TABLE OF CONTENTS

LIST OF TABLES 2
LIST OF FIGURES 3
略号および用語の定義一覧 4
1. まとめ 6
1.1. 吸収 6
1.2. 分布 6
1.3. 代謝 7
1.4. 排泄 7
1.5. 薬物動態学的薬物相互作用 7
2. 分析法 8
2.1. 分析対象 8
2.2. LC-MS/MS を用いた分析法 8
2.3. 放射能 9
3. 吸収 9
3.1. 単回投与 PK 10
3.1.1. マウス 10
3.1.2. ラット 11
3.1.3. サル 12
3.1.4. バイオアベイラビリティ 12
3.2. 反復投与 PK 13
3.2.1. マウス 13
3.2.2. サル 13
3.3. 反復投与トキシコキネティクス 13
3.3.1. ラット 13
3.3.2. サル 14
4. 分布 15
4.1. 血漿蛋白結合 15
4.2. 血球移行性 15
4.3. P-gp を介した移行性 15
4.4. 組織分布 16
4.4.1. マウスを用いたツカチニブの脳への分布の評価 16

4.4.2. ラットを用いたツカチニブの組織分布試験 16
4.5. 胎盤通過性 17
5. 代謝 17
5.1. 代謝物の構造決定 17
5.2. In vitro 代謝 19
5.3. 代謝に関与する酵素の同定 20
5.4. In vivo 代謝 21
6. 排泄 22
7. 薬物動態学的薬物相互作用 23
7.1. 薬物代謝酵素誘導 23
7.2. 薬物代謝酵素阻害 23
7.3. カペシタビン代謝阻害 24
7.4. トランスポーターを介した薬物相互作用 25
7.4.1. トランスポーター基質性 25
7.4.2. トランスポーター阻害 25
8. その他の薬物動態試験 26
9. 考察および結論 26
9.1. 吸収 26
9.2. 分布 27
9.3. 代謝 27
9.4. 排泄 28
9.5. 薬物動態学的薬物相互作用 28
9.6. 結論 29
10. 図表 30
参考文献 30

LIST OF TABLES

Table 1. バリデートされた LC-MS/MS における K_2EDTA 血漿中ツカチニブおよび ONT-993 濃度の定量限界 9
Table 2. 非臨床 PK 試験で用いたツカチニブの調製方法の一覧 10
Table 3. ツカチニブを単回投与後の PK パラメータ（ノンコンパートメント解析） 12
Table 4. 反復投与時のツカチニブのトキシコキネティクスパラメータ 14

Table 5. [^{14}C]ツカチニブの in vitro 代謝 20
Table 6. 各動物種における[^{14}C]ツカチニブの回収率（%） 23

LIST OF FIGURES

Figure 1. ツカチニブ，ONT-993 および[^{14}C]ツカチニブの化学構造式 8
Figure 2. ツカチニブを単回経口投与したときの C_{max} および AUC_{24h} の投与量補正値 11
Figure 3. [^{14}C]ツカチニブの in vivo 推定代謝経路 19

略号および用語の定義一覧

略号，用語	省略していない表現または定義
5-FU	5-fluorouracil：5-フルオロウラシル
AUC	area under the concentration-time curve：濃度 - 時間曲線下面積
AUC_{12h}	area under the concentration-time curve through 12 hours：投与後 12 時間までの濃度−時間曲線下面積
AUC_{24h}	area under the concentration-time curve through 24 hours：投与後 24 時間までの濃度−時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the concentration-time curve from 0 to infinity： 0 時間から無限大時間までの濃度−時間曲線下面積
AUC_{last}	area under the concentration-time curve from 0 to the last measurable concentration：0 時間から最終定量可能時間までの濃度−時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein
BDC	bile duct cannulated：胆管カニューレーション
BSEP	bile salt export pump
CL	total body clearance：全身クリアランス
C_{max}	maximum observed plasma concentration：最高血漿中濃度
CMC	carboxymethyl cellulose：カルボキシメチルセルロース
CYP	cytochrome P450：シトクロム P450
DMSO	dimethyl sulfoxide：ジメチルスルホキシド
EC_{50}	half maximal effective concentration：50%効果濃度
F	bioavailability：バイオアベイラビリティ
FBAL	α-fluoro-β-alanine：α-フルオロ-β-アラニン
HER	Human Epidermal Receptor：ヒト上皮増殖因子受容体
HPLC	high performance liquid chromatography：高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	half maximal inhibitory concentration：50%阻害濃度
ICH	International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use：医薬品規制調和国際会議
K_2EDTA	dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid：エチレンジアミン四酢酸二カリウム
Ki	intrinsic inhibition constant (in units of inhibitor concentration) that defines the affinity of a reversible inhibitor for an enzyme：阻害定数
K_I	inhibitor concentration causing half-maximal inactivation：最大不活性化速度の 50%の速度をもたらす阻害薬の濃度
k_{inact}	maximal rate constant of enzyme inactivation：最大酵素不活性化速度定数
LC-MS/MS	liquid chromatography with tandem mass spectrometry：液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計
MATE	multidrug and toxin extrusion

略号，用語	省略していない表現または定義
MRI	magnetic resonance imaging：磁気共鳴画像法
mRNA	messenger ribonucleic acid：メッセンジャーリボ核酸
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NCA	non-compartmental analysis：ノンコンパートメント解析
OAT	organic anion transporter
OATP	organic anion transporting polypeptide
OCT	organic cation transporter
P_{app}	In vitro 細胞膜透過試験における被験薬物の見かけの透過係数。頂側膜側から基底膜側への見かけの透過係数を $P_{app\ A\ to\ B}$，基底膜側から頂側膜側への見かけの透過係数を $P_{app\ B\ to\ A}$ と表した。
P-gp	P-glycoprotein：P-糖蛋白質
PBPK	Physiologically based pharmacokinetic：生理学的薬物速度論
PBS	phosphate buffered saline：リン酸緩衝生理食塩液
PEG	polyethylene glycol：ポリエチレングリコール
PK	pharmacokinetic
PXR	pregnane X receptor：プレグナン X 受容体
SD	Sprague-Dawley
$t_{½}$	apparent terminal half-life：終末相の見かけの消失半減期
T_{max}	time to reach maximum plasma concentration：最高血漿中濃度到達時間
UGT	uridine diphosphate glucuronosyl transferase：ウリジン二リン酸グルクロン酸転移酵素
V	volume of distribution：分布容積
V_{ss}	volume of distribution at steady state：定常状態における分布容積

1. まとめ

ツカチニブ（別名 ONT-380，ARRY-380 または AR00432380）は，ヒト上皮増殖因子受容体 2 型（HER2）を標的とする低分子の可逆的チロシンキナーゼ阻害薬であり，臨床投与経路は経口投与である。薬理試験および毒性試験で用いた非臨床動物種およびヒトにおけるツカチニブの薬物動態プロファイルについて，種々の in vitro および in vivo 試験により検討した。また，ヒト血漿中における主代謝物である ONT-993（M1，AR00440993 または SGD-8281：エナンチオマー*R* 体と *S* 体の混合）についても蛋白結合率および薬物相互作用関連の in vitro 試験を実施した。In vivo 試験は主として薬理・毒性試験で使用した動物種であるマウス，ラットおよびカニクイザルを用いて検討した。単回投与による血漿中濃度推移を検討した試験の投与経路は，静脈内または臨床投与経路である経口投与とした。吸収，分布，代謝および薬物トランスポーターに関する検討には目的に応じた in vitro 試験系を用いた。分布，代謝および排泄の検討には[^{14}C]ツカチニブも使用した。血漿中のツカチニブ濃度の定量には液体クロマトグラフィー/タンデム質量分析計（LC-MS/MS）を用いた。

1.1. 吸収

マウス，ラットおよびカニクイザルにツカチニブを単回経口投与または静脈内投与したときの PK を評価した。ツカチニブを 0.5 または 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与したときのクリアランス（CL）はラットで中程度，カニクイザルで高かった。種々の溶液，懸濁液またはカプセル剤でのツカチニブの経口投与後，最高血漿中濃度（C_{max}）および血漿中濃度-時間曲線下面積（AUC）は，マウス（20～100 mg/kg），ラット（10～100 mg/kg）およびカニクイザル（15～45 mg/kg）で用量の増加に伴って増加した。いずれの動物においても，単回経口投与後の半減期（$t_{½}$）は 2～4 時間であった。ラットの 28 日間および 13 週間投与毒性試験におけるトキシコキネティクス評価では，C_{max} および AUC_{12h} は用量の増加に伴って増加した。投与初日から最終投与日の間に約 2～4 倍の蓄積が認められた。カニクイザルの 28 日間および 13 週間投与毒性試験の両試験で，曝露量は用量の増加に伴って増加し，性差は概してみられず，蓄積は 2 倍未満であった。

1.2. 分布

ツカチニブの血漿蛋白結合率は 0.1～50 µmol/L の間で同程度であり，いずれの動物種においても 93%を上回った。1 µmol/L（480 ng/mL）におけるヒトでの血漿蛋白結合率は 97.1%であった。ヒトでのツカチニブの血液/血漿中濃度比は 0.2～20 µmol/L の濃度で約 1 であり，血球と血漿にほぼ均等に分布した。ツカチニブは，Caco-2 細胞および MDR1 発現 LLC-PK1 細胞で高い透過性を有することが示された。Long Evans ラットを用いた組織分布試験では，[^{14}C]ツカチニブ由来の放射能が投与後 1 時間までに広範な組織にわたって分布し，多くの組織で投与後 168 時間までに消失した。

HER2 を過剰発現するヒト乳癌由来細胞株 BT-474 を頭蓋内（右脳線条体領域）に移植したマウスに[^{14}C]ツカチニブを経口投与したところ，放射能の脳への分布は限定的であったが，投与後 3 時間の腫瘍移植領域（右脳）の正常脳（左脳）に対する放射能比は 3.6～10.9 であったことから，[^{14}C]ツカチニブ由来の放射能が血液脳腫瘍関門を通過し，腫瘍を移植した領域に優先的に分布したことが示された。

1.3. 代謝

In vitro ならびにラット，カニクイザルおよびヒトでの in vivo 試験によりツカチニブの代謝を検討した。ヒト試料を用いた in vitro 評価により同定された代謝物は，いずれも 1 種以上の動物種由来の試料を用いた試験でも認められた。同定された代謝物は概ね酸化代謝物（水酸化，脱水素化および脱アルキル化など）であった。CYP2C8 によるツカチニブのジメチルジヒドロオキサゾール環におけるメチル基の水酸化は in vitro での主要な代謝経路であり，キラル代謝物である ONT-993 が生成する。ヒトまたはカニクイザル由来試料を用いた in vitro 試験およびヒトまたはカニクイザルにツカチニブ投与後の尿中における ONT-993 の *S* 体に対する *R* 体の比率は 3.2～4.85 であった。BT-474 細胞株に対する *R* 体および *S* 体の細胞毒性作用に関する 50%効果濃度（EC_{50} 値）はそれぞれ 60 および 87 nmol/L であり，ツカチニブの EC_{50} 値（27 nmol/L）の 2～3 倍であった（CTD 2.6.2.2.4.3）。ONT-993 のヒト血漿蛋白結合率は 97.1%であった。

健康成人に[^{14}C]ツカチニブを 300 mg（150 µCi）の用量で単回経口投与したところ，血漿中の主要な薬物関連物質は未変化体および ONT-993 であり，血漿中曝露量（AUC_{24h}）はそれぞれ 5210（血漿中放射能の 75.6%）および 631 ng eq•h/mL（同 9.16%）であった。また，LC-MS/MS における血漿中 AUC_{inf} はそれぞれ 3220 および 582 ng•h/mL であった。定常状態における血漿中代謝物について検討するためにツカチニブを 300 mg の用量で 14 日間反復投与したところ，ONT-993 は総薬物関連物質の 6.46%と算出され，総薬物関連物質の 10%を超える代謝物は認められなかった。

1.4. 排泄

胆管カニューレーション（BDC）処置および未処置ラット，カニクイザルならびにヒトに[^{14}C]ツカチニブを単回経口投与したところ，放射能の回収率はそれぞれ 93.6%，91.4%，82.8%および 89.9%であった。放射能の多くは代謝物として糞便中（BDC ラットでは胆汁中）に回収され，ヒトを含むいずれの動物種においても，ツカチニブの主な消失経路は代謝および胆汁排泄であることが示された。カニクイザルの糞便中では ONT-993 が最も多く排泄された薬物関連物質であり，投与量の 16.4%を占め，次いで未変化体が投与量の 11.8%であった。ヒトにおいても ONT-993 が糞便中に最も多く存在する薬物関連物質であり，投与量の 36.8%を占め，次いで未変化体が投与量の 15.9%であった。ラット，カニクイザルおよびヒトの尿中に回収された放射能は投与量の 5%未満であった。

1.5. 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro 試験の成績から，ツカチニブは主に CYP2C8，次いで CYP3A4，CYP3A5 およびアルデヒドオキシダーゼなどの複数の薬物代謝酵素によって代謝されることが示された。In vitro 試験において，ツカチニブは CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A に対して競合的な阻害作用を示し，阻害定数（Ki 値）はそれぞれ 0.170，4.57 および 0.805 µmol/L であった。また，CYP3A に対しては時間依存的阻害を示し，最大酵素不活性化速度定数（k_{inact} 値）は 0.011 min^{-1}，50%阻害濃度（K_I 値）は 0.54 µmol/L であった。ONT-993 も CYP3A に対する時間依存的阻害を示し，k_{inact} 値は 0.015 min^{-1}，K_I 値は 1.6 µmol/L であった。ツカチニブ（最高 30 µmol/L）による CYP1A2，CYP2B6 および CYP3A の酵素活性誘導ならびに mRNA 量の増加は認められなかった。

ツカチニブは P-gp および BCRP の基質となることが示唆された一方，OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，MATE1，MATE2-K および BSEP の基質とはならなかった。ツ

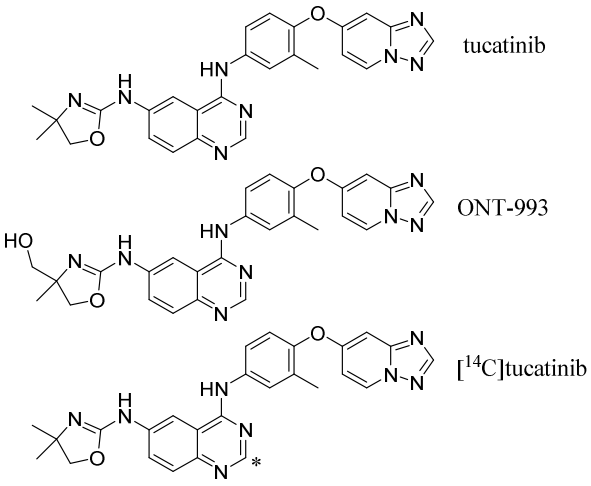
カチニブは腎近位尿細管トランスポーターである OCT2，MATE1 および MATE2-K を介したメトホルミンの輸送を阻害し，50%阻害濃度（IC_{50} 値）はそれぞれ 14.7，0.340 および 0.135 µmol/L であった。また，OCT2 および MATE1 を介したクレアチニンの輸送を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 0.107 および 0.0855 µmol/L であった。

2. 分析法

2.1. 分析対象

In vivo 薬物動態試験において，各動物種に対してツカチニブまたは[^{14}C]ツカチニブを投与し，ツカチニブまたは ONT-993（一部の試験ではキラルカラムを用いて *R* 体と *S* 体の比率を検討した）の生体試料中濃度を測定した。[^{14}C]ツカチニブを投与した試験では，対象の生体試料中の放射能を測定した。ツカチニブ，ONT-993 および[^{14}C]ツカチニブの化学構造式を Figure 1 に示す。

Figure 1.　ツカチニブ，ONT-993 および[^{14}C]ツカチニブの化学構造式



* 標識位置

2.2. LC-MS/MS を用いた分析法

試験報告書：P0002968，AV[redacted]-ONT380-01，AV[redacted]-ONT380-02，AV[redacted]-ONT380-01
概要表：2.6.5.2

非臨床薬物動態試験および毒性試験における生体試料中の薬物濃度を定量するため，分析法の開発およびバリデーションを実施した。

Good Laboratory Practice（GLP）適用のトキシコキネティクス試験での分析を行うため，ラット，ウサギおよびカニクイザル血漿中ツカチニブの定量法を 1～1000 ng/mL の濃度範囲でバリデートした（P0002968 試験，AV[redacted]-ONT380-01 試験，AV[redacted]-ONT380-02 試験，AV[redacted]-ONT380-01 試験）。AV[redacted]-ONT380-01 試験および AV[redacted]-ONT380-02 試験では ONT-993 も同様の濃度範囲で同時定量した（Table 1）。これらの試験では内標準物質として各分析対象物の重水素標識体を用いた。ツカチニブおよび ONT-993 はラット，ウサギおよびカニクイザル血漿中において，室温で 4～6.3 時間，-70°C で 29～426 日間安定であり，凍結融解を 4 回繰り返しても安定であっ

た。試料の分析は安定性の確認された保存期間内に実施した。ラットおよびカニクイザルを用いた一般毒性試験（8369684 試験，8369685 試験）ならびにウサギを用いた胚・胎児発生に関する用量設定試験（20144956 試験）から得られた試料について Incurred sample reanalysis（ISR：定量値の再現性確認のため，異なる日に別の分析単位で投与後試料を再分析すること）を実施した。その結果，いずれも許容基準（総検体数の 66.7%以上で再分析値が初回値の±20%以内）に適合しており，トキシコキネティクス解析における各分析法の適切性が確認された。

Table 1.　バリデートされた LC-MS/MS における K_2EDTA 血漿中ツカチニブおよび ONT-993 濃度の定量限界

分析対象	動物種	定量下限（ng/mL）	定量上限（ng/mL）	バリデーション試験報告書	分析法番号	毒性試験番号
ツカチニブ	ラット カニクイザル	1.00 1.00	1000 1000	P0002968	V0003625	1140-028 JAY00093
ツカチニブ ONT-993	ラット	1.00 1.00	1000 1000	AV[redacted]-ONT380-01	TM[redacted]-343	8369684
ツカチニブ ONT-993	カニクイザル	1.00 1.00	1000 1000	AV[redacted]-ONT380-02	TM[redacted]-344	8369685
ツカチニブ	ウサギ	1.00	1000	AV[redacted]-ONT380-01	TM[redacted]-485	20144956

マウス，ラットおよびカニクイザルを用いた薬物動態試験における血漿中ツカチニブおよび ONT-993 濃度は，上述した LC-MS/MS を用いた方法に準じて定量した。

2.3. 放射能

[^{14}C]ツカチニブを用いた Long Evans ラットの組織分布試験（8369173 試験）では，定量的全身オートラジオグラフィーにより組織中の放射能を定量した。本法の定量下限値は 97.3 ng eq/g であった。また，[^{14}C]ツカチニブを用いたマウス（[redacted]0229 試験）および Sprague-Dawley ラット（DM[redacted]-063 試験）における分布試験ならびにラット（DM[redacted]-075 試験），カニクイザル（8393554 試験）およびヒト（ONT-380-008 試験）におけるマスバランス試験では各種の生体試料中の放射能を液体シンチレーション計数法により測定した。

3. 吸収

ツカチニブの非臨床 PK 特性をマウス，ラットおよびカニクイザルを用いて評価した。各試験で用いたツカチニブの種々の調製方法の一覧を Table 2 に示す。

Table 2.　非臨床 PK 試験で用いたツカチニブの調製方法の一覧

調製方法	組成
カプセル	・粉末含有カプセル（Capsule）
溶液	・20% 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン（Solution 1） ・30% Captisol（Solution 2） ・0.5% Tween 80，pH 2.6（Solution 3）
懸濁液	・0.5%ナトリウム カルボキシメチルセルロース（NaCMC）/0.1% Tween 80（Suspension 1） ・0.5% NaCMC/0.1% poloxamer 188，pH 7.0（Suspension 2） ・1% CMC/0.5% Tween 80（Suspension 3）
静脈注射液	・15% Solutol/5% DMSO 含有 PBS，pH 7.4（IV 1） ・40% ポリエチレングリコール（PEG）400/20%エタノール（IV 2）

DMSO =ジメチルスルホキシド，PBS =リン酸緩衝生理食塩液

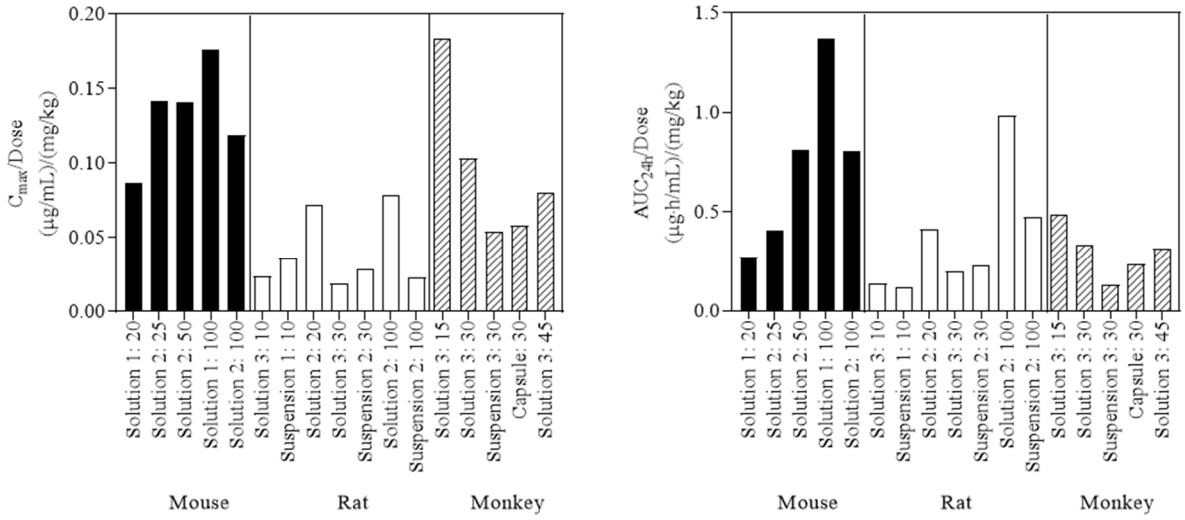
3.1. 単回投与 PK

3.1.1. マウス

試験報告書：TRN-5562，DM[redacted]-034，DM[redacted]-004，概要表：CTD 2.6.5.3.1

雌雄 CD-1 マウスに 2 種類の組成の溶液（20% 2-ヒドロキシプロピル-β-シクロデキストリン溶液：20 および 100 mg/kg，30% Captisol 溶液：25，50 および 100 mg/kg）で調製したツカチニブを単回経口投与した（TRN-5562 試験，DM[redacted]-034 試験，DM[redacted]-004 試験）。ノンコンパートメント解析（NCA）により PK パラメータを求めたところ，C_{max} および AUC_{24h} は用量の増加に伴って増加した（Figure 2）。ツカチニブを 20，25，50 および 100 mg/kg の用量で投与したときの C_{max} はそれぞれ 1.74，3.55，7.04 および 17.6/11.9（雌/雄）µg/mL，AUC_{24h} はそれぞれ 5.53，10.3，40.5 および 137/80.6（雌/雄）µg•h/mL であった。100 mg/kg 投与時の雌マウスの曝露量は雄マウスの 2 倍弱であった。最高血漿中濃度到達時間（T_{max}）は 0.5～2 時間であった。また，1-コンパートメントモデルにより評価したところ，これらの PK パラメータは NCA と類似していた。

Figure 2.　ツカチニブを単回経口投与したときの C_{max} および AUC_{24h} の投与量補正値



3.1.2. ラット

試験報告書：TRN-5562，DM[redacted]-035，概要表：CTD 2.6.5.3.2

雄 Sprague-Dawley ラットにツカチニブを単回静脈内または経口投与して PK を評価した（TRN-5562 試験，DM[redacted]-035 試験）。

ラットにツカチニブ（15% Solutol/5% DMSO 含有 PBS 溶液）を 0.5 および 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，NCA により PK パラメータを求めた。$t_{½}$はそれぞれ 0.725 および 1.30 時間，定常状態における分布容積（V_{ss}）はそれぞれ 1.86 および 5.04 L/kg であり，CL はそれぞれ 29.6 および 46.9 mL/min/kg と中程度の値を示した（Table 3）。C_{max} および AUC_{24h} は概ね用量の増加に伴って増加し，これらの PK パラメータは 1-コンパートメントモデルによる評価と類似していた。

ラットに 2 種類の溶液（30% Captisol 溶液：20 または 100 mg/kg，0.5% Tween 80 溶液：10 または 30 mg/kg）もしくは 2 種類の懸濁液（0.5% NaCMC/0.1% Tween 80 懸濁液：10 mg/kg，0.5% NaCMC/0.1% poloxamer 188 懸濁液：30 または 100 mg/kg）で調製したツカチニブを単回経口投与した。NCA による解析の結果，10 または 30 mg/kg で調製液間の AUC_{24h} の差はみられなかったが，100 mg/kg 投与時の AUC_{24h} は溶液に比べ懸濁液で低値であった。ツカチニブを 10，20，30 または 100 mg/kg の用量で投与したときの AUC_{24h} はそれぞれ 1.35/1.23（溶液/懸濁液：連記されている箇所は以下同様），8.29，6.01/6.88 および 98.3/47.5 µg•h/mL で，用量比を上回って増加した（Figure 2）。一方，C_{max} はそれぞれ 0.236/0.358，1.44，0.574/0.859 および 7.87/3.42 µg/mL で同様の傾向はみられなかった。1-コンパートメントモデルによる評価において，これらの PK パラメータは NCA と類似していた。

3.1.3. サル

試験報告書：TRN-5562，DM[redacted]-036，DM[redacted]-003，概要表：CTD 2.6.5.3.3

雄カニクイザルにツカチニブを静脈内投与または経口投与により単回投与して PK を評価した（TRN-5562 試験，DM[redacted]-036 試験，DM[redacted]-003 試験）。

カニクイザルにツカチニブ（40% PEG400/20%エタノール溶液）を 1 mg/kg の用量で単回静脈内投与し，NCA により PK パラメータを求めた。$t_{½}$および V_{ss} はそれぞれ 0.456 時間および 4.07 L/kg であり，CL は 105 mL/min/kg と高い値を示した（Table 3）。

カニクイザルに，3 種類の方法で調製したツカチニブ（0.5% Tween 80 溶液，カプセルまたは 1% CMC/0.5% Tween 80 懸濁液）をそれぞれ単回経口投与した。NCA による解析では，溶液，カプセル剤および懸濁液のツカチニブを 30 mg/kg の用量で経口投与したときの C_{max} はそれぞれ 3.09，1.73 および 1.62 µg/mL，AUC_{24h} はそれぞれ 9.95，7.09 および 3.94 µg•h/mL で，溶液投与時の曝露量が最も高かった（Figure 2）。T_{max} は 1～4 時間であった。また，1-コンパートメントモデルにより評価したところ，これらの PK パラメータは NCA と類似していた。

3.1.4. バイオアベイラビリティ

試験報告書：TRN-5562，概要表：CTD 2.6.5.3

ラットにツカチニブの溶液および懸濁液を 10 mg/kg の用量で投与したとき NCA による計算値に基づくバイオアベイラビリティはそれぞれ 23.8%および 21.9%であった（0.5 mg/kg 静脈内投与時の曝露データを用いて算出）（Table 3）（TRN-5562 試験）。バイオアベイラビリティは用量比に伴って増加したが，個体値のばらつきは大きかった。カニクイザルにおいてはバイオアベイラビリティが 100%を上回ったが，これは非線形 PK（飽和性の薬物代謝酵素やトランスポーターの関与による高用量投与時の高曝露）による可能性が考えられた。

Table 3.　ツカチニブを単回投与後の PK パラメータ（ノンコンパートメント解析）

動物種	投与経路	投与量 (mg/kg)	調製液	CL または CL/F (mL/min/kg)	V_{ss} または V/F (L/kg)	$t_{½}$ (hr)	AUC_{24h} (µg•h/mL)	C_{max} (µg/mL)	F (%)
ラット	静脈内	0.5	IV 1	29.6	1.86	0.725	0.286	0.399	NA
	経口	10	Solution 3	233	47.1	2.51	1.35	0.236	23.8
		10	Suspension 1	NR	NR	NR	1.23	0.358	21.9
サル	静脈内	1.0	IV 2	105	4.07	0.456	0.171	0.224	NA
	経口	15	Solution 3	42.6	7.59	1.95	7.35	2.75	>100
		30	Solution 3	61.4	14.9	2.78	9.95	3.09	>100
		45	Solution 3	58.1	18.5	3.62	14.2	3.60	>100

AUC_{24h}=投与後 24 時間までの血漿中濃度 - 時間曲線下面積，C_{max}=最高血漿中濃度，CL =全身クリアランス，F=バイオアベイラビリティ，NA=該当なし，NR=報告値なし，$t_{½}$=終末相半減期，V_{ss}=定常状態における分布容積，V=分布容積

3.2. 反復投与 PK

3.2.1. マウス

試験報告書：DM[redacted]004，概要表：CTD 2.6.5.4.1

雄 CD-1 マウスにツカチニブ（30% Captisol 溶液）を 100 mg/kg/回の用量で 1 日 2 回 5 日間（計 9 回）経口投与し，ツカチニブおよび ONT-993 の血漿中濃度を測定した（DM[redacted]-004 試験）。試験 5 日のツカチニブの T_{max}，C_{max} および AUC_{inf} はそれぞれ 2 時間，12.9 µg/mL および 92.2 µg•h/mL であり，ONT-993 の T_{max}，C_{max} および AUC_{inf} はそれぞれ 2 時間，1.03 µg/mL および 8.90 µg•h/mL であった。初回投与後のツカチニブの AUC_{inf} は 57.6 µg•h/mL であり，反復投与による蓄積性が示された（1.6 倍）。C_{max} は初回投与時と試験 5 日で同程度であった。未変化体に対する ONT-993 の AUC の比は初回投与時で 7.23%，試験 5 日で 9.47%であった。

3.2.2. サル

試験報告書：DM[redacted]-036，概要表：CTD 2.6.5.4.2

雄カニクイザルにツカチニブ（30% Captisol 溶液）を 30 または 60 mg/kg/回の用量で 1 日 2 回 5 日間経口投与し，ツカチニブおよび ONT-993 の血漿中濃度を測定した（DM[redacted]-036 試験）。30 および 60 mg/kg/回投与群の試験 5 日のツカチニブの AUC_{inf} はそれぞれ 31.0 および 157 µg•h/mL であり，初回投与時のそれぞれ約 3 倍および 5 倍であった。また，C_{max} はそれぞれ 4.46 および 13.4 µg/mL であり，いずれも初回投与時の約 3 倍であった。これらの曝露パラメータより，反復投与による蓄積性が示された。初回投与後の ONT-993 の C_{max} は 30 mg/kg/回群と 60 mg/kg/回群で類似していた。試験 5 日の 30 mg/kg/回群におけるツカチニブの C_{max} は初回投与時と同程度であったが，60 mg/kg/回群では約 3 倍に増加した。両投与群の初回投与時および試験 5 日のツカチニブおよび ONT-993 の T_{max} は 1.67～3.33 時間であり，ONT-993 の AUC_{inf} はツカチニブの AUC_{inf} の 0.5%～2%であった。

3.3. 反復投与トキシコキネティクス

3.3.1. ラット

試験報告書：1140-028，8369684，概要表：CTD 2.6.5.4.3.1，2.6.5.4.3.2

反復投与毒性試験において，雌雄 Sprague-Dawley ラットにツカチニブ（0.5% NaCMC/0.1% poloxamer 188 懸濁液）を 10，30 または 100 mg/kg/回の用量で 1 日 2 回 28 日間経口投与し，ツカチニブの血漿中濃度を測定した（100 mg/kg/回群の用量は試験 8 日に 60 mg/kg/回に減量した）（1140-028 試験）。試験 27 日の C_{max} および AUC_{12h} は雄に比べ雌で高い傾向がみられたが，その差は概ね 2 倍未満であった。試験 1 日から試験 27 日にかけて AUC_{12h} は雌雄ともに用量の増加に伴って増加し，10 mg/kg/回群および 30 mg/kg/回群の試験 27 日の AUC_{12h} は試験 1 日の平均 3.58 倍であった。トキシコキネティクスパラメータを Table 4 に示す。

雌雄 Sprague-Dawley ラットにツカチニブ（0.5% NaCMC/0.1% poloxamer 188 懸濁液）を 3，10 または 30 mg/kg/回の用量で 1 日 2 回 13 週間経口投与し，ツカチニブおよび ONT-993 の血漿中濃度を測定した（8369684 試験）。ツカチニブの C_{max} および AUC_{12h} は雄に比べて雌で高値であった。雌雄ともに，C_{max} および AUC_{12h} は用量の増加に伴って増加し，試験 88 日の C_{max} および AUC_{12h} は試験 1 日の約 2～4 倍であった。ONT-993 の C_{max} および AUC_{12h} の性差はツカチニブで

観察されたものよりも小さく，また，曝露量はツカチニブの用量増加に伴って増加した。その結果，ツカチニブと ONT-993 の曝露比は概ね試験 1 日の方が試験 88 日よりも高かった。

Table 4.　反復投与時のツカチニブのトキシコキネティクスパラメータ

動物種	試験番号	投与量 (mg/kg/回)[a]	試験日	C_{max} (µg/mL)	T_{max}[b] (時間)	AUC_{12h} (µg•h/mL)	AUC_{12h}/投与量 (µg•h/mL)/(mg/kg)	AUC_{24h} (µg•h/mL)
SD ラット	1140-028[c]	10	1	0.686	13[e]	1.18	0.118	3.11
			27	0.745	13[e]	3.15	0.315	6.17
		30	1	4.28	13[e]	8.34	0.278	28.2
			27	5.37	15[e]	29.6	0.988	68.3
		100/60[d]	1	16.5	15[e]	90.7	0.907	208
			27	9.27	4	72.5	1.21	NA
	8369684	3	1	0.0279	2	0.107	0.0357	0.331
			88	0.105	2	0.319	0.106	0.637
		10	1	0.250	2	1.34	0.134	4.39
			88	0.864	1	3.70	0.370	8.42
		30	1	2.43	2	14.2	0.474	41.8
			88	6.36	2	41.1	1.37	86.1
カニクイザル	JAY00093	10	1	0.892	1.52	3.01	0.301	NS
			28	1.17	1.41	5.22	0.522	NS
		30	1	2.91	2	14.0	0.468	NS
			28	4.60	2.33	26.4	0.879	NS
		45	1	4.54	3.03	23.8	0.528	NS
			28	NS	NS	NS	NS	NS
	8369685	2.5	1	0.0339	1	0.103	0.0414	0.183
			91	0.0361	1	0.145	0.0582	0.308
		10	1	0.439	2	1.24	0.124	3.20
			91	0.139	2	0.557	0.0557	2.26
		20	1	1.09	2	4.38	0.219	17.2
			91	1.83	2	9.92	0.496	26.5

NA=該当なし，NS=測定せず，SD=Sprague-Dawley
a. いずれの試験も 1 日 2 回投与
b. 8369684 試験および 8369685 試験は中央値，JAY00093 試験は平均値を示す
c. スパースサンプリングのため有意差検定を行わなかった
d. 試験 8 日以降の投与量を 100 mg/kg/回から 60 mg/kg/回に減量した
e. 該当日の 1 回目の投与後 0 から 24 時間における T_{max} を示す

3.3.2. サル

試験報告書：JAY00093，8369685，概要表：CTD 2.6.5.4.4.1，2.6.5.4.4.2

反復投与毒性試験において，雌雄カニクイザルにツカチニブ（0.5% Tween 80 溶液）を 10，30 または 45 mg/kg/回の用量で 1 日 2 回 28 日間経口投与し，ツカチニブの血漿中濃度を測定した（JAY00093 試験）。曝露量に顕著な性差はみられなかった。C_{max} および AUC_{12h} は用量の増加に伴って増加し，試験 28 日の曝露量は試験 1 日の 2 倍未満であった。トキシコキネティクスパラメータを Table 4 に示す。

雌雄カニクイザルにツカチニブ（0.5% Tween 80 溶液）を 2.5，10 または 20 mg/kg/回の用量で 1 日 2 回 13 週間経口投与した（8369685 試験）。曝露量に顕著な性差はみられなかった。C_{max} および AUC_{12h} は用量の増加に伴って増加し，試験 91 日の曝露量は試験 1 日の最大 2 倍程度で

あった。ONT-993 の曝露量に顕著な性差はみられず，蓄積性は示されなかった。ツカチニブと ONT-993 の曝露比は試験 1 日の方が試験 91 日よりも高かった。

4. 分布

4.1. 血漿蛋白結合

試験報告書：DM[redacted]-046，TRN-5483，概要表：CTD 2.6.5.6.1，2.6.5.6.2

CD-1 マウス，Sprague-Dawley ラット，カニクイザルおよびヒトの血漿を用いて，迅速平衡透析法によりツカチニブの血漿蛋白結合を評価した（DM[redacted]-046 試験）。ツカチニブの 0.1，1，10 または 50 µmol/L の濃度における血漿蛋白結合率は，いずれの動物種においても 93%を上回った。ツカチニブ 1 µmol/L でのマウス，ラット，カニクイザルおよびヒトの血漿蛋白結合率はそれぞれ 98.7%，98.4%，96.5%および 97.1%であった。

ONT-993 のヒト血漿蛋白に対する結合率は，5 µmol/L で 97.1%であった（TRN-5483 試験）。

4.2. 血球移行性

試験報告書：DM[redacted]-054，概要表：CTD 2.6.5.6.3

ヒトの全血を用いて，ツカチニブの血球移行を検討した（DM[redacted]-054 試験）。0.2，2 または 20 µmol/L の濃度でのツカチニブの血液/血漿中濃度比はそれぞれ 1.02，1.00 および 0.98 であり，ツカチニブが血球と血漿にほぼ均等に分布することが示唆された。

4.3. P-gp を介した移行性

試験報告書：DM[redacted]-072，DM[redacted]-072-A1，DM[redacted]-072-A2，概要表：CTD 2.6.5.8

Caco-2 細胞を用いて，ツカチニブの膜透過性および P-gp に対する基質性を評価した（DM[redacted]-072 試験）。ツカチニブを 10 µmol/L の濃度として検討したところ，頂端膜側から基底膜側への見かけの透過係数（$P_{app\ A\ to\ B}$）は 11.4 ± 3.9 × 10^{-6} cm/sec，基底膜側から頂端膜側への見かけの透過係数（$P_{app\ B\ to\ A}$）は 32.2 ± 13.1 × 10^{-6} cm/sec であり，efflux ratio（B to A/A to B）は 2.9 であった。

Caco-2 細胞を用い，ツカチニブを 1，10 または 100 µmol/L の濃度として検討したところ，efflux ratio は 1 µmol/L では 7.1 であったのに対し，100 µmol/L では 0.3 と低下した（DM[redacted]-072-A1 試験）。また，既知の P-gp 阻害薬であるベラパミルの存在下（100 µmol/L）では，ツカチニブ 1，10 および 100 µmol/L の濃度における efflux ratio はそれぞれ 2.6，1.0 および 0.3 であった。

MDR1 発現 LLC-PK1 細胞を用い，ベラパミル存在下（100 µmol/L）または非存在下でのツカチニブの膜透過性および P-gp に対する基質性を評価した（DM[redacted]-072-A2 試験）。ツカチニブの濃度は 0.3～100 µmol/L とした。ベラパミル存在下での $P_{app\ A\ to\ B}$ は 21.3 × 10^{-6}～53.2 × 10^{-6} cm/sec であり，ツカチニブの高い膜透過性が示された。ベラパミル非存在下での $P_{app\ B\ to\ A}$ は 58.7 × 10^{-6}～85.4 × 10^{-6} cm/sec と高かったが，efflux ratio はツカチニブ濃度の増加に伴って低下した。ベラパミルが存在することにより $P_{app\ B\ to\ A}$ および efflux ratio は低下した。

以上の試験成績から，ツカチニブは P-gp の基質であることが示唆された。

4.4. 組織分布

4.4.1. マウスを用いたツカチニブの脳への分布の評価

試験報告書：DM[redacted]-004，[redacted]0229，概要表：CTD 2.6.5.5.1，2.6.5.5.2

マウスにツカチニブを単回または反復経口投与し，血漿中および脳中のツカチニブおよび ONT-993 の濃度を測定した（DM[redacted]-004 試験：血漿 PK パラメータについては 3.2.1 項に記載）。雄 CD-1 マウスにツカチニブ（30% Captisol 溶液）を 100 mg/kg の用量で単回経口投与した結果，脳におけるツカチニブの T_{max} は 1 時間，C_{max} は 0.284 µg/g，AUC_{inf} は 0.871 µg•h/g（血漿の約 0.02 倍），ONT-993 の T_{max} は 4 時間，C_{max} は 0.0742 µg/g，AUC_{last} は 0.616 µg•h/g（血漿の約 0.15 倍）であった。雄 CD-1 マウスにツカチニブ（30% Captisol 溶液）を 100 mg/kg の用量で 1 日 2 回 5 日間（計 9 回）経口投与したところ，脳におけるツカチニブの T_{max} は 2 時間，C_{max} は 3.30 µg/g，AUC_{inf} は 4.73 µg•h/g（血漿の約 0.05 倍），ONT-993 の T_{max} は 2 時間，C_{max} は 0.265 µg/g，AUC_{last} は 0.977 µg•h/g（血漿の約 0.11 倍）であった。脳におけるツカチニブの AUC_{inf} は反復投与により 5.4 倍となり，血漿での 1.6 倍よりも高かった。反復投与後の脳における ONT-993 の未変化体に対する AUC 比は 21.0%であり，血漿（9.47%：3.2.1 項）に比べて高かった。

頭蓋内（右脳線条体領域）に BT-474 腫瘍を移植したマウスに，70 mg/kg の用量の[^{14}C]ツカチニブ（30% Captisol 溶液）を 12 時間間隔で計 3 回経口投与した（[redacted]0229 試験）。最終投与後 3 時間および 24 時間に血漿，腎臓，肝臓および脳を採取し，液体シンチレーション計数法（血漿，腎臓，肝臓）またはオートラジオグラフィー（脳）により各組織の[^{14}C]ツカチニブ由来放射能を測定した。その結果，最終投与後 3 時間と 24 時間で共に肝臓において血漿および腎臓と比較して放射能の含有量が高く，また，脳への分布は検出限界未満であった。そこで，脳切片からの[^{14}C]放射能を抽出し，液体シンチレーション計数法で測定したところ，放射能は血液脳腫瘍関門を通過し，腫瘍を移植した右脳線条体に優先的に分布したことが示された。[^{14}C]ツカチニブ投与後 3 時間の腫瘍移植領域（右脳）と正常脳（左脳）の放射能比は 3.6～10.9 であった。さらに，放射能が検出された脳切片は，磁気共鳴画像法（MRI）によって示された腫瘍局在と一致していた。

4.4.2. ラットを用いたツカチニブの組織分布試験

試験報告書：DM[redacted]-063，8369173，概要表：CTD 2.6.5.5.3，2.6.5.5.4

雄 Sprague-Dawley ラットに[^{14}C]ツカチニブ（0.5% CMC/0.1% Poloxamer 188 懸濁液）を 30 mg/kg の用量で単回経口投与し，投与後 1，2，4，8 および 24 時間に血漿，肝臓，腎臓，肺，脳および脊髄の放射能を液体シンチレーション計数法により測定した（DM[redacted]-063 試験）。肝臓，腎臓および肺における[^{14}C]ツカチニブ由来放射能が血漿に比べて高く，各組織中と血漿中の C_{max} の比はそれぞれ 13.4，11.2 および 3.26 であった。一方，脳および脊髄への[^{14}C]ツカチニブ由来放射能の分布はわずかであり，血漿中との C_{max} 比はそれぞれ 0.056 および 0.085 であった。

雌雄 Long Evans ラットに[^{14}C]ツカチニブ（0.5% CMC/0.1% Poloxamer 188 懸濁液）を 26.8 mg/kg（約 300 µCi/kg）の用量で単回経口投与し，定量的全身オートラジオグラフィーによって投与後 1～672 時間の放射能の全身分布を評価した（8369173 試験）。血中および血漿中の[^{14}C]ツカチニブ由来放射能は投与後 1 時間で最も高かった。血中放射能は雄および雌でそれぞれ投与後 168

時間および 336 時間まで測定可能であった。血漿中放射能は雌雄ともに投与後 72 時間まで測定可能であった。血液および血漿での C_{max} はほとんどの組織と比べて低かった。[^{14}C]ツカチニブ由来放射能は，投与後 1 時間でほとんどの組織において検出された。一部の組織を除き，多くの組織で[^{14}C]ツカチニブ由来放射能は投与後 72 時間または 168 時間までに消失した。最終測定時点である投与後 672 時間では，放射能が検出されたのは雌雄ともにぶどう膜および眼のみであった。雌雄共通で C_{max} が高値であった組織はぶどう膜，肝臓，副腎および眼であった。一方，雌雄共通で C_{max} が低かったのは，腹部脂肪，骨および鼻甲介であった。水晶体ならびに非脳室周囲の中枢神経組織（小脳，大脳，延髄，嗅葉および脊髄）は，投与後 1 時間の雌の脊髄を除いて，放射能は検出されなかった。

4.5. 胎盤通過性

ツカチニブの胎盤通過性を検討する試験は実施していない。

5. 代謝

5.1. 代謝物の構造決定

試験報告書：DM[redacted]-081，DM[redacted]-063，8393554，ONT-380-008，TRN-5541
概要表：CTD 2.6.5.9.1，2.6.5.9.3，2.6.5.10.4，2.6.5.11

各種 P450 分子種発現系ミクロソーム，肝ミクロソームおよび肝細胞を用いた in vitro 試験（DM[redacted]-081 試験），ならびにラット（DM[redacted]-063 試験，DM[redacted]-081 試験），カニクイザル（8393554 試験）およびヒト（ONT-380-008 試験）にツカチニブを投与した in vivo 試験により，ツカチニブの代謝物の同定を行った。

In vitro 試験より同定された代謝物の多くは酸化代謝物であった。In vitro 試験においては，ONT-993（M1：ジメチルジヒドロオキサゾール環のメチル基水酸化体），M2（ジメチルジヒドロオキサゾール環の加水分解体），M4（M2 の酸化体），M5（ジメチルジヒドロオキサゾール環の酸化体），M6（トルイジン部分のメチル基の水酸化体），M7～M10（トリアゾロピリジン，トルイジンまたはキナゾリン部分の酸化体），M13（構造不明）が観察された。In vitro 代謝物プロファイルは，検討に用いた動物種間で概ね一貫していた。

未変化体のジメチルジヒドロオキサゾール環のメチル基水酸化によりキラル代謝物である ONT-993 が生成する。カニクイザルおよびヒトの in vitro および in vivo 試験においてエナンチオマー *R* 体（SGD-8288）および *S* 体（SGD-8289）の比率を検討したところ，いずれにおいても *R* 体の比率が *S* 体に比べて高く，ヒト CYP2C8，ヒト肝ミクロソームおよびサル肝ミクロソームを用いた in vitro 試験ならびにツカチニブを投与したヒトおよびサルの尿中における *R* 体の *S* 体に対する比率は 3.2～4.85 であった（TRN-5541 試験）。

ラットに[^{14}C]ツカチニブを 30 mg/kg（400 µCi/kg）の用量で単回経口投与し各種マトリックス中の代謝物を検討したところ，主な代謝物として ONT-993，M2，M3（脱ジメチルジヒドロオキサゾール環体）および M5 が検出された。

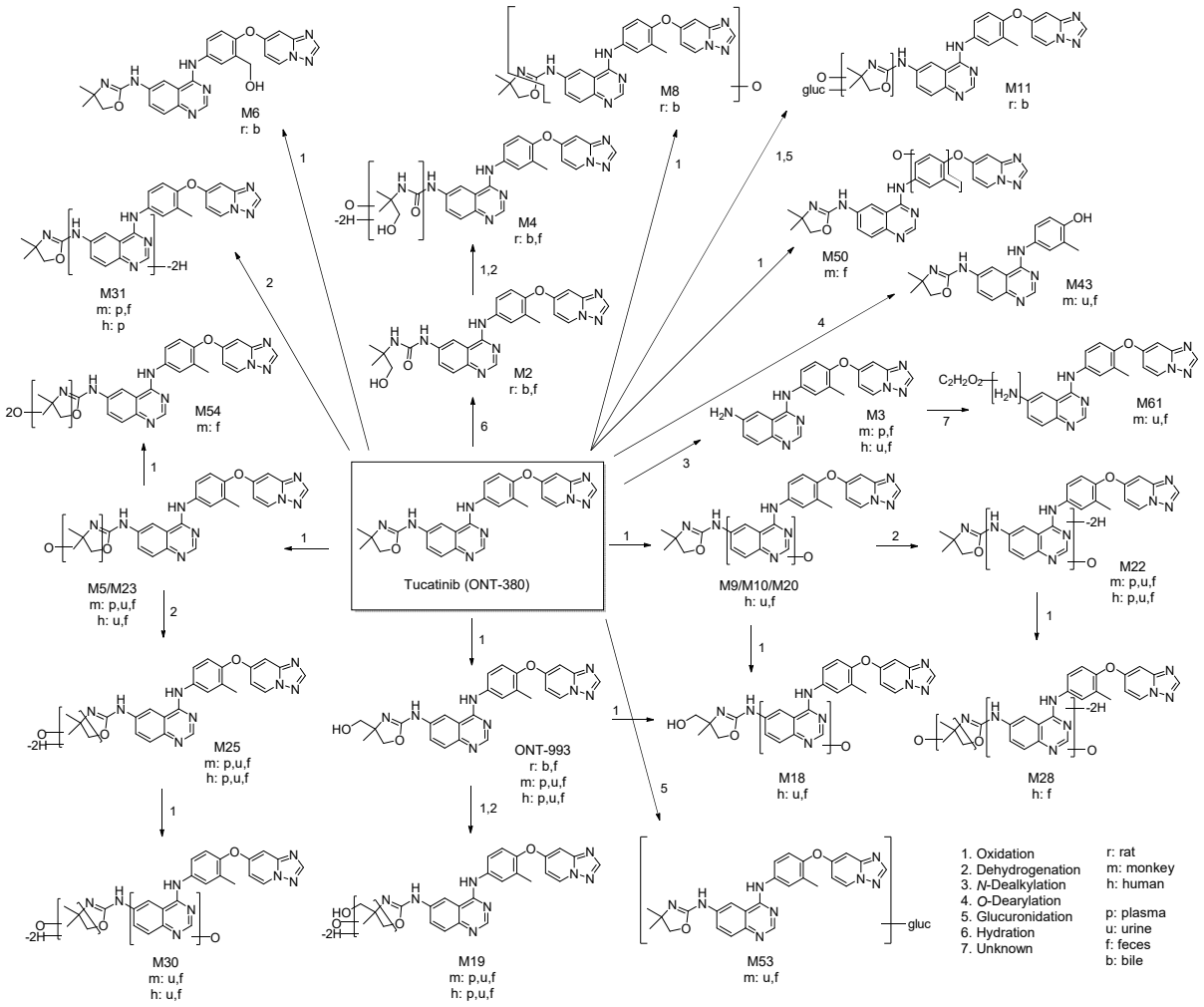
カニクイザルに[^{14}C]ツカチニブを 20 mg/kg（137 µCi/kg）の用量で単回経口投与し各種マトリックス中の代謝物を検討した。代謝物は多岐にわたり，14 種類の同定代謝物および 34 種類の未同定代謝物の生成が確認された。ジメチルジヒドロオキサゾール環における酸化が主要な代謝経

路であり，比較的少量の代謝物としてキナゾリンの酸化体，脱水素化体，*N*-脱アルキル化体，*O*-脱アルキル化体および未変化体のグルクロン酸抱合体が認められた。ONT-993 は，尿および糞便中では薬物関連物質の中で最も多く，血漿中では未変化体および M31 に次いで多く存在した。ONT-993 の酸化および脱水素化により，少量の M19（ONT-993 の酸化および脱水素化によるジオキシデヒドロ代謝物）が血漿，尿および糞便中に検出された。ジメチルジヒドロオキサゾール環の酸化により生成する M5/M23 は，血漿，尿および糞便中で少量検出された。M23 が脱水素化を受けることにより M25 が生成する可能性が考えられた。さらに M25 の酸化により，微量の M30 が生成し，尿および糞便中に検出された。キナゾリンの酸化により酸化代謝物である M9/M10/M20 が生成し，さらに脱水素化を受けて M22 が生成した。糞便中および血漿中の微量な代謝物として M3 が生成した。M3 の未同定の抱合体である M61 が尿および糞便中に代謝物として微量検出された。さらに，トリアゾロピリジンとトルイジンの架橋エーテルでの酸化的 *O*-脱アルキル化を受けて，微量な代謝物として M43 が尿および糞便中で検出された。未変化体のグルクロン酸抱合体である M53 が尿および糞便中に微量検出された。

ヒトにツカチニブを 300 mg（150 µCi）の用量で単回経口投与し，各種マトリックス中の代謝物を検討した。その結果，11 種類の代謝物が同定された。ジメチルジヒドロオキサゾール環の酸化がヒトの主要な代謝経路であり，その他の代謝経路としてキナゾリンの酸化，脱水素化および *N*-脱アルキル化が認められた。ONT-993 から M19 およびキナゾリンでの酸化によるツカチニブのジオキシ代謝物 M18 が生成した。ジメチルジヒドロオキサゾール環の酸化により生成した M23 が糞便中に微量検出された。さらに，脱水素化を受けてツカチニブのオキシデヒドロ代謝物 M25 が生成する可能性が示された。キナゾリンでのツカチニブの酸化により M20 が，さらに脱水素化を受けて M22 が生成した。M22 のジメチルジヒドロオキサゾール環の酸化により微量の M28 が生成した。ツカチニブの脱水素化により微量の M31 が生成し，血漿中代謝物として検出された。また，キナゾリンとジメチルジヒドロオキサゾール環の架橋アミンの切断により，M3 が生成した。

[^{14}C]ツカチニブの in vivo 推定代謝経路および各代謝物の構造を Figure 3 に示す。

Figure 3.　[^{14}C]ツカチニブの in vivo 推定代謝経路



出典：試験報告書 DM[redacted]-063，DM[redacted]-075，8393554 および ONT-380-008

5.2. In vitro 代謝

試験報告書：DM[redacted]-040，DM[redacted]-080，概要表：CTD 2.6.5.10.1，2.6.5.10.2

マウス，ラット，イヌ，カニクイザルおよびヒトの肝ミクロソームまたは肝細胞を用い，ツカチニブ（1 µmol/L）の代謝安定性を in vitro で評価した（DM[redacted]-040 試験）。肝ミクロソームおよび肝細胞の肝抽出率（肝クリアランス/肝血流量）は，それぞれマウスで 53%および 32%，ラットで 27%および 10%，イヌで 59%および 28%，カニクイザルで 59%および 59%，ヒトで 64%および 63%と算出された。また，ラットの全血，ヒトの全血およびにカニクイザルの血漿にツカチニブを添加して 37°C で 4 時間インキュベートしたときの未変化体の残存率は，それぞれ 92%，80%および 96%であった。

マウス，ラット，ウサギ，カニクイザルおよびヒトの肝ミクロソームまたは肝細胞を用い，[^{14}C]ツカチニブ（10 µmol/L）の代謝を評価したところ，動物種間の代謝プロファイルの違いはわずかであった（DM[redacted]-080 試験）。ヒトの肝ミクロソームおよび肝細胞における主要な代謝物

は ONT-993 であった。ONT-993 はウサギ肝ミクロソームを除くすべての動物種において認められた。M2 はウサギの肝細胞でのみ，M7～M10 はカニクイザルの肝ミクロソームでのみ観察されたが，その他の代謝物は複数の動物種でみられた。ヒトで認められた代謝物はいずれも 1 種以上の他の動物種で観察された（Table 5）。

Table 5.　[^{14}C]ツカチニブの in vitro 代謝

代謝物	マウス		ラット		ウサギ		サル		ヒト	
	Mic[a]	Hep[b]	Mic	Hep	Mic	Hep	Mic	Hep	Mic	Hep
ONT-993 (M1)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
M5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
M7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M13	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-

a. 肝ミクロソーム
b. 肝細胞

5.3. 代謝に関与する酵素の同定

試験報告書：DM[redacted]-027，TRN-5578，概要表：CTD 2.6.5.10.3

ヒト肝ミクロソームおよび各種 P450 分子種の選択的阻害薬を用い，ツカチニブ（1 または 10 µmol/L）の酸化的代謝に関与する P450 分子種を検討した（DM[redacted]-027 試験）。その結果，CYP2C8 がツカチニブの代謝に主に関与することが示された。すなわち，CYP2C8 阻害薬であるモンテルカストおよび gemfibrozil 1-glucuronide は，ONT-993 の生成を顕著に阻害した。CYP3A 阻害薬であるトロレアンドマイシンまたはケトコナゾールをツカチニブとともにインキュベートしたところ，M5 および M9/M10 の生成が減少し，これらの代謝物の生成には CYP3A が主に関与することが示された。CYP1A2，CYP2C9，CYP2C19 および CYP2D6 に対する選択的阻害薬はツカチニブの代謝に明らかな影響を及ぼさなかった。各種リコンビナント P450 と[^{14}C]ツカチニブをインキュベーションした結果，ツカチニブを ONT-993 に代謝する主要な酵素は CYP2C8 であることが確認された。ONT-993 は，CYP2C8 によって生成した唯一の代謝物であった（総放射能の 30%超）。ツカチニブと CYP3A4 とのインキュベーションにより少量の M5，M6，M9/M10 および M13 が観察され，CYP3A5 とのインキュベーションでは少量の ONT-993，M5，M6 および M13 がみられた（いずれも総放射能の 30%以下）。他の P450 分子種（CYP1A1，CYP1B1，CYP1A2，CYP2B6，CYP2C9，CYP2C19 および CYP2D6）によって生成した代謝物は，CYP1A1 および CYP1B1 による M5 を除いて，いずれも総放射能の 10%未満であった。

M9/M10/M20 生成の代謝経路がキナゾリン環の窒素原子のα-炭素における酸化と推定されたことから，ツカチニブの代謝におけるアルデヒドオキシダーゼの関与を検討するために追加の in vitro 試験を実施した（TRN-5578 試験）。ツカチニブはヒト肝サイトゾルで M20 に代謝され，その生成はアルデヒドオキシダーゼの既知の阻害剤であるヒドララジンまたはラロキシフェン

によって完全または部分的に阻害された。ヒト肝ミクロソームとツカチニブをインキュベートしたところ微量の M20 が検出され，アルデヒドオキシダーゼと P450 の両方が M20 の生成に関与していることが示唆された。

以上のことから，ツカチニブの代謝には主として CYP2C8 が関与しており，CYP3A4 および CYP3A5 によっても代謝された。また，アルデヒドオキシダーゼがツカチニブの代謝に関与する酵素として同定された。

5.4. In vivo 代謝

試験報告書：DM[redacted]-063，DM[redacted]-075，8393554，ONT-380-008，14663
概要表：CTD 2.6.5.9.1，2.6.5.9.2，2.6.5.9.3

BDC 処置および未処置ラットに[^{14}C]ツカチニブを 30 mg/kg（400 µCi/kg）の用量で単回経口投与し，血漿，組織（肝臓，腎臓，肺，脳および脊髄）（DM[redacted]-063 試験），糞便ならびに胆汁（DM[redacted]-075 試験）中のツカチニブの代謝物を検索した。血漿中における主な薬物関連物質は未変化体であり，投与後 2 時間では代謝物は検出されなかった。肝臓，腎臓および肺においても，主要な薬物関連物質は未変化体であった。脳においては，未変化体と ONT-993 はすべての測定時点で定量下限を下回った。脊髄では，ONT-993 はすべての測定時点で定量下限を下回った一方，未変化体が検出された。BDC ラットを用いた試験では，糞便中の薬物関連物質は，未変化体（投与量の 62%），ONT-993（同 12%），M2（同 6.3%），M5（同 8.6%）および M13（同 1.6%）であった。胆汁において同定された主な代謝物は ONT-993（同 3.8%）であった。以上のように，ラットの血漿中および糞便/胆汁中では未変化体が主要な薬物関連物質であり，次いで多くみられたのが酸化代謝物である ONT-993 および M5，M2 ならびに M13 であった。

カニクイザルに[^{14}C]ツカチニブを 20 mg/kg（137 µCi/kg）の用量で単回経口投与し，血漿，尿および糞便中のツカチニブの代謝物を検索した（8393554 試験）。血漿中の主要な薬物関連物質は未変化体であり，投与後 24 時間までの放射能（AUC）は 17,200 ng eq•h/mL（血漿中放射能の 67.5%）であった。次いで多く存在したのは ONT-993 であり，投与後 24 時間までの放射能は 689 ng eq•h/mL（同 2.7%）であった。LC-MS/MS による分析における血漿中の未変化体および ONT-993 の AUC_{inf} はそれぞれ 12,800 および 440 ng•h/mL であり，$t_{½}$はそれぞれ 2.41 時間および 2.16 時間であった。糞便中および尿中の未変化体はそれぞれ投与量の 11.8%および 0.189%であり，ONT-993 はそれぞれ 16.4%および 0.53%であった。糞便中において，M61 は投与量の 5.53%であり，M19 は投与量の 5.11%であった。その他の同定または未同定の代謝物は，いずれも投与量の 2%以下であった。投与後 96 時間までの尿および糞便中に累積したツカチニブの代謝物は，投与量の約 50%であった。以上のように，カニクイザルに[^{14}C]ツカチニブを経口投与したところ，多くの割合で代謝物として排泄された。排泄経路は糞便中が主であり，尿中排泄はわずかであった。

ヒトに[^{14}C]ツカチニブを 300 mg（150 µCi）の用量で単回経口投与し，血漿，尿および糞便中のツカチニブの代謝物を検索した（ONT-380-008 試験）。血漿中の主要な薬物関連物質は未変化体および ONT-993 であり，AUC_{24h} はそれぞれ 5210（血漿中放射能の 75.6%）および 631 ng eq•h/mL（同 9.16%）であった。LC-MS/MS による分析における血漿中の未変化体および ONT-993 の AUC_{inf} はそれぞれ 3220 および 582 ng•h/mL であった。その他の同定（M19，M22，M25，M31 等）および未同定（M17，M32，M33，M34 等）の代謝物はいずれもわずかであっ

た。糞便中および尿中の未変化体はそれぞれ投与量の 15.9%および 0.714%であり，代謝物はそれぞれ投与量の約 59%および約 3%であった。排泄物中の薬物関連物質で最も多かったのは ONT-993 で，糞便中の放射能の 36.8%，尿中の放射能の 1.47%を占めた。糞便中では，M18，M19，M28 および M25 が少量の代謝物として検出され，それぞれ投与量の 6.07%，5.29%，3.86%および 1.54%であった。また，HPLC クロマトグラム上で同時に溶出される代謝物である M20 および M3 は合わせて投与量の 2.65%，同じく同時に溶出される代謝物である M22 および M5/M23 は合わせて投与量の 2.01%であった。その他の尿中および糞便中の薬物関連物質はさらに微量であった。以上のように，ヒトに経口投与されたツカチニブは広範な代謝を受けることが示された。代謝は主にジメチルジヒドロオキサゾール環の酸化によるもので，血中および排泄物中の主要な代謝物は ONT-993 であった。血中に最も多く存在した薬物関連物質は未変化体であった。

ヒトにツカチニブを反復投与したところ，ヒト血漿で検出されたすべての代謝物は総薬物関連物質の 10%未満であった（14663 試験）。ヒト血漿中における主要代謝物は ONT-993 であり，総薬物関連物質の 6.46%であり，ICH M3(R2)で定義される，定常状態で総薬物関連物質の 10%を上回る代謝物は認められなかった。ヒト血漿中に認められたすべての代謝物はラットまたはカニクイザルの血漿においても検出された。

6. 排泄

試験報告書：DM[redacted]-075，8393554，ONT-380-008，概要表：CTD 2.6.5.13，2.6.5.14

BDC 処置および未処置ラットに[^{14}C]ツカチニブを 30 mg/kg の用量で単回経口投与してマスバランス試験を実施した（DM[redacted]-075 試験）。BDC 未処置ラットでは，投与後 24 時間までに投与量の 85%以上が回収された。投与後 120 時間までの回収率は 91.4%であり，その内訳は糞便中 90.9%，尿中 0.5%であった（Table 6）。BDC ラットでは，投与後 24 時間までに投与量の 84.9%が回収された。投与後 96 時間までの回収率は 93.6%であり，その内訳は胆汁中 12.3%，糞便中 80.2%，尿中 1.1%であった。胆汁排泄量および尿中排泄量に基づくと，少なくとも 13%程度は吸収されたと考えられた。以上のように，ラットにおいて[^{14}C]ツカチニブは部分的に吸収され，主に胆汁および糞便中に排泄された。

雌カニクイザルに[^{14}C]ツカチニブを 20 mg/kg の用量で単回経口投与してマスバランス試験を実施した（8393554 試験）。投与後 48 時間までに投与量の約 67%が回収された。投与後 168 時間までの回収率は 82.8%であり，糞便中および尿中の放射能はそれぞれ投与量の 76.6%および 1.78%であった。糞便中の酸化または抱合により生じた代謝物の合計は投与量の約 50%であったことから，投与された[^{14}C]ツカチニブの少なくとも 50%程度は吸収されたことが示唆された。以上のように，カニクイザルに投与された[^{14}C]ツカチニブの大半は代謝されて糞便中に排泄されたことが示された。

ヒトに[^{14}C]ツカチニブを 300 mg の用量で単回経口投与してマスバランス試験を実施した（ONT-380-008 試験）。投与後 312 時間までの糞便中および尿中の放射能の回収率は 89.9%であり，その内訳は糞便中 85.8%，尿中 4.09%であった。放射能の多くは投与後 120 時間以内に回収され，回収率は 83.4%であった。糞便中の薬物関連物質は酸化代謝物の割合が多く，それに比べて未変化体は糞便中，尿中のいずれにおいても少量であったことから（5.4 項），ヒトではツカチニブの吸収は良好であり（糞便中の代謝物および尿中の薬物関連物質の回収率の合計に基づ

く），酸化的代謝（ジメチルジヒドロオキサゾール環の酸化）を受けたのちに胆汁排泄される経路が主な消失経路であることを示唆している。

Table 6.　各動物種における[^{14}C]ツカチニブの回収率（%）

	BDC ラット (投与後 96 時間)	ラット (投与後 120 時間)	カニクイザル (投与後 168 時間)	ヒト (投与後 312 時間)
胆汁	12.3	-	-	-
糞便	80.2	90.9	76.6	85.8
尿	1.1	0.5	1.78	4.09
ケージ	0.0	<0.01	4.43	-
合計	93.6	91.4	82.8	89.9

7. 薬物動態学的薬物相互作用

7.1. 薬物代謝酵素誘導

試験報告書：DM[redacted]-045，[redacted]3058，概要表：CTD 2.6.5.12.1

ヒト肝細胞を用い，ツカチニブによる CYP1A2 および CYP3A4 の誘導を評価した（DM[redacted]-045 試験）。ヒト肝細胞にツカチニブを 0.3～30 µmol/L の濃度で 48 時間曝露したところ，ツカチニブによる CYP1A2 および CYP3A4 の酵素活性の誘導はみられなかった。CYP1A2 および CYP3A4 の mRNA 発現量の濃度依存的な増加がみられたが，その程度は，CYP1A2 および CYP3A4 誘導の陽性対照であるリファンピシン（25 µmol/L）および 3-メチルコラントレン（1 µmol/L）の 20%未満であった。さらなる検討を行うため，CYP3A4 遺伝子および程度は低いが CYP1A2 遺伝子発現を調節することが知られているヒトプレグナン X 受容体（PXR）の活性化について，細胞を用いたレポーター遺伝子アッセイにより評価したところ，ツカチニブ（最高 30 µmol/L）による PXR の活性化は認められなかった。以上のことから，ツカチニブが in vivo で CYP1A2 および CYP3A4 の活性を誘導する可能性は低いと考えられた。また，別の試験において，ヒト肝細胞に最大 30 µmol/L のツカチニブを添加して CYP2B6 の誘導を評価した（[redacted]3058 試験）。CYP2B6 の mRNA 発現の変化はみられなかった（誘導率は陰性対照の 2 倍未満，陽性対照フェノバルビタールの 20%未満であった）。

7.2. 薬物代謝酵素阻害

試験報告書：DM[redacted]-047，[redacted]5036，[redacted]5073，[redacted]5024，DM[redacted]-025，8373547，TR-00036，[redacted]5034，概要表：CTD 2.6.5.12.2，2.6.5.12.3，2.6.5.12.4，2.6.5.12.5

ヒト肝ミクロソームを用いてツカチニブによる各 P450 分子種（CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6 および CYP3A）に対する阻害能を評価した。ツカチニブの CYP1A2，CYP2B6，CYP2C19 および CYP2D6 に対する阻害が示されたものの IC_{50} 値は 20 µmol/L を上回り，これらの分子種に対する阻害作用は弱いことが示唆された（DM[redacted]-047 試験，[redacted]5036 試験）。一方，CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A に対するツカチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 8.8，10.5 および 13.0/16.9 µmol/L であった。これらの P450 分子種に対する阻害についてさらに検討するために追加試験を実施した（8373547 試験）。その結果，ツカチニブは CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A を Ki 値それぞれ 0.170，4.57 および 0.805 µmol/L で阻害し，

阻害様式はいずれも競合阻害と考えられた。CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9 および CYP2D6 に対する時間依存的阻害は認められなかった（[redacted]5036 試験，[redacted]5073 試験）。一方，CYP3A に対する時間依存的阻害がみられ，NADPH 添加条件での IC_{50} 値は NADPH 非添加条件の 2.71 分の 1（基質：ミダゾラム）または 2.13 分の 1（基質：testosterone 6β-hydroxylation）であった。ミダゾラムの CYP3A の代謝に対するツカチニブの阻害に関する k_{inact} 値は 0.011 min^{-1}，K_I 値は 0.54 µmol/L であった（[redacted]5024 試験）。

ヒト肝ミクロソームを用いてツカチニブによる UGT1A1 に対する阻害能を評価した（8373547 試験，DM[redacted]-025 試験）。ツカチニブは UGT1A1 によるスコポレチンおよび SN-38 のグルクロン酸抱合を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 4.2 µmol/L および 2.4 µmol/L であった。また，β-estradiol をマーカー基質として用いた時の UGT1A1 に対するツカチニブの Ki 値は 1.81 µmol/L であった。

ヒト肝ミクロソームを用いて ONT-993 による各 P450 分子種（CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2D6，CYP2E1 および CYP3A）に対する阻害能を評価した。CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19，CYP2E1 および CYP3A に対しては ONT-993 の最高濃度（10 µmol/L）まで 50%以上の阻害はみられず，IC_{50} 値は求められなかった（TR-00036 試験）。CYP2D6 に対する ONT-993 の阻害が認められ，IC_{50} 値は 7.9 µmol/L であった。ONT-993 は CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9，CYP2C19 および CYP2D6 に対して時間依存的阻害を示さなかった。一方，CYP3A に対する ONT-993 の時間依存的阻害がみられ，NADPH 添加条件での IC_{50} 値は NADPH 非添加条件の 5.6 分の 1（基質：ミダゾラム）または 4.0 分の 1（基質：testosterone 6β-hydroxylation）であった（[redacted]5034 試験）。ミダゾラムの CYP3A の代謝に対する ONT-993 の阻害に関する k_{inact} 値は 0.015 min^{-1}，K_I 値は 1.6 µmol/L であった。

7.3. カペシタビン代謝阻害

試験報告書：TR-00037，概要表：CTD 2.6.5.12.6

ツカチニブの併用薬であるカペシタビンの代謝に，ツカチニブおよび ONT-993 が影響を及ぼす可能性について in vitro で評価した（TR-00037 試験）。カペシタビンの活性代謝拮抗薬 5-フルオロウラシル（5-FU），およびその後の 5-FU のα-fluoro-β-alanine（FBAL）への代謝に対し，ツカチニブおよび ONT-993 の顕著な影響は認められなかった。評価に用いた最高濃度（10 µmol/L）において，カペシタビンの代謝に寄与する代謝酵素であるカルボキシルエステラーゼ，シチジンデアミナーゼ，チミジンホスホリラーゼおよびジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼに対するツカチニブの阻害率はそれぞれ 32%，10%，1%および 20%であり，ONT-993 の阻害率はそれぞれ 18%，15%，0%および 22%であった。以上の結果より，ツカチニブがカペシタビンの活性体の薬物動態に影響を及ぼす可能性は低いと考えられた。

7.4. トランスポーターを介した薬物相互作用

7.4.1. トランスポーター基質性

試験報告書：[redacted]-20[redacted]-128，[redacted]-20[redacted]-202/[redacted]-20[redacted]-539，概要表：CTD 2.6.5.15.1，2.6.5.15.2

各種トランスポーター（OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，MATE1，MATE2-K，P-gp，BCRP および BSEP）発現細胞を用い，ツカチニブおよび ONT-993 の基質性を評価した。

ツカチニブ（10 µmol/L）の OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，MATE1 または MATE2-K 発現細胞もしくは BSEP 発現反転膜小胞への取り込みは非発現の対照細胞・反転膜小胞の 2 倍未満であり，これらのトランスポーターの基質性の臨床的意義は乏しいと考えられた（[redacted]-20[redacted]-128 試験）。BCRP または P-gp 発現細胞を用いて透過性を評価したところ，発現細胞と非発現細胞の efflux ratio の比はいずれも 2 を上回り，ツカチニブが BCRP および P-gp の基質となることが示唆された。

ONT-993（1 µmol/L）の OAT1，OAT3，OCT1，OCT2 または OATP1B1 発現細胞もしくは BSEP 発現反転膜小胞への取り込みは非発現の対照細胞・反転膜小胞の 2 倍未満であり，これらのトランスポーターの基質性の臨床的意義は乏しいと考えられた（[redacted]-20[redacted]-202/[redacted]-20[redacted]-539 試験）。OATP1B3 発現細胞の取り込み量が対照細胞の 2 倍をわずかに上回っていたことから（2.05 倍），ONT-993 は OATP1B3 の基質となる可能性が考えられた。BCRP または P-gp 発現細胞を用いて透過性を評価したところ，発現細胞と非発現細胞の efflux ratio の比はいずれも 2 を上回り，ONT-993 が BCRP および P-gp の基質となることが示唆された。

7.4.2. トランスポーター阻害

試験報告書：DM[redacted]-072-A1，DM[redacted]-072-A2，[redacted]-20[redacted]-020，[redacted]-20[redacted]-143，[redacted]-20[redacted]-167，[redacted]-20[redacted]-081，[redacted]-20[redacted]-241/[redacted]-20[redacted]-042，[redacted]-20[redacted]-063，概要表：CTD 2.6.5.15.3，2.6.5.15.4，2.6.5.15.5，2.6.5.15.6，2.6.5.15.7

ツカチニブの P-gp に対する阻害能を in vitro 輸送系で評価した。P-gp 基質であるジゴキシン（10 µmol/L）を用いて，Caco-2 細胞（DM[redacted]-072-A1 試験）または MDR1 発現 LLC-PK1 細胞（DM[redacted]-072-A2 試験）における P-gp を介したジゴキシン輸送に対するツカチニブの影響を検討した。Caco-2 細胞および MDR1 発現 LLC-PK1 細胞を用いた評価においてツカチニブの P-gp 阻害能が示され，IC_{50} 値はそれぞれ 3～10 µmol/L および 10～30 µmol/L であった。

ツカチニブの OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，P-gp，BCRP および BSEP に対する阻害能を評価した（[redacted]-20[redacted]-020 試験）。ツカチニブ（10 µmol/L）は OAT1，OAT3 および P-gp の基質の輸送に対する有意な阻害を示さなかった。一方，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，BCRP および BSEP の基質輸送に対しては有意な阻害を示し，阻害率はそれぞれ 13.6%，63.6%，38.0%，30.3%，67.7%および 47.1%であった（溶媒対照値との比率）。ツカチニブによる各種トランスポーター（OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，P-gp，BCRP および BSEP）阻害について精査するために，種々の濃度のツカチニブを用いて in vitro 試験を追加実施した（[redacted]-20[redacted]-081 試験，[redacted]-20[redacted]-143 試験，[redacted]-20[redacted]-167 試験）。その結果，ツカチニブを 100 µmol/L の濃度とした際の OCT2，BCRP および BSEP を介

した基質輸送に対する最大阻害率はそれぞれ 76.5%，91.9%および 97.9%であり，IC_{50} 値はそれぞれ 14.7，8.98 および 8.48 µmol/L であった。OATP1B1 および OATP1B3 を介した基質輸送に対するツカチニブの IC_{50} 値はそれぞれ 6.29 および 4.36 µmol/L であった。また，ツカチニブは MATE1 および MATE2-K を介した基質（メトホルミン：10 µmol/L）の輸送を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 0.340 および 0.135 µmol/L であった。腎トランスポーターに対するツカチニブの阻害能について，クレアチニン（100 µmol/L）を基質としてさらに評価を行った（[redacted]-20[redacted]-241/20[redacted]-042 試験）。OAT2 を介したクレアチニン輸送の最大阻害率は 14.7%であり，OAT2 の IC_{50} 値は得られなかった。一方，OCT2 および MATE1 を介したクレアチニン輸送の IC_{50} 値はそれぞれ 0.107 および 0.0855 µmol/L であり，ツカチニブはメトホルミン輸送と比較してクレアチニン輸送に対する阻害能が高いことが示唆された。

ONT-993 の OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，P-gp，BCRP および BSEP に対する阻害能を評価した（[redacted]-20[redacted]-063 試験）。いずれのトランスポーターを介した各基質の輸送に対しても，ONT-993（2 µmol/L）の影響は軽微なものであった。MATE1 および MATE2-K を介する基質輸送は，ONT-993 によってそれぞれ 89.4%および 88.2%阻害された。追加の試験では，ONT-993 は MATE1 および MATE2-K を介した基質（メトホルミン：10 µmol/L）の輸送を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 0.247 および 0.220 µmol/L であった（[redacted]-20[redacted]-081 試験）。腎トランスポーターに対する ONT-993 の阻害能について，クレアチニン（100 µmol/L）を基質としてさらに評価を行った（[redacted]-20[redacted]-241/[redacted]-20[redacted]-042 試験）。OAT2 を介したクレアチニン輸送の最大阻害率は 44.9%であり，ツカチニブと同様に，ONT-993 の OAT2 に対する IC_{50} 値は求められなかった。OCT2 および MATE1 の IC_{50} 値はそれぞれ 0.544 および 0.0863 µmol/L であり，ONT-993 はメトホルミン輸送と比較してクレアチニン輸送に対する阻害能が高いことが示唆された。

8. その他の薬物動態試験

該当資料なし。

9. 考察および結論

ツカチニブの吸収，分布，代謝，排泄および薬物動態学的薬物相互作用について，in vitro 試験ならびに in vivo 試験（マウス，ラットおよびカニクイザル）を実施して評価した。また，ヒトでの代謝および排泄の検討も行った。

9.1. 吸収

ラットにツカチニブを静脈内投与したところ，CL は中程度であり，$t_{½}$は 0.725 時間であった。経口投与時の C_{max} は概ね用量に伴って増加したが，AUC の増加は用量比を上回った。10 mg/kg 経口投与および 0.5 mg/kg 静脈内投与時のデータに基づくと，バイオアベイラビリティは 21.9%～23.8%であった。ラットにツカチニブを 28 日間または 13 週間経口投与した試験では，曝露量は用量の増加に伴って増加した。また，最終投与後の曝露量は試験 1 日の 2～4 倍であった。

カニクイザルにツカチニブを静脈内投与したときの CL は肝血流量の約 2 倍であり，$t_{½}$は 0.456 時間であった。ツカチニブの溶液（0.5% Tween 80 溶液）を 15～45 mg/kg の用量で単回経口投与したときの C_{max} および AUC は用量の増加に伴って増加した。バイオアベイラビリティは

100%を上回ったが，これは検討した用量範囲での非線形 PK による可能性が考えられた。カニクイザルにおけるツカチニブの曝露は 0.5% Tween 80 溶液投与時に最も高かったため，カニクイザルを用いた毒性試験の溶媒とした。28 日間および 13 週間反復投与毒性試験では，いずれにおいても曝露量に顕著な性差は認められず，曝露量は用量の増加に伴って増加した。いずれの試験においても，最終投与後のツカチニブの AUC は試験 1 日の 2 倍未満であった。

9.2. 分布

ツカチニブの血漿蛋白結合率は 0.1～50 µmol/L の間で一貫しており，種差はみられなかった。ツカチニブ 1 µmol/L（480 ng/mL）におけるヒトでの血漿蛋白結合率は 97.1%であった。ツカチニブは Caco-2 細胞および MDR1 発現 LLC-PK1 細胞で高い透過性を有し（$>10 \times 10^{-6}$ cm/sec），P-gp の基質であることが示唆された。

Long Evans ラットを用いた組織分布試験では，[^{14}C]ツカチニブ由来の放射能が投与後 1 時間までに広範な組織にわたって分布し，多くの組織で投与後 168 時間までに消失した。最終測定時点である投与後 672 時間では，放射能が検出されたのは雌雄共にぶどう膜および眼のみであった。なお，カニクイザルを用いた毒性試験において眼への影響はみられていない（CTD 2.6.6）。

CD-1 マウスにツカチニブを 100 mg/kg の用量で 1 日 2 回 5 日間（計 9 回）経口投与した。脳におけるツカチニブの AUC は試験 1 日で 0.871 µg•h/g であったのに対し，試験 5 日では 4.73 µg•h/g であった。脳におけるツカチニブの AUC は反復投与により 5.4 倍となり，血漿での 1.6 倍より高かった。[^{14}C]ツカチニブを BT-474 腫瘍頭蓋内移植マウスに経口投与したところ，放射能の脳への分布は限定的であったものの，放射能は血液脳腫瘍関門を通過し，腫瘍を移植した右脳線条体に優先的に分布したことが示された。ツカチニブの脳腫瘍への分布機構は不明であるが，脳転移患者におけるツカチニブの脳への分布は，いくつかの要因によって正常時と比較して増加する可能性が考えられる。例えば，比較的酸性の腫瘍微小環境下においては，ツカチニブ（pKa = 6.15）のような弱塩基性薬物に対する P-gp/BCRP を介した排出は減少する。加えて，正常な血液脳関門と比較して転移性脳腫瘍において P-gp などのトランスポーターの発現は低下する。また，脳腫瘍存在下においては，血液脳関門のタイトジャンクションが障害を受けることが報告されている[1,2,3,4]。

9.3. 代謝

CYP2C8 による，ツカチニブのジメチルジヒドロオキサゾール環におけるメチル基の水酸化は，in vitro での主要な代謝経路であり，キラル代謝物である ONT-993 が生成する。ヒト CYP2C8 ならびにヒトおよびカニクイザル肝ミクロソームを用いた in vitro 試験ならびにツカチニブを投与したヒトおよびサルの尿中における *R* 体と *S* 体の比率は 3.2～4.85 であった。なお，BT-474 細胞株に対する ONT-993 の *R* 体および *S* 体の細胞毒性作用に関する EC_{50} 値（60 および 87 nmol/L）はツカチニブの EC_{50} 値（27 nmol/L）の 2～3 倍であり，すなわち ONT-993 の効力はツカチニブに比べて低い（CTD 2.6.2.2.4.3）。マウス，ラット，ウサギ，カニクイザルおよびヒトの肝試料を用いた in vitro 代謝試験では，主要な代謝物である ONT-993 に加えて，酸化，加水分解およびグルクロン酸抱合による代謝物が少量生成することが示された。ヒト試料を用いた試験で認められた代謝物はいずれも他の 1 種以上の動物種で観察され，ヒトに特有の代謝物は存在しなかった。In vivo 代謝試験で同定された代謝物は概ね酸化代謝物（水酸化，脱水素化，

脱アルキル化など）であった。酸化は主にジメチルジヒドロオキサゾール環またはキナゾリン環で認められた。また，グルクロン酸抱合および加水分解による代謝物も検出された。

ヒトに[^{14}C]ツカチニブを 300 mg（150 µCi）の用量で単回経口投与したマスバランス試験では，ONT-993 が血漿中における主要な代謝物であり，AUC_{24h} に基づく血漿中放射能での割合は 9.16%であった。カニクイザルに[^{14}C]ツカチニブを 20 mg/kg（137 µCi/kg）の用量で単回経口投与したところ，投与後 24 時間までの ONT-993 の血漿中放射能での割合は 2.7%であった。ヒトおよびカニクイザルに[^{14}C]ツカチニブを単回経口投与して尿中の ONT-993 エナンチオマー*R* 体および *S* 体を測定したところ，*R* 体は *S* 体のそれぞれ 3.74 倍および 4.85 倍であった。定常状態における血漿中代謝物について検討するためにツカチニブをヒトに反復投与したところ，ONT-993 は総薬物関連物質の 6.46%であった。ヒトで総薬物関連物質の 10%を超える代謝物は認められず，いずれも他の動物種でも認められたことから，代謝物の毒性試験は実施しなかった。さらに，ONT-993 の効力はツカチニブと比較して低く，未変化体と同等の高い血漿蛋白結合率（97.1%）を示したことから，ツカチニブをヒトに投与したときの有効性および安全性に対する代謝物の寄与は軽微であると結論付けた。

9.4. 排泄

BDC 処置および未処置ラット，カニクイザルならびにヒトに[^{14}C]ツカチニブを単回経口投与したところ，放射能の回復率はそれぞれ 93.6%，91.4%，82.8%および 89.9%であった。放射能の多くは代謝物として糞便中（BDC ラットでは胆汁中）に回収され，ヒトを含むいずれの動物種においても，ツカチニブの主な消失経路は代謝および胆汁排泄であることが示された。ヒトでは ONT-993 が糞便中に最も多く含まれる薬物関連物質であり，投与量の 36.8%を占め，次いで未変化体が投与量の 15.9%であった。カニクイザルの糞便中においても ONT-993 が最も多く排泄された薬物関連物質であり，投与量の 16.4%を占め，次いで未変化体が投与量の 11.8%であった。ラット，カニクイザルおよびヒトの尿中に回収された放射能は投与量の 5%未満であり，ツカチニブの尿中排泄は限定的と考えられた。ヒトに[^{14}C]ツカチニブを 300 mg の用量で単回経口投与した後に回収された糞便中の代謝物および尿中の放射能の合計から，投与量の 70%超が吸収されたことが示唆された。

9.5. 薬物動態学的薬物相互作用

In vitro 試験の成績から，ツカチニブは主に CYP2C8，次いで CYP3A4，CYP3A5 およびアルデヒドオキシダーゼといった複数の薬物代謝酵素によって代謝されることが示された。この結果は，後に実施した臨床薬物相互作用試験において，gemfibrozil 1-glucuronide（強い CYP2C8 阻害薬）およびイトラコナゾール（強い CYP3A 阻害薬）がツカチニブの AUC をそれぞれ約 3 倍および約 1.3 倍に増加させたことと一致した（ONT-380-012 試験）。ツカチニブ（最高 30 µmol/L）による CYP1A2，CYP2B6 および CYP3A の酵素活性誘導，ならびにそれらの mRNA 量の増加は認められなかった。ツカチニブは CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A に対して阻害作用を示し，Ki 値はそれぞれ 0.170，4.57 および 0.805 µmol/L であった。CYP1A2，CYP2B6，CYP2C8，CYP2C9 および CYP2D6 に対する時間依存性阻害は認められなかった。一方，CYP3A に対しては時間依存的な阻害を示し，k_{inact} 値は 0.011 min^{-1}，K_I 値は 0.54 µmol/L であった。なお，臨床薬物相互作用試験（ONT-380-012 試験）において，ツカチニブとの併用投与により CYP3A4 の基質であるミダゾラムの AUC が約 5.7 倍に増加し，CYP2C8 の基質であるレパグリニドの AUC は約 1.7 倍に増加した。

ツカチニブは P-gp および BCRP の基質となることが示唆された一方，OAT1，OAT3，OCT1，OCT2，OATP1B1，OATP1B3，MATE1，MATE2-K および BSEP の基質とはならなかった。BCRP，BSEP，OATP1B1 および OATP1B3 に対するツカチニブの阻害がみられ，IC_{50} 値は 4.36～8.98 μmol/L であった。PBPK モデルでは，ロスバスタチンの OATP1B1 および OATP1B3 を介した輸送に関する薬物相互作用は予測されなかった（R_SEAT_1_B 試験）。ツカチニブは腎近位尿細管トランスポーターである OCT2，MATE1 および MATE2-K を介したメトホルミンの輸送を阻害し，IC_{50} 値はそれぞれ 14.7，0.340 および 0.135 μmol/L であった。また，クレアチニンをプローブ基質としたところ OCT2 および MATE1 に対する IC_{50} 値はそれぞれ 0.107 および 0.0855 μmol/L と低下した。この結果から，腎取り込みトランスポーターに対するツカチニブの阻害が OCT2 に対してより顕著であることが示唆された。OCT2，MATE1 および MATE2-K の基質であるメトホルミンを用いた臨床薬物相互作用試験（SGNTUC-020 試験）において，ツカチニブとの併用投与によりメトホルミンの曝露量が約 40%増加し，腎機能に影響を与えることなく血清クレアチニンの一時的な増加を引き起こした。血清クレアチニンの増加は，OCT2 および MATE1 を介したクレアチニンの尿細管分泌の阻害によるものと考えられた。

ツカチニブを 300 mg の用量で 1 日 2 回経口投与したときの未変化体および ONT-993 の血漿中濃度を検討する PBPK モデルを開発した（R_SEAT_1_B 試験）。PBPK モデルにより，ツカチニブを臨床用量投与時に得られる曝露量において，CYP2C9，OATP1B1，OATP1B3 および UGT1A1 を阻害する可能性は低いと予測された。

9.6. 結論

ツカチニブを静脈内投与したときの CL はラットで中程度であり，カニクイザルでは高く肝血流量を上回った。1 日 2 回反復経口投与後，概してツカチニブの曝露量は用量の増加に伴って増加し，投与初日から最終投与日の間に曝露量の増加がみられた。血漿蛋白結合率はヒトで 97.1%であり，いずれの動物種においても 93%を上回った。ツカチニブは主に CYP2C8（ONT-993 を生成），次いで CYP3A4 などの複数の薬物代謝酵素によって代謝されることが示された。総薬物関連物質の 10%を超える代謝物は認められず，主代謝物である ONT-993 の効力はツカチニブと比較して低い。したがって，ツカチニブをヒトに投与したときの有効性および安全性に対する代謝物の寄与は軽微なものと考えられた。ラット，カニクイザルおよびヒトに[^{14}C]ツカチニブを単回経口投与後に放射能の多くは代謝物として糞便中に回収され，ツカチニブの主な消失経路は代謝および胆汁排泄であることが示された。ツカチニブの尿中排泄は限定的であった。ヒトのマスバランス試験では，回収された糞便中の代謝物および尿中の放射能の合計から，投与量の 70%超が吸収されたことが示唆された。ツカチニブによる P450 誘導はみられなかったが，CYP2C8，CYP2C9 および CYP3A に対する阻害が認められた。また，ツカチニブおよび ONT-993 の CYP3A に対する時間依存的阻害が認められた。臨床薬物相互作用試験において，ミダゾラムおよびレパグリニドの曝露量はツカチニブとの併用によりそれぞれ約 5.7 倍および約 1.7 倍に増加した。ツカチニブは P-gp および BCRP の基質であり，また，腎トランスポーター OCT2，MATE1 および MATE2-K を in vitro で阻害した。ツカチニブおよびメトホルミンを用いた臨床薬物相互作用試験で観察された血清クレアチニンの増加は，OCT2 および MATE1 を介したクレアチニンの尿細管分泌に対するツカチニブの阻害によるものと考えられたものの，腎機能に影響を与えなかった。構築した PBPK モデルによる解析の結果，ツカチニブを臨床用量投与時に得られる曝露量において，CYP2C9，OATP1B1，OATP1B3 および UGT1A1 を阻害する可能性は低いと予測された。

10. 図表

図表は本文中または概要表に示した。

参考文献

1 Gerstner ER, Fine RL. Increased permeability of the blood-brain barrier to chemotherapy in metastatic brain tumors: establishing a treatment paradigm. J Clin Oncol. 2007;25(16):2306-12.

2 Fortin D. The blood-brain barrier: its influence in the treatment of brain tumors metastases. Curr Cancer Drug Targets. 2012;12(3):247-59.

3 Li J, Wu J, Bao X, et al. Quantitative and Mechanistic Understanding of AZD1775 Penetration across Human Blood–Brain Barrier in Glioblastoma Patients Using an IVIVE–PBPK Modeling Approach. Clin Cancer Res. 2017;23(24):7454-66.

4 Kabraji S, Ni J, Lin NU, et al. Drug resistance in HER2-positive breast cancer brain metastases: Blame the barrier or the brain? Clin Cancer Res. 2018;24(8):1795-804.

TABLE OF CONTENTS

2.6.5.1. PHARMACOKINETICS OVERVIEW 3
2.6.5.2. ANALYTICAL METHODS AND VALIDATION REPORTS 7
2.6.5.3. PHARMACOKINETICS: ABSORPTION AFTER A SINGLE DOSE 8
2.6.5.3.1 Absorption After a Single Dose of Tucatinib to Mice 8
2.6.5.3.2 Absorption After a Single Dose of Tucatinib to Rats 9
2.6.5.3.3 Absorption After a Single Dose of Tucatinib to Monkeys 11
2.6.5.4. PHARMACOKINETICS: ABSORPTION AFTER REPEATED DOSES 12
2.6.5.4.1 Pharmacokinetics After Repeated Doses of Tucatinib to Mice 12
2.6.5.4.2 Pharmacokinetics After Repeated Doses of Tucatinib to Monkeys 13
2.6.5.4.3 Toxicokinetics After Repeated Doses of Tucatinib to Rats 14
2.6.5.4.3.1 Toxicokinetics after 28-day doses of tucatinib to rats 14
2.6.5.4.3.2 Toxicokinetics after 13-week doses of tucatinib to rats 15
2.6.5.4.4 Toxicokinetics After Repeated Doses of Tucatinib to Monkeys 17
2.6.5.4.4.1 Toxicokinetics after 28-day doses of tucatinib to monkeys 17
2.6.5.4.4.2 Toxicokinetics after 13-week doses of tucatinib to monkeys 18
2.6.5.5. PHARMACOKINETICS: ORGAN DISTRIBUTION 20
2.6.5.5.1 Organ Distribution of [^{14}C]Tucatinib in Mice 20
2.6.5.5.2 Organ Distribution of Tucatinib in Mice 21
2.6.5.5.3 Organ Distribution of [^{14}C]Tucatinib in Rats 22
2.6.5.5.4 Quantitative Whole-Body Autoradiography in Rats 23
2.6.5.6. PHARMACOKINETICS: PLASMA PROTEIN BINDING 27
2.6.5.6.1 Plasma Protein Binding of Tucatinib 27
2.6.5.6.2 Plasma Protein Binding of ONT-993 28
2.6.5.6.3 Blood Cell Distribution 29
2.6.5.7. PHARMACOKINETICS: STUDY IN PREGNANT OR NURSING ANIMALS 30
2.6.5.8. PHARMACOKINETICS: STUDIES OF TUCATINIB WITH HUMAN P-GP TRANSPORTER 31
2.6.5.8.1 Studies of Tucatinib With Human P-gp Transporter 31
2.6.5.9. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VIVO 32
2.6.5.9.1 Metabolism of Tucatinib In Vivo 32
2.6.5.9.2 In Vivo Metabolite Exposure Comparison 34
2.6.5.9.3 In Vivo Metabolite Identification 35
2.6.5.10. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VITRO 36
2.6.5.10.1 In Vitro Stability in Whole Blood and Plasma 36
2.6.5.10.2 In Vitro Stability in Liver Microsomes and Hepatocytes 37

2.6.5.10.3 In Vitro Reaction Phenotyping 38
2.6.5.10.4 In Vitro Metabolite Identification 40
2.6.5.11. PHARMACOKINETICS: POSSIBLE METABOLIC PATHWAYS 41
2.6.5.12. PHARMACOKINETICS: INDUCTION/INHIBITION OF DRUG METABOLIZING ENZYMES 43
2.6.5.12.1 Induction of Drug Metabolizing Enzymes 43
2.6.5.12.2 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes by Tucatinib 45
2.6.5.12.3 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes by Tucatinib: Inhibition of CYP3A4/5 46
2.6.5.12.4 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes by ONT-993 47
2.6.5.12.5 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes by ONT-993: Inhibition of CYP3A4/5 48
2.6.5.12.6 Inhibition of Capecitabine Catabolism/Metabolism by Tucatinib and ONT-993 49
2.6.5.13. PHARMACOKINETICS: EXCRETION 50
2.6.5.13.1 Excretion of Tucatinib in Rats and Monkeys 50
2.6.5.13.2 Excretion of Tucatinib in Humans 51
2.6.5.14. PHARMACOKINETICS: EXCRETION INTO BILE 52
2.6.5.14.1 Excretion of Tucatinib into Bile in Rats 52
2.6.5.15. PHARMACOKINETICS: DRUG-DRUG INTERACTIONS 53
2.6.5.15.1 Tucatinib as a Substrate of Human Transporters OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, P-gp, BCRP, and BSEP 53
2.6.5.15.2 ONT-993 as a Substrate of Human Transporters OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, P-gp, BCRP, and BSEP 55
2.6.5.15.3 Studies of Tucatinib With Human P-gp Transporter 57
2.6.5.15.4 Tucatinib as an Inhibitor of Human Transporters OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, P-gp, BCRP, and BSEP 58
2.6.5.15.5 Tucatinib as an Inhibitor of Human Transporters OAT2, OATP1B1, OATP1B3, OCT2, MATE1, MATE2-K, BCRP, and BSEP 60
2.6.5.15.6 ONT-993 as an Inhibitor of Human Transporters OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, P-gp, BCRP, and BSEP 61
2.6.5.15.7 ONT-993 as an Inhibitor of Human Efflux Transporters OAT2, OCT2, MATE1, and MATE2-K 63
2.6.5.16. PHARMACOKINETICS: OTHER 64

2.6.5.1. PHARMACOKINETICS OVERVIEW

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Test Article	ROA	Testing Facility	Study Number
PK/TK						
Single dose pharmacokinetics	No	CD-1 mouse, Sprague-Dawley rat, cynomolgus monkey	Tucatinib	Oral, IV	Seattle Genetics, Inc.	TRN-5562
Single dose pharmacokinetics	No	CD-1 mouse	Tucatinib	Oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-034
Single dose pharmacokinetics	No	Sprague-Dawley rat	Tucatinib	Oral, IV	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-035
Single dose pharmacokinetics	No	Cynomolgus monkey	Tucatinib	Oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-003
Single and repeat dose pharmacokinetics	No	CD-1 mouse	Tucatinib	Oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-004
Single and repeat dose pharmacokinetics	No	Cynomolgus monkey	Tucatinib	Oral, IV	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-036
Toxicokinetics	Yes	Sprague-Dawley rat	Tucatinib	Oral	[redacted]	1140-028
Toxicokinetics	Yes	Sprague-Dawley rat	Tucatinib	Oral	[redacted]	8369684
Toxicokinetics	Yes	Cynomolgus monkey	Tucatinib	Oral	[redacted]	JAY00093
Toxicokinetics	Yes	Cynomolgus monkey	Tucatinib	Oral	[redacted]	8369685
Distribution						
Protein binding	No	Mouse, rat, monkey, and human plasma	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-046
Protein binding	No	Human plasma	ONT-993	In vitro	Seattle Genetics, Inc.	TRN-5483
Blood-to-plasma partitioning	No	Human plasma	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-054
Permeability	No	Caco-2 cell monolayer	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-072
Permeability	No	Caco-2 cell monolayer	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-072-A1
Permeability	No	MDR1 LLC-PK1 cell monolayer	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-072-A2
Tissue distribution	No	BALB/c mouse (BT-474 xenograft)	[^{14}C]Tucatinib	Oral	[redacted]	[redacted]0229
Tissue distribution	No	CD-1 mouse	Tucatinib	Oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-004

2.6.5.1. PHARMACOKINETICS OVERVIEW

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Test Article	ROA	Testing Facility	Study Number
Tissue distribution	No	Sprague-Dawley rat	[^{14}C]Tucatinib	Oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-063
Tissue distribution (QWBA)	No	Long Evans rat	[^{14}C]Tucatinib	Oral	[redacted]	8369173
Metabolism						
Metabolite profiling	No	Sprague-Dawley rat	[^{14}C]Tucatinib	Oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-063
Metabolite profiling	No	Sprague-Dawley rat	[^{14}C]Tucatinib	Oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-075
Mass balance, excretion, and metabolite profiling	No	Cynomolgus monkey	[^{14}C]Tucatinib	Oral	[redacted]	8393554
Metabolism, excretion, and metabolite profiling	No	Human	[^{14}C]Tucatinib	Oral	[redacted]	ONT-380-008
ONT-993 profiling	No	Human and monkey urine, liver microsomes, and recombinant CYPs	[^{14}C]Tucatinib	In vitro	Seattle Genetics, Inc.	TRN-5541
Metabolite identification	No	Liver microsomes, hepatocytes, recombinant CYPs, and rat bile and feces	[^{14}C]Tucatinib	In vitro, oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-081
Metabolic stability	No	Liver microsomes and hepatocytes	[^{14}C]Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-080
Metabolic stability	No	Liver microsomes, hepatocytes, blood, and plasma	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-040
Reaction phenotyping	No	Human liver microsomes and recombinant CYPs	[^{14}C]Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-027
Metabolism by aldehyde oxidase	No	Human liver microsomes and cytosol	Tucatinib	In vitro	Seattle Genetics, Inc.	TRN-5578
Metabolite exposure comparison	No	Human, monkey, and rat plasma	Tucatinib	Oral	[redacted]	14663
Excretion						
Mass balance, excretion, and metabolite profiling	No	Sprague-Dawley rat	[^{14}C]Tucatinib	Oral	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-075
Mass balance, excretion, and metabolite profiling	No	Cynomolgus monkey	[^{14}C]Tucatinib	Oral	[redacted]	8393554

2.6.5.1. PHARMACOKINETICS OVERVIEW

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Test Article	ROA	Testing Facility	Study Number
Metabolism and excretion	No	Human	[^{14}C]Tucatinib	Oral	[redacted]	ONT-380-008
Pharmacokinetic Drug Interactions						
CYP induction	No	Human hepatocytes	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-045
CYP induction	No	Human hepatocytes	Tucatinib	In vitro	[redacted]	[redacted]3058
CYP inhibition	No	Human liver microsomes	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-047
CYP inhibition	No	Human liver microsomes	Tucatinib	In vitro	[redacted]	[redacted]5036
Inhibition Ki	No	Human liver microsomes	Tucatinib	In vitro	[redacted]	8373547
CYP inhibition	No	Human liver microsomes	Tucatinib	In vitro	[redacted]	[redacted]5073
CYP inhibition	No	Human liver microsomes	Tucatinib	In vitro	[redacted]	[redacted]5024
UGT1A1 inhibition	No	Human liver microsomes	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-025
CYP inhibition	No	Human liver microsomes	ONT-993	In vitro	[redacted]	TR-00036
CYP inhibition	No	Human liver microsomes	ONT-993	In vitro	[redacted]	[redacted]5034
Capecitabine inhibition	No	Human liver cytosol, recombinant enzyme	Tucatinib, ONT-993	In vitro	[redacted]	TR-00037
OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2-K, BCRP, P-gp, and BSEP	No	MDCK-II monolayers, MDCK-MDR1 monolayers, membrane vesicles	Tucatinib	In vitro	[redacted]	[redacted]-20[redacted]-128
OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2-K, BCRP, P-gp, and BSEP	No	MDCK-II monolayers, MDCK-MDR1 monolayers, membrane vesicles	ONT-993	In vitro	[redacted]	[redacted]-20[redacted]-202/[redacted]-20[redacted]-539
P-gp	No	Caco-2 cell monolayers	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-072-A1
P-gp	No	MDR1 LLC-PK1 cell monolayers	Tucatinib	In vitro	Array BioPharma, Inc.	DM[redacted]-072-A2
OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, BCRP, P-gp, and BSEP	No	MDCK-II monolayers, MDCK-MDR1 monolayers, Caco-2 monolayers, membrane vesicles	Tucatinib	In vitro	[redacted]	[redacted]-20[redacted]-020

2.6.5.1. PHARMACOKINETICS OVERVIEW

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Test Article	ROA	Testing Facility	Study Number
OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2-K, BCRP, P-gp, and BSEP	No	MDCK-II monolayers, MDCK-MDR1 monolayers, membrane vesicles	ONT-993	In vitro	[redacted]	[redacted]-20[redacted]-063
OCT2, BCRP, and BSEP	No	MDCK-II monolayers, membrane vesicles	Tucatinib	In vitro	[redacted]	[redacted]-20[redacted]-143
OATP1B1 and OATP1B3	No	MDCK-II monolayers	Tucatinib	In vitro	[redacted]	[redacted]-20[redacted]-167
MATE1 and MATE2-K	No	MDCK-II monolayers	Tucatinib, ONT-993	In vitro	[redacted]	[redacted]-20[redacted]-081
OAT2, OCT2, MATE1, and MATE2-K	No	MDCK-II monolayers	Tucatinib, ONT-993	In vitro	[redacted]	[redacted]-20[redacted]-241/ [redacted]-20[redacted]-042

Abbreviations: BCRP=breast cancer resistance protein; BSEP=bile salt export pump; CYP=cytochrome P450; GLP=Good Laboratory Practice; IV=intravenous; MATE = multidrug and toxin extrusion transporter; MDCK=Madin-Darby canine kidney; MDR1=multidrug resistance 1; MDR1 LLC-PK1=multi-drug resistance-1 transfected epithelial-like porcine kidney; OAT=organic anion transporter; OCT=organic cation transporter; OATP=organic anion transporting polypeptide; P-gp=P-glycoprotein; PK=pharmacokinetic; QWBA=quantitative whole-body autoradiography; ROA=route of administration; TK=toxicokinetic

a An entry of "Yes" indicates that the study include a GLP compliance statement.

2.6.5.2. ANALYTICAL METHODS AND VALIDATION REPORTS

See M2.6.4 Pharmacokinetics Written Summary, Sections 2.2 and 2.3.

2.6.5.3. PHARMACOKINETICS: ABSORPTION AFTER A SINGLE DOSE

2.6.5.3.1 Absorption After a Single Dose of Tucatinib to Mice

Test Article: Tucatinib
Species: CD-1 mouse

Study Number	TRN-5562		TRN-5562		
Sex (M/F)/Number of Animals	F/3[a]		M/3[a]	M/3[a]	M/8[a]
Feeding Condition	Nonfasted		Nonfasted		
Vehicle/Formulation	20% 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin		30% aqueous Captisol®		
Method of Administration	Oral		Oral		
Dose (mg/kg)	20	100	25	50	100
Sample	Plasma		Plasma		
Analyte	Tucatinib		Tucatinib		
Assay	LC-MS/MS		LC-MS/MS		
PK Parameters					
C_{max} (µg/mL)	1.74	17.6	3.55	7.04	11.9
C_{max}/Dose (µg/mL)/(mg/kg)	0.087	0.176	0.142	0.141	0.119
$T_{1/2}$ (h)	2.38	1.77	3.48	1.86	2.26
AUC_{24h} (µg·h/mL)	5.53	137	10.3	40.5	80.6
AUC_{24h}/Dose (µg·h/mL)/(mg/kg)	0.276	1.37	0.411	0.811	0.806
AUC_{inf} (µg·h/mL)	5.55	137	10.3	40.5	93.4
CL/F (mL/min/kg)	64.9	12.2	41.5	21.4	17.9
V/F (L/kg)	15.0	1.86	12.2	3.54	3.49

Note: Bioanalysis data was presented in Studies DM[redacted]-034 and DM[redacted]-004; pharmacokinetic parameters (non-compartmental analysis) presented in TRN-5562.
Abbreviations: AUC_{24h}=area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours; AUC_{inf}=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; C_{max}=maximum observed concentration; CL/F=total body clearance over bioavailability; F=Female; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; PK=pharmacokinetic; $T_{1/2}$=terminal elimination half-life; V/F=volume of distribution over bioavailability
a Animals per time point.

2.6.5.3.2 Absorption After a Single Dose of Tucatinib to Rats

Test Article: Tucatinib
Species: Sprague-Dawley rats

Study Number	TRN-5562		TRN-5562		TRN-5562
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3[a]	M/2[a]	M/6[a]	M/3[a]	M/3[a]
Feeding Condition	Nonfasted		Nonfasted		Nonfasted
Vehicle/Formulation	15% Solutol/5% DMSO in PBS, pH 7.4		0.5% Tween 80 in water, pH 2.6	0.5% NaCMC/0.1% Tween 80 in water	30% aqueous Captisol®
Method of Administration	IV		Oral		Oral
Dose (mg/kg)	0.5	1	10		20
Sample	Plasma		Plasma		Plasma
Analyte	Tucatinib		Tucatinib		Tucatinib
Assay	LC-MS/MS		LC-MS/MS		LC-MS/MS
PK Parameters					
C_{max} (µg/mL)	0.399	0.240	0.236	0.358	1.44
C_{max}/Dose (µg/mL)/(mg/kg)	0.798	0.240	0.024	0.036	0.072
$T_{1/2}$ (h)	0.725	1.30	2.51	NR	2.33
AUC_{24h} (µg·h/mL)	0.286	0.356	1.35	1.23	8.29
AUC_{24h}/Dose (µg·h/mL)/(mg/kg)	0.573	0.356	0.135	0.123	0.414
AUC_{inf} (µg·h/mL)	0.281	0.356	1.22	NR	8.30
CL/F (mL/min/kg)	29.6	46.9	233	NR	47.7
V_{ss} or V/F (L/kg)	1.86	5.04	47.1	NR	9.67

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

Study Number	TRN-5562		TRN-5562	
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3[a]		M/3[a]	M/3[a]
Feeding Condition	Nonfasted		Nonfasted	
Vehicle/Formulation	0.5% Tween 80 in water, pH 2.6	0.5% NaCMC/0.1% Poloxamer 188 in water	30% aqueous Captisol®	0.5% NaCMC/0.1% Poloxamer 188 in water
Method of Administration	Oral		Oral	
Dose (mg/kg)	30		100	
Sample	Plasma		Plasma	
Analyte	Tucatinib		Tucatinib	
Assay	LC-MS/MS		LC-MS/MS	
PK Parameters				
C_{max} (µg/mL)	0.574	0.859	7.87	3.42
C_{max}/Dose (µg/mL)/(mg/kg)	0.019	0.029	0.079	0.034
$T_{1/2}$ (h)	1.90	2.06	4.14	3.41
AUC_{24h} (µg·h/mL)	6.01	6.88	98.3	47.5
AUC_{24h}/Dose (µg·h/mL)/(mg/kg)	0.20	0.229	0.983	0.475
AUC_{inf} (µg·h/mL)	11.1	9.27	167	70.1
CL/F (mL/min/kg)	45.2	58.7	9.98	23.8
V/F (L/kg)	7.44	10.5	3.58	7.01

Note: Bioanalysis data was presented in Study DM[redacted]-035; pharmacokinetic parameters (non-compartmental analysis) presented in TRN-5562.
Abbreviations: AUC_{24h}=area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours; AUC_{inf}=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; C_{max}=maximum observed concentration; CL/F=total body clearance over bioavailability; IV=intravenous; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; NaCMC=sodium carboxymethyl cellulose; NR=not reported; PK=pharmacokinetic; $T_{1/2}$=terminal elimination half-life; V/F=volume of distribution over bioavailability; V_{ss} =volume of distribution at steady state
a Animals per time point.

2.6.5.3.3 Absorption After a Single Dose of Tucatinib to Monkeys

Test Article: Tucatinib
Species: Cynomolgus monkeys

Study Number	TRN-5562	TRN-5562		TRN-5562		TRN-5562
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3	M/3	M/7	M/4	M/4	M/3
Feeding Condition	Fasted	Fasted		Fasted		Fasted
Vehicle/Formulation	40% PEG 400/20% ethanol/40% water	0.5% Tween 80 in water, pH 2.6	0.5% Tween 80 in water, pH 2.6	1% CMC/0.5% Tween 80	Capsule	0.5% Tween 80 in water, pH 2.6
Method of Administration	IV	Oral		Oral		Oral
Dose (mg/kg)	1	15		30		45
Sample	Plasma	Plasma		Plasma		Plasma
Analyte	Tucatinib	Tucatinib		Tucatinib		Tucatinib
Assay	LC-MS/MS	LC-MS/MS		LC-MS/MS		LC-MS/MS
PK Parameters						
C_{max} (µg/mL)	0.224	2.75	3.09	1.62	1.73	3.60
C_{max}/Dose (µg/mL)/(mg/kg)	0.224	0.184	0.103	0.054	0.058	0.080
$T_{1/2}$ (h)	0.456	1.95	2.78	2.70	3.06	3.62
AUC_{24h} (µg·h/mL)	0.171	7.35	9.95	3.94	7.09	14.2
AUC_{24h}/Dose (µg·h/mL)/(mg/kg)	0.171	0.490	0.332	0.131	0.236	0.316
AUC_{inf} (µg·h/mL)	0.167	7.31	9.95	4.62	8.46	14.3
CL/F (mL/min/kg)	105	42.6	61.4	121	88.3	58.1
V_{ss} or V/F (L/kg)	4.07	7.59	14.9	25.1	19.5	18.5

Note: Bioanalysis data was presented in Studies DM[redacted]-003 and DM[redacted]-036; pharmacokinetic parameters (non-compartmental analysis) presented in TRN-5562.
Abbreviation: AUC_{24h}=area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours; AUC_{inf}=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; C_{max}=maximum observed concentration; CL/F=total body clearance over bioavailability; IV=intravenous; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; CMC=carboxymethyl cellulose; PEG=polyethylene glycol; PK=pharmacokinetic; $T_{1/2}$=terminal elimination half-life; V/F=volume of distribution over bioavailability; V_{ss}=volume of distribution at steady state

2.6.5.4. PHARMACOKINETICS: ABSORPTION AFTER REPEATED DOSES

2.6.5.4.1 Pharmacokinetics After Repeated Doses of Tucatinib to Mice

Test Article: Tucatinib
Species: CD-1 mice

Study Number	DM[redacted]-004			
Sex (M/F)/Number of Animals	M/5[a]			
Feeding Condition	Nonfasted			
Vehicle/Formulation	30% Captisol®			
Method of Administration	Oral			
Dose (mg/kg)	100 (BID for 4.5 days; 9 total doses)			
Sample	Plasma			
Analyte	Tucatinib		ONT-993	
Assay	LC-MS/MS			
	Dose Cycle		**Dose Cycle**	
PK Parameters	**First (Day 1)**	**Last (Day 5)**	**First (Day 1)**	**Last (Day 5)**
C_{max} (µg/mL)	11.3	12.9	0.805	1.03
T_{max} (h)	1.00	2.00	1.00	2.00
AUC_{last} (µg·h/mL)	57.6	91.7	4.17	8.69
AUC_{inf} (µg·h/mL)	57.6	92.2	NA	8.90
$MR_{AUClast}$ (%)	NA	NA	7.23	9.47

Note: Pharmacokinetic parameters determined using non-compartmental analysis.
Abbreviations: AUC_{last}=area under the concentration-time curve from time 0 to the time of the last measurable concentration; AUC_{inf}=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; BID=twice daily; C_{max}=maximum observed concentration; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; $MR_{AUClast}$=metabolite to parent ratio of the AUC_{last} value; NA=not applicable; PK=pharmacokinetic; T_{max}=time of the maximum observed concentration
a Animals per time point.

2.6.5.4.2 Pharmacokinetics After Repeated Doses of Tucatinib to Monkeys

Test Article: Tucatinib
Species: Cynomolgus monkeys

Study Number	DM[redacted]-036				DM[redacted]-036			
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3				M/3			
Feeding Condition	Nonfasted				Nonfasted			
Vehicle/Formulation	30% Captisol®				30% Captisol®			
Method of Administration	Oral				Oral			
Dose (mg/kg)	30 (BID for 5 days)				60 (BID for 5 days)			
Sample	Plasma				Plasma			
Analyte	Tucatinib		ONT-993		Tucatinib		ONT-993	
Assay	LC-MS/MS				LC-MS/MS			
	Dose Cycle		**Dose Cycle**		**Dose Cycle**		**Dose Cycle**	
PK Parameters	**First (Day 1)**	**Last (Day 5)**	**First (Day 1)**	**Last (Day 5)**	**First (Day 1)**	**Last (Day 5)**	**First (Day 1)**	**Last (Day 5)**
C_{max} (µg/mL)	1.50	4.46	0.036	0.024	4.20	13.4	0.057	0.159
T_{max} (h)	2.33	2.00	2.00	1.67	3.33	2.67	2.67	2.00
AUC_t (µg·h/mL)	8.66	30.2	0.182	0.131	28.9	84.0	0.347	0.629
AUC_{inf} (µg·h/mL)	9.12	31.0	0.205	0.159	32.2	157	0.380	1.13

Note: Pharmacokinetic parameters determined using non-compartmental analysis.
Abbreviations: AUC_t=area under the concentration-time curve from time 0 to the last time point; AUC_{inf}=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; BID=twice daily; C_{max}=maximum observed concentration; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; PK=pharmacokinetic; T_{max}=time of the maximum observed concentration

2.6.5.4.3 Toxicokinetics After Repeated Doses of Tucatinib to Rats

Test Article: Tucatinib
Species: Sprague-Dawley rats

2.6.5.4.3.1 Toxicokinetics after 28-day doses of tucatinib to rats

Study Number	1140-028		
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3[a] and F/3[a]		
Feeding Condition	Nonfasted	**Vehicle/Formulation**	0.5% NaCMC/0.1% Poloxamer 188 in water, pH 7
Method of Administration	Oral	**Dose (mg/kg/dose)**	10, 30, and 60/100[b] BID
Sample	Plasma		
Analyte	Tucatinib	**Assay**	LC-MS/MS

Analyte	Interval (Day)	Dose Level (mg/kg)	Sex	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (h)	AUC_{12h} (µg·h/mL)	AUC_{12h}/Dose (µg·h/mL)/(mg/kg)	AUC_{24h} (µg·h/mL)
Tucatinib	1	10	M	0.394	13	0.846	0.085	1.72
			F	1.19	13	1.68	0.168	6.54
			MF	0.686	13	1.18	0.118	3.11
		30	M	3.34	13	3.76	0.125	15.1
			F	5.49	13	18.9	0.631	55.4
			MF	4.28	13	8.34	0.278	28.2
		100	M	14.4	13	74.9	0.749	174
			F	19.9	15	117	1.17	258
			MF	16.5	15	90.7	0.907	208
	27	10	M	0.508	15	2.32	0.232	5.81
			F	1.32	13	4.35	0.435	7.59
			MF	0.745	13	3.15	0.315	6.17
		30	M	4.78	15	27.0	0.902	61.5
			F	7.27	13	33.6	1.12	78.3
			MF	5.37	15	29.6	0.988	68.3
		100/60[b]	M	9.37	4[c]	62.8	1.05	NA
			F	9.41	8[c]	92.4	1.54	NA[c]
			MF	9.27	4[c]	72.5	1.21	NA

Note: Toxicokinetic parameters determined using non-compartmental analysis. Values are means.
Abbreviations: AUC_{12h} or AUC_{24h}=area under the concentration-time curve from time 0 to 12 hours or 24 hours; BID=twice daily; C_{max}=maximum observed concentration; F=female; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; MF=combined male and female; NA=not applicable; NaCMC=sodium carboxymethyl cellulose; T_{max}=time of the maximum observed concentration
a Animals per group per time point.
b Animals in the 100 mg/kg/dose group had their doses reduced to 60 mg/kg/dose on Day 8 and thereafter.
c Samples were not available beyond the 12-hour time point.

2.6.5.4.3.2 Toxicokinetics after 13-week doses of tucatinib to rats

Test Article: Tucatinib
Species: Sprague-Dawley rats

Study Number	8369684
Sex (M/F)/Number of Animals	M/3[a] and F/3[a]
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	0.5% NaCMC/0.1% Poloxamer 188 in water, pH 7
Method of Administration	Oral
Dose (mg/kg/dose)	3, 10, and 30 BID
Sample	Plasma
Analyte	Tucatinib and ONT-993
Assay	LC-MS/MS

Analyte	Interval (Day)	Dose Level (mg/kg)	Sex	$C_{max\ 12h}$ (ng/mL)	$T_{max\ 12h}$ (h)	AUC_{12h} (ng·h/mL)	AUC_{12h}/Dose (ng·h/mL)/(mg/kg)	AUC_{24h} (ng·h/mL)
Tucatinib	1	3	M	23.4	2.00	60.8	20.3	173
			F	61.1	1.00	228	75.8	684
			MF	27.9	2.00	107	35.7	331
		10	M	227	2.00	1130	113	3740
			F	293	4.00	1650	165	5210
			MF	250	2.00	1340	134	4390
		30	M	2120	2.00	11,100	370	35,700
			F	4120	4.00	20,500	685	52,000
			MF	2430	2.00	14,200	474	41,800
	88	3	M	63.8	2.00	194	64.6	425
			F	173	2.00	536	179	1060
			MF	105	2.00	319	106	637
		10	M	751	2.00	3290	329	6570
			F	1180	1.00	4320	432	11,200
			MF	864	1.00	3700	370	8420
		30	M	8250	2.00	44,700	1490	97,700
			F	8010	1.00	40,800	1360	81,200
			MF	6360	2.00	41,100	1370	86,100

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

Analyte	Interval (Day)	Dose Level (mg/kg)	Sex	$C_{max\ 12h}$ (ng/mL)	$T_{max\ 12h}$ (h)	AUC_{12h} (ng·h/mL)	AUC_{12h}/Dose (ng·h/mL)/(mg/kg)	AUC_{24h} (ng·h/mL)
ONT-993	1	3	M	3.94	4.00	20.3	6.75	40.4
			F	5.49	1.00	26.7	8.88	56.2
			MF	4.34	4.00	23.2	7.72	44.1
		10	M	12.9	4.00	90.8	9.08	172
			F	14.6	4.00	90.6	9.06	160
			MF	13.7	4.00	88.1	8.81	161
		30	M	31.0	2.00	181	6.03	377
			F	46.3	4.00	278	9.26	454
			MF	32.5	4.00	220	7.34	404
	88	3	M	6.39	4.00	34.5	11.5	62.9
			F	6.69	1.00	31.1	10.4	64.6
			MF	6.41	2.00	32.6	10.9	62.9
		10	M	19.8	2.00	145	14.5	272
			F	14.6	4.00	98.0	9.80	180
			MF	15.1	1.00	116	11.6	211
		30	M	29.7	2.00	214	7.13	433
			F	35.4	1.00	200	6.67	404
			MF	25.7	4.00	181	6.02	384

Note: Toxicokinetic parameters determined using non-compartmental analysis. Values are geometric means.
Abbreviations: AUC_{12h} or AUC_{24h}=area under the concentration-time curve from time 0 to 12 hours or 24 hours; BID=twice daily; $C_{max\ 12h}$=maximum observed concentration from time 0 to 12 hours; F=female; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; MF=combined male and female; NaCMC=sodium carboxymethyl cellulose; $T_{max\ 12h}$=time of the maximum observed concentration from time 0 to 12 hours
a Animals per group per time point.

2.6.5.4.4 Toxicokinetics After Repeated Doses of Tucatinib to Monkeys

Test Article: Tucatinib
Species: Cynomolgus monkeys

2.6.5.4.4.1 Toxicokinetics after 28-day doses of tucatinib to monkeys

Study Number	JAY00093
Sex (M/F)/Number of Animals	M/5 and F/5 per group
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	0.5% Tween 80, pH 2.6
Method of Administration	Oral (nasogastric)
Dose (mg/kg/dose)	10, 30, and 45 BID
Sample	Plasma
Analyte	Tucatinib
Assay	LC-MS/MS

Analyte	Interval (Day)	Dose Level (mg/kg)	Sex	C_{max} (µg/mL)	T_{max} (h)	AUC_{12h} (µg·h/mL)	AUC_{12h}/Dose (µg·h/mL)/(mg/kg)
Tucatinib	1	10	MF	0.892	1.52	3.01	0.301
		30	MF	2.91	2.00	14.0	0.468
		45	MF	4.54	3.03	23.8	0.528
	28	10	MF	1.17	1.41	5.22	0.522
		30	MF	4.60	2.33	26.4	0.879
		45	MF	NS	NS	NS	NS

Note: Pharmacokinetic parameters determined using non-compartmental analysis. Values are means.
Abbreviations: AUC_{12h}=area under the concentration-time curve from time 0 to 12 hours; BID=twice daily; C_{max}=maximum observed concentration; F=female; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; MF=combined male and female; NS=no samples; T_{max}=time of the maximum observed concentration

2.6.5.4.4.2 Toxicokinetics after 13-week doses of tucatinib to monkeys

Test Article: Tucatinib
Species: Cynomolgus monkeys

Study Number	8369685
Sex (M/F)/Number of Animals	M/6 and F/6 per group
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	0.5% Tween 80, pH 2.6
Method of Administration	Oral
Dose (mg/kg/dose)	2.5, 10, and 20 BID
Sample	Plasma
Analyte	Tucatinib and ONT-993
Assay	LC-MS/MS

Analyte	Interval (Day)	Dose Level (mg/kg)	Sex	$C_{max\ 12h}$ (ng/mL)	$T_{max\ 12h}$ (h)	AUC_{12h} (ng·h/mL)	AUC_{12h}/Dose (ng·h/mL)/(mg/kg)	AUC_{24h} (ng·h/mL)
Tucatinib	1	2.5	M	45.6	1.00	117	46.8	199
			F	25.3	1.00	91.6	36.6	168
			MF	33.9	1.00	103	41.4	183
		10	M	381	2.00	1190	119	3510
			F	505	1.50	1290	129	2920
			MF	439	2.00	1240	124	3200
		20	M	912	4.00	4130	206	16,900
			F	1310	2.00	4650	232	17,600
			MF	1090	2.00	4380	219	17,200
	91	2.5	M	59.6	0.750	197	79.0	404
			F	21.9	1.00	107	42.9	234
			MF	36.1	1.00	145	58.2	308
		10	M	161	2.00	740	74.0	3240
			F	122	1.00	440	44.0	1670
			MF	139	2.00	557	55.7	2260
		20	M	1150	4.00	6370	318	19,300
			F	2930	2.00	15,500	773	36,400
			MF	1830	2.00	9920	496	26,500

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

Analyte	Interval (Day)	Dose Level (mg/kg)	Sex	$C_{max\ 12h}$ (ng/mL)	$T_{max\ 12h}$ (h)	AUC_{12h} (ng·h/mL)	AUC_{12h}/Dose (ng·h/mL)/(mg/kg)	AUC_{24h} (ng·h/mL)
ONT-993	1	2.5	M	9.67	1.00	24.1	9.66	32.4
			F	2.45	1.00	6.77	2.71	9.42
			MF	4.24	1.00	11.3	4.50	15.4
		10	M	24.1	2.00	84.9	8.49	172
			F	32.5	1.00	103	10.3	186
			MF	28.0	1.50	93.4	9.34	179
		20	M	33.0	2.00	163	8.17	322
			F	53.8	1.50	205	10.3	372
			MF	42.1	2.00	183	9.15	346
	91	2.5	M	4.99	1.00	NA	NA	25.2
			F	2.39	2.00	6.96	2.79	18.8
			MF	3.45	1.50	NA	NA	22.1
		10	M	5.00	2.00	28.7	2.87	93.9
			F	4.19	1.00	16.8	1.68	50.7
			MF	4.54	2.00	21.5	2.15	67.1
		20	M	10.5	3.00	79.5	3.98	204
			F	21.5	2.00	132	6.61	273
			MF	15.0	2.00	103	5.13	236

Note: Pharmacokinetic parameters determined using non-compartmental analysis. Values are geometric means.
Abbreviations: AUC_{12h} or AUC_{24h}=area under the concentration-time curve from time 0 to 12 hours or 24 hours; BID=twice daily; $C_{max\ 12h}$=maximum observed concentration from time 0 to 12 hours; F=female; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; MF=combined male and female; NA=not applicable; $T_{max\ 12h}$=time of the maximum observed concentration from time 0 to 12 hours

2.6.5.5. PHARMACOKINETICS: ORGAN DISTRIBUTION

2.6.5.5.1 Organ Distribution of [^{14}C]Tucatinib in Mice

Test Article: [^{14}C]Tucatinib

Study Number	[redacted]0229
Species	BT-474 intracerebral tumor-bearing BALB/c Nude mice
Sex (M/F)/Number of Animals	F/3 per time point
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	30% Captisol®, pH 3.5
Method of Administration	Oral
Dose (mg/kg)	70 (q12hx3)
Radionuclide	[^{14}C]
Specific Activity	105.07 µCi/mg
Analyte/Assay	[^{14}C]/direct LSC (plasma, liver, and kidney) or autoradiography (brain)
Sampling Time (h)	3 and 24 (post last dose)

	Concentration (µCi/mL or µCi/g)	
Tissue/organs	**3 h**	**24 h**
Plasma	0.067	0.012
Liver	0.657	0.298
Kidney (left)	0.104	0.013
Kidney (right)	0.109	0.013

Brain Slices (3 hours post last dose; slices 2 to 6)	**DPM**		
	Mouse 1	**Mouse 5**	**Mouse 9**
Left striatum (no tumor)	404	496	372
Right striatum (tumor)	1359	793	926
Total (left + right)	1763	1289	1298
Net Tumor (sum right – sum left)	955	297	554
Total brain (sum left + sum right of all slices)	2806	2031	2079
Normal brain (total brain – tumor sections)	1851	1734	1525
Tumor DPM/mg	47.75	14.85	27.7
Normal brain DPM/mg	4.4	4.13	3.63
Tumor/normal brain radioactivity ratio	10.85	3.6	7.63

Notes: Assumes an average mouse brain volume of 420 mm^3 = 420 mg. Assumes a tumor volume of 20 mm^3 = 20 mg.
Abbreviations: DPM=disintegrations per minute; F=female; LSC=liquid scintillation counting; q12hx3=every 12 hours times three

2.6.5.5.2 Organ Distribution of Tucatinib in Mice

Test Article: Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-004	
Species	CD-1 mice	
Sex (M/F)/Number of Animals	M/5 per time point	
Feeding Condition	Nonfasted	
Vehicle/Formulation	30% Captisol®	
Method of Administration	Oral	
Dose (mg/kg)	100 (BID for 4.5 days; 9 total doses)	
Sample	Brain	
Analyte	Tucatinib	ONT-993
Assay	LC-MS/MS	

Parameter	**Dose Cycle**		**Dose Cycle**	
	First (Day 1)	**Last (Day 5)**	**First (Day 1)**	**Last (Day 5)**
T_{max} (h)	1.00	2.00	4.00	2.00
C_{max} (µg/g)	0.284	3.30	0.0742	0.265
AUC_{last} (h·µg/g)	0.830	4.66	0.616	0.977
AUC_{inf} (h·µg/g)	0.871	4.73	NA	NA
$MR_{AUClast}$ (%)	NA	NA	74.2	21.0

Abbreviation: AUC_{last}=area under the concentration-time curve from time 0 to the time of the last measurable concentration; AUC_{inf}=area under the concentration-time curve from time 0 to infinity; BID=twice daily; C_{max}=maximum observed concentration; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; M=male; $MR_{AUClast}$=metabolite to parent ratio of the AUC_{last} value; NA=not applicable; T_{max}=time of the maximum observed concentration

2.6.5.5.3 Organ Distribution of [^{14}C]Tucatinib in Rats

Test Article: [^{14}C]Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-063
Species	Sprague-Dawley rats
Sex (M/F)/Number of Animals	M/2 per time point
Feeding Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5% CMC/0.1% Poloxamer 188
Method of Administration	Oral
Dose (mg/kg)	30
Radionuclide	[^{14}C]
Specific Activity	50 mCi/mmol
Analyte/Assay	[^{14}C]/LSC

Tissue/organ	**C_{max} (µg equivalent/g tissue)**	**Tissue/Plasma Ratio**
Plasma	1.45	NA
Liver	19.5	13.4
Kidneys	16.2	11.2
Lungs	4.67	3.26
Brain	0.0807	0.056
Spinal cord	0.121	0.085

Abbreviations: CMC=carboxymethyl cellulose; LSC=liquid scintillation counting; M=male; NA=not applicable

2.6.5.5.4 Quantitative Whole-Body Autoradiography in Rats

Test Article: [^{14}C]Tucatinib

Study Number	8369173
Species	Long-Evans rats
Sex (M/F)/Number of Animals	M/8 and F/8 (M/1 and F/1 per time point)
Feeding Condition	Nonfasted
Vehicle/Formulation	0.5% NaCMC and 0.1% Poloxamer 188 in water
Method of Administration	Oral
Dose (mg/kg)	30
Radionuclide	[^{14}C]
Specific Activity	105.07 µCi/mg
Analyte/Assay	[^{14}C]/Quantitative Whole-Body Autoradiography
Sampling Time (h)	1, 8, 24, 48, 72, 168, 336, and 672

	Male Concentration (ng eq./mL or ng eq./g)							
Tissue/organs	**1 h**	**8 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**168 h**	**336 h**	**672 h**
Blood (wet blood by LSC)	1010	241	41.0	26.7	13.0	7.61	BLQ	BLQ
Plasma (wet plasma by LSC)	1490	389	64.5	42.9	13.7	BLQ	BLQ	BLQ
Adrenal gland(s)	10,700	1920	110[a]	191	141[a]	137[a]	ND	ND
Arterial wall	2520	648	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bile	61,900	16,500	1210	ND	ND	ND	ND	ND
Blood	901	224	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Bone	227	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bone marrow	1590	317	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Brain cerebellum	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	2060	435	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Cecum	1220	958	188	ND	ND	ND	ND	ND
Diaphragm	1830	342	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Epididymis	362	655	226	102	ND	ND	ND	ND
Esophagus	4130	3060	153	ND	ND	ND	ND	ND
Exorbital lacrimal gland	3150	720	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Table continued on next page (footnotes on last page of this section)

(continued)

	Male Concentration (ng eq./mL or ng eq./g)							
Tissue/organs	**1 h**	**8 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**168 h**	**336 h**	**672 h**
Eye lens	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eye uveal tract	5630	26,200	23,900	48,400	50,200	35,000	26,700	28,100
Eye(s)	891	4260	4140	9690	7360	5480	3620	3950
Fat (abdominal)	126	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	1720	360	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Harderian gland	2280	1960	255	107	ND	ND	ND	ND
Intra-orbital lacrimal gland	2900	718	668	ND	ND	ND	ND	ND
Kidney cortex	12,700	3410	149	173	111	ND	ND	ND
Kidney medulla	7190	2810	254	388	238	ND	ND	ND
Kidney(s)	11,700	3160	204	309	189	BLQ	ND	ND
Large intestine	1170	1170	166	ND	ND	ND	ND	ND
Liver	24,800	6450	1570	1620	966	368	BLQ	ND
Lung(s)	3080	548	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Lymph node(s)	1860	394	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Meninges	680	1350	2470	5480	4190	2300	1800	ND
Muscle	914	103	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Myocardium	2350	363	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Nasal turbinates	177	268	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Pancreas	2490	444	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Pituitary gland	6220	1190	547	ND	ND	ND	ND	ND
Preputial gland	981[a]	2450[a]	995[a]	979[a]	926[a]	856[a]	559[a]	ND
Prostate gland	1100	343	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Salivary gland(s)	4370	711	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Seminal vesicle(s)	346	ND[b]	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Skin (nonpigmented)	777	214	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Skin (pigmented)	1050	1990	1150	2410	2670	134	BLQ	ND
Small intestine	5530	1020	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Spinal cord	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Spleen	3040	529	BLQ	BLQ	ND	ND	ND	ND
Stomach	1610	597	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Testis(es)	BLQ	309	141	101	99.2	ND	ND	ND
Thymus	1350	285	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Thyroid	3230	653	ND	ND	ND	ND	ND	ND

(continued)

	Male Concentration (ng eq./mL or ng eq./g)							
Tissue/organs	**1 h**	**8 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**168 h**	**336 h**	**672 h**
Urinary bladder	1150	2230	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Urine	7960	3400	ND	ND	ND	ND	ND	ND

	Female Concentration (ng eq./mL or ng eq./g)							
Tissue/organs	**1 h**	**8 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**168 h**	**336 h**	**672 h**
Blood (wet blood by LSC)	3180	1010	64.9	26.3	19.1	10.6	8.31	BLQ
Plasma (wet plasma by LSC)	4960	1540	96.1	32.4	20.3	BLQ	BLQ	BLQ
Adrenal gland(s)	24,300[a]	7200[a]	467	203[a]	130[a]	106[a]	ND	ND
Arterial wall	7910	2840	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bile	235,000	34,100	848	ND	ND	ND	ND	ND
Blood	2700	796	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bone	521	196	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bone marrow	6530	1780	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Brain cerebellum	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Cecum	4780[a]	NR	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Diaphragm	5480	1330	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Esophagus	9090	2410	442	ND	ND	ND	ND	ND
Exorbital lacrimal gland	10,600	4130	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Eye lens	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eye uveal tract	20,800	99,900	90,100	81,100	79,700	88,300	54,000	33,200
Eye(s)	3390	17,200	13,600	11,400	13,900	13,100	7780	7060
Fat (abdominal)	517	190	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	4080	1080	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Harderian gland	11,300	9780	211	150	BLQ	ND	ND	ND
Intra-orbital lacrimal gland	9200	3780	262	160	ND	ND	ND	ND
Kidney cortex	15,600	5010	169	107	BLQ	ND	ND	ND
Kidney medulla	14,400	3840	247	165	BLQ	ND	ND	ND
Kidney(s)	14,700	4440	224	140	BLQ	ND	ND	ND

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

	Female Concentration (ng eq./mL or ng eq./g)							
Tissue/organs	**1 h**	**8 h**	**24 h**	**48 h**	**72 h**	**168 h**	**336 h**	**672 h**
Large intestine	6090	2010	501	166	BLQ	ND	ND	ND
Liver	75,500	22,500	3370	1930	1250	475	128	ND
Lung(s)	8270	2950	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Lymph node(s)	6070	2470	154	ND	ND	ND	ND	ND
Meninges	2830	4950	5800	2720	1760	1820	1820	ND
Muscle	2880	821	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Myocardium	7610	1950	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nasal turbinates	1660	759	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Ovary(ies)	3000[a]	833[a]	BLQ[a]	ND	ND	ND	ND	ND
Pancreas	7420	1940	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Pituitary gland	12,200	3120	114	ND	ND	ND	ND	ND
Preputial gland	12,000[a]	6900[a]	1560[a]	1530[a]	1000[a]	1400[a]	ND	ND
Salivary gland(s)	18,100	5150	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Skin (nonpigmented)	2670	3160	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Skin (pigmented)	2550	4480	4280	2760	2020	223	ND	ND
Small intestine	6010	2570	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Spinal cord	133	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Spleen	12,700	4300	180	115	BLQ	ND	ND	ND
Stomach	5610	2100	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Thymus	5330	2250	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Thyroid	8110	1990	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Urinary bladder	2100[a]	1200	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Urine	24,100	3110	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Uterus	2720[a]	1050[a]	BLQ[a]	ND	ND	ND	ND	ND

Abbreviations: BLQ=Below the limit of quantitation (<97.3 ng eq./g); F=female; LSC=liquid scintillation counting; M=male; NaCMC=sodium carboxymethyl cellulose; ND=Not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue); NR=Not represented (tissue not present in section)

a Tissue appeared to be fat soaked.

b Tissue not detectable due to flare from gastrointestinal contents.

2.6.5.6. PHARMACOKINETICS: PLASMA PROTEIN BINDING

2.6.5.6.1 Plasma Protein Binding of Tucatinib

Test Article: Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-046
Study System	In vitro plasma
Study Description	Rapid equilibrium dialysis of naïve plasma containing tucatinib at four concentrations. Plasma was obtained from male animals/volunteers and pooled by species.

Species	Concentration Tested (µmol/L)	% Bound (SD)
CD-1 mouse	0.1	94.8 (9.01)
	1.0	98.7 (0.29)
	10	96.7 (4.00)
	50	98.2 (0.59)
Sprague-Dawley rat	0.1	100 (0.00)
	1.0	98.4 (0.19)
	10	97.5 (4.38)
	50	97.3 (0.33)
Cynomolgus monkey	0.1	93.5 (11.21)
	1.0	96.5 (0.83)
	10	95.2 (3.93)
	50	95.9 (0.58)
Human	0.1	97.8 (3.87)
	1.0	97.1 (0.90)
	10	97.9 (1.23)
	50	97.5 (0.24)

Abbreviation: SD=standard deviation

2.6.5.6.2 Plasma Protein Binding of ONT-993

Test Article: ONT-993

Study Number	TRN-5483
Study System	In vitro plasma
Study Description	Rapid equilibrium dialysis of naïve plasma containing ONT-993 at one concentration.

Species	Concentration Tested (µmol/L)	% Bound (SD)
Human	5	97.1 (0.05)

Abbreviation: SD=standard deviation

2.6.5.6.3 Blood Cell Distribution

Test Article: Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-054
Study System	In vitro blood
Study Description	Blood-to-plasma partitioning of naïve blood containing tucatinib at three concentrations. Whole blood was obtained from three healthy volunteers.

Species	Concentration Tested (µmol/L)	Blood:Plasma Ratio (SD)
Human	0.2	1.02 (0.10)
	2.0	1.00 (0.10)
	20	0.98 (0.07)

Abbreviation: SD=standard deviation

2.6.5.7. PHARMACOKINETICS: STUDY IN PREGNANT OR NURSING ANIMALS

Not applicable.

2.6.5.8. PHARMACOKINETICS: STUDIES OF TUCATINIB WITH HUMAN P-GP TRANSPORTER

2.6.5.8.1 Studies of Tucatinib With Human P-gp Transporter

Test Article: Tucatinib

Study Numbers	DM[redacted]-072, DM[redacted]-072-A1, DM[redacted]-072-A2
Study System	DM[redacted]-072 and DM[redacted]-072-A1: Caco-2 cell monolayers DM[redacted]-072-A2: MDR1 LLC-PK1 cell monolayers
Study Description	Efflux ratio and apparent permeability of tucatinib in cell monolayers in the apical to basolateral (P_{app} A-B) and basolateral to apical (P_{app} B-A) directions in the presence and absence of a specific P-gp (MDR1) inhibitor.

Study Number	Test Condition	P_{app} A-B (10^{-6} cm/sec)	P_{app} B-A (10^{-6} cm/sec)	Efflux Ratio
	Efflux ratio and apparent permeability of tucatinib			
DM[redacted]-072[a]	10 µmol/L tucatinib	11.4 (3.9)	32.2 (13.1)	2.9
	Efflux ratio and apparent permeability of tucatinib in the presence and absence of a specific MDR1 inhibitor			
DM[redacted]-072-A1[b]	1 µmol/L tucatinib	4.5	31.7	7.1
	10 µmol/L tucatinib	16.3	28.1	1.7
	100 µmol/L tucatinib	25.8	7.8	0.3
	1 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	19.9	51.0	2.6
	10 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	38.2	36.7	1.0
	100 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	33.9	10.9	0.3
DM[redacted]-072-A2[a]	0.3 µmol/L tucatinib	1.1 (0.3)	85.4 (8.1)	56.5
	1 µmol/L tucatinib	1.0 (0.2)	60.4 (8.7)	58.0
	3 µmol/L tucatinib	1.4 (0.5)	58.7 (7.5)	47.0
	10 µmol/L tucatinib	0.9 (0.2)	64.4 (10.7)	70.0
	30 µmol/L tucatinib	4.4 (0.6)	65.1 (12.1)	14.3
	100 µmol/L tucatinib	14.4 (0.7)	62.3 (9.1)	2.4
	0.3 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	25.4 (2.9)	57.6 (12.6)	2.7
	1 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	21.3 (7.9)	51.3 (13.8)	2.3
	3 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	22.6 (3.3)	44.2 (10.5)	1.7
	10 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	26.4 (2.5)	38.0 (9.5)	1.4
	30 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	27.5 (1.4)	41.8 (4.8)	0.8
	100 µmol/L tucatinib + 100 µmol/L verapamil	53.2 (1.9)	35.0 (3.7)	0.6

Abbreviations: MDR1=multidrug resistance 1; LLC-PK1=epithelial-like porcine kidney; P_{app} A-B=apparent permeability from apical to basolateral; P_{app} B-A=apparent permeability from basolateral to apical; P-gp=P-glycoprotein
a. Permeability values are means (standard deviation). b. Permeability values are an average of two replicates.

2.6.5.9. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VIVO

2.6.5.9.1 Metabolism of Tucatinib In Vivo

Test Article: [^{14}C]Tucatinib

Study Numbers	DM[redacted]-063, DM[redacted]-075, 8393554, ONT-380-008
Study System	DM[redacted]-063: Sprague-Dawley rat plasma and tissues DM[redacted]-075: Sprague-Dawley rat bile and feces 8393554: Cynomolgus monkey plasma, urine, and feces ONT-380-008: Human plasma, urine, and feces
Study Description	The metabolism of [^{14}C]tucatinib was studied in intact and BDC rats following a single oral dose at 30 mg/kg (400 µCi/kg), in monkeys following a single oral dose at 20 mg/kg (137 µCi/kg), and in humans following a single oral dose at 300 mg (150 µCi).

Study Number: DM[redacted]-063 (rat)

Component	Plasma (2 hours)	Liver (2 hours)	Kidney (2 hours)	Lungs (2 hours)
Tucatinib	+	+	+	+
M1	-	+	-	-
M3	-	-	+	-
M5	-	+	-	-

Study Number: DM[redacted]-075 (rat)
% of Radioactive Dose

Component	Bile (0-24 hours)	Feces (0-48 hours)
Tucatinib	Trace	62
M1	3.8	12
M2	Trace	6.3
M4	Trace	-
M5	-	8.6
M6	Trace	-
M8	Trace	-
M11	Trace	-
M12	Trace	-
M13	Trace	1.6

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

	Study Number: 8393554 (monkey)				Study Number: ONT-380-008 (human)			
	Plasma (0.25-24 h[a])		Urine (0-48 h)	Feces (0-96 h)	Plasma (1-24 h[a])		Urine (0-48 h)	Feces (0-216 h)
Component	AUC (ng eq·h/g)	Percent of AUC Radioactivity	Average % of Radioactive Dose		AUC (ng eq·h/g)	Percent of AUC Radioactivity	Average % of Radioactive Dose	
M43	-	-	0.0158	1.13	-	-	-	-
M50	-	-	-	1.41	-	-	-	-
M53	-	-	0.0113	0.923[b]	-	-	-	-
M54	-	-	-		-	-	-	-
M1 (ONT-993)	689	2.70	0.530	16.4	631	9.16	1.47	36.8
M18	-	-	-	-	-	-	0.0839	6.07
Tucatinib	17,200	67.5	0.189	11.8	5210	75.6	0.714	15.9
M19	234	0.917	0.0714	5.11	77.3	1.12	0.322	5.29
M20 (M9/M10)	84.2[c]	0.330[c]	0.0507	2.05[c]	-	-	0.0549[c]	2.65[c]
M3			-		-	-		
M22	86.6[d]	0.340[d]	0.120[d]	1.40[d]	-	-	0.321[d]	2.01[d]
M23 (M5)					-	-		
M25	94.3	0.370	0.0101	1.78	86.6	1.26	0.0284	1.54
M61	-	-	0.0534	5.53	-	-	-	-
M28	-	-	-	-	-	-	-	3.86
M30	-	-	0.00199	0.967	-	-	0.0143	0.348
M31	1130	4.43	-	0.576	278	4.03	-	-
Unidentified*	1440	5.66	0.381	10.1	256	3.71	0.346	0.922

Abbreviations: +=metabolite observed; -=not observed; AUC=area under the concentration-time curve; BDC=bile duct-cannulated; trace=<1% of dose

* Sum of all unidentified components.

a Time-weighted AUC-representative pool.

b M53 and M54 co-eluted in this matrix.

c M20 (M9/M10) and M3 co-eluted in this matrix.

d M22 and M23 (M5) co-eluted in this matrix.

2.6.5.9.2 In Vivo Metabolite Exposure Comparison

Test Article: Tucatinib

Study Number	14663
Study System	Plasma from rats, monkeys, and humans
Study Description	The objective of this study was to determine if major or unique human metabolites were detected that exceeded the 10% total drug related exposure threshold specified by the FDA and ICH guidance. Plasma was obtained from six Sprague Dawley rats following twice daily oral administration of tucatinib at 30 mg/kg/dose for 13 weeks. Plasma was obtained from twelve cynomolgus monkeys following twice daily oral administration of tucatinib at 20 mg/kg/dose for 13 weeks. Plasma was obtained from fifteen human subjects following twice daily oral administration of tucatinib at 300 mg/dose for 14 days (cycle 1 day 14). Plasma was pooled by species to generate Hamilton (AUC) pools. Relative exposures of metabolites were determined by UPLC-HRMS.

Historical Metabolite Number	Metabolite Identifier	Average % TDRE			Biotransformation
		Rat	Monkey	Human	
M1 (ONT-993)	Met1	0.39	0.37	6.46	+O
M3	Met2	0.04	0.07	0.28	*N*-Dealkylation
M5	Met3	0.04	0.02	0.06	+O
-	Met4	0.10	0.05	0.32	+O -2H
M31	Met5	7.63	10.02	4.94	-2H
-	Met6	0.0	0.4	0.3	+O -2H
Tucatinib	Tucatinib	91.80	89.04	87.68	-

Abbreviations: -= Metabolite not applicable; AUC=area under the concentration-time curve; FDA=Food and Drug Administration; ICH= International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use; TDRE=total drug related exposure; UPLC-HRMS=ultra-performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry

2.6.5.9.3 In Vivo Metabolite Identification

Test Article: Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-081, 8393554, and ONT-380-008
Study System	Sprague-Dawley rats, cynomolgus monkeys, and humans
Study Description	In vivo samples were analyzed LC-MS for identification of metabolites.

Component	*m/z*	Δ mass (amu) from parent	Proposed transformation
Tucatinib	481	+0	-
M1 (ONT-993)	497	+16	Aliphatic hydroxylation
M2	499	+18	Hydrolysis (oxazoline ring-opened)
M3	384	-97	*N*-Dealkylation (loss of dimethyloxazoline)
M4	513	+32	Dehydrogenation + mono-oxidation of M2
M5 (M23)	497	+16	Mono-oxidation (dimethyloxazoline)
M6	497	+16	Aliphatic hydroxylation (methylphenyl)
M7	497	+16	Mono-oxidation
M8	497	+16	Mono-oxidation
M9/M10 (M20)	497	+16	Aromatic hydroxylation (quinazoline)
M11	673	+192	Mono-oxidation + glucuronidation (dimethyloxazoline)
M43	364	-117	*O*-Dealkylation (loss of triazole pyridine)
M50	497	+16	Mono-oxidation (methylphenyl)
M53	657	+176	Glucuronidation
M54	513	+32	Mono-oxidation of M5 (M23)
M18	513	+32	Aromatic hydroxylation of M1 (quinazoline)
M19	511	+30	Mono-oxidation + dehydrogenation of ONT-993 (dimethyloxazoline)
M22	495	+14	Dehydrogenation of M20
M25	495	+14	Mono-oxidation + dehydrogenation (dimethyloxazoline)
M61	442	-39	Unknown cleavage
M28	511	+30	Aliphatic hydroxylation of M22
M30	511	+30	Aromatic hydroxylation of M25 (quinazoline)
M31	479	-2	Dehydrogenation (quinazoline)

Abbreviation: LC-MS=liquid chromatography-mass spectrometry

2.6.5.10. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VITRO

2.6.5.10.1 In Vitro Stability in Whole Blood and Plasma

Test Article: Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-040
Study System	Whole blood (Sprague-Dawley rats and humans) Plasma (cynomolgus monkeys)
Study Description	The in vitro metabolic stability of tucatinib (5 µmol/L) was studied in whole blood and plasma following incubation at 37°C.

Incubation Time (minutes)	**Mean % Tucatinib Remaining**		
	Human Blood	**Rat Blood**	**Monkey Plasma**
0	100	100	100
60	99	102	99
120	107	97	101
240	80	92	96

2.6.5.10.2 In Vitro Stability in Liver Microsomes and Hepatocytes

Test Article: Tucatinib

Study Numbers	DM[redacted]-040 and DM[redacted]-080
Study System	DM[redacted]-040: Liver microsomes and hepatocytes (CD-1 mouse, Sprague-Dawley rat, beagle dog, cynomolgus monkey, and human) DM[redacted]-080: Liver microsomes and hepatocytes (mouse, rat, rabbit, monkey, and human)
Study Description	DM[redacted]-040: The in vitro metabolic stability of tucatinib (1 µmol/L) was studied in microsomes (1 mg protein/mL for 20 minutes at 37°C) and hepatocytes (10^6 cells/mL for 2 hours at 37°C). DM[redacted]-080: The in vitro metabolic stability of tucatinib (10 µmol/L) was studied in microsomes (0.1 mg protein/mL for rabbit and 1 mg protein/mL for mouse, rat, monkey, and human; for 30 minutes at 37°C) and hepatocytes (2 x 10^6 cells/mL for 2 hours at 37°C).

Study Number: DM[redacted]-040

	Mouse		Rat		Dog		Monkey		Human	
Mean Parameters	**Mic**	**Hep**	**Mic**	**Hep**	**Mic**	**Hep**	**Mic**	**Hep**	**Mic**	**Hep**
% Tucatinib Remaining	68	61	85	85	66	62	49	14	63	26
$T_{1/2}$ (min)	33	180	68	533	33	226	18	43	28	62
CL_h (mL/min/kg)	47	29	19	7	21	10	26	26	13	13
ER (%)	53	32	27	10	59	28	59	59	64	63

Study Number: DM[redacted]-080

	Mouse		Rat		Rabbit		Monkey		Human	
Component	**Mic**	**Hep**	**Mic**	**Hep**	**Mic**	**Hep**	**Mic**	**Hep**	**Mic**	**Hep**
ONT-993 (M1)	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
M2	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
M4	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
M5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M6	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
M7	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M8	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M9	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M13	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-

Abbreviations: +=metabolite observed; -= Metabolite not observed; CL_h (predicted hepatic clearance)=$\frac{CL_{int} \cdot Q}{CL_{int}+Q}$, where Q is the species-dependent hepatic blood flow, and Cl_{int} is predicted intrinsic clearance; ER (predicted hepatic extraction ratio)=$\frac{CL_h}{Q}$; Hep=hepatocytes; Mic=liver microsomes; $T_{1/2}$=half-life for degradation based on linear regression of -ln(% remaining) *versus* time

2.6.5.10.3 In Vitro Reaction Phenotyping

Test Article: Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-027
Study System	Human liver microsomes (HLM)
Study Description	Reaction phenotyping experiments with tucatinib (1 and 10 µmol/L) and CYP isoform specific chemical inhibitors in human liver microsomes (0.1 mg protein/mL) at 37°C.

Study Number: DM[redacted]-027

Matrix	Tucatinib Concentration	Inhibitor (CYP)	Mean Relative Concentration M1 (ONT-993)	M5	M9-M10
HLM	1 µmol/L	No time-dependent inhibitor*	100	100	100
		No competitive inhibitor	100	100	100
		Troleandomycin (CYP3A4)*	100	33	7.4
		Ketoconazole (CYP3A4)	87	8.5	5.2
		Quinidine (CYP2D6)	96	100	100
		Gemfibrozil 1-glucuronide (CYP2C8)*	6.9	110	61
		Montelukast (CYP2C8)	14	100	100
		Sulfaphenazole (CYP2C9)	94	96	100
		N-Benzylnirvanol (CYP2C19)	80	77	77
		Furafylline (CYP1A2)*	90	140	62
HLM	10 µmol/L	No time-dependent inhibitor*	100	100	100
		No competitive inhibitor	100	100	100
		Troleandomycin (CYP3A4)*	93	26	25
		Ketoconazole (CYP3A4)	89	6.7	13
		Quinidine (CYP2D6)	90	89	94
		Gemfibrozil 1-glucuronide (CYP2C8)*	5.9	80	98
		Montelukast (CYP2C8)	44	98	100
		Sulfaphenazole (CYP2C9)	93	98	100
		N-Benzylnirvanol (CYP2C19)	84	86	87
		Furafylline (CYP1A2)*	90	83	97

* 20 minute pre-incubation. Normalized to “no time-dependent inhibitor” control.

(continued)

Study Numbers	DM[redacted]-027 and TRN-5578
Study System	DM[redacted]-027: Recombinant cytochrome P450 (rCYP) TRN-5578: Human liver microsomes (HLM) and human liver cytosol (HLC)
Study Description	DM[redacted]-027: Reaction phenotyping experiments with tucatinib (10 µmol/L) and rCYP (100 pmol/mL enzyme content) at 37°C. TRN-5578: Formation of selected tucatinib metabolites in human liver microsomes or human liver cytosol.

Study Number: DM[redacted]-027

			Metabolite Formation						
Matrix	**Tucatinib Concentration**	**rCYP Isoform**	**M1 (ONT-993)**	**M5**	**M6**	**M8**	**M9**	**M10**	**M13**
rCYP	10 µmol/L	rCYP1A1	-	++	-	+	-	-	+
		rCYP1B1	-	++	-	-	-	-	-
		rCYP1A2	-	+	-	-	-	-	-
		rCYP2B6	-	-	-	-	-	-	-
		rCYP2C8	+++	-	-	-	-	-	-
		rCYP2C9	-	-	-	-	-	-	-
		rCYP2C19	-	-	-	-	-	-	-
		rCYP2D6	-	-	-	-	-	-	-
		rCYP3A4	-	++	+	-	+	+	+
		rCYP3A5	+	+	++	-	-	-	+

\- Metabolite not observed.
\+ <10% of total radioactivity (by peak height).
++ 10%-30% of total radioactivity (by peak height).
+++ >30% of total radioactivity (by peak height).

Study Number: TRN-5578

				Component Peak Area (x 10^4)		
Matrix	**Tucatinib Concentration**	**Treatment**	**Tucatinib**	**M1 (ONT-993)**	**M20**	**M23**
HLM	5 µmol/L	- NADPH	847	-	-	-
		+ NADPH	678	15.3	5.54	4.93
HLC	5 µmol/L	None	770	-	15.6	-
		+ Hydralazine (5 µmol/L)	770	-	-	-
		+ Raloxifene (5 µmol/L)	770	-	14.7	-

Abbreviations: -=Does not match predicted metabolites; CYP=cytochrome P450; NADPH=nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen

2.6.5.10.4 In Vitro Metabolite Identification

Test Article: Tucatinib

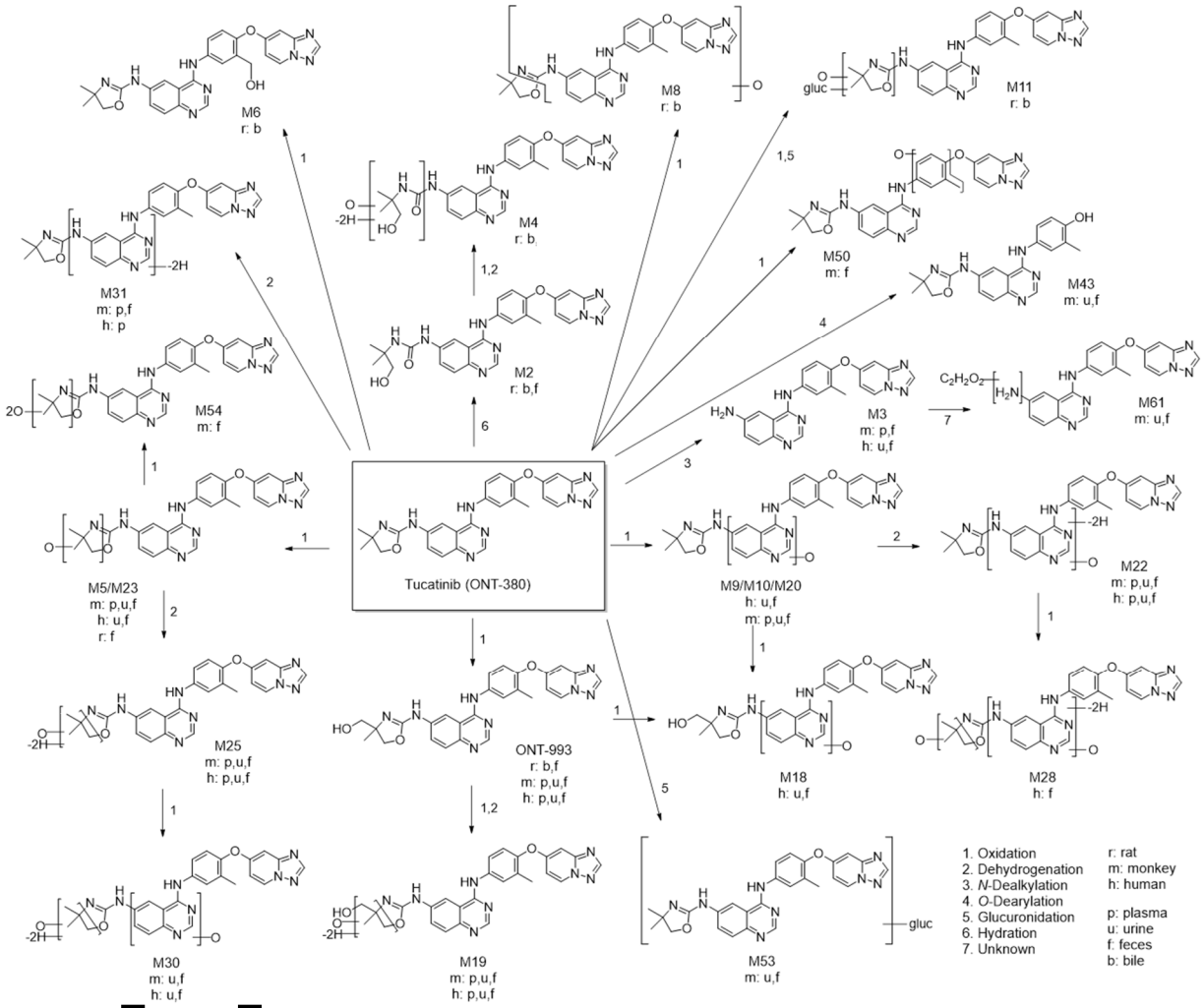
Study Number	DM[redacted]-081
Study System	Recombinant CYPs (from Study DM[redacted]-027) Mouse, rat, rabbit, monkey, and human liver microsomes and hepatocytes (from Study DM[redacted]-080)
Study Description	In vitro samples were analyzed LC-MS for identification of metabolites.

Component	*m/z*	Δ mass (amu) from parent	Proposed transformation
Tucatinib	481	+0	-
M1 (ONT-993)	497	+16	Aliphatic hydroxylation
M2	499	+18	Hydrolysis (oxazoline ring-opened)
M4	513	+32	Dehydrogenation + mono-oxidation of M2
M5	497	+16	Mono-oxidation (dimethyloxazoline)
M6	497	+16	Aliphatic hydroxylation (methylphenyl)
M7	497	+16	Mono-oxidation
M8	497	+16	Mono-oxidation
M9	497	+16	Mono-oxidation
M10	497	+16	Mono-oxidation

Abbreviations: CYP=cytochrome P450; LC-MS=liquid chromatography-mass spectrometry

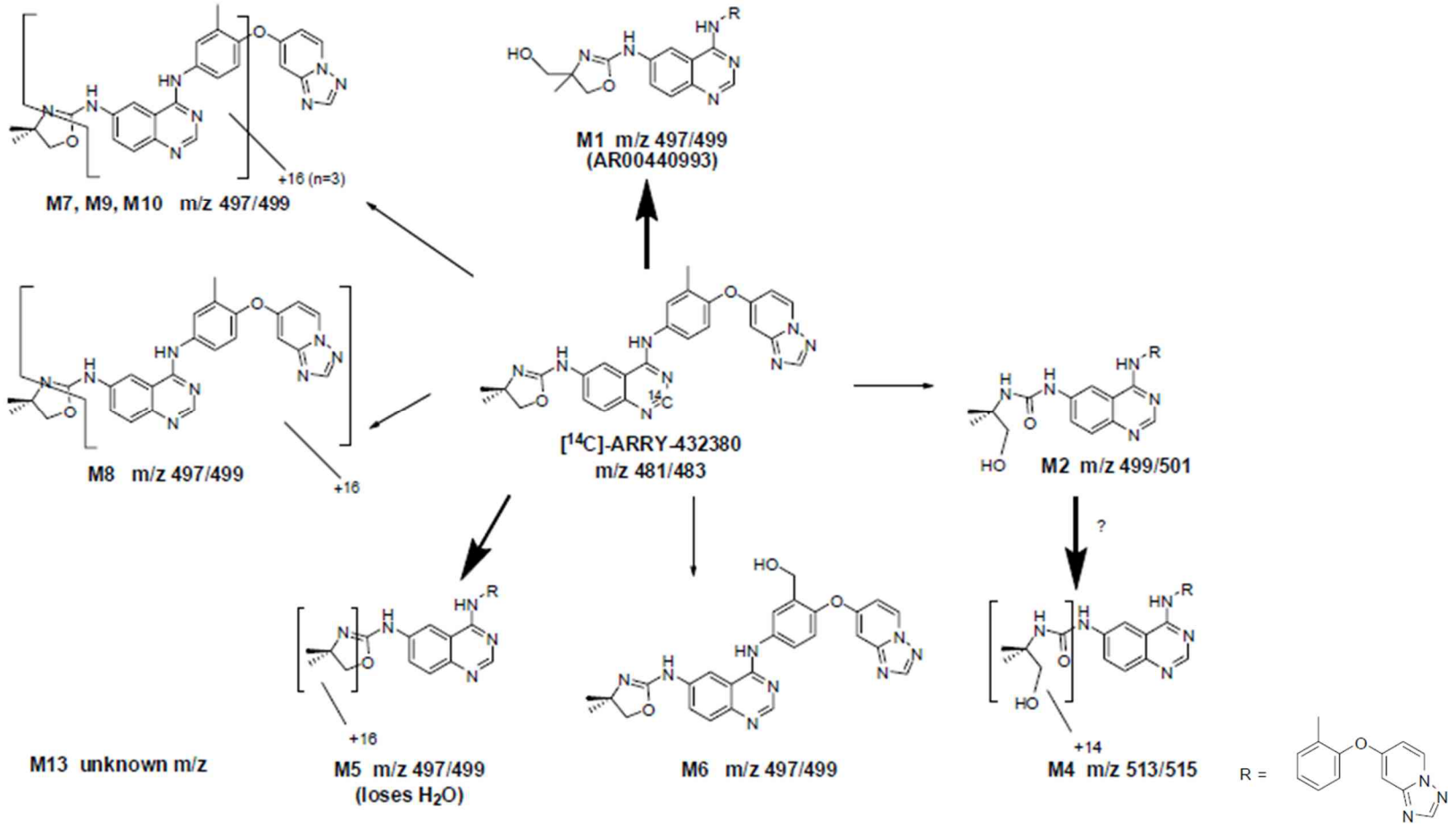
2.6.5.11. PHARMACOKINETICS: POSSIBLE METABOLIC PATHWAYS

Figure 1. Metabolic scheme summarizing proposed structures and in vivo pathways for metabolites of tucatinib



Source: DM[redacted]-063, DM[redacted]-075, 8393554, ONT-380-008

Figure 2.　Metabolic scheme summarizing proposed structures and in vitro pathways for metabolites of tucatinib



Source: DM[redacted]-080

2.6.5.12. PHARMACOKINETICS: INDUCTION/INHIBITION OF DRUG METABOLIZING ENZYMES

2.6.5.12.1 Induction of Drug Metabolizing Enzymes

Test Article: Tucatinib

Study Numbers	DM[redacted]-045 and [redacted]3058
Study System	Primary human hepatocyte cultures
Study Description	Cultured human hepatocytes from three separate human livers were treated with tucatinib, known inducers, or controls once daily for two or three consecutive days. After 48 hours (Study DM[redacted]-045), CYP-specific probe substrate was added to the cultures and incubated for 30 minutes. Reactions were terminated and samples were analyzed by LC-MS/MS. After 48 or 72 hours (Studies DM[redacted]-045 and [redacted]3058), the hepatocytes were lysed, RNA was isolated, and samples were analyzed by RT-PCR.

Study Number: DM[redacted]-045

		Enzyme Activity Fold Induction								
		CYP1A2 (Phenacetin *O*-deethylation)			CYP3A4 (Testosterone 6β-hydroxylation)			CYP3A4 (Midazolam 1′-hydroxylation)		
Treatment	**Concentration**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
Tucatinib	0.3 µmol/L	0.86	1.39	0.87	0.51	0.65	0.50	0.48	0.74	0.60
Tucatinib	1 µmol/L	1.02	1.19	0.90	0.48	0.39	0.45	0.47	0.52	0.53
Tucatinib	3 µmol/L	1.29	1.30	1.11	0.49	0.40	0.42	0.50	0.51	0.55
Tucatinib	10 µmol/L	1.69	1.05	0.84	0.51	0.35	0.38	0.67	0.34	0.45
Tucatinib	30 µmol/L	0.63	0.52	0.60	0.59	0.38	0.56	0.62	0.18	0.31
Rifampicin	25 µmol/L	NA	NA	NA	8.49	8.91	13.9	6.91	2.41	5.43
3-MC	1 µmol/L	10.95	5.95	13.84	NA	NA	NA	NA	NA	NA

		mRNA Fold Induction						mRNA % of Positive Control					
		CYP1A2			CYP3A4			CYP1A2			CYP3A4		
Treatment	**Concentration**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
Tucatinib	0.3 µmol/L	3.6	1.1	1.0	1.3	1.8	0.8	5.1	0.0	0.0	0.14	5.6	0.0
Tucatinib	1 µmol/L	3.5	0.7	1.6	1.4	0.8	0.9	4.9	0.0	3.5	0.16	0.0	0.0
Tucatinib	3 µmol/L	4.5	2.0	0.9	2.7	1.6	0.6	6.9	8.4	0.0	0.75	4.0	0.0
Tucatinib	10 µmol/L	6.0	2.0	1.2	4.7	2.3	0.9	9.9	7.8	0.7	1.7	9.9	0.0
Tucatinib	30 µmol/L	6.9	3.1	2.1	10.5	3.7	4.4	11.6	18.1	6.6	4.3	21.9	12.7
Rifampicin	25 µmol/L	NA	NA	NA	221	11.8	26.8	NA	NA	NA	100	100	100
3-MC	1 µmol/L	50.5	10.8	15.6	NA	NA	NA	100	100	100	NA	NA	NA

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

Study Number: [redacted]3058

		mRNA Fold Induction CYP2B6			mRNA % of Positive Control CYP2B6		
Treatment	**Concentration**	**D1**	**D2**	**D3**	**D1**	**D2**	**D3**
DMSO	0.1%	1.00	1.00	1.00	0	0	0
Tucatinib	0.03 µmol/L	1.02	1.02	1.41	0.196	0.0749	2.91
Tucatinib	0.1 µmol/L	0.680	1.10	1.37	-3.03	0.332	2.61
Tucatinib	0.3 µmol/L	1.50	1.90	0.987	4.75	3.12	-0.0937
Tucatinib	1 µmol/L	1.06	1.79	0.872	0.601	2.73	-0.897
Tucatinib	3 µmol/L	0.982	1.67	1.45	-0.174	2.32	3.20
Tucatinib	10 µmol/L	0.955	1.21	1.26	-0.427	0.730	1.81
Tucatinib	30 µmol/L	0.871	0.939	0.870	-1.22	-0.212	-0.910
Flumazenil	25 µmol/L	1.61	1.55	1.08	5.74	1.90	0.572
Phenobarbital	750 µmol/L	11.5	29.9	15.2	100	100	100

Abbreviations: 3-MC=3-methylcholanthrene; CYP=cytochrome P450; D=donor; LC-MS/MS=liquid chromatography with tandem mass spectrometry; NA=not applicable; RT-PCR=real time polymerase chain reaction

2.6.5.12.2 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes by Tucatinib

Test Article: Tucatinib

Study Numbers	DM[redacted]-047, [redacted]5036, 8373547, [redacted]5073, and DM[redacted]-025
Study System	Human liver microsomes and recombinant UGT1A1
Study Description	Direct inhibition and/or time-dependent inhibition of cytochrome P450s and UGT1A1 by tucatinib were studied by monitoring probe substrate reactions in human liver microsomes and recombinant UGT1A1.

		Direct Inhibition			Time-Dependent –NADPH		Metabolism-Dependent +NADPH	
Enzyme	**Probe Substrate Reaction**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**	**K_i (µmol/L)**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**
CYP1A2	Phenacetin *O*-deethylation	>25[a]	7.2[a]	-	-	30.4[b]	-	32.5[b]
CYP2B6	Efavirenz 8-hydroxylation	>30[c]	30[c]	-	>30[c]	22[c]	>30[c]	28[c]
CYP2C8	Paclitaxel 6α-hydroxylation	8.8[a]	82.1[a]	-	-	-	-	-
CYP2C8	Amodiaquine *N*-dealkylation	-	-	0.170[d]	-	21.4[e]	-	21.3[e]
CYP2C9	Tolbutamide 4′-hydroxylation	10.5[a]	78.5[a]	-	-	-	-	-
CYP2C9	Diclofenac 4′-hydroxylation	-	-	4.57[d]	-	63.3[b]	-	59.7[b]
CYP2C19	*S*-Mephenytoin 4′-hydroxylation	>25[a]	41.1[a]	-	-	47.7[b]	-	34.2[b]
CYP2D6	Dextromethorphan *O*-demethylation	21.1[a]	53.7[a]	-	-	73.5[b]	-	72.2[b]
CYP3A4/5	Testosterone 6β-hydroxylation	13.0[a]	62.8[a]	-	-	-	-	-
CYP3A4/5	Midazolam 1′-hydroxylation	16.9[a]	57.0[a]	0.805[d]	-	-	-	-
UGT1A1	β-Estradiol 3-glucuronidation	-	-	1.81[d]	-	-	-	-
UGT1A1[f]	Scopoletin glucuronidation	4.2[g]	65.4[g]	-	-	-	-	-
UGT1A1	SN-38 glucuronidation	2.4[g]	82.7[g]	-	-	-	-	-

Notes: Experiments were conducted using human liver microsomes, unless otherwise noted. Percent inhibition is at the highest concentration tested.
Abbreviations: -= not applicable; CYP= cytochrome P450; Direct inhibition= 0-minute preincubation; IC_{50}= half maximal inhibitory concentration; K_i=inhibitor constant; NADPH= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen; -NADPH= 30-minute preincubations without NADPH; +NADPH= 30-minute preincubation with NADPH; UGT= UDP- glucuronosyl transferase

a Study DM[redacted]-047 (highest tucatinib concentration of 25 µmol/L).
b Study [redacted]5073 (tucatinib concentration of 20 µmol/L).
c Study [redacted]5036 (highest tucatinib concentration of 30 µmol/L).
d Study 8373547 (highest tucatinib concentration of 25 µmol/L).
e Study [redacted]5073 (tucatinib concentration of 1 µmol/L).
f Recombinant UGT1A1.
g Study DM[redacted]-025 (highest tucatinib concentration of 10 µmol/L).

2.6.5.12.3 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes by Tucatinib: Inhibition of CYP3A4/5

Test Article: Tucatinib

Study Number	[redacted]5024
Study System	Human liver microsomes
Study Description	Time-dependent inhibition of CYP3A4/5 by tucatinib (up to 10 µmol/L) was studied by monitoring probe substrate reactions in human liver microsomes.

		Direct Inhibition		Time-Dependent –NADPH		Metabolism-Dependent +NADPH	
Enzyme	**Probe Substrate Reaction**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**
CYP3A4/5	Testosterone 6β-hydroxylation	>10	44	>10	25	4.7	59
CYP3A4/5	Midazolam 1′-hydroxylation	3.3	71	3.8	66	1.4[a]	80

Abbreviations: CYP= cytochrome P450; Direct inhibition=0-minute preincubation; IC_{50}= half maximal inhibitory concentration; K_I= concentration of an inactivator that supports half the maximal rate of
enzyme inactivation; k_{inact}=rate of enzyme inactivation; NADPH= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen; –NADPH=30-minute preincubations without NADPH; +NADPH=30-minute preincubation with NADPH

a The K_I and k_{inact} values for inactivation of CYP3A4/5 were measured to be 0.54 µmol/L and 0.011 min^{-1}, respectively.

2.6.5.12.4 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes by ONT-993

Test Article: ONT-993

Study Number	TR-00036
Study System	Human liver microsomes
Study Description	Direct inhibition and/or time/metabolism-dependent inhibition of cytochrome P450s by ONT-993 (up to 10 µmol/L) were studied by monitoring probe substrate reactions in human liver microsomes.

		Direct Inhibition		Time-Dependent	Metabolism-Dependent
Enzyme	**Probe Substrate Reaction**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**	**–NADPH IC_{50} (µmol/L)**	**+NADPH IC_{50} (µmol/L)**
CYP1A2	Phenacetin *O*-deethylation	-	3.1	-	-
CYP2B6	Bupropion hydroxylation	-	11.5	-	-
CYP2C8	Amodiaquine *N*-dealkylation	-	8.1	-	-
CYP2C9	Diclofenac 4′-hydroxylation	-	20.7	-	-
CYP2C19	*S*-Mephenytoin 4′-hydroxylation	-	10.4	-	-
CYP2D6	Bufuralol 1′-hydroxylation	7.9	57.5	7.46	7.57
CYP2E1	Chlorzoxazone 6-hydroxylation	-	None	-	-
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylation	-	9.7	>10	6.16
CYP3A4	Midazolam 1′-hydroxylation	-	28.6	7.48	2.29

Abbreviations: -= not applicable; CYP= cytochrome P450; Direct inhibition=0-minute preincubation; IC_{50}= half maximal inhibitory concentration; NADPH= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen; –NADPH=30-minute preincubations without NADPH; +NADPH=30-minute preincubation with NADPH

2.6.5.12.5 Inhibition of Drug Metabolizing Enzymes by ONT-993: Inhibition of CYP3A4/5

Test Article: ONT-993

Study Number	[redacted]5034
Study System	Human liver microsomes
Study Description	Direct inhibition and/or time/metabolism-dependent inhibition of cytochrome P450s by ONT-993 (up to 10 µmol/L) were studied by monitoring probe substrate reactions in human liver microsomes.

		Direct Inhibition		Time-Dependent –NADPH		Metabolism-Dependent +NADPH	
Enzyme	**Probe Substrate Reaction**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**	**IC_{50} (µmol/L)**	**Inhibition (%)**
CYP3A4/5	Testosterone 6β-hydroxylation	>25	47	>25	28	6.3	70
CYP3A4/5	Midazolam 1′-hydroxylation	16	62	18	57	3.2[a]	80

Abbreviations: CYP= cytochrome P450; Direct inhibition=0-minute preincubation; IC_{50}= half maximal inhibitory concentration; K_I= concentration of an inactivator that supports half the maximal rate of
enzyme inactivation; k_{inact}=rate of enzyme inactivation; NADPH= nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogen; –NADPH=30-minute preincubations without NADPH; +NADPH=30-minute preincubation with NADPH

a The K_I and k_{inact} values for inactivation of CYP3A4/5 were measured to be 1.6 µmol/L and 0.015 min^{-1}, respectively.

2.6.5.12.6 Inhibition of Capecitabine Catabolism/Metabolism by Tucatinib and ONT-993

Test Article: Tucatinib, ONT-993

Study Number	TR-00037
Study System	Human liver cytosol and recombinant CES1 (rhCES1)
Study Description	Inhibition of capecitabine catabolism/metabolism by tucatinib and ONT-993 was studied in human liver cytosol or rhCES.

Test Article	Enzyme*	Maximum Inhibition (%)
Tucatinib[a]	Carboxyesterase (rhCES1)	36
	Carboxyesterase	32
	Cytidine deaminase	10
	Thymidine phosphorylase	1
	Dihydropyrimidine dehydrogenase	20
ONT-993[a]	Carboxyesterase (rhCES1)	19
	Carboxyesterase	18
	Cytidine deaminase	15
	Thymidine phosphorylase	0
	Dihydropyrimidine dehydrogenase	22

Abbreviation: CES= carboxyesterase
* Experiments were conducted using human liver cytosol, unless otherwise noted.
a Highest tucatinib and ONT-993 concentrations were 10 µmol/L.

2.6.5.13. PHARMACOKINETICS: EXCRETION

2.6.5.13.1 Excretion of Tucatinib in Rats and Monkeys

Test Article: [^{14}C]Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-075	8393554
Species	Sprague-Dawley rat (intact)	Cynomolgus monkey
Sex (M/F)/Number of Animals	M/4	F/2
Feeding Condition	Fasted	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5% NaCMC/0.1% Poloxamer 188 in water	0.5% Tween 80 in water, pH 2.6
Method of Administration	Oral	Oral
Dose (mg/kg)	30	20
Analyte	Total [^{14}C] radioactivity	Total [^{14}C] radioactivity
Assay	LSC	LSC

Study Number: DM[redacted]-075				**Study Number: 8393554**			
Urine		**Feces**		**Urine**		**Feces**	
Time (h)	**Mean % Recovery**	**Time (h)**	**Mean % Recovery**	**Time (h)**	**Average % Recovery**	**Time (h)**	**Average % Recovery**
0-8	0.2	-	-	0-6	0.674	-	-
8-24	0.2	0-24	85.4	6-12	0.392	-	-
24-48	0.1	24-48	4.3	12-24	0.423	0-24	46.0
48-72	0.0	48-72	0.9	24-48	0.153	24-48	18.8
72-96	0.0	72-96	0.2	48-72	0.0495	48-72	8.06
96-120	0.0	96-120	0.1	72-96	0.0341	72-96	2.53
Total	0.5	Total	90.9	96-120	0.0219	96-120	0.669
				120-144	0.0179	120-144	0.314
				144-168	0.0146	144-168	0.218
				Total	1.78	Total	76.6

Abbreviations: -= not applicable; F=female; LCS=liquid scintillation counting; M=male; NaCMC=sodium carboxymethyl cellulose

2.6.5.13.2 Excretion of Tucatinib in Humans

Test Article: [^{14}C]Tucatinib

Study Number	ONT-380-008
Species	Human
Number of Subjects	8
Method of Administration	Oral
Dose	300 mg (150 µCi)
Analyte	Total [^{14}C] radioactivity
Assay	LSC

Urine		Feces		Cumulative Total	
Time (h)	**Mean % Recovered**	**Time (h)**	**Mean % Recovered**	**Time (h)**	**Mean % Recovered**
0-6	2.08	-	-	0-6	2.08
6-12	0.791	-	-	0-12	2.88
12-24	0.649	0-24	1.43	0-24	4.96
24-48	0.405	24-48	33.8	0-48	39.1
48-72	0.106	48-72	18.7	0-72	58.0
72-96	0.0394	72-96	16.3	0-96	74.3
96-120	NA	96-120	9.06	0-120	83.4
120-144	NA	120-144	3.15	0-144	86.5
144-168	NA	144-168	1.52	0-168	88.1
168-192	NA	168-192	0.677	0-192	88.7
192-216	NA	192-216	0.651	0-216	89.4
216-240	NA	216-240	0.383	0-240	89.7
240-264	NA	240-264	0.196	0-264	89.8
264-288	NA	264-288	NA	0-288	89.8
288-312	NA	288-312	NA	0-312	89.9
Total	4.09	Total	85.8		

Abbreviations: LSC=liquid scintillation counting; NA=not applicable

2.6.5.14. PHARMACOKINETICS: EXCRETION INTO BILE

2.6.5.14.1 Excretion of Tucatinib into Bile in Rats

Test Article: [^{14}C]Tucatinib

Study Number	DM[redacted]-075
Species	Sprague-Dawley rat
Sex (M/F)/Number of Animals	M/4[a] (bile duct-cannulated)
Feeding Condition	Fasted
Vehicle/Formulation	0.5% NaCMC/0.1% Poloxamer 188 in water
Method of Administration	Oral
Dose (mg/kg)	30
Analyte	Total [^{14}C] radioactivity
Assay	LSC

Urine		Feces		Bile	
Time (h)	**Mean % Recovered**	**Time (h)**	**Mean % Recovered**	**Time (h)**	**Mean % Recovered**
-	-	-	-	0-4	2.8
0-8	0.8	-	-	4-8	2.5
8-24	0.4	0-24	72.3	8-24	6.1
24-48	0.1	24-48	7.6	24-48	0.7
48-72	0.0	48-72	0.3	48-72	0.1
72-96	0.1	72-96	0.2	72-96	0.2
Total	1.1	Total	80.2	Total	12.3

Abbreviations: LSC=liquid scintillation counting; M=male; NaCMC=sodium carboxymethyl cellulose
a One animal was excluded from calculation of the mean recoveries (n=3).

2.6.5.15. PHARMACOKINETICS: DRUG-DRUG INTERACTIONS

2.6.5.15.1 Tucatinib as a Substrate of Human Transporters OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, P-gp, BCRP, and BSEP

Test Article: Tucatinib

Study Number	[redacted]-20[redacted]-128
Study System	Transfected MDCK-II monolayers (OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2-K, and BCRP), MDCK-MDR1 monolayers (P-gp), Sf9 membrane vesicles (BSEP)
Study Description	The purpose of this study was to determine if tucatinib was a substrate of selected transporters.

Transporter	Test Condition	Transporter Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Control Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Net Transporter Mediated Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)
OAT1	2 µmol/L p-aminohippurate	2.85 (0.361)	0.0276 (0.0185)	2.82 (0.361)
	10 µmol/L tucatinib	21.8 (3.73)	25.6 (1.77)	-3.85 (3.73)
OAT3	0.1 µmol/L estrone-3-sulfate	0.147 (0.0238)	0.0286 (0.0118)	0.119 (0.0238)
	10 µmol/L tucatinib	20.9 (1.64)	22.0 (1.78)	-1.10 (1.64)
OCT1	2 µmol/L MPP^+	5.47 (2.08)	0.458 (0.155)	5.01 (2.08)
	10 µmol/L tucatinib	33.5 (0.994)	32.3 (2.11)	1.20 (0.994)
OCT2	10 µmol/L metformin	14.4 (3.14)	0.361 (0.0808)	14.1 (3.14)
	10 µmol/L tucatinib	10.6 (0.694)	11.3 (7.79)	-0.705 (0.694)
OATP1B1	2 µmol/L estradiol-17β-D-glucuronide	0.650 (0.0542)	0.0398 (0.0132)	0.610 (0.0542)
	10 µmol/L tucatinib	15.3 (0.916)	17.2 (2.23)	-1.94 (0.916)
OATP1B3	2 µmol/L CCK-8	2.92 (0.233)	0.0470 (0.0432)	2.87 (0.233)
	10 µmol/L tucatinib	3.89 (0.406)	4.70 (1.06)	-0.806 (0.406)
MATE1	10 µmol/L metformin	13.6 (1.33)	0.233 (0.0157)	13.4 (1.33)
	10 µmol/L tucatinib	6.59 (0.398)	7.91 (0.429)	-1.32 (0.398)

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

Transporter	Test Condition	Transporter Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Control Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Net Transporter Mediated Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)
MATE2-K	10 µmol/L metformin	1.65 (0.158)	0.207 (0.00657)	1.45 (0.158)
	10 µmol/L tucatinib	37.1 (3.86)	35.8 (0.800)	1.35 (3.86)
Transporter	**Test Condition**	**Transporter Cell Efflux Ratio**	**Control Cell Efflux Ratio**	**Net Efflux Ratio (Transporter/Control)**
BCRP	2 µmol/L prazosin	18.6 (1.33)	2.60 (0.267)	7.15 (0.511)
	10 µmol/L tucatinib	8.12 (0.702)	0.784 (0.121)	10.4 (0.895)
P-gp	0.1 µmol/L quinidine	63.6 (3.48)	4.95 (0.467)	12.8 (0.703)
	10 µmol/L tucatinib	27.7 (3.32)	0.620 (0.217)	44.7 (5.36)
Transporter	**Test Condition**	**Cellular Accumulation: Transporter + ATP (pmol/min/mg)**	**Cellular Accumulation: Transporter + AMP (pmol/min/mg)**	**Net Accumulation: ATP – AMP (pmol/min/mg)**
BSEP	1 µmol/L taurocholic acid	44.1 (10.2)	5.75 (2.68)	38.4 (10.2)
	10 µmol/L tucatinib	15.5 (4.85)	18.9 (8.86)	-3.40 (4.85)

Note: Values are means (standard deviation).
Abbreviations: AMP=adenosine monophosphate; ATP=adenosine triphosphate; BCRP=breast cancer resistance protein; BSEP=bile salt export pump; CCK-8=cholecystokinin octapeptide; MDCK=Madin-Darby canine kidney; MDR1=multidrug resistance 1; MPP^+=1-methyl-4-phenylpyridinium; OAT=organic anion transporter; OCT=organic cation transporter; OATP=organic anion transporting polypeptide; MATE=multidrug and toxin extrusion transporter; P-gp=P-glycoprotein

2.6.5.15.2 ONT-993 as a Substrate of Human Transporters OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, P-gp, BCRP, and BSEP

Test Article: ONT-993

Study Number	[redacted]-20[redacted]-202/[redacted]-20[redacted]-539
Study System	Transfected MDCK-II monolayers (OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2-K, and BCRP), MDCK-MDR1 monolayers (P-gp), Sf9 membrane vesicles (BSEP)
Study Description	The purpose of this study was to determine if ONT-993 was a substrate of selected transporters.

Transporter	Test Condition	Transporter Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Control Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Net Transporter Mediated Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Fold of Activity
OAT1	2 µmol/L p-aminohippurate	3.47 (0.412)	0.0484 (0.00799)	3.43 (0.412)	
	1 µmol/L ONT-993	5.29 (0.204)	6.79 (0.837)	-1.50 (0.204)	0.779
OAT3	0.1 µmol/L estrone-3-sulfate	0.179 (0.00796)	0.0373 (0.00355)	0.142 (0.00796)	
	1 µmol/L ONT-993	11.2 (0.247)	6.25 (0.143)	4.90 (0.247)	1.79
OCT1	2 µmol/L MPP^+	7.67 (1.18)	0.363 (0.0833)	7.31 (1.18)	
	1 µmol/L ONT-993	4.53 (0.366)	5.90 (0.143)	-1.36 (0.366)	0.768
OCT2	10 µmol/L metformin	9.44 (2.44)	0.489 (0.0639)	8.95 (2.44)	
	1 µmol/L ONT-993	5.38 (0.395)	5.44 (1.25)	-0.0578 (0.395)	0.989
OATP1B1	2 µmol/L estradiol-17β-D-glucuronide	1.51 (0.207)	0.0936 (0.00905)	1.42 (0.207)	
	1 µmol/L ONT-993	11.7 (0.950)	7.23 (0.200)	4.47 (0.950)	1.62
OATP1B3	2 µmol/L CCK-8	1.53 (0.131)	0.0232 (0.0238)	1.51 (0.131)	
	1 µmol/L ONT-993	13.6 (1.71)	6.64 (0.168)	6.99 (1.71)	2.05
MATE1	10 µmol/L metformin	34.3 (4.96)	0.564 (0.111)	33.7 (4.96)	
	1 µmol/L ONT-993	BLQ	BLQ	NA	NA
MATE2-K	10 µmol/L metformin	5.33 (0.247)	0.376 (0.0672)	4.95 (0.247)	
	1 µmol/L ONT-993	BLQ	BLQ	NA	NA

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

Transporter	Test Condition	Transporter Cell Efflux Ratio	Control Cell Efflux Ratio	Net Efflux Ratio (Transporter/Control)
BCRP	2 µmol/L prazosin	11.2 (0.936)	3.71 (0.204)	3.02 (0.252)
	1 µmol/L ONT-993	29.4 (5.28)	8.33 (0.601)	3.54 (0.634)
P-gp	0.1 µmol/L quinidine	52.4 (2.68)	5.28 (0.307)	9.94 (0.507)
	1 µmol/L ONT-993	47.3 (10.2)	9.60 (0.115)	4.93 (1.06)

Transporter	Test Condition	Cellular Accumulation: Transporter + ATP (pmol/min/mg)	Cellular Accumulation: Transporter + AMP (pmol/min/mg)	Net Accumulation: ATP – AMP (pmol/min/mg)	Fold of Activity
BSEP	1 µmol/L taurocholic acid	40.6 (1.50)	1.78 (0.0892)	38.8 (1.50)	
	1 µmol/L ONT-993	4.01 (1.00)	4.54 (0.505)	-0.533 (1.00)	0.883

Note: Values are means (standard deviation).
Abbreviations: AMP=adenosine monophosphate; ATP=adenosine triphosphate; BCRP=breast cancer resistance protein; BLQ=below the limit of quantitation; BSEP=bile salt export pump; CCK-8=cholecystokinin octapeptide; MDCK=Madin-Darby canine kidney; MDR1=multidrug resistance 1; MPP^+=1-methyl-4-phenylpyridinium; OAT=organic anion transporter; OCT=organic cation transporter; OATP=organic anion transporting polypeptide; MATE=multidrug and toxin extrusion transporter; NA=not applicable; P-gp=P-glycoprotein

2.6.5.15.3 Studies of Tucatinib With Human P-gp Transporter

Test Article: Tucatinib

Study Numbers	DM[redacted]-072-A1, DM[redacted]-072-A2
Study System	DM[redacted]-072-A1: Caco-2 cell monolayers DM[redacted]-072-A2: MDR1 LLC-PK1 cell monolayers
Study Description	Efflux ratio and apparent permeability of tucatinib in cell monolayers in the apical to basolateral (P_{app} A-B) and basolateral to apical (P_{app} B-A) directions in the presence and absence of a specific P-gp substrate (digoxin)

Study Number	Test Condition	P_{app} A-B (10^{-6} cm/sec)	P_{app} B-A (10^{-6} cm/sec)	Efflux Ratio
DM[redacted]-072-A1[a]	10 µmol/L digoxin	0.13	1.25	9.5
	10 µmol/L digoxin + 1 µmol/L tucatinib	0.14	0.71	5.2
	10 µmol/L digoxin + 3 µmol/L tucatinib	0.12	0.72	5.9
	10 µmol/L digoxin + 10 µmol/L tucatinib	0.22	0.36	1.6
	10 µmol/L digoxin + 30 µmol/L tucatinib	0.38	0.23	0.6
	10 µmol/L digoxin + 100 µmol/L tucatinib	0.32	0.19	0.6
DM[redacted]-072-A2[b]	10 µmol/L digoxin	0.5 (0.2)	13.6 (0.8)	26.6
	10 µmol/L digoxin + 0.1 µmol/L tucatinib	0.4 (0.0)	12.8 (2.8)	32.1
	10 µmol/L digoxin + 0.3 µmol/L tucatinib	0.5 (0.1)	18.8 (2.1)	40.0
	10 µmol/L digoxin + 1 µmol/L tucatinib	0.6 (0.2)	18.0 (3.1)	28.1
	10 µmol/L digoxin + 3 µmol/L tucatinib	0.5 (0.1)	16.5 (3.9)	30.6
	10 µmol/L digoxin + 5 µmol/L tucatinib	0.6 (0.1)	17.5 (2.7)	31.9
	10 µmol/L digoxin + 10 µmol/L tucatinib	0.7 (0.2)	17.6 (3.2)	24.8
	10 µmol/L digoxin + 30 µmol/L tucatinib	1.1 (0.2)	11.4 (2.1)	10.3
	10 µmol/L digoxin + 50 µmol/L tucatinib	1.1 (0.3)	10.4 (1.5)	9.8
	10 µmol/L digoxin + 100 µmol/L tucatinib	1.5 (0.3)	7.7 (1.0)	5.3

Abbreviations: MDR1=multidrug resistance 1; MDR1 LLC-PK1=multi-drug resistance-1 transfected epithelial-like porcine kidney; P_{app} A-B=apparent permeability from apical to basolateral; P_{app} B-A=apparent permeability from basolateral to apical; P-gp=P-glycoprotein

a Permeability values are an average of two replicates.

b Permeability values are means (standard deviation).

2.6.5.15.4 Tucatinib as an Inhibitor of Human Transporters OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, P-gp, BCRP, and BSEP

Test Article: Tucatinib

Study Number	[redacted]-20[redacted]-020
Study System	Transfected MDCK-II monolayers (OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, and OATP1B3), MDCK-MDR1 monolayers (P-gp), Caco-2 monolayers (BCRP), Sf9 membrane vesicles (BSEP)
Study Description	The purpose of this study was to determine if tucatinib inhibited the transport of probe substrates mediated by selected transporters.

Transporter	Test Condition	Transporter Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Control Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Net Transporter Mediated Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Inhibition (%)
OAT1	vehicle	2.77 (0.228)	0.0241 (0.00196)	2.75 (0.228)	-
	10 µmol/L tucatinib	3.16 (0.158)	0.0264 (0.00679)	3.13 (0.158)	-13.8 (5.76)
	100 µmol/L probenecid	0.207 (0.0268)	0.0185 (0.00392)	0.188 (0.0268)	93.2 (0.976)
OAT3	vehicle	0.561 (0.0545)	0.0982 (NA)	0.463 (0.0545)	-
	10 µmol/L tucatinib	0.490 (0.0858)	0.0976 (0.00700)	0.392 (0.0858)	15.2 (18.5)
	100 µmol/L probenecid	0.102 (0.0201)	0.0931 (0.00582)	0.00872 (0.0201)	98.1 (4.35)
OCT1	vehicle	7.56 (0.461)	0.783 (0.0659)	6.78 (0.461)	-
	10 µmol/L tucatinib	6.19 (0.141)	0.338 (0.0570)	5.85 (0.141)	13.6 (2.08)
	100 µmol/L quinidine	1.26 (0.129)	0.827 (0.153)	0.434 (0.129)	93.6 (1.90)
OCT2	vehicle	6.74 (0.439)	0.286 (0.0330)	6.46 (0.439)	-
	10 µmol/L tucatinib	2.53 (0.580)	0.177 (0.0908)	2.35 (0.580)	63.6 (8.98)
	100 µmol/L quinidine	1.17 (0.131)	1.17 (0.101)	-0.00317 (0.131)	100 (2.02)
OATP1B1	vehicle	1.42 (0.106)	0.0698 (0.00685)	1.35 (0.106)	-
	10 µmol/L tucatinib	0.912 (0.179)	0.0731 (0.00685)	0.839 (0.179)	38.0 (13.2)
	100 µmol/L rifampicin	0.0860 (0.00473)	0.0797 (0.00828)	0.00624 (0.00473)	99.5 (0.350)
OATP1B3	vehicle	1.91 (0.278)	0.0502 (0.0102)	1.86 (0.278)	-
	10 µmol/L tucatinib	1.36 (0.196)	0.0626 (0.0199)	1.30 (0.196)	30.3 (10.5)
	100 µM rifampicin	0.0516 (0.00653)	0.0581 (0.0052)	-0.00651 (0.00653)	100 (0.351)

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

Transporter	Test Condition	Efflux Ratio	Inhibition (%)
BCRP	vehicle	5.10 (0.0628)	-
	10 µmol/L tucatinib	1.47 (0.0470)	67.7 (3.24)
	100 µmol/L chrysin	1.03 (0.0221)	97.2 (1.95)
P-gp	vehicle	41.2 (2.49)	-
	10 µmol/L tucatinib	21.4 (0.851)	-0.934 (4.21)
	100 µmol/L verapamil	1.50 (0.00572)	88.2 (0.134)

Transporter	Test Condition	Vesicular Accumulation: ATP (pmol/min/mg protein)	Vesicular Accumulation: AMP (pmol/min/mg protein)	Net Transporter Mediated Vesicular Accumulation (pmol/min/mg protein)	Inhibition (%)
BSEP	vehicle	15.0 (0.581)	1.80 (0.0851)	13.2 (0.581)	-
	10 µmol/L tucatinib	10.3 (0.408)	3.30 (1.23)	6.99 (0.408)	47.1 (3.09)
	300 µmol/L rifampicin	1.79 (0.0377)	1.66 (0.232)	0.127 (0.0377)	99.0 (0.285)

Note: Values are means (standard deviation). Probe substrates were 2 µmol/L p-aminohippurate (OAT1), 10 µmol/L p-aminohippurate (OAT3), 10 µmol/L MPP^+ (OCT1), 10 µmol/L metformin (OCT2), 2 µmol/L estradiol-17β-D-glucuronide (OATP1B1), 2 µmol/L CCK-8 (OATP1B3), 25 nmol/L genistein (BCRP), 100 nmol/L digoxin (P-gp), and 1 µM taurocholate (BSEP).
Abbreviations: AMP=adenosine monophosphate; ATP=adenosine triphosphate; BCRP=breast cancer resistance protein; BSEP=bile salt export pump; CCK-8=cholecystokinin octapeptide; MDCK=Madin-Darby canine kidney; MDR1=multidrug resistance 1; MPP^+=1-methyl-4-phenylpyridinium; OAT=organic anion transporter; OCT=organic cation transporter; OATP=organic anion transporting polypeptide; NA=not applicable; P-gp=P-glycoprotein

2.6.5.15.5 Tucatinib as an Inhibitor of Human Transporters OAT2, OATP1B1, OATP1B3, OCT2, MATE1, MATE2-K, BCRP, and BSEP

Test Article: Tucatinib

Study Numbers	[redacted]-20[redacted]-241/[redacted]-20[redacted]-042, [redacted]-20[redacted]-143, [redacted]-20[redacted]-167, [redacted]-20[redacted]-081
Study System	Transfected MDCK-II monolayers (OAT2, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2-K, and BCRP), Sf9 membrane vesicles (BSEP)
Study Description	The purpose of these studies was to determine the IC_{50} values of tucatinib against the transport of probe substrates mediated by selected transporters.

Transporter	Tucatinib Concentration Range	Probe Substrate	Maximum Inhibition (%)	IC_{50}	Study Number
OAT2	0.03 – 10 µmol/L	100 µmol/L creatinine	14.7	>10 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-241/[redacted]-20[redacted]-042
OCT2	0.3 – 100 µmol/L	10 µmol/L metformin	76.5	14.7 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-143
OCT2	0.03 – 10 µmol/L	100 µmol/L creatinine	94.1	0.107 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-241/[redacted]-20[redacted]-042
OATP1B1	0.1 – 30 µmol/L	2 µmol/L estradiol-17β-D-glucuronide	95.1	6.29 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-167
OATP1B3	0.1 – 30 µmol/L	2 µmol/L CCK-8	99.3	4.36 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-167
MATE1	0.03 – 10 µmol/L	10 µmol/L metformin	97.5	0.340 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-081
MATE1	0.003 – 1 µmol/L	100 µmol/L creatinine	92.8	0.0855 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-241/[redacted]-20[redacted]-042
MATE2-K	0.03 – 10 µmol/L	10 µmol/L metformin	99.1	0.135 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-081
MATE2-K	0.03 – 10 µmol/L	100 µmol/L creatinine	NA	NA	[redacted]-20[redacted]-241/[redacted]-20[redacted]-042
BCRP	0.3 – 100 µmol/L	2 µmol/L prazosin	91.9	8.98 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-143
BSEP	0.3 – 100 µmol/L	1 µmol/L taurocholate	97.9	8.48 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-143

Abbreviations: BCRP=breast cancer resistance protein, BSEP=bile salt export pump; CCK-8=cholecystokinin octapeptide; IC_{50}=half maximal inhibitory concentration; OAT=organic anion transporter; OCT=organic cation transporter, OATP=organic anion transporting polypeptide; MATE=multidrug and toxin extrusion transporter; MDCK=Madin-Darby canine kidney; NA=not applicable, insufficient net creatinine uptake was observed

2.6.5.15.6 ONT-993 as an Inhibitor of Human Transporters OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2-K, P-gp, BCRP, and BSEP

Test Article: ONT-993

Study Number	[redacted]-20[redacted]-063
Study System	Transfected MDCK-II monolayers (OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B1, OATP1B3, MATE1, MATE2-K, and BCRP), MDCK-MDR1 monolayers (P-gp), Sf9 membrane vesicles (BSEP)
Study Description	The purpose of this study was to determine if ONT-993 inhibited the transport of probe substrates mediated by selected transporters.

Transporter	Test Condition	Transporter Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Control Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Net Transporter Mediated Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Inhibition (%)
OAT1	vehicle	4.24 (0.0119)	0.0286 (0.0103)	4.21 (0.0119)	-
	2 µmol/L ONT-993	3.90 (0.0575)	0.0403 (0.0141)	3.86 (0.0575)	8.36 (1.37)
	100 µmol/L probenecid	0.545 (0.0388)	0.0234 (0.0125)	0.522 (0.0388)	87.6 (0.922)
OAT3	vehicle	0.934 (0.0807)	0.0968 (0.00893)	0.837 (0.0807)	-
	2 µmol/L ONT-993	0.900 (0.0902)	0.145 (0.0352)	0.754 (0.0902)	9.89 (10.8)
	100 µmol/L probenecid	0.165 (0.00815)	0.145 (0.0243)	0.0197 (0.00815)	97.6 (0.973)
OCT1	vehicle	3.84 (0.243)	0.714 (0.0816)	3.13 (0.243)	-
	2 µmol/L ONT-993	3.48 (0.303)	0.591 (0.0746)	2.89 (0.303)	7.86 (9.67)
	1000 µmol/L quinidine	0.771 (0.0637)	0.558 (0.0743)	0.213 (0.0637)	93.2 (2.03)
OCT2	vehicle	14.7 (1.91)	1.08 (0.199)	13.6 (1.91)	-
	2 µmol/L ONT-993	11.5 (1.18)	0.714 (0.0923)	10.8 (1.18)	20.9 (8.66)
	1000 µmol/L quinidine	2.63 (0.278)	2.85 (0.121)	-0.212 (0.278)	102 (2.04)
OATP1B1	vehicle	1.90 (0.278)	0.131 (0.0524)	1.77 (0.278)	-
	2 µmol/L ONT-993	1.52 (0.132)	0.128 (0.0498)	1.39 (0.132)	21.5 (7.49)
	100 µmol/L rifampicin	0.105 (0.0151)	0.115 (0.0246)	-0.0102 (0.0151)	101 (0.855)
OATP1B3	vehicle	1.60 (0.187)	0.0379 (0.00226)	1.56 (0.187)	-
	2 µmol/L ONT-993	1.40 (0.117)	0.0497 (0.00986)	1.35 (0.117)	13.4 (7.45)
	100 µmol/L rifampicin	0.111 (0.0172)	0.0680 (0.0171)	0.0429 (0.0172)	97.3 (1.10)

Table continued on next page (footnotes on next page)

(continued)

Transporter	Test Condition	Transporter Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Control Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Net Transporter Mediated Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2)	Inhibition (%)
MATE1	vehicle	33.0 (1.93)	0.459 (0.0589)	32.5 (1.93)	-
	2 µmol/L ONT-993	3.87 (0.155)	0.427 (0.0402)	3.44 (0.155)	89.4 (0.478)
	10 µmol/L cimetidine	1.37 (0.0714)	0.339 (0.201)	1.03 (0.0714)	96.8 (0.220)
MATE2-K	vehicle	4.37 (0.906)	0.426 (0.0167)	3.94 (0.906)	-
	2 µmol/L ONT-993	0.902 (0.0506)	0.437 (0.162)	0.465 (0.0506)	88.2 (1.29)
	10 µmol/L cimetidine	0.811 (0.117)	0.412 (0.0602)	0.399 (0.117)	89.9 (2.97)

Transporter	Test Condition	Efflux Ratio	Inhibition (%)
BCRP	vehicle	10.4 (0.657)	-
	2 µmol/L ONT-993	9.09 (0.948)	13.9 (10.1)
	1 µmol/L Ko143	1.76 (0.136)	91.9 (1.44)
P-gp	vehicle	54.0 (1.24)	-
	2 µmol/L ONT-993	60.0 (1.39)	-11.3 (2.63)
	3 µmol/L elacridar	3.43 (0.159)	95.4 (0.299)

Transporter	Test Condition	Vesicular Accumulation: ATP (pmol/min/mg protein)	Vesicular Accumulation: AMP (pmol/min/mg protein)	Net Transporter Mediated Vesicular Accumulation (pmol/min/mg protein)	Inhibition (%)
BSEP	vehicle	41.0 (2.10)	3.88 (0.130)	37.2 (2.10)	-
	2 µmol/L ONT-993	39.0 (2.05)	4.04 (0.0455)	35.0 (2.05)	5.87 (5.52)
	300 µmol/L rifampicin	3.97 (0.182)	2.83 (0.169)	1.14 (0.182)	96.9 (0.490)

Note: Values are means (standard deviation). Probe substrates were 2 µmol/L p-aminohippurate (OAT1), 10 µmol/L p-aminohippurate (OAT3), 2 µmol/L MPP^+ (OCT1), 10 µmol/L metformin (OCT2, MATE1, MATE2-K), 2 µmol/L estradiol-17β-D-glucuronide (OATP1B1), 2 µmol/L CCK-8 (OATP1B3), 2 µmol/L prazosin (BCRP), 100 nmol/L quinidine (P-gp), and 1 µmol/L taurocholate (BSEP).
Abbreviations: AMP=adenosine monophosphate; ATP=adenosine triphosphate; BCRP=breast cancer resistance protein; BSEP=bile salt export pump; CCK-8=cholecystokinin octapeptide; MDCK=Madin-Darby canine kidney; MDR1=multidrug resistance 1; MPP^+=1-methyl-4-phenylpyridinium; OAT=organic anion transporter; OCT=organic cation transporter; OATP=organic anion transporting polypeptide; MATE=multidrug and toxin extrusion transporter; P-gp=P-glycoprotein

2.6.5.15.7 ONT-993 as an Inhibitor of Human Efflux Transporters OAT2, OCT2, MATE1, and MATE2-K

Test Article: ONT-993

Study Numbers [redacted]-20[redacted]-241/[redacted]-20[redacted]-042, [redacted]-20[redacted]-081
Study System Transfected MDCK-II monolayers (OAT2, OCT2, MATE1, and MATE2-K)
Study Description The purpose of these studies was to determine the IC_{50} values of ONT-993 against the transport of probe substrates mediated by selected transporters.

Transporter	ONT-993 Concentration Range	Probe Substrate	Maximum Inhibition (%)	IC_{50}	Study Number
OAT2	0.03 – 10 µmol/L	100 µmol/L creatinine	44.9	>10 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-241/ [redacted]-20[redacted]-042
OCT2	0.03 – 10 µmol/L	100 µmol/L creatinine	90.3	0.544 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-241/ [redacted]-20[redacted]-042
MATE1	0.03 – 10 µmol/L	10 µmol/L metformin	95.1	0.247 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-081
MATE1	0.01 – 3 µmol/L	100 µmol/L creatinine	92.1	0.0863 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-241/ [redacted]-20[redacted]-042
MATE2-K	0.03 – 10 µmol/L	10 µmol/L metformin	92.1	0.220 µmol/L	[redacted]-20[redacted]-081
MATE2-K	0.03 – 10 µmol/L	100 µmol/L creatinine	NA	NA	[redacted]-20[redacted]-241/ [redacted]-20[redacted]-042

Abbreviations: IC_{50}=half maximal inhibitory concentration; MDCK=Madin-Darby canine kidney; OAT=organic anion transporter; OCT=organic cation transporter; MATE=multidrug and toxin extrusion transporter; NA=not applicable, insufficient net creatinine uptake was observed

2.6.5.16. PHARMACOKINETICS: OTHER

Not applicable.