# 博士論文

# In vitro データに基づく

代謝消失型化合物のヒト体内動態予測法に関する研究: 生理学的薬物速度論におけるアルブミン媒介性肝移行の意義及び ヒト iPS 細胞由来小腸細胞の透過特性の応用

# 令和3年3月

# 眞弓 慶

岡山大学大学院

医歯薬学総合研究科

目次

 略語表	 	 1
古秋		_

# 本論

# 第一章

生理学	学的薬物	速度論モデルの改良及び静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移の予測	15
1.	-1. モデ	リング&シミュレーション法	.17
1.	-1-1.	PBPK モデル	17
1.	-1-2.	従来型 bottom-up PBPK 法	18
1.	-1-3.	新規 bottom-up PBPK 法	20
1.	-2. 実験	材料及び入力パラメータの導出方法	22
1.	-3. 結果		28
1.	-4. 考察		32

# 第二章

hiPSC-IECs を活用した消化管透過性評価及び新規 bottom-up PBPK 法との組み合わせに	よる
経口投与後のヒト血漿中濃度推移の予測	41
2-1. 実験材料及び hiPSC-IECs を活用したヒト消化管透過性の評価方法	42
2-2. モデリング&シミュレーション法	50
2-3. 結果	53
2-4. 考察	61

第三章

in vitro 評価に基づく組織移行性予測方法及び新規 bottom-up PBPK 法との組み合わせによる
静脈内及び経口投与後のヒト血漿濃度推移の予測
3-1. 実験材料及び in vitro 評価結果に基づく組織移行性予測方法
3-2. 結果
3-3. 考察
総括
謝辞92
引用文献

### 略語表

本文中,式中及び図中で使用した略号とその正式名称及び日本語訳は以下の通りである.

- AAFE: Absolute average fold error (絶対平均予測誤差)
- AFE: Average fold error (平均予測誤差)
- AGP: al-acid glycoprotein (al 酸性糖タンパク質)
- AL: Albumin (アルブミン)
- AUC: Area under the plasma concentration time curve (血漿中濃度-時間曲線下面積)
- $AUC_{0-t}$ : AUC from time 0 to t
- $AUC_{0-\infty}$ : AUC from time 0 to infinity
- AUMC: The first moment of the area under the plasma concentration-time curve (血漿中濃度-時間

曲線の1次モーメント下面積)

- BA: Bioavailability (生物学的利用率)
- BCRP : Breast cancer resistance protein
- BMP : Bone morphogenetic protein
- CAT: Compartmental absorption and transit
- CES : Carboxylesterase
- CL<sub>Uint</sub>: Hepatic unbound intrinsic clearance (非結合型化合物の肝固有クリアランス)
- CLUint, in vitro : in vitro CLUint
- CLUint, in vivo: in vivo CLUint
- CL<sub>int</sub>: Hepatic intrinsic clearance (肝固有クリアランス)
- CLint, in vitro : in vitro CLint
- CLint, in vivo : in vivo CLint
- CLtot: Total body clearance (全身クリアランス)
- CYP: Cytochrome P450
- Cmax: Maximum concentration in plasma (最高血漿中濃度)
- C<sub>tissue</sub> : Concentration in tissue
- DMSO: Dimethyl sulfoxide

- D : Dilution factor
- ECCS: Extended clearance classification system
- $F_a \times F_g$ : Intestinal availability (小腸アベイラビリティ)
- $F_h$ : Hepatic availability (肝アベイラビリティ)
- Fui : Unionized fraction
- E<sub>h</sub>: Hepatic extraction rate (肝抽出率)
- GAPDH : Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
- GER:Gastric emptying rate (胃内容物排出速度)
- GFR: Glomerular filtration rate (糸球体ろ過速度)
- IQ: International consortium for innovation & quality in pharmaceutical development
- Kptissue : Tissue-to-plasma partition coefficient (組織移行性)
- Kptissue,corrected : Kptissue corrected by the scaling factor
- LC-MS/MS : Liquid chromatography-tandem mass spectrometry
- MRT: Mean residence time (平均滞留時間)
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: Disodium phosphate (リン酸水素二ナトリウム)
- NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: Sodium dihydrogen phosphate (リン酸二水素ナトリウム)
- NaCl: Sodium chloride (塩化ナトリウム)
- OATP : Organic anion-transporting peptide
- OAT : Organic anion-transporter
- OCT : Organic cation transporter
- P-gp: P-glycoprotein
- PAMPA: Parallel artificial membrane permeation assay plate system
- PBPK: Physiologically-based pharmacokinetics (生理学的薬物速度論)
- PBS: Phosphate-buffered saline
- PCR: Polymerase chain reaction
- PEPT : Peptide transporter
- PK: Pharmacokinetics (薬物動態)
- PLR : Plasma-to-liver albumin concentration ratio
- PXR : Pregnane X receptor

- Pe: Permeability coefficient (膜透過係数)
- Q: Blood flow rate (血流速度)
- R<sup>2</sup>: Coefficient of determination (決定係数)
- R<sub>BP</sub>: Blood-to-plasma concentration ratio (血液/血漿濃度比)
- RMSE: Root mean-squared error (二乗平均平方根誤差)
- SAR: Structure-activity relationship (構造活性相関)
- TGF: Transforming growth factor
- T<sub>max</sub>: Time to the maximum concentration in plasma (最高血漿中濃度到達時間)
- UDP : Uridine diphosphate
- UGT: UDP-glucuronosyltransferase
- VD<sub>3</sub>: 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>
- V<sub>plasma</sub>: Volume of plasma (血漿容積)
- Vss: Distribution volume at steady state (定常状態の分布容積)
- Vss, in vitro : Vss in rats obtained from in vitro study
- V<sub>ss, rat</sub>: V<sub>ss</sub> obtained from rat PK study
- V<sub>ss, simulation, rat</sub> : V<sub>ss</sub> in rats obtained from the simulation
- V<sub>tissue</sub>/fu<sub>tissue</sub>: Volume of distribution for the unbound drug (非結合型化合物の分布容積)
- V<sub>tissue</sub>: Volume of tissue (組織容積)
- cAMP : Cyclic adenosine monophosphate
- fub, fublood: Unbound fraction in blood (血液中タンパク非結合率)
- fu<sub>inc</sub>: Unbound fraction in hepatocyte incubations (肝細胞代謝安定性評価におけるタンパク非結 合率)
- fuliver: Unbound fraction in liver (肝臓中タンパク非結合率)
- fum: Unbound fraction in muscle (筋肉中タンパク非結合率)
- fup-app: Apparent unbound fraction in plasma (分子型化合物の血漿中タンパク非結合率)
- fup, fuplasma: Unbound fraction in plasma (血漿中タンパク非結合率)
- fut, futissue: Unbound fraction in tissue (組織中タンパク非結合率)
- hiPSCs: Human induced pluripotent stem cells (ヒト iPS 細胞)
- hiPSC-IECs: hiPSCs derived intestinal epithelial cells (ヒト iPS 細胞由来小腸細胞)

- ka, app: Apparent permeability coefficient (見かけの吸収速度定数)
- ka, in vivo: in vivo permeability coefficient (in vivo 吸収速度定数)
- kel: Elimination rate constant (消失速度定数)
- $k_t$  : Transit rate constant
- logP: n-octanol water partition coefficient (油水分配係数)
- mRNA: Messenger ribonucleic acid
- pKa: Negative log of the acid dissociation constant (酸解離定数)
- r: Correlation coefficient (相関係数)
- t<sub>1/2</sub>: Elimination half-life of plasma concentration (血漿中濃度半減期)
- velim: Elimination velocity in the liver (肝代謝速度)
- μ: 95% confidence interval (95%信頼区間)

新薬の開発は 9-17年 (Mori, 2014) と長期間を要し、その成功確率は 1/10,000 (Shanti et al., 2018) -1/30,000 (Mori, 2014) と低い. 創薬研究が極めて高難易度となる一因として、非臨 床段階の探索研究において、化合物の臨床有用性を判断するための評価プロセスが未だ十 分でないことが挙げられる.探索研究では, high-throughput screening 法などに代表される in vitro 試験によって化合物特性を評価後、実験動物を用いて薬効試験及び安全性試験を実施 する.一連の評価サイクルから得られる情報は、化合物の構造変換の方向性を定めるために 活用されるが、いずれの情報も実験動物やヒト由来試料を用いた評価に基づいており、ヒト における薬物動態 (PK) を基にした判断ではない. また, 探索研究で見出された有望化合物 は臨床試験に供されるが、実験動物とヒトの生体内挙動に種差が認められる化合物は、臨床 試験で期待される結果を獲得できず,新薬開発の失敗に繋がる場合がある.即ち,創薬研究 では、ヒトで高い有効性及び安全性を有する化合物の創製を目的としているが、探索研究で は, ヒト PK の情報を基にした化合物の構造最適化や臨床有用性の判断ができていない. こ こで, 創薬の初期段階である lead optimization stage において迅速かつ高確度でヒト PK を予 測可能となれば, ヒト PK 情報に基づく化合物の構造最適化を実現できる. また, 従来の探 索研究では,動物試験で得た PK 情報を基に薬効用量や安全域を判断しているが,ヒト PK で規定される有効性及び安全域を基に臨床有用性を判断可能となる場合、動物間の種差に 起因する臨床有用性の誤判断の懸念が低くなることから,新薬開発の成功率向上に繋がる と考えられる.

ヒトPK を予測する方法は,経験的予測手法と理論的予測手法に大別される. single species scaling 法 (Dedrick, 1973) や Allometric scaling 法 (Boxenbaum, 1982; Mordenti, 1986) に代表 される経験的予測手法は、ラット、イヌ及びサル等を用いた体内動態試験から得られる全身 クリアランス (CL<sub>tot</sub>) または定常状態の分布容積 (V<sub>ss</sub>)の値とヒトを含む各動物種の体重 や脳重量との相関関係を基に、ヒト CL<sub>tot</sub> またはヒト V<sub>ss</sub>を予測する手法である.しかし、こ のような経験的予測手法は、代謝安定性やタンパク結合率に動物種差が認められる場合、ヒト 血漿中濃度推移の予測確度が低くなり (Horiuchi et al., 2018)、実測比 2 倍以内の範囲に入 る化合物の割合が 50%未満となることが報告されている (Lombardo et al., 2013).また、経

験的予測手法は、イヌやサル等の高次動物を使用するという特性上、体内動態試験に必要な 化合物原末量が約 100-200 mg となる.従って、経験的予測手法は、ヒト PK の予測性が乏 しい点に加えて、評価の迅速性やコストの観点からも、探索研究で汎用することが困難な方 法である.

これに対し,理論的予測手法は,生理学的薬物速度論 (Physiologically-based pharmacokinetics; PBPK) モデルを基盤とし, ヒトの生理学的環境 (組織容積, 血流速度など) を反映した組織コンパートメントを数理学的モデルで表現することで、生体における化合 物血漿中濃度推移を理論的に予測する方法である (Teorell, 1937). 医薬品開発において, PBPK モデルに基づくヒト PK パラメータの予測確度の評価基準は、化合物の安全域が極め て狭い化合物を除き, 実測値比2倍以内を示す必要があると, 製薬企業及び規制当局関係者 から構成された International Consortium for Innovation & Quality in Pharmaceutical Development (IQ) PBPK working group において提示されており (Jones et al., 2015; Sager et al., 2015), 医薬 品開発の当局申請資料では、この評価基準を満たす場合にのみ PBPK モデルを用いた考察 が可能となる (Shebley et al., 2018). ヒト試料を用いた in vitro 試験結果等を数理学モデルに 入力する手法 (bottom-up PBPK 法) は、基本的な経験的予測手法とは異なり、体内動態特性 の種差がヒト PK パラメータの予測確度に影響することがないため, 比較的高い予測確度が 期待できる. また, イヌやサル等を用いた体内動態試験が不要となるため, 評価の迅速性や コスト面での課題は少ないと考えられる.しかし,米国製薬協の検証 (Poulin et al., 2011) で は、生体内で取り込みトランスポーターの影響を受けない代謝消失型化合物を用いて静脈 内及び経口投与後のヒト血漿中濃度推移を予測した場合, ヒト PK パラメータの予測値は実 測値と比較して平均 3 - 4 倍の乖離が認められており,多くの研究者が bottom-up PBPK 法 (従来型 bottom-up PBPK 法) を用いたヒト血漿中濃度推移の予測性を検証しているが,創薬 の現場で活用できる程の予測確度を得られない (De Buck et al; 2007; Poulin, Kenny et al., 2012; Sayama et al., 2013; Horiuchi et al., 2018). また,代謝消失型化合物と比較して複雑な生 体内挙動を示す取り込みトランスポーターの基質となる化合物では、生体における取り込 み速度を再現可能な in vitro 試験方法について議論されており (Shitara et al., 2013; Mathialagan et al., 2017; Liang et al., 2020), 肝臓及び腎臓に発現する広範なトランスポーター の基質性を示す化合物群を用いて、全身の組織コンパートメントを有する bottom-up PBPK

法により予測適応性を検討された報告例はない.そこで,著者は,創薬の探索研究において ヒトの生体内挙動に基づく化合物の構造最適化の実現及び臨床有用性の適切な判断に貢献 することを目的として,迅速かつ高確度で代謝消失型化合物のヒト血漿中濃度推移を予測 可能とする新規手法の構築を目指した.

Bottom-up PBPK 法を基に静脈内及び経口投与後の血漿中濃度推移を予測するためには、 化合物固有のパラメータとして,肝代謝速度 (veim), 組織と血漿における化合物濃度比であ る組織移行性 (Kptissue) 及び消化管吸収性を表す見かけの吸収速度定数 (ka, app) が必要とな る. 従来型 bottom-up PBPK 法において、Velim は、血漿中に存在するタンパク非結合型薬物 が組織へ移行すると仮定し (フリー理論, Lin 2006; Trainor 2007), 代謝過程を予測する他, 組織に流入した薬物は, 組織血管中で速やかに拡散・攪拌されることで組織血管中の薬物濃 度が一定となるという仮定 (well-stirred モデル) に基づき全身へと分布する (De Buck et al; 2007; Sayama et al., 2013). 肝臓コンパートメントのみに着目し、フリー理論及び well-stirred モデルを基に,25の代謝消失型化合物のヒト肝クリアランス (CL<sub>b</sub>) を予測した場合,絶対 平均予測誤差 (AAFE) 及び実測比2倍以内に入る割合 (% within 2-fold error) は, それぞれ 2.6 及び 48%と報告されている (Poulin, Kenny et al., 2012). また,従来型 bottom-up PBPK 法 により, 16の代謝消失型化合物の CL<sub>tot</sub>を予測した場合, AAFE 及び% within 2-fold error は, それぞれ 4.6 及び 18.8%と報告されていることから, IQ PBPK working group が提唱する評価 基準を指標とした場合,従来型 bottom-up PBPK 法による代謝消失過程の予測性は低い (Horiuchi et al., 2018). フリー理論以外の膜透過を定義する条件として, リン脂質を主成分と する細胞膜が負に帯電していることに因子し、血漿中のタンパク非結合型化合物のうち分 子型のみが細胞膜を透過するという理論 (pH 分配仮説, Shore et al., 1957; Yu et al., 1996; Youdim et al., 2003, Fig. 0-1) が報告されている. 25 の代謝消失型化合物について pH 分配仮 説を組み込んだ well-stirred モデルにより CL<sub>h</sub>を予測した場合, AAFE 及び% within 2-fold error がそれぞれ 2.3 及び 52%であり (Poulin, Kenny et al., 2012), フリー理論と比較して僅か ながら予測確度が改善する (Berezhkovskiy, 2011) ことが報告されている. また, Poulin 及び Kenny らの研究 (Poulin, Kenny et al., 2012) において, 血漿中で主にアルブミンに結合する 中性及び酸性化合物 (Kragh-Hansen et al., 2002; Ghuman et al., 2005) は、塩基性化合物と比較 して CL<sub>b</sub>の予測性が低く,実測値を過小評価する傾向にあった.アルブミンは,薬剤の結合

サイトに塩基性アミノ酸であるヒスチジンやリジンを含むことから、負に帯電する肝細胞 腹とイオン性相互作用を示すことが報告されている (Burczynski et al., 2001; Elmadhoun et al., 2001). 更に, アルブミン結合形化合物は, 細胞膜近傍においてアルブミンとの平衡解離定 数に動的な変化が生じ, フリー理論や pH 分配仮説に基づく場合と比較して細胞内へ分配さ れる化合物の割合が増加することが報告されており, (アルブミン媒介性肝移行, Tsao et al., 1988, Fukuchi et al., 2017; Riccardi et al., 2017; Miyauchi et al., 2018; Bteich et al., 2020, Fig. 0-1), Poulin らは, 肝細胞表面におけるアルブミン結合形リガンドの動的な平衡状態の変化は, 肝 実質細胞内と血漿におけるアルブミン濃度比 (PLR)を基に説明できることを示した (Poulin, Hop et al., 2012; Poulin 2013; Poulin et al., 2016). そこで,著者は,従来型 bottom-up PBPK 法において CL<sub>tot</sub> 及び CL<sub>h</sub>の予測性が低い理由が,血漿中及び肝臓中における化合物 の分子型分率及び肝細胞とアルブミンの相互作用に伴うタンパク質結合型化合物の平衡状 態の変化を考慮できていないことに起因すると考え, CL<sub>tot</sub>の予測性の改善には, PBPK モデ ルの構成パラメータである  $v_{elim}$  の算出過程に, pH 分配仮説及びアルブミン媒介性肝移行の 機序 (Fig. 0-1)を組み込む必要があると仮説立てた.



Fig. 0-1. Schemes of compound penetration into hepatocytes based on pH partition hypothesis and albumin-mediated hepatic uptake.

また, bottom-up PBPK 法によりヒト血漿中濃度推移を予測するためには, 各組織コンパ ートメントに Kptissue を入力する必要がある. 従来型 bottom-up PBPK 法では, tissue composition-based equation (Rodgers et al., 2007) により予測されたヒト Kptissue が汎用される. Tissue composition-based equation は, 化合物の物理化学的性質 (酸解離定数: pKa, 油水分配 係数: logP)を基に、組織構成成分と化合物との親和性を理論的に解析することで、Kptissueを 得る方法である.しかし, Rodgers らの感度分析による予測性の検証によれば, logP が3以 上を示す塩基性化合物及び弱酸性化合物において、組織分布の予測誤差が指数関数的に増 大し, 従来型 bottom-up PBPK 法により予測されたヒト Vss は, 特に高脂溶性化合物におい て, 実測と比較して最大 133 倍の予測誤差が認められている (Rodgers et al., 2007). 更に, tissue composition-based equation を基に,種々の代謝消失型化合物についてヒト V<sub>ss</sub>を予測し た場合, % within 2-fold error は, 32% (De Buck et al., 2007), 43% (Berry et al., 2011), 53% (Berry et al., 2010) 及び 60% (Sayama et al., 2010) と報告されていることから, 従来型 bottom-up PBPK 法ではヒト V<sub>ss</sub>の予測性が低いと考えられた.一方で、第I相臨床試験以降において薬 物間相互作用や薬効及び副作用発現の時間推移の予測に用いられる top-down PBPK 法は, tissue composition-based equation により算出された Kptissue を臨床試験より得られるヒトの Vss で補正することで、ヒト血漿中濃度推移を高い確度で再現することが可能な予測手法であ る (Peters, 2008; Chen et al., 2016, Wang et al., 2016). 創薬の探索研究において, ヒト V<sub>ss</sub>を入 手することは不可能であるが、ラット Vssはラット体内動態試験結果から得られる血漿中濃 度推移をモデル非依存型の薬物動態解析することで獲得可能である. また, 化合物の組織分 布に関連するパラメータのうち,非結合型化合物の分布容積 (Vtissue/futissue) が,ヒトとラッ トにおいて正の相関を示すことが報告されている (Sawada et al., 1985; Imawaka et al., 2009). 以上の報告を基に,著者は, top-down PBPK 法と同様に, Kptissueの計算値を実験値により補 正する手法に着眼し、ラット Vss 及び組織分布の種差を用いて Kptissue を補正することによ り, bottom-up PBPK 法により得られる Vss の予測性が改善できると仮説立てた.

そこで、第一章では、PBPK モデルを構成する肝代謝及び組織移行過程に着眼し、化合物の生体内挙動を反映した  $v_{elim}$  及び  $Kp_{tissue}$  の計算方法について検討する.  $v_{elim}$  では、従来法で用いられるフリー理論に代わり、pH 分配仮説及びアルブミン媒介性肝移行の機序を考慮した新規算出方法を、 $Kp_{tissue}$  では、従来法で活用される tissue composition-based equation に加え、ラット体内動態試験より得られる  $V_{ss}$  ( $V_{ss, rat}$ )、及びラットとヒトにおける  $V_{tissue}/fu_{tissue}$ の

種差に基づく新規算出方法を、それぞれ検討する.加えて、上述する velim 及び Kptissue の導 出過程を含む bottom-up PBPK 法 (新規 bottom-up PBPK 法) を用いて、種々の代謝消失型化 合物について静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移及び PK パラメータを予測し、得られた予 測確度を指標に、従来法及び IQ PBPK working group が提唱する評価基準と比較することで、 velim 及び Kptissue の新規算出手法の予測性改善への寄与と新規予測法としての有用性を論述 する.

Bottom-up PBPK 法を活用して経口投与後のヒト血漿中濃度推移を予測するためには、velim 及び Kptissue に加え、消化管からの吸収性を反映したパラメータである ka. app を PBPK モデル の小腸コンパートメントに入力する必要がある.従来型 bottom-up PBPK 法において, ka, app は、ヒトにおける膜透過係数 (Pe.invive) が既知である複数の化合物を用いて膜透過性試験を 実施し、Peinvivoと膜透過性試験より得た膜透過係数 (Pe) を検量線として、予測対象の化合 物について Peから Pe. in vivo を算出後, Pe. in vivo と消化管半径等を基に推定される (Peters et al., 2008; Poulin et al., 2011; Horiuchi et al., 2018). これまで、Peは、結腸癌由来の株化細胞である Caco-2 細胞 (Peters, 2008; Poulin et al., 2011) や人工膜 (parallel artificial membrane permeation assay plate system; PAMPA, Kansy et al., 1998; Horiuchi et al., 2018) 等を用いて評価されてきた. Caco-2 細胞は、上皮細胞様の形態を示し、単層膜を形成するため小腸上皮モデルとして汎 用されるが,薬物代謝酵素の cytochrome P450 3A4 (CYP3A4)の mRNA 発現量が成人の小腸 上皮細胞と比較して著しく低いため (Kacevska et al., 2008),小腸における代謝の寄与を考慮 できない (Akazawa et al., 2018). また, 疎水性フィルターにリン脂質を塗布し, 生体膜に類 似した脂質膜を保持した PAMPA は,受動拡散の評価のみが可能となる (Kansy et al., 1998). しかし、ヒトの消化管では、CYP3A4 や薬剤排泄トランスポーターの P-glycoprotein (P-gp) が化合物の膜透過性に対して極めて重要な役割を果たしているため (Kacevska et al., 2008), Caco-2 細胞及び PAMPA を用いた膜透過性試験では, 代謝酵素やトランスポーターの寄与を 含む消化管透過性の評価が困難である.また、ka, app の計算過程で必要なパラメータである Pe.invivoは、ヒトの空腸近位に挿入された2つのバルーン間に化合物含有の灌流液を循環し、 灌流液中に含まれる化合物量の減少量から算出される (double balloon 法: Takamatsu et al., 1997; Lennernäs, 2007). Double balloon 法では, 化合物の経時的な吸収挙動を in situ で評価で きるが、体循環に移行する化合物だけでなく、小腸上皮細胞に残留または吸着する化合物も

吸収されると仮定するため、化合物の吸収量及び吸収速度定数を過大評価する可能性がある.

近年, Caco-2 細胞や PAMPA に代わるヒト消化管透過性の評価系として, ヒト iPS 細胞由 来小腸細胞 (hiPSC-IECs) の有用性が検討されている. hiPSC-IECs は, 生体での胚発生過程 を模倣し,分化多能性を有するヒト iPS 細胞 (hiPSCs, Takahashi et al., 2006; Takahashi et al., 2007) から、内胚葉及び小腸前駆細胞を経て細胞形態を変化させることで得られ、化合物の 消化管透過に重要な役割を果たす薬物輸送能及び薬物代謝能を再現する細胞として期待さ れている (Finkbeiner et al., 2012; Ogaki et al., 2013; Iwao et al., 2015; Uchida et al., 2017). しか し, CYP3A4 及び P-gp の両方を発現し, in vivo の消化管吸収性を再現した hiPSC-IECs は報 告されておらず, 既報の分化方法により得られた hiPSC-IECs では, CYP3A4 及び P-gp mRNA 発現量がヒト成人小腸と比較してそれぞれ 1/274 及び 1/11 と低値を示す (Akazawa et al., 2018). CYP3A4 (Coumoul et al., 2002; Luo et al., 2002) 及び P-gp (Huwyler et al., 2006) は、い ずれも核内受容体の pregnane X receptor (PXR) を介して誘導されることが報告されており, hiPSC-IECs においても rifampicin または 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> (VD<sub>3</sub>) を添加することで、 CYP3A4 mRNA がそれぞれ 9.8 倍及び 95 倍誘導されることが報告されている (Negoro et al., 2016). 以上の報告を基に,著者は,既存の分化方法によって得られた hiPSC-IECs であって も、CYP3A4 及び P-gp の誘導剤を処置することで、薬物代謝及び薬物輸送能を獲得し、in vivo における消化管吸収性を再現した評価系を構築できると考えた.

そこで、第二章では、まず、Caco-2 細胞や PAMPA では再現することが困難であった消化 管吸収性を予測するために、CYP3A4 と P-gp の誘導剤である rifampicin 及び VD<sub>3</sub> を処置し た hiPSC-IECs を活用した膜透過性試験を実施し、得られた P<sub>e</sub>をヒト小腸アベイラビリティ (F<sub>a</sub>×F<sub>g</sub>)と比較することで、hiPSC-IECs の有用性を議論する. 続いて、double balloon 法を 介さず hiPSC-IECs の膜透過試験より得られる P<sub>e</sub>から k<sub>a, app</sub>を算出するために、小腸で初回 通過効果を受ける種々の代謝消失型化合物について、F<sub>a</sub>×F<sub>g</sub>と臨床試験から得た *in vivo* 吸 収速度定数 (k<sub>a, in vivo</sub>)との相関性を検討する. 更に、hiPSC-IECs より得られる k<sub>a, app</sub>を新規 bottom-up PBPK 法の小腸コンパートメントに入力し、小腸で初回通過効果を受ける種々の 代謝消失型化合物についてヒト血漿中濃度推移を予測後、得られた PK パラメータの予測確 度を指標として、従来法及び IQ PBPK working group が提唱する評価基準と比較することで、 経口投与後のヒト体内動態を予測する新規手法として hiPSC-IECs の透過特性より得られた

結果を新規 bottom-up PPBK 法に組み込む意義について論述する.

第一章及び第二章で検討する PBPK モデルを創薬の探索研究で用いる場合, 従来のスク リーニング法では実現不可能であったヒト PK に基づく構造活性相関 (SAR) の情報を活用 して化合物の構造最適化が実現可能となる.また,代謝安定性,タンパク結合率及び膜透過 性等について,任意の値を PBPK モデルに入力し,ヒト血漿中濃度推移を予測することで, 有効性及び安全性を両立できる PK パラメータの目標値を論理的に設定することが可能と なる.しかし、上述する新規 bottom-up PBPK 法は、静脈内投与及び経口投与後のヒト血漿 中濃度推移を予測するためにラット体内動態試験を実施する必要がある.一般に、製薬企業 における創薬の探索研究では、ラット等を用いた体内動態試験は in vitro 試験の後に実施さ れるため, in vivo 試験の結果を活用した新規 bottom-up PBPK 法は, スクリーニング後期以 降でのみ活用可能となる. 仮に, in vitro 試験実施後, 直ちにヒト血漿中濃度推移を予測可能 となった場合, ヒト PK 情報の取得までに要する時間を短縮することで SAR 情報を迅速に 取得できるだけでなく、ヒト血漿中濃度推移の予測に必要な化合物合成量の低減も可能と なり, ヒト血漿中濃度推移に基づく創薬の加速化に貢献できる. 従って, 創薬の探索研究に おいて新規 bottom-up PBPK 法の有用性を向上させるには, in vivo 試験を必要としない新規 ヒト PK 予測方法の構築が重要であると考えられた.新規 bottom-up PBPK 法では、ラット 体内動態試験より得られる Vss, rat を Kptissue の補正値として利用している. Vss は, 定常状態 における各組織の Kptissue に組織容積 (Vtissue) を乗じた値の和で定義され, Berry らは, 36の モデル化合物についてラットにおける 14 の組織 (肺,脳,心臓,骨,筋肉,脂肪,皮膚, 胸腺,腎臓,精巣,肝臓,脾臓,すい臓,小腸) の Kptissue をそれぞれ評価し,筋肉,心臓, 精巣及び脾臓のKptissueがVss, ratと比較的良好な相関関係を示す [決定係数 (R<sup>2</sup>): 0.542 - 0.652] ことを報告している (Berry et al., 2010). また, 化合物の組織移行性が pH 分配仮説によって 定義される場合, Kptissueは, 化合物の分子型分率, 血漿及び組織中タンパク非結合率から計 算可能となる (Yu et al., 1996; Youdim et al., 2003; Poulin 2015). 更に, 生体に占める臓器のう ち,約半分の容積を筋肉が占め (Rowland, 2013), tissue composition-based equation より得た 化合物の筋肉移行性 (Kpmuscle) に全組織容積を乗じた値は、Vss と近似することが報告され ている (Rodgers et al., 2007). 以上の報告を基に,著者は, in vitro 試験を基に V<sub>ss,rat</sub>の代替パ ラメータ (Vss, in vitro) を算出するためには、Kpmuscle が重要な因子となると考え、pH 分配仮説

に基づく場合,血漿中タンパク非結合率 (fu<sub>p</sub>),筋肉中タンパク非結合率 (fu<sub>m</sub>) 及び化合物 の分子型分率を基に, Kp<sub>muscle</sub>を算出できると仮説立てた.

そこで、第三章では、fumの評価方法を検討後、pH 分配仮説に基づき計算される Kpmuscle から Vss, *in vitro* を算出し、ラット体内動態試験より得られる Vss, rat との相関関係を評価するこ とで、*in vitro* 試験から得られる Vss, *in vitro* の有用性を検討する.更に、ヒト Kptissueの算出過 程における Vss, rat を Vss, *in vitro* に変更した場合の新規 bottom-up PBPK 法は、種々の代謝消失 型化合物における静脈内及び経口投与後の血漿中濃度推移及び PK パラメータの予測性を 指標に、IQ PBPK working group が提唱する評価基準と比較することで、*in vitro* 試験結果の みを基にした新規予測手法としての妥当性を論じる.加えて、化合物の排泄経路を予測可能 な extended clearance classification system (ECCS, Varma et al., 2015; Varma et al., 2017) を改変 することで、代謝消失型化合物を予測適応範囲とする新規 bottom-up PBPK 法の創薬におけ る活用手順を提示し、新規 bottom-up PBPK を活用した創薬研究手法の有用性を論じる.

本研究で検討する従来型及び新規 bottom-up PBPK 法の特徴は, 次ページの Table に示す. 以下,本研究での検討内容を詳細に論述する.

Table	0-1.	Conventiona	l and nov	el bottom-up	<b>PBPK</b> a	pproaches f	or predictin	g human	PK 1	profiles after in	travenous and	l oral administration.
						FF						

		Velim	Kp <sub>tissue</sub>	k <sub>a, app</sub>
	Assumption / Component technology	Free drug theory	Tissue composition- based equation	Caco-2cells PAMPA Double-balloon method
Conventional PBPK approach	Input parameters	CL <sub>int, in vivo</sub> fu <sub>inc</sub> fu <sub>p</sub> (human) R <sub>BP</sub> (human)	logP pKa fu <sub>p</sub> (rat, human) R <sub>BP</sub> (rat, human)	Pe Pe, <i>in vivo</i> K <sub>a, app</sub>
	Assumption / Component technology	pH partition hypothesis Albumin-mediated hepatic uptake	Tissue composition- based equation Species difference of V <sub>tissue</sub> /fu <sub>tissue</sub>	$\label{eq:response} \begin{array}{l} hiPSC\text{-IECs} \\ Correlation \ between \ F_a \times \ F_g \ and \\ k_{a, \ in \ vivo} \end{array}$
Novel PBPK approach	Input parameters	CL <sub>int, in vivo</sub> fu <sub>inc</sub> fu <sub>p</sub> (human) R <sub>BP</sub> (human) pKa PLR	logP pKa $fu_p$ (rat, human) $R_{BP}$ (rat, human) $V_{ss, rat}$ (For chapter 1) $fu_m$ (For chapter 3)	$P_e$ $F_a \times F_g$ $k_{a, app}$ $k_{a, in vivo}$

 $CL_{int, in vivo}$ : in vivo intrinsic clearance, fu<sub>inc</sub>: unbound fraction in incubation, fu<sub>p</sub>: unbound fraction in plasma, R<sub>BP</sub>: blood-to-plasma concentration ratio, logP: n-octanol water partition coefficient, pKa: negative log of the acid dissociation constant, PLR: plasma-to-liver albumin concentration ratio, fu<sub>m</sub>: unbound fraction in muscle, V<sub>ss, rat</sub>: V<sub>ss</sub> obtained from rat PK study, P<sub>e</sub>: permeability, P<sub>e, in vivo</sub>: *in vivo* permeability, F<sub>a</sub> × F<sub>g</sub>: intestinal availability, k<sub>a, in vivo</sub>: *in vivo* permeability coefficient

#### 本論

#### 第一章

生理学的薬物速度論モデルの改良及び静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移の予測

本章では、代謝消失型化合物の生体内挙動を緻密に再現した予測方法を構築するために、 PBPK モデルを構成する veim 及び Kptissue の新規計算方法を検討し、幅広い化合物特性を示 す代謝消失型の 12 化合物をモデル化合物として、従来型及び新規 bottom-up PBPK 法を基 に、各化合物の静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移及び PK パラメータを予測し、得られた PK パラメータの予測確度を指標として、veim 及び Kptissue の導出方法の有用性及び応用性に ついて検討した. PBPK モデルを構成する組織コンパートメントは、well-stirred モデルに基 づき、速やかに拡散・攪拌されることで組織血管中の薬物濃度が一定となると仮定した.

従来型 bottom-up PBPK 法で用いた *v*<sub>elim</sub> 及び Kp<sub>tissue</sub> は, それぞれフリー理論 (Lin 2006; Trainor 2007) 及び tissue composition-based equation (Rodgers et al., 2007) に基づいて計算した.

新規 bottom-up PBPK 法では、 $v_{elim}$  の計算過程において、血漿中での主結合タンパク質が アルブミンとなる化合物は pH 分配仮説 (Shore et al., 1957; Yu et al., 1996; Youdim et al., 2003) に加えてアルブミン媒介性肝移行 (Tsao et al., 1988, Fukuchi et al., 2017; Riccardi et al., 2017; Miyauchi et al., 2018; Bteich et al., 2020) の機序を、アルブミン以外に結合する化合物は pH 分 配仮説 (Shore et al., 1957; Yu et al., 1996; Youdim et al., 2003) をそれぞれ考慮し、化合物の結 合タンパク質に応じた計算方法により算出した.また、新規 bottom-up PBPK 法における Kptissue は、まず tissue composition-based equation (Rodgers et al., 2007) を基にラット Kptissue 及 びラット Vss (Vss, simulation, rat) を予測した. 続いて、Vss, simulation, rat 及び静脈内投与後のラット血 漿中濃度推移をモデル非依存型の薬物速度論解析することで得た Vss, rat を用いてラット Kptissue を補正した.更に、ラットとヒトにおける Vtissue/futissue の相関関係 (Sawada et al., 1985) を基に、ラット Kptissue からヒト Kptissue を算出した.従来型及び新規 bottom-up PBPK 法にお ける詳細なヒト Kptissue の予測手順は、Fig. 1-1 に示す.



Fig. 1-1 Calculation schemes for human Kptissue in conventional and novel PBPK approach.

1-1-1. PBPK モデル

PBPK モデルは、分布容積に影響を及ぼす組織コンパートメント(脂肪,消化管,肝臓, 肺,腎臓,筋肉及び皮膚)で構成されており、全ての組織コンパートメントは静脈及び動脈 の血液循環で結合されている (Fig. 1-2).また、投与後、組織移行した化合物は各組織コン パートメントにおいて瞬時に拡散・攪拌し、化合物の代謝及び糸球体ろ過はそれぞれ肝臓及 び腎臓で起こるものとした.PBPK モデルにおける筋肉、消化管、皮膚及び脂肪の物質収支 式は、式 1-1 で表される.

$$V_{\text{tissue}} \times \frac{dC_{\text{tissue}}}{dt} = Q_{\text{tissue}} \times (C_{\text{artery}} - \frac{C_{\text{tissue}} \times R_{\text{BP}}}{K_{\text{ptissue}}})$$
(1-1)

式 1-1 における V<sub>tissue</sub> 及び Q<sub>tissue</sub> は,筋肉,消化管,皮膚または脂肪の体積及び血流速度であり,C は動脈血または組織中の化合物濃度を示す.続いて,肺及び腎臓の物質収支式は, それぞれ式 1-2 及び式 1-3 のように表される.

$$V_{\text{lung}} \times \frac{dC_{\text{lung}}}{dt} = Q_{\text{lung}} \times \left(C_{\text{vein}} - \frac{C_{\text{lung}} \times R_{\text{BP}}}{Kp_{\text{lung}}}\right)$$
(1-2)

$$V_{kidney} \times \frac{dC_{kidney}}{dt} = Q_{kidney} \times \left(C_{artery} - \frac{C_{kidney} \times R_{BP}}{Kp_{kidney}}\right) - fu_{blood} \times GFR \times \frac{C_{kidney}}{Kp_{kidney}}$$
(1-3)

式 1-3 において GFR は糸球体ろ過速度である.動脈血及び静脈血の物質収支式は,それぞ れ式 1-4 及び 1-5 のように表される.

$$V_{artrey} \times \frac{dC_{artery}}{dt} = -\sum (Q_{tissue} \times C_{artery}) + Q_{lung} \times \frac{C_{lung} \times R_{BP}}{Kp_{lung}}$$
(1-4)

$$V_{\text{vein}} \times \frac{dC_{\text{vein}}}{dt} = \sum Q_{\text{tissue}} \times \frac{C_{\text{tissue}} \times R_{\text{BP}}}{Kp_{\text{tissue}}} - Q_{\text{lung}} \times C_{\text{vein}} + \text{infusion time}$$
(1-5)

式 1-4 及び式 1-5 における Q<sub>tissue</sub> 及び C<sub>tissue</sub> は,それぞれ動脈血及び静脈血と結合された組織である.また, infusion time が 0 のとき,化合物が急速静脈内投与されたことを意味する. 肝臓における物質収支式は,式 1-6 で表される.

$$V_{\text{liver}} \times \frac{dC_{\text{liver}}}{dt} = \left(Q_{\text{liver}} - Q_{\text{gi}}\right) \times C_{\text{artery}} + Q_{\text{gi}} \frac{C_{\text{gi}} \times R_{\text{BP}}}{Kp_{\text{gi}}} - Q_{\text{liver}} \frac{C_{\text{liver}} \times R_{\text{BP}}}{Kp_{\text{liver}}} - \nu_{\text{elim}} \quad (1-6)$$

Cgi 及び Kpgi は、それぞれ消化管における化合物濃度及び消化管移行性であり、velim は肝代 謝消失速度である.式 1-1 から式 1-6 で表された各組織の近似解は、Microsoft Visual Basic for Application 7.0 により動作させた 4 次の Runge-Kutta 法を基に解いた.



Fig. 1-2. A schematic diagram of the physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model for predicting human PK profile after intravenous administration.

# 1-1-2. 従来型 bottom-up PBPK 法

# a) <u>velim</u>の算出方法

Well-stirred モデルを仮定した PBPK モデルの肝臓における代謝消失速度は,式 1-7 で表される.

$$v_{\text{elim}} = CL_{\text{Uint}, in \, vivo} \times C_{\text{liver}} \times fu_{\text{liver}}$$
(1-7)

ここで、CL<sub>Uint, in vivo</sub>及び fuliver 及びはそれぞれ *in vivo* における非結合型化合物の肝固有クリ アランス及び肝臓中タンパク非結合率を示す. 従来型 bottom-up PBPK 法では、フリー理論 に基づき、血中のタンパク非結合型化合物のみが体循環から組織に分配されると仮定した. このとき、velim は、以下の式 1-8 で表される.

$$v_{\text{elim}} = \text{CL}_{\text{Uint}, in \, vivo} \times \text{C}_{\text{liver}} \times \frac{\text{fu}_{\text{blood}} \times \text{R}_{\text{BP}}}{\text{Kp}_{\text{liver}}}$$
(1-8)

fublood 及び R<sub>BP</sub> は, それぞれ血液中タンパク非結合率及び血液/血漿濃度比を示す. 従来型 bottom-up PBPK 法では, 式 1-8 から算出される *v*<sub>elim</sub> を使用した.

# b) <u>ヒト Kp<sub>tissue</sub>の算出方法</u>

Rodgers らの報告に基づいた場合,組織と血漿におけるタンパク非結合型化合物の濃度比
(Kptissue,u) は,組織構成成分と化合物固有のパラメータに基づいて計算できる (Rodgers et al., 2007). pKa (base) ≥7以上を示す化合物の Kptissue,u は,次式で表される.

$$Kp_{tissue,u} = \left[ \left( \frac{(1+X) \times f_{IW}}{1+Y} \right) + f_{EW} + \left( \frac{Ka_{AP} \times [AP]_T \times X}{1+Y} \right) + \left( \frac{P \times f_{NL} + (0.3 \times P + 0.7) \times f_{NP}}{1+Y} \right) \right]$$
(1-9)

X 及び Y は化合物のイオン化に関連するパラメータである(一価の塩基性化合物の場合: X = 10<sup>pKa-pHIW</sup>, Y = 10<sup>pKa-pHPI</sup>, f 及び P は,それぞれ分子型化合物の組織構成成分の含有比率及び 油水分配係数を示す).下付き文字の IW, EW, NL, NP 及び Pl は,それぞれ細胞内液,細胞外 液,組織中の中性脂質,中性リン脂質及び血漿を示す.[AP]<sub>T</sub> 及び Ka<sub>AP</sub> はそれぞれ組織中の 酸性リン脂質濃度及び酸性リン脂質に対する化合物の親和定数を示す.また,中性,酸性及 び pKa (base) < 7 の弱塩基性化合物の Kp<sub>tissue,u</sub> は次式で表される.

$$Kp_{tissue,u} = \left[ \left( \frac{(1+X) \times f_{IW}}{1+Y} \right) + f_{EW} + Ka_{PR} \times [PR]_T + \left( \frac{P \times f_{NL} + (0.3 \times P + 0.7) \times f_{NP}}{1+Y} \right) \right]$$
(1-10)

[PR]<sub>T</sub> は細胞外液中のアルブミン濃度 (酸性及び弱塩基性化合物の場合) また中性のリポタ ンパク質濃度 (中性化合物の場合) を示し, Kapr は, 細胞外液中のアルブミンまたはリポタ ンパク質に対する薬物の親和定数を示す. Kptissue は, 式 1-11 で表される (Poulin and Haddad, 2012).

$$Kp_{tissue} = \frac{fu_{plasma}}{fu_{tissue}} = fu_{plasma} \times Kp_{tissue,u}$$
(1-11)

従来型 bottom-up PBPK 法では,各組織コンパートメントに式 1-9 から式 1-11 より算出さ れるヒトの Kp<sub>tissue</sub>を入力した.

### 1-1-3. 新規 bottom-up PBPK 法

# a) <u>velim</u>の算出方法

式 1-7 で表される fu<sub>liver</sub>の算出において,主結合タンパク質がアルブミンとなる化合物で は、pH 分配仮説に加え、アルブミン媒介性の肝移行の寄与を考慮した (Poulin, Kenny et al., 2012). 分子型化合物の血漿中タンパク非結合率 (fu<sub>p-app</sub>) は、Henderson-Hasselbalch の式に基 づく (Poulin et al., 2012) と、以下の式 1-12 から式 1-16 で表すことができる.

$$fu_{p-app (neutral)} = fu_p \tag{1-12}$$

$$fu_{p-app(monoprotic acid)} = fu_p \times \frac{1}{1 + (10^{pH-pKa})}$$
(1-13)

$$fu_{p-app(diprotic acid)} = fu_p \times \frac{1}{1 + (10^{pH-pKa1} + 10^{2pH-pKa1-pKa2})}$$
(1-14)

$$fu_{p-app(monoprotic base)} = fu_p \times \frac{1}{1 + (10^{pKa-pH})}$$
(1-15)

$$fu_{p-app(diprotic base)} = fu_p \times \frac{1}{1 + (10^{pKa1-pH} + 10^{pKa1-pKa2-2pH})}$$
(1-16)

更に、血漿での主結合タンパク質がアルブミンである化合物の fu<sub>p-app</sub> は、式 1-17 で表すことができる (Berezhkovskiy 2007; Berezhkovskiy et al., 2009).

$$fu_{p-app} = \frac{1}{1+k} \tag{1-17}$$

式 1-17 において、k=P/K であり、P はアルブミン濃度、K はアルブミンに対する薬物の結 合定数である. 肝臓中アルブミン濃度は血漿と比較して 1/PLR の値 (PLR: 13.3) であること から、アルブミン結合形化合物がアルブミンの濃度勾配によって細胞内液に移行する場合、 fuliver は次式のように表すことができる.

$$fu_{liver} = \frac{1}{1 + \frac{k}{PLR}}$$
(1-18)

式 1-17 において, k を左辺へ移行すると,

$$k = \frac{1}{fu_{p-app} - 1} \tag{1-19}$$

と式変形できる.式 1-19 を式 1-18 へ代入すると, fuliver は, 次式で与えられる.

$$fu_{liver} = \frac{PLR \times fu_{p-app}}{1 + (PLR - 1) \times fu_{p-app}}$$
(1-20)

以上の式変形を基に、血漿中での主結合タンパク質がアルブミンである化合物の場合、新規 bottom-up PBPK モデルでの肝臓コンパートメントでは、式 1-7 に式 1-20 から算出した fuliver を代入して得た velim 値を用いることとした.

また,血漿中の主結合タンパク質がアルブミンではない化合物は,上述するアルブミン媒 介性の肝移行の影響を受けないと考えられる.そこで,主結合タンパク質がα1-酸性糖タン パク質 (AGP) である化合物では,pH 分配仮説の影響を考慮するために,式1-8の fu<sub>b</sub>×R<sub>BP</sub> の項を式1-12 から式1-16より得られる fu<sub>p-app</sub> に置き換えて,v<sub>elim</sub>を算出した.

## b) <u>ヒトKptissue</u>の算出方法

新規 bottom-up PBPK 法では,式 1-9 及び式 1-10 で表される tissue composition-based equation の他, ラット体内動態試験より得た  $V_{ss, rat}$  及びラットとヒトにおける  $V_{tissue}/fu_{tissue}$ の相関関 係を基にヒト  $Kp_{tissue}$ を算出した.まず,  $V_{ss}$ と  $Kp_{tissue}$ は式 1-21 の等式が成り立つ.

$$V_{ss} = V_{plasma} + \sum (V_{tissue} \times Kp_{tissue})$$
(1-21)

 $V_{plasma}$ は血漿容積を示し、 $V_{tissue}$ は 11 組織 (脂肪, 骨, 脳, 消化管, 心臟, 腎臟, 肝臟, 肺, 筋肉, 皮膚及び脾臟) の容積を示す. ここで, 式 1-9 から式 1-11 を基に算出したラット  $K_{Ptissue}$ を式 1-21 に入力することで、ラット  $V_{ss}$ の予測値である  $V_{ss, simulation, rat}$ を得た. 続いて、ラット体内動態試験より得た  $V_{ss, rat}$  と  $V_{ss, simulation, rat}$ の比を補正係数とし、得られた補正係数を、tissue composition-based equation より得たラット  $K_{Ptissue}$  に乗じた後、式 1-11 を基にラット $fu_{tissue}$ を算出した. ここで、ラットとヒトにおける  $V_{tissue}/fu_{tissue}$ には、式 1-22 で示す相関関係が成り立つ (Sawada et al., 1985).

$$\left(\frac{v_{\text{tissue}}}{fu_{\text{tissue}}}\right)_{\text{human}} = \left(\frac{v_{\text{tissue}}}{fu_{\text{tissue}}}\right)_{\text{rat}}^{0.951} \tag{1-22}$$

式 1-22 は, futissue, human を左辺に移項することで式 1-23 に変形できる.

$$fu_{tissue,human} = \left(\frac{fu_{tissue}}{V_{tissue}}\right)_{rat}^{0.951} \times V_{tissue,human}$$
(1-23)

fu<sub>tissue,rat</sub>及び既知の生理学的パラメータである V<sub>tissue</sub>を基に,式 1-23 より fu<sub>tissue,human</sub>を算出 した.得られた fu<sub>tissue, human</sub>を式 1-11 に代入し,ヒト Kp<sub>tissue</sub>を算出した.新規 bottom-up PBPK 法では,ここで得たヒト Kp<sub>tissue</sub>を PBPK モデルの各組織コンパートメントに入力し た.

#### 1-2.実験材料及び入力パラメータの導出方法

### 使用化合物

PBPK モデルにより静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移を予測するためのモデル化合物 として, 肝臓に含まれる多様な酵素 (CYP, glucuronosyltransferase, N-acetyltransferase, reductase) によって代謝を受ける, 12 の医薬品 (alprazolam, diazepam, diclofenac, linezolid, meloxicam, sildenafil, bisoprolol, haloperidol, nicardipine, quinidine, tamsulosin 及び tramadol) を選定し, 試験には市販特級品を用いた.

## 静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移の予測に用いたデータ

ヒト血漿中濃度推移の予測には、血液中タンパク非結合率 (fub)、肝細胞代謝安定性評価 におけるタンパク非結合率 (fuinc)、pKa、logP、肝固有クリアランス (CLint)、R<sub>BP</sub>及びラット 体内動態試験より得た V<sub>ss, rat</sub> を使用した.以下に、実験方法または予測方法を詳細に記す. モデル化合物の各パラメータは、Table 1-1 に示す.試験に供した試薬及び溶媒は、市販特級 品を用いた.ヒト肝細胞及びラットを用いた全ての研究は、塩野義製薬 (株)の動物実験及 びヒト組織に関する倫理委員会によって承認されている.

#### 血漿中主結合タンパク質

酸性及び中性を示す低分子化合物は, 主にアルブミンに結合し (Kragh-Hansen et al., 2002; Ghuman et al., 2005), 塩基性を示す低分子化合物は主に AGP に結合する (Booker et al., 1996) ことが報告されている. そこで, pKa (acid) が 7.0 以下を示す酸性化合物及び中性化合物は アルブミン結合形, pKa (base) が 7.0 以上を示す化合物を AGP 結合形と定義した.

#### 血液/血漿濃度比 (RBP)

ヒト R<sub>BP</sub> 値は, 既報 (Fura et al., 2008 及び Uchimura et al., 2010)より引用した. ラット R<sub>BP</sub> は, Berezhkovskiy らの方法 (Berezhkovskiy et al., 2011) に準じて評価した.

### タンパク非結合率

Dimethyl sulfoxide (DMSO) に溶解させたモデル化合物を健常ヒト (Kohjin Bio Co., Ltd.) または Sprague-Dawley ラット (7 - 9 週齡, 雄性, Charles River Laboratories Japan, Inc.) の血 清に添加し, 終濃度 2 µg/mL の血清サンプルを調製した. 平衡透析デバイス (EC-0, Sanplatec corp.) に分画分子量が 12,000 – 14,000 の透析膜 (Spectra/Por® 2 Dialysis Membrane Standard RC Tubing MWCO: 12,000 to 14,000, Spectrum Laboratories, Inc.) を配置し, 平衡透析デバイ スのドナー側に 450 µL の血清サンプル, アクセプター側に 450 µL の 53 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 13 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 及び 50 mM NaCl を含有する phosphate-buffered saline (PBS, pH7.4) を添加し た. サンプル添加後の平衡透析デバイスは 37°Cで 24 時間インキュベートした. インキュベ ート終了後, 30 µL のドナー側サンプル及び 270 µL のアクセプター側サンプルに対して, ブランク PBS 及びブランク血清をそれぞれ 270 µL 及び 30 µL ずつ添加し, 十分に攪拌後, LC-MS/MS に供して化合物由来のピーク面積を算出した. 得られたピーク面積比は, ドナー 側及びアクセプター側サンプルの希釈倍率で補正することによって, 血漿中タンパク非結 合率 (fu<sub>p</sub>) を算出した. fu<sub>b</sub>は, fu<sub>p</sub>を R<sub>BP</sub> で除すことで得た.

fu<sub>inc</sub>は、化合物固有のパラメータ (pKa, logP, fu<sub>p</sub>)から理論的に算出する方法が報告され ている (Poulin et al., 2013). 既報 (Poulin et al., 2013)では、95 化合物について fu<sub>inc</sub> を予測さ れており、平均予測誤差 (average fold error: AFE)、二乗平均平方根誤差 (root mean-squared error: RMSE) はそれぞれ 1.08 及び 0.30 を示し、実測比 1.5 倍、2 倍及び 3 倍に入る化合物 の割合はそれぞれ 71%、85%及び 91%であることが示されている. 高い確度で fu<sub>inc</sub> を予測 できることが示された (Poulin et al., 2013). そこで、著者は、Poulin らが報告する mechanistic equation を用いて算出した fu<sub>inc</sub> をそれぞれのモデル化合物の fu<sub>inc</sub> とした.

#### 酸解離定数 (pKa)・油水分配係数 (logP)

市販ソフトウェアである ACD/Percepta (Fujitsu Kyushu Systems Limited.) を用いて予測した pKa 及び logP を,それぞれのモデル化合物の pKa 及び logP とした.

### <u>肝固有クリアランス (CL<sub>int</sub>)</u>

ヒト凍結肝細胞 (Lot. HC5-23, XenoTech) を William's E 培地 (Thermo Fisher Scientific Inc.) に 1×10<sup>5</sup> または 1×10<sup>6</sup> cells/mL で懸濁した.得られた肝細胞懸濁液に 0.1 または 0.5 μmol/L

の終濃度でモデル化合物を溶解し、37°Cで 0.25 時間から 8 時間曝露した.サンプル中の化 合物濃度は LC-MS/MS によって測定した.モデル化合物の基質残存率は、反応 0 時間のサ ンプルに対する所定のインキュベート時間におけるモデル化合物のピーク面積比から算出 した. *In vitro* 肝固有クリアランス (CL<sub>int, in vitro</sub>) は、基質残存率の自然対数値をインキュベ ーション時間に対してプロットして得た直線の傾きから得られる消失速度定数から計算し た. CL<sub>int, in vitro</sub> は、mL/min/10<sup>6</sup> cells の単位で表され、肝細胞代謝安定性評価系への非特異的 な結合を含む総濃度に基づいた値となる.そこで、CL<sub>int, in vitro</sub> を fu<sub>ine</sub> で除すことにより、非 結合形化合物の CL<sub>int, in vitro</sub> (CL<sub>Uint, in vitro</sub>) を算出した.CL<sub>Uint, in vitro</sub> は、体重 1 kg 当たりの肝細 胞含量 (24 g liver/kg body weight) 及び肝臓 1 g 当たりの肝細胞含量 (135 × 10<sup>6</sup> cells/g liver) (Houston 1994; Bonn 2016)の文献値で補正し、*in vivo* における非結合型肝固有クリアランス である CL<sub>Uint, in vivo</sub> を得た.

### <u>ラットにおける定常状態の分布容積 (Vss, rat)</u>

Sprague-Dawley ラット (8 週齡, 雄性, Charles River Laboratories Japan, Inc.) にモデル化合物 0.5-5 mg/kg を静脈内投与した. 化合物投与後, 0.033, 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6及 び 8 時間に, 0.89 M ethylenediaminetetraacetic acid 及び 20% (v/v) ヘパリンナトリウム含有シリンジを用いて頸静脈から血液約 200 µL を採取した. 採取した血液を遠心分離 (3000 g, 15分, 4°C) することにより血漿を得た. 得られた血漿に含まれる化合物濃度は LC-MS/MS により定量した. 静脈内投与後の PK パラメータは, 得られた血漿中濃度推移をモデル非依存型の薬物速度論解析することで得た. Vss, rat は, CLtot に平均滞留時間 (MRT) を乗じることで算出した. CLtot は, 投与量を無限時間までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC0 $_{\infty}$ ) で除すことでそれぞれ算出した. AUC0 $_{\infty}$ 及び AUMC は, それぞれ静脈内投与後の血漿中濃度推移を基に台形法によって算出した.

#### 薬物動態学的解析

CLtot, Vss 及び AUC<sub>0-∞</sub>の算出方法は,それぞれ第一章 ラットにおける定常状態の分布容 積 (Vss,rat) の項に記載した.時間 t までの血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC<sub>0-t</sub>) は,台形法 により算出した.血漿中濃度半減期 (t<sub>1/2</sub>) は, 0.693 を k<sub>el</sub>(k<sub>el</sub>: 定常状態の血漿中濃度推移の 傾きより得た消失速度定数) で除することで算出した.

# 予測確度の評価

PK パラメータの予測確度は、「RMSE」、「AFE」、全モデル化合物における絶対誤差の平均値である「AAFE」及び予測値が実測値と比較して 1/X から X 倍乖離する化合物の割合を示す「% within X fold error」を基に実測値と比較することで評価した. AFE の値が 1 を上回った場合、PK パラメータを過大評価し、AFE が 1 を下回った場合は、PK パラメータを過小評価することを意味する. RMSE、AFE 及び AAFE は、それぞれ式 1-24 から式 1-26 で表される.

$$RMSE = \sqrt{\frac{\Sigma(\text{Log predicted value}-\text{Log observed value})^2}{n}}$$
(1-24)

$$AFE = 10^{\frac{1}{n}\sum(\log \text{ Fold error})}$$
(1-25)

$$AAFE = 10^{\frac{1}{n}\sum|\log Fold \, error|} \tag{1-26}$$

nは,モデル化合物の数である.

Carrania	V	<i>V</i>	Main				Human			Rat		
Generic	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub>	binding	LogP	fup <sup>c</sup>	$R_{ m BP}$	CLint, in vivo <sup>b</sup>	fuinc	fup <sup>c</sup>	$R_{ m BP}$	V <sub>ss</sub> <sup>e</sup>	Metabolic enzymes
Iname	(acid)	(base)	proteins <sup>a</sup>				(mL/min/kg)				(L/kg)	
Alprazolam			AL	2.50	0.32	0.78	0.027 <sup>d</sup>	0.79	0.33	0.96	1.8	СҮРЗА4, СҮРЗА5
Diazepam			AL	2.91	0.011	0.58	4.2	0.60	0.14	0.55	3.7	CYP2C19, CYP3A4
D' 1 C	4.0		A T	1.00	0.0050	0.71	150	1.0	0.0060	0.71	0.47	СҮР1А2, СҮР2С9, СҮР2С19, СҮРЗА4,
Diciotenac	4.0		AL	4.06	0.0050	0.71	152	1.0	0.0060	0.71	0.47	UGT1A9, UGT2B7
T . 1.1			A T	0.20	0.00	0.45	2.1	1.0	0.60	0.45	0.50	Non-enzymatic reaction,
Linezolid			AL	0.30	0.69	0.45	2.1	1.0	0.68	0.45	0.59	Amidase, N-acetyltransferase
Meloxicam	4.1		AL	3.43	0.0060	1.2	1.7	1.0	0.010	0.56	0.16	CYP2C9, CYP3A4
Sildenafil			AL	2.75	0.032	0.64	49	0.68	0.050	0.64	1.9	CYP2C9, CYP3A4
Bisoprolol		9.4	AGP	2.14	0.85	0.58	2.0	1.0	0.84	1.1	3.5	CYP2D6, CYP3A4
Halamanidal		0 2		2.01	0.17	0.91	10	0.69	0.10	0.91	12	Carbonyl reductase, CYP1A2, CYP2D6,
Haloperidoi		8.3	AGP	3.01	0.17	0.81	12	0.08	0.10	0.81	15	CYP3A4
Nicardipine		8.6	AGP	5.13	0.0030	0.71	208	0.043	0.0054	0.80	3.6	CYP3A4, reductase
Quinidine		8.8	AGP	3.44	0.19	0.92	13	0.63	0.33	1.4	5.8	CYP2E1, CYP2C9, CYP3A4
Tamsulosin		8.4	AGP	2.24	0.0091	0.53	18	1.0	0.19	1.2	1.9	CYP2D6, CYP3A4
Tromodol		0.2		2.51	0.01	0.60	0 0	1.0	0.00	0.60	2 1	Glucuronosyltransferase, Sulfotransferase,
Tramadol		9.3	AUP	2.31	0.91	0.09	0.0	1.0	0.90 0.69		5.1	CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4

Table 1-1. Summary of preclinical parameters for 12 drugs.

AL, albumin; AGP, α1-acid glycoprotein, CYP; cytochrome P450, UGT; UDP-glucuronosyltransferase

AL-binding compounds (alprazolam, diazepam, diclofenac, linezolid, meloxicam and sildenafil) and AGP-binding compounds (bisoprolol, haloperidol, nicardipine, quinidine, tamsulosin and tramadol) are listed in alphabetical order, respectively.

<sup>a</sup>Acidic (pKa (acid) < 7.0) and neutral drugs was defined as albumin binding type, and basic drugs (pKa (base) > 7.0) was defined as AGP binding type (Booker et al., 1996; Kragh-Hansen et al., 2002; Ghuman et al., 2005). For each drug except for bisoprolol and tramadol, the main binding proteins assumed by acid dissociation constant are consistent with the experimentally determined results reported by Poulin et al. (Poulin P, Hop et al., 2012) and other papers (Stalker et al., 2003; NIH, 2020; EMEA, 2005; Procyshyn et al., 2003; Routledge, 1986; Franco-Salinas, 2010). Poulin et al. estimated AGP/albumin binding ratio by equilibrium dialysis of albumin and AGP solution which are spiked with test drugs, and they suggested that the AGP/albumin ratio determined from the area ratio of analyte greater than -0.6 is AGP binding drug (Poulin P, Hop et al., 2012).

<sup>b</sup>CL<sub>int, in vivo</sub> was defined as CL<sub>Uint, in vivo</sub> multiplied by fu<sub>inc</sub>. The metabolic assay was evaluated in duplicate.

<sup>c</sup>The errors between the samples were all around 20% to 30%, representing it is reliable regardless of  $fu_p$  value. The protein binding study was performed in duplicate.

<sup>d</sup>Alprazolam was very stable in metabolic study using human hepatocytes with a substrate remaining rate of 99.9% or more after incubation for 2 hours. Since CL<sub>int, *in vivo*</sub> value of alprazolam was calculated to be 0.027 mL/min/kg assuming metabolic stability as 99.9%, PBPK modeling analyses was performed using this CL<sub>int, *in vivo*</sub> value.

<sup>e</sup>The rat PK study was performed in duplicate.

#### 1-3. 結果

#### 既存及び新規 bottom-up PBPK 法による静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移の予測

従来型及び新規 bottom-up PBPK 法により予測されたモデル化合物の静脈内投与後のヒト 血漿中濃度推移を Fig. 1-3 に、血漿中濃度推移より得られた PK パラメータの実測値及び予 測値の相関プロットを Fig. 1-4 に,各化合物の PK パラメータの予測誤差を Fig. 1-5 に,予 測確度の統計解析結果を Table 1-2 にそれぞれ示す.新規 bottom-up PBPK 法により予測した AUC<sub>0-∞</sub>, AUC<sub>0-t</sub>, CL<sub>tot</sub>, t<sub>1/2</sub>及びV<sub>ss</sub>のAFEは、それぞれ1.17、0.96、0.85、1.23及び0.96であ り (Table 1-2), いずれのパラメータについても従来型 bottom-up PBPK 法と比較して1に近 い値を示した (AUC<sub>0-x</sub>: 1.87, AUC<sub>0-t</sub>: 1.54, CL<sub>tot</sub>: 0.54, t<sub>1/2</sub>: 1.29, V<sub>ss</sub>: 0.67, Table 1-2). また, 新規 bottom-up PBPK 法を基に算出した AUC<sub>0-∞</sub>, AUC<sub>0-t</sub>, CL<sub>tot</sub>, t<sub>1/2</sub>及び V<sub>ss</sub>の AAFE は,そ れぞれ 1.63, 1.30, 1.63, 1.84 及び 1.59 であることから (Table 1-2), 新規 bottom-up PBPK 法 では, モデル化合物のヒト PK パラメータを実測と比較して平均2倍以内で予測可能である ことが示された. 一方で, 従来型 bottom-up PBPK 法では, AUC0-∞, AUC0-t, CLtot, t1/2及び V<sub>ss</sub>のAAFE がそれぞれ 2.22, 1.88, 2.22, 2.11 及び 2.10 を示した (Table 1-2). 新規 bottomup PBPK 法によって予測した各 PK パラメータの% within 1.5-及び 2-fold error (AUC0-x: 75 -92%, AUC<sub>0-t</sub>: 92 - 100%, CL<sub>tot</sub>: 75 - 92%, t<sub>1/2</sub>: 58 - 67%, V<sub>ss</sub>: 50 - 75%) は、いずれも従来型 bottom-up PBPK 法の予測結果 (AUC<sub>0-x</sub>: 25 - 50%, AUC<sub>0-t</sub>: 33 - 42%, CL<sub>tot</sub>: 25 - 50%, t<sub>1/2</sub>: 33 -67%, Vss: 33 - 42%) と比較して高値を示した (Table 1-2). 従って,新規 bottom-up PBPK 法 は、従来型 bottom-up PBPK 法と比較して、静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移及び PK パ ラメータを高い確度で予測できることが示唆された.

個々のモデル化合物についてヒト PK パラメータの予測確度を精査したところ,従来型及 び新規 bottom-up PBPK 法によって予測した meloxicam の CL<sub>tot</sub> は,実測値と比較して 1/10 以下の値を示し,これに伴い AUC<sub>0-∞</sub>及び t<sub>1/2</sub>の予測値は,実測値と比較して 10 倍以上の値 を示した (Fig. 1-4, 1-5). また,従来型及び新規 bottom-up PBPK 法によって予測した diclofenac の投与後 6 時間の血漿中濃度は,実測値と比較して 10 倍以上高値を示した (Fig. 1-4, 1-5).



Fig. 1-3. Predictions of plasma concentration-time profiles after intravenous dosing of 12 drugs to humans.

Solid line, novel PBPK approach; Dashed line, conventional PBPK approach; open circle: observed data.



Fig. 1-4. Correlation between the predicted and observed pharmacokinetic parameters of 12 drugs.

Closed circle, novel PBPK approach; Open circle, conventional PBPK approach; Dashed line: 2-fold errors between predicted and observed parameters.



Fig. 1-5. Fold errors for human PK parameters of 12 drugs.

AL-binding compounds (alprazolam, diazepam, diclofenac, linezolid, meloxicam and sildenafil) and AGP-binding compounds (bisoprolol, haloperidol, nicardipine, quinidine, tamsulosin and tramadol) are listed in alphabetical order, respectively. Closed circle, novel PBPK approach; Open circle, conventional PBPK approach; solid line, unity; Dashed line, 2-fold errors between predicted and observed values.

D		MOL	D) (CE			Percentage within		
Parameters	Methods	MSE	KMSE	AFE	AAFE	1.5-fold error	2-fold error	
	Conventional PBPK	0.20	0.44	1.87	2.22	25.0	50.0	
AUC <sub>0-∞</sub>	Novel PBPK	0.12	0.35	1.17	1.63	75.0	91.7	
AUC <sub>0-t</sub>	Conventional PBPK	0.11	0.33	1.54	1.88	33.3	41.7	
	Novel PBPK	0.01	0.12	0.96	1.30	91.7	100	
	Conventional PBPK	0.20	0.44	0.54	2.22	25.0	50.0	
CL <sub>tot</sub>	Novel PBPK	0.12	0.35	0.85	1.63	75.0	91.7	
t <sub>1/2</sub>	Conventional PBPK	0.19	0.44	1.29	2.11	33.3	66.7	
	Novel PBPK	0.19	0.43	1.23	1.84	58.3	66.7	
V <sub>ss</sub>	Conventional PBPK	0.14	0.37	0.67	2.10	33.3	41.7	
	Novel PBPK	0.05	0.23	0.96	1.59	50.0	75.0	

Table 1-2. Statistics for the predicted human PK parameters using conventional and novel PBPK approaches.

#### 1-4.考察

従来型 bottom-up PBPK 法 (De Buck et al., 2007; Poulin, Kenny et al., 2012; Sayama et al., 2013, Horiuchi et al., 2018) では、肝臓での代謝消失速度の計算過程において、フリー理論を仮定 している.代謝消失速度は、血漿中濃度推移の消失相の傾きを決定する因子であるため、主 に CLtot や t1/2 の予測確度に影響を与える. 従来型 bottom-up PBPK 法では,予測された CLtot の AFE 及び AAFE がそれぞれ 0.54 及び 2.22 を示すことから,フリー理論に基づいた予測 手法によって得られる CLtot は、実測値と比較して 2 倍以上過小評価することが示された (Table 1-2). また,  $t_{1/2}$ の AFE 及び AAFE は, それぞれ 1.29 及び 2.11 を示すことから,  $t_{1/2}$ の 予測値は、実測値と比較して2倍以上過大評価することが示唆された (Table 1-2). 特に、 diazepam 及び sildenafil は, CL<sub>tot</sub>の fold error がそれぞれ 0.37 及び 0.35, t<sub>1/2</sub>の fold error がそ れぞれ 2.97 及び 2.35 と、検証化合物の平均値と比較して低い予測性を示した (Table 1-3). すなわち,フリー理論を基に肝代謝消失速度を計算した場合,アルブミン結合形化合物の中 には,予測された血漿中濃度推移の消失相が臨床試験結果と乖離し,緩やかな傾きを示す場 合があると考えられる.一方で,新規 bottom-up PBPK 法では,アルブミン結合形化合物の 肝代謝消失速度を算出するために,式 1-12 から式 1-20 で与えられた pH 分配仮説及びアル ブミン媒介性の肝移行を適応した.この場合,得られた fu<sub>liver</sub>は,フリー理論を基にした値 と比較して高値を示すことから,新規 bottom-up PBPK 法により予測された血漿中濃度推移 は、従来型 bottom-up PBPK 法と比較して急峻な消失相を示すこととなる.新規 bottom-up PBPK 法を用いて diazepam 及び sildenafil の血漿中濃度推移を予測した場合,得られた CL<sub>tot</sub> の fold error はそれぞれ 0.71 及び 1.48 と実測比 1.5 倍以内の予測確度を示し,各化合物の t<sub>1/2</sub> の fold error もそれぞれ 1.08 及び 1.11 と実測値に近似する予測結果が得られた (Table 1-3). 同様に,アルブミン結合形化合物である alprazolam, diclofenac 及び linezolid においても,新 規 bottom-up PBPK 法により予測された CL<sub>tot</sub>の fold error (alprazolam; 0.95, diclofenac; 0.52, linezolid; 0.71) は、従来法の予測確度 (alprazolam; 2.66, diclofenac; 0.23, linezolid; 0.37) と 比較して改善する結果が得られた (Table 1-4). 以上より, アルブミン媒介性の肝移行及び pH 分配仮説を基にした新規 bottom-up PBPK 法では,フリー理論を基にした従来型 bottom-up PBPK 法と比較して, アルブミン結合形化合物の肝臓における代謝消失過程の予測性を改善 できることが示された.また,新規 bottom-up PBPK 法では,AGP 結合形化合物の肝代謝消

失速度の算出において, pH 分配仮説を適応した. その結果, AGP 結合形 6 化合物のうち, bisoprolol, nicardipine, tamsulosin 及び tramadol の t<sub>1/2</sub>は, フリー理論を基にした従来型 bottom-up PBPK 法と比較していずれも予測確度が改善した (Figure 1-4). 更に, 新規 bottom-up PBPK 法は, CL<sub>tot</sub> 及び t<sub>1/2</sub>の AAFE が 1.63 及び 1.84 であることから, CL<sub>tot</sub> 及び t<sub>1/2</sub> を実測比平均 2 倍以内で予測可能であった (Table 1-2). 従って, pH 分配仮説を基にした新規 bottom-up PBPK 法では, フリー理論を基にした従来型 bottom-up PBPK 法と比較して, AGP 結合形化合物の 肝臓における代謝消失過程の予測性を改善できることが示された.

Table 1-3. Fold errors for CL<sub>tot</sub> and t<sub>1/2</sub> in diazepam and sildenafil.

	Fold errors						
	Conventio	onal PBPK	Novel PBPK				
	CL <sub>tot</sub>	t <sub>1/2</sub>	CL <sub>tot</sub>	t <sub>1/2</sub>			
Diazepam	0.37	2.97	0.71	1.08			
Sildenafil	0.35	2.35	1.48	1.11			

The fold error is calculated by dividing the predicted value of each parameter by the observed value.

Table 1-4. Fold errors	for CL <sub>tot</sub>	t in alprazolan	ı, diclofenac	and linezolid.
------------------------	-----------------------	-----------------	---------------	----------------

	Fold errors					
	CL <sub>tot</sub>					
	Conventional	Novel				
	PBPK	PBPK				
Alprazolam	2.66	0.95				
Diclofenac	0.23	0.52				
Linezolid	0.37	0.71				

The fold error is calculated by dividing the predicted CLtot by the observed one.
従来型 bottom-up PBPK 法で用いられる Kptissue は, tissue composition-based equation (式 1-9,式1-10)のみを基に算出される.この場合,12のモデル化合物のうち,7化合物 (haloperidol, linezolid, tamsulosin, tramadol, nicardipine, bisoprolol 及び alprazolam) で予測された V<sub>ss</sub> が実測 比2倍以上の乖離を示し (Fig. 1-5), 既報と同等の予測確度 [% within 2-fold error: 32% (De Buck et al., 2007), 43% (Berry et al., 2011), 53% (Berry et al., 2010) 及び 60% (Sayama et al., 2010)] であることから, tissue composition-based equation によって算出された Kptissue の理論 値は、既報と同様、実測値と乖離する傾向にあった.一方で新規 bottom-up PBPK 法では、 ラットを用いて Kptissue の理論値と実測値の乖離度を算出後、ラットとヒトの組織分布に関 する相関関係を基にヒト Kptissue を得ることとした (Fig. 1-1). この結果, 新規 bottom-up PBPK 法では, 従来型 bottom-up PBPK 法と比較して, haloperidol, linezolid, tamsulosin, tramadol, nicardipine, bisoprolol 及び alprazolam の V<sub>ss</sub>を高い確度で予測可能となった (Fig. 1-5). また, 新規 bottom-up PBPK 法では,予測された V<sub>ss</sub>の AAFE, % within 1.5-及び 2-fold error がそれ ぞれ 1.59,50%及び 75%と,従来型 bottom-up PBPK 法で得られた統計値 (AAFE:2.10,% within 1.5-fold error: 33.3%, % within 2-fold error: 41.7%) と比較して予測確度が向上した (Table 1-2). 従来法及び新規 bottom-up PBPK 法により予測されたヒト V<sub>ss</sub>の AFE は, それぞ れ 0.67 及び 0.96 を示すことから (Table 1-2),従来法では,新規予測法と比較してヒト Vss を過小評価する傾向にあった. 各予測法 (Fig. 1-1) を基に予測されたモデル化合物のヒト Kptissueの相関プロットを Fig. 1-6 に示す.その結果,ラット体内動態試験より得られた Vss. ratを補正係数として用いる新規 Kptissueの予測方法では, adipose を除く6つの組織において, 従来法よりも高値を示す傾向にあり,従来法により予測された Kptissue と比較して 3 倍以上 の高値を示す割合は全体の 42.9%であった.従って、新規 bottom-up PBPK 法においてヒト V<sub>ss</sub>の予測性が改善した理由は, 適応した新規ヒト Kp<sub>tissue</sub>の算出方法において, adipose を除 く各組織の Kptissue 値が, 従来法と比較して高い値に補正されることに起因すると考えられ た.



Fig. 1-6. Correlation of Kp<sub>tissue</sub> predicted by conventional (Eqs. 1-9 to 1-11) and novel methods (Eqs. 1-9 to 1-11 and 1-21 to 1-23).

Solid line, unity; Dashed line, 3-fold errors between conventional and novel methods.

12 のモデル化合物について,新規 bottom-up PBPK 法を用いて静脈内投与後のヒト血漿中 濃度推移を予測した場合,得られる AUC<sub>0-t</sub>の AAFE 及び% within 1.5-及び 2-fold error は, それぞれ 1.30,91.7%及び 100%であり,全てのモデル化合物が実測比 2 倍以内の予測確度 を示した (Table 1-2).これは,従来型 bottom-up PBPK 法によって予測された AUC<sub>0-t</sub>の予測 確度 (AAFE: 1.88,% within 1.5-fold error: 33.3%,% within 2-fold error: 41.7%, Table 1-2)よ りも高い予測確度であった.従って,新規 bottom-up PBPK 法では,AUC<sub>0-t</sub>を含む全ての PK パラメータの予測確度が従来型 bottom-up PBPK 法と比較して改善しており,かつ全ての PK パラメータは実測と比較して 2 倍以内の予測確度を示したことが明らかとなった.以上の 検討結果より,PBPK モデルの肝コンパートメントにおける代謝消失速度の算出方法及び各 組織コンパートメントにおける組織移行性の計算過程を改良した新規 bottom-up PBPK 法は, ヒト血漿中濃度推移を確度高く予測する有用な予測手法であると考えられる.

一方で、本章で検討した 2 種類の bottom-up PBPK 法では、meloxicam の PK パラメータ (CLtot, AUC0-∞及び t1/2; Fig. 1-4, 1-5, Table 1-5) 及び diclofenac の投与 6 時間後の血漿中濃度 の予測値 (Fig. 1-4, 1-5, Table 1-6) が,実測値と比較して 10 倍以上乖離した値を示した.静 脈内投与後のヒト血漿中濃度推移 (Schmid et al., 1995) を基に meloxicam の CL<sub>Uint, in vivo</sub> を well-stirred モデルで計算した場合, 30.7 mL/min/kg を示す. この数値は、ヒト肝細胞代謝安 定性試験より得られた CL<sub>Uint, in vivo</sub> (1.7 mL/min/kg)と比較して 10 倍以上高値を示したことか ら, meloxicam の CL<sub>tot</sub>, AUC<sub>0-∞</sub>及び t<sub>1/2</sub>の予測誤差は, 固有クリアランスの in vitro 評価系に 起因すると考えられた. 高い代謝安定性を示す薬物の肝固有クリアランスを算出するため の評価系として、HepatoPac®がある (Chan et al., 2013). HepatoPac®は、マウス線維芽細胞と ヒト肝細胞の共培養により肝代謝酵素の活性を維持でき、代謝反応を長時間モニタリング することが可能な評価系である.しかし, Hutzler らの研究 (Hutzler et al., 2015) では, HepatoPac<sup>®</sup>による meloxicam の肝細胞代謝安定性評価の結果から得た CL<sub>Uint. in vivo</sub> は 4.6 mL/min/kg であり、本研究で得た評価結果と同様、in vivo 試験を基に算出した CLUint, in vivo と 比較して過小評価した.従って,現在,創薬で活用されている代謝評価系では,高い代謝安 定性を示す化合物の CL<sub>tot</sub>を過小評価する可能性がある.また,diclofenac は,ヒト肝細胞に 発現する CYP1A, 2C 及び 3A 分子種によって代謝を受けることが報告されており (Smith, 2012), diclofenac の CL<sub>int, in vivo</sub> (152 mL/min/kg, Table 1-1) は, 肝血流速度 (21 mL/min/kg) を 上回る値を示す. この CL<sub>int, in vivo</sub>は, ヒト肝ミクロソームを酵素源として diclofenac 水酸化 反応の速度論解析より得た報告値 [315 mL/min/kg = 453 µL/min/mg protein × 29 mg protein/g liver × 24 g liver/kg body weight; Tang et al., 2000] と 2.1 倍の乖離であったことから, 肝代謝 固有クリアランスは, 血漿中濃度推移の予測誤差の主要な要因ではないと考えられた. 近年, diclofenac は, organic anion-transporting peptide (OATP) 1B3 (Kindla et al., 2011) 及び organic anion-transporter (OAT) 2 (Kimoto et al., 2018) の基質であることが報告されている.従って, diclofenac のヒト血漿中濃度推移の予測確度を改善するためには、肝取り込みトランスポー ターの寄与を考慮した予測手法を構築する必要がある. Watanabe らは、肝取り込みトラン スポーターの基質であり、血流律速となる pravastatin の血漿中濃度推移を予測するための PBPK モデルを提唱している (Watanabe et al., 2009). しかし, 肝細胞を用いた取り込み試験 を基に算出された肝取り込みクリアランスは, in vivo 試験から得られる値と乖離するため (Jones et al., 2012; Shitara et al., 2013; Izumi et al., 2018), 取り込みトランスポーターの基質化

合物のヒト血漿中濃度推移を予測するためには, in vivo 取り込みクリアランスを再現可能 な評価系の構築が重要と考えられる.

	Fold errors								
	Со	nventional PBP	K	Novel PBPK					
	CL <sub>tot</sub>	AUC <sub>0-∞</sub>	t <sub>1/2</sub>	CL <sub>tot</sub>	AUC <sub>0-∞</sub>	t <sub>1/2</sub>			
Meloxicam	0.10	10.5	13.7	0.08	12.4	20.0			

Table 1-5. Fold errors for  $CL_{tot}$ ,  $AUC_{0-\infty}$  and  $t_{1/2}$  in meloxicam.

The fold error is calculated by dividing the predicted value of each parameter by the observed value.

 Table 1-6. Fold errors for plasma concentration in 6 hours after intravenous administration in

 diclofenac.

	Fold errors of $C_{6h}^{a}$					
	Conventional PBPK	Novel PBPK				
Diclofenac	19.7	16.7				

The fold error is calculated by dividing the predicted value of each parameter by the observed value.  ${}^{a}C_{6h}$ : plasma concentration in 6 hours after intravenous administration

P-gp の基質である nicardipine (Kimura et al., 2007) や quinidine (Fromm et al., 1999) の血漿 中濃度推移を新規 bottom-up PBPK 法により予測した結果,得られた PK パラメータ (AUCa  $\infty$ , CL<sub>tot</sub>, t<sub>1/2</sub>, V<sub>ss</sub>及び AUCo-t) は実測値と比較して 2 倍以内 (Fig. 1-5) であった. P-gp は, 主に消化管の刷子縁膜側,肝臓の毛細胆管膜,脳血液関門の血管内皮細胞及び腎臓の近位尿 細管の頂端側膜に発現するトランスポーターであり,生体異物の体外への排泄や重要な器 官を異物から保護する役割を担う(Staud et al., 2010). Doran らは,野生型マウスと P-gp ノッ クアウトマウスに quinidine を皮下投与し AUC を比較した結果,野生マウスと P-gp ノック アウトマウスの AUC 比は 1.1 であり, P-gp の基質においても血漿中濃度推移に対する P-gp の寄与は極めて軽微であったことを報告している (Doran et al., 2005).本研究においても, P-gp の寄与を考慮しない PBPK モデルで P-gp 基質の血漿中濃度推移の予測は可能であるこ とが示され、少なくとも血漿中濃度推移の予測に P-gp の考慮は不要であることが示唆された.

本研究では、タンパク結合試験及びヒト肝細胞代謝安定性試験において、1 化合物当たり 2 例の値を平均し、PBPK モデル (式 1-1 - 式 1-6) に入力している. そこで、これらの in vitro 評価より得た平均値に対するデータのばらつきがヒトの PK パラメータの解析結果へ 与える影響を精査した.まず、fup(1956 例) 及びヒト肝細胞代謝安定性 (976 例) について、 それぞれ同一平均値を示す複数化合物の試験結果を抽出し、各平均値を構成する個別値を 基に標準偏差を算出後、95%信頼区間 (µ) を得た (社内化合物を用いた未公表データ). 続 いて、fup またはヒト肝細胞代謝安定性と µ の実数プロットに対して非線形最小二乗法 (XLfit software, ID Business Solution) により近似曲線を得たところ、R<sup>2</sup>がそれぞれ 0.9983 及 び 0.9992 と良好な相関性を示す回帰モデルが得られた (社内化合物を用いた未公表データ) ことから、実験値の差異を回帰モデルに基づき評価した.

モデル化合物 (Table 1-1) のうち, fu<sub>p</sub>の最大値を示す tramadol (fu<sub>p</sub> = 91%) 及び最小値を 示す nicardipine (fu<sub>p</sub> = 0.30%) について,回帰モデルを基に各化合物の fu<sub>p</sub>のµを算出したと ころ, tramadol は 84% ≤µ≤97%, nicardipine では 0.20% ≤µ≤0.41%となった. fu<sub>p</sub>は, 肝臓 コンパートメント (式 1-6) 及び組織移行性 (式 1-9 – 式 1-11,式 1-21 – 式 1-23) の構成要 素であることから, fu<sub>p</sub>の実験誤差は,主に CL<sub>tot</sub>, V<sub>ss</sub>及び t<sub>1/2</sub>に対して影響を及ぼすと考え られる. そこで,新規 bottom-up PBPK 法を基に, tramadol 及び nicardipine の CL<sub>tot</sub>, V<sub>ss</sub>及び t<sub>1/2</sub>の予測結果に対する µ の影響度を算出した.その結果, fu<sub>p</sub>の実験誤差により, tramadol の CL<sub>tot</sub>, V<sub>ss</sub>及び t<sub>1/2</sub>の予測値は,それぞれ±1.7%,±5.7%及び±5.5%, nicardipine の CL<sub>tot</sub>, V<sub>ss</sub> 及び t<sub>1/2</sub>の予測値は,それぞれ±8.8%,±23%,±20%変動した (Table 1-7).従って,極めて高 いタンパク結合率を示す化合物では,fu<sub>p</sub>の実験誤差に起因し,V<sub>ss</sub>及び t<sub>1/2</sub>の予測において 最大で 20%程度の予測誤差が生じる可能性が示唆されたが,PBPK モデルにおいて 30%未 満の予測誤差は許容とする報告 (Sager et al., 2015) に基づく場合,ヒトPK 予測の信頼性を 欠く予測誤差には繋がらないと考えられる.

続いて、検証化合物群のうち CL<sub>int, in vitro</sub>の最大値を示す nicardipine (208 mL/min/kg) 及び 最小値を示す meloxicam (1.7 mL/min/kg) について、回帰モデルを基に各化合物の CL<sub>int, in vitro</sub> のμを算出したところ、nicardipine では 199 mL/min/kg ≤μ≤218 mL/min/kg、meloxicam では

1.4 mL/min/kg  $\leq \mu \leq 2.0$  mL/min/kg となった. CL<sub>int, in vitro</sub> は, v<sub>elim</sub> (式 1-7) の構成要素であるこ とから, CL<sub>int, in vitro</sub>の測定値の差異は, 主に CL<sub>tot</sub> に対して影響を及ぼすと考えられる. そこ で, CL<sub>int, in vitro</sub>の実験誤差に基づく CL<sub>tot</sub> の予測誤差を算出したところ, nicardipine では, ±1.7%, meloxicam では±6.3%となった (Table 1-8). 従って, CL<sub>int, in vitro</sub>の実験誤差は, fu<sub>p</sub>の 実験誤差と比較して予測値へ及ぼす影響が軽微であり, CL<sub>tot</sub> の予測誤差は最大で 6%程度に 止まることが明らかとなった.

Table 1-7. Prediction errors of PK parameters based on the 95% confidence interval of fu<sub>p</sub> in tramadol and nicardipine.

CL		
CLtot	$V_{ss}$	t <sub>1/2</sub>
Tramadol ±1.7%	±5.7%	±5.5%
nicardipine ±8.8%	±23%	±20%

Table 1-8. Prediction errors of PK parameters based on the 95% confidence interval of CL<sub>int, in vitro</sub> in nicardipine and meloxicam.

	Prediction errors
	CL <sub>tot</sub>
Nicardipine	±1.7%
Meloxicam	±6.3%

第一章では、新規 bottom-up PBPK 法の予測確度と予測適応範囲を検討することを目的と して、CL<sub>int, in vivo</sub>が 0.027 mL/min/kg (alprazolam) - 208 mL/min/kg (nicardipine), fu<sub>p</sub>が 0.0030 (nicardipine) - 0.91 (tramadol) と幅広い体内動態特性を示すモデル化合物について、静脈内投 与後のヒト血漿中濃度推移を予測した.新規 bottom-up PBPK 法では、肝代謝消失速度の算 出過程において、血漿中の主結合タンパク質がアルブミンとなる化合物は pH 分配仮説及び 肝細胞内外のアルブミンの濃度勾配に基づく肝移行を、主結合タンパク質がアルブミン以 外の化合物は pH 分配仮説を、それぞれ考慮した.更に、組織移行性の算出過程では、従来 型 bottom-up PBPK 法で用いられる tissue composition-based equation に加え、ラット体内動態 試験より得られる  $V_{ss, rat}$  及びラットとヒトにおける  $V_{tissue}/fu_{tissue}$  の相関関係を活用した. その結果,新規 bottom-up PBPK 法は,  $fu_p$  が高値を示す化合物において  $V_{ss}$  及び  $t_{1/2}$  の予測誤差が約 20%生じる場合があるが, P-gp の基質を含む代謝消失型化合物について,静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移を従来型 bottom-up PBPK 法よりも高い予測性を示し, PK パラメータの予測確度が実測値と比較して平均 2 倍以内であることが示された.

#### 第二章

hiPSC-IECs を活用した消化管透過性評価及び新規 bottom-up PBPK 法との組み合わせによ る経口投与後のヒト血漿中濃度推移の予測

第二章では,経口投与後のヒト血漿中濃度推移を予測するために,hiPSC-IECs を用いた 膜透過性試験の結果から消化管透過性の指標である k<sub>a, app</sub>を算出し,第一章で検討した新規 bottom-up PBPK 法に組み込むこととした.続いて,消化管で初回通過効果を受ける種々の 代謝消失型化合物をモデル化合物とし,経口投与後のヒト血漿中濃度推移及び PK パラメー タを予測後,得られた予測確度を従来法及び IQ PBPK working group が提唱する評価基準と 比較することで,hiPSC-IECs を用いた膜透過性評価より得た k<sub>a, app</sub> を新規 bottom-up PBPK 法に組み込む意義について論じた.

hiPSC-IECs は、Akazawa らの方法 (Akazawa et al., 2018) に従い iPSCs から分化後、 rifampicin 及び VD<sub>3</sub>を処置することで、CYP3A4 及び P-gp mRNA の誘導を試みた. 続いて、 上述する 2 種の誘導剤を処置した hiPSC-IECs を用いて、CYP3A4 及び P-gp の基質を含む 14 のモデル化合物の膜透過性を評価し、得られた P<sub>e</sub>を臨床試験より得られた F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>と比較す ることで *in vivo* 消化管吸収性の予測における hiPSC-IECs の有用性を検討した.

hiPSC-IECsの膜透過試験を基に、PBPK モデルの消化管コンパートメントへの入力パラメ ータである  $k_{a, app}$ を算出するために、臨床試験結果が報告されている 27 のモデル化合物に ついて、 $F_a \times F_g$ と臨床試験より得た  $k_{a, in vivo}$ の相関関係を解析した.更に、CYP3A4 及び Pgp 基質を含む 10 のモデル化合物について、hiPSC-IECsの膜透過性評価より得た Pe から  $k_{a, app}$ を算出後、得られた  $k_{a, app}$ を PBPK モデルの消化管コンパートメントに入力し、経口投与 後のヒト血漿中濃度推移及び PK パラメータを予測した.

#### 2-1. 実験材料及び hiPSC-IECs を活用したヒト消化管透過性の評価方法

#### 実験材料

hiPSCs (TkDA3-4) は、大津 真氏 (東京大学医科学研究所) より提供頂いた. ヒト成人小 腸細胞由来の pooled total RNAs (5 ドナー, 20 - 61 歳) は、Clontech (Palo Alto) より購入し た. Caco-2 細胞は、American Type Culture Collection (Rockville) より購入した. hiPSCs を用 いた全ての研究は、塩野義製薬 (株) のヒト組織及びゲノム研究に関する倫理委員会によっ て承認されている. 試験に供した試薬及び溶媒は、全て市販特級品を用いた.

#### 使用化合物

3 つのグループに分類される計 38 化合物を使用した. Group 1 (n = 14) は、小腸において 代謝及び能動輸送の影響を受ける化合物群であり、hiPSC-IECs を用いた膜透過性評価より 得た P<sub>e</sub> (cm/s) と *in vivo* 試験より得られた F<sub>a</sub>×F<sub>g</sub>の相関性を評価するために用いた. Group 2 (n = 27) は、F<sub>a</sub>×F<sub>g</sub>と k<sub>a, *in vivo*</sub>の相関性を評価するために用いた. k<sub>a, *in vivo*</sub>の値を算出するた めに、Group 2 の化合物は以下の 4 つの観点から選抜した. 1) 絶食下での臨床成績が報告さ れている、または食事摂取の影響がない化合物、2) 臨床試験の被験者数が 6 名以上、3) 消 化管吸収が溶解速度律速ではなく膜透過律速となる化合物、4) k<sub>a, *in vivo*</sub>の標準偏差を k<sub>a, *in vivo*</sub> の平均値で除した値 (変動係数: 0.5 以上で優位な個体差があると判定) が 0.5 未満の値を取 る化合物. Clocacillin (k<sub>a, *in vivo* = 2.95 ± 2.17, Spino et al., 1984), digoxin (k<sub>a, *in vivo* = 0.89 ± 0.75, Kobayashi et al., 2005), midazolam (k<sub>a, *in vivo* = 1.61 ± 1.01, Chen et al., 2006) 及び prednisolone (k<sub>a, *in vivo* = 5.62 ± 5.78, Magee et al., 2001) などの k<sub>a, *in vivo*</sub> に大きな個人差が認められる化合物は, Group 2 に含まない.</sub></sub></sub></sub>

Group 3 (n = 10) は,経口投与後のヒト血漿中濃度推移の予測に用いた化合物群であり, CYP, glucuronosyltransferase 及び reductase などの多様な代謝様式を示す代謝消失型化合物を 選抜した. Group 3 には, P-gp 基質 (amitriptyline, bisoprolol, domperidone, nicardipine, quinidine 及び sildenafil) 及び小腸で代謝を受ける医薬品 (amitriptyline, domperidone, nicardipine, quinidine, sildenafil, tamsulosin 及び tramadol) が含まれる. Group 1 から Group 3 に含まれ る化合物の情報は, Table 2-1 に纏めた.

#### 経口投与後のヒト PK プロファイルの予測に用いたデータ

ヒトPK プロファイルの予測には、 $fu_{b}$ 、 $fu_{inc}$ 、pKa、logP、 $CL_{int}$ 、 $R_{BP}$ 、 $V_{ss, rat}$ 及び $k_{a, app}$ を使用した. $k_{a, app}$ を除く各種パラメータは、第一章に記載した方法に準じて評価した.モデル化合物の各種パラメータは、Table 2-1B に示した.

#### Transwell における hiPSC-IECs の単層培養

hiPSCs から hiPSC-IECs への分化及び hiPSC-IECs の単層培養は,共同研究者が報告した 方法 (Akazawa et al., 2018) に従った. hiPSC-IECs は, 0.5 mg/mL の laminin 511-E8 (iMatrix-511; Nippi) でコーティングされた 96-well Transwell (ポアサイズ: 1 μm; Corning Inc) の多孔 質ポリエステル膜に 3.0 × 10<sup>5</sup> cell/cm<sup>2</sup> の密度で播種した. hiPSC-IECs は, 10 μM Y-27632 (Wako) 含有 intestinal epithelial cell (IEC) maintenance medium (Thermo Fisher Scientific)で 3 日 間培養後, Y-27632 非含有 IEC maintenance medium に培地交換し, 2 日または 3 日毎に培地 を交換して 18 日間培養した. 培養 18 日目に,培地を 10 μM rifampicin (Sigma-Aldrich) 及び 10 nM VD<sub>3</sub> (Toronto Research Chemicals) 含有 IEC maintenance medium に交換した. 続いて, 培養 21 日目に 10 μM rifampicin 及び 10 nM VD<sub>3</sub> 含有 IEC maintenance medium を wash out 後, 得られた hiPSC-IECs に対し薬物代謝酵素及びトランスポーターの mRNA 発現量解析及び 膜透過性試験を実施した.

#### 薬物代謝酵素及びトランスポーターの mRNA 発現量解析

hiPSC-IECs に発現する薬物代謝酵素 [CYP3A4, carboxylesterase 2 (CES2), UDPglucuronosyltransferase 1A1 (UGT1A1)]及びトランスポーター [P-gp, breast cancer resistance protein (BCRP), peptide transporter 1 (PEPT1)] の mRNA 量は, 既報 (Akazawa et al., 2018) に 従って quantitative polymerase chain reaction (定量的 PCR) 法により解析した.

Groups for creating		Pe <sup>a</sup>	$F_a \times F_g{}^b \\$	k <sub>a, in vivo</sub> b	
calibration curves	Generic Name	(x 10 <sup>-6</sup> cm/s)		(1/hr)	Kelerence
Group 1	Acetaminophen	14.0	1	4.8°	Varma et al., 2010, Renner et al., 2007, Wright et al., 1983
Group 1	Antipyrine	24.1	1	-	Varma et al., 2010
Group 1	Atenolol	1.06	0.5	0.50°	Varma et al., 2010, Wójcicki et al., 2003
Group 1	Digoxin	1.4	0.7	-	Varma et al., 2010, Edwards et al., 2017
Group 1	Doxorubicin	0.0111	0.12	-	Varma et al., 2010
Group 1	Famotidine	1.15	0.38	-	Zhao et al., 2001
Group 1	Furosemide	0.819	0.52	0.8	Varma et al., 2010, Klausner et al., 2003
Group 1	Hydrochlorothiazide	1.23	0.6	-	Akabane et al., 2010
Group 1	Lisinopril	0.554	0.25	0.40 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, Sáenz-Campos et al., 1996
Group 1	Pravastatin	0.823	0.27	-	Varma et al., 2010
Group 1	Propranolol	3.22	0.78	-	Akabane et al., 2010
Group 1	Ranitidine	1.29	0.65	0.70 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, van Hecken et al., 1982
Group 1	Saquinavir	0.127	0.15	-	Varma et al., 2010
Group 1	Sulpiride	0.879	0.27	-	Varma et al., 2010
Group 2	Acetaminophen	14.0	1	4.8°	Varma et al., 2010, Renner et al., 2007, Wright et al., 1983
Group 2	Alprazolam	-	0.9	1.9°	Varma et al., 2010, D'Souza et al., 2001
Group 2	Amitriptyline	-	0.65	1.1°	Varma et al., 2010, Nam et al., 2015
Group 2	Atenolol	1.06	0.5	0.50°	Varma et al., 2010, Wójcicki et al., 2003

Table 2-1A. Summary of permeability in hiPSC-IEC monolayers and human *in vivo* parameters in Group 1 and Group 2 drugs.

Groups for creating	Generic Name	Pe <sup>a</sup>	$F_a \times F_g{}^b$	k <sub>a, in vivo</sub> b	Reference
calibration curves		$(x \ 10^{-6} \ cm/s)$		(1/hr)	
Group 2	Bisoprolol	-	0.91	1.0°	Varma et al., 2010, Li et al., 2012
Group 2	Chloroquine	-	0.87	1.8	Varma et al., 2010, Obua et al., 2006
Group 2	Cimetidine	-	0.69	0.60 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, Vaithianathan et al., 2016
Group 2	Diltiazem	-	0.45	0.60 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, Shum et al., 1996
Group 2	Doxycycline	-	0.94	1.7	Varma et al., 2010, Saivin et al., 1988
Group 2	Furosemide	0.819	0.52	0.8	Varma et al., 2010, Klausner et al., 2003
Group 2	Ketorolac	-	1	4.9	Varma et al., 2010, Mandema et al., 1996
Group 2	Levofloxacin	-	1	4.8	Varma et al., 2010, Alsultan et al., 2015
Group 2	Lisinopril	0.554	0.25	0.40°	Varma et al., 2010, Sáenz-Campos et al., 1996
Group 2	Metformin	-	0.52	0.80 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, Homsek et al., 2010
Group 2	Methotrexate	-	0.71	1.5	Varma et al., 2010, Wang et al., 2017
Group 2	Metoprolol	-	0.82	0.85	Varma et al., 2010, Sirisuth et al., 2000
Group 2	Metronidazole	-	1	2.4	Varma et al., 2010, Lau et al., 1992
Group 2	Nicardipine	-	0.2	0.30 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, Yamashita et al., 2015
Group 2	Quinidine	-	0.88	1.4 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, Li et al., 2002
Group 2	Ranitidine	1.29	0.65	0.70 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, van Hecken et al., 1982
Group 2	Rosiglitazone	-	1	3.1°	Varma et al., 2010, Kumar et al., 2008
Group 2	Sildenafil	-	0.68	0.70 <sup>c</sup>	Varma et al., 2010, Muirhead et al., 2000

## Table 2-1A. Continued.

Group 1 and Group 2 compounds are listed in alphabetical order, respectively.

<sup>a</sup>The transcellular transport study using hiPSC-IECs was performed in duplicate.

<sup>b</sup>Human  $F_a \times F_g$  and  $k_{a, in vivo}$  values were taken from the following references.

46

<sup>c</sup>To determine  $k_{a, in vivo}$ ,  $k_{el}$  and  $T_{max}$  were estimated from human PK profiles after intravenous or oral administration. Next, using the following equation as proposed by Gertz et al. (Gertz et al., 2011),  $k_{a, in vivo}$  was calculated from the PK parameters.

$$T_{max} = \frac{\ln\left(\frac{k_a}{k_{el}}\right)}{k_a - k_{el}}$$

When estimating human  $k_{a, app}$  value of group 3 (alprazolam, amitriptyline, bisoprolol, nicardipine, quinidine sildenafil tamsulosin, tramadol) drugs from the correlation between  $F_a \times F_g$  and  $k_{a, in vivo}$ , a standard curve excluding the drug from group 2 was used.

		N4 <sup>1</sup>			Hun	nans			Rats					
Conorio Norro	Dolonita	Main Dia dia 2	LagD	$\mathrm{fu}_{\mathrm{B}}^{\mathrm{d}}$	CLint,in vivo <sup>d</sup>	$\mathbf{fu}_{inc}$	$\mathbf{P}\mathbf{e}^{\mathbf{d}}$	ka, app	$fu_{\mathrm{B}}{}^{d}$	$V_{ss}{}^d$	Matahalia any mag	P-gp mediated		
Generic Name	Polarity	Binding Protein <sup>b</sup>	LogP		(mI/min/kg)		(×10 <sup>-6</sup>	(1/br)		(L/lrg)	Metabolic enzymes	transport		
		Tiotem			(IIIL/IIIII/Kg)		cm/s)	(1/11)		(L/Kg)				
Alprazolam	Neutral	AL	2.5	0.41	0.027°	0.79	13.2	1.8	0.34	1.8	СҮРЗА4, СҮРЗА5	No		
1 mitrintulina	Dago	ACD	4.0	0.000	28	0.26	2.00	0.0	0.024	12	CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4,	Vac		
Amurptyme	Dase	AGP	4.9	0.090	2.0	0.30	2.00	0.9	0.034	12	Glucuronosyltransferase	168		
Bisoprolol	Base	AGP	2.1	1.0	2.0	1.00	1.71	0.8	0.75	3.5	CYP2D6, CYP3A4	Yes		
Domenanidono	Daga		15	0.091	20	0.44	0 200	0.2	0.021	2.0	CYP1A2, CYP2D6, CYP2B6,	Vac		
Domperidone	Base	AGP	4.3	0.081	29	0.44	0.298	0.5	0.031	5.9	3.9	5.9	CYP2C9, CYP3A4	105
Meloxicam	Acid	AL	3.4	0.0049	1.7	1.00	19.6	1.8	0.018	0.16	СҮР2С9, СҮРЗА4	No		
Nicardipine	Base	AGP	5.1	0.0042	208	0.04	0.745	0.4	0.0068	3.6	CYP3A4, reductase	Yes		
Quinidine	Base	AGP	3.4	0.21	13	0.63	1.26	0.5	0.23	5.8	CYP2E1, CYP2C9, CYP3A4	Yes		
Sildenafil	Neutral	AL	2.8	0.049	49	0.68	3.60	1.5	0.078	1.9	CYP2C9, CYP3A4	Yes		
Tamsulosin	Base	AGP	2.2	0.017	18	1.00	0.754	0.4	0.16	1.9	CYP2D6, CYP3A4	No		
Tramadol	Base	AGP	2.5	1.0	8.8	1.00	3.06	1.4	1.0	3.1	CYP2B6, CYP2D6, CYP3A4	No		

Table 2-1B. Summary of preclinical parameters for the Group 3 drugs.

AL, albumin; AGP,  $\alpha$ 1-acid glycoprotein

Group 3 compounds are listed in alphabetical order, respectively.

<sup>a</sup>Drugs showing pKa (acid) < 7.0 are defined as acidic drugs, and drugs showing pKa (base) >7.0 are defined as basic drugs.

<sup>b</sup>Acidic (pKa (acid) < 7.0) and neutral drugs was defined as albumin binding type, and basic drugs (pKa (base) > 7.0) was defined as AGP binding type

(Booker et al., 1996; Kragh-Hansen et al., 2002; Ghuman et al., 2005).

<sup>c</sup>Alprazolam was very stable in metabolic study using human hepatocytes with a substrate remaining rate of 99.9% or more after incubation for 2 hours. Since CL<sub>int, *in vivo*</sub> value of these drugs was calculated to be 0.027 mL/min/kg assuming metabolic stability as 99.9%, PBPK modeling analyses were performed using this CL<sub>int, *in vivo*</sub> value.

<sup>d</sup>The protein binding assay, metabolic study, transcellular transport study using hiPSC-IECs and rat PK study were performed in duplicate.

#### <u>hiPSC-IECs を用いた膜透過性評価</u>

Group 1 及び Group 3 のモデル化合物 (lisinopril: 10  $\mu$ M, その他モデル化合物: 2  $\mu$ M) を Transwell の apical 側へ添加した. いずれのモデル化合物においても P-gp の輸送能の飽和を 回避するために, apical 側への化合物添加濃度は, P-gp の K<sub>m</sub>値と比較して十分低い濃度と した. Transwell に化合物を添加後, 37°C, 150 分間インキュベートし, apical 側及び receiver 側の化合物濃度を LC-MS/MS で測定した. 得られた化合物濃度を基に, 式 2-1 に従い P<sub>e</sub>を 算出した.

$$P_{e} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_{0}}$$
(2-1)

dQ/dtは、hiPSC-IECs 単層膜の透過率であり、インキュベート時間に対する receiver 側の累 積透過量の傾きによって定義される値である. A は単層膜の表面積 (0.33 cm<sup>2</sup>) であり、 $C_0$ は apical 側に添加した化合物の初期濃度である.

#### <u>見かけの吸収速度定数 (ka,app)</u>

Group 1 の膜透過性評価より得た P<sub>e</sub>と Table 2-1A に示す文献より得た F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>の回帰曲線 及び回帰式は,統計解析ソフトウェア (XLfit software, ID Business Solution) により非線形最 小二乗法を用いて算出した.得られた回帰式と Group 3 の膜透過性評価より得た P<sub>e</sub>を基に, Group 3 の F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>を算出した. 続いて, Group 2 について, Table 2-1A に示す文献または既 報のデコンボリューション法 (Gertz et al., 2011) を基に k<sub>a, in vivo</sub> を算出した. 得られた Group 2 の k<sub>a, in vivo</sub> と Table 2-1A に示す F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>から,非線形最小二乗法 (XLfit software) を用いて 回帰曲線及び回帰式を算出した. 得られた回帰式は,  $\chi$ 二乗適合性検定を基に,  $\chi$ <sup>2</sup>値を有意 水準 0.05 の値 ( $\chi$ <sup>2</sup><sub>0.05</sub>) と比較することで,近似曲線として妥当であることを確認した. 最後 に,得られた回帰式及び Group 3 の F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>を基に,Group 3 の k<sub>a, app</sub>を算出した.

#### 2-2. モデリング&シミュレーション法

#### PBPK モデル

PBPK モデルは、V<sub>ss</sub>に影響のある組織コンパートメント(脂肪,消化管,肝臓,肺,腎臓, 筋肉及び皮膚)で構成されており、全ての組織コンパートメントは静脈及び動脈の血液循環 で結合されている(Fig. 2-1).また、経口投与後の化合物は、小腸及び肝臓で初回通過効果 を受けるものとし、各組織コンパートメントへ移行後、瞬時に攪拌・拡散され、代謝及び糸 球体ろ過によって生体内から排泄されるものとした.PBPK モデルにおける脂肪、肝臓、肺、 腎臓、筋肉及び皮膚の物質収支式は、第一章の式 1-1 から式 1-6 で表される.





臨床で用いられる原薬は、熱力学的に安定な結晶系をとるだけでなく、最終製剤は塩や個 体分散体などの製剤処方が適応される.一方、探索研究の初期では、アモルファスや準安定 形をとる化合物を使用することが多いことから、最終製剤の化合物の溶解特性を把握する ことが不可能である.そこで、本研究では、化合物の最大曝露量を基に有望化合物を選抜す るために、経口投与後のモデル化合物は、胃内ですべて溶解すると仮定した.ここで、PBPK モデルの消化管コンパートメントは、1 つの胃内腔コンパートメント、7 つの小腸内腔コン パートメント及び 1 つの大腸内腔コンパートメントで構成される compartmental absorption and transit (CAT) モデルを適応した (Yu et al., 1999). 胃内腔コンパートメントの物質収支式 は、式 2-2 で表される.

$$\frac{dA_{stomach}}{dt} = -GER \times A_{stomach}$$
(2-2)

Astomach 及び GER は、胃内の化合物量及び胃内容物排出速度を示す.胃内腔コンパートメントから続く小腸内腔の第1コンパートメントの物質収支式は、式 2-3 で表される.

$$\frac{dA_{intestine,1}}{dt} = GER \times A_{stomach} - k_{a,app} \times A_{intestine,1} - k_t \times A_{intestine,1}$$
(2-3)

k<sub>t</sub>は、小腸内腔における化合物の移動速度を示し、下付き文字の1は、小腸の第1コンパートメントであることを表す。絶食条件において、k<sub>t</sub>は 0.0853 (1/min) である (Rowland, 2013).小腸内腔側の第2から第7コンパートメントの物質収支式は、式 2-4 で表される.

$$\frac{dA_{intestine,i}}{dt} = k_t \times A_{intestine,i-1} - k_{a,app} \times A_{intestine,i} - k_t \times A_{intestine,i}$$
(2-4)

下付き文字のiは、第iコンパートメントであることを表す.消化管からの化合物の吸収は、小腸内腔コンパートメントから起こるとした場合、小腸コンパートメントは、式2-5 で表される.

$$V_{\text{intestine}} \times \frac{dC_{\text{intestine}}}{dt} = Q_{\text{intestine}} \times \left(C_{\text{artrey}} - \frac{C_{\text{intestine}} \times R_{\text{BP}}}{K_{\text{p,intestine}}}\right) + \sum_{i=1}^{7} \left(k_{a,\text{app}} \times A_{\text{intestine,i}}\right)$$
(2-5)

Vintestine, Cintstine, Cartrey 及び Qintestine は、それぞれ小腸容積、小腸中化合物濃度、動脈血中化 合物濃度及び小腸血流速度を示す.

#### 薬物動態解析

AUC<sub>0-t</sub>及びAUC<sub>0-∞</sub>は、それぞれ経口投与後の血漿中濃度推移を基に台形法によって算出 した.最高血漿中濃度 (C<sub>max</sub>)及び最高血漿中濃度到達時間 (T<sub>max</sub>)はそれぞれ経口投与後 の血漿中濃度推移より得た.生物学的利用率 (BA)は、静脈内投与後の血漿中濃度推移よ り得たAUC<sub>0-∞</sub>に対する同一投与量における経口投与後の血漿中濃度推移より得たAUC<sub>0-∞</sub> の比より算出した.

## 予測確度の評価

PK パラメータの予測確度は, 第一章の式 1-24 から式 1-26 で表される RMSE, AFE, AAFE 及び% within X fold error を基に評価した.

#### 2-3. 結果

#### hiPSC-IECs における薬物代謝酵素及びトランスポーターの mRNA 発現量

Rifampicin または VD<sub>3</sub>を培地中に添加した hiPSC-IECs の CYP3A4 mRNA 発現量は, 誘導 剤非添加の条件と比較して, それぞれ 56 倍または 121 倍の値を示した (Fig. 2-2A). 両誘導 剤を添加した hiPSC-IECs における CYP3A4 mRNA 発現量は, Caco-2 細胞と比較して 373 倍 の値を示した (Fig. 2-2B). また, hiPSC-IECs の CYP3A4, CES2, UGT1A1, P-gp, BCRP, および PEPT1 の遺伝子発現レベルは, ヒト成人小腸と比較して, それぞれ 1/22, 1/40, 1/3.8, 1/3.5, 1/17 及び 1/7.2 の値を示した (Fig. 2-2B).





A) Control; hiPSC-IECs without rifampicin and VD<sub>3</sub>, +Rifampicin; hiPSC-IECs treated with 10 μM rifampicin, +VD<sub>3</sub>; hiPSC-IECs treated with 10 nM VD<sub>3</sub>.

B) Gene expression level of metabolic enzymes and transporters that were normalized by the expression level of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The gene expression level of human adult intestine, Caco-2 and hiPSCs were referred from our previous literature (Akazawa et al., 2018). White bar; human adult intestine, dotted bar; Caco-2 cells, gray bar; hiPSCs, black bar; hiPSC-IECs treated with both rifampicin and VD<sub>3</sub>.

## <u>hiPSC-IECsの</u>膜透過性評価より得た $P_e \ge E \vdash F_a \times F_g$ の相関関係及び E $\vdash F_a \times F_g \ge k_{a, in vivo}$ の相関関係

Group 1 のモデル化合物について、hiPSC-IECs の膜透過性を評価後、得られた P<sub>e</sub>及び既報 (Zhao et al., 2001; Akabane et al., 2010; Varma et al., 2010) より得たヒト F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>の値との相関関 係を Fig. 2-3A に、Group 2 のモデル化合物におけるヒト F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>と k<sub>a, in vivo</sub>の相関性を Fig. 2-3B に示す. Group 1 の P<sub>e</sub>とヒト F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>の値は、R<sup>2</sup>が 0.8934 と良好な相関関係を示した (Fig. 2-3A). また、Group 2 のヒト F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>と k<sub>a, in vivo</sub>の値は、R<sup>2</sup>が 0.8488 と良好な相関関係を示し た (Fig. 2-3B). Group 1 のモデル化合物について、Caco-2 を用いた膜透過性試験 (Cruciani et al., 2000, Li et al., 2007, Gertz et al., 2010, Takenaka et al., 2016) より得た P<sub>e</sub>は、ヒト F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>の 値と R<sup>2</sup>が 0.6973 の相関性を示した (Fig. 2-3C).





A) Standard curve for estimating human  $F_a \times F_g$  from  $P_e$  in hiPSC-IECs. The sigmoidal curve was calculated by XLfit software according to the following equation ; human  $F_a \times F_g = \frac{1-217.02 \times A}{A}$ ,  $A = e^{\frac{-10.09-P_e}{1.86}}$  B) Standard curve for estimating human  $k_{a, in vivo}$  from human  $F_a \times F_g$ . The curve was calculated by XLfit software according to the following equation; human  $F_a \times F_g = \frac{4.86 \times k_{a,in\,vivo}}{0.073 + k_{a,in\,vivo}} - 3.77$  C) Correlation of Caco-2 permeability and human  $F_a \times F_g$ . The curve was calculated by XLfit software according to the following equation; human  $F_a \times F_g = \frac{0.92}{1+1.90 \times A}$ ,  $A = e^{-0.52 \times P_e}$ 

#### 経口投与後のヒト血漿中濃度推移の予測

Group 3 について, Table 2-1B に示すパラメータを PBPK モデル (Fig. 2-1) に入力し, 連 立微分方程式を解くことで経口投与後のヒト血漿中濃度推移を得た (Fig. 2-4). 経口投与後 の血漿中濃度推移から算出した PK パラメータの実測値及び予測値の相関関係を Fig. 2-5 に, 新規 bottom-up PBPK 法により得られた PK パラメータの予測性及び米国製薬協による従来 型 bottom-up PBPK 法の検証結果 (Poulin et al., 2011) を Table 2-2 にそれぞれ示す.

新規 bottom-up PBPK 法で予測された C<sub>max</sub>, AUC<sub>0-t</sub>及び BA の RMSE は, それぞれ 0.19, 0.23 及び 0.19 を示し, 従来型 bottom-up PBPK 法で得た Cmax, AUC0-t 及び BA の RMSE (Cmax: 0.66, AUC<sub>0-t</sub>: 0.68, BA: 0.56) と比較して低値を示した.新規 bottom-up PBPK 法によって予 測された domperidone の BA は, 実測値と比較して 2.6 倍の値を示し, amitriptyline 及び sildenafil の血漿中濃度推移より得た AUCot の予測値は, 実測値と比較してそれぞれ約 3.2 倍 及び 1/2.4 の値を示した. 感度分析により sildenafil の fu<sub>liver</sub>を 0.1 と設定した場合, 血漿中 濃度推移は良好な予測性を示し, AUC0+の予測値は, 実測と比較して 1.2 倍の値を示した (Fig. 2-6). Group 3 の全ての化合物群において,新規 bottom-up PBPK 法によって予測された C<sub>max</sub>, AUC<sub>0</sub>, 及び BA の AAFE は, それぞれ 1.47, 1.52 及び 1.39) であり, 平均 2 倍以内の 値であった.この AAFE は,従来法より得た AAFE (C<sub>max</sub>:3.58,AUC<sub>0+t</sub>: 3.90,BA: 2.85) と比 較して低値を示した.また,新規 bottom-up PBPK 法で得た C<sub>max</sub>,AUC<sub>0-t</sub>及び BA の% within 2-fold error 及び 3-fold error (C<sub>max</sub>: 90 - 100%, AUC<sub>0-t</sub>: 80 - 90%, BA: 80 - 100%) は, 従来法に より予測した Cmax, AUC0-t 及び BA (Cmax: 31 - 54%, AUC0-t: 23 - 39%, BA: 46 - 62%) 比較し て高値を示した.従って,hiPSC-IECsの膜透過性評価結果より算出した ka, app を入力した新 規 bottom-up PBPK 法により, 経口投与後のヒト血漿中濃度推移を予測した場合, PK パラメ ータを実測比平均2倍以内で予測可能であり,従来型 bottom-up PBPK 法と比較して高い確 度でヒト血漿中濃度推移を予測可能であることが示された.



# Fig. 2-4. Predictions of plasma concentration-time profiles after oral dosing of Group 3 drugs to humans.

Solid line, novel PBPK approach; open circle, observed data.



**Fig. 2-5.** Correlation between predicted and observed human PK parameters of Group 3 drugs. Dashed line and Solid lines represent 2-fold and 3-fold errors between predicted and observed parameters, respectively.

1; Alprazolam, 2; Amitriptyline, 3; Bisoprolol, 4; Domperidone, 5; Meloxicam, 6; Nicardipine, 7; Quinidine, 8; Sildenafil, 9; Tamsulosin, 10; Tramadol.

Parameters	PRPK approaches	n	RMSE	٨FF	AAFE	Percentage within		
	T BI K approaches	11	RMSE	APE		1.5-fold	2-fold	3-fold
C	This study	10	0.19	0.89	1.47	50.0	90.0	100.0
Cmax	PhRMA <sup>a</sup>	13	0.66	0.36	3.58	NA	30.8	53.8
T	This study	10	0.33	1.28	1.84	40.0	80.0	80.0
1 max	PhRMA <sup>a</sup>				NA			
AUC <sub>0-t</sub>	This study	10	0.23	0.99	1.52	70.0	80.0	90.0
	PhRMA <sup>a</sup>	13	0.68	0.38	3.90	NA	23.1	38.5
BA	This study	10	0.19	1.09	1.39	60.0	80.0	100
	PhRMA <sup>a</sup>	13	0.56	0.78	2.85	NA	46.2	61.5

### Table 2-2. Statistical analysis for human PK parameters.

NA, not available

<sup>a</sup>The statistical data based on the conventional PBPK model was taken from the literature (Poulin et al., 2011).

The literature represents the statistical data divided into 2 drug classes (BCS 1 and BCS 2).

In order to sum up the population (BCS 1 and BCS 2), the statistical values described in the cited references were re-calculated based on the Eqs. 1-24 to 1-26.



Fig. 2-6. Predicted plasma concentration-time profiles after oral dosing of sildenafil to humans.

Open circle; Observed data, solid line; predicted PK profile using  $fu_{liver}$  of 0.30, Dashed line; predicted PK profile using  $fu_{liver}$  of 0.10. In this study, the main bind protein of sildenafil was assumed to albumin, and the value of  $fu_{liver}$  was calculated to be 0.30 as the  $fu_{liver}$  was determined by the albumin-mediated hepatic uptake. When the main bind protein of sildenafil was assumed to AGP,  $fu_{liver}$  is calculated to be 0.017 as the value of  $fu_{liver}$  was determined by the pH partition hypothesis. Since it has been experimentally shown that sildenafil binds to both AGP and AL, the actual  $fu_{liver}$  is considered to be lower than 0.30 but higher than 0.017. Therefore, the simulated  $fu_{liver}$  of 0.10 is theoretically acceptable.

2-4. 考察

化合物の消化管吸収性を予測するために、多くの研究者が hiPSC-IECs の分化方法を報告 している (Finkbeiner et al., 2012; Ogaki et al., 2013; Iwao et al., 2015; Uchida et al., 2017). しか し, in vivo の消化管吸収吸収性を再現できる hiPSC-IECs を用いた評価系は存在しない.こ れら2種のタンパク質は、いずれも化合物の消化管透過性に対して重要な役割を果たす (Kacevska et al., 2008) ことから、既報の hiPCS-IECs では、CYP3A4 及び P-gp の寄与を定量 的に評価することが困難であり、小腸上皮細胞における初回通過効果を精緻に求めること が困難であると考えらえる. そこで, 著者は, hiPSC-IECs における CYP3A4 及び P-gp mRNA の発現量を向上させるための手法として、hiPSC-IECsの培養時に CYP3A4 及び P-gpの誘導 剤である rifampicin 及び VD3 を添加し, 誘導剤を処置した hiPSC-IECs の有用性を検討した. その結果, rifampicin または VD<sub>3</sub>を処置することにより, hiPSC-IECs における CYP3A4 の mRNA 量は,非処置群と比較して 56 - 121 倍の値を示し (Fig. 2-2A), rifampicin 及び VD3 を 処置した hiPSC-IECs における CYP3A4 mRNA 発現量は, Caco-2 と比較して 373 倍の値を示 した (Fig. 2-2B) ことから, hiPSC-IECs は CYP3A4 基質の小腸代謝を過小評価する Caco-2 細胞 (Prueksaritanont et al., 1996) と比較して, 消化管透過性の予測確度の改善が期待された. 更に, CYP3A4 と同様, PXR (Huwyler et al., 2006) を介して誘導される P-gp の mRNA 発現 量は、hiPSC-IECsにおいて成人小腸の 1/3.5の値にまで改善することが明らかとなった (Fig. 2-2B).

Rifampicin 及び VD<sub>3</sub> を処置した hiPSC-IECs を用いて,Group 1 の膜透過性を評価した. Group 1 には, P-gp 及び CYP3A4 の非基質 (atenolol, famotidine, furosemide, hydrochlorothiazide, lisinopril, pravastatin, propranolol, ranitidine 及び sulpiride) に加え,P-gp 基質 (digoxin, doxorubicin 及び saquinavir) 及び CYP3A4 基質 (acetaminophen, antipyrine 及び saquinavir) が 含まれる. 膜透過性評価より得られた Pe は,ヒト Fa × Fg との R<sup>2</sup> が 0.8934 (Fig. 2-3A) であ り, Caco-2 細胞より得た Pe (R<sup>2</sup>=0.6973, Fig. 2-3C) と比較して良好な相関性を示した. 続い て Group 3 に含まれる小腸代謝を受ける 5 化合物 (amitriptyline, domperidone, nicardipine, quinidine 及び sildenafil) について, hiPSC-IECs を用いた膜透過性評価を実施後,得られた Pe と Fig. 2-3A で示される相関関係を基に,各化合物のヒト Fa × Fg を予測した.その結果,ヒ ト Fa × Fg の予測値 (amitriptyline: 0.74, domperidone: 0.14, nicardipine: 0.27, quinidine: 0.52,

sildenafil: 0.87) は、いずれも報告値 [amitriptyline: 0.65, domperidone: 0.24, nicardipine: 0.20, quinidine: 0.88, sildenafil: 0.68, Varma et al., 2010, Table 2-1A] と同等の値を示した (Table 2-3). 以上より, CYP3A4 及び P-gp mRNA 発現量を向上させた hiPSC-IECs は、CYP3A4 及び P-gp 基質の消化管吸収性の予測に有用であることが示された.

Table 2-3.  $F_a \times F_g$  values based on the permeation assay using hiPSC-IECs and clinical data (Varma et al., 2010).

	$F_a  imes F_g$					
		Clinical data				
	mPSC-IECs	(Varma et al., 2010)				
Amitriptyline	0.74	0.65				
Domperidone	0.14	0.24				
Nicardipine	0.27	0.20				
Quinidine	0.52	0.88				
Sildenafil	0.87	0.68				

ー方で、hiPSC-IECs の CYP3A4 及び P-gp mRNA 発現量は、ヒト成人小腸と比較してそれ ぞれ約 1/22 及び 1/3.5 の値を示すことから、hiPSC-IECs はヒト成人小腸における遺伝子発 現量を完全に再現した細胞ではない. hiPSC-IECs における CYP3A4 及び P-gp mRNA 量の更 なる向上には、hiPSC-IECs の成熟化が必要であると考えられる.小腸細胞の成熟化を促す 手法として、DNA メチル化阻害剤、mitogen activated protein inhibitor 及び transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 経路阻害剤を共添加する培養手法 (Iwao et al., 2015) が報告されている他、 cyclic adenosine monophosphate (cAMP) シグナルプロモーターを用いた培養方法 (Kabeya et al., 2018) も有用であると考えられる.近年、cAMP シグナルを活性化するために、forskolin を hiPCS-IECs に処置した場合、成人ヒト小腸と同等の CYP3A4 及び P-gp mRNA 発現量を 有する hiPSC-IECs を hiPSC から分化可能となることが報告された (Kabeya et al., 2020).し かし、いずれの分化方法を用いた場合においても、小腸上皮細胞への分化促進を目的として bone morphogenetic protein (BMP) シグナルを抑制するための noggin を添加していることか らコストが高くなる. 今後は、コストと有用性を両立した hiPSC-IECs の分化及び培養方法の構築が望まれる.

また、本研究では、mRNAの発現量を定量しているものの、タンパク質発現量は評価して いない. CYP3A4 及び P-gp の mRNA 発現量とタンパク質絶対発現量の相関関係は, Watanabe ら(Watanabe et al., 2004) 及び Ohtsuki ら (Ohtsuki et al., 2012) によって報告されている. CYP3A4mRNA 発現量は、ウェスタンブロット法により定量されたタンパク発現量 [相関係 数 (r) = 0.963, Watanabe et al., 2004] 及び LC-MS/MS により定量されたタンパク質絶対発現 量 (R<sup>2</sup> = 0.952 - 0.97, Ohtsuki et al., 2012) と高い相関性を示すだけでなく, CYP3A4 の典型 的基質である testosterone の代謝活性 (r = 0.947, Watanabe et al., 2004) や midazolam 及び nifedipine の代謝活性 (R<sup>2</sup> = 0.952 - 0.978, Ohtsuki et al., 2012) と良好な相関性を示す. 一方 で, P-gpの mRNA 発現量とタンパク質絶対発現量の相関性 (R<sup>2</sup>=0.185, Ohtsuki et al., 2012) は乏しく, タンパク質発現量と輸送活性に相関が認められない (De Lange et al., 2018) こと から,mRNA 発現量及びタンパク質発現量から輸送活性を推定することが困難であること が示唆されている.本研究で用いた hiPSC-IECs は,P-gp mRNA 発現量が成人の 1/3.5 の値 を示すものの, 3種の P-gp 基質 (digoxin, doxorubicin 及び saquinavir) を含む Group 1の化 合物群において, Fa×Fgと Peが良好な相関性 (R<sup>2</sup>=0.8934, Fig. 2-3A) を示し, Group 3 に含 まれる 5 種の P-gp 基質 (amitriptyline, domperidone, nicardipine, quinidine 及び sildenafil) の Fa × Fgが報告値と同等の値を示す (Table 2-1A) ことから,P-gp のタンパク質発現及び輸送機 能を保有していると考えられるが,hiPSC-IECs の有用性を更に高めるためには,P-gp タン パク質の絶対発現量を評価する必要があると考える.

PBPK モデルを用いて経口投与後の血漿中濃度推移を予測するためには,第一章で示した 肝代謝消失速度及び組織移行性の他,消化管コンパートメントにおける吸収速度定数が必 要となる.一般に,k<sub>a,app</sub>は,膜透過性試験より得た Pe から,検量線を基に Pe, in vivo を推定後, Pe, in vivo と消化管半径及び化合物固有の補正係数を基に算出される (Peters et al., 2008; Poulin et al., 2011; Horiuchi et al., 2018). ここで用いられる Pe, in vivo は,ヒトの空腸近位に挿入された 2 つのバルーン間に化合物含有の灌流液を循環し,灌流液中に含まれる化合物量の減少量か ら算出される (double balloon 法: Takamatsu et al., 1997; Lennernäs, 2007).しかし, double balloon 法では,体循環に吸収された化合物だけでなく,小腸上皮細胞に残留または吸着する化合物 についても吸収されると仮定されるため,化合物の吸収量及び吸収速度定数を過大評価す

る. そこで、本研究では、group 1 (14 化合物) の  $P_e \ge F_a \times F_g$ の相関関係 (Fig. 2-3A)、及び group 2 (27 化合物) の  $F_a \times F_g \ge$ 臨床試験から得た  $k_{a, in vivo}$ の相関関係 (Fig. 2-3B) を検量線 とし、ヒト血漿中濃度推移を予測するためのモデル化合物 (group 3; 10 化合物) について hiPSC-IECs の膜透過性評価より得た  $P_e$ に基づき  $k_{a, app}$ を算出した. その結果, group 3 にお ける BA の AFE, AAFE, % within 2-fold error 及び 3-fold error は、それぞれ 1.09, 1.39, 80% 及び 100%であり、従来型 bottom-up PBPK 法 (AFE: 0.78, AAFE: 2.85, % within 2-fold error: 46%, % within 3-fold error: 62%) と比較して、高い予測確度を示した (Table 2-2). また、 $k_{a,app}$ を入力した新規 bottom-up PBPK 法では、予測された  $C_{max}$ ,  $T_{max}$  及び AUC<sub>04</sub> の AAFE ( $C_{max}$ : 1.47,  $T_{max}$ : 1.84, AUC<sub>04</sub>: 1.52) は 2 を下回る値を示し、各 PK パラメータの% within 2-fold error は 80% - 90%を示した (Table 2-2). この結果は、従来型 bottom-up PBPK 法を用いた場 合 (AAFE: 3.58 - 3.90, % within 2-fold error: 23% - 31%) と比較して、良好な予測性を示した. 従って、新規 bottom-up PBPK 法は、経口投与後の血漿中濃度推移から得られる PK パラメ ータを実測比平均 2 倍以内で予測可能であり、従来法と比較して高い予測確度を示すこと が示された.

一方で、新規 bottom-up PBPK 法によって予測された domperidone, nicardipine, quinidine 及び tamsulosin の T<sub>max</sub> (domperidone, nicardipine 及び quinidine; 2.0 hr, tamsulosin; 4.0 hr) は、 実測値 (domperidone; 1.0 hr, nicardipine; 0.5 hr, quinidine; 1.0 hr, tamsulosin; 1.0 hr) と比較し て、高値を示した (Table 2-4). これらの化合物はいずれも弱塩基性であり、弱酸性を示す胃 内で分子型となる. 胃内で分子型を示す化合物は、小腸に加えて胃からも吸収されることか ら (Schanker et al., 1957), T<sub>max</sub>の過大評価は、消化管コンパートメントの吸収部位を小腸に 絞ったことが原因であると考えらえる.

	T <sub>max</sub> (hr)						
	Novel PBPK	Observed data					
Domperidone	2.0	1.0					
Nicardipine	2.0	0.5					
Quinidine	2.0	1.0					
Tamsulosin	4.0	1.0					

Table 2-4. Predicted and observed  $T_{max}$  value in domperidone, nicardipine, quinidine and tamsulosin.

また, domperidone, amitriptyline 及び sildenafil は, Group 3 に含まれる他の化合物群と比 較して,経口投与後の血漿中濃度推移の予測確度が不良であった. Domperidone は, BA の 予測値が実測値と比較して 2.6 倍の値を示し、血漿中濃度推移を過大評価した (Fig. 2-4, 2-5). Domperidone の肝アベイラビリティ (F<sub>h</sub>) の予測値及び実測値は, それぞれ 0.59 及び 0.62 を示すことから、BAの予測誤差はFhに起因しないと考えられる.一方で、domperidoneの ヒト F<sub>a</sub>×F<sub>g</sub> (= BA/F<sub>h</sub>)の予測値は、実測値 (Varma et al., 2010)と比較して約 2.4 倍高値を示 し、水に対する溶解度が低いことが報告されている (5.09 µg/mL, Ahmed et al., 2016). 以上よ り, 新規 bottom-up PBPK 法により domperidone の BA を過大評価する理由は, PBPK モデル の胃内腔において、化合物の全量が可溶型を取るという仮定に起因すると考えられた. 続い て, amitriptylineのAUC0-tの予測値は、実測値と比較して 3.2 倍高値を示し、血漿中濃度推 移を過大評価した (Fig. 2-4, 2-5). hiPSC-IECs の膜透過性評価を基に予測された amitriptyline のヒトF<sub>a</sub>×F<sub>g</sub>は0.74であり,報告値(0.65; Varma et al., 2010)と同程度の値を示すことか ら,AUC0+の予測誤差は消化管透過が原因ではないと考えられた.Amitriptyline について, 肝臓における代謝の寄与度を示す肝抽出率 (Eb) を算出した結果, Ebの予測値は 0.066 を示 し、実測値 (0.26) と比較して 1/3.9 の値であったことから (Table 2-5), AUC<sub>0-t</sub>の予測誤差 は、肝臓における代謝過程を過小評価することに起因すると考えられた. Amitriptylineの臨 床試験の被験者は,韓国人の健常ボランティアであるが (Nam et al., 2015),本検討でヒト血 漿中濃度推移の予測に用いた肝細胞は、白人由来のものである. Amitriptyline の主代謝経路 は、C10のヒドロキシル化及び脂肪族側鎖の脱メチル化であり、両代謝反応は CYP2D6 によ

って触媒される (Ghahramani et al., 1997). アジア人では,不活性型の遺伝子多型である CYP2D6\*4 を有する割合は,人口の 1%である一方,白人では人口の 12 - 21%が CYP2D6\*4 を有することが報告されている (Ingelman-Sundberg, 2005). 従って,血漿中濃度推移の過大 評価には, CYP2D6 の遺伝子多型が影響した可能性が有り,遺伝子発現の人種差を考慮する ためには,種々の人種由来の細胞を用いた *in vitro* 評価や薬物代謝酵素の遺伝子の発現頻度 を考慮した母集団薬物動態解析法 (Aarons, 1991) が有用であると考える.

Table 2-5. Predicted and observed E<sub>h</sub> value in amitriptyline.

	Р	redicted value	Observe	ed value	
	$CL_h$	$F_h{}^a$	${\rm E_h}^{\rm b}$	$F_h^c$	${E_h}^d$
	(mL/min/kg)				
Amitriptyline	1.39	0.93	0.066	0.74	0.26

<sup>a</sup>F<sub>h</sub> was calculated by subtracting E<sub>h</sub> from 1.

 ${}^{b}E_{h}$  was calculated by dividing CL<sub>h</sub> by hepatic blood flow (21 mL/min/kg, Rowland et al., 2013).

<sup>c</sup>Observed F<sub>h</sub> was taken from previous literature (Varma et al., 2010).

 ${}^{d}E_{h}$  was calculated by subtracting  $F_{h}$  from 1.

Sildenafil では、AUC<sub>0-t</sub>の予測値が実測値と比較して 1/2.4 の値を示し、血漿中濃度推移を 過小評価した (Fig. 2-4, 2-5). hiPSC-IECs の膜透過性評価を基に得たヒトF<sub>a</sub>×F<sub>g</sub>は 0.87 で あり、報告値 (0.68; Varma et al., 2010) と同等の値であったことから、AUC<sub>0-t</sub>の予測誤差の 主因ではないと考えられる.また、第一章における検討の結果、bottom-up PBPK 法によっ て予測された sildenafil の V<sub>ss</sub>は、実測値と乖離が認められなかった (Mayumi et al., 2019). 加えて、ヒトにおいて、尿及び糞中に sildenafil の未変化体が認められないことから、sildenafil は、代謝消失型の化合物であると考えられる (Muirhead et al., 2002).すなわち、sildenafil は、代謝消失型の化合物であると考えられる (Muirhead et al., 2002).すなわち、sildenafil に おける血漿中濃度推移の予測誤差は、肝代謝速度の計算過程に起因すると考えらえた。肝コ ンパートメントにおける代謝消失速度は、第一章の式 1-7 で示される通り、Cliver、CL<sub>Uint, in vivo</sub> 及び fuliver によって規定される. Cliver は変数であることから、予測誤差には影響しない.ヒ ト肝細胞代謝安定性より得た CL<sub>Uint, in vivo</sub>は、72 mL/min/kg であり (Table 2-1B)、既報 (90 mL/min/kg, Zanelli et al., 2012) と概ね同等の値を示した。従って、予測誤差の主因は、fuliver と考えられた. fuliver は、血漿中での主結合タンパク質の種類を定性的に判断することで算 出されるパラメータである. Sildenafilの pKa (base) は 6.8 を示す (Véronique et al., 2000) た め、fuliver (= 0.30) は、アルブミン媒介性の肝移行 (式 1-20) 及び pH 分配仮説 (式 1-12 - 式 1-17) を基に算出した. しかし、sildenafil がアルブミン以外の血漿中タンパク質とも結合す る場合、アルブミン媒介性の肝移行の影響は低減され、この場合、fuliver は本検討で使用し た値と比較して低値を示す. そこで、アルブミンと AGP に対する sildenafil の結合比率を、 精製タンパク質を用いた平衡透析法 (Poulin, Hop et al., 2012) を基に評価した. その結果、 sildenafil の AGP に対するアルブミンへの結合分率は 1.19 を示したことから、sildenafil は AGP とも強く結合することが示唆された. 続いて、sildenafil の fuliver の値に対して感度分析 をした結果、fuliver = 0.10 となった場合、経口投与後の血漿中濃度推移の予測結果が実測と 同等となることが明らかとなった (Fig.2-6). 従って、血漿中に存在する AGP 及びアルブミ ンの両タンパク質に結合する化合物の場合、アルブミンへの結合分率を基にした定量的な アルブミン媒介性の肝移行を算出する手法を構築することで、血漿中濃度推移の予測性を 改善できると考えられた.

第二章では、経口投与後のヒト血漿中濃度推移を予測することを目的として、hiPSC-IECs の膜透過評価を基に消化管透過性を求めた後、第一章で得られた新規 bottom-up PBPK 法と 合わせて血漿中濃度推移を予測する手法を検討した. P-gp 及び CYP3A4 の基質を含む化合 物群について、hiPSC-IECs の膜透過性評価より得た Peは、Caco-2 の膜透過性評価より得た Peと比較して、ヒト Fa×Fgと高い相関性を示した.続いて、hiPSC-IECs の膜透過性評価よ り推定した ka,app を利用し、P-gp 及び CYP3A4 の基質を含む種々の代謝消失型化合物につい て、新規 bottom-up PBPK 法により経口投与後のヒト血漿中濃度推移を予測した. PK パラメ ータの予測値は、実測値と比較して平均 2 倍以内の予測確度を示し、従来型 bottom-up PBPK 法と比較して優れた予測性を示しことから、新規 bottom-up PBPK 法は、経口投与後のヒト 血漿中濃度推移を高い確度で予測可能となる有用な方法であることが示された. 今後、更に 血漿中濃度推移を高い確度で予測可能となる有用な方法であることが示された. 今後、更に 如漿中濃度推移の予測性を改善するためには、人種間における代謝酵素の遺伝子多型及び 胃からの吸収を考慮する他、定量的なアルブミン媒介性肝移行の算出方法を構築すること が有用であると考察された. また、原薬の溶解度並びに製剤の崩壊速度及び溶解速度を入力 可能な消化管コンパートメントを構築することで、創薬研究の探索後期において、血漿中濃 度推移に対する製剤化の影響度が把握可能となると考えられる.

#### 第三章

*in vitro* 評価に基づく組織移行性予測方法及び新規 bottom-up PBPK 法との組み合わせによる静脈内及び経口投与後のヒト血漿濃度推移の予測

第三章では、創薬の探索研究において、高い予測性を示すヒト体内動態予測方法を迅速に 活用できる体制を構築するために、*in vitro* 試験結果のみを活用した新規 bottom-up PBPK 法 を検討し、予測された血漿中濃度推移及び PK パラメータを算出後、実測値及び IQ PBPK working group が提唱すると評価基準と比較することで、新規予測方法の有用性を論じた. 併せて、化合物の排泄経路を予測可能な ECCS (Varma et al., 2015; Varma et al., 2017) を改変 することで、代謝消失型化合物を予測適応範囲とする新規 bottom-up PBPK 法を基にしたヒ ト血漿中濃度推移の予測手順を提示し、創薬の探索研究における新規予測法の活用意義を 論じた.

第一章及び第二章で得た bottom-up PBPK 法では, tissue composition-based equation より算 出した Kp<sub>tissue</sub>の補正係数として、ラット体内動態試験より得られた V<sub>ss, rat</sub>を用いている.従 って、V<sub>ss, rat</sub>の代替パラメータである V<sub>ss, in vitro</sub> を *in vitro* 試験結果から得られる場合, *in vitro* 試験のみからヒト血漿中濃度推移及び PK パラメータを予測可能となる. V<sub>ss</sub> は、定常状態 における各組織の Kp<sub>tissue</sub> に組織容積 (V<sub>tissue</sub>)を乗じた値の和で定義され、生体に占める臓 器のうち、約半分の容積を筋肉が占めることから (Rowland, 2013),著者は、Kp<sub>muscle</sub>が V<sub>ss</sub>を 規定する重要な因子であると考え, *in vitro* 試験に基づく Kp<sub>muscle</sub>の算出方法を検討した. ま ず、ラットより得た筋肉ホモジネートを用いて、平衡透析法による fu<sub>m</sub>の評価方法を検討後、 pH 分配仮説 (Shore et al., 1957; Yu et al., 1996; Youdim et al., 2003) に基づき, fu<sub>m</sub>, fu<sub>p</sub> 及び化 合物の分子型分率からラット Kp<sub>muscle</sub>を算出した.続いて、ラット Kp<sub>muscle</sub> に全組織容積を 乗じることで V<sub>ss, in vitro</sub> の妥当性を考察した. 更に、V<sub>ss, in vitro</sub> を用いて、tissue composition-based equation より計算された Kp<sub>tissue</sub>を補正後、PBPK モデルに入力し、幅広い 化合物特性を示す種々の代謝消失型化合物について、静脈内及び経口投与後の血漿中濃度 推移を予測した.本章におけるヒト Kp<sub>tissue</sub>の詳細な予測手順は、Fig. 3-1 に示す.



Fig. 3-1. The novel scheme for calculating human Kp<sub>tissue</sub> from *in vitro* studies and tissue composition-based equation.
#### 3-1. 実験材料及び in vitro 評価結果に基づく組織移行性予測方法

#### 使用化合物

モデル化合物として,代謝消失型または糸球体ろ過により腎排泄を受ける 17 の医薬品 (alprazolam, amitriptyline, bisoprolol, cefixime, domperidone, efavirenz, epinastine, griseofulvin, haloperidol, linezolid, meloxicam, nicardipine, phenytoin, quinidine, sildenafil, tamsulosin及び tramadol) 及び 14 の医薬候補化合物 (SNG-01 - SNG-14) を用いた.取り込みトランスポーターの基質である diclofenac (Kindla et al., 2011, Kimoto et al., 2018) 及び血漿中でアルブミンに加え AGP とも強い結合を示す sildenafil は、モデル化合物から除外した.モデル化合物のうち、17 医薬品は市販特級品を、SNG-01 から SNG-14 は、塩野義製薬(株) 創薬化学研究所において合成されたものを試験に用いた.

## 静脈内及び経口投与後のヒト PK プロファイルの予測に用いたデータ

ラット及びヒト PK プロファイルの予測には、fub, fuinc, pKa, logP, CLint, RBP, Vss, rat, ka, app, fumを使用した.fumを除く各種パラメータは、第一章及び第二章に記載した方法に準 じて評価した.モデル化合物の各種パラメータは、Table 3-1 に示す.なお、ヒト肝細胞及び ラットを用いた全ての研究は、塩野義製薬(株)の動物実験及びヒト組織に関する倫理委員 会によって承認されている.試験に供した試薬及び溶媒は、全て市販特級品を用いた.

					Human								Rat								
Generic	$pK_a$	pKa	binding	LogP	fu <sub>n</sub> a	RBP	CL int in viva	fuinc	ka ann <sup>a</sup>	Huma	ın PK		CL <sub>int, in vivo</sub> <sup>a</sup>	fuinc	fu <sub>n</sub> a	R <sub>BP</sub> <sup>b</sup>	fuª	Kp <sub>muscle</sub> <sup>c</sup>	Observed	Rat PK	
Name	(acid)	(base)	Protein	8-	шp	51		inc	а,арр	predi	prediction		mi, <i>m vivo</i>	rome		51		Finaseie	rat $V_{ss}$	prediction	
			Tiotem				(mL/min/kg)		(1/hr)	iv	ро		(mL/min/kg)						(L/kg)	iv	
Alprazolam	-	-	AL	2.50	0.32	0.78	0.027	0.79	1.8	0	0		73	0.79	0.33	0.96	0.15	2.1	1.6	0	
Amitriptyline	-	9.2	AGP	4.92	0.077	0.86	2.8	0.36	0.9	0	0		1756	0.10	0.066	1.9	0.022	6.5	12	0	
Bisoprolol	-	9.4	AGP	2.14	0.85	0.58	2.0	1.0	0.8	0	0		62	0.90	0.84	1.1	1.0	1.8	3.3	0	
Cefixime	2.5	-	AL	0.66	-	-	-	-	-	-	-		4.4	1.0	0.23	0.87	0.27	0.39	0.22	0	
Domperidone	-	9.0	AGP	4.50	0.060	0.74	29	0.44	0.3	0	0		97	0.12	0.042	1.3	0.016	5.2	3.9	0	
Efavirenz	-	-	AL	4.38	-	-	-	-	-	-	-		37	0.047	0.0042	0.97	0.0016	2.5	3.4	0	
Epinastine	-	11.4	AGP	4.28	-	-	-	-	-	-	-		11	0.37	0.40	2.4	0.073	12	13	0	
Griseofulvin	-	-	AL	2.25	-	-	-	-	-	-	-		80	0.87	0.24	1.0	0.17	1.4	1.3	0	
Haloperidol	-	8.3	AGP	3.01	0.17	0.81	12	0.68	-	0	-		149	0.51	0.10	0.81	0.017	12	12	0	
Linezolid	-	-	AL	0.30	0.69	0.45	2.1	1.0	-	0	-		-	-	0.68	0.45	1.0	0.68	0.59	-	
Meloxicam	4.1	-	AL	3.43	0.0060	1.2	1.7	1.0	1.8	0	0		3.3	1.0	0.010	0.56	0.12	0.040	0.17	0	
Nicardipine	-	8.6	AGP	5.13	0.0030	0.71	208	0.043	0.4	0	0		896	0.040	0.0054	0.80	0.0031	3.3	3.3	0	
Phenytoin	-	-	AL	2.44	0.17	1.6	0.027	0.81	-	0	-		90	0.81	0.17	1.6	0.22	0.77	0.90	0	
Quinidine	-	8.8	AGP	3.44	0.19	0.92	13	0.63	0.5	0	0		-	-	0.33	1.4	0.15	4.5	5.8	-	
Sildenafil	-	-	AL	2.75	-	-	-	-	-	-	-		-	-	0.050	0.64	0.070	0.71	1.9	-	
Tamsulosin	-	8.4	AGP	2.24	0.0091	0.53	18	1.0	0.4	0	0		213	0.46	0.19	1.2	0.18	2.2	1.9	0	
Tramadol	-	9.3	AGP	2.51	0.91	0.69	8.8	1.0	1.4	0	0		-	-	0.90	0.69	1.0	1.9	3.1	-	

Table 3-1. Summary of <i>in vitro</i> parameters to predict rat and human PK profiles for 31 test compounds.

## Table 3-1. Continued.

			м. <sup>-</sup>				Human						Rat								
Generic Name	pK <sub>a</sub> (acid)	pK <sub>a</sub> (base)	binding	LogP	${{{{{{{{fu}}}}}^{a}}}}$	R <sub>BP</sub>	CL <sub>int, in vivo</sub> <sup>a</sup>	fu <sub>inc</sub>	k <sub>a,app</sub> ª	Huma predie	Human PK prediction iv po		CL <sub>int, in vivo</sub> <sup>a</sup>	fu <sub>inc</sub>	fu <sub>p</sub> <sup>a</sup>	$R_{BP}^{b}$	fu <sub>m</sub> ª	Kp <sub>muscle</sub> <sup>c</sup>	Observed rat V <sub>ss</sub>	Rat PK prediction	
			FIOtem				(mL/min/kg)		(1/hr)	iv			(mL/min/kg)						(L/kg)	iv	
SNG-01	-	8.3	AGP	3.10	-	-	-	-	-	-	-		27	0.85	0.30	1.0	0.41	1.4	2.0	0	
SNG-02	-	7.7	AGP	3.07	-	-	-	-	-	-	-		20	0.62	0.11	1.0	0.078	2.4	1.4	0	
SNG-03	-	7.6	AGP	2.58	-	-	-	-	-	-	-		25	0.80	0.23	1.0	0.10	3.5	2.9	0	
SNG-04	-	7.9	AGP	2.75	-	-	-	-	-	-	-		70	0.10	0.0073	1.0	0.0053	2.5	2.4	0	
SNG-05	-	7.9	AGP	2.18	-	-	-	-	-	-	-		49	0.27	0.024	1.0	0.010	4.2	4.0	0	
SNG-06	-	7.9	AGP	3.72	-	-	-	-	-	-	-		19	0.16	0.013	1.0	0.0037	6.6	7.6	0	
SNG-07	-	7.9	AGP	2.86	-	-	-	-	-	-	-		92	0.24	0.022	1.0	0.0089	4.4	2.4	0	
SNG-08	-	7.8	AGP	2.65	-	-	-	-	-	-	-		131	0.79	0.21	1.0	0.089	4.2	3.0	0	
SNG-09	-	8.2	AGP	2.72	-	-	-	-	-	-	-		39	0.86	0.29	1.0	0.22	2.7	2.8	0	
SNG-10	-	7.4	AGP	1.60	-	-	-	-	-	-	-		81	0.99	0.46	1.0	0.21	2.2	2.4	0	
SNG-11	-	-	AL	3.79	-	-	-	-	-	-	-		65	0.35	0.12	1.0	0.12	1.0	1.2	0	
SNG-12	-	-	AL	3.06	-	-	-	-	-	-	-		25	0.74	0.20	1.0	0.25	0.81	1.7	0	
SNG-13	-	-	AL	2.10	-	-	-	-	-	-	-		34	0.96	0.32	1.0	0.38	0.83	0.65	0	
SNG-14	-	8.1	AGP	2.14	-	-	-	-	-	-	-		144	0.45	0.053	1.0	0.017	6.0	7.8	0	

Test compounds are listed in alphabetical order, respectively.

<sup>a,b</sup>The protein binding assay, metabolic study, transcellular transport study using hiPSC-IECs and blood-to-plasma partitioning study for marketed drugs in rats were performed in duplicate.

<sup>a</sup>The errors between the samples were all around 20% to 30%, representing it is reliable regardless of fu<sub>p</sub> and fu<sub>m</sub> value.

<sup>b</sup>Uchimura et al. (Uchimura et al., 2010) reported that the average value for human  $R_{BP}$  was determined as 0.89 using 96 compounds, and the correlation between human  $R_{BP}$  and rat  $R_{BP}$  was observed as following equation;

human R\_{BP}=0.610 \times rat R\_{BP}+0.279

In this study, rat  $R_{BP}$  for SNG-01 to 14 was assumption of 1.0 from this equation and the average value for human  $R_{BP}(0.89)$  (Uchimura et al., 2010).

<sup>c</sup>The Kp<sub>muscle</sub> was determined by Eq. 2 using the unbound fraction in plasma and that in 10% muscle homogenate, unionized fraction in plasma and that in muscle.

### ラット10%筋ホモジネートの調製

Sprague-Dawley ラット (8 週齢, 雄性, Charles River Laboratories Japan, Inc.) を, イソフル ラン麻酔下にて腹部大動脈より全採血致死させた. その後,下肢大腿部より大腿筋を切除し, 分離した大腿筋をトリミング後,直ちに液体窒素下で凍結した.筋サンプルは, Multi-Beads Shocker (Yasui Kikai, Co.) により, 3000 rpm, 15 秒間の条件で 3 回凍結粉砕後, 9 倍量の PBS を添加した.更に,得られた筋肉サンプルは,Multi-Beads Shocker により,3000 rpm, 60 秒 間の条件で 3 回粉砕することにより 10%筋ホモジネートを調製した.得られた 10%筋ホモ ジネートは、タンパク結合試験に供するまで-30℃で保管した.凍結した 10%筋ホモジネー トは、室温で融解後、筋組織の凝集物を Shake Master NEO (BMS, Tokyo, Japan) で 1500 rpm, 2 分間破砕し、タンパク結合試験に供するサンプルとした.

#### 筋肉中タンパク非結合率 (fum)

DMSO に溶解させたモデル化合物をラット 10%筋ホモジネートに添加し, 終濃度 2 µM の 10%筋ホモジネートサンプルを調製した. 平衡透析デバイス (HTD96b, HTDialysis) に分画 分子量が 12,000 - 14,000 の透析膜 (Spectra/Por<sup>®</sup> 2 Dialysis Membrane Standard RC Tubing MWCO: 12,000 to 14,000, Spectrum Laboratories, Inc.) を配置し, 平衡透析デバイスのドナー 側に 100 µL の 10%筋ホモジネートサンプル, アクセプター側に 100 µL の PBS を添加した. サンプル添加後の平衡透析デバイスは 37℃で 24 時間インキュベートした. インキュベート 後, 4 µL のドナー側サンプル及び 36 µL のアクセプター側サンプルに対して, ブランク PBS 及びブランク筋ホモジネートをそれぞれ 36 µL 及び 4 µL ずつ添加し, 十分に攪拌後, LC-MS/MS に供して化合物由来のピーク面積を算出した. 10%筋ホモジネート中のタンパク非結合率及び筋肉 の希釈倍率を基に, 式 3-1 によって算出した (Kalvass et al., 2007).

$$fu_{m} = \frac{\binom{1}{D}}{\binom{1}{fu_{1}} - 1 + \binom{1}{D}}$$
(3-1)

Fu<sub>1</sub>及びDは,それぞれ10%筋ホモジネート中のタンパク非結合率及びサンプルの希釈倍率を表す.

### <u>化合物の筋肉移行性 (Kpmuscle)</u>

pH 分配仮説に基づく場合,血漿におけるタンパク非結合型・分子型化合物濃度は,組織中のタンパク非結合型・分子型化合物濃度と等しくなる.この場合,Kpmuscleは,式 3-2 で表される.

$$Kp_{muscle} = \frac{Concentration in muscle}{Concentration in plasma} = \frac{fu_p \times Fui_p}{fu_m \times Fui_m}$$
(3-2)

Fui<sub>p</sub>及び Fui<sub>m</sub> はそれぞれ血漿及び筋肉における化合物の分子型分率を示す.ここで,
Henderson-Hasselbalch 式に基づくと,分子型分率 (Fui) は,化合物の酸解離定数に応じて式
3-3 から式 3-7 で表される.

$$\operatorname{Fui}_{(\text{for neutral})} = 1 \tag{3-3}$$

$$\operatorname{Fui}_{(\text{for monoprotic acid})} = \frac{1}{1 + (10^{\text{pH}-\text{pKa}})}$$
(3-4)

$$Fui_{(\text{for diprotic acid})} = \frac{1}{1 + (10^{\text{pH}-\text{pKa1}} + 10^{2\text{pH}-\text{pKa1}-\text{pKa2}})}$$
(3-5)

$$\operatorname{Fui}_{(\text{for monoprotic base})} = \frac{1}{1 + (10^{\text{pKa}-\text{pH}})}$$
(3-6)

$$Fui_{(for diprotic base)} = \frac{1}{1 + (10^{pKa1 - pH} + 10^{pKa1 - pKa2 - 2pH})}$$
(3-7)

血漿及び筋肉中 pH は, それぞれ 7.4 及び 7.0 である (Roos et al., 1981; Harashima et al., 1984).

## In vitro 試験結果のみを基にした Kptissue

V<sub>ss,in vitro</sub>は、式 3-8 で表されるように、Kp<sub>muscle</sub>と組織容積の和より算出される (Rodgers et al., 2007).

$$V_{ss,in\,vitro} = V_{plasma} + Kp_{muscle} \times \sum V_{tissue}$$
(3-8)

 $V_{plasma}$ は血漿容積を示し、 $V_{tissue}$ は、11の組織(脂肪,骨,脳,消化管,心臓,腎臓,肝臓,肺,筋肉,皮膚及び脾臓)の組織容積を示す.式 3-8 における  $Kp_{muscle}$ は、式 3-2 で得た値を用いた.また、第一章の式 1-21 より、tissue composition-based equation (式 1-9 及び式 1-10)を基に算出される定常状態の分布容積 ( $V_{ss, simulation}$ ) と  $Kp_{tissue}$  には、式 3-9 の関係が成り立つ.

$$V_{\rm ss,simulation} = V_{\rm plasma} + \sum (V_{\rm tissue} \times K p_{\rm tissue})$$
(3-9)

式 3-8 及び式 3-9 は、Vplasma を左辺に移項することで、式 3-10 及び式 3-11 に変換できる.

$$V_{ss,in\,vitro} - V_{plasma} = Kp_{muscle} \times \sum V_{tissue}$$
(3-10)

 $V_{\text{ss,simulation}} - V_{\text{p}} = \sum (V_{\text{tissue}} \times K p_{\text{tissue}})$ (3-11)

式 3-10 及び式 3-11 より, tissue composition-based equation (式 1-9 及び式 1-10) より得た Kptissue の補正係数 (scaling factor) は,式 3-12 で表される.

Scaling factor = 
$$\frac{V_{ss,in \, vitro} - V_p}{V_{ss,simulation} - V_p} = \frac{Kp_{muscle} \times \Sigma V_{tissue}}{\Sigma(V_{tissue} \times Kp_{tissue})}$$
 (3-12)

ここで、補正されたラット Kptissue (Kptissue, corrected) は、式 3-13 で表される.

$$Kp_{tissue,corrected} = Scaling factor \times Kp_{tissue}$$
(3-13)

得られたラット Kp<sub>tissue, corrected</sub>は,式1-11 によりラット fu<sub>tissue</sub>に変換後,式1-23 で表され るラットとヒトにおける V<sub>tissue</sub>/fu<sub>tissue</sub>の種差を基に,ラット fu<sub>tissue</sub> からヒト fu<sub>tissue</sub> を算出後, Kp<sub>tissue</sub> と fu<sub>tissue</sub>の関係式 (式1-21)を基にヒト Kp<sub>tissue</sub> を算出した.

式 3-13 より得たラット Kp<sub>tissue, corrected</sub> は,第一章で示す PBPK モデル (式 1-1 - 式 1-6), に 入力し,静脈内投与後のラット血漿中濃度推移の予測に用いた.また,ヒト Kp<sub>tissue</sub> は,第一 章及び第二章で示す PBPK モデル (式 1-1 - 式 1-6,式 2-2 - 式 2-5) に入力し,静脈内及び 経口投与後のヒト血漿中濃度推移の予測に用いた.

#### 薬物動態解析及び予測確度の評価

静脈内投与後のラット血漿中濃度推移,静脈内及び経口投与後のヒト血漿中濃度推移から,第一章及び第二章に記載した薬物動態解析法に基づき,AUC<sub>0-∞</sub>,CL<sub>tot</sub>,t<sub>1/2</sub>,V<sub>ss</sub>,AUC<sub>0-</sub>t,C<sub>max</sub>,T<sub>max</sub>及びBAを算出した.PKパラメータの予測確度は,第一章の式1-24-式1-26で表される RMSE,AFE,AAFE 及び% within X fold error を基に評価した.

#### 3-2. 結果

#### <u>Vss, in vitro</u>及び Vss, rat の相関関係

31 のモデル化合物について,式 3-2 にタンパク非結合率及び分子型分率を入力すること でラット Kp<sub>muscle</sub>を算出後,得られた Kp<sub>muscle</sub>を式 3-8 に入力することでラット V<sub>ss, in vitro</sub> を得 た.また,Rodgers らが報告した tissue composition-based equation (式 1-9, 1-10; Rodgers et al., 2007) より算出した Kp<sub>tissue</sub>を式 3-9 に入力することで,ラット V<sub>ss, simulation</sub> を得た.得られた ラット V<sub>ss, in vitro</sub> 及び V<sub>ss, simulation</sub> とラット体内動態試験より算出した V<sub>ss, rat</sub> との相関関係を Fig. 3-2 に示す.V<sub>ss, rat</sub> とラット V<sub>ss, in vitro</sub> の R<sup>2</sup> は 0.859 であり,V<sub>ss, rat</sub> とラット V<sub>ss, simulation</sub> の R<sup>2</sup> (0.566) と比較して高値を示した.従って,タンパク非結合率及び pH 分配仮説より算出 したラット V<sub>ss, in vitro</sub> は, tissue composition-based equation のみを用いた場合と比較して,V<sub>ss, rat</sub> の予測性が高くなることが示された.

#### ヒト Vss 予測法の比較検討

ヒト Kptissue は、1) tissue composition-based equation 及びラット V<sub>ss, in vitro</sub>を用いる方法(式 3-8)の他、2) tissue composition-based equationのみを用いる方法(式 1-9 - 式 1-11),3) tissue composition-based equation及び V<sub>ss, rat</sub>を用いる方法(第一章; Mayumi et al., 2019,第二章; Mayumi et al., 2020)によりそれぞれ算出した.続いて、各予測方法により得たヒト Kptissueを PBPK モデルに入力後、ヒト V<sub>ss</sub>を予測した.得られたヒト V<sub>ss</sub>の予測確度は、Table 3-2 に 示す.その結果、V<sub>ss, in vitro</sub>を補正係数としてヒト V<sub>ss</sub>を予測した場合、AAFE、% within 1.5fold error及び% within 2-fold error は、それぞれ 1.76、33%及び 92%であり(Table 3-2)、V<sub>ss, rat</sub>を補正係数として用いた予測方法(Mayumi et al., 2019; Mayumi et al., 2020)と概ね同等の 予測確度 (AAFE: 1.70、% within 1.5-fold error: 67%及び% within 2-fold error: 75%)を示した. また、補正係数として V<sub>ss, in vitro</sub> または V<sub>ss, rat</sub>を用いる予測方法では、ヒト V<sub>ss</sub>の実測値と 3 倍以上乖離する化合物は認められなかった.一方で、tissue composition-based equationのみを 用いた場合、得られたヒト V<sub>ss</sub>の AAFE、% within 1.5-fold error 及び% within 2-fold error はそ れぞれ 2.04、33%及び 58%を示し、他の 2 つの予測方法と比較して AAFE は高値を、% within 2-fold error は低値を示した.加えて、本手法による domperidone 及び linezolid のヒト V<sub>ss</sub>の 予測値は、実測値と比較してそれぞれ 3.2 倍及び 3.1 倍高値を示した.以上の結果より、式 3-8 で得られる  $V_{ss, in vitro}$  を  $V_{ss, rat}$  の代替パラメータとして使用した場合, ヒト  $V_{ss}$  を実測と比較して平均 2 倍以内で予測可能であり, tissue composition-based equation のみを基にした予測方法と比較して高い確度でヒト  $V_{ss}$  を予測可能であることが示唆された.



Fig. 3-2 Predicted rat V<sub>ss</sub> versus observed rat V<sub>ss</sub> for 31 reference compounds.

A) Correlation between rat  $V_{ss, in vitro}$  calculated by Eq. 3-8 and observed rat  $V_{ss, B}$ ) Correlation between rat  $V_{ss, simulation}$  calculated by Eq. 3-9 and observed rat  $V_{ss}$ . Dashed line: 2-fold errors.



Fig. 3-3 Predicted rat Kp<sub>muscle</sub>×V<sub>muscle</sub> versus observed rat V<sub>ss.</sub>

Rat Kp<sub>muscle</sub> was calculated in Eq. 3-2. Volume of muscle in rats was used the value of 0.4876 (L/kg) (Mayumi et al., 2019). Solid line: unity, Dashed line: 2-fold errors, Double dashed line: 3-fold errors.

Table 3-7 Statistical analysis for human	V prediction by t	he PRPK annroaches u	ising three estin	nation methods of	f human Kn.
Table 5-2 Statistical analysis for numan	v <sub>ss</sub> prediction by t	ine i di Kappioaches u	ising three estin	nation methods of	i numan Kptissue

	The predictive accuracy of $V_{ss}$ in humans													
Calculation methods of human $Kp_{tissue}$		DMCE			Percentage within									
	п	RNISE	ΑΓΕ	ΑΑΓΕ	1.5-fold error	2-fold error	3-fold error							
Scaling factor: Corrected rat Kptissue <sup>a</sup>	12	0.23	0.88	1.76	33.3	91.7	100.0							
No scaling factors <sup>b</sup>	12	0.30	1.13	2.04	33.3	58.3	83.3							
Scaling factor: Observed rat V <sub>ss</sub> <sup>c</sup>	12	0.22	0.94	1.70	66.7	75.0	100.0							

<sup>a</sup>The value of Kp<sub>tissue</sub> in humans were calculated from the rat Kp<sub>tissue,corrected</sub> (Eq. 3-13) and the correlation of  $V_{tissue}$ /fu<sub>tissue</sub> between rats and humans (Eq. 1-23). <sup>b</sup>The value of Kp<sub>tissue</sub> in humans were calculated from simulated rat Kp<sub>tissue</sub> based on the tissue composition-based equation proposed by Rodgers et al. (Rodgers et al., 2007) and the correlation of  $V_{tissue}$ /fu<sub>tissue</sub> between rats and humans (Eq. 1-23).

<sup>c</sup>The value of Kp<sub>tissue</sub> in humans were calculated from  $V_{ss, rat}$  and the correlation of  $V_{tissue}$ /fu<sub>tissue</sub> between rats and human reported in our previous study (Mayumi et al., 2019).

#### 静脈内投与及び経口投与後の血漿中濃度推移の予測

27 のモデル化合物を用いた静脈内投与後のラット血漿中濃度推移の予測結果は Fig 3-4 に, 12 のモデル化合物を用いた静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移の予測結果及び 9 のモデル 化合物を用いた経口投与後のヒト血漿中濃度推移の予測結果は,それぞれ Fig. 3-5 及び Fig. 3-6 に示した.また,静脈内投与後及び経口投与後の血漿中濃度推移より得られた PK パラ メータの実測値と予測値の相関関係は,それぞれ Fig. 3-7 及び Fig. 3-8 に示し,各 PK パラ メータの予測確度は Table 3-3 に纏めた.ラットについて予測された PK パラメータの AAFE (AUC<sub>0-∞</sub>: 1.35, CL<sub>tot</sub>: 1.35,  $t_{1/2}$ : 1.37,  $V_{ss}$ : 1.47, AUC<sub>0-t</sub>: 1.32) は,全て 2 を下回る値であった. また,予測された AUC<sub>0-∞</sub>, CL<sub>tot</sub>,  $t_{1/2}$ ,  $V_{ss}$ 及び AUC<sub>0-t</sub> の% within 1.5-fold 及び 2-fold error は, それぞれ 59 - 96%, 59 - 96%, 70 - 93%, 52 - 89%及び 74 - 96%であった.

静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移を予測した結果,得られた AUC<sub>0-∞</sub>, CL<sub>tot</sub>, t<sub>1/2</sub>, V<sub>ss</sub>及 び AUC<sub>0-t</sub>の AAFE は,それぞれ 1.74, 1.75, 1.98, 1.76 及び 1.30 と 2 を下回る値を示した (Table 3-3). また,予測された AUC<sub>0-∞</sub>, CL<sub>tot</sub>, t<sub>1/2</sub>, V<sub>ss</sub>及び AUC<sub>0-t</sub>の% within 1.5-fold 及び% within 2-fold error は,それぞれ 83 - 92%, 83 - 92%, 75 - 92%, 92 - 100%及び 100%を示した (Table 3-3). 以上の結果から,補正係数としてラット V<sub>ss, in vitro</sub>を用いて Kp<sub>tissue</sub>を得る手法は, 静脈内投与後のラット及びヒト血漿中濃度推移 (Fig. 3-4, 3-5) 及び PK パラメータ (Fig. 3-7) を実測値と比較して平均 2 倍以内で予測可能であることが示された.

経口投与後のヒト血漿中濃度を予測した結果,得られた PK パラメータの AFE (C<sub>max</sub>: 1.12, T<sub>max</sub>: 1.43, AUC<sub>0-1</sub>: 1.19, BA: 1.2) は、いずれも 1 を上回る値であった (Table 3-3). また, T<sub>max</sub> を除く全ての PK パラメータの AAFE (C<sub>max</sub>: 1.63, T<sub>max</sub>: 2.06, AUC<sub>0-1</sub>: 1.65, BA: 1.54) は, 2 を下回る値であり, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC<sub>0-1</sub>及び BA の% within 1.5-fold error 及び 2-fold error は, それぞれ 78 - 89%, 67%, 78 - 89%及び 78 - 89%であった (Table 3-3). 従って, *in vitro* パラ メータのみを基に予測した経口投与後のヒト血漿中濃度推移 (Fig. 3-6) 及び PK パラメータ (Fig. 3-8) は、血漿中濃度及び T<sub>max</sub> を過大評価する傾向にあったものの、T<sub>max</sub> を除き実測値 と比較して平均 2 倍以内の予測確度を示した (Table 3-3).

80



Fig. 3-4 Observed and predicted PK profiles in rats after intravenous administration of 27 compounds.

Solid line, predicted PK profiles; open circle, observed PK data.



**Fig. 3-5 Observed and predicted PK profiles in humans after intravenous administration of 12 compounds.** Solid line, prediction results based on the method in Chapter 3; dashed line, prediction results based on the method in Chapter 1; open circle, observed PK data. The observed human PK profiles after intravenous administration for amitriptyline and domperidone was not shown as these data could not be acquired from literatures.



Fig. 3-6 Observed and predicted PK profiles in humans after oral administration of 9 compounds.

Solid line, prediction results based on the method in Chapter 3; dashed line, prediction results based on the method in Chapter 2; open circle, observed PK data.



Fig. 3-7 Correlations between Observed and predicted PK parameters in rats and humans after an intravenous administration.

Open circle, human PK parameters; closed circle, rat PK parameters; dashed line: 2-fold errors.



Fig. 3-8 Correlation between Observed and predicted PK parameters in humans after an oral administration.

Open circle, human PK parameters; dashed line, 2-fold errors; solid line, 3-fold errors.

		Human								Rat								Rat and Human						
Parameters	Administration		Percentage within								Percentage within									Percentage within				
	route	n	RMSE	AFE	AAFE	1.5- fold error	2-fold error	3-fold error	n	RMSE	AFE	AAFE	1.5- fold error	2-fold error	3-fold error	n	RMSE	AFE	AAFE	1.5- fold error	2-fold error	3-fold error		
$AUC_{0-\infty}$		12	0.31	1.14	1.74	66.7	83.3	91.7	27	0.16	0.96	1.35	59.3	96.3	100.0	39	0.22	1.00	1.42	61.5	92.3	97.4		
CL <sub>tot</sub>		12	0.31	0.87	1.75	66.7	83.3	91.7	27	0.16	1.04	1.35	59.3	96.3	100.0	39	0.22	0.99	1.42	61.5	92.3	97.4		
t <sub>1/2</sub>	iv	12	0.30	1.08	1.98	33.3	75.0	91.7	27	0.17	1.13	1.37	70.4	92.6	100.0	39	0.22	1.11	1.48	59.0	87.2	97.4		
V <sub>ss</sub>		12	0.23	0.88	1.76	33.3	91.7	100.0	27	0.20	1.31	1.47	51.9	88.9	100.0	39	0.21	1.16	1.51	46.2	89.7	100.0		
AUC <sub>0-t</sub>		10	0.14	1.01	1.30	70.0	100.0	100.0	27	0.15	0.95	1.32	74.1	96.3	100.0	37	0.15	0.97	1.31	73.0	97.3	100.0		
C <sub>max</sub>		9	0.27	1.12	1.63	55.6	77.8	88.9																
T <sub>max</sub>		9	0.39	1.43	2.06	33.3	66.7	66.7	-															
AUC <sub>0-t</sub>	ро	9	0.31	1.19	1.65	55.6	77.8	88.9	-															
BA		9	0.25	1.28	1.54	66.7	77.8	88.9	-															

# Table 3-3 Statistical analysis for rat and human PK parameters.



## Fig. 3-9 The schematic diagram for exploiting our PBPK approach in drug discovery.

The ECCS was quoted from the literature reported by Varma et al. (Varma et al, 2015; Varma et al., 2017) with partially modification. The thresholds of permeability and molecular weight are  $5 \times 10^{-6}$  cm/s and 400, respectively (Varma et al, 2015; Varma et al., 2017).

#### 3-3. 考察

式 3-8 より得た V<sub>ss, in vitro</sub>の有用性は,幅広い特性 [logP: 0.30 (linezolid) - 5.13 (nicardipine), fu<sub>p</sub>: 0.0042 (efavirenz) - 0.90 (tramadol), V<sub>ss. rat</sub>: 0.17 L/kg (meloxicam) - 12 L/kg (epinastine, haloperidol)] を示す 31 化合物を用いて検証した. ラット V<sub>ss, in vitro</sub> を得るためには, 筋肉ホ モジネートを用いた平衡透析法により fum を算出する必要がある. Berry らが報告するホモ ジネートの調製方法 (Berry et al., 2010) の場合, サンプル中に組織繊維が残留するため, 均 ーなホモジネートの調製が困難となるだけでなく精確な分注操作ができない. そこで,本検 討では, 液体窒素存在下で筋肉を凍結粉砕することで, 組織繊維の残留や凝集体の生成を回 避した.また,筋肉ホモジネートの調製濃度を高値に設定した場合,サンプルが高粘度とな るため平衡透析中に攪拌が困難となり, 沈殿物が生じた. そこで, 沈殿物が生じない最大濃 度の筋ホモジネートを検討した結果,10%が最適値であることを見出した. 続いて, fu,, fum 及び pH 分配仮説よりラット V<sub>ss, in vitro</sub> を算出し, ラット体内動態試験より得た V<sub>ss, rat</sub>との相 関関係を評価した結果,良好な相関性 (R<sup>2</sup>=0.859) を示した. この結果は, tissue-composition based equation のみより得たラット  $V_{ss. simulation}$  と  $V_{ss. rat}$ の相関性 (R<sup>2</sup>=0.566) よりも良好であ ることを示している. 31 のモデル化合物について、Kpmuscle に筋肉容積 (Vmuscle) を乗じ、筋 肉への分布容積 (Kp<sub>muscle</sub> × V<sub>muscle</sub>) を算出したところ,全モデル化合物の V<sub>ss, rat</sub> に対する Kpmuscle × Vmuscle の割合は約 47.8%であり、全組織容積に対する筋肉容積の占める割合 (約 50%, Rodgers et al., 2007) と概ね同値を示した. また, Kpmuscle × Vmuscle と Vss, rat には, 良好な 相関性が認められた (R<sup>2</sup>=0.874, Fig. 3-3).従って,Kp<sub>muscle</sub>に全組織容積の和を乗じて得た V<sub>ss, in vitro</sub>が V<sub>ss, rat</sub>と良好な相関性を示した理由は、筋肉における化合物の分布と組織容積が 正の比例関係にあったためと考えられる.以上より,代謝消失型化合物において, in vitro 試 験より得た V<sub>ss, in vitro</sub> は, V<sub>ss, rat</sub> と高い相関性を示すことから, bottom-up PBPK 法において V<sub>ss,</sub> ratの代替パラメータとして有用であることが示唆された.

*In vitro* 試験のみを基にした新規 bottom-up PBPK 法では,予測されたヒト  $V_{ss}$ の AAFE 及び% within 2-fold error がそれぞれ 1.76 及び 92%を示し,実測比 3 倍以上の乖離を示す化合物群は認められなかった (Table 3-2). この予測結果は,第一章及び第二章で検討した方法と同等以上のヒト  $V_{ss}$ の予測確度 (AAFE: 1.70,% within 2-fold error: 75%,% within 3-fold error: 100%, Table 3-2) であり, tissue composition-based equation のみからヒト  $V_{ss}$ を予測する従来

型 bottom-up PBPK 法 (AAFE: 2.04, % within 2-fold error: 58%, % within 3-fold error: 83%, Table 3-2) と比較して,予測性の改善が認められる結果であった.従って, V<sub>ss, in vitro</sub> を補正係数として用いた新規 bottom-up PBPK 法は,第一章及び第二章で検討した方法に代わるヒト組織分布の予測方法であることが示された.

更に、新規 bottom-up PBPK 法が、V<sub>ss</sub>以外の PK パラメータについても高い予測性を示す か、検討した. 27 のモデル化合物について静脈内投与後のラット血漿中濃度推移を予測し た結果、得られた CL<sub>tot</sub>, t<sub>1/2</sub>, V<sub>ss</sub>及び AUC<sub>0t</sub>の AAFE は 1.35, 1.37, 1.47 及び 1.32 であっ た. 同様に、静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移の予測においても、各 PK パラメータの AAFE は 2 を下回る値であった (Table 3-3). 従って、いずれの動物種においても静脈内投与 後の血漿中濃度推移は、実測と比較して平均 2 倍以内と高い確度で予測可能であることが 示された. また、経口投与後のヒト血漿中濃度推移の予測では、得られた C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC<sub>0</sub>t及び BA の AFE が 1 を上回る値を示し、血漿中濃度推移は過大評価する傾向にあった. こ れは、代謝プロファイルに人種差が影響する amitriptyline, 化合物の溶解過程が小腸アベイ ラビリティに影響する domperidone 及び胃からの吸収が想定される弱塩基性化合物の予測 誤差に起因すると考えられる. 一方で、予測された C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC<sub>0</sub>-及び BA の AFE が 1.65, 1.54 を示し (Table 3-3), T<sub>max</sub> を除く全ての PK パラメータで実 測比 2 倍以内と高い確度で予測可能であった.

本章で検討した予測方法を探索初期のスクリーニング段階で活用する場合,合成された 新規化合物が取り込みトランスポーターの基質でないことを判断する必要がある. Varma ら が報告 (Varma et al., 2015; Varma et al., 2017) する ECCS に基づくと,化合物固有のパラメー タである分子量,酸解離定数及び膜透過性を基に,化合物の主排泄経路を判断することが可 能であるが,腎クリアランスを糸球体ろ過と能動輸送に切り分けることができない.腎クリ アランスによって排泄される化合物のうち,分子量が400 未満を示す高極性化合物では,腎 臓の近位尿細管の基底膜に局在する OATs (Ullrich, 1997) または organic cation transporters (OCTs, Ullrich, 1997; Inui et al., 2000; Launay-Vacher et al., 2006; Ahlin et al., 2008) による能動 的分泌を受ける可能性が高い.これらの ECCS 及び腎臓に発現する取り込みトランスポー ターの基質特異性に関する報告を基に,化合物の生体内挙動を判断し,本章で検討した新規 bottom-up PBPK 法を適応するための評価手順を Fig. 3-9 に示した.このスクリーニングフロ ーでは,2 種類の物理化学的性質 (pKa, logP) と4 種の ADME 特性 (肝細胞代謝安定性,

87

タンパク非結合率, 膜透過性, OATP 基質性) が必要となるが, これらの評価は highthroughput 化が可能であることに加え, いずれも 1 mg 以下の少ない化合物量で評価が可能 である. 従って, この評価手順に基づいた場合, 迅速かつ高い確度でヒト血漿中濃度推移を 予測可能であることから, 探索初期からヒト体内動態特性に基づく SAR 情報を収集が可能 となるため, 創薬の研究期間短縮や効率的な医薬品の創出に貢献できるものと考えられる. 一方で, 肝臓及び腎臓に発現する取り込みトランスポーターの基質化合物は, 新規 bottomup PBPK 法によりヒト血漿中濃度推移を予測することが困難であり, また, 予測の成功事例 も報告されていない. 従って, 創薬における bottom-up PBPK 法の有用性を更に拡大するた めには, 取り込みトランスポーター基質についてヒト血漿中濃度推移を予測する手法を確 立することが今後の重要な課題であると考えられる.

本章では、*in vitro* 試験を基に  $V_{ss,rat}$ の代替パラメータの算出方法を検討した.更に、幅広 い化合物特性を有する代謝消失型化合物を用いて静脈内及び経口投与後の血漿中濃度推移 を予測した.その結果、*in vitro* 試験より得た  $V_{ss,in vitro}$ は、ラット体内動態試験より得た  $V_{ss,rat}$ の代替パラメータとして有用であることが示された.この  $V_{ss,in vitro}$ を入力した新規 bottomup PBPK 法は、静脈内及び経口投与後のヒト血漿中濃度推移及び PK パラメータを実測比平 均2倍以内で予測可能 ( $T_{max}$ を除く)であり、IQ PBPK working group が提示する評価基準を 概ね満たす予測性を示した.更に、high-throughput 化が可能な *in vitro* 評価に基づいて、bottomup PBPK 法を適応可能な化合物特性を判断し、創薬の探索研究において活用可能なスクリ ーニングフローを提示した.これらの知見は、化合物探索の初期スクリーニングにおける迅 速な化合物の構造最適化戦略の策定及び臨床薬効用量の推定に貢献できると考える.

88

創薬研究の効率化と成功確度の向上を目的として,迅速かつ高確度でヒト血漿中濃度推移を予測可能となる新規 bottom-up PBPK 法を構築するために, *in vitro* 試験, *in vivo* 試験及びこれらのデータを統合する物質収支式について種々の検討を行い,以下の結論を得た.

- 肝代謝消失速度の算出過程では、血漿中の主結合タンパク質がアルブミンとなる化合物 について、pH 分配仮説及び肝細胞内外のアルブミンの濃度勾配に基づく肝移行を、主 結合タンパク質がアルブミン以外の化合物について pH 分配仮説を、それぞれ考慮した. その結果、新規 bottom-up PBPK 法により予測されたヒト CL<sub>tot</sub> 及び t<sub>1/2</sub>は、血漿中に存 在するタンパク非結合型薬物が肝臓へ移行すると仮定した従来型 bottom-up PBPK 法と 比較して高い予測性を示した.
- 化合物の組織分布を予測するために必要なヒト Kp<sub>tissue</sub> は, tissue composition-based equation に加え、ラット体内動態試験より得た V<sub>ss, rat</sub> 及びラットとヒトにおける非結合 型化合物の分布容積の相関関係を基に算出した. その結果、新規 bottom-up PBPK 法に より予測されたヒト V<sub>ss</sub> は, tissue composition-based equation のみを用いる従来型 bottomup PBPK 法と比較して高い予測性を示した.
- 新規 bottom-up PBPK 法は、静脈内投与後のヒト血漿中濃度推移より得られる全ての PK パラメータ (AUC<sub>0-∞</sub>, AUC<sub>0-t</sub>, V<sub>ss</sub>, CL<sub>tot</sub>, t<sub>1/2</sub>) について、実測比平均 2 倍以内の確度で 予測可能であり、従来型 bottom-up PBPK 法と比較して高い予測性を示した.
- CYP3A4 及び P-gp の基質を含む化合物について、rifampicin 及び VD<sub>3</sub>を処置した hiPSC-IECs を用いて膜透過性評価を行った. その結果、得られた P<sub>e</sub>は、ヒト F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>と良好な 相関性 (R<sup>2</sup>=0893) が認められた. また、ヒト F<sub>a</sub>× F<sub>g</sub>は、ヒト k<sub>a,invivo</sub>と高い相関性 (R<sup>2</sup> =0.845) を示した. 従って、経口投与後のヒト血漿中濃度推移を予測するために必要な k<sub>a,app</sub>は、hiPSC-IECs の膜透過性評価から得られることが示された.
- 5. CYP3A4 及び P-gp の基質を含む化合物について、hiPSC-IECs の膜透過性評価より得ら れた k<sub>a, app</sub>を PBPK モデルの消化管コンパートメントに入力し,経口投与後のヒト血漿 中濃度推移を予測した.その結果,得られた PK パラメータ (C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC<sub>0-t</sub>, BA) は、いずれも実測比平均 2 倍以内で予測可能であり、従来型 bottom-up PBPK 法と比較 して、高い予測性を示した.

- 6. ラットの血漿及び筋肉におけるタンパク非結合率と pH 分配仮説を基に算出したラット  $V_{ss, in vitro}$ は、ラット体内動態試験より得た  $V_{ss, rat}$  と良好な相関性 ( $R^2 = 0.859$ ) を示した ことから、 $V_{ss, rat}$ の代替パラメータとして有用であることが示された.
- ラット V<sub>ss, in vitro</sub> を補正係数としてヒト Kp<sub>tissue</sub> を算出後,得られたヒト Kp<sub>tissue</sub> を PBPK モ デルに入力し,静脈内投与及び経口投与後のヒト血漿中濃度推移を予測した.その結果, T<sub>max</sub> を除く全ての PK パラメータ (CL<sub>tot</sub>, V<sub>ss</sub>, AUC<sub>0-∞</sub>, C<sub>max</sub>, T<sub>max</sub>, AUC<sub>0-t</sub>, BA) は実測 比平均2倍以内で予測可能であった.

以上のように、iPSC-IECsの膜透過特性を含む in vitro 試験結果を活用した新規 bottom-up PBPK 法は, Table 0-1 の理論に基づく従来型 bottom-up PBPK 法と比較して予測性が改善し, IQ PBPK working group が設定した予測確度の評価基準を概ね達成可能であることが明らか となった. 更に, in vitro 試験結果のみを基にした新規 bottom-up PBPK 法によって, 探索研 究における初期スクリーニングで獲得可能な6つの in vitro パラメータ (pKa, logP, 肝細胞 代謝安定性, fu,, fum及び膜透過性) から, ヒト血漿中濃度推移を基に SAR 情報を取得する ことが可能となった.一方で、本研究で構築した新規 bottom-up PBPK 法は、予測対象が代 謝消失型化合物に限られているとともに探索初期での活用が目的であることから経口投与 された化合物は、胃内で全溶解し小腸で吸収されるという仮定を置いている.また、特にタ ンパク結合率が高値を示す化合物において、タンパク結合試験の実験誤差が Vss 及び tu2の 予測性に影響しやすい. 今後は, in vitro 試験系の精緻化による予測性の向上に加え, 肝臓及 び腎臓に発現する取り込みトランスポーターの基質についてヒト血漿中濃度推移を予測す る方法の確立や血漿中濃度推移に対する製剤化の影響を定量的に評価可能な消化管コンパ ートメントの予測モデルの構築により適用範囲を拡大し、探索研究全般でより多くの候補 化合物について有益な情報を提供できる予測方法を確立したいと考える.また,本研究は, 既存化合物を用いた後ろ向き研究であるため,予測手法の信頼性向上には,本方法を前向き 研究に供する必要があり、継続的に予測方法の妥当性を議論する必要がある.

従来の探索研究では、動物試験で得た PK 情報を基に薬効用量や安全域を判断していた. 一方で、本研究により得られた知見を活用することで、ヒト PK を基に有効性及び安全域を 判断することが可能となる.更に、任意のパラメータを PBPK モデルに入力することで、有 効性及び安全性を両立した理想的な血漿中濃度推移を予測可能となるため、CL<sub>Uint, in vivo</sub>, fup

90

及び $F_a \times F_g$ などのヒトPKを規定する *in vitro* パラメータの目標値を理論的に設定すること ができ、SAR 情報を基にした化合物の構造最適化戦略を策定する場合に有用であると考え られる.即ち、本手法は、従来の創薬研究手法では実現困難なヒトPK 情報を基にした医薬 候補品の創製に貢献でき、体内動態の種差の影響を受けることなく化合物の臨床有用性を 判断することが可能となるため、新薬開発の成功率向上に繋がる創薬の基盤技術としての 活用が期待される. 終わりに鑑み,御懇篤なる御指導,御鞭撻を賜りました岡山大学薬学部生物薬剤学教室 教授 檜垣 和孝博士に深甚なる謝意を表します.

また、本研究の機会を頂きました塩野義製薬株式会社 創薬開発研究所 長谷川 博司 博士に深謝いたします.併せて、種々の有益な御指導、御助言を頂きました、山口 嘉隆博 士、大西 秀一博士、金津 卓史博士、島岡 祐行氏に深謝致します.更に、実験の一部に ご協力戴きました赤澤 貴憲博士、シオノギテクノアドバンスリサーチ株式会社 橘 美 保氏、吉田 芽生氏に感謝致します.

#### 引用文献

- Aarons L. Population pharmacokinetics: theory and practice. Br J Clin Pharmacol. 1991;32(6):669-670.
- Ahlin G, Karlsson J, Pedersen JM, Gustavsson L, Larsson R, Matsson P, Norinder U, Bergström CA, Artursson P. Structural requirements for drug inhibition of the liver specific human organic cation transport protein 1. J Med Chem. 2008 Oct 9;51(19):5932-42.
- Ahmed E. Aboutaleb, Sayed I. Abdel-Rahman, Mahrous O. Ahmed, Mahmoud A. Younis. Improvement of domperidone solubility and dissolution rate by dispersion in various hydrophilic carriers. J. Appl. Pharm. Sci. 2016 July;6 (7):133-139
- Akabane T, Tabata K, Kadono K, Sakuda S, Terashita S, Teramura T. A comparison of pharmacokinetics between humans and monkeys. *Drug Metab Dispos.* 2010 Feb;38(2):308-16.
- Akazawa T, Yoshida S, Ohnishi S, Kanazu T, Kawai M, Takahashi K. Application of intestinal epithelial cells differentiated from human induced pluripotent stem cells for studies of prodrug hydrolysis and drug absorption in the small intestine. *Drug Metab Dispos*. **2018** Nov;46(11):1497-1506.
- Berezhkovskiy LM, Khojasteh SC, Halladay JS, Hop CE. On the prediction of hepatic clearance using the diluted plasma in metabolic stability assay. *J Pharm Sci.* **2009**;98(6):1922-1927.
- Berezhkovskiy LM, Zhang X, Cheong J. A convenient method to measure blood-plasma concentration ratio using routine plasma collection in *in vivo* pharmacokinetic studies. *J Pharm Sci.* 2011;100(12):5293-5298.
- Berezhkovskiy LM. On the calculation of the concentration dependence of drug binding to plasma proteins with multiple binding sites of different affinities: determination of the possible variation of the unbound drug fraction and calculation of the number of binding sites of the protein. *J Pharm Sci.* **2007**;96(2):249-257.
- Berezhkovskiy LM. The corrected traditional equations for calculation of hepatic clearance that account for the difference in drug ionization in extracellular and intracellular tissue water and the corresponding corrected PBPK equation. *J Pharm Sci.* **2011**;100(3):1167-1183.

- Berry LM, Roberts J, Be X, Zhao Z, Lin MH. Prediction of Vss from *in vitro* tissue-binding studies. *Drug Metab Dispos.* 2010 Jan;38(1):115-21.
- Berry LM, Chao Li, Zhiyang Zhao, Species Differences in Distribution and Prediction of Human V(ss) From Preclinical Data. *Drug Metab Dispos*. 2011 Nov;39(11):2103-16.
- Bonn B, Svanberg P, Janefeldt A, Hultman IA, Grime K. Determination of human hepatocyte intrinsic clearance for slowly metabolized compounds: comparison of a primary hepatocyte/stromal cell coculture with plated primary hepatocytes and HepaRG. *Drug Metab Dispos*. **2016**;44(4):527-533.
- Booker PD, Taylor C, Saba G. Perioperative changes in alpha 1-acid glycoprotein concentrations in infants undergoing major surgery. *Br J Anaesth.* **1996**;76(3): 365-368.
- Boxenbaum H. Interspecies scaling, allometry, physiological time, and the ground plan of pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*. **1982**;10(2):201-227.
- Bteich M, Poulin P, Haddad S. Comparative assessment of extrapolation methods based on the conventional free drug hypothesis and plasma protein-mediated hepatic uptake theory for the hepatic clearance predictions of two drugs extensively bound to both the albumin and alpha-1-acid glycoprotein. *J Pharm Sci.* 2020 Nov 18:S0022-3549(20)30736-X.
- Burczynski FJ, Wang GQ, Elmadhoun B, She YM, Roberts MS, Standing KG. Hepatocyte [3H]palmitate uptake: effect of albumin surface charge modification. *Can J Physiol Pharmacol*. 2001;79(10):868-875.
- Chan TS, Yu H, Moore A, Khetani SR, Tweedie D. Meeting the challenge of predicting hepatic clearance of compounds slowly metabolized by cytochrome P450 using a novel hepatocyte model, HepatoPac. *Drug Metab Dispos*. 2013 Dec;41(12):2024-32.
- Chen M, Ma L, Drusano GL, Bertino JS Jr, Nafziger AN. Sex differences in CYP3A activity using intravenous and oral midazolam. *Clin Pharmacol Ther.* **2006** Nov;80(5):531-8.
- Chen Y, Ma F, Lu T, Budha N, Jin JY, Kenny JR, Wong H, Hop CE, Mao J. Development of a Physiologically Based Pharmacokinetic Model for Itraconazole Pharmacokinetics and Drug-Drug Interaction Prediction. *Clin Pharmacokinet*. **2016** Jun;55(6):735-49.
- Coumoul X, Diry M, Barouki R. PXR-dependent induction of human CYP3A4 gene expression by organochlorine pesticides. *Biochem Pharmacol.* **2002** Nov 15;64(10):1513-9.

- Cruciani G, Pastor M, Guba W. VolSurf: A new tool for the pharmacokinetic optimization of lead compounds. *Eur J Pharm Sci.* **2000** Oct;11 Suppl 2:S29-39.
- De Buck SS, Sinha VK, Fenu LA, Nijsen MJ, Mackie CE, Gilissen RA. Prediction of human pharmacokinetics using physiologically based modeling: a retrospective analysis of 26 clinically tested drugs. *Drug Metab Dispos*. 2007;35(10): 1766-1780.
- De Lange ECM, Vd Berg DJ, Bellanti F, Voskuyl RA, Syvänen S. P-glycoprotein protein expression versus functionality at the blood-brain barrier using immunohistochemistry, microdialysis and mathematical modeling. *Eur J Pharm Sci.* **2018** Nov 1;124:61-70.

Dedrick RL. Animal scale-up. J Pharmacokinet Biopharm. 1973;1(5):435-461.

- Doran A, Obach RS, Smith BJ, Hosea NA, Becker S, Callegari E, Chen C, Chen X, Choo E, Cianfrogna J, Cox LM, Gibbs JP, Gibbs MA, Hatch H, Hop CE, Kasman IN, Laperle J, Liu J, Liu X, Logman M, Maclin D, Nedza FM, Nelson F, Olson E, Rahematpura S, Raunig D, Rogers S, Schmidt K, Spracklin DK, Szewc M, Troutman M, Tseng E, Tu M, Van Deusen JW, Venkatakrishnan K, Walens G, Wang EQ, Wong D, Yasgar AS, Zhang C. The impact of P-glycoprotein on the disposition of drugs targeted for indications of the central nervous system: evaluation using the MDR1A/1B knockout mouse model. *Drug Metab Dispos.* 2005 Jan;33(1):165-74.
- Elmadhoun BM, Wang GQ, Kirshenbaum LA, Burczynski FJ. Palmitate uptake by neonatal rat myocytes and hepatocytes. Role of extracellular protein. *Eur J Biochem.* **2001** Jun;268(11):3145-53.
- Tsao SC, Sugiyama Y, Sawada Y, Iga T, Hanano M. Kinetic analysis of albumin-mediated uptake of warfarin by perfused rat liver. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1988 Apr;16(2):165-81.
- EMEA: European Medicines Evaluation Agency. Scientific discussion. Revatio. Oct 2005. Available

   at:
   <a href="https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-discussion/revatio-epar-scientific-discussion/revatio-epar-scientific-epar-scie

discussion\_en.pdf. Accessed February 10, 2021.

- Finkbeiner SR, Zeng XL, Utama B, Atmar RL, Shroyer NF, Estes MK. Stem cell-derived human intestinal organoids as an infection model for rotaviruses. *MBio*. **2012** Jul 3;3(4):e00159-12.
- Franco-Salinas G, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tamsulosin in its modified-release and oral controlled absorption system formulations. *Clin Pharmacokinet*. **2010** Mar;49(3):177-88.

- Fromm MF, Kim RB, Stein CM, Wilkinson GR, Roden DM. Inhibition of P-glycoprotein-mediated drug transport: A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine. *Circulation.* 1999 Feb 2;99(4):552-7.
- Fukuchi Y, Toshimoto K, Mori T, Kakimoto K, Tobe Y, Sawada T, Asaumi R, Iwata T, Hashimoto Y, Nunoya KI, Imawaka H, Miyauchi S, Sugiyam Y. Analysis of nonlinear pharmacokinetics of a highly albumin-bound compound: contribution of albumin-mediated hepatic uptake mechanism. J Pharm Sci. 2017 Sep;106(9):2704-2714.
- Fura A, Vyas V, Humphreys W, Chimalokonda A, Rodrigues D. Prediction of human oral pharmacokinetics using nonclinical data: examples involving four proprietary compounds. *Biopharm Drug Dispos.* 2008;29(8):455-468.
- Gertz M, Harrison A, Houston JB, Galetin A. Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from *in vitro* clearance and permeability data. *Drug Metab Dispos*. 2010 Jul;38(7):1147-58.
- Gertz M, Houston JB, Galetin A. Physiologically based pharmacokinetic modeling of intestinal firstpass metabolism of CYP3A substrates with high intestinal extraction. *Drug Metab Dispos*. **2011** Sep;39(9):1633-42.
- Ghahramani P, Ellis SW, Lennard MS, Ramsay LE, Tucker GT. Cytochromes P450 mediating the Ndemethylation of amitriptyline. *Br J Clin Pharmacol.* 1997 Feb;43(2):137-44.
- Ghuman J, Zunszain PA, Petitpas I, Bhattacharya AA, Otagiri M, Curry S. Structural basis of the drugbinding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol.* 2005;353(1):38-52.
- Harashima H, Sugiyama Y, Sawada Y, Iga T, Hanano M. Comparison between *in vivo* and *in vitro* tissue-to-plasma unbound concentration ratios (Kp,f) of quinidine in rats. *J Pharm Pharmacol*. 1984 May;36(5):340-2.
- Horiuchi K, Ohnishi S, Matsuzaki T, et al. Improved human pharmacokinetic prediction of hepatically metabolized drugs with species-specific systemic clearance. *J Pharm Sci.* **2018**;107(5):1443-1453.
- Houston JB. Utility of *in vitro* drug metabolism data in predicting *in vivo* metabolic clearance. *Biochem Pharmacol.* **1994**;47(9):1469-1479.
- Hutzler JM, Ring BJ, Anderson SR. Low-turnover drug molecules: A current challenge for drug metabolism scientists. *Drug Metab Dispos.* 2015 Dec;43(12):1917-28.

- Huwyler J, Wright MB, Gutmann H, Drewe J. Induction of cytochrome P450 3A4 and P-glycoprotein by the isoxazolyl-penicillin antibiotic flucloxacillin. *Curr Drug Metab.* **2006** Feb;7(2):119-26.
- Imawaka H, Ito K, Kitamura Y, Sugiyama K, Sugiyama Y. Prediction of human bioavailability from human oral administration data and animal pharmacokinetic data without data from intravenous administration of drugs in humans. *Pharm Res.* 2009 Aug;26(8):1881-9.
- Ingelman-Sundberg M. Genetic polymorphisms of cytochrome P450 2D6 (CYP2D6): clinical consequences, evolutionary aspects and functional diversity. *Pharmacogenomics J.* 2005;5(1):6-13.
- Inui KI, Masuda S, Saito H. Cellular and molecular aspects of drug transport in the kidney. *Kidney Int.*2000 Sep;58(3):944-58.
- Iwao T, Kodama N, Kondo Y, Kabeya T, Nakamura K, Horikawa T, Niwa T, Kurose K, Matsunaga T. Generation of enterocyte-like cells with pharmacokinetic functions from human induced pluripotent stem cells using small-molecule compounds. *Drug Metab Dispos*. 2015 Apr;43(4):603-10.
- Izumi S, Nozaki Y, Kusuhara H, Hotta K, Mochizuki T, Komori T, Maeda K, Sugiyama Y. Relative Activity Factor (RAF)-Based Scaling of Uptake Clearance Mediated by Organic Anion Transporting Polypeptide (OATP) 1B1 and OATP1B3 in Human Hepatocytes. *Mol Pharm.* 2018 Jun 4;15(6):2277-2288.
- Jones HM, Barton HA, Lai Y, Bi YA, Kimoto E, Kempshall S, Tate SC, El-Kattan A, Houston JB, Galetin A, Fenner KS. Mechanistic pharmacokinetic modeling for the prediction of transportermediated disposition in humans from sandwich culture human hepatocyte data. *Drug Metab Dispos*. 2012 May;40(5):1007-17.
- Jones HM, Chen Y, Gibson C, Heimbach T, Parrott N, Peters SA, Snoeys J, Upreti VV, Zheng M, Hall SD. Physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development: A pharmaceutical industry perspective. *Clin Pharmacol Ther.* 2015 Mar;97(3):247-62.
- Kabeya T, Qiu S, Hibino M, Nagasaki M, Kodama N, Iwao T, Matsunaga T. Cyclic AMP signaling promotes the differentiation of human induced pluripotent stem cells into intestinal epithelial cells. *Drug Metab Dispos.* 2018 Oct;46(10):1411-1419.

- Kacevska M, Robertson GR, Clarke SJ, Liddle C. Inflammation and CYP3A4-mediated drug metabolism in advanced cancer: impact and implications for chemotherapeutic drug dosing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008 Feb;4(2):137-49.
- Kalvass JC, Maurer TS, Pollack GM. Use of plasma and brain unbound fractions to assess the extent of brain distribution of 34 drugs: comparison of unbound concentration ratios to *in vivo* pglycoprotein efflux ratios. *Drug Metab Dispos*. **2007** Apr;35(4):660-6.
- Kansy, M., Senner, F., Gubernator, K. Physicochemical high throughput screening: Parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *J Med Chem.* 1998 Mar 26;41(7):1007-10.
- Kimoto E, Mathialagan S, Tylaska L, Niosi M, Lin J, Carlo AA, Tess DA, Varma MVS. Organic Anion Transporter 2-Mediated Hepatic Uptake Contributes to the Clearance of High-Permeability-Low-Molecular-Weight Acid and Zwitterion Drugs: Evaluation Using 25 Drugs. *J Pharmacol Exp Ther*. 2018 Nov;367(2):322-334.
- Kimura Y, Kioka N, Kato H, Matsuo M, Ueda K. Modulation of drug-stimulated ATPase activity of human MDR1/P-glycoprotein by cholesterol. *Biochem J.* 2007 Jan 15;401(2):597-605.
- Kindla J, Müller F, Mieth M, Fromm MF, König J. Influence of non-steroidal anti-inflammatory drugs on organic anion transporting polypeptide (OATP) 1B1- and OATP1B3-mediated drug transport. *Drug Metab Dispos*. 2011 Jun;39(6):1047-53.
- Kobayashi M, Saitoh H, Yamaguchi M, Saito T, Fujita H, Suno M, Matsubara K, Aungst BJ. Relationship between loperamide-induced sedative effect and digoxin pharmacokinetics in healthy Japanese subjects. *Pharm Res.* 2005 Mar;22(3):413-8.
- Kragh-Hansen U, Chuang VT, Otagiri M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull.* **2002**;25(6):695-704.
- Launay-Vacher V, Izzedine H, Karie S, Hulot JS, Baumelou A, Deray G. Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol.* 2006;103(3):p97-106.
- Lennernäs H. Intestinal permeability and its relevance for absorption and elimination. *Xenobiotica*. **2007** Oct-Nov;37(10-11):1015-51.

- Li C, Liu T, Cui X, Uss AS, Cheng KC. Development of *in vitro* pharmacokinetic screens using Caco-2, human hepatocyte, and Caco-2/human hepatocyte hybrid systems for the prediction of oral bioavailability in humans. *J Biomol Screen*. 2007 Dec;12(8):1084-91.
- Liang X, Park Y, DeForest N, Hao J, Zhao X, Niu C, Wang K, Smith B, Lai Y. In Vitro Hepatic Uptake in Human and Monkey Hepatocytes in the Presence and Absence of Serum Protein and Its In Vitro to In Vivo Extrapolation. *Drug Metab Dispos*. **2020** Dec;48(12):1283-1292.
- Lin JH. Tissue distribution and pharmacodynamics: a complicated relationship. *Curr Drug Metab*. **2006** Jan;7(1):39-65.
- Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, et al. Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on *in vivo* animal pharmacokinetic data, part 1: volume of distribution at steady state. *J Clin Pharmacol.* **2013**;53(2):167-177.
- Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, et al. Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on *in vivo* animal pharmacokinetic data, part 2: clearance. *J Clin Pharmacol.* 2013;53(2):178-191.
- Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, Hamilton G, Rizzo C, Jolley S, Gilbert D, Downey A, Mudra D, Graham R, Carroll K, Xie J, Madan A, Parkinson A, Christ D, Selling B, LeCluyse E, Gan LS. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2002 Jul;30(7):795-804.
- Magee MH, Blum RA, Lates CD, Jusko WJ. Prednisolone pharmacokinetics and pharmacodynamics in relation to sex and race. *J Clin Pharmacol.* **2001** Nov;41(11):1180-94.
- Mathialagan S, Piotrowski MA, Tess DA, Feng B, Litchfield J, Varma MV. Quantitative Prediction of Human Renal Clearance and Drug-Drug Interactions of Organic Anion Transporter Substrates Using In Vitro Transport Data: A Relative Activity Factor Approach. *Drug Metab Dispos*. 2017 Apr;45(4):409-417.
- Mayumi K, Akazawa T, Kanazu T, Ohnishi S, Hasegawa H. Successful prediction of human pharmacokinetics after oral administration by optimized physiologically based pharmacokinetics approach and permeation assay using human induced pluripotent stem cell-derived intestinal epithelial cells. *J Pharm Sci.* **2020** Apr;109(4):1605-1614.

- Mayumi K, Ohnishi S, Hasegawa H. Successful prediction of human pharmacokinetics by improving calculation processes of physiologically based pharmacokinetic approach. J Pharm Sci. 2019 Aug;108(8):2718-2727.
- Miyauchi S, Masuda M, Kim SJ, Tanaka Y, Lee KR, Iwakado S, Nemoto M, Sasaki S, Shimono K, Tanaka Y, Sugiyama Y. The Phenomenon of Albumin-Mediated Hepatic Uptake of Organic Anion Transport Polypeptide Substrates: Prediction of the In Vivo Uptake Clearance from the In Vitro Uptake by Isolated Hepatocytes Using a Facilitated-Dissociation Model. *Drug Metab Dispos*. 2018 Mar;46(3):259-267.
- Mordenti J. Man versus beast: pharmacokinetic scaling in mammals. *J Pharm Sci.* **1986**;75(11):1028-1040.
- Mori K. Proposal for the Japan society of Drug Delivery System. *Drug Delivery System*. **2014**;29(1):73-76.
- Muirhead GJ, Rance DJ, Walker DK, Wastall P. Comparative human pharmacokinetics and metabolism of single-dose oral and intravenous sildenafil. *Br J Clin Pharmacol.* 2002;53 Suppl 1:13S-20S.
- Nam Y, Lim CH, Lee HS, Chung SJ, Chung YH, Shin YK, Kim MG, Sohn UD, Kim HC, Jeong JH.
  Single-dose, randomized, open-label, 2-way crossover study of the pharmacokinetics of amitriptyline hydrochloride 10- and 25-mg tablet in healthy male Korean volunteers. *Clin Ther.*2015 Feb 1;37(2):302-10.
- Negoro R, Takayama K, Nagamoto Y, Sakurai F, Tachibana M, Mizuguchi H. Modeling of drugmediated CYP3A4 induction by using human iPS cell-derived enterocyte-like cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2016 Apr 15;472(4):631-6.
- NIH: US Natl Inst Health. Dec 2020. Available at: <u>https://dailymed.nlm.nih.gov/dailymed/drugInfo.cfm?setid=5fe76337-eae5-4e5c-96ef-6cfa97983c6e</u>. Accessed February 10, 2021.
- Ogaki S, Shiraki N, Kume K, Kume S. Wnt and Notch signals guide embryonic stem cell differentiation into the intestinal lineages. *Stem Cells*. **2013** Jun;31(6):1086-96.
- Ohtsuki S, Schaefer O, Kawakami H, Inoue T, Liehner S, Saito A, Ishiguro N, Kishimoto W, Ludwig-Schwellinger E, Ebner T, Terasaki T. Simultaneous absolute protein quantification of transporters,

cytochromes P450, and UDP-glucuronosyltransferases as a novel approach for the characterization of individual human liver: comparison with mRNA levels and activities. *Drug Metab Dispos*. **2012** Jan;40(1):83-92.

- Peters SA. Evaluation of a generic physiologically based pharmacokinetic model for lineshape analysis. *Clin Pharmacokinet*. **2008**;47(4):261-75.
- Poulin P, Burczynski FJ, Haddad S. The Role of Extracellular Binding Proteins in the Cellular Uptake of Drugs: Impact on Quantitative *In vitro*-to-*In vivo* Extrapolations of Toxicity and Efficacy in Physiologically Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Research. *J Pharm Sci.* 2016 Feb;105(2):497-508.
- Poulin P, Haddad S. Advancing prediction of tissue distribution and volume of distribution of highly lipophilic compounds from a simplified tissue composition-based model as a mechanistic animal alternative method. *J Pharm Sci.* **2012**;101(6):2250-2261.
- Poulin P, Haddad S. Hepatocyte composition-based model as a mechanistic tool for predicting the cell suspension: aqueous phase partition coefficient of drugs in *in vitro* metabolic studies. *J Pharm Sci.* 2013;102(8):2806-2818.
- Poulin P, Haddad S. Toward a new paradigm for the efficient *in vitro-in vivo* extrapolation of metabolic clearance in humans from hepatocyte data. *J Pharm Sci.* **2013**;102(9):3239-3251.
- Poulin P, Hop CE, Ho Q, Halladay JS, Haddad S, Kenny JR. Comparative assessment of *in vitro-in vivo* extrapolation methods used for predicting hepatic metabolic clearance of drugs. *J Pharm Sci.* 2012 Nov;101(11):4308-26.
- Poulin P, Jones RD, Jones HM, Gibson CR, Rowland M, Chien JY, Ring BJ, Adkison KK, Ku MS, He H, Vuppugalla R, Marathe P, Fischer V, Dutta S, Sinha VK, Björnsson T, Lavé T, Yates JW. PHRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 5: prediction of plasma concentration-time profiles in human by using the physiologically-based pharmacokinetic modeling approach. *J Pharm Sci.* 2011 Oct;100(10):4127-57.
- Poulin P, Kenny JR, Hop CE, Haddad S. *In vitro-in vivo* extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. *J Pharm Sci.* 2012;101(2):838-851.

- Poulin P. Drug distribution to human tissues: Prediction and examination of the basic assumption in in vivo pharmacokinetics-pharmacodynamics (PK/PD) research. J Pharm Sci. 2015 Jun;104(6):2110-2118.
- Procyshyn R, Tsai G, Wasan KM. The influence of dyslipidemia on the plasma protein and lipoprotein distribution of haloperidol. *Eur Neuropsychopharmacol.* **2003** Jan;13(1):33-7.
- Prueksaritanont T, Gorham LM, Hochman JH, Tran LO, Vyas KP. Comparative studies of drugmetabolizing enzymes in dog, monkey, and human small intestines, and in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos.* 1996 Jun;24(6):634-42.
- Riccardi K, Lin J, Li Z, Niosi M, Ryu S, Hua W, Atkinson K, Kosa RE, Litchfield J, Di L. Novel Method to Predict In Vivo Liver-to-Plasma Kpuu for OATP Substrates Using Suspension Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2017 May;45(5):576-580.
- Rodgers T, Rowland M. Mechanistic approaches to volume of distribution predictions: understanding the processes. *Pharm Res.* 2007;24(5):918-933.
- Roos A, Boron WF. Intracellular pH. Physiol Rev. 1981 Apr;61(2):296-434.
- Routledge PA, The plasma protein binding of basic drugs. *Br J Clin Pharmacol.* **1986** Nov;22(5):499-506.
- Rowland M. Physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulations principles, methods, and applications in the pharmaceutical industry. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol*. **2013** Jul 10;2:e55.
- Sager, J.E., Yu, J., Ragueneau-Majlessi, I., Isoherranen, N. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulation Approaches: A Systematic Review of Published Models, Applications, and Model Verification. *Drug Metab Dispos*. 2015 Nov;43(11):1823-37.
- Sawada Y, Hanano M, Sugiyama Y, Iga T. Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats. *J Pharmacokinet Biopharm.* 1985;13(5):477-492.
- Sayama H, Komura H, Kogayu M, Iwaki M. Development of a hybrid physiologically based pharmacokinetic model with drug-specific scaling factors in rat to improve prediction of human pharmacokinetics. *J Pharm Sci.* **2013**;102(11): 4193-4204.
- Schanker LS, Shore PA, Brodie BB, Hogben CA. Absorption of drugs from the stomach. I. The rat. J

Pharmacol Exp Ther. 1957 Aug;120(4):528-39.

- Schmid J, Busch U, Heinzel G, Bozler G, Kaschke S, Kummer M. Pharmacokinetics and metabolic pattern after intravenous infusion and oral administration to healthy subjects. *Drug Metab Dispos*. 1995;23(11):1206-1213.
- Shanti A, Teo J, Stefanini C. *In vitro* Immune Organs-on-Chip for Drug Development: A Review. *Pharmaceutics.* **2018** Dec 15;10(4).
- Shebley M, Sandhu P, Emami Riedmaier A, Jamei M, Narayanan R, Patel A, Peters SA, Reddy VP, Zheng M, de Zwart L, Beneton M, Bouzom F, Chen J, Chen Y, Cleary Y, Collins C, Dickinson GL, Djebli N, Einolf HJ, Gardner I, Huth F, Kazmi F, Khalil F, Lin J, Odinecs A, Patel C, Rong H, Schuck E, Sharma P, Wu SP, Xu Y, Yamazaki S, Yoshida K, Rowland M. Physiologically Based Pharmacokinetic Model Qualification and Reporting Procedures for Regulatory Submissions: A Consortium Perspective. *Clin Pharmacol Ther.* 2018 Jul;104(1):88-110.
- Shitara Y, Maeda K, Ikejiri K, Yoshida K, Horie T, Sugiyama Y. Clinical significance of organic anion transporting polypeptides (OATPs) in drug disposition: their roles in hepatic clearance and intestinal absorption. *Biopharm Drug Dispos*. 2013 Jan;34(1):45-78.
- Shore PA, Brodie BB, Hogben CA. The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis. J Pharmacol Exp Ther. 1957 Mar;119(3):361-9.
- Smith CM, Nolan CK, Edwards MA, Hatfield JB, Stewart TW, Ferguson SS, Lecluyse EL, Sahi J. A comprehensive evaluation of metabolic activity and intrinsic clearance in suspensions and monolayer cultures of cryopreserved primary human hepatocytes. *J Pharm Sci.* 2012 Oct;101(10):3989-4002.
- Spino M, Chai RP, Isles AF, Thiessen JJ, Tesoro A, Gold R, MacLeod SM. Cloxacillin absorption and disposition in cystic fibrosis. J Pediatr. 1984 Nov;105(5):829-35.
- Stalker DJ, Jungbluth GL. Clinical pharmacokinetics of linezolid, a novel oxazolidinone antibacterial. *Clin Pharmacokinet*. **2003**;42(13):1129-40.
- Staud F, Ceckova M, Micuda S, Pavek P. Expression and function of p-glycoprotein in normal tissues: effect on pharmacokinetics. *Methods Mol Biol.* **2010**;596:199-222.
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell.* **2006** Aug 25;126(4):663-76.

- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell.* 2007 Nov 30;131(5):861-72.
- Takamatsu N, Welage LS, Idkaidek NM, Liu DY, Lee PI, Hayashi Y, Rhie JK, Lennernäs H, Barnett JL, Shah VP, Lesko L, Amidon GL. Human intestinal permeability of piroxicam, propranolol, phenylalanine, and PEG 400 determined by jejunal perfusion. *Pharm Res.* 1997 Sep;14(9):1127-32.
- Takenaka T, Harada N, Kuze J, Chiba M, Iwao T, Matsunaga T. Application of a Human Intestinal Epithelial Cell Monolayer to the Prediction of Oral Drug Absorption in Humans as a Superior Alternative to the Caco-2 Cell Monolayer. J Pharm Sci. 2016 Feb;105(2):915-924.
- Tang C, Shou M, Rodrigues AD. Substrate-dependent effect of acetonitrile on human liver microsomal cytochrome P450 2C9 (CYP2C9) activity. *Drug Metab Dispos*. 2000;28(5):567-572.
- Teorell T. Kinetics of distribution of substances administered to the body I. The extravascular modes of administration. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **1937**;57: 205-225.
- Teorell T. Kinetics of distribution of substances administered to the body II. The intravascular modes of administration. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* **1937**;57, 226-240.
- Trainor GL. The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*. 2007 Jan;2(1):51-64.
- Uchida H, Machida M, Miura T, Kawasaki T, Okazaki T, Sasaki K, Sakamoto S, Ohuchi N, Kasahara M, Umezawa A, Akutsu H. A xenogeneic-free system generating functional human gut organoids from pluripotent stem cells. *JCI Insight*. 2017 Jan 12;2(1):e86492.
- Uchimura T, Kato M, Saito T, Kinoshita H. Prediction of human blood-to-plasma drug concentration ratio. *Biopharm Drug Dispos*. **2010**;31(5-6):286-297.
- Ullrich KJ. Renal transporters for organic anions and organic cations. Structural requirements for substrates. *J Membr Biol.* **1997** Jul 15;158(2):95-107.
- Varma MV, El-Kattan AF, Feng B, Steyn SJ, Maurer TS, Scott DO, Rodrigues AD, Tremaine LM. Extended Clearance Classification System (ECCS) informed approach for evaluating investigational drugs as substrates of drug transporters. *Clin Pharmacol Ther.* 2017 Jul;102(1):33-36.

- Varma MV, Obach RS, Rotter C, Miller HR, Chang G, Steyn SJ, El-Kattan A, Troutman MD. Physicochemical space for optimum oral bioavailability: contribution of human intestinal absorption and first-pass elimination. *J Med Chem.* 2010 Feb 11;53(3):1098-108.
- Varma MV, Steyn SJ, Allerton C, El-Kattan AF. Predicting clearance mechanism in drug discovery: Extended Clearance Classification System (ECCS). *Pharm Res.* 2015 Dec;32(12):3785-802.
- Véronique G, Géraldine B, Pierre-Alain C, Bernard T, Hubert H. G. Physicochemical characterization of sildenafil: ionization, lipophilicity behavior, and ionic-partition diagram studied by two-phase titration and electrochemistry. *Helv. Chim. Acta*, 2000;83(7), 1465-1474.
- Wang HY, Chen X, Jiang J, Shi J, Hu P. Evaluating a physiologically based pharmacokinetic model for predicting the pharmacokinetics of midazolam in Chinese after oral administration. *Acta Pharmacol Sin.* **2016** Feb;37(2):276-84.
- Yu LX, Lipka E, Crison JR, Amidon GL. Transport approaches to the biopharmaceutical design of oral drug delivery systems: prediction of intestinal absorption. *Adv Drug Deliv Rev.* 1996 Jun 12;19(3):359-76.
- Yu LX, Amidon GL. A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. *Int J Pharm.* 1999 Sep 20;186(2):119-25.
- Youdim KA, Avdeef A, Abbott NJ. *In vitro* trans-monolayer permeability calculations: often forgotten assumptions. *Drug Discov Today*. **2003** Nov 1;8(21):997-1003.
- Zanelli U, Caradonna NP, Hallifax D, Turlizzi E, Houston JB. Comparison of cryopreserved HepaRG cells with cryopreserved human hepatocytes for prediction of clearance for 26 drugs. *Drug Metab Dispos*. 2012 Jan;40(1):104-10.
- Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, Butina D, Beck G, Sherborne B, Cooper I, Platts JA. Evaluation of human intestinal absorption data and subsequent derivation of a quantitative structure-activity relationship (QSAR) with the Abraham descriptors. *J Pharm Sci.* 2001 Jun;90(6):749-84.