目次

目次 1
表一覧 2
図一覧 3
略語及び略号一覧 4
2.6.4 薬物動態試験の概要文 7
2.6.4.1 まとめ 7
2.6.4.2 分析法 15
2.6.4.3 吸収 16
2.6.4.3.1 SD ラットを用いた CYH33 及び I27 の薬物動態試験 16
2.6.4.3.2 JVC ラットにおける［^{14}C］CYH33 の薬物動態試験 18
2.6.4.3.3 ビーグル犬における CYH33 及び I27 の薬物動態 19
2.6.4.3.4 Caco-2 細胞透過性試験 21
2.6.4.4 分布 22
2.6.4.4.1 *In vitro* 血漿蛋白結合 22
2.6.4.4.2 SD ラットにおける CYH33 及び I27 の組織内分布 23
2.6.4.4.3 雄 LE ラットを用いた［^{14}C］CYH33 の組織内分布試験 25
2.6.4.5 代謝 31
2.6.4.5.1 *In vitro* 代謝 31
2.6.4.5.1.1 肝ミクロソームにおける代謝安定性 31
2.6.4.5.1.2 様々な動物種の肝細胞における代謝 31
2.6.4.5.1.3 アミド加水分解酵素の同定 31
2.6.4.5.1.4 ヒト肝ミクロソームにおける I27 の *in vitro* 代謝プロファイル及び CYP450 フェノタイピング 32
2.6.4.5.2 *In vivo* 代謝 33
2.6.4.5.2.1 ラット及びイヌを用いた CYH33 の生物変換試験 33
2.6.4.5.2.2 SD ラットを用いた［^{14}C］CYH33 の *in vivo* 生物変換試験 37
2.6.4.6 排泄 40
2.6.4.6.1 SD ラットを用いた CYH33 の排泄試験 40
2.6.4.6.2 ラットにおける［^{14}C］CYH33 の排泄試験 41
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 42
2.6.4.7.1 CYH33 及び I27 の CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 に対する誘導能 42
2.6.4.7.2 CYH33 及び I27 による CYP2B6/CYP3A4 誘導の EC_{50} 及び E_{max} の測定 43
2.6.4.7.3 CYH33 及び I27 の CYP2C8、CYP2C9、及び CYP2C19 の mRNA 発現に対する誘導能 43
2.6.4.7.4 CYP450 酵素阻害試験 44
2.6.4.7.5 P-gp 及び BCRP の基質及び阻害剤となる可能性 44

2.6.4.7.6 MDR1 及び BCRP 阻害試験における IC_{50} の測定 45
2.6.4.7.7 OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K の基質及び阻害剤となる可能性 46
2.6.4.7.8 腎臓の主要 SLC トランスポーターの基質及び阻害剤としての可能性 46
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 48
2.6.4.9 考察及び結論 48
参考文献 51

表一覧

表 2.6.4-1. CYH33 の非臨床薬物動態及び代謝試験の一覧 9
表 2.6.4-2. ラットへの CYH33 1 mg/kg の単回静脈内注射後の PK パラメータ（n=3） 16
表 2.6.4-3. 雄ラットへの異なる用量の CYH33 の経口投与後の未変化体及び代謝産物の薬物動態パラメータ（n=3） 17
表 2.6.4-4. 雌ラットへの異なる用量の CYH33 の胃内投与後の未変化体及び代謝産物の薬物動態パラメータ（n=3） 17
表 2.6.4-5. SD ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後における血中及び血漿中の TRA の薬物動態パラメータ（平均±標準偏差） 19
表 2.6.4-6. イヌへの CYH33 の単回静脈内投与後の薬物動態パラメータ（n=6、雌雄比=1：1） 20
表 2.6.4-7. イヌへの異なる用量の経口投与後の CYH33 の薬物動態（n=6、雌／雄比=1：1） 20
表 2.6.4-8. イヌへの異なる用量の CYH33 の経口投与後の代謝産物 I27 の薬物動態（n=6、雌雄比=1：1） 21
表 2.6.4-9. アテノロール、プロプラノロール、ジゴキシン及び CYH33 の透過性 22
表 2.6.4-10. CYH33 及び I27 の血漿蛋白結合率（PPB） 22
表 2.6.4-11. 雄ロングエバンス系ラット（n=5）への［^{14}C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の血液、血漿及び組織中における総放射能（ng Eq./g） 27
表 2.6.4-12. 雄ロングエバンス系ラットへの［^{14}C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の血液、血漿及び組織中における総放射能の薬物動態パラメータ 29
表 2.6.4-13. ラットにおける CYH33 の代謝産物に関する UPLC/Q-TOF MS 情報 35
表 2.6.4-14. ビーグル犬血漿中における CYH33 の代謝産物に関する UPLC/Q-TOF MS 情報 36
表 2.6.4-15. 雌雄ラットへの［^{14}C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の［^{14}C］CYH33 及びその代謝産物の血漿中における分布（%AUC） 37
表 2.6.4-16. 雌雄ラットへの［14C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の［^{14}C］CYH33 及びその代謝産物の胆汁、尿及び糞中における分布（%用量） 38
表 2.6.4-17. ラットの尿、糞及び胆汁における CYH33 の回収率 41

表 2.6.4-18. 無処置 SD ラットへの［^{14}C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の投与後 0～168 時間における尿、糞及びケージ洗浄液中の回収率（平均 ± 標準偏差） 41
表 2.6.4-19. BDC SD ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、投与後 0～72 時間に胆汁、尿、糞及びケージ洗浄液で回収された投与量の割合（平均±標準偏差） 42

図一覧

図 2.6.4-1. SD ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後における血中及び血漿中総放射能（ng Eq./g）の平均濃度（±標準偏差）- 時間曲線（n=6、雌雄比=1：1） 19
図 2.6.4-2. 雄ラットへの CYH33 3 mg/kg の経口投与後の未変化体及び代謝産物 I27 の組織内分布のヒストグラム 24
図 2.6.4-3. 雌ラットへの CYH33 3 mg/kg の経口投与後の未変化体及び代謝産物 I27 の組織内分布のヒストグラム 25
図 2.6.4-4. ラットにおける CYH33 の推定代謝経路 40
図 2.6.4-5. BDC SD ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後の放射能の累積排泄（雄 3 匹、雌 3 匹） 42

略語及び略号一覧

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
μCi	Microcurie	マイクロキュリー
ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion	吸収、分布、代謝、排泄
AUC	Area under the blood concentration-time curve	血中薬物濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to the time t	0 から t 時間後における血中薬物濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0-\infty}$	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to time infinity	0 から無限大時間における血中薬物濃度-時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
BDC	Bile duct cannulated	胆管カニューレを挿入した
BLQ	Below limit of quantification	定量下限未満
BNPP	Di-p-nitropheny phosphate	ジ- p -ニトロフェニルリン酸
BSA	Bovine Serum Albumin	ウシ血清アルブミン
Caco-2	Human colon carcinoma cell line	ヒト結腸癌由来細胞株
CL	Clearance	クリアランス
CL_{int}	Intrinsic clearance	固有クリアランス
C_{max}	Maximum blood concentration	最高血中濃度
$C_{max\ ss}$	Maximum blood concentration at steady state	定常状態における最高血中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクロム P450
DDI	Drug-Drug Interactions	薬物間相互作用
DDVP	Dichlorvos	ジクロルボス
ESI	Electrospray Ionization	エレクトロスプレーイオン化
F%	Bioavailability	バイオアベイラビリティ
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution	ハンクス平衡塩溶液
HEK	Human embryonic kidney cells	ヒト胎児腎臓細胞
hERG	Human Ether-a-go-go Related Gene	ヒト ether-a-go-go 関連遺伝子
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	50% Inhibitory Concentration	50%阻害濃度

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
$I_{max,u}$	Maximal unbound plasma concentration of the interacting drug	非結合型最高血漿中濃度
IS	Internal standard	内標準物質
JVC	Jugular vein cannulation	頸静脈カニュレーション
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LE	Long-Evans (a pigmented rat strain)	ロングエバンス系（皮膚に有色部分のあるラットの動物系統）
LLOQ	Lower limit of quantitation	定量下限値
LSC	Liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MATE	Multidrug and toxin compound extrusion	多剤・毒性化合物排出
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells	Madin-Darby イヌ腎細胞
MDR1	Multidrug resistance gene 1	多剤耐性遺伝子 1
MRM	Multiple Reaction Monitoring	多重反応モニタリング
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRT	Mean Residence Time	平均滞留時間
$MRT_{0-\infty}$	Mean residence time from the start of dosing (t_0) to the time of infinity concentration	0 から無限大時間までの平均滞留時間
MRT_{0-last}	Mean residence time from the start of dosing (t_0) to the time of the last detectable concentration	0 から最終測定可能時点までの平均滞留時間
MS/MS	tandem mass spectrometry	タンデム質量分析法
NA	Not applicable	該当なし
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Reduced form	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型
nCi	Nanocurie	ナノキュリー
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーターポリペプチド
Papp	Apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝生理食塩水
P-gp	P-glycoprotein	P 糖蛋白
PO	Oral	経口

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
QWBA	Quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
SD	Sprague-Dawley (rat strain)	Sprague-Dawley（ラット動物系統）
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
T_{max}	Time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TRA	Total radioactivity	総放射能
UPLC/Q-TOF MS	Ultra-performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry	高性能液体クロマトグラフィータンデム四重極型飛行時間型質量分析
ULOQ	Upper limit of quantification	定量上限値
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

2.6.4 薬物動態試験の概要文

2.6.4.1 まとめ

本項にはCYH33（一般名：リソバリシブメシル酸塩水和物）の吸収、分布、代謝、排泄（ADME）、薬物相互作用、及びその他の薬物動態試験について記載する。本項で使用する実験動物の種及び系統、並びに治験薬は、薬理試験及び毒性試験で使用するものと同じである。

非同位体標識試験

ラット及びイヌへの単回静脈内投与後において、CYH33は、中等度から低度のクリアランス、中等度の分布容積、中等度から長い消失半減期（$t_{1/2}$）を示した。単回経口投与後において、CYH33は、雄ラットでは中等度の吸収率と低いバイオアベイラビリティ（F%）（19%）を示し、雌ラットでは中等度のバイオアベイラビリティ（53.7%）を示し、イヌでは比較的高いバイオアベイラビリティ（70.9%）を示した。また、ラットでは曝露量に性差が認められたが、イヌでは認められなかった。*In vitro* において、CYH33は中等度の透過性を示した。用量比例性に関しては、ラットにおけるCYH33及びその代謝産物I27のC_{max}及びAUC_{0-t}の増加率は用量の増加に近いか、それよりも低かった。イヌでは、CYH33のC_{max}及びAUC_{0-t}は0.05～0.2 mg/kgの用量範囲において用量比例的に増加したが、I27のC_{max}の増加は用量比をわずかに下回ったものの、I27のAUC_{0-t}は用量比例的に増加した。ラット及びイヌへの反復経口投与後において、CYH33の有意な蓄積は認められなかった。ラットへの経口投与後において、CYH33は、組織において広範に分布した。肝臓、副腎、消化管、膵臓、脾臓及び卵巣における曝露量は血漿中曝露量の約4倍超であったが、脳における曝露量は血漿中曝露量よりもかなり低かった（血漿中曝露量の約20%）。*In vitro* では、CYH33はヒト及び非臨床動物種において高い血漿蛋白結合率（90%超）を示したが、用量依存性は認められなかった。ラットにおけるCYH33の主要代謝経路は、一酸化水素化、二重酸化及びモルホリン環の開環であった。イヌでは、CYH33のアミド加水分解は主に肝臓で起こり、カルボキシルエステラーゼによって媒介された。ヒト肝ミクロソームにおけるI27の代謝は、主にCYP3A4及びCYP3A5によって触媒された。ラットにおけるCYH33及びI27の主要排泄経路は糞中排泄であった。

同位体標識試験

ラットへの［^{14}C］CYH33の胃内投与後、血漿／血液中の総放射能（TRA）のT_{max}は約0.5時間であったが、ほとんどの組織において投与後4時間であった。雌ラットのC_{max}、AUC_{0-t}、MRT及び血漿中TRAの$t_{1/2}$は、いずれも雄ラットよりも高値を示した。［^{14}C］CYH33の放射能は、胃腸系、肝臓、腎臓、眼及びブドウ膜などに広く分布し、主な放射能は未変化体に関連していた。血液/血漿比の結果に基づくと、CYH33及び／又はその代謝産物は血球と結合を示さなかった。ラットにおける［^{14}C］CYH33の主要代謝経路は1）モルホリン又はピペラジン環の酸化、2）モルホリン又はピペラジンの開環による脱エチル、3）アミド加水分解であった。ラットへの［^{14}C］CYH33の単回経口投与後においては、放射能は投与後168時間以内に回収された。吸収後、［^{14}C］CYH33由来放射能は主に胆汁を介して糞中に排泄された。胆管カニューレを挿入し

た（BDC）ラットを用いた試験で得られた尿中及び胆汁中排泄データから、［^{14}C］CYH33 の吸収率は少なくとも投与量の 77.52%（雄）及び 61.10%（雌）と推定された。

薬物動態学的薬物相互作用

CYH33 及び I27 は、CYP1A2、CYP2C9、CYP2D6 又は CYP3A4/5 に対する明らかな可逆的又は時間依存的な阻害作用を示さなかった。CYH33 及び I27 は CYP1A2 の誘導による薬物間相互作用を示さなかったが、*in vitro* では CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP3A4 の mRNA 発現に対する誘導能を示した。CYH33 は P-gp 及び BCRP の基質ではなかったが、I27 は P-gp 及び BCRP トランスポーターの基質であった。CYH33 は BCRP 及び P-gp を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 6.82 μM 及び 17.4 μM であり、P-gp 及び BCRP に対する I27 の IC_{50} 値は、それぞれ 36.1 μM 及び>50 μM であった。CYH33 及び I27 はいずれも、OAT1、OAT3、OCT2 の基質ではなかった。CYH33 はこれらのトランスポーターに対して阻害作用を示さなかったが、I27 は OAT3 に対して弱い阻害作用（IC_{50} >100 μM）を示し、OAT1 及び OCT2 に対しては阻害作用を示さなかった。CYH33 及び I27 はいずれも OATP1B1/3、MATE1/2-K の基質ではなかったが、CYH33 及び I27 はいずれもこれらのトランスポーターの阻害剤であり、IC_{50} は 0.92～40 μM であった。一方、臨床推奨用量（リソバリシブメシル酸塩 40 mg、1 日 1 回）では、CYH33 及び I27 による P-gp、BCRP、OATP1B1/3 及び MATE1/2-K の阻害による薬物間相互作用の可能性は低かった。本項で参照する試験を表 2.6.4-1 に示す。

表 2.6.4-1. CYH33 の非臨床薬物動態及び代謝試験の一覧

Content of Study	Method of Administration	Species (Sex)	Dose・Concentration	Report No. (CTD No.)
Analytical Method and Validation				
Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in SD Rat Plasma Bioanalytic Method Validation Report (Amendment) (Non-GLP)	-	Sprague-Dawley rat	CYH33: 2.10‐1050 ng/mL I27: 0.200-200 ng/mL	15[redacted]018 (M4.2.2.1-1)
Validation of an HPLC-MS/MS Methodology for the Determination of CYH33 and I27 in Beagle Dog Plasma Bioanalytical Method Validation Report (Amendment) (Non-GLP)	-	Beagle dog	CYH33: 2.10-1050 ng/mL I27: 0.200-200 ng/mL	16[redacted]003 (M4.2.2.1-2)
Method Validation for Determination of the Concentration of CYH33 in Extracellular Solution by LC-MS/MS (GLP)	-	-	CYH33: 0.3- 60 µmol/L	19063-19037 (M4.2.2.1-3)
Validation of an HPLC Method for CYH33 and Evaluation of Formulation Homogeneity and Stability (GLP)	-	-	CYH33: 5- 100 µg/mL	CYH33-V001 (M4.2.2.1-4)
Partial Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in SD Rat Plasma (Na Heparin) (GLP)	-	Sprague-Dawley rat	CYH33: 2.00-1000 ng/mL I27: 0.200-200 ng/mL	20[redacted]04[redacted] (M4.2.2.1-5)

Content of Study	Method of Administration	Species (Sex)	Dose・Concentration	Report No. (CTD No.)
Partial Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in Beagle Dog Plasma (Na Heparin) (GLP)	-	Beagle dog	CYH33: 0.200-200 ng/mL I27: 0.200-200 ng/mL	20[redacted]03[redacted] (M4.2.2.1-6)
Method Validation of an LC-MS/MS method for the determination of CYH33, I27 in BN Rat heparin sodium plasma (GLP)	-	Brown Norway rat	CYH33: 2-2000 ng/mL I27: 1-1000 ng/mL	[redacted]23066[redacted]01 (M4.2.2.1-7)
Absorption				
Single and 7-day Administration (Non-GLP)	PO and IV	Sprague-Dawley rat (male/female)	Single IV: 1 mg/kg Single PO: 1, 3, and 12 mg/kg 7-day repeat PO daily dose: 3 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
Pharmacokinetic Study after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague-Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/100 μCi/kg (dose levels were calculated by Risovalisib)	[redacted]00952 (M4.2.2.2-2)
Single and 7-day Administration (Non-GLP)	PO and IV	Beagle dog (male/female)	Group A Single IV: 0.05 mg/kg Single PO: 0.05 and 0.2 mg/kg Group B Single PO: 0.1 mg/kg	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)

Content of Study	Method of Administration	Species (Sex)	Dose・Concentration	Report No. (CTD No.)
			7-day repeat PO daily dose: 0.1 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	
Intestinal Mucosal Permeation in Caco-2 Cells(Non-GLP)	*In vitro*	Human Caca-2 cell	2, 10 and 50 μM	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
Distribution				
Plasma Protein Binding Across Species (Non-GLP)	*In vitro*	Rat, dog, human plasma	Rat and human plasma: 40, 100, and 400 ng/mL Dog plasma: 10, 20, and 50 ng/mL	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
Tissue Distribution after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
Tissue Distribution after Single Administration (Non-GLP)	PO	Long-Evans rat (male)	Single PO: 3 mg/100 μCi/kg (dose levels were calculated by Risovalisib)	[redacted]00998 (M4.2.2.3-1)
Metabolism				
Metabolic Stability in Liver Microsomes (Non-GLP)	*In vitro*	Mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsome	3 μM	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
Hepatic Metabolism (Non-GLP)	*In vitro*	Mouse, rat, dog, monkey, and human hepatocyte	3 μM	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)

Content of Study	Method of Administration	Species (Sex)	Dose・Concentration	Report No. (CTD No.)
Enzyme Identification for Amide-Hydrolyzation (Non-GLP)	*In vitro*	Dog liver and intestinal homogenate	3 μM	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
In Vitro Metabolic Profiles in Human Liver Microsomes and CYP450 Phenotyping of I27 (Non-GLP)	*In vitro*	Human liver microsome Recombinant human CYP enzyme	3 μM	[redacted]-I27-MetID-EP (M4.2.2.4-2)
Metabolites Identification after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague Dawley rat (male/female), and Beagle Dog (male/female) samples from absorption and excretion studies	Rat: single PO: 3 mg/kg Dog: single PO: 0.1 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
Metabolites Identification after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/100 μCi/kg (dose levels were calculated by Risovalisib)	[redacted]01053 (M4.2.2.4-1)
Excretion				
Single-Dose Excretion in Feces and Urine (Non-GLP)	PO	Sprague Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/kg (dose levels were calculated by Risovalisib Mesilate Hydrate)	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
Pharmacokinetic Study after Single Administration (Non-GLP)	PO	Sprague-Dawley rat (male/female)	Single PO: 3 mg/100 μCi/kg (dose levels were calculated by Risovalisib)	[redacted]00952 (M4.2.2.2-2)

Content of Study	Method of Administration	Species (Sex)	Dose・Concentration	Report No. (CTD No.)
Pharmacokinetic Drug Interactions				
Induction potentials of CYH33 and I27 on CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 (Non-GLP)	*In vitro*	Human primary hepatocyte	0.1-10 μM	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-EID (M4.2.2.6-1)
EC_{50} and E_{max} Determination for CYP2B6/CYP3A4 Induction by CYH33 and I27(Non-GLP)	*In vitro*	Human primary hepatocyte	0.1-10 μM	[redacted]-S2308-07-1 (M4.2.2.6-2)
Induction potentials of CYH33 and I27 on the mRNA expression of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 (Non-GLP)	*In vitro*	Human primary hepatocyte	CYH33: 0.01-20 μM I27: 0.01-10 μM	[redacted]-S2510-01-1 (M4.2.2.6-7)
CYP450 Enzyme Inhibition (Non-GLP)	*In vitro*	Human liver microsome	0.1-100 μM	CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)
CYP450 Enzyme Time-Dependent Inhibition (Non-GLP)	*In vitro*	Human liver microsome	0.1-100 μM	[redacted]-CYH33-2019-ADME-DDI-EI (M4.2.2.6-3)
Potential as Substrates and Inhibitors of P-gp and BCRP (Non-GLP)	*In vitro*	MDCK cell model	Substrate studies: 10 μM Inhibition studies: CYH33: 10 and 40 μM, I27: 10 μM and 100 μM	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-ETP (M4.2.2.6-4)
Determination of IC_{50} in MDR1 and BCRP Inhibition Test (Non-GLP)	*In vitro*	Human MDR1 and BCRP vesicles	CYH33: 0.016-10 μM I27: 0.08-50 μM	[redacted]-S2210-20-1 (M4.2.2.6-5)

Content of Study	Method of Administration	Species (Sex)	Dose・Concentration	Report No. (CTD No.)
Potential as Substrates and Inhibitors of OATP1B1, OATP1B3, MATE1 and MATE2-K (Non-GLP)	*In vitro*	HEK293 cell	Substrate studies: 1 and 10 µM Inhibition studies: CYH33: 0.3-40 µM and I27: 0.3-100 µM	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-UTP (M4.2.2.6-6)
Potential as Substrates and Inhibitors of Renal Major SLC Transporters (Non-GLP)	*In vitro*	HEK293 cell	Substrate studies: 0.1, 1 and 10 µM Inhibition studies: CYH33: 0.1-40 µM and I27: 0.1-100 µM	[redacted]-CYH33-2025-*In vitro*-DDI-UTP (M4.2.2.6-8)

IV = intravenous, F = female, M = male, PO = oral, '-' : Not applicable, HEK : Human Embryonic Kidney cells, MDCK : Madin-Darby Canine Kidney cells

各試験の所見を含む PK 試験の概要表を[M2.6.5]に示す。

2.6.4.2 分析法

PK 試験及び GLP 反復投与毒性試験では、バリデートされた HPLC-MS/MS 法を用いて CYH33 及び I27 の血漿中濃度を測定した（CTD 記載箇所：ラット：15[redacted]018 (M4.2.2.1-1)、イヌ：16[redacted]003 (M4.2.2.1-2)）。バリデーション法には、イオン化法として ESI を用いた MRM モードでの HPLC-MS/MS による蛋白質沈殿及び希釈試料残留物の分析が含まれた。本アッセイでは、試料分析工程に従い、感度、選択性、回収率、マトリックス効果、ロット内及びロット間の真度及び精度、CYH33 及び I27 の安定性を測定した。したがって、SD ラットでは、30 µL のラット血漿試料を使用し、CYH33 については 2.10 ng/mL（LLOQ）から 1050 ng/mL（ULOQ）、I27 については 0.200 ng/mL（LLOQ）から 200 ng/mL（ULOQ）の範囲の血漿中 CYH33 及び I27 の日常的分析に適していることが示された。イヌでは、30 µL のイヌ試料血漿を用いて、0.210 ng/mL（LLOQ）から 210 ng/mL の範囲の CYH33 及び 0.200 ng/mL（LLOQ）から 200 ng/mL（ULOQ）の範囲の I27 の日常的分析に適していることが示された。ULOQ 濃度を超える両動物種の血漿試料の 10 倍希釈手順はバリデートされている。

分析法移転及び内標準物質置換のため、SD ラット／ビーグル犬を用いた 26 週間／39 週間反復経口投与毒性試験の血漿中 CYH33 及び I27 濃度測定のため、HPLC-MS/MS 法の部分バリデーションが実施された（CTD 記載箇所：ラット：20[redacted]04[redacted] (M4.2.2.1-5)、イヌ：20[redacted]03[redacted] (M4.2.2.1-6)）。本アッセイでは、感度、選択性、キャリーオーバー評価、溶血評価、バッチサイズの決定、バッチ内及びバッチ間の真度及び精度、並びに全血安定性、マトリックス抽出における CYH33 及び I27 のベンチトップ安定性などを測定した。結果として、本方法は、CYH33/I27 については 2.00/0.200 ng/mL（LLOQ）から 1000/200 ng/mL（ULOQ）の線形範囲において、SD ラット血漿中の CYH33 及び I27 の日常的分析に適していることが示された。イヌについては、本法は、0.200/0.200 ng/mL（I）から 200/200 ng/mL（ULOQ）の線形範囲において、ビーグル犬血漿中の CYH33 及び I27 の日常的分析に適していることが示された。この方法は CYH33 及び I27 分析に特異的かつ選択的であった。CYH33 及び I27、並びに CYH33-D8 及び I27-D8 の内標準物質（IS）の分析において有意なシステムキャリーオーバーはなかった。

[M2.6.2]の安全性薬理試験の項における hERG アッセイの分析を裏付けるため、0.3～60 µmol/L の線形範囲においてバリデートされた LC-MS-MS 法を用いて細胞外液中の CYH33 濃度を測定した（CTD 記載箇所：19063-19037 (M4.2.2.1-3)）。

1% HPMC 溶液及び DMSO 溶液中の CYH33 の均一性及び安定性を分析する HPLC 法は、反復経口投与毒性試験においてバリデートされ、問題なく評価された（CTD 記載箇所：CYH33-V001 (M4.2.2.1-4)）。

BN ラットを用いた経口強制投与による CYH33 の光毒性試験のための分析を裏付けるため、BN ラットの血漿試料中の CYH33 及び I27 の濃度を、CYH33 については 2.0 ng/mL（LLOQ）から 2000 ng/mL（ULOQ）の線形範囲、I27 については 1.0 ng/mL（LLOQ）から 1000 ng/mL

（ULOQ）線形範囲についてバリデートされた LC-MS-MS 法により測定した（CTD 記載箇所：[redacted]23066[redacted]01 (M4.2.2.1-7)）。

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 SD ラットを用いた CYH33 及び I27 の薬物動態試験

1 mg/kg を静脈内投与後、雌ラットにおける CYH33 の曝露量は雄ラットよりもはるかに高く（AUC 比 7.2）、これは雄ラットの血漿クリアランス（CL）（34.0 mL/min/kg）が雌ラット（4.83 mL/min/kg）よりもはるかに高値であったことと一致した。定常状態における分布容積（V_{ss}）は 1.96 L/kg であり、組織において広範に分布することが示された（表 2.6.4-2）。アミド加水分解代謝産物 I27 の血漿中曝露量は、雄ラットでは未変化体の約 1.79%、雌ラットでは約 13.5%であった。（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）

表 2.6.4-2. ラットへの CYH33 1 mg/kg の単回静脈内注射後の PK パラメータ（n=3）

PK Parameters	Unit	CYH33		I27	
		Male	Female	Male	Female
T_{max}	(h)	N.A.	N.A.	0.58 ± 0.38	4.0 ± 0.0
C_{max}	(ng/mL)	N.A.	N.A.	2.95 ± 0.98	21.3 ± 5.77
AUC_{0-t}	(ng·h/mL)	365 ± 56.0	2640 ± 668	6.80 ± 3.82	342 ± 50
$AUC_{0-\infty}$	(ng·h/mL)	366 ± 56.1	2647 ± 673	7.16 ± 4.11	347 ± 48.5
$MRT_{0-\infty}$	(h)	1.00 ± 0.21	6.84 ± 1.24	1.73 ± 0.47	12 ± 2.56
$t_{1/2}$	(h)	1.21 ± 0.37	6.19 ± 1.84	1.21 ± 0.3	7.72 ± 1.78
CL	(mL/min/kg)	34.0 ± 4.88	4.83 ± 1.18	N.A.	N.A.
V_{ss}	(L/kg)	1.99 ± 0.13	1.93 ± 0.16	N.A.	N.A.
R*	(%)	N.A.	N.A.	1.79 ± 0.75	13.5 ± 3.81

R: ratio of metabolite AUC_{0-t} to parent AUC_{0-t}. NA: not applicable

雄ラットへの 1、3、12 mg/kg の CYH33 の単回経口投与後、最高血中濃度到達時間（T_{max}）の平均値は 2.9 時間、血漿中消失半減期（$t_{1/2}$）は 1.33～4.54 時間であった。I27 の T_{max} は未変化体と一致し、血漿中曝露量は未変化体の約 2.2%であり、静脈内投与群に近い値であった。1～12 mg/kg の用量範囲では、CYH33 の C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加率は用量増加率よりわずかに低かった。I27 の C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加率は用量の増加率より低かった（表 2.6.4-3）。

表 2.6.4-3. 雄ラットへの異なる用量の CYH33 の経口投与後の未変化体及び代謝産物の薬物動態パラメータ（n=3）

Analyte	Dose (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	$MRT_{0-\infty}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	R* (%)
CYH33	1	2.0 ± 0.0	20.3 ± 3.56	68.8 ± 20.2	69.5 ± 20.5	2.95 ± 0.28	1.33 ± 0.06	N.A.
	3	3.3 ± 2.3	53.3 ± 26.4	303 ± 147	316 ± 149	6.74 ± 4.82	3.48 ± 2.54	N.A.
	12	3.3 ± 2.3	137 ± 59.5	835 ± 812	884 ± 895	5.53 ± 4.39	4.54 ± 1.13	N.A.
	3_D7	1.7 ± 0.6	45.8 ± 8.21	178 ± 41.6	181 ± 41.9	/	1.37 ± 0.14	N.A.
I27	1	2.0 ± 0.0	0.642 ± 0.22	1.99 ± 1.21	N.A.	N.A.	N.A.	2.77 ± 0.99
	3	3.3 ± 2.3	1.31 ± 0.85	6.48 ± 5.54	7.15 ± 5.89	5.29 ± 2.4	1.96 ± 0.48	2.07 ± 0.99
	12	3.3 ± 2.3	3.09 ± 2.55	17.4 ± 21.2	24.1 ± 27.0	5.86 ± 3.58	2.81 ± 1.66	1.76 ± 0.63
	3_D7	2 ± 0	1.35 ± 0.211	5.2 ± 0.867	5.67 ± 0.728	/	1.89 ± 0.40	3.01 ± 0.67

R: ratio of metabolite AUC_{0-t} to parent AUC_{0-t}.

雌ラットへの 1、3 及び 6 mg/kg の単回経口投与後、CYH33 の T_{max} は 3.6 時間、$t_{1/2}$ は 6.7 時間であった。I27 の T_{max} は 5.6 時間であり、未変化体の T_{max} よりも長く、I27 の血漿中曝露量は CYH33 の約 15.6%であり、静脈内投与群に近い値であった（表 2.6.4-4）。同一用量において、雌ラットの CYH33 及び I27 の曝露量（AUC）は、雄ラットのそれぞれ約 12 倍及び 66 倍であった。1～6 mg/kg の用量範囲では、CYH33 の C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加率は用量増加率よりもわずかに低いか、用量増加率とほぼ同じであり、I27 の C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加率は用量増加率よりも低かった。

表 2.6.4-4. 雌ラットへの異なる用量の CYH33 の胃内投与後の未変化体及び代謝産物の薬物動態パラメータ（n=3）

Analyte	Dose (mg/kg)	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	$MRT_{0-\infty}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	R (%)
CYH33	1	3.3 ± 1.2	123 ± 85.5	1410 ± 1020	1420 ± 1000	8.81 ± 0.64	6.17 ± 1.08	N.A.
	3	2.7 ± 1.2	313 ± 74.8	3710 ± 1140	3710 ± 1140	9.1 ± 1.08	6.9 ± 0.44	N.A.
	6	4.7 ± 1.2	438 ± 122	5860 ± 1600	5860 ± 1610	10.2 ± 1.02	7.03 ± 0.12	N.A.
	3_D7	3.3 ± 1.2	422 ± 109	6300 ± 3040	6310 ± 3030	/	6.52 ± 0.59	N.A.
I27	1	4.7 ± 1.2	14.2 ± 9.87	258 ± 173	262 ± 172	13.7 ± 1.13	7.92 ± 1.6	19.3 ± 3.2
	3	4.7 ± 1.2	24.7 ± 8.58	429 ± 126	432 ± 126	12.8 ± 1.04	7.19 ± 0.87	12.2 ± 4.9
	6	7.3 ± 1.2	41.4 ± 15.1	840 ± 289	845 ± 292	14.7 ± 0.35	8.75 ± 0.44	15.4 ± 8.3
	3_D7	5.3 ± 4.2	50.4 ± 15.2	1120 ± 500	1120 ± 502	/	8.11 ± 0.12	19.1 ± 6

R: ratio of metabolite AUC_{0-t} to parent AUC_{0-t}.

雄ラットにおいて、CYH33 3 mg/kg の 1 日 1 回 7 日間連日経口投与後の CYH33 の C_{max} 及び AUC_{0-t} は、CYH33 3 mg/kg を単回経口投与したときの CYH33 の C_{max} 及び AUC_{0-t} のそれぞれ 0.86 倍及び 0.59 倍であった。同様に、7 日間連日投与後の I27 の C_{max} 及び AUC_{0-t} は、単回投与後のそれぞれ 1.03 倍及び 0.80 倍であった。蓄積性は認められなかった。一方、雌ラットでは、単回経口投与と比較して、CYH33 の C_{max} は 35%、AUC_{0-t} は 70%増加し、I27 の 2 つのパラメータは 1 日 1 回 7 日間の経口投与後にそれぞれ 104%、161%増加した。これは、雌ラットでは I27 の $t_{1/2}$ が比較的長いことに起因すると考えられた（表 2.6.4-3 及び表 2.6.4-4）。平均 $AUC_{0-\infty}$から算出した CYH33 1 mg/kg の単回経口投与後の絶対 バイオアベイラビリティ（F%）は雄ラットでは 19%、雌ラットでは 53.7%であった。

2.6.4.3.2 JVC ラットにおける［^{14}C］CYH33 の薬物動態試験

JVC ラットへの 3 mg/100 µCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後の血液中及び血漿中の平均総放射能（TRA）の時間曲線を図 2.6.4-1 に示す。血中及び血漿中の推定薬物動態パラメータを表 2.6.4-5 に要約した。（CTD 記載箇所：[redacted]00952 (M4.2.2.2-2)）

血液

単回経口投与後において、血中 TRA は投与後 0.500 時間及び 0.667 時間で最高値に達し、平均最高血中濃度（C_{max}）は、雄ラットでは 567 ng Eq./mL、雌ラットでは 804 ng Eq./mL であり、経時的に徐々に消失した。血中 TRA は雄ラットでは 10 時間まで、雌ラットでは 24 時間まで測定可能であった。血中 TRA の平均 AUC_{0-t} 値は 1843 h·ng Eq./mL（雄）及び 9416 h·ng Eq./mL（雌）であり、MRT_{0-t} の平均値は 3.08 時間（雄）及び 7.99 時間（雌）であり、$t_{1/2}$ の平均値は 3.14 時間（雄）及び 8.62 時間（雌）と推定された。

血漿

単回経口投与後、血漿中 TRA は投与後 0.500 時間で最高値に達し、平均 C_{max} は 724 ng Eq./mL（雄）及び 1106 ng Eq./mL（雌）であった。雌ラットにおける血漿中 TRA の消失は、雄ラットより緩徐であり、投与後 24 時間において濃度は 10.8 ng Eq./mL（雄）及び 174 ng Eq./mL（雌）であり、雄ラットの C_{max} の 1.49%、雌ラットの C_{max} の 15.7%を占めた。雌ラットの血漿中 TRA は 72 時間後まで測定可能であり、平均濃度は 5.79 ng Eq./mL ではあったが、雄ラットでは投与 72 時間後に定量下限未満となった。血漿中 TRA の AUC_{0-t} の平均値は 2784 h·ng Eq./mL（雄）及び 15879 h·ng Eq./mL（雌）、MRT_{0-t} の平均値は 4.59 時間（雄）及び 11.2 時間（雌）、$t_{1/2}$ の平均値は 5.72 時間（雄）及び 9.11 時間（雌）であった。

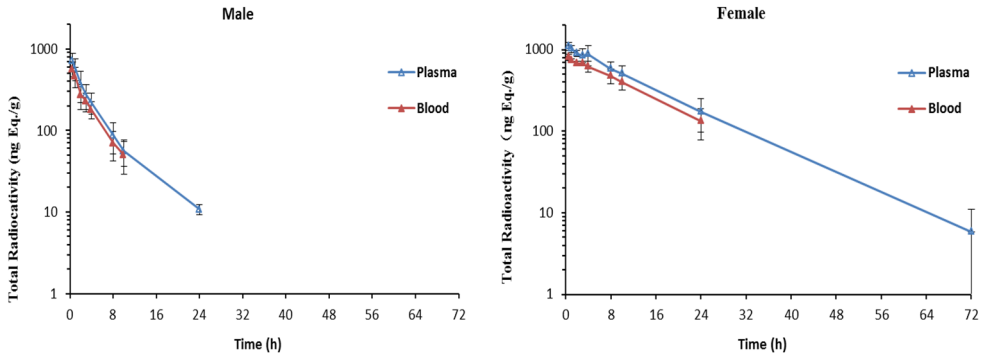


図 2.6.4-1. SD ラットへの 3 mg/100 µCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後における血中及び血漿中総放射能（ng Eq./g）の平均濃度（±標準偏差）- 時間曲線（n=6、雌雄比=1：1）

表 2.6.4-5. SD ラットへの 3 mg/100 µCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後における血中及び血漿中の TRA の薬物動態パラメータ（平均±標準偏差）

PK		Blood			Plasma		
Parameters	Unit	Female (n=3)	Male (n=3)	Female vs. Male	Female (n=3)	Male (n=3)	Female vs. Male
T_{max}	h	0.667±0.289	0.500±0.00	1.33	0.500±0.00	0.500±0.00	1
C_{max}[a]	ng Eq./ml	804±69.5	567±116	1.42	1106±118	724±152	1.53
AUC_{0-t}[a]	h·ng Eq./ml	9416±1629	1843±513	5.11	15879±5899	2784±888	5.7
$AUC_{0-\infty}$	h·ng Eq./ml	11159±2543	2084±653	5.35	16243±5504	2872±889	5.66
MRT_{0-t}	h	7.99±0.693	3.08±0.105	2.59	11.2±3.59	4.59±0.0874	2.44
$t_{½}$	h	8.62±1.68	3.14±0.498	2.75	9.11±2.00	5.72±0.731	1.59

[a] For the total radioactivity, units of C_{max} and AUC are ng Eq/ mL and h·ng Eq / mL respectively, where density of plasma or blood assumed to be 1 (g/mL).

総放射能の血液/血漿比

雌雄 SD ラットへの 3 mg/100 µCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後において、全採血時点における血液／血漿比の平均値は 0.89 以下であり、CYH33 及び／又はその代謝産物は血球と結合しないことが示された。

2.6.4.3.3 ビーグル犬における CYH33 及び I27 の薬物動態

イヌへの CYH33 の単回静脈内ボーラス投与後において、CYH33 の CL は低かった（6.75 mL/min/kg）。V_{ss} は 1.86 L/kg であり、総体液量 0.6 L/kg を上回った（Davies B et al. 1993）。代謝産物である I27 の AUC_{0-t} は未変化体の約 1.3 倍であった（表 2.6.4-6）。（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）

表 2.6.4-6. イヌへの CYH33 の単回静脈内投与後の薬物動態パラメータ（n=6、雌雄比=1：1）

Parameter (unit)	CYH33			I27		
	Male	Female	Mean	Male	Female	Mean
T_{max} （h）	N.A.	N.A.	N.A.	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0
C_{max} （ng/mL）	N.A.	N.A.	N.A.	6.26 ± 0.61	4.11 ± 1.24	5.18 ± 1.47
AUC_{0-t} （ng·h/mL）	91.2 ± 2.37	83.4 ± 2.78	87.3 ± 4.9	144 ± 2.65	83.8 ± 40	114 ± 41.5
$AUC_{0-\infty}$ （ng·h/mL）	94.3 ± 1.14	87.3 ± 3.73	90.8 ± 4.5	147 ± 2.89	85.7 ± 40.4	117 ± 42.4
$MRT_{0-\infty}$ （h）	4.86 ± 0.86	4.35 ± 0.56	4.61 ± 0.7	19.3 ± 1.15	14.6 ± 4.01	17.0 ± 3.67
$t_{1/2}$ （h）	4.17 ± 1.31	3.25 ± 0.42	3.71 ± 1.01	13.7 ± 1.18	8.65 ± 3.11	11.2 ± 3.48
CL （mL/min/kg）	6.49 ± 0.08	7.01 ± 0.29	6.75 ± 0.34	N.A.	N.A.	N.A.
V_{ss} （L/kg）	1.89 ± 0.31	1.84 ± 0.29	1.86 ± 0.27	N.A.	N.A.	N.A.
R* （%）	N.A.	N.A.	N.A.	158 ± 1.5	102 ± 51	130 ± 45

R: ratio of metabolite AUC_{0-t} to parent AUC_{0-t}.

単回経口投与後の T_{max} は 2 時間であった。イヌにおいては未変化体の曝露量に関して有意な性差は認められなかった。CYH33 の $t_{1/2}$ は 5.1 時間であった（表 2.6.4-7）。I27 の T_{max} は 4.4 時間であり、CYH33 よりも長かった。I27 の C_{max} は CYH33 の約 60%、I27 の血漿中曝露量は未変化体の約 1.4～1.8 倍であり、I27 の $t_{1/2}$ が 10.3 時間と長いことに起因すると考えられた（表 2.6.4-8）。0.05～0.2 mg/kg の CYH33 の用量範囲内では、未変化体の C_{max} 及び AUC_{0-t} は用量比例的に増加したが、I27 の C_{max} の用量比例的な増加は用量の増加率をわずかに下回り、I27 の AUC_{0-t} は用量比例的に増加した。0.1 mg/kg の CYH33 の 1 日 1 回 7 日間反復投与後の第 7 日目における CYH33 の C_{max} 及び AUC_{0-t} は、単回投与後のそれぞれ 0.88 倍及び 0.85 倍であった。I27 の C_{max} 及び AUC_{0-t} は単回投与後のそれぞれ 0.84 倍及び 0.95 倍であった。したがって、これらの結果から、反復胃内投与後のイヌにおける CYH33 及び I27 の有意な蓄積は示されなかった。イヌへの 0.05 mg/kg の単回胃内投与後の平均絶対バイオアベイラビリティ（F%）は 70.9%であった。

表 2.6.4-7. イヌへの異なる用量の経口投与後の CYH33 の薬物動態（n=6、雌／雄比=1：1）

Dose (mg/kg)	Sex	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	$MRT_{0-\infty}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)
0.05	Male	2.0 ± 0.0	9.05 ± 1.84	58.7 ± 5.59	62.1 ± 4.17	6.55 ± 1.06	4.52 ± 1.05
	Female	2.0 ± 0.0	8.02 ± 1.45	59.7 ± 8.26	61.3 ± 8.25	6.55 ± 0.35	4.63 ± 0.43
	Mean	2.0 ± 0.0	8.53 ± 1.57	59.2 ± 6.33	61.7 ± 5.87	6.55 ± 0.71	4.58 ± 0.72
0.1	Male	1.33 ± 0.58	15.3 ± 1.72	105 ± 14.6	110 ± 15	7.06 ± 0.65	5.59 ± 0.92
	Female	2.67 ± 1.15	13.5 ± 1.22	106 ± 27.8	113 ± 34.1	7.73 ± 1.63	5.81 ± 1.2
	Mean	2.0 ± 1.1	14.4 ± 1.66	106 ± 20	111 ± 23.6	7.39 ± 1.17	5.7 ± 0.97
0.2	Male	2.0 ± 0.0	30.4 ± 5.64	202 ± 45.2	211 ± 46.2	7.13 ± 0.35	5.69 ± 0.84

Dose (mg/kg)	Sex	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	$MRT_{0-\infty}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)
	Female	2.0 ± 0.0	25.1 ± 8.6	172 ± 59.7	176 ± 60.2	6.17 ± 0.44	4.36 ± 0.5
	Mean	2.0 ± 0.0	27.7 ± 7.12	187 ± 50.3	193 ± 51.8	6.65 ± 0.63	5.02 ± 0.96
0.1_D7	Male	2.0 ± 0.0	12.2 ± 3.15	90.9 ± 17.3	95.5 ± 15.5	/	5.48 ± 1.14
	Female	1.67 ± 0.58	13.2 ± 1.25	88.3 ± 15.9	93.8 ± 15	/	4.85 ± 1.59
	Mean	1.83 ± 0.41	12.7 ± 2.23	89.6 ± 14.9	94.5 ± 13.5	/	5.16 ± 1.29

表 2.6.4-8. イヌへの異なる用量の CYH33 の経口投与後の代謝産物 I27 の薬物動態（n=6、雌雄比=1：1）

Dose (mg/kg)	Sex	T_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC_{0-t} (ng·h/mL)	$AUC_{0-\infty}$ (ng·h/mL)	$MRT_{0-\infty}$ (h)	$t_{1/2}$ (h)	R* (%)
0.05	Male	4.0 ± 0.0	6.28 ± 0.61	137 ± 5.77	140 ± 5.51	18.6 ± 0.9	11.8 ± 0.52	236 ± 28
	Female	4.0 ± 0.0	4.37 ± 1.96	77.3 ± 45.2	82.1 ± 47.8	14.7 ± 3.68	9.15 ± 2.81	124 ± 64
	Mean	4.0 ± 0.0	5.32 ± 1.67	107 ± 43.6	111 ± 43.6	16.7 ± 3.22	10.5 ± 2.33	180 ± 75
0.1	Male	4.0 ± 0.0	8.91 ± 1.64	171 ± 55	175 ± 58.5	16.8 ± 4.22	11.3 ± 4.03	163 ± 45
	Female	4.0 ± 0.0	7.75 ± 2.31	126 ± 53.5	131 ± 49.4	14.4 ± 3.38	8.88 ± 2.29	115 ± 28
	Mean	4.0 ± 0.0	8.32 ± 1.89	148 ± 54.6	153 ± 54	15.6 ± 3.64	10.1 ± 3.2	139 ± 42
0.2	Male	5.3 ± 2.3	17.6 ± 3.59	465 ± 89.7	473 ± 90.6	20.1 ± 0.55	11.7 ± 0.85	231 ± 8.1
	Female	5.3 ± 2.3	13.1 ± 7.9	261 ± 207	266 ± 207	15.8 ± 4.71	9.22 ± 3.0	139 ± 67
	Mean	5.3 ± 2.1	15.4 ± 6.02	363 ± 181	370 ± 182	17.9 ± 3.81	10.5 ± 2.4	185 ± 66
0.1_D7	Male	4.0 ± 0.0	7.67 ± 2.74	175 ± 76.3	179 ± 78.7	/	11.0 ± 3.29	192 ± 74
	Female	4.0 ± 0.0	6.33 ± 0.64	106 ± 33.5	110 ± 29.2	/	8.83 ± 1.99	118 ± 19
	Mean	4.0 ± 0.0	6.99 ± 1.91	140 ± 64.8	144 ± 65	/	9.92 ± 2.7	155 ± 63

R: ratio of metabolite AUC_{0-t} to parent AUC_{0-t}.

2.6.4.3.4 Caco-2 細胞透過性試験

Caco-2 細胞を用いて、CYH33 の双方向透過性及び吸収機序を検討した（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）。HBSS（0.5% BSA 添加 HBSS）における被験物質の頂端膜側から基底膜側（A-B）及び基底膜側から頂端膜側（B-A）への輸送を 2、10、及び 50 μM の濃度で Caco-2 細胞単層膜において測定した。培養は 37ºC で 120 分間行い、ジゴキシン、アテノロール、プロプラノロールを対照として試験系の機能を確認した。培養開始時及び終了時にドナー及びレシーバーコンパートメントの培養培地中の陽性基質濃度を測定するため、被験物質及び対照化合物の透過率を UPLC-MS/MS で測定した。濃度データを用いて、A-B 及び B-A から見かけの膜透過係数（P_{app}）を算出し、その後、P_{app}（流出）比を算出した。

2、10 及び 50 μM の CYH33 の P_{app}（A-B）は 4.24×10^{-6} cm/s、7.76×10^{-6} cm/s 及び 5.40×10^{-6} cm/s であり、流出比は 6.31、2.25 及び 1.52 であった。これらの結果から、CYH33 は中等度の透過性

を示し、流出トランスポーターの基質である可能性が示された。10～50 μM の CYH33 では、P_{app} 比が試験化合物濃度の上昇に伴って有意に低下したことから、トランスポーターの飽和又は阻害が生じ、P_{app} 比が低下した可能性が示された（表 2.6.4-9）。

表 2.6.4-9. アテノロール、プロプラノロール、ジゴキシン及び CYH33 の透過性

Compound	Papp（10^{-6}cm/s）						Papp ration
	A→B			B→A			
Atenolol	0.30	±	0.10	1.33	±	0.04	4.43
Propranolol	9.37	±	0.32	13.9	±	0.71	1.48
Digoxin	0.08	±	0.01	10.7	±	0.82	135
CYH33 2.00 μM	4.24	±	0.62	26.8	±	0.73	6.31
CYH33 10.0 μM	7.76	±	0.14	17.5	±	0.91	2.25
CYH33 50.0 μM	5.40	±	0.17	8.23	±	0.43	1.52

2.6.4.4 分布

2.6.4.4.1 *In vitro* 血漿蛋白結合

ラット、イヌ、ヒトにおける *in vitro* 試験において、CYH33 とその代謝産物 I27 の血漿蛋白結合プロファイルを平衡透析法により測定した（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）。CYH33 及び I27 血漿試料を 5% CO_2 存在下において 37℃で 4 時間培養したときの安定性も測定した。ラット及びヒトの血漿蛋白質試料を 40、100 及び 400 ng/mL の CYH33 とともに培養し、イヌの血漿試料を 10、20 及び 50 ng/mL の CYH33 とともに培養した。各濃度につき 3 回試験した。

CYH33 及び I27 の安定性試験の結果は、正常値から±15%以内の変動であり、両化合物は本試験条件下で安定していた。CYH33 の血漿蛋白結合率はラットで 97.5%、イヌで 97.1%、ヒトで 94.9%であり、明らかな濃度依存性は認められなかった。代謝産物 I27 の血漿蛋白結合率はラット、イヌ及びヒトでそれぞれ 83.3%、80.5%及び 79.1%であり、濃度依存性も認められなかった。（表 2.6.4-10）。全体として、検討した動物種のいずれにおいても CYH33 は蛋白結合率の高い分子であった（>90%）。

表 2.6.4-10. CYH33 及び I27 の血漿蛋白結合率（PPB）

Analyte	Rat		Dog		Human	
	Concentration (ng/mL)	PPB (%)	Concentration (ng/mL)	PPB (%)	Concentration (ng/mL)	PPB (%)
CYH33	40.0	97.5	10.0	97.1	40.0	95.0
	100	97.5	20.0	96.9	100	94.7
	400	97.6	50.0	97.1	400	95.0
	Mean value	97.5	Mean value	97.1	Mean value	94.9

Analyte	Rat		Dog		Human	
	Concentration (ng/mL)	PPB (%)	Concentration (ng/mL)	PPB (%)	Concentration (ng/mL)	PPB (%)
I27	40.0	84.1	10.0	80.5	40.0	78.5
	100	82.2	20.0	80.5	100	79.2
	400	83.7	50.0	80.4	400	79.8
	Mean value	83.3	Mean value	80.5	Mean value	79.1

2.6.4.4.2 SD ラットにおける CYH33 及び I27 の組織内分布

ラット（30 匹、雌雄比 1：1）に CYH33 3 mg/kg を単回胃内（経口）投与し、異なる採取時点での組織内及び血漿中の被験物質濃度を測定した（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）（図 2.6.4-2 及び図 2.6.4-3）。

その結果、CYH33 の経口投与後、ほとんどの組織における未変化体濃度は血漿中濃度より高かった。CYH33 は、主に肝臓、副腎、消化管、肺、膵臓、腎臓、脾臓及び卵巣に分布し、血漿中曝露量の 4 倍を超えていた。脳中の曝露量が最も低かった（血漿中曝露量の 20%）。全血中濃度と血漿中濃度の比が約 0.7 であったため、CYH33 は赤血球に分布しなかった。CYH33 は速やかに分布し、投与 1 時間後に最高濃度に達し、雄ラットにおける投与 10 時間後の最高濃度の約 20%であった。投与 72 時間後、採取した組織中において CYH33 は検出されなかった。一方、CYH33 は雌ラットにおいて投与 6 時間後に最大組織中濃度に達し、投与 24 時間後には最大濃度の約 10%となり、投与 72 時間後には最大濃度の 0.5%を下回った。雌ラットの CYH33 の組織内曝露量は雄ラットの約 7～18 倍であった。

また、I27 の分布特性は未変化体と類似していた。I27 は主に肝臓、副腎、消化管、腎臓、肺及び膵臓に分布した。脳中において I27 は検出されなかった。投与 72 時間後には I27 は検出されなかった。I27 の組織内曝露量は、雄及び雌ラットでそれぞれ CYH33 の約 5%以下及び 15%以下であった。

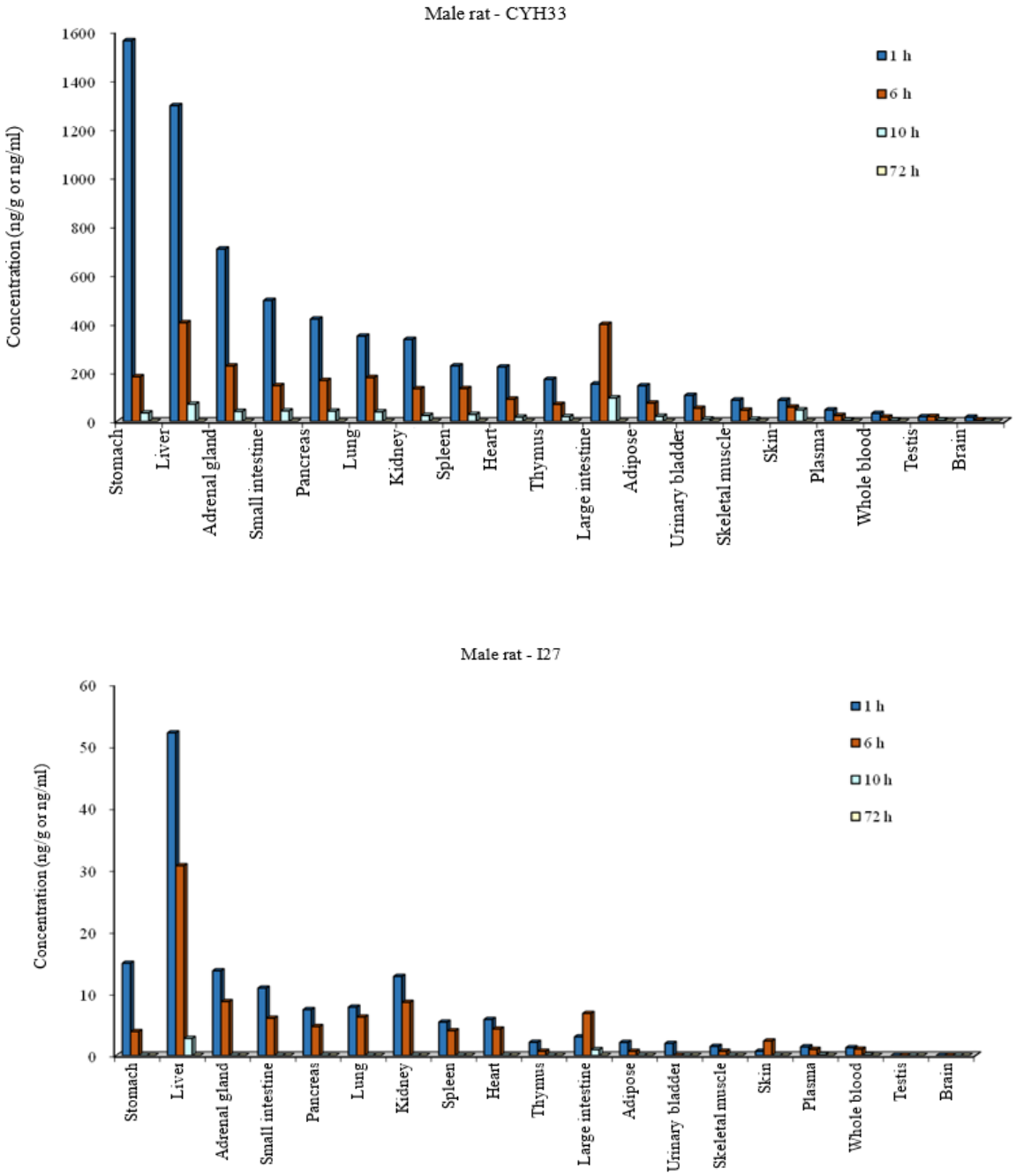


図 2.6.4-2. 雄ラットへの CYH33 3 mg/kg の経口投与後の未変化体及び代謝産物 I27 の組織内分布のヒストグラム

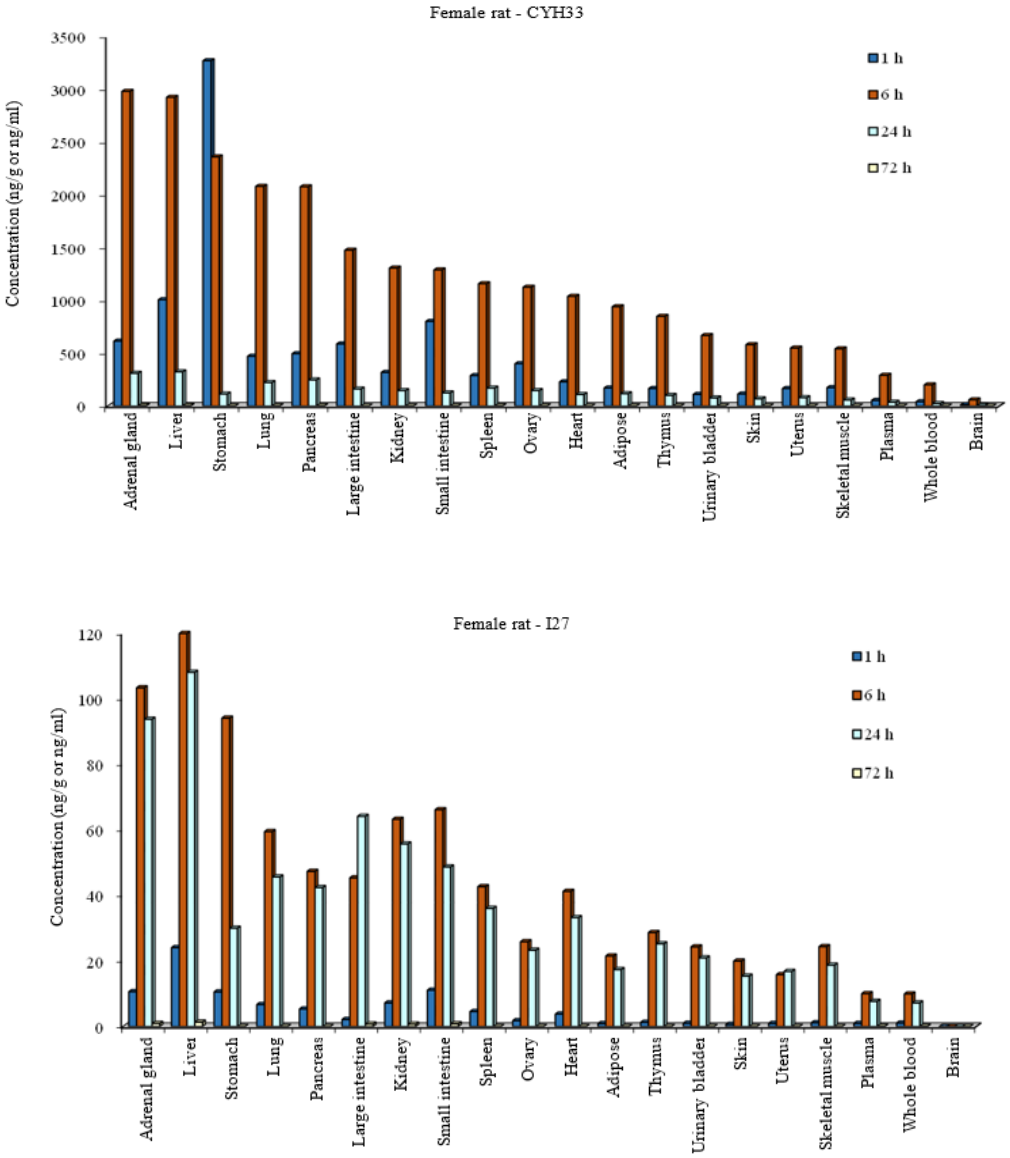


図 2.6.4-3. 雌ラットへの CYH33 3 mg/kg の経口投与後の未変化体及び代謝産物 I27 の組織内分布のヒストグラム

2.6.4.4.3 雄 LE ラットを用いた［^{14}C］CYH33 の組織内分布試験

雄 LE ラットへの 3 mg/100 µCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後において、血漿中の TRA は投与後 4 時間で最大濃度の 345 ng Eq./g に達し、その後ゆっくりと消失した。投与後 168 時間の血漿中 TRA は 0.380 ng Eq./g であり、定量下限（0.338 ng Eq./g）を上回った。投与 840 時間後（最終分析時点）、血漿中の TRA は定量下限未満であった。血漿中 TRA の $AUC_{0\text{-}168\ h}$ は 5019 h·ng Eq./g であった。血中 TRA（心臓）も投与後 4 時間で最高値に達し、C_{max} は 280 ng Eq./g であった。LSC 法で測定した血液中の TRA 値は QWBA 法で測定した値と同様であった。

各時点の血液/血漿比は 0.82 未満であり、CYH33 及び/又はその代謝産物は血球と結合しないことが示された。

投与後 0.5 時間では、TRA は主に胃腸系に分布した。肝臓（5465 ng Eq./g）、ブドウ膜（1592 ng Eq./g）、副腎皮質（1492 ng Eq./g）、副腎（1372 ng Eq./g）においても比較的高い放射能が認められ、それぞれ、血漿（230 ng Eq./g）の 23.8、6.92、6.49 及び 5.97 倍であった。その他の組織の TRA は血漿中の 5 倍未満であった。この時点で、水晶体中の TRA は定量下限未満であった。投与 4 時間後には、大部分の組織の TRA は最高値に達し、大腸壁（30330 ng Eq./g）が最も濃度が高く、次いで、非腺胃壁（25195 ng Eq./g）、ブドウ膜（18288 ng Eq./g）、小腸壁（14144 ng Eq./g）、肝臓（5856 ng Eq./g）、ハーダー腺（3333 ng Eq./g）、眼（3183 ng Eq./g）、有色皮膚（1964 ng Eq./g）であり、それぞれ、血漿（345 ng Eq./g）の 87.9 倍、73.0 倍、53.0 倍、41.0 倍、17.0 倍、9.66 倍、9.23 倍及び 5.69 倍であった。この時点で、血液（心臓）、精巣、鼻甲介、骨、骨髄、水晶体及び脳の TRA は血漿中よりも低かった。また、脳／血漿の TRA 比は 0.13 であり、CYH33 やその代謝産物は容易には血液脳関門を通過できないことが示された。投与 24 時間後では、すべての組織において TRA が減少し、非腺胃壁、食道壁、大動脈、副腎髄質、骨髄、精巣、骨、脊髄、脳では定量下限未満であった。168 時間後においても、ブドウ膜、眼、肝臓、下垂体、眼窩外涙腺、褐色脂肪、リンパ節、脾臓、大腸壁、副腎皮質、前立腺及び副腎における TRA は依然として検出可能であり、この値は同時点における血漿中の値（0.380 ng Eq./g）よりも大幅に高かった。一方、他の組織の TRA は定量下限未満であった。840 時間後、眼（595 ng Eq./g）及びブドウ膜（1865 ng Eq./g）の TRA は依然として検出可能であり、それぞれ、C_{max} の 18.69%及び 10.20%を占めた。定量可能な組織内濃度に基づき、組織／AOI の $t_{1/2}$ を推定した。一部の組織では、終末消失相の時点が限られていたため、$t_{1/2}$ の推定値は参考値とした。$t_{1/2}$ が最も長かったのは眼（675 時間）であり、最も短かったのは小腸壁であった（2.24 時間）。組織内／血漿中 AUC_{0-t} 比の最高値は 841.29（ブドウ膜）であった。

LE ラットへの［^{14}C］CYH33 3 mg/100 µCi/kg の単回経口投与後、多くの放射能が消化管に含まれていた。胃腸排出の影響により、放射能は小腸及び大腸に移行した。小腸内容物及び大腸内容物の TRA は投与後 4 時間で最高値に達した。その後、TRA は胃腸内容物の排泄とともに低下した。840 時間後（最終分析時点）、胃腸内容物の TRA は定量下限未満であった。（表 2.6.4-11、表 2.6.4-12）（CTD 記載箇所：[redacted]00998 (M4.2.2.3-1)）。

表 2.6.4-11. 雄ロングエバンス系ラット（n=5）への［^{14}C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の血液、血漿及び組織中における総放射能（ng Eq./g）

Sort	Matrix	Total Radioactivity (ng Eq./g)				
		0.5 h	**4 h**	**24 h**	**168 h**	**840 h（%C_{max}）**
Vascular	Plasma (LSC)	230	345	5.83	0.38	BLQ1
	Blood (LSC)	189	239	BLQ1	BLQ1	BLQ1
	Aorta	441	853	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Blood (cardiac)	247	280	BLQ2	BLQ2	BLQ2
Central nervous system	Brain	25	46.5	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Spinal cord	27.3	57.7	BLQ2	BLQ2	BLQ2
Ocular	Eye	269	3183	1396	1153	595（18.69）
	Lens	BLQ2	47.4	21.7	BLQ2	BLQ2
	Uveal tract	1592	18288	8318	6607	1865（10.20）
Demal	Non-pigmented skin	182	345	20.4	BLQ2	BLQ2
	Pigmented skin	288	1964	265	BLQ2	BLQ2
Endocrine	Adrenal cortex	1492	1622	29.5	18.6	BLQ2
	Adrenal gland	1372	1414	25.9	17	BLQ2
	Adrenal medulla	631	679	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Pituitary gland	610	955	52	33	BLQ2
	Thyroid gland	628	583	17.4	BLQ2	BLQ2
Fatty	Brown fat	372	390	24.3	22.1	BLQ2
	White fat (inguinal)	163	571	17	BLQ2	BLQ2
Gastrointestinal tract	Esophagus wall	450	1483	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Oral mucosa	453	508	32.4	BLQ2	BLQ2
	Large intestine wall	423	30330	83.8	18.9	BLQ2
	Small intestine wall	12312	14144	28.8	BLQ2	BLQ2
	Stomach wall (glandular)	7447	826	22.7	BLQ2	BLQ2
	Stomach wall (non-glandular)	40210	25195	BLQ2	BLQ2	BLQ2
Lymphatic	Lymph node (cervical)	378	727	31.2	21.8	BLQ2
	Spleen	712	898	33.6	20.5	BLQ2
	Thymus	315	628	16.2	BLQ2	BLQ2
Metabolic/Excretory	Kidney	892	1237	32.4	BLQ2	BLQ2
	Kidney cortex	1051	1483	36.3	BLQ2	BLQ2
	Kidney medulla	745	922	22.4	BLQ2	BLQ2
	Liver	5465	5856	207	70.3	BLQ2
	Urinary bladder wall	250	1177	25	BLQ2	BLQ2
Muscular	Heart	574	760	26.1	BLQ2	BLQ2

Sort	Matrix	Total Radioactivity (ng Eq./g)				
		0.5 h	**4 h**	**24 h**	**168 h**	**840 h（%C_{max}）**
Reproductive	Muscle (femoral)	405	562	17.7	BLQ2	BLQ2
	Prostate	369	429	18.9	18	BLQ2
	Testis	49.5	228	BLQ2	BLQ2	BLQ2
Respiratory	Lung	871	841	19.7	BLQ2	BLQ2
	Nasal turbinates	39.6	179	26.8	BLQ2	BLQ2
	Trachea	259	435	16.1	BLQ2	BLQ2
Secretory	Exorbital lacrymal gland	700	1198	33	25	BLQ2
	Harderian gland	550	3333	49.2	BLQ2	BLQ2
	Pancreas	1102	1384	31.2	BLQ2	BLQ2
	Salivary Gland	628	877	23.4	BLQ2	BLQ2
Skeletal	Bone (femur)	84.1	92.2	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Bone marrow (femur)	483	658	BLQ2	BLQ2	BLQ2
Gastrointestinal tract contents	Large intestine contents	32.7	485225*	958	17.6	BLQ2
	Small intestine contents	63273*	66336*	100	BLQ2	BLQ2
	Stomach contents	39610	16787	BLQ2	BLQ2	BLQ2

BLQ1: Below the limit of quantification of LSC, which means <0.338 ng Eq./g (plasma) or <27.1 ng Eq./g (blood).
BLQ2: Below the limit of quantification of QWBA, which means <15.5 ng Eq./g
QWBA：LLOQ = 0.516 nCi/g ÷ 73926 DPM/μg × 2220 × 1000 = 15.5 ng Eq./g
QWBA：ULOQ = 2040 nCi/g ÷ 73926 DPM/μg × 2220 × 1000 = 61261 ng Eq./g
*: The concentration was higher than the ULOQ.

表 2.6.4-12. 雄ロングエバンス系ラットへの［^{14}C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の血液、血漿及び組織中における総放射能の薬物動態パラメータ

Sort	Matrix	C_{max} (ng Eq./g)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-t} (ng Eq.·h/g)	$AUC_{0-\infty}$ (ng Eq.·h/g)	MRT_{0-t} (h)	Tissue/ Plasma*	r^2	Note
Vascular	Plasma (LSC)	345	4	20.9	5019	5031	6.48	1	0.748	ab
	Blood (LSC)	239	4	NA	796	NA	2.34	0.16	NA	
	Aorta	853	4	NA	2375	NA	2.7	0.47	NA	
	Blood (cardiac)	280	4	NA	984	NA	2.24	0.2	NA	
Central nervous system	Brain	46.5	4	NA	131	NA	2.67	0.03	NA	
	Spinal cord	57.7	4	NA	156	NA	2.77	0.03	NA	
Ocular	Eye	3183	4	675	822754	1402563	304	163.93	0.998	
	Lens	47.4	4	17.7	786	1341	9.52	0.16	1	b
	Uveal tract	18288	4	375	4222440	5231708	236	841.29	0.999	
Dermal	Non-pigmented skin	345	4	4.9	4622	4766	4.61	0.92	1	b
	Pigmented skin	1964	4	6.92	26303	28949	5.94	5.24	1	b
Endocrine	Adrenal cortex	1622	4	37.9	25801	26817	14	5.14	0.444	ab
	Adrenal gland	1414	4	38.5	22706	23650	14.3	4.52	0.437	ab
	Adrenal medulla	679	4	NA	2450	NA	2.2	0.49	NA	
	Pituitary gland	955	4	49.3	19081	21427	28.7	3.8	0.475	ab
	Thyroid gland	628	0.5	4.32	8280	8389	3.89	1.65	0.986	b
Fatty	Brown fat	390	4	61.7	8910	10876	37.5	1.78	0.38	ab
	White fat (inguinal)	571	4	3.94	7205	7302	4.31	1.44	1	b
Gastrointestinal tract	Esophagus wall	1483	4	NA	3495	NA	3.1	0.7	NA	
	Oral mucosa	508	4	5.04	7199	7434	4.46	1.43	1	b
	Large intestine wall	30330	4	21.6	365456	366044	4.98	72.81	0.542	ab
	Small intestine wall	14144	4	2.24	191104	191197	3.58	38.08	1	b
	Stomach wall (glandular)	7447	0.5	3.1	24827	24928	2.08	4.95	0.94	b
	Stomach wall (non-glandular)	40210	0.5	5.19	124511	313149	1.74	24.81	1	b
Lymphatic	Lymph node (cervical)	727	4	48.3	13426	14944	26.8	2.68	0.443	ab

Sort	Matrix	C_{max} (ng Eq./g)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-t} (ng Eq.·h/g)	$AUC_{0-\infty}$ (ng Eq.·h/g)	MRT_{0-t} (h)	Tissue/ Plasma*	r^2	Note
Metabolic/Excretory	Spleen	898	4	44	16207	17508	22	3.23	0.471	ab
	Thymus	628	4	3.79	8171	8260	4.13	1.63	1	b
	Kidney	1237	4	3.81	16643	16821	4.01	3.32	1	b
	Kidney cortex	1483	4	3.74	19890	20086	4	3.96	1	b
	Kidney medulla	922	4	3.73	12548	12668	3.94	2.5	1	b
	Liver	5856	4	35.1	101774	105337	15.1	20.28	0.586	ab
	Urinary bladder wall	1177	4	3.6	14580	14710	4.22	2.9	1	b
Muscular	Heart	760	4	4.11	10339	10494	4.12	2.06	1	b
	Muscle (femoral)	562	4	4.01	7591	7693	4.09	1.51	1	b
Reproductive	Prostate	429	4	56.5	8625	10091	31.9	1.72	0.365	ab
	Testis	228	4	NA	498	NA	3.3	0.1	NA	
Respiratory	Lung	871	0.5	4.07	11821	11936	3.82	2.36	0.983	b
	Nasal turbinates	179	4	7.3	2450	2733	6.07	0.49	1	b
	Trachea	435	4	4.21	5790	5888	4.24	1.15	1	b
Secretory	Exorbital lacrymal gland	1198	4	44.6	19983	21591	21.2	3.98	0.415	ab
	Harderian gland	3333	4	3.29	40755	40988	4.15	8.12	1	b
	Pancreas	1384	4	3.66	18778	18943	3.92	3.74	1	b
	Salivary Gland	877	4	3.83	11795	11924	4.02	2.35	1	b
Skeletal	Bone (femur)	92.2	4	NA	330	NA	2.21	0.07	NA	
	Bone marrow (femur)	658	4	NA	2118	NA	2.4	0.42	NA	
Gastrointestinal tract contents	Large intestine contents	485225	4	14	5781282	5781638	4.31	1151.88	0.738	ab
	Small intestine contents	66336	4	2.13	906994	907302	3.53	180.71	1	b
	Stomach contents	39610	0.5	2.83	108597	177038	1.45	21.64	1	b

a: $r^2<0.8$, relevant data was for reference only.
b: C_{max} was used to calculate $t_{1/2}$.
*: AUC_{0-t} ratio of tissue to plasma.
NA: Not applicable.

2.6.4.5 代謝

2.6.4.5.1 *In vitro* 代謝

2.6.4.5.1.1 肝ミクロソームにおける代謝安定性

In vitro 代謝試験では、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソーム（0.5 mg/mL）とともにCYH33（3 μM）を1 μMのNADPHの存在下で60分間培養した（CTD記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）。試料はUPLC-UV-MS/MSで分析した。

その結果、60分間の培養後のCYH33の残存率はマウスで63.4%、ラットで84.9%、イヌで85.5%、サルで61.7%、ヒト肝ミクロソームで96.5%であった。マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝ミクロソームにおけるCL_{int}は、それぞれ、57.5、10.4、13.5、23.1及び1.5 mL/min/kgと算出された。したがって、CYH33はラット及びヒトでは低度のクリアランスの化合物であり、マウス、イヌ及びサルでは中等度のクリアランス化合物であった。

2.6.4.5.1.2 様々な動物種の肝細胞における代謝

マウス、ラット、イヌ、サル及びヒトの肝細胞とともに180分間培養した後、CYH33（3 μM）の潜在的代謝産物を測定し、UPLC/Q-TOF MS法により検出した（CTD記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）。

培養後の未変化体CYH33の残存率は、マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト肝細胞でそれぞれ約28%、約30%、約57%、約45%及び約30%であった。また、検出された代謝産物の数はマウスで3種類、ラットで3種類、イヌで1種類（I27）、サルで5種類、ヒト肝細胞で1種類（I27）であった。主な代謝経路はアミド加水分解であった（I27、M3）。アミド結合の加水分解性代謝の程度は、他の動物種と比較してイヌ肝細胞において最も大きかった。サル肝細胞ではアミド結合の加水分解による代謝の程度は比較的小さかったが、酸化的代謝（M5、M6）の程度は評価した動物種の中で最も大きかった。

2.6.4.5.1.3 アミド加水分解酵素の同定

本試験では、イヌ肝臓及び腸ホモジネート並びにエステラーゼ阻害剤BNPP（ビス-p-ニトロフェニルホスフェイト）及びDDVP（O,O-ジメチル-O-(2,2-ジクロロビニル)ホスフェイト）を用いて、CYH33の責任アミド加水分解代謝酵素（3 μM）を評価した（CTD記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）。

結果は、イヌ肝細胞ホモジネートではCYH33の90%がI27に代謝されたことが示された。BNPP及びDDVPの添加は、加水分解プロセスを阻害し、BNPPの阻害作用がDDVPよりも強かった。腸管ホモジネート及びPBS系において加水分解反応はほとんど又はまったくなく、アミド加水分解によるCYH33の代謝は主に肝臓のカルボキシルエステラーゼを介したものであることが示された。

全体として、CYH33のアミド加水分解は主に肝臓で起こり、カルボキシルエステラーゼにより媒介された。

2.6.4.5.1.4 ヒト肝ミクロソームにおける I27 の *in vitro* 代謝プロファイル及び CYP450 フェノタイピング

（1） 代謝酵素阻害試験

I27 をヒト肝ミクロソームで 60 分間インキュベートした後、I27 に加えて 5 種類の代謝物が同定された。正確質量及びフラグメントイオンの解析に基づき、それぞれ以下のように同定された：ピペラジン環開裂（-C_2H_2）代謝物 M514、脱水素化代謝物 M538-2、モノ酸化代謝物 M556-1 及び M556-2、モノ酸化及び水素化代謝物 M558。

UPLC/Q-TOF MS 法による MS ピーク面積に基づくと、M556-2 及び M514 が主要代謝物として同定され、それぞれ未変化体薬物のピーク面積の 5.03%及び 1.45%を占めた。その他の代謝物の MS ピーク面積は、いずれも未変化体薬物の 1.00%未満であった。

CYP 阻害剤 1-ABT 及び CYP3A 阻害剤ケトコナゾールは、すべての代謝物の生成を有意に阻害した。一方、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、及び 2E1 阻害剤の添加は、I27 のヒト肝ミクロソーム中の代謝物プロファイルに有意な影響を与えなかった（CTD 記載箇所：[redacted]-I27-MetID-EP (M4.2.2.4-2)）。

（2） リコンビナントヒト CYP アイソザイム

I27 を CYP3A4 酵素で 60 分間インキュベートした後、I27 に加えて 11 種類の代謝物が同定された。正確質量及びフラグメントイオンの解析に基づき、以下の代謝物が同定された：酸化的脱アミノ化及び脱水素化代謝物 M392、N-脱アルキル化代謝物 M393、酸化的脱アミノ化代謝物 M394、ピペラジン環開裂（-C_2H_2）代謝物 M514、脱水素化代謝物 M538-1 及び M538-2、モノ酸化代謝物 M556-1 及び M556-2、モノ酸化及び水素化代謝物 M558、二重酸化及び脱水素化代謝物 M570-2、二重酸化代謝物 M572。

UPLC/Q-TOF MS 法による MS ピーク面積に基づき、M556-2、M514 及び M556-1 が主要代謝物として同定され、それぞれ未変化体薬物の MS ピーク面積の約 20.2%、7.06%及び 2.78%を占めた。その他の代謝物はすべて 2.00%未満であった。

同様に、CYP3A5 酵素でも I27 に加えて 11 種類の代謝物が同定され、酸化的脱アミノ化及び脱水素化代謝物 M392、N-脱アルキル化代謝物 M393、酸化的脱アミノ化代謝物 M394、ピペラジン環開裂（-C_2H_2）代謝物 M514、脱水素化代謝物 M538-2、モノ酸化代謝物 M556-1 及び M556-2、二重酸化及び脱水素化代謝物 M570-1、M570-2、M570-3、二重酸化代謝物 M572 が同定された。UPLC/Q-TOF MS 法による MS ピーク面積に基づき、M514、M556-1 及び M556-2 が主要代謝物であり、それぞれ未変化体薬物の約 14.6%、5.87%及び 5.63%を占めた。その他の代謝物はいずれも 2.00%未満であった。

さらに、CYP2J2 酵素では親化合物に加えてモノ酸化代謝物 M556-1 が検出され、その MS ピーク面積は未変化体薬物の約 3.46%であった。

CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP4F2 では、親化合物のみが検出された。

（3） 結論

I27 のヒト肝ミクロソームにおける代謝経路は、主にモノ酸化（M556）、ピペラジン環開裂（$-C_2H_2$）（M514）、脱水素化（M538-2）、及びモノ酸化・水素化（M558）で構成されており、主に CYP3A 酵素によって触媒されることが明らかとなった。

また、CYP2J2 もモノ酸化代謝物 M556-1 の生成に一部関与していた。

ヒト肝ミクロソーム及びリコンビナントヒト CYP 酵素における I27 の推定代謝経路は、以下に示す通りである。



2.6.4.5.2 *In vivo* 代謝

2.6.4.5.2.1 ラット及びイヌを用いた CYH33 の生物変換試験

本試験では、UPLC-UV/Q-TOF MS 法を用いて、SD ラットに 3 mg/kg、ビーグル犬に 0.1 mg/kg の用量の単回経口投与後の血漿、尿、糞、胆汁試料中における CYH33 の潜在的代謝産物が同定された（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）。本試験で使用したラットの胆汁、尿及

び糞試料は、排泄アッセイから採取した。ラット及びビーグル犬の血漿試料は、吸収アッセイから採取した。

雄ラットで血漿中に認められた代謝産物は主に M0（未変化体）及び脱水素代謝産物 M4 であり、雌ラットでは主に M0（未変化体）であった。尿中では、一酸化水素化代謝産物 M5-1、未変化体 M0、モルヒネ環開裂代謝産物 M1-2 及びアミド加水分解代謝産物 M3（I27）が検出された。糞中では、主に一酸化水素化代謝産物 M5-1 及び M5-2、二酸化代謝産物 M6-1 及び M6-2、未変化体 M0 及びモルヒネ環開裂代謝産物 M1-2 が検出された。胆汁中では、二酸化代謝産物 M6-1 及び M6-2、一酸化水素化代謝産物 M5-1 及び M5-2、モルヒネ環開裂代謝産物 M1-2 が検出された（表 2.6.4-13）。

イヌでは、未変化体 M0 及びアミド加水分解代謝産物 M3（I27）が主に血漿中で検出された（表 2.6.4-14）。

表 2.6.4-13. ラットにおける CYH33 の代謝産物に関する UPLC/Q-TOF MS 情報

	Metabolic pathway	*m/z*	Molecular formula	Quality Deviation (ppm)	Retention time (min)		LC-MS peak area (× 10^3)							
							Pooled plasma (0-24 h)		Urine (0-48 h)		Feces (0-48 h)		Bile (0-48 h)	
						Bile	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
M0	Parent drug	599.2009	$C_{24}H_{29}N_8O_5F_3S$	0.4	7.66	7.99	11.1	339	14.0	18.1	373	289		45.0
M1	Cleavage of the piperazine ring	573.1834	$C_{22}H_{27}N_8O_5F_3S$	-2.7	6.16	7.01								10.3
M1-2	Cleavage of Morpholine Ring	573.1847	$C_{22}H_{27}N_8O_5F_3S$	-0.5	4.54	5.33	0.75	0.26	18.4	5.70	151	60.8	110	75.2
M2-2	Piperazine oxidation	615.1979	$C_{24}H_{29}N_8O_6F_3S$	3.8	7.46	7.72		2.12						3.58
M3	Amide bond hydrolysis	541.1948	$C_{22}H_{27}N_8O_3F_3S$	-0.6	4.20		0.25	20.7		19.0		81.9		
M4	Dehydrogenation	597.1839	$C_{24}H_{27}N_8O_5F_3S$	-1.8	8.90		10.6	16.1						
M5-1	Mono-Oxidative Hydrogenation	617.2111	$C_{24}H_{31}N_8O_6F_3S$	-0.2	4.56	5.28	2.21	0.28	57.5	22.2	703	461	294	402
M5-2	Mono-Oxidative Hydrogenation	617.2115	$C_{24}H_{31}N_8O_6F_3S$	0.3	5.32	6.24	0.32	1.30	1.78	10.8	29.1	268		495
M6-1	Di-oxidation	631.1906	$C_{24}H_{29}N_8O_7F_3S$	0.2	4.03	4.34	0.11		4.20		525	19.3	1850	18.3
M6-2	Di-oxidation	631.1910	$C_{24}H_{29}N_8O_7F_3S$	0.9	4.91	5.42			1.33	1.67	94.4	228	138	198
M7	M3 Mono-oxidative Hydrogenation	559.2067	$C_{22}H_{29}N_8O_4F_3S$	1.7	1.79	2.45					15.2	48.2	51.9	
M8	Cleavage of morpholine ring to form carboxylic acid	587.1643	$C_{22}H_{25}N_8O_6F_3S$	0	4.04	4.73					31.4	4.37	36.5	
M9	Tri-oxidation	647.1859	$C_{24}H_{29}N_8O_8F_3S$	0.8	3.72	4.02							39.6	
M10-1	Mono-oxidative glucuronic acid conjugation	791.2254	$C_{30}H_{37}N_8O_{12}F_3S$	-2.8		4.39							9.97	1.38
M10-2	Mono-oxidative glucuronic acid conjugation	791.2317	$C_{30}H_{37}N_8O_{12}F_3S$	5.1		5.11							8.49	

表 2.6.4-14. ビーグル犬血漿中における CYH33 の代謝産物に関する UPLC/Q-TOF MS 情報

	Metabolic pathway	*m/z*	Molecular formula	Quality deviation (ppm)	Retention time (min)	LC-MS peak area (× 10^3)	
						Pooled plasma (0-24 h)	
						Male	Female
M0	Parent drug	599.2014	$C_{24}H_{29}N_8O_5F_3S$	1.3	7.72	6.73	7.22
M3	Amide bond hydrolysis	541.1958	$C_{22}H_{27}N_8O_3F_3S$	1.2	4.22	7.13	5.47

2.6.4.5.2.2 SD ラットを用いた［^{14}C］CYH33 の *in vivo* 生物変換試験

ラットへの 3 mg/100 µCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回胃内投与後、オンライン放射能検出と併せて LC-MS/MS により代謝産物の特性解析及び／又は同定を行った。ラット血漿、胆汁、尿及び糞中における、モルホリン環の酸化的開裂（M558-1）、モルホリン環の二酸化（M630-1 及び M630-2）、ピペラジン環の脱エチル（M572-1）、モルホリン環の脱エチル（M572-2）、モルホリン環の酸化開裂（M616-1 及び M616-2）、アミド加水分解（M540、I27）、モルホリン環の一酸化（M614-2）、ピペラジン環の一酸化（M614-3）、モルホリン環の脱水素（M596）を含む合計 11 種類の放射性代謝産物が LC-MS/MS により暫定的に同定された（表 2.6.4-15、表 2.6.4-16）（CTD 記載箇所：[redacted]01053 (M4.2.2.4-1)）。

表 2.6.4-15. 雌雄ラットへの［^{14}C］CYH33 3 mg/100 µCi/kg の単回経口投与後の［^{14}C］CYH33 及びその代謝産物の血漿中における分布（%AUC）

Metabolites	Modification	Plasma (%AUC)	
		Male	Female
CYH33	Parent	33.42	63.92
M572-2	Deethyl of morpholine ring	0.95	8.34
M616-1	Oxidative cleavage of morpholine ring	+	+
M614-2	Mono-oxidation of morpholine ring	16.58	+
M596	Dehydrogenation of morpholine ring	42.53	27.74

Note: +: only detected by LC-MS.

表 2.6.4-16. 雌雄ラットへの［14C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の［^{14}C］CYH33 及びその代謝産物の胆汁、尿及び糞中における分布（%用量）

Metabolites	Modification	Bile[a] (%Dose)		Urine[a] (%Dose)		Feces[a] (%Dose)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
CYH33	Parent	1.36	1.99	<0.01	0.14	9.15	18.58
M558-1	Oxidative cleavage of morpholine ring and amide hydrolysis	21.83	3.66	0.14	0.08	22.55	3.74
M630-1	Di-oxidation of morpholine ring						
M630-2	Di-oxidation of morpholine ring	8.53	17.88	0.09	0.16	5.21	12.09
M572-1	Deethyl of piperazine ring	ND	ND	+	+	1.28	2.88
M572-2	Deethyl of morpholine ring	4.40	3.04	0.28	0.23	10.51	5.86
M616-1	Oxidative cleavage of morpholine ring	6.91	6.46	0.96	0.35	21.99	11.27
M616-2	Oxidation and ring cleavage of morpholine ring	0.90	4.26	<0.01	0.25	1.92	13.75
M540	Amide hydrolysis, I27 CYH33 -Impurity D	+	0.75	+	0.30	+	10.31
M614-2	Mono-oxidation of morpholine ring	3.84	0.16	+	+	12.37	1.68
M614-3	Mono-oxidation of piperazine ring	+	+	+	+	+	1.09
M596	Dehydrogenation of morpholine ring	+	0.06	+	+	0.65	2.70

a: Percent of the dose in 0 h-72 h rat bile, 0 h-72 h rat urine, or 0 h-168 h rat feces.
Note: ND: not detected. +: only detected by LC-MS.

血漿

JVC ラットに［^{14}C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg を単回経口投与した結果、主な放射能は未変化体であり、ラットの血漿中 TRA の 33.42%（雄）及び 63.92%（雌）を占めた。M596 は血漿中に豊富に存在する代謝産物であり、TRA の 42.53%（雄）及び 27.74%（雌）を占めた。代謝産物 M572-2 及び M614-2 は、血漿中で認められた微量代謝産物であった。M572-2 は TRA の 0.95%（雄）及び 8.34%（雌）、M614-2 は TRA の 16.58%（雄）を占めた。いくつかの放射能ピークも認められたが、いずれも TRA の 3.67%未満であり、同定されなかった。

胆汁中

BDC ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後では、投与後 0～72 時間以内に投与量の約 68.92%（雄）及び 53.68%（雌）が胆汁中で回収された。胆汁中の未変化体［^{14}C］CYH33 は投与量の 1.36%（雄）及び 1.99%（雌）を占めた。代謝産物 M558-1/M630-1（共溶出）及び M630-2 がラット胆汁中の主要代謝産物であった。M558-1/M630-1（共溶出）は投与量の 21.83%（雄）及び 3.66%（雌）を占めた。M630-2 は投与量の 8.53%（雄）及び 17.88%（雌）を占めた。代謝産物 M572-2、M616-1、M616-2 及び M614-2 が胆汁中で認められた微量代

謝産物であった。M572-2 は、投与量の 4.40%（雄）及び 3.04%（雌）を占めた。M616-1 は、投与量の 6.91%（雄）及び 6.46%（雌）を占めた。M616-2 は、投与量の 0.90%（雄）及び 4.26%（雌）を占めた。M614-2 は、投与量の 3.84%（雄）及び 0.16%（雌）を占めた。代謝産物 M540 及び M596 は胆汁試料中で認められた比較的少量の代謝産物であり、投与量の 0.75%未満であった。いくつかの放射能ピークも認められたが、いずれも胆汁中において投与量の 4.89%未満であり、同定されなかった。

尿中

無処置ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、投与量の約 2.02%（雄）及び約 1.68%（雌）が投与後 0～72 時間以内に尿中で回収された。未変化体の［^{14}C］CYH33 は投与量の 0.14%（雌）を占めた。代謝産物 M616-1 がラット尿中で認められた主代謝産物であり、投与量の 0.96%（雄）及び 0.35%（雌）を占めた。代謝産物 M558-1/M630-1（共溶出）、M630-2、M572-2、M616-2 及び M540 も認められ、それぞれ投与量の 0.08～0.30%を占めた。いくつかの放射能ピークも認められたが、いずれも尿中において投与量の 0.17%未満であり、同定されなかった。

糞中

無処置ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、投与量の約 96.10%（雄）及び約 94.63%（雌）が投与後 0～168 時間以内に糞中で回収された。放射能の大部分は未変化体に由来し、投与量の 9.15%（雄）及び 18.58%（雌）を占めた。代謝産物 M558-1/M630-1（共溶出）及び M616-1 が糞試料中で認められた主要代謝産物であった。M558-1/M630-1（共溶出）は投与量の 22.55%（雄）及び 3.74%（雌）を占めた。M616-1 は投与量の 21.99%（雄）及び 11.27%（雌）を占めた。代謝産物 M630-2、M572-2、M616-2、M540 及び M614-2 が糞試料中で認められた微量代謝産物であった。M630-2 は投与量の 5.21%（雄）及び 12.08%（雌）を占めた。M572-2 は投与量の 10.51%（雄）及び 5.86%（雌）を占めた。M616-2 は投与量の 1.92%（雄）及び 13.75%（雌）を占めた。M540 は投与量の 10.31%（雌）を占めた。M614-2 は投与量の 12.37%（雄）及び 1.68%（雌）を占めた。代謝産物 M572-1、M614-3 及び M596 も認められ、いずれも投与量の 2.88%未満であった。いくつかの放射能ピークも認められたが、いずれも糞中において投与量の 2.28%未満であり、同定されなかった。

ラットにおける CYH33 の *in vivo* 代謝

ラットで同定された CYH33 の代謝産物に基づくと、ラットにおける CYH33 の代謝経路には、1）モルホリン又はピペラジン環の酸化、2）モルホリン又はピペラジンの環開環による脱エチル、3）アミド加水分解が含まれた。ラットにおける CYH33 の推定代謝経路を図 2.6.4-4 に示す。



Note: P, B, U and F represented plasma, bile, urine, and feces, respectively.

図 2.6.4-4. ラットにおける CYH33 の推定代謝経路

2.6.4.6 排泄

2.6.4.6.1 SD ラットを用いた CYH33 の排泄試験

雌雄ラットへの CYH33（3 mg/kg）の単回経口投与後、96 時間まで尿及び糞を採取した（CTD 記載箇所：CYH33-ADME-1 (M4.2.2.2-1)）。試料は LC-MS/MS で分析した。

雌雄ラットでの主要排泄経路は糞を介したものであった（23.9～29.2%）。尿中及び胆汁中への排泄はわずかであり、投与された CYH33 は、CYH33 及びその代謝産物 I27 として回収された割合は投与量の 0.5%未満であった（表 2.6.4-17）。

表 2.6.4-17. ラットの尿、糞及び胆汁における CYH33 の回収率

Analyte	The cumulative excretion percentage (%)			
	Feces (0-96 h)		Urine (0-96 h)	Bile (0-48 h)
	Male	Female		
Parent drug CYH33	23.9	24.4	< 0.5	< 0.2
I27 (Amide hydrolyzed metabolite M3)	< 0.1	4.72	< 0.5	< 0.1
Total	23.9	29.2	< 1	< 0.2

2.6.4.6.2　　ラットにおける［^{14}C］CYH33 の排泄試験

無処置及び BDC ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後の胆汁、尿、糞、ケージすすぎ液／洗浄液における TRA 回収率（投与量に対する割合）を表 2.6.4-18 及び表 2.6.4-19 に要約した。（CTD 記載箇所：[redacted]00952 (M4.2.2.2-2)）

投与後 0～168 時間以内に、無処置ラットから投与量の約 98.43%（雄）及び約 96.65%（雌）が回収された。尿中においてそれぞれ 2.02%（雄）及び 1.68%（雌）、糞中においてそれぞれ 96.10%（雄）及び 94.63%（雌）、ケージすすぎ液／洗浄液においてそれぞれ 0.31%（雄）及び 0.34%（雌）が回収された。投与量の大部分（雄ラットで総排泄量の 99.61%、雌ラットで 97.89%）が 0～48 時間以内に回収された。

投与後 0～72 時間以内に、BDC ラットから投与量の約 96.52%（雄）及び約 98.20%（雌）が回収された。胆汁中において 68.92%（雄）及び 53.68%（雌）、尿中において 8.60%（雄）及び 7.42%（雌）、糞中において 18.60%（雄）及び 36.78%（雌）、ケージ洗浄液において 0.40%（雄）及び 0.33%（雌）が回収された。胆汁排泄は主に 48 時間以内に起こり、投与後 0～4 時間に最も多く、総排泄量の 36.29%（雄）及び 13.15%（雌）を占めた。この結果は、吸収された［^{14}C］CYH33 由来の放射能は主に胆汁を介して糞中に排泄されることを示した。ラットにおける PK 挙動の性差は、雄ラットの方が雌ラットよりも胆汁排泄が速く、その排泄量が多かったことに関連していると考えられる。

表 2.6.4-18. 無処置 SD ラットへの［^{14}C］CYH33 3 mg/100 μCi/kg の単回経口投与後の投与後 0～168 時間における尿、糞及びケージ洗浄液中の回収率（平均 ± 標準偏差）

Gender (Number)	Urine (%)	Feces (%)	Cage Rinse/Wash (%)	Total Dose Recovered (%)
Female (n=3)	1.68±0.21	94.63±0.25	0.34±0.15	96.65±0.37
Male (n=3)	2.02±0.26	96.10±1.87	0.31±0.17	98.43±1.91

表 2.6.4-19. BDC SD ラットへの 3 mg/100 µCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、投与後 0～72 時間に胆汁、尿、糞及びケージ洗浄液で回収された投与量の割合（平均±標準偏差）

Gender (Number)	Urine (%)	Feces (%)	Cage Rinse/Wash (%)	Bile (%)	Total Dose Recovered (%)
Female (n=3)	7.42±0.21	36.78±1.07	0.33±0.06	53.68±0.70	98.20±0.57
Male (n=3)	8.60±3.07	18.60±2.61	0.40±0.27	68.92±7.03	96.52±1.08

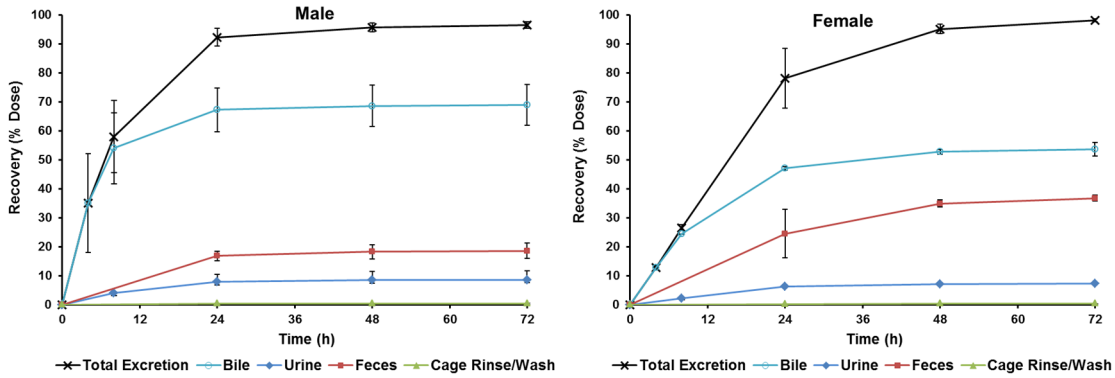


図 2.6.4-5. BDC SD ラットへの 3 mg/100 µCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後の放射能の累積排泄（雄 3 匹、雌 3 匹）

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1　CYH33 及び I27 の CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 に対する誘導能

本試験では、3 つの異なるロットのヒト初代肝細胞を使用し、72 時間の培養後に 0.1～10 µM の CYH33 及び I27 がチトクロム P450 に対する誘導能を評価した（CTD 記載箇所：[redacted]-CYH33-ADME-DDI-EID (M4.2.2.6-1)）。CYP1A2、CYP2B6、CYP3A4 の酵素活性及び mRNA 量の変化を測定した。誘導作用が陽性対照の 20%を超える場合に陽性とした。

その結果、酵素活性に対する誘導作用については、CYH33 を選択した濃度で処理した場合、CYP1A2 及び CYP2B6 に対する最大誘導作用は陽性対照の 20%未満であった。CYP3A4 については、誘導作用は陽性対照の 20%未満～27.9%であった。

また mRNA に対する誘導作用については、CYP1A2 に対する CYH33 の誘導作用は陽性対照の 20%未満であった。CYP2B6 mRNA については、誘導作用は陽性対照の 23.9～110%であった。CYP3A4 については、陽性対照の 20%未満～74%であった。

さらに、I27 で処理後、CYP1A2 及び 2B6 の酵素活性に対する誘導作用は陽性対照の 20%未満であった。I27 の CYP3A4 酵素活性に対する誘導作用は陽性対照の 20%未満～30.3%であった。

また、I27 の誘導作用は、CYP1A2 mRNA 陽性対照の 20%未満、CYP2B6 陽性対照の 21.95～110%、CYP3A4 陽性対照の 20%未満～68.1%であった。

結論として、CYH33 及び I27 は CYP1A2 に対する誘導能を示さなかったが、CYP2B6 及び CYP3A4 に対する誘導能については、臨床曝露に基づいてさらに評価すべきである。

2.6.4.7.2 CYH33 及び I27 による CYP2B6/CYP3A4 誘導の EC_{50} 及び E_{max} の測定

CYH33：3 名のドナー由来のヒト初代肝細胞を用いて、試験濃度 10、3、1、0.3 及び 0.1 μM で CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現に対する CYH33 の誘導能を評価した。

10 μM、3 μM、1 μM、0.3 μM 及び 0.1 μM の試験濃度において CYH33 で処理した後、3 名のドナー由来のヒト肝細胞（OQA、RAS 及び XSM）の CYP2B6 の mRNA 発現レベルは、溶媒対照（VC）群の 2 倍超であり、濃度依存的に誘導倍率が上昇した。さらにフィッティングした結果、EC_{50} 値はそれぞれ約 0.414 μM、約 0.280 μM 及び約 1.41 μM であり、E_{max} 値はそれぞれ約 2.49 倍、約 3.17 倍及び約 5.97 倍であった。上記の試験濃度において CYH33 で処理した場合、ドナー3 名（OQA、RAS、XSM）の CYP3A4 の mRNA 発現レベルは VC 群の 2 倍超となり、濃度依存的に誘導倍率が上昇した。さらにフィッティングした結果、EC_{50} 値はそれぞれ約 0.204 μM、約 0.0815 μM 及び約 0.296 μM であり、E_{max} 値はそれぞれ約 41.7 倍、約 6.65 倍及び約 17.6 倍であった。

I27：3 名のドナー由来のヒト初代肝細胞を用いて、試験濃度 50、10、3、1、0.3 及び 0.1 μM で CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現に対する被験物質 I27 の誘導能を評価した。

3 例のドナー（OQA、RAS 及び XSM）由来のヒト肝細胞と I27 を 50 μM、10 μM、3 μM、1 μM、0.3 μM 及び 0.1 μM の試験濃度で培養した結果、ヒト肝細胞の CYP2B6 mRNA 発現レベルは VC 群の 2 倍超となり、濃度依存的に誘導倍率が上昇した。さらにフィッティングした結果、EC_{50} 値はそれぞれ約 4.50 μM、約 1.66 μM、約 0.0286 μM であり、E_{max} 値はそれぞれ約 6.13 倍、約 4.98 倍、約 3.68 倍であった。上記の試験濃度において I27 で処理した場合、ドナー3 名（OQA、RAS、XSM）の CYP3A4 の mRNA 発現レベルは VC 群の 2 倍超となり、濃度依存的に誘導倍率が上昇した。さらにフィッティングした結果、EC_{50} 値はそれぞれ約 2.65 μM、約 0.270 μM 及び約 0.228 μM であり、E_{max} 値はそれぞれ約 77.8 倍、約 7.41 倍及び約 12.0 倍であった。

結果は、CYH33 及び I27 が *in vitro* において CYP2B6 及び CYP3A4 の mRNA 発現に対して用量依存的な誘導能を有することを示唆した。したがって、臨床における血漿中濃度又は曝露量に基づき、CYH33 及び I27 の CYP2B6 及び CYP3A4 に対する誘導作用による薬物間相互作用の可能性をさらに評価すべきである。（CTD 記載箇所：[redacted]-S2308-07-1 (M4.2.2.6-2)）。

2.6.4.7.3 CYH33 及び I27 の CYP2C8、CYP2C9、及び CYP2C19 の mRNA 発現に対する誘導能

本試験は、ICH-M12 薬物相互作用試験に関するガイドラインに従い、3 名のドナー由来ヒト初代肝細胞を用いて、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 の mRNA 発現に対する CYH33（試験濃度

20、5、1、0.5、0.1、0.01 μM）及び I27（10、3、1、0.3、0.1、0.01 μM）の誘導能を評価するために実施された（CTD 記載箇所：[redacted]-S2510-01-1 (M4.2.2.6-7)）。

CYH33：試験物質は CYP2C8 の mRNA 発現を誘導し、EC_{50} が 0.0689～0.640 μM、E_{max} が 5.83～8.74 倍であった。CYP2C9 の mRNA 発現を誘導し、EC_{50} が 0.106 μM、E_{max} が 3.48 倍であった。CYP2C19 の mRNA 発現を誘導し、EC_{50} < 5.0 μM、E_{max} > 4.0 倍であった。

I27：被験物質は CYP2C8 の mRNA 発現を誘導し、EC_{50} が 0.345～0.710 μM、E_{max} が 3.39～10.8 倍であった。CYP2C9 の mRNA 発現を誘導し、EC_{50} が 0.195 μM、E_{max} が 3.21 倍であった。CYP2C19 の mRNA 発現を誘導し、EC_{50} < 3.0 μM、E_{max} > 3.0 倍であった。

対照：CYP2C の既知の誘導剤であるリファンピシン（10 μM）は、3 名のドナーすべてにおいて CYP2C8、2C9、2C19 の mRNA 発現を 2.0 倍超に誘導し、CYP2C の既知の非誘導剤であるロキシスロマイシン（10 μM）は、CYP2C8、2C9、2C19 の mRNA 発現を 2 倍未満誘導した。対照はヒト初代肝細胞を用いた試験系に適格していた。

CYH33 及び I27 は CYP2C8、2C9 及び 2C19 に対して誘導能を有する可能性があり、臨床的意義を評価するにはさらなる臨床データが必要である可能性がある。

2.6.4.7.4 CYP450 酵素阻害試験

可逆的阻害：CYH33（0.10～100 μM）及びプローブ基質とともに培養したプールヒト肝ミクロソームを用いて、CYP 酵素活性の変化を測定し、IC_{50} 値を算出することで、主要な CYP450 アイソフォームに対する CYH33 の阻害作用を評価した。その結果、CYH33 は 100 μM までの濃度において CYP1A2、CYP2C8、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4（midazolam 1'-hydroxylation）及び CYP3A4（testosterone 6β-hydroxylation）に対する阻害作用を示さなかった。

時間依存的阻害：本試験の目的は、ヒト肝ミクロソームを用いて、主要なヒト CYP 酵素に対する CYH33 及び I27 の時間依存的阻害を測定することであった（CTD 記載箇所：[redacted]-CYH33-2019-ADME-DDI-EI (M4.2.2.6-3)）。ミクロソームは、プローブ基質及び CYH33 又は I27（0.1～100 μM）とともに培養した。CYP 酵素活性を LC-MS/MS により測定した。

その結果、CYP1A2、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、3A4/5 の活性は、CYH33 又は I27 との培養後に有意な変化を示さなかった。評価した濃度範囲において阻害率が低かったため、対応する IC_{50} 値を求めることはできなかった。

したがって、CYH33 及び I27 は検討した主な CYP 酵素の阻害剤ではないと考えられ、CYP 阻害による薬物間相互作用を引き起こす可能性は低かった。

2.6.4.7.5 P-gp 及び BCRP の基質及び阻害剤となる可能性

本試験では、MDR1 及び BCRP を遺伝子導入した MDCK 細胞モデルを用いて、P-gp 及び BCRP に対する CYH33 及びその代謝産物 I27 の（基質又は阻害剤として）の作用を評価した（CTD 記載箇所：[redacted]-CYH33-ADME-DDI-ETP (M4.2.2.6-4)）。

基質試験：CYH33 は P-gp 及び BCRP の基質ではなかったが、I27 は両トランスポーターの基質であった。

- **P-gp**：頂端膜側から基底膜側（A→B）方向の 10 μM CYH33 の P_{app} 値は（14.0±0.6）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、B→A 方向の P_{app} 値は（24.3±1.6）$\times 10^{-6}$ cm/s であった。流出比は 1.73 であった。CYH33 を P-gp 阻害剤と併用投与した時、$P_{app\ (A\rightarrow B)}$ は（19.0±5.0）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、$P_{app\ (B\rightarrow A)}$ は（20.4±3.3）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、流出比は 1.08 であった。したがって、CYH33 は P-gp の基質ではなかった。
  これに対して、10 μM の I27 では、$P_{app\ (A\rightarrow B)}$ は（6.96±3.3）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、$P_{app\ (B\rightarrow A)}$ は（24.8±2.8）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、流出比は 3.56 であった。I27 を P-gp 阻害剤と併用投与した時、$P_{app\ (A\rightarrow B)}$ は（18.4±2.8）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、$P_{app\ (B\rightarrow A)}$ は（22.0±2.1）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、流出比は 1.19 であった。したがって、I27 は P-gp の基質であった。
- **BCRP**：10 μM の CYH33 では、$P_{app\ (A\rightarrow B)}$ 及び $P_{app\ (B\rightarrow A)}$ は、それぞれ（16.1±1.7）$\times 10^{-6}$ cm/s 及び（16.7±1.5）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、流出比は 1.03 であった。CYH33 を BCRP 阻害剤と併用投与した時、$P_{app\ (A\rightarrow B)}$ は（17.6±1.5）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、$P_{app\ (B\rightarrow A)}$ は（15.9±2.8）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、流出比は 0.90 であった。したがって、CYH33 は BCRP の基質ではなかった。
  10 μM の I27 では、$P_{app\ (A\rightarrow B)}$ 及び $P_{app\ (B\rightarrow A)}$ は、それぞれ（6.14±1.4）$\times 10^{-6}$ cm/s 及び（28.2±11.0）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、流出比は 4.6 であった。I27 を BCRP 阻害剤と併用投与した時、I27 の $P_{app\ (A\rightarrow B)}$ は（16.4±2.3）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、$P_{app\ (B\rightarrow A)}$ は（25.4±1.7）$\times 10^{-6}$ cm/s であり、流出比は 1.55 であったことから、I27 は BCRP の基質であることが示された。

阻害試験：CYH33 及び I27 は、いずれも P-gp 及び BCRP の阻害剤であった。

- **P-gp**：ジゴキシンを単独投与した場合、ジゴキシン流出比は 3.84 であった。ジゴキシンを 10 及び 40 μM の CYH33 と併用投与した時、ジゴキシンの流出比はそれぞれ 2.22 及び 2.36 であった。残存 P-gp 活性は、それぞれ 57.8%及び 61.6%であった。さらに、ジゴキシンを 10 μM 及び 100 μM の I27 と併用投与した時、ジゴキシンの流出比はそれぞれ 1.7 及び 1.54 であり、P-gp の残存活性はそれぞれ 44.2%及び 40.0%であった。したがって、CYH33 及び I27 はいずれも P-gp 阻害剤であった。
- **BCRP**：イマチニブを単独投与した時の流出比は 14.7 であった。イマチニブを 10 μM 及び 40 μM の CYH33 と併用投与した時、イマチニブ流出比は 3.49 及び 3.30 であり、残存 BCRP 活性はそれぞれ 23.8%及び 22.5%であった。イマチニブを 10 μM 及び 100 μM の I27 と併用投与した時、イマチニブ流出比は 9.85 及び 2.86 であり、残存 BCRP 活性はそれぞれ 67.1%及び 19.5%であった。
  したがって、CYH33 及び I27 はいずれも BCRP 阻害剤であった。

2.6.4.7.6 MDR1 及び BCRP 阻害試験における IC_{50} の測定

本試験は、上記トランスポーターを発現するベシクル膜を用いて、ATP 結合カセット（ABC）BCRP 及び MDR1 トランスポーターに対する CYH33 及び I27 の阻害能をそれぞれ評価することを目的として実施した。（CTD 記載箇所：[redacted]-S2210-20-1 (M4.2.2.6-5)）

CYH33：試験濃度 0.016、0.08、0.4、2 及び 10 μM の CYH33 で処理した場合、BCRP の相対輸送活性はそれぞれ 107%、101%、107%、85.8%及び 31.5%であった。試験濃度 0.08、0.4、2、10 及び 50 μM における MDR1 の相対輸送活性はそれぞれ 103%、103%、85.1%、66.7%及び 23.7%であった。

結果は、CYH33 が BCRP 及び MDR1 のトランスポーター活性に対して阻害能を有することを示唆し、IC_{50} 値はそれぞれ 6.82 及び 17.4 μM であった。

I27：試験濃度 0.08、0.4、2、10 及び 50 μM の I27 で処理した場合、BCRP の相対輸送活性はそれぞれ 117%、118%、111%、98.7%及び 55.1%であり、MDR1 の相対輸送活性はそれぞれ 93.8%、79.2%、81.4%、78.3%及び 45.6%であった。

結果は、IC_{50} 値はそれぞれ>50 及び 36.1 μM であり、I27 が BCRP 及び MDR1 のトランスポーター活性に対して阻害能を有することを示唆した。

2.6.4.7.7 OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K の基質及び阻害剤となる可能性

CYH33 及び I27 のトランスポーターに対する作用は、トランスポーターOATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K をそれぞれ発現させた HEK293 細胞を用いて検討した（CTD 記載箇所：[redacted]-CYH33-ADME-DDI-UTP (M4.2.2.6-6)）。

トランスポーター発現 HEK293 細胞と溶媒 HEK293 細胞との間に CYH33 及び I27（1 及び 10 μM で試験）の取り込みに有意差が認められなかったことから、CYH33 及び I27 はいずれも評価したトランスポーターの基質ではないことが示唆された。

また、CYH33 は 40.0 μM においてアトルバスタチンの OATP1B1 取り込みを有意に阻害し、残存 OATP1B1 活性は 76.5%であった。CYH33 は、残存トランスポーター介在性基質取り込みを濃度依存的に阻害し、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K に対する IC_{50s} 値はそれぞれ 2.13、0.92 及び 28.5 μM であった。

また、I27 もトランスポーター介在性基質取り込みを濃度依存的に阻害し、OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K に対する IC_{50s} 値はそれぞれ 17.6、18.6、21.6 及び 24.9 μM であった。

以上より、CYH33 及び I27 はいずれも OATP1B1/3、MATE1/2-K の基質ではなかったが、CYH33 及び I27 はいずれもこれらのトランスポーターの阻害剤であった。

2.6.4.7.8 腎臓の主要 SLC トランスポーターの基質及び阻害剤としての可能性

本試験では、OAT1、OAT3 及び OCT2 を発現する HEK293 細胞を用いて、CYH33 及び I27 が取り込みトランスポーターである OAT1、OAT3、OCT2 の基質及び／又は阻害剤であるかを評価した。CYH33、I27 及び陽性化合物の濃度は LC-MS/MS 法により測定された（CTD 記載箇所：[redacted]-CYH33-2025-*In vitro*-DDI-UTP (M4.2.2.6-8)）。

OAT1 の陽性基質としてパラアミノ馬尿酸ナトリウム（PAH）、OAT3 の陽性基質としてフロセミド、OCT2 の陽性基質として 1-メチル-4-フェニルピリジニウムイオン（MPP+）が使用された。一方、プロベネシドは OAT1 及び OAT3 の陽性阻害剤として、イミプラミンは OCT2 の陽性阻害剤として選択された。陽性化合物の結果はすべて試験施設の許容範囲内であり、試験系が正常に機能しており、取り込みトランスポーターである OAT1、OAT3、OCT2 の基質及び阻害剤の評価に適していることが示された。

基質試験：

CYH33 及び I27 は、トランスポーター導入細胞又は Mock 細胞と 10 分間インキュベートした後、対応する陽性阻害剤の有無で 0.1、1、及び 10 µM の濃度で試験された。基質を定義するための主な基準は、取り込み比（導入細胞対 Mock 細胞）が 2 以上であり、陽性阻害剤と共にインキュベートした場合に取り込みが 50%以上減少することである。

·0.1 µM では、OAT1/OAT3 導入細胞及び Mock 細胞における CYH33 及び I27 の濃度は定量下限値（1 nM）を下回り、有意な取り込み分析は不可能であった。

·CYH33 の 1 µM では、OAT1 及び OAT3 導入細胞における取り込み比はそれぞれ 2.13 及び 2.15 であった。しかし、プロベネシドと共にインキュベーションした場合では、残存活性が 80.1%（OAT）及び 90.5%（OAT3）しか減少せず、50%以上の活性低下要件を満たさなかった。10 µM では、OAT1 及び OAT3 導入細胞における取り込み比は Mock 細胞とほぼ同等であった（取り込み比はそれぞれ 1.51 及び 1.78）。

·試験したすべての濃度（0.1～10 µM）において、OCT2 導入細胞における取り込みは Mock 細胞と有意な差がなく（比は 1.35～1.76）、OCT2 の基質ではないことが確認された。

·I27 では、1 µM 及び 10 µM の濃度で、Mock 細胞と比較してすべてのトランスポーター導入細胞において取り込み比が 2 未満であった。陽性阻害剤による有意な阻害は認められず、I27 が OAT1、OAT3、OCT2 の基質ではないという結論に至った。

阻害試験：

本試験では、OAT1、OAT3 及び OCT2 による陽性基質の取り込みに対する CYH33（0.1～40 µM）及び I27（0.1～100 µM）の阻害の可能性を検討した。阻害はトランスポーターの残存活性（RA）を測定することで評価され、陽性基質の取り込みが大幅に減少することが有意な阻害であると定義された。

·CYH33 は、OAT1、OAT3 及び OCT2 に対して、全濃度範囲（0.1～40 µM）で阻害作用を示さず、すべてのトランスポーターで残存活性が一貫して 80%以上であった。

·I27 は、試験した最高濃度（100 µM）でのみ OAT3 に対して弱い阻害を示し、残存活性は 71.0%であった。OAT3 の IC_{50} は>100 µM と推定された。I27 は OAT1 及び OCT2 に対して 100 µM まで阻害作用を示さなかった。

以上より、CYH33 及び I27 は腎臓の取り込みトランスポーターである OAT1、OAT3 及び OCT2 の基質として機能しない。CYH33 はこれらのトランスポーターに対して 40 μM までの濃度で阻害作用を示さなかった。I27 は高濃度（100 μM）でのみ OAT3 を弱く阻害し、OAT1 又は OCT2 に対しては阻害作用を示さなかった。これらの知見は、臨床において CYH33 又は I27 が関与するトランスポーターを介した薬物相互作用の可能性が低いことを示唆している。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

この開発段階では、CYH33 を用いたその他の薬物動態試験は実施されていない。

2.6.4.9 考察及び結論

本項には、CYH33 の吸収、分布、代謝、排泄（ADME）及び薬物動態学的薬物相互作用を検討した試験を記載する。

吸収

In vitro において、CYH33 は中等度の透過性を示した。単回静脈内投与後の CYH33 は中等度から低度のクリアランス（雄ラットにおいて 34 mL/min/kg、雌ラットにおいて 4.83 mL/min/kg、イヌにおいて 6.75 mL/min/kg）と中等度の分布容積（ラットにおいて 1.96 L/kg、イヌにおいて 1.86 L/kg）を示した。単回経口投与後、CYH33 のバイオアベイラビリティ（F%）は雄ラットにおいて低値（19%）、雌ラットにおいて中等度（53.7%）、イヌにおいては相対的に高値（70.9%）を示した。また、CYH33 の曝露量（AUC_{0-t}）は、雌ラットで雄ラットの約 12 倍であったが、イヌでは性差は認められなかった。

SD ラットへの単回経口投与後、C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加は CYH33 の用量比例的な増加に近いかそれを下回った。アミド加水分解代謝産物 I27 の血漿中曝露量は、雄ラットでは未変化体の約 2.2%、雌ラットでは約 15.6%であった。ラットにおける I27 の C_{max} 及び AUC_{0-t} の増加率は用量比例的な増加を下回った。イヌでは、C_{max} 及び AUC_{0-t} は、CYH33 の用量増加に伴い、評価した範囲（0.05～0.2 mg/kg）で比例的に増加したが、I27 の C_{max} の比例的な増加は用量比例的な増加をわずかに下回ったが、I27 の AUC_{0-t} は用量比例的な増加を示した。反復経口投与後、雄ラット及びイヌでは CYH33 及びその代謝産物 I27 の顕著な蓄積は認められなかったが、雌ラットでは I27 の一定の蓄積が認められ、雌ラットにおいて I27 の相対 $t_{1/2}$ が長いことに起因すると考えられた。

SD ラットへの［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、血中及び血漿中の TRA は投与後約 0.5 時間で最高値に達した。血漿中 TRA の PK 挙動には雌雄ラット間で差が認められた。雌ラットの血漿中 TRA の C_{max} は雄ラットの約 1.53 倍であった。投与 24 時間後の平均濃度は C_{max} の 1.49%（雄）及び 15.7%（雌）であり、雌ラットにおける TRA の消失は雄ラットよりも速いことが示された。雌ラットにおける血漿中 TRA の AUC_{0-t}、MRT 及び $t_{1/2}$ は、それぞれ雄ラットの 5.70 倍、2.44 倍及び 1.59 倍であった。

分布

In vitro において、CYH33 はヒト及び非臨床動物種の血漿蛋白質に高い結合率（90%超）を示したが、用量依存的な結合は認められなかった。

ラットへの CYH33 3 mg/kg の経口投与後、CYH33 は、組織において広範に分布した。肝臓、副腎、消化管、肺、膵臓、腎臓、脾臓及び卵巣における曝露量は血漿中曝露量の約 4 倍超であったが、脳における曝露量は血漿中の 20%と著しく低かった。雌ラットの CYH33 の組織内曝露量は雄ラットの約 7～18 倍であった。

血液/血漿比の結果に基づくと、CYH33 及び／又はその代謝産物は血球と結合を示さなかった。

雄ロングエバンス系ラットへの［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、ほとんどの組織の総放射能（TRA）は投与 4 時間後に最高値に達し、主に胃腸系、肝臓、腎臓、眼及びブドウ膜などに分布した。脊髄及び脳における TRA は投与後 0.5 時間及び 4 時間のみで検出可能であり、その濃度は LLOQ よりわずかに高く、血漿中濃度よりはるかに低く、CYH33 及び／又はその代謝産物は容易に血液脳関門を通過できないことが示された。840 時間後（最終分析時点）では、大部分の組織において TRA は定量下限未満であったが、眼及びブドウ膜では依然として検出可能であり、C_{max} のそれぞれ 18.69%及び 10.20%であったことから、CYH33 及び／又はその代謝産物はメラニン含有組織に結合し、緩やかに消失する可能性があることが示された。

代謝

CYH33 は、ラット肝ミクロソーム（CL_{int}：10.4 mL/min/kg）及びヒト肝ミクロソーム（CL_{int}：1.5 mL/min/kg）では低度のクリアランスの化合物であり、マウス肝ミクロソーム（CL_{int}：57.5 mL/min/kg）、イヌ肝ミクロソーム（CL_{int}：13.5 mL/min/kg）及びサル肝ミクロソーム（CL_{int}：23.1 mL/min/kg）では中等度のクリアランスの化合物であった。

イヌ及びヒトの肝細胞では、CYH33 の代謝産物としてアミド加水分解代謝産物 I27 のみが同定された。

代謝表現型解析から、アミド加水分解による CYH33 の代謝は主に肝臓のカルボキシルエステラーゼを介していることが示された。

ヒト肝ミクロソームにおける I27 の代謝経路は、主に CYP3A4 及び CYP3A5 によって触媒されていた。

ラットへの CYH33 の単回経口投与後、合計 14 種類の代謝産物が検出され、主な代謝産物は一酸化水素化（M5）、二重酸化（M6）、モルホリン環の開環（M1-2）によるものであった。イヌでは、未変化体及びアミド加水分解代謝産物 M3（I27）が主に血漿中において検出された。

ラットへの［^{14}C］CYH33 の胃内投与後における［^{14}C］CYH33 の主要代謝経路は、1）モルホリン又はピペラジン環の酸化、2）モルホリン又はピペラジンの環開環による脱エチル、3）アミド加水分解であった。

排泄

ラットにおける CYH33 及びその代謝産物 I27 の主要排泄経路は糞中排泄であった（23.9～29.2%）。ラットへの CYH33（3 mg/kg）の単回経口投与後における尿中及び胆汁中への排泄は微量（それぞれ投与した CYH33 の 1%未満）であった。

雌雄 SD ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後において、無処置ラットから用量の 98.43%（雄）及び 96.65%（雌）が投与後 0～168 時間以内に回収された。投与量の大部分（雄ラットにおいて総排泄量の 99.61%、雌ラットにおいて 97.89%）が投与後 0～48 時間以内に回収された。TRA は、主に糞を介して排泄され、雄において 96.10%、雌において 94.63%を占め、尿を介した排泄は少量であり、雄において 2.02%、雌において 1.68%を占めた。BDC ラットへの 3 mg/100 μCi/kg の［^{14}C］CYH33 の単回経口投与後、用量の約 68.92%（雄）及び 53.68%（雌）が投与後 0～72 時間以内に胆汁を介して排泄された。胆汁排泄は投与後 0～4 時間に最も多く、総排泄量の 36.29%（雄）及び 13.15%（雌）を占めた。結果は、吸収された［^{14}C］CYH33 由来の放射能は主に胆汁を介して糞中に排泄されることを示した。ラットにおける PK 挙動の性差は、雄ラットの方が雌ラットよりも胆汁排泄が速く、大きかったことに関連していると考えられる。胆管カニューレを挿入した（BDC）ラットの尿中及び胆汁中排泄データから、［^{14}C］CYH33 の吸収率は少なくとも投与量の 77.52%（雄）及び 61.10%（雌）と推定された。

薬物動態学的薬物相互作用

CYH33 及び I27 は、0.1～100 μM の濃度範囲において CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5 に対する明らかな可逆的又は時間依存的な阻害を示さなかった。

CYH33 及び I27 は、CYP1A2 誘導を介した薬物間相互作用を引き起こす可能性がないことが示された一方、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP3A4 に対する *in vitro* 誘導作用を示した。

CYH33 は P-gp 及び BCRP の基質ではなかったが、I27 は P-gp 及び BCRP トランスポーターの基質であった。

CYH33 は BCRP 及び P-gp を阻害し、IC_{50} 値はそれぞれ 6.82 μM 及び 17.4 μM であり、P-gp 及び BCRP に対する I27 の IC_{50} 値は、それぞれ 36.1 μM 及び>50 μM であった。

CYH33 及び I27 はいずれも OAT1、OAT3、OCT2 の基質ではなかった。CYH33 はこれらのトランスポーターに対し阻害作用を示さず、I27 は OAT3 に対して弱い阻害作用（IC_{50} >100 μM）を示したが、OAT1 及び OCT2 に対しては阻害作用示さなかった。

トランスポーター発現 HEK293 細胞と溶媒 HEK293 細胞との間において CYH33 及び I27（1 及び 10 μM）の取り込みに有意差が認められなかったことから、CYH33 及び I27 はいずれも OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K の基質ではないと考えられた。

CYH33 は 40.0 μM でアトルバスタチンの OATP1B1 取り込みを有意に阻害し、残存 OATP1B1 活性は 76.5%であった。また、CYH33 はトランスポーターOATP1B3、MATE1 及び MATE2-K を介した基質の取り込みも濃度依存的に阻害し、IC_{50s} 値はそれぞれ 2.13、0.92 及び 28.5 μM であっ

た。また、I27 もトランスポーターを介した基質の取り込みを濃度依存的に阻害し、IC_{50} 値は OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K に対してそれぞれ 17.6、18.6、21.6 及び 24.9 μM であった。臨床推奨用量（リソバリシブメシル酸塩 40 mg、1 日 1 回）での CYH33 及び I27 の定常状態での血漿中 $C_{max\ ss}$ は、それぞれ約 297 ng/mL（約 0.50 μM）及び約 114 ng/mL（約 0.21 μM）であり、算出された $I_{max,\ U}$ はそれぞれ 0.025 μM 及び 0.044 μM であった。$I_{max,\ U}/IC_{50s}$ が 0.1 を下回ったことから、臨床において CYH33 及び I27 による P-gp、BCRP、OATP1B1/3 及び MATE1/2-K の阻害に起因する薬物間相互作用の可能性は低いことが示唆された。

参考文献

Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans[J]. Pharm Res., 1993, 10:1093-1095.

以上の文献の写しは、M4.3 に添付した。

目次

略語及び略号一覧 3
2.6.5 薬物動態試験の概要表 5
2.6.5.1 薬物動態の概要 5
2.6.5.2 薬物動態試験：分析方法及びバリデーション試験 8
2.6.5.2.1 薬物動態試験：分析方法及びバリデーション試験の一覧 8
2.6.5.2.2 ラット血漿におけるバリデーション試験 9
2.6.5.2.3 イヌ血漿におけるバリデーション試験 11
2.6.5.2.4 細胞外液分析法のバリデーション試験 13
2.6.5.2.5 調製液の分析方法及びバリデーション試験 14
2.6.5.2.6 ラット血漿におけるバリデーション試験 15
2.6.5.2.7 イヌ血漿におけるバリデーション試験 17
2.6.5.2.8 ラット血漿におけるバリデーション試験 19
2.6.5.3 薬物動態試験：吸収 21
2.6.5.3.1 ラットにおける単回及び7日間反復投与後の吸収（静脈内及び経口投与） 21
2.6.5.3.2 ラットにおける単回経口投与後の薬物動態試験 23
2.6.5.3.3 イヌにおける単回及び7日間反復投与後の吸収（静脈内及び経口投与） 24
2.6.5.3.4 Caco-2細胞における腸管粘膜透過性 26
2.6.5.4 薬物動態試験：分布 27
2.6.5.4.1 様々な動物種における*In Vitro*血漿蛋白結合 27
2.6.5.4.2 単回投与後の組織分布（ラット） 28
2.6.5.4.3 単回投与後の組織分布（ラット、QWBA） 33
2.6.5.5 薬物動態試験：代謝 35
2.6.5.5.1 肝ミクロソームにおける代謝安定性 35
2.6.5.5.2 マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト肝細胞における*in vitro*代謝 36
2.6.5.5.3 アミド加水分解酵素の同定 37
2.6.5.5.4 ヒト肝臓ミクロソームにおける*in vitro*代謝プロファイルとI27のCYP450フェノタイピング 40
2.6.5.5.5 ラット及びイヌの血漿、尿、糞便及び胆汁中代謝産物のプロファイリング 42
2.6.5.5.6 単回投与後の代謝物（ラット、RI標識体） 44
2.6.5.6 薬物動態試験：排泄 47
2.6.5.6.1 ラットにおける胆汁、糞及び尿中排泄 47
2.6.5.6.2 単回投与後の排泄（ラット、RI標識体） 48
2.6.5.7 薬物動態学的薬物相互作用 49
2.6.5.7.1 CYP450酵素誘導 49
2.6.5.7.2 CYP450酵素誘導試験におけるEC_{50}及びE_{max}の測定 52
2.6.5.7.3 CYH33及びI27のCYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 mRNA 発現に対する誘導能 57
2.6.5.7.4 CYP33及びI27の時間依存的CYP阻害 58
2.6.5.7.5 P-gp及びBCRPの排出トランスポーターに対するCYH33及びI27の潜在的作用 65

2.6.5.7.6 MDR1及びBCRP阻害試験におけるIC_{50}の測定 67
2.6.5.7.7 CYH33及びI27のOATP1B1、OATP1B3、MATE1及びMATE2-Kに対する潜在的作用 70
2.6.5.7.8 腎臓の主要なSLCトランスポーターの基質お及び阻害剤としての可能性 79

略語及び略号一覧

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
μCi	Microcurie	マイクロキュリー
μg	Microgram	マイクログラム
ADME	Absorption, distribution, metabolism, excretion	吸収、分布、代謝、排泄
AUC	Area under the blood concentration-time curve	血中薬物濃度-時間曲線下面積
AUC_{0-t}	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to the time t	0 からt 時間後における血中薬物濃度-時間曲線下面積
$AUC_{0-\infty}$	Area under the blood concentration-time curve from time 0 to time infinity	0から無限大時間における血中薬物濃度-時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白
BDC	Bile duct cannulated	胆管カニューレを挿入した
BLQ	Below limit of quantification	定量下限未満
Caco-2	Human colon cancer cell	ヒト結腸癌由来細胞-2
CL	Clearance	クリアランス
CL_{int}	Intrinsic clearance	固有クリアランス
C_{max}	Maximum blood concentration	最高血中濃度
CYP	Cytochrome P450	チトクロムP450
DDI	Drug-Drug Interactions	薬物間相互作用
GLP	Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準
HEK	Human embryonic kidney cells	ヒト胎児腎臓細胞
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	50% Inhibitory Concentration	50%阻害濃度
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry	液体クロマトグラフィータンデム質量分析
LE	Long-Evans (a pigmented rat strain)	ロングエバンス系（皮膚に有色部分のあるラットの動物系統）
LLOQ	Lower limit of quantitation	定量下限値
LSC	Liquid scintillation counter	液体シンチレーションカウンター
MATE	Multidrug and toxin compound extrusion	多剤・毒性化合物排出
MDCK	Madin-Darby canine kidney cells	Madin-Darbyイヌ腎細胞
MDR1	Multidrug resistance gene 1	多剤耐性遺伝子1
mRNA	Messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
MRT	Mean Residence Time	平均滞留時間
$MRT_{0-\infty}$	Mean residence time from the start of dosing (t_0) to the time of infinity concentration	0から無限大時間までの平均滞留時間
MRT_{0-t}	Mean residence time from the start of dosing (t_0) to the time of the last detectable concentration	最終測定可能時点までの平均滞留時間
MS/MS	tandem mass spectrometry	タンデム質量分析法
NA	Not applicable	該当なし
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, Reduced form	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸還元型

略語/略号	略していない表現（英語）	略していない表現（日本語）
nCi	Nacurie	ナノキュリー
OAT	Organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide	有機アニオントランスポーターポリペプチド
Papp	Apparent permeability coefficient	見かけの透過係数
PBS	Phosphate buffered saline	リン酸緩衝液
P-gp	P-glycoprotein	P糖蛋白
PO	Oral	経口
QD	Once a Day	1日1回
QWBA	Quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
SD	Sprague-Dawley (rat strain)	Sprague-Dawley（ラット動物系統）
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
T_{max}	Time to reach maximum plasma concentration	最高血漿中濃度到達時間
TRA	Total radioactivity	総放射能
UPLC/Q-TOF MS	Ultra-performance liquid chromatography tandem quadrupole time-of-flight mass spectrometry	高性能液体クロマトグラフィータンデム四重極型飛行時間型質量分析
ULOQ	Upper limit of quantification	定量上限値
V_{ss}	Volume of distribution at steady state	定常状態における分布容積

2.6.5 薬物動態試験の概要表

2.6.5.1 薬物動態の概要

				Test Article: CYH33	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Report No.**	**Location in eCTD**
Absorpt					
Single and 7-day (Non-GLP)	Rat/Sprague Dawley	Intravenous (IV) bolus and oral gavage (PO)	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Pharmacokinetic Study after Single Administration (Non-GLP)	Rat/Sprague Dawley	Oral gavage (PO)	[redacted]	[redacted]00952	M4.2.2.2-2
Single and 7-day (Non-GLP)	Dog /Beagle	Intravenous bolus (IV) and oral gavage (PO)	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Intestinal Mucosal Permeation (Non-GLP)	Caco-2 Cells	*In vitro*	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Distribution					
Plasma Protein Binding Across Species (Non-GLP)	Rat, dog, and human plasma	*In vitro*	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Single-dose Tissue Distribution (Non-GLP)	Rat/Sprague Dawley	Oral gavage (PO)	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Tissue Distribution after Single Administration (Non-GLP)	Rat/Long-Evans	Oral gavage (PO)	[redacted]	[redacted]00998	M4.2.2.3-1
Metabolism					
Metabolic Stability in Liver Microsomes (Non-GLP)	Mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes	*In vitro*	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Hepatic Metabolism (Non-GLP)	Mouse, rat, dog, monkey, and human hepatocytes	*In vitro*	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Enzyme Identification for Amide-Hydrolyzation (Non-GLP)	Dog liver and intestinal homogenates	*In vitro*	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
In Vitro Metabolic Profiles in Human Liver Microsomes and CYP450 Phenotyping of I27 (Non-GLP)	Human Liver Microsomes	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-I27-MetID-EP	M4.2.2.4-2

				Test Article: CYH33	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Report No.**	**Location in eCTD**
Metabolites Identification after Single Administration (Non-GLP)	Rat/Sprague Dawley, Dog/Beagle samples from absorption and excretion studies	Oral gavage (PO)	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Metabolites Identification after Single Administration (Non-GLP)	Rat/Sprague Dawley	Oral gavage (PO)	[redacted]	[redacted]01053	M4.2.2.4-1
Excretion					
Single-dose Excretion in Feces and Urine (Non-GLP)	Rat/Sprague Dawley	Oral Gavage	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
Pharmacokinetic Study after Single Administration (Non-GLP)	Rat/Sprague Dawley	Oral gavage (PO)	[redacted]	[redacted]00952	M4.2.2.2-2
Pharmacokinetic Drug Interactions					
CYP450 Enzyme Induction (Non-GLP)	Human hepatocytes	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-EID	M4.2.2.6-1
Determination of EC_{50} and E_{max} in CYP450 Enzyme Induction Test (Non-GLP)	Human hepatocytes	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-S2308-07-1	M4.2.2.6-2
Induction potentials of CYH33 and I27 on the mRNA expression of CYP2C8, CYP2C9 and CYP2C19 (Non-GLP)	Human primary hepatocyte	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-S2510-01-1	M4.2.2.6-7
CYP450 Enzyme Inhibition (Non-GLP)	Human liver microsomes	*In vitro*	[redacted]	CYH33-ADME-1	M4.2.2.2-1
CYH33 and I27 Time-dependent CYP Inhibition (Non-GLP)	Human liver microsomes	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-CYH33-2019-ADME-DDI-EI	M4.2.2.6-3
Potential as Substrates and Inhibitors of P-gp and BCRP (Non-GLP)	MDCK cell models	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-ETP	M4.2.2.6-4
Determination of IC_{50} in MDR1 and BCRP Inhibition Test (Non-GLP)	Human MDR1 and BCRP vesicles	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-S2210-20-1	M4.2.2.6-5
Potential as Substrates and Inhibitors of OATP1B1, OATP1B3, MATE1 and MATE2-K (Non-GLP)	HEK293 cells	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-CYH33-ADME-DDI-UTP	M4.2.2.6-6

				Test Article: CYH33	
Type of Study	**Test System**	**Method of Administration**	**Testing Facility**	**Report No.**	**Location in eCTD**
Potential as Substrates and Inhibitors of Renal Major SLC Transporters (Non-GLP)	HEK293 cells	*In vitro*	[redacted]	[redacted]-CYH33-2025-In vitro-DDI-UTP	M4.2.2.6-8

2.6.5.2 薬物動態試験：分析方法及びバリデーション試験

2.6.5.2.1 薬物動態試験：分析方法及びバリデーション試験の一覧

Matrix	GLP compliance	Testing facility	Study number	CTD section number
Rat Plasma	Not required	[redacted]	15[redacted]018	M4.2.2.1-1
Dog Plasma	Not required	[redacted]	16[redacted]003	M4.2.2.1-2
Extracellular Fluid	GLP	[redacted]	19063-19037	M4.2.2.1-3
Suspension and solution	GLP	[redacted]	CYH33-V001	M4.2.2.1-4
Rat Plasma	GLP	[redacted]	20[redacted]04[redacted]	M4.2.2.1-5
Dog Plasma	GLP	[redacted]	20[redacted]03[redacted]	M4.2.2.1-6
Rat Plasma	GLP	[redacted]	[redacted]23066[redacted]01	M4.2.2.1-7

2.6.5.2.2 ラット血漿におけるバリデーション試験

Study title:	Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in SD Rat Plasma Bioanalytic Method Validation Report (Amendment)		Study No.	15[redacted]018
Location in CTD:	M4.2.2.1-1			
GLP compliance:	Not required			
Test articles:	CYH33 and I27			
Species / matrix:	Rat / Plasma			
Method:	The method for a 30 μL plasma sample consists of protein precipitation with 150 μL of acetonitrile containing 20.0 ng/mL internal standard, centrifugation, aspiration of 100 μL supernatant, mixing the supernatant with 200 μL diluents solvent (0.01% FA in H_2O), injection of 10 μL into an LC-MS/MS system and measurement in MRM mode using ESI positive as the ionization method.			
Substance analyzed:	CYH33 and I27			
Internal standard:	CYH33-D			
Results:	Selectivity:	**Interference in Blank Matrix:** The results met the criteria. **Interference of Internal Standard to CYH33 and I27:** The results met the criteria: The peak area at the retention time of CYH33 and I27 in the samples was no more than 20% of mean peak area of LLOQ QC samples in the analytical batch. **Interference of CYH33 to I27 and Internal Standard:** The results met the criteria: The peak area at the retention time of internal standard in the samples was no more than 5% of mean internal standard peak area of LLOQ calibrators in the analytical batch. **Interference of I27 to CYH33 and Internal Standard:** The results met the criteria: The peak area at the retention time of CYH33 in the samples was no more than 20% of mean peak area of LLOQ QC samples. The peak area at the retention time of internal standard in the samples was no more than 5% of mean internal standard peak area of LLOQ calibrators in the analytical batch.		
	Stability:	**Reference Standard Stock Solution Stability:** Stable for 27 hours in clear glass bottle (wrapped with aluminum foil) at room temperature. Stable for 22 days at 2 to 8°C and protected from light. **Working Solution Stability:** Stable for 25.5 hours (CYH33) and 26 hours (I27) in umber polypropylene centrifuge tube at room temperature. Stable for 21 days (CYH33) and 8 days (I27) at 2 to 8°C and protected from light. **Autosampler Stability:** Stable for 64 hours in autosampler at about 4°C. **Room Temperature/Ice-bath at room temperature Stability in Matrix:** Stable for 26 hours in umber polypropylene centrifuge tube at room temperature. Stable for 6 hours in umber polypropylene centrifuge tube in ice-bath at room temperature. **Freeze/Thaw Cycles Stability in Matrix:** Stable for 4 freeze/thaw (ice bath-frozen) cycles. **Frozen-Storage Stability in Matrix:** Stable for 167 days at ≤ -65°C and protected from light. **Stability in Matrix without DDVP:** Stable for 6 hours in umber polypropylene centrifuge tube in ice-bath at room temperature. Stable for 142 days at ≤ -65°C and protected from light.		
	Intra-day accuracy and precision:	**CYH33:** **Intra-batch Accuracy (%Bias):** Run1: -5.2 to 1.6, Run 2: -0.5 to 3.6, Run 3: -0.5 to -1.9. I**ntra-batch Precision (%CV):** Run 1: 1.8 to 5.5, Run 2: 1.9 to 5.3, Run 3: 4.5 to 7.0. **I27:** **Intra-batch Accuracy (%Bias):** Run 1: 1.0 to 4.5, Run 2: 0.3 to 11.0, Run 3: -1.0 to 2.0. **Intra-batch Precision (%CV):** Run 1: 1.7 to 14.5, Run 2: 1.3 to 10.5, Run 3: -1.7 to 10.1.		

	Inter-day accuracy and precision:	**CYH33:** **Inter-batch Accuracy (%Bias):** -2.4 to 1.9 **Inter-batch Precision ((%CV):** 3.1 to 6.0 **I27:** **Inter-batch Accuracy (%Bias):** 0.0 to 4.5 **Inter-batch Precision ((%CV):** 2.4 to 12.2
	Dynamic range:	**LLOQ:** CYH33/I27: 2.10/0.200 ng/mL; **ULOQ:** CYH33/I27: 1050/200 ng/mL
	Sensitivity (LLOQ)	The results met the acceptance criteria: The precision (n=6) was ≤ 20% and the Bias was within ±20% of the nominal concentration. At least two thirds of all LLOQ QC samples met the acceptance criteria (means the precision of all measured samples was within 20%, and more than two thirds of measured samples was within 20%).
	Recovery:	**CYH33:** **Mean recovery (%):** QCs low: 89.2, QCs mid: 86.5, QCs high: 89.1, Overall: 88.2. **CV (%):** QCs low: 10.2, QCs mid: 9.3, QCs high: 10.7, Overall: 9.6. **I27:** **Mean recovery (%):** QCs low: 88.3, QCs mid: 90.2, QCs high: 87.3, Overall: 88.6. **CV (%):** QCs low: 5.4, QCs mid: 7.6, QCs high: 5.2, Overall: 6.0.
	Matrix effect:	The results met the acceptance criteria. The CV% of matrix effect at each concentration level of all batches and the CV% of all concentration levels were within 15%.
	Carryover:	The carryover assessment results of CYH33, I27 and internal standard (CYH33-D) in all accepted batches met the criteria.
	Calibration:	Deviation of ±15% (±20% at the LLOQ) for 75% of the calibration standards from the nominal values at a minimum of 6 different levels.
	Dilution Capability:	Dilution QC concentration was above ULOQ (CYH33 and I27: 5250 and 1000 ng/mL, respectively), dilution factor of 10-fold was validated, and the results met the requirement.
	Special issues:	None.

2.6.5.2.3 イヌ血漿におけるバリデーション試験

Study title:	Validation of an HPLC-MS/MS Methodology for the Determination of CYH33 and I27 in Beagle Dog Plasma Bioanalytical Method Validation Report (Amendment)	Study No.	16[redacted]003
Location in CTD:	M4.2.2.1-2		
GLP compliance:	Not required		
Test articles:	CYH33 and I27		
Species / matrix:	Dog / Plasma		
Method:	The method for a 30 µL plasma sample consists of protein precipitation with 150 µL of acetonitrile containing 20.0 ng/mL internal standard, centrifugation, aspiration of 120 µL supernatant, mixing the supernatant with 200 µL diluents solvent (0.01% FA in H_2O), injection of 10 µL into an LC-MS/MS system and measurement in MRM mode using ESI positive as the ionization method.		
Substance analyzed:	CYH33 and I27		
Internal standard:	CYH33-D		
Results:	Selectivity:	**Interference in Blank Matrix:** The results met the criteria. **Interference of Internal Standard to CYH33 and I27:** The result of interference of internal standard (20.0 ng/mL) to CYH33 did not meet the criteria, the result of interference of internal standard (20.0 ng/mL) to I27 met the criteria. The concentration of internal standard was changed to 5.0 ng/mL and the interference results for CYH33 and I27 met the acceptance criteria. **Interference of CYH33 and I27 to Internal Standard:** The interference of CYH33 and I27 to internal standard met the criteria: The peak area at the retention time of internal standard was no more than 5% of mean internal standard peak area of active LLOQ calibrators in the analytical batch. The interferences of CYH33 and I27 to internal standard were evaluated at two concentration levels of IS (20 ng/mL and 5.0 ng/mL) and all results met the acceptance criteria. **Mutual Interference between CYH33 and I27:** The results met the criteria.
	Stability:	**Reference Standard Stock Solution Stability:** Stable for 27 hours in transparent glass bottle wrapped with aluminum foil paper stored at room temperature. Stable for 22 days at 2 to 8°C and protected from light. **Working Solution Stability:** Stable for 25.5 hours (CYH33) and 26 hours (I27) in brown polypropylene tube stored at room temperature. Stable for 21 days (CYH33) and 8 days (I27) at 2 to 8°C and protected from light **Autosampler Stability:** Stable for 54 hours in autosampler at about 4°C. **Room Temperature Stability in Matrix:** Stable for 21 hours in brown polypropylene tube stored at room temperature. **Freeze/Thaw Cycles Stability in Matrix:** Stable for 4 freeze/thaw cycles. **Long-term Frozen Storage Stability in Matrix:** Stable for 139 days stored at ≤ -65°C and protected from light.
	Intra-day accuracy and precision:	**CYH33:** **Intra-batch Accuracy (%Bias)**: Run 1: -7.6 to 5.2, Run 2: -8.4 to -1.9, Run 3: -6.7 to -1.3. **Intra-batch Precision (%CV)**: Run 1: 1.9 to 5.3, Run 2: 1.4 to 7.2, Run 3: 3.4 to 8.4. **I27:** **Intra-batch Accuracy (%Bias):** Run 1: -12.8 to -0.7, Run 2: -7.0 to -0.8, Run 3: -8.7 to 3.0. **Intra-batch Precision (%CV):** Run 1: 1.9 to 12.6, Run 2: 1.9 to 16.1, Run 3: 5.6 to 10.4.
	Inter-day accuracy and precision:	**CYH33:** **Inter-batch Accuracy (%Bias):** -6.5 to -1.9 **Inter-batch Precision (%CV):** 3.4 to 8.4 **I27:** **Inter-batch Accuracy (%Bias):** -7.8 to -0.9

		Inter-batch Precision (%CV): 4.8 to 12.5
	Dynamic range:	**LLOQ:** CYH33/I27: 2.10/0.200 ng/mL; **ULOQ:** CYH33/I27: 210/200 ng/mL
	Sensitivity (LLOQ)	The result met the criteria: the precision (n=6) was ≤20% and the Bias was within ±20% of the nominal concentration. At least two thirds of all LLOQ QC samples met the bias acceptance criteria.
	Recovery:	**CYH33:** **Mean recovery (%):** QCs low: 98.2, QCs mid: 96.3, QCs high: 104.8, Overall: 99.8. **CV (%):** QCs low: 7.2, QCs mid: 1.5, QCs high: 3.5, Overall: 5.8. **I27:** **Mean recovery (%):** QCs low: 93.8, QCs mid: 99.1, QCs high: 98.9, Overall: 97.3. **CV (%):** QCs low: 7.2, QCs mid: 5.4, QCs high: 5.3, Overall: 6.2.
	Matrix effect:	The result met the criteria: At each concentration level, the CV% of matrix effect for all batches and all concentration levels was within 15%.
	Carryover:	For CYH33, only one batch of all the acceptable batches (n=9) did not meet the criteria, the carryover was 33.7%, which was a little higher than 20% and implied that might exist carryover. If the carryover in TK samples analysis was beyond the standard, then the batch would accept carryover evaluation. For Internal Standard (CYH33-D), the carryover evaluation in all the acceptable batches of CYH33 and I27 met the criteria. For I27, the carryover of all the acceptable batches (n=9) met the criteria: There was no peak area or the maximum peak area at the retention time of the analyte was no more than 20% of relevant mean active LLOQ calibrators peak area and the internal standard was no more than 5% of relevant mean internal standard peak area of active LLOQ calibrators.
	Calibration:	Deviation of ±15% (±20% at the LLOQ) for 75% of the calibration standards from the nominal values at a minimum of 6 different levels.
	Dilution Capability:	Dilution QC concentration was above ULOQ (CYH33 and I27: 1050 and 1000 ng/mL, respectively), dilution factor of 10-fold was validated, and the results met the requirement.
	Special issues:	None.

2.6.5.2.4 細胞外液分析法のバリデーション試験

Study title:	Method Validation for Determination the Concentration of CYH33 in Extracellular Solution by LC-MS/MS		Study No.	19063-19037
Location in CTD:	M4.2.2.1-3			
GLP compliance:	Required			
Test articles:	CYH33			
Species / matrix:	Extracellular solution (ECS)			
Method:	3 μL of calibration standard working solutions, QC working solutions, or other validation working solutions was added into 997 μL of blank matrix, vortex mixing to yield calibration standard samples, QC samples, and other validation samples, then processed by sample processing method to prepare samples for LC-MS/MS analysis.			
Substance analyzed:	CYH33			
Internal standard:	Warfarin			
Results:	System Suitability Test:	The RSD of the peak area of analyte was ≤ 9.83%. The RSD of the retention time of analyte was ≤ 0.63%.		
	Specificity:	The peak response in the retention region of the analyte of blank matrix was ≤ 2.67% of analyte response in active LLOQ. The peak response in the retention region of the internal standard of blank matrix was ≤ 0.00% of the average IS responses of the calibration standards and QCs.		
	Carryover:	The analyte response in the blank was ≤ 10.81% of analyte response in active LLOQ. The IS response in the blank was ≤ 0.00% of IS response in active LLOQ.		
	Linearity:	The RE of at least 75% calibration standards was within -1.57% to 1.57%. The r^2 was ≥ 0.9966.		
	Ancillary Validation QC Samples:	≥ 2/3 of all QCs and at least 50% at each QC level was within -0.04% to 0.04% RE of the nominal value.		
	Stability:	**All Met Acceptance Criteria** **Stock Solution Stability (analyte and IS):** The RSD of peak area of analyte was ≤ 3.96%, and the RD was within -2.31% to 1.94%. The RSD of peak area of IS was ≤ 2.76%, and the RD was within -2.42% to 0.46%. **Working Solution Stability (analyte and IS):** The RSD of peak area of analyte was ≤ 2.81%, and the RD was within -1.41% to -1.07%. The RSD of peak area of IS was ≤ 1.40%, and the RD was 3.11%. **Bench Top Stability:** The RSD of stability samples was ≤4.10%, and the average RE was within -4.90% to 0.41%. **Processed Sample Stability:** The RSD of stability samples was ≤ 5.11%, and the average RE was within -5.50% to 0.30%. **Autosampler Stability:** The RSD of stability samples was ≤ 6.33%, and the average RE was within -0.94% to 0.12%.		

2.6.5.2.5 調製液の分析方法及びバリデーション試験

Study title:	Validation of an HPLC Method for CYH33 and Evaluation of Formulation Homogeneity and Stability		Study No.	CYH33-V001
Location in CTD:	M4.2.2.1-4			
GLP compliance:	Required			
Test articles:	CYH33			
Species / matrix:	None/Suspension and solution			
Method:	**Suspension:** After vortex, aliquot certain volume of test formulation sample, added appropriate volume of 50% ACN. The samples were dissolved by ultrasonication for at least 10 minutes and diluted to final volume with 50% ACN after cooling down to room temperature. **Solution (vehicle: 1%HPMC or DMSO**): Aliquot certain volume of test formulation sample, diluted to final volume of 50%ACN. If the concentration was within the calibration curve range, the samples would be analyzed without dilution.			
Substance analyzed:	CYH33			
Internal standard:	None.			
Results:	Stock Standard Comparison:	RSD: 0.0% ~ 0.4%; Difference: -0.5% ~0.5%.		
	System Suitability Test:	RSD: 0.0% ~ 0.5%; Tailing Factor: 1.365~1.542; N: 4327~6009.		
	Performance Check:	Bias: -0.8% ~ 0.8%.		
	Calibration curve and Linearity Range:	Correlation coefficient: 0.9999929~0.9999985; Bias: -0.2% ~0.1%.		
	Accuracy and Precision:	Formulation 1 (Suspension): Bias: -0.6%~6.0%; RSD: 0.2%~1.5%. Formulation 2 (Solution): Bias: -1.8%~6.1%; RSD: 0.0%~1.0%.		
	Selectivity:	No analyte peak detected in diluents and vehicle, No carryover peak (carryover: 0.0% LLOQ).		
	Sensitivity (LLOQ):	S/N: 1374.36~1622.38; Bias: 0.6%; RSD: 0.3%.		
	Stability:	**4℃ autosampler stability:** Stable for at least 24h. **Formulation Storage Stability:** **Formulation 1 (suspension):** 0.02 mg/mL to 98.8 mg/mL, free base; 0.02442 mg/mL to 120.6 mg/mL, salt base, at room temperature (not protected from light), stable for at least 14 days. **Formulation 2 (solution):** 0.00988 mg/mL to 49.4 mg/mL, free base; 0.01206 mg/mL to 60.32 mg/mL, salt base, at room temperature (protected from light), stable for at least 24h. **Standard Solution (diluents) Stability:** 5.25 μg/mL to 105 μg/mL, free base, at room temperature (protected from light), at 2-8℃ (protected from light), stable for at least 24h. **Standard Stock Solution Storage Stability:** 1.05 mg/mL, free base at room temperature (protected from light), at 2-8ºC (protected from light), stable for at least 14 days.		
	Special issues:	None		

2.6.5.2.6 ラット血漿におけるバリデーション試験

Study title:	Partial Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in SD Rat Plasma (Na Heparin)	Study No.	20[redacted]04[redacted]
Location in CTD:	M4.2.2.1-5		
GLP compliance:	Required		
Test articles:	CYH33		
Species / matrix:	Rat / Plasma		
Method:	The method for a 30 µL plasma sample consists of protein precipitation with 150 µL of ACN containing 5.00 ng/mL CYH33-D8 and 5.00 ng/mL I27-D8 internal standard, centrifugation, aspiration of 100 µL supernatant, mixing the supernatant with 200 µL diluent solvent (0.01% FA in Water), injection of 20 µL into an LC-MS/MS system and measurement in MRM mode using ESI positive as the ionization method.		
Substance analyzed:	CYH33/I27		
Internal standard:	CYH33-D8/I27-D8		
Results:	Selectivity:	The results met the requirement.	
	Stability:	**Reference Standard Stock Solution Stability:** Stable for 27 hours in clear glass bottle (wrapped with aluminum foil) at room temperature, Stable for 22 days at 2 to 8°C and protected from light. **Working Solution Stability:** CYH33: Stable for 25.5 hours in umber polypropylene centrifuge tube at room temperature; stable for 21 days at 2 to 8°C and protected from light. I27: Stable for 26 hours in umber polypropylene centrifuge tube at room temperature; stable for 8 days at 2 to 8°C and protected from light. Processed Sample Stability: Stable for 64 hours in autosampler (about 4°C). **Stability of Matrix Sample at Room Temperature:** Stable for 26 hours at room temperature. **Freeze-Thaw Cycle Stability of Matrix Sample:** Stable after 4 freeze-thaw cycles (≤-65°C / ice-bath). **Long-term Frozen Storage Stability of Matrix Sample:** Stable for 167 days at ≤-65°C and protected from light.	
	Intra-day accuracy and precision:	**Intra-batch Accuracy (%Bias):** **CYH33:** Run 1: -1.5 to 5.2, Run 2:2.6 to 5.4, Run 3: -14.5 to 10.0. **I27:** Run 1: -6.0 to -0.7, Run 2: -1.2 to 6.0, Run 3: -1.0 to 1.3. **Intra-batch Precision (%CV):** **CYH33:** Run 1: 3.0 to 12.6, Run 2: 3.2 to 8.9, Run 3: 5.6 to 15.5. **I27:** Run 1: 1.9 to 5.9, Run 2: 0.9 to 9.2, Run 3: 1.0 to 7.1.	
	Inter-day accuracy and precision:	**Inter-batch Accuracy (%Bias):** **CYH33:** -4.0 to 6.1. **I27:** -2.3 to 1.3. **Inter-batch Precision (%CV):** **CYH33:** 4.2 to 14.3. **I27:** 3.0 to 8.8.	
	Dynamic range:	LLOQ: CYH33/I27: 2.00/0.200 ng/mL; ULOQ: CYH33/I27: 1000/200 ng/mL	
	Recovery:	The results met the acceptance criteria.	
	Matrix effect:	The results met the acceptance criteria.	

Study title:	Partial Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in SD Rat Plasma (Na Heparin)	Study No.	20[redacted]04[redacted]
	Carryover:	Except that carryover was observed on CYH33, which will be evaluated during sample analysis, the carryover evaluation on I27 and IS met the acceptance criterion. The system carryover for the batch was out of 20% of LLOQ peak area, but the analytical results of this batch were not considered affected after assessment.	
	Calibration:	Deviation of ±15% (±20% at the LLOQ) for 75% of the calibration standards from the nominal values at a minimum of 6 different levels.	
	Special issues:	None.	

2.6.5.2.7 イヌ血漿におけるバリデーション試験

Study title:	Partial Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in Beagle Dog Plasma (Na Heparin)	Study No.	20[redacted]03[redacted]
Location in CTD:	M4.2.2.1-6		
GLP compliance:	Required		
Test articles:	CYH33		
Species / matrix:	Beagle dog / Plasma		
Method:	The method for a 30 µL plasma sample consists of protein precipitation with 150 µL of ACN containing 5.00 ng/mL CYH33-D8 and 5.00 ng/mL I27-D8 internal standard, centrifugation, aspiration of 120µL supernatant, mixing the supernatant with 200 µL of diluent solvent (0.01% FA in Water), injection of 20 µL into an LC-MS/MS system and measurement in MRM mode using ESI positive as the ionization method.		
Substance analyzed:	CYH33/I27		
Internal standard:	CYH33-D8/I27-D8		
Results:	Selectivity:	The results met the requirement.	
	Stability:	**Reference Standard Stock Solution Stability:** Stable for 27 hours in clear glass bottle (wrapped with aluminum foil) at room temperature; stable for 22 days at 2 to 8°C and protected from light. **Working Solution Stability:** CYH33: Stable for 25.5 hours in umber polypropylene centrifuge tube at room temperature; stable for 21 days at 2 to 8°C and protected from light. I27: Stable for 26 hours in umber polypropylene centrifuge tube at room temperature; stable for 8 days at 2 to 8°C and protected from light. **Processed Sample Stability:** Stable for 54 hours in autosampler (about 4°C). **Stability of Matrix Sample at Room Temperature:** Stable for 21 hours at room temperature. **Freeze-Thaw Cycle Stability of Matrix Sample:** Stable for 4 freeze/thaw cycles (≤-65°C/RT). **Long-term Frozen Storage Stability of Matrix Sample:** Stable for 139 days at ≤ -65°C.	
	Intra-day accuracy and precision:	**Intra-batch Accuracy (%Bias):** **CYH33:** Run 1: -3.3 to 12.5, Run 2: -4.7 to 12.5, Run 3: -12.0 to 11.0. **I27:** Run 1: -8.0 to -0.3, Run 2: -3.3 to 3.2, Run 3: -3.0 to 3.0. **Intra-batch Precision (%CV):** **CYH33:** Run 1: 5.3 to 12.8, Run 2: 4.5 to 13.9, Run 3: 6.7 to 12.0. **I27:** Run 1: 3.0 to 5.7, Run 2: 2.9 to 6.9, Run 3: 2.9 to 7.1.	
	Inter-day accuracy and precision:	**Inter-batch Accuracy (%Bias):** **CYH33:** -1.3 to 4.0. **I27:** -4.7 to 1.0. **Inter-batch Precision ((%CV):** **CYH33:** 7.0 to 16.9. **I27:** 4.0 to 6.4.	
	Dynamic range:	LLOQ: CYH33/I27: 0.200/0.200 ng/mL; ULOQ: CYH33/I27: 200/200 ng/mL	
	Recovery:	The results met the acceptance criteria.	
	Matrix effect:	The results met the acceptance criteria.	
	Carryover:	The system carryover met the acceptance criteria.	

Study title:	Partial Validation of an HPLC-MS/MS Method for the Determination of CYH33 and I27 in Beagle Dog Plasma (Na Heparin)	Study No.	20[redacted]03[redacted]
	Calibration:	Deviation of ±15% (±20% at the LLOQ) for 75% of the calibration standards from the nominal values at a minimum of 6 different levels	
	Special issues:	None.	

2.6.5.2.8 ラット血漿におけるバリデーション試験

Study title:	Method Validation of an LC-MS/MS method for the determination of CYH33, I27 in BN Rat heparin sodium plasma	Study No.	[redacted]23066[redacted]01
Location in CTD:	M4.2.2.1-7		
GLP compliance:	Required		
Test articles:	CYH33		
Species / matrix:	Brown Norway rat / Plasma		
Method:	The method for a 20 µL plasma sample consists of protein precipitation with 20 µL Internal Standard Working Solution (CYH33-D8/ I27-D8: 100.000 ng/mL) and 210 µL of precipitant solution (ACN), vortex for 10min at 1000 rpm, centrifugation, aspiration of 100 µL supernatant, mixing the supernatant with 200 µL of reconstitution solution (0.01% of FA in 10% of ACN: Water) to each well for dilution, injection of 5 µL into an LC-MS/MS system and measurement in MRM mode using ESI positive as the ionization method.		
Substance analyzed:	CYH33/I27		
Internal standard:	CYH33-D8/I27-D8		
Results:	Selectivity:	The results met the requirement.	
	Stability:	**Short-term stability of stock solution:** CYH33: stable for at least 15 hours at room temperature under white light; I27: stable for at least 15 hours at room temperature under white light; CYH33-D8: stable for at least 15 hours at room temperature under white light; I27-D8: stable for at least 15 hours at room temperature under white light. **Short-term stability of working solution:** CYH33/I27: stable for at least 15 hours at room temperature under white light; CYH33-D8/IS23066-B: stable for at least 15 hours at room temperature under white light. **Long-term stability of stock solution:** CYH33: stable for at least 56 days at -70 - -90 °C; I27: stable for at least 56 days at -70 - -90 °C; CYH33-D8: stable for at least 56 days at -70 - -90 °C; I27-D8: stable for at least 56 days at -70 - -90 °C. **Long-term stability of working solution:** CYH33/I27: stable for at least 56 days at -70 - -90 °C; CYH33-D8/IS23066-B: stable for at least 56 days at -70 - -90 °C. **Short-Term Stability of QC Samples:** Stable for at least 14 hours in ice bath under white light. **Freeze-Thaw Stability:** Stable after at least 4 cycles at -70 - -90 °C/ in ice bath under white light. **Processed Samples Stability:** Stable for at least 131 hours at auto-sampler (5 °C) temperature. **Long-Term Stability in Matrix:** Stable for at least 56 days at -70 - -90 °C. **Whole Blood Stability:** Blood samples stable for at least 1.5 hours in ice bath under white light.	
	Intra-batch Accuracy and Precision (all QC samples except LLOQ):	**Intra-batch Accuracy (%Bias):** CYH33: -8.7 - 6.9%; I27: -3.7 - 8.2%. **Intra-batch Precision (%CV):** CYH33: 11.2; I27: 8.1.	

Study title:	Method Validation of an LC-MS/MS method for the determination of CYH33, I27 in BN Rat heparin sodium plasma	Study No.	[redacted]23066[redacted]01
	Intra-batch Accuracy and Precision (LLOQ QC):	**Intra-batch Accuracy (%Bias):** CYH33: -9.1 - 2.1%; I27: -8.3 - 1.6%. **Intra-batch Precision (%CV):** CYH33: 11.9; I27: 7.3	
	Inter-batch Accuracy and Precision (all QC samples except LLOQ):	**Inter-batch Accuracy (%Bias):** CYH33: -2.1 - 0.8%; I27: -2.9 - 5.4%. **Inter-batch Precision (%CV):** CYH33: 7.6; I27: 6.9	
	Inter-batch Accuracy and Precision (LLOQ QC):	**Inter-batch Accuracy (%Bias):** CYH33: -3.1%; I27: -2.4%. **Inter-batch Precision (%CV):** CYH33: 10.6; I27: 7.3	
	Inter-day accuracy and precision:	Inter-batch Accuracy (%Bias): CYH33: -1.3 to 4.0; I27: -4.7 to 1.0. Inter-batch Precision ((%CV): CYH33: 7.0 to 16.9; I27: 4.0 to 6.4.	
	Linearity Range:	CYH33: 2.000 - 2000.000 ng/mL; I27: 1.000 - 1000.000 ng/mL	
	Recovery:	The results met the acceptance criteria.	
	Matrix effect:	The results met the acceptance criteria.	
	Carryover:	The system carryover met the acceptance criteria.	
	Calibration:	Deviation of ±15% (±20% at the LLOQ) for 75% of the calibration standards from the nominal values at a minimum of 6 different levels	
	Special issues:	None.	

2.6.5.3 薬物動態試験：吸収

2.6.5.3.1 ラットにおける単回及び 7 日間反復投与後の吸収（静脈内及び経口投与）

	Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)	**Test Article: CYH33** **Report No.:** CYH33-ADME-1 **Location in eCTD:** M4.2.2.2-1
Species/Strain: Rat /Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** Single IV and PO, and daily 7-day oral administration	**GLP Compliance: Non-GLP**
Number of animals/Gender/Dose: 3/sex/group	**Feeding Condition:** Fast at least 10 hr before dosing and drink water ad libitum	
Study Date: [redacted], 20[redacted]	**Method of Administration:** IV bolus & Oral gavage	**Vehicle/Formulation:** PO: 1% HPMC with a dose volume of 10 mL/kg, IV: 10% DMSO/10% Tween 80/80% normal saline solution
Sample: Plasma	**Analytes:** CYH33 and I27	**Assay:** LC-MS/MS

Special Features:
IV Dose: 1 mg/kg
PO Dose: single PO at 1, 3, and 12 (male)/ 6 (female) mg/kg; multiple PO for 7-day at 3 mg/kg
Batch No.: [redacted]
Sample collection time points: pre-dose, 5 min, 15 min, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10, 24, 48, and 72 hours post-dose for IV group, and at pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, and 72 hours post-dose for single PO administration, and at pre-dose on D5, 6, and 7, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, and 72 hours post-dose on D7 for the multiple PO dose group
Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using WinNonlin® Pharsight software (Version 8.3).

Pharmacokinetic parameters

Dosing Route	IV		PO							
Dose Regimen	Single		Single						7-Day QD	
CYH33 Dose Levels (mg/kg)	1		1		3		12 (male)/6 (female) mg/kg		3 mg/kg	
Gender (n=3)	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F
CYH33										
T_{max} (hr)	NA	NA	2.0 ± 0.0	3.3 ± 1.2	3.3 ± 2.3	2.7 ± 1.2	3.3 ± 2.3	4.7 ± 1.2	1.7 ± 0.6	3.3 ± 1.2
C_{max} (ng/mL)	NA	NA	20.3 ± 3.56	123 ± 85.5	53.3 ± 26.4	313 ± 74.8	137 ± 59.5	438 ± 122	45.8 ± 8.21	422 ± 109
AUC_{0_t} (hr·ng/mL)	365 ± 56.0	2640 ± 668	68.8 ± 20.2	1410 ± 1020	303 ± 147	3710 ± 1140	835 ± 812	5860 ± 1600	178 ± 41.6	6300 ± 3040
AUC_{0_∞} (hr·ng/mL)	366 ± 56.1	2647 ± 673	69.5 ± 20.5	1420 ± 1000	316 ± 149	3710 ± 1140	884 ± 895	5860 ± 1610	181 ± 41.9	6310 ± 3030
$MRT_{0-\infty}$ (hr)	1.00 ± 0.21	6.84 ± 1.24	2.95 ± 0.28	8.81 ± 0.64	6.74 ± 4.82	9.1 ± 1.08	5.53 ± 4.39	10.2 ± 1.02	-	-
$T_{1/2}$ (hr)	1.21 ± 0.37	6.19 ± 1.84	1.33 ± 0.06	6.17 ± 1.08	3.48 ± 2.54	6.9 ± 0.44	4.54 ± 1.13	7.03 ± 0.12	1.37 ± 0.14	6.52 ± 0.59
CL_{obs} (mL/min/kg)	34.0 ± 4.88	4.83 ± 1.18	-	-	-	-	-	-	-	-
V_{ss} (L/kg)	1.99 ± 0.13	1.93 ± 0.16	-	-	-	-	-	-	-	-
R* (%)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
I27										
T_{max} (hr)	0.58 ± 0.38	4.0 ± 0.0	2.0 ± 0.0	4.7 ± 1.2	3.3 ± 2.3	4.7 ± 1.2	3.3 ± 2.3	7.3 ± 1.2	2 ± 0	5.3 ± 4.2
C_{max} (ng/mL)	2.95 ± 0.98	21.3 ± 5.77	0.642 ± 0.22	14.2 ± 9.87	1.31 ± 0.85	24.7 ± 8.58	3.09 ± 2.55	41.4 ± 15.1	1.35 ± 0.211	50.4 ± 15.2
AUC_{0_t} (hr·ng/mL)	6.80 ± 3.82	342 ± 50	1.99 ± 1.21	258 ± 173	6.48 ± 5.54	429 ± 126	17.4 ± 21.2	840 ± 289	5.2 ± 0.867	1120 ± 500
AUC_{0_∞} (hr·ng/mL)	7.16 ± 4.11	347 ± 48.5	N.A.	262 ± 172	7.15 ± 5.89	432 ± 126	24.1 ± 27.0	845 ± 292	5.67 ± 0.728	1120 ± 502

$MRT_{0-\infty}$ (hr)	1.73 ± 0.47	12 ± 2.56	N.A.	13.7 ± 1.13	5.29 ± 2.4	12.8 ± 1.04	5.86 ± 3.58	14.7 ± 0.35	-	-
$T_{1/2}$ (hr)	1.21 ± 0.3	7.72 ± 1.78	N.A.	7.92 ± 1.6	1.96 ± 0.48	7.19 ± 0.87	2.81 ± 1.66	8.75 ± 0.44	1.89 ± 0.40	8.11 ± 0.12
CL_{obs} (mL/min/kg)	N.A.	N.A.	-	-	-	-	-	-	-	-
V_{ss} (L/kg)	N.A.	N.A.	-	-	-	-	-	-	-	-
R^* (%)	1.79 ± 0.75	13.5 ± 3.81	2.77 ± 0.99	19.3 ± 3.2	2.07 ± 0.99	12.2 ± 4.9	1.76 ± 0.63	15.4 ± 8.3	3.01 ± 0.67	19.1 ± 6

Data expressed as mean±SD values; Abbreviations: M= male; F = female; D=day; IV = intravenous bolus; PO = oral; 17.4 ± 21.2N/A = Not Applicable; R: ratio of metabolite AUC_{0-t} to parent AUC_{0-t}., "-" not measured

2.6.5.3.2 ラットにおける単回経口投与後の薬物動態試験

	Report Title: Abortion and Excretion of [^{14}C]CYH33 in Male and Female Sprague-Dawley Rats Following a Single Oral Administration at 3 mg/100 µCi/kg	**Test Article:** [^{14}C]CYH33 **Report No.:** [redacted]00952 **Location in eCTD:** M4.2.2.2-2
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley **Number of animals/Gender/Dose:** 3/sex/group	**Duration of Dosing:** Single PO **Feeding Condition:** Fast at least 10 hr before dosing and drink water ad libitum	**GLP Compliance:** Non-GLP
Study Date: [redacted], 20[redacted]-[redacted], 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Vehicle/Formulation:** PO: 1% HPMC with a dose volume of 10 mL/kg
Sample: Plasma	**Analytes:** [^{14}C]CYH33	**Assay:** Liquid scintillation counting

Special Features:	PO Dose: single PO at 3 mg/100 µCi/kg Batch No.of [^{14}C]CYH33: [redacted] Sample collection time points: pre-dose, 0.5 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 8 h, 10 h, 24 h, 72 h and 168 h post-dose from the rats. Urine, feces, and cage rinse/wash were collected up to 168 h post-dose from six intact rats; and bile, urine, feces, and cage rinse/wash were collected up to 72 h post-dose from the BDC rats. Aliquots of plasma, bile, urine, and cage rinse/wash samples were radio-assayed by liquid scintillation counting (LSC) directly. Fecal powder and blood samples were combusted by oxidizer, and the generated [^{14}C]CO_2 was captured by scintillation liquid, followed by radio-assay using liquid scintillation counter. The TRA determined in bile, urine, feces and cage rinse/cage wash were used to calculate percent of the administered dose recovery, and the TRA determined in blood and plasma were converted to nanogram equivalent of [^{14}C]CYH33 per gram sample (ng Eq./g). Plasma pharmacokinetic analysis was performed using WinNonlin® Pharsight software (Version 8.3).

Pharmacokinetic parameters

PK Parameters	Unit	Blood			Plasma		
		Female (n=3)	Male (n=3)	Female vs. Male	Female (n=3)	Male (n=3)	Female vs. Male
T_{max}	h	0.667±0.289	0.500±0.00	1.33	0.500±0.00	0.500±0.00	1
C_{max}[a]	ng Eq./ml	804±69.5	567±116	1.42	1106±118	724±152	1.53
AUC_{0-t}[a]	h·ng Eq./ml	9416±1629	1843±513	5.11	15879±5899	2784±888	5.7
$AUC_{0-\infty}$	h·ng Eq./ml	11159±2543	2084±653	5.35	16243±5504	2872±889	5.66
MRT_{0-t}	h	7.99±0.693	3.08±0.105	2.59	11.2±3.59	4.59±0.0874	2.44
$t_{½}$	h	8.62±1.68	3.14±0.498	2.75	9.11±2.00	5.72±0.731	1.59

[a]For the total radioactivity, units of C_{max} and AUC are ng Eq/ mL and h·ng Eq / mL respectively, where density of plasma or blood assumed to be 1 (g/mL).

2.6.5.3.3 イヌにおける単回及び７日間反復投与後の吸収（静脈内及び経口投与）

	Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)	**Test Article: CYH33** **Report No.:** CYH33-ADME-1 **Location in eCTD:** M4.2.2.2-1
Species/Strain: Dog/Beagle	**Duration of Dosing:** Single IV and PO, and daily 7-day oral administration	**GLP Compliance: Non-GLP**
Number of animals/Gender/Dose: 3/sex/group	**Feeding Condition:** Fast	
Dosing Date: Study Duration from [redacted], 20[redacted]-[redacted], 20[redacted]	**Method of Administration**: IV bolus & Oral gavage	**Vehicle/Formulation**: PO: 1% HPMC. IV: 5% DMSO/95% normal saline solution containing 20% PEG400
Sample: Plasma	**Analytes:** CYH33 and I27	**Assay:** LC-MS/MS

Special Features: IV Dose: 0.05 mg/kg (0.5 mL/kg)
PO Dose: single PO at 0.05, 0.1, and 0.2 mg/kg (2 mL/kg), 7 days PO QD at 0.1 mg/kg (2 mL/kg)
Batch No.: [redacted]
Sample collection time points: For IV administration, plasma samples were collected at pre-dose, 5 min, 15 min, 0.5, 1, 2, 4, 6, 10, 24, 48, and 72 hours post-dose. For the single PO administration, plasma samples were collected at pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, and 72 hours post-dose. For the 7-day PO QD regimen, plasma samples were collected On Day 4, 6, and 7 at pre-dose and on Day 7 at 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48, and 72 hours post-dose.
Plasma pharmacokinetic analysis of CYH33 and I27 was performed using the WinNonlin system 6.4.
No gender differences regarding exposure of CYH33 in dogs

Pharmacokinetic parameters					
Dosing Route	IV	PO			
Dose Freqency		Single-Dose			7-Day QD
Dose Level (mg/kg)	0.05	0.05	0.1	0.2	0.1
CYH33					
T_{max} (hr)	N.A.	2.0 ± 0.0	2.0 ± 1.1	2.0 ± 0.0	1.83 ± 0.41
C_{max} (ng/mL)	N.A.	8.53 ± 1.57	14.4 ± 1.66	27.7 ± 7.12	12.7 ± 2.23
AUC_{0_t} (hr·ng/mL)	87.3 ± 4.9	59.2 ± 6.33	106 ± 20	187 ± 50.3	89.6 ± 14.9
AUC_{0_∞} (hr·ng/mL)	90.8 ± 4.5	61.7 ± 5.87	111 ± 23.6	193 ± 51.8	94.5 ± 13.5
$MRT_{0-\infty}$ (hr)	4.61 ± 0.7	6.55 ± 0.71	7.39 ± 1.17	6.65 ± 0.63	-
$T_{1/2}$ (hr)	3.71 ± 1.01	4.58 ± 0.72	5.7 ± 0.97	5.02 ± 0.96	5.16 ± 1.29
CL_{obs} (mL/min/kg)	6.75 ± 0.34	-	-	-	-
V_{ss} (L/kg)	1.86 ± 0.27	-	-	-	-
R^* (%)	N.A.	-	-	-	-
I27					
T_{max} (hr)	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	4.0 ± 0.0	5.3 ± 2.1	4.0 ± 0.0
C_{max} (ng/mL)	5.18 ± 1.47	5.32 ± 1.67	8.32 ± 1.89	15.4 ± 6.02	6.99 ± 1.91
AUC_{0_t} (hr·ng/mL)	114 ± 41.5	107 ± 43.6	148 ± 54.6	363 ± 181	140 ± 64.8
AUC_{0_∞} (hr·ng/mL)	117 ± 42.4	111 ± 43.6	153 ± 54	370 ± 182	144 ± 65
$MRT_{0-\infty}$ (hr)	17.0 ± 3.67	16.7 ± 3.22	15.6 ± 3.64	17.9 ± 3.81	-
$T_{1/2}$ (hr)	11.2 ± 3.48	10.5 ± 2.33	10.1 ± 3.2	10.5 ± 2.4	9.92 ± 2.7

CL_{obs} (mL/min/kg)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
V_{ss} (L/kg)	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
R^{*} (%)	130 ± 45	180 ± 75	139 ± 42	185 ± 66	155 ± 63

Data expressed as mean±SD values; Abbreviations: M= male; F = female; D=day; IV = intravenous bolus; PO = oral; 17.4 ± 21.2N/A = Not Applicable; R: ratio of metabolite AUC_{0-t} to parent AUC_{0-t}., "-" not measured

2.6.5.3.4 Caco-2 細胞における腸管粘膜透過性

	Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)	**Test Article: CYH33** **Report No.:** CYH33-ADME-1 **Location in eCTD:** M4.2.2.2-1
Species/Strain: Caco-2 Cell **Number of animals/Gender/Dose:** not applicable	**Duration of Dosing:** *in vitro* not applicable	**GLP Compliance: Non-GLP**
Study Date: Study Duration from [redacted], 20[redacted]-[redacted], 20[redacted]	**Method of Administration:** *in vitro*	
	Analytes: CYH33	**Assay:** UPLC-MS/MS

Special Features: **CYH33:** 2, 10, and 50 μM
Batch No.: [redacted], drug content, 94.10%
The Papp values from side B to side A and side A to side B, as well as the Papp ratios of (side B to side A)/ (side A to side B) of each control compound and the test compound were calculated using software Excel 2003 and the recovery rates of each control compound and the test compound were calculated

Compound	Papp(10^{-6}cm/s)						Papp ratio
	A→B			B→A			
Atenolol	0.30	±	0.10	1.33	±	0.04	4.43
Propranolol	9.37	±	0.32	13.9	±	0.71	1.48
Digoxin	0.08	±	0.01	10.7	±	0.82	135
CYH33 2.00 μM	4.24	±	0.62	26.8	±	0.73	6.31
CYH33 10.0 μM	7.76	±	0.14	17.5	±	0.91	2.25
CYH33 50.0 μM	5.40	±	0.17	8.23	±	0.43	1.52

A to B: apical-to-basolateral
B to A: basolateral-to-apical

2.6.5.4 薬物動態試験：分布

2.6.5.4.1 様々な動物種における *In Vitro* 血漿蛋白結合

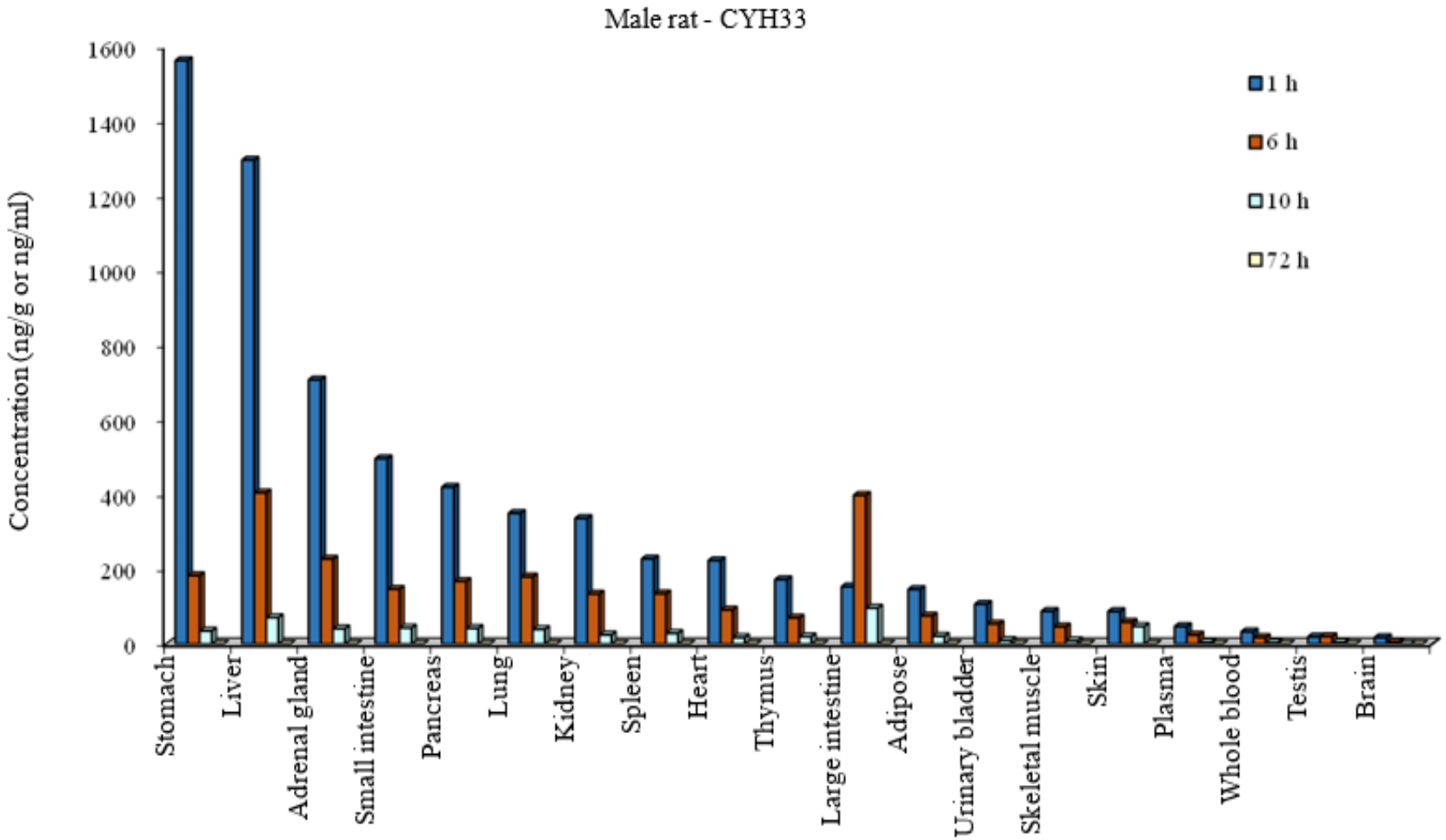
Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)
Test Article: CYH33 and I27
Report No.: CYH33-ADME-1
Location in eCTD: M4.2.2.2-1
Study System: *In vitro*
Target Entity: Plasma
GLP Compliance: Non-GLP
Test System: Plasma of Rat, Dog, and Human
Method: Equilibrium Dialysis
Analytes CYH33 and I27
Special Features: CYH33: 40, 100, 400 ng/mL
Batch No.: CYH33 (Lot No. [redacted], drug content: 94.1%) I27, Lot No. [redacted], purity: 99.13%
The stability of CYH33 and I27 plasma samples was also determined when incubated at 37°C with 5% CO_2 for 4 hours.

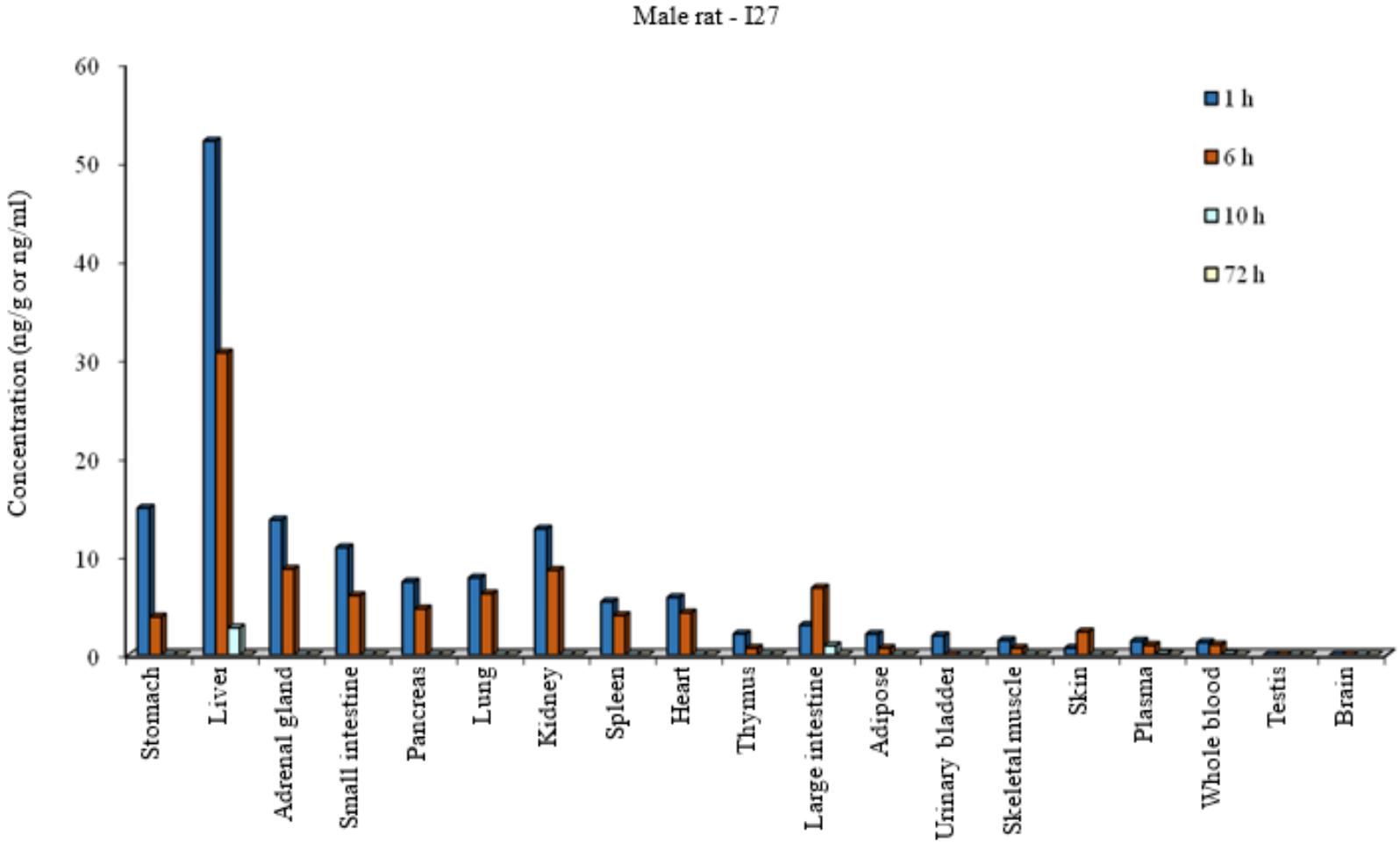
Analyte	Rat		Dog		Human	
	Concentration (ng/mL)	PPB (%)	Concentration (ng/mL)	PPB (%)	Concentration (ng/mL)	PPB (%)
CYH33	40.0	97.5	10.0	97.1	40.0	95.0
	100	97.5	20.0	96.9	100	94.7
	400	97.6	50.0	97.1	400	95.0
	Mean value	97.5	Mean value	97.1	Mean value	94.9
I27	40.0	84.1	10.0	80.5	40.0	78.5
	100	82.2	20.0	80.5	100	79.2
	400	83.7	50.0	80.4	400	79.8
	Mean value	83.3	Mean value	80.5	Mean value	79.1

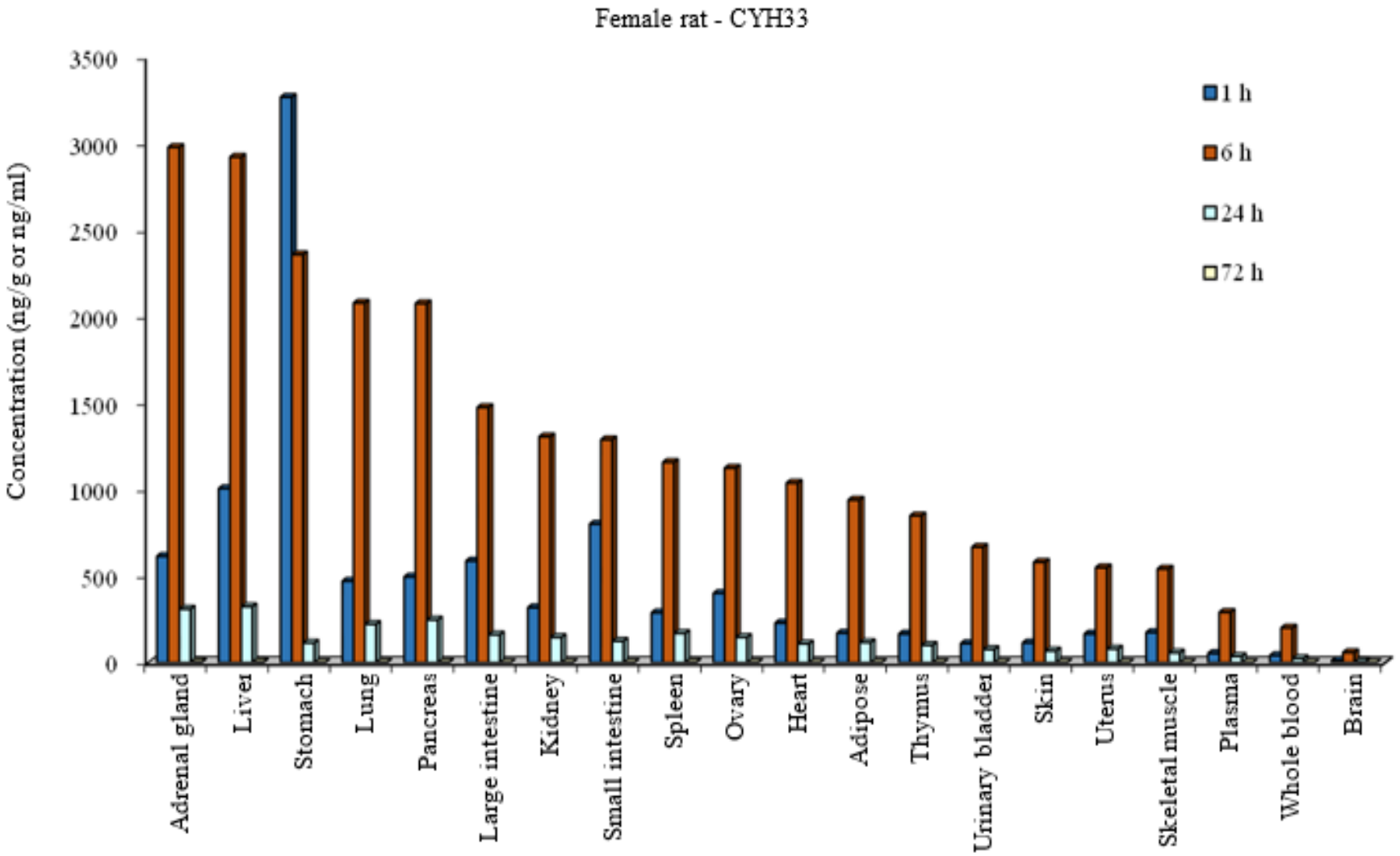
2.6.5.4.2 単回投与後の組織分布（ラット）

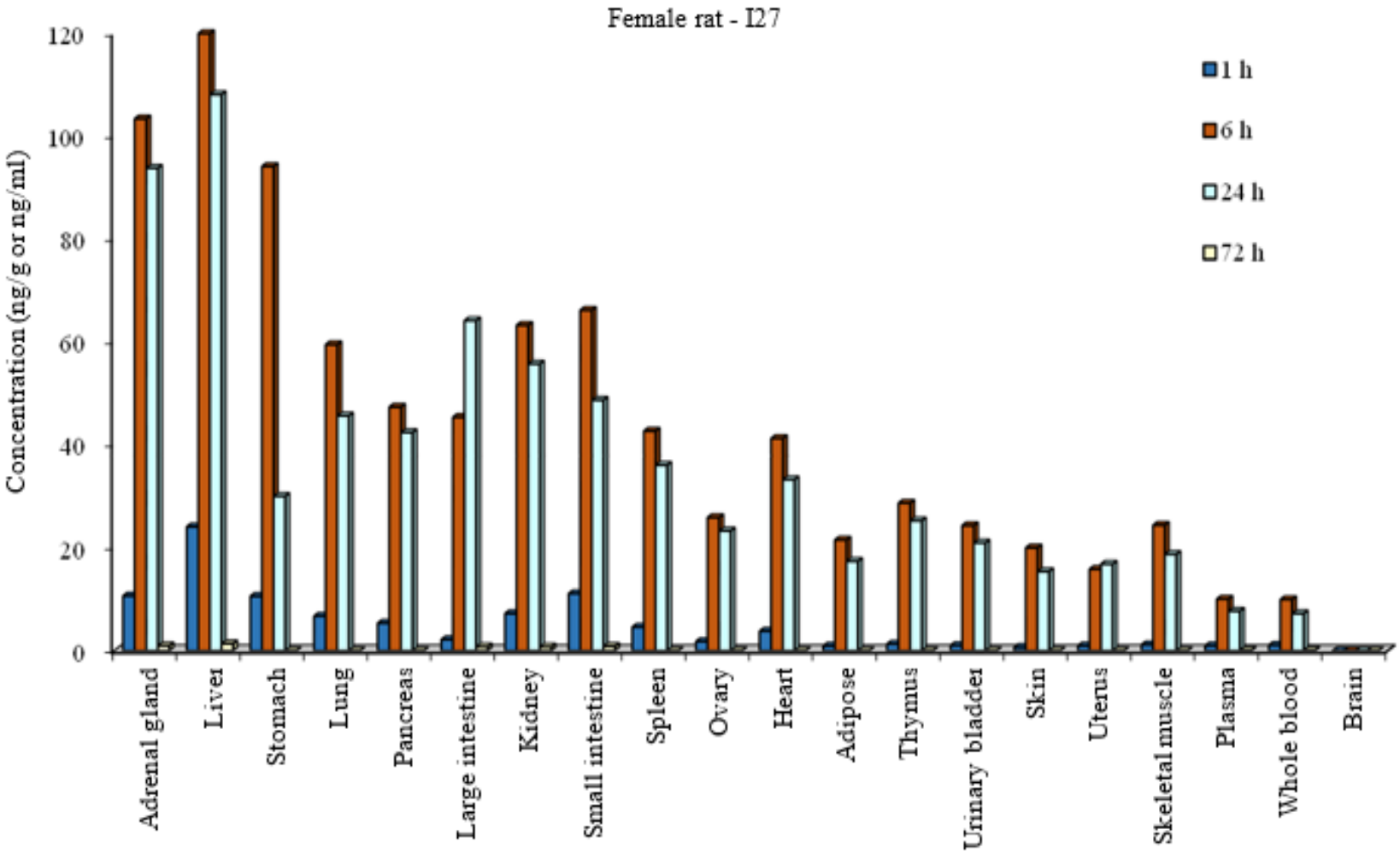
	Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)	**Test Article:** CYH33 **Report No.:** CYH33-ADME-1 **Location in eCTD:** M4.2.2.2-1
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** Single administration	**GLP Compliance: Non-GLP**
Number of animals/Gender/Dose: 15/sex for one dose at 3 mg/kg	**Feeding Condition:** Fast 12 hours before drug administration	
Dosing Date: Study Duration from [redacted], 20[redacted]-[redacted], 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Vehicle/Formulation:** PO: 1% HPMC.
Sample: tissue and plasma	**Analytes:** CYH33, I27	**Assay:** LC-MS/MS
Special Features: PO Dose: 3 mg/kg Batch No.: [redacted], drug content: 99.5%		

Figure: Histogram of Tissue Distribution of Parent Drug and Metabolite after PO administration of CYH33 at 3 mg/kg in Rats




Male rat - I27
Concentration (ng/g or ng/ml)
60
50
40
30
20
10
0
1 h
6 h
10 h
72 h
Stomach
Liver
Adrenal gland
Small intestine
Pancreas
Lung
Kidney
Spleen
Heart
Thymus
Large intestine
Adipose
Urinary bladder
Skeletal muscle
Skin
Plasma
Whole blood
Testis
Brain


Female rat - CYH33
Concentration (ng/g or ng/ml)
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
1 h
6 h
24 h
72 h
Adrenal gland
Liver
Stomach
Lung
Pancreas
Large intestine
Kidney
Small intestine
Spleen
Ovary
Heart
Adipose
Thymus
Urinary bladder
Skin
Uterus
Skeletal muscle
Plasma
Whole blood
Brain


Female rat - I27
Concentration (ng/g or ng/ml)
120
100
80
60
40
20
0
1 h
6 h
24 h
72 h
Adrenal gland
Liver
Stomach
Lung
Pancreas
Large intestine
Kidney
Small intestine
Spleen
Ovary
Heart
Adipose
Thymus
Urinary bladder
Skin
Uterus
Skeletal muscle
Plasma
Whole blood
Brain

2.6.5.4.3　単回投与後の組織分布（ラット、QWBA）

	Report Title: Distribution of [^{14}C]CYH33 in Long-Evans Rats Following a Single Oral Dose of [^{14}C]CYH33 at 3 mg/100 μCi/kg Using Quantitative Whole-Body Autoradiography (QWBA)	**Test Article:** [^{14}C]CYH33 **Report No.:** [redacted]00998 **Location in eCTD:** M4.2.2.3-1
Species/Strain: Long-Evans rats **Number of animals/Gender/Dose:** 3/sex/group	**Duration of Dosing:** Single PO Feeding Condition: Fast at least 10 hr before dosing and drink water ad libitum	**GLP Compliance: Non-GLP**
Dosing Date: [redacted], 20[redacted]-[redacted], 20[redacted]	**Method of Administration**: Oral gavage	**Vehicle/Formulation**: PO: 1% HPMC with a dose volume of 10 mL/kg
Sample: Plasma	**Analytes:** [^{14}C]CYH33	**Assay:** Liquid scintillation counting
Special Features:	PO Dose: single PO at 3 mg/100 μCi/kg Batch No.of [^{14}C]CYH33: [redacted] At each time point of 0.5 h, 4 h, 24 h, 168 h, 336 h, 504 h and 840 h post-dose (the 2 time points of 336 h and 504 h were reserved), one LE rat was euthanized by overdose of CO_2, followed by collection of blood via cardiac puncture. Carcasses were frozen in hexane/dry ice bath immediately. A portion of whole blood was centrifuged to obtain plasma. Plasma was thoroughly mixed, aliquoted and radio-assayed directly. Blood samples were combusted by oxidizer, and the generated [^{14}C]CO_2 was captured by scintillation liquid, followed by radio-assay using liquid scintillation counter. The total radioactivity (TRA) of tissues and areas of interest (AOIs, including contents) was analyzed using quantitative whole-body autoradiography (QWBA).	

Total radioactivity after administration of [^{14}C]CYH33（μg equiv /g）

Sort	Matrix	Total Radioactivity (ng Eq./g)				
		0.5 h	**4 h**	**24 h**	**168 h**	**840 h（%C_{max}）**
Vascular	Plasma (LSC)	230	345	5.83	0.38	BLQ1
	Blood (LSC)	189	239	BLQ1	BLQ1	BLQ1
	Aorta	441	853	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Blood (cardiac)	247	280	BLQ2	BLQ2	BLQ2
Central nervous system	Brain	25	46.5	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Spinal cord	27.3	57.7	BLQ2	BLQ2	BLQ2
Ocular	Eye	269	3183	1396	1153	595（18.69）
	Lens	BLQ2	47.4	21.7	BLQ2	BLQ2
	Uveal tract	1592	18288	8318	6607	1865（10.20）
Demal	Non-pigmented skin	182	345	20.4	BLQ2	BLQ2
	Pigmented skin	288	1964	265	BLQ2	BLQ2
Endocrine	Adrenal cortex	1492	1622	29.5	18.6	BLQ2
	Adrenal gland	1372	1414	25.9	17	BLQ2
	Adrenal medulla	631	679	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Pituitary gland	610	955	52	33	BLQ2
	Thyroid gland	628	583	17.4	BLQ2	BLQ2
Fatty	Brown fat	372	390	24.3	22.1	BLQ2
	White fat (inguinal)	163	571	17	BLQ2	BLQ2
Gastrointestinal tract	Esophagus wall	450	1483	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Oral mucosa	453	508	32.4	BLQ2	BLQ2

	Large intestine wall	423	30330	83.8	18.9	BLQ2
	Small intestine wall	12312	14144	28.8	BLQ2	BLQ2
	Stomach wall (glandular)	7447	826	22.7	BLQ2	BLQ2
	Stomach wall (non-glandular)	40210	25195	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Lymph node (cervical)	378	727	31.2	21.8	BLQ2
Lymphatic	Spleen	712	898	33.6	20.5	BLQ2
	Thymus	315	628	16.2	BLQ2	BLQ2
	Kidney	892	1237	32.4	BLQ2	BLQ2
	Kidney cortex	1051	1483	36.3	BLQ2	BLQ2
Metabolic/Excretory	Kidney medulla	745	922	22.4	BLQ2	BLQ2
	Liver	5465	5856	207	70.3	BLQ2
	Urinary bladder wall	250	1177	25	BLQ2	BLQ2
Muscular	Heart	574	760	26.1	BLQ2	BLQ2
	Muscle (femoral)	405	562	17.7	BLQ2	BLQ2
Reproductive	Prostate	369	429	18.9	18	BLQ2
	Testis	49.5	228	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Lung	871	841	19.7	BLQ2	BLQ2
Respiratory	Nasal turbinates	39.6	179	26.8	BLQ2	BLQ2
	Trachea	259	435	16.1	BLQ2	BLQ2
	Exorbital lacrymal gland	700	1198	33	25	BLQ2
Secretory	Harderian gland	550	3333	49.2	BLQ2	BLQ2
	Pancreas	1102	1384	31.2	BLQ2	BLQ2
	Salivary Gland	628	877	23.4	BLQ2	BLQ2
Skeletal	Bone (femur)	84.1	92.2	BLQ2	BLQ2	BLQ2
	Bone marrow (femur)	483	658	BLQ2	BLQ2	BLQ2
Gastrointestinal tract contents	Large intestine contents	32.7	485225*	958	17.6	BLQ2
	Small intestine contents	63273*	66336*	100	BLQ2	BLQ2
	Stomach contents	39610	16787	BLQ2	BLQ2	BLQ2

BLQ1: Below the limit of quantification of LSC, which means <0.338 ng Eq./g (plasma) or <27.1 ng Eq./g (blood).

BLQ2: Below the limit of quantification of QWBA, which means <15.5 ng Eq./g

QWBA：LLOQ = 0.516 nCi/g ÷ 73926 DPM/μg × 2220 × 1000 = 15.5 ng Eq./g

QWBA：ULOQ = 2040 nCi/g ÷ 73926 DPM/μg × 2220 × 1000 = 61261 ng Eq./g

*: The concentration was higher than the ULOQ.

2.6.5.5 薬物動態試験：代謝

2.6.5.5.1 肝ミクロソームにおける代謝安定性

Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)

Test Article: CYH33
Report No.: CYH33-ADME-1
Location in eCTD: M4.2.2.2-1
GLP Compliance: Non-GLP

Study System: *In vitro*
Test System: mouse, rat, dog, monkey, and human liver microsomes in the presence of 1 μM of NADPH for 60 min
Method: UPLC-MS/MS
Analytes: CYH33
Special Features: Batch No.: [redacted], drug content, 94.10%)
CYH33: 3 μM incubated with liver microsomes (0.5 mg/mL)

Table 1: Reference Value

Table 1. Type of drug metabolism clearance

Species	Low clearance	Medium clearance	High clearance
Human	$CL_{int} < 4$	$4 < CL_{int} < 17$	$CL_{int} > 17$
Monkey	$CL_{int} < 9$	$9 < CL_{int} < 35$	$CL_{int} > 35$
Dog	$CL_{int} < 8$	$8 < CL_{int} < 33$	$CL_{int} > 33$
Rat	$CL_{int} < 11$	$11 < CL_{int} < 44$	$CL_{int} > 44$
Mouse	$CL_{int} < 18$	$18 < CL_{int} < 72$	$CL_{int} > 72$

Table 2. $T_{1/2}$ of CYH33 in liver microsomes of all species and derivation of *in vivo* CL_{int}

Incubation systems	$T_{1/2}$ (min)	CL_{int} (mL/min/kg)
Human liver microsomes	1155	1.50
Monkey liver microsomes	87.7	23.1
Dog liver microsomes	257	13.5
Rat liver microsomes	239	10.4
Mouse liver microsomes	95.0	57.5

2.6.5.5.2 マウス、ラット、イヌ、サル及びヒト肝細胞における *in vitro* 代謝

Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)

Test Article: CYH33
Report No.: CYH33-ADME-1
Location in eCTD: M4.2.2.2-1
GLP Compliance: Non-GLP

Study System: *In vitro*
Test System: mouse, rat, dog, monkey, and human hepatocytes
Method: UPLC/Q-TOF MS
Analytes: CYH33

Special Features: Batch No. [redacted], final concentration 3 μM
The incubation system, with a total volume of 100 μl and using William's Medium E (pH 7.4) as the medium, consisted of hepatocytes (HLMs) at a cellular density of 1.0×106 cells/mL, CYH33 at a final concentration of 3.0 μM. The mixed solution was incubated in a water bath at 37℃ and the reaction was terminated by the addition of 100 μL of ice-cold acetonitrile after 180 min of initiation of the reaction. And the samples were stored at -70℃ until analysis. All the incubation was conducted in duplicate.

Related UPLC/Q-TOF MS information on the metabolites of CYH33 in hepatocytes from 5 species: human, monkey, dog, rat, and mouse

	Metabolic pathway	Mass-to-charge ratio	Molecular formula	Quality deviation (ppm)	Retention time (min)	LC-MS peak area (× 10^3)					
						Inactivated hepatocytes	Human	Monkey	Dog	Rat	Mous
M0	Parent drug	599.2003	$C_{24}H_{29}N_8O_5F_3S$	-0.5	7.49	727	528	387	331	553	598
M1	Cleavage of the piperazine ring	573.1865	$C_{22}H_{27}N_8O_5F_3S$	2.7	6.09					0.39	2.00
M2-2	Piperazine oxidation	615.1975	$C_{24}H_{29}N_8O_6F_3S$	3.1	7.35						1.95
M3	Amide bond hydrolysis	541.1969	$C_{22}H_{27}N_8O_3F_3S$	3.2	4.02		60.6	6.38	277	52.5	43.0
M5-1	Mono-oxygenation and dehydrogenation	617.2133	$C_{24}H_{31}N_8O_6F_3S$	3.4	4.36			2.68			
M5-2	Mono-oxygenation and dehydrogenation	617.2091	$C_{24}H_{31}N_8O_6F_3S$	-3.5	5.14			6.72		0.65	
M6-1	Di-oxidation	631.1916	$C_{24}H_{29}N_8O_7F_3S$	1.8	3.80			1.88			
M6-2	Di-oxidation	631.1915	$C_{24}H_{29}N_8O_7F_3S$	1.6	4.66			0.59			

	UV peak area					
	Inactivated hepatocytes	Human	Monkey	Dog	Rat	Mous
M0	1383	973	754	597	962	996
M3		218	<100	757	210	152
M5			20.0			
M6-1			25.0			

2.6.5.5.3 アミド加水分解酵素の同定

Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)
Test Article: CYH33
Report No.: CYH33-ADME-1
Location in eCTD: M4.2.2.2-1
GLP Compliance: Non-GLP

Study System: *In vitro*
Test System: dog liver and intestinal homogenates
Method: LC/MS/MS
Analytes: CYH33

Special Features: Batch No. [redacted], drug content: 94.10%, final concentration 3 μM
The incubation system, with a total volume of 200 μl and using dog liver homogenates and intestinal homogenates as the medium, consisted of CYH33 at a final concentration of 3.00 μM and 1.00 mM BNPP/0.500 mM DDVP. The mixed solution was incubated in a water bath at 37℃ and the reaction was terminated by the addition of equal volume of ice-cold acetonitrile after 0, 1 and 4 hours of initiation of the reaction. respectively. The negative control was incubated with PBS for 0 and 4 hours, respectively. The remainder amount of CYH33 parent drug and the production amount of the metabolite I27 were determined by LC/MS/MS. All the incubation was conducted in duplicate.

Identification of enzymatic phenotypes involved in amide hydrolytic metabolic pathway.

Table 1-1 CYH33 concentrations in dog liver homogenate incubation system*

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Remainder percentage (%)
0	9.68	9.52	9.60	100
1	3.09	3.23	3.16	32.9
4	0.530	0.538	0.534	5.56

* CYH33 concentrations were characterized by peak area ratios of CYH33/IS (CYH33-d3), and CYH33 concentrations were characterized consistently in the table below.

Table 1-2 I27 Concentrations in dog liver homogenate incubation system*

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Ratio
0	1.56	1.80	1.68	1.00
1	106	109	108	64.0
4	132	137	135	80.1

* I27 concentrations were characterized by the peak area ratio of I27/IS (I27-d4), and I27 concentrations were characterized in a consistent manner in the table below.

Table 2-1 CYH33 concentrations in dog liver homogenate incubation system containing BNPP

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Remainder percentage (%)
0	10.5	10.4	10.5	100
1	11.7	12.4	12.1	115
4	11.0	11.1	11.1	106

Table 2-2 I27 concentrations in dog liver homogenate incubation system containing BNPP

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Ratio
0	0.0669	0.0562	0.0616	1.00
1	0.101	0.0761	0.0886	1.44

4	0.158	0.201	0.180	2.92

Table 3-1 CYH33 concentrations in dog liver homogenate incubation system containing DDVP

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Remainder percentage (%)
0	10.7	10.9	10.8	100
1	11.9	11.0	11.5	106
4	12.1	12.7	12.4	115

Table 3-2 I27 concentrations in dog liver homogenate incubation system containing DDVP

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Ratio
0	0.0320	0.0621	0.0471	1.00
1	0.102	0.115	0.109	2.31
4	0.535	0.551	0.543	11.5

Table 4-1 CYH33 concentrations in dog intestinal homogenate incubation system

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Remainder percentage (%)
0	8.77	9.38	9.08	100
1	13.5	14.2	13.9	153
4	12.0	10.6	11.3	125

Table 4-2 I27 concentrations in dog intestinal homogenate incubation system

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Ratio
0	0.0645	0.0587	0.0616	1.00
1	0.112	0.114	0.113	1.83
4	0.212	0.196	0.204	3.31

Table 5-1 CYH33 concentrations in dog intestinal homogenate incubation system containing BNPP

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Remainder percentage (%)
0	10.3	9.41	9.86	100
1	12.3	12.3	12.3	125
4	13.6	11.2	12.4	126

Table 5-2 I27 concentrations in dog intestinal homogenate incubation system containing BNPP

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Ratio
0	0.0633	0.0663	0.0648	1.00
1	0.0980	0.0816	0.090	1.39
4	0.124	0.138	0.131	2.02

Table 6-1 CYH33 concentrations in dog intestinal homogenate incubation system containing DDVP

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Remainder percentage (%)

0	10.2	10.3	10.3	100
1	13.2	13.0	13.1	128
4	13.6	11.0	12.3	120

Table 6-2 I27 concentrations in dog intestinal homogenate incubation system containing DDVP

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean value	Ratio
0	0.0795	0.0689	0.0742	1.00
1	0.0919	0.0975	0.0947	1.28
4	0.147	0.133	0.140	1.89

Table 7-1 CYH33 concentrations in PBS incubation system

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean	Remainder percentage (%)
0	9.17	8.91	9.04	100
4	10.8	11.0	10.9	121

Table 7-2 I27 concentrations in PBS incubation system

Time (h)	Sample 1	Sample 2	Mean	Ratio
0	0.0700	0.0580	0.0640	1.00
4	0.0845	0.0899	0.0872	1.36

2.6.5.5.4 ヒト肝臓ミクロソームにおける *in vitro* 代謝プロファイルと I27 の CYP450 フェノタイピング

Report Title: *In Vitro* Metabolic Profiles in Human Liver Microsomes and CYP450 Phenotyping of I27
Test Article: I27
Report No.: [redacted]-I27-MetID -EP
Location in eCTD: M4.2.2.4-2
GLP Compliance: Non-GLP

Study System: *In vitro*
Test System: Human liver microsome and Human recombinant CYP enzymes
Method: LC/MS/MS
Analytes: I27

Special Features: Lot No.: [redacted], Purity: 99.63%, Purity factor: 0.9935, final concentration 3 μM
Chemical Inhibition in Human Liver Microsomes: 100 μL incubations were performed at 37°C in 100 mM PBS (pH 7.4). The system contained 0.5 mg/mL liver microsomes, 1.0 mM NADPH, and specific CYP450 inhibitors (2.0 μM ketoconazole for CYP3A; 24 μM ticlopidine for CYP2B6/CYP2C19; 8.0 μM quinidine for CYP2D6; 24 μM chlormethiazole for CYP2E1; 2.0 μM α-naphthoflavone for CYP1A2; 6.0 μM sulfaphenazole for CYP2C9; 5.0 μM montelukast for CYP2C8; 1.0 mM 1-aminobenzotriazole for general CYPs). After 10-minute pre-incubation, 3.0 μM I27 was added to initiate reaction, which was terminated by equal volume of ice-cold acetonitrile after 60 min. All incubations were done in duplicate.
Recombinant CYP450 Isoenzymes: 100 μL incubations were carried out at 37°C in 100 mM PBS (pH 7.4) with 3.0 μM I27 and 1.0 mM NADPH. After pre-incubation, 50 pmol/mL recombinant CYP450 isoenzymes (CYP1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5, 2J2, 4F2) were added to start the reaction. It was terminated by equal volume of ice-cold acetonitrile after 60 min, with all incubations in duplicate.

Table 1 UPLC/Q-TOF MS information on I27 metabolites in human liver microsomes with individual CYP inhibitors

	Metabolic pathway	Fomular	*m/z* $[M+H]^+$	Mass deviation (ppm)	Retention time (min)	LC-MS peak area（$\times 10^4$）								
						HLM	ABT CYPs	ANF 1A2	TCL 2B6/2C19	ML 2C8	SPZ 2C9	QD 2D6	CMT 2E1	KET 3A
I27	Parent drug	$C_{22}H_{27}F_3N_8O_3S$	541.1936	-2.9	5.99	113	137	112	118	119	125	112	115	126
M514	Piperazine ring opening C_2H_2	$C_{20}H_{25}F_3N_8O_3S$	515.1785	-2.0	5.51	1.64		0.81	1.04	0.72	0.72	0.57	0.85	
M538-2	Dehydrogenation	$C_{22}H_{25}F_3N_8O_3S$	539.1780	-2.7	8.62	0.54		+	0.34	0.36	0.38	0.33	0.37	
M556-1	Mono-oxidation	$C_{22}H_{27}F_3N_8O_4S$	557.1907	1.2	5.88	1.03		0.93	1.30	0.87	0.95	0.69	0.65	
M556-2	Mono-oxidation	$C_{22}H_{27}F_3N_8O_4S$	557.1894	-1.2	6.03	5.68	0.35	3.54	3.80	2.96	3.41	2.74	3.51	0.49
M558	Mono-oxidation and hydrogenation	$C_{22}H_{29}F_3N_8O_4S$	559.2065	1.4	4.91	0.28		0.20	0.29	0.15	0.15	0.11	0.17	

+: Peak detected in the chromatogram, but the peak area could not be determined.

Table 2 UPLC/Q-TOF MS information on I27 metabolites in recombinant human CYP450 isoenzymes

	Metabolic pathway	Fomular	*m/z* $[M+H]^+$	Mass deviation (ppm)	Retention time (min)	LC-MS peak area（$\times10^4$）												
						Inactive CYPs	1A2	2A6	2B6	2C8	2C9	2C19	2D6	2E1	3A4	3A5	2J2	4F2
I27	Parent drug	$C_{22}H_{27}F_3N_8O_3S$	541.1936	-2.9	5.99	113	87.2	95.3	105	122	117	116	124	112	64.0	61.5	92.2	122
M392	Oxidative deaminization and dehydrogenation	$C_{17}H_{15}F_3N_6O_2$	393.1278	-0.7	8.37										0.30	0.27		
M393	*N*-dealkylation	$C_{17}H_{18}F_3N_7O$	394.1593	-1.2	5.05										0.69	0.71		
M394	Oxidative deamination	$C_{17}H_{17}F_3N_6O_2$	395.1446	2.1	6.77										0.20	0.14		
M514	Piperazine ring opening C_2H_2	$C_{20}H_{25}F_3N_8O_3S$	515.1785	-2.0	5.51										4.52	8.98		
M538-1	Dehydrogenation	$C_{22}H_{25}F_3N_8O_3S$	539.1788	-1.3	6.76										0.15			
M538-2	Dehydrogenation	$C_{22}H_{25}F_3N_8O_3S$	539.1780	-2.7	8.62										+	1.10		
M556-1	Mono-oxidation	$C_{22}H_{27}F_3N_8O_4S$	557.1907	1.2	5.88										1.78	3.61	3.19	
M556-2	Mono-oxidation	$C_{22}H_{27}F_3N_8O_4S$	557.1894	-1.2	6.03										12.9	3.46		
M558	Mono-oxidation and hydrogenation	$C_{22}H_{29}F_3N_8O_4S$	559.2065	1.4	4.91										0.48			
M570-1	Di-oxidation and dehydrogenation	$C_{22}H_{25}F_3N_8O_5S$	571.1679	-2.5	7.18											0.12		
M570-2	Di-oxidation and dehydrogenation	$C_{22}H_{25}F_3N_8O_5S$	571.1687	-1.1	7.84										0.24	0.53		
M570-3	Di-oxidation and dehydrogenation	$C_{22}H_{25}F_3N_8O_5S$	571.1686	-1.2	7.97											0.20		
M572	Di-oxidation	$C_{22}H_{27}F_3N_8O_5S$	573.1840	-1.7	6.19										0.27	0.51		

+: Peak detected in the chromatogram, but the peak area could not be determined.

2.6.5.5.5 ラット及びイヌの血漿、尿、糞便及び胆汁中代謝産物のプロファイリング

Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)

Test Article: CYH33
Report No.: CYH33-ADME-1
Location in eCTD: M4.2.2.4
GLP Compliance: Non-GLP

Study System: *In vivo*
Test System: Rat (single dose at 3 mg/kg) and Dog (single dose at 0.1 mg/kg)
Method: UPLC/Q-TOF MS
Analytes: CYH33

Special Features: Batch No. [redacted]
The rat bile, urine, and fecal samples used in this study were obtained from the excretion assay. The rat and beagle plasma samples were obtained from the absorption assay.

Table 1. Related UPLC/Q-TOF MS information on metabolite of CYH33 in rats

	Metabolic pathway	*m/z*	Molecular formula	Quality Deviation (ppm)	Retention time (min)		LC-MS peak area (× 10^3)							
							Pooled plasma (0-24 h)		Urine (0-48 h)		Feces (0-48 h)		Bile (0-48 h)	
						Bile	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female
M0	Parent drug	599.2009	$C_{24}H_{29}N_8O_5F_3S$	0.4	7.66	7.99	11.1	339	14	18.1	373	289		45
M1	Cleavage of the piperazine ring	573.1834	$C_{22}H_{27}N_8O_5F_3S$	-2.7	6.16	7.01								10.3
M1-2	Cleavage of Morpholine Ring	573.1847	$C_{22}H_{27}N_8O_5F_3S$	-0.5	4.54	5.33	0.75	0.26	18.4	5.7	151	60.8	110	75.2
M2-2	Piperazine oxidation	615.1979	$C_{24}H_{29}N_8O_6F_3S$	3.8	7.46	7.72		2.12						3.58
M3	Amide bond hydrolysis	541.1948	$C_{22}H_{27}N_8O_3F_3S$	-0.6	4.2		0.25	20.7		19		81.9		
M4	Dehydrogenation	597.1839	$C_{24}H_{27}N_8O_5F_3S$	-1.8	8.9		10.6	16.1						
M5-1	Mono-Oxidative Hydrogenation	617.2111	$C_{24}H_{31}N_8O_6F_3S$	-0.2	4.56	5.28	2.21	0.28	57.5	22.2	703	461	294	402
M5-2	Mono-Oxidative Hydrogenation	617.2115	$C_{24}H_{31}N_8O_6F_3S$	0.3	5.32	6.24	0.32	1.3	1.78	10.8	29.1	268		495
M6-1	Di-oxidation	631.1906	$C_{24}H_{29}N_8O_7F_3S$	0.2	4.03	4.34	0.11		4.2		525	19.3	1850	18.3
M6-2	Di-oxidation	631.191	$C_{24}H_{29}N_8O_7F_3S$	0.9	4.91	5.42			1.33	1.67	94.4	228	138	198
M7	M3 Mono-oxidative Hydrogenation	559.2067	$C_{22}H_{29}N_8O_4F_3S$	1.7	1.79	2.45					15.2	48.2	51.9	
M8	Cleavage of morpholine ring to form carboxylic acid	587.1643	$C_{22}H_{25}N_8O_6F_3S$	0	4.04	4.73					31.4	4.37	36.5	
M9	Tri-oxidation	647.1859	$C_{24}H_{29}N_8O_8F_3S$	0.8	3.72	4.02							39.6	

M10-1	Mono-oxidative glucuronic acid conjugation	791.2254	$C_{30}H_{37}N_8O_{12}F_3S$	-2.8	4.39	9.97	1.38
M10-2	Mono-oxidative glucuronic acid conjugation	791.2317	$C_{30}H_{37}N_8O_{12}F_3S$	5.1	5.11	8.49	

Table 2. Related UPLC/Q-TOF MS information on metabolite of CYH33 in beagle dog plasma

	Metabolic pathway	*m/z*	Molecular formula	Quality deviation (ppm)	Retention time (min)	LC-MS peak area (× 10^3)	
						Pooled plasma (0-24 h)	
						Male	Female
M0	Parent drug	599.2014	$C_{24}H_{29}N_8O_5F_3S$	1.3	7.72	6.73	7.22
M3	Amide bond hydrolysis	541.1958	$C_{22}H_{27}N_8O_3F_3S$	1.2	4.22	7.13	5.47

2.6.5.5.6 単回投与後の代謝物（ラット、RI 標識体）

	Report Title: Metabolite Radioprofiling and Identification of [^{14}C]CYH33 in Male and Female Sprague-Dawley Rats Following a Single Oral Administration	**Test Article:** [^{14}C]CYH33 **Report No.:** [redacted]01053 **Location in eCTD:** M4.2.2.4-1
Species/Strain: Sprague-Dawley Rats	**Duration of Dosing:** Single PO Feeding Condition: Fast at least 10 hr before dosing and drink water ad libitum	**GLP Compliance: Non-GLP**
Number of animals/Gender/Dose: 3/sex/group		
Dosing Date: [redacted], 20[redacted]-[redacted], 20[redacted]	**Method of Administration**: Oral gavage	**Vehicle/Formulation**: PO: 1% HPMC with a dose volume of 10 mL/kg
Sample: Plasma	**Analytes:** [^{14}C]CYH33	**Assay:** Liquid scintillation counting
Special Features:	PO Dose: single PO at 3 mg/100 μCi/kg Batch No.of [^{14}C]CYH33: [redacted] The rat bile, urine, and fecal samples used in this study were obtained from the excretion assay. The rat plasma samples were obtained from the absorption assay.	

Metabolites of CYH33 in rats

Table 1. Distribution of [^{14}C]CYH33 and its metabolites expressed as %AUC in male and female rat plasma following a single oral administration of 3 mg/100 μCi/kg of [^{14}C]CYH33

Metabolites	Modification	Plasma (%AUC)	
		Male	Female
CYH33	Parent	33.42	63.92
M572-2	Deethyl of morpholine ring	0.95	8.34
M616-1	Oxidative cleavage of morpholine ring	+	+
M614-2	Mono-oxidation of morpholine ring	16.58	+
M596	Dehydrogenation of morpholine ring	42.53	27.74

Note: +: only detected by LC-MS.

Table 2. Distribution of [^{14}C]CYH33 and metabolites expressed as %dose in male and female rat bile, urine and feces following a single oral administration of 3 mg/100 µCi/kg of [^{14}C]CYH33

Metabolites	Modification	Bile[a] (%Dose)		Urine[a] (%Dose)		Feces[a] (%Dose)	
		Male	Female	Male	Female	Male	Female
CYH33	Parent	1.36	1.99	<0.01	0.14	9.15	18.58
M558-1	Oxidative cleavage of morpholine ring and amide hydrolysis	21.83	3.66	0.14	0.08	22.55	3.74
M630-1	Di-oxidation of morpholine ring						
M630-2	Di-oxidation of morpholine ring	8.53	17.88	0.09	0.16	5.21	12.09
M572-1	Deethyl of piperazine ring	ND	ND	+	+	1.28	2.88
M572-2	Deethyl of morpholine ring	4.40	3.04	0.28	0.23	10.51	5.86
M616-1	Oxidative cleavage of morpholine ring	6.91	6.46	0.96	0.35	21.99	11.27
M616-2	Oxidation and ring cleavage of morpholine ring	0.90	4.26	<0.01	0.25	1.92	13.75
M540	Amide hydrolysis, I27 CYH33 -Impurity D	+	0.75	+	0.30	+	10.31
M614-2	Mono-oxidation of morpholine ring	3.84	0.16	+	+	12.37	1.68
M614-3	Mono-oxidation of piperazine ring	+	+	+	+	+	1.09
M596	Dehydrogenation of morpholine ring	+	0.06	+	+	0.65	2.70

[a]Percent of the dose in 0 h-72 h rat bile, 0 h-72 h rat urine, or 0 h-168 h rat feces.

Note: ND: not detected. +: only detected by LC-MS.



Note: P, B, U and F represented plasma, bile, urine, and feces, respectively.

Proposed metabolic pathways of CYH33 in the rat

2.6.5.6 薬物動態試験：排泄

2.6.5.6.1 ラットにおける胆汁、糞及び尿中排泄

	Report Title: CYH33 Non-clinical Pharmacokinetic Study Report (I)	**Test Article:** CYH33 **Report No.:** CYH33-ADME-1 **Location in eCTD:** M4.2.2.2-1
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** Single administration **Feeding Condition:** Fasted overnight (>12 hours) prior to dosing and fed ~ 2 hours after dosing, free access to water	**GLP Compliance: Non-GLP**
	Method of Administration: Oral gavage	**Vehicle/Formulation:** 1% HPMC
Sample: Urine, feces, bile	**Analytes:** CYH33, I27	**Assay:** LC-MS/MS

Special Features: PO Dose: 3 mg/kg
Batch No.: [redacted]

Collection of urine and fecal samples

Six SD rats (female/male ratio=1:1) were housed in the metabolism cage with free access to food and water. The blank urine and fecal samples were simultaneously collected. The rats were fasted for 12 hours and were intragastrically administrated with 3 mg/kg (dosing volume 10 mL/kg) CYH33. Urine and fecal samples were collected at specified time intervals of 0 - 8, 8 - 24, 24 - 48, 48 - 72 and 72 - 96 hours after drug administration, respectively. The volume of urine samples was recorded, and fecal samples were weighed, and all the samples were stored at -70 ºC until analysis.

Collection of bile samples

Six SD rats (female/male ratio=1:1) were fasted for 12 hours before the analysis. After bile duct cannulation, CYH33 was intragastrically administered at a dose of 3 mg/kg (dosing volume 10 mL/kg). The animal had free access to food and water 2 hours after administration. Bile samples were collected at specified time intervals of 0 - 4, 4 - 8, 8 - 24 and 24 - 48 hours after drug administration and the collected volumes were recorded and the samples were stored at -70ºC until analysis.

Recovery of CYH33 in Rat Urine, Feces and Bile

Analyte	The cumulative excretion percentage (%)			
	Feces (0-96 h)		Urine (0-96 h)	Bile (0-48 h)
	Male	Female		
Parent drug CYH33	23.9	24.4	< 0.5	< 0.2
I27 (Amide hydrolyzed metabolite M3)	< 0.1	4.72	< 0.5	< 0.1
Total	23.9	29.2	< 1	< 0.2

2.6.5.6.2 単回投与後の排泄（ラット、RI 標識体）

	Report Title: Abortion and Excretion of [^{14}C]CYH33 in Male and Female Sprague-Dawley Rats Following a Single Oral Administration at 3 mg/100 µCi/kg	**Test Article:** [^{14}C]CYH33 **Report No.:** [redacted]00952 **Location in eCTD:** M4.2.2.2-2
Species/Strain: Rat/Sprague Dawley	**Duration of Dosing:** Single PO	**GLP Compliance:** Non-GLP
Number of animals/Gender/Dose: 3/sex/group	**Feeding Condition:** Fast at least 10 hr before dosing and drink water ad libitum	
Study Date: [redacted], 20[redacted]-[redacted], 20[redacted]	**Method of Administration:** Oral gavage	**Vehicle/Formulation:** PO: 1% HPMC with a dose volume of 10 mL/kg
Sample: Plasma	**Analytes:** [^{14}C]CYH33	**Assay:** Liquid scintillation counting

PO Dose: single PO at 3 mg/100 µCi/kg
Batch No.of [^{14}C]CYH33: [redacted]

Special Features: Urine, feces, and cage rinse/wash were collected up to 168 h post-dose from six intact rats; and bile, urine, feces, and cage rinse/wash were collected up to 72 h post-dose from the BDC rats. Aliquots of plasma, bile, urine, and cage rinse/wash samples were radio-assayed by liquid scintillation counting (LSC) directly. Fecal powder and blood samples were combusted by oxidizer, and the generated [^{14}C]CO_2 was captured by scintillation liquid, followed by radio-assay using liquid scintillation counter. The TRA determined in bile, urine, feces and cage rinse/cage wash were used to calculate percent of the administered dose recovery, and the TRA determined in blood and plasma were converted to nanogram equivalent of [^{14}C]CYH33 per gram sample (ng Eq./g).

Table 1. Percent of the administered dose recovered in 0 hour ~168 h urine, feces and cage rinse/wash following a single oral dose of [^{14}C]CYH33 at 3 mg/100 µCi/kg to intact Sprague-Dawley rats (Mean ± SD)

Gender (Number)	Urine (%)	Feces (%)	Cage Rinse/Wash (%)	Total Dose Recovered (%)
Female (n=3)	1.68±0.21	94.63±0.25	0.34±0.15	96.65±0.37
Male (n=3)	2.02±0.26	96.10±1.87	0.31±0.17	98.43±1.91

Table 2. Percent of the administered dose recovered in 0 hour ~ 72 h bile, urine, feces and cage rinse/wash following a single oral dose of [^{14}C]CYH33 at 3 mg/100 µCi/kg to BDC Sprague-Dawley rats (Mean ± SD)

Gender (Number)	Urine (%)	Feces (%)	Cage Rinse/Wash (%)	Bile (%)	Total Dose Recovered (%)
Female (n=3)	7.42±0.21	36.78±1.07	0.33±0.06	53.68±0.70	98.20±0.57
Male (n=3)	8.60±3.07	18.60±2.61	0.40±0.27	68.92±7.03	96.52±1.08

2.6.5.7 薬物動態学的薬物相互作用

2.6.5.7.1 CYP450 酵素誘導

Report Title: Evaluation of CYH33 and I27 for *In Vitro* Induction Potential of CYPs in Human Hepatocytes
Test Article: **CYH33 and I27**
Report No.: [redacted]-CYH33-ADME-DDI-EID
Location in eCTD: M4.2.2.6-1
GLP Compliance: Non-GLP
Study System: *In vitro*
Test System: Human hepatocytes
Method: UPLC-MS/MS
Study Completion Date: Jan, 2020
Analyte: CYH33 and I27

Special Features

- lot No. (CYH33): [redacted] (purity 99.77%); lot No: (I27): [redacted] (content: 95.7%); human hepatocytes: [redacted] (Caucasian), [redacted] (Caucasian), [redacted] (Caucasian).

Table 1. Effects of CYH33 and I27 on CYP1A2 enzymatic activity

Compounds	Relative activity of CYP1A2（Mean ± SD, n=3）									% Positive Control		
	LHuf17905A			LHum15101			RMH			LHuf17905A	LHum15101	RMH
Vehicle control	1	±	0.01	1	±	0.03	1	±	0	\	\	\
Omeprazole (100 μM)	14	±	0.1	71.7	±	1.7	17.9	±	2.4	100	100	100
CYH33 (0.1 μM)	1.46	±	0.04	1.76	±	0.07	1.56	±	0.01	＜4	＜2	＜4
CYH33 (1 μM)	1.29	±	0.08	2.39	±	0.07	1.75	±	0.05	＜3	＜2	＜5
CYH33 (10 μM)	0.91	±	0.05	1.98	±	0.02	1.37	±	0	＜0	＜2	＜3
I27 (0.1 μM)	1.42	±	0.05	1.63	±	0.07	1.7	±	0.07	＜4	＜1	＜5
I27 (1 μM)	1.3	±	0.02	2.37	±	0.07	1.66	±	0.12	＜3	＜2	＜4
I27 (10 μM)	1.01	±	0.05	2.51	±	0.05	0.65	±	0.02	＜1	＜3	＜0

Table 2. Effects of CYH33 and I27 on CYP2B6 enzymatic activity

Compounds	Relative activity of CYP2B6（Mean ± SD, n=3）									% Positive Control		
	LHuf17905A			LHum15101			RMH			LHuf17905A	LHum15101	RMH
Vehicle control	1	±	0.04	1	±	0.01	1	±	0	\	\	\
Phenobarbital (1000 μM)	2.28	±	0.08	4.23	±	0.09	6.67	±	0.45	100	100	100
CYH33 (0.1 μM)	0.66	±	0.05	1.12	±	0.09	1.68	±	0.19	＜0	＜4	＜13
CYH33 (1 μM)	0.45	±	0.01	0.79	±	0.04	1.67	±	0.13	＜0	＜0	＜12
CYH33 (10 μM)	0.34	±	0.03	0.63	±	0.05	1.2	±	0.09	＜0	＜0	＜4
I27 (0.1 μM)	0.78	±	0.04	1.23	±	0.1	1.99	±	0.22	＜0	＜8	＜18
I27 (1 μM)	0.48	±	0.05	0.8	±	0.05	1.71	±	0.25	＜0	＜0	＜13
I27 (10 μM)	0.41	±	0.01	0.66	±	0.04	0.66	±	0.03	＜0	＜0	＜0

Table 3. Effects of CYH33 and I27 on CYP3A4 enzymatic activity

Compounds	Relative activity of CYP3A4（Mean ± SD, n=3）									% Positive Control		
	LHuf17905A			LHum15101			RMH			LHuf17905A	LHum15101	RMH
Negative control (Vehicle)	1	±	0.05	1	±	0.07	1	±	0.02	\	\	\
Rifampicin (10 μM)	4.02	±	0.33	15.2	±	0.5	12.1	±	1.2	100	100	100
9106-IM-2 (0.005 μM)	1.73	±	0.04	3.28	±	0.09	1.89	±	0.07	24.3	＜17	＜9
9106-IM-2 (0.05 μM)	1.61	±	0.12	4.96	±	0.19	2.27	±	0.08	20.2	27.9	＜12
9106-IM-2 (0.5 μM)	1.08	±	0.06	4	±	0.12	1.52	±	0.05	＜3	21.1	＜5
I27 (0.1 μM)	1.68	±	0.06	2.9	±	0.1	1.95	±	0.11	22.5	＜14	＜9
I27 (1 μM)	1.7	±	0.06	4.81	±	0.3	2.07	±	0.11	23.3	26.8	＜10
I27 (10 μM)	1.18	±	0.07	5.3	±	0.3	0.81	±	0.05	＜6	30.3	＜0

Table 4. Effects of CYH33 and I27 on CYP1A2 mRNA

Compounds	Induction fold of CYP1A2 mRNA（Mean ± SD, n=3）									% Positive Control		
	LHuf17905A			LHum15101			RMH			LHuf17905A	LHum15101	RMH
Vehicle control	1	±	0.07	1.01	±	0.13	1	±	0.02	\	\	\
Omeprazole (100 μM)	216	±	33	174	±	36	143	±	7	100	100	100
CYH33 (0.1 μM)	1.24	±	0.29	2.01	±	0.09	1.66	±	0.18	＜1	＜1	＜1
CYH33 (1 μM)	0.94	±	0.33	2.51	±	0.15	1.61	±	0.22	＜0	＜1	＜1
CYH33 (10 μM)	0.86	±	0.06	7.3	±	1.49	2.45	±	0.3	＜0	＜4	＜2
I27 (0.1 μM)	0.9	±	0.16	1.9	±	0.26	1.44	±	0.13	＜0	＜1	＜1
I27 (1 μM)	0.66	±	0.05	2.1	±	0.46	1.64	±	0.12	＜0	＜1	＜1
I27 (10 μM)	0.74	±	0.17	4.09	±	0.64	2.03	±	0.34	＜0	＜2	＜1

Table 5. Effects of CYH33 and I27 on CYP2B6 mRNA

Compounds	Induction fold of CYP2B6 mRNA（Mean ± SD, n=3）									% Positive Control		
	LHuf17905A			LHum15101			RMH			LHuf17905A	LHum15101	RMH
Vehicle control	1	±	0.12	1	±	0.09	1	±	0.05	\	\	\
Phenobarbital (1000 μM)	3.74	±	0.42	11.4	±	4.8	10.8	±	0.3	100	100	100
CYH33 (0.1 μM)	1.74	±	0.1	4.23	±	0.26	3.33	±	0.17	27	31	23.9
CYH33 (1 μM)	1.33	±	0.26	6.85	±	0.71	6.37	±	0.64	＜12	56.3	55
CYH33 (10 μM)	1.54	±	0.22	12.5	±	2.09	6.56	±	0.62	＜20	110	57
I27 (0.1 μM)	1.53	±	0.37	4.26	±	0.93	3.14	±	0.21	＜20	31.4	21.9
I27 (1 μM)	1.21	±	0.31	7.58	±	1.99	6.29	±	0.65	＜8	63.3	54.2
I27 (10 μM)	1.95	±	0.64	12.5	±	2.84	11.3	±	1.37	34.5	110	106

Table 6. Effects of CYH33 and I27 on CYP3A4 mRNA

Compounds	Induction fold of CYP3A4 mRNA（Mean ± SD, n=3）									% Positive Control		
	LHuf17905A			LHum15101			RMH			LHuf17905A	LHum15101	RMH
Vehicle control	1.01	±	0.14	1.01	±	0.15	1	±	0.07	\	\	\

Rifampin (10 μM)	6.5	±	0.98	57	±	3.1	8.4	±	2.6	100	100	100
CYH33 (0.1 μM)	3.38	±	0.46	11.2	±	0.58	2.31	±	0.44	43.2	＜19	＜18
CYH33 (1 μM)	2.84	±	0.84	21.5	±	3.51	2.19	±	0.12	33.4	36.6	＜17
CYH33 (10 μM)	5.07	±	0.46	39.8	±	4.37	2.31	±	0.52	74	69.3	＜18
I27 (0.1 μM)	2.86	±	0.35	22.9	±	2.7	2.04	±	0.34	33.8	39.2	＜14
I27 (1 μM)	3.75	±	0.44	39.1	±	2.3	1.72	±	0.14	50.1	68.1	＜10
I27 (10 μM)	2.86	±	0.35	22.9	±	2.7	2.04	±	0.34	33.8	39.2	＜14

2.6.5.7.2 CYP450 酵素誘導試験における EC_{50} 及び E_{max} の測定

Report Title: In Vitro Study for Evaluating TA-22-294 (CYH33) and TA-22-295 (I27) As A Potential Inducer of CYP450 Enzymes (mRNA Expression)

Test Article: **CYH33 and I27**
Report No.: [redacted]**-S2308-07-1**
Location in eCTD: M4.2.2.6-2

Study System: *In vitro* **Test System:** Human hepatocytes **GLP Compliance: Non-GLP**
Method: Quantitative real-time polymerase chain reaction (q-PCR)

Analyte: CYH33 and I27 **Study Completion Date**: Oct., 2023

Special Features
- lot No. (CYH33): [redacted] (purity: 99.88%); lot No: (I27): [redacted] (purity: 99.62%); human hepatocytes: Lot No.: [redacted], [redacted] and [redacted].

Table 1. The effect of TA-22-294 (CYH33) on the mRNA expression of CYP2B6 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (OQA)

Compound/ Conc.	CYP2B6 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	0.942	0.982	1.08	1.00	0.0721	NA
Phenobarbital / 1000 µM	5.55	5.36	5.75	5.56	0.193	100
TA-22-294 / 30 µM	2.27	2.26	2.09	2.21	0.100	26.5
TA-22-294/ 10 µM	2.50	2.35	2.00	2.29	0.255	28.2
TA-22-294/ 3 µM	2.49	2.42	2.38	2.43	0.0516	31.4
TA-22-294/ 1 µM	2.13	2.05	2.27	2.15	0.113	25.3
TA-22-294 / 0.3 µM	1.55	1.69	1.44	1.56	0.124	12.2
TA-22-294 / 0.1 µM	1.23	1.27	1.12	1.21	0.0779	4.56
Roxithromycin / 10 µM	1.04	0.916	0.879	0.944	0.0832	0.00*

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 2. The effect of TA-22-294 (CYH33) on the mRNA expression of CYP2B6 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (RAS)

Compound/ Conc.	CYP2B6 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	1.04	0.986	0.979	1.00	0.0305	NA
Phenobarbital / 1000 µM	18.6	19.7	21.7	20.0	1.56	100
TA-22-294 / 30 µM	2.17	2.28	1.92	2.12	0.186	5.91
TA-22-294/ 10 µM	3.18	2.85	3.25	3.09	0.215	11.0
TA-22-294/ 3 µM	2.87	2.99	3.05	2.97	0.0939	10.4
TA-22-294/ 1 µM	2.93	2.93	2.55	2.80	0.219	9.48
TA-22-294 / 0.3 µM	2.01	2.08	1.77	1.95	0.168	5.02
TA-22-294 / 0.1 µM	1.53	1.80	1.78	1.70	0.153	3.69
Roxithromycin / 10 µM	0.946	0.973	0.973	0.964	0.0154	0.00*

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 3. The effect of TA-22-294 (CYH33) on the mRNA expression of CYP2B6 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (XSM)

Compound/ Conc.	CYP2B6 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	0.984	1.01	1.00	1.00	0.0144	NA
Phenobarbital / 1000 µM	8.26	8.73	7.40	8.13	0.679	100
TA-22-294 / 30 µM	1.86	1.86	1.74	1.82	0.0720	11.5
TA-22-294/ 10 µM	6.22	5.49	5.45	5.72	0.433	66.2
TA-22-294/ 3 µM	3.40	4.25	3.72	3.79	0.427	39.1
TA-22-294/ 1 µM	3.05	2.78	2.88	2.90	0.133	26.7
TA-22-294 / 0.3 µM	2.41	2.61	2.46	2.49	0.109	20.9
TA-22-294 / 0.1 µM	2.07	2.00	1.77	1.94	0.152	13.3
Roxithromycin / 10 µM	1.11	1.03	1.05	1.06	0.0464	0.878

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 4. The effect of TA-22-294 (CYH33) on the mRNA expression of CYP3A4 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (OQA)

Compound/ Conc.	CYP3A4 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	1.07	1.01	0.929	1.00	0.0694	NA
Rifampicin / 25 µM	155	160	159	158	2.88	100
TA-22-294 / 30 µM	15.6	16.5	16.4	16.2	0.484	9.65
TA-22-294/ 10 µM	41.7	38.9	38.4	39.7	1.79	24.7
TA-22-294/ 3 µM	37.6	36.1	40.0	37.9	1.99	23.5
TA-22-294/ 1 µM	40.6	40.9	36.1	39.2	2.69	24.3
TA-22-294 / 0.3 µM	23.0	22.4	23.6	23.0	0.638	14.0
TA-22-294 / 0.1 µM	14.1	14.1	15.0	14.4	0.522	8.51
Roxithromycin / 10 µM	0.948	1.03	1.03	1.00	0.0475	0.00196

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 5. The effect of TA-22-294 (CYH33) on the mRNA expression of CYP3A4 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (RAS)

Compound/ Conc.	CYP3A4 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	1.11	0.918	0.984	1.00	0.0959	NA
Rifampicin / 25 µM	17.8	15.5	17.2	16.9	1.20	100
TA-22-294 / 30 µM	0.672	0.610	0.623	0.635	0.0328	0.00*
TA-22-294/ 10 µM	6.13	6.09	6.57	6.27	0.267	33.2
TA-22-294/ 3 µM	6.67	7.19	6.71	6.86	0.292	36.9
TA-22-294/ 1 µM	6.48	6.26	6.39	6.38	0.111	33.9
TA-22-294 / 0.3 µM	4.91	5.49	5.02	5.14	0.307	26.1

TA-22-294 / 0.1 µM	4.05	4.34	4.34	4.24	0.168	20.4
Roxithromycin / 10 µM	1.03	1.33	1.03	1.13	0.173	0.792

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 6. The effect of TA-22-294 (CYH33) on the mRNA expression of CYP3A4 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (XSM)

Compound/ Conc.	CYP3A4 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	1.14	0.877	1.00	1.01	0.132	NA
Rifampicin / 25 µM	43.1	40.2	40.8	41.4	1.53	100
TA-22-294 / 30 µM	4.29	3.61	3.97	3.95	0.341	7.32
TA-22-294/ 10 µM	20.3	18.1	18.8	19.0	1.09	44.7
TA-22-294/ 3 µM	13.7	13.0	14.9	13.9	0.975	31.9
TA-22-294/ 1 µM	13.5	13.5	14.3	13.8	0.475	31.6
TA-22-294 / 0.3 µM	8.82	9.25	10.3	9.47	0.784	21.0
TA-22-294 / 0.1 µM	5.70	6.02	5.70	5.80	0.188	11.9
Roxithromycin / 10 µM	1.06	1.05	0.865	0.993	0.111	0.00*

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 7. The effect of TA-22-295 (I27) on the mRNA expression of CYP2B6 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (OQA)

Compound/ Conc.	CYP2B6 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	0.961	1.07	0.975	1.00	0.0573	NA
Phenobarbital / 1000 µM	6.56	6.74	5.91	6.40	0.437	100
TA-22-295 / 50 µM	6.38	6.20	6.25	6.28	0.0909	97.7
TA-22-295/ 10 µM	3.69	4.33	3.93	3.98	0.322	55.2
TA-22-295/ 3 µM	2.83	3.37	6.74	4.32	2.12	61.4
TA-22-295/ 1 µM	1.76	1.70	1.76	1.74	0.0346	13.6
TA-22-295 / 0.3 µM	1.58	1.56	1.66	1.60	0.0529	11.2
TA-22-295 / 0.1 µM	1.48	1.19	1.30	1.32	0.144	6.01
Roxithromycin / 10 µM	1.05	0.961	0.942	0.985	0.0589	0.00*

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 8. The effect of TA-22-295 (I27) on the mRNA expression of CYP2B6 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (RAS)

Compound/ Conc.	CYP2B6 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	1.22	0.895	0.914	1.01	0.184	NA
Phenobarbital / 1000 µM	24.8	24.9	26.4	25.3	0.875	100
TA-22-295 / 50 µM	4.92	4.69	4.23	4.61	0.355	14.8
TA-22-295/ 10 µM	4.23	4.38	4.92	4.51	0.367	14.4
TA-22-295/ 3 µM	3.94	3.29	3.43	3.56	0.342	10.5
TA-22-295/ 1 µM	1.48	1.97	2.04	1.83	0.304	3.42

TA-22-295 / 0.3 μM	2.57	2.58	2.51	2.56	0.0368	6.39
TA-22-295 / 0.1 μM	1.52	1.84	1.58	1.65	0.172	2.65
Roxithromycin / 10 μM	0.920	1.10	1.04	1.02	0.0927	0.0884

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 9. The effect of TA-22-295 (I27) on the mRNA expression of CYP2B6 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (XSM)

Compound/ Conc.	CYP2B6 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	1.01	1.03	0.961	1.00	0.0353	NA
Phenobarbital / 1000 μM	17.5	14.9	14.4	15.6	1.72	100
TA-22-295 / 50 μM	17.9	16.8	16.5	17.1	0.746	110
TA-22-295/ 10 μM	9.74	10.7	10.4	10.3	0.469	63.4
TA-22-295/ 3 μM	8.59	7.69	8.48	8.25	0.490	49.7
TA-22-295/ 1 μM	4.39	4.30	3.90	4.19	0.259	21.9
TA-22-295 / 0.3 μM	2.65	2.30	2.65	2.53	0.198	10.5
TA-22-295 / 0.1 μM	3.47	3.54	3.21	3.41	0.172	16.5
Roxithromycin / 10 μM	1.04	0.948	1.02	1.00	0.0480	0.0212

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00"

Table 10. The effect of TA-22-295 (I27) on the mRNA expression of CYP3A4 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (OQA)

Compound/ Conc.	CYP3A4 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	0.991	0.998	1.01	1.00	0.0106	NA
Rifampicin / 25 μM	102	98.8	98.1	99.7	2.24	100
TA-22-295 / 50 μM	85.4	81.9	82.5	83.3	1.87	83.3
TA-22-295/ 10 μM	44.2	45.5	40.7	43.5	2.48	43.0
TA-22-295/ 3 μM	37.7	43.0	46.4	42.4	4.39	41.9
TA-22-295/ 1 μM	19.2	19.0	20.3	19.5	0.722	18.8
TA-22-295 / 0.3 μM	12.5	12.8	11.2	12.2	0.845	11.3
TA-22-295 / 0.1 μM	5.64	5.49	6.05	5.73	0.289	4.79
Roxithromycin / 10 μM	0.918	1.07	1.08	1.02	0.0895	0.0216

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 11. The effect of TA-22-295 (I27)on the mRNA expression of CYP3A4 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (RAS)

Compound/ Conc.	CYP3A4 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	0.975	1.03	1.00	1.00	0.0281	NA
Rifampicin / 25 μM	18.9	17.7	17.5	18.1	0.770	100
TA-22-295 / 50 μM	6.74	7.23	6.98	6.98	0.242	35.1
TA-22-295/ 10 μM	8.59	7.85	7.23	7.89	0.684	40.4

TA-22-295/ 3 µM	6.88	6.25	7.48	6.87	0.617	34.4
TA-22-295/ 1 µM	4.80	4.45	4.97	4.74	0.266	21.9
TA-22-295 / 0.3 µM	5.22	4.94	5.07	5.08	0.141	23.9
TA-22-295 / 0.1 µM	2.76	2.59	3.28	2.88	0.359	11.0
Roxithromycin / 10 µM	1.05	1.04	1.08	1.06	0.0225	0.335

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

Table 12. The effect of TA-22-295 (I27) on the mRNA expression of CYP3A4 - Fold change relative to VC and percent increase relative to PC (XSM)

Compound/ Conc.	CYP3A4 mRNA expression levels (Fold change relative to VC)			Mean	SD	% of PC
VC	0.968	1.10	0.942	1.00	0.0830	NA
Rifampicin / 25 µM	46.3	46.6	49.0	47.3	1.44	100
TA-22-295 / 50 µM	30.6	31.9	30.1	30.8	0.896	64.5
TA-22-295/ 10 µM	21.5	22.8	21.2	21.8	0.895	45.0
TA-22-295/ 3 µM	21.2	21.5	23.5	22.0	1.26	45.4
TA-22-295/ 1 µM	10.5	9.80	10.8	10.4	0.513	20.2
TA-22-295 / 0.3 µM	6.03	6.47	6.20	6.24	0.218	11.3
TA-22-295 / 0.1 µM	5.44	5.22	5.25	5.30	0.119	9.29
Roxithromycin / 10 µM	0.989	1.05	0.910	0.983	0.0714	0.00*

: The calculated value was minus, which was indicated as "0.00".

2.6.5.7.3 CYH33 及び I27 の CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19 mRNA 発現に対する誘導能

Report Title: *In Vitro* Study for Evaluating CYH33 and I27 as A Potential Inducer of CYP450 Enzymes (mRNA Expression)

Test Article: CYH33 and I27
Report No.: [redacted]-S2510-01-1
Location in eCTD: M4.2.2.6-7
GLP Compliance: Non-GLP

Study System: *In vitro*
Test System: Human primary hepatocytes
Method: Quantitative real-time polymerase chain reaction (q-PCR)
Analytes: CYH33 and 27

Special Features: CYH33: Batch No.: [redacted], Purity: 99.9%, Purity factor: 0.9384, Final concentration: 20, 5, 1, 0.5, 0.1 and 0.01 μM. I27: Batch No.: [redacted], Purity: 99.63%, Purity factor: 0.9935, Final concentration: 10, 3, 1, 0.3, 0.1 and 0.01 μM. Human hepatocytes: [redacted] (Caucasian), [redacted] (Caucasian), [redacted] (American Indian), [redacted] (Caucasian), [redacted] (Caucasian), [redacted] (Caucasian).

Table 1. Induction Parameters for mRNA expression of CYP2C8, 2C9 and 2C19

Test Article	Parameters	Donor for CYP2C8			Donor for CYP2C9			Donor for CYP2C19		
		OQA	SQV	WZJ	OQA	RAS	LFW	OQA	SQV	IOO
CYH33	EC_{50}, μM	NA	0.0689	0.640	NA	NA	0.106	<0.01	<5.0	NA
	E_{max}, Fold	NA	5.83	8.74	NA	NA	3.48	> 4.0	>2.0	NA
I27	EC_{50}, μM	0.602	0.345	0.710	NA	NA	0.195	< 3.0	<3.0	NA
	E_{max}, Fold	3.39	5.22	10.8	NA	NA	3.21	> 2.0	>3.0	NA

NA: Not applicable due to negative induction results

2.6.5.7.4 CYP33 及び I27 の時間依存的 CYP 阻害

Report Title: Evaluation of CYH33 and I27 for CYP450 *In Vitro* Time-dependent Inhibition Potential

Test Article: **CYH33 and I27**
Report No.: [redacted]-CYH33-2019-ADME-DDI-EI
Location in eCTD: M4.2.2.6-3
GLP Compliance: Non-GLP

Study System: *In vitro*
Test System: human liver microsomes
Method: UPLC-MS/MS method
Analyte: CYH33 and I27
Study Completion Date: Jan, 2020

Special Features: CYH33 and I27 Concentration: 0.1-100 μM
Batch No.: CYH33: [redacted], I27: [redacted]

Effect of CYH33 and I27 on CYP1A2 Enzyme Activity

	NADPH +		NADPH -	
Furafylline (μM)	CYP1A2		CYP1A2	
	Acetaminophen (μM)	Remaining activity (%)	Acetaminophen (μM)	Remaining activity (%)
0	0.527	100	0.579	100
0.01	0.518	98.2	0.591	102
0.03	0.499	94.7	0.585	101
0.1	0.458	86.9	0.584	101
0.33	0.321	60.8	0.591	102
1	0.195	37	0.554	95.7
3.33	0.074	14.1	0.438	75.7
10	0.056	10.6	0.306	52.9
CYH33 (μM)	CYP1A2		CYP1A2	
	Acetaminophen (μM)	Remaining activity (%)	Acetaminophen (μM)	Remaining activity (%)
0	0.481	100	0.609	100
0.1	0.446	92.8	0.615	101
0.33	0.502	104	0.589	96.7
1	0.522	109	0.556	91.3
3.33	0.502	104	0.546	89.6
10	0.473	98.3	0.583	95.7
33.3	0.486	101	0.558	91.5
100	0.474	98.6	0.559	91.7
I27 (μM)	CYP1A2		CYP1A2	
	Acetaminophen (μM)	Remaining activity (%)	Acetaminophen (μM)	Remaining activity (%)
0	0.506	100	0.666	100
0.1	0.515	102	0.644	96.6
0.33	0.511	101	0.624	93.6
1	0.534	105	0.641	96.2
3.33	0.526	104	0.617	92.6
10	0.527	104	0.609	91.5

33.3	0.498	96.7	0.584	87.7
100	0.493	97.4	0.604	90.7

Effect of CYH33 and I27 on CYP2B6 Enzyme Activity

	NADPH +		NADPH -	
Ticlopidine (μM)	CYP2B6		CYP2B6	
	Hydroxy bupropion (μM)	Remaining activity (%)	Hydroxy bupropion (μM)	Remaining activity (%)
0	0.16	100	0.199	100
0.01	0.147	92	0.184	92.2
0.03	0.127	79.4	0.196	98
0.1	0.097	60.8	0.191	95.7
0.33	0.031	19.7	0.15	75.5
1	0.009	5.62	0.12	60.2
3.33	0.005	3.26	0.038	18.9
10	0.005	3.21	0.019	9.76
CYH33 (μM)	CYP2B6		CYP2B6	
	Hydroxy bupropion (μM)	Remaining activity (%)	Hydroxy bupropion (μM)	Remaining activity (%)
0	0.184	100	0.306	100
0.1	0.166	90.3	0.267	87.5
0.33	0.173	94	0.258	84.4
1	0.174	94.5	0.264	86.2
3.33	0.171	93.2	0.261	85.4
10	0.181	98.7	0.272	89
33.3	0.177	96.2	0.26	84.9
100	0.167	91.1	0.258	84.4
I27 (μM)	CYP2B6		CYP2B6	
	Hydroxy bupropion (μM)	Remaining activity (%)	Hydroxy bupropion (μM)	Remaining activity (%)
0	0.196	100	0.301	100
0.1	0.193	98.8	0.291	96.6
0.33	0.179	91.6	0.309	103
1	0.178	90.8	0.272	90.4
3.33	0.181	92.8	0.278	92.5
10	0.181	92.8	0.281	93.2
33.3	0.192	99.2	0.279	92.7
100	0.188	96	0.279	92.7

Effect of CYH33 and I27 on CYP2C8 Enzyme Activity

	NADPH +		NADPH -	
Phenelzine (μM)	CYP2C8		CYP2C8	
	6α-hydroxy paclitaxel (μM)	Remaining activity (%)	6α-hydroxy paclitaxel (μM)	Remaining activity (%)
0	0.133	100	0.133	100
0.1	0.127	95.2	0.13	97.7

0.33	0.136	102	0.129	97.2
1	0.126	94.5	0.129	97.3
3.33	0.126	94.8	0.118	88.8
10	0.103	77.8	0.114	85.7
33.3	0.074	55.8	0.099	74.7
100	0.04	30.1	0.072	53.9

CYH33 (μM)	CYP2C8		CYP2C8	
	6α-hydroxy paclitaxel (μM)	Remaining activity (%)	6α-hydroxy paclitaxel (μM)	Remaining activity (%)
0	0.07	100	0.075	100
0.1	0.069	113	0.068	89.9
0.33	0.06	104	0.071	94
1	0.07	102	0.07	92.7
3.33	0.07	101	0.077	103
10	0.069	98.9	0.07	93.1
33.3	0.071	102	0.077	102
100	0.067	95.9	0.065	86.4

I27 (μM)	CYP2C8		CYP2C8	
	6α-hydroxy paclitaxel (μM)	Remaining activity (%)	6α-hydroxy paclitaxel (μM)	Remaining activity (%)
0	0.077	100	0.092	100
0.1	0.074	95.5	0.073	79.6
0.33	0.073	95.1	0.072	79.1
1	0.073	94.5	0.075	82
3.33	0.082	107	0.08	87.8
10	0.07	90.6	0.072	78.9
33.3	0.076	98.8	0.075	81.5
100	0.077	99.4	0.08	87.2

Effect of CYH33 and I27 on CYP2C9 Enzyme Activity

(μM)	NADPH +		NADPH -	
Tinic acid (μM)	CYP2C9		CYP2C9	
	7-hydroxy warfarin (μM)	Remaining activity (%)	7-hydroxy warfarin (μM)	Remaining activity (%)
0	5.48E-03	100	5.95E-03	100
0.01	4.64E-03	84.7	5.98E-03	100
0.03	4.24E-03	77.3	5.92E-03	99.4
0.1	2.95E-03	53.9	5.10E-03	85.7
0.33	1.34E-03	24.3	3.83E-03	64.3
1	9.93E-04	18.1	2.31E-03	38.7
3.33	6.75E-04	12.3	1.29E-03	21.7
10	BQL	N.A.	6.63E-04	11.1

CYH33 (μM)	CYP2C9		CYP2C9	
	7-hydroxy warfarin (μM)	Remaining activity (%)	7-hydroxy warfarin (μM)	Remaining activity (%)

0	4.90E-03	100	5.89E-03	100
0.1	4.95E-03	101	6.21E-03	106
0.33	4.94E-03	101	6.09E-03	103
1	4.98E-03	102	6.34E-03	108
3.33	4.87E-03	99.3	5.96E-03	101
10	4.74E-03	96.7	5.74E-03	97.5
33.3	4.60E-03	93	5.91E-03	100
100	4.39E-03	89.6	5.08E-03	86.4

I27 (μM)	CYP2C9		CYP2C9	
	7-hydroxy warfarin (μM)	Remaining activity (%)	7-hydroxy warfarin (μM)	Remaining activity (%)
0	5.30E-03	100	6.08E-03	100
0.1	5.36E-03	101	6.51E-03	107
0.33	5.25E-03	99	6.07E-03	100
1	5.27E-03	99.4	6.32E-03	104
3.33	5.27E-03	99.4	6.11E-03	100
10	4.86E-03	91.7	5.64E-03	92.8
33.3	4.98E-03	93.9	5.63E-03	92.6
100	5.36E-03	101	5.58E-03	91.8

Effect of CYH33 and I27 on CYP2C19 Enzyme Activity

(μM)	NADPH +		NADPH -	
Ticlopidine	CYP2C19		CYP2C19	
(μM)	4'-hydroxymefentoin (μM)	Remaining activity (%)	4'-hydroxymefentoin (μM)	Remaining activity (%)
0	0.095	100	0.089	100
0.01	0.093	97.3	0.099	112
0.03	0.096	101	0.093	105
0.1	0.098	103	0.1	113
0.33	0.086	90.4	0.103	116
1	0.042	44.4	0.088	99.6
3.33	BQL	N.A.	0.057	64.6
10	BQL	N.A.	0.045	51

CYH33 (μM)	CYP2C19		CYP2C19	
	4'-hydroxymefentoin (μM)	Remaining activity (%)	4'-hydroxymefentoin (μM)	Remaining activity (%)
0	0.091	100	0.082	100
0.1	0.091	100	0.083	101
0.33	0.095	105	0.096	116
1	0.09	98.7	0.089	109
3.33	0.086	94.8	0.09	109
10	0.098	108	0.089	108
33.3	0.083	92	0.083	101
100	0.076	84.2	0.074	90

I27 (μM)	CYP2C19	CYP2C19

	4’-hydroxymefentoin	(μM)	Remaining activity (%)	4’-hydroxymefentoin	(μM)	Remaining activity (%)
0	0.096		100	0.093		100
0.1	0.094		97.2	0.097		104
0.33	0.097		101	0.099		106
1	0.103		107	0.095		101
3.33	0.101		105	0.1		107
10	0.094		97.2	0.085		91.1
33.3	0.097		101	0.095		102
100	0.094		97.1	0.093		100

Effect of CYH33 and I27 on CYP2D6 Enzyme Activity

(μM)	NADPH +			NADPH -		
Paroxetine	CYP2D6			CYP2D6		
(μM)	*O*-demethyl dextromethorphan (μM)		Remaining activity (%)	O-demethyl dextromethorphan	(μM)	Remaining activity (%)
0	0.107		100	0.107		100
0.01	0.1		93.4	0.104		97.5
0.03	0.089		82.5	0.092		85.4
0.1	0.059		55	0.083		77
0.33	0.013		11.8	0.059		55.4
1	0.005		4.29	0.029		27.2
3.33	0.002		2.2	0.016		14.6
10	0.002		1.56	0.006		5.8
CYH33 (μM)	CYP2D6			CYP2D6		
	O-demethyl dextromethorphan	(μM)	Remaining activity (%)	O-demethyl dextromethorphan	(μM)	Remaining activity (%)
0	0.102		100	0.114		100
0.1	0.097		94.4	0.11		96.3
0.33	0.115		112	0.116		101
1	0.098		95.6	0.104		91.3
3.33	0.113		110	0.11		96.6
10	0.106		104	0.105		91.8
33.3	0.101		104	0.109		95.9
100	0.089		86.7	0.097		84.8
I27 (μM)	CYP2D6			CYP2D6		
	O-demethyl dextromethorphan	(μM)	Remaining activity (%)	O-demethyl dextromethorphan	(μM)	Remaining activity (%)
0	0.108		100	0.11		100
0.1	0.102		95	0.103		94
0.33	0.105		97.4	0.114		104
1	0.1		93.3	0.109		99.2
3.33	0.097		90.5	0.106		96.4
10	0.102		94.4	0.108		97.8
33.3	0.092		85.7	0.1		90.9

100	0.101		94.3	0.101	91.7

Effect of CYH33 and I27 on the activity of CYP3A4 (midazolam 1'-hydroxylation reaction)

(μM)	NADPH +			NADPH -		
Verapamil	CYP3A4			CYP3A4		
(μM)	1'-hydroxymidazolam	(μM)	Remaining activity (%)	1'-hydroxymidazolam	(μM)	Remaining activity (%)
0	0.339		100	0.37		100
0.1	0.306		90.4	0.322		87
0.33	0.312		92	0.354		95.5
1	0.242		71.5	0.332		89.6
3.33	0.166		49	0.315		85.1
10	0.098		28.9	0.256		69.2
33.3	0.053		15.7	0.183		49.3
100	0.025		7.44	0.127		34.4
CYH33 (μM)	CYP3A4			CYP3A4		
	1'-hydroxymidazolam	(μM)	Remaining activity (%)	1'-hydroxymidazolam	(μM)	Remaining activity (%)
0	0.365		100	0.31		100
0.1	0.353		96.6	0.291		93.8
0.33	0.361		98.8	0.298		96
1	0.337		92.3	0.302		97.5
3.33	0.284		77.6	0.281		90.7
10	0.277		75.7	0.269		87
33.3	0.273		77.4	0.259		83.6
100	0.247		67.5	0.248		79.9
I27 (μM)	CYP3A4			CYP3A4		
	1'-hydroxymidazolam	(μM)	Remaining activity (%)	1'-hydroxymidazolam	(μM)	Remaining activity (%)
0	0.384		100	0.302		100
0.1	0.376		97.7	0.317		105
0.33	0.378		98.4	0.304		101
1	0.379		98.6	0.296		98
3.33	0.377		97.9	0.351		116
10	0.407		106	0.391		130
33.3	0.411		107	0.395		131
100	0.395		103	0.384		127

Effect of CYH33 and I27 on enzyme activity of CYP3A4 (testosterone 6β- hydroxylation reaction)

(μM)	NADPH +			NADPH -		
Verapamil	CYP3A4			CYP3A4		
(μM)	6β-hydroxytestosterone	(μM)	Remaining activity (%)	6β-hydroxytestosterone	(μM)	Remaining activity (%)
0	6.67		100	5.27		100
0.1	6.36		95.3	5.7		108
0.33	6.09		91.4	5.63		107

1	4.43		66.5	5.21	98.8
3.33	2.41		36.1	4.47	84.7
10	1.11		16.6	3.7	70.1
33.3	0.49		7.34	1.92	36.3
100	0.26		3.9	0.88	16.6

CYH33	(μM)	CYP3A4			CYP3A4		
		6β-hydroxytestosterone	(μM)	Remaining activity (%)	6β-hydroxytestosterone	(μM)	Remaining activity (%)
0		7.05		100	6.19		100
0.1		7.24		103	5.35		86.5
0.33		7.21		102	5.73		92.6
1		6.21		88.1	5.26		84.9
3.33		6.21		88.1	5.49		88.6
10		6.52		92.5	5.42		87.5
33.3		6.27		86.6	5.55		89.7
100		5.72		81.1	5.08		82

I27	(μM)	CYP3A4			CYP3A4		
		6β-hydroxytestosterone	(μM)	Remaining activity (%)	6β-hydroxytestosterone	(μM)	Remaining activity (%)
0		6.39		100	5.35		100
0.1		6.36		99.5	5.26		98.2
0.33		6.75		106	5.91		110
1		6.67		104	5.65		106
3.33		6.52		102	5.7		106
10		6.21		97.2	6.21		116
33.3		6.03		94.3	5.7		106
100		6.08		95.1	6		112

2.6.5.7.5 P-gp 及び BCRP の排出トランスポーターに対する CYH33 及び I27 の潜在的作用

Report Title: The Potential Effects of CYH33 and I27 on Efflux Transporters of P-gp and BCRP
Report No.: [redacted]-CYH33-ADME-DDI-ETP
Test Article: CYH33, I27
Location in eCTD: M4.2.2.6-4
GLP Compliance: Non-GLP
Test System: MDCK cell model
Method: UPLC-MS/MS to determine test and control compounds concentration
Substrate: digoxin for P-gp and imatinib for BCRP
Inhibitor: GF120918 for P-gp and Ko143 for BCRP

Study System: *In vitro*

Experiment Completion Date: [redacted] 20[redacted]

Analyte: CYH33 and I27

Special Features: Batch No.: CYH33: [redacted], I27: [redacted]; Substrate studies: CYH33 and I27: 10 μM, Inhibition studies: CYH33: 10 and 40 μM, I27: 10 μM and 100 μM

Transport of digoxin in MDCKII-MDR1 Cells

Compounds	Papp (10^{-6} cm/s) (Mean ± SD, n=3)						ER	%RA
	A→B			B→A				
10 μM digoxin	2.05	±	0.32	7.86	±	0.71	3.84	-
10 μM digoxin + 10 μM GF120918	3.25	±	0.33	4.35	±	0.18	1.34	-
10 μM digoxin + 10 μM CYH33	3.41	±	0.24	7.58	±	0.72	2.22	57.8
10 μM digoxin + 40 μM CYH33	2.97	±	0.44	7.02	±	0.92	2.36	61.6
10 μM digoxin + 10 μM I27	7.84	±	6.88	13.3	±	1.8	1.7	44.2
10 μM digoxin + 100 μM I27	6.98	±	4.91	10.7	±	3.4	1.54	40

Transport of imatinib in MDCK-BCRP Cells

Compounds	Papp (10^{-6} cm/s) (Mean ± SD, n=3)						ER	%RA
	A→B			B→A				
300 nM imatinib	1.94	±	0.25	28.5	±	3	14.7	-
300 nM imatinib+ 10 μM Ko143	6.16	±	0.72	11.6	±	0.9	1.89	-
300 nM imatinib+ 10 μM CYH33	3.87	±	0.28	13.5	±	0.5	3.49	23.8
300 nM imatinib+ 40 μM CYH33	4.56	±	0.22	15.1	±	0.8	3.3	22.5
300 nM imatinib+ 10 μM I27	2.19	±	0.07	21.6	±	0.6	9.85	67.1
300 nM imatinib + 100 μM I27	5.37	±	0.3	15.4	±	1.1	2.86	19.5

The recovery of digoxin, CYH33 and I27 in MDCKII-MDR1 Cells

Compounds	Recovery (%) (Mean ± SD, n=3)					
	A→B			B→A		
10 μM digoxin	117	±	6	104	±	6
10 μM digoxin + 10 μM GF120918	110	±	4	107	±	2

10 μM digoxin + 10 μM CYH33	102	±	7	101	±	4
10 μM digoxin + 40 μM CYH33	107	±	5	101	±	3
10 μM digoxin + 10 μM I27	99.2	±	1.8	101	±	1
10 μM digoxin + 100 μM I27	102	±	2	103	±	1
10 μM CYH33	94.8	±	2.2	95.1	±	1.4
10 μM CYH33 + 10 μM GF120918	98.5	±	4	100	±	2
10 μM I27	93.6	±	1.1	95.3	±	10.9
10 μM I27 + 10 μM GF120918	95.2	±	3.5	122	±	7

The recovery of imatinib, CYH33 and I27 in MDCKII-BCRP Cells

Compounds	Recovery (%) (Mean ± SD, n=3)					
	A→B			B→A		
300 nM imatinib	102	±	4	93	±	0.7
300 nM imatinib+ 10 μM Ko143	90.6	±	1.6	98.6	±	4
300 nM imatinib+ 10 μM CYH33	94	±	2.5	95	±	1.5
300 nM imatinib+ 40 μM CYH33	91.3	±	3.2	102	±	3
300 nM imatinib+ 10 μM I27	105	±	6	94.9	±	5.8
300 nM imatinib + 100 μM I27	98.5	±	2.1	101	±	7
10 μM CYH33	90.5	±	3.2	94	±	0.7
10 μM CYH33 + 10 μM Ko143	92.5	±	1.6	93.7	±	1.7
10 μM I27	90	±	4.1	93	±	20
10 μM I27 + 10 μM Ko143	102	±	8	109	±	6

Transport of CYH33 and I27 in MDCK-MDR1 Cells

Compounds	Papp (10^{-6} cm/s)						ER
	A→B			B→A			
10.0 μM CYH33	14	±	0.6	24.3	±	1.6	1.73
10.0 μM CYH33 + 10 μM GF120918	19	±	5	20.4	±	3.3	1.08
10.0 μM I27	6.96	±	3.3	24.8	±	2.8	3.56
10.0 μM I27 + 10 μM GF120918	18.4	±	2.8	22	±	2.1	1.19

Transport of CYH33 and I27 in MDCK-BCRP Cells

Compounds	Papp (10^{-6} cm/s)						ER
	A→B			B→A			
10.0 μM CYH33	16.1	±	1.7	16.7	±	1.5	1.03
10.0 μM CYH33 + 10 μM Ko143	17.6	±	1.5	15.9	±	2.8	0.9
10.0 μM I27	6.14	±	1.4	28.2	±	11	4.6
10.0 μM I27 + 10 μM Ko143	16.4	±	2.3	25.4	±	1.7	1.55

2.6.5.7.6 MDR1 及び BCRP 阻害試験における IC_{50} の測定

Report Title: *In Vitro* Study for Evaluating TA-22-294 (CYH33) and TA-22-295 (I27) as a Potential Inhibitor of Human ABC Transporters
Test Article: CYH33, I27
Protocol No.: RD-S2210-20-1
Location in eCTD: M4.2.2.6-5
GLP Compliance: Non-GLP
Study System: *In vitro*
Test System: MDCK cell model
Experiment Completion Date: [redacted]. 20[redacted]
Method: UPLC-MS/MS to determine test and control compounds concentration
Analyte: CYH33 and I27
Substrate: digoxin for P-gp and imatinib for BCRP
Inhibitor: GF120918 for P-gp and Ko143 for BCRP
Special Features: Batch No.: CYH33: [redacted], I27: [redacted];
Inhibition studies: CYH33: 0.016, 0.08, 0.4, 2 and 10 μM, I27: 0.08, 0.4, 2, 10 and 50 μM

Table 1. Transported activity and relative transported activity of BCRP to LFY in the presence of TA-22-294 (CYH33)

Test System	Amount of Probe Substrate (pmol)					Transported Activity (pmol/mg/min)					Relative Transported Activity (% of NC)
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	SD	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	SD	
NC-ATP	90.4	90.2	87.0	89.2	1.92	343	342	329	338	7.69	100
NC-AMP	NA	4.91	4.35	4.63	NA						
PC-ATP	5.27	2.89	3.80	3.99	1.20	9.81	0.255	3.93	4.66	4.82	1.38
PC-AMP	2.92	2.72	NA	2.82	NA						
10 μM-ATP	31.9	29.5	27.7	29.7	2.14	115	106	98.3	106	8.56	31.5
10 μM-AMP	1.82	4.38	3.02	3.08	1.28						
2 μM-ATP	75.0	74.4	76.1	75.2	0.876	289	287	294	290	3.50	85.8
2 μM-AMP	2.51	2.73	NA	2.62	NA						
0.4 μM-ATP	94.2	98.4	89.4	94.0	4.50	363	380	344	362	18.0	107
0.4 μM-AMP	5.08	1.80	3.45	3.44	1.64						
0.08 μM-ATP	84.9	96.0	87.9	89.6	5.74	324	368	336	343	22.9	101
0.08 μM-AMP	4.04	3.76	NA	3.90	NA						
0.016 μM-ATP	93.6	94.6	93.6	93.9	0.585	362	366	362	363	2.34	107
0.016 μM AMP	3.79	2.56	3.15	3.17	0.618						
UR=NC-ATP/NC-AMP											19.3
IC_{50} (μM)											6.82
95% Confidence Interval (μM)											4.61-10.1

Table 2. Transported activity and relative transported activity of MDR1 to NMQ in the presence of TA-22-294 (CYH33)

Test System	Amount of Probe Substrate (pmol)					Transported Activity (pmol/mg/min)					Relative Transported Activity (% of NC)
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	SD	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	SD	
NC-ATP	78.0	79.6	79.8	79.2	0.983	136	139	140	138	1.97	100
NC-AMP	9.28	12.1	8.80	10.1	1.79						
PC-ATP	15.1	15.9	16.2	15.7	0.578	8.82	10.4	11.1	10.1	1.16	7.31
PC-AMP	10.8	9.32	11.9	10.7	1.30						
50 μM-ATP	27.5	26.1	26.4	26.7	0.763	34.4	31.6	32.1	32.7	1.53	23.7
50 μM-AMP	11.9	10.5	8.57	10.3	1.69						
10 μM-ATP	52.6	63.6	55.3	57.2	5.71	83.1	105	88.4	92.2	11.4	66.7

10 μM-AMP	12.0	11.6	9.64	11.1	1.26						
2 μM-ATP	75.1	67.5	67.0	69.9	4.56	128	113	112	118	9.12	85.1
2 μM-AMP	11.7	9.44	12.1	11.1	1.43						
0.4 μM-ATP	81.8	87.2	74.8	81.3	6.22	143	154	129	142	12.4	103
0.4 μM-AMP	11.0	8.81	11.1	10.3	1.28						
0.08 μM-ATP	85.4	79.9	81.5	82.3	2.88	148	137	140	142	5.75	103
0.08 μM-AMP	11.1	11.4	11.7	11.4	0.287						
UR=NC-ATP/NC-AMP											7.87
IC_{50} (μM)											17.4
95% Confidence Interval (μM)											13.4-22.6

Table 3. Transported activity and relative transported activity of BCRP to LFY in the presence of TA-22-295 (I27)

Test System	Amount of Probe Substrate (pmol)					Transported Activity (pmol/mg/min)					Relative Transported Activity (% of NC)
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	SD	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	SD	
NC-ATP	63.5	66.5	62.2	64.1	2.23	236	249	231	239	8.90	100
NC-AMP	4.65	4.03	NA	4.34	NA						
PC-ATP	3.25	3.41	3.14	3.26	0.135	0.00*	0.00*	0.00*	0.00	NA	0.00
PC-AMP	NA	6.22	4.94	5.58	NA						
50 μM-ATP	35.9	37.3	34.1	35.8	1.62	132	138	125	132	6.47	55.1
50 μM-AMP	2.52	NA	3.24	2.88	NA						
10 μM-ATP	61.2	60.1	63.3	61.5	1.60	235	230	243	236	6.41	98.7
10 μM-AMP	3.18	1.97	NA	2.58	NA						
2 μM-ATP	68.9	70.1	68.4	69.1	0.880	265	270	263	266	3.52	111
2 μM-AMP	3.17	2.28	2.60	2.69	0.451						
0.4 μM-ATP	77.7	69.7	70.8	72.7	4.31	303	271	275	283	17.2	118
0.4 μM-AMP	1.99	1.60	2.55	2.05	0.475						
0.08 μM-ATP	68.4	74.8	73.4	72.2	3.38	265	290	285	280	13.5	117
0.08 μM-AMP	2.56	NA	1.91	2.24	NA						
UR=NC-ATP/NC-AMP											14.8
IC_{50} (μM)											>50
95% Confidence Interval (μM)											NA

**: The calculated value was minus, and which was set as"0.00".*

Table 4. Transported activity and relative transported activity of MDR1 to NMQ in the presence of TA-22-295 (I27)

Test System	Amount of Probe Substrate (pmol)					Transported Activity (pmol/mg/min)					Relative Transported Activity (% of NC)
	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	SD	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Mean	SD	
NC-ATP	48.2	50.9	47.6	48.9	1.77	174	185	172	177	7.08	100
NC-AMP	4.98	NA	4.40	4.69	NA						
PC-ATP	8.22	5.42	5.89	6.51	1.50	8.90	0.00*	0.00*	2.97	5.14	1.68
PC-AMP	7.33	5.70	4.95	5.99	1.22						
50 μM-ATP	22.2	24.7	25.4	24.1	1.70	73.0	83.0	85.9	80.6	6.79	45.6
50 μM-AMP	4.13	NA	3.69	3.91	NA						
10 μM-ATP	32.9	43.8	34.1	37.0	5.97	122	166	127	138	23.9	78.3

10 μM-AMP	NA	1.28	3.42	2.35	NA						
2 μM-ATP	43.7	42.8	39.1	41.9	2.44	151	148	133	144	9.76	81.4
2 μM-AMP	4.38	6.46	6.71	5.85	1.28						
0.4 μM-ATP	38.5	37.3	44.5	40.1	3.85	134	129	158	140	15.4	79.2
0.4 μM-AMP	4.31	NA	5.87	5.09	NA						
0.08 μM-ATP	50.3	42.6	43.1	45.4	4.32	186	155	157	166	17.3	93.8
0.08 μM-AMP	NA	4.25	3.51	3.88	NA						
UR=NC-ATP/NC-AMP											10.4
IC_{50} (μM)											36.1
95% Confidence Interval (μM)											20.5-63.5

. *: *The calculated value was minus, and which was set as"0.00".*

2.6.5.7.7 CYH33 及び I27 の OATP1B1、OATP1B3、MATE1 及び MATE2-K に対する潜在的作用

Report Title: The Potential Effects of CYH33 and I27 on Uptake Transporter of OATP1B1, OATP1B3, MATE1, and MATE2-K
Test Article: CYH33, I27

Study System: *In vitro*
Test System: HEK293 cells
Report No.: [redacted]-CYH33-ADME-DDI-UTP
Experiment Completion Date: [redacted] 20[redacted]
Method: UPLC-MS/MS
Location in eCTD: M4.2.2.6-6
Analyte: CYH33, I27
Inhibitor: rifampin for OATP1B1/1B3, cimetidine for MATE1/2-L
GLP Compliance: Non-GLP

Positive and Negative Control: OATP1B1/3: atorvastatin as positive control, MATE1/2-K: metformin as positive control
Special Features: Substrate studies: CYH33 and I27: 1 and 10 μM, Inhibition studies: CYH33: 0.3-40 μM and I27: 0.3-100 μM
Batch No.: CYH33: [redacted], I27: [redacted]

The uptake of CYH33 mediated by OATP1B1

1 μM CYH33	**HEK-293 (Mock)**	Samples	2-7-1A1	2-7-1A2	2-7-1A3
		Concentration (nM)	19.1	18.9	18.1
		$M_{protein}$ (μg/mL)	59.3	55.3	72.9
		UR (pmol/min/mg)	32.2	34.2	24.8
		Average		**30.4**	
		SD		4.9	
	HEK-293 (OATP1B1)	Samples	2-7-1A4	2-7-1A5	2-7-1A6
		Concentration (nM)	11.1	11.2	11.2
		$M_{protein}$ (μg/mL)	43.2	44.1	42.9
		UR (pmol/min/mg)	25.7	25.4	26.1
		Average		25.7	
		SD		0.3	
		URR		**0.85**	
1 μM CYH33 + 200 μM Rifampin	**HEK-293 (OATP1B1)**	Samples	2-7-1A7	2-7-1A8	2-7-1A9
		Concentration (nM)	8.24	7.49	8.17
		$M_{protein}$ (μg/mL)	50.4	57.2	53.4
		UR (pmol/min/mg)	16.3	13.1	15.3
		Average		**14.9**	
		SD		1.7	
		RA (%)		**57.9**	
10 μM CYH33	**HEK-293 (Mock)**	Samples	2-7-2A1	2-7-2A2	2-7-2A3

		Concentration (nM)	266	248	231
		$M_{protein}$ (µg/mL)	99.7	98.3	99
		UR (pmol/min/mg)	267	252	233
		Average		**251**	
		SD		17	
	HEK-293 (OATP1B1)	Samples	2-7-2A4	2-7-2A5	2-7-2A6
		Concentration (nM)	228	218	197
		$M_{protein}$ (µg/mL)	50.8	52.6	50.5
		UR (pmol/min/mg)	449	415	390
		Average		**418**	
		SD		30	
		URR		**1.67**	
10 µM CYH33 + 200µM Rifampin	**HEK-293 (OATP1B3)**	Samples	2-7-2A7	2-7-2A8	2-7-2A9
		Concentration (nM)	141	132	136
		$M_{protein}$ (µg/mL)	47.3	43.2	41.7
		UR (pmol/min/mg)	298	306	326
		Average		**310**	
		SD		15	
		RA (%)		**74.2**	

The uptake of CYH33 mediated by OATP1B3

1 µM CYH33	**HEK-293 (Mock)**	Samples	2-7-1A1	2-7-1A2	2-7-1A3
		Concentration (nM)	19.1	18.9	18.1
		$M_{protein}$ (µg/mL)	59.3	55.3	72.9
		UR (pmol/min/mg)	32.2	34.2	24.8
		Average		**30.4**	
		SD		4.9	
	HEK-293 (OATP1B3)	Samples	2-7-1A13	2-7-1A14	2-7-1A15
		Concentration (nM)	23.8	25.1	25.2
		$M_{protein}$ (µg/mL)	44.9	43.6	46.9

		UR (pmol/min/mg)	53	57.6	53.7
		Average		54.8	
		SD		2.5	
		URR		**1.8**	
1 µM CYH33 + 200 µM Rifampin	**HEK-293 (OATP1B3)**	Samples	2-7-1A16	2-7-1A17	2-7-1A18
		Concentration (nM)	16.8	17.9	18.9
		$M_{protein}$ (µg/mL)	46.7	47.4	46.9
		UR (pmol/min/mg)	36	37.8	40.3
		Average		**38**	
		SD		2.2	
		RA (%)		**69.4**	
10 µM CYH33	**HEK-293 (Mock)**	Samples	2-7-2A1	2-7-2A2	2-7-2A3
		Concentration (nM)	266	248	231
		$M_{protein}$ (µg/mL)	99.7	98.3	99
		UR (pmol/min/mg)	267	252	233
		Average		**251**	
		SD		17	
	HEK-293 (OATP1B3)	Samples	2-7-2A13	2-7-2A14	2-7-2A15
		Concentration (nM)	198	221	230
		$M_{protein}$ (µg/mL)	48.4	46.6	47.3
		UR (pmol/min/mg)	409	474	486
		Average		**456**	
		SD		42	
		URR		**1.82**	
10 µM CYH33+200µM Rifampin	**HEK-293 (OATP1B3)**	Samples	2-7-2A16	2-7-2A17	2-7-2A18
		Concentration (nM)	172	176	204
		$M_{protein}$ (µg/mL)	47.1	46.4	44.8
		UR (pmol/min/mg)	365	379	456
		Average		**400**	

		SD	49
		RA (%)	**87.7**

The uptake of CYH33 mediated by MATE1 and MATE2-K

		1 μM CYH33			**1 μM CYH33+200 μM cimetidine**			**10 μM CYH33**			**10 μM CYH33+200 μM cimetidine**		
HEK-293 (WT)	Samples	7-1-C1	7-1-C2	7-1-C3	7-1-C4	7-1-C5	7-1-C6	7-2-C1	7-2-C2	7-2-C3	7-2-C4	7-2-C5	7-2-C6
	Concentration (nM)	11.5	11.8	12	12.1	10.7	10.2	240	245	255	213	210	165
	$M_{protein}$ (μg/mL)	99.4	88.9	97.3	87.4	87.1	86.6	84.3	77.9	82.8	81.4	86.1	81.1
	UR (pmol/min/mg)	11.6	13.3	12.3	13.8	12.3	11.8	285	314	308	262	244	203
	Average		**12.4**			**12.6**			**302**			**236**	
	SD		0.9			1.1			16			30	
HEK-293 (MATE1)	Samples	7-1-C7	7-1-C8	7-1-C9	7-1-C10	7-1-C11	7-1-C12	7-2-C7	7-2-C8	7-2-C9	7-2-C10	7-2-C11	7-2-C12
	Concentration (nM)	7.06	7.33	7.99	8.34	7.5	7.3	114	116	117	175	154	131
	$M_{protein}$ (μg/mL)	62.9	57.9	56.6	57.2	59.3	65.4	69.8	66.8	67.1	65.8	67.5	65.6
	UR (pmol/min/mg)	11.2	12.7	14.1	14.6	12.6	11.2	163	174	174	266	228	200
	Average		**12.7**			**12.8**			**170**			**231**	
	SD		1.4			1.7			6			33	
	URR		**1**			NA			**0.6**			NA	
	RA (%)		NA			101			NA			136	
HEK-293 (MATE2-K)	Samples	7-1-C13	7-1-C14	7-1-C15	7-1-C16	7-1-C17	7-1-C18	7-2-C13	7-2-C14	7-2-C15	7-2-C16	7-2-C17	7-2-C18
	Concentration (nM)	6.97	7.03	7.17	9.29	6.89	8.2	111	105	129	176	154	148
	$M_{protein}$ (μg/mL)	49.6	43.9	42.2	42.1	43.3	47	55.3	54	52.2	52.9	53.2	53.3
	UR (pmol/min/mg)	14.1	16	17	22.1	15.9	17.4	201	194	247	333	290	278
	Average		**15.7**			**18.5**			**214**			**300**	
	SD		1.5			3.2			29			29	
	URR		**1.3**			NA			**0.7**			NA	
	RA (%)		NA			118			NA			140	

The uptake of I27 mediated by OATP1B1

1 μM I27	**HEK-293 (Mock)**	Samples	2-8-1A1	2-8-1A2	2-8-1A3
		Concentration (nM)	7.92	8.35	7.18
		$M_{protein}$ (μg/mL)	103	62	69.1
		UR (pmol/min/mg)	7.66	135	10.4
		Average		**10.5**	
		SD		2.9	
		Samples	2-8-1A4	2-8-1A5	2-8-1A6

	HEK-293 (OATP1B1)	Concentration (nM)	7.34	7.53	5.94
		$M_{protein}$ (µg/mL)	41.8	41	37.9
		UR (pmol/min/mg)	17.5	18.4	157
		Average		**17.2**	
		SD		1.4	
		URR		**1.64**	
1 µM I27 + 200 µM rifampin	**HEK-293 COATP1B1)**	Samples	2-8-1A7	2-8-1A8	2-8-1A9
		Concentration (nM)	7.3	7.83	6
		$M_{protein}$ (µg/mL)	46.2	43.3	37.7
		UR (pmol/min/mg)	15.8	18.1	15.9
		Average		**16.6**	
		SD		1.3	
		RA (%)		**96.6**	
10 µM I27	**HEK-293 (Mock)**	Samples	2-8-2A1	2-8-2A2	2-8-2A3
		Concentration (nM)	97.4	102	90.5
		$M_{protein}$ (µg/mL)	82.7	73.5	63.3
		UR (pmol/min/mg)	118	139	143
		Average		**133**	
		SD		14	
	HEK-293 (OATP1B1)	Samples	2-8-2A4	2-8-2A5	2-8-2A6
		Concentration (nM)	71.5	71.8	72.8
		$M_{protein}$ (µg/mL)	46	40.8	41.3
		UR (pmol/min/mg)	155	176	176
		Average		**169**	
		SD		12	
		URR		**1.27**	
10 µM I27 + 200 µM rifampin	**HEK-293 (OATP1B1)**	Samples	2-8-2A7	2-8-2A8	2-8-2A9
		Concentration (nM)	62.5	64.5	62.9
		$M_{protein}$ (µg/mL)	42.6	42.3	48.5
		UR (pmol/min/mg)	147	153	130
		Average		**143**	

		SD		12	
		RA (%)		**84.5**	
The uptake of I27 mediated by OATP1B3					
	HEK-293(Mock)	Samples	2-8-1A1	2-8-1A2	2-8-1A3
		Concentration (nM)	7.92	8.35	7.18
		$M_{protein}$ (μg/mL)	103	62	69.1
		UR (pmol/min/mg)	7.66	13.5	10.4
		Average		**10.5**	
		SD		2.9	
1 μM I27	**HEK-293 (OATP1B3)**	Samples	2-8-1A13	2-8-1A14	2-8-1A15
		Concentration (nM)	7.66	7.33	6.84
		$M_{protein}$ (μg/mL)	44.9	43.6	46.9
		UR (pmol/min/mg)	17.1	16.8	14.6
		Average		**16.2**	
		SD		1.4	
		URR		**1.54**	
1 μM I27 + 200 μM rifampin	**HEK-293 (OATP1B3)**	Samples	2-8-1A16	2-8-1A17	2-8-1A18
		Concentration (nM)	6.3	6.5	6.73
		$M_{protein}$ (μg/mL)	46.7	47.4	46.9
		UR (pmol/min/mg)	13.5	13.7	14.3
		Average		**13.9**	
		SD		0.4	
		RA (%)		**85.8**	
10 μM I27	**HEK-293 (Mock)**	Samples	2-8-2A1	2-8-2A2	2-8-2A3
		Concentration (nM)	97.4	102	90.5
		$M_{protein}$ (μg/mL)	82.7	73.5	63.3
		UR (pmol/min/mg)	118	139	143
		Average		**133**	
		SD		14	
	HEK-293 (OATP1B3)	Samples	2-8-2A13	2-8-2A14	2-8-2A15

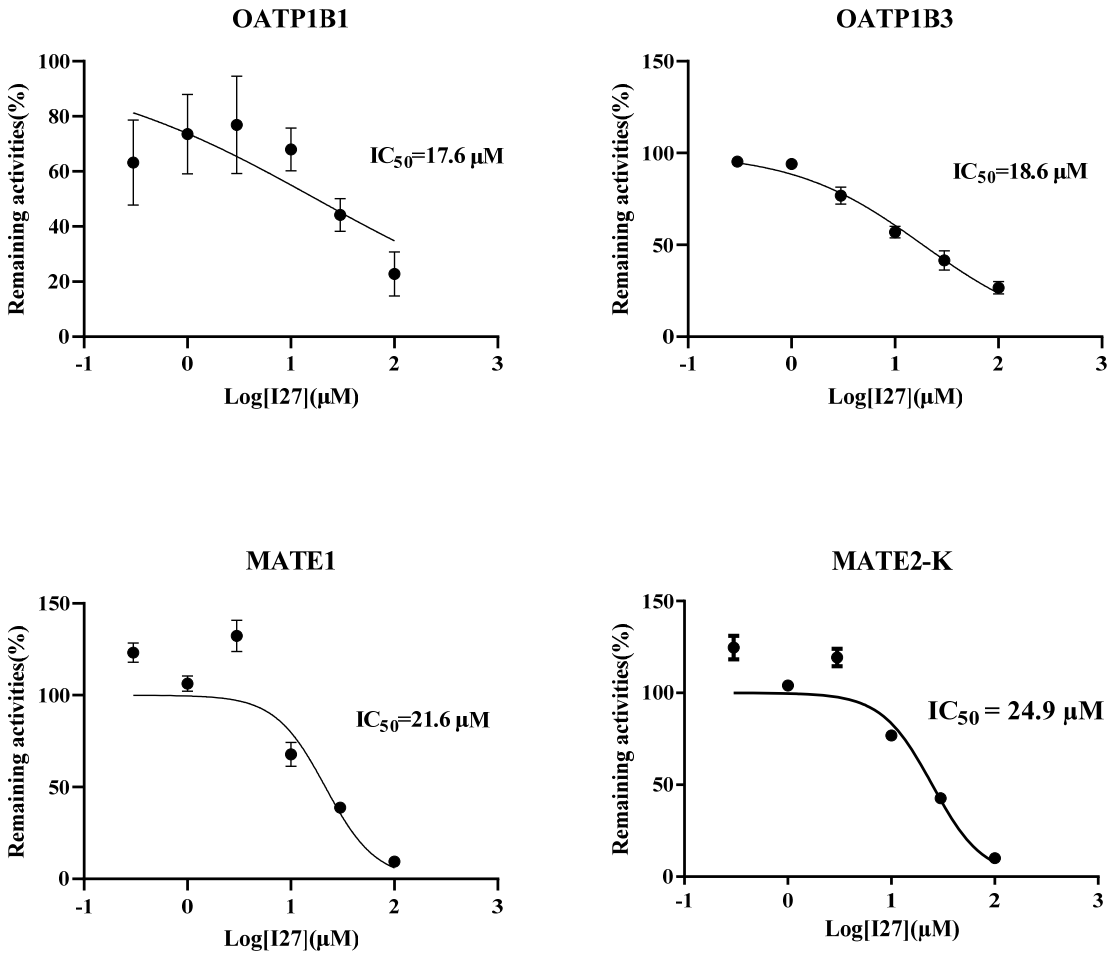
		Concentration (nM)	66.9	62.1	62.2
		$M_{protein}$ (μg/mL)	48.4	46.6	47.3
		UR (pmol/min/mg)	138	133	131
		Average		**134**	
		SD		3	
		URR		**1.01**	
10 μM I27 + 200 μM rifampin	**HEK-293 (OATP1B3)**	Samples	2-8-2A16	2-8-2A17	2-8-2A18
		Concentration (nM)	60.3	52.6	47.1
		$M_{protein}$ (μg/mL)	47.1	46.4	44.8
		UR (pmol/min/mg)	128	113	105
		Average		**116**	
		SD		12	
		RA (%)		**86**	

The uptake of I27 mediated by MATE1 and MATE2-K

		1 μM I27			**1 μM I27+200 μM cimetidine**			**10 μM I27**			**10 μM I27+200 μM cimetidine**		
HEK-293 (WT)	Samples	8-1C1	8-1C2	8-1C3	8-1C4	8-1C5	8-1C6	8-2C1	8-2C2	8-2C3	8-2C4	8-2C5	8-2C6
	Concentration (nM)	6.37	6.67	6.51	6.64	6.08	6.24	82.2	82.7	92.6	74.7	71.5	63.4
	$M_{protein}$ (μg/mL)	87.6	84.6	84.6	843	943	94.4	86.3	80	83.8	82.4	85.3	102
	UR (pmol/min/mg)	7.27	7.89	7.7	7.87	6.45	6.61	95.2	103	111	90.6	83.8	62.4
	Average		**7.62**			**6.98**			**103**			**78.9**	
	SD		0.31			0.78			8			14.7	
HEK-293 (MATE1)	Samples	8-1C7	8-1C8	8-1C9	8-1C10	8-1C11	8-1C12	8-2C7	8-2C8	8-2C9	8-2C10	8-2C11	8-2C12
	Concentration (nM)	3.33	3.87	3.47	3.98	4.26	4.06	39	42.7	37.8	51.2	54.5	41.6
	$M_{protein}$ (μg/mL)	68.1	69.8	69.3	70.1	63.8	75.3	66.2	61.8	67.4	68.5	73.5	75.8
	UR (pmol/min/mg)	4.89	5.54	5.01	5.68	6.67	5.39	58.9	69.1	56.1	74.7	74.1	54.9
	Average		**5.15**			**5.91**			**61.4**			**67.9**	
	SD		0.35			0.67			6.9			11.3	
	URR		**0.68**			NA			**0.6**			NA	
	RA (%)		NA			115						111	
HEK-293 (MATE2-K)	Samples	8-1C13	8-1C14	8-1C15	8-1C16	8-1C17	8-1C18	8-2C13	8-2C14	8-2C15	8-2C16	8-2C17	8-2C18
	Concentration (nM)	3.48	4.11	3.47	4.44	4.27	4.32	37.4	36.9	40.1	53.3	50.4	43
	$M_{protein}$ (μg/mL)	50	46.3	54	46.3	52.3	55.1	55.7	52.7	56.5	55.8	50.3	57.8

	UR (pmol/min/mg)	6.96	8.89	6.43	9.6	8.17	7.84	67.2	70.1	71	95.6	100	74.5
	Average		**7.42**			**8.54**			**69.4**			**90.1**	
	SD		1.29			0.93			2			13.8	
	URR		**0.97**			NA			**0.67**			NA	
	RA (%)		NA			115			NA			130	

The IC_{50} values of I27 for OATP1B1, OATP1B3, MATE1 and MATE2-K



2.6.5.7.8 腎臓の主要な SLC トランスポーターの基質お及び阻害剤としての可能性

Report Title: Evaluating the Potential of CYH33 and Its Metabolite I27 as Substrates and Inhibitors of Uptake Transporters

Test Article: CYH33 and I27
Report No.: [redacted]-CYH33-2025-In vitro-DDI-UTP
Location in eCTD: M4.2.2.6-8
GLP Compliance: Non-GLP

Study System: *In vitro*
Test System: HEK293 cells expressing OAT1, OAT3 and OCT2
Method: LC-MS/MS
Analytes: CYH33 and 27

Special Features: CYH33: Batch No.: [redacted], Purity: 99.9%, Purity factor: 0.9384. I27: Batch No.: [redacted], Purity: 99.63%, Purity factor: 0.9935.
Substrates Study: CYH33: 0.1, 1 and 10 μM, I27: 0.1, 1 and 10 μM. Inhibition Study: CYH33: 0.1 ~ 40μM, I27: 0.1 ~ 100 μM.

Table 1 The uptake results of CYH33 on each transport cell

Transporter	Concentration（μM）	Uptake ratio	Residual activity (RA, %)
OAT1	0.1	NA	NA
	1	2.13	80.1
	10	1.51	89.1
OAT3	0.1	NA	108
	1	2.15	90.5
	10	1.78	74.5
OCT2	0.1	1.76	NA
	1	1.42	62.0
	10	1.35	57.5

Table 2 The uptake results of I27 on each transport cell

Transporter	Concentration（μM）	Uptake ratio	RA (%)
OAT1	0.1	NA	NA
	1	1.88	44.4
	10	1.35	116
OAT3	0.1	NA	NA
	1	1.37	51.1
	10	0.977	142
OCT2	0.1	NA	NA

1	1.27	65.0
10	1.35	131

Table 3 Evaluation results of the inhibition of CYH33 on positive substrates for uptake transporters

CYH33（μM）	*RA (%)*		
	OAT1	OAT3	OCT2
0.1	106	90.6	111
0.3	107	90.4	117
1	122	90.4	113
3	125	91.6	113
10	136	84.5	136
20	141	80.2	129
40	143	83.2	109
IC_{50}（μM）	NI	NI	NI

NI indicates no inhibitory effect.

Table 4 Evaluation results of the inhibition of I27 on positive substrates for uptake transporters

I27（μM）	*RA (%)*		
	OAT1	OAT3	OCT2
0.1	107	99.3	111
0.3	114	98.7	115
1	124	100	110
3	133	99.2	114
10	145	89.4	105
30	144	86.8	112
100	144	71.0	119
IC_{50}（μM）	NI	> 100	NI

NI indicates no inhibitory effect.