ツシジノスタット
ハイヤスタ錠 10mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.1 緒言

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
Akt	セリンスレオニンキナーゼ
AITL	血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫
ALCL	未分化大細胞リンパ腫
ALK	未分化リンパ腫キナーゼ
ATL	成人 T 細胞白血病リンパ腫
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
BCR-ABL	A fusion gene formed by the combination of the break point cluster region (bcr) and the c-Abelson (Abl) genes
CAS	ケミカル・アブストラクツ・サービス
CD	Cluster of differentiation
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
CTCL	皮膚 T 細胞リンパ腫
DLBCL	びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫
Flt-3	FMS 様チロシンキナーゼ-3
HDAC	ヒストン脱アセチル化酵素
Her-2	ヒト上皮増殖因子受容体-2
HSP	熱ショックたんぱく質
HUYA	HUYA Japan 合同会社
HUYABIO	HUYABIO International, LLC
IND	Investigational New Drug
INN	医薬品国際一般名称
JAN	日本医薬品一般的名称
JCOG	日本臨床腫瘍研究グループ
JSH	日本血液学会
NHL	非ホジキンリンパ腫
NMPA	中国国家薬品監督管理局
NOS	非特定型
NSCLC	非小細胞肺がん
PTCL	末梢性 T 細胞リンパ腫
SAHA	スベロイルアニリドヒドロキサム酸（ボリノスタット）
Sir2	Silent information regulator 2
US	米国
USAN	米国一般名
VEGF-R	血管内皮増殖因子受容体

目次

頁
略号一覧表 2
2.6.1 緒言 4
2.6.1.1 薬剤情報 5
2.6.1.2 薬理学クラス及び科学的背景 5
2.6.1.2.1 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 5
2.6.1.2.2 血液悪性腫瘍における HBI-8000 使用の科学的根拠 6
2.6.1.2.2.1 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 6
2.6.1.2.2.2 末梢性 T 細胞リンパ腫に対する現在の治療法 7
2.6.1.3 参考文献 8

2.6.1 緒言

HBI-8000（ツシジノスタット、chidamide）は、低ナノモル濃度でクラスIのヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の触媒ポケットを阻害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。

本申請資料内においては、HBI-8000、ツシジノスタット及びchidamideの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別に用いられている用語である。

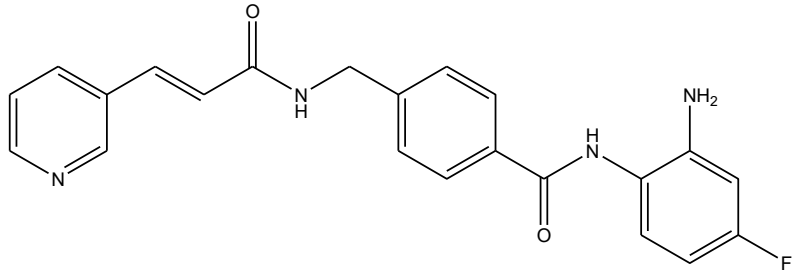
HBI-8000は、中国のShenzhen Chipscreen Biosciences Co, Ltd.（以下、Chipscreen）により最初に発見・開発された。米国サンディエゴ市に本社を置くHUYABIO International, LLC（以下、HUYABIO）は、本化合物について中国以外の国・地域での開発販売権を取得している。2014年にHUYABIOは、日本法人としてHuya Japan合同会社（以下、HUYA）を設立した。

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総局 [CFDA]）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、及び局所進行性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）の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相部分を完了した。悪性黒色腫患者を対象とした第Ib/II相試験の第II相部分は、現在進行中である。

日本では、2021年6月に「ハイヤスタ錠10mg」の販売名で「再発又は難治性の成人T細胞白血病リンパ腫」を効能・効果とした医薬品製造販売承認を取得しており、今般、再発又は難治性PTCLについて効能追加の承認申請を行うこととした。

2.6.1.1 薬剤情報

USAN:	Tucidinostat
INN:	Tucidinostat
JAN:	ツシジノスタット
化合物名 JAN:	*N*-(2-Amino-4-fluorophenyl)-4-[N-[(E)-3-(3-pyridyl) acryloyl)aminomethyl]benzamide *N*-(2-Amino-4-fluorophenyl)-4-{[(2*E*)-3-(pyridin-3-yl)prop-2-enamido]methyl}benzamide
Company codes:	HBI-8000, CS055, chidamide
CAS 登録番号:	1616493-44-7
分子式:	$C_{22}H_{19}FN_4O_2$
分子量:	390.4 g/mol
構造式:	

CAS = ケミカル・アブストラクツ・サービス; INN = 医薬品国際一般名称; JAN = 日本医薬品一般的名称: USAN = 米国一般名

2.6.1.2 薬理学クラス及び科学的背景

2.6.1.2.1 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、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）。HDAC1及びHDAC2は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）及び末梢性T細胞リンパ腫(PTCL)において正常なリンパ球組織と比較して高度に発現しており、HDAC1はDLBCLに比してPTCLにおいてより高度に発現していることが報告されている（Marquard 2009）。また、PTCLの病型に関わらず、HDAC1、HDAC2及びHDAC3を含むクラスIのHDACはPTCLにおいて正常細胞と比較して高度に発現しており、一方、クラスIIのHDACの発現レベルは正常細胞と同様であることも報告されている（古川 2018）。HDAC1及びHDAC2は、PTCLと類似の疾患である皮膚T細胞リンパ腫（CTCL）においても発現していることが報告されている（Marquard 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（NSCLC）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。

2.6.1.2.2 血液悪性腫瘍におけるHBI-8000使用の科学的根拠

2.6.1.2.2.1 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%で特徴的に生じ、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。

2.6.1.2.2.2 末梢性 T 細胞リンパ腫に対する現在の治療法

PTCL は、成熟した T 細胞から発生する非ホジキンリンパ腫の 1 つであり、一般的にアグレッシブで比較的治療抵抗性の、多様な病型から構成されている（Vose 2008）。

日本において、再発又は難治性の PTCL の現在の初回治療法及び救援治療法は、日本血液学会による造血器腫瘍診療ガイドラインに要約されている（JSH ガイドライン 2018）。

PTCL の初回治療法としては、CHOP（シクロフォスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチン及びプレドニゾン）を用いた併用化学療法が未分化リンパ腫キナーゼ（ALK）陽性未分化大細胞リンパ腫（ALCL）患者の治療に推奨されている。また、非特定型 PTCL（PTCL-NOS）、血管免疫芽球性 T 細胞リンパ腫（AITL）、又は ALK 陰性 ALCL 患者については、CHOP を含む併用化学療法が推奨されている。しかしながら、これらの PTCL 病型の患者について、CHOP を用いた治療効果は不十分であり、標準初回治療レジメンは確立していない。そのため、臨床試験への参加が推奨されている（JSH ガイドライン 2018）。

JSH ガイドライン 2018 では、再発又は難治性の PTCL 患者の救援療法に用いられる推奨標準療法は記載されていない。しかしながら、再発又は難治性 PTCL の救援療法として、他のアグレッシブリンパ腫に対するものと同様の他剤併用サルベージ化学療法のほか、再発又は難治性の CD30 陽性 ALCL ではブレンツキシマブベドチンも選択肢の 1 つである（JSH ガイドライン 2018）。ブレンツキシマブベドチンは再発又は難治性の CD30 陽性 ALCL に対して高い奏効率を示したが（武田薬品工業 2019）、CD30 陽性 ALCL は PTCL の病型の 1 つであり、そのため当該治療法が適用可能な患者は少数である。2020 年 2 月にアレクチニブが、再発又は難治性の ALK 陽性 ALCL に対して承認された。ALK 陽性 ALCL は、ALCL の病型の 1 つであり、ブレンツキシマブベドチンと同様に、本治療法が適用可能な患者数は限定的に過ぎない。2020 年 7 月の時点で、日本においては、上記の 2 剤の他に 4 剤（モガムリズマブ、フォロデシン、プララトレキサート及びロミデプシン）が再発又は難治性の PTCL を適応として承認されている。しかしながら、新たな治療法の登場にも関わらず、PTCL 患者の予後は依然として不良であり、推奨標準療法は確立されていない。そのため、再発又は難治性の PTCL について、有効かつ忍容性に優れた新たな治療法には強いアンメットメディカルニーズが存在する。

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た。PTCL について特異的な非臨床試験は実施していない。従って、PTCL のための効能追加承認申請に関する非臨床 CTD モジュールは本質的に初回承認申請時のモジュールと同一である。

2.6.1.3 参考文献

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.

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.

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

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

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.

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.

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.

Marquard L, Gjerdrum LM, Christensen Ib J, et al. Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. Histopathology. 2008; 53: 267-277.

Marquard L, Christian BP, Gjerdrum LM, et al. Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. Histopathology. 2009; 54: 688-698.

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.

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.

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.

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.

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.

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.

Vose J, Armitage J, Weisenburger D; International T-Cell Lymphoma Project. International peripheral T-cell and natural killer/T-cell lymphoma study: Pathology findings and clinical outcomes. J Clin Oncol. 2008; 26: 4124–30.

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.

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

古川雄祐. PTCLにおけるHDAC阻害薬の基礎的背景と治療的意義. 血液内科. 2018; 76(6): 824-830.

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 [cited on 20 September 2019]. Available from http://www.jshem.or.jp/gui-hemali/table.html

武田薬品工業. Adcetris injection interview form. Dec. 2019. ver.6. Available from: https://www.pmda.go.jp/PmdaSearch/iyakuDetail/ResultDataSetPDF/400256_4291425D1021_1_11

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

ツシジノスタット
ハイヤスタ錠 10mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.2 薬理試験の概要文

Huya Japan 合同会社

略号一覧表

略語・用語	内容
ADCC	抗体依存性細胞障害
ATL	成人 T 細胞白血病リンパ腫
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
BIW	週 2 回
CCC-HEK	ヒト胎児腎臓由来細胞
CCC-HEL	ヒト胎児肝臓由来細胞
CD	Cluster of differentiation
C_{max}	最高血漿中濃度
CTL	細胞傷害性 T 細胞
DLBCL	びまん性大細胞リンパ腫
DMSO	ジメチルスルホキシド
DNA	デオキシリボ核酸
ECG	心電図
FAS	TNF receptor superfamily, member 6
FOB	機能観察総合評価
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
GZMA	グランザイム A
HDAC	ヒストン脱アセチル化酵素
hERG	ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子
IC_{50}	50%阻害濃度
ICH	医薬品規制調和国際会議
IKr	急速活性化遅延整流性カリウムチャネル
LC_{50}	50%致死濃度
M	モル濃度
NCI-60	米国立がん研究所による培養ヒト腫瘍細胞株 60 種
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
NHL	非ホジキンリンパ腫
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
NSCLC	非小細胞肺がん
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
PCC	ピアソンの相関係数
PD	薬力学
PK	薬物動態
PTCL	末梢性 T 細胞リンパ腫
QTc	補正 QT
SAHA	スベロイルアニリドヒドロキサム酸（ボリノスタット）
SD	標準偏差
SE	標準誤差
SEM	平均値の標準誤差
TGI	完全増殖抑制

目次

頁
略号一覧表 2
2.6.2 薬理試験概要文 5
2.6.2.1 まとめ 5
2.6.2.1.1 *In Vitro* での HBI-8000 の阻害活性 5
2.6.2.1.2 HBI-8000 のナチュラルキラー細胞を介した細胞障害性 6
2.6.2.1.3 *In Vivo* での HBI-8000 の抗腫瘍活性 6
2.6.2.1.4 HBI-8000 の安全性薬理試験 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 6
2.6.2.2.1 *In Vitro* での HBI-8000 の阻害活性 6
2.6.2.2.1.1 HBI-8000 による HDAC 酵素阻害 6
2.6.2.2.1.2 ヒストン H3 アセチル化に対する HBI-8000 の効力 7
2.6.2.2.1.3 HBI-8000 の NCI-60 スクリーニング及び HDAC 阻害剤の COMPARE 解析（試験番号 1008NS06） 8
2.6.2.2.1.4 HBI-8000 による細胞増殖抑制 10
2.6.2.2.2 NK 細胞を介した HBI-8000 の細胞毒性 11
2.6.2.2.3 *In Vivo* での抗腫瘍活性 13
2.6.2.2.3.1 複数の *In Vivo* 腫瘍モデルでの HBI-8000 の有効性（試験番号 CXHL0502435） 13
2.6.2.2.3.2 ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルに HBI-8000 を異なる投与間隔で投与したときの有効性（試験番号 CXHB0801220） 16
2.6.2.3 副次的薬理試験 17
2.6.2.4 安全性薬理試験 17
2.6.2.4.1 *In Vitro* での安全性薬理試験 17
2.6.2.4.1.1 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） 17
2.6.2.4.2 一般毒性試験における *In Vivo* 安全性薬理評価 18
2.6.2.4.2.1 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） 18
2.6.2.4.2.2 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） 19
2.6.2.4.2.3 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） 20
2.6.2.4.2.4 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） 21
2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用 22
2.6.2.6 考察及び結論 22
2.6.2.7 参考文献 26

表

頁
表 2.6.2-1 HBI-8000、entinostat 及びボリノスタットの構造とヒト組替え HDAC に対する IC_{50} 値 7
表 2.6.2-2 HDAC 阻害剤に対する HBI-8000 の GI_{50} 値の COMPARE 解析 10
表 2.6.2-3 形質転換細胞株及び正常細胞に対する HBI-8000（chidamide）及び entinostat（MS-275）の 50%細胞増殖阻害濃度（GI_{50}） 11
表 2.6.2-4 HBI-8000 をラットに反復投与したときの初回投与（Day-1）又は反復投与（Day-27）における血漿中濃度の概要（試験番号 1515-002） 24

図

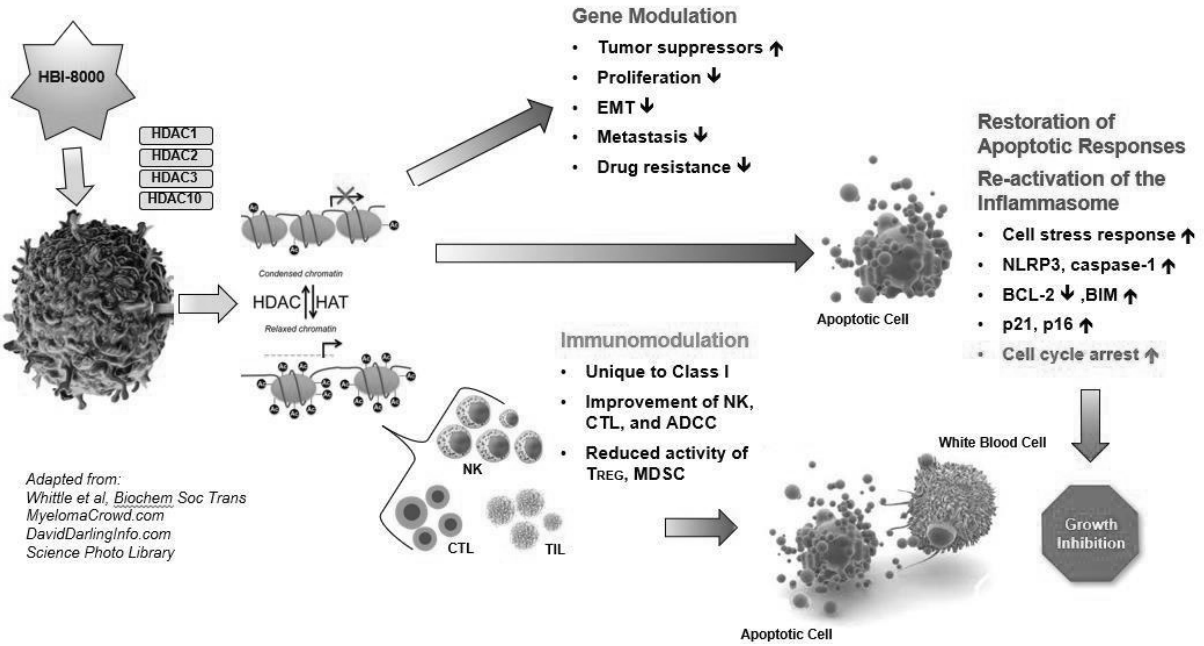
頁
図 2.6.2-1 HBI-8000 の作用機序 5
図 2.6.2-2 がん細胞及びヒト PBMC 中での HBI-8000 によるヒストンアセチル化の誘導 8
図 2.6.2-3 ヒト骨髄性白血病由来K562細胞の免疫細胞を介した細胞溶解作用に対するHBI-8000 による促進 12
図 2.6.2-4 HBI-8000 による NK 機能に関与するたんぱく質発現の促進 13
図 2.6.2-5 ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 (CHI)の *In Vivo* での抗腫瘍効果 15
図 2.6.2-6 ヒト腫瘍細胞ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 の *In Vivo* での抗腫瘍効果 16
図 2.6.2-7 ヌードマウスに移植した HCT-8 の腫瘍体積に及ぼす HBI-8000 の投与間隔の影響の経時的曲線 17

2.6.2 薬理試験概要文

2.6.2.1 まとめ

HBI-8000 は、低ナノモル濃度でクラス I のヒストン脱アセチル化酵素（HDAC）の触媒ポケットを阻害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 の作用機序を図 2.6.2-1 に示す。

図 2.6.2-1 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

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

HBI-8000 の HDAC アイソタイプの阻害における選択性と効力を一連のヒト組替え HDAC たんぱく質を用いて解析した。HBI-8000 は、HDAC のクラス I に属する HDAC1、HDAC2 及び HDAC3、並びにクラス IIb の HDAC10 をナノモルレベルで阻害することが認められた。これらの酵素の 50%阻害濃度（IC_{50}）は 67～160 nM の範囲であった（Ning 2012）。

HBI-8000 は、ヒト子宮頸部腺がん HeLa 細胞及び末梢血単核細胞（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）。

ヒト腫瘍由来細胞株パネル NCI-60 を用いて、HBI-8000 の細胞増殖抑制効果を 5 用量（10^{-4} M～10^{-8} M）で検討した（試験番号 1008NS06）結果、HBI-8000 は、6 種の白血病由来細胞株を含む広範囲のヒト腫瘍由来細胞株の増殖を抑制し、IC_{50} は 1～10 μM 未満の範囲であった。HBI-8000 は非形質転換細胞に対し毒性を示さなかった（IC_{50} は 100 μM 以上）。

ヒト腫瘍由来細胞 18 株で細胞増殖抑制を検討した試験において、HBI-8000 は entinostat（MS-275）と同様に、低 μM 濃度範囲で大多数の腫瘍細胞株の増殖を抑制した。一方、HBI-8000、及び

HBI-8000 に比して程度は低いものの MS-275 も同様に、正常なヒト胎児腎臓由来細胞（CCC-HEK）株及びヒト胎児肝臓由来細胞（CCC-HEL）株に対する毒性が顕著に低く、HBI-8000 の細胞傷害反応が正常細胞とがん細胞とで異なっていることが示された（Ning 2012）。

2.6.2.1.2 HBI-8000 のナチュラルキラー細胞を介した細胞障害性

健常ドナー由来の PBMC に HBI-8000 を添加することにより、ナチュラルキラー（NK）細胞を介した細胞傷害性を評価する標的細胞として用いられている K562 細胞に対する溶解性が著しく高まった。標的細胞溶解活性は HBI-8000 を 100 nM で添加した際に最大となり、この濃度では 48 時間が最適なインキュベーション時間であった。健常ドナー2 例からの PBMC に 100 nM の HBI-8000 を添加して 48 時間後に、NK 細胞の活性化に関与する受容体たんぱく質である CD16（低親和性免疫グロブリン G 受容体）及びナチュラルキラーグループ 2D（NKG2D）、並びに細胞傷害性酵素であるグランザイム A（GZMA）の大幅な発現増加が認められた（Ning 2012）。

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

HBI-8000 は、ヒト結腸がん HCT-8 細胞、ヒト肺がん A549 細胞、ヒト肝がん BEL-7402 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞のマウスゼノグラフトなどのいくつかの *in vivo* 腫瘍モデルにおいて、単剤で活性を示した（試験番号 CXHL0502435）。本試験において、HBI-8000 は 12.5～50 mg/kg の用量範囲で、20～28 日間、各腫瘍モデルに経口投与された。検討した全腫瘍モデルで、25%～84%の腫瘍増殖抑制効果が認められ、体重減少は認められなかった（試験番号 CXHL0502435）。HBI-8000 は上記用量範囲で、HCT-8、A549、BEL-7402 及び MCF-7 を用いたヒトがんゼノグラフトモデルにおいて用量依存的に腫瘍サイズと腫瘍重量を抑制した（Ning 2012）。ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトマウスモデルを用いて、HBI-8000 の異なる投与間隔の影響を評価した（試験番号 CXHB0801220）。HBI-8000 は、1 日 1 回、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。

2.6.2.1.4 HBI-8000 の安全性薬理試験

中枢神経系及び呼吸器系に対する影響を、ラットにおける反復投与毒性試験（4 週間及び 13 週間）で実施した詳細な一般状態観察及び機能観察総合評価法（FOB）により、並びにイヌにおける反復投与毒性試験（4 週間及び 13 週間）で実施したケージ外からの観察及び詳細な一般状態観察により評価した。心血管系に対する *in vitro* の影響は hEGR（ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子）チャネル電流に対する影響に基づき評価した。心血管系に対する *in vivo* の影響は、イヌにおける反復投与毒性試験（4 週間及び 13 週間）でのケージ外からの観察、詳細な一般状態観察及び心電図検査（ECG）に基づき評価した。安全性薬理評価は ICH S7A ガイダンスに準じて実施し、試験は全て GLP 適合下で実施された。

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

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

2.6.2.2.1.1 HBI-8000 による HDAC 酵素阻害

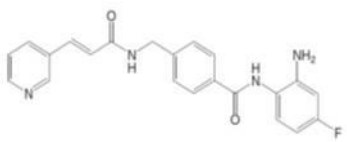
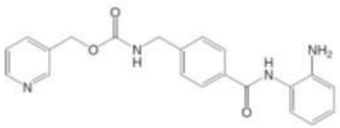
参考資料[4.3-28] Ning 2012

HDAC アイソタイプ酵素の阻害に対する HBI-8000 の選択性及び効力を一連のヒト組替え HDAC たんぱく質を用いて *in vitro* で評価し、entinostat（MS-275）及びボリノスタット（SAHA）

と比較した。Entinostat 及びボリノスタットは、それぞれベンスアミド及びヒドロキサム酸クラスの HDAC 阻害剤を代表している（Eckschlager 2017）。

表 2.6.2-1 に示すように、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 をナノモル濃度で阻害することが認められた。HBI-8000 のこれらの酵素に対する IC_{50} は 67～160 nM の範囲にあった。HBI-8000 の酵素阻害プロファイルは、MS-275 と同様であったが、その阻害活性は MS-275 より高かった。SAHA と異なり、HBI-8000 及び MS-275 はいずれも HDAC6 を阻害せず、また両者はいずれも HDAC8 及び HDAC11 に対して SAHA と比較して低い阻害活性を示した（表 2.6.2-1）。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。

表 2.6.2-1 HBI-8000、entinostat 及びボリノスタットの構造とヒト組替え HDAC に対する IC_{50} 値

Compound	Structure	IC_{50} (μM)[a]										
		Class I				Class IIa				Class IIb		Class IV
		1	2	3	8	4	5	7	9	6	10	11
Chidamide[b] (HBI-8000)		0.095	0.160	0.067	0.733	>30	>30	>30	>30	>30	0.078	0.432
Entinostat (MS-275)		0.262	0.306	0.499	2.700	>30	>30	>30	>30	>30	0.254	0.649
Vorinostat (SAHA)		0.038	0.144	0.006	0.038	>30	>30	>30	>30	0.010	0.021	0.028

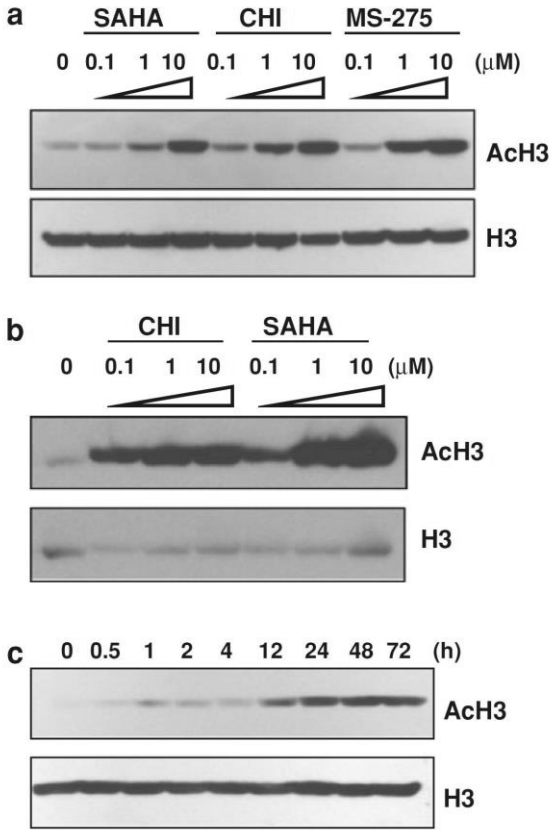
HDAC = ヒストン脱アセチル化酵素; IC_{50} = 50%阻害濃度
[a] Chidamide（HBI-8000）又は entinostat（MS-275）の HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC6、HDAC8、HDAC10 及び HDAC11 に対する IC_{50} 値は、9 種の濃度（0.001～30 μM の範囲）で 2 回実施した実験結果に基づく。HDAC4、HDAC5、HDAC7 及び HDAC9 に対する IC_{50} 値は、3、10 及び 30 μM の化合物濃度での 2 回の実験結果に基づく。30 μM 超の IC_{50} 値は、検討した最高濃度まで顕著な阻害が認められなかったことを意味する。
[b] 結果は、3 回の独立した実験結果からの平均値として示した。
原典: Ning 2012 – Table 1

2.6.2.2.1.2 ヒストン H3 アセチル化に対する HBI-8000 の効力

参考資料[4.3-28] Ning 2012

HeLa 細胞及び PBMC から単離した核抽出物中のヒストン H3 のアセチル化を測定することにより、ヒトがん細胞及び PBMC 中の HDAC 活性に対する HBI-8000 の作用を評価した。図 2.6.2-2a,b に示すように、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。HeLa 細胞を 1 μM 濃度の HBI-8000 と共にインキュベートしたとき、ヒストン H3 のアセチル化の増加は処理後 30 分～60 分の時点で認められ、24 時間～72 時間の時点で最大に達した（図 2.6.2-2c）。

図 2.6.2-2　がん細胞及びヒト PBMC 中での HBI-8000 によるヒストンアセチル化の誘導



AcH3 = アセチル化ヒストン H3；CHI = chidamide = HBI-8000；H3 = ヒストン H3；MS-275 = entinostat；SAHA = ボリノスタット
[a] HeLa 細胞を、図示した濃度の HBI-8000（CHI）、SAHA、又は MS-275 と共に 24 時間インキュベートした。
[b] 健常人からのヒト PBMC を図示した濃度の HBI-8000 又は SAHA と供に ex-vivo で 24 時間インキュベートした。
[c] HeLa 細胞を、1 μM 濃度の HBI-8000 と共に図示した時間インキュベートした。
ヒストンを全細胞溶解物より単離し、ヒストン H3 アセチル化の状態を抗アセチル化ヒストン H3 抗体及び再プローブした抗ヒストン H3 抗体を用いたウェスタン免疫ブロット法により解析した。
原典：Ning 2012 – Figure 1.

2.6.2.2.1.3　HBI-8000 の NCI-60 スクリーニング及び HDAC 阻害剤の COMPARE 解析（試験番号 1008NS06）

参考資料[4.2.1.1-1] 1008NS06

米国国立がん研究所のヒト腫瘍由来細胞株パネル（NCI-60）での 59 種の細胞株を用いて 5 用量（10^{-4} M～10^{-8} M）の HBI-8000 の細胞増殖抑制活性を検討した。50%増殖阻害濃度（GI_{50}）、細胞分裂阻害活性の尺度である完全増殖阻害濃度（TGI）、及び細胞傷害性の尺度である 50%致死濃度（LC_{50}）を求めた。59 の細胞株を用いて試験が行われた。

6 種類の白血病由来細胞株［CCRF-CEM、HL-60 (TB)、K-562、MOLT-4、RPMI-8226、及び SR］に対する増殖抑制活性を評価した。HBI-8000 は、用いた全ての白血病由来細胞株に対し、マイクロモルレベルの低濃度で増殖抑制活性を示し、GI_{50} は 1.04～10.4 μM であった。TGI は、PRMI-8226（39.8 μM）を除く白血病細胞株で 10^{-4} M 超の濃度で得られると考えられた。HBI-8000 は、細胞毒性を有さず、LC_{50} は 10^{-4} M を超えると考えられた。白血病由来細胞株に対する HBI-8000 の *in vitro* での増殖抑制活性は、他の腫瘍細胞株、特に *in vivo* 試験でも評価されている（2.6.2.2.3.1

項参照）ヒト非小細胞肺がん（NSCLC）由来 A549 細胞（GI_{50}＝8.74 μM）及びヒト乳がん由来 MCF-7 細胞（GI_{50}= 2.11 μM）に対する増殖抑制活性と同等であった。

HDAC 阻害剤である depsipeptide、ボリノスタット、belinostat、entinostat（SNDX275）及び HBI-8000 について GI_{50} による COMPARE 解析を行った。平均 $\log_{10} GI_{50}$ でみると、HBI-8000 は他の HDAC 阻害剤より効力が低かった（depsipeptide＞belinostat＞ボリノスタット＞entinostat＞HBI-8000）。HBI-8000 は腫瘍サブパネル解析で選択性が全く示されなかったが、検討した他の HDAC 阻害剤とは異なる GI_{50} プロファイル／パターンが示された。

entinostat（SNDX275）、belinostat、ボリノスタット及び depsipeptide と HBI-8000 との相関性について、GI_{50} 値に基づく COMPARE マトリックス解析を行った（表 2.6.2-2）。HBI-8000 を含む全ての HDAC 阻害剤はそれぞれの自身との完全な相関関係（1.0）にあり、この解析の妥当性が認められた。検討した 5 つの化合物間での相関関係は弱かった。ベンズアミドクラスに属するもう一つの化合物である entinostat（SNDX275）と HBI-8000 とのピアソン相関係数（PCC）は 0.422 で被検化合物の中では最良の相関関係にあったが、他の HDAC 阻害剤と HBI-8000 との間の相関性はごく低かった。

表 2.6.2-2 HDAC 阻害剤に対する HBI-8000 の GI_{50} 値の COMPARE 解析

Compound	**Compound**	**PCC***
HBI-8000	HBI-8000	1.0
HBI-8000	Entinostat (NSC706995)	0.422
HBI-8000	Belinostat (NSC726630)	0.306
HBI-8000	Vorinostat (NSC701852)	0.238
HBI-8000	Depsipeptide (NSC630176)	0.255

HDAC = ヒストン脱アセチル化酵素
*PCC = ピアソン相関係数
原典：1008NS06 – Table I

GI_{50} 値に基づく HBI-8000 に感受性の高い腫瘍細胞株／腫瘍タイプとして、黒色腫（7 株）、非小細胞肺がん（3 株）、乳がん（2 株）、腎がん（2 株）及び卵巣がん（シスプラチン抵抗性である OVCAR-3 及び OVCAR-5 の 2 株）が同定された。多くの細胞株は、最小濃度（約 1 μM）で HBI-8000 に感受性を示した。HBI-8000 の効力のデータは、他の HDAC 阻害剤のデータと異なっていた。

これらの結果から、白血病を含む数多くの腫瘍タイプ由来の細胞株に対する HBI-8000 の IC_{50} は低マイクロモルで得られ、一方細胞毒性は低い（大半の細胞株で LC_{50} が 100 μM 超）ことが示された。ある種の腫瘍タイプ又は細胞株は、バックグラウンドの変異又はエピジェネティック変化が HBI-8000 の作用によって無効化されるために、HBI-8000 に対してより高い感受性を示す可能性がある。

2.6.2.2.1.4 HBI-8000 による細胞増殖抑制

参考資料[4.3-28] Ning 2012

3 種の白血病由来細胞株（骨髄性白血病由来 HL-60 細胞株、骨髄単球性白血病由来 28SC 細胞株及び急性 T 細胞白血病由来 Jurkat 細胞株）、並びに 1 種のリンパ種由来細胞株（B 細胞リンパ腫由来 Raji 細胞株）を含む 18 種のヒト腫瘍由来細胞株を用いて実施した細胞増殖抑制試験において、HBI-8000 及び entinostat（MS-275）は同様に低マイクロモル濃度範囲でほとんどの腫瘍細胞の増殖を抑制したものの、一部の腫瘍細胞に対しては抑制しなかった（表 2.6.2-3）。特に、B 細胞リンパ腫由来 Raji 細胞株及び急性 T 細胞白血病由来 Jurkat 細胞株の GI_{50} 濃度は、肺がん由来 A549 細胞株、乳がん由来 MCF-7 細胞株及び結腸がん由来 HCT-8 細胞株などの他の固形がん由来細胞株における濃度と同等であった。一方で HBI-8000 は、MS-275 に比べ、ヒト胎児腎臓（CCC-HEK）及び肝臓（CCC-HEL）由来の正常細胞に対して毒性が顕著に低く、HBI-8000 に対する細胞毒性反応性が正常細胞とがん細胞で異なることが示された。

表 2.6.2-3 形質転換細胞株及び正常細胞に対する HBI-8000（chidamide）及び entinostat（MS-275）の 50%細胞増殖阻害濃度（GI_{50}）

Cell line	Cell type	GI_{50} (μM)	
		HBI-8000	MS-275
Transformed cell lines			
A549	Lung	8.2 ± 2.9	10.8 ± 3.4
DU-145	Prostate	25 ± 6.7	13 ± 4.3
LNCaP	Prostate	4.0 ± 1.2	2.5 ± 0.8
MCF-7	Breast	5.0 ± 1.3	6.3 ± 1.7
MB-231	Breast	7.9 ± 2.1	5.0 ± 2.0
SK-OV-3	Ovarian	>50	>50
HeLa	Cervical	40 ± 8.3	25 ± 4.2
SK-N-SH	Neuroblastoma	>50	>50
HCT-8	Colon	7.2 ± 1.7	1.2 ± 0.3
SMMC	Liver	16 ± 3.2	20 ± 2.8
HepG2	Liver	4.0 ± 1.5	3.2 ± 1.1
PANC-1	Pancreas	6.3 ± 2.1	5.0 ± 1.7
SGC-7901	Gastric	>50	>50
U2OS	Osteosarcoma	2.0 ± 0.6	1.0 ± 0.3
Raji	B-cell lymphoma	4.0 ± 0.9	6.3 ± 1.4
HL-60	Myelogenous leukemia	0.4 ± 0.1	0.32 ± 0.1
28SC	Myelomonocytic leukemia	5.8 ± 1.2	4.0 ± 0.8
Jurkat	Acute T-cell leukemia	6.3 ± 0.9	6.3 ± 1.1
Normal cells			
CCC-HEK	Human fetal kidney cells	>100	30 ± 6.9
CCC-HEL	Human liver cells	>100	40 ± 5.7

結果は少なくとも 3 回独立して実施した実験から求めた平均値 ± SE として示されている。
DMSO = ジメチルスルホキシド; GI_{50} = 50% 増殖抑制濃度.
注：chidamide = HBI-8000, MS-275 = entinostat
各細胞株は 5～10 × 10^3 cells/well（個々の細胞株の増殖速度に準じて）となるよう 96-well plate に播種した。24 時間後に、被験物質を異なる濃度で添加し、引き続き細胞を 72 時間培養し、その後 CellTiter 96 Aquous One Solution Reagent (Promega, Madison, WI, USA)を 20 μL/well 添加した。プレートを 37 °C で 2 時間インキュベートした後、96-well 用のマイクロプレートリーダーを用いて 490 nm の波長での吸光度を測定した。細胞の生存率は、$A_{treatment}/A_{control}$ × 100%（A は 490 nm の波長での吸光度を現す）として求めた。対照物質に対して 50%の割合で細胞増殖を抑制した被験物質の濃度を GI_{50} とした。全ての化合物は DMSO に溶解し、培養液中の最終 DMSO が 0.1%以下となるよう 1000 倍に希釈して培養液に添加した。全ての試料について 2 回評価し、個々の実験は少なくとも 3 回繰り返した。
原典：Ning 2012 – Table 2

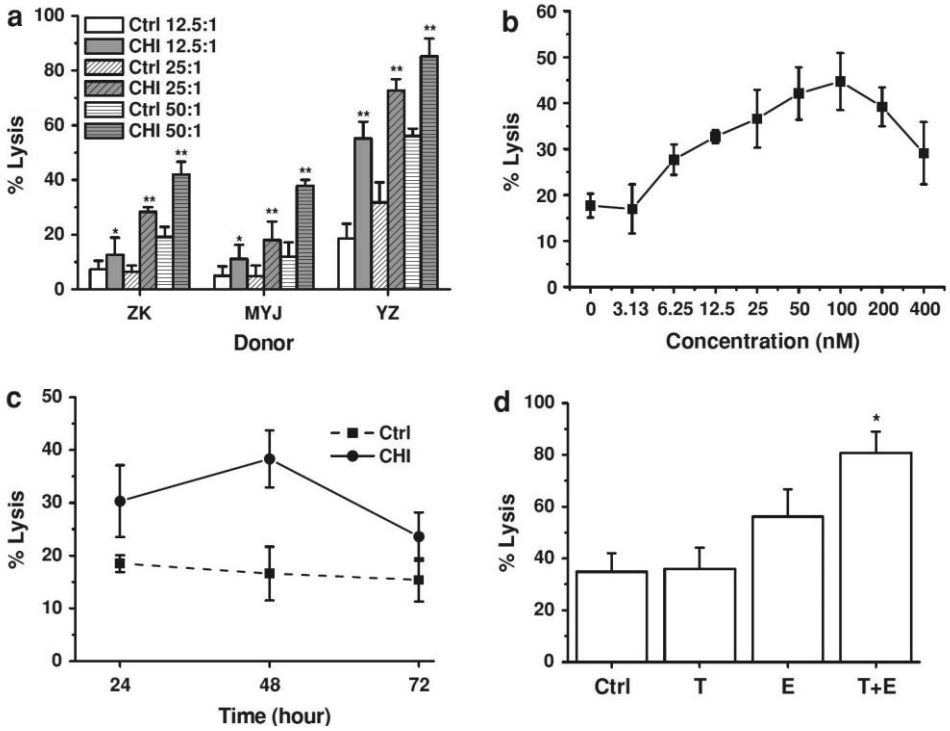
2.6.2.2.2 NK 細胞を介した HBI-8000 の細胞毒性

参考資料[4.3-28] Ning 2012

NK 細胞のソースとして、健常ドナーからの PBMC を用いて免疫系を介した HBI-8000 の抗腫瘍効果の潜在能力を検討した。健常ドナーの PBMC は HBI-8000 とインキュベートした後、免疫系を介した腫瘍細胞溶解性を評価するために、ヒト慢性骨髄性白血病由来 K562 細胞株と共にインキュベートした。図 2.6.2-3a に示す様に、健常ドナーからの 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での標的細胞である K562 細胞の溶解作用は有意に高まった。最大の標的細胞溶解活性は 100 nM の HBI-8000 添加時に認められ（図 2.6.2-3b）、この濃度では 48 時間が最適培養時間であった（図 2.6.2-3c）。HBI-8000 は、200 nM 濃度で添加後 72 時間時点までは、溶媒を添加した場合と比較して、PBMC に対して細胞毒性作用を発揮しなかった。標的の K562 細胞のみに HBI-8000 を添加して培養したとき、HBI-8000 を添加しなかった PBMC の共存下で細胞溶解性は促進されなかったが、標的細胞及びエフェクター細胞の双方に HBI-8000 を添加したときには、エフェクター細胞のみに添加した場合と比較して細胞溶解性は顕著に高ま

った（図 2.6.2-3d）。

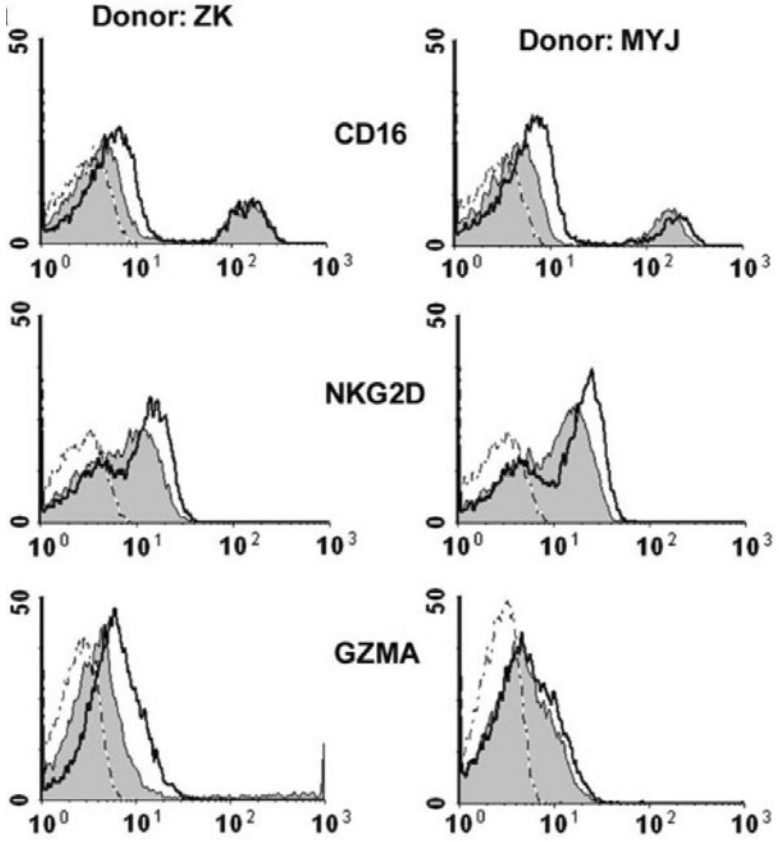
図 2.6.2-3 ヒト骨髄性白血病由来 K562 細胞の免疫細胞を介した細胞溶解作用に対する HBI-8000 による促進



CHI = HBI-8000; Ctrl = 対照; PBMC =末梢血単核細胞; SE = 標準誤差; T = 標的細胞; E = エフェクター細胞; T + E = 標的細胞とエフェクター細胞; *E/T* = 標的細胞に対するエフェクター細胞の割合
a: 健常ドナーから単離した PBMC を 100 nM の HBI-8000 で 48 時間処理し、次に異なる割合の K562 細胞と共に培養し、その後細胞毒性アッセイにより評価した。**P* < 0.05 及び***P* < 0.01 は HBI-8000 での処理を行わなかったエフェクター細胞の値と比較したものである。統計解析はスチューデントの *t* 検定により実施した。
b: PBMC を図示した異なる濃度の HBI-8000 で 48 時間処理した後、*E/T* = 25:1 で細胞毒性アッセイを行った。
c: PBMC を HBI-8000 100 nM で図示した時間処理した後、*E/T* = 25:1 で細胞毒性アッセイを行った。
d: HBI-8000 100 nM の存在下、又は非存在下で 48 時間処理したときの *E/T* = 25:1 での細胞毒性アッセイの結果を示す ; Ctrl は PBMC 及び K562 細胞の両者について HBI-8000 非存在下で処理した結果を; T は K562 細胞のみを HBI-8000 で処理した結果を ; E は PBMC のみを HBI-8000 で処理した結果を ; T + E は PBMC と K562 細胞の両者を HBI-8000 で処理した結果をそれぞれ示している。**P* < 0.05 はエフェクター細胞のみを HBI-8000 で処理したときの値と比較したものである。結果は、独立して実施した 3 回の試験結果より得た平均値 ± SE として示した。
原典：Ning 2012 – Fig. 3

免疫細胞を介した細胞溶解作用に関与することが知られているたんぱく質パネルの発現レベルをフローサイトメトリーを用いて解析した。図 2.6.2-4 に示すように、ドナー2 例から採取して *ex vivo* で 100 nM の HBI-8000 を添加して 48 時間培養した PBMC において、NK 活性化受容体として機能するたんぱく質である CD16 及び NKG2D、並びに細胞傷害性酵素であるグランザイム A（GZMA）の顕著なアップレギュレーションが認められた。

図 2.6.2-4 HBI-8000 による NK 機能に関与するたんぱく質発現の促進



CHI = chidamine; PBMC = 末梢血単核細胞
2 名の異なる健常ドナーから単離した PBMC を 100 nM の HBI-8000 で 48 時間処理し、処理前と処理後の図示した各タンパクの発現をフローサイトメトリーにより分析した。網掛けしたヒストグラムは未処理細胞の染色を、実線で示したオープンヒストグラムは処理細胞の染色を、及び点線で示したオープンヒストグラムは対照アイソタイプで処理した細胞の染色をそれぞれ示している。
原典：Ning 2012 – Fig. 4a

2.6.2.2.3 *In Vivo* での抗腫瘍活性

2.6.2.2.3.1 複数の *In Vivo* 腫瘍モデルでの HBI-8000 の有効性（試験番号 CXHL0502435）

参考資料[4.2.1.1-2] CXHL0502435
参考資料[4.3-28] Ning 2012

白血病／リンパ腫モデルは検討されなかったが、HBI-8000 の *in vivo* 抗腫瘍活性を、ヒト結腸がん HCT-8 細胞、ヒト非小細胞肺がん（NSCLC）A549 細胞、ヒト肝がん BEL-7402 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞を用いたマウスゼノグラフトモデルにおいて評価した（試験番号 CXHL0502435）。これら 4 種のヒト由来の腫瘍に対する HBI-8000 の *in vivo* での抗腫瘍活性は、Ning 2012 によっても報告されている。

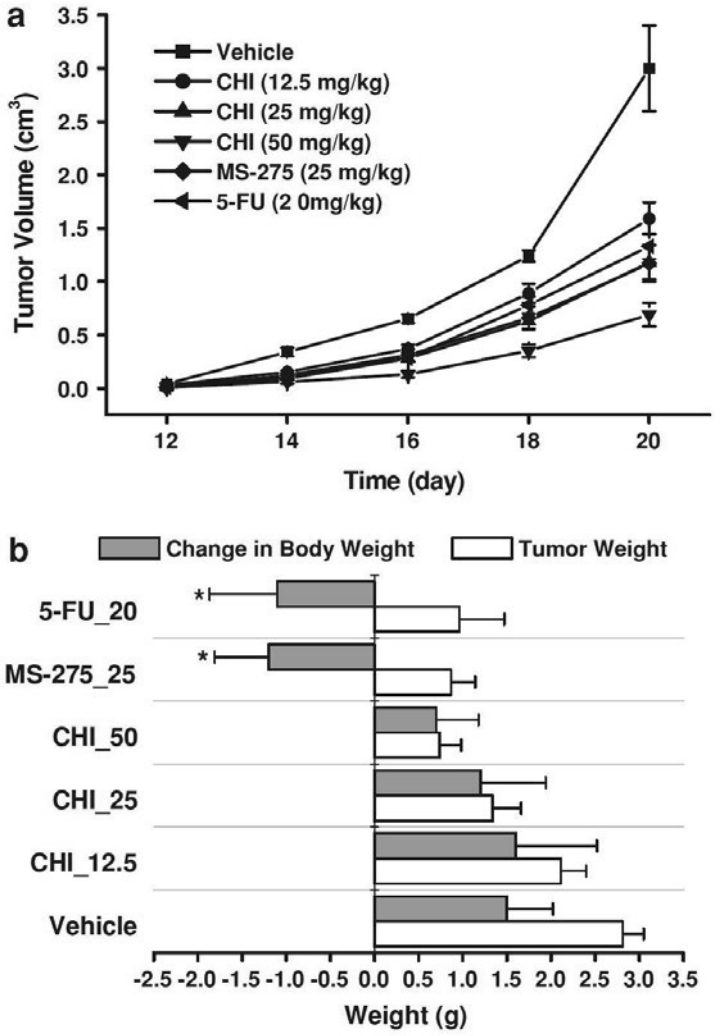
ヒト腫瘍細胞ゼノグラフトモデルを用いた試験においては、溶媒対照群と共に、entinostat（MS-275）及び 5-fluorouracil（5-FU）を陽性対照として評価した。雄のヌードマウスに HCT-8、A549 及び BEL-7402 細胞を移植し、雌のヌードマウスに MCF-7 細胞を移植した。薬剤投与（各群 8～10 匹）は細胞移植後 3 日目に開始した。0.2%カルボキシメチルセルロース及び 0.1% Tween 80 で溶解した HBI-8000 及び entinostat を、腫瘍の種類に応じて、1 日 1 回 20～28 日間経口投与した。5-FU は 2 日に 1 回腹腔内投与した。腫瘍の長径及び短径を 3 日に 1 回測定し、腫瘍体積を算出し

た。試験終了時にはマウスを安楽死させ腫瘍を分離し、腫瘍重量を測定した。体重は最終投与翌日に測定した。腫瘍増殖抑制率は、[（対照群の平均腫瘍重量－投与群の平均腫瘍重量）／対照群の平均腫瘍重量]×100%から算出し、スチューデントの *t* 検定は腫瘍重量で行った。

HBI-8000 は全てのヒト腫瘍細胞ゼノグラフトモデルにおいて 25%～84%の腫瘍増殖抑制を示した。HBI-8000 の用量 12.5 mg/kg～50 mg/kg の範囲において、腫瘍増殖抑制率は、ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルでは 24.9%～73.7%及び 38.4%～67.7%（2 回の独立した試験）、ヒト NSCLC A549 細胞ゼノグラフトモデルでは 45.1%～79.3%及び 47.9%～84.1%（2 回の独立した試験）、ヒト肝がん BEL-7402 細胞ゼノグラフトモデルでは 29.2%～71.4%（単一試験）、及びヒト乳がん MCF-7 細胞ゼノグラフトモデルでは 49.3%～70.0%（単一試験）であった（試験番号 CXHL0502435）。

ヒト由来腫瘍ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 の用量－抗腫瘍活性相関は、Ning 2012 によっても報告されている。図 2.6.2-5a 及び図 2.6.2-5b に示すように HBI-8000 は、ヒト結腸がん HCT-8 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。50 mg/kg 用量では、陽性対照薬剤である 5-FU（20 mg/kg）及び entinostat（MS-275）（25 mg/kg）と比較して同等以上の有効性を示した。また、HBI-8000 は、上記の用量範囲で忍容性を示したものの、陽性対照薬剤では有意な体重減少が認められた（図 2.6.2-5b）。

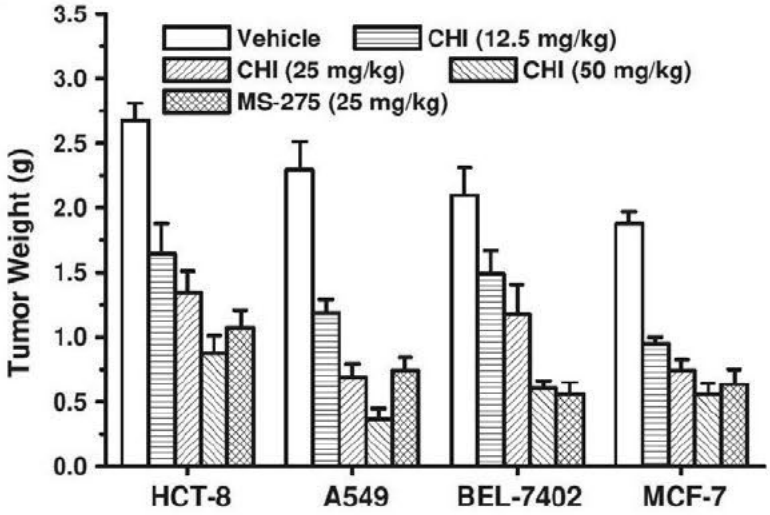
図 2.6.2-5 ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 (CHI)の *In Vivo* での抗腫瘍効果



5 FU = 5-fluorouracil; CHI = chidamide
CHI = HBI-8000、MS-275 = entinostat
体重変化量は day0 と day21 の体重より算出した。
*：MS-275 又は 5-FU を投与した群と 50 mg/kg の HBI-8000 を投与した群の間で $P < 0.05$（スチューデントの *t* 検定）であった。
原典; Ning 2012 – Figure 2a and 2b

同様の有意で用量依存性を示す HBI-8000 の増殖抑制効果は、ヒト NSCLC A549 細胞、ヒト肝がん BEL-7402 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞ゼノグラフトモデルにおいても観察された（図 2.6.2-6）。全 4 種のヒト固形がん由来細胞ゼノグラフトモデルにおいて、HBI-8000 の用量 50 mg/kg での有効性は、entinostat（MS-275）の用量 25 mg/kg と同等、又はそれ以上であった。

図 2.6.2-6 ヒト腫瘍細胞ゼノグラフトモデルにおける HBI-8000 の *In Vivo* での抗腫瘍効果



CHI = chidamide
CHI = HBI-8000、MS-275 = entinostat
ヒト結腸がん HCT-8 細胞、ヒト肺がん A549 細胞、ヒト肝がん BEL-7402 細胞及びヒト乳がん MCF-7 細胞を移植したヌードマウスに CHI 又は MS-275 を上述のように投与し、試験の終了時点でマウスを安楽死させ、各マウスについて腫瘍重量を測定した。各群には 8～10 匹のマウスを用いた。
原典: Ning 2012 – Fig. 2c

2.6.2.2.3.2 ヒト結腸がん HCT-8 細胞ゼノグラフトモデルに HBI-8000 を異なる投与間隔で投与したときの有効性（試験番号 CXHB0801220）

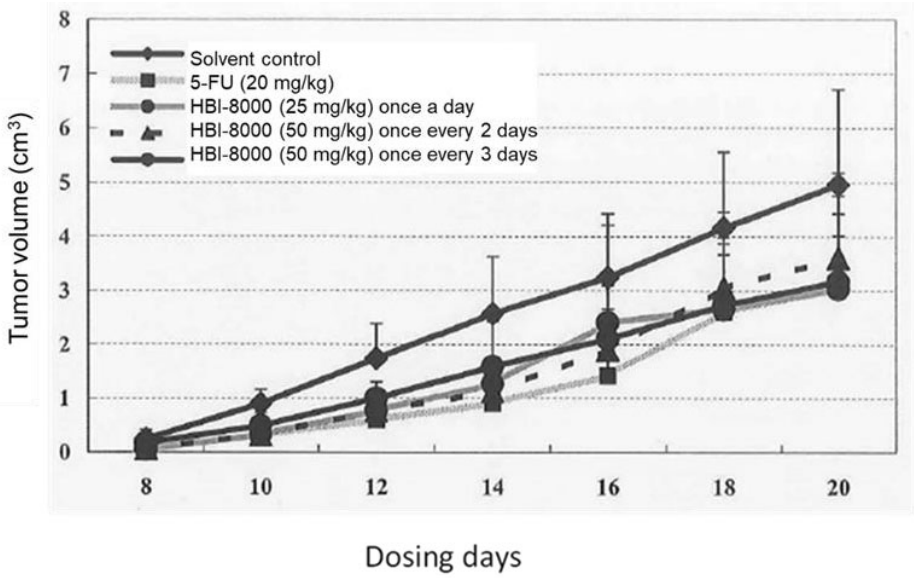
参考資料[4.2.1.1-3] CXHB0801220

HBI-8000 は、ヒト腫瘍由来細胞ゼノグラフトヌードマウスにおいて 1 日 1 回投与による抗腫瘍効果を示したこと（試験番号 CXHL0502435）に加え、動物において持続的な血漿中濃度推移を示したこと（再発又は難治性の ATL を対象とした初回申請資料、2.6.4 薬物動態概要文、2.6.4.3.1 項参照）より、臨床における投与スケジュールのデザインの参考にするため、HBI-8000 を間歇投与したときの抗腫瘍効果を評価した（試験番号 CXHB0801220）。

本試験では、雄のヌードマウス（15～17 g、50 匹）に、ヒト結腸がん HCT-8 細胞移植後、10 匹／群、5 群（3 つの HBI-8000 投与群、陽性対照薬剤 5-FU 群及び溶媒対照群）に無作為割付けし、投与期間は 20 日間とした。腫瘍移植後 3 日目に投与を開始し、最終投与翌日（1 日 1 回 25 mg/kg 投与群、2 日に 1 回 50 mg/kg 投与群及び 5-FU 投与群）又は 2 日目（3 日に 1 回 50 mg/kg 投与群）に動物を安楽死させ、腫瘍重量を測定して以下の式で各群の腫瘍増殖抑制率を算出した：[（対照群の平均腫瘍重量－投与群の平均腫瘍重量）／対照群の平均腫瘍重量]×100%。また、腫瘍重量のデータを用いてスチューデントの *t* 検定を行った。投与開始後 8 日目から 2 日に 1 回腫瘍サイズを測定し、体積を算出した。

投与開始後 8 日目～20 日目における各群の腫瘍体積の経時的変化を図 2.6.2-7 に示す。

図 2.6.2-7 ヌードマウスに移植した HCT-8 の腫瘍体積に及ぼす HBI-8000 の投与間隔の影響の経時的曲線



5-FU = 5-fluorouracil
原典: CXHB0801220 – Figure 1

本試験結果から、HBI-8000 を 2～3 日間隔で投与したときでも有意な抗腫瘍効果が示された。総投与量が等しい場合、2 日に 1 回 50 mg/kg 投与の効果は、基本的に 1 日 1 回 25 mg/kg の効果に等しく、3 日に 1 回投与（総投与量は 1 日 1 回投与の 70%に相当）の場合でも、ほぼ同等の腫瘍増殖抑制効果が維持された。

2.6.2.3 副次的薬理試験

HBI-8000 についての副次的薬理試験は実施していない。

2.6.2.4 安全性薬理試験

2.6.2.4.1 *In Vitro* での安全性薬理試験

2.6.2.4.1.1 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）

評価資料[4.2.1.3-1] 080415.IVZ

hERG（ヒト ether-à-go-go 関連遺伝子）チャネル電流（急速活性化遅延整流カリウムチャネルである 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（平均値 ± 平均値の標準誤差[SEM]）2.5 ± 0.7%（n = 3）であったが、溶媒対照による阻害は 0.2 ± 0.1%（n = 3）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（$P < 0.05$）。溶解度限界のため、HBI-8000 の hERG カリウム電流に対する阻害作用の 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。

同一条件下で、陽性対照（60 nM のテルフェナジン）による hERG カリウム電流の阻害は（平

均値 ± 標準偏差 [SD]）78.1±4.5%（n＝2）であった。この結果により、hERG 阻害に対する試験系の感度が確認された。

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

Sprague-Dawley 系ラット（試験番号 1515-002 及び 20092736）並びにビーグル犬（試験番号 1515-001 及び 20092737）を用いた 4 週間（28 日間）及び 13 週間（90 日間）GLP 適合の毒性試験におけるケージ外からの観察、詳細な一般状態観察、及び機能観察総合評価法（FOB）に基づき、HBI-8000 の *in vivo* 安全性薬理を評価した。

2.6.2.4.2.1 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）

評価資料[4.2.3.2-1] 1515-002

雌雄の Sprague-Dawley 系ラットに HBI-8000 を 2 日に 1 回 4 週間経口投与、4 週間回復期間とする GLP 適合の 4 週間経口投与毒性試験を実施した。雄（n＝15／投与群）及び雌（n＝15／投与群）のラットに 9、18、又は 36 mg/kg の HBI-8000 を強制経口投与した。28 日目にラット 10 匹／性／群を安楽殺した。残りの 5 匹／性／群には 4 週間の回復期間を設定した。

試験期間中、全ての動物に対して病的状態、死亡、外傷及び摂餌・摂水の状況を 1 日 2 回観察した。

本試験の各動物について週 1 回詳細な一般状態観察を実施した。全ての動物について-7 日目に投与期間前の一般状態観察を実施した。皮膚、被毛、眼、耳、鼻、口腔、胸部、腹部、外性器、四肢、呼吸器系及び心血管系に対する影響、流涎などの自律神経系に対する影響、並びに振戦、痙攣、ハンドリングへの反応及び異常行動などの神経系に対する影響を観察した。

機能観察総合評価（FOB）は、盲検下で実施した。FOB は本試験の主試験動物全てに対し、投与期間前、及び投与期間中は週 1 回、投与約 1 時間後に、ホームケージ内、ハンドリング時、オープンフィールド内などにおいて実施した。オープンフィールド内での評価は、20 × 20 × 8 インチ（51 × 51 × 20 cm）の黒色プレキシガラス ™ 製観察ボックスに入れた動物を 3 分間以上観察した。FOB の観察項目は Moser（Moser 1988; Moser 1996）に基づいて実施した。活動及び覚醒状態、姿勢、立ち上がり回数、異常行動、間代性及び強直性運動、歩行、運動量、常同行動、正向反射、刺激（接近、クリック音、尾の痛覚、及び接触）への反応、閉眼、瞳孔反応、立毛、眼球突出、流涙、流涎及び呼吸などの観察項目を評価した。また、排便及び排尿の量、定性的／定量的測定値を記録した。四肢の握力は Edward and Parker（Edwards 1977）の記載に基づき測定した。痛覚は Ankier（Ankier 1974）の記載に基づき、52 ± 1°C に設定したホットプレート上の各動物の痛覚（熱）刺激に対する反応潜時の測定によって評価した。また、体重及び体温を測定した。

中枢神経系に対する影響

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。認められた一般状態所見は、対照動物にも低頻度で発現又は存在が認められたため、被験物質に関連しないと判断された。

対照群と比較して認められた体重減少を除き、FOB に被験物質投与に関連する所見はなかった。感覚運動神経系及び自律神経系に関連する測定項目に被験物質投与に関連する所見はなかった。

呼吸器系に対する影響

ケージ外からの観察、詳細な一般状態観察及び FOB の結果、HBI-8000 に起因する呼吸器系に対する影響は認められなかった。

2.6.2.4.2.2 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）

評価資料[4.2.3.2-2] 20092736

雄（n = 15／投与群）及び雌（n = 15／投与群）の Sprague-Dawley 系ラットに HBI-8000 を 2 日に 1 回投与 13 週間経口投与、4 週間回復期間とする GLP 適合の 13 週間経口投与毒性試験を実施した。ラットには 3、9、又は 27 mg/kg の HBI-8000 を強制経口投与した。90 日目にラット 10 匹／性／群を安楽殺した。残りの 5 匹／性／群には 4 週間の回復期間を設定した。

本主試験では、以下の測定及び観察項目を評価した：一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、FOB、眼科学的検査、臨床病理学的検査（血液学的検査、血液凝固検査、臨床化学的検査及び尿検査）、トキシコキネティクス、剖検、臓器重量、並びに病理組織学的検査。

ケージ外からの観察は、毎日 1 回、投与期間 1 週前から開始して投与期間及び回復期間中継続し、投与日には投与後 1～3 時間に実施した。投与開始前から回復期間を通じ、詳細な一般状態観察を実施した日には、ケージ外からの観察は実施しなかった。投与期間 1 週前から開始して少なくとも週 1 回、動物をケージから取り出して、詳細な一般状態観察を実施した。

FOB は、5 匹／性／群及び主試験での代替動物に対して、投与期間前（-7 日目）、投与期間中には週 1 回（1、9、15、23、29、37、43、51、57、65、75、79 及び 85 日目）、投与後 1 時間時点で実施した。評価は盲検下で実施した（動物の投与群は特定されなかった）。

FOB では以下の項目を評価した：ホームケージ内での観察（姿勢、不随意運動［間代性及び強直性］、及び泣鳴）、ホームケージ外での観察（取り出し易さ、ハンドリング時の反応、流涙、閉眼、流涎、及び立毛）、オープンフィールド内観察（不随意運動［間代性及び強直性］、歩行スコア、異常歩行、運動スコア、覚醒状態、常同行動、異常行動、及び立ち上がり回数）、手技によるテスト（接近反応、接触反応、驚愕反応、尾の痛覚反応、瞳孔反応、正向反射、握力、着地時後肢開脚、及び体温）、並びに運動能（全般的、自発運動量、及び聴覚反応）。

中枢神経系に対する影響

対照群と比較して 3、9、又は 27 mg/kg 群では、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。投与期間中に毒性学的意義がある影響がなかったことから、回復期間中の FOB は実施しなかった。

呼吸器系に対する影響

ケージ外からの観察、詳細な一般状態観察及び FOB の結果、HBI-8000 に起因する呼吸器系に対する影響は認められなかった。

2.6.2.4.2.3 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）

評価資料[4.2.3.2-3] 1515-001

本試験では最初、ビーグル犬 5 匹／性の 3 投与群にそれぞれ 0.25、0.75、又は 1.25 mg/kg の HBI-8000 を 1 日 1 回 4 週間経口投与した。対照群の 5 匹／性には、溶媒である 10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン及び 10%プロピレングリコールを含有する pH 2.5（±0.1）の脱イオン水を投与した。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 回目投与した後は、計 28 日間となるまで 2 日に 1 回投与した。投与期間完了後、所定の動物（2 匹／性／群）には 28 日間の回復期間を設定した。

全ての動物について病的状態、死亡、外傷及び摂餌・摂水の状況を 1 日 2 回観察した。ケージ外からの観察は 1 日 1 回所定の時間に実施した。試験期間を通じて、各動物の詳細な一般状態観察を週 1 回実施した。皮膚、被毛、眼、耳、鼻、口腔、胸部、腹部、外性器、四肢、呼吸器系及び心血管系に対する影響、流涎などの自律神経系に対する影響、並びに振戦、痙攣、ハンドリングへの反応及び異常行動などの神経系に対する影響を評価した。

全ての動物には投与期間前、並びに 1、2、3、4、及び 8 週目の投与約 30 分（±5 分）後に心電図（ECG）検査を実施した。ECG の記録前には、測定値の過剰な変動及びアーチファクトを最小化するため、動物に不要な興奮を引き起こさないよう可能な限りの注意を払った。標準的 ECG（10 誘導）は 50 mm/秒で記録した。第 II 誘導（又は適切な誘導）を用いて ECG、RR、PR、及び QT 間隔、QRS 時間、並びに心拍数を測定した。補正 QT（QTc）間隔は、Fridericia（Fridericia 1920）の方法に基づいて算出した。全ての心電図波形記録は顧問の獣医心臓専門医が評価した。

投与期間前、並びに 1、2、3、4、及び 8 週目の投与約 30 分（±5 分）後に各動物の血圧を測定して記録した。血圧値は、平均動脈圧が 20 mmHg 以内である 3 測定値を報告した。

中枢神経系に対する影響

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、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。これらの所見は 0.75 mg/kg 以上を投与した雌雄で 7 日目頃に最初に認められ、投与期間中継続した。食欲不振及び削痩が繰り返し認められたため、試験 2 週目から 0.75 及び 1.25 mg/kg 投与群の動物に補助餌料を与えた。用法変更後、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臨床所見が改善した。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。

呼吸器系に対する影響

ケージ外からの観察及び詳細な一般状態観察の結果、HBI-8000 に起因する呼吸器系に対する影響は認められなかった。

心血管系に対する影響

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が認められなかった。

HBI-8000 の経口投与に起因する定性的 ECG 異常はなかった。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%超の QTc 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 変化は、少なくとも部分的には、被験物質関連の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。定性的及び定量的 ECG パラメータに対する 0.25 mg/kg 投与の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。

2.6.2.4.2.4 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）

評価資料[4.2.3.2-4] 20092737

雌雄のビーグル犬を用いて 4 週間の回復期間を設けた GLP 適合の 13 週間経口投与毒性試験を実施した。本試験では、1 群あたり雌雄各 5 匹に HBI-8000 の 0.25、0.75、又は 1.25 mg/kg を 2 日に 1 回 13 週間強制経口投与した。13 週間終了時に、各投与群の雌雄各 3 匹を安楽死させて剖検した。各投与群の残りの雌雄各 2 匹には 4 週間の回復期間を設定した。本試験では、以下のパラメータ及び項目を評価した：一般状態、体重、体重増加量、摂餌量、眼科学的検査、心電図、臨床病理学的検査（血液学的検査、凝固検査、臨床化学的検査及び尿検査）、トキシコキネティクス、剖検、臓器重量、並びに病理組織学的検査。

ケージ外からの観察は 1 日 1 回以上、投与開始 1 週前から開始して投与期間及び回復期間中継続した。投与日の観察は投与前、投与後約 1～2 時間、及び就業時間終了前に実施した。ケージ外からの観察は、投与期間前（1 日目以前）及び回復期間中の詳細な一般状態観察日、並びに投与期間中の非投与日にも実施した。

投与開始 1 週前から少なくとも週 1 回、イヌをケージから取り出して詳細な一般状態観察を実施した。

ECG 測定は全ての動物で、投与期間前に 1 回（-8 日目）、1 日目、投与期間中は月 1 回（29 日目及び 58 日目）、並びに投与最終週（85 日目）に投与 60～90 分後に実施した。心電図波形記録は顧問の獣医心臓専門医が評価した。

中枢神経系に対する影響

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、これらは間歇的に発現し、自発的に又は限定的な（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。

呼吸器系に対する影響

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。

心血管系に対する影響

QTc を含む心血管系に対する HBI-8000 投与の潜在的影響はなかった。

2.6.2.5 薬力学的薬物相互作用

成人 T 細胞白血病リンパ腫（ATL）及び末梢性 T 細胞リンパ腫（PTCL）を含め T 細胞リンパ腫に対して HBI-8000 の他剤との薬力学的薬物相互作用を検討した *in vitro* 及び *in vivo* 試験は実施していない。

2.6.2.6 考察及び結論

上述した非臨床薬理試験により、HBI-8000 の作用機序が裏付けられた。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す。

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 阻害剤の中、ボリノスタット（SAHA）、belinostat 及びパノビノスタットはヒドロキサム酸クラスの汎-HDAC 阻害剤の代表例である。ロミデプシンは、環状テトラペプチドであり、汎-HDAC 阻害剤でもある。Entinostat 及び mocetinostat（MGCD0103）は、ベンズアミドクラスであり、クラス I の HDAC 及びクラス I/IV の HDAC をそれぞれ選択的に阻害する（Eckschlager 2017）。

HBI-8000 は、ナノモル濃度範囲でクラス I 及び一つのクラス IIb の HDAC を阻害する。HBI-8000 の酵素阻害プロファイルは、entinostat と同様であったが、その阻害活性は entinostat より高かった。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。HDAC の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。クラス I の HDAC のうち、HDAC1 及び HDAC2 は PTCL 及びびまん性大細胞リンパ腫（DLBCL）において正常なリンパ球組織と比較して高度に発現しており、また、HDAC1 は DLBCL に比して PTCL においてより高度に発現していることが報告されている（Marquard 2009）。さらに、クラス I の HDAC の強発現は、腫瘍化の維持に重要な役割を果たしており、T 細胞リンパ種における有力な治療標的と考えられている（古川 2018）。

HBI-8000 は、ヒト子宮頸部腺がん HeLa 細胞及びヒト PBMC 中においてヒストン H3 のアセチル化を顕著に誘導し、薬剤濃度 0.1～10 μM 範囲で認められた HBI-8000 によるアセチル化誘導レベルは entinostat （MS-275）及びボリノスタット（SAHA）で認められたレベルと同様であった。

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 細胞株及び骨髄単球性白血病由来 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。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された。

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、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（fragment crystallizable）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。これらのデータは、HBI-8000 が癌免疫療法に適していることを裏付けている。

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* 腫瘍モデルに対して単剤で有効性を示した。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%（2 回の独立した試験）、ヒト乳がん由来 MCF-7 細胞移植モデルに対して 49.3%～70.0%（単回試験）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。全体として、HBI-8000 を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くかった。

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 回の投与と比較して低くなるものの、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（BIW）の臨床投与レジメンを支持している。

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）。よって、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単離した PBMC 由来の NK 細胞又は CTL 細胞の *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。

HBI-8000 が、PTCL を含め T 細胞リンパ腫の動物モデルに対して *in vivo* 抗腫瘍効果を示す直接的な根拠はないものの、経口投与後の血漿中 HBI-8000 濃度と薬力学的バイオマーカーとしてのがん細胞に対する抗腫瘍効果との関係性を検討した。その結果以下に示すように、血漿中曝露量とがん細胞に対する抗腫瘍効果との間に相関性が認められた。

HBI-8000 をヒト固形がん由来細胞ゼノグラフトマウスモデルに 12.5～50 mg/kg の用量範囲で 1 日 1 回 20～28 日間経口投与したときの血漿中濃度は測定されていない。一方で HBI-8000 の薬物動態プロファイルは、9～36 mg/kg の用量範囲においてラットでの 4 週間反復投与毒性試験（再発又は難治性の ATL を対象とした初回申請資料、2.6.4 薬物動態の概要文、2.6.4.3.1 項を参照）で評価されており、当該試験での用量範囲は、ヒト固形がん由来細胞ゼノグラフトマウスモデルを用いた *in vivo* 抗腫瘍活性試験の用量範囲とよく重なっていた。HBI-8000 の血漿中暴露量の用量依存的な増加は、検討した全てのヒト固形がん由来細胞ゼノグラフトモデルにおける *in vivo* 抗腫瘍効果の用量依存的な増加（2.6.2.2.3.1 項、図 2.6.2-5、図 2.6.2-6 参照）と一致しており、HBI-8000 の血漿中暴露レベルと *in vivo* における有効性の相関性を示している。血液がん細胞は血中において HBI-8000 に直接曝露する可能性があるため、薬物動態（PK）／薬力学（PD）の相関性は PTCL を含む T 細胞リンパ腫ではより明確になる可能性がある。

HBI-8000 をラットに 4 週間反復経口投与したときの血漿中濃度の概要を表 2.6.2-4 に示す。

表 2.6.2-4 HBI-8000 をラットに反復投与したときの初回投与（Day-1）又は反復投与（Day-27）における血漿中濃度の概要（試験番号 1515-002）

パラメータ	HBI-8000 平均血漿中濃度 ng/mL (μM*)			
	Male (n= 6)		Female (n= 6)	
	Day-1	Day-27	Day-1	Day-27
Dose: 9 mg/kg				
C_{max}	438 (1.12)	468 (1.20)	712 (1.82)	817 (2.09)
1.5-hour post dose	368 (0.943)	280 (0.717)	374 (0.958)	400 (1.02)
24-hour post dose	18.3 (0.0469)	25.5 (0.0653)	32.3 (0.0827)	22.5 (0.0576)
Dose: 18 mg/kg				
C_{max}	1030 (2.64)	2270 (5.81)	2550 (6.53)	2470 (6.32)
1.5-hour post dose	828 (2.12)	1140 (2.92)	1580 (4.05)	1190 (3.05)
24-hour post dose	37.0 (0.0948)	45.1 (0.116)	144 (0.369)	75.7 (0.194)
Dose: 36 mg/kg				
C_{max}	2520 (6.45)	3670 (9.40)	4410 (11.2)	6640 (17.0)
1.5-hour post dose	2310 (5.92)	1400 (3.59)	2390 (6.12)	2290 (5.87)
24-hour post dose	169 (0.433)	181 (0.464)	178 (0.456)	281 (0.720)

C_{max} = 最大血漿中濃度
*：ng/mL で測定した血漿中濃度データを分子量 390.41 に基づいて μM 濃度に変換した。
原典: 1515-002 – Appendix O: Toxicokinetics Report- Tables 1 to Table 6

Hela 細胞及び PBMC を HBI-8000 で処理すると、ヒストン H3 脱アセチル化の阻害により、0.1～10 μM の濃度範囲でアセチル化ヒストン H3 のレベルが増加した（2.6.2.2.1.2 項を参照）。細胞内でのヒストン H3 アセチル化を誘発する HBI-8000 のモル（M）活性についても、9～36 mg/kg の用量範囲で HBI-8000 をラットに単回及び反復経口投与したときの平均 C_{max}（1.12～17.0 μM）と同等であった。HBI-8000 の血漿中濃度は、投与後 24 時間では低いレベルまで減少した（表 2.6.2-4）。9 mg/kg の投与後 24 時間の血漿中濃度は、細胞内のヒストン H3 アセチル化を誘発する濃度範囲を下回っているものの、18 mg/kg 及び 36 mg/kg での血漿中濃度は、依然としてアセチル化を誘発する濃度範囲内にある。PBMC を用いて検討したときの HBI-8000 のヒストン H3 アセチル化を誘発する濃度範囲を下回る投与後 24 時間以降の血漿中濃度においても、ベンズアミドクラスの選択的クラス I HDAC 阻害剤が有する長い半減期と緩徐で強い結合機序により、持続的な HDAC 阻害とヒストン H3 アセチル化の上昇が期待できる（Bonfils 2008; Chou 2008）。したがっ

て、C_{max} は、*in vivo* における細胞内でのヒストン H3 アセチル化に関連する有用な薬物動態パラメータであると考えられる。

がん細胞を 1 μM 濃度の HBI-8000 と共にインキュベートしたとき、ヒストン H3 のアセチル化の増加はインキュベーション後 30～60 分の時点で認められた（2.6.2.2.1.2 項）。検討された用量範囲でラットに HBI-8000 を単回及び反復投与したとき、血漿中濃度は投与後 30 分で C_{max} に達し（1515-002 試験で報告された t_{max} は 0.5 時間）、投与後 1.5 時間までの間 1 μM 以上の濃度に維持されていた（表 2.6.2-4）。

以上のことから、HBI-8000 を動物モデルに 9～36 mg/kg の用量範囲で単回又は反復経口投与したときの血漿中暴露量は、*in vivo* において細胞内のヒストン H3 アセチル化を誘発するに十分なレベルに達する可能性が高いことを示唆している。

非ホジキンリンパ腫の日本人患者を対象とした第 I 相試験（HBI-8000-201 試験；再発又は難治性の ATL を対象とした初回申請資料、2.7.2 臨床薬理試験概要参照）では、用量 30 mg 及び 40 mg での初回投与時（Day-1）の平均 C_{max} は、それぞれ 199 ng/mL（0.510 μM）及び 590 ng/mL（1.51 μM）であった。週 2 回（BIW）反復投与後（Day-25）の平均 C_{max} は、30 mg 及び 40 mg の用量でそれぞれ 240 ng/mL（0.615 μM）及び 385 ng/mL（0.986 μM）であった。これら平均 C_{max} は、ATL 由来細胞の IC_{50} の範囲（0.7～1.7 μM）と同様であり、また *ex vivo* の試験系での細胞内のヒストン H3 アセチル化のモル活性と同等と考えられる。ヒストン H3 アセチル化活性については、中国で実施された HBI-8000 の第 I 相試験において、患者から単離された PBMC 中で最長 72 時間のヒストン H3 アセチル化の持続が報告されている（Chung 2006）。

上述の非臨床薬理試験の結果から、HBI-8000 は PTCL 治療の新しい選択肢となることが期待される。

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機能観察総合評価の結果、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、被験物質投与に関連して活動低下、食欲不振、削痩及び水様／粘液／変色便が認められたが、これらの影響の大部分は回復期間内に可逆性を示し、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 13 週間試験でのケージ外からの観察及び詳細な臨床観察の結果、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 電流に対する顕著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。HBI-8000 の経口投与に起因する定性的 ECG 異常は認められなかった。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。4 週間試験では、1.25 mg/kg 投与後の雌の RR 間隔は溶媒対照群の値より統計的有意に長かった。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%超の QTc 延長が 0.75 mg/kg 及び 1.25 mg/kg 群で生じた。QTc 変化は、少なくとも部分的には、被験物質関連の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。定性的及び定量的 ECG パラメータに対する 0.25 mg/kg 投与の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、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 間隔の変化を含め心血管系に対する影響を誘発しなかった。

2.6.2.7 参考文献

Ankier SI. New hot plate tests to quantify anti-nociceptive and narcotic antagonist activities. Eur J Pharmacol. 1974 Jun; 27(1): 1-4.

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.

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.

Chou CJ, Herman D, Gottesfeld JM. Pimelic diphenylamide 106 is a slow, tight-binding inhibitor of Class I histone deacetylses. J. Biol Chem. 2008; 283: 35402-35409.

Chung EJ, Lee M-J, Lee S, Trepel JB. Assays for pharmacodynamic analysis of histone deacetylase inhibitors. Expert Opin Drug Metab Toxicol. 2006; 2: 213-230.

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

Edwards PM, Parker VH. A simple, sensitive and objective method for early assessment of acrylamide neuropathy in rats. Toxicol Appl Pharmacol. 1977; 40: 589-591.

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.

Fridericia LS. Die systolendauer im elektrokardiogramm bei normalen menschen und bei herzkranken. Acta Med Scand. 1920; 53: 469-486.

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.

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

Marquard L, Christian BP, Gjerdrum LM, et al. Histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in B- and T-cell lymphomas. Histopathology. 2009; 54: 688-698.

Moser VC, McCormick JP, Creason JP, MacPhail RC. Comparison of chlordimeform and carbaryl using a functional observation battery. Fund Appl Toxicol. 1988; 11: 189-206.

Moser VC, Ross JF. US EPA/ATHC Training video and reference manual for a functional observation battery. US Environmental Protection Agency 1996; Washington, D.C.

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.

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.

古川雄祐. PTCLにおけるHDAC阻害薬の基礎的背景と治療的意義. 血液内科. 2018; 76(6): 824-830.

ツシジノスタット
ハイヤスタ錠 10mg

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.3 薬理試験概要表

Huya Japan 合同会社

2.6.3 薬理試験概要表

本申請は，既承認の製剤についての一部変更承認申請であり，本項目についての新たな記載事項はない。