目次

2.6.4 薬物動態試験の概要文 6
2.6.4.1 まとめ 6
2.6.4.2 分析法 6
2.6.4.2.1 標識化合物 6
2.6.4.2.1.1 放射能の測定 7
2.6.4.2.2 非標識化合物 7
2.6.4.3 吸収 10
2.6.4.3.1 排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び膜透過性 10
2.6.4.3.2 単回投与 10
2.6.4.3.3 本薬投与後の M1 の薬物動態 13
2.6.4.3.4 反復投与 16
2.6.4.4 分布 18
2.6.4.4.1 *In vitro* 血漿蛋白結合 18
2.6.4.4.2 幼若マウス及びラットでの血漿蛋白結合 18
2.6.4.4.3 幼若カニクイザルでの血漿蛋白結合 19
2.6.4.4.4 ヒト小児血漿蛋白結合 19
2.6.4.4.5 *In vitro* 血球移行 19
2.6.4.4.6 *In vitro* メラニン結合 19
2.6.4.4.7 組織分布 20
2.6.4.5 代謝（動物種間の比較） 24
2.6.4.5.1 推定代謝経路 24
2.6.4.5.2 *In vitro* における代謝 26
2.6.4.5.3 M1 の *in vitro* 代謝 26
2.6.4.5.4 主代謝部位及び関与酵素 26
2.6.4.5.5 主代謝関与酵素の年齢依存性（*in vitro*） 27
2.6.4.5.6 反応性代謝物 27
2.6.4.5.7 *In vivo* における代謝 28
2.6.4.5.7.1 ラット及びサルの血漿中代謝物 28
2.6.4.5.7.2 ラットの尿中代謝物 28
2.6.4.5.7.3 ラットの糞及び胆汁中代謝物 28
2.6.4.5.7.4 ヒトの血漿，尿及び糞中代謝物 29
2.6.4.6 排泄 29
2.6.4.6.1 尿糞中排泄 29
2.6.4.6.2 胆汁中排泄 30
2.6.4.6.3 乳汁中排泄 30
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 31
2.6.4.7.1 CYP に対する阻害及び誘導能 31

2.6.4.7.2 トランスポーターに対する影響 33
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 35
2.6.4.9 考察及び結論 35
2.6.4.10 図表 36
2.6.4.11 参考文献 37

表一覧

表 2.6.4.3.1-1 排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び膜透過性 10
表 2.6.4.3.2-1 雄ラットに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ 11
表 2.6.4.3.2-2 雄ラットに本薬を単回静脈内投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ ... 11
表 2.6.4.3.2-3 雄カニクイザルに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ12
表 2.6.4.3.2-4 雄カニクイザルに本薬を単回静脈内投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ 12
表 2.6.4.3.2-5 幼若及び成熟ラットに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ 13
表 2.6.4.3.3-1 ラット及びウサギに本薬を単回経口投与したときの本薬及び M1の PK パラメータ 15
表 2.6.4.3.3-2 血漿中主要代謝物 M1のヒト及び動物間での曝露比較 16
表 2.6.4.3.4-1 雌雄ラットに本薬を26週間連日反復経口投与した時の 血漿中本薬の PK パラメータ 16
表 2.6.4.3.4-2 雌雄のカニクイザルに本薬を39週間連日反復経口投与したときの 初回及び最終投与後の血漿中本薬の PK パラメータ 17
表 2.6.4.3.4-3 雄カニクイザルに本薬を経口投与したときの本薬及び M1の PK パラメータ18
表 2.6.4.4.7-1 雄の白色及び有色ラットに本薬 3 mg/kg を4日間連日経口投与（4回投与）後の $AUC_{1\text{-}48h}$ の組織/血漿中濃度比（T/P ratio） 20
表 2.6.4.4.7-2 ラット及びカニクイザルに本薬3 mg/kg を単回又は反復投与後の 本薬の眼を含む各組織中濃度/血漿中濃度比（T/P ratio） 21
表 2.6.4.4.7-3 雄有色ラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与後の 主要組織中の放射能濃度推移 22
表 2.6.4.4.7-4 妊娠ラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与後の母動物及び胎児の 主要組織中放射能濃度推移 23
表 2.6.4.6.1-1 雄ラットに[^{14}C] RO7034067を経口投与したときの尿糞中への放射能の累積排泄率（0～168 h での投与量に対する%） 30
表 2.6.4.7.1-1 ヒト肝ミクロソームにおける本薬の各 CYP 分子種に対する阻害能 31
表 2.6.4.7.1-2 ヒト肝ミクロソームにおける M1の各 CYP 分子種に対する阻害能 32
表 2.6.4.7.1-3 ヒト肝細胞における本薬による各 CYP 分子種に対する誘導能 33

図一覧

図 2.6.4.2-1 [^{14}C] RO7034067の化学構造と^{14}C 標識部位 7
図 2.6.4.3.2-1 雄ラットに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体濃度推移 11
図 2.6.4.3.2-2 雄カニクイザルに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体の濃度推移 12
図 2.6.4.3.3-1 雄ラットに本薬 3 mg/kg を単回経口投与後の血漿中未変化体 及び M1の濃度推移 14

図 2.6.4.3.3-2 雄ウサギに本薬 3 mg/kg を単回経口投与後の血漿中未変化体 及び M1の濃度推移 15
図 2.6.4.3.4-1 雄カニクイザルに本薬 3 mg/kg を反復経口投与したときの 初回及び3回目投与後の血漿中未変化体及び M1の濃度推移 18
図 2.6.4.5.1-1 本薬の推定代謝経路（ヒト） 25
図 2.6.4.5.5-1 ヒトの各年齢由来の肝ミクロソームにおける CYP3A4，CYP3A7及び FMO3 活性並びに本薬代謝能 27
図 2.6.4.6.3-1 乳汁及び血漿中の放射能濃度推移（平均） 30

略語一覧

略語	英名	和名
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 h	0～24時間までの濃度–時間曲線下面積
AUC_{last}	Area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration	投与後定量可能時間までの濃度–時間曲線下面積
AUC_{inf}	Area under the concentration-time curve from time zero to infinity	無限時間までの濃度–時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
CCK-8	Cholecystokinin octapeptide	–
CL	Clearance	全身クリアランス
C_{max}	Maximum concentration	最高濃度
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
CYP	Cytochrome P450	シトクロム P450
$E_2$17βG	Estradiol-17β-glucuronide	–
E3S	Estrone-3-sulfate	–
F	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
FMO	Flavin-containing monooxygenase	フラビン含有モノオキシゲナーゼ
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
K_I	Concentration of inhibitor resulting in 50% of the maximum enzyme inactivation	最大不活性化速度の50%の速度をもたらす阻害薬の濃度
K_{inact}	Maximum inactivation rate constant	最大不活性化速度定数
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム型質量分析
LSC	Liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MATE	Multidrug and toxin extrusion	–
MATE2-K	Multidrug and toxin extrusion protein 2	–
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NOAEL	No observed adverse effect level	無毒性量
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
PAH	P-aminohippuric acid	パラアミノ馬尿酸
P_{app}	Apparent permeability coefficient	見かけの膜透過係数
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
QC	Quality control	品質保証
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
SMA	Spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症

略語	英名	和名
T_{max}	Time to maximum concentration	最高濃度到達時間
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失相の半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
T/P ratio	Tissue/plasma concentration ratio	組織/血漿中濃度比
V_{ss}	Volume of distribution at steady-state	定常状態の分布容積

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

リスジプラム（以下，本薬）の非臨床薬物動態試験は，主にラット及びカニクイザルを，一部マウス及びウサギを用いて行った。これらの動物種は薬理又は毒性試験で評価に用いた動物種である。

本薬は *in vitro* で良好な膜透過性を有し，排泄トランスポーターであるヒト P-糖蛋白質（P-gp，MDR1）の基質にならない。本薬をラット及びカニクイザルに経口投与（臨床投与経路）したとき，これらの動物種のバイオアベイラビリティ（F）はそれぞれ平均で>100%（ラット）及び43%（サル）であった。本薬をラット及びカニクイザルに静脈内投与したときの本薬の全身クリアランス（CL）はおおよそ5～10 mL/min/kg と小さく，消失相の半減期（$t_{1/2}$）は約5 h であった。定常状態の分布容積（V_{ss}）はおおよそ2～3 L/kg と中程度であった。ラット及びカニクイザルに本薬を26週及び39週間反復経口投与したとき，曝露量は投与量にほぼ比例して増加し，雌雄の差は認められなかった。最終投与後の曝露量は初回投与後と比較して最大で約3倍であり，顕著な蓄積性は認められなかった。

本薬の血漿蛋白結合率をヒト，サル，ラット，ウサギ及びマウスで評価したところ，試験したすべての動物種で類似しており，非結合型分率として10%～16%の範囲であった。ラットの非結合型分率は日齢に依存し，幼若であるほど高かった。一方，ヒトの血漿蛋白結合率は年齢に依存しなかった。白色及び有色ラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与後の組織内分布を調べた結果，放射能は各組織に速やかに分布し，高濃度を示した組織は外側鼻腺，包皮腺，眼窩外涙腺，眼窩内涙腺，副腎（皮質及び髄質），唾液腺，マイボーム腺及び尿道球腺であった。各組織中放射能は，投与後168 h（7日）ではほとんどの組織で定量下限未満となったが，有色ラットの眼のブドウ膜では投与後168 h でも顕著な放射能が検出され，本薬のメラニンへの強い親和性が示唆された。妊娠16日目のラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与したところ，放射能の胎児への移行が認められた。

本薬は主に代謝によって消失し，主要代謝関与酵素はフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）及び CYP3A であった。本薬投与後にヒト血漿中に検出された主要代謝物は N-水酸化体 M1（以下，M1）であり，M1はマウス，ラット，ウサギ及びサル血漿中でも代謝物として検出された。

ラットにおいて本薬及びその代謝物は尿糞中にほぼ完全に排泄され，大部分は糞中への未変化体としての排泄であった。単一の代謝物としての排泄は尿，糞中とも投与量の数%以下と少なかった。

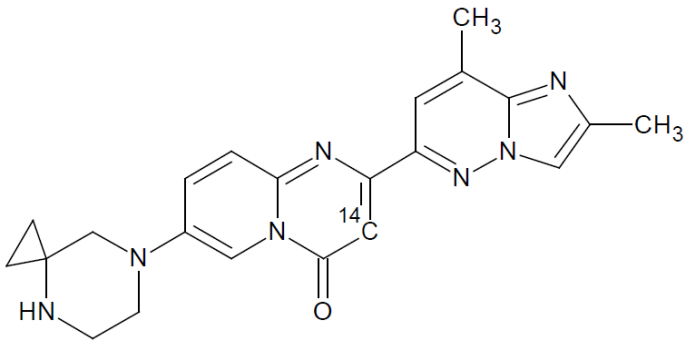
ヒト肝細胞又は肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験系において，本薬は CYP 各分子種に対する誘導能を示さず，CYP3A4を除く CYP 各分子種に対する阻害能も有さなかった。本薬は CYP3A4に対しては弱い阻害能を示し，M1は CYP3A4に対して時間依存性の阻害能を示した。また，本薬は MDR1，OATP1B1，OATP1B3，OAT1又は OAT3を阻害しなかったが，OCT2，MATE1及び MATE2-K に対する阻害能が認められた。

2.6.4.2 分析法

2.6.4.2.1 標識化合物

標識体を用いた試験には，本薬を^{14}C 標識した化合物（[^{14}C] RO7034067，図 2.6.4.2-1）を使用した。本化合物の比放射能は0.74～5.1 MBq/mg であり，放射化学的純度は96%以上であった。

図 2.6.4.2-1 [^{14}C] RO7034067の化学構造と^{14}C 標識部位



2.6.4.2.1.1 放射能の測定

[^{14}C] RO7034067を投与した組織内分布試験の各組織内放射能濃度は，定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）法で測定し，血液，血漿，尿中等の放射能濃度は，試料を溶解処理後又は直接シンチレーション溶液に混合し，液体シンチレーションカウンター（LSC）で測定した。

2.6.4.2.2 非標識化合物

マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルの血漿中並びに組織中の本薬又は M1の濃度は，試料を除蛋白後，液体クロマトグラフィータンデム型質量分析（LC-MS/MS）法を用いて定量した。ラット，ウサギ及びカニクイザルのトキシコキネティクス（TK）試験では，バリデートされた測定法を用い，他の探索的な試験を含む DMPK 試験ではバリデーション試験としては行っていないものの，測定法としての信頼性が確保された方法を用いた。いずれの試験においても精度・真度は妥当性の基準値である15%以内（定量下限濃度では20%以内）であった。各試験に用いた測定法のバリデーション結果は表2.6.5.2-1に示す。

本薬は光に感受性を示すため，操作は遮光下で行った。M1は光に感受性を示すと同時に試料保存中及び測定操作中に酸化的分解を受けるため，試料に酸化防止剤としてアスコルビン酸（10 mmol/L）を添加し，操作は氷冷下（約4℃）で行った。これらの操作法は20[redacted]年[redacted]月以降開始の試験に適用した。

1) マウス血漿中の本薬濃度測定法

（資料番号4.2.2.1-6）

本測定法の検量線範囲は，2.5～2500 ng/mL であり，定量下限値は2.5 ng/mL であった。分析単位内の真度は−3.2%～16.0%，精度は0.8%～7.7%であった。分析単位間の真度は−1.6%～3.6%，精度は1.5%～10.1%であった。本測定法は，マウス毒性試験（4.2.3.2-2）の TK 測定で使用した。

2) ラット血漿中の本薬濃度測定法

（資料番号4.2.2.1-2，4.2.2.2-1，4.2.2.2-3）

ラット TK 試験に用いた測定法の検量線範囲は0.5～500 ng/mL であり，定量下限及び上限値は0.5 ng/mL 及び500 ng/mL であった。分析単位内の真度は−4.7%～10.2%，精度は0.4%～12.8%であった。分析単位間の真度は−2.7%～6.8%，精度は2.2%～9.0%であった。本測定法は，ラット毒性試験（4.2.3.2-4，4.2.3.2-5，4.2.3.5.4-2，4.2.3.5.4-4）の各 TK 測定で使用した。

ラット薬物動態（PK）試験における測定法の検量線範囲は5.0～2500 ng/mL であり，定量下

限は5.0 ng/mL であった。5.0，50及び1000 ng/mL の QC 試料を用いて評価した分析単位内の真度は−2.2%～18.2%であり，精度は1.3%～4.9%であった。本測定法は，ラット単回投与 PK 試験（4.2.2.2-1）で使用した。

幼若ラット PK 試験に用いた測定法の検量線範囲は0.5～500 ng/mL であり，定量下限は0.5 ng/mL であった。1.5，25及び400 ng/mL の QC 試料を用いて評価した真度は−4.0%～6.8%であり，精度は1.5%～2.9%であった。本測定法は，幼若及び成熟ラット単回投与 PK 試験（4.2.2.2-3）で使用した。

3) ウサギ血漿中の本薬濃度測定法

（資料番号4.2.2.1-3）

本測定法の検量線範囲は10～10000 ng/mL であり，定量下限及び上限値はそれぞれ10 ng/mL 及び10000 ng/mL であった。分析単位内の真度は −5.0%～7.0%，精度は1.7%～4.7%であった。分析単位間の真度は−4.2%～4.0%，精度は2.5%～5.3%であった。本測定法は，ウサギ毒性試験（4.2.3.5.2-4，4.2.3.5.2-5）の各 TK 測定で使用した。

4) カニクイザル血漿中の本薬濃度測定法

（資料番号4.2.2.1-4，4.2.2.2-2）

TK 試験に用いた本測定法の検量線範囲は0.5～500 ng/mL であり，定量下限及び上限値はそれぞれ0.5 ng/mL 及び500 ng/mL であった。分析単位内の真度は−3.8%～14.0%，精度は0.7%～9.4%であり，分析単位間の真度は−2.4%～7.8%，精度は2.5%～8.2%であった。本測定法は，カニクイザル毒性試験（4.2.3.2-8，4.2.3.2-9）の各 TK 測定で使用した。

PK 試験で用いた測定法の検量線範囲は0.5～2500 ng/mL であり，定量下限は0.5 ng/mL であった。1，50及び1000 ng/mL の QC 試料を用いて評価した真度は−13.1%～−12.5%であり，精度は1.5%～5.1%であった。本測定法は，カニクイザル単回投与 PK 試験（4.2.2.2-2）で使用した。

5) カニクイザル脳脊髄液（CSF）及び組織（脳，皮膚，眼）中の本薬濃度測定法

（資料番号4.2.2.1-5，4.2.2.2-9）

CSF 中濃度測定法の検量線範囲は0.1～100 ng/mL であり，定量下限値は0.1 ng/mL であった。検量線及び QC 試料には人工 CSF（サロゲートマトリックス）を使用した。0.10，0.30，5.0及び80 ng/mL の QC 試料を用いて評価した分析単位内の真度は −18.1%～3.4%，精度は1.1%～12.6%であった。分析単位間の真度は−10.7%～2.6%であり，精度は1.8%～11.5%であった。本測定法は，カニクイザル39週間毒性試験（4.2.3.2-9）の TK 測定で使用した。

脳組織中濃度測定法の検量線範囲は10.0～10000 ng/g であり，定量下限は10.0 ng/g であった。7.5，125及び2000 ng/mL の QC 試料を用いて評価した真度は−13.0%～−12.5%であり，精度は0.9%～3.8%であった。本測定法は，カニクイザル39週間毒性試験（4.2.3.2-9）の TK 測定で使用した。

皮膚及び眼の組織中濃度測定に関しては，皮膚組織は水で，眼の組織はカニクイザルの血漿でホモジナイズし，除蛋白後の試料を LC-MS/MS で測定した。検量線はカニクイザルの血漿を用いて調製した。本測定法の検量線範囲は0.250～250 ng/mL であり，定量下限は0.250 ng/mL であった。0.750，10.0及び200 ng/mL の QC 試料を用いて評価した真度は−6.5%～−4.1%であり，精度は6.6%～8.0%であった。本測定法は，カニクイザル39週間毒性試験（4.2.3.2-9）の TK 測定で使用した。

6) マウス及びラット血漿中 M1 濃度測定法

（資料番号4.2.2.1-1，4.2.2.1-8，4.2.2.2-4）

マウス TK 試験に用いた測定法の検量線範囲は，0.5～500 ng/mL（定量下限値は0.5 ng/mL）であった。分析単位内の真度は−11.3%～5.8%，精度は1.5%～15.0%であった。分析単位間の真度は−5.3%～−1.3%，精度は2.9%～13.9%であった。本測定法は，マウス毒性試験（4.2.3.7.7-2）の TK 測定で使用した。

ラット TK 試験に用いた測定法の検量線範囲は，0.5～500 ng/mL（定量下限値は0.5 ng/mL）であった。分析単位内の真度は−8.0%～3.6%，精度は1.2%～11.4%であった。分析単位間の真度は−4.0%～0.4%，精度は2.3%～11.2%であった。本測定法は，ラット毒性試験（4.2.3.5.2-2，4.2.3.5.3-2，4.2.3.5.4-3）の各 TK 測定で使用した。

ラット PK 試験での血漿中 M1濃度測定法の検量線範囲は0.250～250 ng/mL であり，定量下限は0.250 ng/mL であった。0.750，10.0，200及び1000 ng/mL の QC 試料を用いて評価した真度は−2.5%～1.5%であり，精度は4.0%～10.2%であった。本測定法は，ラット単回経口投与 PK 試験（4.2.2.2-4）で使用した。

7) ウサギ及びカニクイザル血漿中の M1 濃度測定法

（資料番号4.2.2.2-5，4.2.2.2-6）

本測定法の検量線範囲は0.250～250 ng/mL であり，定量下限は0.250 ng/mL であった。0.250，0.750，10.0，200及び1000 ng/mL の QC 試料を用いて評価した真度はウサギ及びカニクイザルの試料でそれぞれ−4.1%～3.0%及び−5.0%～9.9%であり，精度はウサギで2.8%～6.2%であった（カニクイザルの精度は測定が n=2であったため算出せず）。本測定法は，ウサギ単回及びカニクイザル反復経口投与 PK 試験（4.2.2.2-5及び4.2.2.2-6）で使用した。

8) 血漿中での安定性

（資料番号4.2.2.1-2～4，4.2.2.1-6，4.2.2.1-7，4.2.2.1-9～11）

本薬は，マウス，ラット，ウサギ及びカニクイザルの血漿中において，それぞれ室温で少なくとも18.5，25，25及び29時間安定であった。いずれの動物種の試料も凍結（−20°C 以下）・融解サイクルを5回繰り返した後も安定であった。長期保存下での安定性は，マウス及びラット血漿中で−75°C で保存した場合，それぞれ少なくとも396日間及び363日間，ウサギ及びカニクイザル血漿中では−20°C 以下に保存した場合に少なくとも183日間及び174日間安定であった。

9) 血漿中での M1 の安定性

（資料番号4.2.2.1-1，4.2.2.1-7，4.2.2.1-8，4.2.2.1-9）

M1は，マウス及びラットの血漿中（10 mmol/L のアスコルビン酸を含む）において，それぞれ室温で少なくとも4及び4.5時間安定であった。凍結/融解時の安定性は，マウス，ラットともに−75/5°C で凍結/融解サイクルを3回繰り返した後も安定であった。長期保存下では−75℃で保存した場合に，マウス及びラット血漿中でそれぞれ少なくとも396日間及び363日間安定であった。

10) CSF 中での安定性

（資料番号4.2.2.1-5）

本薬は，カニクイザルの CSF 中において，室温で少なくとも20時間安定であった。試料を−85°C で凍結・融解サイクルを3回繰り返した後も安定であった。−85℃で保存した場合には，CSF 中で少なくとも52日間安定であった。

2.6.4.3　吸収

2.6.4.3.1　排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び膜透過性

（資料番号4.2.2.6-5, 4.2.2.6-8，4.2.2.6-10，4.2.2.6-6）

本薬及び M1の排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び膜透過性の評価結果を表 2.6.4.3.1-1に示す。

本薬あるいは M1の MDR1を介する輸送について，MDR1を発現させた LLC-PK1細胞（LLC-PK1-MDR1細胞）を用いて評価した結果，本薬は MDR1の基質ではなかったが M1は弱い基質であった。ヒト乳癌耐性蛋白（BCRP）を発現させた MDCKII 細胞を用いて評価したところ，本薬及び M1ともに BCRP の弱い基質であった。また，本薬及び M1のマウス P-gp（Mdr1a）及びマウス Bcrp1に対して基質になるか調べたところ，本薬及び M1は Mdr1a の弱い基質であり，Bcrp1に対しては基質であることが示された。

野生型の LLC-PK1細胞を用いて本薬の膜透過性を評価した結果，本薬の見かけの膜透過係数（apparent permeability coefficient, Papp）の平均は350 nm/s と高い膜透過性を示した。M1の膜透過性を MDR1を発現させた LLC-PK1細胞を用いて MDR1阻害薬存在下で評価したところ，M1も Papp 平均310 nm/s と高い膜透過性を示した。さらに，ヒト BCRP を発現させた MDCKII 細胞を用いて BCRP 阻害薬存在下で本薬及び M1の膜透過性を調べた結果，いずれも高い膜透過性を示し，それぞれの Papp は318 nm/s 及び522 nm/s であった。

表 2.6.4.3.1-1　排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び膜透過性

膜透過性	**本薬**	**M1**
Papp（LLC-PK1細胞）	350 nm/s	310 nm/s
Papp（MDCKII 細胞）	318 nm/s	522 nm/s
基質特性	**本薬**	**M1**
MDR1	2.2, 2.9[1)]	4.2[1)]
BCRP	3.1[1)]	4.1[1)]
Mdr1a	3.7[1)]	5.5[1)]
Bcrp1	43.7[1)]	75.4[1)]

[1)] efflux ratio (Papp, Basal to Apical / Papp, Apical to Basal)，3回の試験結果
Mdr1a：マウス P-gp
Bcrp1：マウス Bcrp1

2.6.4.3.2　単回投与

1)　ラット

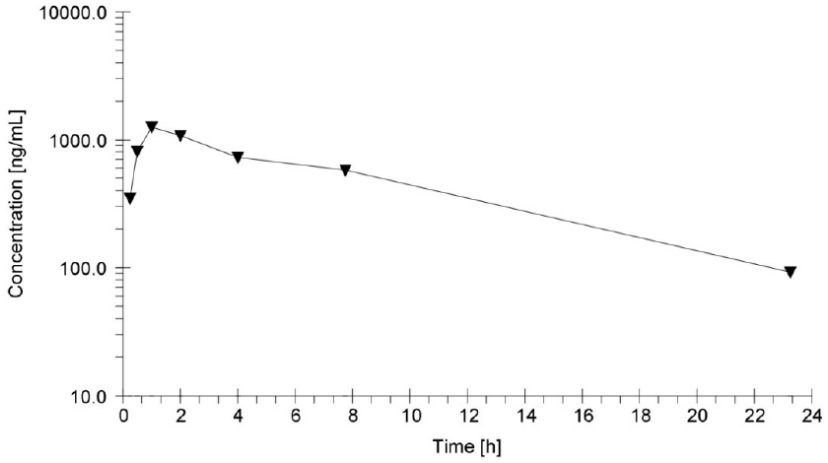
a.　経口投与

（資料番号4.2.2.2-1）

雄ラット（Wistar）に本薬5 mg/kg を単回経口投与後の血漿中未変化体濃度を測定し，薬物動態（PK）パラメータを算出した。血漿中濃度推移を図 2.6.4.3.2-1に，PK パラメータを表 2.6.4.3.2-1に示す。

本薬の吸収は速やか（平均 T_{max}: 1.5 h）であり，C_{max} 及び AUC_{inf} の平均はそれぞれ1310 ng/mL 及び12200 ng•h/mL であった。血漿中未変化体は比較的速やかに消失し，$t_{1/2}$は6.37 h であった。F の平均は117%と良好であった。

図 2.6.4.3.2-1　雄ラットに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体濃度推移



各点は2例の平均　（4.2.2.2-1の Figure 2を再掲）

表 2.6.4.3.2-1　雄ラットに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ

投与量 (mg/kg)	PK パラメータ				
	T_{max} (h)	AUC_{inf} (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)	F[1)] (%)
5	1.00, 2.00 (1.50)	12200, 12300 (12200)	1530, 1090 (1310)	5.19, 7.56 (6.37)	116, 118 (117)

各値は個別データ，カッコ内は平均を示す。　[4.2.2.2-1 Table 2を改変]

[1)] 静脈内投与した際の $AUC_{inf.}$（表 2.6.4.3.2-2）を用いて算出

b.　静脈内投与

（資料番号4.2.2.2-1）

雄ラット（Wiatar）に本薬 1.5 mg/kg を単回静脈内投与したときの血漿中未変化体濃度を測定し，PK パラメータを算出した。血漿中 PK パラメータを表 2.6.4.3.2-2に示す。

本薬の CL は8.90 mL/min/kg でありラットの肝血流量55.2 mL/min/kg[1)] よりも小さく，$t_{1/2}$は5.02 h であった。V_{ss}は3.07 L/kg であり，ラットの全身水分量668 mL/kg[1)] に比べて大きかった。

表 2.6.4.3.2-2　雄ラットに本薬を単回静脈内投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ

投与量 (mg/kg)	PK パラメータ			
	CL (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{inf} (ng•h/mL)
1.5	8.08, 9.71 (8.90)	2.86, 3.28 (3.07)	4.74, 5.30 (5.02)	3960, 3310 (3640)

各値は個別データ，カッコ内は平均を示す。　（4.2.2.2-1 Table 3を改変）

2)　カニクイザル

a.　経口投与

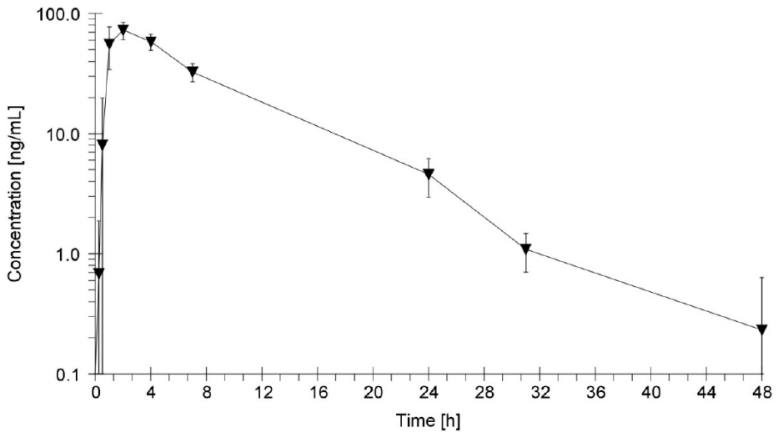
（資料番号4.2.2.2-2）

雄のカニクイザルに本薬 0.5 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中未変化体濃度を測定し，PK パラメータを算出した。血漿中濃度推移を図 2.6.4.3.2-2に，PK パラメータを表 2.6.4.3.2-3

に示す。

本薬の吸収は速やか（T_{max}: 平均1.67 h）であり，F は平均で42.6%であった。血漿中からの消失は比較的速やかであり，$t_{1/2}$の平均は5.4 h であった。

図 2.6.4.3.2-2　雄カニクイザルに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体の濃度推移



各点は3例の平均 ± 標準偏差　（4.2.2.2-2 Figure 5を再掲）

表 2.6.4.3.2-3　雄カニクイザルに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ

投与量 (mg/kg)	PK パラメータ				
	T_{max} (h)	AUC_{inf} (ng•h/mL)	C_{max} (ng/mL)	$t_{1/2}$ (h)	F[1)] (%)
0.5	1.67 ± 0.577	699 ± 97.4	79.0 ± 3.72	5.40 ± 1.14	42.6 ± 5.17

各値は3例の平均 ± 標準偏差を示す。　（4.2.2.2-2 Table 3を改変）

[1)] 静脈内投与した際の AUC_{inf}（表 2.6.4.3.2-4）を用いて算出

b.　静脈内投与

資料番号4.2.2.2-2

雄のカニクイザルに本薬 0.1 mg/kg を単回静脈内投与したときの血漿中未変化体濃度を測定し，PK パラメータを算出した。血漿中 PK パラメータを表 2.6.4.3.2-4に示す。

本薬の CL は平均で5.74 mL/min/kg でありサルの肝血流量43.6 mL/min/kg[1)] よりも小さく，$t_{1/2}$は平均で4.9 h であった。V_{ss}は平均で2.02 L/kg であり，サルの全身水分量693 mL/kg[1)] に比べて大きかった。

表 2.6.4.3.2-4　雄カニクイザルに本薬を単回静脈内投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ

投与量 (mg/kg)	PK パラメータ			
	CL (mL/min/kg)	V_{ss} (L/kg)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{inf} (ng•h/mL)
0.1	5.74 ± 2.49	2.02 ± 0.771	4.90 ± 1.48	357 ± 127

各値は3例の平均 ± 標準偏差を示す。　（4.2.2.2-2 Table 2を改変）

3)　幼若ラット

（資料番号4.2.2.2-3）

生後4，12，21日齢の幼若ラット及び雄成熟ラット（Wistar）に本薬をそれぞれ5.39，6.09，

5.52及び5.11 mg/kg 単回経口投与したときの血漿中未変化体濃度を測定し，PK パラメータを算出した。血漿中 PK パラメータを表 2.6.4.3.2-5に示す。

本薬の吸収及び消失は幼若ラットでは成熟ラットに比べて緩やかであり，生後4及び12日齢ラットの T_{max} は7 h，$t_{1/2}$はそれぞれ15.1及び20.4 h であったが，21日齢ラットでは $t_{1/2}$が5.53 h，T_{max} は3 h となり，成熟ラットの値（$t_{1/2}$：5.98 h，T_{max}：3 h）と同様であった。これらの結果より，本薬は若齢ラットでは成熟ラットに比べて吸収及び消失が緩やかであるが，離乳期の生後21日では，吸収及び消失速度は成熟ラットと同様になるものと考えられた。

表 2.6.4.3.2-5 幼若及び成熟ラットに本薬を単回経口投与後の血漿中未変化体の PK パラメータ

生後日齢	PK パラメータ			
	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{inf} (ng•h/mL)	$t_{1/2}$ (h)
4日齢	7.00	566	15600	15.1
12日齢	7.00	461	16600	20.4
21日齢	3.00	448	7230	5.53
成熟ラット	3.00	775	10300	5.98

投与量（mg/kg）：5.39（4日齢），6.09（12日齢），5.52（21日齢），5.11（成熟）
1時点3例の平均濃度の値より算出

（4.2.2.2-3 Table 6を改変）

2.6.4.3.3 本薬投与後の M1の薬物動態

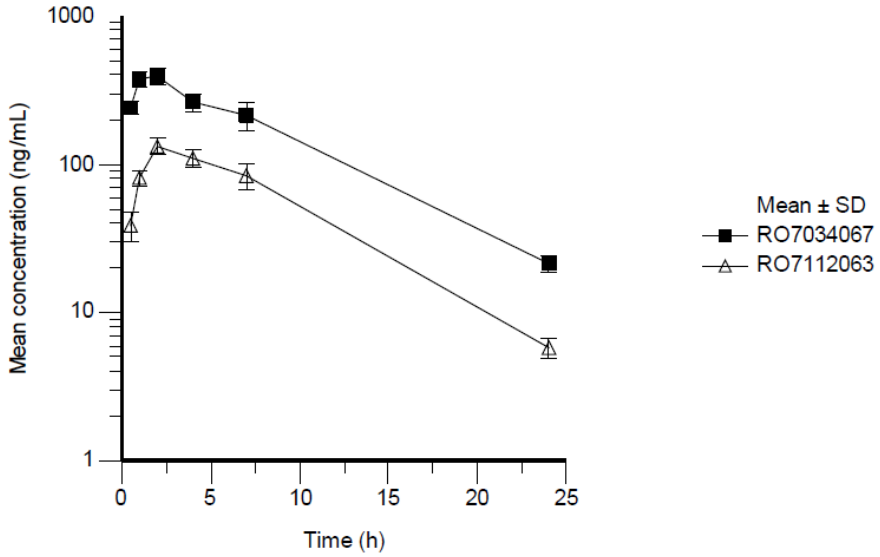
1) ラット単回投与

（資料番号4.2.2.2-4）

雄ラット（Wistar）に本薬 3 mg/kg を単回経口投与後の血漿中未変化体及び M1の濃度を測定し，PK パラメータを算出した。本測定では，安定化剤としてアスコルビン酸を添加した検量線及び QC 試料を用いた。血漿中濃度推移を図 2.6.4.3.3-1に，PK パラメータを表 2.6.4.3.3-1に示す。

本薬投与後の血漿中 M1の T_{max} は平均2 h（本薬の T_{max}：平均1.67 h）であり，本薬から M1への変換は速やかであると考えられた。M1の C_{max} 及び AUC_{last}（$AUC_{0\text{-}24h}$）の平均はそれぞれ132 ng/mL 及び1440 ng•h/mL であり，AUC_{last} の比較で M1は未変化体の約36%（34.2%～37.6%）であった。M1の $t_{1/2}$の平均は4.6 h であり，未変化体に比較してやや速やかに血漿から消失した。

図 2.6.4.3.3-1 雄ラットに本薬 3 mg/kg を単回経口投与後の血漿中未変化体及び M1の濃度推移



RO7034067: 未変化体，RO7112063: M1 （4.2.2.2-4 Figure 2を再掲）
各点は3例の平均 ± 標準偏差

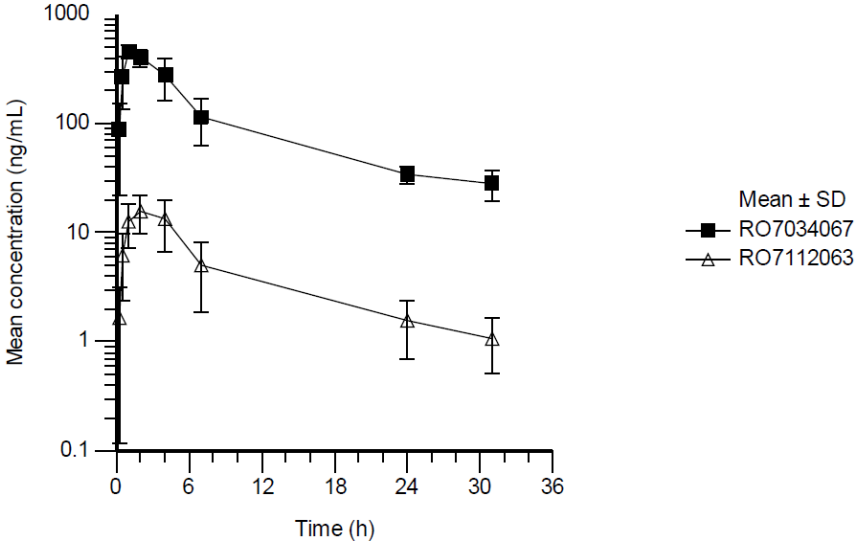
2) ウサギ単回投与

（資料番号4.2.2.2-5）

雄のウサギ（Dutch Belted）に本薬 3 mg/kg を単回経口投与後の血漿中未変化体及び M1の濃度を測定し，PK パラメータを算出した。本測定では，安定化剤としてアスコルビン酸を添加した検量線及び QC 試料を用いた。血漿中濃度推移を図 2.6.4.3.3-2に，PK パラメータを表 2.6.4.3.3-1に示す。

血漿中 M1の T_{max}，C_{max} 及び AUC_{last} の平均はそれぞれ1.67 h，16.2 ng/mL 及び142 ng•h/mL であった。M1の T_{max} が2 h と速かったことから，本薬から M1への変換は速やかであると考えられた。AUC_{last} の比較で M1は未変化体の4.55%（2.03%～7.58%）であった。

図 2.6.4.3.3-2　雄ウサギに本薬 3 mg/kg を単回経口投与後の血漿中未変化体及び M1の濃度推移



RO7034067: 未変化体，RO7112063: M1
各点は3例の平均 ± 標準偏差

（4.2.2.2-5 Figure 2を再掲）

表 2.6.4.3.3-1　ラット及びウサギに本薬を単回経口投与したときの本薬及び M1の PK パラメータ

PK パラメータ	ラット		ウサギ	
	本薬	M1	本薬	M1
T_{max} (h)	1.67	2.00	1.33	1.67
C_{max} (ng/mL)	395	132	470	16.2
AUC_{last} (ng•h/mL)	3980	1440	3410	142
$t_{1/2}$ (h)	5.44	4.61	12.0	11.5
M1/本薬 (%)	−	36.3	−	4.55

（4.2.2.2-4 Table 2～4及び4.2.2.2-5 Table 3～5を改変）

AUC_{last}：最終測定時点（ラット 24 h，ウサギ 31 h）までの AUC
各値は3例の平均

3)　M1 の曝露評価

（資料番号4.2.2.2-7，4.2.2.2-9，4.2.2.2-10）

ヒト血漿中の主代謝物 M1は試験したすべての動物種で検出された。M1は酸化的に不安定であり，初期の毒性試験においては血漿中の M1曝露は評価できていないが，20[redacted]年以降に実施した TK 試験（血漿にアスコルビン酸を添加）のデータを用いて動物での M1曝露量とヒト血漿中 M1曝露量を比較した。

毒性試験の評価動物であるラット，ウサギ及びカニクイザルの無毒性量（NOAEL）での M1曝露量をヒトの臨床用量での M1曝露量と比較した結果，1種類の動物種（ラット）でヒトの曝露量の1/2を超えていた（表 2.6.4.3.3-2）ことから，ICH M3ガイドライン（「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」に関する質疑応答集（Q&A）について，平成24年8月16日）に従って，毒性試験においてヒト主代謝物 M1の安全性は評価されていると考える。

表 2.6.4.3.3-2　血漿中主要代謝物 M1のヒト及び動物間での曝露比較

動物種	NOAEL 投与量 (mg/kg)		NOAEL AUC_{0-24h} (ng･h/mL) [1]		動物／ヒト[2] AUC 比	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
ラット[3]	1.5	1.5	439	406	0.66	0.61
ウサギ[4]	NA	4	NA	303	NA	0.45
カニクイザル[5]	1.5	1.5	285[6]	314[6]	0.43	0.47

[1] 最終投与後の血漿中濃度より算出した AUC_{0-24h}
[2] ヒト M1の AUC は，脊髄性筋萎縮症（SMA）患者の血漿中本薬濃度の $AUC_{0-24h,ss}$ 平均値（2000 ng•h/mL）に SMA 患者での M1/本薬の濃度比（0.334）を乗じて算出した推定値（2000 x 0.334=668 ng･h/mL）
[3] 4.2.2.2-7
[4] 4.2.2.2-10
[5] 4.2.2.2-9
[6] 測定までに血漿中 M1の酸化的分解を防ぐ処置をしていないため，本薬濃度に安定化剤を添加した条件下で得られている M1/本薬の濃度比（0.152，4.2.2.2-6）を乗じて算出した推定値
NA：Not applicable

2.6.4.3.4　反復投与

反復投与時の PK は，主にラット及びカニクイザルの TK 試験の結果を用いて評価した。マウス及びウサギについても一部毒性試験の中で曝露評価を行っており（2.6.6.3.2，2.6.6.6.3），すべての動物種で性差はなく，概ね用量に比例した曝露増加を示した。また，反復投与による蓄積性はほとんど認められていない。

1)　ラット 26 週間反復投与（TK 試験）

（資料番号4.2.2.2-8）

雌雄のラット（Wistar）に本薬を1，3及び7.5 mg/kg/日の用量で1日1回26週間反復経口投与したときの1，91及び182日目における血漿中未変化体濃度を測定し，PK パラメータを算出した（表 2.6.4.3.4-1）。

血漿中未変化体の C_{max} 及び AUC_{0-24h} は1，91及び182日のいずれにおいてもほぼ用量に比例した増加が認められた。1日目に対する91及び182日の蓄積率は AUC_{0-24h} ベースで1.61～3.31であり，顕著な蓄積は認められなかった。C_{max} 及び AUC_{0-24h} の雌雄間での比は0.979～1.39であり差は認められなかった。

表 2.6.4.3.4-1　雌雄ラットに本薬を26週間連日反復経口投与した時の血漿中本薬の PK パラメータ

Day	Dose (mg/kg)	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{0-24h} (ng•h/mL)	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
1	1	3	3	92.3	97.6	809	1010
	3	3	1	256	320	2630	3260
	7.5	3	1	786	907	8700	9780
91	1	1	1	198	280	1960	2720
	3	1	1	753	972	8690	8510
	7.5	3	1	1720	1970	21200	20900
182	1	3	1	203	295	2200	2400
	3	1	1	651	768	7010	8830
	7.5	3	1	1140	1170	16100	15700

1時点2例の平均濃度の値より算出　（4.2.2.2-8 Appendix14 Table3を改変）

2)　カニクイザル 39 週間反復投与（TK 試験）

（資料番号4.2.2.2-9）

雌雄のカニクイザルに本薬を1.5，3及び7.5 mg/kg/日（26日以降は5 mg/kg/day）の用量で1日1回39週間反復経口投与したときの1，12，26 (5 mg/kg/day のみ)，57，92，180及び267日目における血漿中未変化体濃度を測定し，PK パラメータを算出した（表 2.6.4.3.4-2）。

血漿中未変化体の C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ はいずれの測定日においても1.5～5 mg/kg/日（1及び12日目では1～7.5 mg/kg/day）で用量にほぼ比例した増加が認められた。1日目に対する267日目の蓄積率は，C_{max} ベースで0.584～2.81，$AUC_{0\text{-}24h}$ では0.784～1.77と顕著な蓄積は認められなかった。C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}24h}$ の雌雄間での比は0.604～1.98でありラット同様，雌雄差は認められなかった。

表 2.6.4.3.4-2　雌雄のカニクイザルに本薬を39週間連日反復経口投与したときの初回及び最終投与後の血漿中本薬の PK パラメータ

Dose (mg/kg)	Day	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng•h/mL)	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
1.5	1	1	1	323 ± 124	422 ± 58.7	1670 ± 247	1780 ± 305
	267	1	1	414 ± 158	396 ± 117	1870 ± 240	2060 ± 350
3	1	1	1	696 ± 391	578 ± 160	3510 ± 826	3730 ± 524
	267	1	1	1000 ± 428	973 ± 247	4880 ± 292	4850 ± 491
7.5[1)]	1	1	3	820 ± 151	1070 ± 268	7570 ± 945	8790 ± 1880
	12	3	1	1020 ± 374	1070 ± 417	11200 ± 4240	10200 ± 2790
5[2)]	26	1	1	683 ± 256	549 ± 158	4810 ± 1070	4900 ± 1300
	267	1	1	701 ± 280	1160 ± 320	5880 ± 733	6470 ± 778

（4.2.2.2-9 Appendix 17 Table2～5, 8, 9を改変）

各値は3～5例の平均 ± 標準偏差（T_{max} は群平均濃度の最高時点）

[1)]7.5 mg/kg は day 12まで投与後動物の状態悪化のため，day 13から day 25まで休薬

[2)]Day 26以降7.5 mg/kg から5 mg/kg に減量し投与を再開（5 mg/kg の Day26は day1に相当）

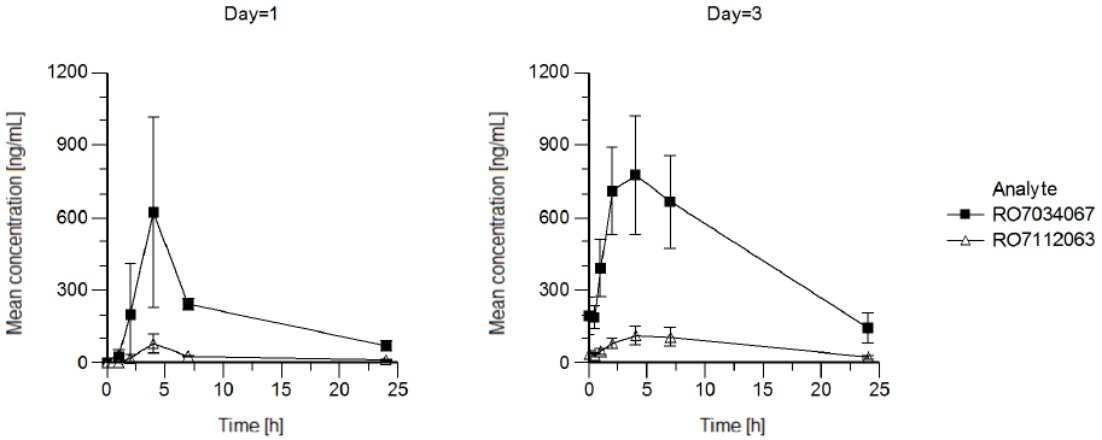
3)　サルに反復投与後の M1 の薬物動態

（資料番号4.2.2.2-6）

雄のカニクイザルに本薬 3 mg/kg を3日間1日1回反復経口投与し，1及び3回投与後の血漿中未変化体及び M1の濃度を測定し，PK パラメータを算出した。本測定では，安定化剤としてアスコルビン酸を添加した検量線及び QC 試料を用いた。血漿中濃度推移を図 2.6.4.3.4-1に，PK パラメータを表 2.6.4.3.4-3に示す。

未変化体の T_{max}，C_{max} 及び AUC_{last}（$AUC_{0\text{-}24h}$）の平均は初回投与後でそれぞれ4 h，622 ng/mL 及び4900 ng•h/mL，3回目投与後ではそれぞれ5 h，788 ng/mL 及び11300 ng•h/mL であった。M1については，T_{max}，C_{max} 及び AUC_{last} の平均は初回投与後でそれぞれ4 h，79.5 ng/mL 及び605 ng•h/mL，3回目投与後ではそれぞれ4 h，113 ng/mL 及び1720 ng•h/mL であった。M1及び未変化体の T_{max} がほぼ同じであったことから，本薬から M1への変換は速やかであると考えられた。未変化体に対する M1の割合は AUC_{last} の比較で12.4%（1日目）～15.2%（3日目）であった。1日目に比較して3日目の AUC_{last} は未変化体及び M1ともに増加し，蓄積率はそれぞれ2.32及び2.81であった。

図 2.6.4.3.4-1　雄カニクイザルに本薬 3 mg/kg を反復経口投与したときの初回及び3回目投与後の血漿中未変化体及び M1の濃度推移



RO7034067: 未変化体，RO7112063: M1　[4.2.2.2-6 Figure 2を再掲]
各点は3例の平均 ± 標準偏差

表 2.6.4.3.4-3　雄カニクイザルに本薬を経口投与したときの本薬及び M1の PK パラメータ

PK パラメータ	採血日	本薬	M1
T_{max} (h)	Day 1	4 ± 0	4 ± 0
	Day 3	5 ± 1.73	4 ± 0
C_{max} (ng/mL)	Day 1	622 ± 394	79.5 ± 41.6
	Day 3	788 ± 248	113 ± 38.5
AUC_{last} (ng•h/mL)	Day 1	4900 ± 1620	605 ± 164
	Day 3	11300 ± 3270	1720 ± 583
M1/本薬(%) [1)]	Day 1	−	12.4
	Day 3	−	15.2

AUC_{last}：最終測定時点（24 h）までの AUC　（4.2.2.2-6 Table 3～5を改変）
各値は3例の平均 ± 標準偏差
[1)]AUC_{last} を基に算出した M1/本薬の比

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　*In vitro* 血漿蛋白結合

（資料番号4.2.2.3-6, 4.2.2.3-7）

本薬の血漿蛋白結合率をマウス，ラット，ウサギ，カニクイザル及びヒトの血漿試料を用いて評価した。

本薬の血漿蛋白結合率は試験したすべての動物種において明確な種差は認められず，マウス，ラット，ウサギ，カニクイザル及びヒト血漿に本薬を1 µmol/L で添加した際の非結合型分率は，それぞれの動物種の平均で10%，16%，10%，15%及び11%であった。ヒト血漿での本薬の結合蛋白はヒト血清アルブミンであり，α1酸性糖蛋白との結合はみられなかった。

ヒト血漿中の主代謝物である M1に関して，各動物種間での血漿中での蛋白結合率に明確な種差はなく，添加濃度1 µmol/L でのマウス，ラット，ウサギ，カニクイザル及びヒトの血漿非結合型分率は，それぞれの動物種の平均で13.4%，8.9%，7.5%，11.2%及び7.4%であった。

2.6.4.4.2　幼若マウス及びラットでの血漿蛋白結合

（資料番号4.2.2.3-8，4.2.2.3-9）

マウス（薬理試験に使用した SMNΔ マウス）及びラット（Wistar）の成熟又は幼若動物の血漿を用いて本薬1 µmol/L 存在下での *in vitro* 蛋白結合を評価した。

生後11日齢の幼若マウス及び成熟マウスの非結合型分率はそれぞれ各2例の平均で27%及び12%であった。生後4日齢，12日齢及び成熟ラットの非結合型分率は52%，52%及び17%（各1例）であり，幼若動物で高かった。

また，異なったバッチの血漿試料を用いて，生後4日齢，12日齢及び成熟ラット（Wistar）の蛋白結合率に関して，バッチ間のばらつきを評価した結果，本薬添加濃度1 µmol/L での非結合型分率はそれぞれ17.7%～90.4%，17.5%～79.2%及び11.0%～16.5%であり，幼若ラットでは高いばらつきがみられた。

これらの結果より，マウスに比べてラットでは血漿蛋白結合率の日齢依存性が強く認められ，幼若動物では非結合型の割合が高く，個体間のばらつきが大きいことが示された。

2.6.4.4.3 幼若カニクイザルでの血漿蛋白結合

（資料番号4.2.2.3-11）

生後10日，1カ月，3カ月，6カ月及び1年10～11カ月齢の幼若カニクイザル3例の血漿を用いて本薬33.3 ng/mL 存在下での *in vitro* 蛋白結合率を調べた。

生後10日から3カ月齢までのサルの非結合型分率は22.1%～26.6%（1例のサルでは19.8%～25.8%）であったが，生後6カ月及び1年10～11カ月齢では13.0%～15.9%（1例のサルでは13.3%及び20.8%）と成熟動物の非結合型分率（11.6%，12.8%）に近かった。

この結果より，カニクイザルの血漿蛋白結合率は，幼若動物では成熟動物に比べて非結合型の割合が高い傾向が示されたが，マウス同様に日齢依存性は強くなかった。

2.6.4.4.4 ヒト小児血漿蛋白結合

（資料番号4.2.2.3-10）

0～12歳までの小児血漿試料（臍帯血を含む），生後1～7カ月の SMA 患者及び2～25歳の SMA 患者（いずれも投薬前）の血漿試料を用いて本薬33.3 ng/mL 存在下の蛋白結合を調べた。

臍帯血（出生直後），0～6カ月，6カ月～1歳，1～2歳，及び2～12歳の小児血漿に本薬を添加した際の本薬非結合型の割合は，それぞれ平均で12.2%，10.9%，11.4%，10.4%及び8.0%であった。成人の蛋白結合率（非結合型分率）は11%（2.6.4.4.1）であったことから，本薬のヒト血漿蛋白結合率はラットの場合（2.6.4.4.2）と異なり，年齢に依存しないことが示された。

生後1～7カ月及び2～25歳の SMA 患者の血漿に本薬を添加した際の本薬非結合型の割合は，それぞれ平均で10.1%及び9.8%であり，SMA 患者においても本薬の蛋白結合率は正常な小児と同様な値を示し，年齢に依存せずほぼ同様であった。

2.6.4.4.5 *In vitro* 血球移行

（資料番号4.2.2.3-6）

ラット，カニクイザル及びヒトの血液に本薬を1 µmol/L で添加した際の血球移行率を調べた結果，RO7034067の血液／血漿中濃度比は，それぞれ平均で0.9，1.0及び1.3であり，いずれの動物種においても赤血球への移行性は認められなかった。

2.6.4.4.6 *In vitro* メラニン結合

（資料番号4.2.2.3-12）

天然メラニン（購入品）への本薬の結合率を *in vitro* で調べた。

本薬 1及び10 µmol/L を1 mg/mL のメラニン含有リン酸緩衝液（pH7.4）懸濁液中でインキュベーションし，遠心分離（2,300 rpm で室温10分間）後の上清に含まれる本薬の非結合型濃度を LC-MS/MS で測定した。

本薬のメラニンへの結合率は非常に高く，1及び10 µmol/L 添加時の非結合型分率は，それぞれ平均で ＜0.1%及び0.2%であった。

2.6.4.4.7 組織分布

本薬の組織分布は，SMA モデルマウス，ラット（白色及び有色）及びカニクイザルに非標識体を投与したときの組織内における未変化体濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。また，ラット（白色及び有色）に本薬の標識体を投与後の組織内放射能分布を QWBA 法により評価した。

1) 非標識体を用いた試験

a. ラット

（資料番号4.2.2.3-1）

雄の白色（Wistar）及び有色（Brown Norway）ラットに本薬 3 mg/kg を4日間連日経口投与（4回投与）後，白色ラットは1，7，24及び48 h，有色ラットについては1，7，24，48，168，336及び1008 h に眼組織（脈絡膜・網膜色素上皮，強膜，虹彩，角膜，網膜，水晶体及び硝子体液），脾臓，皮膚，筋肉，脳及び CSF 中の未変化体の組織分布及び消失を評価した。

有色ラットでは白色ラットに比較して眼のメラニン含有組織（脈絡膜・網膜色素上皮，虹彩及び強膜）への分布が著しく高く，有色ラットの非有色の眼組織（網膜，水晶体及び硝子体液）やその他の組織（筋肉，脳及び CSF）に比べても高かった（表 2.6.4.4.7-1，表 2.6.4.4.7-2）。最終投与後7，14及び42日目の組織内濃度より算出した眼の有色組織での $t_{1/2}$は約60日と推定された。また，標的組織と考えられる脳及び筋肉へも未変化体として移行することがラットで確認された。

表 2.6.4.4.7-1 雄の白色及び有色ラットに本薬 3 mg/kg を4日間連日経口投与（4回投与）後の $AUC_{1\text{-}48h}$ の組織/血漿中濃度比（T/P ratio）

組織	$AUC_{1\text{-}48h}$（T/P ratio）	
	白色ラット	有色ラット
脈絡膜+網膜色素上皮	1.01	15800
強膜	1.11	10100
虹彩	1.04	5770
角膜[1)]	0.368	2160
網膜	0.973	63.0
硝子体液	0.123	3.51
水晶体	0.207	3.40
脾臓	8.28	23.4
皮膚	10.3	4.27
脳	1.02	1.52
筋肉	0.738	0.663
CSF	0.0421	0.0356

[1)]周辺組織（毛様体，虹彩及び強膜）が若干混入している可能性がある。

（4.2.2.3-1 Table 16を改変）

b. カニクイザル

（資料番号4.2.2.3-2，4.2.2.2-9）

雄のカニクイザルに本薬 3 mg/kg を7日間連日経口投与（7回投与）後0.25，0.5, 1, 2, 4, 7及び24 h に眼組織（脈絡膜・網膜色素上皮，強膜，虹彩，角膜，網膜，水晶体，硝子体液/硝子体及び房水），及びその他各組織中の未変化体の組織分布並びに消失を評価した。

本薬の組織中濃度は，眼のメラニン含有組織（脈絡膜・網膜色素上皮，虹彩及び強膜）が非含有の眼組織（網膜，水晶体及び硝子体）やその他の組織（筋肉，脳及び CSF）に比べて著しく高かった。投与7日目の投与後2 h 及び最終投与後42日目の組織内濃度から，眼の有色組織での $t_{1/2}$は脈絡膜・網膜色素上皮で約30日，網膜で約20日，硝子体で約9日と推定された。

また，本試験結果より，標的組織と考えられる脳及び筋肉への未変化体としての分布がカニクイザルにおいても確認された。

雌雄のカニクイザルに本薬 3 mg/kg/日を1日1回39週間反復経口投与したときの眼の各組織中未変化体濃度を比較した結果，本試験においてもメラニン含有組織である虹彩及び脈絡膜周辺部位（脈絡膜及び網膜色素上皮）の濃度が顕著に高かった。次いで強膜，網膜の順であり，水晶体及び硝子体液では低かった（表 2.6.4.4.7-2）。

表 2.6.4.4.7-2　ラット及びカニクイザルに本薬3 mg/kg を単回又は反復投与後の本薬の眼を含む各組織中濃度/血漿中濃度比（T/P ratio）

眼の組織	ラット		カニクイザル	
	白色	有色		
	4 day[1)]	4 day[1)]	7 day[2)]	39 W[3)]
脈絡膜+網膜色素上皮	0.799	5220	172	2190
虹彩	0.920	2270	58.0	3180
強膜	0.634	1960	8.17	117
網膜	0.658	19.7	5.29	27.7
水晶体	0.0483	0.926	0.172	1.34
硝子体液	0.0586	0.802	0.384	0.383
脳	0.960	1.15	1.00	0.676[4)], 0.693[5)]
筋肉	0.686	0.508	0.844	–
CSF	0.0533	0.0415	0.0674	0.0730

数値は組織/血漿中濃度比（T/P ratio）を示す。
[1)]最終投与（4日目）後1 h，[2)] 最終投与（7日目）後2 h
[3)] 最終投与（39週目）後3又は5 h（雌雄の平均）
[4)] Brain cortex，[5)] Brain stem
- 測定せず

（4.2.2.3-1 Table 17，4.2.2.3-2 Table 5及び4.2.2.2-9 Table 17, 18を改変）

c.　幼若マウスでの脳移行性

（資料番号4.2.2.3-3，4.2.2.3-4）

生後10日齢の幼若マウス（薬理試験に使用した SMNΔ7マウス，2.6.2.2.2.1）に本薬 3 mg/kg を単回腹腔内投与したときの血漿及び脳中の未変化体濃度を経時的に調べた。

腹腔内投与後の本薬の吸収は速やか（T_{max}: ≤ 2 h）であり，脳への移行が認められた。血漿及び脳中での C_{max} はそれぞれ0.208 µg/mL 及び0.190 µg/g，AUC_{last} はそれぞれ2.16 µg･h/mL 及び1.71 µg･h/g であり，本薬は脳中で血漿中に近い曝露量を示した。

また，雌の C/C アレルマウス（薬理試験に使用したマウス，2.6.2.2.2.2）に本薬10 mg/kg を単回経口投与後，血漿及び脳中の未変化体濃度を経時的に測定した結果，本薬は血漿中濃度に近い濃度で脳に検出され，本薬は血液-脳関門を通過することが示された。

以上の試験結果より，腹腔内投与あるいは経口投与で実施した薬理試験結果（2.6.2.2.2.1，2.6.2.2.2.2）の妥当性が裏付けられた。

2)　標識体を用いた試験

a.　組織分布（QWBA）

（資料番号4.2.2.3-5）

雄の白色（Wistar）及び有色（Lister-Hooded）ラットに[^{14}C] RO7034067 5 mg/kg を単回経口投与後，2，24，72及び168 h 後に各組織中の放射能濃度を測定した結果，放射能は速やかに各

組織に分布し，多くの組織で最初の測定時点である2 h に最高濃度を示した（表 2.6.4.4.7-3）。投与後168 h を通して高い濃度を示した主な組織は外側鼻腺，包皮腺，眼窩外涙腺，眼窩内涙腺，副腎（皮質及び髄質），唾液腺，マイボーム腺，尿道球腺及び甲状腺であった。放射能は，投与後168 h には多くの組織で定量下限未満に低下した。有色ラットでは，眼のブドウ膜/網膜で著しく高濃度の放射能が認められ，投与後168 h では低下したものの高い濃度の放射能が残存し，メラニンへの高い親和性が示唆された。メラニン含有組織以外の組織では有色及び白色ラットで放射能の分布特性はほぼ同様であった。

表 2.6.4.4.7-3　雄有色ラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与後の主要組織中の放射能濃度推移

組織	μg equivalent of RO7034067/g			
	2 h	24 h	72 h	168 h
血漿	0.803	0.071	0.011	0.003
脳	0.642 (0.800)	BLQ	BLQ	BLQ
脳脊髄膜	0.798 (0.994)	0.116 (1.63)	BLQ	BLQ
松果体	4.33 (5.39)	0.370 (5.21)	BLQ	BLQ
脳下垂体	9.71 (12.1)	0.402 (5.66)	BLQ	1.11 (337)
骨髄	3.78 (4.71)	0.427 (6.00)	0.117 (10.7)	BLQ
ブドウ膜/網膜	60.7 (75.7)	142 (1990)	111 (10100)	54.7[1)] (16700)
外側鼻腺	58.3 (72.7)	51.8 (729)	3.88 (354)	0.753 (230)
眼窩内涙腺	27.9 (34.7)	19.2 (269)	4.27 (389)	1.32 (402)
眼窩外涙腺	48.1 (59.9)	20.2 (284)	1.96 (179)	0.222 (67.7)
甲状腺	4.20 (5.23)	0.730 (10.3)	0.850 (77.5)	0.214 (65.4)
唾液腺	8.10 (10.1)	2.45 (34.5)	1.75 (159)	0.133 (40.4)
マイボーム腺	6.24 (7.78)	15.0[1)] (211)	13.8[1)] (1260)	3.27[1)] (995)
ハーダー腺	12.8 (16.0)	0.814 (11.5)	0.098 (8.96)	BLQ
尿道球腺	12.3 (15.3)	7.36 (104)	0.989 (90.2)	0.095 (28.8)
包皮腺	40.9 (51.0)	104 (1460)	71.4 (6510)	1.54 (468)
副腎皮質	10.9 (13.6)	5.89 (82.8)	4.70 (429)	3.47 (1060)
副腎髄質	9.92 (12.4)	1.48 (20.8)	1.00 (91.2)	0.783 (239)
肺	3.16 (3.94)	0.252 (3.54)	BLQ	BLQ
肝臓	5.15 (6.42)	0.684 (9.61)	0.220 (20.1)	0.107 (32.5)
腎臓皮質	5.31 (6.62)	1.30 (18.3)	0.458 (41.7)	0.242 (73.7)
腎臓髄質	2.88 (3.59)	0.236 (3.32)	BLQ	BLQ
筋肉	0.886 (1.10)	0.088 (1.24)	BLQ	BLQ
心筋	1.90 (2.37)	0.152 (2.13)	BLQ	BLQ
膵臓	3.60 (4.49)	0.272 (3.82)	BLQ	BLQ
胸腺	3.32 (4.14)	0.261 (3.67)	BLQ	BLQ
精巣	1.60 (1.99)	0.209 (2.95)	BLQ	BLQ

[1)]周辺組織の高濃度放射能による影響により上方ぶれの可能性がある　（4.2.2.3-5 Table9及び10を改変）

括弧内は組織中濃度/血漿中濃度の比

BLQ：定量下限未満（ ＜0.090 μg equiv/g）

b.　胎児移行

（資料番号4.2.2.3-13）

妊娠16日のラットに[^{14}C] RO7034067 5 mg/kg を単回経口投与し，母動物及び胎児の各組織中放射能濃度を測定した結果，投与後30分で胎児への放射能の移行が認められ，[^{14}C] RO7034067はラットの胎盤を通過することが示された。放射能は投与後24 h まで検出されたが，投与後72 h では検出されなかった（表 2.6.4.4.7-4）。

妊娠及び非妊娠ラットで放射能分布に違いはなく，ともに各組織に速やかに分布し，ほとん

どの組織で2又は6 h 後に最も高い濃度を示した。高い濃度を示した組織は，陰核，外側鼻腺，涙腺（眼窩内，外），副腎（皮質，髄質），脾臓，ハーダー腺，甲状腺，唾液腺及び腎臓（髄質）であり，生殖器官を除いて雄ラットの分布特性（表 2.6.4.4.7-3）と同様であった。

表 2.6.4.4.7-4　妊娠ラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与後の母動物及び胎児の主要組織中放射能濃度推移

組織	µg equivalent of RO7034067/g				
	30 min	2 h	6 h	24 h	72 h
血漿	0.693	0.972	0.849	0.096	0.008
脳	0.474 (0.685)	0.790 (0.812)	0.696 (0.820)	0.054 (0.566)	BLQ
脳脊髄膜	0.896 (1.29)	1.78 (1.83)	1.15 (1.36)	0.232 (2.41)	0.052 (6.21)
松果体	2.37 (3.42)	7.12 (7.33)	5.58 (6.57)	0.459 (4.78)	BLQ
脳下垂体	2.96 (4.27)	6.51 (6.69)	4.65 (5.47)	0.813 (8.46)	BLQ
骨髄	3.58 (5.16)	7.51 (7.73)	5.56 (6.55)	BLQ	0.231 (27.7)
脊髄	0.306 (0.442)	0.459 (0.472)	0.410 (0.483)	0.045 (0.471)	BLQ
眼（水晶体)	0.053 (0.077)	0.121 (0.125)	0.139 (0.164)	0.066 (0.688)	BLQ
外側鼻腺	–	31.1 (32.0)	24.6 (29.0)	21.0 (218)	1.09 (131)
眼窩内涙腺	8.13 (11.7)	25.7 (26.4)	28.4 (33.4)	10.7 (111)	1.64 (197)
眼窩外涙腺	–	27.9 (28.7)	30.9 (36.4)	14.5 (151)	2.54 (304)
甲状腺	4.29 (6.19)	9.77 (10.0)	13.2 (15.5)	1.75 (18.2)	0.978 (117)
唾液腺	3.71 (5.35)	8.32 (8.56)	7.69 (9.05)	2.40 (24.9)	0.527 (63.2)
ハーダー腺	4.10 (5.92)	16.3 (16.8)	17.0 (20.0)	1.85 (19.2)	0.123 (14.8)
副腎皮質	7.75 (11.2)	27.3 (28.1)	22.2 (26.1)	11.9 (123)	7.14 (856)
副腎髄質	5.65 (8.16)	20.3 (20.9)	12.3 (14.4)	2.77 (28.8)	3.53 (424)
肺	2.11 (3.05)	5.91 (6.08)	3.79 (4.46)	0.439 (4.56)	0.064 (7.72)
肝臓	4.76 (6.87)	8.12 (8.36)	6.84 (8.05)	1.16 (12.0)	0.315 (37.8)
腎臓皮質	4.98 (7.19)	6.74 (6.93)	6.38 (7.51)	1.64 (17.1)	1.06 (127)
腎臓髄質	2.30 (3.32)	4.65 (4.79)	3.76 (4.42)	0.526 (5.47)	0.156 (18.7)
脾臓	4.94 (7.13)	17.9 (18.4)	12.1 (14.2)	2.02 (21.0)	0.537 (64.4)
筋肉	0.565 (0.815)	1.23 (1.26)	1.05 (1.23)	0.140 (1.45)	BLQ
心筋	1.32 (1.91)	2.45 (2.52)	2.08 (2.44)	0.261 (2.71)	0.055 (6.62)
膵臓	3.04 (4.39)	5.03 (5.17)	4.60 (5.42)	0.495 (5.15)	0.062 (7.43)
胸腺	1.91 (2.76)	5.19 (5.34)	4.18 (4.92)	0.527 (5.48)	0.103 (12.4)
陰核	10.4 (15.1)	71.5 (73.5)	158 (187)	119 (1240)	86.5 (10400)
子宮	1.67 (2.42)	3.30 (3.39)	3.40 (4.01)	0.538 (5.59)	BLQ
卵巣	1.97 (2.84)	4.17 (4.29)	2.52 (2.96)	0.777 (8.08)	0.169 (20.3)
羊水	BLQ	0.108 (0.112)	0.098 (0.115)	BLQ	BLQ
胎盤	1.03 (1.49)	1.97 (2.03)	1.98 (2.33)	0.246 (2.56)	BLQ
胎児	0.326 (0.470)	0.667 (0.686)	0.669 (0.787)	0.118 (1.23)	ND
胎児血液	0.236 (0.340)	0.524 (0.539)	0.885 (1.04)	0.077 (0.802)	ND
胎児脳	0.277 (0.400)	0.514 (0.529)	0.678 (0.799)	0.073 (0.754)	ND
胎児肝臓	0.566 (0.817)	1.36 (1.40)	1.15 (1.36)	0.224 (2.33)	BLQ
胎児心筋	0.176 (0.253)	0.626 (0.644)	0.806 (0.949)	–	ND

括弧内は組織中濃度/血漿中濃度の比　（4.2.2.3-13 Table1及び2を改変）

BLQ：定量下限未満（ ＜0.042 µg equiv/g）

ND：放射能検出されず

–：試料なし

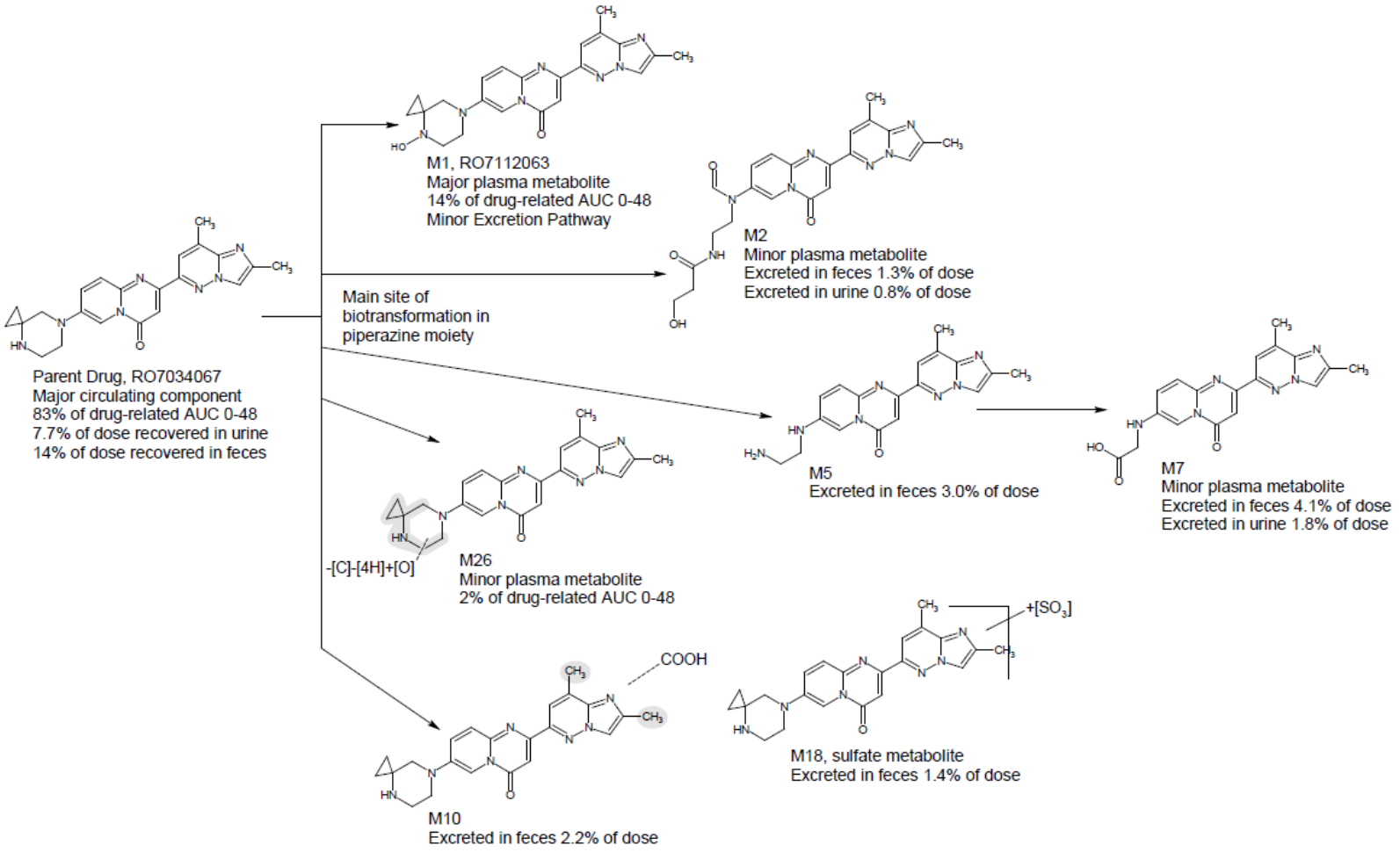
2.6.4.5 代謝（動物種間の比較）

2.6.4.5.1 推定代謝経路

（資料番号4.2.2.4-7）

本薬の代謝はヒトにおいて N-水酸化代謝物 M1への経路，ピペラジン環の開裂による M2，M5及び M7の生成，並びにカルボン酸体 M10及び硫酸抱合体の M18生成といった経路が推定される（図 2.6.4.5.1-1）。各代謝物はラット及びカニクイザルでも認められている。

図 2.6.4.5.1-1　本薬の推定代謝経路（ヒト）



（4.2.2.4-7 Figure 2を再掲）

2.6.4.5.2 *In vitro* における代謝

（資料番号4.2.2.4-5）

マウス，ラット，ウサギ，カニクイザル及びヒトの肝ミクロソーム，肝細胞及び発現系CYP分子種を用いて，本薬の *in vitro* 代謝を評価した。

本薬は *in vitro* 試験系で代謝的に安定であり，ヒト肝ミクロソームと1 hインキュベーション後でも試料中の未変化体は89%残存していた。代謝物ではN-水酸化体M1（試料中の3.8%）が最も多く認められ，次いでシクロプロピル環及びピペラジン環の開裂体である M2，酸化及びシクロプロピル環の開裂体 M3がともに2.8%みられ，その他酸化的代謝物 M4，ピペラジン環の開裂代謝物 M5，M6及び M7がわずかに認められた。肝細胞においては，インキュベーション3 h後に未変化体が試料中の98%残存しており，代謝物では主にM1が1.7%認められた以外はM2，M3，M5及び M7がわずかにみられた。ヒト試料で認められたこれらの代謝物は，試験したすべての動物種においてもみられた（肝ミクロソームではM6及びM7以外，肝細胞ではM4及びM6以外）。

2.6.4.5.3 M1の *in vitro* 代謝

（資料番号4.2.2.4-2）

M1は CYP（CYP1A1，2C8，2C19，2J2及び3A4）及び FMO（1及び3）によりさらに代謝された。これらの酵素のうち，CYP2J2，CYP3A4，FMO1及びFMO3の寄与が高かった。

2.6.4.5.4 主代謝部位及び関与酵素

（資料番号4.2.2.4-5，4.2.2.4-3）

ヒトの発現系CYP分子種（CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1及び3A4）を本薬10 µmol/Lと30 minインキュベーション後，代謝物プロファイルを調べた。

本薬のこれら CYP 分子種による代謝率は低かった。最も代謝に関与した分子種は CYP3A4であり，代謝物としてM1，M2，M3/M4及びM5がそれぞれ2.6%，3.2%，1.8%及び1.6%認められたが，未変化体が91%残存していた。その他の分子種でも同様な代謝物が検出されたが，割合はより低く，未変化体として96%以上残存していた。

本薬の主要代謝部位及び関与酵素を調べる目的で，[^{14}C] RO7034067（10 µmol/L）をヒトの肝臓，腎臓及び小腸ミクロソームとニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）存在下37°C で60 min インキュベーション後，代謝物プロファイル及び代謝酵素の寄与について評価した。

代謝の寄与は肝臓が最も大きく，[^{14}C] RO7034067の消失率は肝臓が24%，次いで腎臓（9%），小腸（2%）の順であった。いずれも複数の代謝物が認められ，腎臓では主に M1であったが，肝臓及び小腸では M1に加えてシクロプロピルあるいはピペラジン環の開裂代謝物M2及び M3のピークが検出された。これらの代謝に対する FMO 及び CYP3A の寄与の程度を調べるため，それぞれの阻害薬であるmethimazole（1 mmol/L）及びketoconazole（1 µmol/L）を加えたところ，肝臓では methimazole の存在下ですべての代謝物ピークが75%以上減少したのに対して，ketoconazole 存在下では最大で20%の減少であった。腎臓（M1及び M3に対してのみを評価）では，methimazole により M1が90%以上の減少を示したのに対して，ketoconazoleでは10%未満であった。

FMO1及び3並びに CYP1A1，3A4及び3A7の発現系酵素（0.25 mg/mL FMO，200 pmol/mL CYP）を[^{14}C]RO7034067（10 µmol/L）と37°C で60 min インキュベーション後，代謝物産生及び各酵素の寄与について評価した結果，FMO1及び3とのインキュベーションでは CYP 分子種に比較してより高い M1ピークが認められた。CYP 各分子種は主に M1，M2及び M3を産生したが，CYP1A1及び3A7では CYP3A4に比べて M1の産生は少なかった。各酵素別の[^{14}C] RO7034067の消失率はFMOでは60%以上（FMO1: 72.3%，FMO3: 62.4%）であったのに対して，

CYP では10%未満（1A1: 6.9%，3A4: 8.3%, 3A7: 7.1%）であった。

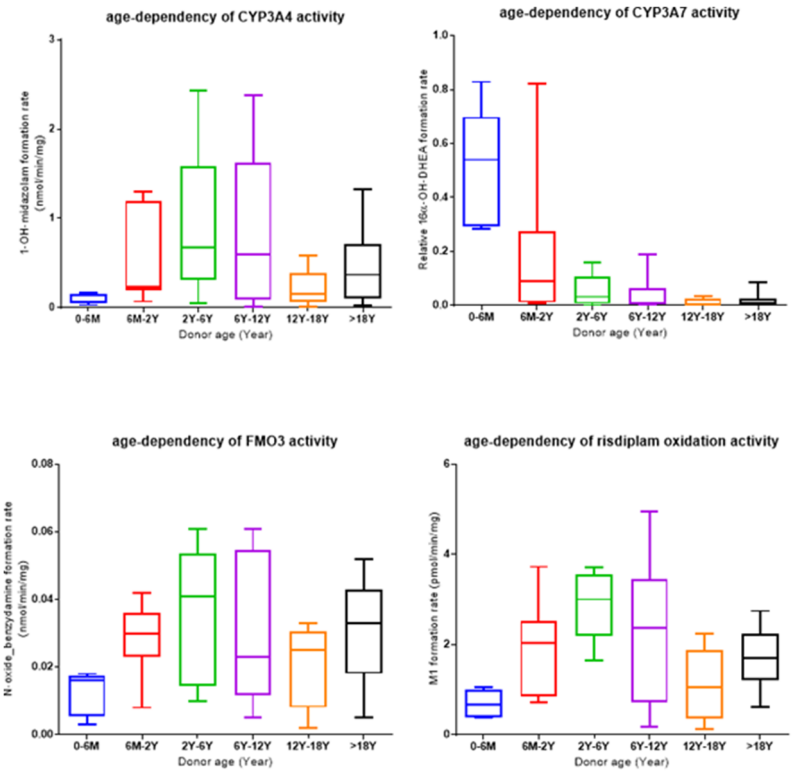
以上の結果より，RO7034067の代謝への寄与は CYP よりも FMO の方が大きいことが示唆された。

2.6.4.5.5 主代謝関与酵素の年齢依存性（*in vitro*）

（資料番号4.2.2.4-6）

個々のヒト肝ミクロソーム（小児30ドナー，成人9ドナー）を用いて，CYP3A4，CYP3A7及び FMO3活性，並びに本薬の代謝能を比較した結果，図 2.6.4.5.5-1に示すように，CYP3A4及び FMO3活性，並びに本薬の代謝能は0～6カ月児由来のミクロソームで最も低く，6カ月～2歳児で増加し，2～6歳児ではさらに増加を示した。逆に CYP3A7は0～6カ月児で最も活性が高く，その後低下した。これらのことから，本薬の代謝能は小児の場合，年齢に依存すると考えられた。

図 2.6.4.5.5-1 ヒトの各年齢由来の肝ミクロソームにおける CYP3A4，CYP3A7及び FMO3活性並びに本薬代謝能



CYP3A4活性：基質として midazolam を用い，1'-OH midazolam の生成速度で評価
CYP3A7活性：基質として DHEAS を用い，16α-OH DHEA 生成速度で評価
FMO3活性：基質として benzydamine を用い，benxydamine N-oxide 生成速度で評価
本薬代謝能：M1生成速度で評価

（4.2.2.4-6 Figure 4を改変）

2.6.4.5.6 反応性代謝物

（資料番号4.2.2.4-4）

本薬由来物質の共有結合（cvb）性を，[^{14}C] RO7034067を用いてヒト肝ミクロソームで評価した。本薬（2 μmol/L）で生成した NADPH 依存的な共有結合物の cvb 値は59 pmol/mg であっ

た。グルタチオン存在下（肝細胞と類似の条件）では，cvb 値は20 pmol/mg まで減少した。この結果より，ヒト肝臓における本薬由来の反応性代謝物産生の可能性を完全に否定することはできないものの，本薬の cvb 値は低い範囲内にあり，肝臓で本薬由来の反応性代謝物が過剰に産生されることによって毒性が発現するリスクは低いと考える。

2.6.4.5.7 *In vivo* における代謝

In vivo 代謝の評価は，胆管カニューレを挿入したラット又は未処置のラットに[^{14}C] RO7034067を経口又は静脈内投与したときの血漿，尿，糞及び胆汁中の代謝物を評価した。また，ラット及び幼若ラット，並びにカニクイザルに本薬を1日1回反復経口投与した際の血漿試料を用いて代謝物プロファイルを探索的に調べた。

2.6.4.5.7.1 ラット及びサルの血漿中代謝物

（資料番号4.2.2.4-1，4.2.2.4-5）

雄ラット（Wistar）に[^{14}C] RO7034067を経口（5 mg/kg）又は静脈内投与（2 mg/kg）したときの血漿中の主代謝物を評価した結果，[^{14}C]RO7034067投与後48 h（経口）又は24 h（静脈内）で血漿中には主として未変化体が認められ，それぞれ血漿中放射能の74%又は88%を占めた。代謝物は少なく，経口投与後1 h 及び静脈内投与後0.5 h の初期の血漿では M1がそれぞれ血漿中放射能の4.3%及び1.9%認められた。

ラット（Wistar）に本薬2.5 mg/kg を1日1回反復経口投与した試験（4.2.3.2-3）の血漿試料（14日目の投与後1及び7 h）及び幼若ラット（Wistar）に本薬10 mg/kg を1日1回反復経口投与した試験（4.2.3.5.4-1）の血漿試料（出生後10日目ラットの投与7日目），並びに本薬6 mg/kg をカニクイザルに1日1回反復経口投与した試験（4.2.3.2-7）の血漿試料（14日目の投与後1及び7 h）を用いて，MS のイオン強度（ピーク面積）を比較することで探索的に代謝物プロファイルを評価した。

代謝物は定性的には *in vitro* 試験（2.6.4.5.2）でみられた代謝物と同じであり，その割合は，サル血漿では未変化体が試料中の89%（14日間反復投与後1 h の血漿）及び84%（14日間反復投与後7 h の血漿）と主であった。サル血漿中代謝物は M1が試料中の6.0%（14日間反復投与後1 h の血漿）及び14%（14日間反復投与後7 h の血漿）であったが，M2～M7は1.6%以下とわずかであった。幼若及び成熟ラットの血漿においても，主に未変化体（試料中の88～99%）が認められた。

2.6.4.5.7.2 ラットの尿中代謝物

（資料番号4.2.2.4-1）

ラット（Wistar）に[^{14}C] RO7034067を経口（5 mg/kg）又は静脈内投与（2 mg/kg）したときの尿中の主代謝物を評価したところ，投与後48 h までの尿中には未変化体，代謝物ともに排泄は少なく，未変化体が経口及び静脈内投与後にそれぞれ投与放射能の2.4%及び2.2%であり，代謝物は投与放射能の0.6%を超えなかった。

2.6.4.5.7.3 ラットの糞及び胆汁中代謝物

（資料番号4.2.2.4-1）

胆管カニューレ挿入及び未処置の雄ラット（Wistar）に[^{14}C] RO7034067を経口（5 mg/kg）及び静脈内（2 mg/kg）投与したときの糞中及び胆汁中代謝物を調べた。

糞中には主に未変化体が認められ，未処置ラットで未変化体が経口及び静脈内投与後48 h でそれぞれ投与量の48%及び42%を占めた。胆管カニューレ挿入ラットでは糞中に未変化体がそれぞれ投与量の48%及び32%を占めた。糞中に代謝物は少なく，主に M5が未処置ラットで経

口及び静脈内投与後48 h でそれぞれ投与量の6.4%及び5.4%排泄された。胆管カニューレ挿入ラットでは糞中に M5がそれぞれ投与量の4.0%及び3.7%排泄された。

胆汁中には，胆管カニューレ挿入ラットの経口及び静脈内投与後48 h でそれぞれ投与量の8.0%及び19.1%（それぞれ2例の平均）の放射能が回収され，未変化体としてはそれぞれ投与量の0.6%及び0.8%であった。いずれの投与経路でも投与量の2%を超える単一の代謝物（未変化体も含めて）は認められなかった。

2.6.4.5.7.4 ヒトの血漿，尿及び糞中代謝物

（資料番号4.2.2.4-7）

健康成人に[^{14}C] RO7034067を18 mg 単回経口投与後の血漿，尿及び糞中の代謝物を調べた（2.7.2.2.1.2）。

投与後1，4.5，12，24及び48 h のプール血漿試料中には主に未変化体が認められ，血中の薬物由来物質（$AUC_{0\text{-}48h}$）の83%を占めた。代謝物は M1が主で $AUC_{0\text{-}48h}$ の14%であり，他には単一の代謝物として2.2%を超えるものはなかった。

投与後840 h（35日）までに尿及び糞中にそれぞれ投与放射能の28%及び53%が排泄された。投与後168 h（7日）までのプールした尿及び糞試料を用いて代謝物を調べたところ，尿中には未変化体が投与量の7.7%排泄され，代謝物ではピペラジン環の開裂体である M7が投与量の1.8%認められた。他には投与量の1.0%を超える単一の代謝物はみられなかった。糞中に排泄された薬物由来物質としては未変化体が主であり，投与量の14%であった。代謝物としてはピペラジン環の開裂体である M5，M7及びカルボン酸体の M10がそれぞれ投与量の3.0%，4.1%及び2.2%みられた。他には投与量の1.5%を超える単一の代謝物は認められなかった。

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 尿糞中排泄

（資料番号4.2.2.3-5，4.2.2.2-1，4.2.2.3-2）

[^{14}C] RO7034067を単回で経口（雄白色ラット Wistar 及び有色ラット Lister-Hooded，5 mg/kg）又は静脈内投与（雄白色ラット Wistar，2 mg/kg）したときの放射能の尿糞中への排泄を調べた。

経口投与後，放射能の排泄は白色及び有色ラットで同様であり，主として糞中に投与量のそれぞれ約87%及び約82%が排泄され，尿中排泄は約8%及び約7%と少なかった。168 h までにケージ洗浄液中の放射能を含めて両ラットの平均で投与量の94.1%の放射能が回収（糞中：85.4%，尿中：7.74%）された。放射能の排泄は速やかであり，24 h 以内に投与量の65%以上が尿糞中に回収された（表 2.6.4.6.1-1）

静脈内投与後168 h までにケージ洗浄液中の放射能を含めて，投与量の平均95.4%の放射能が回収（糞中：79.4%，尿中：11.6%）され，糞中排泄が主であった。放射能の排泄は速やかであり，投与後24 h 以内に投与量の平均69.6%（尿糞中，ケージ洗浄液，呼気中放射能の合計）が回収された。

雄ラット（Wistar）に本薬を単回で経口（5 mg/kg）及び静脈内投与（1.5 mg/kg）したときの未変化体の尿中排泄を調べたところ，未変化体としての尿中への排泄は，経口及び静脈内投与後にそれぞれ2.1%及び3.6%と少なかった。また，雄カニクイザルに本薬を単回経口投与（3 mg/kg）したときも未変化体としての尿中への排泄は，投与量の約1%と少なかった。これらの結果より，本薬のクリアランスにおける腎排泄の寄与は少ないと考えられた。

表 2.6.4.6.1-1　雄ラットに[^{14}C] RO7034067を経口投与したときの尿糞中への放射能の累積排泄率（0～168 h での投与量に対する%）

試料	白色ラット	有色ラット	平均 ± SD
尿	7.93，8.27	7.01	7.74 ± 0.652
糞	87.1，87.0	82.1	85.4 ± 2.86
合計[1)]	96.2，96.0	90.2	94.1 ± 3.41

[1)]：ケージ洗浄液中の放射能を含む　（4.2.2.3-5 Table 14を改変）
白色及び有色ラットのデータは個別値

2.6.4.6.2　胆汁中排泄

（資料番号4.2.2.4-1）

胆管カニューレを挿入した雄ラット（Wistar）に[^{14}C] RO7034067 5 mg/kg（経口）又は2 mg/kg（静脈内）を単回投与したときの胆汁中への放射能の排泄率を調べた。

投与後48 h までの投与放射能に対する胆汁中総排泄率は，2例の平均で経口及び静脈内投与後にそれぞれ8.0%（6.7%，9.2%）及び19.1%（15.9%，22.2%）であった。未変化体としての排泄は少なく，投与量のそれぞれ0.6%及び0.8%であった。いずれの投与経路でも投与量の2%を超える単一の代謝物の排泄は認められなかった（2.6.4.5.7.3）。

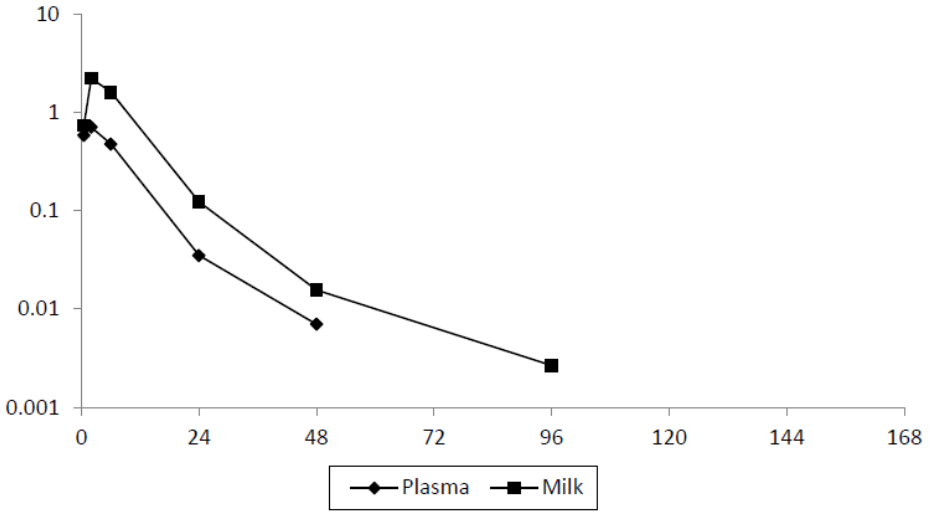
2.6.4.6.3　乳汁中排泄

（資料番号4.2.2.5-3）

授乳ラット（Sprague Dawley，分娩後約10日目）に[^{14}C] RO7034067を単回経口投与後，乳汁及び血漿中の放射能濃度を経時的に測定した。

[^{14}C] RO7034067は乳汁に移行し，乳汁及び血漿中放射能はいずれも投与後2 h にピークに達した後，それぞれ14及び7.68 h の半減期で消失した（図 2.6.4.6.3-1）。乳汁中濃度は血漿中に比較して高く，乳汁対血漿中濃度比の平均は1.25～3.5であった。動物個体間でのばらつきは少なかった。

図 2.6.4.6.3-1　乳汁及び血漿中の放射能濃度推移（平均）



（4.2.2.5-3 Figure 1を再掲）

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1　CYP に対する阻害及び誘導能

ヒト肝ミクロソームを用いて各 CYP 分子種プローブ基質の代謝に対する本薬及び M1の阻害能について *in vitro* で評価した。プローブ基質には phenacetin（CYP1A2），bupropion（CYP2B6），amodiaquine（CYP2C8），diclofenac（CYP2C9），(S)-mephenytoin（CYP2C19），dextromethorphan（CYP2D6），midazolam（CYP3A4）及び testosterone（CYP3A4）を用いた。

また，ヒト凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験系において，本薬及び M1の CYP1A2，2B6，2C8，2C9，2C19及び3A4の mRNA に対する誘導能を評価した。陽性対照に omeprazole（CYP1A2），phenobarbital（CYP2B6）及び rifampicin（CYP2C8，2C9，2C19及び3A4）を用いた。

1)　本薬の CYP 阻害（*in vitro*）

（資料番号4.2.2.6-1）

CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19及び2D6に対する本薬の IC_{50}はいずれも>12.5 μmol/L，CYP3A4に対しては11 μmol/L であり，いずれの CYP 分子種に対しても顕著な阻害能は認められなかった。またヒト肝ミクロソームを30 min プレインキュベーションしたときの時間依存性の阻害試験の結果，CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19及び2D6に対する IC_{50}はいずれも>12.5 μmol/L であり，阻害は認められなかった（表 2.6.4.7.1-1）。一方，CYP3A4に対する本薬の時間依存性阻害の IC_{50}（4.8 μmol/L（midazolam）及び4.1μmol/L（testosterone））は，プレインキュベーションなしの IC_{50}（> 12.5 μmol/L（midazolam）及び > 11 μmol/L（testosterone））に比べて低下し，本薬による CYP3A4の時間依存性の阻害が確認された。CYP3A4に対する最大不活性化速度定数（K_{inact}）は0.065 min^{-1}，最大不活性化速度の50%の速度をもたらす阻害薬の濃度（K_I）は13 μmol/L と推定された。

これらの結果より，本薬は CYP3A4に対して弱い阻害能を示すが，他の CYP 分子種に対する阻害能はないと考えられた。

表 2.6.4.7.1-1　ヒト肝ミクロソームにおける本薬の各 CYP 分子種に対する阻害能

CYP 分子種	基質	直接阻害	時間依存性阻害
		本薬 IC_{50} (μmol/L)	
CYP1A2	Phenacetin	>12.5	>12.5
CYP2B6	Bupropion	>12.5	>12.5
CYP2C8	Amodiaquine	>12.5	>12.5
CYP2C9	Diclofenac	>12.5	>12.5
CYP2C19	(S)-Mephenytoin	>12.5	>12.5
CYP2D6	Dextromethorphan	>12.5	>12.5
CYP3A4	Midazolam	>12.5	4.8
CYP3A4	Testosterone	11	4.1

（4.2.2.6-1 Table 1を改変）

2)　M1 の CYP 阻害（*in vitro*）

（資料番号4.2.2.6-2）

CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19，2D6及び3A4に対する M1の IC_{50}はいずれも>10 μmol/L であり，いずれの CYP 分子種に対しても顕著な阻害能は認められなかった。また，これらの CYP 分子種について時間依存性の阻害の有無を評価した結果，CYP3A4に対する M1の IC_{50}は7.5 μmol/L（midazolam）及び9.3 μmol/L（testosterone）であり，時間依存性の阻害を示し，K_{inact} 値は0.063 min^{-1}，K_I 値は13.7 μmol/L と推定された。その他の CYP 分子種に対する時間依存性の阻害は認められなかった（表 2.6.4.7.1-2）。

これらの結果より，M1は CYP3A4に対して時間依存性の阻害能を示すが，他の CYP 分子種

に対する阻害能はないと考えられた。

表 2.6.4.7.1-2 ヒト肝ミクロソームにおける M1の各 CYP 分子種に対する阻害能

CYP 分子種	基質	直接阻害	時間依存性阻害
		M1 IC_{50} (μmol/L)	
CYP1A2	Phenacetin	>10	>10
CYP2B6	Bupropion	>10	>10
CYP2C8	Amodiaquine	>10	>10
CYP2C9	Diclofenac	>10	>10
CYP2C19	(S)-Mephenytoin	>10	>10
CYP2D6	Dextromethorphan	>10	>10
CYP3A4	Midazolam	>10	7.5
CYP3A4	Testosterone	>10	9.3

（4.2.2.6-2 Table 10～54を改変）

3) 本薬及び M1 の CYP 誘導（*in vitro*）

（資料番号4.2.2.6-3，4.2.2.6-4）

本薬0.1，1及び10 μmol/L での CYP1A2，2B6及び3A4の誘導能について2回の試験（2ドナー）を行った結果，いずれの CYP 分子種に対しても mRNA 発現の濃度依存的な上昇は認められず，陽性対照の誘導倍率に対して20%以内であった（表 2.6.4.7.1-3）。したがって，本薬の CYP1A2，2B6及び3A4に対する誘導能はないと考えられた。

表 2.6.4.7.1-3 ヒト肝細胞における本薬による各 CYP 分子種に対する誘導能

	CYP1A2 mRNA		CYP2B6 mRNA		CYP3A4 mRNA	
	Fold	% of positive control	Fold	% of positive control	Fold	% of positive control
Risdiplam						
0.1 μmol/L	1.12 ± 0.18 0.77 ± 0.11	0.02 <1.00	1.28 ± 0.06 0.73 ± 0.06	0.07 <1.00	2.76 ± 1.92 0.84 ± 0.54	5.17 <1.00
1 μmol/L	0.95 ± 0.11 0.81 ± 0.04	<1.00 <1.00	1.03 ± 0.47 0.90 ± 0.09	<1.00 <1.00	0.76 ± 0.15 1.23 ± 0.51	<1.00 0.56
10 μmol/L	1.09 ± 0.24 0.62 ± 0.02	0.02 <1.00	0.82 ± 0.07 0.63 ± 0.04	<1.00 <1.00	0.34 ± 0.07 0.56 ± 0.30	<1.00 <1.00
Omeprazole						
1 μmol/L	111.32 ± 14.67 1.69 ± 0.13	18.74 3.26	1.31 ± 0.22 ND	0.93 −	1.23 ± 0.32 ND	0.46 −
10 μmol/L	589.61 ± 24.75 6.29 ± 0.32	100 25.0	3.00 ± 0.58 ND	46.88 −	7.46 ± 0.60 ND	19.63 −
100 μmol/L	− 22.2 ± 1.17	− 100	− ND	− −	− ND	− −
Phenobarbital						
10 μmol/L	− ND	− −	− 1.03 ± 0.26	− 0.63	− ND	− −
100 μmol/L	− ND	− −	− 2.27 ± 0.41	− 24.3	− ND	− −
1000 μmol/L	− ND	− −	− 6.24 ± 0.39	− 100	− ND	− −
Rifampicin						
0.1 μmol/L	− ND	− −	− ND	− −	− 6.53 ± 1.26	− 13.6
1 μmol/L	1.29 ± 0.44 ND	0.05 −	4.85 ± 3.27 ND	97.17 −	26.58 ± 0.47 28.2 ± 3.36	78.49 66.7
10 μmol/L	1.17 ± 0.11 ND	0.03 −	4.96 ± 1.49 ND	100 −	33.57 ± 3.64 41.7 ± 8.31	100 100
0.1% DMSO	1.00 ± 0.04 1.02± 0.19	0.00 0.00	1.25 ± 0.81 1.01± 0.15	0.00 0.00	1.08 ± 0.47 1.05 ± 0.34	0.00 0.00

2ドナーでの個別の結果（値はそれぞれ3回測定の平均 ± 標準偏差） （4.2.2.6-3 Table 1及び2を改変）
ND：測定無し
−：該当せず

また，M1による CYP1A2，2B6，2C8，2C9，2C19及び3A4の誘導能について評価した結果，いずれの CYP 分子種に対しても1 μmol/L の濃度まで mRNA 発現の上昇は2倍以内であり，かつ陽性対照の誘導倍率に対して20%以内であった。したがって，本薬に加え M1についてもこれら CYP 分子種に対する誘導能はないと考えられた。

2.6.4.7.2 トランスポーターに対する影響

1) 本薬の排泄トランスポーターMDR1 を介する *in vitro* 基質輸送阻害

（資料番号4.2.2.6-5, 4.2.2.6-7）

MDR1に対する本薬の阻害能を MDR1を発現させた LLC-PK1細胞（LLC-PK1-MDR1細胞）を用いて評価した。

MDR1の典型基質である digoxin 5 μmol/L の efflux ratio（平均23.8）は，典型阻害薬である zosuquidar 1 μmol/L により1.2に低下したが，本薬10及び20 μmol/L 存在下での efflux ratio は

17.8及び15.7と低下はわずかであった。また，digoxin 5 µmol/L の efflux ratio（平均10.7）は zosuquidar 1 µmol/L により低下（1.2）したが，本薬10及び20 µmol/L 存在下では低下はわずか（6.9及び7.4）であった。これらの結果より，本薬は20 µM までの濃度で MDR1を介する digoxin 輸送をほとんど阻害しないことが示された。

MDR1を発現させた MDCKII 細胞（MDCKII-MDR1細胞）を用いて行った同様の別試験において，本薬 5及び50 µmol/L 存在下で efflux ratio の顕著な低下は認められなかった。

以上の2試験の結果より，本薬は50 µmol/L までの濃度で digoxin 輸送を阻害しないと考えられた。

2) M1 の排泄トランスポーターMDR1 を介する *in vitro* 基質輸送阻害

（資料番号4.2.2.6-8）

MDR1に対する M1の阻害能を LLC-PK1-MDR1細胞を用いて評価した結果，digoxin 5 µmol/L における efflux ratio は平均10.3～15.3（3回評価）であり，zosuquidar 1 µmol/L 存在下で efflux ratio は1.3～1.4に低下した。一方，M1 10及び50 µmol/L 存在下では efflux ratio 9.9及び3.1と高濃度では低下し，M1による MDR1に対する弱い輸送阻害（IC_{50}：>10 µmol/L）が確認された。

これらの結果より，M1は MDR1に対して弱い阻害能を示すと考えられた。

3) 本薬及び M1 の排泄トランスポーターBCRP を介する *in vitro* 基質輸送阻害

（資料番号4.2.2.6-10）

BCRP 輸送に対する本薬（1及び20 µmol/L）の阻害能をヒト BCRP を過剰発現させた MDCKII 細胞（MDCKII-BCRP 細胞）を用いて評価した結果，BCRP の典型基質 RO7020322（2 µmol/L）の MDCKII-BCRP 細胞における efflux ratio は平均9.2及び8.1であり，典型阻害薬である Ko143（1 µmol/L）存在下では平均1.2に低下した。一方，本薬 1及び20 µmol/L 存在下でのそれぞれの efflux ratio は 平均9.3及び4.9であり，ほとんど阻害されなかった。

また，M1の BCRP 輸送阻害能を評価した結果，RO7020322（2 µmol/L）の MDCKII-BCRP 細胞における efflux ratio は平均9.2及び8.1であり，Ko143（1 µmol/L）存在下では平均1.2及び1.0に低下した。一方，M1 1及び10 µmol/L 存在下ではそれぞれの efflux ratio は 平均5.4及び1.3であり，M1 10 µmol/L 存在下で低下した。M1 0.01～10 µmol/L 存在下で算出した IC_{50}値は2.29 ± 0.36 µmol/L であった。

これらの試験結果より，BCRP に対して本薬はほとんど阻害しないが，M1は阻害能を有すると考えられた。

4) 本薬の取り込みトランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び基質輸送阻害

（資料番号4.2.2.6-11, 4.2.2.6-7）

本薬（1 µmol/L）が OATP1B1及び OATP1B3の基質になる可能性についてヒト肝細胞を用いて調べたところ，OATP1B1及び OATP1B3の典型基質である rosuvastatin（10 µmol/L）の肝取り込みは典型阻害薬である rifamycin SV（100 µmol/L）存在下で阻害されたのに対して，本薬の取り込みは rifamycin SV により阻害されなかった。

本試験結果より，本薬は OATP1B1及び OATP1B3の基質ではないと考えられた。

各取り込みトランスポーター（OATP1B1，OATP1B3，OAT3，OAT1，OCT2，MATE1及び MATE2-K）に対する本薬の阻害能を OATP1B1，OATP1B3及び OAT3の安定発現 HEK293FT 細胞，OAT1及び OCT2の安定発現 CHO 細胞，並びに MATE1及び MATE2-K の安定発現 MDCKII 細胞を用いて評価した。典型基質は $E_2$17βG（OATP1B1），CCK-8（OATP1B3），PAH（OAT1），E3S（OAT3）及び metformin（OCT2, MATE1, MATE2-K）を用い，典型阻害薬としては，rifampicin（OATP1B1, OATP1B3），probenecid（OAT1, OAT3），verapamil（OCT2）及

び pyrimethamine（MATE1, MATE2-K）を用いた。

試験の結果，本薬は OATP1B1，OATP1B3，OAT1及び OAT3に対して50 μmol/L までの濃度で明らかな阻害を示さなかった。一方，OCT2，MATE1及び MATE2-K に対しては阻害能を示し，IC_{50}値はそれぞれ8.72，0.15及び0.09 μmol/L であった。

5) M1 の取り込みトランスポーターを介する *in vitro* 基質輸送阻害

（資料番号4.2.2.6-9, 4.2.2.6-8）

OAT1，OAT3，OCT2，MATE1及び MATE2-K に対する M1の阻害能を OAT1，OAT3及び OCT2の安定発現 HEK293FT 細胞，MATE1及び MATE2-K の安定発現 MDCKII 細胞を用いて評価した。典型基質薬は PAH（OAT1），E3S（OAT3）及び metformin（OCT2, MATE1, MATE2-K）を，典型阻害薬として benzbromarone（OAT1），probenecid（OAT3），varapamil（OCT2）及び pyrimethamine（MATE1, MATE2-K）を用いた。

結果は，OAT3に対して M1は20 μmol/L の濃度で阻害しなかった。一方，OAT1，OCT2，MATE1及び MATE2-K に対しては，20 μmol/L の濃度でそれぞれ34，45，77及び54%阻害し，IC_{50}値は OCT2及び MATE2-K に対して20 μmol/L 以上，MATE1に対しては14.8 μmol/L であった。

OATP1B1及び OATP1B3に対する M1の阻害能を OATP1B1あるいは OATP1B3を発現させた CHO 細胞を用いて評価した。典型基質は pravastatin（OATP1B1）及び rosuvastatin（OATP1B3）を，典型阻害薬としては rifamycin SV（OATP1B1, OATP1B3）を用いた。

Pravastatin 5 μmol/L の OATP1B1発現細胞における取り込み量は平均20.8 pmol/mg/min であり，M1（10及び50 μmol/L）の存在下ではそれぞれ22.6及び15.0 pmol/mg/min とほとんど変化しなかった。また，rosuvastatin 10 μmol/L の OATP1B3 発現細胞における取り込み量は37.4 pmol/mg/min であり，M1（10及び50 μmol/L）の存在下ではそれぞれ43.1及び50.3 pmol/mg/min とほとんど変化しなかった。これらの結果より，M1は OATP1B1及び OATP1B3の基質輸送を阻害しないと考えられた。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

該当なし。

2.6.4.9 考察及び結論

本薬は *in vitro* で良好な膜透過性を有し，MDR1の基質にならない。また，主に肝臓で代謝され，小腸での代謝寄与は小さい。これら *in vitro* での試験結果から推察されるように，本薬をラット及びカニクイザルに経口投与したとき，これらの動物種での F はそれぞれ平均で>100%（ラット）及び43%（サル）と良好であった。静脈内投与後の本薬の CL はおおよそ5～10 mL/min/kg と小さく，$t_{1/2}$は約5 h であった。V_{ss} は2～3 L/kg と中程度であり各動物種の全身水分量[1)] を超える値であった。ラット及びカニクイザルに本薬を1日1回26及び39週間反復経口投与したとき，曝露量は投与量にほぼ比例して増加した。最終投与後の曝露量は初回投与後と比較して最大で約3倍であり，顕著な蓄積性は認められなかった。

本薬の血漿蛋白結合率をヒト，サル，ラット，ウサギ及びマウスで評価したところ，試験したすべての動物種で類似しており非結合型分率が10%～16%の範囲であった。ヒト血漿中の主な結合蛋白はアルブミンであり，α1酸性糖蛋白への結合は認められなかった。ラットの非結合型分率及び血漿中未変化体半減期は日齢に依存し，幼若であるほど非結合型分率が高く半減期は長かったが，離乳後は成熟動物と同様の値となった。幼若ラットで半減期が長い理由として，本薬のクリアランス経路が離乳前ではまだ十分に成熟していない可能性が考えられる。白色及び有色ラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与後の組織内分布を調べた結果，放射能は標的組織である脳及び筋肉を含む各組織に広く分布し，中程度の V_{ss} 値を反映していた。放射能の分布は速やかであり，多くの組織で投与後2 h に最高濃度を示した。各組織中放射能は，投与

後168 h ではほとんどの組織で定量下限未満となったが，有色ラットの眼のブドウ膜では投与後168 h でも顕著な放射能が検出され，本薬のメラニンへの強い親和性が示唆された。妊娠16日目のラットに[^{14}C] RO7034067を単回経口投与したところ，放射能の胎児への移行が認められた。

本薬は *in vitro* 及び *in vivo* で代謝的に安定であり，ラット及びカニクイザルに経口投与後の血漿中の主な存在形態は未変化体である。本薬は主に肝代謝によって消失し，腎クリアランスの寄与は小さい。本薬の主要代謝関与酵素は FMO 及び CYP3A であり，FMO の寄与が高いと考えられる。本薬投与後，ヒト血漿中に検出された主要代謝物は M1である。M1は薬理活性を有さず，マウス，ラット，ウサギ及びサル血漿中でも代謝物として検出されている。本薬はヒト肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験系において共有結合性を示す反応性代謝物の産生値は低い範囲にあり，肝臓で本薬の反応性代謝物が過剰に産生されることによって毒性が発現するリスクは低いと考えられる。

ラットにおいて本薬及びその代謝物はほぼ完全に尿糞中に排泄された。大部分は糞中への排泄であり，存在形態としては未変化体が最も多かった。胆汁及び尿中への未変化体としての排泄は少なく，ラットでは投与量の1%程度であった。単一代謝物としては，尿，糞中とも投与量の数%以下の排泄であり少なかった。

本薬は CYP に対する誘導能は認められず，CYP3A4を除いて阻害能も有していない。本薬はCYP3A4に対しては弱い阻害能（IC_{50}値11 µmol/L）を有し，M1は CYP3A4に対して時間依存性の阻害能（K_{inact} 値は0.063 min^{-1}，K_I 値は13.7 µmol/L）を示した。また，本薬は CYP3A4の基質になることから，CYP3A4で主に代謝される薬物又は CYP3A4の強い阻害剤との併用時には，併用薬物又は本薬の曝露量が上昇する可能性を否定できない。しかし，臨床薬物相互作用試験において，ミダゾラムを併用してもミダゾラムの曝露量に臨床的に重要な違いはみられず（2.7.2.2.1.4），イトラコナゾールを用いた臨床薬物相互作用試験の結果（2.7.2.2.1.1.4），CYP3A4の阻害による本薬の PK への影響がわずか（C_{max} で9%低下，$AUC_{0\text{-}120h}$ で11%増加）であったことから，本薬が CYP3A4を介した薬物相互作用に関与する可能性は低いと考える。

本薬は MDR1，OATP1B1，OATP1B3，OAT1及び OAT3を阻害しない。そのため，これらのトランスポーターの基質となる他の薬物の PK に影響を与える可能性は低い。一方，本薬は OCT2，MATE1及び MATE2-K に対しては阻害能を有するため，これらトランスポーターの基質となる他剤と併用した場合に薬物相互作用が生じる可能性を完全に除外することはできない。しかしながら，OCT2に対する本薬及び M1の IC_{50}はそれぞれ8.7 µmol/L（約3.5 µg/mL）及び20 µmol/L（約8 µg/mL）以上であり，本薬18 mg 投与時の健康成人における本薬 C_{max} の平均値（93.2 ng/mL）と比較して高値であることから，臨床においては薬物相互作用の可能性はほとんどないと考えられる。MATE1及び MATE2-K に対する本薬の IC_{50}はそれぞれ0.15 µmol/L（約60 ng/mL）及び0.09 µmol/L（約36 ng/mL）であり，M1の IC_{50}はそれぞれ14.8 µmol/L（約6 µg/mL）及び20 µmol/L（約8 µg/mL）以上であった。M1については C_{max} と比較して高値であり，薬物相互作用の可能性は低いと考えられるが，本薬では C_{max} とほぼ同レベルの値であった。本薬の MATE1及び MATE2-K に対する阻害のリスク評価を「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」（平成30年7月23日 薬生薬審発 0723 第4号）の図2-7に従って行った結果，MATE1及び MATE2-K の値はそれぞれ1.17及び1.28となり，ガイドラインに記載の評価基準値（1.02）を上回った。本剤を MATE1又は MATE2-K 基質と併用したときの臨床的意義については，それぞれのトランスポーターに特異的な基質が存在しないことから評価できていないが，臨床試験において OCT2，MATE1及び MATE2-K により輸送される生体内物質である[2)] クレアチニンの濃度上昇は認められていない（5.3.3.5-1）。

2.6.4.10 図表

図表は必要に応じ本文中に記載した。

2.6.4.11 参考文献

1） Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res 1993;10:1093-5.

2） Chu X, Bleasby K, Chan GH, Nunes I, Evers R. The complexities of interpreting reversible elevated serum creatinine levels in drug development: Dose a correlation with inhibition of renal transporters exist? Drug Metab Dispos 2016;44:1498-509.

目次

2.6.5 薬物動態試験概要表 5
2.6.5.1 薬物動態試験一覧表 5
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 9
2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収 11
2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収 18
2.6.5.5 薬物動態試験：組織内分布 23
2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合 31
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 37
2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験 43
2.6.5.9 薬物動態試験：*In Vivo* における代謝 44
2.6.5.10 薬物動態試験：*In Vitro* における代謝 48
2.6.5.11 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 57
2.6.5.12 薬物動態試験：排泄 58
2.6.5.13 薬物動態試験：胆汁中排泄 61
2.6.5.14 薬物動態試験：その他 74

表一覧

表 2.6.5.1-1 薬物動態試験一覧 5
表 2.6.5.2-1 分析方法及びバリデーション試験結果 9
表 2.6.5.3-1 マウス単回腹腔内投与試験 11
表 2.6.5.3-2 マウス単回経口投与試験 12
表 2.6.5.3-3 ラット単回経口投与試験 13
表 2.6.5.3-4 幼若ラット単回経口投与試験 14
表 2.6.5.3-5 ラット単回経口及び静脈内投与試験 15
表 2.6.5.3-6 ウサギ単回経口投与試験 16
表 2.6.5.3-7 サル単回経口及び静脈内投与試験 17
表 2.6.5.4-1 幼若ラット4週間経口投与試験（TK） 18
表 2.6.5.4-2 ラット26週間反復経口投与試験（TK） 19
表 2.6.5.4-3 サル反復投与薬物動態試験 20
表 2.6.5.4-4 サル39週間反復経口投与試験（TK） 21
表 2.6.5.4-5 妊娠ウサギ14日間経口投与試験（TK） 22
表 2.6.5.5-1 ラット組織内分布試験（QWBA） 23
表 2.6.5.5-2 ラット組織内分布試験（未変化体移行性） 27
表 2.6.5.5-3 サル組織内分布試験（未変化体移行性） 29
表 2.6.5.6-1 血漿蛋白結合及び血球移行 31
表 2.6.5.6-2 血漿蛋白結合（M1） 32
表 2.6.5.6-3 幼若動物の血漿蛋白結合（マウス及びラット） 33
表 2.6.5.6-4 幼若動物の血漿蛋白結合（ラット） 34
表 2.6.5.6-5 幼若動物の血漿蛋白結合（サル） 35

表 2.6.5.6-6 ヒト小児血漿蛋白結合 36
表 2.6.5.7-1 妊娠ラットの組織内分布試験 37
表 2.6.5.8-1 *In vitro* メラニン結合 43
表 2.6.5.9-1 ラット及びサルにおける代謝（血漿中代謝物） 44
表 2.6.5.9-2 ラットにおける代謝（胆汁，尿及び糞中代謝物） 45
表 2.6.5.10-1 肝ミクロソーム及び肝細胞における代謝物 48
表 2.6.5.10-2 M1の *in vitro* 代謝 50
表 2.6.5.10-3 主代謝酵素 52
表 2.6.5.10-4 反応性代謝物 55
表 2.6.5.10-5 ヒト肝ミクロソームにおける代謝（バッチ間の比較） 56
表 2.6.5.12-1 ラットに単回投与後の放射能の尿糞中排泄 58
表 2.6.5.12-2 乳汁中排泄 60
表 2.6.5.13-1 本薬の CYP 阻害（ヒト肝ミクロソーム） 62
表 2.6.5.13-2 M1の CYP 阻害（ヒト肝ミクロソーム） 64
表 2.6.5.13-3 CYP 誘導（ヒト肝細胞） 65
表 2.6.5.13-4 本薬及び M1の CYP 誘導（ヒト肝細胞） 66
表 2.6.5.13-5 本薬の排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び基質輸送阻害：MDR167
表 2.6.5.13-6 本薬のマウス P-gp (L-Mdr1a)を介する *in vitro* 輸送 68
表 2.6.5.13-7 本薬の取り込みトランスポーターを介する *in vitro* 輸送 69
表 2.6.5.13-8 本薬の排泄又は取り込みトランスポーターを介する基質輸送阻害 70
表 2.6.5.13-9 M1の排泄又は取り込みトランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び基質輸送阻害 71
表 2.6.5.13-10 本薬及び M1の排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び基質輸送阻害：BCRP 72
表 2.6.5.13-11 M1の取り込みトランスポーターを介する基質輸送阻害 73

略語一覧

略語	英名	和名
AUC	Area under the concentration-time curve	濃度–時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	Area under the concentration-time curve from time 0 to 24 h	0～24時間までの濃度–時間曲線下面積
AUC_{all}	Area under the concentration-time curve from zero to T_{last} and including the area extrapolated from the T_{last} to 24 h post-dose	投与後定量可能時間及びその後24時間までの濃度–時間曲線下面積
AUC_{last}	Area under the concentration-time curve from time zero to the last measurable concentration	投与後定量可能時間までの濃度–時間曲線下面積
AUC_{inf}	Area under the concentration-time curve from time zero to infinity	無限時間までの濃度–時間曲線下面積
$AUC_{[rest]}$	% of AUC_{inf} due to extrapolation from T_{last} to infinity	最終の濃度測定時間から無限時間までの AUC の%
$AUC_{[inf\ extr]}$	% of extrapolated AUC to time infinity	無限時間までの外挿 AUC の%
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
CL	Clearance	全身クリアランス
C_{max}	Maximum concentration	最高濃度
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
CYP	Cytochrome P450	シトクロム P450
DMSO	Dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
F	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
FMO	Flavin-containing monooxygenase	フラビン含有モノオキシゲナーゼ
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	–	還元型グルタチオン
IC_{50}	50% inhibitory concentration	50%阻害濃度
IP	Intraperitoneal	腹腔内
IV	Intravenous	静脈内
K_I	Concentration of inhibitor resulting in 50% of the maximum enzyme inactivation	最大不活性化速度の50%の速度をもたらす阻害薬の濃度
K_{inact}	Maximum inactivation rate constant	最大不活性化速度定数
LC-MS/MS	Liquid chromatography-tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム型質量分析
LSC	Liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MATE	Multidrug and toxin extrusion	–
MATE2-K	Multidrug and toxin extrusion protein 2	–
MRT	Mean residence time	平均滞留時間
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター

略語	英名	和名
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
P_{app}	Apparent permeability coefficient	見かけの膜透過係数
PND	Postnatal day	生後日数
PO	Per os	経口
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白
T_{last}	Time of last measureable concentration	最終の濃度測定時間
T_{max}	Time to maximum concentration	最高濃度到達時間
$t_{1/2}$	Elimination half-life	消失相の半減期
TK	Toxicokinetics	トキシコキネティクス
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
SMA	Spinal muscular atrophy	脊髄性筋萎縮症
V_c	Volume of distribution of central compartment	中央コンパートメントの分布容積
V_{ss}	Volume of distribution at steady-state	定常状態の分布容積

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

表 2.6.5.1-1 薬物動態試験一覧

Test article: Risdiplam

Type of Study	Animal or Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Absorption				
Single dose PK	rat	IV/PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.2-1 [1064409]
Single dose PK	monkey	IV/PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.2-2 [1064410]
Single dose PK	rat	PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.2-3 [1064408]
Single dose PK	rat	PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.2-4 [1078302]
Single dose PK	rabbit	PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.2-5 [1078251]
Multiple dose PK	monkey	PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.2-6 [1078303]
4-week TK	juvenile rat	PO	[redacted]	4.2.2.2-7 (同4.2.3.5.4-3) [1088815]
26-week TK	rat	PO	[redacted]	4.2.2.2-8 (同4.2.3.2-5) [1067365]
39-week TK	monkey	PO	[redacted]	4.2.2.2-9 (同4.2.3.2-9) [1063584]
14-day TK	pregnant rabbit	PO	[redacted]	4.2.2.2-10 (同4.2.3.5.2-5) [1084122]

表 2.6.5.1-1 薬物動態試験一覧（続）

Test article: Risdiplam

Type of Study	Animal or Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Distribution				
Tissue distribution study after multiple dosing	rat	PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.3-1 [1067462]
Tissue distribution study after multiple dosing	monkey	PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.3-2 [1065261]
Single dose PK	mice	IP	[redacted] USA)	4.2.2.3-3 [1063287]
Single dose PK	mice	PO	[redacted] USA)	4.2.2.3-4 [1063715]
QWBA study	rat	IV/PO	[redacted] UK)	4.2.2.3-5 [1065260]
Plasma protein binding Blood plasma partitioning	Rabbit, mouse, rat, monkey and human plasma Rat, monkey, and human whole blood	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.3-6 [1066030]
Plasma protein binding of metabolite M1 (RO7112063)	Rabbit, mouse, rat, monkey and human plasma	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.3-7 [1084838]
Plasma protein binding in plasma of neonatal to adult rodents	Mouse and rat plasma	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.3-8 [1068283]
Plasma protein binding in plasma of neonatal to adult rats	Rat plasma	–	[redacted] Switzerland)	4.2.2.3-9 [1074560]
Plasma protein binding in plasma of neonates to adults	Human plasma	–	[redacted] Switzerland)	4.2.2.3-10 [1077760]
Plasma protein binding in plasma of monkeys at different ages	Monkey plasma	–	[redacted] Switzerland)	4.2.2.3-11 [1090306]
Melanin binding	Natural melanin from *Sepia officinalis*	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.3-12 [1066867]
QWBA study in pregnant rats (GLP)	Pregnant or nulliparous rat	PO	[redacted] UK)	4.2.2.3-13 [1084364]

表 2.6.5.1-1 薬物動態試験一覧（続）

Test article: Risdiplam

Type of Study	Animal or Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Metabolism				
In vivo metabolite characterization using [^{14}C]-risdiplam	Naïve and bile-duct cannulated rats	IV/PO	[redacted] ([redacted] UK)	4.2.2.4-1 [1068338]
Enzyme phenotyping of risdiplam and metabolite M1 (RO7112063)	Human liver microsomes, FMO and CYP450 enzymes	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.4-2 [1092235]
Enzyme phenotyping	Human liver, intestine and kidney microsomes, FMO and CYP450 enzymes	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.4-3 [1066973]
Covalent binding	Human liver microsomes	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.4-4 [1066482]
Plasma metabolite identification	Juvenile and adult rat and monkey plasma	PO	[redacted] ([redacted] UK)	4.2.2.4-5 [1062728]
In vitro metabolism	Human, rat, monkey, mouse, rabbit liver microsomes and hepatocytes human CYP450 enzymes	–	[redacted] ([redacted] UK)	4.2.2.4-5 [1062728]
In vitro metabolism (age-dependency)	Human liver microsomes	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.4-6 [1089229]
Excretion				
^{14}C Excretion study	Rat	IV/PO	[redacted] ([redacted] UK)	4.2.2.5-1 (同4.2.2.3-5) [1065260]
Urinariy excretion of parent drug	Rat	IV/PO	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.5-2 (同4.2.2.2-1) [1064409]
Lacteal secretion (GLP)	Lactating rat	PO	[redacted] ([redacted] UK)	4.2.2.5-3 [1084368]

表 2.6.5.1-1 薬物動態試験一覧（続）

Test article: Risdiplam

Type of Study	Animal or Test System	Method of Administration	Testing Facility	Location in CTD [Report No.]
Pharmacokinetic Drug Interactions				
In vitro CYP inhibition	human liver microsomes	–	[redacted] ([redacted] USA)	4.2.2.6-1 [1090549]
In vitro CYP inhibition of metabolite M1 (RO7112063)	human liver microsomes	–	[redacted] ([redacted] USA)	4.2.2.6-2 [1077033]
In vitro CYP induction	human hepatocytes	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.6-3 [1064537]
In vitro CYP induction of risdiplam and metabolite M1 (RO7112063)	human hepatocytes	–	[redacted] ([redacted] USA)	4.2.2.6-4 [1090966]
Transport proteins substrate/inhibition	human proteins in LLC-PK1 and L-MDR1 cells	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.6-5 [1066927]
Transport protein substrate	murine Mdr1a in LLC-PK1 cells	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.6-6 [1090180]
Transport proteins substrate/inhibition	human proteins in CHO, HEK293FT and MDCKII cells	–	[redacted] ([redacted] Hungary)	4.2.2.6-7 [1067280]
Transport proteins substrate/inhibition of metabolite M1 (RO7112063)	human proteins in LLC-PK1 and CHO cells	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.6-8 [1081903]
Transport proteins inhibition of metabolite M1 (RO7112063)	human proteins in HEK293FT and MDCKII cells	–	[redacted] ([redacted] Hungary)	4.2.2.6-9 [1074124]
BCRP transport protein substrate/inhibition of risdiplam and metabolite M1 (RO7112063)	human BCRP and murine Bcrp1 in MDCKII cells	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.6-10 [1087637]
Transport protein substrate	human hepatocytes	–	F. Hoffmann-La Roche, Ltd. (Basel, Switzerland)	4.2.2.6-11 [1098464]

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

表 2.6.5.2-1 分析方法及びバリデーション試験結果

Test article: Risdiplam, M1

Species/Matrix	Analyte(s)	Calibration Range (ng/mL)	Intra-assay	Inter-assay	Bioanalytical Laboratory	Location in CTD [Report No.]
			Precision (%CV) Accuracy (%bias)	Precision (%CV) Accuracy (%bias)		
マウス/血漿（TK 試験）[1)]	Risdiplam	2.5～2500	0.8%～7.7% −3.2%～16.0%	1.5%～10.1% −1.6%～3.6%	[redacted]	4.2.2.1-6 [1085806]
マウス/血漿（TK 試験）[1)]	M1	0.5～500	1.5%～15.0% −11.3%～5.8%	2.9%～13.9% −5.3%～−1.3%	[redacted]	4.2.2.1-1 [1087031]
ラット/血漿（TK 試験）[1)]	Risdiplam	0.5～500	0.4%～12.8% −4.7%～10.2%	2.2%～9.0% −2.7%～6.8%	[redacted]	4.2.2.1-2 [1066346]
ラット/血漿（TK 試験）[1)]	M1	0.5～500	1.2%～11.4% −8.0%～3.6%	2.3%～11.2% −4.0%～0.4%	[redacted]	4.2.2.1-8 [1087033]
ラット/血漿（PK 試験）[2)]	Risdiplam	5～2500	1.3%～4.9% −2.2%～18.2%	–	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	4.2.2.2-1 [1064409]
ラット/血漿（PK 試験）[2)]	M1	0.25～250	4.0%～10.2% −2.5%～1.5%	–	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	4.2.2.2-4 [1078302]
幼若ラット/血漿（PK 試験）[2)]	Risdiplam	0.5～500	1.5%～2.9% −4.0%～6.8%	–	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	4.2.2.2-3 [1064408]
ウサギ/血漿（TK 試験）[1)]	Risdiplam	10～10000	1.7%～4.7% −5.0%～7.0%	2.5%～5.3% −4.2%～4.0%	[redacted]	4.2.2.1-3 [1084197]
ウサギ/血漿（PK 試験）[2)]	M1	0.25～250	2.8%～6.2% −4.1%～3.0%	–	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	4.2.2.2-5 [1078251]

表 2.6.5.2-1　分析方法及びバリデーション試験結果（続）

Test article: Risdiplam M1

Species/Matrix	Analyte(s)	Calibration Range (ng/mL or g tissue)	Intra-assay	Inter-assay	Bioanalytical Laboratory	Location in CTD [Report No.]
			Precision (%CV) Accuracy (%bias)	Precision (%CV) Accuracy (%bias)		
カニクイザル/血漿（TK 試験）[1)]	Risdiplam	0.5～500	0.7%～9.4% −3.8%～14.0%	2.5%～8.2% −2.4%～7.8%	[redacted]	4.2.2.1-4 [1066347]
カニクイザル/血漿（PK 試験）[2)]	Risdiplam	0.5～2500	1.5%～5.1% −13.1%～−12.5%	–	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	4.2.2.2-2 [1064410]
カニクイザル/血漿（PK 試験）[2)]	M1	0.25～250	– −5.0%～9.9%	–	F. Hoffmann-La Roche Ltd.	4.2.2.2-6 [1078303]
カニクイザル/CSF（TK 試験）[1)]	Risdiplam	0.1～100	1.1%～12.6% −18.1%～3.4%	1.8%～11.5% −10.7%～2.6%	[redacted]	4.2.2.1-5 [1068360]
カニクイザル/脳組織（TK 試験）[2)]	Risdiplam	10～10000	0.9%～3.8% −13.0%～−12.5%	–	[redacted]	4.2.2.2-9 (同4.2.3.2-9) [1063584]
カニクイザル/皮膚及び眼組織（TK 試験）[2)]	Risdiplam	0.250～250	6.6%～8.0% −6.5%～−4.1%	–	[redacted]	4.2.2.2-9 (同4.2.3.2-9) [1063584]

1) バリデーション試験を実施して妥当性が保証された方法
2) 測定時の信頼性が確保された方法
− 未評価

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収

表 2.6.5.3-1 マウス単回腹腔内投与試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-3
Report No.: 1063287

Species	Mouse (Wild-type/heterozygous mice from delta7 colony, PND10)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/F pups/3 per time point; total: 18
Vehicle/Formulation	100% DMSO
Method of Administration	IP
Feeding condition	Not specified
Dose (mg/kg)	3
Sample	Plasma, brain
Sampling time	1, 2, 4, 7, 16 and 24 h postdose
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

PK parameters	Plasma	Brain tissue
T_{max} (h)	2	1
C_{max} (ng/mL for plasma, ng/g for tissue)	208	190
AUC_{last} (ng·h/mL for plasma, ng·h/g for tissue)	2160	1710

表 2.6.5.3-2 マウス単回経口投与試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-4
Report No.: 1063715

Specie	Mouse (wt C/C-allele FVB colony)
Sex (M/F)/No. of Animals	F/3 per time point; total: 15
Vehicle/Formulation	0.5% Hydroxypropyl methylcellulose, 0.1% Tween 80
Method of Administration	PO (gavage)
Feeding condition	Ad libitum
Dose (mg/kg)	10
Sample	Plasma, brain tissue
Sampling time	1, 2, 4, 7 and 24 h postdose
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

PK parameters	Plasma	Brain tissue
T_{max} (h)	1	1
C_{max} (ng/mL for plasma, ng/g for tissue)	818	592
AUC_{last} (ng·h/mL for plasma, ng·h/g for tissue)	8960	3400
AUC_{all} (ng·h/mL for plasma, ng·h/g for tissue)	8960	6710
AUC_{inf} (ng·h/mL for plasma, ng·h/g for tissue)	9050	9500
Brain/plasma ratio (based on AUC_{all})	–	0.75

表 2.6.5.3-3 ラット単回経口投与試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-4
Report No.: 1078302

Species	Rat (Wistar)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/3
Vehicle/Formulation	20% 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in water
Method of Administration	PO (gavage)
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg)	3 (nominal dose)
Sample	Plasma
Sampling time	0.5, 1, 2, 4, 7 and 24 h postdose
Analyte	risdiplam, metabolite M1 (RO7112063)
Assay	LC-MS/MS

PK parameters	**Risdiplam**			**Metabolite M1 (RO7112063)**		
	Median	**Maen**	**CV(%)**	**Median**	**Mean**	**CV (%)**
C_{max} (ng/mL)	–	395	13	–	132	12.6
T_{max} (h)	2	1.67	1-2 (range)	2	2	0
$t_{½}$ (h)	5.52	5.44	2.61	4.60	4.61	1.70
T_{last} (h)	24	24	0	24	24	0
AUC_{last} (ng·h/mL)	–	3980	15.6	–	1440	15.7
AUC_{inf} (ng·h/mL)	–	4140	15.4	–	1480	15.6
$AUC_{[inf_extr]}$ (%)	–	4.08	8.58	–	2.62	10.7
MRT (inf) (h)	6.86	6.96	3.37	6.58	6.62	3.22
M1/parent $AUC_{(0\text{-}last)}$ (%)	–	–	–	37.0	36.3	5.02

Actual dose : 3.21 mg/kg

表 2.6.5.3-4 幼若ラット単回経口投与試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-3
Report No.: 1064408

Species	Rat (Wistar)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/F pups/3/time point (33 total) M adult/3/time point (4 total)
Vehicle/Formulation	Microsuspension in 10 mmol/L L-ascorbic acid/ 0.01 mg/mL Na-thiosulfate pentahydrate (pH 3)
Method of Administration	PO (gavage)
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg)	5 (nominal dose)
Sample	Plasma
Sampling time	0.25, 0.5, 1, 3, 7 and 24 h postdose
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

PK parameters	**M/F (PND 4) n=3**	**M/F (PND 12) n=3**	**M/F (PND 21) n=3**	**M (adult) n=3**
T_{max} (h)	7	7	3	3
C_{max} (ng/mL)	566	461	448	775
$t_{½}$ (h)	15.1	20.4	5.53	5.98
T_{last} (h)	24	24	24	24
AUC_{last} (ng·h/mL)	9950	8930	6820	9670
AUC_{inf} (ng·h/mL)	15600	16600	7230	10300
$AUC_{[rest]}$ (%)	36.2	46.0	5.7	6.2
MRT (tot) (h)	22.9	30.1	8.31	8.06

Actual dose : 5.39 mg/kg (PND 4), 6.09 mg/kg (PND 12), 5.52 mg/kg (PND 21), 5.11 mg/kg (adult)
$AUC_{[rest]}$: $\%AUC_{last\sim inf}$

表 2.6.5.3-5 ラット単回経口及び静脈内投与試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-1
Report No.: 1064409

Species	Rat (Wistar)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/2/group
Vehicle/Formulation	Microsuspension in 0.9% NaCl (PO); solution in 7.5% gelatine, 0.62% NaCl (IV)
Method of Administration	PO (gavage), IV
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg)	5 (PO), 1.5 (IV) (nominal doses)
Sample	Plasma, urine
Sampling time	PO: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7.75 and 23.25 h postdose IV: 0.0833, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7.75 and 23.25 h postdose
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

PK parameters	PO (n=2)	IV (n=2)
Plasma		
T_{max} (h)	1.5	0.292
C_{max} (ng/mL)	1310	1030
$t_{½}$ (h)	6.37	5.02
T_{last} (h)	23.3	23.3
AUC_{last} (ng·h/mL)	11300	3520
AUC_{inf} (ng·h/mL)	12200	3640
$AUC_{[rest]}$ (%)	7.3	3.2
CL (mL/min/kg)	NA	8.90
Vc (L/kg)	NA	1.49
V_{ss} (L/kg)	NA	3.07
F (%) (calculated besed on AUC_{inf})	116.9	NA
Urine		
Total % of dose excreted	2.1	3.6

Actual dose : 5.54 mg/kg (PO), 1.93 mg/kg (IV)
NA : Not applicable

表 2.6.5.3-6 ウサギ単回経口投与試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-5
Report No.: 1078251

Species	Rabbit (Dutch Belted)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/3
Vehicle/Formulation	20% 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in water
Method of Administration	PO (gavage)
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg)	3 (nominal dose)
Sample	Plasma
Sampling time	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24 and 31 h postdose
Analyte	Risdiplam, metabolite M1 (RO7112063)
Assay	LC-MS/MS

PK parameters	**Risdiplam**			**Metabolite M1 (RO7112063)**		
	Median	**Maen**	**CV (%)**	**Median**	**Mean**	**CV (%)**
C_{max} (ng/mL)	–	470	13.4	–	16.2	37.2
T_{max} (h)	1	1.33	1-2 (range)	2	1.67	1-2 (range)
$t_{½}$ (h)	10.3	12.0	25.6	9.89	11.5	36.4
T_{last} (h)	30.5	30.5	0.3	30.5	30.5	0.3
AUC_{last} (ng·h/mL)	–	3410	26.5	–	142	47.2
AUC_{inf} (ng·h/mL)	–	3890	25.2	–	159	46.6
$AUC_{[inf\ extr]}$ (%)	–	12.3	23.7	–	10.9	32.3
MRT (inf) (h)	11.5	12.3	11.8	11.7	12.0	19.6
M1/parent AUC_{last} (%)	–	–	–	4.04	4.55	61.8

Actual dose : 3.59 mg/kg

表 2.6.5.3-7 サル単回経口及び静脈内投与試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-2
Report No.: 1064410

Species	Monkey (cynomolgus)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/3/group
Vehicle/Formulation	2.1% Citric acid/monohydrate (PO), 30% 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (IV)
Method of Administration	PO (gavage), IV
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg)	0.5 (PO), 0.1 (IV) (nominal doses)
Sample	Plasma
Sampling time	PO: 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24, 31 and 48 h postdose IV: 0.0833, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, 24, 31 and 48 h postdose
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

PK parameters	PO (n=3)	IV (n=3)
T_{max} (h)	2.00	0.25
C_{max} (ng/mL)	79.0	43.2
$t_{½}$ (h)	5.40	4.90
T_{last} (h)	31.0	24.0
$AUC_{0\text{-}24\ h}$ (ng·h/mL)	667	346
AUC_{last} (ng·h/mL)	693	350
AUC_{inf} (ng·h/mL)	699	357
$AUC_{[rest]}$ (%)	0.9	2.0
CL (mL/min/kg)	NA	5.74
Vc (L/kg)	NA	2.94
V_{ss} (L/kg)	NA	2.02
F (%) (calculated besed on AUC_{inf})	42.6	NA

Actual dose : 0.507 mg/kg (PO), 0.110 mg/kg (IV)

NA : Not applicable

T_{max}, T_{last} : Median

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収

表 2.6.5.4-1 幼若ラット4週間経口投与試験（TK）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-7 (同4.2.3.5.4-3)
Report No.: 1088815

Studies are summarized under 2.6.7.15.3

表 2.6.5.4-2 ラット26週間反復経口投与試験（TK）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-8 (同4.2.3.2-5)
Report No.: 1067365

Species	Rat (Wistar)
Sex (M/F)/No. of Animals	6/sex/dose
Vehicle/Formulation	10 mmol/L ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3
Method of Administration	PO (gavage), once daily for 26 weeks
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg)	1, 3, 7.5 (nominal doses)
Sample	Plasma
Sampling time	day 1, day 91 and day 182 : predose, 1, 3, 7 and 24 h postdose
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

Day	Dose (mg/kg)	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		$AUC_{0\text{-}24\ h}$ (ng･h/mL)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
1	1	3	3	92.3	97.6	809	1010
	3	3	1	256	320	2630	3260
	7.5	3	1	786	907	8700	9780
91	1	1	1	198	280	1960	2720
	3	1	1	753	972	8690	8510
	7.5	3	1	1720	1970	21200	20900
182	1	3	1	203	295	2200	2400
	3	1	1	651	768	7010	8830
	7.5	3	1	1140	1170	16100	15700

n=2

表 2.6.5.4-3 サル反復投与薬物動態試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-6
Report No.: 1078303

Species	Monkey (cynomolgus)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/3
Vehicle/Formulation	20% 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin in water
Method of Administration	PO (gavage), once daily for 3 days
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg)	3 (nominal doses)
Sample	Plasma
Sampling time	Day 1 and 3: 0, 0.5, 1, 2, 4, 7 and 24 h postdose
Analyte	Risdiplam, metabolite M1 (RO7112063)
Assay	LC-MS/MS

PK parameters	Risdiplam				Metabolite M1 (RO7112063)			
	Day 1		Day 3		Day 1		Day 3	
	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)	Mean	CV (%)
C_{max} (ng/mL)	622	63.4	788	31.4	79.5	52.3	113	34.1
T_{max} (h)	4/4/4[a)]	–	4/7/4[a)]	–	4/4/4[a)]	–	4/4/4[a)]	–
T_{last} (h)	24/24/24[a)]	–	24/24/24[a)]	–	24/24/24[a)]	–	24/24/24[a)]	–
AUC_{last} (ng·h/mL)	4900	33.1	11300	28.9	605	27.0	1720	33.9
Ratio AUC_{last} Day3/Day1	–	–	2.36	22.7	–	–	2.88	26.6
Ratio C_{max} Day3/Day1	–	–	1.44	29.6	–	–	1.58	36.1
M1/parent AUC_{last} (%)	–	–	–	–	12.4	10.1	15.2	15.0
M1/parent C_{max} (%)	–	–	–	–	13.3	15.8	14.5	23.7

[a)] No mean calculated, individual values presented.

表 2.6.5.4-4 サル39週間反復経口投与試験（TK）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-9 (同4.2.3.2-9)
Report No.: 1063584

Species	Monkey (cynomolgus)
Sex (M/F)/No. of Animals	3/sex/group plus 2/sex/recovery group
Vehicle/Formulation	10 mmol/L ascorbic acid/0.0064 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3
Method of Administration	PO (gavage), once daily for 39 weeks
Feeding condition	Non fasted
Dose (mg/kg)	1.5, 3, 5, 7.5 (nominal doses)
Sample	Plasma
Sampling time	1, 3, 7 and 24 h on study day 1, 12, 26 (week 4, Group 4 only, 1st dosing day of 5 mg/kg), 57, 92, 180 and 267
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

Dose (mg/kg)	Day	T_{max} (h)		C_{max} (ng/mL)		$AUC_{0\text{-}24\ h}$ (ng･h/mL)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
1.5	1	1	1	323 ± 124	422 ± 58.7	1670 ± 247	1780 ± 305
	267	1	1	414 ± 158	396 ± 117	1870 ± 240	2060 ± 350
3	1	1	1	696 ± 391	578 ± 160	3510 ± 826	3730 ± 524
	267	1	1	1000 ± 428	973 ± 247	4880 ± 292	4850 ± 491
7.5[a)]	1	1	3	820 ± 151	1070 ± 268	7570 ± 945	8790 ± 1880
	12	3	1	1020 ± 374	1070 ± 417	11200 ± 4240	10200 ± 2790
5[b)]	26	1	1	683 ± 256	549 ± 158	4810 ± 1070	4900 ± 1300
	267	1	1	701 ± 280	1160 ± 320	5880 ± 733	6470 ± 778

a) 7.5 mg/kg/day administered from study days 1 to 12, no dose administered from study days13 to 25.
b) 5 mg/kg/day administered from study day 26 onwards.
b) Study days 26 and 267 correspond to dosing days 1 and 242 for 5 mg/kg/day, respectively.

表 2.6.5.4-5　妊娠ウサギ14日間経口投与試験（TK）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.2-10 (同4.2.3.5.2-5)
Report No.: 1084122

Studies are summarized under 2.6.7.13.4

2.6.5.5 薬物動態試験：組織内分布

表 2.6.5.5-1 ラット組織内分布試験（QWBA）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-5
Report No.: 1065260

Species	Rat (Wistar, Crl:WI)	Rat (Wistar, Crl:WI)	Rat (Wistar, Crl:WI)	Rat (Lister-Hooded, Crl:LIS)	Rat (Wistar, Crl:WI)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/1 (group A)	M/4 (group B)	M/1 (group C)	M/4 (group D)	M/3 (group E)
Feeding condition	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum
Vehicle/Formulation	Solution containing 0.9% saline solution, pH 3 (concentration of 1.59 mg/mL)	Solution containing 10 mmol/L ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.5 (concentration of 0.844 mg/mL)	Solution containing 10 mmol/L ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.5 (concentration of 0.844 mg/mL)	Solution containing 10 mmol/L ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.5 (concentration of 0.844 mg/mL)	Solution containing 0.9% saline solution, pH 3 (concentration of 1.59 mg/mL)
Method of Administration	IV	PO (gavage)	PO (gavage)	PO (gavage)	IV
Dose (mg/kg)	2	5	5	5	2
Sample	Tissue, plasma	Excreta, tissue, plasma	Excreta, plasma	Excreta, tissue, plasma	Excreta, plasma
Sampling time	10 minutes	2, 24, 72, 168[a)] hours	168 hours	2, 24, 72, 168[a)] hours	168 hours
Radionuclide	^{14}C	^{14}C	^{14}C	^{14}C	^{14}C
Specific activity	2.08 MBq/mg	0.844 MBq/mg	0.844 MBq/mg	0.844 MBq/mg	2.08 MBq/mg
Purity	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%
Assay	QWBA (LSC for plasma and blood)	QWBA, excretion balance at 168h (LSC)	Excretion balance (LSC)	QWBA, excretion balance at 168h (LSC)	Excretion balance (LSC)

表 2.6.5.5-1 ラット組織内分布試験（QWBA）（続）

Group	Tissue/plasma ratio of radioactivity concentarations[b)]								
	A	B	B	B	B	D	D	D	D
Tissues / organs	**10 min**	**2 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**	**2 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Plasma[c)]	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Blood[c)]	0.919	1.02	0.897	1.74	1.42	1.00	0.940	1.62	2.39
Blood (QWBA)	0.808	0.829	0.873	NC	NC	0.776	NC	NC	NC
Adrenal cortex	11.4	15.0	118	579	965	13.6	82.8	429	1060
Adrenal medulla	9.00	23.7	52.8	106	474	12.4	20.8	91.2	239
Aortic wall	1.34	1.67	1.44	NC	NC	1.65	1.58	NC	NC
Bile ducts	10.7	4.57	8.94	44.9	33.5	6.90	16.5	30.9	28.4
Bone marrow	3.53	5.53	5.14	NC	10.5	4.71	6.00	10.7	NC
Bone surface	0.868	0.709	0.972	NC	NC	1.07	NC	NC	NC
Brain	1.05	0.818	NC	NC	NC	0.800	NC	NC	NC
Brown fat	0.917	1.63	2.07	NC	NC	0.860	NC	NC	NC
Bulbo-urethral gland	7.42	11.7	60.8	18.3	25.7	15.3	104	90.2	28.8
Choroid plexus	2.06	2.35	1.38	NC	NC	2.11	NC	NC	NC
Epididymis	1.20	1.43	1.58	NC	NC	1.97	1.53	NC	NC
Epithelial tongue	2.06	2.80	5.33	NC	NC	2.03	6.35	NC	NC
Exorbital lachrymal gland	11.5	31.0	177	30.1	27.6	59.9	284	179	67.7
Fur (non-pigmented)	0.114	NC	NC	34.0	16.9	NC	NC	13.0	51.0
Fur (pigmented)	NA	NA	NA	NA	NA	0.136	1.42	392	1790
Harderian gland	4.37	12.3	12.5	NC	NC	16.0	11.5	8.96	NC
Intra-orbital lachrymal gland	10.3	28.2	151	39.1	32.0	34.7	269	389	402
Kidney cortex	13.1	9.08	23.9	253	120	6.62	18.3	41.7	73.7
Kidney medulla	4.58	4.05	3.57	NC	NC	3.59	3.32	NC	NC
Lens	NC	NC	0.907	NC	NC	NC	4.10[e)]	14.8	NC
Liver	4.64	7.19	10.6	29.7	18.6	6.42	9.61	20.1	32.5
Lung	3.77	7.08	4.17	NC	NC	3.94	3.54	NC	NC
Mandibular lymph node	3.31	4.79	3.61	NC	NC	4.35	3.56	NC	NC
Meibomian glands	1.91	3.51	15.6	45.8	115	7.78	211[e)]	1260	995[e)]
Meninges	0.647	0.945	NC	NC	NC	0.994	1.63	NC	NC
Muscle	1.48	1.23	1.20	NC	NC	1.10	1.24	NC	NC
Myocardium	2.27	2.38	2.44	NC	NC	2.37	2.13	NC	NC
Nasal mucosa	0.648	1.09	3.58	9.29	NC	1.54	3.23	9.25	NC

表 2.6.5.5-1 ラット組織内分布試験（QWBA）（続）

Group	Tissue/plasma ratio of radioactivity concentarations[b)]								
	A	B	B	B	B	D	D	D	D
Tissues / organs	**10 min**	**2 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**	**2 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**
Pancreas	4.72	4.65	3.66	NC	NC	4.49	3.82	NC	NC
Periodontal membrane	2.60	1.80	2.12	NC	NC	1.66	1.31	NC	NC
Pineal body	4.86	5.17	2.68	NC	NC	5.39	5.21	NC	NC
Pituitary	5.55	7.35	5.23	NC	NC	12.1	5.66	NC	337
Preputial gland	5.75	32.1	830	4530	683	51.0	1460	6510	468
Prostate	2.10	3.16	2.94	NC	NC	3.92	4.78	NC	NC
Salivary glands	7.85	12.9	25.6	57.6	26.9	10.1	34.5	159	40.4
Seminal vesicles	0.905	1.56	1.64	NC	NC	1.78	2.04	NC	NC
Skin (non-pigmented)	1.06	1.60	2.00	NC	12.1	1.33	5.53	14.5	NC
Skin (pigmented)	NA	NA	NA	NA	NA	3.27	90.7	213	NC
Spinal cord	0.875	0.725	NC	NC	NC	0.656	NC	NC	NC
Spleen	5.95	7.97	8.23	14.4	22.4	9.39	8.60	18.4	44.4
Stenos gland	16.7	42.8	317	336	NC	72.7	729	354	230
Testis	0.551	1.80	1.77	NC	NC	1.99	2.95	NC	NC
Thymus	2.51	4.64	3.32	NC	NC	4.14	3.67	NC	NC
Thyroid	11.2	5.65	30.7	337	142	5.23	10.3	77.5	65.4
Tongue	1.97	2.04	1.96	NC	NC	1.87	2.28	NC	NC
Tooth pulp	2.83	2.29	2.45	NC	NC	2.08	NC	NC	NC
Trachea	0.289	2.66	1.12	NC	NC	2.29	1.52	NC	NC
Urinary bladder wall	3.10	1.51[e)]	14.1	NC	NC	6.34	10.3	12.6	27.0
Urinary bladder contents	4.21[e)]	11.7	11.4	68.0	NC	4.34	13.7	9.56	NC
Uveal tract/retina	1.84	0.964	2.04	NC	NC	75.7	1990	10100	16700[e)]
White fat	0.090	0.328	NC	NC	NC	0.220	NC	NC	NC
Oesophageal wall	0.768	2.46	2.34	NC	NC	1.75	2.40	NC	NC
Stomach mucosa (fundus)	4.88	3.24[e)]	3.93	NC	NC	9.28[e)]	14.4	NC	NC
Stomach mucosa (non-fundic)	0.998	3.55[e)]	4.01	NC	NC	4.21[e)]	1.83	NC	NC
Small intestine mucosa	1.20[e)]	3.40[e)]	2.61[e)]	NC	NC	4.14[e)]	5.66[e)]	NC	NC
Caecum mucosa	2.15	2.41[e)]	5.65[e)]	NC	NC	3.22	12.0	NC	NC
Large intestine mucosa	1.27	1.50[e)]	2.72[e)]	NC	NC	1.69	9.12[e)]	NC	NC
Rectum mucosa	5.24	4.10	1.64[e)]	NC	NC	1.36	4.66[e)]	NC	NC

表 2.6.5.5-1 ラット組織内分布試験（QWBA）（続）

Group	Blood/plasma concentration ratios of radioactivity, hematocrit and f_E values										
	A	**B**	**B**	**B**	**B**	**C**	**D**	**D**	**D**	**D**	**E**
	10 min	**2 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**	**168 h**	**2 h**	**24 h**	**72 h**	**168 h**	**168 h**[d)]
Plasma[c)] (µg equiv/g)	0.997	0.882	0.106	0.011	0.009	0.005	0.830	0.074	0.011	0.003	0.003-0.004
Blood[c)] (µg equiv/g)	0.916	0.897	0.095	0.019	0.013	0.011	0.832	0.069	0.018	0.008	0.011-0.013
B/P Ratio	0.919	1.02	0.897	1.74	1.42	2.20	1.00	0.940	1.62	2.39	3.07-4.81
Hematocrit (mean [n=2] as %)	40	39	39	42.5	59	45	39	38.5	40	41	45-48
f_E (bound fractio %)	34.7	40.0	32.0	67.0	70.7	75.0	39.1	34.5	62.9	75.3	82.1-89.2
E/P ratio	0.80	1.04	0.74	2.74	1.71	3.67	1.01	0.84	2.55	4.38	5.59-8.95

Limit of quantification (QWBA):
Group A = ULOQ = 71.6 µg equiv/g, LLOQ = 0.048 µg equiv/g, 0.001 µg equiv/g (plasma) or 0.002 µg equiv/g (blood).
Group B and D = ULOQ = 135 µg equiv/g, LLOQ = 0.090 µg equiv/g, 0.003 µg equiv/g (plasma) or 0.005 µg equiv/g (blood).
a) Animal subjected to QWBA analysis after collection of excreta throughout the experimental period.
b) Tissue concentration of radioactivity (µg equiv/g risdiplam) is listed in the report.
c) Radioactivity determined by liquid scintillation.
d) Individual data, mean was not calculated.
e) Measurement affected by high levels of radioactivity in the adjacent contents.
fE=Fraction of total amount of radioactivity of blood bound to the blood cells (expressed as %); B/P=blood/plasma concentration ratio; E/P ratio=erythrocyte/plasma concentration ratio; NC=not calculable (plasma or tissue concentration below lower limit of quantification); NA=not applicable.

表 2.6.5.5-2 ラット組織内分布試験（未変化体移行性）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-1
Report No.: 1067462

Species	Rat (Wistar Crl:WI(Han), albino and Brown Norway BN/Crl, pigmented)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/12/group, 5/control group (albino) M/22[a]/group, 5/control group (pigmented)
Vehicle/Formulation	10 mmol/L L-ascorbic acid, 0.01 mg/mL sodium thiosulfate (pH 3)
Method of Administration	PO (gavage), once daily for 4 days
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg/day)	3
Sample	CSF, plasma, tissue
Sampling time	Plasma, tissue: 1, 7, 24, and 48 h after last dose in albino rats; 1, 7, 24, 48, 168, 336, and 1008 h after last dose in pigmented rats (n=3 per time-point) At 1 or 7 h after last dose in control rats
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

Plasma	**Albino rats**	**Pigmented rats**
T_{max} (h)[b]	1	1
C_{max} (ng/mL) [b]	567	668
$AUC_{1\text{-}48h}$ (h·ng/mL) [b]	5220	7830
$AUC_{0\text{-}1008h}$ (h·ng/mL) [b]	NA	8860
T_{last} (h) [b]	48 (last sampling time point)	336
$t_{1/2}$ (day) [b]	n.c.	2.4[d]

表 2.6.5.5-2 ラット組織内分布試験（未変化体移行性）（続）

Tissues / matrix	Albino rats	Pigmented rats	
	Tissue/Plasma ratio $AUC_{(1-48h)}$ [b]	Tissue/Plasma ratio $AUC_{(1-48h)}$ [b]	$t_{½}$ (day) [d]
Chloroid+RPE	1.01	15800	65
Sclera	1.11	10100	7.6
Iris	1.04	5770	59
Cornea[c]	0.368	2160	48
Retina	0.973	63.0	13
Lens	0.207	3.40	51
Vitreous humor	0.123	3.51	120
Spleen	8.28	23.4	8.6
Skin	10.3	4.27	n.c.
Brain	1.02	1.52	19
Muscle	0.738	0.663	n.c.
CSF	0.0421	0.0356	n.c.
Additional information: Study was terminated after sampling time point at 336 h due to parvovirus breakout at the rodent colony from the vendor. Study was restarted 1 month later as Study part 2 with treatment of 3 pigmented rats with risdiplam and sampling time-point at 1008h after last dosing. Some cross contamination was observed in control animals (n=1, sampling at 1 h after the last dose) in part 1 which is considered due to combined housing with drug treated animals. No drug was quantifiable in control animals in part 2 when control animals were housed separately (n=4, sampling at 7 h after the last dose).			

[a] Including one additional animal at 1 h for eye fixation in Davidson's fixative, all non-ocular tissues were quantified for risdiplam.

[b] Represents mean data of 3 animals per time-point.

[c] Cornea including minimal impurities of ciliary body, iris and sclera.

[d] Time interval for $t_{½}$ estimate from 168-1008 h (3 time points) for all tissue and 48-336 h for plasma.

NA; not applicable

n.c.; not calculated

表 2.6.5.5-3 サル組織内分布試験（未変化体移行性）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-2
Report No.: 1065261

Species	Monkey (cynomolgus)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/4/group, 1/control group
Vehicle/Formulation	10 mmol/L L-ascorbic acid, 0.01 mg/mL Na-thiosulfate pentahydrate (pH 3-3.5)
Method of Administration	PO (gavage), once daily for 7 days
Feeding condition	Fed
Dose (mg/kg/day)	3
Sample	Plasma, tissue, urine
Sampling time	Plasma: 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 7, and 24 h postdose on days 1 and 6, n=4; 2h on day 7 (at necropsy), n=2; days 14, 28, 49 (at necropsy), n=2. Urine: 0-6, 6-24h on day 1.
Analyte	Risdiplam
Assay	LC-MS/MS

	Plasma					
	Day 1	**Day 6**	**Day 7 (2 h)**	**Day 14**	**Day 28**	**Day 49**
	Mean (n=4)		Mean (n=2)			
C (ng/mL)	–	–	794	4.26	0.384	0
T_{max} (h)	3	2	–	–	–	–
C_{max} (ng/mL)	885	1050	–	–	–	–
$t_{1/2}$ (h)	4.32[a)]	5.69[a)]	–	–	–	–
T_{last} (h)	24	24	–	–	–	–
$AUC_{0\text{-}24\ h}$ (ng·h/mL)	9130	8740	–	–	–	–
AUC_{inf} (ng·h/mL)	9350	9320	–	–	–	–
$AUC_{[rest]}$ (%)	2.3	6.0	–	–	–	–
	Urine					
fe (0-24h) (%)	0.695	NA	–	–	–	–

表 2.6.5.5-3 サル組織内分布試験（未変化体移行性）（続）

Tissues / organs	Tissue concentration (ng/g) Mean (n=2)		Tissue/plasma ratio Mean (n=2)	Tissue concentration ratio Mean (n=2)
	Day 7 (2h)	Day 49	Day 7 (2h)[b]	Day 7 (2h)/D49[c]
Choroid+RPE	136000	52400	172	2.60
Iris	45300	40300	58.0	1.12
Sclera	6350	1480	8.17	4.29
Retina	4170	938	5.29	4.45
Cornea	322	28.3/248[d]	0.409	11.4/1.30[d]
Vitreous humor/body	294	9.72	0.384	30.2
Lens	136	323/31.8[d]	0.172	0.420/4.26[d]
Aqueous humor	13.8	<0.500	0.0180	n.c.
Duodenum	26100	0.630	33.5	41400
Liver	26100	3.89	32.8	6710
Kidney	7930	3.68	10.1	2160
Skin	4400	1180/32.8[d]	5.51	3.72/134[d]
Spleen	4000	0.590	5.21	6780
Bone marrow	388/4420[d]	<2.50	0.466/5.86[d]	n.c.
Testis	1840	<1.00	2.37	n.c.
Larynx	1040	0.795	1.34	1310
Heart	816	<1.00	1.04	n.c.
Brain	783	<1.00	1.00	n.c.
Muscle	668	<1.00	0.844	n.c.
CSF	53.5	<0.500	0.0674	n.c.
Additional information: Blood sampling from control animal on day 1 (4 h), day 6 (4 h) and day 7 (necropsy).				

[a] Based on 2-3 data points only.

[b] Mean of individual concentration ratios.

[c] Ratios based on mean concentrations.

[d] Individual results given because of high inter-individual variability.

fe=Fraction of total dose excreted unchanged in urine (expressed as %).

NA; not applicable

n.c.; not calculated

2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合

表 2.6.5.6-1 血漿蛋白結合及び血球移行

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-6
Report No.: 1066030

Study system	*In vitro*
Target entity	Plasma from human, mouse (C57Bl/6j), rat (Wistar), monkey (cynomolgus) and rabbit (New Zealand White) Blood from human, rat and monkey
Test system	Equilibrium dialysis for plasma protein binding and centrifugation for blood plasma partitioning
Assay	LC-MS/MS

Species (Strain)	Concentration tested (µmol/L)	Number of wells	Plasma protein binding Geometric mean % fraction unbound ± SD	Blood plasma partitioning Geometric mean ± SD
Mouse (C57Bl/6j)	1	3	10 ± 0.6	–
Rat (Wistar)	1	3	16 ± 3.1	0.9 ± 0.1
Rabbit (New Zealand White)	1	2	10	–
Monkey (Cynomolgus)	1	3	15 ± 3.6	1.0 ± 0.1
Human	1	3	11 ± 0.7	1.3 ± 0.2

表 2.6.5.6-2 血漿蛋白結合（M1）

Test article: Metabolite M1 (RO7112063)
Location in CTD: 4.2.2.3-7
Report No.: 1084838

Study system	*In vitro*
Target entity	Plasma from human, rat (Wistar), mouse (C57Bl/6), monkey (cynomolgus), rabbit (New Zealand White) (all adults)
Test system	Equilibrium dialysis
Assay	LC-MS/MS

Plasma protein binding of metabolite M1 (RO7112063)			
Species	**Concentration tested (µ mol/L)**	**Number of wells**	**Geometric mean % fraction unbound ± SD**
Mouse (C57Bl/6)	1	3	13.4 ± 1.2
Rat (Wistar)	1	3	8.9 ± 0.1
Rabbit (New Zealand White)	1	3	7.5 ± 0.1
Monkey (Cynomolgus)	1	3	11.2 ± 0.7
Human	1	3	7.4 ± 0.1

表 2.6.5.6-3 幼若動物の血漿蛋白結合（マウス及びラット）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-8
Report No.: 1068283

Study system	*In vitro*
Target entity	Plasma from rat (Wistar) at age PND4, PND12 and adult, mouse (delta 7) at age PND11 and adult
Test system	Equilibrium dialysis
Assay	LC-MS/MS

Species	**Concentration tested (μ mol/L)**	**Number of wells**	**Geometric mean % fraction unbound ± SD**
Rat, PND4	0.7	3	52 ± 14
Rat, PND12	0.7	3	52 ± 2
Rat, adult	0.7	3	17 ± 1
Mouse, PND11	0.8/1.7[a)]	3	26 ± 4 / 28 ± 8
Mouse, adult	1.0/1.1[a)]	3	15 ±3 / 9 ± 1

[a)] Result of two studies

表 2.6.5.6-4　幼若動物の血漿蛋白結合（ラット）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-9
Report No.: 1074560

Study system	*In vitro*
Target entity	Plasma from rat (Wistar) at age PND4, PND12 and adult
Test system	Equilibrium dialysis
Assay	LC-MS/MS

Species	Concentration tested (μ mol/L)	Range % fraction unbound	Means of individual plasma batches (%)[a)]
Rat, PND4	1	17.7–90.4 (n=9)[a)]	51.5[c)], 85.9, 84.6, 78.8, 84.2, 90.4, 39.0, 38.5, 32.4, 17.7
Rat, PND12	1	17.5–79.2 (n=9)[a)]	51.7[c)], 79.2, 62.4, 50.8, 61.5, 58.8, 19.8, 20.6, 17.8, 17.5
Rat, adult	1	11.0–16.5 (n=8)[b)]	16.5[c)], 11.5, 11.8, 12.0, 11.0

[a)] Number of plasma batches which were analyzed in one to three experiments in duplicate or triplicate wells.
[b)] Each batch was analyzed in triplicate wells.
[c)] Data of study 1068283 (4.2.2.3-8) is included where one batch of PND4, 12 and adult rats was tested.

表 2.6.5.6-5 幼若動物の血漿蛋白結合（サル）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-11
Report No.: 1090306

Study system	*In vitro*
Target entity	Plasma from the same three monkeys (cynomolgus) at the age of 10 days, 1, 3, 6 months and 1.8 years and pooled adult plasma
Test system	Equilibrium dialysis
Assay	LC-MS/MS

Monkey (n=3M) Age	**Concentration tested (ng/mL)**	**Number of wells**	**% Fraction unbound (mean (CV))**		
			Animal 1	**Animal 2**	**Animal 3**
10 days	33.3	3	25.6 (5.0)	22.1 (15.4)	25.8 (5.5)
1 month	33.3	3	26.6 (6.3)	25.7 (1.8)	20.9 (11.2)
3 months	33.3	3	26.4 (6.5)	22.8 (13.5)	19.8 (7.8)
6 months	33.3	3	14.3 (13.6)	13.0 (5.4)	13.3 (10.6)
1year and 10 months	33.3	3	14.0 (7.9)	15.9 (7.6)	20.8 (6.6)
Monkey (pooled) Age	**Concentration tested (ng/mL)**	**Number of wells**	**% Fraction unbound (mean (CV))**		
			Pool SP_S_16072	Pool SP_P_180065	
Adult (Lot CYN145881)	33.3	3	12.8 (7.0)	11.6 (14.9)	

表 2.6.5.6-6　ヒト小児血漿蛋白結合

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-10
Report No.: 1077760

Study system	*In vitro*
Target entity	Human plasma from cord blood, neonates, children, adolescents and adults
Test system	Equilibrium dialysis
Assay	LC-MS/MS

Study 1 (non-SMA patients aged birth-12 years)	**Concentration tested (ng/mL)**	**Number of wells**	**Geometric mean % fraction unbound ± SD**	**FU % risdiplam / FU % risdiplam in controls[a)]**
Cohort I (0-6 months), n=24	33.3	3	11.27 ± 3.17	1.0
Cohort II (0.5-1 years), n=7	33.3	3	11.44 ± 1.22	1.1
Cohort III (1-2 years), n=14	33.3	3	10.41 ± 1.85	1.0
Cohort IV (2-12 years), n=30	33.3	3	7.97 ± 1.68	0.9
Study 2 (Type 1 SMA patients aged 1-7 months)		There is no statistically significant age effect on the unbound protein binding at the α=0.05 level for the pooled data set of studies 1, 2 and 3.		
Study 3 (Type 2 and 3 SMA patients aged 2-25 years)				

[a)] Control value from healthy adults not individually reported, compare values from healthy adults in reports 1066030 (4.2.2.3-6).

2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

表 2.6.5.7-1 妊娠ラットの組織内分布試験

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-13
Report No.: 1084364

Species	Rat (SD, pregnant and nulliparous)
Sex (M/F)/No. of Animals	F/5/group (pregnant, nulliparous)
Vehicle/Formulation	10 mmol/L L-ascorbic acid, 0.01 mg/mL Na- thiosulfate pentahydrate (pH 3.79)
Method of Administration	PO (gavage), single dose (for pregnant rats on GD16)
Feeding condition	ad libitum
Dose (mg/kg/day)	5
Sample	Plasma, blood, tissues
Sampling time	Plasma: 0.5, 2, 6, 24 and 72 h postdose
Analyte	^{14}C-Risdiplam
Specific activity	1.19 MBq/mg
Assay	QWBA, LSC

Mean concentrations of radioactivity (µg·equiv/g) and tissue/plasma ratio in the tissues of pregnant albino rats (n=5)										
Tissue/organs	**0.5 h**		**2 h**		**6 h**		**24 h**		**72 h**	
	Conc	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**
Plasma[a)]	0.693	1.00	0.972	1.00	0.849	1.00	0.096	1.00	0.008	1.00
Blood[a]	0.610	0.880	0.952	0.979	0.826	0.972	0.107	1.11	0.024	2.88
Blood	0.559	0.807	0.887	0.912	0.658	0.774	0.095	0.983	BLQ	NA
Adrenal cortex	7.75	11.2	27.3	28.1	22.2	26.1	11.9	123	7.14	856
Adrenal medulla	5.65	8.16	20.3	20.9	12.3	14.4	2.77	28.8	3.53	424
Aortic wall	1.06	1.53	1.96	2.01	1.53	1.80	0.220	2.28	BLQ	NA
Bile ducts	5.19	7.50	5.75	5.91	3.39	3.99	1.66	17.3	0.689	82.6
Bone marrow	3.58	5.16	7.51	7.73	5.56	6.55	BLQ	NA	0.231	27.7
Bone surface	0.296	0.428	0.291	0.299	1.73	2.04	0.126	1.31	BLQ	NA
Brain	0.474	0.685	0.790	0.812	0.696	0.820	0.054	0.566	BLQ	NA
Brown fat	0.930	1.34	1.99	2.05	1.47	1.73	0.277	2.88	0.046	5.51
Choroid plexus	0.954	1.38	2.15	2.21	2.51	2.96	0.211	2.19	RND	NA
Clitoris	10.4	15.1	71.5	73.5	158	187	119	1240	86.5	10400
Exorbital lachrymal gland	NS	NS	27.9	28.7	30.9	36.4	14.5	151	2.54	304

表 2.6.5.7-1 妊娠ラットの組織内分布試験（続）

Mean concentrations of radioactivity (µg·equiv/g) and tissue/plasma ratio in the tissues of pregnant albino rats (n=5)										
Tissue/organs	**0.5 h**		**2 h**		**6 h**		**24 h**		**72 h**	
	Conc	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**
Harderian gland	4.10	5.92	16.3	16.8	17.0	20.0	1.85	19.2	0.123	14.8
Intra-orbital lachrymal gland	8.13	11.7	25.7	26.4	28.4	33.4	10.7	111	1.64	197
Kidney cortex	4.98	7.19	6.74	6.93	6.38	7.51	1.64	17.1	1.06	127
Kidney medulla	2.30	3.32	4.65	4.79	3.76	4.42	0.526	5.47	0.156	18.7
Lens	0.053	0.077	0.121	0.125	0.139	0.164	0.066	0.688	BLQ	NA
Liver	4.76	6.87	8.12	8.36	6.84	8.05	1.16	12.0	0.315	37.8
Lung	2.11	3.05	5.91	6.08	3.79	4.46	0.439	4.56	0.064	7.72
Mammary tissue	1.14	1.65	2.28	2.34	2.78	3.27	0.420	4.37	0.069	8.23
Mandibular lymph nodes	2.02	2.92	4.38	4.50	3.96	4.66	0.425	4.42	0.045	5.42
Meibomium glands	1.44	2.07	4.36	4.49	7.34	8.64	1.84	19.2	1.60	192
Meninges	0.896	1.29	1.78	1.83	1.15	1.36	0.232	2.41	0.052	6.21
Muscle	0.565	0.815	1.23	1.26	1.05	1.23	0.140	1.45	BLQ	NA
Myocardium	1.32	1.91	2.45	2.52	2.08	2.44	0.261	2.71	0.055	6.62
Nasal mucosa	0.377	0.544	1.15	1.18	1.18	1.39	0.418	4.34	0.149	17.9
Ovary	1.97	2.84	4.17	4.29	2.52	2.96	0.777	8.08	0.169	20.3
Pancreas	3.04	4.39	5.03	5.17	4.60	5.42	0.495	5.15	0.062	7.43
Periodontal membrane	0.816	1.18	1.96	2.02	3.20	3.77	0.164	1.70	0.102	12.2
Pineal body	2.37	3.42	7.12	7.33	5.58	6.57	0.459	4.78	BLQ	NA
Pituitary	2.96	4.27	6.51	6.69	4.65	5.47	0.813	8.46	BLQ	NA
Salivary glands	3.71	5.35	8.32	8.56	7.69	9.05	2.40	24.9	0.527	63.2
Skin	0.301	0.435	2.23	2.29	3.65	4.29	3.20	33.2	0.225	27.0
Spinal cord	0.306	0.442	0.459	0.472	0.410	0.483	0.045	0.471	BLQ	NA
Spleen	4.94	7.13	17.9	18.4	12.1	14.2	2.02	21.0	0.537	64.4
Steno’s gland	NS	NS	31.1	32.0	24.6	29.0	21.0	218	1.09	131
Thymus	1.91	2.76	5.19	5.34	4.18	4.92	0.527	5.48	0.103	12.4
Thyroid	4.29	6.19	9.77	10.0	13.2	15.5	1.75	18.2	0.978	117
Tongue	1.51	2.18	2.10	2.16	2.03	2.39	0.274	2.85	BLQ	NA
Tooth pulp	0.883	1.28	2.18	2.24	1.71	2.01	0.170	1.76	BLQ	NA
Trachea	0.330	0.477	1.05	1.08	1.38	1.63	0.161	1.67	BLQ	NA
Urinary bladder wall	4.99	7.20	5.08	5.22	14.1	16.7	0.791	8.22	0.074	8.83

表 2.6.5.7-1 妊娠ラットの組織内分布試験（続）

Mean concentrations of radioactivity (µg·equiv/g) and tissue/plasma ratio in the tissues of pregnant albino rats (n=5)										
Tissue/organs	0.5 h		2 h		6 h		24 h		72 h	
	Conc	T/P	Conc	T/P	Conc	T/P	Conc	T/P	Conc	T/P
Urine	2.35	3.39	5.01	5.15	9.86	11.6	0.650	6.76	0.053	6.38
Uterus	1.67	2.42	3.30	3.39	3.40	4.01	0.538	5.59	BLQ	NA
Uveal tract/retina	0.861	1.24	1.24	1.28	1.18	1.39	0.204	2.12	0.079	9.42
White fat	0.198	0.285	0.386	0.397	0.319	0.376	0.061	0.637	BLQ	NA
Oesophageal wall	0.577	0.833	1.45	1.49	1.78	2.10	0.206	2.14	BLQ	NA
Stomach mucosa (fundus)	26.2	37.8	21.5	22.1	7.18	8.45	2.27	23.6	0.211	25.3
Stomach mucosa (non-fundic)	208	300	83.0	85.4	10.3	12.1	1.37	14.3	0.498	59.8
Small intestine mucosa	2.74	3.95	3.55	3.65	12.4	14.6	0.408	4.25	0.199	23.8
Caecum mucosa	2.26	3.26	17.5	18.0	3.84	4.52	0.552	5.74	0.192	23.1
Large intestine mucosa	1.20	1.73	1.91	1.97	9.95	11.7	0.710	7.38	0.463	55.6
Rectum mucosa	0.757	1.09	1.98	2.04	5.04	5.94	1.87	19.5	0.113	13.5
Amniotic fluid	BLQ	NA	0.108	0.112	0.098	0.115	BLQ	NA	BLQ	NA
Foetus	0.326	0.470	0.667	0.686	0.669	0.787	0.118	1.23	RND	NA
Foetal adrenal	NS	NS	1.05	1.08	0.565	0.665	NS	NS	RND	NA
Foetal blood	0.236	0.340	0.524	0.539	0.885	1.04	0.077	0.802	RND	NA
Foetal brain	0.277	0.400	0.514	0.529	0.678	0.799	0.073	0.754	RND	NA
Foetal eye	0.282	0.407	0.879	0.904	0.624	0.735	0.088	0.915	RND	NA
Foetal gastrointestinal tract	0.317	0.458	0.743	0.764	0.848	0.999	0.099	1.03	RND	NA
Foetal kidney	NS	NS	NS	NS	0.646	0.761	0.124	1.29	RND	NA
Foetal liver	0.566	0.817	1.36	1.40	1.15	1.36	0.224	2.33	BLQ	NA
Foetal lung	0.172	0.249	NS	NS	0.584	0.688	NS	NS	RND	NA
Foetal myocardium	0.176	0.253	0.626	0.644	0.806	0.949	NS	NS	RND	NA
Foetal skin	0.093	0.135	0.292	0.301	0.253	0.298	0.087	0.907	RND	NA
Foetal uveal tract	NS	NS	0.696	0.716	0.339	0.399	NS	NS	RND	NA
Placenta	1.03	1.49	1.97	2.03	1.98	2.33	0.246	2.56	BLQ	NA

表 2.6.5.7-1 妊娠ラットの組織内分布試験（続）

Mean concentrations of radioactivity (µg·equiv/g) and tissue/plasma ratio in the tissues of nulliparous albino rats (n=5)										
Tissue/organs	**0.5 h**		**2 h**		**6 h**		**24 h**		**72 h**	
	Conc	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**
Plasma[a)]	0.698	1.00	0.928	1.00	0.863	1.00	0.083	1.00	0.010	1.00
Blood[a)]	0.674	0.966	0.941	1.01	0.877	1.02	0.107	1.29	0.021	2.09
Blood	0.547	0.784	0.842	0.907	0.687	0.796	0.083	0.996	BLQ	NA
Adrenal cortex	6.52	9.34	17.8	19.2	25.8	29.9	16.6	200	8.82	900
Adrenal medulla	7.21	10.3	14.6	15.7	19.2	22.3	7.89	94.9	2.82	287
Aortic wall	1.24	1.78	2.19	2.35	2.17	2.51	0.284	3.42	BLQ	NA
Bile ducts	5.96	8.53	6.48	6.98	1.43	1.65	0.743	8.95	0.228	23.3
Bone marrow	3.23	4.63	6.25	6.73	5.38	6.23	0.711	8.56	0.152	15.5
Bone surface	0.347	0.497	0.492	0.530	0.377	0.437	0.063	0.756	BLQ	NA
Brain	0.711	1.02	0.991	1.07	0.893	1.03	0.080	0.967	BLQ	NA
Brown fat	1.59	2.28	2.51	2.70	3.32	3.84	0.253	3.04	BLQ	NA
Choroid plexus	0.892	1.28	1.82	1.96	3.47	4.02	0.197	2.37	1.08	110
Clitoris	9.64	13.8	47.2	50.8	114	132	138	1660	32.2	3280
Exorbital lachrymal gland	7.29	10.4	16.6	17.9	39.8	46.1	25.6	308	1.54	157
Harderian gland	4.58	6.56	18.9	20.4	22.6	26.2	1.92	23.1	0.102	10.4
Intra-orbital lachrymal gland	6.79	9.72	11.2	12.0	32.0	37.0	22.1	266	1.02	104
Kidney cortex	4.63	6.63	5.66	6.10	6.96	8.06	2.06	24.8	0.589	60.1
Kidney medulla	2.71	3.89	13.2	14.2	3.99	4.62	0.427	5.14	0.179	18.3
Lens	BLQ	NA	0.133	0.143	0.161	0.187	0.067	0.809	BLQ	NA
Liver	7.48	10.7	7.27	7.83	7.00	8.11	1.12	13.5	0.229	23.4
Lung	3.03	4.34	4.04	4.35	6.98	8.08	0.250	3.01	0.047	4.79
Mammary tissue	0.372	0.533	0.520	0.560	1.28	1.48	0.080	0.967	0.061	6.19
Mandibular lymph nodes	2.17	3.11	4.79	5.16	4.00	4.63	0.471	5.67	BLQ	NA
Meibomian glands	2.15	3.09	3.48	3.75	5.27	6.11	3.44	41.4	3.52	359
Meninges	1.53	2.19	1.66	1.79	1.98	2.29	0.209	2.52	BLQ	NA
Muscle	0.888	1.27	1.65	1.78	1.36	1.58	0.126	1.52	BLQ	NA
Myocardium	1.63	2.33	2.78	3.00	1.97	2.28	0.227	2.73	BLQ	NA
Nasal mucosa	0.507	0.727	1.16	1.24	1.39	1.61	0.317	3.82	0.104	10.6
Ovary	3.10	4.44	3.36	3.62	5.18	6.00	0.579	6.97	0.191	19.5
Pancreas	4.16	5.96	6.00	6.46	4.89	5.67	0.523	6.29	BLQ	NA

表 2.6.5.7-1 妊娠ラットの組織内分布試験（続）

Mean concentrations of radioactivity (µg·equiv/g) and tissue/plasma ratio in the tissues of nulliparous albino rats (n=5)										
Tissue/organs	**0.5 h**		**2 h**		**6 h**		**24 h**		**72 h**	
	Conc	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**	**Conc**	**T/P**
Periodontal membrane	1.32	1.89	2.68	2.89	2.03	2.35	0.250	3.01	BLQ	NA
Pineal body	4.25	6.08	4.88	5.26	4.30	4.98	0.228	2.74	BLQ	NA
Pituitary	3.13	4.48	6.47	6.97	4.96	5.74	0.487	5.86	BLQ	NA
Salivary glands	5.74	8.23	11.2	12.1	10.9	12.7	5.41	65.1	0.563	57.5
Skin	0.741	1.06	1.36	1.46	1.51	1.75	0.631	7.60	0.259	26.4
Spinal cord	0.327	0.468	0.783	0.844	0.613	0.710	0.056	0.669	BLQ	NA
Spleen	6.20	8.88	11.7	12.6	7.96	9.23	1.45	17.5	0.295	30.1
Steno’s gland	13.0	18.6	15.4	16.6	21.5	24.9	23.6	284	2.56	261
Thymus	1.89	2.71	5.21	5.61	3.61	4.18	0.348	4.19	BLQ	NA
Thyroid	4.79	6.86	3.93	4.23	5.16	5.98	1.42	17.1	0.471	48.1
Tongue	1.43	2.05	2.63	2.83	1.89	2.18	0.234	2.81	BLQ	NA
Tooth pulp	1.53	2.19	2.77	2.99	1.63	1.89	0.175	2.11	BLQ	NA
Trachea	0.818	1.17	1.91	2.06	1.06	1.23	0.166	1.99	BLQ	NA
Urinary bladder wall	1.85	2.64	5.09	5.49	1.79	2.08	0.286	3.44	BLQ	NA
Urine	1.18	1.69	8.22	8.85	0.904	1.05	0.106	1.28	BLQ	NA
Uterus	2.02	2.89	2.66	2.87	2.17	2.52	0.525	6.32	BLQ	NA
Uveal tract/retina	0.820	1.18	1.74	1.87	1.04	1.20	0.189	2.27	BLQ	NA
White fat	0.448	0.642	0.552	0.594	0.445	0.515	BLQ	NA	BLQ	NA
Oesophageal wall	1.89	2.71	2.91	3.14	1.57	1.82	0.755	9.08	BLQ	NA
Stomach mucosa (fundus)	1.12	1.60	3.24	3.49	1.92	2.22	0.367	4.41	BLQ	NA
Stomach mucosa (non-fundic)	3.61	5.17	3.78	4.08	1.90	2.20	0.403	4.85	BLQ	NA
Small intestine mucosa	2.03	2.91	1.40	1.51	2.28	2.64	0.450	5.42	BLQ	NA
Caecum mucosa	2.12	3.03	6.53	7.04	15.4	17.8	0.626	7.53	0.071	7.21
Large intestine mucosa	1.48	2.11	9.47	10.2	1.21	1.40	1.19	14.3	0.083	8.43
Rectum mucosa	1.45	2.08	4.89	5.26	3.40	3.94	0.345	4.15	BLQ	NA

表 2.6.5.7-1 妊娠ラットの組織内分布試験（続）

Blood/plasma concentration ratios of radioactivity, hematocrit and f_E values										
	Pregnant albino rats					**Nulliparous albino rats**				
	0.5 h	**2 h**	**6 h**	**24 h**	**72 h**	**0.5 h**	**2 h**	**6 h**	**24 h**	**72 h**
Plasma[a)] (µg equiv/g)	0.693	0.972	0.849	0.096	0.008	0.698	0.928	0.863	0.083	0.010
Blood[a)] (µg equiv/g)	0.610	0.952	0.826	0.107	0.024	0.674	0.941	0.877	0.107	0.021
B/P Ratio	0.880	0.979	0.972	1.11	2.88	0.966	1.01	1.02	1.29	2.09
Haematocrit	75.0	65.4	65.8	66.4	22.8	64.2	79.0	58.6	61.1	29.6
f_E (bound fraction %)	25.0	34.6	34.2	33.6	77.2	35.8	21.0	41.4	38.9	70.4
E/P ratio	0.647	0.943	0.923	1.44	6.44	0.910	1.07	1.04	2.40	3.87

[a)] Radioactivity determined by liquid scintillation counting.

NA=not applicable, tissue concentration below the limit of quantification; T/P=tissue/plasma concentration ratio; RND=radioactivity not detectable; f_E=fraction of total amount of radioactivity of blood bound to the blood cells (expressed as %); B/P=blood/plasma concentration ratio; E/P=erythrocyte/plasma concentration ratio.

BLQ; below lower limit of quantification

NA; not applicable

2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験

表 2.6.5.8-1 *In vitro* メラニン結合

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.3-12
Report No.: 1066867

Study system	*In vitro*
Target entity	Natural melanin from *Sepia officinalis*
Test system	1% DMSO solution containing risdiplam was incubated for 4 h with a pre-incubated melanin suspension. The concentration was determined in the supernatant (free fraction) after centrifugation.
Assay	LC-MS/MS

Concentration tested (µmol/L)	Number of wells	% Fraction unbound[a)]	Measured mean concentration in supernatant (µmol/L)	Measured mean concentration in buffer (µmol/L)
1	3	<0.1	< 0.001	0.97
10	3	0.2	0.006/0.013/0.009[b)]	4.09
Additional information: High binding of risdiplam to melanin.				

[a)] Fraction unbound (%)=$C_{supernatant}/C_{buffer}$*100.

[b)] Individual results presented.

2.6.5.9 薬物動態試験：*In Vivo* における代謝

表 2.6.5.9-1 ラット及びサルにおける代謝（血漿中代謝物）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.4-5
Report No.: 1062728

Species (Strain)	Adult and juvenile rat (Wistar), Cynomolgus monkey
Sex (M/F)/No. of Animals	2/sex (adult rat), 8/sex (juvenile rat), 1/sex (monkey)
Feeding condition	Fed
Vehicle/Formulation	10 mmol/ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3
Method of Administration	PO (gavage), multiple dosing
Dose (mg/kg)	2.5 (adult rat), 10 (juvenile rat) and 6 (monkey)
Sample	Plasma[a)]
Sampling time	Adult rat plasma: 1 and 7 h postdose on day 14 Juvenile plasma: day 7 (day 10 pp) Monkey plasma: 1 and 7 h postdose on day 14
Assay	HPLC/UPLC

Metabolite profiles of risdiplam in plasma					
Metabolite	**% in sample[b)]**				
	Adult Rat day 14 - 1h	**Adult Rat day 14 - 7h**	**Juvenile Rat day 10 pp**	**Cynomolgus monkey day 14 - 1h**	**Cynomolgus monkey day 14 - 7h**
Parent	98	99	88	89	84
M1[c)]	–	–	–	6.0	14
M2[c)]	1.0[e)]	0.8[e)]	1.6	1.6	0.3[e)]
M3 and M4[d)]	0.6[e)]	–	4.8[f)]	1.2	0.5[e)]
M5[c)]	0.6[e)]	0.6[e)]	0.5[e)]	0.1[e)]	0.1[e)]
M6	–	–	–	0.5	0.1
M7	–	–	4.9	1.2	0.4
M1-gluc	–	–	–	0.2	0.6
Additional information: In vitro metabolism data is presented in table 2.6.5.10-1 (表 2.6.5.10-1).					

[a)] Remaining toxicokinetic plasma samples obtained from studies 1061416 (RO7021707 and RO7034067: 14-day oral (gavage) pilot toxicity study in the rat followed by a 14-day treatment free period), 1063098 (A 4-week dose-range finding toxicity study of RO7034067 by oral gavage in juvenile Wistar Hannover rats [including Amendment 1] and 1061651 (RO7021707 and RO7034067: Maximum tolerated dose followed by a 2 week repeat dose oral [gavage] administration toxicity study in the monkey). [b)] By semi-quantitative analysis.
[c)] Component detected at low levels in the authentic standard of risdiplam. [d)] Metabolites M3 and M4 were not completely resolved by LC-QToF/MS. The summed abundance is shown.
[e)] Component detected at a similar level in the authentic standard of risdiplam and/or in control plasma spiked with the authentic standard of risdiplam. [f)] Only M4 detected.

表 2.6.5.9-2 ラットにおける代謝（胆汁，尿及び糞中代謝物）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.4-1
Report No.: 1068338

Species	Rat (Wistar, Crl:WI), naïve/BDC	Rat (Wistar, Crl:WI), naïve/BDC
Sex (M/F)/No. of Animals	M/5 (naïve), 2 (BDC)	M/5 (naïve), 2 (BDC)
Feeding condition	Ad libitum	Ad libitum
Vehicle/Formulation	Solution containing 8 mmol/L hydrochloric acid (concentration of 1.88 mg/g)	Solution containing 10 mmol/L ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3, (concentration of 1.06 mg/g)
Method of Administration	IV	PO
Dose (mg/kg)	2	5
Sample	Excreta, plasma, red blood cell	Excreta, plasma, red blood cell
Sampling time	BDC: urine, feces and bile (pooled 0-48h) Naïve: urine, feces (pooled 0-48 h), blood (0.5,3,24,48,72h)	BDC: urine, feces and bile (pooled 0-48h) Naïve: urine, feces (pooled 0-48 h), blood (1,3,6,24,48,72h)
Radionuclide	^{14}C	^{14}C
Specific activity	137.7 µCi/mg	100 µCi/mg
Purity	98.7%	98.7%
Assay	LC-MS-RAM	LC-MS-RAM

表 2.6.5.9-2 ラットにおける代謝（胆汁，尿及び糞中代謝物）（続）

Metabolite profiles of risdiplam in plasma and red blood cells				
Metabolite	**Relative metabolite profile to dose administered in pooled samples (0-48 h)**			
	Naïve rat-IV (0.5 h)	Naïve rat-IV (0.5 h)	Naïve rat-PO (1 h)	Naïve rat-PO (1 h)
	Plasma	Red blood cells	Plasma	Red blood cells
Parent	85	87	84	86
M1	1.9	0.6	4.3	2.4
M2	0.5	0.8	0.3	0.7
M5	1.1	2.2	0.9	2.3
M7	1.0	0.6	0.7	0.4
M8	0.6	1.0	0.7	1.8
M10	0.9	nd	0.6	nd
M14	0.5	0.4	0.3	0.4
M16	1.4	0.8	1.0	0.7
M17	1.5	2.3	1.5	1.8
M20	0.7	2.1	1.0	1.6
M21	nd	nd	nd	nd
M22	0.5	0.9	0.6	0.6
M23	1.1	0.6	0.8	0.6
M24	1.3	nd	1.2	nd
M25	1.5	0.6	1.8	0.7
M26	0.7	0.3	0.7	0.4
Total	100	100	100	100

表 2.6.5.9-2 ラットにおける代謝（胆汁，尿及び糞中代謝物）（続）

Metabolite profiles of risdiplam in feces, urine and bile								
Metabolite	**Relative metabolite profile to dose administered in pooled samples (0-48 h)**							
	Naïve rat iv	BDC rat- iv	Naïve rat- iv	BDC rat- iv	Naïve rat- po	BDC rat- po	Naïve rat- po	BDC rat- po
	feces	feces	urine	bile	feces	feces	urine	bile
Parent	42	32	2.2	0.8	48	48	2.4	0.6
M1	nd	nd	0.1	nd	nd	nd	0.1	nd
M2	1.7	0.6	0.3	1.1	1.9	0.6	0.3	0.4
M5	5.4	3.7	0.3	1.5	6.4	4.0	0.4	0.7
M7	2.0	0.9	0.6	0.8	1.4	0.4	0.4	0.2
M10	1.3	nd	nd	1.6	1.2	nd	nd	0.8
M11	1.2	0.8	nd	nd	1.3	0.9	nd	nd
M12	2.5	0.5	nd	nd	1.6	0.9	nd	nd
M13	1.3	nd	nd	nd	1.2	nd	nd	nd
M14	2.4	1.6	0.5	0.8	1.7	1.7	0.3	0.3
M15	nd	nd	0.3	1.5	nd	nd	0.2	0.6
M16	1.4	0.8	0.3	nd	1.5	1.1	0.2	nd
M17	2.9	1.9	nd	nd	2.9	1.6	nd	nd
M18	3.3	0.6	nd	1.4	2.3	0.6	nd	0.7
M19	nd	nd	0.4	nd	nd	nd	0.3	nd
unidentified	16	6.5	4.3	9.6	17	10	2.2	3.7
Total	83	50	9.3	19.1	88	70	6.8	8.0

2.6.5.10 薬物動態試験：*In Vitro* における代謝

表 2.6.5.10-1 肝ミクロソーム及び肝細胞における代謝物

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.4-5
Report No.: 1062728

Study system	*In vitro*
Target entity	Liver microsomes (human, rat, monkey, mouse, rabbit), hepatocytes (human, rat, monkey, mouse, rabbit), recombinant human P450 enzymes: 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4.
Test system	Liver microsomes: incubation for 0, 0.5 and 1 h; hepatocyctes: incubation for 0, 0.5, 1 and 3 h; recombinant P450s: incubation for 0, 10 and 30 min.
Assay	HPLC/UPLC
Concentration (µmol/L)	10

Metabolite profiles of risdiplam in liver microsomes (0.636 mg/mL) after 1 h incubation					
Metabolite	**Liver microsomes (% in sample[a])**				
	Human[g]	**Rat**	**Monkey**	**Mouse**	**Rabbit**
Parent	89	73	71	82	73
M1[b]	3.8	24	11	12	18
M2[b],[c]	2.8	1.0	5.5	2.0	2.7
M3 and M4[c],[d]	2.8 and 3.3	1.1	5.8	2.5	3.7
M5[b], [c]	0.5	1.3	0.5[e]	1.6	0.6[e]
M6[f]	0.3	–	4.7	0.2	1.0
M7[f]	0.1	0.1	1.7	–	1.2

表 2.6.5.10-1 肝ミクロソーム及び肝細胞における代謝物（続）

Metabolite profiles of risdiplam in hepatocytes (0.5 million cells/mL) after 3 h incubation					
Metabolite	**Hepatocytes (% in sample[a])**				
	Human[g]	**Rat**	**Monkey**	**Mouse**	**Rabbit**
Parent	98	86	88	84	80
M1[b]	1.7	11	3.9	1.4[e]	1.1[e]
M2[b], [c]	0.3	1.3	1.8	4.3[e]	5.1[e]
M3 and M4[c], [d]	0.1[h]	0.5[e]	1.2[e]	1.5[e]	1.5 [e], [h]
M5[b], [c]	0.1	1.0[e]	0.4[e]	4.2[e]	0.8[e]
M6[f]	–	–	2.3	0.5	0.2
M7[f]	0.2	0.3	2.9	4.1	11

Metabolite profiles of risdiplam in recombinant human P450 enzymes (150 nmol/L) after 0.5 h incubation									
Metabolite	**Recombinant human CYP450 enzymes (% in sample[a])**								
	1A2	2A6	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4
Parent	96	97	97	96	97	98	97	97	91
M1[b]	1.2[e]	0.8[e]	1.1[e]	0.8[e]	0.9[e]	0.6[e]	0.6[e]	0.8[e]	2.6
M2[b], [c]	0.9[e]	0.7[e]	0.5[e]	1.0	0.8[e]	0.8[e]	1.1[e]	1.2[e]	3.2
M3 and M4[c], [d]	0.4[e]	0.2[e]	0.3[e]	0.6	0.4[e]	0.3[e]	0.5[e]	0.4[e]	1.8
M5[b], [c]	1.6[e]	1.2[e]	1.6[e]	1.6	1.3[e]	0.7[e]	0.7[e]	0.7[e]	1.6
Additional information: In vivo metabolism data is presented in table 2.6.5.9-1 (表 2.6.5.9-1)									

[a] By semi-quantitative analysis.

[b] Component detected at low levels in the authentic standard of risdiplam.

[c] Component formed at low levels in no cofactor and/or no microsomes/hepatocytes controls.

[d] Metabolites M3 and M4 were not completely resolved by LC-QToF/MS. The summed abundance is shown.

[e] Component detected in no microsome/hepatocyte controls, in microsomal incubations terminated at T=0 min and/or in the authentic standard of risdiplam at a similar level.

[f] Component formed to some degree in no cofactor controls.

[g] Incubations under minimal light exposure and using optimized chromatography.

[h] Only M3 detected.

表 2.6.5.10-2 M1の *in vitro* 代謝

Test article: Risdiplam, M1
Location in CTD: 4.2.2.4-2
Report No.: 1092235

Study system	*In vitro*
Target entity	Human liver microsomes, recombinant human P450 enzymes: 1A1, 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2J2, 3A4, 3A5, FMO1, FMO3.
Test system	Pre-incubation of HLM in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) for 5 min at 37°C, followed by incubation with substrates for 3 or 15 min in presence and absence of the respective inhibitors.
Assay	HPLC/UHPLC
Concentration (µmol/L)	1, 10
Generation of risdiplam (1 and 10 µmol/L) metabolites by individual CYP and FMO enzymes	
Conclusion: Generation of seven metabolites was observed. M1 peak areas were the greatest. FMO1 and FMO3 were highly active in generating metabolites M1, M14 and M21. CYP3A4 was the most active CYP enzyme, generating M1, M2, M5, M11, M14 and M21. CYP2J2 was also capable of generating these metabolites, but to a lower extent than CYP3A4. CYP1A1 was active in the generation of M11 and M2. Peak area of M7 was generally very small.	
Generation of metabolite M1 (RO7112063) (1 and 10 µmol/L) metabolites by individual CYP and FMO enzymes	
Conclusion: Generation of three metabolites was observed. Metabolite M15 was catalyzed by FMO1, FMO3, CYP3A4, CYP2J2, CYP1A1, CYP2C8 and CYP2C19. Generation of M5 and M14 was less clear due to higher background signals. Overall, the same enzymes which metabolise the parent drug risdiplam are also active in the further metabolism of the metabolite M1 (RO7112063): FMO1, FMO3, CYP3A4 and CYP2J2.	

表 2.6.5.10-2 M1の *in vitro* 代謝（続）

Effect of chemical inhibitors on HLM metabolism of risdiplam to metabolite M1 (RO7112063), M2 and M5						
Enzyme/inhibitor	**1 µmol/L Risdiplam (mean±SD)[a)]**			**10 µmol/L Risdiplam (mean±SD)[a)]**		
	M1	**M2**	**M5**	**M1**	**M2**	**M5**
CYP1A1/1A2: α-NF	102±4	100±4	97±7	94±9	98±10	95±8
CYP2B6: Ticlopidine	102±6	94±3	95±7	98±7	100±6	94±5
CYP2C8: Montelukast	86±2	**75±8**	**79±9**	85±8	**77±5**	83±5
CYP2C9: Sulfaphenazole	90±2	93±17	97±20	98±7	113±25	110±21
CYP2C19: Benzyphenobarbital	98±9	100±5	103±10	106±8	102±4	105±7
CYP2D6: Quinidine	82±14	85±11	89±1	103±6	105±12	105±4
CYP3A4/5: Ketoconazole	**38±3**	**77±9**	**72±10**	**30±4**	**49±4**	**53±5**
FMO3: Methimazole	**54±7**	83±4	**78±3**	**76±7**	103±18	**78±11**
Effect of chemical inhibitors on HLM metabolism of metabolite M1 (RO7112063)						
Conclusion: Due to the low metabolite peak area signals and large variation between replicates for many of the inhibitors, no detailed examination of these data has been made.						
Additional information: Positive control inhibitors met the acceptance criteria and confirm assay validity with exception of CYP2C8 (amodiaquine), where an accurate estimate of inhibitor effect could not be made due to non-linearity of metabolite appearance, further metabolism of the desethyl metabolite and almost complete depletion of the parent drug molecule.						

[a)] Mean and standard deviation of triplicate values; values indicating more than 15% inhibition effect are shown in bold.

表 2.6.5.10-3 主代謝酵素

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.4-3
Report No.: 1066973

Study system	*In vitro*
Target entity	Human liver, kidney and intestinal microsomes, recombinantly expressed CYP 1A1, 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4, 3A5, 3A7, FMO1, FMO3 and FMO5 enzymes
Test system	Pre-incubation of 1 mg/mL human tissue microsomes, 200 pmol/mL CYPS or 0.25 mg/mL SF9 cell membranes expressing FMOs, with 1 mM NADPH in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.4) for 10 min at 37°C, followed by incubation with substrate for 60 minutes at 37°C Inhibitors: CYP 3A4: ketoconazole; FMO: methimazole
Assay	LC-MS/MS, HPLC, solid scintillation counting
Concentration (µmol/L)	1 (unlabeled risdiplam), 10 (^{14}C-risdiplam, specific activity: 137 µCi/mg)

Turnover of 10 µmol/L risdiplam by human tissue microsomes and metabolic profile						
Metabolite	**Metabolite peak**					
	Human liver microsomes		**Human kidney microsomes**		**Human intestinal microsomes**	
	Turnover %	**% Metabolites**	**Turnover %**	**% Metabolites**	**Turnover %**	**% Metabolites**
P1	3.6	15	0.2	2	0.7	41
P2	1.5	6	−0.1	−1	0.2	14
P3	−0.3	−1	−0.2	−2	0.8	42
Parent	23.6	100	9.4	100	1.8	100
M2	3.1	13	−0.1	−1	0.3	15
M3+M6	6.6	28	1.1	12	0.6	32
P4	0.4	2	0.1	1	−0.6	−32
M1	5.0	21	9.0	95	0.9	50
Unassigned	3.6	15	−0.5	−6	−1.1	−62
Intrinsic clearance estimate (µL/min/mg)	9		3		0.7	

表 2.6.5.10-3 主代謝酵素（続）

Turnover of risdiplam by recombinantly expressed individual CYP and FMO isoforms[a)]							
Enzyme	CYP1A1	CYP3A4	CYP1A2 CYP2B6 CYP2C8 CYP2C9 CYP2C19 CYO2D6 CYP3A5	CYP3A7	FMO1	FMO3	FMO5
% Turnover of risdiplam	6.9	8.3	<3[c)]	7.1	72.3	62.4	0.8

Inhibition of human tissue microsomal metabolism of 10 µmol/L ^{14}C-risdiplam by ketoconazole and methimazole[b)]						
Metabolite	**Metabolite peak**					
	Human liver microsomes			**Human kidney microsomes**		
	Turnover % Metabolites	**Ketoconazole % activity**	**Methimazole % activity**	**Turnover % Metabolites**	**Ketoconazole % activity**	**Methimazole % activity**
P1	15	79	25	–	–	–
Parent	100	105	26	100	87	7
M2	13	86	31	–	–	–
M3	28	91	27	12	92	28
M6				–	–	–
M1	21	115	16	95	88	4

表 2.6.5.10-3 主代謝酵素（続）

Inhibition of human liver microsomal metabolism of 1 µmol/L-risdiplam by ketoconazole and methimazole		
Metabolite	**Metabolite peak**	
	Ketoconazole % activity (mean ± SD)[d]	**Methimazole % activity (mean ± SD)**
M1	64 ± 7	14 ± 0
M2	46 ± 5	30 ± 5
M3	46 ± 4	25 ± 1
Metabolite identification from human liver microsomal samples and FMO1 incubates		
Additional metabolites (M10-M14) were found in FMO1 incubations, all involving oxidative metabolism/cleavage in the piperazine ring.		
Additional information: Activity of enzymes was confirmed with control substances, with the exception of FMO5 where activity could not be confirmed.		

[a] Metabolism products generated by the various CYPs were different. CYP3A4 generated metabolites M1, M2, M3/M6 as well as the unidentified metabolites in peaks P1 and P2. In contrast, nearly no M1 peak was generated by CYP1A1 or CYP3A7 and proportionately more M3 was seen with CYP3A7.

[b] Only metabolic peaks with activities of risdiplam >10% are shown.

[c] Assay limitations as high detection threshold due to high levels of radiolysis products. Turnover of risdiplam less than 3% for individual CYP isoforms.

[d] Mean of triplicates ± SD.

P1=Highly polar peak.

表 2.6.5.10-4 反応性代謝物

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.4-4
Report No.: 1066482

Study system	*In vitro*
Target entity	Human liver microsomes
Test system	Incubation of 1 mg/mL HLM with substrate and with or without NADPH for 5 min at 37°C, followed by incubation with or without GSH for 30 minutes at 37°C
Assay	LC-MS/MS
Concentration	2 µmol/L [^{14}C]-Risdiplam or positive control

Matrix	**Cofactor**	**Mean covalent binding value ± SD (pmol/mg) n=3**	
		[^{14}C]-risdiplam	**[^{14}C]-Rosiglitazone**
HLM	− NADPH	8 ± 0.2	8.3 ± 0.6
HLM	+ NADPH (1 mmol/L)	67 ± 1.6	115 ± 2.5
HLM	+ NADPH, + GSH (5 mmol/L)	28 ± 1.8	22 ± 0.4
Conclusion: NADPH-dependent (ie., after subtraction of background value measured in the absence of NADPH) covalent binding value of risdiplam was 59 pmol/mg. It was reduced to 20 pmol/mg in the presence of glutathione (hepatocyte like conditions).			

表 2.6.5.10-5 ヒト肝ミクロソームにおける代謝（バッチ間の比較）

Test article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.4-6
Report No.: 1089229

Study system	*In vitro*
Target entity	Human liver microsomes (39 individual donors, 150 donor-pools)
Test system	Pre-incubation of HLM in 0.5% v/v DMSO for 5 min at 37°C, followed by incubation with risdiplam for 5 or 20 minutes or with substrates for 2 or 20 minutes, all in triplicates. Experiment 1: incubation by 5 minutes and semiquantitative analysis for risdiplam metabolites Experiment 2: incubation by 20 minutes and quantitative analysis for M1 concentration. Donors: n=5-9 of the age groups: 0-6 month, 6 month–2 years, 2-6 years, 6-12 years, 12-18 years and >18 years. Substrates: benzydamine (FMO3), DHEAS (CYP3A7), midazolam (CYP3A4/5)
Assay	LC-MS/MS, UHPLC
Concentration (µmol/ L)	1 (for risdiplam, midazolam, benzydamine), 10 (for DHEAS)

Inter-individual variation in risdiplam metabolism associated with FMO and CYP3A activities.	
Conclusion:	There was a high inter-individual variability for metabolism of risdiplam in tested HLM donors (range of 6 - 258% for oxidation relative to 150-donor pool HLM activities: 40-fold variation for FMO3 and M1, 400-fold variation for CYP3A4/5, almost 1000-fold variation for CYP3A7). Pooled HLM activities were consistent.
Donor age dependence in risdiplam metabolism associated with FMO and CYP3A activities.	
Conclusion:	There was an increase in midazolam (CYP3A4), benzydamine (FMO3) and risdiplam metabolism rates between the 0-6 months (n=5), 6 months - 2 years (n=7) and 2-6 years (n=6) old age groups. There was a high CYP3A7 activity in very young donor samples but a low activity in older age donors.
Correlation of M1 activities between samples and analyses and estimation of metabolite formation rates for M2, M3/4, M5 and M6.	
Conclusion:	There was a good correlation of the M1 formation rate versus the qualitative M1 peak area. There was a high variability in individual donor activities for all risdiplam metabolites. M1, M2 and M5 were main contributors to total risdiplam metabolism values. The profile of increasing risdiplam metabolism rate with age between 0-6 months, 6 months-2 years and 2-6 years age groups seen for M1 generation is reflected in the categorical analysis of the summed metabolites data.

2.6.5.11 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

Studies are summarized under 2.6.5.14 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions (表 2.6.5.13-1～表 2.6.5.13-4)

2.6.5.12 薬物動態試験：排泄

表 2.6.5.12-1 ラットに単回投与後の放射能の尿糞中排泄

Test article: Risdiplam

Location in CTD: 4.2.2.5-1 (同4.2.2.3-5)

Report No.: 1065260

Species	Rat (Wistar,Crl:WI)	Rat (Wistar,Crl:WI)	Rat (Lister-Hooded, Crl:LIS)	Rat (Wistar,Crl:WI)
Sex (M/F)/No. of Animals	M/1 (group B)	M/1 (group C)	M/1 (group D)	M/3 (group E)
Feeding condition	Ad libitum	Ad libitum	Ad libitum	Ad libitum
Vehicle/Formulation	Solution containing 10 mmol/L ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.5 (concentration of 0.816 mg/mL)	Solution containing 10 mmol/L ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.5 (concentration of 0.816 mg/mL)	Solution containing 10 mmol/L ascorbic acid/0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate, pH 3.5 (concentration of 0.816 mg/mL)	Solution containing 0.9% saline solution, pH 3 (concentration of 1.51 mg/mL)
Method of Administration	PO (gavage)	PO (gavage)	PO (gavage)	IV
Dose (mg/kg)	5	5	5	2
Sample	Excreta, tissue, plasma	Excreta, plasma	Excreta, tissue, plasma	Excreta, plasma
Sampling time	168 hours	168 hours	168 hours	168 hours
Radionuclide	^{14}C	^{14}C	^{14}C	^{14}C
Specific activity	0.74 MBq/mg	0.74 MBq/mg	0.74 MBq/mg	1.85 MBq/mg
Purity	98.4%	98.4%	98.4%	98.4%
Assay	Excretion balance (LSC)	Excretion balance (LSC)	Excretion balance (LSC)	Excretion balance (LSC)

表 2.6.5.12-1 ラットに単回投与後の放射能の尿糞中排泄（続）

Excretion Balance Investigation (% administered dose)				
Sample	**Group B (n=1) PO**	**Group C (n=1) PO**	**Group D (n=1) PO**	**Group E (n=3) IV**
	168 hours	**168 hours**	**168 hours**	**168 hours**
Urine	7.93	8.27	7.01	11.6
Feces	87.1	87.0	82.1	79.4
Cage wash	0.945	0.651	1.01	0.901
Expired air trap	0.018	0.020	0.019	0.023
Cage debris	0.012	ND	0.030	0.006
Final cage wash	0.128	0.076	0.052	0.138
Carcass	NA	2.49	NA	3.29
Total excreted (0–168 h)	96.2	98.5	90.2	95.4
Additional information: Organ distribution data of the study is presented in table 2.6.5.5-1 (表 2.6.5.5-1)				

NA; not applicable
ND; not detected

表 2.6.5.12-2 乳汁中排泄

Test Article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.5-3
Report No.: 1084368

Species	Rat (Sprague Dawley)
Sex (M/F)/No. of Animals	F/21 (lactating)
Vehicle/Formulation	10 mmol/L L-ascorbic acid, 0.01 mg/mL sodium thiosulfate pentahydrate (pH 3.79)
Method of Administration	PO (gavage), single dose on approx. 10 days post-partum
Feeding condition	ad libitum
Dose (mg/kg/day)	5
Sample	Plasma, milk
Sampling time	Plasma, milk: 0.5, 2, 6, 24, 48, 96, 168 h
Analyte	^{14}C-Risdiplam
Specific activity	1.19 MBq/mg
Assay	LSC

Milk and plasma concentrations and ratio of ^{14}C-risdiplam after single oral dose of 5 mg/kg (n=3/time-point,composite design) (mean±SD)

Sample	0.5 h	2 h	6 h	24 h	48 h	96 h	168 h
Plasma, conc (µg equiv/g)	0.58±0.17	0.71±0.06	0.48±0.02	0.04±0	0.01±0	NA	NA
Milk, conc (µg equiv/g)	0.73±0.24	2.22±0.28	1.60±0.29	0.12±0.01	0.02±0.01	0±0	ND
Milk/plasma ratio	1.25±0.07	3.18±0.70	3.40±0.71	3.50±0.50	1.33±0.58	NA	NA

Pharmacokinetics of radioactivity in the plasma and milk

Sample	**$t_{1/2\ elim}$ (h)**	**T_{max} (h)**	**C_{max} (µg equiv/g)**	**T_{last} (h)**	**AUC_{last} (ng equiv·h/g)**	**AUC_{all} (ng equiv·h/g)**	Milk/plasma ratio (AUC_{all})
Milk	14.0	2	2.22	96	22.0	22.1	3.04
Plasma	7.68	2	0.71	48	7.17	7.28	–

NA; not applicable
ND; not detected

2.6.5.13 薬物動態試験：胆汁中排泄

Excretion into the bile was investigated in excretion studies summarized in 2.6.5.9 薬物動態：排泄 (表 2.6.5.9-2).

表 2.6.5.13-1　本薬の CYP 阻害（ヒト肝ミクロソーム）

Test Article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.6-1
Report No.: 1090549

Study system	*In vitro*
Target entity	Human liver microsomes
Test system	Direct inhibition assay: Incubation of HLM with risdiplam, substrate and NADPH-regenerating system for 5-10 min (depending on substrate used) at 37°C in 100 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4). Time-dependent inhibition assay: Pre-incubation of HLM with risdiplam and with or without NADPH-regenerating system for 30 min at 37°C in 100 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4), followed by incubation with substrate for 5-10 min (depending on substrate used) at 37°C. Time-dependent inhibition of CYP3A4 (K_I assay): Pre-incubation of HLM with risdiplam and with or without NADPH-regenerating system for 0, 4, 15, 30, 45 and 60 min at 37°C, followed by incubation with midazolam for 5 min at 37°C.
Assay	LC-MS/MS
Concentration (µmol/L)	0.1–12.5

表 2.6.5.13-1 本薬の CYP 阻害（ヒト肝ミクロソーム）（続）

Direct and time-dependent inhibition of CYP450 enzymes by risdiplam			
Enzyme	**Substrate**	**Direct inhibition**	**Time-dependent inhibition**
		Risdiplam IC_{50} (µmol/L)	**Fold change in IC_{50}[b)]**
CYP1A2	Phenacetin	>12.5[a)]	NA
CYP2B6	Bupropion	>12.5[a)]	NA
CYP2C8	Amodiaquine	>12.5[a)]	NA
CYP2C9	Diclofenac	>12.5[a)]	NA
CYP2C19	(S)-Mephenytoin	>12.5[a)]	NA
CYP2D6	Dextromethorphan	>12.5[a)]	NA
CYP3A4	Midazolam	>12.5[a)]	>2.6
CYP3A4	Testosterone	11	>3.0
CYP3A4 inactivation parameters for risdiplam			
Enzyme	**Substrate**	**k_{inact} (min^{-1})**	**K_I (µmol/L)**
CYP3A4	Midazolam	0.065	13
Additional information: All positive control inhibitors demonstrated the validity of the assays.			
Conclusion: No significant reversible inhibition of CYPs 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, or 2D6 was detected with risdiplam up to 12.5 µmol/L. There was some inhibition of CYP 3A4. Risdiplam demonstrated low potential to cause time-dependent inhibition of all isoforms, except for CYP3A4. A follow-up CYP3A4 inactivation kinetics assay resulted in a K_I and k_{inact} estimates of 13 µmol/L and 0.065 min^{-1}, respectively.			

a) Represents the limit of solubility.

b) The fold change in IC_{50} was not applicable when there was insufficient inhibition for calculation of IC_{50} values.

Incubations were conducted in duplicates.

NA; not applicable

表 2.6.5.13-2 M1の CYP 阻害（ヒト肝ミクロソーム）

Test Article: M1
Location in CTD: 4.2.2.6-2
Report No.: 1077033

Study system	*In vitro*
Target entity	Human liver microsomes
Test system	Direct inhibition assay: Incubation of HLM with M1, substrate and NADPH-regenarating system for 5-10 min (depending on substrate used) at 37°C in 100 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4). Time-dependent inhibition assay: Pre-incubation of HLM with M1 and with or without NADPH-regenerating system for 30 min at 37°C in 100 mmol/L potassium phosphate buffer (pH 7.4), followed by incubation with substrate for 5-10 min (depending on substrate used) at 37°C.
Assay	LC-MS/MS
Concentration (µmol/L)	0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1.0, 3.0 and 10

CYP inhibition			
Enzyme	**Substrate**	**Direct inhibition[a)]**	**Time-dependent inhibition**
		M1 IC_{50} (µmol/L)	**Fold change in IC_{50}[b)]**
CYP1A2	Phenacetin	>10	NA
CYP2B6	Bupropion	>10	NA
CYP2C8	Amodiaquine	>10	NA
CYP2C9	Diclofenac	>10	NA
CYP2C19	(S)-Mephenytoin	>10	NA
CYP2D6	Dextromethorphan	>10	NA
CYP3A4	Midazolam	>10	>1.3
CYP3A4	Testosterone	>10	>1.1
CYP3A4 inactivation parameters			
Inhibitor	k_{inact} (min^{-1})	K_I (µmol/L)	
Midazolam, 15 µmol/L	0.063	13.7	
Additional information: Positive control inhibitors met the acceptance criteria and confirm assay validity.			

[a)] Incubations were conducted in duplicates.

[b)] The fold change in IC_{50} was not applicable for time-dependent inhibition evaluation for all enzymes. This is because there was insufficient inhibition for IC_{50} values to be calculated.

NA; not applicable

表 2.6.5.13-3 CYP 誘導（ヒト肝細胞）

Test Article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.6-3
Report No.: 1064537

Study system	*In vitro*
Target entity	Cryopreserved human hepatocytes (two different donors)
Test system	Hepatocytes were exposed to risdiplam, control inducers or vehicle (DMSO) for 24 h. mRNA expression levels of CYP1A2, CYP2B6, CYP3A4 were evaluated. Positive controls: omeprazole (CYP1A2), phenobarbital (CYP2B6), rifampicin (CYP2B6, CYP3A4).
Assay	RT-PCR

Enzyme	**Fold induction over negative control (mean ± SD)[a)]**			
		Risdiplam 0.1 µmol/L	**Risdiplam 1 µmol/L**	**Risdiplam 10 µmol/L**
CYP1A2	Experiment 1	1.12 ± 0.18	0.95 ± 0.11	1.09 ± 0.24
	Experiment 2	0.77 ± 0.11	0.81 ± 0.04	0.62 ± 0.02
CYP2B6	Experiment 1	1.28 ± 0.06	1.03 ± 0.47	0.82 ± 0.07
	Experiment 2	0.73 ± 0.06	0.90 ± 0.09	0.63 ± 0.04
CYP3A4	Experiment 1	2.76 ± 1.92	0.76 ± 0.15	0.34 ± 0.07
	Experiment 2	0.84 ± 0.54	1.23 ± 0.51	0.56 ± 0.30
Additional information: Positive controls showed significant induction of respective CYP mRNAs and confirm assay validity.				

[a)] Each result represents mean ± SD of 3 biological replicates.

表 2.6.5.13-4 本薬及び M1の CYP 誘導（ヒト肝細胞）

Test Article: Risdiplam, M1
Location in CTD: 4.2.2.6-4
Report No.: 1090966

Study system	*In vitro*
Target entity	Cryopreserved human hepatocytes (three different donors)
Test system	Hepatocytes were exposed to risdiplam, Metabolite M1 (RO7112063), control inducers or vehicle (DMSO) for 48h. mRNA expression levels of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 and activity of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 were evaluated. Positive controls: omeprazole (CYP1A2), phenobarbital (CYP2B6), rifampicin (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4).
Assay	RT-PCR
Concentration	0.001-1 µmol/L risdiplam or metabolite M1 (RO7112063)

Enzyme	**Fold induction of enzyme mRNA relative to control cells[a)]**		**Fold induction of enzyme activity[a)]**	
	1 µmol/L Risdiplam	**1 µmol/L Metabolite M1 (RO7112063)**	**1 µmol/L Risdiplam**	**1 µmol/L Metabolite M1 (RO7112063)**
CYP1A2	0.54-0.75	1.15-1.33	0.52-0.96	1.21-1.52
CYP2B6	0.54-0.90	1.03-1.26	1.19-1.32	1.35-1.66
CYP2C8	0.14-0.20	1.23-1.29	NA	NA
CYP2C9	0.86-1.54	0.84-1.38	NA	NA
CYP2C19	1.13-2.01	1.18-1.43	NA	NA
CYP3A4	0.27-0.43	1.27-1.58	0.18-0.61	0.73-1.14
Additional information: All positive control inducers demonstrated the validity of the assays. Cell viability was determined when incubated for up to 72 h with risdiplam at up to 5 µmol/L and with metabolite M1 (RO7112063) up to 1.25 µmol/L.				
Conclusion: Treatment of hepatocytes with up to 1 µmol/L risdiplam or RO7112063 did not lead to significant induction (≥ 2-fold increase of CYP enzymes; ≥ 20% of the maximal positive control for the fold-induction) of mRNA for CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 or activity for CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4.				

NA=not applicable.

[a)] Range of fold-induction of three donors. Each fold-induction is calculated as mean of four replicates.

表 2.6.5.13-5　本薬の排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び基質輸送阻害：MDR1

Test Article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.6-5
Report No.: 1066927

Study system	*In vitro*
Target entity	LLC-PK1 wild type cell line, L-MDR1 (human-P-gp) transfected cell line
Test system	Transcellular transport of risdiplam was determined using polarized cells expressing hMDR1. MDR1 inhibition was assessed using digoxin as marker substrate and risdiplam as inhibitor.
Assay	LC-MS/MS, LSC

Substrates	Inhibitors	Observations *in vitro*
Permeability in LLC-PK1 wild type cells		
Risdiplam (1 µmol/L)	–	high (350 nm/s)
MDR1 (assessed in over expressing LLC-PK1 cells)		
Risdiplam (1 µmol/L) (Screening)	–	No significant efflux (ER <3)
Risdiplam (1 µmol/L) (Regulatory)	–	No significant efflux (ER <3)
Digoxin (5 µmol/L)	Risdiplam (20 µmol/L)	No significant inhibition (< 40%)

表 2.6.5.13-6　本薬のマウス P-gp (L-Mdr1a)を介する *in vitro* 輸送

Test Article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.6-6
Report No.: 1090180

Study system	*In vitro*
Target entity	LLC-PK1 wild type cells transfected with L-Mdr1a (mouse-P-gp)
Test system	Transcellular transport of risdiplam was determined using L-Mdr1a monolayers.
Assay	LC-MS/MS, LSC
Test substrate	Risdiplam

Mean Apparent Permeability across L-Mdr1a monolayers			
Substrates	**Inhibitors**	**Observations *in vitro***	**Comment**
Risdiplam (1 µmol/L)	Zosuquidar (1 µM)	P_{app} = 289 nm/s	Highly permeable
Mouse P-gp substrate potential			
Risdiplam (1 µmol/L)	–	ER = 3.7 ± 0.1[a)]	Substrate of mouse P-gp

[a)] Mean ± SD of triplicate wells.

表 2.6.5.13-7　本薬の取り込みトランスポーターを介する *in vitro* 輸送

Test Article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.6-11
Report No.: 1098464

Study sysytem	*In vitro*
Target entity	Cryopreserved human hepatocytes
Test system	The potential of risdiplam for substrate interaction with human liver OATP transporters was assessed by determining the hepatic uptake of risdiplam in plated human hepatocytes in the presence and absence of a well-characterized OATP inhibitor, rifamycin SV (RifSV).
Assay	LC-MS/MS
Test substrate	Risdiplam

Substrate	**Incubation time (min)**	**Uptake (pmol/mg)**		% **inhibited**	**Ovservations**
		Control	**+ RifSV (100 μmol/L)**		
Rosuvastatine (10 μmol/L)	1	183.1 ± 5.5	29.0 ± 1.3	84	Reference substrate
Quinidine (10 μmol/L)	1	1415 ± 164	1876 ± 153	0	Non-substrate reference
Risdiplam (1 μmol/L)	1	116 ± 5.5	170 ± 15.4	0	Uptake response shows no sensitivity to an OATP inhibitor
	5	484 ± 18.1	813 ± 170	0	
	10	1065 ± 86	1229 ± 181	0	
	30	1681 ± 167	1921 ± 278	0	

表 2.6.5.13-8 本薬の排泄又は取り込みトランスポーターを介する基質輸送阻害

Test Article: Risdiplam
Location in CTD: 4.2.2.6-7
Report No.: 1067280

Study system	*In vitro*
Target entity	OATP1B1-, OATP1B3- or OAT3 expressing HEK293FT cells; OAT1 or OCT2 expressing CHO cells; MDR1, MATE1- or MATE2-K expressing MDCKII cells
Test system	Efflux transporter and uptake transporter inhibition assays for risdiplam to investigate the interaction with the human MDR1, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1 and MATE2-K transporters. MDR1, MATE1 and MATE2-K were studied in overexpressing MDCKII cells, OCT2 and OAT1 in overexpressing CHO cells and the OATPs and OAT3 in HEK293 cells expressing the transport protein of interest.
Assay	LSC

Transporters	Substrates	Inhibitors	Observations in vitro[a)]
MDR1[b)]	Digoxin (5 µmol/L)	risdiplam (5 and 50 µmol/L)	Risdiplam did not decrease the relative transport of digoxin up to 50 µmol/L
OATP1B1	Estradiol-17β-glucuronide (1 µmol/L)	risdiplam (5 and 50 µmol/L)	No interaction up to 50 µmol/L
OATP1B3	Cholecystokinine-8 (0.11 µmol/L)	risdiplam (5 and 50 µmol/L)	No interaction up to 50 µmol/L
OAT1	p-Aminohippuric acid (5 µmol/L)	risdiplam (5 and 50 µmol/L)	No interaction up to 50 µmol/L
OAT3	Estrone-3-sulfate (1 µmol/L)	risdiplam (5 and 50 µmol/L)	No interaction up to 50 µmol/L
OCT2	Metformin (10 µmol/L)	risdiplam (0.21 - 150 µmol/L)	Risdiplam displayed inhibition against OCT2 (IC_{50} = 8.72 µmol/L)
MATE-1	Metformin (10 µmol/L)	risdiplam (0.021–15 µmol/L)	Risdiplam displayed significant inhibition against MATE1 (IC_{50} = 0.15 µmol/L)
MATE2-K	Metformin (10 µmol/L)	risdiplam (0.0064–100 µmol/L)	Risdiplam displayed significant inhibition against MATE2-K (IC_{50} = 0.09 µmol/L)

a) Only >20% difference from control (probe substrate transport) is considered as meaningful interaction.

b) Follow-up experiment using M199 cell culture media supplemented with 10% FBS, confirmed the result on the MDR1-mediated efflux of digoxin.

表 2.6.5.13-9 M1の排泄又は取り込みトランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び基質輸送阻害

Test Article: M1
Location in CTD: 4.2.2.6-8
Report No.: 1081903

Study system	*In vitro*
Target entity	LLC-PK1 wild type cells transfected with L-MDR1 (human-P-gp) or L-Mdr1a (mouse-P-gp); OATP1B1 or OATP1B3 expressing CHO cells
Test system	Transcellular transport of RO7112063 was determined using polarized cells expressing human (MDR1) and mouse (Mdr1a) P-gp. Human P-gp inhibition was assessed using digoxin as probe substrate. OATP1B1 and OATP1B3 inhibition was conducted using over-expressing CHO cells and probe substrates pravastatin and rosuvastatin, respectively.
Assay	LC-MS/MS, LSC, BCA protein assay
Test substrate	Metabolite M1 (RO7112063)

Substrates	Inhibitors	Observations *in vitro*
Permeability (assessed in over expressing LLC-PK1 cells)		
Metabolite M1 (RO7112063) (1 µmol/L)	–	High permeability P_{app} ~310 nm/s
MDR1 (assessed in over expressing LLC-PK1 cells)		
Metabolite M1 (RO7112063) (1 µmol/L)	–	ER = 4.2 ± 0.4[a)]
Digoxin (5 µmol/L)	RO7112063 (10 µmol/L)	No significant inhibition (< 40%): IC_{50}>10 µmol/L
Mdr1a (assessed in over expressing LLC-PK1 cells)		
Metabolite M1 (RO7112063) (1 µmol/L)	–	ER = 5.5 ± 0.3[a)]
OATP1B1 (assessed in over expressing CHO cells)		
Pravastatin (5 µmol/L)	RO7112063 (10–50 µmol/L)	No inhibition
OATP1B3 (assessed in over expressing CHO cells)		
Rosuvastatin (10 µmol/L)	RO7112063 (10–50 µmol/L)	No inhibition

[a)] Mean ± SD of triplicate wells

表 2.6.5.13-10 本薬及び M1の排泄トランスポーターを介する *in vitro* 輸送及び基質輸送阻害：BCRP

Test Article: Risdiplam, M1
Location in CTD: 4.2.2.6-10
Report No.: 1087637

Study system	*In vitro*
Target entity	MDCKII cells transfected with human BCRP (M-BCRP) and mouse Bcrp1 (M-Bcrp1)
Test system	Transcellular transport of risdiplam and metabolite M1 (RO7112063) was determined using polarized MDCK II cells expressing hBCRP and mBcrp1. Experiments were conducted using Ko143 as reference inhibitor.
Assay	LC-MS/MS
Test substrate	Risdiplam, Metabolite M1 (RO7112063)

Substrates	Inhibitors	Observations *in vitro*
Mean apparent permeability in M-BCRP cells in presence of inhibitor		
Risdiplam (1 µmol/L)	Ko143 (1 µmol/L)	Perm = 318 nm/s
Metabolite M1 (RO7112063) (1 µmol/L)		Perm = 522 nm/s
Mean apparent permeability in M-Bcrp1 cells in presence of inhibitor		
Risdiplam (1 µmol/L)	Ko143 (1 µmol/L)	Perm = 322 nm/s
Metabolite M1 (RO7112063) (1 µmol/L)		Perm = 402 nm/s
Human BCRP Substrate and inhibition (assessed in over expressing MDCK-II cells)		
Risdiplam (1 µmol/L)	–	ER = 3.1 ± 0.3
	Ko143 (1 µmol/L)	ER = 1.3 ± 0.1
Metabolite M1 (RO7112063) (1 µmol/L)	–	ER = 4.1 ± 0.2
	Ko143 (1 µmol/L)	ER = 1.4 ± 0.1
Positive control (RO7020322) (2 µmol/L)	Risdiplam (0.03–20 µmol/L)	38–46 % inhibition at 20 µmol/L
	Metabolite M1 (RO7112063) (0.01–10 µmol/L)	IC_{50} = 2.29 ± 0.36 µmol/L
Mouse Bcrp1 Substrate (assessed in over expressing MDCK-II cells)		
Risdiplam (1 µmol/L)	–	ER = 43.7 ± 4.9
	Ko143 (1 µmol/L)	ER = 1.3 ± 0.1
Metabolite M1 (RO7112063) (1 µmol/L)	–	ER = 75.4 ± 7.7
	Ko143 (1 µmol/L)	ER = 1.6 ± 0.1
Additional information: The positive control RO7020322 met the acceptance criteria and confirmed assay validity.		

Perm; permeability

表 2.6.5.13-11 M1の取り込みトランスポーターを介する基質輸送阻害

Test Article: M1
Location in CTD: 4.2.2.6-9
Report No.: 1074124

Study system	*In vitro*
Target entity	MATE1- or MATE2-K expressing MDCKII cells; OAT1-, OAT3- or OCT2 expressing HEK293FT cells
Test system	Cells were exposed to metabolite M1, control inhibitor or vehicle (DMSO) for 20 min at 37°C. The inhibition potential of metabolite M1 was evaluated for the following transporters: OAT1-, OAT3-, OCT2-, MATE1- and MATE2-K) at 2 and 20 µmol/L. A follow-up experiment using seven concentrations between 0-20 µmol/L was performed for OCT2-, MATE1- and MATE2-K transporters. Substrates: OAT1: p-aminohippuric acid; OAT3: estrone-3-sulfate; OCT2, MATE-1, MATE2-K: metformin. Negative controls: mock transfected HEK293FT and CAT transfected MDCKII
Assay	LSC
Test substrate	Metabolite M1 (RO7112063)

Transporters	Substrates	Inhibitors	Observations in vitro
OAT1	p-Aminohippuric acid (5 µmol/L)	RO7112063 (2 and 20 µmol/L)	34% relative inhibition at 20 µmol/L
OAT3	Estrone-3-sulfate (1 µmol/L)	RO7112063 (2 and 20 µmol/L)	No interaction observed at 20 µmol/L
OCT2	Metformin (10 µmol/L)	RO7112063 (2 and 20 µmol/L)	45% relative inhibition at 20 µmol/L (follow-up: 34% at 20 µmol/L), no IC_{50} calculated[a)]
MATE-1	Metformin (10 µmol/L)	RO7112063 (2 and 20 µmol/L)	77% relative inhibition at 20 µmol/L (follow-up: 66% at 20 µmol/L), IC_{50} = 14.8 µmol/L
MATE2-K	Metformin (10 µmol/L)	RO7112063 (2 and 20 µmol/L)	54% relative inhibition at 20 µmol/L (follow-up: 45% at 20 µmol/L), no IC_{50} calculated[a)]
Additional information: Positive controls confirmed function of the transporter in the applied cells and confirm assay validity.			
Conclusion: RO7112063 is an inhibitor of the MATE1 > MATE2-K (limited inhibition) > OCT2 > OAT1 transporters in vitro, but not an inhibitor of the OAT3 transporter up to 20 µmol/L.			

[a)] No IC_{50} (95%CI) calculation as the maximum inhibition did not reach 50%.

2.6.5.14 薬物動態試験：その他

該当なし。