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）

2.6.1　緒言

日本セルヴィエ株式会社

目次

1.　緒言 5
1.1　ボラシデニブの概要 5
1.2　臨床における効能・効果及び投与法 5
1.3　非臨床開発の概要 5
2.　参考文献一覧 7

図一覧

図 1-1　ボラシデニブ　クエン酸水和物原薬の化学構造 5

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）
2-HG	2-hydroxyglutarate	2-ヒドロキシグルタル酸
ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
AG-881/ AGI-0023088/ S095032/ S095032-1/ AGI-23088	Vorasidenib	ボラシデニブ
DMPK	Drug metabolism and pharmacokinetics	薬物の代謝及び薬物動態
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
HT1080	Human chondrosarcoma/fibrosarcoma cell line	ヒト軟骨肉腫／線維肉腫細胞株
ICH	International Council of 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	Isocitrate dehydrogenase-1	イソクエン酸脱水素酵素-1
IDH2	Isocitrate dehydrogenase-2	イソクエン酸脱水素酵素-2
IDH1R132C/ IDH1R132H IDH2R140Q/	IDH-mutant induced tumorigenesis	IDH 変異誘発腫瘍形成
IV	Intravenous	静脈内
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
TS603	Orthotopic glioma tumor cell line	同所性神経膠腫腫瘍細胞株
U87	Glioblastoma astrocytoma cell line	神経膠芽腫星細胞腫細胞株

1.　緒言

1.1　ボラシデニブの概要

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：AG-881、AGI-23088、S095032、S095032-1、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）変異タンパク質を阻害する脳透過性の強力かつ可逆的な経口低分子薬である。がんにおける IDH 変異の特徴は発がん性代謝物 2-ヒドロキシグルタル酸（2-HG）の過剰産生であり、過剰産生の結果、細胞分化が損傷され、細胞増殖が加速して発がんに至る[1)]。

原薬は当初ボラシデニブ遊離塩基（S095032）として開発された。その後、開発を継続し、安定形（S095032-1、ボラシデニブ　クエン酸水和物）を同定した。このボラシデニブ　クエン酸水和物がこれまでの臨床開発に使用されており、有効成分として用いられている。ボラシデニブ　クエン酸水和物はヘミクエン酸共結晶の半水和物で、特性はよく解析されており、分子式は $C_{14}H_{13}ClF_6N_6$•1/2 $C_6H_8O_7$•1/2 H_2O、分子量は 519.81 g/mol である。ボラシデニブ　クエン酸水和物の化学構造を図 1-1 に示す。

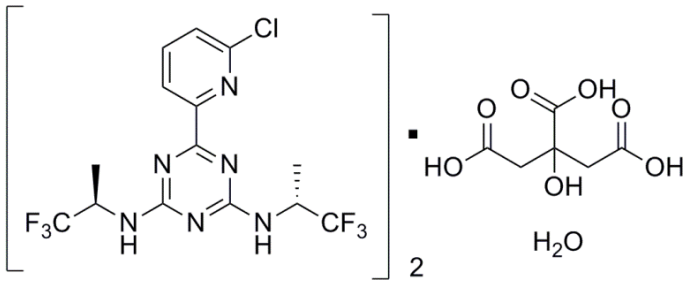


図 1-1　　ボラシデニブ　クエン酸水和物原薬の化学構造

1.2　臨床における効能・効果及び投与法

ボラシデニブは、*IDH1* 又は *IDH2* 遺伝子変異陽性の神経膠腫の治療薬候補として開発されている。ボラシデニブの販売承認申請は、国際共同第 III 相 AG881-C-004 試験及び補助的試験である第 I 相試験（AG881-C-001、AG881-C-002 及び AG120-881-C-001）から得られた有効性及び安全性データに基づいて行われる。

推奨用量は 40 mg、1 日 1 回の経口投与で、投与は疾患進行又は許容できない毒性が生じるまで継続する。

1.3　非臨床開発の概要

ボラシデニブの一連の非臨床薬理試験、安全性薬理試験、薬物動態（PK）試験及び毒性試験が完了しており、対象患者集団に対するボラシデニブの販売承認申請を支持する結果が得られている。グローバルプログラムは、医薬品規制調和国際会議（ICH）S9「抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン」[2)] に従って実施されている。

非臨床開発時の *in vivo* 試験では、ボラシデニブの[redacted]（[redacted]）を用いた[redacted]（[redacted]）処方を使用した。非臨床 PK 試験で使用したボラシデニブは、静脈内（IV）投与ではすべての動物種に対し遊離塩基体を使用し、ラット及びイヌの経口投与に対しては遊離塩基体の経口懸濁剤、マウス及びサルに対しては経口[redacted]として投与した。さらに、カニクイザルを用いた試験では、ヒト初回投与試験で使用した製剤であるボラシデニブ　クエン酸水和物を使用した。

医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠した *in vivo* 毒性試験でボラシデニブを定量分析するために、感度と選択性の高い液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を開発し、バリデートした。

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、ボラシデニブの効果及び標的の変異 IDH 酵素を阻害してオンコメタボライトである 2-HG を低減する能力の特性を解析することを目的とした *in vivo* 探索試験及び *ex vivo* 探索試験が含まれている。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、内在性 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、U87IDH2R140Q 神経膠芽腫星細胞腫異種移植モデル、及び同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫異種移植モデルを使用してボラシデニブが腫瘍組織中で 2-HG の産生を抑制する効果を確認した。これらの試験の結果から、腫瘍の 2-HG を持続的に抑制する効果的な曝露量を予想した。非臨床薬理プログラムでは受容体結合アッセイ及び機能アッセイも実施し、受容体、イオンチャネル及び酵素が 89 種類含まれたパネルを使用して、ボラシデニブの結合性及び酵素活性を阻害する可能性を評価した。

これらの試験で、この化合物は 2-HG を HT1080 マウス異種移植モデル及び U87 マウス異種移植モデルでは 96%超、同所性神経膠腫モデルでは 97%超低下させることが示された。また、ボラシデニブは白血病細胞モデルにおいて細胞分化を誘発することも示された。

安全性薬理試験においては、ボラシデニブが心血管系に影響を及ぼす可能性を評価した。試験としては、パッチクランプアッセイ（オート及びマニュアル）、並びにカニクイザルを用いた 28 日間及び 13 週間の GLP 準拠試験における心電図の評価などが実施された。ラットを用いた 28 日間 GLP 試験では Irwin アッセイも実施された。

非臨床薬理試験を【2.6.2】に要約し、概要表を【2.6.3】に示す。

ボラシデニブの吸収、分布、代謝及び排泄（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された。動物種全体で単回投与及び反復投与を評価した。ボラシデニブの脳への移行はマウス、ラット、サルを用いた複数の試験で評価した。*In vitro* 代謝試験をラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームと肝細胞で実施し、安定性、代謝経路及び薬物相互作用の可能性を評価した。脳への移行性はすべての動物種で一貫して観察された。

非臨床薬物動態試験を【2.6.4】に要約し、概要表を【2.6.5】に示す。

ボラシデニブの非臨床毒性試験には、Sprague Dawley ラット及びカニクイザルを用いた *in vivo* 28 日間及び 13 週間反復投与毒性試験、細菌を用いる *in vitro* 復帰突然変異試験による完全な遺伝毒性評価、ヒト末梢血リンパ球小核試験及び *in vivo* 小核試験なども含まれた。胚胎児発生毒性試

験をラット及びウサギで実施した。聴覚毒性試験で耳に対する機能的及び形態学的作用を評価した。光毒性試験も実施した。これらの毒性試験の結果、肝臓、消化管、皮膚、腎臓、骨格筋及び生殖器が標的臓器として特定された。既存の曝露マージン、並びにげっ歯類及び非げっ歯類で観察された毒性の程度及び／又は重篤度が低く可逆的であったことに基づき、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、神経膠腫患者の治療薬としての開発が支持される。

毒性試験の結果を【2.6.6】に要約し、概要表を【2.6.7】に示す。

作用機序、非臨床薬理試験、安全性薬理試験、薬物の代謝及び薬物動態（DMPK）、並びに毒性試験のデータから、臨床において対象患者集団に対して予定している投与レジメンでボラシデニブを使用することが支持される。

2.　参考文献一覧

1）Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*. 2009;462(7274):739-44.

2）FDA. Guidance for Industry: S9 Nonclinical Evaluation for Anticancer Pharmaceuticals. DHHS, ed. 2010; Pp. 1-12: U.S. Department of Health and Human Services.

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）

2.6.2　薬理試験の概要文

日本セルヴィエ株式会社

目次

1.　まとめ 8

2.　効力を裏付ける試験 16
2.1　薬物動態の特性 16
2.2　セルベースでの活性 18
2.3　トランスレーショナル・リサーチ 20
2.3.1　TF-1 IDH1 R132H 細胞及び TF-1 IDH2 R140Q 細胞におけるボラシデニブの IDH 変異誘導による分化遮断の解消効果：ヘモグロビン γ 1/2 及び Kruppel 様因子 1 の発現 20
2.3.2　急性骨髄性白血病（AML）患者由来の IDH1 及び IDH2 初代細胞におけるボラシデニブの骨髄分化の誘導 22
2.4　*In vivo* 薬理試験 26
2.4.1　HT1080 IDH1R132C 異種移植マウスモデルにボラシデニブ 0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg 又は 30 mg/kg を 3 回経口投与した PK/PD 試験 27
2.4.2　U87 IDH2R140Q 異種移植マウスモデルにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 30 mg/kg を 3 回経口投与した PK/PD 試験（AG881-N-034-R1）、及び 5、30 又は 150 mg/kg を 3 回経口投与した PK/PD 試験（AG881-N-035-R1） 29
2.4.3　同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫異種移植マウスモデルにボラシデニブ 0.03、0.1 又は 0.3 mg/kg（低用量範囲）又は 0.3、3 又は 10 mg/kg（高用量範囲）を経口投与した PK/PD 試験 31

3.　副次的薬理試験 34
3.1　選択性：受容体への結合 34

4.　安全性薬理試験 35
4.1　*In vitro* 安全性薬理試験 35
4.1.1　QPatch（オートパッチクランプアッセイ）：ボラシデニブが心臓 hERG 活性に及ぼす影響（AG881-N-018-R1） 35
4.1.2　ヒト胎児腎細胞で発現したクローン hERG カリウムチャネルに対するボラシデニブの影響（AG881-N-019-R1） 35
4.1.3　ヒト胎児腎細胞で発現したクローン hERG カリウムチャネルに対する AGI-69460 の影響（AG881-N-066） 35
4.2　*In vivo* 安全性薬理 36
4.2.1　Irwin 変法によるスクリーニング 36
4.2.2　カニクイザルを用いた心電図の評価 36
4.2.3　呼吸器系の評価 36

5.　薬力学的薬物相互作用試験 38

6.　考察及び結論 39

7.　参考文献一覧 41

表一覧

表 1:1　薬理試験の概要 11
表 2:1　IC_{50}の決定 17
表 2:2　IDH1 変異細胞及び IDH2 変異細胞に対するボラシデニブの有効性及び特異性 19
表 2:3　HT1080 を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.3、1、3 又は 30 mg/kg を 3 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中及び腫瘍中のボラシデニブの AUC と腫瘍中 2-HG の AUC 及び減少率（報告書 AG881-N-033-R1） 28
表 2:4　HT1080 を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.3、1、3 又は 30 mg/kg を 3 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中ボラシデニブ曝露量と腫瘍中 2-HG 濃度の PK/PD 相関（報告書 AG881-N-033-R1） 28
表 2:5　U87 IDH2R140Q を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3、5、30 又は 150 mg/kg を 3 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中及び腫瘍中のボラシデニブの AUC と腫瘍中 2-HG の AUC 及び減少率（報告書 AG881-N-034-R1） 30
表 2:6　U87 IDH2R140Q を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3、5、30 又は 150 mg/kg を 3 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中ボラシデニブ曝露量と腫瘍中 2-HG 濃度の PK/PD 相関（報告書 AG881-N-034- R1） 30
表 2:7　同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫を異種移植した雄の ICR SCID マウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 10 mg/kg を 6 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿、脳、及び脳腫瘍中のボラシデニブの AUC、及び脳と脳腫瘍中の 2-HG の AUC（報告書 AG881-N-046-R1） 32
表 2:8　同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫を異種移植した雄の ICR SCID マウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 10 mg/kg を 6 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの脳組織及び脳腫瘍中の 2-HG 減少率（報告書 AG881-N-046-R1） 32
表 2:9　同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫を異種移植した雄の ICR SCID マウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 10 mg/kg を 6 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中ボラシデニブ曝露量と脳腫瘍中 2-HG 濃度の PK/PD 相関 33

図一覧

図 2:1　ジアホラーゼ／レサズリン結合系を使用した IDH1/2 変異酵素に対する阻害薬のスクリーニング 16
図 2:2　対照細胞株（TF-1 pLVX）及び TF-1 IDH1R132H 変異細胞及び TF-1 IDH2R140Q 変異細胞を対照（DMSO）又は 2 つの用量のボラシデニブ（AG-881）で 7 日間処理した後の、HBG 1/2 及び KLF-1 の相対的な発現 21
図 2:3　細胞内 2-HG 濃度に対応する細胞ペレットの画像 22
図 2:4　IDH1 変異又は IDH2 変異を有する患者由来の試料をボラシデニブ（AG-881）で 13 日間処理した後の培地中の 2-HG（DMSO 対照との比較） 23
図 2:5　患者由来の初代細胞をボラシデニブ（AG-881）で処理したときの生存細胞の数 24
図 2:6　IDH1 変異又は IDH2 変異を有する AML 患者由来の初代細胞のボラシデニブ（AG-881）処理後の FACS 解析 25
図 2:7　IDH1 変異又は IDH2 変異を有する患者由来初代細胞をボラシデニブ（AG-881）で処理したときの細胞表面マーカーの変化 26

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）
2-HG	2-Hydroxyglutarate	2-ヒドロキシグルタル酸
α-KG	α-Ketoglutarate	α-ケトグルタル酸
ACE	Angiotensin converting enzyme	アンジオテンシン変換酵素
AG-881/S095032/ AGI-23088	Vorasidenib	ボラシデニブ
AGI-69460	Metabolite of vorasidenib	ボラシデニブの代謝物
AML	Acute myelogenous leukemia	急性骨髄性白血病
AUC	Area under the concentration × time curve	濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the concentration × time curve from 0 to t hours	0 時間から t 時間までの濃度-時間曲線下面積
CD4+	Lymphocytes T presenting CD4 protein	CD4 陽性 T リンパ球
CHO	Chinese hamster ovary	チャイニーズハムスター卵巣
C_{max}	Maximum observed concentration	最高血中濃度
COR-L 105	Human lung adenocarcinoma cell line	ヒト肺腺癌細胞株
DMSO	Dimethylsulfoxide	ジメチルスルホキシド
$EAUC_{50[0-12/24hr]}$	Efficacious area under the vorasidenib concentration × time curve from 0 to 12 or 24 hours that resulted in sustained 50% tumor 2-HG inhibition	腫瘍の 2-HG を持続的に 50%阻害する効果を示す、0 時間から 12 時間又は 24 時間までのボラシデニブ濃度-時間曲線下面積
$EAUC_{97[0-12/24hr]}$	Efficacious area under the vorasidenib concentration × time curve from 0 to 12 or 24 hours that resulted in sustained 97% tumor 2-HG inhibition	腫瘍の 2-HG を持続的に 97%阻害する効果を示す、0 時間から 12 時間又は 24 時間までのボラシデニブ濃度-時間曲線下面積
ECG	Electrocardiogram	心電図
E_{max}	Maximum percent decrease in 2-HG	2-HG の最大減少率
EPO	Erythropoietin	エリスロポエチン
FACS	Fluorescence-activated cell sorting	蛍光活性化セルソーティング
GI_{50}	Concentration needed to inhibit the growth of cancer cells by 50%	腫瘍細胞増殖 50%阻害濃度
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
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony stimulating factor	顆粒球マクロファージコロニー刺激因子
HBG 1/2	Hemoglobin gamma 1/2	ヘモグロビンγ1/2
HCCC-9810	Human cholangiocarcinoma cell line	ヒト胆管細胞癌細胞株
HCT-116	Human colorectal carcinoma cell line	ヒト結腸癌細胞株
HEK	Human embryonic kidney cells	ヒト胎児腎細胞
hERG	Human ether-à-go-go related gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子

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）
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
IFN	Interferon	インターフェロン
IDH	Isocitrate dehydrogenase	イソクエン酸脱水素酵素
IDH1	Isocitrate dehydrogenase-1	イソクエン酸脱水素酵素-1
IDH2	Isocitrate dehydrogenase-2	イソクエン酸脱水素酵素-2
I_{Kr}	Rapidly activating delayed rectifier potassium current	急速活性型遅延整流カリウム電流
JJ012	Human chondrosarcoma cell line	ヒト軟骨肉腫細胞株
KLF-1	Kruppel-like factor 1	Kruppel 様因子 1
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
NA	Not applicable	該当せず
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型
ND	Not determined	検出不能
PCR	Polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PD-1	Programmed cell death protein 1	プログラム細胞死タンパク質 1
PK/PD	Pharmacokinetic/pharmacodynamics	薬物動態／薬力学
pLVX	HIV-1-based lentiviral expression vector	HIV-1 に由来するレンチウイルスベクター
PO	*Per os*	経口投与
QTc	Heart-rate corrected QT interval	心拍数で補正した QT 間隔
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
SCID	Severe combined immunodeficiency disease	重症複合免疫不全症
SD	Standard deviation	標準偏差
SEM	Standard error of the mean	平均の標準誤差
SSC	Side scatter	側方散乱光
$t_{½}$	Terminal half-life	終末相の半減期
TF-1	Human erythroid leukemia cell line	ヒト赤白血病細胞株
TS603	Human brain cancer cell line	ヒト脳腫瘍細胞株

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）
U87MG	Human glioblastoma astrocytoma cell line	ヒト神経膠芽腫星細胞腫細胞株
WT	Wild-type	野生型

1.　まとめ

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）について、複数の IDH 変異モデルを使用して、ボラシデニブの有効性及び標的である変異イソクエン酸脱水素酵素（IDH）の阻害による代謝物（オンコメタボライト）2-ヒドロキシグルタル酸（2-HG）産生の抑制について一連の探索的薬理試験を実施した。さらにオフターゲットスクリーニングパネル、Irwin 変法及び心血管系に対する安全性薬理試験を実施した。これまでに実施された非臨床薬理試験を表 1:1 に要約する。

初期の試験の目的は、変異したイソクエン酸脱水素酵素-1 及び-2（IDH1 及び IDH2）を阻害し、がん細胞で 2-HG 産生を抑制できるかを確認することであった（2.1 項）。ボラシデニブは、50%阻害濃度（IC_{50}）値において IDH1R132（H、C、G、L 及び S）、IDH2R140Q 及び IDH2R172K ホモダイマー酵素、並びに IDH1 野生型 (WT)/R132H、IDH2(WT)/R140Q 及び IDH2(WT)/R172K ヘテロダイマー変異酵素に対して、強力な阻害作用を示した（低ナノモル範囲）。ボラシデニブは IDH1R132H ホモダイマー酵素に対しては、α-ケトグルタル酸（α-KG）基質に関して非競合的阻害を示した。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（社内資料）。これらのデータから、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。ボラシデニブを IDH1R132H ホモダイマー酵素上で 1～16 時間インキュベートしたとき、IC_{50} 値は時間依存性を示さなかった。この所見は、ボラシデニブが IDH1R132H ホモダイマーに対して急速平衡化阻害薬であることと一致する。1～16 時間の間、IDH2R140Q ホモダイマーに対するボラシデニブの IC_{50} 値は時間依存性を示すが、IDH2R172K ホモダイマーに対して時間依存性はみられなかった。これらのデータは、ボラシデニブが IDH2R140Q ホモダイマーに対しては遅延型結合阻害薬であり、IDH2R172K ホモダイマーに対しては急速平衡化阻害薬であることと一致する。IDH1 WT/R132H、IDH2 WT/R140Q 及び IDH2 WT/R172K ヘテロダイマー酵素に対しては、1～16 時間の間にボラシデニブの有効性は時間依存的に増加した。これらのデータから、ボラシデニブがこれらのヘテロダイマー酵素に対して遅延型結合阻害薬でと考えられる。

IC_{50} の測定の結果から、ボラシデニブは IDH1 及び IDH2 WT ホモダイマー酵素に対しても阻害能を示した。これらの酵素に対する有効性は 1～16 時間の間に時間依存的に増加し、WT 酵素に対して遅延型結合阻害薬であると考えられる。

また、IDH1 変異及び IDH2 変異に対するボラシデニブの有効性はセルベースアッセイでも示された（2.2 項）。遺伝子導入によりヒト神経膠芽腫星細胞腫（U87MG）細胞に IDH2R140Q 変異を発現させ、ヒト赤白血病（TF-1）細胞に IDH1R132H 変異又は IDH1R140Q 変異を発現させた。さらに、ヒト軟骨肉腫／線維肉腫（HT1080）、軟骨肉腫（JJ012）、肺腺癌（COR-L 105）、胆管細胞癌（HCCC-9810）及び神経膠腫神経球などの内因性 IDH1 変異を有する複数のヒト細胞株、及び内因性座位に IDH1 変異及び IDH2 変異をノックインした結腸直腸癌（遺伝的に同質）の細胞株 HCT-116 にて評価した。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 が高濃度で産生される。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 0.04～22 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。また、IDH1R132C HT1080、IDH1R132H TS603、IDH2R172K HCT116 の各モデルにおいて、ボラシデニブの代謝物である AGI-69460 の阻害作用も評価された。3 つの細胞株すべてにおいて、ボラシデニブは AGI-69460 よりも強力な 2-HG 産生阻害薬であることが判明した。

IDH1R132H 変異と IDH2R140Q 変異が細胞分化に及ぼす固有の効果を検討するために、成長因子である顆粒球マクロファージコロニー刺激因子（GM-CSF）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（2.3.1 項）。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。TF-1 IDH1R132H 細胞及び TF-1 IDH2R140Q 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、IDH 依存的な遮断により消失したエリスロポエチン（EPO）が誘発する赤血球系分化が回復することが示された。さらに、IDH 変異 TF-1 細胞をボラシデニブに曝露したところ、細胞の色が黄色から赤色に変化したことが目視で確認された。この所見は、TF-1 細胞分化の特徴であるヘモグロビンの発現増加及び赤血球分化と一致した。

ボラシデニブがヒト急性骨髄性白血病（AML）骨髄芽球初代細胞中の IDH1 変異タンパク質及び IDH2 変異タンパク質を阻害し、骨髄芽球の分化を誘導する能力も評価した。具体的には、*ex vivo* アッセイで AML 患者由来の IDH1R132C、IDH2R172K 及び IDH2R140Q 骨髄芽球の試料をボラシデニブで処理した（2.3.2 項）。患者由来の IDH1R132C 変異試料及び IDH2R140Q 変異試料をボラシデニブで 13 日間 *ex vivo* 処理したところ、2-HG の濃度はボラシデニブの最低用量（0.1 μM）で 80%超、0.5～1 μM の用量で 95%超低下し、IDH2R172K 変異試料では、最高用量の 1 μM で 88%超低下した。さらに、これらの変異試料をボラシデニブで処理すると、Day 3～6 に急激に増殖した。また、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 異種移植モデル、U87 IDH2R140Q 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、ボラシデニブの一連の *in vivo* 薬理試験 4 試験を実施した（2.4 項）。これらの試験の目的は、反復経口投与後のボラシデニブ曝露量と 2-HG 産生減少の薬物動態／薬力学（PK/PD）関係を評価することであった。これらの試験で腫瘍中 2-HG の減少とボラシデニブ曝露量間で用量反応性が確認された。HT1080 マウスモデル及び U87 マウスモデルに反復投与したとき（12 時間に 1 回）、腫瘍中 2-HG 濃度は 30 mg/kg 以上の用量で 96%超低下し、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 97%超低下した。

さらに、TS603 神経膠腫 IDH1R132H モデルを使用した *in vivo* 薬理試験では、2-HG 減少と腫瘍増殖率の関係を評価した。TS603 異種移植腫瘍は皮下増殖させた後、溶媒のみによる処理、もしくはハイスループットのスクリーニングで IDH1-R132H 変異ホモダイマーを阻害する化合物とし

て特定された AGI-5198 で処理した[1]。ボラシデニブ処理マウスは溶媒処理マウスに比べ、腫瘍の 2-HG が約 90%、腫瘍量が約 60%減少した[2]。

HLA-A2/HLA-DR1-同一遺伝子 IDH1R132H 変異同所性神経膠腫モデルに AG-881（50 mg/kg）を投与したとき、2-HG 濃度は IDH1R132H 神経膠腫細胞で減少（10 分の 1）しただけではなく、腫瘍関連骨髄細胞でも減少した。AG-881 単剤投与で IDH1R132H 神経膠腫の進行が CD4+細胞及び CD8+細胞依存性に抑制され、炎症性 IFNγ関連遺伝子の発現が増加し、腫瘍浸潤性 CD4+ T 細胞の数が増加した。HLA-A2-ペプチド及び DR1-IDH1R132H ペプチドを IDH 阻害薬と併用して接種すると、生存期間が有意に延長した。AG-881 とプログラム細胞死タンパク質 1（PD-1）遮断抗体を併用して IDH1R132H 腫瘍担がんマウスを処理すると、いずれかの単独処理のみと比べて生存率が改善した[3]。

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の結合性及び酵素活性を阻害する可能性を評価した（3.1 項）。化合物は選択性が高く、顕著なオフターゲット効果はアデノシン A3 受容体に対してのみであった。AGI-69460 は、88 種類の受容体、イオンチャネル、酵素のうち 86 種類を含むパネルでも評価され、ボラシデニブのオフターゲット活性が評価された（除外された 2 つの酵素、すなわちアンジオテンシン変換酵素（ACE）とロイコトリエン B4 に対してボラシデニブは不活性であった）。AGI-69469 は、アデノシン A3 受容体（1 μM で 75%の結合阻害）に限定された有意なオフターゲット活性（50%以上）を持つことが示された。*In vivo* 毒性試験では、アデノシン A3 受容体阻害作用と一致する影響（ヒスタミン及び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】。

ボラシデニブが心血管系に影響を及ぼす可能性を複数の試験で評価した。試験には、ヒト遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（hERG）がコード化する急速活性型遅延整流カリウム電流（I_{Kr}）の阻害能を評価するパッチクランプアッセイ（オート及びマニュアル）、及び医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠したサル 28 日間反復投与毒性試験（4.2.2 項）で実施した心電図（ECG）評価などが含まれる。ボラシデニブの最大溶解度の観点から、試験で検討した最高濃度は 12.3 μM であったが、この濃度では I_{Kr} に有意な阻害はみられなかった（IC_{50} 値は 12.3 μM 超）。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 QT 間隔（QTc）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考えられた。ボラシデニブの代謝物である AGI-69460 についても hERG 評価を実施し、IC_{50} は 30 μM 超と推定された。

Sprague-Dawley ラットを用いた GLP 準拠 28 日間反復投与毒性試験の一部として、ボラシデニブが行動に影響を及ぼす可能性を Irwin 変法アッセイで評価した。Irwin 変法アッセイで評価した評価項目にボラシデニブ関連の影響はなかった（4.2.1 項）。

呼吸器系は、Sprague-Dawley ラット及びカニクイザルにおける 28 日間及び 13 週間の GLP 反復投与毒性試験の一部として評価された。呼吸機能を含む一般状態が評価され、肺の肉眼及び顕微鏡による評価も行われた。肉眼、顕微鏡及び一般状態による観察では、ボラシデニブに関連する呼吸器系の所見は認められなかった（4.2.3 項）。

表 1:1　　薬理試験の概要

Study Description	Species/ Test System	Test Article	Method of Administration	GLP Compliance	Study [Document Number]
PRIMARY PHARMACODYNAMICS					
AG-881: Inhibition and Characterization in IDH1 and IDH2 Biochemical Systems	Purified Enzymes: IDH1R132H IDH1R132C IDH1R132G IDH1R132L IDH1R132S IDH2R140Q IDH2R172K IDH1 WT IDH2 WT IDH1 WT/R132H IDH2 WT/R140Q IDH2 WT/R172K	AG-881	In vitro DMSO vehicle	No	AG881-N-042 [NP41940]
AG-881: Inhibition of 2-HG in IDH1 and IDH2 Mutant Expressing Cells	Cell lines: Neurospheres (603) (IDH1R132H) Neurospheres (HK213) (IDH1R132H) Neurospheres (HK252) (IDH1R132H) Neurospheres (HK207) (IDH1R132H) Neurospheres (BT142) (IDH1R132H/-) HCT-116 KI (IDH1R132C) HCT-116 KI (IDH1R132H) HCT-116 KI (IDH2R172K) COR-L 105 (IDH1R132C) HCCC-9810 (IDH1R132S) HT1080 (IDH1R132C) JJ012 (IDH1R132G) TF-1 pLVX (IDH1R132H) TF-1 pLVX (IDH2R140Q) U87MG pLVX (IDH2R140Q)	AG-881	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-043-R1 [NP41860]

表 1:1　　薬理試験の概要（続き）

Study Description	Species/ Test System	Test Article	Method of Administration	GLP Compliance	Study [Document Number]
AG-881 and AGI-69460: inhibition of 2-HG production in 2 cell lines containing IDH1R132H mutations	Human fibrosarcoma cells (HT1080) and primary human neurosphere cells (TS603)	AG-881 AG-69460	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-068 [NP41865]
AG-881 and AGI-69460: inhibition of wild-type IDH1/2 and IDH1R132H	HCT116 IDH WT and HCT116 IDH1R132H/+ cell lines	AG-881 AG-69460	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-069 [NP41866]
AG881: Inhibition of 2-HG production by AG-881 and its metabolite AGI-69460 in one cell line containing IDH2R172K mutation	HCT116 IDH2R172K/+ cell lines	AG-881 AGI-69460	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	R-00004806 [NP42942]
AG-881: inhibition of IDH1 and IDH2 wild Type activity in cell-based and in vivo mouse xenograft systems	HCT116 R132H and WT cells mouse (Nu/nu) Ex vivo tissue slices	AG120 AG-881	In tissue culture medium or tissue slices DMSO vehicle	No	AG120-881-N-001 [NP41288]
AG-881: Reversal of Mutant IDH-Induced Differentiation Block in TF-1 IDH1R132H and TF-1 IDH2R140Q Cells: Hemoglobin Gamma 1/2 and KLF-1 Expression	Cell lines: TF-1 IDH1R132H TF-1 IDH2R140Q	AG-881	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-044-R1 [NP41862]
AG-881: Induction of Myeloid Differentiation in Primary IDH1 and IDH2 Mutant AML Patient Samples	Primary human IDH1R132C, IDH2R172K, IDH2R140Q, IDHWT myeloblast cells	AG-881	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-045-R1 [NP41864]
AG-881: PK/PD study in HT1080 IDH1R132C Xenograft Mouse Model Following 3 Oral Doses (12-Hour Intervals) of AG-881 at 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, or 30 mg/kg	Mouse (BALB/c)	AG-881[1]	Oral gavage	No	AG881-N-033-R1 [NP41858]
AG-881: PK/PD study in U87IDH2R140Q Xenograft Mouse Model Following 3 Oral Doses (12-Hour Intervals) of AG-881 at 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 3 mg/kg, or 30 mg/kg	Mouse (BALB/c)	AG-881[2]	Oral gavage	No	AG881-N-034-R1 [NP41859]
AG-881: PK/PD study in U87IDH2R140Q Xenograft Mouse Model Following 3 Oral Doses (12-Hour Intervals) of AG-881 at 5 mg/kg, 30 mg/kg, or 150 mg/kg	Mouse (BALB/c)	AG-881[2]	Oral gavage	No	AG881-N-035-R1 [NP41861]

PKPD Study of AG-881 Following Oral Administrations of AG-881 to Male ICR SCID Mice Bearing Orthotopic TS603 IDH1R132H Glioma Tumor Xenografts	Mouse (ICR SCID)	AG-881[3]	Oral gavage	No	AG881-N-046-R1 [NP41863]

表 1:1　　薬理試験の概要（続き）

Study Description	Species/ Test System	Test Article	Method of Administration	GLP Compliance	Study [Document Number]
SECONDARY PHARMACODYNAMICS					
AG-881 Off-target Screening Panel: General	In vitro	AG-881	N/A	No	AG881-N-020-R1 [NP41856]
AG-881 Off-target Screening Panel: Adenosine A3	In vitro: CHO-K1 cells	AG-881	N/A	No	AG881-N-021-R1 [NP41857]
AGI-69460 Off-target Screening Panel: General	In vitro	AGI-69460	N/A	No	TW04-0016507 [NP42842]
SAFETY PHARMACOLOGY					
AG-881 Automated Patch Clamp: hERG	In vitro (CHO cells expressing hERG)	AG-881	N/A	No	AG881-N-018-R1 [NP41869]
AG-881 Manual Patch Clamp: hERG	In vitro (HEK-293 cells expressing hERG)	AG-881	N/A	Yes	AG881-N-019-R1 [NP41868]
Effect of AGI-69460 on Cloned hERG	In vitro (HEK-293 cells expressing hERG)	AGI-69460	N/A	Yes	AG881-N-066 [NP41972]
Modified Irwin Assay: A 28-Day Oral (Gavage) Toxicity and Toxicokinetic Study of AGI-23088 in Sprague Dawley Rats with a 14-Day Recovery Period ([redacted]-888084)[4]	Sprague-Dawley rat	AG-881[1]	Oral gavage	Yes	AG881-N-012-R1 [NP41973]
Cardiovascular Safety: A 28-Day Oral (Nasogastric) Toxicity and Toxicokinetic Study of AGI-23088 in Cynomolgus Monkeys with a 14-Day Recovery Period ([redacted]-888085)[5]	Cynomolgus monkey	AG-881[1]	Oral gavage	Yes	AG881-N-013-R1 [NP41976]
Respiratory Function (by Observation): A 28-Day Oral (Gavage) Toxicity and Toxicokinetic Study of AGI-23088 in Sprague Dawley Rats with a 14-Day Recovery Period ([redacted]-888084)[6]	Sprague-Dawley rat	AG-881[1]	Oral gavage	Yes	AG881-N-012-R1 [NP41973]
Respiratory Function (by Observation): A 13-Week Toxicity Study of AG-881 Given by Oral Gavage to Sprague Dawley Rats with a 4-Week Recovery Period[6]	Sprague-Dawley rat	AG-881	Oral gavage	Yes	AG881-N-056 [NP41974]

Study Description	Species/ Test System	Test Article	Method of Administration	GLP Compliance	Study [Document Number]
Respiratory Function (by Observation): A 28-Day Oral (Nasogastric) Toxicity and Toxicokinetic Study of AGI-23088 in Cynomolgus Monkeys with a 14-Day Recovery Period[6]	Cynomolgus monkey	AG-881[1]	Oral gavage	Yes	AG881-N-013-R1 [NP41976]
Respiratory Function (by Observation): A 13-Week GLP Toxicity Study of AG-881 Given by Oral Gavage to Cynomolgus Monkeys with a 4-Week Recovery Period[6]	Cynomolgus monkey	AG-881	Oral gavage	Yes	AG881-N-057 [NP41981]

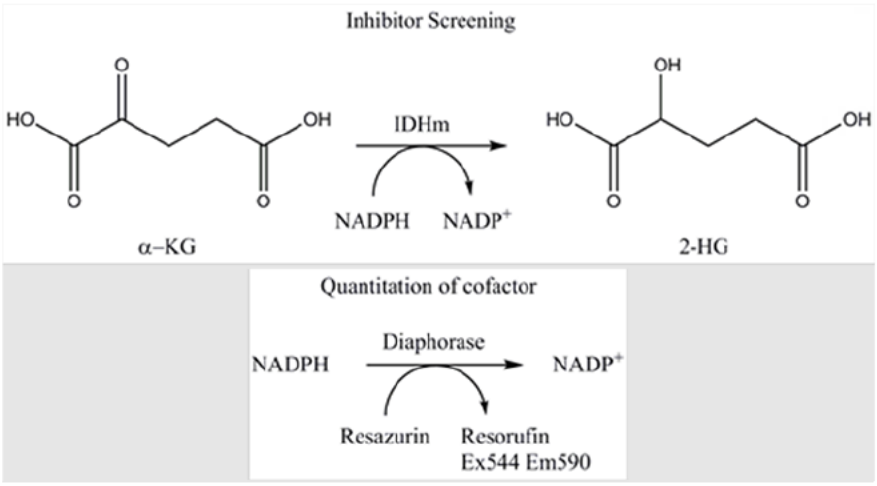
2-HG = 2-hydroxyglutarate; AML = acute myeloid leukemia; CHO = Chinese hamster ovary; DMSO = dimethylsulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; HCT-116 = human colorectal carcinoma cell line; HEK = human embryo kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene; IDH1/2 = isocitrate dehydrogenase 1/2; KLF-1 = Kruppel-like factor 1; N/A = not applicable; PD = pharmacodynamic; PK = pharmacokinetic; SCID = severe combined immunodeficiency disease; WT = wild-type.
AG-881 = vorasidenib, formerly known as AGI-23088. AGI-69460 = vorasidenib major circulating metabolite in humans
[1] AG-881 [redacted] ([redacted]) with [redacted] ([redacted])
[2] AG-881 free base
[3] AG-881 free base for high dose groups and [redacted] for low dose groups.
[4] Results of the Irwin test from the GLP 28-day toxicology study are presented in this summary; toxicology results are provided in Module 2.6.6, Section 3.1.4
[5] Electrocardiogram data from the GLP 28-day toxicology study are presented in this summary; toxicology results are provided in Module 2.6.6, Section 3.2.2
[6] Respiratory function by visual observation data from the GLP 28-day and 13-week toxicology studies in rats and monkeys are presented in this summary; toxicology results are provided in Module 2.6.6, Sections 3.1.4, 3.1.5, 3.2.2, and 3.2.3.

2.　効力を裏付ける試験

2.1　薬物動態の特性

がん細胞中の 2-HG 産生を抑制する手段として、脳透過性 IDH 阻害薬の選定及び特性解析を実施した。本項では、IDH1R132H/C/G/L/S、IDH2R140Q 及び IDH2R172K のホモダイマー変異及びヘテロダイマー変異、並びに IDH1 WT 酵素及び IDH2 WT 酵素に対するボラシデニブの生化学的活性を記述する【AG881-N-042】。ジアホラーゼ／レサズリン結合系を使用し、IDH1 変異、IDH2 変異及び WT 酵素の反応に対する化合物の阻害能を測定した。

ボラシデニブの特性解析では、不連続 IDH1 変異活性又は IDH2 変異活性アッセイを使用し、α-KG から 2-HG への変換にて残存するニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型（NADPH）を測定することにより変異活性の変化を捉えた。このアッセイでは、ジアホラーゼとレサズリンを添加して過剰触媒させて蛍光シグナルを発生させ、NADPH 残余を測定停止値まで測定した。シグナルの増加は変異 IDH1 又は変異 IDH2 阻害の程度に比例した（図 2:1）。IDH1WT 酵素及び IDH2WT 酵素を使用した試験では、NADPH 産生とジアホラーゼ／レサズリン読取り値が直接関連していた。シグナル増加は IDH1WT 阻害と IDH2WT 阻害の量に反比例した。IC_{50} を測定するために、被験物質を最高濃度 10 µM から公比 3 で 10 段階希釈し、各酵素とともにプレインキュベートした。各希釈液を酵素及び $NADP^+$/NADPH 補因子混合物とともに 1 時間又は 16 時間インキュベートした後、基質の α-KG を添加して反応を開始した。



Abbreviations: 2-HG = 2-Hydroxyglutarate; α-KG = α-Ketoglutarate; Ex = Excitation; Em = Emission; IDH = Isocitrate dehydrogenase; NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form.
Source: Report AG881-N-042, Figure 1.

図 2:1　ジアホラーゼ／レサズリン結合系を使用した IDH1/2 変異酵素に対する阻害薬のスクリーニング

測定した 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 の変異ホモダイマー酵素、IDH1WT 酵素及び IDH2WT 酵素、並びに IDH1WT/R132H、

IDH2WT/R140Q 及び IDH2WT/R172K のヘテロダイマー酵素に対して低い濃度（ナノモル）で阻害能を示した（表 2:1）。

表 2:1　IC_{50} の決定

Enzymes	IC_{50} μM (SD)
IDH1 Enzymes	
IDH1 R132H + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.006 (0.002)
IDH1 R132H + NADP+/NADPH @ 16 hrs	0.008 (n/a)
IDH1 R132C + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.019 (0.004)
IDH1 R132G + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.017 (0.002)
IDH1 R132L + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.034 (0.005)
IDH1 R132S + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.006 (0.003)
IDH1 WT + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.190 (n/a)
IDH1 WT + NADP+/NADPH @ 16 hrs	0.004 (0.002)
IDH1 WT/R132H + NADP+/NADPH @ 1 hr WT direction	0.006 (0.001)
IDH1 WT/R132H + NADP+/NADPH @ 16 hrs WT direction	0.0008 (0.0002)
IDH1 WT/R132H + NADP+/NADPH @ 1 hr mutant direction	0.004 (0.001)
IDH1 WT/R132H + NADP+/NADPH @ 16 hrs mutant direction	0.0006 (0.0001)
IDH2 R140Q + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.118 (0.014)
IDH2 R140Q + NADP+/NADPH @ 16 hrs	0.012 (0.002)
IDH2 R172K + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.032 (0.004)
IDH2 R172K + NADP+/NADPH @ 16 hrs	0.094 (0.016)
IDH2 WT + NADP+/NADPH @ 1 hr	0.374 (0.036)
IDH2 WT + NADP+/NADPH @ 16 hrs	0.031 (0.006)
IDH2 WT/R140Q + NADP+/NADPH @ 1 hr WT direction	0.307 (0.036)
IDH2 WT/R140Q + NADP+/NADPH @ 16 hrs WT direction	0.024 (0.004)
IDH2 WT/R140Q + NADP+/NADPH @ 1 hr mutant direction	0.251 (0.037)
IDH2 WT/R140Q + NADP+/NADPH @ 16 hrs mutant direction	0.032 (0.005)
IDH2 WT/R172K + NADP+/NADPH @ 1 hr WT direction	0.111 (0.015)
IDH2 WT/R172K + NADP+/NADPH @ 16 hrs WT direction	0.018 (0.003)
IDH2 WT/R172K + NADP+/NADPH @ 1 hr mutant direction	0.049 (0.005)
IDH2 WT/R172K + NADP+/NADPH @ 16 hrs mutant direction	0.008 (0.002)

Abbreviations: IC_{50} = concentration of drug that achieved half-maximal inhibition; IDH1/2 = isocitrate dehydrogenase 1/2; n/a = not applicable $NADP^+$ = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADPH = reduced form of NADP; SD = standard deviation; WT = wild-type

Source: Report AG881-N-042, Table 4

ボラシデニブは IDH1R132H ホモダイマーに対しては、α-KG 基質に関して非競合的阻害を示した。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（社内資料）。これらのデータから、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。さらに 1～16 時間のインキュベーションでは、ボラシデニブの

IC_{50} に時間依存性はなかった。この所見から、ボラシデニブが IDH1R132H ホモダイマーに対して急速平衡化阻害薬であると考えられる。

ボラシデニブは IDH1WT ホモダイマー及び IDH2WT ホモダイマーに対しては、$NADP^+$補因子に関して非競合的阻害を示し、1～16 時間のプレインキュベーションで有効性は時間依存的に増加（IC_{50} 値が低下）した。これらのデータから、ボラシデニブが IDH1WT ホモダイマー酵素及び IDH2WT ホモダイマー酵素に対して遅延型結合阻害薬であると考えられる。

1～16 時間の間、IDH2 R140Q ホモダイマーに対するボラシデニブの IC_{50} 値は時間依存性を示すが、IDH2R172K ホモダイマーに対して時間依存性はみられなかった。これらのデータから、IDH2R140Q ホモダイマーに対しては遅延型結合阻害薬であり、IDH2R172K ホモダイマーに対しては急速平衡化阻害薬であると考えられる。

IDH1WT/R132H、IDH2WT/R140Q 及び IDH2WT/R172K ヘテロダイマー酵素に対しては、1～16 時間のプレインキュベーションの間にボラシデニブの有効性は時間依存的に増加（IC_{50} 値の低下）した。これらのデータから、ボラシデニブがこれらのヘテロダイマー酵素に対して遅延型結合阻害薬であると考えられる。

結論：

- ボラシデニブは IDH1 変異酵素及び WT 酵素、並びに IDH2 変異酵素及び WT 酵素の強力な阻害薬である。

2.2　セルベースでの活性

細胞における IDH1 変異及び IDH2 変異に対するボラシデニブの有効性を複数のセルベースアッセイを用いて評価した（表 2:2）【AG881-N-043-R1】。

遺伝子導入により作成した、IDH2R140Q 変異を発現するヒト神経膠芽腫星細胞腫（U87MG）細胞及び IDH1R132H 変異又は IDH2R140Q 変異を発現するヒト赤白血病（TF-1）細胞では、高濃度の 2-HG が産生された。

ヒト軟骨肉腫／線維肉腫（HT1080）、ヒト軟骨肉腫（JJ012）、肺腺癌（COR-L 105）、胆管細胞癌（HCCC-9810）及び神経膠腫神経球などの内因性 IDH1 変異を有する複数のヒト細胞株、及び IDH1 変異又は IDH2 変異をノックインした結腸直腸癌（遺伝的に同質）の細胞株 HCT-116 を評価した。

細胞をマイクロタイタープレートに播種し、一晩インキュベートした。希釈したボラシデニブ溶液を添加してから 48 時間後（すべての細胞株）及び 72 時間後（TF-1）の時点で、2-HG 濃度を液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）で測定した。

細胞 IC_{50}、90%の阻害を達成する薬剤の濃度（IC_{90}）、2-HG の最大阻害率及び増殖の 50%阻害濃度（GI_{50}）を算出し、結果を表 2:2 に示す。

ボラシデニブによる 2-HG 阻害の IC_{50} 値は、IDH1R132C 変異、R132G 変異、R132H 変異又は R132S 変異を発現する細胞で 0.04～20 nM、IDH2R140Q 変異、R172K 変異を発現する細胞でそれぞれ 7～14 nM と 130 nM であった。72 時間のインキュベーション後には、いずれの用量でも増殖阻害は観察されなかった。

ボラシデニブの代謝物 AGI-69460 の有効性も、IDH1R132C HT1080 モデル、IDH1R132H TS603 モデル及び IDH2R172K HCT116 モデルで評価した【AG881-N-068】【AG881-N-069】。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 6.709 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。

表 2:2　　IDH1 変異細胞及び IDH2 変異細胞に対するボラシデニブの有効性及び特異性

Cell Line	2-HG IC_{50} (nM) Mean ± SD	Maximum 2-HG Inhibition (%)	N	GI_{50} 3 µM Top Dose
Neurospheres 603 (IDH1R132H)	0.250 ± 0.16	97	43	>3 µM
Neurospheres HK213 (IDH1R132H)	0.043	92	1	ND
Neurospheres HK252 (IDH1R132H)	0.059	91	1	ND
Neurospheres 522 (IDH1R132H)	0.292	96	1	ND
Neurospheres BT142 (IDH1R132H/-)	2 ± 0.9	88	6	>3 µM
HCT-116 KI IDH1R132C	20 ± 13.9	87	2	ND
HCT-116 KI IDH1R132H	3 ± 1	90	6	ND
HCT-116 KI IDH2R172K	130 ± 59	87	10	ND
COR-L 105 (IDH1R132C)	3.8 ± 5	91	5	>3 µM
HCCC-9810 (IDH1R132S)	0.845 ± 0.3	91	13	>3 µM
HT1080 (IDH1R132C)	4.0 ± 0.3	91	5	>3 µM
JJ012 (IDH1R132G)	6.6 ± 2.4	93	12	>3 µM
TF-1 pLVX IDH1R132H	3.2 ± 0.8	85	3	>3 µM
TF-1 pLVX IDH2R140Q	14 ± 1.1	89	3	>3 µM
U87MG pLVX IDH2R140Q	7.1 ± 3	95	7	>3 µM

Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; GI_{50} = concentration of drug which effects half-maximal growth inhibition; HCT-116 = human colorectal carcinoma cell line; IDH = Isocitrate dehydrogenase; IC_{50} = concentration of drug that achieved half-maximal inhibition; SD = standard deviation; ND = not determined
Source: Report AG881-N-043-R1, Table 4

結論：

- ボラシデニブは IDH1R132C 変異、R132G 変異、R132H 変異又は R132S 変異を発現する細胞及び IDH2R140Q を発現する細胞において 2-HG 産生を強力に阻害し、IDH2R172K を発現する細胞における 2-HG 阻害作用はこれよりも弱かった。

2.3　トランスレーショナル・リサーチ

2.3.1　TF-1 IDH1 R132H 細胞及び TF-1 IDH2 R140Q 細胞におけるボラシデニブの IDH 変異誘導による分化遮断の解消効果：ヘモグロビン γ 1/2 及び Kruppel 様因子 1 の発現

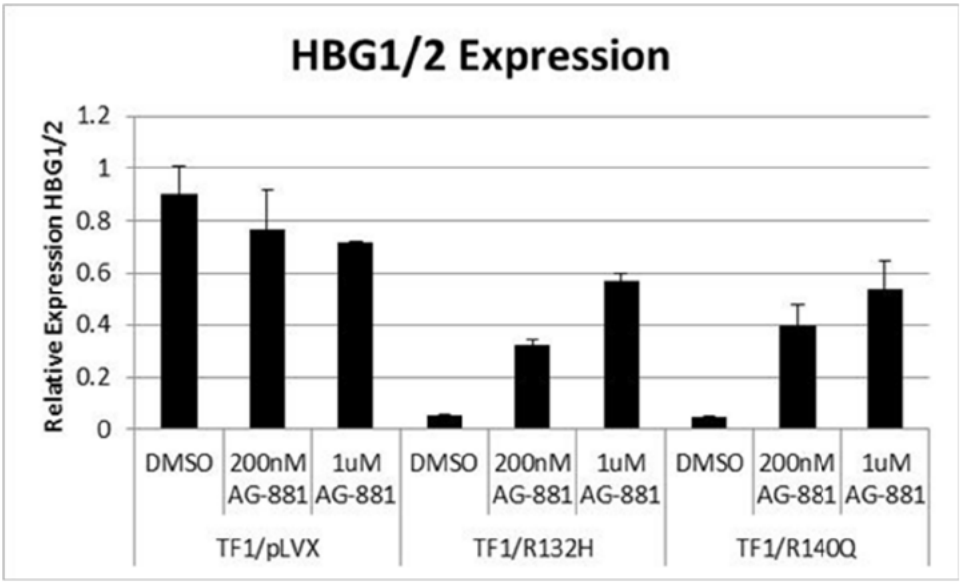
IDH1R132H 変異及び IDH2R140Q 変異が細胞分化に及ぼす固有の効果を評価するために、レンチウイルス pLVX 系を使用して、GM-CSF 依存性赤白血病細胞株 TF-1 に IDH1R132H 変異アレル及び IDH2R140Q 変異アレルを遺伝子導入してモデル系を作成した。これらの細胞の特性を解析し、変異酵素の発現及び細胞内で高濃度の 2-HG が存在することを確認した。対照として、空のベクターの過剰発現により TF-1 pLVX 細胞を作成した。

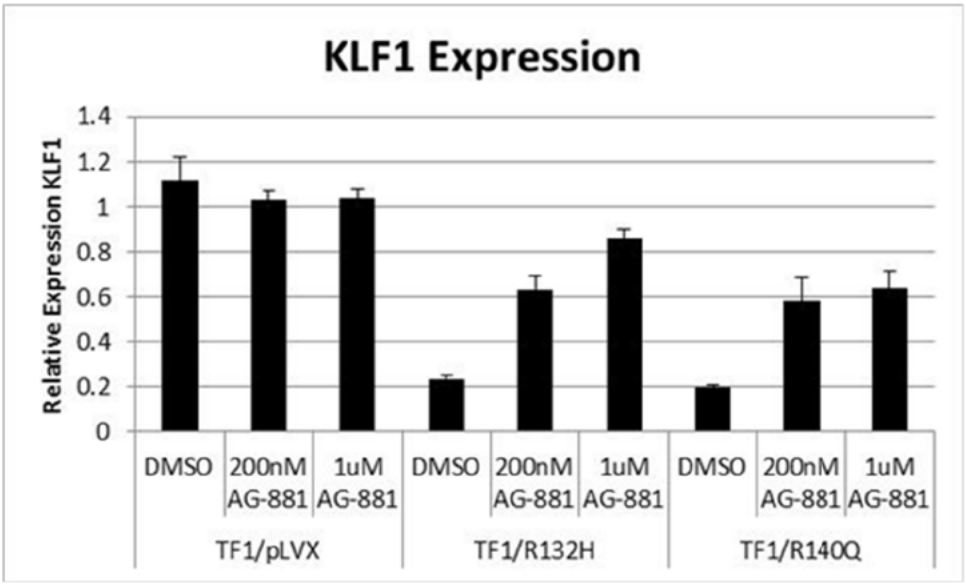
この試験の目的は、細胞内で IDH1R132H 又は IDH2R140Q を選択的に阻害することにより、変異タンパク質の発現で誘発された分化の遮断が解消されるかどうかを評価し、遮断を解消するために必要な 2-HG 阻害の濃度を評価することであった【AG881-N-044-R1】。

細胞分化遮断の解消を評価するために、GM-CSF 存在下で TF-1 pLVX 細胞、TF-1 IDH1R132H 細胞及び TF-1 IDH2R140Q 細胞をジメチルスルホキシド（DMSO）又はボラシデニブ 0.2 μM 又は 1 μM で 7 日間処理し、次に洗浄して残留 GM-CSF を除去した。その後、ボラシデニブ又は DMSO の存在下で EPO（2 units/mL）を使用して分化を誘導した（GM-CSF 非存在下）。誘導を 7 日間継続し、細胞ペレットを採取し、リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を実施して、赤血球分化マーカーである HBG 1/2 及び KLF-1 遺伝子の発現を検出した。

図 2:2 に、TF-1 IDH1R132H 変異細胞、TF-1 IDH2R140Q 変異細胞及び対照細胞株（TF-1 pLVX）を DMSO（ボラシデニブの投与量は 0）、又は 2 用量（0.2 μM 及び 1 μM）のボラシデニブで処理した後の HBG1/2（上のパネル）及び KLF-1（下のパネル）の相対的な発現を示す。

HBG 1/2 及び KLF-1TF-1 濃度が非常に低いことが示すように、TF-1 細胞における IDH1R132H 及び IDH2R140Q の発現及び高濃度の 2-HG により、EPO 誘導性の分化は遮断されており、この所見は、IDH 変異が血球分化を損傷することを公表した報告[4)]と一致している。TF-1 IDH1R132H 変異細胞及び IDH2R140Q 変異細胞をボラシデニブで処理すると、HBG1/2 及び KLF-1（血球新生時にアップレギュレートされることが知られている転写因子）[5)]の EPO-誘発性発現が部分的に回復した。



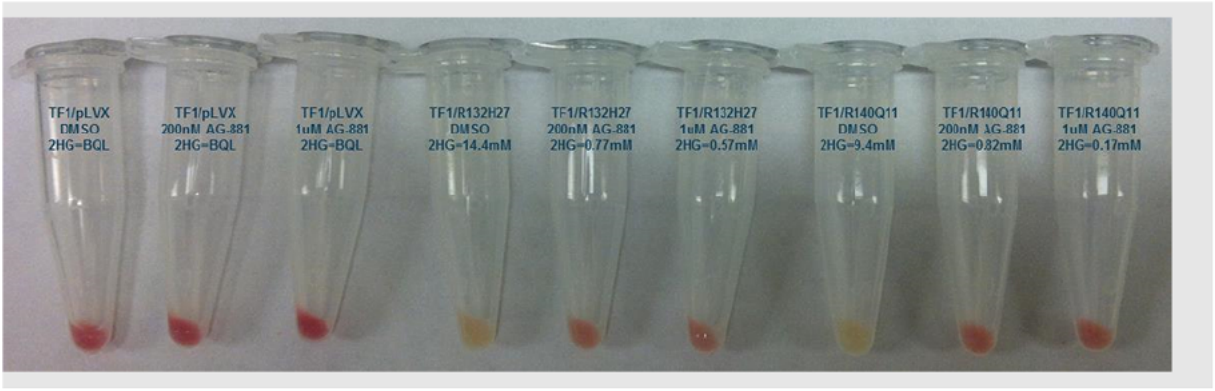


Abbreviations: AG-881 = vorasidenib; DMSO = dimethylsulfoxide; HBG1/2 = hemoglobin gamma 1/2; KLF-1 = Kruppel-like factor 1; R132H = IDH1 R132H mutant cell line; R140Q = IDH2 R140Q mutant cell line; pLVX = control cell line; TF-1 = human erythroid leukemia cell line
Source: Report AG881-N-044-R1, Figure 1

図 2:2　対照細胞株（TF-1 pLVX）及び TF-1 IDH1R132H 変異細胞及び TF-1 IDH2R140Q 変異細胞を対照（DMSO）又は 2 つの用量のボラシデニブ（AG-881）で 7 日間処理した後の、HBG 1/2 及び KLF-1 の相対的な発現

この実験では、TF-1 IDH1R132H 細胞では細胞内 2-HG 濃度は未処理の場合は 14.4 mM であるがボラシデニブ 0.2 μM 及び 1 μM で処理するとそれぞれ 0.77 mM と 0.57 mM に低下し、TF-1 IDH2R140Q 細胞では未処理の場合は 9.4 mM であるがボラシデニブ 0.2 μM 及び 1 μM で処理する

とそれぞれ 0.82 mM と 0.17 mM に低下し、ボラシデニブで処理した細胞では HBG 1/2 及び KLF-1 の発現が相対的に増加し、ヘモグロビンの再発現を示す著明な色の変化がみられた（図 2:3）。



Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; BQL = below the quantifiable limit; DMSO = dimethylsulfoxide; R132H27 = IDH1 R132H mutant cell line; R140Q11 = IDH2 R140Q mutant cell line; pLVX = control cell line; TF1 = human erythroid leukemia cell line; AG-881 = vorasidenib
Source: Report AG881-N-044-R1, Figure 2

図 2:3　　細胞内 2-HG 濃度に対応する細胞ペレットの画像

結論：

- TF-1 細胞を用いて、2-HG をバックグラウンド濃度まで低下させる濃度のボラシデニブで TF-1 IDH1R132H 変異細胞及び TF-1 IDH2R140Q 変異細胞を処理すると、IDH 依存性 EPO 誘発性の赤血球分化遮断が解消された。これは、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た。

2.3.2　急性骨髄性白血病（AML）患者由来の IDH1 及び IDH2 初代細胞におけるボラシデニブの骨髄分化の誘導

ヒト AML 腫瘍初代細胞における IDH1 変異と IDH2 変異の阻害作用を評価するために、*ex vivo* アッセイで患者の骨髄由来の IDH1 変異骨髄芽球及び IDH2 変異骨髄芽球をボラシデニブで処理した【AG881-N-045-R1】。IDH1 変異又は IDH2 変異を有する AML 患者由来初代細胞において、IDH1 変異又は IDH2 変異の選択的阻害が骨髄芽球の分化を誘発する能力も評価した。

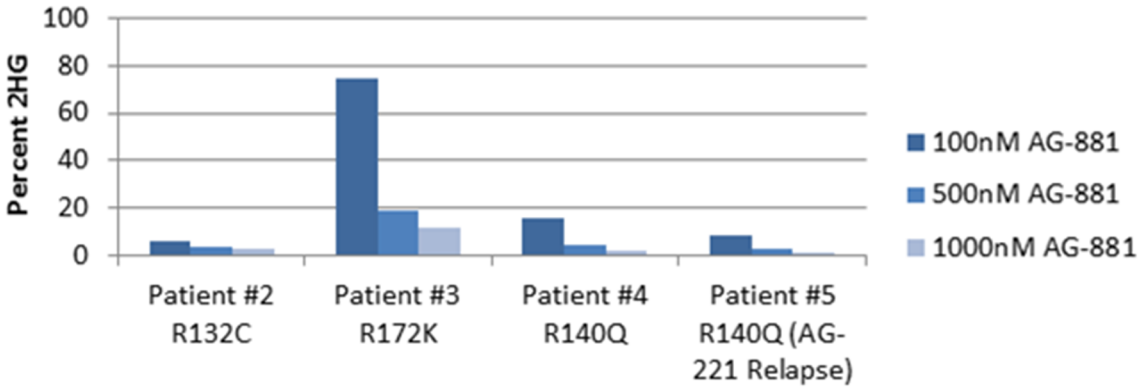
[redacted]（[redacted]、フランス）において、悪性疾患の診断時点で末梢血試料又は骨髄吸引試料を患者から得た。AML の診断は French-American-British（FAB）分類に従って形態学的に確認し、核型はヒト染色体に関する国際命名規約 [6] に従って記述した。遺伝子の変異状態は PCR 及び直接シーケンシングで決定した。

患者 5 例から得た AML 骨髄初代細胞を無血清条件で、組換えヒトサイトカイン［インターロイキン-3（IL-3）、インターロイキン-6（IL-6）、幹細胞因子（SCF）、トロンボポエチン（TPO）、EPO、FMS 様チロシンキナーゼ 3 受容体リガンド（FLT3L）、GM-CSF、顆粒球コロニー刺激因子（G-CSF）］存在下、及びボラシデニブ 0.1 µM、0.5 µM、1 µM 又は DMSO の存在下で *ex vivo* で

培養した[7]。Day 3、6、10 及び 13 に細胞を計数し、100,000 個以上の細胞を取り出して、蛍光活性化セルソーティング（FACS）で解析した。

Ex vivo 処理の Day 3、6、10 及び 13 に、各患者から得た初代細胞の骨髄又は血中骨髄芽球の形態の分析及び分化状態の細胞学的分析を実施した。

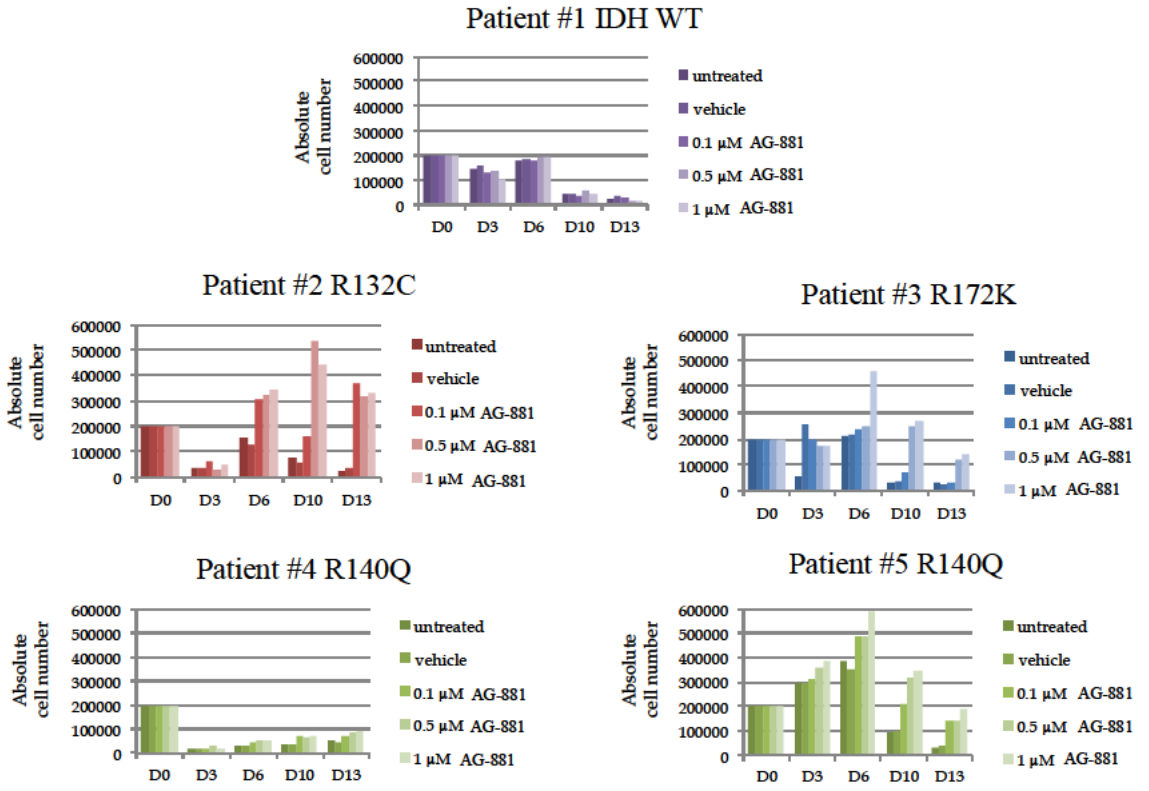
患者由来の IDH1R132C 変異試料及び IDH2R140Q 変異試料中の 2-HG 濃度はボラシデニブによる *ex vivo* 処理で低下し、低下率は最低用量（0.1 μM）で 80%超、0.5～1 μM で 95%超であった。患者の中には、IDH2 変異阻害薬の enasidenib（AG-221）投与後に再発した患者も含まれていた（患者番号 2、4 及び 5）（図 2:4）。IDH2R172K 変異を有する患者番号 3 では、最高用量（1 μM）で 2-HG 濃度を 88%超低下させた。この結果は、IDH2R172K 変異細胞における 2-HG 産生阻害能（IC_{50}）と一致する【AG881-N-042】及び【AG881-N-043-R1】。WT 患者（患者番号 1）の試料では定量が可能な 2-HG は検出されなかった（社内資料）。



Abbreviations: 2-HG = 2-Hydroxyglutarate; AG-221 = enasidenib; DMSO = dimethylsulfoxide; R132C = IDH1 R132C mutant; R172K = IDH2 R172K mutant; R140Q = IDH2 R140Q mutant
Source: Report AG881-N-045-R1, Figure 1

図 2:4　IDH1 変異又は IDH2 変異を有する患者由来の試料をボラシデニブ（AG-881）で 13 日間処理した後の培地中の 2-HG（DMSO 対照との比較）

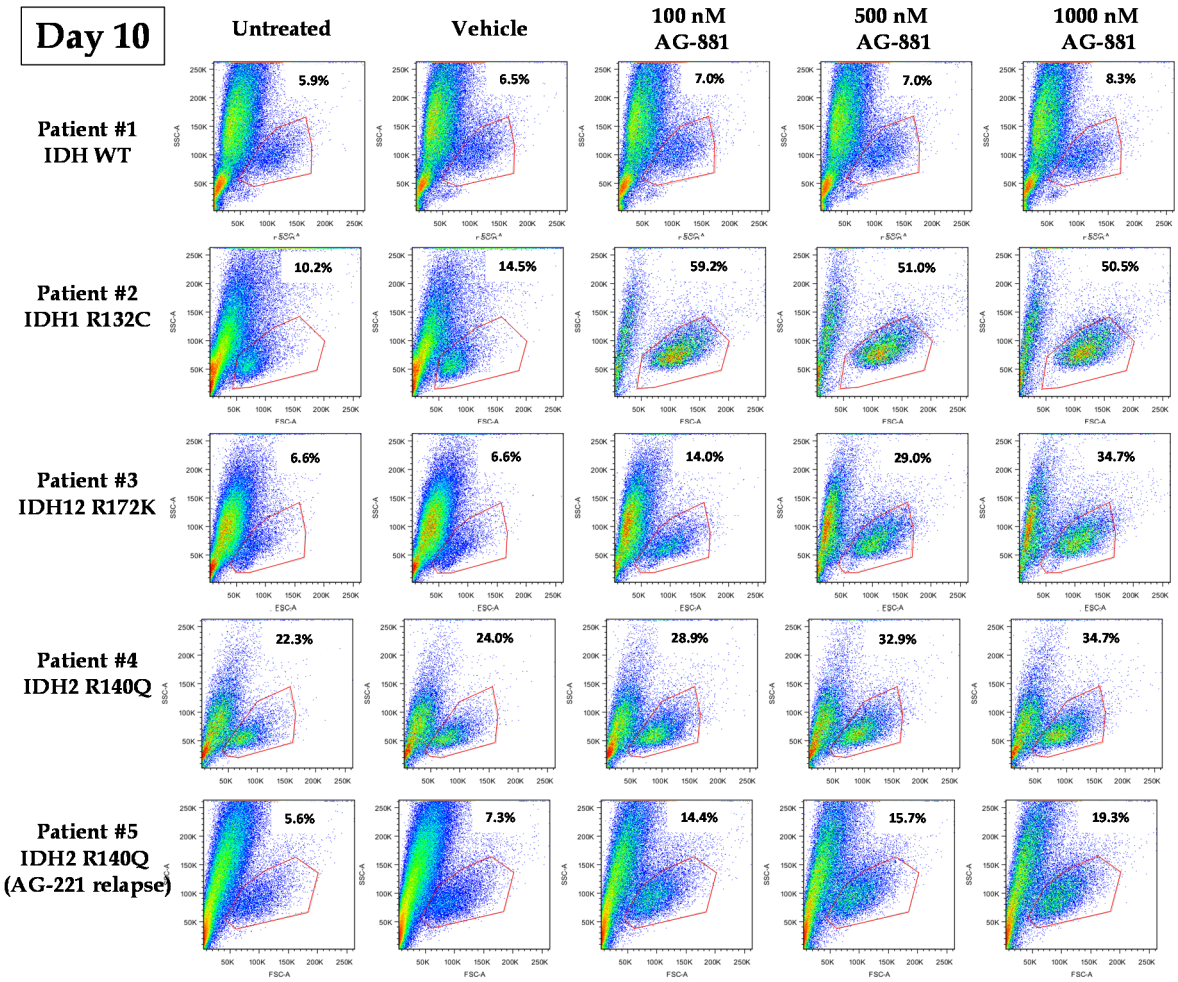
図 2:5 に、IDH1 変異患者及び IDH2 変異患者から得た試料を *ex vivo* でボラシデニブ処理し、生存細胞の数を比較した結果を示す。患者番号 2～5 の試料では、ボラシデニブ処理後 Day 3～6 に急増殖が始まった。この所見は細胞分化の開始と一致する。IDH2R140Q 変異を有する患者番号 4 由来の試料は *ex vivo* ではあまり増殖しなかったが、細胞残余をボラシデニブで処理すると急増殖が誘発された。患者番号 1 由来の IDH1/2 WT 試料では急増殖はみられなかった。



Abbreviations: AG-881 = vorasidenib; IDH = isocitrate dehydrogenase; R132C = IDH1 R132C mutant; R172K = IDH2 R172K mutant; R140Q = IDH2 R140Q mutant; WT = wild-type
Source: Report AG881-N-045-R1, Figure 2

図 2:5　　患者由来の初代細胞をボラシデニブ（AG-881）で処理したときの生存細胞の数

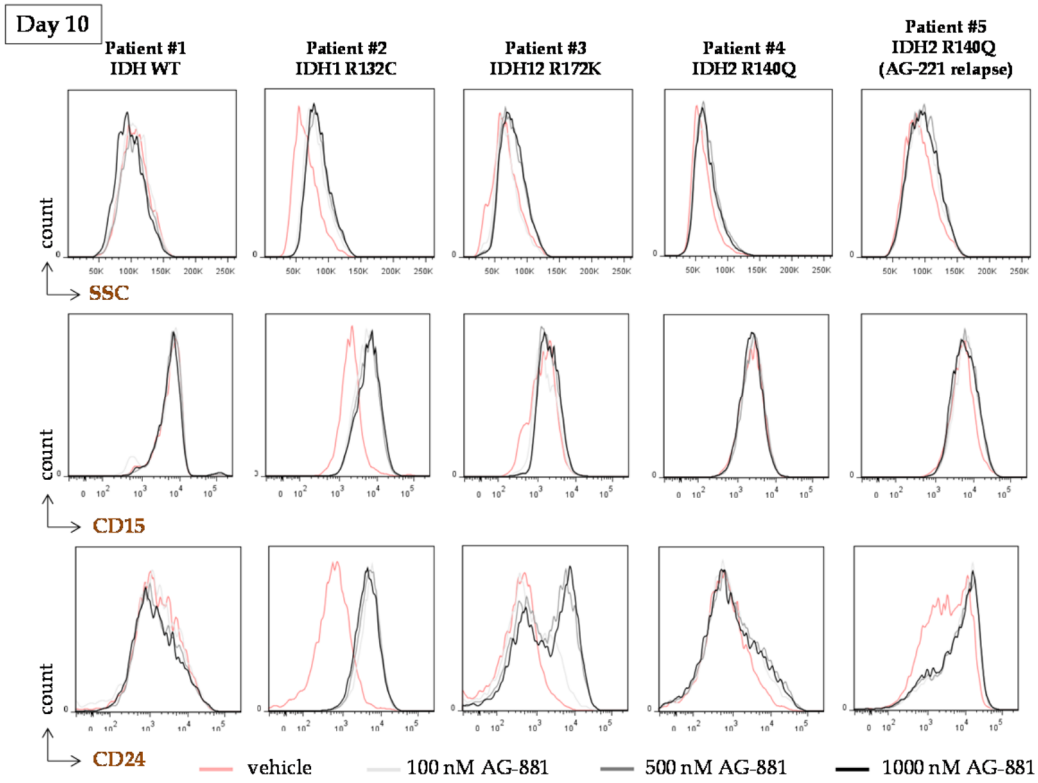
生存細胞の FAC 分析を実施し、ボラシデニブ処理後の分化状態を評価した。液体培養で 10 日間増殖すると、大きさと顆粒密度は用量依存的に増加し、この所見はIDH1 変異患者及びIDH2 変異患者（患者番号 2～5）の試料で顆粒球への分化が誘導されたことと一致した（図 2:6）。IDH WT 患者（患者番号 1）の試料をボラシデニブで処理しても増加はみられなかった。AML 骨髄芽球の成熟を FACS 分析で評価し、単球及び顆粒球の分化と関連する細胞表面マーカー（CD15 及び CD24）の変化を検討した。ボラシデニブ処理により、IDH1、IDH2 のいずれの変異試料でも（患者番号 2～5）分化細胞の数の増加が誘導された。



Abbreviations: AG-221 = enasidenib; AG-881 = vorasidenib; AML = acute myelogenous leukemia; FACS = fluorescence-activated cell sorting; FSC = forward scatter; IDH = isocitrate dehydrogenase; R132C = IDH1 R132C mutant; R172K = IDH2 R172K mutant; R140Q = IDH2 R140Q mutant; SSC = side scatter; WT = wild-type
Source: Report AG881-N-045-R1, Figure 3

図 2:6　IDH1 変異又は IDH2 変異を有する AML 患者由来の初代細胞のボラシデニブ（AG-881）処理後の FACS 解析

患者番号 2～5 由来の初代細胞をボラシデニブで処理した IDH1 変異試料及び IDH2 変異試料では細胞表面のマーカー（CD15 及び CD24）の平均蛍光強度及び側方散乱光（SSC）集団の増加がみられた（灰色の線）が、DMSO 対照ではみられなかった（赤い線）（図 2:7）。このシフトは、IDH WT 試料（患者番号 1）をボラシデニブで処理しても Day 10 に観察されなかった。



Abbreviations: AG-221 = enasidenib; AG-881 = vorasidenib;CD15 and CD24 = monocytic and granulocytic differentiation markers; IDH = isocitrate dehydrogenase; SSC = side scatter; WT = wild-type
Source: Report AG881-N-045-R1, Figure 4

図 2:7　IDH1 変異又は IDH2 変異を有する患者由来初代細胞をボラシデニブ（AG-881）で処理したときの細胞表面マーカーの変化

結論：

- ボラシデニブは、IDH1 変異又は IDH2 変異を有する AML 患者由来骨髄初代細胞において、2-HG の産生を抑制し、骨髄分化を誘導する。増殖アッセイでみられた急増殖は、細胞分化の開始と一致する。

2.4　*In vivo* 薬理試験

ボラシデニブの一連の *in vivo* 薬理試験 4 試験は、マウス異種移植モデル（内因性 IDH1R132C 変異を有する HT1080 異種移植モデル、U87 IDH2R140Q 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など）を使用して実施した。これらの試験の目的は、ボラシデニブ反復経口投与後の、ボラシデニブ曝露量と腫瘍中の 2-HG 産生減少の PK/PD 関係を評価することであった。これら 4 試験はほぼ同じデザインで実施した。

最初の 3 試験では、雌の BALB/c ヌードマウスの側腹部に HT1080 細胞 3.0×10^6【AG881-N-033-R1】又は U87I DH2R140Q 細胞 1.0×10^7 を皮下接種した【AG881-N-034-R1】及び【AG881-N-035-

R1】。接種後 Day 22～29 に腫瘍が約 430～3880 mm^3 になった時点でマウスを無作為化し、溶媒又はボラシデニブを 12 時間間隔で 3 回又は 6 回経口投与した。

神経膠腫異種移植モデルでは、雄の ICR SCID マウスの頭蓋内に TS603 IDH1R132H 神経球細胞 2.0×10^5 を接種した。接種後 8 週目時点でマウスを無作為化し、溶媒又はボラシデニブを 12 時間間隔で 6 回経口投与した。

経口投与では、0.5%メチルセルロース及び 0.2% Tween 80 を含む水溶液中の[redacted]（[redacted]）（50% w/w）とともに、フリー体又は[redacted]（[redacted]）を均一懸濁液として調製した。投与後、あらかじめ定めた時点で血液、脳（神経膠腫腫瘍モデルのみ）及び腫瘍の試料を採取した。

血漿、脳組織（神経膠腫腫瘍モデルのみ）及び腫瘍試料中のボラシデニブ及び 2-HG の濃度は、バリデートされていない LC-MS/MS 法で測定した。血漿、脳、及び腫瘍から得た濃度データについて、WinNonLin®（Version [redacted], Pharsight Corp）で薬物動態解析を行った。

これらの試験を以下の項で要約する。

2.4.1　HT1080 IDH1R132C 異種移植マウスモデルにボラシデニブ 0.3 mg/kg、1 mg/kg、3 mg/kg 又は 30 mg/kg を 3 回経口投与した PK/PD 試験

【AG881-N-033-R1】試験では、雌の BALB/c ヌードマウス 56 匹に HT1080 細胞を接種した。各マウスに溶媒又はボラシデニブ SDD（0.3、1、3 又は 30 mg/kg）を 12 時間間隔で 3 回強制経口投与した（溶媒群 1 群は 8 匹、実薬群 4 群は 1 群あたり 12 匹）。

本試験の目的は、ボラシデニブ曝露量と腫瘍中の 2-HG 減少の PK/PD を評価することであった。最終投与から 1、3、12 又は 24 時間後に、血液試料及び腫瘍組織試料を採取した（溶媒群では各時点で 2 匹ずつ、実薬群では各時点で 3 匹ずつ）。

ボラシデニブの血漿試料及び腫瘍試料における 0 時間から 12 時間の濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0\text{-}12hr}$）、及び 2-HG の腫瘍試料中における $AUC_{0\text{-}12hr}$ と腫瘍中の 2-HG 減少率を表 2:3 に示す。

ボラシデニブは試験で検討した用量範囲（0.3～30 mg/kg）で用量線形性の PK を示した。これらの用量を投与したときの腫瘍中濃度-時間曲線下面積（AUC）と血漿中 AUC の比は 1.19（$AUC_{0\text{-}12hr}$）から 1.81（$AUC_{0\text{-}24hr}$）であった。

腫瘍中 2-HG の $AUC_{0\text{-}12hr}$ は、0.3 mg/kg の投与で 41.7%、30 mg/kg の投与で 96.6%低下した。$AUC_{0\text{-}24hr}$ についても同様の観察結果が得られた。

表 2:3　HT1080 を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.3、1、3 又は 30 mg/kg を 3 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中及び腫瘍中のボラシデニブの AUC と腫瘍中 2-HG の AUC 及び減少率（報告書 AG881-N-033-R1）

Group	Vorasidenib				2-HG	
	$AUC_{0\text{-}12hr}$ (hr•ng/mL or hr•ng/g)			Tumor to Plasma AUC Ratio		
	Plasma	Plasma, Dose-normalized[1]	Tumor		$AUC_{0\text{-}12hr}$ in Tumor (hr•ng/g)	% Decrease of 2-HG $AUC_{0\text{-}12hr}$
Vehicle	NA	NA	NA	NA	18300000	NA
0.3 mg/kg	474	1580	785	1.66	10700000	41.5
1 mg/kg	1270	1270	1510	1.19	6820000	62.7
3 mg/kg	3750	1250	6440	1.72	3090000	83.1
30 mg/kg	41500	1380	57900	1.40	597000	96.7

Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; $AUC_{0\text{-}12hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 12 hours; HT1080 = human chondrosarcoma/fibrosarcoma cell line; NA = not applicable; PO = per os.
[1] *Dose-normalized to 1 mg/kg*
Source: Report AG881-N-033-R1, Table 8 and Table 9.

$AUC_{0\text{-}12hr}$ と $AUC_{0\text{-}24hr}$ のデータの PK/PD モデリングに基づいて算出した 2-HG の最大減少率（E_{max}）はそれぞれ 97.6%及び 97.5%であった（表 2:4）。腫瘍の 2-HG を 50%減少させるために必要な血漿中 AUC（$EAUC_{50[0\text{-}12hr]}$及び $EAUC_{50[0\text{-}24hr]}$）はそれぞれ 694 hr•ng/mL と 954 hr•ng/mL であった。これらのモデルパラメータを使用して、腫瘍の 2-HG を持続的に 97%減少させる血漿中ボラシデニブの濃度-時間曲線を算出したところ、$EAUC_{97[0\text{-}12hr]}$は 22400 hr•ng/mL、$EAUC_{97[0\text{-}24hr]}$は 30800 hr•ng/mL と推定された。

表 2:4　HT1080 を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.3、1、3 又は 30 mg/kg を 3 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中ボラシデニブ曝露量と腫瘍中 2-HG 濃度の PK/PD 相関（報告書 AG881-N-033-R1）

Parameter	2-HG Decrease Based on $AUC_{0\text{-}12hr}$	2-HG Decrease Based on $AUC_{0\text{-}24hr}$
E_{max} (% reduction of 2-HG)[1]	97.6 ± 2.04	97.5 ± 2.30
$EAUC_{50}$ (hr•ng/mL)[1]	694 ± 60.0	954 ± 95.6
$EAUC_{90}$ (hr•ng/mL)[2]	6250	8590
$EAUC_{97}$ (hr•ng/mL)[2]	22400	30800

Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; $AUC_{0\text{-}12hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 12 hours; $AUC_{0\text{-}24hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 24 hours; $EAUC_{50/90/97}$ = efficacious area under the vorasidenib plasma concentration × time curve that resulted in sustained 50%/90%/97% tumor 2-HG reduction; E_{max} = maximum % decrease in 2-HG; PD = pharmacodynamic; PK = pharmacokinetic; PO = per os.
[1] *Model parameters*
[2] *Derived from the model*
Source: Report AG881-N-033-R1, Table 10

結論：

- HT1080 IDH1R132C を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.3、1、3 及び 30 mg/kg を 12 時間間隔で 3 回経口投与したとき、腫瘍組織中の 2-HG 濃度は 41.5%～96.7%低下した。
- ボラシデニブによる腫瘍中 2-HG 減少の用量反応相関が確認された。シンプル E_{max} モデルを用いて、溶媒群を対照としてボラシデニブ群のボラシデニブ AUC と 2-HG AUC 減少について PK/PD モデリングしたところ、腫瘍組織中 2-HG を 97%減少させる血漿中ボラシデニブの $AUC_{0\text{-}12hr}$ は 22,400 hr•ng/mL、$AUC_{0\text{-}24hr}$ は 30,800 hr•ng/mL であった。
- ボラシデニブ 0.3～30 mg/kg を経口投与したときの血漿中曝露量に基づき、用量線形性の PK が確認された。評価した用量では、ボラシデニブ曝露量は腫瘍中のほうが血漿中よりわずかに高かった。

2.4.2　U87 IDH2R140Q 異種移植マウスモデルにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 30 mg/kg を 3 回経口投与した PK/PD 試験（AG881-N-034-R1）、及び 5、30 又は 150 mg/kg を 3 回経口投与した PK/PD 試験（AG881-N-035-R1）

U87 IDH2R140Q 異種移植マウスモデルを使用した試験を 2 試験実施した。【AG881-N-034-R1】試験では、雌の BALB/c ヌードマウス 72 匹に IDH2R140Q 細胞を接種し、各マウスに溶媒又はボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 30 mg/kg を 12 時間間隔で 3 回強制経口投与した（1 群あたり 12 匹）。【AG881-N-035-R1】試験では、雌の BALB/c ヌードマウス 36 匹に U87 IDH2R140Q 細胞を接種し、各マウスに溶媒又はボラシデニブ 5、30 又は 150 mg/kg を 12 時間間隔で 3 回強制経口投与した（1 群あたり 9 匹）。

これらの試験の目的は、血漿中及び腫瘍中のボラシデニブの PK 及び 2-HG 減少の PD を評価すること【AG881-N-034-R1】、及びボラシデニブ曝露量と 2-HG 産生減少の PK/PD を評価すること【AG881-N-034-R1】及び【AG881-N-035-R1】であった。最終投与から 1、3、6 時間後【AG881-N-034-R1】又は 12 時間後に、マウスの血液試料及び腫瘍組織試料を採取した（各時点で 3 匹ずつ）。

ボラシデニブの血漿試料中及び腫瘍試料中における $AUC_{0\text{-}12hr}$、2-HG の腫瘍試料中における $AUC_{0\text{-}12hr}$ 及び腫瘍中の減少率を表 2:5 に提示する。

血漿中ボラシデニブ曝露量は総じて用量線形性を示した。投与から 12 時間後の腫瘍中 2-HG 産生減少率は、これらの 2 試験全体で評価した用量全体（0.03～150 mg/kg）で 17.7%～98.5%であった。

表 2:5　U87 IDH2R140Q を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3、5、30 又は 150 mg/kg を 3 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中及び腫瘍中のボラシデニブの AUC と腫瘍中 2-HG の AUC 及び減少率（報告書 AG881-N-034-R1）

Group	Vorasidenib $AUC_{0\text{-}12hr}$ (hr•ng/mL or hr•ng/g)		2-HG $AUC_{0\text{-}12hr}$ (hr•ng/g)	% Decrease in Tumor 2-HG Based on $AUC_{0\text{-}12hr}$
	Plasma	Tumor	Tumor	Tumor
Vehicle	NA	NA	24600000	NA
Vehicle[1]	NA	NA	26400000	NA
0.03 mg/kg	58.5	1790	21000000	17.7
0.1 mg/kg	176	6550	21400000	16.0
0.3 mg/kg	465	11500	15700000	38.4
3 mg/kg	4840	27400	3280000	87.1
5 mg/kg[1]	5220	31700	2590000	89.9
30 mg/kg	40800	122000	934000	96.3
30 mg/kg[1]	34300	129000	662000	97.4
150 mg/kg[1]	121000	240000	382000	98.5

Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; $AUC_{0\text{-}12hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 12 hours; BID = twice daily; NA = not applicable; PO = per os.
[1] Data from Report AG881-N-035-R1
Source: Report AG881-N-034-R1, Table 8 and Table 9

ボラシデニブ曝露量と腫瘍中の 2-HG 低下について、【AG881-N-034】試験及び【AG881-N-035】試験から得た結果から作成したシンプル E_{max} モデルを用いて PK/PD モデリングを実施したところ（表 2:6）、E_{max} は 99.4%と推定された。$EAUC_{50[0\text{-}12hr]}$は 698 hr•ng/mL であり、腫瘍中 2-HG の AUC の 90%低下及び 97%低下に必要な血漿中ボラシデニブ AUC はそれぞれ、6280 hr•ng/mL と 22600 hr•ng/mL と推定された。

表 2:6　U87 IDH2R140Q を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3、5、30 又は 150 mg/kg を 3 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中ボラシデニブ曝露量と腫瘍中 2-HG 濃度の PK/PD 相関（報告書 AG881-N-034-R1）

Parameter	2-HG Decrease based on $AUC_{0\text{-}12hr}$
E_{max} (% reduction of 2-HG)[1]	99.4 ± 2.45
EAUC50 (hr•ng/mL)[1]	698 ± 111
EAUC90 (hr•ng/mL)[2]	6280
EAUC97 (hr•ng/mL)[2]	22600

Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; $EAUC_{50/90/97}$ = efficacious area under the vorasidenib plasma concentration × time curve that resulted in sustained 50%/90%/97% tumor 2-HG reduction; E_{max} = maximum % decrease in 2-HG; PO = per os.
[1] Model parameters
[2] Derived from the model
Source: Report AG881-N-034-R1, Table 10

結論：

- 【AG881-N-034-R1】試験及び【AG881-N-035-R1】試験において、U87 IDH2R140Q を異種移植した雌の BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3、5、30 又は 150 mg/kg を 12 時間間隔で 3 回経口投与した結果、腫瘍中 2-HG 濃度は 17.7%～98.5%低下した。
- ボラシデニブによる腫瘍中 2-HG 減少の用量反応相関が確認された。腫瘍中 2-HG を 50%、90%及び 97%低下させる血漿中ボラシデニブの $AUC_{0\text{-}12hr}$ は、それぞれ 698 hr•ng/mL、6280 hr•ng/mL 及び 22600 hr•ng/mL と推定された。
- 血漿中曝露量に基づくと、ボラシデニブは総じて用量線形性を示した。2 試験【AG881-N-034-R1】及び【AG881-N-035-R1】において、いずれの用量でもボラシデニブの AUC は腫瘍中のほうが血漿中よりも高かった。

2.4.3　同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫異種移植マウスモデルにボラシデニブ 0.03、0.1 又は 0.3 mg/kg（低用量範囲）又は 0.3、3 又は 10 mg/kg（高用量範囲）を経口投与した PK/PD 試験

【AG881-N-046-R1】試験では、雄の ICR SCID マウス 54 匹に TS603 IDH1R132H 神経球細胞を頭蓋内接種した。この試験は 2 段階で実施した。最初の段階（高用量範囲）では、マウスに溶媒又はボラシデニブ 0.3、3 又は 10 mg/kg を 12 時間間隔で 6 回強制経口投与し、次の段階（低用量範囲）では、溶媒又はボラシデニブ 0.03、0.1 又は 0.3 mg/kg を 12 時間間隔で 6 回強制経口投与した。

本試験の目的は、ボラシデニブ曝露量と腫瘍中 2-HG 減少の PK/PD を評価することであった。最終投与から 1、3 又は 12 時間後に、血液、脳組織及び脳腫瘍の試料を採取した（各時点で 1～3 匹）。

ボラシデニブの血漿、脳組織及び脳腫瘍試料中における $AUC_{0\text{-}12hr}$、及び 2-HG の脳組織中における $AUC_{0\text{-}12hr}$ を表 2:7、2-HG の脳及び脳腫瘍中における減少率を表 2:8 に示す。

算出されたボラシデニブの $AUC_{0\text{-}12hr}$ は用量線形性の PK を示し、脳組織中の 2-HG 濃度は用量依存的に低下した。10 mg/kg を投与したときの 2-HG の $AUC_{0\text{-}12hr}$ に基づくと脳中での最大減少率は 50.8%であった。2-HG の減少は脳組織中より脳腫瘍中のほうが大きく上回った。脳腫瘍中 2-HG の減少は、試験で使用した最低用量（0.03 mg/kg）で 75%であり、最高用量（10 mg/kg）では 99.9%とほぼ完全な阻害であった。0.1 mg/kg の投与では 99.7%であり、このときの血漿中ボラシデニブの $AUC_{0\text{-}12hr}$ は 201 ng•hr/mL であった。

表 2:7　同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫を異種移植した雄の ICR SCID マウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 10 mg/kg を 6 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿、脳、及び脳腫瘍中のボラシデニブの AUC、及び脳と脳腫瘍中の 2-HG の AUC（報告書 AG881-N-046-R1）

Group	Vorasidenib						2-HG $AUC_{0\text{-}12hr}$ (hr•ng/g)[1]	
	$AUC_{0\text{-}12hr}$ (hr•ng/mL or hr•ng/g)				Brain to Plasma AUC Ratio	Brain Tumor to Plasma AUC Ratio		
	Plasma	Plasma, Dose-normalized[2]	Brain	Brain Tumor			Brain	Brain Tumor
Vehicle	NA	NA	NA	NA	NA	NA	142000	12100000
Vehicle[3]	NA	NA	NA	NA	NA	NA	147000	10800000
0.03	84.2	2800	96.0	388	1.14	4.62	140000	2860000
0.1	201	2010	393	522	1.96	2.60	146000	339000
0.3	706	2350	903	1430	1.28	2.02	123000	204000
0.33	754	2510	1090	2110	1.45	2.80	102000	167000
3	9160	3050	8690	8200	0.95	0.90	89600	55400
10	24000	2400	26300	19200	1.10	0.80	71100	32500

Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; $AUC_{0\text{-}12hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 12 hours; NA = not applicable; PO = per os; SCID = severe combined immunodeficiency disease.
[1] 2-HG levels in plasma were not measured in the high-dose study group
[2] Dose-normalized to 1 mg/kg
[3] High-dose group
Source: Report AG881-N-046-R1, Table 16

表 2:8　同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫を異種移植した雄の ICR SCID マウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 10 mg/kg を 6 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの脳組織及び脳腫瘍中の 2-HG 減少率（報告書 AG881-N-046-R1）

Group	% Decrease of 2-HG $AUC_{0\text{-}12hr}$	
	Brain	Brain Tumor
Vehicle	NA	NA
0.03 mg/kg	3.11	75.0
0.1 mg/kg	-1.04	99.7
0.3 mg/kg	14.9	99.8
0.3 mg/kg[1]	29.4	99.9
3 mg/kg[1]	38	100
10 mg/kg[1]	50.8	99.9

Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; $AUC_{0\text{-}12hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 12 hours; NA = not applicable; PO = per os; SCID = severe combined immunodeficiency disease.
[1] High-dose group
Source: Report AG881-N-046-R1, Table 17

シンプル E_{max} モデルを用いて脳腫瘍中のボラシデニブ曝露量と 2-HG 減少を PK/PD モデリングしたところ（表 2:9）、$EAUC_{50[0\text{-}12hr]}$は 23.3 hr•ng/mL であり、$EAUC_{90}$ と $EAUC_{97}$ はそれぞれ 210 hr•ng/mL と 753 hr•ng/mL と算出された。

表 2:9　同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫を異種移植した雄の ICR SCID マウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 又は 10 mg/kg を 6 回 PO 投与（12 時間間隔）したときの血漿中ボラシデニブ曝露量と脳腫瘍中 2-HG 濃度の PK/PD 相関

Parameter	2-HG Decrease based on $AUC_{0\text{-}12hr}$
E_{max} (% reduction of 2-HG)[1]	102 ± 1.8
$EAUC_{50}$ (hr•ng/mL)[1]	23.3 ± 4.9
$EAUC_{90}$ (hr•ng/mL)[2]	210
$EAUC_{97}$ (hr•ng/mL)[2]	753

Abbreviations: 2-HG = 2-hydroxyglutarate; $AUC_{0\text{-}12hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 12 hours; $EAUC_{50/90/97}$ = efficacious area under the vorasidenib plasma concentration × time curve that resulted in sustained 50%/90%/97% tumor 2-HG reduction; E_{max} = maximum % decrease in 2-HG; PO = per os; SCID = severe combined immunodeficiency disease.
[1] *Model parameters*
[2] *Derived from the model*
Source: Report AG881-N-046-R1, Table 18

結論：

- 同所性の TS603 IDH1R132H 神経膠腫を異種移植した雄の ICR SCID マウスにボラシデニブ 0.03、0.1、0.3、3 及び 10 mg/kg を 12 時間間隔で 6 回経口投与したとき、脳腫瘍組織中の 2-HG 濃度は 75%～99.9%超低下した。
- シンプル E_{max} モデルに基づくと、脳腫瘍中 2-HG の 50%減少及び 97%減少に対応するボラシデニブの血漿中 $AUC_{0\text{-}12hr}$ は、それぞれ 23.3 hr•ng/mL と 753 hr•ng/mL であった。0.1 m/kg を投与すると 2-HG 減少率は 97.4%に達し、このときの血漿中ボラシデニブの $AUC_{0\text{-}12hr}$ は 201 ng•hr/mL であった。
- ボラシデニブは 0.03～10 mg/kg の用量範囲で用量線形性の PK を示した。
- ボラシデニブは脳透過性を示し、脳中 AUC と血漿中 AUC の比は 0.95～1.96 の範囲であった。

3.　副次的薬理試験

3.1　　選択性：受容体への結合

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の結合性及び酵素活性を阻害する可能性を評価した。

一般的なオフターゲットスクリーニングパネルとして、神経伝達物質受容体（ヒスタミン、ムスカリン、ニコチン、ノルエピネフリン、オピオイド、セロトニン）、イオンチャネル（カルシウム、カリウム、ナトリウム、GABA）、プロスタグランジン（ロイコトリエン）、脳・腸ペプチド（アンジオテンシン、ブラジキニン、エンドセリン、神経ペプチド）、酵素（コリンエステラーゼ、シクロオキシゲナーゼ）及び酵素キナーゼ（PKC 及び LCK）が含まれ、スクリーニングは、ボラシデニブの濃度は 1 μM で実施した。これらのアッセイで使用した方法の詳細は、報告書【AG881-N-020-R1】に記述する。

その結果、アデノシン A3 受容体に対してのみ、阻害率 92%という明らかな阻害（結合阻害率 50%以上）が認められた。

その結果に基づきアデノシン受容体及びトランスポーターへの結合選択性の評価、GTPγS（グアノシン 5’-O-三リン酸）アッセイで機能活性の評価を実施した【AG881-N-021-R1】。ボラシデニブはアデノシン A3 受容体に結合して機能的拮抗薬として作用し、IC_{50} は 1.50 μM であることが示された。

AGI-69460 は、ボラシデニブのオフターゲット活性を評価するために使用された 88 種類の受容体、イオンチャネル、及び酵素のうち 86 種類を含むパネルでも評価された［ボラシデニブは、除外された 2 つの酵素、すなわちアンジオテンシン変換酵素（ACE）およびロイコトリエン B4 に対しては不活性であった］。AGI-69460 は、アデノシン A3 受容体（1 μM で 75%の結合阻害）に限定された有意なオフターゲット活性（50%以上）がみられ、非常に選択性の高いことも示された【TW04-0016507】。

4.　安全性薬理試験

4.1　*In vitro* 安全性薬理試験

4.1.1　QPatch（オートパッチクランプアッセイ）：ボラシデニブが心臓 hERG 活性に及ぼす影響（AG881-N-018-R1）

ボラシデニブについてオートパッチクランプアッセイを実施し、遅延整流性カリウムイオンチャネル遺伝子（hERG）がコード化する急速活性型遅延整流カリウム電流（I_{Kr}）を阻害する可能性を評価した【AG881-N-018-R1】。試験は、hERG cDNA が安定的に遺伝子導入され、カリウム hERG チャネルを発現するチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株で実施し、陽性対照としてシサプリドを使用した。オートパッチクランプアッセイにおいてボラシデニブの hERG に対する IC_{50} は 30 µM 超であった。

4.1.2　ヒト胎児腎細胞で発現したクローン hERG カリウムチャネルに対するボラシデニブの影響（AG881-N-019-R1）

ボラシデニブが生理学的温度に近い温度で hERG チャネルに及ぼす影響を *in vitro* マニュアルパッチクランプアッセイで評価した。

ボラシデニブの hERG 電流阻害能（平均 ± SEM）は 3.1 µM で 5.0 ± 0.3%（n=3）、12.3 µM で 9.5 ± 0.6%（n=6）であり、対照（溶媒）では 2.2 ± 0.4%（n=3）であった。hERG 阻害能は試験に使用したすべての濃度で、溶媒対照の値と比べて統計的に有意（$p<0.05$）であった。HEPES 緩衝生理食塩液 + 0.3% DMSO 中での溶解性に限度があったため、これ以上の濃度は検討していない。50%超の阻害は観察されていないため、濃度-反応データをフィットさせることができず、プロトコルで規定した IC_{50} 並びに IC_{20} 値を算出できなかった。同一条件下で陽性対照（60 nM テルフェナジン）の hERG カリウム電流阻害能（平均 ± SD；n=2）は 84.8 ± 0.1%であり、hERG 阻害試験系の感度に問題はなかった。

4.1.3　ヒト胎児腎細胞で発現したクローン hERG カリウムチャネルに対する AGI-69460 の影響（AG881-N-066）

AGI-69460（ヒト循環血中のボラシデニブの主な代謝物）の hERG チャネル電流に対する影響を検討して、急速活性型遅延整流カリウム電流（I_{Kr}）を阻害する可能性を評価した（I_{Kr}）【AG881-N-066】。

AGI-69460 の hERG 電流阻害能（平均 ± SEM；n=3）は 3 µM で 2.2 ± 0.9%、10 µM で 10.2 ± 0.3%、30 µM で 36.6 ± 0.5%であり、対照では 1.7 ± 0.8%（n=3）であった。10 µM と 30 µM の hERG 阻害は、溶媒対照の値と比べて統計的に有意（$p<0.05$）であった。溶媒中での被験物質の溶解度に限度があるため、30 µM 超の濃度は評価しなかった。陽性対照物質テルフェナジンの hERG カリウム電流阻害能（平均 ± SD；n=2）は 60 nM で 87.6 ± 1.8%であり、hERG 阻害試験系の感度に問題はなかった。

AGI-69460 の hERG カリウム電流阻害作用の IC_{50} は算出できなかったが、30 µM 超と推定された。

4.2　*In vivo* 安全性薬理

4.2.1　Irwin 変法によるスクリーニング

ラットを用いた GLP 準拠 28 日間試験の一部として、Irwin 変法によるスクリーニングを Day 0（投与前及び投与後 4 時間）及び Day 27（投与後 4 時間）に実施した【AG881-N-012-R1】。詳細な結果は【2.6.6_3.1.4】に記述する。ボラシデニブ 3、10、30 及び 100 mg/kg/day（同時対照群には溶媒）を 28 日間連続で 1 日 1 回強制経口投与した。

Irwin 試験の評価では被験物質関連の影響はなかった。ラットを用いた 28 日間 GLP 準拠試験における Irwin 変法による評価、及び中枢神経系におけるボラシデニブの影響の可能性は【2.6.6】に記述する。

4.2.2　カニクイザルを用いた心電図の評価

カニクイザルを用いた GLP 準拠 28 日間試験の一部として、心電図評価を実施した【AG881-N-013-R1】。詳細な結果は【2.6.6_3.2.2】に記述する。

ボラシデニブ 3、10 及び 40 mg/kg/day（同時対照には溶媒）を 28 日間連続で 1 日 1 回経鼻胃管投与した。馴化中（Day -17）及び投与期間終了間際（Day 25）の投与後約 6 時間に、すべての動物からマルチリード（I、II、III、aVR、aVL 及び aVF）ECG を記録した。

40 mg/kg/day の用量では、Day 25 の平均 QTc 間隔は雄では対照群と比べて有意に延長したが、雌では延長はみられなかった。この群の 3 匹のうち、雄 1 匹のみで心拍数で補正した QTc 延長のわずかな変化（32 msec）がみられた。この雄の Day 27 の最高血漿中濃度（C_{max}）は同じ群の中で最も高かった（Day 27 の $AUC_{0\text{-}24hr}$ と C_{max} はそれぞれ 164,000 ng•h/mL と 22,100 ng/mL）。忍容性のない用量（40 mg/kg/day）を投与した動物では、ECG パラメータの回復は評価しなかった。3 mg/kg/day 又は 10 mg/kg/day の用量では、被験物質関連の ECG 所見はなかった。

4.2.3　呼吸器系の評価

呼吸器系に関しては、ボラシデニブを用いて特化した試験は実施されていない。しかし、ラット及びサルにおける 28 日間及び 13 週間の反復投与毒性試験【それぞれ AG881-N-012-R1 及び AG881-N-056、AG881-N-013-R1 及び AG881-N-057】において、呼吸機能を含む動物の一般状態を目視により評価した。肺は肉眼及び顕微鏡下で評価され、いずれの種においても肉眼的及び顕微鏡的な重大な所見は観察されなかった。忍容性のない用量においては、ラットで散発的な影響が観察された。例えば、28 日間のラット反復投毒性試験【AG881-N-012-R1】において、100 mg/kg/日の投与を受けた動物で 11 日及び 27 日後に呼吸数の減少が、13 週間の反復投与毒性試験【AG881-N-056】において、5、15、及び 50 mg/kg/日投与群で呼吸数の増加及び浅い呼吸が認められた【AG881-N-056】。忍容性のない用量で呼吸系への影響が認められたことから、急性安全性薬理試験では安全性に関する追加情報は得られないと考えられる。

したがって、動物試験で重大な所見は認められず、IDH 阻害剤投与患者に対するリスクも特定されていないことから、呼吸系に特化した試験は不要と判断された。

動物の呼吸器系の所見は実臨床との関連性が低いことを考慮すると、主要な反復投与毒性試験で得られた所見は、ヒトに対する重大なリスクを排除するには十分であると考えられる。

5.　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 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。

6. 考察及び結論

一連の探索的薬理試験を実施して IDH 変異誘発腫瘍形成モデルを開発し、ボラシデニブの有効性及び標的の変異 IDH 酵素を阻害して代謝物 2-HG の産生を抑制する能力の特性を解析した。

ボラシデニブは IDH1R132（H、C、G、L 及び S）、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、基質である α-KG に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。これらのデータから、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。さらに 1～16 時間のインキュベーションでは、ボラシデニブの IC_{50} に時間依存性はみられなかった。この所見から、ボラシデニブが IDH1R132H ホモダイマーホモダイマーに対して急速平衡化阻害薬であると考えられる。IDH2 R140Q ホモダイマーに対しては 1～16 時間の間で IC_{50} 値は時間依存性であったが、IDH2R172K ホモダイマーに対しては時間依存性がみられなかった。これらのデータから、ボラシデニブが IDH2R140Q ホモダイマーに対しては遅延型結合阻害薬であり、IDH2R172K ホモダイマーに対しては急速平衡化阻害薬であると考えられる。IDH1WT/R132H、IDH2WT/R140Q 及び IDH2WT/R172K ヘテロダイマー酵素に対しては、1～16 時間の間に有効性が時間依存的に増加した。これらのデータから、ボラシデニブがこれらのヘテロダイマー酵素に対して遅延型結合阻害薬であると考えられる。

IC_{50} 値から、ボラシデニブは IDH1 及び IDH2 WT ホモダイマー酵素に対しても阻害能を示す。これらの酵素に対する有効性は 1～16 時間の間に時間依存的に増加し、WT 酵素に対して遅延型結合阻害薬であると考えられる。

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急激な増殖が始まり、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 変異及び／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 産生抑制が確認された。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 97%超低下した。したがって、IDH1 変異及び／又は IDH2 変異を有する血液腫瘍と神経膠腫を含む固形腫瘍でボラシデニブが適用できる可能性が確認された。

In vivo 曝露反応解析に基づくと、ボラシデニブは腫瘍中の 2-HG を減少させることにより、神経膠腫のへ効能・効果及び血液腫瘍と固形腫瘍への効能・効果が期待された。

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の結合性及び酵素活性を阻害する可能性を評価した。化合物は選択性が高く、有意なオフターゲット活性はアデノシン A3 受容体に対する活性のみであった。*In vivo* 毒性試験では、アデノシン A3 受容体拮抗作用と一致する影響（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】。

サルを用いた GLP 準拠 28 日間反復投与試験では、カリウムチャネル hERG を阻害する可能性を評価するパッチプランプアッセイ（オート及びマニュアル）及び ECG 評価を含む複数の試験を実施し、ボラシデニブが心血管系に影響を及ぼす可能性を検討した【2.6.6_3.2.2】。マニュアルパッチクランプアッセイでは、ボラシデニブは I_{Kr}（hERG）電流を 3.1 µM で 5.0 ± 0.3%、12.3 µM（溶解性に限度があるため 12.3 µM は試験で検討した最高濃度である）で 9.5 ± 0.6%阻害した（IC_{50} 値は 12.3 µM 超）。雄のサルに高用量（40 mg/kg/day）を単回投与したとき QTc がわずかに（32 msec）延長し、このサルは Day 27 に同じ群で最大の曝露量を示した（$AUC_{0\text{-}24hr}$ と C_{max} はそれぞれ 164000 ng•h/mL と 22100 ng/mL）。この値は、ヒトで治療効果が予想される $EAUC_{97[0\text{-}24hr]}$ と C_{max} の値（45200 ng•h/mL と 2570 ng/mL）と比べると、それぞれ 3.6 倍と 8.6 倍である。Day 27 の C_{max} 値 22100 ng/mL は蛋白フリー画分濃度で 3.2 µM に相当し（10 µM でのサルの血漿中蛋白フリー画分は 0.061 であることに基づく）、マニュアルパッチクランプアッセイでこの濃度を評価したとき hERG チャネルの阻害はわずかに 5%であったため（3.1 µM で 5.0 ± 0.3%）、雄ザル 1 匹でみられた QTc のわずかな延長が hERG 阻害による可能性は低いと考えられる【2.6.4_4.3】。忍容性のない用量を投与した動物 1 匹で生じた、わずかではあるが統計的に有意な QTc 延長はモニタリング可能であり、可逆的な可能性がある。

ラットを用いた GLP 準拠 28 日間反復投与試験では Irwin 変法も実施し【2.6.6_3.1.4】、ボラシデニブが Sprague-Dawley ラットの行動に影響を及ぼす可能性を評価した。Irwin 変法の評価項目において、ボラシデニブに関連する影響はなかった。

Sprague-Dawley ラット及びカニクイザルにおける 28 日間及び 13 週間の反復投与毒性試験では、ボラシデニブに関連する呼吸器系の所見は認められなかった【2.6.6_3.1.4】【2.6.6_3.1.5】【2.6.6_3.2.2】【2.6.6_3.2.3】。

7.　参考文献一覧

1) Popovici-Muller J, Saunders JO, Salituro FG, Travins JM, Yan S, et al. Discovery of the first potent inhibitors of mutant IDH1 that lower tumor 2-HG in vivo. ACS medicinal chemistry letters. 2012;3(10):850-5. [PE0173147]
2) Rohle D, Popovici-Muller J, Palaskas N, Turcan S, Grommes C, et al. An inhibitor of mutant IDH1 delays growth and promotes differentiation of glioma cells. Science. 2013; 340(6132):626-630. [PE0163596]
3) Chuntova P, Yamamichi A, Chen T, et al. Inhibition of D-2HG leads to upregulation of a proinflammatory gene signature in a novel HLA-A2/ HLA-DR1 transgenic mouse model of IDH1R132H-expressing glioma. *Journal for immunotherapy of cancer.* 2022;10(5):e004644. [PE0167746]
4) Sasaki M, Knobbe CB, Munger JC, Lind EF, Brenner D, Brustle A, et al. IDH1(R132H) mutation increases murine haematopoietic progenitors and alters epigenetics. Nature. 2012;488(7413):656-659. [PE0162784]
5) Koury MJ, Sawyer ST, and Brandt SJ. New insights into erythropoiesis. Current opinion in hematology. 2002;9(2):93-100. [PE0172164]
6) Mitelman F. International System for Cytogenetic Nomenclature. Guidelines for Cancer Cytogenetics. Supplement to: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature. New York: Basel. 1995.
7) Norol F, Vitrat N, Cramer E, Guichard J, Burstein SA, Vainchenker W, et al. Effects of cytokines on platelet production from blood and marrow CD34+ cells. Blood. 1998;91(3):830-43. [PE0162783]

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）

2.6.3　薬理試験概要表

日本セルヴィエ株式会社

目次

1.　薬理試験：一覧表 3
1.1　薬理試験概要 3
1.2　効力を裏付ける試験 6
1.3　副次的薬理試験 6
1.4　安全性薬理試験 6
1.5　薬力学的薬物相互作用試験 7

1.　薬理試験：一覧表

1.1　薬理試験概要

Study Description	Species/ Test System	Test Article	Method of Administration	GLP Compliance	Study [Document Number]
PRIMARY PHARMACODYNAMICS					
AG-881: Inhibition and Characterization in IDH1 and IDH2 Biochemical Systems	Purified Enzymes: IDH1R132H IDH1R132C IDH1R132G IDH1R132L IDH1R132S IDH2R140Q IDH2R172K IDH1 WT IDH2 WT IDH1 WT/R132H IDH2 WT/R140Q IDH2 WT/R172K	AG-881	*In vitro* DMSO vehicle	No	AG881-N-042 [NP41940]
AG-881: Inhibition of 2-HG in IDH1 and IDH2 Mutant Expressing Cells	Cell lines: Neurospheres (603) (IDH1R132H) Neurospheres (HK213) (IDH1R132H) Neurospheres (HK252) (IDH1R132H) Neurospheres (HK207) (IDH1R132H) Neurospheres (BT142) (IDH1R132H/-) HCT-116 KI (IDH1R132C) HCT-116 KI (IDH1R132H) HCT-116 KI (IDH2R172K) COR-L 105 (IDH1R132C) HCCC-9810 (IDH1R132S) HT1080 (IDH1R132C) JJ012 (IDH1R132G) TF-1 pLVX (IDH1R132H) TF-1 pLVX (IDH2R140Q) U87MG pLVX (IDH2R140Q)	AG-881	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-043-R1 [NP41860]

Study Description	Species/ Test System	Test Article	Method of Administration	GLP Compliance	Study [Document Number]
AG-881 and AGI-69460: inhibition of 2-HG production in 2 cell lines containing IDH1R132H mutations	Human fibrosarcoma cells (HT1080) and primary human neurosphere cells (TS603)	AG-881 AGI-69460	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-068 [NP41865]
AG-881 and AGI-69460: inhibition of wild-type IDH1/2 and IDH1R132H	HCT116 IDH WT and HCT116 IDH1R132H/+ cell lines	AG-881 AGI-69460	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-069 [NP41866]
AG881: Inhibition of 2-HG production by AG-881 and its metabolite AGI-69460 in one cell line containing IDH2R172K mutation	HCT116 IDH2R172K/+ cell lines	AG-881 AGI-69460	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	R-00004806 [NP42942]
AG-881: inhibition of IDH1 and IDH2 wild type activity in cell-based and in vivo mouse xenograft systems	HCT116 R132H and WT cells mouse (Nu/nu) Ex vivo tissue slices	AG120 AG-881	In tissue culture medium or tissue slices DMSO vehicle	No	AG120-881-N-001 [NP41288]
AG-881: Reversal of Mutant IDH-Induced Differentiation Block in TF-1 IDH1R132H and TF-1 IDH2R140Q Cells: Hemoglobin Gamma 1/2 and KLF-1 Expression	Cell lines: TF-1 IDH1R132H TF-1 IDH2R140Q	AG-881	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-044-R1 [NP41862]
AG-881: Induction of Myeloid Differentiation in Primary IDH1 and IDH2 Mutant AML Patient Samples	Primary human IDH1R132C, IDH2R172K, IDH2R140Q, IDHWT myeloblast cells	AG-881	In tissue culture medium DMSO vehicle	No	AG881-N-045-R1 [NP41864]
AG-881: PK/PD study in HT1080 IDH1R132C Xenograft Mouse Model Following 3 Oral Doses (12-Hour Intervals) of AG-881 at 0.3 mg/kg, 1 mg/kg, 3 mg/kg, or 30 mg/kg	Mouse (BALB/c)	AG-881[1]	Oral gavage	No	AG881-N-033-R1 [NP41858]
AG-881: PK/PD study in U87IDH2R140Q Xenograft Mouse Model Following 3 Oral Doses (12-Hour Intervals) of AG-881 at 0.03 mg/kg, 0.1 mg/kg, 0.3 mg/kg, 3 mg/kg, or 30 mg/kg	Mouse (BALB/c)	AG-881[2]	Oral gavage	No	AG881-N-034-R1 [NP41859]
AG-881: PK/PD study in U87IDH2R140Q Xenograft Mouse Model Following 3 Oral Doses (12-Hour Intervals) of AG-881 at 5 mg/kg, 30 mg/kg, or 150 mg/kg	Mouse (BALB/c)	AG-881[2]	Oral gavage	No	AG881-N-035-R1 [NP41861]

Study Description	Species/ Test System	Test Article	Method of Administration	GLP Compliance	Study [Document Number]
PKPD Study of AG-881 Following Oral Administrations of AG-881 to Male ICR SCID Mice Bearing Orthotopic TS603 IDH1R132H Glioma Tumor Xenografts	Mouse (ICR SCID)	AG-881[3]	Oral gavage	No	AG881-N-046-R1 [NP41863]
SECONDARY PHARMACODYNAMICS					
AG-881 Off-target Screening Panel: General	*In vitro*	AG-881	N/A	No	AG881-N-020-R1 [NP41856]
AG-881 Off-target Screening Panel: Adenosine A3	*In vitro*: CHO-K1 cells	AG-881	N/A	No	AG881-N-021-R1 [NP41857]
AGI-69460 Off-target Screening Panel: General	*In vitro*	AGI-69460	N/A	No	TW04-0016507 [NP42842]
SAFETY PHARMACOLOGY					
AG-881 Automated Patch Clamp: hERG	*In vitro* (CHO cells expressing hERG)	AG-881	N/A	No	AG881-N-018-R1 [NP41869]
AG-881 Manual Patch Clamp: hERG	*In vitro* (HEK-293 cells expressing hERG)	AG-881	N/A	Yes	AG881-N-019-R1 [NP41868]
Effect of AGI-69460 on Cloned hERG	*In vitro* (HEK-293 cells expressing hERG)	AGI-69460	N/A	Yes	AG881-N-066 [NP41972]
Modified Irwin Screen: A 28-Day Oral (Gavage) Toxicity and Toxicokinetic Study of AGI-23088 in Sprague Dawley Rats with a 14-Day Recovery Period ([redacted]-888084)[4]	Sprague-Dawley rat	AG-881[1]	Oral gavage	Yes	AG881-N-012-R1 [NP41973]
Cardiovascular Safety Evaluation: A 28-Day Oral (Nasogastric) Toxicity and Toxicokinetic Study of AGI-23088 in Cynomolgus Monkeys with a 14-Day Recovery Period ([redacted]-888085)[5]	Cynomolgus monkey	AG-881[1]	Oral gavage	Yes	AG881-N-013-R1 [NP41976]

2-HG = 2-hydroxyglutarate; AML = acute myeloid leukemia; CHO = Chinese hamster ovary; DMSO = dimethylsulfoxide; GLP = Good Laboratory Practice; HCT-116 = human colorectal carcinoma cell line; HEK = human embryo kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene; IDH1/2 = isocitrate dehydrogenase 1/2; KLF-1 = Kruppel-like factor 1; PD = pharmacodynamic; PK = pharmacokinetic; SCID = severe combined immunodeficiency disease; WT = wild-type.

AG-881 = vorasidenib (formerly known as AGI-23088 and AGI-00230880. AGI-69460 = vorasidenib major circulating metabolite in humans

[1] AG-881 [redacted] with [redacted]

[2] AG-881 free base

[3] AG-881 free base for high dose groups and [redacted] for low dose groups.

[4] Results of the Irwin test from the GLP 28-day toxicology study are presented in this summary; toxicology results are provided in Module 2.6.6, Section 3.1.4

[5] Electrocardiogram data from the GLP 28-day toxicology study are presented in this summary; toxicology results are provided in Module 2.6.6, Section 3.2.2

1.2　効力を裏付ける試験

効力を裏付ける試験については、【2.6.2_2】に記載した。

1.3　副次的薬理試験

副次的薬理試験については、【2.6.2_3】に記載した。

1.4　安全性薬理試験

Organ Systems Evaluated	Species/ Strain	Method of Admin.	Test Article (Doses)	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Study Number
Cardiovascular (hERG current inhibition – automated patch clamp)	In vitro (CHO cells expressing hERG)	NA	AG-881: 0.1, 0.3, 1, 3, 10 and 30 µM	NA	AG-881 hERG IC_{50} >30 µM	No	AG881-N-018-R1 [NP41869]
Cardiovascular (hERG current inhibition – manual patch clamp)	In vitro (HEK-293 cells expressing hERG)	NA	AG-881: 3.1 and 12.3 µM	NA	AG-881 hERG IC_{50} >12.3 µM	Yes	AG881-N-019-R1 [NP41868]
Cardiovascular Effect of AGI-69460 on Cloned hERG	In vitro (HEK-293 cells expressing hERG)	NA	AGI-69460 3, 10, 30µM	NA	AGI-69460 IC_{50} >30 µM	Yes	AG881-N-066 [NP41972]

CHO = Chinese hamster ovary; GLP = Good Laboratory Practice; HEK = human embryo kidney; hERG = human ether-à-go-go related gene; AG-881 = vorasidenib; AGI-69460 = vorasidenib major circulating metabolite in humans; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; NA = not applicable

Sprague-Dawley ラットを用いた 28 日間 GLP 試験である Irwin 試験（AG881-N-016）の結果及びカニクイザル用いた 28 日間 GLP 試験（AG881-N-017）で得られた心電図の結果の概要表の結果は、【2.6.7】に記載されている。

1.5　薬力学的薬物相互作用試験

該当なし。