ボラシデニブ　クエン酸水和物

医薬品製造販売承認申請書添付資料

第２部（モジュール２）

2.6.4　薬物動態試験の概要文

日本セルヴィエ株式会社

目次

1.　まとめ....8

2.　分析法....13
2.1　放射性標識体を用いた生体試料中薬物濃度分析法....13
2.2　放射性標識体を用いない生体試料中薬物濃度分析法....13

3.　吸収及び薬物動態....15
3.1　*In vitro* での吸収....15
3.1.1　Caco-2 細胞の *in vitro* での双方向透過性の評価....15
3.2　単回投与の薬物動態....15
3.2.1　静脈内投与及び経口投与....15
3.2.1.1　マウス....15
3.2.1.2　ラット....17
3.2.1.3　イヌ....18
3.2.1.4　カニクイザル....19
3.2.2　経口投与....20
3.2.2.1　カニクイザル....20
3.3　反復投与の薬物動態....22
3.3.1　経口投与....22
3.3.1.1　ラット....22
3.3.1.2　カニクイザル....23

4.　分布....24
4.1　脳内移行....24
4.1.1　雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ（50 mg/kg 又は 150 mg/kg）を経口投与したときの脳内移行試験....25
4.1.2　雄の Sprague-Dawley ラットにボラシデニブを単回経口投与又は 1 日 1 回反復経口投与したときの脳及び CSF へのボラシデニブの移行....26
4.2　赤血球分配....28
4.3　血漿タンパク、脳組織及び IDH1 発現細胞ライセートとの結合....28

5.　代謝....31
5.1　代謝安定性....31
5.1.1　ヒト、サル、イヌ、マウス及びラットの肝ミクロソームを用いたボラシデニブの代謝安定性の評価....31
5.1.2　ヒト、サル、イヌ及びラット肝細胞を用いたボラシデニブの代謝安定性の評価....31
5.2　代謝経路....32
5.2.1　*In vitro* 代謝....32
5.2.2　*In vivo* 代謝....34

6.　排泄....38
6.1　ボラシデニブの尿中排泄....38
6.2　雄の Sprague-Dawley ラットにボラシデニブ（1 mg/kg）を単回静脈内投与したときの胆汁排泄試験....38
6.3　ラットを用いたボラシデニブのマスバランス試験....39

7.　薬物動態学的薬物相互作用....39
7.1　酵素反応表現型....39
7.2　*In vitro* でのヒト肝ミクロソームを用いたチトクロム P450 酵素の阻害薬としてのボラシデニブの評価....39

7.3　*In vitro* での培養ヒト肝細胞を用いたチトクロム P450 発現誘導薬としてのボラシデニブの評価.....40
7.4　*In vitro* での培養ヒト肝細胞を用いた自己誘導薬としてのボラシデニブの評価.....45
7.5　*In vitro* での排出及び取込みトランスポーターの基質及び阻害薬としてのボラシデニブの評価.....45
7.6　*In vitro* でのヒト肝ミクロソームを用いた UGT1A1 阻害薬としてのボラシデニブの評価....46
8.　考察及び結論.....46
9.　参考文献一覧.....48

表一覧

表 1:1　マウス、ラット、イヌ及びサルにおけるボラシデニブの薬物動態パラメータ.....9
表 4:1　マウス、ラット及びサルで観察されたボラシデニブの脳／血漿中濃度比.....24
表 4:2 ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスにおけるボラシデニブ平均非結合型分率（%）.....28
表 4:3：ボラシデニブ及び AGI-69460 のヒト血漿タンパク質、ヒト血清アルブミン、α-1 酸性糖タンパク質に対する非結合画分.....30
表 5:1　マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト肝細胞を用いた *in vitro* でのボラシデニブの生体内変換.....32
表 5:2　マウス、ラット及びサル血漿中のボラシデニブの *in vivo* での生体内変換.....35
表 5:3　Day 7 投与後の雄の Sprague-Dawley ラット及び雄のカニクイザルにおける平均血漿中薬物動態パラメータの要約.....37
表 7:1　推定されるボラシデニブの IC_{50}.....40
表 7:2　マーカー基質の活性及び mRNA 量に基づくボラシデニブの CYP 酵素誘導 E_{max} 及び EC_{50}（平均 ± SD）.....42
表 7:3　マーカー基質の活性及び mRNA 量に基づくボラシデニブの CYP 酵素誘導 E_{max} 及び EC_{50}（平均 ± SD）.....43
表 7:4　AGI-69460 を介した CYP 酵素誘導における mRNA 量に基づいた E_{max} 及び EC_{50}（平均値）.....44

図一覧

図 2:1　ボラシデニブ、[^{14}C]ボラシデニブ及び AGI-69460 の構造 13
図 3:1　雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブのフリー体を静脈内投与又はボラシデニブ [redacted] を PO 投与したときのボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）-時間推移 16
図 3:2　雄の Sprague-Dawley ラットにボラシデニブを静脈内又は経口投与したときのボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）-時間推移 17
図 3:3　雄ビーグル犬にボラシデニブを静脈内又は経口投与したときのボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）-時間推移 18
図 3:4　雄カニクイザルにボラシデニブを静脈内又は経口投与したときの血漿中の平均ボラシデニブ濃度（±SD）-時間推移 19
図 3:5　雄カニクイザル（1 群 4 匹）にボラシデニブ錠剤又は懸濁液を経口投与したときのボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）- 時間推移 21
図 4:1　雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブを 50 mg/kg 又は 150 mg/kg の用量で経口投与したときのボラシデニブの平均血漿中及び脳中濃度 - 時間プロット 25
図 4:2　Sprague-Dawley ラット（N=3）にボラシデニブを 50 mg/kg の用量で単回 PO 投与したときの平均血漿、脳及び CSF 中のボラシデニブ濃度（±SD）- 時間推移 26
図 5:1　マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝細胞で生成されるボラシデニブ代謝物の推定構造 33
図 5:2　ラット肝細胞における *in vitro* での[^{14}C]ボラシデニブの代謝経路（案） 34
図 5:3　ラットにおける[^{14}C]ボラシデニブの推定肝代謝経路 36
図 6:1　雄の Sprague-Dawley ラット（3 匹）に 1 mg/kg の用量で IV 投与したときの胆汁中における未変化体（ボラシデニブ）の平均累積排泄率（±SD）（投与量に対する%） 38

略語・略号一覧

略語・略号	省略していない表現（英語）	省略していない表現（日本語）
B-RAM	B-radioactivity monitoring	β放射能モニタリング
ADME	Absorption, distribution, metabolism, and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
AUC	Area under the concentration ×time curve	濃度−時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}xxhr}$	Area under the concentration ×time curve from time 0 to xx hours	0 時間から xx 時間までの濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}\infty}$	Area under the concentration ×time curve from time 0 to infinity	0 時間から無限時間までの濃度-時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
BCS	Biopharmaceutics Classification System	生物薬剤学分類システム
BID	Twice daily	1 日 2 回
BSEP	Bile salts export pump	胆汁酸塩排出ポンプ
CL	Clearance	クリアランス
CL_{hep}	Hepatic clearance	肝クリアランス
CL_{int}	Intrinsic clearance	固有クリアランス
CL_p	Total body plasma clearance	全身血漿クリアランス
C_{max}	Maximum observed plasma concentration	最高血漿中濃度
CSF	Cerebrospinal fluid	脳脊髄液
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
DDI	Drug-drug interaction	薬物相互作用
$EAUC_{97(0\text{-}12hr)}$	Vorasidenib area under the concentration versus time curve from 0 to 12 hours required to achieve 97% of maximum drug-induced effect	薬剤による最大作用の 97%の達成に必要な 0 時間から 12 時間までのボラシデニブ濃度-時間曲線下面積
$EAUC_{97(0\text{-}24hr)}$	Vorasidenib area under the concentration versus time curve from 0 to 24 hours required to achieve 97% of maximum drug-induced effect	薬剤による最大作用の 97%の達成に必要な 0 時間から 24 時間までのボラシデニブ濃度-時間曲線下面積
EC_{50}	Concentration of drug that achieved half maximal effect	50%有効濃度
E_{max}	Maximum drug-induced effect	薬剤による最大作用
F	Oral bioavailability	経口バイオアベイラビリティ
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
GD	Gestation day	妊娠日数
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
GSH	Glutathione	グルタチオン
IC_{50}	Concentration of drug that achieved half maximal inhibition	50%阻害濃度
IV	Intravenous	静脈内
$K_{RBC/PL}$	Red blood cell partitioning coefficient	赤血球分配係数
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LC-UV-MS	Liquid chromatography with ultraviolet and mass spectrometry	紫外線検出及び質量分析を組み合わせた液体クロマトグラフィー
LSC	Liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数
MATE	Multidrug and toxic extrusion protein	多剤・毒性排出タンパク質
MC	Methylcellulose	メチルセルロース

mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRT	Mean residence time	平均滞留時間
MS	Mass spectrometry	質量分析法
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
P_{app}	Apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
P-gp	P-glycoprotein	P-糖タンパク質
PK	Pharmacokinetic	薬物動態
PK/PD	Pharmacokinetic/pharmacodynamic	薬物動態／薬力学
PO	*Per Os* (Orally)	経口
QD	Once daily	1 日 1 回
QWBA	Quantitative Whole-Body Autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
RBC	Red blood cells	赤血球
SD	Standard deviation	標準偏差
$t_{½}$	Terminal half-life	終末相半減期
T_{max}	Time to maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TK	Toxicokinetic	トキシコキネティクス
UGT	Uridine diphosphate-glucuronosyltransferase	ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
UGT1A1	Uridine 5′-diphospho-glucuronosyltransferase 1A1	ウリジン 5′-二リン酸グルクロン酸転移酵素 1A1
UV	ultraviolet	紫外線
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積
V_z	Volume of distribution at terminal phase	終末相の分布容積

1.　まとめ

ボラシデニブ［一般名：ボラシデニブクエン酸水和物、治験成分記号：S095032、AG-881 又は AGI-23088 の薬物動態（PK）プロファイルを *in vitro* 及び *in vivo* 試験により評価した。BALB/c マウス、Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬及びカニクイザルを用いて、吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）試験を実施した。ADME、薬物相互作用（DDI）の可能性及び他の特性を評価する *in vitro* 試験も実施した。

すべての動物種にボラシデニブフリー体を静脈内（IV）投与し、ラット及びイヌには経口懸濁液として、マウス及びサルには[redacted]（[redacted]）として経口投与した。さらに、カニクイザルを用いて、ヒト初回投与試験で使用される製剤であるクエン酸水和物の錠剤を用いる試験を実施し、絶食下及び摂餌下での投与がボラシデニブの PK に及ぼす影響を評価した。これらの動物種における PK パラメータを表 1:1 に要約する。

ボラシデニブの PK は、マウス、ラット、サルでの低い全身血漿クリアランス（CLp）及びイヌでの高い CLp、並びにマウス、ラット、イヌ及びサルにおける定常状態での高い分布容積により特徴付けられる。IV 投与後のボラシデニブの平均消失半減期（$t_{½}$）は、イヌでの 6.4 時間からサルでの 24 時間である。ボラシデニブは Caco-2 細胞で認められる *in vitro* での高い透過性と一致して、速やかな経口吸収を受ける。経口バイオアベイラビリティの範囲は 6.42%（フリー体、イヌ）～109%（[redacted]、サル）であった。サルで推定される 100%を超える高いバイオアベイラビリティは、サルで観察された終末相半減期が長いことによると考えられ、0 時間から無限時間までの濃度-時間曲線下面積（$AUC_{0-\infty}$）の正確な算出ができなかった可能性が高い。ボラシデニブは人工胃液（pH 1.2、60 分）及び人工腸液（pH 6.5、180 分）で安定であり、Caco-2 細胞の一方向及び双方向の高い透過性を考慮すると、Biopharmaceutics Classification System（BCS）のクラス II に属する。

ラット及びサルを用いた反復投与試験では、ボラシデニブの曝露量に顕著な性差は認められなかった。トキシコキネティクス（TK）試験において 7 日間、28 日間及び 13 週間にわたり反復投与したとき、ボラシデニブの蓄積率は試験期間を通してラットで 2.7～8.5 倍、サルで 1.5～5.0 倍の範囲であった。医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）に準拠したラットの 13 週間 TK 試験では、最終投与（Day 91）後のボラシデニブの曝露量は、5 mg/kg/day 及び 15 mg/kg/day では用量に比例して増加したが、50 mg/kg/day での増加は用量比を下回った。サルを用いた 13 週間の GLP 準拠 TK 試験では、最終投与（Day 91）後のボラシデニブの曝露量は、2 mg/kg/day 及び 6 mg/kg/day の用量では用量比例性を示したが、20 mg/kg/day の用量では用量比を上回った。

ボラシデニブクエン酸水和物（初期の臨床試験で使用した処方）の 100 mg/kg 経口錠剤をサルに投与したとき、血漿中ボラシデニブ曝露量は、絶食下よりも摂餌後の方が高かった（$AUC_{0-\infty}$で 2.0 倍増加）。

表 1:1　　マウス、ラット、イヌ及びサルにおけるボラシデニブの薬物動態パラメータ

Species (Gender)	Dose (mg/kg) (Formulation)	Route	CL_p (L/hr/kg)	V_{ss} (L/kg)	$t_{½}$ (hr)	C_{max} (ng/mL)	T_{max} (hr)	$AUC_{0-\infty}$ (hr•ng/mL)	F (%)	Report Number
Mouse (Female)	0.3	IV	0.407	7.58	17	NA	NA	737	NA	AG881-N-023-R1 [NP41880]
	1	IV	0.404	7.91	16	NA	NA	2480	NA	
	0.3 ([redacted])	PO	NA	NA	9.4	28.7	0.50	255	34.6	
	1 ([redacted])	PO	NA	NA	13	122	0.50	1230	51.7	
Rat (Male)	1	IV	0.289	8.27	21	NA	NA	1970 [a]	NA	AG881-N-026-R1 [NP41882]
	10 (free base, partly crystalline)	PO	NA	NA	ND	545	8.0	10600 [a]	53.8	
Dog (Male)	1	IV	1.85	13.7	6.4	632	0.17	547	NA	AG881-N-029-R1 [NP41883]
	10 (free base, crystalline)	PO	NA	NA	16	56.1	0.67	351	6.42	
Monkey (Male)	0.3	IV	0.506	12.3	24	216	0.197	625	NA	AG881-N-030-R1 [NP41884]
	0.5 ([redacted])	PO	NA	NA	31	130	1.4	1140	109	
Monkey (Male)	5 mg tablet (citrate salt), fasted	PO	NA	NA	17	152	2.8	2740	73.1	AG881-N-049-R1 [NP41885]
	25 mg tablet (citrate salt), fasted	PO	NA	NA	18	143	11	4580	26.5	
	100 mg tablet (citrate salt), fasted	PO	NA	NA	22	477	8.5	20900	31.0	
	100 mg tablet (citrate salt), fed	PO	NA	NA	18	1230	8.0	41700	57.0	
	100 mg suspension of citrate salt, fasted	PO	NA	NA	27	915	7.0	46700	63.5	

Abbreviations: CL_p = total body plasma clearance, C_{max} = maximum observed plasma concentration; F = oral bioavailability; IV = intravenous; NA = not applicable; ND = not determined; PO = orally; [redacted] = [redacted]; $t_{½}$ = terminal half-life; T_{max} = time to maximum plasma concentration; V_{ss} = volume of distribution at steady state

[a] AUC_{0-24hr}

ボラシデニブは、ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスの血漿において高いタンパク結合率（>94%）を示し、0.2～10 μM の範囲では、結合率に明らかな動物の種差又は非線形性はみられなかった。ボラシデニブは、ヒト血清アルブミンに対して濃度非依存的にα-1 酸性糖タンパク質よりも優先的に結合することが示された（4.3 項）。ボラシデニブは主として血漿中に留まり、ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスの血液中での赤血球移行性は低かった（RBC：$K_{RBC/PL}$ <0.6、血液／血漿中濃度比：0.87）（4.2 項）。

ボラシデニブのヒト血液中で主要代謝物であり、薬理活性を有する AGI-69460 は、ヒト血漿中においても高いタンパク結合率（87%以上）を示し、α-1 酸性糖タンパク質よりもヒト血清アルブミンに優先的に結合した（4.3 項）。ヒト血液中では、AGI-69460 は血漿よりも赤血球に多く分配された（$K_{RBC/PL}$：2.17、血液／血漿中濃度比：1.38）（4.2 項）。

ラットの脳組織では、ボラシデニブ（結合率 99%超）及び AGI-69460（結合率 96%超）の両方で高い組織結合が認められた。

ボラシデニブは脳透過性を示し、脳／血漿中濃度比は、AUC に基づき腫瘍のないマウスで 0.624～0.720、脳腫瘍のあるマウスで 0.950～1.96、ラットで 1.11～1.48、及び最終投与後から 24 時間での濃度からサルで 1.25～3.01 であった。雄ラットに[^{14}C]ボラシデニブを単回経口（PO）投与したときの組織分布試験から、薬剤による放射能は速やかに吸収されて組織に分布し、体内から緩やかに消失することが示された。放射能の眼球血管膜などのメラニン含有組織への放射能の大幅な分布は認められず、[^{14}C]ボラシデニブに起因する放射能はメラニンに結合しないことが示された。

非臨床試験の動物種では、代謝がボラシデニブの主な消失経路である。ラットの胆汁中並びにラット、イヌ及びサルの尿中へのボラシデニブ（未変化体）の排泄はわずかであった。ラット、イヌ、サル及びヒト由来の肝ミクロソーム及び肝細胞を用いたボラシデニブの代謝回転率は低かった（5.1.1 項及び 5.1.2 項）。

無処置ラットに[^{14}C]ボラシデニブを単回経口投与したとき、未変化体がすべての時点で血漿中に認められた唯一の放射能ピークであり、放射能検出器付き液体クロマトグラフィーにより代謝物は検出されなかった【AG881-N-050】。胆管カニューレラットでは、投与後 96 時間以内の平均累積回収率は 84.3%であり、放射能の 61.0%が胆汁中、21.4%が糞中、1.77%が尿中で回収された。胆汁中の代謝物は、酸化、*N*-脱アルキル化、及び／又はグルタチオン（GSH）、システイン、グリシン若しくはグルクロン酸との抱合又はこれらの経路の組合わせによるものであった。胆汁中の未変化体は少量にすぎず、ボラシデニブがラットでは主に代謝により消失することが示唆される。

In vitro 代謝試験ではボラシデニブの代謝は低く、肝ミクロソームとの培養実験では代謝物は検出されなかった。ボラシデニブの代謝物プロファイルを培養肝細胞を用いて評価した【AG881-N-007】。代謝は、水酸化された後、グルクロン酸抱合又はクロロピリジン環の脱塩素後の GSH 若しくはシステイン抱合（又は GSH 若しくはシステイン抱合により引き起こされるクロロピリジン環の脱塩素）のいずれかで構成された。水酸化、グルクロン酸抱合及び GSH／システイン抱

合の組合わせが、二次代謝物として観察された。全体として、*in vitro* で検出されたヒトの代謝物はすべて、安全性試験に用いられた動物種で *in vitro* 又は *in vivo* のいずれかで観察された。

AGI-69460 は、ボラシデニブのデスクロロメチルスルホン代謝物であり、代謝の後期に形成される循環血中の主な下流の代謝物に相当する。単回経口投与したときのヒト ADME 試験において最初に特定され、さらに AG881-C-004 臨床試験において定常状態の曝露量から確認された。AGI-69460 は薬理学的に活性の代謝物であるが、細胞アッセイでボラシデニブほど強力ではない【2.6.2】。AGI-69460 は、先の *in vitro* 代謝試験又はラット及びサルを用いた *in vivo* 試験で単回静脈内又は経口投与したときの血漿、胆汁及び排泄物中では同定には至らなかった。ボラシデニブをそれぞれ 30 mg/kg/day 及び 20 mg/kg/day の用量で 7 日間反復経口投与したとき、ラット及びサル双方の血漿及び肝臓で AGI-69460 への曝露が確認された。

また、AGI-69460 への曝露は、ラット及びウサギ胚胎児発生毒性試験においても確認された。

CYP 選択的化学阻害剤の存在下でのボラシデニブと遺伝子組換えチトクロム P450（CYP450）酵素及びヒト肝細胞を用いた代謝から、CYP1A2 がボラシデニブの代謝を担う主要な酵素であり、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び／又は CYP3A4/5 の寄与はほとんどないことが示された。また、CYP 以外の酵素がボラシデニブの代謝に最大 30%寄与し、デスクロロ GSH 抱合及び他の下流の代謝が生じる可能性がある。

AGI-69460 の CYP 酵素による潜在的な代謝は、CYP 酵素を発現させた肝細胞を用いた代謝実験により、AGI-69640 は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 に対して安定であることが分かった。

ボラシデニブは、臨床で確認された濃度では CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の直接の阻害作用は確認されなかった。ボラシデニブは、検討したいずれの CYP 酵素において時間又は代謝依存性阻害の可能性をほとんどあるいは全く示さない。ヒト肝ミクロソームでは、ボラシデニブはウリジン 5′-二リン酸グルクロン酸転移酵素 1A1（UGT1A1）に対して 50%阻害濃度（IC_{50}）である 8.0 μM に到達した薬物濃度で 17β-エストラジオールの抱合を阻害した。臨床で確認された濃度では、UGT1A1 の阻害に介在されるボラシデニブによる薬物相互作用（DDI）は生じないと見込まれる。

AGI-69460 は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4/5 の直接的あるいは時間依存的な阻害薬ではない。

ボラシデニブは、*in vitro* で CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4/5 及びウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素（UGT）1A4 の誘導薬であると見込まれる。ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験では、ボラシデニブ代謝の自己誘導は認められなかった。

AGI-69460 は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4/5 を誘導薬である。AGI-69460 による CYP2C19 の誘導については結論に至っていない。臨床で確認された濃度では、AGI-69460 は CYP1A2 の有意な誘導を引き起こすことはないと予想されるため、CYP1A2 誘導によるボラシデニブの PK 又は DDI への影響は生じないと見込まれる。

ボラシデニブは、P 糖タンパク質（P-gp）、乳癌耐性タンパク質（BCRP）、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1 又は OATP1B3 の基質ではない。

ボラシデニブは P-gp の阻害薬ではないが、BCRP の阻害薬である（IC_{50} は 1.22 μM）。ボラシデニブは、BCRP 基質の腸管吸収の増加を引き起こす可能性がある。ボラシデニブは、7.5 μM（検討した最高濃度）までの濃度で、胆汁酸塩排出ポンプ（BSEP）、多剤耐性関連タンパク質（MRP）2、MRP3、OATP1B1、OATP1B3、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3 及び有機カチオントランスポーター（OCT）2 の 50%を上回る阻害を示さなかった。ボラシデニブは、25 μM（検討した最高濃度）までの濃度で、多剤・毒性排出タンパク質（MATE）1 及び 2-K タンパク質の 50%を上回る阻害を示さなかった。

AGI-69460 は、P-gp、BCRP、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではない。AGI-69460 は BCRP 及び OATP1B3 の阻害薬であり、IC_{50} 値はそれぞれ 5.84 μM と 2.97 μM である。AGI-69460 は P-gp、OATP1B1、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 及び OCT2 の阻害薬ではない。臨床で確認された濃度では、ボラシデニブによる BCRP 及び OATP1B3 基質の取込みの阻害に介在される DDI は生じないと見込まれる。

2.　分析法

2.1　放射性標識体を用いた生体試料中薬物濃度分析法

[^{14}C]ボラシデニブを用いて *in vitro* 及び *in vivo* 試験を実施した。[^{14}C]の位置を図 2:1 に示す。

放射性標識した吸収、組織分布、代謝及び排泄試験において、投与剤及び生体マトリックス（血漿及び排泄物）中の総放射能の濃度を液体シンチレーション計数（LSC）により直接又は $^{14}CO_2$ へのサンプル燃焼法を用いて測定し、組織中の総放射能濃度は定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）により測定した。*In vitro* サンプルはいずれも総放射能を LSC により分析した。

代謝物のプロファイルについては、*in vitro* 及び *in vivo* 試験の処理済みのサンプルをインライン紫外線（UV）及び β 放射線モニタリング（β-RAM）フロー検出器並びにタンデム質量分析計付きの高圧液体クロマトグラフィー（液体クロマトグラフィータンデム質量分析：LC-MS/MS）により分析した。

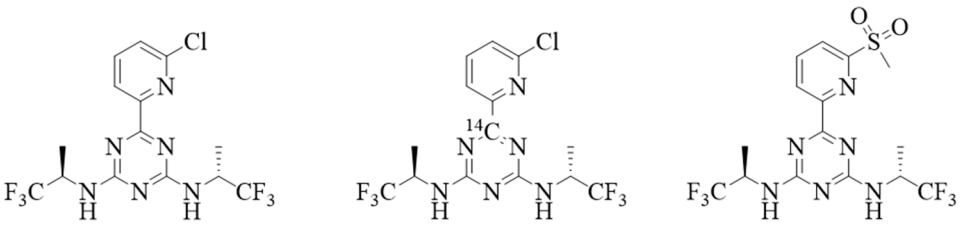


図 2:1　ボラシデニブ、[^{14}C]ボラシデニブ及び AGI-69460 の構造

2.2　放射性標識体を用いない生体試料中薬物濃度分析法

ラット及びサル TK 試験（GLP）の血漿試料の分析では、ラット及びサルの血漿を用いたボラシデニブの定量法として高感度かつ選択的な LC-MS/MS 法として【AG881-Q-004-R1】及び【AG881-Q-003-R1】をそれぞれ設定し、現行の米国食品医薬品局（FDA）のガイダンス「Bioanalytical Method Validation（生体試料中薬物濃度分析法バリデーション）」[1)]及び「医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン」[2)]に従ってバリデートした。バリデートした方法の定量下限は 25 µL サンプルで 5.0 ng/mL であった。ボラシデニブはラット及びサルの血漿サンプル中で、−20°C で保存した場合は 112 日間以上、−80°C で保存した場合は 198 日間安定であった。また、上述の FDA、PMDA のガイダンス/ガイドラインに従い、胚胎児発生毒性試験のラット及びウサギ血漿におけるボラシデニブ及びその代謝物 AGI-69460 を定量する生体試料中薬物濃度分析法も設定し、それぞれバリデートした【PB-22-95032-002-DRVA】及び【PB-22-95032-003-DLVA】。ラット及びウサギ両方の血漿（10 µL サンプル）における定量下限は、ボラシデニブで 100 ng/mL、AGI-69460 で 0.5 ng/mL であった。−70°C で保存

したとき、AGI-69460 はラット血漿中で 78 日間以上安定であり、ウサギ血漿中で 80 日間安定であった。

マウス、ラット、イヌ及びサルを用いた非 GLP の PK 試験並びに *in vitro* 試験のサンプルアッセイは、バリデートされていない LC-MS/MS 法を用いて分析を実施した。分析法の詳細は各 ADME 報告書に記載する。

3.　吸収及び薬物動態

3.1　*In vitro* での吸収

3.1.1　Caco-2 細胞の *in vitro* での双方向透過性の評価

一方向及び双方向 Caco-2 透過性アッセイをボラシデニブ 1 μM の濃度で実施した【PB-22-095032-007-DHAB】。一方向 Caco-2 透過性アッセイでは、ボラシデニブの見かけの透過係数（P_{app}）は併用投与した膜透過性の高い標準品であるミノキシジルよりも高かった。また、双方向 Caco-2 透過性アッセイでは、Caco-2 細胞単層中のボラシデニブの P_{app} は、A-B 方向（頂端側から側底側）で [redacted] cm/sec、B-A 方向（側底側から頂端側）で [redacted] cm/sec であり、efflux ratio は 0.955 であった。これらの結果は、過去に実施されたボラシデニブ 10 μM 濃度での双方向 Caco-2 透過性アッセイと一致した【AG881-N-048-R1】。したがって、BCS に従い、ボラシデニブは BCS クラス II（濃度依存性のない透過性の高い薬物）に分類することができる。

人工胃液及び人工腸液を用いた安定性評価【PB-22-095032-007-DHAB】では、ボラシデニブは、人工胃液（pH 1.2）で 60 分間以上、人工腸液（pH 6.5）で 180 分間以上安定であることが示された。

3.2　単回投与の薬物動態

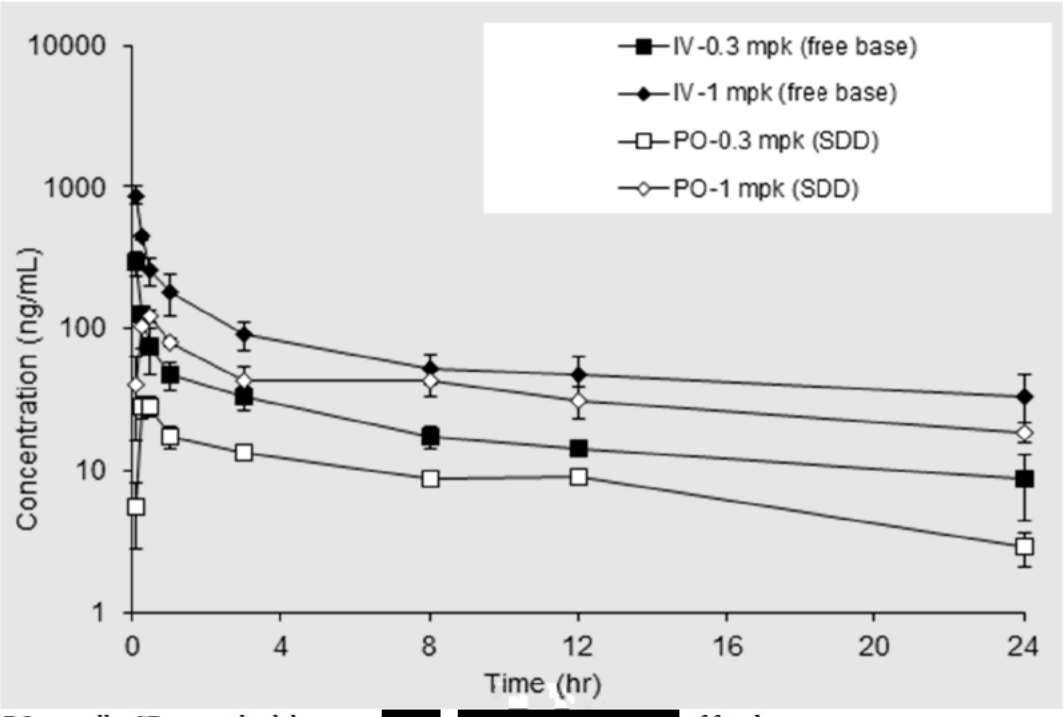
3.2.1　静脈内投与及び経口投与

特に記載がない限り、すべての投与量、濃度及び PK パラメータはフリー体（ボラシデニブ）として表す。経口投与試験では、すべての動物を投与前日の夜から投与後 4 時間まで絶食させた。

3.2.1.1　マウス

雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブのフリー体（0.3 mg/kg 又は 1 mg/kg）を単回静脈内投与したとき、又はボラシデニブ [redacted]（0.3 mg/kg 又は 1 mg/kg）を経口投与したときのボラシデニブの薬物動態及び経口バイオアベイラビリティ

雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブを単回静脈内投与（0.3 mg/kg 又は 1 mg/kg）又は強制経口投与（0.3 mg/kg 又は 1 mg/kg）したときのボラシデニブの PK 及び経口バイオアベイラビリティを検討した【AG881-N-023-R1】。ボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）の推移プロファイルを図 3:1 に示す。



PO = orally; SD = standard deviation; [redacted] = [redacted] of free base
Source: AG881-N-023-R1, Figure 1

図 3:1　雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブのフリー体を静脈内投与又はボラシデニブ [redacted] を PO 投与したときのボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）-時間推移

ボラシデニブのフリー体 0.3 mg/kg を静脈内投与したとき、マウス血漿中のボラシデニブ濃度の消失は一次速度式に従い、$t_{½}$は 17 時間であった。0 時間から 12 時間（$AUC_{0\text{-}12hr}$）、0 時間から 24 時間（$AUC_{0\text{-}24hr}$）及び 0 時間から無限時間（$AUC_{0\text{-}\infty}$）までの濃度-時間曲線下面積平均はそれぞれ 390 hr•ng/mL、527 hr•ng/mL 及び 737 hr•ng/mL であった。平均 CL、V_{ss}及び終末相の分布容積（V_z）は、それぞれ 0.407 L/hr/kg、7.58 L/kg 及び 9.73 L/kg と算出された。0 時間から無限時間までの平均滞留時間（MRT）は 19 時間であった。

ボラシデニブのフリー体 1 mg/kg を静脈内投与したとき、マウス血漿中のボラシデニブ濃度の消失は一次速度式に従い、$t_{½}$は 16 時間であった。平均 $AUC_{0\text{-}12hr}$、$AUC_{0\text{-}24hr}$、及び $AUC_{0\text{-}\infty}$は、それぞれ 1230 hr•ng/mL、1700 hr•ng/mL 及び 2480 hr•ng/mL であった。平均 CL、V_{ss}及びV_zは、それぞれ 0.404 L/hr/kg、7.91 L/kg 及び 9.30 L/kg であった。MRT は 20 時間であった。

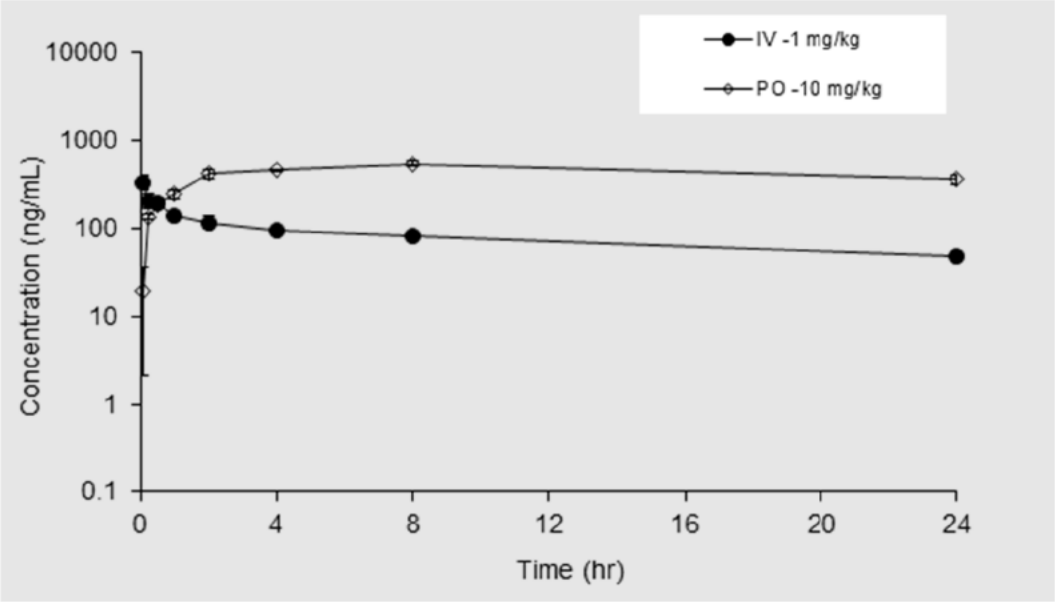
0.5%メチルセルロース（MC）及び 0.2% Tween 80 を水で懸濁したフリー体のボラシデニブ [redacted]（非晶質体）を 0.3 mg/kg で単回経口投与したとき、マウスで観察された最高血漿中濃度（C_{max} = 28.7 ng/mL）に投与後 0.50 時間の時点で到達した［最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）］。$t_{½}$は 9.4 時間であった。平均 $AUC_{0\text{-}12hr}$、$AUC_{0\text{-}24hr}$及び $AUC_{0\text{-}\infty}$は、それぞれ 144 hr•ng/mL、216 hr•ng/mL 及び 255 hr•ng/mL であった。雌マウスにおけるボラシデニブの経口バイオアベイラビリティは 34.6%であった。

ボラシデニブ[redacted]を 1 mg/kg で単回経口投与したとき、マウスで観察された C_{max}（122 ng/mL）に投与後 0.50 時間（T_{max}）で到達した。$t_{½}$は 13 時間であった。平均 AUC_{0-12hr}、AUC_{0-24h} 及び $AUC_{0-\infty}$は、それぞれ 583 hr•ng/mL、885 hr•ng/mL 及び 1230 hr•ng/mL であった。雌マウスにおけるボラシデニブの経口バイオアベイラビリティは 51.7%であった。1 mg/kg での単回経口投与は 0.3 mg/kg と比較して、C_{max} 及び AUC に用量比例を上回る増加が認められた。

3.2.1.2　ラット

雄の Sprague-Dawley ラットに単回静脈内投与（1 mg/kg）又は経口投与（10 mg/kg）したときのボラシデニブの薬物動態及び経口バイオアベイラビリティ

雄の Sprague-Dawley ラットにボラシデニブを単回静脈内投与（1 mg/kg）及び強制経口投与（10 mg/kg）したときのボラシデニブの PK 及び経口バイオアベイラビリティを検討した【AG881-N-026-R1】。静脈内投与及び経口投与の双方にボラシデニブフリー体（一部結晶体）を使用した。ボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）の推移プロファイルを図 3:2 に示す。



Source: Report AG881-N-026-R1, Figure 3

図 3:2　雄の Sprague-Dawley ラットにボラシデニブを静脈内又は経口投与したときのボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）-時間推移

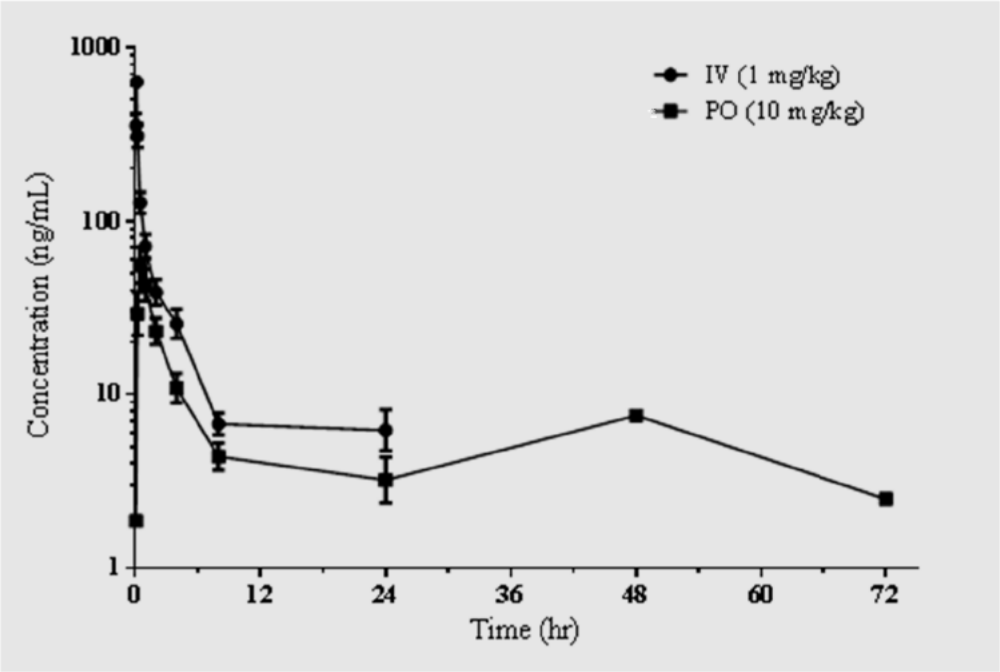
ラットにボラシデニブを 1 mg/kg で静脈内投与したとき、ラット血漿中のボラシデニブ濃度の消失は一次速度式に従い、$t_{½}$は 21 ± 4.2 時間であった。平均 AUC_{0-24hr} 及び $AUC_{0-\infty}$（±SD）は、それぞれ 1970 ± 35.8 hr•ng/mL 及び 3490 ± 389 hr•ng/mL であった。平均 CL、V_{ss} 及び V_z（±SD）は、それぞれ 0.289 ± 0.0303 L/hr/kg、8.27 ± 0.824 L/kg 及び 8.80 ± 0.719 L/kg と算出された。尿中に未変化体で回収されたボラシデニブはわずかであった（投与量の 0.00438%）。

ボラシデニブ（0.5% MC 及び 0.2% Tween 80 の懸濁液）を 10 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、ラットにおける平均 C_{max}（±SD）の 545 ± 44.5 ng/mL には投与後 8.0 ± 0.0 時間（T_{max}）で到達した。平均 $AUC_{0\text{-}24hr}$（±SD）は 10600 ± 438 hr•ng/mL であった。雄ラットにおける $AUC_{0\text{-}24hr}$ に基づく懸濁液中のボラシデニブフリー体の経口アベイラビリティは 53.8 ± 2.23%であった。

3.2.1.3　イヌ

雄ビーグル犬にボラシデニブを単回静脈内投与又は経口投与したときのボラシデニブの薬物動態

雄ビーグル犬にボラシデニブフリー体（結晶）を単回静脈内投与（1 mg/kg）及び強制経口投与（10 mg/kg）したときのボラシデニブの PK 及び経口バイオアベイラビリティを検討した【AG881-N-029-R1】。ボラシデニブフリー体は静脈内投与及び経口投与の双方に使用した。ボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）の推移プロファイルを図 3:3 に示す。



Source: Report AG881-N-029-R1, Figure 3

図 3:3　雄ビーグル犬にボラシデニブを静脈内又は経口投与したときのボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）-時間推移

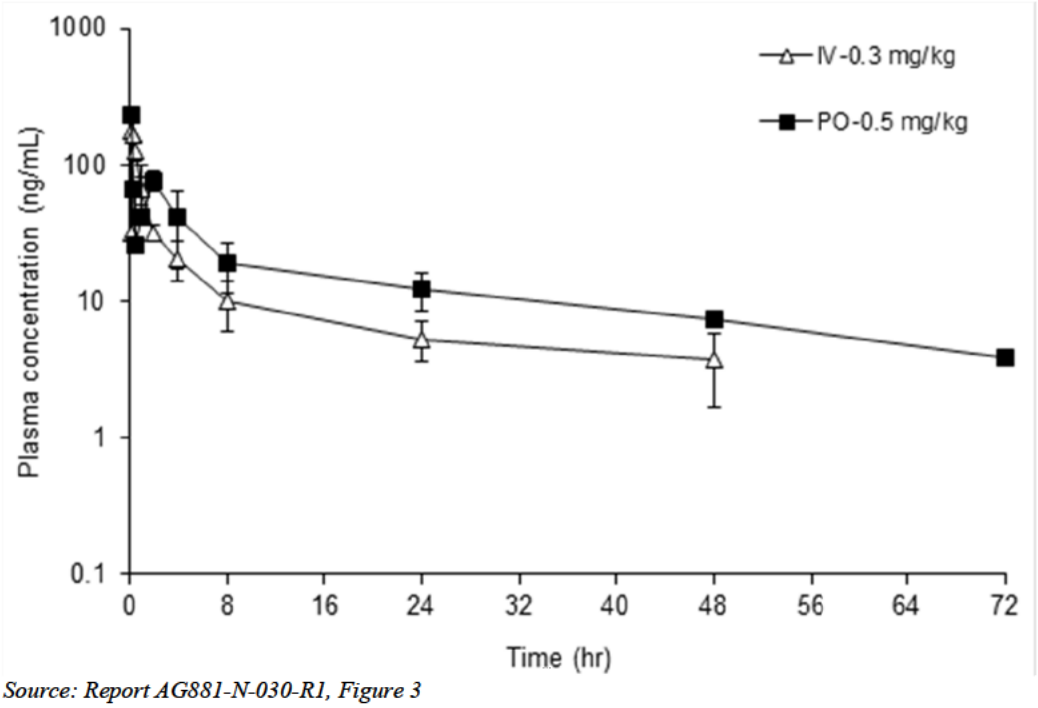
イヌにボラシデニブ（1 mg/kg）を 10 分かけて静脈内投与したとき、ボラシデニブの血漿中濃度の消失は一次速度式に従い、$t_{½}$は 6.4 ± 0.91 時間であった。平均 $AUC_{0\text{-}24hr}$ 及び $AUC_{0\text{-}\infty}$（±SD）は、それぞれ 488 ± 62.1 hr•ng/mL 及び 547 ± 81.9 hr•ng/mL であった。平均 CL、V_{ss} 及び V_z（±SD）は、それぞれ 1.85 ± 0.274 L/hr/kg、13.7 ± 2.18 L/kg 及び 16.8 ± 1.93 L/kg であった。ボラシデニブは尿中では回収されなかった。

0.5% MC 及び 0.2% Tween 80 で懸濁したボラシデニブを 10 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、イヌでの平均 C_{max}（±SD）（56.1 ± 14.3 ng/mL）に投与後 0.67 ± 0.29 時間（T_{max}）で到達した。平均 $t_{½}$（±SD）は 16 ± 11 時間であった。平均 $AUC_{0\text{-}72hr}$ 及び $AUC_{0\text{-}\infty}$（±SD）は、それぞれ 276 ± 135 hr•ng/mL 及び 351 ± 154 hr•ng/mL であった。1 mg/kg の静脈内投与及び 10 mg/kg、単回経口投与から得られた $AUC_{0\text{-}\infty}$に基づき、雄イヌにおけるボラシデニブの経口バイオアベイラビリティは 6.42 ± 2.82%と算出された。

3.2.1.4　カニクイザル

雄カニクイザルにボラシデニブのフリー体を単回静脈内投与又はボラシデニブ [redacted] を経口投与したときのボラシデニブの薬物動態

雄カニクイザルを用いて、ボラシデニブを単回静脈内投与（0.3 mg/kg）及び強制経口投与（0.5 mg/kg）したときのボラシデニブの PK 及び経口バイオアベイラビリティを検討した【AG881-N-030-R1】。IV 投与にはボラシデニブのフリー体を、経口投与には 0.5% MC と 0.2% Tween 80 で懸濁したフリー体（非晶質体）の [redacted] を使用した。血漿中の平均ボラシデニブ濃度（±SD）の推移プロファイルを図 3:4 に示す。



Source: Report AG881-N-030-R1, Figure 3

図 3:4　雄カニクイザルにボラシデニブを静脈内又は経口投与したときの血漿中の平均ボラシデニブ濃度（±SD）-時間推移

サルにボラシデニブフリー体（0.3 mg/kg）を 10 分間かけて静脈内投与したときの血漿中のボラシデニブ濃度は一次速度式に従って消失し、$t_{½}$は 24 ± 3.6 時間であった。平均 $AUC_{0\text{-}48hr}$ 及び

$AUC_{0-\infty}$（±SD）は、それぞれ 504 ± 134 hr•ng/mL 及び 625 ± 183 hr•ng/mL であった。平均 CL、V_{ss} 及び V_z（±SD）は、それぞれ 0.506 ± 0.137 L/hr/kg、12.3 ± 2.40 L/kg 及び 17.6 ± 6.38 L/kg であった。尿中で回収されたボラシデニブの量はわずか（投与量の 0.0183%）であった。

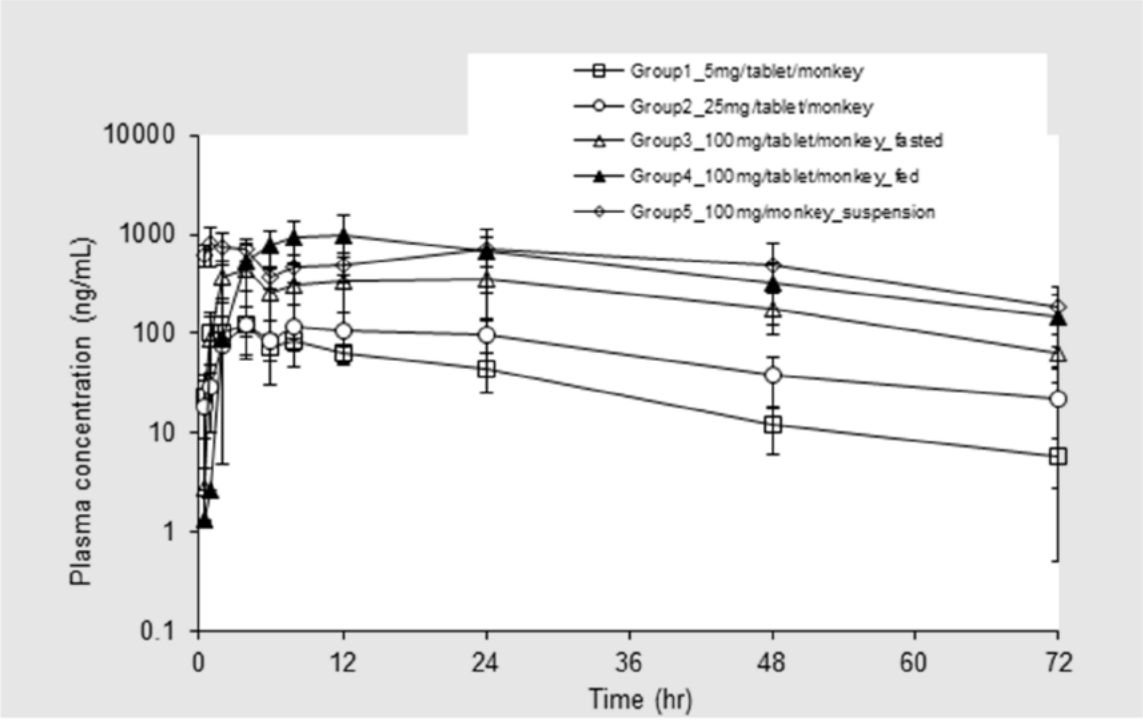
ボラシデニブ [redacted] を 0.5 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、サルでの平均 C_{max}（130 ± 87.9 ng/mL）は投与後 1.4 ± 1.1 時間（T_{max}）で到達した。平均 $t_{½}$（± SD）は 31 ± 7.5 時間であった。平均 AUC_{0-72h} 及び $AUC_{0-\infty}$（± SD）は、それぞれ 960 ± 194 hr•ng/mL 及び 1140 ± 170 hr•ng/mL であった。0.3 mg/kg の静脈内投与及び 0.5 mg/kg の経口投与から得られた $AUC_{0-\infty}$に基づき、雄サルにおけるボラシデニブの経口バイオアベイラビリティは 109 ± 16.3%と算出された。サルで推定されるバイオアベイラビリティが高い理由は、サルで観察された終末相消失半減期が長いため、正確な $AUC_{0-\infty}$の算出が出来なかった可能性が高い。

3.2.2　経口投与

3.2.2.1　カニクイザル

雄カニクイザルにボラシデニブクエン酸塩錠剤又は懸濁液を経口投与したときのボラシデニブの薬物動態

雄カニクイザルに、絶食下又は摂餌下で、ボラシデニブクエン酸水和物の錠剤 A（5 mg 錠）、B（25 mg 錠）、C（100 mg 錠）又はボラシデニブクエン酸水和物の懸濁液（100 mg/匹）を単回経口投与したときのボラシデニブクエン酸水和物の錠剤及び懸濁液の PK を検討した【AG881-N-049-R1】。平均血漿中濃度（±SD）-時間プロファイルを図 3:5 に示す。



Source: Report AG881-N-049-R1, Figure 6

図 3:5　雄カニクイザル（1 群 4 匹）にボラシデニブ錠剤又は懸濁液を経口投与したときのボラシデニブの平均血漿中濃度（±SD）- 時間推移

絶食下の雄サルにボラシデニブ錠 A（5 mg 錠）を単回経口投与したとき、平均ピーク血漿中濃度（C_{max} = 152 ± 57.2 ng/mL）に投与後 2.8 ± 1.5 時間（T_{max}）で到達した。平均 $t_{1/2}$ は 17 ± 5.0 時間であった。AUC_{0-t} 及び $AUC_{0-\infty}$は、それぞれ 2590 ± 416 hr•ng/mL 及び 2740 ± 466 hr•ng/mL と算出された。経口バイオアベイラビリティは、サルの静脈内投与試験から得た平均 $AUC_{0-\infty}$値に基づき、73.1%と算出された（3.2.1.4 項）【AG881-N-030-R1】。

絶食下の雄サルにボラシデニブ錠 B（25 mg 錠剤）を単回経口投与したとき、平均ピーク血漿中濃度（C_{max} = 143 ± 62.1 ng/mL）には投与後 11 ± 8.9 時間（T_{max}）で到達した。平均 $t_{1/2}$ は 18 ± 8.3 時間であった。AUC_{0-t} 及び $AUC_{0-\infty}$は、それぞれ 4720 ± 1310 hr•ng/mL（n=4）及び 4580 ± 822 hr•ng/mL（n=3）と算出された。経口バイオアベイラビリティは 26.5%であった。

絶食下の雄サルにボラシデニブ錠 C（100 mg 錠剤）を単回経口投与したとき、平均ピーク血漿中濃度（C_{max} = 477 ± 313 ng/mL）には投与後 8.5 ± 10 時間（T_{max}）で到達した。平均 $t_{1/2}$ は 22 ± 4.1 時間であった。AUC_{0-t} 及び $AUC_{0-\infty}$は、それぞれ 17100 ± 9870 hr•ng/mL 及び 20900 ± 12100 hr•ng/mL と算出された。経口バイオアベイラビリティは 31%であった。

摂餌下の雄サルにボラシデニブ錠 C（100 mg 錠剤）を単回 PO 投与したとき、平均ピーク血漿中濃度（C_{max} = 1230 ± 510 ng/mL）には投与後 8.0 ± 3.3 時間（T_{max}）で到達した。平均 $t_{1/2}$ は 18 ± 4.8 時間であった。AUC_{0-t} 及び $AUC_{0-\infty}$は、それぞれ 35200 ± 16500 hr•ng/mL 及び 41700 ± 19400 hr•ng/mL と算出された。経口バイオアベイラビリティは 57.0%であった。

絶食下の雄サルにボラシデニブ懸濁液を 1 匹あたり 100 mg の用量で単回 PO 投与したとき、平均ピーク血漿中濃度（C_{max} = 915 ± 272 ng/mL）に投与後 7.0 ± 11 時間（T_{max}）で到達した。平均

$t_{1/2}$ は 27 ± 6.3 時間であった。$AUC_{0\text{-}t}$ 及び $AUC_{0\text{-}\infty}$は、それぞれ 36100 ± 15600 hr•ng/mL 及び 46700 ± 25000 hr•ng/mL と算出された。経口バイオアベイラビリティは 63.5%であった。

錠剤 A（5 mg）、B（25 mg）及び C（100 mg）は、サルでボラシデニブの良好な吸収を示し、高用量では T_{max} が遅延した。曝露量（C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$）は用量の増加に伴い、用量比を下回って増加した。摂餌下のサル（第 4 群）は絶食下のサル（第 3 群）よりも平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ がそれぞれ 2.6 倍及び 2 倍高かった。懸濁液の投与を受けたサル（第 5 群）の平均 C_{max} 及び $AUC_{0\text{-}t}$ は、錠剤 C を投与したサル（第 3 群）よりも、それぞれ 1.9 倍及び 2.1 倍高かった。サルにおけるボラシデニブの血漿への曝露は摂餌下のほうが絶食下よりも高かった。

3.3　反復投与の薬物動態

3.3.1　経口投与

3.3.1.1　ラット

ラットを用いて実施した 7 日間【AG881-N-009-R1】【AG881-N-011-R1】【AG881-N-014-R1】、28 日間【AG881-N-012-R1】及び 13 週間【AG881-N-056】の反復投与試験の成績をそれぞれ【2.6.6_［3.1.1、3.1.4 及び 3.1.5］】に要約する。

雄ラットを用いた 1 日 2 回（BID）7 日間の反復投与 TK 試験【AG881-N-009-R1】では、0.1～1 mg/kg BID の用量では用量比をわずかに下回る増加が認められ、1 mg/kg 及び 5 mg/kg BID の用量では用量比をわずかに上回る増加が認められた。最終投与日後の雄ラットにおける 7 日間の BID 投与（0.1、1 及び 5 mg/kg/dose）後の蓄積比（AUC に基づき算出）はそれぞれ 5.12、4.05 及び 5.09 であった。

ラットを用いた 1 日 1 回（QD）7 日間の反復投与 TK 試験（AG881-N-014-R1）では、最終投与日後の $AUC_{0\text{-}24hr}$ に基づき、雌の曝露量が雄と比較して 1.82 倍高かった。$AUC_{0\text{-}24hr}$ の蓄積比は、30 mg/kg/day 及び 100 mg/kg/day の用量で、それぞれ 5.10（Day 7）及び 10.10（Day 6）であった。

ラットに 28 日間 QD 投与したとき、ボラシデニブにおおむね用量比例性が認められた【AG881-N-014-R1】。単回投与又は反復投与のいずれの投与でも PK に性差は認められなかった。3、10、30 及び 100 mg/kg/dose の用量で 1 日 1 回 28 日間投与したときの蓄積比（AUC に基づき算出）は、雌雄ラットを併せてそれぞれ 3.70、3.64、2.81 及び 4.41 であった。

13 週間反復投与毒性試験【AG881-N-056】において、雌雄ラットにボラシデニブを 5 mg/kg/day（低用量）、15 mg/kg/day（中用量）及び 50 mg/kg/day（高用量）で強制経口投与した。中用量群及び高用量群の雌ラットには、Day 1 に 12 mg/kg 及び 38 mg/kg で過少量投与した。投与前、投与後 1、2、4、8 及び 24 時間の時点で血漿を採取した。ボラシデニブの最高濃度到達時間は、Day 1 では投与後 1～8 時間、Day 91 では投与後 1～4 時間の範囲であり、雌では両日の評価時点及び雄では Day 1 のみで用量の増加に伴い遅延する傾向にあった。$AUC_{0\text{-}24hr}$ は、雄では Day 1 で 5 mg/kg 及び 50 mg/kg 間で用量の増加に伴い用量比例的に増加し、Day 91 では 5～50 mg/kg では用量比を下回った。雌では、Day 1 の 5 mg/kg 及び 12 mg/kg では用量比の増加を上回り、12～38 mg/kg 間ではほぼ用量に比例して増加した。Day 91 では、雌に対する用量の増加は、5 mg/kg と 15 mg/kg

の用量間ではほぼ用量に比例し、15 mg/kg と 50 mg/kg 間では用量比を下回った。投与 91 日後、ボラシデニブの曝露は雌雄とも Day 1 に比べて増加した。5、15 及び 50 mg/kg/day の用量での $AUC_{0\text{-}24hr}$ の蓄積比は、雄でそれぞれ 8.53、6.96 及び 5.19、雌でそれぞれ 6.52、4.95 及び 3.39 であった。用量で補正した $AUC_{0\text{-}24hr}$（$AUC_{(0\text{-}24\ hr)}$/Dose）が雄と比較して雌でわずかに高かった Day 1 の 15/12 mg/kg 及び 50/38 mg/kg を除き、曝露量は Day 1 と Day 91 の雌雄間で同程度であった（比はそれぞれ 1.49 及び 1.42）。

3.3.1.2　カニクイザル

サルを用いて実施した 7 日間【AG881-N-010-R1】、28 日間【AG881-N-013-R1】及び 13 週間【AG881-N-057】の反復投与試験の結果をそれぞれ【2.6.6_［3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3］】に要約する。

雄サルに 1、10、50、100 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 7 日間反復投与した TK 試験【AG881-N-010】では、最終投与日後のボラシデニブの $AUC_{0\text{-}24hour}$ から、1、10 mg/kg/day の用量間では用量比を下回る増加、10、50、100 mg/kg/day までの用量では、用量比を上回る増加が示された。ボラシデニブの蓄積比は、1、10、50 mg/kg/day の用量で、それぞれ 3、3.1、2.6 倍、100 mg/kg/day の用量で 5.0 倍であった。

雌雄サルに 3、10 及び 40 mg/kg/day の用量で 1 日 1 回 28 日間反復投与した TK 試験【AG881-N-013】では、ボラシデニブの PK に顕著な性差は認められなかった。最終投与後の蓄積比（AUC に基づき算出）は雌雄で同程度であり、（Day 28 に 3、10 及び 40 mg/kg の用量で）雌雄併せてそれぞれ 2.33、3.02 及び 1.73 であった。3 mg/kg/day 及び 10 mg/kg/day で 1 日 1 回投与したボラシデニブの $AUC_{0\text{-}24hour}$ 曝露量は、雄サルでは用量比に応じて増加し、雌サルでは用量比を上回って増加した。40 mg/kg/day の用量では、雌雄のサルとも用量比を下回って増加した。

13 週間反復投与毒性試験【AG881-N-057】において、雌雄のサルにボラシデニブを 2、6 及び 20 mg/kg/day の用量で強制経口投与した。予定された安楽死まで生存した動物の TK 評価から、Day 1 のボラシデニブのピーク濃度到達時間はおおむね投与後 1～2 時間の範囲であり、Day 91 では投与後 1～8 時間の範囲であった。$t_{1/2}$ は、Day 1 に 2 mg/kg/day で投与した雌サル 1 匹についてのみ報告され、10.3 時間と推定された。ボラシデニブの曝露（$AUC_{0\text{-}24hr)}$ は、Day 1 では用量比に応じて増加した。Day 91 には、2 mg/kg/day 及び 6 mg/kg/day の雌で用量比に応じた増加であったが、雌雄の曝露量の増加はおおむね用量比を上回った。20 mg/kg/day の用量で雌雄ともにボラシデニブの顕著な蓄積性が認められ、平均蓄積比はそれぞれ 4.89 及び 4.53 であった。Day 1 と Day 91 の雌雄間の曝露は同程度であり、雌／雄の比率は、C_{max} が 0.861～1.36、$AUC_{0\text{-}24hr}$ が 0.806～1.59 の範囲であった。規定通りの剖検時に採取した脳サンプルでは、ボラシデニブ濃度が Day 92 の剖検時点で 2 mg/kg/day の雌 1 匹を除くすべてのサルで定量可能であり、Day 120 では 2 mg/kg/day の雄 1 匹を除くいずれのサルでも定量限界未満であった。

4.　分布

4.1　脳内移行

ボラシデニブの脳内移行は、マウス、ラット及びサルを用いた評価を含めた複数の試験で評価した。マウスでは、脳透過性データは無処置（4.1.1 項）及び同所性 TS603 IDH1R132H 神経膠腫腫瘍を異種移植したマウス【2.6.2_2.4.3】から得た。ラットでは、脳透過性についての情報は、分布に特化した試験（4.1.2 項）及び毒性試験【2.6.6_[3.1.1、3.1.4 及び 3.1.5]】から取得した。サルにおける脳透過性は毒性試験でのみ評価した【2.6.6_[3.2.1、3.2.2 及び 3.2.3]】。

表 4:1 に詳述するとおり、いずれの動物種でも一貫して良好な脳透過性が認められた。

表 4:1　マウス、ラット及びサルで観察されたボラシデニブの脳／血漿中濃度比

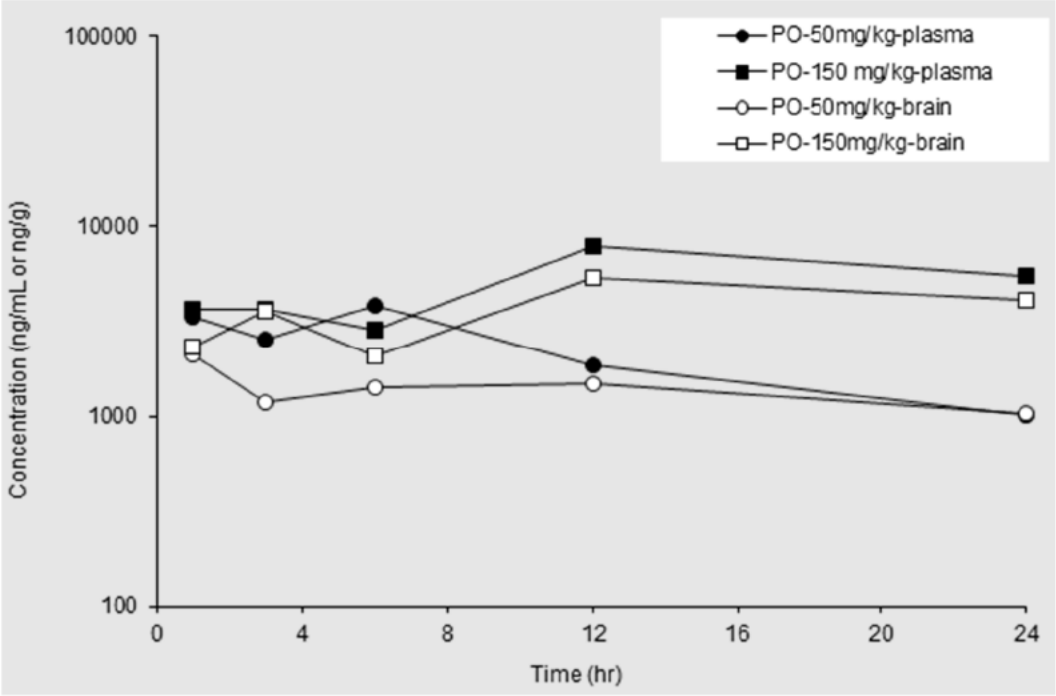
Species, Strain	Dose and Dosing Regimen	Range of Brain-to-Plasma Ratios (Method)[a]	Reference
Mouse, Balb/C	50, 150 mg/kg, single PO dose	0.624 to 0.720 (AUC)	Report AG881-N-022-R1 [NP41886]
Mouse, ICR SCID	0.03, 0.1, 0.3, 3, or 10 mg/kg, 3 PO (12 hr intervals) doses	0.95 to 1.96 (AUC)	Report AG881-N-046-R1 [NP41863]
Rat, SD	0.3, 3, or 50 mg/kg single dose	1.11 to 1.42 (AUC)	Report AG881-N-025-R1 [NP41889]
	0.3, 3, or 50 mg/kg multiple (QD for 5 days) doses	1.18 to 1.48 (AUC)	
Rat, SD	7 days of BID dosing (0.2 to 10 mg/kg)	1.36 to 2.40 (concentration at 24 hr after the last dose)	Report AG881-N-009-R1 [NP41947]
Rat, SD	7 days of BID dosing (30 and 100 mg/kg/day)	1.12 to 1.27 (concentration at 12 hr after the last dose)	Report AG881-N-011-R1 [NP41948]
Rat, SD	28 days of QD dosing (3, 10, 30 or 100 mg/kg/day)	0.935 to 1.13 (concentration at 24 hr after the last dose)	Report AG881-N-012-R1 [NP41973]
Rat, SD	13 weeks of QD dosing (male; 5, 15, 50 mg/kg/day; Female: 5, 12, 38 mg/kg/day)	0.431 to 1.12 (concentration at 24 hr after the last dose)	Report AG881-N-056 [NP41974]
Monkey, cynomolgus	7 days of 1, 10, 50, or 100 mg/kg QD dosing	1.63 to 3.01 (concentration at 24 hr after the last dose)	Report AG881-N-010-R1 [NP41977]
Monkey, cynomolgus	28 days of 3, 10, or 40 mg/kg QD dosing	1.25 to 2.43 (concentration at 24 hr after the last dose)	Report AG881-N-013-R1 [NP41976]
Monkey, cynomolgus	13 weeks of QD dosing (2, 6, 20 mg/kg/day)	0.711 to 2.12 (concentration at 24-hr after the last dose)	Report AG881-N-057 [NP41981]

AUC = area under the concentration × time curve; BID = twice daily; hr = hour; PO = orally; QD = once daily; SCID = severe combined immunodeficiency; SD = Sprague-Dawley

[a] *Data presented are the range of brain-to-plasma ratios across all doses evaluated within the study and do not necessarily reflect the range from the highest to lowest studied dose.*

4.1.1　雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ（50 mg/kg 又は 150 mg/kg）を経口投与したときの脳内移行試験

雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブ 50 mg/kg 及び 150 mg/kg を単回投与したときの脳内移行を検討した【AG881-N-022-R1】。血漿中及び脳中のボラシデニブ濃度-時間プロファイルを図 4:1 に示す。



Source: Report AG881-N-022-R1, Figure 1

図 4:1　雌 BALB/c ヌードマウスにボラシデニブを 50 mg/kg 又は 150 mg/kg の用量で経口投与したときのボラシデニブの平均血漿中及び脳中濃度 - 時間プロット

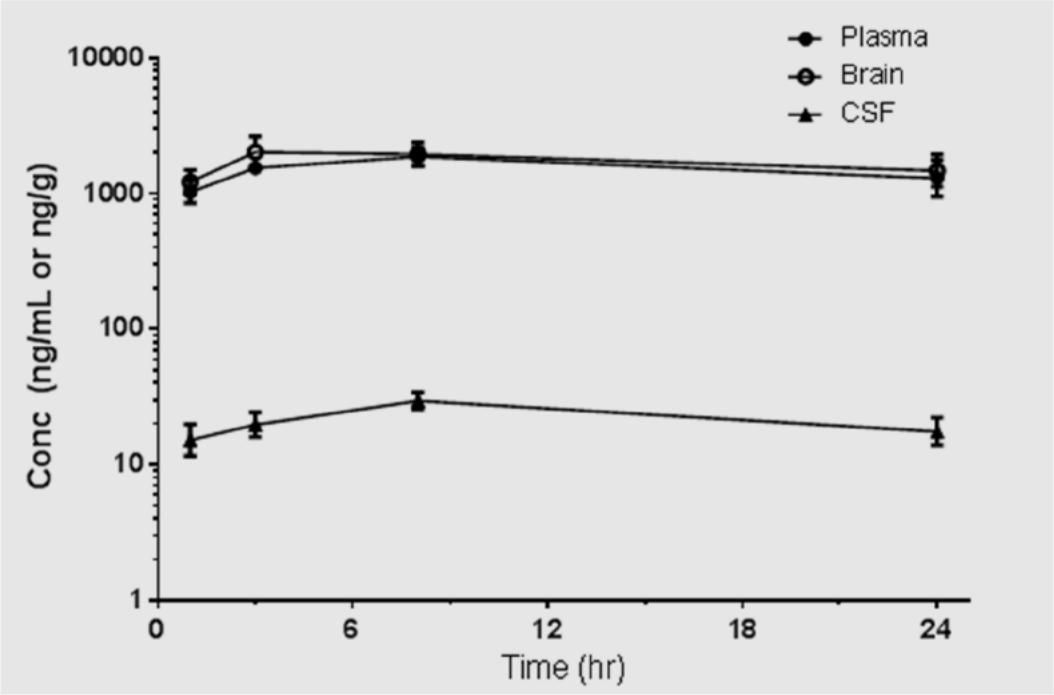
ボラシデニブを 50 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、血漿中及び脳中の C_{max} はそれぞれ 3860 ng/mL 及び 2130 ng/g であった。ボラシデニブの T_{max} は、血漿中及び脳中でそれぞれ投与後 6.0 時間及び 1.0 時間であった。血漿中及び脳中のボラシデニブの 0 時間から最終検体採取時点までの曲線下面積（$AUC_{0\text{-}24hr}$）は、それぞれ 51600 hr•ng/mL 及び 32200 hr•ng/g であり、ボラシデニブ $AUC_{0\text{-}24h}$ の脳／血漿比は 0.624 であった。

150 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、血漿中及び脳中のボラシデニブの C_{max} は、それぞれ 7940 ng/mL 及び 5400 ng/g であった。血漿中及び脳中の T_{max} は双方とも投与後 12 時間であった。血漿中及び脳中のボラシデニブの $AUC_{0\text{-}24hr}$ は、それぞれ 132000 hr•ng/mL 及び 95000 hr•ng/g であり、ボラシデニブ $AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿比は 0.720 であった。

結論として、ボラシデニブはマウスの脳に十分に移行した（$AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿比は、50 mg/kg の用量で 0.624、150 mg/kg の用量で 0.720 であった）。

4.1.2　雄の Sprague-Dawley ラットにボラシデニブを単回経口投与又は 1 日 1 回反復経口投与したときの脳及び CSF へのボラシデニブの移行

雄の Sprague-Dawley ラットにボラシデニブを 0.3 mg/kg、3 mg/kg 又は 50 mg/kg の用量で単回経口投与又は 1 日 1 回 5 日間反復経口投与したときのボラシデニブの脳内移行を検討した【AG881-N-025-R1】。あらかじめ規定された時点で、血漿、脳、脳脊髄液（CSF）を採取した。代表的な用量である 50 mg/kg での単回投与による血漿、脳及び CSF 中の平均ボラシデニブ濃度（±SD）-時間プロファイルを図 4:2 に示す。



Source: Report AG881-N-025-R1, Figure 3

図 4:2　Sprague-Dawley ラット（N=3）にボラシデニブを 50 mg/kg の用量で単回 PO 投与したときの平均血漿、脳及び CSF 中のボラシデニブ濃度（±SD）- 時間推移

ボラシデニブ（[redacted]）を 0.3 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、血漿中及び脳中のボラシデニブの C_{max} は、それぞれ 34.1 ng/mL 及び 40.8 ng/g であった。ボラシデニブの T_{max} は、血漿及び脳組織中とも投与から 1.0 時間後であった。ボラシデニブの血漿中及び脳中の $AUC_{0\text{-}24hr}$ はそれぞれ 412 hr•ng/mL 及び 584 hr•ng/g、$AUC_{0\text{-}\infty}$はそれぞれ 650 hr•ng/mL 及び 1400 hr•ng/g であった。ボラシデニブ $AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿比は 1.42 であった。0.3 mg/kg の用量での CSF 中のボラシデニブ値は定量下限（3 ng/mL）未満であった。

ボラシデニブを 3 mg/kg の用量で単回経口投与したとき、血漿、脳及び CSF 中のボラシデニブの C_{max} は、それぞれ 256 ng/mL、307 ng/g 及び 3.90 ng/mL であった。ボラシデニブの T_{max} は、血漿及び脳組織ともに投与後 3.0 時間であり、CSF では投与後 8.0 時間であった。血漿中、脳中及び CSF 中のボラシデニブの $AUC_{0\text{-}24hr}$ は、それぞれ 5030 hr•ng/mL、6490 hr•ng/g 及び 76.4 hr•ng/mL で

あった。ボラシデニブ $AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿及び CSF／血漿比は、それぞれ 1.29 及び 0.0152 であった。

ボラシデニブ 50 mg/kg を単回経口投与したときの血漿中、脳中及び CSF 中のボラシデニブの C_{max} は、それぞれ 1870 ng/mL、2020 ng/g 及び 29.6 ng/mL であった。ボラシデニブの T_{max} は、血漿及び CSF の双方で投与後 8.0 時間、脳組織では投与後 3.0 時間であった。ボラシデニブの血漿、脳及び CSF の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は、それぞれ 37000 hr•ng/mL、41200 hr•ng/g 及び 543 hr•ng/mL であった。ボラシデニブ $AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿及び CSF／血漿比は、それぞれ 1.11 及び 0.0147 であった。

ボラシデニブを 0.3 mg/kg の用量で 1 日 1 回 5 日間経口投与したとき、血漿中、脳中、及び CSF 中のボラシデニブの C_{max} は、それぞれ 7.7 ng/mL、120 ng/g 及び 1.83 ng/mL であった。ボラシデニブの T_{max} は、血漿では投与後 1.0 時間であり、脳組織及び CSF の双方では投与後 3.0 時間であった。ボラシデニブの血漿、脳及び CSF の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は、それぞれ 1610 hr•ng/mL、2380 hr•ng/g 及び 32.0 hr•ng/mL であり、血漿の $AUC_{0\text{-}\infty}$ は 6000 hr•ng/mL であった。ボラシデニブ $AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿及 CSF／血漿比は、それぞれ 1.48 及び 0.0199 であった。

ボラシデニブを 3 mg/kg の用量で 1 日 1 回 5 日間経口投与したとき、血漿中、脳中、及び CSF 中のボラシデニブの C_{max} は、それぞれ 904 ng/mL、1050 ng/g 及び 13.6 ng/mL であった。T_{max} は、血漿及び CSF ともボラシデニブの投与後 1.0 時間であり、脳組織では投与後 3.0 時間であった。ボラシデニブの血漿、脳及び CSF の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は、それぞれ 17000 hr•ng/mL、21200 hr•ng/g 及び 252 hr•ng/mL であった。血漿及び CSF の $AUC_{0\text{-}\infty}$ はそれぞれ 55600 hr•ng/mL 及び 810 hr•ng/mL であった。ボラシデニブ $AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿及び CSF／血漿比は、それぞれ 1.25 及び 0.0148 であった。

ボラシデニブを 50 mg/kg の用量で 1 日 1 回 5 日間経口投与したとき、血漿中、脳中、及び CSF 中のボラシデニブの C_{max} は、それぞれ 8350 ng/mL、10500 ng/g 及び 133 ng/mL であった。血漿、脳及び CSF でのボラシデニブの T_{max} は投与後 8.0 時間であった。ボラシデニブの血漿、脳及び CSF の $AUC_{0\text{-}24hr}$ は 167000 hr•ng/mL、197000 hr•ng/g 及び 2710 hr•ng/mL であった。ボラシデニブ $AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿及び CSF／血漿比は、それぞれ 1.18 及び 0.0162 であった。

単回投与又は反復投与のいずれの結果に基づいても、血漿及び脳中のボラシデニブの $AUC_{0\text{-}24hr}$ には、0.3 mg/kg 及び 3 mg/kg の経口投与用量間では用量比に応じた増加が認められ、3 mg/kg 及び 50 mg/kg の経口投与用量間では用量比を下回る増加が認められた。$AUC_{0\text{-}24hr}$ の脳／血漿比は 0.3～50 mg/kg で同様であった（単回投与群で 1.11～1.42、反復投与群で 1.18～1.48）。$AUC_{0\text{-}24hr}$ の CSF／血漿比は、単回投与では 0.015（3 mg/kg 及び 50 mg/kg のデータから算出）、反復投与では 0.015～0.02 であった。

結論として、ボラシデニブは、ラットにおいて良好な脳透過性を示した。CSF 中のボラシデニブ濃度は低く、*in vitro* で測定された血漿タンパクへの非結合分画にほぼ近かった（ラットでの遊離分画 0.035）（_Plasma_Protein_Binding4.3 項参照）。

4.2　赤血球分配

ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスの血液を用いて *in vitro* でボラシデニブの赤血球移行を検討した【AG881-N-036-R1】。

ボラシデニブの赤血球分配係数（$K_{RBC/PL}$）は、ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスでそれぞれ 0.23、0.15、0.13、0.22 及び 0.22 であった。全体として、ボラシデニブは主に血漿中に留まり、ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウス血中での赤血球への移行は小さかった（$K_{RBC/PL}$<0.5）。

確認試験では、ボラシデニブ（1 µM）と AGI-69460（0.1 µM、0.2 µM、0.4 µM）の両方について、赤血球分画係数（$K_{RBC/PL}$）と血液／血漿中濃度比が測定された。ボラシデニブの $K_{RBC/PL}$ はそれぞれ 0.59、0.99、1.20、0.95、0.53 であり、ヒト、サル、ウサギ、ラット、マウスの血液／血漿中濃度比はそれぞれ 0.87、0.99、1.09、0.97、0.81 であった【240001_6877】。ヒト血液中では、AGI-69460 は赤血球への濃度非依存的な分配を示し、平均 $K_{RBC/PL}$ 値は 2.17、血液／血漿中濃度比は 1.38 であった【240001_6878】。

4.3　血漿タンパク、脳組織及び IDH1 発現細胞ライセートとの結合

ボラシデニブのタンパク結合率をヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスの血漿を用いて、0.2 µM、1 µM 及び 10 µM の濃度で平衡透析法により測定した【AG881-N-037-R1】。各動物種の濃度ごとの平均非結合型分率（%）の結果を表 4:2 に示す。ボラシデニブの平均血漿タンパク結合率はいずれの動物種でも 94%を上回り、0.2～10 µM の範囲で顕著な動物種間差又は非線形性は認められなかった。

表 4:2　ヒト、サル、イヌ、ラット及びマウスにおけるボラシデニブ平均非結合型分率（%）

Test Concentration (µM)	Fraction Unbound %				
	Human	Monkey	Dog	Rat	Mouse
0.2	2.6	5.0	3.9	3.2	2.7
1	2.8	4.6	3.6	3.1	2.2
10	3.5	6.1	4.6	4.2	2.9
Mean ± SD	2.95 ± 0.452	5.26 ± 0.790	4.06 ± 0.486	3.49 ± 0.623	2.57 ± 0.371

Source: Report AG881-N-037-R1, Table 1 and Table 2

さらに追加評価【AG881-N-067】を実施し、ボラシデニブ及び AGI-69460（AG881-C-005 試験の臨床血漿検体から特定された代謝物）のヒト血漿タンパク結合率を測定した。血漿と緩衝液の濃度が平衡に達した後、ボラシデニブ及び AGI-69460 はヒト血漿中タンパクに高い結合率を示した。全体的な平均非結合型分率は、ボラシデニブで 2.66 ± 0.182%、AGI-69460 で 13.0 ± 1.07%であり、検討した範囲内の濃度に依存しなかった。

50 nM、300 nM 及び 3000 nM で実施された血漿タンパク結合試験では、ボラシデニブ及び AGI-69460 は、平均非結合率がそれぞれ 4.14%及び 16.5%で、濃度非依存的なタンパク結合を示した【240001_6916】。ボラシデニブ及び AGI-69460 は、α-1 酸性糖タンパク質よりもヒト血清アルブミンに対して優先的に結合し、濃度非依存的であることが示された（表 4:3）。

表 4:3：ボラシデニブ及び AGI-69460 のヒト血漿タンパク質、ヒト血清アルブミン、α-1 酸性糖タンパク質に対する非結合画分

Fraction unbound of vorasidenib and AGI-69460 to human plasma protein and its components				
Analyte	**Concentration (nM)**	**Human Plasma**	**HSA (40 g/L)**	**AAG (0.6 g/L)**
Vorasidenib	50	4.47	16.8	84.3
	300	3.98	14.7	73.3
	3000	3.98	14.3	76.4
	Mean (%fu)	4.14	15.3	78.0
AGI-69460	50	16.7	46.0	90.9
	300	17.0	40.3	93.4
	3000	15.9	37.8	94.6
	Mean (%fu)	16.5	41.4	93.0

HSA: human serum albumin; AAG: alpha-1 acid glycoprotein; fu: fraction unbound
Source:Report NP42869; Study 240001_6916, Table 9 through Table 14.

AGI-69460 の血漿タンパク結合の種間比較を 50 nM、300 nM 及び 3000 nM の濃度で実施したところ、血漿タンパク結合は濃度に依存せず、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、サル、ヒトにおける平均非結合率はそれぞれ 8.84%、11.6%、13.7%、19.1%、25.4%、16.9%であった【240001_6907】。また、ラット（50 nM～60000 nM）、ウサギ（50 nM～6000 nM）、サル（50 nM～30000 nM）において、ボラシデニブの血漿タンパク結合率も再確認され、濃度に依存しないことが示された。ラット、ウサギ、サルにおける平均非結合率はそれぞれ 3.27%、3.51%、5.76%であることが判明した【240001_6907】。

血漿タンパク結合と同様に、ラットの脳組織におけるボラシデニブ及び AGI-69460 の結合も、検証した濃度範囲内の濃度に依存しないことが分かった。ボラシデニブ（50 nM～100000 nM の濃度範囲）の平均非結合率は 0.78%から 1.31%（結合率 98.7%超）であり、AGI-69460（50 nM～3000 nM の濃度範囲）では 2.79%から 4.06%（結合率 95.9%以上）であった【240001_6913】。

また、腫瘍細胞（IDH1 を発現する U87MG 細胞株）のライセートに対するボラシデニブ及び AGI-69460 の結合についても、平衡透析法を用いて評価された【S095032_A-R-00006829-DHPB】。結果は、ホモ接合型又はヘテロ接合型変異細胞と比べ mock 細胞間で濃度依存的な結合は認められなかった（0.03～3 µM の濃度範囲）。非結合率は、ボラシデニブでは約 60%～73%、AGI-69460 では約 69%～96%であった。

さらに、10%FCS を含む RMPI 培地（*in vitro* における AGI-69460 のボラシデニブ活性への寄与を決定するために使用した培地）における平均非結合率は、ボラシデニブでは約 13%、AGI-69460 では同じ濃度範囲で約 25%であった。

雄 Long-Evans 系ラットを用いて、300 μCi/kg を含有する[^{14}C]ボラシデニブを 300 mg/kg の用量で単回経口投与したときの[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能の組織分布を、定量的全身オートラジオグラフィーを用いて評価した【AG881-N-053】。

[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能は速やかに吸収され、組織に分布し、体内から緩やかに消失した。投与後 504 時間の時点で、評価した組織の約 63%が定量下限を上回った。皮膚、内分泌、分泌組織並びに消化管及び代謝／排泄系の組織において[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能の分布が最も大きかった。中枢神経系で認められた放射能濃度は低く、放射能の $AUC_{0-\infty}$の脳／血漿中比は 0.76 であった。また、眼球血管膜などのメラニン含有組織への放射能の大幅な分布は認められず、[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能はメラニンに結合しないことが示された。有色皮膚における[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能に対する曝露量は、投与開始後の初めの時点では非有色皮膚の曝露量と比較してわずかに多かったが、$AUC_{0-\infty}$は有色及び非有色皮膚間で同程度であった。

5.　代謝

5.1　代謝安定性

5.1.1　ヒト、サル、イヌ、マウス及びラットの肝ミクロソームを用いたボラシデニブの代謝安定性の評価

ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームを用いてボラシデニブの代謝安定性を評価した【AG881-N-038】。ボラシデニブの肝ミクロソームにおける CL_{int} は、ラット、マウス、イヌ及びヒト肝ミクロソームでは 11.6 μL/min/mg 未満であり、サルでは 13.1 μL/min/mg であった。CL_{int} データに基づき推定される肝クリアランス（CL_{hep}）は、マウスで 0.000323 L/min 未満、ラットで 0.00226 L/min 未満、イヌで 0.108 L/min 未満、サルで 0.0219 L/min 未満、ヒトで 0.259 L/min 未満と推定された。

5.1.2　ヒト、サル、イヌ及びラット肝細胞を用いたボラシデニブの代謝安定性の評価

ラット、マウス、イヌ、サル及びヒト肝細胞を用いてボラシデニブの代謝安定性を評価した【AG881-N-038】。ボラシデニブの肝細胞の CL_{int} は、ラット、マウス及びヒトで 2.89 μL/min/100 万個細胞未満であり、イヌで 9.9 μL/min/100 万個細胞、サルで 5.5 μL/min/100 万個細胞であった。CL_{int} データに基づく CL_{hep} は、マウスで 0.000446 L/min 未満、ラットで 0.00277 L/min 未満、イヌで 0.360 L/min、サルで 0.0658 L/min、ヒトで 0.382 L/min 未満であった。

フォローアップ試験では、ヒト肝細胞培養実験において同様に低いボラシデニブの代謝回転率が認められた。平均肝固有クリアランス（9.52 mL/min/g protein）は濃度依存的ではなく、検討した濃度範囲（0.1～10 μM）にわたり代謝の飽和状態はないと考えられた【RB-23-095032-001-DHIZ】。

5.2　代謝経路

ヒト、サル、イヌ、マウス及びラットの肝ミクロソーム及び肝細胞、並びに *in vivo* でのサル、マウス及びラット PK 試験から取得した血漿を用いてボラシデニブの代謝経路を検討した。代謝プロファイルは *in vitro* 及び *in vivo* 試験で同様で、違いは軽微なもののみであった。

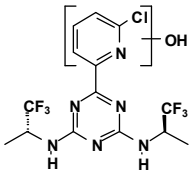
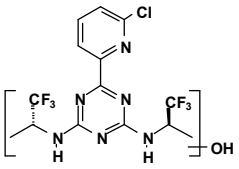
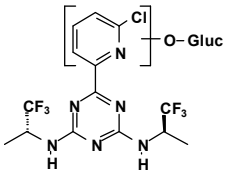
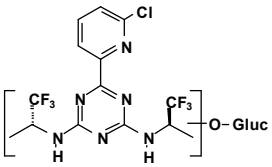
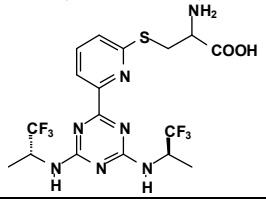
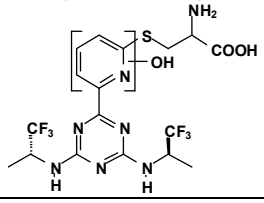
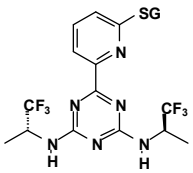
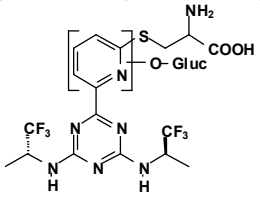
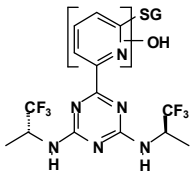
5.2.1　*In vitro* 代謝

ラット、マウス、イヌ、サル及びヒトのプレートに播種した肝細胞培養実験により、ボラシデニブの代謝プロファイルを明らかにした【AG881-N-007】。その結果を表 5:1 に要約する。直接水酸化後+グルクロン酸抱合、又はクロロピリジン環の脱塩素後+GSH 若しくはシステイン抱合（あるいは GSH 若しくはシステイン抱合に引き起こされたクロロピリジン環の脱塩素）のいずれかの代謝反応がみられた。二次代謝物として、水酸化、グルクロン酸抱合及び GSH／システイン抱合の組合わせが観察された。M6（水酸化、脱塩素、システイン及びグルクロニド抱合）はヒト肝細胞でのみ検出されたが、その上流の前駆体である M1a/b、M3、M4 及び M5 は検討した他のいずれの動物種でも十分にみられた。代謝プロファイルは検討したすべての動物種間でおおむね同様であった。暫定的な構造を図 5:1 に示す。

表 5:1　マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト肝細胞を用いた *in vitro* でのボラシデニブの生体内変換

Compounds	$[M+H]^+$	Biotransformation	Mouse		Rat		Dog		Monkey		Human	
			UV	MS	UV	MS	UV	MS	UV	MS	UV	MS
Parent (vorasidenib)	415	Parent	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
M1a/M1b	431	Hydroxylation	ND	X	ND	X	ND	X	ND	X	ND	X
M2a	607	Hydroxylation/glucuronide	ND	X	X	X	X	X	X	X	ND	X
M2b	607	Hydroxylation/glucuronide	ND	ND	ND	ND	ND	ND	X	X	ND	ND
M3	500	Des-chloro, cysteine adduct	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
M4	516	Hydroxylation, Des-chloro, cysteine adduct	X	X	ND	ND	X	X	X	X	X	X
M5	686	Des-chloro, GSH adduct	ND	X	ND	X	ND	X	X	X	ND	X
M6	692	M4 + glucuronide	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	X	X
M7	702	Hydroxylation, De-chloro, GSH adduct	X	X	ND	X	X	X	X	X	X	X

GSH = glutathione; MS = mass spectrometry; ND = not detectable; UV = ultraviolet; X= detected
Note: Incubation Time = 24 hrs, Concentration = 500 µM
Source: Report AG881-N-007-R1, Table 2

Hydroxyl AG881 (M1a, MW430) 	Hydroxyl AG881 (M1b, MW430) 	Hydroxyl AG881 glucuronide conjugate (M2a, MW606) 
Hydroxyl AG881 glucuronide conjugate (M2b, MW606) 	AG881 cysteine adduct (M3, MW499) 	Hydroxyl AG881 cysteine adduct (M4, MW515) 
AG881 GSH adduct (M5, MW685) 	Cysteine adduct of hydroxyl AG881 glucuronide (M6, MW691) 	GSH adduct of Hydroxyl AG881 (M7, MW701) 

Note: Metabolites M3, M4, M5, M6, and M7 are all dechlorinated metabolites of vorasidenib.
Source: Report AG881-N-007-R1, Table 1

図 5:1　マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝細胞で生成されるボラシデニブ代謝物の推定構造

In vitro での[^{14}C]ボラシデニブの代謝も、ラット及びヒト由来の肝ミクロソーム及び肝細胞を用いて検討した【AG881-N-052】。[^{14}C]ボラシデニブはラット及びヒトの肝ミクロソームで安定であり、ヒト肝細胞でも安定であった。代謝物に関連した放射能ピークは、未変化体を除き観察されなかった。対照的に、ラットの肝細胞培養実験では 5 種類のボラシデニブ代謝物が検出された。これらの代謝物は、M701（脱塩素、酸化及び GSH 抱合による産物、M7 の可能性が高い）、M990a（脱塩素及び di-GSH 抱合の産物）、M990b（M990a の異性体）、M719（GSH 抱合）及び M318（*N*-脱アルキル化）であった（図 5:2）。

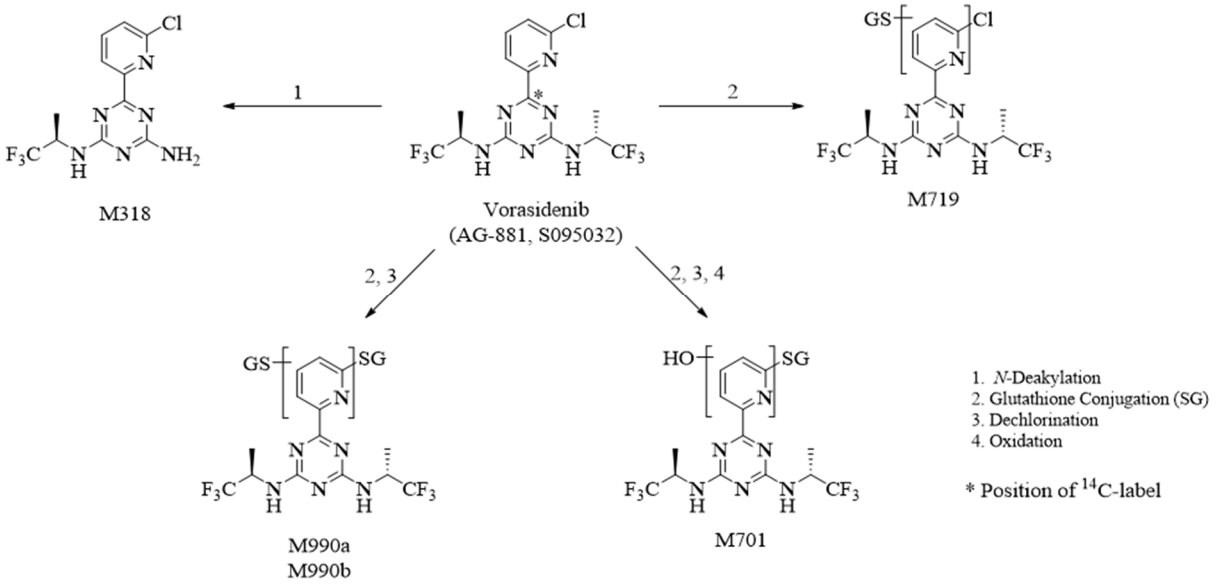


図 5:2　　ラット肝細胞における *in vitro* での[^{14}C]ボラシデニブの代謝経路（案）

別の試験【RB-23-095032-001-DHIZ】では、[^{14}C]標識及び非標識のボラシデニブとヒト肝細胞懸濁液との培養実験からも、塩素置換、酸化及び GSH 抱合並びにその後の加水分解によるグリシルシステイン及びシステイン抱合がボラシデニブの主要な代謝経路であることが確認された。[^{14}C]ボラシデニブとヒト肝細胞との培養実験後に観察された主な代謝物は M701（GSH 抱合に伴う水酸化及び脱塩素化）と一致した。

5.2.2　*In vivo* 代謝

マウス、ラット及びサルを用いたボラシデニブの反復投与試験の血漿サンプルの代謝物プロファイルについて分析した【AG881-N-041-R1】。ボラシデニブ（10 mg/kg）を 7 日間反復経口 BID 投与した雌マウス 24 匹、ボラシデニブ（30、100、300 及び 1000 mg/kg/day）を 7 日間反復経口投与した雄の Sprague-Dawley ラット 1 群につき 3 匹、及び 1、10、50 及び 100 mg/kg を 9 日間反復経口 QD 投与した雄カニクイザル 1 群につき 3 匹の血漿を Hamilton 法 [3)]に従ってプールし、各動物種について代謝物対未変化体の相対的存在比率を測定した。

ボラシデニブを反復投与したマウス、ラット及びサルのプールした（0～24 時間）血漿試料の紫外線検出及び質量分析を組み合わせた液体クロマトグラフィー（LC-UV-MS）分析から、未変化体のみが UV クロマトグラム（表 5:2）で検出されたため、主な成分であることが示された。他の代謝物は、質量分析（MS）シグナルを用いることにより検出可能であった。

ボラシデニブの代謝には種差が認められた（表 5:2）。マウスは、酸化及び酸化+グルクロン酸抱合を介してボラシデニブを代謝すると考えられた。ラット及びサルはマウスと同一の経路を介してボラシデニブを代謝するが、クロロピリジン環の変換を介してもボラシデニブを代謝すると考えられた。ラット及びサルでは、クロロピリジン環が脱塩素を受け、その後 GSH 若しくはシステインのいずれかと抱合する（又は GSH 若しくはシステインの抱合により脱塩素が引き起こ

される)。他の代謝物は、水酸化、脱塩素／GSH／システイン抱合及びグルクロニド抱合の組合わせである。暫定的な構造を図 5:3 に示す。ヒト肝細胞培養実験でのみ観察された代謝物 M6 が、LC-MS/MS によりサルの血漿中で検出されたことには注目に値する。

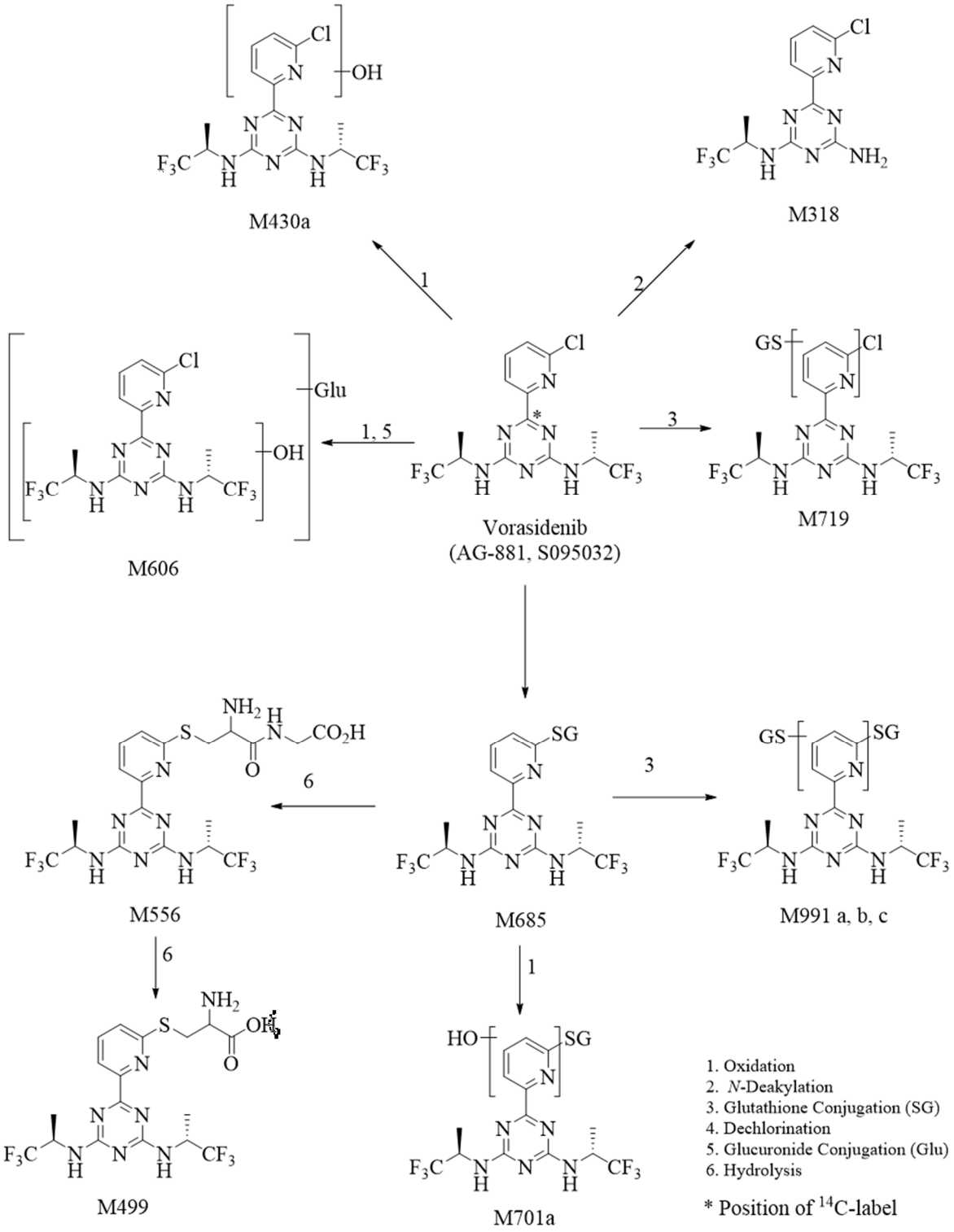
ボラシデニブの用量増加に伴い代謝物プロファイルに変化がみられないことから、マウス、ラット及びサルにおける消失経路は変わらないことが示される。したがって、ボラシデニブの用量増加により代謝が依存しないと考えられる。*In vivo* でのボラシデニブの代謝プロファイルは *in vitro* で観察された代謝プロファイルと同様であった。

表 5:2　　マウス、ラット及びサル血漿中のボラシデニブの *in vivo* での生体内変換

Compounds	MH+	Biotransformation	Mouse		Rat		Monkey	
			UV	MS	UV	MS	UV	MS
Parent (vorasidenib)	415	Parent	X	X	X	X	X	X
M1a	431	Hydroxylation	ND	ND	ND	X	ND	X
M1b	431	Hydroxylation	ND	X	ND	X	ND	X
M2a	607	Hydroxylation/glucuronide	ND	X	ND	X	ND	X
M2b	607	Hydroxylation/glucuronide	ND	ND	ND	X	ND	X
M3	500	Des-chloro, cysteine adduct	ND	ND	ND	ND	ND	X
M4	516	Hydroxylation, Des-chloro, cysteine adduct	ND	ND	ND	X	ND	X
M5	686	Des-chloro, GSH adduct	ND	ND	ND	ND	ND	X
M6	692	M4+ glucuronide	ND	ND	ND	ND	ND	X
M7	702	Hydroxylation, Des-chloro, GSH adduct	ND	ND	ND	X	ND	X

GSH = glutathione; MS = mass spectrometry; ND = not detectable; UV = ultraviolet; X = detected
Source: Report AG881-N-041-R1, Table 5

無処置ラット（300 µCi/kg）及び胆管カニューレラット（250 µCi/kg）に[^{14}C]ボラシデニブを 30 mg/kg の用量で単回経口投与したとき【AG881-N-050】、ラットの胆汁中に酸化／エポキシ化、*N*-脱アルキル化、及び／又は GSH、システイン、グリシン、若しくはグルクロン酸との抱合、又はこれらの経路の組合わせに由来する計 11 種類の代謝物が検出された（図 5:3）。未変化体は微量であった。ラットの胆汁中で特定された主な代謝物（投与量の 5%超）は M701a、M685、M990a 及び M990b で、酸化／エポキシ化、脱塩素及び GSH 抱合の組合わせに由来した。微量代謝物（総放射能の 5%未満）として、M990c（脱塩素、GSH 抱合）、M318（*N*-脱アルキル化）、M719（GSH 抱合）、M499（システイン抱合）、M606（酸化及びグルクロン酸抱合）、M556（システイン-グリシン抱合）、M430a（酸化）が検出された（図 5:3）。



Source: Report AG881-N-050, Figure 9

図 5:3　　ラットにおける[^{14}C]ボラシデニブの推定肝代謝経路

主要な代謝物であり生成の遅い循環血中代謝物である AGI-69460（図 2:1）は、ヒト ADME 試験（AG881-C-005）において初めて同定され、さらに AG881-C-004 臨床試験において定常状態の

曝露量が確認された。AGI-69460 は、細胞アッセイでのボラシデニブほど強力ではないが、薬理学的に活性な代謝物である【2.6.2】。AGI-69460 は、これまでの *in vitro* 代謝アッセイ又はラット及びサルに単回静脈内／経口投与した *in vivo* 試験の血漿、胆汁、排泄物中では同定には至らなかった。AGI-69460 はボラシデニブの脱塩素+GSH 抱合の下流代謝物であると推定され、加水分解によりチオールになり、その後肝及び肝外の経路の組合わせを介してメチル化及び酸化によりデスクロロメチルスルホンになると考えられる。AGI-69460 がヒト固有の代謝物ではなかったことを確認する上で、さらに、摂餌下の雄の Sprague-Dawley ラット及び雄のカニクイザルにボラシデニブをそれぞれ 30 mg/kg 及び 20 mg/kg QD の用量で 7 日間経口投与したときの血漿及び肝臓におけるボラシデニブとその代謝物である AGI-69460 の PK プロファイルを評価した【AG881-N-070】及び【AG881-N-071】。

ボラシデニブの血漿中濃度は、ラット及びサルの PK 測定用試料（Day 1 及び Day 7 両日の投与前、投与後 4、8、24 時間の時点で採取）を用いて投与後のいずれの時点でも定量可能であった。ラット及びサルの双方で、AGI-69460 は、Day 1 の投与の 24 時間後まで定量できなかったが、Day 7 で採取されたすべての PK 測定用試料で定量が可能であった。ボラシデニブ及び AGI-69460 とも Day 7 のボラシデニブの投与後、肝臓で検出可能であった。PK パラメータを表 5:3 に示す。

表 5:3　Day 7 投与後の雄の Sprague-Dawley ラット及び雄のカニクイザルにおける平均血漿中薬物動態パラメータの要約

Species	Analyte	Dose Day	n	T_{max} (hr) (SD)	C_{max} (ng/mL) (SD)	$AUC_{0\text{-}10hr}$ (hr•ng/mL) (SD)	$AUC_{0\text{-}last}$ (hr•ng/mL) (SD)	$t_{½}$ (hr) (SD)
Rat	Vorasidenib	7	4	4 (0)	10,600 (1,840)	99,700 (13,800)	218,000 (28,600)	29.35 (5.12)
Rat	AGI-69460	7	4	1 (2)	34 (10.3)	302 (90)	691 (199)	113.63 (66.71)[a]
Monkey	Vorasidenib	7	4	5 (2)	5,340 (1,190)	45,400 (12,700)	97,700 (29,300)	23.6 (10.16)
Monkey	AGI-69460	7	4	2 (2.31)	198 (139)	1,900 (1,370)	4,370 (3,190)	102.24 (21.08)

Source: Reports AG881-N-070 and AG881-N-071.
Abbreviations: $AUC_{0\text{-}10hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 10 hours; $AUC_{0\text{-}last}$ = area under the concentration × time curve from 0 to the last measurable concentration; C_{max} = maximum observed concentration; SD = standard deviation; $t_{½}$ = elimination half-life; T_{max} = time to maximum observed concentration.
[a] *n=3 for $t_{1/2}$ (hr) determination*

ボラシデニブ及び AGI-69460 の血漿中濃度は、ボラシデニブ 10、25 及び 75 mg/kg/day を妊娠日数（GD）6 日目から 17 日目（17 日目を含む）まで投与したラット【20360627】並びにボラシデニブ 2、6 及び 18 mg/kg/day を投与したウサギ【20360619】の胚胎児発生毒性試験においても測定した。ボラシデニブ及び AGI-69460 の両方が蓄積性を示し、ラットでは GD6～GD17 でそれぞれ 2.7 倍～3.5 倍、4.7 倍～10.2 倍、ウサギでは GD6～GD19 にそれぞれ 3.8 倍～21.2 倍、17.6 倍～38.1 倍の蓄積を示した。ボラシデニブの蓄積率は、ラット及びウサギの双方で用量増加に伴い低

下した。AGI-69460 の蓄積率も、ラットでは用量増加に伴い低下したが、ウサギでは、2 mg/kg/day の用量での最低蓄積率である 17.6 倍が認められ、6 mg/kg/day 及び 18 mg/kg/day の用量では約 2 倍高い 38.1 倍及び 30.5 倍であった。

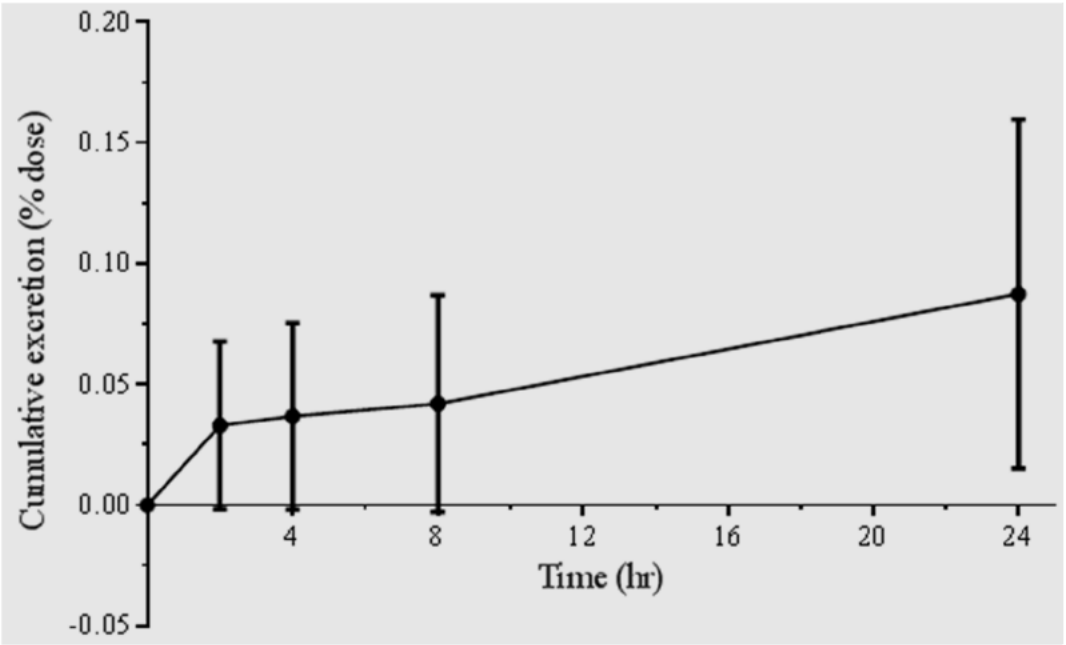
6.　排泄

6.1　ボラシデニブの尿中排泄

ラット、イヌ及びサルにボラシデニブを単回静脈内投与したときの未変化体のボラシデニブの尿中排泄を評価した（3.2.1 項）。ボラシデニブの尿中排泄は、ラット及びサルではわずかであり（それぞれ投与量の 0.00438%及び 0.0183%）、イヌの尿中ではボラシデニブは検出されなかった【AG881-N-026-R1】【AG881-N-029-R1】【AG881-N-030-R1】。

6.2　雄の Sprague-Dawley ラットにボラシデニブ（1 mg/kg）を単回静脈内投与したときの胆汁排泄試験

雄の Sprague-Dawley ラットを用いてボラシデニブ（1 mg/kg）を単回静脈内投与したときの胆汁排泄を検討した【AG881-N-027-R1】。単回投与から最大 24 時間後までのボラシデニブ平均累積排泄率（±SD）を図 6:1 に示す。



Source: Report AG881-N-027-R1, Figure 2

図 6:1　雄の Sprague-Dawley ラット（3 匹）に 1 mg/kg の用量で IV 投与したときの胆汁中における未変化体（ボラシデニブ）の平均累積排泄率（±SD）（投与量に対する%）

ラット胆汁中の未変化体（ボラシデニブ）の回収率が低い（投与量 0.0875 ± 0.0723%）ことから、胆汁排泄は未変化体（ボラシデニブ）の主な消失経路ではないことが示唆された。

6.3　ラットを用いたボラシデニブのマスバランス試験

雄の胆管カニューレ Sprague-Dawley ラットを用いて、[^{14}C]ボラシデニブを 30 mg/kg の用量で単回経口投与したときの[^{14}C]ボラシデニブの排泄経路を調べた【AG881-N-050】。平均累積回収率（±SD）は 84.3% ± 7.85 であった。胆汁は薬物に関連した総放射能の主な排泄経路であり、投与量の 61.0% ± 11.7 を占めた。一方、投与量の 21.4% ± 10.2 は糞中で回収された。尿中排泄は、それほど重要な排泄経路ではなく、投与量の 1.77% ± 0.31 を占めるにすぎなかった。

7.　薬物動態学的薬物相互作用

7.1　酵素反応表現型

ボラシデニブと遺伝子組換え CYP450 酵素との培養実験から、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び／又は CYP3A4/5 の寄与が示された。

ヒト肝細胞中のボラシデニブと CYP 選択的阻害薬との培養実験から、CYP1A2 が、ボラシデニブの肝代謝クリアランスに 53%（フラフィリン阻害薬を使用）～90%（シプロキサシン阻害薬を使用）寄与する主な CYP アイソザイムであり、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び／又は CYP3A4/5 からの寄与はわずかであることが示された【AG881-N-001】【AG881-N-064】【RB-23-095032-001-DHIZ】。

1-アミノベンゾトリアゾール（ABT）存在下又は非存在下でのヒト肝細胞を用いたボラシデニブの *in vitro* 培養実験により、CYP 以外の経路がボラシデニブの肝代謝クリアランスの最大 30%まで寄与する可能性があることが示された【RB-23-095032-001-DHIZ】。

AGI-69460 は、組換え CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 酵素を用いた *in vitro* 代謝において安定していた【S095032_A-R-00006524-DHIZ】。

7.2　*In vitro* でのヒト肝ミクロソームを用いたチトクロム P450 酵素の阻害薬としてのボラシデニブの評価

現行の FDA[4)]及び PMDA[5)]の薬物相互作用試験ガイドライン又は現行の業界のベストプラクティス [6)-8)]に従って、ヒト肝ミクロソームを用いて *in vitro* でボラシデニブ及びその主要代謝物 AGI-69460 の CYP 酵素の阻害薬としての評価を実施した【AG881-N-005-R1】【S095032_A-R-00006525-DHIP】。ボラシデニブの 50%阻害濃度（IC_{50}）を達成した薬物濃度、並びに時間依存的及び代謝依存的阻害の結果の要約を表 7:1 に示す。

検討した試験条件下では、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 を顕著な阻害は認められず、IC_{50} 値は、試験系におけるボラシデニブの溶解限度である 10 µM を上回った。

IC_{50} シフト（NADPH 存在下、非存在下）実験下では、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の時間又は代謝に基づく阻害はほとんど又は全くなかった。

AGI-69460 は、10 µM までの濃度では、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の直接阻害薬あるいは時間依存性阻害薬ではない【S095032_A-R-00006525-DHIP】。

表 7:1　　推定されるボラシデニブの IC_{50}

		Experimentally determined IC_{50} (µM)[a]	Inhibition observed at 10 µM with 0-minute preincubation (%)[b]	Inhibition observed at 10 µM with 30-minute preincubation (%)[b]	Potential for time or metabolism dependent inhibition[c,d]
CYP1A2	Phenacetin	> 10	18	9.2	No
CYP2B6	Efavirenz	> 10	9.5	10	No
CYP2C8	Amodiaquine	> 10	23	25	No
CYP2C9	Diclofenac	> 10	43	46	No
CYP2C19	S-Mephenytoin	> 10	15	15	No
CYP2D6	Dextromethorphan	> 10	1.8	4.8	No
CYP3A4/5	Testosterone	> 10	0	8.6	No
CYP3A4/5	Midazolam	> 10	NA	NA	No

IC_{50} = concentration of drug that achieved half maximal inhibition; NA = not applicable.
[a] *Average data (i.e., percent of control activity) obtained from duplicate samples for each test article concentration were used to calculate IC_{50} values.*
[b] *Inhibition observed (%) is calculated with the following formula (results are rounded to two significant figures): Inhibition observed (%) = 100% − Percent solvent control.*
[c] *Time-dependent (i.e., NADPH-independent) inhibition was determined by comparison of percent of control activities for zero-minute preincubation and 30-minute preincubation without NADPH samples and by visual inspection of the IC50 plot.*
[d] *Metabolism-dependent (i.e., NADPH-dependent) inhibition was determined by comparison of percent of control activities for zero-minute preincubation and 30-minute preincubation with NADPH samples and by visual inspection of the IC_{50} plot*
Source: Report AG881-N-005-R1, Table 3

7.3　*In vitro* での培養ヒト肝細胞を用いたチトクロム P450 発現誘導薬としてのボラシデニブの評価

ボラシデニブ及びその主要代謝物 AGI-69460 のヒト肝酵素を発現する誘導能を評価した【AG881-N-002-R1】【AG881-N-059】【S095032_A-R-00006521-DHIN】。FDA[4]及び PMDA[5]の薬物相互作用試験ガイドライン又は現行の業界のベストプラクティス[6)-8)]に従って試験を実施した。

3 例のヒトドナー（n=3）の肝細胞を用いて CYP 誘導試験を実施した。ボラシデニブは CYP1A2 活性又は CYP1A2 mRNA 量（2 倍未満）にほとんど又は全く影響を示さなかったが、CYP2B6、CYP3A4（表 7:2）及び CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19（活性のみ）及び UGT1A4（mRNA、活性は評価していない）（表 7:3）に対して誘導能が認められた。

ヒト肝細胞培養における CYP 酵素誘導薬としての AGI-69460（最大 10 µM の濃度）のボラシデニブと同様の評価により、AGI-69460 が CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4 の誘導薬であることが示された。AGI-69460 による CYP2C19 誘導のデータは結論に至っていない（表 7:4）【S095032_A-R-00006521-DHIN】。AGI-69460 の臨床で確認された濃度において、

CYP1A2 誘導の EC_{50} 及び E_{max} が高いことから、AGI-69460 による CYP 誘導は生じないと見込まれる。

表 7:2　　マーカー基質の活性及び mRNA 量に基づくボラシデニブの CYP 酵素誘導 E_{max} 及び EC_{50}（平均 ± SD）

Treatment	CYP	Assay	Donor					
			HC10-1		HC5-30		HC7-4	
			E_{max} fold change	**EC_{50}[a] (μM)**	**E_{max} fold change**	**EC_{50}[a] (μM)**	**E_{max} fold change**	**EC_{50} [a] (μM)**
Vorasidenib (0.003 to 20 μM)	CYP1A2	Activity	ND	ND	ND	ND	1.31 ± 0.10	0.159 ± 0.034
		mRNA	3.74 ± 19.67	13.5 ± 38.0	ND	ND	1.71 ± 0.15	3.39 ± 1.17
	CYP2B6	Activity	11.8 ± 0.6	0.298 ± 0.040	6.21 ± 0.32	0.238 ± 0.031	7.75 ± 0.34	0.316 ± 0.046
		mRNA	6.04 ± 0.40	0.178 ± 0.034	2.84 ± 0.18	0.235 ± 0.036	9.76 ± 0.39	0.256 ± 0.032
	CYP2C9	Activity	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		mRNA	1.31 ± 0.11	0.237 ± 0.042	1.35 ± 0.08	0.130 ± 0.030	1.50 ± 0.09	0.238 ± 0.030
	CYP3A4/5	Activity	2.11 ± 0.15	0.253 ± 0.058	1.49 ± 0.12	0.160 ± 0.037	4.62 ± 0.14	0.201 ± 0.021
	CYP3A4	mRNA	14.5 ± 1.5	0.162 ± 0.050	9.52 ± 0.79	0.180 ± 0.040	3.62 ± 0.13	0.150 ± 0.016

CYP = cytochrome P450; EC_{50} = concentration of drug that achieved half maximal effect; E_{max} = maximum drug-induced effect; mRNA = messenger ribonucleic acid; ND = not determined (fold change <2 and/or % increase <20% of positive control)

[a] *Based on the enzyme activity concentration-response curves, using Sigmoidal 3-Parameter Fit or Sigmoidal Hill 3-Parameter Fit*

Source: Report AG881-N-002-R1, Figure 5, Figure 10, Figure 15, and Figure 20

表 7:3　　マーカー基質の活性及び mRNA 量に基づくボラシデニブの CYP 酵素誘導 E_{max} 及び EC_{50}（平均 ± SD）

Treatment	CYP	Assay	Donor					
			HC10-23		HC10-50		HC5-27	
			E_{max} fold change	**EC_{50}[a] (μM)**	**E_{max} fold change**	**EC_{50}[a] (μM)**	**E_{max} fold change**	**EC_{50} [a] (μM)**
Vorasidenib (0.01 to 10 μM)	CYP2C8	Activity	ND	ND	4.45 ± 0.11	0.073 ± 0.008	9.76 ± 0.44	0.285 ± 0.048
		mRNA	2.73 ± 0.09	0.059 ± 0.022	3.07 ± 0.19	0.091 ± 0.042	4.16 ± 0.10	0.161 ± 0.018
	CYP2C9	Activity	2.27 ± 0.05	0.030 ± 0.012	2.42 ± 0.11	0.067 ± 0.027	3.81 ± 0.24	0.302 ± 0.107
		mRNA	3.42 ± 0.08	0.097 ± 0.013	3.01 ± 0.15	0.082 ± 0.029	6.35 ± 0.17	0.203 ± 0.024
	CYP2C19	Activity	4.30 ± 0.20	0.110 ± 0.026	6.04 ± 0.33	0.202 ± 0.039	ND	ND
		mRNA	ND	ND	ND	ND	NA	NA
	UGT1A4	Activity	ND	ND	ND	ND	ND	ND
		mRNA	5.36 ± 0.15	0.222 ± 0.022	ND	ND	10.1 ± 0.5	0.288 ± 0.048

CYP = cytochrome P450; EC_{50} = concentration of drug that achieved half maximal effect; E_{max} = maximum drug-induced effect; mRNA = messenger ribonucleic acid; NA = Not applicable (fold change for positive control rifampin was <2; ND = not determined (fold change <2 or percent increase <20% of positive control)

[a] *Based on the enzyme activity concentration-response curves, using Sigmoidal 3-Parameter Fit or Sigmoidal Hill 3-Parameter Fit*

Source: Report AG881-N-059, Figure 3, Figure 6, Figure 9, and Figure 11

表 7:4　AGI-69460 を介した CYP 酵素誘導における mRNA 量に基づいた E_{max} 及び EC_{50}（平均値）

CYP450	Donor 1		Donor 2		Donor 3	
	E_{max} (fold)	**EC_{50} (µM)**	**E_{max} (fold)**	**EC_{50} (µM)**	**E_{max} (fold)**	**EC_{50} (µM)**
CYP1A2	*2.99	2.96	*4.34	2.53	*4.10	2.04
CYP2B6	18.3	3.37	8.5	2.51	24.7	2.53
CYP3A4	8.96	0.67	7.65	0.477	24.4	0.596
CYP2C8	2.96	0.805	5.2	1.36	6.76	0.512
CYP2C9	NA	NA	2.03	0.169	3.29	0.589
CYP2C19	NA	NA	NA	NA	NA	NA
CYP2C9[a]	*3.09	2.06	*5.01	2.3	**4.53	**2.43

NA: not applicable
a Based on CYP2C9 marker substrate activity
* E_{max} values are constrained to the observed maximum fold induction

** Calculated based on three-parameters dose-response analysis

7.4　*In vitro* での培養ヒト肝細胞を用いた自己誘導薬としてのボラシデニブの評価

自己誘導の可能性を評価するために、ボラシデニブの重水素標識体のクリアランスを高める能力について評価した【AG881-N-003-R1】。ヒト肝細胞をボラシデニブと様々な濃度で72時間培養し、AGI-28187（ボラシデニブの重水素標識体）の固有クリアランスに及ぼす影響を測定した。AGI-28187の固有クリアランスは、ボラシデニブの20 μMまでの培養による実質的な影響は受けず、ボラシデニブが自身の代謝を誘導するリスクはほとんどないことが示された。さらに、AGI-28187固有のクリアランスはリファンピシンとの培養によりわずかな影響を受けたにすぎず（すべての場合で2倍未満）、CYP3A4の誘導により影響されないことが示唆された。

7.5　*In vitro* での排出及び取込みトランスポーターの基質及び阻害薬としてのボラシデニブの評価

FDA[4)]及びPMDA[5)]の薬物相互試験ガイドライン又は業界のベストプラクティス[6)-8)]に従った方法を用いて、P-gp及びBCRPの基質及び阻害薬としてボラシデニブを評価した【AG881-N-004-R1】。

MDCKII-MDR1及びBCRP細胞でボラシデニブの1 μMでのnet efflux ratioは、それぞれ1.15及び1.05であった。これらの結果から、ボラシデニブはP-gp又はBCRPの基質ではないことが確認された。

ボラシデニブはCaco-2細胞においてP-gpの基質であるジゴキシンの輸送を阻害しなかった［IC_{50} >11 μM（検討した溶解可能な最高濃度）］【S095032_A-R-00006898-DHTI】。

ボラシデニブはBCRPの基質であるプラゾシンの輸送を5 μMで70.2%阻害した。ボラシデニブ（0.1～5 μM）の存在下でプラゾシンの双方向の透過性を評価し、IC_{50}は1.22 μMと算出された。したがって、ボラシデニブはBCRPの阻害薬である。

OATP1B1及びOATP1B3発現細胞におけるボラシデニブの取込み比は2未満であり、ボラシデニブがOATP1B1又はOATP1B3の基質ではないことが示唆された【AG881-N-058】。

ボラシデニブは、既定の実験条件下で7.5 μM（検討した最高濃度）までの濃度で、BSEP、MRP2、MRP3、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3又はOCT2の50%を超える阻害率を示さなかった【AG881-N-051】。

多剤・毒性排出タンパク質（MATE）1及びMATE2-Kトランスフェクト細胞を用いて、25 μM（検討した最高濃度）までの濃度で、ボラシデニブは[^{14}C]メトホルミンの50%を上回る阻害率を示さなかった（IC_{50} >25 μM）【AG881-N-058】。臨床推奨用量で、ボラシデニブによるこれらのトランスポーターの基質とのDDIは生じないと見込まれた。

ボラシデニブの代謝物であるAGI-69460は、P-gp【AG881-N-073】、BCRP【AG881-N-072】又はOATP1B1若しくはOATP1B3【AG881-N-074】の基質ではなかった。AGI-69460はP-gp、OATP1B1、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3あるいはOCT2の阻害薬ではなく、BCRP及びOATP1B3の阻害薬であり、IC_{50}値はそれぞれ5.84 μM及び2.97 μMであった【S095032_A-R-

00006522-DHTI】【AG881-N-075】。臨床で確認された濃度では、AGI-69460 と BCRP 基質もしくは OATP1B3 基質との間に臨床的に意義のある DDI は生じないと見込まれる。

7.6　*In vitro* でのヒト肝ミクロソームを用いた UGT1A1 阻害薬としてのボラシデニブの評価

ボラシデニブを UGT1A1 の阻害薬として評価した【AG881-N-006-R1】。ボラシデニブは UGT1A1 による 17β-エストラジオールの抱合を IC_{50} 8.0 μM で阻害した。ボラシデニブの臨床での定常状態の血漿中濃度を考慮すると、UGT1A1 阻害による重大な相互作用が生じる可能性は低い。

8.　考察及び結論

BALB/c マウス、Sprague-Dawley ラット、ビーグル犬及びカニクイザルを用いてボラシデニブの ADME 試験を実施した。*In vitro* で代謝及びトランスポーター試験も実施し、非臨床試験の動物種及びヒトにおけるボラシデニブの ADME プロファイルを評価した。これらの試験の結果から、ヒトを対象としてさらに試験及び開発を進める上で、ボラシデニブが許容可能な ADME プロファイルをもつことが示された。ボラシデニブの PK は、速やかな経口吸収、マウス、ラット及びサルにおける低い総 CL_p 及びイヌにおける高い CL_p、並びにマウス、ラット、イヌ及びサルにおける定常状態での高い分布容積により特徴付けられる。ボラシデニブの平均消失半減期（$t_{½}$）の範囲は、静脈内投与で 6.4 時間（イヌ）～24 時間（サル）であった。経口バイオアベイラビリティの範囲は 6.42%（フリー体、イヌ）～109%（[redacted]、サル）であった。

[redacted]絶食下のサルにおける経口バイオアベイラビリティは、ボラシデニブクエン酸水和物錠 5 mg、25 mg 及び 100 mg で 27%～73%の範囲であると推定された。摂餌下での 100 mg 錠剤の経口バイオアベイラビリティは 57%であった。食物と投与するとボラシデニブの曝露量は増加した（0 時間～無限時間までの AUC で 1.86 倍増加）。

反復投与試験（7 日間、28 日間及び 13 週間 TK 試験）では、ラット及びサルの雌雄間のボラシデニブの曝露量に顕著な性差は認められなかった。TK 試験において 7 日間、28 日間及び 13 週間反復投与したとき、ボラシデニブの蓄積率は、試験期間中にわたりラットで 2.7～8.5 倍、サルで 1.5～5.0 倍であった。ラットを用いた 13 週間反復投与 TK 試験では、最終投与（Day 91）後のボラシデニブの曝露量は、5 mg/kg/day 及び 15 mg/kg/day の用量では用量比に応じて増加したが、50 mg/kg/day では用量比を下回る増加であった。サルを用いた 13 週間反復投与 TK 試験では、最終投与日後のボラシデニブの曝露量は、2 mg/kg/day 及び 6 mg/kg/day で用量比に応じて増加したが、20 mg/kg/day では用量比を上回った。

ボラシデニブは、血漿タンパク結合率が高く（ヒト血漿中の非結合型の割合は 2.66%）、α-1 酸性糖タンパク質よりもヒト血清アルブミンに主に結合することが示されている。ボラシデニブは、血液／血漿中濃度比が 0.87 であるため、赤血球にはほとんど分配されない。

ボラシデニブは脳透過性を示し、脳／血漿中濃度比は、AUC に基づき腫瘍のないマウスで 0.624～0.720、脳腫瘍のあるマウスで 0.95～1.96、ラットで 1.11～1.48、及び最終投与後の 24 時間時点での濃度に基づきサルで 1.25～3.01 であった。雄ラットに[^{14}C]ボラシデニブを単回経口投与

したときの組織分布試験から、薬剤由来の放射能は速やかに吸収されて組織に分布し、体内から緩やかに消失することが示された。眼球血管膜などのメラニン含有組織への放射能の大幅な分布は認められず、[^{14}C]ボラシデニブ由来の放射能はメラニンに結合しないことが示された。

非臨床試験の動物種では、代謝がボラシデニブの主な消失経路である。ラットの胆汁中並びにラット、イヌ及びサルの尿中への未変化体のボラシデニブの排泄はわずかであった。

ボラシデニブのデスクロロ-メチルスルホン下流代謝物である AGI-69460 は、血漿中の主要な循環代謝物としてヒト ADME 試験（AG881-C-005）において初めて同定され、AG881-C-004 臨床試験において定常状態の濃度が確認された。AGI-69460 は、細胞アッセイでのボラシデニブほど強力ではないが、薬理学的に活性の代謝物である。AGI-69460 は *in vitro* 代謝アッセイ及び単回静脈内／経口投与したときの *in vivo* 代謝試験では同定されていないが、この代謝物の存在は、7 日間にわたり反復投与したときのラット及びサルの血漿中及び肝臓で確認され、また、ボラシデニブの胚胎児発生毒性試験のラット及びウサギの血漿中で確認された。

ヒトを含め、様々な動物種の肝ミクロソーム及び肝細胞においてボラシデニブの代謝回転率は低い。ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームとの培養実験とプレートに播種した肝細胞を用いた実験における代謝プロファイルは同様であった。ラット及びサルの *in vivo* プロファイルは *in vitro* で認められたプロファイルに類似していた。総じて *in vitro* でのヒトの代謝物はすべて、安全性試験に用いられた動物種の *in vitro* 又は *in vivo* のいずれかで認められた。

ボラシデニブとヒト肝ミクロソーム、遺伝子組換え CYP450 酵素及び CYP 選択的化学阻害薬の存在下でのヒト肝細胞と培養実験から、CYP1A2 がボラシデニブの肝代謝を担う主要な酵素であり、CYP2B6、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の寄与はわずかであると考えられる。なお、ボラシデニブの肝代謝クリアランスのうち、CYP 以外の代謝経路が最大 30%寄与する可能性がある。

ボラシデニブは、臨床で確認された濃度では CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 への顕著なの阻害作用を示さない。ボラシデニブは、検討したいずれの CYP 酵素の時間又は代謝依存性阻害の可能性をほとんどあるいは全く示さない。

ヒト肝ミクロソームにおいて、ボラシデニブは、ウリジン 5′-二リン酸グルクロン酸転移酵素 1A1（UGT1A1）による 17β-エストラジオールの抱合を IC_{50} 8.0 μM で阻害した。臨床で確認された濃度では、UGT1A1 阻害による相互作用が生じる可能性は極めて低い。

ボラシデニブは、*in vitro* で CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP3A4/5 及び UGT1A4 の誘導薬であると考えられた。ヒト肝細胞を用いた *in vitro* 試験では、ボラシデニブ代謝の自己誘導は認められなかった。

ボラシデニブは、P-gp、BCRP、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではない。

ボラシデニブは P-gp の阻害薬ではないが、BCRP の阻害薬である（IC_{50} は 1.22 μM）。ボラシデニブは、7.5 μM（検討した最高濃度）までの濃度で、BSEP、MRP2、MRP3、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 に対して 50%を上回る阻害を示さなかった。ボラシデニブは、25 μM（検討した最高濃度）までの濃度で、MATE1 及び 2-K タンパク質の 50%を上回る阻害

を示さなかった。臨床で確認された濃度で、ボラシデニブがこれらのトランスポーターの基質との DDI は生じないと見込まれた。

AGI-69460 のタンパク結合率は高く（非結合率：13.0%）、α-1 酸性糖タンパク質よりもヒト血清アルブミンに優先的に結合する。また、AGI-69460 は高い赤血球への分配を示し、血液/血漿中濃度比は 1.38 であった。

AGI-69460 は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の基質ではなかった。また、AGI-69460 は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4/5 の直接的あるいは時間依存的な阻害薬ではない。AGI-69460 は CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4/5 を誘導するが、AGI-69460 の臨床で確認された濃度において、CYP1A2 誘導の EC_{50} 及び E_{max} が高いことから、AGI-69460 による CYP 誘導は生じないと見込まれる。

AGI-69460 は、P-gp、BCRP、OATP1B1 又は OATP1B3 の基質ではない。AGI-69460 は P-gp、OATP1B、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 及び OCT2 の阻害薬ではないが、BCRP と OATP1B3 の阻害薬であり、IC_{50} はそれぞれに対して 5.84 μM、2.97 μM であった。AGI-69460 の臨床で確認された濃度で、OATP1B3 基質と意義のある DDI は生じないと見込まれる。

9.　参考文献一覧

1) FDA. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. DHHS, 2018.
2) 医薬品開発における生体試料中薬物濃度分析法のバリデーションに関するガイドライン（薬食審査発 0711 第 1 号）、平成 25 年 7 月 11 日
3) Hamilton RA, Garnett WR, and Kline BJ. Determination of mean valproic acid serum level by assay of a single pooled sample. *Clin Pharmacol Ther.* 1981;29(3):408-13.
4) FDA. Clinical Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry, 2020.
5) 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン（薬生薬審発 0723 第 6 号）、平成 30 年 7 月 23 日
6) Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, et al. The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos.* 2003;31(7):815-32.
7) Huang SM, Strong JM, Zhang L, Reynolds KS, Nallani S, Temple R, et al. New era in drug interaction evaluation: US Food and Drug Administration update on CYP enzymes, transporters, and the guidance process. *J Clin Pharmacol.* 2008;48(6):662-70.
8) Ogilvie BW, Usuki E, Yerino P, and Parkinson A. In vitro approaches for studying the inhibition of drug-metabolizing enzymes responsible for the metabolism of drugs (reaction phenotyping) with emphasis on cytochrome P450. In Drug-Drug Interactions. A.D. Rodrigues, ed. Pp. 231-358. New York, NY: Informa Healthcare, USA. 2008.

ボラシデニブ　クエン酸水和物

医薬品製造販売承認申請書添付資料

第２部（モジュール２）

2.6.5　薬物動態試験概要表

日本セルヴィエ株式会社

目次

1. 薬物動態試験：一覧表 3
2. 分析方法及びバリデーション試験 10
3. 薬物動態試験：吸収：単回投与 11
4. 薬物動態試験：吸収：反復投与 16
5. 薬物動態試験：分布 17
6. 薬物動態試験：タンパク結合 25
7. 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 31
8. 薬物動態試験：その他の分布試験 32
9. 薬物動態試験：代謝：*In Vitro* 35
10. 薬物動態試験：代謝：*In Vivo* 43
11. 薬物動態試験：推定代謝径路 45
12. 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 51
13. 薬物動態試験：排泄 52
14. 薬物動態試験：排泄：胆汁中 53
15. 薬物動態試験：薬物相互作用 54
16. 薬物動態試験：その他 85

1.　薬物動態試験：一覧表

Type of Study Study Title	Test System	Test Article	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
ABSORPTION[a]					
SINGLE-DOSE ADMINISTRATION					
Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of AG-881 in Female BALB/c Nude Mice Following Single Intravenous (0.3 mg/kg or 1 mg/kg) Administration of AG-881 Free Base or Oral (0.3 mg/kg or 1 mg/kg) Administration of AG-881 [redacted]	Mouse	AG-881	IV and PO	[redacted] China	AG881-N-023-R1 [NP41880]
Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of AG-881 Following Single Intravenous (1 mg/kg) or Oral (10 mg/kg) Administration to Male Sprague-Dawley Rats	Rat	AG-881	IV and PO	[redacted] China	AG881-N-026-R1 [NP41882]
Pharmacokinetics of AG-881 Following Single Intravenous Infusion or Oral Administration of AG-881 to Male Beagle Dogs	Dog	AG-881	IV and PO	[redacted] China	AG881-N-029-R1 [NP41883]
Pharmacokinetics of AG-881 Following Single Intravenous Dose of AG-881 Free Base or Oral Administration of AG-881 [redacted] to Male Cynomolgus Monkeys	Monkey	AG-881	IV and PO	[redacted] China	AG881-N-030-R1 [NP41884]
Pharmacokinetics of AG-881 Following Oral Administration of AG-881 Tablets or Suspension in Male Cynomolgus Monkeys	Monkey	AG-881	PO	[redacted] China	AG881-N-049-R1 [NP41885]

[a] *In vitro evaluation of AG-881 as an inhibitor of P-gp and BCRP (AG881-N-004; NP41967) and bidirectional permeability across Caco-2 cells (AG881-N-048-R1; NP41903) is summarized in Pharmacokinetic Drug Interactions in Section 15.*

Abbreviations: IV = intravenous; PO = per os; P-gp = permeability glycoprotein; [redacted] = [redacted].

Type of Study Study Title	Test System	Test Article	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
DISTRIBUTION					
BRAIN DISTRIBUTION					
AG-881 Brain Distribution Study Following Oral (50 mg/kg or 150 mg/kg) Administration to Female BALB/c Nude Mice	Mouse	AG-881	PO	[redacted] China	AG881-N-022-R1 [NP41886]
Brain and CSF Distribution of AG-881 Following Single or Multiple QD Oral Doses of AG-881 in Male Sprague-Dawley Rats	Rat	AG-881	PO	[redacted] China	AG881-N-025-R1 [NP41889]
Tissue Distribution of Radioactivity Following a Single Oral Dose of [^{14}C]AG-881 in Male Long-Evans Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)	Rat	[^{14}C]AG-881	PO	[redacted] USA	AG881-N-053 [NP41895]
PROTEIN BINDING					
AG-881: Plasma Protein Binding in Human, Monkey, Dog, Rat, and Mouse Plasma using Equilibrium Method	Plasma	AG-881	NA	[redacted] China	AG881-N-037-R1 [NP41890]
In Vitro Protein Binding Determination of AG-881 and AGI-69460 in Human Plasma	Plasma	AG-881, AGI-69460	NA	[redacted] USA	AG881-N-067 [NP41894]
Advanced Plasma Protein Binding in Human using 3 Concentrations of AG-881 and AGI-69460	Plasma	AG-881, AGI-69460	NA	[redacted] France	240001_6916 [NP42869]
Fu Determination of AG-881 in Rat, Rabbit and Monkey Plasma with RED Device. Fu Determination of AGI-69460 in Mouse, Rat, Rabbit, Dog, Monkey and Human Plasma with RED Device	Plasma	AG-881, AGI-69460	NA	[redacted] France	240001_6907 [NP42890]

Fu Determination of AG-881 and AGI-69460 in Rat Brain with RED device	Brain	AG-881, AGI-69460	NA	[redacted] France	240001_6913 [NP42870]
In Vitro Protein Binding of S095032 and its Metabolite AGI-69460 in Tumor Cell Lysate and in Culture Medium	U87MG Glioblastoma Cell line	AG-881, AGI-69460	NA	Technologie Servier, Gif-sur-Yvette, France	S095032_A-R-00006829-DHPB [NP42856]
DISTRIBUTION IN RED BLOOD CELLS					
AG-881: Red Blood Cell Partition in Human, Monkey, Dog, Rat, and Mouse Blood	Blood, plasma	AG-881	NA	[redacted] China	AG881-N-036-R1 [NP41893]
Method Transfer to Assay AG-881 in Human, Mouse, Rat, Rabbit, Dog and Monkey Plasma. Determination of AG-881 Response in Blood/Plasma Tests Performed in Human, Mouse, Rat, Rabbit, Dog and Monkey Plasma Samples	Whole Blood, Plasma	AG-881	NA	[redacted] France	240001_6877 [NP42891]
Red Blood Cell Partition Coefficient in Human Blood and Qualification of AGI-69460 in Human Plasma	Whole Blood, Plasma	AGI-69460	NA	[redacted] France	240001_6878 [NP42843]
METABOLISM					
***IN VIVO* METABOLISM (No studies performed)**					
Identification of Metabolites of AG-881 in Plasma Samples of Mouse, Rat, and Monkey Plasma	Mouse, rat and monkey plasma	AG-881	PO	[redacted]	AG881-N-041 [NP41954]
Pharmacokinetic Profile of AG-881 and its Metabolite AGI-69460 After Seven Days of QD PO Dosing of AG-881 in Male Sprague-Dawley Rats	Rat	AG-881	PO	[redacted] USA	AG881-N-070 [NP41910]
Pharmacokinetic Profile of AG-881 and its Metabolite AGI-69460 After Seven Days of QD PO Dosing of AG-881 in Male Cyno Monkeys	Monkey	AG-881	PO	[redacted] USA	AG881-N-071 [NP41911]

***IN VITRO* METABOLISM**					
Metabolic Stability of AG-881 in Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human Hepatocytes and Liver Microsomes	Human, monkey dog, rat and mouse hepatocytes and liver microsomes	AG-881	NA	[redacted]	AG881-N-038 [NP41941]
METABOLIC PATHWAYS					
Cytochrome P450 Reaction Phenotyping for ^{14}C-AGI-002308	Recombinant cytochrome P450 enzymes	^{14}C AG-881	NA	[redacted]	AG881-N-001 [NP41986]
Cytochrome P450 Reaction Phenotyping for ^{14}C-AGI-002308: Non-CYP Pathways	Human Hepatocytes	^{14}C AG-881	NA		AG881-N-001-R2 [NP41987]
Identification of the human cytochrome P450 enzyme(s) responsible for the in vitro metabolism of AG-881	Human liver microsomes and human hepatocytes	AG-881, [^{14}C]AG-881	NA		AG881-N-064 [NP41900]
Identification of the Enzyme Involved in the Hepatic Metabolism of S095032	Human hepatocytes, bactosomes over expressing human CYP1A2	S095032 (AG-881), [^{14}C]S095032	NA	Technologie Servier, Orléans, France	RB-23-095032-001-DHIZ [NP42349]
In Vitro Evaluation of AGI-69460 as a Substrate of the Human CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4/5 Metabolic Enzymes in Liver Microsomes and in Recombinant Enzyme System	Human recombinant cytochrome P450 enzymes and human liver microsomes	AGI-69460	NA	[redacted] Hungary	S095032_A-R-00006524-DHIZ [NP42839]

Identification of Metabolites of AG-881 in Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human Hepatocytes	Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human hepatocytes	AG-881	NA	[redacted]	AG-881-N-007 [NP41944]
In vitro Metabolism of [^{14}C]AG-881 in Rats and Human Liver Microsomes and Hepatocytes	Human liver microsomes, human hepatocytes	[^{14}C]AG-881	NA	[redacted] USA	AG881-N-052 [NP41898]
In vivo Metabolism and Excretion of [^{14}C]AG-881 in Rats	Rat	[^{14}C]AG-881	PO	[redacted] USA	AG881-N-050 [NP41899]
EXCRETION					
In vivo Metabolism and Excretion of [^{14}C]AG-881 in Rats	Rat	[^{14}C]AG-881	PO	[redacted] USA	AG881-N-050 [NP41899]
AG-881 Biliary Excretion Study Following Single Intravenous Administration (1 mg/kg) in Male Sprague-Dawley Rats	Sprague-Dawley Rats	AG-881	IV	[redacted] China	AG881-N-027-R1 [NP41901]
PHARMACOKINETIC DRUG INTERACTIONS					
In Vitro Evaluation of AG-881 as an Inducer of Cytochrome P450 Expression in Cultured Human Hepatocytes	Human hepatocytes	AG-881	NA	[redacted]	AG881-N-002 [NP41964]
In Vitro Evaluation of AG-881 as an Autoinducer in cultured human hepatocytes	Human hepatocytes	Deuterated AG-881 (also known as AGI-28187)	NA		AG881-N-003 [NP41965]
In Vitro Evaluation of AG-881 as an Inducer of Cytochrome P450 Expression in Cultured Human Hepatocytes	Human hepatocytes	AG-881	NA	USA	AG881-N-059 [NP41902]
In Vitro Evaluation of AGI-69460 as an Inducer of the Human CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 Metabolic Enzymes in Hepatocytes	Human Hepatocytes	AGI-69460	NA	[redacted] Hungary	S095032_A-R-00006521-DHIN [NP42841]

In Vitro Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Liver Microsomes	Human liver microsomes	AG-881	NA	[redacted] Hungary	AG881-N-005 [NP41966]
In Vitro Evaluation of AGI-69460 as an Inhibitor of the Human CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4/5 Metabolic Enzymes	Human liver microsomes	AGI-69460	NA		S095032_A-R-00006525-DHIP [NP42813]
Permeability and Gastrointestinal Fluid Stability of Vorasidenib (AG-881) According to the Biopharmaceutics Classification System (BCS)	Caco-2 cells	Vorasidenib (AG-881)	NA	[redacted] USA	PB-22-095032-007-DHAB [NP42279]
In Vitro Evaluation of Bidirectional Permeability of AG-881 across Caco-2 Cells	Caco-2 Cells	AG-881	NA	[redacted] China	AG881-N-048-R1 [NP41903]
In Vitro Evaluation of AG-881 as an Inhibitor and Substrate of Human P-gp and BCRP Transporters	Caco-2 Cells, Transfected MDCK cells	AG-881	NA	[redacted] Hungary	AG881-N-004 [NP41967]
In Vitro Inhibition Studies of Vorasidenib with Human MDR1 Efflux (ABC) Transporter in Caco-2 Cells	Caco-2 cells	AG-881	NA		S095032_A-R-00006898-DHTI [NP42853]
In Vitro Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of MATE-1 and MATE2-K and a Substrate of OATP1B1 and OATP1B3	Transfected MDCKII and HEK293 cells	AG-881	NA	[redacted] USA	AG881-N-058 [NP41906]
In Vitro Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters	Transfected membrane vesicles and HEK293 cells	AG-881	NA	[redacted] USA	AG881-N-051 [NP41905]
Evaluation of AGI-69460 as a Potential P-glycoprotein Substrate, Using Verapamil and LY335979 as Inhibitor in Caco-2 Cell Monolayers	Caco-2 cells	AGI-69460	NA	[redacted] China	AG881-N-073 [NP41913]

Evaluation of AGI-69460 as a Potential BCRP Substrate, Using Novobiocin and Ko143 as Inhibitor in Caco-2 Cell Line	Caco-2 cells	AGI-69460	NA	[redacted] China	AG881-N-072 [NP41912]
Evaluation of AGI-69460 as Substrate of OATP1B1 and OATP1B3	Transfected HEK293 cells	AGI-69460	NA	[redacted] China	AG881-N-074 [NP41914]
Evaluation of AGI-69460 as Inhibitor of OATP1B1 and OATP1B3	Transfected HEK293 cells	AGI-69460	NA	[redacted] China	AG881-N-075 [NP41915]
In vitro Interaction Studies of AGI-69460 with Human BCRP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and with Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3 and OCT2 Uptake Transporters	Transfected HEK293 cells	AGI-69460	NA	[redacted] Hungary	S095032_A-R-00006522-DHTI [NP42812]
In Vitro Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of UGT1A1 in Human Liver Microsomes	Human liver microsomes	AG-881	NA	[redacted]	AG881-N-006 [NP41904]
OTHER PHARMACOKINETIC STUDIES					
Permeability and Gastrointestinal Fluid Stability of Vorasidenib (AG-881) According to the Biopharmaceutics Classification System (BCS)	Simulated gastric fluid, Simulated intestinal fluid	Vorasidenib (AG-881)	NA	[redacted] USA	PB-22-095032-007-DHAB [NP42279]

Abbreviations: BCRP = breast cancer resistance protein; BCS = biopharmaceutics classification system; BSEP = bile salt export pump; CSF = cerebrospinal fluid; CYP = cytochrome; HEK = human embryonic kidney cell line; IV = intravenous; MATE = multidrug and toxin extrusion protein; MDCK = madin-darby canine kidney cell line; MDR = multidrug resistance protein; MRP = multidrug resistance-associated protein; NA = not applicable; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptide; OCT = organic cation transporter; PO = per os; P gp = permeability glycoprotein; QD = once a day; RED = rapid equilibration dialysis; UGT = uridine diphosphate glucuronosyl transferase.

2.　分析方法及びバリデーション試験

Species/ Sample Matrix	Analytes	Calibration Range	Type of Assay	Method Utilized	Noteworthy Findings (Precision and Accuracy Validation, AG-881)	GLP Compliance	Report Number
Rat Plasma	AGI-23088 (AG-881)	5.0 - 5000 ng/mL	LC-MS/MS	Protein precipitation	%Bias = -2.9 to 2.0% %CV = 1.8% to 5.7 %	Yes	AG881-Q-004 [NP41938]
Monkey Plasma	AGI-23088 (AG-881)	5.0 - 5000 ng/mL	LC-MS/MS	Protein precipitation	%Bias = -1.2 to 1.2% %CV = 2.2% to 6.4 %	Yes	AG881-Q-003 [NP41936]
Rat Plasma	AG-881	100 – 50,000 ng/mL	LC-MS/MS	Protein precipitation	%Dev (Intra-run) = -8.30 to 1.33% %CV (Intra-run) ≤ 4.86%	Yes	ATL-22-3046 [NP42338]
	AGI-69460	0.5 - 500 ng/mL					
Rabbit Plasma	AG-881	100 – 50,000 ng/mL	LC-MS/MS	Protein precipitation	%Dev (Intra-run) = -8.00 to 2.67% %CV (Intra-run) ≤ 3.52%	Yes	ATL-22-3048 [NP42315]
	AGI-69460	0.5 - 500 ng/mL					

Abbreviations: CV = coefficient of variation; LC-MS/MS = liquid chromatography with tandem mass spectrometry.

3.　薬物動態試験：吸収：単回投与

Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of AG-881 in Female BALB/c Nude Mice Following Single Intravenous (0.3 mg/kg or 1 mg/kg) Administration of AG-881 Free Base or Oral (0.3 mg/kg or 1 mg/kg) Administration of AG-881 [redacted]			**Test Article: AG-881**	
GLP Compliant: No			**Report No. NP41880, AG881-N-023-R1**	
Species	Mouse, BALB/c nude			
Gender (M/F)/Number of animals:	Female/ N = 12 /group, 48 total			
Feeding condition:	IV group not fasted.		PO group not fasted.	
Vehicle/Formulation:	AG-881 free base solution in 10% N-methyl-2-pyrrolidone (NMP), 10% Solutol HS 15 and 80% saline		AG-881 [redacted] suspension in 0.5% methylcellulose with 0.2% Tween 80 in water	
Method of Administration:	IV, single dose		PO, single dose	
Dose (mg/kg):	0.3, 1		0.3, 1	
Sample:	Plasma			
Analyte:	AG-881			
Assay:	LC-MS/MS			
PK parameters:	**IV (mean)**		**PO (mean)**	
	0.3 mg/kg	**1.0 mg/kg**	**0.3 mg/kg**	**1.0 mg/kg**
T_{max} (hr)	NA	NA	0.50	0.50
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	28.7	122
$AUC_{0\text{-}12hr}$ (hr•ng/mL)	390	1230	144	583
$AUC_{0\text{-}24hr}$ or AUC_t (hr•ng/mL)	527	1700	216	885
$AUC_{0\text{-}\infty}$ (hr•ng/mL)	737	2480	255	1230
$t_{1/2}$ (hr)	17	16	9.4	13
CL (L/hr/kg)	0.407	0.404	NA	NA
V_{ss} (L/kg)	7.58	7.91	NA	NA
V_z (L/kg)	9.73	9.30	NA	NA
MRT (hr)	19	20	NA	NA
F (%)	NA	NA	34.6	51.7

Additional information: Linear PK was observed from 0.3 mg/kg to 1 mg/kg dose.
Abbreviations: AUC = area under the curve; CL = clearance; C_{max} = maximum drug concentration; F = bioavailability; GLP = good laboratory practice; HS = hydroxy stearate; IV = intravenous, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, MRT = mean residence time; NA = not applicable, ND = not determined; PK = pharmacokinetic; PO = oral; $t_{1/2}$ = terminal half life; T_{max} = time to peak drug concentration; V_{ss} = steady-state volume of distribution; V_z = apparent volume of distribution during terminal phase.

Pharmacokinetics and Oral Bioavailability of AG-881 Following Single Intravenous (1 mg/kg) or Oral (10 mg/kg) Administration to Male Sprague-Dawley Rats			**Test Article: AG-881**	
GLP Compliant: No			**Report No. NP41882, AG881-N-026-R1**	
Species	Rat, Sprague-Dawley			
Gender (M/F)/Number of animals:	Male/ N = 3 /group, 6 total			
Feeding condition:	IV group not fasted		PO group fasted overnight and 4 hours post dose	
Vehicle/Formulation:	AG-881 free base solution in 10% N-methyl-2-pyrrolidone, 10% Solutol HS 15 and 80% saline		AG-881 free base suspension in 0.5% methylcellulose with 0.2% Tween 80 in water	
Method of Administration:	IV, single dose		PO, single dose	
Dose (mg/kg):	1		10	
Sample:	Plasma, urine			
Analyte:	AG-881			
Assay:	LC-MS/MS			
PK parameters:	**IV**		**PO**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**
T_{max} (hr)	NA	NA	8.0	0.0
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	545	44.5
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (hr•ng/mL)	1970	35.8	10600	438
$AUC_{0-\infty}$ (hr•ng/mL)	3490	389	ND[1]	ND[1]
$t_{1/2}$ (hr)	21	4.2	ND[1]	ND[1]
CL(L/hr/kg)	0.289	0.0303	NA	NA
V_{ss} (L/kg)	8.27	0.824	NA	NA
F (%)	NA	NA	53.8	2.23

Additional information: The amount of AG-881 excreted in rat urine was negligible (0.00438% of dose) over 24 hr post dose.
[1]Not determined due to insufficient terminal phase data points.
Abbreviations: AUC = area under the curve; CL = clearance; C_{max} = maximum drug concentration; F = bioavailability; GLP = good laboratory practice; hrs = hours; HS = hydroxy stearate; IV = intravenous, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, NA = not applicable, ND = not determined; PK = pharmacokinetic; PO = oral, SD = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to peak drug concentration; Vss = steady-state volume of distribution.

Pharmacokinetics of AG-881 Following Single Intravenous Infusion or Oral Administration of AG-881 to Male Beagle Dogs			**Test Article: AG-881**	
GLP Compliant: No			**Report No. NP41883, AG881-N-029-R1**	
Species	Dog, beagle			
Gender (M/F)/Number of animals:	Male/ N = 3/group, total 6			
Feeding condition:	IV group not fasted		PO group fasted overnight and 4 hours post dose	
Vehicle/Formulation:	AG-881 free base solution in 10% N-methyl-2-pyrrolidone, 10% Solutol HS 15 and 80% saline		AG-881 free base suspension in 0.5% methylcellulose and 0.2%Tween 80 in water	
Method of Administration:	IV 10 min infusion		PO	
Dose (mg/kg):	1		10	
Sample:	Plasma, urine			
Analyte:	AG-881			
Assay:	LC-MS/MS			
PK parameters:	**IV**		**PO**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**
T_{max} (hr)	0.17	0.0	0.67	0.29
C_{max} (ng/mL)	632	52.0	56.1	14.3
$AUC_{0\text{-}24hr,iv}$; $AUC_{0\text{-}72hr,po}$ (hr•ng/mL)	488	62.1	276	135
$AUC_{0-\infty}$ (hr•ng/mL)	547	81.9	351	154
CL (L/hr/kg)	1.85	0.274	NA	NA
V_{ss} (L/kg)	13.7	2.18	NA	NA
Vz (L/kg)	16.8	1.93	NA	NA
$t_{1/2}$ (hr)	6.4	0.91	16	11
MRT	7.5	1.7	NA	NA
F(%)	NA	NA	6.42	2.82

Additional information: No AG-881 was recovered in urine.
Abbreviations: AUC = area under the curve; CL = clearance; C_{max} = maximum drug concentration; F = bioavailability; GLP = good laboratory practice; hrs = hours; HS = hydroxy stearate; IV = intravenous, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, MRT = mean residence time; NA = not applicable, PK = pharmacokinetic; PO = oral, SD = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal half life; T_{max} = time to peak drug concentration; V_{ss} = steady-state volume of distribution; V_z = apparent volume of distribution during terminal phase.

Pharmacokinetics of AG-881 Following Single Intravenous Dose of AG-881 Free Base or Oral Administration of AG-881 SDD to Male Cynomolgus Monkeys			**Test Article: AG-881**	
GLP Compliant: No			**Report No. NP41884, AG881-N-030-R1**	
Species	Monkey, cynomolgus			
Gender (M/F)/Number of animals:	Male/ N = 3/group, total 6			
Feeding condition:	IV group not fasted		PO group fasted overnight and 4 hours post dose	
Vehicle/Formulation:	AG-881 free base solution in 10% N-methyl-2-pyrrolidone, 10% Solutol HS 15 and 80% saline		AG-881 [redacted] in 0.5% methylcellulose with 1% [redacted] ([redacted]) in water	
Method of Administration:	IV, single dose		PO, single dose	
Dose (mg/kg):	0.3		0.5	
Sample:	Plasma, urine			
Analyte:	AG-881			
Assay:	LC-MS/MS			
PK parameters:	**IV**		**PO**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**
T_{max} (hr)	0.197	0.048	1.4	1.1
C_{max} (ng/mL)	216	7.81	130	87.9
$AUC_{0\text{-}12hr}$ (hr•ng/mL)	309	58.8	409	100
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (hr•ng/mL)	394	88.7	586	151
$AUC_{0\text{-}48hr,iv}$; $AUC_{0\text{-}72hr,po}$ (hr•ng/mL)	504	134	960	194
AUC_{∞} (hr•ng/mL)	625	183	1140	170
CL (L/hr/kg)	0.506	0.137	NA	NA
V_{ss} (L/kg)	12.3	2.40	NA	NA
V_z (L/kg)	17.6	6.38	NA	NA
$t_{1/2}$ (hr)	24	3.6	31	7.5
MRT (hr)	25	2.9	NA	NA
F(%)	NA	NA	109	16.3

Additional information: The amount of AG-881 excreted in monkey urine was negligible (0.0183% of dose).
Abbreviations: AUC = area under the curve; CL = clearance; C_{max} = maximum drug concentration; F = bioavailability; GLP = good laboratory practice; hrs = hours; HS = hydroxy stearate; IV = intravenous, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, MRT = mean residence time; NA = not applicable, PK = pharmacokinetic; PO = oral, SD = standard deviation, [redacted] = [redacted]; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to peak drug concentration; V_{ss} = steady-state volume of distribution; V_z = apparent volume of distribution during terminal phase.

Pharmacokinetics of AG-881 Following Oral Administration of AG-881 Tablets or Suspension to Male Cynomolgus Monkeys					**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No					**Report No. NP41885, AG881-N-049-R1**
Species	Monkey, cynomolgus				
Gender (M/F)/Number of animals:	Male/ N = 4/group, total 20				
Feeding condition:	All groups were fasted except Group 4 Monkeys were fasted overnight and 4 hours post dose				
Vehicle/Formulation:	AG-881 citrate suspension was prepared in 0.5% methylcellulose with 0.2% Tween 80 in water				
Method of Administration:	PO, single dose				
Dose (mg/monkey):	5 mg/monkey for Group 1, 25 mg/monkey for Group 2, 100 mg/monkey for Groups 3, 4 and 5				
Sample:	Plasma				
Analyte:	AG-881				
Assay:	LC-MS/MS				
PK parameter	**Group 1**	**Group 2**	**Group 3**	**Group 4**	**Group 5**
	Tablet A (5 mg)	**Tablet B (25 mg)**	**Tablet C (100 mg)**	**Tablet C (100 mg)**	**Suspension (100 mg)**
	Fasted	**Fasted**	**Fasted**	**Fed**	**Fasted**
T_{max} (hr)	2.8	11	8.5	8.0	7.0
C_{max} (ng/mL)	152	143	477	1230	915
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (hr•ng/mL)	1670	2340	7830	17500	13700
$AUC_{0\text{-}72hr}$ (hr•ng/mL)	2590	4720	17100	35200	36100
AUC_{∞} (hr•ng/mL)	2740	4580*	20900	41700	46700
$t_{1/2}$ (hr)	17	18	22	18	27
F (%)	73.1	26.5	31.0	57.0	63.5

Additional information: The oral bioavailability was calculated based on the mean value of AUC∞ obtained from the monkey IV study (Report AG881-N-030-R1)
** AUC∞ was calculated for n=3.*
Abbreviations: AUC = area under the curve; CL = clearance; C_{max} = maximum drug concentration; F = bioavailability; GLP = good laboratory practice; hrs = hours; HS = hydroxy stearate; LC MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, MRT = mean residence time; PK = pharmacokinetic; PO = oral; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to peak drug concentration; V_{ss} = steady-state volume of distribution; V_z = apparent volume of distribution during terminal phase.

4.　薬物動態試験：吸収：反復投与

反復投与試験については、【2.6.2】（薬理試験の概要文）及び【2.6.7】（毒性試験概要表）に記載した。

5.　薬物動態試験：分布

AG-881 Brain Distribution Study Following Oral (50 mg/kg or 150 mg/kg) Administration to Female BALB/c Nude Mice				**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No				**Report No. NP41886, AG881-N-022-R1**
Species / strain	Mouse / BALB/c nude			
Gender (M/F)/Number of animals:	Female / N=10 for 50 mg/kg dose group; N=10 for 150 mg/kg dose group			
Feeding conditions	Fed			
Vehicle/Formulation:	AG-881 free base suspension in 0.5% methylcellulose with 0.2% Tween 80 in water			
Method of Administration:	PO, single dose			
Dose (mg/kg):	50, 150			
Sample:	Plasma and brain			
Analyte:	AG-881			
Assay:	LC-MS/MS			
PK parameters:	**50 mg/kg**		**150 mg/kg**	
	Plasma	**Brain**	**Plasma**	**Brain**
T_{max} (hr)	6.0	1.0	12.0	12.0
C_{max} (ng/mL)	3860	2130	7940	5400
$t_{1/2}$ (hr)	NC	NC	NC	NC
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (hr•ng/mL)	51600	32200	132000	95000
AUC_{∞} (hr•ng/mL)	NC	NC	NC	NC
$AUC_{0\text{-}24hr\ (brain)}/AUC_{0\text{-}24hr\ (plasma)}$	0.624		0.720	

Abbreviations: AUC = area under the curve; C_{max} = maximum drug concentration; GLP = good laboratory practice; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, NC = not calculated, PO = oral; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to peak drug concentration

Brain and CSF Distribution of AG-881 Following Single or Multiple QD Oral Doses of AG-881 in Male Sprague-Dawley Rats	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41889, AG881-N-025-R1**

Species / strain	Rat / Sprague-Dawley
Gender (M/F)/Number of animals:	Male / N=36 for single dose group; N=36 for multiple dose group
Feeding conditions	Fed (fasted overnight before dosing)
Vehicle/Formulation:	AG-881 [redacted] in 0.5% methylcellulose with 0.2% Tween 80 in water
Method of Administration:	PO, single dose and QD for 5 days
Dose (mg/kg):	0.3, 3, and 50
Sample:	Plasma, brain, and CSF
Analyte:	AG-881
Assay:	LC-/MS/MS

PK parameters:	**Single Dose (Day 1)**								
	0.3 mg/kg			**3 mg/kg**			**50 mg/kg**		
	Plasma	**Brain**	**CSF**	**Plasma**	**Brain**	**CSF**	**Plasma**	**Brain**	**CSF**
T_{max} (hr)	1.0	1.0	NA	3.0	3.0	8.0	8.0	3.0	8.0
C_{max} (ng/mL)	34.1	40.8	NA	256	307	3.90	1870	2020	29.6
$t_{1/2}$ (hr)	16.4	30.2	NA	NC	NC	NC	NC	NC	NC
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (hr•ng/mL)	412	584	NA	5030	6490	76.4	37000	41200	543
AUC_{∞} (hr•ng/mL)	650	1400	NA	NC	NC	NC	NC	NC	NC
$AUC_{0\text{-}24hr\ (brain)}$ /$AUC_{0\text{-}24hr\ (plasma)}$	1.42			1.29			1.11		
$AUC_{0\text{-}24hr\ (CSF)}$ /$AUC_{0\text{-}24hr\ (plasma)}$	NA			0.0152			0.0147		

Brain and CSF Distribution of AG-881 Following Single or Multiple QD Oral Doses of AG-881 in Male Sprague-Dawley Rats	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41889, AG881-N-025-R1**

PK parameters	**Multiple Dose (Day 5)**								
	0.3 mg/kg			**3 mg/kg**			**50 mg/kg**		
	Plasma	**Brain**	**CSF**	**Plasma**	**Brain**	**CSF**	**Plasma**	**Brain**	**CSF**
T_{max} (hr)	1.0	3.0	3.0	1.0	3.0	1.0	8.0	8.0	8.0
C_{max} (ng/mL)	77.7	120	1.83	904	1050	13.6	8350	10500	133
$t_{1/2}$ (hr)	54.0	NC	NC	45.5	NC	47.8	NC	NC	NC
$AUC_{0\text{-}24hr}$ (hr•ng/mL)	1610	2380	32.0	17000	21200	252	167000	197000	2710
AUC_{∞} (hr•ng/mL)	6000	NC	NC	55600	NC	810	NC	NC	NC
$AUC_{0\text{-}24hr\ (brain)}$ /$AUC_{0\text{-}24hr\ (plasma)}$	1.48			1.25			1.18		
$AUC_{0\text{-}24hr\ (CSF)}$ /$AUC_{0\text{-}24hr\ (plasma)}$	0.0199			0.0148			0.0162		

Abbreviations: AUC = area under the curve; C_{max} = maximum drug concentration; CSF = cerebrospinal fluid; GLP = good laboratory practice; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, NA = not available, NC = not calculated, PK = pharmacokinetic; PO = oral, QD = once daily, [redacted]= [redacted]; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to peak drug concentration.

PKPD study of AG-881 following oral administration of AG-881 to male ICR SCID mice bearing orthotopic TS603 IDH1R132H glioma tumor xenografts	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41863, AG881-N-046-R1**

Species / strain	Mouse / ICR SCID
Gender (M/F)/Number of animals:	Male / N=54
Feeding conditions	Fed
Vehicle/Formulation:	AG-881 free base and AG-881 [redacted] ([redacted]) as 50%AG-881 in 50% [redacted] (w/w)
Method of Administration:	PO, BID x 3
Dose (mg/kg):	Low dose: vehicle, 0.03, 0.1, and 0.3 mg/kg (AG-881 [redacted]) and High dose: 0.3, 3, and 10 mg/kg (AG-881 free base)
Sample:	Plasma, brain, and brain tumor tissue
Analyte:	AG-881
Assay:	LC-MS/MS

Dose group (mg/kg)	**$AUC_{0\text{-}12hr}$ (hr*ng/mL or hr*ng/g)**					
	Plasma	**Plasma, Dose Normalized[1]**	**Brain**	**Brain Tumor**	**Brain to Plasma AUC Ratio**	**Brain Tumor to Plasma AUC Ratio**
Vehicle (low-dose group)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Vehicle (high-dose group)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0.03	84.2	2800	96	388	1.14	4.62
0.1	201	2010	393	522	1.96	2.60
0.3	706	2350	903	1430	1.28	2.02
0.33	754	2510	1090	2110	1.45	2.80
3	9160	3050	8690	8200	0.95	0.90
10	24000	2400	26300	19200	1.1	0.80

Abbreviations: $AUC_{0\text{-}12hr}$ = area under the concentration × time curve from 0 to 12 hrs; BID = twice daily; GLP = good laboratory practice; [redacted] = [redacted]; hrs = hours; LC MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, NA = not applicable; PO = oral; SCID = severe combined immunodeficiency; [redacted] = [redacted].

[1] Dose normalized to 1 mg/kg

Tissue Distribution of Radioactivity Following a Single Oral Dose of [^{14}C]AG-881 in Male Long-Evans Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)	**Test Article: [^{14}C]AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41895, AG881-N-053**

Species / Strain:	Rat / Long Evans
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male/9
Feeding Condition:	Fed *ad libitum*
Formulation/Vehicle:	[^{14}C]AG-881 formulated in 10% TPGS/1% [redacted]/0.1% simethicone in water
Method of Administration:	Oral gavage
Dose (mg/kg):	30 mg/kg containing 300 µCi/kg [^{14}C]
Sample:	Tissues were collected from one animal/time point at 1, 2, 4, 8, 24, 48, 96, 168, and 504 hours postdose.
Assay:	Tissue distribution of total radioactivity evaluated by quantitative whole-body autoradiography
Analyte:	[^{14}C]AG-881

Tissue Group	**Tissue Name**	**[^{14}C]AG-881-derived radioactivity Concentration (µg equivalents/g)**								
		Hours Post-Dose								
		(1 hr)	**(2 hr)**	**(4 hr)**	**(8 hr)**	**(24 hr)**	**(48 hr)**	**(96 hr)**	**(168 hr)**	**(504 hr)**
Vascular	Plasma (LSC)	3.37	3.36	2.46	3.07	2.31	1.49	0.598	0.191	BQL
	Blood (LSC)	2.34	2.17	1.67	2.03	1.56	1.12	0.496	0.257	0.0728
	Aorta	7.43	7.57	9.72	16.0	5.52	3.53	1.06	0.281	BQL
	Blood (cardiac)	2.96	2.54	1.70	2.04	1.58	1.09	0.521	0.269	0.0859
Central Nervous System	Brain (whole)	3.59	3.02	2.49	2.10	1.40	1.09	0.559	0.184	BQL
	Spinal Cord	3.65	3.70	3.02	2.64	1.58	1.27	0.644	0.188	BQL
Ocular	Eye	1.42	1.87	0.952	1.07	1.04	1.12	0.409	0.225	BQL
	Lens	0.334	0.537	0.388	0.69	1.09	1.03	0.507	0.171	BQL
	Uveal Tract	2.75	3.74	1.60	2.17	1.27	0.684	0.693	0.315	0.0554
Dermal	Non-pigmented skin	8.26	9.56	5.47	12.0	7.24	5.43	1.79	0.584	0.0526
	Pigmented skin	10.5	17.5	16.4	15.2	6.56	6.95	2.67	0.484	BQL

Tissue Distribution of Radioactivity Following a Single Oral Dose of [^{14}C]AG-881 in Male Long-Evans Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)	**Test Article: [^{14}C]AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41895, AG881-N-053**

Tissue Group	**Tissue Name**	**[^{14}C]AG-881-derived radioactivity Concentration (µg equivalents/g)**								
		Hours Post-Dose								
		(1 hr)	**(2 hr)**	**(4 hr)**	**(8 hr)**	**(24 hr)**	**(48 hr)**	**(96 hr)**	**(168 hr)**	**(504 hr)**
Endocrine	Adrenal cortex	18.2	20.5	23.6	26.3	16.7	9.60	6.17	1.53	0.228
	Adrenal gland	18.1	18.7	19.8	22.8	14.9	8.87	5.42	1.45	0.225
	Adrenal medulla	17.2	13.3	11.6	10.2	8.34	4.02	3.37	1.14	0.217
	Pituitary gland	6.36	4.70	3.93	2.72	1.62	1.71	0.885	0.236	BQL
	Thyroid gland	9.78	12.9	15.2	5.37	6.71	4.15	1.65	1.31	0.059
Fatty	Brown fat	32.2	56.7	61.3	51.6	37.0	25.1	11.2	2.74	0.119
	White fat (inguinal)	23.2	39.5	55.2	67.8	59.0	50.2	22.8	3.38	0.127
Gastrointestinal Tract	Cecum mucosa	4.99	38.7	136	19.0	2.61	7.25	1.82	0.835	0.0975
	Esophagus wall	35.2	63.9	19.1	5.57	2.37	1.59	1.18	0.164	0.0557
	Large intestine wall	5.86	125	61.3	98.8	15.9	6.24	4.37	0.556	0.165
	Oral mucosa	3.18	3.20	3.24	2.07	1.53	1.23	0.68	0.173	BQL
	Small intestine wall	175	59.5	39.9	21.6	15.4	3.18	2.59	1.52	0.0781
	Stomach wall (glandular)	62.9	74.0	44.3	16.6	4.50	4.27	4.34	1.24	0.137
	Stomach wall (non-glandular)	38.1	17.0	3.85	2.64	1.97	1.54	0.831	0.224	0.109

Tissue Distribution of Radioactivity Following a Single Oral Dose of [^{14}C]AG-881 in Male Long-Evans Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)	**Test Article: [^{14}C]AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41895, AG881-N-053**

Tissue Group	**Tissue Name**	**[^{14}C]AG-881-derived radioactivity Concentration (µg equivalents/g)**								
		Hours Post-Dose								
		(1 hr)	**(2 hr)**	**(4 hr)**	**(8 hr)**	**(24 hr)**	**(48 hr)**	**(96 hr)**	**(168 hr)**	**(504 hr)**
Gastrointestinal Tract Contents	Cecum contents	6.63	131	203	209	35.0	41.5	12.9	2.52	0.143
	Large intestine contents	7.98	456	216	241	40.3	67.2	15.1	6.10	0.228
	Small intestine contents	514	522	260	22.9	41.3	13.0	11.0	2.67	0.203
	Stomach contents	472	453	465	0.275	2.55	0.170	1.05	0.099	0.0552
	Urinary bladder contents	0.795	0.846	1.19	1.34	0.78	0.561	4.81	0.102	BQL
Lymphatic	Bone marrow (femur)	6.78	12.6	5.69	9.23	2.80	1.91	1.31	0.292	BQL
	Lymph node (cervical)	3.72	13.1	4.39	11.7	8.69	1.15	0.921	0.143	BQL
	Spleen	4.73	4.34	3.62	4.66	2.56	1.64	0.945	0.330	0.0804
	Thymus	3.35	3.73	2.88	2.47	1.70	1.15	0.623	0.187	BQL
Metabolic/ Excretory	Bile (in duct)	21.3	40.3	27.9	25.4	13.4	9.73	0.744	1.83	BQL
	Kidney	8.65	9.44	8.22	9.71	6.27	3.84	3.53	1.21	0.117
	Kidney cortex	9.88	10.9	9.59	11.3	7.72	4.03	3.85	1.23	0.128
	Kidney medulla	6.93	7.71	6.57	7.20	4.60	3.36	2.95	0.973	0.101
	Liver	24.3	22.9	14.0	12.5	9.65	7.62	5.38	2.56	0.174
	Urinary bladder wall	5.62	12.0	3.57	4.01	2.71	2.94	0.954	0.248	0.0624
Muscular	Heart	9.14	7.72	6.26	7.34	6.50	5.29	4.78	1.19	0.0855
	Muscle (femoral)	5.03	3.82	3.52	3.50	2.12	2.00	0.941	0.209	0.0525

Tissue Distribution of Radioactivity Following a Single Oral Dose of [14C]AG-881 in Male Long-Evans Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (QWBA)	**Test Article: [^{14}C]AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41895, AG881-N-053**

Tissue Group	**Tissue Name**	**[^{14}C]AG-881-derived radioactivity Concentration (µg equivalents/g)**								
		Hours Post-Dose								
		(1 hr)	**(2 hr)**	**(4 hr)**	**(8 hr)**	**(24 hr)**	**(48 hr)**	**(96 hr)**	**(168 hr)**	**(504 hr)**
Reproductive	Epididymus	4.84	8.34	4.64	4.64	2.49	2.29	1.07	0.397	BQL
	Prostate	2.67	2.15	3.03	1.89	1.42	0.71	0.601	0.215	BQL
	Seminal vesicle	4.15	5.60	2.60	2.08	1.30	1.71	0.842	0.161	BQL
	Testis	3.34	3.86	2.91	2.34	1.45	1.38	0.745	0.181	BQL
Respiratory	Lung	4.29	4.38	2.76	2.80	2.03	1.62	0.795	0.322	0.0719
	Nasal turbinates	5.24	5.67	6.39	7.14	6.56	5.05	3.93	2.75	0.811
	Trachea	7.79	7.38	11.00	9.29	2.98	3.01	2.85	1.86	BQL
Secretory	Ex-orbital lachrymal gland	9.46	8.66	8.01	7.15	5.41	4.00	2.52	1.04	0.114
	Hardean gland	20.4	21.4	17.7	13.8	13.9	6.80	4.33	1.07	0.188
	Intra-orbital lachrymal gland	7.98	8.99	13.3	6.73	5.72	3.99	1.98	1.04	0.0867
	Pancreas	10.8	10.7	9.36	7.07	6.38	3.85	2.16	0.698	0.0663
	Preputial gland	12.2	17.6	8.58	19.1	18.3	13.1	6.06	0.953	BQL
	Salivary gland	7.06	6.56	6.70	5.22	3.29	2.84	1.56	0.531	0.0588
Skeletal	Bone (femur)	1.33	1.50	1.83	1.08	0.880	0.617	0.445	0.0754	BQL

Abbreviations: BQL = below quantification limit; GLP = good laboratory practice; [redacted] = [redacted]; hr = hour; LLOQ = lower limit of quantification; LSC = liquid scintillation counting; QWBA = quantitative whole-body autoradiography; TPGS = tocopheryl polyethylene glycol succinate.
BQL = <LLOQ for LSC = <0.0169 µg equiv/g (plasma) or <0.0343 µg equiv/g (blood)
BQL = <LLOQ for QWBA = <0.0504 µg equiv/g

6.　薬物動態試験：タンパク結合

AG-881: Plasma Protein Binding in Human, Monkey, Dog, Rat, and Mouse Plasma using Equilibrium Method	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41890, AG881-N-037-R1**

Study System:	Plasma equilibrium dialysis
Target entity, Test System and Method:	AG-881, plasma, equilibrium dialysis

Compound	**Test Concentration (µM)**	**Binding %**				
		Human	**Monkey**	**Dog**	**Rat**	**Mouse**
AG-881	0.2	97.4	95.0	96.1	96.8	97.3
	1	97.2	95.4	96.4	96.9	97.8
	10	96.5	93.9	95.4	95.8	97.1
	Mean ± SD	97.0 ± 0.452	94.7 ± 0.790	95.9 ± 0.486	96.5 ± 0.623	97.4 ± 0.371

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; SD = standard deviation

In Vitro Protein Binding Determination of AG-881 and AGI-69460 in Human Plasma			**Test Article: AG-881 and AGI-69460**
GLP Compliant: No			**Report No. NP41894, AG881-N-067**
Study System:	Plasma equilibrium dialysis		
Target entity, Test System and Method:	AG-881, AGI-69460, plasma, rapid equilibrium dialysis		
Compound	**Test Concentration (µM)**	**% Unbound**	
		Mean	**SD**
AG-881	0.2	2.74	0.0819
	1	2.43	0.1
	10	2.80	0.02
	Overall % Unbound Mean	2.66	0.182
AGI-69460	0.1	14.2	0.624
	0.5	11.9	0.0577
	5	12.9	0.265
	Overall % Unbound Mean	13.0	1.07

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; SD = standard deviation

Advanced Plasma Protein Binding in Human using 3 Concentrations of AG-881 and AGI-69460				**Test Article: AG-881 and AGI-69460**
GLP Compliant: No				**Report No. NP42869, Study No. 240001_6916**
Study System:	Plasma			
Target entity, Test System and Method:	AG-881, AGI-69460, plasma, rapid equilibrium dialysis			
Compound	**Test Concentration (nM)**	**Mean % Plasma Unbound Fraction (bound fraction)**		
		Human Plasma	**Human Albumin**	**Human AAG**
AGI-69460	50	16.7 (83.3)	46 (54.0)	90.9 (9.10)
	300	17.0 (83.0)	40.3 (59.7)	93.4 (6.60)
	3000	15.9 (84.1)	37.8 (62.2)	94.6 (5.40)
AG-881	50	4.47 (95.5)	16.8 (83.2)	84.3 (15.7)
	300	3.98 (96.0)	14.7 (85.3)	73.3 (26.7)
	3000	3.98 (96.0)	14.3 (85.7)	76.4 (23.6)

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; AAG = Acidic alpha-1 glycoprotein.

Fu Determination of AG-881 in Rat, Rabbit and Monkey Plasma with RED Device. Fu Determination of AGI-69460 in Mouse, Rat, Rabbit, Dog, Monkey and Human Plasma with RED Device							**Test Article: AG-881 and AGI-69460**
GLP Compliant: No							**Report No. NP42890, Study No. 240001_6907**
Study System:		Plasma					
Target entity, Test System and Method:		AG-881, AGI-69460, plasma, rapid equilibrium dialysis					
Compound	**Test Concentration (nM)**	**Mean % Plasma Unbound Fraction (bound fraction)**					
		Mouse	**Rat**	**Rabbit**	**Dog**	**Monkey**	**Human**
AGI-69460	50	8.32 (91.7)	11.5 (88.5	14.1 (85.9)	19.9 (80.1)	28.0 (72.0)	17.3 (82.7)
	300	9.26 (90.7)	11.3 (88.7)	13.6 (86.4)	18.9 (81.1)	27.4 (72.6)	16.9 (83.1)
	3000	8.94 (91.1)	11.9 (88.1)	13.4 (86.6)	18.5 (81.5)	20.9 (79.1)	16.5 (83.5)
AG-881	50	NA	3.17 (96.8)	3.63 (96.4)	NA	6.42 (93.6)	NA
	300		3.40 (96.6)	3.71 (96.3)		7.09 (92.9)	
	3000		3.07 (96.9)	3.41 (96.6)		5.64 (94.4)	
	60000 (rat) /6000 (Rabbit) /30000 (Monkey)		3.45 (96.5)	3.29 (96.7)		3.89 (96.1)	

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; Fu = unbound fraction; NA = not applicable; RED = rapid equilibration dialysis.

Fu Determination of AG-881 and AGI-69460 in Rat Brain with RED Device		**Test Article: AG-881 and AGI-69460**
GLP Compliant: No		**Report No. NP42870, Study No. 240001_6913**
Study System:	**Brain**	
Target entity, Test System and Method:	**AG-881, AGI-69460, rat brain, rapid equilibrium dialysis**	
Compound	**Test Concentration (nM)**	**Mean % Unbound Fraction (bound fraction) in Rat Brain**
AGI-69460	50	4.06 (95.9)
	300	3.94 (96.1)
	3000	2.79 (97.2)
AG-881	50	0.835 (99.2)
	300	1.23 (98.8)
	3000	0.939 (99.1)
	30000	0.784 (99.2)
	100000	1.31 (98.7)

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; Fu = unbound fraction; RED = rapid equilibration dialysis.

In Vitro Protein Binding of S095032 and its Metabolite AGI-69460 in Tumor Cell Lysate and in Culture Medium							**Test Article: AG-881 and AGI-69460**
GLP Compliant: No							**Report No. NP42856, S095032_A-R-00006829-DHPB**
Study System:	**U87MG human glioblastoma cell line**						
Target entity, Test System and Method:	**S095032, AGI-69460, U87MG tumor cells, rapid equilibrium dialysis**						
Compound	**Matrix**	**Mean % Unbound and Bound Fraction of S095032 and AGI-69460 in RPMI+10%FCS Medium or in Tumor Cell Lysate**					
		0.03 µM		**0.3 µM**		**3 µM**	
		fu (%)	fb (%)	fu (%)	fb (%)	fu (%)	fb (%)
S095032	RPMI + 10% FCS	14.0	86.0	12.0	88.0	13.1	86.9
	Mock cell lysate	62.6	37.4	60.6	39.4	61.3	38.7
	UG87 heterozygote cell lysate	71.4	28.6	73.0	27.0	68.1	31.9
	UG87 homozygote cell lysate	60.2	39.8	71.8	28.2	67.3	32.7
AGI-69460	RPMI + 10% FCS	25.9	74.1	23.2	76.8	25.1	74.9
	Mock cell lysate	69.6	30.4	77.9	22.1	72.0	28.0
	UG87 heterozygote cell lysate	83.6	16.4	87.0	13.0	95.8	4.2
	UG87 homozygote cell lysate	79.7	20.3	78.0	22.0	88.4	11.6

Abbreviations: RPMI = Roswell Park Memorial Institute; fb = bound fraction; FCS = Fetal calf serum; fu = unbound fraction; RED = rapid equilibrium dialysis.
Note: The non-specific binding in RED system was about 21% for S095032 and 17% for AGI-69460 at 0.03 µM.

7.　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

該当なし。

8.　薬物動態試験：その他の分布試験

AG-881: Red Blood Cell Partition in Human, Monkey, Dog, Rat, and Mouse Blood						**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No						**Report No. NP41893, AG881-N-036-R1**
Study System:	Whole blood					
Target entity, Test System and Method:	AG-881, whole blood and plasma from human, monkey, dog, rat, and mouse					
Compound	**Test Concentration (µM)**	**RBC to plasma ratio ($K_{RBC/PL}$)**				
		Human	**Monkey**	**Dog**	**Rat**	**Mouse**
AG-881	1.0	0.23	0.15	0.13	0.22	0.22

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; KRBC/PL = RBC-to-plasma partition coefficient; RBC = red blood cell.

Method transfer to assay AG-881 in human, mouse, rat, rabbit, dog and monkey plasma Determination of AG-881 Response in Blood/Plasma Tests Performed in Human, Mouse, Rat, Rabbit, Dog and Monkey Plasma Samples							**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No							**Report No. NP42891, Study No. 240001_6877**
Study System:	Whole blood and Plasma						
Test System:	AG-881, whole blood and plasma from human, monkey, dog, rat, and mouse						
Parameter	**Test Concentration**	**AG-881 Blood to Plasma Ratio and RBC Partitioning Coefficient**					
	(nM)	**Human**	**Monkey**	**Dog**	**Rabbit**	**Rat**	**Mouse**
B/P	1000	0.866	0.991	1.04	1.09	0.973	0.811
$K_{RBC/PL}$	1000	0.589	0.986	1.08	1.2	0.947	0.529

Abbreviations: B/P = blood-to-plasma ratio; GLP = good laboratory practice; KRBC/PL = RBC-to-plasma partition coefficient; RBC = red blood cell.

Red Blood Cell Partition Coefficient Determination in Human Blood and Qualification of AGI-69460 in Human Plasma			**Test Article: AGI-69460**
GLP Compliant: No			**Report No. NP42843, Study No. 240001_6878**
Study System:	**Whole blood and Plasma**		
Test System:	**Human whole blood and plasma**		
Compound	**Test Concentration (nM)**	**AGI-69460 Partitioning in Human Blood**	
		$K_{RBC/PL}$	**B/P**
AGI-69460	100	2.6	1.52
	200	1.78	1.26
	400	2.12	1.37

Abbreviations: B/P = blood-to-plasma ratio; GLP = good laboratory practice; KRBC/PL = RBC-to-plasma partition coefficient.

9.　薬物動態試験：代謝：*In Vitro*

Metabolic Stability of AG-881 in Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human Hepatocytes and Liver Microsomes					**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No					**Report No. NP41941, AG881-N-038**
Assay:	LC-MS/MS				
Study System:	Liver microsomes				
Incubation Time:	0, 15, 30, and 60 minutes				
Concentration:	1 µM				
PK Parameters:	**Human**	**Monkey**	**Dog**	**Mouse**	**Rat**
$t_{1/2}$ (minute)	> 60.0	52.9	> 60.0	> 60.0	>60.0
CL_{int} (µL/min/mg)	< 11.6	13.1	< 11.6	< 11.6	< 11.6
CL_{hep} (L/min)	< 0.259	0.0219	< 0.108	< 0.000323	< 0.00226
Study System:	Hepatocytes				
Incubation Time:	0, 10, 60, 120, and 240 minutes				
Concentration:	1 µM				
Parameter:	**Human**	**Monkey**	**Dog**	**Mouse**	**Rat**
$t_{1/2}$ (minute)	> 240	126	70	> 240	> 240
CL_{int} (µL/min/million cells)	< 2.89	5.5	9.9	< 2.89	< 2.89
CL_{hep} (L/min)	< 0.382	0.0658	0.360	< 0.000446	< 0.00277

Abbreviations: CL_{int} = intrinsic clearance, CL_{hep} = hepatic clearance; GLP = good laboratory practice; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; PK = pharmacokinetic; $t_{1/2}$ = elimination half-life

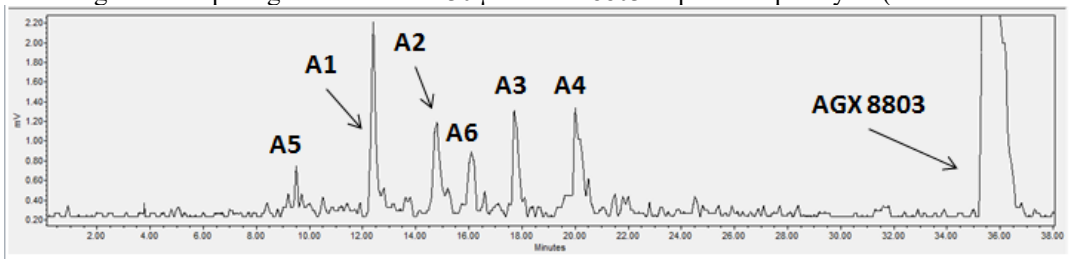
Cytochrome P450 Reaction Phenotyping for ^{14}C-AGI-0023008			**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No			**Report No. NP41986, AG881-N-001**
Test System:	Human recombinant cytochrome P450 enzymes		
AG-881 (µM)	**Enzyme**	**AG-881 Remaining (%)**	**CYP concentration Used (pmol CYP/mL)**
30	CYP1A2*	99.2%	207
	CYP2B6	100	50
	CYP2C8	100	358
	CYP2C9	100	500
	CYP2C19	100	40
	CYP2D6	100	20
	CYP2E1	100	50
	CYP3A4	100	394
	CYP3A5	100	315

Incubation time = 120 min; Normalized rate (pmol/min/mg protein) = Rate (pmol/min/pmol CYP) x Specific content (pmol CYP/mg protein)
% Total Normalized rate = Normalized rate (pmol/min/pmol CYP) ÷ Total rate of clearance x 100%
Percentages are rounded to one decimal place. Percentages ≥ 100% are rounded to the nearest whole number.
Values are rounded to three significant figures.
Additional information: No disappearance of ^{14}C-AGI-23088 (aka AG-881) observed in any incubation or in human liver microsomes.
**Two small metabolite peaks observed, but were below the limits of quantitation (< 1% of total peak area).*
Abbreviations: CYP = cytochrome P450; GLP = good laboratory practice.

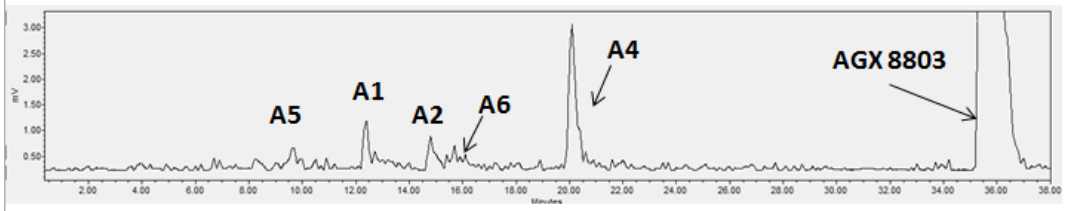
Non-CYP Reaction Phenotyping for ^{14}C-AGI-0023008	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41987, AG881-N-001-R2**

Test System:	Human cryopreserved hepatocytes

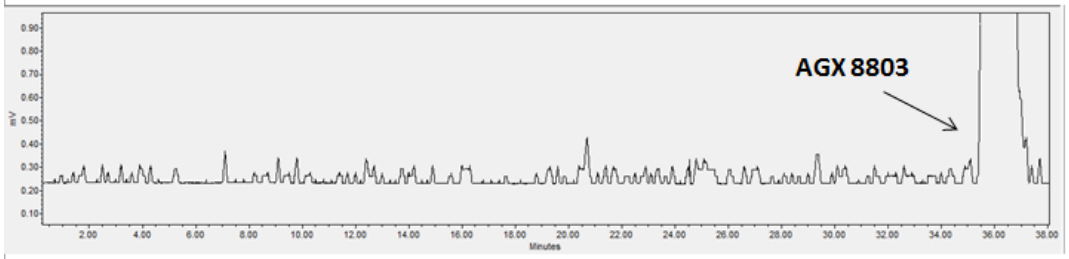
Chromatograms comparing metabolism of 30 µM AGX 8803 in plated hepatocytes (4 hour incubation)



4 h incubation time, media sample



4 h incubation time, cell lysate



Fortified media – 0 min

Abbreviations: AGX-8803 = 14C-AGI-23088 = 14C-AG881; CYP = cytochrome; GLP = good laboratory practice.

Non-CYP Reaction Phenotyping for ^{14}C-AGI-0023008					**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No					**Report No. NP41987, AG881-N-001-R2**
Metabolite	**MH+**	**RT (min)**	**Metabolite**	**Fragmentation ions consistent with metabolites reported in AG881-N-041-R1**	**Possible corresponding metabolite detected by radioactive analysis**
AGX-8803 deschloro cysteine adduct	500	~19.0	M3	136.9; 259.8; 413.1	A4
AGX-8803 hydroxylated deschloro cysteine adduct	516	~16.8	M4	429.2	A3
GX-8803 deschloro glutathione adduct	686	~14.5	M5	413.1; 557.2	A2
AGX-8803 glucuronide conjugate of hydroxylated deschloro cysteine adduct	692	~12.2	M6	429.2; 516.2	A1
AGX-8803 hydroxylated deschloro glutathione adduct	702	~14.1	M7	429.2; 573.4	A2

Incubation time = 24 hr
Abbreviations: GLP = Good laboratory practice; GSH = glutathione; GST = glutathione S-transferase; hr = hour; MH+= protonated molecular ion; min = minute; RT = retention time.
All detected transformations of ^{14}C-AG-881 appear to be a result of direct reaction with GSH or cysteine, possibly mediated via GST.
Note: AGX-8803 = ^{14}C-AGI-23088 = ^{14}C-AG881

Identification of the Enzyme Involved in the Hepatic Metabolism of S095032		Test Article: AG-881, [^{14}C]**AG-881**		
GLP Compliant: No		Report No. NP41900, **AG881-N-064 [NP41900]**		
Study System:		Human liver microsomes, Human Hepatocytes, and recombinant Cytochrome P450		
Target entity and Method:		AG-881, [^{14}C]AG-881, LC-MS/MS		
Cytochrome P450 Isozyme	**Inhibitor**	**Percent Inhibition of AG-881 Metabolite formation in Incubations with**		
		Human Liver Microsomes	**Human Hepatocytes**	
		M701[a]	**M499**	**M515**
CYP1A2	Furafylline (1 µM)	56.3 (0.6)	N	
CYP1A2	Furafylline (10 µM)	92.1 (0.4)	92.7 (0.5)	92.4 (0.8)
CYP2B6	Thiotepa	-1.8 (8.2)	8.1 (5.6)	-17.9 (11.9)
CYP2C8	Montelukast	-0.8 (4.5)	-68.1 (6.7)	-139.8 (10.4)
CYP2C9	Sulfaphenazole	4.8 (3.7)	-24.0 (9.2)	-24.4 (11.8)
CYP2C19	Benzylnirvanol	2.5 (2.8)	5.3 (14.2)	-0.2 (9.4)
CYP2D6	Quinidine	5.8 (5.3)	-32.3 (6.7)	-46.7 (11.9)
CYP3A4	Ketoconazole	6.8 (2.6)	35.5 (3.3)	34.2 (6.4)

Abbreviations: CYP = cytochrome; GLP = good laboratory practice; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; M701: glutathione conjugate of hydroxy deschloro-vorasidenib; M499: Cysteine conjugate of deschloro-vorasidenib; M515: cysteine conjugate of hydroxy deschloro-vorasidenib
a In [14C]AG-881 incubations with recombinant cytochrome P450, metabolite M701 was formed primarily by recombinant CYP1A2 and at trace level by CYP2B6, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4.

Identification of the Enzyme Involved in the Hepatic Metabolism of S095032			**Test Article: S095032, [^{14}C]-S095032**
GLP Compliant: No			**Report No. NP42349, RB-23-095032-001-DHIZ**
Study System:	Human Hepatocytes, bactosomes overexpressing human CYP1A2 (rCYP1A2)		
Target entity, Test System and Method:	S095032, [^{14}C]S095032, Hepatocytes, LC-MS/MS and LC-β-radioactivity detector (Top Count)		
S095032 *in vitro* kinetic parameters in human hepatocytes			
Compound	**Concentration (µM)**	**$Cl_{int,IVT}$ (mL/min/g protein)**	**Predicted Cl_H (mL/min)**
S095032	0.1	10.5	15.8
	1	10.8	16.4
	10	7.42	11.3
	10 (^{14}C)	9.37	14.2
	Mean ± SD	9.52 ± 1.52	14.4
Summary of estimated enzymes contribution in S095032 human metabolism			
Metabolic Pathways	**Enzyme**	**Individual relative contribution (%)**	**Overall contribution (%)**
Oxidative[1]	CYP1A2[2]	53	70.7
	Other CYPs	17.7	
Non-oxidative	unknown	29.3	29.3
In vitro inhibitory potential of CYP1A2 inhibitor drugs on [^{14}C]S095032 intrinsic clearance in human hepatocytes			
Metabolic Pathways	**Enzyme**	**Inhibition of S095032 metabolism (%)**	**Overall contribution (%)**
Ciprofloxacin	CYP1A2	90.6 / 100	95.3
Fluvoxamine	CYP1A2	ND / 90.7	90.7

Note: S095032 = AG-881.
Abbreviations: $Cl_{int,IVT}$: In vitro intrinsic clearance; Cl_H: Hepatic clearance, CYP = cytochrome; GLP = good laboratory practice; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; ND = Not determined; SD = standard deviation.1 Oxidative pathways: total CYP-dependent contribution determined after incubation of S095032 (1 µM) in human hepatocytes in the presence of 1-ABT (1 mM)
2 CY1A2 contribution determined after incubation of S095032 (1 µM) in human hepatocytes in the presence of furafylline (10 µM)

Identification of the Enzyme Involved in the Hepatic Metabolism of S095032		**Test Article: S095032, [^{14}C]-S095032**
GLP Compliant: No		**Report No. NP42349, RB-23-095032-001-DHIZ**
Study System:	Human Hepatocytes, bactosomes overexpressing human CYP1A2	
Target entity, Test System and Method:	S095032, [^{14}C]S095032, Hepatocytes, LC-MS/MS and LC-β-radioactivity detector (Top Count)	

Mass signal inhibition (%) of S095032 metabolites by selective and non-selective inhibitors after 5h incubation of S0950032 at 1 µM using human hepatocytes

ID	Biotransformation	1-ABT	Furafylline	Azamulin	Fluvoxamine
M685	Dechlorination + gluthatione conjugation	100 / 100	100 / 96.7	12.5 / -24.4	72.2
M701	Hydroxylation + dechlorination + gluthatione conjugation	100 / 100	100 / 95.0	5.62 / -28.6	82.9
M556	Dechlorination and cysteine-glycine conjugation	ND / 100	ND /100	ND / -23.2	100
M572	Hydroxylation +dechlorination + cysteine-glycine conjugation	100 / 100	100 / 100	-19 /-13.4	82.0
M499	Dechlorination + Cysteine conjugation	100 / 100	91.3 / 93.3	-14.7 / -18.9	78.0
M515	Hydroxylation + dechlorination + cysteine conjugation	100 / 100	100 / 100	-13.2 / -27.2	79.3

Abbreviations: 1-ABT = 1-Aminobenzotriazole; GLP = good laboratory practice; ID = identity; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; Mxxx: metabolite + nominal mass; ND: not detected; n=2 assays expect for fluvoxamine n=1
Note: Inhibition of metabolism assay in hepatocytes was determined using S095032 (AG-881)

In Vitro Evaluation of AGI-69460 as a Substrate of the Human CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4/5 Metabolic Enzymes in Liver Microsomes and in Recombinant Enzyme System		**Test Article: AGI-69460**
GLP Compliant: No		**Report No. NP42839, S095032_A-R-00006524-DHIZ**
Test System:	Human recombinant cytochrome P450 enzymes and Human Liver Microsomes	
AGI-69460 (nM) (nominal)	**Human Recombinant Enzyme (250 pmol CYP/mL) or HLM (0.5 mg/mL)**	**AGI-69460 Remaining Concentration after 120-minutes of Incubation (n=3)**
200	CYP1A2	237
	CYP2B6	250
	CYP2C8	249
	CYP2C9	223
	CYP2C19	255
	CYP2D6	259
	CYP3A4	272
	CYP3A5	278
	Control	272
200	HLM	217
1000	HLM	891

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; CYP = cytochrome P450; HLM = human liver microsomes

10. 薬物動態試験：代謝：*In Vivo*

Pharmacokinetic Profile of AG-881 and its Metabolite AGI-69460 After Seven Days of QD PO Dosing of AG-881 in Male Sprague-Dawley Rats						**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No						**Report No. NP41910, AG881-N-070**
Species	Rat, Sprague-Dawley					
Gender (M/F)/Number of animals:	Male / N = 4					
Feeding condition:	Fed *ad libitum*					
Vehicle/Formulation:	AG-881 in 10% vitamin E TPGS/1% [redacted]/0.1% simethicone in deionized water					
Method of Administration:	PO, QD for 7 days					
Dose (mg/kg):	30					
Sample:	Plasma					
Analyte:	AG-881, AGI-69460					
Assay:	LC-MS/MS					
PK parameters:	**AG-881**				**AGI-69460**	
	Day 1		**Day 7**		**Day 7**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
T_{max} (hr)	4	0	4	0	1	2
C_{max} (ng/mL)	4600	624	10600	1840	34	10.3
$AUC_{0\text{-}10hr}$ (hr•ng/mL)	45200	5260	99700	13800	302	90
$AUC_{0\text{-}last}$ (hr•ng/mL)	94200	9100	218000	28600	691	199
AUC_{∞} (hr•ng/mL)	198000	3770	503000	88700	5990	4680
CLss_F (mL/hr)	949	127	447	70.7	150000	48000
V_{z_F} (mL)	36500	9570	19100	5300	20800000	10200000
$t_{1/2}$ (hr)	26.34	3.35	29.35	5.12	113.63	66.71
MRT (hr)	40.3	5.32	48.6	7.62	165	105

Abbreviations: AUC = area under the curve; $CL_{ss}.F$ = apparent plasma clearance of drug after extravascular administration at steady-state; C_{max} = maximum drug concentration; GLP = good laboratory practice; [redacted] = [redacted]; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; MRT = mean residence time; PK = pharmacokinetic; PO = oral; QD = once daily; SD = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to peak drug concentration; TPGS = tocopheryl polyethylene glycol succinate; $V_z.F$ = Apparent volume of distribution at steady state after extravascular administration.

Pharmacokinetic Profile of AG-881 and its Metabolite AGI-69460 After Seven Days of QD PO Dosing of AG-881 in Male Cyno Monkeys	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41911, AG881-N-071**

Species	Monkey, Cynomolgus
Gender (M/F)/Number of animals:	Male / N = 4
Feeding condition:	Fed *ad libitum*
Vehicle/Formulation:	AG-881 in 10% vitamin E TPGS/1% [redacted]/0.1% simethicone in deionized water
Method of Administration:	PO, QD for 7 days
Dose (mg/kg):	20
Sample:	Plasma
Analyte:	AG-881, AGI-69460
Assay:	LC-MS/MS

PK parameters:	**AG-881**				**AGI-69460**	
	Day 1		**Day 7**		**Day 7**	
	Mean	**SD**	**Mean**	**SD**	**Mean**	**SD**
T_{max} (hr)	2.67	4.62	9.33	12.86	2	2.31
C_{max} (ng/mL)	0.95	0.31	1.05	0.52	198	139
$AUC_{0\text{-}10hr}$ (hr•ng/mL)	7.23	1.34	7.45	1.92	1900	1370
$AUC_{0\text{-}last}$ (hr•ng/mL)	13.7	10.1	9.86	5.9	4370	3190
AUC_{∞} (hr•ng/mL)	NA	NA	NA	NA	27000	15100
CLss_F (mL/hr)	1160000	460000	1210000	NA	6510	3850
V_{z_F} (mL)	NA	NA	NA	NA	1000000	640000
$t_{1/2}$ (hr)	NA	NA	NA	NA	102.24	21.08
MRT (hr)	NA	NA	NA	NA	147.48	30.12

AUC = area under the curve; $CL_{ss}.F$ = apparent plasma clearance of drug after extravascular administration at steady-state; C_{max} = maximum drug concentration; GLP = good laboratory practice; [redacted] = [redacted]; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; MRT = mean residence time; PK = pharmacokinetic; PO = oral; QD = once daily; SD = standard deviation; $t_{1/2}$ = terminal half-life; T_{max} = time to peak drug concentration; TPGS = tocopheryl polyethylene glycol succinate; $V_z.F$ = Apparent volume of distribution at steady state after extravascular administration.

11. 薬物動態試験：推定代謝径路

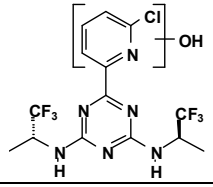
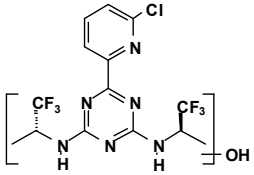
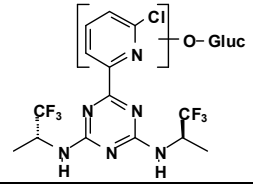
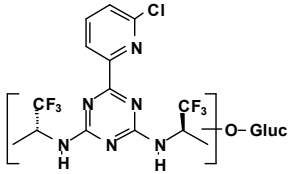
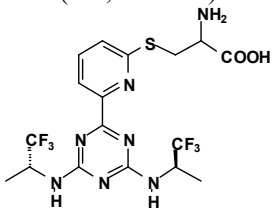
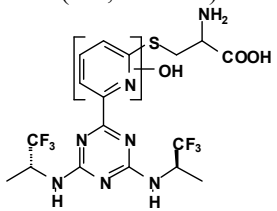
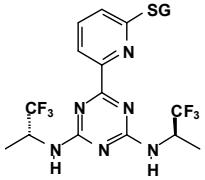
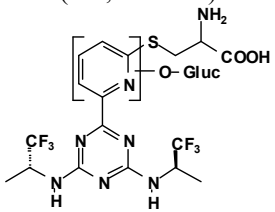
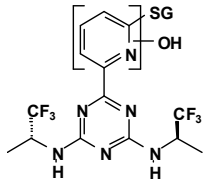
Identification of Metabolites of AG-881 in Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human Hepatocytes	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41944, AG-881-N-007**
Study System: Hepatocytes	
Analysis: LC-UV-MS/MS	
Incubation Time:	24 hours
Concentration:	50 µM
Metabolites formed upon incubation of AG-881 with mouse, rat, dog, monkey, and human hepatocytes. Incubations were done in 1 to 2 mL suspensions with ~1 x 10^6 cells.	

Metabolite	**[M+H]$^+$**	**Rt (min)**	**Biotransformation**	**Mouse**		**Rat**		**Dog**		**Monkey**		**Human**	
				UV	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**
AG-881 (P)	415	14.1	Parent drug	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M1a (P+16)	431	12.5	Monohydroxylation		+		+		+		+		+
M1b (P+16)	431	12.1	Monohydroxylation		+		+		+		+		+
M2a (P+16+176)	607	10.2	Monohydroxylation and glucuronidation		+	+	+	+	+	+	+		+
M2b (P+16+176)	607	9.9	Monohydroxylation and glucuronidation							+	+		
M3 (P-35+120)	500	9.8	Dechlorination and cysteine adduct	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
M4 (P+16-35+120)	516	8.5	Hydroxylation, Dechlorination and cysteine adduct	+	+			+	+	+	+	+	+
M5 (P-35+306)	686	8.1	Dechlorination and GSH adduct		+		+		+	+	+		+
M6 (P+16-35+120+176)	692	7.7	Hydroxylation, Dechlorination, Glucuronidation and cysteine adduct									+	+
M7 (P+16-35+306)	702	7.5	Hydroxylation, Dechlorination and GSH adduct	+	+		+	+	+	+	+	+	+

+ sign indicates the metabolite detected by LC-UV (280 nm) or LC-MS.
Abbreviations: GLP = good laboratory practice; GSH = glutathione; hrs = hours; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-UV = liquid chromatography-ultraviolet spectroscopy; [M+H]+ = protonated molecular ion; Rt = retention time; UV = ultraviolet.

Identification of Metabolites of AG-881 in Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human Hepatocytes	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41944, AG-881-N-007**

Tentative Structures of AG-881 Metabolites Formed in Mouse, Rat, Dog, Monkey and Human Hepatocytes

Hydroxyl AG-881 (M1a, MW430) 	Hydroxyl AG-881 (M1b, MW430) 	Hydroxyl AG-881 glucuronide conjugate (M2a, MW606) 
Hydroxyl AG-881 glucuronide conjugate (M2b, MW606) 	AG-881 cysteine adduct (M3, MW499) 	Hydroxyl AG-881 cysteine adduct (M4, MW515) 
AG-881 GSH adduct (M5, MW685) 	Cysteine adduct of hydroxyl AG-881 glucuronide (M6, MW691) 	GSH adduct of Hydroxyl AG-881 (M7, MW701) 

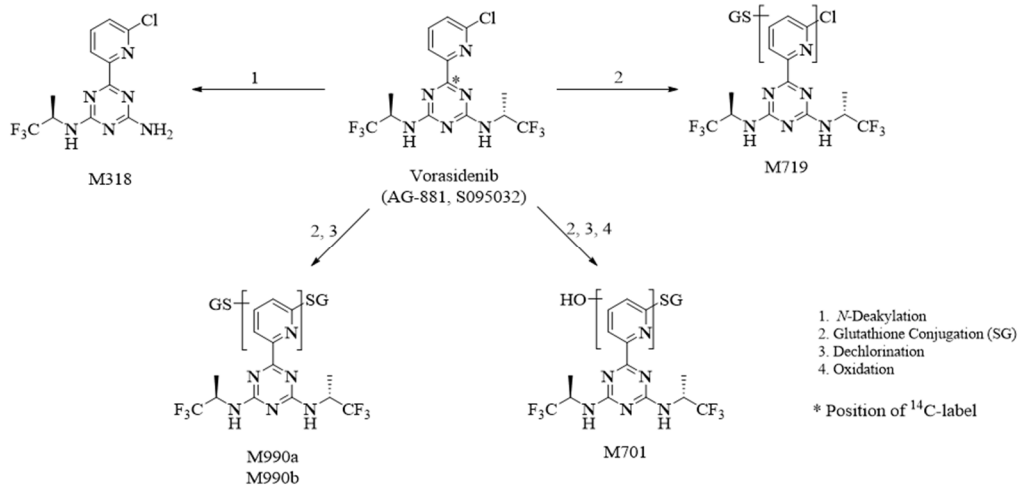
Additional information: No human specific or disproportionate metabolites were observed. Metabolites M3, M4, M5, M6, and M7 are dechlorinated metabolites.

In vitro Metabolism of [^{14}C]AG-881 in Rats and Human Liver Microsomes and Hepatocytes	**Test Article: [^{14}C]AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41898, AG881-N-052**
Study System:	Rat and human liver microsomes and hepatocytes
Target entity, Test System and Method:	[^{14}C]AG-881, Liver microsomes, Hepatocytes, LC-MS/MS and LC-β-radioactivity monitoring flow detector

Metabolism Pathways in Rat Hepatocytes

Radioactive Peaks	Biotransformation Pathways	% Peak Area	Measured $[M+H]^+$
M990a	Dechlorination+diglutathione conjugation	6.93	993.2676
M990b	Dechlorination+diglutathione conjugation	4.70	993.2676
M318	N-dealkylation	2.52	321.0720
M701	Oxidation+dechlorination+glutathione	18.56	704.1941
M719	Glutathione conjugation	3.55	722.1607
AG-881	Parent	62.66	417.0915

Proposed In Vitro Metabolic Pathway of AG-881 in Rat Hepatocytes

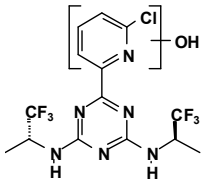
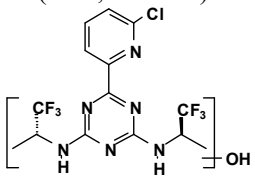
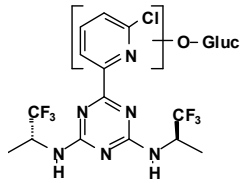
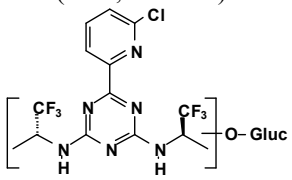
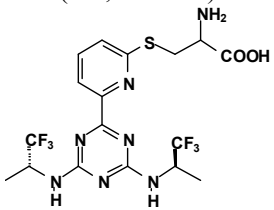
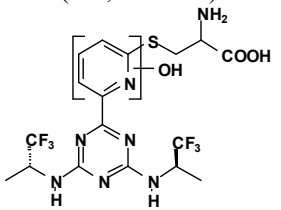
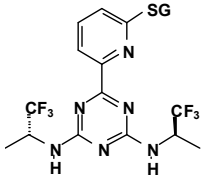
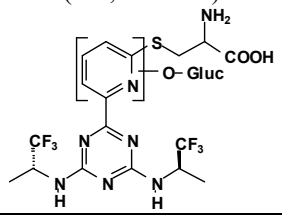
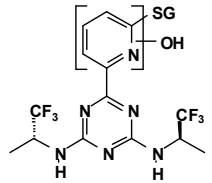


Note: No ^{14}C-radiolabeled metabolite peaks of AG-881 were detected in rat and human liver microsomes and in rat hepatocytes.
Abbreviations: GLP = good laboratory practice; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; [M+H]+ = protonated molecular ion.

Identification of Metabolites of AG-881 in Plasma Samples of Mouse, Rat, and Monkey Plasma	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41954, AG881-N-041**
Gender (M/F)/Number of animals: Mice (female) N=28; Rats (male) N=3/dose level; Monkey (male) N=3/dose level	
Feeding Condition: Fed	
Method of Administration: oral gavage	
Dose (mg/kg): Mouse: 10 mg/kg; Rat: 30, 100, 300 & 1000 mg/kg; Monkey: 1, 10, 50 & 100 mg/kg	
Analysis: LC-UV-MS/MS	

Metabolite	**$[M+H]^+$**	**Rt (min)**	**Biotransformation**	**Mouse**		**Rat**		**Monkey**	
				UV	**MS**	**UV**	**MS**	**UV**	**MS**
AG-881 (P)	415	14.1	Parent drug	+	+	+	+	+	+
M1a (P+16)	431	12.5	Monohydroxylation	ND	ND	ND	+	ND	+
M1b (P+16)	431	12.1	Monohydroxylation	ND	+	ND	+	ND	+
M2a (P+16+176)	607	10.2	Monohydroxylation and glucuronidation	ND	+	ND	+	ND	+
M2b (P+16+176)	607	9.9		ND	ND	ND	+	ND	+
M3 (P-35+120)	500	9.8	Dechlorination and cysteine adduct	ND	ND	ND	ND	ND	+
M4 (P+16-35+120)	516	8.5	Hydroxylation, Dechlorination and cysteine adduct	ND	ND	ND	+	ND	+
M5 (P-35+306)	686	8.1	Dechlorination and glutathione adduct	ND	ND	ND	ND	ND	+
M6 (P+16-35+120+176)	692	7.7	Hydroxylation, Dechlorination and cysteine adduct	ND	ND	ND	ND	ND	+
M7 (P+16-35+306)	702	7.5	Hydroxylation, Dechlorination and glutathione adduct	ND	ND	ND	+	ND	+

LC-UV was monitored at 280 nm.
Abbreviations: GLP = good laboratory practice; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; LC-UV = liquid chromatography-ultraviolet spectroscopy; [M+H]+ = protonated molecular ion; MS = mass spectrometry; ND = Not detected; Rt = retention time; UV = ultraviolet.

Identification of Metabolites of AG-881 in Plasma Samples of Mouse, Rat, and Monkey	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41954, AG881-N-041**
Gender (M/F)/Number of animals: Mice (female) N=28; Rats (male) N=3/dose level; Monkey (male) N=3/dose level	
Feeding Condition: Fed	
Method of Administration: oral gavage	
Dose (mg/kg): Mouse: 10 mg/kg; Rat: 30, 100, 300 & 1000 mg/kg; Monkey: 1, 10, 50 & 100 mg/kg	
Tentative proposed structures of AG-881	
Hydroxyl AG-881 (M1a, MW430) 	Hydroxyl AG-881 (M1b, MW430) 
Hydroxyl AG-881 glucuronide conjugate (M2a, MW606) 	
Hydroxyl AG-881 glucuronide conjugate (M2b, MW606) 	AG-881 cysteine adduct (M3, MW499) 
Hydroxyl AG-881 cysteine adduct (M4, MW515) 	
AG-881 GSH adduct (M5, MW685) 	Cysteine adduct of hydroxyl AG-881 glucuronide (M6, MW691) 
GSH adduct of Hydroxyl AG-881 (M7, MW701) 	

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; GSH = glutathione, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry

***In vivo* Metabolism and Excretion of [^{14}C]AG-881 in Rats**	**Test Article: [^{14}C]AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41899, AG881-N-050**

Species/Strain	Rat / Sprague-Dawley
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male / 3 per group
Formulation/Vehicle:	[^{14}C]AG-881 and AG-881 were formulated in 10% VE-TPGS/1% [redacted]/0.1% simethicone in water
Method of Administration:	Oral gavage
Dose (mg/kg):	Intact rats: 30 mg/kg containing 300 µCi/kg [^{14}C]
	Bile-duct cannulated rats: 30 mg/kg containing 250 µCi/kg [^{14}C]
Sample:	Plasma from intact rats and bile, urine, and feces from bile-duct cannulated rats
Assay:	Selected bile, feces, plasma, and urine samples profiled by HPLC with in-line radio-detection. Excreta, bile, blood, plasma, and carcasses analyzed for total radioactivity by LSC. Metabolites identified by LC-MS and/or LC-MS/MS.
Analyte:	[^{14}C]AG-881 derived radioactivity

Relative Abundance of [^{14}C]AG-881 and Metabolites in Pooled Bile (90% of radioactivity) from BDC Rats

Parent/Metabolite Name	Biotransformation Pathway	Measured $[M+H]^+$	% of Dose
AG-881	Parent	415.0876	ND
M990c	Dechlorination, di-glutathione conjugation	991.2667	2.34
M990a	Dechlorination, di-glutathione conjugation	991.2664	7.97
M990b	Dechlorination, di-glutathione conjugation	991.2663	10.0
M318	N-dealkylation	319.0690	1.25
M685	Dechlorination and glutathione conjugation	686.1960	16.6*
M701a	Oxidation, dechlorination, glutathione conjugation	702.1912	
M719	Glutathione conjugation	720.1574	4.64
M499	Dechlorination, cysteine conjugation	500.1311	1.60
M606	Oxidation, glucuronidation	607.1161	1.69
M556	Dechlorination, cysteinyl glycine conjugation	557.1532	0.52
M430a	Oxidation	431.0833	2.12
Unknown-1	NA	NA	2.33
Unknown-2	NA	NA	1.17
Unknown-3	NA	NA	0.57
		Total	52.8

Note: Only parent [^{14}C]AG-881 was detected in $AUC_{0\text{-}24}$ hour pooled rat plasma.
** Metabolites M685 and M701a were not resolved and counted together.*
Abbreviations: BDC = bile-duct cannulated; GLP = good laboratory practice; HPLC = high-performance liquid chromatography; [redacted] = [redacted]; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; [M+H]+ = protonated molecular ion; NA = Not applicable; ND = Not detected in radiochromatogram; VE-TPGS = vitamin E - tocopheryl polyethylene glycol succinate.

12. 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

潜在的な DDI を評価するために実施された *In vitro* 試験は、15 項に要約した。

13. 薬物動態試験：排泄

***In vivo* Metabolism and Excretion of [^{14}C]AG-881 in Rats**	**Test Article: [^{14}C]AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41899, AG881-N-050**

Species/Strain	Rat / Sprague-Dawley
Gender (M/F)/Number of Animals:	Male / 3 per group
Formulation/Vehicle:	[^{14}C]AG-881 and AG-881 were formulated in 10% VE-TPGS/1% [redacted]/0.1% simethicone in water
Method of Administration:	Oral gavage
Dose (mg/kg):	Intact rats: 30 mg/kg containing 300 µCi/kg [^{14}C]
	Bile duct-cannulated rats: 30 mg/kg containing 250 µCi/kg [^{14}C]
Sample:	Plasma from intact rats and bile, urine, and feces from bile-duct cannulated rats
Assay:	Selected bile, feces, plasma, and urine samples profiled by HPLC with in-line radio-detection. Excreta, bile, blood, plasma, and carcasses analyzed for total radioactivity by LSC.
Analyte:	[^{14}C]AG-881 derived radioactivity

Mean±SD Percent Radioactive Dose Recovered in Bile Duct-cannulated Rats

Time Intervals (Hours)	Bile	Urine	Feces	Cage Wash	Total
0-8	8.40±0.89	0.40±0.01	17.8±9.89*	NA	8.80±0.88
8-24	22.8±4.63	0.65±0.17		NA	41.2±8.32
24-48	16.2±4.87	0.32±0.07	1.83±0.69	NA	18.3±4.23
48-72	8.65±2.22	0.23±0.09	1.15±0.30	NA	10.0±2.08
72-96	4.99±0.96	0.16±0.09	0.66±0.02	0.10±0.04	5.92±1.07
Total Recovery	61.0±11.7	1.77±0.31	21.4±10.2	0.10±0.04	84.3±7.85

** Feces were collected over 0-24 hour interval.*

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; HPLC = high-performance liquid chromatography; [redacted] = [redacted]; hrs = hours, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; LSC = liquid scintillation counting; NA = Not applicable; ND = Not detected in radiochromatogram; VE-TPGS = vitamin E - tocopheryl polyethylene glycol succinate.

14. 薬物動態試験：排泄：胆汁中

AG-881 Biliary Excretion Study Following Single Intravenous Administration (1 mg/kg) in Male Sprague-Dawley Rats		**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No		**Report No. NP41901, AG881-N-027-R1**
Species / strain	Rat / Sprague-Dawley	
Gender (M/F)/Number of animals:	Male / N = 3	
Feeding Condition:	Fed	
Vehicle/Formulation:	AG-881 free base solution in 10% N-methyl-2-pyrrolidone, 10% Solutol HS 15 and 80% saline	
Method of Administration:	IV bolus	
Dose (mg/kg):	1	
Analysis:	LC-MS/MS	
Analyte:	AG-881	
Parameters:	**Mean**	**SD**
F_B (AG-881)	0.0875	0.0723

Abbreviations: F_B = fraction of dose excreted unchanged in bile, F= Female; GLP = good laboratory practice; HS = hydroxy stearate; IV = intravenous, LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; M = Male; SD = standard deviation.

15. 薬物動態試験：薬物相互作用

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inducer of Cytochrome P450 Expression in Cultured Human Hepatocytes**										**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No										**Report No. NP41964, AG881-N-002**
Treatment	**Concentration**	**CYP**	**Assay**	**Donors**						
				HC10-1		**HC5-30**		**HC7-4**		
				E_{max} (fold)	**EC_{50}[a] (µM)**	**E_{max} (fold)**	**EC_{50}[a] (µM)**	**E_{max} (fold)**	**EC_{50}[a] (µM)**	
AG-881	0.003 to 20 µM	CYP1A2	Activity	ND	ND	ND	ND	1.31 ± 0.10	0.159 ± 0.034	
			mRNA	3.74 ± 19.67	13.5 ± 38.0	ND	ND	1.71 ± 0.15	3.39 ± 1.17	
		CYP2B6	Activity	11.8 ± 0.6	0.298 ± 0.040	6.21 ± 0.32	0.238 ± 0.031	7.75 ± 0.34	0.316 ± 0.046	
			mRNA	6.04 ± 0.40	0.178 ± 0.034	2.84 ± 0.18	0.235 ± 0.036	9.76 ± 0.39	0.256 ± 0.032	
		CYP2C9	Activity	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
			mRNA	1.31 ± 0.11	0.237 ± 0.042	1.35 ± 0.08	0.130 ± 0.030	1.50 ± 0.09	0.238 ± 0.030	
		CYP3A4/5	Activity	2.11 ± 0.15	0.253 ± 0.058	1.49 ± 0.12	0.160 ± 0.037	4.62 ± 0.14	0.201 ± 0.021	
		CYP3A4	mRNA	14.5 ± 1.5	0.162 ± 0.050	9.52 ± 0.79	0.180 ± 0.040	3.62 ± 0.13	0.150 ± 0.016	

Data are expressed as mean ± standard deviation
Abbreviations: CYP = cytochrome; EC_{50} = half maximal effective concentration; E_{max} = maximum effect; GLP = good laboratory practice; HC = hepatocyte preparation; mRNA = messenger ribonucleic acid; ND = not determined, fold change <2 or <20% of positive control
[a] *Based on the enzyme activity concentration-response curves, using Sigmoidal 3-Parameter Fit or Sigmoidal Hill 3-Parameter Fit*

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Autoinducer in cultured human hepatocytes**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41965, AG881-N-003**

AG-881 was evaluated for its ability to increase the clearance of the deuteron labeled version of AG-881 (also known as AGI-28187). Human hepatocytes were incubated with AG881 for 72 hr at various concentrations and the effect on AGI-28187 intrinsic clearance was measured.

	Intrinsic clearance (µL/min/million cells)											
	Substrate AGI-28187 0.1 µM						**Substrate AGI-28187 1 µM**					
Hepatocyte donors →	**HC10-1**		**HC5-30**		**HC7-4**		**HC10-1**		**HC5-30**		**HC7-4**	
Treatment group ↓	**Value**	**SE**	**Value**	**SE**	**Value**	**SE**	**Value**	**SE**	**Value**	**SE**	**Value**	**SE**
0.1% v/v DMSO	0.915	0.238	2.45	0.15	1.11	0.40	0.728	0.060	2.16	0.39	1.03	0.33
0.01 µM AG-881	1.08	0.29	2.97	0.51	1.31	0.49	1.04	0.22	2.57	0.50	1.16	0.42
0.1 µM AG-881	1.07	0.30	3.21	0.60	1.15	0.38	0.708	0.095	2.62	0.57	1.17	0.45
0.5 µM AG-881	1.05	0.26	3.14	0.71	1.21	0.44	0.810	0.164	2.42	0.45	1.13	0.49
1 µM AG-881	0.989	0.267	3.74	1.16	1.15	0.41	0.609	0.124	2.82	0.38	1.07	0.43
10 µM AG-881	0.892	0.237	4.02	0.97	1.22	0.45	0.624	0.161	3.19	0.47	1.24	0.44
20 µM AG-881	0.695	0.227	2.64	0.71	1.14	0.34	0.422	0.147	2.32	0.41	1.22	0.33
20 µM Rifampin	1.11	0.17	4.54	0.79	1.35	0.58	0.759	0.081	3.11	0.45	1.16	0.46

Data are expressed as mean ± standard error
Abbreviations: DMSO = dimethyl sulfoxide; GLP = good laboratory practice; hr = hour; HC = hepatocyte preparation; hrs = hours; SE = standard error.
[a] *Based on the enzyme activity concentration-response curves, using Sigmoidal 3-Parameter Fit or Sigmoidal Hill 3-Parameter Fit*
AG-881 had no effect on the intrinsic clearance of AGI-28187 and is therefore unlikely to be an auto-inducer.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inducer of Cytochrome P450 Expression in Cultured Human Hepatocytes**										**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No										**Report No. NP41902, AG881-N-059**
Treatment	**Concentration**	**CYP**	**Assay**	**Hepatocyte donors**						
				HC10-23		**HC10-50**		**HC5-27**		
				E_{max}	**EC_{50}[a]**	**E_{max}**	**EC_{50}[a]**	**E_{max}**	**EC_{50} [a]**
				fold change	**(µM)**	**fold change**	**(µM)**	**fold change**	**(µM)**
AG-881	0.01 to 10 µM	CYP2C8	Activity	ND	ND	4.45 ± 0.11	0.073 ± 0.008	9.76 ± 0.44	0.285 ± 0.048
			mRNA	2.73 ± 0.09	0.059 ± 0.022	3.07 ± 0.19	0.091 ± 0.042	4.16 ± 0.10	0.161 ± 0.018
		CYP2C9	Activity	2.27 ± 0.05	0.030 ± 0.012	2.42 ± 0.11	0.067 ± 0.027	3.81 ± 0.24	0.302 ± 0.107
			mRNA	3.42 ± 0.08	0.097 ± 0.013	3.01 ± 0.15	0.082 ± 0.029	6.35 ± 0.17	0.203 ± 0.024
		CYP2C19	Activity	4.30 ± 0.20	0.110 ± 0.026	6.04 ± 0.33	0.202 ± 0.039	ND	ND
			mRNA	ND	ND	ND	ND	NA	NA
		UGT1A4	Activity	ND	ND	ND	ND	ND	ND
			mRNA	5.36 ± 0.15	0.222 ± 0.022	ND	ND	10.1 ± 0.5	0.288 ± 0.048

Data are expressed as mean ± standard deviation

Abbreviations: CYP = cytochrome; EC_{50} = half maximal effective concentration; E_{max} = maximum effect; NA = <2-fold change in positive control incubations; HC = hepatocyte preparation; ND = not determined, fold change <2 or <20% of positive control.

[a] *Based on the enzyme activity concentration-response curves, using Sigmoidal 3-Parameter Fit or Sigmoidal Hill 3-Parameter Fit*

***In Vitro* Evaluation of AGI-69460 as an Inducer of the Human CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 and CYP3A4 Metabolic Enzymes in Hepatocytes**										**Test Article: AGI-69460**
GLP Compliant: No										**Report No. NP42841, S095032_A-R-00006521-DHIN**
Treatment	**Concentration**	**CYP**	**Assay**	**Donors**						
				Donor-1		**Donor-2**		**Donor-3**		
				E_{max} (fold)	**EC_{50} (µM)**	**E_{max} (fold)**	**EC_{50} (µM)**	**E_{max} (fold)**	**EC_{50} (µM)**	
AGI-69460	0.003 to 20 µM	CYP1A2	Activity	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
			mRNA	2.99**	2.96	4.34**	2.53	4.1**	2.04	
		CYP2B6	Activity	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
			mRNA	18.3	3.37	8.5	2.51	24.7	2.53	
		CYP2C8	Activity	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
			mRNA	2.96	0.805	5.2	1.36	6.76	0.512	
		CYP2C9*	Activity	3.09**	2.06	5.01**	2.3	4.53***	2.43***	
			mRNA	NA	NA	2.03	0.169	3.29	0.589	
		CYP2C19*	Activity****	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
			mRNA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	
		CYP3A4/5	Activity	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
		CYP3A4	mRNA	8.96	0.670	7.65	0.477	24.4	0.596	

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; EC50 = half-maximal effective concentration; Emax = maximum effect concentration; GLP = good laboratory practice; mRNA = messenger ribonucleic acid; ND = not determined; NA = not applicable
** Positive control induction of CYP2C9 mRNA was <2-fold in Donor-1 and positive control induction of CYP2C19 mRNA was <2-fold in all donors*
*** Emax values are constrained to the observed maximum fold induction*
**** Calculated based on three-parameters dose-response analysis*
***** Suppression of CYP2C19 activity was observed*

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Cytochrome P450 (CYP) Enzymes in Human Liver Microsomes**										**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No										**Report No. NP41966, AG881-N-005**
Method:	Enzyme activities were measured by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Incubations were performed using human liver microsomes at ≤ 0.1 mg/mL and a probe substrate added at a concentration equivalent to its approximate Km or S50 value and 0.01 to 10 µM AG-881 concentration range.									
Enzyme	**Substrate**	**Direct inhibition**		**Time-dependent inhibition**			**Metabolism-dependent inhibition**			
		Zero-minute preincubation		**30-minute preincubation without NADPH**			**30-minute preincubation with NADPH**			
		IC_{50} (µM) [a]	**Inhibition observed at 10 µM (%) [b]**	**IC_{50} (µM) [a]**	**Inhibition observed at 10 µM (%) [b]**	**Potential for time-dependent inhibition [c]**	**IC_{50} (µM) [a]**	**Inhibition observed at 10 µM (%) [b]**	**Potential for metabolism-dependent inhibition [d]**	
CYP1A2	Phenacetin	> 10	18	> 10	15	No	> 10	9.2	No	
CYP2B6	Efavirenz	> 10	9.5	> 10	8.2	No	> 10	10	No	
CYP2C8	Amodiaquine	> 10	23	> 10	24	No	> 10	25	No	
CYP2C9	Diclofenac	> 10	43	> 10	44	No	> 10	46	No	
CYP2C19	*S*-Mephenytoin	> 10	15	> 10	17	No	> 10	15	No	
CYP2D6	Dextromethorphan	> 10	1.8	> 10	10	No	> 10	4.8	No	
CYP3A4/5	Testosterone	> 10	0	> 10	NA	No	> 10	8.6	No	
CYP3A4/5	Midazolam	> 10	NA	> 10	NA	No	> 10	NA	No	

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; GLP = good laboratory practice; IC_{50} = half-maximal inhibition concentration; NADPH = reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NA=not applicable. No value was obtained as the rates at the highest concentration of AG-881 evaluated (10 µM) were higher than the control rates; NC =not calculated; S_{50} = Substrate concentration for allosteric kinetics which supports half the maximum rate of an enzyme-catalyzed reaction

[a] *Average data (i.e., percent of control activity) obtained from duplicate samples for each test article concentration were used to calculate IC_{50} values.*

[b] *Inhibition observed (%) is calculated with the following formula (results are rounded to two significant figures): Inhibition observed (%) = 100% − Percent solvent control.*

[c] *Time-dependent (i.e., NADPH-independent) inhibition was determined by comparison of percent of control activities for zero-minute preincubation and 30-minute preincubation without NADPH samples and by visual inspection of the IC_{50} plot.*

[d] *Metabolism-dependent (i.e., NADPH-dependent) inhibition was determined by comparison of percent of control activities for zero-minute preincubation and 30-minute preincubation with NADPH samples and by visual inspection of the IC_{50} plot.*

***In Vitro* Evaluation of AGI-69460 as an Inhibitor of the Human CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4/5 Metabolic Enzymes**							**Test Article: AGI-69460**		
GLP Compliant: No							**Report No. NP42813, S095032_A-R-00006525-DHIP**		
Method:	Enzyme activities were measured by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Incubations were performed using human liver microsomes at 0.3 mg/mL and a probe substrate added at a concentration equivalent to its approximate Km or S50 value and 0.01 to 10 µM AGI-69460 concentration range.								
Enzyme	**Substrate**	**Direct inhibition**		**Time-dependent inhibition**			**Metabolism-dependent inhibition**		
		Zero-minute preincubation		**30-minute preincubation without NADPH**			**30-minute preincubation with NADPH**		
		IC_{50} (µM)	**Activity Remaining at 10 µM (%)**	**IC_{50} (µM)**	**Activity Remaining at 10 µM (%)**	**Potential for time-dependent inhibition [c]**	**IC_{50} (µM)**	**Activity Remaining at 10 µM (%)**	**Potential for metabolism-dependent inhibition**
CYP1A2	Phenacetin	> 10	103	> 10	107	No	> 10	115	No
CYP2B6	Bupropion	> 10	112	> 10	117	No	> 10	117	No
CYP2C8	Amodiaquine	> 10	108	> 10	112	No	> 10	104	No
CYP2C9	Diclofenac	> 10	91.6	> 10	102	No	> 10	99.2	No
CYP2C19	*S*-Mephenytoin	> 10	94.4	> 10	92.3	No	> 10	92.4	No
CYP2D6	Dextromethorphan	> 10	107	> 10	114	No	> 10	115	No
CYP3A4/5	Testosterone	> 10	101	> 10	112	No	> 10	111	No
CYP3A4/5	Midazolam	> 10	119	> 10	124	No	> 10	129	No

Abbreviations: CYP = cytochrome P450; GLP = good laboratory practice; IC_{50} = half-maximal inhibition concentration; NADPH = reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

Permeability and Gastrointestinal Fluid Stability of Vorasidenib (AG-881) According to the Biopharmaceutics Classification System (BCS)	**Test Article: Vorasidenib**
GLP Compliant: No	**Report No. NP42279, PB-22-095032-007-DHAB**

Type of Study:	*In vitro* cell permeability and efflux assessment
Method:	Unidirectional and bidirectional permeability assessment of vorasidenib across Caco-2 cells (transwell assay)

Unidirectional (A - B) Caco-2 Permeability, Recovery, and Mass Balance Results for Vorasidenib (Nominal 1.00 µM), Atenolol, and Minoxidil

Analyte	Nominal Dosing Conc. (µM)	P_{app} [a] (10^{-6} cm/s)	Recovery (%)	Mass Balance (%)
Vorasidenib	1.00	[redacted]	44.5 ± 1.7	54.0 ± 1.7
Atenolol	100	0.322 ± 0.040	87.5 ± 2.0	ND
Minoxidil	10.0	3.10 ± 0.55	93.7 ± 1.4	ND

The data are presented as mean ± SD (n=4). Recovery and mass balance for the test article are low because all parameters are calculated by normalizing to the nominal concentration (1.00 µM) and the measured donor concentrations of vorasidenib are much lower than the nominal concentration. This was a consistent finding throughout the study; the reason is unknown, but it is apparently not due to analytical interference by the reference compounds.

[a] The atenolol P_{app} was less than 1.00×10^{-6} cm/s and the ratio of minoxidil P_{app} to atenolol P_{app} was greater than 3 for each replicate, confirming cell monolayer integrity.
ND = not determined

Bidirectional Caco-2 Permeability and Recovery of Vorasidenib

Parameter	Vorasidenib (1 µM)	
	A to B	B to A
P_{app} #	[redacted][a]	[redacted][b]
Recovery (%)	74.0 ± 3.3[a]	84.5 ± 6.1[b]
Mass Balance (%)	90.1 ± 3.8	97.3 ± 4.2
Efflux Ratio	0.955	

The data are presented as mean ± standard deviation (n=5a or n=4b for Papp and recovery, n=3 for mass balance).
 # Papp values expressed in units of 10-6 cm/s; e.g., "1.0" represents a value of 1.0 × 10-6 cm/s
a One replicate was excluded for apparent failure of cell monolayer integrity; n=5
b Two replicates were excluded for apparent failure of cell monolayer integrity; n=4
Abbreviations: GLP = good laboratory practice; ND = not determined; Papp = apparent permeability; SD = standard deviation.

***In Vitro* Evaluation of Bidirectional Permeability of AG-881 across Caco-2 Cells**		**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No		**Report No. NP41903, AG881-N-048-R1**
Type of Study:	*In vitro* cell permeability and efflux assessment	
Method:	Permeability and efflux ratio of AG-881 across Caco-2 cells was used to determine if AG-881 is a P-glycoprotein (P-gp) substrate.	
Experimental Conditions	1 µM AG-881; 1.5 hr incubation	
Parameter	**P_{app} (10^{-6} cm/sec)**	
Apical to Basal	[redacted]	
Basal to Apical		
Efflux ratio	0.603	

Efflux ratio < 2 indicates AG-881 is not a transporter substrate.
Mass recovery of AG-881 were 102% (A-B) and 79.9% (B-A), respectively
Abbreviations: GLP = good laboratory practice; hrs = hours; Papp = apparent permeability; P-gp = permeability glycoprotein.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor and Substrate of Human P-gp and BCRP Transporters**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41967, AG881-N-004-R1**

Type of study:	*In vitro* evaluation of AG-881 as an inhibitor and substrate of human P-gp and BCRP transporters
Method:	Inhibition: Bidirectional permeability of a probe substrate across Caco-2 or MDCKII-BCRP cells was measured in the presence of AG-881 (0.03 to 5 µM) Substrate: Bidirectional permeability of AG-881 (at various concentrations) across MDCKII-MDR1 and MDCKII-BCRP cells in the presence of a MDR1 or BCRP inhibitor was measured with detection by high performance liquid chromatography and mass spectrometry.

Tabulated results: Inhibition:

Transporter	Test System	Probe Substrate	ER[a]	ER[a] at 5 µM AG-881	Inhibition at 5 µM AG-881(%)[b]	IC_{50} (µM)
P-gp	Caco-2	10 µM Digoxin	[redacted]	19.4	12	> 5
BCRP	MDCKII-BCRP	1 µM Prazosin	8.17	3.14	70	1.22

ER = Efflux Ratio, A = Apical, B = Basal
[a] Net flux on Caco-2 cells ($P_{app\ BA} – P_{app\ AB}$), Corrected ER on MDCKII-BCRP cells (ER transfected ÷ ER control cells)
[b] Percent inhibition calculated from the following formulas,
P-gp: Net flux with inhibitor ÷ Net flux without inhibitor x 100%, BCRP: (ER with inhibitor-1) ÷ (ER without inhibitor-1) x 100%

Substrate

Transporter	AG-881 (µM)	P_{app} (10^{-6} cm/sec)		ER	ER[c]	Recovery (%)		AG-881 (µM) with inhibitor	P_{app} (10^{-6} cm/sec)		ER	Recovery (%)	
		A-B	B-A			A-B	B-A		A-B	B-A		A-B	B-A
MDCKII-MDR1 (P-gp)	0.1	[redacted]		1.20	NA	80.6	79.9	0.1 + Val[d]	[redacted]		1.10	74.0	77.7
	1			1.47		72.8	95.4	1 + Val[d]			1.29	79.7	95.1
	1**			1.29	1.15	78.9	94.7	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5			1.14	NA	75.4	104.3	5 + Val[d]	[redacted]		1.35	74.9	95.7
MDCKII-BCRP	0.1			1.19	NA	97.8	97.5	0.1 + Ko143[e]			1.06	81.9	88.2
	1			1.19		88.2	92.1	1 + Ko143[e]			1.13	97.2	97.7
	1**			1.13	1.05	94.9	94.9	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5			1.04	NA	97.1	96.9	5 + Ko143[e]	[redacted]		1.02	93.1	93.7

Abbreviations: A = Apical, B = Basal; BCRP = breast cancer resistance protein; ER = Efflux Ratio; GLP = good laboratory practice; IC50 = half-maximal inhibitory concentration; MDCKII = madin-Darby canine kidney II; MDR1 = multidrug resistance mutation 1; NA = Not applicable; Papp = apparent permeability; P-gp = permeability glycoprotein.
*** 1 µM also tested on control MDCKII cells, c Corrected ER on MDCKII-BCRP cells (ER transfected ÷ ER control cells)*
d Val = valspodar (10 µM), MDR1 inhibitor, e Ko143 = 1 µM, BCRP inhibitor
Efflux ratio <2 indicates AG-881 is not a transporter substrate.

***In Vitro* Inhibition Studies of Vorasidenib with Human MDR1 Efflux (ABC) Transporter in Caco-2 Cells**					**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No					**Report No. NP42853, S095032_A-R-00006898-DHTI**
Type of study:	*In vitro* evaluation of vorasidenib as an inhibitor human MDR1 (P-gp) transporter				
Test System, Method:	Caco-2; Inhibition of bidirectional permeability of a probe substrate, digoxin, across Caco-2 cells in the presence and absence of vorasidenib (5 to 40 µM)				
Transporter	**Compound**	**Nominal Concentration (µM)**	**Actual Concentration (µM)**	**ER**	**Relative Transport (%)**
MDR1 (P-gp)	Digoxin	10	-	7.07	100
	+ Valspodar	10	-	0.763	10.8
	+ Verapamil	60	-	1.17	16.6
	+ Vorasidenib	40	6.62	6.69	94.7
		30	11.0	6.58	93.1
		20	10.7	6.13	86.7
		10	6.28	7.10	100
		5	3.65	6.01	85.0

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ER = efflux ratio, GLP = good laboratory practice; MDR1 = multidrug resistance mutation 1; P-gp = permeability glycoprotein.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of MATE-1 and MATE2-K and a Substrate of OATP1B1 and OATP1B3**					**Test Article: AG-881**	
GLP Compliant: No					**Report No. NP41906, AG881-N-058**	
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition and substrate assessment					
Method:	The accumulation of AG-881 with and without inhibitor in OATP1B1 and OATP1B3 transporter-expressing and control HEK-293 cells. The inhibition of probe substrate accumulation in MATE-1 and MATE2-K transporter expressing and control MDCKII and HEK-293 cells, respectively, by AG-881.					
OATP1B1 Substrate: AG-881 accumulation in the absence of OATP inhibitors						
Substrate	**Incubation time (min)**	**Uptake rate (pmol/mg/min) (mean ± SD)**		**Uptake ratio**	**Recovery (%)**	
		Control	**OATP1B1**		**Control**	**OATP1B1**
AG-881 (0.1 µM)	1	0.775 ± 0.098	1.22 ± 0.21	1.57	NA	
	3	0.440 ± 0.033	0.569 ± 0.041	1.29		
	10	0.229 ± 0.018	0.288 ± 0.018	1.26	72.4	79.5
AG-881 (1 µM)	1	8.82 ± 1.28	12.4 ± 0.9	1.4	NA	
	3	5.23 ± 0.43	6.62 ± 0.33	1.27		
	10	2.47 ± 0.30	2.94 ± 0.10	1.19		
AG-881 (10 µM)	1	54.4 ± 5.7	80.8 ± 1.6	1.49		
	3	35.7 ± 2.2	43.8 ± 4.2	1.23		
	10	22.0 ± 1.8	28.3 ± 0.4	1.29		
AG-881 (25 µM)	1	101 ± 8	161 ± 6	1.59		
	3	81.8 ± 3.7	114 ± 10	1.39		
	10	65.2 ± 3.0	84.2 ± 5.6	1.29	86.8	89.5
OATP1B1 Substrate: AG-881 accumulation in the presence of OATP inhibitors						
Substrate	**Incubation time (min)**	**Uptake rate (pmol/mg/min) (mean ± SD)**		**Uptake ratio**		
		Control	**OATP1B1**			
AG-881 (1 µM) (+) Rifampin (10 µM)	1	10.2 ± 0.2	12.8 ± 1.2	1.25		
	3	5.83 ± 0.35	7.62 ± 0.33	1.31		
	10	3.01 ± 0.11	3.44 ± 0.13	1.15		
AG-881 (1 µM) (+) Cyclosporine (1 µM)	1	11.4 ± 0.5	13.4 ± 0.5	1.18		
	3	6.13 ± 0.35	7.47 ± 0.36	1.22		
	10	3.36 ± 0.37	3.62 ± 0.07	1.08		

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of MATE-1 and MATE2-K and a Substrate of OATP1B1 and OATP1B3**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41906, AG881-N-058**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition and substrate assessment
Method:	The accumulation of AG-881 with and without inhibitor in OATP1B1 and OATP1B3 transporter-expressing and control HEK-293 cells. The inhibition of probe substrate accumulation in MATE-1 and MATE2-K transporter expressing and control MDCKII and HEK-293 cells, respectively, by AG-881.

OATP1B3 Substrate: AG-881 accumulation in the absence of OATP inhibitors

Substrate	Incubation time (min)	Uptake rate (pmol/mg/min) (mean ± SD)		Uptake ratio	Recovery (%)	
		Control	OATP1B3		Control	OATP1B3
AG-881 (0.1 µM)	1	0.775 ± 0.098	1.00 ± 0.06	1.29	NA	
	3	0.440 ± 0.033	0.455 ± 0.060	1.03		
	10	0.229 ± 0.018	0.252 ± 0.021	1.1	72.4	81.2
AG-881 (1 µM)	1	8.82 ± 1.28	10.7 ± 1.1	1.21	NA	
	3	5.23 ± 0.43	5.16 ± 0.61	0.987		
	10	2.47 ± 0.30	2.67 ± 0.23	1.08		
AG-881 (10 µM)	1	54.4 ± 5.7	61.8 ± 1.0	1.14		
	3	35.7 ± 2.2	34.9 ± 1.9	0.978		
	10	22.0 ± 1.8	23.3 ± 0.8	1.06		
AG-881 (25 µM)	1	101 ± 8	128 ± 12	1.27		
	3	81.8 ± 3.7	75.6 ± 10.0	0.924		
	10	65.2 ± 3.0	58.7 ± 1.6	0.9	86.8	91.3

OATP1B3 Substrate: AG-881 accumulation in the presence of OATP inhibitors

Substrate	Incubation time (min)	Uptake rate (pmol/mg/min) (mean ± SD)		Uptake ratio
		Control	OATP1B3	
AG-881 (1 µM) (+) Rifampin (10 µM)	1	10.2 ± 0.2	12.1 ± 0.8	1.19
	3	5.83 ± 0.35	5.91 ± 0.26	1.01
	10	3.01 ± 0.11	3.41 ± 0.06	1.14
AG-881 (1 µM) (+) Cyclosporine (1 µM)	1	11.4 ± 0.5	13.7 ± 1.0	1.2
	3	6.13 ± 0.35	6.58 ± 0.16	1.07
	10	3.36 ± 0.37	3.44 ± 0.08	1.02

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney cell line; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; MATE-1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MDCKII = madin-Darby canine kidney II; NA = not applicable; OATP = organic anion transporting polypeptides; SD = standard deviation.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of MATE-1 and MATE2-K and a Substrate of OATP1B1 and OATP1B3**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41906, AG881-N-058**

Type of Study:	*In vitro* cell transporter enzyme inhibition and substrate assessment
Method:	The accumulation of AG-881 with and without inhibitor in OATP1B1 and OATP1B3 transporter-expressing and control HEK-293 cells. The inhibition of probe substrate accumulation in MATE-1 and MATE2-K transporter expressing and control MDCKII and HEK-293 cells, respectively, by AG-881.

AG-881: MATE1 inhibition in MDCKII cells

Probe substrate	**Inhibitor**	**[Inhibitor] (µM)**	**Uptake rate (pmol/mg/min) (mean ± SD)**		**Background-corrected uptake rate (pmol/mg/min)**	**Percent of control**	**IC_{50} parameters**
			Control	**MATE1**			
[^{14}C]-Metformin (10 µM)	No solvent control	0	6.55 ± 2.14	254 ± 55	248	NA	NA
	Solvent control	0	7.77 ± 1.26	286 ± 30	278	100	IC_{50} >25 µM
	AG-881	0.03	7.44 ± 2.22	321 ± 39	314	113	
		0.1	7.10 ± 1.39	355 ± 9	348	125	
		0.3	7.66 ± 0.88	303 ± 35	295	106	
		1	9.43 ± 2.83	309 ± 31	299	108	
		3	7.44 ± 2.83	285 ± 39	278	99.9	
		10	4.33 ± 0.33	268 (n = 2)	264	94.7	
		25	5.88 ± 3.16	184 ± 34	178	64.1	

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney cell line; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; MATE-1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MDCKII = madin-Darby canine kidney II; NA = not applicable; OATP = organic anion transporting polypeptides; SD = standard deviation.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of MATE-1 and MATE2-K and a Substrate of OATP1B1 and OATP1B3**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41906, AG881-N-058**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter enzyme inhibition and substrate assessment
Method:	The accumulation of AG-881 with and without inhibitor in OATP1B1 and OATP1B3 transporter-expressing and control HEK-293 cells. The inhibition of probe substrate accumulation in MATE-1 and MATE2-K transporter expressing and control MDCKII and HEK-293 cells, respectively, by AG-881.

ND = Not determined

Probe substrate	**Inhibitor**	**[Inhibitor] (µM)**	**Uptake rate (pmol/mg/min) (mean ± SD)**		**Background-corrected uptake rate (pmol/mg/min)**	**Percent of control**	**IC_{50} parameters**
			Control	**MATE2-K**			
[^{14}C]-Metformin (10 µM)	No solvent control	0	1.50 ± 0.08	13.3 ± 0.2	11.8	NA	NA
	Solvent control	0	1.33 ± 0.47	14.1 ± 0.4	12.8	100	IC_{50} >25 µM
	AG-881	0.03	1.92 (n = 2)	13.7 ± 1.2	11.8	91.8	
		0.1	1.44 ± 0.15	14.2 ± 1.2	12.8	99.7	
		0.3	1.58 ± 0.35	15.0 ± 0.6	13.5	105	
		1	2.16 ± 0.22	16.1 ± 1.0	14	109	
		3	2.15 ± 0.36	14.3 ± 0.6	12.2	95	
		10	1.66 ± 0.12	13.2 ± 1.2	11.5	90.2	
		25	2.26 ± 0.46	12.2 ± 1.5	9.95	77.7	

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney cell line; IC50 = half-maximal inhibitory concentration; MATE-1 = multidrug and toxin extrusion protein 1; MDCKII = madin-Darby canine kidney II; NA = not applicable; OATP = organic anion transporting polypeptides; SD = standard deviation.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41905, AG881-N-051**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in transporter expressing vesicle (BSEP, MRP2, and MRP3) and HEK-293 cells (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) by AG-881.

BSEP inhibition: Accumulation of [^{3}H]-taurocholic acid into BSEP vesicles in the presence of AG-881

Substrate	Inhibitor	[Inhibitor] (µM)	Uptake (pmol/mg protein)			Percent of Control	Percent Inhibition	+ATP/+AMP ratio	IC_{50} parameters
			+ATP	+AMP	ATP-dependent				
[^{3}H]-Taurocholic acid (0.4 µM)	Solvent Control	0	27.2	1.58	25.7	100	0	17.3	IC_{50} >7.5 µM
	AG-881	0.0075	27.9	1.37	26.5	103	NA	20.3	
		0.0225	29.6	1.48	28.1	110	NA	19.9	
		0.075	30.2	1.7	28.5	111	NA	17.7	
		0.225	27.7	1.42	26.3	102	NA	19.5	
		0.75	28.6	1.66	27	105	NA	17.2	
		2.25	29.8	1.7	28.1	110	NA	17.5	
		7.5	26.2	1.62	24.6	96	4	16.2	
	Cyclosporine	20	2.86	1.79	1.08	4.2	95.8	1.6	ND
	Glyburide	100	1.61	1.64	0	0	100	0.981	

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ATP = adenosine triphosphate; AMP = adenosine monophosphate; BSEP = bile salt export pump; HEK = human embryonic kidney cell line; MRP2/3 = multi-drug resistance protein 2/3; NA = Not applicable. No value was obtained as the uptake at the highest concentration of AG-881 evaluated (7.5 µM) was higher than that of solvent control; ND = Not determined; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptides; OCT = organic cation transporter.

Values are duplicate determinations rounded to three significant figures.

Negative values are reported as zero.

Percentages are rounded to one decimal place except percentages ≥ 100, which are rounded to the nearest whole number.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters**									**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No									**Report No. NP41905, AG881-N-051**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment								
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in transporter expressing vesicles (BSEP, MRP2, and MRP3) and HEK-293 cells (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) by AG-881.								
MRP2 inhibition: Accumulation of [^{3}H]-estradiol-17β-glucuronide into MRP2 vesicles in the presence of AG-881									
Substrate	**Inhibitor**	**[Inhibitor] (µM)**	**Uptake (pmol/mg protein)**			**Percent of Control**	**Percent Inhibition**	**+ATP/+AMP ratio**	**IC_{50} parameters**
			+ATP	**+AMP**	**ATP-dependent**				
[^{3}H]-Estradiol-17β-glucuronide (50 µM)	Solvent Control	0	2680	198	2480	100	0	13.5	IC_{50} >7.5 µM
	AG-881	0.0075	2810	192	2620	106	NA	14.7	
		0.0225	2610	199	2410	97.2	2.8	13.1	
		0.075	2890	236	2650	107	NA	12.2	
		0.225	2390	190	2200	88.7	11.3	12.6	
		0.75	2380	196	2180	88	12	12.1	
		2.25	2670	219	2450	98.7	1.3	12.2	
		7.5	2800	209	2590	104	NA	13.4	
	Benzbromarone	100	524	200	323	13	87	2.62	ND

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ATP = adenosine triphosphate; AMP = adenosine monophosphate; BSEP = bile salt export pump; HEK = human embryonic kidney cell line; MRP2/3 = multi drug resistance protein 2/3; NA = Not applicable. No value was obtained as the uptake at the highest concentration of AG-881 evaluated (7.5 µM) was higher than that of solvent control; ND = Not determined; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptides; OCT = organic cation transporter.

Values are duplicate determinations rounded to three significant figures.

Negative values are reported as zero.

Percentages are rounded to one decimal place except percentages ≥ 100, which are rounded to the nearest whole number.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41905, AG881-N-051**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in transporter expressing vesicle (BSEP, MRP2, and MRP3) and HEK-293 cells (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) by AG-881.

MRP3 inhibition: Accumulation of [^{3}H]-estradiol-17β-glucuronide into MRP3 vesicles in the presence of AG-881

Substrate	Inhibitor	[Inhibitor] (µM)	Uptake (pmol/mg protein)			Percent of Control	Percent Inhibition	+ATP/+AMP ratio	IC_{50} parameters
			+ATP	+AMP	ATP-dependent				
[^{3}H]-Estradiol-17β-glucuronide (1 µM)	Solvent Control	0	13.1	1.9	11.2	100	0	6.92	IC_{50} >7.5 µM
	AG-881	0.0075	14	2.04	11.9	106	NA	6.86	
		0.0225	13.2	1.68	11.6	103	NA	7.89	
		0.075	15.6	2.03	13.5	120	NA	7.67	
		0.225	14.1	2.06	12	107	NA	6.85	
		0.75	14.3	2.23	12.1	108	NA	6.44	
		2.25	15.2	2.24	12.9	115	NA	6.78	
		7.5	15.7	2.24	13.5	120	NA	7.02	
	Indomethacin	1000	2.37	2.54	0	0	100	0.931	ND

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ATP = adenosine triphosphate; AMP = adenosine monophosphate; BSEP = bile salt export pump; HEK = human embryonic kidney cell line; MRP2/3 = multi-drug resistance protein 2/3; NA = Not applicable. No value was obtained as the uptake at the highest concentration of AG-881 evaluated (7.5 µM) was higher than that of solvent control; ND = Not determined; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptides; OCT = organic cation transporter.
Values are duplicate determinations rounded to three significant figures.
Negative values are reported as zero.
Percentages are rounded to one decimal place except percentages ≥ 100, which are rounded to the nearest whole number.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41905, AG881-N-051**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in transporter expressing vesicle (BSEP, MRP2, and MRP3) and HEK-293 cells (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) by AG-881.

OATP1B1 inhibition: Accumulation of [^{3}H]-estradiol-17β-glucuronide into OATP1B1 cells in the presence of AG-881

Substrate	Inhibitor	[Inhibitor] (µM)	Uptake (pmol/mg protein)		Background corrected uptake rate (pmol/mg/min)	Percent of Control	Percent Inhibition	IC_{50} parameters
			Control	OATP1B1				
[^{3}H]-Estradiol-17β-glucuronide (50 µM)	Solvent Control	0	0.0247±0.0052	2.24±0.20	1.11	100	0	IC_{50} >7.5 µM
	AG-881	0.0075	0.0254±0.0071	2.30±0.12	1.13	102	NA	
		0.0225	0.0208±0.0041	2.29±0.11	1.13	102	NA	
		0.075	0.0251 (n=2)	2.13±0.05	1.05	95	5	
		0.225	0.0215±0.0078	2.07±0.03	1.02	92.2	7.8	
		0.75	0.0274±0.0121	1.97±0.08	0.97	87.4	12.6	
		2.25	0.0210±0.0104	1.73±0.05	0.856	77.2	22.8	
		7.5	0.0199±0.0038	1.66±0.04	0.821	74	26	
	Rifampin	10	0.0197±0.0077	0.193±0.014	0.0866	7.8	92.2	ND
	Cyclosporine	1	0.0169±0.0081	0.178±0.025	0.0805	7.3	92.7	

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ATP = adenosine triphosphate; AMP = adenosine monophosphate; BSEP = bile salt export pump; HEK = human embryonic kidney cell line; MRP2/3 = multi-drug resistance protein 2/3; n = number of replicates; NA = Not applicable. No value was obtained as the uptake at the highest concentration of AG-881 evaluated (7.5 µM) was higher than that of solvent control; ND = Not determined; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptides; OCT = organic cation transporter.

Unless otherwise indicated, values are triplicate determinations rounded to three significant figures with standard deviations rounded to the same degree of accuracy.
Percentages are rounded to one decimal place except percentages ≥ 100, which are rounded to the nearest whole number.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41905, AG881-N-051**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in transporter expressing vesicle (BSEP, MRP2, and MRP3) and HEK-293 cells (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) by AG-881.

OATP1B3 inhibition: Accumulation of [^{3}H]-estradiol-17β-glucuronide into OATP1B3 cells in the presence of AG-881

Substrate	Inhibitor	[Inhibitor] (µM)	Uptake (pmol/mg protein)		Background corrected uptake rate (pmol/mg/min)	Percent of Control	Percent Inhibition	IC_{50} parameters
			Control	OATP1B3				
[^{3}H]-Estradiol-17β-glucuronide (50 µM)	Solvent Control	0	0.0227±0.0046	0.399±0.021	0.188	100	0	IC_{50} >7.5 µM
	AG-881	0.0075	0.0234±0.0064	0.393±0.021	0.185	98.3	1.7	
		0.0225	0.0193±0.0037	0.393±0.030	0.187	99.2	0.8	
		0.075	0.0231 (n=2)	0.393±0.027	0.185	98.4	1.6	
		0.225	0.0199±0.0069	0.408±0.028	0.194	103	NA	
		0.75	0.0252±0.0108	0.370±0.031	0.172	91.5	8.5	
		2.25	0.0195±0.0093	0.338±0.021	0.159	84.6	15.4	
		7.5	0.0185±0.0034	0.330±0.013	0.156	82.7	17.3	
	Rifampin	10	0.0183±0.0069	0.0232±0.0025	0.00248	1.3	98.7	ND
	Cyclosporine	1	0.0158±0.0072	0.0662±0.0127	0.0252	13.4	86.6	

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ATP = adenosine triphosphate; AMP = adenosine monophosphate; BSEP = bile salt export pump; HEK = human embryonic kidney cell line; MRP2/3 = multi-drug resistance protein 2/3; n = number of replicates = 3 unless otherwise stated; NA = Not applicable. No value was obtained as the uptake at the highest concentration of AG-881 evaluated (7.5 µM) was higher than that of solvent control; ND = Not determined; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptides; OCT = organic cation transporter.

Unless otherwise indicated, values are triplicate determinations rounded to three significant figures with standard deviations rounded to the same degree of accuracy.

Percentages are rounded to one decimal place except percentages ≥ 100, which are rounded to the nearest whole number.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41905, AG881-N-051**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in transporter expressing vesicle (BSEP, MRP2, and MRP3) and HEK-293 cells (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) by AG-881.

OAT1 inhibition: Accumulation of [^{3}H]-*p*-aminohippurate into OAT1 cells in the presence of AG-881

Substrate	Inhibitor	[Inhibitor] (µM)	Uptake (pmol/mg protein)		Background corrected uptake rate (pmol/mg/min)	Percent of Control	Percent Inhibition	IC_{50} parameters
			Control	OAT1				
[^{3}H]-*p*-aminohippurate (1 µM)	Solvent Control	0	0.586±0.200	20.1±1.1	19.5	100	0	IC_{50} >7.5 µM
	AG-881	0.0075	0.415±0.190	19.4±0.9	19	97.3	2.7	
		0.0225	0.338±0.269	20.7±1.4	20.3	104	NA	
		0.075	0.303±0.077	21.4±1.7	21.1	108	NA	
		0.225	0.453 (n=2)	18.2±0.4	17.8	90.9	9.1	
		0.75	0.254±0.038	17.7±1.6	17.5	89.4	10.6	
		2.25	0.324±0.074	20.2±1.4	19.8	101	NA	
		7.5	0.167±0.012	19.6±1.8	19.4	99.4	0.6	
	Probenecid	100	0.2723±0.242	2.44±0.09	2.17	11.1	88.9	ND
	Novobiocin	300	0.279±0.071	0.765±0.065	0.486	2.5	97.5	

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ATP = adenosine triphosphate; AMP = adenosine monophosphate; BSEP = bile salt export pump; HEK = human embryonic kidney cell line; MRP2/3 = multi-drug resistance protein 2/3; n = number of replicates = 3 unless otherwise stated; NA = Not applicable. No value was obtained as the uptake at the highest concentration of AG-881 evaluated (7.5 µM) was higher than that of solvent control; ND = Not determined; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptides; OCT = organic cation transporter.

Unless otherwise indicated, values are triplicate determinations rounded to three significant figures with standard deviations rounded to the same degree of accuracy.
Percentages are rounded to one decimal place except percentages ≥ 100, which are rounded to the nearest whole number.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41905, AG881-N-051**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in transporter expressing vesicle (BSEP, MRP2, and MRP3) and HEK-293 cells (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) by AG-881.

OAT3 inhibition: Accumulation of [^{3}H]-estrone-3-sulfate into OAT3 cells in the presence of AG-881

Substrate	Inhibitor	[Inhibitor] (µM)	Uptake (pmol/mg protein)		Background corrected uptake rate (pmol/mg/min)	Percent of Control	Percent Inhibition	IC_{50} parameters
			Control	OAT3				
[^{3}H]-estrone-3-sulfate (50 nM)	Solvent Control	0	0.00573±0.00201	0.0489±0.0122	0.0216	100	0	IC_{50}>7.5 µM
	AG-881	0.0075	0.00619±0.00391	0.0776±0.0034	0.0357	166	NA	
		0.0225	0.00355 (n=2)	0.0828±0.0099	0.0396	184	NA	
		0.075	0.00493±0.0000	0.0699±0.0141	0.0325	151	NA	
		0.225	0.00516±0.00244	0.0905±0.0213	0.0427	198	NA	
		0.75	0.00596±0.00499	0.0866±0.0076	0.0403	187	NA	
		2.25	0.00458 (n=2)	0.0876±0.0134	0.0415	193	NA	
		7.5	0.00596 (n=2)	0.0747±0.0099	0.0344	159	NA	
	Probenecid	100	0.00269 (n=2)	0.0106±0.0066	0.00393	18.2	81.8	ND
	Ibuprofen	100	0.00372 (n=2)	0.00987±0.00309	0.00307	14.2	85.8	

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ATP = adenosine triphosphate; AMP = adenosine monophosphate; BSEP = bile salt export pump; HEK = human embryonic kidney cell line; MRP2/3 = multi drug resistance protein 2/3; n = number of replicates = 3 unless otherwise stated; NA = Not applicable. No value was obtained as the uptake at the highest concentration of AG-881 evaluated (7.5 µM) was higher than that of solvent control.
ND = Not determined; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptides; OCT = organic cation transporter.
Unless otherwise indicated, values are triplicate determinations rounded to three significant figures with standard deviations rounded to the same degree of accuracy.
Percentages are rounded to one decimal place except percentages ≥ 100, which are rounded to the nearest whole number.

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of Human ABC (BSEP, MRP2 and MRP3) and SLC (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) Transporters**	**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41905, AG881-N-051**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in transporter expressing vesicle (BSEP, MRP2, and MRP3) and HEK-293 cells (OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, and OCT2) by AG-881.

OCT2 inhibition: Accumulation of [^{14}C]-metformin into OCT2 cells in the presence of AG-881

Substrate	Inhibitor	[Inhibitor] (µM)	Uptake (pmol/mg protein)		Background corrected uptake rate (pmol/mg/min)	Percent of Control	Percent Inhibition	IC_{50} parameters
			Control	OAT3				
[^{14}C]-Metformin (10 µM)	Solvent Control	0	6.37±0.74	309±12	151	100	0	IC_{50}>7.5 µM
	AG-881	0.0075	6.21±1.15	313±16	153	101	NA	
		0.0225	6.94±0.56	332±22	163	108	NA	
		0.075	6.50±0.44	342±17	168	111	NA	
		0.225	7.58±1.47	292±10	142	93.9	6.1	
		0.75	7.02±1.93	290±8	141	93.4	6.6	
		2.25	6.58±0.60	299±12	146	96.5	3.5	
		7.5	5.12±1.85	299±14	147	97.2	2.8	
	Quinidine	300	3.47±0.74	6.07±0.52	1.3	0.9	99.1	ND
	Cimetidine	1000	2.74±0.91	20.3±1.8	8.77	5.8	94.2	

Abbreviations: ABC = ATP binding cassette; ATP = adenosine triphosphate; AMP = adenosine monophosphate; BSEP = bile salt export pump; HEK = human embryonic kidney cell line; MRP2/3 = multi-drug resistance protein 2/3; NA = Not applicable. No value was obtained as the uptake at the highest concentration of AG-881 evaluated (7.5 µM) was higher than that of solvent control; ND = Not determined; OAT = organic anion transporter; OATP = organic anion transporting polypeptides; OCT = organic cation transporter.

Unless otherwise indicated, values are triplicate determinations rounded to three significant figures with standard deviations rounded to the same degree of accuracy.

Values are duplicate determinations rounded to three significant figures.

Percentages are rounded to one decimal place except percentages ≥ 100, which are rounded to the nearest whole number.

Evaluation of AGI-69460 as a Potential P-glycoprotein Substrate, Using Verapamil and LY335979 as Inhibitor in Caco-2 Cell Monolayers	**Test Article: AGI-69460**
GLP Compliant: No	**Report No. NP41913, AG881-N-073**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter substrate assessment
Method:	Permeability of AGI-69460 in Caco-2 cells monolayer in the absence and presence of P-gp inhibitors

P-glycoprotein Substrate: AGI-69460 permeability in Caco-2 cells in the absence and presence of P-gp inhibitors

Substrate (µM)	**Inhibitor**	**P_{app} (cm/s×10^{-6}) (Mean±SD)**		**Efflux Ratio**	**Reduction (%)**
		A - B	**B - A**	**($P_{app\ BA}$)/($P_{app\ AB}$)**	
Digoxin (5 µM)	None	0.590±0.0207	18.3±1.36	30.9	NA
	Verapamil	4.54±0.377	6.06±0.123	1.33	95.7
	LY335979	4.64±0.350	5.18±0.183	1.12	96.4
Propranolol (5 µM)	None	29.0±2.08	27.7±0.555	0.956	NA
	Verapamil	39.6±2.84	33.2±2.90	0.838	12.3
	LY335979	32.4±2.61	29.3±1.67	0.905	5.37
AGI-69460 (0.1 µM)	None	12.2±0.0668	12.9±0.271	1.06	NA
	Verapamil	13.5±0.463	12.6±0.0719	0.933	12.1
	LY335979	11.2±0.292	11.1±0.250	0.991	6.68
AGI-69460 (1 µM)	None	12.5±0.244	15.2±0.147	1.22	NA
	Verapamil	14.4±0.168	15.3±0.175	1.06	13.1
	LY335979	14.0±0.420	13.7±0.325	0.976	20
AGI-69460 (5 µM)	None	12.9±0.193	15.9±0.701	1.23	NA
	Verapamil	14.3±0.166	15.0±0.193	1.05	14.8
	LY335979	12.7±0.427	15.0±0.435	1.17	4.92

Abbreviations: A = apical side; B = Basolateral side; GLP = good laboratory practice; NA = not applicable; Papp = apparent permeability; P-gp = permeability glycoprotein; SD = standard deviation.

Evaluation of AGI-69460 as a Potential BCRP Substrate, Using Novobiocin and Ko143 as Inhibitor in Caco-2 Cell Line				**Test Article: AGI-69460**	
GLP Compliant: No				**Report No. NP41912, AG881-N-072**	
Type of Study:	*In vitro* cell transporter substrate assessment				
Method:	Permeability of AGI-69460 in Caco-2 cells monolayer in the absence and presence of BCRP inhibitors				
BCRP Substrate: AGI-69460 permeability in Caco-2 cells in the absence and presence of inhibitors					
Substrate (µM)	**Inhibitor**	**P_{app} (cm/s×10^{-6}) (Mean±SD)**		**Efflux Ratio**	**Reduction (%)**
		A - B	**B - A**	**($P_{app\ BA}$)/($P_{app\ AB}$)**	
Rosuvastatin (5 µM)	None	0.118±0.0111	11.0±0.345	93.3	NA
	Novobiocin	0.563±0.0149	4.05±0.104	7.19	92.3
	Ko143	0.611±0.0234	4.34±0.0679	7.09	92.4
Propranolol (5 µM)	None	41.5±1.86	36.3±1.42	0.875	NA
	Novobiocin	35.4±1.41	36.1±0.679	1.02	-16.7
	Ko143	38.6±2.43	34.6±0.827	0.897	-2.51
AGI-69460 (0.1 µM)	None	8.98±0.539	17.1±2.15	1.91	NA
	Novobiocin	11.9±0.548	20.7±1.05	1.73	9.06
	Ko143	10.6±0.981	18.2±0.708	1.72	9.68
AGI-69460 (1 µM)	None	11.5±0.972	15.8±0.685	1.37	NA
	Novobiocin	14.9±0.478	18.3±0.161	1.23	10.6
	Ko143	12.2±0.758	18.6±0.214	1.52	-10.9
AGI-69460 (5 µM)	None	10.6±1.05	14.2±0.687	1.34	NA
	Novobiocin	12.7±0.479	13.9±0.732	1.1	18.1
	Ko143	12.5±0.904	15.0±0.463	1.2	10.3

Abbreviations: A=apical side; B=Basolateral side; BCRP = breast cancer resistance protein; GLP = good laboratory practice; NA=not applicable; P_{app} = apparent permeability; SD = standard deviation.

Evaluation of AGI-69460 as Substrate of OATP1B1 and OATP1B3					**Test Article: AGI-69460**
GLP Compliant: No					**Report No. NP41914, AG881-N-074**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter substrate assessment				
Method:	Accumulation of AGI-69460 in OATP1B1 and OATP1B3 over-expressing and control HEK293 cells				
AGI-69460 uptake rate in the presence and absence of inhibitor in OATP1B1 and OATP1B3 over-expressing HEK293 cells					
Transporter	**Substrate (µM)**	**Inhibitor (µM)**	**Uptake rate (pmol/mg/min) (Mean±SD)**	**Uptake ratio**	**Reduction (%)**
OATP1B1	Estradiol-17β-glucuronide (10 µM)	None	91.1±2.72	>152	
		Rifampicin (10 µM)	10.8±2.14	>15.3	NC
	AGI-69460 (0.1 µM)	None	0.655±0.0472	1.06	
		Rifampicin (10 µM)	0.754±0.0143	0.954	10.1
	AGI-69460 (1 µM)	None	7.52±0.443	1.01	
		Rifampicin (10 µM)	8.52±0.0974	0.94	7.26
	AGI-69460 (5 µM)	None	59.0±0.922	0.768	
		Rifampicin (10 µM)	63.1±1.91	0.868	-13
OATP1B3	Estradiol-17β-glucuronide (10 µM)	None	47.0±1.00	>78.3	
		Rifampicin (10 µM)	1.70±0.108	>2.40	NC
	AGI-69460 (0.1 µM)[a]	None	<0.483	<0.606	
		Rifampicin (10 µM)	<0.479	<0.783	NC
	AGI-69460 (1 µM)	None	5.03±0.259	0.678	
		Rifampicin (10 µM)	4.67±0.199	0.516	24
	AGI-69460 (5 µM)	None	42.2±1.88	0.55	
		Rifampicin (10 µM)	41.5±0.0403	0.571	-3.93

a: The uptake concentration was below the lower limit of quantitation (BLLOQ), the LLOQ was 1 nM. The mean value was reported as < the highest value of three parallel samples.
Abbreviations: GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney cell line; NC: Not calculated; OATP = organic anion transporting polypeptides; SD = standard deviation.

Evaluation of AGI-69460 as Substrate of OATP1B1 and OATP1B3			**Test Article: AGI-69460**
GLP Compliant: No			**Report No. NP41914, AG881-N-074**
AGI-69460 uptake rate in the presence and absence of inhibitor in OATP1B1 and OATP1B3 mock HEK293 cells (Control)			
Transporter	**Substrate (μM)**	**Inhibitor (μM)**	**Uptake rate (pmol/mg/min) (Mean±SD)**
OATP1B1 & OATP1B3	Estradiol-17β-glucuronide (10 μM)[a]	None	<0.600
		Rifampicin (10 μM)	<0.707
	AGI-69460 (0.1 μM)	None	0.617±0.0519
		Rifampicin (10 μM)	0.790±0.0391
	AGI-69460 (1 μM)	None	7.41±0.711
		Rifampicin (10 μM)	9.06±0.915
	AGI-69460 (5 μM)	None	76.8±4.03
		Rifampicin (10 μM)	72.7±0.769

a: The uptake concentration was below the lower limit of quantitation (BLLOQ), the LLOQ was 1.56 nM.
The mean value was reported as < the highest value of three parallel samples.
Abbreviations: GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney cell line; OATP = organic anion transporting polypeptides; SD = standard deviation.

Evaluation of AGI-69460 as Inhibitor of OATP1B1 and OATP1B3				**Test Article: AGI-69460**
GLP Compliant: No				**Report No. NP41915, AG881-N-075**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment			
Method:	The inhibition of probe substrate accumulation in OATP1B1 and OATP1B3 over-expressing HEK-293 cells by AGI-69460.			
OATP1B1 inhibition: Accumulation of estradiol-17β-glucuronide into OATP1B1 cells in the presence of AG-881				
Inhibitor	**Concentration (μM)**	**Uptake Rate (pmol/mg protein/min) (Mean±SD)**	**Percent Control Activity (%)**	**Percentage Inhibition (%)***
Vehicle (no inhibitor)	0	68.2±0.913	100	0
Rifampicin	10	5.43±0.262	0	100
AGI-69460	0.03	67.6±0.979	98.9	1.1
	0.1	69.6±8.36	102	-2.1
	0.3	65.6±1.88	95.8	4.21
	1	61.2±2.08	88.7	11.3
	3	57.6±1.39	83.1	16.9
	5	57.4±2.15	82.7	17.3
	10	49.0±1.73	69.4	30.6
	IC_{50} > 10 μM			
OATP1B3 inhibition: Accumulation of estradiol-17β-glucuronide into OATP1B3 cells in the presence of AG-881				
Inhibitor	**Concentration (μM)**	**Uptake Rate (pmol/mg protein/min) (Mean±SD)**	**Percent Control Activity (%)**	**Percentage Inhibition (%)***
Vehicle (no inhibitor)	0	45.1±2.16	100	0
Rifampicin	10	2.20±0.535	0	100
AGI-69460	0.03	43.1±2.62	95.3	4.68
	0.1	39.3±1.16	86.5	13.5
	0.3	38.4±3.26	84.5	15.5
	1	31.3±1.74	67.9	32.1
	3	26.1±0.769	55.7	44.3
	5	18.8±1.29	38.8	61.2
	10	13.7±0.704	26.9	73.1
	IC_{50} = 2.97 μM			

**Corrected for passive transport (Uptake rate in presence of 10 μM rifampicin when the transport activity of OATP1B1 is considered completely inhibited)*
Abbreviations: GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney cell line; IC50 = half-maximal inhibitory concentration; OATP = organic anion transporting polypeptides; SD = standard deviation.

***In vitro* Interaction Studies of AGI-69460 with Human BCRP and MDR1 Efflux (ABC) Transporters, and with Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3 and OCT2 Uptake Transporters**			**Test Article: AGI-69460**
GLP Compliant: No			**Report No. NP42812, S095032_A-R-00006522-DHTI**
Type of Study:	*In vitro* cell transporter inhibition assessment		
Method:	The inhibition of vesicular transport/uptake of selective substrates of BCRP, MDR1, MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OCT2 in HEK293 cells stably expressing the human transporters		
BCRP: Effect of AGI-69460 on BCRP-mediated transport of estrone-3-sulfate			
Compound	Concentration (µM)	Relative Inhibition (%)	IC_{50} (µM)*
AGI-69460	8.23	59	5.84
	2.85	32	
	1.09	16	
	0.427	10	
	0.163	4	
	0.0621	2	
	0.0257	0	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
Ko143	0.200	95	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
MDR1: Effect of AGI-69460 on MDR1-mediated transport of N-methyl quinidine			
Compound	Concentration (µM)	Relative Inhibition (%)	IC_{50} (µM)*
AGI-69460	8.23	-19	ND
	2.85	-18	
	1.09	-19	
	0.427	-10	
	0.163	-10	
	0.0621	-11	
	0.0257	-19	
DMSO	<1.5%, v/v	0	

Valspodar	1.00	96	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
MATE1: Effect of AGI-69460 on MATE1-mediated transport of metformin			
Compound	Concentration (μM)	Relative Inhibition (%)	IC_{50} (μM)*
AGI-69460	7.12	13	ND
	2.02	4	
	0.718	-1	
	0.251	-3	
	0.0841	-2	
	0.0277	-3	
	0.0104	-6	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
Pyrimethamine	5.00	99	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
MATE2-K: Effect of AGI-69460 on MATE2-K-mediated transport of metformin			
Compound	Concentration (μM)	Relative Inhibition (%)	IC_{50} (μM)*
AGI-69460	7.12	4	ND
	2.02	3	
	0.718	-3	
	0.251	0	
	0.0841	1	
	0.0277	2	
	0.0104	-4	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
Pyrimethamine	5.00	102	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
OAT1: Effect of AGI-69460 on OAT1-mediated transport of tenofovir			
Compound	Concentration (μM)	Relative Inhibition (%)	IC_{50} (μM)*
AGI-69460	5.75	16	ND
	1.89	10	
	0.708	6	
	0.232	2	
	0.08	3	

	0.0276	2	
	0.0102	1	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
Probenecid	300.00	100	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
OAT3: Effect of AGI-69460 on OAT3-mediated transport of estrone-3-sulfate			
Compound	Concentration (μM)	Relative Inhibition (%)	IC_{50} (μM)*
AGI-69460	5.75	17	ND
	1.89	3	
	0.708	-1	
	0.232	-5	
	0.08	-4	
	0.0276	-5	
	0.0102	5	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
Probenecid	500	97	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
OCT2: Effect of AGI-69460 on OCT2mediated transport of metformin			
Compound	Concentration (μM)	Relative Inhibition (%)	IC_{50} (μM)*
AGI-69460	5.75	24	ND
	1.89	11	
	0.708	10	
	0.232	12	
	0.08	3	
	0.0276	2	
	0.0102	6	
DMSO	<1.5%, v/v	0	
Clonidine	100	98	
DMSO	<1.5%, v/v	0	

Abbreviations: BCRP = breast cancer resistance protein; DMSO = dimethylsulfoxide; GLP = good laboratory practice; HEK = human embryonic kidney cell line; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; MATE2-K = multidrug And Toxin Extrusion Protein 2-K; MDR1 = multidrug resistance mutation 1; ND = not determined; OAT = organic anion transporter; OCT = organic cation transporter; v/v = volume by volume.

**The IC_{50} values were corrected according to the result of the non-specific binding assay.*

***In Vitro* Evaluation of AG-881 as an Inhibitor of UGT1A1 in Human Liver Microsomes**			**Test Article: AG-881**
GLP Compliant: No			**Report No. NP41904, AG881-N-006**
Type of study:	Evaluation of AG-881 as an inhibitor of UGT1A1		
Method:	Enzyme activity for the IC_{50} determination was measured by high performance liquid chromatography and mass spectrometry. Incubations were performed using human liver microsomes at 0.1 mg/mL and a probe substrate added at a concentration equivalent to its approximate S50 value and 0.01 to 10 µM AG-881 concentration range.		
Tabulated results:			
Enzyme	**Substrate**	**Direct inhibition**	
		IC50 ± SE[a] (µM)	**Inhibition observed at 10 µM[b] (%)**
UGT1A1	17β-Estradiol	8.0 ± 1.1	52

a Average data (i.e., percent of control activity) obtained from duplicate samples for each test article concentration were used to calculate IC50 values. IC50 values were calculated with XLfit.

b Inhibition observed (%) is calculated with the following formula:

Inhibition observed (%) = 100% − Percent solvent control at 10 µM AG-881.

Abbreviations: GLP = good laboratory practice; IC_{50} = half-maximal inhibitory concentration; SE = standard error; S50 = substrate concentration for allosteric kinetics which supports half the maximum rate of an enzyme-catalyzed reaction; UGT = uridine diphosphate glucuronosyltransferase.

16. 薬物動態試験：その他

Permeability and Gastrointestinal Fluid Stability of Vorasidenib (AG-881) to Assess the Biopharmaceutics Classification System (BCS)			**Test Article: Vorasidenib**	
GLP Compliant: No			**Report No. NP42279, PB-22-095032-007-DHAB**	
Type of Study	*In vitro* cell permeability and efflux assessment			
Method:	Stability of vorasidenib at 1 µM in simulated gastric and intestinal fluid by LC-MS/MS			
Matrix	**SGF (pH 1.2)**		**SIF (pH 6.5)**	
Time (min)	**0**	**60**	**0**	**180**
Measured Concentration (nM)	1140	1140	1200	1120
	1150	1130	1070	1030
	1130	1160	1200	1120
Mean Conc. (nM)	1140	1143	1157	1090
Mean % Recovery[a]	100	100	100	94.2
CV (%)	0.877	1.34	6.49	4.77

a % Recovery = measured concentration / measured initial concentration × 100
Abbreviations: CV (%): coefficient of variation (standard deviation / mean × 100%); GLP = good laboratory practice; LC-MS/MS = liquid chromatography tandem mass spectrometry; SGF=simulated gastric fluid; SIF=simulated intestinal fluid