

LCB-604とV-119-24の血中濃度

LCB-604 40 mg/kg IP

Time (h)	Conc. (ng/mL)			Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)
	Group 1	Group 2	Group 3		
0.5	2740	2720	2730	2730	10
1	358	228	647	411	214
2	284	72.1	98.5	152	115
4	48.8	58.3	57.2	54.8	5.2
8	7.68	8.59	10.1	8.8	1.2
24	1.51	1.53	1.36	1.47	0.09

V-119-24 40 mg/kg IP

Time (h)	Conc. (ng/mL)			Mean (ng/mL)	SD (ng/mL)
	Mouse1	Mouse2	Mouse3		
0.5	266	256	355	292	55
1	136	221	229	195	52
2	133	188	127	149	34
4	38.3	34.5	23.9	32.2	7.5
8	27.0	27.2	47.7	34.0	11.9
24	15.4	21.2	9.77	15.5	5.7

図7 LCB-604およびV-119-24のin vivo PKデータ

図6上段に示すように、平均腫瘍体積が370 mm³に達した時点から、LCB-604 (40 mg/kg)を腹腔内投与したところ、LCB-604は、投与期間中 (days 0 - 8)は、アバスチンとほぼ同等の腫瘍増殖抑制作用を示したが、アバスチンの腫瘍増殖抑制作用を増強しなかった。そして、LCB-604は、単独投与およびアバスチンとの併用において、体重に全く影響を与えなかった。また、LCB-604 40 mg/kgを腹腔内投与した際の血中濃度を図7上段に示した。LCB-604のVEGF刺激HUVECの増殖抑制作用のIC₅₀値は約200 nMであったが、この数値は、分子量を考慮すると約76 ng/mLとなる。LCB-604の蛋白結合率は測定していないが、単回投与における経時的な血中濃度、および、LCB-604は9日間連続投与していることを考え併せると、LCB-604の腫瘍増殖抑制作用をLCB-604の未変化体の血中濃度に基づいて説明することが可能であろうと推察している。

一方、図6下段に示すように、V-119-24は、投与初期に体重を若干減少させてものの、投与期間中 (days 0 - 8)は、アバスチンと同等以上の腫瘍増殖抑制作用を示し、しかも、アバスチンの腫瘍増殖抑制作用を増強した。また、V-119-24 40 mg/kgの腹腔内投与時の血中濃度を図7下段に示した。V-119-24のVEGF刺激HUVECの増殖抑制作用のIC₅₀値が4.4 μMであり、この値は、V-119-24の分子量を考慮すると約1650 ng/mLとなる。V-119-24の単回投与によるPK試験においては、投与0.5時間後の血中濃度でさえ、4.4 μMの1/5程度であり、4時間後においては、1/50程度の血中濃度になってしまうことが判明した。この結果は、V-119-24を9日間連続投与していることを考慮に入れても、V-119-24の腫瘍増殖抑制作用をV-119-24の未変化体の血中濃度に基づいて説明することは非常に困難であることを示している。さらに、アバスチンとの併用において、アバ

スチンの腫瘍増殖抑制作用を増強したことを考慮すると、V-119-24のin vivoにおける活性本体は、未変化体と異なる可能性が高いと推察された。

次年度半ばに臨床候補化合物を選定するという目標を達成するためには、2種類の骨格の異なる化合物の誘導体の合成、評価を同時並行的に進める方法では時間的に無理である。上述のようにV-119-24のin vivoの活性本体は元の化合物と異なる可能性が高く、しかも、経口投与時のBA (bioavailability; 生物学的利用能)が非常に低い (0.6%)ことを総合的に判断して、LCB-604の誘導体を合成し、その中から、臨床開発候補物質を選抜することを決断した。

LCB-604の改善すべき主な点は、①経口投与時のBAを改善すること、および②VEGF刺激HUVEC増殖抑制活性を増強することである。

LCB社は代表的なV-103シリーズ化合物 (20 mg/kg)を経口投与し、血中濃度を経時的に測定するin vivo PK試験を実施し、経口投与後の体内動態の構造活性相関に関する知見を蓄積していた。そしてこの知見に基づき、LCB-604の体内動態を改善する方法として、benzimidazole環をbenzothiazole環に変換する方向が示唆されたことから、この方向に従って、LCB-451およびLCB-604のbenzothiazole型誘導体であるLCB-630およびLCB-631を合成した。

LCB-604とLCB-631のin vivo PKデータ

LCB-604

LCB-604 Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C ₀ (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
IV	10	3.28	NA	9054	1146	1173	115	NA
Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
IP	40	4.30	0.5	2730	2165	2175	54.1	46.4
Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
PO	40	1.80	0.5	92.0	227	239	5.7	5.1

LCB-631

LCB-631 Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C ₀ (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
IV	5	3.46	NA	4195	848	879	170	NA
Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
IP	20	6.41	0.5	1250	1298	1318	64.9	37.5
Route	Dosing (mg/kg)	t _{1/2} (h)	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _{last} (h*ng/mL)	AUC _{inf} (h*ng/mL)	AUC _{last} /D (h*mg/mL)	F (%)
PO	20	6.32	0.5	61.7	327	352	16.4	10.0

図8 LCB-631のin vivo PKデータ

図8に、LCB-604とLCB-631のin vivo PKデータを示す。

図8に示すように、LCB-631の経口投与時のBA (F)およびAUC_{last}/D値は、LCB-604のそれぞれ約2倍および約3倍となったことから、予想通りに体内

動態が改善されたと考えられる。

次いで、LCB-604とLCB-631とについて、VEGF刺激HUVEC、EGM2刺激HUVEC、ヒト大腸がん細胞株LS174T細胞、およびヒト皮膚由来繊維芽細胞の増殖に対する作用を比較した。

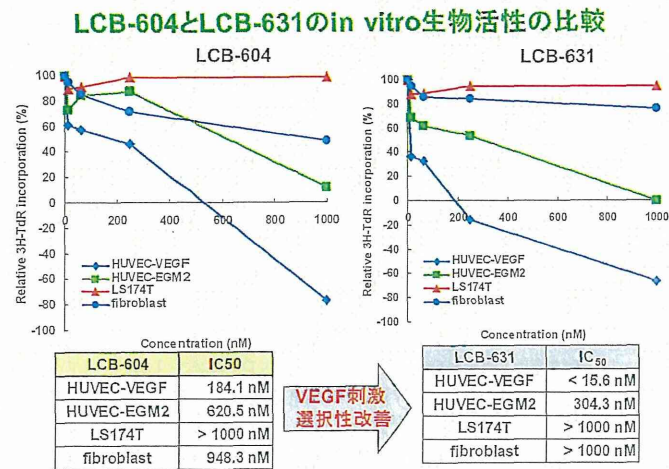


図9 LCB-603とLCB-631のin vitro生物活性

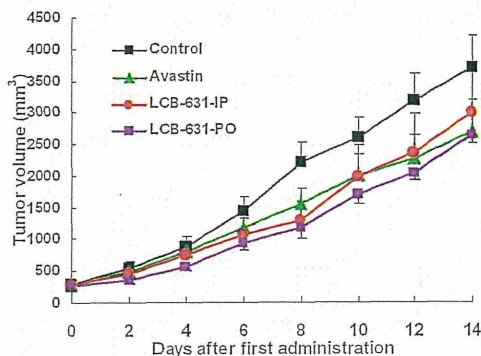
図9に示すように、VEGF刺激HUVECの増殖に対するLCB-631のIC₅₀値は、LCB-604のそれの10倍以上良好な値であった。その後、LCB-631のIC₅₀値を確定するため、4回検討を行い、IC₅₀値は、約34 nMであると結論付けたことから、LCB-604のそれに比べ約5倍改善されたことになる。一方、LS174T腫瘍細胞や繊維芽細胞に対するLCB-631のIC₅₀値は、LCB-604のそれと同程度であることから、LCB-631は、VEGF刺激HUVECに対して選択性が向上したと考えられた。

LCB-631のVEGF刺激HUVECの増殖に対するIC₅₀値が改善され、LCB-631のIC₅₀値の34 nMは、LCB-631の分子量を考慮すると13.5 ng/mLとなる。LCB-631の蛋白結合率は測定していないが、LCB-631の単回投与における血中濃度の経時的変化、LCB-631は9日間連続投与する予定であること、および、LCB-604の血中濃度と腫瘍増殖抑制作用の関係を考慮に入れると、少なくとも、LCB-631 20 mg/kgの腹腔内投与においては、明らかな腫瘍増殖抑制作用が観察される可能性が高いと推察された。さらに、LCB-631 40 mg/kgを経口投与すれば、腫瘍増殖抑制作用が観察される可能性があることも推察された。そこで、LS174Tをヌードマウスに皮下移植したxenograftモデルを用いて、平均腫瘍体積が276 mm³に達した時点から、LCB-631の投与を開始した。

図10に示すように、LCB-631 20 mg/kgを腹腔内投与した場合には、アバスタチンと同程度の腫瘍増殖抑制作用が観察された。そして、興味深いことに、LCB-631 40 mg/kgを経口投与した場合にも、アバスタチンと同等以上の腫瘍増殖抑制作用が観察された。さらに、LCB-631を5, 15, 45 mg/kg経口投与した際

に、用量依存的な腫瘍増殖抑制作用が観察された(データ未掲載)。これら結果は、“「アバスタチン」と同等以上の薬効を有する、経口投与可能な安価に製造することができる低分子医薬品を開発する”という目標に向けて大きく前進したことを示す。

LCB-631とAvastinの腫瘍増殖抑制作用



LS174T細胞をヌードマウスに皮下移植した。1週間後に各マウスの腫瘍体積を測定し、次の4つのグループに分け(各群5匹、平均腫瘍体積、276 mm³)、その日をday 0とした。以下に示す投与スケジュールに従って化合物の投与を実施した。
 1. Control (PBS, days 0 - 8 i.p.)
 2. Avastin 5 mg/kg day 0, 3, 7 i.p.
 3. LCB-631 20 mg/kg days 0 - 8 i.p.
 4. LCB-631 40 mg/kg days 0 - 8 p.o.

図10 LCB-631の腫瘍増殖抑制作用

LCB-630 & LCB-631のキナーゼパネル

Kinase	% Inhibition				
	L-451 10µM	L-604 10µM	L-630 10µM	L-631 10µM	L-633 10µM
EGFR	43.7	63.7	2.5	5.5	4.5
EGFR_1mM	-7.4	-2.8	-1.6	-4.3	-2.5
FGFR1	26.0	15.1	7.2	1.6	-1.4
FGFR1_1mM	3.5	4.0	0.9	2.3	-0.6
IGF1R	2.9	-9.1	-12.1	-9.4	-12.6
IGF1R_1mM	-3.9	-4.8	-3.8	-3.8	-3.6
KDR	58.9	45.5	1.4	6.2	3.3
KDR_1mM	16.6	8.8	-2.0	-2.1	-3.4
TRKA	99.3	96.5	9.0	20.7	19.7
TRKA_1mM	93.1	85.7	0.3	1.9	0.5
TRKB	106.7	102.4	8.7	17.3	11.4
TRKB_1mM	90.5	75.6	6.3	11.5	4.5
TRKC	99.2	96.0	4.9	12.8	8.9
TRKC_1mM	83.7	66.5	-0.8	-1.4	-2.9

図11 LCB-604とLCB-631のキナーゼ活性抑制作用

さらに、骨格にbenzimidazole環を有するLCB-451、LCB-604とそれぞれのbenzothiazole環誘導体であるLCB-630、LCB-631、およびbenzothiazole環に他の置換基が導入されているLCB-633について、7種類のチロシンキナーゼに対する直接的な作用を検討した。その結果、図11に示すように、benzimidazole環をbenzothiazole環に変更することによって10 µMの濃度における直接的なキナーゼ阻害活性が減弱することが判明した。ある種のキナーゼを抑制することにより予期せぬ副作用が発生する可能性があることを考慮すると、今回の結果は予期せぬ副作用の低減につながると考えられるため、非常に興味深いと考えている。

【リード化合物誘導体の作用機序の解析】

図12に、提案者が目指す低分子VEGF阻害薬の作用機序とその証明法の模式図を示す。

すなわち、目標とする低分子化合物は、VEGFに結合することにより、VEGFとVEGF受容体2 (VEGFR2)との相互作用を減弱することにより、VEGFR2の1175番目のチロシンのリン酸化を抑制し、その結果として下流のシグナル伝達を抑制することを目指して設計している。そして、各作用段階で、低分子化合物が目標通りの作用を示しているか否かについては、以下のように検討している。1) SPR (surface plasmon resonance) 法、NMR法および共結晶法により、低分子化合物が、VEGFに結合していることを確認する。2) VEGFとVEGFR2の相互作用については、VEGF₁₆₅により引き起こされるVEGFR2の1175番目のチロシンのリン酸化の状態をSureFire法により検討し、そのリン酸化抑制作用は、低分子化合物のチロシンキナーゼの直接的な抑制作用に起因するものではないことをリコンビナントVEGFR2チロシンキナーゼに対する直接的な抑制作用を検討することにより、確認している。3) さらに、下流のシグナルに対する効果は、VEGF刺激時HUVECの増殖に対する効果として確認している。

VEGF阻害剤の作用機序と証明方法

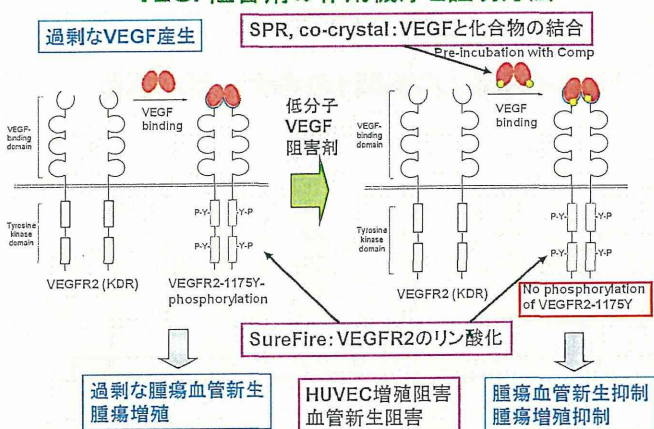


図12 VEGF阻害剤の作用機序とその証明法の模式図

上述のように、V-119-24は、弱いながらVEGF刺激HUVECの増殖を抑制し、VEGF₁₆₅により誘発されるHUVEC上のVEGFR2の1175番目のチロシンのリン酸化を直接的なチロシンキナーゼ抑制作用を介さず抑制する。そして、SPR法によりVEGF蛋白質に結合することが明らかになったことから、提案者の想定する作用機序により、VEGFシグナルを抑制している可能性が高い有望なリード化合物であると考えられた。しかし、in vivoの薬理学的・薬物動態学的検討により、in vivoの活性本体がV-119-24自身ではなく代謝産物である可能性が極めて高いと考えられたことから、V-119シリーズ化合物のリード骨格としての追及を中止した。

一方、V-103シリーズのLCB-604は、in vivoの活性本体が未変化体である可能性が高いことが明らかになったことから、リード骨格として追及する決断を下した。そして、薬物動態の改善を目標として、benzimidazole環をbenzothiazole環に変更した誘

導体LCB-631を合成したところ、LCB-631は、LCB-604に比べて、in vivo PKプロフィールのみならず、in vitro活性、腫瘍増殖抑制作用も改善されていることが判明した。すなわち、LCB-631は、VEGF刺激HUVECおよびLS174T細胞の増殖に対するIC₅₀値がそれぞれ34 nMおよび1000 nM以上 (別の実験で14.2 μMと判明)であり、LS174Tを皮下移植したxenograftモデルに対して、経口投与により、アバスチンと同程度の腫瘍増殖抑制作用を示すことが判明した。

そこで、LCB-631の作用機序の解析を実施したところ、SureFire法により、LCB-631は、2 μMの濃度において、VEGF₁₆₅により誘発されるVEGFR2の1175番目のチロシンのリン酸化をほぼ完全に抑制することが示され (データ未掲載)、このリン酸化抑制作用は直接的なVEGFR2チロシンキナーゼ阻害作用に起因するものではないことが判明した (図7)。以上のことから、生物活性の面からは、LCB-631は、提案者が想定している作用機序に従って生物学的活性を発揮している可能性が示唆された。

この可能性を検証するために、SPR法により、LCB-631のVEGF蛋白質への結合を検討したところ、RU_k < 5となり、結合していることを示す証拠は得られなかった。ここで、SPR法に用いているVEGF蛋白質は、VEGF₁₆₅に比べて短いVEGF₈₋₁₀₉である。この2種類の蛋白質は、立体構造が異なる可能性があることから、LCB-631やLCB-604のVEGF蛋白質への結合を証明するためには、VEGF₁₆₅蛋白質を用いたSPR試験を実施することが必要であると考えている。現在、VEGF蛋白質とLCB-631の共結晶を作成し、電子密度の解析も行っている。共結晶解析によりLCB-631とVEGF蛋白質の結合様式の詳細が明らかになれば、医薬候補化合物の設計に、インタープロテインの独自の分子設計法を最大限活用する予定である。作用機序を明らかにすることは、医薬品候補化合物の開発には必須であることから、作用機序の解明には、今後さらに注力する予定である。

D. 考察

【リード化合物誘導体の薬理的・薬物動態学的評価】

【in vitro活性】

細胞評価系であるVEGF刺激HUVECの増殖阻害活性に関しては、IC₅₀値が一桁 nMの活性を目指している。現在、LCB-631で30 nM前後の活性に到達していることから、かなり目標に近づいたと考えている。あと数倍の活性の増強を目指して、LCB-631の誘導体を合成し、構造活性相関を検討中である。

【選択性】

LS174T細胞の増殖に対するIC₅₀値とVEGF刺激HUVECのそれとの比を選択性の指標として用いると、LCB-631の場合は、約400倍となり、ほぼ満足ができる値であると考えている。

【Xenograftモデルを用いた腫瘍増殖抑制作用】

化合物投与開始時期の腫瘍体積を200 - 400 mm³にすることにより、かなり厳しい条件での評価を実施してきた。この条件で、LCB-631の経口投与は、用量依存的な腫瘍増殖抑制作用を示し、40 mg/kg

投与では、アバスチン 5 mg/kgの腹腔内投与と同等の腫瘍増殖抑制を示すことが判明したことは大きな成果であると考えている。

【安全性】

これまでに設計、合成を重ねてきた化合物群は、細胞毒性が極めて低く、細胞傷害性を示す抗がん剤のような毒性の懸念は現時点ではない。特に103シリーズ化合物については、一部の化合物で14日間の毒性試験を100 mg/kgまで実施した経緯があり、毒性を示唆する所見は見られなかった。さらに、LCB-631については、9日間の連日投与においても、体重減少などの副作用は観察されなかった。これらの結果から、平成26年1月からの開始を計画している非臨床試験、さらにはFIH (first in human)に向かうあたり自信を深めている。

【PKプロファイル】

有望化合物については、in vivo 腫瘍増殖抑制作用とin vivo PK試験を並行して実施した結果、V-119-24のin vivoの活性本体が代謝産物である可能性が示唆され、リード化合物の絞り込みの際に有益な情報となった。一方、LCB-604やLCB-631などのV-103シリーズ化合物については、in vitroのVEGF刺激HUVEC増殖抑制活性とin vivo PKデータから、腫瘍増殖抑制作用のおおまかな予測ができることが明らかになりつつある。さらに、現在、経口投与によるBAが31.7%と、目標とする数値に到達しているLCB-631の誘導体も見出している。そのため、次年度は、これらの知見をうまく活用して、PKプロファイルの改善とin vitro活性の向上を両立できる化合物をデザインすることにより、より早期の非臨床試験候補化合物の最終的な選定につなげたいと考えている。

【リード化合物誘導体の作用機序の解析】

本補助金を活用することにより、作用機序の解析の手段として、SPR法に加え、SureFire法およびNMR法の系を立ち上げることができた。V-103シリーズ化合物、特に、LCB-631に関しては、生物学的な面からは想定通りの作用機序に従って、VEGFシグナルを抑制している可能性が示唆されていることから、VEGF蛋白質に直接結合しているという証拠を得るために、SPE法、NMR法、共結晶法を総動員して、実験を実施している。

【総括】

インタープロテインは世界のフロントランナーとして、2018年には癌分野で最大の売上高となると予測されている抗VEGF抗体医薬品を同じ作用機序を有する低分子医薬品への置き換えを目指して、低分子PPI阻害薬の開発に挑戦している。当初の計画は、“平成23年度から平成24年度中に医薬候補化合物を確定し、GLPによる非臨床試験の主項目を終了

し、平成25年度に医師主導臨床試験を開始する”ことであったが、今年度は“今年度末にリード骨格の絞り込みと以降の合成展開方針を決定する”という修正計画に沿って実験を実施し、ほぼ予定通りに、LCB-631に到達することができた。このように、当初の計画に比べて遅れてはいるものの、医薬候補化合物に大きく近づく成果が得られたと考えている。実際に医薬候補化合物が特定できれば、高額医療のやり玉にあがるアバスチンの経口薬化により、より多くの患者に福音をもたらすと同時に、抗体医薬品の経口薬化の世界競争の最初の成功例となることから、その成果のインパクトは計り知れないと考えられるため、出来る限り短時間で医薬候補化合物を決定したいと考えている。さらに、欧州のファーマとアライアンス締結に向けて課題遂行を進める。

E. 結論

‘真’のイノベーションによる低分子PPI阻害薬の創薬の実現に向けて、複数の母核の化合物からリード最適化を進め、医薬候補化合物の決定への合成展開方針を決定することができた。開発体制は本補助金により強化されており、最終の医薬候補化合物を短時間で決定すべく研究開発を進めて行きたい。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
2011年10月に特許出願
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金
 (難病・がん等の疾患分野の医療の実用化研究事業研究事業 (臨床試験関係研究分野)
 分担 研究報告書

研究事業5. PARP阻害剤 医師主導治験

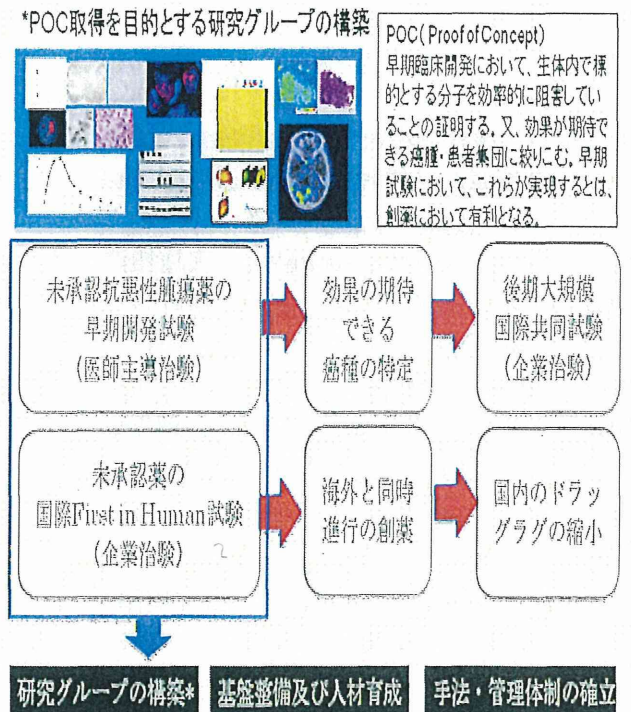
研究分担者 藤原 康弘 国立がん研究センター中央病院 科長
 研究分担者 田村 研治 国立がん研究センター中央病院 医長
 研究分担者 米盛 勸 国立がん研究センター中央病院 医員

研究要旨

遺伝子修復に関与するPARPの阻害剤であるオラパリブ (国内外未承認薬、アストラゼネカ社) を用いて、トリプルネガティブ乳癌を対象に、新たな抗がん剤との併用レジメンを開発する第I/II相試験を、POC取得を目的とする医師主導治験として実施する。又、サイトカインレセプターやBcr-Ablの下流に位置する、セリン・スレオニンキナーゼであるPIMの阻害剤を用いたGlobal First in Human試験を、アストラゼネカ社の治験として実施する。未承認薬の早期臨床試験を医師主導治験として行う体制の確立、および、国内でのドラッグ・ラグの縮小を目標とした、海外と同時進行のFirst in Human早期臨床試験を行う体制を確立する。

A. 研究目的

国内外未承認の新規薬剤の早期開発試験についてPOC (Proof of Concept) 取得を目的とする医師主導治験として実施することは新たな治療法を開発し、後期大規模開発 (国際共同試験) への橋渡しへとつながる。さらに、医師主導治験で未承認薬の早期開発の経験を通じて、その手法・管理体制の国内確立を目指す。また、Global First in Human 試験に参画することは、海外と同時進行の創薬を目指し、国内でのドラッグ・ラグの縮小を目標とすると同時に、Global First in Human 試験の経験を積むことができる。各種試験を遂行すべく基盤整備を進めるとともに人材育成を行い、今後の国内のGlobal First in Human 試験を促進する。



B. 研究方法

研究班（分担研究者）は、治験薬提供者（アストラゼネカ社）の実施したオラパリブを用いた非臨床試験と PARP 阻害薬の開発状況をもとに、研究開発計画の戦略設定、医師主導治験の治験実施計画書の作成と研究実施の体制整備を行った。早期探索目的医師主導治験であり、治験対象患者に対する薬物動態研究（Pharmacokinetics; PK）・薬力学研究（Pharmacodynamics; PD）・バイオマーカー研究（Pharmacogenomics; PDx、及び Proof of Concept; POC 研究）等が必要であるということから、基礎研究グループと広く連携し、それらの研究計画を立案した。平成25年1月より、当該医師主導治験を開始した。

PIM 阻害剤を用いた国際 First in Human 臨床試験を、国立がん研究センター中央病院と英国の Christie Hospital の2施設で、共通のプロトコル同一の治験として実施することを計画し、実施に必要な体制を整備した。結果、平成12年8月より登録を開始し、現在までに14名が登録している。（Christie Hospital 5名、国立がん研究センター中央病院9名）

（倫理面への配慮）

動物を用いる実験においては「動物愛護管理法」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛軽減に関する基準」、「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」、「厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」を遵守して行う。臨床研究はすべて「ヘルシンキ宣言」、「臨床研究に関する倫理指針」、「疫学研究に関する倫理指針」などに基いて実施する。倫理委員会（IRB）での審査・承認を受けた後に実施する。各患者より文書による説明と同意を得た上で行われる。各患者の人権、プライバシーに充分配慮し、個人情報保護を厳守した形で行われる。臨床検体の解析においては、研究に直接かかわらない「遺伝子情報管理者」を特定し「連結可能匿名化」を行う。外部への解析依頼も匿名化された番号のみを用い個人の特定が不可である形で行う。データの発表に関しても、個人を特定できるような形での発表は行わない。

C. 研究結果

【Olaparib臨床試験：医師主導治験（早期臨床開発）】

以下の研究を分担研究者で協議を行い実施した。

1. 治療開発コンセプトの検討

生体における PARP の機序、乳がんにおける PARP 阻害薬を用いた臨床試験を検討し、開発状況、治験実施計画書のコンセプト、毒性等の検討を行った。基本的な臨床試験のコンセプトについて以下に示す。

（第 I 相試験部分）

Eribulin は、1.4mg/m²を day 1, 8, に静脈投与、オラパリブはレベルに合わせて1日2回経口投与とし、21日間を1コースとする。第 I 相試験部分は、Level 1 より3例ずつ登録を行い、1コースの有害事象により用量規制毒性（DLT）を評価する。DLT の発現症例数にて最大耐用量（MTD）を確認し、第 II 相試験での推奨用量を推定する。また、レベル4まで増量しても MTD にいたらなかった場合は、レベル4を推奨用量と推定する。

Level	投与量
Level 1	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 25mg 1日2回 (50mg/day)
Level 2	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 50mg 1日2回 (100mg/day)
Level 3	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 75mg 1日2回 (150mg/day)
Level 4	エリブリン 1.4mg/m ² Day1, 8 + オラパリブ 100mg 1日2回 (200mg/day)

（第 II 相試験部分）

II 相試験は、I 相試験において推定された推奨用量を I 相試験と同じスケジュールで投与する。疾患の増悪または有害事象により治療が継続できない場合まで、治験を継続できる。

（予定症例数と研究期間試験期間）

予定登録症例数：6-44 例（I 相：最小 26-最大 24 例 II 相：20 例）

登録期間：2 年（2012 年 7 月～ 2014 年 6 月 予定）

追跡期間：最終症例登録終了後1年
 試験期間：3年（2012年7月～2015年6月
 予定）

2. 研究実施計画書案の作成

研究実施計画書案を検討し作成する研究
 業務及びプロトコールレビューを開始した。

3. 英文研究実施計画書案の作成・登録

研究実施計画書案（和文）を英文に翻訳し
 た。研究実施計画書案（英文）を治験薬提供
 者（英国アストラゼネカ社）へ提出し、研究
 実施計画書案の第一次レビューを受けた。

4. 説明・同意文書案の作成

研究実施計画書案に基づき、説明・同意文
 書案の作成を開始した。

5. 治験における薬物動態研究案の検討

第I相開発治験において、日本人における
 オラパリブの薬物動態検討が必要と判断さ
 れたことから、薬物動態解析の実施について
 検討を行った。既に行われたオラパリブ単剤
 療法の薬物動態検討結果との比較検討が行
 えるように、治験で使用した測定系である英
 国 Covance Laboratories での測定検査が必
 要と判断した。英国 Covance Laboratories
 との薬物動態測定との交渉を開始した。また、
 検体の国内・国際搬送に関して Covance
 Japan との交渉を開始した。

6. 国内規制当局勤務経験者医師による開発計画
 検討

未承認の薬剤を用いた早期探索目的の開
 発計画であることから、国内規制当局経験者
 医師と 今後の規制当局への治験届・手続き
 に関する事、治験薬提供者の行う企業治験
 の進捗状況に合わせた本研究の開発進捗管
 理に関して検討を行った。本治験で使用する
 オラパリブ錠剤単剤の国内第I相治験実施後
 に医師主導治験を開始する進捗計画が適切
 であると判断した。

7. Olaparib と抗がん剤の併用効果の検討

乳がん細胞株を用いて、オラパリブと他の
 抗がん剤（パクリタキセル、エリブリン、イ
 リノテカン等）の併用効果の関係（相乗効
 果・相加効果）を検討した。研究からは、オ
 ラパリブとエリブリンとの併用は相加効果
 を示し、併用による治療開発候補薬剤とし
 て妥当であると判断した。

8. 治験に付随する臨床研究の体制整備

国立がん研究センター研究所と連携し、以
 下の通り医師主導治験におけるバイオマ
 ーカー研究のための研究計画案と実施体制の
 整備を実施した。

薬物動態 (PK) 研究：

エリブリン単剤、オラパリブ単剤、オラパ

リブおよびエリブリン併用時のそれぞれの
 薬剤の薬物動態について評価することとし、
 エリブリン単剤 9ポイント、オラパリブ単剤
 6ポイント、併用時のエリブリン 9ポイント、
 併用時のオラパリブ 6ポイントの検体採取
 ポイントを決定した。血漿中エリブリン及び
 オラパリブの測定は、熊本大学薬学部大学院
 （浜田哲暢教授研究室）において、液体クロ
 マトグラフィー—タンデム型質量分析法
 （LC-MS/MS）を用いて実施することとし、そ
 の測定系を完成させた。

薬力学 (PD) 研究：

オラパリブ投与時の末梢血単核球 (PBMC)
 における PARP 阻害活性は国立がん研究セン
 ターもしくは委託分析機関（三菱化学メディ
 エンス株式会社）において実施することとし
 た。Plummer らの方法 (Plummer ER. et al.,
 Clin. Cancer Res. 2005, 11:3402-3409) を
 改変し、ジギトニン処理により細胞膜を破壊
 し得た粗抽出液を用いて ex vivo で PARP 活
 性をプロット法にて測定する測定系を構築
 した。(図1) オラパリブ投与時の尿検体、
 血漿検体中の PAR 代謝物の測定は、国立がん
 研究センター研究所もしくは委託分析機関
 （神奈川工科大学高村岳樹教授研究室）にお
 いて実施することとした。PARP 代謝物である
 ribosyladenosine および rinosylinosine 等
 を高速液体クロマトグラフィー—質量分析
 法 (HPLC-MS/MS) を用いて定量することとし
 た。

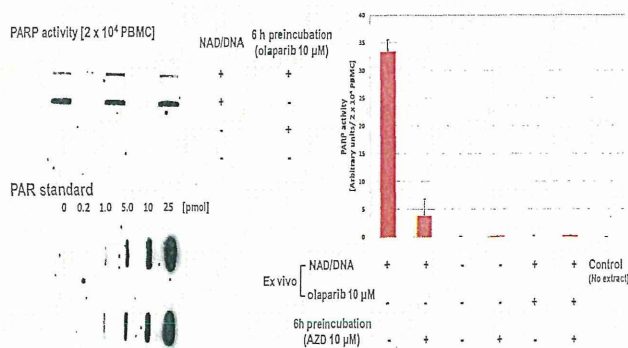


図1 オラパリブ暴露時のPBMC中のPARP活
 性のドットプロット法による測定

Pharmacogenomics (PGx) 研究：

免疫組織学的染色法 (IHC) を用いて、腫
 瘍検体における複数のがん関連タンパク質
 の発現量を測定する。具体的には、Twist,
 Snail, ERCC1 (Excision repair
 cross-complementing 1), XRCC1 (X-ray
 repair cross-complementing protein 1),

EGFR (Epidermal growth factor receptor), Cytokeratin 5/6, Cytokeratin 14, Cytokeratin 17、Nucleostemin (NS), TRRT (Telomerase reverse transcriptase), STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3)などの発現量を調べる。又、治療効果を予測するバイオマーカーの候補として、BRCA1 遺伝子変異、BRCA1 メチル化、PIK3CA 遺伝子変異を同定する。

9. 治験薬提供者との検討会議及び国際電話会議
治験薬提供者より 2011 年 12 月 20 日に以下の連絡を受けた。①卵巣癌に対して実施された Olaparib を用いたランダム化比較第 II 相治験の結果は Positive あったが、第 III 相試験に進むには不十分と判断したこと。②オラパリブカプセル剤から錠剤への海外移行試験において、適切な用量設定 (錠剤) が同定できなかったこと。①、②のため、オラパリブの乳癌領域の開発計画を再検討するということであった。このような状況から、アストラゼネカ社内でのオラパリブの今後の開発の方針が 2012 年 4 月中旬以降に決定されることとなった。2011 年 4 月 25 日、アストラゼネカ社より正式に当該医師主導治験の実施に関する許可が決定され、プロジェクトが再開された。

【PIM阻害剤臨床試験：企業主導治験

(First in Human 早期臨床開発)】

以下の研究を分担研究者や治験依頼者 (アストラゼネカ社)、共同研究者 (Malcolm Ranson, Christie Hospital NHS Trust) で協議を行った。

1. 治験名 「進行固形悪性腫瘍患者及び悪性リンパ腫患者を対象とした AZ1208 の安全性、忍容性、薬物動態、及び抗腫瘍効果を検討する非盲検用量漸増多施設共同第 I 相試験」

2. 治験のコンセプト

PIM キナーゼは、細胞周期チェックポイント、及び細胞代謝を介したアポトーシス、及び正常な細胞の増殖を制御するリン酸化基質によってプログラム細胞死を調節する、セリン/スレオニンキナーゼである。非臨床試験から、これらのタンパク質が機能的且つ機械的に細胞生存及び細胞増殖に関与していることが確認された。ま

た、これらのタンパク質の過剰発現が、急性骨髄性白血病 (AML)、前立腺癌、膀胱癌、膵臓癌を含む多くのヒトの癌において認められている。AZD1208 は、PIM1、PIM2、PIM3 の 3 種類の PIM キナーゼ阻害剤である。

3. 治験の主要評価項目

進行固形悪性腫瘍患者及び悪性リンパ腫患者に AZD1208 を経口投与したときの安全性及び忍容性を最大耐用量 (MTD) に達するまで検討し、今後の臨床評価に用いる用量を決定する。

4. 治験の副次評価項目

AZD1208 を経口投与したときの単回投与後及び反復投与後の定常状態での AZD1208 の薬物動態 (PK) を検討する。又、AZD1208 の抗腫瘍効果を検討する

5. 治験の探索的評価項目

血管新生、細胞死、細胞浸潤、並びに抗腫瘍効果及び毒性との関連性が考えられる循環血中のバイオマーカーに対する AZD1208 の作用を検討する。AZD1208 に対する薬物動態、忍容性及び有効性に影響する可能性のある遺伝子/遺伝子変異を探索する。AZD1208 投与後の薬力学的バイオマーカーの変化量を測定する。AZD1208 投与後の循環血中腫瘍細胞数 (CTC 数) の変化、並びにその変化と抗腫瘍活性との関連性を検討する。

6. 海外共同研究者との情報共有

英国、Christie Hospital と、アストラゼネカ社 (英国本社、米国支社) との間の SRC (Safety Review Committee) を 1 回 1 時間、これまでに 17 回施行した。

7. 現在までの治験の進捗

Cohort 1: 120mg/day, Cohort 2: 240mg/day, Cohort 3: 360mg/day まで用量漸増している。現在まで、14 名が登録した。用量制限毒性としては、これまで、低酸素血症、肝機能異常が報告されている。

D. 考察

【Olaparib臨床試験：医師主導治験

（早期臨床開発）】

再発・転移性のトリプルネガティブ乳癌におけるオラパリブの併用化学療法はエリブリンと設定した。治験実施施設と協議を重ねエリブリンとの併用療法の治験は過去に実施されていないため Phase I/II 試験とし、用量検討は4段階（開始用量 25mg 1日2回）と設定した。また医師主導治験における検討として、オラパリブの薬物動態を設定し、エリブリンの薬物動態・PARP の薬力学、バイオマーカーの検討は付随する臨床研究として実施することが妥当と判断した。2011年4月25日、アストラゼネカ社より正式に当該医師主導治験に対する未承認薬オラパリブの提供が許可されたため、プロジェクトを再開した。

【PIM阻害剤臨床試験：企業主導治験

（グローバルFirst in Human 第I相試験）】

ヒトに初めて投与される Global First in Human 試験として計画どおり開始した。海外と同時進行であるだけでなく、同一のプロトコルの中で、国立がん研究センター中央病院と、英国、Christie Hospital との間を行われることに意味がある。海外研究者との情報共有も円滑に行われた。各 Cohort における症例の組み入れのスピードや、組み入れ数も、当初心配されたが、現在まで、日本側が早く、又、多い結果となっている。

E. 結論

治療抵抗性再発・転移性のトリプルネガティブ乳癌に対する医師主導治験として、オラパリブとエリブリンの併用療法による Phase I/II 試験を、治験実施施設及びデータセンターと立案した。また、治験調整事務局の機能整備、治験実施施設の試験実施体制の整備、付随するバイオマーカー研究に関して国立がん研究センター研究所と研究体制整備を進めた。

PIM 阻害剤の First in Human 早期臨床試験を海外と同一のプロトコルで施行する。対応する情報交換、基盤整備、海外との電話会議、国内規制当局からの情報収集などを行った。平成24年度7月より開始予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

2. 実用新案登録
なし

3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Ochiya T	RNA interference	Schwab M	Encyclopedia of Cancer, 3rd edition	Springer	Germany	2012	
Ono M, Fujiwara Y, Ochiya T	Breast cancer stem cell: translating to the clinic	Hayat MA	Stem Cells and Cancer Stem Cells, volume 4	Springer-Verlag	Germany	2012	249-257

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Doi T, Hamaguchi T, Shirao K, Chin K, Hatake K, Noguchi K, Ohtsuki T, Mehta A, Ohtsu A.	Evaluation of safety, pharmacokinetics, and efficacy of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in the treatment of gastrointestinal (GI) cancer in a phase I clinical trial.	Int J Clin Oncol.	18(1)	87-95	2013
Doi T, Ohtsu A, Fuse N, Yoshino T, Tahara M, Shibayama K, Tagakubo T, Weinreich DM.	Phase I study of trebananib (AMG 386), an angiogenesis targeting angiopoietin-1/2 antagonist, in Japanese patients with advanced solid tumors.	Cancer Chemother Pharmacol.	71(1)	227-235	2013
Yoshino T, Yamazaki K, Yamaguchi K, Doi T, Bokaku N, Machida N, Onozawa Y, Aoyama M, Fujino T, Ohtsu A.	A phase I study of intravenous aflibercept with FOLFIRI in Japanese patients with previously treated metastatic colorectal cancer.	Invest New Drugs.	Epub ahead of print		2012
Doi T, Ohtsu A, Yoshino T, Bokaku N, Onozawa Y, Fukutomi A, Hironaka S, Koizumi W, Sasaki T.	Phase I study of TAS-102 treatment in Japanese patients with advanced solid tumours.	Br J Cancer.	107(3)	429-434	2012
Kawamoto Y, Tsuchihara K, Yoshino T, Ogasawara N, Kojima M, Ohtsuka M, Ochiai A, Bando H, Fuse N, Tahara M, Doi T, Esaki H, Komatsu Y, Ohtsu A.	KRAS mutations in primary tumours and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer.	Br J Cancer.	107(2)	340-344	2012

S Murata, Y Koga, Y Moriya, T Akasu, S Fujita, S Yamamoto, Y Kakugawa, Y Ohtake, N Saito, Y Matsumura.	Application of miRNA expression analysis of exfoliated colonocytes for colorectal cancer diagnosis.	Gastrointestinal Cancer Targets and Therapy.	2	11-18	2012
M Yasunaga, S Manabe, D Tarin, Y Matsumura.	Tailored immunotherapy depending on a quantity of tumor stroma.	Cancer Sci.	104(2)	231-237	2013
Yamamoto N, Murakami H, Nishina T, Hirashima T, Sugio K, Muro K, Takahashi T, Naito T, Yasui H, Akinaga S, Koh Y, Boku N.	The effect of CYP2C19 polymorphism on the safety, tolerability, and pharmacokinetics of tivantinib (ARQ 197): results from a phase I trial in advanced solid tumors.	Annals of Oncology	24	1-7	2013
Yoshino T, Mizunuma N, Yamazaki K, Nishina T, Komatsu Y, Baba H, Tsuji A, Yamaguchi K, Muro K, Sugimoto N, Tsuji Y, Moriwaki T, Esaki T, Hamada C, Tanase T, Ohtsu A.	TAS-102 monotherapy for pretreated metastatic colorectal cancer: a double-blind, randomized, placebo-controlled phase 2 trial.	Lancet Oncology	13(10)	993-1001	2012
Uchino K, Takeshita F, Takahashi RU, Kosaka N, Fujiwara K, Naruoka H, Sonoke S, Yano J, Sasaki H, Nozawa S, Yoshiike M, Kitajima K, Chikaraishi T, Ochiya T	Therapeutic effects of microRNA-528-5p and -3p on the inhibition of bladder cancer progression	Mol Ther	21	610-619	2013
Kosaka N, Takeshita F, Yoshioka Y, Hagiwara K, Katsuda T, Ochiya T	Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy: "Exocure" is another choice for cancer treatment	Adv Drug Deliv Rev		in press	2013

Kobayashi S, Yamada-Okabe H, Suzuki M, Natori O, Kato A, Matsubara K, Jau C, Chen Y, Yamazaki M, Funahashi S, Yoshida K, Hashimoto E, Watanabe Y, Mutoh H, Ashihara M, Kato C, Watanabe T, Yoshikubo T, Tamaoki N, Ochiya T, Kuroda M, Levine AJ, Yamazaki T	LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug-resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution	Stem Cells	30	2631-2644	2012
Ohno S, Takahashi M, Sudo K, Ueda S, Ishikawa A, Matsuyama N, Fujita K, Mizutani T, Ohgishita T, Ochiya T, Gotoh N, Kuroda M	Systemically Injected Exosomes Targeted to EGFR Deliver Antitumor or MicroRNA to Breast Cancer Cells	Mol Ther		In press	2013
Gailhouse L, Ochiya T	Cancer-related microRNAs and their role as tumor suppressors and oncogenes in hepatocellular carcinoma	Histol Histo		In press	2013
Goda T, Masuno K, Nishida J, Kosaka N, Ochiya T, Matsumoto A, Miyahara Y	A label-free electrical detection of exosomal microRNAs using microelectrode array	Chem Commun	48	11942-11944	2012
Hagiwara K, Kosaka N, Yoshioka Y, Takahashi R, U, Takeshita F, Ochiya T	Stilbene derivatives promote Ago2-dependent tumour-suppressive microRNA activity	Sci Rep	2	314	2012
Hamasaki T, Suzuki H, Shirohzu H, Matsumoto T, D'Alessandro-Gabazza CN, Gil-Bernabe P, Boveda-Ruiz D, Naito M, Kobayashi T, Toda M, Mizutani T, Taguchi O, Morser J, Eguchi Y, Kuroda M, Ochiya T, Hayashi H, Gabazza EC, Ohgishita T	Efficacy of a novel class of RNA interference therapeutic agent	PLoS One	7	E42655	2012

Hirose Y, Saijo U, Sugano Y, Takeshita F, Nishimura S, Nonaka H, Chen YR, Sekine K, Kido T, Nakamura T, Kato S, Kanke T, Nakamura K, Nagai R, Ochiya T, Miyajima A	Inhibition of Stabilin-2 elevates circulating hyaluronic acid levels and prevents tumor metastasis	Proc Natl Acad Sci U S A	109	4263-4268	2012
Suetsugu A, Honma K, Saji S, Moriawaki H, Ochiya T, Hoffman RM	Imaging exosome transfer from breast cancer cells to stroma at metastatic sites in orthotopic nude-mouse models	Adv Drug Deliv Rev		In press	2013
Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Hagiwara K, Takeshita F, Ochiya T	Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs	J Biol Chem	287	1397-1405	2012
Kosaka N, Ochiya T	Unraveling the mystery of cancer by secretory microRNA: horizontal microRNA transfer between living cells	Front Genet	2	97	2012
Morita S, Takahashi RU, Yamashita R, Toyoda A, Horii T, Kimura M, Fujiyama A, Nakai K, Tajima S, Matoba R, Ochiya T, Hatada I	Genome-wide analysis of DNA methylation and Expression of microRNAs in breast cancer cells	Int J Mol Sci	13	8259-8272	2012
Murakami Y, Toyoda H, Tanahashi T, Tanaka J, Kumada T, Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Taguchi YH	Comprehensive miRNA expression analysis in peripheral blood can diagnose liver disease	PLoS One	7	e48366	2012
Takeshita F, Takahashi RU, Onodera J, Ochiya T	In vivo imaging of oligonucleotide delivery	Methods Mol Biol	872	243-253	2012
Yoshioka Y, Kosaka N, Ochiya T, Kato T	Micromanaging iron homeostasis - Hypoxia-inducible micro-RNA-210 suppresses iron homeostasis-related proteins	J Biol Chem	287	34110-34119	2012

Evaluation of safety, pharmacokinetics, and efficacy of vorinostat, a histone deacetylase inhibitor, in the treatment of gastrointestinal (GI) cancer in a phase I clinical trial

Toshihiko Doi · Tetsuya Hamaguchi · Kuniaki Shirao ·
Kensho Chin · Kiyohiko Hatake · Kazuo Noguchi ·
Tetsuya Otsuki · Anish Mehta · Atsushi Ohtsu

Received: 25 May 2011 / Accepted: 29 October 2011 / Published online: 11 January 2012
© Japan Society of Clinical Oncology 2012

Abstract

Background Control of epigenetic changes using histone deacetylase inhibitors (HDACi) is thought to be a promising target in therapy of gastrointestinal (GI) cancer. In this study, we evaluated the safety, pharmacokinetics, and efficacy of two dosing regimens of vorinostat, an oral HDACi, in patients with GI tumors.

Methods Patients received either vorinostat 300 mg bid for 3 consecutive days followed by 4 rest days per cycle ($n = 10$) or vorinostat 400 mg qd for 21 consecutive days per cycle ($n = 6$). Pharmacokinetic parameters were assessed for the first treatment cycle. Efficacy was determined through evaluation of tumors and assessment of treatment response.

Results The median treatment duration of 300 mg bid was 52.0 days and of 400 mg qd was 51.5 days. The most common drug-related adverse events were anorexia, nausea, fatigue, and hyperglycemia. Two patients taking

400 mg qd had dose-limiting toxicities (DLTs) of thrombocytopenia. No patients taking 300 mg bid experienced DLT. Five patients taking 300 mg bid and 2 patients taking 400 mg qd maintained stable disease for >8 weeks, with the maximum duration of 245 days. Mean drug exposure (\pm SD) was generally higher with 400 mg qd (area under the curve [AUC_{0–∞}] of $7.75 \pm 2.79 \mu\text{M h}$ on Day 1 post-dose) compared with 300 mg bid (AUC_{0–∞} of $3.94 \pm 1.56 \mu\text{M h}$ on Day 1 post-dose).

Conclusions Vorinostat 300 mg bid for 3 consecutive days followed by 4 days of rest was better tolerated in patients with GI cancer than a higher once daily dose. Additionally, there were patients in both groups who achieved stable disease, most maintaining it for longer than 8 weeks, suggesting vorinostat as a possible active agent in the treatment of GI cancer.

Keywords Histone deacetylase inhibitor (HDACi) · Gastrointestinal cancer · Vorinostat · Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)

T. Doi (✉) · A. Ohtsu
National Cancer Center Hospital East, Chiba, Japan
e-mail: doi.toshi3@gmail.com

T. Hamaguchi
National Cancer Center, Tokyo, Japan

K. Shirao
Oita University, Oita, Japan

K. Chin · K. Hatake
Cancer Institute Hospital of Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan

K. Noguchi · T. Otsuki
MSD K.K., Tokyo, Japan

A. Mehta
Merck Sharpe & Dohme Corp, Whitehouse Station, NJ, USA

Introduction

While cancer has traditionally been associated with genetic damage, pharmacologic interventions for some forms of malignancies have recently focused on epigenetic damage. Epigenetic damage (i.e., the deactivation of genes after multiple cell divisions), which occurs due to factors such as aging and chronic inflammatory processes, has led to many treatment-resistant cancers such as myelodysplastic syndrome. DNA methylation is an important epigenetic marker; malignancy has been associated with hypomethylation of human tumor DNA as well as hypermethylation of tumor suppressor genes. Additionally, the acetylation of

core nucleosome histone proteins remodels chromatin, increases access to DNA of transcription factors and other co-activator proteins, and promotes gene transcription. Histone acetylation is accomplished by histone acetyltransferases (HATs), whereas the deacetylation of histones is accomplished by histone deacetylases (HDACs) [1]. In normal cells, HAT and HDAC activities are balanced and tightly regulated by homeostasis. However, excess HDAC activity is common in cancer cells and contributes to oncogenic transformation by mediating the function of oncogenic translocation products [2–4]. In patients with gastrointestinal (GI) malignancies, epigenetic deactivation of genes through DNA hypermethylation and histone deacetylation has been implicated, particularly in gastric cancer, in which patients are often affected by chronic gastritis due to *H. pylori* infection [5–7].

The activity of HDACs has been further elucidated recently to include modification of non-histone proteins such as transcription factors, tumor suppressor genes, cell cycle regulators, mediators of signal transduction, a cytoskeletal modifier, the molecular chaperone Hsp90, and SRY [8]. As a result, inhibition of HDACs was identified as a possible target for pharmacologic antineoplastic agents; clinical research with HDAC inhibitors has since validated these agents in a variety of solid tumor and hematologic malignancy settings [9–12].

There are 3 major classes of HDACs that include at least 18 isozymes; HDAC classes are separated based on size, cellular localization, number of catalytic active sites, and homology to yeast HDAC proteins. Class I HDACs are generally localized to the nucleus of cells and include HDAC1, HDAC2, HDAC3, and HDAC8 while class II HDACs shuttle between the nucleus and the cytoplasm and include two subclasses (Class IIa includes HDAC4, HDAC5, HDAC7, and HDAC9, each of which contains a single catalytic active site, and Class IIb includes HDAC6 and HDAC10, which both contain two active sites. Class III HDACs operate by a NAD⁺-dependent mechanism unrelated to the other HDAC proteins.

Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid) is a small molecule inhibitor of class I and II HDAC enzymes that has been shown to promote cell cycle arrest and apoptosis of cancer cells through regulation of gene expression [12, 13]. Vorinostat has demonstrated activity against various types of tumors in vitro and also improved survival and/or produced antitumor effects in animal models [9]. Interestingly, HDAC inhibitors, including vorinostat, reactivated RUNX3, a gastric tumor suppressor in gastric cancer-derived cells lines that is epigenetically silenced [14]. In addition, the loss of transforming growth factor- β (TGF β) response contributes to oncogenesis and has been described in GI cancer [15, 16]. Vorinostat can restore TGF β activity [17].

Vorinostat had a favorable toxicity profile in phase I and II trials in Japanese and non-Japanese patients [10, 11, 18–20]. Phase I trials to evaluate the safety and activity of vorinostat were conducted in patients with advanced solid and hematologic malignancies and demonstrated that oral vorinostat was well tolerated [18, 20]. Dose-limiting toxicities (DLTs) included anorexia, dehydration, diarrhea, fatigue, and thrombocytopenia. The maximum tolerated doses of oral vorinostat were determined to be 400 mg qd or 200 mg bid as continuous dosing, and 300 mg bid for 3 consecutive days per week, or 200 mg orally bid or tid for 14 days followed by 7 days of rest [18]. In two phase II trials, vorinostat 400 mg qd as continuous dosing was safe and effective, with an overall response rate of 24–30% in refractory advanced patients with cutaneous T-cell lymphoma (CTCL) including large cell transformation and Sézary syndrome [10, 19]. In October 2006, vorinostat was approved by the US Food and Drug Administration (FDA) for the treatment of cutaneous manifestations in patients with CTCL who have progressive, persistent or recurrent disease on or after two systemic therapies [21].

Based on these promising preclinical and clinical findings, a phase I trial of vorinostat in Japanese patients with solid tumors was conducted. In the study, vorinostat was generally well tolerated up to 500 mg daily for 14 days followed by 7 days of rest. The safety profile and pharmacokinetics data from Japanese patients were similar to those from non-Japanese patients [18, 22]. The current study was conducted in order to evaluate the safety, tolerability, and pharmacokinetics of two non-Japanese maximum tolerated doses (MTDs) of vorinostat (400 mg orally every day as continuous dosing, and 300 mg orally bid for 3 consecutive days per week) in Japanese patients; these dosing schedules were selected based on their dose intensities. An exploratory objective in this study was to determine if vorinostat has anti-tumor activity against GI cancer, especially gastric cancer.

Methods

This phase I study (Protocol 048) was conducted at 3 study centers in Japan and approved by Institutional Review Boards at each study center. All patients provided written informed consent prior to enrollment in accordance with principles of Good Clinical Practice. This study was conducted at the following sites: National Cancer Center Hospital East, Chiba, Japan; National Cancer Center, Tokyo, Japan; Oita University, Oita, Japan; Cancer Institute Hospital of the Japanese Foundation for Cancer Research, Oita, Japan; and Cancer Institute Hospital of the Japanese Foundation for Cancer Research, Tokyo, Japan.

Eligibility criteria

Patients who were eligible to enroll in this study included those with a histologically or cytologically diagnosed solid tumor with no standard therapy available or those who had failed to respond to standard therapy, with ECOG performance status of 0–2, whose life expectancy was ≥ 3 months after enrollment, and who were ≥ 20 years of age.

Patients were not eligible for enrollment if they had adverse events (AEs) from previous anti-cancer treatments that were National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) version 3.0 grade 2 or more severe (with the exception of alopecia); were positive for HIV, HBV, or HCV; had a brain tumor or brain metastasis; had any concurrent malignancy (unless they had tumors localized in mucosa/epithelium or those who had been in remission for ≥ 5 years); had anemia requiring blood transfusions within 2 weeks before enrollment; had bone marrow, hepatic, or renal dysfunction beyond predefined criteria; had peritoneal or pleural effusion requiring treatment; or had any uncontrolled concomitant illness (arrhythmias, unstable angina, congestive heart failure, uncontrolled hypertension, infections requiring systemic treatment, or continuous use of steroids). Additionally, patients were excluded if they required immunotherapy, radiotherapy, surgery, or chemotherapy or if they underwent these procedures within 4 weeks before enrollment; had hematopoietic cytokine treatment (e.g., G-CSF) within 2 weeks before enrollment; had mitomycin C or nitrosoureas within 6 weeks before enrollment; had a history of radiotherapy directed toward $>25\%$ of hematopoietic marrow cells; or had previously participated in a clinical trial of an HDAC inhibitor. The use of prophylactic concomitant use of colony stimulating factors, antibiotics, or antiemetics was prohibited during the 1st cycle.

Treatment plan

The doses studied in this clinical trial were selected based on their dose intensities. A dose regimen of 200 mg bid for 14 days followed by 7 days of rest (a dose intensity of 5600 mg) had already been determined to be well tolerated in Japanese patients with solid tumors. Because this was the first study in Japanese patients with GI cancer treated with multiple prior chemotherapies, an initial dosing regimen of 300 mg bid for 3 consecutive days per week was chosen due to a lower dose intensity (5400 mg). The 400 mg qd dose was chosen for this study because it is the regimen recommended internationally for other cancers.

Treatment was administered at a hospital for the first cycle and at home for each subsequent cycle. Two dosing regimens that had been used in the previous clinical studies conducted outside Japan were investigated in this study: group 1 and group 2.

For group 1, vorinostat 300 mg (3×100 -mg oral tablets) was administered twice daily for 3 consecutive days (within 30 min after breakfast and dinner) followed by 4 off-drug days; this was repeated 3 times for each cycle of treatment. For group 2, vorinostat 400 mg qd was administered for 21 consecutive days.

At least 3 evaluable patients for a dose-limiting toxicity (DLT) were enrolled in each dosing regimen using a standard “3 + 3” design. In order to assess the safety of each dosing regimen, we followed the procedure detailed in Fig. 1.

Additional patients were enrolled at the same level up to a total of 10 patients for each dosing regimen (a total of 20 patients) to evaluate pharmacokinetics once safety was confirmed. If a patient developed a DLT during a treatment cycle, the patient was to stop treatment for the rest of the days in the cycle, and the dose was reduced to 200 mg bid for 3 consecutive days followed by 4 off-drug days if the

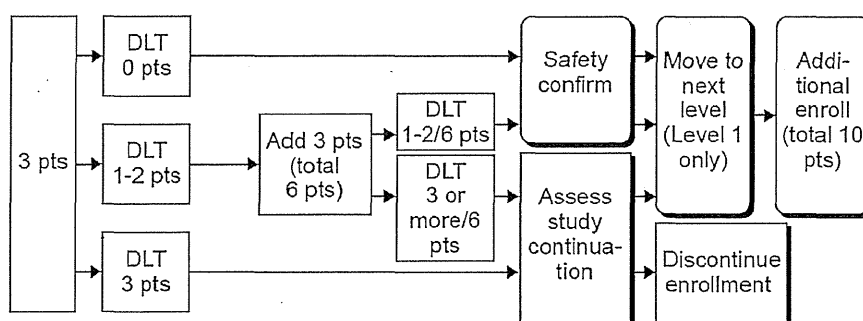


Fig. 1 Procedure for evaluating dose levels for safety based on DLTs: (1) If none of the first 3 patients at a level developed a DLT during the first cycle, the dose was deemed tolerable. (2) If 1 or 2 of the first 3 patients enrolled at a level developed a DLT during the first cycle, 3 additional patients were enrolled at the same level to further assess tolerability with 6 patients; if 2 or fewer of the 6 patients

developed a DLT, the dose was deemed tolerable. If 3 or more of the 6 patients developed a DLT, continuation of the level was to be determined by the sponsor after assessment by the efficacy and safety board. (3) If all 3 patients enrolled at a level developed a DLT during the first cycle, continuation of the level was to be determined by the sponsor after assessment by the efficacy and safety board

patient was in group 1, or the dose was reduced to 300 mg qd for 21 consecutive days if the patient was in group 2 in the subsequent cycles.

Safety

Adverse experiences (AEs) were evaluated by investigators who determined their relationship to the study drug and degree of severity. The CTCAE version 3.0 was used to grade AEs. DLTs were defined as the manifestation of one of the following drug-related AEs: (1) grade 4 neutropenia persisting for more than 5 days; (2) grade 3 or higher neutropenia with fever; (3) grade 3 thrombocytopenia requiring platelet transfusions or grade 4 thrombocytopenia; (4) grade 3 or higher non-hematological toxicities; (5) AST/ALT elevation of over 300 IU/L.

Pharmacokinetics

Serum vorinostat concentration was analyzed using a turbulent flow on-line extraction format for analyte isolation followed by reversed-phase high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. Pharmacokinetic parameters (AUC, C_{max} , T_{max} and $t_{1/2}$) were calculated according to a noncompartmental analysis from the serum concentration of vorinostat based on actual blood sampling time pre-dose and post-dose (at 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, and 24 h after administration of vorinostat) on Day 1, Day 3 of the 1st cycle at dose level 1 and Day 1, Day 21 of the 1st cycle at dose level 2. WinNonLin Professional version 5.0.1 (Pharsight Corp., Mountain View, CA, USA) was used for the pharmacokinetic analysis.

Efficacy

Tumor response was assessed according to the RECIST Version 1.0 guidelines [23] in patients with evaluable lesions. Tumor markers were chosen by investigators based on the type of cancer. All assessments required at baseline were performed within 4 weeks of the initiation of the study treatment. After initiation of treatment, tumor response was assessed by imaging at least every 6 weeks (every 2 cycles).

Target lesions were set by choosing up to 5 measurable lesions in one organ and up to 10 measurable lesions in the whole body. Tumor response was assessed by using the following criteria: complete response (CR) was assigned when all target lesions disappeared for 4 weeks; partial response (PR) was assigned when the sum of the longest diameters of the target lesions were reduced by $\geq 30\%$ for

4 weeks; progressive disease (PD) was assigned when the sum of the longest diameters of the target lesions increased by $\geq 20\%$ from the minimum sum recorded during treatment; and stable disease (SD) was assigned when the change in tumor size was not sufficient to assign PR or PD. For non-target lesions, CR was assigned when all non-target lesions disappeared or levels of all tumor markers had been normalized; incomplete response (IR) or SD was assigned when one or more non-target lesion persisted or levels of one or more tumor markers were higher than the upper limit of normal; PD was assigned for non-target tumors when there was an apparent aggravation of pre-existing non-target lesions. New lesions were recorded and treated as non-target lesions. An evaluation of overall response was also conducted by evaluating the response to target lesions, non-target lesions, and presence of new lesions.

Statistical methods

The primary purpose of the present study was to confirm safety. Therefore, the sample size was dependent on the occurrence of DLTs, although 20 patients were to be enrolled in order to obtain pharmacokinetics data. Because data were insufficient for the purpose of estimating the width of confidence intervals, there was no power calculation. A significance level of 5% (two-tailed) was used for all analyses. No adjustments were made for multiplicity since the primary objective of the study was to confirm safety.

For the evaluation of safety, the incidence of patients with AEs, drug-related AEs, and DLTs were summarized by dose levels and grades. For laboratory test parameters, vital sign parameters, and body weight, summary statistics (mean, standard error, minimum, and maximum) were provided. For the 12-lead ECG, a table of the number and percent of patients experiencing abnormalities was summarized by dose levels and time points.

For pharmacokinetic analysis, summary statistics of each pharmacokinetic parameter (AUC, C_{max} , T_{max} and $t_{1/2}$) were calculated. For calculation of AUC and C_{max} , logarithmic transformed values were used. To assess the effect of a repeated administration on pharmacokinetic parameters, the geometric mean ratio of AUC_{0–12 h} (Day 3/Day 1) and its 90% confidence interval at dose level 1 was calculated. On dose level 2, only the geometric mean ratio of AUC_{0–24 h} (Day 21/Day 1) was calculated because of limited available data ($n = 2$). For Day 8 at dose level 2, summary statistics were calculated as the trough value of serum concentration of vorinostat. For the other pharmacokinetic parameters, the appropriate transformation was done.

The exploratory analysis of efficacy was performed by summarizing the response of each dosing regimens using RECIST Version 1.0 guidelines.

Results

Patient characteristics

A total of 16 patients were enrolled in this study; 10 at dose level 1 (group 1) and 6 at dose level 2 (group 2). Baseline patient characteristics are shown in Table 1. The specific diagnoses for the patients who enrolled in this study included gastric cancer, colon cancer, and rectal cancer. The median numbers of prior regimens were 3.5 (range 2–6) for patients in group 1 and 4.5 (range 3–6) for those in group 2.

Table 1 Baseline characteristics

	300 mg bid × 3 days/ week (n = 10)	400 mg qd 21 consecutive days (n = 6)
Median age, years [range]	61 [43–73]	55 [32–66]
Male (n)	8	4
Female (n)	2	2
ECOG performance status (n)		
0	9	2
1	1	4
Disease type (n)		
Gastric cancer	8	2
Colon cancer	1	1
Rectal cancer	1	3
Number of prior chemotherapy regimens [range]	3.5 [2–6]	4.5 [3–6]

Table 2 Most common drug-related hematologic and non-hematologic AEs

	Total (n = 16)		300 mg bid × 3 days/ week (n = 10)		400 mg qd 21 consecutive days (n = 6)	
	Grade 1 or 2	Grade 3 or 4	Grade 1 or 2	Grade 3 or 4	Grade 1 or 2	Grade 3 or 4
Hematologic						
Thrombocytopenia	4	5	2	1	2	4
Lymphopenia	7	0	4	0	3	0
Non-hematologic						
Anorexia	15	0	9	0	6	0
Nausea	14	0	8	0	6	0
Fatigue	11	0	8	0	3	0
Hyperglycemia	11	0	6	0	5	0
Vomiting	9	0	5	0	4	0
Blood creatinine increased	9 ^a	0	4	0	4	0

^a One patient experienced blood creatinine increase after dose reduction from 400 mg qd to 300 mg qd

Safety and tolerability

Group 1 (300 mg bid for 3 consecutive days followed by 4 rest days)

There were 10 patients who received vorinostat in group 1. The median treatment duration was 52.0 days (range 17–243). In this group of patients, no DLTs were observed. The most common drug-related AEs included anorexia, nausea, and fatigue (Table 2). Of these drug-related AEs, the instances of thrombocytopenia were considered grade 3/4.

Four patients in group 1 experienced serious AEs. Of these, abdominal pain (grade 2) and diarrhea (grade 2), and vomiting (grade 2) and abdominal pain (grade 1) were considered by the investigator to be drug-related. Since these events required hospitalization for a follow-up, they corresponded to serious AEs. Disease progression and hyperbilirubinaemia were considered to be unrelated to the study drug.

One death was reported during this study. The patient, who had a primary disease of gastric cancer, showed disease progression at the end of the first cycle and completed the study. The patient died 26 days after the end of study therapy. The death was considered to be due to underlying disease progression and not related to the study drug.

Group 2 (400 mg qd for 21 consecutive days)

There were 6 patients who received vorinostat in group 2. The median treatment duration was 51.5 days. Of these 6 patients, 2 patients did not complete the first cycle and were not included in the DLT assessment. Of the 4 remaining patients, 2 patients developed DLTs of grade 4 thrombocytopenia. The two patients in group 2 had dose reductions from 400 mg qd to 300 mg qd. The most

common drug-related AEs included anorexia, nausea and thrombocytopenia (Table 2). There were 4 cases of thrombocytopenia that were considered to be grade 3/4 in group 2.

One patient in group 2 discontinued due to AEs. The patient experienced acetonemic vomiting and gastric hemorrhage due to primary disease.

Pharmacokinetics

In group 1, the maximum serum concentrations (C_{\max}) of vorinostat were observed at 0.50–5.97 h after the first dose on Day 1 and 0.25–6.00 h after the morning dose on Day 3 following 3 days of multiple oral doses of vorinostat 600 mg daily (300 mg \times 2) with food. Vorinostat was then rapidly eliminated with apparent $t_{1/2}$ of 0.94–1.05 h on average. The $AUC_{0-12\text{ h}}$ was $3.92 \pm 1.52 \mu\text{M h}$ after the first dose on Day 1 and $4.19 \pm 1.84 \mu\text{M h}$ after the morning dose on Day 3. C_{\max} was $1.17 \pm 0.43 \mu\text{M h}$ after the first dose on Day 1 and $1.32 \pm 0.75 \mu\text{M h}$ after the morning dose on Day 3. These results suggest that there was no significant change in absorption or elimination of vorinostat. The accumulation ratio of vorinostat following 3 days of multiple oral dose was 1.07 (90% confidence interval; 0.97, 1.18), suggesting no accumulation after administration of vorinostat with this dose regimen (Table 3).

In group 2, the C_{\max} were observed by 3.80–6.00 h after the first dose and 2.98–3.67 h after the final dose. Vorinostat was eliminated rapidly with an apparent $t_{1/2}$ of 1.17–1.49 h on average. The $AUC_{0-24\text{ h}}$ was $7.97 \pm 3.05 \mu\text{M h}$ after the first dose and $8.45 \mu\text{M h}$ after the final

dose. C_{\max} was $1.62 \pm 0.52 \mu\text{M h}$ after the first dose and $2.04 \mu\text{M h}$ after the final dose. At this dosing level, we were unable to evaluate the effect of multiple dosing on the pharmacokinetic parameters because the parameters following the final dose were calculated for only 2 patients. In these 2 patients, the accumulation ratio was 1.50, but because of limited data, these results should be viewed with caution (Table 4).

Patients with higher AUC values had more AEs compared with those who had lower AUC values. The other studies show the similar result of the correlation between AUC and AEs.

Efficacy

In group 1, of the 10 patients who received vorinostat, 5 patients achieved stable disease ≥ 8 weeks as best response: 4 patients with gastric cancer, 1 patient with colon cancer. Of these, one patient with gastric cancer showed sustained stable disease for up to 245 days. The median duration of time to progression (TTP) was 70 days (range 21–245 days).

In group 2, of the 6 patients who received vorinostat, 3 patients achieved stable disease as best response. Of these, 2 patients achieved stable disease ≥ 8 weeks: 1 patient with colon cancer and 1 patient with rectosigmoid cancer; no patients in group 2 with the specific diagnosis of gastric cancer had SD or better (Fig. 2).

Table 3 Summary of serum pharmacokinetic parameters at 300 mg bid \times 3 days/week

Parameter	Day 1 ($n = 10$, fed state)	Day 3 ($n = 10$, fed state)
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{M h}$)	3.94 ± 1.56	4.15 ± 2.15^a
$AUC_{0-12\text{ h}}$ ($\mu\text{M h}$)	3.92 ± 1.52	4.19 ± 1.84
C_{\max} (μM)	1.17 ± 0.43	1.32 ± 0.75
T_{\max} (h)	1.99 (0.50–5.97)	0.99 (0.25–6.00)
$t_{1/2}$ (h)	1.05 ± 0.32	0.94 ± 0.54^a
Accumulation ratio ^b	–	1.07 (0.97, 1.18)

$AUC_{0-\infty}$, area under the concentration time curve from zero to infinity; $AUC_{0-12\text{ h}}$, AUC from time to zero to 12 h; C_{\max} , maximum concentration; $t_{1/2}$, terminal half life; $AUC_{0-\infty}$, $AUC_{0-12\text{ h}}$ and C_{\max} , geometric mean \pm geometric SD; T_{\max} , median (range); $t_{1/2}$, harmonic mean \pm Jackknife SD

^a $n = 9$ (Since the terminal elimination phase was not able to be evaluated in one patient, the $t_{1/2}$ and $AUC_{0-\infty}$ could not be determined.)

^b $AUC_{0-12\text{ h}}$, Day 3/ $AUC_{0-12\text{ h}}$, Day 1 (geometric mean)

Table 4 Summary of serum pharmacokinetic parameters at 400 mg qd for 21 consecutive days

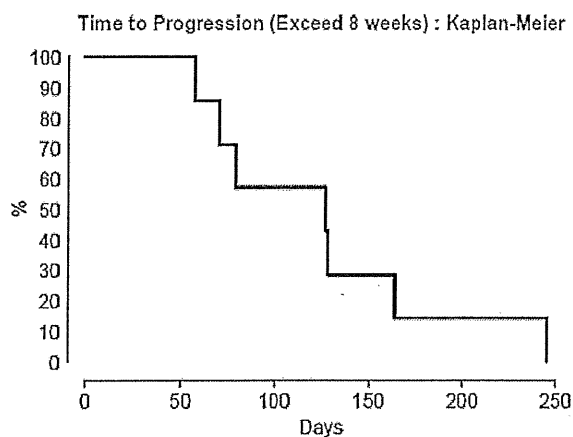
Parameter	Day 1 ($n = 5^a$, fed state)	Day 21 ($n = 2^b$, fed state)
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{M h}$)	7.75 ± 2.79	8.30
$AUC_{0-24\text{ h}}$ ($\mu\text{M h}$)	7.97 ± 3.05	8.45
C_{\max} (μM)	1.62 ± 0.52	2.04
T_{\max} (h)	3.93 (3.80–6.00)	3.33 (2.98–3.67)
$t_{1/2}$ (h)	1.49 ± 0.82	1.17
Accumulation ratio ^c	–	1.50

$AUC_{0-\infty}$, area under the concentration time curve from zero to infinity; $AUC_{0-24\text{ h}}$, AUC from time to zero to 24 h; C_{\max} , maximum concentration; $t_{1/2}$, terminal half life; $AUC_{0-\infty}$, $AUC_{0-24\text{ h}}$ and C_{\max} , geometric mean \pm geometric SD; T_{\max} , median (range); $t_{1/2}$, harmonic mean \pm Jackknife SD, accumulation ratio:geometric mean

^a Serum pharmacokinetic parameters on Day 1 in one patient were unavailable for calculation of mean and SD because the subject vomited after administration on Day 1

^b Mean serum pharmacokinetic parameters on Day 21 were calculated from 2 patients

^c $AUC_{0-24\text{ h}}$, Day 21/ $AUC_{0-24\text{ h}}$, Day 1 (geometric mean)



Type of Cancer	Number of Prior Chemotherapy Regimens	Best Response	Time to Progression (days)
300 b.i.d × 3 days/week			
Rectal cancer	3	SD	127
Gastric cancer	2	SD	164
Gastric cancer	6	SD	70
Gastric cancer	2	SD	245
Gastric cancer	4	SD	128
400 q.d.			
Rectosigmoid cancer	6	SD	79
Colon cancer	3	SD	57

Fig. 2 Patients who achieved stable disease lasting ≥ 8 weeks (56 days)

Discussion

Previous studies, conducted in Japanese and non-Japanese populations, have evaluated vorinostat in a variety of conditions, including hematologic and solid malignancies, with various dosing regimens [10, 11, 18–20]. The results of the present study demonstrated that vorinostat was generally well tolerated. The most common drug-related AEs were anorexia, nausea, fatigue, and hyperglycemia; these AEs occurred in both dosing regimens and have been observed in previous vorinostat studies [10, 11, 18–20]. These drug-related AEs were grade 1/2. In patients who experienced DLTs, pharmacokinetic exposure was relatively higher; patients with higher AUC values also had more AEs compared with those who had lower AUC values in other studies.

In the treatment of CTCL, the dosing regimen approved by the United States FDA is 400 mg qd as continuous dosing [10, 19, 21]. It should be noted that CTCL differs from solid cancers such as the gastric cancer treated in the present study. In general, prior therapies in patients with CTCL include topical treatments such as interferon- γ and bexarotene or systemic treatments such as monoclonal antibodies, immune response modifiers (IFNs and retinoids), and well-tolerated antiproliferative drugs such as

methotrexate [24], whereas combination chemotherapy is the standard therapy for patients with gastric and colorectal cancer [25].

Given the greater number and different types of prior therapies in patients with gastric and colorectal cancer, it is likely that the tolerability results observed in this study would reflect the heavily pretreated nature of this patient population. Indeed, with regard to DLTs and grade 3/4 AEs, it was apparent that the 300 mg bid dose for 3 consecutive days followed by 4 days of rest [a dose associated with a lower dose intensity (5400 mg per cycle) compared with 400 mg qd (6300 mg per cycle)] resulted in greater tolerability compared with the 400 mg qd dose. Additionally of note, because of the platelet-suppressing effects of vorinostat, hematologic effects, such as thrombocytopenia, are expected with vorinostat use. With regard to hematologic toxicities, there was an apparent advantage to the 300 mg bid dosing regimen; grade 3/4 thrombocytopenia AEs were observed in 4 out of 6 patients who received 400 mg qd for 21 consecutive days compared with only 1 out of 10 patients who received 300 mg bid for 3 consecutive days followed by 4 days of rest.

Another Phase I study recently assessed the safety and pharmacokinetics of vorinostat 100 mg bid, 200 mg bid, 400 mg qd, and 500 mg qd in 18 Japanese patients with solid tumors (roughly half of the patients had non-small cell lung cancer; the rest had bile duct cancer, invasive thymoma, esophageal cancer, and malignant mesothelioma) [20]. The results of that study were similar to those observed in the present study in terms of the types of AEs that patients experienced (thrombocytopenia, anorexia, and fatigue). However, the 400 and 500 mg qd doses in that study were better tolerated compared with the 400 mg qd dose in the present study. The mean drug exposure observed in that study was comparable to that observed in the current study for the 300 mg bid dose level, but lower than the 400 mg qd dose level in the present study [20]. Of note, the number of prior chemotherapy regimens among patients in the present study was higher compared with the number of prior chemotherapy regimens among patients in the Fujiwara et al. [20] study, again highlighting the possibility that tolerability may be affected by the nature of prior therapies. On the other hand, the serum exposure of the 400 mg qd dose level in the present study was higher than those of the 400 and 500 mg doses in that study. Identification of the reason is difficult due to the small number of enrolled patients. Also, the relationship between change in pharmacokinetics with vorinostat and the following factors cannot be demonstrated because of variation in concomitant therapy as well as the small number of enrolled patients. However, potential factors could include differences in health status of patients enrolled in the study and/or concomitant therapy during dosing with vorinostat.