ムンデシンカプセル 100mg

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.1　緒言

ムンディファーマ株式会社

目次

1　医薬品に関する情報 5

2　薬力学的特性 5

3　効能・効果 5

4　用法・用量 5

図目次

図 2.6.1- 1　フォロデシン塩酸塩の構造式..... 5

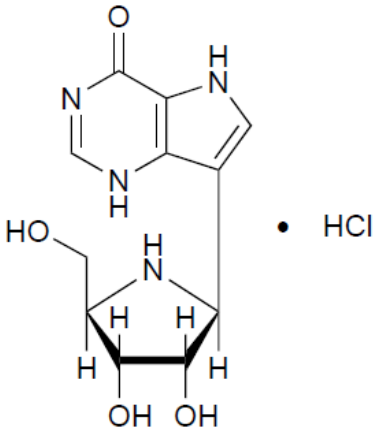
略号一覧

略号	日本語	英語
PNP	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ	purine nucleoside phosphorylase

1　医薬品に関する情報

ムンデシンカプセル 100 mg の原薬であるフォロデシン塩酸塩の化学名は 7-[(2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)pyrrolidin-2-yl]-1,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-one monohydrochloride である。構造式を図 2.6.1- 1 に示す。フォロデシン塩酸塩の分子式は $C_{11}H_{14}N_4O_4$・HCl、分子量は 302.71 である。

図 2.6.1- 1　フォロデシン塩酸塩の構造式



2　薬力学的特性

フォロデシン塩酸塩は強力なプリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）の新規アナログ阻害剤である。フォロデシンの T 細胞増殖抑制に対する効力は、これまでに報告されている PNP 阻害剤より 10～100 倍強力であり、PNP をほぼ完全に阻害して、T 細胞増殖抑制に必要なプリン代謝経路の変化をもたらすと考えられる。なお、ヒト赤血球由来の PNP に対するフォロデシンの 50%阻害濃度は、1.19±0.21 nmol/L であった。

3　効能・効果

再発又は難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫

4　用法・用量

通常、成人にはフォロデシンとして 1 回 300 mg を 1 日 2 回経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

ムンデシンカプセル 100mg

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.2　薬理試験の概要文

ムンディファーマ株式会社

目次

1　まとめ……6
2　効力を裏付ける試験……8
2.1　PNP 阻害作用……8
2.1.1　ヒト及び非ヒト赤血球由来 PNP 阻害作用……8
2.1.2　フォロデシン／PNP 結合体の解離半減期……9
2.2　細胞増殖阻害作用……10
2.2.1　ヒトリンパ球に対する増殖阻害作用……10
2.2.2　T-ALL 由来 CEM 細胞に対する増殖阻害作用……12
2.2.3　非 T 細胞性ヒトがん細胞株に対する増殖阻害作用……15
2.2.4　B-CLL 由来初代培養リンパ球に対する細胞障害作用……16
2.2.5　非ヒトリンパ球に対する増殖阻害作用……18
2.3　*In vivo* 試験……18
2.3.1　hu-PBL-SCID マウスモデルに対する作用……18
2.3.2　DNFB 誘発接触性遅延型過敏症マウスモデルに対する作用……20
2.3.3　GVH 反応誘発性脾腫マウスモデルに対する作用……20
3　副次的薬理試験……20
4　安全性薬理試験……21
4.1　中枢神経系に対する作用……21
4.2　心血管系に対する作用……22
4.2.1　*In vitro* 試験……22
4.2.2　*In vivo* 試験……22
4.3　呼吸器系に対する作用……22
5　薬力学的薬物相互作用試験……23
6　考察及び結論……24
7　参考文献……26

表目次

表 2.6.2- 1　フォロデシンの PNP 阻害活性 9

表 2.6.2- 2　細胞内 dGTP 濃度及び IL-2 刺激によるリンパ球増殖に対する フォロデシンの作用 12

表 2.6.2- 3　フォロデシンの CEM 細胞、MJ 細胞、HuT 78 細胞及びヒトリンパ球細胞増殖に対する阻害作用（dGuo 存在下） 13

表 2.6.2- 4　非 T 細胞性がん細胞に対するフォロデシンの IC_{50} 値 15

表 2.6.2- 5　dGuo 存在下でのフォロデシンの非ヒトリンパ球の細胞増殖及び dGTP 濃度に対する作用 18

表 2.6.2- 6　hu-PBL-SCID マウスの生存期間に対するフォロデシンの作用 19

表 2.6.2- 7　hu-PBL-SCID マウスの生存期間に対するフォロデシン及びシクロスポリンの作用 19

表 2.6.2- 8　hu-PBL-SCID マウスの生存期間に対するフォロデシン及びシクロスポリンの併用作用 20

表 2.6.2- 9　安全性薬理試験項目一覧 21

図目次

図 2.6.2- 1　PNP 阻害による T 細胞増殖抑制機構 8

図 2.6.2- 2　IL-2（A）、MLR（B）又は PHA（C）誘発ヒト PBL 増殖に対する フォロデシンの阻害作用 11

図 2.6.2- 3　フォロデシンの CEM 細胞内 dNTP 濃度に対する作用（dGuo 存在下） 13

図 2.6.2- 4　dGuo 存在下／非存在下でのフォロデシンの CEM 細胞に対する アポトーシス誘導作用 14

図 2.6.2- 5　フォロデシン及び dGuo での併用処理後のヒトリンパ球及び CEM 細胞 における dGTP 濃度の消失推移 14

図 2.6.2- 6　フォロデシン及び dGuo 単独又は併用処理による B-CLL 初代培養細胞 に対するアポトーシス誘導作用 17

図 2.6.2- 7　フォロデシン及び dGuo 併用処理時の B-CLL 細胞生存率と 細胞内 dGTP 濃度との相関性 17

略号一覧

記号	日本語	英語
B-CLL	B 細胞性慢性リンパ球性白血病	B-cell chronic lymphocytic leukemia
CTCL	皮膚 T 細胞性リンパ腫	cutaneous T-cell lymphoma
dATP	2'-デオキシアデノシン三リン酸	2'-deoxyadenosine triphosphate
dCK	2'-デオキシシチジンキナーゼ	2'-deoxycytidine kinase
dCyt	2'-デオキシシチジン	2'-deoxycytidine
dGMP	2'-デオキシグアノシンン一リン酸	2'-deoxyguanosine monophosphate
dGTP	2'-デオキシグアノシン三リン酸	2'-deoxyguanosine triphosphate
dGuo	2'-デオキシグアノシン	2'-deoxyguanosine
DNFB	2, 4-ジニトロフルオロベンゼン	2, 4-dinitrofluorobenzene
dNTP	2'-デオキシヌクレオチド三リン酸	2'-deoxynucleotide triphosphate
ECG	心電図	electrocardiogram
GVH	移植片対宿主	graft-versus-host
hERG	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子	human ether-a-go-go related gene
IC_{50}	50%阻害濃度	half maximum inhibitory concentration
ICH	日米 EU 医薬品規制調和国際会議	International Conference on Harmonization
IL	インターロイキン	interleukin
MLR	混合リンパ球反応	mixed lymphocyte reaction
PBMC	末梢血単核球	peripheral blood mononuclear cell
PBL	末梢血リンパ球	peripheral blood lymphocytes
PBS	リン酸緩衝食塩水	phosphate buffered saline
PHA	フィトヘマグルチニン	phytohemagglutinin
PNP	プリンヌクレオシドホスホリラーゼ	purine nucleoside phosphorylase
SCID	重症複合型免疫不全	severe combined immunodeficient
SD	-	Sprague-Dawley
SEM	標準誤差	standard error of the mean
T-ALL	T 細胞性急性リンパ芽球性白血病	T-cell acute lymphoblastic leukemia
x-GVHD	異種移植片対宿主病	xenograft graft-versus-host disease

1　まとめ

フォロデシン塩酸塩（開発番号：BCX-1777、7-[(2*S*,3*S*,4*R*,5*R*)-3,4-Dihydroxy-5-(hydroxymethyl)pyrrolidin-2-yl]-1,5-dihydro-4*H*-pyrrolo[3,2-*d*]pyrimidin-4-one monohydrochloride）は、強力なプリンヌクレオシドホスホリラーゼ（PNP）の新規アナログ阻害剤であり、再発又は難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫治療薬である。PNP は、デオキシイノシンや 2'-デオキシグアノシン（dGuo）のようなプリンヌクレオシドから塩基とデオキシリボース-1-リン酸への加リン酸分解を触媒する。PNP 欠損症の小児患者で T 細胞の枯渇が生じることから、正常なヒト T 細胞増殖には PNP が必要であることが示唆される［1］。

生体内で dGuo を基質とする酵素には、PNP 及び 2'-デオキシシチジンキナーゼ（dCK）の 2 つがある。PNP は dGuo の加リン酸分解を触媒し、グアニンとデオキシリボース-1-リン酸に代謝する。dCK は dGuo を 2'-デオキシグアノシン一リン酸（dGMP）に変換し、最終的には、2'-デオキシグアノシン三リン酸（dGTP）へリン酸化する（図 2.6.2- 1）。dGuo の親和性は dCK よりも PNP で高いため、dGuo は主に PNP によりリン酸化される［2］。PNP 欠損症の小児患者では、PNP がほぼ皆無（<5%）であるため、血漿中に dGuo（2～14 µmol/L）が蓄積するとともに、赤血球中の dGTP 濃度上昇が認められる［1］。また、フォロデシンによる PNP 阻害により、血漿中及び T 細胞内 dGuo 濃度が増加する。dGuo は dCK によって dGTP に変換され、dGTP が T 細胞内に蓄積すると 2'-デオキシヌクレオチド三リン酸（dNTP）プールの不均衡が生じ、アポトーシスによる細胞死が生じる。（図 2.6.2- 1）。T 細胞は他の細胞と比較して細胞内キナーゼ活性が高く、ヌクレオチダーゼ活性が低いことから、細胞内で dGuo のリン酸化を行う細胞の大部分は T 細胞である。このように、フォロデシンは選択的に T 細胞を抑制することから、T 細胞に起因する疾患である T 細胞白血病または T 細胞リンパ腫に対して有効性を示すことが期待されている。

フォロデシンの T 細胞増殖抑制に対する効力は、これまでに報告されている PNP 阻害剤の 10～100 倍強力であり［2］、PNP をほぼ完全に阻害して T 細胞増殖抑制に必要なプリン代謝経路の変化をもたらすと考えられる。

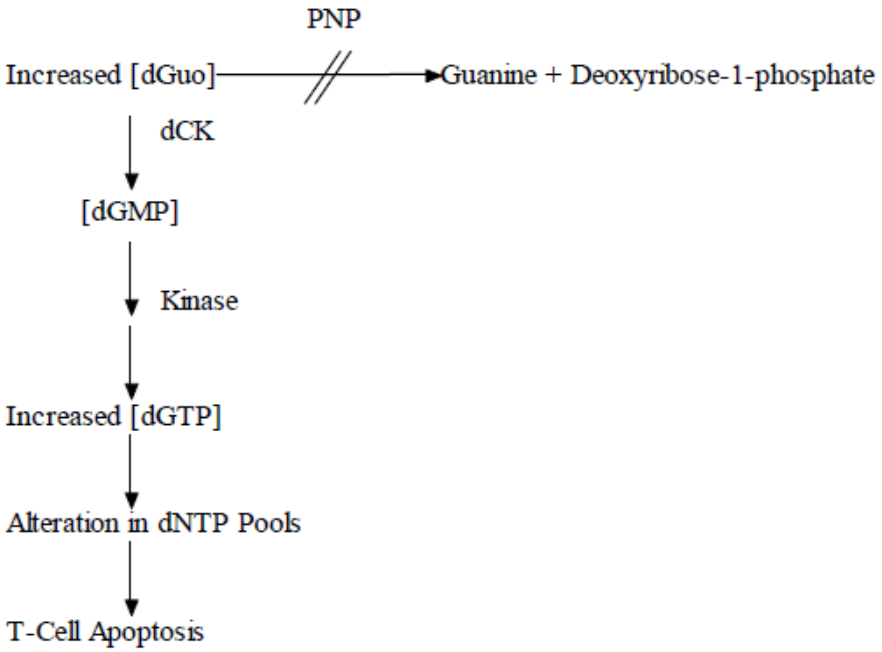
フォロデシンはヒト、マウス、ラット、イヌ及びサルの赤血球由来 PNP をいずれも 0.48～1.57 nmol/L の 50%阻害濃度（IC_{50}）で阻害した（本項 2.1.1 章）。フォロデシンは dGuo 存在下、インターロイキン（IL）-2 刺激、混合リンパ球反応（MLR）を用いた同種抗原刺激及びフィトヘマグルチニン（PHA）刺激による末梢血リンパ球（PBL）増殖を 0.05～0.39 µmol/L の IC_{50} 値で抑制した。またフォロデシンは dGuo 存在下、IL-2 刺激による PBL 細胞内の dGTP 濃度を増加させた（本項 2.2.1 章）。フォロデシン及び dGuo による T 細胞性急性リンパ芽球性白血病（T-ALL）由来リンパ芽球様細胞株（CEM）の増殖抑制作用を検討した結果、フォロデシンは dGuo 存在下で CEM 細胞増殖を抑制し、その IC_{50} 値は 0.015 µmol/L であった。フォロデシン及び dGuo で併用処理した CEM 細胞では有意な dGTP（154 倍）及び 2'-デオキシアデノシン三リン酸（dATP）（8 倍）濃度の増加が認められた。これらのフォロデシンの dGuo 存在下での作用は、dGuo から dGMP への変換を阻害する 2'-デオキシシチジン（dCyt）により阻害された（本項 2.2.2 章）。乳腺腺がん、結腸腺がん、腎臓がん、前骨髄球性白血病、リンパ腫、黒色腫、前立腺腺がん、扁平上皮がん、肝臓がん及び B リンパ芽球様細胞株を含む非 T 細胞性ヒトがん細胞株に対するフォロデシンの増殖

抑制作用を評価した結果、dGuo 存在下／非存在下にかかわらず、フォロデシンはいずれの非 T 細胞性がん細胞株に対しても増殖抑制作用を示さなかった（本項 2.2.3 章）。フォロデシンは dGuo 存在下、B 細胞性慢性リンパ球性白血病（B-CLL）初代培養リンパ球に対して有意な細胞障害作用を示すと共に、有意に細胞内 dGTP 濃度を増加させた（96 倍）（本項 2.2.4 章）。一方、マウス及びラット脾細胞並びにイヌ及びサル PBL 細胞においては、フォロデシン及び dGuo 存在下で増殖は阻害されず（IC_{50} 値はいずれも>100 μmol/L）、dGTP の蓄積も認められなかった（本項 2.2.5 章）。

重篤な異種移植片対宿主病（x-GVHD）を発症する hu-PBL-重症複合型免疫不全（SCID）マウスモデルにおいて、フォロデシン塩酸塩（20 mg/kg/日、経口投与）は溶媒投与群と比較して有意に平均生存期間を延長した。また、同モデルにおけるフォロデシン塩酸塩（20 mg/kg/日、腹腔内投与）の効果は免疫抑制剤であるシクロスポリン（20 mg/kg/日、腹腔内投与）と同程度であり、フォロデシン塩酸塩及びシクロスポリンの併用投与でシクロスポリン単独投与と比較して、生存期間の延長傾向がみられた（本項 2.3.1 章）。一方、マウス T 細胞モデルである 2, 4-ジニトロフルオロベンゼン（DNFB）誘発接触性遅延型過敏症（本項 2.3.2 章）及び移植片対宿主（GVH）反応誘発性脾腫モデル（本項 2.3.3 章）においては、フォロデシン塩酸塩はいずれも効果を示さなかった。

フォロデシンの中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する影響を検討するため、安全性薬理コアバッテリー試験を実施した。フォロデシン塩酸塩（10、30 及び 100 mg/kg、静脈内投与）の中枢神経系に対する影響を、ラットを用いた Irwin 法により評価した結果、用量依存的で一過性の軽度な皮膚潮紅が認められたが、10 及び 30 mg/kg 投与群では投与 360 分後までに、100 mg/kg 投与群では投与 24 時間後までに消失した（本項 4.1 章）。心血管系においては、フォロデシンは 300 μmol/L までヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）カリウム電流を阻害せず、IC_{50} 値は 3000 μmol/L を超えると推察された（本項 4.2.1 章）。また、フォロデシン塩酸塩の単回静脈内投与は、覚醒ラット（50 及び 150 mg/kg）及びサル（10、30 及び 90 mg/kg）を用いたテレメトリー法において動脈圧、心拍数、心電図（ECG）パラメーターに影響しなかった（本項 4.2.2 章）。さらに、ラットを用いたフォロデシン塩酸塩（10、30 及び 100 mg/kg、静脈内投与）の呼吸器系への影響を、覚醒・非拘束下で全身プレチスモグラフィーにより評価した結果、フォロデシンによる呼吸器系に対する影響は認められなかった（本項 4.3 章）。

図 2.6.2- 1　PNP 阻害による T 細胞増殖抑制機構



2　効力を裏付ける試験

フォロデシンの薬理学的特性を *in vitro* 及び *in vivo* 試験で検討した。*In vitro* 試験では、赤血球由来 PNP に対する阻害作用並びにヒト T リンパ球、T-ALL 由来 CEM 細胞、非 T 細胞株、B-CLL 初代培養リンパ球及び非ヒトリンパ球に対するフォロデシンの細胞増殖阻害作用を評価した。また *in vivo* 試験では、hu-PBL-SCID マウスモデル並びに DNFB 誘発接触性皮膚炎マウス及び GVH 反応誘発性脾腫マウスモデルを用いてフォロデシンの作用を評価した。

2.1　PNP 阻害作用

2.1.1　ヒト及び非ヒト赤血球由来 PNP 阻害作用

（試験番号 P98-1777-001、添付資料 4.2.1.1.1、評価資料）

ヒト及び各種動物の赤血球由来の PNP に対するフォロデシンの阻害作用について検討した。

ヒト PNP は Sigma（St. Louis, MO）から購入した。マウス、ラット、イヌ及びサルの PNP は赤血球から精製した［3］。各種濃度のフォロデシン塩酸塩と PNP を室温で 10 分間インキュベートした。[8-^{14}C]イノシンを加えて反応を開始させ、10 分後にギ酸を添加して反応を終了させた。フォロデシンの PNP に対する阻害作用として、PNP が触媒する[8-^{14}C]イノシンから[8-^{14}C]ヒポキサンチンへの変換に対する IC_{50} 値を算出した。データは独立した 3～4 試験の平均値及び標準誤差（SEM）で示した。

ヒト赤血球由来の PNP に対するフォロデシンの IC_{50} 値は、1.19±0.21 nmol/L であった。また、マウス、ラット、イヌ及びサルの赤血球由来 PNP に対するフォロデシンの IC_{50} 値は 0.48～1.57 nmol/L の範囲であった（表 2.6.2- 1）。いずれの種でもフォロデシン 3～10 nmol/L の濃度で約 90%～100%の最大阻害作用が得られたことから、フォロデシンは赤血球由来 PNP に対する強力な阻害剤であることが明らかになった。

表 2.6.2- 1　フォロデシンの PNP 阻害活性

Species	IC_{50} (nmol/L)[a]
Human	1.19 ± 0.21
Mouse	0.48 ± 0.13
Rat	1.24 ± 0.17
Monkey	0.66 ± 0.04
Dog	1.57 ± 0.14

a: Values are the mean ± SEM of three to four independent experiments.
Source: Study No. P98-1777-001; Table 2

2.1.2　フォロデシン／PNP 結合体の解離半減期

（試験番号 P03-1777-068、添付資料 4.2.1.1.2、評価資料）

フォロデシンの PNP に対する結合特性を明らかにするため、フォロデシン／PNP 結合体の半減期を平衡透析法により評価した。

ヒト赤血球由来 PNP にフォロデシン塩酸塩（0.1 mmol/L）又はリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を混合し、フォロデシンの最終濃度を 0.154 µmol/L とした。これは、フォロデシンの PNP への親和性（Kd）の 200 倍を超える濃度である。混合液は室温で 2 時間インキュベーションした。非結合型フォロデシンはサイズ排除クロマトグラフィーで除去し、フォロデシン／PNP 結合体を含む混合液を採取した。フォロデシン／PNP 混合液を透析装置用チューブに移し、室温で平衡透析を実施した。PNP 活性評価のため、各測定時点（0、1、2、4、8、10 及び 14 日後）でのサンプルを採取した。

各測定時点で採取したサンプルに基質を含む酵素液（0.525 mmol/L イノシン、50 mmol/L リン酸カリウム、pH7.5、0.14 U/mL キサンチンオキシダーゼ）を加え、分光光度計で 293 nm における吸光度を 10 分間測定し、PNP 活性を算出した。データはコントロール（PBS）サンプルに対するフォロデシンを含むサンプルの PNP 阻害率として表した。

平衡透析法による評価結果から、フォロデシン／PNP 結合体からのフォロデシンの 50%解離に要する時間（解離半減期）は 72 時間であった。

2.2　細胞増殖阻害作用

2.2.1　ヒトリンパ球に対する増殖阻害作用

（試験番号 P99-1777-001、添付資料 4.2.1.1.3、参考資料）

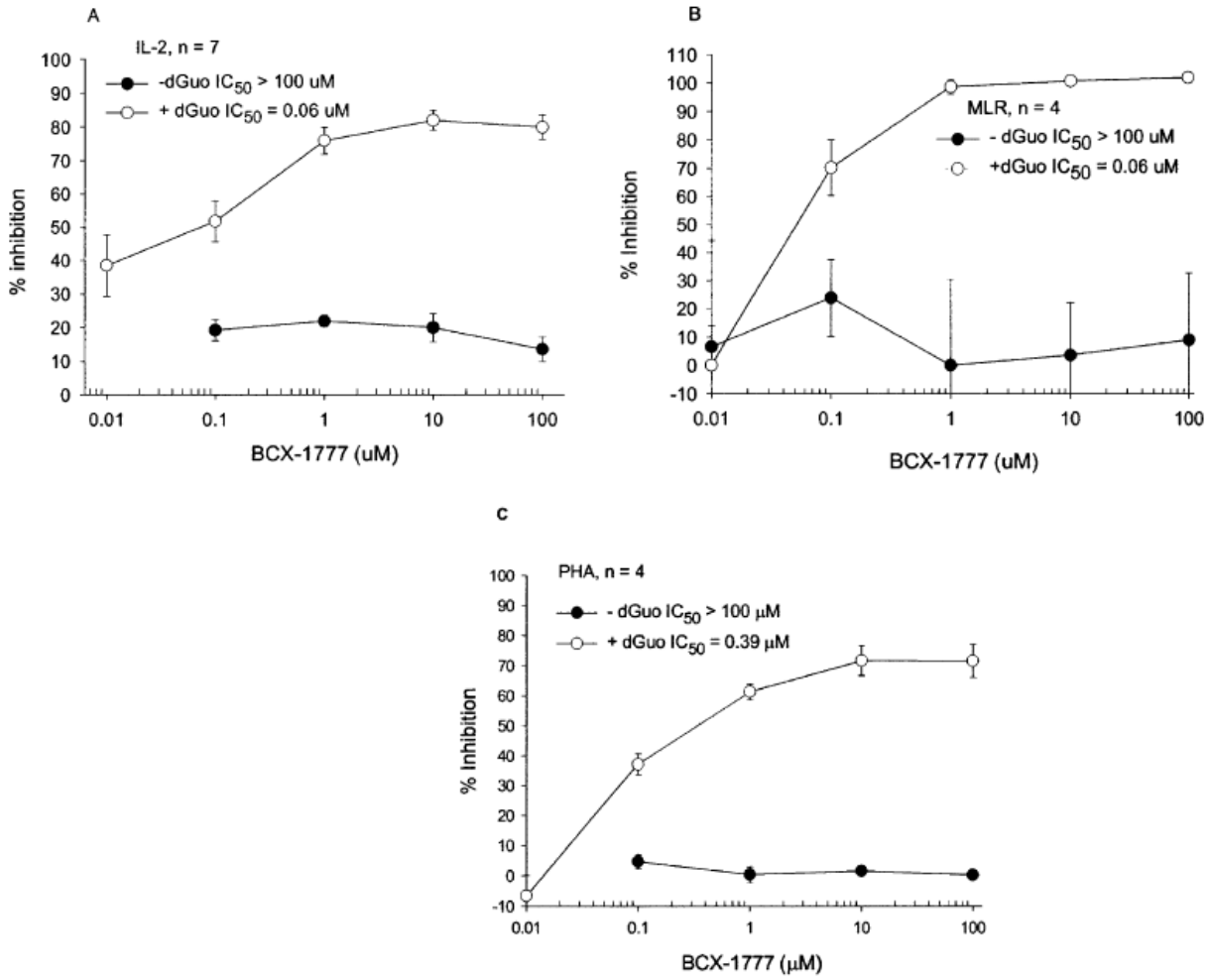
1）IL-2 刺激、2）MLR を用いた同種抗原刺激及び 3）PHA 刺激によるリンパ球増殖に対するフォロデシンの抑制作用を評価した。

1）健康ドナーから得た PBL（約 1.5 x 10^5 cells）を dGuo（10 µmol/L）存在／非存在下で各種濃度のフォロデシン塩酸塩を含む RPMI 1640 培地に懸濁し、組換えヒト IL-2（最終濃度 50 U/mL）を加えてインキュベートした。培養 6 日後、細胞を[^{3}H]-チミジンに 6～8 時間曝露し、シンチレーションカウンターで細胞内チミジン取り込み量を測定した。dGuo（10 µmol/L）存在下、フォロデシンは濃度依存的に IL-2 刺激による PBL 増殖を抑制し、その IC_{50} 値は 0.06 µmol/L であった。dGuo 非存在下でフォロデシンの IC_{50} 値は 100 µmol/L を超えた（図 2.6.2- 2 A）。

2）PBL（反応性 PBL、1 x 10^5 cells）は放射線照射した同種異系ドナー由来の PBL（活性化 PBL）と共に、dGuo（10 µmol/L）存在／非存在下で各種濃度のフォロデシン塩酸塩を含む RPMI 1640 培地で培養した。コントロールには活性化 PBL を加えなかった。培養 5 日後、細胞を[^{3}H]-チミジンに 6 時間曝露し、シンチレーションカウンターで細胞内チミジン取り込み量を測定した。MLR を用いた同種抗原刺激による PBL 増殖に対し、フォロデシンは dGuo（10 µmol/L）存在下で用量依存的な抑制作用を示し、0.05 µmol/L で 50%抑制、1 µmol/L で 90～100%抑制を示した。dGuo 非存在下ではフォロデシンは 100 µmol/L まで抑制作用を示さなかった（図 2.6.2- 2 B）。

3）PBL（1.5 x 10^5 cells）を dGuo 存在／非存在下で各種濃度のフォロデシン塩酸塩を含む RPMI 1640 培地に懸濁し、PHA（5 mg/mL）を加えてインキュベートした。コントロールには PHA を加えなかった。培養 48 時間後、細胞を[^{3}H]-チミジンに 6～8 時間曝露し、シンチレーションカウンターで細胞内チミジン取り込み量を測定した。dGuo（10 µmol/L）存在下、フォロデシンは PHA 刺激による PBL 増殖を用量依存的に抑制し、その IC_{50} 値は 0.387 µmol/L であった。dGuo 非存在下ではフォロデシンは抑制作用を示さなかった（図 2.6.2- 2 C）。

図 2.6.2- 2　IL-2（A）、MLR（B）又は PHA（C）誘発ヒト PBL 増殖に対する
フォロデシンの阻害作用



Experiments were performed in the presence or absence of 10 µmol/L dGuo. Values are mean ± SEM of *n* independent experiments and each experiment was performed in quadruplicate.
Source: Study No. P99-1777-001; Figure 2
+dGuo IC_{50} in Figure B was corrected to 0.05 µM from 0.06 µM
BCX-1777 = forodesine hydrochloride

次に、細胞内 dGTP 濃度に対するフォロデシンの影響を検討した。PBL（1 x 10^7 cells）を dGuo 及び dCyt 存在／非存在下で各種濃度のフォロデシン塩酸塩を含む RPMI 1640 培地に懸濁し、組換えヒト IL-2（最終濃度 50 U/mL）を加えて 24 時間インキュベートした。その後 60%メタノールでヌクレオシドを抽出し、細胞内 dGTP 濃度をポリメラーゼアッセイ［4］により測定した。

dGuo（10 µmol/L）存在下、フォロデシンは 0.1 及び 1 µmol/L で、コントロールと比較して細胞内 dGTP 濃度をそれぞれ約 4.5 及び 7.5 倍増加させた。また、このフォロデシンによる作用は dGuo から dGMP への変換を阻害する dCyt（3 µmol/L）存在下で部分的に阻害された（表 2.6.2- 2）。

表 2.6.2- 2　細胞内 dGTP 濃度及び IL-2 刺激によるリンパ球増殖に対するフォロデシンの作用

Condition	Inhibition (%) [a]	dGTP pmoles / 8x10^6 cells [b]
Control	0	3.8 ± 0.5
0.1 µmol/L Forodesine + dGuo	51.7 ± 6.1	17.6 ± 3.6
1 µmol/L Forodesine + dGuo	75.9 ± 3.9	29.1 ± 3.3
1 µmol/L Forodesine + dGuo + dCyt	32.8 ± 11.9	10.8 ± 2.7

a: % inhibition values are mean ± SEM of four separate experiments each performed in quadruplicate.
b: dGTP values are mean ± SEM of four separate experiments.
Source: Study No. P99-1777-001; Table 3

以上のように、dGuo 存在下で、フォロデシン濃度増加とともに、ヒトリンパ球増殖抑制作用が強くなり、細胞内 dGTP 濃度は増加していたことから、フォロデシンは dGTP を介したメカニズムによってヒト T 細胞増殖を抑制していることが示された。

2.2.2　T-ALL 由来 CEM 細胞に対する増殖阻害作用

（試験番号 P99-1777-003、添付資料 4.2.1.1.4、評価資料）

フォロデシンの T-ALL 由来 CEM 細胞の増殖抑制作用を dGuo 併用下で検討した。また、皮膚 T 細胞性リンパ腫（CTCL）細胞株に対する作用も検討した。

CEM 細胞（約 1.5 x 10^5 cells）を dGuo（10 µmol/L）存在／非存在下で各種濃度フォロデシン塩酸塩を含む RPMI 1640 培地に懸濁し、72 時間インキュベーション後、コールターカウンター又は [^{3}H]-チミジン取り込み法により細胞増殖抑制作用を評価した。次に、CEM 細胞内 dNTP 濃度に対するフォロデシン及び dGuo の影響を評価するため、CEM 細胞（1 x 10^6 cells）をフォロデシン塩酸塩（1 µmol/L）及び dGuo（10 µmol/L）で 48 時間インキュベートし、ポリメラーゼアッセイ［4］により dNTP 濃度を測定した。アポトーシスはアネキシン V 染色により評価した。CTCL 細胞株（MJ 及び HuT-78）にも同じ方法を適用した。

フォロデシンは dGuo（10 µmol/L）存在下で CEM 細胞増殖を抑制し、その IC_{50} 値は 0.015 µmol/L であった（表 2.6.2- 3）。このフォロデシンによる CEM 細胞増殖抑制作用は、dCyt（10 µmol/L）存在下で完全に阻害された。フォロデシン及び dGuo で併用処理した CEM 細胞では有意な dGTP（154 倍）及び dATP（8 倍）濃度増加が認められ、この作用は dCyt（10 µmol/L）存在下でコントロールレベルに戻った（図 2.6.2- 3）。また、フォロデシン及び dGuo で併用処理した CEM 細胞ではアポトーシスが確認された（図 2.6.2- 4）。CEM 細胞及びヒトリンパ球での dGTP 消失半減期を検討するため、各細胞をフォロデシン（1 µmol/L）及び dGuo（10 µmol/L）の併用処理で 24 時間インキュベートし、インキュベート後の細胞内 dGTP の消失を検討した結果、CEM 細胞及びヒトリンパ球における dGTP 消失半減期はそれぞれ 18 及び 4 時間であった（図 2.6.2- 5）。

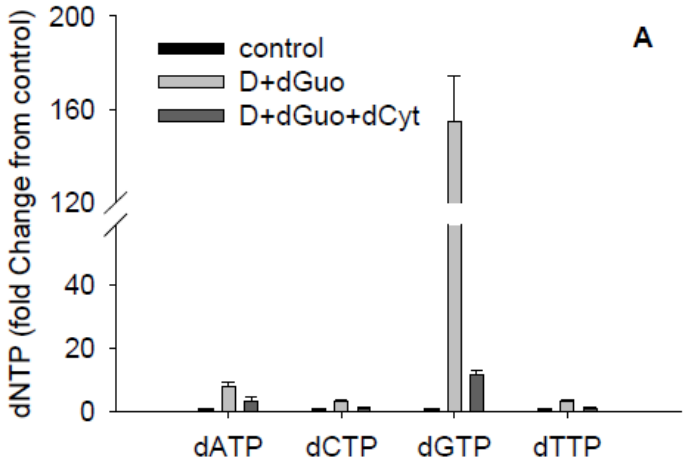
一方、フォロデシンは CTCL 細胞株である MJ 細胞及び Hut-78 細胞に対して dGuo 存在及び非存在下のどちらにおいても 30 µmol/L まで作用を示さなかった。

表 2.6.2- 3　フォロデシンの CEM 細胞、MJ 細胞、HuT 78 細胞及びヒトリンパ球細胞増殖に対する阻害作用（dGuo 存在下）

Cells	IC_{50} (μmol/L) [a]	dGTP (fold increase)
CEM	0.015 ± 0.001	154.4 ± 20.1
MJ	> 30	-
HuT 78	> 30	-
Human Lymphocytes	0.06 [b]	15.4 ± 4.4 [c]

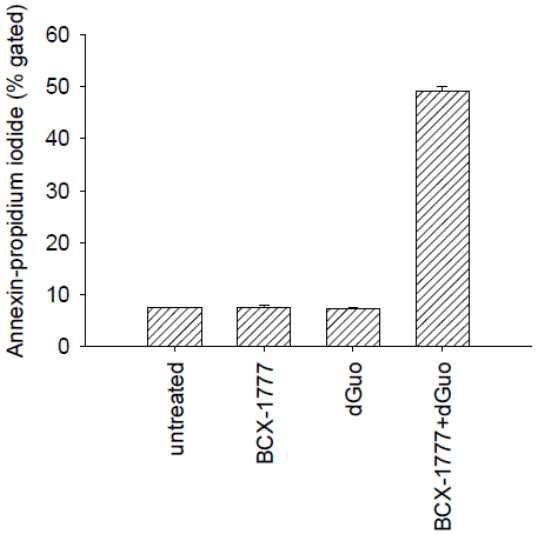
a: dGTP values are mean ± SEM of three separate experiments.
b:.Bantia-2001［2］
c: Bantia-2002［5］
Source: Study No. P99-1777-003; Table 3

図 2.6.2- 3　フォロデシンの CEM 細胞内 dNTP 濃度に対する作用（dGuo 存在下）



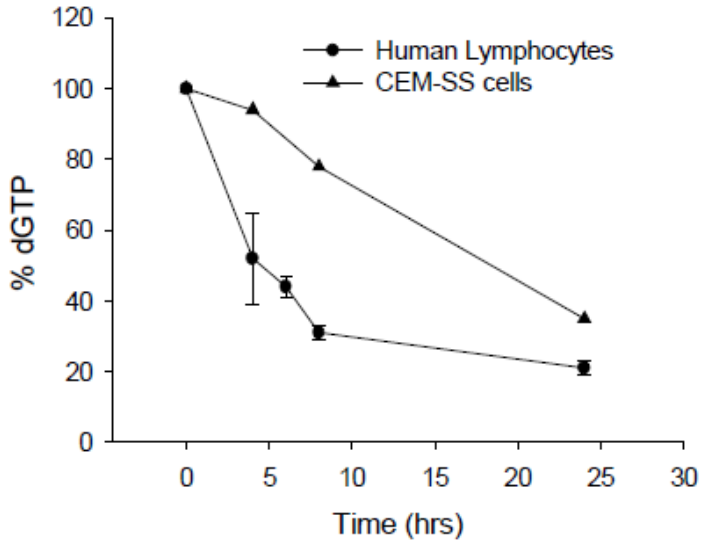
CEM-SS cells were incubated with forodesine (D) 1 μmol/L, dGuo 10 μmol/L and/or dCyt 10 μmol/L for 48 h. Values are mean ± S.E.M. of three experiments.
Source: Study No. P99-1777-003; Figure 3A

図 2.6.2- 4　dGuo 存在下／非存在下でのフォロデシンの CEM 細胞に対する
アポトーシス誘導作用



BCX-1777 = forodesine hydrochloride
CEM-SS cells were treated with forodesine (1 µmol/L) and/or dGuo (10 µmol/L) for 48 h. Values are mean ± SEM of three experiments.
Source: Study No. P99-1777-003; Figure 5

図 2.6.2- 5　フォロデシン及び dGuo での併用処理後のヒトリンパ球及び CEM 細胞
における dGTP 濃度の消失推移



Cells were preincubated with forodesine (1 µmol/L) and dGuo (10 µmol/L) for 24 h. Cells were washed, resuspended in fresh media and then at various times cells were extracted with 60% methanol and dGTP was determined using a polymerase assay. Values are mean ± SEM of four experiments for human lymphocytes and two experiments for CEM-SS cells.
Source: Study No. P99-1777-003; Figure 4

以上の結果より、フォロデシンは dGTP を介したメカニズムにより T-ALL 由来 CEM 細胞の増殖を抑制し、アポトーシス様細胞死をもたらすことが示された。

2.2.3　非 T 細胞性ヒトがん細胞株に対する増殖阻害作用

（試験番号 P99-1777-002、添付資料 4.2.1.1.5、評価資料）
（試験番号 1009704、添付資料 4.2.1.1.6、参考資料）

乳腺腺がん（MCF7）、結腸腺がん（DLD-1）、腎臓がん（A-498）、前骨髄球性白血病（HL-60）、リンパ腫（H33HJ-JA1）、黒色腫（SK-MEL-5）、前立腺腺がん（PC-3）、扁平上皮がん（A-431）及び B リンパ芽球様細胞株（MGL-8）を含む 9 種類の非 T 細胞性ヒトがん細胞株に対するフォロデシンの増殖抑制作用を評価した（試験番号 P99-1777-002）。

各種細胞を 37ºC で 24 時間培養後、dGuo（10 µmol/L）存在下／非存在下でフォロデシン塩酸塩（0.01、0.1、1、10 及び 100 µmol/L）を加えてさらに 72 時間インキュベートした。MGL8 細胞以外は、インキュベーション終了時にアラマーブルー色素を加え、6 時間後に蛍光強度の測定により細胞増殖を評価した。MGL8 細胞はコールターカウンターを用いて細胞増殖を評価した。

dGuo 存在下／非存在下にかかわらず、フォロデシンはいずれの非 T 細胞性がん細胞株に対しても増殖抑制作用を示さなかった（表 2.6.2- 4）。陽性対照であるマイトマイシンは評価した全てのがん細胞株に対して増殖抑制作用を示し、その IC_{50} 値はいずれも 0.3 µmol/L 以下であった。

表 2.6.2- 4　非 T 細胞性がん細胞に対するフォロデシンの IC_{50} 値

Cell Line	Cell Type	Forodesine + dGuo [a]	Mitomycin
MCF7	Breast Adenocarcinoma	99 µmol/L	0.042 µmol/L
DLD-1	Colon Adenocarcinoma	≥100 µmol/L	0.30 µmol/L
A-498	Kidney Carcinoma	≥100 µmol/L	0.17 µmol/L
HL-60	Promyelocytic Leukemia	≥100 µmol/L	0.063 µmol/L
H33HJ-JA1	Jurkat-derived Lymphoma	≥100 µmol/L	0.060 µmol/L
SK-MEL-5	Malignant Melanoma	93 µmol/L	0.051 µmol/L
PC-3	Prostate Adenocarcinoma	85 µmol/L	0.053 µmol/L
A-431	Epidemoid Carcinoma	≥100 µmol/L	0.070 µmol/L
MGL-8	B cell	≥100 µmol/L	ND[b]

a: dGuo alone had no activity on any of the cell lines.
b: ND-Not determined.
Source: Study No. P99-1777-002; Table 4

ヒト肝臓がん細胞株（HepG2）に対するフォロデシンの増殖抑制作用を評価した（試験番号 1009704）。HepG2 細胞を 37ºC で 24 時間培養後、フォロデシン塩酸塩（0.01～100 µmol/L）を加えてさらに 72 時間インキュベートした。インキュベーション終了時にアラマーブルー色素を加え、6 時間後に蛍光強度の測定により細胞増殖を評価した。

フォロデシンは検討したいずれの濃度においても、HepG2 細胞増殖に対する抑制作用を示さなかった。

2.2.4　B-CLL 由来初代培養リンパ球に対する細胞障害作用

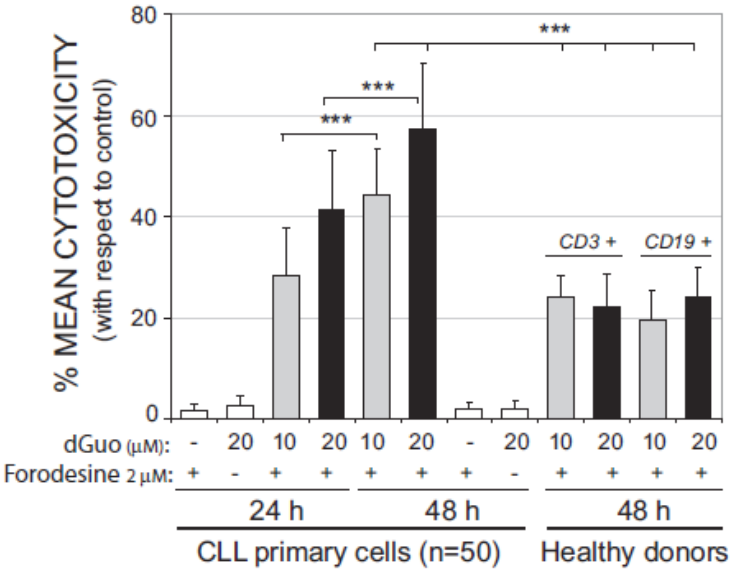
（Alonso et al 2009、添付資料 4.2.1.1.7、参考資料）

B-CLL 細胞では dCK 活性が上昇していることから［6］、B-CLL はフォロデシンに感受性を示すと推察される。この仮説を検証するため、B-CLL 患者由来初代培養リンパ球に対するフォロデシン及び dGuo の作用を検討した。

B-CLL 患者（50 例）から採取した初代培養リンパ球（以下、B-CLL 細胞）並びに健康ドナー（4 例）の末梢血単核球（PBMC）から単離した $CD3^+$（T リンパ球）及び $CD19^+$（B リンパ球）細胞を、dGuo（10～20 µmol/L）存在下／非存在下でフォロデシン塩酸塩（2 µmol/L）とインキュベートした。24 及び 48 時間後、アネキシン V 及びヨウ化プロピジウム染色によりアポトーシスを評価した。細胞障害作用（平均値）は、コントロール細胞の生存率に対するアポトーシス細胞の割合として示した。また、dGuo（10µmol/L）及びフォロデシン塩酸塩（2 µmol/L）併用処理 18 時間後の B-CLL 細胞（26 例）について細胞内 dGTP 濃度を測定した。60%メタノールでヌクレオシドを抽出し、細胞内 dGTP 濃度をポリメラーゼアッセイ［4］により測定した。

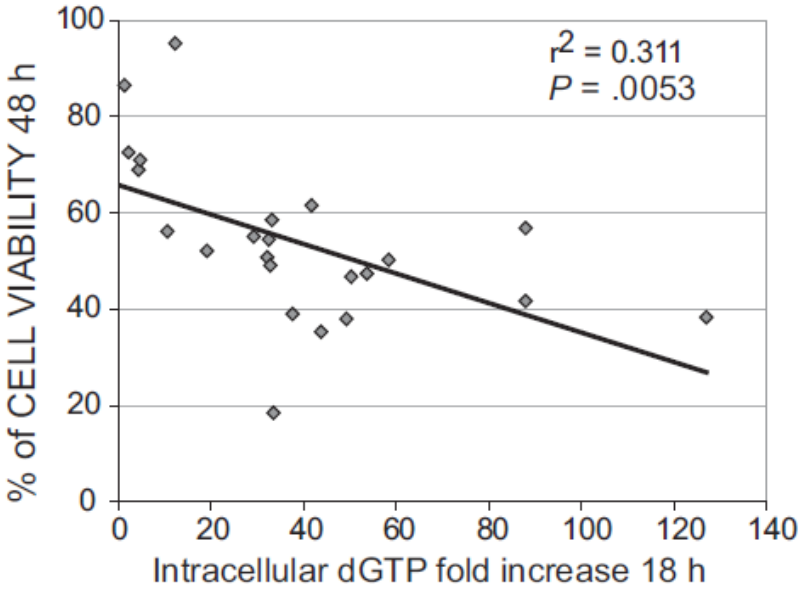
dGuo 存在下、フォロデシンは B-CLL 細胞に対して有意な細胞障害作用を示した（図 2.6.2- 6）。一方、健康ドナー由来の T リンパ球及び B リンパ球に対するフォロデシンの細胞障害作用は B-CLL 細胞と比較して弱かった。また、dGuo（10 µmol/L）及びフォロデシン（2 µmol/L）で併用処理した B-CLL 細胞内の dGTP 濃度は、コントロールと比較して 96 倍上昇しており、この細胞内 dGTP 濃度増加とフォロデシン処理 24 時間（$P<0.05$）及び 48 時間後（$p = 0.005$、$r^2=0.31$）の細胞生存率には有意な相関が認められた（図 2.6.2- 7）。

図 2.6.2- 6　フォロデシン及び dGuo 単独又は併用処理による B-CLL 初代培養細胞に対するアポトーシス誘導作用



Primary cells from 50 patients with CLL and $CD3^+$ cells or $CD19^+$ cells from PBMCs of 4 healthy donors were incubated with 2 µmol/L forodesine and dGuo (10-20 µmol/L), and cell death was analyzed by annexin V binding at 24 and 48 hours. Mean cytotoxicities are given as the percentage of the apoptotic cells with respect to the viability of control cells. Data are given as the mean ± standard deviation.

図 2.6.2- 7　フォロデシン及び dGuo 併用処理時の B-CLL 細胞生存率と細胞内 dGTP 濃度との相関性



Cell viability (analyzed by annexin V binding) after forodesine 2 µmol/L and dGuo 10 µmol/L treatment for 48 hours was plotted against the intracellular dGTP fold increase observed after 18 hours of treatment in 26 B-CLL cases.

2.2.5　非ヒトリンパ球に対する増殖阻害作用

（試験番号 P99-1777-004、添付資料 4.2.1.1.8、評価資料）

マウス及びラット脾細胞並びにイヌ及びサル PBL 増殖に対するフォロデシンの抑制作用を検討した。

Balb/c マウス及び Sprague Dawley（SD）ラットから単離した脾細胞又はカニクイザル及びビーグル犬の全血から精製した PBL（約 1.5 x 10^5 cells）は dGuo（10 µmol/L）存在下で各種濃度のフォロデシン塩酸塩を含む RPMI 1640 培地に懸濁し、組換えヒト IL-2（最終濃度 50 U/mL）を加えてインキュベートした。培養 4～6 日後、細胞を[^{3}H]-チミジンに 6～8 時間曝露し、シンチレーションカウンターで細胞内チミジン取り込み量を測定した。次に細胞内 dGTP 濃度に対するフォロデシンの影響を検討した。マウス及びラット脾細胞並びにイヌ及びサル PBL（1 x 10^7 cells）は dGuo（10 µmol/L）存在下で各種濃度のフォロデシン塩酸塩を含む RPMI 1640 培地に懸濁し、組換えヒト IL-2（最終濃度 50 U/mL）を加えて 24 時間インキュベートした。その後 60%メタノールでヌクレオシドを抽出し、細胞内 dGTP 濃度をポリメラーゼアッセイ［4］により測定した。

dGuo 存在下、フォロデシンはマウス及びラット脾細胞並びにイヌ及びサル PBL 増殖に対して抑制作用を示さなかった（表 2.6.2- 5）。また、ヒトリンパ球とは異なり、フォロデシン及び dGuo 併用処理による細胞内 dGTP の蓄積はいずれの非ヒトリンパ球においても認められなかった。

表 2.6.2- 5　dGuo 存在下でのフォロデシンの非ヒトリンパ球の細胞増殖及び dGTP 濃度に対する作用

Species	IC_{50} (µmol/L) [a]	Fold increase in dGTP compared to untreated cells[b] mean ± S.E.M.
Mouse	>100	1.1 ± 0.1 (n=3)
Rat	>100	1.10 ± 0.09 (n=5)
Dog	>100	1.3 ± 0.01 (n=2)
Monkey	>100	2.0 ± 0.5 (n=3)

a: n=3-7 determinations
b: Forodesine (1 µmol/L) and dGuo (10 µmol/L).
Source: Study No. P99-1777-004; Table 3

2.3　*In vivo* 試験

2.3.1　hu-PBL-SCID マウスモデルに対する作用

（試験番号 P98-1777-005、添付資料 4.2.1.1.9、評価資料）

SCID マウスにヒト PBL を移植した hu-PBL-SCID マウスは、体重減少、下痢、円背位、被毛状態の異常を伴う x-GVHD が発症し、最終的にマウス組織へのヒトリンパ球浸潤により死亡する［7］。正常なヒト免疫機能の研究に頻用されている同モデルに対するフォロデシンの作用を検討した。

SCID マウス（6～8 週齢）に、ヒト PBL 移植前日、NK 細胞を除去するため抗 ASGM1 抗体（げっ歯類の NK 細胞を認識するウサギポリクローナル抗体）を単回腹腔内投与し、さらに、移植直前に放射線照射による前処置を行った後、健康ドナーから採取したヒト PBL（3.0-5.0 x 10^7 個）を

無菌下で腹腔内投与した。3 人のドナーから採取した PBL は、SCID マウス（n=10 ; フォロデシン投与群 5 匹、溶媒群 5 匹）にそれぞれ移植し、3 つの独立した試験を行った（Study 1~3）。

フォロデシン塩酸塩（20 mg/kg/日）又は溶媒（0.5%カルボキシメチルセルロース）をヒト PBL 移植 5 日前からマウスに 1 日 2 回連日経口投与し、平均生存期間を比較した。3 試験での平均生存期間はフォロデシン投与群で 30～43 日、対照群で 15～20 日であり、いずれもフォロデシン投与で有意な生存期間の延長がみられた。（表 2.6.2- 6）。

表 2.6.2- 6　hu-PBL-SCID マウスの生存期間に対するフォロデシンの作用

Study	Vehicle [a]	Forodesine hydrochloride (20 mg/kg/day, bid, PO) [a]
1	15 ± 1	30 ± 1 [b]
2	17 ± 3	39 ± 2 [b]
3	20 ± 4	43 ± 2 [b]

a: Survival in days presented as mean ± SEM, n=5
b: P<0.001 as compared to vehicle
bid = twice a day, PO = oral administration
Source: Study No. P98-1777-005; Table 3

次に、フォロデシン塩酸塩及びシクロスポリン（いずれも 20 mg/kg/日）をヒト PBL 移植 5 日前からマウスに 1 日 1 回連日腹腔内投与し、平均生存期間を比較した。フォロデシン及びシクロスポリン投与群の平均生存期間はそれぞれ 36～42 日及び 32～42 日であり、フォロデシンはシクロスポリンと同様に hu-PBL-SCID マウスに対して顕著な効果を示すことが示唆された（表 2.6.2- 7）。

表 2.6.2- 7　hu-PBL-SCID マウスの生存期間に対するフォロデシン及びシクロスポリンの作用

Study	Forodesine hydrochloride (20 mg/kg/day, qd, IP) [a]	Cyclosporine (20 mg/kg/day, qd, IP) [a]
1	38 ± 5	42 ± 1
2	42 ± 5	38 ± 6
3	36 ± 2	32 ± 6

a: Survival in days presented as mean ± SEM, n=5
qd = once a day, IP: intraperitoneal administration
Source: Study No. P98-1777-005; Table 4

最後に、同モデルにおけるフォロデシン及びシクロスポリンの併用効果をシクロスポリン単独投与時と比較検討した。フォロデシン塩酸塩／シクロスポリン又はシクロスポリン（いずれも 20 mg/kg/日）をヒト PBL 移植 5 日前からマウスに 1 日 1 回連日腹腔内投与し、平均生存期間を比較した。平均生存期間はフォロデシン／シクロスポリン併用群での 50～57 日間に対して、シクロスポリン単独投与群では 37～48 日間であった（表 2.6.2- 8）。統計学的有意差は認められなかったが、シクロスポリン単独投与と比較して、フォロデシン／シクロスポリン併用投与群では、生存期間が延長する傾向を示した。

表 2.6.2- 8　hu-PBL-SCID マウスの生存期間に対するフォロデシン及びシクロスポリンの併用作用

Study	Cyclosporine (20 mg/kg/day, qd, IP) [a]	Forodesine hydrochloride (20 mg/kg/day, qd, IP) + Cyclosporine (20 mg/kg/day, qd, IP) [a]
1	48 ± 6	56 ± 5
2	46 ± 6	57 ± 4
3	37 ± 6	50 ± 6

a: Survival in days presented as mean ± SEM, n=5
qd = once a day, IP: intraperitoneal administration
Source: Study No. P98-1777-005; Table 5

以上の結果から、フォロデシンは hu-PBL-SCID モデルにおいて x-GVHD の発症予防に効果を示し、その作用は免疫抑制剤であるシクロスポリンと同程度であることが明らかとなった。

2.3.2　DNFB 誘発接触性遅延型過敏症マウスモデルに対する作用

（試験番号 P98-1777-003、添付資料 4.2.1.1.10、評価資料）

Balb/c マウス（雌、18～21 g）の腹部を剃毛し、Day 0 及び 1 に 0.5% DNFB 25 µL を腹部に塗布して感作した。Day 5 にイソフルラン吸入麻酔下で 0.3% DNFB 20 µL を右耳介の両側に 10 µL ずつ塗布し、ノギスを用いて 24 時間後の耳介腫脹を測定した。各群 9 匹のマウスにフォロデシン塩酸塩（30 mg/kg、経口投与）、シクロスポリン（50 mg/kg、腹腔内投与）又は溶媒（生理食塩液、腹腔内投与）の投与を Day 0 の感作 1 時間前に開始し、1 日 1 回 6 日間（Day 0～5）行った。

フォロデシンは DNFB 誘発接触性遅延型過敏症モデルにおいて抗炎症作用を示さなかった。一方、陽性対照であるシクロスポリンは溶媒投与群と比較して有意な抗炎症作用を示した。

2.3.3　GVH 反応誘発性脾腫マウスモデルに対する作用

（試験番号 P98-1777-004、添付資料 4.2.1.1.11、評価資料）

GVH 反応による脾腫に対するフォロデシンの効果を検討するため、親（C57Bl/6）マウスの脾細胞を交雑（B6C3F1）レピシエントマウスに腹腔内投与した。レピシエントマウスにフォロデシン塩酸塩を腹腔内（30 mg/kg、1 日 1 回 10 日間）又は経口投与（30 mg/kg、1 日 1 回 10 日間又は 50 mg/kg、1 日 3 回 10 日間）した。コントロール群には生理食塩液を、陽性対照群にはシクロスポリン（50 mg/kg）を 1 日 1 回 10 日間腹腔内投与した。Day10 の体重測定後に屠殺し、摘出した脾臓の重量を測定した。脾腫に対するフォロデシンの作用は体重に対する脾臓重量の比で表した。

GVH 反応誘発性脾腫に対して、フォロデシンはいずれの投与経路及び投与量でも効果を示さなかった。一方、シクロスポリンは同モデルの脾腫をコントロールと比較して有意に抑制した。

3　副次的薬理試験

該当する資料はない。

4　安全性薬理試験

フォロデシンの安全性薬理試験は、日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S7A ガイドラインに従って実施した。フォロデシンで実施した安全性薬理試験を表 2.6.2- 9 に示す。

表 2.6.2- 9　安全性薬理試験項目一覧

Type of Study and Test System	Study Period	GLP Compliant	Study Number
CNS, SD rats	2009	Yes	FDS-SPHARM-002
Cardiovascular, hERG	2009	Yes	FDS-SPHARM-001
Cardiovascular, SD rats	2001	Yes	1440/BCX/01
Cardiovascular, cynomolgus monkeys	2009-2010	Yes	FDS-SPHARM-004
Respiratory, SD rats	2009	Yes	FDS-SPHARM-003

GLP = Good Laboratory Practice, CNS = central nervous system, hERG = human ether-a-go-go related gene, SD = Sprague-Dawley

4.1　中枢神経系に対する作用

（試験番号 FDS-SPHARM-002、添付資料 4.2.1.3.1、評価資料）

ラットを用いてフォロデシンの中枢神経系に対する作用を Irwin 法により評価した。SD ラット（雄、7 週齢、6 匹／群）にフォロデシン塩酸塩（10、30 及び 100 mg/kg）、溶媒対照（生理食塩液）又は陽性対照（クロルプロマジン 3 mg/kg）を 2.5 mL/kg の投与容量で単回静脈内投与した。投与前、投与 0～5、15、45、90、180 及び 360 分後並びに 24 時間後に一般症状及び行動を Irwin 法により評価した。また、同時に体温を測定した。

フォロデシンの静脈内投与後、ほとんどの動物で用量依存的な一過性の軽度な皮膚潮紅が認められ、低用量投与群では耳に限局していた。概して、皮膚潮紅は投与 15 分後に出現して 90 分後までに最大となり、10 及び 30 mg/kg 投与群では投与 360 分後までに、100 mg/kg 投与群では投与 24 時間後までに消失した。同作用は血管拡張によるものと考えられる。また、フォロデシンによる体温への影響は認められなかった。一方、クロルプロマジン投与群では顕著な鎮静作用及び体温低下が認められ、これまでの報告と一致した結果が得られた。

4.2　心血管系に対する作用

4.2.1　*In vitro* 試験

（試験番号 FDS-SPHARM-001、添付資料 4.2.1.3.2、評価資料）

hERG を発現させた HEK-293 細胞を用いて、カリウムチャネル電流に対するフォロデシンの作用をホールセルパッチクランプ法で評価した。

フォロデシンは 10 及び 300 μmol/L の濃度で hERG カリウムチャネル電流をいずれも 0.6 ± 0.2%（平均値±SEM、n=3）阻害し、溶媒（生理食塩液）（1.0 ± 0.1%、n=3）と比較して有意な阻害作用を示さなかった。また、最高濃度 3000 μmol/L での阻害率は 6.3 ± 0.1%（n=3）であり、溶媒と比較して有意な阻害作用を示した（$P<0.05$）が、阻害作用は<50%であったため IC_{50} 値は算出できず、3000 μmol/L を超えると推察された。

4.2.2　*In vivo* 試験

（試験番号 1440/BCX/01、添付資料 4.2.1.3.3、参考資料）

（試験番号 FDS-SPHARM-004、添付資料 4.2.1.3.4、評価資料）

覚醒ラットを用いてフォロデシンの心血管系に対する影響を非拘束下テレメトリー法により評価した（試験番号 1440/BCX/01）。テレメトリー装置を装着した SD OFA ラット 8 匹（雄、体重 196～221 g）に、陽性対照溶媒（生理食塩液）、陽性対照（イソプロテレノール 0.05 mg/kg）、溶媒（乳酸加リンゲル液）並びにフォロデシン塩酸塩 50 及び 150 mg/kg を 2 mL/kg の投与容量で静脈内投与した。各投与のウォッシュアウト期間は最短 3 日とした。ECG 波形、心拍数、動脈圧（収縮期、拡張期及び平均）を投与 30 分前から投与 6 時間後まで記録した。フォロデシン単回静脈内投与により 50 mg/kg で心拍数がわずかに増加したが、150 mg/kg でその作用は認められなかった。血圧及び ECG に対しては 150 mg/kg まで影響しなかった。

覚醒カニクイザルを用いてフォロデシンの心血管系に対する影響をテレメトリー法により評価した（試験番号 FDS-SPHARM-004）。テレメトリー装置を装着したカニクイザル 4 匹（雄、4～7 年齢）に、ラテン方格配置によるクロスオーバー法を用いてフォロデシン塩酸塩（10、30 及び 90 mg/kg）及び溶媒（生理食塩液）を 5 mL/kg の投与容量で静脈内投与した。心拍数、動脈圧（収縮期、拡張期及び平均）、ECG 波形（PR、QRS、RR、QT 及び QTc 間隔並びに R 振幅）及び体温を、各投与の約 2 時間前から 19 時間後まで記録した。

カニクイザルにおいて、フォロデシンの単回静脈内投与はいずれの用量でも観察した全てのパラメーターに対して影響を及ぼさなかった。

4.3　呼吸器系に対する作用

（試験番号 FDS-SPHARM-003、添付資料 4.2.1.3.5、評価資料）

ラットを用いてフォロデシンの呼吸器系への影響を、覚醒・非拘束下で全身プレチスモグラフィーにより評価した。SD ラット（雄、約 7 週齢、6 匹／群）に、溶媒（生理食塩液）、フォロデ

シン塩酸塩（10、30 及び 100 mg/kg）又は陽性対照（バクロフェン 5 mg/kg）を 2.5 mL/kg の投与容量で単回静脈内投与した。呼吸数、一回換気量及び分時拍出量を投与 6 時間後まで測定した。

フォロデシンはいずれの用量においても、溶媒対照と比較してラットの呼吸機能に有意な影響を与えなかった。一方、陽性対照であるバクロフェンはこれまでの報告通り、一回換気量の代償性増加を伴う呼吸数の有意な減少が認められた。

5　薬力学的薬物相互作用試験

該当する資料はない。

6　考察及び結論

PNP 欠損症の小児患者では、T 細胞による細胞性免疫は著しく欠如しているが、B 細胞の機能は正常もしくは若干低下している［1］ことから、PNP 阻害剤は T 細胞に選択的な増殖抑制作用を示すと考えられる。PNP 欠損症の小児患者では、赤血球中の PNP 活性が正常の 5%未満であり、血漿中に dGuo の蓄積（2～14 μmol/L）が認められる。一方、彼らの両親でも PNP 活性は正常の 30%～50%に低下しているが、免疫機能は正常であり、血漿中 dGuo 蓄積も認められない［2］。また、他の PNP 阻害薬である BCX-34（IC_{50} 値：36 nmol/L）を用いた健康ドナーでの臨床薬理試験［8］並びに乾癬及び CTCL 患者での臨床試験［9］が実施されたが、最高投与量の経口及び静脈内投与のいずれでも T 細胞増殖阻害に必要な dGuo 濃度上昇を達成できなかった。これらの知見から、T 細胞の増殖阻害に必要な dGuo 濃度上昇を得るためには、PNP 活性をほぼ完全に阻害する必要があることが示唆される。この仮説を検証するため、より強力な PNP 阻害薬であるフォロデシンの T 細胞増殖阻害作用を *in vitro* 及び *in vivo* 試験系で検討した。

フォロデシンはヒト、マウス、ラット、イヌ及びサルの PNP 活性を強力に阻害し、その IC_{50} 値は 0.48～1.57 nmol/L であった。フォロデシンは比較的 T 細胞に選択的な刺激である IL-2、PHA、及び MLR によるヒト PBL 増殖を 0.05～0.39 μmol/L の IC_{50} 値で抑制した。他の PNP 阻害剤（BCX-34 及び PD141955）の MLR 及び IL-2 刺激による T 細胞増殖に対する IC_{50} 値は 1～15 μmol/L、PHA 刺激性 PBMC 増殖に対する IC_{50} 値は>30 μmol/L であると報告されている［10、11］。これらの PNP 阻害剤と比較して、フォロデシンは 10～100 倍強力にヒトリンパ球の増殖を阻害することが示された。フォロデシンはヒト PBL 増殖抑制作用を示すとともに、細胞内 dGTP 濃度を上昇させ、フォロデシン及び dGuo 存在下で培養したヒト PBL では dGTP の蓄積が認められた。フォロデシンによるヒト PBL 増殖抑制作用は、dGuo から dGTP への変換を阻害する dCyt により抑制された。

B-CLL 細胞では dCK 活性が上昇していることから［6］、B-CLL はフォロデシンに感受性を示すと推測されるため、B-CLL 患者由来初代培養リンパ球に対するフォロデシン及び dGuo の作用を検討した結果、フォロデシン及び dGuo で処理した B-CLL 細胞では、細胞内 dGTP 濃度増加と細胞生存率に有意な相関が認められた。

これらの結果から、フォロデシンは T 細胞増殖阻害に必要な dGuo 濃度の上昇をもたらす PNP 阻害作用を有していることが示唆される。

フォロデシンは T-ALL 由来 CEM 細胞増殖を阻害すると共に、dGTP 濃度を上昇させた。このフォロデシンの作用はいずれも dCyt により抑制された。CEM 細胞及びヒトリンパ球を同一濃度のフォロデシン及び dGuo で併用処理した場合、コントロールに対する dGTP 増加比は、CEM 細胞で 154 倍、ヒトリンパ球で 15 倍であった［5］ことから、CEM 細胞でのキナーゼ活性はヒトリンパ球と比較して高いことが示唆される。また、CEM 細胞及びヒトリンパ球における dGTP 消失半減期はそれぞれ 18 及び 4 時間であったことから、dGTP を分解するヌクレオチダーゼの活性が CEM 細胞よりもヒトリンパ球で高いことが示唆される。高いキナーゼ活性及び低いヌクレオチダーゼ活性を持つ CEM 細胞は、正常ヒトリンパ球と比較してフォロデシン及び dGuo に対する感受性が高いと考えられる。

SCID マウスにヒト PBL を移植した hu-PBL-SCID マウスで発症する x-GVHD には、移植したヒト T 細胞がエフェクターとして関与していると考えられる。同モデルにおいてフォロデシンは溶媒と比較して平均生存期間を 2 倍に延長したことから、フォロデシンは SCID マウスにおけるヒト PBL の増殖を抑制することが示唆された。一方、フォロデシンは DNFB 誘発接触性遅延型過敏症や GVH 反応誘発性脾腫マウスモデルなどのマウス T 細胞モデルで効果を示さなかった。これは、フォロデシンがマウス脾細胞増殖を抑制しなかった結果と一致する。なぜマウスでは PNP 活性阻害による dGTP 蓄積がないのか、その生化学的メカニズムは不明であるが、成熟したマウス T 細胞は、ヒト T 細胞と異なり、キナーゼ活性が低い及び／又はヌクレオチダーゼ活性が高いのかもしれない。また、フォロデシンはラット脾細胞、イヌ及びサルの PBL 細胞に対して増殖阻害作用を示さず、dGTP の蓄積も認められなかったが、これはマウスと同様の要因によるものかもしれない。

一連の非臨床安全性薬理試験において、フォロデシンによる中枢神経系、心血管系及び呼吸器系に対する臨床的に意義のある影響はいずれも認められなかった。

以上の *in vitro* 及び *in vivo* 薬力学試験並びに安全性薬理試験の結果は、フォロデシン塩酸塩の臨床開発・製造販売承認をサポートするものと考えられる。

7　参考文献

1　Markert ML. Purine nucleoside phpsphorylase deficiency. Immunodef Rev 1991; 3:45–81. (4.3.7)

2　Bantia S, Miller PJ, Parker CD, Ananth SL, Horn LL, et al. Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 (Immucillin-H)-a novel potent and orally active immunosuppresive agent. Int Immunopharmacol 2001; 1:1199–1210. (4.3.2)

3　Bantia S, Montgomery JA, Johnson HG, Walsh GM. In vivo and in vitro pharmacologic activity of the purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-34: the role of GTP and dGTP. Immunopharmacology 1996; 35:53-63. (4.3.1)

4　Sherman PA and Fyfe JA. Enzymatic assay for deoxyribonucleoside triphosphates using synthetic oligonucleotides as template primers. Anal. Biochem. 1989; 180:222-226. (4.3.11)

5　Bantia S, Miller PJ, Parker CD, Ananth SL, Horn LL, et al. Comparison of in vivo efficacy of BCX1777 and cyclosporin in xenogeneic graft-vs.-host disease: the role of dGTP in antiproliferative action of BCX1777. Int Immunopharmacol 2002; 2: 913-923. (4.3.3)

6　Jacobsson B, Albertioni F, Eriksson S. Deoxynucleoside anabolic enzyme levels in acute myelocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia cells. Cancer Lett. 2001; 165:195-200. (4.3.9)

7　Sandhu JS, Gorczynski R, Shpitz B, Gallinger S, Nguyen H, et al. A human model of xenogeneic graft-versus-host disease in SCID mice engrafted with human PBL. Transplantation 1995; 60:179–184. (4.3.10)

8　Viegas TX, Omura GA, Stoltz RR, Kisicki J. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of Peldesine (BCX-34), a purine nucleoside phosphorylase inhibitor, following single and multiple oral doses in healthy volunteers. J Clin Pharmacol 2000; 40:410–420. (4.3.12)

9　Morris PE, Omura GA. Inhibitors of the enzyme purine nucleoside phosphorylase as potential therapy for psoriasis. Curr Pharm Des 2000; 6:943–959. (4.3.8)

10　Wilburn DJ, Dong MK, Gilbertsen RB. PD 141955 and CI-972: 9-deazaguanine analog purine nucleoside phosphorylase inhibitors: I. Suppression of the human mixed lymphocyte reaction (MLR). Agents Actions 1993; 39:C96–98 (special conference issue). (4.3.13)

11　Conry RM, Bantia S, Turner HS, Barlow DL, Allen KO, et al. Effects of a novel purine nucleoside phosphorylase inhibitor, BCX-34, on activation and proliferation of normal human lymphoid cells. Immunopharmacology 1998; 40:1–9. (4.3.4)

ムンデシンカプセル 100mg

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.3　薬理試験概要表

ムンディファーマ株式会社

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 6

2.6.3.3　副次的薬理試験 6

2.6.3.4　安全性薬理試験 7

2.6.3.5　薬理学的薬物相互作用試験 9

2.6.3.6　その他の薬力学試験 9

2.6.3.1　薬理試験：　一覧表

Test Article: Forodesine hydrochloride

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
In Vitro Primary Pharmacodynamics					
Inhibition of Nonhuman and Human Red Blood Cell Purine Nucleoside Phosphorylase by Forodesine	Human and nonhuman (mouse, rat, dog and monkey) Red Blood Cell (RBC) Purine Nucleoside Phosphorylase (PNP)	*In vitro*	[redacted] USA	P98-1777-001	4.2.1.1.1
Kinetic Studies to Characterize the Binding Affinity of Forodesine	Human RBC PNP	*In vitro*	[redacted] USA	P03-1777-068	4.2.1.1.2
Inhibition of Proliferation of Human T Lymphocytes by Forodesine	Human peripheral blood lymphocytes (PBLs)	*In vitro*	[redacted] USA	P99-1777-001	4.2.1.1.3
Effect of Forodesine on T-cell Lines	CEM [T-acute lymphoblastic leukemia (T-ALL)], MJ and Hut-78 [cutaneous T-cell lymphoma (CTCL)]	*In vitro*	[redacted] USA	P99-1777-003	4.2.1.1.4
Lack of Inhibition of Proliferation of Non T-Cell Lines by Forodesine	MCF-7 (breast adenocarcinoma), DLD-1 (colon adenocarcinoma), A-498 (kidney carcinoma), HL-60 (promyelocytic leukemia), H33HJ-JA1 (lymphoma), SK-MEL-5 (melanoma), PC-3 (prostate adenocarcinoma), A431 (epidermoid carcinoma) and MGL8 (B cell line)	*In vitro*	[redacted] USA	P99-1777-002	4.2.1.1.5
Pharmacology data report – Objectives: to evaluate the growth effects of test compound BCP-2 on human liver tumor cell lines, HepG2.	HepG2 (human liver tumor)	*In vitro*	[redacted] Taiwan	1009704	4.2.1.1.6

2.6.3.1　薬理試験：　一覧表（続き）

Test Article: Forodesine hydrochloride

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
In vitro Primary Pharmacodynamics (cont.)					
Forodesine has high antitumor activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM	Primary leukemic lymphocytes from patients with B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL) and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors	*In vitro*	University of Barcelona, Barcelona, Spain	Alonso 2009	4.2.1.1.7
Lack of Inhibition of Proliferation of Non Human Lymphocytes/Splenocytes by Forodesine	PBLs from Cynomolgous monkeys and Beagle dogs,　and splenocytes from Balb/c mice and SD rats	*In vitro*	[redacted] USA	P99-1777-004	4.2.1.1.8
In vivo Primary Pharmacodynamics					
Effect of Forodesine in the Human PBL-SCID Mouse Model	Severe combined immunodeficient (SCID) mice	PO or IP	[redacted] USA	P98-1777-005	4.2.1.1.9
Effect of Forodesine on the Dinitrofluorobenzene (DNFB)-Induced Contact Hypersensitivity Mouse Ear Edema Model	Balb/c mice	PO	[redacted] USA	P98-1777-003	4.2.1.1.10
Effect of Forodesine in the Graft vs. Host Induced Splenomegaly in Mice	Hybrid B6C3F1 mice, C57Bl/6 mice	PO or IP	[redacted] USA	P98-1777-004	4.2.1.1.11
Secondary Pharmacodynamics					
NA					

2.6.3.1　薬理試験：　一覧表（続き）

Test Article: Forodesine hydrochloride

Type of Study/Description	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Safety Pharmacology					
Forodesine: Effects on General Activity, Behaviour and Body Temperature in the Rat Following Intravenous Administration	SD rats	IV	[redacted] UK	FDS-SPHARM-002	4.2.1.3.1
Effect of Forodesine on Cloned hERG Potassium Channels Expressed in Human Embryonic Kidney Cells	HEK-293 cells	NA (*in vitro*)	[redacted] USA	FDS-SPHARM-001	4.2.1.3.2
Effect of BCX-1777 (50 and 150mg/kg i.v.) on Blood Pressure, Heart Rate and ECG in Freely Moving Male Rats	SD OFA rats	IV	[redacted] Switzerland	1440/BCX/01	4.2.1.3.3
Cardiovascular Investigations Using Radiotelemetry in the Conscious Cynomolgus Monkey Following Intravenous Administration	Cynomolgus monkeys	IV	[redacted] Germany	FDS-SPHARM-004	4.2.1.3.4
Forodesine: Measurement of Respiratory Parameters in the Freely Moving Conscious Rat Using Whole Body Plethysmography	SD rats	IV	[redacted] UK	FDS-SPHARM-003	4.2.1.3.5
Pharmacodynamic Drug Interaction					
NA					

HEK = human embryonic kidney, hERG = human ether-a-go-go related gene, IP = Intraperitoneal, IV = Intravenous, NA = Not Applicable, OFA = Oncis France Strain A, PO = Oral, SD = Sprague-Dawley, ECG = electrocardiogram

2.6.3.2　　効力を裏付ける試験

2.6.2.2 項を参照

2.6.3.3　　副次的薬理試験

2.6.2.3 項を参照

2.6.3.4　　安全性薬理試験

Test Article: Forodesine hydrochloride

Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP[a]	Study Number / Location
Central Nervous System	SD Rats	IV	0, 10, 30, 100 mg/kg	Male, n = 6	IV administration of a single bolus dose of forodesine hydrochloride at 10, 30 and 100 mg/kg produced a mild, transient, dose-related effect in the majority of rats in this study. The only sign seen was flushing of the skin, which in the low dose group was restricted to the ears. The degree of flushing increased with increasing dose level. IV administration of forodesine hydrochloride dose levels of 10, 30 and 100 mg/kg had no effect on body temperature in rats when compared to the vehicle-treated group.	Yes	FDS-SPHARM-002/ 4.2.1.3.1
Cardiovascular System (hERG Inhibition)	HEK-293 cells	*In vitro*	0, 10, 300, 3000 µmol /L	n = 3	Forodesine hydrochloride had no significant effect on hERG current at either 10 or 300 µmol/L compared to control. The inhibition (mean ± SEM) was 0.6 ± 0.2% at 10 µmol/L (n = 3) and 0.6 ± 0.2% at 300 µmol/L (n = 3) versus 1.0 ± 0.1% (n = 3) in control. Forodesine hydrochloride, at the maximum test concentration of 3000 µmol/L inhibited hERG current by (mean ± SEM) 6.3 ± 0.1% (n = 3) versus 1.0 ± 0.1% (n = 3) in control. hERG inhibition at 3000 µmol/L was significantly different ($P < 0.05$) when compared to vehicle control values. The IC_{50} for the inhibitory effect of forodesine hydrochloride on hERG potassium current could not be calculated but was estimated to be greater than 3000 µmol/L.	Yes	FDS-SPHARM-001/ 4.2.1.3.2

2.6.3.4　　安全性薬理試験（続き）

Test Article: Forodesine hydrochloride

Organ Systems Evaluated	Test System	Method of Administration	Dose	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP[a]	Study Number / Location
Cardiovascular System	SD OFA Rats	IV	0, 50, 150 mg/kg	Male, n = 8	Forodesine hydrochloride (50 mg/kg) slightly increased heart rate. This effect was not seen with forodesine hydrochloride (150 mg/kg). Forodesine hydrochloride (50 and 150 mg/kg) had no effect on mean, systolic, diastolic blood pressure and ECG after IV administration when compared to the vehicle.	Yes	1440/BCX/01 / 4.2.1.3.3
Cardiovascular System	Cynomolgus monkeys	IV	0, 10, 30, 90 mg/kg	Male, n = 4	Forodesine hydrochloride did not cause any adverse clinical or cardiovascular effects and was well tolerated at all dose levels.	Yes	FDS-SPHARM-004/ 4.2.1.3.4
Respiratory System	SD Rats	IV	0, 10, 30, 100 mg/kg	Male, n= 6	IV administration of forodesine hydrochloride at 10, 30 and 100 mg/kg, did not elicit any biologically significant changes in respiratory parameters in the conscious rat during a 6-hour period, when compared to the vehicle-treated group.	Yes	FDS-SPHARM-003/ 4.2.1.3.5

a　An entry of "Yes" indicates that the study was performed in compliance with GLP (Good Laboratory Practice).
HEK = human embryonic kidney, hERG = human ether-a-go-go related gene, IC_{50} = 50% inhibitory concentration, IV = Intravenous, OFA = Oncis France Strain A, SD = Sprague-Dawley, SEM = standard error of the mean, ECG = electrocardiogram

2.6.3.5　　薬理学的薬物相互作用試験

2.6.2.5 項を参照

2.6.3.6　　その他の薬力学試験

2.6.2.6 項を参照