ボラシデニブ　クエン酸水和物

医薬品製造販売承認申請書添付資料

第２部（モジュール２）

2.4　非臨床試験の概括評価

日本セルヴィエ株式会社

目次

1.　非臨床試験計画の概略 7
2.　薬理試験 8
2.1　標的に対する薬理作用 8
2.2　安全性薬理試験 10
2.3　薬力学的薬物相互作用試験 11
3.　薬物動態試験 11
3.1　分析法 11
3.2　吸収及び薬物動態 11
3.3　分布 12
3.4　代謝 13
3.5　排泄 14
3.6　薬物動態学的相互作用 14
4.　毒性試験 15
4.1　単回投与毒性試験 16
4.2　反復投与毒性試験 16
4.2.1　ラット 16
4.2.2　サル 18
4.3　遺伝毒性試験 19
4.4　がん原性試験 19
4.5　生殖発生毒性試験 19
4.5.1　受胎能及び初期胚発生 19
4.5.2　胚・胎児発生 20
4.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験 20
4.5.4　新生児を対象とした試験 21
4.6　局所刺激性 21
4.7　その他の毒性試験 21
4.7.1　聴覚毒性試験 21
4.7.2　光毒性試験 21
4.7.3　不純物の試験 22
5.　総括及び結論 22
5.1　薬理試験 22
5.2　薬物動態試験 23
5.3　毒性 26
5.4　曝露マージン 29
6.　参考文献一覧 31
7.　添付資料 32

表一覧

表 5:1　ヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの曝露量と比較した安全マージン.....30

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
α-KG	Alpha-ketoglutarate	α-ケトグルタル酸
2-HG	2-hydroxyglutarate	2-ヒドロキシグルタル酸
ABR	Auditory Brainstem Response	聴性脳幹反応
ACE	Angiotensin Converting Enzyme	アンジオテンシン変換酵素
ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AML	Acute myelogenous leukemia	急性骨髄性白血病
API	Active pharmaceutical ingredient	有効成分
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
AUC	Area under the concentration × time curve	濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}12hr}$	Area under the concentration × time curve from 0 to 12 hours	0 時間から 12 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24hr}$	Area under the concentration × time curve from 0 to 24 hours	0 時間から 24 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\infty}$	Area under the concentration × time curve from 0 to infinity	0 時間から無限時間までの濃度-時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
BID	Bis in die, twice daily	1 日 2 回
BSEP	Bile salts export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
CLp	Total body plasma clearance	全身血漿クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome	チトクロム
DDI	Drug-drug interaction	薬物相互作用
DLT	Dose limiting toxicities	用量制限毒性
DRF	Dose range-finding	用量設定
ECG	Electrocardiogram	心電図
EPO	Erythropoietin	エリスロポエチン
F	Bioavailability	生物学的利用能
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GD	Gestation day	妊娠日数
GGT	Gamma-glutamyl transaminase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
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
GSH	Glutathione	グルタチオン
HBG ½	Hemoglobin gamma ½	ヘモグロビンγ 1/2
hERG	Human ether-à-go-go	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子
[redacted]		
HNSTD	Highest non–severely-toxic dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HT1080	Human chondrosarcoma/fibrosarcoma cell line	ヒト軟骨肉腫／線維肉腫細胞株
IC_{50}	Concentration of drug that achieved half maximal inhibition	50%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonization	医薬品規制調和国際会議

IDH	Isocitrate dehydrogenase	イソクエン酸脱水素酵素
IDH1/IDH2	Isocitrate dehydrogenase-1/Isocitrate dehydrogenase-2	イソクエン酸脱水素酵素-1／イソクエン酸脱水素酵素-2
IKr	Rapidly activating delayed rectifier potassium current	急速活性型遅延整流カリウム電流
iPSP	Initial pediatric study plan	初期小児医薬品開発計画
IV	Intravenous	静脈内
KLF	Kruppel-like factor 1	Kruppel 様因子 1
$K_{RBC/PL}$	Red blood cell-to-plasma partition coefficient	血球／血漿分配係数
LC-MS/MS	Liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LSC	Liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数
MATE	Multidrug and toxin extrusion protein	多剤・毒性排出タンパク質
MRP	Multidrug resistance-associated protein	多剤耐性関連タンパク質
MTD	Maximum tolerated dose	最大耐用量
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No observed effect level	無作用量
NRU	Neutral red uptake	ニュートラルレッド取込み
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーターペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development	経済協力開発機構
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PIP	Pediatric investigational plan	小児医薬品開発計画
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
PIP	Pediatric investigation plan	小児医薬品開発計画
PO	Per Os (Oral)	経口
QD	Once daily	1 日 1 回
(Q) SAR	(Quantitative) Structure Activity Relationship	（定量的）構造活性相関
QTc	Corrected QT interval	QTc 間隔
QWBA	Quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
R132C	Arginine-132 mutated to cysteine	アルギニン-132 のシステインへの変異
R132G	Arginine-132 mutated to glycine	アルギニン-132 のグリシンへの変異
R132H	Arginine-132 mutated to histidine	アルギニン-132 のヒスチジンへの変異
R132L	Arginine-132 mutated to leucine	アルギニン-132 のロイシンへの変異
R132S	Arginine-132 mutated to serine	アルギニン-132 のセリンへの変異
R140Q	Arginine-140 mutated to glutamine	アルギニン-140 のグルタミンへの変異
R172K	Arginine-172 mutated to lysine	アルギニン-172 のリジンへの変異
RBC	Red Blood Cells	赤血球
SDH	Sorbitol dehydrogenase	ソルビトール脱水素酵素
STD10	Severely toxic dose leading to 10% lethality	重度の毒性が発現する用量（10%致死量）
$t_{1/2}$	Terminal half-life	終末相半減期
TF-1	Erythroleukemia cell line	赤白血病細胞株
TK	Toxicokinetic	トキシコキネティクス
TS603	Orthotopic glioma cell line	同所性神経膠腫細胞株
TTC	Threshold of toxicological concern	毒性学的懸念の閾値

U87	Glioblastoma astrocytoma cell line	神経膠芽腫星細胞腫細胞株
UGT	Uridine diphosphate glucuronosyl transferase	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
UV	Ultraviolet	紫外線
WT	Wild-type	野生型

1.　非臨床試験計画の概略

ボラシデニブ（一般名：ボラシデニブ　クエン酸水和物、治験成分記号：S095032、AG-881 又は AGI-23088）は、イソクエン酸脱水素酵素-1（IDH1）及びイソクエン酸脱水素酵素-2（IDH2）変異タンパク質の強力な阻害薬である。イソクエン酸脱水素酵素はクエン酸回路における非常に重要な酵素であり、イソクエン酸の酸化的脱炭酸を触媒し、二酸化炭素と α-ケトグルタル酸（α-KG）を産生する。変異 IDH 酵素は触媒活性を有するが、新たな酵素活性として、オンコメタボライトである 2-ヒドロキシグルタル酸（2-HG）へのα-ケトグルタル酸（α-KG）の還元を触媒する活性がある。2-HG は固形腫瘍及び血液腫瘍の患者で増加することが分かっている。

本申請で対象とするボラシデニブの効能・効果は、*IDH1* 又は *IDH2* 遺伝子変異陽性の神経膠腫の手術後の治療である。

ボラシデニブの推奨用量は 40 mg で、疾患進行又は許容できない毒性が生じるまで 1 日 1 回（QD）経口投与する。

ボラシデニブはクエン酸水和物［化学名：6-(6-chloropyridin-2-yl)-N^2,N^4-bis[(2*R*)-1,1,1-trifluoropropan-2-yl]-1,3,5-triazine-2,4-diamine,2-hydroxypropane-1,2,3-tricarboxylic acid, hydrate (2:1:1)］を含む錠剤を用いた。錠剤には、添加剤として結晶セルロース、クロスカルメロースナトリウム、軽質無水ケイ素、ラウリル硫酸ナトリウム及びステアリン酸マグネシウムを含む。

ボラシデニブの非臨床プロファイル及び循環血中の主な代謝物の特性は、薬理試験、薬物動態（PK）試験及び毒性試験で検討されており、*IDH1* 又は *IDH2* 遺伝子変異陽性の神経膠腫を対象とした製造販売承認申請を支持している。非臨床毒性プログラムは、医薬品規制調和国際会議（ICH）の S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」[1)] に従って計画された。安全性薬理試験及びピボタル毒性試験は、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠して実施されており、試験実施時点で施行されていた経済協力開発機構（OECD）の基準にも一致した。非 GLP 毒性試験も、GLP 施設にて適切な管理下で実施された。

非臨床薬理プログラムには、IDH 変異誘発腫瘍形成モデルによる、ボラシデニブ及び AGI-69460 の力価及び標的の変異 IDH 酵素を阻害して代謝物である 2-HG の低減能力を特性として解析することを目的とした *ex vivo* 探索試験及び／又は *in vitro* 探索試験が含まれる。さらに、マウス異種移植モデルを使用して *in vivo* 薬理試験を実施し、内因性 IDH1R132C 変異を有するヒト軟骨肉腫／線維肉腫（HT1080）異種移植モデル、IDH2R140Q を過剰発現する U87 神経膠芽腫星細胞腫モデル、及び内因性 IDH1R132H 変異を有する同所性の TS603 神経膠腫モデルなどを使用して、ボラシデニブが腫瘍組織中で 2-HG の産生を抑制する力価を確認した。これらの試験に基づき、腫瘍中の 2-HG を持続的に抑制するボラシデニブの血漿中曝露量を予想した。

非臨床薬理プログラムには受容体結合アッセイ及び機能アッセイも含め、88 種類の受容体、イオンチャネル及び酵素にて、ボラシデニブ及び AGI-69460 の結合性及び酵素活性を阻害する可能性を評価した。

パッチクランプアッセイ（オート及びマニュアル）などの安全性薬理試験を実施し、ボラシデニブ及びボラシデニブの循環血中の主な代謝物である AGI-69460 が心血管系に影響を及ぼす可能

性を評価した。また、カニクイザルを用いた 28 日間及び 13 週間の GLP 準拠反復投与毒性試験では心電図（ECG）評価も実施した。中枢神経系については、ラットを用いた 28 日間毒性試験の一部として Irwin 変法を用いて、ボラシデニブが行動に影響を及ぼす可能性を評価した。

ボラシデニブの PK について、BALB/c マウス、Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬及びカニクイザルを用いた非 GLP 試験で吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）を評価した。動物種全体で、単回静脈内（IV）投与、単回経口投与及び反復経口投与を評価した。ボラシデニブの脳への移行はマウス、ラット及びサルで評価した。ボラシデニブの代謝経路は、ヒト、サル、イヌ、マウス及びラットの肝ミクロソーム、肝細胞の *in vitro* 試験で得られた試料と共に、サル、マウス及びラットを用いた PK 試験から得られた血漿、並びに、ADME 試験でラットに[^{14}C] ボラシデニブを経口投与した後に得られた血漿及び胆汁を使用して検討した。また、チトクロム P450（CYP）酵素、ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）酵素及びトランスポーターを介した PK 薬物相互作用（DDI）を評価するため、適切なアッセイ系を用いて *in vitro* 試験を実施した。

患者への投与は経口投与であるため、ラット及びサルを用いた非臨床毒性試験では強制経口投与でボラシデニブを投与した。ラットとカニクイザルは安全性プロファイルの評価に使用する標準的な動物種であり、代謝物プロファイルがヒトと類似しているため、これらの動物種を選択した。安全性評価には Sprague-Dawley ラットとカニクイザルを用いた 28 日間及び 13 週間の反復投与毒性試験、*in vitro* 細菌復帰変異アッセイ、ヒト末梢血リンパ球小核アッセイ、及び *in vivo* 小核アッセイによる一連の遺伝毒性評価を含めた。Sprague-Dawley ラット及び New Zealand White ウサギを用いた胚胎児発生毒性試験として、用量設定（DRF）試験及び本試験を実施した。聴覚系に対する機能的及び形態学的作用を評価する聴覚毒性試験、並びに光毒性試験も実施した。ボラシデニブ及び AGI-69460 の定量は、ラット及びサルの血漿を使用し、バリデートされた生体試料中薬物濃度分析法により定量した。トキシコキネティクス（TK）及び投与液の分析法は、【2.6.5】に要約する。

In vitro 試験、*in vivo* 小核試験及び胚胎児発生毒性試験では、臨床で用いられるボラシデニブクエン酸水和物で動物に投与した。ラットを用いた初期の毒性試験では 1 日 2 回（BID）で投与したため、濃度-時間曲線下面積（AUC）の値は 0～12 時間のデータ（$AUC_{0\text{-}12hr}$）に基づいて報告するが、他の毒性試験では QD 投与したため、曝露量の結果は 0～24 時間のデータ（$AUC_{0\text{-}24hr}$）に基づいて報告する【2.6.7_3】。以下の項では、動物における曝露量がヒトにおける曝露量の何倍であるかは、神経膠腫患者に 1 日 50 mg を反復投与したときの定常状態での平均 $AUC_{0\text{-}24hr}$（3144 ng.h/mL）を基準として算出した【2.7.2】。

2.　薬理試験

2.1　標的に対する薬理作用

複数の IDH 変異モデルを使用して一連の探索的薬理試験を実施し、ボラシデニブの力価及び標的の変異 IDH 酵素を阻害することによる代謝物 2-HG の低減能力を解析した【2.6.2】及び【2.6.3】。

初期の試験では、IDH1 変異及び IDH2 変異を阻害し、がん細胞中の 2-HG 産生を抑制することのできる阻害薬を特定することを目標とした【2.6.2_2.1】。50%阻害濃度（IC_{50}）に基づくと、ボ

ラシデニブは IDH1R132（H、C、G、L 及び S）、IDH2R140Q 及び IDH2R172K のホモダイマー酵素、及び IDH1 野生型（WT）/R132H、IDH2 WT/R140Q 及び IDH2 WT/R172K のヘテロダイマー酵素に対し、ナノモルレベルの低い濃度で阻害能を示した。ボラシデニブは IDH1R132H 及び IDH2R172K ホモダイマー酵素に対して急速平衡化阻害薬であり、IDH1 WT/R132H、IDH2 WT/R140Q 及び IDH2 WT/R172K ヘテロダイマー及び IDH2R140Q ホモダイマーに対して遅延型結合阻害薬である。また、IDH1 WT と IDH2 WT のホモダイマー酵素に対しても力価は低いが阻害を示し、これらの酵素に対しては遅延型結合阻害薬である。

IDH1 変異酵素及び IDH2 変異酵素に対してのボラシデニブの力価は、IDH 変異を発現するように操作したセルベースアッセイでも示されている【2.6.2_2.2】。これらの細胞株ではいずれも変異 IDH タンパク質が発現しているため、2-HG が高産生される。ボラシデニブによる 2-HG 阻害の IC_{50} 範囲は、IDH1R132C 変異、IDH1R132G 変異、IDH1R132H 変異又は IDH1R132S 変異を発現する細胞で 0.04～20 nM、IDH2R140Q 変異、IDH2R172K 変異を発現する細胞でそれぞれ 7～14 nM と 130 nM であった。ボラシデニブの循環血中の主な代謝物である AGI-69460 の力価も、IDH1R132C HT1080 モデル、IDH1R132H TS603 モデル及び IDH2R172K HCT116 モデルで測定した。いずれの細胞株でも 2-HG 産生阻害作用はボラシデニブのほうが AGI-69460 より強かった。AGI-69460 の IC_{50} は、HT1080 細胞で 264.0 nM、TS603 細胞で 6.7 nM であった。IDH2 R172KHCT116 細胞において、ボラシデニブ及びその代謝物 AGI-69460 の IC_{50} はそれぞれ 83 nM 及び 585 nM であった。

IDH1 変異と IDH2 変異が細胞分化に及ぼす固有の効果を検討するために、成長因子顆粒球マクロファージコロニー刺激因子依存性赤白血病細胞株（TF-1）に、IDH1R132H 変異アレル又は IDH2R140Q 変異アレルを遺伝子導入してモデル系を作成した【2.6.2_2.3】。これらの細胞の特性を解析したところ、変異酵素が発現し、2-HG の細胞内濃度が高いことが確認された。遺伝子導入した細胞を、ボラシデニブ（0.2 μM 及び 1 μM）で 7 日間処理したところ、2-HG 産生が阻害され TF-1 細胞のバックグラウンド濃度まで低下した。赤血球分化の 2 つのマーカーであるヘモグロビン γ 1/2（HBG 1/2）遺伝子及び Kruppel 様因子 1（KLF-1）遺伝子の発現が部分的に回復し、エリスロポエチン（EPO）が誘発する赤血球系分化に対して IDH 依存性遮断が消失したことが示された。

ヒト急性骨髄性白血病（AML）骨髄芽球初代細胞を使用し、ボラシデニブが IDH1 変異タンパク質及び IDH2 変異タンパク質に対しての阻害能も評価した。具体的には、*ex vivo* アッセイで AML 患者由来の IDH1R132C、IDH2R172K 及び IDH2R140Q 骨髄芽球をボラシデニブで処理した【2.6.2_2.3.2】。13 日間ボラシデニブにより *ex vivo* 処理すると、測定が可能な 2-HG が減少し、Day 3～6 に急激に増殖が始まった。さらに、10 日間の液体培養による増殖後には、患者由来の IDH1 変異試料及び IDH2 変異試料で顆粒球への分化が誘導された。

マウス異種移植モデル（内因性 IDH1R132C 変異を有する HT1080 軟骨肉腫／線維肉腫異種移植モデル、U87 IDH2R140Q 神経膠芽腫異種移植モデル、及び同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫異種移植モデル）を使用して一連の *in vivo* 薬理試験を実施し、ボラシデニブが腫瘍組織中で 2-HG 量を抑制する効果が確認された【2.6.2_2.4】。これらの試験では、ボラシデニブ投与後、腫瘍

内の 2-HG 濃度が急速に低下し、阻害は用量及び曝露量に依存的であった。30 mg/kg 以上の濃度で HT1080（IDH1R132C）マウスモデル及び U87（IDH2R140Q）マウスモデルにボラシデニブを反復投与すると（12 時間に 1 回）、腫瘍中 2-HG 濃度は 96%超低下した。同所性神経膠腫モデル（IDH1R132H）では、0.1 mg/kg 以上の用量で脳腫瘍中 2-HG 濃度は 99%超低下した。

ボラシデニブの結合阻害能及び酵素活性阻害能を、88 種類の受容体、イオンチャネル及び酵素にて評価した【2.6.2_3.1】。ボラシデニブの選択性が高く、有意なオフターゲット活性（50%以上）はアデノシン A3 受容体に対してのみであった（1 μM で 92%の結合阻害）。フォローアップアッセイでは、ボラシデニブがアデノシン A3 受容体の機能的アンタゴニストとして作用することが示され、IC_{50} は 1.50 μM であった。*In vivo* 毒性試験では、アデノシン A3 受容体拮抗作用に相当する所見（ヒスタミンとマスト細胞の調節又は眼圧の変化）はみられなかった【2.6.6】。AGI-69460 は、ボラシデニブのオフターゲット活性の評価に用いられたものと同様のパネル（88 種類中 86 種類の受容体、イオンチャネル、酵素のパネル）を用いて評価された。なお、アンジオテンシン変換酵素（ACE）及びロイコトリエン B4 はボラシデニブで非活性であったため、除外した。その結果、アデノシン A3 受容体（1 μM で 75%の結合阻害）に限定される有意なオフターゲット活性（≧50%）とともに、高い選択性を示すことが示された【2.6.2_3.1】。

ボラシデニブの標的に対する薬理作用を *in vitro*、*in vivo* 及び *ex vivo* で評価したデータを総合すると、ボラシデニブは IDH1 変異酵素又は IDH2 変異酵素を有する悪性腫瘍患者において、これらの新形態の活性に対して強力な阻害薬となり、腫瘍細胞内での 2-HG 産生を阻害して腫瘍細胞の分化を遮断し、腫瘍量を低減する可能性が示される。

2.2　安全性薬理試験

安全性薬理試験は、【2.6.2_4】及び【2.6.3_1.4】に要約する。

ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（hERG）によりコードされている急速活性型遅延整流カリウム電流（I_{Kr}）阻害能を評価するパッチクランプアッセイ（オ―ト及びマニュアル）の複数の試験により、ボラシデニブ及び循環血中の主な代謝物である AGI-69460 が心血管系に作用する可能性を評価した。ボラシデニブはこれらの試験で、使用した最高濃度でも I_{Kr} を阻害しなかった（IC_{50} は 12.3 μM 超）。AGI-69460 については、hERG カリウム電流阻害作用の IC_{50} は 30 μM 超と推定された。サルを用いた GLP28 日間反復投与毒性試験では、ECG も評価した【2.6.2_4】【2.6.6_3】。忍容性のない用量（40 mg/kg/day）を投与した雄ザル 1 匹で、心拍数で補正した QTc 間隔がわずかに（32 msec）延長し、ボラシデニブに関連する可能性があると考えられた。13 週間毒性試験では ECG パラメータに影響はなかった。

Sprague-Dawley ラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験で、Irwin 変法アッセイでボラシデニブが行動に影響する可能性を評価した。いずれの評価項目についてもボラシデニブに関連する影響はみられなかった【2.6.6_3】【2.6.7_7】。

ラットとカニクイザルを用いた 28 日間試験及び 13 週間試験で、呼吸器系には投与に関連した一般状態の所見はなかった【2.6.6_3】。

2.3　薬力学的薬物相互作用試験

ボラシデニブの非臨床試験では、薬力学的薬物相互作用は評価していない。ICH ガイドライン S9（ICH 2009）ではこの種の試験は必要とされていないため、妥当と考えられる[1)]。

3.　薬物動態試験

ボラシデニブの ADME 試験は BALB/c マウス、Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬、及びカニクイザルを用いて実施し【2.6.4】及び【2.6.5】、経口投与及び IV 投与で評価した。IV 投与ではすべての動物種にフリー体を使用し、経口投与ではラットとイヌにフリー体の経口用懸濁液、マウスとサルに経口投与用の[redacted]（[redacted]）を使用した。カニクイザルに対してクエン酸水和物（ヒト初回投与試験で使用した処方）を使用した試験を実施し、絶食下及び摂餌下の薬物動態を評価した【2.6.4_3.2.2.1】。毒性学的評価でラットとサルにみられた全身曝露量と代謝は、これらの動物がヒトにおけるボラシデニブ及び代謝物の安全性の予想に適した動物種であることを示した。

3.1　分析法

ラットとサルを用いた GLP 毒性試験で血漿試料のアッセイとして、米国食品医薬品局（FDA）の「Guidance for Bioanalytical Method Validation（生体試料中薬物濃度分析法バリデーション）」[2)]に従って高感度かつ選択的な液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）法を開発し、バリデートした。

マウス、ラット、イヌ及びサルを用いた非 GLP の PK 試験及び *in vitro* 試験の試料については、バリデートされていない LC-MS/MS 法で分析した。

[^{14}C]ボラシデニブを使用した試験では、*in vitro* 及び *in vivo* 試験で得られた試料の放射能は、直接液体シンチレーション計数（LSC）で測定するか試料燃焼後に LSC で測定した。組織中の放射能濃度は定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）で測定した。代謝物のプロファイリングと同定は、インライン紫外線（UV）及び β-放射能モニタリングフロー検出器、並びにタンデム質量分析計付きの液体クロマトグラフィーで実施した。

3.2　吸収及び薬物動態

ボラシデニブの PK は速やかな経口吸収性の特徴を示し、全身血漿クリアランス（CL_p）はマウス、ラット及びサルで小さく（それぞれ平均 0.406 L/hr/kg、0.289 L/hr/kg 及び 0.506 L/hr/kg）、イヌでは大きかった（1.85 L/hr/kg）。定常状態での分布量はマウス、ラット、イヌ、サルで高値（それぞれ平均 7.75 L/kg、8.27 L/kg、13.7 L/kg 及び 12.3 L/kg）であった。静脈内投与後の終末相半減期（$t_{½}$）はイヌ以外では長く、6.4 時間（イヌ）から 24 時間（サル）の範囲であった。各動物種での経口バイオアベイラビリティ（F）は、6.42%（フリー体、イヌ）から 109%（[redacted]、サ

ル）の範囲であった【2.6.4_表 1:1】。初期の臨床試験用のプロトタイプ処方をサルに絶食下で投与したときの経口バイオアベイラビリティは、ボラシデニブ　クエン酸水和物錠 5 mg、25 mg 及び 100 mg で 26.5%～73.1%の範囲と推定され、摂餌下では 100 mg 錠で 57%であった。サルにクエン酸水和物処方を投与して食物の影響を評価したところ、食物とともに投与するとボラシデニブ曝露量が増加した［0 時間から無限時間までの濃度-時間曲線下面積（AUC_{∞}）は 1.86 倍］【2.6.4_3.2.2.1】。

ラット及びサルを用いた反復投与試験では、ボラシデニブの曝露量に顕著な性差は認められなかった。7 日間、28 日間及び 13 週間にわたり反復投与したとき、ボラシデニブの蓄積率は試験期間中を通してラットで 2.7～8.5 倍、サルで 1.5～5.0 倍の範囲であった。ラットを用いて実施した 13 週間の TK 試験（GLP）では、最終投与（Day 91）後のボラシデニブの曝露量は、5 mg/kg/day 及び 15 mg/kg/day では用量に比例して増加したが、50 mg/kg/day では用量に比例した増加を下回った。サルを用いた 13 週間の TK 試験（GLP）では、最終投与（Day 91）後のボラシデニブの曝露量は、2 mg/kg/day 及び 6 mg/kg/day の用量では用量比例性を示したが、20 mg/kg/day の用量では用量比例を上回った。

3.3　分布

ボラシデニブは透過性及び血漿タンパク結合率が高く、広く分布し、血液脳関門を通過する。

ボラシデニブの平均血漿タンパク結合率は高く、動物種全体で 94.7%～97.4%である【2.6.4_4.3】。ボラシデニブはヒト、サル、イヌ、ラット、マウスの血中では主に血漿中に留まり、赤血球（RBC）への移行は少ない（$K_{RBC/PL}$ <0.5）【2.6.4_4.2】。ボラシデニブは細胞膜透過性が高く（P_{app} は[redacted]cm/sec）、排出ポンプの基質ではない（Caco2 細胞での排出比は 0.603）。

ボラシデニブは脳に移行し、$AUC_{0\text{-}24hr}$ に基づく脳中曝露量と血漿中曝露量の比は、マウスで 0.62～1.96、ラットで 1.11～1.48、及びサルで 1.25～3.01（最終投与から 24 時間後の濃度）であった【2.6.4_4.1】。

ボラシデニブは P-糖タンパク質（P-gp）又は乳癌耐性タンパク質（BCRP）の基質ではなく【2.6.4_7.5】、P-gp の阻害薬ではないが、BCRP の阻害薬である（IC_{50} は 1.22 μM）【2.6.4_7.5】。

[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能は速やかに吸収され、組織に分布し、体内から緩やかに消失した。皮膚、内分泌、分泌組織並びに消化管及び代謝／排泄系の組織が[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能の分布が最も大きかった。脳でボラシデニブ由来の放射能が検出され、脳／血漿中 $AUC_{0\text{-}\infty}$ 比は 0.76 であった。また、眼球血管膜などのメラニン含有組織への放射能の大幅な分布は認められず、[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能はメラニンに結合しないことが示唆された。

薬理活性を有するボラシデニブの主要な血液中ヒト代謝物である AGI-69460 も、ヒト血漿中で高いタンパク結合（87%以上）を示し、α-1 酸性糖タンパク質よりもヒト血清アルブミンに優先的に結合した【2.6.4_4.3】。ヒトの血液では、AGI-69460 は血漿と比較して赤血球により多く分配された（$K_{RBC/PL}$：2.17 及び血液／血漿中濃度比：1.38）【2.6.4_4.2】。

ラットの脳組織では、ボラシデニブ（結合率 99%超）及び AGI-69460（結合率 96%超）は、いずれも高い組織結合性を示した。

3.4　代謝

ボラシデニブの代謝回転率は、ヒトを含む複数の動物種由来の肝ミクロソーム及び肝細胞で低い。

ボラシデニブの主な消失経路は代謝である【2.6.4_5】。ラット胆汁中（0.0875%）、及びラットとサルの尿中（それぞれ 0.00438%と 0.0183%）にボラシデニブの未変化体の排泄はわずかであり、イヌの尿中ではボラシデニブは検出されなかった【2.6.4_6】。

マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトのプレートに播種した肝細胞を用いて、ボラシデニブの代謝物プロファイリングを *in vitro* で実施し、マウス、ラット、サルの PK 試験でボラシデニブを反復投与した後、採取した血漿を使用して *in vivo* で実施した。その結果、代謝プロファイルは試験に用いたすべての動物種全体でほぼ同じであった【2.6.4_[5.2.1, 5.2.2]】。ボラシデニブの定量可能な主な代謝経路は、グルタチオン又はシステインとの抱合と考えられる【2.6.4_5.2】。これは非臨床試験に用いた動物種全体及びヒトで共通の代謝経路と考えられ、毒性試験に使用する動物としてラットとサルが適切であることを裏付けている【2.6.4_5.2】。

In vivo で観察された代謝物は *in vitro* でみられた代謝物と一致していた。マウスは、酸化及び酸化+グルクロン酸抱合を介してのみボラシデニブを代謝すると考えられた。ラット及びサルはマウスと同一の経路を介してボラシデニブを代謝するが、クロロピリジン環の変換を介してもボラシデニブを代謝すると考えられた。ラット及びサルでは、クロロピリジン環が脱塩素を受け、その後グルタチオン（GSH）若しくはシステインのいずれかと抱合する（又は GSH 若しくはシステインの抱合により脱塩素が引き起こされる）。他の代謝物は、水酸化、脱塩素／GSH／システイン抱合及びグルクロニド抱合の組合わせである。*In vivo* 代謝物プロファイルは用量増加により変化することはなく、ヒトで代謝が変わる可能性はないことが示唆された【2.6.4_5.2.2】。

無処置ラット（300 µCi/kg）及び胆管カニューレ挿入ラット（250 µCi/kg）に[^{14}C]ボラシデニブを 30 mg/kg の用量で単回経口（PO）投与したとき、ラットの胆汁中に酸化／エポキシ化、*N*-脱アルキル化、及び／又はグルタチオン、システイン、グリシン、若しくはグルクロン酸との抱合、又はこれらの経路の組合わせに由来する計 11 種類の代謝物が検出された。未変化体は微量であった。ラットの胆汁中で特定された主な代謝物（投与量の 5%超）は M701a、M685、M990a 及び M990b で、酸化／エポキシ化、脱塩素及びグルタチオン抱合の組合わせに由来した。微量代謝物（総放射能の 5%未満）には、M990c（脱塩素、グルタチオン抱合）、M318（*N*-脱アルキル化）、M719（グルタチオン抱合）、M499（システイン抱合）、M606（酸化及びグルクロン酸抱合）、M556（システイン-グリシン抱合）、M430a（酸化）が含まれた。投与量の 61%がラットの胆汁で回収され、未変化体は微量しか検出されなかったことから、ラットにおけるボラシデニブの主なクリアランス経路は肝代謝である。

ヒトの *in vitro* 代謝物はいずれも、安全性試験に用いた動物種において *in vitro* 又は *in vivo* で検出された。AGI-69460 はボラシデニブ代謝の後期に形成される下流のデスクロロ-メチルスルホン

代謝物であり、ヒト ADME 試験で最初に特定された循環血中の主な代謝物である。AGI-69460 はラットに 30 mg/kg/day、サルに 20 mg/kg/day を 7 日間反復経口投与した後にも、血漿と肝臓で確認された。ラットとウサギを用いた胚胎児発生毒性試験でも、血漿中の AGI-69460 曝露が確認された。

3.5　排泄

ラットとサルにボラシデニブを単回静脈内投与したときの尿中排泄はわずかであり、イヌでは尿中で検出されなかった。胆管カニューレ挿入ラットに単回静脈内投与したとき、胆汁中で回収されたボラシデニブは少量であったため、胆汁排泄は主な経路ではないことが示された。

ラットを用いたマスバランス試験で[^{14}C]ボラシデニブを経口投与したとき、投与量の 61%が胆汁中で回収され、糞中では 21.4%、尿中では 1.77%が回収された。この結果は、[^{14}C]ボラシデニブ由来放射能の主な排泄経路は胆汁排泄であることを示している。

3.6　薬物動態学的相互作用

ボラシデニブは主に CYP1A2 で代謝され、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の寄与は少ない。肝臓におけるボラシデニブの代謝クリアランスでは、CYP 以外の経路が最大で 30%関与していると考えられる。

ボラシデニブは、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の直接／可逆的、又は時間依存的な阻害薬ではない。

ウリジン 5′-二リン酸グルクロン酸転移酵素 1A1（UGT1A1）に対しては弱い阻害作用を有し、IC_{50} は 8.0 μM である。

ボラシデニブは、CYP1A2 の誘導薬ではないが、培養したヒト肝細胞中で CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP2C19（活性のみ）及び CYP3A4/5 を誘導する【2.6.4_7.3】。

ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験で、ボラシデニブ代謝の自己誘導はみられなかった【2.6.4_7.4】。

ボラシデニブは、P-gp、BCRP、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1 及び OATP1B3 の基質ではない。

P-gp の阻害薬ではないが、BCRP の阻害薬であり、IC_{50} は 1.22 μM で、試験に使用した最高濃度である 5 μM では 70.2%の阻害を示した。

ボラシデニブは、胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）、多剤・毒性排出タンパク質（MATE）1、MATE2-K、多剤耐性関連タンパク質（MRP）2、MRP3、OATP1B1、OATP1B3、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3、及び有機カチオントランスポーター（OCT）2 の阻害薬ではない。これらのトランスポーターの基質とボラシデニブの DDI はないと見込まれた。

ヒトにおけるボラシデニブの循環血中の主な代謝物である AGI-69460 は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、及び CYP3A4/5 との代謝実験では安定であった。

AGI-69460 は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、又は CYP3A4/5 の直接的あるいは時間依存性阻害薬ではない。

AGI-69460 は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4/5 の誘導薬である。AGI-69460 による CYP2C19 の誘導については結論に至っていない。臨床で確認された濃度では、AGI-69460 は CYP1A2 の有意な誘導を引き起こすことはないと予想されるため、CYP1A2 誘導によるボラシデニブの PK への影響又は DDI は生じないと見込まれる。

AGI-69460 は P-gp、BCRP、OATP1B1、OATP1B3 の基質ではない。AGI-69460 は BCRP 及び OATP1B3 の阻害薬であり、それぞれ IC_{50} 値は 5.84 μM 及び 2.97 μM である。AGI-69460 は、P-gp、OATP1B1、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 及び OCT2 の阻害薬ではない。臨床で確認された濃度では、ボラシデニブによる BCRP 及び OATP1B3 基質の取込み阻害を介した DDI は生じないと見込まれる。

4.　毒性試験

IDH1 又は *IDH2* 遺伝子変異陽性の神経膠腫の成人患者及び 12 歳以上の小児患者に対する手術後の治療薬としてボラシデニブの販売承認申請を裏付けるために、安全性を評価する非臨床試験を実施した。実施されたボラシデニブの毒性試験を【2.6.7_1】に示す。

非臨床毒性プログラムは ICH S9 ガイドライン（ICH 2009）に従って設計した。安全性薬理試験及びピボタル毒性試験は GLP に準拠して実施し、OECD 基準にも一致している。非 GLP 試験もラット（7 日間反復投与試験）及びサル（単回投与及び 7 日間反復投与試験）を用いて実施し、ボラシデニブの安全性を評価した。

ボラシデニブの毒性プロファイルは、ラットとカニクイザルを用いた単回投与及び反復投与毒性試験、遺伝毒性試験、ラットとウサギを用いた生殖発生毒性試験、及び聴覚毒性試験、光毒性試験などの特殊な毒性試験で評価し、一部の不純物について潜在的な毒性を評価した。

Sprague-Dawley ラットとカニクイザルは、ヒトに対する有害作用を予想するために従来から使用されている動物種であること、これらの動物種の *in vitro* 肝代謝はヒト肝ミクロソームでみられた代謝とほぼ同じであること【2.6.4_5】、及びラットもサルも許容できる PK プロファイルを示したこと【2.6.4_[3,4]】に基づいて非臨床試験用動物として選択し、反復投与毒性試験での毒性評価に用いた。

In vivo 非臨床毒性プログラムでは臨床投与経路と合わせ、ボラシデニブを経口で投与し、評価した。ボラシデニブは、添加剤[redacted]（[redacted]）（1:1 w/w）を用いた[redacted]として投与した。本文書に記載された用量は、投与する有効成分（API）の量を反映している。一部の毒性試験では、2 種類の溶媒対照（溶媒のみと[redacted]＋溶媒）を使用し、添加剤に対する曝露も考慮した。溶媒に添加した[redacted]の量（添加剤負荷）は、各試験で使用した最高用量に含まれる量と等しい量とした。*In vitro* 試験、*in vivo* 小核試験及び胚胎児発生毒性試験では、ボラシデニブ　クエン酸水和物を投与した（臨床処方で使用しているクエン酸水和物と同じ）。

ボラシデニブは、ラット及びサルの血漿を使用した分析法で定量した。TK 分析法は【2.6.5_2】に要約する。

以下の項では、ヒトに対する曝露マージンは、神経膠腫患者に 50 mg を連日投与したとき、定常状態における 0 時間から 24 時間の濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24hr}$）である 3144 ng.h/mL を基準として算出した。安全性マージンを算出する際に選択したヒトに対する用量は、相対バイオアベイラビリティ試験、ポピュレーション PK モデル、及び第 I 相試験の臨床 PK データの結果に基づいており、フィルムコーティング錠剤 40 mg を連日投与したときの定常状態での AUC は、非コーティング錠剤 50 mg を連日投与したときの定常状態での AUC と同程度と見積もられる【2.7.2】。

4.1　単回投与毒性試験

カニクイザルを用いて経口単回投与毒性試験を実施し、ボラシデニブの TK プロファイルを評価した【2.6.7_5】。雌雄のカニクイザルに 3、40、80 mg/kg/day を強制経口投与したときの忍容性は良好で、死亡や体重に対する影響はなかった。

各用量を投与したときの曝露量は、$AUC_{0\text{-}24hr}$ が雄でそれぞれ 3520、44700、139000 ng.h/mL、雌で 5020、83300、90600 ng.h/mL、C_{max} が雄で 484、3280、6550 ng/mL、雌で 538、4520、4610 ng/mL であった。

4.2　反復投与毒性試験

Sprague-Dawley ラットとカニクイザルを用いて反復投与毒性試験を実施し、ボラシデニブを最長 13 週間投与した【2.6.6_3】【2.6.7_7】。患者に対しては経口投与を目的としているため、いずれの試験でも動物に経口投与した。ボラシデニブ投与用懸濁液は[redacted]を用いた[redacted]（[redacted]）として調製した。用量はいずれも投与した API の量で記載した。ボラシデニブに関連する影響の可逆性、持続性、及び遅延発現は、いずれの動物種でも、28 日間試験では 14 日間、13 週間試験では 4 週間評価した。ラットとサル由来の血漿におけるボラシデニブの TK を【2.6.7_3】に要約する。

4.2.1　ラット

GLP28 日間反復投与毒性試験では、雌雄のラットに 3、10、30、100 mg/kg/day を投与した。

100 mg/kg/day では忍容性はなく、10%致死量（STD_{10}）に至る重度の毒性が発現する用量を超えていた。死亡／瀕死状態の原因は、被験物質投与による体重減少／飢餓衰弱であった。腺胃／十二指腸の潰瘍及び腹膜炎の発現率が高く、胃と十二指腸の病変が根本的な原因であることが裏付けられた。他にも肝臓、生殖器官、中耳及び皮膚に所見があった。また、主にこの用量で血液生化学パラメータも変化した［アルカリホスファターゼ（ALP）減少、総ビリルビンのわずかな増加、及びコレステロール、γ-グルタミルトランスフェラーゼ（GGT）、総タンパク質、アルブミン、グロブリン及び尿素窒素の増加］。

ラットで評価した 2 番目に高い用量（30 mg/kg/day）の忍容性は良好で、Day 27 の $AUC_{0\text{-}24hr}$ とヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの $AUC_{0\text{-}24hr}$ を比べると、安全性マージンは 62 倍であった。RBC パラメータの値（赤血球数、ヘモグロビン及びヘマトクリット）が低下したが、胃びらんから二次的に生じた可能性がある。血液生化学検査値で影響があったのはビリルビン、ALP 及びコレステロールのみであり、影響の程度はわずかであった。精嚢と前立腺の萎縮が 30 mg/kg/day 以上を投与した動物でみられ、胃の肥厚（雄 1 匹のみ）もみられた。肝臓重量が増加し（10 mg/kg/day 以上を投与した雄及び 3 mg/kg/day 以上を投与した雌）、腎臓重量が減少した（10 mg/kg/day 以上を投与した雄及び 100 mg/kg/day を投与した雌）。試験に関連した顕微鏡所見として、薬剤の刺激作用と一致した消化管潰瘍とびらん、肝細胞酵素誘導に相関する肝臓所見（重量増加、肝細胞肥大及びビリルビン増加）、中耳の好中球浸潤及び生殖器（前立腺及び精嚢）の萎縮がみられた。この用量では、被験物質関連の所見のほとんどは 14 日間の回復期間中に部分的又は完全に可逆的であった。

10 mg/kg/day 及び 3 mg/kg/day の用量の忍容性は良好であった。血液、肉眼所見、一般状態の所見、体重又は摂餌量などのパラメータに被験物質に関連する影響はなかった。中耳、非腺胃及び精嚢には病理組織学的所見がみられたのみであった。

いずれの群でも眼科検査にボラシデニブに関連する異常はなく、Irwin 変法アッセイの評価項目に被験物質に関連した影響はなかった。

13 週間の GLP 毒性試験では、雌雄のラットに 5、15、50 mg/kg/day を投与した。50 mg/kg/day の用量は忍容性がなく、予定外の死亡が生じた。主な所見は顕著な体重減少、骨格筋萎縮及び腎尿細管変性であった。

最大耐用量は 15 mg/kg/day であった。この用量では、体重に可逆的な影響があった（雄）。好中球のわずかな減少（雄のみ）及びリンパ球数のわずかかつ可逆的な増加は炎症を示唆し、これに相関して複数の臓器に炎症細胞浸潤の組織学的所見がみられた。雌雄とも、赤血球パラメータ値がわずかに低下したが可逆的であった。摂餌量減少に関連して ALP がわずかに低下し、トリグリセリド濃度が低下した。尿素とクレアチニン濃度もわずかに低下した（雌）。尿検査では、尿量が軽度から中等度増加した（雌雄）。この用量で被験物質に関連した顕微鏡所見は、骨格筋（神経原性筋萎縮）、肝臓（肝細胞肥大）、腎臓（尿細管変性）、生殖系（精巣、前立腺及び精嚢の萎縮、発情周期の変化、子宮肥大、子宮頸部と膣の上皮過形成、黄体数減少及び／又は大きな閉鎖卵胞の増加）、並びに乳腺（雄で萎縮）であった。

5 mg/kg/day の用量の忍容性は良好であった。ボラシデニブに関連した顕微鏡所見は 15 mg/kg/day 群でみられた組織と同じ組織にみられたが、発現率も重症度も低かった。血液に対する影響はリンパ球数増加のみであった。血液生化学検査値に対する影響は摂餌量減少と相関し、他の血液生化学検査値と尿検査値の変化は血清リンとカリウムの排泄分画のわずかな増加のみであった。

いずれの群でも眼科検査にボラシデニブに関連する異常はなかった。

4 週間回復期間終了時には、ボラシデニブに関連する所見のほとんどは部分的又は完全に可逆的であった。腎臓（尿細管変性）、肝臓（肝細胞変性は部分的に可逆的）、骨格筋（中用量及び高

用量群のみ。萎縮は部分的に可逆的)、雌雄の生殖器（精細管の変性は可逆的ではなく、他の所見は部分的に可逆的）及び乳腺の顕微鏡的所見は依然として観察された。

4.2.2　サル

Sprague-Dawley ラットを用いたボラシデニブの 7 日間反復投与毒性及び TK 試験を 3 件実施し、カニクイザルを用いたボラシデニブの単回投与による TK と 7 日間反復投与毒性試験（をそれぞれ 1 件ずつ実施した。観察された所見はより長期間の試験でみられた所見と一致していた【2.6.7_6】。

GLP28 日間毒性試験では、雌雄のカニクイザルに 3、10、40 mg/kg/day を投与した。

用量制限毒性が 40 mg/kg/day で生じ、振戦、運動失調、平衡感覚障害、及び頭部傾斜がみられ、瀕死状態のため安楽死が必要となった。その他の所見は、体重減少、肝細胞酵素誘導と相関する影響［肝臓重量増加、肝細胞肥大、及び GGT、アラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT)、ソルビトール脱水素酵素（SDH）の増加］、ストレス（副腎皮質束状帯空胞化の中等度の減少、骨髄枯渇及び胸腺のリンパ球枯渇)、並びに皮膚の表皮剥離であった。ECG（心拍数及び波形の間隔）を分析したところ、忍容性が不良であった 40 mg/kg/day の用量で、雄 1 匹に QTc のわずかな延長（32 msec）が生じた。

いずれの用量でも眼科所見に被験物質に関連した影響はなかった。

3 mg/kg/day 群及び 10 mg/kg/day 群では、被験物質に関連した一般状態、体重に対する影響、血液学的検査値及び凝固系の検査値に影響はなかった。

サルに投与した 2 番目に高い用量（10 mg/kg/day）の忍容性は良好で、被験物質に関連した影響は軽度の肝細胞肥大（肝臓重量増加と血液生化学パラメータ値の増加に相関)、及び副腎皮質空胞化の軽度の減少のみであった。この用量を重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）と定義した。これらの所見のほとんどは、14 日間の回復期間中に部分的又は完全に可逆的であった。この用量に対応する安全性マージンは、ヒトに 50 mg を連日投与したときに予想される曝露量の 12 倍以上であった。3 mg/kg/day の忍容性は非常に良好であった。

GLP13 週間ピボタル毒性試験では、雌雄のカニクイザルに 2、6、20 mg/kg/day を投与した。

ボラシデニブ 20 mg/kg/day を投与した雄 1 匹は、拡張型心筋症及び二次性うっ血性心不全のため一般状態が悪化し、Day 51 に早期安楽死させた。これらの事象とボラシデニブの因果関係は否定できない。この動物における血漿中ボラシデニブ濃度は 24800 ng/mL であり、雌雄を合わせた Day 91 の C_{max}（13400 ng/mL）より顕著に高く、ヒトに 50 mg を連日投与したときの曝露量の 120 倍であった。しかし、この動物の生存中に実施した観察／検査では、ボラシデニブに関連する一般状態の徴候や変化はなかった。この用量では血液学的検査値に変化が生じ、赤血球量がわずかに低下し、同時に血小板が軽度に増加した。また、雌ではアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ（AST）がわずかに増加した。

次の用量である 6 mg/kg/day は最大耐用量と判断され、曝露値（Day 91 の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 26500 ng.h/mL）はヒトにおける曝露値の 8 倍であった。この用量では凝固パラメータの変化

（フィブリノーゲン減少）、ALT 増加、及び GGT のわずかな増加がみられた。これらの増加に相関して、肝細胞肥大の病理組織学的所見があった。安楽死させた動物の顕微鏡所見は肝臓のみにみられ、肝細胞肥大と混合細胞浸潤は回復した。

最低用量の 2 mg/kg/day の忍容性は非常に良好で、無作用量（NOEL）と定義された（Day 91 の $AUC_{0\text{-}24}$ は 6,790 ng.h/mL で、ヒトに 50 mg を投与したときの 2 倍）。

カニクイザルに最大耐用量（MTD）を投与したときの標的臓器は肝臓（肝細胞肥大、混合細胞浸潤及びクッパー細胞過形成、可逆的又は部分的に可逆的）であり、これに関連して臨床検査パラメータ値にも変化が生じた。

4.3　遺伝毒性試験

ボラシデニブの遺伝毒性は、細菌を用いる *in vitro* 復帰突然変異試験、ヒト末梢血リンパ球小核試験及び *in vivo* 小核試験で評価した。これらの試験については、【2.6.6_4】【2.6.7_8】【2.6.7_9】に要約する。

ボラシデニブ及び循環血中の主な代謝物である AGI-69460 は、*in vitro* 復帰突然変異試験（Ames 試験）で変異原性を示さず、*in vitro* ヒトリンパ球小核試験や *in vivo* ラット骨髄小核試験でも、染色体異常誘発性を示さなかった【2.6.7_[8, 9]】。

4.4　がん原性試験

ボラシデニブは進行がんの治療を目的としており、ICH S9 ガイドライン [1)] に従ってがん原性試験は必要ではないため実施していない。

4.5　生殖発生毒性試験

ICH S9 ガイドライン [1)] に従い、受胎能及び着床までの初期胚発生に関する試験、及び出生前及び出生後の発生に対する影響を評価する試験は実施していない。

4.5.1　受胎能及び初期胚発生

生殖器に対する影響は、ラットとカニクイザルを用いた GLP 反復投与毒性試験で評価した。カニクイザルを用いた 28 日間及び 13 週間試験では、生殖器に対する影響はなかった【2.6.7_7】。ラットを用いた 28 日間試験では、雄の生殖器（100 mg/kg/day の投与で精巣の精細管変性、及び精巣上体の内腔細胞残屑、30 mg/kg/day 以上の投与で前立腺の上皮萎縮、10 mg/kg/day 以上の投与で精嚢の上皮萎縮）、及び雌の生殖器（発情周期の喪失、卵巣内の黄体数減少、子宮、子宮頸部及び膣の萎縮、並びに子宮頸部と膣の粘液増加）に影響が生じた。これらの変化は、回復期間終了時には部分的に可逆的であった。ラットを用いた 13 週間毒性試験でも、雌雄の生殖器に同じ影響がみられた。雄ではすべての用量（5、15、50 mg/kg/day）で精巣（精細管変性／萎縮）、前立腺及び精嚢（萎縮）に影響がみられ、15 mg/kg/day 以上の投与で精巣上体の内腔細胞残屑が

みられた。雌ではすべての用量で、子宮上皮肥厚及び子宮頸部と膣の上皮過形成に伴う発情周期の変化が観察された。50 mg/kg/day 群では子宮の形質転換、周期外の膣粘液増加が確認され、黄体数減少及び／又は大きな閉鎖卵胞がすべての投与でみられた。子宮、膣、精巣上体及び卵巣に対する影響はいずれも部分的に可逆的であった。

ただし、回復期間（14 日間又は 28 日間）は精子形成周期や卵胞の発達／成長の期間を完全に網羅しているわけではないため、生殖器に対する一部の影響での可逆性については留意する必要がある。

4.5.2　胚・胎児発生

妊娠 Sprague-Dawley ラットを用いて GLP 準拠の胚胎児発生毒性試験の本試験を実施し、妊娠日数（GD）6～17 で、10、25、75 mg/kg/day を経口投与した【2.6.7_13】。

25 mg/kg/day 及び 75 mg/kg/day の投与で一般状態及び母動物に対する毒性（体重増加抑制及び摂餌量減少）が生じ、75 mg/kg/day を投与した雌 1 匹は早期に安楽死させた。母動物に対する無毒性量（NOAEL）は、25 mg/kg/day と判断した。

胚について、25 mg/kg/day までボラシデニブに関連した胚損失のエビデンスはなかった。被験物質に関連した胚に対する影響として、用量に依存してわずかから重度の平均胎児重量の減少などがすべての用量でみられた。25 mg/kg/day 及び 75 mg/kg/day の投与では胎児毒性が生じ［早期吸収と内臓奇形（75 mg/kg/day の投与で腎臓と精巣の位置異常）の発現率が高かった］、すべての投与群で複数の骨について用量に関連した骨化遅延及び短い肋骨が観察された。胚胎児発生毒性の NOAEL は 10 mg/kg/day と判断した。

New Zealand White ウサギを用いた GLP 準拠の胚胎児発生毒性試験の本試験では、2、6、18 mg/kg/day の用量でボラシデニブを経口投与した【2.6.7_13】。すべての用量で平均体重増加抑制及び摂餌量減少がみられ、18 mg/kg/day 群の雌 1 匹で流産が生じた。いずれの群でもボラシデニブに関連した肉眼所見はなく、平均妊娠子宮重量にも影響はなかった。母動物に対する毒性の NOAEL は 6 mg/kg/day と判断した（AUC：GD 19 に 15500 ng.h/mL）。同腹仔に関しては、6 mg/kg/day 以上の投与で用量に関連した軽微から中等度の胎児平均重量の減少及び複数の骨の骨化遅延がみられ、18 mg/kg/day の投与では後期吸収の発現率がわずかに上昇した。これらの影響は母動物でみられた毒性と一致しており、胎児に対する直接の毒性によるものではない。したがって、NOAEL は 6 mg/kg/day と判断した。

4.5.3　出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験

ボラシデニブは進行がんの治療を目的としており、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する影響を評価する試験は必要ではないため、実施していない[1)]。

4.5.4　新生児を対象とした試験

新生児を対象とした毒性試験は実施されておらず、また実施する必要性も認められない。合意済みの小児開発計画［初期小児医薬品開発計画（iPSP）及び小児医薬品開発計画（PIP）］では、12 歳未満の小児集団に対して部分的な免除が合意されており、小児における対象集団は 12 歳から 18 歳未満である。

4.6　局所刺激性

目的とする投与経路は経口である。Sprague-Dawley ラットとカニクイザルを用いたすべての反復投与毒性試験で消化管を評価した。したがって、局所刺激性の評価を目的とした試験は実施していない。

4.7　その他の毒性試験

4.7.1　聴覚毒性試験

Sprague-Dawley ラットにボラシデニブを 28 日間反復投与したとき、中耳にいくつかの影響がみられたため、聴覚に対する影響を評価する聴覚毒性試験を実施した。Sprague-Dawley ラットに 3、10、30、100 mg/kg/day を 28 日間連日投与し、聴覚機能に変化が生じる可能性及びコルチ器と卵形嚢の有毛細胞に対する細胞毒性を評価した【2.6.7_17.1】。

100 mg/kg/day の投与量で瀕死状態、有害な一般状態の徴候及び体重に対する影響が生じたため、安楽死が必要となった。

3、10、30 mg/kg/day 群では有害な一般状態や体重に対する影響はなかった。

ボラシデニブ 30 mg/kg/day 及び 100 mg/kg/day の投与では、被験物質に関連する可能性のある肉眼所見として、側頭骨の茶色の病巣、卵円窓（前庭窓）の異物、及び鼓室部の浮腫が生じた。これらの所見に相関する顕微鏡所見はなかった。

ボラシデニブ 10、30、100 mg/kg/day を投与した時の有害ではなく可逆的な顕微鏡所見は、中耳及び耳管の上皮におけるわずかな好中球浸潤（中耳炎）であった。聴性脳幹反応（ABR）、耳鏡検査、シトコクレオグラム、卵形嚢有毛細胞の密度、脳、蝸牛神経及びらせん神経節の肉眼又は顕微鏡病理に、ボラシデニブに関連する影響はみられなかった。

4.7.2　光毒性試験

ボラシデニブはわずかな吸光性を示し、最大吸収波長は 215 nm と 281 nm であるがメラニンには結合しない。BALB/c 3T3 マウスの線維芽細胞でボラシデニブの光毒性の可能性を評価し【2.6.7_17.2】、ボラシデニブ存在下と非存在下で細胞を UV 光に曝露した。その結果、ボラシデニブに光毒性の可能性はなかった。結論として、BALB/c 3T3 マウスの線維芽細胞を使用した *in vitro* ニュートラルレッド取込み（NRU）光毒性試験ではボラシデニブに細胞毒性はなく、重大な光毒性リスクはないと考えられる。

4.7.3　不純物の試験

GLP ピボタル非臨床試験に使用した被験物質は、組成、構造及び品質特性（不純物プロファイルを含む）の点で、臨床試験に使用する製剤及び市販予定の製剤と同一である【2.6.7_17.3】。

原薬中の 3 種類の不純物（　不純物A、不純物B　及び　不純物C　）は 2 種類の（定量的）構造活性相関［(Q)SAR］モデルで陰性であり、ラット及びサルを用いた GLP 準拠 28 日間毒性試験において、予定している規格で毒性プロファイルが適切に評価されている。原薬製造に用いる出発物質、中間体及び原薬中で検出された不純物と潜在的な不純物、試薬、溶媒又は触媒、並びに原薬自体について変異原性の可能性を *in silico* で評価した。「Inconclusive」と評価された不純物不純物D　及び　不純物E について変異原性を評価する実験を実施したところ、陰性であった。その他の ICH M7 クラス 1、2 又は 3 の不純物は、TTC 値（毒性学的懸念の閾値）である患者 1 例1 日あたり 1.5 µg、あるいは化合物ごと又はクラスごとの限度に従って管理される【3.2.S_3.2】。

5.　総括及び結論

ボラシデニブは IDH1 及び IDH2 変異タンパク質の強力な阻害薬であり、酵素に対する作用を評価した実験系、セルベース実験系及び *in vivo* 実験系で 2-HG の産生を抑制することが示されている。薬理試験は、ボラシデニブによる　2-HG　量の抑制で細胞の下流マーカーが変化し、遮断されていた腫瘍細胞の分化が解消されるという仮説を支持している。

ヒトにおける循環血中の主な代謝物である AGI-69460 は、ボラシデニブと比べると IDH1R132C 変異を有する HT1080 細胞株、IDH1R132H 変異を有する TS603 細胞株及び IDH2R172K 変異を有する HCT116 細胞株における 2-HG 産生の阻害作用は弱かった。AGI-69460 は、反復投与 PK 試験でラットとサルの血漿、及び胚胎児発生毒性試験でラットとウサギの血漿で同定された。毒性学的評価に用いたラットとサルにおけるボラシデニブの代謝プロファイルは、ラットとサルはヒトにおけるボラシデニブ及び代謝物の安全性を予想する動物種として適切であることを示している。

ボラシデニブの ADME 及び毒性プロファイルは許容可能であり、*IDH1* 又は *IDH2* 遺伝子変異陽性の神経膠腫の成人患者及び 12 歳以上の小児患者に対する手術後の治療薬としての販売承認申請が支持される。

5.1　薬理試験

ボラシデニブは　IDH1R132、IDH2R140Q　及び　IDH2R172K　ホモダイマー変異酵素、並びに IDH1 WT/R132H、IDH2 WT/R140Q 及び IDH2 WT/R172K ヘテロダイマー変異酵素に対する強力な阻害薬であり、2-HG 阻害の IC_{50} はナノモル範囲である。IDH1R132H ホモダイマー酵素に対しては、　α-KG　基質に関して非競合的阻害を示し、この所見はボラシデニブの構造アナログは活性部位から離れた位置で結合するという結晶学的所見と一致している。これらのデータ全体は、ボラシデ
ニブがアロステリック阻害薬であると結論付けられる。ボラシデニブは　IDH1　WT/R132H、IDH2 WT/R140Q　及び　IDH2　WT/R172K　ヘテロダイマー酵素に対する遅延型結合阻害薬である。TF-1 IDH1R132H 変異細胞及び IDH2R140Q 変異細胞を使用したモデル系で、2-HG を TF-1 細胞のバッ

クグラウンド濃度に低下させる濃度のボラシデニブで処理すると、いずれの細胞でも IDH 依存性 EPO 誘発性赤血球分化の遮断が解消された。これは、赤血球分化の 2 つのマーカーである HBG 1/2 遺伝子及び KLF-1 遺伝子の発現が部分的に回復したことで示される。

また、患者由来の IDH1R132C 変異、IDH2R172K 変異、IDH2R140Q 変異試料で、ボラシデニブが細胞分化を誘導することが示された。ボラシデニブ処理による 2-HG 濃度の低下は、IDH1R132C 変異試料及び IDH2R140Q 変異試料で 0.5～1 μM の用量で 95%超、IDH2R172K 変異試料で 1 μM の用量で 88%超であった。さらに、患者由来の IDH1 変異試料及び IDH2 変異試料をボラシデニブで処理すると、Day 3～6 から細胞分化の開始と一致する増殖の急増が始まり、液体培養で 10 日間増殖させると顆粒球への分化が誘導された。これらの結果は、IDH 変異選択的療法により、IDH1 及び／又は IDH2 変異腫瘍で分化の誘導が促進される可能性を示唆する。

複数の異種移植マウスモデルを使用して実施した一連の *in vivo* 薬理試験では、ボラシデニブによる血漿中及び腫瘍組織中の 2-HG 産生阻害が確認された。これらの試験では、腫瘍中 2-HG 減少について用量反応性が確認された。HT1080 マウスモデル及び U87 マウスモデルに 12 時間間隔で反復投与すると、30 mg/kg 以上の用量で腫瘍の 2-HG 濃度が 96%超低下した。TS603 同所性神経膠腫モデルでは、0.1 mg/kg 以上の投与で脳腫瘍の 2-HG 濃度が 99%超低下した。したがって、IDH1 及び／又は IDH2 変異を有する血液腫瘍と固形腫瘍（神経膠腫を含む）でボラシデニブが使用できる可能性が確認された。

安全性薬理試験で、ボラシデニブが心血管系及び中枢神経系に影響を及ぼす可能性を評価した。ボラシデニブ及び循環血中の主な代謝物である AGI-69460 は、試験で検討した最高濃度でも急速活性型遅延 I_{Kr} を阻害しない（IC_{50} はそれぞれ>12.3 μM 及び>30 μM）。カニクイザルを用いた 28 日間試験及び 13 週間試験では ECG 評価も実施した。28 日間試験では、忍容性のない用量（40 mg/kg/day）を投与した雄で QTc がわずかに（32 msec）延長したが、13 週間試験では ECG パラメータに対する影響はなかった。Sprague-Dawley ラットを用いた 28 日間反復投与毒性試験の一部として Irwin 変法を実施したところ、有害作用はなかった。呼吸器系に関しては、ラットとカニクイザルを用いた 28 日間試験でも 13 週間試験でも投与に関連した一般状態は認められなかった。

5.2　薬物動態試験

ボラシデニブの PK プロファイルを *in vitro* 及び *in vivo* 試験を組合わせて確立した。BALB/c マウス、Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬及びカニクイザルを用いて、ADME 試験を実施した。ADME、DDI の可能性及び他の特定の特性を評価する *in vitro* 試験も実施した。

すべての動物種にボラシデニブのフリー体を静脈内投与し、ラット及びイヌには経口懸濁液を、マウス及びサルには [redacted] を経口投与した。さらに、カニクイザルを用いて、ヒト初回投与試験で使用されるクエン酸水和物の錠剤を用いる試験を実施し、絶食下及び摂餌下での投与がボラシデニブの PK に及ぼす影響を評価した。

ボラシデニブの PK は、マウス、ラット、サルでの CL_p は小さかったが、イヌでは大きく、また、マウス、ラット、イヌ及びサルにおける定常状態での高い分布容積により特徴付けられる。静脈内投与後のボラシデニブの平均消失 $t_{½}$の範囲は、イヌでの 6.4 時間からサルでの 24 時間である。ボラシデニブは Caco-2 細胞で認められる *in vitro* での高い透過性と一致して、速やかな経口吸収を受ける。経口バイオアベイラビリティの範囲は 6.42%（フリー体、イヌ）～109%（[redacted]、サル）であった。サルで推定されたバイオアベイラビリティは 100%を超える高値であったが、サルでは $t_{½}$が長かったため $AUC_{0-\infty}$を正確に算出できなかった可能性が高い。

ボラシデニブを TK 試験でラット及びサルに反復経口投与したとき、TK に明らかな性差は認められなかった。ラットを用いた 13 週間毒性試験では、最終投与（Day 91）後のボラシデニブ曝露量は 5 mg/kg/day 及び 15 mg/kg/day では用量比例的であり、50 mg/kg/day の用量を投与したときの曝露量は用量に比例した増加を下回った。試験中、ラットにおけるボラシデニブの血漿中蓄積率は、雄で 5.2～8.5 倍、雌で 3.4～6.5 倍であった。サルを用いた 13 週間 TK 試験では、最終投与後のボラシデニブ曝露量は 2 kg/kg/day 及び 6 kg/kg/day の投与では用量比例的であり、20 mg/kg/day の投与では用量比例より上回った。試験中に血漿中のボラシデニブ蓄積率は雄でも雌でも 1.5～5.0 倍であった。

初期の臨床試験に使用した処方（100 mg/kg 錠）でサルに経口投与したところ、血漿中ボラシデニブ曝露量は摂餌下の投与のほうが絶食下の投与よりも高くなった（$AUC_{0-\infty}$は 2.0 倍）。

ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスの血漿中のタンパク質結合率は 94%超と高く、0.2～10 μM の範囲で動物種間に顕著な差はなく、非線形でもなかった。ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスの血液中ではボラシデニブは主に血漿中に存在し、赤血球（RBC）への移行は低かった（$K_{RBC/PL}$<0.5）。

ボラシデニブは脳透過性を示し、脳／血漿中濃度比は、AUC に基づき腫瘍のないマウスで 0.624～0.720、脳腫瘍のあるマウスで 0.950～1.96、ラットで 1.11～1.48、及び最終投与から 24 時間後時点の濃度に基づきサルで 1.25～3.01 であった。雄ラットに[^{14}C]ボラシデニブを単回経口投与したときの組織分布試験から、薬剤による放射能は速やかに吸収されて組織に分布し、体内から緩やかに消失することが示された。眼球血管膜などのメラニン含有組織への放射能の大幅な分布は認められず、[^{14}C]ボラシデニブに起因する放射能はメラニンに結合しないことが示唆された。

非臨床試験の動物種では、代謝がボラシデニブの主な消失経路である。ラットの胆汁中並びにラット、イヌ及びサルの尿中へのボラシデニブ（未変化体）の排泄はわずかであった。ラット、イヌ、サル及びヒト由来の肝ミクロソーム及び肝細胞を用いたボラシデニブの代謝回転率は低かった。

無処置ラットに[^{14}C]ボラシデニブを単回経口投与したとき、未変化体がすべての時点で血漿中に認められた唯一の放射能ピークであり、放射能検出器付き液体クロマトグラフィーにより代謝物は検出されなかった。胆管カニューレ挿入ラットでは、投与後 96 時間以内の平均累積回収率は 84.3%であり、放射能の 61.0%が胆汁中、21.4%が糞中、1.77%が尿中で回収された。胆汁中の代謝物は、酸化、*N*-脱アルキル化、及び／又は GSH、システイン、グリシン若しくはグルクロン

酸との抱合又はこれらの経路の組合わせによるものであった。胆汁中の未変化体は少量にすぎず、ボラシデニブがラットでは主に肝代謝により消失することが示唆される。

ラット、イヌ、サル及びプレートに播種したヒト肝細胞における代謝プロファイルは同様であった。毒性試験でマウス、ラット及びサルの血漿から得た *in vivo* プロファイルは、*in vitro* の肝細胞培養で認められたプロファイルに類似していた。

AGI-69460 は、ボラシデニブのデスクロロ-メチルスルホン代謝物であり、代謝の後期に形成される循環血中の主な下流の代謝物に相当する。AGI-69460 はヒトに単回経口投与した ADME 試験で最初に同定され、AG881-C-004 臨床試験で定常状態での曝露が確認された。AGI-69460 は薬理活性のある代謝物であるが、細胞アッセイではボラシデニブに比べ力価が弱かった。AGI-69460 は、*in vitro* 代謝アッセイ又は *in vivo* 代謝試験で単回静脈内投与又は経口投与したときには確認されなかったが、ボラシデニブ 30 mg/kg/day と 20 mg/kg/day をそれぞれラット及びサルに 7 日間経口投与すると AGI-69460 への曝露が血漿及び肝臓で確認され、ラットとウサギを用いたボラシデニブの胚胎児発生毒性試験で得た血漿でも確認された。

In vitro 代謝試験での主な薬剤関連の成分はボラシデニブであった。代謝は、直接水酸化+グルクロン酸抱合、又はクロロピリジン環の脱塩素後+GSH 若しくはシステイン抱合（又は GSH 若しくはシステイン抱合により引き起こされるクロロピリジン環の脱塩素）のいずれかで構成された。水酸化、グルクロン酸抱合及びGSH／システイン抱合の組合わせが、二次代謝物として観察された。全体として、*in vitro* でのヒトの代謝物はすべて、安全性試験に用いられた動物種で *in vitro* 又は *in vivo* のいずれかで観察された。

ボラシデニブと遺伝子組換え CYP450 酵素及び CYP 選択的化学阻害剤の存在下でのヒト肝細胞との培養実験から、CYP1A2 がボラシデニブの代謝を担う主要な酵素であり、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び／又は CYP3A4/5 の寄与はほとんどない又は少ないことが示された。また、CYP 以外の酵素がボラシデニブの代謝に最大 30%寄与し、デスクロロ-グルタチオン抱合及び他の下流の代謝が生じる可能性がある。

ボラシデニブは、臨床投与量に対応した濃度では CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の直接の阻害作用のエビデンスを示さない。ボラシデニブは、検討したいずれの CYP 酵素の時間又は代謝依存性阻害の可能性をほとんどあるいは全く示さない。ヒト肝ミクロソームでは、ボラシデニブは 8.0 μM の IC_{50} で UGT1A1 による 17β-エストラジオールの抱合を阻害した。

ボラシデニブは、*in vitro* で CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4/5 及び UGT1A4 の誘導薬であると考えられた。ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験では、ボラシデニブ代謝の自己誘導は認められなかった。

ボラシデニブは、P-gp、BCRP、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではない。

ボラシデニブは P-gp の阻害薬ではないが、BCRP の阻害薬である（IC_{50} は 1.22 μM）。ボラシデニブは、7.5 μM（検討した最高濃度）までの濃度で、BSEP、MRP2、MRP3、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 に対して 50%を上回る阻害を示さなかった。ボラシデニブ

は、25 μM（検討した最高濃度）までの濃度で、MATE1 及び 2-K タンパク質に対して 50%を上回る阻害を示さなかった。

AGI-69460 は、P-gp、BCRP、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではない。AGI-69460 は OATP1B1 の阻害薬ではなかったが（IC_{50} は>10 μM）、OATP1B3 の阻害薬であり、IC_{50} は 2.97 μM であった。

5.3　毒性

ボラシデニブの毒性プロファイルは、ラットとサルを用いた 28 日間及び 13 週間の反復投与毒性試験、及び遺伝毒性試験、光毒性試験、聴覚毒性試験などの *in vitro* 及び *in vivo* 毒性試験により的確に特徴付けられた。Sprague-Dawley ラットと New Zealand White ウサギを用いた胚胎児発生毒性試験の用量設定試験及び本試験も実施した。非臨床安全性プログラムは ICH S9[1)] に従って計画されている。

これらの動物に投与したときのボラシデニブの曝露量（$AUC_{0\text{-}24hr}$）を、対象となる患者集団に 1 日 50 mg を反復投与したときの Cycle 2 Day 1 の曝露量（3144 ng.hr/mL）と比較すると、ラットには 7～172 倍（反復投与試験）、サルには 2～65 倍（反復投与試験）の用量で投与されている【2.7.2】。化合物の忍容性は最低曝露量で良好であり、ヒトにおける曝露量（3144 ng.h/mL）と比較すると、ラットでは 7 倍（28 日間試験）、サルでは 2 倍（3 カ月間試験）であった。

主な標的臓器は肝臓（ラットとサル）、消化管（ラット）、皮膚（ラット）、腎臓（ラット）、筋肉（ラット）、生殖器（ラット）であった。詳細は以下に記す。ラットの耳でみられた所見は、聴覚毒性の評価を目的とした 28 日間試験で毒性学的意義がないと確認された。投与に関連する毒性は全般的に用量依存性であった。ヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの定常状態の平均 $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 3144 ng.h/mL であり、この値と各臓器で毒性を示す曝露量とを比較したマージンを表 5:1 に示す。

ラットとサルを用いた反復投与毒性試験では、死亡／瀕死状態又は有害作用が生じる用量制限毒性又は最大耐量に至るまで投与した。ラットの 13 週間試験で耐用量は 5 mg/kg/day（ヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの曝露量の 26 倍）、MTD は 15 mg/kg/day（ヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの曝露量の 70 倍）と判断した。サルの 13 週間試験では NOEL は 2 mg/kg/day、MTD は 6 mg/kg/day であり、いずれもヒトに 50 mg を投与したときの曝露量に対する安全マージンは 2 倍と 4 倍であった。

ラットとカニクイザルを用いた反復投与試験で肝臓に対する影響がみられた。ラットでは GGT、総ビリルビン及び肝臓重量が増加し、10 mg/kg/day 以上の投与で雌雄共に肝細胞肥大がみられ、これに相関して平均肝臓重量が増加した。13 週間反復投与試験では、肝細胞肥大とこれに関連した平均肝臓重量の増加が 5 mg/kg/day 以上の投与で観察された。この所見に相関する肝酵素活性の変化はなかった。肝臓に対する影響は回復期間終了時にも依然として観察されたが、発現率及び／又は重症度は低く、部分的に可逆的であることを示した。サルでは、肝細胞肥大、肝臓重量増加、GGT、ALT、SDH 及びトリグリセリドの平均値増加が反復投与毒性試験で観察された。肝細胞肥大は、細胞希薄化を伴う小葉中心性びまん性肝細胞腫大という特徴を呈した。回復期間終

了時には、肝臓に対する影響は可逆的又は部分的に可逆的であった。ラット及びサルの反復投与毒性試験で検討した最低用量又は耐用量で観察された肝臓に対する影響は、肝酵素誘導を示す徴候（肝臓重量増加及び肝細胞肥大）のみであり、肝細胞の変性や壊死を伴うことはなかった。これらの所見に関連し、主にサルで一部の肝酵素が増加したが、曝露量が非常に高くない限り（ヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの曝露量の 65 倍超）、対照群と比べ 3 倍超まで増加することはまれであった。したがって、肝臓に対する影響の機序は十分な解明には至っていないが、ラットとサルにおける肝酵素誘導に関連があると考えられる。

ラットでは、胃（びらん、過形成、浮腫及び炎症）及び十二指腸（びらん、過形成）に消化管毒性が観察された。一部の影響は対照群でも観察されたため、添加剤の局所刺激作用と関連があった。これらの影響は回復期間終了時には部分的に可逆的であった。サルでは消化管に明らかな影響はなく、ラットを用いた 13 週間試験でもみられなかった。ラットを用いた 28 日間試験での所見は最高用量及び 2 番目に高い用量に限定されており、ボラシデニブの局所刺激性が示唆された。

ラットを用いた 28 日間及び 13 週間試験では、最高用量を投与したとき皮膚毒性がみられた。100 mg/kg/day の投与で原発性皮膚上皮過形成及び皮脂腺肥大が生じた。これらの所見は 14 日間回復期間後には可逆的であり、AUC ベースではヒトの曝露量の 170 倍を超える忍容性のない用量のみでみられた。サルで皮膚に対する影響が生じたのは 28 日間試験のみであり、10 mg/kg/day 群の雌 1 匹が死亡状態で発見された。この試験に用いたその他の動物では関連する組織学的所見はなく、皮膚に一般状態又は顕微鏡での所見もなく、13 週間試験では皮膚への影響はなかったため、サルにおいて皮膚は毒性対象ではないと考えられる。IDH 阻害薬を投与した患者では、IDH 阻害薬に伴う皮膚の有害事象（炎症性皮膚症、皮膚血管の異常、皮膚感染及びそう痒症）が文献に記載されている [3)]。したがって、ラットに高用量を投与したときに観察された皮膚に対する可逆的な影響は、治療薬としてヒトに使用したときにも関連するが、対処は可能と判断した。

腎臓に対する影響はラットに 28 日間（重量減少）又は 13 週間（尿細管変性、腎尿細管上皮に茶色の色素、膀胱で細胞の炎症性浸潤、腎盂の細胞浸潤）投与したときのみに観察された。重量に対する影響は用量に関連しており、部分的に可逆的であった。4 週間の回復期間終了時に、顕微鏡的変化は依然として観察され、発現率及び／又は重症度もほぼ同じであったため、可逆的ではないと判断した。

ラットを用いた 13 週間毒性試験では、用量制限毒性（DLT）で骨格筋に有害作用が生じた（骨格筋の神経原性萎縮）。注目すべき点として、平滑筋、横隔膜（採取した場合）、舌及び心臓に萎縮はなく、坐骨神経と脊髄にも被験物質に関連した軸索の変性はなかった。回復期では 15 mg/kg/day 群及び 50 mg/kg/day 群で肉眼所見及び顕微鏡所見が残存していたが、部分的には可逆性であると考えられた。5 mg/kg/day の投与でみられた所見（ヒトにおける曝露量と比較すると 25 倍の血漿中曝露量となる用量）では、発現率が低く及び毒性グレードも低い状態であり、関連する一般状態の徴候はなく完全に可逆的であった。試験に用いたいずれのサルでも、筋肉毒性の一般状態の徴候又は顕微鏡的徴候はなかった。

生殖器毒性に関しては、雌ラットで発情周期／萎縮、卵巣／卵管（重量）、子宮（重量、萎縮）、子宮頸部と膣（萎縮、粘液分泌）、及び黄体数、雄では精巣上体（細胞残屑）、精嚢／前立腺（萎縮）及び精巣（重量、精細管変性）に影響が観察された。ほとんどの影響は STD（100 mg/kg/day）で観察された。一般的に生殖器に関連する組織の萎縮は有意な体重減少及び／又はストレスに伴って観察され、これらの影響が生殖器の顕微鏡所見である萎縮に寄与した可能性がある。回復期剖検時には、被験物質に関連した臓器重量の変化は、精嚢／前立腺の重量、精巣上体及び卵巣／卵管、並びに子宮では部分的に回復した。高用量群では雌雄ともに臓器重量の変化は残存していた。ただし、回復期間（14 日間又は 28 日間）は精子形成周期、卵胞の発達／成長期間を完全にカバーしているわけではないため、生殖器に対する一部の影響については可逆性がみられなかった可能性がある。ラットを用いた 13 週間反復投与毒性試験でも、雌雄の生殖器に対する影響がみられた。

ラットを用いた 28 日間試験では、中耳の粘膜／粘膜下に好中球浸潤、浸出液、及びマクロファージ空胞化など耳へのいくつかの影響が観察された。これらの所見は添加剤の影響で、被験物質によって悪化した可能性もある。好中球浸潤の場所は中耳の耳管の入口又は入口に隣接しており、炎症性浸潤、マクロファージ及び浸出液は耳管の刺激によるものであることが示唆された。中耳の病理組織所見は可逆的であった。

ラットを用いて聴覚毒性の評価を目的とした 28 日間試験を実施し、これらの所見の意義を評価した。ボラシデニブを投与すると中耳及び耳管の上皮において、有害ではなく可逆的でわずかな好中球浸潤（中耳炎）がみられた。いずれの投与量でも聴性脳幹反応（ABR）、耳鏡検査、シトコクレオグラム、卵形嚢有毛細胞の密度にボラシデニブに関連する影響はなく、脳、蝸牛神経及びらせん神経節の肉眼所見や顕微鏡所見にも影響はなかった。中耳炎は咽喉頭酸逆流による喉頭刺激で生じることが知られている [4)]。本試験においては、強制経口投与時に添加剤又は被験物質に直接接触したことで中咽頭刺激が生じた可能性がある。その後ラットを用いて実施した 13 週間毒性試験でもサルを用いたいずれの試験でも、中耳に組織学的所見はなかった。

サルを用いた 28 日間毒性試験では、高用量（40 mg/kg/day 群）の雄 1 匹でわずかな QTc 延長（32 msec）が生じた。この QTc 延長は程度が低く生理学的な意義はないと判断したが、この雄の Day 27 の血漿中 C_{max} は最も高かったため、ボラシデニブとの関連は否定できない。この他には、心電図パラメータ又はトレースにボラシデニブに関連する変化はなかった。13 週間試験では、心拍、律動又は波形、伝導時間にボラシデニブに関連する異常はなかった。さらに、ボラシデニブ及びその代謝物 AGI-69469 は、hERG 又はその他の心臓イオンチャネルに関し、*in vitro* でアラートを示さなかった【2.6.1】及び【2.6.2】。

遺伝毒性の評価では、*in vitro* 細菌復帰変異（Ames）アッセイで変異原性はなく、*in vitro* ヒトリンパ球小核試験でも *in vivo* ラット骨髄小核試験でも染色体異常誘発性はなかった。

ICH S9 ガイドラインに従い、ボラシデニブの受胎能及び出生前及び出生後の発生毒性試験は実施していない。上記のように、ラットを用いた反復投与毒性試験で雌雄の生殖器に影響が生じている。胚／胎児発生に対する影響をラット及びウサギで評価した。妊娠 Sprague-Dawley ラットに対し、器官形成期を通してボラシデニブを反復経口投与したとき、75 mg/kg/day で母動物に対す

る毒性がみられた。NOAEL は 25 mg/kg と判断された。胎児毒性は 25 mg/kg/day 以上で観察された［すべての投与群で早期吸収の発現率上昇、内臓奇形（腎臓及び精巣）、及び用量に関連した骨化遅延］。胚／胎児発生の NOAEL は 10 mg/kg/day と判断された。妊娠 New Zealand White ウサギに 2、6、18 mg/kg/day を経口投与したところ、すべての用量で体重増加抑制及び摂餌量減少が生じ、高用量を投与した雌 1 匹は流産につながった。母動物に対する毒性の NOAEL は 6 mg/kg/day と判断された。胚／胎児発生毒性については、平均胎児重量の減少と骨化遅延がみられたため、NOAEL は 6 mg/kg/day と判断された。これらの影響は母動物で観察された毒性と一致しており、胎児に対する直接の毒性に起因しているわけではない。

ヒト ADME 試験では、ボラシデニブの血漿中の主要な循環血中代謝物としてデスクロロ-メチルスルホン代謝物である AGI-69460 が最初に同定された【2.7.2】。その後、ラットとサルに 7 日間反復投与したときに血漿中でこの代謝物の存在が確認されたため、これらの動物種を用いた毒性試験を通して、この代謝物が適格に評価されていることが示された。AGI-69460 の血漿中曝露は、ボラシデニブの胚胎児発生毒性試験及び *in vivo* 骨髄小核試験でも評価され、明らかになった。AGI-69460 の遺伝毒性の可能性を評価したところ、*in vitro* 変異原性試験で遺伝毒性を示さなかった。毒性試験を通じて、代謝物 AGI-69460 の毒性プロファイルが適切に評価された。

ボラシデニブはわずかに吸光性があり、最大吸収波長は 215 nm と 281 nm であった。しかし、BALB/c 3T3 マウスの線維芽細胞を使用した *in vitro* NRU 光毒性の結果は陰性であった。したがって、ボラシデニブに重篤な光毒性リスクはないと判断した。

結論として、標的臓器と所見は、肝臓（ラットとサルで、肝臓重量増加及び肝細胞肥大などの肝酵素誘導を示唆する徴候）、皮膚（ラットで上皮過形成、表皮剥離）、腎臓（ラットで尿細管変性）、消化器（ラットで局所刺激作用）、生殖器（ラットで萎縮／変性）、及び骨格筋（ラットで神経原性萎縮）であった。これらの所見のほとんどは完全又は部分的に可逆的であった。

毒性試験の結果に基づくと、ボラシデニブの非臨床安全性プロファイルは許容可能であり、進行がんの治療薬としての製造販売承認申請が支持される。表 5:1 に示すように、ヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの基準曝露量と比較したとき、ボラシデニブの標的臓器別又は動物種別曝露マージンは 8～70 であった。

5.4　曝露マージン

ヒトにボラシデニブ 1 日 50 mg を反復投与したときの基準曝露量（AUC に基づく）と比較した曝露マージンを表 5:1 に示す。標的臓器別及び動物種別の曝露マージンは 8～70 であった。最低曝露量で化合物の忍容性は良好であり、この曝露量はヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの曝露量（3144 ng.h/mL）と比較すると 7 倍（ラットを用いた 28 日間試験）及び 2 倍（サルを用いた 3 カ月間試験）である。

表 5:1　　ヒトに 1 日 50 mg を反復投与したときの曝露量と比較した安全マージン

Type of study/target organs	Species	No or Lowest toxic dose (mg/kg/day)	Vorasidenib	
			$AUC_{0\text{-}24hr}$ [a] (ng.h/mL)	Animal to Human Exposure Ratio
Repeat dose toxicity studies				
Liver	Rat	5	82,600	26
	Monkey	6	26,500	8
Gastro-intestinal tract	Rat	15	221,000	70
Skin	Rat	15	221,000	70
Kidneys	Rat	15	221,000	70
Skeletal muscle	Rat	5	82,600	26
Reproductive organs	Rat	5	82,600	26

a: $AUC_{0\text{-}24h}$ for sex margin
Sources data: Repeat-dose toxicity studies in rats and monkeys reports Module 2.6.6, Section 3 and Module 2.6.7, Section 6.

げっ歯類及び非げっ歯類を用いた試験で適切な曝露マージンが示されたこと、標的臓器毒性の程度及び／重症度はわずかであり、可逆的であることから、ボラシデニブの非臨床安全性プロファイルは許容可能であり、対象とする患者への治療薬として支持される。

6.　参考文献一覧

1） ICH S9: Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals, 2009.
2） FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. DHHS, 2018.
3） Parisi R, Cowen EA, Stoll JR, Zhu H, Dusza S, Pulitzer MP, et al. Dermatologic adverse events associated with IDH inhibitors ivosidenib and enasidenib for the treatment of acute myeloid leukemia. Leuk Res. 2022 Dec;123:106970. doi: 10.1016/j.leukres.2022.106970. Epub 2022 Oct 22.
4） Al-Saab F, Manoukian JJ, Al-Sabah B, Almot S, Nguyen LH, et al. Linking larygopharyngeal reflux to otitis media with effusion: pepsinogen study of adenoid tissue and middle ear fluid. Journal of Otolaryngology - Head and Neck Surgery 2008, 37(4), 565-571.

7.　添付資料

添付資料 1：未提出とした CTD モジュールの根拠

4.2.3.4	がん原性	ICH S9 ガイドラインに従い、試験は実施していない。 ボラシデニブは、*IDH1* 又は *IDH2* 遺伝子変異陽性の神経膠腫の術後介入（進行がんと判断される）としての治療を目的としている。
4.2.3.5.1	受胎能及び初期胚発生	ICH S9 ガイドラインに従い、受胎能及び初期胚発生試験は実施していない。 ボラシデニブは、イソクエン酸脱水素酵素-1（IDH1）変異又はイソクエン酸脱水素酵素-2（IDH2）変異感受性の主に造影されない星細胞腫又は乏突起神経膠腫の術後介入（進行がんと判断される）としての治療を目的としている。 生殖器に対する影響は反復投与毒性試験で評価されている。
4.2.3.5.3	出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験	ICH S9 ガイドラインに従い、出生前及び出生後の発生並びに母体の機能に関する試験は実施していない。 ボラシデニブは、イソクエン酸脱水素酵素-1（IDH1）変異又はイソクエン酸脱水素酵素-2（IDH2）変異感受性の主に造影剤で増強されない星細胞腫又は乏突起神経膠腫の術後介入（進行がんと判断される）としての治療を目的としている。
4.2.3.5.4	新生児を対象とした試験	新生児を対象とした試験は実施していない。 ボラシデニブは低悪性度神経膠腫の治療薬として小児医薬品開発計画（PIP）免除の対象である。12～18 歳の小児患者の治療薬としての PIP に関する合意に基づき、新生児を対象とした試験は必要ではないと考えられる（モジュール 1）。
4.2.3.6	局所刺激性	局所刺激性試験は実施していない。目的の投与経路は経口投与である。消化管に対する影響はすべての反復投与毒性試験で評価されている。
4.2.3.7.1	抗原性試験	ICH S9 ガイドラインによれば、この種の試験は必要ではないため抗原性試験は実施していない。
4.2.3.7.2	免疫毒性	免疫毒性試験は実施していない。 ICH S9 ガイドラインに記載されているように、一般毒性試験で免疫原性は十分に評価されていると考えられる。さらに、反復投与毒性試験で免疫毒性の徴候はみられなかった。
4.2.3.7.3	作用機序試験	作用機序試験は実施していない。 ICH S9 ガイドラインではこの種の試験は求められていない。
4.2.3.7.4	依存性	依存性を評価する試験は実施していない。 ICH S9 ガイドラインではこの種の試験は求められていない。