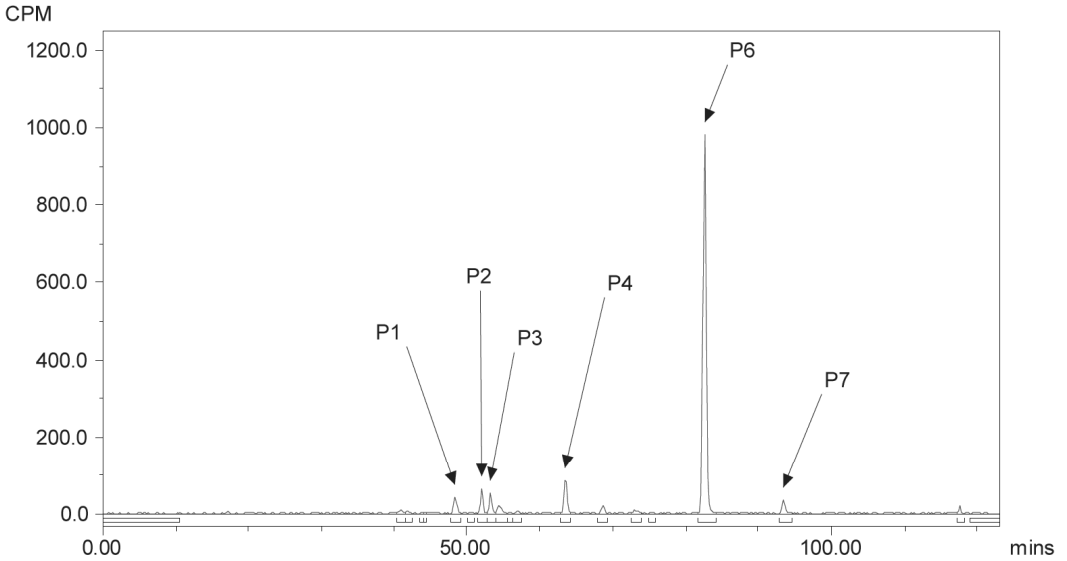
2.6.5.5.4 *In vivo* 代謝物プロファイリング

Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion Studies following a Single Oral Dose Administration to Male Rats	**Test Article: HBI-8000** **Location in CTD: 4.2.2.4-1** **Report No.: HYI/01**
動物種	Sprague Dawley 系ラット
摂餌条件	絶食
性別／動物数	血漿：雄／各時点 2 匹 尿、糞及び胆汁：雄／3 匹
投与量	血漿：9 mg/kg（500 μCi/kg） 尿、糞及び胆汁：9 mg/kg（100 μCi/kg）
溶媒／処方	10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン及び 10%プロピレングリコールを含有する脱イオン水溶液（pH 2.5）
投与法	強制経口投与
投与回数	1 回
サンプリング時間	血漿：投与前及び投与後 0.5、1、2、4、6、8 及び 24 時間（$AUC_{0\ 5\text{-}24}$ プールを調製） 尿：投与前及び投与後 0-6、6-24 時間及び以降投与後 240 時間まで 24 時間間隔（投与後 0～48 時間のプールを調製） 糞：投与前及び投与後 240 時間まで 24 時間間隔（投与後 0～72 時間のプールを調製） 胆汁：投与前及び投与後 1-2、2-3、3-4、4-5、5-6、6-24、24-48 及び 48-72 時間（投与後 1～48 時間のプールを調製）
分析法	高分解能精密質量分析装置及び 96-well プレートフラクションコレクターを備えた液体クロマトグラフィー

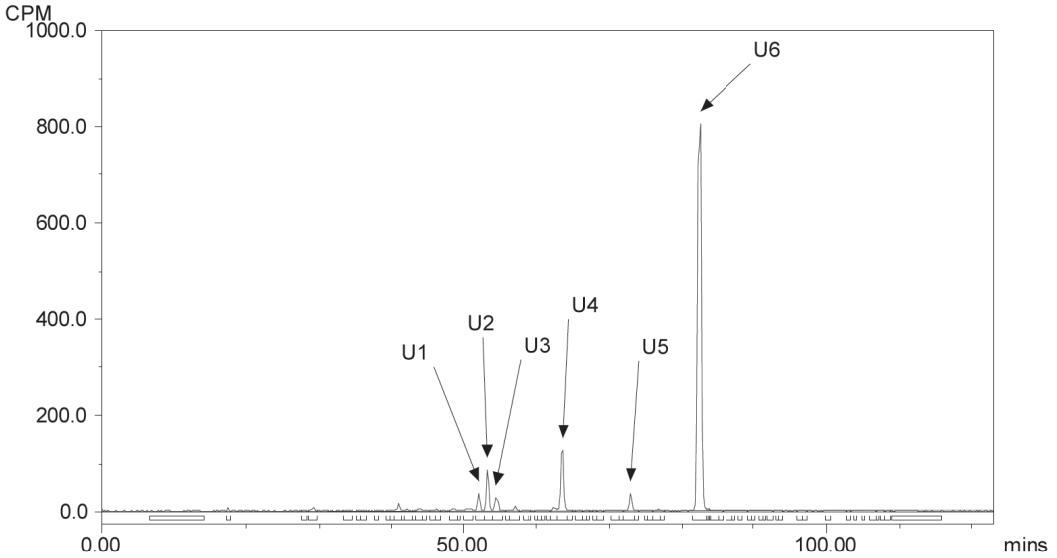
[^{14}C]HBI-8000 をラットに 9 mg/kg（血漿採取には 500 µCi/kg、尿、糞、胆汁採取には 100 µCi/kg）の投与量で単回経口投与したときのラジオクロマトグラム

血漿 $AUC_{0\ 5\text{-}24}$ プール



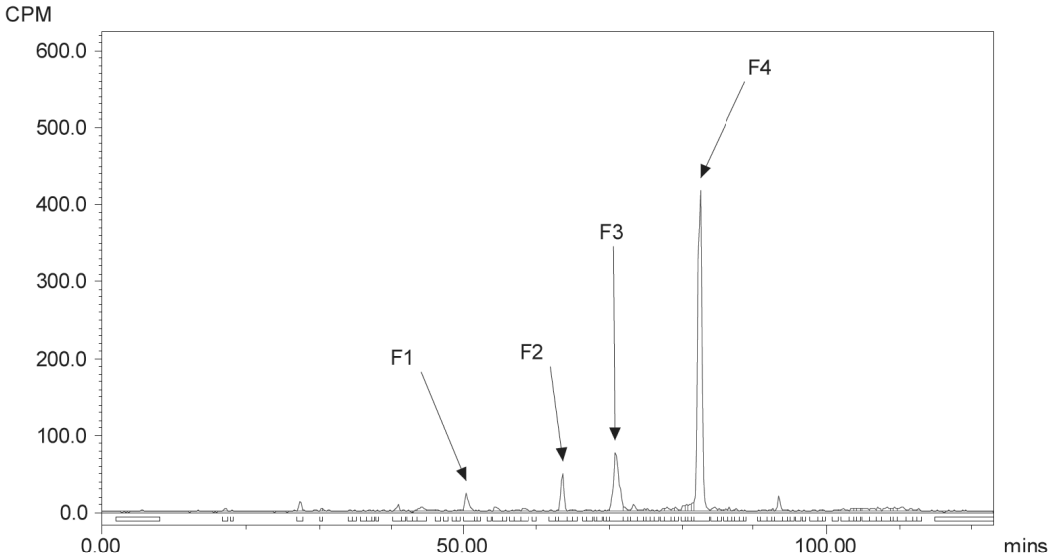
Peak name	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7
Retention time (min)	48.44	52.08	53.21	63.5	68.59	82.47	93.52
% of sample radioactivity	2.83	4.29	3.68	7.69	-	66.3	2.91

尿 0～48 時間プール



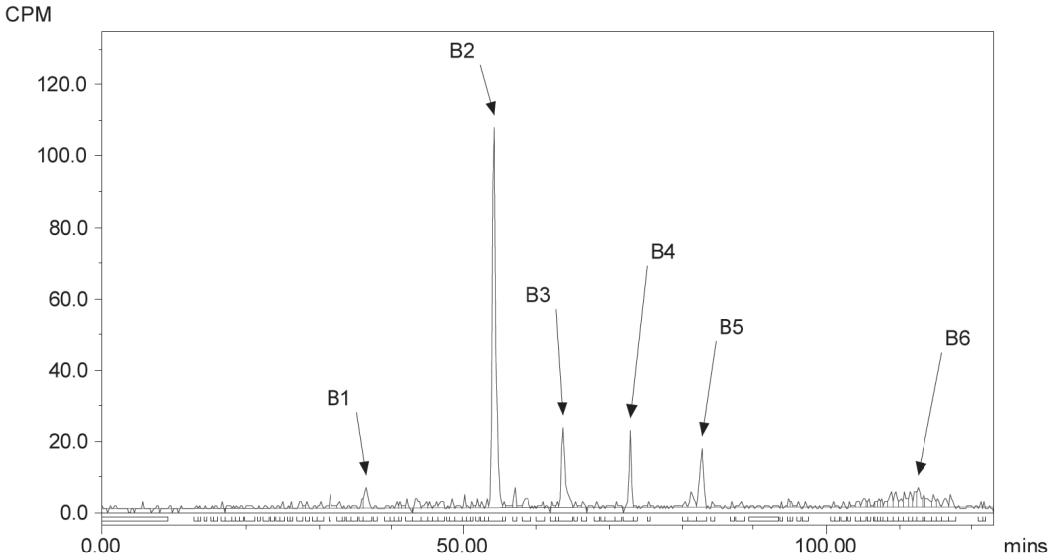
Peak name	U1	U2	U3	U4	U5	U6
Retention time (min)	52.08	53.15	54.44	63.66	72.87	82.52
% of dosed radioactivity	0.74	1.78	0.59	3.13	0.74	18.85
% of sample radioactivity	2.54	6.14	2.02	10.77	2.56	64.96

糞 0～72 時間プール



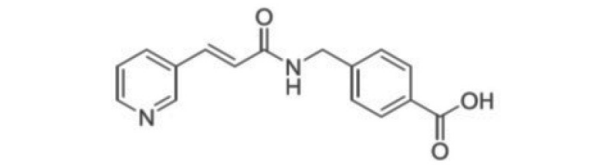
Peak name	F1	F2	F3	F4
Retention time (min)	50.37	63.66	70.73	82.52
% of dosed radioactivity	1.83	3.59	8.99	30.11
% of sample radioactivity	2.79	5.47	13.7	45.9

胆汁 1～48 時間プール

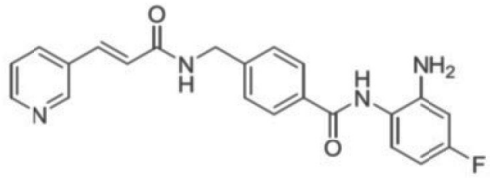


Peak name	B1	B2	B3	B4	B5	B6
Retention time (min)	36.65	54.23	63.66	72.87	82.73	112.53
% of dosed radioactivity	0.19	3.46	0.86	0.44	0.53	0.19
% of sample radioactivity	2.05	37.99	9.44	4.83	5.82	2.12

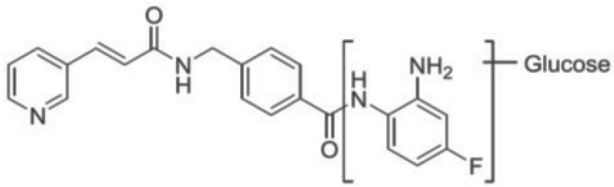
***In Vivo* における HBI-8000 の推定主要代謝経路**



M282: Amide hydrolysed metabolite of Tucidinostat [P4]



M390: Tucidinostat [P6, F4, U6 and B5]



M552: Tucidinostat *N*-glucose [F3]

2.6.5.6 排泄

2.6.5.6.1 ラットにおける排泄

Absorption, Distribution, Metabolism and Excretion Studies following a Single Oral Dose Administration to Male Rats	Test Article: HBI-8000 Location in CTD: 4.2.2.5-1 Report No.: HYI/01
動物種	Sprague Dawley 系ラット
摂餌条件	絶食
性別／動物数	雄／3 匹
投与量	9 mg/kg (100 μCi/kg)
溶媒／処方	10%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン及び 10%プロピレングリコールを含有する脱イオン水溶液（pH 2.5）
投与法	強制経口投与
投与回数	1 回
サンプリング時間	尿：投与前及び投与後 0-6、6-24 時間及び以降投与後 240 時間まで 24 時間間隔 糞：投与前及び投与後 240 時間まで 24 時間間隔 呼気：投与前及び投与後 72 時間まで 24 時間間隔 ケージ洗浄液：投与前及び投与後 240 時間まで 24 時間間隔 カーカス：投与後 240 時間 胆汁（胆管カニュレーションラット）：投与前及び投与後 1-2、2-3、3-4、4-5、5-6、6-24、24-48 及び 48-72 時間
分析法	液体シンチレーションカウンティング（LSC）

2.6.5.6.1 ラットにおける排泄（続き）

[^{14}C]HBI-8000 をラットに 9 mg/kg（100 µCi/kg）の投与量で単回経口投与したときの放射能の回収率						
Sample	**Collection period (hrs)**	**Recovery (% of dosed radioactivity)**			**Mean**	**SD**
		04M	**05M**	**06M**		
Urine	Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	0 - 6	37.52	10.35	10.95	19.61	15.52
	6 - 24	10.94	6.66	5.10	7.57	3.02
	24 - 48	3.38	1.16	1.00	1.85	1.33
	48 - 72	1.38	0.31	0.32	0.67	0.61
	72 - 96	0.53	0.18	0.18	0.30	0.20
	96 - 120	0.26	0.10	0.14	0.17	0.08
	120 - 144	0.18	0.06	0.08	0.11	0.06
	144 - 168	0.14	0.03	0.05	0.07	0.06
	168 - 192	0.09	0.02	0.03	0.05	0.04
	192 - 216	0.06	0.02	0.02	0.03	0.02
	216 - 240	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01
	Sub-total	54.51	18.90	17.88	30.43	20.86
Feces	Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	0 - 24	0.21	71.77	72.62	48.20	41.56
	24 - 48	22.82	7.43	3.69	11.31	10.14
	48 - 72	17.39	0.46	0.41	6.09	9.79
	72 - 96	1.92	0.25	0.18	0.78	0.99
	96 - 120	0.47	0.12	0.14	0.24	0.20
	120 - 144	0.25	0.07	0.09	0.14	0.10
	144 - 168	0.22	0.05	0.05	0.11	0.10
	168 - 192	0.13	0.02	0.03	0.06	0.06
	192 - 216	0.08	0.02	0.02	0.04	0.03
	216 - 240	0.06	BLQ	0.01	0.02	0.03
	Sub-total	43.55	80.19	77.24	66.99	20.36

2.6.5.6.1 ラットにおける排泄（続き）

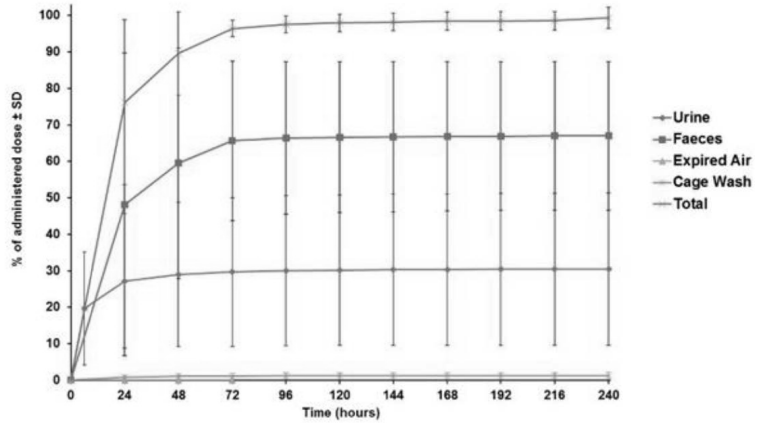
Sample	Collection period (hrs)	Recovery (% of dosed radioactivity)			Mean	SD
		04M	05M	06M		
Expired Air[A]	Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	0 - 24	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	24 - 48	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	48 - 72	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	Sub-total	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
Cage Wash	Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	24	1.42	0.63	0.48	0.84	0.51
	48	0.42	0.16	0.06	0.21	0.19
	72	0.21	0.05	0.02	0.09	0.10
	96	0.09	0.03	0.02	0.05	0.04
	120	0.03	0.02	0.01	0.02	0.01
	144	0.03	0.01	0.01	0.02	0.01
	168	0.02	BLQ	BLQ	0.01	0.01
	192	0.01	BLQ	BLQ	<0.01	0.01
	216	0.01	BLQ	BLQ	<0.01	0.01
	240	0.01	0.02	BLQ	0.01	0.01
	Sub-total	2.25	0.92	0.60	1.26	0.88
Carcass	240	1.35	0.46	0.44	0.75	0.52
Total Recovery		101.66	100.47	96.16	99.43	2.89

2.6.5.6.1 ラットにおける排泄（続き）

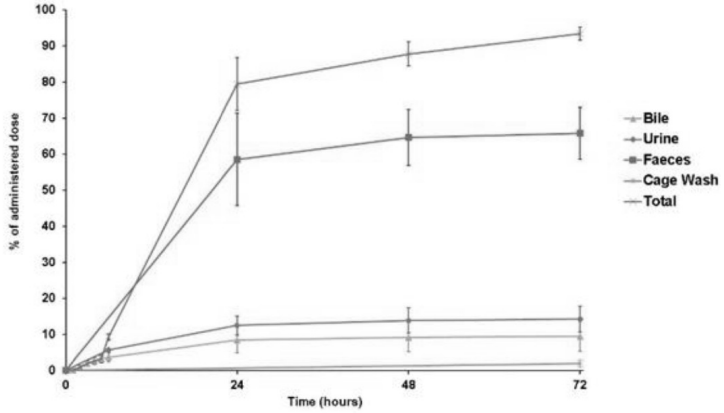
[^{14}C]HBI-8000 を胆管カニュレーションラットに 9 mg/kg（100 µCi/kg）の投与量で単回経口投与したときの放射能の回収率						
Sample	**Collection period (hrs)**	**Recovery (% of dosed radioactivity)**			**Mean**	**SD**
		04M	**05M**	**06M**		
Bile	Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	0 - 1	0.18	0.22	0.03	0.14	0.10
	1 - 2	0.90	1.17	0.40	0.82	0.39
	2 - 3	1.00	1.25	0.63	0.96	0.31
	3 - 4	0.83	0.71	0.51	0.68	0.16
	4 - 5	0.75	0.55	0.38	0.56	0.19
	5 - 6	0.71	0.42	0.27	0.47	0.22
	6 - 24	7.77	3.59	2.99	4.78	2.60
	24 - 48	1.59	0.41	0.50	0.83	0.66
	48 - 72	0.38	0.15	0.17	0.23	0.13
	Sub-total	14.11	8.47	5.88	9.49	4.21
Urine	Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	0 - 6	5.00	5.84	6.12	5.65	0.58
	6 - 24	10.31	4.37	5.81	6.83	3.10
	24 - 48	2.50	0.88	0.94	1.44	0.92
	48 - 72	0.48	0.32	0.38	0.39	0.08
	Sub-total	18.29	11.41	13.25	14.32	3.56
Feces	Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	0 - 24	44.37	62.18	69.23	58.59	12.81
	24 - 48	12.38	2.66	3.04	6.03	5.51
	48 - 72	1.33	1.91	0.22	1.15	0.86
	Sub-total	58.08	66.75	72.49	65.77	7.25
Cage Wash	Pre-dose	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	NC
	72	1.46	3.15	1.20	1.94	1.06
	Sub-total	1.46	3.15	1.20	1.94	1.06
Carcass	72	2.50	1.55	1.79	1.95	0.49
Total Recovery		94.44	91.33	94.61	93.46	1.85

2.6.5.6.1 ラットにおける排泄（続き）

[^{14}C]HBI-8000 をラットに 9 mg/kg（100 µCi/kg）の投与量で単回経口投与したときの放射能の平均回収率の経時的推移



[^{14}C]HBI-8000 を胆管カニュレーションラットに 9 mg/kg（100 µCi/kg）の投与量で単回経口投与したときの放射能の平均回収率の経時的推移



[A]: 2 時点連続で投与総放射能の 1%未満であったため投与後 72 時間の採取後に試料採取を中止した。
BLQ = 定量下限未満; NC = 算出せず; SD = 標準偏差

2.6.5.7 薬物相互作用

2.6.5.7.1 CYP 阻害（8HUYAP3）

Cytochrome P450 Inhibition	**Test Article: HBI-8000** **Location in CTD: 5.3.2.2-4** **Report No.: 8HUYAP3**
アッセイ	*In vitro*、ヒト肝ミクロソーム、カクテル基質法：37℃で 7 分間インキュベーション、単独基質法：37℃で 20 分間インキュベーション
カクテル基質法における **CYP** 分子種／基質／代謝物	CYP1A2／7-ethoxyresorufin／resorufin CYP2A6／coumarin／6-hydroxycoumarin CYP2C19／S-mephenytoin／4’-hydroxymephenytoin CYP2C9／tolbutamide／hydroxytolbutamide CYP2D6／bufuralol／1’-hydroxybufuralol CYP2E1／chlorzoxazone／6-hydroxy-chlorzoxazone CYP3A4／midazolam／1-hydroxymidazolam
単独基質法における **CYP** 分子種／基質／代謝物	CYP2B6／bupropion／hydroxybupropion CYP2C8／taxol／6-hydroxy-taxol CYP3A4／testosterone／6β-hydroxy-testosterone
分析法	LC-MS/MS
化合物濃度／肝ミクロソーム濃度	10 μM／0.8 mg/mL

2.6.5.7.1 CYP 阻害（8HUYAP3）（続き）

カクテル基質法							
CYP 分子種	測定代謝物	代謝物濃度（nM、n=3）				コントロール活性に対する残存率（%）	
		+HBI-8000		+溶媒（コントロール）		**Mean**	**SD**
		Mean	**SD**	**Mean**	**SD**		
CYP1A2	Resorufin	78	10	67	11	116	14
CYP2A6	6-Hydroxycoumarin	2590	252	2497	76	104	10
CYP2C19	4’-Hydroxymephenytoin	97	12	121	3.5	80.6	9.7
CYP2C9	Hydroxytolbutamide	303	25	375	35	81.0	6.5
CYP2D6	1’-Hydroxybufuralol	121	3.8	179	3.5	67.9	2.1
CYP2E1	6-Hydroxy-chlorzoxazone	351	56	539	30	65.2	10
CYP3A4	1-Hydroxymidazolam	909	32	3070	130	29.6	1.0
単独基質法							
CYP 分子種	測定代謝物	代謝物濃度（nM、n=3）				コントロール活性に対する残存率（%）	
		+HBI-8000		+溶媒（コントロール）		**Mean**	**SD**
		Mean	**SD**	**Mean**	**SD**		
CYP2B6	Hydroxybupropion	481	7	513	29	93.6	1.3
CYP2C8	6-Hydroxy-taxol	272	52	618	13	44.0	8.4
CYP3A4	6β-Hydroxy-testosterone	2250	731	23900	8282	9.4	3.1

2.6.5.7.2 CYP 阻害（8HUYAP5R1）

Determination of IC_{50} Values of HBI-8000 for CYP2C8 and CYP3A4 in Human Liver Microsomes	**Test Article: HBI-8000**
	Location in CTD: 5.3.2.2-5
	Report No.: 8HUYAP5R1

アッセイ	*In vitro*、ヒト肝ミクロソーム、CYP2C8：37°C で 20 分間インキュベーション、CYP3A4：37°C で 10 分間インキュベーション
CYP 分子種／基質／代謝物	CYP2C8/paclitaxel/6-α-OH paclitaxel CYP3A4/testosterone/6β-hydroxy-testosterone
分析法	LC-MS/MS
化合物濃度／肝ミクロソーム濃度	0、0.0412、0.123、0.370、1.11、3.33、10.0、30.0 µM／0.25 mg/mL

CYP 分子種	コントロール活性に対する残存率（%）								**IC_{50} (µM)**
	0 µM	**0.0412 µM**	**0.123 µM**	**0.370 µM**	**1.11 µM**	**3.33 µM**	**10.0 µM**	**30.0 µM**	
CYP2C8	100	105	107	99.4	92.0	81.4	54.0	34.7	12.7
CYP3A4	100	57.3	58.6	48.5	44.0	54.5	23.3	3.75	1.47

2.6.5.7.3 CYP 阻害（HUYA-04-[redacted]）

***In vitro* Inhibition and Induction Studies of HBI-8000 with the human CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 Metabolic Enzymes**	**Test Article: HBI-8000** **Location in CTD: 5.3.2.2-6** **Report No.: HUYA-04-[redacted]**
アッセイ	*In vitro*、ヒト肝ミクロソーム、NADPH 有無の条件下において 37°C で 30 分間プレインキュベーション後、基質を添加し 37°C で 10 分間インキュベーション
CYP 分子種／基質／代謝物	CYP2B6/bupropion/OH-bupropion CYP2C8/repaglinide/OH-repaglinide CYP2C9/diclofenac/OH-diclofenac CYP2C19/omeprazole/5-OH-omeprazole CYP2C19/omeprazole/desmethylomeprazole
分析法	LC-MS/MS
化合物濃度／肝ミクロソーム濃度	0.3、1、3、10、30、100 μM／0.3 mg/mL

CYP 分子種	**測定代謝物**	**IC_{50}（μM）****		**IC_{50} シフト（倍）**	**暫定 Ki（μM）**
		-NADPH	**+NADPH**		
CYP2B6*	OH-Bupropion	*123*	>>100	NA	*120*
CYP2C8*	OH-Repaglinide	11.7	12.4	0.9	9.7
CYP2C9*	OH-Diclofenac	*150*	>>100	NA	*75.0*
CYP2C19*	Desmethylomeprazole	4.8	5.0	1.0	3.2
CYP2C19*	5-OH-Omeprazole	3.2	3.3	1.0	2.1

CYP＝ チトクローム P450；IC_{50}＝50%阻害濃度；NA＝ 該当せず；NADPH＝ 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
* 上部プラトー値を 100%に固定する調整をした後のフィッティングから得られたデータ。
** フィッティングから 100～200 μM と外挿された値はイタリックで表示した。

2.6.5.7.4 CYP 阻害（AAIR-0011-DV-TB）

Determination of Time-Dependent Inhibition of CYP450 Enzyme Activity by HBI-8000	Test Article: HBI-8000
	Location in CTD: 5.3.2.2-7
	Report No.: AAIR-0011-DV-TB

アッセイ	*In vitro*、ヒト肝ミクロソーム、NADPH 有無の条件下において 37°C で 30 分間プレインキュベーション後、基質を添加し 37°C で 30 分間インキュベーション
CYP 分子種／基質／代謝物	CYP1A2/phenacetin/acetaminophen CYP2D6/dextromethorphan/dextrorphan CYP3A4/midazolam/hydroxymidazolam CYP3A4/testosterone/hydroxytestosterone
分析法	LC-MS/MS
化合物濃度／肝ミクロソーム濃度	0、0.001、0.004、0.018、0.07、0.28、1.13、4.5、6.7、10 μM/0.1 mg/mL

CYP 分子種	**測定代謝物**	**IC_{50}（μM）又は平均阻害率（%）**		**IC_{50} シフト（倍）**
		-NADPH	**+NADPH**	
CYP1A2	Acetaminophen	17.6%	9.2%	ND
CYP2D6	Dextrorphan	32.0%	34.8%	ND
CYP3A4	Hydroxymidazolam	5.08	4.50	1.13
CYP3A4	Hydroxytestosterone	6.82	6.10	1.12

CYP＝ チトクローム P450；IC_{50} =50%阻害濃度；還元型 NADPH＝ ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸; ND＝ 算出せず
注：回帰フィッティングは NADPH 有りの条件で少なくとも 70%阻害した化合物についてのみ実施した。他の条件で最大阻害率が 70%未満の場合、曲線の最大値を 100%に固定した。完全な用量反応曲線が得られなかった場合（少なくとも 70%超、理想的には 90%超の阻害）、阻害率は検討した最高濃度を表示した。TDI の可能性は、一般的に IC_{50} シフトが>1.5 で示唆される。

2.6.5.7.5 CYP 誘導（HUYA-02-[redacted]）

***In vitro* Interaction Studies of HBI-8000 with human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3 and OCT2 Uptake Transporters and with the human CYP1A2 and CYP3A4 Metabolic Enzymes**	**Test Article: HBI-8000** **Location in CTD: 5.3.2.2-8** **Report No.: HUYA-02-[redacted]**
アッセイ	*In vitro*、ドナー3 例のヒト肝細胞、5% CO_2 下 37°C で 48 時間インキュベーション
mRNA（qPCR）分析	機器：Quantstudio™ 6 Flex Real-Time PCR System with fast 96-well block ターゲットジーンアッセイ：CYP1A2 Hs_00167927_m1（Life Technologies）、CYP3A4 Hs_00604506_m1（Life Technologies） リファレンスジーンアッセイ：GAPDH Hs02758991_g1（Life Technologies）、B2M Hs00984230_m1（Life Technologies） ケミストリー：TaqMan™ probe chemistry レポーター色素：FAM（CYP1A2、CYP3A4）、VIC（GAPDH、B2M）、ROX（internal reference dye） クエンチャー色素：non-fluorescent ソフトウェア：Quantstudio™ Real-Time PCR software v1.0
化合物濃度／肝細胞数	0.3、1、3、10、30、100 μM／0.72 × 10^5 cells/well

CYP1A2 mRNA レベル

反応系	ドナーGKV		ドナーGNA		ドナーSVL	
	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%
	Mean (SD)	**Mean**	**Mean (SD)**	**Mean**	**Mean (SD)**	**Mean**
DMSO	1.0 (0.2)	0%	1.0 (0.1)	0%	1.0 (0.4)	0%
50 μM Omeprazole	**38.5** (6.8)	**100%**	**12.5** (1.8)	**100%**	**18.8** (3.7)	**100%**
10 μM Rifampicin	1.3 (0.3)	1%	0.7 (0.1)	-3%	0.6 (0.4)	-2%
0.3 μM HBI-8000	1.6 (0.1)	2%	1.4 (0.0)	4%	**2.8** (0.3)	10%
1 μM HBI-8000	**2.8** (0.6)	5%	**2.1** (0.6)	10%	**3.3** (0.5)	13%
3 μM HBI-8000	**4.1** (2.3)	8%	**2.6** (0.8)	14%	**4.1** (1.2)	17%
10 μM HBI-8000	**2.5** (0.1)	4%	1.9 (0.2)	8%	**2.3** (0.6)	7%
30 μM HBI-8000	1.7 (0.8)	2%	1.4 (0.3)	4%	1.8 (0.3)	4%
100 μM HBI-8000	1.1 (0.2)	0%	1.0 (0.6)	0%	1.1 (0.2)	1%

2.6.5.7.5 CYP 誘導（HUYA-02-[redacted]）（続き）

CYP3A4 mRNA レベル						
反応系	ドナーGKV		ドナーGNA		ドナーSVL	
	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%
	Mean (SD)	**Mean**	**Mean (SD)**	**Mean**	**Mean (SD)**	**Mean**
DMSO	1.0 (0.1)	0%	1.0 (0.1)	0%	1.0 (0.4)	0%
50 μM Omeprazole	**5.5** (0.5)	**62%**	**3.3** (0.3)	**36%**	**5.5** (1.0)	**59%**
10 μM Rifampicin	**8.2** (1.5)	**100%**	**7.5** (1.2)	**100%**	**8.7** (1.7)	**100%**
0.3 μM HBI-8000	1.2 (0.3)	2%	**3.0** (0.2)	**31%**	**3.5** (0.8)	**33%**
1 μM HBI-8000	1.7 (0.2)	10%	**4.6** (0.1)	**56%**	**3.5** (0.4)	**32%**
3 μM HBI-8000	1.3 (0.3)	4%	**2.9** (0.1)	**30%**	1.6 (0.3)	8%
10 μM HBI-8000	0.5 (0.1)	-7%	0.6 (0.0)	-5%	0.3 (0.0)	-9%
30 μM HBI-8000*	0.1 (0.0)	-13%	0.1 (0.0)	-13%	0.1 (0.0)	-12%
100 μM HBI-8000*	0.0** (0.0)	-14%	0.1 (0.0)	-14%	0.0 (0.0)	-12%

CYP= チトクローム P450；DMSO= ジメチルスルホキシド；MATE = multidrug and toxin extrusion transporter；mRNA= メッセンジャーリボ核酸；OAT = organic anion transporter；OATP = organic anion transporting polypeptide；OCT = organic cation transporter；qPCR = 定量的ポリメラーゼ連鎖反応； SD = 標準偏差
陽性対照による最大誘導倍率の 20%以上の誘導又は 2 倍以上の誘導倍率を示す値を太字で示した。
* 結晶がインキュベーション中の細胞の目視検査で観察されたため、溶液中の化合物濃度は 30 及び 100 μM より低くなっている可能性あり。
** 誘導倍率が 0.0 と表示されているデータは検出可能な遺伝子発現を示したものの、溶媒添加のコントロール試料に対して 0.1 倍未満であったと推定される。

2.6.5.7.6 CYP 誘導（HUYA-04-[redacted]）

***In vitro* Inhibition and Induction Studies of HBI-8000 with the human CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 Metabolic Enzymes**	**Test Article: HBI-8000** **Location in CTD: 5.3.2.2-6** **Report No.: HUYA-04-[redacted]**
アッセイ	*In vitro*、ドナー3 例のヒト肝細胞、5% CO_2 下 37°C で 48 時間インキュベーション
mRNA（qPCR）分析	機器：Quantstudio™ 6 Flex Real-Time PCR System with fast 96-well block ターゲットジーンアッセイ：CYP2C8 Hs00946140_g1（Life Technologies）、CYP2B6 Hs03044634_m1（Life Technologies）、CYP2C9 Hs04260376_m1（Life Technologies） リファレンスジーンアッセイ：GAPDH Hs02758991_g1（Life Technologies）、B2M Hs00984230_m1（Life Technologies） ケミストリー：TaqMan™ probe chemistry レポーター色素：FAM（CYP2C8、CYP2B6、CYP2C9）、VIC（GAPDH、B2M）、ROX（internal reference dye） クエンチャー色素：non-fluorescent ソフトウェア：Quantstudio™ Real-Time PCR software v1.0
化合物濃度／肝細胞数	0.3、1、3、10、30、100 μM／0.72×10^5 cells/well

2.6.5.7.6 CYP 誘導（HUYA-04-[redacted]）（続き）

CYP2B6 mRNA レベル						
反応系	ドナー**DSX**		ドナー**DVA**		ドナー**RMH**	
	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%
	Mean (SD)	**Mean**	**Mean (SD)**	**Mean**	**Mean (SD)**	**Mean**
DMSO	1.0 (0.1)	0%	1.0 (0.1)	0%	1.0 (0.0)	0%
1000 µM Phenobarbital	**26.0** (6.2)	**100%**	**38.2** (9.1)	**100%**	**9.1** (0.5)	**100%**
10 µM Rifampicin	**14.5** (7.2)	**54%**	**20.7** (2.1)	**53%**	**5.6** (0.2)	**58%**
0.1 µM CITCO	**5.6** (2.3)	18%	**12.8** (2.6)	**32%**	**2.5** (0.2)	18%
25 µM Flumazenil	0.7 (0.1)	-1%	0.8 (0.3)	0%	0.9 (0.1)	-1%
0.3 µM HBI-8000	1.4 (0.2)	2%	**2.1** (07)	3%	1.8 (0.3)	10%
1 µM HBI-8000	1.3 (0.3)	1%	1.2 (0.5)	1%	2.5 (0.2)	19%
3 µM HBI-8000	**2.8** (1.0)	7%	1.8 (0.6)	2%	1.9 (0.2)	11%
10 µM HBI-8000	**3.0** (0.6)	8%	1.8 (0.7)	2%	1.2 (0.2)	2%
30 µM HBI-8000	**2.2** (0.5)	5%	1.5 (0.5)	1%	1.2 (0.1)	2%
100 µM* HBI-8000	**2.2** (0.6)	5%	1.5 (0.4)	1%	1.5 (0.1)	6%

2.6.5.7.6 CYP 誘導（HUYA-04-[redacted]）（続き）

CYP2C8 mRNA レベル						
反応系	ドナー**DSX**		ドナー**DVA**		ドナー**RMH**	
	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%
	Mean (SD)	**Mean**	**Mean (SD)**	**Mean**	**Mean (SD)**	**Mean**
DMSO	1.0 (0.1)	0%	1.0 (0.2)	0%	1.0 (0.1)	0%
1000 µM Phenobarbital	**6.5** (1.1)	**100%**	**7.5** (0.9)	**100%**	**7.0** (0.6)	**100%**
10 µM Rifampicin	**4.9** (2.0)	**71%**	**7.0** (0.7)	**92%**	**5.3** (0.6)	**73%**
0.1 µM CITCO	1.5 (0.6)	9%	**2.3** (0.2)	19%	1.1 (0.1)	2%
25 µM Flumazenil	0.9 (0.1)	-2%	0.8 (0.2)	-3%	0.9 (0.1)	-2%
0.3 µM HBI-8000	**2.8** (0.0)	**33%**	**2.7** (0.6)	**26%**	**2.2** (0.2)	**21%**
1 µM HBI-8000	**2.8** (0.6)	**33%**	**2.0** (0.6)	15%	**3.7** (0.3)	**45%**
3 µM HBI-8000	1.9 (0.5)	17%	1.2 (0.2)	3%	1.9 (0.3)	15%
10 µM HBI-8000	0.6 (0.1)	-8%	0.3 (0.1)	-11%	0.8 (0.0)	-3%
30 µM HBI-8000	0.2 (0.0)	-14%	0.1 (0.0)	-13%	0.5 (0.0)	-8%
100 µM HBI-8000*	0.2 (0.0)	-15%	0.1 (0.0)	-14%	0.4 (0.1)	-10%

2.6.5.7.6 CYP 誘導（HUYA-04-[redacted]）（続き）

CYP2C9 mRNA レベル						
反応系	ドナーDSX		ドナーDVA		ドナーRMH	
	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%	誘導倍率	陽性対照に対する%
	Mean (SD)	Mean	Mean (SD)	Mean	Mean (SD)	Mean
DMSO	1.0 (0.1)	0%	1.0 (0.1)	0%	1.0 (0.0)	0%
1000 µM Phenobarbital	**3.1** (0.5)	**100%**	**2.9** (0.1)	**100%**	**2.7** (0.2)	**100%**
10 µM Rifampicin	**2.5** (1.0)	**73%**	**2.8** (0.4)	**96%**	**2.4** (0.1)	**83%**
0.1 µM CITCO	1.0 (0.4)	2%	1.4 (0.4)	22%	1.1 (0.1)	9%
25 µM Flumazenil	0.8 (0.1)	-9%	0.8 (0.2)	-13%	1.0 (0.1)	0%
0.3 µM HBI-8000	**2.1** (0.2)	**51%**	1.6 (0.4)	**31%**	1.5 (0.3)	**31%**
1 µM HBI-8000	1.7 (0.4)	**33%**	1.1 (0.4)	3%	1.5 (0.3)	**32%**
3 µM HBI-8000	1.5 (0.5)	**22%**	0.8 (0.1)	-10%	1.1 (0.3)	8%
10 µM HBI-8000	0.6 (0.1)	-18%	0.3 (0.1)	-36%	0.6 (0.0)	-25%
30 µM HBI-8000	0.4 (0.1)	-31%	0.2 (0.1)	-42%	0.4 (0.1)	-34%
100 µM HBI-8000	0.3 (0.1)	-35%	0.2 (0.0)	-44%	0.4 (0.0)	-35%

CYP＝ チトクローム P450；DMSO＝ ジメチルスルホキシド；mRNA＝ メッセンジャーRNA；qPCR＝ 定量的ポリメラーゼ連鎖反応；SD＝ 標準偏差
陽性対照による最大誘導倍率の 20%以上の誘導又は 2 倍以上の誘導倍率を示す値を太字で示した。
* 結晶がインキュベーション中の細胞の目視検査で観察されたため、溶液中の化合物濃度は 100 µM より低くなっている可能性あり。

2.6.5.7.7 トランスポーターの基質となる可能性（14F147 HUYA）

***In Vitro* Determination of Blood-Brain Barrier Penetration Potential P-gp, BCRP, and MRP2 Substrate Potential Assessment P-gp and BCRP Inhibition Potential Assessment**	**Test Article: HBI-8000** **Location in CTD: 5.3.2.2-9** **Report No.: 14F147 HUYA**
アッセイ	*In vitro*、Caco-2 細胞、5%vCO_2 下 37°C で 120 分間インキュベーション
実験手順	Caco-2 細胞（C2BBe1 のクローン）は、American Type Culture Collection（Manassas, VA）から入手した。細胞単層は、12 ウェル CostarTranswell®プレートのコラーゲンコーティングされた微孔性ポリカーボネート膜上でコンフルエントになるまで培養した。透過性アッセイバッファーには、10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid（HEPES）及び pH 7.4 の 15 mM グルコースを含む Hanks Balanced Salt Solution（HBSS）を使用した。レシーバーチャンバーのバッファーには、1% ウシ血清アルブミンも添加した。薬物濃度は、アッセイバッファー（阻害剤有り／無し）中で 5 µM とした。阻害剤有り／無しの条件下において 30 分間プレインキュベートした後、薬物を頂側膜側（A-to-B）又は側底膜側（B-to-A）に添加し、加湿インキュベーター内で 5% CO_2 下 37°C でインキュベートした。120 分後にサンプルを採取し、2 回繰り返し測定した。同時添加した lucifer yellow flux を測定し、実験中細胞単層に損傷がないことを確認した。サンプルは、エレクトロスプレーイオン化を使用した LC-MS/MS で分析した。

反応系	透過方向	回収率（%）	見かけの透過係数 P_{app}（10^{-6} cm/s）			排出比	基質判定
			R1	R2	AVG		
HBI-8000	A-to-B	91	0.36	0.35	0.36	79.8	---
	B-to-A	97	26.1	30.7	28.4		
HBI-8000 +1 µM valspodar (P-gp)	A-to-B	86	0.99	1.05	1.02	27.2	Positive
	B-to-A	89	26.4	28.9	27.7		
HBI-8000 +10 µM Ko143 (BCRP)	A-to-B	89	2.70	2.42	2.56	9.9	Positive
	B-to-A	93	22.4	28.5	25.5		
HBI-8000 +30 µM MK571 (MRP2)	A-to-B	88	3.48	3.51	3.49	7.7	Positive
	B-to-A	95	25.8	28.2	27.0		

BCRP = breast cancer resistance protein ; Caco-2 = human epithelial colorectal adenocarcinoma cells ; MRP2 = multidrug resistance protein 2 ; Papp = 見かけの透過係数 : P-gp = P-glycoprotein.

2.6.5.7.8 トランスポーターの基質となる可能性（HUYA-02-[redacted]）

***In vitro* Interaction Studies of HBI-8000 with human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3 and OCT2 Uptake Transporters and with the human CYP1A2 and CYP3A4 Metabolic Enzymes**	**Test Article: HBI-8000** **Location in CTD: 5.3.2.2-8** **Report No.: HUYA-02-[redacted]**
アッセイ	*In vitro*、MDCKII 細胞又は HEK293 細胞、5% CO_2 下 37°C で 10 分間インキュベーション
実験手順	HBI-8000 の取り込みは、各取り込みトランスポーターを過剰発現させた細胞及びコントロール細胞を使用して評価した。10 分間インキュベーション後、4 濃度（1、5、10、50/45 μM）の HBI-8000 が能動的に細胞に取り込まれたか調べた。 OAT3、OCT2 及び MATE2-K との相互作用を確認するため、各トランスポーターに対する阻害剤の存在下でも測定した。 実験前に、培地を除去し、細胞をバッファー300 μL で 2 回洗浄した。細胞への HBI-8000 の取り込みは、HBI-8000 を含む適切なバッファー300 μL を加え、37 °C ± 1 °C でインキュベートして実施した。 HBI-8000 を含む KH 又は HBSS バッファーを除去することにより反応を停止し、細胞を 300 μL の適切なバッファーで 2 回洗浄した。 300 μL の MeOH：H_2O（2：1）を加えて細胞を溶解し、4°C±1°C で 20 分間インキュベートした。細胞溶解物中の HBI-8000 は、LC-MS/MS により定量した。各ウェルのタンパク質量は、bicinchoninic acid（BCA）タンパク質アッセイキット（Thermo Scientific、Rockford、IL、USA）又はタンパク質測定用 BCA キット（Sigma-Aldrich、St Louis、MO、USA）を使用して定量した。

MATE1 基質性

反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM HBI-8000	8.52 (1.06)	6.59 (0.06)	1.93 (1.06)	1.29
5 μM HBI-8000	41.78 (0.51)	38.76 (0.63)	3.01 (0.81)	1.08
10 μM HBI-8000	91.35 (5.95)	74.17 (4.28)	17.18 (7.33)	1.23
50 μM HBI-8000	494.83 (102.51)	426.03 (4.10)	68.80 (102.59)	1.16
10 μM Metformin	350.00 (13.00)	21.33 (10.21)	328.67 (16.53)	16.41
10 μM Metformin + 1 μM Pyrimethamine	33.00 (6.08)	20.00 (12.73)	13.00 (14.11)	1.65

2.6.5.7.8 トランスポーターの基質となる可能性（HUYA-02-[redacted]）（続き）

MATE2-K 基質性				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM HBI-8000	17.57 (1.49)	8.39 (2.08)	9.18 (2.56)	2.09
5 μM HBI-8000	70.55 (6.47)	39.37 (5.01)	31.17 (8.19)	1.79
10 μM HBI-8000	135.54 (12.14)	89.06 (7.40)	46.49 (14.21)	1.52
50 μM HBI-8000	592.82 (43.72)	487.68 (121.15)	105.14 (128.79)	1.22
10 μM Metformin	248.00 (11.27)	15.33 (4.16)	232.67 (12.01)	16.17
10 μM Metformin + 10 μM Pyrimethamine	21.33 (6.43)	23.33 (4.73)	-2.00 (7.98)	0.91
OAT1 基質性				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM HBI-8000	29.55 (12.01)	45.03 (23.77)	-15.48 (26.63)	0.66
5 μM HBI-8000	104.52 (9.21)	123.85 (13.39)	-19.34 (16.25)	0.84
10 μM HBI-8000	219.13 (12.01)	223.20 (9.98)	-4.07 (15.61)	0.98
50 μM HBI-8000	1052.56 (51.28)	1162.99 (32.69)	-110.43 (60.81)	0.91
5 μM Tenofovir	2450.00 (106.66)	47.00 (6.24)	2403.00 (106.84)	52.13
5 μM Tenofovir + 500 μM Probenecid	81.67 (6.81)	37.67 (5.51)	44.00 (8.76)	2.17

2.6.5.7.8 トランスポーターの基質となる可能性（HUYA-02-[redacted]）（続き）

OAT3 基質性				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM HBI-8000	95.02 (6.55)	24.13 (0.45)	70.89 (6.56)	3.94
5 μM HBI-8000	470.29 (64.23)	110.74 (2.88)	359.55 (64.29)	4.25
10 μM HBI-8000	851.21 (117.37)	246.24 (50.93)	604.97 (127.95)	3.46
45 μM HBI-8000	2630.14 (707.43)	1026.42 (108.97)	1603.72 (715.78)	2.56
1 μM E3S	6575.67 (115.98)	123.67 (19.73)	6452.00 (117.64)	53.17
1 μM E3S + 500 μM Probenecid	331.33 (40.86)	112.33 (6.81)	219.00 (41.42)	2.95
OATP1B1 基質性				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM HBI-8000	48.29 (2.29)	63.81 (10.36)	-15.52 (10.61)	0.76
5 μM HBI-8000	174.46 (23.74)	233.48 (27.07)	-59.02 (36.01)	0.75
10 μM HBI-8000	335.15 (24.21)	409.95 (33.09)	-74.81 (41.01)	0.82
45 μM HBI-8000	1512.62 (145.76)	2260.79 (261.98)	-748.17 (299.80)	0.67
1 μM E217βG	3052.00 (46.36)	46.67 (4.62)	3005.33 (46.59)	65.40
1 μM E217βG + 50 μM Rifampicin	122.67 (41.43)	56.67 (12.66)	66.00 (43.32)	2.16

2.6.5.7.8 トランスポーターの基質となる可能性（HUYA-02-[redacted]）（続き）

OATP1B3 基質性				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM HBI-8000	51.37 (3.70)	51.15 (5.73)	0.22 (6.82)	1.00
5 μM HBI-8000	207.78 (21.69)	207.66 (22.66)	0.12 (31.37)	1.00
10 μM HBI-8000	389.85 (44.32)	429.37 (111.88)	-39.51 (120.34)	0.91
50 μM HBI-8000	1797.90 (33.09)	1896.00 (250.16)	-98.10 (252.33)	0.95
0.11 μM CCK-8	802.67 (44.38)	21.00 (3.46)	781.67 (44.51)	38.22
0.11 μM CCK-8 + 50 μM Rifampicin	47.33 (3.21)	83.33 (27.43)	-36.00 (27.62)	0.57
OCT2 基質性				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM HBI-8000	44.57 (18.47)	22.25 (2.45)	22.32 (18.63)	2.00
5 μM HBI-8000	111.37 (9.82)	83.72 (8.87)	27.65 (13.23)	1.33
10 μM HBI-8000	203.76 (13.81)	183.58 (5.95)	20.19 (15.04)	1.11
50 μM HBI-8000	1198.02 (92.03)	983.23 (34.36)	214.79 (98.24)	1.22
10 μM Metformin	485.67 (47.04)	52.67 (10.50)	433.00 (48.19)	9.22
10 μM Metformin + 300 μM Verapamil	68.67 (10.02)	32.33 (2.52)	36.33 (10.33)	2.12

2.6.5.7.8 トランスポーターの基質となる可能性（HUYA-02-[redacted]）（続き）

OAT3 基質性（確認試験）				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
5 μM HBI-8000	490.03 (158.05)	213.26 (18.06)	276.76 (159.08)	2.30
5 μM HBI-8000 + 500 μM Probenecid	264.53 (49.48)	239.43 (32.16)	25.11 (59.01)	1.10
1 μM E3S	4586.67 (438.42)	103.00 (15.62)	4483.67 (438.70)	44.53
1 μM E3S + 500 μM Probenecid	193.33 (6.35)	92.67 (18.01)	100.67 (19.10)	2.09
OCT2 基質性（確認試験）				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM HBI-8000	27.94 (2.53)	26.80 (1.12)	1.14 (2.77)	1.04
1 μM HBI-8000 + 300 μM Verapamil	26.90 (1.32)	55.31 (21.61)	-28.41 (21.65)	0.49
10 μM Metformin	496.33 (20.23)	46.33 (16.77)	450.00 (26.28)	10.71
10 μM Metformin + 300 μM Verapamil	49.67 (13.32)	31.00 (17.06)	18.67 (21.64)	1.60

2.6.5.7.8 トランスポーターの基質となる可能性（HUYA-02-[redacted]）（続き）

MATE2-K 基質性（確認試験）				
反応系	取り込み量（pmol/mg protein）			取り込み比
	トランスポーター発現細胞	コントロール細胞	能動的輸送	
	Mean (SD)、n=3	Mean (SD)、n=3	Mean (SD)、n=3	
1 μM HBI-8000	35.29 (3.43)	12.19 (0.69)	23.10 (3.50)	2.90
1 μM HBI-8000 + 10 μM Pyrimethamine	8.64 (0.30)	7.23 (0.63)	1.41 (0.69)	1.19
10 μM Metformin	464.33 (13.43)	26.00 (7.81)	438.33 (15.53)	17.86
10 μM Metformin + 10 μM Pyrimethamine	44.67 (5.69)	28.67 (3.06)	16.00 (6.45)	1.56

CYP＝ チトクローム P450；HBSS = Hanks Balanced Salt Solution；HEK293＝ ヒト胎児腎細胞 293；KH = Krebs Henseleit；MATE = multidrug and toxin extrusion transporter；MDCK = Madin-Darby canine kidney；OAT = organic anion transporter；OATP = organic anion transporting polypeptide；OCT = organic cation transporter；SD＝ 標準偏差

2.6.5.7.9 トランスポーター阻害（14F147 HUYA）

In Vitro Determination of Blood-Brain Barrier Penetration Potential P-gp, BCRP, and MRP2 Substrate Potential Assessment P-gp and BCRP Inhibition Potential Assessment	Test Article: HBI-8000 Location in CTD: 5.3.2.2-9 Report No.: 14F147 HUYA
アッセイ	*In vitro*、MDR1-MDCK 細胞又は BCRP-MDCK 細胞、5% CO_2 下 37°C で 120 分間インキュベーション
実験手順	細胞単層は、12 ウェル Costar Transwell®プレートのコラーゲンコーティングされた微孔性ポリカーボネート膜上でコンフルエントになるまで培養した。透過性アッセイバッファーには、10 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid（HEPES）及び pH 7.4 の 15 mM グルコースを含む Hanks Balanced Salt Solution（HBSS）を使用した。基質濃度は、アッセイバッファー中で 10 µM の digoxin 又は cladribine とし、阻害剤濃度は、1 µM の valspodar 又は 10 µM の Ko143 及び cladribine、並びに 0.412～100 µM の HBI-8000 とした（6 濃度）。基質を側底膜側（B-to-A）に添加し、加湿インキュベーター内で 5% CO_2 下 37 °C でインキュベートした。120 分後にサンプルを採取し測定した。同時添加した lucifer yellow flux を測定し、実験中細胞単層に損傷がないことを確認した。サンプルは、エレクトロスプレーイオン化を使用した LC-MS/MS で分析した。

P-gp 阻害

反応系	透過方向	回収率（%）	見かけの透過係数 P_{app}（10^{-6} cm/s）			IC_{50}（µM）
			R1	R2	AVG	
10 µM Digoxin	B-to-A	122	6.45	6.33	6.39	---
10 µM Digoxin + 1 µM Valspodar	B-to-A	80	0.44	0.43	0.43	---
10 µM Digoxin + 100 µM HBI-8000	B-to-A	76	5.57	---	5.57	>100
10 µM Digoxin + 33.3 µM HBI-8000	B-to-A	92	5.41	---	5.41	
10 µM Digoxin + 11.1 µM HBI-8000	B-to-A	77	6.06	---	6.06	
10 µM Digoxin + 3.70 µM HBI-8000	B-to-A	82	7.07	---	7.07	
10 µM Digoxin + 1.23 µM HBI-8000	B-to-A	94	6.58	---	6.58	
10 µM Digoxin + 0.412 µM HBI-8000	B-to-A	116	7.50	---	7.50	

2.6.5.7.9 トランスポーター阻害（14F147 HUYA）（続き）

BCRP 阻害						
反応系	透過方向	回収率（%）	見かけの透過係数 P_{app}（10^{-6} cm/s）			IC_{50}（μM）
			R1	**R2**	**AVG**	
10 μM Cladribine	B-to-A	105	14.3	14.7	14.5	---
10 μM Cladribine + 10 μM Ko143	B-to-A	120	0.30	0.29	0.29	---
10 μM Cladribine + 100 μM HBI-8000	B-to-A	135	9.03	---	9.03	>100
10 μM Cladribine + 33.3 μM HBI-8000	B-to-A	144	9.77	---	9.77	
10 μM Cladribine + 11.1 μM HBI-8000	B-to-A	124	8.42	---	8.42	
10 μM Cladribine + 3.70 μM HBI-8000	B-to-A	106	13.1	---	13.1	
10 μM Cladribine + 1.23 μM HBI-8000	B-to-A	97	12.8	---	12.8	
10 μM Cladribine + 0.412 μM HBI-8000	B-to-A	102	13.9	---	13.9	

BCRP = breast cancer resistance protein; MDCK = Madin-Darby canine kidney; MDR1 = multidrug resistance 1; MRP2 = multidrug resistance protein 2; P-gp = P-glycoprotein

2.6.5.7.10 トランスポーター阻害（HUYA-02-[redacted]）

***In vitro* Interaction Studies of HBI-8000 with human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3 and OCT2 Uptake Transporters and with the human CYP1A2 and CYP3A4 Metabolic Enzymes**	**Test Article: HBI-8000** **Location in CTD: 5.3.2.2-8** **Report No.: HUYA-02-[redacted]**
アッセイ	*In vitro*、MDCKII 細胞又は HEK293 細胞、5% CO_2 下 37 ℃ で 1～15 分間インキュベーション
実験手順	実験前に、培地を除去し、細胞をバッファー100 µL で 2 回洗浄した。細胞への取り込みは、基質及び HBI-8000 又は溶媒を含む適切なバッファー50 µL を加え、37 ℃ ± 1 ℃ でインキュベートして実施した。反応終了後、氷冷した KH 又は HBSS バッファー100 µL で細胞を 2 回洗浄し、50 µL の 0.1 M NaOH を加えて細胞を溶解した。4℃ ± 1℃ で 20 分間インキュベートした。細胞溶解物中の HBI-8000 は、LC-MS/MS により定量した。各ウェルのタンパク質量は、放射性標識プローブ基質は、各ウェルから得られた 35 µL を液体シンチレーションカウンターで測定して定量した。

2.6.5.7.10 トランスポーター阻害（HUYA-02-[redacted]）（続き）

MATE1 阻害			
反応系	トランスポーター特異的取り込み（cpm）	相対的トランスポーター特異的取り込み（コントロールに対する%）	相対的阻害率（%）
	Mean (SD)、n=3	Mean (SD)、n=3	
10 μM Metformin + 50 μM HBI-8000	232.00 (12.60)	54.46 (3.94)	46
10 μM Metformin + 16.67 μM HBI-8000	298.67 (12.22)	70.11 (4.41)	30
10 μM Metformin + 5.56 μM HBI-8000	385.00 (46.18)	90.38 (11.67)	10
10 μM Metformin + 1.85 μM HBI-8000	421.67 (69.27)	98.98 (16.93)	1
10 μM Metformin + 0.62 μM HBI-8000	408.33 (24.75)	95.85 (7.40)	4
10 μM Metformin + 0.21 μM HBI-8000	416.00 (35.27)	97.65 (9.50)	2
10 μM Metformin + 0.07 μM HBI-8000	401.67 (13.80)	94.29 (5.55)	6
10 μM Metformin + Vehicle (DMSO)	426.00 (20.35)	100.00 (6.75)	0
10 μM Metformin + 1 μM Pyrimethamine	25.33 (10.41)	6.40 (2.76)	94
10 μM Metformin + Vehicle (DMSO)	396.00 (51.21)	100.00 (18.29)	0

2.6.5.7.10 トランスポーター阻害（HUYA-02-[redacted]）（続き）

MATE2-K 阻害			
反応系	トランスポーター特異的取り込み（cpm）	相対的トランスポーター特異的取り込み（コントロールに対する%）	相対的阻害率（%）
	Mean (SD)、n=3	Mean (SD)、n=3	
10 μM Metformin + 50 μM HBI-8000	94.67 (20.75)	40.69 (9.16)	59
10 μM Metformin + 16.67 μM HBI-8000	106.67 (8.85)	45.85 (4.48)	54
10 μM Metformin + 5.56 μM HBI-8000	154.33 (4.83)	66.33 (4.01)	34
10 μM Metformin + 1.85 μM HBI-8000	181.67 (13.20)	78.08 (6.96)	22
10 μM Metformin + 0.62 μM HBI-8000	236.33 (11.72)	101.58 (7.27)	-2
10 μM Metformin + 0.21 μM HBI-8000	223.00 (25.39)	95.85 (11.98)	4
10 μM Metformin + 0.07 μM HBI-8000	231.00 (20.07)	99.28 (10.04)	1
10 μM Metformin + Vehicle (DMSO)	232.67 (12.01)	100.00 (7.30)	0
10 μM Metformin + 10 μM Pyrimethamine	-2.00 (7.98)	-0.84 (3.34)	101
10 μM Metformin + Vehicle (DMSO)	239.00 (19.54)	100.00 (11.57)	0

2.6.5.7.10 トランスポーター阻害（HUYA-02-[redacted]）（続き）

OAT1 阻害			
反応系	トランスポーター特異的取り込み（cpm）	相対的トランスポーター特異的取り込み（コントロールに対する%）	相対的阻害率（%）
	Mean (SD)、n=3	Mean (SD)、n=3	
5 μM Tenofovir + 50 μM HBI-8000	1951.33 (351.69)	71.49 (14.27)	29
5 μM Tenofovir + 16.67 μM HBI-8000	2442.00 (154.13)	89.47 (9.53)	11
5 μM Tenofovir + 5.56 μM HBI-8000	2664.67 (268.55)	97.63 (12.92)	2
5 μM Tenofovir + 1.85 μM HBI-8000	2547.67 (268.28)	93.34 (12.68)	7
5 μM Tenofovir + 0.62 μM HBI-8000	2697.67 (221.94)	98.84 (11.74)	1
5 μM Tenofovir + 0.21 μM HBI-8000	2667.67 (289.93)	97.74 (13.53)	2
5 μM Tenofovir + 0.07 μM HBI-8000	2714.33 (298.30)	99.45 (13.86)	1
5 μM Tenofovir + Vehicle (DMSO)	2729.33 (233.99)	100.00 (12.12)	0
5 μM Tenofovir + 500 μM Probenecid	44.00 (8.76)	1.83 (0.37)	98
5 μM Tenofovir + Vehicle (DMSO)	2403.00 (106.84)	100.00 (6.29)	0

2.6.5.7.10 トランスポーター阻害（HUYA-02-[redacted]）（続き）

OAT3 阻害			
反応系	トランスポーター特異的取り込み（cpm）	相対的トランスポーター特異的取り込み（コントロールに対する%）	相対的阻害率（%）
	Mean (SD)、n=3	Mean (SD)、n=3	
1 μM E3S + 45 μM HBI-8000	4783.33 (450.65)	76.56 (7.50)	23
1 μM E3S + 15 μM HBI-8000	5147.33 (377.22)	82.38 (6.43)	18
1 μM E3S + 5 μM HBI-8000	5414.33 (349.60)	86.66 (6.06)	13
1 μM E3S + 1.67 μM HBI-8000	5681.67 (251.25)	90.94 (4.71)	9
1 μM E3S + 0.56 μM HBI-8000	5973.00 (237.86)	95.60 (4.59)	4
1 μM E3S + 0.19 μM HBI-8000	5863.67 (323.57)	93.85 (5.76)	6
1 μM E3S + 0.06 μM HBI-8000	6012.67 (66.22)	96.23 (2.79)	4
1 μM E3S + Vehicle (DMSO)	6248.00 (167.83)	100.00 (3.80)	0
1 μM E3S + 500 μM Probenecid	219.00 (41.42)	3.39 (0.64)	97
1 μM E3S + Vehicle (DMSO)	6452.00 (117.64)	100.00 (2.58)	0

2.6.5.7.10 トランスポーター阻害（HUYA-02-[redacted]）（続き）

OATP1B1 阻害			
反応系	トランスポーター特異的取り込み（cpm）	相対的トランスポーター特異的取り込み（コントロールに対する%）	相対的阻害率（%）
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	
1 μM $E_2$17βG + 45 μM HBI-8000	1899.00 (126.83)	65.72 (6.97)	34
1 μM $E_2$17βG + 15 μM HBI-8000	2280.00 (87.10)	78.91 (7.17)	21
1 μM $E_2$17βG + 5 μM HBI-8000	2483.67 (131.25)	85.95 (8.42)	14
1 μM $E_2$17βG + 1.67 μM HBI-8000	2658.67 (80.50)	92.01 (8.08)	8
1 μM $E_2$17βG + 0.56 μM HBI-8000	2609.67 (92.31)	90.32 (8.10)	10
1 μM $E_2$17βG + 0.19 μM HBI-8000	2783.67 (166.57)	96.34 (9.82)	4
1 μM $E_2$17βG + 0.06 μM HBI-8000	2852.33 (154.75)	98.71 (9.74)	1
1 μM $E_2$17βG + Vehicle (DMSO)	2889.50 (238.27)	100.00 (11.66)	0
1 μM $E_2$17βG + 50 μM Rifampicin	66.00 (43.32)	2.20 (1.44)	98
1 μM $E_2$17βG + Vehicle (DMSO)	3005.33 (46.59)	100.00 (2.19)	0

2.6.5.7.10 トランスポーター阻害（HUYA-02-[redacted]）（続き）

OATP1B3 阻害			
反応系	トランスポーター特異的取り込み（cpm）	相対的トランスポーター特異的取り込み（コントロールに対する%）	相対的阻害率（%）
	Mean (SD)、n=3	**Mean (SD)、n=3**	
0.1 μM CCK-8 + 50 μM HBI-8000	495.33 (48.80)	63.37 (7.21)	37
0.1 μM CCK-8 + 16.67 μM HBI-8000	603.33 (31.96)	77.19 (6.00)	23
0.1 μM CCK-8 + 5.56 μM HBI-8000	687.67 (81.00)	87.97 (11.51)	12
0.1 μM CCK-8 + 1.85 μM HBI-8000	684.67 (53.14)	87.59 (8.43)	12
0.1 μM CCK-8 + 0.62 μM HBI-8000	780.67 (29.04)	99.87 (6.79)	0
0.1 μM CCK-8 + 0.21 μM HBI-8000	771.67 (47.73)	98.72 (8.30)	1
0.1 μM CCK-8 + 0.07 μM HBI-8000	807.00 (66.59)	103.24 (10.35)	-3
0.1 μM CCK-8 + Vehicle (DMSO)	781.67 (44.51)	100.00 (8.05)	0
0.1 μM CCK-8 + 50 μM Rifampicin	-36.00 (27.62)	-4.36 (3.35)	104
0.1 μM CCK-8 + Vehicle (DMSO)	826.17 (34.51)	100.00 (5.91)	0

2.6.5.7.10 トランスポーター阻害（HUYA-02-[redacted]）（続き）

OCT2 阻害			
反応系	トランスポーター特異的取り込み（cpm）	相対的トランスポーター特異的取り込み（コントロールに対する%）	相対的阻害率（%）
	Mean (SD)、n=3	Mean (SD)、n=3	
10 μM Metformin + 50 μM HBI-8000	680.33 (55.24)	157.12 (21.65)	-57
10 μM Metformin + 16.67 μM HBI-8000	637.67 (21.85)	147.27 (17.15)	-47
10 μM Metformin + 5.56 μM HBI-8000	556.67 (53.14)	128.56 (18.85)	-29
10 μM Metformin + 1.85 μM HBI-8000	511.00 (32.06)	118.01 (15.08)	-18
10 μM Metformin + 0.62 μM HBI-8000	486.67 (57.15)	112.39 (18.19)	-12
10 μM Metformin + 0.21 μM HBI-8000	467.67 (23.27)	108.01 (13.17)	-8
10 μM Metformin + 0.07 μM HBI-8000	478.67 (63.24)	110.55 (19.10)	-11
10 μM Metformin + Vehicle (DMSO)	433.00 (48.19)	100.00 (15.74)	0
10 μM Metformin + 300 μM Verapamil	36.33 (10.33)	8.63 (2.53)	91
10 μM Metformin + Vehicle (DMSO)	420.83 (29.54)	100.00 (9.93)	0

CYP= チトクローム P450；DMSO= ジメチルスルホキシド；HBSS = Hanks Balanced Salt Solution；HEK293 = ヒト胎児腎細胞 293；KH = Krebs Henseleit；MATE = multidrug and toxin extrusion transporter；MDCK = Madin-Darby canine kidney；OAT = organic anion transporter；OATP = organic anion transporting polypeptide；OCT = organic cation transporter；SD = 標準偏差

2.6.5.8 その他の薬物動態試験

該当試験なし。