タピナロフ

第 2 部 CTD の概要（サマリー）
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.4 薬物動態試験の概要文

日本たばこ産業株式会社

目次

略号及び用語の定義一覧 4
2.6.4 薬物動態試験の概要文 6
2.6.4.1 まとめ 6
2.6.4.1.1 トキシコキネティクス試験で使用した経皮製剤 7
2.6.4.1.2 吸収 9
2.6.4.1.3 分布 12
2.6.4.1.4 代謝 12
2.6.4.1.5 排泄 15
2.6.4.1.6 薬物相互作用試験 15
2.6.4.2 分析方法 16
2.6.4.3 吸収及び薬物動態 18
2.6.4.3.1 *In Vitro* 試験 23
2.6.4.3.2 単回投与時の PK 24
2.6.4.3.3 反復投与時の薬物動態／トキシコキネティクス 29
2.6.4.4 分布 43
2.6.4.4.1 *In Vitro* 分布試験 45
2.6.4.4.2 *In Vivo* 分布試験 46
2.6.4.5 代謝（種間比較） 46
2.6.4.5.1 *In Vitro* 代謝試験 48
2.6.4.5.2 *In Vivo* 代謝試験 51
2.6.4.6 排泄 53
2.6.4.6.1 *In Vivo* 排泄試験 55
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 57
2.6.4.7.1 *In Vitro* 薬物相互作用試験 59
2.6.4.7.2 *In Vivo* 薬物相互作用試験 60
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 60
2.6.4.8.1 *In Vitro* 試験 63
2.6.4.8.2 *In Vivo* 試験 63
2.6.4.9 考察及び結論 64
2.6.4.10 図表 66
2.6.4.11 参考文献 67

表目次

表 1　非臨床試験で投与されたタピナロフクリーム....8
表 2　タピナロフの非臨床試験における生体試料分析法....17
表 3　タピナロフの吸収及び薬物動態試験一覧....19
表 4　タピナロフの分布試験一覧....44
表 5　タピナロフの代謝試験一覧....47
表 6　タピナロフの排泄試験一覧....54
表 7　タピナロフの薬物動態学的薬物相互作用試験一覧....58
表 8　タピナロフのその他の薬物動態試験一覧....62

図目次

図 1　タピナロフの構造....6
図 2　タピナロフの推定代謝経路....14

略号及び用語の定義一覧

略号及び用語	定義
AD	Atopic dermatitis，アトピー性皮膚炎
ADME	Absorption, distribution, metabolism, and excretion，薬物の体内動態（吸収，分布，代謝，排泄）
AhR	Aryl hydrocarbon receptor，芳香族炭化水素受容体
AhrR	Aryl hydrocarbon receptor repressor，芳香族炭化水素受容体リプレッサー
API	Active pharmaceutical ingredient，有効成分
ARNT	Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator，芳香族炭化水素受容体核内輸送体
AUC	Area under the concentration-time curve，血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein，乳癌耐性蛋白
BDC	Bile duct cannulated，胆管カニュレーション処置
BQL	Below quantitation limit，定量下限未満
BSA	Body surface area，体表面積
C_0	Concentration extrapolated to time zero，投与直後濃度
CL	Clearance，クリアランス
C_{max}	Maximum plasma concentration，最高血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450，チトクローム P450
DDI	Drug-drug interaction，薬物相互作用
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium，ダルベッコ改変イーグル培地
EC_{50}	Effectiveconcentration; Concentration causing half-maximal effect determined *in vitro*，　*In vitro* 試験で最大作用の 50%を示す濃度
F	Female，雌性
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
GSK	GlaxoSmithKline
HBSS	Hank's balanced salt solution，ハンクス平衡塩類溶液
HLC	Human liver cytosol，ヒト肝臓サイトゾル
HLM	Human liver microsomes，ヒト肝ミクロソーム
HPMC	Hydroxypropyl methylcellulose，ヒドロキシプロピルメチルセルロース
IC_{50}	Inhibitory concentration; Concentration causing half-maximal effect determined *in vitro*，阻害濃度；*in vitro* 試験で最大作用の 50%を示す濃度
IV	Intravenous，静脈内
LLOQ	Lower limit of quantitation，定量下限
LC-MS/MS	Liquid chromatography / tandem mass spectrometry，液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー
MATE	Multidrug and toxic compound extrusion，プロトン／有機カチオン逆輸送担体
MCT	Medium chain triglyceride，中鎖脂肪酸トリグリセリド
MDCKII-MDR1	Madin-Darby canine kidney cells with mdr1 gene (encoding p-glycoprotein)，mdr1 遺伝子（P 糖蛋白質をコード）を発現させた Madin-Darby イヌ腎臓由来細胞
mRNA	Messenger ribonucleic acid，伝令リボ核酸
MRT_{0-t}	Mean residence time from time 0 to time after dosing at which the last quantifiable concentration was observed，平均滞留時間
MS	Mass spectrometry，質量分析

略号及び用語	定義
NQO1	NAD(P)H quinone dehydrogenase 1，NAD(P)H キノンオキシドレダクターゼ 1
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
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development，経済協力開発機構
PBS	Phosphate buffered saline，リン酸緩衝生理食塩水
PEG	Polyethylene glycol，ポリエチレングリコール
PG	Propylene glycol，プロピレングリコール
P-gp	p-glycoprotein ; Multidrug resistance protein，P 糖蛋白質；多剤耐性蛋白質
pIC_{50}	Negative log of the IC_{50} value，IC_{50} 値の負の対数
PK	Pharmacokinetics，薬物動態
QD	Once daily，1 日 1 回
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography，定量的全身オートラジオグラフィー
SULT	Sulfotransferase，硫酸転移酵素
$t_{1/2}$	Elimination half-life，消失半減期
TK	Toxicokinetics，トキシコキネティクス
t_{max}	Time to reach C_{max} concentration，最高血漿中濃度到達時間
UDP	Uridine diphosphate，ウリジン二リン酸
UGT	UDP-glucuronosyltransferases，UDP グルクロン酸転移酵素
ULOQ	Upper limit of quantitation，定量上限
UPLC-MS/MS	Ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry，超高速液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー
USP	United States Pharmacopeia，米国薬局方
V_{ss}	Volume of distribution at steady state，定常状態における分布容積
WH	Wistar Han [Crl:WI(Han)]

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

タピナロフ（JTE-061 又は DMVT-505，旧名：GSK2894512A，GSK2894512 又は WBI-1001）は，天然物であるスチルベノイド誘導体の完全合成品であり，本邦では日本たばこ産業株式会社及び鳥居薬品株式会社が，尋常性乾癬及びアトピー性皮膚炎（AD）の外用剤として開発中である。なお，海外では Dermavant Sciences, Inc.（Dermavant 社）が 18 歳以上の尋常性乾癬患者に対する外用剤として 2022 年 5 月に米国でタピナロフクリーム 1%の承認を取得し，現在，小児尋常性乾癬及び AD の外用剤としても開発中である。タピナロフクリーム 1%は，尋常性乾癬及び AD の皮膚病変への局所治療用の白色のクリームである。タピナロフクリームは，非臨床試験では 8%まで，臨床試験では 2%までの濃度が評価されている。

in vitro 試験，並びに CD-1 マウス，Sprague Dawley ラット，Wistar Han（WH）ラット，New Zealand White ウサギ及び Göttingen ミニブタを用いた *in vivo* 試験により，タピナロフの薬物動態（PK），吸収，分布，代謝，排泄（ADME）及び薬物相互作用（DDI）を評価した。投与経路は皮下投与，経口投与，静脈内（IV）投与及び／又は経皮投与とし，原薬の非標識体，[^{14}C]-タピナロフ又は各種のタピナロフクリームを使用した。タピナロフの構造を図 1 に示す。

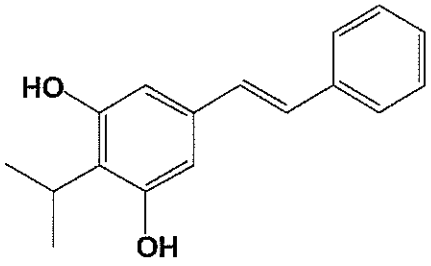


図 1 タピナロフの構造

PK 及びトキシコキネティクス（TK）試験では，液液抽出又は除蛋白後に液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー（LC-MS/MS）により，タピナロフの血漿中濃度を測定した。分析法の濃度範囲は様々であり，定量下限（LLOQ）は 0.04～5 ng/mL，定量上限（ULOQ）は 40～1250 ng/mL であった。分析方法は「医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準」（GLP）の業界基準及び関連する国際基準に従って適切にバリデートし，定量下限値はタピナロフの PK 及び TK 解析を実施するのに妥当なものであった。

単回投与の PK 及び TK 試験では，経口，静脈内，皮下又は経皮投与後のタピナロフの全身曝露を比較した。経皮投与にはタピナロフクリームの処方 A 及び E を使用した（表 1）。複数のタピナロフクリーム（処方 A から F）を反復塗布した後の全身曝露を評価するための反復投与試験を，マウス，ラット，ウサギ及びミニブタで実施した。マウス（13 週間及び 102 週間試験）及びミニブタ（28 日間及び 39 週間試験）における反復経皮投与毒性試験及び TK 試験では，最終的な治験用製剤である処方 F を用いた。その後，タピナロフの全身曝露を最大化するために一連のラット試験では皮下投与（媒体：Captisol®）した。皮下投与期間は非 GLP 試験で 4～7 日間，GLP 試験

の毒性及びTK試験で7日間，28日間，13週間，26週間及び83週間であった。

タピナロフの分布，代謝及び排泄試験が完了している。マウス，ラット，ウサギ，ミニブタ及びヒト血漿，並びにミニブタ及びヒト皮膚を用いたタピナロフの *in vitro* 蛋白結合試験と，ラットを用いたタピナロフ皮下投与後の定量的全身オートラジオグラフィー(QWBA)試験を実施した。経皮投与後のヒト血漿，尿及び皮膚を用いて，タピナロフの代謝物の構造解析を実施した。ラット及びマウスを用いてタピナロフを皮下投与する代謝試験を完了した。2 試験でマウス及びラットにタピナロフを皮下投与して排泄を検討し，別の 1 試験でミニブタに経皮投与して排泄を検討した。最後に，*in vitro* 及びミニブタ皮膚で，タピナロフの DDI を評価した。

タピナロフの ADME 及び PK 試験の概要を以下に示し，詳細な概要を次項以降に示す。実施した試験一覧，GLP 適合状況及びモジュール 4 内の記載箇所を示す。ほとんどの *in vitro* 試験及び PK 試験は非 GLP 試験であったが，主要な TK 試験は GLP 試験として実施した。

2.6.4.1.1 トキシコキネティクス試験で使用した経皮製剤

先行する非臨床試験及び臨床試験の多くは，タピナロフを含有する過去の外用クリーム処方（A，B，C，D 及び E）を使用して実施した。過去に検討されたこれらの処方は，現行の治験用タピナロフクリーム（処方 F）とは添加物組成が異なっていた。過去に使用した処方は，[redacted]として[redacted]でなく[redacted]及び[redacted]を含有した。その他の相違点としては，[redacted]の相違（[redacted]でなく[redacted]を使用），[redacted]の相違（[redacted]でなく[redacted]を使用），一部の処方（処方 A～C）で[redacted]及び[redacted]が使用されていないことなどもあった。経皮投与を行った試験では表 1 に示すように処方 A～F と表記される様々な処方のタピナロフクリームを使用した。

表 1　非臨床試験で投与されたタピナロフクリーム

タピナロフクリーム					
A	B	C	D	E	F
[redacted]					プロピレングリコール
					ジエチレングリコールモノエチルエーテル
					ポリソルベート 80
					中鎖脂肪酸トリグリセリド
					乳化ロウ*
					ポリオキシエチレン (2) ステアリルエーテル
					ポリオキシエチレン (20) ステアリルエーテル
					安息香酸
					ジブチルヒドロキシトルエン
					精製水
					クエン酸ナトリウム水和物
					クエン酸/クエン酸水和物
					エデト酸ナトリウム水和物

*　「乳化ロウ」表記は「[redacted]」を指す

2.6.4.1.2 吸収

2.6.4.1.2.1 *In Vitro* 試験

- タピナロフのヒト皮膚への浸透性／透過性を評価して有効成分（API）の送達に対する処方変更の影響を評価するため，*in vitro* 皮膚透過性試験を実施した。中鎖脂肪酸トリグリセリド（MCT）クリーム（処方 F）では，0.5%～2%のタピナロフで用量に比例して浸透量及び透過量が増加した。
- [^{14}C]-タピナロフは，強力な P 糖蛋白質（P-gp）阻害剤である GF120918 の存在下では mdr1 遺伝子（P 糖蛋白質をコード）を発現させた Madin-Darby イヌ腎臓由来（MDCKII-MDR1）細胞において pH 7.4 で 670 nm/s，pH 5.5 で 500 nm/s の高い受動的膜透過性を示した。

2.6.4.1.2.2 単回投与時の薬物動態

2.6.4.1.2.2.1.1 ラット試験

- タピナロフクリーム 8%（処方 A；480 mg/kg）をラットに単回塗布したとき，塗布 30 分後のタピナロフの平均血漿中濃度は雄が 410 ng/mL，雌が 214 ng/mL であった。投与後 1 時間以内で血漿中濃度は約 90%低下し，投与後 1～12 時間には概ねほぼ一定のまま推移した。投与後 24 時間の平均濃度は，雄で 17.7 ng/mL，雌で 7.7 ng/mL まで低下した。
- タピナロフを 10 mg/kg の用量で単回経口又は皮下投与したときの TK 評価の結果，検討した 3 処方のいずれも経口投与による全身曝露量は低いことが示された。一方，皮下投与時のラットの全身曝露量は使用した処方に関係なく，経口投与時に比べて顕著に高く（約 40～95 倍），血漿中濃度は投与後 8 時間又は 24 時間まで定量可能であった。

2.6.4.1.2.2.1.2 ミニブタ試験

- 単回投与クロスオーバー試験で，タピナロフを雌性 Göttingen ミニブタに静脈内又は経口投与した。1 mg/kg を単回静脈内投与したときのタピナロフの平均血漿クリアランスは肝血漿流量とほとんど差がなく，クリアランスが高いことが示された。10 mg/kg を静脈内投与したときには，平均血漿クリアランスが約 40%低下し，投与後最終値が観測された時点までの AUC（AUC_{0-t}）の平均値は用量比を上回って上昇した。用量 10 倍に対して AUC_{0-t} の平均値は 17 倍上昇し，投与直後濃度（C_0）及び最高血漿中濃度（C_{max}）の平均値は 15 倍上昇した。Göttingen ミニブタの体内総水分量は，マウス，ラット，ウサギ，イヌ，サル及びヒトでの報告と同様に，600～730 mL/kg の範囲内にあると仮定した場合[1]，タピナロフの定常状態における見かけの分布容積（V_{ss}）は 1270～1500 mL/kg であるため，タピナロフは各組織に広く分布することが示されている。平均滞留時間（MRT_{0-t}）が用量増加に伴って延長したのは，クリアランスの低下によるものである。タピナロフを経口投与したときの C_{max} 及び AUC_{0-t} 値には大きな個体間差（約 10 倍）が認められた。強制経口投与したときのタピナロフのバイオアベイラビリティは低く，1%～11%で変動がみられ，平均値は 4.5%であった。
- 別の試験で，クロスオーバーを行わない試験デザインにより，タピナロフを雄性 Göttingen ミニブタに食後静脈内，経口及び経皮投与した（処方 E；10 mg/kg）。静脈内投与時のタピナロ

フのクリアランス速度は 972 mL/h/kg，半減期（$t_{1/2}$）は 0.5 時間であった。経口バイオアベイラビリティは低く（F = 0.5%），C_{max} は 5.1 ng/mL であった。クロスオーバー試験でミニブタの血漿クリアランス（CL_P）及び V_{ss} に性差が認められた理由は不明であるが，試験デザインの違いに関係がある可能性がある。経皮投与したときには血漿中にタピナロフは検出されなかった。

2.6.4.1.2.3 反復投与時の PK 試験

2.6.4.1.2.3.1.1 経皮投与

- ラット及びウサギを用いて，28 日間までのタピナロフ（処方 A；最高 8%）の反復経皮投与試験を実施した。血漿中濃度は概ね 0.5～6 時間以内に C_{max} に到達し，投与 1 日目と投与 28 日目の比較によりラットで軽度の蓄積が認められた。有意な性差は認められなかった。
- ラットを用いてタピナロフ（処方 F）の 13 週間反復経皮投与試験を実施した。タピナロフの全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t} 値）は雌雄で概ね同程度であった。AUC_{0-t} 値は，0.5%から 1.5%への用量増加に伴って概ね用量比を上回って上昇し，1.5%から 3%への用量増加時にはばらつきが認められた。反復経皮投与したときの全身曝露量（AUC）は，投与 29 日目と投与 1 日目でほとんど差がなく，投与 91 日目には投与 1 日目に比べて雄ではばらつきがみられ，雌では低かった。この試験ではタピナロフの硫酸抱合体の TK も評価したところ，タピナロフの硫酸抱合体は血漿中では概して定量下限未満であり，濃度が LLOQ（20 pg/mL）を上回った検体は 10%未満であった。測定可能な場合，タピナロフの硫酸抱合体の最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）はばらつきがみられ，投与前から投与後 24 時間までの範囲であった。
- マウスを用いてタピナロフクリーム（処方 E 及び F；それぞれ最高 4%及び 3%）を 13 週間まで投与する反復経皮投与試験を実施した。投与 91 日目には，高用量群（雄 164 mg/kg/day，雌 206 mg/kg/day）の雄 1 例及び雌 1 例で投与後 24 時間でも定量可能なままであったことを除き，タピナロフの血漿中濃度は雌雄ともすべての用量群で投与後 8 時間まで定量可能であった。投与 91 日目，雄の t_{max} は 28 mg/kg/day 群で投与後 2 時間，56 及び 164 mg/kg/day 群では投与後 1 時間であった。投与 91 日目，雌の t_{max} はすべての用量群で投与後 1 時間であった。全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は，用量増加に伴って概ね用量比を上回って増加した。
- マウスがん原性試験では，タピナロフクリーム（処方 F；最高 3%）を 102 週間まで経皮投与し，タピナロフの TK を投与 4 及び 26 週目に評価した。投与 4 週目の全身曝露量には一貫した性差は認められず，投与 26 週目においても顕著な全身曝露量の性差（2 倍超）はほとんど認められなかったが，0.5%群のみで雌の C_{max} 及び AUC_{0-t} 値のほうが高かった。全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は，雄では両方の評価時点，雌では投与 4 週目に投与濃度上昇に伴って概ね濃度比を上回って増加し，投与 26 週目の雌の全身曝露量の増加は用量比を下回っていた。
- ミニブタを用いて，タピナロフクリーム（処方 F；最高 3%）を 9 ヵ月間まで経皮投与したときの血漿中及び皮膚内 TK を評価した。タピナロフの血漿中濃度は，初回投与後 24 時間まで定量可能であった。投与 26 週目の全身曝露量は，10～20 mg/kg/day の範囲では用量増加に伴って用量比を上回って増加し，20～60 mg/kg/day の範囲では用量増加に伴って用量比を下回って増加した。投与 5 及び 39 週目には，全身曝露量は 10～60 mg/kg/day の範囲で用量増加

に伴って概ね用量に比例して増加した。概して，試験全体の様々な時期の曝露量に顕著な差（2 倍超）は認められなかった。39 週間の経皮投与及び 1 ヵ月間の休薬後に試験終了時に安楽殺した雌雄ミニブタから採取した皮膚サンプルのタピナロフの濃度は，真皮下層よりも表皮／真皮上層で高かった。タピナロフの平均皮膚中濃度は概ね用量に応じて上昇した。60 mg/kg/day 群のタピナロフの皮膚中濃度は，雌雄ともに，1 ヵ月間の休薬後も依然として定量可能であった。

2.6.4.1.2.3.1.2 皮下投与

- ラットを用いてタピナロフ（媒体：Captisol®）を 13 週間，26 週間及び 83 週間まで皮下投与する試験を実施した。投与経路として皮下投与を選択した理由は，本薬の全身曝露量を経皮投与時よりも増加させるためであった。血漿中濃度は雌雄とも概ね 0.5～2 時間（t_{max}）で最高濃度に到達した。$t_{1/2}$ には明らかな性差は見られなかったが，用量依存性が見られ，$t_{1/2}$ は低用量群及び中用量群よりも高用量群で長くなった。全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は用量依存的に増加した。タピナロフの全身への蓄積性は認められなかった。
- タピナロフを 3，10 又は 40 mg/kg/day［媒体：米国薬局方（USP）プロピレングリコール］の用量で雌雄 Sprague Dawley ラットに 1 日 1 回（QD）皮下投与する 13 週間試験を実施した。t_{max} の平均値は 0.5～2 時間であり，用量，性別及び投与日の影響を受けなかった。投与 14 及び 91 日目，低用量群及び中用量群の投与前の検体では低濃度のタピナロフが検出され［範囲：定量下限未満（BQL）～3.56 ng/mL］，高用量群では高濃度（29.66～48.79 ng/mL）であった。C_{max} 又は AUC_{0-t} に顕著な性差（2 倍超）は認められなかった。各用量群の雌雄のデータを併合したところ，投与 1 日目の C_{max} 及び AUC_{0-t} は，40 mg/kg/day 群の投与 91 日目の AUC_{0-t} を除き，投与 14 及び 91 日目に比べて高かった。この試験では全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）に用量依存的な増加が認められ，特に AUC は用量比例性を示した。40 mg/kg までの用量を 3 ヵ月間皮下投与したラットでは，タピナロフの全身への蓄積は認められないと考えられた。
- タピナロフを 0，1，6 又は 30 mg/kg/day（媒体：Captisol®）の用量で雌雄 WH ラットに QD で 26 週間まで皮下投与した。タピナロフの TK 評価のため，投与 13 及び 26 週目に採取した血漿検体を分析した。タピナロフの血漿中濃度は，投与後 8 時間まで概ね定量可能であった 1 mg/kg/day 群を除き，投与後 24 時間まで概ね定量可能であった。t_{max} は，いずれの時期も投与後 0.5～1 時間であった。いずれの用量でも投与 13 及び 26 週目の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）には顕著な性差（2 倍超）は認められなかった。したがって雌雄平均値を解釈に使用した。C_{max} 及び AUC_{0-t} は，1 mg/kg/day から 30 mg/kg/day への用量増加に伴って概ね比例的に上昇した。全身曝露量は投与 13 週目と投与 26 週目で同程度であり，反復投与によるタピナロフの血漿中への蓄積は認められなかった。
- ラットがん原性試験において，タピナロフを 0，0.1，0.3 又は 1 mg/kg/day（媒体：Captisol®）の用量で WH ラットに QD で 83 週間まで皮下投与した。TK 評価のため，投与 4 及び 26 週目に血漿検体を採取した。いずれの用量においても投与 4 及び 26 週目の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）には顕著な性差（2 倍超）は認められなかった。全身曝露量は，0.1～1 mg/kg/day

の範囲で用量増加に伴って概ね用量比例的に増加した。全身曝露量は投与 4 週目と投与 26 週目で同程度であり，タピナロフの血漿中への蓄積は認められなかった。

2.6.4.1.3 分布

2.6.4.1.3.1 蛋白結合性

- ラット，マウス，ウサギ，ミニブタ及びヒト血漿を用いて，蛋白結合試験を実施した。タピナロフの血漿蛋白結合率は極めて高く，明らかな濃度依存性を示さなかった。タピナロフの平均血漿蛋白結合率は，マウスで 99.5%～99.6%，ラットで 99.1%～99.3%，ウサギで 99.4%，ミニブタで 99.1%～99.2%，ヒトで 99.1%～99.4%であった。
- ミニブタ及びヒト皮膚を用いてタピナロフの *in vitro* 蛋白結合率を検討した。ミニブタ及びヒトの皮膚ホモジネートでのタピナロフの *in vitro* 蛋白結合率はそれぞれ 90.7%及び 92.7%であった。タピナロフの蛋白結合率は高濃度域でタピナロフの濃度上昇に伴い，緩やかに低下した。

2.6.4.1.3.2 定量的全身-オートラジオグラフィー

- 雄性有色ラットに[^{14}C]-タピナロフを名目用量の 2 mg/kg で単回皮下投与し，放射能分布を検討した。放射能は速やかに広く全身に分布し，いずれの組織でも投与後 1 時間（初回屠殺時点）までに放射能濃度が定量可能となった。放射能濃度が相対的に高かった組織は，投与部位皮膚，膀胱壁，副腎皮質，小腸壁，肝臓，褐色脂肪及び腎皮質であった。放射能濃度が相対的に低かった組織は，皮膚（非投与部位），包皮腺，大腸壁及び骨表面であった。大部分の組織の t_{max} は投与後 1 時間であった。放射能濃度は概して投与後 3 時間から 72 時間後にかけて低下したが，投与後 72 時間でも放射能はすべての組織で定量可能であった。組織／全血比の比較において，ほとんどの組織では，[^{14}C]-タピナロフ及びその代謝物の濃度が全血中濃度よりも高値を示した。

2.6.4.1.4 代謝

2.6.4.1.4.1 *In Vitro* 試験

- [^{14}C]-タピナロフ（終濃度：10 μmol/L，4 時間）の代謝された割合は，雄性マウス，雄性ラット，雌性ウサギ，雄性ミニブタ及び男女混合ヒト肝細胞において同様であった（96%～99%が代謝）。ヒト肝細胞でのタピナロフの代謝様式はグルクロン酸抱合又は硫酸抱合，並びにそれらと酸化の組み合わせであった。動物とヒトでの代謝プロファイルは定性的にほぼ同じであり，ヒト肝細胞でみられた[^{14}C]-タピナロフの代謝物はいずれも動物で確認された。各種発現系酵素を用いて，タピナロフのグルクロン酸抱合及び硫酸抱合に関与する代謝酵素の検討を行った結果，グルクロン酸抱合は UGT1A9，硫酸抱合は SULT1A1，SULT1A3 及び SULT1E1 が主に関与していた。
- 発現系酵素を用いて，タピナロフの酸化的代謝に関与するヒトチトクローム P450（CYP）酵素の検討を行った。[^{14}C]-タピナロフ（終濃度：5 μmol/L）の酸化的肝代謝には主に CYP1A2 及び CYP3A4 が関与し，CYP2C9，CYP2C19 及び CYP2D6 の寄与はわずかであった。また，

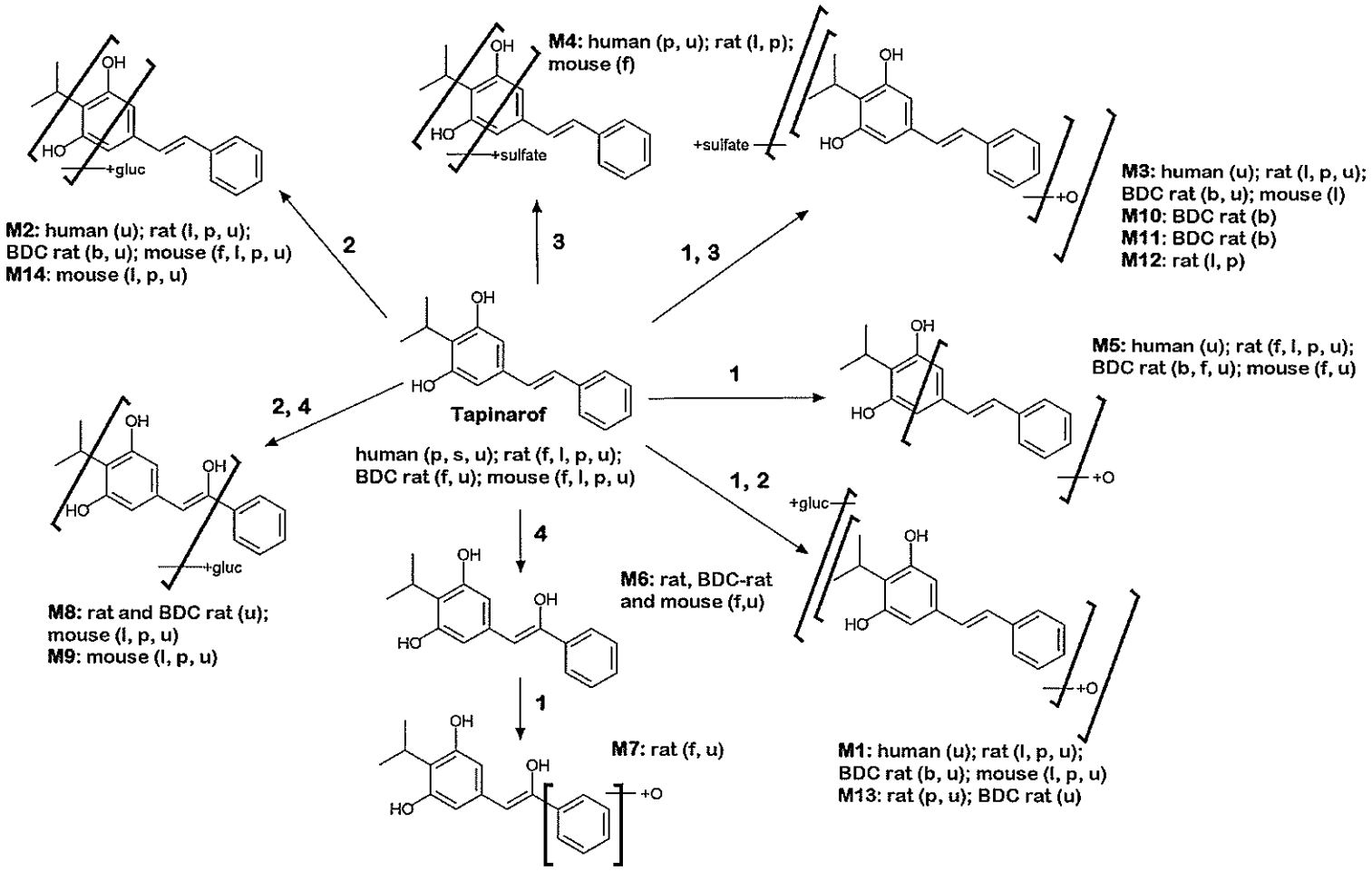
[^{14}C]-タピナロフは肝外酵素 CYP1A1 及び CYP1B1 によっても代謝されるが，CYP1B1 の寄与はわずかであった。CYP1A1 及び CYP1B1 はヒト肝ミクロソームには存在しないため，タピナロフの代謝に対するこれらの CYP の寄与は定量化しなかった。

2.6.4.1.4.2 *In Vivo* 試験

- タピナロフを経皮投与した AD 患者から得たヒト血漿，尿及び皮膚生検を用いて，タピナロフの代謝物組成分析及び構造解析試験を実施した。プールした血漿の抽出物中にはタピナロフの未変化体及びタピナロフの硫酸抱合体（M4）が検出された。コホート 1 の投与 21 日目の 4 検体中 2 検体から低濃度で検出された，光分解副生成物の可能性があるキノン体 [redacted] を除き，皮膚生検抽出物中に検出された唯一のタピナロフ関連物質は未変化体であった。プールした尿検体中には，タピナロフの未変化体，酸化 + グルクロン酸抱合による生成物（M1），グルクロン酸抱合による生成物（M2），酸化 + 硫酸抱合による生成物（M3），硫酸抱合による生成物（M4），酸化体（M5）及び光分解物 [redacted] が検出された。
- 排泄試験で[^{14}C-]タピナロフをマウス（無処置）及びラット（無処置及び BDC）に皮下投与し，代謝物組成分析及び構造解析を行った。マウスでの主な代謝様式は酸化，グルクロン酸抱合及びそれらの組み合わせであった。血漿中，肝臓中及び尿中の主要成分は M1（酸化 + グルクロン酸抱合体）及び M2（グルクロン酸抱合体）であり，糞中で最も多かったのはタピナロフの未変化体（投与量の 45%），次いで M5（酸化体，投与量の 16%）であった。ラットでの主な代謝反応は酸化，水和，グルクロン酸抱合及びそれらの組み合わせであった。血漿中の主要な放射性成分の組成は時間によって変わったが，未変化体，M1，M2 及び 2 つの未同定代謝物の組み合わせであった。BDC ラットでは胆汁中への放射能の排泄率は投与量の 73%であり，M1 及び M2 が主代謝物であった。糞検体中の主成分はタピナロフの未変化体及び M5 であった。無処置ラットでの主な排泄経路は糞中排泄（投与量の 78%）であり，代謝物組成は BDC ラットと同様であった。無処置ラット及び BDC ラットでの尿中への放射能の排泄率は投与量の約 10%であり，無処置ラットでは M1，M2 及び M8（水和 + グルクロン酸抱合体），BDC ラットではタピナロフの未変化体及び M1 が主成分であった。肝臓試料中の主代謝物は M3（酸化 + 硫酸抱合体）であった。タピナロフのキノン体で光分解物の可能性がある [redacted] は，マウス及びラット試験から得られたいずれの検体でも認められなかった。

2.6.4.1.4.3 タピナロフの推定代謝経路

- *in vitro* 及び *in vivo* 試料中のタピナロフ代謝物組成分析を実施した。図 2 に推定代謝経路を示した。



マウス及びラット（皮下投与），並びにヒト（経皮投与）におけるタピナロフの推定代謝経路。数字は代謝反応（1＝ 酸化；2＝ グルクロン酸抱合；3＝ 硫酸抱合；4＝水和），文字は未変化体／代謝物が同定された検体（b＝ 胆汁；f＝ 糞；l＝ 肝臓；p＝ 血漿；s＝ 皮膚；u＝ 尿）を示す。

図 2　　タピナロフの推定代謝経路

2.6.4.1.5 排泄

2.6.4.1.5.1 *In Vivo* 試験

- ラット及びマウスに[^{14}C]-タピナロフを 2 mg/kg の用量で単回皮下投与する排泄試験を実施した。ラット及びマウスでは，主な排泄経路は糞中排泄であった。胆管カニューレ処置ラットでは，主な排泄経路は胆汁中排泄であった。皮下投与では薬物関連物質は速やかに消失し，投与後 24 時間までに投与量の 80%～88%が回収された。血液／血漿比は，ラットで 0.66～1.2，マウスで 0.60～0.77 であった。肝臓／血漿比は，ラットで 7.1～14.0，マウスで 4.0～14.1 であった。
- ミニブタに[^{14}C]-タピナロフを含むタピナロフクリーム 1%（処方 F；10 mg/kg）を単回経皮投与し，排泄経路及び排泄率を検討した。放射能の大部分（投与量の 82.5%）は，経皮投与後 10 時間の投与部位の拭き取りで回収された。最終時点の肝臓試料中放射能は定量可能な濃度ではなかった。投与された放射能の 1%未満が試験期間中に排泄物（尿及び糞）に回収され，放射性試験物質の吸収が極めて限定的であることが示唆された。放射能の血中及び血漿中濃度は，汚染の可能性がある 1 つの血液サンプルを除いて，すべての動物のすべての時点で検出限界を下回った。

2.6.4.1.6 薬物相互作用試験

2.6.4.1.6.1 薬物相互作用を受ける可能性

- CYP 発現系酵素を用いて，タピナロフがヒト CYP 酵素の影響を受ける（基質となる）可能性について検討した結果，5 μmol/L [^{14}C]-タピナロフの酸化的代謝は主に CYP1A2 及び CYP3A4 が寄与し，CYP2C9，CYP2C19 及び CYP2D6 の寄与はわずかであった。ヒト肝細胞を用いた代謝試験の結果に基づくと，CYP 酵素による酸化の他に，グルクロン酸抱合及び硫酸抱合も顕著な役割を果たすことから，これらの CYP のいずれかを阻害してもタピナロフ曝露量の明らかな増加に至る可能性は低いと考えられた。またタピナロフは肝外酵素 CYP1A1 及び CYP1B1 によっても代謝された。

2.6.4.1.6.2 薬物相互作用を引き起こす可能性

- タピナロフクリーム 1%（処方 E，10 mg/kg）を単回経皮投与したとき，タピナロフはミニブタ皮膚で CYP1A1 発現を誘導した。
- ヒトでの CYP 誘導能をさらに詳細に評価するため，ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験を実施し，CYP 遺伝子（CYP1A2，CYP2B6 及び CYP3A4）の mRNA 発現量に対するタピナロフの影響を検討した。CYP1A2 の mRNA 発現量は顕著な上昇が認められ，EC_{50} の範囲は 0.09～0.58 μmol/L，DMSO コントロールに対する処理群の E_{max} 比の範囲は 48～68 であった。CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現量に顕著な上昇は認められなかった。
- ヒト肝ミクロソームを用いた CYP 酵素（CYP1A2，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6 及び 3A4/5）阻害能を評価する *in vitro* 試験では，タピナロフは CYP1A2 を直接的に阻害し，最大阻害率は濃度 100 nmol/L で 23.6%であった。その他の CYP 酵素活性に対する直接的，時間依存的又は代謝依存的な阻害作用は認められず，検討した最高濃度である 100 nmol/L［臨床で認めら

れた C_{max}（2.44 ng/mL）から算出されたタピナロフの遊離型（非結合型）濃度の約 1000 倍］までの結果では IC_{50} 値は算出できなかった。

- タピナロフのヒトトランスポーター胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP），有機アニオントランスポーター（OAT）1，OAT3，有機カチオントランスポーター（OCT）1，OCT2，プロトン／有機カチオン逆輸送担体（MATE）1 及び MATE2 K に対する阻害作用，並びに P-gp，乳癌耐性蛋白（BCRP），有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1 及び OATP1B3 に対する阻害作用及び基質性を評価する *in vitro* 試験を実施した。タピナロフは BCRP を阻害［検討した最高濃度（100 nmol/L）での阻害率は最大 48.8%］したが，この濃度は臨床で認められている C_{max}（2.44 ng/mL）から求められたタピナロフの遊離型（非結合型）濃度の約 1000 倍の濃度である。P-gp, BSEP, OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1 又は MATE2-K に対してタピナロフは阻害作用を示さなかった。またタピナロフは P-gp, BCRP, OATP1B1 及び OATP1B3 の基質でないことが示された。
- ヒト全身曝露（タピナロフクリーム 1%塗布時）並びに *in vitro* 試験結果を規制ガイダンスに従い評価したが，臨床的意義のある DDI が起こる可能性は低いと判断された。

2.6.4.2 分析方法

Welichem 社が委託した初期の GLP 試験を実施するため，ラット及びウサギ血漿におけるタピナロフの定量のための LC-MS/MS による分析方法を [redacted] 社（[redacted], Canada）が設定し，バリデートした。ラット又はウサギ血漿をアセトンで沈殿させた後，タピナロフを抽出し，定量した。ラット血漿中の定量範囲は 5～1000 ng/mL，ウサギ血漿中の定量範囲は 2～1000 ng/mL であった。

Welichem 社が委託したその後の試験のため，[redacted] 社（[redacted], Canada）が LC-MS/MS を用いてラット及びミニブタ血漿中のタピナロフの定量のための分析法を追加で設定し，バリデートした。ミニブタ血漿の分析法では液液抽出法を用い，0.1～50 ng/mL の濃度範囲でタピナロフを定量し，ラット血漿ではアセトニトリルによる除蛋白法を用いて，1～500 ng/mL の濃度範囲でタピナロフを定量した。

GlaxoSmithKline（GSK）社が委託した初期の GLP 試験の実施のため，GSK 社（RTP, NC, USA）が LC-MS/MS を用いてラット及びミニブタ血漿中のタピナロフを定量するための分析法を設定し，バリデートした。ラット及びミニブタ血漿はアセトニトリルによる除蛋白法を用い，0.1～250 ng/mL の濃度範囲でタピナロフを定量した。

GSK 社が委託したその他すべての GLP 試験については，[redacted] 社（[redacted], USA）が LC-MS/MS を用いてアスコルビン酸処理したラット，マウス，ウサギ及びミニブタ血漿中のタピナロフを定量するための分析法を開発し，バリデートした。アスコルビン酸処理したラット，マウス及びウサギ血漿の分析法ではアセトニトリルによる除蛋白法を用い，0.3～750 ng/mL の濃度範囲，ウサギ血漿では 0.5～1250 ng/mL の濃度範囲でタピナロフを定量した。アスコルビン酸処理したミニブタ血漿の分析法では，最初は，アセトニトリルによる除蛋白法を用いて，0.3～750 ng/mL の濃度範囲で定量した。その後，液液抽出法を用いて，0.04～40 ng/mL の濃度範囲で再設定し，バリデートした。

Dermavant 社が委託したラット GLP 試験の実施のため，ラット血漿中のタピナロフ及びタピナロフの硫酸抱合体を定量するために LC-MS/MS 分析法を開発した。この分析方法では，0.1～100 ng/mL の濃度範囲でタピナロフ，0.02～20 ng/mL の濃度範囲でタピナロフの硫酸抱合体を定量するため，除蛋白法を用いた。

GLP 試験を実施するためにバリデートし使用したすべての分析法は，バリデーション試験内で検討した濃度範囲で十分な精度及び真度を有することが示された。バリデートした分析方法の特性及び性能について表 2 に示す。

表 2　タピナロフの非臨床試験における生体試料分析法

マトリックス [報告書番号/CTD 番号]	LLOQ (ng/mL)	ULOQ (ng/mL)	精度 (%) [a]	真度 (%) [a]	マトリックス中の安定性
マウス血漿 [20[redacted]N183358/4.2.2.1-1 （評価資料）]	0.3	750	≤ 12.3	–1.3～ 2.9	–10°C～–30°C 及び–60°C～–80°C の 5 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結：–10°C～–30°C で 44 日間， –60°C～–80°C で 181 日間
ラット血漿 [20[redacted]N163799/4.2.2.1-2 （参考資料）]	5	1000	≤ 10.4	–11.5～ –1.6	-80°C から 3 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結：–80°C で 8 週間
ラット血漿 [08-0167-VRPT-01/4.2.2.1-3（参考資料） 08-0167-VRPT-01-AM-02/ 4.2.2.1-4（参考資料）]	1	500	≤ 10.5	–19.9～ 0.8	–40°C～–70°C で 3 回の F/T サイクル 室温：18 時間 凍結：–40°C 及び–70°C で 193 日間
ラット血漿 [20[redacted]N168051/4.2.2.1-5 （評価資料）]	0.1	250	≤ 4.3	–4.5～ 6.3	–20°C から 3 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結：–20°C で 78 日間
ラット血漿 [20[redacted]N183357/4.2.2.1-6 （評価資料） 20[redacted]N218456/4.2.2.1-7 （評価資料）]	0.3	750	≤ 10.1	–2.5～ 1.5	–10°C～–30°C 及び–60°C～–80°C の 5 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結： –10°C～–30°C 及び–60°C～–80°C で 152 日間
ラット血漿（タピナロフ） [521-1833 AM2/4.2.2.1-8 （評価資料）]	0.1	100	≤ 8.5	1.0～2.4	–20°C 及び–70°C から 5 回の F/T サイクル ベンチトップ（氷上）：23 時間 凍結：–20°C で 94 日間， –70°C で 184 日間
ラット血漿（タピナロフの硫酸抱合体） [521-1833 AM2/4.2.2.1-8 （評価資料）]	0.02	20	≤ 6.3	0.5～3.5	–20°C 及び–70°C から 5 回の F/T サイクル ベンチトップ（氷上）：23 時間 凍結：–20°C 及び–70°C で 184 日間
ウサギ血漿 [20[redacted]N163800/4.2.2.1-9 （参考資料）]	2	1000	≤ 8.8[b]	–2.1～ 3.1	–80°C から 3 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結：–80°C で 10 週間

マトリックス [報告書番号/CTD 番号]	LLOQ (ng/mL)	ULOQ (ng/mL)	精度 (%) [a]	真度 (%) [a]	マトリックス中の安定性
ミニブタ血漿 [20[redacted]N163802/4.2.2.1-10 (参考資料)]	0.1	50	≤8.3	-4.7～ 0.1	-40°C～-70°C で 3 回の F/T サイクル 室温：19 時間 凍結：-40°C 及び-70°C で 29 日間
ミニブタ血漿 [20[redacted]N169750/4.2.2.1-11 (評価資料)]	0.1	250	≤10.5	-5.0～ 6.6	-20°C から 3 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結：-20°C で 56 日間
ミニブタ血漿 [20[redacted]N207562/4.2.2.1-12 (評価資料)， 20[redacted]N236581/4.2.2.1-13 (評価資料)]	0.3	750	≤13.2	-3.7～ 3.5	-10°C～-30°C 及び-60°C～-80°C の 5 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結：-10°C～-30°C 及び -60°C～-80°C で 254 日間
ミニブタ血漿 [20[redacted]N251734/4.2.2.1-14 (評価資料)， 20[redacted]N286975/4.2.2.1-15 (評価資料)]	0.04	40.0	≤7.5	-2.5～ 2.0	-10°C～-30°C 及び-60°C～-80°C の 5 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結：-10°C～-30°C で 46 日間 -60°C～-80°C で 197 日間
ウサギ血漿 [20[redacted]N179037/4.2.2.1-16 (評価資料)， 20[redacted]N260571/4.2.2.1-17 (評価資料)]	0.5	1250	≤9.4	-6.8～ 0.0	-10～-30°C 及び-60°C～-80°C の 5 回の F/T サイクル 室温：24 時間 凍結：-10°C～-30°C 及び -60°C～-80°C で 70 日間

a 判定基準：LLOQ の標準物質及び QC の%バイアスが±20%，その他すべての標準物質及び QC については±15%

F/T = 凍結／融解；LLOQ = 定量下限；ULOQ = 定量上限。

2.6.4.3 吸収及び薬物動態

タピナロフの吸収及び全身（血漿中）の PK/TK の特性を検討するため，一連の *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。実施した試験一覧を，モジュール 4 内の記載箇所及び GLP 適合性とともに，表 3 に示す。

表 3　タピナロフの吸収及び薬物動態試験一覧

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	製剤処方[a]	投与濃度又は投与量（mg/kg/day）	投与期間（検体採取時期）	GLP	試験施設	報告書番号	CTD 番号
***In Vitro* 試験**										
In Vitro 皮膚透過性	*Ex vivo* ヒト皮膚	NA	経皮	C, E, F	0.5%	NA	非適	STFL	20[redacted]N242423	4.2.2.2-1
受動的膜透過性	MDCKII-MDR1 細胞	NA	NA	NA	NA	NA	非適	GSK	20[redacted]N294348	4.2.2.2-2
単回経皮投与試験										
In vivo 皮膚薬物動態（パイロット試験）	ラット（SD）	9M/9F	経皮	A	8% (480)	単回	非適	[redacted]	20[redacted]N163801	4.2.2.2-3
							非適	[redacted]	20[redacted]N163805	4.2.2.2-4
PK	Göttingen ミニブタ	2M	経皮	E	1%	単回	非適	STFL	20[redacted]N239357	4.2.2.2-5
PK	Göttingen ミニブタ	2M	経皮	E	1%	単回	非適	STFL	20[redacted]N239441	4.2.2.2-6
単回経口，静脈内及び皮下投与試験										
TK 及び忍容性	ラット（WH）	3M	経口	NA	10	単回	非適	GSK	20[redacted]N158999	4.2.3.1-1
			皮下							
PK	Göttingen ミニブタ	3F	静脈内，経口	NA	25; 1, 10	単回	非適	GSK	20[redacted]N163550	4.2.2.2-8
PK	Göttingen ミニブタ	3M	静脈内，経口，経皮	E	1; 5, 10	単回	非適	STFL	20[redacted]N239356	4.2.2.2-9

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	製剤処方[a]	投与濃度又は投与量（mg/kg/day）	投与期間（検体採取時期）	GLP	試験施設	報告書番号	CTD番号
反復経皮投与試験										
PK	マウス（CD-1）	3M	経皮	F	0.5%, 1.5%, 3%	4 日間	非適	GSK	20[redacted]N350320	4.2.2.2-10
反復投与毒性及びTK	マウス（CD-1）	10M/10F 6～30M/6～30F[TK]	経皮	E	0%, 1%, 2%, 4%（0.2 mL/マウス）	14 日間	適	[redacted]	20[redacted]N184562	4.2.3.2-2
反復投与毒性及びTK	マウス（CD-1）	12M/12F 3～18M/3～18F[TK]	経皮	F	0%, 0.5%, 1%, 3%（0.2 mL/マウス）	13 週間	適	[redacted]	20[redacted]N241812	4.2.3.2-3
反復投与毒性及びTK	マウス（CD-1）	60M/60F 30M/30F[TK]	経皮	F	0%, 0.5%, 1.5%, 3%（0.2 mL/マウス）	26 週間	適	[redacted]	DMVT-505-9001	4.2.3.4.1-1
反復投与毒性及びTK	ラット（WH）	4M 4M[TK]	経皮	E	0%, 1%, 2%, 4%（0, 10, 20, 40）	7 日間	非適	GSK	20[redacted]N175734	4.2.3.2-5
反復投与毒性及びTK	ラット（SD）	10M/10F	経皮	A	0%, 1%, 4%, 8%（0, 60, 240, 480）	28 日間	非適	[redacted]	20[redacted]N163810	4.2.3.2-6
反復投与毒性及びTK	ラット（WH）	12M/12F 3～6M/3～6F[TK]	経皮	F	0%, 0.5%, 1.5%, 3%（0, 10, 30, 60）	13 週間	適	[redacted]	DMVT-505-9003	4.2.3.2-7
反復投与毒性及びTK	ウサギ（NZW）	4M/4F	経皮	A	0%, 1%, 3%, 4%, 6%（0, 80, 225, 320, 480）	28 日間	非適	[redacted]	20[redacted]N163809	4.2.2.2-17
							非適	[redacted]	20[redacted]N163815	4.2.3.2-10
反復投与毒性及びTK	Göttingen ミニブタ	1M/1F	経皮	D	0%, 1%, 2%, 4%（0, 20, 40, 80）	7 日間	非適	GSK	20[redacted]N163449	4.2.3.2-11
反復投与毒性及びTK	Göttingen ミニブタ	3M	経皮	E, F	0, 2%	7 日間	非適	GSK	20[redacted]N204716	4.2.3.2-12
							非適	STFL	20[redacted]N239358	4.2.2.2-21

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	製剤処方[a]	投与濃度又は投与量（mg/kg/day）	投与期間（検体採取時期）	GLP	試験施設	報告書番号	CTD番号
反復投与毒性及びTK	Göttingen ミニブタ	3M/3F	経皮	B	0%, 1.5%, 3%, 6% (0, 23, 44, 87)	28 日間	非適	[redacted]	20[redacted]N163816	4.2.3.2-13
反復投与毒性及びTK	Göttingen ミニブタ	3M/3F	経皮	D	0%, 1%, 2%, 4% (0, 17/9, 36/18, 74/37)	28 日間	非適	[redacted]	20[redacted]N167695	4.2.3.2-14
反復投与毒性及びTK	Göttingen ミニブタ	3M/3F	経皮	F	0%, 0.5%, 1%, 3%(0, 10, 20, 60)	28 日間	適	[redacted]	20[redacted]N221246	4.2.3.2-15
反復投与毒性及びTK	Göttingen ミニブタ	5M/5F	経皮	C	0%, 1%, 2%, 4%（0, 18～28, 36～56, 72～94)	13 週間	非適	[redacted]	20[redacted]N163817	4.2.3.2-16
反復投与毒性及びTK	Göttingen ミニブタ	4M/4F	経皮	E	0%, 0.1%, 1%, 2%, 4% (0, 0.9, 9.7, 38.4, 76.2)	13 週間	適	[redacted]	20[redacted]N172520	4.2.3.2-17
反復投与毒性及びTK	Göttingen ミニブタ	4M/4F	経皮	F	0%, 0.5%, 1%, 3% (0, 10, 20, 60)	9 ヵ月	適	[redacted]	20[redacted]N299302	4.2.3.2-18

反復皮下投与試験										
PK	ラット（WH）	6M	皮下	NA	1, 6, 20	4 日間	非適	GSK	20[redacted]N315793	4.2.2.2-28
反復投与毒性，DRF	ラット（Hsd:SD）	6M/6F 複合	皮下	NA	0, 200, 500, 1000	7 日間	非適	[redacted]	20[redacted]N163819	4.2.3.2-20
反復投与毒性，DRF	ラット（WH）	3M/3F	皮下	NA	0, 3, 10, 30	7 日間	非適	GSK	20[redacted]N160460	4.2.3.2-19
媒体の検討	ラット（WH）	3M	皮下	NA	0, 30	7 日間	非適	GSK	20[redacted]N164986	4.2.3.2-21
反復投与毒性及び TK	ラット（Hsd:SD）	9M/9F	皮下	NA	0, 3, 10, 40	13 週間	非適	[redacted]	20[redacted]N163820	4.2.3.2-23
反復投与毒性及び TK	ラット（WH）	12M/12F 10M/10F	皮下	NA	0, 1, 6, 30	26 週間	適	[redacted]	20[redacted]N254469	4.2.3.2-24
反復投与毒性及び TK	ラット（WH）	60M/60F 9M/6～9F[TK]	皮下	NA	0, 0.1, 0.3, 1	26 週間	適	[redacted]	DMVT-505-9002	4.2.3.4.1-2

a. タピナロフクリームの経皮製剤を表 1 に示す。

試験施設：[redacted] = [redacted]；[redacted] = [redacted]；[redacted] = [redacted]；[redacted] = [redacted]；[redacted] = [redacted]；[redacted] = [redacted]；[redacted] = [redacted]；STFL = Stiefel；GSK=GlaxoSmithKline；[redacted] = [redacted]

DRF = 用量設定；GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準；F = 雌；WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]；M = 雄；NA = 該当せず；NZW = New Zealand White [Crl:KBL(NZW)BR]；PK = 薬物動態；SD = Sprague-Dawley [Crl:CD(SD) BR]；Hsd:SD = Harlan Sprague Dawley [Hsd:Sprague DawleySD] ；TK = トキシコキネティクス

2.6.4.3.1 *In Vitro* 試験

2.6.4.3.1.1 *Ex Vivo* ヒト腹部皮膚における GSK2894512A クリームの *In Vitro* 皮膚透過性及び分布［報告書番号 20[redacted]N242423］

（評価資料：CTD4.2.2.2-1）

先行する非臨床試験及び臨床試験は，タピナロフを含有する皮膚クリームを使用して実施した。これらの試験は，Welichem Biotech 社が実施した。製剤の安定性を高めるため，この Welichem 社の製剤に変更を加えた。変更後のクリームの乳剤の顕微鏡的外観が不均一であったため，さらなる変更が必要であった。有効成分（API）の送達に対するこれらの変更の影響を検討するため，*in vitro* 皮膚透過性試験を実施し，タピナロフのヒト皮膚への浸透性／透過性を評価した。ヒト皮膚と拡散セル（静置型又はフロースルー型）を用いた *ex vivo* 試験はヒト臨床試験における吸収と相関することが広く知られている[1,2]。このモデルでは，実際の温度及び湿度で維持することが可能な特殊設計の拡散チャンバーに摘出ヒト腹部皮膚を装着して使用する。製品／製剤を皮膚表面に塗布し，皮膚検体の下を流れるレシーバー液への移行速度をモニタリングすることにより，当該化合物の透過性を測定する。さらに，このモデルでは皮膚の異なる層（表皮又は真皮）内の薬物を測定することができる。

これらの *in vitro* 実験では，各クリームで油相や各種の表面活性剤の比率を変更し，用量比例性を比較する。臨床試験と安全性試験のブリッジングのため，比較対照薬として Welichem 社製の変更前のクリーム（処方 C）と Welichem 社製の変更後のクリーム（処方 E）を使用した。これらの *in vitro* 実験の結果，MCT を添加し，透過促進物質プロピレングリコール（PG）及びトランスキトール（TC）を添加しない場合には Welichem（処方 C）及び Tergus（処方 E）に比べてレシーバー液へのタピナロフの皮膚透過性が低下した。しかし，MCT を添加するとタピナロフの真皮への送達が Welichem（処方 C）及び Tergus（処方 E）に比べて約 3 倍増加した。MCT クリーム（処方 F）では，タピナロフ濃度 0.5%～2%の範囲で皮膚及びレシーバー液への透過性に用量比例性が認められ，これらのクリームが皮膚内に送達される濃度を上昇させることが示された。

2.6.4.3.1.2 MDCKII-MDR1 細胞を用いた[^{14}C]-GSK2894512A の受動的膜透過性の *In Vitro* 試験［報告書番号 20[redacted]N294348］

（参考資料：CTD4.2.2.2-2）

本試験では，MDCKII-MDR1 細胞を用いて，強力な P-gp 阻害剤 GF120918 の存在下における pH 7.4 及び pH 5.5 での[^{14}C]-タピナロフの受動的膜透過性を測定することを目的とした。

in vitro 透過性試験には，ヒト排出トランスポーターP-gp を異種発現させた極性 MDCKII-MDR1 細胞株を用いた。P-gp の影響を受けずにこの試験系で受動的透過性が評価されていることを確実にするため，P-pg 活性を 2 µmol/L の GF120918 で阻害した。細胞は Netherlands Cancer Institute から購入した在庫品から入手し，GF120918 の存在下で受動的透過性の測定に関してバリデートした。

GF120918 の存在下では，陽性対照である[^{3}H]-アンプレナビルの受動的膜透過性は高く，pH 7.4 での見かけの透過係数は 270 nm/s であり，これらの測定条件は妥当であると判断された。

[^{14}C]-タピナロフは，pH 7.4 での見かけの透過係数が 670 nm/s，pH 5.5 での見かけの透過係数が

500 nm/s で，高い受動的膜透過性を有すると判断された。

2.6.4.3.2 単回投与時の PK

ラット及びミニブタを用いて，単回経皮投与，経口投与，静脈内投与及び皮下投与時の PK パラメータを以下のとおり測定した。

2.6.4.3.2.1 単回経皮投与試験

2.6.4.3.2.1.1 ラット

2.6.4.3.2.1.1.1 Sprague-Dawley ラットでの単回局所塗布後の WBI-1001 の *In Vivo* 皮膚薬物動態試験（パイロット試験）［報告書番号 20[redacted]N163805, 20[redacted]N163801］

（参考資料：CTD4.2.2.2-4, 4.2.2.2-3）

本試験では，ラットに経皮投与したときのタピナロフの吸収を評価するために PK 用血漿検体を採取することを目的とした。

試験開始の 24 時間前，動物を無作為に選択して試験に割り当て，選択した動物の体幹部全体を電気バリカンで除毛した。投与前，動物の体重を計測し，投与群に割り付けた。算出された用量分の被験物質タピナロフクリーム 8%（処方 A；480 mg/kg）を体表面積（BSA）の 25%となるように動物の皮膚に塗布した。次に，ゴムスリーブをラットに巻きつけ，非刺激性の粘着テープで両端を固定した。次にラットをそれぞれのケージに戻し，6 時間にわたり曝露させた。曝露終了後，ゴムスリーブを外し，注射用滅菌水で皮膚を洗い流して洗浄した。

眼窩静脈叢から血液検体を採取した。血液検体は試験群の動物から 7 時点（塗布 30 分後，1，2，4，8，12 及び 24 時間後）採取した（各時点 4 例ずつ）。対照群の動物（雌雄各 1 匹）からは，塗布 0，8 及び 24 時間後に血液検体を採取した。

タピナロフクリーム塗布 30 分後におけるタピナロフの平均血漿中濃度は雄が 410 ng/mL，雌が 214 ng/mL であった。投与後 1 時間以内で血漿中濃度は約 90%低下し，投与後 1～12 時間には概ねほぼ一定のまま推移した。塗布 24 時間後の平均濃度は，雄で 17.7 ng/mL，雌で 7.7 ng/mL まで低下した。基剤対照群のラット血漿検体中にはタピナロフは検出されなかった。

2.6.4.3.2.1.2 ミニブタ

2.6.4.3.2.1.2.1 雄性 Göttingen ミニブタの皮膚における GSK2894512A の薬物動態を検討する試験［報告書番号 20[redacted]N239357］

（参考資料：CTD4.2.2.2-5）

本試験では，クリーム 1%（処方 E）を単回経皮投与したときのミニブタの皮膚におけるタピナロフの PK パラメータを評価することを目的とした。皮膚における CYP1A1 の誘導についても検討した。

2 匹の Göttingen ミニブタを用いて，背部にクリーム 1%を単回経皮投与したときのタピナロフの皮膚中の PK 特性を評価した。試験開始の 1 週間前に投与部位全体を除毛した。経皮投与の 24 時間前に，各投与部位を再度除毛した。動物への投与は 2 例の雄性動物を用いて実施した。8 ヵ所の投与部位（左右各 4 ヵ所）及び 1 ヵ所の無処置部位を油性マーカーでマーキングした。各投与

部位の大きさは 4 × 11 cm（44 cm^2）とした。製剤は 1 g/44 cm^2（API として 10 mg）の割合で塗布した。皮膚検体（すべて試験終了時に採取）の薬剤への曝露時間が 2，4，8，18，48，72，96 及び 168 時間となるように，製剤を 7 日間にわたって塗布した。

各経皮投与部位を半閉塞ガーゼパッチで覆い，皮膚塗布に適したテープで固定した。ガーゼパッチは，動物の体幹部にメッシュスリーブを巻くことによって固定した。曝露時間が 18 時間より長い投与部位については，塗布後 23 ± 1 時間で半閉塞ガーゼパッチを除去し，中性洗剤で洗浄した。そのため，曝露時間が 18 時間を超える投与部位はいずれも投与時間は 24 時間となった。残りの時間は消失時間とみなした。交差汚染を回避するため，洗浄後の各投与部位には清潔なガーゼパッチを固定した。試験終了時，動物を安楽殺し，投与部位を十分に洗浄し，生検を採取した。

LC-MS/MS 分析のため，最初にカミソリで皮下組織を除去して凍結生検を処理した。次に，検体の上層部分（表皮及び真皮上層：約 500 μm）を真皮から切り離した。以後，「表皮」と言及している箇所はいずれも角層，表皮及び真皮上層から構成される皮膚検体の上層部分のことをいい，「真皮」と言及している箇所は真皮深層を表す。次に，表皮及び真皮切片の重量を計測し，0.1%ギ酸含有の水／アセトニトリル混液（75:25）1 mL に添加してホモジナイズした。次に，0.1%ギ酸含有の 100%アセトニトリル溶液及び内部標準溶液（5 ng/mL）を用いて，除蛋白法によりホモジネートを処理した。除蛋白法により得られた上清を Ostro 96 ウェルプレートに移し，リン脂質を除去した。CYP1A1 誘導の評価，並びに質量分析（MS）及び蛍光イメージングのため，追加でパンチ生検を採取した。

すべての PK パラメータの算出は，先行試験と同様に長い消失相を示した皮膚の表皮／真皮上層切片（約 500 μm）を用いて実施した。皮膚からの $t_{1/2}$ 値を算出することは不可能であったが，表皮／真皮上層からの消失速度は Göttingen ミニブタに単回静脈内投与したとき（$t_{1/2}$ = 0.5 時間）に比べて有意に遅いと考えられた。薬剤は真皮下層検体の一部のみから検出された。したがって，これらの検体で PK パラメータを算出しなかった。

CYP1A1 誘導の結果，塗布 2 時間後から mRNA 発現量の増加が認められ，最大誘導作用が認められたのは塗布 4 時間後であった。mRNA 及び蛋白質の発現誘導倍率の全体的な推移は，皮膚の表皮／真皮上層切片中の薬物濃度推移と一致した。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法によるイメージング MS の結果，角層及び表皮から薬物が消失した後，真皮深層に薬物が移行することが示された。CYP1A1 誘導及びイメージング MS の結果は，タピナロフの皮膚中濃度データから得られた所見を間接的及び直接的に裏付けている。角化細胞を含む表皮層は CYP1A1 の主な産生源であるため，CYP1A1 mRNA の結果は本薬が表皮に浸透したことの間接的な証拠となる。マトリックス支援レーザー脱離イオン化法によるイメージング MS の結果は，タピナロフが真皮に存在することの直接的な証拠となる。

本試験のデータはミニブタ皮膚におけるタピナロフの消失速度が遅いことを示しており，このように皮膚中にタピナロフが長時間滞留することから QD 投与は妥当であると考えられる。

2.6.4.3.2.1.2.2 雄性 Göttingen ミニブタでの局所投与後の GSK2894512A の皮膚薬物動態を検討する試験［報告書番号 20[redacted]N239441］

（参考資料：CTD4.2.2.2-6）

本試験では，雄性ミニブタにタピナロフを食後単回経皮投与したときの皮膚中の PK パラメータを評価することを目的とした。

Göttingen ミニブタ（雄 2 匹）を用いて，タピナロフクリーム 1%（処方 E）を経皮投与したときの皮膚中の PK 特性を評価した。動物への投与は上記と同様に行い（CTD4.2.2.2-5 を参照），皮膚検体の製剤への曝露時間は 2，4，8，18，24 及び 48 時間とした。

試験終了時，動物を安楽殺し，投与部位を十分に洗浄し，動物から皮膚切片を切除した。各時点の組織検体から 3 個の別々の 8 mm 大のパンチ生検を採取し，クライオチューブに入れ，ドライアイス上に置いた。検体の処理は既報のとおり行った（CTD4.2.2.2-5 を参照）。

48 時間後のプラセボ塗布部位又は無処置部位の真皮からは薬物は検出されなかった。無処置部位の表皮 6 検体中 3 検体で微量の薬物が検出された。皮膚検体から検出された薬物の 95%超が表皮／真皮上層切片に存在していた。PK の結果から，皮膚からの消失時間が長いことが示された（平均 $t_{1/2}$ は真皮が 27 時間，表皮が 25 時間）。皮膚からの消失速度はミニブタを用いた単回投与 PK 試験の血漿で認められた速度（CTD4.2.2.2-9：静脈内投与後の $t_{1/2}$ は 0.5 時間）に比べて有意に遅いと考えられた。

以上のデータから，このクリームから皮膚に送達されるタピナロフは皮膚組織中での $t_{1/2}$ が長く，QD 投与が可能であると考えられた。

2.6.4.3.2.2 単回経口，静脈内及び皮下投与試験

2.6.4.3.2.2.1 ラット

2.6.4.3.2.2.1.1 ラットを用いた単回経口及び皮下投与トキシコキネティクス及び忍容性試験［報告書番号 20[redacted]N158999］

（評価資料：CTD 4.2.3.1-1）

本試験は，5 種類の異なる媒体を用いて WH ラットに単回経口及び皮下投与し，タピナロフの忍容性及び TK を検討することを目的とした。一般状態所見を評価した。投与 1 日目に採取した検体を用いて，TK 評価を実施した。

5 種類の異なる媒体を用いてタピナロフの製剤を調製した。

- 経口投与（10 mL/kg）：
  - 0.5%ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）／0.1% Tween 80（懸濁液）
  - 30%ポリエチレングリコール 400（溶液）
  - 30% Captisol®（溶液）
- 皮下投与（2.5 mL/kg）：
  - 40%ポリエチレングリコール 400（溶液）
  - 50%ポリエチレングリコール（溶液）

タピナロフを 0（媒体）又は 10 mg/kg の用量で雄性ラット（各群 3 匹）に単回投与した。投与

後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に血漿検体を採取し，除蛋白の後に LC-MS/MS 分析法（LLOQ：0.5 ng/mL）によりタピナロフ濃度を分析した。

0.5% HPMC/0.1% Tween 80 を用いた製剤で 10 mg/kg を経口投与したとき，タピナロフの濃度は大部分の血漿検体で定量下限未満であった（0.5 ng/mL 未満）。30% ポリエチレングリコール（PEG）400 を用いた製剤で 10 mg/kg を経口投与したとき，血漿中濃度は投与後 2～8 時間にわたって定量可能であった。30%（w/v）スルホブチルエーテル 7-β-シクロデキストリン（Captisol®）を用いた製剤で 10 mg/kg を経口投与したとき及び 10 mg/kg を皮下投与したとき（2 種類の製剤のいずれかを使用），血漿中濃度は投与後 8 時間又は 24 時間まで定量可能であった。

全身曝露量は，使用した処方に関係なく，経口投与時に比べて皮下投与時が顕著に高かった（約 40～95 倍）。いずれの製剤も忍容性は良好であった。

2.6.4.3.2.2.2 ミニブタ

Göttingen ミニブタの一般病理及び幅広い薬剤に対する反応に関する知見に基づき，タピナロフの PK 特性の評価には Göttingen ミニブタを選択した。また，ブタ皮膚の形態及びバリア機能はヒトのそれに最も近いことから，Göttingen ミニブタは経皮投与に適した動物種とも考えられている。

2.6.4.3.2.2.2.1 ミニブタを用いた単回静脈内投与及び経口投与クロスオーバー薬物動態試験［報告書番号 20[redacted]N163550］

（評価資料：CTD4.2.2.2-8）

本試験は，Göttingen ミニブタを用いた単回経口及び静脈内投与によるクロスオーバー薬物動態試験として，タピナロフの忍容性及び TK を検討することを目的とした。評価項目／パラメータは，一般状態観察及び体重とした。検討する 3 つの試験群［経口投与（25 mg/kg）及び静脈内投与（1 及び 10 mg/kg）］に関して，各投与時（1，8 及び 20 日目）に採取した検体を用いて TK 評価を実施した。

30% Captisol®水溶液を用いてタピナロフの製剤を調製し，単回投与クロスオーバー試験として 3 匹の雌性ミニブタに経口及び静脈内投与した。用量は 25 mg/kg の強制経口投与（容量 3 mL/kg），並びに 1 及び 10 mg/kg の耳介静脈への静脈内投与（1 mL/kg）とし，各投与の間には 7 日間以上の休薬期間を設けた。静脈内投与用の製剤は，0.22 μm Millex GV フィルターを通して滅菌褐色ガラスバイアルに分注した。投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に血漿検体を採取し，除蛋白の後に LC-MS/MS 分析（LLOQ：0.1 ng/mL）によりタピナロフ濃度を分析した。

タピナロフを 1 又は 10 mg/kg の用量で静脈内投与したとき，タピナロフはそれぞれ投与後 8 時間又は 24 時間まで定量可能であった。25 mg/kg の用量で強制経口投与したとき，タピナロフは投与後 8 時間又は 24 時間まで定量可能であった。静脈内投与後の t_{max} の中央値は最初の採取時点である 0.5 時間であった。強制経口投与後の t_{max} の中央値は 1 時間であった。

静脈内投与後のタピナロフの $t_{1/2}$ の信頼できる推定値を一貫して求めるためにはデータが不十分であった。しかし，AUC_{0-t} と $AUC_{0-\infty}$の差は無視できる程度であると推察された（$t_{1/2}$ の概算の推定値に基づくと，$AUC_{0-\infty}$の 99%超が AUC_{0-t} の算出区間中に占められると考えられる）。同様に，MRT_{0-t} と $MRT_{0-\infty}$にもほとんど差がなかった。したがって，比較のため，CL 及び V_{ss} の推定値を求

めた。

Göttingen ミニブタにおける肝血流量は 3700 mL/h/kg と報告されている[3]。ヘマトクリットを 0.4 と仮定した場合，肝血漿流量は 2220 mL/h/kg となる。1 mg/kg を単回静脈内投与したときのタピナロフの平均血漿クリアランスは 2110 mL/h/kg であり，肝血漿流量に基づきクリアランスが高いことが示された。10 mg/kg を静脈内投与したときの平均血漿クリアランスは約 40%低下して 1270 mL/h/kg であった。結果として，全身曝露量は用量増加に伴って用量比を上回って増加した。用量を 1 mg/kg から 10 倍増量すると，AUC_{0-t} の平均値が 17 倍上昇し，C_0 及び C_{max} の平均値は 15 倍上昇した。

1 又は 10 mg/kg を静脈内投与したときのタピナロフの平均滞留時間はそれぞれ 0.7 又は 1 時間であり，それぞれ血漿クリアランスが高いこと又は中程度であることと一致した。

タピナロフのいずれの用量の静脈内投与後も V_{ss} にはほとんど差が認められなかったため，用量を 10 mg/kg に増量したときに認められた $t_{1/2}$ の上昇はクリアランスの低下（MRT_{0-t} の上昇と一致）による可能性が高いと考えられた。

タピナロフを経口投与したときの血漿中濃度，C_{max} 及び AUC_{0-t} 値には大きな個体間差が認められた。C_{max} 及び AUC_{0-t} 値には動物によって 10 倍の開きがあり，顕著な異常値が 1 つ存在した。明らかな異常値を示した動物（動物 1）の血漿中濃度は，結果の確認のため 2 回分析した。強制経口投与したときのタピナロフのバイオアベイラビリティは低く，1%～11%（平均値：4.5%）であった。

結論として，経口投与したミニブタでは大きな個体間差が認められたが，AUC の平均値は 25 mg/kg の経口投与時と 1 mg/kg の静脈内投与時で同程度であった。静脈内投与では，1 mg/kg と 10 mg/kg の間でタピナロフの曝露量が用量比を上回って増加した。

2.6.4.3.2.2.2.2 雄性 Göttingen ミニブタでの経口，静脈内及び局所投与後の GSK2894512A の PK を検討する試験［報告書番号 20[redacted]N239356］

（評価資料：CTD 4.2.2.2-9）

本試験では，雄性 Göttingen ミニブタにタピナロフを食後単回静脈内，経口及び経皮投与したときの PK パラメータを評価することを目的とした。

DMSO：Kolliphore HS15：4%ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン混液（10：10：80）を用いて，タピナロフの 1 mg/mL の静脈内投与製剤（1 mg/kg）及び経口投与製剤（5 mg/kg）を調製した。経皮投与製剤はタピナロフクリーム（処方 E；10 mg/kg）とした。

動物を 3 群に分け，タピナロフを単回静脈内，経口又は経皮投与した。連続採血のため，動物の頸静脈にカテーテルを留置した。静脈内投与群には，投与のために別のカテーテルも伏在静脈に留置した。経皮投与群の動物については，投与前日に除毛し，BSA の 10%に相当する部位を油性マーカーでマーキングした。各動物の各経皮投与部位を半閉塞ガーゼパッチで覆い，皮膚に適したテープで固定した。半閉塞ガーゼパッチは投与後 24 時間に除去し，中性洗剤を用いて皮膚から製剤を洗い流した。投与量は個々の動物の体重に基づき算出した。各投与経路での血液検体は，静脈内投与では投与後 5 分，15 分，1，2，4，8 及び 24 時間，経口投与では投与後 30 分，1，2，4，8 及び 24 時間，経皮投与では投与後 30 分，1，2，4，8，24 及び 48 時間に採取した。採取後，

検体を処理して血漿を分離し，LC-MS/MS（LLOQ：0.5 ng/mL）により分析した。

静脈内投与時のタピナロフの全身クリアランスは 972 mL/h/kg，$t_{1/2}$ は 0.5 時間であった。経口バイオアベイラビリティは低く（F = 0.5%），C_{max} は 5.1 ng/mL であった。経皮投与群では，タピナロフの血漿中濃度はいずれも定量下限未満であった。

2.6.4.3.3 反復投与時の薬物動態／トキシコキネティクス

2.6.4.3.3.1 反復経皮投与試験

2.6.4.3.3.1.1 マウス

2.6.4.3.3.1.1.1 雄性 CD-1 マウスでの GSK2894512A の経皮投与後の GSK2894512 及びシス異性体（[redacted]）の血漿中濃度，並びに遺伝子結合［報告書番号 20[redacted]N350320］

（参考資料：CTD4.2.2.2-10）

本試験は，タピナロフクリーム（処方 F；マウス 1 匹あたり 0.2 mL）0%（基剤対照），0.5%，1.5%及び 3%を 4 日間経皮投与したときの血漿及び皮膚検体を採取することを目的とした。採取した血液検体を分析し，血漿中濃度を求めた。採取した皮膚検体を分析し，タピナロフによる標的への結合の指標としての遺伝子発現の有無を分析した。

投与物質（基剤又は被験物質の製剤）を使い捨ての木製ヘラで指定の各部位に均一な層になるように正常皮膚（投与前に除毛）に軽く直接塗布した。適切な投与物質（0.2 mL）を均一な膜状に塗布して，目標面積［全 BSA の 10%］を覆った。

皮膚分析の結果，タピナロフは芳香族炭化水素受容体リプレッサー（AhrR）並びに CYP1A1 及び CYP1B1 の発現を用量依存的に亢進することが示された。このことから，マウス皮膚ではタピナロフによる芳香族炭化水素受容体（AhR）の標的への結合が示唆された。最高投与濃度（3% w/w クリーム）で芳香族炭化水素受容体核内輸送体（ARNT）の発現減少が認められ，同時に NAD(P)H デヒドロキナーゼキノン 1（NQO1）の発現亢進が認められた。

タピナロフクリームとして 0%（基剤対照），0.5%，1.5%又は 3%（w/w）の濃度で雄性マウス（各時点各群 4 匹）に 1 日 1 回経皮投与したとき，すべての時点（投与後 1，2 及び 4 時間）でタピナロフが定量可能であった。分析したいずれの血漿検体でもシス異性体（[redacted]）は定量下限未満であった（LLOQ：0.250 ng/mL）。タピナロフは AhR の下流遺伝子 AhrR，CYP1A1，CYP1B1 及び NQO1 の発現を用量依存的に亢進したことから，マウス皮膚での AhR の活性化が示され，タピナロフの標的への結合が示唆された。さらに，最高投与濃度（3% w/w）では AhR 及び ARNT の発現減少及び NQO1 の発現亢進が認められた。

2.6.4.3.3.1.1.2 マウスを用いた 14 日間経皮投与毒性試験［報告書番号 20[redacted]N184562］

（評価資料：CTD 4.2.3.2-2）

本試験は，米国食品医薬品局の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（21 CFR，パート 58）（FDA GLP）及び OECD の医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（OECD GLP）に従って実施した。

本試験は，タピナロフクリーム 0%（基剤対照），1%，2%又は 4%（処方 E；0，60～80，110～160 又は 220～330 mg/kg/day）をマウスに 14 日間経皮投与したときの毒性，刺激性及び TK を検

討することを目的とした。タピナロフを投与 1～14 日目に CD-1 マウスに QD（1 日約 23 時間）経皮投与した。本試験には TK サテライト群として，対照群に雌雄各 6 匹，本剤の各用量群に雌雄各 30 匹を設定して投与 1 及び 14 日目に TK を実施した。

タピナロフの全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は用量増加に伴って増加した。投与 1 及び 14 日目の実際の投与量（mg/kg/day）に基づく全身曝露量の増加は，概ね用量比を上回っていた。投与濃度を 1%から 2%に 2 倍に上昇させると，C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ最大 5.7 倍及び 4.4 倍に上昇した。投与濃度を 2%から 4%に 2 倍に上昇させると，C_{max} 及び AUC_{0-t} はそれぞれ最大 3.6 倍及び 4.7 倍に上昇した。

1%又は 2%の投与濃度で投与した雄の C_{max} 及び AUC_{0-t} は雌の値に比べて概して低かったが（約 16%～76%），平均体重に基づく投与量（mg/kg/day）は雌の方がわずかに高かった。4%の投与濃度で投与したときの C_{max} 及び AUC_{0-t} は概して雌雄で同程度であった。

雄では，投与 14 日目の C_{max} 及び AUC_{0-t} は投与 1 日目に比べて同程度であり，差は 35%未満であった。雌では，投与 14 日目の C_{max} 及び AUC_{0-t} は，1%の投与濃度で投与したときには投与 1 日目に比べて同程度であったが（差は 30%未満），2%及び 4%の投与濃度で投与したときの方が低かった（約 41%～71%）。なお，投与量（mg/kg/day）は投与 14 日目のほうが投与 1 日目に比べわずかに低かった。

2.6.4.3.3.1.1.3 マウスを用いた 13 週間経皮投与毒性試験［報告書番号 20[redacted]N241812］

（評価資料：CTD 4.2.3.2-3）

本試験は，FDA GLP 及び OECD GLP に従って実施した。

本試験は，タピナロフクリームをマウスに 13 週間経皮投与したときの毒性，刺激性及び TK を検討することを目的とした。名目濃度 0%（基剤対照），0.5%，1%又は 3%のタピナロフクリームを調製し（処方 F；雄では 0，28，56 及び 164 mg/kg/day，雌では 33，65 及び 206 mg/kg/day），0.2 mL の一定容量で，CD-1 マウス（各群雌雄各 12 匹）の除毛した背部表面（BSA の約 10%に相当）に 1 日約 23 時間として QD，13 週間経皮投与した。

対照群から投与後 2 時間で血漿検体を採取し，タピナロフ濃度を分析したところ，すべての検体のタピナロフ濃度は，定量下限（0.300 ng/mL）未満であった。

投与 91 日目には，高用量群（雄 164 mg/kg/day，雌 206 mg/kg/day）の雄 1 例及び雌 1 例で投与後 24 時間に定量可能であったことを除き，タピナロフの血漿中濃度は雌雄ともすべての用量群で投与後 8 時間まで定量可能であった。投与 91 日目，雄の t_{max} は 28 mg/kg/day 群で投与後 2 時間，56 及び 164 mg/kg/day 群では投与後 1 時間であった。投与 91 日目，雌の t_{max} はすべての用量群で投与後 1 時間であった。全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は，用量増加に伴って概ね用量比を上回って増加した。

2.6.4.3.3.1.1.4 マウスを用いた 2 年間の経皮投与によるがん原性試験［報告書番号 DMVT-505-9001］

（評価資料：CTD 4.2.3.4.1-1）

本試験は，FDA GLP 及び OECD GLP に従って実施した。

本試験では，タピナロフクリーム（処方 F）を雌雄 Crl:CD1®（ICR）マウスに 104 週間経皮投与したときのがん原性を検討し，試験開始後 26 週間の TK を評価することを目的とした。名目濃度 0%（基剤対照），0.5%，1.5%又は 3%のタピナロフクリームを 0.2 mL の一定容量で，CD-1 マウス（各群雌雄各 60 匹）の除毛した背部表面（BSA の約 10%に相当）に QD，最大 98 週間（雌）及び最大 102 週間（雄）経皮投与した。

本試験には TK サテライト群として，対照群に雌雄各 6 匹，本薬の各用量群に雌雄各 30 匹を設定した。投与後 1，2，4，8 及び 24 時間に採取時点を設定する複合的な検体採取デザインで投与 28 及び 182 日目に採取した検体を用い，除蛋白の後に LC-MS/MS 法（LLOQ：0.3 ng/mL）で測定したタピナロフ濃度から TK 評価を実施した。投与 28 日目及び投与 182 日目の両日とも，0.5%及び 1.5%群では投与後 8 時間まで，3%群では投与後 24 時間まで，タピナロフの血漿中濃度で定量可能であった。t_{max} は投与後 1～4 時間であった。投与 28 日目の全身曝露量には一貫した性差は認められず，投与 182 日目には顕著な性差（2 倍超）は認められなかったが，0.5%群では雌の C_{max} 値が 7.4 倍，AUC_{0-t} 値が 7.1 倍高かった。全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は，雄では両方の評価時点，雌では投与 28 日目に投与用量の増加に伴って概ね用量比を上回って増加し，投与 182 日目の雌の全身曝露量の増加は用量比を下回っていた。

2.6.4.3.3.1.2 ラット

2.6.4.3.3.1.2.1 ラットを用いた 7 日間経皮投与毒性試験［報告書番号 20[redacted]N175734］

（参考資料：CTD 4.2.3.2-5）

本試験では，タピナロフを雄性 WH ラットに 7 日間反復経皮投与したときの毒性及び TK を評価することを目的とした。

経皮投与部位は BSA の 10%とした。BSA は投与前日の平均体重に基づいて決定した。0%（基剤対照），又はタピナロフクリーム 1%，2%若しくは 4%の適切な濃度の被験物質製剤（処方 E；0，10，20 又は 40 mg/kg/day）を投与部位に均一に直接塗布し，コットンガーゼパッチで覆った。投与部位が半閉塞状態となるように，非刺激性のテープ及びチューブ包帯を用いてパッチを皮膚に固定した。曝露期間終了時，包帯及びパッチを除去し，逆浸透処理した温水及びコットンガーゼで投与部位を拭いた。用量はクリームでの最大溶解度に基づいて決定した。投与 1 及び 7 日目の投与後 1，2，4，8 及び 24 時間に採取した検体を用いて TK 評価を実施し，除蛋白の後に LC-MS/MS 分析（LLOQ：0.1 ng/mL）によりタピナロフ濃度を分析した。

投与 1 日目，全身曝露量（AUC_{0-t} 及び C_{max} の平均値）は，用量を 10 mg/kg/day から 20 mg/kg/day に増量した際，用量増加に伴って概ね用量比例的に増加した。用量を 20 mg/kg/day から 40 mg/kg/day に増量した場合，全身曝露量に増加は認められなかった。

投与 7 日目，全身曝露量は用量増加に伴って用量比を下回る増加が認められた。全身曝露量は，10 mg/kg/day 投与時に比べて 20 mg/kg/day 投与時には 1.4 倍，40 mg/kg/day 投与時には 2.3 倍増加したが，20 mg/kg/day と 40 mg/kg/day では比例的な増加（1.6 倍）が認められた。10 mg/kg/day 群と 20 mg/kg/day 群の間で C_{max} 平均値の上昇は認められなかったが，10 mg/kg/day 群と 40 mg/kg/day 群の間では 1.7 倍の上昇が認められた。投与 7 日目の 20 mg/kg/day の投与後の AUC_{0-t} 及び C_{max} の平均値は，投与 1 日目に比べてそれぞれ 40%及び 61%低かった。投与 7 日目の 10 又は 40 mg/kg/day

の投与後の全身曝露量は投与 1 日目と同程度であった。

2.6.4.3.3.1.2.2 Sprague-Dawley ラットを用いた WBI-1001 の 28 日間反復経皮投与毒性試験［報告書番号 20[redacted]N163810］

（参考資料：CTD4.2.3.2-6）

本試験では，タピナロフをラットに 28 日間反復経皮投与（処方 A）したときの経皮毒性及び全身毒性の有無を評価した。4 群（試験群 3 群，対照／プラセボ群 1 群）を検討した。試験群及び対照群は，それぞれ雌雄各 10 匹の Sprague-Dawley ラット［系統：CD® (Crl:CD®(SD)BR) Charles River Canada］から構成した。1%，4%又は 8%のタピナロフクリーム（処方 A；60，240 及び 480 mg/kg）を経皮投与した。対照群にはプラセボクリームを 6.0 mL/kg の容量で投与した。いずれの試験群でも容量は一定の 6.0 mL/kg とした。各用量群の半数の動物（各群雌雄各 5 匹）の皮膚を投与前に皮下注射針で損傷させた。閉塞包帯下で本薬を皮膚と接触させて固定し，ラットを毎日 6 時間，本薬に曝露した。投与 1 及び 28 日目の TK 評価のため，サテライト群として対照群に雌雄各 8 匹，3 つの各本薬投与群に雌雄各 16 匹を設けた。投与 1 及び 28 日目の投与前，並びに投与後 0.5，1，6，12，24 及び 36 時間に採取した検体を用いて TK 評価を実施し，除蛋白の後に LC-MS/MS 分析（LLOQ：2 ng/mL）によりタピナロフ濃度を分析した。

いずれの用量の経皮投与後も，タピナロフは高い吸収性を示した。いずれの用量でも雌のほうが血漿中濃度は概して高かったが，血漿中濃度推移に顕著な性差は認められなかった。概して，投与 28 日目の血漿中濃度は投与 1 日目に比べて高かった。投与 28 日目の投与前検体に本薬が認められたことから，本薬は 24 時間以内に完全には消失しないことが示された。対照群の検体は 28 日目の 1 例の異常値を除き LLOQ 未満であった。

投与 1 日目，低用量群では塗布後 0.5～1 時間に C_{max} に到達し，中用量群及び高用量群では塗布後 6 時間に C_{max} に到達した。塗布後 6 時間以降，投与 28 日目の血漿中濃度は投与 1 日目に比べて高く，投与 28 日目の AUC 値は投与 1 日目に比べて上昇し，本薬の軽度の蓄積が示された。低用量群を除き，投与 1 日目に比べて投与 28 日目に C_{max} の上昇は認められなかった。

3 群とも，タピナロフの血漿中濃度は 2 つのピークを示すと考えられた。この観察結果は，タピナロフのグルクロン酸抱合体若しくは硫酸抱合体の加水分解体の腸管への再吸収，又は偶発的経口摂取（曝露期間後に本薬を十分に除去して洗浄したが，少量残留した本薬が身づくろいの際に摂取されたことは否定できなかった）によるものと考えられた。

2.6.4.3.3.1.2.3 ラットを用いた DMVT-505（タピナロフ）の 13 週間経皮投与毒性試験［報告書番号 DMVT-505-9003］

（評価資料：CTD 4.2.3.2-7）

本試験は，FDA GLP 及び OECD GLP に従って実施した。

本試験では，タピナロフクリームを雌雄 WH ラットに 13 週間反復局所塗布したときの毒性の可能性を検討することを目的とした。試験デザインは，タピナロフ群 3 群及び対照／プラセボ群 1 群で構成され，各群雌雄各 12 匹とした。本試験の TK サテライト群として，雌雄各 3 匹を対照群，雌雄各 6 匹を各タピナロフクリーム群に追加し，投与 1，29 及び 91 日目に採血した。いずれ

の群でも容量は一定の 2 mL/kg とした。名目濃度 0%（基剤対照），0.5%，1.5%又は 3%のタピナロフクリーム（処方 F）を QD，合計 13 週間経皮投与した。投与物質は，BSA の 10%に相当する投与部位に均一な層になるように皮膚に直接塗布した。本剤を多孔性のガーゼで覆うことにより本剤と皮膚との接触を保持した。塗布部位を包帯材でさらに覆い，粘着テープで固定することにより，本剤を取り除いたり摂取したりできないようにした。包帯材は 6 時間 ± 30 分間貼付した。

投与 1，29 及び 91 日目にタピナロフ及びその硫酸抱合体の TK 特性を検討した。投与 1，29 及び 91 日目の投与前（投与 29 及び 91 日目のみ），並びに投与後 1，2，4，8 及び 24 時間に採取した検体を用いて TK 評価を実施し，除蛋白の後に LC-MS/MS 分析［LLOQ：100 pg/mL（タピナロフ）及び 20 pg/mL（タピナロフの硫酸抱合体）］によりタピナロフ及びタピナロフの硫酸抱合体の濃度を分析した。

タピナロフの t_{max} は，投与 1 日目が投与後 1 又は 2 時間，投与 29 日目が投与後 1 又は 8 時間，投与 91 日目が投与後 0.5～8 時間であった。全身曝露量（AUC_{0-t} 値）は雌雄で同程度であった。AUC_{0-t} 値は，0.5%から 1.5%への用量増加に伴って概ね用量比を上回って上昇し，1.5%から 3%への用量増加時にはばらつきが認められた。反復経皮投与したときの全身曝露量（AUC_{0-t}）は，投与 29 日目と投与 1 日目でほとんど差がなく，投与 91 日目には投与 1 日目に比べて雄ではばらつきがみられ，雌では低かった。

タピナロフの硫酸抱合体の血漿中濃度は概して定量下限未満であった。測定可能な場合，タピナロフの硫酸抱合体の t_{max} はばらつきがみられ，投与前から投与後 24 時間までの範囲であった。投与 91 日目のタピナロフの硫酸抱合体の AUC_{0-t} は 3%群の雄のみで算出することができ，同代謝物の曝露量はタピナロフに比べて大幅に少なく，AUC_{0-t} の代謝物／未変化体比は 0.0484 であった。

2.6.4.3.3.1.3 ウサギ

2.6.4.3.3.1.3.1 New Zealand White ウサギを用いた WBI-1001 の 28 日間反復経皮投与毒性試験［報告書番号 20[redacted]N163815, 20[redacted]N163809］

（参考資料：CTD 4.2.3.2-10, 4.2.2.2-17）

本試験では，タピナロフをウサギに 28 日間反復経皮投与したときの経皮毒性及び全身毒性の有無を評価した。5 群（試験群 4 群，対照／プラセボ群 1 群）を検討した。試験群及び対照群は，それぞれ雌雄各 4 匹の New ZealandWhite ウサギ［Crl:KBL(NZW)BR］から構成した。動物に，0%（基剤対照），1%，3%，4%及び 6%のタピナロフクリーム［処方 A；0，80，320，並びに 480 mg/kg/day（cGMP 適用の新規バッチ使用）及び 320 mg/kg/day（cGMP 非適用の旧バッチ使用）］を経皮投与した。中用量の新規バッチ群（cGMP 適用製造バッチ）及び中用量の旧バッチ群（GMP 非適用製造バッチ）は，新規バッチが cGMP 適合条件下で製造された点を除き，同一となるようにした。本試験に先行して実施したウサギ用量設定試験を旧バッチで実施したため，これらの 2 群は，比較の目的で使用した。しかし，4%クリーム（cGMP 適用 API）の効力は目的とする効力の 70%（すなわち 3%）であった。したがって，本試験の用量は 0%，1%，3%及び 6%クリームバッチ（cGMP 適用 API）でそれぞれ 0，80，225 及び 480 mg/kg/day，追加の 4%バッチ（cGMP 非適用 API）で 320 mg/kg/day となった。対照群にはプラセボクリームを 8.0 mL/kg の容量で投与した。いずれの試験群でも容量は一定の 8.0 mL/kg とし，ウサギを毎日 6 時間，本剤に曝露した。

投与 1 日目の本薬の TK 評価のため，対照群に雌雄各 2 匹，試験群 2～4（cGMP 適用群）に雌雄各 4 匹を追加し，検体採取終了後に安楽殺した。試験の投与 28 日目，主試験群のすべての動物を TK 評価に供した。投与 1 及び 28 日目の投与前，並びに投与後 0.5，1，6，12，24 及び 36 時間に採取した検体を用いて TK 評価を実施し，除蛋白の後に LC-MS/MS 分析（LLOQ：2 ng/mL）によりタピナロフ濃度を分析した。

80，225，320 及び 480 mg/kg/day の用量で反復投与したときのウサギ血漿中のタピナロフ濃度の分析の結果，タピナロフの血漿中濃度に明らかな用量比例的な上昇が認められた。投与 28 日目の投与前検体でタピナロフが認められたことから，28 日間でタピナロフが蓄積することが示唆された。タピナロフの TK データの解析も実施した。タピナロフの終末相消失 $t_{1/2}$ は投与した用量全体で 4.2～30 時間の範囲であり，用量依存性を示す明らかな証拠は認められなかった。タピナロフクリーム 4%の旧バッチを用いて投与した結果，cGMP 適用原薬を用いて製造された名目濃度 4%（実際の濃度 3%）のクリームの新規バッチを用いて投与した場合に比べて，血漿中濃度及び全身曝露量が高かった。

本試験の投与 1 及び 28 日目の TK 評価の結果，いずれの群でも試験物質の吸収は 6 時間の曝露期間全体にわたって認められ，一貫した性差は認められなかった。新規バッチのクリームでは，全身曝露量（C_{max} 及び AUC）に用量依存性が認められた。血漿中濃度は曝露開始後 0.5～6 時間で C_{max} に到達した。各群内の血漿中濃度には大きな個体間差が認められており，本試験の TK 群で得られたデータから算出された TK パラメータの科学的妥当性は低い。

2.6.4.3.3.1.4 ミニブタ

2.6.4.3.3.1.4.1 ミニブタの 7 日間経皮投与毒性及び皮膚刺激性試験［報告書番号 20[redacted]N163449］

（参考資料：CTD4.2.3.2-11）

本試験では，雌雄 Göttingen ミニブタに 7 日間反復経皮投与したときのタピナロフの毒性，皮膚刺激性及び TK を検討することを目的とした。投与 1 及び 7 日目に採取した血漿検体を用いて，TK 評価を実施した。

各ミニブタの BSA の約 10%相当を投与部位とし，投与前に投与部位を油性マーカーでマーキングした。タピナロフクリーム 0%（基剤対照），1%，2%及び 4%（処方 D；0，20，40 及び 80 mg/kg/day）をワックスペーパー（0%，1%及び 2%）又は 50 cc シリンジ及びガラス棒（4%）を用いて，投与部位に直接塗布し，塗布部位をコットンガーゼパッチで覆った。投与部位が半閉塞状態となるように，非刺激性のテープを用いてコットンパッチを皮膚に固定した。コットンパッチには，各ミニブタの頚部に装着したカラーに取り付けたフレキシブルネットをかぶせた。約 23 時間の投与期間の終了時，コットンガーゼパッチ及びネットを除去し，刺激性スコアの判定の約 1 時間前に逆浸透処理した温水及びガーゼで拭いた。

AUC_{0-t} は，投与 7 日目の 80 mg/kg/day の投与後には雌雄で同程度であり，同じ用量群の雄性ミニブタでは投与 7 日目と投与 1 日目も同様であった。投与 7 日目の AUC_{0-t} は，投与濃度を 40 mg/kg/day から 80 mg/kg/day に上昇させた際，雄で用量増加に伴って用量比例的に増加した。投与濃度を上昇させても，C_{max} は必ずしも上昇しなかった。C_{max} 値に対する性別の一貫した影響は認められなかった。t_{max} は 2～8 時間であり，投与濃度，投与日又は性別による t_{max} に対する一

貫した影響は認められなかった。

2.6.4.3.3.1.4.2 ミニブタの 7 日間皮膚刺激性試験[報告書番号 20[redacted]N204716]及び雄性 Göttingen ミニブタでの反復局所投与後の皮膚検体における GSK2894512A の定量分析[報告書番号 20[redacted]N239358]

(参考資料：CTD4.2.3.2-12, 4.2.2.2-21)

本試験は，雄性 Göttingen ミニブタに 7 日間反復経皮投与したときのタピナロフの 3 種類の製剤（処方 E，F 及びミグリオール／Kolliwax 配合処方；0%及び 2%）の皮膚刺激性及び TK を評価することを目的とした。

タピナロフの各製剤をミニブタ（各群雄 3 匹）の健常皮膚に 1 日（約 23 時間），2%の濃度で 7 日間塗布した。これらの群の経皮投与部位は BSA の 10%とした。投与開始前に実施した製剤化のフィージビリティ試験（上記の各用量群の 1 例目のミニブタの BSA の 10%に適切な基剤を約 23 時間塗布した）で決定したとおり，投与重量は 2 g/kg/day とした。投与 1 及び 7 日目に採取した検体を用いて，TK 評価を実施した。

投与 1 及び 7 日目のタピナロフの全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t} の平均値）は，処方 F での投与時に最も低値であった。処方 E 及びミグリオール／Kolliwax 配合処方での投与時のタピナロフの平均 C_{max} 値は，処方 F での投与時と比較して約 15%～75%高かった。処方 E 及びミグリオール／Kolliwax 配合処方での投与時のタピナロフの平均 AUC_{0-t} 値は，処方 F での投与時と比較して約 1.5～2.7 倍高かった。ミグリオール／Kolliwax 配合処方での投与時と処方 E での投与時のタピナロフの全身曝露量は概ね同程度であった。

処方 F 及びミグリオール／Kolliwax 配合処方での反復投与時のタピナロフの皮膚中濃度は，処方 E の場合と比較して表皮及び真皮への皮膚透過性が改善することを示していた。真皮では，処方 F により処方 E と比較してタピナロフの皮膚透過性が 45 倍上昇した。ミグリオール／Kolliwax 配合処方では処方 E と比較して濃度が 129 倍に上昇した。

皮膚の表皮切片でも同様の傾向が認められた。タピナロフの表皮中濃度は，処方 F 使用時が 4 倍，ミグリオール／Kolliwax 配合処方使用時が 6 倍高かった。薬物濃度を角質層，表皮及び真皮上層に分けて個別に定量することができないため，表皮のデータの解釈には限界がある。

真皮検体中のタピナロフの濃度の比較により，処方 F 及びミグリオール／Kolliwax 配合処方では処方 E と比較して真皮深層への薬物の透過性が高くなることが示されている。表皮／真皮上層の組織中濃度を比較した結果，処方 F とミグリオール／Kolliwax 配合処方で有意な差は認められないと考えられる。

2.6.4.3.3.1.4.3 Göttingen ミニブタの 28 日間経皮投与毒性試験及び 14 日間回復性試験［報告書番号 20[redacted]N163816]

(参考資料：CTD4.2.3.2-13)

本試験は，タピナロフをミニブタに 1 日 6 時間，28 日間反復非閉塞経皮投与したときの毒性及び TK プロファイルを評価し，変化が認められた場合にその回復性を 14 日間の回復期間後に評価することを目的とした。タピナロフクリームを 0（基剤クリーム），1.5%，3%及び 6%（処方 B；

0，23，44 及び 87 mg/kg/day）を 1 日 6 時間，28 日間反復経皮投与（非閉塞条件）し，その後，動物を安楽殺して剖検に供した。対照群を含め，すべての動物で容量は 1.5 mL/kg とした。投与 1 及び 28 日目にすべての動物から一連の血液検体（投与前，並びに投与後 0.5，1，6，8，12，24 及び 36 時間）を採取し，タピナロフの血漿中濃度を分析した。

血漿中薬物濃度の用量依存的な上昇が認められ，投与 1 日目に得られた定量可能なデータが少なかったため，その上昇は投与 1 日目に比べて投与 28 日目のほうが明確であった。

タピナロフは，対照群で投与 1 日目に採取した血漿検体の 5%（60 検体中 3 検体）及び投与 28 日目に採取した検体の 16%（80 検体中 13 検体）で検出されたが，LLOQ 付近の濃度であった。投与施設又は分析機関のいずれかで *ex vivo* にて血液検体の汚染が生じたと判断された。実際，生体試料分析データを詳細に評価したところ，1）対照群の一部の検体からは投与 1 日目に被験物質が飼育室に持ち込まれる前の段階でタピナロフが検出されており，2）汚染が散発的な性質のものであり，ある動物から採取されたわずか 1 検体又は 2 検体（t_{max} 以外の検体）でタピナロフが検出されたとしても，その合間に採取されたその他のいずれの検体でもタピナロフが検出されていないことから，対照群の動物にタピナロフが投与された可能性は極めて低いと推定された。汚染された検体数及び相互に交換可能な値が存在しなかったという事実（相互に交換可能な値が存在すれば検体の取り扱い又は表示のミスが通常疑われる）を踏まえると，検体の取り扱い又は表示の段階でミスは発生しなかったと考えられる。*Ex vivo* での汚染を確認することはできなかったが，汚染が散発的なものであり，一部の検体で高濃度のタピナロフが検出されていることから，その汚染の可能性は残る。しかし，本試験を実施した CRO である ITR Laboratories Canada Inc.に対する監査を Welichem 社が実施した結果，本試験は GLP を完全に遵守して実施されていることが示された。分析機関に対する監査でも，本試験は GLP を完全に遵守して実施されていることが示された。

2.6.4.3.3.1.4.4 Göttingen ミニブタの 28 日間経皮投与毒性試験［報告書番号 20[redacted]N167695］

（参考資料：CTD4.2.3.2-14）

本試験は，クリーム基剤で調製したタピナロフを 0%（基剤対照），1%，2%及び 4%（処方 D；0，17，36 及び 74 mg/kg/day）の濃度で Göttingen ミニブタ（各群雌雄各 3 匹）の背部皮膚（約 500 cm^2，BSA の約 10%）に 2 mL/kg の容量で 28 日間反復経皮投与したときの毒性及び TK を検討することを目的とした。投与 1 及び 28 日目の投与前，並びに投与後 1，2，4，8，12 及び 24 時間に採取した検体を用いて TK 評価を実施し，LC-MS/MS（LLOQ：0.1 ng/mL）により分析した。各投与日の投与後，投与部位を約 23 ± 1 時間にわたって半閉塞状態とし，その後，次回投与前に優しく洗浄した。雄では投与 15 日目，雌（投与 10 日目の対照群の交換用の雌を除く）では投与 14 日目から試験終了時まで投与部位で投与容量が異常に多いことが確認されたことを踏まえ，容量を 1 mL/kg に減らし，その結果，第 1 群～第 4 群の用量は 0，9，18 及び 37 mg/kg/day に減量した。

雌におけるタピナロフの全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t} の平均値）は，概して雄に比べて高値であった（約 2～7 倍）。投与 28 日目の C_{max} の平均値は投与 1 日目と同程度であったが，AUC_{0-t} の平均値は投与 14 又は 15 日目に用量を 50%減量したにもかかわらず，投与 1 日目に比べて同程度

であったか，又は約 3 倍高かった。全身曝露量は概して用量増加に伴って増加したが，一貫した用量比例性は認められなかった。

2.6.4.3.3.1.4.5 Göttingen ミニブタの 28 日間経皮投与毒性試験［報告書番号 20[redacted]N221246］

（評価資料：CTD4.2.3.2-15）

本試験は， FDA GLP 及び OECD GLP に従って実施した。

本試験は，タピナロフクリーム 0%（基剤対照），0.5%，1%及び 3% w/w（処方 F；0，10，20 又は 60 mg/kg/day）を Göttingen ミニブタ（各群雌雄各 3 匹）の背部皮膚（BSA の約 10%）に 1 日 2 回（10 ± 1 時間間隔）28 日間経皮投与したときの経皮投与毒性，皮膚刺激性及び TK を検討することを目的とした。各投与日のその日の 1 回目投与から投与部位を約 20 ± 1 時間にわたって半閉塞状態とし，その間，2 回目の投与前に洗浄した。投与 1 及び 28 日目に採取した検体を用いて，TK 評価を実施した。

投与 28 日目の 2 時点（1 回目投与後 3 及び 24 時間）で，1 回 5 mg/kg（10 mg/kg/day）群の雌について 1 匹の濃度値が得られたのを除き，投与 1 及び 28 日目には 1 回 5 及び 10 mg/kg（10 及び 20 mg/kg/day）群でタピナロフの血漿中濃度は定量下限未満であった。1 回 30 mg/kg（60 mg/kg/day）群では，投与 1 及び 28 日目におけるタピナロフの血漿中濃度が，投与（1 又は 2 回目投与）後 3 時間まで定量可能であった。60 mg/kg/day 群の投与 1 及び 28 日目の t_{max} 値は投与（1 又は 2 回目投与）後 1～3 時間であった。C_{max} 値は雌雄とも 0.306～1.81 ng/mL であった。概して，濃度値の大部分が定量下限未満であったため，AUC_{0-t} は報告できなかった。

タピナロフの濃度は，雌雄とも，真皮下層に比べて表皮／真皮上層で概して高かった。剖検時の皮膚中濃度の雌雄平均値は 60 mg/kg/day 群で最も高く，表皮／真皮上層では 8265 ng/g，真皮下層では 1832 ng/g であった。投与 28 日目の 24 時間の血漿中濃度が定量下限未満であったため，皮膚中濃度と血漿中濃度の比較を評価することはできなかった。

2.6.4.3.3.1.4.6 ミニブタを用いた WBI-1001 の 13 週間経皮投与毒性及びトキシコキネティクス試験及び 4 週間回復性試験［報告書番号 20[redacted]N163817］

（参考資料：CTD4.2.3.2-16）

本試験では，タピナロフをミニブタの背部皮膚に 1 日 2 回 13 週間以上経皮投与したときの毒性及び TK を検討し，影響が認められた場合にその回復性，持続性及び遅発性について 4 週間の回復期間後に評価した。雌雄 Göttingen ミニブタを 4 群（各群雌雄各 5 匹）に割り付け，1 日 2 回経皮投与した。各群にタピナロフクリーム 0%（基剤対照），1%，2%又は 4%（処方 C；BSA に応じて 0，18～28，36～56 又は 72～94 mg/kg/day）を含有する投与製剤を 37.8 mg/cm^2 の容量（BSA に応じて，1 匹あたり 17.0～22.7 g の投与量に相当）で塗布した。投与 1，28 及び 91 日目の投与前，並びに投与後 1，2，4，6，8，10，12 及び 24 時間に血液検体を採取し，LC-MS/MS（LLOQ：0.1 ng/mL）により分析した。

t_{max} の個別値は用量群及び検体採取日によって大きく異なり，投与前から投与後 24 時間までの範囲であった。いずれの用量群でも投与 1，28 及び 91 日目の曝露量は雌雄ミニブタで同程度であった。各群の雌雄のデータを併合したところ，t_{max} は 2～10 時間の範囲であった。3 日すべての検

体採取日から算出した終末相消失 $t_{1/2}$ は 3.6～38.4 時間であったが，投与 91 日目の $t_{1/2}$ は 4.6～8.8 時間であった。終末相消失 $t_{1/2}$ に明らかな性差及び用量依存性は認められなかった。全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）は用量依存的に増加した。3 群いずれの投与群でも，投与 28 日目の曝露量は投与 1 及び 91 日目に比べて高かった。C_{max} 値でも同様の結果が認められたが，1%群の結果のみは投与 28 日目と投与 91 日目で同程度であった。AUC データに基づくと，40 mg/g までの濃度で調製したタピナロフを 22.7 g まで 1 日 2 回 3 ヵ月間経皮投与したときには全身へのタピナロフの蓄積は認められなかった。

2.6.4.3.3.1.4.7 Göttingen ミニブタの 13 週間経皮投与毒性試験［報告書番号 20[redacted]N172520］

（評価資料：CTD4.2.3.2-17）

本試験は，FDA GLP 及び OECD GLP に従って実施した。

本試験は，タピナロフクリームを 0%（基剤対照），0.1%，1%，2%及び 4%（処方 E；0，0.9，9.7，38.4 及び 76.2 mg/kg/day）の濃度で Göttingen ミニブタ（各群雌雄各 4 匹）の背部皮膚（BSA の約 10%）に 1 mL/kg の容量で 91 日間反復経皮投与（群 1，2 及び 3 は QD 投与，群 4 及び 5 は 1 日 2 回投与）したときの毒性及び TK を検討することを目的とした。2%及び 4%濃度については 1 日 2 回（約 10 時間間隔）投与した。各投与日の投与後，投与部位を約 23 ± 1 時間にわたって半閉塞状態とし，その後，2 回目投与前に洗浄した。投与 1 日目，投与 4 及び 13 週目に採取した検体を用いて，TK 評価を実施した。0%（基剤対照），0.1%及び 1%群の血液検体は投与前，並びに投与後 1，2，4，8，12 及び 24 時間に採取し，2%及び 4%群では投与前，並びに投与後 1，2，4，8，10（2 回目投与前），12，15 及び 24 時間に検体を採取した。検体は LC-MS/MS 法（LLOQ：0.1 ng/mL）により分析した。

投与 1 日目の雌の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t} の平均値）は雄と同程度であったが，投与 4 週目の雌の全身曝露量は雄の 2～10 倍高かった。投与 13 週目の全身曝露量は，0.9 又は 9.7 mg/kg/day 群では雌が雄の 2～18 倍高かったが，38.4 又は 76.2 mg/kg/day 群では雌雄で同程度（30%以下の差）であった。

雄は，投与 4 週目の全身曝露量は投与 1 日目と同程度であった。投与 13 週目までに，全身曝露量は投与 1 日目に比べて概ね 3～7 倍高くなった。雌は，投与 4 週目の全身曝露量は概ね投与 1 日目に比べて顕著に高かった（約 2～25 倍）。投与 13 週目の全身曝露量は，投与 1 日目に比べて概ね 2～12 倍高かった。概して，投与 13 週目の用量に伴う全身曝露量の増加は，雌では用量にほぼ比例した増加を示していたが，雄では用量比を上回る増加を示していた。

2.6.4.3.3.1.4.8 Göttingen ミニブタの 9 ヵ月間経皮投与毒性試験及び 1 ヵ月間回復性試験［報告書番号 20[redacted]N299302］

（評価資料：CTD4.2.3.2-18）

本試験は，FDA GLP 及び OECD GLP に従って実施した。

本試験は，タピナロフクリーム 0%（基剤対照），0.5%，1%及び 3%（処方 F；0，10，20 又は 60 mg/kg/day）を 1 回あたりの投与重量 1 g/kg で Göttingen ミニブタ（各群雌雄各 4 匹）の背部皮膚（BSA の約 10%）に 1 日 2 回（10 ± 1 時間間隔）9 ヵ月間投与したときの経皮投与毒性，皮膚

刺激性及びTKを検討することを目的とした。対照群及び高用量群に各群雌雄各2匹を追加し，9ヵ月間の投与期間後に4週間休薬させた。各投与日の投与後，投与部位を1回目投与から約20±1時間にわたって半閉塞状態とし，その後，2回目投与前に優しく洗浄した。投与5，26及び39週目の1回目投与後1，3，6，10（1日の2回目投与前），11，13，16及び24時間に採取した検体を用いてTK評価を実施した。検体はLC-MS/MS法（LLOQ：0.4 ng/mL）により分析した。剖検時にすべての動物の投与皮膚の検体も採取し，表皮／真皮上層と真皮下層の2つの領域におけるタピナロフ濃度を評価した。検体調製は2.6.4.3.3.1項に記載のとおり実施し，LC-MS/MS法（LLOQ：1 ng/mL）により分析を実施した。

用量，採血時期及び性別にかかわらず，血漿中タピナロフ濃度は1日の1回目投与後24時間まで定量可能であったが，例外として，0.5% w/w（10 mg/kg/day）群の雄及び雌ではそれぞれ投与39及び5週目の血漿中タピナロフ濃度が1日の1回目投与後13時間まで（又は2回目投与後約3時間まで）定量可能であった。

投与26週目の全身曝露量（C_{max}及びAUC_{0-t}の雌雄平均値）は，10～20 mg/kg/dayの範囲では用量比を上回る増加を示し，20～60 mg/kg/dayの範囲では用量比を下回る増加を示した。投与5及び39週目には，全身曝露量は10～60 mg/kg/dayの範囲で用量増加に伴って概ね用量に比例して増加した。全身曝露量の比は，投与26／5週目の比が0.711～1.5，投与39／5週目の比が0.665～1.4であった。概して，試験の様々な時期の全身への蓄積量に顕著な差（2倍超）は認められなかった。

39週間の経皮投与及び1ヵ月間の休薬後に試験終了時に安楽殺した雌雄ミニブタから採取した皮膚サンプルのタピナロフの濃度は，真皮下層よりも表皮／真皮上層で高かった。タピナロフは概して用量に応じて平均皮膚中濃度は増加した。タピナロフクリーム3%（60 mg/kg/day）群のタピナロフの皮膚中濃度は，雌雄ともに，1ヵ月間の休薬後も依然として定量可能であった。

2.6.4.3.3.2 反復皮下投与試験

2.6.4.3.3.2.1 ラット

2.6.4.3.3.2.1.1 GSK2894512Aを雄性WHラットに名目用量1，6又は20 mg/kg/dayで4日間皮下投与する血漿及び皮膚採取試験［報告書番号20[redacted]N315793］

（参考資料：CTD4.2.2.2-28）

本試験は，30% Captisol®を媒体として用いたタピナロフの製剤を4日間皮下投与したときの血漿及び皮膚検体を採取することを目的とした。投与1日目（投与後1，2及び4時間）及び投与4日目（投与前，並びに投与後1，2及び4時間）に血液検体を採取し，LC-MS/MSによりタピナロフの血漿中濃度を分析した。

タピナロフを雄性ラットに4日間皮下投与したとき，すべてのラットでタピナロフの血漿中濃度は定量可能であった。各時点の平均濃度値は，投与1及び4日目ともに用量増加に伴って概ね用量比例的に上昇した。

2.6.4.3.3.2.1.2 ラットの7日間皮下投与用量設定毒性試験［報告書番号20[redacted]N160460］

（参考資料：CTD4.2.3.2-19）

本試験では，WHラットを用いる7日間皮下投与用量設定試験としてタピナロフの毒性及びTK

を検討することを目的とした。投与 1 及び 7 日目に採取した血漿検体を用いて，TK 評価を実施した。投与 1 及び 7 日目の投与前，並びに投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に血液検体を採取し，除蛋白法により調製後，LC-MS/MS 分析（LLOQ：0.1 ng/mL）によりタピナロフの血漿中濃度を分析した。

ポリエチレングリコール 400 を 40%(v/v)の濃度で注射用滅菌水と混合したものを媒体として，濃度 0，1，3.3 又は 10 mg/mL のタピナロフ（バッチ番号 U26136-10，純度 98.5%）の製剤を調製した。これらの濃度は用量として 0，3，10 又は 30 mg/kg/day に相当した。低用量群は液剤，中用量及び高用量群の製剤は懸濁液であった。製剤容量が不十分であったため，毒性試験群では投与 7 日目において高用量群（30 mg/kg/day）の雄 1 匹のみの投与となったが，TK 群の動物では投与 7 日目に全個体に投与した。

$AUC_{0\text{-}t}$ の平均値は，投与 1 及び 7 日目では雌雄ともに用量増加に伴って概ね用量比例的に上昇した。用量を 3 mg/kg/day から 3.3 倍又は 10 倍に増加させると，平均 $AUC_{0\text{-}t}$ はそれぞれ 2.2～5.2 倍又は 6.0～12 倍に上昇した。しかし，平均 C_{max} は用量増加に伴って用量比を下回って上昇する傾向を示した。用量を 3 mg/kg/day から 3.3 倍又は 10 倍に増加させると，平均 C_{max} はそれぞれ 1.2～3.5 倍又は 1.4～5.9 倍に上昇した。

2.6.4.3.3.2.1.3 ラットを用いた WBI-1001 の 7 日間皮下投与用量設定試験［報告書番号 20[redacted]N163819］

（参考資料：CTD4.2.3.2-20）

本試験では，タピナロフをラットに 7 日間反復皮下投与したときの毒性を評価し，TK を検討することを目的とした。雌雄 Hsd:Sprague Dawley®SD®ラットを各群に割り付けて投与した。各群には，媒体［プロピレングリコール（USP）］又はタピナロフ 200，500 又は 1000 mg/kg/day（媒体添加）を含有する投与液（投与容量 4 mL/kg）を投与した。投与 1 及び 7 日目の投与後 0.5，1，2，4，6 及び 10 時間に血液検体を採取し，タピナロフの血漿中濃度を分析した（LLOQ：1 ng/mL）。

タピナロフの血漿中濃度は，投与 1 日目には 3 用量群とも投与後 2～4 時間に最高濃度に達したが，投与 7 日目には投与後 0.5 時間に最高濃度に達した。血漿中濃度はいずれの用量でも雌に比べて雄でわずかに低かったが，血漿中濃度及び $AUC_{0\text{-}t}$ のいずれにも投与 1 又は 7 日目に大きな性差は認められなかった。曝露量にはわずかな用量比例性が認められ，500 mg/kg/day 群と 200 mg/kg/day 群の比及び 1000 mg/kg/day 群と 200 mg/kg/day 群の比は 1.4～1.7 倍の範囲であり，500 mg/kg/day 群と 1000 mg/kg/day 群の曝露量は同程度であり用量比例性は認められなかった。投与 7 日目には，投与 1 日目に比べて C_{max} は高かったが，$AUC_{0\text{-}t}$ はわずかに低かった。投与 1 日目の終末相消失 $t_{1/2}$ は 4.4～10.4 時間であり，明らかな用量依存性又は性差は認められなかった。投与 7 日目の $t_{1/2}$ は 3.2～4.3 時間であり，投与 1 日目に比べて短かった。

雌雄のデータを併合したところ，投与 1 又は 7 日目のいずれの C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ にも，中用量群（500 mg/kg/day）と高用量群（1000 mg/kg/day）で明らかな有意差は認められなかった。吸収はほぼ飽和状態に達したと判断された。同一の用量群では，投与 7 日目には投与 1 日目に比べて，C_{max} は 1.6～1.9 倍に上昇したが，$AUC_{0\text{-}t}$ はわずかに低下した。本試験の AUC データに基づくと，全身へのタピナロフの経時的な蓄積はないと考えられた。

2.6.4.3.3.2.1.4 ラットの 7 日間皮下投与媒体探索試験［報告書番号 20[redacted]N164986］

（参考資料：CTD4.2.3.2-21）

本試験では，雄性 WH ラットを用いる 7 日間皮下投与媒体探索試験としてタピナロフの忍容性及び TK を検討することを目的とした。コーン油，ピーナッツ油，オリーブ油又は Captisol®を媒体として，用量 30 mg/kg/day（投与容量 3 mL/kg）となるようにタピナロフ製剤を調製した。タピナロフを雄性ラット（各群 3 匹）に 0（媒体）又は 30 mg/kg/day の用量で QD 7 日間皮下（腹部背面）投与した。TK 評価のため，各タピナロフ投与液（30 mg/kg/day）に対して雄 3 匹を追加した。投与 1 及び 7 日目の投与前，並びに投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に採取した検体を用いて TK 評価を実施した。検体は，除蛋白の後に LC-MS/MS 分析（LLOQ：0.1 ng/mL）によりタピナロフの血漿中濃度を分析した。

30% Captisol®を媒体とする皮下投与群では，コーン油，オリーブ油又はピーナッツ油を媒体として皮下投与した場合と比較して，投与 1 及び 7 日目とも，C_{max} の平均値は 8～16 倍に達し，AUC_{0-t} の平均値は 2～4 倍に達した。30% Captisol®を媒体としてタピナロフを投与した場合の t_{max} の中央値は 0.5 時間であり，油系の製剤で投与した場合（1～4 時間）に比べて早かった。使用媒体に関係なく，投与 7 日目にタピナロフの全身曝露量は投与 1 日目と同程度であった。

2.6.4.3.3.2.1.5 ラットを用いた WBI-1001 の 13 週間皮下投与毒性及びトキシコキネティクス試験及び 4 週間回復性試験［報告書番号 20[redacted]N163820］

（参考資料：CTD4.2.3.2-23）

本試験では，タピナロフをラットに 13 週間反復皮下投与したときの毒性及び TK を評価し，影響が認められた場合にその回復性，持続性及び遅発性について 4 週間の回復期間後に評価した。雌雄 Hsd:Sprague Dawley®SD®ラットを各群に割り付けた。各群には，プロピレングリコール（USP）又はタピナロフ 3，10 又は 40 mg/kg/day を含有する投与液（投与容量 1 mL/kg）を投与した。注射部位の皮膚反応を抑制するため，背部の最大 8 ヵ所の皮下投与部位を順番に変えて投与した。投与 1 日目（投与後 0.25，0.5，1，1.5，2，4，7，12 及び 24 時間），並びに投与 14 及び 91 日目（投与前，並びに投与後 0.5，1，1.5，2，4，7，12 及び 24 時間）に血液検体を採取し，タピナロフの血漿中濃度を分析した（LLOQ：1 ng/mL）。

投与期間の投与 1，14 及び 91 日目の血漿中濃度は，雌雄 3 用量群とも投与後 0.5～2 時間（t_{max}）に最高濃度に達した。終末相消失 $t_{1/2}$ に明らかな性差は認められなかったが，用量依存性がみられ，$t_{1/2}$ は高用量群（範囲 9.2～16.4 時間）で低用量群（範囲：1.7～6.7 時間）及び中用量群（範囲：2.8～4.2 時間）に比べて長かった。全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）には，3～40 mg/kg/day の用量範囲で用量依存的な増加が認められた。タピナロフの 3 及び 10 mg/kg/day 群で，投与 1～14 日目及び投与 91 日目に全身曝露量の減少がみられた。タピナロフの全身への蓄積性は認められなかった。

2.6.4.3.3.2.1.6 ラットの 1 日 1 回 26 週間皮下投与毒性試験及び 6 週間回復性試験［報告書番号 20[redacted]N254469］

（評価資料：CTD4.2.3.2-24）

本試験は，OECD GLP に従って実施した。

本試験では，タピナロフを WH ラットに QD で 26 週間皮下投与したときの毒性及び TK を検討することを目的とした。タピナロフに関連する影響の回復性を 6 週間の休薬期間中に評価した。Captisol®を 30%の濃度で注射用滅菌水と混合したものを媒体としてタピナロフ（バッチ番号 2894512A-C-01P）投与液（最終 pH 7.2 ± 0.5）を調製し，3 mL/kg の容量でラットに皮下投与した。ラットに投与した用量は，0（媒体），1，6 又は 30 mg/kg/day であった。各群雌雄各 12 匹としたほか，対照群，中用量群及び高用量群に雌雄各 10 匹を追加して 26 週間の投与期間後に 6 週間休薬させ，所見が認められた場合にその回復性を評価するために使用した。TK 評価のため，各用量群に雌雄各 6 匹を追加した。投与 13 及び 26 週目に採取した複合検体を用いてタピナロフの血漿中 TK 評価を実施し，投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に血液検体を採取してタピナロフの血漿中濃度を分析した（LLOQ：0.3 ng/mL）。

タピナロフの血漿中濃度は，投与後 8 時間まで概ね定量可能であった 1 mg/kg/day 群を除き，投与後 24 時間まで概ね定量可能であった。t_{max} は，いずれの時期も投与後 0.5～1 時間であった。いずれの用量でも投与 13 及び 26 週目の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）には顕著な性差（2 倍超）は認められなかった。C_{max} 及び AUC_{0-t} は，1 mg/kg/day から 30 mg/kg/day への用量増加に伴って概ね比例的に上昇した。全身曝露量は投与 13 週目と投与 26 週目で同程度であり，反復投与によるタピナロフの血漿中への蓄積は認められなかった。

2.6.4.3.3.2.1.7 WH ラットの 2 年間皮下投与がん原性試験［報告書番号 DMVT-505-9002］

（評価資料：CTD4.2.3.4.1-2）

本試験は，FDA GLP 及び OECD GLP に従って実施した。

本試験では，タピナロフを WH ラットに QD で生涯にわたり皮下投与したときのがん原性を検討し，試験開始後 26 週目に TK を評価することを目的とした。Captisol®を 30%の濃度で注射用滅菌水と混合したものを媒体としてタピナロフ（バッチ番号 2894C502）投与液（最終 pH 7.2 ± 0.5）を調製し，3 mL/kg の容量でラットに皮下投与した。ラットに投与した用量は，0（媒体），0.1，0.3 又は 1 mg/kg/day であった。各群雌雄各 60 匹としたほか，TK 評価のため，各用量群に雌雄各 9 匹を追加した。投与 28 日目に媒体である Captisol®の濃度を 30%から 10%に下げた場合の影響についての TK 評価を追加で実施するため，0.1，0.3 及び 1 mg/kg/day 群に雌 6 匹を追加した。投与後 0.5，1，2，4，8 及び 24 時間に血液検体を採取してタピナロフの血漿中濃度を分析し（LLOQ：0.3 ng/mL），投与 4 週目（28 日目）及び投与 26 週目（182 日目）に採取した複合検体を用いてタピナロフの TK 評価を実施した。

タピナロフの血漿中濃度は，0.1 mg/kg/day 群では投与後 2 時間まで定量可能であり，0.3 及び 1 mg/kg/day 群では投与後 4 時間まで概ね定量可能であった。t_{max} は，いずれの時期も投与後 0.5～1 時間であった。いずれの用量でも投与 28 及び 182 日目の全身曝露量（C_{max} 及び AUC_{0-t}）には顕著な性差（2 倍超）は認められなかった。主試験群の雌と低濃度 Captisol®を使用した追加群の雌

の全身曝露量に顕著な差は認められなかった。全身曝露量は，0.1 mg/kg/day から 1 mg/kg/day への用量増加に伴って概ね比例的に上昇した。全身曝露量は投与 28 及び 182 日目で同程度であり，反復投与によるタピナロフの血漿中への蓄積は認められなかった。

2.6.4.4 分布

ヒト，ミニブタ，ウサギ，マウス及びラット血漿，並びにヒト及びミニブタ皮膚を用いて，タピナロフの *in vitro* 結合試験を実施した。ラットを用いた[^{14}C]-タピナロフ皮下投与後の QWBA 試験を実施した。試験一覧を，モジュール 4 内の記載箇所及び GLP 適合性とともに，表 4 に示す。

表 4 タピナロフの分布試験一覧

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	製剤処方	投与濃度又は投与量（mg/kg/day）	投与期間（検体採取時期）	GLP	試験施設	報告書番号	CTD 番号
In Vitro										
血漿蛋白結合率	ラット ミニブタ，ヒト	NA	*in vitro*	NA	20, 50, 100, 500, 1000 ng/mL	NA	非適	[redacted]	20[redacted]N176703	4.2.2.3-1
血漿蛋白結合率	マウス，ウサギ	NA	*in vitro*	NA	20, 50, 100, 500, 1000 ng/mL	NA	非適	[redacted]	20[redacted]N233123	4.2.2.3-2
血漿及び皮膚蛋白結合率	ミニブタ，ヒト	NA	*in vitro*	NA	300, 1500, 3000 ng/mL	NA	非適	STFL	20[redacted]N242613	4.2.2.3-3
In Vivo										
QWBA	ラット（Lister-Hooded）	7M	皮下	NA	2	単回	適	[redacted]	20[redacted]N243602	4.2.2.3-4

試験施設： [redacted] = [redacted]；[redacted] = [redacted]；STFL = Stiefel
GLP = 医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施； NA = 該当せず；QWBA = 定量的全身オートラジオグラフィー

2.6.4.4.1 *In Vitro* 分布試験

2.6.4.4.1.1 プールしたラット，ミニブタ及びヒト血漿を用いて平衡透析法により GSK2894512 の *In Vitro* 蛋白結合率を検討する試験［報告書番号 20[redacted]N176703］

（評価資料：CTD4.2.2.3-1）

ラット，ミニブタ及びヒト血漿を用いて，20，50，100，500 及び 1000 ng/mL の濃度範囲で 37°C で 6 時間（平衡状態到達時間の実験で決定）平衡透析を行い，タピナロフの *in vitro* 血漿蛋白結合率を検討した。タピナロフの定量用に検証済みの LC-MS/MS 法を用いて，タピナロフの結合型及び非結合型濃度を測定した。

陽性対照である[^{14}C]-ワルファリンのヒト血漿蛋白への平均結合率の算出値は 98.5%であり，文献値[4,5]と一致しており，タピナロフの血漿蛋白結合率の測定に用いた透析装置に問題がないことが示されている。

タピナロフの血漿蛋白結合率は 99.1%～99.4%と極めて高く，20～1000 ng/mL の濃度範囲で明らかな濃度依存性はなく，検討した 3 種類の動物種（ラット，ミニブタ及びヒト）でも種差は認められなかった。タピナロフの平均血漿蛋白結合率は，ラットで 99.1%～99.3%，ミニブタで 99.1%～99.2%，ヒトで 99.1%～99.4%であった。

2.6.4.4.1.2 マウス及びウサギを用いて GSK2894512 の *In Vitro* 血漿蛋白結合率を検討する試験［報告書番号 20[redacted]N233123］

（評価資料：CTD4.2.2.3-2）

雄性マウス及び雌性ウサギの血漿を用いて，20，50，100，500 及び 1000 ng/mL の濃度で 37°C で 6 時間（実験で決定した平衡状態到達時間）平衡透析を行い，タピナロフの *in vitro* 血漿蛋白結合率を検討した。タピナロフの定量用に検証済みの LC-MS/MS 法を用いて，タピナロフの結合型及び非結合型濃度を測定した。

マウス又はウサギでは，タピナロフの血漿蛋白結合率は高く，明らかな濃度依存性を示さなかった。タピナロフの平均結合率は，50～1000 ng/mL の濃度範囲でマウスで 99.5%～99.6%であった。迅速平衡透析装置のレシーバーセルにおけるタピナロフの濃度が BQL（0.1 ng/mL 未満）となったため，マウス血漿では 20 ng/mL のタピナロフについては結合率及び非結合率を算出することができなかった。ウサギではすべての濃度でタピナロフの平均結合率は 99.4%であった。

2.6.4.4.1.3 ヒト及びミニブタ皮膚ホモジネート，並びにヒト血漿における GSK2894512A の *In Vitro* 蛋白結合［報告書番号 20[redacted]N242613］

（参考資料：CTD4.2.2.3-3）

ミニブタ及びヒト皮膚ホモジネートを用いて，300，1500 及び 3000 ng/mL の名目濃度範囲で 48 ウェルプレートを用いて 4 時間平衡透析を行い，タピナロフの *in vitro* 結合性を検討した。分析は超高速液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリー（UPLC-MS/MS）法により行った。ヒト及びミニブタの皮膚ホモジネートでのタピナロフの結合率はそれぞれ平均すると 92.7%及び 90.7%であった。各動物種とも濃度上昇に伴って結合率が低下する傾向が認められたため，

結合性はわずかに濃度依存性を示すと判断された。

ヒト検体を用いて，300，1500 及び 3000 ng/mL の名目濃度範囲で 48 ウェルプレートを用いて 4 時間平衡透析を行い，タピナロフの *in vitro* 血漿蛋白結合率を検討した。分析は UPLC-MS/MS 法により行った。血漿蛋白結合率は 99.3%であり，濃度依存性はないと判断された。

2.6.4.4.2 *In Vivo* 分布試験

2.6.4.4.2.1 ラットを用いた定量的全身オートラジオグラフィーによる単回皮下投与組織分布試験［報告書番号 20[redacted]N243602］

（評価資料：CTD4.2.2.3-4）

雄性有色ラット（Lister-Hooded，部分有色；Crl:LIS BR）に[^{14}C]-タピナロフを名目用量の 2 mg/kg で単回皮下投与し，放射能分布を検討した。ラットへの投与量は 2.12～2.15 mg/kg であった。各時点（投与後 1，3 及び 6 時間，並びに 1，3，10 及び 35 日）で 1 匹の屠殺動物の切片を用いて，オートラジオグラフィー画像を撮影した。

雄性有色ラットに[^{14}C]-タピナロフを皮下投与したとき，放射能は速やかに広く全身に分布し，いずれの組織でも投与後 1 時間（初回屠殺時点）までに放射能濃度が定量可能となった。大部分の組織の t_{max} は投与後 1 時間であった。放射能濃度が概して相対的に高かった組織は，投与部位皮膚，膀胱壁，副腎皮質，小腸壁，肝臓，褐色脂肪及び腎皮質であった。放射能濃度が相対的に低かった組織は，皮膚（被毛がほとんどない部位），包皮腺，大腸壁及び骨表面であった。

放射能濃度は概して投与後 3 時間から 72 時間にかけて低下したが，投与後 72 時間でも放射能はすべての組織で定量可能であった。投与後 240 時間（10 日後）までに検討した組織の約 4 分の 1 では定量下限未満となり，投与 35 日までに大多数の組織で放射能濃度は測定不能となった。この時点で放射能濃度が定量可能であったのは，皮膚（白色被毛と暗色被毛の両方の部位），副腎皮質，副腎髄質及びぶどう膜／網膜のみであった。投与 35 日に放射能が定量可能であった組織では，暗色被毛部位の皮膚で投与後 1 時間から投与 10 日まで放射能が減少し，その後投与 35 日で増加を示したことを除き，検体採取時点を通して放射能の減少が認められた。

組織／全血比の比較において，ほとんどの組織では[^{14}C]-タピナロフ及びその代謝物の濃度が全血中濃度よりも高値を示し，一部の組織（肝臓，腎髄質外層，副腎皮質，小腸壁，膀胱壁及び腎皮質）では個々の時点の放射能濃度が血中濃度の最大 30 倍となった。

2.6.4.5 代謝（種間比較）

タピナロフの代謝様式を検討するため，複数の *in vitro* 代謝試験を実施した。さらに，タピナロフの代謝物組成分析を経皮投与後のヒト血漿，尿及び皮膚サンプル，皮下投与後のラット及びマウス試料において実施した。試験一覧を，モジュール 4 内の記載箇所及び GLP 適合性とともに，表 5 に示す。

表 5 タピナロフの代謝試験一覧

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	製剤処方	投与濃度又は投与量（mg/kg/day）	投与期間（検体採取時期）	GLP	試験施設	報告書番号	CTD 番号
In Vitro										
肝細胞を用いた代謝物プロファイルの検討	マウス，ラット，ウサギ，ミニブタ，ヒト	NA	*in vitro*	NA	10 µmol/L	NA	非適	GSK	20[redacted]N212859	4.2.2.4-1
肝細胞を用いた代謝物プロファイルの検討	マウス，ラット，ヒト	NA	*in vitro*	NA	0.1, 1, 10 µmol/L	NA	非適	GSK	20[redacted]N353927	4.2.2.4-2
肝細胞を用いた代謝物プロファイルの検討	ラット，ウサギ，ミニブタ，ヒト	NA	*in vitro*	NA	10 µmol/L	NA	非適	[redacted]	20[redacted]N163811	4.2.2.4-3
酸化的代謝に寄与する分子種の検討	ヒト	NA	*in vitro*	NA	5 µmol/L	NA	非適	GSK	20[redacted]N216849	4.2.2.4-4
グルクロン酸抱合に寄与する分子種の検討	ヒト	NA	*in vitro*	NA	1, 5 µmol/L	NA	非適	[redacted]	20[redacted]N311114	4.2.2.4-5
硫酸抱合に寄与する分子種の検討	ヒト	NA	*in vitro*	NA	1, 5 µmol/L	NA	非適	[redacted]	20[redacted]N324065	4.2.2.4-6
In Vivo										
代謝物組成分析	マウス（CD-1）	30M	皮下	NA	2	単回	非適	GSK	20[redacted]N375928	4.2.2.4-7
代謝物組成分析	ラット（WH）	20M	皮下	NA	2	単回	非適	GSK	20[redacted]N375949	4.2.2.4-8
代謝物組成分析	ヒト	NA	経皮	F	1%, 2%	単回又は 21 日間	非適	GSK	20[redacted]N284870	5.3.3.2-1

試験施設：[redacted] = [redacted]；[redacted] = [redacted]；GSK = GlaxoSmithKline
WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]；NA = 該当せず。

2.6.4.5.1 *In Vitro* 代謝試験

2.6.4.5.1.1 ヒト肝ミクロソーム，並びにラット，ウサギ，Göttingen ミニブタ及びヒト凍結肝細胞を用いた WBI-1001 の代謝物プロファイルの検討［報告書番号 20[redacted]N163811］

（参考資料：CTD4.2.2.4-3）

本試験では，ラット，ウサギ，ミニブタ及びヒトでタピナロフの代謝物プロファイルを比較することを目的とした。

主試験に先立ち，被験物質濃度として 1 及び 10 μmol/L の 2 濃度，インキュベーション時間は 0，1，2，3 及び 4 時間の 5 時点，細胞濃度は生細胞約 0.2×10^6 cells/sample の 1 濃度としてパイロット試験を実施し，ヒト凍結肝細胞で最適な実験条件を確立した。さらに，1 及び 10 μmol/L の濃度のタピナロフをミクロソーム蛋白質濃度（0.5 mg/mL）のヒト肝ミクロソームに添加し，0，15，30，60 及び 90 分間インキュベートした。

ヒト肝細胞を用いて確立した最適実験条件に基づき，4 つの動物種の凍結肝細胞（生細胞約 0.7×10^6 cells/sample）に 10 μmol/L の濃度のタピナロフを添加して 0，2 及び 3 時間インキュベートし，主試験を実施した。0 及び 3 時間後，肝細胞をトリパンブルーで染色して，細胞生存率を評価した。

肝細胞のインキュベーションは，約 37℃の加湿環境（5% CO_2）下にて静かに振とうしながら実施した。0.1%ギ酸含有の氷冷メタノールで反応を停止させた。代謝反応試料を遠心し，上清を LC-MS 法及び LC-MS/MS 法により分析した。

培養肝細胞の活性を確認するため，肝細胞の存在下及び非存在下において 7-エトキシクマリンを添加し，代謝反応試料の上清を測定した。代謝物（7-ヒドロクマリン，7-ヒドロキシクマリングルクロン酸抱合体及び 7-ヒドロキシクマリン硫酸抱合体）の生成を HPLC の UV 検出器により確認した。

各種動物肝細胞代謝反応試料の MS 分析を実施し，陰性対照では認められないピークを検出，同定し，結果を種間で比較した。

タピナロフの代謝反応の種間比較の結果，いずれの動物種においても主な代謝反応はフェノール基の硫酸抱合，フェノール基のグルクロン酸抱合，又は酸化と抱合の組み合わせによるものであることが明らかとなった。ウサギ肝細胞でのみ酸化体が認められ，CYP 酵素による芳香環上の水酸化体であると考えられた。

2.6.4.5.1.2 ヒト，ミニブタ，ウサギ，ラット及びマウス肝細胞における[^{14}C]-GSK2894512 の代謝を検討する *In Vitro* 試験［報告書番号 20[redacted]N212859］

（評価資料：CTD4.2.2.4-1）

雄性マウス，雄性ラット，雄性ミニブタ，雌性ウサギ及び男女混合ヒト肝細胞を用いて，[^{14}C]-タピナロフの *in vitro* 代謝試験を実施した。[^{14}C]-タピナロフを約 10 μmol/L の濃度で肝細胞に添加して 1 及び 4 時間インキュベートした。

4 時間後に[^{14}C]-タピナロフが代謝された割合は，すべての非臨床試験動物種（マウス，ラット，ウサギ及びミニブタ）で同様であり（96%～99%），ヒトと同様であった（99%）。ヒト肝細胞での[^{14}C]-タピナロフの代謝様式は，酸化，硫酸抱合，並びにグルクロン酸抱合又はそれらの組み合

わせであった。ラット肝細胞での[^{14}C]-タピナロフの代謝物組成はヒト肝細胞と最も類似しており，ヒトで認められたすべての代謝物が生成されたのに対し，他の動物種では硫酸抱合体は認められなかった。

動物とヒトでの代謝プロファイルは概して定性的に同じであり，ヒト肝細胞代謝試験で認められた[^{14}C]-タピナロフの代謝物はいずれの動物種でも確認された。

2.6.4.5.1.3 [^{14}C]-GSK2894512 の酸化的代謝に寄与するヒト酵素を検討する *In Vitro* 試験 [報告書番号 20[redacted]N216849]

（評価資料：CTD4.2.2.4-4）

本試験では，ヒト肝及び皮膚ミクロソームでのタピナロフの酸化的代謝に関与するヒト CYP 酵素の分子種を明らかにすることを目的とした。

5 μmol/L の[^{14}C]-タピナロフを 0.1，0.5 若しくは 1 mg/mL のヒト肝ミクロソーム（HLM），又は 25, 50 若しくは 100 pmol/mL の 12 種類の組換え CYP 発現系酵素に添加してインキュベートした。また，1 μmol/L の[^{14}C]-タピナロフを 0.5 mg/mL の HLM 又は 1 mg/mL のヒト皮膚ミクロソームに添加し，インキュベートした。NADPH 存在下にて 37°C で 0～120 分間インキュベートし，代謝反応液に半量のアセトニトリルを添加することによって反応を停止させた。さらに，NADPH 又は発現系酵素の非存在下で対照培養も実施した。

遺伝子組換え CYP 酵素系（CYP1A1，1A2，1B1，2A6，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6，2E1，3A4 及び 3A5），ヒト肝ミクロソーム及びプールしたヒト皮膚ミクロソームを用いて，[^{14}C]-タピナロフの代謝による減少を測定することにより，タピナロフの酸化的代謝に関与する CYP 酵素の寄与について検討した。HLM 内に存在する酵素の相対量を反映するために社内で作成したシステム間外挿係数（ISEF）を用いて，肝 CYP 酵素（1A2，2A6，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6 及び 3A4）でのミクロソームにおける内因性クリアランスを算出してスケーリングした。

肝 CYP 酵素活性のスケーリングにより，[^{14}C]-タピナロフ（終濃度：5 μmol/L）の *in vitro* での酸化的肝代謝には主に CYP1A2 及び CYP3A4 が関与し，CYP2C9，CYP2C19 及び CYP2D6 の寄与はわずかであることが示唆された。また，[^{14}C]-タピナロフは CYP 発現系酵素では肝外酵素（主に CYP1A1）によっても代謝されたが，CYP1B1 の寄与はわずかであった。CYP1A1 及び CYP1B1 はヒト肝ミクロソームには存在しないため，スケーリングにより補正した CYP 酵素活性に基づくタピナロフの肝代謝に対するこれらの CYP の寄与は定量化しなかった。

本条件下でタピナロフは，ヒト皮膚ミクロソームでは代謝されなかった。

2.6.4.5.1.4 GSK2894512 の代謝に関与するヒトウリジングルクロノシルトランスフェラーゼ（*UGT*）分子種の測定 [報告書番号 20[redacted]N311114]

（評価資料：CTD4.2.2.4-5）

本試験（非 GLP 試験）では，タピナロフのグルクロン酸抱合に関与するヒトウリジン二リン酸グルクロノシルトランスフェラーゼ（UGT）酵素の分子種を明らかにすることを目的とした。UDPGA の存在下及び非存在下にて，2 濃度（1.0 及び 5.0 μmol/L）のタピナロフを HLM（1 mg/mL）及び組換え UGT 発現系酵素（UGT1A1，1A3，1A4，1A6，1A7，1A8，1A9，1A10，2B4，2B7，

2B15 及び 2B17）に添加し，インキュベートした。HLM では内因性クリアランス値を算出した。

1 mg/mL の HLM との 10 分間のインキュベート後のタピナロフの残存率は，いずれの試験濃度（1.0 及び 5.0 μmol/L）でも 11%であった。内因性クリアランスは，1.0 及び 5.0 μmol/L のタピナロフでそれぞれ 144 及び 187 μL/min/mg であった。

ヒト肝ミクロソームにおけるタピナロフのグルクロン酸抱合は，UGT1A9 の特異的阻害剤であるニフルム酸（10 μmol/L）により，1.0 及び 5.0 μmol/L のタピナロフでそれぞれ 84%及び 77%阻害された。

タピナロフ（1.0 及び 5.0 μmol/L）を 0.5 mg/mL の発現系酵素（UGT1A1，1A3，1A4，1A6，1A7，1A8，1A9，1A10，2B4，2B7，2B15 及び 2B17）に添加して 10 分間インキュベートしたところ，タピナロフの代謝には UGT1A9 が主に関与することが示唆された。UGT1A9 発現系酵素に 1.0 及び 5.0 μmol/L の濃度のタピナロフを添加，インキュベートしたときのタピナロフの平均残存率はそれぞれ 1.2%及び 2.4%であり，一方，他の分子種でのタピナロフの平均残存率は 91%を上回った。したがって，タピナロフのグルクロン酸抱合には UGT1A9 が大きく関与することが示唆された。

2.6.4.5.1.5 GSK2894512 の代謝に関与するヒト硫酸転移酵素（SULT）分子種の測定［報告書番号 20[redacted]N324065］

（評価資料：CTD4.2.2.4-6）

本試験（非 GLP 試験）では，タピナロフの硫酸抱合に関与するヒト硫酸転移酵素（SULT）の分子種を明らかにすることを目的とした。ヒト肝サイトゾル(HLC)及び SULT 発現系酵素(SULT1A1，SULT1A3，SULT1B1，SULT1E1 及び SULT2A1）を使用した。

1.0 及び 5.0 μmol/L のタピナロフを 2 mg/mL HLC に添加して 60 分間インキュベートしたときのタピナロフの残存率はそれぞれ 33%及び 43%であった。1.0 及び 5.0 μmol/L のタピナロフの内因性クリアランスはそれぞれ 9.33 及び 6.94 μL/min/mg であった。

タピナロフ（1.0 及び 5.0 μmol/L）を 1 mg/mL の発現系酵素（SULT1A1，SULT1A3，SULT1B1，SULT1E1 及び SULT2A1）に添加して 60 分間インキュベートしたところ，タピナロフの代謝に関与する酵素は SULT1A1，SULT1A3 及び SULT1E1 であると示唆された。SULT1A1，SULT1A3 及び SULT1E1 発現系酵素に添加してインキュベートしたときのタピナロフの残存率は，濃度 1.0 μmol/L の場合がそれぞれ 16%，34%及び 4.5%，濃度 5.0 μmol/L の場合がそれぞれ 24%，44%及び 24%であった。他の分子種でのタピナロフの平均残存率は 89%以上であった。

したがって，タピナロフの硫酸抱合に関与する酵素は SULT1A1，SULT1A3 及び SULT1E1 であった。

2.6.4.5.1.6 ヒト，WH ラット及び Crl:ICR (CD-1)マウスにおける[^{14}C]-GSK2894512 の肝代謝を検討する *In Vitro* 試験［報告書番号 20[redacted]N353927］

（評価資料：CTD4.2.2.4-2）

本試験では，0.1，1 及び 10 μmol/L の濃度の[^{14}C]-タピナロフを用いて，ヒト，WH ラット及び CD-1 マウス肝細胞における[^{14}C]-タピナロフの推定肝代謝経路に関する情報を収集することを目

的とした。[^{14}C]-タピナロフを雄性ラット，雄性マウス及びプールした（男女混合の 10 人のドナー）凍結肝細胞に添加，4 時間インキュベートした。

4 時間インキュベートしたときの[^{14}C]-タピナロフの代謝された割合は，すべての動物種で同様であった。ヒト肝細胞で認められた M2（グルクロン酸抱合体），M3（酸化 + 硫酸抱合体）及び M4（硫酸抱合体）の生成は，ラット肝細胞でも認められた。マウス肝細胞では，M2（グルクロン酸抱合体）及び M3（酸化体 + 硫酸抱合体）は認められたが，M4（硫酸抱合体）は検出されなかった。保持時間を踏まえると，10 μmol/L の肝細胞培養で認められたものと同じ代謝物が 1 μmol/L の培養でも認められた。肝細胞試料における保持時間の変動及び低い放射能濃度のため，0.1 μmol/L の培養に関しては明確な結論は得られなかった。

2.6.4.5.2 *In Vivo* 代謝試験

2.6.4.5.2.1 AD の成人患者を対象として GSK2894512 を局所塗布したときのヒト血漿，尿及び皮膚生検中の GSK2894512 の代謝物に関する予備的検討［報告書番号 20[redacted]N284870］

（評価資料：CTD5.3.3.2-1）

本試験では，タピナロフを経皮投与した AD 患者から得たヒト血漿，尿及び皮膚生検を用いて，予備的に代謝物情報を入手することを目的とした。本試験は，タピナロフクリーム 1%又は 2%（処方 F）を経皮投与製剤として用い，単回及び反復（1 日 2 回 21 日間）投与したときのヒト血漿中の代謝物，並びに尿及び皮膚生検検体中の代謝物を検出した。

質量分析法によるタピナロフの検出限界は約 250 pg/mL と判断されたが，これは血漿抽出物中のタピナロフと同程度である。したがって，実施できたのは血中タピナロフ及び代謝物の定性的評価のみであった。

プールした血漿抽出物中にはタピナロフの未変化体及び M4（硫酸抱合体）が検出された。タピナロフは 1%及び 2%製剤のいずれでも投与 1 日目の検体で検出されたのに対し，2%製剤で投与 21 日目に検出されたのは M4 のみであった。

プールした尿検体中には，タピナロフの未変化体，酸化 + グルクロン酸抱合体（M1），グルクロン酸抱合体（M2），酸化 + 硫酸抱合体（M3），硫酸抱合体（M4），酸化体（M5）が検出された。さらに，キノン体である [redacted] はどちらのコホートでも投与 21 日目の尿検体中に認められた。

コホート 1 の 21 日目の検体で低濃度で認められた [redacted] を除き，皮膚生検抽出物中に検出された唯一の関連物質は未変化体であった。

[redacted] は代謝反応を経て生成されるのではなく，光異性化によって生成されるタピナロフの光分解物であると考えられた。これは，尿及び皮膚生検抽出物の検体処理過程で *ex vivo* にて生成された可能性がある。

2.6.4.5.2.2 [^{14}C]-GSK2894512 を 2 mg/kg（フリー体として）の目標用量で雄性マウスに単回皮下投与したときの GSK2894512 の代謝［報告書番号 20[redacted]N375928］

（評価資料：CTD4.2.2.4-7）

[^{14}C]-タピナロフを 2 mg/kg の用量で無処置雄性 CD1 マウスに単回皮下投与したときの *in vivo*

試料の代謝物組成分析を実施した。2.6.4.6.1.2 項で動物から採取した血漿，糞，尿及び肝臓試料を用いて，代謝物プロファイルを確認した。

皮下投与したときの投与後 1，4 及び 8 時間の血漿中の主代謝物は，M1（水酸化 + グルクロン酸抱合体）及び M2（グルクロン酸抱合体）であった。投与後 1 時間の試料では，タピナロフの未変化体及び M14（グルクロン酸抱合体）も認められた。投与後 4 及び 8 時間の試料では，M8 及び M9（水和 + グルクロン酸抱合体）の 2 つの代謝物が認められた。

糞中の主代謝物は M5（酸化体）及び M6（水和物）であり，それぞれ総放射能の 16%及び 11%（投与量としてはそれぞれ 13%及び 9%に相当）を占めた。したがって，糞中でこれらの代謝物で認められたのは，タピナロフの未変化体及び代謝物の胆汁排泄及び／又は腸管への分泌によるものと考えられる。

尿中の主代謝物は M1 及び M2 であり，それぞれマトリックス中放射能の 22%及び 39%を占め，投与量としてはそれぞれ約 2%及び 4%に相当した。ヒト尿検体中に検出された [redacted] は，本試験で分析したいずれのマウス検体でも認められなかった。

肝臓における主成分は，全時点（1～8 時間後）を通して M1 及び M2 であった。

2.6.4.5.2.3 [^{14}C]-GSK2894512 を 2 mg/kg（フリー体として）の目標用量で雄性ラットに単回皮下投与したときの GSK2894512 の代謝［報告書番号 20[redacted]N375949］

（評価資料：CTD4.2.2.4-8）

[^{14}C]-タピナロフを 2 mg/kg の用量で無処置及び胆管カニューレ処置（BDC）雄性 WH ラットに単回皮下投与したときの *in vivo* 試料の代謝物組成分析を実施した。2.6.4.6.1.4 項で動物から採取した血漿，糞，尿，胆汁及び肝臓試料を用いて，代謝物プロファイルを確認した。

皮下投与したときの投与後 1 時間の血漿抽出物中の主成分は，タピナロフの未変化体，M2（グルクロン酸抱合体）及び A（未知代謝物）であり，他にも M1（酸化 + グルクロン酸抱合体）及び M5（酸化体）と，B（別の未知代謝物）があった。投与後 2 時間の血漿ではタピナロフの未変化体及び M5 が微量であったことを除いて同様であり，投与後 6 時間までに A 及び B が主要成分となった。

BDC ラットでは，タピナロフの主消失因子は代謝であり，代謝物は主に胆汁中に排泄された（投与量の 73%）。投与後 0～24 時間のプール胆汁中の主成分は M1 及び M2 であり，未変化体は無視できる程度であった。

無処置ラットの尿中の主成分は，M1 のほか，M2 及び M8（水和 + グルクロン酸抱合体）であり，投与量の 1%～2%を占めた。タピナロフの未変化体の割合は投与量の 0.1%であった。BDC ラットの尿中には複数の代謝物が認められ，未変化体及び M1 が主成分であった。尿中では多種の代謝物が存在し，MS でのタピナロフ及びその代謝物の感度が不足していたため，未同定のままとなっている代謝物が多数認められた。

無処置雄性ラットの糞中で認められた主成分は，タピナロフの未変化体及び M5 であり，それぞれ投与量の 18%及び 21%に相当した。その他に代謝物として M6（水和物）及び M7（水和 + 酸化体）も認められた。BDC ラットの糞便中の代謝物プロファイルは無処置ラットと定性的に同じで，タピナロフの未変化体が主成分であり，糞中放射能の 64%（投与量としては 1%に相当）を示

した。

投与後 1，2 及び 6 時間の肝臓における主成分は M3（酸化 + 硫酸抱合体）であり，その他に M1，M2，M4 及び M5 が認められた。タピナロフの未変化体は微量であった。

[redacted] は，本試験で分析したいずれの検体でも認められなかった。

2.6.4.6 排泄

マウス，ラット及びミニブタを用いて，タピナロフの排泄を評価する一連の試験を実施した。試験一覧を，モジュール 4 内の記載箇所及び GLP 適合性とともに，表 6 に示す。

表 6 タピナロフの排泄試験一覧

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	製剤処方	投与濃度又は投与量（mg/kg/day）	投与期間（検体採取時期）	GLP	試験施設	報告書番号	CTD 番号
排泄	マウス（CD-1）	33M	皮下	NA	2	単回	適	[redacted]	20[redacted]N243607	4.2.2.5-1
排泄	マウス（CD-1）	30M	皮下	NA	2	単回	非適	[redacted]	20[redacted]N389035	4.2.2.5-2
排泄	ラット（WH）	22M	皮下	NA	2	単回	適	[redacted]	20[redacted]N243603	4.2.2.5-3
排泄	ラット（WH）	21M	皮下	NA	2	単回	非適	[redacted]	20[redacted]N389055	4.2.2.5-4
排泄	Göttingen ミニブタ	3M	経皮	F	10	単回	非適	[redacted]	20[redacted]N389316	4.2.2.5-5

試験施設： [redacted] = [redacted] ; [redacted] = [redacted] ; [redacted] = [redacted]
WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)] ; M = 雄 ; NA = 該当せず。

2.6.4.6.1 *In Vivo* 排泄試験

2.6.4.6.1.1 [^{14}C]-GSK2894512：マウスを用いた単回皮下投与（2 mg/kg）排泄試験［報告書番号 20[redacted]N243607］

（評価資料：CTD4.2.2.5-1）

本試験は，OECD GLP に従って実施した。

[^{14}C]-タピナロフを雄性 CD-1 マウスに 2 mg/kg の用量で単回皮下投与した。排泄相で，尿，糞及びケージ洗浄液を投与後 168 時間採取した（第 A 相）。さらに，第 A 相の終了時に排泄物とともに血液，血漿，肝臓及び残留屍体を保管した。第 B 相でも血液，血漿及び肝臓を 24 時間採取した。

[^{14}C]-タピナロフを雄性 CD-1 マウスに目標用量 2 mg/kg で単回皮下投与したときの主な排泄経路は糞中排泄であった（投与量の平均 72.3%）。尿中排泄率は投与量の平均 16.9%であった。皮下投与では薬物関連物質は速やかに消失し，投与後 24 時間までに投与量の 87%超が回収された。平均総回収率は投与量の 91.5%であった。

投与後 24 時間までの放射能濃度の血液／血漿比及び肝臓／血漿比はそれぞれ 0.66～0.77 及び 4.0～13 であった。

2.6.4.6.1.2 [^{14}C]-GSK2894512（フリー体として）を CD-1 マウスに単回皮下投与したときの放射能の排泄［報告書番号 20[redacted]N389035］

（評価資料：CTD4.2.2.5-2）

[^{14}C]-タピナロフを雄性 CD-1 マウスに 2 mg/kg の用量で単回皮下投与した。排泄相で，尿，糞及びケージ洗浄液を投与後 96 時間採取した（第 1 相）。さらに，第 1 相の終了時に排泄物とともに血液，血漿，肝臓，消化管及び残留屍体を保管した。第 2 相でも血液，血漿及び肝臓を 24 時間採取し，投与後 24 時間に安楽殺した動物のみから尿及び糞を採取した。

[^{14}C]-タピナロフを雄性 CD-1 マウスに目標用量 2 mg/kg で単回皮下投与したときの主な排泄経路は糞中排泄であった（投与量の平均 77.7%）。尿中排泄率は投与量の平均 10.7%であった。皮下投与では薬物関連物質は速やかに消失し，投与後 24 時間までに投与量の 85.8%超が回収された。平均総回収率は投与量の 92.2%であった。

投与後 24 時間までの放射能濃度の血液／血漿比及び肝臓／血漿比はそれぞれ 0.6～0.7 及び 4.8～14.1 であった。

本試験で得られた血漿，肝臓，尿及び糞を用いて代謝物の同定を実施した結果を 2.6.4.5.2.2 項に示す。

2.6.4.6.1.3 [^{14}C]-GSK2894512：ラットを用いた単回皮下投与（2 mg/kg）排泄試験［報告書番号 20[redacted]N243603］

（評価資料：CTD4.2.2.5-3）

本試験は，OECD GLP に従って実施した。

[^{14}C]-タピナロフを無処置（第 A 相）及び BDC（第 B 相）雄性 WH ラットに 2 mg/kg の用量で単回皮下投与した。尿及び糞を投与後 168 時間（第 A 相）又は 72 時間（第 B 相）にわたって採

取し，胆汁検体も投与後 72 時間まで採取した。呼気 CO_2 を投与後 72 時間採取した（第 A 相）。第 A 相及び第 B 相の終了時に排泄物とともに血液，血漿，肝臓及び残留屍体を保管した。臓器採取（第 C 相）でも血液，血漿及び肝臓を 24 時間採取した。

[^{14}C]-タピナロフを無処置雄性 WH ラット（2 mg/kg）に単回皮下投与したときの主な排泄経路は糞中排泄であった（投与量の 75.8%）。尿中排泄率は投与量の 16.9%であった。

BDC 雄性ラットに単回皮下投与したときの主な排泄経路は胆汁排泄であった（投与量の平均 67.3%）。糞中排泄率は投与量の 5.32%，尿中排泄率は投与量の 20.9%であった。尿中，胆汁中，肝臓中及び残留屍体中の放射能の回収率に基づくと，皮下吸収率は高く，投与量の平均 89.5%が吸収された。

無処置ラット及び BDC ラットとも皮下投与では薬物関連物質が速やかに消失し，無処置雄性ラットでは投与後 24 時間までに投与量の約 80%が回収され，BDC 雄性ラットでは同じ期間で投与量の 87%が回収された。

総放射能の平均血漿中濃度は，投与後 72 時間までに 320 ng eq/g から 13 ng eq/g へ 25 分の 1 に低下した。この期間中は，平均血中及び肝臓中濃度も同様の割合で低下し，血中では 307 ng eq/g から 13 ng eq/g へ低下し，肝臓中では 2570 ng eq/g から 122 ng eq/g へ低下した。血液中／血漿中濃度比の平均値は 0.71～1.0 であり，放射能は顕著には血球に分布しないことが示された。肝臓／血漿比の平均値は 7.1～10.5 であった。

2.6.4.6.1.4 [^{14}C]-GSK2894512（フリー体として）をラットに皮下投与（2 mg/kg）したときの放射能の排泄［報告書番号 20[redacted]N389055］

（評価資料：CTD4.2.2.5-4）

[^{14}C]-タピナロフを無処置（第 A 相）及び BDC（第 B 相）雄性 WH ラットに 2 mg/kg の用量で単回皮下投与した。尿及び糞を投与後 168 時間（第 A 相）又は 96 時間（第 B 相）にわたって採取し，胆汁検体も投与後 96 時間まで採取した。第 A 相及び第 B 相の終了時に排泄物とともに血液，血漿，肝臓，消化管及び残留屍体を保管した。第 C 相でも血液，血漿及び肝臓を 24 時間採取した。

[^{14}C]-タピナロフを無処置雄性 WH ラット（2 mg/kg）に単回皮下投与したときの主な排泄経路は糞中排泄であった（投与量の 78.1%）。尿中排泄率は投与量の 11.4%であった。

BDC 雄性ラットに単回皮下投与したときの主な排泄経路は胆汁排泄であった（投与量の平均 72.6%）。糞中排泄率は投与量の 2.1%，尿中排泄率は投与量の 10.0%であった。

無処置ラット及び BDC ラットとも皮下投与では薬物関連物質が速やかに消失し，48 時間までに大半が回収された。無処置雄性ラットの総回収率は投与量の約 93.2%であり，BDC 雄性ラットでは 87.9%であった。

総放射能の平均血漿中濃度は，投与後 168 時間までに 323 ng eq/g（投与後 2 時間）から 2.79 ng eq/g へ 116 分の 1 に低下した。この期間中は，平均血中及び肝臓中濃度も 51 分の 1 に低下し，血中では 292 ng eq/g から 5.68 ng eq/g へ低下し，肝臓中では 2930 ng eq/g から 57.8 ng eq/g へ低下した。血中濃度／血漿中濃度比の平均値は，0.66～1.2（投与後 1～96 時間）であり，投与後 168 時間に最高値の 2 に達した。平均肝臓／血漿比は，7.2～14（投与後 1～96 時間）であり，投与後 168

時間に最高値の 21 に達した。

本試験で得られた血漿，肝臓，尿及び糞を用いて代謝物の同定を実施した結果を 2.6.4.5.2.3 項に示す。

2.6.4.6.1.5 [^{14}C]-GSK2894512（フリー体として）をミニブタに経皮投与（10 mg/kg）したときの放射能の排泄［報告書番号 20[redacted]N389316］

（評価資料：CTD4.2.2.5-5）

[^{14}C]-タピナロフを 1%クリーム（処方 F；10 mg/kg）として，成体雄性 Göttingen ミニブタに単回経皮投与した。投与前，BSA のおよそ 10%を優しく除毛した。製剤はシリンジを用いて塗布し，投与部位は動物用 Polster 包帯を用いて半閉塞状態とした。

排泄相で，尿，糞及びケージ洗浄液を投与後 168 時間採取した。さらに，投与前，並びに投与後 1，4，10，24，48，72 及び 96 時間に血液及び血漿を採取した。最終排泄物検体の採取後に，動物を安楽殺し，その後投与部位から製剤の残留物を採取し，放射能測定のために皮膚検体も採取した。肝臓全体も切除し，放射能分析のために調製した。

[^{14}C]-タピナロフをクリームとして Göttingen ミニブタ（10 mg/kg）に単回経皮投与したとき，放射能の大部分（投与量の 82.5%）は，投与後 10 時間の投与部位の拭き取りで回収された。さらに投与量の 3.64%が皮膚洗浄液中に回収された。採取期間（168 時間）の完了時に実施した最終の皮膚洗浄液中には，さらに投与放射能の 0.5%が認められた。さらに，この時点で投与部位から切除した皮膚中に投与放射能の約 1.3%が回収された。最終時点の肝臓試料中放射能は定量可能な濃度ではなかった。

投与された放射能の 1%未満（尿及び糞中にそれぞれ 0.31%及び 0.22%）が試験期間中に排泄物に回収され，放射性試験物質の吸収が極めて限定的であることが示唆された。投与放射能の平均総回収率は 88.7%であった。放射能の血中及び血漿中濃度は，汚染の可能性がある 1 つの血液サンプルを除いて，すべての動物のすべての時点で検出限界を下回った。

2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用

タピナロフの薬物相互作用の可能性の評価の一助とするため， *in vitro* 試験 4 試験及びミニブタを用いた *in vivo* 試験 1 試験を実施した。試験一覧を，モジュール 4 内の記載箇所及び GLP 適合性とともに，表 7 に示す。

表 7　タピナロフの薬物動態学的薬物相互作用試験一覧

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	製剤処方	投与濃度又は投与量（mg/kg/day）	投与期間（検体採取時期）	GLP	試験施設	報告書番号	CTD 番号
スクリーニング及び化合物プロファイリングアッセイ（SCP）	*In vitro* アッセイ（127 回）	NA	*in vitro*	NA	0.0007～40 µmol/L	NA	非適	GSK	20[redacted]N176987	4.2.1.2-1
薬物相互作用	ヒト肝細胞	NA	*in vitro*	NA	0.001～10 µmol/L	NA	非適	GSK	20[redacted]N228896	4.2.2.6-2
薬物相互作用	Göttingen ミニブタ	2M	経皮	E	10 mg/kg	単回	非適	STFL	20[redacted]N239440	4.2.2.6-3
薬物相互作用	ヒト肝ミクロソーム	NA	*in vitro*	NA	0.1～100 nmol/L	NA	非適	[redacted]	DMVT-505-9004	4.2.2.6-4
薬物相互作用	発現系細胞	NA	*in vitro*	NA	0.01 及び 0.1 µmol/L（阻害） 0.5 及び 5 µmol/L（基質）	NA	非適	[redacted]	DMVT-505-9005	4.2.2.6-5

試験施設：GSK = GlaxoSmithKline ; STFL = Stiefel ; [redacted] = [redacted]
NA = 該当せず

2.6.4.7.1 *In Vitro* 薬物相互作用試験

2.6.4.7.1.1 培養ヒト肝細胞を用いてチトクローム P450 遺伝子の mRNA 発現量に対する GSK2894512 の影響を検討する *In Vitro* 試験［報告書番号 20[redacted]N228896］

（評価資料：CTD4.2.2.6-2）

本試験では，ヒト肝細胞を用いて，定量的リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応法により，CYP 遺伝子（CYP1A2，2B6 及び 3A4）の mRNA 発現に対するタピナロフの影響を検討することを目的とした。

3 人のドナーから得られた培養ヒト肝細胞を用いて，0.001～10 μmol/L の濃度で CYP1A2，2B6 及び 3A4 mRNA 発現に対するタピナロフの影響を評価した。各 CYP の mRNA 発現は TaqMan により測定した。

タピナロフを培養ヒト肝細胞に 24 時間添加後，CYP1A2 mRNA 発現量の顕著な増加が認められた。タピナロフは CYP1A2 mRNA 発現を誘導し，EC_{50} 値はドナー1 で 0.086 μmol/L，ドナー2 で 0.43 μmol/L，ドナー3 で 0.58 μmol/L，E_{max} は，ドナー1 が 68 倍，ドナー2 が 48 倍，ドナー3 が 59 倍であった。CYP2B6 及び 3A4 mRNA は 10 μmol/L でのみ発現の増加が認められ，それぞれ 4.9 倍及び 8.4 倍であった。

2.6.4.7.1.2 尋常性乾癬及び AD の治療薬候補タピナロフ（GSK2894512）の GSK 社のスクリーニング及びプロファイリングアッセイにおけるプロファイリング報告［報告書番号 20[redacted]N176987］

（参考資料：CTD4.2.1.2-1）

タピナロフの副次的薬理作用及び選択性プロファイルの評価を目的として，*in vitro* パネルアッセイ評価を実施した。ここで pXC_{50} は 50%効果濃度の負の対数で，XC は JTE-061 の活性化（EC）又は阻害（IC）作用を示す。タピナロフは，CYP2D6（pIC_{50} = 6.1 又は 0.8 μmol/L），CYP2C9（pIC_{50} = 7.5 又は 0.03 μmol/L）及び CYP1A2（pIC_{50} = 6.0 又は 1.0 μmol/L）に対して阻害作用を示した。CYP2C19（pIC_{50} = 5.9 又は 1.3 μmol/L）及び CYP3A4（pIC_{50} = 5.6 又は 2.5 μmol/L）に対する阻害活性は低かった。

2.6.4.7.1.3 ヒト肝ミクロソームを用いてチトクローム P450（CYP）酵素に対する DMVT-505 の阻害作用を評価する *In Vitro* 試験［報告書番号 DMVT-505-9004］

（評価資料：CTD4.2.2.6-4）

ヒト肝ミクロソームを用いて CYP 酵素（CYP1A2，2B6，2C8，2C9，2C19，2D6 及び 3A4/5）に対するタピナロフの阻害能を評価する *in vitro* 試験を実施した。評価濃度は，各酵素とも 0.1～100 nmol/L とした。タピナロフは CYP1A2 を直接的阻害（100 nmol/L での阻害率は最大 23.6%）したが，この供試最高濃度は臨床で認められている C_{max}（2.44 ng/mL）から算出したヒトでのタピナロフの遊離型（非結合型）濃度の約 1000 倍である。その他のいずれの分子種に対しても直接的，時間依存的又は代謝依存的阻害作用はほとんど認められず，供試最高濃度である 100 nmol/L までの結果では IC_{50} 値は決定できなかった。

2.6.4.7.1.4 DMVT-505：トランスポーターの阻害剤及び基質としての可能性［報告書番号 DMVT-505-9005］

（評価資料：CTD4.2.2.6-5）

本 *in vitro* 試験では，タピナロフのヒトトランスポーターBSEP，OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，MATE1 及び MATE2-K に対する阻害作用，並びに P-gp，BCRP，OATP1B1 及び OATP1B3 に対する阻害作用及び基質性を評価することを目的とした。阻害作用の評価では評価濃度を 10 及び 100 nmol/L とし，基質性の評価では 0.5 及び 5 μmol/L の濃度を評価した。

タピナロフは BCRP を阻害［検討した最高濃度（100 nmol/L）での阻害率は最大 48.8%］したが，この濃度は臨床で認められている C_{max}（2.44 ng/mL）から求められたヒトでのタピナロフの遊離型（非結合型）濃度の約 1000 倍の濃度である。タピナロフは，P-gp，BSEP，OATP1B1，OATP1B3，OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，MATE1 及び MATE2-K に対して阻害作用を示さないと判断された。さらに，タピナロフは検討した条件下において P-gp，BCRP，OATP1B1 及び OATP1B3 の基質ではなかった。

2.6.4.7.2 *In Vivo* 薬物相互作用試験

2.6.4.7.2.1 ミニブタを用いた GSK2894512 の PK 試験における *Cyp1a1* 発現の評価［報告書番号 20[redacted]N239440］

（参考資料：CTD4.2.2.6-3）

本試験では，タピナロフを単回経皮投与したときのミニブタ皮膚での CYP1A1 mRNA 及び蛋白質発現量を評価した。2.6.4.3.2.1 項でタピナロフクリーム 1%（処方 E；10 mg/kg）を投与された雄性ミニブタ 2 匹から検体を採取した。

AhR 経路の活性化により CYP1A1 mRNA 発現が誘導されることが示されている。したがって，タピナロフを経皮投与されたミニブタの皮膚試料を用いて CYP1A1 発現を評価し，CYP1A1 mRNA が標的蛋白への結合を証明するためのバイオマーカーとなり得るかどうか検討した。ウェスタンブロット上にて，CYP1A1 のバンド強度をグリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素のバンド強度で補正することにより，CYP1A1 蛋白質を定量した。

タピナロフの用量に比例して CYP1A1 mRNA 発現が誘導された。CYP1A1 mRNA 発現はいずれのミニブタでも経皮塗布後 4 時間にピークに達し，投与後 8 時間の CYP1A1 mRNA 発現は投与後 4 時間に比べて低下していたが，ベースラインまでは戻っていなかった。CYP1A1 蛋白質発現量は投与後 8 時間にピークに達し，ベースラインに比べて蛋白質発現量は約 3 倍の増加を示した。投与後 18 時間の CYP1A1 mRNA は約 60 倍の増加が認められたにもかかわらず，蛋白質発現量はベースラインに戻っていた。投与 7 日後でも mRNA 発現量は対照発現量の約 25 倍であることが明らかとなった。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

生体マトリックス及び緩衝液中におけるタピナロフの構造異性化について検討した。2 種の *in vivo* 試験で採取したマウス及びラット血漿中でも，2.6.4.3.3.1 項で経皮投与したいずれのマウス

血漿試料でもシス異性体（[redacted]）は定量下限未満であった。その他の PK 試験は実施していない。試験一覧を，モジュール 4 内の記載箇所及び GLP 適合性とともに，表 8 に示す。

表 8 タピナロフのその他の薬物動態試験一覧

試験の種類	動物種（系統）／試験系	例数／性別／群	投与方法	製剤処方	投与濃度又は投与量（mg/kg/day）	投与期間（検体採取時期）	GLP	試験施設	報告書番号	CTD 番号
In Vitro										
異性体変換	*In vitro*，生体マトリックス，緩衝液	NA	NA	NA	1000 ng/mL	NA	非適	GSK	20[redacted]N361131	4.2.2.7-1
反復投与試験の生体試料分析	マウス血漿（プール）	NA	経皮	F	0.5%, 1.5%, 3%	28，182 日間	非適	GSK	20[redacted]N342907	4.2.2.7-2
	ラット血漿（プール）	NA	皮下	NA	0.1, 0.3, 1.0	28，182 日間	非適	GSK		

試験施設：GSK = GlaxoSmithKline ; NA = 該当せず

2.6.4.8.1 *In Vitro* 試験

2.6.4.8.1.1 *In Vitro* マトリックス及び緩衝液中における GSK2894512 及び [redacted] の異性体相互変換の可能性の検討［報告書番号 20[redacted]N361131］

（参考資料：CTD4.2.2.7-1）

本試験では，加温件下で様々な生体マトリックス及び緩衝液中におけるタピナロフのシス - トランス異性化反応について検討することを目的とした。

ヒト，マウス，ラット，ミニブタ及びウサギ血液を 37°C にて 2 時間インキュベートした結果，2 種類の異性体間で目立った相互変換は認められなかった。同様に，ヒト，マウス，ラット，ミニブタ及びウサギ血漿で 37°C にて 7 時間までインキュベートした結果，トランス異性体とシス異性体の間で目立った相互変換は認められなかった。タピナロフ又は [redacted] は，ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM），DMEM：アセトニトリル（ACN）（50：50），リン酸緩衝生理食塩水（PBS），0.05 mol/L リン酸カリウム緩衝液（pH 7.5），HLM 添加 0.05 mol/L リン酸カリウム緩衝液（pH 7.5），ハンクス平衡塩類溶液（HBSS）（pH 7.4）又は HBSS（pH 8.5）にて 37°C で最長 2 時間インキュベートしたが，明らかな相互変換を示さなかった。

CD-1 マウス，WH ラット，Göttingen ミニブタ，New Zealand White ウサギ及びヒトの血液及び血漿，HLM，並びに 0.05 mol/L リン酸カリウム緩衝液（pH 7.5，HLM を添加及び無添加），DMEM，PBS 及び HBSS（pH 7.4 及び 8.5）でタピナロフ（トランス異性体）と [redacted]（シス異性体）を別々に 37°C でインキュベートしても，顕著な異性体相互変換は生じなかった。

2.6.4.8.2 *In Vivo* 試験

2.6.4.8.2.1 毒性試験 20097894（[redacted]）及び 20097892（[redacted]）で得られた GSK2894512 のプール検体中における [redacted] の有無の検討［報告書番号 20[redacted]N342907］

（参考資料：CTD4.2.2.7-2）

本試験では，タピナロフ（トランス異性体）投与（処方 F）後に採取されたラット及びマウスのプール検体における [redacted]（シス異性体）の有無を明らかにすることを目的とした。

ラット及びマウスの血漿／20 mmol/L アスコルビン酸（1：1，v/v）検体を下記の試験から本試験に移管した。

- [redacted] 20097894（[redacted]）：GSK2894512A：マウスを用いた 2 年間経皮投与がん原性試験
- [redacted] 20097892（[redacted]）：GSK2894512A：ラットを用いた 2 年間皮下投与がん原性試験

動物種別，1 日投与量及び時間別に検体をプールし，暗室灯下で抽出した。

プールしたラット及びマウス血漿／20 mmol/L アスコルビン酸（1：1，v/v）検体の分析の結果，いずれの動物種でも [redacted]（シス異性体）のピーク反応は認められなかったが，第 5 群／投与 182 日目／投与後 4 時間のプールマウス検体では [redacted] のピーク面積比がタピナロフ（トランス異性体）のピーク面積比の 0.07%となった。

[redacted]（シス異性体）は単一の動物種，単一の時点で散発的に検出されたことから，タピナロフのトランス異性体からシス異性体への相互変換は頻繁に生じるわけではないと示唆され，また，単一の用量群での異常な検出であったことから，これは分析処理によるものである可能性があると示唆される。

2.6.4.9 考察及び結論

一連の *in vitro* 試験，並びに CD-1 マウス，Sprague Dawley ラット，WH ラット，New Zealand White ウサギ及び Göttingen ミニブタを用いた *in vivo* 試験により，タピナロフの PK，ADME 及び DDI の可能性を評価した。これらの試験で使用した動物種及び系統には，タピナロフの毒性評価に使用した動物種及び系統が含まれていた。

細胞単層膜を用いた *in vitro* 膜透過性試験では，タピナロフは高い受動的膜透過性を示した。

タピナロフの血漿蛋白結合性は極めて高く，種差はなく，明らかな濃度依存性を示さなかった。タピナロフの血漿蛋白結合率は，マウスで 99.5%～99.6%，ラットで 99.1%～99.3%，ウサギで 99.4%，ミニブタで 99.1%～99.2%，ヒトで 99.1%～99.4%であった。

排泄バランス試験で[^{14}C]-タピナロフを皮下投与したマウス及びラットでは，総放射能の血液／血漿比がそれぞれ 0.66～0.77 及び 0.71～1.0 であった。このことから，[^{14}C]-タピナロフに由来する放射能の血球移行性は低いと示唆された。

1 及び 10 mg/kg の用量でミニブタに単回静脈内投与したときのタピナロフの固有の PK パラメータを算出した。全身 CL は，1 mg/kg の投与後に高く，肝血漿流量と同程度であり，投与量を 10 mg/kg に増やすと 40%減少した。タピナロフの定常状態での分布容積（V_{ss}）は総体液量よりも大きく，全身循環を超えた広範な分布を示唆した。ミニブタにおける経口投与時の絶対バイオアベイラビリティは 5%未満であった。

ラットの血漿中全身曝露量は経口投与時に比べて皮下投与時で顕著に高い（約 40～95 倍）ことが示されたことから，全身曝露量を最大化するため，83 週間までの一連のラット試験ではタピナロフ投与液（媒体：Captisol®）の皮下投与を用いた。皮下投与後のタピナロフの t_{max} は，雌雄ともに概して 0.5～2 時間であった。最終相の $t_{1/2}$ に明らかな性差は見られなかったが，低用量群及び中用量群よりも高用量群で長くなる傾向があった。C_{max} 及び AUC は概して用量増加に伴って上昇し，AUC は 3～40 mg/kg/day（13 週間），1～30 mg/kg/day（26 週間）及び 0.1～1 mg/kg/day（がん原性試験）の用量範囲で概ね用量比例性を示した。反復投与によるタピナロフの蓄積はなかった。低用量域で反復投与すると曝露量の減少が観察されたが，30 mg/kg/day 以上では明らかではなかった。ラット皮下投与でタピナロフの PK／TK に明らかな性差は見られなかった。

概して，マウス及びミニブタの経皮投与時の全身曝露量は同一サンプリング日ではいずれも用量依存的に増加した。また，投与 1 日目と比較して以降の時点で全身曝露量は同程度かわずかに高かった。マウスの C_{max} 及び AUC は 26 週間の期間中用量比以上に上昇したが，9 ヵ月間試験の投与最終週でのミニブタの C_{max} 及び AUC はほぼ用量に比例して上昇した。概して全身曝露量では性差は見られず，蓄積も見られなかった。

肝臓におけるタピナロフの酸化的代謝には主に CYP1A2 及び 3A4 が寄与し，CYP2C9，2C19 及び 2D6 の寄与はわずかであった。肝外臓器に多く発現している酵素で主に関与している CYP 分

子種は CYP1A1 であり，CYP1B1 の寄与はわずかであった。タピナロフのグルクロン酸抱合は主に UGT1A9 が，硫酸抱合には SULT1A1，SULT1A3 及び SULT1E1 が関与していた。タピナロフの代謝には複数の酵素が関与していると思われることから，これらの経路のいずれかを阻害しても，タピナロフの曝露量が有意に増加する可能性は低いと考えられた。

非臨床試験で使用した動物種とヒトの代謝プロファイルは概して同じであった。ヒト肝細胞におけるタピナロフの *in vitro* 代謝様式はグルクロン酸抱合又は硫酸抱合，並びにそれらと酸化との組み合わせであった。ヒト肝細胞代謝試験でみられた[^{14}C]-タピナロフの代謝物はいずれも非臨床試験動物種で確認された。したがって，*in vitro* ではヒト特有の代謝物は認められなかった。

皮下投与後のタピナロフの代謝を探索的に検討することを目的としたマウス試験において，血漿，尿及び肝臓で検出された主要代謝物は M1（酸化 + グルクロン酸抱合体）及び M2（グルクロン酸抱合体）であった。糞中では，M5（酸化体）及び M6（水和物）が主要代謝物として認められた。

ラットでは，血漿中の主要な薬物関連成分は，タピナロフの未変化体，M1，M2，M5 及び 2 種類の未分類代謝物であった。胆汁中の主要な成分は，M1 及び M2 であった。尿中の主要成分は，M1，並びに共溶出した M2 及び M8（水和 + グルクロン酸抱合体）であった。糞中の主要な薬物関連成分はタピナロフの未変化体及び M5 であった。肝臓では，M3（酸化 + 硫酸抱合体）が主要な薬物関連成分であり，その他に目立った成分として M1，M2，M4（硫酸抱合体）及び M5 が認められた。

反復経皮投与後にヒト被験者から得られた検体を用いて，ヒト血漿中のタピナロフ及び代謝物，並びに尿及び皮膚生検で検出された代謝物の定性的評価を実施した。プールした血漿中に検出された唯一の代謝物は M4 であり，皮膚生検抽出物中に代謝物は検出されなかった。プールした尿検体中に検出された代謝物は，ヒト肝細胞で認められた代謝経路（グルクロン酸抱合又は硫酸抱合，並びにそれらと酸化との組み合わせを含む）と矛盾しなかった。

雄性ラットを用いた QWBA 試験では，放射能は速やかに広く全身に分布した。いずれの組織でも投与後 1 時間までに放射能濃度が定量可能となった。大多数の組織で t_{max} は 1 時間であった。放射能濃度は投与後 3 時間から 72 時間にかけて概ね低下したが，投与後 72 時間の時点でも放射能はすべての組織で定量可能であった。放射能濃度が相対的に高かった組織は，投与部位皮膚，膀胱壁，副腎皮質，小腸壁，肝臓，褐色脂肪及び腎皮質であった。組織／全血比において，ほとんどの組織では，[^{14}C]-タピナロフ及びその代謝物の濃度が全血中濃度よりも高値を示した。同様に，排泄バランス試験では，肝臓／血漿比は，マウスで 4.0～14.1，ラットで 7.1～14 の範囲であった。

マウス及びラットを用いた排泄試験では，皮下投与した放射能は主に糞中に検出され（投与量の約 76%），次いで尿中であった（投与量の約 14%）。さらに詳細な検討の結果，BDC ラットでは，胆汁中への放射能の排泄率は投与量の 73%であった。したがって，非経口投与後の主な排泄経路は，胆汁を介した糞中排泄と考えられた。ミニブタに経皮投与したとき，放射能の大部分は，投与部位の拭き取りで回収された。放射能の血中及び血漿中濃度は 1 検体を除くすべての検体で検出限界未満であった。投与された放射能の 1%未満が試験期間中に排泄物（尿及び糞）に回収され，経皮投与後に放射性試験物質の吸収が極めて限定的であることが示唆された。

CYP 酵素活性に対する直接的，時間依存的又は代謝依存的阻害作用はほとんど認められず，検

討した最高濃度である 100 nmol/L［臨床で認められた C_{max}（2.44 ng/mL）から算出されたヒトでのタピナロフの遊離型（非結合型）濃度の約 1000 倍］までの結果では IC_{50} 値は決定できなかった。

タピナロフは乳癌耐性蛋白（BCRP）を阻害［最高濃度（100 nmol/L）での阻害率 48.8%］したが，これは臨床で認められている遊離型 C_{max} の約 1000 倍の濃度である。P-gp，BSEP，OATP1B1，OATP1B3，OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，MATE1 又は MATE2-K に対してタピナロフは阻害作用を示さなかった。またタピナロフは P-gp，BCRP，OATP1B1 及び OATP1B3 の基質でないことが示された。

ヒト及びミニブタ皮膚において，タピナロフはその薬理作用による AhR の活性化により CYP1A1 の誘導作用を示した。同様に，CYP1A2（AhR によって制御される）も顕著に誘導し，最大誘導作用の 50%を示す濃度（EC_{50}）は 0.09～0.58 μmol/L，最大誘導倍率（E_{max}）は 48～68 倍であった。CYP2B6 及び CYP3A4 の誘導は認められなかった。

ヒト全身曝露（タピナロフクリーム 1%塗布時）並びに *in vitro* 試験結果を規制ガイダンスに従い評価したが，臨床的意義のある DDI が起こる可能性は低いと判断された。

2.6.4.10 図表

文章中に記載した。

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. Lehman PA, Raney SG, Franz TJ. Percutaneous absorption in man: *in vitro-in vivo* correlation. Skin Parmacol Physiol. 2011; 24(4):224-30.

3. Bode G, Clausing P, Gervis F, Loegsted J, Luft J, Nogues V, et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology. J Pharmacol Toxicol Methods. 2010 Nov-Dec; 62(3):196-220.

4. Toon S, Trager W. Pharmacokinetic implications of stereoselective changes in plasma-protein binding: warfarin/sulfinpyrazone. J Pharmacol Sci. 1984 Nov; 73(11):1671-3.

5. Waters NJ, Jones R, Williams G, Sohal B. Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. J Pharmacol Sci. 2008 Oct; 97(10)4586-95.

タピナロフ

第 2 部 CTD の概要（サマリー）
2.6 非臨床試験の概要文及び概要表
2.6.5 薬物動態試験の概要表

日本たばこ産業株式会社

目次

2.6.5 Pharmacokinetics Tabulated Summary 4
2.6.5.1 Pharmacokinetic Overview 4
2.6.5.1.1 Summary of ADME and Pharmacokinetics Studies Conducted with Tapinarof 4
2.6.5.2 Analytical Methods and Validation 10
2.6.5.2.1 Analytical Methods and Validation Reports 10
2.6.5.3 Pharmacokinetics: Absorption *In Vitro* 12
2.6.5.3.1 Absorption After a Single Dose in an *Ex Vivo* Human Skin Model 12
2.6.5.3.2 *In Vitro* Investigation of Passive Membrane Permeability 13
2.6.5.4 Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose 14
2.6.5.4.1 Absorption After a Single Dermal Dose of Tapinarof Cream 14
2.6.5.4.2 Absorption After a Single Oral or Subcutaneous Dose of Tapinarof in Rat 15
2.6.5.4.3 Absorption After a Single Oral, Dermal, or Intravenous Dose of Tapinarof in Minipig 16
2.6.5.5 Pharmacokinetics: Absorption after Repeated Dose 17
2.6.5.5.1 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Mouse 17
2.6.5.5.2 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Rat 19
2.6.5.5.3 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Rabbit 20
2.6.5.5.4 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Minipig 21
2.6.5.5.5 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Minipig, Continued 22
2.6.5.5.6 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Minipig, Continued 23
2.6.5.5.7 Absorption After Repeat Subcutaneous Administration of Tapinarof in Rat 25
2.6.5.5.8 Absorption After Repeat Subcutaneous Administration of Tapinarof in Rat, Continued 26
2.6.5.5.9 Absorption After Repeat Subcutaneous Administration of Tapinarof in Rat, Continued 27
2.6.5.6 Pharmacokinetics: Organ Distribution 28
2.6.5.6.1 Quantitative Whole Body Autoradiography Tissue Distribution Study in Rat after Single Subcutaneous Dosing 28
2.6.5.7 Pharmacokinetics: Plasma Protein Binding 32
2.6.5.8 Pharmacokinetics: Study in Pregnant or Nursing Animals 33
2.6.5.8.1 Subcutaneous Embryo-Fetal Development Study in Female Rabbits 33
2.6.5.8.2 Subcutaneous Infusion Embryo-Fetal Development Study in Rabbits 34
2.6.5.8.3 Subcutaneous Pre- and Post-Natal Development Study in Rats 35
2.6.5.9 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies 36
2.6.5.10 Pharmacokinetics: Metabolism *In Vivo* 37
2.6.5.11 Pharmacokinetics: Metabolism *In Vitro* 39
2.6.5.12 Pharmacokinetics: Postulated Metabolic Pathways 40
2.6.5.13 Pharmacokinetics: Induction/Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes 41
2.6.5.13.1 An *In Vitro* Investigation into the Human Oxidative Enzymology of [^{14}C]-GSK2894512 41

2.6.5.13.2 Determination of the Human Uridine Glucuronosyl Transferase (*UGT*) Isoforms Involved in the Metabolism of GSK2894512 42
2.6.5.13.3 Determination of the Human Sulfotransferase (SULT) Isoforms Involved in the Metabolism of GSK2894512 44
2.6.5.14 Pharmacokinetics: Excretion 46
2.6.5.15 Pharmacokinetics: Excretion into Bile 48
2.6.5.16 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions 49
2.6.5.16.1 *In Vitro* Drug Interaction in Human Hepatocytes 49
2.6.5.16.2 Selectivity Profile in *In Vitro* Screening and Compound Profiling Assays 50
2.6.5.16.3 Cytochrome P450 Inhibition in Human Liver Microsomes 51
2.6.5.16.4 Transporter Inhibition and Substrate Potential 52
2.6.5.17 Pharmacokinetics: Others 53
2.6.5.17.1 Isomeric Interconversion in *In Vitro* Matrices and Buffers 53
2.6.5.17.2 Evaluation for Presence of Cis Isomer in Pooled Plasma Samples 56

2.6.5 Pharmacokinetics Tabulated Summary

Note: Tapinarof (JTE-061) is referred to as DMVT-505, GSK2894512A, GSK2894512, or WBI-1001 in some study reports.

2.6.5.1 Pharmacokinetic Overview

2.6.5.1.1 Summary of ADME and Pharmacokinetics Studies Conducted with Tapinarof

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dermal Formulation	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Report No. /Location in CTD
Absorption: *In Vitro* Studies								
In Vitro Skin Penetration	*Ex Vivo* Human Skin	NA	Dermal	C, E, F	0.5%	NA	No	20[redacted]N242423 /4.2.2.2-1
Passive Membrane Permeability	MDCKII-MDR1 cells	NA	NA	NA	NA	NA	No	20[redacted]N294348 /4.2.2.2-2
Absorption: Single-Dose Dermal Studies								
Pilot *In Vivo* Dermato-pharmacokinetic	Rat (SD)	9M/9F	Dermal	A	8% (480 mg/kg)	Single	No	20[redacted]N163801 /4.2.2.2-3 20[redacted]N163805 /4.2.2.2-4
Pharmacokinetic	Göttingen minipig	2M	Dermal	E	1%	Single	No	20[redacted]N239357 /4.2.2.2-5
Pharmacokinetic	Göttingen minipig	2M	Dermal	E	1%	Single	No	20[redacted]N239441 /4.2.2.2-6
Absorption: Single-Dose Oral, Intravenous, and Subcutaneous Studies								
Toxicokinetic and Tolerability	Rat (WH)	3M	Oral, Subcutaneous	NA	10 mg/kg	Single	No	20[redacted]N158999 /4.2.3.1-1
Pharmacokinetic	Göttingen minipig	3F	Intravenous; Oral	NA	25; 1, 10 mg/kg	Single	No	20[redacted]N163550 /4.2.2.2-8
Pharmacokinetic	Göttingen minipig	2M (IV); 3M (PO, Dermal)	Intravenous; Oral, Dermal	E	1; 5, 10 mg/kg	Single	No	20[redacted]N239356 /4.2.2.2-9
Absorption: Repeat-Dose Dermal Studies								
Pharmacokinetic	Mouse (CD-1)	3M	Dermal	F	0.5%, 1.5%, 3%	4-Day	No	20[redacted]N350320 /4.2.2.2-10

タピナロフ
2.6.5 薬物動態試験の概要表

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dermal Formulation	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Report No. /Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Mouse (CD-1)	10M/10F 6-30M/6-30F^{TK}	Dermal	E	0%, 1%, 2%, 4% (0.2 mL/mouse)	14-Day	Yes	20[redacted]N184562 /4.2.3.2-2
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Mouse (CD-1)	12M/12F 3-18M/ 3-18F^{TK}	Dermal	F	0%, 0.5%, 1%, 3% (0.2 mL/mouse)	13-Week	Yes	20[redacted]N241812 /4.2.3.2-3
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Mouse (CD-1)	60M/60F 6-30M/ 6-30F^{TK}	Dermal	F	0%, 0.5%, 1.5%, 3% (0.2 mL/mouse)	2-Year[a]	Yes	DMVT-505-9001/4.2.3.4.1-1
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Rat (WH)	4M 3M^{TK}	Dermal	E	0%, 1%, 2%, 4% (0, 10, 20, 40 mg/kg/day)	7-Day	No	20[redacted]N175734 /4.2.3.2-5
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Rat (SD)	10M/10F 8-16M/8-16F^{TK}	Dermal	A	0%, 1%, 4%, 8% (0, 60, 240, 480 mg/kg/day)	28-Day	Yes	20[redacted]N163810 /4.2.3.2-6
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Rat (WH)	12M/12F 3-6M/3-6F^{TK}	Dermal	F	0%, 0.5%, 1.5%, 3% (0, 10, 30, 60 mg/kg/day)	13-Week	Yes	DMVT-505-9003 /4.2.3.2-7
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Rabbit (NZW)	4M/4F 2-4M/2-4F^{TK}	Dermal	A	0%, 1%, 3%, 4%, 6% (0, 80, 225, 320, 480 mg/kg/day)	28-Day	No	20[redacted]N163809 /4.2.2.2-17 20[redacted]N163815 /4.2.3.2-10
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Göttingen Minipig	1M/1F	Dermal	D	0%, 1%, 2%, 4% (0, 20, 40, 80 mg/kg/day)	7-Day	No	20[redacted]N163449 /4.2.3.2-11
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Göttingen Minipig	3M	Dermal	E, F	0%, 2%	7-Day	No	20[redacted]N204716/ 4.2.3.2-12 20[redacted]N239358 /4.2.2.2-21
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Göttingen Minipig	3M/3F 2M/2F^{R}	Dermal	B	0%, 1.5%, 3%, 6% (0, 23, 44, 87 mg/kg/day)	28-Day	No	20[redacted]N163816 /4.2.3.2-13

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dermal Formulation	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Report No. /Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Göttingen Minipig	3M/3F	Dermal	D	0%, 1%, 2%, 4% (0, 17/9, 36/18, 74/37 mg/kg/day)	28-Day	Yes	20[redacted]N167695 /4.2.3.2-14
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Göttingen Minipig	3M/3F	Dermal	F	0%, 0.5%, 1%, 3% (0, 10, 20, 60 mg/kg/day)	28-Day	Yes	20[redacted]N221246 /4.2.3.2-15
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Göttingen Minipig	5M/5F	Dermal	C	0%, 1%, 2%, 4% (0, 18-28, 36-56, 72-94 mg/kg/day)	13-Week	No	20[redacted]N163817 /4.2.3.2-16
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Göttingen Minipig	4M/4F	Dermal	E	0%, 0.1%, 1%, 2%, 4% (0, 0.9, 9.7, 38.4, 76.2 mg/kg/day)	13-Week	Yes	20[redacted]N172520 /4.2.3.2-17
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Göttingen Minipig	4M/4F	Dermal	F	0%, 0.5%, 1%, 3% (0, 10, 20, 60 mg/kg/day)	9-Month	Yes	20[redacted]N299302 /4.2.3.2-18
Absorption: Repeat-Dose Subcutaneous Studies								
Pharmacokinetics	Rat (WH)	6M	Subcutaneous	NA	1, 6, 20 mg/kg/day	4-Day	No	20[redacted]N315793 /4.2.2.2-28
Repeat-Dose Toxicity DRF	Rat (SD)	5M/5F 6M/6F^{TK}	Subcutaneous	NA	0, 200, 500, 1000 mg/kg/day	7-Day	No	20[redacted]N163819 /4.2.3.2-20
Repeat-Dose Toxicity DRF	Rat (WH)	4M/4F 3M/3F^{TK}	Subcutaneous	NA	0, 3, 10, 30 mg/kg/day	7-Day	No	20[redacted]N160460 /4.2.3.2-19
Vehicle Investigative	Rat (WH)	3M	Subcutaneous	NA	0, 30 mg/kg/day	7-Day	No	20[redacted]N164986 /4.2.3.2-21
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Rat (SD)	10M/10F 5M/5F^{R} 3-9M/3-9F^{TK}	Subcutaneous	NA	0, 3, 10, 40 mg/kg/day	13-Week	No	20[redacted]N163820 /4.2.3.2-23
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Rat (WH)	12M/12F 10M/10F^{R} 6M/6F^{TK}	Subcutaneous	NA	0, 1, 6, 30 mg/kg/day	26-Week	Yes	20[redacted]N254469 /4.2.3.2-24

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dermal Formulation	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Report No. /Location in CTD
Repeat-Dose Toxicity and Toxicokinetics	Rat (WH)	60M/60F 9M/9F[TK,b]	Subcutaneous	NA	0, 0.1, 0.3, 1 mg/kg/day	2-Year[a]	Yes	DMVT-505-9002 /4.2.3.4.1-2
Studies in Pregnant or Nursing Animals								
Embryofetal Development	Rabbit (NZW)	22F	Subcutaneous	NA	0, 0.3, 1, 3 mg/kg/day	Days 7 to 19 pc	Yes	20[redacted]N189059 /4.2.3.5.2-3
Embryofetal Development	Rabbit (NZW)	22F	Subcutaneous Infusion	NA	0, 1, 2, 3 mg/kg/day	GD 7 to 19	Yes	20[redacted]N244027 /4.2.3.5.2-4
Pre- and Post-Natal Development	Rat (WH)	24-26F	Subcutaneous	NA	0, 1, 6, 30 mg/kg/day	GD 6 to LD 20	Yes	20[redacted]N368233 /4.2.3.5.3-1
Distribution *In Vitro* Studies								
Plasma Protein Binding	Rat Minipig, Human	NA	*In vitro*	NA	20, 50, 100, 500, 1000 ng/mL	NA	No	20[redacted]N176703 /4.2.2.3-1
Plasma Protein Binding	Mouse, Rabbit	NA	*In vitro*	NA	20, 50, 100, 500, 1000 ng/mL	NA	No	20[redacted]N233123 /4.2.2.3-2
Plasma and Skin Protein Binding	Minipig, Human	NA	*In vitro*	NA	300, 1500, 3000 ng/mL	NA	No	20[redacted]N242613 /4.2.2.3-3
Distribution: *In Vivo* Studies								
QWBA	Rat (LH)	7M	Subcutaneous	NA	2 mg/kg	Single	Yes	20[redacted]N243602 /4.2.2.3-4
Metabolism: *In Vitro* Studies								
Metabolite Profiling in Hepatocytes	Mouse, Rat, Rabbit, Minipig, Human	NA	*In vitro*	NA	10 µM	NA	No	20[redacted]N212859 /4.2.2.4-1
Metabolism Profiling in Hepatocytes	Mouse, Rat, Human	NA	*In vitro*	NA	0.1, 1, 10 µM	NA	No	20[redacted]N353927 /4.2.2.4-2
Metabolite Profiling in Hepatocytes	Rat, Rabbit, Minipig, Human	NA	*In vitro*	NA	10 µM	NA	No	20[redacted]N163811 /4.2.2.4-3
Oxidative Enzymology	Human	NA	*In vitro*	NA	5 µM	NA	No	20[redacted]N216849 /4.2.2.4-4

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dermal Formulation	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Report No. /Location in CTD
Metabolism	Human	NA	*In vitro*	NA	1, 5 µM	NA	No	20[redacted]N311114 /4.2.2.4-5
Metabolism	Human	NA	*In vitro*	NA	1, 5 µM	NA	No	20[redacted]N324065 /4.2.2.4-6
Metabolism: *In Vivo* Studies								
Metabolism	Mouse (CD-1)	30M	Subcutaneous	NA	2 mg/kg	Single	No	20[redacted]N375928 /4.2.2.4-7
Metabolism	Rat (WH)	20M	Subcutaneous	NA	2 mg/kg	Single	No	20[redacted]N375949 /4.2.2.4-8
Metabolism	Human	NA	Dermal	F	1%, 2%	Single or 21-Day	No	20[redacted]N284870 /5.3.3.2-1
Excretion: *In Vivo* Studies								
Excretion	Mouse (CD-1)	33M	Subcutaneous	NA	2 mg/kg	Single	Yes	20[redacted]N243607 /4.2.2.5-1
Excretion	Mouse (CD-1)	30M	Subcutaneous	NA	2 mg/kg	Single	No	20[redacted]N389035 /4.2.2.5-2
Excretion	Rat (WH)	22M	Subcutaneous	NA	2 mg/kg	Single	Yes	20[redacted]N243603 /4.2.2.5-3
Excretion	Rat (WH)	21M	Subcutaneous	NA	2 mg/kg	Single	No	20[redacted]N389055 /4.2.2.5-4
Excretion	Göttingen Minipig	3M	Dermal	F	1% (10 mg/kg)	Single	No	20[redacted]N389316 /4.2.2.5-5
PK Drug Interaction Studies								
Screening and compound profiling assays (SCP)	127 *in vitro* assays	NA	*In vitro*	NA	0.0007 to 40 µM	NA	No	20[redacted]N176987 /4.2.1.2-1
Drug Interaction	Human Hepatocytes	NA	*In vitro*	NA	0.001 to 10 µmol/L	NA	No	20[redacted]N228896 /4.2.2.6-2
Drug Interaction	Göttingen Minipig	2M	Dermal	E	10 mg/kg	Single	No	20[redacted]N239440 /4.2.2.6-3 [c]

Type of Study	Species (Strain)/ Test System	No./Sex/ Group	Method of Administration	Dermal Formulation	Dose (mg/kg/day) or Concentration	Duration of Dosing (Sampling Occasions)	GLP	Report No. /Location in CTD
Drug Interaction	Human Hepatocytes	NA	*In vitro*	NA	0.1 to 100 nmol/L	NA	No	DMVT-505-9004 /4.2.2.6-4
Drug Interaction	Membrane vesicles, Caco-2, MDCK, and HEK293 cells	NA	*In vitro*	NA	0.01, 0.1 µmol/L (inhibition) 0.5, 5 µmol/L (substrate)	NA	No	DMVT-505-9005 /4.2.2.6-5
Other PK Studies								
Isomer Conversion	*In vitro*, Biological Matrices and Buffers	NA	NA	NA	1000 ng/mL	NA	No	20[redacted]N361131 /4.2.2.7-1
Bioanalysis from Repeat-Dose Study	Pooled mouse plasma	NA	Dermal	F	0.5%, 1.5%, 3%	28, 182-Day	No	20[redacted]N342907 /4.2.2.7-2
	Pooled rat plasma	NA	Subcutaneous	NA	0.1, 0.3, 1.0 mg/kg/day	28, 182-Day	No	

a. Last TK sampling at Week 26.
b. Additional TK timepoint at Day 28 with added group (10% Captisol®; reduced vehicle concentration).
c. No tabulated data is available from this study; therefore, this study is not described in this Module.
Caco-2 = human colon epithelial cell line; CD-1 = [Crl:CD1®(ICR)]; DRF = dose-range finding; F = female; GD = gestation day; GLP = Good Laboratory Practices; HEK293 = human embryonic kidney cell line; WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; IV = intravenous; LD = lactation day; LH = Lister Hooded; M = male; MDCK = Madin-Darby canine kidney cell line; MDCKII-MDR1 = MDCK cell line transfected with multidrug resistance gene 1; NA = not applicable; NZW = New Zealand White [Crl:KBL(NZW)BR]; pc = post-coitum; PO = per os; QWBA = quantitative whole-body autoradiography; R = recovery animals; SD = Sprague Dawley [Crl:CD(SD)BR or Hsd:Sprague Dawley SD]; TK = toxicokinetic.

2.6.5.2 Analytical Methods and Validation

2.6.5.2.1 Analytical Methods and Validation Reports

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Interday Precision (%)	Interday Accuracy (%)	GLP	Study Number/Location in CTD
Mouse Plasma	Tapinarof	0.3 to 750 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 12.3	–1.3 to 2.9	No	20[redacted]N183358 /4.2.2.1-1
Rat Plasma	Tapinarof	5 to 1000 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 10.4	–11.5 to –1.6	No	20[redacted]N163799 /4.2.2.1-2
Rat Plasma	Tapinarof	1 to 500 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 10.5	–19.9 to 0.8	No	08-0167-VRPT-01 /4.2.2.1-3 08-0167-VRPT-01-AM-02 /4.2.2.1-4
Rat Plasma	Tapinarof	0.1 to 250 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 4.3	–4.5 to 6.3	No	20[redacted]N168051 /4.2.2.1-5
Rat Plasma	Tapinarof	0.3 to 750 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 10.1	–2.5 to 1.5	No	20[redacted]N183357 /4.2.2.1-6 20[redacted]N218456 /4.2.2.1-7
Rat Plasma	Tapinarof	100 to 100000 pg/mL	LC-MS/MS	≤ 8.5	1.0 to 2.4	No	521-1833 AM2 /4.2.2.1-8
	Tapinarof sulfate	20 to 20000 pg/mL		≤ 6.3	0.5 to 3.5		
Rabbit Plasma	Tapinarof	2 to 1000 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 8.8[a]	–2.1 to 3.1	No	20[redacted]N163800 /4.2.2.1-9
Rabbit Plasma	Tapinarof	0.5 to 1250 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 9.4	–6.8 to 0.0	No	20[redacted]N179037 /4.2.2.1-16 20[redacted]N260571 /4.2.2.1-17
Minipig Plasma	Tapinarof	0.1 to 50 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 8.3	–4.7 to 0.1	No	20[redacted]N163802 /4.2.2.1-10
Minipig Plasma	Tapinarof	0.1 to 250 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 10.5[a]	–5.0 to 6.6[a]	No	20[redacted]N169750 /4.2.2.1-11
Minipig Plasma	Tapinarof	0.3 to 750 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 13.2	–3.7 to 3.5	No	20[redacted]N207562 /4.2.2.1-12 20[redacted]N236581 /4.2.2.1-13

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Interday Precision (%)	Interday Accuracy (%)	GLP	Study Number/Location in CTD
Minipig Plasma	Tapinarof	0.04 to 40 ng/mL	LC-MS/MS	≤ 7.5	–2.5 to 2.0	No	20[redacted]N251734 /4.2.2.1-14 20[redacted]N286975 /4.2.2.1-15

a. intraday
GLP = Good Laboratory Practices; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

2.6.5.3 Pharmacokinetics: Absorption *In Vitro*

2.6.5.3.1 Absorption After a Single Dose in an *Ex Vivo* Human Skin Model

Test Article:	Tapinarof		
Study No.	20[redacted]N242423		
Location in CTD:	4.2.2.2-1		
Study System:	Human skin (*ex vivo*)		
Vehicle/Formulation:	Tapinarof Cream, Formulation C (Welichem)	Tapinarof Cream, Formulation E (Tergus)	Tapinarof Cream, Formulation F (10% MCT, Polawax)
Method of Administration:	Applied to surface of skin		
Sample:	Receptor solution		
Analyte:	Tapinarof		
Assay:	SPE-MS/MS		
Dose (%):	0.5		
Receptor Fluid			
Cumulative Amount (ng)	10.9	8.35	2.72
Lag (hr)	7.3	6.4	7.5
Flux (ng/cm^2*hr)	1.37	0.94	0.36

MCT = medium chain triglycerides; SPE-MS/MS = solid-phase extraction with tandem mass spectrometry.

2.6.5.3.2 *In Vitro* Investigation of Passive Membrane Permeability

Test Article:	Tapinarof		
Study No.	20[redacted]N294348		
Location in CTD:	4.2.2.2-2		
Study System:	MDCKII-MDR1 cells		
Method of Administration:	Applied to surface of membrane		
Sample:	DMEM		
Analyte:	[^{14}C]-tapinarof		
Assay:	Liquid Scintillation Analysis		
Compound/Dose:	3 µmol/L [^{3}H] amprenavir	3 µmol/L [^{14}C]-tapinarof	3 µmol/L [^{14}C]-tapinarof
pH	7.4	7.4	5.5
Parameter			
P_x (nm/s)	270	670	500
Permeability Class	High	High	High

MDCK-MDR1 = Madin-Darby canine kidney cell line transfected with multidrug resistance gene 1; DMEM = Dulbecco's modified eagle medium.

2.6.5.4 Pharmacokinetics: Absorption after a Single Dose

2.6.5.4.1 Absorption After a Single Dermal Dose of Tapinarof Cream

Test Article:	Tapinarof			
Study No.	20[redacted]N163801 20[redacted]N163805	20[redacted]N239357	20[redacted]N239441	
Location in CTD:	4.2.2.2-3 4.2.2.2-4	4.2.2.2-5	4.2.2.2-6	
Species:	Rat (SD)	Göttingen minipig	Göttingen minipig	
Feeding Condition:	Fed	Fed	Fed	
Vehicle/Formulation:	8% Tapinarof Cream, Formulation A	1% Tapinarof Cream, Formulation E	1% Tapinarof Cream, Formulation E	
Method of Administration:	Dermal	Dermal	Dermal	
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma	Skin	Skin (Dermis)	Skin (Epidermis)
Analyte:	Tapinarof	Tapinarof	Tapinarof	Tapinarof
Assay:	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS	LC-MS/MS
Gender (M/F)/Number of animals:	9M/9F	2M	2M	
Dose (mg/kg):	480	10	10	
PK parameters:				
C_{max} (ng/mg)	At 30 minutes following application of tapinarof cream, plasma concentrations of the drug were 410 ng/mL and 214 ng/mL in males and females respectively. Within an hour of dosing, plasma levels had decreased by approximately 90% and generally remained fairly constant through 12 hours after dosing. The respective concentrations had subsided to 17.7 and 7.7 ng/mL, respectively, 24 hours after dosing.	4.7	0.2	9.5
AUC_{last} (hr*ng/mg)		329	4.1	221
$t_{1/2}$ (h)		NR	27.3	24.6

SD = Sprague Dawley; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NR = not reportable.

2.6.5.4.2 Absorption After a Single Oral or Subcutaneous Dose of Tapinarof in Rat

Test Article:	Tapinarof				
Study No.	20[redacted]N158999				
Location in CTD:	4.2.3.1-I				
Species	Rat (WH)				
Feeding condition:	Fed				
Vehicle/Formulation:	HPMC/Tween 80 Suspension	PEG Solution	Captisol® Solution	PEG Solution	PG Solution
Method of Administration:	Oral gavage	Oral gavage	Oral gavage	Subcutaneous injection	Subcutaneous injection
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma				
Analyte:	Tapinarof				
Assay:	LC-MS/MS				
Gender (M/F)/Number of animals:	3M	3M	3M	3M	3M
Dose (mg/kg):	10	10	10	10	10
Pharmacokinetic Parameters					
C_{max} (ng/mL)	0.674	1.57	2.19	116	114
AUC_{0-t} (hr*ng/mL)	NR	5.84	13.4	551	526
t_{max} (h)	NR	2	0.5	2	2

WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; HPMC = hydroxypropyl methylcellulose; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NR = not reportable; PEG = polyethylene glycol; PG = propylene glycol.

2.6.5.4.3 Absorption After a Single Oral, Dermal, or Intravenous Dose of Tapinarof in Minipig

Test Article:	Tapinarof					
Location in CTD:	4.2.2.2-8			4.2.2.2-9		
Study No.	20[redacted]N163550			20[redacted]N239356		
Species	Göttingen minipig			Göttingen minipig		
Feeding condition:	Fed			Fed		
Vehicle/Formulation:	Captisol® solution	Captisol® solution	Captisol® solution	DMSO containing solution[a]	DMSO containing solution[a]	Tapinarof Cream, Formulation E
Method of Administration:	Intravenous injection	Intravenous injection	Oral Gavage	IV	Oral	Dermal
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma			Plasma		
Analyte:	Tapinarof			Tapinarof		
Assay:	LC-MS/MS			LC-MS/MS		
Gender (M/F)/Number of animals:	3F	3F	3F	2M	3M	3M
Dose (mg/kg):	1	10	25	1	5	10
Pharmacokinetic Parameters						
C_{max} (ng/mL)	335	5130	258	NR	5.1	NR
AUC_{last} (hr*ng/mL)	477	7970	550	1030	26.2	NR
t_{max} (h)	0.5	0.5	1.0	NR	2.7	NR

a. DMSO:Kolliphore HS15: 4% Hydroxypropyl-β-cyclodextrin (10:10:80)
LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NR = not reportable.

2.6.5.5 Pharmacokinetics: Absorption after Repeated Dose

2.6.5.5.1 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Mouse

Test Article:	Tapinarof																	
Study No.	20[redacted]N350320[a]		20[redacted]N184562				20[redacted]N241812						DMVT-505-9001					
Location in CTD:	4.2.2.2-10		4.2.3.2-2				4.2.3.2-3						4.2.3.4.1-1					
Species	CD-1 mouse		CD-1 mouse				CD-1 mouse						CD-1 mouse					
Feeding condition:	Fed		Fed				Fed						Fed					
Vehicle/Formulation:	Tapinarof Cream, Formulation F		Tapinarof Cream, Formulation E				Tapinarof Cream, Formulation F						Tapinarof Cream, Formulation F					
Method of Administration:	Dermal		Dermal				Dermal						Dermal					
Duration of Dosing:	4 days		14 days				13 weeks						2 years					
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma		Plasma				Plasma						Plasma					
Analyte:	Tapinarof and [redacted]		Tapinarof				Tapinarof						Tapinarof					
Assay:	LC-MS/MS		LC-MS/MS				LC-MS/MS						LC-MS/MS					
Gender (M/F)/Number of animals:	4M		30M	30F	30M	30F	30M	30F	18M	18F	18M	18F	18M	18F	30M	30F	30M	30F	30M	30F
Dose (%)	0.5, 1.5, and 3		1		2		4		0.5		1		3		0.5		1.5		3	
Dose (mg/kg):	0.2 mL/mouse		60-80		110-160		220-330		28	33	56	65	164	206	25.2	29.1	71.7	90.4	140	166
Pharmacokinetic Parameters																				
C_{max} (ng/mL)	Plasma concentrations of tapinarof were quantifiable at all time points collected and the cis isomer ([redacted]) was not quantifiable (< 0.250 ng/mL) in any of the plasma samples analyzed.																			
Day 1			14.9	51.5	69.1	292	218	313	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 14			18.4	40.7	57.6	128	207	186	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 28			NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	23.6	19.1	97.9	57.8	110	281
Day 91			NA	NA	NA	NA	NA	NA	4.50	11.1	27.5	20.5	151	152	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 182			NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.66	31.9	31.6	46.2	66.4	95.7
AUC_{0-t} (hr*ng/mL)																				
Day 1			78.1	174	266	766	1250	1650	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 14			58.7	126	185	221	821	854	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 28			NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	37.7	33.8	188	146	560	715

Day 91		NA	NA	NA	NA	NA	NA	22.4	34.5	53.0	92.8	498	518	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 182		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	14.1	117	96.5	255	259	444

a. Skin samples were also analyzed for possible gene expression as a measure of target engagement by tapinarof; these data are described in Module 2.6.4.
LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable.; CD-1 mouse = Crl:CD1(ICR).

2.6.5.5.2 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Rat

Test Article:	Tapinarof																					
Study No.	20[redacted]N175734			20[redacted]N163810						DMVT-505-9003												
Location in CTD:	4.2.3.2-5			4.2.3.2-6						4.2.3.2-7												
Species	Rat (WH)			Rat (SD)						Rat (WH)												
Feeding Condition:	Fed			Fed						Fed												
Vehicle/Formulation:	Tapinarof Cream, Formulation E			Tapinarof Cream, Formulation A						Tapinarof Cream, Formulation F												
Method of Administration:	Dermal, semi-occluded			Dermal, occluded for 6 hours						Dermal, occluded for 6 hours												
Duration of Dosing:	7 days			28 days						13 weeks												
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma			Plasma						Plasma												
Analyte	Tapinarof			Tapinarof						Tapinarof						Tapinarof Sulfate						
Assay	LC-MS/MS			LC-MS/MS						LC-MS/MS						LC-MS/MS						
Gender (M/F)/Number of animals:	3M	3M	3M	16M	16F	16M	16F	16M	16F	6M	6F	6M	6F	6M	6F	6M	6F	6M	6F	6M	6F	
Dose (%)	1	2	4	1	1	4	4	8	8	0.5	0.5	1.5	1.5	3	3	0.5	0.5	1.5	1.5	3	3	
Dose (mg/kg/day):	10	20	40	60	60	240	240	480	480	10	10	30	30	60	60	10	10	30	30	60	60	
Pharmacokinetic Parameters																						
C_{max} (ng/mL)																						
Day 1	0.867	2.15	1.36	NR	NR	48.2	107	68.1	113	0.227	0.258	1.23	0.817	1.94	1.93	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Day 7	0.872	0.837	1.44	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
Day 28/29	NA	NA	NA	49.8	198	182	241	152	98.4	0.198	0.341	0.595	0.584	0.799	0.993	NR	NR	NR	0.0647	0.0191	NR	
Day 91	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.317	0.190	1.80	0.470	1.51	0.983	NR	NR	0.0152	0.00717	0.0474	0.0172	
AUC_{0-t} or AUC_{last} (hr*ng/mL)																						
Day 1	4.45	8.93	8.68	NR	NR	614	1020	1590	1370	1.36	2.09	9.99	8.58	19.7	22.3	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Day 7	3.74	5.37	8.44	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
Day 28/29	NA	NA	NA	194	1120	1540	2630	2410	1840	0.776	2.10	7.40	9.06	14.8	15.8	NR	NR	NR	NR	NR	NR	
Day 91	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.72	0.985	7.61	3.71	11.3	10.6	NR	NR	NR	NR	0.548	NR	

WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; SD = Sprague Dawley; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable; NR = not reportable.

2.6.5.5.3 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Rabbit

Test Article:	Tapinarof							
Study No.	20[redacted]N163809, 20[redacted]N163815							
Location in CTD:	4.2.2.2-17/4.2.3.2-10							
Species	Rabbit (NZW)							
Feeding condition:	Fed							
Vehicle/Formulation:	Tapinarof Cream, Formulation A							
Method of Administration:	Dermal once daily, occluded for 6 hours; half of animals had abraded skin							
Duration of Dosing:	28 days							
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma							
Analyte	Tapinarof							
Assay	LC-MS/MS							
Gender (M/F)/Number of animals:	4M	4F	4M	4F	4M	4F	4M	4F
Pharmacokinetic Parameters								
Dose (%)	1	1	3	3	4	4	6	6
Dose (mg/kg/day):	80	80	225	225	320	320	480	480
C_{max} (ng/mL)								
Day 1	132	47.9	238	244	NA	NA	476	324
Day 28	34.2	216	114	158	696	199	179	3500
AUC_{last} (hr*ng/mL)								
Day 1	857	437	1790	2120	NA	NA	4310	3060
Day 28	422	1890	1900	2030	9210	2360	3950	22000

NZW = New Zealand White; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable.

2.6.5.5.4 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Minipig

Test Article:	Tapinarof								
Study No.	20[redacted]N163449						20[redacted]N204716, 20[redacted]N239358		
Location in CTD:	4.2.3.2-11						4.2.3.2-12, 4.2.2.2-21		
Species:	Göttingen Minipig						Göttingen Minipig		
Feeding condition:	Fed						Fed		
Vehicle/Formulation:	Tapinarof Cream, Formulation D						Tapinarof Cream, Formulation E	Tapinarof Cream, Formulation F	Tapinarof Cream, Miglyol/Kolliwax blend
Method of Administration:	Dermal						Dermal		
Duration of Dosing:	7 days						7 days		
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma						Plasma		
Analyte:	Tapinarof						Tapinarof		
Assay:	LC-MS/MS						LC-MS/MS		
Gender (M/F)/Number of animals:	1M	1F	1M	1F	1M	1F	3M	3M	3M
Dose (%):	1		2		4		2	2	2
Dose (mg/kg/day):	20		40		80		40	40	40
Pharmacokinetic Parameters									
C_{max} (ng/mL)									
Day 1	0.130	0.869	0.286	NQ	0.337	0.124	0.436	0.333	0.585
Day 7	0.146	NQ	0.406	0.154	0.349	0.250	0.445	0.388	0.539
AUC_{0-t} (hr*ng/mL)									
Day 1	NR	NR	NR	NR	2.19	NR	2.31	1.55	2.97
Day 7	NR	NR	1.21	NR	2.67	2.20	2.34	0.953	2.61

LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NC = not calculated; NQ = not quantifiable [samples were below the limit of quantitation (0.1 ng/mL)]; NR = not reportable.

2.6.5.5.5 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Minipig, Continued

Test Article:	Tapinarof																	
Study No.	20[redacted]N163816[a]						20[redacted]N167695[b]						20[redacted]N221246					
Location in CTD:	4.2.3.2-13						4.2.3.2-14						4.2.3.2-15					
Species:	Göttingen Minipig						Göttingen Minipig						Göttingen Minipig					
Feeding condition:	Fed						Fed						Fed					
Vehicle/Formulation:	Tapinarof Cream, Formulation B						Tapinarof Cream, Formulation D						Tapinarof Cream, Formulation F					
Method of Administration:	Dermal once daily, occluded for 6 hours						Dermal once daily, semi-occluded for ~23 hours						Dermal, twice daily, approximately 10 hours apart, semi-occluded for ~20 hours per day					
Duration of Dosing:	28 days						28 days						28 days					
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma						Plasma						Plasma and Skin					
Analyte:	Tapinarof						Tapinarof						Tapinarof					
Assay:	LC-MS/MS						LC-MS/MS						LC-MS/MS					
Gender (M/F)/Number of animals:	3M	3F	3M	3F	5M	5F	3M	3F	3M	3F	3M	3F	3M	3F	3M	3F	3M	3F
Dose (%):	1.5		3		6		1		2		4		0.5		1		3	
Dose (mg/kg/day):	23		44		87		17/9		36/18		74/37		10		20		60	
Pharmacokinetic Parameters																		
C_{max} (ng/mL)																		
Day 1	NQ	0.39	NQ	NC	0.54	0.42	0.329	1.65	0.468	0.906	1.34	4.00	NA	NR	NA	NA	0.376	0.408
Day 28	1.06	1.23	3.84	2.98	6.79	3.76	0.451	0.328	0.508	1.48	1.35	4.02	NA	0.395	NA	NA	0.845	0.830
AUC_{0-t} (hr*ng/mL)																		
Day 1	NQ	0.98	NQ	NC	1.36	1.18	0.847	6.22	4.02	3.87	11.4	18.0	NA	NR	NA	NA	NR	NR
Day 28	11.1	6.38	33.6	30.8	91.8	75.6	2.18	3.98	4.06	9.54	11.5	41.0	NA	NR	NA	NA	NR	4.84
Skin Concentration (Day 29, ng/g)																		
Epidermis/Upper Epidermis	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	4830	2540	3950	2270	10000	6530
Lower Dermis	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	166	NQ	615	305	3660	3.04

a. Quantifiable samples were observed in the control group.

b. Due to dose volume reduction from 2 to 1 mL/kg, doses of 17, 36, or 74 mg/kg/day were decreased by approximately 50% to 9, 18, or 37 mg/kg/day, respectively, starting on Day 15 (males), Day 14 (females) and Day 10 (a replacement control female).

LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable; NC = not calculated; NQ = not quantifiable [samples were below the limit of quantitation (1 ng/mL for study 20[redacted]N163816, and 1.99 ng/g for skin tissue in study 20[redacted]N221246)]; NR = not reportable.

2.6.5.5.6 Absorption After Repeat Dermal Administration of Tapinarof in Minipig, Continued

Test Article:	Tapinarof																			
Study No.	20[redacted]N163817						20[redacted]N172520								20[redacted]N299302					
Location in CTD:	4.2.3.2-16						4.2.3.2-17								4.2.3.2-18					
Species:	Göttingen Minipig						Göttingen Minipig								Göttingen Minipig					
Feeding condition:	Fed						Fed								Fed					
Vehicle/Formulation:	Tapinarof Cream, Formulation C						Tapinarof Cream, Formulation E								Tapinarof Cream, Formulation F					
Method of Administration:	Dermal twice daily 6 hours apart, occluded for 6 hours						Dermal, Groups 1, 2 and 3 once daily; Groups 4 and 5 twice daily ~10 hours apart; semi-occluded for ~23 hours								Dermal, twice daily, semi-occluded for ~20 hours					
Duration of Dosing:	13 weeks						13 weeks								9 months					
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma						Plasma								Plasma and Skin					
Analyte:	Tapinarof						Tapinarof								Tapinarof					
Assay:	LC-MS/MS						LC-MS/MS								LC-MS/MS					
Gender (M/F)/Number of animals:	5M	5F	5M	5F	5M	5F	4M	4F	4M	4F	4M	4F	4M	4F	4M	4F	4M	4F	4M	4F
Dose (%):	1		2		4		0.1		1		2		4		0.5		1		3	
Dose (mg/kg/day):	18-28		36-56		72-94		0.9		9.7		38.4		76.2		10		20		60	
Pharmacokinetic Parameters																				
C_{max} (ng/mL)																				
Day 1	0.29	0.29	0.81	0.60	1.31	1.22	NQ	NQ	0.355	0.405	0.936	1.76	0.982	0.631	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 28/Week 4	1.25	1.32	4.14	2.42	14.4	18.3	NQ	NQ	0.237	0.489	0.935	3.26	1.59	15.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.130	0.0995	0.262	0.477	0.582	0.386
Day 91/Week 13	0.80	2.24	2.11	1.68	7.77	6.48	0.194	0.538	0.327	1.16	2.87	2.05	6.48	7.79	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.0976	0.116	0.911	0.137	0.366	0.366
Week 39	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.106	0.182	0.224	0.267	0.455	0.964
AUC_{0-t} (hr*ng/mL)																				
Day 1	3.32	3.36	10.5	8.20	20.7	21.6	NR	NR	0.526	0.723	4.13	11.7	6.42	6.90	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 28/Week 4	21.3	25.1	53.4	38.3	217	196	NR	NR	0.499	2.39	4.11	17.5	11.7	35.9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.01	0.328	2.61	2.27	6.80	4.65
Day 91/Week 13	12.7	16.8	22.8	16.8	101	96.8	0.213	3.84	2.03	4.40	17.9	18.8	34.4	37.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Week 26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.558	1.26	5.70	1.43	4.44	3.78

Week 39	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	0.436	1.21	1.65	1.84	4.65	5.61
Skin Concentration (ng/g)																				
Terminal: Epidermis/Upper Dermis	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10000	14500	57200	54400	110000	44300
Lower Dermis	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	110	516	667	874	367	362
Off-dose: Epidermis/Upper Dermis	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	84700	99500
Lower Dermis	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	215	154

LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable; NQ = not quantifiable [samples were below the limit of quantitation (0.1 ng/mL)]; NR = not reportable.

2.6.5.5.7 Absorption After Repeat Subcutaneous Administration of Tapinarof in Rat

Test Article:	Tapinarof															
Study No.	20[redacted]N315793			20[redacted]N163819						20[redacted]N160460					
Location in CTD:	4.2.2.2-28			4.2.3.2-20						4.2.3.2-19					
Species:	Rat (WH)			Rat (SD)						Rat (WH)					
Feeding condition:	Fed			Fed						Fed					
Vehicle/Formulation:	Captisol®			Propylene glycol						Polyethylene glycol					
Method of Administration:	Subcutaneous injection			Subcutaneous injection						Subcutaneous injection					
Duration of Dosing:	4 days			7 days						7 days					
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma			Plasma						Plasma					
Analyte:	Tapinarof			Tapinarof						Tapinarof					
Assay:	LC-MS/MS			LC-MS/MS						LC-MS/MS					
Gender (M/F)/Number of animals:	6M	6M	6M	6M	6F	6M	6F	6M	6F	3M	3F	3M	3F	3M	3F
Dose (mg/kg/day):	1	6	20	200		500		1000		3		10		30	
Pharmacokinetic Parameters															
C_{max} (ng/mL)															
Day 1	24.4	138	429	375	442	556	583	659	643	92.9	39.7	111	141	204	234
Day 7	NA	NA	NA	551	642	944	1110	832	980	134	58.7	162	187	182	206
AUC_{0-t} (hr*ng/mL)															
Day 1	NR	NR	NR	2080	2520	3190	3580	3820	4010	349	161	758	841	2090	1930
Day 7	NA	NA	NA	2010	2210	3380	2920	2970	3610	295	140	780	677	1830	1490

WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; SD = Sprague-Dawley; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable; NR = not reportable.

2.6.5.5.8 Absorption After Repeat Subcutaneous Administration of Tapinarof in Rat, Continued

Test Article:	Tapinarof												
Study No.	20[redacted]N164986[a]	20[redacted]N163820						20[redacted]N254469					
Location in CTD:	4.2.3.2-21	4.2.3.2-23						4.2.3.2-24					
Species:	Rat (WH)	Rat (SD)						Rat (WH)					
Feeding condition:	Fed	Fed						Fed					
Vehicle/Formulation:	Captisol®	Propylene glycol						Captisol®					
Method of Administration:	Subcutaneous injection	Subcutaneous injection						Subcutaneous injection					
Duration of Dosing:	7 days	13 weeks						26 weeks					
Sample (eg, whole blood, plasma, serum):	Plasma	Plasma						Plasma					
Analyte:	Tapinarof	Tapinarof						Tapinarof					
Assay:	LC-MS/MS	LC-MS/MS						LC-MS/MS					
Gender (M/F)/Number of animals:	3M	9M	9F	9M	9F	9M	9F	6M	6F	6M	6F	6M	6F
Dose (mg/kg/day):	30	3		10		40		1		6		30	
Pharmacokinetic Parameters													
C_{max} (ng/mL)													
Day 1	1020	73.8	65.4	214	146	226	382	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 7	981	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 14	NA	49.3	25.7	117	116	190	149	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 91/Week 13	NA	30.6	32.7	71.4	83.6	296	264	61.2	38.9	267	297	876	1660
Week 26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	37.2	38.0	389	229	1270	1510
AUC_{0-t} (hr*ng/mL)													
Day 1	3770	190	184	550	642	1610	2450	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 7	2390	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 14	NA	93.2	95.5	345	375	1810	1560	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Day 91/Week 13	NA	104	94.4	335	300	2450	2210	67.5	48.6	562	414	3300	2510
Week 26	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	66.0	60.0	677	401	3830	2730

a. Additional vehicles were also assessed. On Days 1 and 7, approximately 2- to 4-fold more tapinarof was absorbed systemically using the Captisol® vehicle compared to the corn oil, olive oil, or peanut oil vehicle.

SD = Sprague-Dawley; WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable.

2.6.5.5.9 Absorption After Repeat Subcutaneous Administration of Tapinarof in Rat, Continued

Test Article:	Tapinarof					
Study No.	DMVT-505-9002					
Location in CTD:	4.2.3.4.1-2					
Species:	Rat (WH)					
Feeding condition:	Fed					
Vehicle/Formulation:	30% Captisol® changed to 10% Captisol® on Day 372					
Method of Administration:	Subcutaneous injection					
Duration of Dosing:	2 years					
Sample (e.g., whole blood, plasma, serum):	Plasma					
Analyte:	Tapinarof					
Assay:	LC-MS/MS					
Gender (M/F)/Number of animals:	9M	9F	9M	9F	9M	9F
Dose (mg/kg/day):	0.1		0.3		1	
Pharmacokinetic Parameters						
C_{max} (ng/mL)						
Day 28	2.98	2.08	10.1	8.05	31.9	30.4
Day 28 – 10% Captisol®	NA	2.11	NA	6.70	NA	35.6
Day 182	3.13	3.19	9.56	11.5	37.7	39.7
AUC_{0-t} (hr*ng/mL)						
Day 28	3.83	2.52	14.0	9.46	49.3	39.8
Day 28 – 10% Captisol®	NA	NC	NA	6.97	NA	37.4
Day 182	4.38	3.90	21.0	18.9	73.1	63.9

WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA = not applicable; NC = not calculated.

2.6.5.6 Pharmacokinetics: Organ Distribution

2.6.5.6.1 Quantitative Whole Body Autoradiography Tissue Distribution Study in Rat after Single Subcutaneous Dosing

Test Article: Tapinarof	**Study No.** 20[redacted]N243602	**Location in CTD:** 4.2.2.3-4
Species: Lister-Hooded rat		
Feeding condition: Fed		
Radionuclide: [^{14}C]-tapinarof		
Specific Activity: 4.06 MBq/mg		
Gender (M/F)/Number of animals: 1 male per time point		
Vehicle/Formulation: 30% w/v Captisol®		
Method of Administration: Subcutaneous injection		
Dose (mg/kg): 2.12 to 2.15 mg/kg (nominal 2 mg/kg)		
Sampling Time: 1, 3, 6 hours, 1, 3, 10, and 35 days post-dose		

		Concentration (µg equivalents/g)						
Concentrations of Radioactivity	**Tissues/organs**	**1 hr**	**3 hr**	**6 hr**	**Day 1**	**Day 3**	**Day 10**	**Day 35**
Circulatory	Aorta	1.23	0.694	0.342	0.098	0.022	0.007	BQL
	Whole blood (venous)[a]	0.495	0.329	0.236	0.064	0.021	0.007	BQL
	Plasma[b]	0.603	0.470	0.356	0.079	0.016	BQL	BQL
	Whole-blood (cardiac)	1.08	0.658	0.396	0.098	0.030	0.009	BQL
	Vena cava wall	1.08	0.563	0.216	0.093	0.027	0.007	BQL
Nervous	Brain	0.348	0.127	0.031	0.010	0.009	0.004	BQL
	Spinal cord	0.435	0.133	0.024	0.013	0.008	0.006	BQL
Ocular	Uveal tract/retina	0.336	0.224	0.070	0.074	0.047	0.032	0.021
	Eye (lens)	0.129	0.013	0.005	0.012	0.009	BQL	BQL
Visceral organs	Kidney cortex	1.51	1.47	1.02	0.501	0.187	0.036	BQL
	Kidney inner medulla	0.657	0.383	0.318	0.077	0.030	0.004	BQL
	Kidney outer medulla	1.28	1.41	1.06	0.602	0.236	0.040	BQL
	Liver	2.75	2.48	1.64	0.529	0.276	0.028	BQL
	Lungs	0.626	0.422	0.311	0.171	0.036	0.009	BQL
	Heart (myocardium)	0.585	0.312	0.157	0.058	0.017	0.006	BQL
	Spleen	0.539	0.288	0.251	0.135	0.113	0.016	BQL
Glandular/secretory	Adrenal cortex	3.78	4.01	1.69	1.31	0.727	0.120	0.031
	Adrenal medulla	NS	3.18	0.716	0.270	0.153	0.047	0.006

Concentration (μg equivalents/g)								
	Exorbital lacrimal gland	0.740	0.330	0.140	0.024	0.020	0.005	BQL
	Harderian gland	1.19	0.871	0.282	0.131	0.058	0.016	BQL
	Intra-orbital lacrimal gland	0.735	0.345	0.239	0.056	0.014	0.008	BQL
	Mandibular lymph node	0.457	0.312	0.115	0.066	0.014	0.009	BQL
	Mesenteric lymph nodes	0.293	0.567	0.403	0.049	0.019	BQL	BQL
	Nasal mucosa	0.638	0.542	0.281	0.103	0.061	0.021	BQL
	Pancreas	0.684	0.348	0.139	0.029	0.018	0.005	BQL
	Pineal gland	0.887	NS	0.120	0.044	0.044	0.010	BQL
	Pituitary	0.549	0.287	0.106	0.042	0.049	0.015	BQL
	Salivary gland	0.424	0.407	0.153	0.046	0.018	0.006	BQL
	Thymus	0.346	0.232	0.105	0.047	0.032	0.006	BQL
	Thyroid	0.907	0.500	0.316	0.161	0.081	0.025	BQL
Reproductive	Epididymis	0.470	0.376	0.366	0.049	0.017	0.008	BQL
	Preputial gland	0.147	0.452	0.177	0.076	NS	BQL	BQL
	Prostate	0.564	1.32	0.325	0.103	0.019	BQL	BQL
	Seminal vesicles	0.434	0.159	0.062	0.027	0.012	BQL	BQL
	Testis	0.445	0.557	0.118	0.045	0.030	0.008	BQL
Musculoskeletal	Bone marrow	0.450	0.250	0.131	0.083	0.031	0.008	BQL
	Bone surface[c]	0.263	0.648	0.082	0.033	0.051	BQL	BQL
	Fat (abdominal)[c]	0.294	0.769	0.720	0.085	0.009	BQL	BQL
	Fat (brown)	2.27	0.669	0.154	0.044	0.031	BQL	BQL
	Muscle (skeletal)	0.278	0.165	0.057	0.021	0.011	BQL	BQL
	Skin dark fur	0.266	0.330	0.098	0.042	0.032	0.014	0.078
	Skin little fur	0.127	0.245	0.173	0.062	0.026	0.008	BQL
	Skin white fur	0.291	0.409	0.102	0.078	0.028	0.010	0.008
	Tongue	0.732	0.322	0.107	0.040	0.023	0.007	BQL
	Dose site	61.6[d]	36.1[d]	8.44	0.189	0.061	0.012	BQL
Excretory	Caecum wall	0.466	1.39	2.50	0.131	0.031	0.005	BQL
	Large intestine wall	0.201	0.241	0.185	0.100	0.041	BQL	BQL
	Stomach wall	0.336	0.357	0.110	0.047	0.023	0.005	BQL
	Small intestine wall	2.97	2.17	0.224	0.105	0.063	BQL	BQL
	Urinary bladder wall	4.66	1.79	0.327	0.299	0.060	BQL	BQL

Whole Blood Radioactivity Concentration Ratio								
Circulatory	Aorta	2.5	2.1	1.4	1.5	1.1	1.0	BQL
	Plasma	1.2	1.4	1.5	1.2	0.76	BQL	BQL
	Whole-blood (cardiac)	2.2	2.0	1.7	1.5	1.4	1.3	BQL
	Vena cava wall	2.2	1.7	0.92	1.5	1.3	1.0	BQL
Nervous	Brain	0.70	0.39	0.13	0.16	0.43	0.57	BQL
	Spinal cord	0.88	0.40	0.10	0.20	0.38	0.86	BQL
Ocular	Uveal tract/retina	0.68	0.68	0.30	1.2	2.2	4.6	NC
	Eye (lens)	0.26	0.04	0.02	0.19	0.43	BQL	BQL
Visceral organs	Kidney cortex	3.1	4.5	4.3	7.8	8.9	5.1	BQL
	Kidney inner medulla	1.3	1.2	1.3	1.2	1.4	0.57	BQL
	Kidney outer medulla	2.6	4.3	4.5	9.4	11	5.7	BQL
	Liver	5.6	7.5	6.9	8.3	13	4.0	BQL
	Lungs	1.3	1.3	1.3	2.7	1.7	1.3	BQL
	Heart (myocardium)	1.2	0.95	0.67	0.91	0.81	0.86	BQL
	Spleen	1.1	0.88	1.1	2.1	5.4	2.3	BQL
Glandular/secretory	Adrenal cortex	7.6	12	7.2	20	35	17	NC
	Adrenal medulla	NS	9.7	3.0	4.2	7.3	6.7	NC
	Exorbital lacrimal gland	1.5	1.0	0.59	0.38	0.95	0.71	BQL
	Harderian gland	2.4	2.6	1.2	2.0	2.8	2.3	BQL
	Intra-orbital lacrimal gland	1.5	1.0	1.0	0.88	0.67	1.1	BQL
	Mandibular lymph node	0.92	0.95	0.49	1.0	0.67	1.3	BQL
	Mesenteric lymph nodes	0.59	1.7	1.7	0.77	0.90	BQL	BQL
	Nasal mucosa	1.3	1.6	1.2	1.6	2.9	3.0	BQL
	Pancreas	1.4	1.1	0.59	0.45	0.86	0.71	BQL
	Pineal gland	1.8	NS	0.51	0.69	2.1	1.4	BQL
	Pituitary	1.1	0.87	0.45	0.66	2.3	2.1	BQL
	Salivary gland	0.86	1.2	0.65	0.72	0.86	0.86	BQL
	Thymus	0.70	0.71	0.44	0.73	1.5	0.86	BQL
	Thyroid	1.8	1.5	1.3	2.5	3.9	3.6	BQL
Reproductive	Epididymis	0.95	1.1	1.6	0.77	0.81	1.1	BQL
	Preputial gland	0.30	1.4	0.75	1.2	NS	BQL	BQL
	Prostate	1.1	4.0	1.4	1.6	0.90	BQL	BQL
	Seminal vesicles	0.88	0.48	0.26	0.42	0.57	BQL	BQL
	Testis	0.90	1.7	0.50	0.70	1.4	1.1	BQL

Whole Blood Radioactivity Concentration Ratio								
Musculoskeletal	Bone marrow	0.91	0.76	0.56	1.3	1.5	1.1	BQL
	Bone surface	0.53	2.0	0.35	0.52	2.4	BQL	BQL
	Fat (abdominal)	0.59	2.3	3.1	1.3	0.43	BQL	BQL
	Fat (brown)	4.6	2.0	0.65	0.69	1.5	BQL	BQL
	Muscle (skeletal)	0.56	0.50	0.24	0.33	0.52	BQL	BQL
	Skin dark fur	0.54	1.0	0.42	0.66	1.5	2.0	NC
	Skin little fur	0.26	0.74	0.73	0.97	1.2	1.1	BQL
	Skin white fur	0.59	1.2	0.43	1.2	1.3	1.4	NC
	Tongue	1.5	0.98	0.45	0.63	1.1	1.0	BQL
	Dose site	120	110	36	3.0	2.9	1.7	BQL
Excretory	Caecum wall	0.94	4.2	11	2.0	1.5	0.71	BQL
	Large intestine wall	0.41	0.73	0.78	1.6	2.0	BQL	BQL
	Stomach wall	0.68	1.1	0.47	0.73	1.1	0.71	BQL
	Small intestine wall	6.0	6.6	0.95	1.6	3.0	BQL	BQL
	Urinary bladder wall	9.4	5.4	1.4	4.7	2.9	BQL	BQL

a. Determined by sample oxidation and liquid scintillation analysis.
b. Determined by direct liquid scintillation analysis.
c. Tissue corrected for quenching.
d. Above the upper limit of quantification.
BQL = below the lower limit of quantitation of 0.004 µg/g; NC = not calculable; NS: tissue not sectioned.

2.6.5.7 Pharmacokinetics: Plasma Protein Binding

Study System: *In vitro*			**Test Article:** Tapinarof	
Target entity, Test System and Method: **Plasma:** Equilibrium dialysis (Rapid Equilibrium Dialysis devices) with tapinarof incubated for 6 hours at 37°C and quantitated by LC-MS/MS. The positive control [^{14}C] warfarin was incubated for 5 hours at 37°C and quantitated by HPLC with radiochemical detection. **Skin:** Equilibrium dialysis with tapinarof incubated for 4 hours, with analysis by UPLC-MS/MS.				
Test System	**Conc. Tested (ng/mL)**	**% Bound**	**Study No.**	**Location in CTD**
Tapinarof: Pooled Male Rat Plasma	20, 50, 100, 500, 1000	99.1 to 99.3 (n=4)	20[redacted]N176703	4.2.2.3-1
Tapinarof: Pooled Male Minipig Plasma	20, 50, 100, 500, 1000	99.1 to 99.2 (n=4)		
Tapinarof: Pooled Male Human Plasma	20, 50, 100, 500, 1000	99.1 to 99.4 (n=4)		
Warfarin: Pooled Male Human Plasma	2000	98.5 (n=3)		
Tapinarof: Pooled Male Mouse Plasma	20, 50, 100, 500, 1000	99.5 to 99.6 (n=4)	20[redacted]N233123	4.2.2.3-2
Tapinarof: Pooled Female Rabbit Plasma	20, 50, 100, 500, 1000	99.4 (n=4)		
Warfarin: Pooled Female Rabbit Plasma	4000	96.5 (n=4)		
Additional Information: There was no apparent concentration dependence in all species tested over the concentration range.				
Tapinarof: Minipig Skin Homogenate	300, 1500, 3000	84.6 to 95.6 (n=9)	20[redacted]N242613	4.2.2.3-3
Tapinarof: Human Skin Homogenate	300, 1500, 3000	91.9 to 93.8 (n=9)		
Tapinarof: Human Plasma	300, 1500, 3000	99.1 to 99.4 (n=9)		
Additional Information: Skin protein binding appeared to be slightly concentration dependent at high concentrations. There was no apparent concentration dependence in all species tested over the concentration range.				

LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry; HPLC = high performance liquid chromatography; UPLC-MS/MS = ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

2.6.5.8 Pharmacokinetics: Study in Pregnant or Nursing Animals

2.6.5.8.1 Subcutaneous Embryo-Fetal Development Study in Female Rabbits

Test Article: Tapinarof			**Study No.:** 20[redacted]N189059		**Location in CTD:** 4.2.3.5.2-3
Report Title:	Subcutaneous Embryo-Fetal Development Study in Female Rabbits				
Design similar to ICH 4.1.3?	Yes	**Duration of Dosing:**	Days 7 to 19 pc	**Test Article (Batch No.):**	Tapinarof ([redacted])
Species/ Strain:	New Zealand White rabbit	**Day of Mating:**	Day 0 pc	**Report No.**	20[redacted]N189059
Initial Age:	~5.5 months	**Day of C-Section:**	Day 29 pc	**Location in CTD:**	4.2.3.5.2-3
Date of First Dose:	[redacted]-[redacted]-20[redacted]	**Method of Administration:**	Subcutaneous injection	**GLP Compliance:**	Yes
Special Features:	TK	**Vehicle/Formulation:**	30% Captisol®/ Solution		
No Observed Adverse Effect Level:	F_1 Litters: 1 mg/kg/day				

Daily Dose (mg/kg/day):	**0 (Control)**	**0.3**	**1**	**3**
Toxicokinetics: AUC_{0-t} (h.ng/mL)	-	16.5	128	239

pc = postcoitum

2.6.5.8.2 Subcutaneous Infusion Embryo-Fetal Development Study in Rabbits

Test Article: Tapinarof			**Study No.:** 20[redacted]N244027		**Location in CTD:** 4.2.3.5.2-4
Report Title:	Subcutaneous Infusion Embryo-Fetal Development Study in Rabbits				
Design similar to ICH 4.1.3?	Yes	**Duration of Dosing:**	GD 7 to 19	**Test Article (Batch No.):**	Tapinarof ([redacted])
Species/ Strain:	New Zealand White rabbit	**Day of Mating:**	GD 0	**Report No.**	20[redacted]N244027
Initial Age:	5 to 6 months	**Day of C-Section:**	GD 29	**Location in CTD:**	4.2.3.5.2-4
Date of First Dose:	[redacted]-[redacted]-20[redacted]	**Method of Administration:**	Subcutaneous Infusion (24 h daily)	**GLP Compliance:**	Yes
Special Features:	None	**Vehicle/Formulation:**	30% Captisol®/ Solution		
No Observed Adverse Effect Level:		F_1 Litters: 3 mg/kg/day			

Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**2**	**3**
Toxicokinetics: $AUC_{0\text{-}24}$ (ng.h/ml)	-	26.2	63.8	159
Toxicokinetics: C_{avg} (ng/mL)	-	1.09	2.66	6.64

GD = gestational day.

2.6.5.8.3 Subcutaneous Pre- and Post-Natal Development Study in Rats

Test Article: Tapinarof			**Study No.:** 20[redacted]N368233		**Location in CTD:** 4.2.3.5.3-1
Report Title:	Subcutaneous Pre- and Post-Natal Development Study in Rats				
Design similar to ICH 4.1.2	Yes	**Duration of Dosing:**	GD 6 to LD 20	**Test Article (Batch No.):**	Tapinarof ([redacted])
Species/ Strain:	Rat (WH)	**Day of Mating:**	GD 0	**Report No.**	20[redacted]N368233
Initial Age:	69 to 75 days	**Method of Administration:**	Subcutaneous injection	**Location in CTD:**	4.2.3.5.3-1
Date of First Dose:	[redacted]-[redacted]-20[redacted]	**Vehicle/Formulation:**	30% Captisol®/ Solution	**GLP Compliance:**	Yes
Special Features:	TK on PND 10 (F_1 pups)	**Litters Culled/Not Culled:**	Not culled		
No Observed Adverse Effect Level:		F_1 Males and Females: 1 mg/kg/day			

Daily Dose (mg/kg/day)	**0 (Control)**	**1**	**6**	**30**
F_1 Litters: (Preweaning)				
Plasma Concentrations (ng/mL, range)	-	-	0.326 to 0.506	0.301 to 0.985

Additional Information: Tapinarof was deemed to be present in rat maternal milk due to the presence of tapinarof in plasma samples collected from F_1 animals

GD = gestational day; LD = lactation day; PND = postnatal day; WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)].

2.6.5.9 Pharmacokinetics: Other Distribution Studies

2.6.5.10 Pharmacokinetics: Metabolism *In Vivo*

Test Article:				Tapinarof												
Gender (M/F)/Number of animals:				Male												
Vehicle/Formulation:				Captisol®												
Method of Administration:				Subcutaneous injection												
Dose (mg/kg):				2												
Radionuclide:				^{14}C												
Specific Activity:				3.7 MBq/mg												
Species	**Sample**	**Sampling Time or Period**	**Dose (%)**	**% Sample Radioactivity (ng equivalents/g)**											**Study Number**	**Location in CTD**
				Parent	**M1**	**M2**	**M14**	**M3**	**M13**	**M4**	**M5**	**M12**	**M8**	**M9**		
CD-1 Mouse	Plasma	1 hr	NA	6.5	35.1	34.3	12.7	ND	NA	NA	NA	NA	ND	1.2	20[redacted]N375928	4.2.2.4-7
	Plasma	4 hr	NA	ND	34.7	34.2	6.3	ND	NA	NA	NA	NA	6.9	6.6		
	Plasma	8 hr	NA	ND	27.1	24.7	ND	ND	NA	NA	NA	NA	7.3	11.5		
	Liver	1 hr	NA	4.4	16.3	70.6	BQL	BQL	NA	NA	NA	NA	ND	ND		
	Liver	4 hr	NA	BQL	22.5	64.1	BQL	BQL	NA	NA	NA	NA	1.3	2.7		
	Liver	8 hr	NA	1.4	21.8	50.9	BQL	2.1	NA	NA	NA	NA	3.7	7.5		
Rat (WH)	Plasma	1 hr	NA	17.2	8.9	25.8	NA	3.3		2.0	7.6	BQL	NA	NA	20[redacted]N375949	4.2.2.4-8
	Plasma	2 hr	NA	2.5	10.1	23.0	NA	2.9		BQL	1.1	BQL	NA	NA		
	Plasma	6 hr	NA	1.3	13.6	12.6	NA	1.3	ND	BQL	1.0	ND	NA	NA		
	Liver	1 hr	NA	4.4	15.1	16.2	NA	30.9	ND	9.5	7.9	1.4	NA	NA		
	Liver	2 hr	NA	2.0	13.9	10.8	NA	40.4	ND	10.3	5.1	BQL	NA	NA		
	Liver	6 hr	NA	BQL	10.0	7.5	NA	23.5	ND	6.5	2.5	BQL	NA	NA		
Human[a]	Plasma	Day 1	1	✓	NA	NA	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA	20[redacted]N284870	5.3.3.2-1
	Plasma	Day 21	1	ND	NA	NA	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA		
	Plasma	Day 1	2	✓	NA	NA	NA	NA	NA	ND	NA	NA	NA	NA		
	Plasma	Day 21	2	ND	NA	NA	NA	NA	NA	✓	NA	NA	NA	NA		
	Urine	Day 1	1	✓	✓	✓	NA	✓	NA	ND	ND	NA	NA	NA		
	Urine	Day 21	1	✓	✓	ND	NA	✓	NA	✓	ND	NA	NA	NA		
	Urine	Day 1	2	ND	✓	✓	NA	✓	NA	✓	ND	NA	NA	NA		
	Urine	Day 21	2	✓	✓	✓	NA	✓	NA	✓	✓	NA	NA	NA		
	Skin	Day 1	1	✓	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
	Skin	Day 21	1	✓	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		
	Skin	Day 1	2	✓	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		

	Skin	Day 21	2	✓	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA		

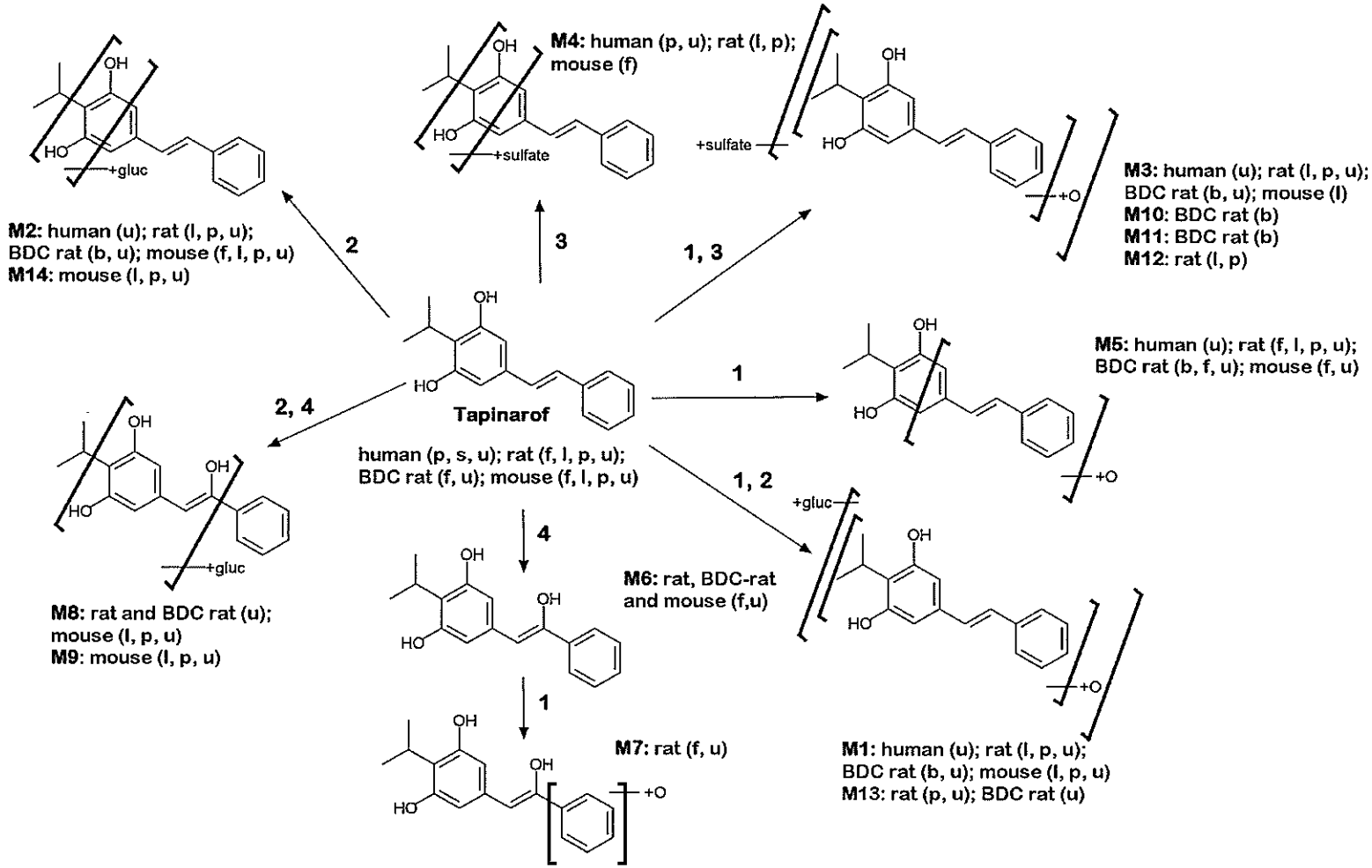
a. [redacted] (quinone) was also observed in urine and skin samples.
WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; ✓ = detected; NA = not applicable; ND = not detected; BQL = below the limit of quantitation (1% of chromatogram for assigned peaks, 5% of chromatogram for unassigned peaks).

2.6.5.11 Pharmacokinetics: Metabolism *In Vitro*

Species/Strain:	**Cryopreserved mouse, rat, rabbit, minipig, and pooled human hepatocytes**								
Radionucleotide:	^{14}C								
Species	**Concentration (µmol/L)**	**Time**	**Parent**	**M1**	**M2**	**M3**	**M4**	**Study Number**	**Location in CTD**
Rat	10	3 hr	✓	✓	✓	✓	✓	20[redacted]N163811	4.2.2.4-3
Rabbit	10	3 hr	✓	✓	✓	✓	✓		
Minipig	10	3 hr	✓	✓	✓	ND	ND		
Human	10	3 hr	✓	✓	✓	✓	✓		
Mouse	10	4 hr	✓	✓	✓	NA	NA	20[redacted]N212859	4.2.2.4-1
Rat	10	4 hr	✓	✓	✓	✓	✓		
Rabbit	10	4 hr	✓	✓	✓	✓	NA		
Minipig	10	4 hr	✓	✓	✓	✓	NA		
Human	10	4 hr	✓	✓	✓	✓	✓		
Mouse	0.1, 1, 10	4 hr	NA	ND	✓	✓	NA	20[redacted]N353927	4.2.2.4-2
Rat	0.1, 1, 10	4 hr	NA	ND	✓	✓	✓		
Human	0.1, 1, 10	4 hr	NA	ND	✓	✓	✓		
Additional Information: All metabolites of tapinarof observed in human hepatocyte incubations were observed in at least one of the nonclinical species									

NA = no associated significant radio-peak; ✓ = detected; ND = not detected.

2.6.5.12 Pharmacokinetics: Postulated Metabolic Pathways



Proposed biotransformation pathways of tapinarof in mice and rats (following subcutaneous administration) and in humans (dermal administration). The numbers designate the biotransformation reaction (1= oxidation; 2=glucuronidation; 3= sulfation; 4=hydration) and the letters where the parent/metabolites were identified (b=bile; f=feces; l=liver; p=plasma; s=skin; u=urine).

2.6.5.13 Pharmacokinetics: Induction/Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes

2.6.5.13.1 An *In Vitro* Investigation into the Human Oxidative Enzymology of [^{14}C]-GSK2894512

Test Article: Tapinarof	**Study No.:** 20[redacted]N216849	**Location in CTD:** 4.2.2.4-4

Study System: Human liver microsomes, and recombinant human CYP enzymes (Supersomes™)

Method: 5 µmol/L [^{14}C]-tapinarof was incubated with 0.1, 0.5 or 1 mg/mL human liver microsomes (HLM) or 25, 50 or 100 pmol/mL of expressed CYP enzymes. 1 µmol/L [^{14}C]-tapinarof was incubated with 0.5 mg/mL HLM or 1 mg/mL human skin microsomes. Incubations were conducted at 37°C in the presence of a nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) regenerating system for 0 to 120 minutes and the reactions were terminated by adding half a volume of acetonitrile to the incubation volume. In addition, control incubations were also performed in the absence of an NADPH regenerating system, protein, or test compound.

Radionucleotide: ^{14}C

Specific Activity: 106 µCi/mg

Analysis: Radio-HPLC

Percent CYP Contribution Based on Disappearance of Parent

CYP	$t_{1/2}$ (min)	CL_{int} (µL/min/pmol CYP)	Scaled CL_{int} (µL/min/mg protein)	Percent Contribution to Hepatic Metabolism[a]
1A1[b]	18	1.6	NC	NC
1A2	5.0	2.8	20	59
1B1[b]	80	NC	NC	NC
2A6	NC	NC	NC	NC
2B6	NC	NC	NC	NC
2C8	NC	NC	NC	NC
2C9	578	0.01	0.15	0.43
2C19	87	0.08	0.21	0.62
2D6	48	0.15	0.15	0.44
2E1[c]	NC	NC	NC	NC
3A4	35	0.40	14	40
3A5[c]	NC	NC	NC	NC
HLM	83	NC	17	NC
HLM[d]	21	NC	60	NC

a. Values represent the normalized (scaled) rates of total parent depletion (expressed as a percentage) of individual CYPs with respect to the total normalized metabolite rates.
b. Non-hepatic CYP enzymes and therefore scaled values were not calculated.
c. no CLint Inter System Extrapolation factor (ISEF) values available and therefore scaled values were not calculated.
d. Incubations performed with 1 µmol/L [^{14}C]-tapinarof.
CL_{int} = intrinsic clearance; NC = not calculated.

2.6.5.13.2 Determination of the Human Uridine Glucuronosyl Transferase (*UGT*) Isoforms Involved in the Metabolism of GSK2894512

Test Article: Tapinarof	**Study No.:** 20[redacted]N311114	**Location in CTD:** 4.2.2.4-5
Study System: cDNA-expressed human UGT enzymes (Supersomes™)		
Method: Reaction mixtures (600 µL) in duplicate contained 2 mmol/L UDPGA, and 8 mmol/L magnesium chloride, 0.025 mg/ml alamethicin, 0.5 mg of each cDNA-expressed isoform and tapinarof at two concentrations (1.0 µmol/L and 5.0 µmol/L) in 0.05 mol/L Tris buffer (pH 7.5). The incubations were conducted for 0 and 10 minutes. The reaction was stopped by transferring 0.2 mL aliquot to 0.1 mL acetonitrile containing tapinarof-[D_7]. Negative control incubations with control enzymes included incubations without substrate, UDPGA or enzyme source.		
Analysis: LC-MS/MS		
Percent Tapinarof Remaining in Incubations with cDNA expressed Enzymes		

UGT Isoform	Tapinarof Concentration (µmol/L)	Average % Remaining
1A1	1.0	94
	5.0	93
1A3	1.0	100
	5.0	95
1A4	1.0	100
	5.0	98
1A6	1.0	98
	5.0	97
1A7	1.0	91
	5.0	95
1A8	1.0	99
	5.0	96
1A9	1.0	1.2
	5.0	2.4
1A10	1.0	98
	5.0	95
2B4	1.0	96
	5.0	91
2B7	1.0	101
	5.0	99
2B15	1.0	99
	5.0	99
2B17	1.0	100
	5.0	98

UGT Isoform	Tapinarof Concentration (µmol/L)	Average % Remaining
Control Supersomes™	1.0	97
	5.0	96
Control Supersomes™ minus UDPGA	1.0	97
	5.0	98
Control Supersomes™	0	-
Control Supersomes™ with no protein	1.0	100
	5.0	97

UDPGA = uridine 5'-diphosphoglucuronic acid; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

2.6.5.13.3 Determination of the Human Sulfotransferase (SULT) Isoforms Involved in the Metabolism of GSK2894512

Test Article: Tapinarof	**Study No.:** 20[redacted]N324065	**Location in CTD:** 4.2.2.4-6
Study System: Corning® UltraPool Human liver cytosol 150, cDNA-expressed human SULT enzymes and control enzyme from Cypex		
Method: Reaction mixtures (200 µl) in duplicate contained 5 mmol/L magnesium chloride, 10 mmol/L dithiothreitol, 1 mg/mL SULT (SULT1A1, 1A3, 1B1, 1E1 or 2A1), 20 µmol/L PAPS and GSK2894512 at two final concentrations (1.0 µmol/L and 5.0 µmol/L) in 0.05 mol/L potassium phosphate buffer (pH 7.5). The incubations were conducted for 0 and 60 minutes, based on the results obtained from Part 1. The reaction was stopped by adding 0.1 mL acetonitrile containing GSK2894512-[D7]. Negative control incubations with control enzymes included incubations without substrate, PAPS or enzyme source.		
Analysis: LC-MS/MS		
Percent Tapinarof Remaining in Incubations with cDNA expressed SULT Enzymes at 1 mg/mL		

SULT Isoform	Tapinarof Concentration (µmol/L)	Incubation Time (min)	Average % Remaining
1A1	1.0	0	NA
		60	16
	5.0	0	NA
		60	24
1A3	1.0	0	NA
		60	34
	5.0	0	NA
		60	44
1B1	1.0	0	NA
		60	91
	5.0	0	NA
		60	89
1E1	1.0	0	NA
		60	4.5
	5.0	0	NA
		60	24
2A1	1.0	0	NA
		60	110
	5.0	0	NA
		60	102
SULT Control	0	0	NA
		60	NA
	1.0	0	NA
		60	93

SULT Isoform	Tapinarof Concentration (µmol/L)	Incubation Time (min)	Average % Remaining
	5.0	0	NA
		60	103
SULT Control minus PAPS	1.0	0	NA
		60	96
	5.0	0	NA
		60	103
Minus protein	1.0	0	NA
		60	94
	5.0	0	NA
		60	97

NA = not applicable; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

2.6.5.14 Pharmacokinetics: Excretion

Test Article: Tapinarof																				
Study Number	20[redacted]N243607				20[redacted]N389035				20[redacted]N243603				20[redacted]N389055				20[redacted]N389316			
Location in CTD	4.2.2.5-1				4.2.2.5-2				4.2.2.5-3				4.2.2.5-4				4.2.2.5-5			
Species:	CD-1 Mouse				CD-1 Mouse				Rat (WH)				Rat (WH)				Göttingen Minipig			
Gender (M/F)/ Number of Animals:	33M				30M				22M				21M				3M			
Feeding Condition:	Fed				Fed				Fed				Fed				Fed			
Vehicle/ Formulation:	Captisol®				Captisol®				Captisol®				Captisol®				Tapinarof Cream, Formulation F			
Method of Administration:	Subcutaneous injection				Subcutaneous injection				Subcutaneous injection				Subcutaneous injection				Dermal			
Dose (mg/kg):	2				2				2				2				10			
Analyte:	Tapinarof				Tapinarof				Tapinarof				Tapinarof				Tapinarof			
Assay:	Liquid scintillation analysis				Liquid scintillation analysis				Liquid scintillation analysis				Liquid scintillation analysis				Liquid scintillation analysis			
Excretion Route:	**U**	**F**	**CW**	**Total[a]**	**U**	**F**	**CW**	**Total[b]**	**U**	**F**	**CW**	**Total[c]**	**U**	**F**	**CW**	**Total[d]**	**U**	**F**	**CW**	**Total[e]**
Time (hr)	**Percent of administered radioactivity**																			
Predose	BQL	BQL	NA	91.5	NA	NA	NA	92.2	BQL	BQL	NA	96.1	ND	ND	ND	93.2	ND	ND	ND	88.7
0 - 6/10	6.57	NA	NA		NA	NA	NA		2.59	NA	NA		1.5	NA	NA		0.01	NS	NS	
0 - 24	NA	71.1	1.92		9.5	73.6	2.7		NA	65.1	2.30		NA	39.3	1.6		NS	0.03	0.01	
6/10 - 24	9.78	NA	NA		NA	NA	NA		12.2	NA	NA		6.6	NA	NA		0.06	NS	NS	
24 - 48	0.41	0.90	0.23		1.1	3.5	0.7		1.68	8.64	0.33		2.5	32.3	0.5		0.09	0.09	0.02	
48 - 72	0.07	0.15	0.05		0.1	0.4	0.2		0.29	1.39	0.04		0.5	4.0	0.2		0.04	0.03	0.01	
72 - 96	0.02	0.07	0.03		0.0	0.1	NC		0.07	0.31	0.03		0.2	1.5	0.1		0.03	0.02	0.02	
96 - 120	0.02	0.04	0.02		NA	NA	NA		0.04	0.14	0.01		0.1	0.7	0.3		0.03	0.01	0.02	
120 - 144	0.01	0.03	0.01		NA	NA	NA		0.02	0.13	0.00		0.0	0.2	0.1		0.03	0.02	0.02	
144 - 168	0.01	0.02	0.01		NA	NA	NA		0.01	0.08	0.03		0.0	0.1	0.0		0.02	0.03	0.02	

a. Includes results from methanol cage wash (BQL), residual carcass (0.06) and liver (0.02).
b. Includes results from ethanol cage wash (NC), liver (0.0), GI tract (NC), and carcass (NC).
c. Includes results from methanol cage wash (0.01), expired air (0.09), residual carcass (0.32), and liver (0.11).
d. Results include cage debris (ND), final cage wash (0.1), liver (0.1), GI tract (0.1), and carcass (0.4).
e. Results include cage debris (NS, interim wash (3.64), interim dressing (82.5), final cage wash (0.01), liver (ND), terminal dose site (1.30), terminal wash (0.49), swabs (0.05), and skin (0.01).
WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; BQL = below limit of quantitation [defined as radioactivity less than twice the sample background levels]; NA = not applicable; NC = not calculable; ND = not detected; NS = no sample; U = urine; F = feces; CW = cage wash.

2.6.5.15 Pharmacokinetics: Excretion into Bile

Study Number	20[redacted]N389055				
Location in CTD:	4.2.2.5-4				
Species:	Rat (WH)				
Gender (M/F)/ Number of Animals:	4M (Bile Duct Cannulated)[a]				
Feeding Condition:	Fed				
Vehicle/ Formulation:	Captisol®				
Method of Administration:	Subcutaneous injection				
Dose (mg/kg):	2				
Analyte:	Tapinarof				
Assay:	Liquid scintillation analysis				
Excretion Route:	Urine	Feces	Cage Wash	Bile	Total[b]
Time (hr)	**Percent of administered radioactivity**				
Predose	NA	NA	NA	ND	87.9
0 - 6	2.6	NA	NA	52.3	
0 - 24	NA	1.1	1.2	NA	
6 - 24	5.9	NA	NA	18.7	
24 - 48	0.9	0.5	0.6	1.2	
48 - 72	0.4	0.3	0.1	0.3	
72 - 96	0.3	0.2	0.2	0.1	

a. Animal 202 had a compromised bile duct cannula and was therefore not included in mean calculations.
b. Results include cage debris (0.1), GI tract (0.1), final cage wash (0.1), liver (0.1), and carcass (0.8).
WH = Wistar Han [Crl:WI(Han)]; NA = not applicable; ND = not detected.

2.6.5.16 Pharmacokinetics: Drug-Drug Interactions

2.6.5.16.1 *In Vitro* Drug Interaction in Human Hepatocytes

Test Article: Tapinarof	**Study No.:** 20[redacted]N228896	**Location in CTD:** 4.2.2.6-2

Study System:

Human hepatocytes were obtained from Bioreclamation (Baltimore, MD), Triangle Research Laboratories (RTP, NC), and XenoTech (Lenexa, KA) as cultured monolayers on a collagen substratum with a Matrigel overlay or as cryo-preserved cells

Method:

Pre-warmed culture medium solutions containing tapinarof (0.001, 0.01, 0.1, 0.3, 1.0, 3 and 10 µmol/L), omeprazole (50 µmol/L), phenobarbital (750 µmol/L) or rifampicin (10 µmol/L) were added to human hepatocytes in duplicate. Hepatocytes were also exposed to solvent control in quadruplicate. All cells were then incubated for 24 hours. At the end of the incubation period, the culture medium was removed; cells were rinsed with ice-cold PBS, then lysed and stored at –80°C for subsequent RNA extraction. Total RNA was extracted by column extraction using a Promega SV 96 Total RNA Isolation System. Genomic DNA was removed from the samples using DNase provided in the kit. cDNA was prepared by performing reverse transcription using an oligo (dT)12-18 primer and catalyzed by Superscript II enzyme. The plate was incubated at 42°C for 50 minutes followed by 70°C for 10 minutes. The specific mRNA level was quantitatively detected for the following enzymes: CYP1A2, 2B6, 3A4 and the housekeeping gene, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH).

Mean Effect on mRNA Level

Gene	**CYP1A2[a]**		**CYP2B6[b]**		**CYP3A4[b]**	
Treatment (µmol/L tapinarof)	**Ratio**	**% induction relative to the prototypic inducer**	**Ratio**	**% induction relative to the prototypic inducer**	**Ratio**	**% induction relative to the prototypic inducer**
DMSO Control	1.0	0.0%	1.0	0.0%	1.0	0.0%
0.001	1.5	1.0%	1.2	1.8%	1.1	<1.0%
0.01	4.0	5.8%	1.1	<1.0%	0.94	<1.0%
0.1	15	24%	1.1	1.2%	0.70	<1.0%
0.3	33	66%	1.4	4.0%	0.82	<1.0%
1.0	46	89%	1.5	4.5%	0.94	<1.0%
3	58	130%	1.8	5.9%	1.3	<1.0%
10	51	110%	4.9	39%	8.4	27%
Prototypical inducer[c]	49	100%	16	100%	26	100%

a. Increase in CYP1A2 mRNA level of ≥ 5 mean ratio of treated over control is considered as a notable induction response for both omeprazole and tapinarof.

b. Increases in CYP2B6 and CYP3A4 mRNA levels of ≥ 3 mean ratio of treated over control are considered as notable induction responses for phenobarbital and rifampicin. Increases in CYP2B6 and CYP3A4 mRNA levels of ≥ 2 mean ratio of treated over control are considered as notable induction responses for tapinarof.

c. Prototypical CYP Inducers: 50 µmol/L Omeprazole (CYP1A2), 750 µmol/L Phenobarbital (CYP2B6), 10 µmol/L Rifampicin (CYP3A4).

2.6.5.16.2 Selectivity Profile in *In Vitro* Screening and Compound Profiling Assays

Test Article: Tapinarof	**Study No.:** 20[redacted]N176987	**Location in CTD:** 4.2.1.2-1

Study System:

Tapinarof was profiled in an *in vitro* screening and compound profiling (SCP) panel of 127 assays measuring activities of 7-transmembrane receptors, nuclear receptors, transporters, kinases, non-kinase enzymes, ion channels, nucleotide-binding, protein-protein interaction, transcription, and cellular toxicity.

Method:

Tapinarof was freshly dissolved from solid in 100% DMSO. From these solutions, master plates were prepared for serial dilutions (2-fold, 3-fold, and 4-fold) and stamped for assays in 96/384-well plates.

Mean Effect on mRNA Level

Target/Assay	**CYP1A2**	**CYP2C19**	**CYP2C9**	**CYP2D6**	**CYP3A4 VG**	**CYP3A4 VR**
pIC_{50}	6.0	5.9	7.5	6.1	5.6	4.9
n of fits	1	1	1	1	1	2
Upper Asymptote	NC	NC	NC	NC	NC	81

pIC_{50} = negative log of the half-maximal inhibitory concentration [IC_{50}]; VG = vivid green FLINT assay; VR = vivid red FLINT assay; NC = not calculable.

2.6.5.16.3 Cytochrome P450 Inhibition in Human Liver Microsomes

Test Article: Tapinarof				**Study No.:** DMVT-505-9004			**Location in CTD:** 4.2.2.6-4
Study System: Human Liver Microsomes							
Method: The ability of tapinarof to inhibit CYP enzymes was investigated with a pool of human liver microsomes to ascertain the IC_{50} values for direct, time dependent and metabolism-dependent inhibition, if concentration-dependent inhibition was observed. Tapinarof concentrations tested covered a range of 0.1 to 100 nanomolar (nmol/L).							
Inhibition Results							
CYP Enzyme:	**CYP1A2**	**CYP2B6**	**CYP2C8**	**CYP2C9**	**CYP2C19**	**CYP2D6**	**CYP3A4/5**	**CYP3A4/5**
Probe Substrate:	Phenacetin	Efavirenz	Amodiaquine	Diclofenac	S-Mephenytoin	Dextromethorphan	Testosterone	Midazolam
Maximum Direct Inhibition (%):	23.6	8.59	15.0	32.1	12.0	11.5	15.3	12.1
IC_{50} (nmol/L):	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Maximum Time Dependent Inhibition (%):	11.5	9.36	8.41	31.9	9.91	4.88	11.6	9.44
IC_{50} (nmol/L):	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100
Maximum Metabolism Dependent Inhibition (%):	14.3	NA[a]	12.9	24.1	9.16	9.41	15.9	10.2
IC_{50} (nmol/L):	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100	> 100

a. Not applicable. No value was obtained as the rates at the highest concentration of tapinarof evaluated were higher than control rates.
IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration.

2.6.5.16.4 Transporter Inhibition and Substrate Potential

Test Article: Tapinarof	**Study No.:** DMVT-505-9005	**Location in CTD:** 4.2.2.6-5

Study Objective:
This study was designed to evaluate tapinarof as an inhibitor of the human transporters BSEP, OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1 and MATE2-K and as an inhibitor and substrate of P-gp, BCRP, OATP1B1 and OATP1B3.

Inhibition Results:

Transporter	Test system	Substrate	Experimental Design	Tapinarof Concentrations Tested (µmol/L)	Maximum inhibition observed (%)	IC_{50} (µmol/L)
P-gp	Caco2-cells	Digoxin	Bidirectional permeability of substrate in cells	0.01, 0.1	6.6	> 0.1
BCRP	MDCKII cells	Prazosin		0.01, 0.1	48.8	> 0.1
BSEP	Vesicles	[^{3}H]-Taurocholic acid	Accumulation of substrate in vesicles	0.01, 0.1	3.2	> 0.1
OATP1B1	HEK293 cells	[^{3}H]-Estradiol-17β-glucuronide	Accumulation of substrate in cells	0.01, 0.1	1.7	> 0.1
OATP1B3				0.01, 0.1	2.5	> 0.1
OAT1		[^{3}H]-*p*-Aminohippurate		0.01, 0.1	None	> 0.1
OAT3		[^{3}H]-Estrone-3-sulfate		0.01, 0.1	11.4	> 0.1
OCT1		[^{14}C]-Tetraethylammonium bromide		0.01, 0.1	3.0	> 0.1
OCT2		[^{14}C]-Metformin		0.01, 0.1	3.7	> 0.1
MATE1				0.01, 0.1	12.0	> 0.1
MATE2-K				0.01, 0.1	None	> 0.1

Substrate Potential

Transporter	Test System	Experimental Design	Tapinarof Concentrations Tested (µmol/L)	Potential Substrate[a]
P-gp	MDCKII cells	Bidirectional permeability of tapinarof in cells	0.5, 5	No
BCRP			0.5, 5	No
OATP1B1	HEK293 cells	Accumulation of tapinarof in cells	0.5, 5	No
OATP1B3			0.5, 5	No

a. Uptake or efflux ratio ≥ 2 and reduced > 50% in presence of inhibitor.
Caco-2 cells = human epithelial colorectal adenocarcinoma cells; MDCKII cells = Madin-Darby canine kidney cells; HEK293 cells = human embryonic kidney cells; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration.

2.6.5.17 Pharmacokinetics: Others

2.6.5.17.1 Isomeric Interconversion in *In Vitro* Matrices and Buffers

Test Article: Tapinarof	**Study No.:** 20[redacted]N361131	**Location in CTD:** 4.2.2.7-1
Study Type: Isomeric interconversion		
Study System: Biological matrices and buffers used include male CD-1 mouse, male Wistar Hanover rat, male Gottingen minipig, female New Zealand white rabbit, and male human whole blood and plasma, 0.05 mol/L potassium phosphate buffer (pH 7.5) with and without HLM, DMEM, PBS, and HBSS at pH 7.4 and 8.5.		
Method: Incubation mixtures were prepared in duplicate by adding 20 µL of a 0.1 mg/mL solution of tapinarof or [redacted] to 1980 µL of blood or plasma, for a final compound concentration of 1000 ng/mL. Samples were analyzed for tapinarof and [redacted] using an analytical method based on the derivatization and solid phase extraction followed by UHPLC-MS/MS analysis, using a 10 µL aliquot of sample.		

Isomeric Interconversion in Blood

Sample	Incubation Time (hr)	Average Cis/Trans Ratio (%)[a]	Average Trans/Cis Ratio (%)[b]
Mouse	0	0.00	0.78
	2	0.00	0.94
Rat	0	0.00	0.43
	2	0.00	0.33
Minipig	0	0.00	0.00
	2	1.87	0.66
Rabbit	0	0.00	0.00
	2	0.00	0.25
Human	0	0.00	0.48
	2	0.26	0.00

Isomeric Interconversion in Plasma			
Sample	**Incubation Time (hr)**	**Average Cis/Trans Ratio (%)[c]**	**Average Trans/Cis Ratio (%)[d]**
Mouse	0	0.20	0.00
	3	0.00	0.20
	7	0.00	0.25
Rat	0	0.12	0.42
	3	0.13	0.00
	7	0.09	0.37
Minipig	0	0.00	0.47
	3	0.00	0.00
	7	0.05	0.09
Rabbit	0	0.12	0.00
	3	0.09	0.00
	7	0.07	0.09
Human	0	0.10	0.00
	3	0.10	0.18
	7	0.00	0.00
Isomeric Interconversion in Various Buffers			
Sample	**Incubation Time (hr)**	**Average Cis/Trans Ratio (%)[e]**	**Average Trans/Cis Ratio (%)[f]**
DMEM	0	0.00	0.50
	2	0.36	0.11
DMEM:ACN (50:50)	0	0.12	0.00
	2	0.23	0.00
PBS	0	0.15	0.00
	2	0.00	0.00
0.05 mol/L Potassium Phosphate Buffer (pH 7.5)	0	0.39	0.00
	2	0.27	0.00
0.05 mol/L Potassium Phosphate Buffer (pH 7.5) + HLM	0	0.36	0.81
	2	0.34	1.12
HBSS (pH 7.4)	0	0.65	0.00
	2	0.00	0.00
HBSS (pH 8.5)	0	0.00	0.00
	2	0.00	0.00

a. Blood samples were spiked with 1000 ng/mL tapinarof and analyzed for tapinarof (trans) and [redacted] (cis).
b. Blood samples were spiked with 1000 ng/mL [redacted] and analyzed for [redacted] (cis) and tapinarof (trans).
c. Plasma samples were spiked with 1000 ng/mL tapinarof and analyzed for tapinarof (trans) and [redacted] (cis).
d. Plasma samples were spiked with 1000 ng/mL [redacted] and analyzed for [redacted] (cis) and tapinarof (trans).
e. Various *in vitro* buffers were spiked with 3 µmol/L tapinarof and analyzed for tapinarof (trans) and [redacted] (cis).
f. Various *in vitro* buffers were spiked with 3 µmol/L of [redacted] and analyzed for [redacted] (cis) and tapinarof (trans).
HLM = human liver microsomes; HBSS = Hank's balanced salt solution; DMEM = Dulbecco's modified eagle medium; PBS = phosphate buffered saline; ACN = acetonitrile; UHPLC-MS/MS = ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

2.6.5.17.2 Evaluation for Presence of Cis Isomer in Pooled Plasma Samples

Test Article: Tapinarof	**Study No.:** 20[redacted]N342907	**Location in CTD:** 4.2.2.2-2
Study Type: Isomeric interconversion		
Study System: Biological matrices used include pooled rat and mouse plasma/20 mmol/L ascorbic acid (1:1, v/v) samples from carcinogenicity toxicology studies.		
Method: Tapinarof and [redacted] were extracted under amber lighting from 10 µL of pooled rat or mouse plasma/20 mmol/L ascorbic acid (1:1, v/v) by protein precipitation followed by derivatization with dansyl chloride and solid phase extraction. Isotopically labelled internal standards ([$^2H_7$]-tapinarof and [$^2H_7$]-[redacted]) were used. Extracts were analyzed by UHPLC-MS/MS using a [redacted]™ interface and multiple reaction monitoring.		
Peak Area Responses in Pooled Rat Plasma		

Group	Day	Time (hr)	Pool ID	Peak Area Ratio (Cis)	Peak Area Ratio (Trans)	% Cis/Trans
3	28	0.5	1	0	0.0178	0
		1	2	0	0.0139	0
		2	3	0	0.00669	0
		4	4	0	0	NC
		8	5	0	0	NC
		24	6	0	0	NC
	182	0.5	7	0	0.0236	0
		1	8	0	0.0189	0
		2	9	0	0.0117	0
		4	10	0	0.00145	0
		8	11	0	0	NC
		24	12	0	0	NC
4	28	0.5	13	0	0.0637	0
		1	14	0	0.0575	0
		2	15	0	0.0234	0
		4	16	0	0.00122	0
		8	17	0	0	NC
		24	18	0	0	NC
	182	0.5	19	0	0.0809	0
		1	20	0	0.0693	0
		2	21	0	0.0432	0
		4	22	0	0.00642	0

Group	Day	Time (hr)	Pool ID	Peak Area Ratio (Cis)	Peak Area Ratio (Trans)	% Cis/Trans
		8	23	0	0	NC
		24	24	0	0	NC
5	**28**	0.5	25	0	0.226	0
		1	26	0	0.164	0
		2	27	0	0.0913	0
		4	28	0	0.00528	0
		8	29	0	0	NC
		24	30	0	0	NC
	182	0.5	31	0	0.291	0
		1	32	0	0.239	0
		2	33	0	0.282	0
		4	34	0	0.0176	0
		8	35	0	0	NC
		24	36	0	0	NC
Peak Area Responses in Pooled Mouse Plasma						

Group	Day	Time (hr)	Pool ID	Peak Area Ratio (Cis)	Peak Area Ratio (Trans)	% Cis/Trans
3	**28**	1	1	0	0.181	0
		2	2	0	0.0430	0
		4	3	0	0.0221	0
		8	4	0	0.00844	0
		24	5	0	0.00118	0
	182	1	6	0	0.0501	0
		2	7	0	0.0364	0
		4	8	0	0.108	0
		8	9	0	0.0158	0
		24	10	0	0	NC
4	**28**	1	11	0	0.509	0
		2	12	0	0.300	0
		4	13	0	0.170	0
		8	14	0	0.0725	0
		24	15	0	0.00122	0

Group	Day	Time (hr)	Pool ID	Peak Area Ratio (Cis)	Peak Area Ratio (Trans)	% Cis/Trans
	182	1	16	0	0.432	0
		2	17	0	0.323	0
		4	18	0	0.220	0
		8	19	0	0.287	0
		24	20	0	0.00306	0
5	**28**	1	21	0	1.40	0
		2	22	0	0.482	0
		4	23	0	1.14	0
		8	24	0	0.140	0
		24	25	0	0.00636	0
	182	1	26	0	0.470	0
		2	27	0	0.200	0
		4	28	0.000898	1.36	0.07
		8	29	0	0.121	0
		24	30	0	0.00561	0

NC = not calculated; UHPLC-MS/MS = ultra-high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.