目次

目次 1
図一覧 1
略語及び略号一覧 2
2.6.1 緒言 4
参考文献 7

図一覧

図 2.6.1-1. CYH33 の構造式 4

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
ARID1A	AT-Rich Interaction Domain 1A	AT リッチ相互作用ドメイン 1A
AUC_{0-t}	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to the time t	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
C_{max}	Maximum blood concentration	最高血中濃度
CNS	Central Nervous System	中枢神経系
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
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
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
GEMM	Genetically Engineered Mouse Model	遺伝子改変マウスモデル
GI_{50}	Growth Inhibition 50%	細胞増殖の半数阻害濃度
hERG	Human Ether-a-go-go Related Gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HEK293	Human Embryonic Kidney 293	ヒト胎児腎臓細胞株 293
IC_{50}	50% Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
MATE	Multidrug and toxin compound extrusion	多剤・毒性化合物排出
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	Phosphoinositide 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-ビスリン酸 3-キナーゼ触媒サブユニット α
PIKK	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinase	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ関連キナーゼ
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
QD	Once a Day	1 日 1 回

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）
rpS6	Ribosomal Protein S6	リボソーム蛋白質 S6
S6K1	p70 Ribosomal Protein S6 Kinase 1	p70 リボソーム蛋白質 S6 キナーゼ 1
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期

2.6.1 緒言

PIK3CA 遺伝子はホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ α（PI3Kα）の p110α 触媒サブユニットをコードしており、この遺伝子は卵巣明細胞癌（OCCC）の約 30～40%で変異している（Kuo KT et al. 2009, Yang Q et al. 2020）。*PIK3CA* 遺伝子のミスセンス変異の 80%超はエクソン 9（ヘリカルドメイン）及びエクソン 20（キナーゼドメイン）で見られ、これらはホットスポット変異と呼ばれている。PI3Kα 及びその変異型の構造に関する情報から、*PIK3CA* ホットスポット変異が PI3Kα の恒常的な活性化を促進するメカニズムが明らかになった（Huang CH et al. 2007）。複数の研究グループが実施した様々な細胞ベース及び生化学的分析により、*PIK3CA* の変異は野生型と比べて機能獲得型であることが確認された（Gymnopoulos M et al. 2007, Isakoff SJ et al. 2005, Kang S et al. 2005）。さらに *in vivo* 形質転換実験や遺伝子改変マウスモデル（GEMM）を用いた複数の研究で腫瘍の発生、進行及び維持における *PIK3CA* 変異のさまざまな役割が示されている（Dey P et al. 2022, Kinross KM et al. 2012, Yuan W et al. 2013）。なお Chandler らによって報告された *PIK3CA* H1047R 変異及び *ARID1A* の欠失を有するトランスジェニックマウスモデルは遺伝学的及び組織学的にヒト OCCC に類似しており、*PIK3CA* の活性化変異が OCCC の腫瘍形成に関与していることが示されている（Chandler RL et al. 2015）。

CYH33（一般名：リソバリシブメシル酸塩水和物）、2-［4-トリフルオロメチル-（6-メトキシカルボニルアミノ）-3-ピリジル］-4-モルホリニル-6-［（4-メタンスルホニルピペラジン-1-イル)）-メチル］-ピロール［2,1-f］［1,2,4］トリアジン メタンスルホン酸二水和物（分子式：$C_{24}H_{29}F_3N_8O_5S \cdot CH_4O_3S \cdot 2H_2O$、分子量：730.73 g/mol）（図 2.6.1-1）は、新規構造を有し、独立した知的財産権を有する、強力かつ選択的な経口ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ α（PI3Kα）の阻害剤である。非臨床試験では、CYH33 が PI3Kα キナーゼ活性を強力かつ選択的に阻害し、*in vitro* 及び *in vivo* にて顕著な抗腫瘍活性を示すことが明らかにされている。

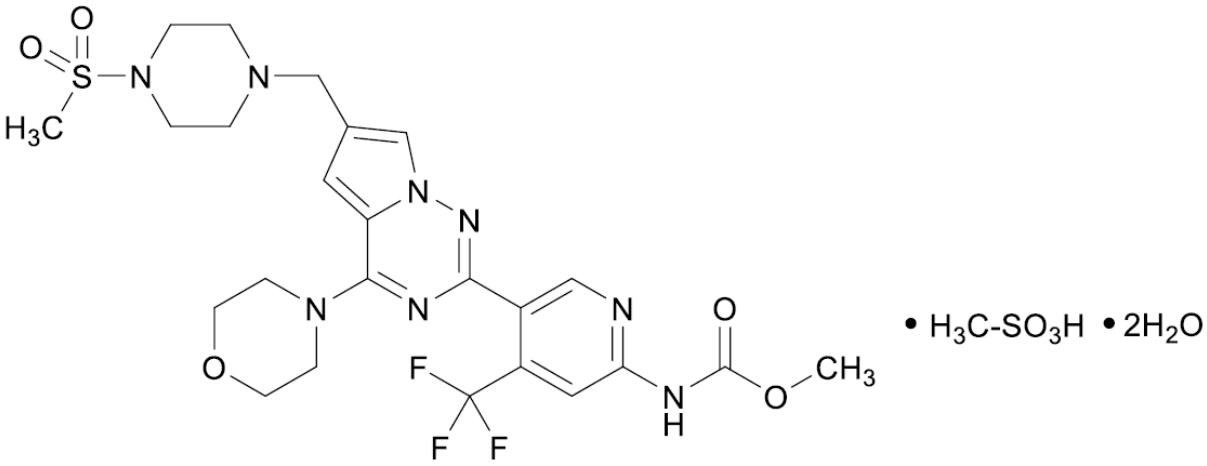


図 2.6.1-1. CYH33 の構造式

酵素アッセイにおいて CYH33 及びその活性代謝物 I27 は PI3Kα 及びその変異型を強力に阻害し、IC_{50} 値は 5〜20 nM の範囲であった。対照的に CYH33 及び I27 は他のクラス I の PI3K に対する影響が比較的弱く、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ関連キナーゼ（PIKK）ファミリーメンバーを含む他の 300 種類を超えるキナーゼに対してはほとんど影響を及ぼさない。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 リン酸化の阻害には約 10〜30 倍高濃度の CYH33 及び I27 が必要であった。また CYH33 及び I27 は癌細胞において AKT のリン酸化と下流エフェクターである S6K1 及び rpS6 のリン酸化を濃度依存的に阻害した。CYH33 及び I27 は *PIK3CA* E545V 変異を有する OCCC 細胞株 OVMANA の増殖を強力に阻害し、IC_{50} 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パネルの増殖を阻害し、GI_{50} 値は 10 nM から>10 μM の範囲であった。CYH33 及び I27 は濃度依存的に G_0/G_1 細胞周期停止を誘導した。*In vivo* では、*PIK3CA* H1047R 活性化変異を導入した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）は自然発症乳腺腫瘍の増殖をほぼ完全に阻害した（Liu XL et al. 2018）。さらに CYH33 は PI3K 経路の活性に対して用量及び時間依存的な阻害作用を示し、卵巣癌、食道癌、胃癌等を含む数種のヒト癌細胞株由来及び患者由来異種移植モデルにおいて腫瘍増殖を用量依存的かつ強力に阻害した。

中枢神経系（CNS）、心血管系、呼吸器系に対する CYH33 の影響を評価するために安全性薬理コアバッテリー試験を実施した。雌雄ラットへの CYH33 の最大 150 mg/kg 用量での単回経口投与は、機能観察総合評価法（FOB）試験で評価された CNS の神経行動学的パラメータやラットの呼吸機能には影響を示さなかった。雌雄イヌへの CYH33 のラテン方格投与デザインによる最大 15 mg/kg 用量での経口投与は、心血管系機能には影響を示さなかった。ヒト胎児腎臓細胞株 293（HEK293）を用いたヒト ether-a-go-go 関連遺伝子（hERG）試験において、心室再分極遅延の可能性は低いことが示された。

CYH33 は非臨床評価において良好な薬物動態（PK）特性を示した。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った。単回経口投与後の終末相半減期（$t_{1/2}$）は中等度以上であり、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%、及びイヌでは比較的高い 70.9%であった。ラットでは CYH33 の曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）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* では、CYH33 の透過性は中等度であることが示された。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 の曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）の増加率は用量増加率とほぼ同じか、それよりも低かった。ラット及びイヌへの反復経口投与後では CYH33 の顕著な蓄積は認められなかった。ラットへの単回経口投与後、CYH33 は消化器系、肝臓、腎臓、眼及びブドウ膜に広く分布し、脳での曝露量は顕著に低かった（血漿中濃度の約 20%）。CYH33 及びその代謝物は血球と結合しなかった。*In vitro* で CYH33 はヒト及び非臨床動物種において高い血漿蛋白結合率（90%超）を示したが、用量依存性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、1）モルホリン環又はピペラジン環の酸化、2）モルホリン環又はピペラジンの開環による脱エチル化、3）アミド加水分解であった。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。ラットでは、CYH33 及び I27 の主要排泄経路は糞中排泄であった。

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作用を示さなかった。CYH33 及び I27 は CYP1A2 の誘導による薬物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、I27 の P-gp 及び BCRP に対する IC_{50} 値は、それぞれ 36.1 μM 及び>50 μM 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。臨床における CYH33 及び I27 の曝露量を考慮すると、CYH33 及び I27 による P-gp、BCRP、OATP1B1/3 及び MATE1/2-K の阻害による薬物相互作用の可能性は、臨床においては低いと考えられた。

CYH33 の毒性プロファイルは、ラット及びイヌにおける単回及び反復投与（4 週間、13 週間、26 週間、及び 39 週間）一般毒性試験、*in vitro*（Ames 試験及び染色体異常試験）及び *in vivo*（マウス小核試験）遺伝毒性試験、妊娠ラットにおける胚・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）光毒性試験で評価された。すべての毒性試験は GLP に準拠して実施された。

CYH33 の遺伝毒性試験の結果はすべて陰性であった。*In vitro* アッセイでは、CYH33 は光毒性の可能性をある程度有するが、アルビノラット及び有色ラットにおける光毒性が発現しない最高用量での C_{max} は、臨床推奨用量である 40 mg QD 投与時の C_{max} の 3～10 倍であった。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 投与時の血中薬物濃度-時間曲線下面積（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。動物実験で得られた所見とその作用機序に基づくと、妊婦に投与された場合、CYH33 は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所見は、回復期間内に部分的又は完全に回復した。

上述の通り 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。CYH33 及び I27 は、*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。良好な PK 特性を有し、薬物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、遺伝毒性及び *in vivo* 光毒性は認められなかった。非臨床試験及び臨床試験の結果に基づき、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に対する治療薬として、CYH33 の製造販売承認申請を行うこととした。

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.

Dey P, Nakayama K, Razia S, et al. Development of Low-Grade Serous Ovarian Carcinoma from Benign Ovarian Serous Cystadenoma Cells. Cancers (Basel), 2022,14(6).

Gymnopoulos M, Elsliger MA, Vogt PK. Rare cancer-specific mutations in PIK3CA show gain of function. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007,104(13):5569-5574.

Huang CH, Mandelker D, Schmidt-Kittler O, et al. The structure of a human p110alpha/p85alpha complex elucidates the effects of oncogenic PI3Kalpha mutations. Science, 2007,318(5857):1744-1748.

Isakoff SJ, Engelman JA, Irie HY, et al. Breast cancer-associated PIK3CA mutations are oncogenic in mammary epithelial cells. Cancer Res, 2005,65(23):10992-11000.

Kang S, Bader AG, Vogt PK. Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005,102(3):802-807.

Kinross KM, Montgomery KG, Kleinschmidt M, et al. An activating Pik3ca mutation coupled with Pten loss is sufficient to initiate ovarian tumorigenesis in mice. J Clin Invest, 2012,122(2):553-557.

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.

Yang Q, Zhang C, Ren Y, et al. Genomic characterization of Chinese ovarian clear cell carcinoma identifies driver genes by whole exome sequencing. Neoplasia, 2020,22(9):399-430.

Yuan W, Stawiski E, Janakiraman V, et al. Conditional activation of Pik3ca(H1047R) in a knock-in mouse model promotes mammary tumorigenesis and emergence of mutations. Oncogene, 2013,32(3):318-326.

上記の文献等の写しは、M4.3 に添付した。

目次

目次 1
表一覧 2
図一覧 3
略語及び略号一覧 4
2.6.2 薬理試験の概要文 6
2.6.2.1 まとめ 6
2.6.2.2 効力を裏付ける試験 15
2.6.2.2.1 *In Vitro* 15
2.6.2.2.1.1 クラス I PI3K キナーゼ活性に対する CYH33 の作用 15
2.6.2.2.1.2 I 型 PI3K サブタイプに対する CYH33 の細胞内選択性 15
2.6.2.2.1.3 癌細胞株における PI3K 経路に対する CYH33 の阻害作用 16
2.6.2.2.1.4 ヒト卵巣明細胞癌に対する CYH33 の *in vitro* 抗腫瘍効果 18
2.6.2.2.1.5 ヒト乳癌及び食道癌細胞株に対する CYH33 の *in vitro* 抗腫瘍効果 18
2.6.2.2.1.6 乳癌及び食道癌細胞の細胞周期に対する CYH33 の作用 20
2.6.2.2.2 *In Vivo* 21
2.6.2.2.2.1 *PIK3CA* H1047R 活性化変異を導入したトランスジェニックマウスモデルにおける CYH33 の抗腫瘍効果 21
2.6.2.2.2.2 ヒト卵巣明細胞癌マウス異種移植モデルにおける CYH33 の抗腫瘍効果 22
2.6.2.2.2.3 マウスを用いたヒト胃癌及び食道癌異種移植モデルにおける CYH33 の抗腫瘍効果 23
2.6.2.2.2.4 マウスを用いた KYSE410 食道癌異種移植モデルにおける CYH33 の *in vivo* PK/PD 試験 32
2.6.2.2.2.5 マウスを用いた HGC-27 胃癌異種移植モデルにおける CYH33 の *In Vivo* PK/PD 試験 34
2.6.2.3 副次的薬理試験 37
2.6.2.4 安全性薬理試験 38
2.6.2.4.1 中枢神経系（CNS） 38
2.6.2.4.2 心血管系 39
2.6.2.4.2.1 イヌにおける心血管系評価 39
2.6.2.4.2.2 HEK293 細胞における hERG チャネルを用いた心血管系評価 39
2.6.2.4.3 呼吸器系 39
2.6.2.5 その他のシステム 39
2.6.2.6 薬力学的薬物相互作用試験 40
2.6.2.6.1 SK-OV-3 ヒト卵巣癌異種移植モデルにおける CYH33 とオラパリブとの併用 40

2.6.2.7 考察及び結論 42
参考文献 44

表一覧

表 2.6.2-1. CYH33 を用いて実施した非臨床薬理試験 7
表 2.6.2-2. クラス I PI3K 及び変異体のキナーゼ活性に対する BYL719、CYH33 及び I27 の阻害活性 15
表 2.6.2-3. ヒト卵巣明細胞癌（OCCC）細胞株 OVMANA の増殖に対する CYH33 及び I27 の IC_{50s} 値 18
表 2.6.2-4. ヒト食道扁平上皮癌（ESCC）細胞株パネルの増殖における CYH33、BYL719 及び I27 の GI_{50} 値（n=11） 19
表 2.6.2-5. ヒト乳癌細胞株パネルの増殖における CYH33、BYL719、I27 の GI_{50} 値（n=21） 20
表 2.6.2-6. ヒト卵巣明細胞癌 OVMANA 異種移植モデルマウスに対する CYH33 の治療効果 22
表 2.6.2-7. ヌードマウスにおける HGC-27 ヒト胃癌異種移植片に対する CYH33、I27、GDC-0077、BYL719 の治療効果 24
表 2.6.2-8. ヌードマウスにおけるヒト食道癌 KYSE410 異種移植片に対する CYH33 の治療効果 I 26
表 2.6.2-9. ヌードマウスにおけるヒト食道癌 KYSE410 異種移植片に対する CYH33 の治療効果 II 27
表 2.6.2-10. ヌードマウスにおけるヒト食道癌 KYSE510 異種移植片に対する CYH33 の治療効果 I 29
表 2.6.2-11. ヌードマウスにおけるヒト食道癌 KYSE510 異種移植片に対する CYH33 の治療効果 II 29
表 2.6.2-12. マウスを用いた食道癌異種移植モデルにおける CYH33 の抗腫瘍効果 32
表 2.6.2-13. CYH33 を経口投与後の KYSE410 異種移植マウスの腫瘍組織中及び血漿中の CYH33 の薬物動態パラメータ 33
表 2.6.2-14. CYH33 を経口投与後の KYSE410 異種移植マウスの腫瘍組織中及び血漿中の I27 の薬物動態パラメータ 33
表 2.6.2-15. マウスを用いた HGC-27 胃癌異種移植モデルにおける CYH33 の *in Vivo* PK/PD 試験の投与レジメン 35
表 2.6.2-16. HGC-27 異種移植モデルにおける CYH33 単回経口投与後 2 時間での血漿中及び腫瘍組織中の CYH33 濃度 36
表 2.6.2-17. 被験物質の投与レジメン 40

図一覧

図 2.6.2-1. Rh30-Myr-p110α/β/γ/δ 細胞における PI3K 経路に対する CYH33 及び I27 の作用 16
図 2.6.2-2. 癌細胞株における PI3K 経路に対する CYH33 及び I27 の作用 17
図 2.6.2-3. 異なる濃度の CYH33、I27 又は BYL719 で 24 時間処理した KYSE510 細胞及び MCF7 細胞の細胞周期分布 21
図 2.6.2-4. ヒト卵巣明細胞癌 OVMANA 異種移植モデルマウスの腫瘍体積に対する CYH33 の作用 23
図 2.6.2-5. 担癌マウスの体重に対する CYH33 の作用 23
図 2.6.2-6. ヒト胃癌 HGC-27 異種移植モデルマウスの腫瘍体積に対する CYH33 及び I27 の作用 25
図 2.6.2-7. 担癌マウスの体重に対する CYH33 及び I27 の作用 25
図 2.6.2-8. マウスにおけるヒト食道癌 KYSE410 異種移植片の腫瘍体積に対する CYH33 の作用［試験 I（A）及び試験 II（B）］ 28
図 2.6.2-9. マウスにおけるヒト食道癌 KYSE510 異種移植片の腫瘍体積に対する CYH33 の作用［試験 I（A）及び試験 II（B）］ 30
図 2.6.2-10. CYH33 単回経口投与後の KYSE410 異種移植モデルの腫瘍組織における PI3K シグナル伝達経路に対する CYH33 の作用 34
図 2.6.2-11. HGC-27 異種移植モデルにおいて CYH33 を単回経口投与した場合の 2 時間後の腫瘍組織の p-AKT（Ser473）濃度に対する CYH33 の作用 35
図 2.6.2-12. HGC-27 異種移植腫瘍モデルでみられる CYH33 の薬物動態/薬力学関係 36
図 2.6.2-13. HGC-27 異種移植モデルにおける CYH33 単回投与後 2 時間での腫瘍組織における p-AKT（Ser473）のタンパク質発現レベル 37
図 2.6.2-14. HGC-27 異種移植モデルにおける CYH33 単回投与後 2 時間での腫瘍組織における p-AKT（Ser473）/t-AKT の Protein Band Gray 解析 37
図 2.6.2-15. SK-OV-3 ヒト卵巣癌移植マウスモデルの腫瘍体積に対する CYH33 とオラパリブ併用療法の作用 41
図 2.6.2-16. SK-OV-3 ヒト卵巣癌移植マウスモデルの腫瘍重量に対する CYH33 とオラパリブ併用療法の作用 41
図 2.6.2-17. 担癌マウスの体重に対する CYH33 とオラパリブによる併用療法の作用 42

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
ATP	Adenosine Triphosphate	アデノシン三リン酸
BID	Twice a Day	1 日 2 回
BWC	Change of Body Weight	体重変化
CDX	Cell Line-Derived Xenografts	細胞株由来異種移植片
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
CTG	CellTiter-Glo ® Luminescent Cell Viability Assay	CellTiter-Glo®発光細胞生存率試験
D	Day	日
ECG	Electrocardiogram	心電図
ESCC	Esophageal Squamous Cell Carcinoma	食道扁平上皮癌
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
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
GI_{50}	Growth Inhibition 50%	細胞増殖の半数阻害濃度
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
hERG	Human Ether-a-go-go Related Gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
h/hr	Hour	時間
HEK293	Human Embryonic Kidney 293	ヒト胎児腎臓細胞株 293
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
min	Minutes	分
MV	Minute Volume	毎分換気量
OCCC	Ovarian Clear Cell Carcinoma	卵巣明細胞癌
PD	Pharmacodynamics	薬力学
PDX	Patient-Derived Xenografts	患者由来異種移植片
PI3Kα	Phosphatidylinositol 3-Kinase Alpha	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ α

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）
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-ビスリン酸 3-キナーゼ触媒サブユニット α
PIKK	Phosphatidylinositol 3-Kinase-Related Kinase	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ関連キナーゼ
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	ホスファチジルイノシトール 4,5-ビスリン酸
PK	Pharmacokinetics	薬物動態
PO	Oral	経口
QD	Once a Day	1 日 1 回
Rf	Respiratory Frequency	呼吸回数
RTV	Relative Tumor Volume	相対的腫瘍体積
rpS6	Ribosomal Protein S6	リボソームタンパク質 S6
SD	Standard Deviation	標準偏差
SEM	Standard Error of the Mean	平均値の標準誤差
SRB	Sulforhodamine B	スルホローダミン B
S6K1	p70 Ribosomal Protein S6 Kinase 1	p70 リボソーム蛋白質 S6 キナーゼ 1
TV	Tidal Volume	1 回換気量
TGI	Tumor Growth Inhibition	腫瘍増殖抑制
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

2.6.2 薬理試験の概要文

2.6.2.1 まとめ

CYH33 及びその代謝物 I27 は PI3Kα 及びその変異体に対する強力な阻害剤であり、IC_{50s} 値は 5～20 nM の範囲であった。対照的に、CYH33 及び I27 は、他のクラス I PI3K に対する影響が比較的弱く、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ関連キナーゼ（PIKK）ファミリーのメンバーを含む他の 300 種類を超えるキナーゼに対してはほとんど影響を及ぼさなかった。

細胞アッセイにおいて、CYH33 及び I27 は Rh30-Myr-p110α/β/γ/δ 細胞においてそれぞれ約 41 nM / 1100 nM / 約 370 nM / 約 370 nM で AKT のリン酸化を阻害し、CYH33 及び I27 は細胞レベルで PI3Kα 活性を選択的に阻害することが示された。さらに、CYH33 及び I27 は、癌細胞株において、AKT のリン酸化を S6K1 や rpS6 などの他の下流エフェクターとともに濃度依存的に阻害した。PI3K のシグナル伝達経路を完全に阻害するために必要な CYH33 及び I27 の最小濃度は BYL719 より低かった。CYH33 及び I27 は卵巣明細胞癌（OCCC）、食道癌及び乳癌細胞株のパネルに対し *in vitro* 抗増殖活性を示し、GI_{50s} 値は 10 nM から>10 μM までの範囲であった。また、CYH33 及び I27 は G_0/G_1 細胞周期停止を用量依存的に誘導した。

In vivo では、*PIK3CA* H1047R 活性化変異によって駆動された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）は自然発症乳癌の増殖をほぼ完全に阻害した（Liu XL et al. 2018）。また、複数のがん細胞株由来異種移植片モデル及び患者由来異種移植片モデルにおいて、CYH33 は用量依存的に腫瘍増殖を抑制した。CYH33 は腫瘍組織における PI3K シグナル伝達経路を時間及び用量依存的に効果的に阻害し、それは CYH33 の腫瘍増殖に対する阻害作用と一致した。

PIK3CA 変異を有するヒト卵巣癌異種移植モデル 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 の抗腫瘍活性を検証した。CYH33 オラパリブを併用した場合、CYH33 とオラパリブのいずれかを単独投与した場合に比べて抗腫瘍効果が有意に高かった。

ラットに CYH33 を 150 mg/kg の用量まで単回経口投与した場合、中枢神経系及び呼吸器系に対する有意な影響は認められなかった。イヌに CYH33 を 15 mg/kg までの用量で単回経口投与した場合、心血管系パラメータに対する影響は認められなかった。hERG 電流阻害に対する CYH33 の IC_{50} 値は 42.75 μM より高く、心室再分極遅延の可能性は低いと考えられた。

CYH33 を用いて実施した非臨床有効性及び安全性薬理試験を表 2.6.2-1 に要約する。

表 2.6.2-1. CYH33 を用いて実施した非臨床薬理試験

Report Number	Title	Test System	Noteworthy Findings
Primary Pharmacodynamic Studies – *in vitro*			
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_{50s} 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_{50s} 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.

Report Number	Title	Test System	Noteworthy Findings
Primary Pharmacodynamic Studies – *in vitro*			
[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.
[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 mammary tumors 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 on 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	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.

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
			Risovalisib Mesilate)	
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), I27 at 10 and 20 mg/kg, GDC-0077 at 5 mg/kg, BYL719 at 5 mg/kg, PO BID for 4 weeks	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%, 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):**	**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

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
			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, 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.	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 (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%

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
			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 **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.	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%) **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.

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
M4.2.1.1-1	The PK/PD study of CYH33 in the KYSE410 human esophageal cancer xenograft mouse model	Mouse/BALB/cA nude (Female)	Vehicle: 0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80, single oral dose (fasted condition) CYH33 at 12.5, 25, and 50 mg/kg, single oral 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.
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 HGC-27 tumor tissues 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	CYH33 in combination use with Lynparza® (Olaparib) showed significantly stronger anti-tumor efficacy compared with either CYH33 or Olaparib as single agent.

Pharmacodynamic Drug Interactions				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
			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 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.

2.6.2.2 効力を裏付ける試験

2.6.2.2.1 *In Vitro*

2.6.2.2.1.1 クラス I PI3K キナーゼ活性に対する CYH33 の作用

PI3K の野生型クラス I PI3K 及び PI3Kα 活性化変異体に対する CYH33、I27（CYH33 の活性代謝物）、並びに BYL719（陽性対照）の阻害活性を、*in vitro* キナーゼ反応系である PI3-キナーゼ均一時間分解蛍光（HTRF）アッセイを用いて評価した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。簡潔に述べると、所定濃度の各酵素を 10 mM PIP2 含有試験緩衝液でインキュベートした。試験化合物の最終濃度は 10 μM～0.3 nM であった。ATP を 20 μM 添加して反応を開始し、室温で 30 分間インキュベートした。

その結果（表 2.6.2-2）、CYH33 及び I27 は PI3Kα 及びその変異体に対して強力に作用し、IC_{50} 値は 5～20 nM の範囲であり、他のクラスの PI3K に対する影響は比較的弱いことが示された。したがって、CYH33 及び I27 は、高選択性 PI3Kα 阻害剤であることが分かった。

表 2.6.2-2. クラス I PI3K 及び変異体のキナーゼ活性に対する BYL719、CYH33 及び I27 の阻害活性

	BYL719 IC_{50} (nM)	**CYH33 IC_{50} (nM)**	**I27 IC_{50} (nM)**
PI3Kα wt	17.8±0.7	5.9±1.1	12.5±2.8
PI3Kα ^{E545K}	18.9±1.7	17.1± 3.4	8.9±0.6
PI3Kα ^{H1047R}	10.9±3.4	8.4±2.7	13.4±4.2
PI3Kβ	1837.3±434.2	598.1±147.2	611.2±194.5
PI3Kγ	1673.0±398.4	224.8±50.5	266.2±55.8
PI3Kδ	382.8±55.8	78.7±4.8	43.9±19.1

The results were from three independent assays and expressed as mean ± SD.

2.6.2.2.1.2 I 型 PI3K サブタイプに対する CYH33 の細胞内選択性

CYH33 及び I27 について、クラス I PI3K に対する、細胞レベルでの選択的阻害能力を評価した。クラス I PI3K の活性化アイソフォームである Myr-p110α、Myr-p110β、Myr-p110γ 又は Myr-p110δ が Rh30 細胞で構成的に発現された。クラス I PI3K に対する阻害活性をウェスタンブロット法により検出した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。

その結果（図 2.6.2-1）、CYH33 及び I27 は、Rh30-Myr-p110α/β/γ/δ 細胞における AKT リン酸化を濃度依存的に阻害した。CYH33 及び I27 は、Rh30-Myr-p110α/β/γ/δ 細胞中の AKT リン酸化をそれぞれ約 41 nM / 1100 nM / 約 370 nM / 約 370 nM で有意に阻害した。CYH33 及び I27 がこの同種細胞パネルにおいて PI3Kα に対する最も強力な阻害活性を示したことから、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示された。CYH33 及び I27 は PI3Kα に対して同様の効力を示し、BYL719 より強力であった。

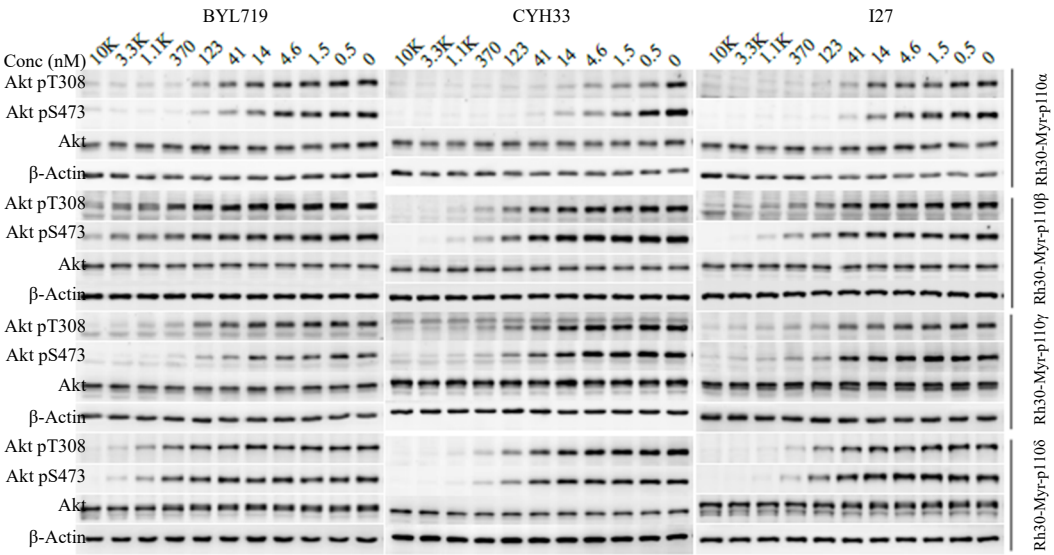


図 2.6.2-1. Rh30-Myr-p110α/β/γ/δ 細胞における PI3K 経路に対する CYH33 及び I27 の作用

Note：Rh30-Myr-p110α, Rh30-Myr-p110β, Rh30-Myr-p110γ and Rh30-Myr-p110δ cells were treated with various concentrations of CYH33, BYL719 and I27 for 1 h. Indicated proteins were detected by Western blot. Data shown are representative of one of three independent experiments.

2.6.2.2.1.3　　癌細胞株における PI3K 経路に対する CYH33 の阻害作用

複数の癌細胞株を用いて、CYH33 及び I27 による PI3K シグナル伝達経路に対する用量及び時間依存的な阻害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、M4.2.1.1-7）。代表的な結果を図 2.6.2-2 に示した。

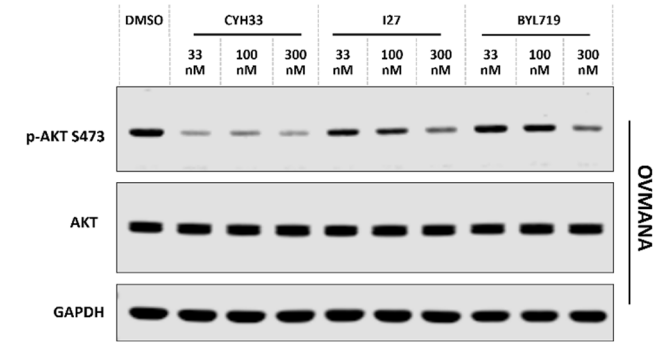
図 2.6.2-2 のパネル A に示すように、*PIK3CA* E545V 変異を有する卵巣明細胞癌細胞株 OVMANA において、CYH33（33～300 nM）は AKT のリン酸化を強力に阻害し、その阻害率は 62.3%から 67.9%であった。また、I27（33～300 nM）は濃度依存的に AKT のリン酸化を阻害した。CYH33 及び I27 の AKT リン酸化阻害活性は、同濃度の BYL719 より高かった。

図 2.6.2-2 のパネル B に示すように、*PIK3CA* E545K 変異を有する食道癌細胞株 KYSE510 において、CYH33（約 10～100 nM）及び I27（約 30～300 nM）は、AKT のリン酸化を濃度依存的に阻害した。また、S6K1 や rpS6 などの下流エフェクターのリン酸化も阻害した。PI3K のシグナル伝達経路を完全に阻害するために必要な CYH33 及び I27 の最小濃度は BYL719 より低かった。

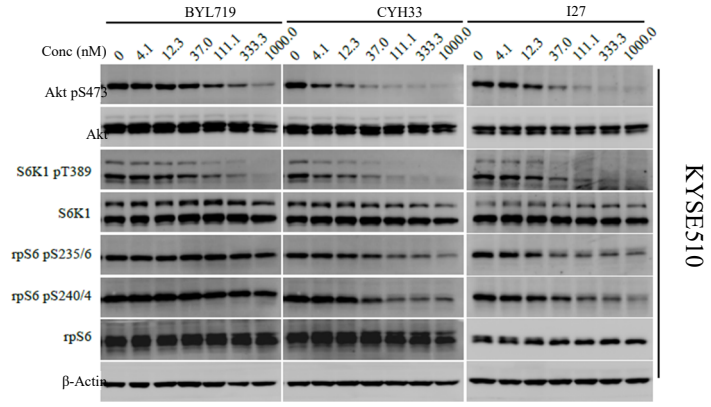
さらに CYH33 による PI3K シグナル伝達経路阻害の時間応答を検討した。図 2.6.2-2 のパネル C に示すように、CYH33（100 nM）及び I27（100 nM）は、KYSE510 細胞と 15 分間インキュベートした場合、AKT のリン酸化を阻害した。AKT のリン酸化は処理 6～24 時間後に回復した。しかし、S6k1 及び rpS6 のリン酸化を阻害し、より長時間の処理（最長 30 分～1 時間）が必要であり、AKT の回復に比べて回復が遅いことが確認された。

以上から、癌細胞において、CYH33 及び I27 は用量及び時間依存的に PI3K 経路を阻害した。より長時間の処理後、シグナル伝達経路は部分的に回復した。CYH33 及び I27 は PI3K 経路に対して同様の阻害活性を示し、BYL719 より強力であった。

(A)



(B)



(C)

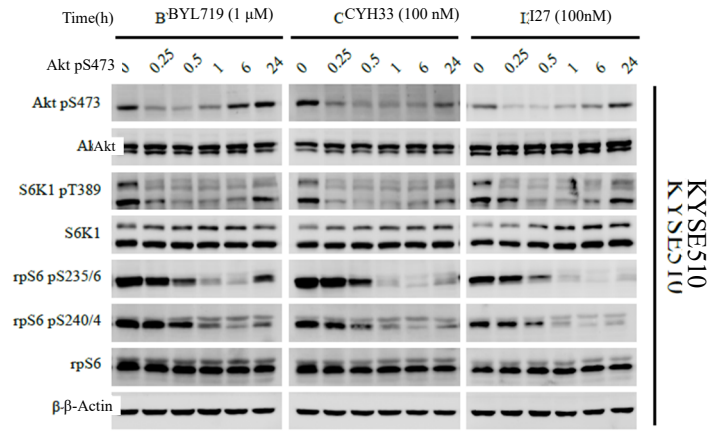


図 2.6.2-2. 癌細胞株における PI3K 経路に対する CYH33 及び I27 の作用

Note：(A): OVMANA cells were treated with various concentrations of CYH33, BYL719 and I27 for 2 h. Indicated proteins were detected by Western blot. (B): KYSE510 cells were treated with various concentrations of CYH33, BYL719 and I27 for 1 h. Indicated proteins were detected by Western blot. (C): KYSE510 cells were treated with CYH33 (100 nM), BYL719 (1 μM) and I27 (100 nM) for indicated times. Data shown in B and C are representative data of three independent experiments.

2.6.2.2.1.4 ヒト卵巣明細胞癌に対する CYH33 の *in vitro* 抗腫瘍効果

PIK3CA E545V 変異を有するヒト卵巣明細胞癌細胞株 OVMANA の増殖に対する CYH33、I27 及びカルボプラチンの阻害作用は、二つの独立した CellTiter-Glo（CTG）発光細胞生存率試験により評価した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-2）。

その結果、CYH33 及び I27 はいずれも 168 時間処理後に OVMANA 細胞の増殖を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 111.58±68.3 nM 及び 277.72±110.0 nM であった（表 2.6.2-3）。一方、カルボプラチンの IC_{50} 値は>10 μM で明らかな OVMANA 細胞の増殖抑制作用を示さず、OVMANA 細胞はプラチナ抵抗性の細胞株であることが確認された。

表 2.6.2-3. ヒト卵巣明細胞癌（OCCC）細胞株 OVMANA の増殖に対する CYH33 及び I27 の IC_{50s} 値

Test Compound	**Relative IC_{50} (nM)**			**Absolute IC_{50} (nM)**		
	Individual studies		**Mean ± SD**	**Individual studies**		**Mean ± SD**
CYH33	47.29	135.65	91.47±62.5	63.27	159.89	111.58±68.3
I27	168.64	325.80	247.22±111.1	199.96	355.47	277.72±110.0
Carboplatin	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000	>10000
Staurosporine	1.03	2.12	1.58±0.8	0.87	1.84	1.36±0.7

Note: The results were obtained from two independent experiments with IC_{50} values presented as individual values and mean ± SD.

2.6.2.2.1.5 ヒト乳癌及び食道癌細胞株に対する CYH33 の *in vitro* 抗腫瘍効果

CYH33 及び I27 の *in vitro* 抗腫瘍活性は、スルホローダミン B（SRB）アッセイにより、11 種類の食道癌細胞株（ESCC）及び 21 種類の乳癌細胞株に対する抗増殖能力を評価することによって調べられた。（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。11 種類の食道癌細胞株（表 2.6.2-4）及び 21 種類の乳癌細胞株（表 2.6.2-5）に対する 72 時間処理後の CYH33、I27 及び BYL719 の GI_{50} 値を以下に示した。

CYH33、BYL719 及び I27 は、テストされた細胞株間で類似した感受性プロファイルを示した。GI_{50} 値は 10 nM から 10 μM 超まで幅があるが、BYL719 の活性は CYH33 や I27 よりも比較的弱いのに対し、CYH33 と I27 との活性は同程度である。

表 2.6.2-4. ヒト食道扁平上皮癌（ESCC）細胞株パネルの増殖における CYH33、BYL719 及び I27 の GI_{50} 値（n=11）

	GI_{50} (μM)											
	BYL719				**CYH33**				**I27**			
Cell Line	1st	2nd	3rd	mean	1st	2nd	3rd	mean	1st	2nd	3rd	mean
KYSE180	0.354	0.740	0.553	0.549	0.001	0.011	0.016	0.009	0.100	0.169	0.077	0.115
KYSE70	0.452	0.450	0.478	0.460	0.033	0.027	0.029	0.030	0.109	0.059	0.112	0.093
KYSE510	1.529	0.835	1.031	1.132	0.055	0.006	0.038	0.033	0.247	0.390	0.204	0.280
KYSE150	1.638	2.110	1.670	1.806	0.040	0.062	0.038	0.047	0.202	0.276	0.150	0.209
KYSE2	1.444	0.911	1.874	1.410	0.024	0.028	0.097	0.050	0.255	0.165	0.310	0.243
KYSE410	1.887	0.816	0.874	1.192	0.146	0.050	0.088	0.095	0.468	0.959	0.229	0.552
KYSE140	2.446	3.611	2.740	2.932	0.484	0.804	0.492	0.593	0.898	0.638	0.792	0.776
COLO680N	6.122	6.054	6.104	6.093	0.743	0.530	0.701	0.658	0.959	0.915	0.917	0.930
Detroit 562	1.970	2.297	2.385	2.217	0.718	0.707	0.769	0.731	0.580	0.527	0.607	0.571
KYSE450	8.592	10.000	8.803	9.132	1.382	0.803	0.938	1.041	1.226	1.005	0.932	1.054
KYSE30	10.000	6.832	4.261	7.031	2.640	0.566	0.285	1.164	2.354	1.098	0.709	1.387

Note: The results were obtained from three independent experiments with IC_{50} values presented as individual values and the mean.

表 2.6.2-5. ヒト乳癌細胞株パネルの増殖における CYH33、BYL719、I27 の GI_{50} 値（n=21）

	GI_{50} (μM)											
	BYL719				CYH33				I27			
Cell Line	1st	2nd	3rd	mean	1st	2nd	3rd	mean	1st	2nd	3rd	mean
HCC1937	0.209	0.166	0.135	0.170	0.039	0.010	0.028	0.026	0.048	0.037	0.033	0.039
EFM-19	0.290	0.131	0.170	0.197	0.040	0.051	0.086	0.059	0.058	0.064	0.053	0.058
MDA-MB-175-VII	0.554	0.383	1.183	0.707	0.064	0.053	0.108	0.075	0.169	0.102	0.093	0.121
MCF-7	0.389	0.450	0.331	0.390	0.105	0.071	0.054	0.077	0.069	0.065	0.059	0.064
EFM-192A	0.446	0.427	0.394	0.422	0.081	0.094	0.110	0.095	0.111	0.088	0.113	0.104
MDA-MB-361	0.488	0.706	0.421	0.538	0.059	0.160	0.072	0.097	0.139	0.274	0.150	0.188
BT-474	0.480	0.374	0.613	0.489	0.051	0.128	0.116	0.098	0.182	0.069	0.059	0.103
SK-BR-3	0.415	0.726	0.453	0.531	0.059	0.181	0.070	0.103	0.146	0.105	0.137	0.129
CAL51	0.360	0.342	0.803	0.502	0.038	0.126	0.155	0.106	0.094	0.139	0.148	0.127
ZR-75-1	3.032	6.097	4.731	4.620	0.090	0.183	0.324	0.199	0.359	0.493	0.369	0.407
T47D	0.145	0.236	0.150	0.177	0.322	0.257	0.102	0.227	0.053	0.058	0.047	0.053
MDA-MB-453	0.469	0.168	0.544	0.394	0.209	0.161	0.372	0.247	0.286	0.055	0.196	0.179
BT-20	0.914	0.582	0.870	0.789	0.460	0.068	0.237	0.255	0.246	0.126	0.216	0.196
HCC38	4.768	3.306	3.990	4.021	0.414	0.138	0.305	0.286	0.628	0.281	0.306	0.405
Hs578T	3.032	2.774	1.902	2.569	0.808	0.789	0.283	0.627	0.483	0.400	0.228	0.370
HCC1954	0.593	0.710	0.618	0.640	1.511	0.561	0.428	0.833	0.227	0.173	0.235	0.212
JIMT-1	6.152	2.240	1.913	3.435	1.528	0.623	0.401	0.851	0.798	0.276	0.442	0.505
HBL-100	9.961	8.337	6.891	8.396	2.665	0.873	1.218	1.585	1.088	0.564	0.782	0.811
BT-549	10.000	10.000	10.000	10.000	4.472	2.007	1.273	2.584	0.950	1.050	0.853	0.951
HCC1500	5.856	9.156	9.305	8.106	10.000	10.000	10.000	10.000	1.414	1.182	1.623	1.406
MDA-MB-231	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	10.000	6.972	4.411	7.128

Note: The results were obtained from three independent experiments with IC_{50} values presented as individual values and the mean

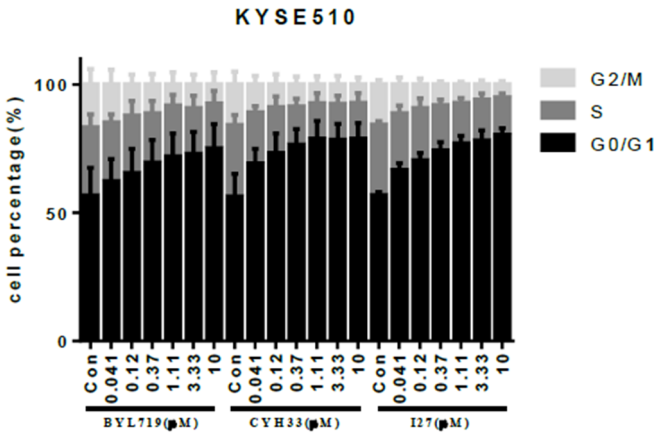
2.6.2.2.1.6 乳癌及び食道癌細胞の細胞周期に対する CYH33 の作用

複数の食道癌及び乳癌細胞株を用いて、CYH33 及び I27 を異なる濃度で処理した場合の細胞周期への作用をフローサイトメトリー法により評価した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。CYH33 及び I27 の処理に感受性を示した食道癌細胞株 KYSE510 及び乳癌細胞株 MCF7 の代表的な結果を図 2.6.2-3 に示した。

CYH33、I27 又は BYL719 を 24 時間処置した後、KYSE510 細胞及び MCF7 細胞において、G_0/G_1 期の細胞集団の増加が認められ、それに伴い S 期及び G_2/M 期では細胞集団の低下が認められた。細胞周期停止は濃度依存的であった。

したがって、PI3Kα 阻害剤である CYH33 及び I27 は、G_0/G_1 細胞周期停止を誘導することにより、細胞増殖を阻害すると考えられる。

(A)



(B)

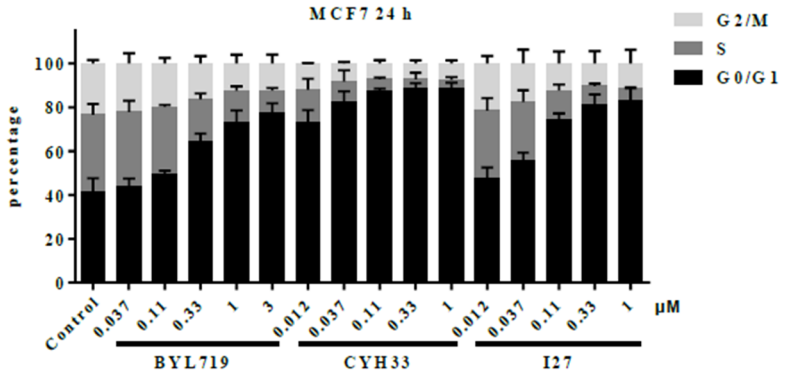


図 2.6.2-3. 異なる濃度の CYH33、I27 又は BYL719 で 24 時間処理した KYSE510 細胞及び MCF7 細胞の細胞周期分布

Note: Data shown are mean + SD from three independent experiments.

2.6.2.2.2 *In Vivo*

2.6.2.2.2.1 *PIK3CA* H1047R 活性化変異を導入したトランスジェニックマウスモデルにおける CYH33 の抗腫瘍効果

CYH33 による PI3Kα の標的化を *in vivo* で確認するために、トランスジェニックマウスモデル R26-Pik3ca^{H1047R} MMTV-Cre を用いて Cre リコンビナーゼを発現させ、次に乳腺上皮に p110α^{H1047R} を発現させた。p110α^{H1047R} の発現は乳腺腫瘍を誘発するのに十分であり、R26-Pik3ca^{H1047R} MMTV-Cre 雌マウスが約 5 ヵ月齢で乳腺腫瘍を発症した。腫瘍体積が約 100 mm^3 に達した後、CYH33（10 mg/kg）又は同等の溶媒（溶媒対照）をマウスに連日経口投与した。105 日間の投与後、溶媒対照群のマウスは腫瘍負荷が大きくなったため安楽死処置した。相対腫瘍体積（RTV）は 25.07 であった。CYH33 を投与した場合、130 日までの RTV は 1.3 であり、腫瘍の

進行をほぼ完全に抑制した。又、CYH33 を投与したマウスの平均体重は対照群と同程度であった（Liu XL et al. 2018）。

CYH33 は主に *PIK3CA* H1047R 変異によって誘発される腫瘍の増殖を強力に阻害し、PI3Kα を標的とすることが実証された。

2.6.2.2.2.2 ヒト卵巣明細胞癌マウス異種移植モデルにおける CYH33 の抗腫瘍効果

PIK3CA E545V 変異を有するヒト卵巣明細胞癌由来細胞株 OVMANA を用いたマウス異種移植モデルにおいて、CYH33 の *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。OVMANA 細胞を NCG 雌マウスの右側背部皮下に接種し、平均腫瘍体積が 140 mm^3 に達した時点でマウスを 3 群（6 匹／群）にランダムに割り付け、溶媒又は CYH33（5 又は 10 mg/kg）を 1 日 1 回 29 日間経口投与した。（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-8）。

被験物質 CYH33（5 及び 10 mg/kg）は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 がそれぞれ 39.85%及び 29.70%であった（表 2.6.2-6、図 2.6.2-4）。また、CYH33 を投与したほとんどのマウスで、腫瘍体積は時間の経過とともに徐々に縮小した。死亡や病的状態はなく、いずれのマウスも実験中に明らかな体重減少を示さなかった（図 2.6.2-5）。

表 2.6.2-6. ヒト卵巣明細胞癌 OVMANA 異種移植モデルマウスに対する CYH33 の治療効果

Group	Dose, Route, Schedule	Animal number		Body Weight (g, mean±SEM)		TV (mm^3, mean±SEM)		T/C[b] (%)	TGI[b] (%)
		d_0	d_{28}	d_0	d_{28}	d_0	d_{28}		
Vehicle	qd×29, po	6	6	20.63 ±0.40	20.03±0.28	140.4 ± 11.8	344.9 ± 33.6	-	
CYH33[a]	5 mg/kg qd×29, po	6	6	20.58±0.47	20.21±0.58	140.0 ± 10.6	137.1 ± 13.3	39.85****	101.45
CYH33[a]	10 mg/kg qd×29, po	6	6	20.46±0.43	20.62±0.40	140.1 ± 9.8	102.2 ± 9.2	29.70****	118.54

Note: [a], The dose levels of CYH33 in the table were calculated by Risovalisib Mesilate. [b]. TGI (%) = [1-(T_{28}-T_0)/(C_{28}-C_0)] ×100, T/C (%) =T_{RTV}/C_{RTV} x 100, RTV=V_{28}/V_0; c. p value is calculated based on tumor size on PG-D28. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test for comparing treatment groups with the vehicle group.****, p<0.0001.

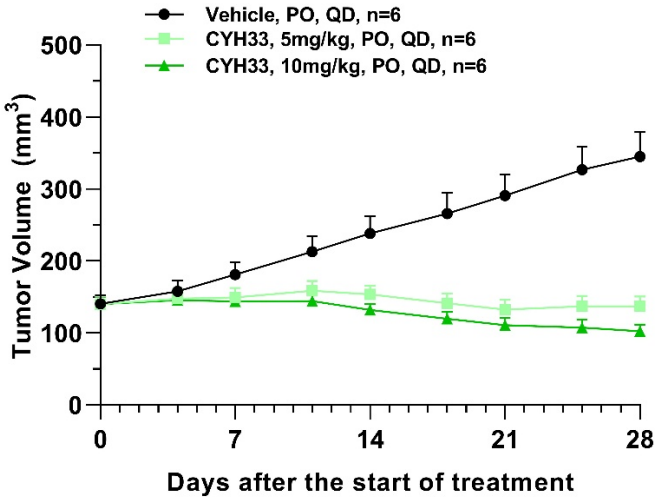


図 2.6.2-4. ヒト卵巣明細胞癌 OVMANA 異種移植モデルマウスの腫瘍体積に対する CYH33 の作用

Note: Data points represent mean tumor volume for each group; error bars represent standard error of the mean (SEM).

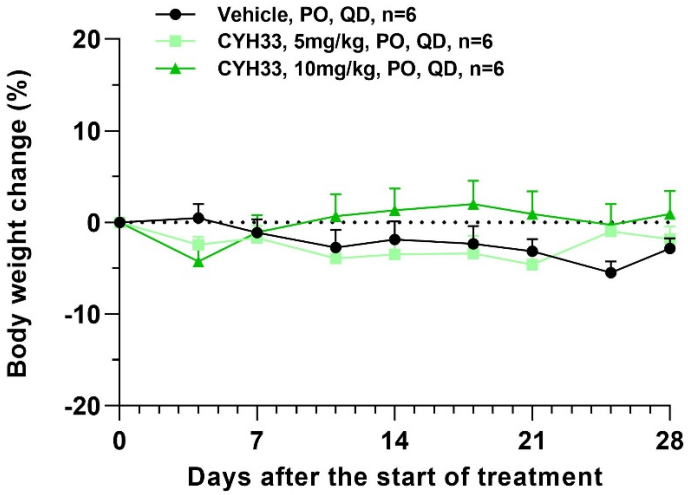


図 2.6.2-5. 担癌マウスの体重に対する CYH33 の作用

Note: Data points represent mean percent change in body weight for each group. Error bars represent SEM.

2.6.2.2.2.3 マウスを用いたヒト胃癌及び食道癌異種移植モデルにおける CYH33 の抗腫瘍効果

ヒト胃癌細胞株由来皮下異種移植モデル HGC-27（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-3）、ヒト食道癌細胞株由来皮下異種移植モデル KYSE410 及び KYSE510、並びにヒト食道癌患者由来皮下異種移植モデル EC104、EC063 及び EC074（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）を用いて、CYH33 の *in vivo* 抗腫瘍効果を評価した。CDX モデル HGC-27、KYSE410 及び KYSE510 の代表的な腫瘍増殖曲線及び T/C 値を以下に示した。その他のモデルについては、投与終了時の T/C 値のみを示した。

HGC-27 モデル

本試験の目的は、*PIK3CA* E542K 変異を有する HGC-27 ヒト胃癌細胞を皮下移植した BALB/c 雌ヌードマウスを用いて、CYH33、I27、GDC-0077 及び BYL719 の *in vivo* における抗腫瘍効果を評価することであった。HGC-27 腫瘍組織が約 120 mm^3 に達した時点で、被験動物を 8 群（6 匹／群）にランダムに割り付け、溶媒、CYH33（2.5、5、10 mg/kg）、I27（10、20 mg/kg）、GDC-0077（5 mg/kg）又は BYL719（5 mg/kg）をそれぞれ 1 日 2 回、28 日間経口投与した（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-3）。

投与後 Day 27 において、被験物質 CYH33（2.5、5 及び 10 mg/kg）は用量依存的に腫瘍増殖を有意に抑制し（図 2.6.2-6）、T/C はそれぞれ 30.26%、20.47%及び 8.28%であった（表 2.6.2-7）。被験物質 I27 の T/C は 20 mg/kg 用量を投与した場合 40.43%と有意な抗腫瘍活性を示したが、10 mg/kg 用量で投与した場合 65.28%とやや弱い抗腫瘍活性を示した。GDC-0077 を 5 mg/kg 及び BYL719 5 mg/kg の用量で投与した場合、有意な抗腫瘍活性が認められ、T/C はそれぞれ 34.36%及び 25.55%であった。同用量（5 mg/kg）を投与した場合、CYH33 は対照物質 GDC-0077 及び BYL719 よりも良好な抗腫瘍作用を示した（表 2.6.2-7）。死亡や病的状態はなく、いずれのマウスも実験中に明らかな体重減少を示さなかった（図 2.6.2-7）。

表 2.6.2-7. ヌードマウスにおける HGC-27 ヒト胃癌異種移植片に対する CYH33、I27、GDC-0077、BYL719 の治療効果

Group [a]	Tumor Volume [b] (mm^3) (PG-D27 [c])	T/C [d] (%)	TGI [d] (%)	*p* value [e]
Vehicle	1,640 ± 364			
CYH33 (2.5 mg/kg)	496 ± 70	30.26	75.27	<0.0001
CYH33 (5 mg/kg)	336 ± 43	20.47	85.79	<0.0001
CYH33 (10 mg/kg)	136 ± 34	8.28	98.96	<0.0001
I27 (10 mg/kg)	1,070 ± 101	65.28	37.47	0.0750
I27 (20 mg/kg)	662 ± 193	40.43	64.31	0.0005
GDC-0077 (5 mg/kg)	563 ± 91	34.36	70.84	0.0001
BYL719 (5 mg/kg)	419 ± 48	25.55	80.31	<0.0001

Note: [a]. The dose levels of CYH33 in the table were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate; [b]. Mean ± SEM; [c]. The 27th day after treatment; [d]. TGI (%) = [1-(T_{27}-T_0)/ (C_{27}-C_0)] ×100, T/C (%) =TRTV/C_{RTV} x 100, RTV=V_{27}/V_0; [e]. p value is calculated based on tumor size on PG-D27. Statistical significance was determined by one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test for comparing treatment groups with the vehicle group.

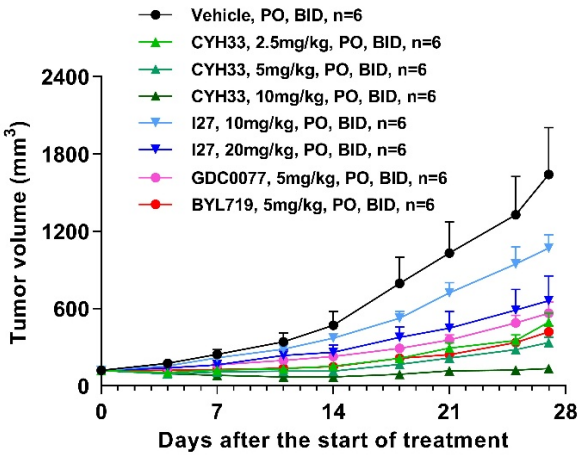


図 2.6.2-6. ヒト胃癌 HGC-27 異種移植モデルマウスの腫瘍体積に対する CYH33 及び I27 の作用

Note: Data points represent mean tumor volume for each group; error bars represent standard error of the mean (SEM).

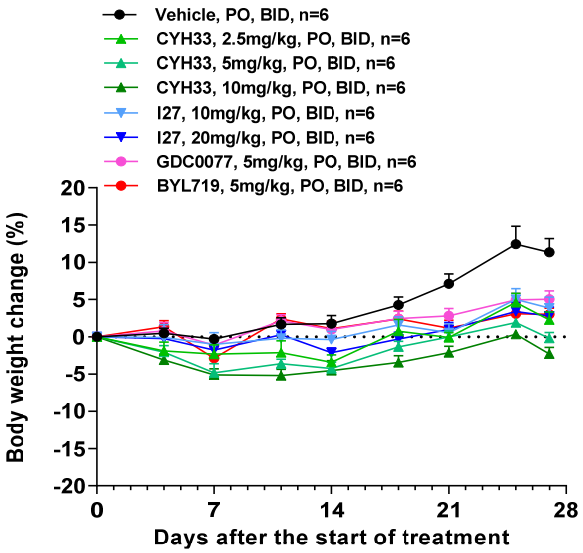


図 2.6.2-7. 担癌マウスの体重に対する CYH33 及び I27 の作用

Note: Data points represent mean percent change in body weight for each group. Error bars represent SEM.

KYSE410 モデル

KYSE410 モデルにおける CYH33 の抗腫瘍活性を評価するために 2 つの試験（試験 I 及び II）を実施した。KYSE410 細胞株由来異種移植片を BALB/cA 雌マウスの右側腹部に皮下接種し、平均腫瘍体積が約 120～130 mm^3 に達した時点で担癌マウスをランダムに割り付けて投与を実施した。試験 I では、溶媒（0 mg/kg、12 匹/群）、BYL719（12.5 mg/kg 及び 50 mg/kg、6 匹/群）、及び CYH33（6.25、12.5、25 及び 50 mg/kg、6 匹/群）のいずれかを 1 日 1 回、21 日間経口投与した。試験 II では、溶媒（0 mg/kg、12 匹/群）、BYL719（50 mg/kg、6 匹/群）及び CYH33（12.5、25 及び 50 mg/kg、6 匹/群）のいずれかを 1 日 1 回、21 日間経口投与した。これらの試験における CYH33 の投与量は、リソバリシブメシル酸塩水和物により算出した。

表 2.6.2-8、表 2.6.2-9 及び図 2.6.2-8 に示すように、CYH33 を 50 mg/kg、25 mg/kg 及び 12.5 mg/kg で投与した場合、KYSE410 異種移植片の増殖を有意に抑制し、T/C 値はそれぞれ 3.37%～6.56%、7.95%～13.44%及び 31.97%～32.05%であった。腫瘍体積は CYH33 を 50 mg/kg で投与後に減少した。CYH33 の 6.25 mg/kg 群は弱い抗腫瘍活性を示し、T/C 値は 68.17%であった。BYL719 を 50 mg/kg 及び 12.5 mg/kg で投与した場合、KYSE410 異種移植片の増殖が有意に阻害され、T/C 値はそれぞれ 25.74%～26.89%及び 29.09%であった。死亡例の報告はなく、被験動物の体重変化から明らかなように、被験物質の忍容性は良好であった。

以上から、CYH33 は用量依存的に KYSE410 腫瘍増殖を有意に抑制した。CYH33 を 50 mg/kg で投与した場合の抗腫瘍活性は、BYL719 を 50 mg/kg で投与した場合より優れていた。

表 2.6.2-8. ヌードマウスにおけるヒト食道癌 KYSE410 異種移植片に対する CYH33 の治療効果 I

Group	Dose, route of administration		Number		Body weight (g)		TV (mm^3, mean±SD)		RTV (mean±SD)	T/C (%)
			d_0	d_{21}	d_0	d_{21}	d_0	d_{21}		
Vehicle	0.2 mL/mouse, qd×21	po	12	12	19.2	23.0	125±43	1758±963	14.01±7.02	
BYL719	50 mg/kg qd×21	po	6	6	20.2	21.7	125±34	417±242	3.61±2.76*	25.74
	12.5 mg/kg qd×21	po	6	6	20.2	21.9	127±44	478±268	4.08±2.28*	29.09
CYH33	50 mg/kg qd×21	po	6	6	19.6	18.3	129±46	59±33	0.47±0.25**	3.37
	25 mg/kg qd×21	po	6	6	19.8	19.0	124±38	135±72	1.11±0.68**	7.95
	12.5 mg/kg qd×21	po	6	6	19.3	21.0	118±37	520±244	4.49±1.65*	32.05
	6.25 mg/kg qd×21	po	6	6	18.9	21.5	121±28	1137±499	9.55±4.00	68.17

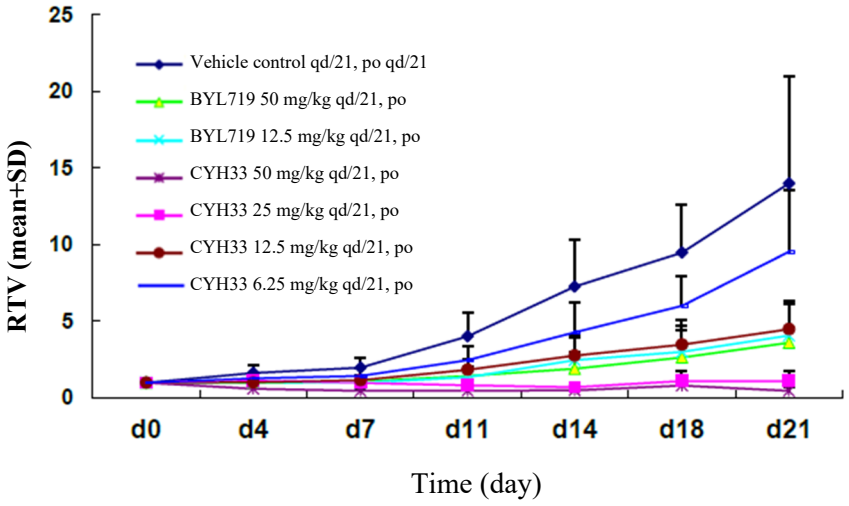
Student's t-test vs vehicle, *p<0.01, ** p<0.001

表 2.6.2-9. ヌードマウスにおけるヒト食道癌 KYSE410 異種移植片に対する CYH33 の治療効果 II

Group	Dose, route of administration		Number		Body weight (g)		TV (mm^3, mean±SD)		RTV (mean±SD)	T/C (%)
			d_0	d_{21}	d_0	d_{21}	d_0	d_{21}		
Vehicle	0.2 mL/mouse, qd×21	po	12	12	19.2	21.0	129±21	1569±753	12.2±5.71	
BYL719	50 mg/kg qd×21	po	6	6	18.9	18.5	130±23	410±302	3.28±2.62*	26.89
CYH33	50 mg/kg qd×21	po	6	6	19.1	17.0	129±21	98±40	0.80±0.37**	6.56
	25 mg/kg qd×21	po	6	6	19.5	17.6	128±23	217±88	1.64±0.47**	13.44
	12.5 mg/kg qd×21	po	6	6	19.2	18.5	128±23	517±372	3.90±2.36*	31.97

Student's t-test vs vehicle, * $p<0.01$, ** $p<0.001$

(A)



(B)

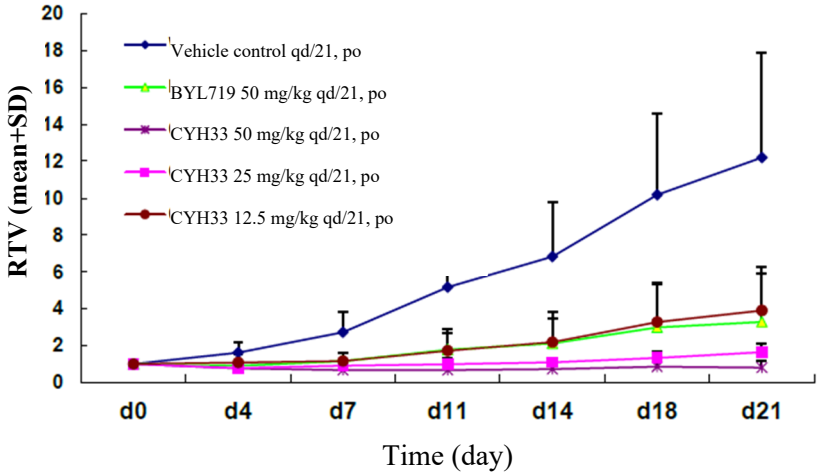


図 2.6.2-8. マウスにおけるヒト食道癌 KYSE410 異種移植片の腫瘍体積に対する CYH33 の作用［試験 I（A）及び試験 II（B）］

KYSE510 モデル

PIK3CA E545K 変異を有する KYSE510 モデルにおける CYH33 の抗腫瘍活性を評価するために 2 つの試験（試験 I 及び II）を実施した。KYSE510 細胞株由来異種移植片を BALB/cA 雌マウスの右側腹部に皮下接種し、試験 I 及び試験 II において平均腫瘍体積がそれぞれ約 240 mm^3 及び 150 mm^3 に達した時点で担癌マウスをランダムに割り付けて投与を実施した。試験 I では、溶媒（0 mg/kg、12 匹/群）、BYL719（12.5 mg/kg 及び 50 mg/kg、6 匹/群）、又は CYH33（6.25、12.5、25 及び 50 mg/kg、6 匹/群）を 1 日 1 回、4 週間経口投与した。試験 II では、溶媒（0 mg/kg、12 匹/群）、BYL719（50 mg/kg、6 匹/群）、又は CYH33（6.25、12.5、25 及び 50 mg/kg、6 匹/群）を 1 日 1 回、4 週間経口投与した。これらの試験における CYH33 の投与量は、リソバリシブメシル酸塩水和物により算出した。

表 2.6.2-10、表 2.6.2-11 及び図 2.6.2-9 に示すように、4 週間投与後、CYH33 は KYSE510 の腫瘍増殖を有意に抑制し、50、25、12.5 及び 6.25 mg/kg で投与した場合の T/C はそれぞれ 11.61%～23.54%、17.96%～21.06%、30.96%～52.39%及び 39.09%～39.47%であった。BYL719 は 50 mg/kg で投与した場合腫瘍増殖を有意に抑制し（T/C：26.32～32.43%）、12.5 mg/kg で投与した場合は腫瘍増殖を部分的に抑制した（T/C：47.62%）。さらに CYH33 を 25 mg/kg で投与した場合（T/C：17.96～21.06%）の抗腫瘍活性は BYL719 を 50 mg/kg で投与した場合（T/C：26.32%～32.43%）よりわずかに優れていた（表 2.6.2-10、表 2.6.2-11）。被験物質の忍容性は良好であり、本試験では担癌動物の体重に対する有意な影響は認められず、死亡例も報告されなかった。

表 2.6.2-10. ヌードマウスにおけるヒト食道癌 KYSE510 異種移植片に対する CYH33 の治療効果 I

Group	Dose, route of administration		Number		Body weight (g)		TV (mm^3, mean±SD)		RTV (mean±SD)	T/C (%)
			d_0	d_{21}	d_0	d_{21}	d_0	d_{21}		
Vehicle	0.2 mL/mouse, qd×28	po	12	12	21.1	24.2	243±69	1050±479	4.46±2.04	
BYL719	50 mg/kg qd×28	po	6	6	20.6	21.8	244±59	355±102	1.45±0.13**	32.43
	12.5 mg/kg qd×28	po	6	6	19.4	21.8	250±73	516±198	2.12±0.93*	47.62
CYH33	50 mg/kg qd×28	po	6	6	20.3	19.1	234±55	248±154	1.05±0.52**	23.54
	25 mg/kg qd×28	po	6	6	20.0	20.0	248±65	229±99	0.94±0.42***	21.06
	12.5 mg/kg qd×28	po	6	6	20.1	21.7	250±73	641±498	2.34±1.06*	52.39
	6.25 mg/kg qd×28	po	6	6	20.4	21.6	244±57	435±219	1.74±0.77**	39.09

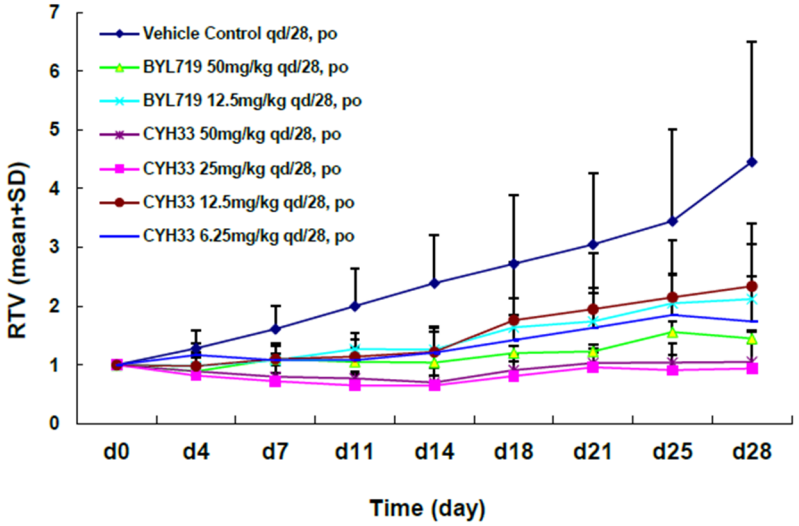
Student's t-test vs vehicle，* p<0.05，**p<0.01，*** p<0.001

表 2.6.2-11. ヌードマウスにおけるヒト食道癌 KYSE510 異種移植片に対する CYH33 の治療効果 II

Group	Dose, route of administration		Number		Body weight (g)		TV (mm^3, mean±SD)		RTV (mean±SD)	T/C (%)
			d_0	d_{21}	d_0	d_{21}	d_0	d_{21}		
Vehicle	0.2 mL/mouse, qd×28	po	12	12	20.2	23.6	154±31	949±409	6.46±3.36	
BYL719	50 mg/kg qd×28	po	6	6	19.7	20.4	156±35	254±55	1.70±0.59**	26.32
CYH33	50 mg/kg qd×28	po	6	6	20.8	18.9	154±35	114±35	0.75±0.21***	11.61
	25 mg/kg qd×28	po	6	6	21.1	21.0	155±39	178±85	1.16±0.52**	17.96
	12.5 mg/kg qd×28	po	6	6	21.9	22.4	153±28	304±89	2.00±0.49**	30.96
	6.25 mg/kg qd/28	po	6	6	21.7	23.5	155±37	411±181	2.55±0.81*	39.47

Student's t-test vs vehicle，* p<0.05，**p<0.01，*** p<0.001

(A)



(B)

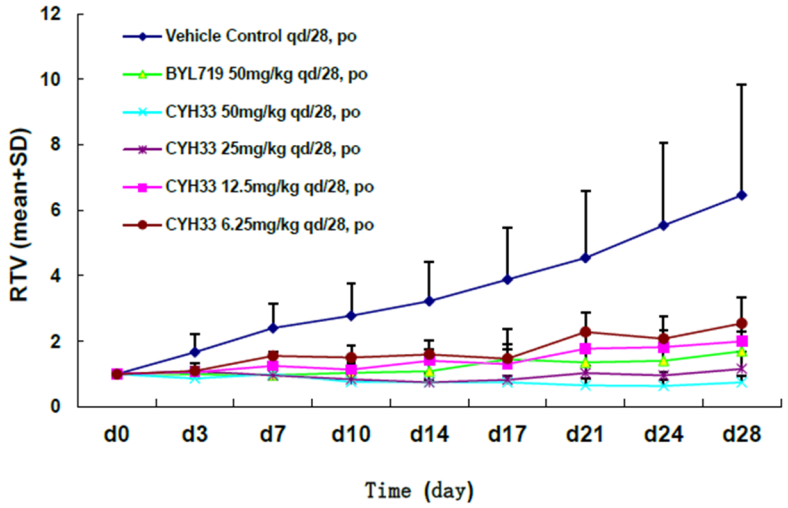


図 2.6.2-9. マウスにおけるヒト食道癌 KYSE510 異種移植片の腫瘍体積に対する CYH33 の作用［試験 I（A）及び試験 II（B）］

EC104 モデル

PIK3CA E542K 変異を有する EC104 モデルにおける CYH33 の抗腫瘍活性を評価するために 2 つの試験（試験 I 及び II）を実施した。患者由来異種移植片 EC104 を BALB/cA 雌マウスの右側腹部に皮下接種し、試験 I 及び試験 II において平均腫瘍体積がそれぞれ約 130 mm^3 及び 100 mm^3 に達した時点で、担癌マウスをランダムに割り付けて投与を実施した。試験 I と試験 II は同様の試験デザインである。溶媒（0 mg/kg、10 匹/群）、BYL719（50 mg/kg、5 匹/群）、又は CYH33（6.25、12.5、25 及び 50 mg/kg、5 匹/群）をそれぞれ 1 日 1 回、28 日間（試験 I）及び 35 日間

（試験 II）経口投与した。これらの試験における CYH33 の投与量は、リソバリシブメシル酸塩水和物により算出した。

その結果、EC104 腫瘍モデルにおいて、CYH33 は用量依存的に腫瘍増殖を有意に抑制した。CYH33 の 50 mg/kg（T/C：13.78%～24.71%）及び 25 mg/kg（T/C：19.74%～25.19%）での抗腫瘍活性は BYL719 の 50 mg/kg（T/C：17.56%～19.38%）での抗腫瘍活性と同程度であった（表 2.6.2-12）。本試験でも、被験動物は全体的に良好な状態であった。担癌動物の体重に対する被験物質の有意な影響はなく、死亡例も報告されなかった。

EC063 モデル

EC063 モデルにおける CYH33 の抗腫瘍活性を評価するために 2 つの試験（試験 I 及び II）を実施した。患者由来異種移植片 EC063 を BALB/cA 雌マウスの右側腹部に皮下接種し、平均腫瘍体積が約 100～130 mm^3 に達した時点で担癌マウスをランダムに割り付けて投与を実施した。試験 I と試験 II は同様の試験デザインである。唯一の違いは、試験 I では溶媒群にマウス 5 匹を、試験 II ではマウス 10 匹をランダムに割り付けたことであった。試験では溶媒（0 mg/kg）、BYL719（50 mg/kg、5 匹/群）、CYH33（6.25、12.5、25 及び 50 mg/kg、5 匹/群）を 1 日 1 回、28 日間経口投与した。これらの試験における CYH33 の投与量は、リソバリシブメシル酸塩水和物により算出した。

その結果、CYH33 はマウスにおいて EC063 腫瘍増殖を有意に抑制し、50、25、12.5 及び 6.25 mg/kg の用量で投与した場合の T/C はそれぞれ 10.18%～16.56%、21.29%～24.53%、24.24%～27.69%及び 30.69%～39.25%であった（表 2.6.2-12）。CYH33 を 50 mg/kg で投与した場合（T/C：10.18%～16.56%）の抗腫瘍活性は BYL719 を 50 mg/kg で投与した場合（T/C：19.44%～25.30%）よりわずかに優れていた（表 2.6.2-12）。本試験でも、評価した動物は良好な状態にあり、有意な体重変化は認められず、死亡例も報告されなかった。

EC074 モデル

患者由来異種移植片 EC074 を BALB/cA 雌マウスの右側腹部に皮下接種し、平均腫瘍体積が約 150 mm^3 に達した時点で担癌マウスをランダムに割り付けて投与を実施した。溶媒（0 mg/kg、10 匹/群）、BYL719（50 mg/kg、5 匹/群）、及び CYH33（6.25、12.5、25 及び 50 mg/kg、5 匹/群）のいずれかを 1 日 1 回、21 日間経口投与した。この試験における CYH33 の投与量は、リソバリシブメシル酸塩水和物により算出した。

その結果、EC074 マウスモデルでは CYH33 により腫瘍増殖が有意に抑制され、T/C は 50 mg/kg 投与時で 24.27%、25 mg/kg 投与時で 36.78%であり、用量依存性が認められた。CYH33 を 12.5 mg/kg で投与した場合は腫瘍増殖を部分的に抑制し、T/C は 55.94%であったが、CYH33 を 6.25 mg/kg で投与した場合は腫瘍増殖の抑制作用は弱く、T/C は 80.46%であった。BYL719 を 50 mg/kg で投与したとき EC074 腫瘍増殖を有意に抑制し、T/C は 30.52%であった。これは CYH33 を 50 mg/kg で投与した場合よりもやや劣っており、T/C は 24.27%であった（表 2.6.2-

12）。本試験では死亡例は報告されず、CYH33 の高用量（50 mg/kg）群では他の群と比較してわずかに体重が減少した。

表 2.6.2-12. マウスを用いた食道癌異種移植モデルにおける CYH33 の抗腫瘍効果

Group	Dose mg/kg	T/C%								
		CDX				PDX				
		KYSE410		KYSE510		EC104		EC063		EC074
BYL-719	50	25.74	26.89	32.43	26.32	19.38	17.56	19.44	25.30	30.52
	12.5	29.09	NA	47.62	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CYH33	50	3.37	6.56	23.54	11.61	24.71	13.78	16.56	10.18	24.27
	25	7.95	13.44	21.06	17.96	25.19	19.74	24.53	21.29	36.78
	12.5	32.05	31.97	52.39	30.96	21.32	40.54	24.24	27.69	55.94
	6.25	68.17	NA	39.09	39.47	54.84	54.20	30.69	39.25	80.46

CDX: Cell line-derived xenografts; PDX: Patient-derived xenografts; "NA" stands for not assessed

大部分の動物モデルにおいて CYH33 は陽性対照物質 BYL719 と同用量で比較した場合、わずかに高い腫瘍抑制作用を示した（表 2.6.2-12）。具体的には、KYSE410 マウスでは、BYL719 を 50 mg/kg で投与した場合（T/C：25.74%～26.89%）、CYH33 を 12.5 mg/kg で投与した場合（T/C：31.97%～32.05%）と同程度の腫瘍増殖抑制作用がみられた。

2.6.2.2.2.4 マウスを用いた KYSE410 食道癌異種移植モデルにおける CYH33 の *in vivo* PK/PD 試験

本試験の目的は、ヒト食道癌 KYSE410 細胞のマウス皮下異種移植モデルを用いて、PI3K シグナル伝達経路に対する CYH33 の *in vivo* 阻害活性及び関連する薬物動態パラメータを評価することであった。KYSE410 の腫瘍組織が 500 mm^3 に達した後、試験動物を溶媒（0 mg/kg）単回投与群（雌 4 匹/群）又は絶食条件下での CYH33（12.5、25、50 mg/kg）経口投与群（雌 21 匹/群）にランダムに割り付けた（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-1）。投与 0.25、0.5、1、2、4、8 及び 24 時間後の各採取時点で各群 3 匹のマウスから血液及び腫瘍組織サンプルを採取した。KYSE410 異種移植マウスモデルにおける CYH33 単回経口投与後の腫瘍組織及び血漿中の CYH33 及び代謝物 I27 の薬物動態パラメータを表 2.6.2-13 及び表 2.6.2-14 に示した。

表 2.6.2-13. CYH33 を経口投与後の KYSE410 異種移植マウスの腫瘍組織中及び血漿中の CYH33 の薬物動態パラメータ

CYH33 Dosage (mg/kg)	Tissue	T_{max} (h)	C_{max} (ng/g)	AUC_{0-t} (h*ng/g)	$AUC_{0-\infty}$ (h*ng/g)	MRT (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-t} Ratio*	Tumor/ Plasma of AUC_{0-t}
12.5	Plasma	1.0	1750	5930	5900	2.81	1.94	1.00	1.74
	Tumor	1.0	2160	10300	10000	3.78	2.41	1.00	
25	Plasma	1.0	1980	10100	11000	6.28	5.62	1.70	1.59
	Tumor	2.0	2590	16100	17000	6.82	6.04	1.56	
50	Plasma	2.0	2530	13100	13000	3.32	2.27	2.21	1.63
	Tumor	2.0	3790	21300	21000	4.02	2.37	2.07	

*: Normalized to AUC_{0-t} of 12.5 mg/kg

表 2.6.2-14. CYH33 を経口投与後の KYSE410 異種移植マウスの腫瘍組織中及び血漿中の I27 の薬物動態パラメータ

CYH33 Dosage (mg/kg)	Tissue	T_{max} (h)	C_{max} (ng/g)	AUC_{0-t} (h*ng/g)	$AUC_{0-\infty}$ (h*ng/g)	MRT (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-t} Ratio*	Tumor/ Plasma of AUC_{0-t}
12.5	Plasma	1.0	21.1	59.7	62.0	2.49	1.59	1.00	1.45
	Tumor	2.0	21	86.5	96.0	3.86	2.18	1.00	
25	Plasma	1.0	21.6	106	110	6.49	5.76	1.78	1.28
	Tumor	2.0	29.6	136	150	3.91	2.21	1.57	
50	Plasma	1.0	27.1	121	130	3.11	1.86	2.03	1.60
	Tumor	4.0	35.7	193	N.A.	N.A.	N.A.	2.23	

*: Normalized to AUC_{0-t} of 12.5 mg/kg, N.A.: not applicable

その結果、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。投与後 0.25 時間（25 mg/kg 及び 50 mg/kg）及び 0.5 時間（12.5 mg/kg）では、AKT 及び rpS6 のリン酸化が有意に低下した。腫瘍組織中の CYH33 濃度は投与後 2 時間でピークに達し、その後徐々に低下した（表 2.6.2-13）。したがって、AKT 及び rpS6 のリン酸化は投与後 8 時間から回復し始め、投与後 24 時間には腫瘍組織のベースライン値に戻った（図 2.6.2-10）。

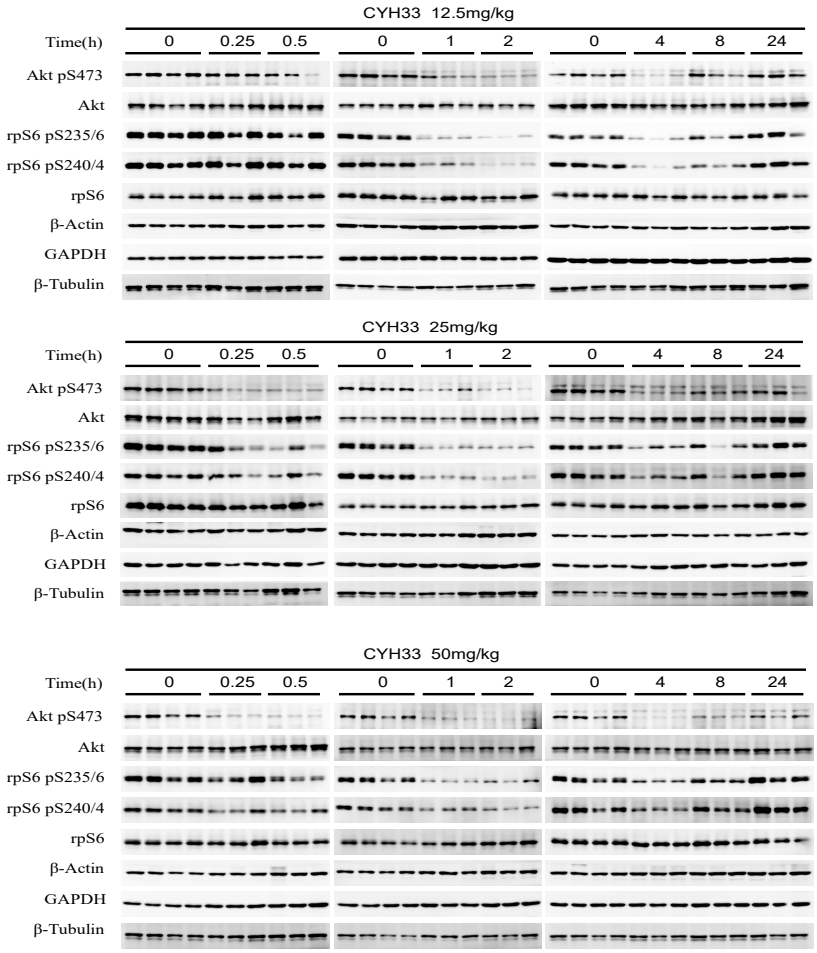


図 2.6.2-10. CYH33 単回経口投与後の KYSE410 異種移植モデルの腫瘍組織における PI3K シグナル伝達経路に対する CYH33 の作用

以上から、KYSE410 ヒト食道癌異種移植モデルでは、CYH33 は PI3Kα を標的として PI3K 経路を用量及び時間依存的に阻害した。

2.6.2.2.2.5 マウスを用いた HGC-27 胃癌異種移植モデルにおける CYH33 の *In Vivo* PK/PD 試験

本試験の目的は、ヒト胃癌細胞株 HGC-27 由来異種移植モデルにおいて、異なる用量の CYH33 を単回投与し、*in vivo* での薬物動態/薬力学（PK/PD）関係を検討することであった（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-4）。腫瘍移植し平均腫瘍サイズが約 345 mm^3 に達した後、Day 22 に CYH33 の投与を開始した。各群は担癌マウス 3 匹とした。実験計画表（表 2.6.2-15）に示した所定の投与レジメンに従って、被験物質をマウスに投与した。最終投与 2 時間後にすべてのマウスを安楽死させ、PK 及び PD 解析用の血漿及び腫瘍組織を採取した。HGC-27 異種移植モデルの腫瘍組織における p-AKT（Ser473）タンパク質に対する CYH33 の作用は、それぞれ Meso Scale Discovery（MSD）社の試験法及びウェスタンブロット法により評価された（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-5）。

表 2.6.2-15. マウスを用いた HGC-27 胃癌異種移植モデルにおける CYH33 の *in Vivo* PK/PD 試験の投与レジメン

Group No.	Treatment (3 female/group)	Dosage (mg/kg) [a]	Dose volume (μL/g)	Route	Schedule
1	0.5% CMC-Na+0.5% Tween80	-	10	PO	Single dose
2	CYH33	0.1	10	PO	Single dose
3	CYH33	0.26	10	PO	Single dose
4	CYH33	0.64	10	PO	Single dose
5	CYH33	1.6	10	PO	Single dose
6	CYH33	4	10	PO	Single dose
7	CYH33	10	10	PO	Single dose
8	CYH33	25	10	PO	Single dose
9	CYH33	62.5	10	PO	Single dose

Note: [a.] The dose levels of CYH33 in the table were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate.

MSD 試験では図 2.6.2-11 に示すように、HGC-27 異種移植モデルにおいて、CYH33 を 0.1 mg/kg、0.26 mg/kg、0.64 mg/kg、1.6 mg/kg、4 mg/kg、10 mg/kg、26 mg/kg、62.5 mg/kg の用量で単回投与した 2 時間後に、腫瘍組織内の p-AKT（Ser473）濃度を有意に阻害し、阻害率はそれぞれ 45.18%（p=0.0007）、47.25%（p=0.0004）、59.03%（p<0.0001）、84.98%（p<0.0001）、86.12%（p<0.0001）、86.73%（p<0.0001）、84.23%（p<0.0001）、86.79%（p<0.0001）であった。

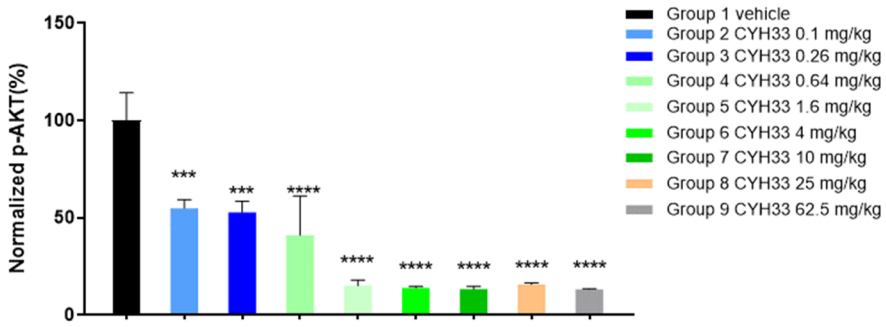


図 2.6.2-11. HGC-27 異種移植モデルにおいて CYH33 を単回経口投与した場合の 2 時間後の腫瘍組織の p-AKT（Ser473）濃度に対する CYH33 の作用

Note: Group 1 vehicle is used as the internal reference. The normalized p-AKT (%) was calculated by dividing the p/t-AKT of CYH33 Group by the average p/t-AKT of Group1 x 100%, p value was calculated by Ordinary one-way ANOVA, ***p<0.001, ****p<0.0001. p/t-AKT % was calculated using the formula provided in the MSD protocol.

HGC-27 皮下移植モデルの血漿及び腫瘍サンプル中の CYH33 濃度は LC-MS/MS 法（CTD 記載箇所：M4.2.1.1-6）により測定しており、結果の詳細を表 2.6.2-16 に示した。PK 試験及び MSD 試験の結果によると、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（図 2.6.2-12）。

表 2.6.2-16. HGC-27 異種移植モデルにおける CYH33 単回経口投与後 2 時間での血漿中及び腫瘍組織中の CYH33 濃度

Group	Dose (mg/kg)	Route	Time point (h)	Mean Plasma Concentration (ng/mL)	Mean Tumor Tissue Concentration (ng/mL)
Group 2	0.100	PO	2	8.01	12.7
Group 3	0.260	PO	2	20.1	35.8
Group 4	0.640	PO	2	42.4	57.0
Group 5	1.60	PO	2	199	208
Group 6	4.00	PO	2	288	316
Group 7	10.0	PO	2	634	727
Group 8	25.0	PO	2	1282	1700
Group 9	62.5	PO	2	2083	2043

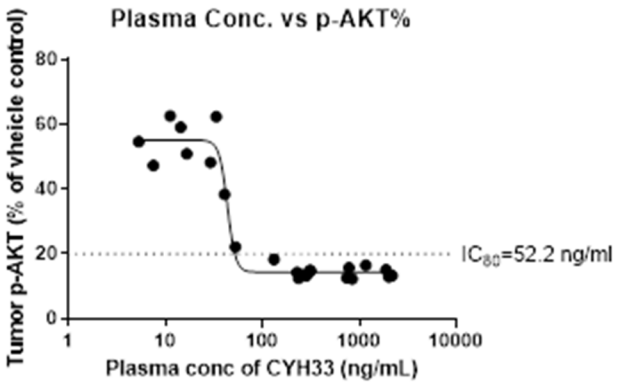


図 2.6.2-12. HGC-27 異種移植腫瘍モデルでみられる CYH33 の薬物動態/薬力学関係
Note: The IC_{80} value was determined using the four-parameter logistic (4PL) model in GraphPad Prism.

ウェスタンブロット法による試験では、CYH33 の投与後に HGC-27 腫瘍組織の総 AKT 発現レベルに有意な変化はなかったが、AKT（Ser473）のリン酸化は用量依存的に有意に減少した（図 2.6.2-13）。溶媒群と比較すると、HGC-27 異種移植腫瘍組織における p-AKT（Ser473）上の CYH33 阻害率は、0.1 mg/kg、1.6 mg/kg、10 mg/kg の用量でそれぞれ 28.62%、49.96%、96.53%であった（図 2.6.2-14）。

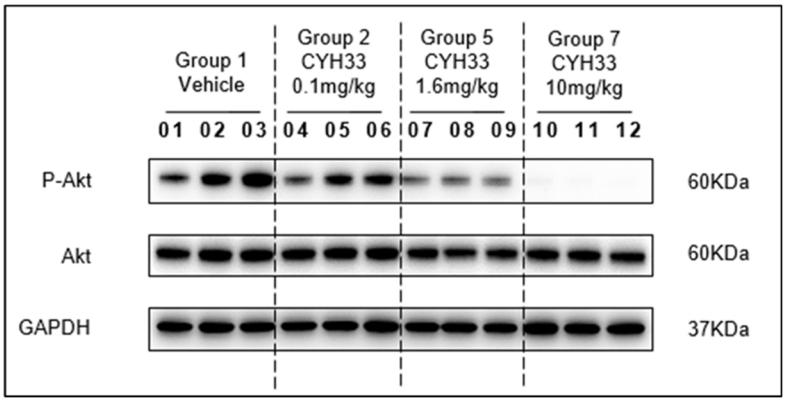


図 2.6.2-13. HGC-27 異種移植モデルにおける CYH33 単回投与後 2 時間での腫瘍組織における p-AKT（Ser473）のタンパク質発現レベル

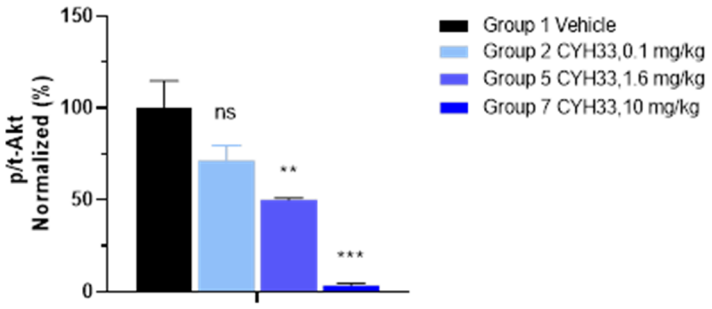


図 2.6.2-14. HGC-27 異種移植モデルにおける CYH33 単回投与後 2 時間での腫瘍組織における p-AKT（Ser473）/t-AKT の Protein Band Gray 解析

Note: Group 1 vehicle is used as the internal reference, and calculate p/t-AKT Normalized (%) by (Signal of p-AKT band/ t-AKT band of CYH33 Groups) /(Average Signal of p-AKT band/ t-AKT band of Group 1)x100%, *p* value was calculated by Ordinary one-way ANOVA, ***p*<0.01, ****p*<0.001.

以上から、HGC-27 ヒト胃癌異種移植モデルにおいて、CYH33 は PI3Kα を標的とすることにより p-AKT（ser473）を用量依存的に阻害した。

2.6.2.3 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、これによ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 I 型 PI3K キナーゼの活性を有意に阻害し、PIKK ファミリーに属する他のメンバーを含む 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、さらに試験を行った結果、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、さらに試験を行った結果、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 キナーゼの高選択性阻害剤であることが示された。

2.6.2.4 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に安全性薬理コアバッテリー試験を実施した。ラットへの 150 mg/kg までの用量での CYH33 の単回経口投与は、機能観察総合評価法（FOB）試験で評価した CNS の神経行動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投与デザインを用いた 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。ヒト胎児腎臓細胞株（HEK293）を用いたヒト ether-a-go-go 遺伝子（hERG）試験で示されたように、心室再分極遅延を惹起する可能性は低いと考えられた。

2.6.2.4.1 中枢神経系（CNS）

SD ラット 64 匹（雌雄各 32 匹）を用いて機能観察総合評価法（FOB）試験を実施した（CTD 記載箇所：M4.2.1.3-2）。動物を 4 群（雌雄各 8 匹/群）にランダムに割り付け、溶媒（1%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液）又は CYH33（溶媒に溶解）を 6、30、150 mg/kg の用量（投与量はリソバリシブメシル酸塩水和物により算出した）で 1 回強制経口投与した。すべての動物は、予定された観察後に安楽死させた。ラットに CYH33 を 150 mg/kg までの用量で単回経口投与したとき、本試験で評価した神経行動パラメータのいずれにも影響は認められなかった。

CYH33 及びその代謝物 I27 は、対照群及び CYH33 投与群の投与前サンプルでは検出されず、投与群のすべての投与後サンプルで CYH33 と I27 の両方が検出された。CYH33 及び I27 の平均濃度は用量レベルの上昇に伴い上昇した。

全 CYH33 投与群の雌、30 及び 150 mg/kg 群の雄に体重減少が認められた。150 mg/kg 群では CYH33 の投与後 1 時間に嗅動作の減少が認められた。CYH33 を 6 及び 30 mg/kg の用量で投与した雌では投与 3 時間後に体温低下が認められたが、投与 24 時間後には回復した。150 mg/kg 群では、投与後 3 時間及び 24 時間の雌に体温低下が認められた。その他、関連する SOP に従って実施したホームケージ観察、ハンドリング、刺激反応性、握力に異常は認められなかった。

以上から、ラットへの 150 mg/kg までの用量での CYH33 の単回経口投与は有意な影響を及ぼさなかったが、例外としてすべての用量群の雌及び 30 mg/kg 及び 150 mg/kg 群の雄で体重減少、150 mg/kg 群で体温低下及び一過性の嗅動作の減少が認められた。

2.6.2.4.2 心血管系

2.6.2.4.2.1 イヌにおける心血管系評価

合計 8 匹のイヌにテレメトリー送信機を埋め込み、ラテン方格法による投与デザインを用いて溶媒（1%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液）及び CYH33 の 3 用量レベル（1.5、5 及び 15 mg/kg）を投与した（投与量はリソバリシブメシル酸塩水和物により算出）。投与は、単回経口強制投与とした（CTD 記載箇所：M4.2.1.3-1）。イヌの症状観察、詳細な臨床観察、ECG、心拍数、体温及び血圧を評価した。

その結果、イヌに CYH33 を 15 mg/kg まで投与した場合でも、ECG、血圧及び体温のいずれの評価パラメータにおいても、被験物質に関連した変化は認められなかった。

2.6.2.4.2.2 HEK293 細胞における hERG チャネルを用いた心血管系評価

HEK 細胞株に発現させた hERG カリウムチャネルに対する CYH33 の作用を評価した。陰性対照（0.5%ジメチルスルホキシド）として 5 株、陽性対照（テルフェナジン）として 3 株、被験物質として 4 株の計 12 株の有効細胞を用いた（CTD 記載箇所：M4.2.1.3-4）。

本アッセイは、陰性対照が hERG 電流の安定性を 20 分超維持し、陽性対照が IC_{50} 0.054 μM で hERG を阻害したことから、妥当かつ高感度の測定法と評価された。CYH33 は、評価した種々の濃度において hERG に対し用量依存的な阻害作用を示した。最高濃度である 42.75 μM を投与した場合、CYH33 は hERG を 38.39%阻害した。したがって、IC_{50} は非線形フィッティングにより算出されなかった。hERG 電流阻害に対する CYH33 の IC_{50} 値は 42.75 μM より高いと考えられた。心室再分極遅延の可能性は低いと考えられた。

2.6.2.4.3 呼吸器系

SD ラット 40 匹（雌雄各 20 匹）を用いて呼吸機能試験を実施した。動物を 4 群（雌雄各 5 匹/群）にランダムに割り付け、溶媒（1%ヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液）又は CYH33 を 6、30、150 mg/kg の用量（リソバリシブメシル酸塩水和物により算出）で単回強制経口投与した（CTD 記載箇所：M4.2.1.3-3）。呼吸データは投与の 1 時間前から投与後 8 時間以上連続的に取得した。一回換気量（TV）、毎分換気量（MV）及び呼吸回数（Rf）を、投与後 0（投与前）、0.5、1、2、4、6 及び 8 時間後に分析した。投与前（0 時間）及び投与 8 時間後に血漿中濃度を測定した。

投与前及び対照サンプルからは CYH33 及びその代謝物 I27 は検出されなかったが、すべての CYH33 投与群では投与後に両者が検出された。血漿中濃度は投与量の増加に伴い上昇し、同一用量群の雌の血漿中濃度は雄より高かった。

以上から、CYH33 を 150 mg/kg まで単回投与した場合、8 時間以上の連続モニタリング後の TV、MV 又は Rf 値に被験物質に関連する影響は認められなかった。

2.6.2.5 その他のシステム

その他の CYH33 の安全性薬理試験は実施しなかった。

2.6.2.6 薬力学的薬物相互作用試験

2.6.2.6.1 SK-OV-3 ヒト卵巣癌異種移植モデルにおける CYH33 とオラパリブとの併用

本試験では、*PIK3CA* H1047R 変異を有する SK-OV-3 ヒト卵巣癌細胞を皮下移植した BALB/c 雌ヌードマウスを用いて、CYH33 の単剤投与及びリムパーザ®（オラパリブ）との併用投与を評価した。腫瘍体積が 150 mm^3 に達した後、マウスを 8 群（雌 6 匹/群）にランダムに割り付け、溶媒、オラパリブ（100 mg/kg）の単剤投与、CYH33（5、10、20 mg/kg）の単独投与又はオラパリブ（100 mg/kg）と CYH33（5、10 及び 20 mg/kg）の併用投与で、それぞれ 1 日 1 回 21 日間経口投与した（表 2.6.2-17）（CTD 記載箇所：M4.2.1.4-1）。

表 2.6.2-17. 被験物質の投与レジメン

Group No.	Treatment (6 female/group)	Dosage Regimen: Oral Daily Dose for 21 Days
1	Vehicle	0.5% sodium carboxymethyl cellulose [0.5% CMC-Na] 0.5% Tween 80
2	Olaparib	100 mg/kg
3	CYH33[a]	20 mg/kg
4	CYH33	10 mg/kg
5	CYH33	5 mg/kg
6	Olaparib and CYH33 combination therapy	100 mg/kg Olaparib and 20 mg/kg CYH33 PO QD for 21 days
7	Olaparib and CYH33 combination therapy	100 mg/kg Olaparib and 10 mg/kg CYH33 PO QD for 21 days
8	Olaparib and CYH33 combination therapy	100 mg/kg Olaparib and 5 mg/kg CYH33 PO QD for 21 days

Note: [a.] The dose levels of CYH33 in the table were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate.

Day 21 に、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%（TGI：75.60%）、29.04%（TGI：68.86%）及び 49.06%（TGI：48.91%）であった。一方、オラパリブ単剤投与群の T/C は 55.44%（TGI：43.37%）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%（TGI：87.72%、$p<0.01$）、20.79%（TGI：80.36%、$p<0.01$）及び 30.84%（TGI：70.32%、$p<0.01$）であった（図 2.6.2-15）。

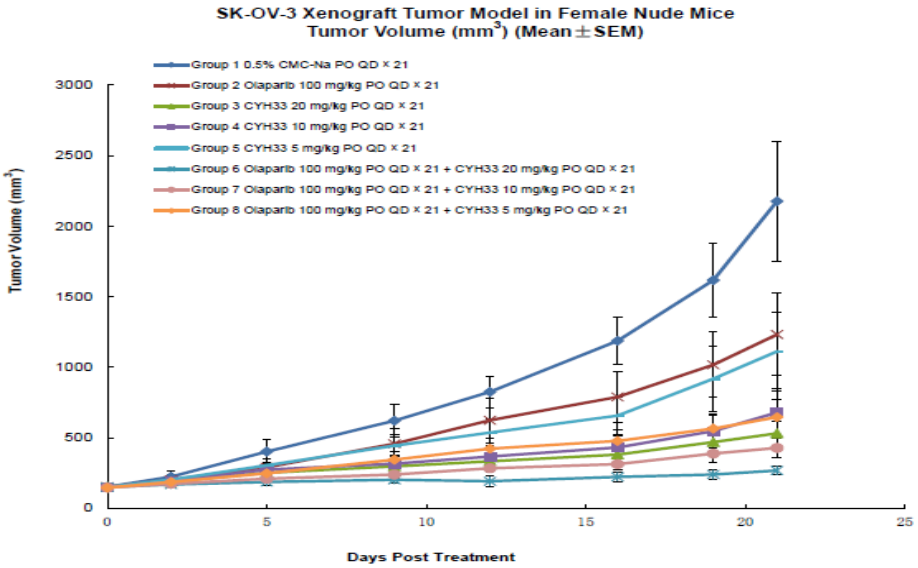


図 2.6.2-15. SK-OV-3 ヒト卵巣癌移植マウスモデルの腫瘍体積に対する CYH33 とオラパリブ併用療法の作用

また、CYH33 単剤投与群の平均腫瘍重量は、20 mg/kg 群で 0.440 g（阻害率［IR］：77.12%）、10 mg/kg で 0.575 g（IR：70.10%）、5 mg/kg で 0.957 g（IR：50.23%）であったのに対し、オラパリブ単剤投与群（100 mg/kg）の平均腫瘍重量は 1.151 g（IR：40.15%）であった。CYH33 とオラパリブの併用投与群（オラパリブ：100 mg/kg）の平均腫瘍重量は 0.194 g（CYH33：20 mg/kg）、0.351 g（CYH33：10 mg/kg）、0.504 g（CYH33：5 mg/kg）であり、IR 値はそれぞれ 89.91%、81.75%、73.79%であった（図 2.6.2-16）。

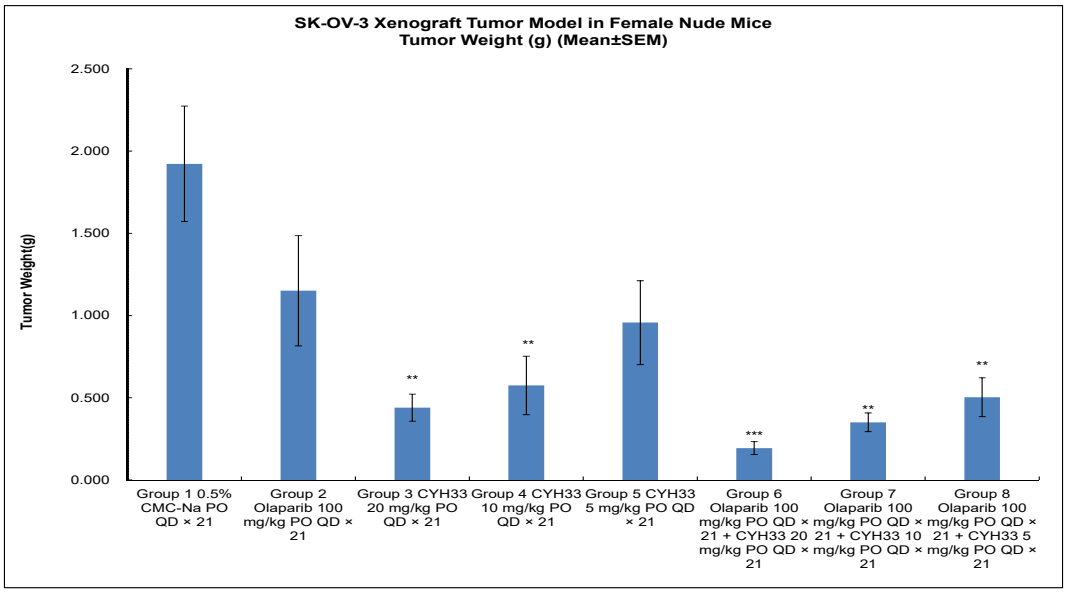


図 2.6.2-16. SK-OV-3 ヒト卵巣癌移植マウスモデルの腫瘍重量に対する CYH33 とオラパリブ併用療法の作用

* p <0.05, ** p <0.01, *** p <0.001 compared to the vehicle

本試験では、検討した用量で CYH33 及びオラパリブを投与したときの忍容性は担癌動物において良好であった。Day 21 における体重変化率（BWC%）は、対照群及びオラパリブ群でそれぞれ 0.29%及び-4.20%であった。CYH33（20、10 及び 5 mg/kg）を単剤投与した場合の BWC%は、それぞれ-8.72%、-9.63%及び-2.41%であった。CYH33（20、10 及び 5 mg/kg）とオラパリブ（100 mg/kg）とを併用投与したときの体重変化率 BWC%は、それぞれ-11.00%、-12.82%及び-8.67%であった（図 2.6.2-17）。

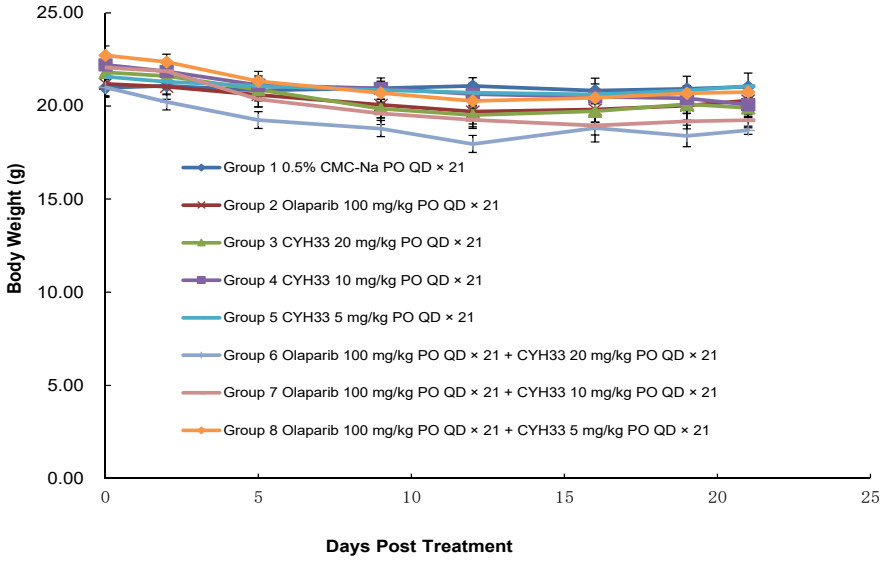


図 2.6.2-17. 担癌マウスの体重に対する CYH33 とオラパリブによる併用療法の作用

以上から、SK-OV-3 ヒト卵巣癌異種移植モデルにおいて、CYH33 単剤投与及びオラパリブ併用投与により腫瘍増殖が有意に阻害された。オラパリブ（100 mg/kg）は腫瘍増殖を抑制し、T/C は 40%を超えた。全体として、オラパリブ、CYH33 の単剤投与又は併用投与群の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。

2.6.2.7 考察及び結論

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、臨床治療の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。ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ α（PI3Kα）の p110α 触媒サブユニットをコードする *PIK3CA* 遺伝子は、卵巣明細胞癌（OCCC）の約 30%～40%で変異している（Kuo KT et al. 2009, Yang Q et al. 2020）。なお、Chandler らによって報告された、*PIK3CA* H1047R の変異及び *ARID1A* の欠失を有するトランスジェニックマウスモデルは、遺伝的及び組織学的にヒト OCCC に類似しており、*PIK3CA* の活性化変異が OCCC の腫瘍形成に関与していることが示されている（Chandler RL et al. 2015）。また、*PIK3CA* H1047R 変異を有するヒト卵巣癌細胞 SK-OV-3 から *PIK3CA* 遺伝子をノックアウトした場合、*in vitro* 増殖及び *in vivo* 腫瘍増殖を阻害することが明らかになっており（Zhang X et al. 2009）、PI3Kα 阻害剤が *PIK3CA* 変異を有する OCCC の治療に有効である可能性が示唆されている。

CYH33 及び I27 は PI3Kα 及びその変異体に対する強力な阻害剤であり、IC_{50} 値は 5～20 nM の範囲であった。対照的に、CYH33 及び I27 は、他のクラス I PI3K に対する影響が比較的弱く、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ関連キナーゼ（PIKK）ファミリーのメンバーを含む他の 300 種類を超えるキナーゼに対してはほとんど影響を及ぼさない。これらのデータから、他のキナーゼよりも、PI3Kα に対する CYH33 及びその主要代謝物 I27 の選択的効力が実証された。

細胞アッセイにおいて、CYH33 及び I27 は PI3Kα を選択的に阻害し、Rh30-Myr-p110α/β/γ/δ 細胞においてそれぞれ約 41 nM/1100 nM/約 370 nM/約 370 nM で AKT のリン酸化を阻害した。また、CYH33（約 10～100 nM）、I27（約 30～300 nM）及び BYL719（約 100～1000 nM）は、S6K1 及び rpS6 の下流エフェクターのリン酸化とともに癌細胞における AKT のリン酸化を濃度依存的に遮断した。PI3K のシグナル伝達経路を完全に阻害するために必要な CYH33 及び I27 の最小濃度は BYL719 より低かった。

CYH33 及び I27 は *PIK3CA* E545V 変異を有する OCCC 細胞株 OVMANA の増殖を強力に阻害し、IC_{50s} 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 から>10 μM の範囲であった。また、CYH33 及び I27 は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 活性化変異を導入した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）は自然発症型乳癌の増殖をほぼ完全に阻害した（Liu XL et al. 2018）。ヒト卵巣明細胞癌細胞株由来異種移植マウスモデル OVMANA（*PIK3CA* E545V）において、CYH33（5 mg/kg 及び 10 mg/kg）は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腫瘍の縮小が経時的に観察された。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。複数の異種移植モデルにおいて、CYH33 は対照とした BYL719 と同用量で比較した場合優れた抗腫瘍活性を示した。CYH33 の薬物動態/薬力学の相関性は、KYSE410 及び HGC-27 マウス異種移植モデルで実証された。*PIK3CA* E542K 変異を有する HGC-27 マウス異種移植モデルでは、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。

さらに、ヒト卵巣癌細胞株由来異種移植モデル SK-OV-3（*PIK3CA* H1047R）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 の抗腫瘍活性を検証した。

ラットへの 150 mg/kg までの用量での CYH33 の単回経口投与は、機能観察総合評価法（FOB）試験で評価した CNS の神経行動パラメータ及び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投与デザインを用いた 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。ヒト胎児腎臓細胞株（HEK293）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。

実施した主要、副次的及び安全性薬理試験から、CYH33 及びその活性代謝物 I27 が強力な選択的 PI3Kα 阻害剤であることが実証された。CYH33 及び I27 は、*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、強力な *in vitro* 及び *in vivo* 抗腫瘍活性を示した。したがって、薬理試験の結果に基づき、CYH33 を *PIK3CA* 変異を有する卵巣明細胞癌（OCCC）の治療薬として開発することは妥当と判断された。

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.

Yang Q, Zhang C, Ren Y, et al. Genomic characterization of Chinese ovarian clear cell carcinoma identifies driver genes by whole exome sequencing. Neoplasia, 2020,22(9):399-430.

Zhang X, Deng HX, Zhao X, et al. RNA interference-mediated silencing of the phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit attenuates growth of human ovarian cancer cells in vitroand in vivo. Oncology, 2009,77(1):22-32.

以上の文献の写しは、M4.3 に添付した。

目次

目次 1
略語及び略号一覧 2
2.6.3 薬理試験概要表 4
2.6.3.1 薬理試験の概要 4
2.6.3.2 効力を裏付ける試験 9
2.6.3.3 副次的薬理試験 14
2.6.3.4 安全性薬理試験 14
2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験 16
参考文献 17

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
BID	Twice a Day	1 日 2 回
[redacted]	[redacted]	[redacted]
[redacted]	[redacted]	[redacted]
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
CTG	CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay	CellTiter-Glo® 発光細胞生存率試験
ECG	Electrocardiogram	心電図
ESCC	Esophageal squamous cell carcinoma	食道扁平上皮癌
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
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
GI_{50}	Growth Inhibition 50%	細胞増殖の半数阻害濃度
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
hERG	Human Ether-a-go-go Related Gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
h/hr	Hour	時間
HEK	Human embryonic kidney cell	ヒト胎児腎臓細胞
HEK293	Human Embryonic kidney cell 293	ヒト胎児腎臓細胞株 293
HTRF	Homogeneous 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
min	Minutes	分
OCCC	Ovarian clear cell carcinoma	卵巣明細胞癌
PD	Pharmacodynamics	薬力学
PI3Kα	Phosphoinositide 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-ビスリン酸 3-キナーゼ 触媒サブユニット α
PIKK	Phosphatidylinositol-3 Kinase-Related Kinase	ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ関連キナーゼ

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	Pharmacokinetics	薬物動態
PO	Oral	経口
QD	Once a Day	1 日 1 回
RTV	Relative Tumor Volume	相対的腫瘍体積
rpS6	Ribosomal Protein S6	リボソームタンパク質 S6
[redacted]	[redacted]	[redacted]
SRB	Sulforhodamine B	スルホローダミン B
S6K1	p70 ribosomal protein S6 kinase 1	p70 リボソーム蛋白質 S6 キナーゼ 1
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

2.6.3 薬理試験概要表

2.6.3.1 薬理試験の概要

Test Article: CYH33

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in eCTD
Primary Pharmacodynamics					
- *In Vitro* Pharmacology					
Effect of CYH33 on PI3K kinase activity	HTRF Assay	*In vitro*	[redacted]	Data of pharmacodynamic study and literature	M4.2.1.1-1
Intracellular selectivity of CYH33 for type I PI3K subtype	Cellular Assay (Western Blot)	*In vitro*	[redacted]	Data of pharmacodynamic study and literature	M4.2.1.1-1
Effect of CYH33 on PI3K pathway in human cancer cell lines	Cellular Assay (Western Blot)	*In vitro*	[redacted]	Data of pharmacodynamic study and literature [redacted]-25-28985	M4.2.1.1-1 M4.2.1.1-7

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in eCTD
Anti-tumor effect of CYH33 on human breast and esophageal cancer cell lines *in vitro*	Cellular Assay (SRB method)	*In vitro*	[redacted]	Data of pharmacodynamic study and literature	M4.2.1.1-1
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)	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-24-28194	M4.2.1.1-2
Effect of CYH33 on cell cycle in human breast and esophageal cancer cell lines	Cellular Assay (Flow cytometry)	*In vitro*	[redacted]	Data of pharmacodynamic study and literature	M4.2.1.1-1
- *In Vivo* Pharmacology					
Anti-tumor Effect of CYH33 on spontaneous breast cancer in a transgenic mouse model of breast cancer driven by PIK3CA H1047R activating mutation	Animal Model	Oral Gavage	[redacted]	(Liu XL et al. 2018)	
Anti-tumor effect of CYH33 on the OVMANA human ovarian clear cell carcinoma xenograft mouse model	Animal Model	Oral Gavage	[redacted]	HAIHE-20250121	M4.2.1.1-8
Anti-tumor Effect of CYH33 on the HGC-27 human gastric cancer xenograft mouse model	Animal Model	Oral Gavage	[redacted]	HAIHE-20230201A	M4.2.1.1-3

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in eCTD
Anti-tumor effect of CYH33 on human esophageal cancer xenograft mouse models (including: KYSE410, KYSE510, EC104, EC063, and EC074)	Animal Model	Oral Gavage	[redacted]	Data of pharmacodynamic study and literature	M4.2.1.1-1
The PK/PD study of CYH33 in the KYSE410 human esophageal cancer xenograft mouse model	Animal Model	Oral Gavage	[redacted]	Data of pharmacodynamic study and literature	M4.2.1.1-1
The PK/PD study of CYH33 in the HGC-27 human gastric cancer xenograft mouse model	Animal Model	Oral Gavage	[redacted]	HAIHE-20230201 HAIHE-20230301 [redacted]23360-[redacted]01_V1.0	M4.2.1.1-4 M4.2.1.1-5 M4.2.1.1-6
Secondary Pharmacodynamic Studies					
Effects of CYH33 and I27 on the activities of 318 kinases	Eurofins protein kinase profiling platform	*In vitro*	[redacted]	[redacted]027 and [redacted]030 [redacted]031 and [redacted]033	M4.2.1.2-1 M4.2.1.2-2
Safety Pharmacology					

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in eCTD
Central Nervous System (CNS)[a]	Sprague Dawley Rats	Oral Gavage	[redacted]	[redacted]010R	M4.2.1.3-2
Cardiovascular System[a]	HEK293 cells	*In vitro*	[redacted]	19063-19039	M4.2.1.3-4
Cardiovascular System[a]	Beagle Dogs	Oral Gavage	[redacted]	[redacted]011D	M4.2.1.3-1
Respiratory System[a]	Sprague Dawley Rats	Oral Gavage	[redacted]	[redacted]019R	M4.2.1.3-3
Pharmacodynamic Drug Interactions					

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in eCTD
Combination use of CYH33 and Lynparza® (olaparib) in SK-OV-3 Human Ovarian Cancer Xenograft Mouse Model	Animal Model	Oral Gavage	[redacted]	[redacted]1905P	M4.2.1.4-1

[a]: Report contains a GLP Compliance Statement

2.6.3.2 効力を裏付ける試験

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_{50s} 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 11 Esophageal Cancer Cell Lines and 21 Breast Cancer Cell Lines *in vitro*	Cellular Assay (SRB method)	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 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	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

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vitro*			
Report Number	**Title**	**Test System**	**Noteworthy Findings**
	OVMANA		were higher than that of BYL719 at the same concentration.
[redacted]-24-28194 (M4.2.1.1-2)	Anti-Proliferation Effect of CYH33 and I27 on OVMANA cells	Cellular Assay (CellTiter-Glo ® Luminescent Cell Viability Assay)	CYH33 and I27 could inhibit the proliferation of OVMANA cells after 168 h 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	Female/R26-Pik3caH1047R; MMTV-Cre mice	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-	Anti-tumor Effect of	Mouse/BALB/c nude	Vehicle (0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80),	Treatment with CYH33 at dose levels of 2.5,

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
20230201A (M4.2.1.1-3)	CYH33 on the HGC-27 human gastric cancer xenograft mouse model	(Female)	CYH33 at 2.5, 5, and 10 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate) I27 at 10, and 20 mg/kg GDC-0077 at 5 mg/kg BYL719 at 5 mg/kg PO BID for 4 weeks	5 and 10 mg/kg significantly inhibited tumor growth in a dose-dependent manner, with T/C of 30.26%, 20.47% and 8.28%, 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 Xenografts in Mouse (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 PO QD for 21 days Study II: vehicle (0 mg/kg), BYL719 at 50 mg/kg, CYH33 at 12.5, 25, and 50 mg 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	**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**
			mg/kg, 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, and 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 as the No. 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 **EC074**: Vehicle (0.5% CMC-Na +0.5% Tween 80),	(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 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%) **EC074**: CYH33 significantly inhibited tumor growth in EC074 xenograft model with T/C

Primary Pharmacodynamic Studies – *in vivo*				
Report Number	**Title**	**Animal species**	**Dose, Schedule**	**Noteworthy findings**
			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.	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 Xenografts Mouse model	Mouse/BALB/cA (Female)	Vehicle: 0.5% CMC-Na+0.5% Tween 80, single oral dose (fast) CYH33 at 12.5, 25, and 50 mg/kg, single oral 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.
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 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 HGC-27 tumor tissue by up to 80% (IC_{80}) when the plasma concentration was 52.2 ng/mL.

PO: oral, QD: once daily, BID: twice daily, IC50: the concentration caused 50% rate of inhibition, T/C ratio: tumor growth inhibition T/C ratio.

2.6.3.3 副次的薬理試験

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.

2.6.3.4 安全性薬理試験

Test Article: CYH33

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Central Nervous System (Neurobehavioral)	Sprague Dawley Rats	Single Oral Administration	0, 6, 30, and 150 mg/kg	8/sex/group	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)	Yes	[redacted]010R (M4.2.1.3-2)

Organ Systems Evaluated	Species/Strain	Method of Administration	Doses	Gender and No. per Group	Noteworthy Findings	GLP Compliance	Report Number
Cardiovascular	HEK293 Cells	*In vitro* Study	-	NA	The CYH33 IC_{50} for hERG current inhibition was likely higher than 42.75 μM. The potential for delayed ventricular repolarization was considered low.	Yes	19063-19039 (M4.2.1.3-4)
Cardiovascular	Beagle Dogs	Single Oral Administration of Each Dose Level	0, 1.5, 5, 15 mg/kg	8 dogs with latin-square dosing design	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)	Yes	[redacted]011D (M4.2.1.3-1)
Respiratory	Sprague Dawley Rats	Single Oral Administration	0, 6, 30, and 150 mg/kg	5/sex/group	Single oral administration up to 150 mg/kg of CYH33 had no effect on respiratory parameters (dose levels were calculated as Risovalisib Mesilate Hydrate)	Yes	[redacted]019R (M4.2.1.3-3)

HEK= human embryonic kidney; GLP = Good Laboratory Practice

2.6.3.5 薬力学的薬物相互作用試験

Pharmacodynamic Drug Interactions				
Report Number	**Title**	**Test System**	**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.

参考文献

Liu Xue-Ling, Xu Yi-Chao, Wang Yu-Xiang et al. Decrease in phosphorylated ERK indicates the therapeutic efficacy of a clinical PI3Kα-selective inhibitor CYH33 in breast cancer. [J]. Cancer Lett, 2018, 433: 273–282.

以上の文献の写しは M4.3 に添付した。