ツシジノスタット
ハイヤスタ錠 10mg

第 2 部 CTD の概要

2.4 非臨床試験の概括評価

Huya Japan 合同会社

略号一覧表

略語・用語	内容
17-AAG	17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン
ADCC	抗体依存性細胞障害
allo-HSCT	同種造血幹細胞移植
ATL	成人 T 細胞白血病／リンパ腫
$AUC_{(0-24)}$	時間 0 から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
$AUC_{(0-48)}$	時間 0 から 48 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
Bcl-2	B 細胞リンパ腫たんぱく質 2
Bcl-6	B 細胞リンパ腫たんぱく質 6
BCRP	Breast cancer resistance protein
BCR-ABL	A fusion gene formed by the combination of the break point cluster region (bcr) and the c-Abelson (Abl) genes.
BIW	週 2 回
Caco-2	Human epithelial colorectal adenocarcinoma cell
CCR4	CC ケモカイン受容体 4
CFDA	中国国家食品薬品監督管理総局
c-Raf	c-Jun N 末端キナーゼ
C_{max}	最高血漿中濃度
CR	完全奏効
CTCL	皮膚 T 細胞リンパ腫
CTL	細胞傷害性 T 細胞
CYP	チトクローム P450
DLBCL	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
ECG	心電図
FDA	Food and Drug Administration
Flt-3	Feline McDonough Sarcoma 様チロシンキナーゼ
FOB	機能観察総合評価
GALT	腸管関連リンパ組織
GGT	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GI	消化管
GI_{50}	50%増殖阻害濃度
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験実施の基準
HBZ	Hemoglobin subunit zeta
HDAC	ヒストン脱アセチル化酵素
HEK293	ヒト胎児腎細胞 293
Her-2	ヒト上皮成長因子受容体 2 遺伝子
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
HPLC	高速液体クロマトグラフィー
HSP	熱ショックたんぱく質
HTLV-1	ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型
HUYA	HUYA Japan 合同会社.
HUYABIO	HUYA Bioscience International, LLC
IC_{50}	50%阻害濃度
ICH	医薬品規制調和国際会議
IE	幼若赤血球
IND	Investigational New Drug
Ki	阻害定数
LC-MS/MS	液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー
M	モル濃度
MATE	Multidrug and toxin extrusion transporter
MDCK	Madin-Darby canine kidney

MDR1	Multidrug resistance 1
MHLW	厚生労働省
MIE	小核を有する幼若赤血球
MPE	Mean photo effect
MRP2	Multidrug resistance protein 2
MTD	最大耐量
NADPH	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NCI-60	米国立がん研究所による培養ヒト腫瘍細胞株 60 種
NF-κB	核内因子-カッパーB
NHL	非ホジキンリンパ腫
NK-cell	ナチュラルキラー細胞
NKG2D	ナチュラルキラーグループ 2D
NMPA	中国国家薬品監督管理局
NOAEL	無毒性量
NSCLC	非小細胞肺がん
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion-transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
OS	全生存率
p21	サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21
PBMC	末梢血単核細胞
P-gp	P-glycoprotein
PTCL	末梢性 T 細胞リンパ種
QOD	2 日に 1 回
QTc	補正 QT 間隔
SAHA	スベロイルアニリドヒドロキサム酸（ボリノスタット）
SEM	平均の標準誤差
Sir2	Silent information regulator 2
TDI	時間依存的阻害作用
US	米国
UV	紫外線
VEGF-R	血管内皮増殖因子受容体

目次

頁
略号一覧表 2
2.4 非臨床概括評価 6
2.4.1 緒言 6
2.4.1.1 がんにおける治療標的としてのヒストン脱アセチル化酵素 6
2.4.1.2 血液悪性腫瘍における HBI-8000 使用の科学的根拠 7
2.4.1.2.1 T 細胞又は B 細胞非ホジキンリンパ腫における HBI-8000 使用の科学的根拠 7
2.4.1.2.2 成人 T 細胞白血病／リンパ腫における HBI-8000 使用の科学的根拠 7
2.4.1.3 HBI-8000 8
2.4.2 非臨床試験計画概略 10
2.4.2.1 薬理試験計画 10
2.4.2.2 薬物動態試験 11
2.4.2.3 毒性試験 11
2.4.2.4 被験物質 12
2.4.3 薬理試験 12
2.4.3.1 効力を裏付ける試験 12
2.4.3.1.1 *In Vitro* での HBI-8000 の阻害活性 12
2.4.3.1.2 ナチュラルキラー細胞を介した HBI-8000 の細胞毒性 12
2.4.3.1.3 *In Vitro* 及び *Ex Vivo* モデルにおける T 細胞白血病／リンパ腫に対する HBI-8000 の抗腫瘍活性 13
2.4.3.1.4 *In Vivo* での HBI-8000 の抗腫瘍活性 13
2.4.3.2 安全性薬理試験 14
2.4.3.2.1 ヒト胎児腎細胞で発現したクローン化 hERG カリウムチャネルに対する HBI-8000 の影響（試験番号 080415.IVZ） 14
2.4.3.2.2 一般毒性試験における *In Vivo* 安全性薬理評価 14
2.4.3.2.2.1 中枢神経系に対する影響 14
2.4.3.2.2.2 呼吸器系に対する影響 15
2.4.3.2.2.3 心血管系に対する影響 15
2.4.3.3 要約 15
2.4.4 薬物動態試験 16
2.4.4.1 生体試料分析 17
2.4.4.2 吸収 17
2.4.4.3 分布 17
2.4.4.4 代謝 17
2.4.4.5 排泄 19
2.4.4.6 薬物動態学的薬物相互作用 19
2.4.4.7 要約 21
2.4.5 毒性試験 22
2.4.5.1 単回投与毒性試験 22
2.4.5.2 反復投与毒性試験 22

2.4.5.2.1 ラットにおける HBI-8000 の 21 日間反復経口投与毒性試験（試験番号 11470-07）.....22
2.4.5.2.2 ラットにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-002）.....23
2.4.5.2.3 ラットにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092736）.....23
2.4.5.2.4 イヌにおける HBI-8000 の 19 日間反復経口投与用量設定試験（試験番号 11296-07）.....24
2.4.5.2.5 イヌにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-001）.....24
2.4.5.2.6 イヌにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092737）.....25
2.4.5.3 遺伝毒性試験.....26
2.4.5.3.1 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 9601677）.....26
2.4.5.3.2 ヒト末梢血リンパ細胞における *In Vitro* 哺乳類染色体異常試験（試験番号 9601678）.....26
2.4.5.3.3 ラットにおける *In Vivo* 小核試験（試験番号 9800415）.....26
2.4.5.4 がん原性評価.....27
2.4.5.5 生殖発生毒性試験.....27
2.4.5.6 局所刺激性試験.....28
2.4.5.7 その他の毒性試験.....28
2.4.5.7.1 原薬の潜在的不純物 不純物Ｆ＊ のネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 [redacted]08-368）.....28
2.4.5.7.2 BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *In Vitro* 光毒性試験（試験番号 20245854）.....28
2.4.5.8 要約.....28
2.4.6 総括及び結論.....29
2.4.7 参考文献.....30

表

頁
表 2.4-1 ラット及びイヌにおける 13 週間反復経口投与毒性試験の最大耐量でのトキシコキネティクスパラメータ.....29

図

頁
図 2.4-1 HBI-8000 の分子構造.....9
図 2.4-2 HBI-8000 の作用機序.....9
図 2.4-3 HBI-8000 の推定代謝経路（*in vitro*）.....18

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

2.4 非臨床概括評価

2.4.1 緒言

2.4.1.1 がんにおける治療標的としてのヒストン脱アセチル化酵素

発がんは遺伝子変異のみで説明することは不可能であり、エピジェネティックなプロセスも関与している。アセチル化によるヒストン修飾は、遺伝子発現のエピジェネティックな制御において重要な役割を果たしており、ヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）及びヒストンアセチルトランスフェラーゼの間のバランスによって制御されている（Roth 1996; Eckschlager 2017）。

HDAC は、酵母類縁体との相同性に基づき、4 つのクラスに分けられる。クラス I は核内に存在し、HDAC 1、2、3 及び 8 により構成される。HDAC 4、5、7 及び 9 はクラス IIa のメンバーであり、クラス IIb（HDAC 6 及び 10）と共に細胞質及び核内の両方に存在する。クラス IV（HDAC 11 のみ）はクラス I 及び II のいくつかの特徴を有している。酵母 silent information regulator 2（Sir2）たんぱく質である NDA 依存性ホモログ 1～7（サーチュイン）は HDAC クラス III として分類されている（Tang 2013）。

HDAC 阻害剤は、細胞増殖抑制剤として作用するエピジェネティック調節剤の 1 つであり、細胞周期の停止、アポトーシス誘導などを引き起こすことによって、*in vitro* や *in vivo* の系で腫瘍細胞増殖を抑制する。ヒストンのアセチル化／脱アセチル化はクロマチントポロジーの変調及び遺伝子転写の調節において重要な役割を果たす。3 つのクラスの HDAC（クラス I、IIa/IIb 及び IV）は、ヒストン及び非ヒストンたんぱく質の脱アセチル化において、亜鉛による触媒メカニズムを利用している（Bolden 2006; Minucci 2006; Glaser 2007; Rasheed 2007; Rasheed 2008; Witt 2009; Haberland 2009）。

急性骨髄性白血病、急性前骨髄球性白血病、非ホジキンリンパ腫（NHL）、前立腺がん、胃がん、結腸直腸がん、乳がん及び子宮頸がんでは、クラス I の HDAC（HDAC1、HDAC2、HDAC3 及び HDAC8）の発現又は活性の上昇がみられる（Bolden 2006; Nakagawa 2007; Fritzsche 2008; Weichert 2008）。

クラス IIb の HDAC（HDAC6 及び HDAC10）は、α-チューブリンや熱ショックたんぱく質（HSP）90 などの非ヒストンたんぱく質を選択的に標的とすることが知られている。HSP90 は、BCR-ABL（a fusion gene formed by the combination of the break point cluster region (bcr) and the c-Abelson (Abl) genes）、突然変異 FMS 様チロシンキナーゼ-3（Flt-3）、プロテインキナーゼ B（セリンスレオニンキナーゼ Akt としても知られている）、c-Jun N 末端キナーゼ（c-Raf）、エストロゲン受容体、ヒト上皮増殖因子受容体-2（Her-2）及び血管内皮増殖因子受容体（VEGF-R）などのがんたんぱく質を安定化することにより、悪性形質転換に関係することが示されている。α-チューブリンは、ミスフォールドたんぱく質のリソソームによるクリアランスを促進することによって腫瘍細胞のアポトーシスを抑制する。HDAC6 又は HDAC10 によって HSP90 と α-チューブリンが脱アセチル化されると、これらのたんぱく質が活性化し、悪性形質の一因となる。逆に HDAC6 又は HDAC10 の阻害により、腫瘍の増殖が抑制されることが知られている。HSP90 阻害剤［17-アリルアミノ-17-デメトキシゲルダナマイシン（17-AAG）］と抗腫瘍プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブでみられた相乗作用は、提唱されているこれらのメカニズムをさらに裏付けている（Glaser 2004; Bali 2005; Rodriguez-Gonzalez 2008; Schemies 2009; Park 2008）。

予備的臨床試験の結果では、HDAC 阻害剤を他の抗腫瘍剤と併用した場合に、非小細胞肺がん及び乳がんの治療に有効であることが示されている。しかし、単剤療法では固形がんに対する有効性は示されていない（Blumenschein 2008; Crump 2008; Luu 2008; Modesitt 2008; Vansteenkiste 2008）。

こうしたHDAC阻害剤の有効性上の限界を克服するため、現在は薬物動態プロファイル及び安全性プロファイルが改善したHDAC阻害剤の開発に焦点が置かれている。

2.4.1.2 血液悪性腫瘍におけるHBI-8000使用の科学的根拠

2.4.1.2.1 T細胞又はB細胞非ホジキンリンパ腫におけるHBI-8000使用の科学的根拠

T細胞リンパ腫は、臨床試験でHDAC阻害剤に対して一貫して反応を示す腫瘍型である（Duan 2005）。B細胞リンパ腫たんぱく質6（Bcl-6）は、びまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）の約40%で過剰発現する転写因子であり、HDAC2を動員し増殖制御遺伝子を抑制する（Bolden 2006）。さらに、B細胞リンパ腫たんぱく質2（Bcl-2）の転座は濾胞性リンパ腫の85%及びDLBCLの20%で起こり、またHDAC阻害剤が腫瘍細胞におけるBcl-2の発現を抑制することが知られている（Duan 2005）。

HDAC阻害剤には、いくつかのタイプのHDACに対してのみ特異的に作用する阻害剤（HDACアイソフォーム選択的阻害剤）と、全てのタイプのHDACに対して作用する阻害剤（汎HDAC阻害剤）がある。HDAC阻害剤の内、ボリノスタット（vorinostat／SAHA）及びbelinostatはヒドロキサム酸クラスの汎阻害剤の代表例である。ロミデプシン（romidepsin）は、環状テトラペプチドであり、同様に汎阻害剤である。Entinostat（MS-275）及びmocetinostatは、ベンズアミド誘導体であり、クラスIのHDACを選択的に阻害する。米国では、ボリノスタット及びロミデプシンが皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）の適応で既に承認されており、belinostatはPTCLで承認されている。Entinostat及びmocetinostatは、ホジキンリンパ腫を対象とした臨床試験中である（Ceccacci 2016）。日本では、ボリノスタット、ロミデプシン及びパノビノスタットが、それぞれCTCL、PTCL及び多発性骨髄腫の適応で承認されている。

2.4.1.2.2 成人T細胞白血病／リンパ腫におけるHBI-8000使用の科学的根拠

成人T細胞白血病／リンパ腫（ATL）は、ヒトT細胞白血病ウイルス-1型（HTLV-1）の潜伏感染によって発症する（Oshima 2017）。感染からATL発症までに最大40年の長い潜伏期間があり、HTLV-1に感染した人の5%がATLを発症する。日本には推定で108万人のHTLV-1キャリアが存在した（Yamaguchi 2011）。厚生労働省（MHLW）が2019年に報告した2017年の患者調査によると、日本には約2000人のATL患者が存在する（厚生労働省 2019）。ATLに起因する死亡者数は、過去20年に渡り年間約1000人で推移しており、ATLの年間死亡率はATLの年間発症率にほぼ近似している（Iwanaga 2012）。一般的にATL患者の予後は悪く、3年全生存率（OS）は従来の化学療法で約24%である（Tsukasaki 2007; JSHガイドライン 2018）。

JSHガイドラインでは、急速に進行する進行性ATL（急性型、リンパ腫型及び予後不良因子を有する慢性型）に対して多剤併用化学療法が推奨されており、VCAP-AMP-VECP療法（mLSG15）が第一選択療法として推奨されている（JSHガイドライン 2018）。しかしながら、mLSG15による化学療法後のアグレッシブATLの予後は不良である。1年無増悪生存率は28%であり、大多数の患者が治療開始後12ヵ月以内に再発又は進行している。同様に、3年OSは24%であり、平均生存期間（MST）は13ヵ月であった（Tsukasaki 2007）。

化学療法感受性のアグレッシブATL患者に対しては、患者が比較的若年で、身体的適合性があり、適切なドナーがいる場合には同種造血幹細胞移植（allo-HSCT）が推奨される。

抗CCケモカイン受容体4（CCR4）モノクローナル抗体であるモガムリズマブは、未治療のア

グレッシブ ATL に対する化学療法と併用で第一選択療法として、2014 年 12 月に国内承認を得ている。しかしながら、モガムリズマブの追加によって完全奏効（CR）率は高くなったものの、生存ベネフィットは向上しなかった（医薬品医療機器総合機構 [PMDA] 2014）。モガムリズマブは、再発又は難治性 ATL 患者に対する治療剤としても 2012 年 3 月に国内承認を得ている。

サリドマイド誘導体であるレナリドミド水和物（以下、レナリドミド）は、再発又は難治性 ATL の治療剤として、2017 年 3 月に国内承認を得ている。

モガムリズマブ及びレナリドミドによる治療は初期には反応が認められるものの、いずれの治療も最終的には再発又は難治性 ATL 患者の病勢をコントロールすることはできず、ほとんどの患者では短期間のうちに ATL が進行する。

再発又は難治性 ATL 患者の予後は依然として不良であり、進行したアグレッシブ ATL に対する有効で忍容性の高い新規治療剤、特に国内で現在承認されている薬剤と重複しない新たな作用機序の治療剤に対する強いアンメットメディカルニーズが存在する。

難治性の ATL 患者に対する治療剤が欠如していることより、HDAC 阻害剤の必要性がより高まっている。

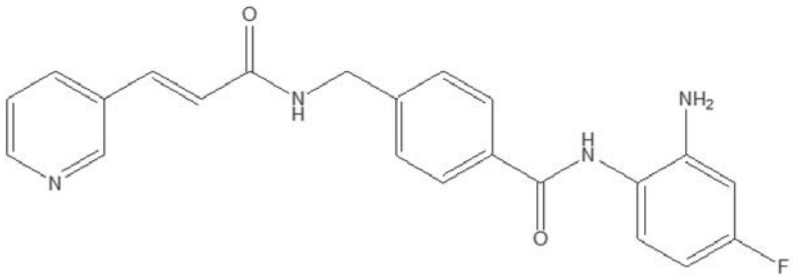
現在の研究データに基づいて、HDAC 阻害剤には、成人 T 細胞白血病／リンパ種（ATL）に対する効果が期待されている。HDAC 阻害剤は、*in vitro* 及び *ex vivo* において、ATL 細胞、HTLV-1 に感染した前がん性リンパ球又は HTLV-1 形質転換細胞株のアポトーシスを引き起こす（Hasegawa 2011）。さらに、HDAC 阻害剤は、ウイルス性がん遺伝子である hemoglobin subunit zeta（Hbz）の発現を抑制し（Belrose 2011）、及び ATL で継続的に活性化されている核内因子-カッパ－B （NF-κB）の阻害を示す（Nishioka 2008）ことから、ATL に対して有用と考えられている。また、HDAC 阻害剤は、他の T 細胞及び B 細胞リンパ腫細胞及び細胞株においても同様に有効な遺伝学的機序を介して HTLV-1 感染細胞のアポトーシスを引き起こすことができる（Murata 2000）。HDAC 阻害剤は、HTLV-1 感染細胞及び形質転換細胞のアポトーシスを引き起こすことに加え、これらの細胞に潜伏ウイルス抗原を再発現させ免疫機構の攻撃に感受性にすることによってこれらの細胞を死滅させることができる。さらに、HDAC 阻害剤は、2 つの異なる ATL マウスモデルで生存期間を延長した（Nishioka 2008; Chen 2009）。したがって、HDAC 阻害剤には *in vitro* 及び *in vivo* で ATL に対する治療効果があることを裏付ける多くのエビデンスが存在する。これらのデータは、再発 ATL 患者に対する HBI-8000 による治療のさらなる裏付けとなっている。

2.4.1.3 HBI-8000

HBI-8000（ツシジノスタット、chidamide）は、低ナノモル濃度でクラス I の HDAC の触媒ポケットを遮断するよう設計された、ベンズアミドクラスの HDAC 阻害剤の 1 つである。HBI-8000 の化学構造を図 2.4-1 に示す。HBI-8000 は、経口投与可能な、クラス I の HDAC に対する選択的阻害剤である。

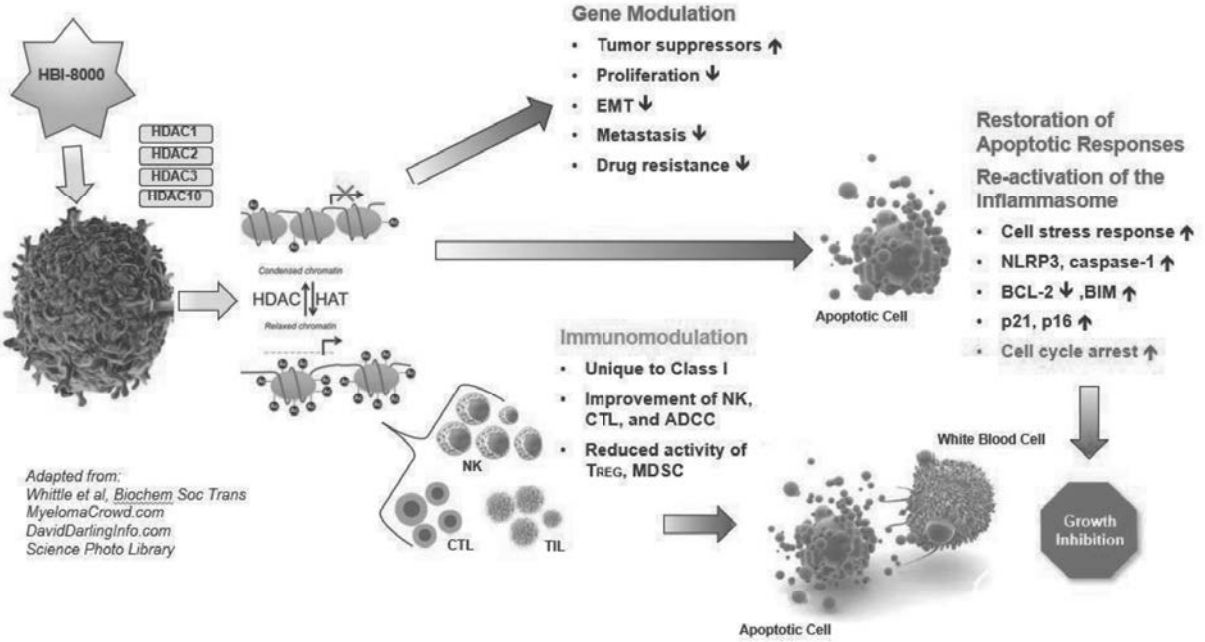
本申請資料では、HBI-8000、ツシジノスタット及び chidamide という用語が同一の意味で使用されている。chidamide は中国国内での開発及び使用に関連する記載において特に用いる用語である。

図 2.4-1 HBI-8000 の分子構造



HBI-8000 の作用機序を図 2.4-2 に示す。

図 2.4-2 HBI-8000 の作用機序



ADCC = 抗体依存性細胞障害; BCL 2 = B 細胞リンパ腫たんぱく質 2; BIM = Bcl-2 様たんぱく質 11; CTL = 細胞傷害性 T 細胞; EMT = 上皮間葉転換; HDAC = ヒストン脱アセチル化酵素; MDSC = 骨髄由来免疫抑制細胞; NK = ナチュラルキラー; NLRP3 = ヌクレオチド結合オリゴマー化領域様受容体ーピリンドメイン含有たんぱく質 3; p16 = サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p16; p21 = サイクリン依存性キナーゼ阻害因子 p21; T_{REG} = 制御性 T 細胞。

HBI-8000 は、中国の Shenzhen Chipscreen Biosciences Co., Ltd.（以下、Chipscreen）により最初に発見・開発された。米国サンディエゴ市に本社を置く HUYA Bioscience International, LLC（以下、HUYABIO）が本化合物について中国以外の国・地域での開発販売権を取得している。2014 年に HUYABIO は、日本法人として Huya Japan 合同会社（以下、HUYA）を設立した。

中国において HBI-8000 は、国家薬品監督管理局（NMPA、旧国家食品薬品監督管理局）により、再発又は難治性末梢性 T 細胞リンパ腫（PTCL）の治療剤、及び局所進行又は転移性乳がんに対するアロマターゼ阻害剤エキセメスタンとの併用治療剤として、Epidaza®（chidamide）というブランド名で製造販売承認を受けている。

米国では、HUYABIO が、Investigational New Drug（IND）番号[redacted]の下で開発を進めている。これまでに固形がん又はリンパ腫の患者を対象とした第 I 相試験並びに悪性黒色腫患者を対象と

した HBI-8000 とニボルマブ（OPDIVO®）併用投与時の安全性及び有効性を評価する第 Ib/II 相試験の第 Ib 相部分を完了し、第 II 相部分は現在進行中である。

日本国内において HUYA は、再発又は難治性成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）の治療を目的として HBI-8000 を開発しており、再発又は難治性 PTCL を対象とした第 IIb 相試験を日本及び韓国において実施中である。

2.4.2 非臨床試験計画概略

HBI-8000 は、再発又は難治性 ATL 患者に対する治療剤としての使用を裏付けるため、薬理試験、薬物動態試験及び非臨床安全性試験を含む包括的な非臨床試験プログラムの中で評価されている。薬理、薬物動態及び安全性のプロファイルは動物試験及び *in vitro* 試験によって適切に評価されている。また、非臨床安全性プログラムの結果は、臨床試験プログラム及び製造販売承認申請を支持している。

2.4.2.1 薬理試験計画

HBI-8000 について広範な *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施することにより、HBI-8000 が、がん細胞にみられる複数の異常な、発現抑制された、過剰発現した、又は他の代償性シグナル経路を同時に標的とすることが可能なエピジェネティック制御因子であることを明らかにすると共に、HBI-8000 が ATL の新たな治療選択肢 1 つとなる可能性を評価した。各薬理試験の目的は以下のとおりである：

- 米国立がん研究所による培養ヒトがん細胞株 60 種（NCI-60）スクリーンアッセイによる、リンパ腫及び白血病などの多数の腫瘍細胞株に対する HBI-8000 の細胞増殖阻害作用の評価（試験番号 1008NS06）
- HBI-8000 の抗腫瘍活性についての用量－活性相関に関する文献データ（Ning 2012）に加え、複数のヒト由来腫瘍ゼノグラフトマウスモデルにおける HBI-8000 の *in vivo* での抗腫瘍活性の評価（試験番号 CXHL0502435）
- ヒト結腸がん HCT-8 ゼノグラフトマウスモデルにおける HBI-8000 の各種投与間隔の有効性の評価（試験番号 CXHB0801220）

上記の試験に加え、HDAC アイソタイプの阻害における HBI-8000 の選択性と効力、ヒト子宮頸部腺がん HeLa 細胞及びヒト末梢血単核細胞（PBMC）中の HDAC 活性に対する HBI-8000 の作用及びナチュラルキラー（NK）細胞を介した HBI-8000 の細胞傷害性（Ning 2012）、並びに ATL における HBI-8000 の *in vitro* 及び *ex vivo* における抗腫瘍活性（Hasegawa 2016）に関する文献報告を用いた。

HBI-8000 の中枢神経系、呼吸器系及び心血管系に対する影響を *in vivo* で評価するための独立した安全性薬理試験は実施していない。中枢神経系及び呼吸器系に対する影響を、ラット（試験番号 1512-002 及び 20092736）及びイヌ（試験番号 1515-001 及び 20092737）における反復投与毒性試験（4 週間及び 13 週間）で評価した。*in vitro* における心血管系に対する影響はヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hEGR）チャネル電流に対する影響に基づき評価した（試験番号 080415.IVZ）。*in vivo* における心血管系に対する影響は、イヌにおける反復投与毒性試験（4 週間及び 13 週間）で評価した。安全性薬理評価を ICH S7A ガイダンスに準じて実施し、試験は全て GLP に準拠して実施した。反復投与毒性試験のデザインの要約は 2.6.6 毒性試験概要文の表 2.6.6-1 に記載した。

2.4.2.2 薬物動態試験

HBI-8000 の非臨床薬物動態学的特性を一連の試験により評価した。薬物動態試験の目的は以下のとおりであった：

- ラット及びイヌにおける、血漿中 HBI-8000 濃度を定量する分析法バリデーション（試験番号[redacted]08B-0029 及び[redacted]07B-0324）
- ラット（試験番号 1512-002 及び 20092736）及びイヌ（試験番号 1515-001 及び 20092737）における 4 週間及び 13 週間反復経口投与後の血漿中 HBI-8000 への曝露量の定量
- ^{14}C 標識体のラットへの単回経口投与後のマスバランス試験における HBI-8000 の吸収、組織分布、代謝及び排泄特性の評価（試験番号 HYI/01）
- 動物種（ラット及びイヌ）及びヒトにおける血漿タンパク結合及び血球移行性の評価（試験番号 AAIR-008-DV-FB 及び AAIR-0010-DV-LA）
- 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）の存在下及び非存在下におけるプールしたヒト肝ミクロソーム中での代謝安定性の評価、及び特異的チトクローム P450（CYP）阻害剤を用いて HBI-8000 の代謝に関与する CYP 分子種を特定（フェノタイピング試験）（試験番号 8HUYAP2R1）
- リコンビナントヒト CYP 酵素を用いた CYP フェノタイピング（AAIR-0007-DV-HB 及び AAIR-0009-DV-CB）及び *in vitro* での主な代謝経路（試験番号 AAIR-0002-DV-MB 及び 1919-003）の確認

上記の試験に加え、以下の試験を実施することにより、HBI-8000 の薬物相互作用の可能性を評価した：

- CYP によって介在される代謝の誘導剤又は阻害剤としての HBI-8000 の能力の評価（試験番号 8HUYAP3、8HUYAP5R1、HUYA-04-[redacted]、AAIR-0011-DV-TB 及び HUYA-02-[redacted]）
- HBI-8000 が吸収トランスポーター及び排泄トランスポーターの阻害剤又は基質となる可能性の評価（試験番号 14F147 HUYA 及び HUYA-02-[redacted]）

上記の薬物動態試験の要約は 2.6.4 薬物動態試験の概要文の表 2.6.4-1 に記載した。

2.4.2.3 毒性試験

毒性試験計画のデザインは ICH M3 (R2)及び S9 ガイドラインに準拠している。HBI-8000 開発のため、ラット及びイヌを用いた単回及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、並びに光毒性試験を実施した（2.6.6 毒性試験の概要文、表 2.6.6-1）。非臨床毒性試験に用いるげっ歯類及び非げっ歯類動物種として規制当局より受け入れられていること、及び過去において膨大な背景データが存在していることを踏まえ、ラット及びイヌを選択した。さらに、HBI-8000 合成に使用する出発物質であり製剤の潜在的な不純物である、 不純物 F＊ について、細菌を用いる復帰突然変異試験を行った。以下に示す重要な試験は GLP 適合下で実施した：

- ラットにおける 4 週間及び 13 週間経口投与毒性試験（試験番号 1515-002 及び 20092736）
- イヌにおける 4 週間及び 13 週間経口投与毒性試験（試験番号 1515-001 及び 20092737）
- 細菌を用いる *in vitro* 復帰突然変異試験（試験番号 9601677）
- 哺乳類細胞を用いる *in vitro* 染色体異常試験（試験番号 9601678）
- *in vivo* 小核試験（試験番号 9800415）
- 製剤の潜在的不純物についての細菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号[redacted]08-368）

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

- *in vitro* 光毒性試験（試験番号 20245854）

2.4.2.4 被験物質

被験物質は、10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン、10%プロピレングリコール脱イオン水溶液として調製し、pH を 2.5（±0.1）に調節した。被験物質のロット一覧は、2.6.7 毒性試験概要表、2.6.7.4 項に記載した。

2.4.3 薬理試験

2.4.3.1 効力を裏付ける試験

2.4.3.1.1 *In Vitro* での HBI-8000 の阻害活性

HBI-8000 は、クラス I に属する HDAC1、HDAC2 及び HDAC3、並びに、クラス IIb に属する HDAC10 を 50%阻害濃度（IC_{50}）67～160 nM 範囲で阻害した。HBI-8000 の酵素阻害プロファイルは、entinostat（MS-275）と同様であったが、その阻害活性は entinostat より高かった（Ning 2012）。IC_{50} 値より、HBI-8000 は、もう一つのベンズアミドクラスの HDAC 阻害剤である mocetinostat（MGCD0103）（Fournel 2008）の文献値と比してより高い阻害効果を示した。酵素阻害プロファイルに基づき、HBI-8000 は、entinostat（MS-275）及び mocetinostat（MGCD0103）と同様に、主にクラス I の HDAC を標的とするベンズアミドクラスの選択的阻害剤に分類される。

ヒストン H3 脱アセチル化の阻害に基づき、HBI-8000 は、ヒト子宮頸部腺がん HeLa 細胞及び PBMC 中のヒストン H3 のアセチル化を顕著に誘導し、薬剤濃度 0.1～10 μM の範囲で、HBI-8000 によるアセチル化誘導のレベルは、entinostat（MS-275）及びボリノスタット（SAHA）に認められたレベルと同様であった（Ning 2012）。

HBI-8000 を 6 種の白血病由来細胞株（CCRF-CEM、HL-60（TB）、K-562、MOLT-4、RPMI-8226 及び SR）を含む 59 種の細胞株から構成される NCI-60 パネルでスクリーニングした（試験番号 1008NS06）。HBI-8000 は、全ての白血病由来細胞株に対して低マイクロモルレベルで活性を示し、50%増殖阻害濃度（GI_{50}）は 1.04～10.4 μM の範囲であった。全体として、白血病由来細胞株に対する HBI-8000 の *in vitro* 活性は、他の腫瘍由来細胞株、特に *in vivo* 試験（2.4.3.1.4 項参照）にも用いたヒト非小細胞肺がん（NSCLC）A549 細胞（GI_{50} = 8.74 μM）及びヒト乳がん MCF-7 細胞（GI_{50} = 2.11 μM）に対するものと同様であった。

HBI-8000 及び entinostat は、B 細胞リンパ腫由来 Raji 細胞株、急性 T 細胞白血病由来 Jurkat 細胞株、骨髄性白血病由来 HL-60 細胞株及びヒト単球／マクロファージ由来 28SC 細胞株を含む多くのヒト腫瘍由来細胞株の増殖を低マイクロモル濃度範囲で同様に抑制した。しかしながら、HBI-8000 は、ヒト胎児腎臓（CCC-HEK）及び肝臓（CCC-HEL）由来の正常細胞に対する毒性が顕著に低く、正常細胞とがん細胞に対する毒性作用に差があることが示唆された（Ning 2012）。

2.4.3.1.2 ナチュラルキラー細胞を介した HBI-8000 の細胞毒性

健常ドナー由来の PBMC を HBI-8000 で処理することにより、ナチュラルキラー（NK）細胞を介した細胞毒性評価に用いられている K562 細胞の溶解が有意に促進された。最大の標的細胞溶解活性は 100 nM の HBI-8000 で認められた。健常ドナー2 例からの PBMC を 100 nM の HBI-8000 により ex-vivo で処理したとき、NK 細胞の活性化に関与する受容体たんぱく質である CD16（低親和性 Fc [fragment crystallizable] 受容体）、ナチュラルキラーグループ 2D（NKG2D）及び細胞傷害性酵素であるグランザイム A の大幅な発現増加が認められた（Ning 2012）。

2.4.3.1.3 *In Vitro* 及び *Ex Vivo* モデルにおける T 細胞白血病／リンパ腫に対する HBI-8000 の抗腫瘍活性

HTLV-1 によって発症した ATL に対する HBI-8000 の抗腫瘍効果の分子メカニズムを ATL の *in vitro* モデル及び *ex vivo* モデルを用いて詳細に検討した（Hasegawa 2016）。HBI-8000 は、ATL 由来細胞株（平均 IC_{50} = 1.16 μM）及び ATL 患者からの新鮮初代 ATL 細胞（平均 IC_{50} = 4.35 μM）の両方に対して増殖と細胞生存率を抑制した。HBI-8000 はカスパーゼ 3 活性化及びアネキシン V 結合性を増大させ、ミトコンドリア膜電位を低下させて、細胞周期を停止させアポトーシスを誘導した。細胞増殖抑制活性は曝露時間に依存して上昇し、細胞のインターロイキン 2（IL2）依存性には影響されなかった。DNA マイクロアレイ及びアポトーシス関連抗体アレイの結果から、HBI-8000 は NF-κB を抑制し、Bcl-2 様たんぱく質 11（Bim）及びヌクレオチド結合オリゴマー化領域（NOD）様受容体ピリンドメイン含有たんぱく質 3（NLRP3）インフラマソーム経路を活性化させて、ATL 細胞死を誘導することが示された。低分子干渉 RNA（siRNA）を用いた試験で、Bim 発現誘導が、HBI-8000 により誘導される ATL 細胞死に寄与していることが確認された。

重要なことに、HBI-8000 は、併用化学療法にモガムリズマブを加えた療法後に再発した患者由来の 2 種の初代 ATL 細胞において、他の初代 ATL 細胞と同様のレベルでアポトーシスを誘導した。このデータは、HBI-8000 が標準的な治療法に対して不応となった ATL 患者において有効性を示す可能性を示唆している。全体として、報告された結果は、臨床現場での ATL 患者に対する HBI-8000 の有用性をより詳細に検討することを支持するものであった。

2.4.3.1.4 *In Vivo* での HBI-8000 の抗腫瘍活性

HBI-8000 はヒト NSCLC A549 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞を含む複数の *in vivo* 腫瘍モデルに対して単剤で有効性を示した（試験番号 CXHL0502435）。HBI-8000 は、12.5～50 mg/kg の用量範囲で、ヒト NSCLC 由来 A549 細胞移植モデルに対して 45.1%～79.3%及び 47.9%～84.1%、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞移植モデルに対して 49.3%～70.0%の腫瘍増殖抑制率を示した。これらの結果は、NCI-60 パネルを用いたスクリーニングアッセイで認められた *in vitro* 活性と一致していた（2.4.3.1.1 項）。HBI-8000 は、ヒト肺がん A549 細胞、ヒト肝がん BEL-7402 細胞、ヒト結腸がん HCT-8 及びヒト乳がん MCF-7 細胞ゼノグラフトモデルにおいて 12.5～50 mg/kg の用量範囲で、用量依存的に腫瘍体積及び腫瘍重量を低下させた（Ning 2012）。全体として、HBI-8000 をこれら 4 種のヒト固形がん由来細胞ゼノグラフトマウスモデルに 50 mg/kg の用量で投与したときの *in vivo* 活性は、entinostat（MS-275）を 25 mg/kg の用量で投与したときの活性と同等かそれ以上であった。一方で特に体重低下に関して、HBI-8000 は entinostat に比べ影響は有意に低かった。

HBI-8000 は、1 日 1 回、2 日に 1 回又は 3 日に 1 回投与することで腫瘍増殖抑制を示した。3 日に 1 回の投与レジメンでは総投与量は 1 日 1 回の投与よりも低いが、ほぼ同等の有効性を示すと共に安全性プロファイル向上の可能性を示した。この結果は、週 2 回の臨床投与レジメンを支持している（試験番号 CXHB0801220）。

上述のように、HBI-8000 の腫瘍増殖抑制効果は、*in vitro* 及び *in vivo* の両方のアッセイモデルで、entinostat と同等かそれ以上であることが明らかとなった。Entinostat は、ベンズアミドクラスの選択的クラス I HDAC 阻害剤であり、臨床試験において複数の血液及び固形がんの治療に対して経口投与で有効であることが知られている（Glaser 2007; Frys 2015; Apuri 2016）ため、HBI-8000 の *in vitro* 及び *in vivo* の薬力学データから、HBI-8000 も血液がんの治療に対して単剤で有効であ

る可能性が高いことが示唆される。

In vitro 試験では、特定の HDAC アイソタイプを抽出し人工条件で実施されており、正常なたんぱく質間相互作用が変化している可能性がある。したがって、細胞の HDAC 活性を評価することは、より生理的条件に近く、*in vivo* での薬力学的特性に関してより有用な情報が得られると考えられている（Bonfils 2008）。限られたデータしか報告されていないものの、HBI-8000 は、HBI-8000 に奏効を示した 2 名の T 細胞リンパ腫患者から分離した PBMC 由来の NK 細胞又は細胞傷害性 T 細胞（CTL）の *ex vivo* 細胞障害活性を増加させたことが報告されている（Ning 2012）。このことは、NK 細胞又は CTL 細胞の *ex vivo* 細胞障害活性は、T 細胞リンパ腫に対する HBI-8000 の臨床効果と関連している可能性を示唆している。

2.4.3.2 安全性薬理試験

2.4.3.2.1 ヒト胎児腎細胞で発現したクローン化 hERG カリウムチャネルに対する HBI-8000 の影響（試験番号 080415.IVZ）

ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子（hERG）チャネル電流（急速活性化遅延整流カリウム電流である IKr のサロゲート[Redfern 2003]）に対する HBI-8000 の影響を *in vitro* で評価した。5 μM の HBI-8000 による hERG 電流の阻害は 2.5±0.7%（平均値 ±SEM）であったが、溶媒対照による阻害は 0.2±0.1%であった。溶媒対照群の値と比較して、5 μM の HBI-8000 による hERG 阻害は統計的に有意であった。溶解度限界のため、hERG カリウム電流に対する HBI-8000 の阻害作用の IC_{50} は求められなかったが、5 μM を上回っていた。このため、本試験条件下では、HBI-8000 には hERG 電流に対する毒性学的意義がある阻害作用はないと判断された。

2.4.3.2.2 一般毒性試験における *In Vivo* 安全性薬理評価

2.4.3.2.2.1 中枢神経系に対する影響

ラットにおける 4 週間毒性試験（試験番号 1515-002）において、いずれの用量においても、一般状態観察で被験物質投与に関連する所見は認められなかった。対照群と比較して認められた体重減少を除き、機能観察総合評価（FOB）に被験物質投与に関連する所見はなかった。ラットにおける 13 週間毒性試験（試験番号 20092736）において、いずれの用量においても、対照群と比較して FOB による一般状態観察において毒性学的意義がある影響は認められなかった。

イヌにおける 4 週間毒性試験（試験番号 1515-001）では、全群の動物に被験物質又は溶媒を 1 日 1 回 12 日間強制経口投与したが、中用量及び高用量群の動物に著しい毒性が生じたため、13 日目は投与を中止し、それ以降は投与頻度を 2 日に 1 回へと変更した。雄 1 匹（動物番号 741）を 1.25 mg/kg 群に追加し、被験物質を試験 11 日目及び 12 日目に初回及び 2 回目投与した後、計 28 日間となるまで 2 日に 1 回投与した。一般状態観察における被験物質投与に関連する影響として、0.75 mg/kg 以上を投与した雌雄に活動低下、食欲不振、削痩及び水様／粘液／変色便が認められた。投与頻度の変更後、0.75 及び 1.25 mg/kg 群中、全例ではないものの数匹の動物で一般状態所見が改善した。観察結果を総合すると、0.75 及び 1.25 mg/kg 群の一般状態所見は有害な影響と判断した。回復期間内に、これらの影響の大部分には可逆性が認められた。1.25 mg/kg を 28 日間にわたり主に 2 日に 1 回（QOD）投与した動物番号 741 には顕著な異常が認められなかった。イヌにおける 13 週間毒性試験（試験番号 20092737）では、HBI-8000 の全用量群で異常歩行、四肢の使用制限及び円背位の一般症状が認められたが、これらは断続的であり、無治療であるいは限定的な（3～7 日間の）獣医学的治療（メロキシカム投与）により回復した。これらの症状は回

復し一過性であったことから、有害な影響ではないと判断された。

2.4.3.2.2.2 呼吸器系に対する影響

2 種の動物種で実施した 4 週間及び 13 週間毒性試験のいずれにおいても、ケージ外からの観察及び詳細な一般状態観察の結果、呼吸器系に対する HBI-8000 投与の影響は認められなかった。

2.4.3.2.2.3 心血管系に対する影響

イヌにおける 4 週間毒性試験（試験番号 1515-001）において、収縮期、拡張期及び平均動脈圧値には、HBI-8000 投与に関連する所見は認められなかった。

心電図（ECG）波形に定性的異常はなく、心拍数、PR 間隔及び QRS 時間に被験物質の影響はなかった。11 日目の 1.25 mg/kg 投与後の雌の RR 間隔は、溶媒対照群に比較して統計的に有意に延長した。11 日目及び 20 日目における 1.25 mg/kg 投与後の雌の QT 間隔は統計学的に有意に延長した。雌雄のデータを合算して溶媒対照群のデータと比較したところ、10%を超える補正 QT 間隔（QTc）の延長が、0.75 mg/kg 群で 1 回（11 日目の投与後）、1.25 mg/kg 群で 2 回（11 日目及び 20 日目の投与後）に生じた。QTc の変化は、少なくとも部分的には、被験物質に関連する血清カリウム及び血清カルシウムの低下に起因する可能性がある。0.25 mg/kg 群では定性的及び定量的 ECG パラメータに対する影響は認められなかった。QTc への影響は、0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg で有害作用と判断された。しかしながら、13 週間試験（試験番号 20092737）では、HBI-8000 は 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg のいずれの用量においても、QTc の変化を含め心血管系に対する影響を誘発しなかった。

2.4.3.3 要約

上述した非臨床薬理試験により、HBI-8000 の予想された作用機序を支持している。HBI-8000 は、がん細胞にみられる複数の異常な、発現抑制された、過剰発現した、又は他の代償性シグナル経路を同時に標的とすることが可能なエピジェネティック制御因子である。HBI-8000 は既知の HDAC 阻害剤のパターン（Eckschlager 2017）と一致する遺伝子制御パターンを示した。

HBI-8000 は、ナノモル濃度範囲でクラス I の HDAC 及び 1 つクラス IIb の 1 つの HDAC を阻害するため、entinostat（MS-275）及び mocetinostat（MGCD0103）と同様に、主にクラス I の HDAC を阻害するベンズアミドクラスの選択的阻害剤に分類される。

0.1～10 μM の薬剤濃度範囲で、HBI-8000 は、HeLa 細胞及びヒト PBMC において entinostat 及びボリノスタットと同レベルまで、アセチル化ヒストン H3 レベルを上昇させた。

HBI-8000 及び entinostat は、B 細胞リンパ腫由来 Raji 細胞株、急性 T 細胞白血病由来 Jurkat 細胞株、骨髄性白血病由来 HL-60 細胞株及びヒト単球／マクロファージ由来 28SC 細胞株を含む多くのヒト腫瘍由来細胞株の増殖を低マイクロモル濃度範囲で同様に抑制した。

健常ドナー由来の PBMC を HBI-8000 で処理することにより、NK 細胞を介した細胞毒性評価に用いられている K562 細胞の溶解が有意に促進された。最大の標的細胞溶解活性は 100 nM の HBI-8000 で認められた。この濃度はクラス I の HDAC に対する IC_{50} に近似している。HBI-8000 は、遺伝子発現の変化を誘発することが示され、間接的な免疫調節作用を有している可能性が示唆された。HBI-8000 は、自然免疫及び適応免疫系の細胞で発現する活性受容体である NKG2D 及び低親和性 Fc 受容体である CD16 の発現を増加させた。HBI-8000 は、免疫系を介した腫瘍細胞溶解に機能的に関与する NK 及び CTL 細胞のたんぱく質であるパーフォリン、グランザイム A、

H、K 及び CD95L（FAS リガンド）の発現も増加させた。

ヒト T 細胞白血病ウイルス-1 型（HTLV-1）によって発症した ATL に対する HBI-8000 の抗腫瘍効果の分子メカニズムを ATL の *in vitro* モデル及び *ex vivo* モデルを用いて詳細に検討した。HBI-8000 は、ATL 由来細胞株（平均 IC_{50} = 1.16 μM）及び ATL 患者からの新鮮初代 ATL 細胞（平均 IC_{50} = 4.35 μM）のいずれにおいても増殖と細胞生存率を抑制した。HBI-8000 は、併用化学療法にモガムリズマブを加えた療法後に再発した患者由来の 2 種の初代 ATL 細胞に対して、他の初代 ATL 細胞と同様のレベルでアポトーシスを誘導した。このデータは、HBI-8000 が標準的な治療法に対して不応となった ATL 患者においても有効性を示す可能性を示唆している。全体として、報告された結果は、臨床現場での ATL 患者に対する HBI-8000 の有用性をより詳細に検討することを支持している。

HBI-8000 を 6 種の白血病由来細胞株（CCRF-CEM、HL-60（TB）、K-562、MOLT-4、RPMI-8226 及び SR）を含む 59 種の細胞株から構成される NCI-60 パネルでスクリーニングした。HBI-8000 は、全ての白血病由来細胞株に対して低マイクロモルレベルで活性を示し、GI_{50} は 1.04～10.4 μM の範囲であった。全体として、白血病由来細胞株に対する HBI-8000 の *in vitro* 活性は、他の腫瘍由来細胞株、特に *in vivo* 試験にも用いたヒト非小細胞肺がん（NSCLC）A549 細胞（GI_{50} = 8.74 μM）及びヒト乳がん MCF-7 細胞（GI_{50} = 2.11 μM）に対するものと同様であった。白血病／リンパ腫モデルは *in vivo* 抗腫瘍活性試験で検討されていないものの、HBI-8000 はヒト NSCLC A549 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞を含む複数の *in vivo* 腫瘍モデルにおいて単剤で有効性を示した。12.5～50 mg/kg の用量範囲で、ヒト NSCLC 由来 A549 細胞及びヒト乳がん由来 MCF-7 細胞移植モデルに対する HBI-8000 の腫瘍増殖抑制率は、NCI-60 パネルを用いたスクリーニングアッセイで認められた *in vitro* 活性と一致していた。

HBI-8000 は、1 日 1 回、2 日に 1 回又は 3 日に 1 回投与することで腫瘍増殖を抑制した。3 日に 1 回の投与レジメンでは総投与量は 1 日 1 回の投与よりも低いが、ほぼ同等の有効性を示すと共に安全性プロファイル向上の可能性を示し、週 2 回の臨床投与レジメンを支持している。

ラットにおける 4 週間及び 13 週間試験での詳細な一般状態観察及び FOB 評価の結果、中枢神経系及び呼吸器系に対する有害作用は認められなかった。イヌにおける 4 週間試験及び 13 週間試験でのケージ外からの観察及び詳細な一般状態観察の結果、中枢神経系及び呼吸器系に対する有害作用は認められなかった。

HBI-8000 には、hERG 電流に対する有意な阻害作用はないと考えられた。イヌにおける 4 週間及び 13 週間試験でケージ外からの観察、詳細な一般状態観察及び ECG を実施した。ECG 波形に定性的な異常はなく、心拍数、PR 間隔及び QRS 時間に対する被験物質の影響はなかった。イヌの 4 週間試験では、1.25 mg/kg 投与後の雌の RR 間隔が溶媒対照群の値より統計学的に有意に延長した。雌雄のデータを合算して溶媒対照群のデータと比較したところ、10%を超える QTc の延長が 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群で生じた。QTc への影響は、0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg で有害作用と判断された。しかし、13 週間試験では、HBI-8000 は 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg のいずれの用量においても、QTc の変化を含め心血管系に対する影響を誘発しなかった。

2.4.4 薬物動態試験

HBI-8000 の非臨床薬物動態特性を以下の試験において評価した。

2.4.4.1 生体試料分析

ラット及びイヌ血漿中の HBI-8000 濃度の分析には、液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー（LC-MS/MS）を用いた。分析法バリデーション及び検体測定は、FDA ガイダンスに従って実施した。

2.4.4.2 吸収

HBI-8000 の吸収特性は、GLP 適合下で実施した 4 週間（ラットを用いた 1515-002 試験及びイヌを用いた 1515-001 試験）及び 13 週間反復投与毒性試験（ラット用いた 20092736 試験及びイヌを用いた 20092737 試験）における単回（投与 1 日目）及び反復投与後の薬物動態特性に基づき評価した。HBI-8000 をラット及びイヌに単回及び反復投与したときの血漿中濃度（は、概して用量比例的又は用量比を上回って増加した。イヌにおいては、雌雄間で血漿中濃度は同様であったが、ラットにおいては、雄に比べて雌で高い血漿中濃度を示した。ラット及びイヌ共に反復投与による血漿中濃度の蓄積又は低下はほとんど認められなかった。

2.4.4.3 分布

HBI-8000 の分布特性は、ラットにおける組織分布、並びに *in vitro* での血漿タンパク結合及び血球移行性に基づき評価した。

[^{14}C]HBI-8000 を部分有色ラット（Long Evans 系）に単回経口投与したとき、組織内の放射能は大部分の組織において投与後 2～8 時間の間でピークに達した。消化管内容物を除いて、最高濃度の放射能は、膀胱、腎臓、肝臓などの排泄に関連する組織で認められた。脾臓、リンパ節、腺組織（胸腺、副腎、下垂体、甲状腺、ハーダー腺を含む）にも比較的高い濃度が認められた。投与後 120 時間から最終採取時点である投与後 840 時間までメラニンを含むブドウ膜にのみ定量可能な放射能が認められ、HBI-8000 関連物質のメラニン親和性が示された。試験を通じて脳及び脊髄の放射能濃度が定量下限未満で推移したことから、HBI-8000 は血液脳関門を通過しないことが示された（試験番号 HYI/01）。

HBI-8000 のラット血漿、イヌ血漿及びヒト血漿における *in vitro* 蛋白結合を超遠心法で検討した（試験番号 AAIR-0008-DV-FB 及び AAIR-0009-DV-CB）。HBI-8000 の蛋白結合率は 0.3～3 μM の濃度範囲で濃度依存性を示さず、ラット血漿中で 86.4%～87.9%、イヌ血漿中で 79.1%～80.1%、及びヒト血漿中で 88.9%～89.4%であった。

HBI-8000 の赤血球への移行性（血球中／血漿中比）をラット、イヌ及びヒトの全血を HBI-8000 と共に 37 ℃ で 1 時間インキュベートすることにより評価した（試験番号 AAIR-0008-DV-FB 及び AAIR-0009-DV-CB）。HBI-8000 は、ラット（48.1%～52.8%）及びイヌ（52.5%～57.8%）に比べてヒトにおいてわずかに高い血球移行（59.2%～76.0%）を示した。ラット及びイヌの血球移行に濃度依存性はほとんど認められなかったが、ヒトにおいて若干の濃度依存性が認められた。

2.4.4.4 代謝

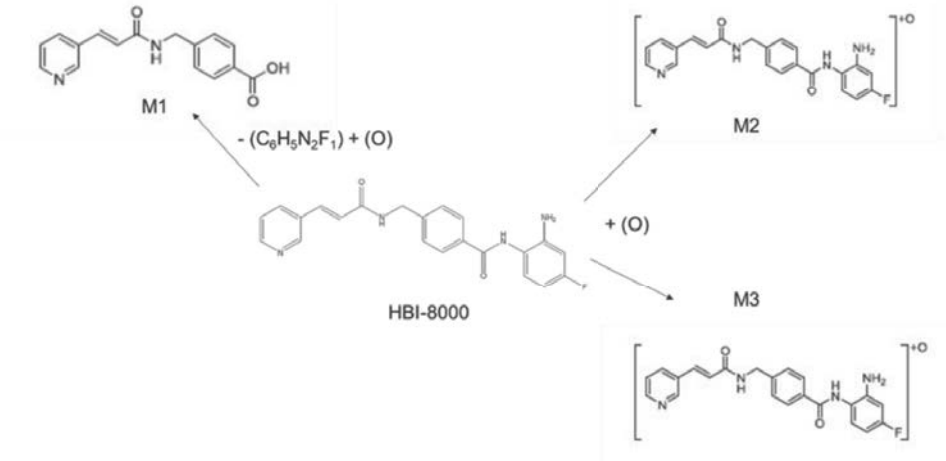
HBI-8000 は補酵素である NADPH 無しの条件下においてプールしたヒト肝ミクソーム中で安定であり、NADPH 有りの条件下では軽度の代謝を示した。別の実験系において、HBI-8000 は、陽性対照試料（NADPH 有り、CYP 阻害剤無し）において陰性対照試料（NADPH 及び CYP 阻害剤無し）中に認められた残存レベルと比較してヒト肝ミクロソーム中で 10～20%のごくわずかな消失を示した。CYP3A4 の阻害剤である ketoconazole を除いて、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、

CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP2E1 に対する特異的な阻害剤を添加した阻害反応試料中の HBI-8000 の残存率は、相当する陽性対照試料中に認められたレベルより顕著に増加しなかった。CYP3A4 阻害剤である ketoconazole の添加により、陽性対照試料中の HBI-8000 の残存率は 81%及び 84%（2 回の独立した試験）から相当する陰性対照試料中の濃度の 96%及び 97%（2 回の独立した試験）に増加した。この結果より、CYP3A4 が HBI-8000 の代謝に関与することが示唆された。

HBI-8000 の代謝において P450（CYP）が果たす役割についてリコンビナントヒト CYP 酵素（Supersomes）を用いて *in vitro* で調べた（試験番号 AAIR-0007-DV-HB 及び AAIR-0009-DV-CB）。HBI-8000 は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C8 及び CYP2C9 によって代謝されず、CYP2D6 及び CYP3A4 でわずかに代謝された。

HBI-8000 の代謝安定性をラット及びヒト凍結肝細胞を用いて *in vitro* で評価した（試験番号 AAIR-0002-DV-MB 及び 1919-003）。LC-MS 分析の結果、3 種の代謝物（M1、M2 及び M3）が少量認められたが、HBI-8000 及びその代謝物の合計に対してそれぞれ 2.9%以下であった。未変化体（親化合物）である HBI-8000 は合計に対して 95%超であった（図 2.4-3）。ヒト肝細胞抽出液中に認められた代謝物はラット肝細胞抽出液中においても認められた一方、代謝物 M3 はラット肝細胞抽出液中にのみ認められた。いずれの代謝物も Phase 1 代謝によるものであり、Phase 2 代謝による代謝物は検出されなかった。

図 2.4-3 HBI-8000 の推定代謝経路（*in vitro*）



原典：Combined Report of AAIR-0002-DV-MB and 1919-003 - Figures 3, 4, 5

HBI-8000 の *in vivo* での代謝プロファイルを、[^{14}C]HBI-8000 を 9 mg/kg 用量で Sprague Dawley 系ラットに単回経口投与することにより検討した（試験番号 HYI/01）。血漿、尿、糞及び胆汁中の未変化体（親化合物）である HBI-8000 及び主要な代謝物を高分解能液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリーにより定量した。血漿、尿及び糞中の主成分は HBI-8000 であり、それぞれ試料中総放射能の 66.3%、64.96%及び 45.9%%を占めた。血漿中にはアミド加水分解体が試料中総放射能の 7.69%を占める少量成分として検出された。この代謝物は、*in vitro* 試験においてラット及びヒト肝細胞で生成された主要代謝物（M1）と一致した（図 2.4-3）。糞中には HBI-8000 の別の代謝物（F3）が試料中総放射能及び総投与量のそれぞれ 13.7%及び 8.99%を占める成分として検出され、N-グルコース抱合体と同定された。胆汁中にも未変化体である HBI-8000 は検出されたものの、試料中総放射能の 5.82%を占める少量成分であった。

2.4.4.5 排泄

[^{14}C]HBI-8000 を用いて、Sprague Dawley 系ラット及び胆管カニュレーションラットにおける HBI-8000 の排泄を評価した（試験番号 HYI/01）。投与された放射能は主に糞中に排泄され、投与後 240 時間で平均 67%が糞中に回収された。投与総放射能の約 30%が尿中に排泄された。ケージ洗浄液中及びカーカスで検出された放射能は微量であり、呼気中に放射能は検出されなかった。胆汁中への放射能の排泄は、投与後 72 時間で約 9%であった。糞中及び尿中に回収された放射能は、それぞれ約 66%及び 14%であった。全体の総回収率は約 91%～95%の範囲で、平均では約 93%（n=3）であった。吸収された薬物の割合は尿中及び胆汁中の合計回収率（23.81%）で表され、糞中に回収された放射能（65.77%）は未吸収薬物に由来する可能性を示している。

2.4.4.6 薬物動態学的薬物相互作用

CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 に対する HBI-8000 の阻害作用についてヒト肝ミクロソームを用いて評価した（試験番号 8HUYAP3 及び 8HUYAP5R1）。HBI-8000 は、10 μM の濃度において CYP3A4 を 70%（カクテル基質法）及び 91%（単独基質法）阻害し、CYP2C8 を 56%阻害したが（単独基質法）、他の CYP 分子種に対して明らかな阻害は示さなかった（試験番号 8HUYAP3）。プールしたヒト肝ミクロソームを用いて、CYP2C8 及び CYP3A4 に対する HBI-8000 の IC_{50} について評価した。その結果、HBI-8000 の IC_{50} は、それぞれ 12.7 μM 及び 1.47 μM であった（試験番号 8HUYAP5R1）。

CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 に対する HBI-8000 の可逆的阻害作用及び時間依存的阻害作用（TDI）を、ヒト肝ミクロソームを用い NADPH 有無の条件下で評価した（試験番号 HUYA-04-[redacted] 及び AAIR-0011-DV-TB）。プレインキュベート時に NADPH 無しの条件での阻害は HBI-8000 による直接的な阻害と考えられ、NADPH 有りの条件での阻害活性の増加は HBI-8000 による時間／代謝依存的な阻害を示すと考えられる。HBI-8000 は CYP2C8 及び CYP2C19 の酵素活性を阻害し、プレインキュベート時に NADPH 無しの条件において IC_{50} はそれぞれ 11.7 μM 及び 3.2～4.8 μM であった。NADPH 有りの条件においても IC_{50} に大きな変化はなく、IC_{50} シフト（NADPH 有りの条件下での IC_{50} 値と NADPH 無しの条件下での IC_{50} 値との比）はそれぞれ 0.9 倍及び 1.0 倍と算出され、時間依存的阻害は示唆されなかった。HBI-8000 は、NADPH 無しの条件において CYP2B6 及び CYP2C9 をわずかに阻害し、外挿した IC_{50} はそれぞれ 123 μM 及び 150 μM であった。一方、NADPH 有りの条件において、これらの CYP 分子種の IC_{50} は本アッセイにおける最高濃度（100 μM）を明らかに超えるものであった（試験番号 HUYA-04-[redacted]）。HBI-8000 が CYP1A2 及び CYP2D6 に対して TDI を有する可能性は示唆されなかった。CYP3A4 に対して midazolam 及び testosterone を基質に用いて評価したところ IC_{50} は 4.50～6.82 μM であり、プレインキュベーション時に NADPH 有りの条件でも IC_{50} に変化は認められなかった（試験番号 AAIR-0011-DV-TB）。以上の試験結果から、HBI-8000 は、CYP2C8、CYP2C19 及び CYP3A4 に対して阻害作用を有することが示唆された。また、検討したいずれの CYP（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4）に対しても TDI の可能性は示唆されなかった。

CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4 を HBI-8000 が誘導する可能性についてドナー3 例からのヒト凍結肝細胞を用いて評価した（試験番号 HUYA-02-[redacted] 及び HUYA-04-[redacted]）。HBI-8000 は、CYP1A2 に対して 0.3～10 μM までの濃度域で弱い濃度依存的な誘導作用を示し、ヒト肝細胞における CYP1A2 のメッセンジャーRNA（mRNA）を最大で 2.6～4.1 倍

（陽性対照である omeprazole の 8%～17%）誘導した。HBI-8000 は、0.3～3 μM の濃度域で CYP3A4 をわずかに誘導し、ヒト肝細胞における CYP3A4 の mRNA を最大で 1.7～4.6 倍（陽性対照の 10%～56%）誘導した（HUYA-02-[redacted]）。HBI-8000 は、また、0.3～100 μM までの濃度域で CYP2B6 を誘導し、ヒト肝細胞における CYP2B6 の mRNA を最大で 2.1～3.0 倍（陽性対照の 3%～19%）誘導した。HBI-8000 は、0.3～1 μM までの濃度域で CYP2C8 を誘導し、ヒト肝細胞における CYP2C8 の mRNA を最大で 2.7～3.7 倍（陽性対照の 26%～45%）誘導した。さらに、HBI-8000 は、0.3 μM の最小濃度で CYP2C9 を誘導し、ヒト肝細胞における CYP2C9 の mRNA の誘導は、最大で 1.5～2.1 倍（陽性対照の 31%～51%）に達した（HUYA-04-[redacted]）。以上の結果より、HBI-8000 は、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4 に対して誘導作用（2 倍以上及び陽性対照の 20%以上）を有する可能性を示した。また、HBI-8000 は、CYP1A2 及び CYP2B6 に対して弱い誘導作用を示した。

P-glycoprotein（P-gp）、breast cancer resistance protein（BCRP）、multidrug resistance protein 2（MRP2）multidrug and toxin extrusion transporter 1（MATE1）、MATE2-K、organic anion transporter 1（OAT1）1、OAT3、organic anion-transporting polypeptide 1B1（OATP1B1）、OATP1B3 及び organic cation transporter 2（OCT2）に対する HBI-8000 の基質性について Caco-2 細胞、Madin-Darby canine kidney（MDCK）II 細胞、又は human embryonic kidney 293（HEK293）細胞を用いて評価した（試験番号 14F147HUYA 及び HUYA-02-[redacted]）。

HBI-8000 は、阻害剤無しの条件において排出比 79.8 を示した。P-gp、BCRP 又は MRP2 に対する阻害剤を添加したところ、排出比はそれぞれ 27.2、9.9 又は 7.7 に低下した。この結果から、HBI-8000 は P-gp、BCRP 及び MRP2 の基質である可能性が示唆された（14F147HUYA）。HBI-8000 の取り込み量（Accumulation）は MATE1、OAT1、OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞とコントロール細胞間で同様（トランスポーター特異的取り込み比[Fold accumulation]は、2 未満）であり、この結果より検討した条件下では HBI-8000 の能動的取り込みは認められなかった。一方で、HBI-8000 の Fold accumulation は MATE2-K、OAT3 及び OCT2 発現細胞において 2 以上を示した（HUYA-02-[redacted]）。

HBI-8000 の Fold accumulation が 2 以上を示したトランスポーターに対して、各トランスポーター特異的阻害剤有無の条件にて確認試験を実施した（HUYA-02-[redacted]）。確認試験において、OAT3 及び MATE2-K に対する Fold accumulation は再現性が得られ、阻害剤の添加により HBI-8000 のトランスポーター特異的取り込みの減少（阻害剤無しの条件でそれぞれ 2.3 及び 2.9 であったが、阻害剤有りの条件ではそれぞれ 1.1 及び 1.2 に低下した）が認められた。一方、OCT2 に対する基質濃度 1 μM、10 分間の条件で得られた Fold accumulation は再現されず、このことより、HBI-8000 は OCT2 の基質ではないことが示された。以上の結果より、HBI-8000 は、P-gp、BCRP、MRP2、OAT3 及び MATE2-K の基質である可能性が示され、MATE1、OAT1、OATP1B1、OATP1B3 及び OCT2 の基質ではないと考えられた。

P-gp、BCRP、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3 及び OCT2 を HBI-8000 が阻害する可能性について、multidrug resistance 1 (MDR1)-MDCK 細胞、BCRP-MDCK 細胞、MDCKII 細胞又は HEK293 細胞を用いて評価した（試験番号 14F147 HUYA 及び HUYA-02-[redacted]）。HBI-8000 は P-gp 及び BCRP に対して阻害作用を示さず、IC_{50} はいずれも 100 μM 超であった（14F147 HUYA）。続いて、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3 及び OCT2 を HBI-8000 が阻害する可能性について評価した（HUYA-02-[redacted]）。HBI-8000 は、MATE2-K を介した metformin 輸送を濃度依存的に 59%阻害した。MATE2-K についての IC_{50} は 18.31 μM であった。HBI-8000 は、MATE1、OAT1、OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3 の各基質輸

送に対して弱い阻害作用を示し、阻害率は最大でそれぞれ 46%、29%、23%、34%及び 37%であった。IC_{50} は阻害率が 50%に達しなかったため算出しなかった。一方で HBI-8000 は、OCT2 の metformin 輸送に対して 50 μM 濃度で 57%の濃度依存的な誘導作用を示した。以上の結果より、HBI-8000 は、MATE2-K を阻害する可能性を示し、IC_{50} 値は 18.31 μM であった。また、HBI-8000 は MATE1、OAT1、OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3 のわずかに阻害する可能性がある。

2.4.4.7 要約

HBI-8000 の薬物動態学的特性をラット及びイヌを用いた *in vivo* 試験及び *in vitro* 試験で評価した。

HBI-8000 をラット及びイヌに単回及び反復投与したときの血漿中濃度は、概して用量比例的又は用量比を上回って増加した。イヌにおいて血漿中濃度は雌雄間で同様であったが、ラットにおいては、雄に比べて雌で高い血漿中濃度を示した。ラット及びイヌ共に反復投与による血漿中濃度の蓄積又は低下はほとんど認められなかった。

[^{14}C]HBI-8000 を部分有色ラットに単回経口投与したときの組織内の放射能は、大部分の組織において投与後 2～8 時間でピークに達した。消化管内容物を除いて、最高濃度の放射能は、膀胱、腎臓、肝臓などの排泄に関連する組織で認められた。投与後 120 時間から最終採取時点である投与後 840 時間までメラニンを含むブドウ膜のみに定量可能な放射能が認められ、本薬由来成分のメラニン親和性が示された。脳及び脊髄の放射能濃度が定量下限未満で推移したことから、HBI-8000 は血液脳関門を通過しないことが示された。

血漿蛋白結合率は、ラットで 86.4%～87.9%、イヌで 79.1%～80.1%、ヒトで 88.9%～89.4%であり、濃度依存性は認められなかった。血球移行率は、ラットで 48.1%～52.8%、イヌ全血で 52.5%～57.8%、ヒトで 59.2%～76.0%であり、ヒトにおいて濃度依存性が認められた。

HBI-8000 は NADPH 無しの条件下においてヒト肝ミクロソーム中で安定であり、NADPH 有りの条件下では軽度の代謝を示した。CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 に対する特異的な阻害剤を用いた CYP フェノタイピング試験において、CYP3A4 が HBI-8000 の代謝に関与することが示唆された。

HBI-8000 の代謝安定性及び CYP フェノタイピングを、リコンビナントヒト CYP 酵素でも評価した。HBI-8000 は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C19、CYP2C8 及び CYP2C9 によって代謝されず、CYP2D6 及び CYP3A4 によってわずかに代謝された。ラット及びヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 代謝試験において、液体クロマトグラフィーマススペクトロメトリー分析の結果、3 種の代謝物が少量認められたが、HBI-8000 及びその代謝物の合計に対してそれぞれ 2.9%以下であった。未変化体である HBI-8000 は合計に対して 95%超であった。ヒト肝細胞抽出液中に認められた代謝物は、概してラット肝細胞抽出液中においても認められた。いずれの代謝物も Phase 1 代謝によるものであり、Phasc 2 代謝による代謝物は検出されなかった。

[^{14}C]HBI-8000 をラットに単回経口投与したときの血漿、尿及び糞中の主成分は HBI-8000 であり、それぞれ試料中総放射能の 66.3%、64.96%及び 45.9 %を占めた。血漿中にはアミド加水分解体が試料中総放射能の 7.69%を占める少量成分として検出された。この代謝物は、*in vitro* 試験においてラット及びヒト肝細胞で生成された主要代謝物（M1）と一致した（図 2.4-3）。糞中には HBI-8000 の N-グルコース抱合体が総投与量の 8.99%を占める成分として検出された。胆汁中にも未変化体である HBI-8000 は検出されたものの、試料中総放射能の 5.82%を占める少量成分であった。

経口投与した放射能は主に糞中に排泄され、投与後 24 時間以内に大部分が回収された。尿中へ

の排泄は少なく、ケージ洗浄液中及びカーカスで検出された放射能は微量であった。吸収された薬物の割合は尿中及び胆汁中の合計回収率（23.81%）で表され、糞中に回収された放射能（65.77%）は未吸収薬物に由来する可能性を示している。

CYP 阻害試験より、HBI-8000 は、CYP2C8、CYP2C19 及び CYP3A4 に対して阻害作用を有することが示唆された。また、検討したいずれの CYP（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4）に対して TDI の可能性は認められなかった。

CYP 誘導試験において、HBI-8000 は、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4 を誘導する可能性が示唆された。また、HBI-8000 は、CYP1A2 及び CYP2B6 をわずかに誘導する可能性がある。

トランスポーター基質性試験において、HBI-8000 は、P-gp、BCRP、MRP2、OAT3 及び MATE2-K の基質である可能性が示された。トランスポーター阻害試験において、HBI-8000 は、MATE2-K を介した基質輸送を阻害する可能性が示された。また、HBI-8000 は、MATE1、OAT1、OAT3、OATP1B1 及び OATP1B3 の各基質輸送もわずかに阻害する可能性がある。

2.4.5 毒性試験

2.4.5.1 単回投与毒性試験

ラット及びイヌでの複数の反復投与毒性試験及び 1.25 mg/kg/day（強制経口投与）及び 10 mg/day（コートあるいは非コートの錠剤）の HBI-8000 をイヌに単回経口投与した試験で致死用量における急性期毒性を評価した。

雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに 10、20、又は 40 mg/kg の HBI-8000 を 2 日に 1 回（QOD）、20 日間強制経口投与した。その結果、40 mg/kg 群の雄 3 匹が体重減少及び軟便を示し死亡した。このことから、MTD は 40 mg/kg 未満と判断した。雄ビーグル犬に試験開始初日から 8 日目まで 1.0 mg/kg/日を投与し、その後、投与量を 1.0、1.5、2.0 及び 2.5 mg/kg に増加し、19 日目まで継続投与した。その結果、2 匹（1 匹は 1.0、2.0 及び 2.5 mg/kg を投与、別の 1 匹は 1.0、1.5 及び 2.0 mg/kg を投与）が、下血及びそれに伴う脱水に関連して死亡した。体重、一般状態観察所見は全用量群にみとめられた。死亡が生じたことから、MTD は 2.0 mg/kg 未満と判断した。

1.25 mg/kg/day（強制経口投与）及び 10 mg/day（コートあるいは非コートの錠剤）の HBI-8000 をイヌに単回経口投与した試験（試験番号 CR20176313）では、良好な忍容性が認められた。

2.4.5.2 反復投与毒性試験

2.4.5.2.1 ラットにおける HBI-8000 の 21 日間反復経口投与毒性試験（試験番号 11470-07）

最大耐量（MTD）を明らかにする目的で、雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに 10、20、又は 40 mg/kg の HBI-8000 を 2 日に 1 回（QOD）で 20 日間強制経口投与した。

試験期間中に 40 mg/kg 群の雄 3 匹が死亡した。3 匹の剖検所見では、肺の蒼白化、肝臓の変色、腹部脂肪の減少、消化管内の液体貯留、胃内のガス貯留及び胸水貯留が認められた。

全用量群で投与に関連する体重増加量の減少が認められた。

途中死亡動物を含め中用量及び高用量群の動物で肺の蒼白化及び脾臓における白色巣が認められた。高用量群の動物で投与に関連する白血球数（リンパ球）の減少、並びに好中球数及び単核球数の増加が認められた。わずかではあるが投与に関連するプロトロンビン時間延長が認められ、HBI-8000 投与に関連すると考えられた。血清化学的検査では、アルブミン、グロブリン及び総タンパク質レベルに投与に関連する変化が認められた。

10 mg/kg 群雌雄のラット 0 日目の $AUC_{(0-24)}$はそれぞれ 3660 及び 2980 ng·h/mL、並びに C_{max} はそれぞれ 961 及び 420 ng/mL であった（中用量及び高用量群の動物ではトキシコキネティクス分析[TK]は実施しなかった）。

40 mg/kg 群に体重減少及び雄 3 匹の死亡が認められたことから、MTD は 40 mg/kg 未満と判断された。

2.4.5.2.2 ラットにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-002）

4 週間反復経口投与試験及び 4 週間回復試験を実施し、毒性及び回復性を評価した。本試験では、雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに 9、18、又は 36 mg/kg の HBI-8000 を QOD で 27 日間強制経口投与した。

9 mg/kg 以上の用量群で、対照群と比較して被験物質投与に関連した平均体重の減少が認められた。投与に関連する有害な影響が血液学的検査値（全用量群）及び臨床生化学的検査値（18 mg/kg 以上の用量群）に認められた。血液学的変化では、総白血球数、好中球数、リンパ球数、網状赤血球数及び血小板数に投与に関連する減少があり、骨髄低形成と一致した。臨床生化学的検査値の変化には、用量依存的なグロブリン及びアルブミンの減少、並びに二次的なカルシウム減少があり、リンパ球数減少から示唆される免疫抑制の可能性と一致した。

腎重量は雄（9 mg/kg 以上の用量群）及び雌（18 mg/kg 及び 36 mg/kg 群）で減少した。36 mg/kg 群の複数の雄で胸腺の小型化が剖検で認められ、9 mg/kg 以上の用量群雌雄で胸腺重量が減少した。雌では、9 mg/kg 以上の用量群で下垂体及び顎下腺重量が減少した。形態学的変化との関連性は雌雄の胸腺にのみ認められた。被験物質投与に関連する病理組織学的所見としては、18 mg/kg 以上の用量群雌雄に骨髄低形成、リンパ組織におけるリンパ球枯渇に加え、膵臓表面に炎症が認められた。18 mg/kg 以上の用量群雌雄で、投与に関連するリンパ組織での濾胞性リンパ球枯渇が認められた。全用量群で投与に関連する脾臓表面の慢性／線維性炎症の発現の増加がみられ、36 mg/kg 群では癒着に進行した。

回復期間終了時に全ての病変は回復あるいは改善傾向を示していた。

生存率及び一般状態所見に基づき、MTD は 36 mg/kg 以上と判断された。9 mg/kg 群では顕著な病理組織学的影響は認められなかったが、白血球数、好中球数及びリンパ球数が減少したため、無毒性量（NOAEL）を判断することはできなかった。

2.4.5.2.3 ラットにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092736）

13 週間反復経口投与試験及び 4 週間回復試験を実施し、毒性及び回復性を評価した。本試験では、雌雄の Spraguc-Dawlcy 系ラットに 3、9、又は 27 mg/kg の HBI-8000 を QOD で 1 日目から 89 日目まで経口投与した。

27 mg/kg を投与した雌 1 匹で 12 日目に計画外の死亡が生じた。この動物では、剖検結果から死因を明らかにすることはできず、病理組織学的検査より細菌感染に伴う脳及び髄膜の炎症反応が生じた可能性が示唆された。

9 mg/kg 以上の用量群雌雄で被験物質投与に関連する体重増加量及び摂餌量の減少がみられた。3 mg/kg 以上の用量群の雄、及び 9 mg/kg 以上の用量群の雌における総白血球数及び大部分の種類の白血球数、27 mg/kg 群の雌雄における血小板数、9 mg/kg 以上の用量群雌雄における網状赤血

球数が、投与に関連して全般的に減少した。さらに、27 mg/kg 群の雌雄で平均赤血球容積及び平均赤血球ヘモグロビン量が減少し、3 mg/kg 以上の用量群の雄及び 9 mg/kg 以上の用量群の雌で平均赤血球ヘモグロビン濃度がわずかに増加した。9 mg/kg 以上の用量群雌雄における総白血球数、好中球数、リンパ球数及び網状赤血球数の変化は有害な影響と判断された。HBI-8000 投与に関連する臨床化学的検査値の変化には、27 mg/kg 群の雄及び 9 mg/kg 以上の用量群の雌における GGT 増加、9 mg/kg 以上の用量群雌雄における尿素窒素の増加、9 mg/kg 以上の用量群雌雄における総タンパク質、アルブミン、グロブリンの減少、27 mg/kg 群雌雄におけるアルブミン／グロブリン比の上昇、並びに 27 mg/kg 群雌雄におけるカルシウム及びカリウムの減少があった。

剖検所見としては、9 mg/kg 以上の用量群で腸間膜リンパ節の変色（雄）、脾臓の淡色巣及び癒着（雄）、胃の暗色化（雌）、並びに胸腺の小型化（雄）が、さらに 27 mg/kg 群で下垂体の蒼白化及び変色（雄）、甲状腺の蒼白化（雄）、盲腸の暗色化（雌）、腸間膜リンパ節の暗色化（雌）、胃の暗色化（雄）、空腸及び回腸の暗色化（雄）、並びに胸腺の小型化（雌）が認められた。被験物質投与に関連する臓器重量変化として、3 mg/kg 以上の用量群で前立腺重量の減少、9 mg/kg 以上の用量群で最終体重（雄）、下垂体、甲状腺（雄）及び胸腺（雄）重量の減少、27 mg/kg 群では最終体重（雌）及び胸腺（雌）重量の減少が認められた。被験物質投与と関連する病理組織学的変化として骨髄低形成、脾臓の単核球炎症及び線維症、心筋出血、心外膜における混合細胞性炎症、及び／又は心臓の心膜脂肪組織における混合細胞性炎症、肺胞の組織球集積、腸内出血、下垂体前葉の萎縮、リンパ組織でのリンパ球枯渇、甲状腺の濾胞拡張及び乳腺の萎縮が認められた。

回復期間終了時に全ての病変は消失あるいは回復していた。

以上の結果から、NOAEL は 3 mg/kg、MTD は 9 mg/kg と判断された。

2.4.5.2.4 イヌにおける HBI-8000 の 19 日間反復経口投与用量設定試験（試験番号 11296-07）

MTD を明らかにする目的で、摂餌下又は絶食下で溶液（強制経口投与）、カプセル、又は錠剤の HBI-8000 を 1 日 1 回（QD）でビーグル犬へ経口投与した。当初、1.0 mg/kg/日を投与し、その後、投与量を 1.0、1.5、2.0 及び 2.5 mg/kg に増加し、19 日目まで継続した。

2 匹（1 匹は錠剤及びカプセル製剤として 1.0、2.0 及び 2.5 mg/kg を投与、別の 1 匹は溶液として 1.0、1.5 及び 2.5 mg/kg を投与）が、おそらく下血及びそれに伴う脱水に関連して死亡した。

体重、一般状態観察所見及び臨床病理学的検査値に対する影響は全用量群で一致した。試験初期には、一部の動物で食欲不振、軟便、下痢、脱水及び摂餌量の減少が認められた。用量を変更した 14 日目以降試験終了まで、一般状態所見の頻度と程度が増加した。

死亡が生じたことから、MTD は 2.0 mg/kg 未満と判断された。

2.4.5.2.5 イヌにおける HBI-8000 の 4 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 1515-001）

4 週間反復経口投与試験及び 4 週間回復試験を実施し、毒性及び回復性を評価した。本試験では、0.25、0.75、又は 1.25 mg/kg の用量の HBI-8000 を、QD で 12 日間強制経口投与した。中用量及び高用量群の動物に重篤な毒性が発現したため、残りの試験期間では投与頻度を QOD に変更した。

投与期間中に瀕死状態を示した 1.25 mg/kg 群の雄 3 匹及び雌 1 匹を安楽殺した。病理組織学的検査の結果、骨髄低形成、並びにリンパ節、脾臓及び胸腺におけるリンパ球枯渇によって肺炎が

生じて瀕死に至ったことが示された。他のイヌは全て剖検予定日まで生存した。

被験物質投与に関連する一般症状所見として 0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄で活動低下、食欲不振、削痩及び水様／粘液／変色便が認められた。0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群における体重及び摂餌量には HBI-8000 投与に関連する影響が認められた。

ECG 波形の質的異常はなく、心拍数、PR 間隔及び QRS 時間では被験物質投与に関連する影響は認められなかった。11 日目の 1.25 mg/kg 投与後における雌の PR 間隔は、対照群と比較して統計学的に有意に延長した。11 日目及び 20 日目における 1.25 mg/kg 群の雌の QT 間隔は統計学的に有意に延長した。雌雄のデータを合算して溶媒対照群のデータと比較したところ、10%を超える QTc 延長が、0.75 mg/kg 群で 1 回（11 日目の投与後に）、1.25 mg/kg 群で 2 回（11 日目及び 20 日目の投与後に）生じた。QTc の変化は、少なくとも部分的には、被験物質投与に関連する血清カリウム及び血清カルシウムの低下に起因する可能性がある。QTc への作用は、0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg で有害な影響と判断された。

0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄で、被験物質投与に関連する赤血球系パラメータの減少が認められた。網状赤血球数は 0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄で対照群と比較して低く、これは他の採血時と比較して 2 週目でより顕著であった。リンパ球数は 2 週目に 0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄で対照群と比較して低かった。被験物質投与に関連する活性化部分トロンボプラスチン時間の延長は、対照群と比較して 1.25 mg/kg 群の雌雄で 2 週目に認められた。0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄で、対照群と比較して被験物質投与に関連する電解質の変化が認められた。1.25 mg/kg 群の雌 2 匹で 2 週目に測定可能なレベルのトロポニン I が認められた。0.75 mg/kg 以上の用量群で 2 週目及び／又は投与終了時に総タンパク質、アルブミン及びアルブミン／グロブリン比の散発的で軽度の低下が認められた。

雌雄のイヌの胸腺重量は全用量群で減少した。1.25 mg/kg/日群の雌雄で脾臓重量が減少し、病理組織学的検査で認められた脾臓のリンパ球枯渇と関連すると考えられた。回復期間の終了時点で、全ての臓器重量は全般的に対照群と同じレベルに回復した。

病理組織学的検査では、骨髄、リンパ節、脾臓及び胸腺に被験物質投与に関連する影響が認められた。1.25 mg/kg 群では骨髄低形成、並びにリンパ節、脾臓及び胸腺のリンパ球枯渇が認められ、4 匹に肺炎を生じ安楽殺に至ったと考えられた。0.75 mg/kg 群の雄 1 匹に軽度の骨髄低形成及び中等度の胸腺萎縮が生じた。これらの変化は 4 週間の回復期間終了時には認められなかった。これらの作用は 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 投与による有害な影響と判断された。

上記の試験結果より、NOAEL は 0.25 mg/kg と判断された。

2.4.5.2.6 イヌにおける HBI-8000 の 13 週間反復経口投与毒性試験及び 4 週間回復試験（試験番号 20092737）

13 週間反復経口投与試験及び 4 週間回復試験を実施し、毒性及び回復性を評価した。本試験では、0.25、0.75、又は 1.25 mg/kg の HBI-8000 を QOD で 13 週間強制経口投与した。

HBI-8000 の一般状態所見として、全用量群で歩行異常、四肢の使用制限及び円背位が認められたが、これらは断続的であり、無治療又は限定的（3～7 日間）な獣医学的治療（メロキシカム投与）で回復した。1.25 mg/kg 群の雄には主に試験の最初の 5 週間に体重増加量のわずかな減少が生じ、最初の 5～6 週間中の摂餌量減少と一致した。被験物質投与に関連する血液学的検査値における有害な影響として、90 日目に 0.75 mg/kg 以上の用量群雌雄における平均赤血球系パラメータ及び平均リンパ球数に減少が認められた。

被験物質投与に関連する剖検所見として、0.75 mg/kg 以上の用量群で肺の暗色化及び斑状の変色、1.25 mg/kg 群で雌雄の生殖器官の小型化、リンパ組織の暗色化及び異物沈着、脾臓の淡色巣、並びに皮下組織での異物沈着が認められた。

HBI-8000 投与に関連する臓器重量の変化としては、0.75 mg/kg 以上の用量群で精巣上体、前立腺、卵巣、精巣及び子宮重量の減少、1.25 mg/kg 群で最終体重（雄）、甲状腺（雄）及び胸腺重量（雄）の減少が認められた。また、0.75 mg/kg 以上の用量群で肺重量（雄）の増加、1.25 mg/kg 群で肺重量（雌）の増加が認められた。被験物質投与に関連する病理組織学的変化として、0.75 mg/kg 以上の用量群でリンパ組織のリンパ球枯渇、肺胞における混合細胞性炎症、並びに精巣上体、前立腺、子宮及び卵巣の萎縮が、1.25 mg/kg 群で甲状腺の濾胞萎縮、肺胞の出血、脾臓の結節性過形成、リンパ組織でのリンパ球枯渇、精巣精細管の萎縮、並びに膣及び子宮頚管の萎縮が認められた。

回復期間終了時に全ての病変は消失あるいは部分的に回復していた。

以上の結果に基づき、NOAEL は 0.25 mg/kg、MTD は 1.25 mg/kg 以上と判断された。

2.4.5.3 遺伝毒性試験

2.4.5.3.1 ネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号 9601677）

HBI-8000 における遺伝毒性を検討する目的で、細菌を用いる復帰突然変異試験を実施した。

ラット肝ミクロソーム（S9 mix）の存在下及び非存在下において、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）（TA1535、TA1537、TA98、及び TA100 株）及び大腸菌（*Escherichia coli*）WP2 *uvrA* に対しプレート法によって、細菌を用いる HBI-8000 の復帰突然変異試験を実施した。

S9 mix の存在下及び非存在下で、いずれの濃度の HBI-8000 曝露によっても、試験菌株に復帰変異体コロニー数の明らかな増加は認められなかった。

本 *in vitro* 変異原性試験の結果から、HBI-8000 に遺伝毒性作用は認められなかった。

2.4.5.3.2 ヒト末梢血リンパ細胞における *In Vitro* 哺乳類染色体異常試験（試験番号 9601678）

HBI-8000 における遺伝毒性を検討することを目的に、ヒト末梢血リンパ細胞における *in vitro* 哺乳類染色体異常試験を実施した。

ヒト末梢血リンパ細胞に 0.8～390 μg/mL の HBI-8000 を添加して、S9 mix の存在下及び非存在下で培養した。

HBI-8000 を添加した培養細胞では、分裂中期異常の発現率に統計学的に有意な増加は認められなかった。S9 mix 存在下の最高用量処理終了後には、培地に沈殿が認められた。

本 *in vitro* 染色体異常試験の結果、HBI-8000 に遺伝毒性作用は認められなかった。

2.4.5.3.3 ラットにおける *In Vivo* 小核試験（試験番号 9800415）

HBI-8000 における遺伝毒性を検討することを目的に、ラットを用いて強制経口投与による小核試験を実施した。

Sprague-Dawley 系ラットに 10、20、又は 40 mg/kg/日の HBI-8000 を 2 日間強制経口投与し、幼若赤血球（IE）について染色体損傷を示す小核の有無を計数した。

HBI-8000 を投与したラットでは小核を有する幼若赤血球（MIE）の明らかな増加は認められず、

本 *in vivo* 試験において HBI-8000 は染色体損傷を誘導しないことが示された。

2.4.5.4 がん原性評価

がん原性試験は実施しなかった。ICH S9 ガイドラインに従い、がん原性試験は不要と判断された。

2.4.5.5 生殖発生毒性試験

以下の理由により、生殖発生毒性試験は実施しなかった。

ICH S9 ガイドライン（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価についてのガイドライン、平成 22 年）に従い、雌雄の受胎能については、ラット（試験番号 1515-002 及び 20092736）並びにイヌ（試験番号 1515-001 及び 20092737）の反復投与試験における生殖器の詳細な検査により評価した。イヌの 13 週間反復経口投与毒性試験（試験番号 20092737）では、被験物質投与に関連する精巣所見（精巣の小型化、精巣重量減少及び精細管の萎縮）が認められ、これらの変化は部分的に回復した。HDAC 阻害活性に関連する類似した変化は、ロミデプシンでも認められている[イストダックス点滴静注用 10 mg 審議結果報告書 （平成 29 年 6 月 7 日）]。本薬は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であることから、これらの情報に基づき、さらなる受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験は不要と判断した。

ICH S9 ガイドラインでは、「抗悪性腫瘍薬の胚・胎児発生に関する試験は、製造販売承認申請までには実施すべきであるが、遺伝毒性が陽性で、分裂の速い細胞（例：陰窩細胞、骨髄など）を標的とする医薬品や、発生毒性を誘発することが既に知られている系統の医薬品について、これらの試験は製造販売承認申請においても必須でない」と記載されている。以下の情報に基づき、HBI-8000 はこの系統に該当すると考えられることから、ICH S9 ガイドラインに従い、胚及び胎児発生に関する毒性試験は不要と判断した。不要な試験の実施は、動物倫理（3R の原則）の観点からも不適切と考える。

- HBI-8000 に遺伝毒性は認められなかったが、骨髄が標的であり、ラット及びイヌにおける一般毒性試験で骨髄低形成が認められている。骨髄及びリンパ抑制が、いずれの種の反復経口投与毒性試験でも一貫した毒性作用として観察された
- HDAC 阻害作用に起因する催奇形性が複数の文献で報告されている（Eikel 2006; Menegola 2006; Giavini 2014）。HDAC 阻害剤のうち、entinostat（MS-275）及びボリノスタットは、それぞれ、ベンズアミドクラスの選択的クラス I HDAC 阻害剤及びヒドロキサム酸クラスの汎 HDAC 阻害剤を代表している（Eckschlager 2017）。entinostat（MS-275）及びボリノスタットはいずれも発生毒性を有する薬剤として知られている（Giavini 2014; Wise 2007）。化学構造の類似性に加え、HDAC アイソタイプの阻害における効力と選択性より、HBI-8000 は、ベンズアミドクラスの選択的クラス I HDAC 阻害剤に分類され、HBI-8000 は *in vitro* 及び *in vivo* で entinostat と同様の薬力学的プロファイルを示した（2.6.2 薬理試験概要文及び Ning 2012 を参照）。さらに、HBI-8000 は *ex vivo* において entinostat 及びボリノスタットと同レベルまで、ヒト PBMC 中のアセチル化ヒストン H3 レベルを上昇させた（2.6.2 薬理試験概要文）。したがって、HBI-8000 は、これら HDAC 阻害剤に共通する毒性として胚・胎児発生毒性を有する可能性が非常に高い。

HBI-8000 は進行がん患者の治療を目的とした医薬品であることから、ICH S9 ガイドラインに従い、出生前及び出生後の毒性試験は不要と判断した。

2.4.5.6 局所刺激性試験

HBI-8000 の予定臨床投与経路は経口であることから、局所刺激性試験は実施しなかった。

2.4.5.7 その他の毒性試験

2.4.5.7.1 原薬の潜在的不純物 不純物F* のネズミチフス菌及び大腸菌を用いる復帰突然変異試験（試験番号[redacted]08-368）

HBI-8000 原薬の合成に使用する出発物質であり、製剤の潜在的な不純物である 不純物F* の遺伝毒性を検討する目的で、ネズミチフス菌（*Salmonella typhimurium*）（TA1535、TA1537、TA98、及び TA100 株）及び大腸菌（*Escherichia coli*）WP2 *uvrA* 株を用いて、復帰突然変異試験を実施した。

陽性反応の判断基準を超える復帰変異コロニー数増加は、代謝活性化系の存在下で TA1537、TA98、及び TA100 株に認められた。1 回目の実験では代謝活性化系の非存在下で TA98 株も軽微に陽性であったが、確認実験では陰性であった。

以上の結果 不純物F* は遺伝毒性を示した。そのため、HUYABIO は最終出荷判定基準における本物質の規格を 5 ppm に設定し、出荷前の製剤からの遺伝毒性を有する出発物質の除去についての管理を継続する。

2.4.5.7.2 BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *In Vitro* 光毒性試験（試験番号 20245854）

HBI-8000 の光毒性を評価する目的で、BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 光毒性試験を実施した。陽性対照物質にはプロメタジンを用いた。

用量設定試験では、細胞毒性の IC_{50} 値を求めることはできなかった。本試験では、5 J/cm^2 の紫外線 A 波（UVA）、23 mJ/cm^2、24 mJ/cm^2、あるいは 25 mJ/cm^2 の紫外線 B 波（UVB）を照射した。細胞毒性の IC_{50} 値が求められない場合には、光毒性の評価には Mean photo effect（MPE）値が用いられる。プロメタジンの MPE 値が陽性基準値を超えていたのに対し、HBI-8000 の MPE 値は陽性基準値を下回っていた。

本試験の結果、HBI-8000 は光毒性反応を引き起こさないことが示された。

2.4.5.8 要約

毒性試験プログラムとして、Sprague-Dawley 系ラット及びビーグル犬を用いた用量設定試験、4 週間及び 13 週間毒性試験を実施した。

ラット及びイヌには類似する毒性徴候がみられた。摂餌量減少は体重減少を引き起こした。下痢は頻回に生じた。軽度～中等度の骨髄低形成が生じ、白血球数、好中球数、リンパ球数、網状赤血球数及び血小板数が減少した。さらに、リンパ節にはリンパ球枯渇が生じた。グロブリン、アルブミン及びカルシウム値は減少した。胃、小腸、大腸及び心筋における出血が、特に高用量群に低頻度で認められた。肺に出血及び線維症を伴う炎症が、特に高用量群に認められた。試験結果からは、HBI-8000 の曝露量が小さい場合には毒性が低下するため、QD 投与より QOD 投与の忍容性が良好であることが示された。

イヌ 4 週間試験で認められた QTc 延長は、被験物質投与に関連した血清カリウム及び血清カルシウムの減少に続発する変化と考えられた。イヌ 13 週間試験では QTc 間隔の変化は認められなかった。

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

ラットでは、3～40 mg/kg の用量範囲で QOD 投与した。MTD は 40 mg/kg QOD 未満、NOAEL は 3 mg/kg QOD であった。イヌでは、0.25～2.5 mg/kg の用量範囲で検討した。1～2.5 mg/kg QD の 21 日間投与では、MTD が 2 mg/kg 未満であることが示された。イヌ 4 週間試験では、0.25～1.25 mg/kg QD の 12 日間投与では顕著な毒性が生じたため、残りの試験期間では用法を QOD に変更した。13 週間の QOD 投与の結果、NOAEL は 0.25 mg/kg、MTD は 1.25 mg/kg 以上と判断された。

予定臨床用法用量（40 mg BIW 投与の 25 日目）における平均 $AUC_{0\text{-}tau}$ は 6010 ng·h/mL であり、ラット及びイヌにおける 13 週間反復経口投与試験で示された MTD での平均 $AUC_{(0\text{-}24)}$の 2.8～13.2 倍にあたる（表 2.4-1）。しかし、これらの毒性試験で認められた所見は、臨床試験で認められた有害事象と同等であると考えられた（2.7.4 臨床的安全性の概要参照）。

表 2.4-1 ラット及びイヌにおける 13 週間反復経口投与毒性試験の最大耐量でのトキシコキネティクスパラメータ

Species	MTD (mg/kg)	$AUC_{(0\text{-}24)}$ (ng·h/mL)	C_{max} (ng/mL)
Rat[a)]	9	1900 (male) 2150 (female)	245 (male) 467 (female)
Dog[b)]	>1.25	455 (male) 669 (female)	209 (male) 283 (emale)

$AUC_{0\text{-}24}$ = 0 時間から 24 時間までの血中濃度－時間曲線下面積; C_{max} = 最大血中濃度; MTD = 最大耐量.
a) ラットにおける 13 週間反復経口投与後 4 週間回復毒性試験（試験番号 20092736）89 日目
b) イヌにおける 13 週間反復経口投与毒性後 4 週間回復毒性試験（試験番号 20092737）89 日目

遺伝毒性試験の結果、HBI-8000 に遺伝毒性は認められなかった。しかし、HBI-8000 原薬の合成に使用する出発物質で製剤の潜在的な不純物である 不純物 F＊ には遺伝毒性が認められたため、HUYABIO は最終出荷判定基準における本物質の規格を 5 ppm に設定し、出荷前の製剤からの遺伝毒性を有する出発物質の除去についての管理を継続する。

BALB/c 3T3 マウス線維芽細胞を用いた *in vitro* 光毒性試験の結果、HBI-8000 は光毒性反応を引き起こさないことが示された。

2.4.6 総括及び結論

上述した非臨床薬理試験により、HBI-8000 の予想された作用機序が裏付けられた。HBI-8000 は、癌細胞にみられる複数の異常な、発現抑制された、過剰発現した、又は他の代償性シグナル経路を同時に標的とすることができる、エピジェネティック制御因子である。HBI-8000 は他の HDAC 阻害剤に既知のパターンと一致する遺伝子調節パターンを示した。

In vitro で、HBI-8000 はナノモルレベルの濃度範囲で、癌に関連するクラス I の複数の HDAC 及びクラス IIb の HDAC の 1 つに対する阻害能を示し、腫瘍細胞内でアセチル化ヒストン H3 の蓄積を促進した。ヒストン H3 脱アセチル化阻害に基づき、HBI-8000 のモル活性は entinostat 及びボリノスタットと同等であると認められた。HBI-8000 は、初代 ATL 細胞及び ATL 由来細胞株の双方で細胞の生存率を阻害することが示され、ATL 患者に対する HBI-8000 の潜在的有用性に関するさらなる検討を支持するエビデンスが提供された。

HBI-8000 は複数の *in vivo* ヒト腫瘍ゼノグラフトモデルにおいて単剤として活性を示した。全てのモデルで 25%～84%の腫瘍増殖阻害が認められ、体重減少はなかった。HBI-8000 は 1 日 1 回、

＊新薬承認情報提供時に不純物名を置き換え

2 日に 1 回及び 3 日に 1 回の投与頻度で腫瘍細胞増殖を抑制した。1 日 1 回投与と比較して、3 日に 1 回の投与レジメンではより低い総用量で同様の有効性が認められると共に、より良好な安全性プロファイルを示すと思われた。

ラット及びイヌにおける経口投与後の血漿中 HBI-8000 濃度は、いずれの種においても用量比例性をわずかに上回るようである。ラット及びイヌ共に反復投与による血漿中濃度の蓄積又は低下はほとんど認められなかった。

HBI-8000 は、主に膀胱、腎臓、肝臓などの排泄に関連する組織に分布した。投与後 120 時間から最終採取時点である投与後 840 時間までメラニンを含むブドウ膜にのみ定量可能な放射能が認められ、本薬由来成分のメラニン親和性が示された。

HBI-8000 は、部分的に CYP2D6 及び CYP3A4 を介して代謝された。*in vitro* においてラット及びヒト肝細胞中で同様の Phase 1 代謝物が同定され、ラットにおいては *in vivo* でも同一の代謝物が認められた。HBI-8000 は、CYP3A4、CYP2C19 及び CYP2C8 を阻害し、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4 を誘導する可能性を示した。HBI-8000 は、P-gp、BCRP、MRP2、OAT3 及び MATE2-K の基質となる可能性があり、MATE2-K を阻害する可能性がある。

複数の種における反復経口投与毒性試験で一貫して認められた毒性徴候には、食欲不振及び下痢などの胃腸障害、並びに骨髄及びリンパ球抑制があった。高用量ではこれらの作用が増大し、さらに消化管での粘膜出血及び精巣精細管の萎縮が認められた。複数の試験で散発的かつ局所的な心筋の炎症及び壊死の徴候、並びにイヌの 1 試験で偶発的に QTc 間隔が延長した。これらの心臓の変化の全てが、いずれの試験でも高用量群にのみ散発的に認められ、可逆性であった。これらの変化は、高用量の HBI-8000 を投与された動物における代謝条件の悪化に関連する可能性が考えられた。

全般的に、ラット及びイヌにおいて認められた HBI-8000 毒性の主要な標的組織は骨髄、リンパ組織及び消化管であった。他の組織は、より高い毒物曝露量で影響を受ける可能性がある。

まとめとして、HBI-8000 の非臨床安全性プログラムの結果は臨床プログラムを支持し、PTCL 及びヒト HTLV-1 によって発症する ATL の治療薬としての製造販売承認申請を支持する適切な安全性データとなった。

2.4.7 参考文献

Apuri S, Sokol L. An overview of investigational histone deacetylase inhibitors (HDACis) for the treatment of non-Hodgkin's lymphoma. Expert Opin Investig Drugs. 2016;25:687-96.

Bali P, Pranpat M, Bradner J, et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90. J Biol Chem. 2005;280(29):26729-26734.

Belrose G, Gross A, Olindo S, et al. Effects of valproate on Tax and HBZ expression in HTLV-1 and HAM/TSP T lymphocytes. Blood. 2011;118(9);2483-2491.

Blumenschein Jr GR, Kies MS, Papadimitrakopoulou VA, et al. Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor vorinostat (Zolinza™, suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) in patients with recurrent and/or metastatic head and neck cancer. Invest New Drugs. 2008;26(1):81-87.

Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. Nat Rev Drug

Discov. 2006;5(9):769-784.

Bonfils C, Kalita A, Dubay M, et al. Evaluation of the pharmacodynamic effects of MGCD0103 from preclinical models to human, using a novel HDAC enzyme assay. Clin Cancer Res. 2008; 14: 3441-3449.

Ceccacci E, Minucci S. Inhibition of histone deacetylases in cancer therapy: Lessons from leukaemia. Br J Cancer. 2016; 114: 605-611.

Chen J, Zhang M, Ju W, Waldmann TA. Effective treatment of a murine model of adult T-cell leukemia using depsipeptide and tis combination with unmodified daclizumab directed toward CD25. Blood. 2009;113(6):1287-1293.

Crump M, Coiffier B, Jacobsen ED, et al. Phase II trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in relapsed diffuse large-B-cell lymphoma. Ann Oncol. 2008;19(5):964-969.

Duan H, Heckman CA, Boxer LM. Histone deacetylase inhibitors down-regulate bcl-2 expression and induce apoptosis in t(14;18) lymphomas. Mol Cell Biol. 2005;25(5):1608-1619.

Eckschlager T, Plch J, Stilborova M, Hrabeta J. Histone deacetylase inhibitors as anticancer drugs. Int J Mol Sci. 2017; 18: 1414.

Eikel D, Lampen A, Nau H. Teratogenic effects mediated by inhibition of histone deacetylases: evidence from quantitative structure activity relationships of 20 valproic acid derivatives. Chem Res Toxicol. 2006;19(2):272-8.

Fournel M, Bonfils C, Hou Y, et al. MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. Mol Cancer Ther. 2008;7(4):759-768.

Fritzsche FR, Weichert W, Röske A, et al. Class I histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in renal cell cancer. BMC Cancer. 2008; 8: 381.

Frys S, Simons Z, Hu Q, et al. Entinostat, a novel histone deacetylase inhibitor is active in B-cell lymphoma and enhances the anti-tumor activity of rituximab and chemotherapy agents. Br J Haematol. 2015; 169: 506-519.

Giavini E, Menegola E. Teratogenic activity of HDAC inhibitors. Curr Pharm Des. 2014;20(34):5438-42.

Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. Biochem Pharmacol. 2007;74(5):659-671.

Glaser KB, Li J, Pease LJ, et al. Differential protein acetylation induced by novel histone deacetylase inhibitors. Biochem Biophys Res Commun. 2004;325(3):683-690.

Haberland M, Montgomery RL, Olson EN. The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. Nat Rev Genet. 2009;10(1):32-42.

Hasegawa H, Yamada Y, Tsukasaki K, et al. LBH589, a deacetylase inhibitor, induces apoptosis in adult T-cell leukemia/lymphoma cells via activation of a novel RAIDD-caspase-2 pathway. Leukemia. 2011;25(4):575-587.

Hasegawa H, Bissonnette RP, Gillings M, et al. Induction of apoptosis by HBI-8000 in adult T-cell leukemia/lymphoma is associated with activation of Bim and NLRP3. Cancer Sci. 2016; 107: 1124-33.

Iwanaga M, Watanabe T, Yamaguchi K. Adult T-cell leukemia: a review of epidemiological evidence. Front Microbio. 2012 Sep 10; 3:322: 1-13.

Luu TH, Morgan RJ, Leong L, et al. A phase II trial of vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) in metastatic breast cancer: a California Cancer Consortium study. Clin Cancer Res. 2008;14(21):7138-7142.

Menegola E, Di Renzo F, Bruccia ML, Giavini E. Inhibition of histone deacetylase as a new mechanism of

teratogenesis. Birth Defects Res C Embryo Today. 2006;78(4):345-53.

Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6(1):38-51.

Modesitt SC, Sill M, Hoffman JS, Bender DP. A phase II study of vorinostat in the treatment of persistent or recurrent epithelial ovarian or primary peritoneal carcinoma: a Gynecologic Oncology Group study. Gynecol Oncol. 2008;109(2):182-186.

Murata M, Towatari M, Kosugi H, et al. Apoptotic cytotoxic effects of a histone deacetylase inhibitor, FK228, on malignant lymphoid cells. Jpn J Cancer Res. 2000;91(11):1154-1160.

Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, et al. Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. Oncol Rep. 2007;18(4):769-774.

Ning Z-Q, Li Z-B, Newman MJ, et al. Chidamide (CS055/HBI-8000): a new histone deacetylase inhibitor of the benzamide class with antitumor activity and the ability to enhance immune cell-mediated tumor cell cytotoxicity. Cancer Chemother Phamacol. 2012; 69: 901-9.

Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, et al. Histone deacetylase inhibitors induce growth arrest and apoptosis of HTLV-1 infected T-cells via blockage of signaling by nuclear factor kappaB. Leuk Res. 2008;32(2):287-296.

Park J-H, Kim S-H, Choi M-C, et al. Class II histone deacetylase play pivotal roles in heat shock protein 90-mediated proteasome degradation of vascular endothelial growth factor receptors. Biochem Biophys Res Commun. 2008;368(2):318-322.

Oshima K, et al. Adult T-cell leukaemia/lymphoma. In: Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al, editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. WHO Classification of Tumours, revised 4th edition, Volume 2. Lyon, IARC; 2017, p363-7.

Rasheed WK, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. Expert Opin Investig Drugs. 2007;16(5):659-678.

Rasheed W, Bishton M, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. Expert Rev Anticancer Ther. 2008;8(3):413-432.

Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, et al. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. Cardiovascular Research. 2003;58(1):32-45.

Rodriguez-Gonzalez A, Lin T, Ikeda AK, et al. Role of the aggresome pathway in cancer: targeting histone deacetylase 6-dependent protein degradation. Cancer Res. 2008;68(8):2557-2560.

Roth SY, Allis CD. Histone acetylation and chromatin assembly: A single escort, multiple dances? Cell. 1996;87:5-8.

Schemies J, Sippl W, Jung M. Histone deacetylase inhibitors that target tubulin. Cancer Lett. 2009; 280(2): 222-232.

Tang J, Yan H, Zhang S. Histone deacetylase as targets for treatment of multiple diseases. Clin Sci. 2013; 124: 65-662.

Tsukasaki K, Utsunomiya A, Fukuda, et al. VCAP-AMP-VECP compared biweekly CHOP for adult T-cell leukemia-lymphoma: Japan Clinical Oncology Group Study JCOG9801. J Clin Oncol. 2007;25(34):5458-64.

Vansteenkiste J, Van Cutsem E, Dumez H, et al. Early phase II trial of oral vorinostat in relapsed or refractory breast, colorectal, or non-small cell lung cancer. Invest New Drugs. 2008;26(5):483-488.

Weichert W, Röske A, Gekeler V, et al. Histone deacetylases 1, 2 and 3 are highly expressed in prostate cancer and HDAC2 expression is associated with shorter PSA relapse time after radical prostatectomy. Br J Cancer. 2008;98(3):604-610.

Wise LD, Turner KJ, Kerr JS. Assessment of developmental toxicity of vorinostat, histone deacetylase inhibitor, in Sprague-Dawley rats and Dutch Belted rabitts. Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicolgy. 2007;80(1):57-68.

Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I. HDAC family: What are the cancer relevant targets? Cancer Lett. 2009;277(1):8-21.

Yamaguchi K (Principal researcher). Survey and comprehensive measures of HTLV-1 infection and related diseases in Japan [cited on 25 March 2020]. Summary research report 2011. Available from: https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/alphabet/htlv-1.html

イストダックス点滴静注用 10 mg 審議結果報告書 （平成 29 年 6 月 7 日）、5.5 項 生殖発生毒性. Available from: https://www.pmda.go.jp/drugs/2017/P20170628001/380809000_22900AMX00586000_A100_2.pdf

JSH ガイドライン 2018: 日本血液学会. 造血器腫瘍診療ガイドライン 2018 年版 [2019 年 9 月 20 日引用]. Available from: http://www.jshem.or.jp/gui-hemali/table.html

厚生労働省 2019: 厚生労働省平成 29 年(2017)患者調査の概要(2019 年公開)[cited on 20 September 2019]. Available from: https://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/kanja/17/index.html

医薬品医療機器総合機構（PMDA）2014: ポテリジオ点滴静注 20 mg 申請資料 Available from: https://www.pmda.go.jp/drugs/2014/P201400027/index.html