ジロキシメルフマラート

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.4 薬物動態試験の概要文

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 5
1 まとめ 7
2 分析法 10
2.1 生体試料中薬物濃度分析法の概要 10
2.1.1 マウス 13
2.1.2 ラット 19
2.1.3 ウサギ 26
2.1.4 サル 30
3 吸収 35
3.1 DRF、HES 及び RDC-8439 の in vitro 膜透過性 35
3.2 ラット 36
3.2.1 ラットでの MMF 標識及び promoiety 標識[^{14}C]-DRF による PK 評価 36
3.2.2 ラット 5 日間反復投与試験における DRF、DMF 及び MMF のトキシコキネティクス 37
3.2.3 ラット 5 日間反復投与試験における薬物動態 38
3.2.3.1 MMF 38
3.2.3.2 HES 40
3.2.3.3 DRF 42
3.2.3.4 RDC-8439 42
3.3 サル 43
3.3.1 サル 5 日間反復投与試験における薬物動態 43
3.3.1.1 MMF 43
3.3.1.2 HES 45
3.3.1.3 DRF 47
3.3.1.4 RDC-8439 47
4 分布 49
4.1 組織分布 49
4.1.1 QWBA を用いた雄性 LE ラットにおける単回経口投与後の[^{14}C]-DRF 由来放射能の組織分布 49
4.2 血漿タンパク結合 50
4.2.1 MMF 及び HES のタンパク結合 50
4.2.2 DRF 及び RDC-8439 のタンパク結合 51
4.2.3 MMF の赤血球移行 52
5 代謝 53
5.1 In vitro 代謝及び代謝物の検討 53
5.1.1 ヒト生体試料での DRF の in vitro 代謝 53
5.1.1.1 ヒト肝及び腸 S9 画分との DRF の in vitro 代謝 53

5.1.1.2 ヒト肝ミクロソームとの DRF の in vitro 代謝 54
5.1.1.3 MMF の血漿及びミクロソーム安定性 54
5.1.1.4 ヒト肝ミクロソームでの HES 及び RDC-8439 の代謝安定性 54
5.2 In vivo 代謝物の検討 55
5.2.1 ラットに[^{14}C]-DRF を単回経口投与したときの ADME 及び代謝プロファイルの検討 55
5.2.1.1 ラット血漿での代謝検討 55
5.2.1.2 ラット尿での代謝検討 55
5.2.2 雄性 LE ラットでの MMF 標識[^{14}C]-DRF の血漿代謝物同定 55
5.3 DRF の推定代謝経路 56
6 排泄 57
6.1 DRF の排泄 57
7 薬物動態学的薬物相互作用 59
7.1 CYP を介した相互作用 60
7.1.1 MMF の in vitro CYP 阻害能の評価 61
7.1.2 ヒト肝ミクロソームでの HES 及び RDC-8439 の in vitro CYP 阻害能の評価 63
7.1.3 ヒト肝ミクロソームでの DRF の in vitro CYP 阻害能の評価 63
7.1.4 MMF の in vitro CYP 誘導能の評価 64
7.1.5 培養ヒト肝細胞での DRF、RDC-8439 及び HES による in vitro CYP 誘導能の評価 67
7.2 トランスポーターを介した相互作用 68
7.2.1 MMF の in vitro P-gp 阻害試験 68
7.2.2 DRF、HES 及び RDC-8439 の in vitro P-gp 基質及び阻害能の評価 69
7.2.3 MMF の in vitro P-gp 誘導能の評価 69
7.2.4 DRF、HES 及び RDC-8439 の in vitro P-gp 誘導能の評価 70
7.2.5 MMF のトランスポーターin vitro 阻害試験 70
7.2.5.1 BCRP 阻害試験 70
7.2.5.2 トランスポーターOATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の阻害試験 71
7.2.6 DRF、HES 及び RDC-8439 による in vitro トランスポーター基質試験及び阻害試験 71
7.2.6.1 BCRP 基質試験 72
7.2.6.2 BCRP 阻害試験 72
7.2.6.3 トランスポーター MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 の阻害試験 72
7.2.6.4 トランスポーター MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 及び OCT2 の基質試験 72
8 その他の薬物動態試験 74
8.1 [^{14}C]-DRF の経口投与によるヒト線量予測 74

9 考察及び結論 75
10 図表 78
11 参考文献 79

略語・略号一覧表

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
A-B	apical to basal	頂端膜側から基底膜側
AAG	alpha-1 acid glycoprotein	α_1-酸性糖タンパク質
ADME	absorption, distribution, metabolism and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	area under the concentration-time curve	濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours	0 時間から 24 時間までの濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	area under the concentration-time curve from time 0 to time t	0 時間から t 時間までの濃度時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the concentration-time curve from time 0 to infinity	0 時間から無限大時間までの濃度時間曲線下面積
AUC_{last}	area under the concentration-time curve from time 0 to time of the last measurable concentration	0 時間から最終定量可能時間までの濃度時間曲線下面積
B-A	basal to apical	基底膜側から頂側膜側
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
BLQ	below the limit of quantitation	定量限界未満
C_{max}	maximum observed concentration	最高血漿中濃度
%CV	coefficient of variation	変動係数
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DDI	drug-drug interaction	薬物相互作用
DMF	dimethyl fumarate	フマル酸ジメチル
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRF	diroximel fumarate	ジロキシメルフマラート
EAE	experimental autoimmune encephalomyelitis	実験的自己免疫性脳脊髄炎
ED	effective dose	実効線量
EMA	European Medicines Agency	欧州医薬品庁
ESCI	electrospray chemical ionisation	エレクトロスプレー化学イオン化
ESI	electrospray ionisation	エレクトロスプレーイオン化
FDA	Food and Drug Administration	米国食品医薬品局
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
HES	2-hydroxyethyl succinimide	2-ヒドロキシエチルスクシンイミド
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HSA	human serum albumin	ヒト血清アルブミン
IC_{50}	concentration resulting in 50% inhibition of response	50%阻害濃度
ICRP	International Commission on Radiological Protection	国際放射線防護委員会

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
IS	internal standard	内標準物質
ISR	incurred sample reanalysis	実試料再分析
K_2EDTA	dipotassium ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸二カリウム
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	ロングエバンス
LLOQ	lower limit of quantification	定量下限
LQC	low quality control	低濃度の quality control
MATE	multidrug and toxin extrusion transporter	多剤・毒性排出トランスポーター
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎臓
MMF	monomethyl fumarate	フマル酸モノメチル
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NA	not applicable	該当せず
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク質
PB	phenobarbital	フェノバルビタール
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
QC	quality control	-
QWBA	quantitative whole body autoradiography	定量的全身オートラジオグラフィー
R	accumulation ratio	累積係数
RE	relative error	相対誤差
RIF	rifampicin	リファンピシン
RRMS	relapsing-remitting multiple sclerosis	再発寛解型多発性硬化症
RT-PCR	real-time polymerase chain reaction	リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応
SD	Sprague Dawley (rat)	-
SD	standard deviation	標準偏差
TCA	tricarboxylic acid	トリカルボン酸
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{max}	time to reach maximum observed concentration	最高濃度到達時間
TRA	total radioactivity	総放射能
UDPGA	uridine diphosphate glucuronic acid	ウリジン二リン酸グルクロン酸
ULOQ	upper limit of quantification	定量上限

1 まとめ

ジロキシメルフマラート（DRF）（開発コード：BIIB098、ALKS 8700 及び RDC-5108）は再発寛解型多発性硬化症（RRMS）の再発予防及び身体的障害の進行抑制を適応とする治療薬として開発されており、経口投与された DRF は、全身循環に入る前に速やかな加水分解を受け、主活性代謝物のフマル酸モノメチル（MMF）、主不活性代謝物の 2-ヒドロキシエチルスクシンイミド（HES）（別名 RDC-6567）及びマイナーな代謝物の RDC-8439（ヒトに DRF を投与したときの総全身曝露量の 1%未満）が生成される。

DRF 462 mg の経口投与による MMF 曝露量は、多発性硬化症の再発予防及び身体的障害の進行抑制を効能・効果として、現在市販されているテクフィデラ®（フマル酸ジメチル［DMF］240 mg 経口投与）と生物学的に同等であることが示された［ALK8700-A103 試験］；［ALK8700-A104 試験］。DRF 及び DMF は全身循環に入る前にエステラーゼにより速やかに加水分解され、活性代謝物である MMF に変換されるため、経口投与後の DRF 及び DMF の血漿中濃度は定量できない。したがって、DMF の薬物動態（PK）解析と同様に、DRF の PK 解析は、代謝物（MMF 及び HES）の血漿中濃度を用いて実施した［ALK8700-A103 試験］；［ALK8700-A104 試験］。

本項では、製造販売承認申請を裏付ける DRF の非臨床試験での吸収、分布、代謝及び排泄（ADME）の結果について要約する。さらに、ヒト生体試料を用いた in vitro 試験（代謝及びトランスポーター試験）の要約も含める。これらの結論を裏付ける MMF の薬物動態試験及び薬物相互作用試験の結果が含まれるテクフィデラ®製造販売承申請時提出の非臨床試験データを利用する。DRF の放射活性試験は、DRF の promoiety であるコハク酸部分及び MMF 部分を[^{14}C]で標識した化合物を用いた。DRF 及びその代謝物濃度の測定に用いた液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）は、2 項に記載した。これらのデータに関する概要表は M2.6.5 に示す。非臨床 ADME 及び薬物動態学的薬物相互作用に関する主な結果を以下に示す。

<u>吸収</u>

- ラット及びサルで、DRF は経口投与後速やかに MMF（主活性代謝物）、HES（主不活性代謝物）及び RDC-8439（マイナーな代謝物）に変換された。
- ラット及びサルの in vivo 試験では、高濃度の血漿中 MMF 及び HES が認められたが、測定可能な血漿中 DRF 濃度は検出されず、血漿中 RDC-8439 濃度は一部の測定時点に検出されたのみであった。
- ラット及びサルでは、DRF の投与量に依存して、MMF 及び HES の血漿中曝露量（濃度時間曲線下面積［AUC］）及び最高血漿中濃度（C_{max}）は増加し、MMF 及び HES の蓄積は認められなかった（累積係数［R］＜1.5）。
- ヒトと同様に、ラット及びサルでの DRF 経口投与後の HES の血漿中曝露量（AUC 及び C_{max}）は、MMF の血漿中曝露量よりも大きかった（範囲：7.16～39.6 倍）。

<u>分布</u>

- ラットの定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験で、MMF 標識[^{14}C]-DRF の放射能は、メラニン含有組織に多く分布すること（組織／血漿比＞1）から、メラニンに結

合する可能性が示唆された。

- ラット脳での HES の蓄積は認められず、脳での HES 曝露量は、promoiety 標識[^{14}C]-DRF を投与したとき末梢コンパートメントの曝露量よりも低かった。
- 非臨床試験で用いた動物種の血漿、ヒト血漿及びヒト血漿成分（ヒト血清アルブミン［HSA］及び α_1-酸性糖タンパク質［AAG］）では、MMF 及び HES のいずれもタンパク結合率は低かった（28%以下）。また、そのタンパク結合率は濃度に依存しなかった。MMF の血漿に対する全血及び赤血球の分配係数はいずれも 1 よりも小さく、血液の細胞成分、特に赤血球への MMF の選択的な分配は起こらないことが示唆された。

<u>代謝</u>

- DRF は、in vitro でヒト肝及び腸の S9 画分により HES、MMF 及び RDC-8439 に速やかに変換され、腸の S9 画分で MMF と HES へ最も変換された。
- DRF は、CYP 酵素は関与せず、ヒドロラーゼ／エステラーゼによって代謝されると考えられる。
- HES 及び MMF は代謝的に安定であったが、RDC-8439 はヒト肝ミクロソームで速やかにかつ多く代謝された。
- HES 及びグルコースは、ラットでの promoiety 標識及び MMF 標識[^{14}C]-DRF のそれぞれの唯一の主代謝物であり（82%～100%）、測定可能な血漿中代謝物であった。

<u>排泄</u>

- DRF は主に代謝により MMF、HES 及び RDC-8439 となり排泄される。
- ラットでは、MMF 標識[^{14}C]-DRF に関連する放射能は主に呼気（35.91%）、次いで尿（14.69%）から排泄され、主な尿中代謝物は MMF であった（投与量の 12.33%）。
- promoiety 標識[^{14}C]-DRF 投与の放射能は尿中に排泄された（75.75%）。HES は主な尿中代謝物であり、ラットでの HES の主要な排泄経路は腎クリアランスであることが示唆された。

<u>薬物動態学的薬物相互作用</u>

- MMF、HES、DRF 及び RDC-8439 は in vitro でヒト肝ミクロソームの主要なチトクローム P450（CYP）酵素（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5）に直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害を示さなかった。
- DRF、MMF、RDC-8439 及び HES によるヒト肝細胞での CYP1A2、CYP2B6、及び CYP3A4 活性並びにメッセンジャーリボ核酸（mRNA）の誘導は認められなかった。
- MMF、HES、DRF 及び RDC-8439 は in vitro 試験で P 糖タンパク質（P-gp）の基質でも誘導剤でもなかった。
- MMF、HES 及び RDC-8439 は P-gp の阻害剤ではなかった。In vitro で DRF（100 μmol/L）は P-gp を 41%阻害したが、臨床での薬物相互作用（DDI）試験では P-gp 阻害作用は認められなかった［M2.7.2、ALK8700-A107 試験］。
- In vitro 試験に基づき、臨床的に重要な CYP 及びトランスポーターと MMF、HES、DRF 及

び RDC-8439 との相互作用による DDI の可能性は低いと考えられる。

その他の薬物動態試験

ラット QWBA 試験に基づくヒトでの線量推定解析の結果、ヒトマスバランス試験［M2.7.2、ALK8700-A105 試験］に用いた promoiety 標識[^{14}C]の放射能量（100 μCi）は、ヒトで推奨される実効線量（ED）である 1 mSv 未満を十分に下回っていることが示唆された。

2 分析法

2.1 生体試料中薬物濃度分析法の概要

非臨床試験全体を通して、マウス、ラット、ウサギ及びサルの血漿中 DRF 及びそれぞれの代謝物である MMF、HES 及び RDC-8439 の定量は、[redacted]（[redacted]、[redacted]、USA）及び[redacted]（[redacted]、[redacted]、USA）で開発され、バリデートされた生体試料分析法を用いて実施した。医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施の基準（GLP）適用試験のすべての試料分析は、液体クロマトグラフィータンデム質量分析（LC-MS/MS）を用いて、ガイドライン（FDA guidance［Center for Drug Evaluation and Research］2001、EMA［EMEA/CHMP/EWP/192217/2009］2011）に従ってバリデーションした方法で実施した。バリデーションの結果、各分析法の感度、選択性、正確性及び再現性が確認された。試料処理中及び長期保存中の分析対象物質の安定性が検証され、すべての実試料分析はバリデーションし長期安定性が確保された期間内で行った。これらの分析法の概要、関連するバリデーション及びそれぞれの分析法を用いた非臨床試験については、2.1.1 項、2.1.2 項、2.1.3 項及び 2.1.4 項に記載した。抽出及び分析法に関する概要、並びにバリデートされたパラメータは動物種別に要約する。実試料再分析（ISR）は、全試験を通して、Fluhler らの推奨事項［Fluhler 2014］に従い、バリデーションした各生体試料中薬物濃度分析法において少なくとも一度は実施している。ISR の結果は、それぞれの動物種毎に項に示す。

DRF、MMF、HES 及び RDC-8439 の分析法

非臨床試験で使用した DRF、MMF、HES 及び RDC-8439 のすべての血漿中薬物濃度測定法の概要を、これらの分析により測定された試験とともに表 1 に示す。

ラット及びサルでの HES の分析法の開発は困難であったため、初期の非臨床 PK 試験及びトキシコキネティクス（TK）試験では DRF、MMF 及び RDC-8439 の濃度を測定し、その後の試験では血漿中 HES 濃度も測定した。HES を測定しなかった試験では、後日、同じ動物種を用いた他の試験より HES の全身曝露量を推定した（この推定法はウサギにも適用可能であった）。また、ラット［AT-5108-27 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-3）、（3.2.3 項）及びサル［AT-5108-28 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-4）、（3.3.1 項）を用いた GLP 適用下の PK 試験から得られた曝露量を線形に外挿することにより、HES の全身曝露量を推定した。

すべての種の血漿試料は、抗凝固剤としてエチレンジアミン四酢酸二カリウム（K_2EDTA）を用いて調製した。ラット血漿及びサル血漿に 10 mmol/L ジクロルボス、10 mmol/L クエン酸及び 1% ギ酸を添加することにより、DRF を安定化させた。又、ウサギ血漿は 10 mmol/L クエン酸及び 1% ギ酸により、マウス血漿は 4 mol/L クエン酸：ギ酸 ＝1：1 を添加することにより、それぞれ DRF を安定化させた。

試験を通して、生体試料分析法はタンパク質沈殿法を用い、DRF にはプロプラノロール塩酸塩、RDC-8439、MMF には MMF-D_3、HES には N-マレイミドメタノールを内標準物質（IS）として使用した。GLP 適用下の毒性試験で得られたすべての TK 試料の生体試料分析は、長期安定性が確保された期間内で実施した。

実施した各試験で、MMF 及び HES の ISR は判定基準に適合した。［AT-5108-05 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-3）（ラット）及び［AT-5108-07 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-7）（サル）で、MMF 及び RDC-8439 の ISR が当初計画されていた。しかし、ISR に必要な検体数を満たすために、ラット及びサルを用いて、複数の試験で ISR を実施した。ラット血漿を用いた一部の ISR では、RDC-8439 は判定基準を満たさなかった［AT-5108-13 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-4）；［AT-5108-25 試験］（添付資料番号 4.2.3.7.6-1）。RDC-8439 の ISR で判定基準を満たさなかったことについて調査したところ、元の分析と ISR の間で希釈率が異なっていたことが原因と考えられた。MMF の定量上限（ULOQ）濃度より高いことから定量範囲にいれるため、試料を希釈した。元の分析と ISR の両方で同じ希釈値が得られた試料のサブセットでは ISR が合格したことから、希釈率が ISR の失敗の原因であることが確認された（表 6）。

バリデートされた DRF、MMF 及び RDC-8439 の測定法により試料を分析したとき、MMF が実試料中で最も高頻度に認められた分析対象物質であったため、MMF 濃度に基づいて ISR 試料を選択した。すべての試料の定量値が低濃度の quality control（LQC）濃度未満か、又は DRF の定量値が LQC を上回る試料数が十分でなかったため、DRF の ISR は実施しなかった。マウスを用いた非臨床安全性試験の TK 測定では、ISR は試料量不足のため実施しなかった［AT-5108-29 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-1）；［AT-5108-31 試験］（添付資料番号 4.2.3.4.2-1）。そのため、ISR の評価に適した広い血漿中濃度範囲（MMF、HES 及び RDC-8439）を得るために、同系統のマウスを用いて単回投与試験を実施した［AT-5108-37 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-3）。この試験により HES 及び MMF に対する ISR が確認可能であった（2.1.1 項）。

2001 年 5 月発出の FDA Bioanalytical Guidance に従い最新の試験法とするため、また、MMF 及び HES の濃度が ULOQ を超える試料分析を行うため、初期のバリデーションで未実施であった追加試験を実施した。

- 検量線及び QC 試料の調製方法は、実試料の採取方法及び血液処理方法とはわずかに異なっていた。具体的な検体採取手順としては、全血をクエン酸又はクエン酸及びジクロルボスで酸性化し、遠心分離して血漿を採取した後にギ酸を添加した。しかし、検量線及び QC 試料は、すでにクエン酸又はクエン酸とジクロルボスで処理されたコントロール血漿に分析対象物質及びギ酸を添加して調製した。血漿検体採取時の安定性試験を、血漿検体採取と血液処理手順とのギャップを埋めるために実施した。この違いの影響は、それぞれバリデートされた分析法で評価された。RDC-8439 でのみ安定性が示されたウサギ［AV14-RDC5108-02 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-6）を除く、バリデートされた各分析法で、試料採取中の安定性が示された（2.1.3 項）。
- マウスでは血漿試料量が少ないため、マウス血漿を用いた追加のパーシャルバリデーションを実施した。すなわち、［AT-5108-37 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-3）で ISR のための試料分析を行うために、試料抽出のすべてのステップでの容積を元の容積の半分にしてパーシャルバリデーションを実施した。

表 1　　血漿 LC-MS/MS 生体試料分析法の要約

Species	Laboratory/ Validation Report No. (Location in CTD)	Analyte	LLOQ (ng/mL)	ULOQ (ng/mL)	Studies Supported (Location in CTD) (* = non-GLP)
Mouse	[redacted]/ AV-5108-07 (4.2.2.1-1) (XBL[redacted]107, Amendment 1, and Amendment 2)	DRF RDC-8439 MMF	50.0	10000	AT-5108-29 (4.2.3.2-1) AT-5108-31 (4.2.3.4.2-1)
	[redacted]/ AV-6567-05 (4.2.2.1-2) (XBL[redacted]106 and Amendment 1)	HES	50.0	10000	AT-5108-29 AT-5108-31
Rat	[redacted] AV-5108-10 (4.2.2.1-4) (AV13-RDC5108-01 Reissued and Addendum 1)	DRF RDC-8439 MMF	50.0	10000	AT-5108-04*[a] (4.2.3.2-2) AT-5108-05 (4.2.3.2-3) AT-5108-09 (4.2.1.3-5) AT-5108-13 (4.2.3.2-4) AT-5108-15 (4.2.3.2-5) AT-5108-17* (4.2.3.5.2-1) AT-5108-19 (4.2.3.5.1-1) AT-5108-20 (4.2.3.5.1-2) AT-5108-21 (4.2.3.5.2-2) AT-5108-23 (4.2.3.3.2-1) AT-5108-25 (4.2.3.7.6-1) AT-5108-26 (4.2.3.4.1-1) AT-5108-27 (4.2.2.2-3) AT-5108-30 (4.2.3.5.3-1) AT-5108-38 (4.2.3.5.4-1)

Species	Laboratory/ Validation Report No. (Location in CTD)	Analyte	LLOQ (ng/mL)	ULOQ (ng/mL)	Studies Supported (Location in CTD) (* = non-GLP)
Rat	[redacted]/ AV-6567-01 (4.2.2.1-5) (XBL[redacted]030, Amendment 1, Amendment 2, and Amendment 3)	HES	50.0	10000	AT-5108-15 AT-5108-21 AT-5108-26 AT-5108-27 AT-5108-30 AT-5108-38
Monkey	[redacted] AV-5108-11 (4.2.2.1-8) (AV13-RDC5108-02 Reissue, Amended Reissue, Addendum 1, and Addendum 2)	DRF RDC-8439 MMF	50.0	10000	AT-5108-06*[a] (4.2.3.2-6) AT-5108-07 (4.2.3.2-7) AT-5108-08 (4.2.1.3-3) AT-5108-14 (4.2.3.2-8) AT-5108-16 (4.2.3.2-9) AT-5108-24 (4.2.3.6-1) AT-5108-28 (4.2.2.2-4)
	[redacted]/ AV-6567-02 (4.2.2.1-9) (XBL[redacted]033, Amendment 1, and Amendment 2)	HES	100	10000	AT-5108-16 AT-5108-28
Rabbit	[redacted] AV14-RDC5108-02 and Addendum 1 (4.2.2.1-6)	DRF RDC-8439 MMF	50.0	10000	AT-5108-18* (4.2.3.5.2-3) AT-5108-22 (4.2.3.5.2-4)
	[redacted]/ AV-6567-03 (4.2.2.1-7) (XBL[redacted]032 and Amendment 1)	HES	50.0	10000	AT-5108-22

[a] A calibration curve ranging from 50.0 ng/mL to 5000 ng/mL was used to quantify DRF, RDC-8439, and MMF in the samples.

2.1.1 マウス

AV-5108-07 試験（添付資料番号 4.2.2.1-1）、
AV-6567-05 試験（添付資料番号 4.2.2.1-2）、
AT-5108-37 試験（添付資料番号 4.2.2.1-3）

DRF、MMF、HES 及び RDC-8439 の分析は試験を通して、2 種類の生体試料分析法を用いた。試料処理中及び分析中の DRF を安定化するため、検体採取の最初にマウス全血をエステラーゼ酵素阻害剤（クエン酸及びギ酸）で処理した。両分析法の概要についてバリデートされたパラメ

ータを表 2 及び表 3 に要約する。 4 に ISR の結果を示す。

酸性化したマウス血漿中の DRF 及びその代謝物である MMF 及び RDC-8439 の濃度を測定する方法は、[redacted]により開発され、バリデートされた［AV-5108-07 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-1）。フルバリデーションは、最初に[redacted]により実施され、報告されている（RPT03829［AV-5108-07 試験］）（添付資料番号 4.2.2.1-1）。すべてのバリデーション試験は酸性化した CD-1 マウス血漿を用いて完了し、酸性化した CByB6F1 マウス血漿で、パーシャルバリデーションを実施した。また、HES の定量法として開発した次の試験法は、[redacted]によりフルバリデーションが実施され、報告されている（RPT03794［AV-6567-05 試験］）（添付資料番号 4.2.2.1-2）。すべてのバリデーション試験は酸性化した CD-1 マウス血漿を用いて完了し、酸性化した CByB6F1 マウス血漿で、パーシャルバリデーションを実施した。4 mol/L クエン酸：ギ酸 = 1：1 で処理したマウス K_2EDTA 血漿中の DRF とその代謝物である MMF、HES 及び RDC-8439 の濃度の測定にタンパク質沈殿法と LC-MS/MS を用いた。

マウス TK 試験では、試料量が不十分であったため、ISR は実施しなかった。そのため、ISR の評価に適した広い血漿中濃度範囲（MMF、HES 及び RDC-8439）を得るために、同系統のマウスを用い、単回投与試験を実施した［AT-5108-37 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-3）。本試験では、HES 及び MMF の ISR を実施した（ 4）。なお、RDC-8439 については、試料量が限られていたため ISR 用試料は 8 本のみであり、これらの試料は ISR 用に 2 倍希釈して抽出した。しかし、2 倍希釈した試料での QC は判定基準を満たさず、RDC-8439 の ISR は許容されなかった。最初の分析は検量線と QC が判定基準を満たさず、また試料量が不十分なため再分析が実施できなかったことから、結果は DRF として報告できなかった。したがって、DRF について ISR は示すことができなかった。

表 2　　CD-1 マウスの血漿 LC-MS/MS 生体試料分析法の要約

Species	**Mouse**			
Strain	**CD-1**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 4 mol/L citric acid : formic acid = 1:1)**			
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-07 (4.2.2.1-1) (XBL[redacted]107, Amendment 1, and Amendment 2)**			**AV-6567-05 (4.2.2.1-2) (XBL[redacted]106 and Amendment 1)**
Laboratory	[redacted]			
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES**
Anticoagulant	K_2EDTA			K_2EDTA
IS	Propranolol hydrochloride	MMF-D_3	MMF-D_3	N-maleimidomethanol
Calibration range (ng/mL)	50.0 to 10000			
Regression fit	Linear $1/x^2$			Quadratic $1/x^2$
Extraction	Protein precipitation			
Instrument model	Sciex API-6500			Waters Xevo TQ-S
Ionisation mode	ESI (positive for DRF and negative for RDC-8439 and MMF)			ESCI (positive)
Calibration standards concentrations (ng/mL)	50.0; 100; 250; 1000; 2500; 5000; 9000; 10000			50.0; 100; 250; 500; 1000; 5000; 9000; 10000
QC concentrations (ng/mL)	Low QC: 150 Mid QC: 4000 High QC: 8000			
Recovery of analyte (%)[a] [% Recovery of analyte at a reduced volume][b, c]	83.27 to 83.50 [75.46 to 79.57]	90.28 to 97.99 [83.05 to 84.30]	63.83 to 66.03 [71.95 to 74.35]	88.43 to 89.15 [80.08 to 86.52]
Recovery of IS (%) [% Recovery of IS at a reduced volume][b, d]	92.66 to 96.50 [95.38 to 96.66]	74.61 to 75.62 [73.86 to 76.88]	63.88 to 66.62 [80.83 to 83.39]	90.1 to 91.19 [67.76 to 69.66]
LLOQ interday precision (%CV) (n = 18)	10.29	5.93	4.62	13.20
LLOQ interday accuracy (%RE) (n = 18)	-3.80	-0.80	2.20	0.60
LLOQ intraday precision (%CV) (n = 6 at each of 3 independent runs) [LLOQ, reduced volume][b] (n = 6)	2.20 to 7.69 [5.63]	2.55 to 5.77 [6.18]	3.18 to 4.91 [7.14]	8.51 to 16.89 [7.98]
LLOQ intraday accuracy (%RE) (n = 6 at each of 3 independent runs) [LLOQ, reduced volume][b] (n = 6)	-15.20 to 4.00 [14.00]	-5.80 to 5.00 [4.60]	-1.40 to 5.00 [0.80]	-3.40 to 4.80 [15.00]
QC interday precision (%CV) (n = 18 at each of 3 levels)	3.44 to 5.85	3.43 to 5.50	1.62 to 4.75	3.19 to 5.42

Species	**Mouse**			
Strain	**CD-1**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 4 mol/L citric acid : formic acid = 1:1)**			
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-07 (4.2.2.1-1) (XBL[redacted]107, Amendment 1, and Amendment 2)**			**AV-6567-05 (4.2.2.1-2) (XBL[redacted]106 and Amendment 1)**
Laboratory	[redacted] / [redacted]			
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES**
QC interday accuracy (%RE) (n = 18 at each of 3 levels)	-3.38 to 4.00	2.00 to 4.67	0.25 to 3.33	-2.67 to -1.13
QC intraday precision (%CV) [QC, reduced volume][b] (n = 6 at each of 3 levels)	0.82 to 5.91 [4.44 to 9.43]	2.23 to 5.48 [3.21 to 5.84]	0.76 to 4.27 [3.57 to 5.30]	1.32 to 6.97 [1.21 to 3.83]
QC intraday accuracy (%RE) [QC, reduced volume][b] (n = 6 at each of 3 levels)	-10.13 to 5.33 [3.50 to 7.33]	0.75 to 8.00 [-0.25 to 10.00]	-1.50 to 8.00 [-4.75 to -3.33]	-5.00 to 2.50 [1.75 to 10.67]
Matrix bench-top stability	4 hours at 4ºC			
Freeze-thaw stability	4 cycles at -70ºC			
Extract stability	99 hours at room temperature and 4°C			150 hours at room temperature and 4ºC
Reinjection stability	128 hours at room temperature; 123 hours at 4ºC			179 hours at room temperature[e]; 154 hours at 4ºC[e]
Long-term storage stability	20 days at -20ºC[f]; 42 days at -70ºC	42 days at -20ºC; 42 days at -70ºC	42 days at -20ºC; 42 days at -70ºC	51 days at -20ºC; 51 days at -70ºC
Analyte stock solution/ working stock solution stability	18 hours at room temperature; 95 days at -20ºC		18 hours at room temperature; 96 days at -20ºC	23 hours at room temperature[g]; 74 days at -20ºC[g] 273 days at -20ºC[h]/ 24 hours at room temperature[i]; 95 days at -20ºC[k]
IS stock solution stability/ spiking solution stability	18 hours at room temperature; 96 days at -20ºC/ 18 hours at room temperature; 101 days at -20ºC	18 hours at room temperature[j]; 96 days at -20ºC[j]/ 18 hours at room temperature; 101 days at -20ºC	18 hours at room temperature[j]; 96 days at -20ºC[j]/ 18 hours at room temperature; 101 days at -20ºC	22 hours at room temperature[g]; 75 days at -20ºC[g]/ 124 days at -20ºC[k]
Dilution integrity	40000 ng/mL (50-fold dilution)			40000 ng/mL (10-fold dilution 20-fold dilution 50-fold dilution)
Interference test (analytes not tested within the assay)	No interference greater than acceptable limits detected at the retention times of interest			The presence of the peak at retention time of HES beyond interference acceptance criteria[l]

Species	**Mouse**			
Strain	**CD-1**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 4 mol/L citric acid : formic acid = 1:1)**			
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-07 (4.2.2.1-1) (XBL[redacted]107, Amendment 1, and Amendment 2)**			**AV-6567-05 (4.2.2.1-2) (XBL[redacted]106 and Amendment 1)**
Laboratory	[redacted]			
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES**
Selectivity	No interference greater than acceptable limits detected at the retention times of interest			

[a] Recovery QC samples were prepared at 2 concentration levels, low QC and high QC.

[b] QC samples were from a partial validation of QC samples prepared using 25 µL of plasma volume to support ISR Study AT-5108-37 sample analysis.

[c] Recovery QC samples were from a partial validation of QC samples prepared at 3 concentration levels, low QC, medium QC, and high QC.

[d] Recovery QC samples were from a partial validation of QC samples of HES prepared at 3 concentration levels, low QC, medium QC, and high QC.

[e] Reinjection reproducibility is reported as extracted samples reproducibility. Extract stability was later performed and reported in Amendment 1.

[f] The long-term stability for DRF in CD-1 mouse plasma stored at -20°C for 42 days tested did not pass as the high end QCs did not meet acceptance criteria. However, long-term stability for 20 days was established.

[g] Source: [AV-6567-01] (M 4.2.2.1-5).

[h] Source: [XBL[redacted]126].

[i] Source: [XBL[redacted]044 Amendment 2].

[j] The stock solution stability for MMF also applies to MMF-D_3.

[k] Source: [AV-6567-02 Amendment 2] (M 4.2.2.1-9).

[l] The presence of the peak at retention time of HES (RDC-6567) beyond interference acceptance criteria was possibly from the impurity of reference material of the interference test articles, because the peak area of the interfering peak was similar in neat solution, blank and LQC samples. Therefore, the presence of the interfering peak observed in this experiment does not have an impact on HES (RDC-6567) quantitation.

表 3　　CByB6F1 マウスの血漿 LC-MS/MS 生体試料分析法の要約
（パーシャルバリデーション）

Species	**Mouse**			
Strain	**CByB6F1**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 4 mol/L citric acid : formic acid = 1:1)**			
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-07 (4.2.2.1-1) (XBL[redacted]107, Amendment 1, and Amendment 2)**			**AV-6567-05 (4.2.2.1-2) (XBL[redacted]106 and Amendment 1)**
Laboratory	[redacted]/[redacted]			
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES**
Anticoagulant	K_2EDTA			
IS	Propranolol hydrochloride	MMF-D_3	MMF-D_3	N-maleimidomethanol
Calibration range (ng/mL)	50.0 to 10000			
Regression fit	Linear $1/x^2$			Quadratic $1/x^2$
Extraction	Protein precipitation			
Instrument model	Sciex API-6500			Waters Xevo TQ-S
Ionisation mode	ESI (positive for DRF and negative for RDC-8439 and MMF)			ESCI (positive)
Calibration standards concentrations (ng/mL)	50.0; 100; 250; 1000; 2500; 5000; 9000; 10000			50.0; 100; 250; 500; 1000; 5000; 9000; 10000
QC concentrations (ng/mL)	Low QC: 150 Mid QC: 4000 High QC: 8000			
QC intraday precision (%CV) [QC Study][a] (n = 6 at each of 3 levels)	2.52 to 3.97 [5.81 to 7.97]	1.37 to 4.96 [3.69 to 5.23]	1.78 to 4.16 [0.92 to 3.41]	1.55 to 4.74 [10.64 to 13.12]
QC intraday accuracy (%RE) [QC Study][a] (n = 6 at each of 3 levels)	0.25 to 13.33 [-8.00 to 2.00]	-3.00 to 12.67 [0.13 to 8.00]	2.50 to 10.67 [-4.75 to 4.00]	-1.75 to 1.50 [-0.75 to 13.33]
Matrix bench-top stability [Dilution QC][b]	4 hours at 4ºC	4 hours at 4ºC	4 hours at 4ºC [4 hours in ice water bath]	4 hours at 4ºC [4 hours in ice water bath]
Freeze-thaw stability [Dilution QC][b]	4 cycles at -70ºC	4 cycles at -70ºC	4 cycles at -70ºC [4 cycles at -70ºC]	4 cycles at -70ºC [4 cycles at -70ºC]
Long-term storage stability [Dilution QC][b]	37 days at -20ºC; 37 days at -70ºC	37 days at -20ºC; 37 days at -70ºC	37 days at -20ºC; 37 days at -70ºC [41 days at -70ºC]	42 days at -20ºC; 31 days at -70ºC; 49 days at -70ºC [53 days at -70ºC]
Dilution integrity	NA	NA	100000 ng/mL and 200000 ng/mL (50-fold dilution)	125000 ng/mL (50-fold dilution)

[a] QC study samples were from a partial validation of QC samples prepared in a manner to mimic the treatment of study samples.

[b] Dilution QC samples were from a partial validation of QC samples prepared at 100000 ng/mL and 200000 ng/mL

concentration levels for MMF and 125000 ng/mL concentration for HES to support the study sample analysis with sample concentrations greater than the ULOQ.

表 4　　マウスの ISR 結果

Validation Report No. (Location in CTD)	Analyte[a]	No. of Samples Analysed (% of total study samples)	ISR Result	Study No. (Location in CTD)
AV-5108-07 (4.2.2.1-1) (XBL[redacted]107, Amendment 1, and Amendment 2)	MMF	24 (66.7%)	24 out of 24 (100%)	AT-5108-37 (4.2.2.1-3)
AV-6567-05 (4.2.2.1-2) (XBL[redacted]106 and Amendment 1)	HES (RDC-6567)	33 (91.7%)	26 out of 32 (81.25%)[b]	

[a] Samples for RDC-5108 (DRF) could not be analysed as a result of Run 1 being rejected for standards and QCs not meeting acceptance criteria. Due to insufficient sample volumes, samples could not be repeated for this analyte.
[b] One of the repeat values was greater than the limit of quantitation and therefore excluded from ISR calculation.
For RDC-8439, 8 samples were available for incurred sample reproducibility due to the limited sample volume, and the 8 samples were extracted with a 2-fold dilution. In the ISR batch, high-quality control samples with a 2-fold dilution were included and failed to meet acceptance criteria. Therefore, ISR values for RDC-8439 are not acceptable or reported.

2.1.2　　ラット

［AV-5108-10 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-4）、［AV-6567-01 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-5）、［AT-5108-05 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-3）、［AT-5108-13 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-4）、［AT-5108-15 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-5）、［AT-5108-25 試験］（添付資料番号 4.2.3.7.6-1）

ラット血漿中の DRF 及びその代謝物である MMF、HES 及び RDC-8439 の分析に用いた生体試料分析法の概要を表 5 に示す。試料処理中及び分析中の DRF を安定化するため、試料採取の最初にラット全血をエステラーゼ酵素阻害剤（クエン酸、ジクロルボス及びギ酸）で処理した。バリデートされた各分析法のパラメータを表 5 に要約する。ISR の結果は、表 6 に示す。

酸性化したラット血漿中の DRF 及びその代謝物である MMF 並びに RDC-8439 濃度を測定する方法は、[redacted]により開発され、バリデートされた［AV-5108-10 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-4）。10 mmol/L ジクロルボス、10 mmol/L クエン酸及び 1%ギ酸を含むラット K_2EDTA 血漿中の DRF、MMF 及び RDC-8439 の濃度を定量するため、タンパク質沈殿法及び LC-MS/MS を用いた。HES 分析用に追加した方法は[redacted]により開発され、フルバリデーションが実施された［AV-6567-01 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-5）。1 mol/L ジクロルボス、1 mol/L クエン酸及びギ酸（1：1：1）で処理したラット K_2EDTA 血漿中の HES 濃度の定量に、タンパク質沈殿法及び LC-MS/MS を用いた。

表 5　　ラット血漿 LC-MS/MS 生体試料分析法の要約

Species	**Rat**			
Strain	**Sprague Dawley (SD)**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L dichlorvos, 10 mmol/L citric acid, and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:1 mol/L dichlorvos in DMSO:formic acid [1:1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-10 (4.2.2.1-4) (AV13-RDC5108-01 Reissued and Addendum 1)**			**AV-6567-01 (4.2.2.1-5) (XBL[redacted]030, Amendment 1, Amendment 2, Amendment 3)**
Laboratory	[redacted]			[redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES (RDC-6567)**
Anticoagulant	K_2EDTA			
IS	Propranolol hydrochloride	MMF-D_3	MMF-D_3	N-maleimidomethanol
Calibration range (ng/mL)	50.0 to 10000			
Regression fit	Linear $1/x^2$	Quadratic $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Quadratic $1/x^2$
Extraction	Protein precipitation			
Instrument model	Sciex API5500 or Sciex API6500			Waters Xevo TQ-S
Ionisation mode	ESI (positive for DRF and negative for RDC-8439 and MMF)			ESCI (positive)
Calibration standards concentrations (ng/mL)	50.0; 100; 500; 1000; 2500; 5000; 7500; 10000			50.0; 100; 250; 500; 1000; 5000; 9000; 10000
QC concentrations (ng/mL)	Low QC: 150 Mid QC: 1250 High QC: 8000			Low QC: 150 Mid QC: 4000 High QC: 8000
Recovery of analyte (%) [% Recovery of analyte at a reduced volume]	69.9 to 79.1	52.6 to 82.4	50.0 to 60.1	80.41 to 82.89 [85.73 to 89.24][a]
Recovery of IS (%) [% Recovery of IS at a reduced volume]	81.5 to 103	58.9 to 83.3	58.9 to 83.3	75.73 to 78.80 [86.32 to 88.86][b]
LLOQ interday precision (%CV) (n = 18)	8.3	7.5	13.3	14.68

Species	**Rat**			
Strain	**Sprague Dawley (SD)**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L dichlorvos, 10 mmol/L citric acid, and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:1 mol/L dichlorvos in DMSO:formic acid [1:1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-10 (4.2.2.1-4) (AV13-RDC5108-01 Reissued and Addendum 1)**			**AV-6567-01 (4.2.2.1-5) (XBL[redacted]030, Amendment 1, Amendment 2, Amendment 3)**
Laboratory	[redacted]			[redacted]/ [redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES (RDC-6567)**
LLOQ interday accuracy (%RE) (n = 18)	8.2	12.2	8.6	-7.60
LLOQ intraday precision (%CV) [LLOQ, reduced volume] **(n = 6)**	11.2	10.1	14.3	8.44 to 19.77 (n = 6 at each of 3 independent runs) [5.57][c, d]
LLOQ intraday accuracy (%RE) [LLOQ, reduced volume] **(n = 6)**	9.4	13.2	4.0	-13.00 to -4.60 (n = 6 at each of 3 independent runs) [-5.60][d]
QC interday precision (%CV) (n = 18 at each of 3 levels)[e]	8.7 to 10.5	6.6 to 7.4	6.2 to 8.5	3.44 to 7.11
QC interday accuracy (%RE) (n = 18 at each of 3 levels)[f]	-2.6 to 2.4	-0.3 to 0.7	-0.5 to 1.3	-3.25 to 6.00
QC intraday precision (%CV) [Study QC][g] **(n = 6 at each of 3 levels)**	3.1 to 8.1 [2.2 to 3.5]	2.3 to 7.0 [2.4 to 4.2]	2.2 to 6.3 [2.5 to 3.4]	1.39 to 9.54 [0.77 to 4.46] [2.10 to 4.24][d]

Species	**Rat**			
Strain	**Sprague Dawley (SD)**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L dichlorvos, 10 mmol/L citric acid, and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:1 mol/L dichlorvos in DMSO:formic acid [1:1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-10 (4.2.2.1-4) (AV13-RDC5108-01 Reissued and Addendum 1)**			**AV-6567-01 (4.2.2.1-5) (XBL[redacted]030, Amendment 1, Amendment 2, Amendment 3)**
Laboratory	[redacted]			[redacted]/ [redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES (RDC-6567)**
QC intraday accuracy (%RE) [Study QC][g] (n = 6 at each of 3 levels)	-3.3 to 6.8 [-7.3 to 0.8]	-3.3 to 6.4 [-9.4 to -5.6]	-6.7 to 6.9 [-6.0 to -3.6]	-7.00 to 10.00 [-11.88 to -1.33] [-3.38 to 2.67][d]
Matrix bench-top stability [Dilution QC][h]	4 hours in ice water			2 hours in ice water [6.5 hours at 4°C]
Freeze-thaw stability [Dilution QC][h]	3 cycles at -70ºC			3 cycles at -70ºC [3 cycles at -70ºC]
Extract stability	30.4 hours in the autosampler at 10°C			73 hours at 4ºC; 73 hours at room temperature
Reinjection stability	12.8 hours in the autosampler at 10°C			97 hours at room temperature[i]; 105 hours at 4ºC
Long-term storage stability [Dilution QC][h]	94 days at -70ºC [44 days at -70ºC][j]			32 days at -20ºC; 68 days at -70ºC [65 days at -70ºC]

Species	**Rat**			
Strain	**Sprague Dawley (SD)**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L dichlorvos, 10 mmol/L citric acid, and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:1 mol/L dichlorvos in DMSO:formic acid [1:1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-10 (4.2.2.1-4) (AV13-RDC5108-01 Reissued and Addendum 1)**			**AV-6567-01 (4.2.2.1-5) (XBL[redacted]030, Amendment 1, Amendment 2, Amendment 3)**
Laboratory	[redacted]			[redacted]/ [redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES (RDC-6567)**
Analyte stock solution/ working stock solution stability	7.2 hours at room temperature[k]; 23 days at -70°C[k] 6.5 hours at room temperature[l]; 30 days at -20°C[l]/ 7.2 hours at room temperature [m]; 23 days at -70°C[m] 5.5 hours at room temperature[n]; 11 days at -70°C[n]	7.2 hours at room temperature[k]; 23 days at -70°C[k] 5.5 hours at room temperature[l]; 30 days at -20°C[l]/ 5.5 hours at room temperature[m]; 14 days at -70°C[m]; 7.2 hours at room temperature[n]; 23 days at -70°C[n]	7.2 hours at room temperature[k]; 23 days at -70°C[k] 6.5 hours at room temperature[l]; 36 days at −20°C[l]/ 5.5 hours at room temperature[m]; 14 days at -70°C[m]; 5.5 hours at room temperature[n]; 12 days at -70°C[n]	23 hours at room temperature; 74 days at -20ºC; 273 days at -20ºC[q]/ 24 hours at room temperature[o]; 95 days at -20ºC[p]
IS stock solution stability / spiking solution stability	5.7 hours at room temperature[r]			22 hours at room temperature; 75 days at -20ºC/ 124 days at -20ºC[p]
Dilution integrity	20000 ng/mL (50-fold dilution)			40000 ng/mL (5-fold dilution 10-fold dilution 20-fold dilution 50-fold dilution) 80000 ng/mL (50-fold dilution) 160000 ng/mL (20-fold dilution)
Selectivity	No interference greater than acceptable limits detected at the retention times of interest			

[a] Recovery test was repeated using 3 QC concentrations.

[b] Recovery test repeated with 3 QC concentrations of HES.

[c] n = 56 at each of 3 levels for DRF, n = 63 at each of 3 levels for MMF, and n = 65 at each of 3 levels for RDC-8439.
[d] All additional validation runs for [Study AV-6567-01 (XBL[redacted]030 Amendment 2)] (M 4.2.2.1-5) were performed using the modified gradient of percent B from 25% to 28% at 2.6 to 3.1 minutes. A partial validation was performed using this modified gradient.
[e] n = 56 at each of 3 levels for DRF, n = 65 at each of 3 levels for RDC-8439, n = 63 at each of 3 levels for MMF, and n = 18 at each of 3 levels for HES.
[f] n = 56 at each of 3 levels for DRF, n = 65 at each of 3 levels for RDC-8439, n = 63 at each of 3 levels for MMF, and n = 18 at each of 3 levels for HES.
[g] QC Study samples were from a partial validation of QC samples prepared in a manner to mimic the treatment of study samples.
[h] Dilution QC samples were from a partial validation of QC samples prepared at 160000 ng/mL or 20000 ng/mL to support the study sample analysis with sample concentrations greater than the ULOQ.
[i] Reinjection reproducibility is reported as extracted samples reproducibility. Extract stability was later performed and reported in the amendment report.
[j] MMF only.
[k] Analyte stock solution of 1.00 mg/mL in 1:1 methanol:acetonitrile + 0.1% formic acid.
[l] Analyte stock solution of 1.00 mg/mL in DMSO. Source: [AV[redacted]-RDC5108-02 and Addendum 1] (M 4.2.2.1-6).
[m] The composite working solution of DRF, RDC-8439, and MMF (333 µg/mL for each analyte) in 1:1 methanol:acetonitrile + 0.1% formic acid.
[n] The composite working solution of DRF, RDC-8439, and MMF (1.00 µg/mL for each analyte) in 1:1 methanol:acetonitrile + 0.1% formic acid.
[o] Source: [XBL[redacted]044 Amendment 2].
[p] Source: [AV-6567-02 Amendment 2] (M 4.2.2.1-9).
[q] Source: [XBL[redacted]126].
[r] IS stock solution stability is not reported. Reported value is for the composite IS working solution of propranolol (5.00 ng/mL) and MMF-D_3 (50.0 ng/mL) in methanol.

表 6　　ラット ISR の結果

Validation Report No. (Location in CTD)	Analyte	No. of Samples Analysed (% of total study samples)	ISR Result[a]	Study No. (Location in CTD)
AV-5108-10 (4.2.2.1-4) (AV13-RDC5108-01 Reissued and Addendum 1)	DRF	NA[b]	NA	AT-5108-05 (4.2.3.2-3)
	RDC-8439	6 (2.5%)[c,d]	5 of 6 (83.3%)	
	MMF	24 (10.0%)	18 of 24 (75.0%)	
AV-5108-10 (4.2.2.1-4) (AV13-RDC5108-01 Reissued and Addendum 1)	DRF	NA[e]	NA	AT-5108-13 (4.2.3.2-4)
	RDC-8439	20 (8.4%)[f]	7 of 19 (36.8%)[g]	
	MMF	23 (9.6%)	18 of 22 (81.8%)[h]	
AV-6567-01 (4.2.2.1-5) (XBL[redacted]030, Amendment 1, Amendment 2, and Amendment 3)	HES (RDC-6567)	12 (10%)	11 of 12 (91.67%)	AT-5108-15 (4.2.3.2-5)
AV-5108-10 (4.2.2.1-4) (AV13-RDC5108-01 Reissued and Addendum 1)	DRF	NA[i]	NA	AT-5108-25 (4.2.3.7.6-1)
	RDC-8439	22 (7.1%)	Failed[j]	
	MMF	22 (7.1%)	22 of 22 (100%)	

[a] ISR was initially planned to be conducted for MMF and RDC-8439 in Study AT-5108-05. However, ISR was performed in multiple studies to attain the number of samples needed, because samples had insufficient sample volume to conduct ISR, samples had an original concentration lower than that of the LQC, or samples did not have valid repeat concentrations for RDC-8439 given that they were diluted in order to compensate for MMF concentrations > ULOQ.

[b] ISR was not performed for DRF as all samples had lower concentrations than the LQC for this analyte.

[c] ISR samples were chosen based upon MMF concentrations because that was the most prevalent analyte found in study samples.

[d] Twenty-four samples were chosen for ISR, but 18 of these samples did not have valid repeat concentrations for RDC-8439 as the samples were diluted in order to compensate for > ULOQ concentrations for MMF; therefore, only 6 samples are reported for RDC-8439.

[e] ISR was not performed for DRF as there were insufficient number of samples with measured concentrations > LQC.

[f] A total of 23 samples were selected for ISR; 3 of 23 samples had an original concentration lower than that of the LQC and were invalid. Therefore, only the results for 20 samples are reported for RDC-8439.

[g] An investigation into the failure of ISR for RDC-8439 was attributed to the differing dilution factors between the original analysis and the ISR analysis. Samples were diluted in order to compensate for > ULOQ concentrations for MMF.

[h] One of the 23 samples selected for ISR was originally diluted due to low sample volume; sample not diluted for ISR evaluation; percentage difference from original value not available.

[i] ISR was not performed for DRF as fewer than 20 samples had a greater concentration than the LQC for this analyte.

[j] A full ISR was not repeated because of insufficient volume of samples. An investigation was conducted, and the failure was attributed to the unavoidable difference in sample dilution factor as the samples were diluted in order to compensate for > ULOQ concentrations for MMF. This was further confirmed because ISR passed for the subset of samples for which diluted values were available for both the original and ISR analysis.

2.1.3 ウサギ

［AV14-RDC5108-02 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-6）、
［AV-6567-03 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-7）、
［AT-5108-22 試験］（添付資料番号 4.2.3.5.2-4）

ウサギ血漿中の DRF 及びその代謝物である MMF、HES 及び RDC-8439 の分析に用いた生体試料分析法の要約を表 7 に示した。ウサギ全血を試料採取の最初にエステラーゼ酵素阻害剤（クエン酸及びギ酸）で処理し、試料処理中及び分析中の DRF を安定化した。バリデートされた各分析法のパラメータを表 7 に要約する。ISR の結果は表 8 に示す。

酸性化したウサギ血漿中の DRF 及びその代謝物である MMF 並びに RDC-8439 濃度測定法は、[redacted]により開発され、バリデートが実施された［AV14-RDC5108-02 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-6）。10 mmol/L のクエン酸と 1%のギ酸を含むウサギ K_2EDTA 血漿中の DRF、MMF 及び RDC-8439 の濃度を定量するため、タンパク質沈殿法と LC-MS/MS を用いた。抗凝固剤を K_2EDTA として採取した血液を 10 mmol/L クエン酸で酸性化し、遠心分離後血漿を採取し、1%ギ酸を添加した。ただし、検量線及び QC 試料は、すでに 10 mmol/L クエン酸及び 1%ギ酸で処理されたコントロール血漿に分析対象物質を添加して調製した。血漿検体採取時の安定性試験は、血漿検体採取と血液処理並びに検量線及び QC 試料調製におけるギャップを埋めるために実施した。試料採取時における安定性は RDC-8439 についてのみ検証された。2 回繰り返したこの試験中に、DRF は減少するとともに MMF は増加し、DRF が試験中に MMF を形成する可能性が最も高いことを示唆した。In vivo では、DRF は全身循環に入る前に速やかに加水分解され、MMF、HES（RDC-6567）及び RDC-8439 が生成する。非臨床試験及び臨床試験で、DRF の定量可能な全身曝露は認められていない。したがって、実試料中には定量可能な濃度の DRF が存在しない可能性が高いため、本試験で DRF 及び MMF の両方の測定が失敗したとしても、実試料中の DRF 及び MMF の推定濃度に意味のある影響を及ぼすことはないと考えられる。そのため、DRF 及び MMF の測定は複数回失敗したが、追加の測定は行わなかった。

[redacted]は HES 分析用に別の方法を開発し、フルバリデーションを行った［AV-6567-03 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-7）。タンパク質沈殿法と LC-MS/MS を用いて、1 mol/L クエン酸とギ酸（1：1）を含むウサギ K_2EDTA 血漿中の HES 濃度を測定した。DRF、MMF 及び RDC-8439 の方法と同様に、HES 分析中の検量線及び QC の調製方法での酸性化のタイミングは、試験試料の採取及び血液処理の方法とわずかに異なっていた。HES では、血漿検体採取の安定性に関して、血漿検体採取と血液処理手順及び検量線と QC 試料調製のギャップを埋めるため追加試験を実施した。HES は試料採取工程を通して安定であることが示された。

表 7　　ウサギ血漿 LC-MS/MS 生体試料分析法の概要

Species	**Rabbit**			
Strain	**New Zealand White**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L citric acid and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:formic acid [1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV14-RDC5108-02 and Addendum 1 (4.2.2.1-6)**			**AV-6567-03 (4.2.2.1-7) (XBL[redacted]032 and Amendment 1)**
Laboratory	[redacted]			[redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES**
Anticoagulant	K_2EDTA			K_2EDTA
IS	Propranolol hydrochloride	MMF-D_3		N-maleimidomethanol
Calibration range (ng/mL)	50.0 to 10000			
Regression fit	Linear $1/x^2$			Quadratic $1/x^2$
Extraction	Protein precipitation			
Instrument model	Sciex API5500			Waters Xevo TQ-S
Ionisation mode	ESI (positive for DRF and negative for RDC-8439 and MMF)			ESCI (positive)
Calibration standards concentrations (ng/mL)	50.0; 100; 500; 1000; 2500; 5000; 7500; 10000			50.0; 100; 250; 500; 1000; 5000; 9000; 10000
QC concentrations (ng/mL)	Low QC: 150 Mid QC: 1250 High QC: 8000			Low QC: 150 Mid QC: 4000 High QC: 8000
Recovery of analyte (%) [% Recovery of analyte at a reduced volume]	102.9 to 120.5	100.6 to 108.0	104.2 to 106.0	89.32 to 89.87 [84.70 to 86.64][a]
Recovery of IS (%) [% Recovery of IS at a reduced volume]	105.4 to 107.9	97.3 to 101.2		101.48 to 101.92 [77.95 to 79.36][b]

Species	**Rabbit**			
Strain	**New Zealand White**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L citric acid and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:formic acid [1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV14-RDC5108-02 and Addendum 1 (4.2.2.1-6)**			**AV-6567-03 (4.2.2.1-7)** (XBL[redacted]032 and Amendment 1)
Laboratory	[redacted]			[redacted]/ [redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES**
LLOQ interday precision (%CV) (n = 18)	11.2	6.9	12.9	14.40
LLOQ interday accuracy (%RE) (n = 18)	-8.6	-6.0	-5.0	-5.40
LLOQ intraday precision (%CV) (n = 6)	7.5	9.4	8.5	5.27 to 19.34 (n = 6 at each of 3 independent runs)
LLOQ intraday accuracy (%RE) (n = 6)	-13.4	-6.6	-10.2	-13.40 to -0.60 (n = 6 at each of 3 independent runs)
QC interday precision (%CV) (n = 18 at each of 3 levels)[c]	6.2 to 7.0	5.4 to 6.9	4.5 to 7.0	5.12 to 6.17
QC interday accuracy (%RE) (n = 18 at each of 3 levels)[c]	-4.5 to 0.0	-3.3 to 0.1	-4.7 to 2.6	-2.38 to 9.33
QC intraday precision (%CV) [Study QC][d] (n = 6 at each of 3 levels)	2.8 to 3.2 [2.4 to 10.4]	1.9 to 4.9 [1.5 to 4.2]	0.9 to 2.9 [2.6 to 14.2]	2.24 to 6.72 [0.91 to 4.75]
QC intraday accuracy (%RE) [Study QC][d] (n = 6 at each of 3 levels)	-8.6 to -4.7 [acceptance criteria not met][e]	-8.7 to -1.1 [-4.0 to 0.0]	-12.0 to 1.1 [acceptance criteria not met][e]	-8.75 to 13.33 [-8.50 to 8.00]
Matrix bench-top stability [Dilution QC][f]	6 hours on ice	6 hours at room temperature; 6 hours on ice		24 hours in ice water [6 hours at 4ºC]
Freeze-thaw stability [Dilution QC][f]	3 cycles at -70ºC	4 cycles at -70ºC		3 cycles at -70ºC [3 cycles at -70ºC]
Extract stability	28.7 hours in the autosampler at 10°C			100 hours at room temperature; 100 hours at 4ºC
Reinjection stability	Not established	38.1 hours in the autosampler at 10°C		174 hours at room temperature[g]; 174 hours at 4ºC[g]
Long-term storage stability [Dilution QC][f]	113 days at -70°C [209 days at -70°C][h]			22 days at -20ºC; 54 days at -70ºC [65 days at -70ºC]

Species	**Rabbit**			
Strain	**New Zealand White**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L citric acid and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:formic acid [1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV14-RDC5108-02 and Addendum 1 (4.2.2.1-6)**			**AV-6567-03 (4.2.2.1-7)** (XBL[redacted]032 and Amendment 1)
Laboratory	[redacted]			[redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES**
Analyte stock solution/ working stock solution stability	As detailed in 表 5, Study AV-5108-10 (AV13-RDC5108-01 Addendum 1)			As detailed in 表 5, Study AV-6567-01 (XBL[redacted]030)
IS stock solution stability / spiking solution stability	As detailed in 表 5, AV-5108-10 (AV13-RDC5108-01 Addendum 1)			As detailed in 表 5, Study AV-6567-01 (XBL[redacted]030)
Dilution integrity	20000 ng/mL (50-fold dilution)			40000 ng/mL (5-fold dilution) 160000 ng/mL (20-fold dilution)
Selectivity	No interference greater than acceptable limits detected at the retention times of interest			

[a] Recovery test was repeated using 3 QC concentrations.
[b] Recovery test was repeated with 3 QC concentrations of HES.
[c] n = 46 at each of 3 levels for DRF, and n = 44 at each of 3 levels for MMF and RDC-8439.
[d] QC Study samples were from a partial validation of QC samples prepared in a manner to mimic the treatment of study samples.
[e] %RE > 15%.
[f] Dilution QC samples were from a partial validation of QC samples prepared at 160,000 ng/mL to support the study sample analysis with sample concentrations greater than the ULOQ.
[g] Reinjection reproducibility is reported as extracted samples reproducibility. Extract stability was later performed and reported in Amendment 1.
[h] MMF only.

表 8　　ウサギの ISR 結果

Validation Report No. (Location in CTD)	**Analyte**	**No. of Samples Analysed (% of total study samples)**	**ISR Result**	**Study No. (Location in CTD)**
AV14-RDC5108-02 and Addendum 1 (4.2.2.1-6)	MMF	24 (17.0%)	22 of 24 (91.7%)	AT-5108-22[a] (4.2.3.5.2-4)
AV-6567-03 (4.2.2.1-7) (XBL[redacted]032 and Amendment 1)	HES (RDC-6567)	17 (12.1%)	15 of 17 (88.24%)	AT-5108-22 (4.2.3.5.2-4)

[a] No ISR was conducted for DRF or RDC-8439 because fewer than 20 samples had measurable concentrations greater than the LQC.

2.1.4 サル

［AV-5108-11 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-8）、［AV-6567-02 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-9）

サル血漿中の DRF 及びその代謝物である MMF、HES 及び RDC-8439 の分析に用いた生体試料分析法の概要を表 9 に示す。試料処理中及び分析中の DRF を安定化するため、試料採取時の最初にサル全血をエステラーゼ酵素阻害剤（クエン酸、ジクロルボス及びギ酸）で処理した。バリデートされた各分析法のパラメータを表 9 に要約する。ISR の結果は表 10 に示す。

酸性化したサル血漿中の DRF 及びその代謝物である MMF 及び RDC-8439 の濃度を測定する方法は、[redacted]により開発され、バリデーションが実施された［AV-5108-11 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-8）。DRF、MMF 及び RDC-8439 濃度の定量には、10 mmol/L ジクロルボス、10 mmol/L クエン酸及び 1%ギ酸を含むサル K_2EDTA 血漿でタンパク質沈殿法及び LC-MS/MS を用いた。［AT-5108-14 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-8）では、5 mmol/L ジクロルボス、5 mmol/L クエン酸及び 1%ギ酸を含む検体を採取した。そのため、［AT-5108-14 試験］（添付資料番号 4.2.3.2-8）の試験試料測定を行うため、パーシャルバリデーションが実施された。HES の別の分析法が、[redacted]により開発され、フルバリデーションが実施された［AV-6567-02 試験］（添付資料番号 4.2.2.1-9）。1 mol/L ジクロルボス、1 mol/L クエン酸及びギ酸（1 : 1 : 1）を含むラット K_2EDTA 血漿中の HES 濃度を、タンパク質沈殿法及び LC-MS/MS で測定した。

表 9　　サル血漿 LC-MS/MS 生体試料分析法の概要

Species	**Monkey**			
Strain	**Cynomolgus**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L dichlorvos, 10 mmol/L citric acid, and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:1 mol/L dichlorvos in DMSO:formic acid [1:1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-11 (4.2.2.1-8) (AV13-RDC5108-02 Reissue, Amended Reissue, Addendum 1, and Addendum 2)**			**AV-6567-02 (4.2.2.1-9) (XBL[redacted]033, Amendment 1, and Amendment 2)**
Laboratory	[redacted]			[redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES (RDC-6567)**
Anticoagulant	K_2EDTA			K_2EDTA
IS	Propranolol hydrochloride	MMF-D_3	MMF-D_3	N-maleimidomethanol
Calibration range (ng/mL)	50.0 to 10000			100.0 to 10000
Regression fit	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Linear $1/x^2$	Quadratic $1/x^2$
Extraction	Protein precipitation			
Instrument model	Sciex API5500			Waters Xevo TQ-S
Ionisation mode	ESI (positive for DRF and negative for RDC-8439 and MMF)			ESCI (positive)
Calibration standards concentrations (ng/mL)	50.0; 100; 500; 1000; 2500; 5000; 7500; 10000			100; 200; 500; 1000; 2000; 5000; 9000; 10000
QC concentrations (ng/mL)	Low QC: 150 Mid QC: 1250 High QC: 8000			Low QC: 300 Mid QC: 4000 High QC: 8000
Recovery of analyte (%) [% Recovery of analyte at a reduced volume]	82.0 to 93.2	74.2 to 91.7	80.7 to 89.7	77.97 to 81.29[a] [90.55 to 104.95][b]
Recovery of IS (%) [% Recovery of IS at a reduced volume]	80.9 to 85.7	89.0 to 97.4	84.9 to 88.3	66.46 to 67.99[a] [70.68 to 78.13][b]
LLOQ interday precision (%CV) (n = 18)	7.2	74.6 with outlier 9.3 without outlier (n = 17)	12.6	14.04
LLOQ interday accuracy (%RE) (n = 18)	9.8	28.9 with outlier 6.4 without outlier (n = 17)	5.2	4.00

Species	**Monkey**			
Strain	**Cynomolgus**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L dichlorvos, 10 mmol/L citric acid, and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:1 mol/L dichlorvos in DMSO:formic acid [1:1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-11 (4.2.2.1-8) (AV13-RDC5108-02 Reissue, Amended Reissue, Addendum 1, and Addendum 2)**			**AV-6567-02 (4.2.2.1-9) (XBL[redacted]033, Amendment 1, and Amendment 2)**
Laboratory	[redacted]			[redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES (RDC-6567)**
LLOQ intraday precision (%CV) (n = 6)	8.6	13.8	12.4	5.90 to 16.25 (n = 6 at each of 3 independent runs)
LLOQ intraday accuracy (%RE) (n = 6)	9.8	10.2	12.6	0.00 to 12.00 (n = 6 at each of 3 independent runs)
QC interday precision (%CV) (n = 18 at each of 3 levels)[c]	6.4 to 9.4	6.6 to 9.2	5.0 to 8.2	3.68 to 6.81
QC interday accuracy (%RE) (n = 18 at each of 3 levels)[c]	-2.3 to 4.0	-0.9 to 5.3	0.0 to 2.7	2.00 to 3.33
QC intraday precision (%CV) [Study QC][d] (n = 6 at each of 3 levels)	2.0 to 4.4 [1.4 to 2.2]	2.3 to 5.6 [2.0 to 3.9]	2.0 to 5.8 [2.0 to 7.9]	2.43 to 5.84 [2.63 to 5.17]
QC intraday accuracy (%RE) [Study QC][d] (n = 6 at each of 3 levels)	-10.0 to -2.4 [-1.1 to 0.0]	-2.8 to 1.3 [-3.0 to 0.0]	-4.0 to -2.0 [-1.8 to 4.0]	-2.33 to 9.00 [-2.25 to 6.33]
Matrix bench-top stability [Dilution QC]	6.4 hours at room temperature; 4 hours on ice [4 hours on ice][e]	6.5 hours at room temperature; 4 hours on ice [4 hours on ice][e]		2.75 hours at 4ºC [3.38 hours in ice water bath][f]
Freeze-thaw stability [Dilution QC]	2 cycles at -70ºC [3 cycles at -70ºC][e]	4 cycles at -70ºC [3 cycles at -70ºC][e]		5 cycles at -70ºC [5 cycles at -70ºC][f]
Extract stability	32.9 hours in the autosampler at 10°C			98 hours at room temperature; 98 hours at 4ºC
Reinjection stability	Due to the lack of reinjection stability, incurred samples were not injected outside of the bracketing calibration curves prepared with each batch.			126 hours at ambient temperature[g]; 120 hours at 4ºC[g]

Species	**Monkey**			
Strain	**Cynomolgus**			
Matrix	**Acidified plasma (treated with 10 mmol/L dichlorvos, 10 mmol/L citric acid, and 1% formic acid)**			**Acidified plasma (treated with 1 mol/L citric acid:1 mol/L dichlorvos in DMSO:formic acid [1:1:1])**
Validation report no. (Location in CTD)	**AV-5108-11 (4.2.2.1-8) (AV13-RDC5108-02 Reissue, Amended Reissue, Addendum 1, and Addendum 2)**			**AV-6567-02 (4.2.2.1-9) (XBL[redacted]033, Amendment 1, and Amendment 2)**
Laboratory	[redacted]			[redacted]
Analyte	**DRF**	**RDC-8439**	**MMF**	**HES (RDC-6567)**
Long-term storage Stability [Dilution QC]	116 days at -70°C [227 days at -70°C][h,i]			29 days at -20ºC; 29 days at -70ºC [42 days at -70ºC][f]
Analyte stock solution/ working stock solution stability	As detailed in 表 5, Study AV-5108-10 (AV13-RDC5108-01 Addendum 1)			As detailed in 表 5, Study AV-6567-01 (XBL[redacted]030)
IS stock solution/ spiking solution stability	As detailed in 表 5, AV-5108-10 (AV13-RDC5108-01 Addendum 1)			As detailed in 表 5, AV-6567-01 (XBL[redacted]030)
Dilution integrity	20000 ng/mL and 50000 ng/mL (50-fold dilution)			40000 ng/mL (5-fold dilution, 10-fold dilution, and 20-fold dilution); 167000 ng/mL (20-fold dilution)
Selectivity	No interference greater than acceptable limits detected at the retention times of interest			

[a] Recovery QC samples were prepared at 2 concentration levels, low QC and high QC.
[b] Recovery QC samples were from a partial validation of QC samples prepared at 3 concentration levels, low QC, medium QC, and high QC.
[c] n = 67 at each of 3 levels for DRF, n = 43 at each of 3 levels for RDC-8439, and n = 55 at each of 3 levels for MMF.
[d] QC study samples were from a partial validation of QC samples prepared in a manner to mimic the treatment of study samples.
[e] Dilution QC samples were prepared at 20000 ng/mL (50-fold dilution) to support the study sample analysis with sample concentrations greater than the ULOQ.
[f] Dilution QC samples were from a partial validation of QC samples prepared at 167000 ng/mL (20-fold dilution) to support the study sample analysis with sample concentrations greater than the ULOQ.
[g] Reinjection reproducibility is reported as extracted samples reproducibility. Extract stability was later performed and reported in Amendment 2.
[h] Dilution QC samples were from a partial validation of QC samples prepared at 50000 ng/mL (50-fold dilution) to support the study sample analysis with sample concentrations greater than the ULOQ.
[i] MMF only.

表 10　　サルの ISR 結果

Validation Report No. (Location in CTD)	Analyte	No. of Samples Analysed (% of total study samples)	ISR Result[a]	Study No. (Location in CTD)
AV-5108-11 (4.2.2.1-8) (AV13-RDC5108-02 Reissue, Amended Reissue, Addendum 1, and Addendum 2)	DRF	NA[b]	NA	AT-5108-07 (4.2.3.2-7)
	RDC-8439	22 (5.2%)[c,d]	20 of 22 (90.9%)	
	MMF	42 (10%)	37 of 42 (88.1%)	
AV-5108-11 (4.2.2.1-8) (AV13-RDC5108-02 Reissue, Amended Reissue, Addendum 1, and Addendum 2)	DRF	NA[b]	NA	AT-5108-14 (4.2.3.2-8)
	RDC-8439	29[e,f]	27 of 29 (93.1%)	
	MMF	59[e,f]	49 of 59 (83.1%)	
AV-5108-11 (4.2.2.1-8) (AV13-RDC5108-02 Reissue, Amended Reissue, Addendum 1, and Addendum 2)	DRF	NA[b]	NA	AT-5108-16 (4.2.3.2-9)
	RDC-8439	18 (4.5%)	18 of 18 (100%)	
	MMF	25 (6.2%)	25 of 25 (100%)	
AV-6567-02 (4.2.2.1-9) (XBL[redacted]033, Amendment 1, and Amendment 2)	HES (RDC-6567)	24 (12.1%)	16 of 24 (66.67%)	AT-5108-16 (4.2.3.2-9)

[a] ISR was initially planned to be conducted for MMF and RDC-8439 in [Study AT-5108-07] (M4.2.3.2-7). However, ISR was performed in multiple studies to attain the number of samples needed, because insufficient samples with measurable concentrations of RDC-8439 were available for complete ISR evaluation in [Study AT-5108-07] (M4.2.3.2-7).

[b] ISR was not performed for DRF as all samples had lower concentrations than the LQC for this analyte.

[c] ISR samples were chosen based upon MMF concentrations because that was the most prevalent analyte found in study samples.

[d] 42 samples were chosen for ISR, but 20 of these samples did not have valid repeat concentrations for RDC-8439 as the samples were diluted in order to compensate for >ULOQ concentrations for MMF; therefore, only 22 samples are reported for RDC-8439.

[e] In [Study AT-5108-14] (M 4.2.3.2-8), a total of 17 samples (5.2% of total study samples) were selected for ISR analysis for MMF and RDC-8439.

[f] The combined ISR results from [Studies AT-5108-07] (M 4.2.3.2-7) and [AT-5108-14] (M 4.2.3.2-8) were reported for both RDC-8439 and MMF.

3 吸収

DRF とその代謝物である HES 及び RDC-8439 の in vitro 膜透過性を Caco-2 細胞で測定した。透過性は HES＞DRF＞RDC-8439 の順で高く、in vitro では、HES の吸収に比べて DRF と RDC-8439 の吸収は低いことが示された。

ラットに MMF 標識及び promoiety 標識[^{14}C]-DRF を単回経口投与し、総放射能（TRA）による PK 特性を評価した。MMF 標識及び promoiety 標識[^{14}C]-DRF 投与によるラットの吸収は速やかであり、平均最高血漿中 TRA 濃度は同程度であった。平均血漿中曝露量（AUC_{inf}）は同程度であった（2 倍以内）が、MMF 標識[^{14}C]-DRF の平均 $t_{1/2}$ は 3.9 倍長く、ラットで MMF 標識[^{14}C]-DRF に関連した放射能の滞留時間が長いことが示唆された。

ラット実験的自己免疫性脳脊髄炎（EAE）モデルでの MMF、DMF 及び DRF の用量設定のため、雌性 Lewis ラットを用いた TK 試験を実施した［M2.6.2.2.1、LSC[redacted]-069 試験］。MMF、DMF 及び DRF（MMF としてモル等価用量）投与での MMF の全身曝露量は全投与群で同程度であった（1.5 倍以内）。ラットでの HES の血漿中曝露量は MMF より高かった（約 12 倍）。

ラット及びカニクイザルに DRF を単回又は反復経口投与し、MMF、HES、RDC-8439 及び DRF の吸収を検討した。ラット及びサルでは、DRF の用量増加に伴い MMF の全身曝露量及び C_{max} は用量依存的に増加した。ラット及びサルに DRF を 1 日 1 回 5 日間投与したとき、いずれの用量でも MMF の蓄積は認められなかった（R＜1.1）。ラット及びサルでは、DRF の用量増加に伴い、HES の全身曝露量（AUC 及び C_{max}）の用量依存的な増加が認められた。ラット及びサルでは、全用量で HES の蓄積は認められなかったか認められてもわずかであった（R＜1.5）。ラット及びサルの Day 1 及び Day 5 での HES の血漿での曝露量（AUC）は、MMF に比べて高かった（範囲：7.16～39.6）。

ラット及びサルに DRF を 1 日 1 回反復経口投与したとき、1 例での 1 時点を除き、血漿中 DRF 濃度は測定できなかった。ラット及びサルに DRF を経口投与したときには、一部の測定時点で RDC-8439 濃度が検出されたのみであったため、推定された PK パラメータは限定的であった。ラット及びサルに高用量の DRF を 5 日間投与したとき、RDC-8439 の軽微な蓄積が認められた（R＜1.6）。ラット及びサルに DRF を経口投与したときの RDC-8439 の曝露量は、MMF の曝露量と比べて、ごくわずかであった（AUC 比＜0.03）。

3.1 DRF、HES 及び RDC-8439 の in vitro 膜透過性

［XT[redacted]8097 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-1）

DRF、HES 及び RDC-8439 の双方向膜透過性及び P-gp 阻害能を評価するために Caco-2 細胞を用いた in vitro 試験を行った。DRF、RDC-8439 及び HES の頂端膜側から基底膜側（A-B）への見かけの膜透過性はそれぞれ、3.72～5.39×10^{-6} cm/sec、0.193～0.247×10^{-6} cm/sec 及び 20.8～21.0×10^{-6} cm/sec であった。3 化合物すべての排出比は＜2 又は＞0.5 であり、DRF、RDC-8439 と HES は Caco-2 細胞では能動輸送されないことが示された。膜透過性の順位は HES＞DRF＞RDC-8439 であり、HES の吸収性に比べて DRF と RDC-8439 の吸収性は低いことが示された。各実験の実験条件及び結果の概要を M2.6.5.3 に記載した。

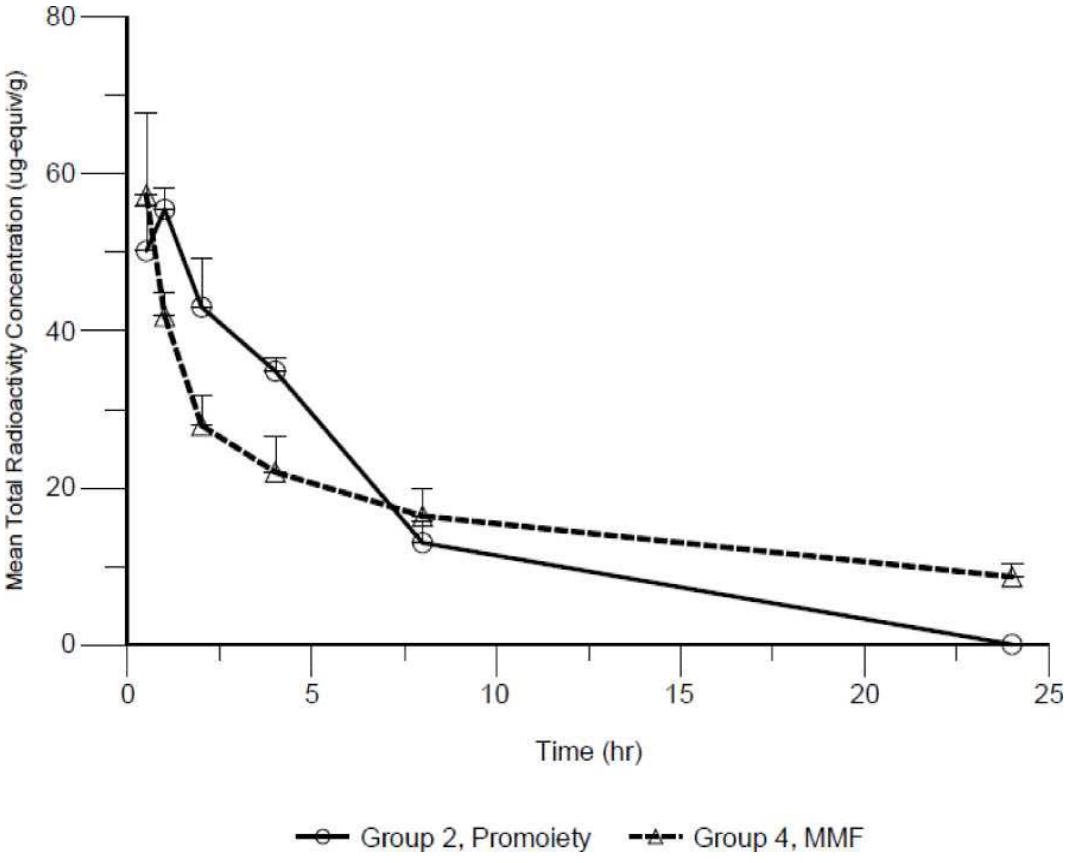
3.2 ラット

3.2.1 ラットでの MMF 標識及び promoiety 標識[^{14}C]-DRF による PK 評価

［032357 試験］（添付資料番号 4.2.2.5-1）

雄性 Sprague Dawley（SD）ラットに DRF の異なった箇所へ[^{14}C]を標識した、MMF 標識又は promoiety 標識[^{14}C]-DRF を単回経口投与し、PK、マスバランス及び代謝物プロファイルを検討した。本試験で得られた代謝物プロファイル及びマスバランスの結果については、それぞれ項及び 6 項に記載する。雄性 SD ラットに promoiety 標識又は MMF 標識[^{14}C]-DRF を経口投与すると、速やかに吸収され（最高濃度到達時間［T_{max}］：0.50～0.92 時間）、平均最高血漿中 TRA 濃度は同程度（55.7 µg-equiv/g 及び 57.3 µg-equiv/g）であった（表 11）。MMF 標識[^{14}C]-DRF 投与による AUC_{inf} 及び平均消失半減期（$t_{1/2}$）は、それぞれ 574.3 µg-equiv*h/g 及び 13.5 時間であった。promoiety 標識[^{14}C]-DRF 投与では、それぞれ 328.4 µg-equiv*h/g 及び 3.44 時間であった。2 つの放射性標識化合物の平均濃度-時間プロファイル及び PK パラメータを、それぞれ図 1 及び表 11 に要約する。試験の詳細は M2.6.5.3 に記載した。

図 1 雄性 SD ラットに promoiety 標識及び MMF 標識[^{14}C]の DRF（50 mg/kg、100 µCi/kg）を経口投与したときの血漿中 TRA 濃度-時間プロファイル



Values are mean ± SD of 6 animals.
Source: Report [032357] (M 4.2.2.5-1), Figure 2.

表 11　SD ラットに promoiety 標識及び MMF 標識[^{14}C]の DRF（50 mg/kg、100 µCi/kg）を経口投与したときの血漿中 TRA の PK パラメータ

Label	**C_{max} (µg-equiv/g)**	**T_{max} (h)**	**$t_{1/2}$ (h)**	**AUC_{0-t} (µg-equiv*h/g)**	**AUC_{inf} (µg-equiv*h/g)**
Promoiety [^{14}C]	55.699 ± 2.434	0.92 ± 0.20	3.44 ± 0.76	261.867 ± 14.854	328.381 ± 30.860
MMF [^{14}C]	57.335 ± 10.513	0.50 ± 0.00	13.5 ± 0.69	400.686 ± 59.868	574.294 ± 88.885

Values are mean ± SD of 6 animals.
Source: Report [032357] (M 4.2.2.5-1), Table 3.

3.2.2　ラット 5 日間反復投与試験における DRF、DMF 及び MMF のトキシコキネティクス

［LSC17-033 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-2）

雌性 Lewis ラットに MMF、DMF 及び DRF を 1 日 1 回 5 日間反復経口投与し MMF の TK を評価した。この試験は、MMF の作用に及ぼす HES の影響を評価するためのラット EAE モデル（［M 2.6.2.2.1、LSC[redacted]-069 試験］）での MMF、DMF 及び DRF の用量設定をサポートするために実施した。MMF 及び HES（DRF 投与群のみ）の曝露量を種々の用量群で測定した。すべての投与量は MMF に等価となる量に設定され、MMF、DMF 及び DRF はそれぞれ 181、200、及び 354 mg/kg が投与された。

雌性 Lewis ラットに MMF、DMF 及び DRF を 1 日 1 回 5 日間反復経口投与したとき、MMF の全身曝露量（AUC_{0-24h}）はすべての投与群で同程度（1.5 倍以内）であった（それぞれ 64300、44000、及び 54500 ng*h/mL）。MMF 投与群で、MMF の C_{max} が最も高かった（最も低い C_{max}［DRF 投与群］の 2.3 倍）（表 12）。DMF 投与群及び MMF 投与群の T_{max} は 0.17 時間であったが、DRF 投与群では遅く T_{max} は 0.75 時間であった。

DRF 1 日 1 回投与後の HES の AUC_{0-24h} は 638100 ng*h/mL であり、MMF の AUC_{0-24h} の約 12 倍であった。雌性 Lewis ラットでの MMF 及び HES（DRF 投与群のみ）の TK パラメータの平均値を表 12 に示した。

表 12　雌性 Lewis ラットに MMF（181 mg/kg）、DMF（200 mg/kg）及び DRF（354 mg/kg）を 1 日 1 回 5 日間経口投与したときの血漿中 TK パラメータ（Day 5）

Treatment	**Dose (mg/kg)**	**Analyte**	**C_{max} (ng/mL)**	**T_{max} (h)**	**AUC_{0-24h} (ng*h/mL)**
MMF	181	MMF	56600	0.17	64300
DMF	200	MMF	31100	0.17	44000
DRF	354	MMF	24800	0.75	54500
		HES	86000	0.75	638100

Each value shows mean (n=3).
Source: Report [LSC17-033] (M 4.2.2.2-2), Appendix C.

3.2.3 ラット 5 日間反復投与試験における薬物動態

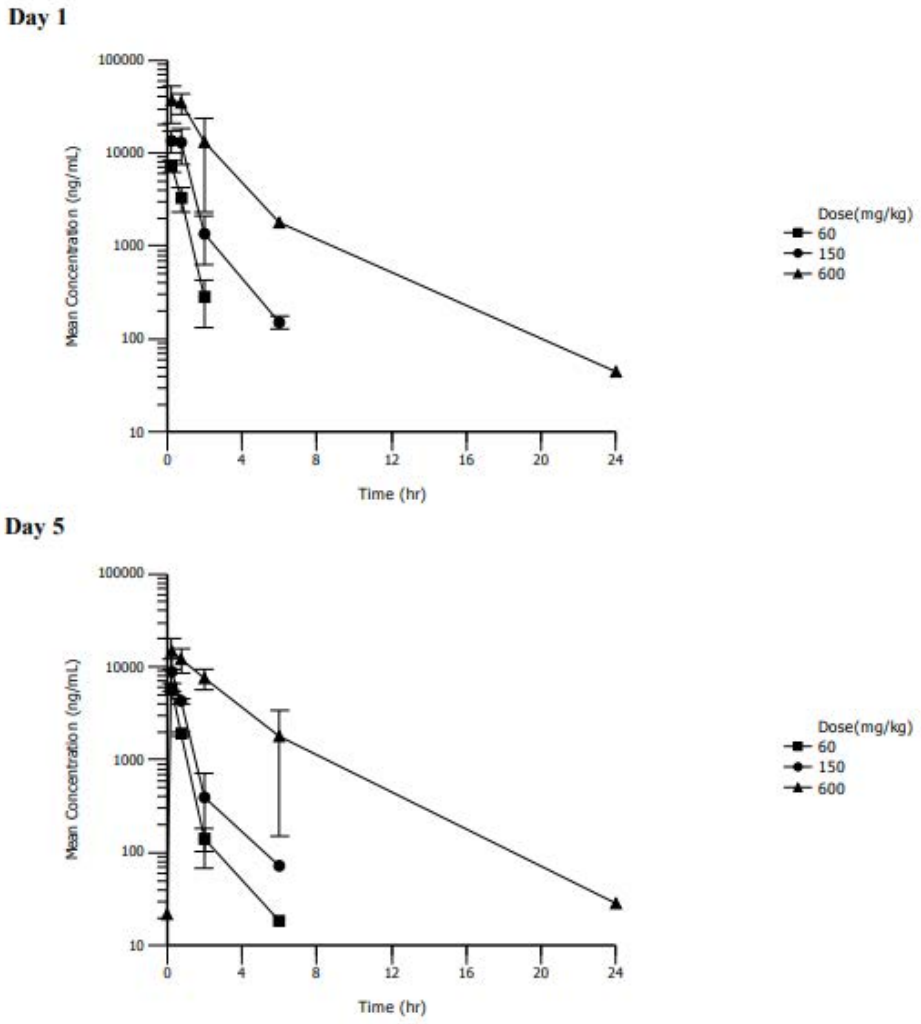
［AT-5108-27 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-3）

雄性 SD ラットに DRF（0、60、150、及び 600 mg/kg）を 1 日 1 回 5 日間経口投与し DRF 及びその代謝物（MMF、RDC-8439 及び HES）の PK を評価した。Day 1 及び Day 5 に投与後 24 時間までの血液試料を採取し、バリデートされた LC-MS/MS 法を用いて血漿試料を分析した。Day 1 及び Day 5 の PK パラメータを [redacted]（Version [redacted]）を用いて算出した。個々の分析対象物質の結果を以下の項に要約する。

3.2.3.1 MMF

DRF を連日投与したとき、すべての用量で Day 1 及び Day 5 の投与後 0.25 時間に MMF は、T_{max} に達した。Day 1 では DRF の用量を 1 : 2.5 : 10 倍に増加したとき、$AUC_{0\text{-}24h}$ は約 1 : 3.4 : 15.5 倍に増加し、C_{max} は約 1 : 1.8 : 5.1 倍に増加した。Day 5 では DRF の用量を 1 : 2.5 : 10 倍に増加したとき、$AUC_{0\text{-}24h}$ は約 1 : 2.0 : 12.6 倍に増加し、C_{max} は 1 : 1.5 : 2.5 倍に増加した。DRF の用量増加に伴い、MMF の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）及び C_{max} が用量依存的に増加した。MMF の R は今回の DRF の用量で 0.411 から 0.695 であり、ラットでは MMF の蓄積性は認められなかった。MMF の平均濃度-時間プロファイル及び PK パラメータをそれぞれ、図 2 及び表 13 に示す。

図 2　　雄性 SD ラットに DRF 60、150、及び 600 mg/kg を経口投与したときの MMF の血漿中濃度-時間プロファイル（Day 1 及び Day 5）



Each value shows mean ± SD (n=3).
Source: Report [AT-5108-27] (M 4.2.2.2-3), Appendix G Figure 1.

表 13　　雄性 SD ラットに DRF 60、150、及び 600 mg/kg を経口投与したときの MMF の PK パラメータ（Day 1 及び Day 5）

Dose (mg/kg)	Day	C_{max} (ng/mL)	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	T_{max} (h)	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	$AUC_{0\text{-}24h}$/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	R[a]
60	1	7310	122	0.25	6370	106	NA
60	5	5830	97.1	0.25	4430	73.8	0.695
150	1	13500	90.2	0.25	21700	145	NA
150	5	8870	59.2	0.25	8930	59.5	0.411
600	1	37100	61.8	0.25	99000	165	NA
600	5	14800	24.6	0.25	55900	93.2	0.565

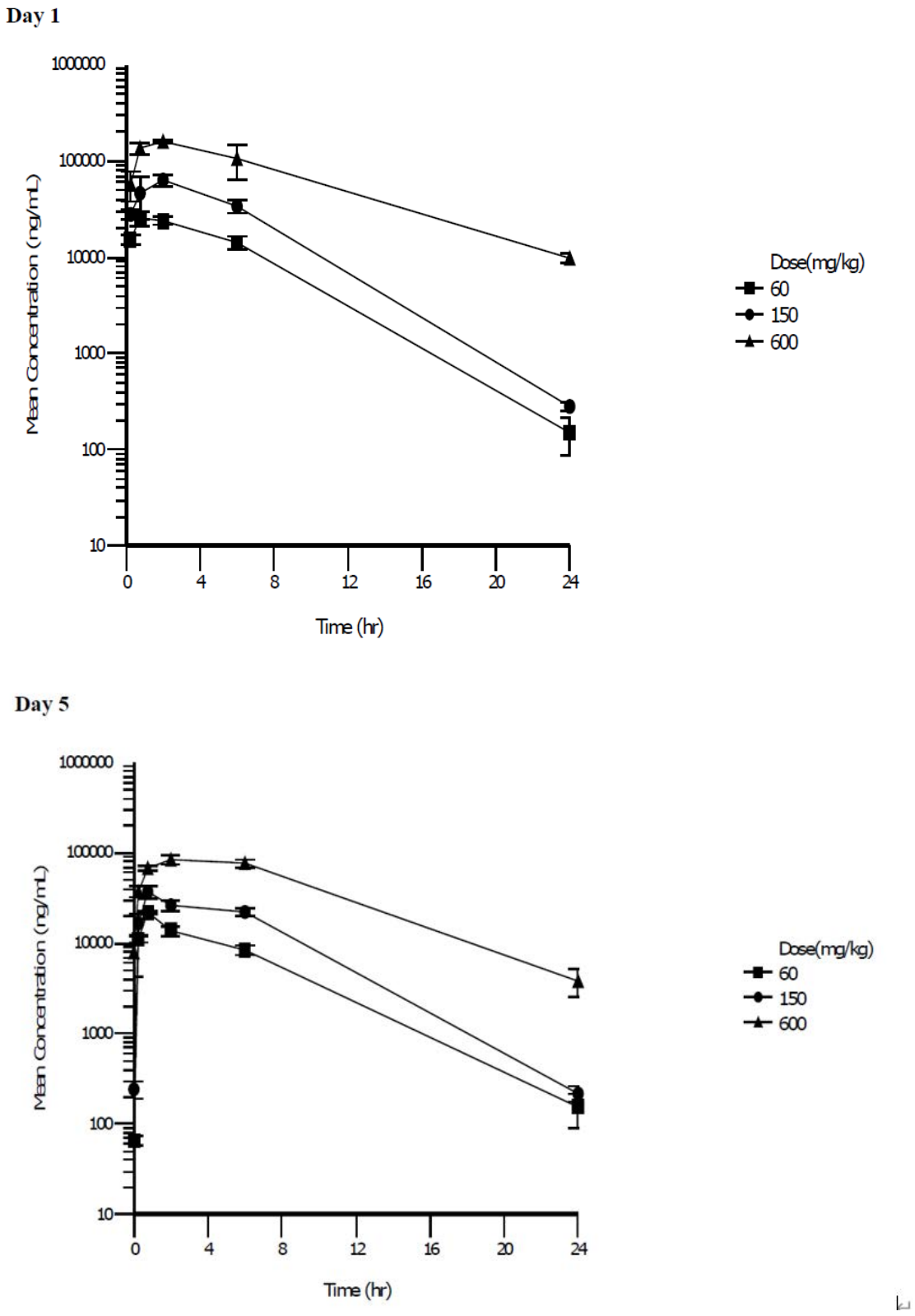
Each value shows mean (n=3).
[a] $AUC_{0\text{-}24h,\ Day\ 5}/AUC_{0\text{-}24h,\ Day\ 1}$.
Source: Report [AT-5108-27] (M 4.2.2.2-3), Appendix G Table 1.

3.2.3.2 HES

DRF を連日投与したとき、Day 1 及び Day 5 の投与後それぞれ 0.75 又は 2 時間に HES は T_{max} に達した。Day 1 では、DRF の用量を 1 : 2.5 : 10 倍に増加したとき、$AUC_{0\text{-}24h}$ は約 1 : 2.4 : 7.3 倍、C_{max} は約 1 : 2.5 : 6.2 倍増加した。Day 5 では、DRF の用量を 1 : 2.5 : 10 倍に増加したとき、$AUC_{0\text{-}24h}$ は約 1 : 2.3 : 7.7 倍に増加し、C_{max} は約 1 : 1.7 : 3.8 倍に増加した。HES の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）及び C_{max} は、DRF の用量増加に伴い、用量依存的に増加した。平均 R は今回の DRF の用量で 0.598～0.651 であり、ラットに DRF を 5 日間反復投与しても HES の蓄積性は認められなかった。

ラットでの HES の血漿中曝露量は、Day 1 及び Day 5 の MMF の曝露量を上回っており、DRF のいずれの用量でも、HES／MMF 比は、Day 1 では 18.3～39.0、Day 5 では 21.1～39.6 であった。雄性 SD ラットに DRF を投与したときの HES の平均濃度-時間プロファイル及び PK パラメータを、それぞれ図 3 及び表 14 に示す。

図 3　　雄性 SD ラットに DRF 60、150、及び 600 mg/kg を経口投与したときの HES 血漿中濃度-時間プロファイル（Day 1 及び Day 5）



Values are mean ± SD (n=3).
Source: Report [AT-5108-27] (M 4.2.2.2-3), Appendix G Figure 2.

表 14　雄性 SD ラットに DRF 60、150、及び 600 mg/kg を経口投与したときの HES の薬物動態パラメータ（Day 1 及び Day 5）

Dose (mg/kg)	Day	C_{max} (ng/mL)	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	T_{max} (h)	AUC_{0-24h} (ng*h/mL)	AUC_{0-24h}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	R[a]	HES-to-MMF Ratio[b]
60	1	25600	426	0.75	248000	4140	N/A	39.0
60	5	22000	367	0.75	154000	2560	0.619	34.7
150	1	63300	422	2	592000	3950	N/A	27.2
150	5	37000	247	0.75	354000	2360	0.598	39.6
600	1	159000	266	2	1810000	3020	N/A	18.3
600	5	84300	141	2	1180000	1960	0.651	21.1

Values are mean (n=3).
[a] $AUC_{0-24h,\ Day\ 5}/AUC_{0-24h,\ Day\ 1}$.
[b] AUC_{0-24h} (HES)/AUC_{0-24h} (MMF).
Source: Report [AT-5108-27] (M 4.2.2.2-3), Appendix G Table 2.

3.2.3.3　DRF

ラットに DRF を連日投与したとき、すべての DRF 血漿中濃度は定量下限（LLOQ：50 ng/mL）未満であった。したがって、ラットで DRF の薬物動態パラメータは算出できなかった。

3.2.3.4　RDC-8439

DRF を連日投与したとき、Day 1 及び Day 5 における RDC-8439 の血漿中濃度は、60 mg/kg では投与 0.25 時間後、150 mg/kg では投与 0.25 及び 0.75 時間後にのみ定量可能であった。したがって、RDC-8439 の PK パラメータは限られたものしか算出できなかった。RDC-8439 の T_{max} は、すべての用量で Day 1 及び Day 5 で投与 0.25 時間後に認められた。DRF の投与量が 1：2.5：10 倍に増加すると、Day 1 の C_{max} は約 1：2.5：6.1 倍に増加し、Day 5 の C_{max} は約 1：1.5：7.1 倍に増加した。RDC-8439 の C_{max} は、DRF の用量増加に伴い増加した。血漿中濃度データが不十分であったため、全身曝露量（AUC_{0-24h}）に基づく用量比例性は確認できなかった。

ラットに DRF 600 mg/kg を 5 日間反復投与したときの RDC-8439 の R は 1.52 であり、RDC-8439 の蓄積性はわずかであることが示された。600 mg/kg 投与群の Day 1 及び Day 5 での MMF に対する RDC-8439 の AUC_{last} の比はそれぞれ 0.00824 及び 0.0221 であったことから、ラットでは MMF と比較して RDC-8439 の曝露量はわずかであることが示された。雄性 SD ラットに DRF を投与したときの RDC-8439 の PK パラメータの平均値を表 15 に示す。

表 15　雄性 SD ラットに DRF 60、150、及び 600 mg/kg を経口投与したときの RDC-8439 の薬物動態パラメータ（Day 1 及び Day 5）

Dose (mg/kg)	Day	C_{max} (ng/mL)	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	T_{max} (h)	AUC_{last} (ng*h/mL)	AUC_{last}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	R[a]	RDC-8439-to-MMF Ratio[b]
60	1	95.6	1.59	0.25	NA[c]	NA[c]	NA	NA
60	5	94.9	1.58	0.25	NA[c]	NA[c]	NA	NA
150	1	238	1.59	0.25	NA[c]	NA[c]	NA	NA
150	5	143	0.956	0.25	NA[c]	NA[c]	NA	NA
600	1	585	0.975	0.25	815	1.36	NA	0.00824
600	5	673	1.12	0.25	1240	2.06	1.52	0.0221

Values are mean (n=3).
[a] $AUC_{last, Day\ 5}/AUC_{last, Day\ 1}$.
[b] AUC_{last} (RDC-8439)/AUC_{last} (MMF).
[c] AUC not reported because of fewer than 3 consecutive quantifiable concentrations.
Source: Report [AT-5108-27] (M 4.2.2.2-3), Appendix G Table 3.

3.3　サル

3.3.1　サル 5 日間反復投与試験における薬物動態

［AT-5108-28 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-4）

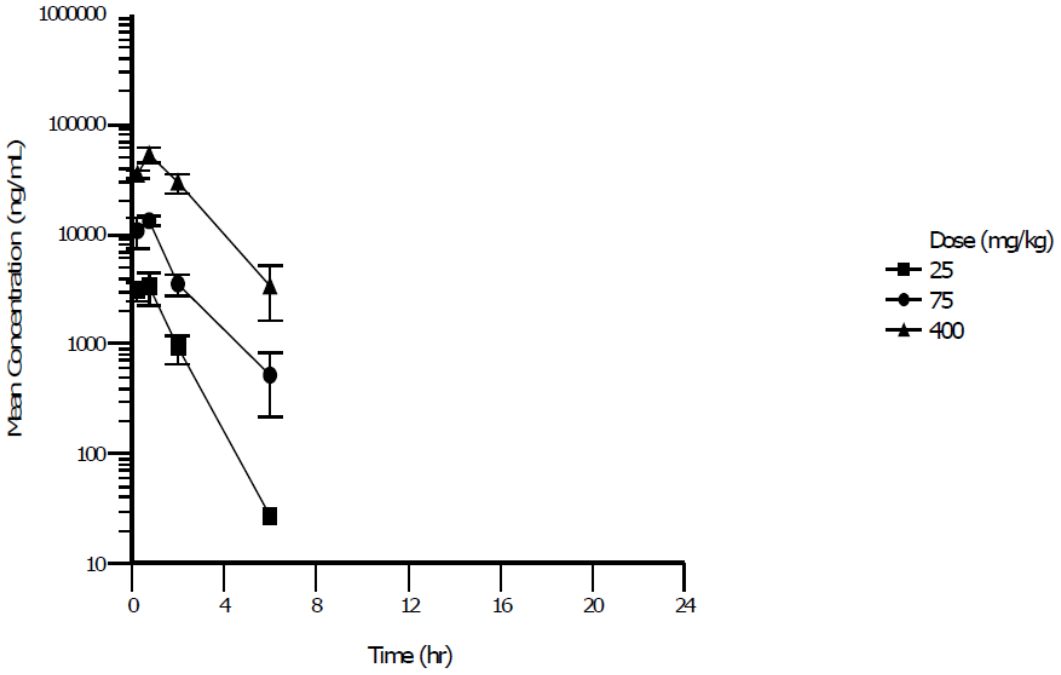
雄性カニクイザル（*Macaca fascicularis*）に DRF の 0、25、75、及び 400 mg/kg を 1 日 1 回、5 日間連日経口投与し DRF 及びその代謝物（MMF、HES 及び RDC-8439）の PK を検討した。血液試料を、Day 1 及び Day 5 の投与前、投与約 0.25、0.75、2、6、及び 24 時間後に、対照投与群では投与約 0.25 及び 6 時間後に採取した。血漿試料はバリデートされた LC-MS/MS 法を用いて分析し、PK パラメータを [redacted]（Version [redacted]）を用いて算出した。個々の分析対象物質の結果を以下に要約する。

3.3.1.1　MMF

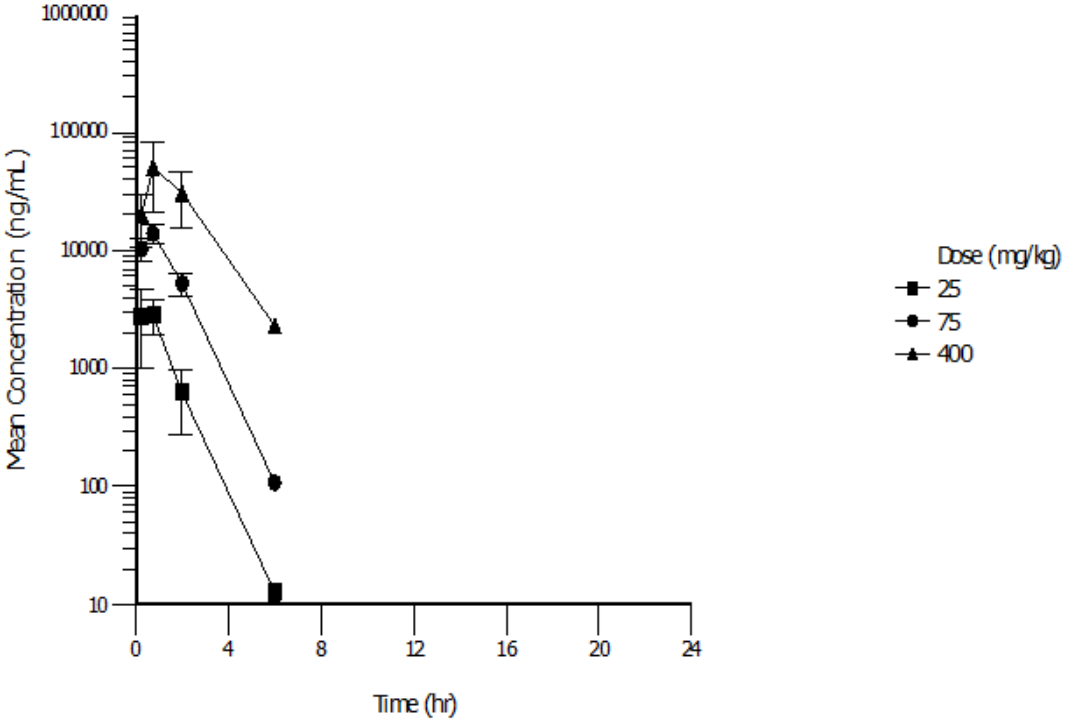
DRF の連日投与後、すべての用量で、Day 1 及び Day 5 の投与後 0.75 時間（中央値）に MMF は T_{max} に達した（T_{max}：0.25～2 時間）。Day 1 で、DRF の投与量を 1：3：16 倍に増加したとき、$AUC_{0\text{-}24h}$ は約 1：4.3：23.3 倍に増加し、C_{max} は約 1：4.0：15.3 倍に増加した。Day 5 では、DRF の投与量を 1：3：16 倍に増加したとき、$AUC_{0\text{-}24h}$ は約 1：5.9：32.8 倍に増加し、C_{max} は約 1：4.4：17.2 倍に増加した。サルでは、DRF の用量増加に伴い、MMF の全身曝露量（$AUC_{0\text{-}24h}$）及び C_{max} は用量依存的に増加した。MMF の R は、今回の DRF の用量で 0.736～1.02 であり、サルで MMF の蓄積性は認められなかった。雄性サルに DRF を投与したときの MMF の血漿中濃度-時間プロファイルを図 4 に、PK パラメータを表 16 に示す。

図 4　　雄性カニクイザルに DRF 25、75、及び 400 mg/kg を経口投与したときの MMF の血漿中濃度-時間プロファイル（Day 1 及び Day 5）

Day 1



▪ Day 5



Values are mean ± SD (n=5).
Source: Report [AT-5108-28] (M 4.2.2.2-4), Appendix H Figure 1.

表 16　雄性カニクイザルに DRF 25、75、及び 400 mg/kg を経口投与したときの MMF の薬物動態パラメータ（Day 1 及び Day 5）

Dose (mg/kg)	Day	C_{max} (ng/mL)	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	T_{max}[a] (h)	AUC_{0-24h} (ng*h/mL)	AUC_{0-24h}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	R[b]
25	1	3470	139	0.75	7500	300	NA
25	5	3140	125	0.75	5160	206	0.736
75	1	13800	184	0.75	31900	426	NA
75	5	13900	185	0.75	30600	408	0.917
400	1	53200	133	0.75	175000	438	NA
400	5	54000	135	0.75	169000	423	1.02

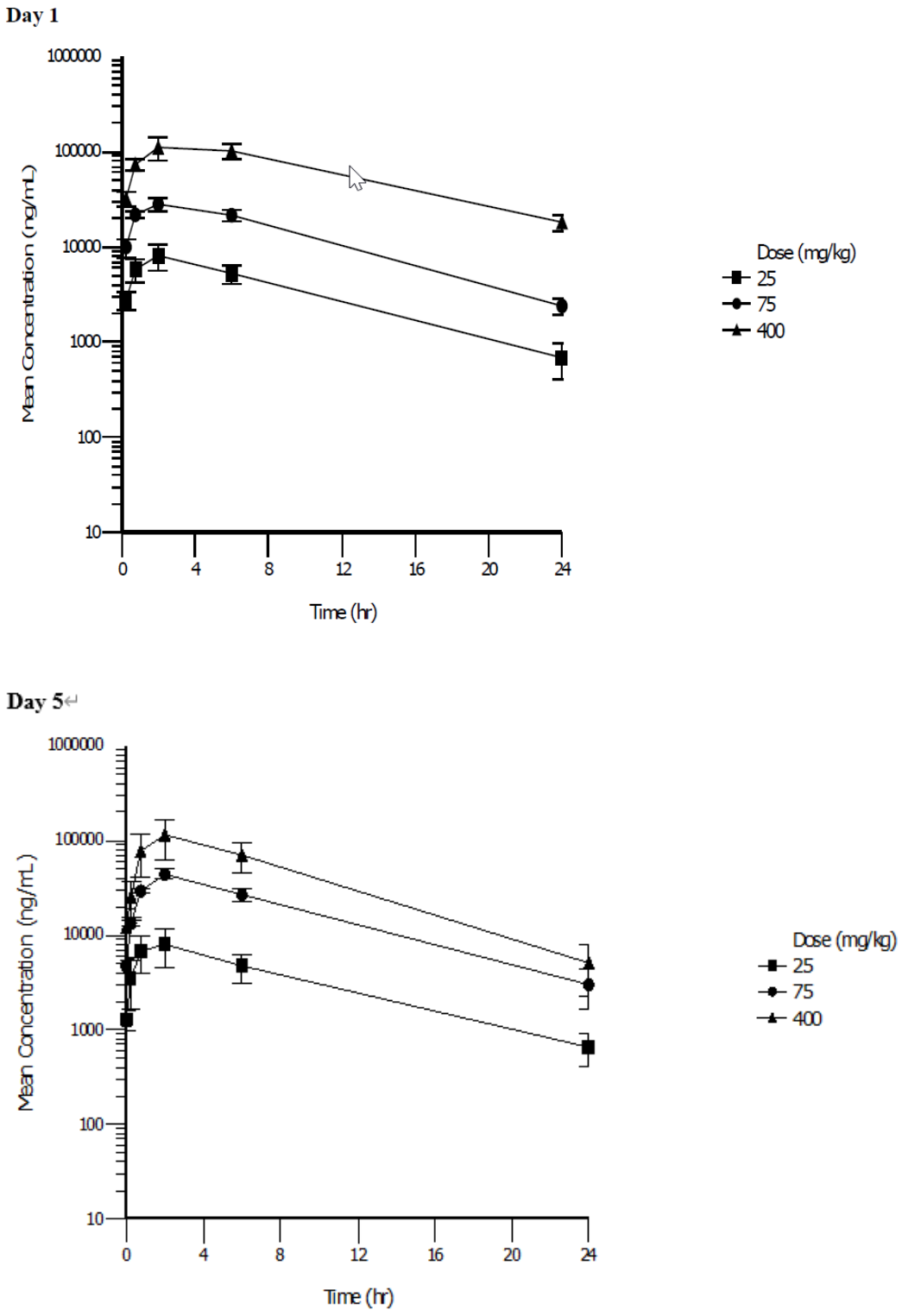
Values are mean (n=3 to 5) except T_{max}.
[a] Median value.
[b] $AUC_{0-24h, Day\ 5}/AUC_{0-24hr, Day\ 1}$.
Source: Report [AT-5108-28] (M 4.2.2.2-4), Appendix H Table 1.

3.3.1.2　HES

DRF を連日投与したとき、Day 1 及び Day 5 の投与後 2 時間（中央値）に T_{max} に達した（個々の動物の T_{max}：0.75～6 時間）。Day 1 で DRF の投与量を 1：3：16 倍に増加したとき、AUC_{0-24h} は約 1：3.9：18.0 倍に増加し、C_{max} は約 1：3.5：14.4 倍に増加した。Day 5 では DRF の投与量を 1：3：16 倍に増加したとき、AUC_{0-24h} は約 1：5.4：13.9 倍に増加し、C_{max} は約 1：5.2：13.6 倍に増加した。HES の全身曝露量（AUC_{0-24h}）及び C_{max} は、DRF の用量増加に伴い用量依存的に増加した。R の平均値は 0.757 から 1.35 であり、サルに 5 日間反復投与しても HES の蓄積はわずかであることが示された。

サルの Day 1 及び Day 5 での HES の血漿中曝露量は MMF の血漿中曝露量を上回っており、HES と MMF の曝露量比は、いずれの用量でも Day 1 で 9.55～13.6、Day 5 で 7.96～15.7 であった。雄性サルに DRF を投与したときの HES の血漿中濃度-時間プロファイル及び PK パラメータをそれぞれ図 5 及び表 17 に示す。

図 5　　雄性カニクイザルに DRF 25、75、及び 400 mg/kg を経口投与したときの HES 血漿中濃度-時間プロファイル（Day 1 及び Day 5）



Values are mean ± SD (n=5).
Source: Report [AT-5108-28] (M 4.2.2.2-4), Appendix H Figure 2.

表 17　雄性カニクイザルに DRF 25、75、及び 400 mg/kg を経口投与したときの HES 薬物動態パラメータ（Day 1 及び Day 5）

Dose (mg/kg)	Day	C_{max} (ng/mL)	C_{max}/Dose (kg*ng/ mL/mg)	T_{max}[a] (h)	AUC_{0-24h} (ng*h/ mL)	AUC_{0-24h}/Dose (ng*kg*h/ mL/mg)	R[b]	HES-to-MMF Ratio[c]
25	1	8120	325	2	91700	3670	NA	13.6
25	5	8580	343	2	87000	3480	0.943	15.5
75	1	28100	375	2	355000	4740	NA	11.1
75	5	44200	589	2	471000	6280	1.35	15.7
400	1	117000	291	2	1650000	4130	NA	9.55
400	5	117000	292	2	1210000	3010	0.757	7.96

values are mean (n=3 to 5) except T_{max}.
[a] Median.
[b] $AUC_{0-24h, Day 5}/AUC_{0-24h, Day 1}$.
[c] AUC_{0-24h} (HES)/AUC_{0-24h} (MMF).
Source: Report [AT-5108-28] (M 4.2.2.2-4), Appendix H Table 2.

3.3.1.3　DRF

血漿中 DRF 濃度は、75 mg/kg 投与の Day 1 の投与 2 時間後に定量可能な値（72.8 ng/mL）を示した雄 1 例を除き、すべて LLOQ 未満（＜50 ng/mL）であった。サルでの薬物動態パラメータは算出できなかった。

3.3.1.4　RDC-8439

DRF を連日投与したとき、25 mg/kg 投与では血漿中濃度 RDC-8439 は定量できず、75 mg/kg 投与の投与 0.25 及び 0.75 時間後にのみ定量可能であった。したがって、RDC-8439 の PK パラメータは限られたものしか算出できなかった。RDC-8439 の C_{max} は、75 mg/kg から 400 mg/kg への用量増加に伴って増加した。血漿中濃度データが不十分であったため、全身曝露量（AUC_{0-24h}）に基づく用量比例性は確認できなかった。400 mg/kg 投与の平均 R は 0.858 であり、サルでは RDC-8439 の蓄積性は認められなかった。

400 mg/kg 投与の Day 1 及び Day 5 での RDC-8439 の全身曝露量は、MMF の全身曝露量よりも低かった。400 mg/kg 投与の Day 1 及び Day 5 での MMF と RDC-8439 の AUC_{last} の比はそれぞれ 0.00543 及び 0.00419 であったことから、雄性サルでは MMF と比較して RDC-8439 の曝露量はわずかであることが示された。雄性サルに DRF を投与したときの RDC-8439 の PK パラメータの平均値を表 18 に示す。

表 18　雄性カニクイザルに DRF 25、75、及び 400 mg/kg を経口投与したときの RDC-8439 薬物動態パラメータ（Day 1 及び Day 5）

Dose (mg/kg)	**Day**	**C_{max} (ng/mL)**	**C_{max}/Dose (kg*ng/ mL/mg)**	**T_{max}[a] (h)**	**AUC_{last} (ng*h/mL)**	**AUC_{last}/Dose (ng*kg*h/ mL/mg)**	**R[b]**	**RDC-8439-to-MMF Ratio[c]**
25	1	0.00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25	5	0.00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
75	1	101	1.34	0.75	NA	NA	NA	NA
75	5	82.1	1.10	0.75	NA	NA	NA	NA
400	1	629	1.57	0.75	792	1.98	NA	0.00543
400	5	654	1.63	0.75	671	1.68	0.858	0.00419

values are mean (n=3 or 5).

[a] Median.

[b] $AUC_{last,\ Day\ 5}/AUC_{last,\ Day\ 1}$.

[c] AUC_{last} (RDC-8439)/AUC_{last} (MMF).

Source: Report [AT-5108-28] (M 4.2.2.2-4), Appendix H Table 3.

4 分布

Long-Evans（LE）ラットに promoiety 標識又は MMF 標識の[^{14}C]-DRF を経口投与し、QWBA により DRF 由来放射能の組織分布を測定した。MMF 標識[^{14}C]-DRF 由来の放射能は広範囲に分布し、眼窩内涙腺、脊髄、肝臓、ハーダー腺及び脳に主に分布した。MMF 標識[^{14}C]-DRF 由来の放射能はメラニン含有組織に多く分布したこと（組織/血漿比＞1）から、メラニンに結合する可能性が示唆された。promoiety 標識[^{14}C]-DRF に由来の放射能は広範囲に分布し、膀胱壁、腎髄質、大動脈、肝臓及び血液などの組織に主に分布した。promoiety 標識[^{14}C]-DRF を投与した動物では、脳の HES の蓄積は認められず、脳の HES 曝露量は末梢コンパートメントでの曝露量よりも低かった。

マウス、ラット、ウサギ、サル及びヒト血漿中の MMF 及び HES の血漿タンパク結合率を平衡透析法により測定した。MMF と HES の HSA と AAG への結合も測定した。マウス、ラット、ウサギ、サル、ヒト血漿及びヒト血漿成分（HSA 及び AAG）に対する MMF 及び HES の結合率は同程度で低かった（28%以下）。MMF 及び HES には濃度依存的なタンパク結合は認められなかった。

ヒト血漿及びヒト血漿成分（HSA 及び AAG）中の DRF 及び RDC-8439 のタンパク結合率を限外ろ過法により検討した。DRF のヒト血漿中でのタンパク結合率は中等度であった（90%未満）が、HSA 及び AAG への結合率は低かった（50%未満）。DRF のタンパク結合は濃度依存的ではなかった。RDC-8439 のヒト血漿及びそのタンパク質への結合はごくわずかであった（10%未満）。

ヒト全血又は赤血球を用いて MMF の赤血球移行を検討した。その結果、MMF の血漿に対する全血及び赤血球の分配係数はいずれも 1 よりも小さく、血液の細胞成分、特に赤血球への MMF の選択的な移行は起こらないことが示唆された。

4.1 組織分布

4.1.1 QWBA を用いた雄性 LE ラットにおける単回経口投与後の[^{14}C]-DRF 由来放射能の組織分布

［RPT03551 試験］（添付資料番号 4.2.2.3-1）

雄性の LE 有色ラットに 50 mg/kg（100 μCi/kg）の[^{14}C]-DRF を単回経口投与した後の組織分布を評価するために、QWBA を用いた in vivo 試験を実施した。promoiety 又は MMF のいずれかを[^{14}C]で標識した 2 つの異なる[^{14}C]-DRF 標識化合物を投与した。

MMF 標識[^{14}C]-DRF を投与したとき、大部分の組織で T_{max} は投与 1 時間後であった。MMF 標識[^{14}C]-DRF 由来の放射能は、眼窩内涙腺、脊髄、肝臓、ハーダー腺及び脳に多く分布した（組織／血漿比＞1）。脳での組織／血漿中放射能濃度比は 5.36 であり、脳からの消失速度は血漿中よりも遅かった。投与 672 時間後では、胸腺及び前立腺のみが定量限界未満（BLQ）であったが、他のすべての組織では組織／血漿中 AUC_{0-t} 比が 1.00 を上回っていた。さらに、ぶどう膜、有色皮膚、副腎髄質などのメラニン含有組織への放射能が多く分布していた（組織／血漿比＞1）ことから、MMF 標識[^{14} C]-DRF 由来の放射性物質はメラニンに結合する可能性があることが示唆され

た。

ラットに promoiety 標識[^{14}C]-DRF を投与したとき、大部分の組織で T_{max} は投与 1 時間後であった。promoiety 標識の DRF 由来放射能は、膀胱壁、腎髄質、大動脈、肝臓及び血液に多く分布した（組織／血漿比＞1）。脳での放射能の組織/血漿比は 0.6 であり、脳からの放射能の消失は血漿と同程度であった。消化管壁組織にも放射能の高い分布が認められ、曝露量は口腔粘膜の 163 µg-equiv*h/g から大腸壁の 896 µg-equiv*h/g の範囲であり、これは消化管内容物の放射能の影響によるものと考えられた。投与 72 時間後では、血液及び胃壁（腺）を除くすべての組織で BLQ であった。投与後 168 時間までにすべての組織で BLQ となった。

ラットの QWBA 試験では、脳での HES の蓄積は認められず、promoiety 標識[^{14}C]-DRF を投与した動物での組織／血漿中放射能比が 0.6 であり、脳での HES 曝露量は末梢コンパートメントよりも低かった。試験結果の概要を M2.6.5.5 表 7 に示す。

4.2 血漿タンパク結合

4.2.1 MMF 及び HES のタンパク結合

［RPT3644 試験］（添付資料番号 4.2.2.3-2）

雌雄の血漿を混ぜた CD-1 マウス、SD ラット、ニュージーランド白色種ウサギ、カニクイザル及びヒトの血漿での MMF 及び HES の血漿タンパク結合率を、平衡透析法で測定した。加えて、MMF 及び HES の HSA 及び AAG への結合も測定した。各動物種の血漿及びヒト血漿成分において MMF の 0.5、5、及び 50 µmol/L また、HES の 1、10、及び 100 µmol/L におけるタンパク結合率を検討した。

MMF は、検討したすべての動物種及びヒト血漿成分で、検討した濃度範囲での結合は認められないか、あるいは極めて低かった（28%以下）。HES のタンパク結合率は MMF と同程度であり、結合は認められないか、あるいは低かった（21%以下）。全体として、マウス、ラット、ウサギ、サル、ヒトの血漿及びヒト血漿成分の HSA 及び AAG での MMF 及び HES の結合率は低く、同程度であった。ヒト血漿及びヒト血漿成分（HSA 及び AAG）を含むいずれの動物種でも、MMF 及び HES に濃度依存的な結合は認められなかった。ヒト血漿での結果は、HSA と AAG の両方がヒト血漿で MMF の結合に関わることを示した。試験結果の概要は 19 に示す。

表 19 各動物種における MMF 及び HES の血漿タンパク結合率の要約

Species	MMF Test Concentration (µmol/L)	% Bound (Mean)	HES Test Concentration (µmol/L)	% Bound (Mean)
Mouse	0.5	0	1.0	0
	5.0	0	10	0
	50	0	100	1.80
Rat	0.5	0	1.0	0
	5.0	0	10	0
	50	0	100	0
Rabbit	0.5	2.87	1.0	0

Species	MMF Test Concentration (µmol/L)	% Bound (Mean)	HES Test Concentration (µmol/L)	% Bound (Mean)
	5.0	0	10	0
	50	3.89	100	0
Monkey	0.5	27.2	1.0	0
	5.0	15.2	10	7.75
	50	16.5	100	0
Human	0.5	25.4	1.0	0
	5.0	19.2	10	0
	50	15.9	100	0
Human, HSA	0.5	10.9	1.0	0.27
	5.0	12.1	10	3.75
	50	14.4	100	0
Human, AAG	0.5	7.73	1.0	20.6
	5.0	11.3	10	18.1
	50	11.2	100	0

values are mean (n=2 to 3).
Source: Report [Study RPT3644] (M 4.2.2.3-2), Table 4.

4.2.2 DRF 及び RDC-8439 のタンパク結合

［XS-0516 試験］（添付資料番号 4.2.2.3-3）

ヒト血漿、HSA 及び AAG での DRF 及び RDC-8439 の in vitro タンパク結合率を限外ろ過法により測定した。DRF 及び RDC-8439 の濃度は 0.5、5、及び 50 µmol/L とした。

ヒト血漿での DRF の in vitro タンパク結合率の平均値は、検討した濃度範囲（0.5～50 µmol/L）で 83.0%～87.4%であった。DRF の HSA に対する結合率は 35.1%～42.0%、AAG に対する結合率は 18.0%～37.4%であった。DRF のタンパク結合は濃度依存的ではなかった。ヒト血漿及びそのタンパク質への RDC-8439 の結合はごくわずかであった（10%未満）。試験結果は表 20 に示す。

表 20 ヒト血漿、HSA 及び AAG での DRF 及び RDC-8439 のタンパク結合

Matrix	DRF Test Concentration (µmol/L)	% Bound (Mean)	RDC-8439 Test Concentration (µmol/L)	% Bound (Mean)
Human plasma	0.5	87.4	0.5	0.0
	5	87.0	5	0.0
	50	83.0	50	0.0
HSA	0.5	42.0	0.5	0.0
	5	39.3	5	9.8
	50	35.1	50	0.0
AAG	0.5	29.0	0.5	0.0
	5	37.4	5	0.0
	50	18.0	50	0.0

values are mean (n=3).
Source: Report [XS-0516] (M 4.2.2.3-3), Table 1.

4.2.3 MMF の赤血球移行

［P00012-10-07 試験］（テクフィデラ申請資料）

ヒト全血又は赤血球を用いて MMF の赤血球移行を検討した。その結果、試験した 3 濃度（0.05、0.5、及び 5.0 μmol/L）の血漿に対する全血及び赤血球の移行係数はそれぞれ 0.83、0.74、及び 0.70、ならびに 0.62、0.41、及び 0.32 であり、いずれも 1 よりも小さく、血液の細胞成分、特に赤血球への MMF の選択的な移行は起こらないことが示唆された。

MMF の赤血球への移行が起こらないことから、MMF の in vivo 血漿中濃度は、測定された MMF の濃度値をより正確に反映するものと考えられる。

5 代謝

DRF の in vitro での代謝、並びに MMF、HES 及び RDC-8439 への変換を、ヒト肝及び腸 S9 画分、並びにヒト肝ミクロソームで評価した。DRF は肝及び腸 S9 画分で補酵素（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸：NADPH）の非存在下で迅速に MMF、HES 及び RDC-8439 へと変換されたことから、CYP 酵素の寄与はなく、その代謝にはヒドロラーゼ／エステラーゼが寄与している可能性が示唆された。ヒト肝ミクロソームでも同様の結果が認められた。DRF の MMF 及び HES への変換は腸 S9 画分で最大であった。ヒト肝ミクロソームで、HES は代謝的に安定であった（4%～8%の消失）。ヒト肝ミクロソームで、RDC-8439 は補酵素（NADPH）の存在下及び非存在下で速やかに代謝された（67%～100%）。

雄性 SD ラットに、MMF 標識又は promoiety[^{14}C]標識-DRF を単回経口投与したときの DRF の代謝物プロファイルを検討した。promoiety 標識[^{14}C]-DRF を投与したラット血漿試料では、HES が唯一の測定可能な放射能成分であり、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）ピークの 100%を占めた。MMF 標識[^{14}C]-DRF を投与したラット血漿試料では、グルコースが HPLC ピークの 82%～100%を占める主な放射性成分であった。ラット尿中では、HES（放射能の 75%）及び MMF（放射能の 12.33%）が、それぞれ promoiety 標識及び MMF 標識[^{14}C]-DRF の唯一の主代謝物であった。MMF はトリカルボン酸（TCA）回路を介して代謝され、CYP は関与しないと考えられた（109HV102 試験［テクフィデラ申請資料］、［Werdenberg 2003］）。推定代謝経路を図 6 に示す。

5.1 In vitro 代謝及び代謝物の検討

5.1.1 ヒト生体試料での DRF の in vitro 代謝

［P00012-10-06 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［P00012-04-12 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［XT[redacted]4113 試験］（添付資料番号 4.2.2.4-1）

ヒト生体試料による DRF の in vitro 代謝を評価した。DRF をヒト肝及び腸 S9 画分とインキュベーションし、MMF、HES 及び RDC-8439（すべて加水分解物）への変換を検討した。また、ヒト肝ミクロソームとインキュベーションし、MMF、HES 及び RDC-8439 の生成を検討した。HES 及び RDC-8439 の代謝安定性を、それぞれ CYP 及び UGT 酵素の補酵素である NADPH 及び UDPGA の存在下又は非存在下でヒト肝ミクロソームを用いて評価した。

5.1.1.1 ヒト肝及び腸 S9 画分との DRF の in vitro 代謝

DRF（1、10、及び 100 µmol/L）の代謝における加水分解経路を評価するため、補酵素非存在下でヒト肝 S9 画分及び腸 S9 画分とインキュベーションした。ヒト肝 S9 画分では、DRF の消失は 80～100%であったが、対照群の S9 画分タンパク質の非存在下の消失は 4%以下であった。HES 生成はインキュベーション時間及び基質濃度とともに増加したが、RDC-8439 及び MMF は初期に生成した後に減少した。

ヒト腸 S9 画分で DRF の消失は 98%～100%であり、対照群の S9 画分タンパク質非存在下の消失は 12%以下であった。HES 及び MMF の代謝物レベルは、初期に生成した後一定のままか、時

間及びタンパク質含量の増加に伴って減少した。DRF の MMF 及び HES への変換は腸 S9 画分で最大であった。概して、RDC-8439 の生成は肝 S9 画分で最大であった。検討した条件下では、腸 S9 インキュベーションによる RDC-8439 の生成は限定的であった。In vitro の結果より、DRF の代謝は、ヒドロラーゼ／エステラーゼがその役割を果たすことが示された。

5.1.1.2 ヒト肝ミクロソームとの DRF の in vitro 代謝

DRF（1、10、及び 100 μmol/L）を NADPH 添加のヒト肝ミクロソームとインキュベートし、MMF、HES 及び RDC-8439 の生成を評価した。ヒト肝ミクロソームでの基質の消失は 69%～100%であった。対照群のミクロソームタンパク質非存在下の基質損失は 2%以下であった。補酵素（NADPH）非存在下では、検討した DRF の濃度で基質損失は約 98%であった。補酵素の存在下及び非存在下で、DRF の代謝に明らかな差は認められなかった。ヒト肝ミクロソームでの DRF の代謝物 MMF、HES 及び RDC-8439 への変換は、NADPH の有無にかかわらず速やかに生じた。これらの結果は、ヒトの肝又は腸の S9 画分で認められた結果と同様であった。

5.1.1.3 MMF の血漿及びミクロソーム安定性

In vitro でのヒト血漿中の MMF の安定性を 0.5 μmol/L 及び 5.0 μmol/L の濃度で検討した。0.5 μmol/L 及び 5.0 μmol/L において、一次消失速度式で算出した MMF の半減期は 67.9 時間及び 72.3 時間（平均値）であった。この結果は、in vitro で MMF がヒト血漿中で安定であることを示している［P00012-10-06 試験］（テクフィデラ申請資料）。

ヒト肝ミクロソーム及び CYP2D6 又は CYP3A4 を発現させたヒト cDNA 発現ミクロソーム（ヒト B リンパ芽球様細胞株 AHH-1 より調製）を用いて、MMF の代謝安定性を検討した［P00012-04-12 試験］（テクフィデラ申請資料）。これらの系でインキュベーションしたとき、MMF は安定であった（濃度として 5%未満の減少）。これらデータは、MMF が CYP2D6 又は CYP3A4 又はヒトミクロソームの内在性酵素によっては、代謝されないことを示している。

5.1.1.4 ヒト肝ミクロソームでの HES 及び RDC-8439 の代謝安定性

プールしたヒト肝ミクロソームを用いて、HES（1 μmol/L）及び RDC-8439（1 μmol/L）の in vitro での代謝安定性を評価した。インキュベーションは、NADPH 及びウリジン二リン酸グルクロン酸（UDPGA）生成系の補酵素混合物の存在下及び非存在下で行った。HES は試験条件下で代謝的に安定であり、NADPH 及び UDPGA 補酵素混合物の存在下及び非存在下でインキュベーションしたとき、基質の損失はわずかであった（4%～8%）。RDC-8439 の消失は、NADPH 及び UDPGA 補酵素混合物の存在下では 67%～100%、補酵素混合物の非存在下では 100%であり、DRF の代謝で認められたものと同様であった。

5.2 In vivo 代謝物の検討

5.2.1 ラットに[^{14}C]-DRF を単回経口投与したときの ADME 及び代謝プロファイルの検討

［032357 試験］（添付資料番号 4.2.2.5-1）

この in vivo 試験では、雄性 SD ラットに MMF 標識又は promoiety 標識[^{14}C]-DRF を単回経口投与したときの DRF の薬物動態、マスバランス及び代謝物プロファイリングを評価した。代謝物検討の結果を以下の項に要約する。マスバランス及び薬物動態は、それぞれ 6.1 項及び 3.2.1 項に要約する。試験の詳細は M2.6.5 に記載した。

5.2.1.1 ラット血漿での代謝検討

ラットに MMF 標識[^{14}C]-DRF を投与したときの血漿では、溶出時間 4.46 分の未知の代謝物が主要な放射能成分であり、1、2、及び 4 時間の時点では採取可能な放射能の 100%、0.5 時間の時点では採取可能な放射能の 82%を占めた。なお、この代謝物は後にグルコースであることが確認されており［RPT03503 試験］（添付資料番号 4.2.2.4-2）、その結果は 5.2.2 項に記載した。MMF は投与後 0.5 時間の血漿試料のみに認められ、採取可能な放射能の 18%を占めた。投与 8 時間及び投与 24 時間後の血漿試料では、MMF 標識[^{14}C]-DRF を投与したラット血漿試料中に測定可能な放射能ピークは認められなかった。

promoiety 標識[^{14}C]-DRF を投与したラット血漿試料では、DRF 及び RDC-8439 は検出されず、すべての試料で測定可能な唯一の放射能成分は HES であり、ラットの HPLC ピークの 100%を占めた。

5.2.1.2 ラット尿での代謝検討

ラットに[^{14}C]-DRF を経口投与したとき、尿中（ケージ洗浄液を含む）に複数の代謝物が認められた。代謝物の大部分は微量（投与量に対する放射能の割合（%）：0.06%～10.22%）であり、ラット尿中に検出された主代謝物は、それぞれ MMF（MMF 標識[^{14}C]-DRF 投与量の 12.33%の放射能）及び HES（promoiety 標識[^{14}C]-DRF 投与量の 75%の放射能）のみであった。

5.2.2 雄性 LE ラットでの MMF 標識[^{14}C]-DRF の血漿代謝物同定

［RPT03503 試験］（添付資料番号 4.2.2.4-2）

この試験の目的は、5.2.1 項に記載したマスバランス試験で、MMF 標識[^{14}C]-DRF を投与したラット血漿中の溶出時間 4.46 分を示す放射性成分を同定することであった。本試験では、MMF 標識[^{14}C]-DRF 50 mg/kg（100 µCi/kg）を投与した雄性 LE ラットから採取した血漿試料（0.5 時間後）を使用した。

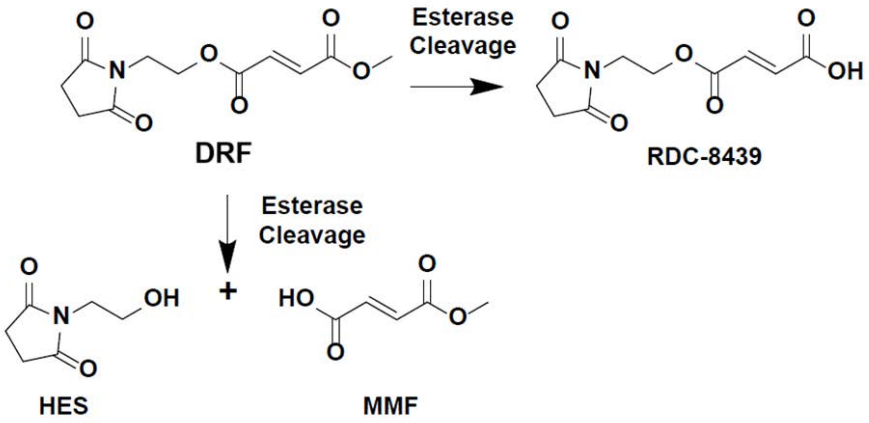
2 つの HPLC 条件下で[^{14}C]-D-グルコース標準物質と代謝物の溶出時間を比較することにより代謝物同定を行った。同定はさらにグルコースの化学誘導体化によって確認した。放射能の溶出時

間及び化学誘導体化の結果を[^{14}C]-D-グルコース標準物質と比較したところ、ラット血漿中の未知の放射性代謝物はグルコースであると同定された。

5.3 DRF の推定代謝経路

非臨床動物種を用いた in vitro 及び in vivo 試験に基づくと、図 6 に示すように、DRF はエステラーゼにより加水分解され、MMF、HES 及び RDC-8439 となる。In vitro 試験に基づくと、DRF は腸及び肝臓で MMF 及び HES に加水分解される。MMF のさらなる代謝は TCA 回路を介して起こり、CYP 酵素は関与しない（図 7）。血漿中 MMF の主代謝物はグルコース、クエン酸及びフマル酸であり、これらは DMF の開発時に同定された［P00012-07-03 試験］（テクフィデラ申請資料）。

図 6 DRF の推定生体内代謝経路



DRF = diroximel fumarate; HES = 2-hydroxyethyl succinimide; MMF = monomethyl fumarate.

6 排泄

DRF は代謝後、主に MMF、HES 及び RDC-8439 として消失する。ラットでは、MMF 標識[^{14}C]-DRF 由来の放射能は主に呼気中に（35.91%）、次いで尿中に排泄され（14.69%）、尿中の主代謝物は MMF であった（12.33%）。promoiety 標識[^{14}C]-DRF 投与では、放射能は尿中に排泄され（75.75%）、尿中の主代謝物は HES であった（75.16%）ことから、HES の主要排泄経路は腎クリアランスであることが示唆された［032357 試験］（添付資料番号 4.2.2.5-1）。RDC-8439 は一部の測定時点で検出されたのみであったことから、その消失は検討しなかった。

6.1 DRF の排泄

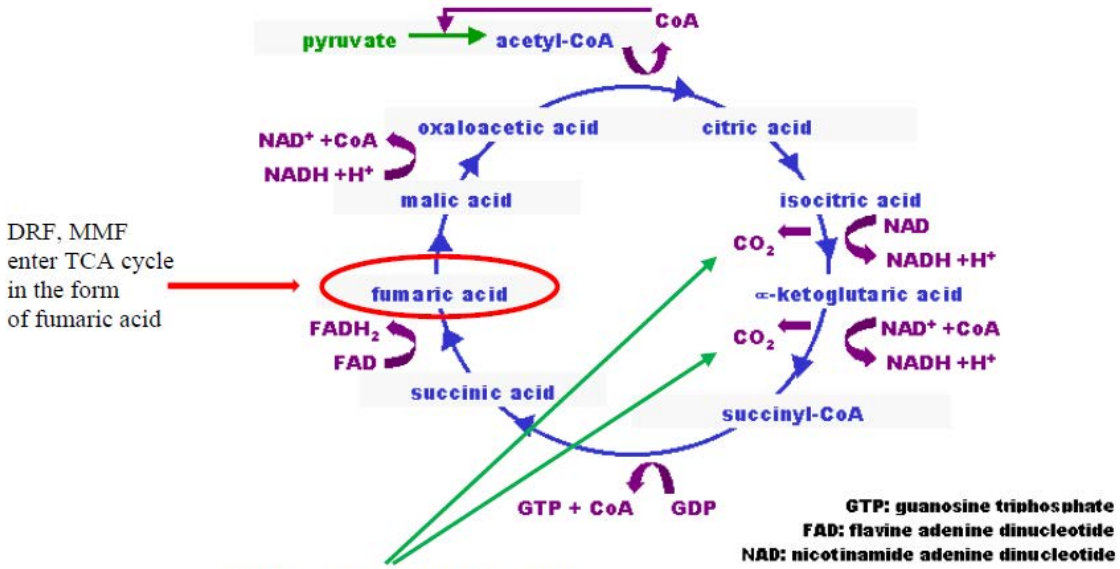
［032357 試験］（添付資料番号 4.2.2.5-1）、
［P00012-07-03 試験］（テクフィデラ申請資料）

In vitro 及び in vivo 試験に基づくと DRF の主要消失経路は代謝であった。DRF はヒドロラーゼ／エステラーゼによって代謝され、MMF、HES 及び RDC-8439 が生成する（5.3 項）。雄性 SD ラットで、MMF 標識及び promoiety 標識[^{14}C]-DRF の総放射能の平均 $t_{1/2}$ は、それぞれ 13.5 時間及び 3.44 時間であった［032357 試験］（添付資料番号 4.2.2.5-1）。非臨床試験の動物種では、DRF は血漿中で検出されなかったが、これは恐らく全身循環に入る前の代謝によるものであり、PK パラメータは推定できなかった。RDC-8439 は一部の測定時点で検出されたが、非臨床動物種での血漿中曝露量は非常に小さく（3.2.3 項及び 3.3.1 項）、消失相が測定できないため推定 $t_{1/2}$ 値は算出していない。

ラットに MMF 標識[^{14}C]-DRF を経口投与したところ、投与した放射能の大部分（35.91%）が呼気中に排泄され、これは DMF で認められている（図 7［P00012-07-03 試験］［テクフィデラ申請資料］）。尿、ケージ洗浄液及び糞中には、それぞれ投与量の 14.69%、7.12%、及び 1.84%が含まれた。尿中の主代謝物は MMF であり、投与量の 12.33%を占めた。

ラットに promoiety 標識[^{14}C]-DRF を経口投与したとき、投与量の大部分は尿中（75.75%）及びケージ洗浄液中（19.88%）に排泄された。ケージ洗浄液を含め、尿中で同定された主代謝物（75.16%）は HES であり、HES の主な消失経路は腎クリアランスであることが示された。ラットで、promoiety 標識[^{14}C]-DRF 排泄への糞及び呼気の寄与はわずかであった（＜2%）。

図 7　　TCA 回路への MMF の流入と CO_2 の産生



Production of CO2 in the TCA cycle

• Source: Krebs Cycle/TCA Cycle Public Domain

7 薬物動態学的薬物相互作用

DRF、HES 及び RDC-8439 の薬物相互作用の可能性を評価するため、種々の CYP 及びトランスポーターを用いて in vitro 試験を行った。CYP 分子種（バキュロウイルス感染昆虫細胞から調製したミクロソームに CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4 を発現）に対する MMF の阻害作用の IC_{50} 値はいずれも 50 μmol/L 超であり、MMF による CYP 阻害は認められないことが示された［PD05-28 試験］（テクフィデラ申請資料）。ヒト肝ミクロソームの 8 種の分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4）に対する MMF の阻害作用の IC_{50} 値は 50 μmol/L 超であり、MMF が CYP を介した DDI を引き起こす可能性は低いことも示唆された［PD00012-10-03 試験］（テクフィデラ申請資料）。

HES 及び RDC-8439 は、in vitro で CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 の直接的又は時間依存的阻害を示さなかった［XT[redacted]A014 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-1）。DRF は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4/5 の時間又は代謝依存的阻害をほとんど、又は全く示さず、CYP2C8 の代謝依存的阻害を、ほとんど又は全く示さなかった。DRF（200 μmol/L）による CYP2C8 の時間依存的阻害を示す複数のデータがみられた［XT[redacted]5135 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-4）。しかし、ヒト血漿中では DRF が検出されていないことを考えあわせると、HES、RDC-8439 及び DRF が CYP を阻害（直接、時間及び代謝依存的）することにより、臨床で薬物相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

ヒト肝細胞に MMF を曝露しても、検討した MMF のすべての濃度で、CYP1A2、CYP2B6 又は CYP3A に関連する酵素活性の in vitro における顕著な誘導は認められなかった。2 μmol/L MMF では CYP2C9 又は CYP2C19 活性の in vitro における誘導は認められなかった。20 μmol/L MMF による 1 例のドナー肝細胞及び 200 μmol/L MMF による 2 例のドナー肝細胞で、CYP2C9 の誘導が認められた。又、20 又は 200 μmol/L の MMF に曝露した 1 例のドナー肝細胞で、CYP2C19 の誘導が認められた［P00012-04-14 試験］（テクフィデラ申請資料）。

健常被験者に DRF を 420 mg を投与したときの MMF の最高血漿中濃度の中央値は、約 13 μmol/L であった［ALK8700-001 試験］。さらに、MMF の代謝に CYP 系は関与せず、TCA 回路を介して代謝される［109HV102 試験］（テクフィデラ申請資料）。したがって、この誘導プロファイルに臨床的意義はないと考えられる。DRF（最大 300 μmol/L）、HES（最大 5000 μmol/L）及び RDC-8439（最大 300 μmol/L）によるヒト肝細胞での CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4 活性又は CYP mRNA の誘導は認められなかった。HES の治療濃度を上回る 5000 μmol/L（ヒトでの定常状態の C_{max} は約 76 μmol/L）の濃度では、3 例のうち 1 例のドナーで、CYP2B6（2.34 倍の増加）及び CYP3A4（2.12 倍の増加）の mRNA レベルに 2.0 倍を超える変化が認められたが、臨床的に重要ではないと判断した［XT[redacted]3079 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-2）。

MMF、HES、DRF 及び RDC-8439 は in vitro で P-gp の基質でも誘導剤でもなかった。ヒト P-gp を発現させた LLC-PK_1 細胞単層膜で、MMF（0.01～300 μmol/L）はヒト P-gp を介したジゴキシンの輸送を阻害しなかった［P00012-06-03 試験］（テクフィデラ申請資料）。MMF は 5 μmol/L 及び 50 μmol/L で P-gp を阻害しなかった［P00012-10-04 試験］（テクフィデラ申請資料）。最大 100 μmol/L の MMF で 3 日間曝露したヒト肝細胞で、P-gp mRNA の誘導は認められなかった［P00012-06-05 試験］（テクフィデラ申請資料）。HES 及び RDC-8439 は P-gp の阻害剤ではなかった。しかし、

DRF（100 µmol/L 又は 25.5 µg/mL）は in vitro で、P-gp を 41%阻害したことから、in vivo での相互作用の可能性が示唆された［XT[redacted]8097 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-1）。この可能性を確認するため、臨床 DDI 試験を実施したところ、DRF は in vivo で P-gp を阻害しないことが示された［M2.7.2、ALK8700-A107 試験］。HES 及び DRF は in vitro で乳癌耐性タンパク質（BCRP）の基質ではなかった。RDC-8439 は BCRP の基質である可能性があった。しかし、透過性が低く、実際の排出比の変動が大きいことから、これらの結果は in vivo ではほとんど影響を及ぼさないと考えられる。DRF 及び HES は BCRP の阻害剤ではなかった。

MMF は BCRP、有機アニオン輸送ポリペプチド（OATP）1B1、OATP1B3、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3、有機カチオントランスポーター（OCT）1、OCT2、多剤・毒性排出トランスポーター（MATE）1、MATE2-K のいずれに対しても阻害剤ではなかった［P00012-12-03 試験］（テクフィデラ申請資料）；［P00012-12-05 試験］（テクフィデラ申請資料）；［P00012-12-06 試験］（テクフィデラ申請資料）。HES は MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 又は OCT2 の基質又は阻害剤ではなかった。また、HES は in vitro で OATP1B1、OATP1B3 及び OCT1 を阻害しなかった［Alkermes.01-[redacted]20[redacted] 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-3）。

以上の結果から、CYP 又はトランスポーターとの相互作用に起因する MMF、HES、DRF 及び RDC-8439 との臨床における DDI の可能性は低いことが示された。

In vitro の CYP 阻害試験及び誘導試験、又は P-gp 試験で、MMF との DDI の可能性は確認されなかった（テクフィデラ申請資料）。

7.1 CYP を介した相互作用

CYP に対する DRF、MMF、RDC-8439 及び HES の阻害作用及び誘導作用を検討した in vitro 試験の一覧を表 21 に示し、試験の概要を以下に示す。

表 21 DRF、MMF、RDC-8439 及び HES による in vitro CYP 阻害及び誘導

Study Type	**Test Article: Concentration**	**Study No. (Location in CTD) (Laboratory)**
CYP Inhibition		
Inhibitory potential of DMF and methyl hydrogen fumarate (MMF) toward human hepatic microsomal cytochrome P450 isoenzymes	MMF: 0, 0.1, 0.5, 2, 10, or 50 µmol/L	P00012-04-13* ([redacted])
Evaluation of inhibition of the catalytic activities of human recombinant cytochromes P450 2B6 and 2C8 by MMF and DMF	MMF: 0, 0.01, 0.03, 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100, or 300 µmol/L	P00012-06-04* ([redacted])
Evaluation of in vitro cytochrome P450 inhibition profile of DMF and MMF using high-throughput inhibitor screening kits	MMF: 0, 0.391, 0.781, 1.563, 3.125, 6.25, 12.5, 25, or 50 µmol/L	PD05-28* (Biogen Idec, Inc.)
Reversible CYP inhibition potential of monomethyl fumarate determined in vitro using human liver microsomes	MMF: 0.0076, 0.023, 0.068, 0.205, 0.617, 1.85, 5.55, 16.7, or 50 µmol/L	P00012-10-03* (Biogen Idec, Inc.)

Study Type	Test Article: Concentration	Study No. (Location in CTD) (Laboratory)
Evaluation of the potential of HES and RDC-8439 for direct and time-dependent inhibition of specific substrates for CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5 in human liver microsomes	HES: 0, 0.2, 0.6, 2, 6, 20, 60, or 200 µmol/L RDC-8439: 0, 0.2, 0.6, 2, 6, 20, 60, or 200 µmol/L	XT[redacted]A014 (4.2.2.6-1) ([redacted])
Evaluation of the potential of DRF for direct, time-dependent, and metabolism-dependent inhibition of specific substrates for CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP3A4/5 in human liver microsomes	DRF: 0, 0.2, 0.6, 2, 6, 20, 60, or 200 µmol/L	XT[redacted]5135 (4.2.2.6-4) ([redacted])
CYP Induction		
Methyl hydrogen fumarate: evaluation of CYP450 induction using primary cultures of human hepatocytes	MMF: 2, 20, or 200 µmol/L	P00012-04-14* ([redacted])
Evaluation of induction potential of cytochrome P450 2B6, 2C8, and P-gp by MMF in cultured human hepatocytes	MMF: 0, 1, 10, or 100 µmol/L	P00012-06-05* ([redacted])
Evaluation of the potential for DRF, RDC-8439, and HES to induce CYP1A2, CYP2B6, or CYP3A4/5 in cultured human hepatocytes	DRF: 0.3, 1, 3, 6, 10, 30, 100, or 300 µmol/L RDC-8439: 0.3, 1, 3, 6, 10, 30, 100, or 300 µmol/L HES: 0.5, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, or 5000 µmol/L	XT[redacted]3079 (4.2.2.6-2) ([redacted])

* These studies have been submitted and evaluated in the J-NDA filing of Tecfidera.

7.1.1 MMF の in vitro CYP 阻害能の評価

［P00012-04-13 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［P00012-06-04 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［PD05-28 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［P00012-10-03 試験］（テクフィデラ申請資料）

ヒト cDNA 発現系及び代表的基質（CYP2D6：ブフラロール、CYP3A4：テストステロン及びミダゾラム）を用いて、MMF による CYP2D6 及び CYP3A4 の阻害能を検討した［P00012-04-13 試験］。3 種のアイソザイム選択的 CYP 活性、すなわち CYP2D6 ではブフラロール 1’-ヒドロキシラーゼ、CYP3A4 ではミダゾラム 1’-ヒドロキシラーゼ及びテストステロン 6β-ヒドロキシラーゼに対する MMF 及び DMF の 50%阻害濃度（IC_{50} 値）を表 22 に示す。これらの結果より、MMF は上記の CYP 活性に対して阻害作用がないことが示された［P00012-04-13 試験］（テクフィデラ申請資料）。

表 22　ミクロソームの cDNA 発現 CYP 活性を用いた MMF 及び DMF によるアイソザイム選択的 CYP 活性の阻害能

P450 Isoenzyme	Activity Measured	IC_{50} (μmol/L)	
		MMF	DMF
CYP2D6	Bufuralol 1'-hydroxylase	NA	27.6
CYP3A4	Testosterone 6β-hydroxylase	NA	NA
CYP3A4	Midazolam 1'-hydroxylase	NA	NA

NA: No significant inhibition was observed. IC_{50} value cannot be determined.
Source: [P00012-04-13]（テクフィデラ申請資料）, Table 1.

ヒト cDNA 発現 CYP2B6 及び CYP2C8 に対する MMF の阻害能を評価した［P00012-06-04 試験］（テクフィデラ申請資料）。CYP2B6 と CYP2C8 に対する代表的基質／阻害剤として、それぞれブプロピオン／トラニルシプロミンとパクリタキセル／ケルセチンを使用した。MMF による CYP2B6 又は CYP2C8 の阻害は、これらの実験で用いた最高濃度では認められなかった（IC_{50} 値＞300 μmol/L）。なお、トラニルシプロミンは 25 μmol/L で CYP2B6 活性を 73%～77%阻害し、ケルセチンは 30 μmol/L で CYP2C8 活性を 96%～99%阻害した。

ヒト組換え CYP 分子種の CYP1A2、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4（バキュロウイルス感染昆虫細胞由来のミクロソームで発現）に対する MMF の阻害能を検討し、IC_{50} 値を算出した［PD05-28 試験］（テクフィデラ申請資料）。結果、これらの CYP 分子種に対する IC_{50} 値はすべて 50 μmol/L 超であったことから、MMF は CYP 阻害剤ではないことが示唆された。

ヒト肝ミクロソーム及び CYP 分子種特異的薬物プローブ基質を用いて、MMF の CYP 阻害能評価のための追加試験を実施した。結果は表 23 に示す。8 つの分子種（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4）に対する阻害作用の IC_{50} 値は 50 μmol/L 超であり、MMF が CYP を介した DDI を引き起こす可能性は低いことが示唆された［P00012-10-03 試験］（テクフィデラ申請資料）。

表 23　In vitro における MMF による CYP 阻害能［P00012-10-03 試験］（テクフィデラ申請資料）

	IC_{50} [μmol/L]	
isoform/substrate	MMF	Positive Control
1A2/tacrine	> 50	2.52
2B6/bupropion	> 50	0.11
2C8/amodiaquine	> 50	0.59
2C9/tolbutamide	> 50	0.32
2C19/(S)-mephenytoin	> 50	0.56
2D6/dextromethorphan	> 50	0.06
2E1/chlorzoxazone	> 50	39.5
3A4/midazolam	> 50	0.09
3A4/testosterone	> 50	0.041

Source: [P00012-10-03]（テクフィデラ申請資料）, Table 6.

7.1.2 ヒト肝ミクロソームでの HES 及び RDC-8439 の in vitro CYP 阻害能の評価

［XT[redacted]A014 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-1）

この in vitro 試験で、ヒト肝ミクロソームを用いて、HES 及び RDC-8439 による主要 CYP 酵素（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5）への直接及び時間依存的阻害能を評価した。各被験物質が併用薬の代謝を阻害する可能性を確認するため、7 種の代表的な CYP 基質のカクテルを用いてインキュベーションした。HES 及び RDC-84390 を 0.2～200 μmol/L の 7 濃度で評価した。試験の詳細は M2.6.5.15 に要約する。

ヒト肝ミクロソームを用いたこの試験では、HES 及び RDC-8439 は、CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A4/5 で検討した最高濃度（200 μmol/L）まで、CYP への直接阻害も、時間依存的阻害も示さなかった。50%阻害濃度は 200 μmol/L 超と推定され、HES 及び RDC-8439 による直接的又は時間依存的な CYP 阻害により臨床で DDI が生じる可能性は低いことが示唆された。

7.1.3 ヒト肝ミクロソームでの DRF の in vitro CYP 阻害能の評価

［XT[redacted]5135 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-4）

この in vitro 試験で、DRF のヒト肝ミクロソームでの主な CYP 酵素（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5）に対する阻害能を評価した。

DRF が、CYP 活性に対して直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害を示すかどうかを、ヒト肝ミクロソームを用いて評価した。ミクロソームを DRF（0.2～200 μmol/L の 7 濃度）の存在下又は非存在下で、マーカー基質とインキュベーションした。時間依存的阻害と代謝依存的阻害を区別するために、マーカー基質とのインキュベーション前に、DRF を NADPH 生成系の有無でそれぞれ 30 分間ヒト肝ミクロソームとプレインキュベーションした。すべての実験に陽性対照を含めた。試験の詳細は M2.6.5.15 に要約する。

本試験の実験条件下で、検討した最高濃度の 200 μmol/L まで、DRF による直接阻害はほとんど、又は全く認められなかった（阻害率：CYP 分子種全体で 3.3%～14%）。

NADPH 非存在下でヒト肝ミクロソームを DRF と 30 分間プレインキュベーションしたとき、DRF による CYP2C8 の時間依存的阻害が以下のように認められた。すなわち、プレインキュベーションしなかった試料に比べて、NADPH 非存在下で 30 分間プレインキュベーションした試料で、200 μmol/L DRF による阻害が 20%増加した。CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 又は CYP3A4/5 の時間又は代謝依存的阻害は、ほとんど又は全く認められなかった。NADPH 存在下又は非存在下でヒト肝ミクロソームと DRF を 30 分間プレインキュベーションしたとき、阻害率の増加が 10%未満であったことから、DRF による CYP2C8 の代謝依存的阻害はほとんど認められないことが示唆された。

ヒトで DRF の血漿中濃度が測定可能な濃度ではないことと併せて考えると、これらの結果は、DRF による CYP 阻害（直接的、時間依存的、代謝依存的）による臨床での DDI の可能性は低いことを示唆している。

7.1.4 MMF の in vitro CYP 誘導能の評価

［P00012-04-14 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［P00012-06-05 試験］（テクフィデラ申請資料）

ヒト新鮮肝細胞を用いて、MMF の CYP1A2、CYP2B6、CYP2C9、CYP2C19 及び CYP3A4 活性の誘導能を評価した［P00012-04-14 試験］（テクフィデラ申請資料）。3 例のドナー肝細胞を市販供給業者から入手した。肝細胞を MMF、代表的な誘導剤又は溶媒対照に 72 時間曝露した。適切なプローブ基質を 1 時間インキュベーションし、蛍光検出又は LC-MS/MS を用いて関連する代謝物の生成速度を測定し、CYP アイソザイム活性を評価した。

ヒト肝細胞を MMF 又は代表的な誘導剤に曝露したときの平均誘導倍率を表 24 に示す。

ヒト肝細胞を MMF に曝露しても、検討したすべての MMF 濃度で CYP1A2、CYP2B6 又は CYP3A4 に関連する酵素活性の in vitro 試験で顕著な誘導は認められなかった。In vitro で、2 µmol/L の MMF による CYP2C9 及び CYP2C19 活性の誘導は認められなかった。20 µmol/L MMF 曝露による 1 例のドナー肝細胞及び 200 µmol/L MMF による曝露の 2 例のドナー肝細胞で、CYP2C9 活性誘導の可能性が認められた。20 又は 200 µmol/L の MMF の曝露により、1 例のドナー肝細胞で CYP2C19 誘導の可能性が認められた［P00012-04-14 試験］（テクフィデラ申請資料）。多発性硬化症患者の MMF の 1 日の最高血漿中濃度の中央値は、DRF の 420 mg 1 日 1 回投与で約 13 µmol/L であった［ALK8700-001 試験］。さらに、MMF の代謝は TCA 回路を介して行われ［109HV102 試験］（テクフィデラ申請資料）、CYP 系の関与はない。したがって、この誘導プロファイルに臨床的意義はないと考えられる。

表 24　　ヒト肝細胞での MMF 又は代表的な誘導剤による誘導倍率［P00012-04-14 試験］（テクフィデラ申請資料）

CYP Isoform	Inducer	Concentration of Inducer (μmol/L)	Fold Induction		
			Donor 1	Donor 2	Donor 3
CYP1A2	MMF	2	1.0	1.0	0.9
	MMF	20	0.9	1.0	1.0
	MMF	200	0.9	0.7	0.6
	Omeprazole	25	3.1	8.2	21
CYP2B6	MMF	2	0.8	1.0	0.8
	MMF	20	1.2	0.9	1.0
	MMF	200	2.7	1.8	2.6
	PB	1000	8.8	6.3	11
CYP2C9	MMF	2	0.9	0.9	1.1
	MMF	20	0.8	1.0	1.4
	MMF	200	1.0	1.6	1.6
	RIF	50	2.3	2.0	1.8
CYP2C19	MMF	2	0.8	1.1	1.1
	MMF	20	1.4	1.2	1.3
	MMF	200	1.4	1.6	1.8
	RIF	50	18	2.5	5.1
CYP3A4	MMF	2	1.0	1.1	0.9
	MMF	20	0.9	0.8	1.0
	MMF	200	0.5	0.6	0.6
	RIF	50	2.6	4.7	4.4

Note: Fold induction is calculated relative to an appropriate solvent control. Typically, an induction response of > 40% of that of the typical inducer is considered significant [Bjornsson 2003]. PB: Phenobarbital, RIF: Rifanpicin.
Source: [P00012-04-14]（テクフィデラ申請資料）, Table 2, 4, 6, 8, 10.

3 例のドナーの初代培養ヒト肝細胞を用いて、MMF による P-gp、CYP2B6 及び CYP2C8 の誘導能並びに肝毒性が検討された［P00012-06-05 試験］（テクフィデラ申請資料）。一濃度の陽性対照誘導剤及び溶媒対照についても試験した。

結果は、MMF が肝細胞生存率に測定可能な影響を及ぼさないことを示した［P00012-06-05 試験］（テクフィデラ申請資料）。CYP 誘導を検討するために、CYP2B6 の S-メフェニトイン N-デメチル化活性を MMF の存在下で試験し、陽性対照のフェノバルビタール（PB）と比較した。MMF は 100 μmol/L までの濃度で CYP2B6 活性を誘導しなかった（表 25）。

表 25　3 例のドナーから採取した肝細胞での CYP2B6 による S-メフェニトイン N-デメチル化活性に対する MMF 及び陽性対照 PB の作用［P00012-06-05 試験］（テクフィデラ申請資料）

Donor	Treatment	Activity (pmol/mg/min)	Fold Induction	Induction as % of Positive Control*
All three donors	0 µmol/L (DMSO)-vehicle	0.97 ± 0.28	-	-
	1 µmol/L MMF	1.0 ± 0.44	1.0 ± 0.14	NA
	10 µmol/L MMF	1.1 ± 0.81	1.0 ± 0.47	NA
	100 µmol/L MMF	1.3 ± 0.77	1.2 ± 0.51	1.9
	Positive controls			
	PBS-vehicle	0.87 ± 0.39	-	-
	2000 µmol/L PB	18 ± 13	19 ± 12	-

Data are the mean from 3 separate wells in each group.
*% of positive control = (Activity of test article-Activity of DMSO)/(Activity of PB-Activity of PBS) × 100, not applicable if the enzyme activity in test article-treated cells was lower than that from solvent vehicle control-treated cells.
Source: [P00012-06-05]（テクフィデラ申請資料）, Table 4.

CYP2B6 と CYP2C8 の mRNA 発現の測定も、誘導を同定するため用いた。PB とリファンピシン（RIF）を CYP2C8 誘導の陽性対照として用いた。リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を用いて mRNA 発現を測定した。100 µmol/L までの MMF を 3 日間曝露した肝細胞では、CYP2C8 の誘導は認められなかった［P00012-06-05 試験］（テクフィデラ申請資料）（ 26 及び表 27）。100 µmol/L の MMF を曝露した 1 例のドナーの肝細胞で CYP2B6 mRNA 発現に対する中程度の誘導を示したが、その誘導レベルは in vivo で誘導可能性を示す基準［Bjornsson 2003］を満たさなかった。

表 26　3 例のドナーから採取した肝細胞での CYP2B6 mRNA 発現に対する MMF 及び陽性対照 PB の作用

Donor	Treatment	Fold Induction	Induction as % of Positive Control*
All three donors	1 µmol/L MMF	1.1 ± 0.74	0.5
	10 µmol/L MMF	1.3 ± 1.4	1.5
	100 µmol/L MMF	1.8 ± 1.9	4.0
	Positive controls		
	2000 µmol/L PB	21 ± 2.8	-

Data are the mean from three separate wells in each group.
*% of positive control = (Fold of test article-1)/(Fold of PB-1) × 100, not applicable if the fold induction in test article was < 1.
Source: [P00012-06-05]（テクフィデラ申請資料）, Table 5.

表 27　3 例のドナーから採取した肝細胞での CYP2C8 mRNA 発現に対する MMF 並びに陽性対照 PB 及び RIF の作用

Donor	Treatment	Fold Induction	Induction as % of Positive Control*
All three donors	1 µmol/L MMF	1.32 ± 0.17	6.0
	10 µmol/L MMF	1.19 ± 0.62	3.6
	100 µmol/L MMF	1.1 ± 0.59	1.9
	Positive controls		
	2000 µmol/L PB	6.3 ± 6.8	-
	20 µmol/L RIF	1.5 ± 0.58	-

Data are the mean from three separate wells in each group.
*% of positive control = (Fold of test article-1)/(Fold of PB-1) × 100, not applicable if the fold induction in test article was < 1.
Source: [P00012-06-05]（テクフィデラ申請資料）, Table 6.

7.1.5　培養ヒト肝細胞での DRF、RDC-8439 及び HES による in vitro CYP 誘導能の評価

［XT[redacted]3079 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-2）

この in vitro 試験の目的は、凍結ヒト肝細胞の初代培養細胞を用いて、DRF、RDC-8439 及び HES による CYP（CYP1A2、CYP2B6 及び CYP3A4）誘導能を評価することであった。3 つのヒト凍結肝細胞の初代培養細胞に、DMSO（溶媒対照）、フルマゼニル（25 µmol/L、陰性対照）、各 8 濃度の DRF（範囲：0.3～300 µmol/L）、RDC-8439（範囲：0.3～300 µmol/L）又は HES（範囲：0.5～5000 µmol/L）を 1 日 1 回、連続 3 日間処理した。試験には適切な陽性対照を用いた。CYP 酵素活性及び mRNA を分析し、試験した CYP 分子種の誘導能を評価した。

陽性対照の CYP 誘導剤では CYP 活性及び mRNA 発現が予想どおり増加したことから、試験系が適切に機能していることが確認された（M2.6.5.15）。

DRF（最大 300 µmol/L）、RDC-8439（最大 300 µmol/L）又は HES（最大 5000 µmol/L）を処理したヒト肝細胞では、CYP1A2 及び CYP2B6 活性並びに mRNA レベルに対する影響は認められなかった（変化量が 2.0 倍未満かつ陽性対照の 20%未満）。例外として、ドナー1 例で、HES の治療濃度を上回る 5000 µmol/L（ヒトでの定常状態の C_{max} は約 76 µmol/L）の濃度により CYP2B6 の mRNA レベルに影響が認められた（2.34 倍の増加）が、これは臨床的に重要ではないと考えられた。

DRF（最大 300 µmol/L）、RDC-8439（最大 300 µmol/L）又は HES（最大 5000 µmol/L）を処理したヒト肝細胞では、CYP3A4/5 活性に対する影響は認められなかった（変化量が 2.0 倍未満かつ陽性対照の 20%未満）が、例外として、ドナー1 例で、検討した最高濃度である 300 µmol/L の DRF により、溶媒対照と比較して CYP3A4/5 活性が 58.4%低下した。

同様に、少数の例外を除き、ヒト肝細胞で、DRF（最大 100 µmol/L）、RDC-8439（最大 300 µmol/L）又は HES（最大 5000 µmol/L）による CYP3A4 mRNA レベルへの影響は認められなかった（変化量が 2.0 倍未満かつ陽性対照の 20%未満）。検討した最高濃度である 300 µmol/L の DRF を処理し

たすべて 3 つの培養細胞で、溶媒対照と比較して 70%超の減少が認められた。ドナー1 例では、検討した最高濃度の 300 μmol/L の RDC-8439 で溶媒対照と比較して 50%を超える減少が認められた。別のドナーでは、検討した最高濃度の 5000 μmol/L の HES で、CYP3A4 mRNA レベルの 2.12 倍の増加が認められたが、この増加は陽性対照のリファンピシンのわずか 1.17%であった。

DRF（最大 300 μmol/L）、RDC-8439（最大 300 μmol/L）及び HES（最大 5000 μmol/L）は培養ヒト肝細胞で CYP1A2、CYP2B6 又は CYP3A4 活性又は mRNA レベルの誘導を起こさなかった。HES の治療濃度を上回る 5000 μmol/L（ヒトでの定常状態の C_{max} は約 76 μmol/L）の濃度で試験した 3 培養細胞のうち 1 つで、CYP2B6（2.34 倍の増加）及び CYP3A4（2.12 倍の増加）の mRNA レベルに 2.0 倍を超える変化が認められたが、これは臨床的に重要ではないと考えられた。ヒト血漿で DRF が測定可能な濃度ではないことや一部の時点でのみ RDC-8439 濃度がヒト血漿中に検出されることを併せて考えると、これらの結果は、DRF、HES 及び RDC-8439 による CYP 誘導に起因する臨床での DDI の可能性は低いことを示唆している。

7.2 トランスポーターを介した相互作用

薬物動態に関連する取込み及び排出トランスポーターの基質及び阻害能を評価するため、DRF、MMF、RDC-8439 及び HES を用いた一連の in vitro 試験を実施した。DRF とその代謝物 MMF、HES 及び RDC-8439 の P-gp 誘導能も測定した。試験の概要を以下に示す。

7.2.1 MMF の in vitro P-gp 阻害試験

［P00012-06-03 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［P00012-10-04 試験］（テクフィデラ申請資料）

ヒト P-gp 発現 LLC-PK_1 細胞単層を用いて、MMF が P-gp を介したジゴキシン輸送を阻害する可能性について検討した［P00012-06-03 試験］（テクフィデラ申請資料）。

[^{3}H]-ジゴキシンの双方向輸送を、ドナーチャンバーとレシーブチャンバーで MMF の濃度を増加させて測定した。陽性対照としてケトコナゾールを用い、ルシファーイエローの透過で単層の完全性を確認した。MMF（0.01～300 μmol/L）は、LLC-PK_1 細胞で、ヒト P-gp を介したジゴキシンの輸送を阻害しなかった［P00012-06-03 試験］（テクフィデラ申請資料）。

MMF の P-gp 阻害能を検討するため、Caco-2 細胞を用いた追加試験を実施した。陽性対照の PSC833、DMF 又は MMF の存在下又は非存在下でのジゴキシンの双方向輸送について、Caco-2 単層膜でのジゴキシンのみかけの透過性を算出することにより評価した。この試験の結果から、5 μmol/L 及び 50 μmol/L の MMF は P-gp を阻害しないことが示唆された［P00012-10-04 試験］（テクフィデラ申請資料）。

7.2.2 DRF、HES 及び RDC-8439 の in vitro P-gp 基質及び阻害能の評価

［XT[redacted]8097 試験］（添付資料番号 4.2.2.2-1）

P-gp に対する DRF、HES 及び RDC-8439 阻害能は、プローブ基質であるジゴキシンの Caco-2 細胞単層膜（10 及び 100 µmol/L）の双方向膜透過性を測定することにより評価した。実験条件及び実験結果の概要は M2.6.5.3 に示す。

DRF は 100 µmol/L（25.5 µg/mL）の濃度でのみ P-gp を介した輸送を 41%阻害した。P-gp を介した輸送に対する阻害は、RDC-8439（100 µmol/L で 10.6%阻害）及び HES（100 µmol/L で 2.3%阻害）では認められなかった。これらの結果を踏まえ、臨床での DDI 試験を実施した結果、DRF は in vivo で P-gp を阻害しないことが示唆された（M2.7.2.2.9）。

Caco-2 細胞での DRF、HES 及び RDC-8439（10 µmol/L）の双方向透過性を測定し、これらが Caco-2 細胞を通して能動輸送されるかどうかを検討した。3 つの被験物質すべての排出比は＜2 及び＞0.5 であったことから、DRF、HES 及び RDC-8439 は Caco-2 細胞を通して能動輸送されず、P-gp の基質ではないことが示された。

7.2.3 MMF の in vitro P-gp 誘導能の評価

［P00012-06-05 試験］（テクフィデラ申請資料）

P00012-06-05 試験で、3 例のドナーから得た肝臓の初代培養ヒト肝細胞を用いて、MMF による P-gp の誘導能を検討した。一濃度の陽性対照誘導剤及び溶媒対照についても試験した。誘導能を評価するために、P-gp の mRNA 発現を測定した。PB と RIF を P-gp 誘導の陽性対照として用いた。RT-PCR を用いて mRNA 発現を測定した。100 µmol/L までの濃度の MMF を 3 日間曝露した肝細胞では、P-gp の誘導は認められなかった（表 28）。

表 28　MMF 及び陽性対照（PB 及び RIF）が 3 ドナーの肝細胞における P-gp mRNA 発現に及ぼす影響

Donor	Treatment	Fold Induction	Induction as % of Positive Control*
All 3 donors	1 µmol/L MMF	1.0 ± 0.43	NA
	10 µmol/L MMF	1.3 ± 0.53	18
	100 µmol/L MMF	1.1 ± 0.54	5.9
	Positive controls		
	2000 µmol/L PB	2.7 ± 0.82	-
	20 µmol/L RIF	1.3 ± 0.47	-

Data are the mean from 3 separate wells in each group.
*% of positive control = (Fold of test article-1)/(Fold of PB-1) × 100, not applicable if the fold induction in test article was < 1.
Source: [P00012-06-05]（テクフィデラ申請資料）, Table 7.

7.2.4 DRF、HES 及び RDC-8439 の in vitro P-gp 誘導能の評価

［[redacted]ALKRP1R3 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-5）

ヒト結腸腺癌細胞株（LS-180）を用いて、DRF（0.3、3、及び 10 μmol/L）及びその代謝物である HES（100、1000、及び 5000 μmol/L）並びに RDC-8439（0.1、10、及び 30 μmol/L）の P-gp 誘導能を評価するため、in vitro 試験を実施した。

細胞の忍容性、P-gp 活性及び P-gp mRNA 発現に及ぼす影響を被験物質及び適切な対照薬を用いて評価した。DRF（3 μmol/L）、HES（100、1000、及び 5000 μmol/L）及び RDC-8439（0.1、10、及び 30 μmol/L）によるホルマザン生成物の吸光度は、被験物質を含まない処理（陰性対照）の 75%超であり、これらの処理により細胞の生存率には影響を及ぼさないことが示された。ホルマザン生成物の吸光度変化により DRF では、30 及び 300 μmol/L で細胞に対する細胞毒性の可能性が、観察されたため、その後の実験では、0.3、3、及び 10 μmol/L の DRF 濃度を使用した。試験の詳細は M2.6.5.15 に要約する。

P-gp 取り込み基質である rhodamine 123 の取り込みは、3 つの被験物質処理群すべてで陰性対照の 85%超であった。rhodamine 123 の取り込みが 15%未満の減少であったことから、3 つの被験物質処理による P-gp の機能活性の誘導はないことが示唆された。さらに、3 つの被験物質処理群いずれでも P-gp mRNA 発現の増加は認められず、DRF（最大 10 μmol/L）、HES（最大 5000 μmol/L）及び RDC-8439（最大 30 μmol/L）による P-gp の誘導はないことが示された。陽性対照であるリトナビルにより P-gp mRNA 発現が溶媒処理群と比較して約 6 倍の増加がみられたことから、試験系が適切に機能していることが確認された。

7.2.5 MMF のトランスポーターin vitro 阻害試験

［P00012-12-03 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［P00012-12-05 試験］（テクフィデラ申請資料）、
［P00012-12-06 試験］（テクフィデラ申請資料）

この in vitro 試験の目的は、MMF とヒト排出（ATP 結合カセット）トランスポーターBCRP 並びにヒト取り込み溶質輸送体トランスポーター OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K との相互作用を評価することであった。

In vitro で検討した濃度範囲は、最近の FDA 及び EMA ガイドラインの勧告に基づいて選択した。各トランスポーターの機能は、代表的阻害剤の存在下でプローブ基質の取り込みにより確認した。MMF は 100 μmol/L までの濃度で検討した。試験の詳細は M2.6.5.15 に要約する。

7.2.5.1 BCRP 阻害試験

MMF（5 μmol/L 及び 50 μmol/L）は小胞輸送体アッセイで BCRP を介したエストロン-3-硫酸の蓄積を阻害しなかったことから、BCRP の阻害剤ではないと考えられた［P00012-12-06 試験］（テクフィデラ申請資料）。

7.2.5.2 トランスポーターOATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1及び MATE2-K の阻害試験

MMF（100 µmol/L まで）は、OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K に対する特異的プローブ基質輸送を阻害せず、検討したトランスポーターの阻害剤ではないと考えられた［P00012-12-03 試験］（テクフィデラ申請資料）；［P00012-12-05 試験］（テクフィデラ申請資料）。

7.2.6 DRF、HES 及び RDC-8439 による in vitro トランスポーター基質試験及び阻害試験

［Alkermes-01-[redacted]20[redacted] 試験］（添付資料番号 4.2.2.6-3）

この in vitro 試験の目的は、DRF 及びその代謝物（HES 及び RDC-8439）とヒト排出（ATP 結合カセット）トランスポーターBCRP 並びにヒト取り込み溶質輸送体トランスポーターMATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 との相互作用を評価することであった（表 29）。

表 29 DRF、HES 及び RDC-8439 のトランスポーター試験の要約

Test Article	Assay Type	Transporter	Concentration Tested
DRF	Substrate in monolayer	BCRP	1 and 10 µmol/L
	VT inhibition	BCRP	
HES	Substrate in monolayer	BCRP	50 and 5000 µmol/L
	VT inhibition	BCRP	
	Uptake inhibition in cell suspension	MATE1	
		MATE2-K	
		OAT1	
		OAT3	
		OATP1B1	
		OATP1B3	
		OCT1	
		OCT2	
	Uptake substrate in cell suspension	MATE1	
		MATE2-K	
		OAT1	
		OAT3	
		OCT2	
RDC-8439	Substrate in monolayer	BCRP	0.5, 5, and 10 µmol/L
	VT inhibition	BCRP	0.5 and 5 µmol/L

Source: Report [Alkermes-01-[redacted]20[redacted]], Table 4.

In vitro 試験の濃度範囲は、最近の FDA 及び EMA のガイドラインの勧告に基づき、HES の総 C_{max} 値が約 77 µmol/L、RDC-8439 の総 C_{max} 値が 0.1 µmol/L であることを考慮に入れ選択した。DRF は 10 µmol/L までの濃度で検討した。その他の試験の詳細は M2.6.5.15 に要約する。

7.2.6.1 BCRP 基質試験

Madin-Darby イヌ腎臓 II-BCRP（MDCKII-BCRP）細胞での双方向膜透過性測定では、HES は頂端膜側から基底膜側（A-B）方向より B-A 方向でより高い透過性を示し、MDCKII-BCRP 細胞で HES の能動輸送の可能性を示した。最も高い実際の排出比は 5000 µmol/L で 6.06 であったが、この影響は 50 µmol/L では認められず、高濃度の被験物質では通常、能動輸送の飽和が認められることとは対照的であった。この試験の追加確認試験では、5000 µmol/L の HES で認められた排出の結果に再現性はなく、MDCKII-BCRP 細胞では能動輸送は認められなかった。さらに、排出比は特異的 BCRP 阻害剤（Ko143）の非存在下と存在下で非常に類似しており、2 未満であった。3 回目の反復実験でこれらの結果が確認されたことから、HES は BCRP の基質ではないことが示唆された（M2.6.5.15）。

DRF（1 及び 10 µmol/L）は、MDCKII-BCRP 細胞で B-A 及び A-B 方向への透過性が同程度であったことから、MDCKII-BCRP 細胞で能動輸送を受けていないことが示された（M2.6.5.15）。その結果、DRF は BCRP の基質ではないことが示唆された（M2.6.5.15）。

MDCKII-BCRP 双方向膜透過性試験では、最初に RDC-8439 を 0.5 及び 5 µmol/L の濃度で試験したが、生体試料分析感度が低いため、結果は得られなかった。その結果、RDC-8439 濃度を 10 µmol/L に増加した。RDC-8439 は MDCKII-BCRP 細胞で A-B 方向よりも B-A 方向に高い透過性を示し、能動輸送を示した。観察された最も高い実際の排出比は 1.81 ± 1.60 であり、これは BCRP 阻害剤、Ko143 の存在下で 0.56 ± 0.92 に低下した。その結果、RDC-8439 は BCRP の基質である可能性が高いことが示された。しかし、透過性が低く、実際の排出比の変動が大きいため、これらの結果が in vivo で及ぼす影響はわずかであると考えられた。

7.2.6.2 BCRP 阻害試験

HES（5000 µmol/L）、DRF（10 µmol/L）及び RDC-8439（5 µmol/L）は小胞輸送体アッセイで BCRP によるエストロン-3-硫酸の蓄積を阻害しなかった（M2.6.5.15）ことから、BCRP の阻害剤ではないことが示された。

7.2.6.3 トランスポーター MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 の阻害試験

HES（50 及び 5000 µmol/L）は、MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3、OATP1B1、OATP1B3、OCT1 及び OCT2 に対する特異的プローブ基質輸送を阻害せず（M2.6.5.15）、検討したトランスポーターの阻害剤ではないことが示された。

7.2.6.4 トランスポーター MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 及び OCT2 の基質試験

HES（50 及び 5000 µmol/L）の蓄積は、MATE1、MATE2-K、OAT3 及び OCT2 トランスポーター発現細胞と対照細胞で同程度であり（トランスポーター特異的蓄積倍率＜2）、HES は検討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。

HES 5000 µmol/L による OAT1 発現細胞での累積係数は 2.88 であり、能動輸送が示唆された。

しかし、この影響は 50 μmol/L の低濃度では認められなかった。阻害剤の存在下での OAT1 の追加試験で、5000 μmol/L で認められた蓄積の倍率には再現性がなく、阻害剤は HES の蓄積に影響を及ぼさなかったことから、HES は OAT1 の基質ではないことが示唆された（M2.6.5.15）。

8 その他の薬物動態試験

8.1 [^{14}C]-DRF の経口投与によるヒト線量予測

［RPT03551 試験］（添付資料番号 4.2.2.3-1）

Promoiety 標識及び MMF 標識[^{14}C]-DRF 経口投与後の[^{14}C]-DRF 由来放射能のヒトでの吸収を推定するために、線量推定解析を行った。解析にはラット QWBA 試験データを用いた。

この線量推定解析に基づくと、100 μCi の promoiety 標識[^{14}C]-DRF を男性被験者に単回経口投与した場合、全身への ED は約 13 mrem（0.13 mSv）となり、100 μCi の MMF 標識[^{14}C]-DRF を単回経口投与した場合、全身への ED は約 39 mrem（0.39 mSv）となる。同じ試験の男性被験者に promoiety 標識[^{14}C]-DRF と MMF 標識[^{14}C]-DRF の両方を投与した場合（各標識につき 100 μCi の用量を 1 回投与）、米国在住者では、全身への ED は約 52 mrem（0.52 mSv）、背景平均的な全身への ED（ラドンを含む）である約 300 mrem/年の約 1/6 と考えられる。さらに、100 μCi の promoiety 標識[^{14}C]-DRF と 100 μCi の MMF 標識[^{14}C]-DRF を同一試験で併用投与しても、21 Code of Federal Regulations 361.1 に規定されている単回投与の限界値を十分に下回り、EMA ガイダンスとも一致する。また、0.52 mSv という ED は、放射線防護令に引用されている［The Swiss Federal Council 1994］5 mSv/年の患者 1 人あたりの吸収 ED の約 1/10 であり、国際放射線防護委員会［(ICRP) 1991］によれば、リスクカテゴリーIIa（1 mSv 未満）に分類される。

放射能を用いるヒトでのマスバランス試験では、ED は可能な限り通常 1 mSv 未満（リスクカテゴリーIIa 以下）に維持する。この解析に基づき、100 μCi の promoiety 標識[^{14}C]-DRF と 100 μCi の MMF 標識[^{14}C]-DRF（合計 200 μCi）の併用でヒトに単回経口投与すると、ヒトで許容可能な吸収線量限度である 100 mrem 又は 1 mSv の範囲内の放射能曝露になると予想される。ヒトを対象としたマスバランス試験では、100 μCi の promoiety 標識[^{14}C]を使用したが［M2.7.2、ALK8700-A105 試験］、これは推奨 ED である 1 mSv 未満を十分に下回っている。

9 考察及び結論

ラット及びサルの反復投与試験で、DRF を 1 日 1 回経口投与したときの DRF、MMF、HES 及び DRF の PK 特性を評価した。DRF、MMF、HES 及び RDC-8439 の濃度は LC-MS/MS を用いて測定した。GLP 適用の安全性薬理試験／毒性試験でのすべての TK 評価では、ガイダンスで概説されている原則（FDA guidance［Center for Drug Evaluation and Research］2001、EMA［EMEA/CHMP/EWP/192217/2009］2011）に従い、バリデートされた LC-MS/MS を使用した。ADME 試験及びヒト生体試料を用いた in vitro 試験から得られた主な結論を以下に示す。MMF の代謝、排泄及び薬物相互作用データはテクフィデラ申請資料に記載されている。

吸収

ラット及びカニクイザルに DRF を単回又は反復経口投与したときの MMF、HES、RDC-8439 及び DRF の全身吸収を検討した。DRF は in vivo で速やかに MMF（主活性代謝物）及び HES（主不活性代謝物）に変換された。ラット及びサルでは、DRF の測定可能な血漿中濃度は観察されず、一部の時点のみで RDC-8439 濃度が検出された。したがって、DRF の PK 解析は MMF 及び HES を用いた。Caco-2 細胞からの in vitro 膜透過性データにより、透過性の順番は HES＞DRF＞RDC-8439 であり、HES に比べ DRF と RDC-8439 の吸収性は低いことが示された。ラット及びサルで、DRF の経口投与量の増加に伴い、MMF 及び HES の全身曝露量及び C_{max} の用量依存的な増加が認められた。ラット及びサルに DRF を 1 日 1 回 5 日間投与したとき、すべての用量で MMF 及び HES の蓄積性は認められないか、あるいはわずかであった（R＜1.5）。ヒトと同様に、ラット及びサルでも HES の血漿中曝露量は MMF と比較して大きかった（範囲：7.16～39.6 倍）。ラットに MMF 及び promoiety 標識[^{14}C]-DRF を単回経口投与したときの TRA による PK は速やかな吸収を示し、平均 C_{max} は同程度であった。

分布

LE ラットの QWBA 試験では、MMF 標識[^{14}C]-DRF 由来の放射能は脳を含む多くの組織及びメラニン含有組織に主に広範囲に分布したことから、メラニンへの結合の可能性が示唆された。promoiety 標識[^{14}C]-DRF 投与群では、脳での HES 蓄積の証拠はなく、TRA に基づくと脳での HES 曝露量は末梢コンパートメントよりも低かった。マウス、ラット、ウサギ、サル、ヒト血漿及びヒト血漿成分（HSA 及び AAG）での MMF 及び HES のタンパク結合率は低かった（28%以下）。MMF 及び HES に濃度依存的なタンパク結合は認められなかった。

MMF の血漿に対する全血及び赤血球の分配係数はいずれも 1 よりも小さく、血液の細胞成分、特に赤血球への MMF の選択的な移行は起こらないことが示唆された。

代謝

ヒト肝及び腸 S9 画分で、DRF は補酵素の非存在下、MMF、HES 及び RDC-8439 に速やかに変換されたことから、CYP 酵素の寄与はなく、代謝にはヒドロラーゼ／エステラーゼが寄与する可能性が示唆された。非臨床及び臨床の両方で測定可能なレベルの DRF が in vivo で検出されていないことから、DRF は代謝物へ速やかに変換することをさらに確認した。ヒト肝ミクロソームで、

HES は代謝的に安定であった（4%～8%の消失）が、RDC-8439 は速やかに代謝された（67%～100%）。これらの結果は、in vivo で RDC-8439 は一部の時点で測定されたのみであるが高濃度の HES がみられた in vivo での観察とよく一致する。

ラットでの promoiety 標識[^{14}C]-DRF による in vivo 代謝物試験では、HES が唯一の測定可能な放射性代謝物であることが示された。MMF 標識[^{14}C]-DRF を投与したラット血漿試料では、グルコースが主要な放射性成分であり、これは DMF の既知の結果と一致している［P00012-07-03 試験］（テクフィデラ申請資料）。ラット尿中では、HES（放射能の 75%）及び MMF（放射能の 12.33%）が、それぞれ promoiety 標識及び MMF 標識[^{14}C]-DRF の唯一の主代謝物であった。

排泄

DRF は主に代謝により MMF、HES 及び RDC-8439 となり消失する。ラットでは、MMF 標識[^{14}C]-DRF 由来放射能は、主に呼気（35.91%）から、次いで尿（14.69%）から排泄され、尿中の主代謝物は MMF であった（12.33%）。promoiety 標識[^{14}C]-DRF 投与群では、放射能は尿中に排泄され（75.75%）、尿中の主代謝物は HES であった（75.16%）ことから、主排泄経路は腎クリアランスであることが示唆された。

薬物動態学的薬物相互作用

DRF、MMF、HES 及び RDC-8439 による DDI の可能性を評価するため、一連の in vitro 試験を実施した。ヒト肝ミクロソームで、HES、DRF 及び RDC-8439 による主要な CYP 酵素（CYP1A2、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP3A4/5）への直接的、時間依存的及び代謝依存的阻害は認められなかった。

DRF、MMF、RDC-8439 及び HES によるヒト肝細胞での CYP1A2、CYP2B6 又は CYP3A4 活性及び CYP mRNA の誘導は認められなかった。1 例のドナー肝細胞で、治療濃度を超える HES 濃度（5000 μmol/L）により、CYP2B6（2.34 倍の増加）及び CYP3A4（2.12 倍の増加）mRNA に 2 倍を超える変化（増加）が認められた。この増加は濃度非依存的であるか、又は適切な陽性対照の 20%未満であった。これらの結果は、ヒトで予想される HES、DRF 及び RDC-8439 の曝露量と比較して考察する必要がある。

MMF、HES、DRF 及び RDC-8439 は in vitro で P-gp の基質でも誘導剤でもなかった。MMF、HES 及び RDC-8439 は P-gp の阻害剤ではなかったが、DRF は in vitro で P-gp を阻害した。確認のため実施した DDI の臨床試験では、DRF は in vivo で P-gp を阻害しないことが示された。HES 及び DRF は in vitro で BCRP の基質ではなかった。HES は MATE1、MATE2-K、OAT1、OAT3 及び OCT2 の基質でも阻害剤でもなかった。RDC-8439 は BCRP の基質である可能性が高いが、透過性が低く、実際の排出比の変動が大きいため、これらの結果より in vivo で及ぼす影響はわずかであると考えられた。DRF と HES は BCRP の阻害剤ではなかった。

全体として、これらの結果から、CYP 又はトランスポーターとの相互作用による MMF、HES、DRF 及び RDC-8439 の臨床での DDI の可能性は低いことが示唆された。

HES/MMF 比

多発性硬化症患者での定常状態の C_{max} 及び AUC は、HES の方が MMF よりも 6.6 倍及び 21 倍高かった（M2.7.2.2.10.1）。これらの比は、非臨床試験で認められた値と類似している。ラットを用いたすべての試験（[LSC17-033 試験]（添付資料番号 4.2.2.2-2）；[AT-5108-27 試験]（添付資料番号 4.2.2.2-3）；[AT-5108-15 試験]（添付資料番号 4.2.3.2-5）、表 30）及びすべての用量を通じて、HES と MMF の平均 C_{max} の比（HES/MMF 比）は 2.6～5.7 であった。平均値 AUC の比は 11.7～39.6 であった。非臨床動物種での HES 曝露量の詳細は M2.6.6 に示す。

表 30　　ラットでの HES/MMF の C_{max} 及び AUC 比

Study No.	**DRF Dose (mg/kg)**	**C_{max} Ratio (HES/MMF)**	**AUC Ratio (HES/MMF)**	**Comments**
LSC17-033	354	3.47	11.71	5-day repeat-dose TK study in female Lewis rats
AT-5108-27	60_Day 1	3.50	38.93	5-day repeat-dose TK study in SD rats
	60_Day 5	3.77	34.76	
	150_Day 1	4.69	27.28	
	150_Day 5	4.17	39.64	
	600_Day 1	4.29	18.28	
	600_Day 5	5.70	21.11	
AT-5108-15	50_Day 182	3.76	19.57	26-week oral dose TK study of DRF in SD rats
	100_Day 182	2.63	31.07	
	300_Day 182	4.18	34.82	
		Average C_{max} ratio (± SD)	Average AUC ratio (± SD)	Across rat studies and across dose levels
		4.02 (± 0.82)	27.72 (± 9.63)	

10 図表

概要表（M2.6.5）を参照のこと。

11 参考文献

(ICRP) ICoRP. Radiological Protection in Biomedical Research. Ann ICRP. 1991;22(3): 1-28.

Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, et al. The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. Drug Metab Dispos. 2003;31(7): 815-32.

European Medicines Agency. Guideline on bioanalytical method validation. EMEA/CHMP/EWP/192217/2009. July 21, 2011.

Fluhler E, Vazvaei F, Singhal P, Vinck P, Li W, Bhatt J, et al. Repeat analysis and incurred sample reanalysis：recommendation for best practices and harmonization from the global bioanalysis consortium harmonization team. AAPS J. 2014;16(6): 1167-74.

Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. 2001.

The Swiss Federal Council. Radiological Protection Ordinance. Radiological Protection Act 1994;814.501.

Werdenberg D, Joshi R, Wolffram S, Langguth P. Presystemic metabolism and intestinal absorption of antipsoriatic fumaric acid esters. Biopharm Drug Dispos. 2003;24(6): 259-73.

ジロキシメルフマラート

第 2 部 CTD の概要

2.6 非臨床試験の概要文及び概要表

2.6.5 薬物動態試験概要表

バイオジェン・ジャパン株式会社

目次

頁

略語・略号一覧表 3
1 薬物動態試験：一覧表 5
2 分析方法及びバリデーション試験 7
3 薬物動態試験：単回投与後の吸収 8
4 薬物動態試験：反復投与後の吸収 10
5 薬物動態試験：分布 15
6 薬物動態試験：タンパク結合 18
7 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 21
8 薬物動態試験：その他の分布試験 22
9 薬物動態試験：代謝：In vivo 23
10 薬物動態試験：代謝：In vitro 26
11 薬物動態試験：推定代謝経路 29
12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 30
13 薬物動態試験：排泄 31
14 薬物動態試験：排泄：胆汁中 32
15 薬物動態試験：薬物相互作用 33
16 薬物動態試験：その他 45

略語・略号一覧表

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
ABC	adenosine triphosphate-binding cassette	アデノシン三リン酸結合カセット
ADME	absorption, distribution, metabolism and excretion	吸収、分布、代謝及び排泄
ATP	adenosine triphosphate	アデノシン三リン酸
AUC	area under the concentration-time curve	濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}24h}$	area under the concentration-time curve from time 0 to 24 hours	0 時間から 24 時間までの濃度時間曲線下面積
$AUC_{0\text{-}t}$	area under the concentration-time curve from time 0 to time t	0 時間から t 時間までの濃度時間曲線下面積
AUC_{inf}	area under the concentration-time curve from time 0 to infinity	0 時間から無限大時間までの濃度時間曲線下面積
AUC_{last}	area under the concentration-time curve from time 0 to time of the last measurable concentration	0 時間から最終定量可能時間までの濃度時間曲線下面積
BCRP	breast cancer resistance protein	乳癌耐性タンパク質
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid	相補的デオキシリボ核酸
C_{max}	maximum observed concentration	最高血漿中濃度
cpm	counts per minute	毎分カウント
CYP	cytochrome P450	チトクローム P450
DMF	dimethyl fumarate	フマル酸ジメチル
DMSO	dimethyl sulfoxide	ジメチルスルホキシド
DRF	diroximel fumarate	ジロキシメルフマラート
$E_2$17βG	estradiol-17-beta-glucuronide	エストラジオール-17-β-グルクロニド
E3S	estrone-3-sulfate	エストロン-3-硫酸
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	ハンクス平衡塩液
HEK293	human embryonic kidney	ヒト胎児腎
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid	4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジンエタンスルホン酸
HES	2-hydroxyethyl succinimide	2-ヒドロキシエチルスクシンイミド
HPLC	high-performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
IC_{50}	concentration resulting in 50% inhibition of response	50%阻害濃度
KH	Krebs-Henseleit	クレブス・ヘンゼライト
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass	液体クロマトグラフィータンデム質量

略語・略号	略していない表現	
	英語	日本語
	spectrometry	分析
LE	Long-Evans	ロングエバンス
LSC	liquid scintillation counting	液体シンチレーション計数法
LY	Lucifer yellow	ルシファーイエロー
MATE	multidrug and toxin extrusion transporter	多剤・毒性排出トランスポーター
MDCK	Madin-Darby canine kidney	Madin-Darby イヌ腎臓
MMF	monomethyl fumarate	フマル酸モノメチル
mRNA	messenger ribonucleic acid	メッセンジャーリボ核酸
NA	not applicable	該当せず
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate	ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NC	not calculated	算出せず
ND	not determined	測定せず
NR	not reported	報告なし
OAT	organic anion transporter	有機アニオントランスポーター
OATP	organic anion transporting polypeptide	有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	organic cation transporter	有機カチオントランスポーター
P_{app}	apparent permeability	見かけの透過性
P-gp	P-glycoprotein	P 糖タンパク質
PK	pharmacokinetic(s)	薬物動態
R	accumulation ratio	累積係数
RIF	rifampicin	リファンピシン
RSD	relative standard deviation	相対標準偏差
SD	standard deviation	標準偏差
S.E.	standard error	標準誤差
$t_{1/2}$	elimination half-life	消失半減期
TK	toxicokinetic(s)	トキシコキネティクス
T_{last}	time to reach last quantifiable concentration	最終定量可能濃度到達時間
T_{max}	time to reach maximum observed concentration	最高濃度到達時間
UDPGA	uridine diphosphate glucuronic acid	ウリジン二リン酸グルクロン酸
v/v	volume/volume	容量/容量
w/v	weight/volume	重量/容量
w/w	weight/weight	重量/重量

1 薬物動態試験：一覧表

各薬物動態（PK）試験は下記の表に提示する。PK を完全に網羅するため、M2.6.4.3 の「吸収」に要約したトキシコキネティクス（TK）試験も以下の概要表に示す。これらの試験及び他の毒性試験の TK データについては M2.6.7 に一覧表を示したが、非臨床で使用した動物でのブリッジング試験（AT-5108-27 及び AT-5108-28）の TK パラメータについては本文書の 4 項に示した。

表 1 薬物代謝及び薬物動態試験の一覧表

Study Type and Duration[a] (Study No. / Location in CTD)	Species	Route of Administration	GLP Compliance
Absorption			
In Vitro Study to Assess Caco-2 Cell Permeability and P-gp Inhibition Potential (XT[redacted]8097 / 4.2.2.2-1)	In vitro	NA	Non-GLP
Single-Dose Oral ADME and Metabolite Profiling Study of [^{14}C]RDC-5108 in Rats (032357 / 4.2.2.5-1)	Rat	Oral	Non-GLP
5-Day Repeated-Dose TK Study of ALKS 8700, DMF, or MMF in Rats (LSC17-033 / 4.2.2.2-2)	Rat	Oral	Non-GLP
5-Day Oral Gavage PK Study in Rats (AT-5108-27 / 4.2.2.2-3)	Rat	Oral	GLP
RDC-5108: A 5-Day Oral Gavage PK Study in Monkeys (AT-5108-28 / 4.2.2.2-4)	Monkey	Oral	GLP
Distribution			
Comparative Tissue Distribution of [^{14}C]-ALKS 8700-Derived Radioactivity After a Single Oral Gavage Administration of [^{14}C]-ALKS 8700 Labeled in 2 Different Positions to Male LE Rats Using Quantitative Whole Body Autoradiography (14787 [RPT03551] / 4.2.2.3-1)	Rat	Oral	Non-GLP
Protein Binding of MMF and RDC-6567 in Mouse, Rat, Rabbit, Monkey, and Human Plasma (15674 [RPT3644] / 4.2.2.3-2)	In vitro	NA	Non-GLP
In Vitro Assessment of RDC-5108 and RDC-8439 Binding to Human Plasma Proteins (XS-0516 / 4.2.2.3-3)	In vitro	NA	Non-GLP
Metabolism			
Single-Dose Oral ADME and Metabolite Profiling Study of [^{14}C]RDC-5108 in Rats (032357 / 4.2.2.5-1)	Rat	Oral	Non-GLP
In Vitro Metabolism in Human Liver Microsomes and Intestinal S9 Fractions (XT[redacted]4113 / 4.2.2.4-1)	In vitro	NA	Non-GLP
Plasma Metabolite Identification of MMF Labeled [^{14}C]-ALKS 8700 in Male LE Rats (14831 [RPT03503] / 4.2.2.4-2)	Rat	Oral	Non-GLP
Excretion			
Single-Dose Oral ADME and Metabolite Profiling Study of [^{14}C]-RDC-5108 in Rats (032357 / 4.2.2.5-1)	Rat	Oral	Non-GLP

Study Type and Duration[a] (Study No. / Location in CTD)	Species	Route of Administration	GLP Compliance
PK Drug Interactions			
In Vitro Evaluation of RDC-5108, RDC-8439, and RDC-6567 as an Inhibitor of CYP Enzymes in Human Liver Microsomes (XT[redacted]5135 / 4.2.2.6-4 and XT[redacted]A014 / 4.2.2.6-1)	In vitro	NA	Non-GLP
In Vitro Evaluation of RDC-5108, RDC-8439, and RDC-6567 as Inducers of CYP Expression in Cultured Human Hepatocytes (XT[redacted]3079 / 4.2.2.6-2)	In vitro	NA	Non-GLP
ALKS 8700 (RDC-5108) and its Metabolites (RDC-6567 and RDC-8439): A Non-GLP In Vitro Study of P-gp Induction Potential in LS-180 Cells ([redacted]ALKRP1R3 / 4.2.2.6-5)	In vitro	NA	Non-GLP
ALKS 8700 (RDC-5108) and its Metabolites (RDC-6567 and RDC-8439): A Non-GLP In Vitro Interaction Studies With Human BCRP Efflux (ABC) Transporter and With Human MATE1, MATE2-K, OAT1, OAT3, OATP1B1, OATP1B3, OCT1 and OCT2 Uptake Transporters (Alkermes-01-[redacted]20[redacted] / 4.2.2.6-3)	In vitro	NA	Non-GLP
Other PK Studies			
Human Dosimetry Prediction for Oral [^{14}C]-ALKS 8700, 2 Label Positions (RPT03573 / 4.2.2.7-1)	Rat	NA	Non-GLP

RDC-5108 = ALKS 8700 = DRF

[a]Test article nomenclature is presented as reported in the individual study report.

2 分析方法及びバリデーション試験

M2.6.4.2 を参照。

3 薬物動態試験：単回投与後の吸収

表 2 DRF、HES 及び RDC-8439 の in vitro 透過性、P-gp 排出及び阻害（XT[redacted]8097/ 4.2.2.2-1）

Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439					
Test System:		Caco-2 cells (P-gp); bidirectional			
Probe Substrate:		Digoxin (10 µmol/L)			
Positive Control Inhibitor:		Valspodar (1 µmol/L)			
Permeability Control:		LY (40 µg/mL)			
Preincubation Time (minutes):		30 to 60			
Incubation Time (minutes):		Donor: 0, 120; receiver: 120			
Incubation Temperature:		37°C ± 2°C			
Incubation Buffer:		HBSS supplemented with HEPES (25 mmol/L) and glucose (25 mmol/L)			
Assay (probe substrate):		LC-MS/MS			
No. of Replicates:		3			
Study No.:		XT[redacted]8097			
Inhibitor	Concentration (µmol/L)	Mean ± SD P_{app} (× 10^{-6} cm/sec) Apical to Basal	Mean ± SD P_{app} (× 10^{-6} cm/sec) Basal to Apical	Net Flux[a]	Percent Inhibition (%)[b]
Solvent control	0	2.00 ± 0.19	25.7 ± 1.5	23.7	NA
DRF	10	1.67 ± 0.16	26.4 ± 5.4	24.7	0
	100	2.46 (n = 2)	16.3 (n = 2)	13.9	41.4
RDC-8439	10	1.48 (n = 2)	24.7 ± 6.3	23.2	1.9
	100	1.39 ± 0.24	22.5 ± 3.2	21.2	10.6
HES	10	1.19 ± 0.33	25.8 ± 3.3	24.7	0
	100	1.45 ± 0.60	24.6 ± 3.1	23.1	2.3
Valspodar	1	9.70 (n = 2)	8.19 ± 0.37	-1.52	~100
Substrate	Concentration (µmol/L)	Mean ± SD P_{app} (× 10^{-6} cm/sec) Apical to Basal	Mean ± SD P_{app} (× 10^{-6} cm/sec) Basal to Apical	Efflux ratio	Percent of control(%)
DRF	10	3.72 ± 0.54	5.39 ± 0.69	1.45	NA
RDC-8439	10	0.247 ± 0.159	0.193 ± 0.168	0.780	NA
HES	10	21.0 ± 1.7	20.8 ± 2.8	0.989	NA
Digoxin	10	1.13 ± 0.19	24.5 ± 1.0	21.7	100
Digoxin + Valspodar (1 µmol/L)	10	7.53 ± 1.39	10.3 ± 0.7	1.37	1.8

[a]Net flux calculated as P_{app} (basal to apical) - P_{app} (apical to basal).
[b]Calculated independently from study report as 100 - (percent of control, %); reported as “0” when efflux ratio in presence of test article was greater than efflux ratio for solvent control.

表 3　雄性 Sprague Dawley ラットに MMF 標識及び Promoiety 標識の[^{14}C]-DRF を単回経口投与したときの総放射能の PK パラメータ（032357 / 4.2.2.5-1）

		Test Article: [^{14}C]-DRF
Species:	Rat	
Study No.	032357	
Feeding Condition:	Fasted	
Sample (e.g., whole blood, plasma, serum):	Plasma	
Analyte:	Total radioactivity	
Assay:	Liquid scintillation counting	
Test Article Administered:	Promoiety-labeled [^{14}C]-DRF	MMF-labeled [^{14}C]-DRF
Number of Animals/Gender:	6/male (n = 6/timepoint)	6/male (n = 6/timepoint)
Vehicle/Formulation:	50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% Methocel E50 Premium LV and 0.2% polysorbate 20, pH 4	50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% Methocel E50 Premium LV and 0.2% polysorbate 20, pH 4
Route of Administration:	Oral	Oral
Dose (mg/kg):	50 (100 µCi/kg)	50 (100 µCi/kg)
Mean ± SD PK Parameters:		
C_{max} (µg-equiv/g)	55.699 ± 2.434	57.335 ± 10.513
T_{max} (h)	0.92 ± 0.20	0.50 ± 0.00
$t_{1/2}$ (h)	3.44 ± 0.76	13.5 ± 0.69
AUC_{0-t} (µg-equiv*h/g)	261.867 ± 14.854	400.686 ± 59.868
AUC_{inf} (µg-equiv*h/g)	328.381 ± 30.860	574.294 ± 88.885

4 薬物動態試験：反復投与後の吸収

表 4 雌性 Lewis ラットを用いた 5 日間反復投与毒性試験における DRF、DMF 及び MMF の TK（LSC17-033 / 4.2.2.2-2）

			Test Articles: DRF, DMF, and MMF	
Species:	Rat			
Study No.:	LSC17-033			
Feeding Condition:	Fed			
Sample (e.g., whole blood, plasma, serum):	Plasma			
Analyte:	MMF, HES (for DRF group only)			
Assay:	LC-MS/MS			
Number of Animals and Gender/Group:	6 females/group (for DMF and MMF group) with n = 3 samples/timepoint; 9 females/group (DRF group) with n = 3 samples/timepoint			
Test Article Administered:	MMF	DMF	DRF	
Vehicle/Formulation:	50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% (w/w) Methocel E50 Premium LV and 0.2% (w/w) polysorbate 20, pH 4			
Route of Administration:	Oral	Oral	Oral	
Dose (mg/kg):	181	200	354	
Analyte:	MMF	MMF	MMF	HES
Mean PK Parameters[a]:				
C_{max} (ng/mL)	56600	31100	24800	86000
T_{max} (h)	0.17	0.17	0.75	0.75
AUC_{last} (ng*h/mL)	48300	43800	54500	638100
$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	64300	44000	54500	638100

RDC-6567 = HES

[a] PK parameters on Day 5 after once-daily administration of MMF, DMF, and DRF.

表 5　雄性 Sprague Dawley ラットを用いた 5 日間反復投与試験における PK（AT-5108-27 / 4.2.2.2-3）

							Test Article: DRF
Species:		Rat					
Study No.:		AT-5108-27					
Feeding Condition:		Fed					
Sample (e.g., whole blood, plasma, serum):		Plasma					
Analyte:		MMF, HES, DRF, and RDC-8439					
Assay:		LC-MS/MS					
Number of Animals/Dose Group:		12					
Vehicle/Formulation:		50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% (w/w) Methocel E50 Premium LV and 0.2% (w/w) polysorbate 20 in deionized water, pH 4 ± 0.1					
Route of Administration:		Oral					
Dose (mg/kg)[a]:		60		150		600	
Study Day:		1	5	1	5	1	5
Mean PK Parameters[b]:							
MMF	C_{max} (ng/mL)	7310	5830	13500	8870	37100	14800
	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	122	97.1	90.2	59.2	61.8	24.6
	T_{max} (h)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	T_{last} (h)	2	6	6	6	24	24
	AUC_{last} (ng*h/mL)	5800	4260	20400	8280	99000	55900
	AUC_{last}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	96.7	71.0	136	55.2	165	93.2
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	6370	4430	21700	8930	99000	55900
	$AUC_{0\text{-}24h}$/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	106	73.8	145	59.5	165	93.2
	R^c	NA	0.695	NA	0.411	NA	0.565
HES	C_{max} (ng/mL)	25600	22000	63300	37000	159000	84300
	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	426	367	422	247	266	141

							Test Article: DRF
	T_{max} (h)	0.75	0.75	2	0.75	2	2
	T_{last} (h)	24	24	24	24	24	24
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	248000	154000	592000	354000	1810000	1180000
	$AUC_{0\text{-}24h}$/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	4140	2560	3950	2360	3020	1960
	R[c]	NA	0.619	NA	0.598	NA	0.651
	HES:MMF Ratio[d]	39.0	34.7	27.2	39.6	18.3	21.1
RDC-8439	C_{max} (ng/mL)	95.6	94.9	238	143	585	673
	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	1.59	1.58	1.59	0.956	0.975	1.12
	T_{max} (h)	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
	T_{last} (h)	0.25	0.25	0.75	0.75	6	6
	AUC_{last} (ng*h/mL)	NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	815	1240
	AUC_{last}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	1.36	2.06
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	1020	NA[f]
	$AUC_{0\text{-}24h}$/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	NA[e]	NA[e]	NA[e]	NA[e]	1.69	NA[f]
	R[g]	NA	NA	NA	NA	NA	1.52
	RDC-8439:MMF Ratio[h]	NA	NA	NA	NA	0.00824	0.0221
	RDC-8439:MMF Ratio[i]	NA	NA	NA	NA	0.0103	NA

[a]Dose of DRF.
[b]DRF levels were below the limit of quantitation (< 50 ng/mL) across dose groups, and hence, no PK parameters could be calculated.
[c]$R = AUC_{0\text{-}24h,\ Day\ 5}/AUC_{0\text{-}24h,\ Day\ 1}$.
[d]HES:MMF ratio = $AUC_{0\text{-}24h,\ HES}/AUC_{0\text{-}24h,\ MMF}$.
[e]AUC not reported due to less than 3 consecutive quantifiable concentrations.
[f]$AUC_{0\text{-}24h}$ not reported due to percent extrapolation greater than 25%.
[g]$R = AUC_{last,\ Day\ 5}/AUC_{last,\ Day\ 1}$.
[h]RDC-8439:MMF ratio = $AUC_{last,\ RDC\text{-}8439}/AUC_{last,\ MMF}$.
[i]RDC-8439:MMF ratio = $AUC_{0\text{-}24h,\ RDC\text{-}8439}/AUC_{0\text{-}24h,\ MMF}$.

表 6　　雄性カニクイザルを用いた 5 日間反復投与試験における PK（AT-5108-28 / 4.2.2.2-4）

							Test Article: DRF
Species:		Monkey					
Study No.:		AT-5108-28					
Feeding Condition:		Fed					
Sample (e.g., whole blood, plasma, serum):		Plasma					
Analyte:		MMF, HES, DRF, and RDC-8439					
Assay:		LC-MS/MS					
Number of Animals/Dose Group:		5					
Vehicle/Formulation:		50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% (w/w) Methocel E50 Premium LV and 0.2% (w/w) polysorbate 20 in deionized water, pH 4 ± 0.1					
Route of Administration:		Oral					
Dose (mg/kg)[a]:		25		75		400	
Study Day:		1	5	1	5	1	5
Mean ± SD PK Parameters[b]:							
MMF	C_{max} (ng/mL)	3470 ± 1020	3140 ± 1550	13800 ± 1870	13900 ± 2500	53200 ± 7910	54000 ± 27200
	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	139 ± 40.6	125 ± 62.1	184 ± 25.0	185 ± 33.3	133 ± 19.8	135 ± 68.0
	T_{max} (h)[c]	0.75 (0.25-0.75)	0.75 (0.25-0.75)	0.75 (0.25-0.75)	0.75 (0.75-0.75)	0.75 (0.75-0.75)	0.75 (0.75-2)
	T_{last} (h)[c]	2 (2-6)	2 (2-6)	6 (2-6)	6 (2-6)	6 (6-6)	6 (6-6)
	AUC_{last} (ng*h/mL)	5660 ± 2040	4260 ± 1370	24200 ± 4520	28000 ± 3870	145000 ± 18800	136000 ± 50200
	AUC_{last}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	227 ± 81.8	170 ± 54.6	323 ± 60.2	374 ± 51.6	362 ± 47.1	340 ± 126
	AUC_{0-24h} (ng*h/mL)	7500 ± 1490	5160 ± 1690	31900 ± 1400	30600 ± 2650	175000 ± 21300	169000 ± 26100
	AUC_{0-24h}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	300 ± 59.5	206 ± 67.7	426 ± 18.6	408 ± 35.3	438 ± 53.2	423 ± 65.3
	R[a]	NA	0.736 ± 0.163	NA	0.917 ± 0.0662	NA	1.02 ± 0.233
HES	C_{max} (ng/mL)	8120 ± 2580	8580 ± 3700	28100 ± 4160	44200 ± 4960	117000 ± 24900	117000 ± 50200
	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	325 ± 103	343 ± 148	375 ± 55.4	589 ± 66.1	291 ± 62.2	292 ± 126
	T_{max} (h)[c]	2 (2-2)	2 (0.75-2)	2 (2-2)	2 (2-2)	2 (2-6)	2 (2-6)
	T_{last} (h)[c]	24 (24-24)	24 (24-24)	24 (24-24)	24 (24-24)	24 (24-24)	24 (24-24)
	AUC_{0-24h} (ng*h/mL)	91700 ± 20200	87000 ± 29900	355000 ± 40000	471000 ± 69100	1650000 ± 280000	1210000 ± 453000
	AUC_{0-24h}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	3670 ± 809	3480 ± 1200	4740 ± 533	6280 ± 921	4130 ± 700	3010 ± 1130
	R[d]	NA	0.943 ± 0.195	NA	1.35 ± 0.324	NA	0.757 ± 0.314

							Test Article: DRF
	HES:MMF Ratio[e]	13.6 ± 1.07	15.5 ± 1.63	11.1 ± 1.08	15.7 ± 2.18	9.55 ± 2.05	7.96 ± 1.05
RDC-8439	C_{max} (ng/mL)	0.0 ± NA	0.0 ± NA	101 ± 39.5	82.1 ± 16.5	629 ± 190	654 ± 553
	C_{max}/Dose (kg*ng/mL/mg)	NA	NA	1.34 ± 0.526	1.10 ± 0.220	1.57 ± 0.476	1.63 ± 1.38
	T_{max} (h)[c]	NA	NA	0.75 (0.25-0.75)	0.75 (0.25-0.75)	0.75 (0.75-0.75)	0.75 (0.25-0.75)
	T_{last} (h)[c]	NA	NA	0.75 (0.75-0.75)	0.75 (0.25-0.75)	2 (2-2)	2 (0.75-2)
	AUC_{last} (ng*h/mL)	NA	NA	NA	NA	792 ± 207	671 ± 166
	AUC_{last}/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	NA	NA	NA	NA	1.98 ± 0.517	1.68 ± 0.415
	$AUC_{0\text{-}24h}$ (ng*h/mL)	NA	NA	NA	NA	754 ± NA	617 ± NA
	$AUC_{0\text{-}24h}$/Dose (ng*kg*h/mL/mg)	NA	NA	NA	NA	1.89 ± NA	1.54 ± NA
	R[f]	NA	NA	NA	NA	NA	0.858 ± 0.181
	RDC-8439:MMF Ratio[g]	NA	NA	NA	NA	0.00543 ± 0.000959	0.00419 ± 0.000471

[a]Dose of DRF.
[b]DRF levels were below the limit of quantitation (< 50 ng/mL) across dose groups (only 1 measurable concentration across dose groups, animals, and timepoints), and hence, no PK parameters could be calculated.
[c]Median (minimum-maximum), median value only reported if actual collection interval.
[d]$R = AUC_{0\text{-}24h,\ Day\ 5}/AUC_{0\text{-}24h,\ Day\ 1}$.
[e]HES:MMF ratio = $AUC_{0\text{-}24h,\ HES}/AUC_{0\text{-}24h,\ MMF}$.
[f]$R = AUC_{last,\ Day\ 5}/AUC_{last,\ Day\ 1}$.
[g]RDC-8439:MMF ratio = $AUC_{last,\ RDC\text{-}8439}/AUC_{last,\ MMF}$.

5 薬物動態試験：分布

表 7 雄性 LE ラットに Promoiety 標識又は MMF 標識[^{14}C]-DRF を単回経口投与したときの組織分布の比較（RPT03551 / 4.2.2.3-1）

Test Article: [^{14}C]-DRF With [^{14}C] Labeled Either on Promoiety or MMF							
Species:	Rat						
Study No.:	RPT03551						
Feeding Condition:	Fasted						
Number of Animals/Group:	8 (for promoiety-labeled group), 10 (for MMF-labeled group)						
Vehicle/Formulation:	50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% Methocel E50 Premium LV and 0.2% polysorbate 20, pH 4						
Route of Administration:	Oral gavage						
Dose (mg/kg):	50						
Radionuclide:	[^{14}C]						
Specific Activity:	11.5 mCi/mmol for promoiety label and 8.2 mCi/mmol for MMF label						
Sampling Time (h):	1, 2, 4, 8, 24, 72, 120, 168 [plus 336 and 672 for MMF label group only]						
DRF-Associated Radioactivity ([^{14}C] labeled on promoiety)							
	PK Parameters						
Matrix/Tissue	C_{max} (µg-equiv/g)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-t} (µg-equiv*h/g)	AUC_{inf} (µg-equiv*h/g)	Tissue: Plasma Ratio[a]	r^2
Plasma	54.1	1.0	2.4	198	199	1.00	0.9960
Blood (LSC)	42.7	1.0	NC	199	NC	1.01	NC
Aorta	59.7	1.0	3.7	227	230	1.15	0.8826
Blood (cardiac)	55.3	1.0	3.6	195	197	0.98	0.9508
Brain (whole)	30.1	1.0	1.8	119	126	0.60	0.9972
Spinal cord	21.1	2.0	NC	87.3	NC	0.44	NC
Eye	23.3	1.0	2.7	98.9	114	0.50	0.9074
Lens	29.0	1.0	3.9	149	151	0.75	0.9894
Uveal tract	40.5	1.0	2.2	173	187	0.87	0.8311
Nonpigmented skin	27.2	1.0	1.8	112	120	0.57	0.9999
Pigmented skin	30.4	1.0	1.8	106	112	0.53	0.9979
Adrenal cortex	40.2	1.0	1.9	116	124	0.58	0.9893
Adrenal gland	40.0	1.0	1.9	115	123	0.58	0.9827
Adrenal medulla	42.7	1.0	1.9	121	129	0.61	0.9778
Pituitary gland	51.0	1.0	1.9	159	169	0.80	0.9977
Thyroid gland	52.4	1.0	1.8	155	162	0.78	0.9855
Brown fat	25.9	1.0	1.6	69.1	71.8	0.35	0.9975
White fat (inguinal)	7.49	1.0	2.7	19.6	22.2	0.10	0.9894
Esophagus wall	52.2	2.0	NC	197	NC	0.99	NC
Large intestine wall	228	4.0	NC	896	NC	4.52	NC
Oral mucosa	55.4	1.0	1.9	163	173	0.82	0.9870
Small intestine wall	90.6	4.0	NC	411	NC	2.07	NC
Stomach wall (glandular)	49.1	1.0	11.3	327	333	1.65	0.8915
Stomach wall (nonglandular)	293	1.0	NC	764	NC	3.85	NC

Lymph node (cervical)	45.6	1.0	4.3	167	171	0.84	0.8565
Spleen	36.8	1.0	3.8	179	182	0.90	0.9740
Thymus	47.9	1.0	2.0	148	159	0.75	0.9993
Kidney	48.8	1.0	3.5	192	252	0.97	0.9141
Kidney cortex	46.7	1.0	2.0	155	168	0.78	0.9802
Kidney medulla	53.0	1.0	2.3	232	258	1.17	0.9897
Liver	52.3	1.0	3.3	224	226	1.13	0.9800
Urinary bladder wall	354	2.0	4.1	1890	1910	9.51	0.9656
Heart	48.8	1.0	2.1	139	151	0.70	0.9683
Muscle (femoral)	34.3	1.0	3.6	158	160	0.80	0.9461
Prostate	41.8	2.0	4.4	174	176	0.88	0.9169
Testis	40.7	1.0	3.8	178	181	0.90	0.9640
Lung	33.6	1.0	2.1	129	141	0.65	0.9909
Nasal turbinates	34.5	2.0	NC	162	NC	0.82	NC
Trachea	47.3	1.0	2.2	142	155	0.71	0.9989
Ex-orbital lachrymal gland	32.0	1.0	1.8	123	131	0.62	0.9949
Harderian gland	22.1	1.0	2.1	82.9	89.9	0.42	0.9803
Intraorbital lachrymal gland	33.0	1.0	1.9	96.1	103	0.48	0.9425
Pancreas	35.1	1.0	2.0	123	133	0.62	0.9972
Salivary glands	48.1	1.0	1.8	141	148	0.71	0.9926
Bone (femur)	16.0	1.0	1.7	54.2	57.0	0.27	0.9999
Bone marrow (femur)	32.2	1.0	1.9	121	130	0.61	0.9968
DRF-Associated Radioactivity ([^{14}C] labeled on MMF)							
	PK Parameters						
Matrix/Tissue	C_{max} (µg-equiv/g)	T_{max} (h)	$t_{1/2}$ (h)	AUC_{0-t} (µg-equiv*h/g)	AUC_{inf} (µg-equiv*h/g)	Tissue: Plasma Ratio[a]	r^2
Plasma	27.1	1.0	93.2	828	844	1.00	0.8189
Blood (LSC)	29.4	1.0	312.5	3930	5360	4.75	0.8063
Aorta	25.0	2.0	164.8	2630	2900	3.17	0.8793
Blood (cardiac)	38.5	1.0	245.8	4160	5080	5.02	0.8454
Brain (whole)	81.1	1.0	211.9	4440	5150	5.36	0.8681
Spinal cord	73.6	1.0	247.0	6440	7900	7.77	0.8612
Eye	22.8	1.0	461.9	1240	1840	1.50	0.9344
Lens	11.4	1.0	NC	1450	NC	1.75	NC
Uveal tract	46.6	1.0	120.3	2330	2400	2.81	0.8379
Nonpigmented skin	26.6	1.0	NC	1740	NC	2.10	NC
Pigmented skin	27.4	1.0	174.4	2680	3050	3.23	0.8029
Adrenal cortex	40.3	2.0	131.4	3180	3350	3.84	0.8785
Adrenal gland	35.3	2.0	141.5	3090	3260	3.73	0.8974
Adrenal medulla	36.7	1.0	134.0	3100	3250	3.74	0.8961
Pituitary gland	45.7	1.0	124.0	2700	2850	3.26	0.8373
Thyroid gland	31.1	1.0	125.9	2450	2580	2.96	0.8582
Brown fat	18.7	1.0	196.4	1780	2000	2.15	0.9127
White fat (inguinal)	6.54	1.0	506.1	1440	2520	1.74	0.8000
Esophagus wall	47.5	2.0	180.8	2770	2920	3.35	0.8600
Large intestine wall	48.8	2.0	287.7	1670	1900	2.01	0.8307

Oral mucosa	50.7	2.0	NC	3910	NC	4.72	NC
Small intestine wall	143	1.0	330.2	2370	2640	2.86	0.8674
Stomach wall (glandular)	82.0	1.0	103.6	2300	2360	2.78	0.8297
Stomach wall (nonglandular)	40.4	1.0	232.5	2130	2420	2.57	0.9004
Lymph node (cervical)	46.5	1.0	108.9	1900	1940	2.29	0.8991
Spleen	40.8	1.0	129.0	3000	3180	3.63	0.8408
Thymus	60.5	1.0	57.0	2730	2800	3.30	0.9633
Kidney	85.9	1.0	118.2	3600	3750	4.34	0.8572
Kidney cortex	113	1.0	112.6	3770	3900	4.55	0.8721
Kidney medulla	51.6	4.0	155.8	3080	3290	3.71	0.8547
Liver	84.3	1.0	140.9	6180	6580	7.47	0.8883
Urinary bladder wall	51.0	4.0	181.4	1950	2140	2.36	0.8358
Heart	38.3	1.0	154.8	2270	2480	2.74	0.8448
Muscle (femoral)	12.8	1.0	185.6	1610	1820	1.94	0.8759
Prostate	30.7	1.0	64.4	2040	2080	2.46	0.9781
Testis	25.8	1.0	138.9	1770	1880	2.14	0.8580
Lung	34.7	1.0	377.7	2760	3860	3.33	0.9400
Nasal turbinates	35.9	1.0	128.7	2740	2880	3.31	0.8710
Trachea	44.4	1.0	339.4	2960	3790	3.57	0.9133
Ex-orbital lachrymal gland	80.2	4.0	113.0	2530	2600	3.06	0.8684
Harderian gland	129	4.0	89.4	5230	5280	6.31	0.8153
Intraorbital lachrymal gland	164	1.0	92.7	6680	6730	8.07	0.8112
Pancreas	83.5	1.0	158.5	2140	2290	2.59	0.8663
Salivary glands	84.0	2.0	113.1	2640	2700	3.19	0.8290
Bone (femur)	24.9	1.0	NC	1370	NC	1.65	NC
Bone marrow (femur)	50.5	1.0	145.7	2740	2820	3.30	0.8466

[a]Tissue:plasma ratio based on AUC_{0-t}.

6 薬物動態試験：タンパク結合

表 8 種々の動物種における MMF 及び HES の in vitro タンパク結合（RPT3644 / 4.2.2.3-2）

					Test Articles: MMF and HES
Study No.:	RPT3644				
Study System:	Plasma, serum albumin, and α1-acid-glycoprotein (humans only)				
Method:	Equilibrium dialysis				
Species or Subfraction	Concentration Tested[a] (μmol/L)	% Bound (Mean)	RSD	% Recovery (Mean)	RSD
MMF Protein Binding					
Mouse Plasma	0.5	0	NA	101	NA
	5	0	NA	108	NA
	50	0	NA	94.8	9.72
Rat Plasma	0.5	0	NA	81.0	NA
	5	0	NA	88.8	2.16
	50	0	NA	86.9	NA
Rabbit Plasma	0.5	2.87	173	91.6	NA
	5	0	NA	91.1	3.24
	50	3.89	88.0	94.2	4.85
Monkey Plasma	0.5	27.2	NA	88.0	8.81
	5	15.2	45.2	93.3	5.56
	50	16.5	19.3	89.8	3.90
Human Plasma	0.5	25.4	61.9	88.4	10.3
	5	19.2	14.0	93.1	6.18
	50	15.9	25.4	85.7	2.73
Human Serum Albumin (4%, w/v)	0.5	10.9	56.5	99.4	9.33
	5	12.1	47.4	86.3	3.33
	50	14.4	25.8	93.1	1.37
α1-Acid-Glycoprotein (0.07%, w/v)	0.5	7.73	173	86.1	8.50
	5	11.3	41.8	81.6	1.96
	50	11.2	18.6	88.5	2.96
HES Protein Binding					
Species or Subfraction	Concentration Tested[a] (μmol/L)	% Bound (Mean)	RSD	% Recovery (Mean)	RSD
Mouse Plasma	1	0	NA	96.0	0.55
	10	0	NA	97.8	5.1
	100	1.80	165	91.0	4.28
Rat Plasma	1	0	NA	93.3	4.06
	10	0	NA	95.0	4.52
	100	0	NA	90.6	NA
Rabbit Plasma	1	0	NA	97.5	3.79
	10	0	NA	97.4	2.99
	100	0	NA	91.4	3.06
Monkey Plasma	1	0	NA	94.1	2.16
	10	7.75	141	90.0	4.71
	100	0	NA	88.6	4.15
Human Plasma	1	0	NA	99.0	4.36
	10	0	NA	94.0	2.51
	100	0	NA	90.1	6.02
Human Serum Albumin (4%, w/v)	1	0.27	173	88.6	3.39
	10	3.75	83.1	94.9	3.08
	100	0	NA	102	3.84

					Test Articles: MMF and HES
Study No.:	RPT3644				
α1-Acid-Glycoprotein (0.07%, w/v)	1	20.6	12.8	81.0	2.82
	10	18.1	15.7	85.2	1.69
	100	0	NA	92.4	0.84

[a]Each concentration was tested in triplicate.

表 9　　ヒト血漿及びタンパク質画分における DRF 及び RDC-8439 の in vitro タンパク結合（XS-0516 / 4.2.2.3-3）

Test Articles: DRF and RDC-8439					
Study No.:	XS-0516				
Study System:	Human plasma, human serum albumin, and α1-acid-glycoprotein				
Method:	Ultrafiltration				
Test Article:		DRF		RDC-8439	
Matrix	Conc. Tested (μmol/L)	% Unbound[a] (Mean ± SD)	% Bound[a] (Mean ± SD)	% Unbound[a] (Mean ± SD)	% Bound[a] (Mean ± SD)
Human Plasma	0.5	12.6 ± 0.3	87.4 ± 0.3	106.3 ± 3.8	0.0 ± 0.0
	5	13.0 ± 0.5	87.0 ± 0.5	112.5 ± 3.4	0.0 ± 0.0
	50	17.0 ± 0.4	83.0 ± 0.4	101.7 ± 5.8	0.0 ± 0.0
Human Serum Albumin	0.5	58.0 ± 5.3	42.0 ± 5.3	111.1 ± 1.3	0.0 ± 0.0
	5	60.7 ± 0.8	39.3 ± 0.8	90.2 ± 5.6	9.8 ± 5.6
	50	64.9 ± 3.6	35.1 ± 3.6	103.7 ± 4.6	0.0 ± 0.0
α1-Acid-Glycoprotein	0.5	71.0 ± 1.6	29.0 ± 1.6	122.3 ± 2.1	0.0 ± 0.0
	5	62.6 ± 3.1	37.4 ± 3.1	111.7 ± 5.6	0.0 ± 0.0
	50	82.0 ± 3.2	18.0 ± 3.2	112.6 ± 5.7	0.0 ± 0.0

[a]Data represents mean ± SD of 3 measurements.

7　　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

該当なし。

8 薬物動態試験：その他の分布試験

該当なし。

9 薬物動態試験：代謝：In vivo

表 10 雄性 Sprague Dawley ラットに MMF 標識及び Promoiety 標識[^{14}C]-DRF を単回経口投与したときの代謝プロファイリング（032357 / 4.2.2.5-1）

							Test Articles: MMF-Labeled and Promoiety-Labeled [^{14}C]-DRF			
Species:	Rat									
Study No.:	032357									
Feeding Condition:	Fasted									
Sample:	Plasma, urine, and feces[a]									
Test Article Administered:	Promoiety-labeled [^{14}C]-DRF				MMF-labeled [^{14}C]-DRF					
Number of Animals/Gender:	6 males (plasma); 3 males (urine, feces, expired air, and carcass)				6 males (plasma); 3 males (urine, feces, expired air, and carcass)					
Vehicle/Formulation:	50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% Methocel E50 Premium LV and 0.2% polysorbate 20, pH 4				50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% Methocel E50 Premium LV and 0.2% polysorbate 20, pH 4					
Route of Administration:	Oral				Oral					
Dose (mg/kg):	50 (100 µCi/kg)				50 (100 µCi/kg)					
Specific Activity:	11.5 mCi/mmol for promoiety label				8.2 mCi/mmol for MMF label					
Metabolite Profile in Promoiety-Labeled [^{14}C]-DRF Plasma Samples										
Sampling Time (h)	0.5		1		2		4		8	
	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g
Pooled Sample	NA	50.204	NA	55.500	NA	43.057	NA	34.874	NA	12.966
Extractable[b]	NA	50.053	NA	51.837	NA	43.057	NA	33.688	NA	11.371
Retention Time (min)										
8.63 (HES)[c]	100.0	50.053	100.0	51.837	100.0	43.057	100.0	33.688	100.0	11.371
22.70 (RDC-8439)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26.74 (DRF)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total[d]	NA	50.053	NA	51.837	NA	43.057	NA	33.688	NA	11.371
Metabolite Profile in MMF-Labeled [^{14}C]-DRF Plasma Samples										
Sampling Time (h)	0.5		1		2		4		8	24
	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g	% HPLC	µg-equiv/g
Pooled Sample	NA	57.335	NA	41.898	NA	27.942	NA	21.979	NA	16.378	NA	8.621
Extractable[e]	NA	37.038	NA	19.399	NA	10.478	NA	4.286	NA	5.372	NA	1.543

								Test Articles: MMF-Labeled and Promoiety-Labeled [^{14}C]-DRF				
Retention Time (min)												
4.46[c,f]	82.17	30.434	100.0	19.399	100.0	10.478	100.0	4.286	ND	ND	ND	ND
22.23 (MMF)[c]	17.83	6.604	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
22.70 (RDC-8439)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
26.74 (DRF)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total[d]	NA	37.038	NA	19.399	NA	10.478	NA	4.286	NA	ND	NA	ND

Metabolite Profile in Promoiety-Labeled [^{14}C]-DRF Urine Samples[g]							
Collection Interval (h)	0-6		6-12		12-24		
	% HPLC	% Administered Dose[i]	% HPLC	% Administered Dose[i]	% HPLC	% Administered Dose[i]	% Administered Dose Total[h]
Pooled Sample	NA	37.15	NA	29.33	NA	8.47	74.95
Retention Time (min)							
4.46[f]	0.82	0.30	3.72	1.09	3.86	0.33	1.72
6.46	7.85	2.92	10.74	3.15	21.57	1.83	7.89
8.63 (HES)	84.58	31.42	78.98	23.16	64.76	5.49	60.07
9.43	6.59	2.45	5.75	1.69	8.35	0.71	4.84
10.46	ND	ND	0.81	0.24	1.45	0.12	0.36
22.70 (RDC-8439)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
24.02	0.16	0.06	ND	ND	ND	ND	0.06
26.74 (DRF)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Total[h]	NA	37.15	NA	29.33	NA	ND	74.95

Metabolite Profile in MMF-Labeled [^{14}C]-DRF Urine Samples[g]					
Collection Interval (h)	0-6		6-12		% Administered Dose Total[h]
	% HPLC	% Administered Dose[i]	% HPLC	% Administered Dose[i]	
Pooled Sample	NA	11.22	NA	2.39	13.61
Retention Time (min)					
4.46[f]	12.50	1.40	64.90	1.55	2.95
6.80	1.95	0.22	ND	ND	0.22
8.25	ND	ND	ND	ND	ND
9.43	3.29	0.37	ND	ND	0.37
15.07	1.51	0.17	ND	ND	0.17
17.83	2.89	0.32	ND	ND	0.32
19.30	2.26	0.25	ND	ND	0.25

				Test Articles: MMF-Labeled and Promoiety-Labeled [^{14}C]-DRF	
20.50	3.89	0.44	ND	ND	0.44
21.77	18.68	2.10	25.66	0.61	2.71
22.23 (MMF)	51.25	5.75	ND	ND	5.75
22.70 (RDC-8439)	ND	ND	ND	ND	ND
24.02	1.78	0.20	9.44	0.23	0.43
26.74 (DRF)	ND	ND	ND	ND	ND
Total[h]	NA	11.22	NA	2.39	13.61

[a]Feces samples were not analyzed because none of the samples contained greater than 5% of the administered dose.
[b]Extractability of radioactivity was 99.7%, 93.4%, 100.0%, 96.6%, and 87.7% for the 0.5-, 1-, 2-, 4-, and 8-hour samples, respectively.
[c]µg-equiv/g = (µg-equiv/g in pooled sample)(% HPLC)/100. Peak assignments were based on HPLC retention time with standards.
[d]Sum of µg-equiv/g in all HPLC peaks.
[e]Extractability of radioactivity was 64.6%, 46.3%, 37.5%, 19.5%, 32.8%, and 17.9% for the 0.5-, 1-, 2-, 4-, 8-, and 24-hour samples, respectively.
[f]This metabolite was confirmed to be glucose based on a separate study (RPT03503 / 4.2.2.4-2).
[g]Metabolite profiles in cage wash samples were identical to urine samples, and hence, data were not tabulated.
[h]Overall total of % administered dose.
[i]% Administered dose in HPLC peak = (% administered dose in pooled sample)(% HPLC)/100. Peak assignments were based on HPLC retention time with standards.

表 11　　雄性 LE ラットでの MMF 標識[^{14}C]-DRF の血漿代謝物同定（RTP03503 / 4.2.2.4-2）

M2.6.4.5.2.2 参照。

10 薬物動態試験：代謝：In vitro

表 12 ヒト生体試料における DRF の in vitro 代謝（XT[redacted]4113 / 4.2.2.4-1）

Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439						
Study No.:	XT[redacted]4113					
Study System: Human liver S9 fractions						
Compound Incubated, Conc (µmol/L)	Protein Conc (mg/mL)	Incubation Time (min)	Substrate Loss (%)	MMF Formation Rate (pmol/mg/min)	HES Formation Rate (pmol/mg/min)	RDC-8439 Formation Rate (pmol/mg/min)
DRF, 0	1	30	NA	NA	NA	NA
DRF, 1	0	0	NA	NA	NA	NA
		30	4.2	NA	NA	NA
	0.5	0	NA	NA	NA	NA
		30	100[a]	27.2	40.0	26.5
	1	0	NA	NA	NA	NA
		15	100[a]	27.9	43.5	24.3
		30	100[a]	12.6	20.4	9.18
		60	100[a]	6.18	12.9	3.21
		120	100[a]	2.48	6.50	NC
	2	0	NA	NA	NA	NA
		30	100[a]	5.82	11.1	2.62
DRF, 10	0	0	NA	NA	NA	NA
		30	1.4	NA	NA	NA
	0.5	0	NA	NA	NA	NA
		30	95.5	252	364	270
	1	0	NA	NA	NA	NA
		15	84.9	265	383	251
		30	89.3	120	184	106
		60	90.4	58.9	101	47.3
		120	93.9	24.1	51.8	15.9
	2	0	NA	NA	NA	NA
		30	80.3	56.4	90.0	36.0
DRF, 100	0	0	NA	NA	NA	NA
		30	3.5	NA	NA	NA
	0.5	0	NA	NA	NA	NA
		30	98.9	2560	3630	3210
	1	0	NA	NA	NA	NA
		15	98.1	2540	3570	3160
		30	98.5	1200	1740	1470
		60	98.9	598	927	707
		120	99.4	279	461	313
	2	0	NA	NA	NA	NA
		30	97.9	542	868	602
Study System: Human intestinal S9 fractions						
Compound Incubated, Conc (µmol/L)	Protein Conc (mg/mL)	Incubation Time (min)	Substrate Loss (%)	MMF Formation Rate (pmol/mg/min)	HES Formation Rate (pmol/mg/min)	RDC-8439 Formation Rate (pmol/mg/min)
DRF, 0	1	30	NA	NA	NA	NA
DRF, 1	0	0	NA	NA	NA	NA
		30	2.1	NA	NA	NA
	0.5	0	NA	NA	NA	NA
		30	98.8	52.4	54.6	NC

Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439						
	1	0	NA	NA	NA	NA
		15	98.9	52.4	56.3	NC
		30	99.7	23.3	24.8	NC
		60	99.7	12.3	13.9	NC
		120	100[a]	5.75	6.69	NA
	2	0	NA	NA	NA	NA
		30	99.0	10.7	13.4	NA
DRF, 10	0	0	NA	NA	NA	NA
		30	No loss	NA	NA	NA
	0.5	0	NA	NA	NA	NA
		30	98.8	502	562	7.77
	1	0	NA	NA	NA	NA
		15	98.6	483	596	6.93
		30	99.5	231	281	NC
		60	99.6	121	155	NC
		120	99.8	54.5	75.3	NC
	2	0	NA	NA	NA	NA
		30	98.8	98.7	141	NC
DRF, 100	0	0	NA	NA	NA	NA
		30	12.3	NA	NA	NA
	0.5	0	NA	NA	NA	NA
		30	98.2	4350	6510	83.0
	1	0	NA	NA	NA	NA
		15	97.9	4180	6690	72.0
		30	99.2	1990	3360	32.6
		60	99.4	1080	1670	16.5
		120	99.6	539	810	7.37
	2	0	NA	NA	NA	NA
		30	99.1	938	1640	13.4

Study System: Human liver microsomes							
Compound Incubated, Conc (μmol/L)	Protein Conc (mg/mL)	Incubation Time (min)	NADPH (+/-)[b]	Substrate Loss (%)	MMF Formation Rate (pmol/mg/min)	HES Formation Rate (pmol/mg/min)	RDC-8439 Formation Rate (pmol/mg/min)
DRF, 0	1	10	(+)	NA	NA	NA	NA
DRF, 1	0	0		NA	NA	NA	NA
		10		0.7	NA	NA	NA
	0.25	0		NA	NA	NA	NA
		10		76.3	NA	NA	159
	0.5	0		NA	NA	NA	NA
		5		70.2	140	NA	158
		10		91.0	82.7	NA	83.6
		20		98.7	49.0	NA	38.0
		40		99.9	23.7	NA	12.0
	1	0		NA	NA	NA	NA
		10		98.6	43.5	NA	33.4
	0.5	10	(-)	97.6	98.2	NA	88.3
DRF, 10	0	0	(+)	NA	NA	NA	NA
		10		No loss	NA	NA	NA
	0.25	0		NA	NA	NA	NA
		10		74.9	1440	1470	1640
	0.5	0		NA	NA	NA	NA

							Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439
		5		70.7	1390	1400	1600
		10		91.1	833	880	901
		20		98.7	468	548	476
		40		99.9	237	300	218
	1	0		NA	NA	NA	NA
		10		98.5	447	518	434
	0.5	10	(-)	97.4	963	1010	1020
DRF, 100	0	0		NA	NA	NA	NA
		10		2.2	NA	NA	NA
	0.25	0		NA	NA	NA	NA
		10		75.4	13500	13200	15900
	0.5	0		NA	NA	NA	NA
		5	(+)	69.0	13100	12900	15200
		10		90.8	7840	7980	9150
		20		98.8	4320	4600	4940
		40		100[a]	2190	2420	2440
	1	0		NA	NA	NA	NA
		10		98.5	4180	4480	4880
	0.5	10	(-)	97.1	8320	8540	9450

Study System: Human liver microsomes				
Compound Incubated, Conc (µmol/L)	Protein Conc (mg/mL)	Incubation Time (min)	NADPH/UDPGA (+/-)[b]	Substrate Loss (%)
HES, 1	1	0	(+)	NA
		15		4.1
		30		5.0
		60		7.6
		0	(-)	NA
		60		5.4

Study System: Human liver microsomes				
Compound Incubated, Conc (µmol/L)	Protein Conc (mg/mL)	Incubation Time (min)	NADPH/UDPGA (+/-)[b]	Substrate Loss (%)
RDC-8439, 1	1	0	(+)	NA
		15		67.2
		30		82.2
		60		100
		0	(-)	NA
		60		100

[a]Lack of detection of substrate in timed incubation is represented as 100% loss of substrate.
[b]Cofactor present = (+), cofactor absent = (-).

11 薬物動態試験：推定代謝経路

DRF の推定代謝経路を M2.6.4.5.3 に示す。

12　　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

15 項参照。

13 薬物動態試験：排泄

表 13 雄性 Sprague Dawley ラットに MMF 標識及び Promoiety 標識[^{14}C]-DRF を単回経口投与したときの ADME（032357 / 4.2.2.5-1）

Test Articles: MMF-Labeled and Promoiety-Labeled [^{14}C]-DRF												
Species:	Rat											
Study No.:	032357											
Feeding Condition:	Fasted											
Test Article Administered:	Promoiety-labeled [^{14}C]-DRF						MMF-labeled [^{14}C]-DRF					
Number of Animals/Gender:	3 males						3 males					
Vehicle/Formulation:	50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% Methocel E50 Premium LV and 0.2% polysorbate 20, pH 4						50 mmol/L citrate buffer containing 0.5% Methocel E50 Premium LV and 0.2% polysorbate 20, pH 4					
Route of Administration:	Oral						Oral					
Dose (mg/kg):	50 (100 µCi/kg)						50 (100 µCi/kg)					
Specific Activity:	11.5 mCi/mmol for promoiety label						8.2 mCi/mmol for MMF label					
Assay:	Liquid scintillation counter											
% of Administered Dose Recovered (Mean)												
	Promoiety-Labeled [^{14}C]-DRF						MMF-Labeled [^{14}C]-DRF					
Excretion Route: Time (h)	Urine	Cage Wash	Feces[a]	Expired Air[b]	Carcass[c]	Total[d]	Urine	Cage Wash	Feces[a]	Expired Air[b]	Carcass[c]	Total[d]
6	37.15	8.07	NA	0.09	NA		11.22	3.19	NA	31.26	NA	
12	29.33	9.35	< 0.005	0.05	NA		2.39	3.39	0.21	3.14	NA	
24	8.47	2.02	1.40	0.04	NA		0.61	0.29	0.81	1.51	NA	
48	0.73	0.33	0.26	NA	NA		0.34	0.16	0.61	NA	NA	
72	0.07	0.11	0.03	NA	NA		0.12	0.10	0.22	NA	NA	
Total	75.75	19.88	1.70	0.18	0.17	97.68	14.69	7.12	1.84	35.91	14.41	73.98

[a]Samples collected at 12-, 24-, 48-, and 72-hour intervals.
[b]Samples collected at 6-, 12-, and 24-hour intervals.
[c]Collected at the end.
[d]Represents the sum total of % dose recovered across excretion routes.

14　　薬物動態試験：排泄：胆汁中

該当なし。

15 薬物動態試験：薬物相互作用

表 14 DRF の直接的、時間依存的及び代謝依存的 CYP 阻害能の評価（XT[redacted]5135 / 4.2.2.6-4）

							Test Article: DRF
Study No.:		XT[redacted]5135					
Type of Study:		Direct, time-dependent, and metabolism-dependent inhibition					
Method:		Human liver microsomes with cocktail of 7 substrates					
Enzyme	Enzyme Reaction	Direct Inhibition		Time-Dependent Inhibition		Metabolism-Dependent Inhibition	
		0-Minute Preincubation		30-Minute Preincubation Without NADPH		30-Minute Preincubation With NADPH	
		IC_{50} (μmol/L)	% Inhibition at 200 μmol/L	IC_{50} (μmol/L)	% Inhibition at 200 μmol/L	IC_{50} (μmol/L)	% Inhibition at 200 μmol/L
CYP1A2	phenacetin *O*-dealkylation	> 200	NA	> 200	NA	> 200	NA
CYP2B6	efavirenz 8-hydroxylation	> 200	NA	> 200	NA	> 200	NA
CYP2C8	amodiaquine *N*-dealkylation	> 200	14	> 200	34	> 200	41
CYP2C9	diclofenac 4'-hydroxylation	> 200	3.3	> 200	6.2	> 200	5.5
CYP2C19	*S*-mephenytoin 4'-hydroxylation	> 200	NA	> 200	4.9	> 200	NA
CYP2D6	dextromethorphan *O*-demethylation	> 200	NA	> 200	0.6	> 200	9.3
CYP3A4/5	testosterone 6β-hydroxylation	> 200	NA	> 200	NA	> 200	0
CYP3A4/5	midazolam 1'-hydroxylation	> 200	NA	> 200	0.9	> 200	5.0

表 15　HES 及び RDC-8439 の直接及び時間依存的 CYP 阻害能の評価（XT[redacted]A014 / 4.2.2.6-1）

				Test Articles: HES and RDC-8439
Study No.:	XT[redacted]A014			
Type of Study:	Direct and time-dependent inhibition			
Method:	Human liver microsomes with cocktail of 7 substrates			
	Estimated IC_{50} (μmol/L)			
	HES[a]		RDC-8439[a]	
Preincubation time	0 minutes	30 minutes	0 minutes	30 minutes
P450 Isoform (metabolite monitored)				
CYP1A2 (phenacetin *O*-dealkylation)	> 200	> 200	> 200	> 200
CYP2B6 (bupropion hydroxylation)	> 200	> 200	> 200	> 200
CYP2C8 (paclitaxel 6α-hydroxylation)	> 200	> 200	> 200	> 200
CYP2C9 (diclofenac 4'-hydroxylation)	> 200	> 200	> 200	> 200
CYP2C19 (*S*-mephenytoin 4'-hydroxylation)	> 200	> 200	> 200	> 200
CYP2D6 (dextromethorphan *O*-demethylation)	> 200	> 200	> 200	> 200
CYP3A4/5 (midazolam 1'-hydroxylation)	> 200	> 200	> 200	> 200

[a]Seven concentrations of the compound were tested (0, 0.2, 0.6, 2, 6, 20, 60, and 200 μmol/L).

表 16　DRF、RDC-8439 及び HES のヒト肝細胞における CYP 誘導能評価（XT[redacted]3079 / 4.2.2.6-2）

Test Articles: DRF, RDC-8439, and HES									
Study No.:		XT[redacted]3079							
Type of Study:		Induction							
Study System:		Cultured human hepatocytes							
DRF									
		Mean Activity Percent Positive Control[a]							
P450 Isoform	Substrate	0.3 µmol/L	1 µmol/L	3 µmol/L	6 µmol/L	10 µmol/L	30 µmol/L	100 µmol/L	300 µmol/L
CYP1A2	Phenacetin	0.177	0.135	0.357	0.271	0.156	0.156	0.468	0.234
CYP2B6	Bupropion	6.82	5.18	5.89	1.03	5.18	3.13	16.8	6.70
CYP3A4 /5	Midazolam	2.54	1.85	1.53	0.296	1.03	-0.0386	0.566	-6.78
		Mean mRNA Percent Positive Control[b]							
P450 Isoform	Substrate	0.3 µmol/L	1 µmol/L	3 µmol/L	6 µmol/L	10 µmol/L	30 µmol/L	100 µmol/L	300 µmol/L
CYP1A2	Phenacetin	-0.417	-0.599	-0.298	-0.254	-0.373	-0.268	-0.732	-0.504
CYP2B6	Bupropion	0.311	-2.54	0.311	-0.477	0.499	-0.463	-1.37	-1.37
CYP3A4 /5	Midazolam	-1.80	-0.559	-0.982	-0.533	-0.884	-2.51	-4.20	-7.23
RDC-8439									
		Mean Activity Percent Positive Control[a]							
P450 Isoform	Substrate	0.3 µmol/L	1 µmol/L	3 µmol/L	6 µmol/L	10 µmol/L	30 µmol/L	100 µmol/L	300 µmol/L
CYP1A2	Phenacetin	-0.171	-0.236	-0.0964	-0.244	-0.424	-0.354	0.293	-0.394
CYP2B6	Bupropion	-1.44	-3.29	-3.98	-6.30	-3.52	-1.96	-2.46	-5.20
CYP3A4 /5	Midazolam	-2.40	-2.95	-3.56	-4.60	-2.64	-1.28	-2.96	-6.04
		Mean mRNA Percent Positive Control[b]							
P450 Isoform	Substrate	0.3 µmol/L	1 µmol/L	3 µmol/L	6 µmol/L	10 µmol/L	30 µmol/L	100 µmol/L	300 µmol/L
CYP1A2	Phenacetin	-0.0556	-0.0779	0.152	0.225	0.0101	-0.00889	-0.117	-0.320
CYP2B6	Bupropion	1.19	-0.654	3.03	1.50	1.26	4.12	0.826	0.710
CYP3A4 /5	Midazolam	0.693	-0.551	0.243	-0.293	-0.543	-0.298	-0.476	-3.31
HES									
		Mean Activity Percent Positive Control[a]							
P450 Isoform	Substrate	0.5 µmol/L	5 µmol/L	10 µmol/L	50 µmol/L	100 µmol/L	500 µmol/L	1000 µmol/L	5000 µmol/L
CYP1A2	Phenacetin	-0.148	-0.267	-0.469	-0.467	-0.283	-0.217	0.342	2.13
CYP2B6	Bupropion	4.38	-2.11	2.02	-2.86	1.63	1.03	1.58	6.75
CYP3A4 /5	Midazolam	2.03	-0.863	0.585	-1.59	1.60	1.59	0.187	2.15
		Mean mRNA Percent Positive Control[b]							
P450 Isoform	Substrate	0.5 µmol/L	5 µmol/L	10 µmol/L	50 µmol/L	100 µmol/L	500 µmol/L	1000 µmol/L	5000 µmol/L
CYP1A2	Phenacetin	0.125	0.367	0.496	0.680	0.278	0.631	0.884	2.29
CYP2B6	Bupropion	4.04	2.84	5.02	6.17	5.97	4.34	6.00	13.4
CYP3A4 /5	Midazolam	0.444	1.45	0.667	2.00	1.84	2.23	1.24	2.68

[a]Percent positive control (%) = ([Fold change of test article-treated cells - Fold change of vehicle control]/[Fold change of positive control - Fold change of vehicle control]) × 100.
[b]Percent positive control (%) = ([Fold change in test article-treated cells - 1]/[Fold change of positive control - 1]) × 100.

表 17　　DRF、HES 及び RDC-8439 の LS-180 細胞における P-gp 誘導能評価（in vitro）
（[redacted]ALKRP1R3 / 4.2.2.6-5）

			Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439
Test System:	LS-180 cells		
Probe Substrate:	Rhodamine 123 (5 µmol/L)		
Positive Control:	Ritonavir (10 µmol/L)		
Incubation Time (hours):	72		
Incubation Temperature:	37°C		
Assay:	Fluorescence (for uptake) and quantitative polymerase chain reaction (for mRNA)		
No. of Replicates:	3		
Study No.:	[redacted]ALKRP1R3		
Treatment	Concentration (µmol/L)	% of Negative Control (uptake)	% of Vehicle Control (mRNA)
Negative control	NA	NA	NA
Ritonavir (positive control)	10	68.0	615
DRF	0.3	94.5	52.8
	3	95.1	61.5
	10	103	69.4
HES	100	95.8	75.8
	1000	108	57.0
	5000	111	81.8
RDC-8439	0.1	88.6	111
	10	86.7	45.1
	30	97.9	94.1

表 18　　DRF、HES 及び RDC-8439 の MDCKII-BCRP 細胞における BCRP 基質評価（Alkermes-01-[redacted]20[redacted] / 4.2.2.6-3）

Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439												
Test System:	Control and BCRP-transfected MDCKII cell monolayers											
Probe Substrate:	Prazosin (1 µmol/L)											
Positive Control Inhibitor:	Ko143 (1 µmol/L)											
Permeability Control:	LY (40 µg/mL)											
Incubation Time (minutes):	120 (for test articles); 60 (for prazosin)											
Incubation Temperature:	37°C ± 1°C											
Incubation Buffer:	HBSS (pH 7.4)											
Assay (Probe Substrate):	LC-MS/MS											
No. of Replicates:	3											
Study No.:	Alkermes-01-[redacted]20[redacted]											
DRF ([redacted]-[redacted]-20[redacted])												
		MDCKII Control Cells					MDCKII-BCRP Cells					
		Mean ± SD P_{app} (× 10^{-6} cm/sec)			Recovery (%)		Mean ± SD P_{app} (×10^{-6} cm/sec)			Recovery (%)		
Compound	Concentration	Apical to Basal	Basal to Apical	Efflux Ratio[b]	Apical to Basal	Basal to Apical	Apical to Basal	Basal to Apical	Efflux Ratio[b]	Apical to Basal	Basal to Apical	Net Efflux Ratio[a]
LY	40 µg/mL	0.28 ± 0.06	NA	ND	NR	NR	0.29 ± 0.10	NA	ND	NR	NR	ND
LY + DRF apically	40 µg/mL + 10 µmol/L	0.28 ± 0.08	NA	ND	NR	NR	0.24 ± 0.10	NA	ND	NR	NR	ND
LY + DRF basolaterally	40 µg/mL+ 10 µmol/L	0.23 ± 0.01	NA	ND	NR	NR	0.21 ± 0.05	NA	ND	NR	NR	ND
Prazosin	1 µmol/L	21.01 ± 0.60	23.08 ± 3.50	1.10 ± 0.17	NR	NR	3.73 ± 0.41	53.93 ± 6.15	14.46 ± 2.29	NR	NR	13.36 ± 2.91
Prazosin + Ko143	1 µmol/L + 1 µmol/L	14.34 ± 5.65	20.74 ± 3.56	1.45 ± 0.62	NR	NR	17.23 ± 0.85	23.32 ± 2.35	1.35 ± 0.15	NR	NR	-0.09 ± 0.42
DRF	10 µmol/L	18.61 ± 3.25	21.11 ± 3.93	1.13 ± 0. 29	85 ± 6	145 ± 6	17.21 ± 1.58	16.61 ± 0.24	0.97 ± 0.09	67 ± 4	120± 5	-0.17 ± 0.23
DRF	1 µmol/L	18.43 ± 4.49	15.05 ± 2.36	0.82 ± 0. 24	76 ± 11	127 ± 15	18.48 ± 3.48	11.44 ± 0.36	0.62 ± 0.12	72 ± 9	115 ± 4	-0.20 ± 0.26
HES ([redacted]-[redacted]-20[redacted])												
LY	40 µg/mL	0.49 ± 0.08	NA	ND	NR	NR	0.45 ± 0.01	NA	ND	NR	NR	ND
LY + HES apically	40 µg/mL + 5000 µmol/L	0.33 ± 0.09	NA	ND	NR	NR	0.29 ± 0.06	NA	ND	NR	NR	ND

												Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439
LY + HES basolaterally	40 µg/mL + 5000 µmol/L	0.47 ± 0. 10	NA	ND	NR	NR	0.60 ± 0.05	NA	ND	NR	NR	ND
Prazosin	1 µmol/L	26.52 ± 2.26	21.39 ± 1.53	0.81 ± 0.09	NR	NR	4.95 ± 0.27	56.96 ± 7.15	11.50 ± 1.58	NR	NR	10.69 ± 2.52
Prazosin + Ko143	1 µmol/L + 1 µmol/L	21.88 ± 2.82	22.13 ± 0.91	1.01 ± 0.14	NR	NR	20.89 ± 2.33	24.57 ± 2.50	1.18 ± 0.18	NR	NR	0.17 ± 0.24
HES	5000 µmol/L	2.20 ± 0.13	2.47 ± 0.59	1.12 ± 0. 28	84 ± 15	131 ± 9	1.35 ± 0.32	9.70 ± 0.77	7.18 ± 1.77	81 ± 4	100 ± 10	6.06 ± 2.23
HES	50 µmol/L	8.88 ± 1.24	9.20 ± 0.34	1.04 ± 0. 15	98 ± 4	101 ± 10	5.94 ± 1.05	5.29 ± 0.64	0.89 ± 0.19	88 ± 3	105 ± 1	-0.15 ± 0.22
HES ([redacted])												
LY	40 µg/mL	0.45 ± 0.03	NA	ND	NR	NR	0.29 ± 0.06	NA	ND	NR	NR	ND
Prazosin	1 µmol/L	8.85 ± 1.64	22.75 ± 4.16	2.57 ± 0.67	NR	NR	3.77 ± 0.63	56.71 ± 10.44	15.03 ± 3.74	NR	NR	12.46 ± 2.11
Prazosin + Ko143	1 µmol/L + 1 µmol/L	8.05 ± 2.09	22.56 ± 4.46	2.80 ± 0.91	NR	NR	16.33 ± 9.24	19.28 ± 3.61	1.18 ± 0.70	NR	NR	-1.62 ± 0.29
HES	5000 µmol/L	4.02 ± 0.12	2.69 ± 0.17	0.67 ± 0.05	73 ± 1	78 ± 3	2.90 ± 0.16	2.24 ± 0.11	0.77 ± 0.06	75 ± 2	102 ± 7	0.10 ± 0.12
HES + Ko143	5000 µmol/L + 1 µmol/L	3.24 ± 0.16	2.07 ± 0.07	0.64 ± 0.04	55 ± 5	50 ± 4	3.03 ± 0.62	2.34 ± 0.26	0.77 ± 0.18	75 ± 1	92 ± 1	0.13 ± 0.29
HES ([redacted])												
LY	40 µg/mL	0.46 ± 0.04	NA	ND	NR	NR	0.24 ± 0.02	NA	ND	NR	NR	ND
Prazosin	1 µmol/L	20.82 ± 10.37	26.11 ± 4.82	1.25 ± 0.67	NR	NR	5.33 ± 0.33	64.22 ± 8.90	12.04 ± 1.83	NR	NR	10.79 ± 5.31
Prazosin + Ko143	1 µmol/L + 1 µmol/L	15.82 ± 3.15	24.17 ± 1.60	1.53 ± 0.32	NR	NR	20.79 ± 3.33	26.21 ± 3.66	1.26 ± 0.27	NR	NR	-0.27 ± 0.25
HES	5000 µmol/L	1.85 ± 0.09	1.90 ± 0.28	1.03 ± 0.16	62 ± 5	76 ± 11	1.59 ± 0.12	0.74 ± 0.17	0.46 ± 0.11	62 ± 4	71 ± 3	-0.57 ± 0.13
HES + Ko143	5000 µmol/L + 1 µmol/L	2.17 ± 0.04	3.84 ± 0.22	1.77 ± 0.11	67 ± 6	89 ± 4	1.54 ± 0.08	0.95 ± 0.16	0.62 ± 0.11	64 ± 5	79 ± 4	-1.15 ± 0.07
RDC-8439 ([redacted])												
LY	40 µg/mL	0.49 ± 0.08	NA	ND	NR	NR	0.45 ± 0.01	NA	ND	NR	NR	ND
LY + RDC-8439 apically	40 µg/mL + 5.0 µmol/L	0.59 ± 0.29	NA	ND	NR	NR	0.45 ± 0.12	NA	ND	NR	NR	ND

												Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439
LY + RDC-8439 basolaterally	40 µg/mL + 5.0 µmol/L	0.53 ± 0.16	NA	ND	NR	NR	0.58 ± 0.11	NA	ND	NR	NR	ND
Prazosin	1 µmol/L	26.52 ± 2.26	21.39 ± 1.53	0.81 ± 0.09	NR	NR	4.95 ± 0.27	56.96 ± 7.15	11.50 ± 1.58	NR	NR	10.69 ± 2.52
Prazosin + Ko143	1 µmol/L + 1 µmol/L	21.88 ± 2.82	22.13 ± 0.91	1.01 ± 0.14	NR	NR	20.89 ± 2.33	24.57 ± 2.50	1.18 ± 0.18	NR	NR	0.17 ± 0.24
RDC-8439	5.0 µmol/L	0.24 ± 0.13	0.13 ± 0.06	0.55 ± 0.40	75 ± 5	89 ± 2	0.00 ± 0.00	0.14 ± 0.01	NA	NA ± NA	94 ± 1	NA
RDC-8439	0.5 µmol/L	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	NA	NA ± NA	NA ± NA	0.52 ± 0.91	0.00 ± 0.00	NA	NA ± NA	NA ± NA	NA
RDC-8439 ([redacted])												
LY	40 µg/mL	0.45 ± 0.03	NA	ND	NR	NR	0.29 ± 0.06	NA	ND	NR	NR	ND
LY + RDC-8439 apically	40 µg/mL + 10 µmol/L	1.39 ± 0.72	NA	ND	NR	NR	0.27 ± 0.10	NA	ND	NR	NR	ND
LY + RDC-8439 basolaterally	40 µg/mL + 10 µmol/L	0.57 ± 0.12	NA	ND	NR	NR	0.28 ± 0.05	NA	ND	NR	NR	ND
Prazosin	1 µmol/L	8.85 ± 1.64	22.75 ± 4.16	2.57 ± 0.67	NR	NR	3.77 ± 0.63	56.71 ± 10.44	15.03 ± 3.74	NR	NR	12.46 ± 2.11
Prazosin + Ko143	1 µmol/L + 1 µmol/L	8.05 ± 2.09	22.56 ± 4.46	2.80 ± 0.91	NR	NR	16.33 ± 9.24	19.28 ± 3.61	1.18 ± 0.70	NR	NR	-1.62 ± 0.29
RDC-8439	10 µmol/L	0.85 ± 0.11	0.61 ± 0.05	0.72 ± 0.11	90 ± 1	102 ± 1	0.31 ± 0.13	0.79 ± 0.11	2.52 ± 1.07	88 ± 1	99 ± 1	1.81 ± 1.60
RDC-8439 + Ko143	10 µmol/L + 1 µmol/L	0.81 ± 0.09	0.70 ± 0.05	0.86 ± 0.12	92 ± 3	101 ± 1	0.35 ± 0.10	0.50 ± 0.23	1.42 ± 0.77	88 ± 5	99 ± 1	0.56 ± 0.92

[a]Net efflux ratio calculated as efflux ratio(BCRP-transfected cell) - efflux ratio(Control cells).
[b]Efflux ratio calculated as $P_{app\ B\text{-}A}/P_{app\ A\text{-}B}$.

表 19　DRF、HES 及び RDC-8439 の小胞輸送阻害アッセイにおける BCRP 阻害評価（in vitro）（Alkermes-01-[redacted]20[redacted] / 4.2.2.6-3）

Test Articles: DRF, HES, and RDC-8439				
Test System:		Inside-out membrane vesicles expressing BCRP		
Probe Substrate:		Estrone-3-sulfate (1 µmol/L)		
Positive Control Inhibitor:		Ko143 (1 µmol/L)		
Preincubation Time (minutes):		15		
Incubation Temperature:		32°C ± 1°C		
Incubation Buffer:		START buffer pH 7.4		
Assay (Probe Substrate):		Liquid scintillation counting		
No. of Replicates:		3 per test article concentration		
Study No.:		Alkermes-01-[redacted]20[redacted]		
		Mean ± SD		
Compound	Concentration	ATP-Dependent Transport (pmol/mg/min)	Relative ATP-Dependent Transport (% of control)	Relative Inhibition (%)[a]
DRF	10 µmol/L	802.47 ± 65.20	85.70 ± 7.71	14
DRF	1 µmol/L	992.49 ± 140.91	105.99 ± 15.59	-6
DMSO	1 (%, v/v)	936.40 ± 36.09	100.00 ± 5.45	0
Ko143	1 µmol/L	17.20 ± 4.15	2.00 ± 0.50	98
DMSO	1 (%, v/v)	858.27 ± 47.09	100.00 ± 7.76	0
HES	5000 µmol/L	932.25 ± 27.00	115.21 ± 8.27	-15
HES	50 µmol/L	910.32 ± 36.24	112.50 ± 8.64	-12
DMSO	1 (%, v/v)	809.20 ± 53.14	100.00 ± 9.29	0
Ko143	1 µmol/L	17.20 ± 4.15	2.00 ± 0.50	98
DMSO	1 (%, v/v)	858.27 ± 47.09	100.00 ± 7.76	0
RDC-8439	5.00 µmol/L	928.46 ± 69.02	113.31 ± 13.02	-13
RDC-8439	0.50 µmol/L	878.01 ± 78.43	107.16 ± 13.40	-7
DMSO	1 (%, v/v)	819.37 ± 71.76	100.00 ± 12.39	0
Ko143	1.00 µmol/L	17.20 ± 4.15	2.00 ± 0.50	98
DMSO	1 (%, v/v)	858.27 ± 47.09	100.00 ± 7.76	0

[a]Calculated as (relative ATP-dependent transport for vehicle) - (relative ATP-dependent transport for test article).

表 20　HES の取り込みトランスポーター阻害評価（in vitro）（Alkermes-01-[redacted]20[redacted] / 4.2.2.6-3）

				Test Article: HES
Test System:		MDCKII cells transfected with MATE1 or MATE2-K; HEK293 cells transfected with OAT1 or OAT3 or OATP1B1 or OATP1B3 or OCT1 or OCT2 transporters		
Probe Substrate:		Metformin (MATE1, MATE2-K, OCT1, and OCT2); tenofovir (OAT1); estrone-3-sulfate (OAT3); $E_2$17βG (OATP1B1); cholecystokinine-8 (OATP1B3)		
Positive Control Inhibitor:		Pyrimethamine (1 µmol/L): MATE1; pyrimethamine (10 µmol/L): MATE2-K; probenecid (300 µmol/L): OAT1; probenecid (500 µmol/L): OAT3; rifampin (50 µmol/L): OATP1B1 and OATP1B3; verapamil (100 µmol/L): OCT1; verapamil (300 µmol/L): OCT2		
Incubation Time (minutes):		15 (MATE1, MATE2-K); 2 (OAT1); 1 (OAT3); 3 (OATP1B1); 2 (OATP1B3); 5 (OCT1); 1 (OCT2)		
Incubation Temperature:		37°C ± 1°C		
Incubation Buffer:		KH (pH 8.0) for MATE1 and MATE2-K; KH (pH 7.4) for OATP1B1 and OAT3; HBSS (pH 7.4) for OATP1B3, OAT1, OCT1, and OCT2		
Assay (Probe Substrate):		Liquid scintillation counting		
No. of Replicates:		3 per test article concentration per transporter		
Study No.:		Alkermes-01-[redacted]20[redacted]		
Compound	Nominal Conc.	Mean ± SD Transporter-Specific Accumulation (cpm)	Relative Transporter-Specific Accumulation (% of control)	Relative Inhibition (%)[a]
MATE1				
HES	5000 µmol/L	324.00 ± 11.05	100.41 ± 3.76	0
HES	50 µmol/L	317.67 ± 4.62	98.45 ± 2.08	2
DMSO	1 (%, v/v)	322.67 ± 4.97	100.00 ± 2.18	0
Pyrimethamine	1 µmol/L	23.67 ± 2.31	7.37 ± 0.76	93
DMSO	1 (%, v/v)	321.00 ± 11.31	100.00 ± 4.98	0
MATE2-K				
HES	5000 µmol/L	406.33 ± 7.96	102.27 ± 2.23	-2
HES	50 µmol/L	392.00 ± 10.98	98.66 ± 2.92	1
DMSO	1 (%, v/v)	397.33 ± 3.83	100.00 ± 1.36	0
Pyrimethamine	10 µmol/L	29.33 ± 2.52	7.58 ± 0.70	92
DMSO	1 (%, v/v)	387.00 ± 13.59	100.00 ± 4.97	0
OAT1				
HES	5000 µmol/L	2216.00 ± 259.16	81.13 ± 10.98	19
HES	50 µmol/L	2360.67 ± 450.83	86.43 ± 17.52	14
DMSO	1 (%, v/v)	2731.33 ± 186.08	100.00 ± 9.63	0
Probenecid	300 µmol/L	96.67 ± 15.08	3.61 ± 0.62	96
DMSO	1 (%, v/v)	2680.67 ± 185.45	100.00 ± 9.78	0
OAT3				

				Test Article: HES
HES	5000 µmol/L	5818.67 ± 351.06	101.63 ± 9.68	-2
HES	50 µmol/L	5486.67 ± 83.87	95.83 ± 7.21	4
DMSO	1 (%, v/v)	5725.33 ± 421.81	100.00 ± 10.42	0
Probenecid	500 µmol/L	177.67 ± 32.25	3.07 ± 0.57	97
DMSO	1 (%, v/v)	5790.00 ± 227.32	100.00 ± 5.55	0
OATP1B1				
HES	5000 µmol/L	2830.00 ± 221.85	93.59 ± 7.46	6
HES	50 µmol/L	3095.33 ± 114.64	102.37 ± 4.06	-2
DMSO	1 (%, v/v)	3023.67 ± 42.97	100.00 ± 2.01	0
RIF	50 µmol/L	60.00 ± 12.08	1.79 ± 0.37	98
DMSO	1 (%, v/v)	3354.33 ± 124.32	100.00 ± 5.24	0
OATP1B3				
HES	5000 µmol/L	709.00 ± 49.34	86.85 ± 9.83	13
HES	50 µmol/L	801.67 ± 39.87	98.20 ± 10.04	2
DMSO	1 (%, v/v)	816.33 ± 72.92	100.00 ± 12.63	0
RIF	50 µmol/L	13.67 ± 8.98	1.52 ± 1.01	98
DMSO	1 (%, v/v)	899.00 ± 97.72	100.00 ± 15.37	0
OCT1				
HES	5000 µmol/L	690.00 ± 26.58	99.76 ± 4.09	0
HES	50 µmol/L	677.33 ± 29.89	97.93 ± 4.53	2
DMSO	1 (%, v/v)	691.67 ± 9.66	100.00 ± 1.98	0
Verapamil	100 µmol/L	30.33 ± 5.51	4.59 ± 0.85	95
DMSO	1 (%, v/v)	660.33 ± 22.72	100.00 ± 4.87	0
OCT2				
HES	5000 µmol/L	320.00 ± 14.45	103.23 ± 5.62	-3
HES	50 µmol/L	322.33 ± 15.63	103.98 ± 5.95	-4
DMSO	1 (%, v/v)	310.00 ± 9.42	100.00 ± 4.30	0
Verapamil	300 µmol/L	18.67 ± 4.16	6.25 ± 1.44	94
DMSO	1 (%, v/v)	298.67 ± 17.59	100.00 ± 8.33	0

[a]Calculated as (relative transporter-specific accumulation for vehicle) - (relative transporter-specific accumulation for test article).

表 21　HES の取り込みトランスポーター基質評価（in vitro）（Alkermes-01-[redacted]20[redacted] / 4.2.2.6-3）

Test Article: HES						
Test System:	MDCKII cells transfected with MATE1 or MATE2-K; HEK293 cells transfected with OAT1 or OAT3 or OCT2 transporters					
Probe Substrate:	Metformin (MATE1, MATE2-K, and OCT2); Tenofovir (OAT1); E3S (OAT3)					
Positive Control Inhibitor:	Pyrimethamine (1 µmol/L): MATE1; pyrimethamine (10 µmol/L): MATE2-K; probenecid (300 µmol/L): OAT1; probenecid (500 µmol/L): OAT3; verapamil (300 µmol/L): OCT2					
Incubation Time (minutes):	15 (MATE1, MATE2-K); 2 (OAT1); 1 (OAT3); 1 (OCT2)					
Incubation Temperature:	37°C ± 1°C					
Incubation Buffer:	KH (pH 8.0) for MATE1 and MATE2-K; KH (pH 7.4) for OAT3; HBSS (pH 7.4) for OAT1 and OCT2					
Assay (Probe Substrate):	Liquid scintillation counting					
No. of Replicates:	3 per test article concentration per transporter					
Study No.:	Alkermes-01-[redacted]20[redacted]					
	Conditions		Accumulation (pmol/mg protein)			
Compound	min	µmol/L	In MATE1-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
HES	10	5000	162069.65 ± 13457.46	154938.02 ± 1342.58	7131.63 ± 13524.26	1.05
HES	10	50	17148.49 ± 7821.90	25077.92 ± 4400.45	-7929.42 ± 8974.74	0.68
	Conditions		Positive Control (accumulation in cpm)			
Compound	min	µmol/L	In MATE1-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
Metformin	15	10	398.67 ± 22.72	20.67 ± 0.58	378.00 ± 22.73	19.29
Metformin + Pyrimethamine	15	10+1	49.33 ± 2.52	21.33 ± 1.53	28.00 ± 2.94	2.31
	Conditions		Accumulation (pmol/mg protein)			
Compound	min	µmol/L	In MATE2-K-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
HES	10	5000	142017.01 ± 15204.21	143989.81 ± 2042.91	-1972.81 ± 15340.85	0.99
HES	10	50	20876.62 ± 4543.62	24244.57 ± 1999.82	-3367.94 ± 4964.25	0.86
	Conditions		Positive Control (accumulation in cpm)			
Compound	min	µmol/L	In MATE2-K-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
Metformin	15	10	349.00 ± 10.44	22.00 ± 1.00	327.00 ± 10.49	15.86
Metformin + Pyrimethamine	15	10 + 10	40.33 ± 4.04	20.33 ± 2.08	20.00 ± 4.55	1.98
	Conditions		Accumulation (pmol/mg protein)			
Compound	min	µmol/L	In OAT1-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
HES	10	5000	40678.62 ± 9833.04	14101.49 ± 1210.38	26577.13 ± 9907.26	2.88
HES	10	50	35077.38 ± 2628.22	59333.81 ± 2372.82	-24256.43 ± 3540.88	0.59
	Conditions		Positive Control (accumulation in cpm)			
Compound	min	µmol/L	In OAT1-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation

						Test Article: HES
Tenofovir	2	5	3292.67 ± 70.30	17.67 ± 1.15	3275.00 ± 70.31	186.38
Tenofovir + Probenecid	2	5 + 300	121.33 ± 7.02	22.67 ± 3.51	98.67 ± 7.85	5.35
OAT1 Transporter Substrate Assay – Inhibition Follow-Up						
	Conditions		Accumulation (pmol/mg protein)			
Compound	min	µmol/L	In OAT1-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
HES	10	5000	20826.39 ± 3730.51	20364.58 ± 751.71	461.82 ± 3805.49	1.02
HES + Probenecid	10	5000 + 300	18653.31 ± 1584.19	2170.34 ± 1965.58	-2617.03 ± 2524.51	0.88
	Conditions		Positive Control (accumulation in cpm)			
Compound	min	µmol/L	In OAT1-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
Tenofovir	2	5	1960.00 ± 213.83	24.00 ± 11.14	1936.00 ± 214.12	81.67
Tenofovir + Probenecid	2	5 + 300	67.33 ± 4.73	22.33 ± 2.31	45.00 ± 5.26	3.01
	Conditions		Accumulation (pmol/mg protein)			
Compound	min	µmol/L	In OAT3-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
HES	10	5000	27066.59 ± 4382.94	16708.90 ± 2547.08	10357.69 ± 5069.30	1.62
HES	10	50	38355.48 ± 1650.86	54140.04 ± 2026.98	-15784.56 ± 2614.19	0.71
	Conditions		Positive Control (accumulation in cpm)			
Compound	min	µmol/L	In OAT3-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
E3S	1	1	6676.67 ± 102.00	87.33 ± 18.56	6589.33 ± 103.68	76.45
E3S + Probenecid	1	1 + 500	377.33 ± 19.14	76.33 ± 14.36	301.00 ± 23.93	4.94
	Conditions		Accumulation (pmol/mg protein)			
Compound	min	µmol/L	In OCT2-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
HES	10	5000	31604.97 ± 5250.48	26145.98 ± 379.07	5458.99 ± 5264.15	1.21
HES	10	50	33502.07 ± 471.70	51180.24 ± 2136.81	-17678.17 ± 2188.26	0.65
	Conditions		Positive Control (accumulation in cpm)			
Compound	min	µmol/L	In OCT2-Expressing Cells	In Control Cells	Active Transport	Fold Accumulation
Metformin	1	10	459.00 ± 8.19	19.33 ± 1.53	439.67 ± 8.33	23.74
Metformin + Verapamil	1	10 + 300	46.67 ± 4.51	15.33 ± 1.15	31.33 ± 4.65	3.04

16 薬物動態試験：その他

M2.6.4.8 参照。