目次

略号一覧表 4
2.6.4 薬物動態試験の概要文 8
2.6.4.1 まとめ 8
2.6.4.2 分析法 11
2.6.4.3 吸収 13
2.6.4.3.1 透過性、P-gp 及び BCRP の基質評価 13
2.6.4.3.2 単回投与時の経口吸収 14
2.6.4.4 分布 19
2.6.4.4.1 血漿蛋白結合 19
2.6.4.4.2 血球移行 20
2.6.4.4.3 組織分布 20
2.6.4.5 代謝（動物間の比較） 22
2.6.4.5.1 In vitro 代謝 22
2.6.4.5.2 in vivo 代謝 32
2.6.4.6 排泄 41
2.6.4.6.1 ラット 41
2.6.4.6.2 サル 42
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 42
2.6.4.7.1 In vitro での CYP 阻害 42
2.6.4.7.2 In vitro での CYP 誘導 43
2.6.4.7.3 In vitro での薬物トランスポーターとの相互作用 44
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 49
2.6.4.9 考察及び結論 49
2.6.4.10 図表 50
2.6.4.11 参考文献一覧 50

表

表 2.6.4.1-1　Brigatinib の ADME 評価試験 9
表 2.6.4.2-1　分析法の要約 12
表 2.6.4.3-1　[^{14}C]brigatinib の C2BBe1、MDR1-MDCK、MDCK 及び BCRP-MDCK 細胞における透過性並びに P-gp/BCRP 基質評価 14
表 2.6.4.3-2　Brigatinib をマウスに経口投与したときの薬物動態パラメータ 15
表 2.6.4.3-3　Brigatinib をラットに静脈内又は経口投与したときの薬物動態パラメータ 16
表 2.6.4.3-4　Brigatinib をサルに静脈内又は経口投与したときの brigatinib 及び AP26123 の薬物動態パラメータ 19

表 2.6.4.4-1　マウス、ラット、サル及びヒトにおける in vitro での brigatinib の血漿蛋白結合率 19
表 2.6.4.4-2　マウス、ラット、サル及びヒトにおける in vitro での brigatinib の血球移行 20
表 2.6.4.4-3　[^{14}C]brigatinib を白色ラットに経口投与したときの放射能の薬物動態パラメータ 21
表 2.6.4.4-4　[^{14}C]brigatinib を有色ラットに経口投与したときの放射能の薬物動態パラメータ 21
表 2.6.4.5-1　In vitro 代謝試験条件 23
表 2.6.4.5-2　Brigatinib の in vitro での固有クリアランス及び予測肝クリアランス 23
表 2.6.4.5-3　[^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームとインキュベートしたときの brigatinib 及びその代謝物の割合 28
表 2.6.4.5-4　[^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝細胞とインキュベートしたときの brigatinib 及びその代謝物の割合 28
表 2.6.4.5-5　CYP 選択的阻害剤又は抗体によるヒト肝ミクロソーム中の AP26123 生成阻害 29
表 2.6.4.5-6　Brigatinib のクリアランスにおける CYP3A4 及び CYP2C8 の寄与率 30
表 2.6.4.5-7　rhCYP による[^{14}C]brigatinib 及び代謝物（AP26123 及び M25）生成量の割合 30
表 2.6.4.5-8　[^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの各試料中の代謝物の割合 35
表 2.6.4.5-9　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの各試料中の代謝物の割合 40
表 2.6.4.7-1　Brigatinib 及び AP26123（代謝物）の CYP 阻害 IC_{50} 値 43
表 2.6.4.7-2　MDR1-MDCK 及び C2BBe1 細胞における digoxin の排出輸送に対する brigatinib の阻害作用 45
表 2.6.4.7-3　BCRP-MDCK 及び C2BBe1 細胞における cladribine の排出輸送に対する brigatinib の阻害作用 46

図

図 2.6.4.1-1　Brigatinib の構造 8
図 2.6.4.3-1　Brigatinib をマウスに経口投与したときの血漿濃度推移 15
図 2.6.4.3-2　Brigatinib をラットに静脈内又は経口投与したときの血漿中濃度推移 16
図 2.6.4.3-3　Brigatinib の溶液製剤又はカプセル剤をサルに静脈内投与又は経口投与したときの brigatinib 及び AP26123 の血漿中濃度推移 18
図 2.6.4.5-1　[^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームとインキュベーションしたときの代表的ラジオクロマトグラム 24
図 2.6.4.5-2　[^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝細胞とインキュベートしたときの代表的ラジオクロマトグラム 26
図 2.6.4.5-3　マウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソーム並びに肝細胞における brigatinib の in vitro での推定代謝経路 29

図 2.6.4.5-4　[^{14}C]brigatinib を rhCYP とインキュベートしたときのラジオクロマトグラム 31
図 2.6.4.5-5　[^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの血漿中ラジオクロマトグラム 32
図 2.6.4.5-6　[^{14}C]brigatinib を BDC ラットに経口投与したときの胆汁中ラジオクロマトグラム 33
図 2.6.4.5-7　[^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの尿中ラジオクロマトグラム 33
図 2.6.4.5-8　[^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの糞中ラジオクロマトグラム 34
図 2.6.4.5-9　[^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの in vivo での推定代謝経路 37
図 2.6.4.5-10　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの血漿中ラジオクロマトグラム 38
図 2.6.4.5-11　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの尿中ラジオクロマトグラム 39
図 2.6.4.5-12　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの糞中ラジオクロマトグラム 39
図 2.6.4.5-13　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの in vivo での推定代謝経路 41
図 2.6.4.7-1　C2BBe1 細胞における digoxin の排出輸送に対する brigatinib の影響 46
図 2.6.4.7-2　C2BBe1 細胞における cladribine の排出輸送に対する brigatinib の阻害作用 47
図 2.6.4.7-3　OCT1 発現細胞による MPP^+取り込みに対する brigatinib の阻害作用 48
図 2.6.4.7-4　MATE1 発現細胞による metoformin 取り込みに対する brigatinib の阻害作用 48
図 2.6.4.7-5　MATE2K 発現細胞による ASP 取り込みに対する brigatinib の阻害作用 49

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
ADME	absorption, distribution, metabolism, excretion	吸収、分布、代謝、排泄
ALCL	Anaplastic large-cell lymphoma	未分化大細胞リンパ腫
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase	未分化リンパ腫キナーゼ
ALP	Alkaline phosphatase	アルカリホスファターゼ
ALT	Alanine aminotransferase	アラニンアミノトランスフェラーゼ
AMP	adenosine 5'-monophosphate	アデノシン 5'-一リン酸
ASP	4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium	4-(4-ジメチルアミノスチリル)-N-メチルピリジニウム
AST	Aspartate aminotransferase	アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ
A-to-B	apical-to-basolateral	頂端膜側から基底膜側
ATP	adenosine 5'-triphosphate	アデノシン 5'-三リン酸
AUC	area under the plasma concentration-time curve	血漿中濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-24}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to 24 hours postdose	投与後 0 時間から 24 時間までの AUC
$AUC_{0-\infty}$	area under the plasma concentration-time curve from time zero to infinity	0 時間から無限大時間までの AUC
$AUC_{0-\tau}$	area under the plasma concentration-time curve over the dosing interval	投与間隔時間における AUC
AUC_{all}	area under the plasma concentration-time curve from time 0 to the last measurable time point or to the last time point that is below the limit of quantitation and assumed as zero for calculations	0 時間から最終測定可能時点又は定量下限未満を下回り計算上 0 と仮定される最終時点までの AUC
AUC_{last}	area under the plasma concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration above the lower limit of quantitation	0 時間から定量下限を上回る最終測定可能時点までの AUC
BA	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
BCRP	breast cancer resistance protein	-
BDC	bile duct-cannulated	胆管ろう形成
BSEP	bile salt export pump	-
B-to-A	basolateral-to-apical	基底膜側から頂端膜側
C2BBe1	human colon carcinoma cell line	ヒト結腸癌細胞株
Cave	average plasma concentration	平均血漿中濃度
CD74	Cluster of differentiation 74	分化抗原群 74
CHMP	Committee for Medicinal Products for Human Use	-
CL	clearance	クリアランス
CLh	hepatic clearance	肝クリアランス
CL_{int}	intrinsic clearance	固有クリアランス
Cmax	maximum plasma concentration	最高血漿中濃度
CNS	Central nervous system	中枢神経系
CsA	cyclosporine A	シクロスポリン A
CSR	clinical study report	治験総括報告書
CYP	cytochromes P450	チトクローム P450
DFG	Asp-Phe-Gly	-
DMPO	Dimethylphosphine oxide	ジメチルホスフィンオキシド
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド

略号	略していない表現又は説明	
DNA	deoxyribonucleic acid	デオキシリボ核酸
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor	上皮成長因子受容体
EGFR-Del	EGFR (delE746_A750)	-
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
EML4	echinoderm microtubule-associated protein-like 4	棘皮動物微小管結合蛋白質様 4
EPAR	European Public Assessment Report	欧州公開医薬品審査報告書
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase	細胞外シグナル調節キナーゼ
EU	European Union	欧州連合
FDA	Food and Drug Administration	（米国）食品医薬品局
FIG	Fused In Glioblastoma	膠芽細胞腫における融合
FLT3	Fms-like tyrosine kinase 3	-
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue	消化管関連リンパ系組織
GeoMean	Geometric mean	幾何平均
GGT	Gamma glutamyltransferase	γ-グルタミルトランスフェラーゼ
GI_{50}	growth inhibition 50%	細胞増殖を 50%阻害する濃度
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
GSH	glutathione	グルタチオン
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HER2	human epidermal growth factor receptor type 2	ヒト上皮細胞増殖因子受容体 2
hERG	human ether-a-go-go Related Gene	ヒト遅延整流性カリウムイオンチャンネル遺伝子
HNSTD	Highest-non-severely-toxic-dose level (in nonrodents)	（非げっ歯類において）重篤な毒性が発現しない最大投与量
HPLC	high pressure liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	Inhibitory concentration 50%	50%阻害濃度
IC_{90}	Inhibitory concentration 90%	90%阻害濃度
ICH	International Conference on Harmonization	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
IGF-1	insulin-like growth factor 1	インスリン様成長因子 1
IGF-1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	インスリン様成長因子 1 受容体
IL-3	Interleukin-3	インターロイキン 3
INSR	Insulin receptor	インスリン受容体
IV	intravenous	静脈内
KB/P	blood to plasma ratio	血液－血漿比
Km	Michaelis-Menten constant	ミカエリス・メンテン定数
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LD50	Lethal dose eliciting 50% mortality	50%致死量
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱水素酵素
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数
MAA	Marketing Authorization Application	販売承認申請
MATE	multidrug and toxic compound extrusion	-
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎
MDR1	multi-drug resistance 1	多剤耐性遺伝子
MET	Hepatocyte growth factor receptor	肝細胞増殖因子の受容体チロシンキナーゼ

略号	略していない表現又は説明	
MPP+	methylphenylpyridinium	メチルフェニルピリジニウム
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MTD	Maximum Tolerated Dose	最大耐量
NA	Not applicable	該当せず
NADPH	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NDA	New Drug Application	新薬承認申請
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
NOEL	No-observed-effect level	無影響量
NPM	nucleophosmin	ヌクレオフォスミン
NSCLC	Non-small cell lung cancer	非小細胞肺癌
NTCP	sodium taurocholate cotransporting polypeptide	-
OAT	organic anion transporter	-
OATP	organic anion-transporting polypeptide	-
OCT	organic cation transporter	-
ORR	objective response rate	客観的奏効率
P-	Phosphorylated-	リン酸化-
P_{app}	apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
PD	Pharmacodynamic	薬力学
PFS	progression-free survival	無増悪生存期間
P-gp	permeability-glycoprotein	P-糖蛋白質
PK	pharmacokinetic	薬物動態
PO	oral	経口
QD	once daily	1日1回
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RBC	red blood cell	赤血球
RET	rearranged during transfection	-
rhCYP	recombinant human Cytochromes P450	遺伝子組換えヒトチトクロム P450
ROS	c-ros oncogene 1	c-ros がん遺伝子-1
SAWP	Scientific Advice Working Party	-
SCID	Severe combined immunodeficient	重症複合免疫不全
SD	Standard deviation	標準偏差
SDC4	Syndecan 4	シンデカン 4
SDH	Sorbitol dehydrogenase	ソルビトール脱水素酵素
SEM	Standard error of the mean	平均の標準誤差
STAT3	signal transducer and activator of transcription 3	シグナル伝達兼転写活性化因子 3
STD10	Severely toxic dose eliciting ≥10% lethality (in rodents)	（げっ歯類において）供試動物の 10%以上に重篤な毒性が発現する用量
$t_{1/2}$	half-life	半減期
TDI	time-dependent inhibition	時間依存的阻害
TKI	Tyrosine kinase inhibitor	チロシンキナーゼ阻害剤
Tmax	time of maximum concentration	最高濃度到達時間
TPM3	tropomyosin 3	トロポミオシン 3
TRA	total radioactivity	総放射能

略号	略していない表現又は説明	
Tyr	tyrosine	チロシン
USPI	United States prescribing information	米国添付文書
Vd	volume of distribution	分布容積
Vmax	Maximum velocity	最大速度

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

Brigatinib（AP26113）は、非小細胞肺癌（NSCLC）に認められる ALK 融合（EML4-ALK など）を含む、anaplastic lymphoma kinase（ALK）の発がん性変異に対する経口阻害剤である。また、brigatinib は ALK-L1196M 変異など、crizotinib 耐性を示す変異型 ALK の強力な阻害剤である。Brigatinib の構造を図 2.6.4.1-1 に示す。

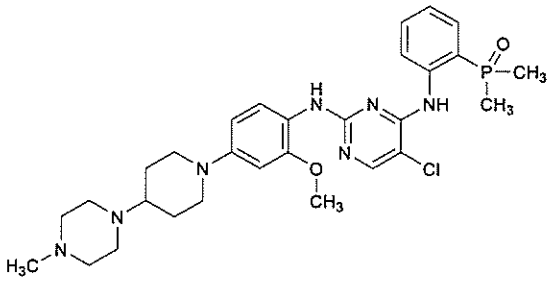


図 2.6.4.1-1　Brigatinib の構造

Brigatinib の吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）特性を本項に要約する。表 2.6.4.1-1 に、本項に記載した薬物動態／ADME 試験の概要を示す。

表 2.6.4.1-1　Brigatinib の ADME 評価試験

添付資料番号	試験の目的	試験系	brigatinib 濃度又は目標用量及び投与経路
In vitro			
4.2.2.2-1	透過性評価、トランスポーターの基質評価及び阻害	C2BBe1 細胞、トランスポーター発現細胞、トランスポーター発現膜ベシクル	0.1–120 μmol/L
4.2.2.3-1	マウス、ラット、サル及びヒトにおける血漿蛋白結合及び血球移行	マウス、ラット、サル、ヒト血漿	0.2–5 μmol/L
		マウス、ラット、サル、ヒト血漿及び全血	0.1–3 μmol/L
4.2.2.4-1	肝ミクロソーム、肝細胞及びヒト CYP 発現ミクロソームによる brigatinib の in vitro 代謝	ラット、サル、ヒト肝ミクロソーム及び肝細胞、ヒト CYP 発現ミクロソーム	1–200 μmol/L
4.2.2.4-2	マウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソーム及び肝細胞及びヒト CYP 発現ミクロソームにおける [^{14}C]brigatinib の in vitro 代謝	マウス、ラット、サル、ヒト肝ミクロソーム及び肝細胞、ヒト CYP 発現ミクロソーム	3, 30 μmol/L [^{14}C]brigatinib
4.2.2.6-1	CYP 阻害	ヒト肝ミクロソーム	0.1–100 μmol/L
4.2.2.6-2	CYP 誘導	ヒト肝細胞	0.25–20 μmol/L
4.2.2.6-3	トランスポーターの基質性	トランスポーター発現細胞	0.1–10 μmol/L
4.2.2.6-4	トランスポーターの阻害	トランスポーター発現細胞	0.0823–65 μmol/L
In vivo			
4.2.2.2-2	マウス及びラットに経口投与後の薬物動態	マウス	10, 50 mg/kg; PO
		ラット	2 mg/kg; IV 10 mg/kg; PO
4.2.2.2-3 4.2.2.2-4 4.2.2.2-5	サルに静脈内投与、経口投与及びカプセル剤として経口投与したときの薬物動態	サル	5 mg/kg; IV 15 mg/kg; PO 溶液 15 mg/kg; PO カプセル剤
4.2.2.3-2	[^{14}C]brigatinib を有色ラット及び白色ラットに経口投与後の全身オートラジオグラフィーによる組織分布	有色ラット及び白色ラット	30 mg/kg [^{14}C]brigatinib (225 μCi/kg); PO
4.2.2.4-3 4.2.2.4-4 4.2.2.4-5	[^{14}C]brigatinib を無処置及び胆管ろう形成ラットに経口投与後の薬物動態、代謝及び排泄	ラット	30 mg/kg[^{14}C]brigatinib (200 μCi/kg); PO
4.2.2.4-6 4.2.2.4-7 4.2.2.4-8	[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与した時の薬物動態、代謝及び排泄	サル	30 mg/kg [^{14}C]brigatinib (40 μCi/kg); PO

Brigatinib は排出トランスポーターの基質であるにもかかわらず、消化管からの吸収性が高かった。ラット及びサルにおける経口バイオアベイラビリティ（BA）は中等度（約 40%～53%）であった。Brigatinib のラット及びサルにおけるクリアランスは低く、分布容積は中等度、消失半減期（$t_{1/2}$）は中等度又は長かった。In vitro での brigatinib のマウス、ラット、サル及びヒト血漿蛋白結合率は中等度（64.1%～73.0%）であった。Brigatinib は、マウス、ラット、サル及びヒト血液中で、赤血球に濃縮的に分布することはなかった。

In vitro でラット、サル及びヒト肝ミクロソーム及び肝細胞により生成される brigatinib の代謝物は質的に同様であり、ヒト特異的代謝物は認められなかった。検討した全ての動物種の肝ミクロソーム及びヒトの肝細胞において brigatinib の主代謝経路は N-脱メチル化による AP26123（M36）の生成であった。M21〔グルタチオン（GSH）抱合体〕がマウス、ラット及びサル肝細胞中の主代謝物であり、AP26123 がラット及びサル肝細胞中で 2 番目に多い代謝物であった。ラット及びサル肝細胞中に認められた微量のその他の代謝物は M4（不飽和

+GSH 抱合体）及び M21a（GSH 抱合体）、M5（水酸化+GSH 抱合体）、M22（N-酸化体、AP32831）、M25（N-酸化体、AP32830）及び M13（一水酸化+グルクロン酸抱合体）であった。

[^{14}C]brigatinib をラット及びサルに経口投与したときの brigatinib の代謝物は、質的に同様であり、AP26123 の生成に至る脱メチル化反応が主代謝経路であった。ラット及びサルでは、brigatinib 未変化体が主成分で、血漿中総放射能（TRA）の 75%～84%を占め、AP26123 は 10%未満であった。

ラットに[^{14}C]brigatinib を経口投与後の尿中の主成分は brigatinib 未変化体、AP26123 及び M25 であり、それぞれ尿中 TRA の 73.46%、7.61%及び 3.15%を占めていた。3 種類の微量代謝物も検出されたが、尿中 TRA の 1%未満であった。ラット糞中の主成分は、brigatinib、AP26123 及び M28（システイン抱合体）であり、それぞれ糞中 TRA の 63.60%、8.75%及び 3.98%であった。残りの 4 種類の代謝物は、糞中 TRA の 2%未満であった。胆管ろう形成(BDC)ラットに[^{14}C]brigatinib を経口投与後の胆汁中には 26 種類の代謝物が検出され、brigatinib 及び M21、AP26123 及び M25 は、胆汁中 TRA のそれぞれ 9.11%、21.98%、21.26%及び 7.65%であった。残りの 23 種類の微量代謝物は胆汁中 TRA の 2%～5%以下であった。

サルに[^{14}C]brigatinib を経口投与後の尿中の主成分は brigatinib 及び AP26123 であり、それぞれ尿中 TRA の 52.4%及び 15.52%を占めていた。また、14 種類の微量代謝物も認められ、尿中 TRA の 0.64%～4.19%であった。サル糞中の主成分は brigatinib、AP26123 及び M28 で、それぞれ糞中 TRA の 21.93%、13.91%及び 20.39%を占めていた。残りの 7 種類の微量代謝物は、糞中 TRA の 0.99%～6.66%であった。Brigatinib はサルにおいて、広範な代謝を受け、サル糞中には多くの識別不能な構造が未知の微量代謝物が認められた。

ラット及びサルにおいて、主要な放射能排泄経路は糞中排泄であった（排泄率、ラット：87.64%、サル：66.48%）。ラット及びサルにおいて尿中排泄率はそれぞれ 7.05%及び 9.75%であった。ラット及びサル糞中の未変化体は投与放射能量のそれぞれ 55.74%及び 14.58%であった。ラット及びサル尿中の未変化体は投与放射能量のそれぞれ 5.18%及び 5.02%であり、ラット胆汁中では投与放射能量の 2.89%であった。

In vitro 試験の結果、チトクローム P450（CYP）2C8 及び CYP3A4 が brigatinib 代謝に関与する主な分子種であり、CYP3A5 の寄与は軽微であると考えられた。このため、CYP2C8 及び CYP3A4/5 誘導剤及び阻害剤は、brigatinib の薬物動態に影響を及ぼす可能性がある。

In vitro で、brigatinib 及びその代謝物 AP26123 は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP2D6 を阻害しなかった（IC_{50} 値>100 μmol/L）。Brigatinib 及び AP26123 は CYP3A4/5 によるミダゾラム 1'-水酸化を弱いながら阻害したが、IC_{50} 値は 72.9 μmol/L（brigatinib）及び 63.8 μmol/L（AP26123）であった。

ヒト肝細胞を用いて brigatinib（濃度範囲：0.25～20 μmol/L）の CYP 誘導作用を評価した結果、CYP1A2 及び CYP2B6 活性及び CYP1A2 mRNA 量が濃度依存的に低下し、CYP2B6 mRNA 量及び CYP3A4/5 活性について、ベルシェイプ型の結果であった。本試験では 2.5 μmol/L 以上の濃度で細胞毒性が認められた。Brigatinib は 2.5 μmol/L 以下の濃度で、CYP2B6 の弱い誘導剤であった。Brigatinib により CYP3A4 mRNA 量が濃度依存的に増加し、最大誘導作用は 1 μmol/L 又は 2.5 μmol/L で認められ、これより高濃度では誘導倍率が低下し、ベルシェイプ型曲線となった。

Brigatinib は P 糖蛋白質（P-gp）、breast cancer resistance protein（BCRP）及び organic anion transporting polypeptide（OATP）1A2 の基質であるが OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、organic anion transporter（OAT）1、OAT3、organic cation transporter（OCT）1、OCT2、Multidrug and toxin extrusions（MATE）1、MATE2K、bile salt export pump（BSEP）及び sodium-taurocholate cotransporting polypeptide（NTCP）の基質ではなかった。Brigatinib は in vitro で高い溶解度と膜透過性を示すことから、P-gp、BCRP 及び OATP1A2 の阻害が brigatinib の体内動態を変化させる可能性は低いと考えられる。Brigatinib は OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2 又は BSEP の輸送活性を阻害しなかったことから、これらのトランスポーターが関与する相互作用を引き起こす可能性は低いことが示された。一方で brigatinib は P-gp、BCRP、MATE1、MATE2K 及び OCT1 に対する阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 1.76、10.1、0.832、5.19 及び 6.49 μmol/L であった。

2.6.4.2 分析法

マウス、ラット及びサルを用いた薬物動態試験並びにラット及びサルを用いた探索的トキシコキネティクス試験で得られた血漿試料中の brigatinib とその N-脱メチル化代謝物 AP26123 を、バリデートされていない液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS/MS）法を用いて定量した。ラット及びサルを用いた GLP トキシコキネティクス試験については、brigatinib 及び AP26123 の血漿中濃度を測定するため、バリデートされた LC-MS/MS 法を開発した。使用した LC-MS/MS 法については、表 2.6.4.2-1 に詳述する。

定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）、液体シンチレーションカウンタ（LSC）などの放射能測定法によって、[^{14}C]brigatinib をラットに経口投与後の組織中の放射能濃度を測定した。ラット及びサルを用いたマスバランス及び排泄試験においては、LSC（胆汁、尿、血漿）又は燃焼後の LSC（糞）を用いて各試料中の総放射能を測定した。血漿、尿及び糞の有機溶媒抽出物を LC-MS/MS で分析し、同時にカラム溶出液のフラクションコレクションを行った。試料中の放射能を LSC により測定し、放射能データ及びクロマトグラフィー保持時間を用いて、ラジオクロマトグラムを作成した。ラジオクロマトグラム中の代謝物ピークをマニュアルで特定し、各代謝物ピーク中の放射能を定量した。精密質量及び質量フラグメンテーションデータを含む高解像度質量分析法を用いて代謝物の構造を推定した。

表 2.6.4.2-1　分析法の要約

添付資料番号	動物種/系統/性別	GLP	LC-MS/MS 法の詳細
マウス			
4.2.2.2-2	マウス(雌)	非適合	方法：バリデートされていない LC-MS/MS 法 試料：マウス血漿 (Na_2EDTA) 分析対象物：brigatinib 検量線濃度範囲：1～5000 ng/mL 内部標準：Glyburide 試料処理：蛋白沈殿／溶媒抽出
ラット			
4.2.2.2-2	ラット(雄)	非適合	方法：バリデートされていない LC-MS/MS 法 試料：ラット血漿 (Na_2EDTA) 分析対象物：brigatinib、AP26123 検量線濃度範囲：brigatinib (1～5000 ng/mL)、AP26123 (1～5000 ng/mL) 内部標準：AP25717 試料処理：蛋白沈殿／溶媒抽出
4.2.3.2-1	ラット(雌)	非適合	方法：バリデートされていない LC-MS/MS 法 試料：ラット血漿 (K2EDTA) 分析対象物：brigatinib 検量線濃度範囲：1～5000 ng/mL 内部標準：Glyburide 試料処理：蛋白沈殿／溶媒抽出
4.2.3.2-2	ラット(雄及び雌)	適合	方法：バリデートされている LC-MS/MS 法 (添付資料番号：4.2.2.1-1) 試料：ラット血漿 (K2EDTA) 分析対象物：brigatinib、AP26123 検量線濃度範囲：1～100 ng/mL (低レンジ) 75～7500 ng/mL (高レンジ) 内部標準：AP29109 (D_4-brigatinib)、AP29117 (D_8-AP26123) 試料処理：蛋白沈殿／溶媒抽出 安定性 血漿中短期：室温で 26 時間 血漿中長期：-80℃ で 502 日間 血漿中凍結／融解：4 サイクル
4.2.3.7.7-1	有色ラット(雌)	適合	
4.2.3.2-3	ラット(雄及び雌)	適合	
4.2.3.5.2-1	ラット(雌)	非適合	
4.2.3.5.2-2	ラット(雌)	適合	
サル			
4.2.2.2-3	サル(雄)	非適合	方法：バリデートされている LC-MS/MS 法 (添付資料番号：4.2.2.1-2) 試料：サル血漿 (K2EDTA) 分析対象物：brigatinib、AP26123 検量線濃度範囲：1～100 ng/mL (低レンジ) 75～7500 ng/mL (高レンジ) 内部標準：AP29109 (D_4-brigatinib)、AP29117 (D_8-AP26123) 試料処理：蛋白沈殿／溶媒抽出 安定性 血漿中短期：室温で 26 時間 血漿中長期：-80℃ で 498 日間 血漿中凍結／融解：4 サイクル
4.2.3.2-5	サル(雄及び雌)	適合	
4.2.3.2-6	サル(雄及び雌)	適合	
4.2.1.3-3	サル(雄)	適合	
4.2.3.2-4	サル(雄及び雌)	非適合	方法：バリデートされていない LC-MS/MS 法 試料：サル血漿 (K_2EDTA) 分析対象物：brigatinib, AP26123 検量線濃度範囲：brigatinib (3～5000 ng/mL)、AP26123 (3～300 ng/mL) 内部標準：AP25717 試料処理：蛋白沈殿／溶媒抽出

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 透過性、P-gp 及び BCRP の基質評価

：添付資料番号 4.2.2.2-1（評価）

本試験の目的は brigatinib の in vitro での透過性を評価すること並びに brigatinib の P-gp 及び BCRP に対する基質性を評価することであった。

[^{14}C]brigatinib 濃度 0.1、1、4 及び 10 μmol/L で、C2BBe1、MDR1-MDCK 及び MDCK 細胞株を用いて P-gp の基質評価を、C2BBe1、BCRP-MDCK 及び MDCK 細胞株を用いて BCRP 基質評価を実施した。陽性対照として、P-gp の典型基質である digoxin（10 μmol/L）及び BCRP の典型基質である cladribine（10 μmol/L）の透過性も同時に評価した。更に 1 μmol/L valspodar（P-gp 阻害剤）存在下又は 10 μmol/L Ko143（BCRP 阻害剤）存在下での透過性も評価した。Brigatinib の結果を表 2.6.4.3-1 に要約する。

C2BBe1 細胞における[^{14}C]brigatinib の頂端膜〔apical（A）〕側から基底膜〔basal（B）〕A-to-B への見かけの透過係数（P_{app}）は、3.27×10^{-6} cm/s～5.16×10^{-6} cm/s の範囲で、ヒトにおいて中等度から良好な経口吸収を示す薬剤と同等であった [1]。0.1、1、4 及び 10 μmol/L での C2BBe1 細胞における[^{14}C]brigatinib の排出比は、それぞれ 7.8、7.3、6.4 及び 7.1 で、valspodar 存在下で、1 μmol/L の[^{14}C]brigatinib の排出比は 2.5 に低下した（75.5%阻害）。0.1、1、4 及び 10 μmol/L での[^{14}C]brigatinib の Net efflux ratio（MDR1-MDCK 細胞と MDCK 細胞における排出比の比）はそれぞれ 15、40、18 及び 28 であり、1 μmol/L valspodar 存在下で、1 μmol/L [^{14}C]brigatinib の排出比は 0.94 に低下した（100%阻害）。Digoxin は有意な排出比を示したが、これは valspodar 存在下で完全に阻害され、本試験で使用された C2BBe1 及び MDR1-MDCK 細胞における P-gp の機能が確認された。これらの結果から、brigatinib は P-gp の基質であることが示された。

0.1、1、4 及び 10 μmol/L での BCRP に対する[^{14}C]brigatinib の Net efflux ratio（BCRP-MDCK 細胞）はそれぞれ、5.5、6.0、3.6 及び 10 であり、10 μmol/L Ko143（BCRP 阻害剤）存在下で、1 μmol/L [^{14}C]brigatinib の排出比は 2.3 に低下した（93.3%阻害）。MDR1 発現細胞及び BCRP 発現細胞系の結果から、brigatinib は P-gp と BCRP 両方の基質であると考えられる。C2BBe1 細胞における[^{14}C]brigatinib の排出比は 2 を超えており、valspodar による阻害率が 50%以上であったが、10 μmol/L Ko143 の存在下では 1 μmol/L [^{14}C]brigatinib の排出にほとんど影響がなかった（阻害率%は最小で 11.2%）。この齟齬については、以下のような可能性が考えられる。MDR1-MDCK 又は BCRP-MDCK 細胞などの発現細胞では、個々の排出トランスポーターであるそれぞれ P-gp 又は BCRP が過剰発現している。このような系では、過剰発現トランスポーターの基質（この場合、brigatinib）の輸送が増幅される。一方、C2BBe1 細胞は内因性 P-gp 及び BCRP を発現し、P-gp は明らかに brigatinib の輸送の大部分に寄与している（排出は 1 μmol/L valspodar によって完全に阻害）。このため、Ko143 による BCRP 阻害が brigatinib の輸送に対してほとんど又は全く影響はないと推察された。Cladribine（BCRP 典型基質）は有意な排出を示したが、これは、Ko143 存在下で完全に阻害され、本試験で使用された C2BBe1 及び BCRP-MDCK 細胞における BCRP の機能活性が確認された。

表 2.6.4.3-1　[^{14}C]brigatinib の C2BBe1、MDR1-MDCK、MDCK 及び BCRP-MDCK 細胞における透過性並びに P-gp/BCRP 基質評価

細胞	処置	回収率%		P_{app} ($x10^{-6}$ cm/s)		排出比 [a]	基質評価	
		A→B	B→A	A→B	B→A		P-gp	BCRP
C2BBe1	0.1 µmol/L [^{14}C]brigatinib	111 ± 9.2	107 ± 4.7	3.27 ± NC	25.5 ± 6.7	7.8	陽性	NA
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib	104 ± NC	112 ± 0.6	4.01 ± NC	29.2 ± 1.1	7.3		
	4 µmol/L [^{14}C]brigatinib	110 ± 10	114 ± 1.4	5.16 ± 2.9	32.9 ± 4.8	6.4		
	10 µmol/L [^{14}C]brigatinib	110 ± 7.6	108 ± 3.5	4.58 ± 0.77	32.6 ± 4.7	7.1		
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib + 1 µmol/L valspodar	102 ± 3.9	100 ± 5.9	6.93 ± 2.0	17.6 ± 2.0	2.5		
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib + 10 µmol/L Ko143 – Run 1	109 ± 4.3	107 ± 1.5	4.72 ± NC	31.1 ± 2.5	6.6	NA	陰性
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib + 10 µmol/L Ko143 – Run 2	110 ± 2.4	107 ± 5.4	3.76 ± 0.21	34.1 ± 3.3	9.1		
MDR1-MDCK	0.1 µmol/L [^{14}C]brigatinib	98.6 ± 15	88.9 ± 13	0.421 ± NC	16.7 ± 4.1	40	陽性	NA
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib	105 ± 15	104 ± 4.8	0.137 ± 0.02	19.2 ± 0.77	140		
	4 µmol/L [^{14}C]brigatinib	107 ± 3.5	105 ± 3.3	0.221 ± 0.09	18.1 ± 0.67	82		
	10 µmol/L [^{14}C]brigatinib	108 ± 3.1	103 ± 2.0	0.270 ± 0.18	21.6 ± 2.3	80		
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib + 1 µmol/L valspodar	107 ± 4.9	103 ± 4.6	2.58 ± NC	2.42 ± 0.13	0.94		
MDCK	0.1 µmol/L [^{14}C]brigatinib	108 ± 6.0	110 ± 4.5	1.34 ± 0.96	3.63 ± 0.87	2.7	NA	NA
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib	104 ± 1.7	103 ± 4.4	0.933 ± 0.09	3.26 ± 0.43	3.5		
	4 µmol/L [^{14}C]brigatinib	107 ± 2.6	107 ± 2.2	0.764 ± 0.13	3.44 ± 0.08	4.5		
	10 µmol/L [^{14}C]brigatinib	109 ± 2.9	102 ± 0.89	1.04 ± 0.06	2.95 ± 0.39	2.8		
BCRP-MDCK	0.1 µmol/L [^{14}C]brigatinib	105 ± 2.9	110 ± 1.2	1.33 ± 1.1	19.7 ± 2.7	15	NA	陽性
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib	110 ± 4.4	105 ± 4.0	1.01 ± 0.73	21.1 ± 1.1	21		
	4 µmol/L [^{14}C]brigatinib	110 ± 4.7	108 ± 1.7	1.12 ± 0.24	18.5 ± 1.6	16		
	10 µmol/L [^{14}C]brigatinib	109 ± 4.8	107 ± 6.1	0.657 ± 0.17	17.9 ± 0.48	27		
	1 µmol/L [^{14}C]brigatinib + 10 µmol/L Ko143	107 ± 4.2	98.8 ± 2.2	2.74 ± 0.23	6.39 ± 1.2	2.3		

A = 頂端膜、B = 基底膜、P_{app} = 見かけの透過係数、NA = 該当せず、NC = n = 2 のため、計算せず
平均値±標準偏差 (n = 3)
[a]: 排出比は $P_{app\ B\to A}/P_{app\ A\to B}$ として算出
P-gp 及び BCRP の基質分類：
阻害剤非存在下で排出比≥2.0 かつ阻害剤存在下での減少≥50%：陽性
阻害剤非存在下で排出比≥2.0 かつ阻害剤存在下での減少<50%：陰性
阻害剤の有無を問わず排出比<2.0：陰性

以上、データを総合すると、brigatinib は P-gp 及び BCRP の基質である。このため、P-gp 及び BCRP 誘導剤及び阻害剤は brigatinib の薬物動態に影響を及ぼす可能性がある。

2.6.4.3.2 単回投与時の経口吸収

2.6.4.3.2.1 マウス

：添付資料番号 4.2.2.2-2（参考）

本試験の目的はマウスに brigatinib を 10 mg/kg 又は 50 mg/kg の用量で単回経口投与したときの brigatinib の薬物動態特性を評価することであった。

45 例のマウスを 3 つの試験群に、各群 15 例ずつ無作為に割り付けた。第 1 群及び第 2 群には、25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）中の brigatinib をそれぞれ 10 mg/kg 及び 50 mg/kg

で単回経口投与した。第 3 群には、N-メチル-2-ピロリドン／ポリエチレングリコール-400（10%NMP/90%PEG400; v/v）中の brigatinib を 10 mg/kg で単回経口投与した。血漿中の brigatinib をバリデートされていない LC-MS/MS 法を用いて測定した。

Brigatinib をマウスに経口投与したときの brigatinib の平均血漿中濃度 - 時間プロファイルを図 2.6.4.3-1 に示す。Brigatinib の薬物動態パラメータを表 2.6.4.3-2 に示す。

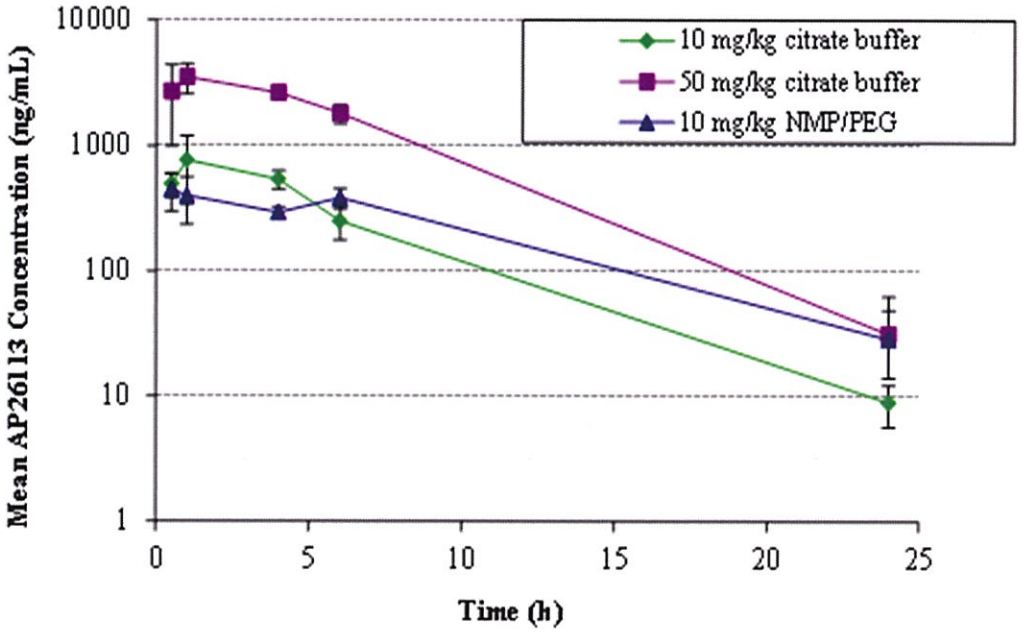


図 2.6.4.3-1　Brigatinib をマウスに経口投与したときの血漿濃度推移

AP26113: brigatinib

表 2.6.4.3-2　Brigatinib をマウスに経口投与したときの薬物動態パラメータ

パラメータ	Brigatinib (PO)		
Dose (mg/kg)	10[a]	50[a]	10[b]
Cmax (ng/mL)	768	3530	448
Tmax (hr)	1.00	1.00	0.500
AUC_{0-24} (ng·hr/mL)	5533	32482	5772
$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/mL)	5579	32624	6020
$t_{1/2}$ (hr)	3.5	3.3	5.9

[a]: 25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）中溶液剤

[b]: 10%NMP/90%PEG400; v/v 中溶液剤

マウスへの経口投与後、brigatinib は急速に吸収され、最高血漿中濃度（Cmax）到達時間（Tmax）は投与後 0.5～1.0 時間であり、血漿中濃度はその後一次関数的に減少した。Brigatinib の全身曝露量〔Cmax 及び血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）〕は、10～50 mg/kg の用量比に応じて増加した。NMP/PEG 製剤として 10 mg/kg を経口投与した時の brigatinib の AUC_{0-24} 及び $AUC_{0-\infty}$は、クエン酸緩衝液製剤として投与した場合と同等であったが Cmax は約 5 分の 3 であった。Brigatinib の $t_{1/2}$ は投与群 1 が 3.5 時間、投与群 2 が 3.3 時間、投与群 3 が 5.9 時間であった。

2.6.4.3.2.2 ラット

：添付資料番号 4.2.2.2-2（参考）

本試験の目的は、brigatinib をラットに 2 mg/kg で単回静脈内投与又は 10 mg/kg で単回経口投与したときの薬物動態特性を評価することであった。

雄性ラット 6 例を A、B、2 つの試験群に各群 3 例ずつ割り付けた。動物は投与前に一晩絶食させた。Brigatinib は静脈内投与用、経口投与用ともに、25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）製剤とした。A 群には、brigatinib 2 mg/kg を単回静脈内投与し、B 群には brigatinib 10 mg/kg を単回経口投与した。血漿中の brigatinib 及びその代謝物 AP26123 をバリデートされていない LC-MS/MS 法で定量した。Brigatinib をラットに静脈内及び経口投与したときの brigatinib の血漿中濃度推移を図 2.6.4.3-2 に、薬物動態パラメータを表 2.6.4.3-3 に示した。

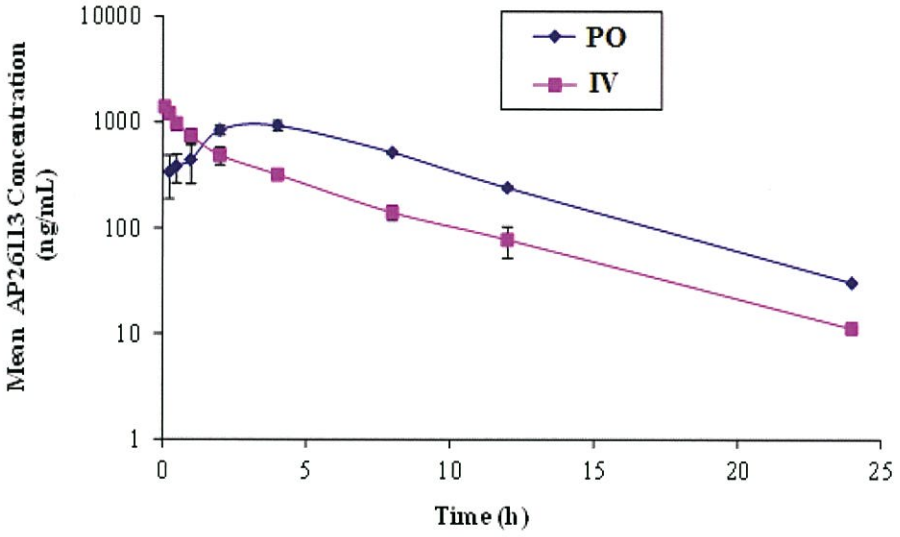


図 2.6.4.3-2　Brigatinib をラットに静脈内又は経口投与したときの血漿中濃度推移

Dose: IV, 2 mg/kg; PO, 10 mg/kg
AP26113: brigatinib

表 2.6.4.3-3　Brigatinib をラットに静脈内又は経口投与したときの薬物動態パラメータ

パラメータ	Brigatinib	
	IV[a]	PO[a]
Dose (mg/kg)	2	10
Cmax (ng/mL)	NA	977 ± 92
Tmax (hr)	NA	3.3 ± 1.2
$AUC_{0\text{-}24}$ (ng·hr/mL)	4329 ± 302	8757 ± 833
$AUC_{0\text{-}\infty}$ (ng·hr/mL)	4400 ± 296	8936 ± 833
CL (mL/hr/kg)	460 ± 31	NA
Vd (mL/kg)	2925 ± 465	NA
$t_{1/2}$ (hr)	4.4 ± 0.4	4.0 ± 0.6
BA (%)[b]	NA	40.7

NA = 該当せず
[a]: 25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）中溶液
[b]: (静脈内投与用量/経口投与用量) *($AUC_{0\text{-}\infty}$,po/$AUC_{0\text{-}\infty}$,iv) として算出
平均値±標準偏差 (n = 3)

ラットに2 mg/kgで静脈内投与後のbrigatinibのクリアランス(CL)は低く(7.67 mL/min/kg)、分布容積(Vd)が中等度で(2.93 L/kg)、$t_{1/2}$が中等度(4.4時間)であった。ラットに10 mg/kgで経口投与したときのTmaxは3.3時間であり、血漿中濃度はその後、一相性に減少した。Cmax、AUC_{0-24}、$AUC_{0-\infty}$及び$t_{1/2}$の平均値はそれぞれ977 ng/mL、8757 ng·hr/mL、8936 ng·hr/mL及び4.0時間であった。ラットにおけるbrigatinibのBAは40.7%と中等度であった。代謝物AP26123濃度は全ての時点で、brigatinib濃度の2%未満であった。

2.6.4.3.2.3 サル

：添付資料番号 4.2.2.2-3（参考）

本試験の目的は、brigatinibをサルに静脈内及び経口投与したときの薬物動態特性を評価することであった。各投与間に1週間の休薬期間を設けたクロスオーバーで評価した。

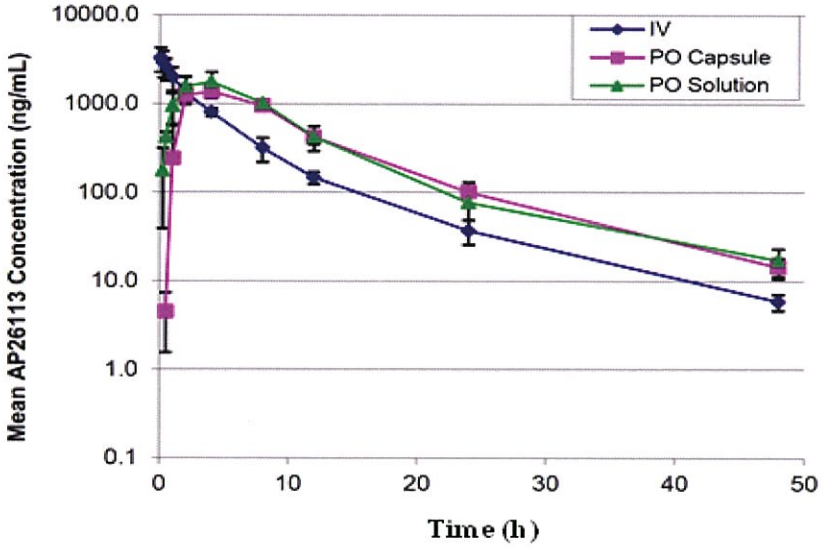
サルを一晩（18時間）絶食させ、3例に5 mg/kgで静脈内投与〔25 mmol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.0）、投与群1〕、15 mg/kgで経口投与〔25 mmol/Lクエン酸緩衝液（pH 4.0）、投与群2〕又はカプセル剤で15 mg/kgを経口投与（投与群3）した。投与後4時間まで絶食させた。血漿中のbrigatinib及びそのN-脱メチル化代謝物AP26123を、バリデートされたLC-MS/MS法を用いて定量した。サルに静脈内及び経口投与したときのbrigatinib及びAP26123の血漿中濃度推移を図2.6.4.3-3に示す。

サルに5 mg/kgで静脈内投与後のCLは低く（7.53 mL/min/kg）、Vdは中等度（3.26 L/kg）で、$t_{1/2}$は長かった（7.70時間）。AP26123の$t_{1/2}$（6.28時間）は未変化体（brigatinib）と比べてやや短かった。

Brigatinibを15 mg/kgでサルに経口投与したときの、Tmaxは4時間で、その後、血漿中濃度は二相性の減少を示した。Cmax、AUC_{last}、$AUC_{0-\infty}$及び$t_{1/2}$の平均値はそれぞれ1757 ng/mL、17535 ng·hr/mL、17706 ng·hr/mL及び6.95時間であった。AP26123の$AUC_{0-\infty}$はbrigatinibの13.6%であった。Brigatinibの溶液製剤のBAは中等度で、52.9%であった。Brigatinibのカプセル剤を15 mg/kgでカニクイザルに経口投与したときのPK特性も同様であった。Tmaxは3時間で、その後、血漿中濃度は二相性の減少を示した。Cmax、AUC_{last}、$AUC_{0-\infty}$及び$t_{1/2}$の平均値はそれぞれ1453 ng/mL、15193 ng·hr/mL、15343 ng·hr/mL及び7.24時間であった。AP26123の$AUC_{0-\infty}$はbrigatinibの13.4%であった。Brigatinibのカプセル剤のBAは中等度で、46.4%であった。Brigatinibの溶液製剤に対するカプセル剤の相対的BAは87.7%であった。

Brigatinibに対するAP26123のAUC比は、IV剤が0.049、PO溶液剤が0.136、POカプセル剤が0.134で、おそらくは初回通過効果の影響により、経口投与したときの方がAP26123の生成量が多かった。

Brigatinib



AP26123 (Metabolite)

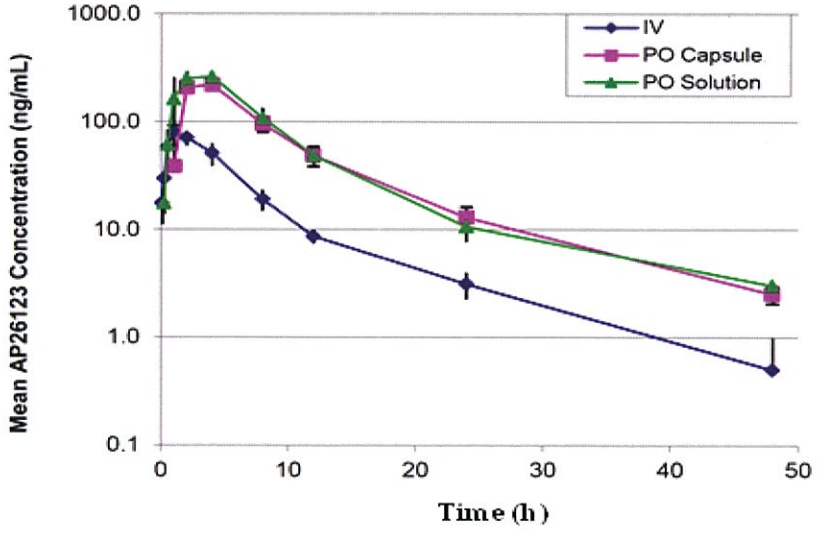


図 2.6.4.3-3　Brigatinib の溶液製剤又はカプセル剤をサルに静脈内投与又は経口投与したときの brigatinib 及び AP26123 の血漿中濃度推移

Dose: IV, 5 mg/kg; PO, 15 mg/kg
AP26113: brigatinib

表 2.6.4.3-4　Brigatinib をサルに静脈内又は経口投与したときの brigatinib 及び AP26123 の薬物動態パラメータ

パラメータ	Brigatinib			AP26123 (M36, metabolite)		
	IV	PO 溶液	PO カプセル	IV	PO 溶液	PO カプセル
Dose (mg/kg)	5[a]	15[a]	15[b]	--	--	--
Cmax (ng/mL)	NA	1757 ± 524	1453 ± 172	--	264 ± 28	224 ± 19
Tmax (hr)	NA	4.0 ± 0.0	3.0 ± 1.0	--	3.0 ± 1.0	3.0 ± 1.0
AUC_{last} (ng·hr/mL)	11137 ± 1551	17535 ± 1729	15193 ± 615	513 ± 42	2351 ± 179	2034 ± 168
$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/mL)	11203 ± 1550	17706 ± 1779	15343 ± 645	542 ± 55	2384 ± 179	2065 ± 171
$AUC_{0-\infty}$ 比[c]	--	--	--	0.049 ± 0.012	0.136 ± 0.021	0.134 ± 0.006
CL (mL/hr/kg)	452 ± 63	NA	NA	--	--	--
Vd (mL/kg)	3257 ± 994	NA	NA	--	--	--
$t_{1/2}$ (hr)	7.70 ± 0.5	6.95 ± 0.415	7.24 ± 0.12	6.28 ± 1.32	7.63 ± 1.04	8.52 ± 0.79
BA (%)[d]	NA	52.9 ± 3.3	46.4 ± 8.3	--	--	--

[a]: 25 mmol/L クエン酸緩衝液中溶液 (pH 4.0)
[b]: カプセル剤
[c]: $AUC_{0-\infty}$比は $AUC_{0-\infty}$,AP26123/$AUC_{0-\infty}$,brigatinib として算出
[d]: (静脈内投与用量/経口投与用量) *($AUC_{0-\infty}$,po/$AUC_{0-\infty}$,iv) として算出
平均値±標準偏差 (n = 3)

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 血漿蛋白結合

：添付資料番号 4.2.2.3-1（参考）

本試験の目的は、in vitro で brigatinib のマウス、ラット、サル及びヒト血漿蛋白結合を評価することである。

Brigatinib のマウス、ラット、サル及びヒト血漿蛋白結合率を、平衡透析法により評価した。0.2、1 及び 5 μmol/L の濃度の brigatinib を添加した血漿試料を、0.01 mol/L リン酸ナトリウム緩衝液（pH 7.4）に対して透析し、brigatinib を LC-MS/MS 法で定量した。

Brigatinib（0.2～5 μmol/L）の血漿蛋白結合率を表 2.6.4.4-1 に示す。In vitro での brigatinib のマウス、ラット、サル及びヒト血漿蛋白結合率は中等度で、蛋白結合に明らかな濃度依存性は認められなかった。マウス、ラット、サル及びヒト血漿中の平均結合率はそれぞれ 64.1%、73.0%、70.8%及び 65.7%であった。

表 2.6.4.4-1　マウス、ラット、サル及びヒトにおける in vitro での brigatinib の血漿蛋白結合率

動物種	濃度(μmol/L)	結合率(%)	平均結合率(%)
マウス	0.2	63.5	64.1
	1.0	65.5	
	5.0	63.2	
ラット	0.2	74.4	73.0
	1.0	73.6	
	5.0	71.1	
サル	0.2	71.2	70.8
	1.0	72.1	
	5.0	69.1	
ヒト	0.2	68.1	65.7
	1.0	65.6	
	5.0	63.5	

平均値 (n = 3)

2.6.4.4.2 血球移行

：添付資料番号 4.2.2.3-1（参考）

全血中の brigatinib の血漿と赤血球への分布を文献[2]の方法で測定した。マウス、ラット、サル及びヒトから採取した新鮮全血を遠心分離し、血漿を分離した（REF PL）。Brigatinib（0.1、0.3、1 及び 3 μmol/L）を添加したマウス、ラット、サル及びヒトの新鮮血液及び血漿を振盪恒温水槽中で 37°C で 1 時間インキュベートした。インキュベーション時間終了後に全血を遠心分離し、血漿を採取した（PL）。LC-MS/MS 法を用いて、brigatinib を定量した。

各動物種で、検討した濃度範囲（0.1～3 μmol/L）での brigatinib の血液－血漿分配比（KB/P）はほぼ一定であったが、動物種間では差があった。Brigatinib はマウス、ラット、サル及びヒト血液中で、血漿よりも赤血球中に濃縮的に分布することはなかった。マウス、ラット、サル及びヒト血液中の brigatinib の血液－血漿比（KB/P）、赤血球－血漿比（KRBC/PL）及び赤血球中の割合を表 2.6.4.4-2 に示す。Brigatinib の平均血液－血漿分配比（KB/P）はマウスが 1.01、ラットが 0.80、サルが 1.18、ヒトが 0.69 であった。

表 2.6.4.4-2　マウス、ラット、サル及びヒトにおける in vitro での brigatinib の血球移行

動物種	KB/P	KRBC/PL	RBC 中の brigatinib%
マウス	1.01 ± 0.078	1.02 ± 0.22	35.0
ラット	0.80 ± 0.078	0.47 ± 0.18	21.7
サル	1.18 ± 0.08	1.48 ± 0.21	47.4
ヒト	0.69 ± 0.048	0.26 ± 0.09	15.7

平均値±標準偏差 (n = 3) 、RBC 中の brigatinib%は平均値のみ。
検討した濃度範囲での平均値を示す。
KB/P = IREF PL ÷ IPL (IREF PL 及び IPL はそれぞれ標準血漿とインキュベートした血液から採取した血漿の装置応答比)
KRBC/PL = 1/H (IREF PL/IPL-1) + 1 (H はヘマトクリット値)
赤血球中の brigatinib% = 100 × (1-1/KB/P (1-H))

2.6.4.4.3 組織分布

：添付資料番号 4.2.2.3-2（評価）

本試験の目的は、[^{14}C]brigatinib を雄性白色ラット及び有色ラットに単回経口投与したときの brigatinib 由来成分の組織分布を定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）で評価することである。

白色ラット 8 例（投与群 1）及び有色ラット 4 例（投与群 2）に 25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）中の[^{14}C]brigatinib を 30 mg/kg（225 μCi/kg）で単回経口投与した。ラットは一晩及び投与後 4 時間絶食させた。ラットは採血後に屍体をヘキサンドライアイス中で凍結し、切片を作製し、QWBA で評価した。QWBA による定量上限及び下限はそれぞれ 766.733 及び 0.048 μg-equiv/g であった。

[^{14}C]brigatinib 由来放射能は白色ラット及び有色ラットの広範な組織に分布した。白色ラットでは大部分の組織（40 組織中 33 組織）で、4 時間までに Tmax に達し、有色ラットでは、全ての組織（41 組織）中の Tmax が 24 時間以内であった。白色ラットでの血中 Tmax は 0.5 時間（Cmax：4.068 μg-equiv/g）で、投与 72 時間後までに定量下限未満となった。有色ラットでの血中 Tmax は 2 時間（Cmax：3.573 μg-equiv/g）で、投与 168 時間後までに定量下限未満となった。

白色ラット及び有色ラットで放射能濃度が高かった（50 μg-equiv/g 以上）組織は、小腸（白色ラット）、甲状腺、肝臓、胃、ハーダー腺、下垂体、腎皮質、脾臓、副腎髄質及び有色ラットの眼のぶどう膜であった（表 2.6.4.4-3 及び表 2.6.4.4-4）。

表 2.6.4.4-3　[^{14}C]brigatinib を白色ラットに経口投与したときの放射能の薬物動態パラメータ

器官/組織	Cmax (μg-equiv/g)	Tmax (hr)	AUC_{all} (μg-equiv·hr/g)	$AUC_{0-\infty}$ (μg-equiv·hr/g)	$t_{1/2}$ (hr)
副腎(髄質)	53.205	4.00	843.8958	950.6048	84.9[a]
ハーダー腺	69.422	8.00	2584.83	2593.4911	19.4
腎臓(皮質)	54.46	0.500	680.5228	763.2479	110.9
肝臓	111.681	0.500	1432.3445	1587.5779	72.7
下垂体	65.867	4.00	811.6735	832.9271	121.8[a]
小腸	253.475	2.00	1280.4923	1425.9448	411.5[a]
脾臓	53.559	4.00	860.0413	902.7433	63.4[a]
胃(胃粘膜)	69.964	4.00	565.583	587.2946	108.3[a]
甲状腺	189.754	4.00	2030.7615	2170.3706	63.8[a]

[a]: $t_{1/2}$ 値のデータ収集が不十分及びその結果得られた r^2 値が許容基準 (0.85 以上) 外であったため、これらの値は推定値とみなす

表 2.6.4.4-4　[^{14}C]brigatinib を有色ラットに経口投与したときの放射能の薬物動態パラメータ

器官/組織	Cmax (μg-equiv/g)	Tmax (hr)	AUC_{all} (μg-equiv·hr/g)	$AUC_{0-\infty}$ (μg-equiv·hr/g)	$t_{1/2}$ (hr)
副腎(皮質)	54.49	2.00	1237.403	1470.6231	331.9[a]
副腎(髄質)	72.561	2.00	2035.624	2442.9046	306.2[a]
眼(ぶどう膜)	177.806	24.0	89137.066	282224.2319	1240.9[a]
腎臓(皮質)	55.174	2.00	1153.213	1200.0576	184.5
肝臓	79.769	2.00	2380.707	2393.3484	99.6
下垂体	57.954	2.00	1094.299	1103.4006	121.3
唾液腺	51.942	2.00	694.601	699.9144	44.4[a]
脾臓	58.64	2.00	1224.484	1314.6273	228
胃(胃粘膜)	62.29	2.00	1046.078	1116.051	516[a]
甲状腺	87.964	2.00	3060.685	3474.7153	288.7

[a]: $t_{1/2}$ 値のデータ収集が不十分及び／又はその結果得られた r^2 値が許容基準 (0.85 以上) 外であったため、これらの値は推定値とみなす

白色ラットでは、胆汁（胆管内）（投与 2 時間後に 258.005 μg-equiv/g）、膀胱内容物（投与 2 時間後に 45.865 μg-equiv/g）及び消化管内容物（小腸内容物：投与 2 時間後に 2705.788 μg-equiv/g、胃内容物：投与 0.5 時間後に 1694.046 μg-equiv/g、大腸内容物：投与 8 時間後に 1011.845 μg-equiv/g 及び盲腸内容物：投与 8 時間後に 561.132 μg-equiv/g）中の濃度（Cmax）も高かった。同様に、有色ラットでは、消化管内容物（盲腸内容物中の 75.624 μg-equiv/g から胃内容物中の 1063.292 μg-equiv/g まで）並びに胆汁（投与 2 時間後に 264.811 μg-equiv/g）及び尿（投与 2 時間後に 105.979 μg-equiv/g）などの排泄組織内容物中の濃度も高く、腎排泄及び胆汁排泄が brigatinib の消失経路であることが示唆された。

白色ラット及び有色ラットで、放射能濃度が低かった（2.0 μg-equiv/g 未満）組織は、中枢神経系、眼球レンズ、白色脂肪組織及び骨であった。白色ラットでは、甲状腺（1.516 μg-equiv/g）及び肝臓（1.481 μg-equiv/g）を除くほとんどの組織で、168 時間後の残留放射能濃度は 1.0 μg-equiv/g 未満であった。有色ラットでは、眼のぶどう膜（107.855 μg-equiv/g）を除くほとんどの組織で、672 時間後の残留放射能濃度は 1.0 μg-equiv/g 未満であった。有色ラットの

眼のぶどう膜中の Cmax（24 時間後に 177.806 µg-equiv/g）は、アルビノラットで認められた値（0.5 時間後に 7.545 µg-equiv/g）と比較して顕著に高かったが、有色ラット眼のぶどう膜中の放射能濃度は投与 24 時間後から 672 時間後まで緩徐な減少を示した。

以上、[^{14}C]brigatinib 由来放射能は白色ラット及び有色ラットの組織において広く分布しており、組織中 Cmax 到達時間は大部分の組織で、白色ラットでは投与後 4 時間以内、有色ラットでは投与後 24 時間以内で、その後減少した。白色ラット及び有色ラットで放射能濃度が高かった（範囲：51.942～253.475 µg-equiv/g）組織は、小腸（白色ラット）、甲状腺、肝臓、胃、ハーダー腺、下垂体、腎皮質、脾臓、副腎髄質及び有色ラットの眼のぶどう膜であった。消化管内容物、胆汁及び尿中の濃度も高く、腎排泄及び胆汁排泄が brigatinib の消失経路であることが示唆された。白色ラット及び有色ラットで、放射能濃度が最も低かった（2.0 µg-equiv/g 未満）組織は、中枢神経系、眼球レンズ、白色脂肪組織及び骨であった。有色ラットの眼のぶどう膜中の Cmax（投与 24 時間後に 177.806 µg-equiv/g）は、白色ラットで認められた値（投与 0.5 時間後に 7.545 µg-equiv/g）より顕著に高かったが、有色ラット眼のぶどう膜中の放射能濃度は投与 24 時間後から 672 時間後まで緩徐な減少を示した。

2.6.4.5 代謝（動物間の比較）

2.6.4.5.1 In vitro 代謝

2.6.4.5.1.1 肝ミクロソーム及び肝細胞における代謝

：添付資料番号 4.2.2.4-1（参考）、-2（参考）

これらの in vitro 試験の目的は、1）マウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソーム及び肝細胞における brigatinib の代謝プロファイルを比較し、2）代謝物を推定し、3）brigatinib の代謝に関与する主なヒト CYP 分子種を推定することであった。

表 2.6.4.5-1 に示す条件下で in vitro 試験を実施した。

表 2.6.4.5-1　In vitro 代謝試験条件

In vitro 系	動物種	目的	培養液中蛋白濃度 細胞濃度	被験物質濃度 (μmol/L)		インキュベーション時間 (分)
				brigatinib	[^{14}C]brigatinib	
肝ミクロソーム	ラット サル ヒト	代謝安定性	0.5 mg/mL	1	--	0、10、20、40、60、90
肝ミクロソーム /rhCYPs	ヒト	酵素反応速度	0.5 mg/mL 及び 20 pmol/mL	1-200 μmol/L	--	10
肝ミクロソーム	マウス ラット サル ヒト	代謝物プロファイリング	1.0 mg/mL	--	3、30	0、45
肝細胞	マウス ラット サル ヒト	代謝物プロファイリング	4.0 x 10^6 cells/mL	10	3、30	0、60、120
肝ミクロソーム +CYP 選択的阻害剤又は抗体	ヒト	CYP 分子種推定	0.5 mg/mL	5	--	10
rhCYP	ヒト	CYP 分子種推定	100 pmol/mL	--	3、30	0、45

rhCYP = 組換えヒト CYP
-- = 該当せず又は報告せず

In vitro でラット、サル及びヒト肝ミクロソームにおいて、brigatinib の肝抽出率は低く、予測肝クリアランス（CL_h）はそれぞれ 6.4、7.8 及び 3.8 mL/min/kg であった（表 2.6.4.5-2）。

表 2.6.4.5-2　Brigatinib の in vitro での固有クリアランス及び予測肝クリアランス

動物種	$t_{1/2}$ (min)	CL_{int} (mL/min/kg)	予測 CL_h (mL/min/kg)
ラット	171.2	7.3	6.4
サル	98.05	9.5	7.8
ヒト	140.3	4.7	3.8

CL_{int} = 固有クリアランス、CL_h = 肝血液クリアランス

肝ミクロソーム及び肝細胞を 30 μmol/L [^{14}C]brigatinib とインキュベートしたときの代謝物プロファイルには、3 μmol/L で生成した代謝物が全て含まれていたため、30 μmol/L での代表的なラジオクロマトグラムのみをそれぞれ図 2.6.4.5-1 及び図 2.6.4.5-2 に示す。

Brigatinib の代謝物プロファイルは、検討した動物種で質的に同様で、ヒト特異的代謝物は認められなかった。肝ミクロソーム中の brigatinib の主代謝経路は、全ての動物種で N-脱メチル化による AP26123 の生成であった（表 2.6.4.5-3）。ヒト及びサル肝ミクロソーム中で 30 μmol/L [^{14}C]brigatinib とのインキュベーションのみ、2 つの微量代謝物 M22 及び M27（酸化体）が認められた。マウス、ラット、サル及びヒト肝細胞における brigatinib の主代謝経路は、GSH 抱合及び N-脱メチル化による M21 及び AP26123 の生成であった（表 2.6.4.5-4）。ラット及びサル肝細胞では、微量代謝物として、M4 及び M21a、M5、M22、M25 及び M13 が認められた。肝ミクロソーム及び肝細胞における brigatinib の推定 in vitro 代謝経路及び対応する代謝物 ID を図 2.6.4.5-3 に示す。

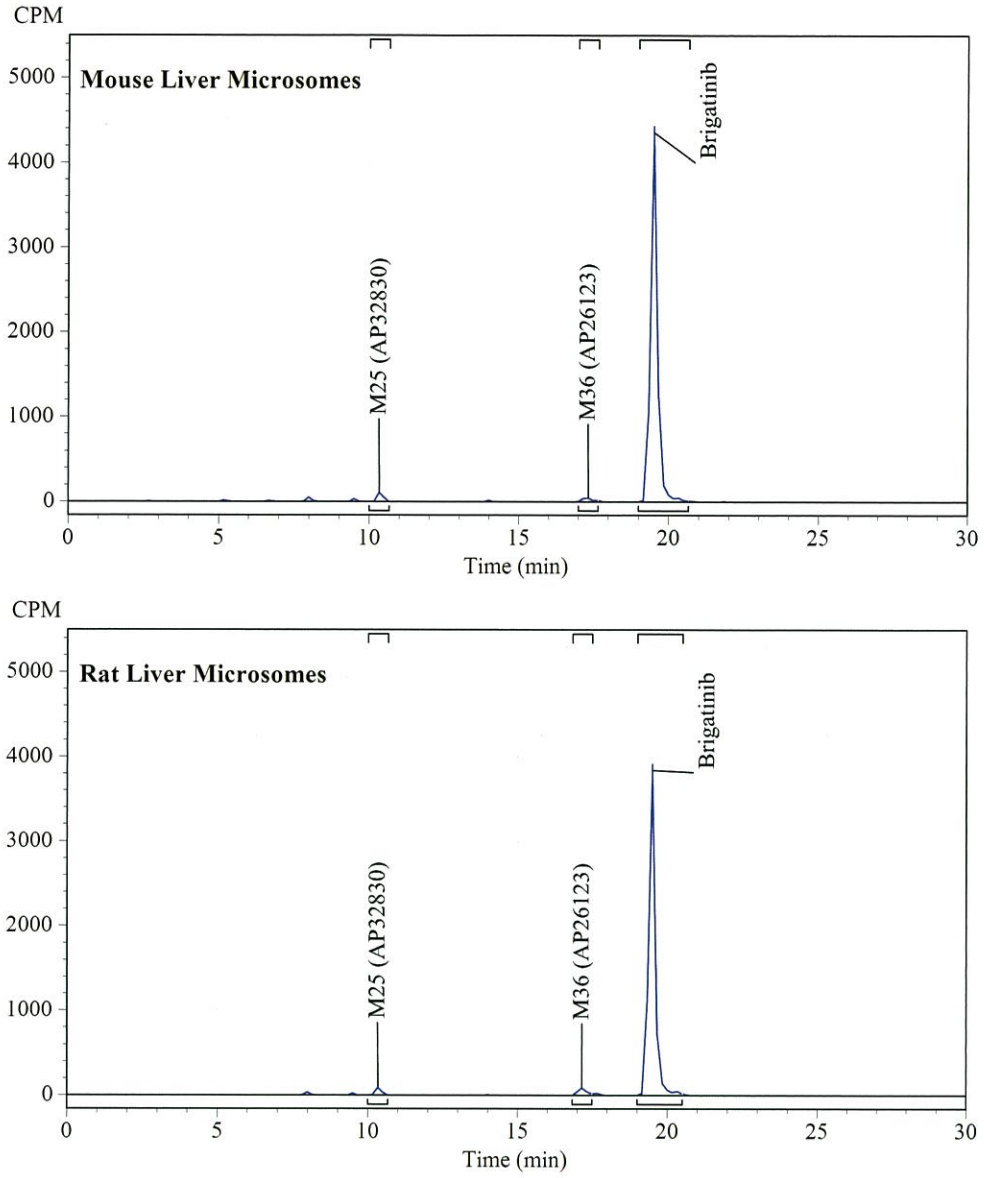


図 2.6.4.5-1　[^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームとインキュベーションしたときの代表的ラジオクロマトグラム

Concentration: 30 µmol/L, Incubation time: 45 min.

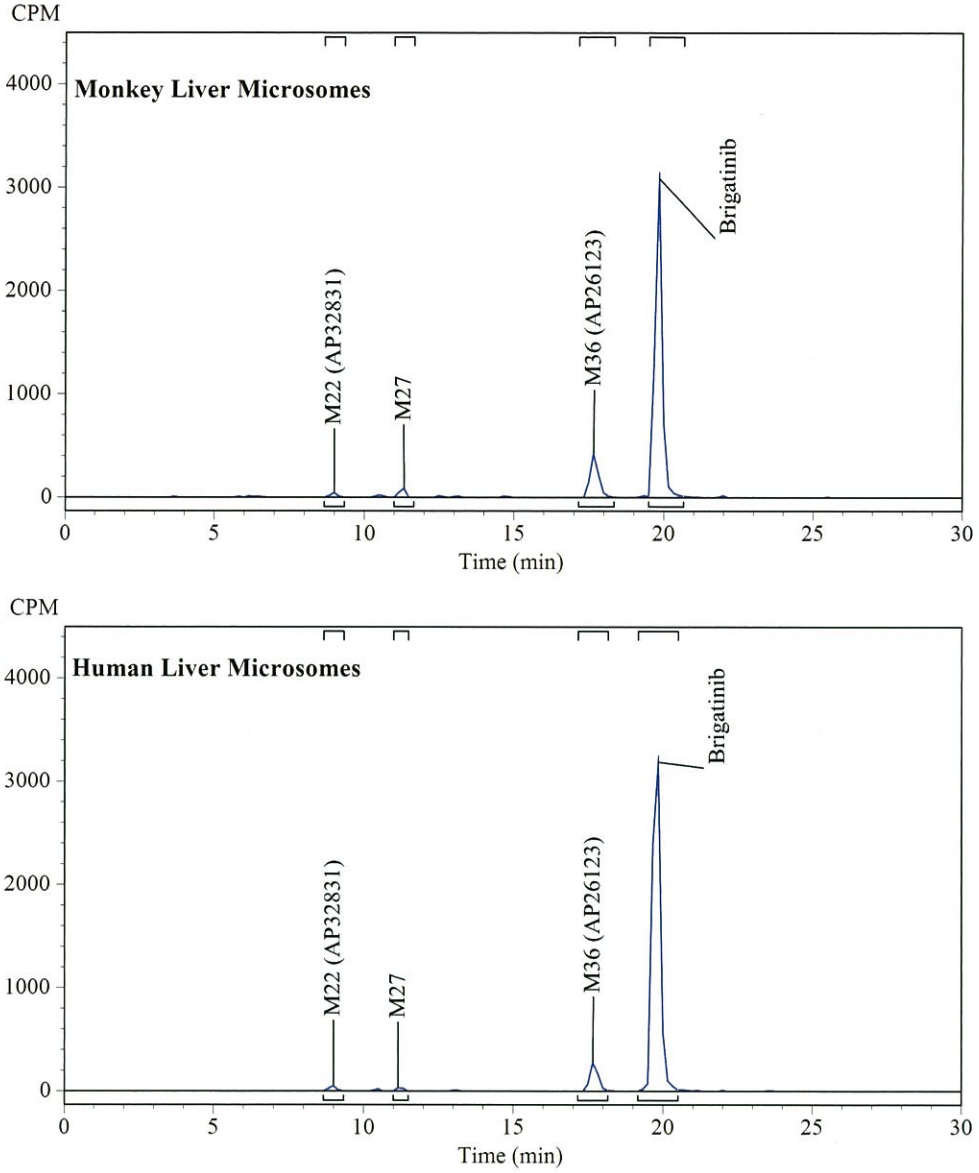


図 2.6.4.5-1　[^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームとインキュベーションしたときの代表的ラジオクロマトグラム（続き）

Concentration: 30 μmol/L, Incubation time: 45 min.

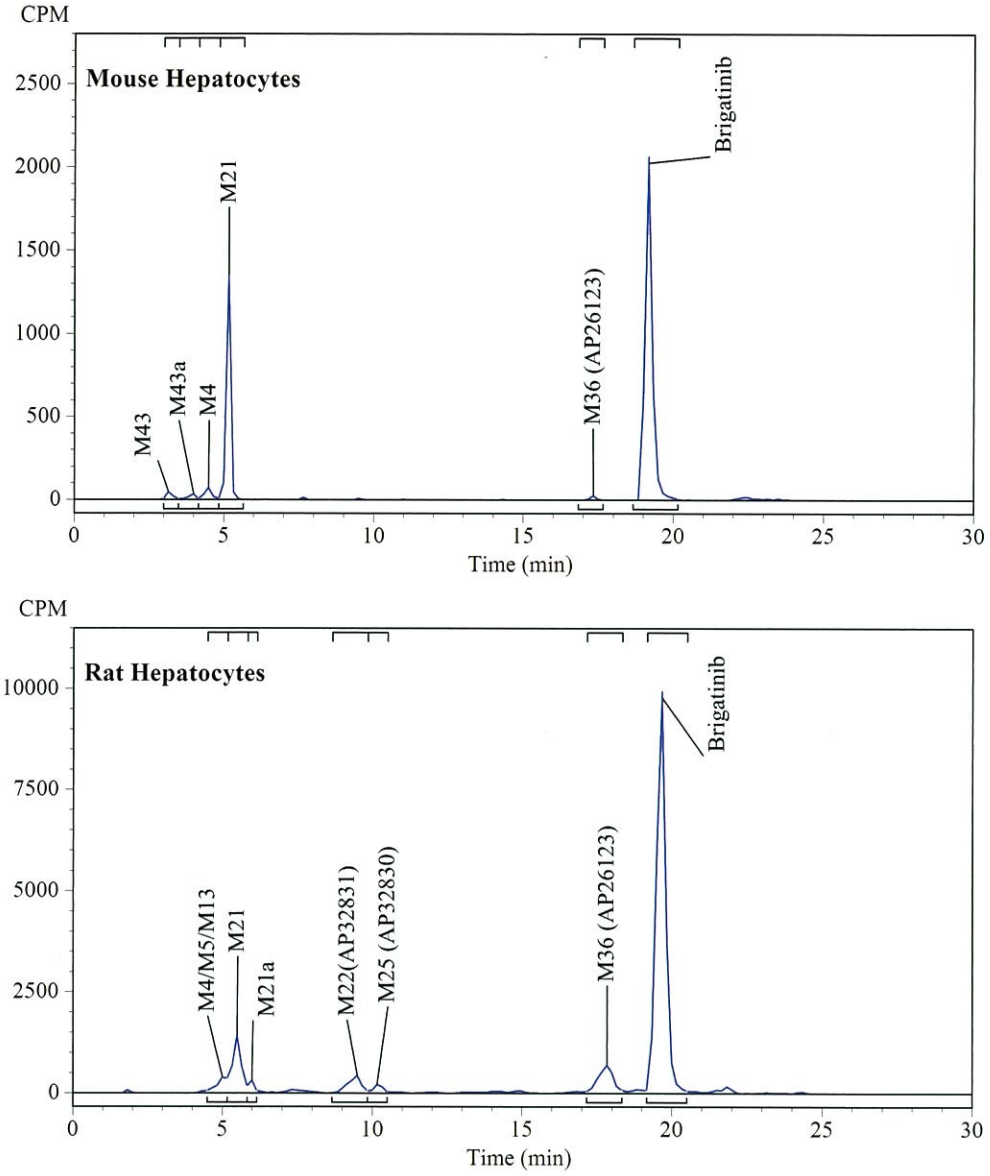


図 2.6.4.5-2　[^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝細胞とインキュベートしたときの代表的ラジオクロマトグラム

Concentration: 30 μmol/L, Incubation time: 120 min.

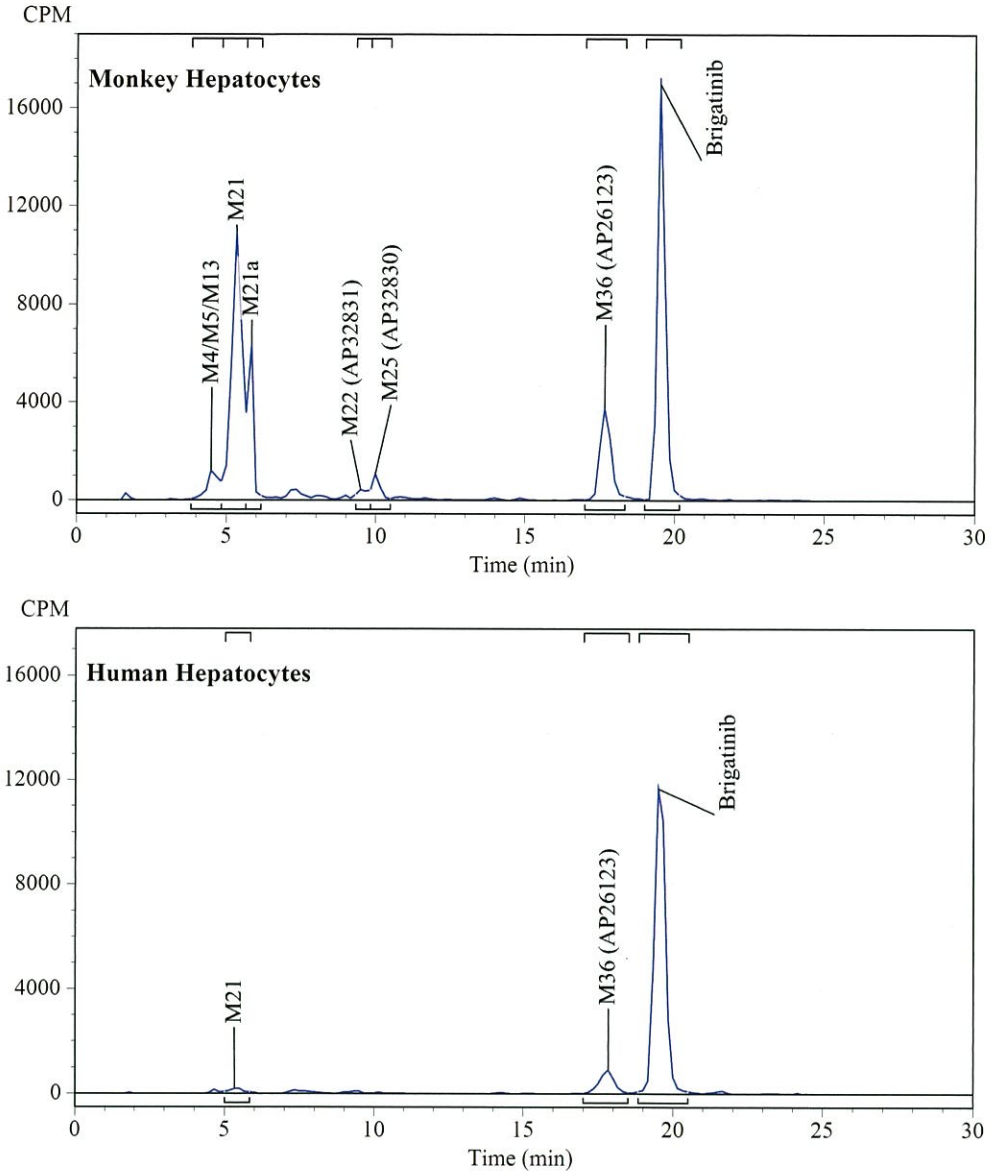


図 2.6.4.5-2 [^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝細胞とインキュベートしたときの代表的ラジオクロマトグラム（続き）

Concentration: 30 μmol/L, Incubation time: 120 min.

表 2.6.4.5-3 [^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソームとインキュベートしたときの brigatinib 及びその代謝物の割合

代謝物 ID	推定代謝物構造	NADPH 存在下での[^{14}C]brigatinib の肝ミクロソーム中の放射能%[a]							
		マウス		ラット		サル		ヒト	
		3 μmol/L	30 μmol/L	3 μmol/L	30 μmol/L	3 μmol/L	30 μmol/L	3 μmol/L	30 μmol/L
M22 (AP32831)	N-酸化体	--	--	--	--	--	1.23	-	1.2
M25 (AP32830)	N-酸化体	--	2.1	--	2	--	--	--	--
M27	酸化体	--	--	--	--	--	2.1	--	0.9
AP26123 (M36)	N-脱メチル化体	1.2	1.4	3.0	2.5	13.2	13.0	6.8	7.6
brigatinib (未変化体)	NA	97.9	93.7	96.0	93.3	79.3	79.6	90.4	88.5

NA = 該当せず
[a]: 各マトリックスで総放射能量の 1%超を含むピークのみを記載
-- = 各マトリックスで総放射能量の 1%未満又は検出せず
インキュベーション時間: 45 分間

表 2.6.4.5-4 [^{14}C]brigatinib をマウス、ラット、サル及びヒト肝細胞とインキュベートしたときの brigatinib 及びその代謝物の割合

代謝物 ID	推定代謝物構造	[^{14}C]brigatinib の肝細胞中の放射能%[a]							
		マウス		ラット		サル		ヒト	
		3 μmol/L	30 μmol/L	3 μmol/L	30 μmol/L	3 μmol/L	30 μmol/L	3 μmol/L	30 μmol/L
M43	N-脱メチル化 + 酸化 + 水素化 + GSH 抱合体	--	1.3	--	--	--	--	--	--
M43a	N-脱メチル化 + 酸化 + 水素化 + GSH 抱合体	--	1.2	--	--	--	--	--	--
M4	GSH 抱合体	2.2	2.4	--	--	--	--	--	--
M4/M5/M13	ピペラジン部位の GSH 抱合体／ピペラジン部位の酸化 + 不飽和化 + GSH 抱合体／酸化 + グルクロン酸抱合体	--	--	4.3	2.3	1.78	3.2	--	--
M21	GSH 抱合体	40.7	28.1	14.8	9.3	40.2	28.4	--	1.7
M21a	GSH 抱合体	--	--	4.0	1.5	7.8	11.3	--	--
M22 (AP32831)	N-酸化体	--	--	1.8	4.0	1.36	1.2	--	--
M25 (AP32830)	N-酸化体	--	--	2.2	1.5	0.8	2.4	--	--
AP26123(M36)	N-脱メチル化体	1.9	0.7	9.6	7.2	11.7	11.0	5.5	8.4
brigatinib (未変化体)	NA	38.7	63.7	62.76	65.8	34.6	35.0	92.9	83.3

NA = 該当せず
[a]: 各マトリックスで総放射能量の 1%超を含むピークのみを記載
-- = 各マトリックスで総放射能量の 1%未満又は検出せず
インキュベーション時間: 120 分間

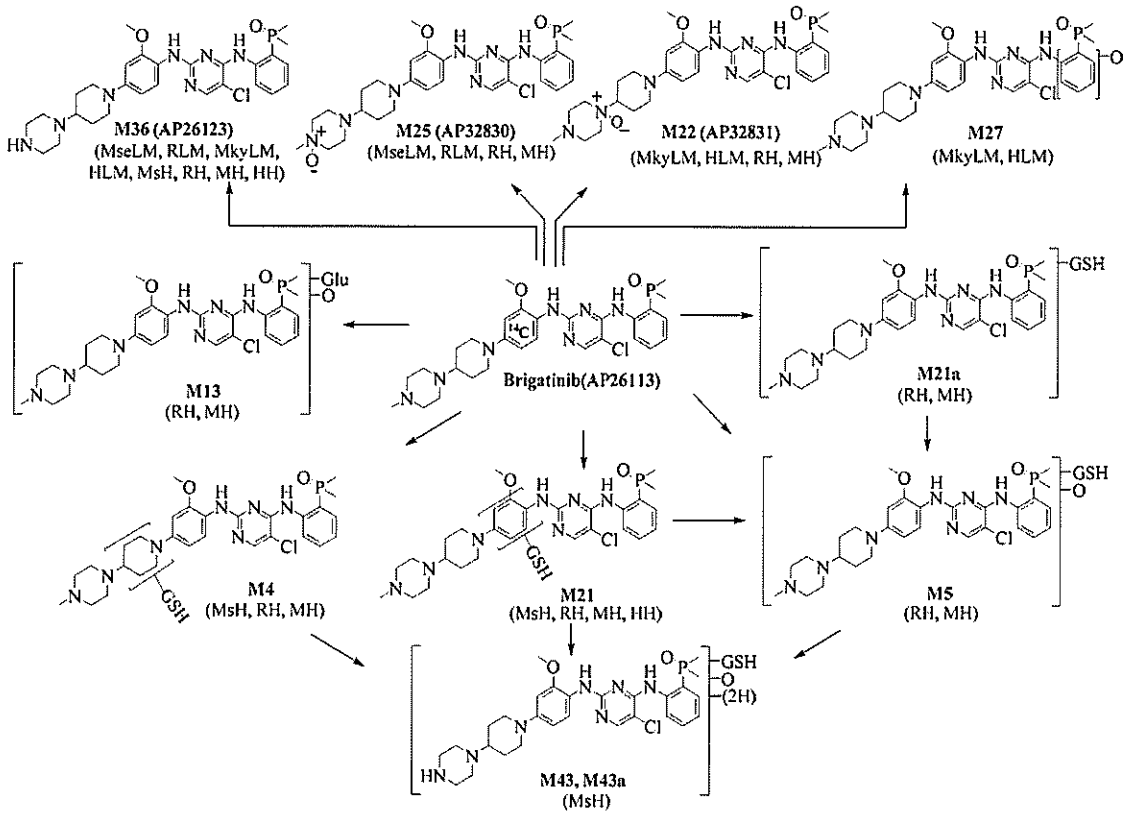


図 2.6.4.5-3　マウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソーム並びに肝細胞における brigatinib の in vitro での推定代謝経路

MseLM, RLM, MkyLM 及び HLM: それぞれマウス、ラット、サル及びヒト肝ミクロソーム
MsH, RH, MH 及び HH: それぞれマウス、ラット、サル及びヒト肝細胞

2.6.4.5.1.2 CYP 分子種同定

：添付資料番号 4.2.2.4-1（参考）、-2（参考）

CYP 選択的阻害剤及び抗体を用いて、ヒト肝ミクロソーム中の brigatinib の CYP 代謝を評価した。主代謝物である AP26123 の生成量を LC-MS/MS によって定量した。CYP2C8 及び CYP3A4/5 が brigatinib の AP26123 への代謝に関与している主な CYP 分子種であり、CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP2D6 はほとんど又は全く寄与していないことが示された（表 2.6.4.5-5）。

表 2.6.4.5-5　CYP 選択的阻害剤又は抗体によるヒト肝ミクロソーム中の AP26123 生成阻害

CYP 分子種	CYP 選択的阻害剤	AP26123 生成の阻害率 (%)	阻害 mAB (μL)[a]	AP26123 生成の阻害率 (%)
CYP1A2	Furafylline (20 μmol/L)	4.4	1	5.4
CYP2C8	Montelukast (5 μmol/L)	58.1	2	73.8
CYP2C9	Sulfaphenazole (10 μmol/L)	9	5	6.8
CYP2C19	Benzylnirvanol (15 μmol/L)	6	10	0
CYP2D6	Quinidine (2 μmol/L)	7.8	2	6.8
CYP3A4/5	Ketoconazole (1 μmol/L)	54.6	10	28.3
CYP3A4/5	Troleandomycin (50 μmol/L)	47.7	NA	NA

mAB = モノクローナル抗体、NA = 該当せず
[a]: μL/100 μg HLM

Brigatinib（濃度範囲：1～200 μmol/L）のヒト肝ミクロソーム（0.5 mg/mL）、組換えヒトCYP（rhCYP）2C8 及び rhCYP3A4（20 pmol/mL）による代謝速度から、AP26123 生成速度パラメータ最大速度（Vmax）及びミカエリス・メンテン定数（Km）を求めた。ヒト肝ミクロソームにおける AP26123 生成の見かけの Km 値は 113.6 μmol/L で、Vmax は 1,012 pmol/min/mg protein であった。固有クリアランス（CL_{int}）の算出値は 8.9 μL/min/mg protein で、AP26123 の生成速度から推定されたヒトにおける brigatinib の CL_h の予測値は 5.9 mL/min/kg で、ヒトでの brigatinib のクリアランスの低さが推察された。CYP 発現系とインキュベートしたときの in vitro での代謝速度（表 2.6.4.5-6）から、brigatinib の代謝に対する CYP2C8 及び CYP3A4 の寄与度はそれぞれ 72.3%及び 27.7%であることが示された。

表 2.6.4.5-6　Brigatinib のクリアランスにおける CYP3A4 及び CYP2C8 の寄与率

rhCYP	速度定数		CYP 含量 (pmol P450/mg HLM)[a]	HLM 中の予測 Vmax (pmol/min/mg HLM)[b]	予測 (CL_{int})[c]	寄与率 (%)[d]
	Vmax (pmol/min/pmol P450)	K_m (μmol/L)				
CYP3A4	5.5	66.9	108	593.8	8.9	27.7
CYP2C8	36.7	101.1	64	2348.8	23.2	72.3

[a]: 特有含量 (出典: [3])
[b]: 予測 Vmax = 測定 Vmax × 特有含量
[c]: 予測固有クリアランス (CL_{int},μL/min/mg HLM) = 予測 Vmax/Observed K_m
[d]: 寄与率 = (CL_{int} of one enzyme/CL_{int} of all enzymes) × 100

[^{14}C]brigatinib と CYP 発現系を用いた CYP 分子種推定評価から、brigatinib は主に CYP2C8 及び CYP3A4 によって代謝され、はるかに程度は小さいが、CYP3A5 によっても代謝されることが示唆された（表 2.6.4.5-7、図 2.6.4.5-4）。

表 2.6.4.5-7　rhCYP による[^{14}C]brigatinib 及び代謝物（AP26123 及び M25）生成量の割合

試験系	NADPH 存在下での rhCYP 中放射能量の割合 (%)					
	M25 (AP32830)		AP26123 (M36)		brigatinib	
	3 μmol/L	30 μmol/L	3 μmol/L	30 μmol/L	3 μmol/L	30 μmol/L
対照	--	--	--	--	98.9	96.9
rhCYP1A2 + 還元酵素	--	--	--	--	97.8	96.6
rhCYP2A6 + 還元酵素 + b5	--	--	--	--	97.3	97.1
rhCYP2B6 + 還元酵素 + b5	--	--	--	--	95.9	95.2
rhCYP2C19 + 還元酵素 + b5	--	--	--	--	97.9	97.4
rhCYP2C8 + 還元酵素 + b5	1.4	3.1	24.8	25.9	61.4	63.1
rhCYP2C9 + 還元酵素 + b5	--	--	--	0.97	96.2	97.2
rhCYP2D6 + 還元酵素	--	--	--	0.98	98.6	97.3
rhCYP2E1 + 還元酵素 + b5	--	--	--	--	97.3	98.2
rhCYP2J1 + 還元酵素 + b5	--	--	--	0.93	97.0	96.0
rhCYP3A5 + 還元酵素 + b5	--	--	1.2	3.0	93.1	87.5
rhCYP3A4 + 還元酵素 + b5	--	--	11.8	15.4	84.8	82.4
rhCYP4F2 + 還元酵素 + b5	--	--	--	0.89	98.3	97.1

-- = 各マトリックスで総放射能量の 1%未満又は検出せず
時間: 45 min

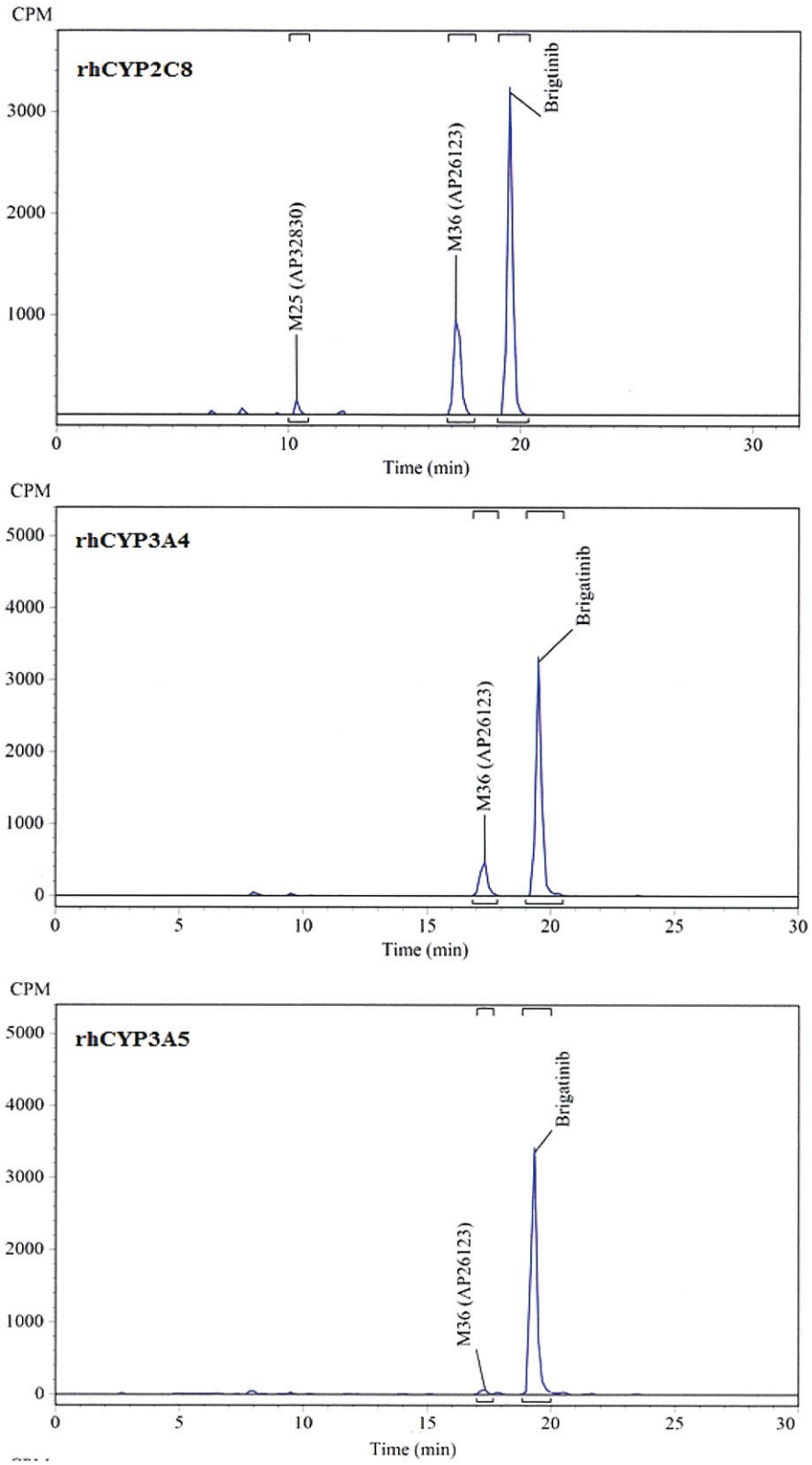


図 2.6.4.5-4　[^{14}C]brigatinib を rhCYP とインキュベートしたときのラジオクロマトグラム

Concentration: 30 µmol/L, Incubation time: 45 min

以上、in vitro でのラット、サル及びヒト肝ミクロソーム及び肝細胞における brigatinib の代謝は質的に同様で、ヒト特有の代謝物は認められなかった。検討した全ての動物種の肝ミ

クロソーム及びヒト肝細胞における brigatinib の主代謝経路は、N-脱メチル化による AP26123 であった。マウス、ラット及びサル肝細胞における主要代謝物は M21 で、ラット及びサル肝細胞中では、AP26123 が 2 番目に多い代謝物であった。ラット及びサル肝細胞における微量代謝物は M4 及び M21a、M5、M22、M25 及び M13 であった。

CYP2C8 及び CYP3A4 が brigatinib の代謝に関与する主な CYP 分子種で、CYP3A5 の寄与は軽微であると考えられる。このため、経口投与した CYP2C8 及び CYP3A4 阻害剤及び誘導剤が brigatinib の薬物動態に影響を及ぼす可能性がある。

2.6.4.5.2 in vivo 代謝

以下に示すラット及びサルにおける[^{14}C]ADME 試験の目的は、血漿中及び排泄物中の代謝物の推定を通じて、in vivo での brigatinib の代謝経路を推定することであった。

2.6.4.5.2.1 ラット

：添付資料番号 4.2.2.4-3（参考）、-4（参考）、-5（参考）

1M 群［胆管ろう形成（BDC）ラット、n = 4］、2M 群（無処置ラット、n = 4）及び 3M 群（無処置ラット、n = 14）の 3 群の雄性ラットに、25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）中の[^{14}C]brigatinib を 30 mg/kg（200 μCi/kg）で、単回経口投与した。2M 及び 3M 群のラットは絶食させたが 1M 群（BDC）のラットは絶食させなかった。1M 群のラットからは尿、糞及び胆汁を採取した。2M 群のラットからは尿及び糞を採取した。1M 群及び 2M 群は排泄物採取終了後に屍体、ケージ洗浄液、ケージ拭取り物を採取した。3M 群のラットからは血液を採取し、血漿を調製した。血漿、胆汁、尿及び糞抽出物の代謝物のラジオクロマトグラムをそれぞれ図 2.6.4.5-5、図 2.6.4.5-6、図 2.6.4.5-7 及び図 2.6.4.5-8 に示し、各試料中の代謝物の割合（%）を表 2.6.4.5-8 に示す。

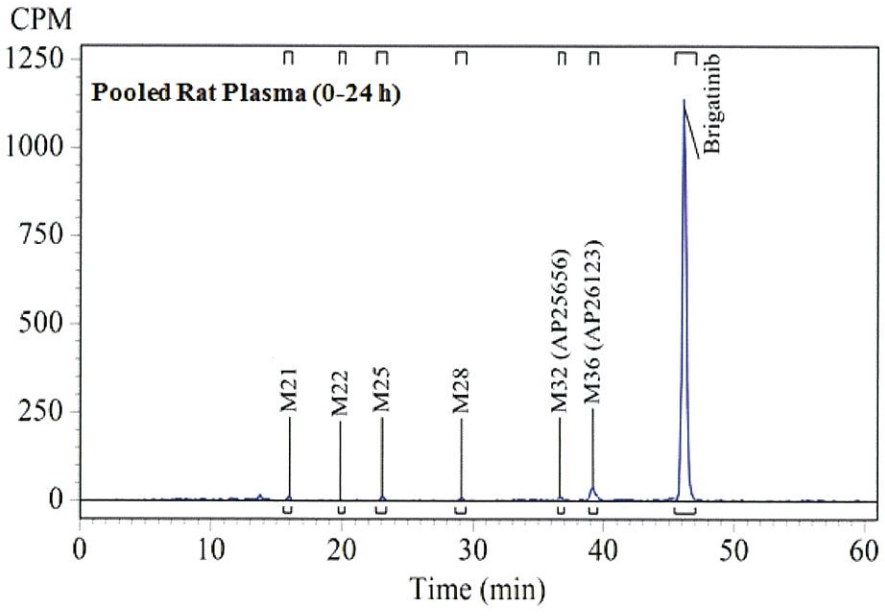


図 2.6.4.5-5 [^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの血漿中ラジオクロマトグラム

Dose: 30 mg/kg, 0-24 h pool

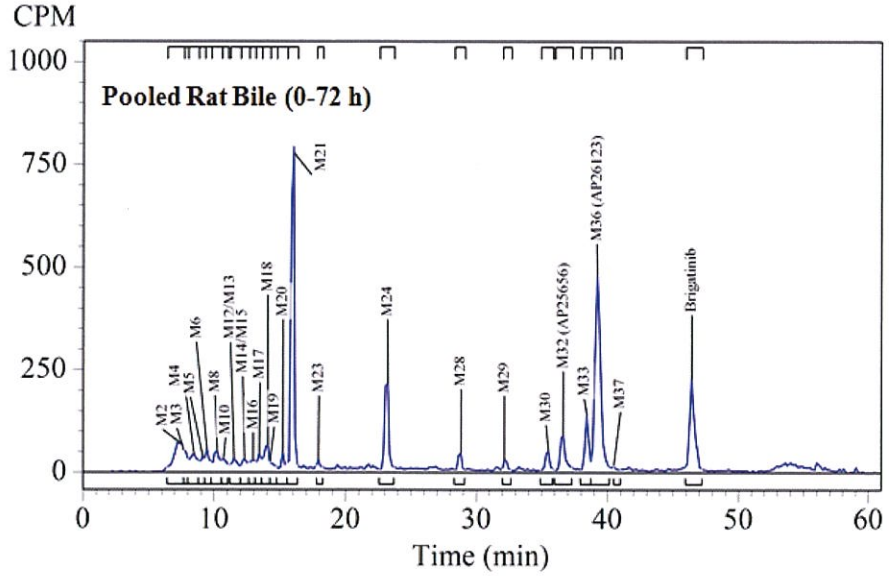


図 2.6.4.5-6　[^{14}C]brigatinib を BDC ラットに経口投与したときの胆汁中ラジオクロマトグラム

Dose: 30 mg/kg, 0-72 h pool

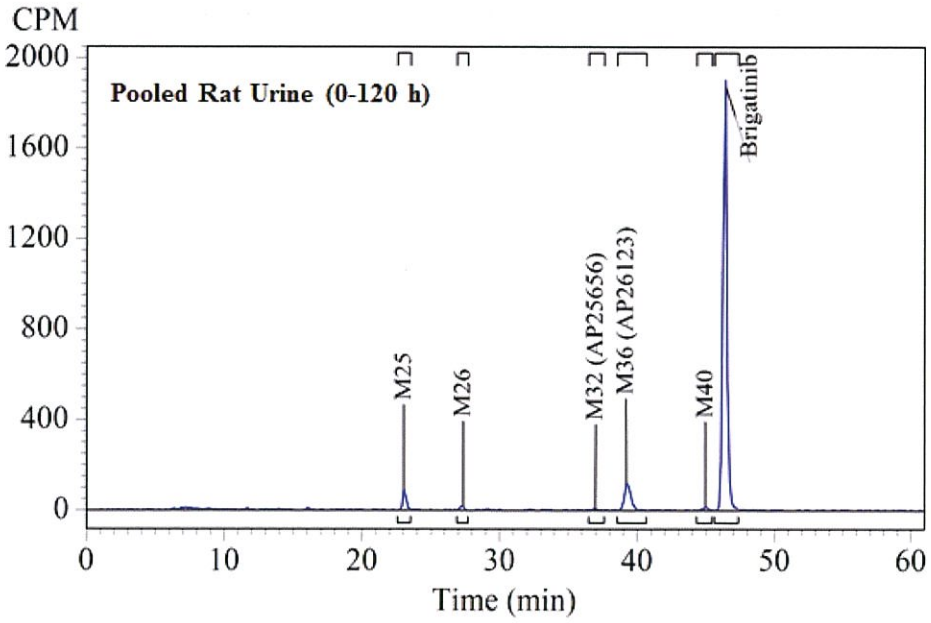


図 2.6.4.5-7　[^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの尿中ラジオクロマトグラム

Dose: 30 mg/kg, 0-120 h pool

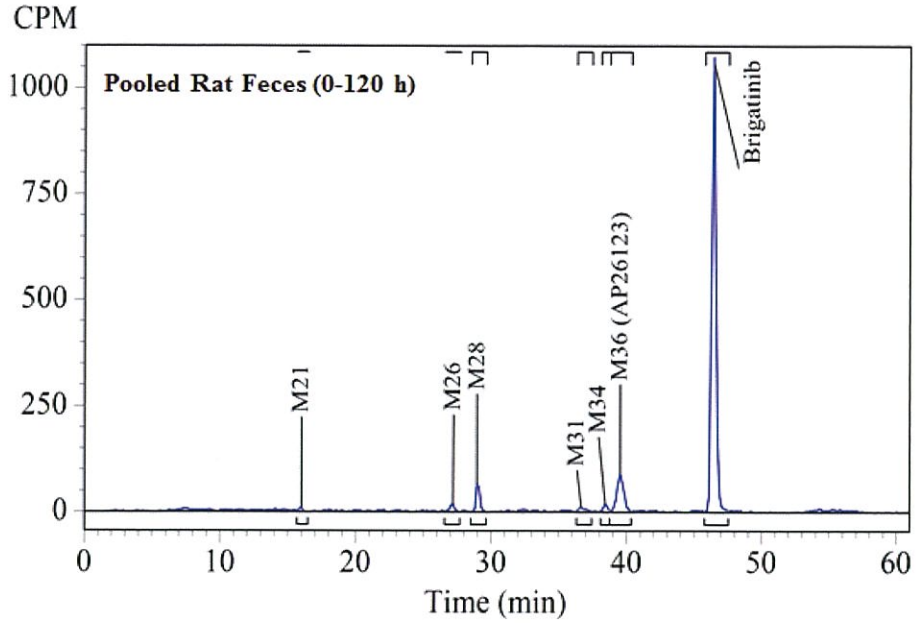


図 2.6.4.5-8　[^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの糞中ラジオクロマトグラム

Dose: 30 mg/kg, 0-24 h pool

表 2.6.4.5-8 [^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの各試料中の代謝物の割合

代謝物 ID	推定代謝物構造	プール試料中の放射能の割合%[a]			
		無処置ラット			BDC ラット
		血漿 0～24 時間	尿[b] 0～120 時間	糞[c] 0～120 時間	胆汁[d] 0～72 時間
M2	グルクロン酸抱合体	--	--	--	4.74
M3	脱アミノ化 + グルクロン酸抱合体	--	--	--	1.41
M4	不飽和化 + GSH 抱合体	--	--	--	2.51
M5	ピペラジン部位の酸化 + GSH 抱合体	--	--	--	1.28
M6	N-脱メチル化 + アセチル化体	--	--	--	1.68
M8	酸化 + GSH 抱合体	--	--	--	2.52
M10	ピペラジン部位のケトン生成 + ジ-不飽和化 + GSH 抱合体	--	--	--	1.21
M12/M13	ピペリジン部位の不飽和化 + グルクロン酸抱合体／酸化 + グルクロン酸抱合体	--	--	--	1.65
M14/M15	ピペラジン部位のケトン生成 + ケトンの還元 + GSH 抱合体/N-脱メチル化 + グルクロン酸抱合体	--	--	--	1.33
M16	ピペラジン部位のケトン生成 + 不飽和化 + 酸化 + グルクロン酸抱合体	--	--	--	1.11
M17	ジ不飽和化 + 酸化 + GSH 抱合体	--	--	--	1.36
M18	ピペラジン部位のケトン生成 + 不飽和化 + GSH 抱合体	--	--	--	2.71
M19	N-脱メチル化 + GSH 抱合体	--	--	--	0.86
M20	ラクタム生成 + GSH 抱合体	--	--	--	1.38
M21	GSH 抱合体	0.62	--	0.61	21.98
M22 (AP32831)	N-酸化体	--	--	--	--
M23	N-酸化 + N-脱メチル化体	--	--	--	0.69
M25 (AP32830)	N-酸化体	0.59	3.15	--	7.65
M26	GSH 抱合 + Glu 脱離体	--	0.79	1.4	--
M28	システイン抱合体	0.49	--	3.98	1.58
M29	不飽和化体	--	--	--	1.04
M30	ビスラクタム体	--	--	--	1.88
M31	N-脱メチル化 + ラクタム体	--	--	1.25	--
M32 (AP25656)	ピペラジン部位のケトン生成+ ケトンの還元体	0.82	0.56	--	3.83
M33	不飽和化 + ビス水酸化体	--	--	--	3.95
M34	不飽和化 + N-脱メチル化体	--	--	1.14	--
AP26123 (M36)	N-脱メチル化体	3.66	7.61	8.75	21.26
M37	N-脱メチル化 + 酸化体	--	--	--	0.78
M40	メチル化 + 酸化体	--	0.92	--	--
brigatinib (未変化体)	NA	84.12	73.46	63.60	9.11

NA = 該当せず、BDC = 胆管ろう形成

[a]: 各マトリックスで総放射能量の 0.5%超を含むピークのみを記載

[b]: 2M 群 (無処置) ラットの尿中から回収された総放射能量は、投与放射能量の 7.05% ± 1.64%であった。

[c]: 2M 群 (無処置) ラットの糞中から回収された総放射能量は、投与放射能量の 87.64% ± 4.14%であった。

[d]: 1M 群 (BDC) ラットの胆汁中の総放射能量は投与放射能量の 31.70% ± 6.98%であった。

-- = 各マトリックスで総放射能量の 0.5%未満又は検出せず

Dose: 30 mg/kg

0～24 時間ラット血漿（図 2.6.4.5-5）中では、brigatinib が主な成分で、TRA の 84.12%を占めていた。主代謝物は AP26123 で、血漿中 TRA の 3.66%を占めていた。血漿中微量代謝物は M21、M25、M28、M32（脱アルキル+還元体、AP25656）で、それぞれ血漿中 TRA の 0.62%、0.59%、0.49%及び 0.82%であった。

BDC ラットでは、投与放射能量の 31.70%が胆汁から回収された。0～72 時間ラットプール胆汁（図 2.6.4.5-6）中には、少なくとも 26 種類の代謝物が認められた。クロマトグラムの初期（6～20 分）に溶出する代謝物は主に brigatinib の抱合体であった。Brigatinib は胆汁中 TRA の 9.11%を占めていた。3 種類の代謝物 M21、AP26123 及び M25 はそれぞれ胆汁中 TRA の 21.98%、21.26%及び 7.65%を占めていた。残りの 23 種類の代謝物は微量で、6 種類はそれぞれ胆汁中 TRA の 2%～5%、17 種類は胆汁中 TRA の 2%未満であった。胆汁中代謝物を以下に示す。

(1) Phase I 代謝物 9 種類（N-脱アルキル化、酸化、不飽和化、メチル化及びそれらの組み合わせによる生成物）- M22、M23、M25、M29、M30、M32、M33、AP26123（M36）及び M37。合わせて、胆汁中 TRA の 41.57%。
(2) Phase II 代謝物 11 種類（brigatinib の GSH 抱合体、Phase I 代謝物の GSH 抱合体及び GSH 抱合体の下流生体内変化代謝物）- M4、M5、M8、M10、M14、M17、M18、M19、M20、M21、M28。合わせて、胆汁中 TRA の 38.41%。
(3) Phase II 代謝物 6 種類（brigatinib 及び Phase I 代謝物のグルクロン酸抱合体）- M2、M3、M12、M13、M15、M16。合わせて、胆汁中 TRA の 10.82%。
(4) Phase II 代謝物 1 種類（AP26123 のアセチル誘導体）- M6。胆汁中 TRA の 1.68%。

無処置ラットでは、投与放射能量の 7.05%が尿から回収されたことから、尿排泄が副次的な消失経路であることが示された。無処置ラットから採取した 0～120 時間プール尿中の主成分は brigatinib で、尿中 TRA の 73.46%を占めていた（図 2.6.4.5-7）。推定された尿中代謝物は AP26123 及び M25 で、それぞれ尿中 TRA の 7.61%及び 3.15%を占めていた。推定された微量代謝物は M32、M26（システイン抱合体）及び M40（メチル化+酸化体）で、それぞれ尿中 TRA の 1%未満であった。

無処置ラットにおける糞中放射能は投与放射能量の 87.64%を占めていた。無処置ラットから採取した 0～120 時間プール糞での主成分は brigatinib で、糞中 TRA の 63.60%を占めていた（図 2.6.4.5-8）。推定された糞中代謝物は、AP26123 及び M28 で、それぞれ糞中 TRA の 8.75%及び 3.98%を占めていた。糞中の TRA の 2%未満を占める主要代謝物は M21、M26、M31（N-脱メチル+ラクタム生成体）及び M34（N-脱メチル+不飽和化体）であった。

無処置 SD ラットにおける brigatinib の推定 in vivo 代謝経路を図 2.6.4.5-9 に示す。

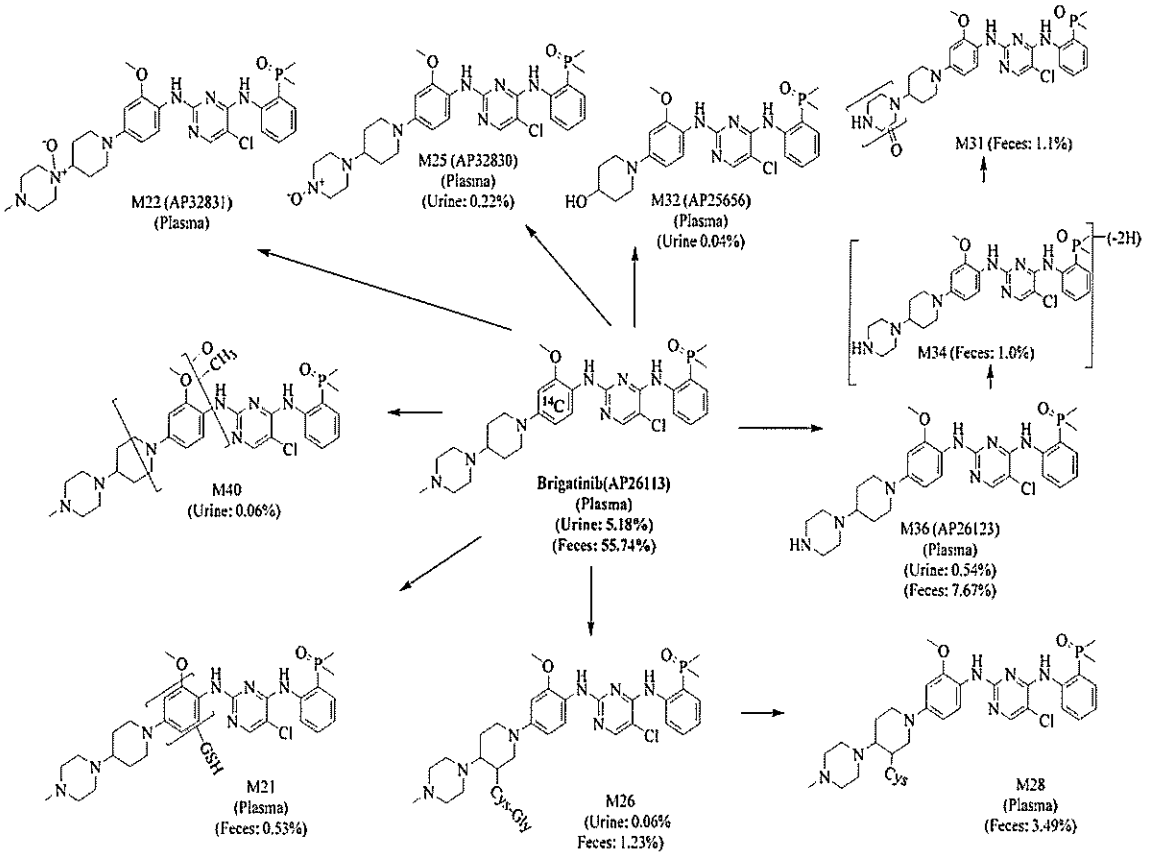


図 2.6.4.5-9 [^{14}C]brigatinib をラットに経口投与したときの in vivo での推定代謝経路
数値は尿及び糞中に回収された各成分の投与放射能量に対する割合を示す。

2.6.4.5.2.2 サル

：添付資料番号 4.2.2.4-6（参考）、-7（参考）、-8（参考）

サル 5 例に、25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）中の[^{14}C]brigatinib を 30 mg/kg（40 μCi/kg）で、単回経口投与した。動物は、一晩（18 時間以上）及び投与後 4 時間絶食させた。全血、血漿、尿及び糞を採取した。投与 168 時間後に、ケージ残屑、ケージ洗浄液及びケージ拭取り物を採取した。嘔吐物があった場合は、マスバランス評価用試料として別途採取した。

サルに[^{14}C]brigatinib〔25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 3.98）中〕を経口投与後の血漿、尿及び糞抽出物のラジオクロマトグラムをそれぞれ図 2.6.4.5-10、図 2.6.4.5-11 及び図 2.6.4.5-12 に示し、各マトリックス中の代謝物の割合%を表 2.6.4.5-9 に示す。

0～24 時間サル血漿（図 2.6.4.5-10）中では、brigatinib が主な成分で、血漿中の TRA の 74.99%を占めていた。代謝物 AP26123 及び M28 はそれぞれ血漿中 TRA の 8.99%及び 2.72%を占めていた。循環血漿中微量代謝物は M13、M27 及び M38（ラクタム生成）で、それぞれ血漿中 TRA の 1.31%、0.89%及び 1.32%を占めていた。

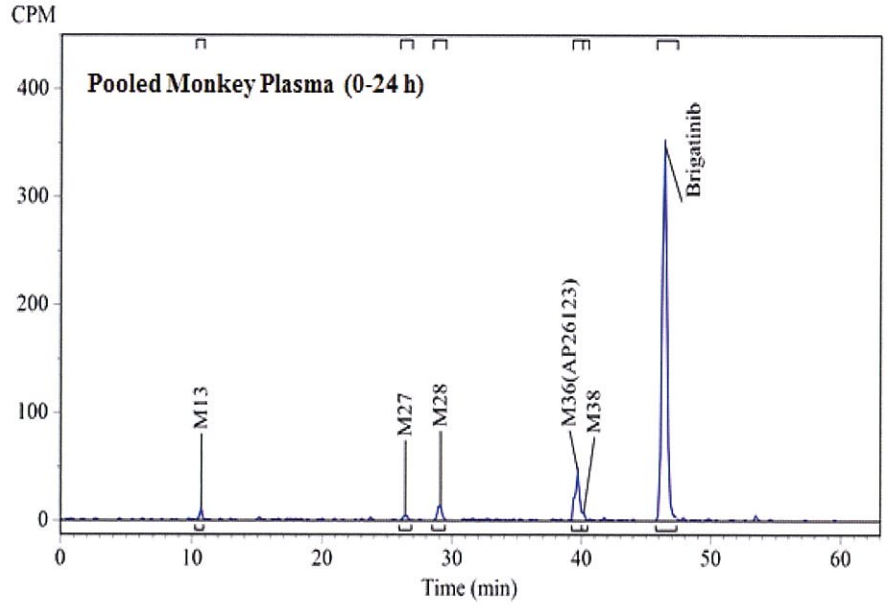


図 2.6.4.5-10　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの血漿中ラジオクロマトグラム

Dose: 30 mg/kg, 0-24 h pool

サルにおける尿中放射能は投与放射能量の 9.75%を占めており、尿中排泄は主な消失経路ではないことが示された。0～96 時間プール尿中では、brigatinib 及び AP26123 が主成分で、それぞれ尿中 TRA の 52.4%及び 15.52%を占めていた（図 2.6.4.5-11）。微量代謝物は、M21、M1（不明）、M28、M9（AP26123 のグルクロン酸抱合体）、M38、M2（グルクロン酸抱合体）、M13 で、それぞれ尿中 TRA の 4.19%、3.78%、2.67%、1.87%、1.62%、1.46%及び 1.40%を占めていた。尿中 TRA の 1%未満を占める代謝物は、M7（酸化+グルクロン酸抱合体、M13 の異性体）、M42（不明）、M35（酸化体）、M26、M25、M41（メチル化体）及び M27 であった。

サルでの糞中放射能は、投与放射能量の 66.48%を占めていた。0～168 時間プール糞中では、brigatinib、AP26123 及び M28 が主成分で、それぞれ糞中 TRA の 21.93%、13.91%及び 20.39%を占めていた（図 2.6.4.5-12）。Brigatinib はサルにおいて、広範な代謝を受け、糞中に多くの識別不能な構造が未知の微量代謝物（領域 1～4）が認められ、これらは糞中 TRA の 16.79%を占めていた。推定された微量代謝物（又は経路）は、M24（不飽和化 + GSH 抱合 + Glu 脱離 + N-アセチル化）、M27、M41、M1（不明）、M35、M26 及び M38 で、それぞれ糞中 TRA の 6.66%、5.91%、3.37%、3.20%、2.38%、2.17%及び 0.99%を占めていた。

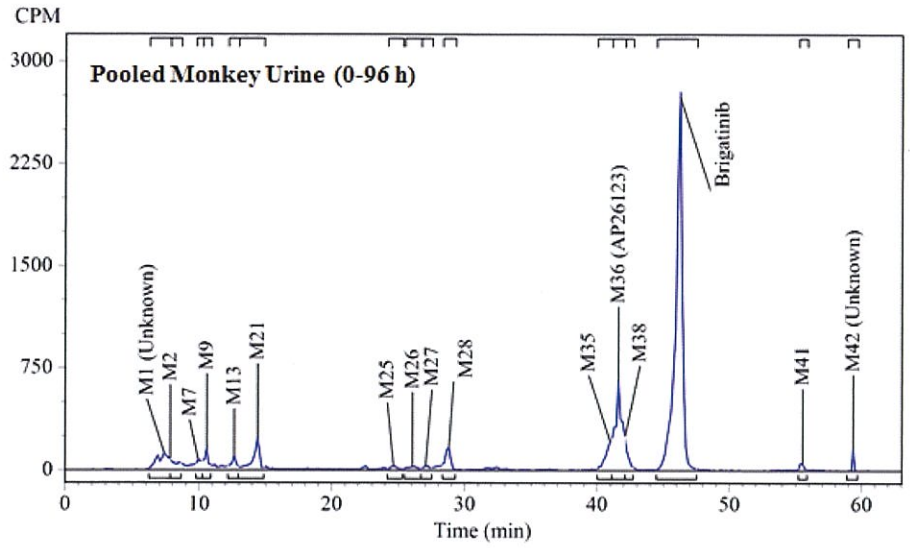


図 2.6.4.5-11　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの尿中ラジオクロマトグラム

Dose: 30 mg/kg, 0-96 h pool

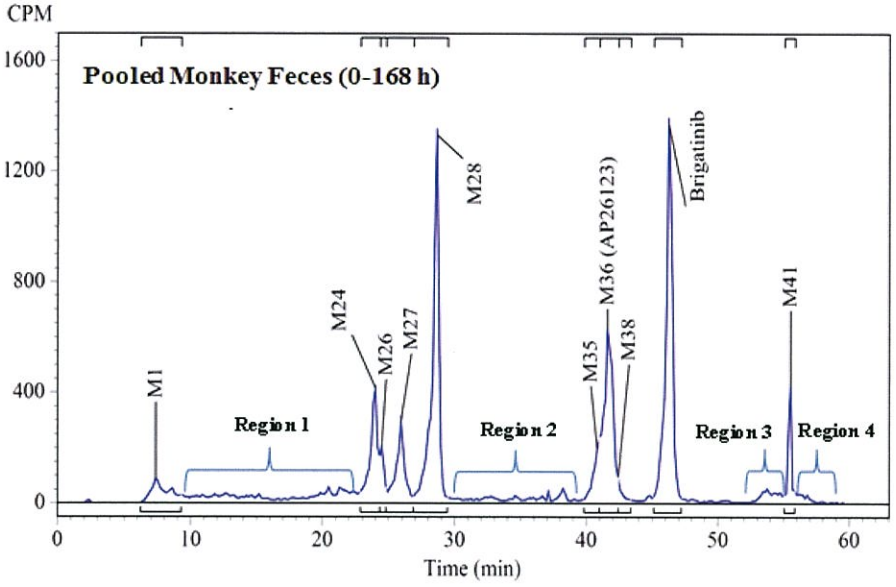


図 2.6.4.5-12　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの糞中ラジオクロマトグラム

Dose: 30 mg/kg, 0-168 h pool

表 2.6.4.5-9　[^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの各試料中の代謝物の割合

代謝物 ID	推定代謝物構造	プール資料中の放射能の割合 (%)[a]		
		血漿 0～24 時間	尿[b] 0～96 時間	糞[c] 0～168 時間
M1 (不明)	不明	--	3.78	3.20
M2	グルクロン酸抱合体	--	1.46	--
領域 1	不明	--	--	9.07
M7	酸化 + グルクロン酸抱合体	--	0.97	--
M9	N-脱メチル化 + グルクロン酸抱合体	--	1.87	--
M13	酸化 + グルクロン酸抱合体	1.31	1.40	--
M21	GSH 抱合体	--	4.19	--
M24	GSH 抱合 + Glu 脱離 + N-アセチル化体	--	--	6.66
M25 (AP32830)	N-酸化体	--	0.71	--
M26	GSH 抱合 + Glu 脱離体	--	0.82	2.17
M27	酸化体	0.89	0.64	5.91
M28	システイン抱合体	2.72	2.67	20.39
領域 2	不明	--	--	4.58
M35	酸化体	--	0.83	2.38
AP26123 (M36)	N-脱メチル化体	8.99	15.52	13.91
M38	ラクタム体	1.32	1.62	0.99
領域 3	不明	--	--	2.02
M41	メチル化体	--	0.69	3.37
領域 4	不明	--	--	1.12
M42	不明	--	0.83	--
brigatinib (未変化体)	NA	74.99	52.40	21.93

略語：NA = 該当せず
[a]: 各マトリックスで総放射能量の 0.5%超を含むピークのみを記載
[b]: 尿中から回収された総放射能量は、投与放射能量の 9.75% ± 0.87%であった。
[c]: 糞中から回収された総放射能量は、投与放射能量の 66.48% ± 6.46%であった。
-- = 各マトリックスで総放射能量の 0.5%未満又は検出せず
Dose: 30 mg/kg

カニクイザルにおける推定 in vivo 代謝経路を図 2.6.4.5-13 に示す。

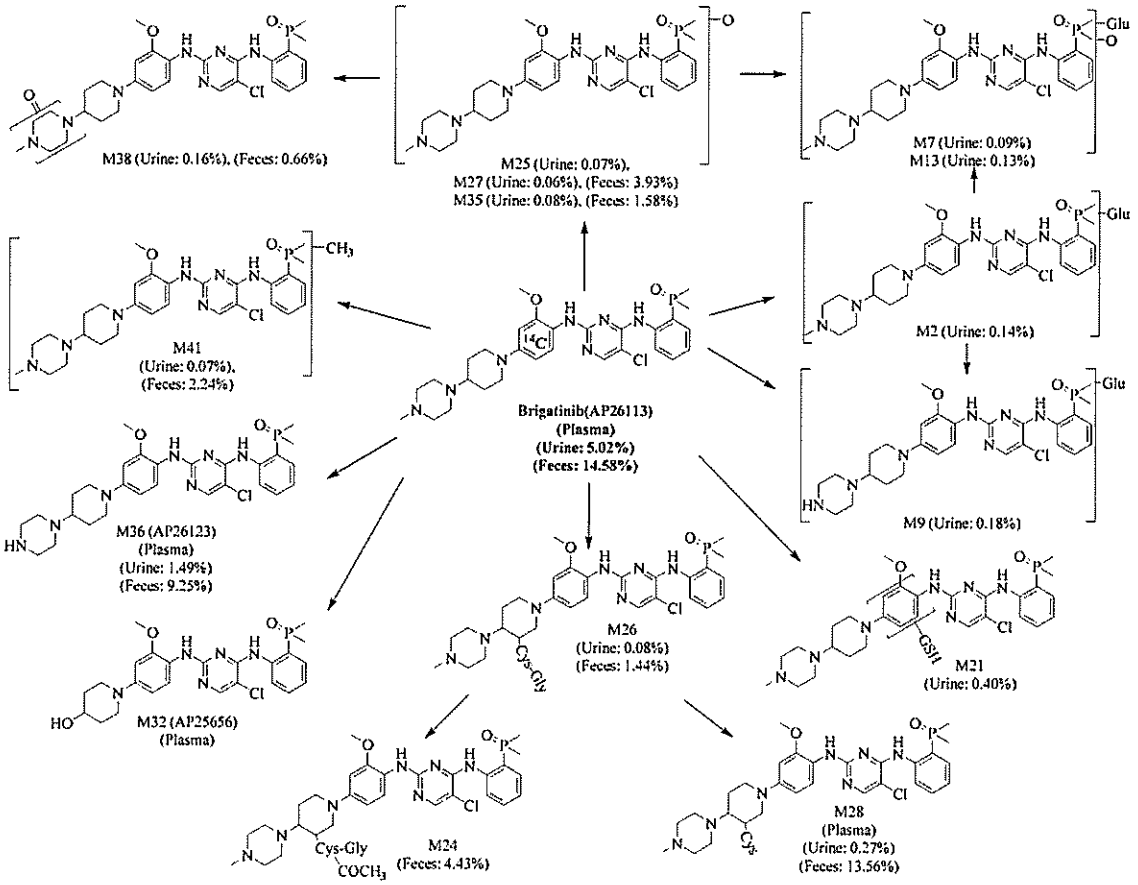


図 2.6.4.5-13 [^{14}C]brigatinib をサルに経口投与したときの in vivo での推定代謝経路

数値は尿及び糞中に回収された各成分の投与放射能量に対する割合を示す。

2.6.4.6 排泄

Brigatinib を単回経口投与したときの投与放射能量の回収率（マスバランス）を求め、さらに brigatinib の主消失経路を特定するため、ラット及びサルに ADME 試験を実施した。

2.6.4.6.1 ラット

：添付資料番号 4.2.2.4-3（参考）、-4（参考）、-5（参考）

無処置及び BDC ラットに 25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）中の[^{14}C]brigatinib を 30 mg/kg（200 μCi/kg）で、単回経口投与したときの排泄を評価した。

BDC ラット（1M 群）では、0～72 時間に採取した胆汁、尿、糞、屍体、ケージ洗浄液及びケージ拭取り物からの平均総回収率は、94.68%であった（n = 4。2 例は、胆管閉塞により死亡）。0～72 時間に胆汁、尿、糞及び屍体から回収された放射能量（投与量に対する%）はそれぞれ 31.70%、21.16%、18.56%及び 17.95%であった。ケージ洗浄液及びケージ拭取り物の放射能量は、それぞれ投与放射能量の 5.23%及び 0.09%であった。BDC ラットでは、[^{14}C]brigatinib の胆汁及び糞中排泄を合わせると、総投与放射能量の 50%を超え、尿中排泄は総投与放射能量の 25%未満であった。

無処置ラット（2M 群）では、投与 120 時間後の尿、糞、屍体、ケージ洗浄液及びケージ拭取り物からの平均総回収率は、投与放射能量の 97.88%（n = 4）で、大部分（93.88%）が 72 時間以内に回収された。投与 120 時間後に尿、糞及び屍体から回収された放射能量（投与量に対する%）はそれぞれ 7.05%、87.64%及び 0.67%であった。ケージ洗浄液及びケージ拭取り物の放射能量は、それぞれ投与放射能量の 2.39%及び 0.12%であった。無処置ラットでは投与放射能量の大部分（85%超）が糞中に排泄され、BDC ラットと同様の排泄パターンが認められた。

以上、雄 SD ラットに[^{14}C]brigatinib 30 mg/kg を単回経口投与すると、投与放射能は主に糞中（87.64%）に排泄され、少量が尿中（7.05%）に排泄され、糞中の未変化体は投与放射能量の 55.74%であった。

2.6.4.6.2 サル

：添付資料番号 4.2.2.4-6（参考）、-7（参考）、-8（参考）

雄性サルに 25 mmol/L クエン酸緩衝液（pH 4.0）中の[^{14}C]brigatinib を 30 mg/kg（40 μCi/kg）で、経口投与したときの排泄を評価した。投与 168 時間後の平均放射能回収率は 88.93%で、投与放射能量の大部分が糞を介して排泄され（66.48%）、投与放射能量のうち尿中に排泄される割合は比較的少なかった（9.75%）。ケージ残屑、ケージ洗浄液、ケージ拭取り物及び嘔吐物中の放射能回収率はそれぞれ投与放射能量の 2.55%、0.67%、0.86%及び 8.42%であった。

以上、雄カニクイザルに[^{14}C]brigatinib 30 mg/kg を単回経口投与すると、投与放射能は主に糞中（66.48%）に排泄され、少量が尿中（9.75%）に排泄され、糞中の未変化体は投与放射能量の 14.58%であった。

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1 In vitro での CYP 阻害

：添付資料番号 4.2.2.6-1（参考）

本試験の目的は、ヒト肝ミクロソームを用いて主要な CYP 酵素（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5）に対する brigatinib 及びその N-脱メチル代謝物 AP26123（M36）の阻害能を評価することであった。Brigatinib 及び AP26123 の CYP 阻害作用を評価するため、典型基質の代謝反応に対する brigatinib の作用を評価した。時間依存的阻害（TDI）の評価のため、典型基質の代謝反応前に、brigatinib を NADPH 非存在下又は存在下で、ヒト肝ミクロソームとともに 30 分間プレインキュベートした。典型基質は LC-MS/MS で定量した。

Brigatinib 及び AP26123 による in vitro での CYP 阻害の IC_{50} 値を表 2.6.4.7-1 に示す。

表 2.6.4.7-1　Brigatinib 及び AP26123（代謝物）の CYP 阻害 IC_{50} 値

被験物質	阻害機序	CYP 分子種	1A2	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	3A4/5[a]	3A4/5[b]
brigatinib	可逆的	IC_{50} (μmol/L)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	72.9
brigatinib	TDI (+NADPH)	IC_{50} (μmol/L)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
brigatinib	TDI (-NADPH)	IC_{50} (μmol/L)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	60.1
AP26123	可逆的	IC_{50} (μmol/L)	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	63.8

CYP = チトクロム P450、IC_{50} = 50%阻害濃度、TDI = 時間依存的阻害（30 分間のプレインキュベーション）
[a]: teststerone 6β-水酸化
[b]: midazolam 1'-水酸化

Brigatinib 及び AP26123 による可逆的 CYP 阻害の IC_{50} 値は 100 μmol/L 超であった。唯一の例外は、CYP3A4/5 媒介 midazolam 1'-水酸化の阻害に対する IC_{50} 値で、72.9 μmol/L（brigatinib）及び 63.8 μmol/L（AP26123）であった。Brigatinib 及び AP26123 による阻害の Ki 値（IC_{50} 値/2）はそれぞれ 36.5 μmol/L 及び 31.9 μmol/L である。Brigatinib は、in vitro で CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4/5 に対する時間依存的阻害作用は認められなかった。

2.6.4.7.2 In vitro での CYP 誘導

：添付資料番号 4.2.2.6-2（評価）

本試験の目的は、3 種類のドナー（[redacted]、[redacted] 及び [redacted]）由来ヒト肝細胞を用いて in vitro で brigatinib の CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 誘導作用を評価することであった。

Brigatinib の細胞毒性は乳酸脱水素酵素（LDH）及び resazurin の還元により評価した。予備試験結果から、ジメチルスルホキシド（DMSO）（媒体）、既知の CYP 誘導剤又は低濃度の brigatinib（2.5 μmol/L 以下）で処理した培養ヒト肝細胞はおおよそ正常な肝細胞形態を示していた。肝細胞 [redacted] 及び [redacted] の目視検査によって、britatinib 処理による細胞形態変化の徴候が 5 μmol/L から濃度依存的に認められた。さらに、LDH 放出実験の結果から、2.5 μmol/L 以上の brigatinib で実施された各 LDH 放出実験における 3 種類の肝細胞のうち 2 種類以上の使用培地中の LDH 量が対照と比べて高値であることが示された。Resazurin を用いた評価でも同様の結果が得られ、1 μmol/L 以上の濃度で肝細胞の生存率が 70%未満に低下した。

DMSO（0.1% v/v、媒体対照）、flumazenil（25 μmol/L、陰性対照）、brigatinib（0.25、1、2.5、5、7.5、10 又は 20 μmol/L）又は既知のヒト CYP 誘導剤である omeprazole（50 μmol/L）、phenobarbital（750 μmol/L）又は rifampicin（20 μmol/L）を肝細胞に 1 日 1 回 2 日間処理した。mRNA 発現の変化及び CYP 典型基質の代謝反応速度により酵素誘導作用を評価した。陽性対照誘導剤である omeprazole、phonobarbital 及び rifampicin により、それぞれ CYP1A2 mRNA（59.0～178 倍）、CYP2B6 mRNA（5.17～10.4 倍）及び CYP3A4 mRNA 量（8.75～27.1 倍）の顕著な誘導が認められた。CYP1A2 活性（6.03～49.5 倍）、CYP2B6 活性（6.22～9.55 倍）及び CYP3A4/5 活性（3.50～8.92 倍）の顕著な誘導も陽性対照の誘導剤処理により認められた。

ヒト肝細胞を brigatinib（0.25～20 μmol/L）で処理すると、CYP1A2 活性（最大 87.3%）及び CYP2B6 活性（最大 70%）及び CYP1A2 mRNA 量（最大 96%）が濃度依存的に低下した。CYP2B6 mRNA 量は濃度依存的に増加し、最大誘導倍率は [redacted] では 1 μmol/L で 2.70（陽性対照の反応の 40.9%）、[redacted] では 1 μmol/L で 2.79（陽性対照の反応の 19.0%）、[redacted] では 2.5 μmol/L で 2.83（陽性対照の反応の 34.3%）となり、これより高用量では、誘導倍率が低下し、ベルシェイプ型曲線となった。また、brigatinib 処理により [redacted] 及び [redacted] では CYP3A4/5 活性が濃度依存的に低下した。[redacted] では、brigatinib により CYP3A4/5 活性が濃度依存的に増加し、最大誘導倍率は、1 μmol/L で 2.18（陽性対照の反応の 14.9%）となり、これより高用量では、誘導倍率が低下し（20 μmol/L brigatinib で 73.2%）、ベルシェイプ型曲線となった。Brigatinib 処理により CYP3A4 mRNA 量は濃度依存的に増加し、最大誘導倍率は [redacted] 及び [redacted] では 1 μmol/L でそれぞれ 5.13（陽性対照の反応の 15.9%）及び 6.19（陽性対照の反応の 67.0%）、[redacted] では 2.5 μmol/L で 6.54（陽性対照の反応の 26.8%）となり、これより高用量では誘導倍率が低下し、ベルシェイプ型曲線となった。

以上、本試験では、ヒト肝細胞を 0.25～20 μmol/L の brigatinib で処理すると、CYP1A2 及び CYP2B6 活性及び CYP1A2 mRNA 量が濃度依存的に低下し、CYP2B6 mRNA 量及び CYP3A4/5 活性について、ベルシェイプ型曲線が認められた。Brigatinib は 2.5 μmol/L 以下の濃度で CYP2B6 の弱い誘導剤であった。また、brigatinib により CYP3A4 mRNA 量が濃度依存的に増加し、[redacted] 及び [redacted] では 1 μmol/L まで、[redacted] では 2.5 μmol/L で最大誘導倍率、これより高用量では、誘導倍率が低下し、ベルシェイプ型曲線となった。

2.6.4.7.3 In vitro での薬物トランスポーターとの相互作用

以下に示す試験の目的は、a) 消化管及び肝臓における排出トランスポーターである P-gp、BCRP 及び BSEP、b) 肝取り込みトランスポーターである OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1、c) 腎トランスポーターである OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2K に対して、brigatinib の基質性又は阻害作用を評価することであった。

2.6.4.7.3.1 トランスポーター基質評価

：添付資料番号 4.2.2.2-1（評価）、4.2.2.6-3（評価）

[^{14}C]brigatinib（0.1、1、4 及び 10 μmol/L）について、C2BBe1、MDR1-MDCK 及び MDCK 細胞株を用いた P-gp 基質評価及び C2BBe1、BCRP-MDCK 及び MDCK 細胞株を用いた BCRP 基質評価を実施した（2.6.4.3.1 参照）。[^{14}C]brigatinib のその他のトランスポーター基質性を、トランスポーター発現細胞又は発現膜ベシクルを用いて評価した。OATP1A2 発現細胞による[^{14}C]brigatinib の取り込み量は対照細胞と比較して 2 倍以上であったため、brigatinib は OATP1A2 の基質となることが示唆された。

一方で、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2K 及び NTCP 発現細胞による[^{14}C]brigatinib の取り込み量は対照細胞と同等であった。また、BSEP 発現膜ベシクルを用いて、アデノシン 5'-三リン酸（ATP）及びアデノシン 5'-一リン酸（AMP）の存在下で[^{14}C]brigatinib の取り込み量は同等であった。

これらのトランスポーター試験の結果から、brigatinib は P-gp、BCRP 及び OATP1A2 の基質であるが、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2K、BSEP 又は NTCP の基質ではないと考えられた。

2.6.4.7.3.2 トランスポーター阻害評価

：添付資料番号 4.2.2.2-1（評価）、4.2.2.6-4（評価）

消化管及び肝排出トランスポーター

[^{3}H]taurocholate（[^{3}H]TCA）を典型基質として、BSEP 発現膜ベシクルを用いて brigatinib の BSEP 阻害能を評価した。その結果、BSEP 活性残存率は全ての濃度（0.3-120 μmol/L）で 50%以上であったため、IC_{50} 値は 120 μmol/L 超であった。MDR1-MDCK 及び C2BBe1 細胞を用いて、P-gp 阻害剤としての brigatinib の予備評価を実施した結果を表 2.6.4.7-2 に示す。

表 2.6.4.7-2　MDR1-MDCK 及び C2BBe1 細胞における digoxin の排出輸送に対する brigatinib の阻害作用

細胞モデル	処理	回収率 (%)		P_{app} ($x10^{-6}$cm/s)		排出比 [a]
		A→B	B→A	A→B	B→A	
MDR1-MDCK	10 μmol/L digoxin	87.6 ± 8.2	94.0 ± 3.7	0.142 ± 0.01	10.1 ± 1.2	71
	10 μmol/Ldigoxin + 120 μmol/L brigatinib	96.7 ± 11.0	101 ± 9.4	0.363 ± 0.08	4.59 ± 0.52	13
	10 μmol/Ldigoxin + 1 μmol/L valspodar	89.2 ± 7.4	105 ± 12	0.468 ± 0.08	0.473 ± 0.03	1.0
C2BBel	10 μmol/Ldigoxin	85.5 ± 0.39	87.7 ± 4.6	1.14 ± 0.19	18.7 ± 0.75	16
	10 μmol/L digoxin + 65 μmol/L brigatinib	86.6 ± 5.7	94.0 ± 4.8	3.80 ± 1.0	4.59 ± 0.27	1.2
	10 μmol/L digoxin + 1 μmol/L valspodar	87.5 ± 3.8	89.9 ± 7.6	4.07 ± 0.32	4.55 ± 0.41	1.1

A = 頂端膜、B = 側底膜、P_{app} = 見かけの透過係数
表中の値は 3 例の平均値 ± SD を示す。
digoxin: P-gp 典型基質
valspodar: P-gp 阻害剤
[a]: 排出比は $P_{app\ B\to A}/P_{app\ A\to B}$ として算出

Brigatinib 及び valspodar 非存在下での、MDR1-MDCK 細胞における digoxin の排出比は 71 であったが、brigatinib 存在下では digoxin の排出比が 13 に減少し、阻害率は 83.4%であった。同様に、brigatinib 又は valspodar 非存在下での、C2BBe1 細胞における digoxin の排出比は 16 であったが、brigatinib 存在下では digoxin の排出比が 1.2 に減少し、阻害率は 98.6%であった。阻害率は 50%を超えており、これらの結果から、brigatinib は P-gp の阻害剤であることが示唆された。その後の試験では、C2BBe1 細胞を用いて、brigatinib の濃度を 0、0.267、0.802、2.41、7.22、21.7 及び 65 μmol/L として digoxin の透過性を評価した結果、濃度依存的な P-gp 阻害が認められ、IC_{50} 値は 1.76 μmol/L であった（図 2.6.4.7-1）。

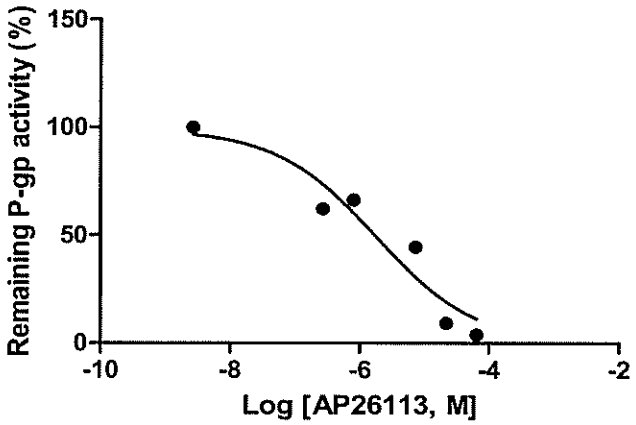


図 2.6.4.7-1　C2BBe1 細胞における digoxin の排出輸送に対する brigatinib の影響

AP26113: brigatinib

BCRP-MDCK 及び C2BBe1 細胞を用いて、BCRP 阻害剤としての brigatinib の予備評価を実施した結果を表 2.6.4.7-3 に示す。

表 2.6.4.7-3　BCRP-MDCK 及び C2BBe1 細胞における cladribine の排出輸送に対する brigatinib の阻害作用

細胞モデル	処理	回収率 (%)		P_{app} (x10-6cm/s)		排出比 [a]
		A→B	B→A	A→B	B→A	
BCRP-MDCK	10 μmol/L cladribine	86.1 ± 1.6	86.4 ± 0.64	0.205 ± 0.01	11.6 ± 1.4	56
	10 μmol/L cladribine + 120 μmol/L brigatinib	85.5 ± 2.6	89.1 ± 3.6	0.232 ± 0.04	1.78 ± 0.14	7.7
	10 μmol/L cladribine + 10 μmol/L Ko143	85.3 ± 3.2	90.2 ± 1.8	0.240 ± 0.03	0.999 ± 0.22	4.2
C2BBe1	10 μmol/L cladribine	90.3 ± 2.5	93.0 ± 1.5	1.27 ± 0.18	24.2 ± 0.83	19
	10 μmol/L cladribine + 65 μmol/L brigatinib	94.1 ± 2.1	99.7 ± 0.87	0.916 ± 0.07	3.82 ± 0.29	4.2
	10 μmol/L cladribine + 10 μmol/L Ko143	95.4 ± 3.1	98.8 ± 1.1	1.70 ± 0.25	1.86 ± 0.11	1.1

略語: A = 頂端膜、B = 側底膜、P_{app} = 見かけの透過係数

表中の値は 3 例の平均値 ± SD を示す。

cladribine: BCRP 典型基質

Ko143: BCRP 阻害剤

[a]: 排出比は $P_{app\ B\rightarrow A}/P_{app\ A\rightarrow B}$ として算出

Brigatinib 又は Ko143 非存在下での、BCRP-MDCK 細胞における cladribine の排出比は 56 であったが、brigatinib 存在下では cladribine の排出比が 7.7 に減少し、阻害率は 87.9%であった。同様に、brigatinib 又は Ko143 非存在下での、C2BBe1 細胞における cladribine の排出比は 19 であったが、brigatinib 存在下では cladribine の排出比が 4.2 に減少し、阻害率は 82.4%であった。Brigatinib による cladribine 輸送阻害は 50%を超えており、これらの結果から、brigatinib は BCRP の阻害剤であることが示唆された。その後の試験では、C2BBe1 中で brigatinib の濃度を 0、0.267、0.802、2.41、7.22、21.7 及び 65 μmol/L として、cladribine の透

過性を評価した結果、濃度依存的な BCRP 阻害が認められ、IC_{50} 値は 10.1 μmol/L であった（図 2.6.4.7-2）。

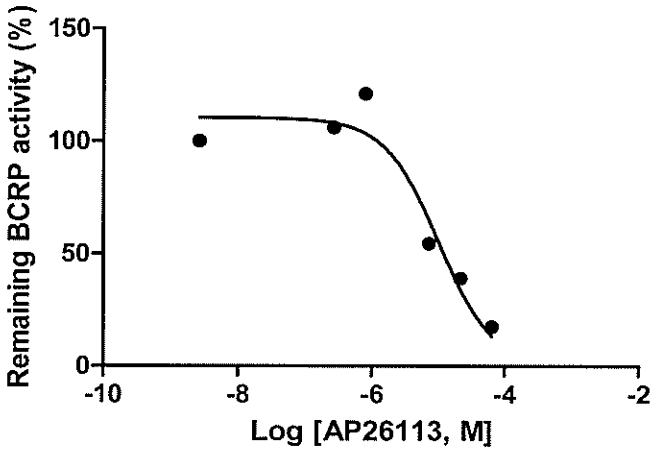


図 2.6.4.7-2　C2BBe1 細胞における cladribine の排出輸送に対する brigatinib の阻害作用
AP26113: brigatinib

肝取り込みトランスポーター

OATP1B1 及び OATP1B3 発現細胞を用いて brigatinib の OATP1B1 及び OATP1B3 の阻害作用を評価した。Brigatinib（120 μmol/L）の非存在下及び存在下で、atorvastatin の取り込み（0.15 μmol/L、OATP1B1 及び OATP1B3 の典型基質）を評価した。Brigatinib は 120 μmol/L で、OATP1B1 発現細胞における atorvastatin 取り込みを 46.8%、OATP1B3 発現細胞における atorvastatin 取り込みを 53.4%阻害した。試験濃度での 50%以上の阻害という閾値に基づくと、brigatinib は OAT1B1 又は OATP1B3 の顕著な阻害剤ではなかった。

OCT1 発現細胞を用いて、methylphenylpyridinium（MPP^+、5 μmol/L）を典型基質として、brigatinib の OCT1 阻害能を評価した。Brigatinib は 65 μmol/L で、OCT1 発現細胞における MPP^+取り込みを 89.1%阻害した。その後の試験では、brigatinib の濃度を 0、0.267、0.802、2.41、7.22、21.7 及び 65 μmol/L として検討し、濃度依存的な OCT1 による MPP^+取り込み阻害作用が認められ、IC_{50} 値は 6.49 μmol/L であった（図 2.6.4.7-3）。

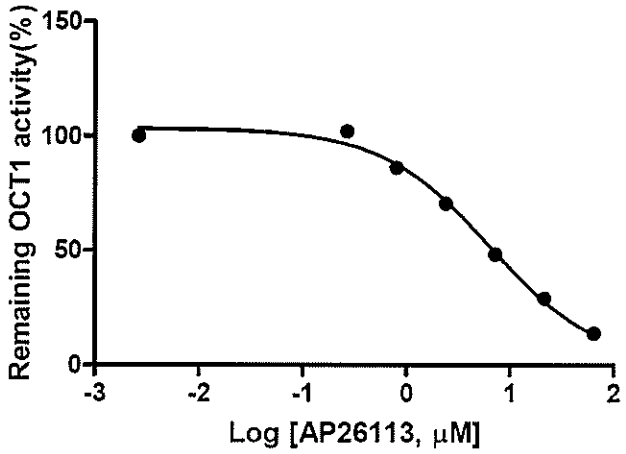


図 2.6.4.7-3　OCT1 発現細胞による MPP^+取り込みに対する brigatinib の阻害作用

AP26113: brigatinib

腎トランスポーター

トランスポーター発現細胞を用いて、*p*-aminohippuric acid（PAH、10 μmol/L）、furosemide（5 μmol/L）、MPP^+（5 μmol/L）、metoformin（50 μmol/L）及び 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium（ASP、1 μmol/L）をそれぞれ典型基質として、brigatinib の OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2K の阻害作用を評価した。

Brigatinib は、65 μmol/L の濃度で OAT1 発現細胞における PAH 取り込みを 18.4%、OAT3 発現細胞における furosemide 取り込みを 36.3%、OCT2 発現細胞における MPP^+取り込みを 26.0%阻害した。Brigatinib（20 μmol/L）は MATE1 発現細胞における metoformin 取り込みを 95.5%、MATE2K 発現細胞における ASP 取り込みを 59.9%阻害した。その後の試験では、brigatinib の濃度を 0、0.0823、0.247、0.741、2.22、6.67 及び 20 μmol/L として検討し、濃度依存的な MATE1 による metformin 取り込みおよび MATE2K による ASP 取り込みの阻害作用が認められ、IC_{50} 値はそれぞれ 0.832 および 5.19 μmol/L であった（図 2.6.4.7-4 及び図 2.6.4.7-5）。

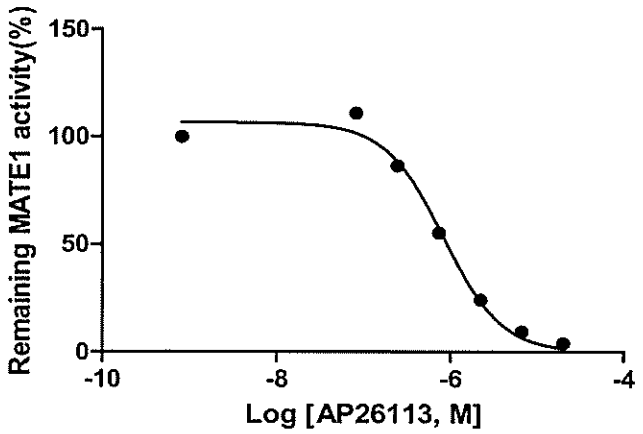


図 2.6.4.7-4　MATE1 発現細胞による metoformin 取り込みに対する brigatinib の阻害作用

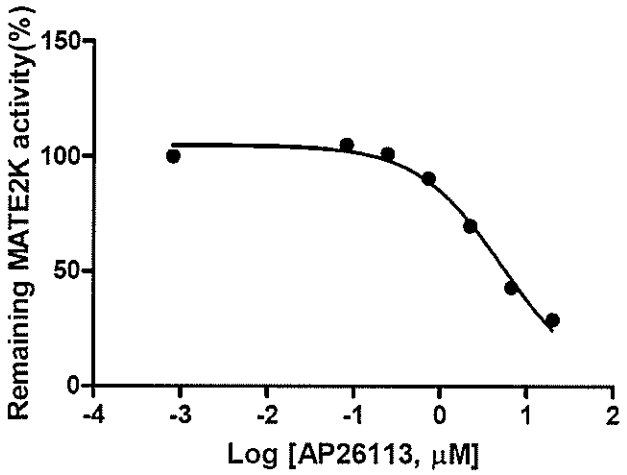


図 2.6.4.7-5　MATE2K 発現細胞による ASP 取り込みに対する brigatinib の阻害作用

Brigatinib は in vitro で OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2 又は BSEP の輸送活性を有意に阻害しなかったことから、これらのトランスポーターの基質と臨床相互作用を示す可能性は低いことが示唆された。一方で brigatinib は P-gp、BCRP、MATE1、MATE2K 及び OCT1 に対する阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 1.76、10.1、0.832、5.19 及び 6.49 μmol/L であった。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

非臨床胎盤通過性及び乳汁排泄試験は実施していない。

2.6.4.9 考察及び結論

Brigatinib は P-gp や BCRP などの排泄トランスポーター基質であるにもかかわらず、消化管からの吸収性は高かった。Brigatinib はラット及びサルにおいて、低クリアランスを示し、分布容積は中等度、t1/2 は中等度又は長かった。ラット及びサルにおける BA は中等度（約 40%～53%）であった。In vitro での brigatinib のマウス、ラット、サル及びヒト血漿蛋白結合率は中等度（64.1%～73.0%）で、RBC への濃縮的な分配も認められなかった。

In vitro 代謝試験の結果、CYP2C8 及び CYP3A4 は brigatinib 代謝に関与する主な CYP 分子種で、CYP3A5 の寄与は軽微であると考えられた。このため、CYP2C8 及び CYP3A4/5 誘導剤及び阻害剤は、brigatinib の薬物動態に影響を及ぼす可能性がある。

[^{14}C]brigatinib をラット及びサルに経口投与したときの brigatinib の代謝物プロファイルは、質的に同様であった。N-脱メチル化による AP26123（M36）の生成が brigatinib の主代謝経路であった。Brigatinib の未変化体が血漿中主成分で TRA の 75%～84.1%であり、AP26123 は 10%未満であった。

ラット及びサルにおける[^{14}C]brigatinib の主排泄経路は糞排泄であった（ラット：87.64%、サル:66.48%）。ラット及びサル糞中の未変化体は投与放射能量のそれぞれ 55.74%及び 14.58%であった。ラット及びサル尿中の未変化体は投与放射能量のそれぞれ 5.18%及び 5.02%で、ラット胆汁中では放射能投与量の 2.89%であった。

Brigatinib は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4/5 阻害による併用薬との薬物相互作用は生じないと推定される。ヒト肝細胞を 0.25～20 μmol/L の濃度で brigatinib を処理すると、CYP1A2 及び CYP2B6 活性及び CYP1A2 の mRNA 量が濃度依存的に低下し、CYP2B6 mRNA 量及び CYP3A4/5 活性について、ベルシェイプ型曲線が認められた。Brigatinib は 2.5 μmol/L 以下の濃度で CYP2B6 の弱い誘導剤であった。Brigatinib により CYP3A4 の mRNA 量は濃度依存的に増加し、最大誘導作用は 1 μmol/L 又は 2.5 μmol/L で認められ、これより高用量では、誘導倍率が低下し、ベルシェイプ型曲線となった。

Brigatinib は P-gp、BCRP 及び OATP1A2 の基質であるが、OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1、MATE2K、BSEP 又は NTCP の基質ではなかった。Brigatinib は in vitro で高い溶解度と膜透過性を示すことから、P-gp、BCRP 及び OATP1A2 の阻害が brigatinib の体内動態を変化させる可能性は低いと考えられる。Brigatinib は、in vitro で OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2 又は BSEP の輸送活性に対する阻害作用は弱く、薬物相互作用を起こす可能性は低いと考えられる。一方で brigatinib は P-gp、BCRP、MATE1、MATE2K 及び OCT1 に対する阻害作用を示し、IC_{50} 値はそれぞれ 1.76、10.1、0.832、5.19 及び 6.49 μmol/L であった。Brigatinib は P-gp、BCRP、OCT1、MATE1 及び MATE2K 基質と薬物動態学的薬物相互作用を示す可能性がある。

2.6.4.10 図表

図表は本文中の適切な箇所に記載した。

2.6.4.11 参考文献一覧

[1] Artursson P, Karlsson J. Correlation Between Oral Drug Absorption in Humans and Apparent Drug Permeability Coefficients in Human Intestinal Epithelial (Caco-2) Cells. Biochem Biophys. Res Comm. 1991;175(3):880-885.

[2] Yu S, Li S, Yang H, Lee F, Wu JT, Qian M. A novel liquid chromatography/tandem mass spectrometry based depletion method for measuring red blood cell partitioning of pharmaceutical compounds in drug discovery. Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005;19:250-254.

[3] Rodrigues AD. Integrated Cytochrome P450 Reaction Phenotyping Attempting to Bridge the Gap Between cDNA-Expressed Cytochromes P450 and Native Human Liver Microsomes. Biochem Pharmacol. 1999;57:465-480.

目次

2.6.5 薬物動態試験概要表 2
2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表 2
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 4
2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収 6
2.6.5.4 薬物動態試験：分布 9
2.6.5.5 薬物動態試験：たん白結合 15
2.6.5.6 薬物動態試験：血球移行 16
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 17
2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験 18
2.6.5.9 薬物動態試験：*In Vivo* における代謝 19
2.6.5.10 薬物動態試験：*In Vitro* における代謝 24
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路 28
2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導/阻害 34
2.6.5.13 薬物動態試験：排泄 38
2.6.5.14 薬物動態試験：薬物相互作用 41
2.6.5.15 薬物動態試験：その他 61

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

薬物動態試験の一覧表　　被験物質：Brigatinib, AP26123 (M36)

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	添付資料番号	区分
Bioanalytical method					
LC-MS/MS	Rat plasma	-	[redacted]	4.2.2.1-1	Reference
LC-MS/MS	Monkey plasma	-	[redacted]	4.2.2.1-2	Reference
Long term stability	Rat and monkey plasma	-	[redacted]	4.2.2.1-3	Reference
Absorption					
Cell permeability P-gp and BCRP substrate assay	Transporter expressing cells C2BBe1 cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.2-1	Pivotal
Single dose	Mouse, Rat	Intravenous, oral	ARIAD Pharmaceuticals, Inc.	4.2.2.2-2	Reference
Single dose	Monkey	Intravenous, oral	ARIAD Pharmaceuticals, Inc [redacted]	4.2.2.2-3 4.2.2.2-4 4.2.2.2-5	Reference Reference Reference
Distribution					
Plasma protein binding Blood to Plasma Partition Ratio	Mouse, Rat, Monkey, Human	In vitro	ARIAD Pharmaceuticals, Inc.	4.2.2.3-1	Pivotal
Tissue distribution	Rat (SD, Long Evans)	Oral	[redacted]	4.2.2.3-2	Pivotal
Metablism and Excretion					
In vitro metabolism CYP phenotyping	Rat, monkey, human liver microsomes and hepatocytes, recombinant CYPs	In vitro	ARIAD Pharmaceuticals, Inc.	4.2.2.4-1	Pivotal
Metabolite profiling (in vitro)	Mouse, rat, monkey, human liver microsomes and hepatocytes, recombinant CYPs	In vitro	ARIAD Pharmaceuticals, Inc.	4.2.2.4-2	Pivotal
Metabolite profiling (in vivo) Excretion	Rat	Oral	ARIAD Pharmaceuticals, Inc. [redacted]	4.2.2.4-3 4.2.2.4-4 4.2.2.4-5	Reference Reference Reference
Metabolite profiling (in vivo) Excretion	Monkey	Oral	ARIAD Pharmaceuticals, Inc. [redacted]	4.2.2.4-6 4.2.2.4-7 4.2.2.4-8	Reference Reference Reference

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

薬物動態試験の一覧表　　被験物質：Brigatinib, AP26123 (M36)

試験の種類	試験系	投与方法	実施施設	添付資料番号	区分
Drug-drug interaction					
CYP inihibition	Human hepatic microsomes	In vitro	ARIAD Pharmaceuticals, Inc.	4.2.2.6-1	Pivotal
CYP induction	Human hepatocytes	In vitro	[redacted]	4.2.2.6-2	Pivotal
Transporter interaction	Transporter expressed cells Transporter expressed membrane vesicles C2BBe1 cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.2-1	Pivotal
Transporter interaction	Transporter expressed cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.6-3	Pivotal
Transporter interaction	Transporter expressed cells	In vitro	[redacted]	4.2.2.6-4	Pivotal

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

被験物質：Brigatinib, AP26123 (M36)

Location in CTD	Species/ Strain/Gender	Details of LC-MS/MS Methods Employed
Mouse		
4.2.2.2-2	CD-1 Mouse (Female)	Method: Non-validated LC-MS/MS method Matrix: Mouse plasma (Na_2EDTA) Analyte: Brigatinib Assay Dynamic Range: 1 to 5000 ng/mL Internal Standard: Glyburide Sample Processing: Protein precipitation/solvent extraction
Rat		
4.2.2.2-2	Sprague-Dawley Rat (Male)	Method: Non-validated LC-MS/MS method Matrix: Rat plasma (Na_2EDTA) Analytes: Brigatinib, AP26123 (M36) Assay Dynamic Range: Brigatinib (1 to 5000 ng/mL) M36 (AP26123) (1 to 5000 ng/mL) Internal Standard: AP25717 Sample Processing: Protein precipitation/solvent extraction
4.2.3.2-1	Sprague-Dawley Rat (Female)	Method: Non-validated LC-MS/MS method Matrix: Rat Plasma (K_2EDTA) Analyte: Brigatinib Assay Dynamic Range: 1 to 5000 ng/mL Internal Standard: Glyburide Sample Processing: Protein precipitation/solvent extraction
4.2.3.2-2	Sprague-Dawley Rat (Male & Female)	Method: Validated LC-MS/MS method [Location in CTD: 4.2.2.1-1, -3] Matrix: Rat Plasma (K_2EDTA) Analytes: Brigatinib, AP26123 (M36) Assay Dynamic Range: 1 to 100 ng/mL (low range) 75 to 7500 (high range) Internal Standard: AP29109 (D_4-Brigatinib) AP29117 (D_8-AP26123) Sample Processing: Protein precipitation/solvent extraction Storage Stability Short Term in Plasma: 26 hours at room temperature Long Term in Plasma: 502 days at -80°C Freeze/Thaw in Plasma: 4 cycles
4.2.3.7.7-1	Long-Evans Pigmented Rat (Female)	
4.2.3.2-3	Sprague-Dawley Rat (Male & Female)	
4.2.3.5.2-1	Sprague-Dawley Rat (Female)	
4.2.3.5.2-2	Sprague-Dawley Rat (Female)	

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験（続き）

被験物質：Brigatinib, AP26123 (M36)

Monkey		
4.2.2.2-3	Cynomolgus Monkey (Male)	Method: Validated LC-MS/MS method [Location in CTD: 4.2.2.1-2, -3] Matrix: Monkey Plasma (K_2EDTA) Analytes: Brigatinib, AP26123 (M36) Assay Dynamic Range: 1 to 100 ng/mL (low range) 75 to 7500 ng/mL (high range) Internal Standard: AP29109 (D_4-Brigatinib) AP29117 (D_8-AP26123) Sample Processing: Protein precipitation/solvent extraction Storage Stability Short Term in Plasma: 26 hours at room temperature Long Term in Plasma: 498 days at -80°C Freeze/Thaw in Plasma: 4 cycles
4.2.3.2-5	Cynomolgus Monkey (Male & Female)	
4.2.3.2-6	Cynomolgus Monkey (Male & Female)	
4.2.1.3-3	Cynomolgus Monkey (Male)	
4.2.3.2-4	Cynomolgus Monkey (Male & Female)	Method: Non-validated LC-MS/MS method Assay Matrix: Monkey Plasma (K_2EDTA) Analytes: Brigatinib, AP26123 (M36) Assay Dynamic Range: Brigatinib (3 to 5000 ng/mL) AP26123 (3 to 300 ng/mL) Internal Standard: AP25717 Sample Processing: Protein precipitation/solvent extraction

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収

2.6.5.3.1 Single Dose Pharmacokinetics in CD-1 Mice

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.2-2

Species/Strain:	CD-1 mouse
Gender (M/F)/Number of Animals:	F/15 mice per group
Feeding Condition:	Fed
Dose:	10, 50 mg/kg
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 4.0) (Groups 1 and 2); 10%NMP: 90%PEG400 (Group 3)/Solution
Method of Administration:	Oral (PO)
Sample:	Blood collected and processed for plasma; 3 mice/time point
Time Points:	0.5, 1, 4, 6, and 24 hr postdose
Analyte(s):	Brigatinib
Assay:	LC-MS/MS

Parameter	PO (Group 1)	PO (Group 2)	PO (Group 3)
Dose (mg/kg)	10	50	10
C_{max} (ng/mL)	768	3530	448
T_{max} (hr)	1.00	1.00	0.500
AUC_{0-24} (ng·hr/mL)	5533	32482	5772
$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/mL)	5579	32624	6020
$t_{1/2}$ (hr)	3.5	3.3	5.9

2.6.5.3.2 Single Dose Pharmacokinetics in Sprague-Dawley Rats

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.2-2

Species/Strain:	Sprague-Dawley rats	
Gender (M/F)/Number of Animals:	M/3 per group	
Feeding Condition:	Fasted overnight	
Dose:	2 mg/kg	10 mg/kg
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 4.0)/Solution	
Method of Administration:	Intravenous (IV)	Oral (PO)
Sample:	Blood collected and processed for plasma	
Time Points:	0.0833, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 hr postdose	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, 48, and 72 hr postdose
Analyte(s):	Brigatinib, AP26123 (M36)	
Assay:	LC-MS/MS	

Parameter	Brigatinib	
	IV	PO
Dose (mg/kg)	2	10
C_{max} (ng/mL)	--	977 ± 92
T_{max} (hr)	--	3.3 ± 1.2
AUC_{0-24} (ng·hr/mL)	4329 ± 302	8757 ± 833
$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/mL)	4400 ± 296	8936 ± 833
Clearance (mL/hr/kg)	460 ± 31	--
Volume of distribution (mL/kg)	2925 ± 465	--
$t_{1/2}$ (hr)	4.4 ± 0.4	4.0 ± 0.6
% Oral Bioavailability[a]	--	40.7

[a]: (Dose, iv/Dose, po)*($AUC_{0-\infty, po}/AUC_{0-\infty, iv}$)

--: Not applicable

Note: Data in table represent mean ± SD of n = 3 animals

Plasma levels of the N-desmethyl metabolite, M36, were <2% of circulating brigatinib plasma levels at all time points

2.6.5.3.3 Single Dose Pharmacokinetics in Cynomolgus Monkeys

Test Article: Brigatinib (AP26113)

Location in CTD: 4.2.2.2-3, -4, -5

Species/Strain:	Cynomolgus monkeys		
Gender (M/F)/Number of Animals:	M/3; PK was evaluated in a 3-way cross-over study design with a 1-week washout between treatments		
Feeding Condition:	Fasted overnight for 12 hr and for up to 4 hr postdose		
Dose:	5 mg/kg	15 mg/kg	15 mg/kg
Method of Administration:	Intravenous (IV)	Oral (PO)	Oral (PO)
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 4.0)/Solution	25 mmol/L Citrate buffer (pH 4.0)/Solution	Drug in capsule
Sample:	Blood collected and processed for plasma		
Time Points:	Predose, 0.0833, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, and 48 hr postdose	Predose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, and 48 hr postdose	Predose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 24, and 48 hr postdose
Analyte(s):	Brigatinib, AP26123 (M36)		
Assay:	LC-MS/MS		

Parameter	Brigatinib			M36 (Metabolite)		
	IV	PO solution	PO Capsule	IV	PO solution	PO Capsule
Dose (mg/kg)	5	15	15	--	--	--
C_{max} (ng/mL)	--	1757 ± 524	1453 ± 172	--	264 ± 28	224 ± 19
T_{max} (hr)	--	4 ± 0	3 ± 1	--	3 ± 1	3 ± 1
T_{last} (hr)	48	48	48	24	48	48
AUC_{last} (ng·hr/mL)	11137 ± 1551	17535 ± 1729	15193 ± 615	513 ± 42	2351 ± 179	2034 ± 168
$AUC_{0-\infty}$ (ng·hr/mL)	11203 ± 1550	17706 ± 1779	15343 ± 645	542 ± 55	2384 ± 179	2065 ± 171
$AUC_{0-\infty}$ Ratio[a]	--	--	--	0.049 ± 0.012	0.136 ± 0.021	0.134 ± 0.006
Clearance (mL/hr/kg)	452 ± 63	--	--	--	--	--
Volume of distribution (mL/kg)	3257 ± 994	--	--	--	--	--
$t_{1/2}$ (hr)	7.70 ± 0.5	6.95 ± 0.415	7.24 ± 0.12	6.28 ± 1.32	7.63 ± 1.04	8.52 ± 0.79
% Oral Bioavailability[b]	--	52.9 ± 3.3	46.4 ± 8.3	--	--	--

[a]: $AUC_{0-\infty}$ ratio calculated as $AUC_{0-\infty, M36}/AUC_{0-\infty, Brigatinib}$

[b]: (Dose, iv/Dose, po)*($AUC_{0-\infty, po}/AUC_{0-\infty, iv}$)

--: Not applicable

Note: Data in table represent mean ± SD of n = 3 animals

2.6.5.4 薬物動態試験：分布

2.6.5.4.1 Tissue Distribution – Albino Rats

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.3-2

Species:	Sprague-Dawley rats
Gender (M/F)/Number of animals:	M/8
Feeding Condition:	Fasted overnight and for up to 4 hr postdose
Dose:	30 mg/kg (225 µCi/kg)
Radionuclide:	[^{14}C]
Specific Activity:	7.019 µCi/mg
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 4.0)/Solution
Method of Administration:	Oral (PO)
Sample:	Blood, plasma, sagittal sections of carcass
Time Points (h):	0.5, 2, 4, 8, 24, 72, 120, and 168 hr postdose; 1 rat per time point
Analyte(s):	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity
Assay:	Liquid scintillation counting (LSC), Phosphor imaging (QWBA)

Tissue Type	Tissue	Concentration (µg-equivalents/g) of Radioactivity							
		0.5 hr	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr	72 hr	120 hr	168 hr
Vascular/Lymphatic	Plasma (LSC)	3.960	3.048	3.664	2.582	0.264	BQL	BQL	BQL
	Blood (LSC)	3.296	2.268	2.654	1.881	0.187	BQL	BQL	BQL
	Blood (cardiac)	4.068	2.958	3.637	2.000	0.157	BQL	BQL	BQL
	Bone Marrow	18.140	23.329	32.645	20.888	1.263	0.411	0.315	0.223
	Lymph Node	7.963	14.257	20.696	23.431	1.506	0.399	0.116	0.135
	Spleen	36.850	41.639	53.559	41.527	2.678	0.811	0.803	0.467
	Thymus	3.443	10.324	17.166	14.865	0.747	0.119	0.096	0.080
Excretory/Metabolic	Bile (in duct)	181.422	258.005	230.834	77.776	16.816	0.713	0.343	0.211
	Kidney (cortex)	54.460	39.609	39.747	25.697	2.767	0.942	0.716	0.517
	Kidney (medulla)	42.418	33.212	40.093	25.024	2.233	0.590	0.307	0.187
	Liver	111.681	64.030	57.709	37.330	10.428	3.701	2.402	1.481
	Urinary Bladder	6.069	12.971	14.156	5.798	0.561	0.069	0.177	0.072
	Urinary Bladder (contents)	8.736	45.865	38.287	29.133	0.837	0.054	0.048	BQL
Central Nervous System	Brain (cerebellum)	0.064	0.085	0.176	0.095	BQL	BQL	BQL	BQL
	Brain (cerebrum)	BQL	0.051	0.219	0.136	BQL	BQL	BQL	BQL
	Brain (medulla)	BQL	0.116	0.219	0.124	BQL	BQL	BQL	BQL
	Spinal Cord	0.073	0.143	0.254	0.203	BQL	BQL	BQL	BQL

2.6.5.4.1 Tissue Distribution – Albino Rats（続き）

Tissue Type	Tissue	Concentration (µg-equivalents/g) of Radioactivity							
		0.5 hr	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr	72 hr	120 hr	168 hr
Endocrine	Adrenal Gland (cortex)	27.553	25.390	29.713	29.479	3.305	0.518	0.509	0.414
	Adrenal Gland (medulla)	31.615	36.689	53.205	37.594	3.411	0.783	0.935	0.871
	Pituitary Gland	19.525	47.066	65.867	28.851	6.167	0.209	0.279	0.121
	Thyroid	47.876	40.082	189.754	70.188	10.390	2.063	3.619	1.516
Secretory	Harderian Gland	9.358	25.992	41.682	69.422	34.494	9.630	2.859	0.310
	Mammary Gland Region	7.415	10.810	11.349	0.167	0.335	0.106	0.064	BQL
	Pancreas	28.899	30.510	31.554	22.168	1.694	0.153	0.093	0.058
	Salivary Gland	19.071	28.748	44.384	29.128	1.188	0.208	0.091	0.061
Fatty	Adipose (brown)	8.873	18.596	22.776	13.601	1.254	0.369	0.183	0.122
	Adipose (white)	1.895	1.689	1.841	1.594	0.126	BQL	BQL	BQL
Dermal	Skin, Non-Pigmented	3.245	5.439	7.218	9.254	6.164	0.082	0.049	BQL
Reproductive	Epididymis	1.916	5.886	7.290	10.475	1.938	0.189	0.068	BQL
	Prostate	8.322	14.430	17.045	10.249	0.816	0.087	BQL	BQL
	Seminal Vesicle	6.225	15.471	11.708	17.883	3.115	0.087	0.276	0.150
	Testis	0.269	1.559	2.269	2.810	2.093	1.196	0.491	0.164
Skeletal/Muscular	Bone	0.975	1.959	1.116	1.250	0.272	BQL	BQL	BQL
	Heart	10.924	8.019	10.295	4.825	0.358	0.150	0.067	BQL
	Skeletal Muscle	3.855	5.051	4.601	3.937	0.148	BQL	BQL	BQL
Respiratory	Lung	20.299	9.455	28.725	14.094	0.933	0.206	0.125	0.053
Alimentary Canal	Cecum	10.036	9.942	9.477	11.019	1.122	0.103	BQL	0.057
	Cecum (contents)	0.091	8.383	294.160	561.132	93.507	0.796	0.389	0.195
	Esophagus	4.668	6.571	6.551	6.219	0.266	BQL	BQL	BQL
	Large Intestine	5.725	19.288	28.575	18.730	2.271	0.220	0.101	BQL
	Large Intestine (contents)	BQL	114.893	148.611	*1011.845	73.915	1.683	1.013	0.236
	Oral Mucosa	3.967	4.979	8.991	4.994	1.622	0.088	BQL	0.095
	Small Intestine	97.493	253.475	57.594	28.034	8.184	0.288	0.098	0.245
	Small Intestine (contents)	*1889.781	*2705.788	218.835	258.220	72.714	0.438	0.130	0.082
	Stomach (gastric mucosa)	3.886	40.980	69.964	18.389	2.041	0.257	0.317	0.139
	Stomach (contents)	*1694.046	*1069.968	490.147	160.526	166.320	0.110	0.075	0.051

2.6.5.4.1 Tissue Distribution – Albino Rats（続き）

Tissue Type	Tissue	Concentration (µg-equivalents/g) of Radioactivity							
		0.5 hr	2 hr	4 hr	8 hr	24 hr	72 hr	120 hr	168 hr
Ocular	Eye (lens)	BQL	0.065	0.271	0.151	BQL	BQL	BQL	BQL
	Eye (uvea)	7.545	6.855	6.340	4.736	0.737	0.087	BQL	BQL

*: Value is above the ULOQ

BQL = Value is below the LLOQ

LLOQ = 0.00033720 µCi/g/0.00702 µCi/µg = 0.048 µg-equivalent/g tissue

ULOQ = 5.38246310 µCi/g/0.00702 µCi/µg = 766.733 µg-equivalent/g tissue

2.6.5.4.2 Tissue Distribution – Pigmented Rats

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.3-2

Species:	Long-Evans Rats
Gender (M/F)/Number of animals:	M/4
Feeding Condition:	Fasted overnight and for up to 4 hr postdose
Dose:	30 mg/kg (225 µCi/kg)
Radionuclide:	[^{14}C]
Specific Activity:	7.019 µCi/mg
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 4.0)/Solution
Method of Administration:	Oral (PO)
Sample:	Blood, plasma, saggital sections of carcass
Time Points:	2, 24, 168, and 672 hr postdose; 1 rat per time point
Analyte(s):	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity
Assay:	Liquid scintillation counting (LSC), Phosphor imaging (QWBA)

Tissue Type	Tissue	Concentration (µg-equivalents/g) of Radioactivity			
		2 hr	24 hr	168 hr	672 hr
Vascular/Lymphatic	Plasma (LSC)	3.811	0.135	BQL	BQL
	Blood (LSC)	3.262	0.113	BQL	BQL
	Blood (cardiac)	3.573	0.114	BQL	BQL
	Bone Marrow	36.294	1.671	0.347	0.094
	Lymph Node	23.194	1.215	0.129	0.068
	Spleen	58.640	2.480	0.759	0.274
	Thymus	15.545	0.744	0.065	BQL
Excretory/Metabolic	Bile (in duct)	264.811	6.916	1.348	0.181
	Kidney (cortex)	55.174	2.459	0.749	0.176
	Kidney (medulla)	31.716	1.480	0.237	BQL
	Liver	79.769	10.329	1.679	0.088
	Urinary Bladder	16.012	0.314	BQL	BQL
	Urinary Bladder (contents)	105.979	1.586	BQL	BQL
Central Nervous System	Brain (cerebellum)	0.169	BQL	BQL	BQL
	Brain (cerebrum)	0.108	BQL	BQL	BQL
	Brain (medulla)	0.255	BQL	BQL	BQL
	Spinal Cord	0.245	BQL	BQL	BQL

2.6.5.4.2 Tissue Distribution – Pigmented Rats（続き）

Tissue Type	Tissue	Concentration (μg-equivalents/g) of Radioactivity			
		2 hr	24 hr	168 hr	672 hr
Endocrine	Adrenal Gland (cortex)	54.490	2.425	0.801	0.487
	Adrenal Gland (medulla)	72.561	5.384	1.499	0.922
	Pituitary Gland	57.954	3.293	0.347	0.052
	Thyroid	87.964	4.175	4.346	0.994
Secretory	Harderian Gland	39.682	39.339	0.480	0.087
	Mammary Gland Region	3.016	0.106	0.080	BQL
	Pancreas	37.033	1.614	0.082	BQL
	Salivary Gland	51.942	0.787	0.083	BQL
Fatty	Adipose (brown)	27.148	0.939	0.204	0.136
	Adipose (white)	2.825	0.115	BQL	BQL
Dermal	Skin, Non-Pigmented	6.230	2.268	0.099	BQL
	Skin, Pigmented	9.491	9.270	1.788	0.511
Reproductive	Epididymis	4.788	1.164	BQL	BQL
	Prostate	8.897	0.520	0.090	BQL
	Seminal Vesicle	30.974	1.082	0.139	BQL
	Testis	2.062	3.014	0.194	BQL
Skeletal/Muscular	Bone	0.970	0.152	BQL	BQL
	Heart	12.272	0.450	0.055	BQL
	Skeletal Muscle	7.791	0.160	BQL	BQL
Respiratory	Lung	26.536	1.214	0.187	0.056
Alimentary Canal	Cecum	12.080	4.313	BQL	BQL
	Cecum (contents)	75.624	22.145	0.228	BQL
	Esophagus	11.977	0.339	BQL	BQL
	Large Intestine	44.126	2.439	0.129	BQL
	Large Intestine (contents)	0.949	40.105	0.353	BQL
	Oral Mucosa	10.650	1.029	BQL	BQL
	Small Intestine	40.676	2.153	0.230	BQL
	Small Intestine (contents)	293.096	6.484	0.164	0.076
	Stomach (gastric mucosa)	62.290	2.590	0.185	0.094
	Stomach (contents)	*1063.292	0.654	BQL	BQL

2.6.5.4.2 Tissue Distribution – Pigmented Rats（続き）

Tissue Type	Tissue	Concentration (µg-equivalents/g) of Radioactivity			
		2 hr	24 hr	168 hr	672 hr
Ocular	Eye (lens)	0.203	0.397	0.174	0.335
	Eye (uvea)	74.361	177.806	142.924	107.855

* Value is above the ULOQ

BQL = Value is below the LLOQ

LLOQ = 0.00033720 µCi/g/0.00702 µCi/µg = 0.048 µg-equivalent/g tissue

ULOQ = 5.38246310 µCi/g/0.00702 µCi/µg = 766.733 µg-equivalent/g tissue

2.6.5.5 薬物動態試験：たん白結合

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.3-1

Test System:	Mouse, rat, monkey, and human plasma
Test Article Concentration:	0.2, 1, 5 µmol/L
Experimental Method:	Equilibrium dialysis method using RED-device (Rapid Equilibrium Dialysis Device)
Positive Control/Concentration:	Testosterone/10 µmol/L
Analyte(s):	Brigatinib, testosterone
Analytical Method:	LC-MS/MS

Species	Brigatinib Concentration (µmol/L)	Mean % Bound in Plasma[a]	Overall Mean % Bound in Plasma[b]
Mouse	0.2	63.5	64.1
	1.0	65.5	
	5.0	63.2	
Rat	0.2	74.4	73.0
	1.0	73.6	
	5.0	71.1	
Monkey	0.2	71.2	70.8
	1.0	72.1	
	5.0	69.1	
Human	0.2	68.1	65.7
	1.0	65.6	
	5.0	63.5	

[a]: Mean of triplicate values at each concentration
[b]: Mean (n = 9) across concentrations tested as % brigatinib bound was nearly constant across the concentration range

Species	Testosterone Concentration (µmol/L)	Mean % Bound in Plasma[a]
Mouse	10	91.3
Rat	10	93.3
Monkey	10	92.9
Human	10	91.5

[a]: Mean of triplicate values

2.6.5.6 薬物動態試験：血球移行

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.3-1

Test System:	Mouse, rat, monkey, human fresh blood and plasma
Test Article Concentration:	0.1, 0.3, 1, 3 μmol/L
Experimental Method:	Incubation in a water bath at 37°C/Centrifugation
Analyte(s):	Brigatinib
Analytical Method:	LC-MS/MS

Species	Brigatinib Concentration (μmol/L)	$K_{B/P}$	$K_{RBC/PL}$	% Brigatinib in RBCs
Mouse	0.1	1.07 ± 0.06	1.19 ± 0.17	39.2
	0.3	0.91 ± 0.01	0.73 ± 0.02	28.2
	1	1.01 ± 0.02	1.03 ± 0.05	35.7
	3	1.01 ± 0.08	1.11 ± 0.25	37.0
	Average[a]	1.01 ± 0.04	1.02 ± 0.12	35.0
Rat	0.1	0.74 ± 0.02	0.32 ± 0.04	16.5
	0.3	0.76 ± 0.01	0.38 ± 0.02	18.8
	1	0.78 ± 0.06	0.42 ± 0.15	20.3
	3	0.90 ± 0.03	0.74 ± 0.09	31.0
	Average[a]	0.78 ± 0.07	0.47 ± 0.08	21.7
Monkey	0.1	1.21 ± 0.10	1.55 ± 0.26	48.5
	0.3	1.23 ± 0.08	1.62 ± 0.22	49.6
	1	1.17 ± 0.05	1.45 ± 0.14	47.0
	3	1.12 ± 0.04	1.30 ± 0.10	44.3
	Average[a]	1.18 ± 0.08	1.48 ± 0.18	47.4
Human	0.1	0.72 ± 0.05	0.33 ± 0.13	18.9
	0.3	0.66 ± 0.02	0.19 ± 0.04	11.9
	1	0.66 ± 0.03	0.20 ± 0.07	12.6
	3	0.72 ± 0.00	0.33 ± 0.01	19.2
	Average[a]	0.69 ± 0.04	0.26 ± 0.06	15.7

Note: Data represent mean ± SD of triplicate values at each concentration

[a]: Data represent mean ± SD (n = 12) across concentrations tested as partition ratios were nearly constant across the concentration range

2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

該当なし

2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験

該当無し

2.6.5.9 薬物動態試験：*In Vivo* における代謝

2.6.5.9.1 Metabolism in Sprague-Dawley Rats

Test Article: [^{14}C]Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.4-3, -4, -5

Species/Strain:	Sprague-Dawley rats
Gender (M/F)/Number of Animals	M/Group 1: Bile duct-cannulated (BDC) rats (n = 4); Group 2: Intact rats (n = 4); Group 3: Intact rats (n = 14)
Feeding Condition:	Fasted overnight (Groups 2 and 3); Group 1 (Fed)
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 3.97)/Solution
Method of Administration:	Oral (PO)
Dose (mg/kg):	30.23 mg/kg (201.82 µCi/kg)
Radionuclide:	[^{14}C]
Specific Activity:	3.9 mCi/mmol/Lol (6.68 µCi/mg)
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC), combustion followed by LSC, LC-MS/MS

2.6.5.9.1.1 Percentage of Brigatinib and Metabolites in Plasma from Intact Rats (Group 3)

Metabolite ID	% of Total Radioactivity in Pooled Rat Plasma						
	1 hr	3 hr	6 hr	12 hr	24 hr	48 hr	0-24 hr
M21	1.22	0.76	0.62	--	0.75	--	0.62
M22 (AP32831)	--	0.87	--	--	--	--	0.09
M25 (AP32830)	0.83	2.89	1.38	0.49	0.75	--	0.59
M28	0.56	0.23	--	--	--	--	0.49
M32 (AP25656)	0.4	0.61	0.68	0.26	0.49	--	0.82
M36 (AP26123)	1.54	1.88	3.14	4.05	1.55	1.87	3.66
Brigatinib (Parent)	88.16	84.13	87.70	85.30	89.80	89.72	84.12

-- = Peak was detected but accounted for <0.4% of the total radioactivity in plasma

2.6.5.9.1.2 Percentage of Brigatinib and Metabolites in Urine and Feces of Intact Rats (Group 2)

Metabolite ID	% of Total Radioactivity in Pooled Matrix[a]		% of Radioactive Dose[b]		
	Rat Urine 0-120 hr	Rat Feces 0-120 hr	Rat Urine 0-120 hr	Rat Feces 0-120 hr	Total (Urine + Feces)
M21	--	0.61	--	0.53	0.53
M25 (AP32380)	3.15	--	0.22	--	0.22
M26	0.79	1.40	0.06	1.23	1.29
M28	--	3.98	--	3.49	3.49
M31	--	1.25	--	1.10	1.10
M32 (AP25656)	0.56	--	0.04	--	0.04
M34	--	1.14	--	1.00	1.00
M36 (AP26123)	7.61	8.75	0.54	7.67	8.21
M40	0.92	--	0.06	--	0.06
Brigatinib (Parent)	73.46	63.60	5.18	55.74	60.92

[a]: Only peaks containing >0.5% of the total radioactivity in each matrix are listed

[b]: Calculated as % of radioactivity in sample x TRA in matrix as fraction of administered dose

Total radioactive dose recovered in urine and feces was 7.05 ± 1.64% and 87.64 ± 4.14%, respectively

-- = Not detected or <0.5% of TRA in matrix

2.6.5.9.1.3 Percentage of Brigatinib and Metabolites in Bile of BDC Rats (Group 1)

Metabolite ID	% of Total Radioactivity in Pooled Matrix[a]	% of Radioactive Dose[b]
	Rat Bile 0-72 hr	Rat Bile 0-72 hr
M2	4.74	1.50
M3	1.41	0.45
M4	2.51	0.80
M5	1.28	0.41
M6	1.68	0.53
M8	2.52	0.80
M10	1.21	0.38
M12/M13	1.65	0.52
M14/M15	1.33	0.42
M16	1.11	0.35
M17	1.36	0.43
M18	2.71	0.86
M19	0.86	0.27
M20	1.38	0.44
M21	21.98	6.97
M23	0.69	0.22
M25 (AP32830)	7.65	2.43
M28	1.58	0.50
M29	1.04	0.33
M30	1.88	0.60
M32 (AP25656)	3.83	1.21
M33	3.95	1.25
M36 (AP26123)	21.26	6.74
M37	0.78	0.25
Brigatinib (Parent)	9.11	2.89

[a]: Only peaks containing >0.5% of the total radioactivity in the matrix are listed

[b]: Calculated as % of radioactivity in sample x TRA in bile as fraction of administered dose

Total radioactive dose recovered in rat bile was 31.70 ± 6.98%

2.6.5.9.2 Metabolism in Cynomolgus Monkeys

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.4-6, -7, -8

Species:	Cynomolgus monkeys
Gender (M/F)/Number of animals:	M/5[a]
Feeding Condition:	Fasted overnight for at least 18 hr and for 4 hr postdose
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 3.98)/Solution
Method of Administration:	Oral (PO)
Dose:	29.9 mg/kg (36.91 µCi/kg)
Radionuclide	[^{14}C]
Specific Activity:	57.5 mCi/mmol (1.23 µCi/mg)
Analyte:	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC), combustion followed by LSC, LC-MS/MS

2.6.5.9.2.1 Percentage of Brigatinib and Metabolites in Monkey Plasma

Metabolite ID	% of Total Radioactivity in Pooled Plasma[b]								
	0.5 hr	1 hr	2 hr	4 hr	8 hr	12 hr	24 hr	48 hr	0-24 hr
M1	--	--	2.38	--	--	--	--	--	--
M13	1.77	2.48	1.62	1.30	0.80	0.70	--	5.74	1.31
M27	--	--	0.51	0.92	--	--	--	--	0.89
M28	1.09	--	2.55	2.67	2.24	1.68	--	--	2.72
M32 (AP25656)	1.85	--	--	--	--	--	--	--	--
M36 (AP26123)	7.49	8.99	7.84	6.82	9.47	11.75	9.25	--	8.99
M38	4.11	3.59	2.55	2.96	1.62	0.74	--	2.58	1.32
Brigatinib (Parent)	79.85	77.97	80.6	71.63	79.16	80.38	82.27	84.25	74.99
M42	--	--	--	--	--	--	--	5.97	--

[a]: Per study protocol 5 animals were dosed; however, data from 2 monkeys (1M1, 1M2) were suspect due to large amounts of radioactivity recovered in urine. It is suspected that these two monkeys had vomited and the emesis went unnoticed and got mixed with urine. Therefore to be definitive, data from only the remaining three monkeys (1M3, 1M4, 1M5) are reported

[b]: Only peaks containing >0.5% of the total radioactivity in matrix are listed

-- = Not detected or <0.5% of TRA in matrix.

2.6.5.9.2.2 Percentage of Brigatinib and Metabolites in Monkey Urine and Feces

Metabolite ID	% of Total Radioactivity in Pooled Matrix[c]		% of Radioactive Dose[d]		
	Monkey Urine (0-96 hr)	Monkey Feces 0-168 hr	Monkey Urine 0-96 hr	Monkey Feces 0-168 hr	Total (Urine + Feces)
M1 (Unknown)	3.78	3.20	0.36	2.13	2.49
M2	1.46	--	0.14	--	0.14
Region 1	--	9.07	--	6.03	6.03
M7	0.97	--	0.09	--	0.09
M9	1.87	--	0.18	--	0.18
M13	1.40	--	0.13	--	0.13
M21	4.19	--	0.40	--	0.40
M24	--	6.66	--	4.43	4.43
M25 (AP32830)	0.71	--	0.07	--	0.07
M26	0.82	2.17	0.08	1.44	1.52
M27	0.64	5.91	0.06	3.93	3.99
M28	2.67	20.39	0.27	13.56	13.83
Region 2	--	4.58	--	3.04	3.04
M35	0.83	2.38	0.08	1.58	1.66
M36 (AP26123)	15.52	13.91	1.49	9.25	10.74
M38	1.62	0.99	0.16	0.66	0.82
Brigatinib (Parent)	52.40	21.93	5.02	14.58	19.60
Region 3	--	2.02	--	1.34	1.34
M41	0.69	3.37	0.07	2.24	2.31
Region 4	--	1.12	--	0.74	0.74
M42	0.83	--	0.08	--	0.08

[a]: Per study protocol 5 animals were dosed; however, data from 2 monkeys (1M1, 1M2) were suspect due to large amounts of radioactivity recovered in urine. It is suspected that these two monkeys had vomited and the emesis went unnoticed and got mixed with urine. Therefore to be definitive, data from only the remaining three monkeys (1M3, 1M4, 1M5) are reported

[b]: Retention time of common, and feces only metabolites are based on feces profile. Retention times of urine only metabolites are based on urine profile. Metabolite IDs are identical in both matrices.

[c]: Only peaks containing >0.5% of the total radioactivity in each matrix are listed

[d]: Calculated as % of radioactivity in sample x TRA in matrix as fraction of administered dose

Total radioactive dose recovered in urine and feces was 9.75 ± 0.87% and 66.48 ± 6.46%, respectively

-- = Not detected or <0.5% of TRA in matrix

2.6.5.10 薬物動態試験：*In Vitro* における代謝

2.6.5.10.1 Liver Microsomes

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.4-2

Test System:	Mouse, rat, monkey, and human liver microsomes
Test Article Concentration:	3, 30 µmol/L
Radionuclide:	[^{14}C]
Specific Activity:	52.6 mCi/mmol
Protein Concentration:	1 mg/mL
Cofactor:	NADPH
Experimental Method:	Incubations were conducted in 96-deep well plates at 37 °C in a shaking water bath. Three negative control incubations were included a) without NADPH, b) with heat inactivated microsomes (5 minutes at 80 °C), and c) with no microsomal protein.
Postive Control/Concentration:	Testosterone/10 µmol/L
Incubation Time:	0, 45 minutes
Analytical Method:	LC-MS/MS, Liquid scintillation counting (LSC)

Metabolite ID	% Radioactivity in [^{14}C]Brigatinib Liver Microsomal Incubates with NADPH (45 min Incubation)[a]							
	Mouse		Rat		Monkey		Human	
	3 µmol/L	30 µmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L
M22 (AP32831)	--	--	--	--	--	1.23	--	1.2
M25 (AP32830)	--	2.1	--	2	--	--	--	--
M27	--	--	--	--	--	2.1	--	0.9
M36 (AP26123)	1.2	1.4	3.0	2.5	13.2	13.0	6.8	7.6
Brigatinib (Parent)	97.9	93.7	96.0	93.3	79.3	79.6	90.4	88.5

[a]: Only peaks containing >1% of the total radioactivity in each matrix are listed
-- = Either <1% of total radioactivity in the matrix or not detected

2.6.5.10.2 Hepatocytes

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.4-2

Test System:	Mouse, rat, monkey, and human hepatocytes
Test Article Concentration:	3, 30 µmol/L
Radionuclide:	[^{14}C]
Specific Activity:	52.6 mCi/mmol
Hepatocyte Concentration:	4 x 10^6 Cells/mL
Experimental Method:	Incubations were carried out in 24-well round bottom polyproplene plates placed on an orbital shaker (55 rpm) in a 37 °C incubator in which a 5% CO_2 and high relative humidy (>90%) was maintained.
Positive Control/Concentration:	7-Ethoxycoumarin/100 µmol/L
Incubation Time:	0, 60, 120 minutes
Analytical Method:	LC-MS/MS, Liquid scintillation counting (LSC)

Metabolite ID	% Radioactivity in [^{14}C]Brigatinib Hepatocyte Incubates (120 min Incubation)[a]							
	Mouse		Rat		Monkey		Human	
	3 µmol/L	30 µmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L
M43	--	1.3	--	--	--	--	--	--
M43a	--	1.2	--	--	--	--	--	--
M4	2.2	2.4	--	--	--	--	--	--
M4/M5/M13	--	--	4.3	2.3	1.78	3.2	--	--
M21	40.7	28.1	14.8	9.3	40.2	28.4	--	1.7
M21a	--	--	4.0	1.5	7.8	11.3	--	--
M22 (AP32831)	--	--	1.8	4.0	1.36	1.2	--	--
M25 (AP32830)	--	--	2.2	1.5	0.8	2.4	--	--
M36 (AP26123)	1.9	0.7	9.6	7.2	11.7	11.0	5.5	8.4
Brigatinib (Parent)	38.7	63.7	62.76	65.8	34.6	35.0	92.9	83.3

[a]: Only peaks containing >1% of the total radioactivity in each matrix are listed
-- = Either <1% of total radioactivity in the matrix or not detected

2.6.5.10.3 Incubations with Recombinant Human CYP Enzymes

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.4-2

Test System:	Recombinant human CYPs (rhCYPs)
Test Article Concentration:	3, 30 µmol/L
Radionuclide:	[^{14}C]
Specific Activity:	52.6 mCi/mmol
Protein Concentration:	100 pmol/mL
Cofactor:	NADPH
Experimental Method:	Incubations were conducted in 96-deep well plates at 37 °C in a shaking water bath. CYP-specific positive control substrates were also incubated in parallel.
Incubation Time:	0, 45 minutes
Analyte:	Brigatinib, M25 (AP32830), M36 (AP26123)
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC), LC-MS/MS

rhCYPs	% Radioactivity in rhCYP Incubates with NADPH (45 min Incubation)[a]					
	M25 (AP32830)		M36 (AP26123)		Brigatinib	
	3 µmol/L	30 µmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L	3 µmol/L	30 µmol/L
Control	--	--	--	--	98.9	96.9
Human CYP1A2 + reductase	--	--	--	--	97.8	96.6
Human CYP2A6 + reductase + b5	--	--	--	--	97.3	97.1
Human CYP2B6 + reductase + b5	--	--	--	--	95.9	95.2
Human CYP2C19 + reductase + b5	--	--	--	--	97.9	97.4
Human CYP2C8 + reductase + b5	1.4	3.1	24.8	25.9	61.4	63.1
Human CYP2C9 + reductase + b5	--	--	--	0.97	96.2	97.2
Human CYP2D6 + reductase	--	--	--	0.98	98.6	97.3
Human CYP2E1 + reductase + b5	--	--	--	--	97.3	98.2
Human CYP2J1 + reductase + b5	--	--	--	0.93	97.0	96.0
Human CYP3A5 + reductase + b5	--	--	1.2	3.0	93.1	87.5
Human CYP3A4 + reductase + b5	--	--	11.8	15.4	84.8	82.4
Human CYP4F2 + reductase + b5	--	--	--	0.89	98.3	97.1

[a]: Only peaks containing >1% of the total radioactivity in each matrix are listed
-- = Either <1% of total radioactivity in the matrix or not detected

2.6.5.10.4 Incubations with CYP-Selective Inhibitors and Inhibitory Monoclonal Antibodies

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.4-1

Test System:	Human liver microsomes (HLM)
Test Article Concentration:	5 µmol/L
Protein Concentration:	0.5 mg/mL
Cofactor:	NADPH
Experimental Method:	Incubations were conducted in the presence and absence of CYP-selective inhibitors or with inhibitory monoclonal antibodies (mAB) in 96- well plates at 37 °C in a shaking water bath.
Incubation Time:	10 minutes
Analyte:	M36 (AP26123)
Analytical Method:	LC-MS/MS

CYP Isozyme	CYP-Selective Inhibitor (µmol/L)	% Inhibition of M36 (AP26123) Formation	CYP Inhibitory mAB (µL)[a]	% Inhibition of M36 (AP26123) Formation
CYP1A2	Furafylline (20)	4.4	1	5.4
CYP2C8	Montelukast (5)	58.1	2	73.8
CYP2C9	Sulfaphenazole (10)	9	5	6.8
CYP2C19	(+)N-3-Benzylnirvanol (15)	6	10	0
CYP2D6	Quinidine (2)	7.8	2	6.8
CYP3A4/5	Ketoconazole (1)	54.6	10	28.3
CYP3A4/5	Troleandomycin[b] (50)	47.7	NA	NA

[a]: µL/100 µg HLM protein as supplied by the vendor

[b]: Troleanodomycin (a time-dependent inhibitor) was preincubated with human liver microsomes and cofactor (NADPH) for 30 minutes prior to the addition of brigatinib

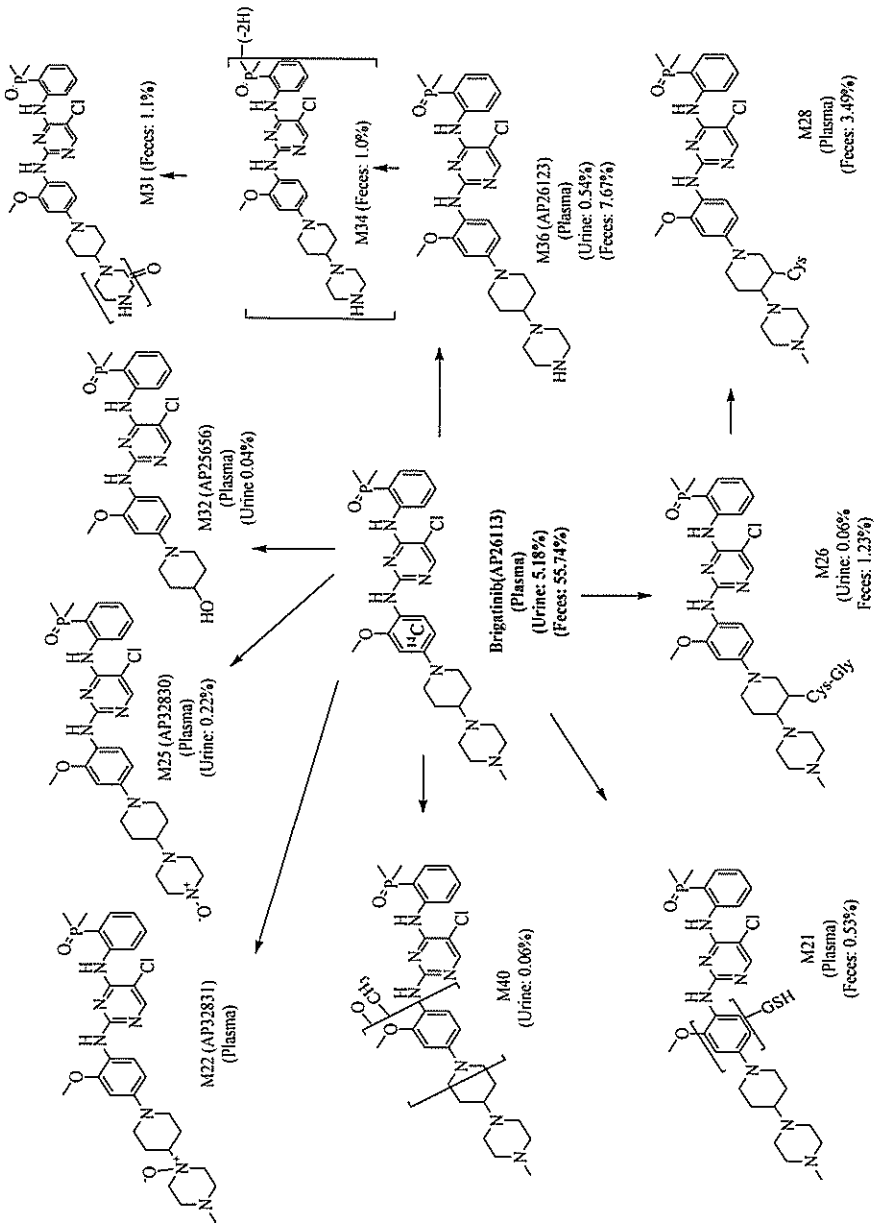
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路

2.6.5.11.1 Proposed *In Vitro* Metabolic Pathways of Brigatinib (AP26113)

Note: MseLM, RLM, MkyLM and HLM refer to liver microsomes from mouse, rat, monkey and human, respectively. MsH, RH, MH and HH notations represent mouse hepatocytes, rat hepatocytes, monkey hepatocytes and human hepatocytes, respectively.

Location in CTD: 4.2.2.4-2

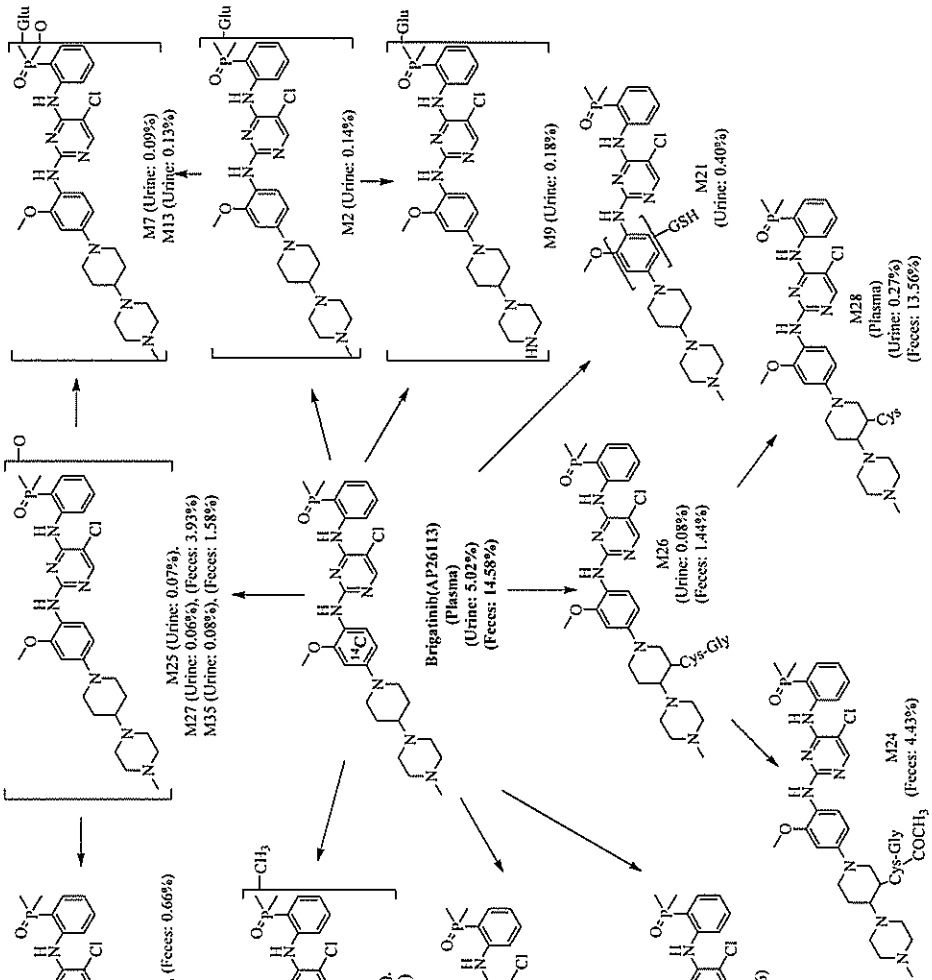
2.6.5.11.2 Proposed *In Vivo* Metabolic Pathways of Brigatinib (AP26113) in Sprague-Dawley Rats



Note: Values reported for urine and feces represent amount of metabolite as % of total radioactive dose recovered

Location in CTD: 4.2.2.4-3

2.6.5.11.3 Proposed *In Vivo* Metabolic Pathways of Brigatinib (AP26113) in Cynomolgus Monkeys



Note: Values reported for urine and feces represent amount of metabolite as % of total radioactive dose recovered

Location in CTD: 4.2.2.4-6

2.6.5.11.4 *In Vitro* and *In Vivo* Metabolites of Brigatinib (AP26113) and Matrices in Which the Metabolites Were Detected

Metabolite ID	Proposed Biotransformation Pathway	*In Vitro*		*In Vivo*			
		Liver Microsomes	Hepatocytes	Plasma	Urine	Feces	Bile
Brigatinib (Parent)	--	Mouse, Rat, Monkey, Human	Mouse, Rat, Monkey, Human	Rat, Monkey	Rat, Monkey	Rat, Monkey	Rat (BDC)
M1	Unknown	--	--	Monkey	Rat (BDC), Monkey	Monkey	--
M2	Glucuronidation of Brigatinib	--	--	--	Monkey	--	Rat (BDC)
Region 1	Undifferentiated and unidentified minor metabolites	--	--	--	--	Monkey	--
M3	Oxidative deamination to phenol + Glucuronidation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M4	Desaturation + GSH conjugation	--	Mouse, Rat, Monkey	--	--	--	Rat (BDC)
M5	Oxidation in the piperazine moiety + Desaturation + GSH conjugation	--	Rat, Monkey	--	--	--	Rat (BDC)
M6	N-Demethylation + Acetylation	--	Rat, Monkey	--	--	--	Rat (BDC)
M7	Oxidation at the DMPO containing Aromatic ring to (possibly) phenol + Glucuronidation	--	--	--	Monkey	--	--
M8	Oxidation+ Desaturation + GSH conjugation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M9	N-Demethylation + Glucuronidation	--	--	--	Monkey	--	--
M10	Dealkylation of piperazine to ketone + Di-desaturation + GSH conjugation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)t
M12	Desaturation at the piperidine ring + Glucuronidation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M13	Oxidation at the DMPO containing the aromatic ring to (possibly) phenol + Glucuronidation	--	Rat, Monkey	Monkey	Rat (BDC), Monkey	--	Rat (BDC)
M14	Dealkylation of piperazine to ketone and reduction of the ketone to alcohol + Desaturation + GSH conjugation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M15	N-Demethylation, Glucuronidation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M16	Dealkylation of piperazine to ketone + Desaturation + Oxidation + Glucuronidation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M17	Didesaturation + Oxidation+ GSH conugation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M18	Dealkylation of piperazine to ketone + Desaturation + GSH conjugation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)

2.6.5.11.4 *In Vitro* and *In Vivo* Metabolites of Brigatinib (AP26113) and Matrices in Which the Metabolites Were Detected（続き）

Metabolite ID	Proposed Biotransformation Pathway	*In Vitro*		*In Vivo*			
		Liver Microsomes	Hepatocytes	Plasma	Urine	Feces	Bile
M19	N-Demethylation + Desaturation + GSH conjugation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M20	Lactam Formation + Desaturation + GSH conjugation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M21	Epoxide formation + GSH conjugation + Loss of water	--	Mouse, Rat, Monkey, Human	Rat	Rat (BDC), Monkey	Rat	Rat (BDC)
M21a	GSH Conjugation		Rat, Monkey	--	--	--	--
M22 (AP32831)	N-oxidation	Monkey, Human	Rat, Monkey	Rat	--	--	--
M23	N-oxidation + N-demethylation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M24	Desaturation + GSH conjugation + Loss of Glu + N-acetylation	--	--	--	--	Monkey	--
M25 (AP32830)	N-oxidation	Mouse, Rat	Rat, Monkey	Rat	Rat, Monkey	--	Rat (BDC)
M26	Desaturation + GSH conjugation + Loss of Glu	--	--	--	Rat, Monkey	Rat, Monkey	--
M27	Oxidation	Monkey, Human	--	Monkey	Monkey	Monkey	--
M28	Desaturation + GSH conjugation + Loss of Glu, Gly	--	--	Rat, Monkey	Rat (BDC), Monkey	Rat, Monkey	Rat (BDC)
Region 2	Undifferentiated and unidentified minor metabolites	--	--	--	--	Monkey	--
M29	Desaturation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M30	Bislactam formation	--	--	--	--	Rat (BDC)	Rat (BDC)
M31	N-Demethylation + Lactam formation	--	--	--	--	Rat	--
M32 (AP25656)	Dealkylation of piperazine to ketone + Reduction of the ketone to alcohol	--	--	Rat, Monkey	Rat	--	Rat (BDC)
M33	Bishydroxylation + Desaturation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)
M34	N-Demethylation + Desaturation	--	--	--	--	Rat	--
M35	Oxidation	--	--	--	Monkey	Monkey	--
M36 (AP26123)	N-Demethylation	Mouse, Rat, Monkey, Human	Mouse, Rat, Monkey, Human	Rat, Monkey	Rat, Monkey	Rat, Monkey	Rat (BDC)
M37	N-Demethylation + Monooxidation	--	--	--	--	--	Rat (BDC)

2.6.5.11.4 *In Vitro* and *In Vivo* Metabolites of Brigatinib (AP26113) and Matrices in Which the Metabolites Were Detected（続き）

Metabolite ID	Proposed Biotransformation Pathway	*In Vitro*		*In Vivo*			
		Liver Microsomes	Hepatocytes	Plasma	Urine	Feces	Bile
M38	Lactam Formation	--	--	Monkey	Monkey	Rat (BDC), Monkey	--
Region 3	Undifferentiated and unidentified minor metabolites	--	--	--	--	Monkey	--
M39	Lactam Formation	--	--	--	--	Rat (BDC)	--
M40	Methylation + Oxidation	--	--	--	Rat	--	--
M41	Methylation	--	--	--	Monkey	Rat (BDC), Monkey	--
Region 4	Undifferentiated and unidentified minor metabolites	--	--	--	--	Monkey	--
M42	Unknown	--	--	Monkey	Monkey	--	--
M43	N-demethylation + Oxidation + Hydrogenation + GSH conjugation	--	Mouse	--	--	--	--
M43a	N-demethylation + Oxidation + Hydrogenation + GSH conjugation	--	Mouse	--	--	--	--

BDC = Bile duct-canulated

-- = Not detected or <1% of TRA in matrix (for in vitro data) and <0.5% of TRA in matrix (for in vivo data)

2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導/阻害

2.6.5.12.1 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes

Test Article: Brigatinib (AP26113), AP26123 (M36)
Location in CTD: 4.2.2.6-1

Type of Study:	CYP inhibition
Test System:	Human liver microsomes
Protein Concentration:	0.1 mg/mL (0.05 mg/mL for midazolam incubations)
Cofactor:	NADPH
Test Article Concentration:	0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µmol/L
Experimental Method:	Incubations were conducted in 96 well plates at 37 °C in a shaking water bath. CYP probe substrate concentrations used were near K_m: phenactein (125 µmol/L), bupropion (50 µmol/L), amodiaquine (6 µmol/L), diclofenac (6 µmol/L), S-mepheytoin (50 µmol/L), dextromethorphan (6 µmol/L), testosterone (50 µmol/L), and midazolam (5 µmol/L).
Incubation Time:	5 minutes (For evaluation of time-dependent inhibition (TDI), brigatinib was preincubated with human liver microsomes in the absence and presence of NADPH for 30 minutes prior to incubation with the marker substrates for 5 minutes)
Analyte(s):	Metabolites of CYP isozyme specific probe substrates
Analytical Method:	LC-MS/MS

CYP Isozyme	CYP Marker Probe Substrate Reaction	Brigatinib IC_{50} (µmol/L)[a]			AP26123 (Metabolite) IC_{50} (µmol/L)[a]
		Reversible Inhibition (RI)	Time-Dependent Inhibition (TDI)		Reversible Inhibition (RI)
		No Preincubation	30-Minute Preincubation (Plus NADPH)	30-Minute Preincubation (Minus NADPH)	No Preincubation
CYP1A2	Phenacetin O-deethylation	>100	>100	>100	>100
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	>100	>100	>100	>100
CYP2C8	Amodiaquine N-dealkylation	>100	>100	>100	>100
CYP2C9	Diclofenac 4′-hydroxylation	>100	>100	>100	>100
CYP2C19	S-Mephenytoin 4′-hydroxylation	>100	>100	>100	>100
CYP2D6	Dextromethorphan O-demethylation	>100	>100	>100	>100
CYP3A4/5	Testosterone 6β-hydroxylation	>100	>100	>100	>100
	Midazolam 1′-hydroxylation	72.9	>100	60.1	63.8

[a]: Average data (ie, percent of control activity) obtained from triplicate or duplicate samples for each test article concentration were used to calculate IC50 values. IC50 values were calculated with XL Fit

2.6.5.12.2 Induction of CYP1A2

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.6-2

Type of Study:	CYP induction *in vitro*
Test System:	Primary cultures of human hepatocytes
CYP Isozyme:	CYP1A2
Test Article Concentration:	0.25, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	Phenactein/100 µmol/L
Postive Control/Concentration:	Omeprazole/50 µmol/L
Negative Control/Concentration:	Flumazenil/25 µmol/L
Experimental Method:	Hepatocyte cultures in culture multi-well plates were treated once daily for 2 consecutive days with test article and controls, in a humidified culture chamber (37 ± 1 °C at 95% relative humidity, 95/5% air/CO_2).
Analytical Method:	LC-MS/MS assay of acetaminophen (probe substrate metabolite), CYP1A2 mRNA quantitation by RT-PCR

Treatment	Concentration	Fold Change[a]					
		CYP1A2 Activity (Phenactein O-Dealkylation)			CYP1A2 mRNA Levels		
		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Dimethyl Sulfoxide	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Brigatinib	0.25 µmol/L	0.767	0.899	0.891	0.871	1.45	1.27
	1 µmol/L	0.786	0.844	0.624	0.436	0.485	1.48
	2.5 µmol/L	0.773	0.725	0.347	0.423	0.204	0.664
	5 µmol/L	0.676	0.599	0.169	0.340	0.0880	0.242
	7.5 µmol/L	0.661	0.628	0.135	0.388	0.0580	0.103
	10 µmol/L	0.585	0.597	0.127	0.285	0.0400	0.0790
	20 µmol/L	0.437	0.507	0.147	0.262	0.531	0.221
Flumazenil	25 µmol/L	0.854	1.19	1.14	0.859	2.29	1.92
Omeprazole	50 µmol/L	6.03	17.4	49.5	178	59.0	70.0

[a]: For enzyme activity fold change is calculated as activity of test article treated cells/activiy of vehicle control; for mRNA fold change values are relative to vehicle control, normalized to GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

2.6.5.12.3 Induction of CYP2B6

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.6-2

Type of Study:	CYP induction *in vitro*
Test System:	Primary cultures of human hepatocytes
CYP Isozyme:	CYP2B6
Test Article Concentration:	0.25, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	Bupropion/500 µmol/L
Postive Control/Concentration:	Phenobarbital/750 µmol/L
Negative Control/Concentration:	Flumazenil/25 µmol/L
Experimental Method:	Hepatocyte cultures in culture multi-well plates were treated once daily for 2 consecutive days with test article and controls, in a humidified culture chamber (37 ± 1 °C at 95% relative humidity, 95/5% air/CO_2).
Analytical Method:	LC-MS/MS assay of hydroxy-bupropion (probe substrate metabolite), CYP2B6 mRNA quantitation by RT-PCR

Treatment	Concentration	Fold Change[a]					
		CYP2B6 Activity (Bupropion Hydroxylation)			CYP2B6 mRNA Levels		
		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Dimethyl Sulfoxide	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Brigatinib	0.25 µmol/L	1.03	1.21	0.830	1.51	1.60	1.12
	1 µmol/L	1.13	1.28	0.957	2.36	2.70	2.79
	2.5 µmol/L	0.993	0.982	0.968	2.83	1.74	2.74
	5 µmol/L	0.848	0.718	0.893	2.20	0.988	2.52
	7.5 µmol/L	0.749	0.508	0.810	1.78	0.694	1.89
	10 µmol/L	0.636	0.473	0.670	1.78	0.510	1.53
	20 µmol/L	0.422	0.345	0.300	1.60	0.171	0.560
Flumazenil	25 µmol/L	1.06	1.26	0.970	0.957	1.55	1.20
Phenobarbital	750 µmol/L	7.01	9.55	6.22	6.33	5.17	10.4

[a]: For enzyme activity fold change is calculated as activity of test article treated cells/activiy of vehicle control; for mRNA fold change values are relative to vehicle control, normalized to GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

2.6.5.12.4 Induction of CYP3A4

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.6-2

Type of Study:	CYP induction *in vitro*
Test System:	Primary cultures of human hepatocytes
CYP Isozyme:	CYP3A4
Test Article Concentration:	0.25, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 20 µmol/L
Probe Substrate:	Midazolam/30 µmol/L
Positive Control/Concentration:	Rifampin/20 µmol/L
Negative Control/Concentration:	Flumazenil/25 µmol/L
Experimental Method:	Hepatocyte cultures in culture multi-well plates were treated once daily for 2 consecutive days with test article and controls, in a humidified culture chamber (37 ± 1 °C at 95% relative humidity, 95/5% air/CO_2)
Analytical Method:	LC-MS/MS assay of 1'-hydroxymidazolam (probe substrate metabolite), CYP3A4 mRNA quantitation by RT-PCR

Treatment	Concentration	Fold Change[a]					
		CYP3A4/5 Activity (Midazolam 1'-Hydroxylation)			CYP3A4 mRNA Levels		
		[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]	[redacted]
Dimethyl Sulfoxide	0.1% (v/v)	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Brigatinib	0.25 µmol/L	0.900	1.34	1.47	3.56	4.05	2.11
	1 µmol/L	0.784	1.36	2.18	5.13	6.19	5.82
	2.5 µmol/L	0.654	0.817	1.67	3.56	3.31	6.54
	5 µmol/L	0.471	0.530	0.911	2.89	1.96	2.79
	7.5 µmol/L	0.397	0.316	0.629	1.96	1.09	1.47
	10 µmol/L	0.336	0.243	0.474	1.68	0.577	0.938
	20 µmol/L	0.214	0.126	0.268	0.658	0.136	0.198
Flumazenil	25 µmol/L	1.06	1.21	1.10	1.13	2.09	2.17
Rifampin	20 µmol/L	3.50	4.98	8.92	27.1	8.75	21.7

[a]: For enzyme activity fold change is calculated as activity of test article treated cells/activiy of vehicle control; for mRNA fold change values are relative to vehicle control, normalized to GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase)

2.6.5.13 薬物動態試験：排泄

2.6.5.13.1 Intact Sprague-Dawley Rats

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.4-3, -4, -5

Species:	Sprague-Dawley rats; Intact
Gender (M/F)/Number of animals:	M/4
Feeding Condition:	Fasted overnight
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 3.97)/Solution
Method of Administration:	Oral (PO)
Dose:	30.23 mg/kg (201.82 µCi/kg)
Radionuclide:	[^{14}C]
Specific Activity:	3.9 mCi/mmol (6.68 µCi/mg)
Analyte:	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC) or combustion followed by LSC

Collection Interval (hr)	Recovery (%) of Administered [^{14}C]Brigatinib Dose in Intact Rats[a]					
	Urine	Feces	Carcass	Cage Wash	Cage Wipe	Total Dose Recovered (%)
Predose	--	--	--	--	--	--
0-24	5.17 ± 2.33	48.29 ± 9.70	--	--	--	--
24-48	1.71 ± 1.20	32.77 ± 10.76	--	--	--	--
48-72	0.11 ± 0.02	5.83 ± 1.96	--	--	--	--
72-96	0.04 ± 0.01	0.51 ± 0.10	--	--	--	--
96-120	0.02 ± 0.00	0.23 ± 0.05	--	--	--	--
Subtotal	7.05 ± 1.64	87.64 ± 4.14	--	--	--	--
120	--	--	0.67 ± 0.12	2.39 ± 1.17	0.12 ± 0.19	97.88 ± 3.51

--: Not applicable

[a]: Values represent mean ± SD (n = 4)

2.6.5.13.2 Bile Duct-Cannulated Sprague-Dawley Rats

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)

Location in CTD: 4.2.2.4-3, -4, -5

Species/Strain:	Sprague-Dawley rats; Bile duct-cannulated (BDC)
Gender (M/F)/Number of animals:	M/6
Feeding Condition:	Fed
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 3.97)/Solution
Method of Administration:	Oral (PO)
Dose:	30.23 mg/kg (201.82 µCi/kg)
Radionuclide:	[^{14}C]
Specific Activity:	3.9 mCi/mmol (6.68 µCi/mg)
Analyte:	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC) or combustion followed by LSC

Collection Interval (hr)	% Recovery of Administered [^{14}C]Brigatinib Dose in BDC Rats[a]						
	Urine	Bile	Feces	Carcass	Cage Wash	Cage Wipe	Total Dose Recovered (%)
Predose	--	--	--	--	--	--	--
0-8	--	5.93 ± 4.65	--	--	--	--	--
8-16	--	5.42 ± 2.29	--	--	--	--	--
16-24	--	3.38 ± 3.28	--	--	--	--	--
0-24	12.54 ± 4.82	--	6.02 ± 3.62	--	--	--	--
24-48	6.74 ± 2.67	13.39 ± 1.48	9.79 ± 8.76	--	--	--	--
48-72	1.88 ± 1.05	3.58 ± 1.49	2.76 ± 2.09	--	--	--	--
Subtotal	21.16 ± 7.12	31.70 ± 6.98	18.56 ± 12.62	--	--	--	--
72	--	--	--	17.95 ± 11.75	5.23 ± 2.70	0.09 ± 0.05	94.68 ± 2.43

--: Not applicable

[a]: Two animals, animal 1M1 and 1M4 died due to obstruction of bile flow during 24-48 h postdose. Hence data from these two animals was excluded from mean and standard deviation calculations and values in the table represent mean ± SD (n = 4)

2.6.5.13.3 Cynomolgus Monkeys

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.4-6, -7, -8

Species:	Cynomolgus monkeys
Gender (M/F)/Number of animals:	M/5[a]
Feeding Condition:	Fasted overnight for 18 h and for 4 h postdose
Vehicle/Formulation:	25 mmol/L Citrate buffer (pH 3.98)/Solution
Method of Administration:	Oral (PO)
Dose:	29.9 mg/kg (36.91 µCi/kg)
Radionuclide	[^{14}C]
Specific Activity:	57.5 mCi/mmol (98.44 µCi/mg)
Analyte:	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC) or combustion followed by LSC

Collection Interval (hr)	Recovery (%) of Administered [^{14}C]Brigatinib Dose in Cynomolgus Monkeys[b]						
	Urine	Feces	Cage Debris	Cage Wash	Cage Wipe	Emesis[c]	Total Dose Recovered (%)
Predose	--	--	--	--	--	--	--
0-24	7.61 ± 1.07	6.13 ± 8.01	--	--	--	--	--
24-48	1.48 ± 0.71	15.25 ± 17.04	--	--	--	--	--
48-72	0.31 ± 0.15	26.54 ± 8.77	--	--	--	--	--
72-96	0.17 ± 0.06	13.02 ± 10.41	--	--	--	--	--
96-120	0.07 ± 0.03	2.85 ± 1.54	--	--	--	--	--
120-144	0.05 ± 0.01	1.04 ± 0.54	--	--	--	--	--
144-168	0.04 ± 0.00	1.65 ± 2.16	--	--	--	--	--
Subtotal	9.75 ± 0.87	66.48 ± 6.46	--	--	--	--	--
168	--	--	2.55 ± 2.80	0.67 ± 0.46	0.86 ± 0.66	8.42 ± 3.27	88.93 ± 3.89

--: Not applicable

[a]: Per study protocol 5 animals were dosed; however, data from 2 monkeys (1M1, 1M2) were suspect due to large amounts of radioactivity recovered in urine. It is suspected that these two monkeys had vomited and the emesis went unnoticed and got mixed with urine. Therefore to be definitive, data from only the remaining three monkeys (1M3, 1M4, 1M5) are reported

[b]: Values in the table represent mean ± SD (n = 3 animals; 1M3, 1M4, and 1M5)

[c]: Emesis was observed at the following time points in animals 1M3 (6 and 8 h postdose), 1M4 (20.5 h postdose), and 1M5 (8 h postdose)

2.6.5.14 薬物動態試験：薬物相互作用

2.6.5.14.1 BSEP Substrate Assessment

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	Vesicles expressing human BSEP
Experimental Method:	Incubations were carried out in 96-well plates in a humidified incubator. Four concentrations of brigatinib were incubated with BSEP vesicles (50 µg) for three incubation times (5, 15, and 30 minutes). The uptake rate of [^{3}H]-taurocholic acid ([^{3}H]TCA) was also assessed in parallel. The reaction was initiated by addition of 5 mmol/L adenosine triphosphate (ATP). Negative controls were run in parallel with 5 mmol/L adenosine 5'-monophosphate (AMP) in place of ATP. Post incubation, reactions were terminated by adding ice-cold wash buffer to each well and vesicle-associated and free [^{14}C]brigatinib or [^{3}H]TCA were separated by rapid filtration under vacuum. After extensive washing with ice-cold washing buffer, the radioactivity of vesicle-associated [^{14}C]brigatinib and [^{3}H]TCA was measured.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	[^{3}H]TCA/1 µmol/L
Analyte(s):	[^{14}C]Brigatinib and ^{3}H-TCA-derived radioactivity
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC)

Treatment	Incubation Time	5 min		15 min		30 min	
	In the Presence of	AMP	ATP	AMP	ATP	AMP	ATP
		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)					
0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	1.06	1.96	0.451	0.474	0.171	0.0955
	Ratio	NA	1.9	NA	1.1	NA	0.56
1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	10.6	10.5	3.23	2.66	1.53	1.46
	Ratio	NA	0.99	NA	0.82	N.A.	0.95
4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	26.7	20.7	5.93	5.55	3.37	3.09
	Ratio	NA	0.78	NA	0.94	NA	0.92
10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	64.0[a]	51.1	16.5	15.3	9.56	8.29
	Ratio	NA	0.80	NA	0.93	NA	0.87
1 µmol/L [^{3}H]TCA	Influx Rate	NT	NT	NT	NT	0.493	13.3
	Ratio	NA	NA	NA	NA	NA	27

Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3
[a]: n = 2; one replicate was a statistical outlier hence excluded from the calculation of the average
NT, not tested; NA, not applicable

2.6.5.14.2 P-gp and BCRP Substrate Assessment

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113) Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	C2BBe1, MDR1-MDCK, MDCK, and BCRP-MDCK cells
Experimental Method:	Incubations were conducted in 12-well transwell culture plates (rat tail collagen-coated) in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. Aliquots of donor and receiver samples were collected at pre-determined time points for analysis of brigatinib, digoxin, and cladribine. After the completion of the permeability assay, cell monolayer integrity was examined using lucifer yellow.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	Digoxin (10 µmol/L; P-gp probe substrate); Cladribine (10 µmol/L; BCRP probe substrate)
Control Inhibitor/Concentration:	Valspodar/1 µmol/L (P-gp); Ko143/10 µmol/L (BCRP)
Analytes(s):	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity, digoxin, cladribine
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC; brigatinib), LC-MS/MS (digoxin, cladribine)

Cell Model	Treatment	% Recovery		P_{app} (x10^{-6} cm/s)		Efflux Ratio[a]	Substrate Classification	
		A→B	B→A	A→B	B→A		P-gp	BCRP
C2BBe1	0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	111 ± 9.2	107 ± 4.7	3.27 ± ND	25.5 ± 6.7	7.8	Positive	NA
	1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	104 ± ND	112 ± 0.6	4.01 ± ND	29.2 ± 1.1	7.3		
	4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	110 ± 10	114 ± 1.4	5.16 ± 2.9	32.9 ± 4.8	6.4		
	10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	110 ± 7.6	108 ± 3.5	4.58 ± 0.77	32.6 ± 4.7	7.1		
	1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib + 1 µmol/L Valspodar	102 ± 3.9	100 ± 5.9	6.93 ± 2.0	17.6 ± 2.0	2.5		
	1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib + 10 µmol/L Ko143 – Run 1	109 ± 4.3	107 ± 1.5	4.72 ± ND	31.1 ± 2.5	6.6	NA	Negative
	1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib + 10 µmol/L Ko143 – Run 2	110 ± 2.4	107 ± 5.4	3.76 ± 0.21	34.1 ± 3.3	9.1		
	10 µmol/L Digoxin	85.5 ±.6.8	90.3 ± 4.4	0.264 ± 0.02	13.9 ± 1.6	53	Positive	NA
	10 µmol/L Digoxin + 1 µmol/L Valspodar	86.8 ± 4.1	95.3 ± 5.6	1.42 ± 0.07	3.48 ± 0.11	2.5		
MDR1-MDCK	0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	98.6 ± 15	88.9 ± 13	0.421 ± ND	16.7 ± 4.1	40	Positive	NA
	1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	105 ± 15	104 ± 4.8	0.137 ± 0.02	19.2 ± 0.77	140		
	4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	107 ± 3.5	105 ± 3.3	0.221 ± 0.09	18.1 ± 0.67	82		
	10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	108 ± 3.1	103 ± 2.0	0.270 ± 0.18	21.6 ± 2.3	80		
	10 µmol/L Digoxin	84.5 ± 7.9	94.8 ± 7.4	0.278 ± 0.08	11,6 ± 0.87	42	Positive	NA
	10 µmol/L Digoxin + 1 µmol/L Valspodar	88.7 ± 4.1	100 ± 3.3	0.390 ± 0.08	0.495 ± 0.19	1.3		
MDCK	0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	108 ± 6.0	110 ± 4.5	1.34 ± 0.96	3.63 ± 0.87	2.7	NA	NA
	1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	104 ± 1.7	103 ± 4.4	0.933 ± 0.09	3.26 ± 0.43	3.5		
	4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	107 ± 2.6	107 ± 2.2	0.764 ± 0.13	3.44 ± 0.08	4.5		
	10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	109 ± 2.9	102 ± 0.89	1.04 ± 0.06	2.95 ± 0.39	2.8		
	10 µmol/L Digoxin	82.9 ± 4.0	87.6 ± 10	0.0481 ± 0.005	0.999 ± 0.02	21	NA	NA

2.6.5.14.2 P-gp and BCRP Substrate Assessment（続き）

Cell Model	Treatment	% Recovery		P_{app} ($x10^{-6}$ cm/s)		Efflux Ratio[a]	Substrate Classification	
		A→B	B→A	A→B	B→A		P-gp	BCRP
BCRP-MDCK	0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	105 ± 2.9	110 ± 1.2	1.33 ± 1.1	19.7 ± 2.7	15	NA	Positive
	1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	110 ± 4.4	105 ± 4.0	1.01 ± 0.73	21.1 ± 1.1	21		
	4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	110 ± 4.7	108 ± 1.7	1.12 ± 0.24	18.5 ± 1.6	16		
	10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	109 ± 4.8	107 ± 6.1	0.657 ± 0.17	17.9 ± 0.48	27		
	1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib + 10 µmol/L Ko143	107 ± 4.2	98.8 ± 2.2	2.74 ± 0.23	6.39 ± 1.2	2.3		
	10 µmol/L Cladribine	93.4 ± 1.6	93.2 ± 2.6	0.367 ± 0.11	20.8 ± 2.6	57	NA	Positive
	10 µmol/L Cladribine + 10 µmol/L Ko143	88.4 ± 5.9	97.7 ± 5.0	0.824 ± 0.14	0.609 ± 0.020	0.74		

A: Apical; B: Basolateral; P_{app}: Apparent permeability coefficient; NA: Not applicable

[a]: Efflux ratio calculated as $P_{app\ B\rightarrow A}/P_{app\ A\rightarrow B}$

Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean ± SD (n = 3)

2.6.5.14.3 OATP1B1 and OATP1B3 Substrate Assessment

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	OATP1B1-transfected, OATP1B3-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Four concentrations of brigatinib were incubated with the transporter- and vector control-transfected HEK cells for three incubation times (2, 5, and 10 minutes). The uptake rate of atorvastatin (positive control substrate) was evaluated in parallel. Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. At the end of the incubation, the cells were lysed, the radioactivity of [^{14}C]brigatinib was counted, and the uptake rate in each cell line was determined.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	Atorvastatin/0.15 µmol/L
Analyte(s):	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity, atorvastatin
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC; Brigatinib), LC-MS/MS (atorvastatin)

Treatment	Incubation Time	2 min			5 min			10 min		
	Cell Line	VC	OATP1B1	OATP1B3	VC	OATP1B1	OATP1B3	VC	OATP1B1	OATP1B3
	Influx Rate (pmol/minute/mg protein)									
0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	3.48	2.98	2.84	0.780	0.918	0.719	1.08	0.930	0.893
	Ratio	NA	0.86	0.82	NA	1.2	0.92	NA	0.86	0.82
1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	31.3	36.7	27.7	8.77	10.3	9.69	9.41	8.98	9.33
	Ratio	NA	1.2	0.89	NA	1.2	1.1	NA	0.95	0.99
4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	134	168	126	39.5	45.6	44.6	43.4	43.7	48.5
	Ratio	NA	1.3	0.95	NA	1.2	1.1	NA	1.0	1.1
10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	276	323	242	83.1	99.2	94.2	97.8	100	114
	Ratio	NA	1.2	0.88	NA	1.2	1.1	NA	1.0	1.2
0.15 µmol/L Atorvastatin	Influx Rate	NT	NT	NT	0.517	9.92	6.18	NT	NT	NT
	Ratio	NA	NA	NA	NA	19	12	NA	NA	NA

HEK: Human embryonic kidney; VC: Vector control-transfected HEK cells; OATP1B1: OATP1B1-transfected HEK cells; OATP1B3: OATP1B3-transfected HEK cells; NA: Not applicable; NT: Not tested
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.4 OATP1A2 Substrate Assessment

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.6-3

Test System:	OATP1A2-transfected and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Four concentrations of brigatinib were incubated with the transporter- and vector control-transfected HEK cells for three incubation times (2, 5, and 10 minutes). The uptake rate of atorvastatin (positive control substrate) was evaluated in parallel. Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. At the end of the incubation, the concentrations of brigatinib and atorvastatin were measured, and the uptake rate in each cell line was determined.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	Atorvastatin/1 µmol/L
Analyte(s):	Brigatinib, atorvastatin
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment	Incubation Time	2 min		5 min		10 min	
	Cell Line	VC	OATP1A2	VC	OATP1A2	VC	OATP1A2
		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)					
0.1 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	ND	1.20	ND	0.623	ND	0.631
	Ratio	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	3.84	12.3	1.44	6.9	1.05	5.77
	Ratio	NA	3.20	NA	4.80	NA	5.51
4 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	13.3	43.0	5.06	25.2	3.69	21.6
	Ratio	NA	3.23	NA	4.99	NA	5.84
10 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	30.8	89.8	10.4	50.0	8.81	43.8
	Ratio	NA	2.91	NA	4.81	NA	4.97
1 µmol/L Atorvastatin	Influx Rate	NT	NT	37.9	95.0	NT	NT
	Ratio	NA	NA	NA	2.50	NA	NA

HEK: Human embryonic kidney; VC: Vector control-transfected HEK cells; OATP1A2: OATP1A2-transfected HEK cells; NA: Not applicable; ND: Not determined; NT: Not tested
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.5 OATP2B1 Substrate Assessment

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.6-3

Test System:	OATP2B1-transfected and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Four concentrations of brigatinib were incubated with the transporter- and vector control-transfected HEK cells for three incubation times (2, 5, and 10 minutes). The uptake rate of rosuvastatin (positive control substrate) was evaluated in parallel. Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. At the end of the incubation, the concentrations of brigatinib and atorvastatin were measured, and the uptake rate in each cell line was determined.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	Rosuvastatin/10 µmol/L
Analyte(s):	Brigatinib, rosuvastatin
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment	Incubation Time	2 min		5 min		10 min	
	Cell Line	VC	OATP2B1	VC	OATP2B1	VC	OATP2B1
	Influx Rate (pmol/minute/mg protein)						
0.1 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	ND	ND	1.75	1.72	1.88	1.85
	Ratio	NA	NA	NA	0.980	NA	0.986
1 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	12.4	11.9	16.8	15.2	16.9	16.9
	Ratio	NA	0.958	NA	0.905	NA	0.998
4 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	66.5	60.3	73.2	68.4	71.9	68.2
	Ratio	NA	0.907	NA	0.934	NA	0.949
10 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	164	158	190	183	199	194
	Ratio	NA	0.964	NA	0.964	NA	0.977
10 µmol/L Rosuvastatin	Influx Rate	12.4	212	NT	NT	NT	NT
	Ratio	NA	17.1	NA	NA	NA	NA

HEK: Human embryonic kidney; VC: Vector control-transfected HEK cells; OATP2B1: OATP2B1-transfected HEK cells; NA: Not applicable; ND: Not determined; NT: Not tested
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.6 NTCP Substrate Assessment

Test Article: Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.6-3

Test System:	NTCP-transfected and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Four concentrations of brigatinib were incubated with the transporter- and vector control-transfected HEK cells for three incubation times (2, 5, and 10 minutes). The uptake rate of atorvastatin (positive control substrate) was evaluated in parallel. Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. At the end of the incubation, the concentrations of brigatinib and atorvastatin were measured, and the uptake rate in each cell line was determined.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	Atorvastatin/0.5 µmol/L
Analyte(s):	Brigatinib, atorvastatin
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment	Incubation Time	2 min		5 min		10 min	
	Cell Line	VC	NTCP	VC	NTCP	VC	NTCP
		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)					
0.1 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	2.64	2.33	2.07	2.00	1.77	1.74
	Ratio	NA	0.886	NA	0.965	NA	0.987
1 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	20.7	20.8	20.1	18.0	16.1	15.1
	Ratio	NA	1.01	NA	0.894	NA	0.933
4 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	88.5	87.2	83.5	79.9	72.0	64.9
	Ratio	NA	0.985	NA	0.957	NA	0.901
10 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	231	213	201	181	240	ND
	Ratio	NA	0.925	NA	0.903	NA	NA
0.5 µmol/L Atorvastatin	Influx Rate	NT	NT	3.09	32.3	NT	NT
	Ratio	NA	NA	NA	10.5	NA	NA

HEK: Human embryonic kidney; VC: Vector control-transfected HEK cells; NTCP: NTCP-transfected HEK cells; NA: Not applicable; ND: Not determined; NT: Not tested
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3.

2.6.5.14.7 OCT1 Substrate Assessment

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	OCT1-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Four concentrations of brigatinib were incubated with the transporter- and vector control-transfected HEK cells for three incubation times (2, 5, and 10 minutes). The uptake rate of 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP^+; positive control substrate) was evaluated in parallel. Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. At the end of the incubation, the cells were lysed, the radioactivity of [^{14}C]brigatinib was counted, and the uptake rate in each cell line was determined.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	MPP^+/5 µmol/L
Analyte(s):	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity, MPP^+
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC; Brigatinib), LC-MS/MS (MPP^+)

Treatment	Incubation Time	2 min		5 min		10 min	
	Cell Line	VC	OCT1	VC	OCT1	VC	OCT1
		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)					
0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	4.92	7.31	1.95	2.81	1.51	2.55
	Ratio	NA	1.5	NA	1.4	NA	1.7
1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	39.0	53.7	18.0	22.9	15.4	19.1
	Ratio	NA	1.4	NA	1.3	NA	1.2
4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	129	137	69.4	79.1	62.2	67.4
	Ratio	NA	1.1	NA	1.1	NA	1.1
10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	276	283	161	182	159	160
	Ratio	NA.	1.0	NA	1.1	NA	1.0
5 µmol/L MPP^+	Influx Rate	8.43	566	NT	NT	NT	NT
	Ratio	NA	67	NA	NA	NA	NA

HEK: Human embryonic kidney; VC: Vector control-transfected HEK cells; OCT1: OCT1-transfected HEK cells; NA: Not applicable; ND: Not determined; NT: Not tested
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.8 OAT1 and OAT3 Substrate Assessment

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	OAT1-transfected, OAT3-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Four concentrations of brigatinib were incubated with the transporter- and vector control-transfected HEK cells for three incubation times (2, 5, and 10 minutes). The uptake rate of para-aminohippurate (PAH; positive control substrate for OAT1) and furosemide (positive control substrate for OAT3) was evaluated in parallel. Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. At the end of the incubation, the cells were lysed, the radioactivity of [^{14}C]brigatinib was counted, and the uptake rate in each cell line was determined.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	PAH/10 µmol/L (OAT1); Furosemide/5 µmol/L (OAT3)
Analyte(s):	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity, PAH, Furosemide
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC; Brigatinib), LC-MS/MS (PAH, Furosemide)

Treatment	Incubation Time	2 min			5 min			10 min		
	Cell Line	VC	OAT1	OAT3	VC	OAT1	OAT3	VC	OAT1	OAT3
		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)								
0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	4.92	4.84	3.13	1.95	1.98	1.72	1.51	1.90	1.62
	Ratio	NA	0.98	0.64	NA	1.0	0.88	NA	1.3	1.1
1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	39.0	48.2	43.8	18.0	25.6	20.4	15.4	24.3	20.7
	Ratio	NA	1.2	1.1	NA	1.4	1.1	NA	1.6	1.3
4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	129	187	160	69.4	100	83.4	62.2	96.4	81.3
	Ratio	NA	1.5	1.2	NA	1.4	1.2	NA	1.6	1.3
10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	276	447	383	161	233	186	159	254	197
	Ratio	NA	1.6	1.4	NA	1.4	1.2	NA	1.6	1.2
10 µmol/L PAH	Influx Rate	NT	NT	NT	1.59	364	NT	NT	NT	NT
	Ratio	NA	NA	NA	NA	229	NA	NA	NA	NA
5 µmol/L Furosemide	Influx Rate	NT	NT	NT	1.95	NT	98.8	NT	NT	NT
	Ratio	NA	NA	NA	NA	NA	51	NA	NA	NA

HEK: Human embryonic cells; VC: Vector control-transfected HEK cells; OAT1: OAT1-transfected HEK cells; OAT3: OAT3-transfected HEK cells; NA: Not applicable; ND: Not determined; NT: Not tested
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.9 OCT2 Substrate Assessment

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	OCT2-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Four concentrations of brigatinib were incubated with the transporter- and vector control-transfected HEK cells for three incubation times (2, 5, and 10 minutes). The uptake rate of 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP^+; positive control substrate) was evaluated in parallel. Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. At the end of the incubation, the cells were lysed, the radioactivity of [^{14}C]brigatinib was counted, and the uptake rate in each cell line was determined.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	MPP^+/5 µmol/L
Analyte(s):	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity, MPP^+
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC; Brigatinib), LC-MS/MS (MPP^+)

Treatment	Incubation Time	2 min		5 min		10 min	
	Cell Line	VC	OCT2	VC	OCT2	VC	OCT2
		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)					
0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	4.92	3.83	1.95	2.73	1.51	1.90
	Ratio	NA	0.78	NA	1.4	NA	1.3
1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	39.0	36.7	18.0	22.5	15.4	19.7
	Ratio	NA	0.94	NA	1.2	NA	1.3
4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	129	118	69.4	83.5	62.2	64.9
	Ratio	NA	0.91	NA	1.2	NA	1.0
10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	276	244	161	195	159	160
	Ratio	NA	0.88	NA	1.2	NA	1.0
5 µmol/L MPP^+	Influx Rate	8.43	616	NT	NT	NT	NT
	Ratio	NA	73	NA	NA	NA	NA

HEK: Human embryonic cells; VC: Vector control-transfected HEK cells; OCT2: OCT2-transfected HEK cells; NA: Not applicable; ND: Not determined; NT: Not tested
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.10 MATE1 and MATE2K Substrate Assessment

Test Article: [^{14}C]Brigatinib (AP26113)
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	MATE1-transfected, MATE2K-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The cells were preincubated with HBSSg_8.5 for 20 minutes. Four concentrations of brigatinib were incubated with the transporter- and vector control-transfected HEK cells for three incubation times (2, 5, and 10 minutes). The uptake rate of metformin and ASP (4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium) (positive control substrates) was evaluated in parallel. At the end of the incubation, the cells were lysed, the radioactivity of [^{14}C]brigatinib was counted, and the uptake rate in each cell line was determined.
Test Article Concentration:	0.1, 1, 4, 10 µmol/L
Positive Control/Concentration:	Metformin/50 µmol/L; ASP/1 µmol/L
Analyte(s):	[^{14}C]Brigatinib-derived radioactivity, Metformin, ASP
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC; Brigatinib), LC-MS/MS (metformin, ASP)

Treatment	Incubation Time	2 min			5 min			10 min		
	Cell Line	VC	MATE1	MATE2K	VC	MATE1	MATE2K	VC	MATE1	MATE2K
		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)								
0.1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	6.65	9.15	5.47	2.09	2.99	1.72	4.37	6.21	2.90
	Ratio	NA	1.4	0.82	NA	1.4	0.82	NA	1.4	0.66
1 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	62.1	94.7	49.0	30.5	41.1	26.7	43.2	51.8	30.7
	Ratio	NA	1.5	0.79	NA	1.3	0.87	NA	1.2	0.71
4 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	293	400	232	168	204	156	219	212	146
	Ratio	NA	1.4	0.79	NA	1.2	0.93	NA	0.97	0.67
10 µmol/L [^{14}C]Brigatinib	Influx Rate	682	797	538	421	491	430	586	640	398
	Ratio	NA	1.2	0.79	NA	1.2	1.0	NA	1.1	0.68
50 µmol/L Metformin	Influx Rate	NT	NT	NT	NT	NT	NT	4.95	858	NA
	Ratio	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	173	NA
1 µmol/L ASP	Influx Rate	NT	NT	NT	NT	NT	NT	4.19	NA	44.0
	Ratio	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10

HEK: Human embryonic kidney; HBSSg: Hanks' balanced salt solution containing 10 mmol/L HEPES and 15 mmol/L D-glucose; VC: Vector control-transfected HEK cells; MATE1: MATE1-transfected HEK cells; MATE2K: MATE2K-transfected HEK cells; NA: Not applicable; ND: Not determined; NT: Not tested
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.11 BSEP Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	Vesicles expressing human BSEP
Experimental Method:	Incubation of BSEP vesicles (50 µg) and [^{3}H]taurocholic acid ([^{3}H]TCA) in the absence and presence of brigatinib or cyclosporine A (CsA) and initiation of the reaction by addition of 5 mmol/L adenosine triphosphate (ATP). Incubations were carried out in 96-well plates in a humidified incubator for 30 minutes. Negative controls were run in parallel with 5 mmol/L adenosine monophosphate (AMP) in place of ATP. Post incubation, the vesicle-associated [^{3}H]TCA and free [^{3}H]TCA were separated by rapid filtration through a glass-fiber filter plate under vacuum. After extensive washing with ice-cold buffer, the radioactivity of vesicle-associated [^{3}H]TCA was measured.
Test Article Concentration:	0.3, 1, 4, 20, 50, 120 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	[^{3}H]TCA/1 µmol/L
Control Inhibitor/Concentration:	CsA/10 µmol/L
Analyte(s):	[^{3}H]TCA-derived radioactivity
Analytical Method:	Liquid scintillation counting (LSC)

Treatment	^{3}H-TCA Influx Rate (pmol/min/mg protein)			BSEP Activity Remaining (%)	% Inhibition of BSEP Activity
	Average Cofactor ATP	Average Cofactor AMP	Net Rate[a]		
10 µmol/L CsA	2.85	0.962	1.89	10.4	89.6
120 µmol/L Brigatinib	12.3	0.839	11.5	63.5	36.5
50 µmol/L Brigatinib	17.3	0.850	16.5	90.9	9.10
20 µmol/L Brigatinib	18.2	0.792	17.4	96.0	4.00
4 µmol/L Brigatinib	17.5	0.788	16.7	92.5	7.50
1 µmol/L Brigatinib	18.6	0.862	17.7	97.9	2.10
0.3 µmol/L Brigatinib	18.7	0.830	17.9	98.6	1.40
Control[b]	19.0	0.844	18.1	100	0.00
IC_{50} (µmol/L)	>120				

[a]: Net rate calculated as average ATP value minus average AMP value

[b]: In the absence of inhibitor (Brigatinib and CsA)

Duplicate wells were used per treatment and values in the table represent mean of n = 2

2.6.5.14.12 P-gp Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	MDR1-MDCK, C2BBe1 cells
Experimental Method:	Incubations were carried out in 12-well transwell (rat tail collagen-coated) plates placed in a humidified incubator for 120 minutes at 37°C with 5% CO_2. The bidirectional transport of digoxin was measured in the absence and presence of brigatinib or a known P-gp inhibitor (valspodar) in MDR1-MDCK and C2BBe1 cells. Aliquots of donor and receiver samples were collected at pre-determined time points for analysis of brigatinib and digoxin. After the completion of the permeability assay, cell monolayer integrity was examined using lucifer yellow.
Test Article Concentration:	0.267, 0.802, 2.41, 7.22, 21.7, 65, 120 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	Digoxin/10 µmol/L
Control Inhibitor/Concentration:	Valspodar/1 µmol/L
Analyte(s):	Digoxin
Analytical Method:	LC-MS/MS

Cell Model	Treatment	% Recovery		P_{app} ($x10^{-6}$ cm/s)		Efflux Ratio[a]
		A→B	B→A	A→B	B→A	
MDR1-MDCK	10 µmol/L Digoxin	87.6 ± 8.2	94.0 ± 3.7	0.142 ± 0.01	10.1 ± 1.2	71
	10 µmol/L Digoxin + 120 µmol/L Brigatinib	96.7 ± 11.0	101 ± 9.4	0.363 ± 0.08	4.59 ± 0.52	13
	10 µmol/L Digoxin + 1 µmol/L Valspodar	89.2 ± 7.4	105 ± 12	0.468 ± 0.08	0.473 ± 0.03	1.0

A: Apical; B: Basolateral; Papp: Apparent permeability coefficient; Triplicate wells were used per treatment and values in the table represent mean ± SD (n = 3);

[a]: Efflux ratio calculated as $P_{app\ B\rightarrow A}/P_{app\ A\rightarrow B}$

Cell Model	Treatment	% Recovery		P_{app} ($x10^{-6}$ cm/s)		Efflux Ratio[a]
		A→B	B→A	A→B	B→A	
C2BBe1	10 µmol/L Digoxin	72.6	79.3	0.561	13.2	23
	10 µmol/L Digoxin + 0.267 µmol/L Brigatinib	80.6	89.6	0.502	7.52	15
	10 µmol/L Digoxin + 0.802 µmol/L Brigatinib	72.1	80.2	0.466	7.41	16
	10 µmol/L Digoxin + 2.41 µmol/L Brigatinib	70.5	77.1	1.64	7.56	4.6
	10 µmol/L Digoxin + 7.22 µmol/L Brigatinib	75.7	77.6	0.682	7.49	11
	10 µmol/L Digoxin + 21.7 µmol/L Brigatinib	74.1	85.2	1.06	3.26	3.1
	10 µmol/L Digoxin + 65 µmol/L Brigatinib	74.8	84.0	1.52	2.89	1.9
	10 µmol/L Digoxin + 1 µmol/L Valspodar	72.3	82.5	2.70	3.18	1.2
IC_{50} (µmol/L)	1.76[b]					
Goodness of Fit (R^2)	0.922					

Duplicate wells were used per treatment and values in the table represent mean of n = 2

[b]: The 2.41 µmol/L brigatinib data was excluded from the calculation of IC50 as the efflux ratio of digoxin at this concentration appears to be an outlier

2.6.5.14.13 BCRP Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	BCRP-MDCK, C2BBe1 cells
Experimental Method:	Incubations were carried out in 12-well transwell (rat tail collagen-coated) plates placed in a humidified incubator for 120 minutes at 37°C with 5% CO_2. The bidirectional transport of cladribine was measured in the absence and presence of brigatinib or a known BCRP inhibitor (Ko143) in BCRP-MDCK and C2BBe1 cells. Aliquots of donor and receiver samples were collected at pre-determined time points for analysis. After the completion of the permeability assay, cell monolayer integrity was examined using lucifer yellow.
Test Article Concentration:	0.267, 0.802, 2.41, 7.22, 21.7, 65 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	Cladribine/10 µmol/L
Control Inhibitor/Concentration:	Ko143/10 µmol/L
Analyte(s):	Cladribine
Analytical Method:	LC-MS/MS

A: Apical; B: Basolateral; Papp: Apparent permeability coefficient; Triplicate wells were used per treatment and values in the table represent mean ± SD (n = 3);
[a]: Efflux ratio calculated as $P_{app\ B\rightarrow A}/P_{app\ A\rightarrow B}$

Cell Model	Treatment	% Recovery		P_{app} ($x10^{-6}$ cm/s)		Efflux Ratio[a]
		A→B	B→A	A→B	B→A	
C2BBe1	10 µmol/L Cladribine	85.9	92.4	1.10	19.2	17
	10 µmol/L Cladribine + 0.267 µmol/L Brigatinib	92.5	98.3	1.03	19.1	18
	10 µmol/L Cladribine + 0.802 µmol/L Brigatinib	84.3	86.5	0.780	16.3	21
	10 µmol/L Cladribine + 2.41 µmol/L Brigatinib	91.7	95.7	0.627	16.6	27
	10 µmol/L Cladribine + 7.22 µmol/L Brigatinib	90.5	93.8	1.17	11.7[b]	10
	10 µmol/L Cladribine + 21.7 µmol/L Brigatinib	91.5	92.9	0.888	6.60[b]	7.4
	10 µmol/L Cladribine + 65 µmol/L Brigatinib	91.4	102	0.648	2.53[b]	3.9
	10 µmol/L Cladribine + 10 µmol/L Ko143	92.6	98.9	1.46	2.59	1.8
IC_{50} (µmol/L)	10.1[c]					
Goodness of Fit (R^2)	0.934					

Duplicate wells were used per treatment and values in the table represent mean of n = 2; [b]: Value represents n = 1 because the Papp of lucifer yellow for one monolayer was >0.8 x 10-6 cm/s; [c]: The 2.41 µmol/L brigatinib data was excluded from the calculation of IC50 as the efflux ratio of cladribine at this concentration appears to be an outlier

2.6.5.14.14 OATP1B1 and OATP1B3 Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	OATP1B1-transfected, OATP1B3-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Incubations with the transporter- and vector control-transfected HEK cells were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The uptake of atorvastatin (probe substrate of OATP1B1 and OATP1B3) was evaluated in the absence and presence of brigatinib or rifamycin SV. At the end of the incubation (5 minutes), the cells were lysed, concentration of atorvastatin determined, and uptake rate in each cell line determined.
Test Article Concentration:	120 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	Atorvastatin/0.15 µmol/L
Control Inhibitor/Concentration:	Rifamycin SV/10 µmol/L
Analyte(s):	Atorvastatin
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)		
		Vector Control-HEK Cells	OATP1B1-HEK Cells	OATP1B3-HEK Cells
0.15 µmol/L Atorvastatin	Influx Rate	0.894	11.7	5.87
	Net Influx Rate	NA	10.8	4.97
0.15 µmol/L Atorvastatin + 120 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	0.799	6.56	3.12
	Net Influx Rate	NA	5.76	2.32
	Inhibition (%)	NA	46.8	53.4
0.15 µmol/L Atorvastatin + 10 µmol/L Rifamycin SV	Influx Rate	0.802	1.37	0.908
	Net Influx Rate	NA	0.569	0.106
	Inhibition (%)	NA	94.7	97.9

HEK: Human embryonic kidney; NA: Not applicable
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.15 OCT1 Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.6-4

Test System:	OCT1-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Incubations with the transporter- and vector control-transfected HEK cells were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP^+; probe substrate of OCT1) was evaluated in the absence and presence of brigatinib or repaglinide. At the end of the incubation (2 minutes), the cells were lysed, concentration of MPP^+ determined, and uptake rate in each cell line determined.
Test Article Concentration:	0.267, 0.802, 2.41, 7.22, 21.7, 65 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	MPP^+/5 µmol/L
Control Inhibitor/Concentration:	Repaglinide/600 µmol/L
Analyte(s):	MPP^+
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)		Net Influx Rate (pmol/minute/mg protein)	% of Control Activity	% Inhibition of OCT1
		Vector Control-HEK Cells	MATE1-HEK Cells			
5 µmol/L MPP^+	Influx Rate	6.58	486	479	100	0.0
	Influx Rate Ratio	NA	73.8			
5 µmol/L MPP^+ + 0.267 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	5.78	494	488	102	0.0[a]
5 µmol/L MPP^+ + 0.802 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	5.77	419	413	86.2	13.8
5 µmol/L MPP^+ + 2.41 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	5.29	343	338	70.5	29.5
5 µmol/L MPP^+ + 7.22 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	4.93	237	232	48.4	51.6
5 µmol/L MPP^+ + 21.7 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	5.26	145	140	29.3	70.7
5 µmol/L MPP^+ + 65 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	4.60	71.5	66.9	14.0	86.0
5 µmol/L MPP^+ + 600 µmol/L Repaglinide	Influx Rate	2.87	60.8	57.9	12.1	87.9
IC_{50} (µmol/L)	6.49					
Goodness of Fit (R^2)	0.9933					

HEK: Human embryonic kidney; NA: Not applicable

[a]: The negative percentage inhibition indicates no inhibition

Duplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 2

2.6.5.14.16 OAT1 and OAT3 Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	OAT1-transfected, OAT3-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The uptake of para-aminohippurate (PAH; probe substrate of OAT1) was evaluated in the absence and presence of brigatinib or probenecid. Similarly, the uptake of furosemide (probe substrate of OAT3) was evaluated in the absence and presence of brigatinib or probenecid. At the end of the incubation (5 minutes), the cells were lysed, concentration of PAH and furosemide were determined, and uptake rate in each cell line determined.
Test Article Concentration:	65 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	PAH/10 µmol/L (OAT1); Furosemide/5 µmol/L (OAT3)
Control Inhibitor/Concentration:	Probenecid/100 µmol/L
Analyte(s):	PAH, Furosemide
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)	
		Vector Control-HEK Cells	OAT1-HEK Cells
10 µmol/L PAH	Influx Rate	0.648	506
	Net Influx Rate	NA	506
10 µmol/L PAH + 65 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	0.802	414
	Net Influx Rate	NA	413
	Inhibition (%)	NA	18.4
10 µmol/L PAH + 100 µmol/L Probenecid	Influx Rate	1.71	60.5
	Net Influx Rate	NA	58.8
	Inhibition (%)	NA	88.4
Treatment		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)	
		Vector Control-HEK Cells	OAT3-HEK Cells
5 µmol/L Furosemide	Influx Rate	1.58	111
	Net Influx Rate	NA	110
5 µmol/L Furosemide + 65 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	5.71	75.5
	Net Influx Rate	NA	69.8
	Inhibition (%)	NA	36.3
5 µmol/L Furosemide + 100 µmol/L Probenecid	Influx Rate	2.45	1.31
	Net Influx Rate	NA	-1.14
	Inhibition (%)	NA	100

HEK: Human embryonic kidney; NA: Not applicable; Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.17 OCT2 Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	OCT2-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The uptake of 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP^+; probe substrate of OCT2) was evaluated in the absence and presence of brigatinib or imipramine. At the end of the incubation (2 minutes), the cells were lysed, concentration of MPP^+ determined, and uptake rate in each cell line determined.
Test Article Concentration:	65 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	MPP^+/5 µmol/L
Control Inhibitor/Concentration:	Imipramine/300 µmol/L
Analyte(s):	MPP^+
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)	
		Vector Control-HEK Cells	OCT2-HEK Cells
5 µmol/L MPP^+	Influx Rate	11.9	734
	Net Influx Rate	NA	722
5 µmol/L MPP^+ + 65 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	3.11	538
	Net Influx Rate	NA	535
	Inhibition (%)	NA	26.0
5 µmol/L MPP^+ + 300 µmol/L Imipramine	Influx Rate	2.72	16.9
	Net Influx Rate	NA	14.2
	Inhibition (%)	NA	98.0

HEK: Human embryonic kidney; NA: Not applicable
Triplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 3

2.6.5.14.18 MATE1 Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.2-1

Test System:	MATE1-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The cells were preincubated with HBSSg_8.5 for 20 minutes. The uptake of metformin (probe substrate of MATE1) was evaluated in the absence and presence of brigatinib or cimetidine. At the end of the incubation (10 minutes), the cells were lysed, concentration of metformin determined, and uptake rate in each cell line determined.
Test Article Concentration:	0.823, 0.247, 0.741, 2.22, 6.67, 20 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	Metformin/50 µmol/L
Control Inhibitor/Concentration:	Cimetidine/100 µmol/L
Analyte(s):	Metformin
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)		Net Influx Rate (pmol/minute/mg protein)	% of Control Activity	% Inhibition of MATE1
		Vector Control-HEK Cells	MATE1-HEK Cells			
50 µmol/L Metformin	Influx Rate	6.57	541	534	100	0.0
	Influx Rate Ratio	NA	82.4			
50 µmol/L Metformin + 0.0823 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	7.06	600	593	111	-10.9 (0)[a]
50 µmol/L Metformin + 0.247 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	5.61	468	463	86.6	13.4
50 µmol/L Metformin + 0.741 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	4.93	300	296	55.3	44.7
50 µmol/L Metformin + 2.22 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	5.14	134	129	24.2	75.8
50 µmol/L Metformin + 6.67 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	3.81	54.5	50.7	9.48	90.5
50 µmol/L Metformin + 20 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	3.65	25.5	21.9	4.09	95.9
50 µmol/L Metformin + 100 µmol/L Cimetidine	Influx Rate	3.99	20.1	NA	NA	NA
	Inhibition (%)	NA	97.0			
IC_{50} (µmol/L)	0.832					
Goodness of Fit (R^2)	0.987					

HEK: Human embryonic kidney; NA: Not applicable

[a]: The negative percentage inhibition indicates no inhibition

Duplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 2

2.6.5.14.19 MATE2K Inhibitor Assessment

Test Article: Brigatinib
Location in CTD: 4.2.2.6-4

Test System:	MATE2K-transfected, and vector control-transfected HEK cells
Experimental Method:	Incubations were conducted in 24-well, poly-D-lysine-coated plates in a humidified incubator at 37°C with 5% CO_2. The cells were preincubated with HBSSg_8.5 for 20 minutes. The uptake of 4-(4-dimethylaminostyryl)-N-methylpyridinium (ASP; probe substrate of MATE2K) was evaluated in the absence and presence of brigatinib or ondansetron. At the end of the incubation (10 minutes), the cells were lysed, concentration of ASP determined, and uptake rate in each cell line determined.
Test Article Concentration:	0.0823, 0.247, 0.741, 2.22, 6.67, 20 µmol/L
Probe Substrate/Concentration:	ASP/1 µmol/L
Control Inhibitor/Concentration:	Ondansetron/100 µmol/L
Analyte(s):	ASP
Analytical Method:	LC-MS/MS

Treatment		Influx Rate (pmol/minute/mg protein)		Net Influx Rate (pmol/minute/mg protein)	% of Control Activity	% Inhibition of MATE1
		Vector Control-HEK Cells	MATE1-HEK Cells			
1 µmol/L ASP	Influx Rate	3.16	32.9	29.8	100	0.0
	Influx Rate Ratio	NA	10.4			
1 µmol/L ASP + 0.0823 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	2.15	33.4	31.2	105	-4.87 (0)[a]
1 µmol/L ASP + 0.247 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	2.13	32.2	30.0	101	-0.909 (0)[a]
1 µmol/L ASP + 0.741 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	2.11	29.0	26.9	90.4	9.61
1 µmol/L ASP + 2.22 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	2.13	22.9	20.8	69.8	30.2
1 µmol/L ASP + 6.67 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	2.03	14.8	12.8	43.0	57.0
1 µmol/L ASP + 20 µmol/L Brigatinib	Influx Rate	2.14	10.8	8.64	29.0	71.0
1 µmol/L ASP + 100 µmol/L Ondansetron	Influx Rate	2.43	4.91	2.48	8.32	91.7
IC_{50} (µmol/L)	5.19					
Goodness of Fit (R^2)	0.986					

HEK: Human embryonic kidney; NA: Not applicable

[a]: The negative percentage inhibition indicates no inhibition Duplicate wells per cell line were used per treatment and values in the table represent mean of n = 2

2.6.5.15 薬物動態試験：その他

該当無し