目次

略号一覧表 5
2.6.4 薬物動態試験の概要文 7
2.6.4.1 まとめ 7
2.6.4.2 分析法 10
2.6.4.2.1 HPLC-MS/MS 法によるラット血漿中フルキンチニブ及び M11 濃度分析法の バリデーション（報告書 8426-160） 12
2.6.4.2.2 LC-MS/MS 法によるラット血漿中のフルキンチニブ濃度分析法の バリデーション（報告書 [redacted]54MV1） 12
2.6.4.2.3 LC-MS/MS 法によるモルモット血漿中のフルキンチニブ及び M11 濃度分析法のバリデーション（報告書 [redacted]186MV05） 12
2.6.4.2.4 LC-MS/MS 法によるラット及びイヌ血漿中のフルキンチニブ濃度分析法の バリデーション（報告書 RP-HMPL-013-ADME_Bioanalysis-MV） 12
2.6.4.2.5 UPLC-MS/MS 法によるラット及びイヌ血漿中のフルキンチニブ、M9 及び M11 濃度分析法のバリデーション（報告書 DMPKR20[redacted]0003-E-01） 12
2.6.4.2.6 HPLC-MS/MS 法によるイヌ血漿中フルキンチニブ及び M11 濃度分析法の バリデーション（報告書 8449-371） 13
2.6.4.2.7 LC-MS/MS 法によるイヌ血漿中フルキンチニブ濃度分析法のバリデーション（報告書 [redacted]54MV2） 13
2.6.4.2.8 [^{14}C]フルキンチニブの合成 13
2.6.4.2.9 代謝試験における分析 13
2.6.4.3 吸収 14
2.6.4.3.1 In vitro 試験 14
2.6.4.3.2 単回投与時の薬物動態 14
2.6.4.3.3 反復投与時の薬物動態 23
2.6.4.3.4 毒性試験における TK データの要約 23
2.6.4.4 分布 35
2.6.4.4.1 In vitro 試験 35
2.6.4.4.2 In vivo 試験 36
2.6.4.5 代謝（種間比較） 38
2.6.4.5.1 In vitro 代謝 39
2.6.4.5.2 In vivo 代謝 44
2.6.4.6 排泄 47
2.6.4.6.1 In vivo 排泄 47
2.6.4.7 DDI 48
2.6.4.7.1 薬物代謝酵素 48
2.6.4.7.2 薬物トランスポーター 52
2.6.4.7.3 CYP 及びトランスポーターの薬物相互作用との関連性 57
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 59

2.6.4.9 考察及び結論 59
2.6.4.10 参考文献 61

表

表 2.6.4.2-1 分析法及びバリデーション試験の一覧 11
表 2.6.4.3-1 フルキンチニブを単回静脈内又は単回経口投与後のフルキンチニブの PK パラメータ（ICR マウス） 15
表 2.6.4.3-2 雌雄 Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブを単回静脈内投与（1 mg/kg）又は単回経口投与（2 mg/kg）投与したときの血漿中放射能の PK パラメータ 16
表 2.6.4.3-3 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを単回経口投与後の血漿中 フルキンチニブ、M9 及び M11 の薬物動態パラメータ 17
表 2.6.4.3-4 モルモットにフルキンチニブを単回経口投与後のフルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ 18
表 2.6.4.3-5 ビーグル犬にフルキンチニブを単回経口投与したときの PK パラメータ 20
表 2.6.4.3-6 ビーグル犬にフルキンチニブ 1 mg/kg を単回経口投与したときのフルキンチニブ、M9 及び M11 の薬物動態パラメータ 22
表 2.6.4.3-7 Sprague Dawley ラットに反復経口投与したときのフルキンチニブの 薬物動態パラメータ（投与 7 日） 23
表 2.6.4.3-8 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 1 日 1 回 3 日間経口投与したときの フルキンチニブの TK パラメータ 24
表 2.6.4.3-9 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 4 週間反復経口投与したときのフルキンチニブの TK パラメータ 24
表 2.6.4.3-10 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 13 週間反復経口投与したときのフルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ 26
表 2.6.4.3-11 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 26 週間反復経口投与したときの TK パラメータ 28
表 2.6.4.3-12 妊娠雌 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを反復経口投与したときの フルキンチニブの TK パラメータ 29
表 2.6.4.3-13 妊娠雌 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを反復経口投与したときの フルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ 30
表 2.6.4.3-14 妊娠雌 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを反復経口投与したときの フルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ 30
表 2.6.4.3-15 ビーグル犬にフルキンチニブを 4 週間反復経口投与したときの TK パラメータ 31
表 2.6.4.3-16 ビーグル犬にフルキンチニブを 13 週間反復経口投与したときの血漿中フルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ 32
表 2.6.4.3-17 ビーグル犬にフルキンチニブを 39 週間反復経口投与したときの TK パラメータ 34

表 2.6.4.4-1 白色ラット（雄）に[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を 単回経口投与したときの放射能の組織中濃度 37
表 2.6.4.4-2 白色ラット（雌）に[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を 単回経口投与したときの放射能の組織中濃度 38
表 2.6.4.4-3 有色ラット（雄）に[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を 単回経口投与したときの放射能の組織中濃度 38
表 2.6.4.5-1 ヒト血漿又はヒト肝ミクロソーム中でフルキンチニブを インキュベートしたときの M205 の生成 44
表 2.6.4.5-2 ヒト血漿又はヒト肝ミクロソーム中でインキュベートしたときの フルキンチニブの消失 44
表 2.6.4.5-3 Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を 単回経口投与したときの血漿中代謝物の割合 46
表 2.6.4.5-4 [^{14}C]フルキンチニブの Sprague Dawley ラットの胆汁、尿及び糞中代謝物（投与量に対する割合） 47
表 2.6.4.6-1 雌雄ラットにの[^{14}C]フルキンチニブ（2 mg/kg）を単回経口投与後の 総放射能の回収率 48
表 2.6.4.7-1 ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブによる CYP1A2、2C9、2D6、3A4/5 酵素活性の低下 50
表 2.6.4.7-2 ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブによる CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19 及び 2D6 酵素活性の低下 51
表 2.6.4.7-3 ヒト肝ミクロソームにおける M9 又は 11 による CYP1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5 酵素活性の低下 51
表 2.6.4.7-4 ヒト肝ミクロソームにおける M11 による CYP2B6、2C8 及び 2C19 酵素活性の低下 52
表 2.6.4.7-5 OATP1B1 又は OATP1B3 発現 HEK293 細胞における フルキンチニブの取込み倍率及び Rs/Ri 値 53
表 2.6.4.7-6 HEK293 細胞におけるトランスポーター活性値 56
表 2.6.4.7-7 M11 による SLC トランスポーターOAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K 阻害 57
表 2.6.4.7-8 DDI の static model を用いた、フルキンチニブによる 可逆的 CYP 阻害の R_1 値の予測 58
表 2.6.4.7-9 DDI の static model を用いた、代謝物 M11 による 可逆的 CYP 阻害の R 値の予測 58
表 2.6.4.7-10 トランスポーター阻害：フルキンチニブの R 値の評価 59
表 2.6.4.7-11 トランスポーター阻害：M11 の R 値の評価 59

図

図 2.6.4.2-1 [^{14}C]フルキンチニブの構造式 13
図 2.6.4.5-1 フルキンチニブの推定代謝経路 41

図 2.6.4.5-2 ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームと 60 分間インキュベート後に 選択イオン検出モードで測定したフルキンチニブ代謝物の面積 41
図 2.6.4.5-3 フルキンチニブの推定代謝経路（Sprague Dawley ラット）） 46
図 2.6.4.7-1 Caco-2 細胞における P-gp を介したジゴキシン輸送に対する フルキンチニブの阻害作用..... 53
図 2.6.4.7-2 Caco-2 細胞における BCRP を介した E3S 輸送に対する フルキンチニブの阻害作用 54
図 2.6.4.7-3 Caco-2 細胞における BCRP を介した E3S 輸送に対する M9 の阻害作用..... 55
図 2.6.4.7-4 Caco-2 細胞における BCRP を介した E3S 輸送に対する M11 の阻害作用..... 55

略号一覧表

略号	略していない表現又は説明	
	英語	日本語
ADME	absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
AUC	area under the concentration-versus-time curve	血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{24}	area under the concentration-versus-time curve from time 0 to 24 hours	投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{∞}	area under the concentration-versus-time curve from 0 hours extrapolated to infinity	投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{last}	area under the concentration-versus-time curve from time 0 to the last measurable concentration	投与後 0 時間から最終定量可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	－
BDC	bile duct cannulated	胆管カニューレ挿入
BLQ	below the limit of quantification	定量下限未満
Caco-2	human colorectal adenocarcinoma	ヒト結腸癌由来細胞
CL	clearance	クリアランス
C_{max}	maximum observed 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
E3S	estrone-3-sulfate	エストロン－3－硫酸
EFD	embryo-fetal development	胚・胎児発生
FMO	flavin-containing monooxygenase	フラビン含有モノオキシゲナーゼ
f_{uB}	unbound fraction in whole blood	血液中非結合型分率
f_{up}	unbound fraction in plasma	血漿中非結合型分率
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
HEK	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HMPL-013	Fruquintinib	フルキンチニブ
HPLC	high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィ
HPLC-MS/MS	high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration	50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation	日米 EU 医薬品規制調和国際会議
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LC-MS^n/PDA	liquid chromatography with multiple-stage mass spectrometry and photodiode array detection	液体クロマトグラフィー多段階質量分析ーフォトダイオードアレイ検出
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
LSC	liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
M1	metabolite of fruquintinib (also known as M379-2)	フルキンチニブの代謝物（M379-2）

略号一覧表（続き）

略号	略していない表現又は説明	
	英語	日本語
M2	metabolite of fruquintinib (also known as HM5012569 or M409-2)	フルキンチニブの代謝物（HM5012569 又は M409-2）
M7	metabolite of fruquintinib (also known as HM5013199 or M379-1)	フルキンチニブの代謝物（HM5013199 又は M379-1）
M9	metabolite of fruquintinib (HM5024093 or M380)	フルキンチニブの代謝物（HM5024093 又は M380）
M10	metabolite of fruquintinib (also known as HM5029127 or M409-3)	フルキンチニブの代謝物（HM5029127 又は M409-3）
M11	metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423 or M379-3)	フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）
M205	metabolite of fruquintinib (also known as HM5040878)	フルキンチニブの代謝物（HM5040878）
MATE	multidrug and toxin extrusion	－
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボヌクレオチドリン酸
MRT	mean residence time	平均滞留時間
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate reduced form	還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
OAT	organic anion transporter	－
OATP	organic anion transporting polypeptide	－
OCT	organic cation transporter	－
P_{app}	apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
$P_{app\ A>B}$	apparent permeability coefficient from apical ide to basolateral side	頂端側膜側から基底膜側への見かけの透過係数
P-gp	P-glycoprotein	P-糖蛋白質
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
PCR	polymerase chain reaction	ポリメラーゼ連鎖反
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィ
R_I	ratio of intrinsic clearance values	固有クリアランス比
R_B	blood-to-plasma concentration ratio	血液／血漿中濃度比
$t_{½}$	half-life / elimination half-life	消失半減期
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
t_{max}	time taken to reach maximum concentration	最高血漿中濃度到達時間
UDPGA	uridine diphosphate glucuronic acid	ウリジン二リン酸グルクロン酸
UGT	uridine diphosphate glucuronosyltransferase	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
UPLC-MS/MS	ultra performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry	超高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析
FDA	United States Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
V_z	volume of distribution based on terminal elimination phase	終末相における分布容積
V_{ss}	volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor	血管内皮増殖因子受容体

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

フルキンチニブ（HMPL-013/TAK-113）は、血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）-1、-2 及び-3 に対して高い選択性を示す強力なチロシンキナーゼ阻害剤である。VEGFR を介した血管内皮増殖因子（VEGF）によるシグナル伝達は、腫瘍血管新生及び腫瘍増殖において重要な役割を果たし、VEGF シグナル伝達経路は結腸・直腸癌を含む抗癌治療標的として広く認められている。フルキンチニブは現在、結腸・直腸癌、胃癌、子宮内膜癌及び乳癌を含む多数の固形癌を対象として開発中である。

フルキンチニブの臨床推奨用法・用量は 5 mg を 1 日 1 回、3 週間経口投与／1 週間休薬の 28 日間の投与サイクルとした。フルキンチニブの予定する適応は、転移性結腸・直腸癌患者の治療である。

フルキンチニブは進行癌の治療を目的としているため、非臨床開発プログラムは日米 EU 医薬品規制調和国際会議（ICH）S9 ガイダンス（抗悪性腫瘍薬の非臨床評価に関するガイドライン）及び ICH S9 質疑応答集に従ってデザインした。

薬物動態（PK）、吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）、並びに薬物動態学的薬物相互作用（DDI）の可能性を明らかにするための試験を実施した。試験結果の大部分は、フルキンチニブの反復投与毒性試験の用量範囲で実施した単回投与試験から得られたものである。非臨床薬物動態試験における投与経路として、臨床投与経路と同じ経口投与を採用し、フルキンチニブの PK 及びバイオアベイラビリティを比較評価するための静脈内投与も採用した。血漿蛋白結合、トランスポーターとの DDI、チトクローム P450（CYP）による代謝又は CYP との DDI を検討するための in vtro 試験を実施した。

本試験で使用した動物種及び系統は、毒性試験におけるフルキンチニブの曝露量を評価し、また、ヒトにおけるフルキンチニブの安全性に関する結論を裏付けるため、毒性試験で使用した動物種及び系統に合わせて選択した。使用した動物種及び系統は ICR マウス、Sprague Dawley 及び Long-Evans ラット、Hartley モルモット及びビーグル犬であった。

本項に記載する試験は、ヒトで使用を予定しているフルキンチニブのフリー体を用いて実施した。本項に記載されている用量及び濃度は、フルキンチニブのフリー体として表記した（以下、フルキンチニブ）。また、M9（HM5024093 又は M380）及び M11（HM5025423 又は M379-3）の DDI リスクを推定するため、一連の in vitro 試験を実施した。

ADME 試験の実施及び解析を容易にするため、^{14}C 標識フルキンチニブを用いた試験を実施した。標識体の比放射能は 54 mCi/mmol であり、放射能検出器を接続した高速液体クロマトグラフィ（HPLC）により測定した放射化学的純度は 100%であった。^{14}C 標識体を非標識フルキンチニブで希釈し、適切な比放射能の投与検体を調製した。

反復投与毒性試験及び非標識フルキンチニブを用いて実施した複数の試験で採取した血漿中の非標識フルキンチニブ濃度を測定することにより、反復投与時のトキシコキネティクス（TK）解析を実施した。

フルキンチニブの開発を裏付けるために実施した薬物動態試験で得られた所見を以下に要約する。薬物動態試験から得られた所見の総合的評価を 2.6.4.9 に示す。結果の概要を 2.6.5 に示す。

吸収

- フルキンチニブはヒト結腸癌由来細胞（Caco-2）で高い膜透過性〔頂端側膜側から基底膜側への見かけの透過係数（$P_{app\ A>B}$）約 30×10^{-6} cm/s〕を示した。
- PK 試験では、マウス、ラット及びイヌにおけるフルキンチニブの血漿クリアランス（CL）は低く（肝血流量の 20%未満）、経口バイオアベイラビリティは中等度（約 50%）であった。
- 単回経口投与したときのフルキンチニブの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）は、ラットでは 0.5～2 mg/kg の用量範囲で用量比を上回る増加を示したが、モルモットでは、25～100 mg/kg の用量範囲で用量比を下回る増加を示し、イヌでは 0.1～1 mg/kg の用量範囲で概して用量に比例した増加が認められた。イヌの PK 試験では、顕著な摂餌の影響及び性差は認められなかった。
- フルキンチニブを反復経口投与したとき、ラットでは概して曝露量の増加は用量比を下回ったのに対し、イヌではほぼ用量に比例して増加した。ラット及びイヌにそれぞれ最長 26 週間及び 39 週間反復経口投与したとき、顕著な蓄積は認められなかった（2 倍未満）。
- ラット、モルモット及びイヌでは、妊娠の有無にかかわらず、雌雄間又は検体採取日間で全身曝露量に 2 倍を超える差は認められなかった。

分布

- フルキンチニブ及び主代謝物 M11 の血漿蛋白結合率は、評価したすべての動物種（マウス、ラット、イヌ及びヒト）で高かった。
- ラット、イヌ及びヒト血液にフルキンチニブを添加後 10 及び 60 分における血液／血漿中濃度比（R_B）は、それぞれ、ヒトでは 0.458 及び 0.601、イヌでは 0.851 及び 0.792、ラットでは 0.709 及び 0.733 であった。
- 蛋白濃度 0.2 mg/mL のヒト肝ミクロソーム（男女プール）中では、濃度 1 及び 10 μM におけるフルキンチニブの蛋白結合率は極めて低かった（それぞれ-3.57%及び 1.58%）。同様に、蛋白濃度 0.5 mg/mL のヒト肝ミクロソーム中におけるフルキンチニブの蛋白結合率は、それぞれ 15.2%及び 24.3%であった。
- Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 1 mg/kg（100 μCi/kg）を単回静脈内投与したとき、投与後 5 分から 48 時間までの放射能の R_B の平均値は 0.34～0.83（雌）及び 0.57～1.28（雄）であり、血球成分への顕著な結合はないと考えられた。
- Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg（100 μCi/kg）を単回経口投与したとき、投与後 10 分から 48 時間までの放射能の R_B の平均値は 0.53～0.77（雌）及び 0.51～1.01（雄）であり、血球成分への顕著な結合はないと考えられた。
- ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg（100 μCi/kg）を単回経口投与したとき、系統及び性別にかかわらず、放射能は主に代謝及び排泄器官（消化管、肝臓、腎臓）に分布し、脳への分布はわずか（血漿中 AUC の 10%以下）であった。
- Long-Evans ラットでは、メラニン含有組織（眼、ぶどう膜及び有色皮膚）に明らかな放射能の分布が認められたことから、[^{14}C]フルキンチニブ由来放射能のメラニン親和性が示唆された。

代謝

- 肝ミクロソームにおける代謝安定性から予測したフルキンチニブの全身 CL は、評価した各動物種で肝血流量より低かったことから、これらの動物種における肝抽出率が低いことが示された（雄サルでは中程度）。評価したすべての動物種でフルキンチニブのミクロソーム代謝に明らかな性差は認められなかった(雌サルのデータは得られていない)。
- フルキンチニブ及び主代謝物 M11 は、評価した各動物種の肝ミクロソームとインキュベートしたときに安定であった。
- フルキンチニブをラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームとインキュベートしたとき、6 種類の主代謝物が認められた。これらの代謝物は、主に CYP により生成された O-脱メチル化体、水酸化体及びカルボン酸体であった。ヒト肝ミクロソームで認められた代謝物の種類は他の動物種と同様であったが、各代謝物の相対量には差がみられた。ヒト特異的な代謝物は確認されなかった。
- ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの代謝には、複数の CYP が関与することが明らかになったが、主に CYP3A4/5 によって代謝されると考えられた。
- ヒト肝ミクロソームにおける主代謝物は M10（HM5029127 又は M409-3）であり、ラット、イヌ及びサルと同様に、副次的代謝物として M1（M379-2）+M7（HM5013199 又は M379-1）及び M2（HM5012569 又は M409-2）が認められた。ラット肝ミクロソームでは、M1+M7 が主代謝物であった。
- ヒト血漿中に最も多く存在する代謝物は M11 であり、主に、M10 から非酵素的に変換されたものであった。M10 は、主に CYP3A4/5 を介して生成された。
- フルキンチニブをヒト血漿及びヒト肝ミクロソームとインキュベートしたところ、代謝物 M205（HM5040878）が少量認められた。M205 の生成には、CYP は関与していなかった。
- 雌雄 Sprague Dawley ラットを用いて、[^{14}C]フルキンチニブの in vivo 代謝を検討した。ラットの血漿、胆汁、尿及び糞中で、未変化体のほかに 19 種類の代謝物が暫定的に同定された。フルキンチニブはラットにおいて大幅に代謝され、主要な第一相代謝経路は、1）N-又は O-脱メチル化、2）酸化、3）O-脱キナゾリン化であった。第二相代謝経路として、グルクロン酸抱合及び硫酸抱合が認められた。

排泄

- 雌雄 Sprague Dawley ラットを用いて、[^{14}C]フルキンチニブを経口投与後の放射能の尿糞中排泄を検討した。フルキンチニブは主に糞中に排泄され、投与後 168 時間までの放射能の糞中排泄率は、雄及び雌でそれぞれ投与量の平均 69.65%及び 73.11%であった。ラットでは、未変化体として尿中に排泄されたのは投与量の 25%未満であったことから、尿排泄は主要な消失経路ではないことが示唆される。排泄率に性差は認められなかった。
- 胆管カニューレ挿入（BDC）ラットでは、尿、糞及び胆汁中にほぼ同量のフルキンチニブが排泄された。

DDI

- フルキンチニブは、10 μM までの濃度で、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対して顕著な可逆的阻害作用を示さず〔50%阻害濃度（IC_{50}）> 10 μM〕、CYP1A2、2B6 及び 3A4 に対して誘導作用を示さなかった。
- フルキンチニブは、10 μM の濃度で CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対して顕著な時間依存的阻害作用を示さなかった。
- M11 は、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 2E1 に対して顕著な可逆的阻害作用を示さなかった（IC_{50} >50 μM）。M11 は、CYP3A4/5 に対して弱い可逆的阻害作用を示した（IC_{50}：38 μM）。
- M9 及び M11 は、10 μM の濃度で CYP1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5 に対して時間依存的な阻害作用を示さなかった。また、M11 は、CYP2B6、2C8 及び 2C19 に対して時間依存的な阻害作用を示さなかった。
- フルキンチニブは in vitro において、P-糖蛋白質（P-gp）などの排出トランスポーターの基質ではないと考えられ、また organic anion transporting polypeptide（OATP）1B1 又は OATP1B3 の基質ではなかった。
- フルキンチニブは P-gp と breast cancer resistance protein（BCRP）を用量依存的に阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 4.60 μM 及び 1.29 μM であった。
- M11 は BCRP を阻害したが（IC_{50}：1.03 μM）、P-gp に対しては顕著な阻害作用を示さなかった（IC_{50} > 20 μM）。
- M9 は BCRP を阻害したが（IC_{50}：7.6 μM）、P-gp に対しては顕著な阻害作用を示さなかった（IC_{50} > 20 μM）。
- フルキンチニブは、OATP1B1、OATP1B3、organic anion transporter（OAT）1、OAT3、organic cation transporter（OCT）2、multidrug and toxin extrusion（MATE）1 及び MATE2-K に対する明らかな阻害作用を示さなかった。
- M11 は OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K を阻害したが、10 μM における阻害率は 40%未満であった。

2.6.4.2 分析法

血漿中のフルキンチニブは、各試験の方法及び使用した動物種に応じて、適切にバリデートされた方法で定量した。分析法及び定量限界は、フルキンチニブ及び代謝物の動態を評価するうえで、特異性及び感度の点で適切であった。

バリデーションは非臨床安全性評価試験に該当しないため、医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）遵守に関する陳述は行わない。しかし、GLP に該当する試験では、すべてのバリデーションを GLP に従って実施した。主要な毒性試験における分析に用いた生体試料分析法バリデーションは、バリデーション報告書に特に明記しない限り、GLP に従って実施した。これらの分析法は、分析時点のガイドラインに従い、検量線の全範囲にわたり、真度、精度及び種々条件下での安定性に関してバリデートした。

分析法及びバリデーション報告書の概要を表 2.6.4.2-1 に示す。分析法バリデーションデータの要約は 2.6.5.2 に示す。

PK 及び TK データの解析にはノンコンパートメント法を用いた。

表 2.6.4.2-1　分析法及びバリデーション試験の一覧

動物種	測定対象	マトリックス	定量範囲	定量下限	分析法を使用した試験	試験番号	添付資料番号
	フルキンチニブ及び M11	血漿	フルキンチニブ： 1.00 ng/mL (LLOQ)～ 750 ng/mL (ULOQ) M11： 1.00 ng/mL (LLOQ)～ 750 ng/mL (ULOQ)	フルキンチニブ： 1.00 ng/mL M11： 1.00 ng/mL	4.2.3.2-2 4.2.3.5.2-2 4.2.3.5.2-3 4.2.3.3.2-2	8426-160	4.2.2.1-1
ラット	フルキンチニブ	血漿	2～4000 ng/mL	2 ng/mL	4.2.3.2-3 4.2.3.5.2-1	[redacted]54MV1	4.2.2.1-2
モルモット	フルキンチニブ及び M11	血漿	フルキンチニブ： 5.000 ng/mL (LLOQ)～ 5000.000 ng/mL (ULOQ) M11： 5.000 ng/mL (LLOQ)～ 5000.000 ng/mL (ULOQ)	フルキンチニブ： 5.000 ng/mL M11： 5.000 ng/mL	4.2.3.7.7-1	[redacted]186MV05	4.2.2.1-3
ラット及びイヌ	フルキンチニブ	血漿	0.500～2000 ng/mL	0.500 ng/mL	4.2.2.2-3 4.2.2.2-5 4.2.3.2-1 4.2.3.2-4	RP-HMPL-013-ADME_ Bio analysis- MV	4.2.2.1-4
ラット及びイヌ	フルキンチニブ、M9 及び M11	血漿	1～800 ng/mL	1 ng/mL	4.2.2.2-4 4.2.2.2-6 4.2.2.3-3	DMPKR20[redacted]0003-E-01	4.2.2.1-5
イヌ	フルキンチニブ及び M11	血漿	フルキンチニブ： 0.500 ng/mL (LLOQ)～ 250 ng/mL (ULOQ) M11： 0.0200 ng/mL (LLOQ)～ 10.0 ng/mL (ULOQ)	フルキンチニブ： 0.500 ng/mL M11： 0.0200 ng/mL	4.2.3.2-5	8449-371	4.2.2.1-6
イヌ	フルキンチニブ	血漿	0.5～200 ng/mL	0.5 ng/mL	4.2.3.2-6	[redacted]54MV2	4.2.2.1-7

LLOQ：定量下限、ULOQ：定量上限、M9：フルキンチニブの代謝物（HM5024093）、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）

2.6.4.2.1 HPLC-MS/MS 法によるラット血漿中フルキンチニブ及び M11 濃度分析法のバリデーション（報告書 8426-160）

：添付資料番号 4.2.2.1-1（参考）

ラット 13 週間反復強制経口投与毒性試験（2.6.6.3.2）、ラット胚・胎児発生に関する強制経口投与用量設定試験（2.6.6.6.2）、ラット胚・胎児発生に関する試験（2.6.6.6.3）並びにラット小核試験及びコメットアッセイ（2.6.6.4.3）で得られたラット血漿中のフルキンチニブ及び代謝物 M11 濃度をバリデート済みの高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析（HPLC-MS/MS）法を用いて測定した。検量線範囲はいずれも 1.00～750 ng/mL であった。

2.6.4.2.2 LC-MS/MS 法によるラット血漿中のフルキンチニブ濃度分析法のバリデーション（報告書 [redacted]54MV1）

：添付資料番号 4.2.2.1-2（参考）

ラット 26 週間反復投与毒性試験（[redacted]54RD1）及び [redacted]54RB1 試験で得られたラット血漿中のフルキンチニブ濃度をバリデート済みの LC-MS/MS 法を用いて測定した。検量線範囲は 2～4000 ng/mL であった。

2.6.4.2.3 LC-MS/MS 法によるモルモット血漿中のフルキンチニブ及び M11 濃度分析法のバリデーション（報告書 [redacted]186MV05）

：添付資料番号 4.2.2.1-3（参考）

モルモット光毒性試験（[redacted]186PT02）で得られたモルモット血漿中のフルキンチニブ及び代謝物 M11 濃度をバリデート済みの LC-MS/MS 法を用いて測定した。検量線範囲はいずれも 5.000～5000.000 ng/mL であった。

2.6.4.2.4 LC-MS/MS 法によるラット及びイヌ血漿中のフルキンチニブ濃度分析法のバリデーション（報告書 RP-HMPL-013-ADME_Bioanalysis-MV）

：添付資料番号 4.2.2.1-4（参考）

ラット単回投与用量相関試験（RP-HMPL-013-ADME-1_RPK）、イヌ単回投与用量相関試験（RP-HMPL-013-ADME-1_DPK）、ラット 4 週間反復投与毒性試験（[redacted]49RD1）及びイヌ 4 週間反復投与毒性試験（[redacted]49RD2）で得られたラット及びイヌ血漿中のフルキンチニブ濃度をバリデート済みの LC/MS/MS 法を用いて測定した。検量線範囲は 0.500～2000 ng/mL であった。

2.6.4.2.5 UPLC-MS/MS 法によるラット及びイヌ血漿中のフルキンチニブ、M9 及び M11 濃度分析法のバリデーション（報告書 DMPKR20[redacted]0003-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.1-5（評価）

ラット単回投与試験（DMPKR20[redacted]0008-E-01）、イヌ単回投与試験（DMPKR20[redacted]0004-E-01）及び R_B 試験（DMPKR20[redacted]0004-E-01）で得られたラット及びイヌ血漿中のフルキンチニブ、並びに代謝物 M9 及び M11 濃度をバリデート済みの超高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析（UPLC-MS/MS）法を用いて測定した。フルキンチニブ及び代謝物の検量線範囲はいずれも 1～800 ng/mL であった。

2.6.4.2.6 HPLC-MS/MS 法によるイヌ血漿中フルキンチニブ及び M11 濃度分析法のバリデーション（報告書 8449-371）

：添付資料番号 4.2.2.1-6（参考）

イヌ 13 週間反復投与毒性試験（8449374）で得られたイヌ血漿中のフルキンチニブ及び代謝物 M11 濃度をバリデート済みの HPLC-MS/MS 法を用いて測定した。検量線範囲は、フルキンチニブでは 0.500～250 ng/mL、M11 では 0.0200～10.0 ng/mL であった。

2.6.4.2.7 LC-MS/MS 法によるイヌ血漿中フルキンチニブ濃度分析法のバリデーション（報告書 [redacted]54MV2）

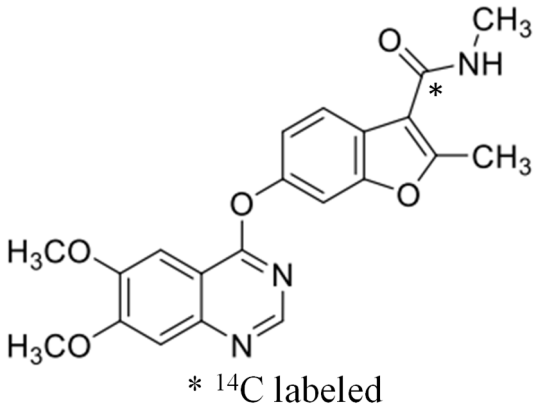
：添付資料番号 4.2.2.1-7（参考）

イヌ 39 週間反復投与毒性試験（[redacted]54RD2）で得られたイヌ血漿中のフルキンチニブ濃度をバリデート済みの LC-MS/MS 法を用いて測定した。検量線範囲は 0.5～200 ng/mL であった。

2.6.4.2.8 [^{14}C]フルキンチニブの合成

一部の吸収及び代謝試験では、[^{14}C]フルキンチニブを用いた（図 2.6.4.2-1）。[^{14}C]フルキンチニブの合成は [redacted], [redacted]において実施した。比活性は 54 mCi/mmol であり、ラジオ HPLC により測定した放射化学的純度は 100%であった。必要に応じて、非標識フルキンチニブを用いて放射性標識体を希釈することにより、各試験で使用する適切な比放射能とした。

図 2.6.4.2-1　[^{14}C]フルキンチニブの構造式



2.6.4.2.9 代謝試験における分析

尿、胆汁、ケージ洗液、血漿、糞抽出物及び投与検体に含まれる放射能は、液体シンチレーションカウンター（LSC）により測定した。糞検体はイソプロパノール／水（50/50、v/v）でホモジナイズし、オキシダイザーで燃焼させた後に LSC で測定した。組織中放射能濃度の測定は、定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）法により行った。

2.6.4.3 吸収

マウス、ラット、モルモット及びイヌにフルキンチニブを単回又は反復投与したときの吸収及び薬物動態を検討した。また、フルキンチニブの膜透過性及び排出輸送の可能性を in vitro で検討した。毒性試験で得られた反復投与時の TK データの概要を 2.6.7.3 に示す。

2.6.4.3.1 In vitro 試験

2.6.4.3.1.1 Caco-2 細胞におけるフルキンチニブの膜透過性及び排出輸送の検討（報告書 DMPKR20[redacted]0007-01）

：添付資料番号 4.2.2.2-1（評価）

フルキンチニブの膜透過性及び排出輸送を検討した。Caco-2 細胞を用いてフルキンチニブの見かけの透過性を検討し、濃度依存的及び時間依存的な双方向輸送を評価した。

フルキンチニブを 0.5、1 及び 5 μM の濃度で頂端膜（A）側又は基底膜（B）側のいずれかに添加し、吸収方向（頂端側膜側から基底膜側へ、A＞B）及び排出方向（基底膜側から頂端膜側へ、B＞A）の両方向の輸送を、見かけの透過係数（P_{app}）及び排出比（$P_{app\ B>A}$／$P_{app\ A>B}$）を算出して評価した。0.5～5 μM の濃度で、フルキンチニブの排出比は 1 に近く、$P_{app\ A>B}$ は約 30×10^{-6} cm/s であった。排出トランスポーター阻害薬であるベラパミルの共存下で、フルキンチニブの透過性及び排出比に顕著な影響は認められなかった。以上の結果より、フルキンチニブの膜透過性は高く、P-gp などの排出トランスポーターの基質ではないことが示唆される。

2.6.4.3.2 単回投与時の薬物動態

2.6.4.3.2.1 マウスに単回静脈内（2.5 mg/kg）又は単回経口（10 mg/kg）投与したときのフルキンチニブの探索的薬物動態評価（報告書 DMPKR20[redacted]0001-01）

：添付資料番号 4.2.2.2-2（参考）

雄 ICR マウス（6 例／群）にフルキンチニブを単回静脈内（2.5 mg/kg）又は単回経口投与（10 mg/kg）したときの血漿中フルキンチニブの PK を評価した。

フルキンチニブ 2.5 mg/kg を単回静脈内投与したときの投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{∞}）は 10497 ng·h/mL であった。最高血漿中濃度（C_{max}）は 3490 ng/mL であり、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）は 0.1 時間であった。全身 CL、消失半減期（$t_{1/2}$）及び終末相における分布容積（V_z）はそれぞれ 3.3 mL/min/kg、2.4 時間及び 700 mL/kg であった。CL は、マウスにおける肝血流量（90 mL/min/kg）と比較して極めて低かった[1]。

フルキンチニブ 10 mg/kg を単回経口投与後の AUC_{∞}は 17649 ng·h/mL であり、経口投与後のバイオアベイラビリティは 43.2%であった。C_{max} は 2057 ng/mL、t_{max} は 2.0 時間、$t_{1/2}$ は 2.0 時間、CL は 3.3 mL/min/kg、V_z は 600 mL/kg であった（表 2.6.4.3-1）。

表 2.6.4.3-1　フルキンチニブを単回静脈内又は単回経口投与後のフルキンチニブの PK パラメータ（ICR マウス）

PK パラメータ	静脈内投与 フルキンチニブ 2.5 mg/kg	経口投与 フルキンチニブ 10 mg/kg
AUC_{∞} (ng·h/mL)	10497	17649
C_{max} (ng/mL)	3490	2057
t_{max} (hours)	0.1	2.0
CL (mL/min/kg)	3.3	3.3
$t_{½}$ (hours)	2.4	2.0
V_z (mL/kg)	700	600

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0001-01
AUC_{∞}：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、CL：クリアランス、C_{max}：最高血漿中濃度、PK：薬物動態、$t_{1/2}$：消失半減期、t_{max}：最高血漿中濃度到達時間、V_z：終末相における分布容積
PK パラメータは 3 例の平均値±標準偏差を示す。

2.6.4.3.2.2 Sprague Dawley ラットに単回経口又は単回静脈内投与したときのフルキンチニブの薬物動態（報告書 RP-HMPL-013-ADME-1_RPK）

：添付資料番号 4.2.2.2-3（参考）

雌雄 Sprague Dawley ラット（3 例／群）にフルキンチニブを単回経口投与（0.5、1 又は 2 mg/kg）又は単回静脈内投与（1 mg/kg）したときの血漿中フルキンチニブの PK を評価した。

フルキンチニブ 1 mg/kg を単回静脈内投与したとき、投与後 0 時間から最終定量可能時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{last}）の平均値は 2424 ng·h/mL であり、CL、$t_{1/2}$ 及び V_z の平均値はそれぞれ 8.017 mL/min/kg、1.03 時間及び 650 mL/kg であった。フルキンチニブを投与したときの曝露量は、雄よりも雌で高かった（平均 AUC_{last} は 1769 ng·h/mL に対し 3079 ng·h/mL）。

フルキンチニブ 0.5、1 又は 2 mg/kg を単回経口投与したとき、t_{max} は投与後 1.8～2.3 時間、C_{max} の平均値はそれぞれ 84.4、326 及び 552 ng/mL、$t_{1/2}$ は 1.17～1.76 時間であった。AUC_{last} の平均値はそれぞれ 302、1130 及び 2989 ng·h/mL であった。フルキンチニブ 1 又は 2 mg/kg を経口投与したときの C_{max} は、0.5 mg/kg 投与時のそれぞれ 3.9 及び 6.5 倍、AUC_{last} の平均値はそれぞれ 3.7 及び 9.9 倍と、用量比を上回る増加を示した。

AUC_{last} の平均値に基づくと、ラットにおけるフルキンチニブの絶対的経口バイオアベイラビリティは、0.5、1 及び 2 mg/kg を単回経口投与したとき、それぞれ 24.9%、46.6%及び 61.7%であった。AUC は用量比を上回る増加を示し、雌ラットにおける曝露量（AUC 及び C_{max}）は雄ラットよりもわずかに大きかった（2 倍未満）。

2.6.4.3.2.3 Sprague Dawley ラットに単回経口投与（2 mg/kg）又は単回静脈内投与（1 mg/kg）したときの[^{14}C]フルキンチニブの薬物動態（報告書 RTC00537）

：添付資料番号 4.2.2.5-1（参考）

雌雄 Sprague Dawley ラット（3 例／群）にフルキンチニブ 2 mg/kg（100 µCi/kg）を単回経口投与又は 1 mg/kg（100 µCi/kg）を単回静脈内投与したときの血漿中総放射能の PK パラメータを評価した。

[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を単回経口投与したとき、PK パラメータは雌雄ラットで同程度であった（2 倍以下）。血漿中放射能の平均 t_{max} は 4 時間（雌雄）、平均 C_{max} は 2199 ng Eq/mL

（雄）及び 1675 ng Eq·h/mL（雌）、平均 AUC_{last} は 20290 ng Eq·h/mL（雄）及び 17841 ng Eq·h/mL（雌）、平均滞留時間（MRT）は 6.63 時間（雄）及び 7.39 時間（雌）、$t_{1/2}$ は 4.92 時間（雄）及び 5.15 時間（雌）であった。絶対的な経口バイオアベイラビリティは雄で 145.85%、雌で 71.69%と、雌に比べ雄が高かった。

[^{14}C]フルキンチニブ 1 mg/kg を単回静脈内投与したときの PK パラメータは、平均 AUC_{last} は 6956 ng Eq·h/mL（雄）及び 12444 ng Eq·h/mL（雌）、平均 MRT は 4.17 時間（雄）及び 5.81 時間（雌）、平均 $t_{1/2}$ は 5.36 時間（雄）及び 5.43 時間（雌）、CL は 4.07 mL/min/kg（雄）及び 1.34 mL/min/kg（雌）、定常状態における分布容積（V_{ss}）の平均値は 477 mL/kg（雄）及び 826 mL/kg（雌）であった（表 2.6.4.3-2）。

表 2.6.4.3-2　雌雄 Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブを単回静脈内投与（1 mg/kg）又は単回経口投与（2 mg/kg）投与したときの血漿中放射能の PK パラメータ

PK パラメータ	血漿中総放射能濃度			
	IV（1 mg/kg [100 μCi/kg]）		Oral（2 mg/kg [100 μCi/kg]）	
	雄 [a]	雌	雄	雌
t_{max} (h)	NA	NA	4 ± 0	4 ± 0
C_{max} [b] (ng Eq/mL)	1964 ± 570	2167 ± 557	2199 ± 552	1675 ± 212
AUC_{last} [b] (ng Eq·h/mL)	6956 ± 4422	12444 ± 929	20290 ± 5761	17841 ± 4593
AUC_{∞} [b] (ng Eq·h/mL)	6982 ± 4427	12472 ± 925	20381 ± 5771	17957 ± 4540
CL [b] (mL/h/kg)	244 ± 241	80.5 ± 5.92	NA	NA
V_{ss} [b] (mL/kg)	826 ± 471	477 ± 39.9	NA	NA
MRT_t (h)	4.17 ± 1.60	5.81 ± 0.04	6.63 ± 0.81	7.39 ± 1.56
$t_{½}$ (h)	5.36 ± 0.61	5.43 ± 0.20	4.92 ± 1.53	5.15 ± 1.12
F [c] (%)	NA	NA	145.85	71.69

出典：報告書 RTC00537

AUC_{last}：投与後 0 時間から最終定量可能時点までの濃度－時間曲線下面積、AUC_{∞}：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、CL：クリアランス、C_{max}：最高血漿中濃度、Eq：equivalent、F%：バイオアベイラビリティ、IV：静脈内投与、MRT_t：平均滞留時間、NA：該当せず、PK：薬物動態、po：経口投与、$t_{1/2}$：消失半減期、t_{max}：最高血漿中濃度到達時間、V_{ss}：定常状態における分布容積

[a] 雄ラット No.02 の血中及び血漿中の総放射能濃度は、同群の他の動物に比べて速やかに低下した。雄ラット No.02 の CL は他の雄ラットの約 5 倍であり、AUC_{last} は 1/5 であった。この動物を除外した場合、雄ラットの絶対的バイオアベイラビリティは、表中に記載した値より低値となる。

[b] C_{max}、AUC、CL 及び V_{ss} は、血漿 1 g を血漿 1 mL に換算して算出した。

[c] $F=[Dose_{iv} \times (AUC_{last})po] / [Dose_{po} \times (AUC_{last})_{iv}]$

PK パラメータは 3 例の平均値±標準偏差を示す。

2.6.4.3.2.4 Sprague Dawley ラットに単回経口投与したときのフルキンチニブ及び代謝物（M9 及び M11）の薬物動態（報告書 DMPKR20[redacted]0008-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.2-4（参考）

雌雄 Sprague Dawley ラット（3 例／群）にフルキンチニブ 20 mg/kg を単回経口投与したときのフルキンチニブ及び代謝物（M9 及び M11）の PK プロファイルを評価した。

平均 PK パラメータを表 2.6.4.3-3 に示す。本試験の結果から、血漿中の M9 及び M11 の曝露量は、フルキンチニブより小さいことが明らかとなった。明らかな性差は認められなかった。

表 2.6.4.3-3　Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを単回経口投与後の血漿中フルキンチニブ、M9 及び M11 の薬物動態パラメータ

PK Parameter	フルキンチニブ		M9		M11	
	雄	雌	雄	雌	雄	雌
MRT (h)	5.50 ±0.292	6.24 ± 0.297	NA	NA	NA	NA
$t_{½}$ (h)	2.42 ± 0.793	7.72 ± 0.284	NA	NA	NA	NA
AUC_{last} (ng·h/mL)	37548 ± 11909	32059 ± 9364	40.5 ± 33.9	42.4 ± 7.96	445 ± 122	469 ± 162
AUC_{∞} (ng·h/mL)	37620 ± 11837	32084 ± 9368	NA	NA	NA	522 ± 206
C_{max} (ng/mL)	4003 ± 784	3543 ± 1200	8.02 ± 7.31	7.32 ± 1.83	32.7 ± 11.7	29.7 ± 10.9
t_{max} (h)	3.33 ± 1.15	2.67 ± 1.15	5.33 ± 2.31	5.33 ± 2.31	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00
AUC_M/P ratio [a] (%)	NA	NA	0.0963 ±0.0576	0.138 ±0.0400	1.20 ±0.137	1.45 ±0.0985

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0008-E-01　Table 16

AUC_{last}：投与後 0 時間から最終定量可能時点までの濃度－時間曲線下面積、AUC_{∞}：投与後 0 時間から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、M9：フルキンチニブの代謝物（HM5024093 又は M380）、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、MRT：平均滞留時間、M/P：代謝物／親化合物、NA：該当せず、PK：薬物動態、$t_{1/2}$：消失半減期、t_{max}：最高血漿中濃度到達時間

[a]　AUC_M/P ratio =各動物における代謝物の AUC_{last}／親化合物の AUC_{last}×100%

PK パラメータは 3 例の平均値±標準偏差を示す。

2.6.4.3.2.5 モルモットを用いた単回経口投与光毒性試験における TK（報告書 [redacted]186PT02）

：添付資料番号 4.2.3.7.7-1（参考）

モルモットを用いた光毒性試験（報告書 [redacted]186PT02）の一環として、フルキンチニブ及び代謝物 M11 の TK パラメータを測定した。

本試験の TK パラメータの平均値の要約を表 2.6.4.3-4 に示す。

モルモットにフルキンチニブ 5、25 又は 100 mg/kg を単回経口投与したとき、フルキンチニブ及び M11 が検出された。100 mg/kg 群のフルキンチニブの平均 C_{max} は 5880 ng/mL（雄）及び 6920 ng/mL（雌）、平均 AUC_{24} は 85400 ng·h/mL（雄）及び 103000 ng·h/mL（雌）であった。また、100 mg/kg 群の M11 の平均 C_{max} は 497 ng/mL（雄）及び 502 ng/mL（雌）、平均 AUC_{24} は 6670 ng·h/mL（雄）及び 7830 ng·h/mL（雌）であった。

モルモットに単回投与したときのフルキンチニブ及び M11 の C_{max} 及び AUC_{24} は用量の増加に伴い増加したが、25～100 mg/kg の用量範囲で用量比を下回る増加を示した。いずれの用量においても、フルキンチニブ及び M11 の曝露量に性差は認められなかった。

表 2.6.4.3-4　モルモットにフルキンチニブを単回経口投与後のフルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ

TK パラメータ	用量 (mg/kg)	フルキンチニブ		M11	
		雄	雌	雄	雌
t_{max} (h)	5	1.5	2	4	4
	25	2	3	8	8
	100	6	6	8	8
C_{max} (ng/mL)	5	1090 ± 95.5	1030 ± 124	27.3 ± 2.35	34.6 ± 1.78
	25	3500 ± 602	3110 ± 428	139 ± 21.0	184 ± 37.9
	100	5880 ± 1380	6920 ± 1820	497 ± 135	502 ± 186
AUC_{24} (ng·h/mL)	5	8510 ± 704	9640 ± 1200	148 ± 11.7	197 ± 16.0
	25	40300 ± 7650	39900 ± 6710	1990 ± 315	2570 ± 491
	100	85400 ± 17700	103000 ± 18100	6670 ± 1380	7830 ± 2040

出典：報告書 ■186PT02
AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、TK：トキシコキネティクス、t_{max}：最高血漿中濃度到達時間
TK パラメータは 4 例の平均値±標準偏差を示す。

2.6.4.3.2.6 ビーグル犬に単回経口及び単回静脈内投与したときのフルキンチニブの薬物動態（報告書 RP-HMPL-013-ADME-1_DPK）

：添付資料番号 4.2.2.2-5（参考）

雌雄ビーグル犬（3 例／群）に単回静脈内及び単回経口投与したときのフルキンチニブの PK を検討し、フルキンチニブ原末と添加剤を含む混合粉末製剤との生物学的同等性、絶対的経口バイオアベイラビリティ、PK の線形性及び摂餌の影響を検討した。

本試験は、4 群（雌雄各 3 例／群）で実施し、各投与の間に 7 日間のウォッシュアウト期間を設けた。

絶食下のビーグル犬に、添加剤を含む混合粉末製剤を充てんしたゼラチンカプセルを用いてフルキンチニブを 0.1、0.3 又は 1 mg/kg の用量で経口投与、フルキンチニブ原末を充てんしたゼラチンカプセルを用いてフルキンチニブを 0.3 mg/kg の用量で経口投与、又はフルキンチニブを 0.3 mg/kg の用量で静脈内投与した。摂餌の影響を検討するために、飽食下で混合粉末製剤を充てんしたゼラチンカプセルを用いて 1 mg/kg の用量で経口投与した。

フルキンチニブ 0.3 mg/kg を単回静脈内投与したとき、平均 AUC_{last} は 3438 ng•h/mL、平均 CL は 1.35 mL/min/kg、平均 V_z は 1640 mL/kg であった。CL は肝血流量（30.9 mL/min/kg[1]）の 4%であったことから、イヌにおけるフルキンチニブの CL は低いことが示唆された。血漿中フルキンチニブの平均 $t_{1/2}$ は 14 時間と、イヌにおける消失は緩徐であった。

混合粉末製剤を充てんしたカプセルとしてフルキンチニブを 0.1、0.3 又は 1 mg/kg の用量で絶食下に単回経口投与したとき、t_{max} は 2.7～4.0 時間、$t_{1/2}$ は 11.5～15.7 時間であった。平均 C_{max} は、それぞれ 60.1、129 及び 352 ng/mL であり、平均 AUC_{last} は、それぞれ 744、1815 及び 5374 ng•h/mL であった。0.1～1 mg/kg の用量範囲で、C_{max} の増加は用量比を若干下回り、AUC_{last} の増加は概ね用量に比例した。

混合粉末製剤を充てんしたカプセルとしてフルキンチニブを絶食下に単回経口投与したときのビーグル犬における絶対的バイオアベイラビリティは、0.1、0.3 及び 1 mg/kg の用量で、それぞれ 64.9%、52.8%及び 46.9%であった。

原末を充てんしたカプセルとしてフルキンチニブを 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、平均 C_{max} は 101 ng/mL、t_{max} は 2.8 時間、平均 AUC_{last} は 1615 ng•h/mL であった。フルキンチニブ 0.3 mg/kg を、原末を充てんしたカプセルとして経口投与したときの平均 C_{max} 及び AUC_{last} は、混合粉末製剤を充てんしたカプセルとして経口投与したときの 78.1%及び 89.0%であった。これら 2 群の間に統計学的な差は認められなかった（$p>0.05$）。

混合粉末製剤を充てんしたカプセルとしてフルキンチニブ 1.0 mg/kg を飽食下に投与したときの平均 C_{max} は絶食時投与に比べ 16%低下し、平均 AUC_{last} は 47%増加（$p>0.05$）した。また、t_{max} に顕著な差は認められなかった。フルキンチニブの PK パラメータに統計学的に有意な摂餌の影響（$p>0.05$）並びに顕著な PK プロファイルの性差は認められなかった。

表 2.6.4.3-5　ビーグル犬にフルキンチニブを単回経口投与したときの PK パラメータ

投与量（mg/kg） 投与経路、剤型	性／ 動物数／群	PK パラメータ t_{max} (h)	 C_{max} (ng/mL)	 AUC_{last} (ng·h/mL)	 AUC_{∞} (ng·h/mL)	 MRT_{∞} (h)	 $t_{½}$ (h)	 CL (L/h/kg)	 V_z (L/kg)
0.3	雄／3	1.7± 1.2	247 ± 35	3193 ± 423	3453 ± 326	18.3 ± 2.4	13.4 ± 4.0	0.09 ± 0.008	1.72 ± 0.64
静脈内投与	雌／3	0.22 ± 0.24	269 ± 6.4	3682 ± 157	4057 ± 167	19.5 ± 0.9	14.6 ± 0.5	0.07 ± 0.003	1.56 ± 0.07
0.1	雄／3	2.3 ± 0.6	57.2 ± 20.9	712 ± 210	759 ± 235	17.0 ± 1.2	12.2 ± 1.8	ND	ND
経口投与、カプセル [a]	雌／3	3.0 ± 1.0	62.9 ± 16.2	776 ± 186	822 ± 210	16.9 ± 3.8	10.8 ± 3.6	ND	ND
0.3	雄／3	4.0 ± 0.0	160 ± 48	2071 ± 393	2338 ± 487	22.7 ± 1.7	15.9 ± 1.1	ND	ND
経口投与、カプセル [a]	雌／3	4.0 ± 0.0	98.6 ± 57.0	1560 ± 880	1756 ± 970	22.7 ± 0.9	15.4 ± 0.9	ND	ND
1.0	雄／3	3.7 ± 0.6	359 ± 243	5392 ± 3086	6140 ± 3522	23.0 ± 6.1	14.0 ± 6.8	ND	ND
経口投与、カプセル [a]	雌／3	4.0 ± 0.0	345 ± 38	5356 ± 808	5997 ± 655	23.1 ± 3.5	14.4 ± 5.2	ND	ND
1.0	雄／3	3.0 ± 0.0	316 ± 57	8123 ± 1250	10132 ± 2546	30.5 ± 10.2	19.1 ± 11.4	ND	ND
経口投与 [b]、カプセル [a]	雌／3	4.3 ± 2.5	274 ± 85	7696 ± 1887	8455 ± 2395	23.1 ± 2.2	12.4 ± 4.3	ND	ND
0.3	雄／3	3.0 ± 1.0	123 ± 44	1812 ± 552	1877 ± 535	17.6 ± 0.7	9.07 ± 2.54	ND	ND
経口投与、原末カプセル	雌／3	2.7 ± 1.2	78.3 ± 42.4	1418 ± 563	1535 ± 619	19.9 ± 0.4	12.3 ± 1.3	ND	ND

出典：報告書 RP-HMPL-013-ADME-1_DPK

AUC_{last}：投与後 0 時間から最終定量可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC_{∞}：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、CL：クリアランス、C_{max}：最高血漿中濃度、MRT_{∞}：投与後 0 時間から無限大時間までの平均滞留時間、ND：測定せず、PK：薬物動態、$t_{1/2}$：消失半減期、t_{max}：最高血漿中濃度到達時間、V_z：終末相おける分布容積

[a] 原末及び添加剤を含む混合粉末製剤を充てんした。

[b] 投与前にイヌに給餌した。

PK パラメータは 3 例の平均値±標準偏差を示す。

2.6.4.3.2.7 ビーグル犬にフルキンチニブを単回経口投与したときのフルキンチニブ、M9 及び M11 の薬物動態（報告書 DMPKR20[redacted]0004-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.2-6（評価）

雌雄ビーグル犬（3 例／群）にフルキンチニブ 1 mg/kg を単回経口投与したときのフルキンチニブ、M9 及び M11 の PK プロファイルを評価した（表 2.6.4.3-6）。

イヌにおけるフルキンチニブ、M9 及び M11 の曝露量に明らかな性差は認められなかった。本試験の結果から、ビーグル犬にフルキンチニブを経口投与したときの M9 及び M11 の濃度が未変化体に比べ低いことが示された。

結果の要約を 2.6.5.3H に示す。

表 2.6.4.3-6　ビーグル犬にフルキンチニブ 1 mg/kg を単回経口投与したときのフルキンチニブ、M9 及び M11 の薬物動態パラメータ

PK	フルキンチニブ			M9			M11		
パラメータ	雄	雌	平均	雄	雌	平均	雄	雌	平均
AUC_{∞} (ng·h/mL)	5990 ± 3842	7904 ± 4464	6947 ± 3869	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AUC_{last} (ng·h/mL)	4927 ± 3213	7311 ± 4000	6119 ± 3498	200 ± 173	282 ± 233	241 ± 189 (3.29 ± 1.86%) [a]	224 ± 215	344 ± 392	284 ± 290 (3.47 ± 2.63%) [a]
C_{max} (ng/mL)	148 ± 144	337 ± 304	242 ± 237	4.61 ± 4.15	9.25 ± 9.66	6.93 ± 7.12	5.14 ± 4.69	7.50 ± 7.38	6.32 ± 5.68
t_{max} (h)	10.7 ± 11.5	10.7 ± 11.5	10.7 ± 10.3	17.3 ± 26.6	10.7 ± 11.5	14.0 ± 18.7	32.0 ± 27.7	40.0 ± 13.9	36.0 ± 20.1
$t_{½}$ (h)	26.1 ± 5.76	17.7 ± 3.35	21.9 ± 6.22	NA	NA	NA	NA	NA	NA
MRT (h)	42.9 ± 9.19	28.5 ± 5.82	35.7 ± 10.5	NA	NA	NA	NA	NA	NA

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0004-E-01

AUC_{last}：投与後 0 時間から最終定量可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC_{∞}：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、h：時間、M9：フルキンチニブ代謝物（HM5024093 又は M380）、M11：フルキンチニブ代謝物（HM5025423 又は M379-3）、MRT：平均滞留時間、NA：該当せず、PK：薬物動態、$t_{1/2}$：消失半減期、t_{max}：最高血漿中濃度到達時間

PK パラメータは 3 例の平均値±標準偏差を示す。

[a]　フルキンチニブの AUC_{last} に対する M9 又は M11 の AUC_{last} の割合（%）

2.6.4.3.3 反復投与時の薬物動態

2.6.4.3.3.1 Sprague Dawley ラットに反復経口及び反復静脈内投与したときのフルキンチニブの薬物動態（報告書 RP-HMPL-013-ADME-1_RPK）

：添付資料番号 4.2.2.2-3（参考）

雌雄 Sprague Dawley ラット（3 例／群）にフルキンチニブ 1 mg/kg を反復経口投与したときの血漿中フルキンチニブの PK を評価した。

1 mg/kg の用量で反復経口投与したとき、投与 7 日の平均 C_{max} 及び AUC_{last} は単回投与後のそれぞれ 1.7 倍及び 2.8 倍であった（本試験で実施した単回投与の結果は 2.6.4.3.2.2 を参照）。投与 1 日及び投与 7 日の t_{max} はそれぞれ 2.3 時間及び 2.5 時間であり、$t_{1/2}$ はそれぞれ 1.72 時間及び 2.60 時間であった。1 mg/kg を反復経口投与したときのラット血漿中フルキンチニブの PK パラメータを表 2.6.4.3-7 に示す。

表 2.6.4.3-7　Sprague Dawley ラットに反復経口投与したときのフルキンチニブの薬物動態パラメータ（投与 7 日）

PK パラメータ	雄	雌	平均
t_{max} (h)	2.7 ± 1.2	2.3 ± 0.6	2.5 ± 0.8
C_{max} (ng/mL)	512 ± 102	382 ± 117	447 ± 121
C_{min} (ng/mL)	1.30 ± 1.29	0.77 ± 0.88	1.03 ± 1.03
C_{avg} (ng/mL)	147 ± 80	85.6 ± 6.4	117 ± 61
AUC_{ss} (ng·h/mL)	3539 ± 1929	2053 ± 153	2796 ± 1470
AUC_{last} (ng·h/mL)	3539 ± 1929	2053 ± 153	2796 ± 1470
AUC_{∞} (ng·h/mL)	3551 ± 1925	2227 ± 217	2889 ± 1424
$t_{½}$ (h)	2.02 ± 0.38	3.17 ± 1.38	2.60 ± 1.10
DF	3.96 ± 1.40	4.40 ± 1.00	4.18 ± 1.11

出典：報告書 HMPL-013-ADME-1_RPK

AUC_{last}：投与後 0 時間から最終定量可能時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUC_{∞}：投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、AUCss：定常状態における血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{avg}：平均血漿中濃度、C_{max}：最高血漿中濃度、C_{min}：最低血漿中濃度、DF：定常状態の平均血漿中濃度と C_{max} の割合、PK：薬物動態、$t_{1/2}$：消失半減期、t_{max}：最高血漿中濃度到達時間

PK パラメータは反復投与 7 日における 3 例の平均値±標準偏差を示す。

2.6.4.3.4 毒性試験における TK データの要約

2.6.4.3.4.1 ラット

（1）ラット小核試験及びコメットアッセイにおける TK（報告書 8456891）

：添付資料番号 4.2.3.3.2-2（評価）

小核／コメットアッセイ（報告書 8456891）の一環として、フルキンチニブ及び代謝物 M11 の TK パラメータを測定した。

フルキンチニブ及び M11 の全身曝露は 500、1000 又は 2000 mg/kg で確認され、C_{max} 及び投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{24}）ともに用量比以下の増加を示した。未変化体に対する代謝物 M11 の曝露の比は、C_{max} で 0.0150 から 0.0184、AUC_{24} で 0.0159 から 0.0197 であった。本試験の TK パラメータ値を表 2.6.4.3-8 に示す。

表 2.6.4.3-8　Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 1 日 1 回 3 日間経口投与したときのフルキンチニブの TK パラメータ

動物	投与方法	投与量 (mg/kg/day)	TK パラメータ（単回経口投与後）			
			C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)	
			フルキンチニブ	M11	フルキンチニブ	M11
Sprague Dawley ラット（雄）	反復経口投与（3 日間）	500	10900	163	161000	2530
		1000	10900	198	162000	3060
		2000	10900	194	169000	3040

出典：報告書 8456891
AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、TK：トキシコキネティクス
TK パラメータは 3 例の平均値を示す。

（2）Sprague Dawley ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験における TK（報告書 ■49RD1）

：添付資料番号 4.2.3.2-1（参考）

Sprague Dawley ラットを用いた 4 週間反復経口投与毒性試験（報告書 ■49RD1）の一環として、フルキンチニブの TK パラメータを測定した。

雌雄の平均 t_{max} の範囲（最小値、最大値）は投与 1 日で 2～5 時間、投与 28 日で 2～7 時間であった。投与 1 日及び投与 28 日の各用量の AUC 及び C_{max} に性差は認められなかった。投与 1 日のフルキンチニブの C_{max} 及び AUC_{24} は、2 mg/kg/日から 60 mg/kg/日の用量範囲で用量比以下の増加を示した。ラットにフルキンチニブを反復投与しても明らかな蓄積は認められなかった。本試験の TK パラメータ値を表 2.6.4.3-9 に示す。

表 2.6.4.3-9　Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 4 週間反復経口投与したときのフルキンチニブの TK パラメータ

動物	投与経路	投与量（mg/kg/日）	性	TK パラメータ			
				C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)	
				1 日	28 日	1 日	28 日
Sprague Dawley ラット（雄）	反復経口投与	2	雄	1128 ± 231	750 ± 35	9236 ± 774	6748 ± 916
			雌	1433 ± 121	873 ± 480	13231 ± 1717	6890 ± 3553
		20	雄	4250 ± 137	3370 ± 417	49567 ± 5895	50281 ± 8499
			雌	5546 ± 1206	3232 ± 353	70862 ± 15019	38652 ± 9275
		60	雄	5322 ± 324	NA	65093 ± 7506	NA
			雌	6571 ± 735	3456 ± NA	86101 ± 8426	60316 ± NA

出典：報告書 ■49RD1
AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3、NA：該当せず、TK：トキシコキネティクス、
TK パラメータは 3 例の平均値±標準偏差を示す。

（3）Sprague Dawley ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験における TK（報告書 8426159）

：添付資料番号 4.2.3.2-2（評価）

Sprague Dawley ラットを用いた 13 週間反復経口投与毒性試験（報告書 8426159）の一環として、フルキンチニブ及び代謝物 M11 の TK を測定した。

対照群でのフルキンチニブ及びM11の血漿中濃度はいずれも定量下限(LLOQ)(1.00 ng/mL)未満であった。フルキンチニブの雌雄の平均 t_{max} の範囲（最小値、最大値）は、投与1日及び投与91日で1～4時間、投与44日で2～4時間であった。投与1日及び投与91日におけるフルキンチニブ及びM11の C_{max} 及び AUC_{24} は概ね用量に依存して増加した。雌雄の曝露量の比較では、明らかな性差は認められなかった

反復投与による影響として、0.3及び0.6 mg/kg/日における比（投与91日／投与1日）は、フルキンチニブの C_{max} 及び AUC_{24} がそれぞれ1.66～2.39倍及び1.69～2.51倍、M11の C_{max} 及び AUC_{24} がそれぞれ1.74～3.39倍及び3.53～4.87倍であったことから、フルキンチニブでわずかな蓄積、M11では明らかな蓄積が認められた。2.4 mg/kg/日における比（投与91日／投与44日）は、フルキンチニブの C_{max} 及び AUC_{24} がそれぞれ0.895～1.21倍及び0.819～1.13倍、M11の C_{max} 及び AUC_{last} がそれぞれ0.862～1.13倍及び0.891～1.28倍であり、蓄積は認められなかった。

本試験のTKパラメータ値を表 2.6.4.3-10 に示す。

表 2.6.4.3-10　Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 13 週間反復経口投与したときのフルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ

動物	投与経路	投与量 (mg/kg/日)	性	フルキンチニブ						M11					
				C_{max} (ng/mL)			AUC_{24} (ng·h/mL)			C_{max} (ng/mL)			AUC_{24} (ng·h/mL)		
				1 日	44 日	91 日	1 日	44 日	91 日	1 日	44 日	91 日	1 日	44 日	91 日
Sprague Dawley ラット	反復経口投与	0.3	雄	140	NA	268	905	NA	1530	0.830	NA	2.61	NA [a]	NA	35
			雌	168	NA	401	647	NA	1630	0.703	NA	2.39	NA [a]	NA	19
		0.6	雄	300	NA	497	1170	NA	2150	2.25	NA	3.91	13	NA	61
			雌	351	NA	760	2180	NA	4360	2.86	NA	5.21	21	NA	72
		1.2/2.4 [b]	雄	502	1840	2230	2790	16100	18200	3.31	27.9	31.6	28	388	496
			雌	652	2290	2050	3090	16700	13600	4.23	17.6	15.2	41	277	247

出典：報告書 8426159

AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度―時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、NA：該当せず、TK：トキシコキネティクス

a　0.3 mg/kg 群の M11 については、定量可能な血漿中濃度が 3 時点未満の場合は AUC 値を報告していない。

b　投与 44 日から変更した。

TK パラメータは 6 例の平均値を示す。

（4）Sprague Dawley ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験における TK
（報告書 ■54RD1）

：添付資料番号 4.2.3.2-3（参考）

Sprague Dawley ラットを用いた 26 週間反復経口投与毒性試験（報告書 ■54RD1）の一環として、フルキンチニブの TK を測定した。

雌雄の平均 t_{max} の範囲（最小値、最大値）は 2～8 時間であった。投与 1 日の AUC_{24} 及び C_{max} は、いずれも 0.5～5 mg/kg の用量範囲では用量に比例して増加したが、10 mg/kg で用量比を下回って増加した。投与 91 日の AUC_{24} 及び C_{max} は 0.25～1.5 mg/kg の用量範囲内であり、用量比例性が認められたが、投与 182 日では、用量比を下回って増加した。

ラットに最長 182 日間反復投与しても、顕著な蓄積は認められなかった。曝露量の性差は 2 倍未満であり、顕著な性差は認められなかった。

本試験の TK パラメータ値を表 2.6.4.3-11 に示す。

表 2.6.4.3-11　Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを 26 週間反復経口投与したときの TK パラメータ

動物	投与経路	投与量（mg/kg/日）	性	C_{max} (ng/mL)			AUC_{24} (ng·h/mL)		
				1 日	91 日	182 日	1 日	91 日	182 日
Sprague Dawley ラット	反復経口投与	0.5/0.25 [a]	雄	352	202	348	3098	2099	4445
			雌	369	271	307	3409	2439	2907
		1.5/0.75[a]	雄	938	785	554	9080	7441	5892
			雌	1120	830	709	11062	6031	5964
		5/3 [b]/1.5 [a]	雄	2780	1383	853	28181	13151	9313
			雌	3670	1517	926	36027	13146	10304
		10/6 [b]	雄	4013	NA[c]	NA[c]	43901	NA[c]	NA [c]
			雌	4507	NA[c]	NA[c]	52848	NA[c]	NA [c]

出典：報告書 [redacted]54RD1

AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、NA：該当せず、TK：トキシコキネティクス

[a] 投与 50 日から変更。

[b] 投与 29 日から変更。

[c] すべての動物が投与 68 日以前に死亡したため、データは得られなかった。

TK パラメータは 6 例の平均値を示す。

（5）Sprague Dawley ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験における TK（報告書 ■54RB1）

：添付資料番号 4.2.3.5.2-1（参考）

妊娠雌 Sprague Dawley ラットを用いた胚・胎児発生（EFD）毒性試験（報告書 ■54RB1）の一環として、妊娠雌ラットに妊娠 6～15 日まで、フルキンチニブ 0（溶媒対照）、0.025、0.1 又は 0.25 mg/kg を反復経口投与した後のフルキンチニブの TK を検討した。

妊娠ラットにおけるフルキンチニブの曝露量（C_{max} 及び AUC_{24}）は用量比に伴い増加した。妊娠 6～15 日まで反復投与による蓄積は認められなかった。本試験の TK パラメータ値を表 2.6.4.3-12 に示す。

表 2.6.4.3-12　妊娠雌 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを反復経口投与したときのフルキンチニブの TK パラメータ

動物	投与経路 [a]	投与量（mg/kg/日）	性	C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng•h/mL)	
				GD6	GD15	GD6	GD15
Sprague Dawley ラット	反復経口投与	0.025	雌	17.9 ± 2.77	24.2 ± 0.45	121 ± 11	152 ± 6
		0.1	雌	76.7 ± 11.5	113 ± 4.04	758 ± 275	1130 ± 81
		0.25	雌	179 ± 19.7	266 ± 28.0	1799 ± 532	3164 ± 259

出典：報告書 ■54RB1、Toxicokinetics Report　Table 7

AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、GD：妊娠日数、TK：トキシコキネティクス

[a]　フルキンチニブを妊娠 6～15 日まで反復経口投与した。

TK パラメータは 6 例の平均値±標準偏差を示す。

（6）Sprague Dawley ラットを用いた胚・胎児発生用量設定毒性試験における TK（報告書 8449386）

：添付資料番号 4.2.3.5.2-2（参考）

妊娠雌 Sprague Dawley ラットを用いた EFD 毒性試験（報告書 8449386）の一環として、妊娠雌ラットの器官形成期（妊娠 6~17 日）にフルキンチニブ 0（溶媒）、0.05、0.25 又は 1.25 mg/kg/日を反復経口投与したときの TK を検討した。

妊娠 6 日及び妊娠 17 日のフルキンチニブの C_{max} 及び AUC_{24} は、0.05 mg/kg/日から 1.25 mg/kg/日まで用量増加に伴って増加した。妊娠 17 日のフルキンチニブの 0.25 mg/kg/日から 1.25 mg/kg/日の C_{max} 及び AUC_{24} は用量比を上回って増加したが、他の C_{max} 及び AUC_{24} は概ね用量比に伴い増加した。反復投与によるフルキンチニブの蓄積は認められなかった。妊娠 6 及び 17 日における M11 の C_{max} は、0.25 mg/kg/日から 1.25 mg/kg/日への用量増加に伴って増加し、概して用量比を上回って増加した。未変化体に対する代謝物の比は、0.25 及び 1.25 mg/kg/日群の C_{max} で 0.00286 から 0.00680 の範囲であり、高用量群の妊娠 6 及び 17 日における AUC_{24} で 0.00681 から 0.0134 の範囲であった。

本試験の TK パラメータを表 2.6.4.3-13 に示す。

表 2.6.4.3-13　妊娠雌 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを反復経口投与したときのフルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ

動物	投与経路	投与量（mg/kg/日）	性	フルキンチニブ				M11			
				C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)	
				GD6	GD17	GD6	GD17	GD6	GD17	GD6	GD17
Sprague Dawley ラット	反復経口投与	0.05	雌	25.5	26.3	173	134	BLQ[a]	BLQ[a]	BLQ[a]	BLQ[a]
		0.25	雌	114	159	723	744	0.363	0.453	NA[b]	NA[b]
		1.25	雌	893	1510	5590	10300	5.28	10.3	38	138

出典：報告書 8449386、Toxicokinetic Contribution Report　Table 8.1 及び Table 8.2
AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、BLQ：定量下限未満、C_{max}：最高血漿中濃度、GD：妊娠日数、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、NA：該当せず、TK：トキシコキネティクス
[a] 低用量（0.05 mg/kg/日）群では、M11 のすべての濃度値が BLQ であったため、TK 解析は行わなかった。
[b] 0.25 mg/kg/日群では、定量可能な濃度が 3 時点未満であったため、M11 の AUC 値を報告していない。
TK パラメータは 6 例の平均値を示す。
フルキンチニブを妊娠 6～17 日まで反復経口投与した。

（7）Sprague Dawley ラットを用いた胚・胎児発生毒性試験における TK（報告書 8449387）

：添付資料番号 4.2.3.5.2-3（評価）

妊娠雌 Sprague Dawley ラットを用いた EFD 毒性試験（報告書 8449387）の一環として、妊娠雌ラットの器官形成期(妊娠 6~17 日)にフルキンチニブ 0(溶媒)、0.025、0.1 又は 0.25 mg/kg/日の用量を反復経口投与したときの TK を検討した。

妊娠 6 及び 17 日の曝露量（C_{max} 及び AUC_{24}）は、0.025 mg/kg/日から 0.25 mg/kg/日まで用量増加に伴って増加した。反復投与によるフルキンチニブの蓄積は認められなかった。フルキンチニブの C_{max} 及び AUC_{24} は概ね用量に比例して増加した。M11 の濃度のほとんどは定量下限未満（BLQ）であり、0.25 mg/kg/日群の C_{max} のみ算出可能であった。0.25 mg/kg/日群の C_{max} の未変化体に対する代謝物の比は、妊娠 6 日で 0.00647、妊娠 17 日で 0.00472 であった。

本試験の TK パラメータ値を表 2.6.4.3-14 に示す。

表 2.6.4.3-14　妊娠雌 Sprague Dawley ラットにフルキンチニブを反復経口投与したときのフルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ

動物	投与経路	投与量（mg/kg/日）	性	フルキンチニブ				M11			
				C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)	
				GD 6	GD 17	GD 6	GD 17	GD 6	GD 17	GD 6	GD 17
Sprague Dawley ラット	反復経口投与	0.025	雌	15.8	18.7	107	114	BLQ[a]	BLQ[a]	BLQ[a]	BLQ[a]
		0.1	雌	48.0	78.4	234	310	BLQ[a]	BLQ[a]	BLQ[a]	BLQ[a]
		0.25	雌	145	187	1070	1260	0.940	0.883	NC[b]	NC[b]

出典：報告書 8449387、Toxicokinetic Contribution Report　Table 8.1 及び Table 8.2
AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、BLQ：定量下限未満、C_{max}：最高血漿中濃度、GD：妊娠日数、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、NC：算出せず、TK：トキシコキネティクス
[a] 0.025 及び 0.1 mg/kg/日群では、M11 のすべての濃度値が定量下限未満であったため、TK 解析は行わなかった。
[b] 0.25 mg/kg/日群の M11 については定量可能な濃度が 3 時点未満であったため、AUC 値を報告していない。
TK パラメータは 6 例の平均値を示す。
フルキンチニブを妊娠 6 日～17 日まで反復経口投与した。

2.6.4.3.4.2 イヌ

（1）ビーグル犬を用いた 4 週間反復経口投与毒性試験における TK（報告書 ■49RD2）

：添付資料番号 4.2.3.2-4（参考）

ビーグル犬を用いた 4 週間反復経口投与毒性試験（報告書 ■49RD2）の一環として、フルキンチニブの TK を測定した。

投与 1 日の各群の平均 t_{max} は 1～6 時間であった。フルキンチニブの曝露量に明らかな性差は認められなかった。C_{max} 及び AUC_{24} は、0.03～0.3 mg/kg/日の用量範囲で用量に比例して増加した。0.03 及び 0.1 mg/kg/日群における投与 28 日の AUC_{24} は、投与 1 日と比較してそれぞれ 2.86 倍及び 2.37 倍であり、蓄積が認められた。

本試験の TK パラメータを表 2.6.4.3-15 に示す。

表 2.6.4.3-15　ビーグル犬にフルキンチニブを 4 週間反復経口投与したときの TK パラメータ

動物	投与経路	投与量（mg/kg/日）	性	C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)	
				1 日	28 日	1 日	28 日
ビーグル犬	反復経口投与	0.03	雄	6.30 ± 0.92	29.5 ± 22.4	107 ± 4	318 ± 145
			雌	9.04 ± 2.76	29.2 ± 4.7	120 ± 20	320 ± 36
		0.1	雄	17.2 ± 7.5	47.0 ± 14.6	284 ± 91	621 ± 177
			雌	14.5 ± 1.7	49.2 ± 29.0	251 ± 66	614 ± 199
		0.3	雄	77.4 ± 9.7	NA [a]	1348 ± 115	NA [a]
			雌	77.9 ± 12.3	NA [a]	1450 ± 308	NA [a]

出典：報告書 ■49RD2

AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、NA：該当せず、TK：トキシコキネティクス

[a] 0.3 mg/kg/日群の大部分の動物は 28 日目までに死亡したため、データは得られていない。

TK パラメータは 3 例の平均値±標準偏差を示す。

（2）ビーグル犬を用いた 13 週間反復経口投与毒性試験における TK（報告書 8449374）

：添付資料番号 4.2.3.2-5（評価）

ビーグル犬を用いた 13 週間反復経口投与毒性試験（報告書 8449374）の一環として、フルキンチニブ及び代謝物 M11 の TK を測定した。

フルキンチニブ及び M11 の TK パラメータに性差は認められず、C_{max} 及び AUC_{24} の平均値の雌雄比は 2 倍未満であった。t_{max} の中央値は、フルキンチニブでは投与 1 日が 1～2 時間、投与 91 日が 2～3 時間で、M11 で投与 1 日が 24 時間、投与 91 日が 4～18 時間であった。

フルキンチニブ及び M11 の C_{max} 及び AUC_{24} は、概ね用量に比例して増加し、フルキンチニブの反復投与による顕著な蓄積は認められなかった。M11 は反復投与による蓄積が認められ、C_{max} は 2.90～3.44 倍、AUC_{24} で 3.12～4.20 倍に増加した。投与 1 日及び投与 91 日の代謝物／未変化体比は、C_{max} が 0.0226～0.0637、AUC_{24} が 0.0250～0.0618 であった。

本試験の TK パラメータを表 2.6.4.3-16 に示す。

表 2.6.4.3-16　ビーグル犬にフルキンチニブを 13 週間反復経口投与したときの血漿中フルキンチニブ及び M11 の TK パラメータ

動物	投与経路	投与量（mg/kg/日）	性	フルキンチニブ				M11			
				C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)		C_{max} (ng/mL)		AUC_{24} (ng·h/mL)	
				1 日	91 日	1 日	91 日	1 日	91 日	1 日	91 日
ビーグル犬	反復経口投与	0.03	雄	13.0 ± 1.45	18.0 ± 4.09	209 ± 30	312 ± 29	0.348 ± 0.091	1.16 ± 0.172	6 ± 1	19 ± 2
			雌	17.4 ± 6.35	17.1 ± 4.54	199 ± 29	284 ± 73	0.470 ± 0.223	1.06 ± 0.504	6 ± 3	18 ± 8
		0.06	雄	23.6 ± 1.85	35.5 ± 4.32	390 ± 56	594 ± 89	0.587 ± 0.172	2.04 ± 0.679	10 ± 2	33 ± 8
			雌	28.9 ± 3.47	41.5 ± 14.5	417 ± 67	802 ± 304	1.06 ± 0.266	2.31 ± 0.208	13 ± 4	44 ± 6
		0.12	雄	69.1 ± 12.2	129 ± 21.7	992 ± 206	1820 ± 803	1.32 ± 0.300	5.20 ± 1.76	21 ± 4	98 ± 45
			雌	73.2 ± 25.2	80.4 ± 19.5	872 ± 249	1140 ± 289	1.88 ± 0.596	4.71 ± 1.38	25 ± 8	77 ± 23

出典：報告書 8449374

AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、TK：トキシコキネティクス

TK パラメータは 5 例の平均値±標準偏差を示す。

（3）ビーグル犬を用いた 39 週間反復経口投与毒性試験における TK（報告書 ■54RD2）：添付資料番号 4.2.3.2-6（参考）

ビーグル犬を用いた 39 週間反復経口投与毒性試験（報告書 ■54RD2）の一環として、フルキンチニブの TK を測定した。

フルキンチニブを 273 日間投与したときの C_{max} 及び AUC_{24} に性差は認められなかった。91 日の反復投与による蓄積は認められなかった。

投与 1 日及び投与 91 日の C_{max} 及び AUC_{24} は、いずれの用量においても用量に比例した増加が認められた。投与 273 日の C_{max} は、用量比を下回る増加がみられたが、AUC_{24} は用量比に依存した増加が認められた。

投与 273 日及び投与 1 日の C_{max}／用量の比（投与 273 日／投与 1 日）は、0.01、0.03、0.1/0.06 及び 0.2/0.12 mg/kg/日の用量群でそれぞれ 4.19、1.67、5.38 及び 3.24、また、AUC_{24}／用量の比は、それぞれ 2.46、1.78、3.15 及び 3.00 であり、273 日間の反復投与により、フルキンチニブがわずかに蓄積することが示された。

本試験の TK パラメータ値を表 2.6.4.3-17 に示す。

表 2.6.4.3-17　ビーグル犬にフルキンチニブを 39 週間反復経口投与したときの TK パラメータ

動物	投与経路	投与量（mg/kg/日）	性	C_{max} (ng/mL)			AUC_{24} (ng•h/mL)		
				1 日	91 日	273 日	1 日	91 日	273 日
ビーグル犬[a]	反復経口投与	0.01	雄	6.82 ± 0.77	9.78 ± 1.75	31.7 ± 22.6	68 ± 6	98 ± 17	199 ± 73
			雌	6.53 ± 1.59	10.6 ± 1.6	24.3 ± 11.3	63 ± 8	109 ± 17	122 ± 32
		0.03	雄	18.9 ± 6.73	28.0 ± 2.65	31.4 ± 2.65	194 ± 28	331 ± 50	311 ± 66
			雌	18.7 ± 1.82	26.5 ± 4.74	31.6 ± 8.42	192 ± 15	281 ± 24	375 ± 12
		0.1/0.06	雄	41.7 ± 9.87	61.8 ± 10.5	214 ± 159	525 ± 110	706 ± 204	1313 ± 204
			雌	39.7 ± 12.3	44.3 ± 6.51	49.1 ± 10.6	500 ± 79	678 ± 39	624 ± 165
		0.2/ 0.12	雄	78.6 ± 34.2	76.2 ± 23.8	126 ± 56.1	1155 ± 478	1012 ± 375	1904 ± 989
			雌	54.9 ± 17.7	79.9 ± 30.9	142[b]	815 ± 207	1257 ± 603	1373[b]

出典：報告書 ■54RD2、Appendix IX　Table 10

AUC_{24}：投与後 0 時間から 24 時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積、C_{max}：最高血漿中濃度、TK：トキシコキネティクス

[a]　1 群あたり雌雄各 5 例からなる 5 群のビーグル犬を主試験に割り当て、うち 1 群あたり雌雄各 2 例を 13 週間の投与終了時に剖検に供し、1 群あたり雌雄各 2 例を 39 週間の投与期間終了時に剖検に供した。残りの動物を 4 週間の回復期間終了時に剖検に供した。

[b]　2 例が予定外に死亡したため、1 例から得られたデータ。

TK パラメータは 1 日及び 91 日は 5 例、273 日は 3 例の平均値±標準偏差を示す。

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 In vitro 試験

2.6.4.4.1.1 マウス、ラット、イヌ及びヒト血漿におけるフルキンチニブの血漿蛋白結合率（報告書 DMPKR20[redacted]0039-E-02）

：添付資料番号 4.2.2.3-1（評価）

平衡透析法を用いて、マウス、ラット、イヌ及びヒト血漿中のフルキンチニブの蛋白結合率を検討した。

1、3 及び 10 μM における蛋白結合率は、それぞれマウスでは 91.2%、92.7%及び 92.8%、ラットでは 96.2%、95.6%及び 96.5%、イヌでは 87.3%、88.7%及び 88.2%、ヒト血漿中で 95.4%、95.3%及び 95.3%と、ラットで高く、イヌで低かった。フルキンチニブの血漿蛋白結合率は、1～10 μM の濃度範囲で一定であった。

データの概要を 2.6.5.6A に示す。

2.6.4.4.1.2 マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト血漿における M11 の蛋白結合率（報告書 DMPKR20[redacted]0018-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.3-2（参考）

平衡透析法を用いて、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトにおける M11 の血漿蛋白結合率を検討した。

血漿蛋白結合率はマウス、ラット、イヌ、サル及びヒトで、それぞれ 96.8%、96.6%、94.8%、95.6%及び 97.7%と同程度であった。蛋白結合率はヒトで最も高く、イヌで最も低かった。

データの概要を 2.6.5.6B に示す。

2.6.4.4.1.3 ラット、イヌ及びヒト血液中のフルキンチニブの R_B（報告書 DMPKR20[redacted]0004-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.3-3（参考）

ラット、イヌ及びヒトの血液中におけるフルキンチニブの R_B を、LC-MS/MS により評価した。

フルキンチニブを 1 μM の濃度で最長 60 分間血液とインキュベートした結果、10 及び 60 分後の R_B はヒトでそれぞれ 0.458 及び 0.601、イヌでそれぞれ 0.851 及び 0.792、ラットでそれぞれ 0.709 及び 0.733 であった。このことから、赤血球と血漿間のフルキンチニブの分配平衡速度は、イヌでは速く、ラット及びヒトでは遅いことが示された。

また、60 分後における R_B 及び血漿中非結合型分率（f_{up}）から、血液中非結合型分率（f_{uB}）を算出した。ラット、イヌ及びヒトにおける f_{uB} は、それぞれ 5.24%、16.0%及び 7.70%であり、イヌで最も高く、ラットで最も低かった。

データの概要を 2.6.5.6C に示す。

2.6.4.4.1.4 ヒト肝ミクロソームにおける蛋白結合（報告書 DMPKR20[redacted]0081-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.3-4（参考）

ヒト肝ミクロソームを用いて、平衡透析法によりフルキンチニブの蛋白結合率を評価した。

6 時間インキュベート後のフルキンチニブの平衡率は、1 及び 10 μM でそれぞれ 98.1%及び 94.8%と、ほぼ平衡に達した。1 及び 10 μM の濃度におけるフルキンチニブのヒト肝ミクロソーム中での蛋白結合率は、蛋白濃度 0.2 mg/mL では-3.57%及び 1.58%、蛋白濃度 0.5mg/mL では 15.2%及び 24.3%であった。以上の結果より、濃度 1 及び 10 μM におけるフルキンチニブの蛋白結合率は極めて低いことが示された。

データの概要を 2.6.5.6D に示す。

2.6.4.4.2 In vivo 試験

2.6.4.4.2.1 Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブを 2 mg/kg の用量で単回経口投与又は 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときの R_B（報告書 RTC00537）

：添付資料番号 4.2.2.5-1（参考）

雌雄 Sprague Dawley ラット（3 例／群）に[^{14}C]フルキンチニブを単回経口投与〔2 mg/kg（100 μCi/kg）〕又は静脈内投与〔1 mg/kg（100 μCi/kg）〕し、投与後 48 時間までの血液を採取した。血液中及び血漿中の総放射能濃度より R_B を算出した。

単回静脈内投与後の R_B の平均値は、投与後 5 分から 48 時間の範囲で 0.34～0.83（雌）及び 0.57～1.28（雄）であり、血球成分への顕著な結合は示唆されなかった。

単回経口投与後の R_B の平均値は、投与後 10 分から 48 時間の範囲で 0.53～0.77（雌）及び 0.51～1.01（雄）であり、ここでも血球成分への顕著な結合は示唆されなかった。

データの概要を 2.6.5.3D に示す。

2.6.4.4.2.2 有色及び白色ラットに[^{14}C]フルキンチニブを単回経口投与したときの放射能の組織分布（報告書 RPT03316）

：添付資料番号 4.2.2.3-5（参考）

雌雄白色ラット（Sprague Dawley、5 例／群）及び雄性有色ラット（Long-Evans、10 例）に[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg（100 μCi/kg）を単回経口投与し、QWBA 法により放射能の組織分布を検討した。

白色ラットに[^{14}C]フルキンチニブを 2 mg/kg（100 μCi/kg）を単回経口投与したとき、組織中総放射能濃度は系統及び性別にかかわらず血漿中濃度と同様に推移し、投与後 0.5 又は 4 時間で最高濃度に達した。投与後 24 時間では、大部分の組織で総放射能は顕著に減少した。単回経口投与したとき、放射能の大部分は雄では肝臓、小腸、大腸、膀胱及び腎臓に、雌では肝臓、小腸、大腸、腎臓及びハーダー腺に分布した。雄では、AUC_{last} に基づく組織／血漿中濃度比は、大腸、小腸、肝臓、膀胱及び腎臓で 1 を上回り、その他のすべての組織では 1 未満であった。雌では、組織／血漿中濃度比は肝臓及び小腸で 1 を上回り、他のすべての組織では 1 未満であった。脳における組織／血漿中濃度比は雌雄とも 0.04 であった。放射能濃度の AUC_{last} に基づく R_B は約 0.5 であり、[^{14}C]フルキンチニブ及び代謝物は主に血漿中に分布することが示唆された。

雄有色ラットに[^{14}C]フルキンチニブを 2 mg/100 μCi/kg の用量で単回経口投与したとき、組織中の総放射能は、大腸、膀胱、ハーダー腺及び水晶体で投与後 8 時間、ぶどう膜、白色脂肪及び有色皮膚で投与後 4 時間、その他の組織では投与後 2 時間で最高濃度に達した。投与

後 24 時間には、ほとんどの組織で総放射能は顕著に減少した。雄有色ラットでは、放射能の大部分が肝臓、大腸、小腸、膀胱、腎臓、有色皮膚、ハーダー腺及びぶどう膜に分布していた。組織／血漿中濃度比は、眼、ぶどう膜、有色皮膚、消化管、肝臓、膀胱及びハーダー腺で 1 を上回り、その他の組織では 1 未満であった。脳における組織／血漿中濃度比は 0.10 であった。

要約すると、組織中の総放射能は、系統や雌雄を問わず、主に代謝・排泄器官（消化管、肝臓及び腎臓）に分布した。脳／中枢神経系への分布は非常に少なかった。投与後 168 時間までにほとんどの組織で BLQ となったことから、組織中の総放射能は速やかに消失することが示された（表 2.6.4.4-1、表 2.6.4.4-2）。有色ラットの QWBA の結果に基づき、メラニン含有組織（眼、ぶどう膜及び有色皮膚など）への総放射能の分布が認められたことから、[^{14}C]フルキンチニブ由来放射能がメラニン親和性を持つことが示された。色素を含有する Long-Evans ラットにおける総放射能の分布・排泄パターンは、Sprague Dawley ラットと同様であった（表 2.6.4.4-3）。

データの概要を 2.6.5.5A に示す。

表 2.6.4.4-1　白色ラット（雄）に[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を単回経口投与したときの放射能の組織中濃度

	投与後の時間（時間）			
	0.5	4	24	168
組織	濃度（ng Eq/g）			
血液	554	359	16.8	BLQ1 [a]
血漿	1163	764	32.5	BLQ1 [a]
副腎	637	514	15.1	BLQ2 [b]
骨髄（大腿骨）	370	219	12.0	BLQ2 [b]
脳（全体）	159	70.0	BLQ2 [b]	BLQ2 [b]
眼球	58.1	73.4	12.3	BLQ2 [b]
褐色脂肪	776	394	11.0	BLQ2 [b]
心臓	485	353	BLQ2 [b]	BLQ2 [b]
腎臓	828	940	123	BLQ2 [b]
大腸 [c]	441	4823	98.8	BLQ2 [b]
肝臓	3349	2398	421	26.9
肺	715	475	20.8	BLQ2 [b]

出典：報告書 RPT03316　Table 1 より改変

BLQ：定量下限未満、Eq：equivalent、LLOQ：定量下限、LSC：液体シンチレーションカウンター、QWBA：定量的全身オートラジオグラフィ

[a] BLQ1＝LSC の LLOQ 未満＝1.29（血漿）又は 2.76（血液）ng Eq/g 未満

[b] BLQ2＝QWBA の LLOQ 未満＝9.59 ng Eq/g 未満

[c] 組織内容物に含まれる放射能の濃度が高い場合、組織壁の分析に影響を及ぼす可能性がある。

組織中濃度は 1 例の値。

表 2.6.4.4-2　白色ラット（雌）に[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を
単回経口投与したときの放射能の組織中濃度

	投与後の時間（時間）			
	0.5	4	24	168
組織	濃度（ng Eq/g）			
血液	720	808	BLQ1[a]	BLQ1[a]
血漿	1391	1641	6.35	BLQ1[a]
副腎	1170	1198	BLQ2[b]	BLQ2[b]
骨髄（大腿骨）	508	612	BLQ2[b]	BLQ2[b]
脳（全体）	232	205	BLQ2[b]	BLQ2[b]
眼球	84	124	BLQ2[b]	BLQ2[b]
褐色脂肪	703	902	BLQ2[b]	BLQ2[b]
心臓	800	1116	BLQ2[b]	BLQ2[b]
腎臓	952	1339	57.0	BLQ2[b]
大腸[c]	460	1260	21.5	BLQ2[b]
肝臓	2847	2648	407	29.0
肺	986	931	BLQ2[b]	BLQ2[b]

出典：報告書 RPT03316　Table 3 より改変
BLQ：定量下限未満、Eq：equivalent、LLOQ：定量下限、LSC：液体シンチレーションカウンター、QWBA：定量的全身オートラジオグラフィ
[a] BLQ1＝LSC の LLOQ 未満＝1.29（血漿）又は 2.76（血液）ng Eq/g 未満
[b] BLQ2＝QWBA の LLOQ 未満＝9.59 ng Eq/g 未満
[c] 組織内容物に含まれる放射能の濃度が高い場合、組織壁の分析に影響を及ぼす可能性がある。
組織中濃度は 1 例の値。

表 2.6.4.4-3　有色ラット（雄）に[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を
単回経口投与したときの放射能の組織中濃度

	投与後の時間（時間）							
	0.25	2	4	8	24	48	168	504
組織	濃度（ng Eq/g）							
血液	174	655	436	228	BLQ1[a]	BLQ1	BLQ1[a]	BLQ1[a]
血漿	340	1340	924	528	6.62	3.64	BLQ1[a]	BLQ1[a]
副腎	367	1383	799	366	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]
骨髄（大腿骨）	107	407	317	159	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]
脳（全体）	53.0	240	148	57.4	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]
眼球	88.3	1637	1863	1465	339	251	62.4	13.6
褐色脂肪	183	973	672	254	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]
心臓	194	701	490	239	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]
腎臓	260	1166	850	517	49.5	37.1	BLQ2[b]	BLQ2[b]
大腸[c]	148	4953	7177	11616	26.3	117	BLQ2[b]	BLQ2[b]
肝臓	1510	3321	2495	1425	489	392	35.9	BLQ2[b]
肺	232	824	588	330	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]	BLQ2[b]

出典：報告書 RPT03316　Table 5 より改変
BLQ：定量下限未満、Eq：equivalent、LLOQ：定量下限、LSC：液体シンチレーションカウンター、QWBA：定量的全身オートラジオグラフィ
[a] BLQ1＝LSC の LLOQ 未満＝1.29（血漿）又は 2.76（血液）ng Eq/g 未満
[b] BLQ2＝QWBA の LLOQ 未満＝9.59 ng Eq/g 未満
[c] 組織内容物に含まれる放射能の濃度が高い場合、組織壁の分析に影響を及ぼす可能性がある。
組織中濃度は 1 例の値。

2.6.4.5 代謝（種間比較）

フルキンチニブの代謝経路を検討するため、in vitro 及び in vivo 試験を実施した。開発初期の検討において、代謝物 HM5013199 は M1 として同定されたが、その後、これは誤りである

ことが判明し M7 に再分類された。この影響を受けるすべての試験について報告書の改訂版が発行された。この変更は申請資料中に正しく反映している。液体クロマトグラフィの溶出時間が短い場合、M1 と M7 の分離が不十分だったことから、本項では M1+M7 として記載する。

2.6.4.5.1 In vitro 代謝

2.6.4.5.1.1 各種動物の肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの代謝安定性の評価（報告書 DMPKR20[redacted]0043-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.4-1（参考）

CD-1 マウス、Sprague Dawley ラット、ビーグル犬、カニクイザル及びヒトの肝ミクロソームにおけるフルキンチニブ（1 μM）の代謝安定性を検討した。全身 CL は、代謝安定性データに基づき、well-stirred モデルにより予測した[2][3]。さらに、代謝安定性に対するフラビン含有モノオキシゲナーゼ（FMO）の関与及び in vitro 固有 CL を評価した。

肝ミクロソーム中での代謝安定性から予測したフルキンチニブの全身 CL は、いずれの動物種においても肝血流量より低く、フルキンチニブの肝抽出率は低いことが示された（雄サルでは中程度）。イヌ及びヒトの肝ミクロソームで予測された全身 CL には性差が認められたが、フルキンチニブはイヌ及びヒト肝ミクロソームにおいて非常に安定であり、$t_{1/2}$ は 300 分を超え、120 分間のインキュベーション後の残存率はおおよそ 80%を超えたことから、イヌ及びヒトの肝ミクロソームにおける代謝安定性に明らかな性差があるという結論を導き出すことはできなかった。検討したすべての動物種でフルキンチニブのミクロソーム代謝に明らかな性差は認められなかった（雌サルでは未検討）。FMO を不活性化したマウス肝ミクロソームではフルキンチニブの in vivo における固有 CL 予測値が顕著に低下したことから、マウス肝ミクロソームでの代謝に FMO が関与していることが明らかになった。その他の動物種では FMO に起因する明らかな影響は認められなかった。

データの概要を 2.6.5.9A に示す。

2.6.4.5.1.2 各種動物の肝ミクロソームにおける M11 の代謝安定性の評価（報告書 DMPKR20[redacted]0019-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.4-2（参考）

還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（NADPH）産生系共存下で、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームを用いて、in vitro インキュベーション系における M11（1 μM）の代謝安定性を評価した。

複数の動物種の肝ミクロソームとインキュベートしたとき、M11 は非常に安定であり、肝ミクロソーム中の $t_{1/2}$ はすべての動物種で 1.5 時間を超えた。雌マウス、雄ラット及び雄サルの肝ミクロソーム中における M11 の代謝速度は遅く、全身 CL の予測値は肝血流量の 30%未満と低かった。雌サルの肝ミクロソーム中における M11 の代謝速度は速く、全身 CL の予測値は肝血流量の 30%～70%と中程度であった[1]。雄マウス、雌ラット、イヌ及びヒトの肝ミクロソームでは、M11 はほとんど代謝されず、120 分間のインキュベート後も 80%超が残存した。ラット肝ミクロソームでは、M11 は、雄よりも雌で安定であり、サル肝ミクロソームでは、雌よりも雄で安定であった。

データの概要を 2.6.5.9B に示す。

2.6.4.5.1.3 マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト肝ミクロソームにおける代謝物の同定（報告書 DMPKR20[redacted]0076-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.4-3（参考）

種々の動物種におけるフルキンチニブの代謝経路を推定するため、予備的な検討を実施した。マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト（雌雄又は男女、サルは雄のみ）の肝ミクロソームとフルキンチニブ 50 μM を 120 分間インキュベートした。

全動物種の肝ミクロソームにおいて、フルキンチニブの主代謝物として、O-脱メチル化体（M1+M7）、水酸化体（M2）及び一酸化体（M3）の 3 種の代謝物が同定された。肝ミクロソームとインキュベーション後の代謝物プロファイルは、イヌが最もヒトに類似していた。

2.6.4.5.1.4 フルキンチニブの全動物種における代謝物の同定（報告書 DMPKR20[redacted]0009-E-01）

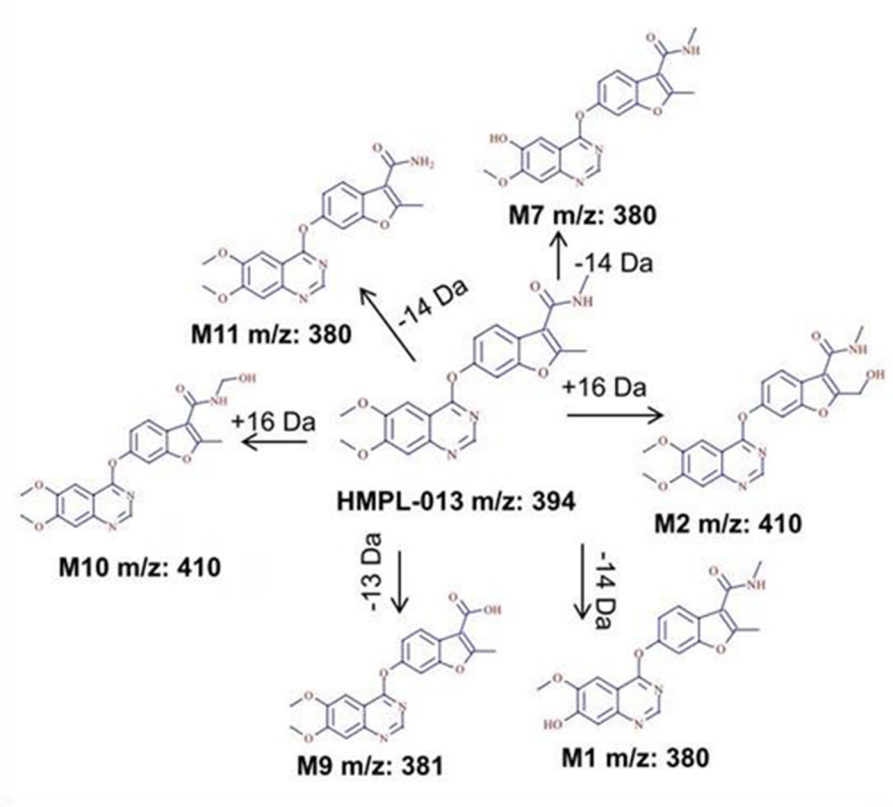
：添付資料番号 4.2.2.4-4（参考）

NADP 産生系共存下で、フルキンチニブ（10 μM）をラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームとともに最長 120 分間インキュベートし、得られた上清を液体クロマトグラフィー多段階質量分析－フォトダイオードアレイ検出（LC-MS^n/PDA）法により分析した。フルキンチニブの in vitro 推定代謝経路を図 2.6.4.5-1 に示す。

ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームとインキュベートしたとき、脱メチル化体（M1、M7 及び M11）、水酸化体（M2 及び M10）及びカルボン酸体（M9）の 6 種の主代謝物が認められた。M1 以外の代謝物について化学構造を同定した。ヒト肝ミクロソームで生成されたフルキンチニブ代謝物は、定性的には他の動物種と類似していたが、各代謝物の相対量には差がみられた。フルキンチニブのヒト特異的な代謝物は検出されなかった。ラット及びイヌの代謝物プロファイルがヒトと類似していることから、ラット及びイヌを GLP 毒性試験の評価動物種とすることは妥当と考えられる。各動物種における代謝プロファイルの比較を図 2.6.4.5-2 に示す。

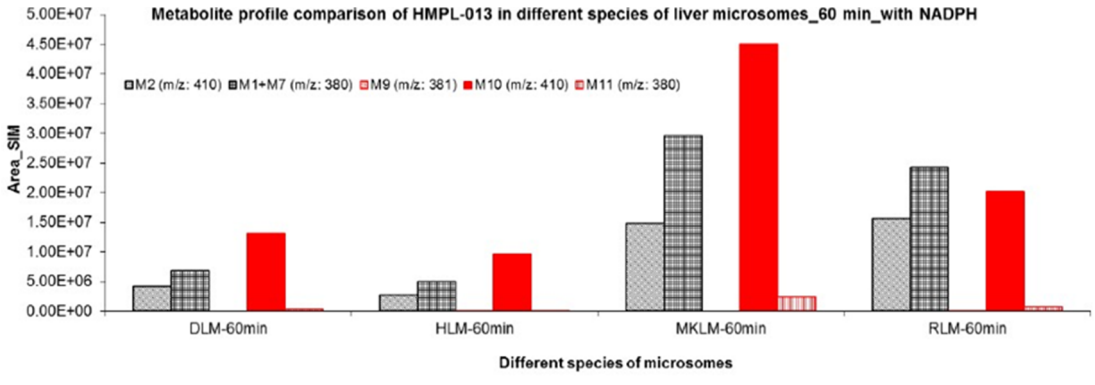
データの概要を 2.6.5.9C に示す。

図 2.6.4.5-1　フルキンチニブの推定代謝経路



出典：報告書 DMPKR20[redacted]0009-E-01
HMPL-013：フルキンチニブ、M1：フルキンチニブの代謝物（M379-2）、M2：フルキンチニブの代謝物（HM5012569 又は M409-2）、M7：フルキンチニブの代謝物（HM5013199 又は M379-1）、M9：フルキンチニブの代謝物（HM5024093）、M10：フルキンチニブの代謝物（HM5029127 又は M409-3）、M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）

図 2.6.4.5-2　ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームと 60 分間インキュベート後に選択イオン検出モードで測定したフルキンチニブ代謝物の面積



出典：報告書 DMPKR20[redacted]0009-E-01　Figure 14
DLM：イヌ肝ミクロソーム、HLM：ヒト肝ミクロソーム、HMPL-013：フルキンチニブ、M1+M7、M2、M9、M10、M11：フルキンチニブの代謝物、MKLM：サル肝ミクロソーム、NADPH：還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、RLM：ラット肝ミクロソーム、SIM：選択イオン検出モード

2.6.4.5.1.5 ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの代謝酵素の同定（報告書 DMPKR20[redacted]0079-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.4-5（参考）

CYP 選択的モノクローナル抗体（CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C19、2D6、2E1 及び 3A4/5）の存在下で、フルキンチニブ（50 μM）をヒト肝ミクロソームとインキュベートし、フルキンチニブの代謝に関与する酵素を評価した。

フルキンチニブから M1+M7（O-脱メチル化）及び M3 への代謝における CYP3A4/5 の寄与率は、それぞれ 64.8%及び 83.5%であったことから、M1+M7 及び M3（一酸化）の生成には CYP3A4/5 が関与することが示された。M1+M7 及び M3 の生成に関与するその他の酵素は、CYP2D6（寄与率：M1+M7：34.2%、M3：27.9%）、CYP2C8（寄与率：M1+M7：19.5%、M3：16.4%）及び CYP2C19（寄与率：M1+M7：11.9%、M3：23.8%）であった。M2 の生成に関与する主な酵素も CYP3A4/5、2D6、2C8 及び 2C19 であり、寄与率は、それぞれ 28.1%、20.6%、19.3%及び 15.3%であった。以上の結果から、ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの代謝には複数の代謝酵素が関与すること、及び検討した CYP 酵素のうち CYP3A4/5 が主要な代謝酵素であることが示された。

データの概要を 2.6.5.9D に示す。

2.6.4.5.1.6 ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの代謝酵素の同定（報告書 DMPKR20[redacted]0003-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.4-6（参考）

ヒト肝ミクロソームを用いて、フルキンチニブ（10 μM）から代謝物 M1+M7、M2、M9、M10 及び M11 への代謝に関与する主な酵素を検討した。本試験では、CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2E1、2D6 及び 3A4 に対するモノクローナル抗体並びに非選択的化学阻害薬（1-アミノベンゾトリアゾール）を用いた。また、フルキンチニブ及び各代謝物をヒト血漿中で 24 時間インキュベートしたときの安定性を検討した。

ヒト肝ミクロソーム中でインキュベートしたとき、M10 はほとんど M11 に変換されなかった。M10 は、塩基性条件（pH=10）又はヒト血漿中では不安定であり、完全又は部分的に M11 に変換された。M1/M7 の生成には、主に CYP3A4（41.1%）及び 2C9（39.2%）が関与し、FMO（19.0%）も関与していた可能性がある。M2 の産生は、主に CYP2C9（46.5%）及び 2C8（43.3%）、次いで 3A4（21.4%）によるものであった。M9 の生成に関与する主な酵素は不明であった。M10 の生成は、主に CYP3A4（77.7%）によるもので、CYP2C9（28.1%）も関与し 24、FMO（23.0%）も関与していた可能性がある。以上の結果から、M10 の生成には CYP3A4 が関与すること、及び M10 は M11 に変換される可能性があることから、M11 の産生に CYP3A4 が関与する可能性が示唆された。結論として、フルキンチニブは、複数の代謝酵素により代謝されると考えられる。

データの概要を 2.6.5.9E に示す。

2.6.4.5.1.7 フルキンチニブの代謝におけるチトクローム P450（CYP）の寄与（報告書 DMPKR20[redacted]0006-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.4-7（参考）

フルキンチニブの代謝における CYP の寄与率を relative activity factor 法により検討した。組換えヒト CYP 分子種（CYP3A4、3A5、2C8、2C9、2C19、1A2、2B6 及び 2D6）における 1 時間のインキュベーション後のフルキンチニブ（10 μM）の減少を評価した。

その結果、M1+M7、M2 及び M10 が検出され、これらの代謝物の生成には、CYP3A4、3A5、2C8、2C9 及び 2C19 が関与することが示された。

フルキンチニブの代謝に関与する主要な分子種は CYP3A4（寄与率：92.5%以上）であり、CYP3A5（寄与率 6.71%以下）もわずかに関与した。CYP2C8、2C9 及び 2C19 の関与は比較的小さかった（寄与率は、それぞれ約 0.529%、0.241%及び 0.015%）。

データの概要を 2.6.5.9F に示す。

2.6.4.5.1.8 ヒト血漿及びヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの代謝物 M205 生成の評価（報告書 DMPKR20[redacted]0015-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.4-8（参考）

フルキンチニブ（10 μM）をヒト血漿及びヒト肝ミクロソーム（1 mg/mL）とともにインキュベートし、代謝物 M205 の生成及びフルキンチニブの消失を検討した。CYP 及びウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）による代謝の補酵素として、それぞれ NADPH 及びウリジン二リン酸グルクロン酸（UDPGA）を添加することにより反応を開始した。補酵素系は、表 2.6.4.5-1 に示すように、以下の 4 群に分けた。すなわち、B 群（+NADPH、-UDPGA）、C 群（-NADPH、-UDPGA）、D 群（+NADPH、+UDPGA）及び E 群（-NADPH、+UDPGA）。

ヒト肝ミクロソーム又はヒト血漿とインキュベートしたとき、少量の M205 が検出された（表 2.6.4.5-1）。ヒト肝ミクロソームにおける M205 の生成は NADPH に依存しなかったことから、フルキンチニブから M205 への代謝に CYP は関与しないことが示された。ヒト肝ミクロソーム中で UDPGA とともにインキュベートしたとき、M205 はさらにグルクロン酸抱合体に代謝される可能性があるが、フルキンチニブのグルクロン酸抱合に対する明らかな影響は認められなかった。

フルキンチニブをヒト肝ミクロソーム（1 mg/mL）とともに 2 時間インキュベートしたとき、UDPGA の有無にかかわらずフルキンチニブの残存率が同程度であったことから（表 2.6.4.5-2）、フルキンチニブは主に CYP 酵素を介して消失することが示された。

データの概要を 2.6.5.9G に示す。

表 2.6.4.5-1　ヒト血漿又はヒト肝ミクロソーム中でフルキンチニブをインキュベートしたときの M205 の生成

反応後の M205 濃度（nM）						
時間（h）	A 群	時間（h）	B 群	C 群	D 群	E 群
	血漿		HLM, + NADPH, - UDPGA	HLM, - NADPH, - UDPGA	HLM, + NADPH, + UDPGA	HLM, - NADPH, + UDPGA
0	5.22 [a]	0	3.45 [a]	3.63	2.63	3.41
2	10.5	0.5	8.44	9.48	6.63	9.68
4	18.1	1	10.5	16.0	11.1	14.6
6	23.4	2	18.0	25.4	14.0	23.6
フルキンチニブから M205 への変換率（%）						
6	0.234	2	0.180	0.254	0.140	0.236

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0015-E-01　Table 8
CV：変動係数、HLM：ヒト肝ミクロソーム、M205：フルキンチニブの代謝物（HM5040878）、NADPH：還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、UDPGA：ウリジン二リン酸グルクロン酸
[a]　2 回反復測定値の CV%が 15 を超えた（18.3～25.2）。
M205 の濃度及び M205 の変換率は 2 例の平均値を示す。

表 2.6.4.5-2　ヒト血漿又はヒト肝ミクロソーム中でインキュベートしたときのフルキンチニブの消失

反応後のフルキンチニブの残存率（%）						
時間（h）	A 群	時間（h）	B 群	C 群	D 群	E 群
	血漿		HLM, + NADPH, - UDPGA	HLM, - NADPH, - UDPGA	HLM, + NADPH, + UDPGA	HLM, - NADPH, + UDPGA
0	100	0	100	100	100	100
2	102	0.5	94.0	96.7	88.6	100
4	97.1	1	90.9	98.8	84.6	102
6	96.9	2	76.9	95.8	73.0	97.7

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0015-E-01　Table 10
HLM：ヒト肝ミクロソーム、NADPH：還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸、UDPGA：ウリジン二リン酸グルクロン酸
フルキンチニブの残存率は 2 例の平均値を示す。

2.6.4.5.2 In vivo 代謝

2.6.4.5.2.1 雌雄 Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を単回経口投与したときの代謝物プロファイリング及び同定（報告書 RTC00559）

：添付資料番号 4.2.2.4-9（参考）

雌雄 Sprague Dawley ラット（血漿：雌雄各 7 例、胆汁、尿及び糞：雌雄各 1 例）に[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg（100 µCi/kg）を単回経口投与し、フルキンチニブの in vivo における代謝を検討した。

[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を雌雄ラットに単回経口投与後のラット血漿、胆汁、尿及び糞中に、未変化体のほかに 19 種類の代謝物が同定された。ラット血漿、尿、糞及び胆汁中のフルキンチニブ及び同定された代謝物の要約を表 2.6.4.5-4 に、主代謝経路を図 2.6.4.5-3 に示す。フルキンチニブはラットにおいて広範な代謝を受け、主要な第一相代謝経路は、1）N-又は O-脱メチル化、2）酸化、3）O-脱キナゾリン化であった。主要な第二相代謝経路として、グルクロン酸抱合及び硫酸抱合が認められた。

血漿：循環血中で最も多く検出されたのはフルキンチニブであり、雄及び雌ラットの 24 時間プール血漿中総放射能のそれぞれ 58.82%及び 78.52%を占め、主代謝物 M2（M409-2 又は HM5012569）はそれぞれ 12.17%及び 14.01%を占めた。M11（M379-3）は、雄及び雌ラットの 24 時間プール血漿中放射能のそれぞれ 2.72%及び 2.02%であった（表 2.6.4.5-3）。

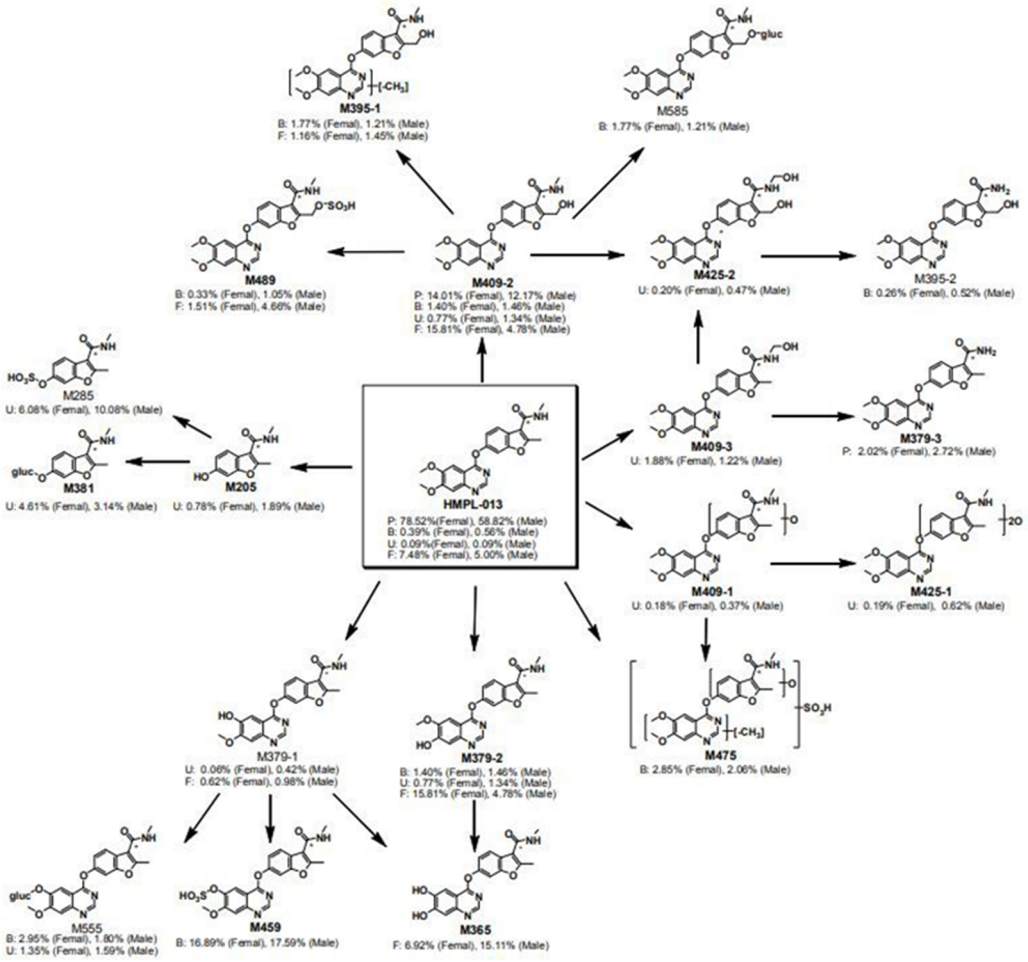
胆汁：胆汁中で[^{14}C]フルキンチニブの占める割合は、雄ラットで投与量の 0.56%、雌ラットで 0.39%であった。ラット胆汁中で最も多く検出された代謝物は M459 であり、雄ラットで投与量の 17.59%、雌ラットで 16.89%であった（0～72 時間）。そのほかに、8 種類の微量代謝物が検出され、投与量に対する割合は 0.26%～2.95%であった（表 2.6.4.5-4 ）。

尿：ラット尿中では、放射能に占める未変化体の割合は少なく、雌雄ともに投与量の 0.09%であった。尿中の主代謝物は M285 であり、雄ラットで投与量の 10.08%、雌ラットで 6.08%であった（0～168 時間）。5 種類の微量代謝物に加え、さらに微量の代謝物が複数検出された（表 2.6.4.5-4）。

糞：糞中では、未変化体の占める割合は、雄ラットで投与量の 5.00%、雌ラットで 7.48%であった。糞中の主代謝物 は M365、M1（M379-2）及び M2（M409-2）であり、雄では M365 が投与量の 15.11%、M1 及び M2 が合わせて 4.78%を占め、雌では同様にそれぞれ 6.92%及び 15.8%（M1 及び M2 の合計）を占めた。3 種類の微量代謝物に加えて、さらに微量の代謝物が 1 つ検出された（表 2.6.4.5-4）。

データの概要を 2.6.5.10A に示す。

図 2.6.4.5-3　フルキンチニブの推定代謝経路（Sprague Dawley ラット））



出典：報告書 RTC00559

B：胆汁、HMPL-013：フルキンチニブ、M379-2：M1、M379-1：フルキンチニブ代謝物（M7 又は HM5013199）、M379-3：フルキンチニブ代謝物（HM5025423 又は M11）、M409-2：フルキンチニブ代謝物（HM5012569 又は M2）、M409-3：フルキンチニブ代謝物（HM5029127 又は M10）、U：尿

割合（%）は各代謝物の血漿中のフルキンチニブ又は代謝物に対する割合（%AUC）又は排泄物中の投与量に対する割合（胆汁、尿及び糞）を示す。

M379-2（M1）と M409-2（M2）の%投与量は、胆汁中、尿中及び糞中のこれら 2 つの代謝物を合計した%投与量である。

M395-1 と M585-1 の%投与量は、胆汁中のこれら 2 つの代謝物を合計した%投与量である。

表 2.6.4.5-3　Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中代謝物の割合

代謝物		%AUC（0～24 時間、プール血漿）	
		雄	雌
フルキンチニブ	未変化体	58.82	78.52
M11	N-脱メチル体	2.72	2.02
M2	一水酸化体	12.17	14.01

出典：報告書 RTC00559　Table S-1

AUC：血漿中濃度－時間曲線下面積、M11：フルキンチニブ代謝物（M379-3 又は HM5025423）、M2：フルキンチニブの代謝物（M409-2 又は HM5012569）

2 例の血漿をプールした。

表 2.6.4.5-4　[^{14}C]フルキンチニブの Sprague Dawley ラットの胆汁、尿及び糞中代謝物（投与量に対する割合）

代謝物	代謝反応	胆汁 0～72 h		尿 0～168 h		糞 0～168 h	
		雄	雌	雄	雌	雄	雌
[^{14}C]フルキンチニブ	Parent	0.56	0.39	0.09	0.09	5.00	7.48
M205	O-脱キナゾリン二脱	ND	ND	1.89	0.78	ND	ND
M285	O-脱キナゾリン、硫酸抱合	ND	ND	10.1	6.08	ND	ND
M365	O, O-メチル	ND	ND	ND	ND	15.11	6.92
M379-1	O-脱メチル	ND	ND	0.42	0.06	0.98	0.62
M379-2 [a]	O-脱メチル	1.46	1.40	1.34	0.77	4.78	15.8
M381	O-脱キナゾリン、グルクロン酸抱合	ND	ND	3.14	4.61	ND	ND
M395-1 [b]	O-脱メチル、一水酸化	1.21	1.77	ND	ND	1.45	1.16
M395-2	O-脱メチル、一水酸化	0.52	0.26	ND	ND	ND	ND
M409-1	一水酸化	ND	ND	0.37	0.18	ND	ND
M409-2 [a]	一水酸化	1.46	1.40	1.34	0.77	4.78	15.8
M409-3	一水酸化	ND	ND	ND	ND	1.22	1.88
M425-1	二水酸化	ND	ND	0.62	0.19	ND	ND
M425-2	二水酸化	ND	ND	0.47	0.20	ND	ND
M459	O-脱メチル、硫酸抱合	17.6	16.9	ND	ND	ND	ND
M475	O-脱メチル、一水酸化、硫酸抱合	2.06	2.85	ND	ND	ND	ND
M489	一水酸化、硫酸抱合	1.05	0.33	ND	ND	4.66	1.51
M555	O-脱メチル、グルクロン酸抱合	1.80	2.95	1.59	1.35	ND	ND
M585 [b]	一水酸化、グルクロン酸抱合	1.21	1.77	ND	ND	ND	ND
非抽出画分（% Dose）		ND	ND	ND	ND	21.2	22.8

出典：報告書 RTC00559　Table S-2

h：時間、ND：検出せず、M205：フルキンチニブ代謝物（HM5040878）、M379-1：フルキンチニブ代謝物（M7 又は HM5013199）、M379-2：フルキンチニブ代謝物（M1）、M379-3：フルキンチニブ代謝物（M11 又は HM5025423）、M409-2：フルキンチニブ代謝物（M2 又は HM5012569）、M409-3：フルキンチニブ代謝物（M10 又は HM5029127）

[a]　%投与量は、それぞれ胆汁中、尿中及び糞中の M379-2 と M409-2 を合計した%投与量である。

[b]　%投与量は、胆汁中の M395-1 と M585 を合計した%投与量である。

投与後 0～72 時間に採取した胆汁並びに、投与後 0～168 時間に採取した尿及び糞を、それぞれプールして代謝物の定量を行った。

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 In vivo 排泄

2.6.4.6.1.1 Sprague Dawley ラットに[^{14}C]フルキンチニブを 2 mg/kg の用量で単回経口投与したときの[^{14}C]フルキンチニブの排泄（報告書 RTC00537）

：添付資料番号 4.2.2.5-1（参考）

雌雄 Sprague Dawley ラット（無処置及び BDC）に 2 mg/kg（100 μCi/kg）の[^{14}C]フルキンチニブを単回経口投与したときの放射能の消失を検討した。無処置ラット（雌雄各 3 例）では投与後 168 時間まで糞及び尿を採取し、BDC ラット（雌雄各 3 例）では投与後 72 時間まで糞、尿及び胆汁を採取し、総放射能を LSC により測定した。

無処置ラットに[^{14}C]フルキンチニブ 2 mg/kg を単回経口投与したとき、放射能の排泄率は雌雄ラットで同程度であった。BDC ラットの尿及び胆汁中排泄率より、[^{14}C]フルキンチニブの吸収率は雄ラットで投与量の 61.68%、雌ラットで 64.90%であった。

無処置の雄ラットでは投与後 168 時間の放射能の回収率は投与量の 95.63%であり、尿では 24.47%、糞では 69.65%、また、ケージ洗液では 1.52%であった。無処置の雌ラットでは投与

後 168 時間の回収率は、投与量の 95.79%であり、尿では 20.23%、糞では 73.11%、また、ケージ洗液では 2.45%であった。

雄 BDC ラットにおける放射能の回収率は、投与量の 92.84%であり、胆汁中に 33.32%、尿中に 28.36%、糞中に 29.80%、また、ケージ洗液では 1.35%であった。雌 BDC ラットでは、投与量の 92.08%が回収され、胆汁中では 33.19%、尿中に 31.71%、糞中に 25.76%、また、ケージ洗液では 1.42%であった。

放射能の消失は速やかであり、投与量の大部分が投与後 24 時間までに回収され、回収率は投与量の 90.15%（無処置の雄）及び 84.27%（無処置の雌）であった。雌雄とも、投与後 48 時間以内に、ほぼすべての放射能（約 95%）が排泄された。

排泄に関するデータを表 2.6.4.6-1 に示す。

表 2.6.4.6-1　雌雄ラットにの[^{14}C]フルキンチニブ（2 mg/kg）を単回経口投与後の総放射能の回収率

群	性	期間 (h)	投与量% 尿	糞	ケージ洗液	胆汁	回収率 (%) [a]
無処置ラット	雄	0-24	23.60 ± 1.58	65.10 ± 1.07	1.45 ± 0.80	NA	90.15 ± 1.23
		0-48	24.31 ± 1.47	69.28 ± 0.57	1.49 ± 0.81	NA	95.08 ± 1.20
		0-72	24.39 ± 1.45	69.50 ± 0.62	1.51 ± 0.81	NA	95.40 ± 1.18
		0-168	24.47 ± 1.41	69.65 ± 0.60	1.52 ± 0.81	NA	95.63 ± 1.04
	雌	0-24	18.77 ± 3.12	63.29 ± 2.92	2.21 ± 1.00	NA	84.27 ± 4.21
		0-48	19.97 ± 2.94	72.49 ± 1.19	2.31 ± 0.99	NA	94.78 ± 0.97
		0-72	20.11 ± 2.94	72.94 ± 1.26	2.35 ± 1.01	NA	95.40 ± 0.99
		0-168	20.23 ± 2.98	73.11 ± 1.15	2.45 ± 0.96	NA	95.79 ± 1.00
BDC ラット	雄	0-72	28.36 ± 5.23	29.80 ± 11.23	1.35 ± 0.53	33.32 ±17.19	92.84 ± 2.11
	雌	0-72	31.71 ± 18.77	25.76 ± 7.99	1.42 ± 1.84	33.19 ±13.68	92.08 ± 1.50

出典：報告書 RTC00537　Table S-2 より改変
BDC：胆管カニューレ挿入、NA：該当せず
[a]　胆汁、尿、糞及びケージ洗液におけるの回収率は、投与量に対する割合（%）として示す。
回収率は 3 例の平均値±標準偏差を示す。

2.6.4.7 DDI

2.6.4.7.1 薬物代謝酵素

2.6.4.7.1.1 CYP 誘導

（1）ヒト凍結肝細胞を用いたフルキンチニブの CYP1A2、2B6 及び 3A4 に対する誘導（報告書 400253-20[redacted]032601-HI）

：**添付資料番号 4.2.2.6-2（参考）**

ヒト凍結肝細胞を用いて、mRNA 発現量変化及び酵素活性を評価することにより、CYP1A2、2B6 及び 3A4 に対するフルキンチニブの誘導作用の有無を評価した。3 例のドナーより得たヒト凍結肝細胞を用いて、フルキンチニブ（10 μM）と 48 時間インキュベートしたときの CYP1A2、2B6 及び 3A4 の mRNA 発現量変化をリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（PCR）により検討した。また、CYP1A2、2B6 及び 3A4 の活性を、それぞれのプローブ基質（フェナセチン、ブプロピオン及びミダゾラム）を用いて評価した。その結果、フルキンチニブは in vitro において 10 μM までの濃度で CYP1A2、2B6 及び 3A4 を誘導しないと考えられた。

データの概要をモジュール 2.6.5.12A に示す。

2.6.4.7.1.2 Cyp 阻害

（1）ヒト肝ミクロソームにおける CYP2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対するフルキンチニブの可逆的阻害（報告書 DMPKR20[redacted]0059-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-3（参考）

CYP2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対するフルキンチニブの可逆的阻害をヒト肝ミクロソームを用いて検討した。フルキンチニブをヒト肝ミクロソームと 37℃で 0.08～50 μM の濃度範囲でインキュベートし、IC_{50} 値を求めた。

CYP2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対する顕著な阻害作用は認められなかった（IC_{50} > 50 μM）。

データの概要を 2.6.5.15A に示す。

（2）ヒト肝ミクロソームにおける CYP1A2 及び 2B6 に対するフルキンチニブの可逆的阻害（報告書 DMPKR20[redacted]0003-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-4（評価）

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP1A2 及び 2B6 に対するフルキンチニブの可逆的な阻害を検討した。フルキンチニブの濃度は、CYP1A2 では 0.0488～200 μM、CYP2B6 では 0.0171～12.5 μM であった。

フルキンチニブは CYP1A2（IC_{50} > 200 μM）及び 2B6（IC50 > 12.5 μM）に対して明らかな阻害作用を示さなかった。

データの概要を 2.6.5.15B に示す。

（3）ヒト肝ミクロソームにおける CYP に対する代謝物 M11 の可逆的阻害（報告書 DMPKR20[redacted]0022-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-5（参考）

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP1A2、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1 及び 3A4/5 に対する M11（0.08～50 μM）の可逆的阻害を検討した。

その結果より、M11 は CYP1A2、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 2E1 に対して可逆的な阻害作用を示さなかったが（IC_{50} > 50 μM）、CYP3A4/5（テストステロン）に対して弱い可逆的阻害作用を示した（IC_{50}：38.0 μM）。

データの概要を 2.6.5.15C に示す。

（4）ヒト肝ミクロソームにおける CYP2B6 に対する代謝物 M11 の可逆的阻害（報告書 DMPKR20[redacted]0001-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-6（参考）

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP2B6 に対する M11（0.4～50 μM）の可逆的阻害作用を検討した。

CYP2B6 に対する M11 の IC_{50} 値は 182 μM であったことから、M11 は CYP2B6 に対して明らかな阻害作用を示さないと考えられる。

データの概要 2.6.5.15D に示す。

（5）ヒト肝ミクロソームにおける CYP1A2、2C9、2D6、3A4/5 に対するフルキンチニブの時間依存的阻害作用についての予備的な in vitro 評価
（報告書 DMPKR20[redacted]0078-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-7（参考）

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5 に対するフルキンチニブの時間依存的阻害作用を検討する予備試験を実施した。

表 2.6.4.7-1 に各分子種に対するフルキンチニブ及び陽性阻害剤の時間依存的阻害作用を示す。フルキンチニブでは各 CYP 分子種のプローブ基質に対する酵素活性の明らかな低下は認められなかった。以上の結果から、フルキンチニブは、CYP1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5 に対して顕著な阻害作用を示さないと考えられた。

データの概要を 2.6.5.15E に示す。

表 2.6.4.7-1　ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブによる CYP1A2、2C9、2D6、3A4/5 酵素活性の低下

被験化合物（濃度：μM）	CYP 分子種／プローブ基質				
	CYP1A2／フェナセチン	CYP2C9／ジクロフェナク	CYP2D6／デキストロメトルファン	CYP3A4/5／テストステロン	CYP3A4/5／ミダゾラム
	活性低下率（%）				
フルキンチニブ（10）	0.08	13.0	10.0	3.22	5.37
プロベネシド（10）	NA	NA	NA	NA	7.78
エリスロマイシン（10）	NA	NA	NA	NA	23.0
ベラパミル（10）	NA	NA	NA	NA	42.6
ネファドゾン（10）	NA	NA	NA	NA	70.6

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0078-E-01
CYP：チトクローム P450、NA：該当せず

（6）ヒト肝ミクロソームにおける CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 に対するフルキンチニブの時間依存的阻害作用についての in vitro 評価
（報告書 DMPKR20[redacted]0005-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-8（参考）

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 に対するフルキンチニブの時間依存的阻害作用を検討した。

評価した各分子種において明らかな酵素活性の低下が認められなかった（10%未満）ことから、フルキンチニブは、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 に対して顕著な阻害作用を示さないと考えられた（表 2.6.4.7-2）。

データの概要を 2.6.5.15F に示す。

表 2.6.4.7-2　ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブによる CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19 及び 2D6 酵素活性の低下

被験化合物（濃度：μM）	CYP 分子種／プローブ基質（濃度：μM）					
	CYP1A2 フェナセチン（250）	CYP2B6 ブプロピオン（450）	CYP2C8 Amodiaquine（15）	CYP2C9 ジクロフェナク（100）	CYP2C19 S－メフェニトイン（200）	CYP2D6 デキストロメトルファン（60）
	活性低下率（%）					
フルキンチニブ（10）	6.51	NI	NI	NI	0.243	0.305
Furafylline（10）	73.0	NA	NA	NA	NA	NA
チクロピジン（0.4）	NA	72.6	NA	NA	NA	NA
Phenelzine（55／200）	NA	NA	16.7/56.4	NA	NA	NA
Tienilic acid（1）	NA	NA	NA	73.7	NA	NA
チクロピジン（4）	NA	NA	NA	NA	52.3	NA
パロキセチン（4）	NA	NA	NA	NA	NA	73.1

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0005-E-01　Table 8

Amodiaquine：amodiaquine dihydrochloride dihydrate、CYP：チトクローム P450、NA：該当せず、NI：明らかな時間依存的阻害なし（試験中に活性低下なし）、Phenelzine：Phenelzine sulfate salt

（7）ヒト肝ミクロソームにおける M9 及び M11 の CYP1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5 に対する時間依存的阻害（予備検討）（報告書 DMPKR20[redacted]0026-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-9（参考）

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP1A2、2C9、2D6、3A4/5 に対する M9 及び M11（10 μM）の時間依存的阻害作用を検討した

M9 及び M11 は、CYP1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5 に対して顕著な阻害作用を示さないと考えられた。これらの分子種における酵素活性の低下は 10%未満であった（表 2.6.4.7-3）。

データの概要を 2.6.5.15G に示す。

表 2.6.4.7-3　ヒト肝ミクロソームにおける M9 又は 11 による CYP1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5 酵素活性の低下

被験化合物（濃度：μM）	CYP 分子種／プローブ基質（濃度：μM）				
	CYP1A2 フェナセチン（250）	CYP2C9 ジクロフェナク（25）	CYP2D6 デキストロメトルファン（30）	CYP3A4/5 テストステロン（225）	CYP3A4/5 ミダゾラム（30）
	活性低下率（%）				
M9	4.07	2.91	NI	NI	NI
M11	NI	5.61	0.448	1.81	6.57
プロベネシド（10）	NA	NA	NA	NA	NI
エリスロマイシン（10）	NA	NA	NA	NA	22.0
ベラパミル（10）	NA	NA	NA	NA	55.0
ネファドゾン（10）	NA	NA	NA	NA	74.5

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0026-E-01　Table 8

CYP:チトクローム P450、M9 :フルキンチニブの代謝物（HM5024093 又は M380）、M11:フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、NA：該当せず、NI：時間依存的阻害なし（活性低下 ≤ 0%）

（8）ヒト肝ミクロソームにおける M11 の CYP2B6、2C8 及び 2C19 の時間依存的阻害に関する in vitro 評価（予備検討）（報告書 DMPKR20[redacted]0020-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-10（参考）

ヒト肝ミクロソームを用いて、CYP2B6、2C8、2C19 に対する M11（10 μM）の時間依存的阻害能を検討した。

本試験の結果から、M11 は、CYP2B6、2C8 及び 2C19 に対して顕著な阻害作用を示さないと考えられた。評価した 3 分子種を M11 とプレインキュベートしたときの酵素活性の低下は 10%未満であった。

表 2.6.4.7-4　ヒト肝ミクロソームにおける M11 による CYP2B6、2C8 及び 2C19 酵素活性の低下

被験化合物（濃度：μM）	CYP 分子種／プローブ基質（濃度： μM）		
	CYP2B6 ブプロピオン （450）	CYP2C8 Amodiaquine （15）	CYP2C19 (S)-mephenytoin （200 μM）
	活性低下率（%）		
M11	3.78	NI	NI
チクロピジン（0.4）	73.5	NA	NA
Phenelzine sulfate salt（200）	NA	41.5	NA
チクロピジン（4）	NA	NA	36.6

出典：報告書 DMPKR20[redacted]0020-E-01　Table 8
CYP：チトクローム P450、M11:フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、NA：該当せず、NI：時間依存的阻害なし（活性低下が 0%以下）
M11 は、報告書中で HM5025423 及び HMPL-13-M11 と記載した。

2.6.4.7.2 薬物トランスポーター

2.6.4.7.2.1 トランスポーター基質試験

（1）フルキンチニブの薬物トランスポーターの基質認識性に関する評価（報告書 400253-20[redacted]032601-OATP1B1, OATP1B3U）

：添付資料番号 4.2.2.6-16（参考）

フルキンチニブが OATP1B1 及び OATP1B3 の基質となる可能性について、ヒトトランスポーター発現ヒト胎児腎細胞（それぞれ HEK293-OATP1B1 及び HEK293-OATP1B3）及び対照細胞（HEK293-MOCK）を用いて検討した。トランスポーター阻害剤存在下又は非存在下で、本薬（0.20～20 μM）を HEK293-MOCK、HEK293-OATP1B1 又は HEK293-OATP1B3 細胞とインキュベートし、OATP 発現細胞と対照細胞の輸送活性の比、及び阻害剤の有無による OATP 発現細胞の輸送活性の比を評価した（表 2.6.4.7-5）。これらの結果から、in vitro において、フルキンチニブは OATP1B1 又は OATP1B3 トランスポーターの基質ではないことが示唆された。

データの概要を 2.6.5.15I に示す。

表 2.6.4.7-5　OATP1B1 又は OATP1B3 発現 HEK293 細胞における
フルキンチニブの取込み倍率及び Rs/Ri 値

細胞株	フルキンチニブ濃度（μM）	取込み倍率	Rs/Ri
HEK293-OATP1B1	0.20	1.07	0.732
	2.00	1.01	0.964
	20.0	1.22	0.485
HEK293-OATP1B3	0.20	1.42	0.769
	2.00	1.42	0.809
	20.0	1.23	0.568

出典：報告書 400253-20[redacted]032601-OATP1B1、OATP1B3U
Rs/Ri：阻害薬非存在下及び存在下における OATP 発現細胞の輸送活性の比

2.6.4.7.2.2 トランスポーター阻害試験

（1）Caco-2 細胞を用いたフルキンチニブの P-gp 阻害
（報告書 DMPKR20[redacted]0077-E-01）

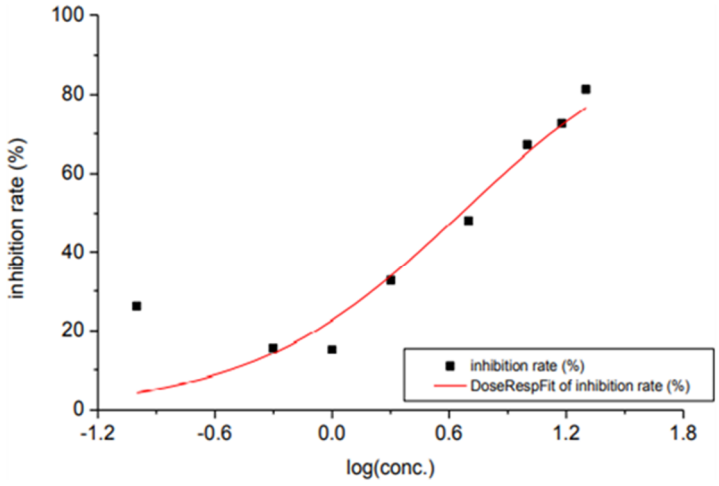
：添付資料番号 4.2.2.6-11（評価）

P-gp を介したジゴキシン輸送に対するフルキンチニブ（0.1～20 μM）の阻害作用を、Caco-2 細胞における双方向輸送により評価した。

本試験の結果から、フルキンチニブはジゴキシン輸送を濃度依存的に阻害することが明らかになり（20 μM で最大 81.4%の阻害）、IC_{50} 値は 4.60 μM と算出された（図 2.6.4.7-1）。

データの概要を 2.6.5.15J に示す。

図 2.6.4.7-1　Caco-2 細胞における P-gp を介したジゴキシン輸送に対する
フルキンチニブの阻害作用



出典：報告書 DMPKR20[redacted]0077-E-01

（2）Caco-2 細胞における代謝物 M9 及び M11 の P-gp 阻害
（報告書 DMPKR20[redacted]0021-E-01）

：添付資料番号 4.2.2.6-13（参考）

P-gp を介したジゴキシン輸送に対する M9（1、5、10 及び 20 μM）及び M11（1、5、10 及び 20 μM）の阻害作用を、Caco-2 細胞における双方向輸送により評価した。

M9 は 5～20 μM の濃度範囲で、Caco-2 細胞におけるジゴキシンの輸送をほとんど又は全く阻害しなかった（1 μM ではデータが得られなかった）。M11 は 1～20 μM の濃度範囲で弱い阻害作用を示し、最大阻害率は 50%未満であった。

データの概要を 2.6.5.15K に示す。

（3）Caco-2 細胞におけるフルキンチニブの BCRP 阻害
（報告書 DMPKR20[redacted]0080-E-01）

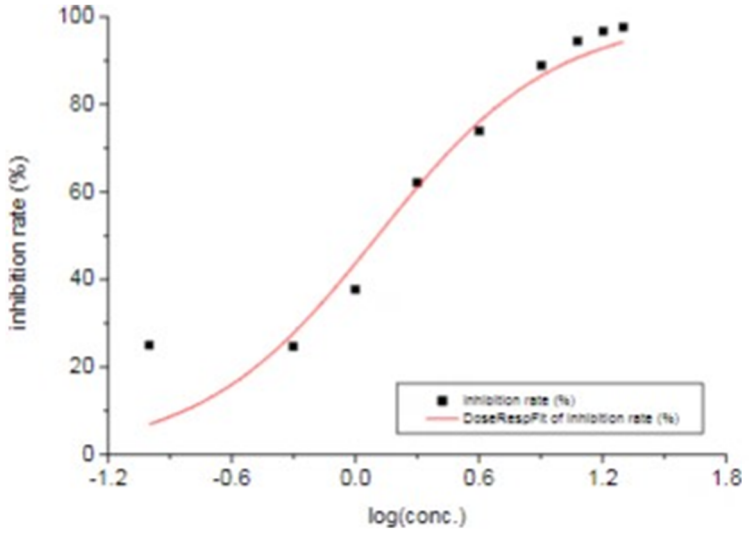
：添付資料番号 4.2.2.6-14（参考）

BCRP を介したエストロン－3－硫酸（E3S、BCRP 基質）輸送に対するフルキンチニブ（0.1～20 μM）の阻害作用を、Caco-2 細胞における双方向輸送により評価した。

フルキンチニブは E3S 輸送を濃度依存的に阻害し（20 μM で最大 97.6%阻害）、IC_{50} 値は 1.29 μM であった（図 2.6.4.7-2）。

データの概要を 2.6.5.15L に示す。

図 2.6.4.7-2　Caco-2 細胞における BCRP を介した E3S 輸送に対する
フルキンチニブの阻害作用



出典：報告書 DMPKR20[redacted]0080-E-01
BCRP：breast cancer resistance protein、E3S：エストロン－3－硫酸

（4）Caco-2 細胞における代謝物 M9 及び M11 の BCRP 阻害
（報告書 DMPKR20[redacted]0027-E-01）

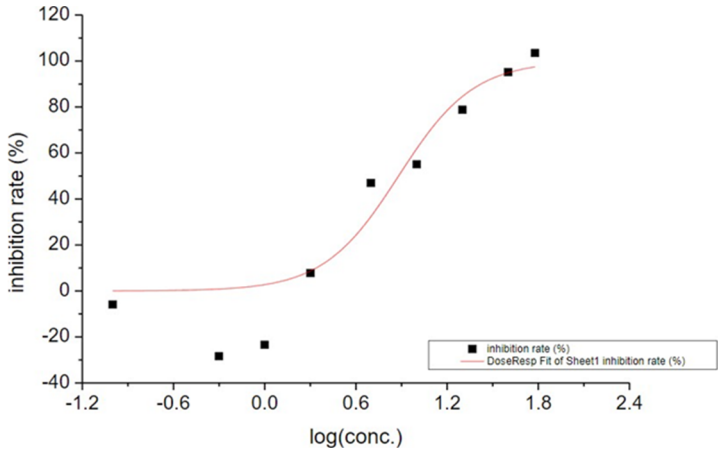
：添付資料番号 4.2.2.6-15（参考）

BCRP を介した E3S 輸送に対する M9（0.1～60 μM）又は M11（0.1～20 μM）の阻害作用を、Caco-2 細胞における双方向輸送により評価した。

M9 及び M11 は E3S 輸送を濃度依存的に阻害し、それぞれ M9 は 60 μM で最大 103%、M11 は 20 μM で最大 95.4%阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 7.6 及び 1.03 μM と算出された（図 2.6.4.7-3 及び図 2.6.4.7-4）。

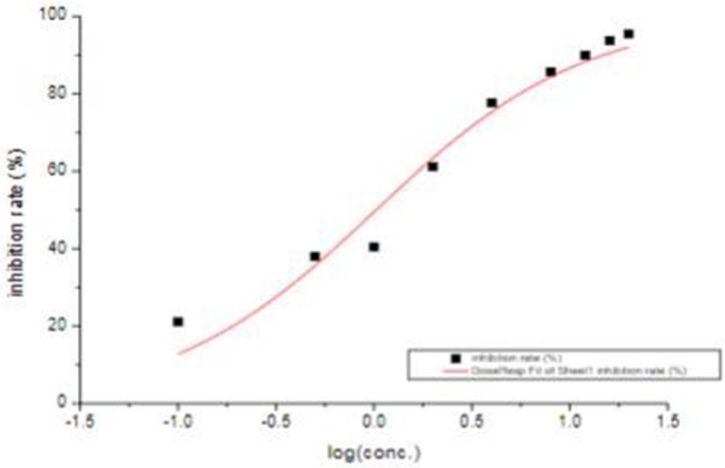
データの概要を 2.6.5.15M に示す。

図 2.6.4.7-3　Caco-2 細胞における BCRP を介した E3S 輸送に対する M9 の阻害作用



出典：報告書 DMPKR20[redacted]0027-E-01
BCRP：breast cancer resistance protein、E3S：エストロン－3－硫酸、M9 :フルキンチニブの代謝物（HM5024093 又は M380）

図 2.6.4.7-4　Caco-2 細胞における BCRP を介した E3S 輸送に対する M11 の阻害作用



出典：DMPKR20[redacted]0027 E 01
BCRP：breast cancer resistance protein、E3S：エストロン－3－硫酸、M11:フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）

（5）ヒト OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対するフルキンチニブの阻害作用（報告書 400253-20[redacted]032601-OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1、MATE2-KI）

：添付資料番号 4.2.2.6-12（参考）

OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対するフルキンチニブ（0.156～20 μM）の阻害作用を、各トランスポーターを発現する HEK293 細胞において評価した。

各トランスポーターにおける最小輸送活性比（%VC）を表 2.6.4.7-6 に示す。各トランスポーターに対するフルキンチニブの IC_{50} 値はいずれも 20.0 μM 以上であった。

データの概要を 2.6.5.15N に示す

表 2.6.4.7-6　HEK293 細胞におけるトランスポーター活性値

トランスポーター	フルキンチニブ濃度（μM）	最小輸送活性比（%VC）
OATP1B1	0.313	96.1
OATP1B3	1.25	89.2
OAT1	10.0	92.2
OAT3	0.156	90.5
OCT2	0.156	76.5
MATE1	20.0	58.6
MATE2-K	10.0	76.4

出典：報告書 400253-20[redacted]032601-OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1, MATE2-KI
%VC：被験化合物の輸送活性の平均値／溶媒コントロールの輸送活性の平均値（%）

（6）OAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K に対する M11 の阻害作用（報告書 ADME-HJHP-210908-SLC）

：添付資料番号 4.2.2.6-17（参考）

OAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K に対する M11（0.01、0.03、0.1、0.3、1、3 及び 10 μM）の阻害作用を、各トランスポーターを発現する HEK293 細胞において評価した。

M11 は、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K に対し阻害作用を示した。10 μM における阻害率は、それぞれ 32.0%、32.3%、28.7%及び 36.7%であり、IC_{50} 値はいずれも 10 μM を上回った。M11 は、検討した濃度範囲 0.01～10 μM において OAT1、OAT3 及び OCT2 に対する阻害作用を示さなかった。10 μM における阻害率は、それぞれ 8.83%、11.6%及び 15.8%であった（表 2.6.4.7-7）。

データの概要を 2.6.5.15O に示す。

表 2.6.4.7-7 M11 による SLC トランスポーターOAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K 阻害

トランスポーター	陽性対照	プローブ基質	プローブ濃度（μM）	阻害率 [a]（%）	IC_{50}（μM）
OAT1	プロベネシド	4-アミノ馬尿酸	10	8.83	NI
OAT3	プロベネシド	エストロン－3－硫酸	10	11.6	NI
OCT2	ベラパミル	メトホルミン	100	15.8	NI
OATP1B1	リファンピシン	β-エストラジオール 17-(β-D-グルクロニド)	5	32	>10
OATP1B3	リファンピシン	β-エストラジオール 17-(β-D-グルクロニド)	10	32.3	>10
MATE1	ピリメタミン	テトラエチルアンモニウム	30	28.7	>10
MATE2-K	ピリメタミン	テトラエチルアンモニウム	30	36.7	>10

出典：報告書 ADME-HJHP-210908-SLC Inhibition, Tables 1 and 5 to 11
M11：フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、IC_{50}：50%阻害濃度、NI：阻害作用なし
[a] M11 濃度 10 μM における阻害率（%）を示す。

2.6.4.7.3 CYP 及びトランスポーターの薬物相互作用との関連性

FDA の薬物相互作用試験に関するガイダンス（FDA ガイダンス）[4]に従い、フルキンチニブが CYP 又はトランスポーターを介した DDI を引き起こす可能性を評価した。

CYP の可逆的及び時間依存的阻害に関する basic static model を用いて、被験物質の存在下と非存在下におけるプローブ基質の固有クリアランス値の比（R_1 値）を算出した。また、同様にトランスポーター阻害についても FDA ガイダンスに従い R 値を算出した。これらの計算には、臨床試験 2015-013-00US1 試験から得られた PK データを用いた。すなわち、フルキンチニブ 5 mg を 1 日 1 回投与したときの定常状態におけるフルキンチニブの C_{max} として 291 ng/mL を、代謝物 M11 の C_{max} として 77.4 ng/mL を用いた。フルキンチニブ及び M11 の可逆的 CYP 阻害の予測に基づく被験物質の存在下と非存在下におけるプローブ基質の R_1 値をそれぞれ表 2.6.4.7-8 及び表 2.6.4.7-9 に示す。評価した CYP 分子種（CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1 及び 3A4）の R_1 値は、推奨されるカットオフを十分に下回ることから、これらの分子種において意味のある DDI のリスクはないと考えられる。

フルキンチニブ及び M11 によるトランスポーター阻害の R 値を、それぞれ表 2.6.4.7-10 及び表 2.6.4.7-11 に示す。これらの結果より、フルキンチニブ及び M11 は、P-gp 及び BCRP 基質の吸収又は全身曝露量に影響を及ぼす可能性があるが、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 又は MATE2-K 基質の曝露量には影響を及ぼさないと考えられる。

表 2.6.4.7-8　DDI の static model を用いた、フルキンチニブによる
可逆的 CYP 阻害の R_1 値の予測

CYP	フルキンチニブ IC_{50} (μM)	K_i [a] (μM)	Basic model $R_1=1+(I_{max,u}/K_i)$ [b]	$R_1 \geq 1.02$
CYP1A2	> 200	> 100	< 1.000	No
CYP2B6	> 12.5	> 6.25	< 1.005	No
CYP2C8	> 50	> 25	< 1.001	No
CYP2C9	> 50	> 25	< 1.001	No
CYP2C19	> 50	> 25	< 1.001	No
CYP2D6	> 50	> 25	< 1.001	No
CYP3A4	> 50	> 25	< 1.001	No
Basic model $R_{1,gut}=1+(I_{gut}/K_i)$ [c]			$R_{1,gut} \geq 11$	
CYP3A4	> 50	> 25	3.03	No

$C_{max,ss}$：定常状態における最高血漿中濃度、CYP：チトクローム P450、DDI：薬物相互作用、IC_{50}：50%阻害濃度、Igut：フルキンチニブの投与量／250 mL として算出したフルキンチニブの腸管内濃度、$I_{max,u}$：定常状態における最高血漿中非結合型薬物濃度、K_i：阻害定数、R1：可逆的阻害に関する、フルキンチニブの存在下と非存在下における特定の酵素反応経路のプローブ基質の固有クリアランス値の比

[a] K_i は $IC_{50}/2$ とした。

[b] $I_{max,u}$ は非結合型フルキンチニブの血漿中 $C_{max,ss}$（$I_{max,u}$=0.74 μM×0.046=0.034 μM）とした。

[c] I_{gut} は 50.8 μM とした。

表 2.6.4.7-9　DDI の static model を用いた、代謝物 M11 による
可逆的 CYP 阻害の R 値の予測

CYP	M11 IC_{50} (μM)	K_i [a] (μM)	Basic model $R_1=1+(I_{max,u}/K_i)$ [b]	$R_1 \geq 1.02$
CYP1A2	> 50	> 25	< 1.0002	No
CYP2B6	> 50	> 25	< 1.0002	No
CYP2C8	> 50	> 25	< 1.0002	No
CYP2C9	> 50	> 25	< 1.0002	No
CYP2C19	> 50	> 25	< 1.0002	No
CYP2D6	> 50	> 25	< 1.0002	No
CYP2E1	> 50	> 25	< 1.0002	No
CYP3A4（テストステロン）	38	19	< 1.0002	No
CYP3A4（ミダゾラム）	> 50	> 25	< 1.0002	No

$C_{max,ss}$：定常状態における最高血漿中濃度、CYP：チトクローム P450、DDI：薬物相互作用、IC_{50}：50%阻害濃度、$I_{max,u}$：定常状態における最高血漿中非結合型薬物濃度、Ki：阻害定数、M11:フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、R_1：可逆的阻害に関する、M11 の存在下と非存在下の特定の酵素反応経路のプローブ基質の固有クリアランス値の比

[a] Ki は $IC_{50}/2$ とした。

[b] $I_{max,u}$ は非結合型 M11 の血漿中 $C_{max,ss}$（$I_{max,u}$=0.20 μM×0.023=0.005 μM）とした。

表 2.6.4.7-10　トランスポーター阻害：フルキンチニブの R 値の評価

トランスポーター	フルキンチニブ IC_{50}（μM）	R 値の算出式	R 値	R ≥カットオフ
小腸				R ≥ 10
P-gp	4.6	$R = I_{gut}/IC_{50}$	11.0	Yes
BCRP	1.29		39.4	Yes
肝臓				R ≥ 1.1
OATP1B1	> 20	$R = 1 + (f_{up} \times I_{in,max}/IC_{50})$ [a]	< 1.003	No
OATP1B3	> 20		< 1.003	No
腎臓				R ≥ 0.1
OAT1	> 20	$R = I_{max,u}/IC_{50}$ [b]	< 0.002	No
OAT3	> 20		< 0.002	No
OCT2	> 20		< 0.002	No
MATE1	> 20		< 0.002	No
MATE2-K	> 20		< 0.002	No

BCRP：breast cancer resistance protein、F_a：吸収率、F_g：腸管アベイラビリティ、f_{up}：血漿中非結合型分率、IC_{50}：50%阻害濃度、I_{gut}：フルキンチニブの投与量／250 mL として算出したフルキンチニブの腸管内濃度、$I_{in,max}$：肝臓の入口における阻害薬の最高血漿中濃度の推定値、$I_{max,u}$：定常状態における非結合型フルキンチニブの最高血漿中濃度、k_a：吸収速度定数、MATE：multidrug and toxin extrusion、OAT：organic anion transporter、OATP：organic anion transporting polypeptide、OCT：organic cation transporter、P-gp：P-糖蛋白、qd：1 日 1 回、Qh：肝血流量、R：比、R_B：血液／血漿中濃度比

[a] $I_{in,max}=C_{max}+(F_aF_g \times k_a \times$ 用量$)/Qh/R_B$。F_a 及び F_g は 1 に設定した（最悪の場合のシナリオ）。f_{up} は 0.046 であった。k_a は 0.0323 min^{-1} であった（2009-013-00CH1 及び 2012-013-00CH3 試験の臨床 PK データに基づく母集団 PK モデリングより引用）。Qh は 1.5 L/min、R_B は 0.60 であった。

[b] $I_{max,u}=C_{max} \times f_{up}$

表 2.6.4.7-11　トランスポーター阻害：M11 の R 値の評価

トランスポーター	M11 IC_{50}（μM）	R 値の算出式	R 値	R ≥カットオフ
小腸				R ≥ 0.1
P-gp	20	$R = I_1/IC_{50}$	0.01	No
BCRP	1.03		0.20	Yes
肝臓				R ≥ 1.1
OATP1B1	> 10	$R = 1 + (f_{up} \times I_{in,max}/IC_{50})$[a]	< 1.004	No
OATP1B3	> 10		< 1.004	No
腎臓				R ≥ 0.1
OAT1	阻害なし	$R = I_{max,u}/IC_{50}$ [b]	-	No
OAT3	阻害なし		-	No
OCT2	阻害なし		-	No
MATE1	> 10		< 0.0005	No
MATE2-K	> 10		< 0.0005	No

BCRP：breast cancer resistance protein、F_a：吸収率、F_g：腸管アベイラビリティ、f_{up}：血漿中非結合型分率、IC_{50}：50%阻害濃度、I_1：代謝物の最高血漿中濃度、$I_{in,max}$：肝臓の入口における阻害薬の最高血漿中濃度の推定値、$I_{max,u}$：定常状態における非結合型 M11 の最高血漿中濃度、k_a：吸収速度定数、M11:フルキンチニブの代謝物（HM5025423 又は M379-3）、MATE：multidrug and toxin extrusion、OAT：organic anion transporter、OATP：organic anion transporting polypeptide、OCT：organic cation transporter、P-gp：P-糖蛋白、qd：1 日 1 回、Qh：肝血流量、R：比、R_B：血液／血漿中濃度比

[a] $I_{in,max}=C_{max}+(F_aF_g \times k_a \times$ 用量$)/Qh/R_B$。F_a 及び F_g は 1 に設定した（最悪の場合のシナリオ）。f_{up} は 0.023 であった。k_a は 0.1 min^{-1} とした（最悪の場合のシナリオ）。Qh は 1.5 L/min であった。R_B は 0.60（フルキンチニブと同じと仮定）とした。

[b] $I_{max,u}=C_{max} \times f_{up}$

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

その他の薬物動態試験は実施していない。

2.6.4.9 考察及び結論

フルキンチニブの PK、吸収、分布、代謝及び排泄に関する試験を実施した。

フルキンチニブは膜透過性が高く、排出比は 1 に近く、P-gp 等の排出トランスポーターの基質ではない。フルキンチニブ及び主謝物 M11 は、いずれの動物種においても肝ミクロソームとインキュベートしたとき安定であった。

GLP 試験及び非 GLP 試験で評価した各動物種において、定常状態における PK 特性は概ね同様であり、検討した範囲で性差は認められなかった。フルキンチニブを単回経口投与したときの AUC は、ラットでは 0.5～2 mg/kg の用量範囲で用量比を上回る増加を示したが、モルモットでは 25～100 mg/kg の用量範囲で用量比を下回る増加を示し､イヌでは 0.1～1 mg/kg の用量範囲で概して用量に比例した増加が認められた。

フルキンチニブをラット又はイヌに反復経口投与したときの曝露量は、ラットでは用量比を下回る増加を示したが、イヌではほぼ用量に比例した増加が認められた。ラット及びイヌでは、いずれの用量においても、2 倍を超える曝露量の性差は認められなかった。ラット及びイヌに最長 26 週間及び 39 週間反復経口投与したとき、曝露量の顕著な蓄積は認められなかった。M9 及び M11 の曝露量はフルキンチニブよりも低く、用量の増加に伴う増加は認められず、また、明らかな性差は認められなかった。

フルキンチニブの血漿蛋白結合率はラットで最も高く、イヌで最も低かった。ヒトにおける血漿蛋白結合率は 95.3%～95.4%であった。代謝物 M11 の血漿蛋白結合率は、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトでそれぞれ 96.8%、96.6%、94.8%、95.6%及び 97.7%と同程度であった。ヒト肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの蛋白結合はごくわずかであることが示された。

ラット、イヌ及びヒトの血液にフルキンチニブを添加し、R_B を測定した。添加後 10 及び 60 分の R_B は、ラットではそれぞれ 0.709 及び 0.733、イヌではそれぞれ 0.851 及び 0.792、ヒトではそれぞれ 0.458 及び 0.601 であった。

ラットに[^{14}C]フルキンチニブを経口投与したとき、フルキンチニブは主に代謝及び排泄組織に分布した。有色動物のメラニン含有組織では中等度の放射能が認められた。脳内に認められた放射能はわずかであり（血漿中 AUC の 10%以下）、血液脳関門を介した分布は限定的であることが示唆された。投与後 168 時間以降、大部分の組織中の放射能濃度は定量不能であったことから、組織中の総放射能は速やかに消失することが示された。

フルキンチニブは CYP 及び非 CYP 酵素により代謝される。フルキンチニブの代謝に関与する主な CYP 分子種は CYP3A4/5 であり､CYP2C8､CYP2C9 及び CYP2C19 の寄与は小さい。

フルキンチニブをラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームとインキュベーションしたとき、6 種類の主要代謝物が認められた。これらの代謝物は、主に CYP による O-脱メチル化体（M1、M7 及び M11）、水酸化体（M2、M10 構造確認済み）及びカルボン酸体（M9）であった（M1 を除き構造が確認されている）。ヒト肝ミクロソームで認められた主要代謝物は M10 であり、二次代謝物はラット、イヌ及びサルと同様に、M1+M7 及び M2 であった。ラット肝ミクロソームでは、M1+M7 が主要代謝物であった。ラットにフルキンチニブを経口投与したとき、M2 及び M11 が血漿中に認められた。ヒト血漿中で最も多く認められたフルキンチニブの代謝物は M11（脱メチル体 HM5025423）であり、主に M10 由来であった。M10 は主に CYP3A4/5 により生成され、引き続き M11 に変換されることから、M11 の生成にも CYP3A4/5 が大きく関与すると考えられた。ヒト特異的代謝物は同定されなかった。ラ

ット及びイヌにおける代謝プロファイルがヒトに類似したことから、フルキンチニブの毒性試験に用いる動物種としてラット及びイヌの選択が妥当であると考えられた。

ヒトを対象とした[^{14}C]フルキンチニブを用いたマスバランス試験において、M205 及びそのグルクロン酸抱合体の生成は主代謝経路の 1 つであることが示された。M205 の生成経路をヒト血漿及びヒト肝ミクロソームで検討した結果、M205 の生成は CYP によるものではないことが示された。

無処置 Sprague Dawley ラットに経口投与したとき、フルキンチニブは主に糞中に排泄され、性差は認められなかった。ラットでは、尿中に回収された未変化体は投与量の 25%未満であったことから、尿中排泄はフルキンチニブの消失経路としては重要ではないことが示唆された。BDC ラットを用いた結果より、ラットでは投与されたフルキンチニブが、胆汁、尿及び糞中にほぼ同量ずつ排泄されることが示唆された。

フルキンチニブは 10 μM の濃度まで CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対して顕著な阻害作用を示さず（IC_{50} > 10 μM）、CYP1A2、2B6 及び 3A4 に対して誘導作用を示さなかった。10 μM において、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対する顕著な時間依存的阻害は認められなかった。同様に、M11 は CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6 及び 2E1 に対して顕著な可逆的阻害を示さなかった（IC_{50} > 50 μM）。M11 は、CYP3A4/5 に対して弱い可逆的阻害作用を示した（IC_{50}：38 μM）。M9 及び M11 はいずれも 10 μM で CYP1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5 に対して時間依存的な阻害作用を示さなかった。また、M11 は CYP2B6、2C8 及び 2C19 に対して時間依存的な阻害作用を示さなかった。これらのデータ及び臨床治療用量におけるフルキンチニブのヒト血漿中濃度より、これらの CYP との相互作用を介してフルキンチニブが併用薬の薬物動態に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

フルキンチニブは P-gp 等の排出トランスポーターの基質である可能性は低く、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではなかった。フルキンチニブは、P-gp 及び BCRP を用量依存的に阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 4.60 及び 1.29 μM と推定された。M11 は BCRP を阻害し IC_{50} 値は 1.03 μM であったが、P-gp は顕著に阻害しなかった（IC_{50} > 20 μM）。M9 は BCRP を阻害し、IC_{50} 値は 7.6 μM であったが、P-gp は顕著に阻害しなかった（IC_{50} > 20 μM）。

OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K 対するフルキンチニブの顕著な阻害作用は認められなかった。M11 は OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K を阻害したが、10 μM での阻害レベルは 40%未満であった。臨床治療用量におけるフルキンチニブ及び M11 のヒト血漿中濃度を考慮すると、これらの肝及び腎トランスポーターに関して臨床的に重要な DDI のリスクはないものと考えられた。

以上の結果より、フルキンチニブの薬物動態試験で得られた結果は、臨床予定用量を投与したときのフルキンチニブの安全性を検討するための毒性試験で使用する動物種の選択の妥当性を裏付けるものである。

2.6.4.10 参考文献

[1] Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm Res. 1993 Jul;10(7):1093-5.

[2] Kuhnz W, Gieschen H. Predicting the oral bioavailability of 19-nortestosterone progestins in vivo from their metabolic stability in human liver microsomal preparations in vitro. Drug Metab Dispos. 1998 Nov;26(11):1120-7.

[3] Obach RS. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. Drug Metab Dispos. 1999 Nov;27(11):1350-9.

[4] U.S. Food and Drug Administration (FDA). Guidance Document: Clinical Drug Interaction Studies － Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry. January 2020. Available from: https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/clinical-drug-interaction-studies-cytochrome-p450-enzyme-and-transporter-mediated-drug-interactions.（添付なし）

目次

2.6.5 薬物動態試験概要表 2
2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表 2
2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験 6
2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収 12
2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収 23
2.6.5.5 薬物動態試験：分布 35
2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合 41
2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 45
2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験 46
2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝 47
2.6.5.10 薬物動態試験：In Vitro における代謝 55
2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路 57
2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 59
2.6.5.13 薬物動態試験：累積排泄 60
2.6.5.14 薬物動態試験：胆汁中排泄 61
2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用 62
2.6.5.16 薬物動態試験：その他 81

2.6.5 薬物動態試験概要表

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
Analytical Methods and Validation						
Bioanalytical method validation supporting TK studies	Rat plasma	Not applicable	[redacted], China	8426-160	4.2.2.1-1	参考
Bioanalytical method validation supporting TK studies	Rat plasma	Not applicable	[redacted] China	[redacted]54MV1	4.2.2.1-2	参考
Bioanalytical method validation supporting TK studies	Guinea pig plasma	Not applicable	[redacted]	[redacted]186MV05	4.2.2.1-3	参考
Bioanalytical method validation supporting PK/TK studies	Rat and dog plasma	Not applicable	[redacted], China	RP-HMPL-013-ADME_Bioanalysis- MV	4.2.2.1-4	参考
Bioanalytical method validation supporting PK studies	Rat and dog plasma	Not applicable	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0003- E-01	4.2.2.1-5	評価
Bioanalytical method validation supporting TK studies	Dog plasma	Not applicable	[redacted], China	8449-371	4.2.2.1-6	参考
Bioanalytical method validation supporting TK studies	Dog plasma	Not applicable	[redacted] China	[redacted]54MV2	4.2.2.1-7	参考
Absorption						
Permeability and substrate for efflux transporter	Caco-2 cells	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0007- 01	4.2.2.2-1	評価
Single-dose PK	Mouse/ ICR	Oral gavage and IV	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0001- 01	4.2.2.2-2	参考
Single and 7-day repeat-dose PK	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage and IV	[redacted], China	RP-HMPL-013-ADME-1_RPK	4.2.2.2-3	参考
Single-dose PK	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0008- E-01	4.2.2.2-4	参考
Single-dose PK	Dog/ Beagle	Oral capsules and IV	[redacted], China	RP-HMPL-013-ADME-1_DPK	4.2.2.2-5	参考
Single-dose PK	Dog/ Beagle	Oral capsules	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0004- E-01	4.2.2.2-6	評価
Phototoxicity	Guinea Pig/ Hartley	Oral gavage	[redacted]	[redacted]186PT02	4.2.3.7.7-1	参考
Combined micronucleus/comet assay	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted], England	8456891	4.2.3.3.2-2	評価

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
Repeat-dose toxicity (4-week)	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted], China	[redacted]49RD1	4.2.3.2-1	参考
Repeat-dose toxicity (13-week)	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted], China	8426159	4.2.3.2-2	評価
Repeat-dose toxicity (26-week)	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted], China	[redacted]54RD1	4.2.3.2-3	参考
Embryo-fetal developmental toxicity study	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted], China	[redacted]54RB1	4.2.3.5.2-1	参考
Dose range-finding embryo-fetal developmental toxicity study	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted], USA	8449386	4.2.3.5.2-2	参考
Embryo-fetal developmental toxicity study	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted], USA	8449387	4.2.3.5.2-3	評価
Repeat-dose toxicity (4-week)	Dog/ Beagle	Oral capsules	[redacted], China	[redacted]49RD2	4.2.3.2-4	参考
Repeat-dose toxicity (13-week)	Dog/ Beagle	Oral capsules	[redacted], China	8449374	4.2.3.2-5	評価
Repeat-dose toxicity (39-week)	Dog/ Beagle	Oral capsules	[redacted], China	[redacted]54RD2	4.2.3.2-6	参考
Distribution						
Plasma protein binding	Mouse, rat, dog, and human	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0039- E-02	4.2.2.3-1	評価
Metabolite (M11) plasma protein binding	Mouse, rat, dog, monkey, and human plasma	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0018- E-01	4.2.2.3-2	参考
Blood-to-plasma distribution	Rat, dog, and human	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0004- E-01	4.2.2.3-3	参考
Protein binding in liver microsomes	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0081- E-01	4.2.2.3-4	参考

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
Blood-to-plasma ratios with [^{14}C]fruquintinib	Rat/ Sprague Dawley and Long-Evans	Oral gavage	[redacted], [redacted], USA	RPT03316	4.2.2.3-5	参考
Metabolism						
Metabolic stability	Mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0043- E-01	4.2.2.4-1	参考
Metabolic stability (metabolite M11)	Mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0019- E-01	4.2.2.4-2	参考
Metabolite identification	Mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0076- E-01	4.2.2.4-3	参考
Metabolite identification	Rat, dog, monkey, and human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0009- E-01	4.2.2.4-4	参考
Metabolic enzyme identification	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0079- E-01	4.2.2.4-5	参考
CYP reaction phenotyping	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0003- E-01	4.2.2.4-6	参考
Metabolic enzyme identification	Human plasma and human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0015- E-01	4.2.2.4-8	参考
CYP reaction phenotyping	Recombinant human CYP450 isoforms	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0006- E-01	4.2.2.4-7	参考
Metabolic profiling	Rat/ Sprague Dawley	Oral gavage	[redacted], China	RTC00559	4.2.2.4-9	参考
Excretion						
PK, metabolism, excretion, and mass balance	Rat/ Sprague Dawley	Intravenous and oral gavage	[redacted], China	RTC00537	4.2.2.5-1	参考
Pharmacokinetic Drug Interaction						
CYP induction	Human hepatocytes	In vitro	[redacted], China	SH09-H01-TR407	4.2.2.6-1	参考
CYP induction	Human hepatocytes	In vitro	[redacted], China	400253-20[redacted]032601- HI	4.2.2.6-2	参考

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Type of Study	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	添付資料番号	区分
CYP inhibition	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0059- E-01	4.2.2.6-3	参考
CYP inhibition	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0003- E-01	4.2.2.6-4	評価
Reversible inhibition (metabolite M11)	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0022- E-01	4.2.2.6-5	参考
Reversible inhibition (metabolite M11)	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0001- E-01	4.2.2.6-6	参考
CYP inhibition	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0078- E-01	4.2.2.6-7	参考
CYP inhibition	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0005- E-01	4.2.2.6-8	参考
CYP inhibition (metabolite M9 and M11)	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0026- E-01	4.2.2.6-9	参考
CYP inhibition (metabolite M11)	Human liver microsomes	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0020- E-01 Final	4.2.2.6-10	参考
Inhibition of transporters	Caco-2 cells	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0077- E-01	4.2.2.6-11	評価
Inhibition of transporters	HEK293 cells	In vitro	[redacted], China	400253-20[redacted]032601-OATP1B1, OATP1B3U, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1, MATE2-KI	4.2.2.6-12	参考
Inhibition of transporter (metabolites M9 and M11)	Caco-2 cells	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0021- E-01	4.2.2.6-13	参考
Inhibition of transporter	Caco-2 cells	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0080- E-01	4.2.2.6-14	参考
Inhibition of transporter (metabolites M9 and M11)	Caco-2 cells	In vitro	HUTCHMED Shanghai, China	DMPKR20[redacted]0027- E-01	4.2.2.6-15	参考
Substrate for uptake transporters	HEK293 cells	In vitro	[redacted], China	400253-20[redacted]032601-OATP1B1, OATP1B3U	4.2.2.6-16	参考
Inhibition of transporters (metabolite M11)	HEK293 cells	In vitro	[redacted], China	ADME-HJHP-[redacted]0908-SLC Inhibition	4.2.2.6-17	参考

Caco-2: human colorectal adenocarcinoma; CYP: cytochrome P450; HEK293: human embryonic kidney; M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423; PK: pharmacokinetic(s); R&D: research and development.
Fruquintinib is referred to as HMPL-013 in some study reports.

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験

被験物質：フルキンチニブ

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Used to Support the Following Studies	Noteworthy Findings (Precision, Accuracy, and Stability Validation)	Study Number	添付資料番号
Rat/Plasma	Fruquintinib and M11	1.00 to 750 ng/mL	HPLC-MS /MS	8426159 8449386 8449387 8456891	Fruquintinib Intraassay: Precision (% CV): 1.9% to 6.9% Accuracy (% relative to nominal concentration): -2.4% to 3.3% Fruquintinib Interassay: Precision (% CV): 2.8% to 6.4% Accuracy (% relative to nominal concentration): -0.3% to 2.0% LLOQ, 1.00 ng/mL Freeze-thaw stability in plasma: 5 cycles Room temperature stability in plasma: 24 hours Processed sample stability at 2°C to 8°C: 168 hours. Frozen storage stability in plasma:179 days at -20 ± 10°C and -70 ± 10°C M11 (HM5025423) Intraassay: Precision (% CV): 3.3% to 18.8% Accuracy (% relative to nominal concentration): -8.6% to 10.0% M11 (HM5025423) Interassay: Precision (% CV): 6.4% to 13.9% Accuracy (% relative to nominal concentration): -2.7% to -1.0% LLOQ, 1.00 ng/mL Freeze-thaw stability in plasma: 5 cycles Room temperature stability in plasma: 24 hours Processed sample stability at 2°C to 8°C: 168 hours Frozen storage stability in plasma: 179 days at -20 ± 10°C and -70 ± 10°C	8426-160	m4.2.2.1-1

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Used to Support the Following Studies	Noteworthy Findings (Precision, Accuracy, and Stability Validation)	Study Number	添付資料番号
Rat/Plasma	Fruquintinib	2 to 4000 ng/mL	LC- MS/MS	[redacted]54RD1 [redacted]54RB1	Intraassay: Precision (% CV): 2.57% to 14.8% Accuracy (% relative to nominal concentration): 93.8% to 99.5% Interassay: Precision (% CV): NA Accuracy (% relative to nominal concentration): NA LLOQ: 2 ng/mL Freeze-thaw stability in plasma: 3 cycles Room temperature stability in plasma: 4 hours Processed sample stability: 4 days Frozen storage stability in plasma: 1 month at -70°C	[redacted]54MV1	4.2.2.1-2
Guinea Pig/Plasma	Fruquintinib and M11	5.000 to 5000.000 ng/mL	LC- MS/MS	[redacted]186PT02	Fruquintinib Intraassay: Precision (% CV): 1.6% to 4.6% Accuracy (% relative to nominal concentration): -4.2% to 5.1% Fruquintinib Interassay: Precision (% CV): 2.9% to 4.7% Accuracy (% relative to nominal concentration): -1.5% to 1.6% M11 Intraassay: Precision (% CV): 1.4% to 15.5% Accuracy (% relative to nominal concentration): -13.4% to 9.3% M11 Interassay: Precision (% CV): 3.5% to 12.7% Accuracy (% relative to nominal concentration): -0.7% to 2.2% LLOQ: 5.000 ng/mL Freeze-thaw stability in plasma: 5 cycles Room temperature stability in plasma: 19 hours Processed sample stability at 5°C: 78 hours Frozen storage stability in plasma: 41 days at -80 ± 10°C	[redacted]186MV05	4.2.2.1-3

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Used to Support the Following Studies	Noteworthy Findings (Precision, Accuracy, and Stability Validation)	Study Number	添付資料番号
Rat and dog/Plasma	Fruquintinib	0.500 to 2000 ng/mL	LC- MS/MS	RP-HMPL-013-ADME-1_RPK RP-HMPL-013-ADME-1_DPK [redacted]49RD1 [redacted]49RD2	Fruquintinib Intraassay (Rat): Precision (% CV): 6.8% to 12.3% Accuracy (% relative to nominal concentration): 90.8% to 110% Fruquintinib Interassay (Rat): Precision (% CV): 5.0% to 7.5% Accuracy (% relative to nominal concentration): 93.6% to 106% Fruquintinib Intraassay (Dog): Precision (% CV): 4.2% to 9.5% Accuracy (% relative to nominal concentration): 99.0% to 104% Fruquintinib Interassay (Dog): Precision (% CV): NA Accuracy (% relative to nominal concentration): NA LLOQ: 0.500 ng/mL Freeze-thaw stability in plasma: 3 cycles Room temperature stability in plasma: 2 hours Processed sample stability at room temparature: 24 hours Frozen storage stability in plasma: 167 days at -20 ± 5°C	RP- HMPL-013- ADME_ Bioanalysis-MV	4.2.2.1-4

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Used to Support the Following Studies	Noteworthy Findings (Precision, Accuracy, and Stability Validation)	Study Number	添付資料番号
Rat and dog/Plasma	Fruquintinib M9 M11	1 to 800 ng/mL	UPLC- MS/MS	DMPKR20 [redacted]0008-E-01 DMPKR20 [redacted]0004-E-01 DMPKR20 [redacted]0004-E-01	Fruquintinib Intraassay (Rat): Precision (% CV): 1.97% to 8.85% Accuracy (% relative to nominal concentration): -8.89% to 10.9% Fruquintinib Interassay (Rat): Precision (% CV): 2.53% to 6.96% Accuracy (% relative to nominal concentration): -3.54% to 6.58% M9 Intraassay (Rat): Precision (% CV): 1.86% to 7.14% Accuracy (% relative to nominal concentration): -6.67% to 14.8%, M9 Interassay (Rat): Precision (% CV): 4.50% to 5.91 % Accuracy (% relative to nominal concentration): 5.39% to 9.20% M11 Intraassay (Rat): Precision (% CV): 1.82% to 7.33% Accuracy (% relative to nominal concentration): -0.97% to 12.7% M11 Interassay (Rat): Precision (% CV): 2.68% to 6.25% Accuracy (% relative to nominal concentration): 4.76% to 7.68% Intrabatch (Dog): Intraassay precision and accuracy for fruquintinib, M9 and M11 were determined to be within the range 0.44% to 7.79% and -8.19% to 3.98%, respectively. LLOQ: 1 ng/mL Freeze-thaw stability in plasma: 3 cycles (rat) Room temperature stability in plasma: 4 hours (rat) Processed sample stability: 3 days at 8°C Frozen storage stability in plasma: 28 days at -80°C (rat); 21 days at -80°C (dog)	DMPKR20 [redacted]0003-E-01	4.2.2.1-5

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Used to Support the Following Studies	Noteworthy Findings (Precision, Accuracy, and Stability Validation)	Study Number	添付資料番号
Dog/Plasma	Fruquintinib and M11	Fruquintinib: 0.500 to 250 ng/mL M11: 0.0200 to 10.0 ng/mL	HPLC-MS /MS	8449374	Fruquintinib Intraassay: Precision (% CV): 0.8% to 6.3% Accuracy (% relative to nominal concentration): -9.5% to 4.7% Fruquintinib Interassay: Precision (% CV): 3.2% to 5.0% Accuracy (% relative to nominal concentration): -3.0% to 2.0% M11 Intraassay: Precision (% CV): 1.5% to 10.2% Accuracy (% relative to nominal concentration): -10.5% to 6.5% M11 Interassay: Precision (% CV): 3.0% to 11.6% Accuracy (% relative to nominal concentration): -4.0% to 1.3% Fruquintinib LLOQ: 0.500 ng/mL M11 LLOQ: 0.0200 ng/mL Freeze-thaw stability in plasma: 5 cycles Room temperature stability in plasma: 27 hours Processed sample stability at room temperature: NA Frozen storage stability in plasma: 177 days at -20°C ± 10°C and -70°C ± 10°C	8449-371	m4.2.2.1-6

2.6.5.2 分析方法及びバリデーション試験（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Used to Support the Following Studies	Noteworthy Findings (Precision, Accuracy, and Stability Validation)	Study Number	添付資料番号
Dog/Plasma	Fruquintinib	0.5 to 200 ng/mL	LC- MS/MS	[redacted]54RD2	Fruquintinib Intraassay: Precision (% CV): 2.22% to 8.57% Accuracy (% relative to nominal concentration): 90.73% to 103.02% Fruquintinib Interassay: Precision (% CV): 3.88% to 6.58% Accuracy (% relative to nominal concentration): 91.02% to 103.23% LLOQ: 0.5 ng/mL Freeze-thaw stability in plasma: 3 cycles Room temperature stability in plasma: 4 hours Processed sample stability at room temperature: NA Frozen storage stability in plasma: 1 month at -70°C	[redacted]54MV2	m4.2.2.1-7

°C: degree Celsius; CV: coefficient of variation; HPLC-MS/MS: high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LLOQ: lower limit of quantification; M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; NA: not applicable; UPLC-MS/MS: ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収

2.6.5.3A 膜透過性及び輸送特性

被験物質：フルキンチニブ

Using Caco-2 Cell Monolayers to Evaluate the Membrane Permeability and the Potential Efflux Transport of Fruquintinib					添付資料番号：4.2.2.2-1	
					Study Number: DMPKR20[redacted]0007-01	
Test System	Caco-2 cell monolayers					
Vehicle/Formulation	HBSS + HEPES/Solution					
Method	The apparent permeability of fruquintinib was examined using a Caco-2 cell model, and concentration- dependent and time-dependent bidirectional transport were assessed in the presence and absence of verapamil, a known inhibitor of P-gp efflux transport; triplicate samples.					
Analyte	Fruquintinib					
Assay	LC-MS/MS					
	Exp 1	Exp 2	Exp 3	Exp 4	Exp 5	Exp 6
Verapamil (10 μM)	-	+	-	-	-	-
Concentration (μM)	1	1	0.5	5	1	1
Incubation time (minutes)	60	60	60	60	90	120
$P_{app\ A>B}$ (10^{-6} cm/sec)	32.8	38.2	30.3	36.3	30.7	30.5
$P_{app\ B>A}$ (10^{-6} cm/sec)	35.1	28.1	37.5	37.0	33.1	35.3
Efflux ratio (B > A)/(A > B)	1.1	0.7	1.2	1.0	1.1	1.2
Recovery (A > B) (%)	89.9	85.2	97.2	85.7	93.4	93.6
Recovery (B > A) (%)	53.4	84.6	57.0	71.4	66.9	68.6
Additional Information: Results represent mean values of samples run in triplicate. The efflux ratio (P_{app}(B > A)/ P_{app}(A > B)) for digoxin (control) was determined to be 16.8, however in the presence of verapamil, this value decreased to 1.8, confirming the sensitivity of the test system. The efflux ratio of fruquintinib was close to 1, with a $P_{app\ A>B}$ of approximately 30x10^{-6}cm/sec, at concentrations up to 5 μM. Co-incubation with verapamil, an inhibitor of efflux transporters, had no significant effect on the permeability and efflux ratio of fruquintinib. The data suggest that fruquintinib has high membrane permeability and is unlikely to be a substrate of efflux transporters (e.g., P-gp).						

A: apical; B: basolateral; Caco-2: human colorectal adenocarcinoma; Exp: experiment; HBSS: hank's balanced salt solution; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; P_{app}: apparent permeability coefficient; P-gp: P-glycoprotein.

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

2.6.5.3B 単回静脈内及び単回経口投与後のフルキンチニブの吸収（ICR マウス）

被験物質：フルキンチニブ

Pharmacokinetic Evaluation of Fruquintinib Following a Single Intravenous and Oral Administrations in Male ICR Mice		添付資料番号：4.2.2.2-2 Study Number: DMPKR20[redacted]0001-01
Species/Strain	Mouse/ICR	
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3/group/time point sampled, composite sampling	
Feeding Condition	Fasted	
Vehicle/Formulation	Intravenous: 0.2 M HCl: ethanol: solutol HS15: saline (0.3 mL: 1 mL: 1 g: 7.70 mL)/Solution	Oral: 0.5% CMC-Na/Suspension
Method of Administration	IV bolus	Oral gavage
Dose (mg/kg) [a]	2.5	10
Sample	Plasma	Plasma
Analyte	Fruquintinib	Fruquintinib
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS
PK Parameters		
F(%)	100.0	43.2
V_z (L/kg)	0.7	0.6
MRT (h)	3.4	5.4
CL (mL/min/kg)	3.3	3.3
$t_{1/2}$ (h)	2.4	2.0
AUC_{last} (ng·h/mL)	10489	17644
AUC_{∞} (ng·h/mL)	10497	17649
C_{max} (ng/mL)	3490	2057
t_{max} (hours)	0.1	2.0
Additional Information: Blood was collected at 5, 15, and 30 minutes and 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, and 24 hours post IV or oral administration using a composite sampling regimen. The clearance was very low compared to the rate of hepatic blood flow (90 mL/min/kg) in mice.		

AUC_{∞}: area under plasma concentration-time curve from time zero (dosing time) to infinity; AUC_{last}: area under the concentration- time curve from time zero (dosing time) to the last measurable concentration; CL: clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; F%: bioavailability; IV: Intravenous; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; MRT: mean residence time; $t_{1/2}$: apparent terminal elimination half-life; t_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z: volume of distribution based on terminal elimination phase.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

2.6.5.3C 単回静脈内及び単回経口投与後のフルキンチニブの吸収（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Pharmacokinetics of Fruquintinib in Sprague Dawley Rats Following Oral and Intravenous Administration at Different Dose Levels											添付資料番号：4.2.2.2-5 Study Number: RP-HMPL-013-ADME-1_RPK	
Species/Strain	Rat/Sprague Dawley											
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3 and F/3 per group; 3/sex/group/time point sampled, serial sampling											
Feeding Condition	Fasted											
Vehicle/Formulation	Intravenous: 0.2 M HCl: ethanol: solutol HS15: saline (0.3 mL: 1 mL: 1 g: 7.7 mL)/Solution								Oral: 0.5% CMC-Na/Suspension			
Method of Administration	IV bolus (single)		Oral gavage (single)		Oral gavage (single)		Oral gavage (single)		Oral gavage (repeated for 7 days)			
Dose (mg/kg) [a]	1.0		0.5		1.0		2.0		1.0			
Sample	Plasma											
Analyte	Fruquintinib											
Assay	LC-MS/MS											
PK Parameters	IV 1 mg/kg		Oral 0.5 mg/kg		Oral 1 mg/kg		Oral 2 mg/kg		Oral 1 mg/kg Day 1		Oral 1 mg/kg Day 7	
	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
AUC_{last} (ng·h/mL) (mean ± SD)	1769± 505	3079± 1191	245 ±98	359 ±188	868 ±361	1391± 26	2073± 533	3905± 813	1606± 1200	764 ±401	3539± 1929	2053± 153
AUC_{∞} (ng·h/mL) (mean ± SD)	1775± 509	3087± 1198	248 ±99	365 ±191	870 ±362	1398± 22	2086± 539	4018± 858	1670± 1292	769 ±399	3551± 1925	2227± 217
MRT_{∞} (h) (mean ± SD)	1.15 ±0.30	1.70 ±0.51	2.29 ±0.55	3.47 ±0.91	2.65 ±0.36	3.28 ±0.06	3.71 ±0.24	5.16 ±0.69	3.83 ±1.27	3.07 ±0.16	NA	NA
$t_{1/2}$ (h) (mean ± SD)	0.90 ±0.23	1.16 ±0.29	0.92 ±0.35	1.43 ±0.39	1.44 ±0.45	1.34 ±0.24	1.33 ±0.24	2.20 ±0.65	1.64 ±0.83	1.79 ±0.69	2.02 ±0.38	3.17 ±1.38
CL (L/h/kg) (mean ± SD)	0.603± 0.207	0.358± 0.135	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
V_z (L/kg) (mean ± SD)	0.734± 0.055	0.565± 0.080	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
t_{max} (h) (mean ± SD)	NA	NA	1.7 ±0.6	2.0 ±0.0	1.7 ±0.6	2.0 ±0.0	2.0 ±0.0	2.7 ±0.6	2.7 ±0.6	2.0 ±0.0	2.7 ±1.2	2.3 ±0.6
C_{max} (ng/mL) (mean ± SD)	NA	NA	86.7 ±23.1	82.1 ±27.7	279 ±121	374 ±11	480 ±140	624 ±59	354 ±193	229 ±128	512 ±102	382 ±117
C_{min} (ng/mL) (mean ± SD)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	1.30 ±1.29	0.77 ±0.88
C_{avg} (ng/mL) (mean ± SD)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	147 ±80	85.6 ±6.4
AUC_{ss} (ng·h/mL) (mean ± SD)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3539± 1929	2053± 153
DF (mean ± SD)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	3.96 ±1.40	4.40 ±1.00
Additional Information: Based on the mean AUC_{last}, the absolute oral bioavailability of fruquintinib in rats was estimated to be 24.9%, 46.6%, and 61.7 % after a single oral dose of 0.5, 1, and 2 mg/kg, respectively. The AUC increased more than dose-proportionally, and female rats had a slightly higher (< 2-fold) exposure (AUC and C_{max}) than male rats.												

AUC_{∞}: area under the concentration from 0 hours extrapolated to infinity; AUC_{last}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to the last measurable concentration; AUC_{ss}: area under the plasma concentration-time curve during a dosing interval at steady state; C_{avg}: mean plasma concentration; CL: total drug clearance from plasma; C_{max}: maximum plasma concentration; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; C_{min}: minimum drug concentration; DF: degree of fluctuation; h: hour(s); F: female; HCl: hydrochloric acid; IV: intravenous; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M: male; MRT_{∞}: mean residence time from zero to infinity; NA: not applicable; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: apparent terminal elimination half-life; t_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z: volume of distribution based on terminal elimination phase.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

2.6.5.3D [^{14}C]フルキンチニブを単回静脈内及び単回経口投与後の放射能の吸収（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Pharmacokinetics of [^{14}C] Fruquintinib in Sprague Dawley Rats After a Single Oral Administration of [^{14}C] Fruquintinib at 2 mg/kg (100 µCi/kg) or a Single IV Administration of [^{14}C] Fruquintinib at 1 mg/kg (100 µCi/kg)			添付資料番号：4.2.2.5-1 Study Number: RTC00537	
Species/Strain	Rat/Sprague Dawley			
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3, F/3		M/3, F/3	
Feeding Condition	Fed		Fasted	
Vehicle/Formulation	Intravenous: Solutol HS15: alcohol: 0.2 M HCl (1 g: 1 mL: 0.3 mL)/Solution		Oral: 0.5% CMC-Na/Suspension	
Method of Administration	IV (bolus)		Oral gavage	
Dose [a,c] (mg/kg)	1 (100 µCi/kg)		2 (100 µCi/kg)	
Sample	Plasma			
Analyte	Total radioactivity			
Assay	LSC			
PK Parameters	IV (bolus)		Oral gavage	
	M [d]	F	M	F
t_{max} (h) (mean ± SD)	NA	NA	4 ± 0	4 ± 0
C_{max} (ng Eq/ mL) (mean ± SD) [b]	1964 ± 570	2167 ± 557	2199 ± 552	1675 ± 212
AUC_{last} (h.ng Eq/mL) (mean ± SD) [b]	6956 ± 4422	12444 ± 929	20290 ± 5761	17841 ± 4593
AUC_{∞} (h.ng Eq/mL) (mean ± SD) [b]	6982 ± 4427	12472 ± 925	20381 ± 5771	17957 ± 4540
CL (mL/h/kg) (mean ± SD) [b]	244 ± 241	80.5 ± 5.92	NA	NA
V_{ss} (mL/kg) (mean ± SD) [b]	826 ± 471	477 ± 39.9	NA	NA
MRT_t (h) (mean ± SD)	4.17 ± 1.60	5.81 ± 0.04	6.63 ± 0.81	7.39 ± 1.56
$t_{1/2}$ (h) (mean ± SD)	5.36 ± 0.61	5.43 ± 0.20	4.92 ± 1.53	5.15 ± 1.12
F(%) [e]	NA	NA	145.85	71.69
Additional Information: For IV administration, samples were taken at 5, 15 and 30 minutes, 1, 2, 4, 6, 8, 24, and 48 hours post dose. For oral administration, samples were taken at 10 and 30 minutes, 1, 1.5, 2, 4, 6, 8, 24, and 48 hours post dose. As part of this study the total radioactivity in plasma and blood was used to calculate the blood-to-plasma ratios. Following a single IV dose, the whole blood-to-plasma ratios ranged from 0.34 to 0.83 (female) and 0.57 to 1.28 (male) in the time frame of 5 minutes to 48 hours post dose, suggesting no significant binding to cellular components. Following a single oral dose, the whole blood-to-plasma ratios ranged from 0.50 to 0.77 (female) and 0.51 to 1.01 (male) in the time frame of 10 minutes to 48 hours post dose, again suggesting no significant binding to cellular components.				

AUC_{∞}: area under the concentration from 0 hours extrapolated to infinity; AUC_{last}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to the last measurable concentration; CL: clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; F: female; F%: bioavailability; h: hour(s); HCl: hydrochloric acid; IV(iv): intravenous; LSC: liquid scintillation counting; M: male;

MRT_t: mean residence time from time 0 to time t; NA: not applicable; PK: pharmacokinetic; po: oral administration; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: apparent terminal elimination half-life; t_{max}: time to maximum plasma concentration; V_{ss}: volume of distribution under steady state.

[a] Target dose, real dose dependent on body weight of rat.

[b] C_{max}, AUC, CL, and V_{ss} were calculated based on the conversion of 1 g plasma to 1 mL plasma.

[c] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[d] The total radioactivity in blood and plasma of male rat Gp1M02 decreased faster compared to other animals in the same group; clearance (CL) was approximately 5-fold higher in Gp1M02 than in other male rats, and AUC_{last} was 5-fold lower. If this animal is excluded, the absolute bioavailability (F) in male rats will be lower than the present value.

[e] $F = [Dose\ iv \times (AUC_{last})po] / [Dose\ po \times (AUC_{last})iv \times 100\%$

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

2.6.5.3E 単回経口投与後のフルキンチニブ及び代謝物の吸収（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

PK of Fruquintinib and its Metabolites (M9 and M11) Following a Single Oral Administration of Fruquintinib in Sprague Dawley Rats		添付資料番号：4.2.2.2-4 Study Number: DMPKR20[redacted]0008-E-01
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Sex (M/F)/Number of Animals: M/3, F/3; 3/sex/group/time point sampled, serial sampling	
Dose (mg/kg) [a]: 20.0	Feeding Condition: Fasted	
Method of Administration: Oral gavage	Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na/Suspension	
Analytes: Fruquintinib, M9, and M11	Sample: Plasma	Assay: UPLC-MS/MS

PK Parameters (n = 3, mean ± SD):

Analyte	Fruquintinib		M9		M11	
	M	F	M	F	M	F
MRT (hours)	5.50 ± 0.292	6.24 ± 0.297	NA	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (hours)	2.42 ± 0.793	7.72 ± 0.284	NA	NA	NA	NA
AUC_{last} (ng·h/mL)	37548 ± 11909	32059 ± 9364	40.5 ± 33.9	42.4 ± 7.96	445 ± 122	469 ± 162
AUC_{∞} (ng·h/mL)	37620 ± 11837	32084 ± 9368	NA	NA	NA	522 ± 206
C_{max} (ng/mL)	4003 ± 784	3543 ± 1200	8.02 ± 7.31	7.32 ± 1.83	32.7 ± 11.7	29.7 ± 10.9
t_{max} (h)	3.33 ± 1.15	2.67 ± 1.15	5.33 ± 2.31	5.33 ± 2.31	8.00 ± 0.00	8.00 ± 0.00
AUC_M/P ratio (%)	NA	NA	0.0963 ± 0.0576	0.138 ± 0.0400	1.20 ± 0.137	1.45 ± 0.0985

Additional Information: This study was conducted using the validated method described in DMPKR20[redacted]0003-E-01. The exposures of M9 and M11 in the plasma samples were lower than that of fruquintinib. No obvious gender differences were observed.

AUC_M/P ratio: AUC_{last} of metabolite/AUC_{last} of parent drug in each animal × 100%; AUC_{∞}: area under the concentration-time curve from time zero (dosing time) to infinity; AUC_{last}: area under the concentration-time curve from time zero (dosing time) to the last measurable concentration; C_{max}: maximum observed concentration; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; F: female; h: hour; M: male; M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; MRT: mean residence time; NA: not applicable; PK: pharmacokinetic; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: terminal half-life; t_{max}: time to reach maximum observed concentration; UPLC-MS/MS: ultra-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

2.6.5.3F 単回経口投与後のフルキンチニブの吸収（光毒性試験、モルモット）

被験物質：フルキンチニブ

A Phototoxicity Study of Fruquintinib via Oral Gavage in Guinea Pigs					添付資料番号：4.2.3.7.7-1			
					Study Number: [redacted]186PT02			
Species/Strain: Guinea Pig/Hartley			Initial age: 5-7 weeks					
Method of Administration: Oral gavage			GLP Compliance: US FDA/NMPA/OECD GLP					
Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na			Duration of Dosing: Single dose					
Analytes: Fruquintinib, M11			Assay: LC-MS/MS					
Dose (mg/kg):	0		5		25		100	
Number of Animals:	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4	M:4	F:4
TK Parameters (mean ± SD)	Day 1 (Fruquintinib)							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	1090 ±95.5	1030 ± 124	3500 ± 602	3110 ± 428	5880 ± 1380	6920 ± 1820
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	8510 ± 704	9640 ±1200	40300 ±7650	39900 ±6710	85400 ±17700	103000 ±18100
t_{max} (hours) (median)	BQL	BQL	1.50	2.00	2.00	3.00	6.00	6.00
TK Parameters (mean ± SD)	Day 1 (M11)							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	27.3 ± 2.35	34.6 ± 1.78	139 ± 21.0	184 ± 37.9	497 ± 135	502 ± 186
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	148 ± 11.7	197 ± 16.0	1990 ± 315	2570 ± 491	6670 ±1380	7830 ±2040
t_{max} (hours) (median)	BQL	BQL	4.00	4.00	8.00	8.00	8.00	8.00
Additional information: In summary, systemic exposure to HMPL-013 in both male and female animals increased lower than the increase of dose. The increase of AUC_{24} HMPL-013-M11 in female and male was higher than the increase of dose. The increase of C_{max} HMPL-013-M11 in female was lower than the increase of dose and was proportional to the increase of dose in male. After administration of a single dose, the female to male plasma ratio of AUC_{24} and C_{max} of fruquintinib and M11 at 5, 25, or 100 mg/kg were all < 2.0-fold. No gender difference was found in the exposure of fruquintinib and M11 at any of the dose levels.									

AUC_{24}: area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours; BQL: below quantification limit; C_{max}: maximum observed concentration; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; F: female; FDA: Food and Drug Administration; GLP: good laboratory practice; M: male; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; NMPA: National Medical Products Administration; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration; US: United States.

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

2.6.5.3G 単回静脈内及び単回経口投与後のフルキンチニブの吸収（ビーグル犬）

被験物質：フルキンチニブ

PK of Fruquintinib in Beagle Dogs Following Oral and Intravenous Administration at Different Dose Levels											添付資料番号：4.2.2.2-5	
											Study Number: RP-HMPL-013-ADME-1_DPK	
Species/Strain	Dog/Beagle											
Vehicle/Formulation:	Intravenous: 24% solution 1 (20 mL Solutol HS15, 20 mL ethanol and 6 mL 0.2 M HCl)/76% saline (v/v) Oral: API capsule (no additional ingredients added) Oral: 5 mg capsules (including excipient mixture in a gelatin capsule)											
Sample:	Plasma											
Analyte:	Fruquintinib											
Assay:	LC-MS/MS											
Sex (M/F)/Number of Animals:	M/3, F/3; 3/sex/group/time point sampled, serial sampling											
Feeding Condition:	Fasted		Fasted		Fasted		Fasted		Fasted		Fed	
Method of Administration:	IV (bolus)		Oral 5 mg capsule		Oral 5 mg capsule		Oral 5 mg capsule		Oral API capsule		Oral 5 mg capsule	
Dose (mg/kg) [a]	0.3 (IV; fasted)		0.1 (Oral; fasted)		0.3 (Oral; fasted)		1.0 (Oral; fasted)		0.3 (Oral; fasted)		1.0 (Oral; fed)	
PK Parameters (n = 3, mean ± SD)	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
t_{max} (hours)	1.7 ±1.2	0.22 ±0.24	2.3 ±0.6	3.0 ±1.0	4.0 ±0.0	4.0 ±0.0	3.7 ±0.6	4.0 ±0.0	3.0 ±1.0	2.7 ±1.2	3.0 ±0.0	4.3 ±2.5
C_{max} (ng/mL)	247±35	269±6.4	57.2±20.9	62.9±16.2	160±48	98.6±57.0	359±243	345±38	123±44	78.3±42.4	316±57	274±85
AUC_{last} (ng·h/mL)	3193±423	3682±157	712±210	776±186	2071±393	1560±880	5392±3086	5356±808	1812±552	1418±563	8123±1250	7696±1887
AUC_{∞} (ng·h/mL)	3453±326	4057±167	759±235	822±210	2338±487	1756±970	6140±3522	5997±655	1877±535	1535±619	10132±2546	8455±2395
$MRT_{0-\infty}$ (hours)	18.3±2.4	19.5±0.9	17.0±1.2	16.9±3.8	22.7±1.7	22.7±0.9	23.0±6.1	23.1±3.5	17.6±0.7	19.9±0.4	30.5±10.2	23.1±2.2
$t_{1/2}$ (hours)	13.4±4.0	14.6±0.5	12.2±1.8	10.8±3.6	15.9±1.1	15.4±0.9	14.0±6.8	14.4±5.2	9.07±2.54	12.3±1.3	19.1±11.4	12.4±4.3
CL (L/h/kg)	0.09±0.008	0.07±0.003	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
V_z (L/kg)	1.72±0.64	1.56±0.07	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Additional Information: The study was a cross-over study with a 7-day wash-out between the two periods. Dogs received either a single oral dose of fruquintinib at 0.1, 0.3, or 1 mg/kg in fasted conditions or a single oral dose of 1 mg/kg in fed conditions (5 mg capsule including excipient mixture in a gelatin capsule), a single oral dose of 0.3 mg/kg (API only capsule, no additional ingredients) in fasted conditions, or a single IV dose of 0.3 mg/kg in fasted conditions.
The oral absolute bioavailability of fruquintinib in dogs was estimated to be 64.9%, 52.8%, and 46.9%, respectively, after a single oral dose of 0.1, 0.3, and 1.0 mg/kg fruquintinib 5-mg capsule. Following a single oral dose of 0.3 mg/kg (API), the mean values of C_{max}, t_{max}, and AUC_{last} were 101 ng/mL, 2.8 hours, and 1615 ng·h/mL, respectively. The mean C_{max} and AUC_{last} values of oral fruquintinib API capsule versus fruquintinib 5 mg capsule (as 100%) were 78.1% and 89.0%. There was no statistical difference between these 2 groups ($p>0.05$).

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

2.6.5.3G 単回静脈内及び単回経口投与後のフルキンチニブの吸収（ビーグル犬）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Administration of 1.0 mg/kg fruquintinib 5 mg capsule to fed dogs resulted in a 16% decrease in mean C_{max} and a 47% increase in mean AUC_{last} ($p>0.05$), compared to administration of the 5 mg capsule at 1.0 mg/kg under fasted conditions. t_{max} had no significant difference. No significant impact of food intake on the PK parameters of fruquintinib was observed based on the comparison of t_{max}, C_{max}, and AUC between fed and fasted conditions at a single oral dose level of 1 mg/kg ($p>0.05$). No marked gender difference was observed in the PK profiles of fruquintinib in dogs.

API: active pharmaceutical ingredient; AUC_{∞}: area under the concentration from 0 hours extrapolated to infinity; AUC_{last}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to the last measurable concentration; CL: clearance; C_{max}: maximum plasma concentration; F: female; HCl: hydrochloric acid; IV: intravenous; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M: male; $MRT_{0-\infty}$: mean residence time from time 0 extrapolated to infinity; NA: not applicable; PK: pharmacokinetic; $t_{1/2}$: apparent terminal elimination half-life; t_{max}: time to maximum plasma concentration; V_z: volume of distribution based on terminal elimination phase.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.3 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

2.6.5.3H 単回経口投与後のフルキンチニブ及び代謝物の吸収（イヌ）

被験物質：フルキンチニブ

Pharmacokinetic Study of Fruquintinib and its Metabolites M9, M11 Following a Single Oral Administration of Fruquintinib in Beagle Dogs					添付資料番号：4.2.2.2-6 Study Number: DMPKR20[redacted]0004-E-01	
Species/Strain:	Dog/Beagle					
Vehicle/Formulation:	1 mg/kg capsule					
Sample:	Plasma					
Analyte:	Fruquintinib, M9, and M11					
Assay:	LC-MS/MS					
Sex (M/F)/Number of Animals:	M/3, F/3; 3/sex/group/time point sampled, serial sampling					
Feeding Condition:	Fasted					
Method of Administration:	Oral capsule					
Dose (mg/kg) [a]:	1 mg/kg					
PK Parameters (n = 3, mean ± SD):						
Analyte	Fruquintinib		M9 (HM5024093)		M11 (HM5025423)	
	M	F	M	F	M	F
MRT (h)	42.9 ± 9.19	28.5 ± 5.82	NA	NA	NA	NA
$t_{1/2}$ (hours)	26.1 ± 5.76	17.7 ± 3.35	NA	NA	NA	NA
AUC_{last} (ng·h/mL)	4927 ± 3213	7311 ± 4000	200 ± 173	282 ± 233	224 ± 215	344 ± 392
AUC_{∞} (ng·h/mL)	5990 ± 3842	7904 ± 4464	NA	NA	NA	NA
C_{max} (ng/mL)	148 ± 144	337 ± 304	4.61 ± 4.15	9.25 ± 9.66	5.14 ± 4.69	7.50 ± 7.38
t_{max} (hours)	10.7 ± 11.5	10.7 ± 11.5	17.3 ± 26.6	10.7 ± 11.5	32.0 ± 27.7	40.0 ± 13.9
AUC_M/P ratio (%)	NA	NA	3.06 ± 2.72	3.52 ± 1.02	3.30 ± 2.92	3.65 ± 2.94
Additional Information: None						

AUC_M/P ratio: AUC_{last} of metabolite/AUC_{last} of parent drug in each animal × 100%; AUC_{∞}: area under the concentration from 0 hours extrapolated to infinity; AUC_{last}: area under the concentration versus time curve from time 0 to the last measurable concentration; C_{max}: maximum observed concentration; F: female; h: hour; LC-MS/MS: liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; M: male; ; M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; MRT: mean residence time; NA: not applicable; PK: pharmacokinetic; SD: standard deviation; $t_{1/2}$: terminal half-life; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収

2.6.5.4A 小核試験及びコメットアッセイにおけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Rat Micronucleus and Alkaline Comet Assay			添付資料番号：4.2.3.3.2-2 Study Number: 8456891
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley		Initial Age: 7-9 weeks	
Sex (M/F)/Number of Animals: 6 M per group for micronucleus/comet analysis; 3 M per group for TK (Day 1 following a single dose), 3/time point sampled, serial sampling		Treatment Schedule: Three administrations at 0 (Day 1), 24 (Day 2), and 44 (Day 3) hours (positive control 45 hours)	
Method of Administration: Oral gavage		Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na (w/w)	
Analytes: Fruquintinib, M11		Sample: Plasma	Assay: LC-MS/MS
Dose (mg/kg):	500	1000	2000
TK Parameters (Mean)	Fruquintinib [a]		
C_{max} (ng/mL)	10900	10900	10900
AUC_{24} (ng·h/mL)	161000	162000	169000
t_{max} (hours)	4	4	8
$t_{1/2}$ (hours)	7.51	8.34	NR
M11 (HM5025423) [b]			
C_{max} (ng/mL)	163	198	194
AUC_{24} (ng·h/mL)	2530	3060	3040
t_{max} (hours)	12	12	12
$t_{1/2}$ (hours)	NR	NR	NR
Additional Information: There were three administrations at 0 (Day 1), 24 (Day 2), and 44 (Day 3) hours of 500, 1000, or 2000 mg/kg/day via oral gavage. Blood samples were collected from all animals at approximately 1, 2, 4, 8, 12, and 24 hours post dose on Day 1 (after a single dose). Fruquintinib systemic exposure was confirmed at 500, 1000, or 2000 mg/kg, but exposure, as assessed by mean C_{max} and AUC_{24} values, did not increase with the increase in dose level from 500 to 2000 mg/kg/day. Exposure, as assessed by M11 mean C_{max} and AUC_{24} values, did not increase with the increase in fruquintinib dose level from 500 to 2000 mg/kg/day.			

AUC_{24}: area under the concentration-time curve from time zero (dosing time) to 24 hours; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; C_{max}: maximum observed concentration; F: female; LC-MS/MS: liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry ; M: male; M11: metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423); NR: not reported due to an inability to characterize the elimination phase; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[b] HM5025423 is metabolite M11 from the parent compound fruquintinib.

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4B 4 週間経口投与反復投与毒性試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Four-Week Oral Gavage Repeat-Dose Toxicity Study of Fruquintinib in SD Rats with a Four-week Recovery					添付資料番号：4.2.3.2-1			
					Study Number: [redacted]49RD1			
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley					Initial Age: 5-7 weeks			
Sex (M/F)/Number of Animals for Toxicokinetic Evaluation: M/3 and F/3 per group, 3/sex/time point sampled for TK, serial sampling					Duration of Dosing: Once daily for 4 weeks			
Method of Administration: Oral gavage					Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na (w/w)			
Analyte: Fruquintinib					Assay: LC-MS/MS			
Daily Dose (mg/kg) [a]	0		2		20		60	
Number of animals: Main Study/Recovery Period/TK Phase [b]	M:5/5/3	F:5/5/3	M: 5/5/3	F: 5/5/3	M: 5/5/3	F: 5/5/3	M: 5/5/3	F: 5/5/3
TK Parameters (Mean ± SD):	Day 1							
C_{max} (ng/mL)	ND [e]	ND [e]	1128 ± 231	1433 ± 121	4250 ± 137	5546 ± 1206	5322 ± 324	6571 ± 735
AUC_{24} (ng·h/mL)	ND [e]	ND [e]	9236 ± 774	13231 ± 1717	49567 ± 5895	70862 ± 15019	65093 ± 7506	86101 ± 8426
t_{max} (hours)	NA	NA	2 ± 0	3 ± 1	4 ± 0	4 ± 0	3 ± 1	5 ± 2
	Day 28							
C_{max} (ng/mL)	ND [e]	ND [e]	750 ± 35	873 ± 480 [c]	3370 ± 417	3232 ± 353	NA	3456 [d]
AUC_{24} (ng·h/mL)	ND [e]	ND [e]	6748 ± 916	6890 ± 3553 [c]	50281 ± 8499	38652 ± 9275	NA	60316 [d]
t_{max} (hours)	NA	NA	4 ± 0	2 ± 0 [c]	7 ± 2	4 ± 0	NA	4 [d]
	Day 28:Day 1 ratio							
C_{max} (ng/mL)	NA		0.65 ± 0.18		0.69 ± 0.14		0.53 [d]	
AUC_{24} (ng·h/mL)	NA		0.65 ± 0.23		0.80 ± 0.30		0.74 [d]	
Additional Information: Fruquintinib was administered by oral gavage, once daily for 28 consecutive days, followed by a 4-week recovery period. Samples were taken on Day 1 and 28 during the dose period, whereby blood was collected pre-dosing and 1, 2, 4, 8, and 24 hours post dosing. N = 2 for females at 2 mg/kg/day on Day 1 and at 60 mg/kg/day on Day 28. Most animals in the 60 mg/kg/day group were found dead by the date of necropsy. The TK data showed that the mean t_{max} of fruquintinib for both sexes ranged from 2 to 5 hours post dose on Day 1, and 2 to 7 hours on Day 28. No significant gender difference was observed with the AUC_{24} and C_{max} at each dose on Day 1 and Day 28. The increases in C_{max} and AUC_{24} of fruquintinib on Day 1 were less than dose proportional in the dose range of 2 to 60 mg/kg/day. No notable accumulation was observed after repeated dosing of fruquintinib to rats.								

AUC_{24}: area under the concentration versus time curve from time 0 to 24 hours; CMC-Na: Sodium carboxymethyl cellulose; C_{max}: maximum observed concentration; F: female; h: hour; LC-MS/MS: liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; M: male; NA: not applicable; ND: not detected; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[b] There were ten animals/sex/group in the main study, of which 5/sex/group were necropsied at the end of the 4-week dosing phase and the remaining animals were necropsied after the 4-week recovery period.

[c] One outlier was not included for the calculations of means.

[d] Means calculated based on two animals, following the death of one rat.

[e] Only trace amounts of fruquintinib were found in the vehicle control group.

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4C 13 週間反復強制経口投与及び 4 週間回復試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Thirteen-Week Oral Gavage Repeat-Dose Toxicity Study of Fruquintinib in SD Rats with a Four-Week Recovery							添付資料番号：4.2.3.2-2 Study Number: 8426159	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley				Initial Age: 7 to 8 weeks				
Sex (M/F)/Number of Animals for Toxicokinetic Evaluation: M/6 and F/6 per group, 3/sex/time point sampled, composite sampling (M/3 and F/3 in control group)				Duration of Dosing: Once daily for 13 weeks				
Method of Administration: Oral gavage				Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na				
Analytes: Fruquintinib, M11				Assay: HPLC-MS/MS				
Daily Dose (mg/kg) [a]:	0		0.3		0.6		1.2/2.4 [b]	
Number of animals: Main Study/Recovery Period/TK Phase [c]	M:10/5/3	F:10/5/3	M:10/5/6	F:10/5/6	M:10/5/6	F:10/5/6	M:10/5/6	F:10/5/6
TK Parameters (Mean):	Fruquintinib							
	Day 1							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	140	168	300	351	502	652
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	905	647	1170	2180	2790	3090
t_{max} (hours)	NC	NC	2	1	2	2	4	1
	Day 44							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	NA	NA	NA	NA	1840	2290
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	NA	NA	NA	NA	16100	16700
t_{max} (hours)	NC	NC	NA	NA	NA	NA	4	2
	Day 91							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	268	401	497	760	2230	2050
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	1530	1630	2150	4360	18200	13600
t_{max} (hours)	NC	NC	2	1	2	2	4	2
	M11 (HM5025423) d							
	Day 91							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	0.830	0.703	2.25	2.86	3.31	4.23
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	BQL	BQL	13	21	28	41
t_{max} (hours)	NC	NC	8	12	8	8	12	8

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4C 13 週間反復強制経口投与及び 4 週間回復試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（Sprague Dawley ラット）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Daily Dose (mg/kg)[a]:	0		0.3		0.6		1.2/2.4 [b]	
Number of animals: Main Study/Recovery Period/TK Phase [c]	M:10/5/3	F:10/5/3	M:10/5/6	F:10/5/6	M:10/5/6	F:10/5/6	M:10/5/6	F:10/5/6
TK Parameters (Mean):	Day 44							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	NC	NC	NC	NC	27.9	17.6
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	NC	NC	NC	NC	388	277
t_{max} (hours)	NC	NC	NC	NC	NC	NC	12	8
	Day 91							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	2.61	2.39	3.91	5.21	31.6	15.2
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	35	19	61	72	496	247
t_{max} (hours)	NC	NC	8	8	8	8	12	8

Additional Information: Fruquintinib was administered by oral gavage, once daily for 13 weeks, followed by a 4-week recovery period. In the control group, blood was collected predose and 2 hours post dose on Days 1, 44 and 91 of the dosing phases.
In the fruquintinib groups, blood was collected predose, 1, 2, 4, 8 12, and 24 hours post dose on Day 1 and Day 91, in addition to predose, 1, 2, 4, 8 12, and 24 hours post dose on Day 44 for the 1.2/2.4 mg/kg/day group only.
Exposure, as assessed by fruquintinib C_{max} and AUC_{24} values, increased with the increase in fruquintinib dose level from 0.3 to 1.2 mg/kg/day on Day 1 and from 0.3 to 2.4 mg/kg/day on Day 91. The increases in fruquintinib and M11 C_{max} and AUC_{24} values were generally dose proportional. Sex differences in fruquintinib C_{max} and AUC_{24} values were less than 2-fold, therefore no marked gender difference was observed.

AUC_{24}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to 24 hours; BQL: below level of quantification; C_{max}: maximum observed concentration; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; F: female; h: hour; HPLC-MS/MS: high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry; M: male; NA: not applicable; NC: not calculated; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[b] The high dose level was increased to 2.4 mg/kg/day from Day 44 of the dosing phases.

[c] There were 15 animals/sex/group in the main study, 10/sex/group were necropsied after the 13-week dosing period and the remaining animals were necropsied after the 4-week recovery period. TK evaluations were performed on additional animals, 3 animals/sex in the control group and 6 animals/sex in the treatment groups.

[d] HM5025423 is metabolite M11 from the parent compound fruquintinib.

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4D 26 週間反復強制経口投与及び 4 週間回復試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Twenty-Six-week Oral Gavage Repeat Dose Toxicity of Fruquintinib in SD Rats with a Four-week Recovery							添付資料番号：4.2.3.2-3			
							Study Number: [redacted]54RD1			
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley					Initial Age: 5 weeks					
Sex (M/F)/Number of Animals for Toxicokinetic Evaluation: M/3 and F/3 in vehicle group, M/6 and F/6 per group in fruquintinib groups, 3/sex/time point sampled, serial sampling					Duration of Dosing: Once daily for 26 weeks		Duration of Post dose: 4 weeks			
Method of Administration: Oral gavage					Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na (w/v) /Suspension					
Analyte: Fruquintinib					Assay: LC-MS/MS					
Daily Dose (mg/kg) [a]:	0		0.5/0.25 (Low)		1.5/0.75 (Middle)		5/3/1.5 (Sub-high)		10/6 (High)	
Number of Animals: Interim Analysis (Week 13)/End of Dosing (Week 26)/Recovery/TK Phase [b]	M:5/5/5/3	F:5/5/5/3	M:5/5/5/6	F:5/5/5/6	M:5/5/5/6	F:5/5/5/6	M:5/5/5/6	F:5/5/5/6	M:5/5/5/6	F:5/5/5/6
TK Parameters (Mean)	Day 1									
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	352	369	938	1120	2780	3670	4013	4507
AUC_{24} (ng·h/mL)	NA	NA	3098	3409	9080	11062	28181	36027	43901	52848
t_{max} (hours)	NA	NA	2	4	4	2	4	4	4	4
	Day 91									
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	202	271	785	830	1383	1517	NA [c]	NA [c]
AUC_{24} (ng·h/mL)	NA	NA	2099	2439	7441	6031	13151	13146	NA [c]	NA [c]
t_{max} (hours)	NA	NA	4	2	4	2	4	4	NA [c]	NA [c]
	Day 182									
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	348	307	554	709	853	926	NA [c]	NA [c]
AUC_{24} (ng·h/mL)	NA	NA	4445	2907	5892	5964	9313	10304	NA [c]	NA [c]
t_{max} (hours)	NA	NA	8	2	2	2	4	2	NA [c]	NA [c]

Additional information: Fruquintinib was administered by oral gavage, once daily for 26 weeks, followed by a 4-week recovery period before scheduled necropsy. Dose groups received 0 (0.5% CMC-Na in deionized water), 0.5/0.25 (decreased from Day 50), 1.5/0.75 (decreased from Day 50), 5/3/1.5 (decreased from Day 29/Day 50, respectively), or 10/6 mg/kg/day (decreased from Day 29). Samples were taken on Days 1, 91, and 182 during the dose period, whereby blood was collected before dosing and 4 hours after dosing for the control group, and for the fruquintinib groups before dosing and 1, 2, 4, 8, and 24 hours after dosing.

No accumulation was observed in rats after oral administration of fruquintinib for 182 days. On Day 1, both AUC_{24} and C_{max} increased dose- proportionally within the dose range of 0.5 to 5 mg/kg/day but less than dose-proportionally when the dose increased further to 10 mg/kg. On Day 91, dose-proportionality was also observed with AUC_{24} and C_{max} within the dose range of 0.25 to 1.5 mg/kg. However, on Day 182, AUC_{24} and C_{max} increased less than dose-proportionally throughout the entire dose range.

Sex differences in exposure levels were less than 2-fold indicating no gender difference was observed.

AUC_{24}: area under the concentration versus time curve from time 0 to 24 hours; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; C_{max}: maximum observed concentration; F: female; h: hour; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M: male; NA: not applicable; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[b] There were 15 animals/sex/group in the main study, 5/sex/group were necropsied after 13 weeks of dosing, 5 sex/group after 26 weeks of dosing, and the remaining animals were necropsied after the 4-week recovery period. TK evaluations were performed on additional animals, 3 animals/sex in the control group and 6 animals/sex in the treatment groups.

[c] All animals died on or before Day 68, therefore data not available.

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4E 胚・胎児発生試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Oral Gavage Embryo-Fetal Developmental Study, Including Toxicokinetics, with Fruquintinib in Rats			添付資料番号：4.2.3.5.2-3 Study Number: 8449387	
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley			Initial Age: 11-12 weeks at dosing	
Sex (F)/Number of Animals for Toxicokinetic Evaluation: F6 per group (F/3 control), 3/time point sampled, on GD 6 and GD 17 serial sampling			Duration of Dosing: GD 6 to GD 17 (12 days)	
Method of Administration: Oral gavage			Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na (w/w)	
Analytes: Fruquintinib, M11			Assay: LC-MS/MS	
Females Daily Dose (mg/kg) [a]	0	0.025	0.1	0.25
Total Number of Animals (Main Study/TK Study)	25 (22/3)	28 (22/6)	28 (22/6)	28 (22/6)
TK Parameters (Mean):	Fruquintinib			
	GD 6 (Day 1 of dosing)			
AUC_{24} (mean, ng·h/mL)	NC	107	234	1070
C_{max} (mean, ng/mL)	NC	15.8	48.0	145
t_{max}	NC	2	1	2
GD 17 (Day 12 of dosing)				
AUC_{24} (mean, ng·h/mL)	NC	114	310	1260
C_{max} (mean, ng/mL)	NC	18.7	78.4	187
t_{max} (h)	NC	2	1	2
M11 (HM5025423) [b]				
GD 6				
AUC_{24} (mean, ng·h/mL)	NC	BLQ	BLQ	NC [c]
C_{max} (mean, ng/mL)	NC	BLQ	BLQ	0.94
t_{max}	NC	BLQ	BLQ	8
GD 17				
AUC_{24} (mean, ng·h/mL)	NC	BLQ	BLQ	NC [c]
C_{max} (mean, ng/mL)	NC	BLQ	BLQ	0.88
t_{max} (h)	NC	BLQ	BLQ	8
Additional Information: Test item was administered by oral gavage, once daily from GD 6 to GD 17. Animals in the control group were sampled at 2 hours post dose, with all other groups being sampled predose and 1, 2, 4, 8, 12, and 24 hours post dose. Exposure, as assessed by fruquintinib C_{max} and AUC_{24} values, increased with the increase in fruquintinib dose				

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4E 胚・胎児発生試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（Sprague Dawley ラット）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

level from 0.025 to 0.25 mg/kg/day on GD 6 and GD 17. The increases in fruquintinib C_{max} and AUC_{24} values were generally dose proportional. Most of the concentration values of M11 were below the limit of quantification (BLQ); therefore, only C_{max} was calculated for the 0.25 mg/kg/day group. No accumulation of fruquintinib was observed after multiple doses in pregnant rats. The AR value for C_{max} in the 0.25 mg/kg/day group was 0.940. The metabolite to parent ratios for C_{max} in the 0.25 mg/kg/day group was 0.00647 on GD 6 and 0.00472 on GD 17.

AR: accumulation ration; AUC_{24}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to 24 hours; BLQ: below level of quantification; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; C_{max}: maximum observed concentration; F: female; h: hour; GD: gestation day; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M: male; NC: not calculated; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[b] HM5025423 is metabolite M11 from the parent compound fruquintinib.

[c] For group 3 (dose of 0.25 mg/kg), the values for AUC are not reported for profiles with fewer than three quantifiable concentrations.

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4F 4 週間反復投与経口投与及び 4 週間回復試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（ビーグル犬）

被験物質：フルキンチニブ

4-Week Oral Toxicity Study of Fruquintinib in Beagle Dogs Followed by a 4-Week Recovery					添付資料番号：4.2.3.2-4	
					Study Number: [redacted]49RD2	
Species/Strain: Dog/Beagle			Initial Age: 5 months			
Sex (M/F)/Number of Animals for Toxicokinetic Evaluation: M/3 and F/3 per group, 3/sex/time point sampled, serial sampling			Duration of Dosing: Once daily for 4 weeks		Duration of Post dose: 4 weeks	
Method of Administration: Oral capsule			Vehicle/Formulation: Empty capsule (containing microcrystalline cellulose (99.7%) with dolomol (0.3%)])			
Analyte: Fruquintinib			Assay: LC-MS/MS			
Daily Dose (mg/kg) [a]:	0.03		0.1		0.3	
Number of Animals: Main Study/Recovery Period	M:2/1	F:2/1	M:2/1	F:2/1	M:2/1	F:2/1
TK parameters (Mean ± SD)	Day 1					
C_{max} (ng/mL)	6.30 ± 0.92	9.04 ± 2.76	17.2 ± 7.5	14.5 ± 1.7	77.4 ± 9.7	77.9 ± 12.3
AUC_{24} (ng·h/mL)	107 ± 4	120 ± 20	284 ± 91	251 ± 66	1348 ± 115	1450 ± 308
t_{max} (h)	5 ± 3	2 ± 2	2 ± 2	1 ± 0	6. ± 4	3 ± 1
	Day 28					
C_{max} (ng/mL)	29.5 ± 22.4	29.2 ± 4.7	47.0 ± 14.6	49.2 ± 29.0	NA [b]	NA [b]
AUC_{24} (ng·h/mL)	318 ± 145	320 ± 36	621 ± 177	614 ± 199	NA [b]	NA [b]
t_{max} (h)	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	2 ± 1	NA [b]	NA [b]
	Day 28:Day 1 ratio					
C_{max} (ng/mL)	4.02 ± 2.12		3.11 ± 1.24		NA [b]	
AUC_{24} (ng·h/mL)	2.86 ± 0.98		2.37 ± 0.69		NA [b]	
Additional Information: All animals (except for the control animals). Time points: Blood samples were collected on Days 1 and 28, from all animals predose, and 1, 2, 4, 8 and 24 hours after dosing. An additional sample was taken 48 hours post-dose (Day 28 only) from dogs designated as recovery animals (0.1 and 0.3 mg/kg groups only). The exposure of fruquintinib in Beagle dogs had no obvious gender differences ($p>0.05$). The increases in C_{max} and AUC_{24} were dose proportional in the dose range of 0.03 to 0.3 mg/kg/day. At 0.03 and 0.1 mg/kg/day, the AUC_{24} values on Day 28 were 2.86-fold and 2.37-fold higher than those on Day 1, respectively, demonstrating notable accumulation.						

AUC_{24}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to 24 hours; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; C_{max}: maximum observed concentration; F: female; h: hour; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M: male; NA: not applicable; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[b] Most animals at 0.3/mg/kg/day died by Day 28, therefore the data is not available.

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4G 13 週間反復投与経口投与及び 4 週間回復試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（ビーグル犬）

被験物質：フルキンチニブ

Thirteen-week Oral Toxicity and Toxicokinetic Study of Fruquintinib in Beagle Dogs Followed by a Four-Week Recovery						添付資料番号：4.2.3.2-5		
						Study Number: 8449374		
Species/Strain: Dog/Beagle			Initial Age: 7.5 to 8.7 months					
Sex (M/F)/Number of Animals for Toxicokinetic Evaluation: M/5 and F/5 per group, 5/sex/time point sampled, serial sampling			Duration of Dosing: Once daily for 13 weeks		Duration of Post dose: 4 weeks			
Method of Administration: Oral (capsule)			Vehicle/Formulation: Empty capsule (placebo, containing powder blend only, same number of capsules as the 0.12 mg/kg/day dose group)					
Analytes: Fruquintinib, M11			Assay: LC-MS/MS					
Daily Dose (mg/kg) [a]	0		0.03		0.06		0.12	
Number of Animals: Main Study/ Recovery Period	M:3/2	F:3/2	M:3/2	F:3/2	M:3/2	F:3/2	M:3/2	F:3/2
TK Parameters (Mean ± SD)	Fruquintinib							
	Day 1							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	13.0 ± 1.45	17.4 ± 6.35	23.6 ± 1.85	28.9 ± 3.47	69.1 ± 12.2	73.2 ± 25.2
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	209 ± 30	199 ± 29	390 ± 56	417 ± 67	992 ± 206	872 ± 249
t_{max} (h) [b]	NC	NC	8	2	8	2	1	2
	Day 91							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	18.0 ± 4.09	17.1 ± 4.54	35.5 ± 4.32	41.5 ± 14.5	129 ± 21.7	80.4 ± 19.5
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	312 ± 29	284 ± 73	594 ± 89	802 ± 304	1820 ± 803	1140 ± 289
t_{max} (h) [b]	NC	NC	4	2	4	2	2	2
	M11 (HM5025423) [c]							
	Day 1							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	0.348 ± 0.091	0.470 ± 0.223	0.587 ± 0.172	1.06 ± 0.266	1.32 ± 0.300	1.88 ± 0.596
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	6 ± 1	6 ± 3	10 ± 22	13 ± 4	21 ± 4	25 ± 8
t_{max} (h) [b]	NC	NC	12	24	12	24	24	24
	Day 91							
C_{max} (ng/mL)	BQL	BQL	1.16 ± 0.172	1.06 ± 0.504	2.04 ± 0.679	2.31 ± 0.208	5.20 ± 1.76	4.71 ± 1.38
AUC_{24} (ng·h/mL)	BQL	BQL	19 ± 2	18 ± 8	33 ± 8	44 ± 6	98 ± 45	77 ± 23
t_{max} (h) [b]	NC	NC	24	12	0	24	4	12

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4G 13 週間反復投与経口投与及び 4 週間回復試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（ビーグル犬）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Additional Information: Doses were administered once daily via oral capsules for 13 weeks. Blood samples were collected from all animals on Day 1 and Day 91 at predose and at approximately 1, 2, 4, 8, 12, and 24 hours post dose.
In general, no sex differences in fruquintinib and M11 were observed with ratios of mean C_{max} and AUC_{24} values between males and females of less than 2-fold. The median t_{max} of both sexes ranged from 1.0 to 2.0 hours on Day 1 and from 2.0 to 3.0 hours on Day 91 for fruquintinib, and 24 hours on Day 1 and from 4.0 to 18.0 hours on Day 91 for M11. The increases in C_{max} and AUC_{24} of fruquintinib and M11 were generally dose proportional. No notable accumulation of fruquintinib was observed after repeated dosing of fruquintinib to dogs. Accumulation of M11 was observed, with mean AR values ranging from 2.90 to 3.44 for C_{max} and from 3.12 to 4.20 for AUC_{24}.

AUC_{24}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to 24 hours; BQL: below quantification limit; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; C_{max}: maximum observed concentration; F: female; h: hour; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M: male; NC: not calculated; SD: standard deviation; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[b] Median values are presented for t_{max}.

[c] HM5025423 is metabolite M11 from the parent compound fruquintinib.

2.6.5.4 薬物動態試験：反復投与後の吸収（続き）

2.6.5.4H 39 週間反復強制経口投与及び 4 週間回復試験におけるフルキンチニブのトキシコキネティクス（ビーグル犬）

被験物質：フルキンチニブ

A 39-Week Oral Gavage Toxicity Study of Fruquintinib (Formulation) with a 4-Week Recovery Period in Beagle Dogs									添付資料番号：4.2.3.2-6 Study Number: [redacted]54RD2	
Species/Strain: Dog/Beagle					Initial Age: 5-6 months (on arrival)					
Sex (M/F)/Number of Animals for Toxicokinetic Evaluation: M/5 and F/5 per group, 5/sex/time point sampled, serial sampling					Duration of Dosing: Once daily for 39 weeks			Duration of Post dose: 4 weeks		
Method of Administration: Oral capsules					Vehicle/Formulation: Empty capsule (with control article; starch 50%, microcrystalline cellulose 49% and talc powder 1%)					
Analyte: Fruquintinib					Assay: LC-MS/MS					
Daily Dose (mg/kg) [a]:	0		0.01		0.03		0.1/0.06[b]		0.2/0.12[b]	
Number of Animals: Interim Analysis (Week 13)/End of Dosing (Week 39)/Recovery [c]	M:2/2/1	F:2/2/1	M:2/2/1	F:2/2/1	M:2/2/1	F:2/2/1	M:2/2/1	F:2/2/1	M:2/2/1	F:2/2/1
TK Parameters (Mean ± SD)	Day 1									
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	6.82 ± 0.77	6.53 ± 1.59	18.9 ± 6.73	18.7 ± 1.82	41.7 ± 9.87	39.7 ± 12.3	78.6 ± 34.2	54.9 ± 17.7
AUC_{24} (ng·h/mL)	NA	NA	68 ± 6	63 ± 8	194 ± 28	192 ±15	525 ± 110	500 ± 79	1155 ± 478	815 ± 207
t_{max} (h)	NA	NA	2 ± 0	2 ± 0	6 ± 10	1 ± 1	1 ± 0	1 ± 0	11 ± 12	1 ± 0
Day 91										
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	9.78 ± 1.75	10.6 ± 1.6	28.0 ± 2.65	26.5 ± 4.74	61.8 ± 10.5	44.3 ± 6.51	76.2 ± 23.8	79.9 ± 30.9
AUC_{24} (ng·h/mL)	NA	NA	98 ± 17	109 ± 17	331 ± 50	281 ± 24	706 ± 204	678 ± 39	1012 ± 375	1257 ± 603
t_{max} (h)	NA	NA	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 0	1 ± 1	2 ± 1
Day 273										
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	31.7 ± 22.6	24.3 ± 11.3	31.4 ± 2.65	31.6 ± 8.42	214 ± 159	49.1 ± 10.6	126 ± 56.1	142[b]
AUC_{24} (ng·h/mL)	NA	NA	199 ± 73	122 ± 32	311 ± 66	375 ± 12	1313 ± 204	624 ± 165	1904 ± 989	1373[b]
t_{max} (hours)	NA	NA	9 ± 13	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	2 ± 0	1[b]
Additional Information All surviving animals sampled. Time points: Control before dosing and 4 hours after dosing. Fruquintinib treated groups before dosing and 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 hours after dosing. There were no gender differences in C_{max} and AUC_{24} when dosed with fruquintinib for 273 days. After 91 days, no significant accumulation was observed. On Day 1 and Day 91 a good linear relationship between the exposure, C_{max}, AUC_{24}, and the dose was observed in the 0.01, 0.03, 0.1/0.06, 0.2/0.12 mg/kg groups. On Day 273 increases in C_{max} were less than dose proportional in these groups, whilst a good linear relationship between AUC_{24} and dose was observed. The results show the possibility of slight drug accumulation when Beagle dogs are dosed with oral fruquintinib once daily for 273 consecutive days.										

AUC_{24}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to 24 hours; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; C_{max}: maximum observed concentration; F: female; h: hour; M: male; NA: not applicable; SD: standard deviation; TK: toxicokinetics; t_{max}: time to reach maximum observed concentration.

[a] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[b] Data taken from only one dog, as a result of 2 unscheduled deaths.

[c] 4M/4F in main study with 2M/2F necropsied at week 13, 2M/2F necropsied at week 39 and 1M/1F necropsied after recovery.

2.6.5.5 薬物動態試験：分布

2.6.5.5A [^{14}C]フルキンチニブを経口投与後の白色ラット及び有色ラットにおける放射能の組織分布（Sprague Dawley ラット及び Long-Evans ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Tissue Distribution of [^{14}C] Fruquintinib-Derived Radioactivity Following a Single Oral Dose of [^{14}C] Fruquintinib in Rats Using Quantitative Whole-Body Autoradiography	添付資料番号：4.2.2.3-5 Study Number: RPT03316
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley and Long-Evans	
Sex (M/F)/Number of Animals: M/5 and F/5 Sprague Dawley rats, M/10 Long-Evans rats	
Feeding Condition: Fasted	
Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na/Suspension	
Method of Administration: Oral gavage, single dose	
Dose: 2 mg/kg (100 μCi/kg) [c]	
Radionuclide: ^{14}C	
Specific Activity: 50 μCi/mg	
Sampling Time: 0.5, 4, 24, and 168 hours post dose, 1M and 1F Sprague Dawley rat per time point; 0.25, 2, 4, 8, 24, 48, 168, and 504 hours post dose for 1M Long-Evans rat per time point	

Group:	M, Sprague Dawley								F, Sprague Dawley							
Tissue/ Organ	Concentration (ng Eq/g) at time post dose				C_{max} (ng Eq/g)	t_{max} (hours)	AUC_{last} (ng Eq·h/g)	Tissue: Plasma [a]	Concentration (ng Eq/g) at time (hour) post dose				C_{max} (ng Eq/g)	t_{max} (hours)	AUC_{last} (ng Eq/g)	Tissue: Plasma [a]
	30 mins	4 hours	24 hours	168 hours					30 mins	4 hours	24 hours	168 hours				
Plasma	1163	764	32.5	BQL1 [d]	1163	0.50	11627	1.00	1391	1641	6.35	BQL1[d]	1641	4.00	22130	1.00
Blood	554	359	16.8	BQL1 [d]	554	0.50	5493	0.47	720	808	BQL1 [d]	BQL1 [d]	808	4.00	2853	0.13
Aorta	1054	500	33.7	BQL2 [e]	1045	0.50	8296	0.71	1384	1216	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1384	0.50	4895	0.22
Brain (whole)	159	70.0	BQL2 [e]	BQL2 [e]	159	0.50	441	0.04	232	205	BQL2 [e]	BQL2 [e]	232	0.50	822	0.04
Eye	58.1	73.4	12.3	BQL2 [e]	73.4	4.00	1101	0.09	84	124	BQL2 [e]	BQL2 [e]	124	4.00	386	0.02
Lens	17.0	68.7	10.4	BQL2 [e]	68.7	4.00	945	0.08	16.1	82.2	15.5	BQL2 [e]	82.2	4.00	1153	0.05
Uveal tract	171	98.3	15.4	BQL2 [e]	171	0.50	1652	0.14	455	448	BQL2 [e]	BQL2 [e]	455	0.50	1694	0.08
Non-pigmented skin	330	250	12.2	BQL2 [e]	330	0.50	3724	0.32	455	742	BQL2 [e]	BQL2 [e]	742	4.00	2208	0.10
Adrenal cortex	637	514	15.1	BQL2 [e]	637	0.50	7464	0.64	1170	1198	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1198	4.00	4435	0.20
Adrenal glands	630	511	15.1	BQL2 [e]	630	0.50	7414	0.64	1146	1166	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1166	4.00	4332	0.20
Adrenal medulla	615	522	14.9	BQL2 [e]	615	0.50	7515	0.65	1152	1085	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1152	0.50	4201	0.19
Pituitary gland	614	316	10.2	BQL2 [e]	614	0.50	5041	0.43	737	785	BQL2 [e]	BQL2 [e]	785	4.00	2847	0.13

2.6.5.5 薬物動態試験：分布（続き）

2.6.5.5A [^{14}C]フルキンチニブを経口投与後の白色ラット及び有色ラットにおける放射能の組織分布（Sprague Dawley ラット及び Long-Evans ラット）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Group:	M, Sprague Dawley								F, Sprague Dawley							
Tissue/ Organ	Concentration (ng Eq/g) at time post dose				C_{max} (ng Eq/g)	t_{max} (hours)	AUC_{last} (ng Eq·h/g)	Tissue: Plasma [a]	Concentration (ng Eq/g) at time (hour) post dose				C_{max} (ng Eq/g)	t_{max} (hours)	AUC_{last} (ng Eq/g)	Tissue: Plasma [a]
	30 mins	4 hours	24 hours	168 hours					30 mins	4 hours	24 hours	168 hours				
Thyroid gland	438	358	17.3	BQL2 [e]	438	0.50	5262	0.45	785	887	BQL2 [e]	BQL2 [e]	887	4.00	3122	0.14
Brown fat	776	394	11.0	BQL2 [e]	776	0.50	6287	0.54	703	902	BQL2 [e]	BQL2 [e]	902	4.00	2985	0.13
White fat (inguinal)	616	364	BQL2 [e]	BQL2 [e]	616	0.50	1869	0.16	709	942	BQL2 [e]	BQL2 [e]	942	4.00	3068	0.14
Esophagus wall	768	374	20.9	BQL2 [e]	768	0.50	6138	0.53	702	771	BQL2 [e]	BQL2 [e]	771	4.00	2752	0.12
Large intestinal wall [b]	441	4823	98.8	BQL2 [e]	4823	4.00	58537	5.03	460	1260	21.5	BQL2 [e]	1260	4.00	15936	0.72
Small intestinal wall [b]	20475	1465	54.7	BQL2 [e]	20475	0.50	58711	5.05	10244	1679	11.7	BQL2 [e]	10244	0.50	40339	1.82
Gastric wall [b] (glandular region)	589	553	11.5	BQL2 [e]	589	0.50	7793	0.67	2821	1254	BQL2 [e]	BQL2 [e]	2821	0.50	7837	0.35
Gastric wall [b] (non- glandular region)	368	313	55.7	BQL2 [e]	368	0.50	4975	0.43	1111	1051	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1111	0.50	4062	0.18
Large intestine contents	245	224978	423	13.7	NA	NA	NA	NA	425	7198	613	BQL2 [e]	NA	NA	NA	NA
Small intestine contents	231014	12272	294	23.0	NA	NA	NA	NA	96594	12439	83	BQL2 [e]	NA	NA	NA	NA
Gastric contents	15508	1583	43.7	BQL2 [e]	NA	NA	NA	NA	41862	4023	BQL2 [e]	BQL2 [e]	NA	NA	NA	NA
Lymph nodes (cervical)	259	136	BQL2 [e]	BQL2 [e]	259	0.50	755	0.06	615	407	BQL2 [e]	BQL2 [e]	615	0.50	1943	0.09
Spleen	348	227	13.4	BQL2 [e]	348	0.50	3493	0.30	501	535	11.6	BQL2 [e]	535	4.00	7404	0.33
Thymus	240	1.92	BQL2 [e]	BQL2 [e]	240	0.50	815	0.07	392	463	BQL2[e]	BQL2 [e]	463	4.00	1595	0.07
Kidney	828	940	123	BQL2 [e]	940	4.00	13928	1.20	952	1339	57.0	BQL2 [e]	1339	4.00	18213	0.82

2.6.5.5 薬物動態試験：分布（続き）

2.6.5.5A [^{14}C]フルキンチニブを経口投与後の白色ラット及び有色ラットにおける放射能の組織分布（Sprague Dawley ラット及び Long-Evans ラット）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Group:	M, Sprague Dawley								F, Sprague Dawley							
Tissue/ Organ	Concentration (ng Eq/g) at time post dose				C_{max} (ng Eq/g)	t_{max} (hours)	AUC_{last} (ng Eq·h/g)	Tissue: Plasma [a]	Concentration (ng Eq/g) at time (hour) post dose				C_{max} (ng Eq/g)	t_{max} (hours)	AUC_{last} (ng Eq/g)	Tissue: Plasma [a]
	30 mins	4 hours	24 hours	168 hours					30 mins	4 hours	24 hours	168 hours				
Renal cortex	855	791	129	BQL2 [e]	855	0.50	12295	1.06	1029	1427	61.0	BQL2 [e]	1427	4.00	19439	0.88
Renal medulla	777	1166	114	BQL2 [e]	1166	4.00	16386	1.41	792	1197	49.8	BQL2 [e]	1197	4.00	16152	0.73
Liver	3349	2398	421	26.9	3349	0.50	71344	6.14	2847	2648	407	29.0	2847	0.50	72233	3.26
Urinary bladder wall [b]	512	2586	43.0	42.7	2586	4.00	38007	3.27	723	839	111	BQL2 [e]	839	4.00	12419	0.56
Heart	485	353	BQL2[e]	BQL2 [e]	485	0.50	1587	0.14	800	1116	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1116	4.00	3554	0.16
Muscle (femoral)	299	180	BQL2[e]	BQL2 [e]	299	0.50	913	0.08	408	450	BQL2 [e]	BQL2 [e]	450	4.00	1604	0.07
Prostate / Ovary	275	749	15.6	BQL2 [e]	749	4.00	9512	0.82	659	847	BQL2 [e]	BQL2 [e]	847	4.00	2801	0.13
Testes / Uterus	167	126	BQL2 [e]	BQL2 [e]	167	0.50	554	0.05	648	926	BQL2 [e]	BQL2 [e]	926	4.00	2916	0.13
Lungs	715	475	20.8	BQL2 [e]	715	0.50	7219	0.62	986	931	BQL2 [e]	BQL2 [e]	986	0.50	3602	0.16
Trachea	373	398	10.6	BQL2 [e]	398	4.00	5526	0.48	567	858	BQL2 [e]	BQL2 [e]	858	4.00	2634	0.12
Ex- orbital lacrimal gland	525	359	BQL2[e]	BQL2 [e]	525	0.50	1679	0.14	712	749	BQL2 [e]	BQL2 [e]	749	4.00	2735	0.12
Harderian gland	583	405	20.4	BQL2 [e]	583	0.50	6129	0.53	720	1090	37.2	10.4	1090	4.00	18046	0.82
Intra- orbital lacrimal gland	573	514	26.7	BQL2 [e]	573	0.50	7451	0.64	730	1109	28.3	BQL2 [e]	1109	4.00	14770	0.67
Pancreas	573	339	BQL2[e]	BQL2 [e]	573	0.50	1740	0.15	777	765	BQL2 [e]	BQL2 [e]	777	0.50	2893	0.13
Salivary gland	518	344	15.9	BQL2 [e]	518	0.50	5232	0.45	724	808	BQL2 [e]	BQL2 [e]	808	4.00	2862	0.13
Bone (femur)	163	59.9	BQL2 [e]	BQL2 [e]	163	0.50	431	0.04	204	207	BQL2 [e]	BQL2 [e]	207	4.00	770	0.03
Bone marrow (femur)	370	219	12.0	BQL2 [e]	370	0.50	3434	0.30	508	612	BQL2 [e]	BQL2 [e]	612	4.00	2087	0.09

2.6.5.5 薬物動態試験：分布（続き）

2.6.5.5A [^{14}C]フルキンチニブを経口投与後の白色ラット及び有色ラットにおける放射能の組織分布（Sprague Dawley ラット及び Long-Evans ラット）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Group:	M, Long-Evans rats										
Tissues/ Organs	Concentration (ng Eq/g) at time (hours) post dose								C_{max} (ng Eq/g)	t_{max} (hours)	AUC_{last} (ng Eq/g)
	0.25 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	168 h	504 h			
Plasma	340	1340	924	528	6.62	3.64	BQL1 [d]	BQL1 [d]	1340	2.00	11085
Blood	174	655	436	228	BQL1 [d]	BQL1 [d]	BQL1 [d]	BQL1 [d]	655	2.00	3164
Aorta	195	1162	1051	403	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1162	2.00	6334
Brain (whole)	53.0	240	148	57.4	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	240	2.00	1063
Eye	88. 3	1637	1863	1465	339	251	62.4	13. 6	1863	4.00	64790
Lens	BQL2 [e]	193	266	354	36.1	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	354	8.00	5015
Uveal tract	229	4037	5058	2286	330	539	264	99.7	5058	4.00	168136
Non- pigmented skin	90.3	491	344	218	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	491	2.00	2479
Pigmented skin	90.4	586	888	346	199	210	BQL2 [e]	BQL2 [e]	888	4.00	13806
Adrenal cortex	367	1383	799	366	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1383	2.00	6088
Adrenal glands	340	1302	797	363	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1302	2.00	5898
Adrenal medulla	271	1157	858	376	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1157	2.00	5766
Pituitary gland	152	691	499	220	28.6	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	691	2.00	5371
Thyroid gland	202	801	529	258	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	801	2.00	3807
Brown fat	183	973	672	254	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	973	2.00	4531
White fat (inguinal)	103	821	1198	170	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1198	4.00	5574
Esophagus wall	12902	1010	1479	206	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	12902	0.25	19645
Large intestinal wall [b]	148	4953	7177	11616	26.3	117	BQL2	BQL2 [e]	11616	8.00	149055
Small intestinal wall [b]	142	8422	9417	1390	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	9417	4.00	46964
Gastric wall [b] (glandular region)	7421	3975	795	299	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	7421	0.25	17857
Gastric wall [b] (non-glandular region)	3336	525	814	262	101	344	BQL2 [e]	BQL2 [e]	3336	0.25	15530
Large intestine contents	136	101536	37670	16462	366	98.9	14.0	BQL2 [e]	NA	NA	NA
Small intestine contents	234	76210	153497	16487	40.7	15.3	BQL2[e]	BQL2[e]	NA	NA	NA

2.6.5.5 薬物動態試験：分布（続き）

2.6.5.5A [^{14}C]フルキンチニブを経口投与後の白色ラット及び有色ラットにおける放射能の組織分布（Sprague Dawley ラット及び Long-Evans ラット）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Group:	M, Long-Evans rats										
Tissues/ Organs	Concentration (ng Eq/g) at time (hours) post dose								C_{max} (ng Eq/g)	t_{max} (hours)	AUC_{last} (ng Eq/g)
	0.25 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	168 h	504 h			
Gastric contents	105355	17780	8961	606	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	NA	NA	NA
Lymph nodes (cervical)	63.1	609	263	177	10.8	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	609	2.00	3851
Spleen	108	482	314	158	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	482	2.00	2269
Thymus	83.7	418	273	135	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	418	2.00	1956
Kidney	260	1166	850	517	49.5	37.1	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1166	2.00	11600
Renal cortex	267	1195	844	540	53.2	49.9	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1195	2.00	12099
Renal medulla	250	1079	871	482	40.0	19.5	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1079	2.00	10742
Liver	1510	3321	2495	1425	489	392	35. 9	BQL2 [e]	3321	2.00	69621
Urinary bladder wall [b]	2251	5443	6592	2693	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	6592	4.00	37617
Heart	194	701	490	239	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	701	2.00	3455
Muscle (femoral)	84.5	428	254	141	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	428	2.00	1934
Prostate / Ovary	106	910	635	388	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	910	2.00	4493
Testes / Uterus	45.7	311	192	80.3	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	311	2.00	1364
Lungs	232	824	588	330	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	824	2.00	4200
Trachea	139	514	226	267	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	514	2.00	2314
Ex- orbital lacrimal gland	141	730	490	223	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	730	2.00	3426
Harderian gland	133	164	635	1306	43.5	19.5	BQL2 [e]	BQL2 [e]	1306	8.00	16513
Intra- orbital lacrimal gland	191	1124	672	319	43.3	37.6	BQL2	BQL2 [e]	1124	2.00	8818
Pancreas	160	736	491	243	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	736	2.00	3499
Salivary gland	173	817	572	257	12.0	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	817	2.00	6091
Bone (femur)	38.8	382	146	83.6	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	382	2.00	1360
Bone marrow (femur)	107	407	317	159	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	BQL2 [e]	407	2.00	2138

2.6.5.5 薬物動態試験：分布（続き）

2.6.5.5A [^{14}C]フルキンチニブを経口投与後の白色ラット及び有色ラットにおける放射能の組織分布（Sprague Dawley ラット及び Long-Evans ラット）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Blood samples were in duplicate. The concentration of fruquintinib and radioactivity in the formulation was 0.2 mg/mL and 12.1 µCi/mL (+21.00% target of 10 µCi/mL), respectively. The specific activity of fruquintinib was 60.4 µCi/mg (+20.80% target of 50 µCi/mg).
AUC_∞ in the liver of male Sprague Dawley rats was 72449 ng Eq. h/g and R^2 was 0.9224. AUC_∞ in the liver of female Sprague Dawley rats was 73436 ng Eq. h/g and R^2 was 0.9047.
AUC_∞ and R^2 in the male Long-Evans rats could be calculated for the following organs:
· Eye: 67058 ng Eq. h/g and 0.943, respectively.
· Uveal tract: 196411 ng Eq. h/g and 0.9685, respectively.
· Pituitary gland: 5578 ng Eq. h/g and 0.9915, respectively.
· Gastric wall (glandular):18595 ng Eq. h/g and 0.8951, respectively.
· Lymph node (cervical): 3917 ng Eq. h/g and 0.9941, respectively.
· Renal medulla: 10998 ng Eq. h/g and 0.8310, respectively.
· Liver: 71537 ng Eq. h/g and 0.9936, respectively.
· Salivary glands: 6153 ng Eq. h/g and 1.0000, respectively.
The total radioactivity in tissues, regardless of strain and sex, was mainly distributed in the metabolic and excretory organs (gastrointestinal tract, liver, and kidney). Distribution in the brain/central nervous system (CNS) was very low. The majority of tissues were below the quantifiable limit (BQL) by 168 hours post dose, indicating that the total radioactivity in tissues was eliminated rapidly. Based on Long-Evans QWBA results, there was an obvious distribution of the total radioactivity to the melanin-containing tissues (such as eye, uveal tract, pigmented skin, etc), indicating that
[^{14}C]fruquintinib-derived radioactivity significantly bound to melanin. The total radioactivity distribution and elimination pattern in pigment- containing Long-Evans rats was similar to that of Sprague Dawley rats.

AUC_∞: area under the concentration from 0 hours extrapolated to infinity; AUC_{last}: area under the concentration-versus-time curve from time 0 to the last measurable concentration; BQL: below the quantifiable limit; C_{max}: maximum plasma concentration; CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; F: female; h: hours; LLOQ: lower limit of quantification; LSC: liquid scintillation counting; M: male; NA: not applicable; QWBA: quantitative whole blood autoradiography; R2: coefficient of determination; $t_{1/2}$: apparent terminal elimination half-life; t_{max}: time to maximum plasma concentration.

[a] Based on AUC_{last}

[b] Analysis could be influenced by the presence of high radioactivity in the tissue contents.

[c] Doses are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

[d] BQL1: < LLOQ for LSC [< 1.29 (plasma) or < 2.76 (blood) ng equiv./g].

[e] BQL2: < LLOQ for QWBA (< 9.59 ng equiv./g).

2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合

2.6.5.6A 血漿蛋白結合率（フルキンチニブ）

被験物質：フルキンチニブ

Plasma Protein Binding of Fruquintinib in Mouse, Rat, Dog, and Human Plasma Using a Rapid Equilibrium Dialysis Method	添付資料番号：4.2.2.3-1
	Study Number: DMPKR20[redacted]0039-E-02

Study System: Mouse, rat, dog, and human plasma

Target Entity, Test System and Method: Fruquintinib at concentrations of 1, 3, or 10 μM [a], in vitro test protein binding using rapid equilibrium dialysis with a 6 hour incubation at 37°C, followed by LC-MS/MS detection.

Species	Concentration Tested (μM)	% Bound
Mouse	1	91.2
	3	92.7
	10	92.8
Rat	1	96.2
	3	95.6
	10	96.5
Dog	1	87.3
	3	88.7
	10	88.2
Human	1	95.4
	3	95.3
	10	95.3

Additional Information: Samples were analyzed in triplicate for equilibrium dialysis. The PPB rate of fruquintinib was independent of concentration as it remained constant at the concentration range of 1 to 10 μM. The PPB rate was highest in rat plasma and lowest in dog plasma. The PPB rate in human plasma was approximately 95.3% to 95.4%.

LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

[a] Concentrations are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合（続き）

2.6.5.6B 血漿蛋白結合率（M11）

被験物質：フルキンチニブ

Evaluation of the Protein Binding of M11 in Mouse, Rat, Dog, Monkey, and Human Plasma with Rapid Equilibrium Dialysis Method	添付資料番号：4.2.2.3-2 Study Number: DMPKR20[redacted]0018-E-01
Study System: Mouse, rat, dog, monkey, and human plasma	
Target Entity, Test System and Method: M11 at a concentration of 1 μM, in vitro test protein binding via rapid equilibrium dialysis with 6-hour incubation at 37°C, followed by LC-MS/MS detection.	

Species	Concentration of M11 (μM)	PPB Rate (%)	Stability (%) (6h/0h)
Mouse	1	96.8	96.0
Rat	1	96.6	95.4
Dog	1	94.8	95.8
Monkey	1	95.6	93.1
Human	1	97.7	96.4

Additional Information: Samples were analyzed in triplicate for equilibrium dialysis. The PPB rates were similar across the species. The rate was highest in human plasma and lowest in dog plasma.

h: hour; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M11: metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423); PPB: plasma protein binding.

2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合（続き）

2.6.5.6C 血球移行率（Sprague Dawley ラット、ビーグル犬及びヒト）

被験物質：フルキンチニブ

Blood to Plasma Concentration Ratio Determination of Fruquintinib in Rat, Dog and Human Blood with an LC-MS/MS Based Depletion Method			添付資料番号：4.2.2.3-3 Study Number: DMPKR20[redacted]0004-E-01
Study System: Rat, dog, human whole blood, and plasma			
Target Entity, Test System and Method: Fruquintinib at 1 μM [a], in vitro blood/plasma distribution for up to 60 minutes at 37ºC using an LC-MS/MS depletion method.			
Species	Incubation time (minutes)	Blood-to-plasma partition ratio	Unbound fraction of fruquintinib in whole blood (%)
Rat	10	0.709	5.41
	60	0.733	5.24
Dog	10	0.851	14.9
	60	0.792	16.0
Human	10	0.458	10.1
	60	0.601	7.7
Additional Information: Samples were prepared in duplicate. Overall, the data indicate that the partition equilibrium rate of fruquintinib between red blood cells and plasma was fast in dog whole blood, and slow in rat and human whole blood.			

LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

[a] Concentrations are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合（続き）

2.6.5.6D 蛋白結合率（ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：フルキンチニブ

Using rapid equilibrium dialysis method to evaluate the protein binding of HMPL-013 in human liver microsomes	添付資料番号：4.2.2.3-4
	Study Number: DMPKR20[redacted]0081-E-01

Study System: Human liver microsomes (gender pooled)

Target Entity, Test System and Method: Fruquintinib at concentrations of 1 or 10 μM, using an in vitro protein binding test using rapid equilibrium dialysis with a 6-hour incubation at 37°C, followed by LC-MS/MS detection.

Protein Content (mg/mL)	Compounds	Concentration (μM)	Protein Bound (%) Mean ± SD	Recovery (%)	Stability (6h/0h) (%)	Equilibrium Rate (%)
Buffer	Fruquintinib	1	ND	ND	ND	98.1%
		10	ND	ND	ND	94.8%
	Propranolol	1	ND	ND	ND	100%
0.2	Fruquintinib	1	-3.57 ± 1.06	90.8	96.2	ND
		10	1.58 ± 3.48	83.1	92.8	ND
	Propranolol	1	15.2 ± 3.47	110	95.6	ND
0.5	Fruquintinib	1	15.2 ± 3.02	85.7	92.4	ND
		10	24.3 ± 4.51	87.9	94.7	ND
	Propranolol	1	46.4 ± 4.80	114	92.6	ND

Additional Information: Samples were analyzed in triplicate for equilibrium dialysis. The equilibrium rate of fruquintinib at the concentrations of 1 and 10 μM were 98.1% and 94.8% respectively after incubation for 6 hours, showing that equilibrium was almost achieved. There was minimal protein binding of fruquintinib at concentrations of 1 and 10 μM.

LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; ND: not determined; No.: number; SD: standard deviation.

2.6.5.7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

妊娠又は授乳動物における組織分布試験は実施していない。妊娠動物にフルキンチニブを反復投与したときの薬物動態又はトキシコキネティクスは 2.6.5.4 に示す。

2.6.5.8 薬物動態試験：その他の分布試験

その他の分布試験は実施していない。

2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝

2.6.5.9A 肝ミクロソームにおけるフルキンチニブの代謝安定性（Sprague Dawley ラット、ビーグル犬、カニクイザル及びヒト）

被験物質：フルキンチニブ

The Metabolic Stability Evaluation of Fruquintinib in Liver Microsomes from Different Species					添付資料番号：4.2.2.4-1		
					Study Number: DMPKR20[redacted]0043-E-01		
Study System: Mouse (CD-1), rat (Sprague Dawley), dog (Beagle), monkey (cynomolgus), and human liver microsomes (with FMO and without FMO); M and F							
Concentration:	1 μM fruquintinib [a]; incubated from 0 to 120 minutes						
Assay:	LC-MS/MS						
Sex:		M			F		
Species	Group	$t_{1/2}$ (min)	Predicted in vivo CL_{int} (mL/min/kg)	Predicted systemic CL (mL/min/kg)	$t_{1/2}$ (minutes)	Predicted in vivo CL_{int} (mL/min/kg)	Predicted systemic CL (mL/min/kg)
Mouse	P450+FMO	77.0	20.2	16.5	102	15.3	13.1
	P450	1125	1.39	1.36	252	6.19	5.79
Rat	P450+FMO	47.8	21.6	16.5	40.8	25.2	18.5
	P450	46.3	22.2	16.9	43.6	23.6	17.6
Dog	P450+FMO	450	1.80	1.68	1009	0.80	0.78
	P450	3080	0.26	0.26	540	1.50	1.42
Monkey	P450+FMO	27.0	36.9	20.1	NA	NA	NA
	P450	38.3	26.0	16.4	NA	NA	NA
Human	P450+FMO	1942	0.34	0.33	308	2.12	1.94
	P450	1071	0.61	0.60	313	2.09	1.91
Additional Information: The incubations were conducted in duplicate. The systemic clearance of fruquintinib predicted from the metabolic stability in liver microsomes was lower than the hepatic blood flow for each test species, indicating that fruquintinib had low hepatic extraction in the species tested (moderate for male monkey). Although significant gender differences were observed in dog and human liver microsomes in terms of predicted systemic clearance, fruquintinib was very stable with $t_{1/2}$ higher than 300 minutes both in male and female dog and human liver microsomes, and the drug remaining after incubation for 120 minutes was close to or higher than 80%. Therefore no obvious gender difference in the metabolic stability of dog and human liver microsomes could be drawn. There was no obvious gender difference in the microsomal metabolism of fruquintinib for all test species (data not available for female monkey). FMO contributed to fruquintinib metabolism in mouse liver microsomes.							

CL: clearance; CL_{int}: intrinsic clearance; F: female; FMO: flavin-containing monooxygenase isoenzyme; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; min: minutes; M: male; NA: not applicable; P450: cytochrome P450; $t_{1/2}$: apparent terminal elimination half-life.

[a] Concentrations are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝（続き）

2.6.5.9B 肝ミクロソームにおける M11 の代謝安定性（Sprague Dawley ラット、ビーグル犬、カニクイザル及びヒト）

被験物質：フルキンチニブ

The Metabolic Stability Evaluation of M11 in mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes				添付資料番号：4.2.2.4-2		
				Study Number: DMPKR20[redacted]0019-E-01		
Study System: Mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes (with and without NADPH); M and F						
Concentration:	1 μM M11; incubated from 0 to 120 minutes					
Assay:	LC-MS/MS					
Sex:	M			F		
Species	$t_{1/2}$ (min)	Predicted in vivo CL_{int} (mL/min/kg)	Predicted systemic CL (mL/min/kg)	$t_{1/2}$ (min)	Predicted in vivo CL_{int} (mL/min/kg)	Predicted systemic CL (mL/min/kg)
Mouse	S*	NC	NC	301	18.1	15.1
Rat	210	11.9	9.78	S*	NC	NC
Dog	S*	NC	NC	S*	NC	NC
Monkey	267	7.02	6.05	97.6	19.2	13.3
Human	S*	NC	NC	S*	NC	NC
Additional Information: The incubations were conducted in duplicate. M11 showed very stable properties with an in vitro $t_{1/2}$ > 1.5 hours in all species. The metabolic rate of M11 was slow in the female mouse, male rat, and male monkey liver microsomes, with low predicted systemic clearances. The rate was faster in female monkey liver microsomes with moderate predicted systemic clearance. There was almost no metabolism in the liver microsomes of male mouse, female rat, and dog and human liver microsomes, where the remaining parent drug was > 80% after 120 minutes of incubation. M11 was more stable in female rather than male rat liver microsomes. However, M11 was more stable in male rather than female monkey liver microsomes.						

CL: clearance; CL_{int}: intrinsic clearance; F: female; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M: male; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; min: minutes; NADPH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphoric acid; NC: not calculated; S*: stability, drug remaining ≥ 80% after 120 minute incubation; $t_{1/2}$: apparent terminal elimination half-life.

2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝（続き）

2.6.5.9C 肝ミクロソームで生成したフルキンチニブ代謝物の同定（Sprague Dawley ラット、ビーグル犬及びヒト）

被験物質：フルキンチニブ

Metabolism of Fruquintinib in Liver Microsomes: Metabolite Identification and Interspecies Comparison					添付資料番号：4.2.2.4-4	
					Study Number: DMPKR20[redacted]0009-E-01	
Study System: Rat, dog, monkey, and human liver microsomes						
Concentration: 10 μM fruquintinib incubated for up to 60 minutes						
Assay: LC-MS^n/PDA						
Time (minutes): Incubations up to 120 (only 60-minute data reported)						
Peak area of each metabolite under selective ion mode						
Species	M7 (m/z:380)	M2 (m/z:410)	M1+M7 (m/z:380)	M9 (m/z:381)	M10 (m/z:410)	M11: (m/z:380)
Rat	1.21×10^7	1.55×10^7	2.42×10^7	7.27×10^4	2.02×10^7	6.40×10^5
Dog	5.25×10^6	4.09×10^6	6.80×10^6	NF	1.31×10^7	2.93×10^5
Monkey	2.92×10^7 [a]	1.48×10^7	2.96×10^7	NF	4.51×10^7	2.25×10^6
Human	4.66×10^6 [a]	2.64×10^6	4.84×10^6	5.38×10^4	9.57×10^6	1.77×10^5
Peak area of each metabolite UV Area Ratio at 322 nm						
Species	M7 (m/z:380)	M2 (m/z:410)	M1 (m/z:380)	M10 (m/z:410)		
Rat	1.47×10^3	1.81×10^4	1.45×10^4	2.55×10^4		
Dog	6.13×10^4	4.29×10^3	NF	1.60×10^4		
Monkey	2.33×10^4	1.32×10^4	1.33×10^4	5.87×10^4		
Human	5.48×10^3	1.76×10^3	NF	1.22×10^4		
Additional Information: Six major metabolites were observed in the incubation with liver microsomes of various species (rats, dogs, monkeys, and humans). These metabolites were the products of demethylation (M1, M7, and M11, structure confirmed except M1), hydroxylation (M2 and M10, structure confirmed) and carboxyl acid formation (M9, structure confirmed). The metabolites of fruquintinib produced in human liver microsomes were qualitatively similar to those found in the other species, however the relative amount was different.						

LC-MS^n/PDA: liquid chromatography with mass spectrometry and photodiode array detection; M1: metabolite of fruquintinib (also known as M379-2); M2: metabolite of fruquintinib (also known as HM5012569 or M409-2); M7: metabolite of fruquintinib (also known as HM5013199 or M379-1); M10: metabolite of fruquintinib (also known as HM5029127 or M409-3); M11: metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423 or M379-3); m/z: mass-to-charge ratio; NF: not found; UV: ultraviolet.

M1 and M7 could not be separated successfully and are therefore reported as M1 + M7 in this table.

[a] May including the peak of M1, because the molecular weight of M1 was the same as M7 and not separated with M7.

2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝（続き）

2.6.5.9D 肝ミクロソームで生成したフルキンチニブ代謝物の同定（Sprague Dawley ラット、ビーグル犬及びヒト）

被験物質：フルキンチニブ

Identification of Metabolic Enzymes Involved in the Metabolism of Fruquintinib in Human Liver Microsomes	添付資料番号：4.2.2.4-5 Study Number: DMPKR20[redacted]0079-E-01

Study System: Human liver microsomes. CYP450 enzymes were phenotyped in the presence of CYP selective monoclonal antibodies (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C19, 2D6, 2E1, and 3A4/5).

Time:	30-minute incubation
Concentration:	50 μM fruquintinib
Assay:	LC-MS

Contribution of CYP450 isoforms in the metabolism of fruquintinib (%)

CYP Isoform:	CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C19	CYP2E1	CYP2D6	CYP3A4/5
M1+M7	NC	NC	NC	19.5	11.9	NC	34.2	64.8
M2	NC	NC	NC	19.3	15.3	NC	20.6	28.1
M3	NC	NC	NC	16.4	23.8	NC	27.9	83.5

Additional Information: The results show that there are several metabolic enzymes involved in the metabolism of fruquintinib in human liver microsomes, but of the tested CYP450 enzymes, CYP3A4/5 is the main contributor to the in vitro metabolism of fruquintinib in human liver microsomes.

CYP: cytochrome P450; LC-MS^n: liquid chromatography combined with multiple-stage mass spectrometry; M1: metabolite of fruquintinib (also known as M379-2); M2: metabolite of fruquintinib (also known as HM5012569 or M409-2); M3: metabolite of fruquintinib; M7: metabolite of fruquintinib (also known as HM5013199 or M379-1); NC: not calculated.

M1 and M7 could not be separated successfully and are therefore reported as M1 + M7 in this table.

2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝（続き）

2.6.5.9E ヒト肝ミクロソームにおける代謝酵素の同定（ヒト）

被験物質：フルキンチニブ

Metabolic Enzyme Identification of Fruquintinib in Human Liver Microsomes							添付資料番号：4.2.2.4-6
							Study Number: DMPKR20[redacted]0003-E-01
Study System: Main enzymes responsible for the biotransformation of fruquintinib were determined using selective monoclonal antibodies and selective CYP450 chemical inhibitors (1-aminobenzotriazole for all CYP450s) in human liver microsomes. In addition, the stability of fruquintinib and its metabolites was determined after incubation for 24 hours in human plasma.							
Concentration:	10 μM						
Assay:	LC-MS/MS or LC-MS^n/PDA						
Parent or Metabolite:		Fruquintinib	M1+M7	M2	M9	M10	M11
Stability after incubation for 24 hours at 37°C in human plasma (%)		103	101	103	149	42.4	6940
Contribution to fruquintinib metabolism (%)	CYP1A2	NA	NC	NC	NC	NC	NC
	CYP2A6	NA	NC	NC	NC	NC	NC
	CYP2B6	NA	NC	NC	14.3	NC	NC
	CYP2C8	NA	NC	43.3	14.0	NC	NC
	CYP2C9	NA	39.2	46.5	NC	28.1	NC
	CYP2C19	NA	NC	NC	NC	NC	NC
	CYP2D6	NA	NC	NC	NC	10.2	NC
	CYP2E1	NA	NC	NC	NC	NC	NC
	CYP3A4	NA	41.1	21.4	NC	77.7	21.9
	FMO	NA	19.0	NC	11.7	23.0	11.1
	ABT [a]	NA	89.3	85.1	NC	96.4	42.7
Additional Information: The results suggest that M11 production may be dependent on CYP3A4 since the formation of M10 was mediated by CYP3A4 and M10 can convert into M11. In conclusion, fruquintinib can be metabolized by several metabolic enzymes.							

ABT: 1-Aminobenzotriazole; CYP: cytochrome P450; FMO: flavin-containing monooxygenase isoenzyme; LC-MS^n/PDA: liquid chromatography with mass spectrometry and photodiode array detection; M1: metabolite of fruquintinib (also known as M379-2); M2: metabolite of fruquintinib (also known as HM5012569 or M409-2); M7: metabolite of fruquintinib (also known as HM5013199 or M379-1); M9: Metabolite of fruquintinib (HM5024093 or M380); M10: metabolite of fruquintinib (also known as HM5029127 or M409-3); M11: metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423 or M379-3); NA: not applicable; NC: not calculated.

[a] inhibitor of all CYP450 enzymes.

M1 and M7 could not be separated successfully and are therefore reported as M1 + M7 in this table

2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝（続き）

2.6.5.9F フルキンチニブ代謝におけるチトクロム P450 各分子種の寄与

被験物質：フルキンチニブ

Contribution Determination of Cytochrome P450 Enzymes to Fruquintinib Metabolism	添付資料番号：4.2.2.4-7
	Study Number: DMPKR20[redacted]0006-E-01

Study System: Substrate depletion in recombinant human CYP3A4, CYP3A5, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP1A2, CYP2B6, and CYP2D6 isoforms. The contributions of CYP enzymes to fruquintinib metabolism were determined using a relative activity factor.

Time (min):	60
Concentration:	10 μM fruquintinib, 5 to 10 pmol/mL CYP protein, incubated for up to 1 hour
Assay:	LC-MS/MS

Fruquintinib metabolite concentration (nM) after incubation with recombinant CYPs for 1 hour

CYP Isoform	M2	M1+M7	M9	M11	M10
CYP3A4	29.1	23.9	BLQ	BLQ	321
CYP3A5	8.06	10.5	BLQ	BLQ	63.2
CYP2C8	10.4	BLQ	BLQ	BLQ	9.50
CYP2C9	10.3	6.74	BLQ	BLQ	5.34
CYP2C19	7.11	BLQ	BLQ	BLQ	0.992
CYP1A2	BLQ	3.68	BLQ	BLQ	BLQ
CYP2B6	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
CYP2D6	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	1.05
LLOQ	2.56	0.51	2.56	2.56	0.51

Metabolite concentrations (nM) after incubation of fruquintinib for up to 1 hour

		M2					M1+M7					M10				
		3A5	2C8	2C9	2C19	3A4	3A5	2C8	2C9	2C19	3A4	3A5	2C8	2C9	2C19	3A4
Incubation Time (minutes)	0	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
	2	NA	NA	NA	NA	1.75	NA	NA	NA	NA	0.876	NA	NA	NA	NA	14.0
	4	NA	NA	NA	NA	3.61	NA	NA	NA	NA	1.85	NA	NA	NA	NA	29.2
	6	NA	NA	NA	NA	4.00	NA	NA	NA	NA	2.37	NA	NA	NA	NA	37.6
	8	NA	NA	NA	NA	6.81	NA	NA	NA	NA	3.67	NA	NA	NA	NA	61.9
	10	0.84	2.19	2.16	0.95	9.38	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	6.77	6.06	1.50	0.78	BLQ	69.6
	20	1.60	2.72	3.39	1.59	9.27	BLQ	BLQ	1.92	BLQ	7.24	11.3	2.38	1.23	0.255	96.9
	40	3.26	4.44	5.41	1.84	15.4	2.36	BLQ	3.99	BLQ	9.30	21.9	4.12	2.42	0.416	142
	60	4.71	5.23	7.29	3.12	16.2	4.06	BLQ	5.50	BLQ	11.7	31.5	4.92	3.13	0.573	165

2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝（続き）

2.6.5.9F フルキンチニブ代謝におけるチトクロム P450 各分子種の寄与（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Formation rates of M1+M7, M2, and M10 (pmol/pmol recCYP450/min)					
CYP Isoform	M2	M1+M7	M10	Total	
CYP3A4	0.185	0.070	1.60	1.85	
CYP3A5	0.016	0.017	0.102	0.135	
CYP2C8	0.013	NA	0.014	0.027	
CYP2C9	0.020	0.018	0.010	0.048	
CYP2C19	0.008	NA	0.002	0.010	
Contribution of each cytochrome P450 isoform to fruquintinib metabolism					
CYP Isoform	CYP3A4	CYP3A5	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19
V_{recCYP} (measured) (pmol/pmolRecCYP450/min)	1.85	0.135	0.027	0.048	0.010
RAF_{CL} (measured)	86.0	NA	34.3	8.66	2.74
V_{CYP} (predicted)	160	11.6	0.912	0.415	0.026
%Contribution	No less than 92.5	No higher than 6.71	0.529	0.241	0.015
Additional Information: $V_{CYP} = V_{recCYP} \times RAF_{CL}$; Contribution%=$V_{recCYP} \times RAF_{CL}/\Sigma V_{recCYP} \times RAF_{CL}$					

BLQ: below the lower limit of quantification; CYP: cytochrome P450; M1: metabolite of fruquintinib (also known as M379-2); M2: metabolite of fruquintinib (also known as HM5012569 or M409-2); M7: metabolite of fruquintinib (also known as HM5013199 or M379-1); M10: metabolite of fruquintinib (also known as HM5029127 or M409-3); M11: metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423 or M379-3); NA: not applicable; LLOQ: lower limit of quantification; RAF: relative activity factor; RAF_{CL}: ratio of metabolic velocity for specific probe substrate in human liver microsome system to that in corresponding recCYP450 system; recCYP: recombinant human CYP450; V_{CYP}: volume of distribution of CYP450; V_{recCYP}: volume of distribution of recombinant human CYP450.
M1 and M7 could not be separated successfully and are therefore reported as M1 + M7 in this table

2.6.5.9 薬物動態試験：In Vivo における代謝（続き）

2.6.5.9G 血漿及び肝ミクロソームにおける M205 の生成（ヒト）

被験物質：フルキンチニブ

Evaluation of the Formation of the Fruquintinib Metabolite M205 in Human Plasma and Human Liver Microsomes	添付資料番号：4.2.2.4-8
	Study Number: DMPKR20[redacted]0015-E-01
Study System: Human plasma and human liver microsomes. Cofactors for CYP-mediated biotransformation were used – β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP), and uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA).	
Time:	Up to 6 hours incubation in plasma, up to 2 hours in liver microsomes
Concentration:	10 μM fruquintinib
Assay:	LC-MS/MS

Concentration of M205 after incubation of fruquintinib in human plasma and human liver microsomes (nM) (n = 2)							Average MS peak area of M205 glucuronide conjugate (n = 2)	
Time (hours)	Group A	Time (h)	Group B	Group C	Group D	Group E	Group D	Group E
	Plasma		HLM, +NADPH, -UDPGA	HLM, -NADPH, -UDPGA	HLM, +NADPH, +UDPGA	HLM, -NADPH, +UDPGA	HLM, +NADPH, +UDPGA	HLM, -NADPH, +UDPGA
0	5.22 [a]	0	3.45 [a]	3.63	2.63	3.41	ND	ND
2	10.5	0.5	8.44	9.48	6.63	9.68	ND	ND
4	18.1	1	10.5	16.0	11.1	14.6	ND	195[a]
6	23.4	2	18.0	25.4	14.0	23.6	306[a]	754[a]

Average percentage of fruquintinib remaining after incubation (%) (n = 2)						
Time (hours)	Group A	Time (h)	Group B	Group C	Group D	Group E
	Plasma		HLM, +NADPH, -UDPGA	HLM, -NADPH, -UDPGA	HLM, +NADPH, +UDPGA	HLM, -NADPH, +UDPGA
0	100	0	100	100	100	100
2	102	0.5	94.0	96.7	88.6	100
4	97.1	1	90.9	98.8	84.6	102
6	96.9	2	76.9	95.8	73.0	97.7
Additional Information: NA						

CV: coefficient of variation; HLM: human liver microsomes; M205: metabolite of fruquintinib, also known as HM5040878; MS: mass spectrometry; NA: not applicable; NADPH: β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ND: not determined; No.: number; UDPGA: uridine diphosphate glucuronic acid.

[a] the CV% of the duplicate samples was larger than 15%.

2.6.5.10 薬物動態試験：In Vitro における代謝

2.6.5.10A In Vivo における代謝物の同定（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Metabolite Profiling and Identification of [^{14}C]Fruquintinib in Male and Female Sprague Dawley Rats after a Single Oral Administration of 2 mg/kg [^{14}C]Fruquintinib						添付資料番号：4.2.2.4-9 Study Number: RTC00559			
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley		Feeding Condition: Fasted							
Sex (M/F)/Number of Animals: Plasma, F/7 and M/7; Bile, F/1, M/1; Urine, F/1, M/1; Feces, F/1, M/1		Dose (mg/kg): 2 mg/kg (100 µCi/kg)							
Method of Administration: Single oral dose		Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na							
Radionuclide: ^{14}C		Specific activity: Approximately 50 µCi/mg							
Analyte: Radioactivity		Samples: Plasma, feces, urine, bile				Assay: LC-MS/MS coupled with radioactivity monitoring			
Distribution of [^{14}C]Fruquintinib and its metabolites - % Dose in Bile, Urine and Feces from Male and Female Rats, and %AUC in Plasma									
Metabolite	Type of metabolite	Bile (0 to 72 hours) % Dose		Urine (0 to 168 hours) % Dose		Feces (0 to 168 hours) % Dose		Plasma (0 to 24 hours) % AUC	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
[^{14}C]Fruquintinib	Parent	0.56	0.39	0.09	0.09	5.00	7.48	58.8	78.5
M205	O-dequinazoline moiety	ND	ND	1.89	0.78	ND	ND	ND	ND
M285	O-dequinazoline moiety, sulfation	ND	ND	10.1	6.08	ND	ND	ND	ND
M365	O, O-didemethylation	ND	ND	ND	ND	15.1	6.92	ND	ND
M379-1	O-demethylation	ND	ND	0.42	0.06	0.98	0.62	ND	ND
M379-2 [a]	O-demethylation	1.46	1.40	1.34	0.77	4.78	15.8	ND	ND
M379-3	N-desmethylation	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.72	2.02
M381	O-dequinazoline moiety, glucuronidation	ND	ND	3.14	4.61	ND	ND	ND	ND
M395-1 [b]	O-demethylation, mono- oxidation	1.21	1.77	ND	ND	1.45	1.16	ND	ND
M395-2	O-demethylation, mono- oxidation	0.52	0.26	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M409-1	Mono-oxidation	ND	ND	0.37	0.18	ND	ND	ND	ND
M409-2 [a]	Mono-oxidation	1.46	1.40	1.34	0.77	4.78	15.8	12.2	14.0
M409-3	Mono-oxidation	ND	ND	ND	ND	1.22	1.88	ND	ND
M425-1	Di-oxidation	ND	ND	0.62	0.19	ND	ND	ND	ND
M425-2	Di-oxidation	ND	ND	0.47	0.20	ND	ND	ND	ND
M459	O-demethylation, sulfation	17.6	16.9	ND	ND	ND	ND	ND	ND
M475	O-demethylation, mono- oxidation, sulfation	2.06	2.85	ND	ND	ND	ND	ND	ND

2.6.5.10 薬物動態試験：In Vitro における代謝（続き）

2.6.5.10A In Vivo における代謝物の同定（Sprague Dawley ラット）（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Metabolite	Type of metabolite	Bile (0 to 72 hours) % Dose		Urine (0 to 168 hours) % Dose		Feces (0 to 168 hours) % Dose		Plasma (0 to 24 hours) % AUC	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
M489	Mono-oxidation, sulfation	1.05	0.33	ND	ND	4.66	1.51	ND	ND
M555	O-demethylation, glucuronidation	1.80	2.95	1.59	1.35	ND	ND	ND	ND
M585 [b]	Mono-oxidation, glucuronidation	1.21	1.77	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Unextractable (% Dose)		ND	ND	ND	ND	21.2	22.8	ND	ND
Additional Information: The metabolism work in this report is from samples collected as part of Study Number RTC00537. Fruquintinib was extensively metabolized in rats after oral administration of 2 mg/100 μCi/kg of [^{14}C]fruquintinib. Nineteen metabolites were tentatively identified. The major phase I metabolic routes of fruquintinib in rats included: 1) N- or O-demethylation, 2) oxidation, and 3) O-dequinazoline moiety. Glucuronidation and sulfation were the main phase II metabolic pathways observed. The potential metabolic pathway of fruquintinib in rats are proposed in section 2.6.5.11.									

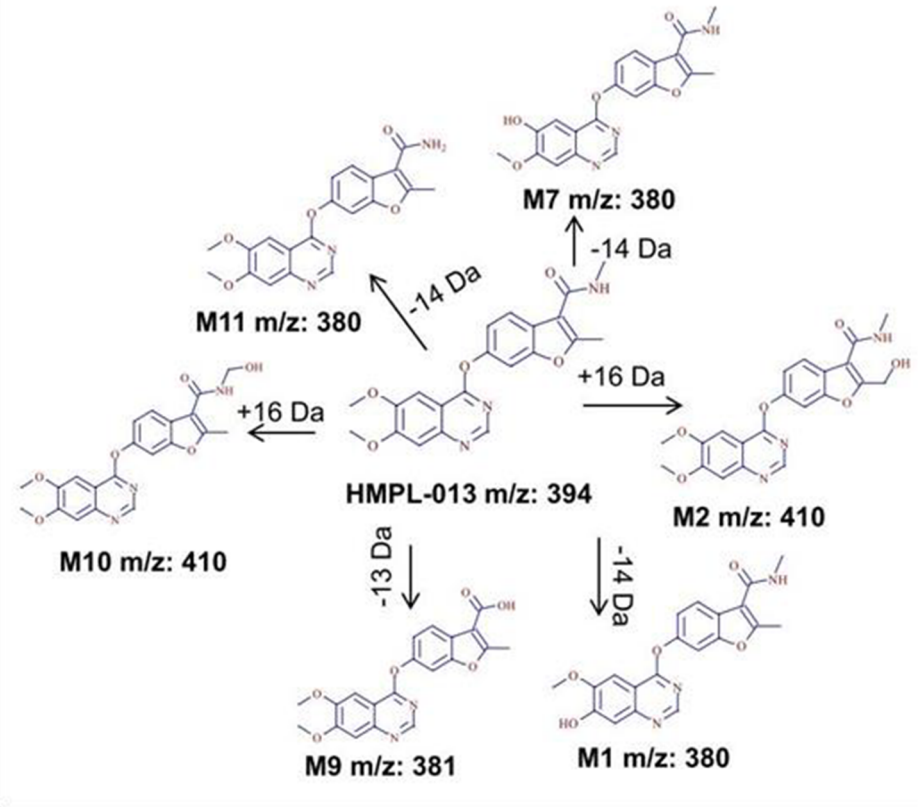
AUC: area under plasma concentration-time curve; ND: not detected; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M205: metabolite of fruquintinib, also known as HM5040878; M379-1: metabolite of fruquintinib, also known as M7 or HM5013199; M379-2: metabolite of fruquintinib, also known as M1; M379-3: metabolite of fruquintinib, also known as M11 or HM5025423; M409-2: metabolite of fruquintinib, also known as M2 or HM5012569; M409-3: metabolite of fruquintinib, also known as M10 or HM5029127.

[a] % Dose is the total % Dose of M379-2 and M409-2 in bile, urine, and feces, respectively.

[b] % Dose is the total % Dose of M395-1 and M585 in bile.

2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路

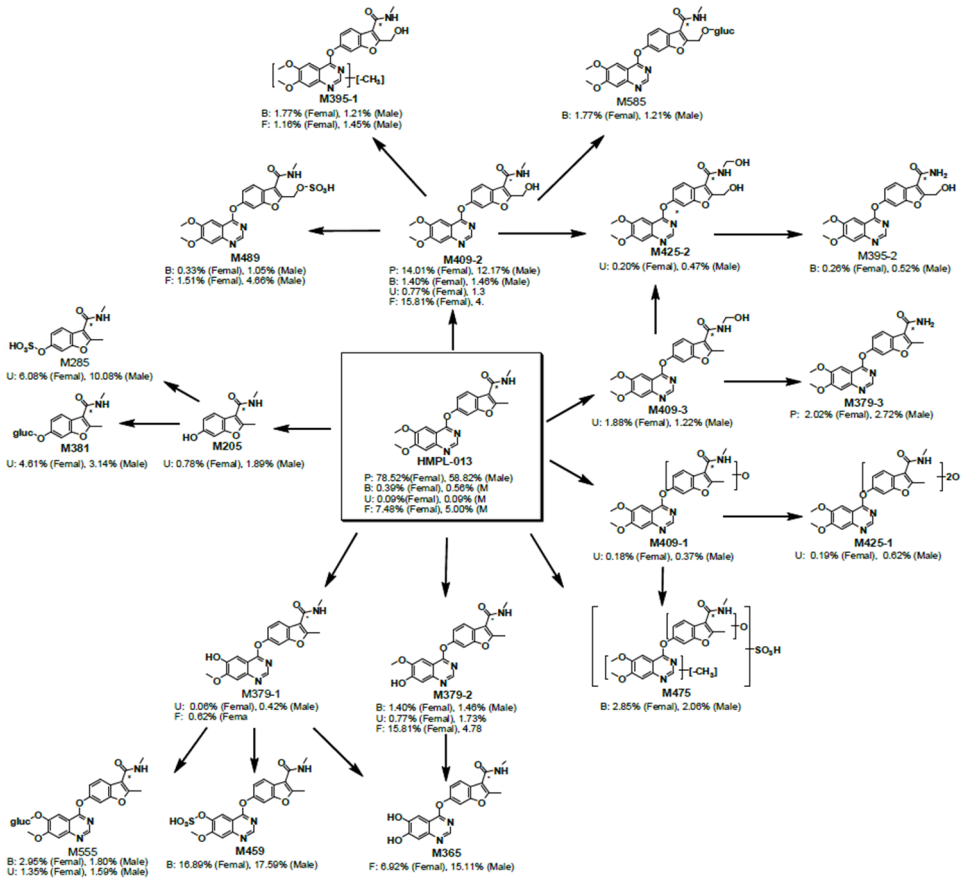
2.6.5.11A In Vitro における推定代謝経路



HMPL-013: fruquintinib; M2: metabolite of fruquintinib, also known as HM5012569 or M409-2; M7: metabolite of fruquintinib also known as HM5013199 or M379-1; M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M10: metabolite of fruquintinib, also known as HM5029127 or M409-3; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3.
Source: Report DMPKR20[redacted]0009-E-01（添付資料番号：4.2.2.4-4）

2.6.5.11 薬物動態試験：推定代謝経路（続き）

2.6.5.11B In Vivo における推定代謝経路（Sprague Dawley ラット）



HMPL-013: fruquintinib; M379-2: metabolite of fruquintinib, also known as M1; M379-1: metabolite of fruquintinib, also known as M7 or HM5013199; M379-3: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M11; M409-2: metabolite of fruquintinib also known as HM5012569 or M2; M409-3: metabolite of fruquintinib also known as HM5029127 or M10.
The percentage means the %AUC(plasma) or %Dose (bile, urine, and feces).
For M379-2 (M1) and M409-2 (M2), the %Dose is the total %Dose of the two metabolites in bile, urine, and feces, respectively.
For M395-1 and M585-1, the % Dose is the total % dose of the two metabolites in bile.
B: bile; F: feces; HMPL-013: fruquintinib; U: urine
Source: Report RTC00559（添付資料番号：4.2.2.4-9）

2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

2.6.5.12A チトクロム P450 1A2、2B6 及び 3A4 に対するフルキンチニブの酵素誘導能（ヒト凍結肝細胞）

被験物質：フルキンチニブ

Evaluation of the Induction Potential of Fruquintinib on CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 in Human Cryopreserved Hepatocytes					添付資料番号：4.2.2.6-2 Study Number: 400253-20[redacted]032601-HI		
Type of Study:	Induction of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 mRNA by fruquintinib, in vitro. Induction was determined by real-time PCR in cryopreserved human hepatocytes of 3 individual donors after 48 hours of treatment and changes in enzyme activity were assessed by the formation of specific metabolites.						
Concentration in Test System:	0.1, 1, and 10 µM fruquintinib						
Substrates:	Phenacetin (CYP1A2), bupropion (CYP2B6), midazolam (CYP3A4)						
Analytical Method:	LC-MS/MS of metabolites of CYP enzyme substrate						
		CYP Enzyme Activity (% of Positive Control)			CYP Gene Expression (Fold of Vehicle Control)		
Donor Number	Fruquintinib (µM)	CYP1A2	CYP2B6	CYP3A4	CYP1A2	CYP2B6	CYP3A4
1	0.1	-0.604	-0.407	-0.560	1.34	0.925	0.910
	1	0.281	1.51	> 0.001	1.09	1.04	0.945
	10	2.71	12.5	-1.61	1.59	2.80	1.29
2	0.1	-0.391	-0.778	-0.126	1.28	1.06	1.16
	1	0.863	-0.115	0.389	0.986	0.791	0.895
	10	1.37	4.75	-0.615	1.10	1.38	1.06
3	0.1	0.760	0.277	0.708	1.17	1.29	1.19
	1	1.51	1.54	0.235	1.43	1.56	1.34
	10	4.67	10.7	0.095	1.96	3.51	1.59
Additional information: Based on enzyme activities and gene expression levels, fruquintinib at concentrations up to 10 µM was not considered an inducer of CYP1A2, CYP2B6, or CYP3A4 in vitro.							

CYP: cytochrome P450; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; PCR: polymerase chain reaction.

2.6.5.13 薬物動態試験：累積排泄

2.6.5.13A [^{14}C]フルキンチニブを単回経口投与後の放射能の尿及び糞中排泄（Sprague Dawley ラット）

被験物質：フルキンチニブ

Excretion of [^{14}C] Fruquintinib in Sprague Dawley Rats After a Single Oral Administration of [^{14}C] Fruquintinib at 2 mg/kg	添付資料番号：4.2.2.5-1
	Study Number: RTC00537
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	Feeding Condition: Fasted
Sex (M/F)/Number of Animals: F/3 and M/3 intact rats; F/3 and M/3 bile duct cannulated rats.	Dose (mg/kg): 2 mg/kg (100 µCi/kg)
Method of Administration: Single dose, oral gavage	Vehicle/Formulation: 0.5% CMC-Na
Analyte: Total radioactivity (percent recovery, ^{14}C)	Assay: Liquid scintillation counting

Animal Group	Sex	Time Period (h)	%Dose				Total Dose Recovered [a] (%)
			Urine	Feces	Cage Rinse/Wash	Bile	
Intact rats	Male	0-24	23.6 ± 1.58	65.1 ± 1.07	1.45 ± 0.80	NA	90.2 ± 1.23
		0-48	24.3 ± 1.47	69.3 ± 0.57	1.49 ± 0.81	NA	95.1 ± 1.20
		0-72	24.4 ± 1.45	69.5 ± 0.62	1.51 ± 0.81	NA	95.4 ± 1.18
		0-168	24.5 ± 1.41	69.7 ± 0.60	1.52 ± 0.81	NA	95.6 ± 1.04
	Female	0-24	18.8 ± 3.12	63.3 ± 2.92	2.21 ± 1.00	NA	84.3 ± 4.21
		0-48	20.0 ± 2.94	72.5 ± 1.19	2.31 ± 0.99	NA	94.8 ± 0.97
		0-72	20.1 ± 2.94	72.9 ± 1.26	2.35 ± 1.01	NA	95.4 ± 0.99
		0-168	20.2 ± 2.98	73.1 ± 1.15	2.45 ± 0.96	NA	95.8 ± 1.00
BDC rats	Male	0-72	28.4 ± 5.23	29.8 ± 11.2	1.35 ± 0.53	33.3 ± 17.2	92.8 ± 2.11
	Female	0-72	31.7 ± 18.8	25.8 ± 7.99	1.42 ± 1.84	33.2 ± 13.7	92.1 ± 1.50
Additional Information: None.							

CMC-Na: sodium carboxymethyl cellulose; F: female; M: male; NA: not applicable.

2.6.5.14 薬物動態試験：胆汁中排泄

胆汁中排泄率は 2.6.5.13A に示す。

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用

2.6.5.15A チトクロム P450 に対するフルキンチニブの可逆的阻害作用（ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：フルキンチニブ

Evaluation of Reversibly Inhibitory Effects of Fruquintinib on CYP Enzymes in Human Liver Microsomes		添付資料番号：4.2.2.6-3 Study Number: DMPKR20[redacted]0059-E-01
Test System:	Inhibitory effect of fruquintinib on CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4/5 in pooled human liver microsomes	
Concentration in Test System:	0.08, 0.4, 2, 10, 50 μM fruquintinib	
Substrates and inhibitors:	Substrates: Paclitaxel (CYP2C8), diclofenac (CYP2C9), S-(+)-mephenytoin (CYP2C19), dextromethorphan (CYP2D6), testosterone and midazolam (CYP3A4/5). Positive Inhibitors: α-naphthoflavone, ketoconazole, quinidine, sulfaphenazole, diethyldithiocarbamate, ticlopidine, quercetin	
Analytical Method:	HPLC-MS/MS	
CYP Isoform	Substrate	IC_{50} (μM)
CYP2C8	Paclitaxel	> 50
CYP2C9	Diclofenac	> 50
CYP2C19	S-(+)-Mephenytoin	> 50
CYP2D6	Dextromethorphan	> 50
CYP3A4/5	Testosterone	> 50
CYP3A4/5	Midazolam	> 50
Additional Information: The IC_{50} values of positive inhibitors were: 1.68, 0.374, 3.61, 0.081, 0.100, 0.083 μM respectively, for quercetin (CYP2C8), sulfaphenazole (CYP2C9), ticlopidine (CYP2C19), quinidine (CYP2D6), ketoconazole (testosterone binding site), and ketoconazole (midazolam binding site) (CYP3A4). No marked inhibitory effects on CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5 were observed (IC_{50} > 50 μM).		

CYP: cytochrome P450; HPLC-MS/MS: high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; IC_{50}: half maximal inhibitory concentration.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15B チトクロム P450 1A2 及び 2B6 に対するフルキンチニブの可逆的阻害作用（ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：フルキンチニブ

Reversible Inhibitory Effects of Fruquintinib on Human Cytochrome P450 1A2 and 2B6		添付資料番号：4.2.2.6-4 Study Number: DMPKR20[redacted]0003-E-01
Test System:	Inhibitory effect of fruquintinib on CYP1A2 and CYP2B6 in pooled human liver microsomes	
Concentration in Test System:	0, 0.0488, 0.195, 0.781, 3.125, 12.5, 50, 200 μM fruquintinib (CYP1A2) 0, 0.0171, 0.0514, 0.154, 0.463, 1.39, 4.17, 12.5 μM fruquintinib (CYP2B6)	
Substrates and inhibitors:	Substrates: Phenacetin (CYP1A2), bupropion hydrochloride (CYP2B6) Positive Inhibitors: α-naphthoflavone (CYP1A2), 2-phenyl-2-(1-piperidinyl) propane (CYP2B6)	
Analytical Method:	HPLC-MS/MS	
CYP Isoform	Substrate	IC_{50} (μM)
CYP1A2	Phenacetin	> 200
CYP2B6	Bupropion hydrochloride	> 12.5
Additional Information: The IC_{50} values of positive inhibitors detected in house were: 0.0147 and 0.448 respectively for α-naphthoflavone (CYP1A2) and 2-phenyl-2-(1- piperidinyl) propane (CYP2B6). Results indicated that fruquintinib has no obvious inhibitory effects against CYP1A2 (IC_{50} > 200 μM) and CYP2B6 (IC_{50} > 12.5 μM).		

CYP: cytochrome P450; HPLC-MS/MS: high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry; IC50: half maximal inhibitory concentration.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15C チトクロム P450 に対する M11 及び M7 の可逆的阻害作用（ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：M11

Evaluation of the Reversible Inhibitory Effects of Metabolite M11 on 7 CYP450 Enzymes in Human Liver Microsomes		添付資料番号：4.2.2.6-5 Study Number: DMPKR20[redacted]0022-E-01
Test System:	Inhibitory effect of M11 on CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1, and CYP3A4/5 in pooled human liver microsomes	
Concentration in Test System:	0.08, 0.4, 2, 10, 50 μM M11	
Substrates and Inhibitors:	Substrates: phenacetin (50 μM; CYP1A2), paclitaxel (10 μM; CYP2C8), diclofenac (5 μM; CYP2C9), S-(+)- mephenytoin (20 μM; CYP2C19), dextromethorphan (6 μM; CYP2D6), chlorzoxazone (70 μM; CYP2E1), testosterone and midazolam (45 μM and 5 μM respectively; CYP3A4/5). Positive Inhibitors: α-naphthoflavone (0.04 μM; CYP1A2), quercetin (1 μM; CYP2C8), sulfaphenazole (0.5 μM, CYP2C9), ticlopidine (4 μM; CYP2C19), quinidine (0.2 μM; CYP2D6), ketoconazole (0.05 μM; CYP3A4/5) and diethyldithiocarbamate (20 μM; CYP2E1).	
Analytical Method:	LC-MS/MS	
CYP Isoform	Substrate	IC_{50} (μM)
CYP1A2	Phenacetin	> 50
CYP2C8	Paclitaxel	> 50
CYP2C9	Diclofenac	> 50
CYP2C19	S-(+)-Mephenytoin	> 50
CYP2D6	Dextromethorphan	> 50
CYP2E1	Chlorzoxazone	> 50
CYP3A4/5	Testosterone	38.0
CYP3A4/5	Midazolam	> 50
Additional Information: Samples were prepared in duplicate. M11 had no reversible inhibitory effect against CYP1A2, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP2E1. M11 demonstrated a weak reversible inhibitory effect on CYP3A4/5 (testosterone). The IC_{50} values of α-naphthoflavone (0.04 μM), quercetin (1 μM), sulfaphenazole (0.5 μM), ticlopidine (4 μM), quinidine (0.2 μM), diethyldithiocarbamate (20 μM), ketoconazole (0.05 μM) on CYP3A4/5 (testosterone), and ketoconazole (0.05 μM) on CYP3A4/5 (midazolam) were 0.012 μM, 1.62 μM, 0.447 μM, 0.399 μM, 0.086 μM, 18 μM, 0.021 μM, and 0.018 μM, respectively, which were similar to values determined by the Sponsor and within the ranges recommended by the FDA.		

CYP: cytochrome P450; IC_{50}: concentration achieving 50% inhibition; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M11: metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423); No.: number.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15D チトクロム P450 2B6 に対する M11 の可逆的阻害作用（ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：M11

Evaluation of the Reversible Inhibitory Effects of Metabolite M11 on CYP2B6 in Human Liver Microsomes		添付資料番号：4.2.2.6-6 Study Number: DMPKR20[redacted]0001-E-01
Test System:	Inhibitory effect of M11 on CYP2B6 in pooled human liver microsomes	
Concentration in Test System:	0.4 to 50 μM M11	
Substrates and Inhibitors:	Substrates: Bupropion (70 μM) Positive Inhibitor: PPP (5 μM)	
Analytical Method:	LC-MS/MS	
CYP Isoform	Substrate	IC_{50} (μM)
CYP2B6	M11	> 50 μM
CYP2B6	PPP	14.1 μM
Additional Information: Samples were prepared in duplicate. M11 had no reversible inhibitory effect against CYP2B6, with the IC_{50} value higher than 50 μM.		

CYP: cytochrome P450; IC_{50}: concentration achieving 50% inhibition; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M11: metabolite of fruquintinib (also known as HM5025423); No.: number; PPP: 2-phenyl-2-(1-piperidinyl) propane.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15E フルキンチニブによるチトクロム P450 の時間依存的阻害（予試験、ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：フルキンチニブ

Preliminary in vitro evaluation of time-dependent inhibition of CYP450s by fruquintinib using pooled human liver microsomes		添付資料番号：4.2.2.6-7
		Study Number: DMPKR20[redacted]0078-E-01
Test System:	Inhibitory effect of fruquintinib on CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4/5 in pooled human liver microsomes	
Concentration in Test System:	10 μM fruquintinib	
Substrates and Inhibitors:	Probe Substrates: Phenacetin (CYP1A2), diclofenac (CYP2C9), dextromethorphan (CYP2D6), testosterone (CYP3A4/5), midazolam (CYP3A4/5) Positive Inhibitors: probenecid, erythromycin, verapamil, nefazodone	
Analytical Method:	LC-MS/MS	
CYP Isoform	Substrate	Activity Loss (%)
CYP1A2	Phenacetin	0.08
CYP2C9	Diclofenac	13.0
CYP2D6	Dextromethorphan	10.0
CYP3A4/5	Testosterone	3.22
CYP3A4/5	Midazolam	5.37
Additional Information:	The IC_{50} values of positive inhibitors were: 7.78, 23.0, 42.6, and 70.6 μM, respectively, for probenecid, erythromycin, verapamil, and nefadazone; all with substrate Midazolam (CYP3A4/5). No obvious enzyme activities were reduced , the results therefore indicated that fruquintinib has no marked inhibitory effects against CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4/5.	

CYP: cytochrome P450; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; IC_{50}: half maximal inhibitory concentration.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15F チトクロム P450（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP2D6）に対するフルキンチニブの時間依存的阻害（ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：フルキンチニブ

Preliminary in vitro evaluation of time-dependent inhibition of CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP2D6 by fruquintinib using pooled human liver microsomes		添付資料番号：4.2.2.6-8 Study Number: DMPKR20[redacted]0005-E-01
Test System:	Inhibitory effect of fruquintinib on CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6 in pooled human liver microsomes	
Concentration in Test System:	10 μM fruquintinib [a]	
Substrates and Inhibitors:	Substrates: phenacetin (250 μM; CYP1A2), bupropion (450 μM; CYP2B6), amodiaquine dihydrochloride dehydrate (15 μM; CYP2C8), diclofenac (100 μM; CYP2C9), S-mephenytoin (200 μM; CYP2C19), dextromethorphan (60 μM; CYP2D6). Positive Inhibitors: furafylline (10 μM; CYP1A2), ticlopidine (0.4 μM) (CYP2B6), phenelzine sulfate salt (55 or 200 μM) (CYP2C8), tienilic acid (1 μM) (CYP2C9), ticlopidine (4 μM) (CYP2C19), paroxetine (4 μM) (CYP2D6).	
Analytical Method:	LC-MS/MS	
CYP Isoform	Substrate	Activity Loss (%)
CYP1A2	Phenacetin	6.51
CYP2B6	Bupropion	NI
CYP2C8	Amodiaquine dihydrochloride dehydrate	NI
CYP2C9	Diclofenac	NI
CYP2C19	S-mephenytoin	0.243
CYP2D6	Dextromethorphan	0.305
Additional Information: The activity loss values of positive inhibitors were: 73.0%, 72.6%, 16.7%, 56.4%, 73.7%, 52.3%, 73.1% respectively for furafylline (10 μM) (CYP1A2), ticlopidine (0.4 μM) (CYP2B6), phenelzine sulfate salt (55 μM) (CYP2C8), phenelzine sulfate salt (200 μM) (CYP2C8), tienilic acid (1 μM) (CYP2C9), ticlopidine (4 μM) (CYP2C19), paroxetine (4 μM) (CYP2D6). No obvious enzyme activities were reduced (< 10%) and the results therefore indicated that fruquintinib has no marked inhibitory effects against CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, and CYP2D6.		

CYP: cytochrome P450; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NI: No apparent time- dependent inhibition, no activity loss found during the study.

[a] Concentrations are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15G チトクロム P450（1A2、2C9、2D6 及び 3A4/5）に対する M9 及び M11 の時間依存的阻害（予試験、ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：M9、M11

Preliminary In Vitro Evaluation of Time-Dependent Inhibition of CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4/5 by M9 and M11 Using Pooled Human Liver Microsomes					添付資料番号：4.2.2.6-9	
					Study Number: DMPKR20[redacted]0026-E-01	
Test System:	Inhibitory effect of M9 and M11 on CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4/5 in pooled human liver microsomes					
Concentration in Test System:	10 μM M9 10 μM M11					
Substrates and Inhibitors:	Probe substrates: phenacetin (250 μM; CYP1A2), diclofenac (25 μM; CYP2C9), dextromethorphan (30 μM; CYP2D6), midazolam and testosterone (30 μM and 225 μM respectively; CYP3A4/5). Positive Inhibitors of CYP3A4/5: probenecid, erythromycin, verapamil and nefazodone					
Analytical Method:	LC-MS/MS					
CYP Isoform	Activity Loss (%)					
	Test Article (Concentration μM)					
	M9 (10)	M11 (10)	Probenecid (10)	Erythromycin (10)	Verapamil (10)	Nefazodone (10)
CYP1A2	4.07	NI	NC	NC	NC	NC
CYP2C9	2.91	5.61	NC	NC	NC	NC
CYP2D6	NI	0.448	NC	NC	NC	NC
CYP3A4/5 (Testosterone)	NI	1.81	NC	NC	NC	NC
CYP3A4/5 (Midazolam)	NI	6.57	NI	22.0	55.0	74.5
Additional Information: Samples were prepared in duplicate. M9 and M11 had no time-dependent inhibitory effects against all four CYP isoforms. The enzyme activity losses of CYP3A4/5 (Midazolam 1'-hydroxylation) after pre-incubation with probenecid (10 μM), erythromycin (10 μM), verapamil (10 μM), and nefazodone (10 μM) for 30 min were 0%, 22.0%, 55.0% and 74.5%, respectively, which were in accordance with the reported data. The enzyme activities of CYP1A2 (Phenacetin O-demethylation), CYP2C9 (Diclofenac 4'-hydroxylation), CYP2D6 (Dextromethorphan O demethylation), CYP3A4/5 (Midazolam 1'-hydroxylation) and CYP3A4/5 (Testosterone 6β-hydroxylation) were detected under pre-incubation with HM5024093 (10 μM) or HM5025423 (10 μM) for 30 minutes. No activity losses for CYP2D6, CYP3A4/5 (Midazolam) and CYP3A4/5 (Testosterone) were observed after pre-incubation with HM5024093, and the activity losses for CYP1A2 and CYP2C9 were 4.07% and 2.91%, respectively. For M11, no activity loss for CYP1A2 was observed, and the activity losses for CYP2C9, CYP2D6, CYP3A4/5 (Testosterone) and CYP3A4/5 (Midazolam) were 5.61%, 0.448%, 1.81% and 6.57%, respectively.						

CYP: cytochrome P450; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; NC: not calculated; NI: no time dependent inhibition, activity loss ≤ 0%.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15H チトクロム P450 酵素（2B6、2C8 及び 2C19 に）対する M11 の時間依存的阻害（予試験、ヒト肝ミクロソーム）

被験物質：M11

Preliminary In Vitro Evaluation of Time-Dependent Inhibition of CYP2B6, CYP2C8 and, CYP2C19 by M11 Using Pooled Human Liver Microsomes				添付資料番号：4.2.2.6-10 Study Number: DMPKR20[redacted]0020-E-01
Test System:	Inhibitory effect of M11 on CYP2B6, CYP2C8 and CYP2C19 in pooled human liver microsomes			
Concentration in Test System:	10 μM M11			
Substrates and Inhibitors:	Substrates: Bupropion (450 μM; CYP2B6); Amodiaquine dihydrochloride dehydrate (15 μM; CYP2C8); S- mephenytoin (200 μM; CYP2C19) Positive Inhibitors: Ticlopidine (0.4 μM; CYP2B6); Phenelzine sulfate salt (200 μM; CYP2C8); Ticlopidine (4 μM; CYP2C19)			
Analytical Method:	LC-MS/MS			
CYP Isoform	Activity Loss (%)			
	Test Article (Concentration μM):			
	M11 (10)	Ticlopidine (0.4)	Ticlopidine (4)	Phenelzine sulfate salt (200)
CYP2B6	3.78	73.5	NA	NA
CYP2C8	NI	NA	NA	41.5
CYP2C19	NI	NA	36.6	NA
Additional Information: Samples were prepared in duplicate. The enzyme activities of CYP2B6, CYP2C8, and CYP2C19 were detected under pre-incubation with HMPL-013-M11 (10 μM) for 30 minutes. M11 (10 μM) showed no obvious time-dependent inhibitory effects against all three tested CYP450 isoforms (CYP2B6, CYP2C8, and CYP2C19) with the activity losses less than 10%.				

CYP: cytochrome P450; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; NA: not applicable; NI: no time dependent inhibition, activity loss ≤ 0%.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15l フルキンチニブの薬物トランスポーターによる輸送（OATP1B1 及び OATP1B3）

被験物質：フルキンチニブ

Evaluation of Fruquintinib as a Potential Substrate of Human OATP1B1 and OATP1B3 Transporters			添付資料番号：4.2.2.6-16 Study Number: 400253-20[redacted]032601-OATP1B1, OATP1B3U
Test System:	HEK293 cells Probe substrates: Estrone-3-sulfate (20 μM; OATP1B1) and β-Estradiol 17-(β-D-glucuronide) (5 μM; OATP1B3). Positive inhibitors: Cyclosporin A (10 μM; OATP1B1) and Ritonavir (10 μM; OATP1B3). Human transporter-specific substrates were used to study the potential of fruquintinib to be a possible OATP1B1 and OATP1B3 substrate using an uptake assay, triplicate samples. Protein content was determined using a BCA Protein Assay Kit.		
Concentration in Test System:	0.20 μM, 2.00 μM, 20.0 μM fruquintinib [a]		
Analytical Method:	LC-MS/MS		
Cell line	Concentration of Fruquintinib (μM)	Uptake Fold	Rs/Ri
HEK293-OATP1B1	0.20	1.07	0.732
	2.00	1.01	0.964
	20.0	1.22	0.485
HEK293-OATP1B3	0.20	1.42	0.769
	2.00	1.42	0.809
	20.0	1.23	0.568
Additional Information: Results represent mean values of samples run in triplicate. The uptake fold and Rs/Ri 20 μM estrone-3-sulfate were 25.4 and 10.4 respectively and for 5.00 μM β-Estradiol-17-(β-D-glucuronide) were 15.2 and 2.67, respectively. Results indicated that fruquintinib was not a substrate of OATP1B1 or OATP1B3 in vitro.			

HEK293: human embryonic kidney 293; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; OATP: organic anion transporting polypeptide Rs/Ri: ratio of transport activity between individual transporter cells without inhibitor and individual transporter cells with inhibitor.

[a] Concentrations are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15J フルキンチニブによる薬物トランスポーターの阻害（Caco-2 細胞、P-gp）

被験物質：フルキンチニブ

Using Caco-2 cell monolayer to evaluate the inhibition potential of fruquintinib on P-glycoprotein	添付資料番号：4.2.2.6-11
	Study Number: DMPKR20[redacted]0077-E-01

Test System:	A P-gp-specific substrate, digoxin, was used to study the potential of fruquintinib to inhibit bidirectional P-gp transport in Caco-2 cells; triplicate samples.
Concentration in Test System:	Up to 20 μM fruquintinib; Substrate: 5 μM digoxin; 60-minute incubations
Analytical Method:	LC-MS/MS for detection of digoxin

Substrate Concentration (μM)	Inhibitor Concentration (μM) [a]	Mean P_{app}, A→B (10^{-6} cm/s)	Mean P_{app}, B→A (10^{-6} cm/s)	Efflux Ratio	Percentage of Inhibition (%)
5	0.1 μM fruquintinib	1.17	29.4	25.3	26.0
	0.5 μM fruquintinib	1.18	33.4	28.3	15.6
	1 μM fruquintinib	1.41	33.8	24.0	15.2
	2 μM fruquintinib	1.57	27.3	17.3	32.7
	5 μM fruquintinib	2.68	22.5	8.42	48.1
	10 μM fruquintinib	4.08	16.6	4.07	67.2
	15 μM fruquintinib	4.67	15.1	3.24	72.6
	20 μM fruquintinib	5.14	12.3	2.39	81.4
	1 μM LY335979 (low permeability positive control)	5.18	7.02	1.36	95.2
	10 μM Ko143 (high permeability positive control)	1.70	30.1	17.7	25.8

Additional Information: The mean recoveries of bidirectional transports of all groups were between 95.1% and 109% in this experiment, suggesting that the results obtained were reliable. Fruquintinib inhibits the transport of digoxin across Caco-2 monolayers in a concentration-dependent manner; the IC_{50} of fruquintinib against P-gp was 4.60 μM. In conclusion, fruquintinib was shown to have the potential to inhibit P-gp in vitro.

A: apical; B: basolateral; Caco-2: human colorectal adenocarcinoma; IC_{50}: concentration achieving 50% inhibition; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; P_{app}: apparent permeability coefficient; P-gp: P-glycoprotein.

[a] Concentrations are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15K M9 及び M11 による薬物トランスポーターの阻害（Caco-2 細胞、P-gp）

被験物質：M9、M11

Evaluation of the Inhibitory Potential of M9 and M11 on P-glycoprotein Using Caco-2 Cell Monolayer	添付資料番号：4.2.2.6-13
	Study Number: DMPKR20[redacted]0021-E-01
Test System:	M9 or M11 was added to either the apical (A) or basolateral (B) side to test its effect on digoxin bidirectional transport across a human Caco-2 cell monolayer. Samples were collected from both sides after 60 minutes preincubation with M9 or M11 and 60 minutes with M9 or M11 and digoxin, and concentrations were determined by LC-MS/MS; triplicate samples.
Concentration in Test System:	Up to 20 μM for both M9 and M11 Substrate: 5 μM digoxin
Analytical Method:	LC-MS/MS

Substrate Digoxin Concentration (μM)	Test Compound	Concentration (μM)	Mean P_{app}, A→B (10^{-6} cm/s) (n = 3)	Mean P_{app}, B→A (10^{-6} cm/s) (n = 3)	Efflux Ratio B→A/ A→B	Percentage of Inhibition (%)
5	GF120918	1	4.38	4.59	1.05	99.0
	Ko143	50	2.87	16.0	5.59	33.8
	LY335979	1	4.33	4.43	1.02	99.5
	M9	5	1.02	21.8	21.4	-4.68
		10	0.923	20.3	22.0	2.37
		20	0.954	18.1	19.0	13.7
	M11	1	1.13	20.9	18.5	0.569
		5	2.37	16.4	6.91	29.5
		10	2.54	14.7	5.79	38.8
		20	2.27	13.7	6.04	42.6

Additional Information: The mean recoveries of both direction transports of all the control groups were between 88.8 and 111% in this experiment, suggesting that the results obtained were reliable. M9 (5 to 20 μM) did not inhibit or only slightly inhibited the transport of digoxin across Caco-2 monolayers. M11 (1 to 20 μM) demonstrated weak inhibition against the transport of digoxin across Caco-2 monolayer (maximum inhibition was less than 50%).

GF120918: strong P-gp inhibitor; IC_{50}: concentration achieving 50% inhibition. Ko143: negative or weak P-gp inhibitor; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; LY335979: specific and strong P-gp inhibitor; M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; Papp: apparent permeability coefficient; P-gp: P-glycoprotein.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15L フルキンチニブによる薬物トランスポーターの阻害（Caco-2 細胞、BCRP）

被験物質：フルキンチニブ

Using Caco-2 cell monolayer to evaluate the inhibition potential of fruquintinib on breast cancer resistance protein				添付資料番号：4.2.2.6-14 Study Number: DMPKR20[redacted]0080-E-01	
Test System:	A BCRP-specific substrate, E3S, was used to study the potential of fruquintinib to inhibit bidirectional BCRP transport in Caco-2 cells; triplicate samples.				
Concentration in Test System:	Up to 20 μM fruquintinib Substrate: 2.5 μM E3S 60-minute incubations				
Analytical Method:	LC-MS/MS				
Substrate Concentration (μM)	Inhibitor Concentration (μM) [a]	Mean P_{app}, A→B (10^{-6} cm/s)	Mean P_{app}, B→A (10^{-6} cm/s)	Efflux Ratio	Percentage of Inhibition (%)
2.5	0.1 μM fruquintinib	2.91	66.0	22.7	25.0
	0.5 μM fruquintinib	4.26	67.6	15.9	24.7
	1 μM fruquintinib	4.52	57.0	12.6	37.7
	2 μM fruquintinib	6.00	37.9	6.31	62.1
	4 μM fruquintinib	6.20	28.1	4.53	73.9
	8 μM fruquintinib	7.81	17.1	2.20	88.9
	12 μM fruquintinib	6.68	11.4	1.70	94.4
	16 μM fruquintinib	6.66	9.43	1.42	96.7
	20 μM fruquintinib	6.77	8.79	1.30	97.6
	1 μM LY335979 (negative or weak BCRP inhibitor)	3.04	86.1	28.3	1.32
	1 μM Ko143 (specific or strong BCRP inhibitor)	10.1	12.7	1.26	96.9
Additional Information: The mean recoveries of bidirectional transports of all groups were between 67.6% and 109% in this experiment, suggesting that the results obtained were reliable. Fruquintinib inhibited the transport of E3S across Caco-2 monolayers in a concentration-dependent manner; the IC_{50} of fruquintinib against BCRP was 1.29 μM. In conclusion, fruquintinib was shown to have the potential to inhibit BCRP in vitro.					

A: apical; B: basolateral; BCRP: breast cancer resistance protein; Caco-2: human colorectal adenocarcinoma; E3S: estrone-3-sulfate; IC_{50}: concentration achieving 50% inhibition; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; Papp: apparent permeability coefficient.

[a] Concentrations are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15M M9 及び M11 による薬物トランスポーターの阻害（Caco-2 細胞、BCRP）

被験物質：M9、M11

Evaluation of the Inhibition Potential of M9 and M11 on Breast Cancer Resistance Protein Using Caco-2 Cell Monolayer	添付資料番号：4.2.2.6-15
	Study Number: DMPKR20[redacted]0027-E-01
Test System:	A BCRP-specific substrate, E3S, was used to study the potential of M9 and M11 to inhibit bidirectional BCRP transport in Caco-2 cells; triplicate samples. Atenolol and metoprolol were used as controls of low and high permeability, respectively. Ko143 and GF120918 were used as controls of BCRP inhibition.
Concentration in Test System:	Up to 60 µM M9; up to 20 µM M11; Substrate: 2.5 µM E3S; 60-minute incubations
Analytical Method:	LC-MS/MS

Substrate E3S Concentration (µM)	Inhibitor or Tested Compound	Inhibitor Concentration (µM)	Mean P_{app}, A→B (10^{-6} cm/s)	Mean P_{app}, B→A (10^{-6} cm/s)	Efflux Ratio	Percentage of Inhibition (%)
2.5	GF120918	5	6.68	10.9	1.64	92.3
	Ko143	1	6.59	11.3	1.71	91.5
	M9	0.1	2.23	60.7	27.3	-5.88
		0.5	2.12	73.0	34.4	-28.4
		1	2.51	70.6	28.2	-23.4
		2	3.10	54.0	17.4	7.78
		5	3.52	32.8	9.32	47.0
		10	3.84	28.6	7.46	55.1
		20	4.50	16.2	3.60	78.8
		40	5.84	8.52	1.46	95.1
		60	9.11	7.19	0.789	103
2.5	GF120918	5	5.03	10.5	2.09	92.0
	Ko143	1	4.91	8.15	1.66	95.2
	M11	0.1	1.96	55.8	28.5	21.1
		0.5	2.24	44.6	19.9	38.0
		1	2.49	43.1	17.3	40.4
		2	3.45	29.9	8.69	61.2
		4	4.60	19.9	4.32	77.6
		8	4.51	14.3	3.17	85.6
		12	4.41	11.3	2.55	90.0
		16	5.28	9.56	1.81	93.7
		20	5.81	8.93	1.54	95.4

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15M M9 及び M11 による薬物トランスポーターの阻害（Caco-2 細胞、BCRP）

被験物質：M9、M11

Additional Information: Two separate experiments were conducted – one with M9 and one with M11, hence there are two sets of results for the controls GF120918 and Ko143. M9 (0.1 to 60 µM) and M11 (0.1 to 20 µM) stably inhibited the transport of E3S across Caco-2 monolayers. The IC_{50}s for BCRP inhibition of M9 and M11 were 7.60 µM and 1.03 µM, respectively. In conclusion, M9 and M11 showed to have potential to inhibit BCRP in vitro.

BCRP: breast cancer resistance protein; E3S: estrone-3-sulfate; GF120918: Elacridar, a BCRP inhibitor control; IC_{50}: concentration achieving 50% inhibition; Ko143: BCRP inhibitor; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; P_{app}: apparent permeability coefficient.

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15N フルキンチニブによる薬物トランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）の阻害

被験物質：フルキンチニブ

Evaluation of the Inhibitory Potential of Fruquintinib on Human OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1 and MATE2-K Transporters	添付資料番号：4.2.2.6-12 Study Number: 400253-20[redacted]032601-OATP1B1, OATP1B3U, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1, MATE2-KI

Test System:	HEK293 cells over-expressing human OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2, MATE1, and MATE2-K, triplicate samples. Probe substrates: The probe substrate for OATP1B1 was estrone-3-sulfate (20 nM), for OATP1B3 was β- estradiol17-(β-D-glucuronide) (5 μM), for OAT1 was p-aminohippurate (3 μM), for OAT3 was estrone-3-sulfate (1 μM), for OCT2 was metformin (100 μM), and for MATE1 and MATE2-K was metformin (20 μM). Positive control inhibitors: The positive control inhibitor for OATP1B1 was cyclosporin A (up to3 μM) and for OATP1B3 was ritonavir (up to 20 μM) for OAT1 and OAT3 was probenecid (up to 50 μM), for OCT2 was verapamil (up to 100 μM), for MATE1 and MATE2-K was pyrimethamine (up to 1 μM).
Concentration in Test System:	Up to 20.0 μM fruquintinib [a]
Analytical Method:	LC-MS/MS

Cell line	Substrate	Concentration of Fruquintinib (μM)	Percent of VC (%)
HEK293-OATP1B1	20.0 nM Estrone-3-sulfate	0.156	102
		0.313	96.1
		0.625	100
		1.25	103
		2.50	107
		5.00	103
		10.0	108
		20.0	109
HEK293-OATP1B3	5.00 μM β-Estradiol 17-(β-D- glucuronide)	0.156	100
		0.313	118
		0.625	102
		1.25	89.2
		2.50	99.3
		5.00	106
		10.0	102
		20.0	102

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15N フルキンチニブによる薬物トランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）の阻害（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Cell line	Substrate	Concentration of Fruquintinib (μM)	Percent of VC (%)
HEK293-OAT1	3.00 μM p-aminohippurate	0.156	99.6
		0.313	95.4
		0.625	105
		1.25	98.7
		2.50	112
		5.00	100
		10.0	92.2
		20.0	99.1
HEK293-OAT3	1.00 μM Estrone-3-sulfate	0.156	90.5
		0.313	103
		0.625	99.7
		1.25	103
		2.50	101
		5.00	121
		10.0	109
		20.0	113
HEK293-OCT2	100 μM Metformin	0.156	76.5
		0.313	88.0
		0.625	90.8
		1.25	91.5
		2.50	91.7
		5.00	85.8
		10.0	93.9
		20.0	79.6

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15N フルキンチニブによる薬物トランスポーター（OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2、MATE1 及び MATE2-K）の阻害（続き）

被験物質：フルキンチニブ

Cell line	Substrate	Concentration of Fruquintinib (μM)	Percent of VC (%)
HEK293-MATE1	20 μM Metformin	0.156	89.6
		0.313	94.3
		0.625	94.5
		1.25	85.5
		2.50	81.9
		5.00	71.2
		10.0	65.0
		20.0	58.6
HEK293-MATE2-K	20 μM Metformin	0.156	90.3
		0.313	91.6
		0.625	89.6
		1.25	89.9
		2.50	91.0
		5.00	76.7
		10.0	76.4
		20.0	76.7
Additional Information: The IC_{50} values for all transporters were greater than 20.0 μM in vitro.			

HEK293: human embryonic kidney 293; IC_{50}: concentration achieving 50% inhibition; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry; OATP: organic anion transporting polypeptide; VC: vehicle control.

[a] Concentrations are in terms of the parent compound, fruquintinib (free base).

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15O M11 による薬物トランスポーター（OAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K）の阻害

被験物質：M11

In vitro Evaluation of HM5025423 as an Inhibitor of OAT1, OAT3, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1 and MATE2-K			添付資料番号：4.2.2.6-17 Study Number ADME-HJHP-[redacted]0908-SLC Inhibition
Test System:	SLC over-expressing HEK293 cells		
Concentration in Test System:	M11 0.01 to 10 μM		
Substrates and Inhibitors:	Substrates: 4-aminohippuric acid (10 μM; OAT1), estrone-3-sulfate (10 μM; OAT3), metformin (100 μM; OCT2), β-estradiol 17-(β-D-glucuronide) (5 μM; OATP1B1), β-estradiol 17-(β-D-glucuronide) (10 μM; OATP1B3), tetraethylammonium (30 μM; MATE1 and MATE2-K). Inhibitors: probenecid (0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30 and 100 μM; OAT1 and OAT3); verapamil (0.3, 1, 3, 10, 30, 100 and 300 μM; OCT2), rifampicin (0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3 and 10 μM; OATP1B1 and OATP1B3), pyrimethamine (0.001, 0.003, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3 and 1 μM; MATE1 and MATE2-K). Negative control: propranolol (5 μM)		
Analytical Method	UPLC-MS/MS		
SLC Transporter	Compound	IC_{50} (μM)	Percentage inhibition (%)
OAT1	M11	NI	NA
	Probenecid	4.81	NA
	Propranolol	NA	1.36
OAT3	M11	NI	NA
	Probenecid	11.0	NA
	Propranolol	NA	-2.16
OCT2	M11	NI	NA
	Verapamil	15.9	NA
	Propranolol	NA	-7.80
OATP1B1	M11	> 10.0	NA
	Rifampicin	0.523	NA
	Propranolol	NA	-1.86
OATP1B3	M11	> 10.0	NA
	Rifampicin	0.441	NA
	Propranolol	NA	-7.95
MATE1	M11	> 10.0	NA
	Pyrimethamine	0.0142	NA
	Propranolol	NA	4.67

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

2.6.5.15O M11 による薬物トランスポーター（OAT1、OAT3、OCT2、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K）の阻害（続き）

被験物質：M11

SLC Transporter	Compound	IC_{50} (μM)	Percentage inhibition (%)
MATE2-K	M11	> 10.0	NA
	Pyrimethamine	0.0191	NA
	Propranolol	NA	-8.25
Additional Information: The samples were prepared in triplicate. M11 was an inhibitor of OATP1B1, OATP1B3, MATE1 and MATE2-K. The percentages of inhibition at 10 μM were 32.0%, 32.3%, 28.7%, and 36.7%, respectively, indicating that the IC_{50} values were all higher than 10 μM. M11 had no inhibitory effects on OAT1, OAT3, and OCT2 over the test concentration range of 0.01 to 10 μM. The percentages of inhibition at 10 μM were 8.83%, 11.6%, and 15.8%, respectively.			

HEK293: uman embryonic kidney 293; LC-MS/MS: liquid chromatography with tandem mass spectrometry M9: metabolite of fruquintinib, also known as HM5024093 or M380; M11: metabolite of fruquintinib, also known as HM5025423 or M379-3; NA: not applicable; NI: no inhibition SLC: solute carrier; UPLC-MS/MS: Ultra-performance Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometric Detection.

2.6.5.16 薬物動態試験：その他

その他の薬物動態試験は実施していない。