目次

目次 1
表一覧 1
2.4 非臨床試験の概括評価 2
略語及び略号一覧 2
2.4.1 非臨床試験の概要 5
2.4.2 薬理試験 5
2.4.2.1 効力を裏付ける試験 14
2.4.2.2 副次的薬理試験 15
2.4.2.3 安全性薬理試験 15
2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験 16
2.4.3 薬物動態試験 16
2.4.3.1 分析法及びバリデーション 22
2.4.3.2 吸収 23
2.4.3.3 分布 23
2.4.3.4 代謝 24
2.4.3.5 排泄 24
2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用 25
2.4.4 毒性試験 25
2.4.4.1 ラット及びイヌにおける単回投与毒性試験 29
2.4.4.2 ラット及びイヌにおける反復投与による主要毒性試験 29
2.4.4.3 遺伝毒性試験 30
2.4.4.4 生殖発生毒性試験 31
2.4.4.5 光毒性試験 31
2.4.5 総括及び結論 31
参考文献 34

表一覧

表 2.4-1. CYH33 について実施した非臨床薬理試験の一覧 6
表 2.4-2. CYH33 及び I27 を用いて実施した非臨床薬物代謝及び薬物動態試験の一覧 17
表 2.4-3. CYH33 を用いて実施した非臨床毒性試験の一覧 26

2.4 非臨床試験の概括評価

略語及び略号一覧

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
AKT	Protein Kinase B	プロテインキナーゼ B
AUC_{0-24h}	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to 24 hours	0 から 24 時間後における血中薬物濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to the time	0 から t 時間後における血中薬物濃度-時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
BID	Twice a Day	1 日 2 回
CL_{int}	Intrinsic clearance	固有クリアランス
C_{max}	Maximum blood concentration	最高血中濃度
CMC-Na	Sodium Carboxymethyl Cellulose	カルボキシメチルセルロースナトリウム
CNS	Central Nervous System	中枢神経系
CYP1A2、CYP3A4/5	Cytochrome P450, family 1 subfamily A member 2, family 3 subfamily A member 4 and 5	シトクロム P450、ファミリー1 サブファミリーA メンバー2、ファミリー3 サブファミリーA メンバー4 及び 5
CYP2B6	Cytochrome P450, family 2 subfamily B member 6	シトクロム P450、ファミリー2 サブファミリーB メンバー6
CYP2C8、2C9、2C19	Cytochrome P450, family 2 subfamily C member 8, 9 and 19	シトクロム P450、ファミリー2 サブファミリーC メンバー8、9 及び 19
CYP2D6	Cytochrome P450, family 2 subfamily D member 6	シトクロム P450、ファミリー2 サブファミリーD メンバー6
DMPK	Drug Metabolism and Pharmacokinetics	薬物代謝及び薬物動態
DMSO	Dimethyl Sulfoxide	ジメチルスルホキシド
ECG	Electrocardiogram	心電図
ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinoma	食道扁平上皮癌
ESI	Electrospray Ionization	エレクトロスプレーイオン化
F	Female	雌
F%	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
FOB	Functional Observational Battery	機能観察総合評価法
G_0	G_0 phase is the quiescent phase of the cell cycle	細胞周期の静止期

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
G_1	G_1 phase is the first phase of the interphase in the cell cycle	細胞周期の間期の第一期
GD	Gestational Day	妊娠日齢
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
HEK293	Human Embryonic Kidney 293	ヒト胎児腎臓細胞株 293
hERG	Human Ether-a-go-go Related Gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HNSTD	The Highest Non-Severely Toxic Dose	重篤な毒性が発現しない最大投与量
HPLC-MS/MS	High Performance Liquid Chromatography coupled with tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析
HTRF	Homogenous Time Resolved Fluorescence	均一時間分解蛍光
IC_{50}	50% Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
IC_{80}	80% Inhibitory Concentration	80%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use	医薬品規制調和国際会議
IV	Intravenous	静脈内
LLOQ	Lower Limit of Quantification	定量下限値
M	Male	雄
MATE1/2-K	Multi-drug and toxin compound extrusion 1 (liver and kidney) and 2-K (kidney)	多剤・毒性化合物排出 1（肝臓及び腎臓）及び 2-K（腎臓）
MDCK	Madin-Darby Canine Kidney Cell	Madin-Darby イヌ腎細胞
MRM	Multiple Reaction Monitoring	多重反応モニタリング
MTD	Maximum Tolerated Dose	最大耐量
MSD	Meso Scale Discovery	メソスケールディスカバリー社
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	無毒性量
OATP	Organic Anion Transporting Polypeptide	有機アニオントランスポーターポリペプチド
OCCC	Ovarian Clear Cell Carcinoma	卵巣明細胞癌
P-gp	P-glycoprotein	P 糖蛋白
PI3Kα	Phosphatidylinositol 3-Kinase Alpha	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ α
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha	ホスファチジルイノシトール-4,5-ビズリン酸 3-キナーゼ触媒サブユニット α
PK	Pharmacokinetics	薬物動態

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
PK/PD	Pharmacokinetics/Pharmacodynamics	薬物動態／薬力学
PO	Oral	経口
QD	Once a Day	1 日 1 回
SD	Sprague Dawley	Sprague-Dawley（ラット動物系統）
T/C	Mean RTV of Treatment Group/ Mean RTV of Vehicle Group	投与群の平均 RTV／溶媒群の平均 RTV
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
ULOQ	Upper limit of quantification	定量上限値

2.4.1 非臨床試験の概要

CYH33（一般名：リソバリシブメシル酸塩水和物）は経口活性を有する強力かつ選択的ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ α（PI3Kα）阻害剤である。CYH33 は進行固形癌及び *PIK3CA* に関連する血管及び／又は過成長症候群の患者に対する治療薬として開発中であり、経口投与用の錠剤として製剤化されている。

CYH33 の臨床開発のために非臨床薬理試験、薬物代謝及び薬物動態（DMPK）試験、並びに安全性薬理及び毒性試験を実施した。CYH33 のすべての非臨床安全性薬理試験及び毒性試験は GLP に従い実施しており、最新の国際的ガイドライン（ICH M3（R2）及び S9）に基づいてデザインした。

2.4.2 薬理試験

CYH33 について実施した非臨床での効力を裏付ける試験、副次的薬理試験、安全性薬理試験及び薬力学的薬物相互作用試験の結果を表 2.4-1 に要約する。

表 2.4-1. CYH33 について実施した非臨床薬理試験の一覧

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vitro*			
Report Number	**Title**	**Test System**	**Noteworthy Findings**
M4.2.1.1-1	Effect of CYH33 on PI3K kinase activity	HTRF Assay	CYH33 and I27 potently inhibited the kinase activity of PI3Kα and its mutants, with IC_{50}s ranging from 5-20 nM, while showing relatively weaker activity against other class I PI3Ks.
	Intracellular selectivity of CYH33 for type I PI3K subtypes	Cellular Assay (Western Blot)	CYH33 and I27 blocked phosphorylation of AKT at ~41 nM/1100 nM/~370 nM/~370 nM for Rh30-Myr-p110α/β/γ/δ cells, respectively, which indicated that CYH33 and I27 selectively inhibited PI3Kα activity at cellular level.
	Effect of CYH33 on PI3K pathway in human cancer cell lines	Cellular Assay (Western Blot)	CYH33 (~10-100 nM), I27 (~30-300 nM), and BYL719 (~100-1000 nM) blocked phosphorylation of AKT along with the phosphorylation of downstream effectors S6K1 and rpS6 in a time- and concentration-dependent manner. The minimal concentration of CYH33 and I27 required to completely inhibit PI3K signaling pathway was lower than that of BYL719.
	Anti-tumor effect of CYH33 on human breast and esophageal cancer cell lines *in vitro*	Cellular Assay (SRB assay)	CYH33, I27 and BYL719 inhibited the proliferation of 11 esophageal cancer cell lines and 21 breast cancer cell lines with GI_{50}s values ranging from 10 nM to >10 μM.
	Effect of CYH33 on cell cycle in human breast and esophageal cancer cell lines	Cellular Assay (Flow cytometry)	CYH33, I27, and BYL719 induced G_0/G_1 cell cycle arrest in esophageal cancer cell lines (e.g. KYSE510) and breast cancer cell lines (e.g. MCF7) after 24 hours incubation.
[redacted]-25-28985 (M4.2.1.1-7)	Effect of CYH33 and I27 on PI3K pathway in human ovarian clear cell carcinoma (OCCC) cell line OVMANA	Cellular Assay (Western Blot)	CYH33 (33-300 nM) and I27 (33-300 nM) exhibited potent inhibitory activity on phosphorylation of AKT in OVMANA cells, and their activity were higher than that of BYL719 at the same concentration.

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vitro*			
Report Number	**Title**	**Test System**	**Noteworthy Findings**
[redacted]-24-28194 (M4.2.1.1-2)	Anti-Proliferation Effects of CYH33 and I27 on human ovarian clear cell carcinoma (OCCC) cell line OVMANA	Cellular Assay (CellTiter-Glo ® Luminescent Cell Viability Assay)	CYH33 and I27 inhibited the proliferation of OVMANA cells after 168h of treatment, with IC_{50} values of 111.58 nM and 277.72 nM, respectively.

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
(Liu XL et al. 2018)	Anti-tumor Effect of CYH33 on spontaneous breast cancer in a transgenic mouse model of breast cancer driven by *PIK3CA* H1047R activating mutation	R26-Pik3caH1047R; MMTV-Cre mice (Female)	Vehicle (1% CMC-Na +0.5% Tween 80), PO QD for 105 days, CYH33 at 10 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate), PO QD for 130 days	CYH33 almost completely inhibited tumor progression with a relative tumor volume (RTV) of 1.3 up to 130 days, compared with an RTV of 25.07 at day 105 in the vehicle control group.
HAIHE-20250121 (M4.2.1.1-8)	Anti-tumor effect of CYH33 on the OVMANA human ovarian clear cell carcinoma xenograft mouse model	Mouse/NCG (Female)	Vehicle (0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80), CYH33 at 5 and 10 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate)	Treatment with CYH33 at dose levels of 5 and 10 mg/kg significantly inhibited tumor growth in a dose-dependent manner, with T/C of 39.85%, and 29.70%, respectively.
HAIHE-20230201A (M4.2.1.1-3)	Anti-tumor effect of CYH33 on the HGC-27 human gastric cancer xenograft mouse model	Mouse/BALB/c nude (Female)	Vehicle (0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80), CYH33 at 2.5, 5, and 10 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	Treatment with CYH33 at dose levels of 2.5, 5 and 10 mg/kg significantly inhibited tumor growth in a dose-dependent manner, with T/C values of 30.26%, 20.47% and 8.28%,

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
			I27 at 10, and 20 mg/kg GDC-0077 at 5 mg/kg BYL719 at 5 mg/kg PO BID for 4 weeks	respectively. At the same dose level of 5 mg/kg, CYH33 (T/C: 20.47%) showed a better antitumor effect than GDC-0077 (T/C: 34.36%) and BYL719 (T/C: 25.55%).
M4.2.1.1-1	Anti-tumor effect of CYH33 on human esophageal cancer xenograft mouse models (including: KYSE410, KYSE510, EC104, EC063, and EC074)	Mouse/BALB/cA nude (Female)	**KYSE410:** Study I: vehicle (0.5% CMC-Na +0.5% Tween 80), BYL719 at 12.5 and 50 mg/kg, CYH33 at 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg, administered orally once daily (PO QD) for 21 days Study II: vehicle (0.5% CMC-Na +0.5% Tween 80), BYL719 at 50 mg/kg, CYH33 at 12.5, 25, and 50 mg/kg, PO QD for 21 days **KYSE 510 (*PIK3CA* E545K):** Study I: vehicle (0.5% CMC-Na +0.5% Tween 80), BYL719 at 12.5 and 50 mg/kg, CYH33 at 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg, PO QD for 28 days. Study II: vehicle (0 mg/kg), BYL719 at 50 mg/kg,	**KYSE410:** CYH33 at 50 mg/kg, 25 mg/kg and 12.5 mg/kg significantly inhibited the growth of KYSE410 xenografts with T/C values of 3.37-6.56%, 7.95-13.44% and 31.97-32.05%, respectively. CYH33 at 12.5 mg/kg (T/C: 32.05%) exhibited a tumor inhibitory effect comparable to BYL719 at 50 mg/kg (T/C: 25.74%). **KYSE510:** CYH33 significantly inhibited the growth of KYSE510 xenografts with T/C values of 11.61-23.54%, 17.96-21.06%, 30.96-52.39%, and 39.09-39.47% at 50, 25, 12.5, and 6.25 mg/kg, respectively. The anti-tumor efficacy of CYH33 at 25 mg/kg

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
			CYH33 at 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg, PO QD for 28 days. **EC104(*PIK3CA* E542K):** Study I (28 days), Study II (35 days) with same dosage group design Vehicle (0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80), BYL719 at 50 mg/kg, CYH33 at 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg, PO QD **EC063:** Study I and Study II used same study design with the only difference in the number of animals in control group. Vehicle (0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80), BYL719 at 50 mg/kg, CYH33 at 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg, PO QD for 28 days	(T/C: 17.96-21.06%) was slightly superior to BYL719 at 50 mg/kg (T/C: 26.32-32.43%). **EC104:** CYH33 significantly suppressed tumor growth in EC104 xenograft model in a dose-dependent manner. The anti-tumor activity of CYH33 at 50 mg/kg (T/C: 13.78-24.71%) and 25 mg/kg (T/C:19.74-25.19%) was similar to that of BYL719 at 50 mg/kg (T/C: 17.56-19.38%). **EC063:** CYH33 significantly inhibited the growth of EC063 xenografts with T/C values of 10.18-16.56%, 21.29-24.53%, 24.24-27.69%, 30.69-39.25% at 50, 25, 12.5, and 6.25 mg/kg, respectively. Antitumor activity of CYH33 at 50 mg/kg (T/C: 10.18-16.56%) was slightly superior to BYL719 at 50 mg/kg (T/C: 19.44-25.30%).

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
			EC074: Vehicle (0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80), BYL719 at 50 mg/kg, CYH33 at 6.25, 12.5, 25, and 50 mg/kg, PO QD for 21 days In the above studies, does levels of CYH33 were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate.	**EC074:** CYH33 significantly inhibited tumor growth in EC074 xenograft model in a dose-dependent manner with T/C values of 24.27% at 50 mg/kg and 36.78% at 25 mg/kg. BYL719 at 50 mg/kg significantly inhibited the growth of EC074 xenografts with a T/C value of 30.52%, which was slightly inferior to CYH33 at 50 mg/kg.
M4.2.1.1-1	The PK/PD study of CYH33 in the KYSE410 human esophageal cancer xenograft mouse model	Mouse/BALB/cA (Female)	Vehicle: 0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80 single oral dose (fasted condition) CYH33 at 12.5, 25, and 50 mg, oral single dose (fasted condition) (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33 dose- and time-denpendently inhibited PI3K pathways in KYSE410 human esophageal cancer xenograft model.

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
HAIHE-20230201 (M4.2.1.1-4) HAIHE-20230301 (M4.2.1.1-5) [redacted]23360-[redacted]01_V1.0 (M4.2.1.1-6)	The PK/PD study of CYH33 in the HGC-27 human gastric cancer xenograft mouse model	Mouse/BALB/c nude (Female)	Vehicle (0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80), CYH33 at 0.1, 0.26, 0.64, 1.6, 4, 10, 25 and 62.5 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate), PO, single dose	CYH33 inhibited p-AKT (Ser473) in HGC27 tumor tissue by up to 80% (IC_{80}) when the plasma concentration was 52.2 ng/ml.

Secondary Pharmacodynamic Studies			
Report Number	**Title**	**Test System**	**Noteworthy Findings**
[redacted]027 and [redacted]030 (M4.2.1.2-1) [redacted]031 and [redacted]033 (M4.2.1.2-2)	Effects of CYH33 and I27 on the activities of 318 kinases	Molecular level analysis (Eurofins protein kinase profiling platform)	CYH33(named in report:[redacted]-C3/20150501) and I27(named in report:[redacted]-17/20150501) significantly inhibited the activity of the type I PI3K kinases, with negligible effects on over 300 other kinases, including other members of the PIKK family.

Safety Pharmacology			
Report Number (GLP status)	**Type of Study**	**Test System**	**Noteworthy Findings**
[redacted]010R (GLP) (M4.2.1.3-2)	Central Nervous System (CNS)	Sprague Dawley Rats	Single oral administration up to 150 mg/kg of CYH33 had no obvious effects on the central nervous system, except the reduction in body weight, body temperature in females, and transient decreased sniffing in animals received 150 mg/kg of test article. (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)
19063-19039 (GLP) (M4.2.1.3-4)	Cardiovascular System	HEK293 Cells	The CYH33 IC_{50} for hERG current inhibition was likely higher than 42.75 μM. The potential for delayed ventricular repolarization was considered low.
[redacted]011D (GLP) (M4.2.1.3-1)	Cardiovascular System	Beagle Dogs	No test article-related change on all the evaluated cardiovascular parameters: ECG, blood pressure, and body temperature in dogs up to 15 mg/kg of CYH33. (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)
[redacted]019R (GLP) (M4.2.1.3-3)	Respiratory System	Sprague Dawley Rats	Single oral administration up to 150 mg/kg of CYH33 had no effect on respiratory parameters (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)

Pharmacodynamic Drug Interactions				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
[redacted]1905P (M4.2.1.4-1)	Combination Use of CYH33 and Lynparza® (olaparib) in SK-OV-3 Human Ovarian Cancer Xenograft Model	Mouse/BALB/c nude (Female)	Vehicle: 0.5%CMC-Na+0.5% Tween 80 CYH33 at 5, 10, and 20 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate) Olaparib at 100 mg/kg CYH33 at 5, 10 and 20 mg/kg + Olaparib at 100 mg/kg PO QD for 21 days	CYH33 in combination use with Lynparza® (olaparib) showed significantly stronger anti-tumor efficacy compared with either CYH33 or olaparib as single agent. CYH33 at 20 mg/kg, 10 mg/kg and 5 mg/kg in combination with olaparib at 100 mg/kg significant delayed tumor growth with a T/C of 12.96% (p <0.01), 20.79% (p <0.01), and 30.84% (p <0.01), respectively.

2.4.2.1 効力を裏付ける試験

CYH33 及びその活性代謝物 I27 は PI3Kα 及びその変異体に対する強力かつ選択的な阻害作用を示し、IC_{50s} 値は 5～20 nM の範囲であった。他のクラス I 型の PI3K に対する影響は比較的弱かった。CYH33 及び I27 は、Rh30-Pyr-p110α/β/γ/δ 細胞における AKT のリン酸化を濃度依存的に有意に阻害した。具体的には、細胞アッセイで、CYH33 及び I27 は、Rh30-Myr-p110α 細胞において、41 nM で PI3Kα を介した AKT リン酸化を阻害した。一方、PI3Kβ/γ/δ を介した AKT リン酸化を阻害するには、約 10～30 倍高濃度の CYH33 及び I27 が必要であった（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。以上より、CYH33 及び I27 は細胞レベルで PI3Kα のキナーゼ活性を選択的に阻害することが確認された。

癌細胞における PI3K シグナル伝達経路に対する CYH33 及び I27 の作用をウェスタンブロット法により評価した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-7）。その結果 CYH33 及び I27 は癌細胞株において AKT 及び S6K1 や rpS6 などの下流エフェクターのリン酸化を濃度依存的に阻害した。特に *PIK3CA* E545V 変異を有する卵巣明細胞癌（OCCC）細胞株である OVMANA 細胞において、CYH33（33～300 nM）は AKT のリン酸化を強力に阻害し、阻害率は 62.3%～67.9%であった。また I27（33～300 nM）は濃度依存的に AKT のリン酸化を阻害した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-7）。

選択した 11 種類の食道癌細胞株（ESCC）、21 種類の乳癌細胞株（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）及び 1 種類の OCCC 細胞株（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-2）に対する被験物質の抗増殖能を評価することにより、CYH33 及び I27 の *in vitro* 抗腫瘍活性を確認した。CYH33 及び I27 は複数種の食道癌、乳癌、OCCC 癌細胞の増殖を選択的に阻害し、GI_{50} は 10 nM～10 μM 超であった。

CYH33 及び I27 を被験物質とともに 24 時間培養した場合、4 種類の食道癌細胞株 KYSE150、KYSE510、KYSE410、及び KYSE30、並びに 2 種類の乳癌細胞株 MCF7 及び T47D において、様々な程度で G_0/G_1 細胞周期停止を誘導した。これらの化合物によって、時間依存性及び濃度依存性の G_0/G_1 停止が生じ、細胞周期関連タンパク質 Rb 及びそのリン酸化アイソフォームの低下、p27 タンパク質の蓄積、並びに Cyclin D1 タンパク質のダウンレギュレーションがみられた（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。

PIK3CA H1047R 活性化変異を有する乳癌トランスジェニックマウスモデルにおいて、CYH33（10 mg/kg、QD）は自然発生乳癌の増殖をほぼ完全に阻害した（Liu XL et al. 2018）。*PIK3CA* E545V 変異を有するヒト OCCC 細胞株由来異種移植モデル OVMANA における CYH33 の *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した（CTD 記載箇所 M4.2.1.1-8）。CYH33 は 5 mg/kg 及び 10 mg/kg で用量依存的に腫瘍増殖を有意に抑制し、投与後 28 日目の T/C はそれぞれ 39.85%、29.70%であった。さらに、CYH33 を投与したほとんどのマウスにおいて、腫瘍体積は時間の経過とともに縮小した。*PIK3CA* E542K 変異を有するヒト胃癌異種移植マウスモデル HGC-27 における CYH33 の有効性を評価した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-3）。CYH33 を 2.5、5 及び 10 mg/kg の用量で投与した場合、腫瘍増殖が用量依存的に有意に抑制され、T/C は 8.28%～30.26%であった（$p<0.0001$）。さらに食道癌 KYSE410、KYSE510、EC104、EC063 及び EC074 の皮下異種移植

マウスモデルでは、6.25～50 mg/kg の用量範囲における CYH33 の抗腫瘍効果を検証した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。上記の試験における CYH33 の忍容性は全般に良好であった。

また KYSE410 異種移植マウスモデルを用いた PK/PD 試験では、12.5～50 mg/kg の用量範囲で CYH33 を単回経口投与したとき、CYH33 は PI3K シグナル伝達経路の主要なエフェクタータンパク質である AKT 及び rpS6 のリン酸化を用量依存的に阻害した。腫瘍組織中の CYH33 濃度は投与後 1～2 時間でピークに達し、その後徐々に低下した。これに伴い AKT 及び rpS6 のリン酸化は投与後 0.5 時間の時点でダウンレギュレートされ、投与後 8 時間の時点で回復し始め、投与後 24 時間の時点で腫瘍組織のベースラインレベルに回復した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。

HGC-27 異種移植マウスモデルを用いた CYH33 の PK/PD 試験を実施した。CYH33 を 0.1～62.5 mg/kg の用量で投与した場合の HGC27 異種移植腫瘍における p-AKT（Ser473）タンパク質に対する作用を、それぞれメソスケールディスカバリー（MSD）社の試験法及びウェスタンブロット法により検出した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-5）。CYH33 は、0.1 mg/kg 以上の用量を単回投与した場合、2 時間後に HGC27 異種移植腫瘍組織における p-AKT（Ser473）レベルを有意に低下させた。PK 試験及び MSD 試験（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-6）の結果によると、血漿中濃度が 52.2 ng/mL のとき、CYH33 は HGC-27 腫瘍組織における p-AKT（Ser473）を最大 80%（IC_{80}）阻害した。

2.4.2.2 副次的薬理試験

Eurofins 社タンパク質キナーゼプロファイリングプラットフォームを用いて 318 種類のキナーゼに対する CYH33 及び I27 の阻害活性を評価した。Eurofins Kinase Profiler™ サービスには一連の放射測定プロテインキナーゼアッセイや HTRF®脂質及び非定型キナーゼアッセイ用パネルが含まれており、大規模なキナーゼパネルに対する化合物の効力及び選択性を調べることができる。CYH33（[redacted]-C3/20150501）及び I27（[redacted]-17/20150501）はクラス I の PI3K キナーゼの活性を有意に阻害し、PIKK ファミリーに含むその他 300 種類を超えるキナーゼに対してはほとんど作用しなかった。CYH33 は 10 μM の濃度ではクラス I の PI3K キナーゼファミリーを除く 3 種類のキナーゼ（B-Raf、B-Raf V599E、SAPK2a）に対して 50%近く又はそれを超える阻害率を示しており、これら 3 種類のキナーゼの IC_{50} 値はそれぞれ 50.671 μM、8.857 μM、>100 μM であった（CTD 記載箇所：M4.2.1.2-1）。同様に I27 も 10 μM の濃度でクラス I の PI3K キナーゼファミリーを除く 6 種類のキナーゼ（C-Kit V654A、Fms、Fms Y969C、mTOR、mTOR/FKBP12、PI3KC2γ）を 50%超で阻害し、これらのキナーゼの IC_{50} 値はそれぞれ 3.241 μM、0.906 μM、0.369 μM、2.761 μM、2.709 μM、6.107 μM であった（CTD 記載箇所：M4.2.1.2-2）。これらの結果から CYH33 及び I27 は PI3Kα キナーゼに対する選択性の高い阻害剤であることが示された。

2.4.2.3 安全性薬理試験

中枢神経系（CNS）、心血管系、呼吸器系に対する CYH33 の作用を評価するため、安全性薬理コアバッテリー試験を実施した。ラットに対し CYH33 を 150 mg/kg（投与量はリソバリシブメシル酸塩水和物として算出）までの用量で単回経口投与したところ、機能観察総合評価法（FOB）試験（CTD 記載箇所：M4.2.1.3-2）で評価した CNS の神経行動学的パラメータ及びラッ

ト呼吸機能試験（CTD 記載箇所：M4.2.1.3-3）のいずれにも影響を及ぼさなかった。イヌに対してラテン方格投与法を用いて CYH33 を 15 mg/kg（投与量はリソバリシブメシル酸塩水和物として算出）までの用量で経口投与した試験においても、心血管系機能に対する影響を示さなかった（CTD 記載箇所：M4.2.1.3-1）。ヒト胎児腎臓細胞株 293（HEK293）（hERG IC_{50} >42.75 μM）を用いたヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）試験で示されたように、心室再分極遅延の可能性は低かった（CTD 記載箇所：M4.2.1.3-4）。

2.4.2.4 薬力学的薬物相互作用試験

併用投与試験では、*PIK3CA*-H1047R 変異を有する SK-OV-3 ヒト卵巣癌異種移植モデルにおいて CYH33 はリムパーザ®（オラパリブ）と相乗的効果を示した。具体的には、CYH33 単剤投与群（20、10 及び 5 mg/kg）では腫瘍増殖が有意に阻害され、T/C はそれぞれ 24.95%、29.04%及び 49.06%であった。一方、オラパリブ単剤投与群の T/C は 55.44%であった。また、CYH33（20 mg/kg、10 mg/kg 及び 5 mg/kg）とオラパリブ（100 mg/kg）の併用投与時の T/C 値はそれぞれ 12.96%、20.79%及び 30.84%であった。全体として、オラパリブ単剤投与群、CYH33 単剤投与群、及び CYH33 とオラパリブの併用投与群のいずれにおいても、動物に体重減少が認められたものの忍容性は良好であった。（CTD 記載箇所：M4.2.1.4-1）

2.4.3 薬物動態試験

ラット及びイヌを用いた非 GLP 試験において、CYH33 を IV 及び PO の両経路で投与し、その薬物動態プロファイルを評価した。血漿タンパク結合、透過性、代謝及び薬物動態学的薬物相互作用を評価するため、*in vitro* 試験を実施した。CYH33 及びその代謝物 I27 を用いて実施した薬物動態関連試験の一覧を以下表 2.4-2 に示す。

表 2.4-2. CYH33 及び I27 を用いて実施した非臨床薬物代謝及び薬物動態試験の一覧

Study	Route	Species (sex)	Dose/treatment level	Report No. /CTD No.
Analytical Method and Validation				
Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in SD Rat Plasma Bioanalytic Method Validation Report (Amendment) (Non-GLP)	-	Sprague-Dawley rat	CYH33: 2.10-1050 ng/mL I27: 0.200-200 ng/mL	15[redacted]018 /M4.2.2.1-1
Validation of an HPLC-MS/MS Methodology for the Determination of CYH33 and I27 in Beagle Dog Plasma Bioanalytical Method Validation Report (Amendment) (Non-GLP)	-	Beagle dog	CYH33: 2.10-1050 ng/mL I27: 0.200-200 ng/mL	16[redacted]003 /M4.2.2.1-2
Method Validation for Determination of the Concentration of CYH33 in Extracellular Solution by LC-MS/MS (GLP)	-	-	CYH33: 0.3-60 μmol/L	19063-19037 /M4.2.2.1-3
Validation of an HPLC Method for CYH33 and Evaluation of Formulation Homogeneity and Stability (GLP)	-	-	CYH33: 5-100 μg/mL	CYH33-V001 /M4.2.2.1-4
Partial Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in SD Rat Plasma (Na Heparin) (GLP)	-	Sprague-Dawley rat	CYH33: 2.00-1000 ng/mL I27: 0.200-200 ng/mL	20[redacted]04[redacted] /M4.2.2.1-5
Partial Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in Beagle Dog Plasma (Na Heparin) (GLP)	-	Beagle dog	CYH33: 0.200-200 ng/mL I27: 0.200-200 ng/mL	20[redacted]03[redacted] /M4.2.2.1-6
Method Validation of an LC-MS/MS method for the determination of CYH33, I27 in BN Rat heparin sodium plasma (GLP)	-	Brown Norway rat	CYH33: 2-2000 ng/mL I27: 1-1000 ng/mL	[redacted]23066[redacted]01 /M4.2.2.1-7

Study	Route	Species (sex)	Dose/treatment level	Report No. /CTD No.
Absorption				
Single and 7-day Administration (Non-GLP)	PO and IV	Sprague-Dawley rat (male/female)	Single IV: 1 mg/kg Single PO: 1, 3, and 12 mg/kg 7-day repeat PO daily dose: 3 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1
Pharmacokinetic Study after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague-Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/100 μCi/kg (dose levels were calculated by Risovalisib)	[redacted]00952 /M4.2.2.2-2
Single and 7-day Administration (Non-GLP)	PO and IV	Beagle dog (male/female)	Group A Single IV: 0.05 mg/kg Single PO: 0.05 and 0.2 mg/kg Group B Single PO: 0.1 mg/kg 7-day repeat PO daily dose: 0.1 mg/kg (Dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1
Intestinal Mucosal Permeation in Caco-2 Cells (Non-GLP)	*In vitro*	Human Caca-2 cell	2, 10 and 50 μM	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1

Study	Route	Species (sex)	Dose/treatment level	Report No. /CTD No.
Distribution				
Plasma Protein Binding Across Species (Non-GLP)	*In vitro*	Rat, dog, human plasma	Rat and human plasma: 40, 100, and 400 ng/mL Dog plasma: 10, 20, and 50 ng/mL	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1
Tissue Distribution after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1
Tissue Distribution after Single Administration (Non-GLP)	PO	Long-Evans rat (male)	Single PO: 3 mg/100 μCi/kg (dose levels were calculated by Risovalisib)	[redacted]00998 /M4.2.2.3-1
Metabolism				
Metabolic Stability in Liver Microsomes (Non-GLP)	*In vitro*	Mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsome	3 μM	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1
Hepatic Metabolism (Non-GLP)	*In vitro*	Mouse, rat, dog, monkey, and human hepatocyte	3 μM	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1
Enzyme Identification for Amide-Hydrolyzation (Non-GLP)	*In vitro*	Dog liver and intestinal homogenate	3 μM	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1

Study	Route	Species (sex)	Dose/treatment level	Report No. /CTD No.
Metabolites Identification after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague Dawley rat (male/female), and Beagle Dog (male/female) samples from absorption and excretion studies	Rat: single PO: 3 mg/kg Dog: single PO: 0.1 mg/kg (Dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1
Metabolites Identification after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/100 μCi/kg (dose levels were calculated by Risovalisib)	[redacted]01053/M4.2.2.4-1
Excretion				
Single-Dose Excretion in Feces and Urine (Non-GLP)	PO	Sprague Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 /M4.2.2.2-1
Pharmacokinetic Study after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague-Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/100 μCi/kg (dose levels were calculated by Risovalisib)	[redacted]00952/M4.2.2.2-2
Pharmacokinetic Drug Interactions				
CYP450 Enzyme Induction (Non-GLP)	*In vitro*	Human primary hepatocyte	0.1-10 μM	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-EID /M4.2.2.6-1
Determination of EC_{50} and E_{max} in CYP450 Enzyme Induction Test (Non-GLP)	*In vitro*	Human primary hepatocyte	0.1-10 μM	[redacted]-S2308-07-1/M4.2.2.6-2

Study	Route	Species (sex)	Dose/treatment level	Report No. /CTD No.
CYP450 Enzyme Inhibition (Non-GLP)	*In vitro*	Human liver microsome	0.1-100 µM	CYH33-ADME-1/M4.2.2.2-1
CYP450 Enzyme Time-Dependent Inhibition (Non-GLP)	*In vitro*	Human liver microsome	0.1-100 µM	[redacted]-CYH33-2019-ADME-DDI-EI /M4.2.2.6-3
Potential as Substrates and Inhibitors of P-gp and BCRP (Non-GLP)	*In vitro*	MDCK cell model	Substrate studies: 10 µM Inhibition studies: CYH33: 10 and 40 µM, I27: 10 µM and 100 µM	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-ETP /M4.2.2.6-4
Determination of IC_{50} in MDR1 and BCRP Inhibition Test (Non-GLP)	*In vitro*	Human MDR1 and BCRP vesicles	CYH33: 0.016-10 µM I27: 0.08-50 µM	[redacted]-S2210-20-1/M4.2.2.6-5
Potential as Substrates and Inhibitors of OATP1B1, OATP1B3, MATE1 and MATE2-K (Non-GLP)	*In vitro*	HEK293 cell	Substrate studies: 1 and 10 µM Inhibition studies: CYH33: 0.3-40 µM and I27: 0.3-100 µM	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-UTP /M4.2.2.6-6

IV = intravenous, PO = oral, '-' : Not applicable, HEK : Human Embryonic Kidney cells, MDCK : Madin-Darby Canine Kidney cells

2.4.3.1 分析法及びバリデーション

PK 試験及び GLP 適合反復投与毒性試験では、バリデートされた HPLC-MS/MS 法を用いて CYH33 及び I27 の血漿中濃度を測定した（ラット試験の CTD 記載箇所：15[redacted]018（M4.2.2.1-1）、イヌ試験の CTD 記載箇所：16[redacted]003（M4.2.2.1-2））。バリデーションではイオン化法として ESI を用いた MRM モードでの HPLC-MS/MS によるタンパク質沈殿及び希釈試料残留物の分析を行った。本アッセイでは試料分析工程に従い感度、選択性、回収率、マトリックス効果、ロット内及びロット間の真度及び精度、CYH33 及び I27 の安定性を測定した。その結果 SD ラットでは 30 µL のラット血漿試料を使用し、CYH33 については 2.10 ng/mL（LLOQ）～1050 ng/mL（ULOQ）、I27 については 0.200 ng/mL（LLOQ）～200 ng/mL（ULOQ）の範囲において本方法が血漿中 CYH33 及び I27 の日常的分析に適していることが示された。イヌでは、30 µL のイヌ試料血漿を用いて 0.210 ng/mL（LLOQ）～210 ng/mL の範囲の CYH33 及び 0.200 ng/mL（LLOQ）～200 ng/mL（ULOQ）の範囲において、本方法が I27 の日常的分析に適していることが示された。両動物種における ULOQ 濃度を超える血漿試料に対する 10 倍希釈手順はバリデートされたものであった。

分析法移転及び内標準物質置換に伴い、SD ラット／ビーグル犬を用いた 26 週間／39 週間反復経口投与毒性試験における血漿中 CYH33 及び I27 濃度を測定するため、HPLC-MS/MS 法の部分バリデーションを実施した（ラット試験の CTD 記載箇所： 20[redacted]04[redacted]（M4.2.2.1-5）、イヌ試験の CTD 記載箇所：20[redacted]03[redacted]（M4.2.2.1-6））。本アッセイでは感度、選択性、キャリーオーバー評価、溶血評価、バッチサイズの決定、バッチ内及びバッチ間の真度及び精度、並びに全血安定性、マトリックス抽出における CYH33 及び I27 のベンチトップ安定性などを測定した。結果として、本方法は CYH33/I27 については 2.00/0.200 ng/mL（LLOQ）～1000/200 ng/mL（ULOQ）の線形範囲において、SD ラット血漿中の CYH33 及び I27 の日常的分析に適していることが示された。イヌについては、本方法は、CYH33 及び I27 の 0.200/0.200 ng/mL（LLOQ）～200/200 ng/mL（ULOQ）の線形範囲において、ビーグル犬血漿中 CYH33 及び I27 の日常的分析に適していることが示された。本方法は CYH33 及び I27 分析に特異的かつ選択的であった。CYH33 及び I27、並びに CYH33-D8 及び I27-D8 の内標準物質（IS）の分析において有意なシステムキャリーオーバーはなかった。

[M2.6.2]の安全性薬理試験の項における hERG アッセイの分析を裏付けるため、0.3～60 µmol/L の線形範囲においてバリデートされた LC-MS-MS 法を用いて細胞外液中の CYH33 濃度を測定した（CTD 記載箇所：19063-19037（M4.2.2.1-3））。

1% HPMC 溶液及び DMSO 溶液中の CYH33 の均一性及び安定性を分析するために用いられた HPLC 法は、反復経口投与毒性試験においてバリデートされ、問題なく評価できた（CTD 記載箇所：CYH33-V001（M4.2.2.1-4））。

BN ラットを用いた経口強制投与による CYH33 の光毒性試験のための分析を裏付けるため、BN ラットの血漿試料中の CYH33 及び I27 の濃度を、CYH33 については 2.0 ng/mL（LLOQ）～2000 ng/mL（ULOQ）の線形範囲、I27 については 1.0 ng/mL（LLOQ）～1000 ng/mL（ULOQ）線

形範囲でバリデートされた LC-MS-MS 法により測定した（CTD 記載箇所：[redacted]23066[redacted]01（M4.2.2.1-7））。

2.4.3.2 吸収

ラット及びイヌにおける単回 IV 及び PO 投与後、並びに反復経口投与後の濃度対時間データのノンコンパートメント解析により CYH33 の PK パラメータを算出した（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1（M4.2.2.2-1））。

CYH33 の非臨床評価において本薬の PK は許容可能であることが示された。単回静脈内投与後の CYH33 は中等度から低度のクリアランス（雄ラットにおいて 34 mL/min/kg、雌ラットにおいて 4.83 mL/min/kg、イヌにおいて 6.75 mL/min/kg）と中等度の分布容積（ラットにおいて 1.96 L/kg、イヌにおいて 1.86 L/kg）を示した。単回経口投与後、CYH33 の $t_{1/2}$ は中程度から長く（雄ラット 1.33～4.54 時間、イヌ 4.36～5.81 時間、雌ラット 6.17～7.03 時間）、バイオアベイラビリティ（F%）は雄ラットにおいては低く（19%）、雌ラットにおいては中等度（53.7%）、イヌにおいては相対的に優れていた（70.9%）。雌ラットにおける CYH33 の曝露量（AUC_{0-t}）は雄ラットの約 12 倍であったが、イヌにおいて性差は認められなかった。*In vitro* において、CYH33 は中等度の透過性を示した。

SD ラットへの単回経口投与後、C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加率は CYH33 の用量増加率に近いか、それよりも低かった。アミド加水分解代謝産物 I27 の血漿中曝露量は、雄ラットでは未変化体の約 2.2%、雌ラットでは約 15.6%であった。ラットにおける I27 の C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加率は用量比例的な増加を下回った。イヌでは C_{max} 及び AUC_{0-t} は CYH33 の用量増加に伴い評価した用量範囲（0.05～0.2 mg/kg）で用量比例的に増加した。一方、I27 の C_{max} の増加は用量比例的な増加をわずかに下回ったが、I27 の AUC_{0-t} は用量比例的に増加した。反復経口投与後、雄ラット及びイヌでは CYH33 及びその代謝産物 I27 の顕著な蓄積は認められなかったが、雌ラットでは I27 の一定の蓄積が認められ、雌ラットで I27 の相対 $t_{1/2}$ が長いことに起因すると考えられた。

SD ラットへの［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、血中及び血漿中の TRA は投与後約 0.5 時間で最高値に達した。血漿中 TRA の PK 挙動には雌雄ラット間で差が認められた。雌ラットの血漿中 TRA の C_{max} は雄ラットの約 1.53 倍であった。投与 24 時間後の平均濃度は雄で C_{max} の 1.49%、雌で 15.7%であり、雌ラットにおける TRA の消失は雄ラットよりも速いことが示された。雌ラットにおける血漿中 TRA の AUC_{0-t}、MRT 及び $t_{1/2}$ は、それぞれ雄ラットの 5.70 倍、2.44 倍及び 1.59 倍であった（CTD 記載箇所：[redacted]00952（M4.2.2.2-2））。

2.4.3.3 分布

ラットへ CYH33 を 3 mg/kg で経口投与した後、CYH33 は組織において広範に分布した。肝臓、副腎、消化管、肺、膵臓、腎臓、脾臓及び卵巣における曝露量は血漿中曝露量の 4 倍を超えていたが、脳における曝露量は血漿中曝露量の約 20%と著しく低かった。雌ラットの CYH33 の組織内曝露量は雄ラットの約 7～18 倍であった。血液／血漿比の結果（1 未満）において、CYH33 及び／又はその代謝産物は血球との結合を示さなかった。*In vitro* において、CYH33 はヒ

ト及び非臨床動物種の血漿タンパク質に高い結合率（90%超）を示したが用量依存的ではなかった（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1（M4.2.2.2-1））。

雄ロングエバンス系ラットへの［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、ほとんどの組織の総放射能（TRA）は投与 4 時間後に最高値に達し、主に胃腸系、肝臓、腎臓、眼及びブドウ膜等に分布した。脊髄及び脳における TRA は投与後 0.5 時間及び 4 時間のみで検出可能であり、その濃度は LLOQ よりわずかに高く、血漿中濃度よりはるかに低く、CYH33 及び／又はその代謝産物は容易に血液脳関門を通過できないことが示された。投与 840 時間後（最終分析時点）では、大部分の組織において TRA は定量下限未満であったが、眼及びブドウ膜では依然として検出可能であり、C_{max} のそれぞれ 18.69%及び 10.20%であったことから、CYH33 及び／又はその代謝産物はメラニン含有組織に結合し、緩やかに消失する可能性があることが示された（CTD 記載箇所：[redacted]00998（M4.2.2.3-1））。

2.4.3.4 代謝

CYH33 はラット（CL_{int}：10.4 mL/min/kg）及びヒト（CL_{int}：1.5 mL/min/kg）肝ミクロソームでは低クリアランスの化合物であり、マウス（CL_{int}：57.5 mL/min/kg）、イヌ（CL_{int}：13.5 mL/min/kg）及びサル（CL_{int}：23.1 mL/min/kg）肝ミクロソームでは中等度のクリアランスの化合物であった。イヌ及びヒトの肝細胞では CYH33 の代謝産物としてアミド加水分解代謝産物 I27 のみが同定された。代謝表現型解析から、イヌではアミド加水分解による CYH33 の代謝は主に肝臓のカルボキシルエステラーゼを介することが示された。ラットへの CYH33 の単回経口投与後、合計 14 種類の代謝産物が検出され、主な代謝産物は一酸化水素化（M5）、二重酸化（M6）、モルホリン環の開環（M1-2）によるものであった。イヌでは、未変化体及びアミド加水分解代謝産物 M3（I27）が主に血漿中において検出された（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1（M4.2.2.2-1））。

ラットへの［^{14}C］CYH33 の胃内投与後における［^{14}C］CYH33 の主要代謝経路は、1）モルホリン又はピペラジン環の酸化、2）モルホリン又はピペラジンの環開環による脱エチル、3）アミド加水分解であった（CTD 記載箇所：[redacted]01053（M4.2.2.4-1））。

2.4.3.5 排泄

ラットに CYH33（3 mg/kg）を単回経口投与したとき、CYH33 とその代謝産物 I27 の主要排泄経路は糞便中排泄であった（CYH33 と I27 の合計：23.9%～29.2%）。尿中及び胆汁中への排泄は微量（それぞれ投与した CYH33 の 1%未満）であった（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1（M4.2.2.2-1））。

雌雄 SD ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後において、無処置ラットから用量の 98.43%（雄）及び 96.65%（雌）が投与後 0～168 時間以内に回収された。用量の大部分（雄ラットにおいて総排泄量の 99.61%、雌ラットにおいて 97.89%）が投与後 0～48 時間以内に回収された。TRA は、主に糞を介して排泄され、雄において 96.10%、雌において 94.63%を占め、尿を介した排泄は少量であり、雄において 2.02%、雌において 1.68%を占めた。BDC ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、用量の約 68.92%（雄）及び 53.68%

（雌）が投与後 0～72 時間以内に胆汁を介して排泄された。胆汁排泄は投与後 0～4 時間に最も多く、総排泄量の 36.29%（雄）及び 13.15%（雌）を占めた。これらの結果はラットでは吸収された［^{14}C］CYH33 由来の放射能は主に胆汁を介して糞中に排泄されることを示すものであった。ラットにおける PK 挙動の性差は、雄ラットの方が雌ラットよりも胆汁排泄が速く、量が多いたことに関連していると考えられる。胆管カニューレを挿入した（BDC）ラットの尿中及び胆汁中排泄データに基づき、［^{14}C］CYH33 の吸収率は少なくとも用量の 77.52%（雄）及び 61.10%（雌）と推定された（CTD 記載箇所：[redacted]00952（M4.2.2.2-2））。

2.4.3.6 薬物動態学的薬物相互作用

CYH33 及び I27 は 0.1～100 μM の濃度範囲で CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5 に対する明らかな可逆的又は時間依存的阻害を示さなかった。

CYH33 及び I27 は CYP1A2 誘導を介した薬物相互作用を引き起こす可能性がないことが示された。一方、0.1～10 μM の濃度範囲において CYP2B6 及び CYP3A4 に対する *in vitro* での誘導作用を示した。

CYH33 は P-gp 及び BCRP の基質ではなかったが、I27 は P-gp 及び BCRP トランスポーターの基質であった。

CYH33 は BCRP 及び P-gp を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 6.82 μM 及び 17.4 μM であり、P-gp 及び BCRP に対する I27 の IC_{50} 値はそれぞれ 36.1 μM 及び 50 μM 超であった。

トランスポーター発現 HEK293 細胞と溶媒 HEK293 細胞との間において CYH33 及び I27（1 及び 10 μM）の取り込みに有意差が認められなかったことから、CYH33 及び I27 はいずれも OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K の基質ではないと考えられた。

CYH33 は 40.0 μM でアトルバスタチンの OATP1B1 取り込みを有意に阻害し、OATP1B1 残存活性は 76.5%であった。また CYH33 はトランスポーターOATP1B3、MATE1 及び MATE2-K を介した基質の取り込みも濃度依存的に阻害し、IC_{50s} 値はそれぞれ 2.13、0.92 及び 28.5 μM であった。また、I27 もトランスポーターを介した基質の取り込みを濃度依存的に阻害し、IC_{50s} 値は OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K に対してそれぞれ 17.6、18.6、21.6 及び 24.9 μM であった。臨床推奨用量（40 mg、QD）における CYH33 及び I27 の血漿中曝露量から、CYH33 及び I27 による P-gp、BCRP、OATP1B1/3、MATE1/2-K の阻害による薬物間相互作用の可能性は低かった。

2.4.4 毒性試験

ラット及びイヌを用いた単回及び反復経口投与毒性試験、*in vitro* 及び *in vivo*（マウス）遺伝毒性試験、妊娠ラットを用いた胚・胎児毒性試験、並びに *in vitro* 及び *in vivo*（アルビノラット及び有色ラット）光毒性試験において CYH33 の非臨床毒性を評価した。

すべての *in vivo* 試験において CYH33 を 1% HPMC 水溶液で経口製剤として調製した。実施した試験の一覧を GLP 適合状況とともに表 2.4-3 に示す。

表 2.4-3. CYH33 を用いて実施した非臨床毒性試験の一覧

Study Type (GLP status)	Route	Species/ Strain	Dose Levels	Report No. (CTD No.)
Single Dose Toxicity Studies				
Single-dose (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	4/sex/group 0 (vehicle), 30, 150, and 600 mg/kg administered by oral gavage (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]004R (M4.2.3.1-1)
Single-dose (GLP)	PO	Dog/Beagle	1/sex/group 0 (vehicle), 10, 40, 120 mg/kg with a volume of 5 mL/kg, administered by oral gavage (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]006D (M4.2.3.1-2)
Repeat-Dose Toxicity Studies				
4-week (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	Main study: 15/sex/group TK satellite study: 3/sex/group (total 144 rats) oral daily dose via gavage for 28 days at 0 (vehicle), 3, 8, and 24 mg/kg for males and 0 (vehicle), 1, 3, and 8 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate).	[redacted]005R (M4.2.3.2-1)
4-week (GLP)	PO	Dog/Beagle	5/sex/group 0 (vehicle), 0.3, 0.8, and 2.4 mg/kg once daily via oral gavage for 28 days (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate). Since severe toxicity noted, on D9, the dose level adjusted to 0 (vehicle), 0.05, 0.2, and 2.4 mg/kg.	[redacted]007D (M4.2.3.2-2)
13-week (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	Main study: 15/sex/group TK satellite study: 4/sex/group (total 152 rats) oral daily dose via gavage for 13 weeks at 0 (vehicle), 3, 8, and 24 mg/kg for males and 0 (vehicle), 0.3, 1, and 3 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate).	[redacted]101R (M4.2.3.2-3)

Study Type (GLP status)	Route	Species/ Strain	Dose Levels	Report No. (CTD No.)
13-week (GLP)	PO	Dog/Beagle	5/sex/group 0 (vehicle), 0.05, 0.2, and 0.5 mg/kg once daily via oral gavage for 13 weeks (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate).	[redacted]102D (M4.2.3.2-4)
26-week (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	Main study: 20/sex/group TK satellite study: 4/sex/group (total 192 rats) oral daily dose via gavage for 26 weeks at 0 (vehicle), 1, 3, and 8 mg/kg for males and 0 (vehicle), 0.3, 1, and 3 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate).	[redacted]104R (M4.2.3.2-5)
39-week (GLP)	PO	Dog/Beagle	7/sex/group 0 (vehicle), 0.05, 0.2, and 0.5 mg/kg once daily via oral gavage for 39 weeks (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate).	[redacted]105D (M4.2.3.2-6)
Genotoxicity Studies				
Bacterial Reverse Mutation Assay (Ames Assay) (GLP)	*In vitro*	Bacterial/*S. typhimurium*	125-2,000 µg/plate (calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]013B (M4.2.3.3.1-1)
Chromosomal Aberration Assay (GLP)	*In vitro*	Chinese Hamster Lung Cells	4h-treatment without S9: 10, 20, 50, and 75 µg/plate 24h-treatment without S9: 2, 4, 9, 12 µg/plate 4h-treatment with S9 20, 50, 100, and 120 µg/plate (calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	[redacted]015C (M4.2.3.3.1-2)

Study Type (GLP status)	Route	Species/ Strain	Dose Levels	Report No. (CTD No.)
Micronucleus Assay (GLP)	PO	ICR Mouse	6 male/group Single PO dose of positive control cyclophosphamide monohydrate at 80 mg/kg, CYH33 at 0 (negative vehicle), 5, 15, 50, 100, and 200 mg/kg for 2 days once daily by oral (PO) gavage (doses level were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate).	[redacted]017M (M4.2.3.3.2-1)
Reproductive and Developmental Toxicity				
Embryo-Fetal Toxicity (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	23 pregnant rats/main group, 5 pregnant rats/TK group 0 (vehicle), 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg from GD6 to GD15 (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate).	[redacted]009R (M4.2.3.5.2-1)
Phototoxicity				
In vitro 3T3 Neutral Red Uptake Phototoxicity (GLP)	*In vitro*	Balb/c 3T3 cells	Concentrations: 0.094, 0.202, 0.435, 0.936, 2.01, 4.33, 9.3, and 20 µg/mL	20213[redacted]03 (M4.2.3.7.7-1)
In vivo Phototoxicity (non-pigmented rats) (GLP)	PO	Rat/Sprague Dawley	Main study: 3/sex/group; TK satellite study: 3/sex/group Test article: oral single dose *via* gavage at 0 (vehicle), 100, 300, and 600 mg/kg for males and 0 (vehicle), 3, 10, and 30 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate). Positive Control: 0.1% methoxsalen solution, 0.2 ml/site, single dose UVA irradiation (320-400 nm), 10 J/cm^2 for 54 min.	20213[redacted]04 (M4.2.3.7.7-2)

Study Type (GLP status)	Route	Species/ Strain	Dose Levels	Report No. (CTD No.)
In vivo Phototoxicity (pigmented rats) (GLP)	PO	Rat/Brown Norway	Main study: 4/sex/group; TK satellite study: 3/sex/group; Test article: Oral daily dose *via* gavage for 3 days at 0 (vehicle), 100, 300, and 600 mg/kg for males and 0 (vehicle), 3, 10, and 30 mg/kg for females (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate). Positive control: 1 mg/ml 8-methoxypsoralen, 0.1 mL/site, for 3 days. UVA irradiation (320-400 nm), 10 J/cm^2 for 48 min.	[redacted]23066[redacted]01 (M4.2.3.7.7-3)

Abbreviations: GLP = Good Laboratory Practice; PO = oral; D: day; GD: Gestation Day

2.4.4.1 ラット及びイヌにおける単回投与毒性試験

GLP 適合単回経口投与毒性試験において、CYH33 はラットでは 600 mg/kg（投与量はリソバリシブメシル酸塩水和物として算出）まで（CTD 記載箇所：M4.2.3.1-1）、イヌでは 120 mg/kg まで（CTD 記載箇所：M4.2.3.1-2）良好な忍容性を示した。以上より CYH33 の最大耐量（MTD）はラットでは 600 mg/kg 以上、イヌでは 120 mg/kg 以上と考えられた。

2.4.4.2 ラット及びイヌにおける反復投与による主要毒性試験

ラットを用いた GLP 適合 4 週間毒性試験において、CYH33 を 1 日 1 回 28 日間強制経口投与したときの忍容性は良好であった（雄：3、8 又は 24 mg/kg、雌：1、3 又は 8 mg/kg、投与量はリソバリシブメシル酸塩水和物として算出）。毒性試験の標的器官は毛包、免疫造血系、雌の生殖系及び膵臓であった。所見はすべての用量群において回復期間中の毒性所見は可逆的又は回復傾向を示した。重篤な毒性が発現しない最大投与量（HNSTD）は雄ラットで 8 mg/kg、雌ラットで 3 mg/kg であった。同じ用量を投与した場合、雌ラットの方が被験物質の曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$）が多く、毒性反応が重度になる傾向がみられた。代謝物 I27 の曝露量は、すべての CYH33 投与群において親化合物 CYH33 よりも有意に低かった（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-1）。

イヌを用いた GLP 適合 4 週間毒性試験（0.3、0.8、2.4 mg/kg、9 日目に投与量を 0.05、0.2、2.4 mg/kg に調整、投与量はリソバリシブメシル酸塩水和物として算出）において CYH33 を 1 日 1 回 28 日間強制経口投与した結果、2.4 mg/kg の用量では忍容性が認められなかった。主な標的器官は、皮膚／粘膜、免疫／造血系、消化管、膵臓、雄性生殖器系であり、毒性所見の程度は用量依存的であった。本試験で認められたいずれの毒性変化も回復期間後に回復又は回復傾向を示した。イヌにおける HNSTD は 0.2 mg/kg、無毒性量（NOAEL）は 0.05 mg/kg であった。I27 の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はそれぞれ CYH33 の約 40%～93%及び 90.9%～180%であった。イヌにおける毒性作用及び血漿中曝露量に性差は認められなかった（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-2）。

ラットを用いた GLP 適合 13 週間毒性試験において、SD ラットに CYH33 を様々な用量（雄：3、8 又は 24 mg/kg、雌：0.3、1 又は 3 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）で 1 日 1 回 13 週間連続強制経口投与した。その結果、24 mg/kg では雄ラットのみが忍容性不良であり、他のすべての用量の忍容性は良好であった。HNSTD は雄で 8 mg/kg、雌で 3 mg/kg であった。毒性の主要標的器官は、大腿骨、造血・リンパ器官、生殖器（雌）、内分泌系器官（雌）、膵臓及び食道であった。4 週間の回復期間終了時には、雌ラットの血液リンパ系器官及び生殖系の病理組織学的変化のみが完全には回復しなかったが、他の変化は完全に回復した（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-3）。

イヌを用いた GLP 適合 13 週間毒性試験において、ビーグル犬に CYH33 を 0.05、0.2 又は 0.5 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩換算用量）で 1 日 1 回 13 週間連続強制経口投与した。すべての用量群において全動物は忍容性を示した。HNSTD は 0.5 mg/kg であった。毒性の主要標的器官は免疫系であり、主要な毒性は一過性の軟便及び血漿生化学検査値の変化であった。4 週間の回復期間後、すべての毒性所見は完全に回復した（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-4）。

ラットを用いた GLP 適合 26 週間毒性試験において、SD ラットに CYH33 を様々な用量（雄：1、3 又は 8 mg/kg、雌：0.3、1 又は 3 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）で 1 日 1 回 26 週間連続強制経口投与した。8 mg/kg 群の雄では CYH33 に対する忍容性は認められず、死亡率は 1/20 であったが、3 mg/kg 群の雌では忍容性は良好であった。10%の動物で重篤な毒性が発現する投与量（STD_{10}）は雄で 8 mg/kg（該当用量では、Day 180 の CYH33 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は 1080 ng·h/mL、I27 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は 14.9 ng·h/mL）を上回り、HNSTD は雌では 3 mg/kg（該当用量では、Day 180 の CYH33 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は 8950 ng·h/mL、I27 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は 729 ng·h/mL）であった。毒性の主要標的器官は、膵臓、骨、血液リンパ系器官及び雌の生殖器系であった。6 週間の回復期間後、雌の骨髄、膵臓、大腿骨及び卵巣の変化は回復傾向を示し、その他の変化は完全に回復した。（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-5）

イヌを用いた GLP 適合 39 週間毒性試験において、ビーグル犬に CYH33 を様々な用量（0.05、0.2 又は 0.5 mg/kg［リソバリシブメシル酸塩換算用量］）で 1 日 1 回 39 週間連続強制経口投与した。雌雄ともにすべての用量で忍容性が認められた。HNSTD は 0.5 mg/kg（この用量での Day 273 の血漿中 CYH33 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は雌雄それぞれ 455 及び 470 ng·h/mL であり、雌雄の血漿中 I27 の $AUC_{0\text{-}t}$ の平均値はそれぞれ 648 及び 429 ng·h/mL）であった。毒性の主要標的器官はリンパ器官／組織であった。6 週間の回復期間後、すべての毒性変化は完全に回復した。（CTD 記載箇所：M4.2.3.2-6）

2.4.4.3 遺伝毒性試験

CYH33 の遺伝毒性試験は陰性であり、細菌変異（CTD 記載箇所：M4.2.3.3.1-1）及び染色体異常（CTD 記載箇所：M4.2.3.3.1-2）の誘発は認められなかった。200 mg/kg までの用量（リソバリシブメシル酸塩水和物として算出）で 1 日 1 回 2 日間投与を行った場合に、マウス骨髄において小核を有する多染性赤血球の割合の増加は認められなかった（CTD 記載箇所：M4.2.3.3.2-1）。

2.4.4.4 生殖発生毒性試験

GLP 適合胚・胎児毒性試験において、SD ラットに CYH33（0.03、0.10、0.30 mg/kg、投与量はリソバリシブメシル酸塩水和物として算出）を妊娠日齢（GD）6 日から 15 日まで 1 日 1 回強制経口投与した。投与期間中、用量依存的に緩徐な体重増加が認められたが、重大な一般状態の異常は認められなかった。0.3 mg/kg 群では生存胎児率の低下、着床後胚損失率、死産及び再吸収の増加、胎盤及び胎児体重の減少、胎児の頭殿長及び尾長の減少、短尾／無尾、骨化遅延、骨格の奇形又は変異が認められ、AUC は 1090 ng·h/mL（臨床推奨用量 40 mg での AUC に基づくヒト曝露量の 0.2 倍）であった。NOAEL は 0.1 mg/kg、AUC は 365 ng·h/mL（推奨臨床用量 40 mg での AUC に基づくヒト曝露量の 0.07 倍）であった（CTD 記載箇所：M4.2.3.5.2-1）。

2.4.4.5 光毒性試験

CYH33 は *in vitro* 3T3 ニュートラルレッド取り込み光毒性試験において光毒性を示した（CTD 記載箇所：M4.2.3.7.7-1）。一方 SD ラット（アルビノラット）を用いた *in vivo* 光毒性試験（CTD 記載箇所：M4.2.3.7.7-2）では、CYH33 を雌では 30 mg/kg まで、雄では 600 mg/kg まで（リソバリシブメシル酸塩換算用量）単回投与した結果、光毒性は認められなかった。Brown Norway ラット（有色ラット）では、CYH33 を雌では 30 mg/kg、雄では 600 mg/kg（リソバリシブメシル酸塩換算用量）までの用量で 3 日間連続投与しても光毒性は認められなかった（CTD 記載箇所：M4.2.3.7.7-3）。アルビノラット及び有色ラットにおける光毒性を示さなかった最高用量レベルにおける C_{max} は、臨床推奨用量 40 mg 投与時の C_{max} の 3～10 倍であった。

2.4.5 総括及び結論

再発／持続性卵巣明細胞癌（OCCC）は化学療法抵抗性の希少な難治性卵巣癌であり、臨床上の治療選択肢が限られていることから、アンメットメディカルニーズとなっている。PI3Kαの p110α 触媒サブユニットをコードする *PIK3CA* 遺伝子は、OCCC 患者の約 30%～40%で変異が認められている（Kuo KT et al. 2009）。*PIK3CA* ホットスポット変異は OCCC の発生及び進行に重要な役割を果たしており（Chandler RL et al. 2015）、OCCC 患者の全般的な生存期間の短縮と関連している（Schnack TH et al. 2023, Ye S et al. 2023）。このことから、PI3Kα阻害剤は *PIK3CA* 変異を有する OCCC 患者に対する有望な治療法であることが示唆される。

非臨床での評価から、CYH33 及びその活性代謝物 I27 は強力かつ選択的な PI3Kα 阻害剤であることが示された。CYH33 及び I27 はいずれも、*PIK3CA* 変異を有する OCCC 及びその他の卵巣癌モデルを含む様々な癌細胞株及び腫瘍異種移植マウスモデルにおいて、強力な *in vitro* 及び *in vivo* 抗腫瘍活性を示した。

具体的には、CYH33 及び I27 は PI3Kα の酵素活性を選択的に阻害し、IC_{50} 値は 5～20 nM の範囲であった。対照的に、他のクラス I 型の PI3K に対する作用は比較的弱く、300 種類を超える他のキナーゼに対する作用は無視できる程度であった。細胞レベルでは、CYH33 及び I27 は Rh30-Pyr-p110α/β/γ/δ 細胞において AKT のリン酸化をそれぞれ約 41 nM/1100 nM/約 370 nM/約 370 nM で阻害し、CYH33 及び I27 の細胞内選択性が確認された。

さらに CYH33 及び I27 は癌細胞において AKT のリン酸化を、下流フェクターである S6K1 及び rpS6 のリン酸化とともに、濃度依存的に阻害した。両化合物は、*PIK3CA* E545V 変異を有する白金製剤抵抗性 OCCC 細胞株 OVMANA の AKT のリン酸化と増殖を効果的に阻害し、増殖阻害の IC_{50s} 値はそれぞれ 111.58 nM 及び 277.72 nM であった。また CYH33 及び I27 は食道癌及び乳癌細胞株のパネルの増殖を阻害し、GI_{50s} 値は 10 nM～>10 μM の範囲であった。また CYH33 及び I27 はどちらも複数の癌細胞株において濃度依存的に G_0/G_1 細胞周期停止を誘導した。

In vivo では *PIK3CA* H1047R 活性化変異を有する乳癌のトランスジェニックマウスモデルにおいて、CYH33（10 mg/kg、QD）は自然発生乳癌の増殖をほぼ完全に阻害した（Liu XL et al. 2018）。また CYH33 は免疫応答性乳癌異種移植マウスモデルにおいて抗腫瘍免疫を促進することが報告されている（Sun P et al. 2021）。*PIK3CA* E545V 変異を有するヒト OCCC 細胞株由来マウス異種移植モデル OVMANA において、CYH33 は 5 mg/kg 及び 10 mg/kg で用量依存的に腫瘍増殖を有意に抑制し、CYH33 を投与したマウスのほとんどで経時的に腫瘍の縮小が観察された。ヒト胃癌異種移植マウスモデル HGC-27（*PIK3CA* E542K）及び複数のヒト食道癌マウス異種移植モデル（KYSE410、KYSE510（*PIK3CA* E545K）、EC104（*PIK3CA* E542K）、EC063、EC074 など）においては、CYH33 は用量依存的に腫瘍増殖を抑制し、一部のモデルでは腫瘍の縮小が認められた。CYH33 の PK/PD の相関性は、KYSE410 及び HGC-27 異種移植マウスモデルで実証された。*PIK3CA* E542K 変異を有する HGC-27 異種移植マウスモデルでは、CYH33 の血漿中濃度が 52.2 ng/mL のとき腫瘍組織における p-AKT（Ser473）を最大 80%（IC_{80}）阻害した。

また、*PIK3CA* H1047R 変異を有するヒト卵巣癌細胞株由来異種移植モデル SK-OV-3 において、CYH33 の単剤投与時及びリムパーザ®（オラパリブ）との併用投与時の CYH33 の抗腫瘍活性が認められた。

ラットへの 150 mg/kg までの用量での CYH33 の単回経口投与は、FOB 試験で評価した CNS の神経行動学的パラメータ及びラットの呼吸機能に対する影響を示さなかった。イヌへのラテン方格法を用いた 15 mg/kg までの用量での CYH33 の経口投与は、心血管系機能に対する影響を示さなかった。HEK293 細胞を用いた hERG 試験で示されたように、心室再分極遅延の可能性は低かった。

CYH33 の非臨床評価では好ましい PK 特性が確認された。単回静脈内注射後のクリアランスは中等度から低度、分布容積は中等度であり、単回経口投与後の終末半減期（$t_{1/2}$）は中程度から長く、バイオアベイラビリティ（F%）は動物種によって異なり、雄ラットで 19%、雌ラットで 53.7%であり、イヌでは 70.9%と比較的高かった。ラットでは CYH33 の曝露量に顕著な性差が認められたが、イヌでは認められなかった。*In vitro* において CYH33 は中等度の透過性を示した。用量比例性に関しては、ラットにおける CYH33 及びその代謝産物 I27 の C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加率は用量の増加率に近いか、それよりも低かった。イヌでは CYH33 の C_{max} 及び AUC_{0-t} は 0.05～0.2 mg/kg の範囲において用量比例的に増加したが、I27 の C_{max} の増加は用量比をわずかに下回ったものの、I27 の AUC_{0-t} は用量比例的に増加した。ラット及びイヌへの反復経口投与後において CYH33 及び I27 の有意な蓄積は認められなかった。ラットへの経口投与後、CYH33 は広範に組

織に分布した。肝臓、副腎、消化管、肺、膵臓、腎臓、脾臓及び卵巣における曝露量は血漿中曝露量の 4 倍を超えていたが、脳における曝露量は血漿中曝露量の約 20%とかなり低かった。*In vitro* で CYH33 はヒト及び非臨床動物種の血漿タンパク質に高い結合率（90%超）を示したが、用量依存的な結合は認められなかった。ラットにおける CYH33 の主要代謝経路は一酸化水素化、二重酸化、モルホリン環の開環であった。イヌでは CYH33 のアミド加水分解は主に肝臓で起こり、カルボキシルエステラーゼによって媒介された。ラットにおける CYH33 及び I27 の主要排泄経路は糞中排泄であった。

SD ラットへの［^{14}C］CYH33 の胃内投与結果、血漿／血液中の総放射能（TRA）の T_{max} は約 0.5 時間であった。雌ラットの C_{max}、$AUC_{0\text{-}t}$、MRT 及び血漿中 TRA の $t_{1/2}$ は、いずれも雄ラットよりも高値を示した。雄ロングエバンス系ラットへの［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、ほとんどの組織の TRA は投与 4 時間後に最高値に達し、主に胃腸系、肝臓、腎臓、眼及びブドウ膜等に分布した。CYH33 及び／又はその代謝物は血球と結合しなかった。ラットにおける［^{14}C］CYH33 の主要代謝経路は 1）モルホリン又はピペラジン環の酸化、2）モルホリン又はピペラジンの開環による脱エチル、3）アミド加水分解であった。SD ラットへの［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後においては、放射能は投与後 168 時間以内に回収された。吸収後、［^{14}C］CYH33 由来放射能は主に胆汁を介して糞中に排泄された。胆管カニューレを挿入した（BDC）ラットから得られた尿中及び胆汁中排泄データに基づき、［^{14}C］CYH33 の吸収率は少なくとも雄で用量の 77.52%、雌で 61.10%と推定された。

CYH33 及び I27 は様々な CYP 酵素に対して明らかな可逆的又は時間依存的な阻害を示さなかった。CYH33 及び I27 は CYP1A2 の誘導による薬物間相互作用を引き起こす可能性を示さなかったが、*in vitro* では CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現に対する誘導作用の可能性を示した。CYH33 は P-gp 及び BCRP の基質ではなかったが、I27 は P-gp 及び BCRP トランスポーターの基質であった。CYH33 は BCRP 及び P-gp を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 6.82 μM 及び 17.4 μM であり、P-gp 及び BCRP に対する I27 の IC_{50} 値は、それぞれ 36.1 μM 及び 50 μM 超であった。CYH33 及び I27 はいずれも OATP1B1/3、MATE1/2-K の基質ではなかったが、CYH33 及び I27 はいずれもこれらのトランスポーターの阻害剤であり、IC_{50} は 0.92～40 μM であった。臨床推奨用量（リソバリシブメシル酸塩 40 mg、QD）での CYH33 及び I27 の定常状態での血漿中 $C_{max\ ss}$ は、それぞれ約 297 ng/mL 及び約 114 ng/mL であり、算出された $I_{max,\ U}$ はそれぞれ 0.025 μM 及び 0.044 μM であった。$I_{max,\ U}/IC_{50s}$ が 0.1 を下回ったことから、臨床において CYH33 及び I27 による P-gp、BCRP、OATP1B1/3 及び MATE1/2-K の阻害に起因する薬物間相互作用の可能性は低いことが示唆された。

CYH33 の毒性プロファイルを一般毒性試験、遺伝毒性試験、生殖発生毒性試験及び光毒性試験で評価した。

CYH33 の遺伝毒性試験の結果はすべて陰性であった。*In vitro* アッセイにおいて CYH33 は光毒性の可能性を示したが、非有色及び有色動物の最大無光毒性用量レベルでの C_{max} が推奨臨床用量である 40 mg QD 投与時の C_{max} の 3～10 倍であったことから、臨床使用時の光毒性リスクは低

いことが示された。妊娠ラットの器官形成期に CYH33 を経口投与したところ、臨床推奨用量である 40 mg QD 投与時の曲線下面積（AUC）に基づくヒト曝露量より低い曝露量で奇形が認められた。動物試験で得られた所見とその推定作用機序に基づくと、妊婦に投与した場合 CYH33 が胎児に害を及ぼす可能性がある。

SD ラットでは同じ用量での曝露量は雄よりも雌の方が高かった。ラットにおける主要標的器官は皮膚、毛包、大腿骨、血液リンパ系器官、生殖器系（雌）、内分泌系器官（雌）、膵臓及び食道であった。ビーグル犬では毒性作用及び曝露量に性差は認められず、主要標的器官は皮膚／粘膜、免疫／造血系、消化管、膵臓、雄性生殖器系であった。ラット及びイヌにおけるすべての毒性所見は、回復期間内に部分的又は完全に回復した。

CYH33 の安全域は概して狭いが、げっ歯類及び非げっ歯類における毒性プロファイル及び標的器官毒性の可逆性に基づき、進行癌患者に対する CYH33 の長期連日投与は適切であることが非臨床データから確認されている。

以上、要約すると CYH33 及びその活性代謝物 I27 は強力かつ選択的な PI3Kα 阻害剤であり、*PIK3CA* 変異を有する OCCC 及びその他の卵巣癌モデルを含む複数の癌モデルにおいて *in vitro* 及び *in vivo* で強力な抗腫瘍活性を示した。CYH33 は良好な PK 特性を有し、薬物間相互作用のリスクが低く、ラット及びイヌにおいて良好な安全性プロファイルを示し、遺伝毒性又は *in vivo* 光毒性は認められなかった。臨床試験の成績と併せて、CYH33 及び I27 に関する広範な非臨床薬理、薬物動態及び毒性データは、化学療法歴のある *PIK3CA* 遺伝子のエクソン 9 又は 20 に変異を有する進行・再発の卵巣明細胞癌の治療薬として、CYH33 の製造販売承認申請を行うための強力な根拠資料となると考えられる。

参考文献

Chandler RL, Damrauer JS, Raab JR, et al. Coexistent ARID1A-PIK3CA mutations promote ovarian clear-cell tumorigenesis through pro-tumorigenic inflammatory cytokine signalling. Nat Commun, 2015,6:6118.

Kuo KT, Mao TL, Jones S, et al. Frequent activating mutations of PIK3CA in ovarian clear cell carcinoma. Am J Pathol, 2009,174(5):1597-1601.

Liu XL, Xu YC, Wang YX, et al. Decrease in phosphorylated ERK indicates the therapeutic efficacy of a clinical PI3Kalpha-selective inhibitor CYH33 in breast cancer. Cancer Lett, 2018,433:273-282.

Schnack TH, Oliveira DNP, Christiansen AP, Hogdall C, Hogdall E. Prognostic impact of molecular profiles and molecular signatures in clear cell ovarian cancer. Cancer Genet, 2023,278-279:9-16.

Sun P, Zhang X, Wang RJ, et al. PI3Kalpha inhibitor CYH33 triggers antitumor immunity in murine breast cancer by activating CD8(+)T cells and promoting fatty acid metabolism. J Immunother Cancer, 2021,9(8).

Ye S, Zhou S, Wu Y, et al. Genomic profiling of ovarian clear cell carcinoma in Chinese patients reveals potential prognostic biomarkers for survival. Ann Med, 2023,55(1):2218104.

上記の文献等の写しは、M4.3 に添付した。