

# 博士論文

ヒト肝細胞移植マウスを用いる医薬候補品の  
ヒト体内動態予測に関する基盤研究

令和2年度

宮本 真紀

目次	
序論.....	1
<b>第I章 ヒト肝細胞移植マウスを用いた医薬候補品のヒト分布容積とクリアランス予測.....</b>	<b>5</b>
第1節 緒言.....	5
第2節 実験材料と実験方法.....	7
I-2-i) 試薬.....	7
I-2-ii) 化合物の選択.....	7
I-2-iii) 使用動物について.....	8
I-2-iv) 血漿の非結合型分率の評価.....	8
I-2-v) 薬物動態試験.....	9
I-2-vi) 薬物濃度測定.....	9
I-2-vii) ヒトおよびサル薬物動態パラメータ.....	10
I-2-viii) 薬物動態パラメータ算出.....	11
I-2-ix) ヒト分布容積とクリアランスの予測方法.....	11
I-2-x) 予測精度の基準.....	12
第3節 結果.....	15
I-3-i) ヒト分布容積とクリアランスの予測結果.....	15
第4節 考察.....	24
第5節 小括.....	28
<b>第II章 ヒト肝細胞移植マウスを用いた医薬候補品のヒト消失半減期予測.....</b>	<b>29</b>
第1節 緒言.....	29
第2節 実験材料と実験方法.....	30
II-2-i) 試薬.....	30
II-2-ii) 使用動物.....	31
II-2-iii) 薬物動態試験.....	31

II-2-iv) 薬物濃度測定 .....	31
II-2-v) 薬物動態算出 .....	32
II-2-vi) 単種外挿法によるヒトクリアランスと分布容積の予測方法 .....	33
II-2-vii) Wajima superposition によるヒトパラメータ算出 .....	34
II-2-viii) ヒトの半減期予測 .....	35
第3節 結果 .....	35
II-3-i) ヒト肝細胞移植マウスと免疫不全マウスの薬物動態パラメータの算出 .....	35
II-3-ii) ヒトの薬物動態パラメータの算出 .....	36
II-3-iii) ヒト肝細胞移植マウス, 免疫不全マウスでの UCN-01 の血漿中濃度推移 .....	39
第4節 考察 .....	42
第5節 小括 .....	47
<b>第III章 異なるヒト肝細胞移植マウスを用いた医薬候補品の血漿中タンパク非結合型分率の評価, およびヒト肝細胞移植マウスの代替血漿の作成 .....</b>	<b>48</b>
第I節 緒言 .....	48
第2節 実験材料と実験方法 .....	50
III-2-i) 試薬 .....	50
III-2-ii) 血漿中非結合型分率の評価 .....	50
III-2-iii) 免疫不全マウスを用いた薬物動態試験 .....	51
III-2-iv) 薬物濃度測定 .....	52
III-2-v) 免疫不全マウスのクリアランス, 分布容積評価 .....	52
III-2-vi) クリアランス, 分布容積のヒト予測 .....	52
第3節 結果 .....	52
III-3-i) ヒト, ヒト肝細胞移植マウス (I), 宿主の免疫不全マウスの血漿の非結合型分率, およびヒトと免疫不全マウスの混合血漿の非結合型分率 .....	52

III-3-ii) ヒト肝細胞移植マウス (II) の血漿の非結合型分率.....	53
III-3-iii) 免疫不全マウスのクリアランスおよび分布容積.....	53
第4節 考察.....	63
第5節 小括.....	69
総括.....	70
本論文内容の誌上発表.....	73
謝辞.....	74
参考文献.....	75

## 略語一覧

AAFE	Absolute average fold error
Ab	アルブミン
AGP	$\alpha_1$ -酸性糖タンパク質
AO	アルデヒドオキシダーゼ
AUC	血漿中濃度曲線下面積
BW	体重
CL	一般的クリアランス
CL <sub>t</sub>	全身クリアランス
CYP	シトクロム P450 の個別分子種
f <sub>up</sub>	血漿の非結合型分率
hAb	ヒトアルブミン
hAGP	ヒト $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質
LC-MS/MS	高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置
mAb	マウスアルブミン
MRT	平均滞留時間 (mean residence time)
P450	シトクロムP450の総称
PK	薬物動態
PPB	血漿中タンパク結合
RI	ヒト肝臓置換率 (replacement index)
SSS	単種外挿法 (single-species scaling)
Vd	分布容積
Vd <sub>ss</sub>	定常状態の分布容積
UGT	UDP-グルクロン酸転移酵素
UPLC	超液体クロマトグラフィー

## 序論

日本において、「新薬」を開発するためには、9–17年の期間を費やすことが知られており、基礎研究を経て非臨床試験、臨床試験、承認審査等の長いプロセスと高額な費用が必要とされる。更に、このようなプロセスを経ても、医薬候補品として研究を開始した化合物が新薬として市場に出る成功確率は3万分の1とも言われている。成功確率を低くしている原因は臨床試験に入った医薬候補品が、ヒトでの期待通りの暴露が得られない、期待した効き目を示さない、あるいは予想外の毒性が発現した、といった事象が主である。したがって、一つの医薬候補品を選択する際に、ヒトの体内での動き(薬物動態, PK)、主となる効き目(薬効)、安全性等、多くの因子を非臨床の段階で効率よく最適化する必要がある。以上のことから、新薬のヒト体内のPK、薬効および安全性を総合的に精度よく予測し、最適な候補化合物を選択して開発することにより、新薬開発の成功確率の改善が期待できる。本研究では、特に薬物がヒトの体内でどのような動きをするか、吸収(absorption)、分布(distribution)、代謝(metabolism)、排泄(excretion)に関して、非臨床段階で精度良く予測できる手法を検討した。

一般的に医薬品の重要な体内動態規定因子としてヒトの予測が必要となる基本的なPKパラメータは、薬物の組織への移行性を表す分布容積(Vd)、薬物の体内からの消失の速さを表すクリアランス(CL)が挙げられる。これらの複合的パラメータであるヒト血中消失半減期( $t_{1/2}$ )は、投与間隔を設定するために重要なパラメータである。薬物が臨床試験において初めて、非臨床では予期できなかった長い消失相の $t_{1/2}$ を示したために、反復投与による薬物蓄積により惹起された毒性等から、臨床開発中止や臨床試験の延長を余儀なくされた例も数多く報告されており、非臨床段階でのヒトの $t_{1/2}$ 予測の重要性は高い。VdやCL値の予測においては、古くからヒト–動物間の体重差等を基に、実験動物データをヒトに外挿する方法がアロメトリックスケーリング法として用いられ、多様な経験則が報告されている(Dedrick, 1973; Lombardo and others, 2013a; Lombardo and others, 2013b; Mordenti, 1986)。しかしながら、結果的にこの経験則

が当てはまらず、予測結果が実測と大きく異なる事例も散見される。予測が外れる要因としては、Vd に関しては血漿中タンパク結合 (PPB) が影響しており、PPB の種差が関連することが報告されている (Lombardo and others, 2013b)。CL 値に関して予測が外れる要因としては、肝薬物代謝酵素や代謝反応のヒト-動物間の種差が無視できない点が考えられる (Houston, 1994; Lombardo and others, 2013a; Obach and others, 1997)。半減期の予測に関しては予測方法の報告自体も少なく、精度も十分ではないといった現状がある。

そこで本研究では、新規基盤技術の整備を目的としてヒト肝細胞移植マウスに着目した。ヒト肝細胞移植マウスは、近年、国内で開発されたヒト肝細胞を移植したマウスであり、世界中で活用されている。このマウスの最大の特徴は、肝臓の 85%以上がヒト肝細胞で置換されている点である。国内で開発されている主なヒト肝細胞移植マウスには、ウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベーター/重症複合免疫不全マウスにヒト肝細胞を注入して作製した系統 (Scheer and Wilson, 2016; Tateno and others, 2004) と、薬物等により肝臓特異的な障害を発症させたマウスにヒト肝細胞を注入して作製した系統 (Hasegawa and others, 2011) の 2 種類がある。

ヒト肝細胞移植マウスの血漿中には肝臓で主に生合成されるヒト由来のアルブミン (Ab) が分泌されており、その量によりマウス肝臓中のヒト肝細胞置換率 (RI) が算出される (Hasegawa and others, 2011; Tateno and others, 2004)。したがって、薬物の PPB に大きく影響を受けることが知られている薬物の組織移行 (Lombardo and others, 2013b)、すなわち Vd が「ヒト型」を示す可能性がある。ヒト肝細胞移植マウスにおいて、主要なヒト薬物代謝酵素やトランスポーターが肝臓に発現していることが報告されており (Katoh and others, 2004; Katoh and others, 2005b)、薬物代謝等の肝臓の機能が「ヒト型」であることが報告されている (Sanoh and Ohta, 2014)。ヒト化された肝薬物代謝機能は、医薬品開発の CL 予測において、ボトルネックである薬物代謝の種差を克服しうる可能性がある。しかしながら、創薬プロセスにおいてヒト肝細胞移植マウスがヒト動態予測に使用できるかの情報は十分とは言えない。

ヒト肝細胞移植マウスはヒト薬物動態予測だけでなく、薬効 (Klumpp and

others, 2018; Mueller and others, 2018; Uchida and others, 2017; Yoshizato and Tateno, 2013), 薬物相互作用 (Hasegawa and others, 2012; Katoh and others, 2005a; Papazyan and others, 2018; Sanoh and others, 2019; Shoda and others, 2007; Takaoka and others, 2018; Takehara and others, 2019; Uchida and others, 2018), 毒性 (Kakuni and others, 2012; Nihira and others, 2019; Sanoh and others, 2017; Tateno and others, 2019; Tateno and others, 2015) についてもヒトの予測に有用であると報告されている。これらの活用に関しては一般的にタンパク結合率が関与する非結合型薬物濃度が重要な役割を担うことが報告されており (Heuberger and others, 2013; Smith and others, 2010; Trainor, 2007), 薬物のヒト肝細胞移植マウスの PPB を考慮した解析が必要であるが, 報告事例は少ない。

以上の背景から本研究では, 薬物のヒトの Vd, CL およびこれらの複合的パラメータである  $t_{1/2}$  について, ヒト肝細胞移植マウスを用いて検証した。さらに, ヒト肝細胞移植マウスを用いて医薬候補品の PPB を網羅的に調べ, これらの情報を統合することで, 創薬段階での薬物動態研究上の新技術基盤整備を目的とした。第 I 章ではヒト Vd と CL の予測精度に関して, ヒトでの主代謝経路が多様な 30 化合物を選択し, それらの代謝経路の種差による影響をヒト肝細胞移植マウス, サル, ラット間で比較し, ヒト肝細胞移植マウスが代謝の種差を克服しうる有用なツールであることを示した。第 II 章では, ヒト肝細胞移植マウスを用いた  $t_{1/2}$  予測精度を評価し, 臨床で予期せぬ長い  $t_{1/2}$  を示す化合物の選択を回避し, 適切な投与計画を非臨床で提示できる可能性について示した。第 III 章では, 医薬候補品の PPB について二種類のヒト肝細胞移植マウス, すなわち免疫不全型ヒト肝細胞移植マウスと肝特異的障害誘導型ヒト肝細胞移植マウスのプロファイルを網羅的に調べ, ヒト肝細胞移植マウスを用いた薬効試験, 薬物相互作用を含む薬物動態試験, 毒性試験でのタンパク結合の影響を考察した。貴重なヒト肝細胞移植マウスの血漿の代替として広く供給可能な創薬ツールの作成を目的として, ヒト血漿とヒト肝細胞移植マウスの宿主マウス血漿を混合することによりヒト肝細胞移植マウス人工血漿を作成し評価した。以上, ヒト肝細胞移植マウスおよび関連する動物由来試料を創薬初期段階に導入活用する本研究手法は, 創薬プロセス上重要な薬物動態規定値の予測精度向上の課

題を克服すると期待されたので、以下に詳述する.

## 第 I 章 ヒト肝細胞移植マウスを用いた医薬候補品のヒト分布容積とクリアランス予測

### 第 1 節 緒言

新薬研究開発のプロセスにおいて、ヒト PK の正確な予測は、ヒトを対象とした臨床第 I 相試験の迅速化、臨床的な有効用量の予測、そして安全性マージンに基づいた適切な投与量の設定に不可欠である。非臨床試験データからのヒト分布容積 (Vd) とクリアランス (CL) の 2 つの主要な PK パラメータの予測は重要であり、これらを予測するために様々なアプローチが提案されてきた (Dedrick, 1973; Houston, 1994; Iwatsubo and others, 1997; Mordenti, 1986).

動物の体重 (BW) と動物の PK パラメータを用いてヒトのパラメータを外挿するアロメトリックスケーリング法は経験的かつ簡便なアプローチであり、動物からヒトへの PK 予測に幅広く用いられている (Dedrick, 1973; Mordenti, 1986). しかし、アロメトリックスケーリング法を用いて動物からヒトの Vd や CL を正確に予測することは困難である。Vd に関しては、薬物のタンパク結合に関連する血漿中アルブミン (Ab) 等合成に関わる肝機能に種差が存在すること (Lombardo and others, 2013b), CL に関しては、肝薬物代謝酵素や代謝反応の種差が無視できないことが原因として考えられる (Lombardo and others, 2013a). タンパク結合や代謝の種差が予測精度に与える影響を最小限に抑えるためには、肝臓がヒト化された新規な動物モデルであるヒト肝細胞移植マウスが有効なツールとして活用できる可能性がある。ヒト肝細胞移植マウスには、ウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチベーター/重症複合免疫不全マウスにヒト肝細胞を注入して作製した系統 (Scheer and Wilson, 2016; Tateno and others, 2004) と薬物投与等によって肝臓特異的な障害を誘導したマウスにヒト肝細胞を注入して作成した系統 (Hasegawa and others, 2011) が国内で開発され、世界中で活用されている。これらの肝細胞移植マウスは、肝臓の 85%以上がヒト肝細胞に置換されているため、主要なヒト薬物代謝酵素やトランスポーターが肝臓に発現しており (Katoh and others, 2004; Katoh and others, 2005b), 薬物代謝等の肝臓の機能がヒト型であることが報告されていることから (Sanoh and Ohta, 2014), ヒト

の Vd および CL 予測に適した動物モデルと考えられる。

本研究では、免疫不全型のヒト肝細胞移植マウスの動態パラメータを用いたヒトの Vd と CL 予測精度を、従来の動物モデルと比較した。比較のための他の動物モデルとしてはラットとサルを選択した。ラットは一般的に PK や毒性動態の評価や薬理学的モデルとして数多く利用されている。サルはヒトと進化的に近く、薬物の肝臓代謝に関してサルとヒトの間に明らかな種差は認められないことが報告されている (Akabane and others, 2010)。Lombardo らは、400 種類以上の薬剤についてヒトの Vd と CL 予測を総合的に評価した結果、サルの方がラットやイヌよりも信頼性の高いモデルであることを示している (Lombardo and others, 2013a; Lombardo and others, 2013b)。例えばアルデヒドオキシダーゼ (AO) 基質については、ヒトとサルの高い AO 活性の類似性から、サルがヒト CL 予測に適したモデルである可能性があげられる (Akabane and others, 2010; Pryde and others, 2010)。最近、Sanoh らはヒト肝細胞移植マウスとラットを用いて、17 種類の薬物についてヒト Vd と CL の単種外挿法 (single-species scaling, SSS) による予測性を評価し、ヒト肝細胞移植マウスがラットより優れた予測精度を示すことを報告した (Sanoh and others, 2015)。しかしながら、本報告は予測精度が高いとされるサルと比較していないことから、ヒト肝細胞移植マウスおよびラットに、サルを加えヒトの Vd と CL 予測性を比較することは重要と考えられる。本研究では、シトクロム P450 (総称を P450, 個別分子種を CYP と略す) と AO, UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGTs) などの non-P450 酵素を媒介とした多様な代謝経路を持つ 30 種類の市販薬を選択し、ヒト肝細胞移植マウス、サル、ラットを用いて静脈内投与時の血漿中濃度評価を行った。これらの動物モデルから得られた血漿中濃度推移から SSS 法を用いて予測したヒトの  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  値を、既報のヒトの  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  値と比較した。ヒトの  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  の予測精度は、予測値のヒトの実測値の 3 倍以内の予測精度、Absolute average fold error (AAFE) によって検証した。

## 第2節 実験材料と実験方法

### I-2-i) 試薬

Carbazeran, dapsone, mycophenolic acid, ketanserin, telmisartan は武田薬品工業株式会社 (Kanagawa, Japan) にて合成した。Bazedoxifene は Florida Chemical Supply 社 (Tampa, FL, USA) から購入した。Fasudil は Focus Biomolecules 社 (Plymouth Meeting, PA, USA) から購入した。Benzydamine は Labotest OHG 社 (Niederschöna, Germany) から購入した。Pefloxacin は LKT Laboratories 社 (St. Paul, MN, USA) から購入した。Zaleplon は Sequoia Research Products 社 (Reading, UK) から購入した。Albuterol, ibuprofen, indomethacin, naltrexone, *O*<sup>6</sup>-benzylguanine, XK-469, zoniporide は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。Gemcitabine と sumatriptan は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) から購入した。BIBX 1382 は Tocris Bioscience 社 (Bristol, UK) から購入した。Antipyrine, clonazepam, diazepam, diclofenac, dolasetron, entacapone, imipramine, ketoprofen, moxifloxacin, (*S*)-naproxen は富士フィルム和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。ヒト血漿は Biopredic International 社 (Rennes, France) から購入した。その他の試薬は HPLC 用試薬, 試薬特級またはそれに相当する試薬を使用した。

### I-2-ii) 化合物の選択

30 種類の化合物を選定し使用した。これらの化合物の生分解に関与する代謝酵素は文献より引用した (Table I-1)。AO や UGT などの non-P450 酵素で代謝される化合物については、ヒトミクロソームや肝細胞を用いた *in vitro* の代謝速度データから *in vivo* でのヒト CL が過小に予測され、予測が困難であることが知られていることから (Akabane and others, 2012a; Kilford and others, 2009; Miners and others, 2006), 主に non-P450 酵素で代謝される化合物を選択した。BIBX 1382, carbazeran, fasudil, *O*<sup>6</sup>-benzylguanine, XK-469, zaleplon, zoniporide は主に AO で代謝されることが知られている。Bazedoxifene, entacapone, imipramine, indomethacin, ketoprofen, moxifloxacin, mycophenolic acid, telmisartan は主に UGTs で代謝される。Diclofenac, ibuprofen, (*S*)-naproxen は UGTs と P450 で代

謝される。さらに、硫酸転移酵素 (SULT), フラビン含有モノオキシゲナーゼ (FMO), モノアミン酸化酵素 (MAO) などの他の non-P450 酵素で代謝されるモデル化合物として, albuterol, benzydamine, dolasetron, gemcitabine, ketanserin, naltrexone, sumatriptan を追加した。主に P450 で代謝される化合物については antipyrine, clonazepam, dapsone, diazepam, pefloxacin の 5 種類の化合物を選択した。

#### I-2-iii) 使用動物について

本研究で使用した動物のすべての実験計画は武田薬品工業株式会社の Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC), フェニックスバイオ社 (Hiroshima, Japan), Shin Nippon Biomedical 社 (Kagoshima, Japan) の Experimental Animal Care and Use Committee により承認されており, AAALAC International の承認を受けたこれらの施設の動物倫理規則に従って動物実験を行った。ヒト肝細胞を移植した雄性のヒト肝細胞移植マウス (PXB マウス®, 12–18 weeks old) の作成および投与はフェニックスバイオ社にて実施した。移植用のヒト肝細胞 (Lot BD195) は, BD Biosciences 社 (San Jose, CA, USA) より入手した。ヒト肝細胞置換率 (replacement index, RI) はヒト肝細胞移植マウスの肝臓中のヒト肝細胞の占める割合であり, RI 値は血中ヒトアルブミン (hAb) の測定により評価した (Tateno and others, 2004)。本研究で使用したヒト肝細胞移植マウスの RI 値は 85–89%であった。雄性の Sprague-Dawley ラット (8 weeks old) は日本チャールズリバー社 (Kanagawa, Japan) から入手し, 武田薬品工業株式会社にて試験を行った。雄のカニクイザル (4-7 years old) は, Shin Nippon Biomedical 社において試験を行った。全ての動物は, 12 時間の明暗サイクルの下で, 温度および湿度管理された環境下で飼育した。

#### I-2-iv) 血漿の非結合型分率の評価

30 化合物のヒト, ラット, およびサル の血漿中非結合型分率 ( $f_{up}$ ) を HTD96 dialysis chamber (HTDialysis, CT, USA), セルロース膜 (MWCO 6-8 kDa, Gales Ferry, CT, USA) を用いた平衡透析法 (Banker and others, 2003; Wang and

others, 2014) により測定した。最終濃度が 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるように化合物溶液を血漿と混合した。リン酸緩衝生理食塩水(PBS) に対して、 $\text{CO}_2$  インキュベーター中 37°Cで 24 時間、60 rpm で振盪した。血漿側と PBS 側の透析液を、内部標準物質 (IS, Table I-1) を含むアセトニトリルで除タンパク後、4,283 g, 4°Cで 5 分間遠心分離した。上清を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) で分析した (I-2-vi)。透析装置の血漿側からの化合物の濃度に対する PBS 側からの化合物の濃度の比として  $f_{\text{up}}$  を計算した。

#### I-2-v) 薬物動態試験

薬物動態試験には選択した 30 化合物を使用し、化合物 (カセット投与の場合は 1 群 10 化合物まで) を *N,N*-ジメチルアセトアミド (DMA) または生理食塩水で溶解し、DMA/生理食塩水 (1/1, v/v) とした。薬液 (ヒト肝細胞移植マウスおよびラットは 1 mL/kg, サルは 0.2 mL/kg) をヒト肝細胞移植マウス, サルおよびラット ( $n=3$ ) に各化合物 0.1 mg/kg で静脈内投与した。ヒト肝細胞移植マウスでは眼窩静脈, ラットでは尾静脈, サルでは大腿静脈から抗凝固剤としてヘパリンを用い採血した。血液採取時間は、ヒト肝細胞移植マウスでは 0.083, 0.25, 1, 3, 7, 24 時間, ラットでは 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 時間, サルでは 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48 時間とした。採取した血液をヒト肝細胞移植マウスは 1,000 g, 4°Cで 10 分間, サルは 1,700 g, 4°Cで 10 分間, ラットは 13,000 g, 4°Cで 5 分間遠心分離し、血漿を得た。血漿は分析まで -80°C下で保存した。血漿 (5, 30 または 50  $\mu\text{L}$ ) を、IS (Table I-1) を含むアセトニトリルと混合し、4,283 g, 4°Cで 5 分間遠心分離した。

#### I-2-vi) 薬物濃度測定

I-2-iv および I-2-v で調整した血漿または平衡透析の透析液の上清を LC-MS/MS 溶媒で希釈した。LC-MS/MS は、LC 部に Prominence UFLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、脱気装置は DGU-20A, 送液ポンプは 10AD-VP または LC-20AD, オートサンプラーは SIL-20ACHT, カラムオーブンは CTO-20AC を使用した。MS 部は API 4000 または API 5000 (株式会社エービー・サイ

エックス, Tokyo, Japan) を使用した。解析には, Analyst software™ version 1.6.2 (SCIEX, Framingham, MA, USA) を使用した。各化合物は Table I-1 に示すフラグメンテーションを用いて検出した。LC と MS の分析条件は以下の通りである。

カラム: Shim-pack XR-ODS (2.0 mm i.d. × 30 mm, 2.2 μm; Shimadzu, Tokyo, Japan)

移動相条件-1

移動相 A: 0.2% (v/v) formic acid in 0.01 mol/L ammonium formate (pH 3.0)

移動相 B: 0.2% (v/v) formic acid in acetonitrile

移動相条件-2

移動相 A: 0.01 mol/L ammonium formate (pH 3.0)

移動相 B: acetonitrileあるいはmethanol

流速: 0.7 mL/min.

カラム温度: 50°C

グラジエント条件 (移動相 B の%): 5% (0-0.2 min), 5- 99% (0.2-1.1 min), 99%(1.1-1.8 min), 99-5% (1.8-1.81 min), 5% (1.81-2.6 min)

※サル血漿中のCarbazeranの分析条件

流速: 0.4 mL/min.

グラジエント条件 (移動相 B の%): 10% (0-0.1 min), 10- 95% (0.1-0.15 min), 95% (0.15-1.8 min), 95-10% (1.8-1.85 min), 10% (1.85-3.0 min)

I-2-vii) ヒトおよびサルの薬物動態パラメータ

ヒト PK パラメータは文献から入手した (Table I-2). Antipyrine, BIBX 1382, clonazepam, diazepam, diclofenac, dolasetron, gemcitabine, imipramine, indomethacin, ketoprofen, moxifloxacin, mycophenolic acid, naltrexone, pefloxacin, *O*<sup>6</sup>-benzylguanine, telmisartan のサルの PK パラメータは文献から取

得した (Table I-2).

#### I-2-viii) 薬物動態パラメータ算出

静脈内投与により得られた血漿中濃度曲線推移を用いて  $CL_t$  値および  $Vd_{ss}$  値をノンコンパートメント解析により求めた。  $CL_t$  値は、用量/ $AUC_{iv}$  (血中濃度曲線下面積) の式から求めた。  $AUC_{iv}$  は、時間 0 から静脈内投与後の最後の測定可能な時点の濃度まで使用した台形法により算出した。  $Vd_{ss}$  は  $AUMC$  (1 次モーメント曲線下面積)/ $AUC \times CL_t$  として算出した。  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  は、個々の動物について算出し、グループの平均値として記載した。 計算は Microsoft Excel 2010 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA) を用いて行った。

#### I-2-ix) ヒト分布容積とクリアランスの予測方法

Total-based のヒトの  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  を SSS により下記の式 (1) と式 (2) より予測した。 既報の生理学的パラメータ (Hosea et al., 2009) に基づき、  $Vd_{ss}$  は 1.0 (生理学的臓器重量等)、  $CL_t$  は 0.75 (血流、濾過作用等) の固定指数値 (a, b) を用いて予測した。 ヒトとサルの BW は、それぞれ 60 kg と 3.5 kg を使用した (Hosea and others, 2009)。 ヒト肝細胞移植マウスの BW は 0.0203 kg, ラットの BW は 0.32 kg であった。

$$\text{Total - based } Vd_{ss, \text{human}} = Vd_{ss, \text{animal}} \times \left( \frac{BW_{\text{human}}}{BW_{\text{animal}}} \right)^a \quad (1)$$

$$\text{Total - based } CL_{t, \text{human}} = CL_{t, \text{animal}} \times \left( \frac{BW_{\text{human}}}{BW_{\text{animal}}} \right)^b \quad (2)$$

非結合型薬物濃度基準の  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  は、下記の式 (3) と式 (4) に従って、ヒトの  $f_{up}$  と動物の  $f_{up}$  の比で補正された Total-based のヒトの  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  の値から計算した。

$$\text{Unbound - based } Vd_{ss, \text{human}} = \text{Total - based } Vd_{ss, \text{human}} \times \left( \frac{f_{up, \text{human}}}{f_{up, \text{animal}}} \right) \quad (3)$$

$$\text{Unbound - based } CL_{t, \text{human}} = \text{Total - based } CL_{t, \text{human}} \times \left( \frac{f_{up, \text{human}}}{f_{up, \text{animal}}} \right) \quad (4)$$

## I-2-x) 予測精度の基準

ヒト肝細胞移植マウス，サルおよびラットから計算された  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  値の予測精度の指標として，下記の式 (5) で定義される AAFE によって評価した (Obach and others, 1997).

$$AAFE = 10^{\sum |\log \frac{\text{Actual}}{\text{Predicted}}| / n} \quad (5)$$

既報のヒト肝細胞移植マウスの報告との比較のため，実測値の3倍以内の予測精度により，予測精度を評価した (Sanoh and others, 2015).

**Table I-1** Mass parameters, analytical conditions and metabolic pathways of model compounds.

Compounds	Ionization mode	Molecular ion	Product ion	Internal standard	Mobile phase condition <sup>a</sup>	Metabolic pathway <sup>b</sup>	
Albuterol	[M + H] <sup>+</sup>	240.20	148.30	alprenolol	1	SULT	(Sanoh and others, 2012a)
Antipyrine	[M + H] <sup>+</sup>	189.10	56.00	alprenolol	1	P450	(Engel and others, 1996)
Bazedoxifene	[M + H] <sup>+</sup>	471.10	126.40	alprenolol	1	UGTs	EMA document
Benzylamine	[M + H] <sup>+</sup>	310.18	86.04	alprenolol	1	FMO	(Akabane and others, 2012b)
BIBX 1382	[M + H] <sup>+</sup>	388.17	97.90	alprenolol	1	AO	(Hutzler and others, 2013)
Carbazepam	[M + H] <sup>+</sup>	361.09	272.06	alprenolol, compound X	1, 2	AO	(Hutzler and others, 2013)
Clonazepam	[M + H] <sup>+</sup>	316.19	270.00	alprenolol	1	P450	(Ogawa and others, 2013)
Dapsone	[M + H] <sup>+</sup>	249.10	156.10	alprenolol	1	P450, NAT	(Sanoh and others, 2012a)
Diazepam	[M + H] <sup>+</sup>	285.21	154.00	alprenolol	1	P450	(Naritomi and others, 2001)
Diclofenac	[M - H] <sup>-</sup>	294.03	249.90	furosemide	2	P450, UGTs	(Sanoh and others, 2012a)
Dolasetron	[M + H] <sup>+</sup>	325.22	164.00	alprenolol	1	CR, SDR	(Akabane and others, 2012b)
Entacapone	[M + H] <sup>+</sup>	306.17	233.00	alprenolol	1	UGTs	(Lautala and others, 2000)
Fasudil	[M + H] <sup>+</sup>	292.23	98.90	alprenolol	1	AO	(Sanoh and others, 2012a)
Gemcitabine	[M + H] <sup>+</sup>	264.10	111.90	metformin	1	CDA	(Plunkett and others, 1995)
Ibuprofen	[M - H] <sup>-</sup>	205.12	161.35	furosemide	2	P450, UGTs	(Sanoh and others, 2012a)
Imipramine	[M + H] <sup>+</sup>	281.35	86.05	alprenolol	1	P450, UGTs	(Deguchi and others, 2011; Lemoine and others, 1993)
Indomethacin	[M + H] <sup>+</sup>	358.07	138.94	alprenolol	1	P450, UGTs	(Duggan and others, 1972; Nakajima and others, 1998)
Ketanserin	[M + H] <sup>+</sup>	396.20	189.30	alprenolol	1	AKR	(Akabane and others, 2012b)
Ketoprofen	[M + H] <sup>+</sup>	255.20	105.00	alprenolol	1	UGTs	(Sanoh and others, 2012a)
Moxifloxacin	[M + H] <sup>+</sup>	402.22	384.20	alprenolol	1	UGTs, SULT	(Moise and others, 2000)
Mycophenolic acid	[M + H] <sup>+</sup>	321.14	207.05	alprenolol	1	UGTs	(Bowalgaha and Miners, 2001)
Naltrexone	[M + H] <sup>+</sup>	342.11	270.06	alprenolol	1	AKR	(Akabane and others, 2012b)
<i>O</i> <sup>6</sup> -Benzylguanine	[M + H] <sup>+</sup>	242.40	91.00	alprenolol	1	AO, P450	(Akabane and others, 2012b)
Pefloxacin	[M + H] <sup>+</sup>	334.19	290.15	alprenolol	1	P450	(Kinzig-Schippers and others, 1999)
( <i>S</i> )-Naproxen	[M - H] <sup>-</sup>	229.12	169.35	furosemide	2	P450, UGTs	(Sanoh and others, 2012a)

Sumatriptan	[M + H] <sup>+</sup>	296.12	58.02	alprenolol	1	MAO	(Akabane and others, 2012b)
Telmisartan	[M + H] <sup>+</sup>	515.40	276.35	alprenolol	1	UGTs	(Deppe and others, 2010)
XK-469	[M + H] <sup>+</sup>	345.17	299.00	alprenolol	1	AO	(Hutzler and others, 2012)
Zaleplon	[M + H] <sup>+</sup>	305.80	236.10	alprenolol	1	AO, P450	(Akabane and others, 2012b)
Zoniporide	[M + H] <sup>+</sup>	321.22	262.00	alprenolol	1	AO	(Hutzler and others, 2013)
Alprenolol	[M + H] <sup>+</sup>	250.30	116.30		1		
Furosemide	[M - H] <sup>-</sup>	328.87	284.80	Internal standard	1		
Metformin	[M + H] <sup>+</sup>	130.08	71.05		1		
Compound X	[M + H] <sup>+</sup>	373.10	203.20		2		

<sup>a</sup> Mobile phase condition-1 consisted of 10 mM ammonium formate/formic acid (100/0.2, v/v) and acetonitrile/formic acid (100/0.2, v/v); Mobile phase condition-2 consisted of 10 mM ammonium acetate and acetonitrile; Mobile phase condition-3 consisted of 10 mM ammonium acetate and methanol.

<sup>b</sup> Metabolic enzymes of compounds were quoted from references. AKR; aldo-keto reductase, AO; aldehyde oxidase, CDA; cytidine deaminase CR; carbonyl reductase, FMO; flavin-containing monooxygenase, NAT; N-acetyltransferase, SDR; short-chain dehydrogenase/reductase, MAO; monoamine oxidase, SULT; sulfotransferase, UGT; UDP-glucuronosyltransferase.

### 第3節 結果

#### I-3-i) ヒト分布容積とクリアランスの予測結果

各動物より得られた  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  は Table I-2 にまとめた。30 種類の化合物のヒト、サルおよびラットの  $f_{up}$  を Table I-3 にまとめた。ヒト肝細胞移植マウス、サル、ラットのパラメータを用いて SSS (式 (1), (2)) により、ヒトの Total-based の  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  の値を予測した。式(3), (4) によって Unbound-based の  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  を計算した。結果は文献から引用したヒトの  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  の値とともに、それぞれ Table I-4 と I-5 にまとめた。ヒト肝細胞移植マウス、サル、ラットから予測したヒトの Total-based  $Vd_{ss}$  値を、ヒトの実測値と比較した (Fig. I-1, (B) ヒト肝細胞移植マウス, (D) サル, (F) ラット)。SSS を用いた  $Vd_{ss}$  の予測精度を Table I-6 にまとめた。実測値の 3 倍以内の予測精度は、ヒト肝細胞移植マウスで 79.3% (23/29 化合物), サルで 82.8% (24/29 化合物), ラットで 55.2% (16/29 化合物) であった。AAFE 値は、ヒト肝細胞移植マウスでは 2.0, サルでは 2.1, ラットでは 2.9 であった。 $CL_t$  と同様に、サル、ラットから予測したヒト Unbound-based  $Vd_{ss}$  は、有意な改善を示さなかった。3 倍以内の予測精度はサルでは 82.8% (Total-based  $Vd_{ss}$ ) から 75.9% (Unbound-based  $Vd_{ss}$ ) となり、ラットでは若干の改善が見られ、3 倍の範囲内の化合物の割合は 55.2% (Total-based  $Vd_{ss}$ ) から 62.1% (Unbound-based  $Vd_{ss}$ ) となった。

ヒト肝細胞移植マウス、サル、ラットから予測したヒトの Total-based  $CL_t$  を実測値と比較した (Fig. I-1, (A) ヒト肝細胞移植マウス, (C) サル, (E) ラット)。SSS を用いたヒト  $CL_t$  の予測精度結果を Table I-6 にまとめた。3 つの動物モデルの中で、ヒト肝細胞移植マウスから予測した Total-based  $CL_t$  は、ヒトでは実測値の 3 倍以内の予測精度が 83.3% (25/30 化合物) で、AAFE が 2.3 と最も高い予測精度を示した。サルから予測した Total-based  $CL_t$  も高い予測精度を示し、実測値の 3 倍以内の予測精度は 70.0% (21/30 化合物), AAFE は 2.4 であった。ラットは最も低い予測精度を示し、3 倍以内の予測精度は 46.7% (14/30 化合物), AAFE は 4.2 であった。Total-based  $CL_t$  をヒトとラット、またはサルの間の  $f_{up}$  の比率で補正したところ、顕著な改善は観察されなかった。実測値の 3 倍以内の

予測精度は、サルでは 70.0% (Total-based CL<sub>t</sub>) から 73.3% (Unbound-based CL<sub>t</sub>) に、ラットでは 46.7% (Total-based CL<sub>t</sub>) から 36.7% (Unbound-based CL<sub>t</sub>) となった。

**Table I-2** Summary of V<sub>dss</sub> and CL<sub>t</sub> in humanized-liver mice, monkeys, and rats.

Compounds	V <sub>dss</sub> (L/kg)						CL <sub>t</sub> (mL/min/kg)					
	Humanized-liver mice		Monkeys <sup>a</sup>		Rats		Humanized-liver mice		Monkeys <sup>a</sup>		Rats	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Albuterol	3.04	0.26	2.99	0.55	7.74	5.71	146.02	7.42	10.57	1.93	98.65	11.8
Antipyrine	0.74	0.08	0.74	-	0.86	0.11	5.25	0.57	4.60	-	4.60	0.40
Bazedoxifene	9.18	3.56	3.33	0.90	17.61	4.23	97.28	1.18	12.27	5.03	66.08	5.60
Benzydamine	4.20	1.69	2.23	0.39	8.35	1.39	104.10	4.82	20.60	4.78	146.30	22.87
BIBX1382	21.11	5.24	39.00	-	8.79	1.22	324.08	63.78	118.00	-	20.08	2.52
Carbazeran	1.70	0.31	1.15	-	1.15	0.16	170.75	33.58	87.87	-	22.42	5.98
Clonazepam	2.18	0.16	6.80	-	1.65	0.05	9.43	0.20	14.30	-	21.7	10.03
Dapsone	0.92	0.12	1.41	0.24	2.03	0.47	3.30	0.50	5.08	1.45	8.30	1.62
Diazepam	1.84	0.45	0.91	-	3.61	0.27	58.45	17.90	24.50	-	58.75	14.28
Diclofenac	0.46	0.07	0.32	-	0.58	0.14	30.62	4.53	8.50	-	18.55	1.87
Dolasetron	3.66	0.70	5.56	-	6.49	1.29	452.85	116.15	77.00	-	412.48	93.55
Entacapone	1.62	0.39	0.61	0.43	1.40	0.23	205.33	75.43	85.28	70.52	64.85	4.80
Fasudil	6.91	1.70	3.24	0.11	5.36	2.12	778.18	234.70	97.25	35.05	302.13	191.55
Gemcitabine	1.82	0.42	5.50	-	0.75	0.05	177.97	40.97	177.00	-	2.17	0.10
Ibuprofen	0.18	0.02	0.44	0.29	0.24	0.02	3.77	0.38	3.85	0.90	4.52	1.62
Imipramine	13.52	2.09	9.69	-	22.94	7.54	235.60	33.67	53.1	-	189.48	39.88
Indomethacin	0.27	0.01	1.79	-	0.11	0.01	0.87	0.05	3.86	-	0.35	0.07
Ketanserin	2.94	0.27	1.67	0.50	0.71	0.24	35.90	4.28	20.78	4.48	3.40	1.62
Ketoprofen	0.21	0.04	0.25	-	0.34	0.03	4.43	0.85	4.92	-	0.88	0.17
Moxifloxacin	2.43	0.26	4.90	-	8.37	1.04	38.02	4.87	11.5	-	38.22	2.45
Mycophenolic acid	0.38	0.06	0.67	-	0.37	0.11	1.83	0.20	3.85	-	2.35	0.52
Naltrexone	3.96	0.61	7.59	-	4.99	0.70	183.13	18.78	54.5	-	155.53	31.23

<i>O</i> <sup>6</sup> -Benzylguanine	1.05	0.41	0.51	-	2.62	0.42	78.73	31.00	4.08	-	104.33	22.77
Pefloxacin	3.61	0.53	0.65	-	3.81	0.65	30.63	2.53	11.03	-	20.33	1.12
( <i>S</i> )-Naproxen	0.13	0.01	0.07	0.01	0.12	0.02	0.58	0.05	0.20	0.03	0.40	0.05
Sumatriptan	4.49	0.72	4.94	1.08	5.30	1.57	188.63	29.83	42.95	11.35	103.42	14.03
Telmisartan	9.18	1.07	1.54	-	2.32	0.06	20.52	4.35	2.82	-	7.80	0.83
XK-469	0.16	0.01	0.12	0.03	0.17	0.03	0.40	0.07	0.52	0.22	0.02	0.01
Zaleplon	1.28	0.36	1.24	-	1.45	0.25	58.68	13.27	18.42	-	20.88	1.12
Zoniporide	6.56	1.10	4.48	1.01	9.00	3.72	336.78	67.33	35.17	13.77	195.83	75.13

Each value represents the mean ( $n=3$ ).

<sup>a</sup>  $CL_t$  and  $Vd_{ss}$  for monkeys were quoted from the literature and the SD values were described as "-": antipyrine, clonazepam, diclofenac, dolasetron ( $CL_t$ ), gemcitabine, moxifloxacin, naltrexone and pefloxacin (Lombardo and others, 2013a), dolasetron ( $Vd_{ss}$ , FDA approval package document), imipramine, indomethacin, ketoprofen, mycophenolic acid, and telmisartan (Deguchi and others, 2011); diazepam (Koyanagi and others, 2014); *O*<sup>6</sup>-benzylguanine (Long and others, 2000) ; BIBX1382 (Hutzler and others, 2014)

**Table I-3** Summary of  $f_{up}$  of humans, monkeys, and rats.

Compounds	$f_{up}$					
	Humans		Monkeys		Rats	
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD
Albuterol	0.9317 <sup>b</sup>	-	0.9794	0.0482	0.9325	0.0782
Antipyrine	0.9591	0.0487	0.821	0.0563	0.9502	0.0586
Bazedoxifene	0.0134	0.0029	0.0074	0.0013	0.0226	0.0031
Benzydamine	0.0507 <sup>b</sup>	-	0.0878	0.0124	0.1679	0.0134
BIBX1382	0.1226	0.0094	0.1099	0.0067	0.1631	0.0091
Carbazeran	0.0938 <sup>b</sup>	-	0.1448	0.0143	0.2661	0.0317
Clonazepam	0.1865	0.0130	0.2171	0.0268	0.2695	0.0269
Dapsone	0.3805	0.0135	0.2322	0.0134	0.4452	0.0306
Diazepam	0.0225	0.0032	0.0463	0.0054	0.1701	0.0029
Diclofenac	0.0033 <sup>b</sup>	-	0.0040	0.0006	0.0123	0.0038
Dolasetron	0.2345	0.0057	0.3594	0.0383	0.3958	0.0435
Entacapone	0.0149	0.0026	0.0189	0.0035	0.0319	0.0018
Fasudil	0.7409	0.0606	0.6393	0.0655	0.8115	0.0619
Gemcitabine <sup>a</sup>	0.9900	-	0.9900	-	0.9149	0.0698
Ibuprofen	0.0027 <sup>b</sup>	-	0.0051	0.0005	0.0232	0.0035
Imipramine	0.2092	0.0120	0.1504	0.0144	0.2233	0.0043
Indomethacin	0.0042 <sup>b</sup>	-	0.0057	0.0006	0.0085	0.0034
Ketanserine	0.0916	0.0074	0.0893	0.0093	0.0503	0.0023
Ketoprofen	0.0091	0.0004	0.013	0.0024	0.0574	0.0031
Moxifloxacin	0.9259	0.0259	0.7612	0.0486	0.7426	0.0193
Mycophenolic acid	0.0143 <sup>b</sup>	-	0.0113	0.0010	0.0248	0.0033
Naltrexone	0.7851 <sup>b</sup>	-	0.7474	0.0381	0.7840	0.0862
<i>O</i> <sup>6</sup> -Benzylguanine	0.1726	0.0125	0.2159	0.0188	0.3464	0.0132
Pefloxacin	0.7525	0.0875	0.5848	0.0363	0.7604	0.0385
( <i>S</i> )-Naproxen	0.0009 <sup>b</sup>	-	0.0011	0.0002	0.0390	0.0024
Sumatriptan	0.8307	0.1261	0.7603	0.0514	0.8651	0.0534
Telmisartan	0.0065	0.0008	0.0090	0.0029	0.0112	0.0014
XK-469	0.0057 <sup>b</sup>	-	0.0149	0.0011	0.0088	0.0035
Zaleplon	0.5726	0.0457	0.6791	0.0578	0.6401	0.0527
Zoniporide	0.3362	0.0368	0.2904	0.0226	0.4055	0.0364

Each value represents the mean  $\pm$  SD ( $n=3$ ).

<sup>a</sup> Human and monkey  $f_{up}$  of gemcitabine were quoted from FDA approval package document (FDA, 1995).

<sup>b</sup> The mean of duplicated samples

**Table I-4** Observed and predicted human  $V_{d_{ss}}$  using SSS with humanized-liver mice, monkeys, and rats.

Compounds	Human Observed $V_{d_{ss}}^a$ (L/kg)	Predicted $V_{d_{ss}}$ (L/kg)				
		SSS of humanized- liver mice	SSS of monkeys		SSS of rats	
			total- based	unbound- based	total- based	unbound- based
Albuterol	1.90	3.04	2.99	2.84	7.74	7.73
Antipyrine	0.77	0.74	0.74	0.86	0.86	0.87
Bazedoxifene	14.70	9.18	3.33	6.02	17.61	10.44
Benzydamine	1.53	4.20	2.23	1.29	8.35	2.52
BIBX 1382	15.00	21.11	39.00	43.51	8.79	6.61
Carbazeran	0.81	1.70	1.15	0.75	1.15	0.40
Clonazepam	2.90	2.18	6.80	5.84	1.65	1.14
Dapsone	0.83	0.92	1.41	2.30	2.03	1.74
Diazepam	1.00	1.84	0.91	0.44	3.61	0.48
Diclofenac	0.22	0.46	0.32	0.26	0.58	0.15
Dolasetron	2.00	3.66	5.56	3.63	6.49	3.84
Entacapone	0.27	1.62	0.61	0.48	1.40	0.66
Fasudil	1.32	6.91	3.24	3.75	5.36	4.89
Gemcitabine	1.50	1.82	5.50	5.50	0.75	0.81
Ibuprofen	0.15	0.18	0.44	0.23	0.24	0.03
Imipramine	12.00	13.52	9.69	13.48	22.94	21.49
Indomethacin	0.93	0.27	1.79	1.32	0.11	0.05
Ketanserin	3.90	2.94	1.67	1.71	0.71	1.30
Ketoprofen	0.13	0.21	0.25	0.18	0.34	0.05
Moxifloxacin	1.40	2.43	4.90	5.96	8.37	10.44
Mycophenolic acid	4.75	0.38	0.67	0.85	0.37	0.22
Naltrexone	7.60	3.96	7.59	7.97	4.99	5.00
<i>O</i> <sup>6</sup> -Benzylguanine	0.31	1.05	0.51	0.41	2.62	1.31
Pefloxacin	1.50	3.61	0.65	0.84	3.81	3.77
( <i>S</i> )-Naproxen	-	0.13	0.07	0.05	0.12	0.003
Sumatriptan	1.70	4.49	4.94	5.40	5.30	5.09
Telmisartan	5.30	9.18	1.54	1.11	2.32	1.35
XK-469	0.22	0.16	0.12	0.05	0.17	0.11
Zaleplon	1.30	1.28	1.24	1.04	1.45	1.30
Zoniporide	1.70	6.56	4.48	5.18	9.00	7.46

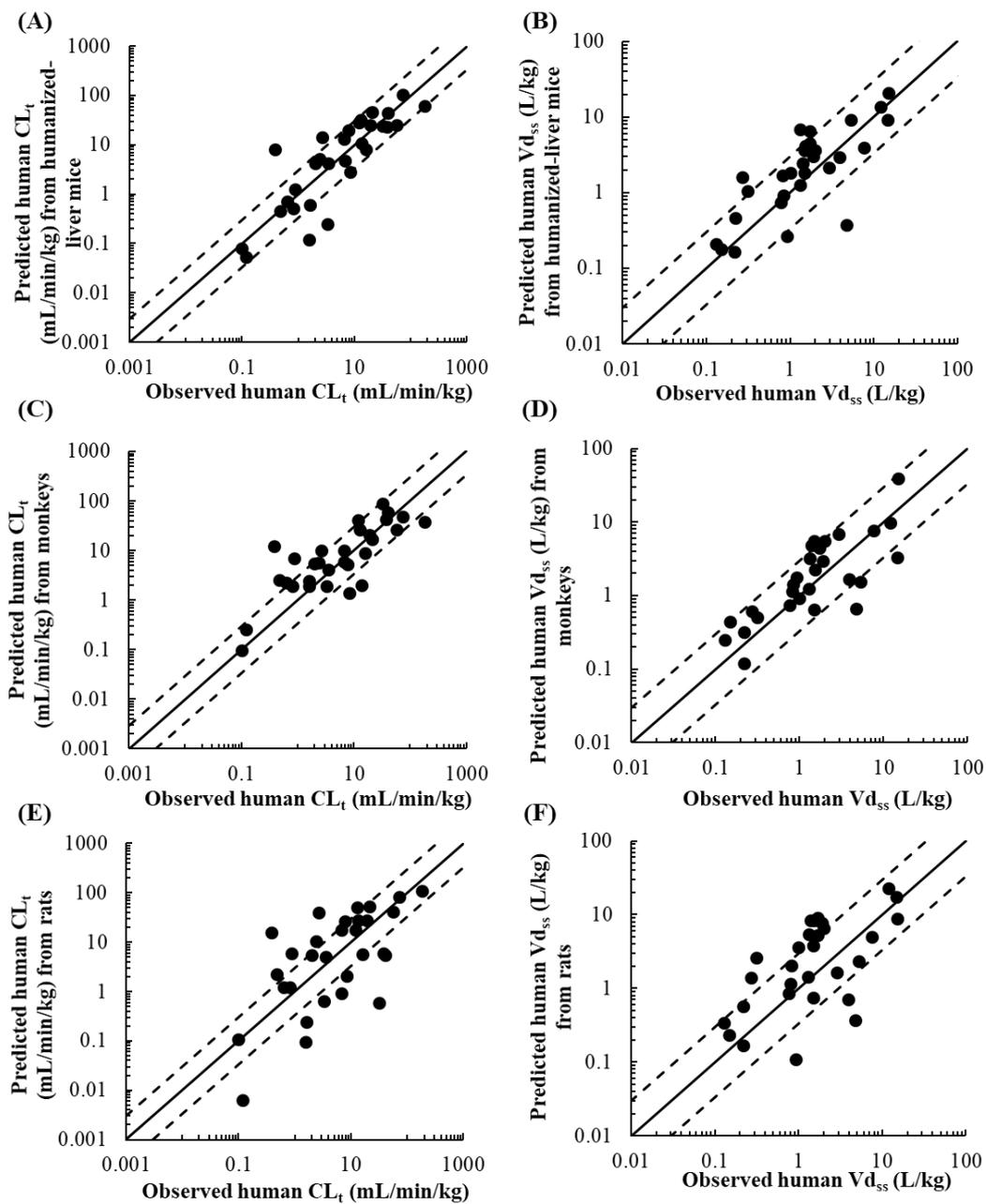
-, Unavailable data from intravenous administration.

<sup>a</sup> The parameters,  $V_{d_{ss}}$ , for humans were quoted from the literature: albuterol, antipyrine, clonazepam, dapsone, diazepam, diclofenac, dolasetron, entacapone, gemcitabine, ibuprofen, imipramine, ketanserin, ketoprofen, moxifloxacin, naltrexone, pefloxacin, sumatriptan, and zaleplon (Lombardo and others, 2013a); indomethacin, mycophenolic acid, and telmisartan (Deguchi and others, 2011); BIBX 1382 (Hutzler and others, 2014); *O*<sup>6</sup>-benzylguanine (Tserng and others, 2003); XK-469 (Hutzler and others, 2013; Undevia and others, 2008); Carbazeran (Kaye and others, 1984); fasudil (Sanoh and others, 2015); Benzydamine (Baldock and others, 1991); bazedoxifene (European medicines agency approval document); zoniporide (Dalvie and others, 2010).

**Table I-5** Observed and predicted human CL<sub>t</sub> using SSS with humanized-liver mice, monkeys, and rats.

Compounds	Human Observed CL <sub>t</sub> <sup>a</sup> (mL/min/kg)	Predicted CL <sub>t</sub> (mL/min/kg)				
		SSS of humanized- liver mice	SSS of monkeys		SSS of rats	
			total- based	unbound- based	total- based	unbound- based
Albuterol	7.80	19.80	5.19	4.94	26.66	26.64
Antipyrine	0.64	0.71	2.26	2.64	1.24	1.25
Bazedoxifene	6.67	13.19	6.03	10.92	17.86	10.59
Benzydamine	2.67	14.12	10.12	5.85	39.54	11.94
BIBX 1382	40.00	43.95	57.99	64.69	5.43	4.08
Carbazeran	37.60	23.16	43.18	27.97	6.06	2.14
Clonazepam	0.88	1.28	7.03	6.04	5.86	4.06
Dapsone	0.48	0.45	2.50	4.09	2.24	1.92
Diazepam	0.38	7.93	12.04	5.85	15.88	2.10
Diclofenac	3.50	4.15	4.18	3.45	5.01	1.34
Dolasetron	180.00	61.42	37.84	24.69	111.47	66.04
Entacapone	12.00	27.85	41.91	33.04	17.53	8.19
Fasudil	73.20	105.54	47.79	55.39	81.65	74.55
Gemcitabine	32.00	24.14	86.99	86.99	0.59	0.63
Ibuprofen	0.82	0.51	1.89	1.00	1.22	0.14
Imipramine	13.00	31.95	26.10	36.30	51.21	47.97
Indomethacin	1.58	0.12	1.90	1.40	0.09	0.05
Ketanserin	6.70	4.87	10.21	10.48	0.92	1.67
Ketoprofen	1.60	0.60	2.42	1.69	0.24	0.04
Moxifloxacin	2.40	5.16	5.65	6.87	10.33	12.88
Mycophenolic acid	3.31	0.25	1.89	2.39	0.64	0.37
Naltrexone	57.00	24.84	26.78	28.14	42.03	42.09
<i>O</i> <sup>6</sup> -Benzylguanine	13.60	10.68	2.01	1.60	28.20	14.05
Pefloxacin	2.00	4.15	5.42	6.98	5.49	5.44
( <i>S</i> )-Naproxen	0.10	0.08	0.10	0.08	0.11	0.002
Sumatriptan	19.00	25.58	21.11	23.06	27.95	26.84
Telmisartan	8.40	2.78	1.39	1.00	2.11	1.22
XK-469	0.12	0.05	0.25	0.10	0.006	0.004
Zaleplon	16.00	7.96	9.05	7.63	5.64	5.05
Zoniporide	21.00	45.68	17.28	20.01	52.92	43.88

<sup>a</sup> The parameters, CL<sub>t</sub>, for humans were quoted from the literature: albuterol, antipyrine, clonazepam, dapsone, diazepam, diclofenac, dolasetron, entacapone, gemcitabine, ibuprofen, imipramine, ketanserin, ketoprofen, moxifloxacin, naltrexone, pefloxacin, sumatriptan, and zaleplon (Lombardo and others, 2013a); indomethacin, mycophenolic acid, and telmisartan (Deguchi and others, 2011); BIBX 1382, carbazeran, and zoniporide (Hutzler and others, 2013; Koyanagi and others, 2014), *O*<sup>6</sup>-benzylguanine and XK-469 (Akabane and others, 2012a); fasudil and (*S*)-naproxen (Sanoh and others, 2015); benzydamine (Baldock and others, 1991; Hutzler and others, 2013); bazedoxifene (EMA, 2009).



**Figure I-1** Relationships of  $CL_t$  (A) and  $Vd_{ss}$  (B) between the observed human parameters and the predicted ones from SSS of humanized-liver mice. Relationship of  $CL_t$  (C) and  $Vd_{ss}$  (D) between the observed human parameters and the predicted ones from SSS of monkeys. Relationship of  $CL_t$  (E) and  $Vd_{ss}$  (F) between the observed human parameters and the predicted ones from SSS of rats. The solid lines represent unity and the area between the dotted lines represent the range within a 3-fold of unity.

**Table I-6** Prediction accuracy for human  $V_{d_{ss}}$  and  $CL_t$  using model compounds.

	Humanized-liver mice	Monkeys		Rats	
	Total-based	Total -based	Unbound d -based	Total -based	Unbound d -based
$V_{d_{ss}}^b$					
Within 3-fold error (%)	79.3	82.8	75.9	55.2	69.0
AAFE	2.0	2.1	2.0	2.9	2.8
$CL_t^b$					
Within 3-fold error (%)	83.3	70.0	73.3	46.7	36.7
AAFE	2.3	2.4	2.4	4.1	5.0

<sup>a</sup> The results of 29 compounds excepted for (*S*)-naproxen.

<sup>b</sup> The results of 30 compounds.

#### 第4節 考察

ヒト  $V_d$  と  $CL$  の予測精度改善を目的として、過去にこれらの PK パラメータ予測について数多く検討されてきた (Dedrick, 1973; Houston, 1994; Iwatsubo and others, 1997; Mordenti, 1986).  $V_{d_{ss}}$  値の予測については、一般的に薬物の物理化学的性質など、動物種に依存しない要素が決定因子となることが知られているため、 $CL$  予測に比べ種差が問題にならず信頼性の高い予測が可能であるという報告がある (Obach and others, 2008). ヒト  $CL$  予測が困難とされる要因は、代謝酵素やトランスポーターには発現量、固有活性、基質特異性に種差がある点、医薬品開発の初期段階では、化合物の詳細な代謝経路や排泄経路の種差が決定されていない場合も多い点が挙げられる (Lombardo and others, 2013a). ヒト肝細胞移植マウスは肝臓がヒト型の機能を示すことが知られていることから、肝代謝やトランスポーターの種差を克服できる動物モデルと考えられる. 本研究では精度の高いヒト  $V_{d_{ss}}$  と  $CL_t$  予測法の構築を目的として、様々な代謝経路を示す化合物のヒト肝細胞移植マウス、サル、ラットのデータを用いてヒト  $V_{d_{ss}}$  および  $CL_t$  値の予測精度を比較した. その結果、ヒト肝細胞移植マウスはサルやラットに比べて、ヒトの  $CL_t$  と  $V_{d_{ss}}$  の予測精度が高いことがわかった (Table I-6).

ヒト  $V_{d_{ss}}$  値予測について、ヒト肝細胞移植マウス、サルおよびラットから SSS を用いて予測精度を比較したところ (Table I-6), ヒト肝細胞移植マウスとサルは高い精度を示し、実測値の 3 倍以内の予測精度は、ヒト肝細胞移植マウスで 79.3%, サルで 82.8%であった. ラットは予測精度が低く、55.2%であった. AAFE 値はヒト肝細胞移植マウスで 2.0, サルで 2.1, ラットで 2.9 であった. 以上の結果より、ヒトの  $V_{d_{ss}}$  予測において、ヒト肝細胞移植マウスとサルは同等の高い予測精度を示した. 一方、Unbound-based のヒト  $V_{d_{ss}}$  予測では顕著な改善は見られず、この結果は Lombardo らの報告と一致している (Lombardo and others, 2013b). 非結合型薬物のみが細胞膜を透過し、臓器、組織へ移行することから、血漿中のタンパク結合は  $V_d$  に影響を与える重要な因子であり、PPB の種差が  $V_d$  の種差の要因の一つと考えられる. 例えば、主な血漿中タンパクである Ab を生合成する各動物の肝機能の種差、Ab への結合性の種差などがタン

パク結合の違いとして観測される。ヒト肝細胞移植マウスでは hAb が血漿中に分泌されていることから、タンパク結合率のプロファイルもヒトと類似している可能性が高く、ヒトの  $Vd_{ss}$  予測で高い精度を示した一因であると推測される。ヒト肝細胞移植マウスの PPB の網羅的な評価は第 3 章にて報告する。

ヒト肝細胞移植マウス、サル、ラットを用いたヒト  $CL_t$  値予測では、ヒト肝細胞移植マウスから得られた予測  $CL_t$  値は、実測値に対する 3 倍以内の予測精度が最も高く (83.3%), 最も高い AAFE 値 (2.3) を示した。P450 酵素で代謝される化合物の CL 予測方法は確立されているが、non-P450 酵素で代謝される化合物の CL 予測は代謝酵素活性の種差が大きいため困難であると報告されている (Ito and Houston, 2004; Ito and others, 1998; Obach, 1999; Obach and others, 1997; Shibata and others, 2002)。以上の背景から、本研究で主に non-P450 酵素で代謝される化合物を選択しており (25/30 化合物)、ヒト肝細胞移植マウスが non-P450 基質のヒト PK 予測の有用なモデルであることが示唆された。サルにおいてもヒト  $CL_t$  の予測値の実測値に対する 3 倍以内の予測精度は 70.0%, AAFE 値は 2.4 と高い精度を示し (Table I-6), 本研究で得られたサルの予測精度は、既報の知見を裏付けるものであった (Lombardo and others, 2013a; Ward and Smith, 2004)。3 種の動物モデルの中で、ラットは  $CL_t$  の予測精度が最も低く、3 倍以内の予測精度は 46.7%, AAFE 値は 4.2 であった (Table I-6)。ラットは従来、創薬研究において動物モデルとしてよく使用されているモデルであるが、ヒト肝細胞移植マウスやサルに比べてヒトの  $Vd_{ss}$  および  $CL_t$  予測の精度が低いことが明らかとなった。本研究では、ヒト肝細胞移植マウスが 3 つの動物モデルの中で最もヒトの CL 予測精度が高かった。

サルとラットから算出した Unbound-based のヒト  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  予測精度には Total-based の予測に比べ有意な改善は見られなかった。理論的には非結合型薬物濃度に基づいた Unbound-based 予測の方が Total-based の予測よりも精度が高いと考えられるが、他の報告結果と同様に、本研究では  $f_{up}$  の組み込みにより予測精度は低下した (Lombardo and others, 2013a; Lombardo and others, 2013b)。非結合型薬物濃度に基づく予測が改善しなかった理由の 1 つに、*in vitro* 法で算出した  $f_{up}$  値が、化合物の吸着や沈殿などに起因する実験操作上の誤差により、*in*

*vivo* での  $f_{up}$  値と同等ではなかった可能性が推察される。

ヒト肝細胞移植マウスからの  $CL_t$  値予測において 4 つの化合物 (diazepam, benzydamine, mycophenolic acid, indomethacin) の予測はヒト実測値の 3 倍から外れた値を示した。Diazepam と benzydamine については過大, mycophenolic acid と indomethacin については過小に予測されていた。Diazepam の  $CL_t$  は全ての動物モデルで過大に予測されており, ヒトの実測値と比較して, ヒト肝細胞移植マウス, サル, ラットからの予測値はそれぞれ 20.9 倍, 31.7 倍, 41.8 倍であった (Fig. I-1)。Sanoh らも, diazepam に関して, ヒトの実測  $CL_t$  値に対するヒト肝細胞移植マウス, ラットからの予測  $CL_t$  値との乖離を指摘している (Sanoh and others, 2015)。マウスでの diazepam の  $CL_t$  がヒトに比べて高く, ヒト肝細胞移植マウス肝臓中の 15% 程度の残存マウス肝細胞の影響が diazepam の  $CL_t$  の過大予測の要因と報告されている (Klotz and others, 1976)。

Benzydamine については, ヒト肝細胞移植マウスから予測した  $CL_t$  がヒト実測値に対して 5.3 倍であった。Benzydamine はヒトでは主に FMO によって代謝され, benzydamine *N*-oxide が生成することが報告されている (Lang and Rettie, 2000)。FMO は肝臓ミクロソームや肝細胞に存在する non-P450 酵素であり, 窒素および硫黄原子の酸化反応を触媒する。Benzydamine *N*-oxide の形成には P450 も寄与していることが報告されており (Lang and Rettie, 2000), benzydamine の肝臓での代謝には, FMO と P450 の両酵素の関与が推測される。マウス肝臓ミクロソームでの benzydamine の代謝速度は, ヒト肝臓ミクロソームでの代謝速度に比べて高いことが示されている (data not shown)。以上のことから, diazepam や benzydamine の過大な予測は, ヒト肝細胞移植マウスの肝臓に残存するマウス肝細胞による代謝に起因する可能性が示唆され, そのような化合物はヒト肝細胞移植マウスモデルでの予測に適さないと考えられる。マウスとヒトの肝臓ミクロソームまたは肝細胞での代謝速度の比較により, ヒト肝臓よりもマウス肝臓での代謝速度が高い化合物を除外することで, ヒト肝細胞移植マウスでの予測に適した化合物を選択することができる。今後, RI 値を更に改善することができれば, ヒト肝細胞移植マウスの肝臓中の残存マウス肝細胞の影響を低減させることができると考えられる。

Mycophenolic acid と indomethacin については過小に予測されており，ヒト実測  $CL_t$  値がヒト肝細胞移植マウスからの予測  $CL_t$  値に比べそれぞれ 13.3 倍，13.4 倍であった．Mycophenolic acid はヒト肝臓ではグルクロン酸抱合が主要な代謝経路として報告されており，同抱合代謝はヒト腎臓と空腸でも観察されている (Bowalgaha and Miners, 2001)．Indomethacin はヒトで UGT2B7, UGT1A9 によって代謝され，腎および胆汁排泄を介して消失する (Duggan and others, 1972)．両化合物は，ヒトでの肝外代謝と排泄がヒト肝細胞移植マウスのそれより寄与が大きいため， $CL_t$  値が低く予測されたと推測される．ヒト肝細胞移植マウスにおいて，化合物が過小に評価されるかどうかを判断するためには，化合物の主要代謝酵素や排泄経路を明らかとし，ヒト肝細胞移植マウスを用いたヒトの  $CL_t$  予測の *in vivo* 評価と組み合わせることが必要である．小腸マイクロソームを用いた *in vitro* 試験も有用であると考えられる．

AO 基質である 7 化合物 (BIBX 1382, carbazeren, fasudil, *O*<sup>6</sup>-benzylguanine, XK-469, zaleplon, zoniporide) については，全ての化合物がヒト肝細胞移植マウスより予測した  $CL_t$  値がヒト実測値の 3 倍以内であった．サルからの  $CL_t$  予測では，7 化合物中 6 化合物がヒト実測値の 3 倍以内に予測されており，サルも AO 代謝を受ける化合物のヒト  $CL_t$  予測に適したモデルであることが示された．サルでは *O*<sup>6</sup>-benzylguanine のみが実測  $CL_t$  値が予測  $CL_t$  値の 6 倍以上であった．ヒトの肝細胞と肝マイクロソームを用いた検討では，*O*<sup>6</sup>-benzylguanine の主要代謝物である *O*<sup>6</sup>-benzyl-8-oxoguanine の生成には AO だけでなく P450 (CYP1A2 と CYP3A4) も関与していることが示されている (Roy and others, 1995)．したがって，ヒトでの P450 による *O*<sup>6</sup>-benzylguanine 代謝の寄与がサルを用いた場合の過小評価の要因の一つであると考えられる．Hutzler らは，BIBX 1382 の代謝研究の結果から，サルがヒトの AO 代謝の予測に有用なモデルになり得ることを示唆している (Hutzler and others, 2014)．本研究では，AO 基質のヒト  $CL_t$  値を予測するための動物モデルとして，ヒト肝細胞移植マウスだけでなくサルも有用であることを示した．これはサルの AO 活性がヒトと同様に高いことを反映していると考えられる (Pryde and others, 2010)．

ヒト肝細胞移植マウスは，霊長類を実験に使用する場合の倫理的問題を回

避できる点で、サルよりも実用的な動物モデルと考えられる。しかし、創薬段階での費用対効果の面において、ヒト肝細胞移植マウスは依然として作製コストが高く貴重なモデルである。そこで、本研究では複数化合物をまとめて、低用量で投与するカセット投与法を選択した。本研究で使用した化合物のうち、albuterol, dapsone, diazepam, diclofenac, fasudil, ibuprofen, ketoprofen, (S)-naproxen, zileplon の 9 化合物について単品投与によるヒト肝細胞移植マウスの  $CL_t$  値が報告されており (Sanoh and others, 2015; Sanoh and Ohta, 2014), fasudil と (S)-naproxen を除き、カセット投与で得られた値の 2 倍以内の範囲内であった。したがって、カセット投与により得られたヒト肝細胞移植マウスの  $CL_t$  値は、文献で報告されている単品投与によるヒト肝細胞移植マウスの  $CL_t$  値と同等であることが示された。Fasudil については、カセット投与、単品投与ともにマウスの肝血流を超えていたこと、(S)-naproxen は低い  $CL_t$  を示すことから、 $CL_t$  値の算出に切り捨て誤差が影響する可能性がある。ヒト肝細胞移植マウスの反復使用は、使用動物数およびコストを削減するためにも有益であり、本研究ではカセット投与法と動物の反復使用を用いて、3 匹のヒト肝細胞移植マウスで 30 化合物の *in vivo* 評価を行うことに成功した。

## 第 5 節 小括

ヒト肝細胞移植マウスのヒト PK 予測への有用性の評価のため、ヒト肝細胞移植マウス、サル、ラットを用いて、SSS 法により多様な代謝経路で代謝される 30 種類の化合物のヒト  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  を予測した。その結果、ヒト肝細胞移植マウスから予測したヒト  $Vd_{ss}$  はサルと同等の高い予測精度を示し、代謝の種差により予測が困難とされるヒト  $CL_t$  についてもヒト肝細胞移植マウスが最も高い予測精度を示した。

本研究によりヒト肝細胞移植マウスは、ヒト型の肝代謝およびタンパク結合に基づく組織移行性を示し、創薬段階の化合物のヒト予測について、代謝の種差を乗り越えることができる、有望なツールであることを明示した。

## 第II章 ヒト肝細胞移植マウスを用いた医薬候補品のヒト消失半減期予測

### 第1節 緒言

臨床試験の際に候補化合物の正確な投与計画を提案するためには、創薬段階でのヒト PK パラメータの予測が重要である。薬物の血漿中濃度の  $t_{1/2}$  は、投与計画の設定のための重要なパラメータの一つである。しかし、ヒトでの  $t_{1/2}$  値予測の報告は少なく、精度が不十分であることから、予測精度改善の必要がある (Lombardo and others, 2016; Sarver and others, 1997; Vuppugalla and others, 2011). UCN-01 (Hoke and others, 2000) や compound A (自社報告書) は、臨床試験において予想外に長い  $t_{1/2}$  値を示した開発候補品である。薬理学的効果に関して、例えば慢性疾患の治療薬においては、薬物の長い  $t_{1/2}$  は、有効濃度を維持し、投与頻度を減らすために好ましいプロファイルである。一方、UCN-01 や compound A のような、薬物のヒトでの長すぎる  $t_{1/2}$  は、薬物の蓄積、有害事象時の薬物の体内からの速やかな除去が困難である等の理由による開発中止、そして薬物開発期間の延長といった問題が生じる可能性がある。Smith らは、一般的に 1 日 1 回投与の経口薬では 12–48 時間の  $t_{1/2}$  が理想的であることを示唆している (Smith and others, 2017). 臨床試験の際、予期せぬ長時間の薬物曝露を回避するためには、非臨床段階でのヒトでの  $t_{1/2}$  値を正確に予測する方法が不可欠である。

ヒト肝細胞移植マウスは肝臓の 85%以上がヒト肝細胞で構築され、肝臓にはヒト薬物代謝酵素やトランスポーターを発現している (Katoh and others, 2004). 第 I 章ではヒト肝細胞移植マウスを用いたヒトの  $V_{d_{ss}}$  と  $CL_t$  の予測精度を、30 種類の化合物で検証し、同マウスはこれらのパラメータを予測するのに適したモデルであることを示した。Sanoh らはヒト肝細胞移植マウスを用いたヒトでの  $t_{1/2}$  の予測可能性について報告しているが、比較的短い  $t_{1/2}$  値を有する化合物を用いており、ヒトでの  $t_{1/2}$  値が 30 時間以上の化合物は評価していない (Sanoh and others, 2012a). そこで、本研究ではヒト肝細胞移植マウスを用いて、ヒトでの静脈内投与および経口投与時の  $t_{1/2}$  値が 7–581 時間と比較的長い化合物を含む 14 化合物を選択し、 $t_{1/2}$  予測について検証した。

一般的に、薬物の経口投与後の消失相における  $t_{1/2}$  は、薬物の血漿中濃度推

移の終点付近の傾きから算出しているため、 $t_{1/2}$  予測にはヒトの薬物の血漿中濃度推移予測が必要である。動物モデルからヒトの薬物の血漿中濃度推移を予測する方法として、Wajima superposition 法がある。同方法は、薬物の血漿中濃度推移が動物種間で類似するという仮定に基づき、ヒトを含む様々な動物種の血漿中濃度推移を体重差等で正規化した曲線は重ね合わせ可能であるという前提により算出する方法である (Wajima and others, 2004)。Wajima superposition 法の血漿中濃度推移予測の有用性については、PhRMA (Pharmaceutical Research and Manufacturers of America)、あるいは Lombardo らの研究において 54 の市販薬により報告されている (Lombardo and others, 2016; Vuppugalla and others, 2011)。本研究では、ヒト肝細胞移植マウスと免疫不全マウス (ヒト肝細胞移植マウスの宿主である CB17/Icr-Prkdcscid/CrlCrlj マウス) を用いて、選択した 14 化合物の静脈内投与後の血漿濃度推移を取得し、これらの薬物のヒトの  $t_{1/2}$  値の予測精度を評価した。静脈内投与後の血漿中濃度推移が 2-コンパートメントモデルに従う化合物のヒト  $t_{1/2}$  の予測には、Wajima superposition 法の血漿中濃度推移を採用し、1-コンパートメントモデルに従う化合物においては、予測した  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  の比より求めた。

## 第2節 実験材料と実験方法

### II-2-i) 試薬

Aripiprazole, compound A, compound B は自社 (Kanagawa, Japan) において合成した。Chlorthalidone, pyrimethamine, tamoxifen は富士フィルム和光純薬工業株式会社より購入した。Mefloquine と phenobarbital は東京化成工業株式会社 (Tokyo, Japan) より購入した。UCN-01 と warfarin は Sigma-Aldrich 社 (St. Louis, MO, USA) より購入した。Gavestinel は, Tocris Bioscience 社 (Bristol, UK) から購入した。Amiodarone は Synfine Research 社 (Richmond Hill, ON, Canada) から購入した。Pazopanib は KareBay Biochem 社 (Monmouth Junction, NJ, USA) から購入した。Probucol は MP Biomedicals 社 (Santa Ana, CA, USA) から購入した。その他の試薬は HPLC 用試薬、試薬特級またはそれに相当する試薬を使用した。

## II-2-ii) 使用動物

本研究で使用した動物の飼育・実験は武田薬品工業株式会社湘南研究所の IACUC の承認のもと、AAALAC International の承認を受けた動物倫理規則に従って行った。雄性免疫不全マウス (CB17/Icr-Prkdcscid/CrlCrlj, 9-14 weeks old) は日本チャールズリバー社から購入した。雄性ヒト肝細胞移植マウス (PXB マウス®, 15-20 weeks old) は、フェニックスバイオ社から購入した。移植用のヒト肝細胞 (Lot BD195) は、BD Biosciences 社 (Woburn, MA, USA) から入手した。ヒト肝細胞移植マウスにおけるヒトの RI 値は血液中の hAb 量の測定により評価し (Tateno and others, 2004), 本研究で使用したヒト肝細胞移植マウスの RI 値は 85–95%であった。動物は温湿度管理された施設内にて 12 時間明暗サイクル下に飼育した。

## II-2-iii) 薬物動態試験

薬物動態試験には Table II-1 に示した 14 化合物を使用し、化合物 (カセット投与の場合は 1 群 10 化合物まで) を DMA または生理食塩水に溶解し、DMA /生理食塩水で希釈し (1/1, v/v), 使用した。ヒト肝細胞移植マウス (UCN-01 では  $n=3$ , その他では  $n=4$ ) および免疫不全マウス (UCN-01 では  $n=3$ , その他では  $n=4$ ) に各化合物 0.1 mg/kg の薬液 (1 mL/kg) を大腿静脈より静脈内投与した。血液採取時間は 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72, 96 時間 (血液量 20  $\mu$ L 以下) で尾静脈から抗凝固剤としてヘパリンを用いて血液を採取し、1,000 g, 4°Cで 10 分間遠心分離し血漿を得た。

## II-2-iv) 薬物濃度測定

血漿 (5  $\mu$ L) を、IS (Table II-1) を含むアセトニトリルと混合し 4,283 g, 4°Cで 5 分間遠心分離した。上清を LC-MS/MS の移動相で希釈した。LC-MS/MS は、LC 部に Prominence UFLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い、脱気装置は DGU-20A, 送液ポンプは 10AD-VP または LC-20AD, オートサンプラーは SIL-20ACHT, カラムオーブンは CTO-20AC を使用した。MS 部は API 5000 (株式会社エービー・サイエックス) を使用した。解析には、Analyst software™ version 1.6.2

(SCIEX) を使用した。各化合物は Table II-1 に示すフラグメンテーション値を用いて検出した。LC と MS の分析条件は以下の通りである。

カラム: Shim-pack XR-ODS (2.0 mm i.d. × 30 mm, 2.2 μm; Shimadzu, Tokyo, Japan)

移動相 A: 0.2% (v/v) formic acid in 0.01 mol/L ammonium formate (pH 3.0)

移動相 B: 0.2% (v/v) formic acid in acetonitrile

流速: 0.7 mL/min.

カラム温度: 50°C

グラジエント条件 (移動相Bの%): 5% (0-0.2 min), 5-99% (0.2-1.1 min), 99% (1.1-1.8 min), 99-5% (1.8-1.81 min), 5% (1.81-2.6 min)

## II-2-v) 薬物動態算出

PK パラメータ,  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  は WinNonlin Std. Ver 7.0 (Certara USA Inc., Princeton, NJ, USA) の Akaike's information criterion (AIC) 値に基づいて決定された 1-コンパートメントモデルまたは 2-コンパートメントモデルの血漿濃度推移を用いて決定した。血漿濃度推移が 1-コンパートメントモデルに従う化合物はノンコンパートメント法で解析した。静脈内投与後の  $CL_t$  は式 (1) より求めた。血漿中濃度時間曲線下面積 ( $AUC_{iv}$ ) の値は時間 0 から投与後の測定可能な濃度を用いて台形法により算出した。 $Vd_{ss}$  は  $CL_t$ ,  $AUC_{iv}$  と  $AUMC_{iv}$  (1 次モーメント曲線下面積) から、式 (2) を用いて算出した。 $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  値は、個々のマウスについて算出し、各群の平均値を記載した。計算は Microsoft Excel 2010 を用いて行った。

$$CL_t = \frac{Dose}{AUC_{iv}} \quad (1)$$

$$Vd_{ss} = \frac{AUMC_{iv}}{AUC_{iv}} \cdot CL_t \quad (2)$$

2-コンパートメントモデルに従う化合物の  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  値は、以下の式 (3)–(10) を用いて推定した。

$$C = A \cdot \exp(-\alpha \cdot t) + B \cdot \exp(-\beta \cdot t) \quad (3)$$

C は濃度， t は投与後の時間であり， A， B，  $\alpha$ ，  $\beta$  は 2-コンパートメントモデルの係数または指数である。

$$AUC = \frac{A}{\alpha} + \frac{B}{\beta} \quad (4)$$

$$CL_t = \frac{\text{Dose}}{AUC} \quad (5)$$

$$k_{21} = \frac{A \cdot \beta + B \cdot \alpha}{A + B} \quad (6)$$

$$k_{10} = \frac{\alpha \cdot \beta}{k_{21}} \quad (7)$$

$$k_{12} = \alpha + \beta - k_{21} - k_{10} \quad (8)$$

$$V_c = \frac{\text{Dose}}{A + B} \quad (9)$$

$$Vd_{ss} = \frac{k_{12} + k_{21}}{k_{21}} \cdot V_c = V_c \cdot \left(1 + \frac{k_{12}}{k_{21}}\right) \quad (10)$$

ここで  $k_{12}$ ，  $k_{21}$  および  $k_{10}$  は 2-コンパートメントモデルの 1 次移動速度定数であり，  $V_c$  は 2-コンパートメントモデルの中央コンパートメントの  $Vd$  である。

$$C_{ss} = \frac{\text{Dose}}{Vd_{ss}} \quad (11)$$

$$MRT = \frac{Vd_{ss}}{CL_t} \quad (12)$$

MRT (mean residence time) は平均滞留時間である。 2-コンパートメントモデルの PK 分析は， WinNonlin Std. Ver 7.0 を用いて実施した。

## II-2-vi) 単種外挿法によるヒトクリアランスと分布容積の予測方法

ヒトの  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  は， SSS により式 (13)， 式 (14) を用いて予測した。 生理学的パラメータに基づき，  $CL_t$  ( $a = 0.75$ ； 血流， 濾過作用等) と  $Vd_{ss}$  ( $b = 1.0$ ； 臓器重量， 生理的体積など) の予測には， 固定指数値 ( $a$ ，  $b$ ) を用いた。 ヒトの

BW は 60 kg を使用した (Hosea and others, 2009). ヒト肝細胞移植マウスと免疫不全マウスの BW は, 動物の BW の平均値, それぞれ 0.020 kg, 0.026 kg を使用した. ヒトの MRT は, 式 (15) 従い, 予測したヒト  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  の値から算出した.

$$CL_{t, human} = CL_{t, animal} \cdot \left( \frac{BW_{human}}{BW_{animal}} \right)^a \quad (13)$$

$$Vd_{ss, human} = Vd_{ss, animal} \cdot \left( \frac{BW_{human}}{BW_{animal}} \right)^b \quad (14)$$

$$MRT_{human} = \frac{Vd_{ss, human}}{CL_{t, human}} \quad (15)$$

## II-2-vii) Wajima superposition によるヒトパラメータ算出

Wajima らは, 式 (16) で記述される血漿中濃度推移の正規化曲線を定義した (Wajima and others, 2004). 血漿濃度が各動物種の  $C_{ss}$  で, 時間が各動物種の MRT で正規化した血漿中濃度推移は全ての動物種間で類似し, 重ね合わせ可能であることを前提としている.

$$C' = \frac{A}{C_{ss}} \cdot \exp(-\alpha \cdot MRT \cdot t') + \frac{B}{C_{ss}} \cdot \exp(-\beta \cdot MRT \cdot t') \quad (16)$$

$C'$  は正規化された濃度 ( $C' = C/C_{ss}$ ) であり,  $t'$  は正規化された時間 ( $t' = t/MRT$ ) である.

$$C = \frac{C_{ss, human}}{C_{ss, animal}} \cdot A_{animal} \cdot \exp\left(-\alpha_{animal} \cdot \frac{MRT_{animal}}{MRT_{human}} \cdot t\right) + \frac{C_{ss, human}}{C_{ss, animal}} \cdot B_{animal} \cdot \exp\left(-\beta \cdot \frac{MRT_{animal}}{MRT_{human}} \cdot t\right) \quad (17)$$

式 (17) から, ヒトのパラメータ  $A$ ,  $B$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  は, 以下の式 (18)–(21) として記述され, これらよりヒトパラメータ  $A$ ,  $B$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  を算出した.

$$A_{human} = \frac{C_{ss, human}}{C_{ss, animal}} \cdot A_{animal} \quad (18)$$

$$B_{human} = \frac{C_{ss, human}}{C_{ss, animal}} \cdot B_{animal} \quad (19)$$

$$\alpha_{human} = \alpha_{animal} \cdot \frac{MRT_{animal}}{MRT_{human}} \quad (20)$$

$$\beta_{human} = \beta_{animal} \cdot \frac{MRT_{animal}}{MRT_{human}} \quad (21)$$

## II-2-viii) ヒトの半減期予測

血漿中濃度推移が 1-コンパートメントモデルに従う化合物については、式 (22) によりヒトの  $t_{1/2}$  を算出した。血漿中濃度推移が 2-コンパートメントモデルに従う化合物については、式 (21) から得られた  $\beta_{human}$  を用いて、式 (23) によりヒトの消失相の  $t_{1/2}$  を算出した。

$$t_{1/2, human} = \ln(2) \cdot \frac{Vd_{ss, human}}{CL_{t, human}} \quad (22)$$

$$t_{1/2, human} = \frac{\ln(2)}{\beta_{human}} \quad (23)$$

## 第3節 結果

### II-3-i) ヒト肝細胞移植マウスと免疫不全マウスの薬物動態パラメータの算出

式 (2)–(13) で算出した 14 化合物のヒト肝細胞移植マウスおよび宿主マウスである免疫不全マウスの PK パラメータ、 $CL_t$ ,  $Vd_{ss}$ ,  $MRT$ ,  $A$ ,  $B$ ,  $\alpha$ ,  $\beta$  を Table II-2, II-3 に示した。ヒト肝細胞移植マウスでは **chlorthalidone**, **phenobarbital**, **pyrimethamine**, **tamoxifen** については 1-コンパートメントモデルを用い、その他の化合物については 2-コンパートメントモデルを用いた。免疫不全マウスでは、**aripiprazole**, **chlorthalidone**, **mefloquine**, **phenobarbital**, **pyrimethamine**, **tamoxifen**, **UCN-01**, **compound A**, **compound B** については 1-コンパートメントモデルを用い、その他の化合物については 2-コンパートメントモデルを用いた。WinNonlin Std. Ver 7.0 による 2-コンパートメントモデルの解析では、終末相のフィッティングには最終時間から 4 時点以上を使用した。

### II-3-ii) ヒトの薬物動態パラメータの算出

Table II-2 および II-3 のパラメータを用いて、ヒトの PK パラメータ  $CL_t$ ,  $Vd_{ss}$ , MRT,  $\beta$  を算出した。ヒト肝細胞移植マウスと免疫不全マウスから得られたヒトの予測値を Table II-4 に示し、計算したヒトの  $t_{1/2}$  の予測値を Table II-5 にまとめた。14 化合物のヒトの実測  $t_{1/2}$  値は、文献値と武田内報告書から引用した (Table II-5)。ヒト肝細胞移植マウスを用いた場合、14 化合物のヒト  $t_{1/2}$  の予測値は、実測値の 2 倍以内の予測精度が 71.4% (10/14 化合物), 3 倍以内の予測精度が 85.7% (12/14 化合物) と高い予測精度であった。一方、ヒト肝細胞移植マウスの宿主である免疫不全マウスでは、ヒト  $t_{1/2}$  の予測値の 2 倍以内の予測精度が 7.1% (1/14 化合物), 3 倍以内の予測精度が 42.9% (6/14 化合物) にとどまった。ヒト肝細胞移植マウスおよび免疫不全マウスから予測したヒトの  $t_{1/2}$  の予測値と実測値と相関を Fig. II-1 に示した。

**Table II-1** Mass parameters and analytical conditions of 14 compounds.

Compounds	Ionization mode	Molecular ion	Product ion	Internal standard
Amiodarone	[M + H] <sup>+</sup>	646	100.1	diclofenac
Aripiprazole	[M + H] <sup>+</sup>	448.1	285.1	alprenolol
Chlorthalidone	[M - H] <sup>-</sup>	337.2	146	diclofenac
Compound A	[M + H] <sup>+</sup>	537.3	257.3	compound C
Compound B	[M + H] <sup>+</sup>	631.5	527	compound C
Gavestinel	[M - H] <sup>-</sup>	373.1	329	diclofenac
Mefloquine	[M + H] <sup>+</sup>	379.2	361.2	alprenolol
Pazopanib	[M + H] <sup>+</sup>	438.2	357.2	alprenolol
Phenobarbital	[M + H] <sup>+</sup>	233.3	198.1	alprenolol
Probucol	[M - H] <sup>-</sup>	515.4	236.4	diclofenac
Pyrimethamine	[M + H] <sup>+</sup>	249.2	233.2	alprenolol
Tamoxifen	[M + H] <sup>+</sup>	372.2	72.4	alprenolol
UCN-01	[M + H] <sup>+</sup>	483.2	88.1	alprenolol
Warfarin	[M - H] <sup>-</sup>	307.16	161	diclofenac
Alprenolol	[M + H] <sup>+</sup>	250.3	116.3	
Diclofenac	[M - H] <sup>-</sup>	294.03	249.9	Internal standard
Compound C	[M + H] <sup>+</sup>	549.3	188.4	

**Table II-2** Calculated parameters from humanized liver mice.

Compounds	Compartment model	Calculated parameters from humanized liver mice <sup>a</sup>			Fitted parameters from humanized liver mice <sup>b</sup>			
		CL <sub>t</sub> (mL/min/kg)	V <sub>dss</sub> (L/kg)	MRT (h)	<i>A</i> (ng/mL)	<i>B</i> (ng/mL)	<i>α</i> (h <sup>-1</sup> )	<i>β</i> (h <sup>-1</sup> )
Amiodarone	2	16.215	16.609	17.07	26.5 ± 14.5	3.89 ± 1.36	1.29 ± 0.69	0.0473 ± 0.0134
Aripiprazole	2	22.487	17.936	13.29	11.1 ± 3.1	3.97 ± 0.88	0.926 ± 0.372	0.0639 ± 0.0067
Chlorthalidone	1	15.783 ± 4.033	3.929 ± 0.512	4.48 ± 1.88	-	-	-	-
Compound A	2	2.695	11.726	72.52	115 ± 61	7.9 ± 0.7	5.2 ± 1.4	0.0133 ± 0.0024
Compound B	2	114.829	14.74	2.14	31.7 ± 14.9	2.27 ± 0.49	5.04 ± 1.35	0.276 ± 0.055
Gavestinel	2	0.77	0.114	2.46	1730 ± 127	63.4 ± 8.1	1.03 ± 0.055	0.131 ± 0.007
Mefloquine	2	13.866	30.399	36.54	18.1 ± 3.5	2.23 ± 0.565	0.841 ± 0.202	0.0226 ± 0.0138
Pazopanib	2	0.371	0.131	5.87	994 ± 82	65.6 ± 24.8	0.281 ± 0.029	0.0691 ± 0.0118
Phenobarbital	1	6.067 ± 1.650	8.193 ± 4.255	21.54 ± 4.78	-	-	-	-
Probucol	2	1.166	2.895	41.38	46.6 ± 10.9	30.1 ± 3.9	0.479 ± 0.211	0.0226 ± 0.0021
Pyrimethamine	1	6.150 ± 0.633	8.394 ± 3.027	22.4 ± 5.93	-	-	-	-
Tamoxifen	1	90.117 ± 7.483	19.375 ± 1.142	3.60 ± 0.36	-	-	-	-
UCN-01	2	0.024	0.143	99.11	823 ± 143	629 ± 104	0.22 ± 0.10	0.0096 ± 0.0025
Warfarin	2	0.379	1.521	66.82	287 ± 66	27.5 ± 9.95	0.18 ± 0.59	0.0098 ± 0.0038

The symbol "-" specifies not calculated.

<sup>a</sup> In the one-compartment model, the calculated parameters were shown as mean±SD obtained by Eq. 1 and 2, and in the two-compartment model, the parameters were calculated according to Eq. 3-12 using the fitted parameters, *A*, *B*, *α* and *β*.

<sup>b</sup> In the two-compartment model, the fitted parameters were shown as estimated value±SD of the estimated variable.

**Table II-3** Calculated parameters from immunodeficient mice (host mice of humanized liver mice).

Compounds	Compartment model	Calculated parameters from immunodeficient mice <sup>a</sup>			Fitted parameters from immunodeficient mice <sup>b</sup>			
		CL <sub>t</sub> (mL/min/kg)	V <sub>dss</sub> (L/kg)	MRT (h)	A (ng/mL)	B (ng/mL)	$\alpha$ (h <sup>-1</sup> )	$\beta$ (h <sup>-1</sup> )
Amiodarone	2	20.329	8.936	7.33	33.3 ± 11.6	3.0 ± 1.7	0.803 ± 0.299	0.0738 ± 0.0351
Aripiprazole	1	14.450 ± 0.700	6.344 ± 0.745	7.31 ± 0.55	-	-	-	-
Chlorthalidone	1	46.400 ± 25.633	4.980 ± 2.085	2.58 ± 1.94	-	-	-	-
Compound A	1	10.98 ± 1.93	2.206 ± 0.254	3.41 ± 0.57	-	-	-	-
Compound B	1	17.000 ± 1.917	4.160 ± 0.577	4.08 ± 0.24	-	-	-	-
Gavestinel	1	145.783 ± 23.617	2.187 ± 0.354	0.25 ± 0.00	-	-	-	-
Mefloquine	1	16.599 ± 3.517	10.018 ± 3.206	10.34 ± 3.07	-	-	-	-
Pazopanib	2	0.233	0.129	9.23	1370 ± 524	260 ± 144	0.421 ± 0.41	0.0668 ± 0.0157
Phenobarbital	1	4.783 ± 0.450	2.556 ± 0.353	8.95 ± 1.26	-	-	-	-
Probucol	2	0.369	1.464	66.12	127 ± 65	64.4 ± 12.5	0.966 ± 0.797	0.0147 ± 0.0025
Pyrimethamine	1	4.833 ± 0.483	2.706 ± 0.150	9.39 ± 0.81	-	-	-	-
Tamoxifen	1	105.167 ± 6.900	18.595 ± 1.929	2.95 ± 0.26	-	-	-	-
UCN-01	1	35.717 ± 5.383	7.150 ± 0.710	3.35 ± 0.19	-	-	-	-
Warfarin	2	0.79	4.557	96.08	230 ± 31	9.8 ± 1.5	0.326 ± 0.042	0.007 ± 0.002

The symbol "-" specifies not calculated.

<sup>a</sup> In the one-compartment model, the calculated parameters were shown as mean±SD obtained by Eq. 1 and 2, and in the two-compartment model, the parameters were calculated according to Eq. 3-12 using the fitted parameters, *A*, *B*,  $\alpha$  and  $\beta$ .

<sup>b</sup> In the two-compartment model, the fitted parameters were shown as estimated value±SD of the estimated variable.

II-3-iii) ヒト肝細胞移植マウス，免疫不全マウスでの UCN-01 の血漿中濃度推移

本研究で最も長いヒトの  $t_{1/2}$  を示した UCN-01 の，ヒト肝細胞移植マウスおよび免疫不全マウスに静脈内投与後の血漿中濃度推移を Fig. II-2 に示す．UCN-01 の静脈内投与後のヒト肝細胞移植マウスの血漿中濃度推移は免疫不全マウスに比べて持続していた (Fig. II-2)．ヒト肝細胞移植マウスから得た UCN-01 のヒトでの予測値， $CL_t$ ， $V_{d_{ss}}$ ，消失相の  $t_{1/2}$  は，それぞれ 0.003 mL/min/kg，0.143 L/kg，536.2 時間であった (Table II-4，II-5)．UCN-01 のヒト肝細胞移植マウスの  $CL_t$ ， $V_{d_{ss}}$ ，消失相の  $t_{1/2}$  はそれぞれ 5.158 mL/min/kg，7.150 L/kg，16.0 時間であった (Table II-4，II-5)．

**Table II-4** Predicted human parameters from humanized liver mice and immunodeficient mice (host mice).

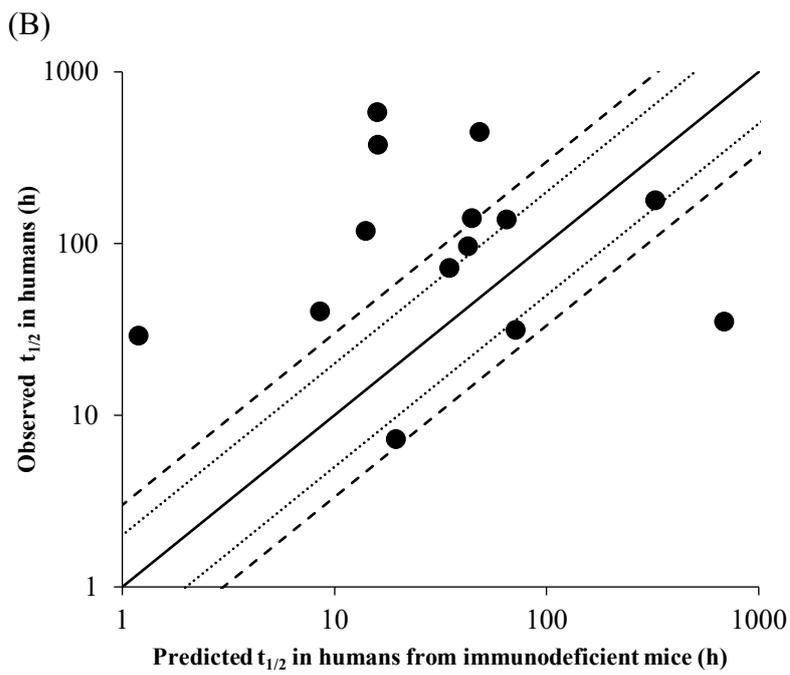
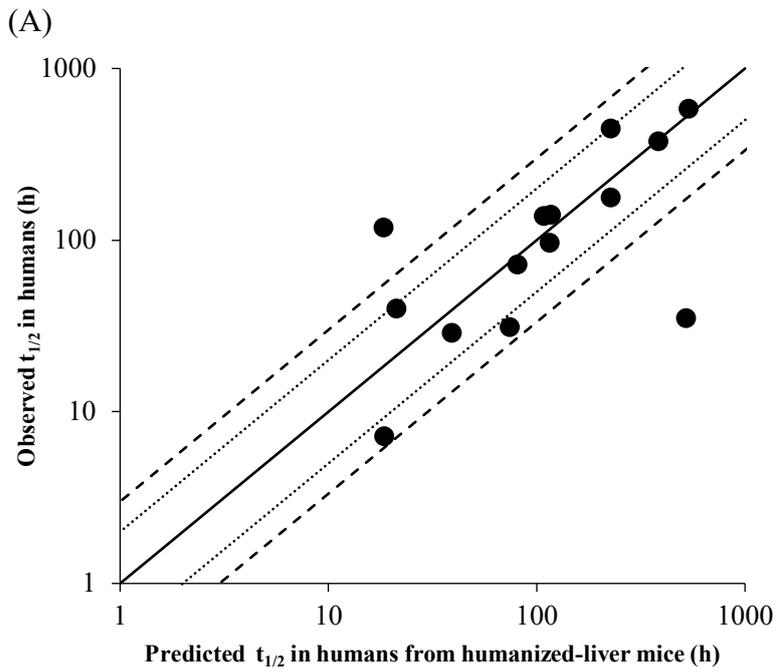
Compounds	humanized liver mice				immunodeficient mice			
	$CL_t$ (mL/min/kg)	$V_{d_{ss}}$ (L/kg)	MRT (h)	$\beta$ (h <sup>-1</sup> )	$CL_t$ (mL/min/kg)	$V_{d_{ss}}$ (L/kg)	MRT (h)	$\beta$ (h <sup>-1</sup> )
Amiodarone	2.190	16.609	126.39	0.0064	2.936	8.936	50.73	0.0107
Aripiprazole	3.037	17.936	98.42	0.0086	2.087	6.344	50.67	-
Chlorthalidone	2.132	3.929	30.72	-	6.701	4.98	12.39	-
Compound A	0.364	11.726	536.90	0.0018	1.586	2.206	23.18	-
Compound B	15.51	14.740	15.84	0.0372	2.455	4.160	28.24	-
Gavestinel	0.104	0.114	18.22	0.0177	21.054	2.187	1.73	-
Mefloquine	1.873	30.399	270.51	0.0031	2.382	10.018	70.10	-
Pazopanib	0.050	0.131	43.44	0.0093	0.034	0.129	63.95	0.0096
Phenobarbital	0.819	8.193	166.64	-	0.691	2.556	61.67	-
Probucol	0.157	2.895	307.32	0.0031	0.053	1.464	460.38	0.0021
Pyrimethamine	0.831	8.394	168.42	-	0.698	2.706	64.61	-
Tamoxifen	12.172	19.375	26.53	-	15.188	18.595	20.41	-
UCN-01	0.003	0.143	762.61	0.0013	5.158	7.150	23.10	-
Warfarin	0.051	1.521	494.67	0.0013	0.114	4.557	665.29	0.0010

The symbol "-" specifies not calculated.

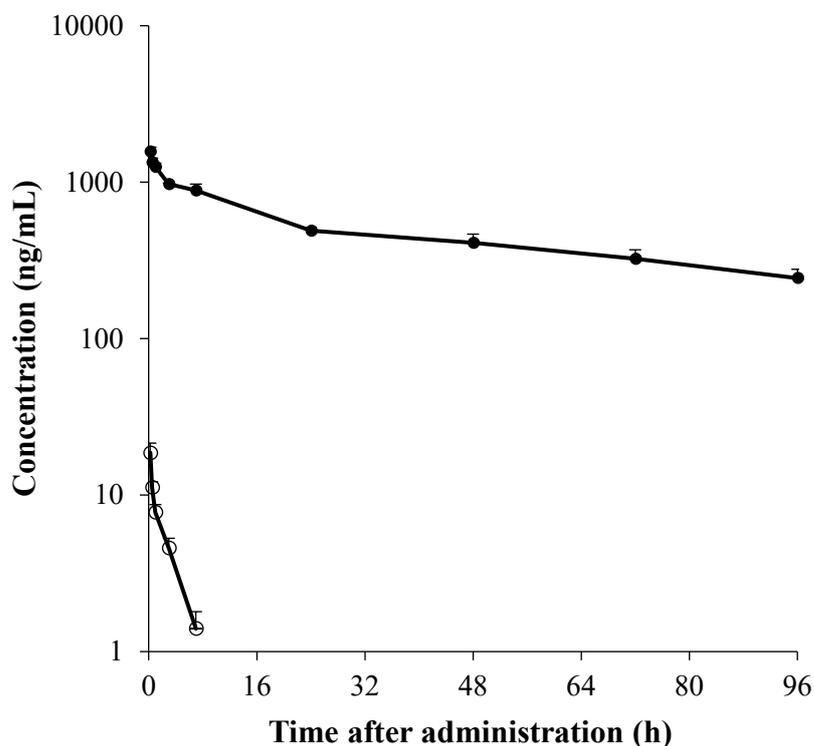
**Table II-5** Predicted and observed  $t_{1/2}$  in humans.

Compounds	$t_{1/2}$ in humans (h)		
	Predicted		Observed <sup>a</sup>
	Humanized liver mice	Immunodeficient mice	
Amiodarone	108.5	65.0	138
Aripiprazole	80.6	35.1	71.9
Compound A	385.1	16.1	375.2
Compound B	18.6	19.6	7.2
Chlorthalidone	21.3	8.6	40
Gavestinel	39.2	1.2	28.9
Mefloquine	227.1	48.6	445.4
Pazopanib	74.3	71.8	31.1
Phenobarbital	115.5	42.7	96
Probucol	227.0	326.5	177.5
Pyrimethamine	116.7	44.8	140
Tamoxifen	18.4	14.1	118
UCN-01	536.2	16.0	581
Warfarin	522.1	693.1	35
Prediction accuracy			
Within 2-fold error	71.4%	7.1%	
Within 3-fold error	85.7%	42.9%	

<sup>a</sup> amiodarone (Zhi and others, 2003), aripiprazole (Kubo and others, 2005), chlorthalidone (Carter and others, 2004), gavestinel (Hoke and others, 2000), mefloquine (Kolawole and others, 2000), pazopanib (Hurwitz and others, 2009), phenobarbital (Patel and others, 1980), probucol (Kim and others, 2009), pyrimethamine (Almond and others, 2000), tamoxifen (Kivisto and others, 1998), UCN-01 (Fuse and others, 2005), warfarin (Holford, 1986), compound A, and compound B (Internal report in Takeda Pharmaceutical Company Ltd.).



**Figure II-1** Relationship of obtained  $t_{1/2}$  values (A) between humans and humanized liver mice, and (B) between humans and immunodeficient mice. The solid lines represent unity and the areas between the fine dotted lines or dotted lines represent the range within a 2-fold or a 3-fold of unity.



**Figure II-2** Observed plasma concentration-time curves of UCN-01 after i.v. dosing of UCN-01 at 0.1 mg/kg in humanized liver mice (black circles) and immunodeficient mice (open circles). Each plotted value represents the mean + SD of three mice.

#### 第4節 考察

第I章では、30種類の化合物を用いてヒト肝細胞移植マウスがヒトの  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  値を予測するのに有用な動物モデルであることを示した。半減期 ( $t_{1/2}$ ) は  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  の複合的なパラメータであることから、第I章の結果は、ヒト肝細胞移植マウスを用いることによりヒトの  $t_{1/2}$  値を予測できる可能性を示唆している。本研究では  $t_{1/2}$  値が長い化合物のヒト  $t_{1/2}$  値の予測精度を検証するために、 $t_{1/2}$  値が24時間を超える薬剤13化合物、そして compound A の後発開発品 compound B の計14化合物を選択した。

ヒト血漿中の UCN-01 の消失相の  $t_{1/2}$  はイヌ、ラット、マウスの値よりも有意に長いことが報告されている (Fuse and others, 2005)。UCN-01 のヒト肝細胞移植マウスでの血漿中濃度は宿主の免疫不全マウスに比べて持続しており (Fig. II-2)、ヒト肝細胞移植マウスから予測したヒトのパラメータ、 $CL_t$ 、 $Vd_{ss}$ 、消失

相の  $t_{1/2}$  の値は、報告されているヒトのパラメータと同等であり、それぞれ 0.003 mL/min/kg, 0.113 L/kg, 581 時間であった (Table II-4 および II-5) (Fuse and others, 2005). 一方、免疫不全マウスから得たこれらのパラメータは、ヒト肝細胞移植マウスから得たパラメータとは乖離しており、イヌ、ラット、マウスから得られたパラメータと類似していた (Fuse and others, 2005). 免疫不全マウス、マウス、ラット、イヌの  $CL_t$ ,  $Vd_{ss}$ , 消失相の  $t_{1/2}$  の値はそれぞれ 10–60 mL/min/kg, 6–17 L/kg, 4–12 時間であり、ヒトで得られた値よりも  $CL_t$ ,  $Vd_{ss}$  が高かった (Fuse and others, 2005). これらの実験動物モデルの中では、ヒト肝細胞移植マウスのみが UCN-01 のヒトの  $CL_t$ ,  $Vd_{ss}$ , および消失相の  $t_{1/2}$  値が予測可能であった. UCN-01 の *in vitro* での PPB 試験やヒト  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質 (hAGP) の存在下または非存在下での *in vivo* 試験の結果から、UCN-01 の hAGP への特異的な、かつ高い親和性の結合が、臨床試験での UCN-01 が予想外の長い  $t_{1/2}$  が観察された要因であると推測されている (Fuse and others, 2005). したがって、ヒト肝細胞移植マウスから得られたヒトパラメータの高い予測精度は、ヒト肝細胞移植マウスとヒトの間で UCN-01 の PPB が類似しているためと考えられる. AGP は肝臓で合成され血漿中に分泌されることから (Fournier and others, 2000), ヒト肝細胞移植マウスでは hAGP が分泌され、ヒトと近い UCN-01 の血漿中濃度推移を示したと推測される. 最近、ヒト肝細胞移植マウスの血漿中にヒトと同程度の濃度で hAGP が分泌されていることがフェニックスバイオ社から報告されている (Shintani, T., personal communication).

Compound A は、心血管疾患および代謝性疾患の治療薬として武田薬品工業株式会社内にて開発されていたが、臨床試験では、経口投与後 375.2 時間という予想外に長い  $t_{1/2}$  値を示すことが明らかとなった. UCN-01 と同様に、ヒトでの compound A の血漿中濃度持続は、サル、ラット、イヌからは予測不可能であった (武田薬品工業株式会社内報告書). 本研究では、compound A のヒト  $t_{1/2}$  値はヒト肝細胞移植マウスにより 385.1 時間と予測され、実測値とほぼ同等の値が得られた (Table II-5). Compound A の後発品として見出された compound B は、compound A よりもヒトで短い  $t_{1/2}$  (7.2 時間) を示し、ヒト肝細胞移植マウスから予測したヒトの  $t_{1/2}$  (18.6 時間) はヒト実測値の 3 倍以内であった (Table II-

5). 非臨床段階でヒト肝細胞移植マウスをヒト PK パラメータ予測に活用することができていれば, compound A と compound B のヒトの  $t_{1/2}$  値の違いは臨床試験前に明らかにすることが可能であったと考えられる.

一般的に, 長い  $t_{1/2}$  を示す薬物の多くは高い組織分布を示すことが知られている. 抗不整脈薬である amiodarone は白色脂肪に蓄積し, 長い消失相  $t_{1/2}$  を示すことが報告されている (Anastasiou-Nana and others, 1982; Holt and others, 1983; Latini and others, 1984; Plomp and others, 1984). Amiodarone の長期投与後のウサギでの生体内分布の調査では, amiodarone の濃度は脂肪組織で最も高く, 次いで肺, 肝臓, 筋肉の順であった (Kannan and others, 1985). Mefloquine のヒトでの薬物動態研究によると, その体内からの消失が遅い要因として広範囲にわたる組織への結合であることが推測されている (Karbwang and White, 1990; Kolawole and others, 2000). Probutol に関しても, ヒトで血漿中よりも脂肪組織中の方が Probutol の濃度が高かった (Choisy and Millart, 1980). 本研究では, これらの amiodarone, mefloquine, probucol のヒト肝細胞移植マウスからのヒトの  $t_{1/2}$  の予測値は, ヒト実測値の 2 倍以内であった. ヒト肝細胞移植マウスにより, 組織分布の大きいこれら 3 化合物の  $V_{d_{ss}}$  が予測可能であったため, ヒト  $t_{1/2}$  の高い予測精度が得られたと推測される.

Tamoxifen と warfarin はヒト肝細胞移植マウスからヒト  $t_{1/2}$  予測が外れた化合物である. Tamoxifen の  $t_{1/2}$  値は, ヒト肝細胞移植マウスでは過小に予測されており, 宿主の免疫不全マウスから得たパラメータと同程度であった. Tamoxifen は主に P450 によって代謝を受けることが報告されており (Klein and others, 2013), 両マウスの tamoxifen の  $CL_t$  値はマウス肝血流 (90 mL/min/kg) に近かったことから, ヒト肝細胞移植マウスの残存マウス肝細胞の代謝活性の影響を受け,  $CL_t$  値が高く予測された結果, ヒトでの  $t_{1/2}$  を過小に予測したと考えられる. Tamoxifen のヒトとマウスの肝外の排泄経路の種差が予測精度に影響している可能性もあげられる. ヒト肝細胞移植マウスと免疫不全マウスの血漿中の代謝物評価や尿中排泄物の測定により, 要因を解明することができると考えられる.

ヒト肝細胞移植マウスの warfarin のヒト  $t_{1/2}$  予測値は 522.1 時間であったが,

ヒトでの  $t_{1/2}$  実測値は 35 時間であった (Table II-5). ヒト肝細胞移植マウスの warfarin の予測  $CL_L$  値は 0.051 mL/min/kg (Table II-4) であり, ヒトで観察された  $CL_L$  値, 0.06 mL/min/kg と近い値であった (Bjornsson and others, 1979). 一方, ヒト肝細胞移植マウスによる warfarin の予測ヒト  $V_{d_{ss}}$  値は 1.521 L/kg であり, ヒトで観測された  $V_{d_{ss}}$  値の 0.13 L/kg (Bjornsson and others, 1979) よりも 10 倍高かったことから (Table II-4), ヒト肝細胞移植マウスからの warfarin のヒト  $V_{d_{ss}}$  の予測精度の低さが  $t_{1/2}$  予測の低さに影響していると推測できる. Nakayama らは, ヒト肝細胞移植マウスを用いた warfarin の PK パラメータ予測について我々と同様の結果を報告している (Nakayama and others, 2018). Nakayama らは Rodgers 式を用いてヒト肝細胞移植マウスから warfarin のヒト  $V_{d_{ss}}$  を予測し, 予測値が観察されたヒト実測値と比較して 4.70 倍であった (Nakayama and others, 2018). ヒト肝細胞移植マウスの warfarin の PPB はヒトと類似していたことから (Inoue and others, 2009), ヒト肝細胞移植マウスのヒト  $V_{d_{ss}}$  の予測精度の低さは, PPB 以外の要因によるものと考えられる. Inoue らはヒト肝細胞移植マウスで warfarin の 30 mg/kg での経口投与後の  $t_{1/2}$  が 17.6 時間であったことを報告しており, 本研究で得られたヒト肝細胞移植マウスの  $t_{1/2}$ , 70.5 時間と乖離していた. 彼らの研究では, warfarin の投与量は高く, 最高濃度は 57,100 ng/mL であったのに対し (Inoue and others, 2009), 本研究では最高濃度は 287 ng/mL と低濃度であり (Table II-2, パラメータ A), 消失相の  $t_{1/2}$  は 70.5 時間であったことから (Table II-5), warfarin の非線形動態がヒト  $V_{d_{ss}}$  や  $t_{1/2}$  値が外れた一つの要因として考えられる. Warfarin の非線形動態については, warfarin の持つ target-mediated drug disposition (TMDD) の性質, すなわち低濃度でよりターゲット組織へ高く分布する性質, に起因するという報告があり (van Waterschoot and others, 2018), これによりヒト肝細胞移植マウスでの投与用量の差による  $t_{1/2}$  の乖離が観測されたと推察される.

低 CL 化合物については, *in vitro* での正確な  $CL_{int}$  値の決定が困難であるため, *in vitro-in vivo* 外挿法によるヒトの PK 予測は信頼性が低いことが知られている. 本研究では, ヒト肝細胞移植マウスを用いることにより低 CL 化合物である gavestinel, pazopanib, UCN-01 のヒトでの  $t_{1/2}$  を精度よく予測することが

できた。Lombardo らは約 400 種類の化合物を用いてヒトの  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  の予測精度を包括的に検証しており、予測に関して推奨モデルを提案している (Lombardo and others, 2013a; Lombardo and others, 2013b)。しかし、彼らの推奨モデルを実行するためにはラット、イヌ、サルを用いた多くの *in vivo* および *in vitro* 試験が必要である。本研究の方法では、ヒトの値を予測するためのパラメータとしてヒト肝細胞移植マウスを用いた静脈投与での *in vivo* 試験のみ必要であり、動物選択のプロセスや *in vitro* の評価を回避することができる。この手法のもう一つの利点として、PPB の評価は必要としない点である。非結合型薬物濃度に基づいたヒト  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  は、ヒトと動物との間の血漿中の  $f_{up}$  を用いて次のように計算できる；

$$\text{Unbound-based } CL_{t, \text{human}} = \text{Total-based } CL_{t, \text{human}} \times (f_{up, \text{human}}/f_{up, \text{animal}})$$

$$\text{Unbound-based } Vd_{ss, \text{human}} = \text{Total-based } Vd_{ss, \text{human}} \times (f_{up, \text{human}}/f_{up, \text{animal}})$$

II-2-vii) の式 (22) と式 (23) による  $t_{1/2}$  算出の過程では、 $Vd_{ss}/CL_t$  が利用され、1-コンパートメントモデルおよび2-コンパートメントモデルについて  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  の  $f_{up}$  の比が相殺される。以上のことから、本研究で用いたヒトの  $t_{1/2}$  予測方法は、ヒト肝細胞移植マウスの *in vivo* 試験の結果のみを使用し、PPB の評価を必要としないことから、創薬の初期段階で化合物の迅速な優先順位決定に適している。本報告で提案したヒトの  $t_{1/2}$  値の予測方法は簡易な方法であることから創薬初期には非常に有用であるが、以下の点に注意が必要である。マウス肝細胞の残存活性がヒトの  $CL_t$  と  $t_{1/2}$  の予測に影響を与える可能性があるため、宿主の免疫不全マウスの  $CL_t$  との比較は重要である。Kamimura らは、別種のヒト肝細胞移植マウス (単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼ導入遺伝子を発現する NOD/Shi-scid IL2 受容体  $\gamma$ -null マウス) の肝 CL ( $CL_{h, \text{int}}$ ) と 0–96.9% の RI が異なるヒト肝細胞移植マウスとの相関から、理論上 RI が 100% 置換されたヒト肝細胞移植マウスの CL として計算しヒト予測に用いている (Kamimura and others, 2017)。このような手法も残存マウス活性の影響を回避するのに有効と考えられる。最近、Nakayama らは、ヒト肝細胞移植マウスと physiologically based pharmacokinetic (PBPK) モデリングの併用によるヒト PK 予測を報告しており (Nakayama and others, 2018)、本手法は候補化合物選択後に代謝経路情報を取得

した後のアプローチとして、臨床試験での投与設計に有効であると考えられる。

## 第5節 小括

本研究ではヒト肝細胞移植マウスを用いた14化合物の静脈内投与後の血漿中濃度推移から、1-または2-コンパートメントモデルにより動物での個別PKパラメータを得て、ヒト  $Vd_{ss}$  と  $CL_t$  値をSSSにて予測し、これらからヒトの消失相の  $t_{1/2}$  を算出した。ヒト肝細胞移植マウスの宿主の免疫不全マウスを用いた際、ヒトの実測での  $t_{1/2}$  値の2倍以内の予測精度は7.1%にとどまった一方、ヒト肝細胞移植マウスからは2倍以内の予測精度は71.4%と高い予測精度を得た。以上、ヒトでの消失半減期の長い医薬候補品の体内動態予測についてもヒト肝細胞移植マウスが有効であることが示された。従来の *in vitro* および *in vivo* モデルでは予測不可能であったヒトでの長い  $t_{1/2}$  値を示す医薬候補品の体内動態の特徴を、ヒト肝細胞移植マウスを用いることによって非臨床段階にて把握しうることを明示した。

### 第III章 異なるヒト肝細胞移植マウスを用いた医薬候補品の血漿中タンパク非結合型分率の評価、およびヒト肝細胞移植マウスの代替血漿の作成

#### 第I節 緒言

薬物の血漿、組織、ターゲット結合部位での  $f_{up}$  は、PK や薬力学 (PD) に大きな影響を与える。フリー体仮説によれば、体内では非結合型の薬物のみが細胞膜を通過し標的部位に到達するため、CL や Vd などの PK 特性に影響を与えることから (Smith and others, 2010)、PPB は重要なパラメータの一つである。フリー体仮説は、薬理学の原理として広く受け入れられており (Heuberger and others, 2013; Smith and others, 2010; Trainor, 2007)、PPB が pharmacokinetics and pharmacodynamics (PK/PD) (Brammer and others, 1990; Day and others, 1995; Debruyne, 1997; Hammarlund-Udenaes and others, 2008; Lin, 2008; Liu and others, 2006; Maurer and others, 2005; Schramm and others, 1994)、薬物-薬物相互作用 (DDI) (Di and others, 2017; Hanke and others, 2018; Heuberger and others, 2013; Hochman and others, 2015)、毒性 (Honda and others, 2019; Redfern and others, 2003; Webster and others, 2002) において重要な役割を果たしている例は数多く報告されている。

しかし、薬物の PPB の生体内での有効性との関係については相反する報告例もあり、血漿中の  $f_{up}$  を用いた補正の是非については広く議論されてきた (Smith and others, 2010)。フリー体仮説が常に適用されるとは限らない 1 つの例は、ヒトの PK 予測である。Lombardo らは、ヒトの CL と Vd 予測の包括的な解析で、一般的に  $f_{up}$  の補正により、アロメトリックスケーリング法や *in vitro* スケーリング法を含むすべての方法によるヒトの PK 予測精度を悪化させる傾向があることを指摘している (Lombardo and others, 2013a; Lombardo and others, 2013b)。第I章では、ヒト肝細胞移植マウスからの SSS によるヒトの  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  予測について検証し、サルとラットにおいて、 $f_{up}$  の補正で予測精度が改善せず、Lombardo らと同様の結果が得られたことを示した。

ヒト肝細胞移植マウスは肝臓内にヒト薬物代謝酵素やトランスポーターを発現していることが報告されており (Katoh and others, 2004; Katoh and others,

2005a), その肝臓中でのヒトの RI 値は, 分泌される血中 hAb 濃度を用いて算出される. ヒト Ab は薬物の PPB に関与する主要なタンパク質であり, ヒト肝細胞移植マウスの血漿中にも分泌されることから, 薬物のヒト肝細胞移植マウスでの PPB はヒトの PPB と類似する可能性がある. しかし, それらを比較した報告例は少ない (Sanoh and others, 2012b).

ヒト肝細胞移植マウスは, ヒトの PK 予測だけでなく薬理作用 (Klumpp and others, 2018; Mueller and others, 2018; Uchida and others, 2017; Yoshizato and Tateno, 2013), DDI (Takaoka and others, 2018; Takehara and others, 2019; Uchida and others, 2018), 毒性 (Nihira and others, 2019; Sanoh and others, 2017; Tateno and others, 2019; Tateno and others, 2015) の予測にも用いられている. しかしながら, これらの研究ではヒト肝細胞移植マウスの PPB を考慮した評価は報告されていない. ヒト肝細胞移植マウスは作製に各個体に手術が必要なため工数がかかる点 (Scheer and Wilson, 2016), 一匹から採取できる血漿が少量である点から, ヒト肝細胞移植マウスの PPB 値はヒトと同等の値として扱っている報告が多い (Nakayama and others, 2019; Naritomi and others, 2018; Naritomi and others, 2019; Sanoh and others, 2012b). したがって, 入手が容易で適切な人工ヒト肝細胞移植マウス血漿が利用可能であれば, ヒト肝細胞移植マウスの PPB 値を評価するための代替血漿として有用である. 本研究では, 第I章および第II章で使用した, 免疫不全型のヒト肝細胞移植マウスモデル (ヒト肝細胞移植マウス(I)とする) の宿主である免疫不全マウス (CB17/Icr-Prkdcscid/CCrlj マウス) の血漿にヒト血漿を混合した人工ヒト肝細胞移植マウス血漿を用いて, 39 化合物の PPB 値を評価した.

別のヒト肝細胞移植マウスとして, 肝特異的障害誘導型のマウスであるヒト肝細胞移植マウス (ヒト肝細胞移植マウス(II)) が, 単純ヘルペスウイルス 1 型チミジンキナーゼトランスジーンを発現する NOD/Shi-scid IL2 受容体  $\gamma$ -null マウスから開発され活用されている (Hasegawa and others, 2011). ヒト肝細胞移植マウス(II)についても, ヒトの PK, 代謝プロファイル, DDI (Hasegawa and others, 2011; Suzuki and others, 2017; Yamazaki and others, 2013), 毒性 (Uchida and others, 2015; Xu and others, 2015a; Xu and others, 2015b) を予測するのに有用な動物モデルであることが報告されているが, PPB 評価の報告は少ない. 最近, Nakayama

らは、ヒト肝細胞移植マウス(II)の血漿中の15化合物のPPBを報告しており、いくつかの化合物のヒト肝細胞移植マウス(II)のPPBプロファイルがヒトとは異なることを示している (Nakayama and others, 2020; Uchida and others, 2015; Xu and others, 2015a; Xu and others, 2015b).

本研究では、二種類のヒト肝細胞移植マウス、ヒト肝細胞移植マウス (I) および (II)の血漿を用いて化合物のPPBを評価し、ヒトのPPB値との比較を行った。人工ヒト肝細胞移植マウス (I) の血漿作成のためのヒト血漿と免疫不全マウス血漿の最適混合比を検討した。最後に、ヒト肝細胞移植マウス(I)から得られた $f_{up}$ 値を用いてヒト $CL_t$ と $Vd_{ss}$ 予測の有用性を再評価し、ヒトPK予測の際のPPBの役割について考察した。

## 第2節 実験材料と実験方法

### III-2-i) 試薬

試薬は第I章および第II章に記載と同様に入手した。ヒト肝細胞移植マウス(I) (PXB マウス®) の血漿はフェニックスバイオ社から購入した。血漿の非結合型分率 ( $f_{up}$ ) 試験に使用したヒト肝細胞移植マウス (I) のRI値は76%から95%であった。ヒト肝細胞移植マウス(II) (NOD/Shi-scid IL2 receptor gamma-null mice expressing a herpes simplex virus type-1 thymidine kinase transgene, humanized TK-NOG マウス) の血漿は、インビボサイエンス社 (Tokyo, Japan) から提供された。使用したヒト肝細胞移植マウス(II)のRI値は77%から86%であった。ヒト肝細胞移植マウス(I)の宿主である免疫不全マウス血漿は、日本チャールズリバー社から購入した。その他の試薬や溶媒はすべて富士フィルム和光純薬工業から入手した。

### III-2-ii) 血漿中非結合型分率の評価

各化合物の $f_{up}$ をHTD96 dialysis chamber (HTDialysis, CT, USA) およびセルロース膜 (MWCO 6-8 kDa, Gales Ferry, CT, USA) を用いた平衡透析法 (Banker and others, 2003; Wang and others, 2014) により測定した。血漿と、最終濃度が1  $\mu\text{g/mL}$  となるように化合物溶液を混合した。リン酸緩衝生理食塩水

(PBS)あるいはリン酸塩緩衝液に対して、CO<sub>2</sub>インキュベーター中37°Cで24時間、60 rpmで振盪した。血漿側および緩衝液側の透析液を、IS (Table I-1, II-1)を含むアセトニトリルで除タンパク後、4,283 g、4°Cで5分間遠心分離した。上清を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC-MS/MS) で分析した。透析装置の血漿側からの化合物の濃度に対する緩衝液側からの化合物の濃度の比として  $f_{up}$  を計算した。血漿 (ヒト肝細胞移植マウス(I)の血漿, ヒト肝細胞移植マウス(II)の血漿, 免疫不全マウス血漿, ヒトと免疫不全マウスの混合血漿 (30/70; v/v) および (85/15; v/v)を、化合物溶液と混合し最終濃度が 1 µg/mL となるように調整した。39 化合物のうち 9 化合物 (aripiprazole, chlorthalidone, gavestinel, mefloquine, pazopanib, pyrimethamine, UCN-01, tamoxifen, warfarin) については、低い  $f_{up}$  が予想されたため、血漿を生理食塩水で 10 倍に希釈して使用した。式(1)に従って  $f_{up}$  を計算した。

$$f_{up} = \frac{\text{compound concentration in buffer}}{\text{compound concentration in plasma}} \quad (1)$$

10%希釈血漿を用いて分析した化合物の  $f_{up}$  は、式(2) および (3) に従って算出した。

$$f'_{up} = \frac{\text{compound concentration in buffer}}{\text{compound concentration in 10\% diluted plasma}} \quad (2)$$

$$f_{up} = \frac{\frac{1}{D}}{\left(\frac{1}{f'_p} - 1\right) + \frac{1}{D}} \quad (3)$$

where D is the dilution factor.

### III-2-iii) 免疫不全マウスを用いた薬物動態試験

免疫不全マウスを用いた PK 試験には、第I章で評価した 30 化合物を使用した。化合物 (カセット投与の場合は 1 群最大 10 化合物) を DMA または生理食塩水で溶解し、DMA/生理食塩水で 1:1 (v/v) に希釈した。各化合物について、免疫不全マウス ( $n=3$ ) に薬液 (1 mL/kg) を 0.1 mg/kg の用量で大腿静脈から静脈内投与した。その後、尾静脈から抗凝固剤としてヘパリンを用いて血液を採取した。採血は 0.083, 0.25, 1, 3, 7, 24 時間後とし、得られた試料を 4°C で 13,000 g、5 分間遠心分離し血漿を得た。次いで、血漿 (5 µL) に IS (第 I 章,

Table I-1) を含むアセトニトリルと混合し 4,283 g, 4°C で 5 分間遠心分離した。上清を LC-MS/MS (API 5000 または API 4000, AB Sciex, Foster City, CA, USA) を用いて分析した。

#### III-2-iv) 薬物濃度測定

III-2-ii および iii で得た上清中の薬物濃度分析は第 I 章 I-2-vi, および第 II 章 II-2-iv と同様の方法, パラメータ (Table I-1, II-1) を用いて LC-MS/MS にて実施した。

#### III-2-v) 免疫不全マウスのクリアランス, 分布容積評価

静脈内投与により得られた血漿中濃度曲線推移を用いて第 I 章 I-2-viii と同様の方法で算出した。Aripiprazole, gavestinel, pazopanib, pyrimethamine, UCN-01 の 5 化合物の PK パラメータは第 II 章で得た値を用いた。

#### III-2-vi) クリアランス, 分布容積のヒト予測

Total-based, Unbound-based のヒトの  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  の予測は第 I 章 I-2-ix 記載の方法で算出した。ヒト肝細胞移植マウスと免疫不全マウスの BW は, それぞれ 0.0203 kg と 0.0261 kg を用いた。

### 第 3 節 結果

#### III-3-i) ヒト, ヒト肝細胞移植マウス (I), 宿主の免疫不全マウスの血漿の非結合型分率, およびヒトと免疫不全マウスの混合血漿の非結合型分率

ヒト, ヒト肝細胞移植マウス (I), 宿主の免疫不全マウス血漿の 39 化合物の  $f_{up}$  を Table III-1 にまとめた。ヒトと免疫不全マウスの混合血漿 (30:70, 85:15) の 39 化合物の非結合型分率 ( $f_u$ ) を Table III-1 にまとめた。ヒトから得られた  $f_{up}$  値とヒト肝細胞移植マウス (I) と免疫不全マウスの  $f_{up}$  値との相関を Fig. III-1 (A), III-1 (B) に示した。ヒトの 39 化合物の  $f_{up}$  値とヒト肝細胞移植マウス (I) または免疫不全マウスの  $f_{up}$  値との関係を線形回帰により評価した。その結果, ヒトとヒト肝細胞移植マウス (I) では  $y = 1.055x$  ( $R^2 = 0.9733$ ), ヒトと免疫不全マウス

ウスでは  $y = 1.087x$  ( $R^2 = 0.6022$ ) の値が得られた。ヒト肝細胞移植マウス (I) と免疫不全マウスから得られた  $f_{up}$  値のうち、ヒトの  $f_{up}$  値の 3 倍以内の  $f_{up}$  値を有する化合物の割合は、ヒト肝細胞移植マウス (I) で 87.2% (34/39 化合物)、免疫不全マウスで 59.0% (23/39 化合物) であった。Diazepam, ibuprofen, ketoprofen, (S)-naproxen, UCN-01 の  $f_{up}$  値は、ヒト肝細胞移植マウス (I) ではヒトよりも 3 倍以上であった。Diazepam は 4.19 倍、ibuprofen は 3.56 倍、ketoprofen は 3.14 倍、(S)-naproxen は 9.56 倍、UCN-01 は 8.77 倍であった。

ヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿と、ヒトと免疫不全マウスの混合血漿 (30:70) または (85:15) の混合血漿から得られた  $f_u$  値との相関を Fig. III-1 (C), III-1 (D) に示した。ヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿とヒトと免疫不全マウスの混合血漿 (30:70) との関係は線形回帰により、 $y = 1.036x$  ( $R^2 = 0.847$ )、ヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿とヒトと免疫不全マウスの混合血漿 (85:15) の関係は線形回帰により、 $y = 0.958x$  ( $R^2 = 0.955$ ) であった。混合血漿で得られた  $f_u$  値のうち、ヒト肝細胞移植マウス (I) の  $f_{up}$  値の 3 倍以内にある化合物の割合は、混合血漿 (30:70) で 74.4%、混合血漿 (85:15) で 97.4% であった。

### III-3-ii) ヒト肝細胞移植マウス (II) の血漿の非結合型分率

ヒト肝細胞移植マウス (II) の 24 化合物の  $f_{up}$  値を Table III-2 にまとめた。15 化合物のヒト肝細胞移植マウス (II) 血漿中の  $f_{up}$  値は、文献から引用した (Nakayama and others, 2020)。ヒト、ヒト肝細胞移植マウス (I), (II) 間の 24 化合物の  $f_{up}$  値の関係を Fig. III-2 (A), III-2 (B) に示した。ヒト肝細胞移植マウス (II) で分析した 24 化合物のうち 15 化合物 (62.5%) の  $f_{up}$  値はヒト  $f_{up}$  値の 3 倍以内であった。ヒト肝細胞移植マウス (II) 血漿での  $f_{up}$  値と、混合血漿 (30:70) または (85:15) から得られた  $f_u$  値の関係を、Fig III-2 (C), III-2 (D) に示した。ヒト肝細胞移植マウス (II) の  $f_{up}$  値の 3 倍以内の化合物の割合は、混合血漿 (30:70) では 56.3% であり、混合血漿 (85:15) では 62.5% であった。

### III-3-iii) 免疫不全マウスのクリアランスおよび分布容積

免疫不全マウスから得られた  $CL_t$  と  $V_{d_{ss}}$  は、Table III-3 にまとめた。ヒト肝

細胞移植マウス (I) と免疫不全マウスから予測されたヒト  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  を Table III-4 にまとめた。得られた免疫不全マウスから予測したヒト  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  予測値と第 I 章の結果 (I-3-1), 第 II 章の結果 (II-3-ii) で得られたヒト肝細胞移植マウスから算出したヒト  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  予測値とヒトの実測  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  値を比較した。ヒト肝細胞移植マウス, 免疫不全マウス (I) から算出した Total-based の  $CL_t$  予測値はそれぞれ 80.6%, 55.6%がヒト実測  $CL_t$  値の 3 倍以内であったが, Unbound-based の  $Vd_{ss}$  予測値はそれぞれ 69.4%, 25.0%がヒト実測  $CL_t$  値の 3 倍以内であった。ヒト肝細胞移植マウス (I) および免疫不全マウスから算出した Total-based の  $CL_t$  予測値はそれぞれ 74.3%, 51.4%がヒト実測  $CL_t$  値の 3 倍以内であったが, Unbound-based の  $CL_t$  予測値はそれぞれ 68.6%, 45.7%がヒト実測  $CL_t$  値の 3 倍以内であった。

**Table III-1** Summary of  $f_u$  in humans, humanized liver mice (I), immunodeficient mice, and the mixed plasma of humans and immunodeficient mice with 30:70 and 85:15.

Compounds	$f_u$									
	Human plasma		Humanized liver mouse (I) plasma		Immunodeficient mice		Human-immunodeficient mouse plasma			
	Mean	SD	Mean	SD	Mean	SD	(30:70)		(85:15)	
						Mean	SD	Mean	SD	
Albuterol <sup>a</sup>	0.93	-	1.00	0.14	0.96	0.11	1.00	0.09	1.00	0.20
Antipyrine <sup>a</sup>	0.96	-	0.81	0.05	0.75	0.05	0.99	0.07	0.94	0.20
Aripiprazole	0.0060	0.0012	0.011	0.001	0.004	0.000	0.0045	0.0002	0.0041	0.0005
Bazedoxifene <sup>a</sup>	0.013	-	0.025	0.002	0.017	0.002	0.021	0.003	0.025	0.005
Benzydamine <sup>a</sup>	0.051	-	0.13	0.03	0.093	0.029	0.17	0.04	0.17	0.01
BIBX1382 <sup>a</sup>	0.12	-	0.16	0.02	0.069	0.009	0.10	0.01	0.14	0.03
Carbazeran <sup>a</sup>	0.094	-	0.20	0.02	0.53	0.13	0.52	0.05	0.19	0.05
Chlorthalidone	0.33	0.09	0.46	0.06	1	-	0.68	0.08	0.28	0.03
Clonazepam <sup>a</sup>	0.19	-	0.20	0.03	0.24	0.01	0.28	0.05	0.20	0.03
Dapsone <sup>a</sup>	0.38	-	0.34	0.03	0.58	0.06	0.63	0.01	0.43	0.08
Diazepam <sup>a</sup>	0.023	-	0.094	0.010	0.20	0.01	0.19	0.03	0.10	0.02
Diclofenac <sup>a</sup>	0.0033	-	0.0041	0.0003	0.055	0.000	0.029	0.003	0.0048	0.0003
Dolasetron <sup>a</sup>	0.23	-	0.34	0.02	0.46	0.05	0.47	0.11	0.27	0.05
Entacapone <sup>a</sup>	0.015	-	0.028	0.005	0.27	0.03	0.18	0.08	0.044	0.015
Fasudil <sup>a</sup>	0.74	-	0.86	0.21	0.86	0.26	0.87	0.12	0.89	0.21
Gavestinel	0.0004	0.0001	0.00044	0.00004	0.0029	0.0001	0.0011	0.0002	0.00033	0.00013
Gemcitabine <sup>a</sup>	0.99	-	1	-	1	-	0.73	0.18	1.00	0.30
Ibuprofen <sup>a</sup>	0.0027	-	0.0096	0.0001	0.14	0.00	0.094	0.005	0.011	0.000

Imipramine <sup>a</sup>	0.21	-	0.25	0.04	0.11	0.02	0.14	0.02	0.28	0.06
Indomethacin <sup>a</sup>	0.0042	-	0.0062	0.0014	0.083	0.024	0.057	0.004	0.012	0.002
Ketanserin <sup>a</sup>	0.092	-	0.14	0.02	0.26	0.02	0.28	0.04	0.19	0.04
Ketoprofen <sup>a</sup>	0.0091	-	0.029	0.006	0.46	0.06	0.21	0.05	0.026	0.001
Mefloquine	0.022	0.006	0.031	0.005	0.0052	0.0001	0.0089	0.0016	0.02	0.002
Moxifloxacin <sup>a</sup>	0.93	-	0.94	0.10	0.90	0.06	0.72	0.08	0.83	0.11
Mycophenolic acid <sup>a</sup>	0.014	-	0.019	0.004	0.39	0.15	0.19	0.02	0.045	0.019
Naltrexone <sup>a</sup>	0.79	-	0.86	0.30	0.78	0.10	0.95	0.19	0.81	0.16
<i>O</i> <sup>6</sup> -Benzylguanine <sup>a</sup>	0.17	-	0.15	0.02	0.42	0.03	0.31	0.03	0.20	0.04
Pazopanib	0.0021	0.0004	0.003	0.0006	0.011	0	0.0034	0.0008	0.0018	0.0006
Pefloxacin <sup>a</sup>	0.75	-	0.78	0.09	0.79	0.16	1.00	0.20	0.87	0.26
Pyrimethamine	0.11	0.01	0.19	0.11	0.13	0.03	0.16	0.04	0.14	0
( <i>S</i> )-Naproxen <sup>a</sup>	0.0009	-	0.0086	0.001	0.34	0.01	0.18	0.01	0.016	0.003
Sumatriptan <sup>a</sup>	0.83	-	1	-	0.92	0.15	0.90	0.15	0.67	0.12
Tamoxifen	0.0012	0.0008	0.0013	0.000	0.0004	0.00016	0.00058	0.00008	0.00061	0.00014
Telmisartan <sup>a</sup>	0.0065	-	0.0062	0.0006	0.039	0.007	0.034	0.009	0.0080	0.0011
UCN-01	0.00073	0.00033	0.0064	0.0019	0.012	0.004	0.0062	0.0004	0.0007	0.00009
Warfarin	0.023	0.003	0.046	0.004	0.54	0.04	0.10	0.01	0.029	0.005
XK-469 <sup>a</sup>	0.0057	-	0.014	0.002	0.11	0.02	0.068	0.007	0.0066	0.0015
Zaleplon <sup>a</sup>	0.57	-	0.61	0.08	0.78	0.09	0.73	0.07	0.58	0.07
Zoniporide <sup>a</sup>	0.34	-	0.38	0.06	0.41	0.06	0.43	0.08	0.45	0.07

Each value represents the mean ( $n=3$ ).

<sup>a</sup> The human  $f_u$  values were quoted from the results obtained in Chapter 1.

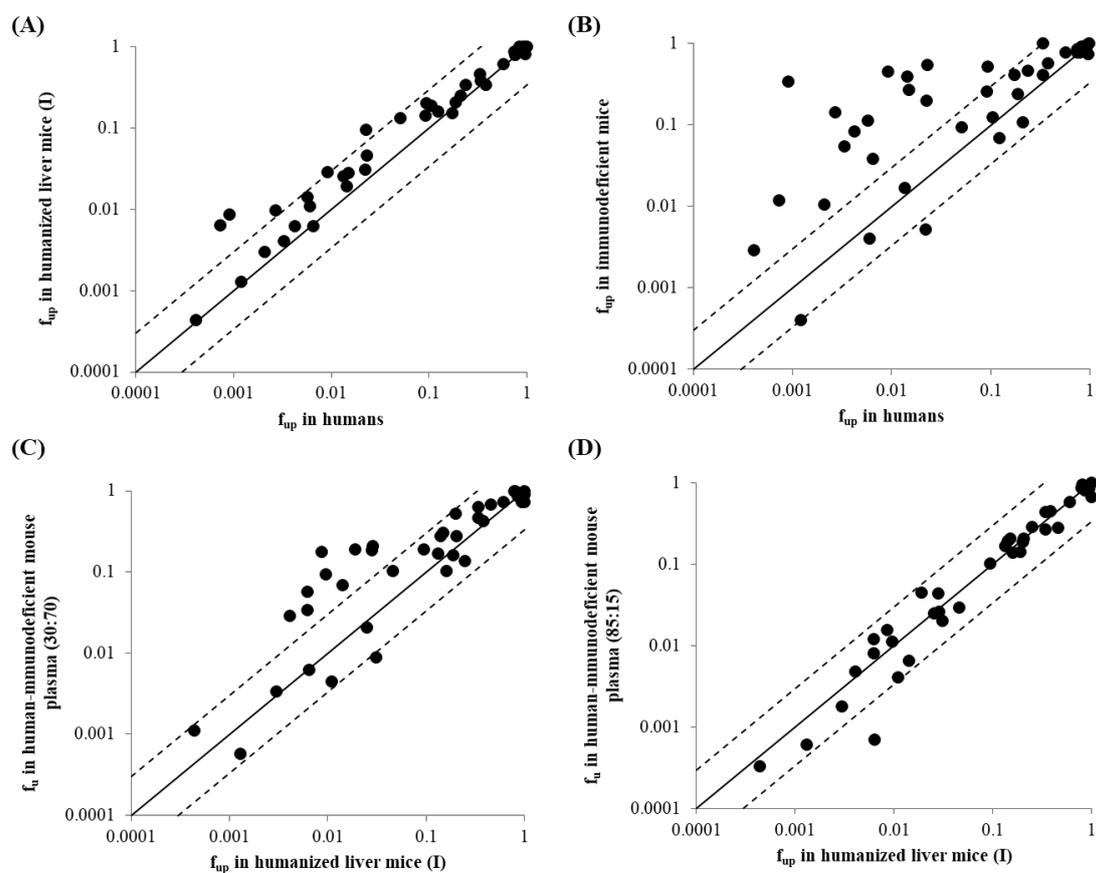
**Table III-2** Summary of  $f_{up}$  in humans and humanized liver mice (II).

Compounds	Humans	Humanized liver mice (II)	
		Mean	SD
Albuterol <sup>a</sup>	0.93	1	-
Aripiprazole	0.006	0.015	0.003
Chlorthalidone	0.33	0.46	0.05
Diazepam <sup>a</sup>	0.023	0.2	-
Diclofenac <sup>a</sup>	0.0033	0.01	-
Digitoxin <sup>b</sup>	0.0041	0.006	-
Fexofenadine <sup>b</sup>	0.16	0.24	-
Ketoprofen <sup>a</sup>	0.0091	0.02	-
Itraconazole <sup>b</sup>	0.0004	0.0006	-
Gavestinel	0.00041	0.0020	0.0008
Mefloquine	0.022	0.030	0.018
Pazopanib	0.0021	0.018	0.012
Phenytoin <sup>b</sup>	0.12	0.53	-
Pravastatin <sup>b</sup>	0.58	0.82	-
Pyrimethamine	0.11	0.28	0.09
Quinidine <sup>b</sup>	0.12	0.58	-
Repaglinide <sup>b</sup>	0.0059	0.011	-
(S)-Naproxen <sup>a</sup>	0.0009	0.014	-
Tamoxifen	0.0012	0.0022	0.0013
Telmisartan <sup>a</sup>	0.0065	0.005	-
UCN-01	0.00073	0.017	0.001
Verapamil <sup>b</sup>	0.078	0.19	-
Warfarin	0.023	0.19	0.05
Zaleplon <sup>a</sup>	0.57	0.68	-

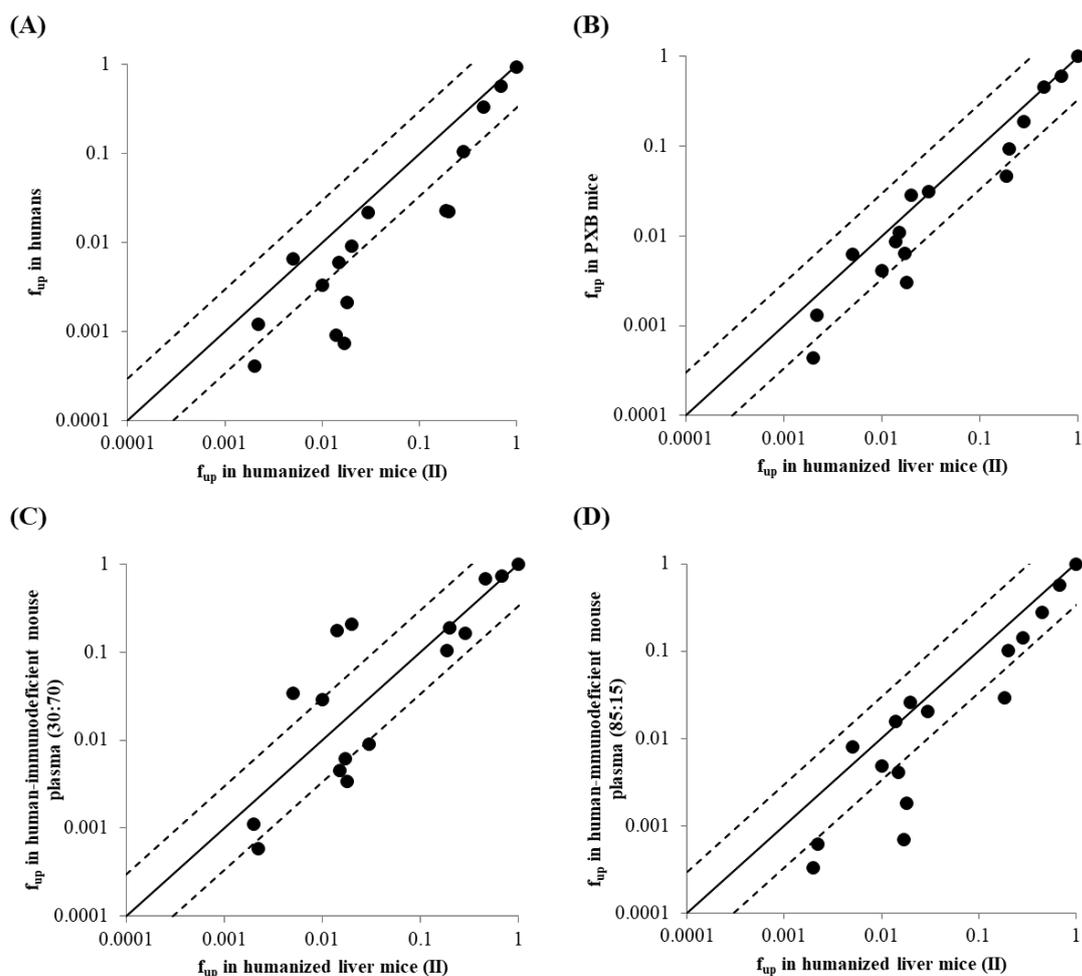
Each value represents the mean ( $n=3$ ).

<sup>a</sup> The  $f_{up}$  values in humanized liver mice (II) were quoted from from a literature (Nakayama and others, 2020)

<sup>b</sup> The  $f_{up}$  values in humans and humanized liver mice (II) were quoted from a literature (Nakayama and others, 2020).



**Figure III-1** Relationship of obtained  $f_{up}$  values of 39 compounds (A) between humans and humanized liver mice(I), and (B) between humans and immunodeficient mice, (C) between humanized liver mouse(I) plasma and the mixed plasma of humans and immunodeficient mice with 30:70, and (D) between humanized liver mouse(I) plasma and the mixed plasma of humans and immunodeficient mice with 85:15. The solid lines represent unity and the area between the dotted lines represent the range within a 3-fold of unity.



**Figure III-2** Relationship of obtained  $f_{up}$  values for 24 compounds (A) between humans and humanized liver mice(II) and for 16 compounds (B) between humanized liver mice(I) and humanized liver mice(II). Relationship of obtained  $f_u$  values for 16 compounds (C) between the mixed plasma of humans and immunodeficient mice with 30:70 and humanized liver mouse(II) plasma, and (D) between the mixed plasma of humans and immunodeficient mice with 85:15 and humanized liver mouse(II) plasma. The solid lines represent unity and the area between the dotted lines represent the range within a 3-fold of unity.

**Table III-3** Summary of CL<sub>t</sub> and Vd<sub>ss</sub> in immunodeficient mice.

Compounds	CL <sub>t</sub> (mL/min/kg)		Vd <sub>ss</sub> (L/kg)	
	Mean	SD	Mean	SD
Albuterol	185.43	42.80	9.32	2.04
Antipyrine	12.40	1.20	0.69	0.12
Aripiprazole <sup>a</sup>	14.45	0.70	6.34	0.75
Bazedoxifene	70.42	4.43	10.05	0.63
Benzydamine	97.97	19.47	7.09	1.19
BIBX1382	33.02	3.78	11.45	0.58
Carbazeran	109.60	10.30	2.52	0.34
Clonazepam	7.28	0.58	1.61	0.07
Dapsone	1.68	0.12	0.46	0.02
Diazepam	86.42	17.10	10.26	1.85
Diclofenac	4.98	0.23	0.44	0.05
Dolasetron	409.23	71.38	5.73	1.40
Entacapone	165.70	33.87	2.75	0.93
Fasudil	308.72	5.72	5.34	2.94
Gavestinel <sup>a</sup>	145.78	23.62	2.19	0.35
Gemcitabine	46.35	0.08	1.16	0.11
Ibuprofen	2.15	0.17	0.23	0.02
Imipramine	103.57	17.92	18.98	3.36
Indomethacin	0.22	0.02	0.09	0.00
Ketanserin	20.88	1.55	2.77	0.33
Ketoprofen	1.88	0.20	0.23	0.01
Moxifloxacin	68.25	9.30	5.38	1.01
Mycophenolic acid	2.70	0.05	0.69	0.11
Naltrexone	235.92	78.72	8.57	1.59
<i>O</i> <sup>6</sup> -Benzylguanine	143.17	31.82	2.81	0.53
Pazopanib <sup>a</sup>	0.23	-	0.13	-
Pefloxacin	44.05	2.08	6.67	0.10
Pyrimethamine <sup>a</sup>	4.83	0.48	2.71	0.15
( <i>S</i> )-Naproxen	0.85	0.08	0.12	0.01
Sumatriptan	119.57	11.67	7.08	0.34
Telmisartan	10.38	1.18	4.89	0.63
UCN-01 <sup>a</sup>	35.72	5.38	7.15	0.71
Warfarin <sup>a</sup>	0.79	-	4.56	-
XK-469	0.63	0.03	0.20	0.01
Zaleplon	42.68	6.40	1.38	0.14
Zoniporide	291.68	20.97	11.19	3.22

Each value represents the mean ( $n=3$ ).

<sup>a</sup> The parameters of CL<sub>t</sub> and Vd<sub>ss</sub> were quoted from the results in Chapter II.

**Table III-4** Observed and predicted human CL<sub>t</sub> and Vd<sub>ss</sub> using SSS with humanized liver mice(I), and immunodeficient mice.

Compounds	Human	Predicted CL <sub>t</sub> (mL/min/kg)				Human	Predicted Vd <sub>ss</sub> (L/kg)			
	Observed	Humanized liver		Immunodeficient mice		Observed	Humanized liver		Immunodeficient mice	
	CL <sub>t</sub> <sup>a</sup> (mL/min/kg)	Total- based <sup>b</sup>	Unbound- based	Total- based <sup>b</sup>	Unbound- d-based	Vd <sub>ss</sub> <sup>a</sup> (L/kg)	Total- based <sup>b</sup>	Unbound- based	Total- based <sup>b</sup>	Unbound- based
Aripiprazole	0.72	3.04	1.66	2.09	3.13	4.96	17.94	9.78	6.34	9.52
Albuterol	7.80	19.80	18.45	26.78	26.07	1.90	3.04	2.83	9.32	9.08
Antipyrine	0.64	0.71	0.84	1.79	2.30	0.77	0.74	0.87	0.69	0.88
Bazedoxifene	6.67	13.19	7.02	10.17	8.02	14.70	9.18	4.88	10.05	7.92
Benzydamine	2.67	14.12	5.41	14.15	7.70	1.53	4.20	1.61	7.09	3.86
BIBX1382	40.00	43.95	33.72	4.77	8.51	15.00	21.11	16.19	11.45	20.43
Carbazeran	37.60	23.16	10.76	15.83	2.81	0.81	1.70	0.79	2.52	0.45
Clonazepam	0.88	1.28	1.17	1.05	0.81	2.90	2.18	1.98	1.61	1.24
Dapsone	0.48	0.45	0.50	0.24	0.16	0.83	0.92	1.02	0.46	0.3
Diazepam	0.38	7.93	1.89	12.48	1.41	1.00	1.84	0.44	10.26	1.16
Diclofenac	3.50	4.15	3.34	0.72	0.04	0.22	0.46	0.37	0.44	0.03
Dolasetron	180.00	61.42	42.32	59.10	29.84	2.00	3.66	2.52	5.73	2.89
Entacapone	12.00	27.85	14.71	23.93	1.33	0.27	1.62	0.86	2.75	0.15
Fasudil	73.20	105.54	90.99	44.58	38.32	1.32	6.91	5.96	5.34	4.59
Gavestinel	0.10	0.10	0.10	21.05	2.98	0.18	0.11	0.11	2.19	0.31
Gemcitabine	32.00	24.14	23.90	6.69	6.63	1.50	1.82	1.80	1.16	1.15
Ibuprofen	0.82	0.51	0.14	0.31	0.01	0.15	0.18	0.05	0.23	0.00
Imipramine	13.00	31.95	26.81	14.96	29.11	12.00	13.52	11.34	18.98	36.94
Indomethacin	1.58	0.12	0.08	0.03	0.00	0.93	0.27	0.18	0.09	0.00
Ketanserin	6.70	4.87	3.15	3.02	1.07	3.90	2.94	1.91	2.77	0.98
Ketoprofen	1.60	0.60	0.19	0.27	0.01	0.13	0.21	0.07	0.23	0.00
Moxifloxacin	2.40	5.16	5.06	9.86	10.16	1.40	2.43	2.38	5.38	5.54

Mycophenolic acid	3.31	0.25	0.19	0.39	0.01	4.75	0.38	0.28	0.69	0.03
Naltrexone	57.00	24.84	22.79	34.07	34.12	7.60	3.96	3.63	8.57	8.58
<i>O</i> <sup>6</sup> -Benzylguanine	13.6	10.68	12.25	20.68	8.59	0.31	1.05	1.21	2.81	1.17
Pazopanib	0.08	0.05	0.04	0.03	0.01	0.16	0.13	0.09	0.13	0.03
Pefloxacin	2.00	4.15	4.00	6.36	6.09	1.50	3.61	3.47	6.67	6.39
Pyrimethamine	0.05	0.83	0.46	0.70	0.58	0.68	8.39	4.64	2.71	2.26
( <i>S</i> )-Naproxen	0.10	0.08	0.01	0.12	0.00	-	-	-	-	-
Sumatriptan	19.00	25.58	21.25	17.27	15.54	1.70	4.49	3.73	7.08	6.37
Telmisartan	8.40	2.78	2.92	1.50	0.25	5.30	9.18	9.63	4.89	0.82
UCN-01	0.003	0.003	0.0003	5.16	0.31	0.11	0.14	0.02	7.15	0.43
Warfarin	0.05	0.05	0.03	0.11	0.01	0.14	1.52	0.76	4.56	0.19
XK-469	0.12	0.05	0.02	0.09	0.01	0.22	0.16	0.07	0.20	0.01
Zaleplon	16.00	7.96	7.52	6.16	4.53	1.30	1.28	1.21	1.38	1.02
Zoniporide	21.00	45.68	40.06	42.12	34.46	1.70	6.56	5.75	11.19	9.15
Prediction accuracy										
Within 3-fold error (%)		80.6	69.4	55.6	25.0		74.3	68.6	51.4	45.7

<sup>a</sup> The parameters,  $CL_t$  and  $Vd_{ss}$ , for humans were quoted from the results in Chapter I and II.

<sup>b</sup> The predicted total-based  $CL_t$  and  $Vd_{ss}$  for humanized liver mice(I) and immunodeficient mice were quoted from the results in Chapter I and II.

**Table III-6** Prediction accuracy for human CL<sub>t</sub> and Vd<sub>ss</sub> using model compounds.

	Humanized liver mice		Immunodeficient mice	
	Total-based	Unbound-based	Total-based	Unbound-based
CL <sub>t</sub> <sup>a</sup>				
Within 3-fold error (%)	80.6	69.4	55.6	25.0
Vd <sub>ss</sub> <sup>b</sup>				
Within 3-fold error (%)	74.3	68.6	51.4	45.7

<sup>a</sup> The results of 36 compounds.

<sup>b</sup> The results of 35 compounds excepted for (*S*)-naproxen.

#### 第4節 考察

本研究での検証では、39化合物 (ヒト  $f_{up}$  値 0.00073-0.99) を用いた評価において、ヒトとヒト肝細胞移植マウス (I) は免疫不全マウスよりも全体的に高い PPB, すなわち低い  $f_{up}$  値が得られ、ヒト肝細胞移植マウス (I) の  $f_{up}$  プロファイルは宿主である免疫不全マウスとは異なっていた (Table III-1, Fig. III-1). ヒト肝細胞移植マウス (I) とヒトの  $f_{up}$  値は類似しており、ヒト肝細胞移植マウス (I) ではヒト血漿中に最も多く存在するタンパク質である hAb より算出した、ヒト肝細胞移植マウスのヒト肝細胞の RI 値が高いことから妥当な結果といえる (Tateno and others, 2004). 39化合物のうち、ヒトでの  $f_{up}$  が 1%未満の化合物 (aripiprazole, diclofenac, gaviscon, ibuprofen, indomethacin, ketoprofen, pazopanib, (*S*)-naproxen, tamoxifen) は、主に hAb と結合することが知られている (Aarons and others, 1983; Bogdan and others, 2008; Chan and others, 1987; Hoke and others, 2000; Hurwitz and others, 2009; Lammers and others, 2013; Li and others, 2003; Paterson and others, 2003; Sakurama and others, 2018). これらの化合物の  $f_{up}$  値は、ヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿とヒト血漿の間で同程度であった。前述したヒト血漿中の  $f_{up}$  が 1%未満の化合物のうち、ヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿中の ibuprofen, ketoprofen, (*S*)-naproxen の  $f_{up}$  値はヒトの  $f_{up}$  値の 3 倍の範囲から外れた値であった。ヒト肝細胞移植マウス (I) は一個体のドナーから肝細胞を移植しているため、ibuprofen, ketoprofen, (*S*)-naproxen の外れ値はヒト  $f_{up}$  値の個人差に基づく可能性がある。  $f_{up}$  値評価の実験間のばらつきも原因の一つとして考えられる。例えば既報の ibuprofen と ketoprofen のヒト  $f_{up}$  値は、本研究で得たヒ

ト肝細胞移植マウス (I) の  $f_{up}$  値の 3 倍以内であった。報告されている *ibuprofen*, *ketoprofen* のヒト  $f_{up}$  値は 0.0125, 0.06 であり, それぞれヒト肝細胞移植マウス (I)  $f_{up}$  値の 0.77 倍, 0.48 倍であった (Aarons and others, 1983; Soars and others, 2002). (*S*)-*naproxen* については, Piafsky らがヒトの  $f_{up}$  値が 0.0009-0.0136 の範囲内ではばらつくことを報告している (Piafsky and Borga, 1977).

ヒト Ab に加えて, ヒト  $\alpha_1$ -酸性糖タンパク質 (hAGP) もヒト血漿中でのタンパク結合に関与する主要なタンパク質である。Telmisartan は hAb と hAGP の両方に結合する (Stangier and others, 2000). UCN-01 は hAGP に高い親和性結合を示し, PPB に種差があり, UCN-01 のヒト PPB は, 他の動物の PPB に比べて高いことが報告されている (Fuse and others, 2005). ヒト hAGP についてもヒト肝細胞移植マウス (I) の血漿中にヒトと同程度の濃度が分泌されていることが明らかとなっている (Shintani, T., personal communication, フェニックスバイオ社). ヒト AGP 濃度は個体間差が大きいことが報告されていることから (Smith and Waters, 2018), ヒトとヒト肝細胞移植マウス (I) の  $f_{up}$  値の違いは, hAGP 血漿中濃度のばらつきが影響している可能性がある。

創薬研究において薬理作用, DDI, 毒性の予測には PPB が重要であるという観点から, ヒト肝細胞移植マウスの標的組織や血漿中の遊離型薬物濃度を評価することは, 臨床試験での投与計画や投与量を正確に予測するのに役立つと考えられる (Brammer and others, 1990; Day and others, 1995; Debruyne, 1997; Hammarlund-Udenaes and others, 2008; Lin, 2008; Liu and others, 2006; Maurer and others, 2005; Schramm and others, 1994). ヒト肝細胞移植マウスは, pregnane X receptor (PXR) を介した CYP2C や CYP3A4 の誘導, そして CYP2C および CYP3A4 の阻害による DDI の検討に有効な動物モデルであることが報告されている (EMA, 2012; FDA, 2012; Hasegawa and others, 2012). Rifampicin による organic anion-transporting polypeptide 1B (OATP1B) の阻害による DDI について報告があるが (Takehara and others, 2019), これらの研究ではヒト肝細胞移植マウスの PPB の影響について検討していない。しかしながら, ヒトの DDI, 薬理作用, 毒性を予測するためには, ヒト肝細胞移植マウスでの阻害剤や誘導剤等の非結合型薬物の血漿中曝露量を検討する必要がある。ヒト肝細胞移植マウスを

用いた PBPK モデル解析や薬物の PK/PD 関係の評価には、非結合型薬物濃度が重要である。以上のことから、ヒト肝細胞移植マウスの創薬上での有用性を考慮するとヒト肝細胞移植マウスを用いた PPB の評価は必須である (Smith and others, 2010)。ヒト肝細胞移植マウス肝臓には残存マウス肝細胞が含まれているため、ヒト肝細胞移植マウス血漿にはヒトとマウス両方のタンパク質、例えばヒトとマウスの Ab, が含まれており、ヒト肝細胞移植マウス血漿はヒト血漿と同一ではない。

本研究では、ヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿の代替品を探索するため、ヒト血漿とヒト肝細胞移植マウス (I) の宿主である免疫不全マウス血漿を混合して人工ヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿を作成した。ヒト肝細胞移植マウス (I) と免疫不全マウスの血液生化学的な比較によると、ヒト肝細胞移植マウス (I) の総 Ab (total Ab, tAb) は 30 mg/mL, 免疫不全マウスの総 Ab は 22 mg/mL である (Tateno and others, 2013)。一方、本研究で使用したヒト肝細胞移植マウス (I) (RI が 85%以上) の hAb は、約 10 mg/mL と報告されており (フェニックスバイオ社提供), 総 Ab (30 mg/mL) と hAb (10 mg/mL) の差から、ヒト肝細胞移植マウス (I) のマウス Ab (mAb) 量は約 20 mg/mL と推測できる。このヒト肝細胞移植マウス血漿中のヒトとマウスの Ab 量の考察に基づいてヒト血漿と免疫不全マウス血漿の比率が 30:70 となるように混合した。ヒト肝細胞移植マウス (I) の RI が約 85%であるため、ヒト血漿と免疫不全マウス血漿の比率を 85:15 の血漿の全 2 種類について検証した。

本研究では、混合血漿 (85:15) を用いて得られた  $f_u$  の値は、混合血漿 (30:70) を用いて得られた値よりも、ヒト肝細胞移植マウス (I) の  $f_{up}$  の値と良好な相関を示した (Fig. III-1 (C), III-1 (D))。このことは、ヒト肝細胞移植マウス (I) の血液中の hAb 濃度から得られる RI 値 (約 85%) が、実際の hAb と mAb の比率を反映していることを示唆している。総 Ab に対する hAb の比率 (mAb + hAb) は 3 分の 1 程度であり、総 Ab の hAb 濃度から予測される比率は、ヒト肝細胞移植マウス (I) の RI 値 (85%以上) と一致しなかった (Tateno and others, 2013)。Tateno らはヒト肝細胞移植マウス肝臓では、再分化したヒト肝細胞の hAb 分泌活性が低く、残存しているマウス肝細胞の mAb 分泌量が高いことを要

因として挙げている (Tateno and others, 2013). RI と hAb/mAb (1/2) 比の不一致を説明するもう一つの要因として、ヒト肝細胞移植マウス(I) 血漿中の hAb と総 Ab 濃度の分析の定量的信頼性がある. RI と hAb/mAb 比の不一致の要因については、さらに検討が必要であるが、 $f_{up}$  値の類似性からも、ヒト血漿と免疫不全マウス血漿の混合血漿 (85:15) が人工のヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿として適していると考えられる.

ヒト肝細胞移植マウス (II) では 15/24 化合物の  $f_{up}$  値がヒトの  $f_{up}$  値の 3 倍以内であった (Fig. III-2(A)). ヒト肝細胞移植マウス(I) および (II) 共通で用いられている 16 化合物の  $f_{up}$  値は両マウスモデル間で同等であり、13/16 化合物の  $f_{up}$  値は 3 倍の範囲内であったが (Fig. III-2(B)), ヒト肝細胞移植マウス(II) の  $f_{up}$  値は、2 種類の混合血漿中の  $f_u$  値と一致しないことが明らかになった (Fig. III-2(C), 2(D)). ヒト肝細胞移植マウス (I) の結果とは異なり、混合血漿 (85:15) は、ヒト肝細胞移植マウス (II) の人工血漿としては適さないと考えられる. Nakayama らの報告では、用いたヒト肝細胞移植マウス (II) の RI 値は 0%から 95%の範囲にあるにも関わらず、ヒト肝細胞移植マウス (II) の  $f_{up}$  値は一定であり、 $f_{up}$  値は RI 値に依存しない結果であった (Nakayama and others, 2020). 一方、本研究では、ヒト肝細胞移植マウス (I) の  $f_{up}$  値は RI 値に基づいた混合血漿 (85:15) 中の  $f_u$  値は、混合血漿 (30:70) の  $f_u$  値よりも、ヒト肝細胞移植マウス(II) の  $f_{up}$  値 (RI~85%) に類似していた. 両系統のマウスで観測された矛盾を明らかにするためには、RI 値の異なるヒト肝細胞移植マウス(I) 血漿中の  $f_{up}$  評価と両マウスモデルの血漿中の hAb と mAb の絶対定量が必要である. ヒト肝細胞移植マウス(I)の血漿中の hAb (10 mg/mL) はヒト肝細胞移植マウス (II) の血漿中の hAb (6 mg/mL) よりも高く、両マウスの PPB プロファイルの違いに起因している可能性がある (Hasegawa and others, 2011; Tateno and others, 2013). Ab については ELISA 法 (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) での定量が確立されているが、ヒトとマウスの Ab の交差反応性のため、現状では本方法を用いたヒト肝細胞移植マウスの血漿中 mAb の定量分析は困難である. PPB に関して、Ab と同様に AGP も血漿中の主要なタンパク質として重要な役割を果たしているが、ヒト肝細胞移植マウスでの交差反応性のないヒトやマウスの AGP 定量

化の報告はない。したがって、ヒト肝細胞移植マウス (I) とヒト肝細胞移植マウス (II) の血漿中の  $f_{up}$  プロファイルの差を解明するためには、ヒトとマウスの交差反応性を伴わない、例えば LC-MS/MS 法による、選択的な Ab および AGP 等の血漿中タンパク質の定量分析法を確立する必要がある。

ヒト肝細胞移植マウス (I), (II) の 10 化合物 (albuterol, iazepam, diclofenac, ketoprofen, quinidine, repaglinide, (S)-naproxen, telmisartan, verapamil, zaleplon) の  $CL_t$  値を, Fig. III-3, Table III-6 にまとめた (Nakayama and others, 2020; Sanoh and others, 2015). 両マウスにおいて報告された 10 化合物のうち 7 化合物の  $CL_t$  値は, 投与量や実験実施場所が異なるにもかかわらず, 両マウス間で 3 倍以内の差であった。今後両マウスでより多くの化合物による詳細な比較が必要と考えられる。

第I章でのヒト肝細胞移植マウス, サル, ラットを用いたヒトの PK 予測に関する報告では, ヒトとサル, ヒトとラット間で  $f_{up}$  比の補正により, ヒトの  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  の予測精度は向上しなかった。本研究では, ヒト肝細胞移植マウス (I) と免疫不全マウスにおいて, 36 化合物の  $f_{up}$  値を用いて, 第I章と第II章のヒト肝細胞移植マウス(I) を用いたヒト PK 予測に対する  $f_{up}$  補正の効果を検証した。ヒト肝細胞移植マウス(I) と免疫不全マウスからの Unbound-based のヒト  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  の予測精度は Total-based の予測に比べ有意に悪化していた (Table III-5). ヒト肝細胞移植マウス(I)の  $f_{up}$  値がヒトの  $f_{up}$  値の 3 倍から外れていた 5 つの化合物 (diazepam, ibuprofen, ketoprofen, (S)-naproxen, UCN-01) について, ヒト  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  値の予測の際の  $f_{up}$  比の補正の影響を検証した。Ibuprofen, ketoprofen, (S)-naproxen, UCN-01 の Total-based の  $CL_t$  の予測値は, ヒトの実測の  $CL_t$  値の 3 倍以内であったが, Unbound-based の  $CL_t$  予測値は 3 倍以内に入らなかった (Table III-4). Diazepam については予測したヒトの Total-based, Unbound-based の  $CL_t$  値は共にヒトの実測  $CL_t$  値の 3 倍以内に入らなかった。この中で 4 化合物のヒト  $Vd_{ss}$  値が利用可能であり, ヒトの Total-based の予測  $Vd_{ss}$  値は, ヒトの実測値の 3 倍以内であり (Table III-4), ヒト肝細胞移植マウス(I) の  $f_{up}$  値を用いた場合 UCN-01 の Unbound-based の  $Vd_{ss}$  予測値のみが外れ値であった。以上のことから, ヒトとヒト肝細胞移植マウス(I) の  $f_{up}$  比を考慮しても

ヒトの  $CL_t$  と  $Vd_{ss}$  の予測精度は向上しなかった。理由は不明であるが、その結果は先行研究の結果と一致している (Hosea and others, 2009; Lombardo and others, 2013a; Lombardo and others, 2013b)。

ヒト肝細胞移植マウス (II) の場合、 $f_{up}$  補正なしのヒト  $CL_t$  予測は  $f_{up}$  補正した場合より良好な予測が得られることが報告されている (Nakayama and others, 2020)。ヒト肝細胞移植マウスの血漿が貴重であり得られる血漿量が少ないことから、ヒト PK 予測にヒト肝細胞移植マウスの  $f_{up}$  評価が不要であることはヒト肝細胞移植マウスのヒト PK 予測を実施する上での利点と考えられる。

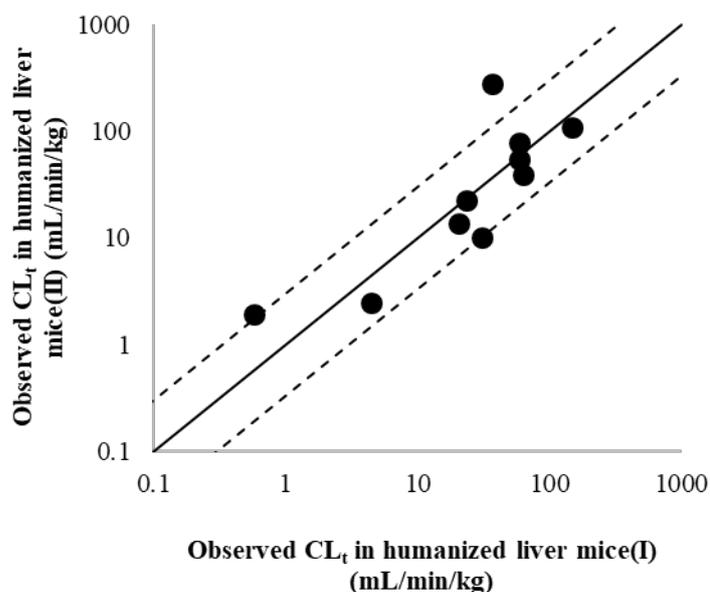
**Table III-6** Summary of obtained  $CL_t$  in humanized liver mice (I) and (II).

Compounds	Observed $CL_t$ (mL/min/kg)	
	Humanized liver mice (I) <sup>a</sup>	Humanized liver mice (II) <sup>b</sup>
Albuterol	146.02	107.83
Diazepam	58.45	78.28
Diclofenac	30.62	10.17
Ketoprofen	4.43	2.47
Quinidine	36.4 <sup>c</sup>	275
Repaglinide	23.7 <sup>c</sup>	22.7
(S)-Naproxen	0.58	1.93
Telmisartan	20.52	13.7
Verapamil	62.3 <sup>c</sup>	38.87
Zaleplon	58.68	55.2

<sup>a</sup> The observed  $CL_t$  values in humanized liver mice(I) were quoted from a literature (Miyamoto and others, 2017; Miyamoto and others, 2019).

<sup>b</sup> The observed  $CL_t$  values in humanized liver mice(II) mice (RI  $\geq$  67.9%) were quoted from a literature (Nakayama and others, 2020).

<sup>c</sup> The observed  $CL_t$  values in humanized liver mice(I) for quinidine, repaglinide and verapamil were quoted from a literature (Sanoh and others, 2015).



**Figure III-3** Relationship of obtained  $CL_t$  values for 10 compounds between humanized liver mice (I) and (II).

#### 第5節 小括

本研究ではヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿中の 39 化合物の PPB プロファイルはヒトと類似していることを検証した。別の系統であるヒト肝細胞移植マウス (II) の薬物の PPB はヒトの PPB とは異なっており、2 種類のヒト肝細胞移植マウスでは異なる PK が得られる可能性が示唆された。これまでの研究では、ヒト肝細胞移植マウスの  $f_{up}$  はヒトと同等として扱われることが多かったが (Kamimura and others, 2015; Nakayama and others, 2019; Naritomi and others, 2018; Naritomi and others, 2019; Sanoh and others, 2015), ヒト肝細胞移植マウスの PPB は、用いるヒト肝細胞移植マウスの系統や化合物によって必ずしも同等ではないことが明らかとなった。本研究ではヒトの PK 予測には  $f_{up}$  値の補正が必要ないことを明らかにしたが、ヒト肝細胞移植マウスから得られる薬理効果, DDI, 毒性データを用いてヒトでのこれらの効果を予測するためには PPB の評価が必要である。そういった観点においては本研究で検討した混合血漿 (ヒト-免疫不全マウス血漿比 85:15) は、PPB 評価においてヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿に代わる有用な人工血漿であることが示された。

## 総括

医薬候補品のヒトでの PK を非臨床段階のデータにより高い精度で予測することは、新薬開発の成功確率向上のために極めて重要であるが、完全な予測方法は未だ存在しない。その理由の一つには種差-組織移行に関するタンパク結合の種差に基づく  $V_d$  の予測の難しさ、ある代謝の種差に基づく  $CL$  の予測の難しさ-が挙げられる。過去の膨大なデータに基づくと、サルが遺伝的にヒトに近いことから、ヒトの  $V_{d_{ss}}$  および  $CL_t$  を精度良く予測できるモデルとして推奨されている。一方で、サルにおいても予測不可能であった事例も数多く存在する。 $V_{d_{ss}}$  および  $CL_t$  により規定される  $t_{1/2}$  予測は、ヒトでの投与間隔の設定に重要なパラメータである。臨床試験において医薬候補品が非臨床からは予測できない長い  $t_{1/2}$  値を示し、毒性等から臨床開発中止、あるいは臨床試験の延長となる例もあり、非臨床データを用いた精度の高い  $t_{1/2}$  予測は創薬において有用である。本研究ではヒトの PK 予測に重要なパラメータ、 $V_{d_{ss}}$  と  $CL_t$  において、 $V_{d_{ss}}$  を示す組織移行性に関連するパラメータである PPB や  $CL_t$  に影響する代謝の種差を克服できる可能性のあるモデルとして、ヒト肝細胞移植マウスに着目し、ヒト  $V_{d_{ss}}$ ,  $CL_t$ ,  $t_{1/2}$  の予測精度を評価した。

ヒト肝細胞移植マウスは、PK 予測だけでなく、薬効、DDI および毒性分野においても活用されているが、これらに大きな影響を与える薬物のタンパクへの結合については考慮された解析例が少ない。一般的にはヒト肝細胞移植マウス中の PPB はヒトと同等として扱われていることが多い。本研究では 39 化合物のヒト肝細胞移植マウスにおける PPB を網羅的に測定し、ヒトの PPB との類似性を調査した。

第I章では、P450 酵素だけでなく、AO, UGTs 等、多様な主代謝経路により消失することが報告されている 30 化合物を選択し、ヒト肝細胞移植マウス、サル、ラット間でヒト  $V_{d_{ss}}$  と  $CL_t$  の予測精度を比較した。ヒト肝細胞移植マウスを用いた予測では、予測精度が良好であると報告されているサルと比較しても  $V_{d_{ss}}$  予測では同等の結果を示し、特に予測が困難とされる  $CL_t$  予測ではサルやラットより良好な予測精度を示した。以上のことから、実験に必要な薬物量、霊長類に対する倫理的問題を考慮すると、ヒト肝細胞移植マウスがこれらのパ

ラメータの予測に有用なモデルであることを明らかとした。一度に低用量で複数化合物を投与するカセット投与や一定期間の休薬期間において複数回投与することで、貴重なヒト肝細胞移植マウスを有効活用することができることを示した。

第II章では、第I章で医薬候補品のヒト  $V_{d_{ss}}$  と  $CL_t$  の高い予測精度を示したヒト肝細胞移植マウスを用いて、両パラメータから算出される  $t_{1/2}$  予測について、非臨床モデルで予測できなかった長い  $t_{1/2}$  をヒトで示した化合物である UCN-01 や compound A を含めた 14 化合物を用いて評価した。結果として、ヒト肝細胞移植マウスから得られた予測値はヒトでの実測  $t_{1/2}$  値の 2 倍以内の予測精度は 71.4% であり、宿主マウスと比較しても高い予測精度を示した。UCN-01 や compound A もヒト肝細胞移植マウスを用いればヒトでの消失相の  $t_{1/2}$  が予測可能であったことから、本モデルを用いれば従来の非臨床モデルでは予測不可能であったヒトでの長い  $t_{1/2}$  を示す医薬候補品の体内動態の特徴を非臨床段階で把握することができ、医薬候補品選択に有用であることを示した。

第III章では、第I章と第II章でヒト肝細胞移植マウスを用いることにより得られた、 $V_{d_{ss}}$ 、 $CL_t$ 、 $t_{1/2}$  の予測の高いヒト予測精度に加えて、ヒト予測で考慮すべき PPB のヒトとヒト肝細胞移植マウス間の種差について 39 種の薬物を用いて網羅的に調べた。ここでは第I章と第II章で使用した免疫不全型のヒト肝細胞移植マウス (I) に加え、肝誘導障害型ヒト化マウス (ヒト化肝細胞移植マウス (II) の血漿を用いた。ヒト肝細胞移植マウス (I) の PPB はヒト肝細胞移植マウス (II) のそれらよりヒトと類似しており、用いるヒト肝細胞移植マウスの系統や薬物の性質によってヒトと同等ではないことが示された。以上のことから、ヒト肝細胞移植マウスから得られる薬理効果、DDI および毒性データを用いてヒトを予測するためには PPB の評価が必要であり、本研究で検討した混合血漿 (ヒト-免疫不全マウス血漿比 85:15) は、PPB 評価において貴重なヒト肝細胞移植マウス (I) 血漿に代わる有用な代替品であることが示された。

以上、本研究により、ヒトでの医薬候補品の主要 PK パラメータ、すなわち  $V_{d_{ss}}$ 、 $CL_t$ 、 $t_{1/2}$  のヒト肝細胞移植マウスを用いた予測手法の有用性を示した。この新たなヒト肝細胞移植マウスの活用により、従来系では予測不可能であつ

たヒトでの長い  $t_{1/2}$  を示す医薬候補品の体内動態の特徴を非臨床段階にて把握し  
うることを明示した。ヒト肝細胞移植マウスの系統によって薬物の **PPB** がヒト  
と異なることを示した。多種多様な医薬候補品を一度に扱う創薬探索段階にて  
ヒト肝細胞移植マウスの **PPB** を評価する際、ヒトと免疫不全マウスの混合血漿  
を広く供給可能な創薬ツールとしての有用性を示した。以上のことから、ヒト  
肝細胞移植マウスや関連する動物由来試料を創薬初期段階に導入活用する本研  
究手法は、創薬プロセス上重要な薬物動態規定値の予測精度向上に資すること  
を示した。本研究で提案するヒト肝細胞移植マウスの創薬段階での積極的活用  
は、医薬候補品の高精度ヒト体内動態研究予測の新技术基盤となり、迅速な化  
合物の最適化と医薬候補品の創出に大きく貢献することが期待される。

本論文内容の誌上発表

本論文の内容は以下の原著論文に発表した。

- Miyamoto M, Iwasaki S, Chisaki I, Nakagawa S, Amano N, Hirabayashi H (2017) Comparison of predictability for human pharmacokinetics parameters among monkeys, rats, and chimeric mice with humanised liver. *Xenobiotica*. **47**(12):1052-1063.
- Miyamoto M, Iwasaki S, Chisaki I, Nakagawa S, Amano N, Kosugi Y, Hirabayashi H (2019) Prediction of human pharmacokinetics of long half-life compounds using chimeric mice with humanised liver. *Xenobiotica*. **49**(12):1379-1387.
- Miyamoto M, Kosugi Y, Iwasaki S, Chisaki I, Nakagawa S, Amano N, Hirabayashi H (2021) Characterization of plasma protein binding in two mouse models of humanized liver, PXB mouse and humanized TK-NOG mouse. *Xenobiotica*. **51**(1):51-60.

## 謝辞

本論文は筆者が武田薬品工業株式会社薬物動態研究所において、ヒト肝細胞移植マウスを用いたヒト動態パラメータ予測に関する基盤研究の成果をまとめたものです。稿を終えるにあたり、本論文の主査として、ご審査賜りました昭和薬科大学薬理学研究室教授 渡邊泰男先生に謹んで感謝の意を表します。本論文の副査として、ご審査賜りました昭和薬科大学薬物治療学研究室教授 水谷颯洋先生、並びに同大学衛生化学研究室教授 石井功先生に謹んで感謝の意を表します。

昭和薬科大学薬物動態学研究室教授 山崎浩史先生には、論文作成にあたってご指導をいただくとともに、成果発表の機会を与えていただきました。謹んで感謝の意を表します。昭和薬科大学薬物動態学研究室准教授 清水万紀子先生、並びに同大学薬物動態学研究室講師 村山典恵先生には、論文作成および成果発表にあたって有益なご助言とご試験を頂き、ここに感謝の意を表します。

研究の機会を与えていただくと共に、終始多大なるご支援とご助言を頂きました。武田薬品工業株式会社リサーチ薬物動態研究所所長 森脇俊哉博士、薬物動態研究所リサーチマネージャー 平林英樹博士、薬物動態研究所主席研究員 小杉洋平博士、ニューロサイエンス創薬ユニットニューロサイエンス研究推進室室長 平井圭介博士、ニューロサイエンス研究推進室ディレクター 水上温司修士、ニューロサイエンス研究推進室主席部員 犬塚弘幸修士、アクセリード株式会社 天野信之修士に感謝の意を表します。本研究にご協力いただいた、武田薬品工業株式会社リサーチ薬物動態研究所主席研究員 岩崎慎治修士、薬物動態研究所主任研究員 知寄郁美修士、アクセリード株式会社 中川さやか氏並びに多くの皆様に深く感謝致します。

最後に、本研究に理解を示し、遂行を支えてくれた家族に心より感謝致します。

## 参考文献

- Aarons L, Grennan DM, Siddiqui M. 1983. The binding of ibuprofen to plasma proteins. *Eur J Clin Pharmacol* 25(6):815-818.
- Akabane T, Gerst N, Masters JN, Tamura K. 2012a. A quantitative approach to hepatic clearance prediction of metabolism by aldehyde oxidase using custom pooled hepatocytes. *Xenobiotica* 42(9):863-871.
- Akabane T, Gerst N, Naritomi Y, Masters JN, Tamura K. 2012b. A practical and direct comparison of intrinsic metabolic clearance of several non-CYP enzyme substrates in freshly isolated and cryopreserved hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 27(2):181-191.
- Akabane T, Tabata K, Kadono K, Sakuda S, Terashita S, Teramura T. 2010. A comparison of pharmacokinetics between humans and monkeys. *Drug Metab Dispos* 38(2):308-316.
- Almond DS, Szwandt IS, Edwards G, Lee MG, Winstanley PA. 2000. Disposition of intravenous pyrimethamine in healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 44(6):1691-1693.
- Anastasiou-Nana M, Levis GM, Moulopoulos S. 1982. Pharmacokinetics of amiodarone after intravenous and oral administration. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 20(11):524-529.
- Baldock GA, Brodie RR, Chasseaud LF, Taylor T, Walmsley LM, Catanese B. 1991. Pharmacokinetics of benzydamine after intravenous, oral, and topical doses to human subjects. *Biopharm Drug Dispos* 12(7):481-492.
- Banker MJ, Clark TH, Williams JA. 2003. Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. *J Pharm Sci*

92(5):967-974.

- Bjornsson TD, Meffin PJ, Swezey S, Blaschke TF. 1979. Clofibrate displaces warfarin from plasma proteins in man: an example of a pure displacement interaction. *J Pharmacol Exp Ther* 210(3):316-321.
- Bogdan M, Pirnau A, Floare C, Bugeac C. 2008. Binding interaction of indomethacin with human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal* 47(4-5):981-984.
- Bowalgaha K, Miners JO. 2001. The glucuronidation of mycophenolic acid by human liver, kidney and jejunum microsomes. *Br J Clin Pharmacol* 52(5):605-609.
- Brammer KW, Farrow PR, Faulkner JK. 1990. Pharmacokinetics and tissue penetration of fluconazole in humans. *Rev Infect Dis* 12 Suppl 3:S318-326.
- Carter BL, Ernst ME, Cohen JD. 2004. Hydrochlorothiazide versus chlorthalidone: evidence supporting their interchangeability. *Hypertension* 43(1):4-9.
- Chan KK, Vyas KH, Brandt KD. 1987. In vitro protein binding of diclofenac sodium in plasma and synovial fluid. *J Pharm Sci* 76(2):105-108.
- Choisy H, Millart H. 1980. [Experimental pharmacology of probucol (author's transl)]. *Nouv Presse Med* 9(40):2981-2984.
- Dalvie D, Zhang C, Chen W, Smolarek T, Obach RS, Loi CM. 2010. Cross-species comparison of the metabolism and excretion of zoniporide: contribution of aldehyde oxidase to interspecies differences. *Drug Metab Dispos* 38(4):641-654.
- Day RO, Francis H, Vial J, Geisslinger G, Williams KM. 1995. Naproxen concentrations in plasma and synovial fluid and effects on prostanoid concentrations. *J Rheumatol* 22(12):2295-2303.
- Debruyne D. 1997. Clinical pharmacokinetics of fluconazole in superficial and systemic mycoses. *Clin Pharmacokinet* 33(1):52-77.

- Dedrick RL. 1973. Animal scale-up. *J Pharmacokinet Biopharm* 1(5):435-461.
- Deguchi T, Watanabe N, Kurihara A, Igeta K, Ikenaga H, Fusegawa K, Suzuki N, Murata S, Hirouchi M, Furuta Y and others. 2011. Human pharmacokinetic prediction of UDP-glucuronosyltransferase substrates with an animal scale-up approach. *Drug Metab Dispos* 39(5):820-829.
- Deppe S, Boger RH, Weiss J, Benndorf RA. 2010. Telmisartan: a review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6(7):863-871.
- Di L, Breen C, Chambers R, Eckley ST, Fricke R, Ghosh A, Harradine P, Kalvass JC, Ho S, Lee CA and others. 2017. Industry Perspective on Contemporary Protein-Binding Methodologies: Considerations for Regulatory Drug-Drug Interaction and Related Guidelines on Highly Bound Drugs. *J Pharm Sci* 106(12):3442-3452.
- Duggan DE, Hogans AF, Kwan KC, McMahon FG. 1972. The metabolism of indomethacin in man. *J Pharmacol Exp Ther* 181(3):563-575.
- EMA. 2009. European Medicines Agency approval document: assessment report for CONBRIZA. Procedure No EMEA/H/C/913:1-49.
- EMA. 2012. EMA guidelines on the investigation of drug interactions.
- Engel G, Hofmann U, Heidemann H, Cosme J, Eichelbaum M. 1996. Antipyrine as a probe for human oxidative drug metabolism: identification of the cytochrome P450 enzymes catalyzing 4-hydroxyantipyrine, 3-hydroxymethylantipyrine, and norantipyrine formation. *Clin Pharmacol Ther* 59(6):613-623.
- FDA. 1995. FDA approval package document: division of oncology and pulmonary drug products review and evaluation of pharmacology and toxicology data original review. NDA:20-509.

- FDA U. 2012. FDA Guidance for industry. Drug interaction studies - Study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations.
- Fournier T, Medjoubi NN, Porquet D. 2000. Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta* 1482(1-2):157-171.
- Fuse E, Kuwabara T, Sparreboom A, Sausville EA, Figg WD. 2005. Review of UCN-01 development: a lesson in the importance of clinical pharmacology. *J Clin Pharmacol* 45(4):394-403.
- Hammarlund-Udenaes M, Friden M, Syvanen S, Gupta A. 2008. On the rate and extent of drug delivery to the brain. *Pharm Res* 25(8):1737-1750.
- Hanke N, Frechen S, Moj D, Britz H, Eissing T, Wendl T, Lehr T. 2018. PBPK Models for CYP3A4 and P-gp DDI Prediction: A Modeling Network of Rifampicin, Itraconazole, Clarithromycin, Midazolam, Alfentanil, and Digoxin. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 7(10):647-659.
- Hasegawa M, Kawai K, Mitsui T, Taniguchi K, Monnai M, Wakui M, Ito M, Suematsu M, Peltz G, Nakamura M and others. 2011. The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun* 405(3):405-410.
- Hasegawa M, Tahara H, Inoue R, Kakuni M, Tateno C, Ushiki J. 2012. Investigation of drug-drug interactions caused by human pregnane X receptor-mediated induction of CYP3A4 and CYP2C subfamilies in chimeric mice with a humanized liver. *Drug Metab Dispos* 40(3):474-480.
- Heuberger J, Schmidt S, Derendorf H. 2013. When is protein binding important? *J Pharm Sci* 102(9):3458-3467.
- Hochman J, Tang C, Prueksaritanont T. 2015. Drug-drug interactions related to altered

- absorption and plasma protein binding: theoretical and regulatory considerations, and an industry perspective. *J Pharm Sci* 104(3):916-929.
- Hoke JF, Dyker AG, Barnaby RJ, Lees KR. 2000. Pharmacokinetics of a glycine site antagonist (gavestinel) following multiple dosing in patients with acute stroke. *Eur J Clin Pharmacol* 55(11-12):867-872.
- Holford NH. 1986. Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics of warfarin. Understanding the dose-effect relationship. *Clin Pharmacokinet* 11(6):483-504.
- Holt DW, Tucker GT, Jackson PR, Storey GC. 1983. Amiodarone pharmacokinetics. *Am Heart J* 106(4 Pt 2):840-847.
- Honda GS, Pearce RG, Pham LL, Setzer RW, Wetmore BA, Sipes NS, Gilbert J, Franz B, Thomas RS, Wambaugh JF. 2019. Using the concordance of in vitro and in vivo data to evaluate extrapolation assumptions. *PLoS One* 14(5):e0217564.
- Hosea NA, Collard WT, Cole S, Maurer TS, Fang RX, Jones H, Kakar SM, Nakai Y, Smith BJ, Webster R and others. 2009. Prediction of human pharmacokinetics from preclinical information: comparative accuracy of quantitative prediction approaches. *J Clin Pharmacol* 49(5):513-533.
- Houston JB. 1994. Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol* 47(9):1469-1479.
- Hurwitz HI, Dowlati A, Saini S, Savage S, Suttle AB, Gibson DM, Hodge JP, Merkle EM, Pandite L. 2009. Phase I trial of pazopanib in patients with advanced cancer. *Clin Cancer Res* 15(12):4220-4227.
- Hutzler JM, Cerny MA, Yang YS, Asher C, Wong D, Frederick K, Gilpin K. 2014. Cynomolgus monkey as a surrogate for human aldehyde oxidase metabolism of the EGFR inhibitor BIBX1382. *Drug Metab Dispos* 42(10):1751-1760.

- Hutzler JM, Obach RS, Dalvie D, Zientek MA. 2013. Strategies for a comprehensive understanding of metabolism by aldehyde oxidase. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9(2):153-168.
- Hutzler JM, Yang YS, Albaugh D, Fullenwider CL, Schmenk J, Fisher MB. 2012. Characterization of aldehyde oxidase enzyme activity in cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 40(2):267-275.
- Inoue T, Sugihara K, Ohshita H, Horie T, Kitamura S, Ohta S. 2009. Prediction of human disposition toward S-3H-warfarin using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Pharmacokinet* 24(2):153-160.
- Ito K, Houston JB. 2004. Comparison of the use of liver models for predicting drug clearance using in vitro kinetic data from hepatic microsomes and isolated hepatocytes. *Pharm Res* 21(5):785-792.
- Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Nakajima Y, Sugiyama Y. 1998. Quantitative prediction of in vivo drug clearance and drug interactions from in vitro data on metabolism, together with binding and transport. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:461-499.
- Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, Ishizaki T, Green CE, Tyson CA, Sugiyama Y. 1997. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol Ther* 73(2):147-171.
- Kakuni M, Morita M, Matsuo K, Katoh Y, Nakajima M, Tateno C, Yokoi T. 2012. Chimeric mice with a humanized liver as an animal model of troglitazone-induced liver injury. *Toxicol Lett* 214(1):9-18.
- Kamimura H, Ito S, Chijiwa H, Okuzono T, Ishiguro T, Yamamoto Y, Nishinoaki S, Ninomiya SI, Mitsui M, Kalgutkar AS and others. 2017. Simulation of human plasma concentration-time profiles of the partial glucokinase activator PF-

04937319 and its disproportionate N-demethylated metabolite using humanized chimeric mice and semi-physiological pharmacokinetic modeling. *Xenobiotica* 47(5):382-393.

Kamimura H, Ito S, Nozawa K, Nakamura S, Chijiwa H, Nagatsuka S, Kuronuma M, Ohnishi Y, Suemizu H, Ninomiya S. 2015. Formation of the accumulative human metabolite and human-specific glutathione conjugate of diclofenac in TK-NOG chimeric mice with humanized livers. *Drug Metab Dispos* 43(3):309-316.

Kannan R, Miller S, Singh BN. 1985. Tissue uptake and metabolism of amiodarone after chronic administration in rabbits. *Drug Metab Dispos* 13(6):646-650.

Karbwang J, White NJ. 1990. Clinical pharmacokinetics of mefloquine. *Clin Pharmacokinet* 19(4):264-279.

Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Kataoka M, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K, Yokoi T. 2004. Expression of human cytochromes P450 in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* 32(12):1402-1410.

Katoh M, Matsui T, Nakajima M, Tateno C, Soeno Y, Horie T, Iwasaki K, Yoshizato K, Yokoi T. 2005a. In vivo induction of human cytochrome P450 enzymes expressed in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* 33(6):754-763.

Katoh M, Matsui T, Okumura H, Nakajima M, Nishimura M, Naito S, Tateno C, Yoshizato K, Yokoi T. 2005b. Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* 33(9):1333-1340.

Kaye B, Offerman JL, Reid JL, Elliott HL, Hillis WS. 1984. A species difference in the presystemic metabolism of carbazepin in dog and man. *Xenobiotica* 14(12):935-945.

Kilford PJ, Stringer R, Sohal B, Houston JB, Galetin A. 2009. Prediction of drug

clearance by glucuronidation from in vitro data: use of combined cytochrome P450 and UDP-glucuronosyltransferase cofactors in alamethicin-activated human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 37(1):82-89.

Kim KP, Kim BH, Lim KS, Kim TE, Shin SG, Jang IJ, Yu KS. 2009. Potential interactions between cilostazol and probucol: a two-part, single-dose, open-label study in healthy Korean male volunteers. *Clin Ther* 31(10):2098-2106.

Kinzig-Schippers M, Fuhr U, Zaigler M, Dammeyer J, Rusing G, Labedzki A, Bulitta J, Sorgel F. 1999. Interaction of pefloxacin and enoxacin with the human cytochrome P450 enzyme CYP1A2. *Clin Pharmacol Ther* 65(3):262-274.

Kivisto KT, Villikka K, Nyman L, Anttila M, Neuvonen PJ. 1998. Tamoxifen and toremifene concentrations in plasma are greatly decreased by rifampin. *Clin Pharmacol Ther* 64(6):648-654.

Klein DJ, Thorn CF, Desta Z, Flockhart DA, Altman RB, Klein TE. 2013. PharmGKB summary: tamoxifen pathway, pharmacokinetics. *Pharmacogenet Genomics* 23(11):643-647.

Klotz U, Antonin KH, Bieck PR. 1976. Proceedings: Hepatic elimination of diazepam and its active metabolites. *Arzneimittelforschung* 26(6):1235-1236.

Klumpp K, Shimada T, Allweiss L, Volz T, Lutgehetmann M, Hartman G, Flores OA, Lam AM, Dandri M. 2018. Efficacy of NVR 3-778, Alone and In Combination With Pegylated Interferon, vs Entecavir In uPA/SCID Mice With Humanized Livers and HBV Infection. *Gastroenterology* 154(3):652-662 e658.

Kolawole JA, Mustapha A, Abudu-Aguye I, Ocheke N. 2000. Mefloquine pharmacokinetics in healthy subjects and in peptic ulcer patients after cimetidine administration. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 25(3-4):165-170.

- Koyanagi T, Yamaura Y, Yano K, Kim S, Yamazaki H. 2014. Age-related pharmacokinetic changes of acetaminophen, antipyrine, diazepam, diphenhydramine, and ofloxacin in male cynomolgus monkeys and beagle dogs. *Xenobiotica* 44(10):893-901.
- Kubo M, Koue T, Inaba A, Takeda H, Maune H, Fukuda T, Azuma J. 2005. Influence of itraconazole co-administration and CYP2D6 genotype on the pharmacokinetics of the new antipsychotic ARIPIPRAZOLE. *Drug Metab Pharmacokinet* 20(1):55-64.
- Lammers I, Lhiaubet-Vallet V, Ariese F, Miranda MA, Gooijer C. 2013. Binding of naproxen enantiomers to human serum albumin studied by fluorescence and room-temperature phosphorescence. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 105:67-73.
- Lang DH, Rettie AE. 2000. In vitro evaluation of potential in vivo probes for human flavin-containing monooxygenase (FMO): metabolism of benzydamine and caffeine by FMO and P450 isoforms. *Br J Clin Pharmacol* 50(4):311-314.
- Latini R, Tognoni G, Kates RE. 1984. Clinical pharmacokinetics of amiodarone. *Clin Pharmacokinet* 9(2):136-156.
- Lautala P, Ethell BT, Taskinen J, Burchell B. 2000. The specificity of glucuronidation of entacapone and tolcapone by recombinant human UDP-glucuronosyltransferases. *Drug Metab Dispos* 28(11):1385-1389.
- Lemoine A, Gautier JC, Azoulay D, Kiffel L, Belloc C, Guengerich FP, Maurel P, Beaune P, Leroux JP. 1993. Major pathway of imipramine metabolism is catalyzed by cytochromes P-450 1A2 and P-450 3A4 in human liver. *Mol Pharmacol* 43(5):827-832.
- Li F, Zhou D, Guo X. 2003. Study on the protein binding of ketoprofen using capillary

- electrophoresis frontal analysis compared with liquid chromatography frontal analysis. *J Chromatogr Sci* 41(3):137-141.
- Lin JH. 2008. CSF as a surrogate for assessing CNS exposure: an industrial perspective. *Curr Drug Metab* 9(1):46-59.
- Liu X, Smith BJ, Chen C, Callegari E, Becker SL, Chen X, Cianfroga J, Doran AC, Doran SD, Gibbs JP and others. 2006. Evaluation of cerebrospinal fluid concentration and plasma free concentration as a surrogate measurement for brain free concentration. *Drug Metab Dispos* 34(9):1443-1447.
- Lombardo F, Berellini G, Labonte LR, Liang G, Kim S. 2016. Systematic Evaluation of Wajima Superposition (Steady-State Concentration to Mean Residence Time) in the Estimation of Human Intravenous Pharmacokinetic Profile. *J Pharm Sci* 105(3):1277-1287.
- Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, Dennehy MK, Zhan J, Gunduz M, Harriman SP, Berellini G, Liric Rajlic I, Obach RS. 2013a. Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on in vivo animal pharmacokinetic data, part 2: clearance. *J Clin Pharmacol* 53(2):178-191.
- Lombardo F, Waters NJ, Argikar UA, Dennehy MK, Zhan J, Gunduz M, Harriman SP, Berellini G, Rajlic IL, Obach RS. 2013b. Comprehensive assessment of human pharmacokinetic prediction based on in vivo animal pharmacokinetic data, part 1: volume of distribution at steady state. *J Clin Pharmacol* 53(2):167-177.
- Long L, Berg SL, Roy SK, McCully CL, Song-Yoo HW, Moschel RC, Balis FM, Dolan ME. 2000. Plasma and cerebrospinal fluid pharmacokinetics of O6-benzylguanine and analogues in nonhuman primates. *Clin Cancer Res* 6(9):3662-3669.
- Maurer TS, Debartolo DB, Tess DA, Scott DO. 2005. Relationship between exposure and

- nonspecific binding of thirty-three central nervous system drugs in mice. *Drug Metab Dispos* 33(1):175-181.
- Miners JO, Knights KM, Houston JB, Mackenzie PI. 2006. In vitro-in vivo correlation for drugs and other compounds eliminated by glucuronidation in humans: pitfalls and promises. *Biochem Pharmacol* 71(11):1531-1539.
- Miyamoto M, Iwasaki S, Chisaki I, Nakagawa S, Amano N, Hirabayashi H. 2017. Comparison of predictability for human pharmacokinetics parameters among monkeys, rats, and chimeric mice with humanised liver. *Xenobiotica* 47(12):1052-1063.
- Miyamoto M, Iwasaki S, Chisaki I, Nakagawa S, Amano N, Kosugi Y, Hirabayashi H. 2019. Prediction of human pharmacokinetics of long half-life compounds using chimeric mice with humanised liver. *Xenobiotica*:1-9.
- Moise PA, Birmingham MC, Schentag JJ. 2000. Pharmacokinetics and metabolism of moxifloxacin. *Drugs Today (Barc)* 36(4):229-244.
- Mordenti J. 1986. Man versus beast: pharmacokinetic scaling in mammals. *J Pharm Sci* 75(11):1028-1040.
- Mueller H, Wildum S, Luangsay S, Walther J, Lopez A, Tropberger P, Ottaviani G, Lu W, Parrott NJ, Zhang JD and others. 2018. A novel orally available small molecule that inhibits hepatitis B virus expression. *J Hepatol* 68(3):412-420.
- Nakajima M, Inoue T, Shimada N, Tokudome S, Yamamoto T, Kuroiwa Y. 1998. Cytochrome P450 2C9 catalyzes indomethacin O-demethylation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 26(3):261-266.
- Nakayama K, Ito S, Suzuki M, Takubo H, Yamazaki H, Nomura Y. 2018. Prediction of human pharmacokinetics of typical compounds by a physiologically based

method using chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica*:1-11.

Nakayama K, Ito S, Suzuki M, Takubo H, Yamazaki H, Nomura Y. 2019. Prediction of human pharmacokinetics of typical compounds by a physiologically based method using chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* 49(4):404-414.

Nakayama K, Kamimura H, Suemizu H, Yoneda N, Nishiwaki M, Iwamoto K, Mizunaga M, Negoro T, Ito S, Yamazaki H and others. 2020a. Predicted values for human total clearance of a variety of typical compounds with differently humanized-liver mouse plasma data. *Drug Metab Pharmacokinet* 35(4):389-396.

Naritomi Y, Sanoh S, Ohta S. 2018. Chimeric mice with humanized liver: Application in drug metabolism and pharmacokinetics studies for drug discovery. *Drug Metab Pharmacokinet* 33(1):31-39.

Naritomi Y, Sanoh S, Ohta S. 2019. Utility of Chimeric Mice with Humanized Liver for Predicting Human Pharmacokinetics in Drug Discovery: Comparison with in Vitro-in Vivo Extrapolation and Allometric Scaling. *Biol Pharm Bull* 42(3):327-336.

Naritomi Y, Terashita S, Kimura S, Suzuki A, Kagayama A, Sugiyama Y. 2001. Prediction of human hepatic clearance from in vivo animal experiments and in vitro metabolic studies with liver microsomes from animals and humans. *Drug Metab Dispos* 29(10):1316-1324.

Nihira K, Nan-Ya KI, Kakuni M, Ono Y, Yoshikawa Y, Ota T, Hiura M, Yoshinari K. 2019. Chimeric Mice With Humanized Livers Demonstrate Human-Specific Hepatotoxicity Caused by a Therapeutic Antibody Against TRAIL-Receptor 2/Death Receptor 5. *Toxicol Sci* 167(1):190-201.

Obach RS. 1999. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic

- microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* 27(11):1350-1359.
- Obach RS, Baxter JG, Liston TE, Silber BM, Jones BC, MacIntyre F, Rance DJ, Wastall P. 1997. The prediction of human pharmacokinetic parameters from preclinical and in vitro metabolism data. *J Pharmacol Exp Ther* 283(1):46-58.
- Obach RS, Lombardo F, Waters NJ. 2008. Trend analysis of a database of intravenous pharmacokinetic parameters in humans for 670 drug compounds. *Drug Metab Dispos* 36(7):1385-1405.
- Ogawa K, Kato M, Houjo T, Ishigai M. 2013. A new approach to predicting human hepatic clearance of CYP3A4 substrates using monkey pharmacokinetic data. *Xenobiotica* 43(5):468-478.
- Papazyan R, Liu X, Liu J, Dong B, Plummer EM, Lewis RD, 2nd, Roth JD, Young MA. 2018. FXR activation by obeticholic acid or nonsteroidal agonists induces a human-like lipoprotein cholesterol change in mice with humanized chimeric liver. *J Lipid Res* 59(6):982-993.
- Patel IH, Levy RH, Cutler RE. 1980. Phenobarbital--valporic acid interaction. *Clin Pharmacol Ther* 27(4):515-521.
- Paterson SC, Lim CK, Smith KD. 2003. Analysis of the interaction between alpha-1-acid glycoprotein and tamoxifen and its metabolites. *Biomed Chromatogr* 17(2-3):143-148.
- Piafsky KM, Borga O. 1977. Plasma protein binding of basic drugs. II. Importance of alpha 1-acid glycoprotein for interindividual variation. *Clin Pharmacol Ther* 22(5 Pt 1):545-549.
- Plomp TA, van Rossum JM, Robles de Medina EO, van Lier T, Maes RA. 1984.

- Pharmacokinetics and body distribution of amiodarone in man. *Arzneimittelforschung* 34(4):513-520.
- Plunkett W, Huang P, Xu YZ, Heinemann V, Grunewald R, Gandhi V. 1995. Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential. *Semin Oncol* 22(4 Suppl 11):3-10.
- Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD. 2010. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *J Med Chem* 53(24):8441-8460.
- Redfern WS, Carlsson L, Davis AS, Lynch WG, MacKenzie I, Palethorpe S, Siegl PK, Strang I, Sullivan AT, Wallis R and others. 2003. Relationships between preclinical cardiac electrophysiology, clinical QT interval prolongation and torsade de pointes for a broad range of drugs: evidence for a provisional safety margin in drug development. *Cardiovasc Res* 58(1):32-45.
- Roy SK, Korzekwa KR, Gonzalez FJ, Moschel RC, Dolan ME. 1995. Human liver oxidative metabolism of O6-benzylguanine. *Biochem Pharmacol* 50(9):1385-1389.
- Sakurama K, Kawai A, Tuan Giam Chuang V, Kanamori Y, Osa M, Taguchi K, Seo H, Maruyama T, Imoto S, Yamasaki K and others. 2018. Analysis of the Binding of Aripiprazole to Human Serum Albumin: The Importance of a Chloro-Group in the Chemical Structure. *ACS Omega* 3(10):13790-13797.
- Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, Tateno C, Horie T, Kitamura S, Ohta S. 2012a. Prediction of in vivo hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos* 40(2):322-328.

- Sanoh S, Naritomi Y, Fujimoto M, Sato K, Kawamura A, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Ohshita H, Tateno C and others. 2015. Predictability of plasma concentration-time curves in humans using single-species allometric scaling of chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* 45(7):605-614.
- Sanoh S, Nozaki K, Murai H, Terashita S, Teramura T, Ohta S. 2012b. Prediction of human metabolism of FK3453 by aldehyde oxidase using chimeric mice transplanted with human or rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 40(1):76-82.
- Sanoh S, Ohta S. 2014. Chimeric mice transplanted with human hepatocytes as a model for prediction of human drug metabolism and pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos* 35(2):71-86.
- Sanoh S, Tamura Y, Fujino C, Sugahara G, Yoshizane Y, Yanagi A, Kisoh K, Ishida Y, Tateno C, Ohta S and others. 2019. Changes in Bile Acid Concentrations after Administration of Ketoconazole or Rifampicin to Chimeric Mice with Humanized Liver. *Biol Pharm Bull* 42(8):1366-1375.
- Sanoh S, Yamachika Y, Tamura Y, Kotake Y, Yoshizane Y, Ishida Y, Tateno C, Ohta S. 2017. Assessment of amiodarone-induced phospholipidosis in chimeric mice with a humanized liver. *J Toxicol Sci* 42(5):589-596.
- Sarver JG, White D, Erhardt P, Bachmann K. 1997. Estimating xenobiotic half-lives in humans from rat data: influence of log P. *Environ Health Perspect* 105(11):1204-1209.
- Scheer N, Wilson ID. 2016. A comparison between genetically humanized and chimeric liver humanized mouse models for studies in drug metabolism and toxicity. *Drug Discov Today* 21(2):250-263.
- Schramm P, Wildfeuer A, Sarnow E. 1994. Determination of fluconazole concentrations

in the prostatic and seminal vesicle fluid (split ejaculate). *Mycoses* 37(11-12):417-420.

Shibata Y, Takahashi H, Chiba M, Ishii Y. 2002. Prediction of hepatic clearance and availability by cryopreserved human hepatocytes: an application of serum incubation method. *Drug Metab Dispos* 30(8):892-896.

Shoda J, Okada K, Inada Y, Kusama H, Utsunomiya H, Oda K, Yokoi T, Yoshizato K, Suzuki H. 2007. Bezafibrate induces multidrug-resistance P-Glycoprotein 3 expression in cultured human hepatocytes and humanized livers of chimeric mice. *Hepatol Res* 37(7):548-556.

Smith DA, Beaumont K, Maurer TS, Di L. 2017. Relevance of Half-Life in Drug Design. *J Med Chem*.

Smith DA, Di L, Kerns EH. 2010. The effect of plasma protein binding on in vivo efficacy: misconceptions in drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 9(12):929-939.

Smith SA, Waters NJ. 2018. Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Considerations for Drugs Binding to Alpha-1-Acid Glycoprotein. *Pharm Res* 36(2):30.

Soars MG, Burchell B, Riley RJ. 2002. In vitro analysis of human drug glucuronidation and prediction of in vivo metabolic clearance. *J Pharmacol Exp Ther* 301(1):382-390.

Stangier J, Schmid J, Turck D, Switek H, Verhagen A, Peeters PA, van Marle SP, Tamminga WJ, Sollie FA, Jonkman JH. 2000. Absorption, metabolism, and excretion of intravenously and orally administered [<sup>14</sup>C]telmisartan in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 40(12 Pt 1):1312-1322.

Suzuki E, Koyama K, Nakai D, Goda R, Kuga H, Chiba K. 2017. Observation of Clinically Relevant Drug Interaction in Chimeric Mice with Humanized Livers:

The Case of Valproic Acid and Carbapenem Antibiotics. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 42(6):965-972.

Takaoka N, Sanoh S, Okuda K, Kotake Y, Sugahara G, Yanagi A, Ishida Y, Tateno C, Tayama Y, Sugihara K and others. 2018. Inhibitory effects of drugs on the metabolic activity of mouse and human aldehyde oxidases and influence on drug-drug interactions. *Biochem Pharmacol* 154:28-38.

Takehara I, Watanabe N, Mori D, Ando O, Kusuhara H. 2019. Effect of Rifampicin on the Plasma Concentrations of Bile Acid-O-Sulfates in Monkeys and Human Liver-Transplanted Chimeric Mice With or Without Bile Flow Diversion. *J Pharm Sci* 108(8):2756-2764.

Tateno C, Fukumuro M, Masumori S, Kakuni M, Ishida Y, Shimada T, Hayashi M. 2019. Chimeric mice with human hepatocytes: A new system for genotoxicity studies. *Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen* 839:9-12.

Tateno C, Miya F, Wake K, Kataoka M, Ishida Y, Yamasaki C, Yanagi A, Kakuni M, Wisse E, Verheyen F and others. 2013. Morphological and microarray analyses of human hepatocytes from xenogeneic host livers. *Lab Invest* 93(1):54-71.

Tateno C, Yamamoto T, Utoh R, Yamasaki C, Ishida Y, Myoken Y, Oofusa K, Okada M, Tsutsui N, Yoshizato K. 2015. Chimeric mice with hepatocyte-humanized liver as an appropriate model to study human peroxisome proliferator-activated receptor-alpha. *Toxicol Pathol* 43(2):233-248.

Tateno C, Yoshizane Y, Saito N, Kataoka M, Utoh R, Yamasaki C, Tachibana A, Soeno Y, Asahina K, Hino H and others. 2004. Near completely humanized liver in mice shows human-type metabolic responses to drugs. *Am J Pathol* 165(3):901-912.

Trainor GL. 2007. The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert*

Opin Drug Discov 2(1):51-64.

Tserng KY, Ingalls ST, Boczko EM, Spiro TP, Li X, Majka S, Gerson SL, Willson JK, Hoppel CL. 2003. Pharmacokinetics of O6-benzylguanine (NSC637037) and its metabolite, 8-oxo-O6-benzylguanine. *J Clin Pharmacol* 43(8):881-893.

Uchida M, Tajima Y, Kakuni M, Kageyama Y, Okada T, Sakurada E, Tateno C, Hayashi R. 2018. Organic Anion-Transporting Polypeptide (OATP)-Mediated Drug-Drug Interaction Study between Rosuvastatin and Cyclosporine A in Chimeric Mice with Humanized Liver. *Drug Metab Dispos* 46(1):11-19.

Uchida T, Hiraga N, Imamura M, Tsuge M, Abe H, Hayes CN, Aikata H, Ishida Y, Tateno C, Yoshizato K and others. 2015. Human Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Acute Liver Failure and Rescue by Immunoglobulin in Human Hepatocyte Transplant TK-NOG Mice. *J Virol* 89(19):10087-10096.

Uchida T, Imamura M, Kan H, Hiraga N, Hayes CN, Tsuge M, Abe-Chayama H, Aikata H, Makokha GN, Miki D and others. 2017. Usefulness of humanized cDNA-uPA/SCID mice for the study of hepatitis B virus and hepatitis C virus virology. *J Gen Virol* 98(5):1040-1047.

Undevia SD, Innocenti F, Ramirez J, House L, Desai AA, Skoog LA, Singh DA, Karrison T, Kindler HL, Ratain MJ. 2008. A phase I and pharmacokinetic study of the quinoxaline antitumour Agent R(+)XK469 in patients with advanced solid tumours. *Eur J Cancer* 44(12):1684-1692.

van Waterschoot RAB, Parrott NJ, Olivares-Morales A, Lave T, Rowland M, Smith DA. 2018. Impact of target interactions on small-molecule drug disposition: an overlooked area. *Nat Rev Drug Discov* 17(4):299.

Vuppugalla R, Marathe P, He H, Jones RD, Yates JW, Jones HM, Gibson CR, Chien JY,

- Ring BJ, Adkison KK and others. 2011. PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 4: prediction of plasma concentration-time profiles in human from in vivo preclinical data by using the Wajima approach. *J Pharm Sci* 100(10):4111-4126.
- Wajima T, Yano Y, Fukumura K, Oguma T. 2004. Prediction of human pharmacokinetic profile in animal scale up based on normalizing time course profiles. *J Pharm Sci* 93(7):1890-1900.
- Wang H, Zrada M, Anderson K, Katwaru R, Harradine P, Choi B, Tong V, Pajkovic N, Mazonko R, Cox K and others. 2014. Understanding and reducing the experimental variability of in vitro plasma protein binding measurements. *J Pharm Sci* 103(10):3302-3309.
- Ward KW, Smith BR. 2004. A comprehensive quantitative and qualitative evaluation of extrapolation of intravenous pharmacokinetic parameters from rat, dog, and monkey to humans. I. Clearance. *Drug Metab Dispos* 32(6):603-611.
- Webster R, Leishman D, Walker D. 2002. Towards a drug concentration effect relationship for QT prolongation and torsades de pointes. *Curr Opin Drug Discov Devel* 5(1):116-126.
- Xu D, Michie SA, Zheng M, Takeda S, Wu M, Peltz G. 2015a. Humanized thymidine kinase-NOG mice can be used to identify drugs that cause animal-specific hepatotoxicity: a case study with furosemide. *J Pharmacol Exp Ther* 354(1):73-78.
- Xu D, Wu M, Nishimura S, Nishimura T, Michie SA, Zheng M, Yang Z, Yates AJ, Day JS, Hillgren KM and others. 2015b. Chimeric TK-NOG mice: a predictive model for cholestatic human liver toxicity. *J Pharmacol Exp Ther* 352(2):274-280.

- Yamazaki H, Suemizu H, Murayama N, Utoh M, Shibata N, Nakamura M, Guengerich FP. 2013. In vivo drug interactions of the teratogen thalidomide with midazolam: heterotropic cooperativity of human cytochrome P450 in humanized TK-NOG mice. *Chem Res Toxicol* 26(3):486-489.
- Yoshizato K, Tateno C. 2013. A mouse with humanized liver as an animal model for predicting drug effects and for studying hepatic viral infection: where to next? *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9(11):1419-1435.
- Zhi J, Moore R, Kanitra L, Mulligan TE. 2003. Effects of orlistat, a lipase inhibitor, on the pharmacokinetics of three highly lipophilic drugs (amiodarone, fluoxetine, and simvastatin) in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 43(4):428-435.