目次

1. 構造式及び主薬理作用.....3
2. 申請効能又は効果、用法及び用量.....3
3. 参考文献.....4

表一覧

表 2.6.1.1-1　バレメトスタットトシル酸とそのフリー体の化学構造 3

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
EZH	enhancer of zeste homolog	－

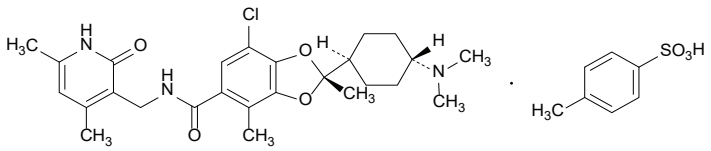
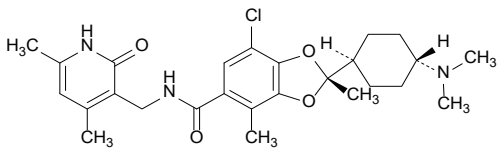
－：該当する表記なし

1. 構造式及び主薬理作用

バレメトスタットトシル酸塩は、enhancer of zeste homolog（EZH）1 及び EZH2 の特異的な低分子阻害剤である[1,2]。バレメトスタットトシル酸塩は EZH1 及び EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性を阻害し、ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基のトリメチル化に対する抑制活性を増加させた。バレメトスタットトシル酸塩は、ヒト造血器腫瘍細胞株に対して強力な増殖抑制活性を示した。マウスの異種移植モデルを用いた in vivo 試験では、バレメトスタットトシル酸塩は、対照薬である EZH2 阻害剤（タゼメトスタット）と比較して、より強い抗腫瘍活性を示した。

バレメトスタットトシル酸塩及びそのフリー体の化学構造を表 2.6.1.1-1 に示す。非臨床試験では、バレメトスタットトシル酸塩及び ^{14}C 標識バレメトスタットの用量は、フリー体であるバレメトスタットの用量で表示する。トシル酸塩からフリー体への変換係数は 0.7392 である。非臨床試験報告書では、バレメトスタットトシル酸塩は DS-3201b、バレメトスタットは DS-3201a と記載されている。

表 2.6.1.1-1　バレメトスタットトシル酸とそのフリー体の化学構造

化合物名	定義	構造式
バレメトスタットトシル酸塩（DS-3201b）	原薬	
バレメトスタット（DS-3201a）	原薬のフリー体	

2. 申請効能又は効果、用法及び用量

【効能又は効果】

再発又は難治性の成人 T 細胞白血病リンパ腫

【用法及び用量】

通常、成人にはバレメトスタットとして 200mg を 1 日 1 回空腹時に経口投与する。なお、患者の状態により適宜減量する。

3. 参考文献

1. Honma D, Kanno O, Watanabe J, et al. Novel orally bioavailable EZH1/2 dual inhibitors with greater antitumor efficacy than an EZH2 selective inhibitor. Cancer Sci. 2017;108(10):2069-78.
2. Yamagishi M, Hori M, Fujikawa D, et al. Targeting excessive EZH1 and EZH2 activities for abnormal histone methylation and transcription network in malignant lymphomas. Cell Rep. 2019;29(8):2321-37.

目次

1. まとめ....5
2. 効力を裏付ける試験....8
2.1 In vitro 薬理試験....8
2.1.1 EZH 阻害薬（バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、及び GSK126）の EZH1 及び EZH2 酵素阻害活性の評価....8
2.1.2 バレメトスタットの代謝物 CALZ-1809a の EZH1 及び EZH2 酵素阻害活性の評価....8
2.1.3 バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、及び GSK126 のヒト大腸癌細胞株 HCT116 内 H3K27 トリメチル化阻害活性の評価....8
2.1.4 CALZ-1809a のヒト大腸癌細胞株 HCT116 内 H3K27 トリメチル化阻害活性の評価....9
2.1.5 バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、及び GSK126 の造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422、MV-4-11、MM.1S、及び TL-Om1 に対する増殖抑制活性....9
2.1.6 CALZ-1809a の造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422、MV-4-11、MM.1S、及び TL-Om1 に対する増殖抑制活性....10
2.2 In vivo 薬理試験....11
2.2.1 バレメトスタットトシル酸塩及びタゼメトスタットのびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 KARPAS-422 皮下移植マウスモデルでの抗腫瘍効果....11
3. 副次的薬理試験....13
4. 安全性薬理試験....14
4.1 心血管系....14
4.1.1 hERG 電流に対する影響....14
4.1.2 イヌ 4 週間反復経口投与試験及び 4 週間回復性試験における心電図評価....14
4.1.3 イヌ 13 週間反復経口投与試験及び 4 週間回復性試験における心電図評価....14
4.1.4 イヌテレメトリー試験....15
4.2 中枢神経系....15
4.2.1 ラットの機能観察総合検査....15
4.3 呼吸器系....15
4.3.1 ラット全身プレチスモグラフィー....15
5. 薬力学的薬物相互作用....16
6. 考察及び結論....17
7. 参考文献一覧....19

表一覧

表 2.6.2.1-1　薬理試験の概要：バレメトスタットトシル酸塩の効力を裏付ける試験 6
表 2.6.2.1-2　薬理試験の概要：バレメトスタットトシル酸塩の安全性薬理試験 7
表 2.6.2.2-1　バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、及び GSK126 の増殖抑制活性 10

図一覧

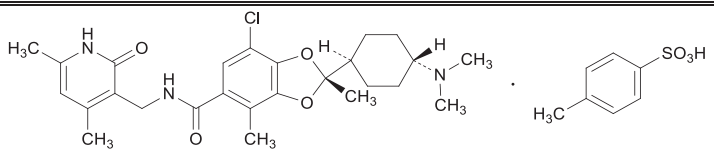
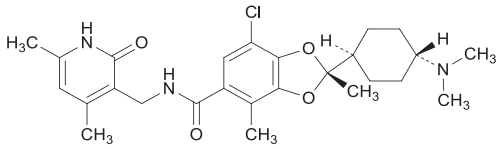
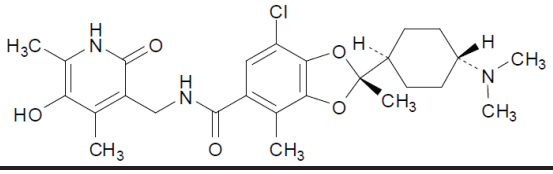
図 2-1　バレメトスタットトシル酸塩及びタゼメトスタットの KARPAS-422 皮下移植マウスモデルでの抗腫瘍効果 12

略語一覧

略語	略していない表現（英）	略していない表現（日）
AML	acute myeloid leukemia	急性骨髄性白血病
ATL	adult T-cell leukemia	成人 T 細胞白血病
DLBCL	diffuse large B-cell lymphoma	びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫
ECG	electrocardiography	心電図検査
EZH	enhancer of zeste homolog	－
GI_{50}	concentration causing 50% growth inhibition	50%増殖抑制濃度
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児由来腎
hERG	human ether-à-go-go related gene	ヒト遅延整流性カリウムチャネル遺伝子
H3K27	histone H3 lysine 27	ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基
H3K27me3	tri-methylated histone H3 lysine 27	トリメチル化されたヒストン H3 の 27 番目のリジン残基
IC_{50}	concentration causing 50% inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
MM	multiple myeloma	多発性骨髄腫
NOAEL	no observed adverse effect level	無毒性量
QTc	corrected QT	補正された QT
SCID	severe combined immune deficiency	重症複合免疫不全
TGIn	tumor growth inhibition rate (net)	腫瘍純増殖抑制率
TRR	tumor regression rate	腫瘍退縮率

－：該当する表記なし

化合物一覧

化合物名	定義	構造式
バレメトスタットトシル酸塩（DS-3201b）	原薬	
バレメトスタット（DS-3201a）	原薬のフリー体	
CALZ-1809a	バレメトスタットの酸化代謝物	

1. まとめ

バレメトスタットトシル酸塩の投与量及び濃度はフリー体であるバレメトスタット換算で表示した。

3 つの in vitro 試験の結果から、バレメトスタットトシル酸塩の薬理活性／作用メカニズムが示された。バレメトスタットトシル酸塩による enhancer of zeste homolog（EZH）1 及び EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性阻害効果を、酵素評価系によって測定した。バレメトスタットトシル酸塩は対照薬である EZH2 阻害薬と比較して、EZH2 に対しては同程度の阻害活性（50%阻害濃度［concentration causing 50% inhibition: IC_{50}］値: 6.0 nmol/L）を示し、かつ EZH1 に対してはより強い阻害活性（IC_{50} 値: 10 nmol/L）を示した。バレメトスタットの酸化代謝物 CALZ-1809a の EZH1 及び EZH2 に対する IC_{50} 値は、それぞれ 240 及び 26 nmol/L であった。また、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 内のヒストン H3 の 27 番目のリジン残基（histone H3 lysine 27: H3K27）トリメチル化に対するバレメトスタットトシル酸塩の阻害作用を評価した。バレメトスタットトシル酸塩は対照薬である EZH2 阻害薬と比較して強い H3K27 トリメチル化阻害活性を示し、IC_{50} 値は 0.55 nmol/L であった。CALZ-1809a の H3K27 トリメチル化阻害活性はバレメトスタットトシル酸塩と比較して弱かった（IC_{50} 値: 190 nmol/L）。さらに、バレメトスタットトシル酸塩のヒト造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422（びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫［diffuse large B-cell lymphoma: DLBCL］）、MV-4-11（急性骨髄性白血病［acute myeloid leukemia: AML］）、MM.1S（多発性骨髄腫［multiple myeloma: MM］）、及び TL-Om1（成人 T 細胞白血病［adult T-cell leukemia: ATL］）に対する増殖抑制活性を検討した。バレメトスタットトシル酸塩はこれら 4 細胞株すべてに対して、対照薬である EZH2 阻害薬と比較して強い増殖抑制活性（50%増殖抑制濃度［concentration causing 50% growth inhibition: GI_{50}］値: 1.43～18.4 nmol/L）を示し、種々の造血器腫瘍細胞に対して増殖抑制を誘導する抗腫瘍薬として、高い有効性を示すことが示唆された。これら 4 細胞株に対する CALZ-1809a の増殖抑制活性はバレメトスタットトシル酸塩と比較して極めて弱かった（GI_{50}: 132～9970 nmol/L）。

In vivo 試験では、機能獲得型変異 EZH2 を発現する KARPAS-422 を重症複合免疫不全（severe combined immune deficiency: SCID）マウスに皮下移植したモデルを用いて、腫瘍増殖抑制効果を検討した。バレメトスタットトシル酸塩は 1.56、6.25、25、及び 100 mg/kg を 1 日 1 回、又は 0.781、3.13、12.5、及び 50 mg/kg を 1 日 2 回、21 日間経口投与した。EZH2 阻害薬タゼメトスタットは 200 mg/kg を 1 日 1 回又は 100 mg/kg を 1 日 2 回 21 日間経口投与した。バレメトスタットトシル酸塩は 100 mg/kg を 1 日 1 回 21 日間経口投与により、100%以上の腫瘍純増殖抑制率（tumor growth inhibition rate [net]: TGIn）かつ 19.2%の腫瘍退縮率（tumor regression rate: TRR）を示し、25 mg/kg を 1 日 1 回 21 日間経口投与によっても明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。また、バレメトスタットトシル酸塩は 50 mg/kg を 1 日 2 回 21 日間経口投与により、100%以上の TGIn かつ 51.7%の TRR を示し、12.5 mg/kg を 1 日 2 回 21 日間経口投与によっても明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。バレメトスタットトシル酸塩の腫瘍増殖抑制効果は、用量依存的であった（スピアマン

の順位相関係数、$P < 0.0001$）。タゼメトスタットは、200 mg/kg を 1 日 1 回又は 100 mg/kg を 1 日 2 回投与のいずれにおいても、明らかな腫瘍増殖抑制効果を示さなかった。以上のことから、バレメトスタットトシル酸塩は、機能獲得型変異 EZH2 を発現する KARPAS-422（DLBCL）の皮下移植マウスモデルに対して、1 日 1 回又は 1 日 2 回投与ともに、21 日間連日投与で用量依存的かつ統計学的に有意な抗腫瘍効果を示し、高い有効性を示すことが確認された。また、バレメトスタットトシル酸塩の抗腫瘍活性は、最終投与後 13 日間は増加又は維持される傾向が認められた。

表 2.6.2.1-1　薬理試験の概要：バレメトスタットトシル酸塩の効力を裏付ける試験

試験名	試験系	投与方法	被験物質及び対照物質	添付資料番号
In vitro				
EZH1 及び EZH2 酵素阻害活性の評価		In vitro	バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、GSK126、CALZ-1809a	4.2.1.1-1、4.2.1.1-2
H3K27 トリメチル化阻害活性の評価	ヒト大腸癌細胞株 HCT116	In vitro	バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、GSK126、CALZ-1809a	4.2.1.1-3、4.2.1.1-4
造血器腫瘍細胞株に対する増殖抑制活性	DLBCL 細胞株 KARPAS-422、AML 細胞株 MV-4-11、MM 細胞株 MM.1S、ATL 細胞株 TL-Om1	In vitro	バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、GSK126、CALZ-1809a	4.2.1.1-5、4.2.1.1-6
In vivo				
DLBCL 皮下移植マウスモデルでの抗腫瘍効果	DLBCL 細胞株 KARPAS-422 皮下移植 SCID マウス	反復経口	バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット	4.2.1.1-7

AML: 急性骨髄性白血病、ATL: 成人 T 細胞白血病、DLBCL: びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、EZH: enhancer of zeste homlog、H3K27: ヒストン H3 の 27 番目のリジン残基、MM: 多発性骨髄腫、SCID: 重症複合免疫不全

医薬品規制調和国際会議（International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use: ICH）S7A 及び ICH S7B に準じ、心血管系、中枢神経系、及び呼吸器系などの主要な生理機能に対する安全性薬理試験は、独立した試験として、あるいはバレメトスタットトシル酸塩の反復経口投与試験に組み込んで実施した。

バレメトスタットトシル酸塩の心血管系に対する影響を調べるため、ヒト遅延整流性カリウムチャネル遺伝子（human ether-à-go-go related gene: hERG）チャネルを安定的に発現するヒト胎児由来腎（human embryonic kidney: HEK）293 細胞を用いて、hERG 試験を実施した。hERG テール電流に対するバレメトスタットトシル酸塩の阻害率は、最高濃度（100 μmol/L）で 22.7%であり、バレメトスタットトシル酸塩の IC_{50} 値は 100 μmol/L より高かった。しかし、イヌ 4 週間反復経口投与試験では、30 mg/kg／日以上の雌にのみ、補正された QT（corrected QT: QTc）間隔の延長が投与 4 週目に認められたことから、無毒性量

（no observed adverse effect level: NOAEL）を確認する目的でイヌのテレメトリー試験を実施した。その結果、60 mg/kg／日群の雌では、7 日間投与後に QT 間隔及び QTc 間隔の有意な延長が認められたが（最大延長率はそれぞれ 7.2%及び 8.3%）、15 mg/kg／日群では有意な延長はみられなかった。以上の結果から、バレメトスタットトシル酸塩は弱い QTc 間隔の延長作用を示すと判断し、心血管系機能に対するバレメトスタットトシル酸塩の NOAEL は 15 mg/kg／日と判断した。

ラット 4 週間反復経口投与試験では、600 mg/kg／日までの連日投与で、機能観察総合評価に毒性所見は認められなかった。バレメトスタットトシル酸塩の全投薬群で、一過性の立ち上がり行動の減少がみられたが、この所見は投与を継続すると消失したため、毒性学的意義はないと判断した。また、全身プレチスモグラフィーでは、全投薬群で影響は認められなかった。以上の結果から、バレメトスタットトシル酸塩は中枢神経系及び呼吸器系に影響を与えないと判断した。

表 2.6.2.1-2　薬理試験の概要：バレメトスタットトシル酸塩の安全性薬理試験

試験	試験系	投与経路	添付資料番号
hERG 電流	hERG 発現 HEK 293 細胞	In vitro	4.2.1.3-1
心血管系	ビーグルイヌ（雌）	強制経口	4.2.1.3-2
心血管系（ECG）	ビーグルイヌ	強制経口	4.2.3.2-5
心血管系（ECG）	ビーグルイヌ	強制経口	4.2.3.2-6
中枢神経系（機能観察総合評価）	Crl:CD(SD)ラット	強制経口	4.2.3.2-2
呼吸器系（全身プレチスモグラフィー）	Crl:CD(SD)ラット	強制経口	4.2.3.2-2

すべて医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（Good Laboratory Practice: GLP）遵守試験
ECG: 心電図検査、HEK: ヒト胎児由来腎、hERG: ヒト遅延整流性カリウムチャネル遺伝子

2. 効力を裏付ける試験

2.1 In vitro 薬理試験

2.1.1 EZH 阻害薬（バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、及び GSK126）の EZH1 及び EZH2 酵素阻害活性の評価

資料番号 4.2.1.1-1

【方法】バレメトスタットトシル酸塩、並びに EZH2 阻害薬タゼメトスタット及び GSK126 の、EZH1 及び EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性に対する阻害活性を評価した。被験物質を 384 ウェルプレート内にて反応混合液とともに作用させ、各ウェルの放射性同位体取り込み量から各被験物質のメチルトランスフェラーゼ活性の阻害効果を求め、IC_{50} 値として示した。

【結果】EZH1 に対する IC_{50} 値は、バレメトスタットトシル酸塩が 10 nmol/L、タゼメトスタットが 35 nmol/L、GSK126 が 210 nmol/L であった。EZH2 に対する IC_{50} 値は、バレメトスタットトシル酸塩が 6.0 nmol/L、タゼメトスタットが 4.8 nmol/L、GSK126 が 4.7 nmol/L であった。バレメトスタットトシル酸塩は EZH2 阻害薬と同程度の EZH2 阻害活性を示し、かつ EZH2 阻害薬と比較して強い EZH1 阻害活性を示した。

2.1.2 バレメトスタットの代謝物 CALZ-1809a の EZH1 及び EZH2 酵素阻害活性の評価

資料番号 4.2.1.1-2

【方法】バレメトスタットの酸化代謝物である CALZ-1809a の、EZH1 及び EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性に対する阻害活性を、2.1.1 と同じ方法で評価した。

【結果】EZH1 及び EZH2 に対する CALZ-1809a の IC_{50} 値はそれぞれ 240 及び 26 nmol/L であった。CALZ-1809a はバレメトスタットトシル酸塩より弱いものの、EZH1 及び EZH2 に対して阻害活性を示した。

2.1.3 バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、及び GSK126 のヒト大腸癌細胞株 HCT116 内 H3K27 トリメチル化阻害活性の評価

資料番号 4.2.1.1-3

【方法】バレメトスタットトシル酸塩、並びに EZH2 阻害薬タゼメトスタット及び GSK126 の、ヒト大腸癌細胞株 HCT116 内 H3K27 トリメチル化阻害活性を評価した。バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット（0、0.051、0.15、0.46、1.4、4.1、12、37、及び 110 nmol/L）、又は GSK126（0、0.46、1.4、4.1、12、37、110、330、及び 1000 nmol/L）を HCT116 とともに培養し、AlphaLISA Tri-Methyl-Histone H3 Lysine 27 (H3K27me3) Cellular Detection Kit を用いて、各濃度の細胞溶解液中 H3K27me3 量を相対値（%）として算出した。

【結果】各被験物質の HCT116 細胞内 H3K27 のトリメチル化を抑制する IC_{50} 値は、バレメトスタットトシル酸塩が 0.55 nmol/L、タゼメトスタットが 6.3 nmol/L、及び GSK126 が

190 nmol/L であった。バレメトスタットトシル酸塩は EZH2 阻害薬タゼメトスタット及び GSK126 と比較して、強い H3K27 トリメチル化阻害活性を示した。

2.1.4 CALZ-1809a のヒト大腸癌細胞株 HCT116 内 H3K27 トリメチル化阻害活性の評価

資料番号 4.2.1.1-4

【方法】バレメトスタットトシル酸塩及び CALZ-1809a のヒト大腸癌細胞株 HCT116 内 H3K27 トリメチル化阻害活性を評価した。CALZ-1809a（39.1～10000 nmol/L）又は対照薬のバレメトスタットトシル酸塩（0.0152～100 nmol/L）を HCT116 とともに培養し、2.1.3 と同じ方法で評価した。

【結果】HCT116 細胞内 H3K27 のトリメチル化を抑制する IC_{50} 値は、バレメトスタットトシル酸塩が 0.50 nmol/L、CALZ-1809a が 190 nmol/L であった。CALZ-1809a は、バレメトスタットトシル酸塩よりも弱い H3K27 トリメチル化阻害活性を示した。

2.1.5 バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、及び GSK126 の造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422、MV-4-11、MM.1S、及び TL-Om1 に対する増殖抑制活性

資料番号 4.2.1.1-5

【方法】バレメトスタットトシル酸塩、並びに EZH2 阻害薬タゼメトスタット及び GSK126 の、ヒト造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422（DLBCL）、MV-4-11（AML）、MM.1S（MM）、及び TL-Om1（ATL）に対する増殖抑制活性を評価した。バレメトスタットトシル酸塩は 1000 nmol/L、EZH2 阻害薬（タゼメトスタット及び GSK126）は 10,000 nmol/L を最高濃度として評価した。

【結果】増殖抑制活性を表 2.6.2.2-1 に示す。10 日間の薬剤処理後のこれら 4 細胞株に対する GI_{50} 値は、バレメトスタットトシル酸塩が 1.43～18.4 nmol/L、タゼメトスタットが 35.6～185 nmol/L、GSK126 が 138～957 nmol/L であった。

バレメトスタットトシル酸塩はこれら 4 細胞株すべてに対して、EZH2 阻害薬タゼメトスタット及び GSK126 と比較して強い増殖抑制活性を示し、造血器腫瘍細胞に対して増殖抑制を誘導する抗腫瘍薬として、高い有効性を示すことが示唆された。

表 2.6.2.2-1　バレメトスタットトシル酸塩、タゼメトスタット、及び GSK126 の増殖抑制活性

細胞株	癌種	GI_{50} 値（nmol/L）、10 日間処理		
		バレメトスタットトシル酸塩	タゼメトスタット	GSK126
KARPAS-422	DLBCL	12.6	119	221
MV-4-11	AML	1.43	48.3	138
MM.1S	MM	2.19	35.6	139
TL-Om1	ATL	18.4	185	957

GI_{50}: 50%増殖抑制濃度
AML: 急性骨髄性白血病、ATL: 成人 T 細胞白血病、DLBCL: びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、MM: 多発性骨髄腫

2.1.6　CALZ-1809a の造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422、MV-4-11、MM.1S、及び TL-Om1 に対する増殖抑制活性

資料番号 4.2.1.1-6

【方法】CALZ-1809a 及びバレメトスタットトシル酸塩（対照薬）のヒト造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422（DLBCL）、MV-4-11（AML）、MM.1S（MM）、及び TL-Om1（ATL）に対する増殖抑制活性を評価した。CALZ-1809a は 10,000 nmol/L、バレメトスタットトシル酸塩は 1000 nmol/L を最高濃度として評価した。

【結果】増殖抑制活性を表 2.6.2.2-2 に示す。14 日間の薬剤処理後のこれら 4 細胞株に対する GI_{50} 値は、CALZ-1809a が 132～9970 nmol/L、バレメトスタットトシル酸塩が 0.848～43.2 nmol/L であった。

CALZ-1809a はこれら 4 つのヒト造血器腫瘍細胞株すべてに対して、バレメトスタットトシル酸塩と比較して、極めて弱い増殖抑制活性を示した。

表 2.6.2.2-2　CALZ-1809a 及びバレメトスタットトシル酸塩の増殖抑制活性

細胞株	癌種	GI_{50} 値（nmol/L）、14 日間処理	
		CALZ-1809a	バレメトスタットトシル酸塩
KARPAS-422	DLBCL	1550	0.918
MV-4-11	AML	132	0.848
MM.1S	MM	3170	1.81
TL-Om1	ATL	9970[a]	43.2

GI_{50}: 50%増殖抑制濃度
AML: 急性骨髄性白血病、ATL: 成人 T 細胞白血病、DLBCL: びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫、MM: 多発性骨髄腫
a: T223-6098b は活性が弱く、Day 14 の最高濃度（10,000 nmol/L）でのみ GT/C が 50%を下回ったため、Sigmoid Emax モデルでは信頼性のある GI_{50} 値を決定できなかった

2.2 In vivo 薬理試験

2.2.1 バレメトスタットトシル酸塩及びタゼメトスタットのびまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫 KARPAS-422 皮下移植マウスモデルでの抗腫瘍効果

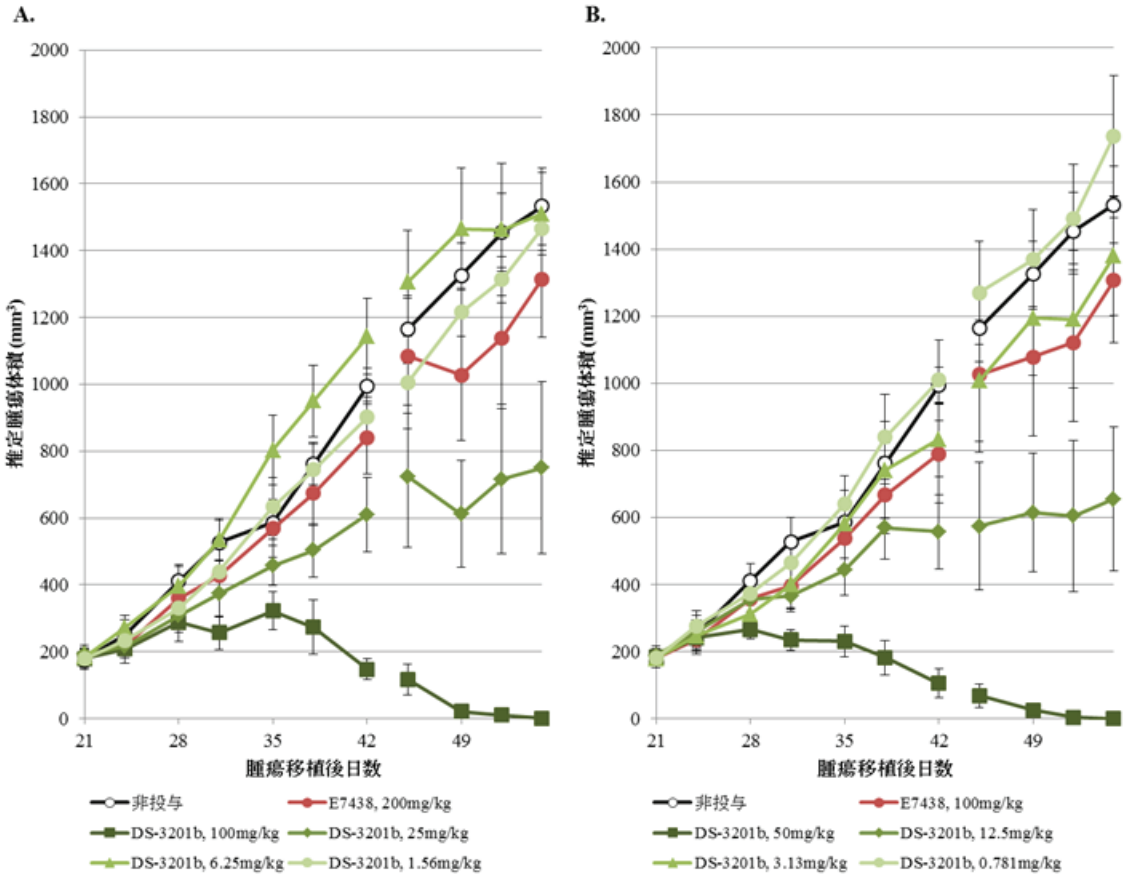
資料番号 4.2.1.1-7

【方法】機能獲得型変異 EZH2 を発現する KARPAS-422（DLBCL）を SCID マウスの皮下に移植し（Day 0）、この腫瘍に対するバレメトスタットトシル酸塩及びタゼメトスタットの抗腫瘍効果を評価した。右側腹部に腫瘍細胞を移植したマウスに、バレメトスタットトシル酸塩又はタゼメトスタットを Day 22 から Day 42 まで 21 日間連日経口投与した。用法及び用量は、バレメトスタットトシル酸塩は 1.56 mg/kg から 100 mg/kg までの 4 用量を 1 日 1 回、又は 0.781 mg/kg から 50 mg/kg までの 4 用量を 1 日 2 回、タゼメトスタットは 200 mg/kg を 1 日 1 回、又は 100 mg/kg を 1 日 2 回とした。各マウスの腫瘍径は Day 21、24、28、31、35、38、42、45、49、52、及び 55 に測定した。マウス各個体の腫瘍体積から、各群の群平均値、TGIn%及び TRR%を算出した。各群 3 個体を Day 43 に、残り 3 個体を Day 56 に安楽殺した。バレメトスタットトシル酸塩及びタゼメトスタットの抗腫瘍効果は Day 42（N = 6／群）及び Day 55（N = 3／群）に解析した。

【結果】バレメトスタットトシル酸塩及びタゼメトスタットの KARPAS-422 皮下移植マウスモデルに対する抗腫瘍効果を図 2-1 に示す。バレメトスタットトシル酸塩は 100 mg/kg を 1 日 1 回 21 日間経口投与後（Day 42）に 100%以上の TGIn かつ 19.2%の TRR が認められ、1 日 1 回 25 mg/kg 投与でも明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。Day 42 時点でのバレメトスタットトシル酸塩の腫瘍増殖抑制効果は、用量依存的であった（スピアマンの順位相関係数、$P < 0.0001$）。また、Day 42 において、バレメトスタットトシル酸塩の 1 日 2 回 50 mg/kg 投与で、TGIn 100%以上かつ TRR 51.7%が認められ、1 日 2 回 12.5 mg/kg 投与でも明らかな腫瘍増殖抑制効果が認められた。Day 42 時点でのバレメトスタットトシル酸塩の腫瘍増殖抑制効果は、用量依存的であった（スピアマンの順位相関係数、$P < 0.0001$）。この抗腫瘍効果は、最終投与後 13 日間（Day 55）までは増加又は維持される傾向が認められた。タゼメトスタットは、200 mg/kg を 1 日 1 回又は 100 mg/kg を 1 日 2 回投与のいずれにおいても、TGIn は 25%以下であり、顕著な腫瘍増殖抑制効果を示さなかった。

以上より、バレメトスタットトシル酸塩は、機能獲得型変異 EZH2 を発現する KARPAS-422（DLBCL）の皮下移植腫瘍モデルに対して、1 日 1 回又は 1 日 2 回投与ともに、21 日間連日投与で用量依存的かつ 100 mg/kg／日及び 25 mg/kg／日投与群で統計学的に有意な抗腫瘍効果を示し、高い有効性を示すことが確認された。また、この抗腫瘍活性は、最終投与後 13 日間は増加又は維持される傾向が認められた。

図 2-1　バレメトスタットトシル酸塩及びタゼメトスタットの KARPAS-422 皮下移植マウスモデルでの抗腫瘍効果



KARPAS-422 腫瘍細胞は Day 0 に雌性 SCID マウスに移植した。Day 21 に各群 N = 6 となるように層別化無作為法により群分けを行い、Day 22 からバレメトスタットトシル酸塩（DS-3201b）又はタゼメトスタット（E7438）を投与した。A: バレメトスタットトシル酸塩 1.56、6.25、25、100 mg/kg、又はタゼメトスタット 200 mg/kg を、Day 22 から Day 42 まで 1 日 1 回 21 日間連日経口投与した。B: タゼメトスタット 0.781、3.13、12.5、50 mg/kg、又はタゼメトスタット 100 mg/kg を Day 22 から Day 42 まで 1 日 2 回 21 日間連日経口投与した。Day 43 に全群半数例（N = 3）を、その後の解析のために安楽殺した。Day 21、24、28、31、35、38、42、45、49、52、及び 55 の各群の腫瘍体積平均値を、標準誤差とともにグラフにプロットした（Day 21 から Day 42 は N = 6、Day 45 から Day 55 は N = 3）。

3. 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

4. 安全性薬理試験

4.1 心血管系

4.1.1 hERG 電流に対する影響

資料番号 4.2.1.3-1

【方法】hERG の cDNA を導入した HEK293 細胞を用いて、hERG チャネルのテール電流に対するバレメトスタットトシル酸塩の影響を評価した。ホールセルパッチクランプ法を用いて hERG 電流を記録し、再分極によって発生するテール電流の振幅を測定した。バレメトスタットトシル酸塩は 10、30、及び 100 µmol/L の濃度で添加した（細胞 3 個／濃度）。対照として、媒体処理群（細胞 3 個）及び陽性対照群（細胞 2 個）を設けた。陽性対照群では、陽性対照物質（E-4031）を 100 nmol/L の濃度で添加した。

【結果】hERG テール電流に対するバレメトスタットトシル酸塩の阻害率（媒体処理群の電流による補正値）は、10、30、及び 100 µmol/L でそれぞれ 4.6%、7.2%、及び 22.7%であった。100 µmol/L では、hERG 電流に対する統計学的に有意な影響が認められた。陽性対照物質（E-4031）は、既知の活性に一致する hERG チャネル阻害作用を示した。

以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩は hERG チャネルを阻害し、最大阻害率は 100 µmol/L で 22.7%であった。検討した濃度から求めたバレメトスタットトシル酸塩の IC_{50} 値は、100 µmol/L より高かった。

4.1.2 イヌ 4 週間反復経口投与試験及び 4 週間回復性試験における心電図評価

資料番号 4.2.3.2-5

【方法】イヌ 4 週間反復経口投与試験では、15、30、及び 60 mg/kg／日の用量で経口投与したときの心電図を評価し、心電図異常が認められた場合には定量的に評価した。評価時点は、投与開始前、投与 4 週目の投与前及び投与約 1 時間後、並びに回復期間の 2 及び 4 週目とした。

【結果】30 mg/kg／日以上の群の雌で、投与に起因する QTc 間隔の延長が認められた。投与開始前の検査では、30 mg/kg／日群の雌 3 例中 1 例、及び 60 mg/kg／日群の雌 3 例中 3 例で QTc 間隔の延長が認められた。投与 4 週目の投与約 1 時間後には、30 mg/kg／日以上の群のすべての個体で QTc 間隔の延長が認められた。30 及び 60 mg/kg／日群での最大延長率の平均値は、それぞれ 11%及び 19%であった。回復期間の 2 及び 4 週目には、30 mg/kg／日群（雌 2 例中 2 例）及び 60 mg/kg／日群（雌 1 例中 1 例）ともに QTc 間隔の延長は認められなかった。

4.1.3 イヌ 13 週間反復経口投与試験及び 4 週間回復性試験における心電図評価

資料番号 4.2.3.2-6

イヌ 13 週間反復経口投与試験では、7.5、15、及び 30 mg/kg／日の用量で経口投与したときの心電図を評価した。評価時点は、投与開始前、並びに投与 4 週目又は 13 週目の投与前

及び投与約 1 時間後とした。その結果、いずれの用量でもバレメトスタットトシル酸塩に関連する変化は認められなかった。

4.1.4　イヌテレメトリー試験

資料番号 4.2.1.3-2

【方法】テレメトリーを装着した覚醒下の雌イヌ（ビーグル）4 例で、動脈血圧、心拍数、深部体温、及び第 II 誘導心電図に対する影響を検討した。バレメトスタットトシル酸塩を 80%ポリエチレングリコール 200 及び 20%注射用水に懸濁し、0（対照）、15、及び 60 mg/kg／日の用量で 7 日間強制経口投与し、各用量の投与の間には 7 日間の休薬期間を設けた。用量は、先に実施したイヌ 14 日間用量設定試験で得られた最大耐量が 60 mg/kg／日であったことに基づき設定した。投与 1 及び 7 日目にテレメトリー評価を実施した。

【結果】60 mg/kg／日群で投与 7 日目の投与 4～8 時間後に、統計学的に有意な QT 間隔延長（対照値との比較で最長 16 ミリ秒［7.2%］の延長）が認められた。また、統計学的に有意な QTc 間隔の延長が投与 3、4、及び 8 時間後にみられ、最長 17 ミリ秒（8.3%）の延長を示した。動脈血圧、心拍数、深部体温、QA 間隔、及びその他の心電図パラメータ（PR、QRS）には変化はみられなかった。

15 及び 60 mg/kg／日群の投与 1 日目、並びに 15 mg/kg／日群の投与 7 日目では、いずれの血行動態及び心電図パラメータ（QTc 間隔を含む）にも、バレメトスタットトシル酸塩に関連する有意な変化は認められなかった。

4.2　中枢神経系

4.2.1　ラットの機能観察総合検査

資料番号 4.2.3.2-2

ラット 4 週間反復経口投与試験では、バレメトスタットトシル酸塩を 1 群 8 例の雄性 Crl:CD(SD)ラットに 60、200、及び 600 mg/kg の用量で経口投与したとき、機能観察総合評価（投与 1 日目の投与 4、8、及び 24 時間後に測定）で毒性所見はみられなかった。バレメトスタットトシル酸塩の全投与群で、投与 8 時間後に統計学的に有意な立ち上がり行動の減少が認められたが、この所見は一過性のもので、その他の行動所見を伴わなかったことから、毒性学的な意義はないと判断した。

4.3　呼吸器系

4.3.1　ラット全身プレチスモグラフィー

資料番号 4.2.3.2-2

ラット 4 週間反復経口投与試験では、バレメトスタットトシル酸塩を 1 群 8 例の雄性 Crl:CD(SD)に 60、200、及び 600 mg/kg／日の用量で経口投与したとき、全身プレチスモグラフィー（投与 2 週目の投与 30 分前～投与 4 時間後に測定）にバレメトスタットトシル酸塩に関連する毒性所見はみられなかった。

5. 薬力学的薬物相互作用

該当する試験は実施していない。

6. 考察及び結論

EZH1 及び EZH2 は、ヒストン H3K27 を特異的にメチル化するメチルトランスフェラーゼであり、polycomb repressive complex 2（PRC2）を形成することによりメチルトランスフェラーゼ活性を示す[1]。H3K27 のトリメチル化はエピジェネティックに遺伝子発現を調節し、ひいては PRC2-EZH2 の調節異常をもたらすことから、癌抑制遺伝子又は細胞分化遺伝子の発現抑制を介した癌の進展に重要な役割を果たすと考えられる[1]。EZH2 の過剰発現は、多くの癌種で、悪性度や予後不良と相関することも報告されている[2]。したがって、増殖と生存を EZH2 酵素活性に依存する癌細胞中の EZH2 を標的とした低分子阻害薬は、有望な抗悪性腫瘍薬になり得ると考えられる。しかし、阻害された EZH2 の機能の一部を EZH1 が相補的に補完すると考えられているため、EZH2 のみの阻害では十分な腫瘍増殖抑制効果を発揮しない可能性がある[3]。以上より、EZH2 と同様に EZH1 も阻害することは、EZH2 のみの阻害と比べて、PRC2 機能抑制による腫瘍増殖抑制効果が増大することが期待される。

バレメトスタットトシル酸塩の薬理活性及び作用機序は in vitro 及び in vivo で確認した。バレメトスタットトシル酸塩は、EZH1 及び EZH2 のメチルトランスフェラーゼ活性に対して阻害作用を示した。また、酸化代謝物 CALZ-1809a は、バレメトスタットトシル酸塩に比べ弱いながら、EZH1 及び EZH2 に対して阻害活性を示した。バレメトスタットトシル酸塩は、ヒト大腸癌細胞の HCT116 細胞において、EZH2 阻害剤と比較して、H3K27 のトリメチル化を強く阻害した。また、CALZ-1809a は、バレメトスタットトシル酸塩に比べ弱いながら、H3K27 のトリメチル化を阻害した。バレメトスタットトシル酸塩は、ヒト造血器腫瘍細胞株 KARPAS-422（DLBCL）、MV-4-11（AML）、MM.1S（MM）、TL-Om1（ATL）に対して、対照薬 EZH2 阻害剤よりも強力な増殖抑制活性を示したことから、バレメトスタットトシル酸塩は造血器腫瘍細胞に対して増殖抑制を誘発する抗腫瘍薬として高い効力を有することが示唆された。また、CALZ-1809a は、バレメトスタットトシル酸塩に比べ極めて弱い増殖抑制活性を示した。バレメトスタットトシル酸塩（1.56～100 mg/kg／日）は、機能獲得型変異 EZH2 を発現する KARPAS-422 の皮下移植腫瘍モデルに対して、用量依存的に有意な抗腫瘍効果な抗腫瘍効果を示し、100 mg/kg／日及び 25 mg/kg／日投与群で統計学的に有意な抗腫瘍効果を示した。対照薬である EZH2 阻害剤（タゼメトスタット）は、200mg/kg／日で有意な抗腫瘍効果を示さなかった。

心血管系安全性薬理は、in vitro の hERG 試験、並びにイヌの 4 週間反復経口投与試験における心電図評価及びイヌのテレメトリー試験にて評価した。hERG 試験では、IC_{50} 値は 100 μmol/L（66 μg/mL）より高かった。しかし、イヌの 4 週間反復経口投与試験で心電図検査を実施した結果、約 4 週間の反復経口投与後、30 及び 60 mg/kg／日群の雌のみで QTc 間隔の延長が認められた。最大延長率は、30 mg/kg／日群で 11%、60 mg/kg／日群で 19%であった。イヌのテレメトリー試験では 60 mg/kg／日群で 7 日間投与後に有意な QTc 間隔の延長が認められた。延長の程度は 4 週間反復経口投与試験と比較して弱く、15 mg/kg／日群では有意な延長はみられなかった。したがって、バレメトスタットトシル酸塩は 15 mg/kg／日を超える用量で軽度の QTc 間隔の延長作用を示すと判断し、NOAEL は 15 mg/kg／日と判

断した。イヌの 13 週間反復経口投与試験で心電図検査を実施した結果、最高用量である 30 mg/kg／日までバレメトスタットトシル酸塩に関連する変化は認められず、イヌの 4 週間反復経口投与試験でみられた QTc 間隔の延長は、投与期間の延長によって増悪しなかった。

ラット 4 週間反復経口投与試験において、中枢神経系機能及び呼吸器系機能に対するバレメトスタットトシル酸塩の影響を、60、200、及び 600 mg/kg／日の用量で評価した。その結果、バレメトスタットトシル酸塩の全投与群で、投与に起因する立ち上がり行動の減少が認められたが、この所見は一過性であり、その他の行動所見を伴わなかったため、毒性学的意義はないと判断した。また、呼吸器系機能にはバレメトスタットトシル酸塩に関連する影響はみられなかった。

以上の結果より、バレメトスタットトシル酸塩は in vitro 及び in vivo で EZH1 及び EZH2 阻害薬として高い有効性を示した。また、バレメトスタットトシル酸塩は軽度な QTc 間隔の延長作用を示したが、中枢神経系及び呼吸器系に対する明らかな影響を示さなかった。

7. 参考文献

1. Xu B, Konze KD, Jin J, et al. Targeting EZH2 and PRC2 dependence as novel anticancer therapy. Exp Hematol. 2015;43(8):698-712.
2. Jiang T, Wang Y, Zhou F, et al. Prognostic value of high EZH2 expression in patients with different types of cancer: a systematic review with meta-analysis. Oncotarget. 2016;7(4):4584-97.
3. Shen X, Liu Y, Hsu YJ, et al. EZH1 mediates methylation on histone H3 lysine 27 and complements EZH2 in maintaining stem cell identity and executing pluripotency. Mol Cell. 2008;32(4):491-502.

目次

1. 薬理試験：一覧表 2
2. 効力を裏付ける試験 4
2.1 In vitro 試験 4
2.2 In vivo 試験 6
3. 副次的薬理試験 7
4. 安全性薬理試験 8
5. 薬力学的薬物相互作用試験 10

1. 薬理試験：一覧表

Type of Study	Test System	Test Article	Method of Admin.	Test Facility	Attachment Number
Primary Pharmacodynamics					
In vitro					
Inhibition of the enzymatic activity of EZH1 and EZH2	In vitro cell-free system	Valemetostat tosylate, tazemetostat, and GSK126	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-1
Inhibition of the enzymatic activity of EZH1 and EZH2	In vitro cell-free system	Valemetostat tosylate, CALZ-1809a	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-2
Suppression of H3K27me3 in human colon cancer cells HCT116	HCT 116 (human colon cancer cell)	Valemetostat tosylate, tazemetostat, and GSK126	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-3
Suppression of H3K27me3 in human colon cancer cells HCT116	HCT 116 (human colon cancer cell)	Valemetostat tosylate, CALZ-1809a	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-4
Growth inhibition against hematologic cancer cell lines: KARPAS-422, MV-4-11, MM.1S, TL-Om1	KARPAS-422 (DLBCL cell line), MV-4-11 (AML cell line), MM.1S (MM cell line), and TL-Om1 (ATL cell line)	Valemetostat tosylate, tazemetostat, and GSK126	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-5
Growth inhibition against hematologic cancer cell lines: KARPAS-422, MV-4-11, MM.1S, TL-Om1	KARPAS-422 (DLBCL cell line), MV-4-11 (AML cell line), MM.1S (MM cell line), and TL-Om1 (ATL cell line)	Valemetostat tosylate, CALZ-1809a	In vitro	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-6
In vivo					
Antitumor effect against subcutaneously inoculated human diffuse large B-cell lymphoma KARPAS-422 xenografted tumor	SCID mice; KARPAS-422 (DLBCL cell line) xenograft model	Valemetostat tosylate, tazemetostat	Oral, once daily or twice daily for 21 days	Daiichi Sankyo Co., Ltd., Japan	4.2.1.1-7

AML, acute myeloid leukemia; ATL, adult T-cell leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; EZH, enhancer of zeste homlog; H3K27me3, trimethylated histone H3 lysine 27; MM, multiple myeloma.

Type of Study	Test System	Test Article	Method of Admin.	Test Facility	Attachment Number
Safety Pharmacology					
In vitro					
In vitro hERG study	HEK293 cells stably transfected with hERG cDNA	Valemetostat tosylate and E-4031	In vitro	[redacted], [redacted], Italy	4.2.1.3-1
In vivo					
Cardiovascular	Beagle dog	Valemetostat tosylate	Oral, once daily for 7 days	[redacted], [redacted], Italy	4.2.1.3-2
Cardiovascular (ECG)	Beagle dog	Valemetostat tosylate	Oral, once daily for 4 weeks	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-5
Cardiovascular (ECG)	Beagle dog	Valemetostat tosylate	Oral, once daily for 13 weeks	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-6
Central nerves system (FOB)	Sprague Dawley rat	Valemetostat tosylate	Oral, once daily for 4 weeks	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-2
Respiratory function (WBP)	Sprague Dawley rat	Valemetostat tosylate	Oral, once daily for 4 weeks	[redacted], [redacted], Italy	4.2.3.2-2

ECG, electrocardiography; FOB, functional observation battery; hERG, human ether-à-go-go related gene; WBP, whole body plethysmography.

2. 効力を裏付ける試験

2.1 In vitro 試験

				Test article: Valemetostat tosylate, CALZ-1809a		
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Sex and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Inhibitory effect of valemetostat tosylate, tazemetostat, and GSK126 on the enzymatic activity of EZH1 and EZH2	In vitro cell-free system	In vitro	1.5, 6.1, 24, 98, 390, 1600, 6300, 25000 nmol/L	NA	The IC_{50} values against EZH1 and EZH2 were 10 and 6.0 nmol/L for valemetostat tosylate, 35 and 4.8 nmol/L for the EZH2 inhibitor tazemetostat, and 210 and 4.7 nmol/L for the EZH2 inhibitor GSK126. Valemetostat tosylate had similar EZH2 inhibition activity to comparator EZH2 inhibitors and greater EZH1 inhibition activity than the EZH2 inhibitors	4.2.1.1-1
Inhibitory effect of CALZ-1809a on the enzymatic activity of EZH1 and EZH2	In vitro cell-free system	In vitro	Valemetostat tosylate and tazemetostat: 1, 10, 100, and 1000 nmol/L CALZ-1809a: 1.5, 6.1, 24, 98, 390, 1600 ,6300, 25000 nmol/L	NA	The IC_{50} values of an oxidized metabolite of valemetostat, CALZ-1809a against EZH1 and EZH2 were 240 and 26 nmol/L, respectively. CALZ-1809a had weaker EZH1 and EZH2 inhibition activities than valemetostat tosylate.	4.2.1.1-2
Inhibitory effect of valemetostat tosylate on trimethylation of H3K27 in human colon cancer cells HCT116	HCT 116 (human colon cancer cell)	In vitro	Valemetostat tosylate and tazemetostat: 0.051, 0.15, 0.46, 1.4, 4.1, 12, 37, and 110 nmol/L GSK126: 0.46, 1.4, 4.1, 12, 37, 110, 330, and 1000 nmol/L	NA	The IC_{50} values for inhibiting trimethylation of H3K27 in HCT116 cells were 0.55 nmol/L for valemetostat tosylate, 6.3 nmol/L for tazemetostat, and 190 nmol/L for GSK126. Valemetostat tosylate inhibited trimethylation of H3K27 over comparator EZH2 inhibitors	4.2.1.1-3

				Test article: Valemetostat tosylate, CALZ-1809a		
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Sex and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Inhibitory effect of CALZ-1809a on trimethylation of H3K27 in human colon cancer cells HCT116	HCT 116 (human colon cancer cell)	In vitro	CALZ-1809a: 0, 39.1, 78.1, 156, 313, 625, 1250, 2500, 5000, and 10,000 nmol/L Valemetostat tosylate (control): up to 100 nmol/L	NA	The IC_{50} values were 190 nmol/L for CALZ-1809a and 0.50 nmol/L for valemetostat tosylate. CALZ-1809a had weaker H3K27me3 suppression activity than valemetostat tosylate.	4.2.1.1-4
Growth inhibitory effects of valemetostat tosylate against hematologic cancer cell lines	KARPAS-422 (DLBCL cell line), MV-4-11 (AML cell line), MM.1S (MM cell line), and TL-Om1 (ATL cell line)	In vitro	Valemetostat tosylate: 0.03 nmol/L to 1000 nmol/L, Tazemetostat and GSK126: 0.3 nmol/L to 10,000 nmol/L,	NA	The GI_{50} values against these 4 cell lines after 10-day treatment were 1.43 nmol/L to 18.4 nmol/L for valemetostat tosylate, 35.6 nmol/L to 185 nmol/L for tazemetostat, and 138 nmol/L to 957 nmol/L for GSK126. Valemetostat tosylate exhibited more potent growth inhibitory activity than the EZH2 inhibitors against all 4 cell lines	4.2.1.1-5
Growth inhibitory effects of CALZ-1809a against hematologic cancer cell lines	KARPAS-422 (DLBCL cell line), MV-4-11 (AML cell line), MM.1S (MM cell line), and TL-Om1 (ATL cell line)	In vitro	CALZ-1809a: 0.3 nmol/L to 10,000 nmol/L Valemetostat tosylate (control): 0.03 nmol/L to 1000 nmol/L	NA	The GI_{50} values of CALZ-1809a and valemetostat tosylate after 14-day treatment were 1550 and 0.918 nmol/L against KARPAS-422, 132 and 0.848 nmol/L against MV-4-11, 3170 and 1.81 nmol/L against MM.1S and 9970 and 43.2 nmol/L against TL-Om1, respectively. CALZ-1809a had much weaker growth inhibitory activity than valemetostat tosylate against all 4 cell lines.	4.2.1.1-6

AML, acute myeloid leukemia; ATL, adult T-cell leukemia; DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; EZH, enhancer of zeste homlog; GI_{50}, concentration causing 50% growth inhibition; H3K27me3, trimethylated histone H3 lysine 27; MM, multiple myeloma.

2.2 In vivo 試験

				Test article: Valemetostat tosylate, CALZ-1809a		
Type of Study	**Species/ Strain**	**Method of Admin.**	**Doses**	**Sex and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**Attachment Number**
Antitumor effect against subcutaneously inoculated human DLBCL KARPAS-422 xenografted tumor	CB17/Icr-*Prkdc*^{scid}/CrlCrlj mice, KARPAS-422 (human DLBCL cell line) xenograft model	Oral, once daily or twice daily for 21 days	Valemetostat tosylate: 1.56, 6.25, 25, and 100 mg/kg once daily or 0.781, 3.13, 12.5, and 50 mg/kg twice daily Tazemetostat: 200 mg/kg once daily or 100 mg/kg twice daily.	Female, 6/group	On Day 42, 100 mg/kg of valemetostat tosylate once daily showed TGIn of > 100% and TRR of 19.2%, and 25 mg/kg of valemetostat tosylate once daily produced notable, but less marked, effects. The dose-dependent antitumor activity was confirmed by Spearman's rank coefficient ($P < 0.0001$). On Day 42, 50 mg/kg of valemetostat tosylate twice daily showed TGIn of > 100% and TRR of 51.7%, and 12.5 mg/kg of valemetostat tosylate twice daily produced notable, but less marked, effects. The dose-dependent antitumor activity was confirmed by Spearman's rank coefficient ($P < 0.0001$). Those antitumor activities tended to increase or continue until 13 days after final administration (Day 55). Tazemetostat demonstrated no significant antitumor effect at either 200 mg/kg once daily or 100 mg/kg twice daily, with a maximum TGIn of 25%.	4.2.1.1-7

DLBCL, diffuse large B-cell lymphoma; TGIn, tumor growth inhibition rate (net); TRR, tumor regression rate.

3. 副次的薬理試験

該当する試験は実施していない。

4. 安全性薬理試験

				Test Article: Valemetostat tosylate			
Organ Systems Evaluated	**Species /Strain**	**Method of Admin.**	**Doses (mg/kg)**	**Sex and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Attachment Number**
Cardiovascular hERG current assay (whole-cell patch clamp)	HEK293 cells stably transfected with hERG cDNA	In vitro	Valemetostat tosylate: 0, 10, 30, 100 µmol/L E4031 (positive control): 100 nmol/L	Valemetostat tosylate: 3 cells/group E4031: 2 cells/group	Valemetostat tosylate at 10, 30, and 100 µmol/L produced vehicle corrected inhibitions of 4.6%, 7.2%, and 22.7%, respectively. IC_{50} >100 µmol/L Sensitivity of test system confirmed by response of positive control.	Yes	4.2.1.3-1
Cardiovascular	Dog/beagle with a telemetry system	Oral gavage, once daily for 7 days	0, 15, 60	Female, 4	On Day 7 at 60 mg/kg, QT interval was increased up to 16 msec (7.2%) from 4 to 8 hours after dosing, and QTc interval was increased up to 17 msec (8.3%) from 3 to 8 hours after dosing. On Day 1 for both dose levels, and on Day 7 at 15 mg/kg/day, there were no treatment-related changes.	Yes	4.2.1.3-2
Cardiovascular	Dog/beagle	Oral gavage, once daily for 4 weeks	0, 15, 30, 60	3/sex/group during pre-dosing and dosing period, or 0 to 2/sex/group during the recovery period	Increased QTc interval in 1 of 3 females at 30 mg/kg/day and 3 of 3 females at 60 mg/kg/day prior to dosing, and in all animals at ≥ 30 mg/kg/day at approximately 1 hour after dosing during Week 4. Mean maximum increases were 11% at 30 mg/kg/day and 19% at 60 mg/kg/day. No QTc prolongation noted in other females at 30 and 60 mg/kg/day in either Week 2 and Week 4 of recovery period.	Yes	4.2.3.2-5

				Test Article: Valemetostat tosylate			
Organ Systems Evaluated	**Species /Strain**	**Method of Admin.**	**Doses (mg/kg)**	**Sex and No. per Group**	**Noteworthy Findings**	**GLP Compliance**	**Attachment Number**
Cardiovascular	Dog/beagle	Oral gavage, once daily for 13 weeks	0, 7.5, 15, 30	4 to 6/sex/group	None	Yes	4.2.3.2-6
Respiratory Function	Rat/Crl:CD(SD)	Oral gavage, once daily for 4 weeks (evaluated on Day 1)	0, 60, 200, 600	Male, 8	None	Yes	4.2.3.2-2
Central nerves system	Rat/Crl:CD(SD)	Oral gavage, once daily for 4 weeks (evaluated on Week 2)	0, 60, 200, 600	Male, 8	Transient, treatment-related, but non-adverse reductions in rearing activity in all groups eight hours after first day of dosing, which was statistically significant.	Yes	4.2.3.2-2

5. 薬力学的薬物相互作用試験

該当する試験は実施していない。