

# 博士論文

新薬候補品のヒト型代謝物検索および  
薬物相互作用の統合予測手法に関する研究

令和2年度

小川 真一郎

## 目次

序論 .....	1
第 I 章 実験動物を用いた肝取り込み過程の薬物相互作用の予測 .....	5
第 1 節 緒言 .....	5
第 2 節 実験材料および実験方法 .....	6
I-2-i) 化合物および試薬 .....	6
I-2-ii) ヒト結腸がん由来細胞株を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 消化管吸収性の評価 .....	7
I-2-iii) ヒト肝細胞移植マウスおよび OATP1B1 の遺伝子型が既知のカニクイザルを用いた OATP1B1 阻害剤併用時のペマフィブラート血漿中濃度の評価 .....	7
第 3 節 結果 .....	9
I-3-i) ヒト結腸がん由来細胞株を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 消化管吸収性の評価 .....	9
I-3-ii) ヒト肝細胞移植マウスおよび OATP1B1 の遺伝子型が既知のカニクイザルを用いた OATP1B1 阻害剤併用時のペマフィブラート血漿中濃度の評価 .....	10
第 4 節 考察 .....	14
第 5 節 小括 .....	17
第 II 章 実験動物を用いた循環血中代謝物の予測 .....	18
第 1 節 緒言 .....	18
第 2 節 実験材料および実験方法 .....	18
II-2-i) 化合物および試薬 .....	18
II-2-ii) マウス, ラット, サルおよびヒトにおけるペマフィブラートの <i>in vitro</i> 血漿蛋白結合率の評価 .....	19
II-2-iii) ラット, サルおよびヒト肝細胞を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 代謝物検索 .....	20
II-2-iv) ヒト肝細胞移植マウス, ラットおよびサルを用いたペマフィブラートおよびその代謝物の血漿中曝露量の評価 .....	20
II-2-v) ペマフィブラートおよびその代謝物の定量分析 .....	21
II-2-vi) ペマフィブラートの薬物動態パラメータ値の解析 .....	23
第 3 節 結果 .....	23
II-3-i) マウス, ラット, サルおよびヒトにおけるペマフィブラートの <i>in</i>	

	<i>vitro</i> 血漿蛋白結合率の評価 .....	23
II-3-ii)	ラット, サルおよびヒト肝細胞を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 代謝物検索 .....	23
II-3-iii)	ヒト肝細胞移植マウス, ラットおよびサルを用いたペマフィブラートおよびその代謝物の血漿中曝露量の評価 .....	24
第 4 節	考察 .....	31
第 5 節	小括 .....	33
第 III 章	計算科学手法による臨床薬物相互作用の予測 .....	34
第 1 節	緒言 .....	34
第 2 節	実験材料および実験方法 .....	35
III-2-i)	化合物および試薬 .....	35
III-2-ii)	ヒトにおけるペマフィブラートの <i>in vitro</i> 血液／血漿濃度比の評価 .....	35
III-2-iii)	ヒト肝ミクロゾームおよび各ヒト P450 分子種発現系を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 代謝活性の評価 .....	36
III-2-iv)	特定の P450 分子種を選択的に不活化したヒト肝ミクロゾームを用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 寄与率の評価 .....	36
III-2-v)	ヒト結腸がん由来細胞株を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 消化管吸収阻害の評価 .....	37
III-2-vi)	ヒト OATP1B1 または OATP1B3 発現系を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 取り込みクリアランスの評価 .....	37
III-2-vii)	ヒト凍結肝細胞を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 取り込み活性の評価 .....	38
III-2-viii)	ペマフィブラートの PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値の決定ならびに PBPK モデルの検証および活用 .....	39
第 3 節	結果 .....	44
III-3-i)	ヒトにおけるペマフィブラートの <i>in vitro</i> 薬物動態パラメータの評価 .....	44
III-3-ii)	ヒト結腸がん由来細胞株を用いたペマフィブラートの <i>in vitro</i> 消化管吸収阻害の評価 .....	45
III-3-iii)	ペマフィブラートの PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値の決定ならびに PBPK モデルの検証および活用 .....	45
第 4 節	考察 .....	61
第 5 節	小括 .....	64

総括 .....	65
本研究の誌上発表 .....	69
謝辞 .....	70
参考文献 .....	71

## 略語表

本論文においては以下の略語を用いた。

ADAM: advanced dissolution, absorption, and metabolism

AUC: area under the curve

AUC<sub>0-inf</sub>: AUC extrapolated to infinity

AUC<sub>0-t</sub>: AUC to the last measurable concentration

BCRP: breast cancer resistant protein

BID: two times a day

Caco-2: human colon adenocarcinoma cell line

CCK-8: cholecystokinin octapeptide

CL: clearance

CL<sub>int</sub>: intrinsic clearance

CL<sub>PD</sub>: nonsaturable uptake clearance (uptake clearance via passive diffusion)

CL<sub>total</sub>: total clearance

C<sub>max</sub>: maximum concentration

CR: contribution ratio

DDI: drug interaction

DMEM: Dulbecco's modified eagle medium

DNA: deoxyribonucleic acid

EMA: European Medicines Agency

F: bioavailability

FA: fenofibric acid

F<sub>a</sub>: apparent absorption ratio

FDA: Food and Drug Administration

F<sub>H</sub>: fraction escaping from hepatic metabolism

f<sub>u, mic</sub>: fraction unbound in hepatic microsomes

f<sub>u, p</sub>: fraction unbound in plasma

f<sub>u, gut</sub>: fraction unbound in enterocytes

GFR: glomerular filtration rate

HBSS: Hanks' balanced salt solution

HEK293: human embryonic kidney 293 cells

HEPES: 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HMG-CoA: 3-hydroxy-3-methyl-glutaryl-coenzyme A

HPLC: high-performance liquid chromatography  
 $k_{el}$ : elimination rate constant  
 $K_I$ : inhibitor concentration causing half-maximal inactivation  
 $K_i$ : inhibitory constant  
 $K_{inact}$ : maximal inactivation rate constant  
 $K_m$ : Michaelis-Menten constant  
 LC-MS/MS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry  
 $\log P$ : octanol/water partition coefficient  
 MES: 2-morpholinoethanesulphonic acid  
 MHLW: Ministry of Health, Labour and Welfare  
 mRNA: messenger ribonucleic acid  
 NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced form  
 $m/z$ : mass-to-charge ratio  
 OATP: organic anion transporting polypeptide  
 $P_{app}$ : apparent permeability coefficient  
 PBPK: physiologically based pharmacokinetics  
 $P_{eff}$ : effective permeability  
 P-gp: P-glycoprotein  
 pH: potential of hydrogen  
 $pK_a$ : acid dissociation constant  
 $PS_{act}$ : transporter-mediated active uptake clearance  
 QD: once a day  
 $Q_H$ : hepatic blood flow rate  
 $R_B$ : blood/plasma concentration ratio  
 RFA: reduced FA  
 S: substrate concentration  
 SD: standard deviation  
 $T_{max}$ : the time of  $C_{max}$   
 $t_{1/2}$ : the elimination half-life  
 UHPLC: ultra high-performance liquid chromatography  
 $v$ : initial uptake velocity  
 $V_d$ : uptake volume  
 $V_{max}$ : maximum velocity  
 $V_{ss}$ : distribution volume at steady state

## 序論

新薬候補品の吸収、分布、代謝および排泄といった薬物動態の予測は未だ困難な部分があり、予期せぬ薬効や毒性に直面することがある。Guidance for Industry - Safety Testing of Drug Metabolites (FDA, 2020b) によると、ヒト血中代謝物の構造解析と定量分析は多数の被験者で長期間投与される Phase III までに実施する必要がある。毒性評価動物における新薬候補品の代謝物の血中曝露量がヒトよりも低い場合は、代謝物を投与した安全性の評価が必要とされる。新薬候補品の代謝物のヒト血中曝露量を早期に把握することは、代謝物を含めた薬効および毒性予測による効率的な医薬品開発につながる。しかし、代謝には種差が存在するだけでなく、生成された代謝物が必ずしも未変化体と同様の分布、代謝および排泄等の動態特性を有し、血中に分布するとは限らない (図 1)。そのため、医薬品開発の初期に得られるげっ歯類における *in vivo* 代謝物プロファイルやヒト由来組織を用いた *in vitro* 代謝プロファイルからヒトにおける代謝物の血中曝露を予測することは難しい。一方で、薬物動態 (代謝、分布および排泄) を規定する主要な臓器である肝臓をヒト型に置換したヒト肝細胞移植マウス (Yamazaki et al., 2016) や、生理学的・遺伝的にヒトに類似しておりシトクロム P450 (P450) (Uno et al., 2018) および有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) (Takahashi et al., 2019) がヒトと類似しているサルは、ヒト予測に有用なツールとして利用可能である。

新薬候補品の薬物相互作用を適切に評価することは、医薬品の適正使用に貢献するだけでなく、薬物相互作用による副作用の発現に起因した臨床開発の中止の回避および薬物相互作用の影響を排除した臨床試験の設計を可能とし、効率的な医薬品開発につながる。現状、血中から代謝過程によってのみ消失する医薬品との単純な薬物相互作用は、世界中で整備されたガイダンスに従い、ある程度予想しうるようになった。しかし、肝取り込み後に引き続き代謝されるような、要因が複雑に関与する薬物相互作用の全体像の予測はいまだ困難なままである (図 1)。

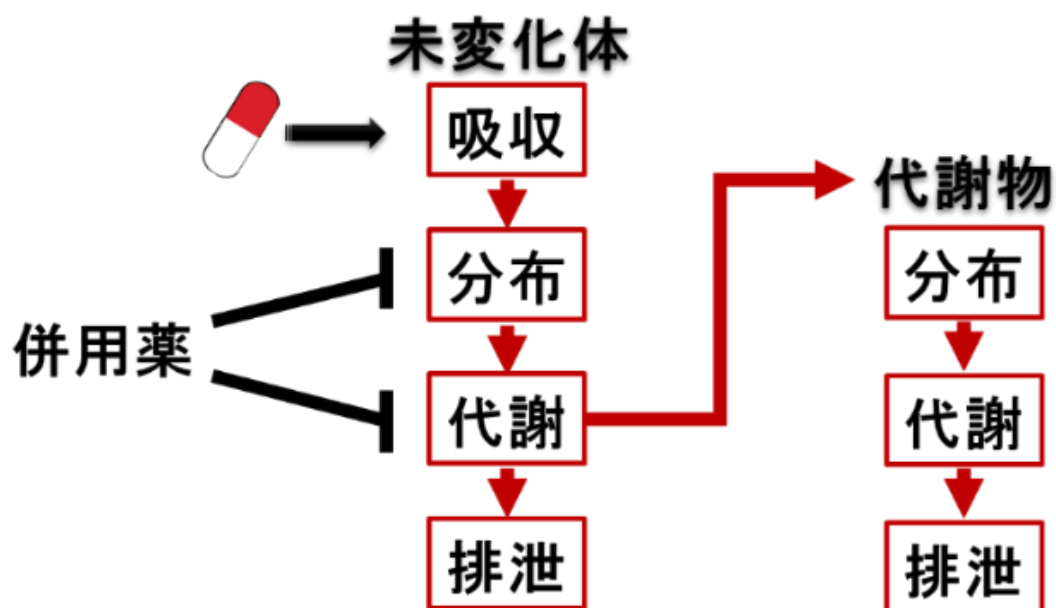


図 1. 医薬品の代謝物の薬物動態と複雑な薬物相互作用

そこで本研究では、これら諸問題を解決すべく、代謝だけでなく、その他の薬物動態因子（吸収、分布および排泄）も考慮したヒトにおける循環血中代謝物および薬物相互作用の統合予測手法を構築することを目的とした。本研究におけるモデル化合物として、薬物輸送担体（トランスポーター）により能動的に肝に取り込まれる過程および肝の代謝酵素により代謝される過程の両過程が薬物動態の規定因子であり、複雑な消失経路をたどる新規高脂血症治療薬ペマフィブラートを選択した（図 2）。

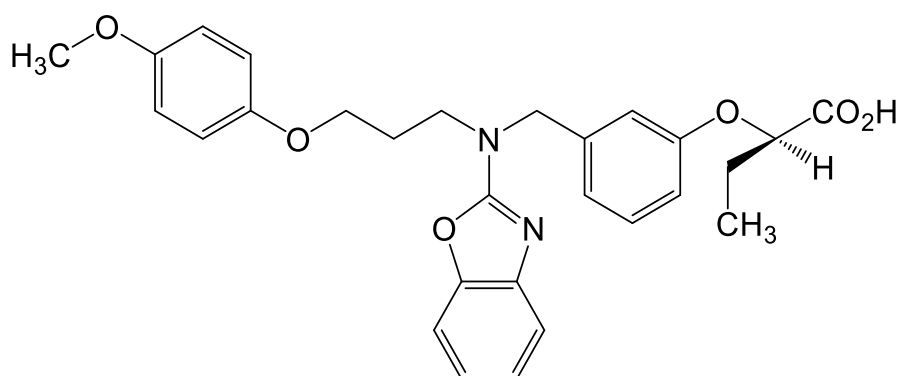


図 2. ペマフィブラートの構造式



ペマフィブラートは選択的ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\alpha$  モジュレーターであり (Fruchart, 2013; Raza-Iqbal et al., 2015), 既存のペルオキシソーム増殖因子活性化受容体  $\alpha$  作働薬であるフェノフィブラートよりも強力で選択的な活性化作用を有している。ペマフィブラートは脂質異常症患者の血漿トリグリセリドを強力に低下させ, 高密度リポ蛋白質コレステロールを上昇させ, かつ副作用も少なく, 良好なベネフィット／リスクバランスを有しており (Ishibashi et al., 2018, 2016), トリグリセリド低下を介した新しく強力な治療法を幅広い患者に提供できる。ペマフィブラートは OATP1B1 で肝臓に取り込まれた後, P450 によりほぼ完全に代謝され, 糞中に代謝物として排泄されるといった複合的な消失経路をたどるため, 消失過程の全体像を考慮した薬物動態の予測は困難であると推察された。

生理学的薬物速度論 (PBPK) は, 薬物動態分野における計算科学手法によるモデリング&シミュレーションツールである。近年, PBPK モデルによる予測結果は添付文書に記載されることも多くなり, 医薬品開発における重要性は高まりつつある。PBPK モデルを活用することにより, 薬剤の情報ならびに生理学的情報を基に, 時間と共に変化する各臓器内の薬物量のシミュレーションが可能となる。さらには, PBPK モデルは倫理的な観点からヒトでの検討が困難な腎・肝機能障害等の患者における薬物相互作用の予測にも活用できる。

以上の背景から本研究では, これら実験動物や PBPK モデルを活用し, 代謝物の薬物動態も考慮したヒト血漿中代謝物の予測および肝取り込みトランスポーターの関与する薬物相互作用の予測を可能とする統合予測手法を構築することを目的とした。第 I 章では, ペマフィブラートの薬物相互作用の予測におけるヒト肝細胞移植マウスおよびサルの有用性を検証した。OATP1B1 が関与する医薬候補品の薬物相互作用予測には, P450 だけでなく OATP1B1 がヒトに類似しているサルが有用であると推察された。第 II 章では, ペマフィブラートの *in vitro* 肝細胞中および *in vivo* 血漿中における代謝プロファイルを検討するとともに, 循環血中代謝物の予測におけるヒト肝細胞移植マウスおよびサルの有用性を検証した。その結果, *in vitro* 肝細胞中および *in vivo* 血漿中代謝プロファイルには乖離が認められ, 血漿中代謝プロファイルには種差が認められた。さらに, サルまたはヒト肝細胞移植マウスを用いた *in vivo* 予測系が循環血中代謝物の予測に有用であることが明らかになった。第 III 章では, 健常人におけるペマフィブラートの血漿中濃度推移および薬物相互作用を予測する PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値を決定した。本モデルを活用することで, 肝障害時における OATP1B1 の活性を初めて明らかとし, ペマフィブラートの血中濃度に及ぼす併

用薬および腎・肝障害による複合的な影響の予測が可能となった。本研究における統合予測法は、ペマフィブラートに限らず適用でき、医薬品開発の効率化に資するとともに、実臨床で多様な患者背景を考慮した医薬品の適正使用に貢献するものと強く期待される。以上、本研究において、新薬候補品のヒト型代謝物検索および薬物相互作用の統合予測手法とその活用例を示したので以下に記述する。

## 第 I 章 実験動物を用いた肝取り込み過程の薬物相互作用の予測

### 第1節 緒言

シトクロム P450 (P450) および有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP) のような代謝酵素および肝取り込みトランスポーターの相互作用薬による阻害は、被相互作用薬の治療効果に影響を及ぼすだけでなく、副作用をも引き起こす懸念がある (Yu H et al., 2015; Yu J et al., 2018)。そのため、日米欧三極の薬物相互作用ガイドラインおよびガイダンス (EMA, 2012; FDA, 2020a; MHLW, 2018) において、P450 および／または OATP を介した薬物相互作用の評価の重要性が言及されている。代謝酵素やトランスポーターの活性に寄与する表現型は、薬物相互作用リスクを評価するために重要な情報である (Di L, 2017)。一部の P450 の遺伝子多型によりその代謝活性が低下するが、肝取り込みトランスポーターである OATP1B1 をコードするヒト *SLCO1B1* 遺伝子の多型においても肝取り込み活性の低下が報告されている (Gaedigk et al., 2018; Niemi et al., 2011)。

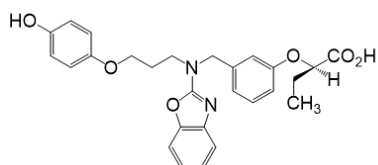
近年、ヒトへの外挿を容易にするために、医薬品の探索および開発におけるモデル動物として、ヒト肝細胞移植マウスが開発された。ヒト肝細胞移植マウスは、ヒト肝臓を介したヒト代謝物の生成および胆汁中排泄の推定に適切に利用され、一般的に有用なツールとして受け入れられている (Yamazaki et al., 2016)。その他、非ヒト霊長類であるカニクイザルも、ヒトに生理学的および遺伝的に類似していることから、医薬品開発に広く使用されている。カニクイザルは P450 (Uno et al., 2018) および OATP (Takahashi et al., 2019) がヒトと類似しているため、医薬品候補化合物の *in vivo* 全身曝露評価に活用される。

生体内でほぼ完全に代謝により除去される肺動脈性肺高血圧症治療薬ボセンタンは、消失過程の律速段階が肝取り込みであると推察されており、肝取り込みトランスポーター OATP の阻害剤であるリファンピシンまたはシクロスポリン A により、ボセンタンの顕著な血漿中曝露上昇がヒトで報告されている (Treiber et al., 2007)。近年上市された脂質異常症治療薬であるペマフィブラートは (Cheng et al., 2019)、その薬物動態および代謝に種差が認められているが、ボセンタンと同様にヒトにおいては代謝によってほぼ完全に消失し、OATP により肝に取り込まれると推察されている。そこで本章では、肝取り込み過程に OATP1B1 が関与する代謝型ペマフィブラートの薬物相互作用の予測におけるヒト肝細胞移植マウスおよびカニクイザルの有用性を、OATP1B1 阻害剤と併用することにより検討した。

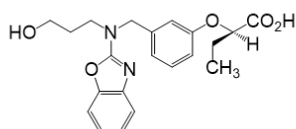
### I-2-i) 化合物および試薬

COC1=CC=C(C=C1)OCCCN(Cc2ccc(cc2)OC(=O)[C@H](C)C)c3nc4ccccc4o3

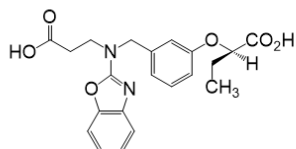
## Pemafibrate



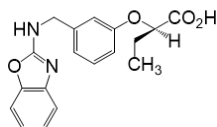
**M1**



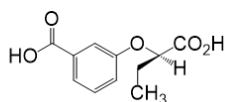
## M2



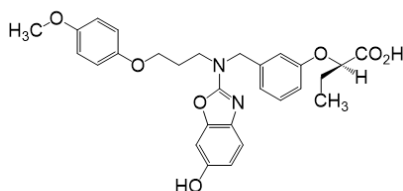
### M3



## M4



## M5



## M6

6

## I-2-ii) ヒト結腸がん由来細胞株を用いたペマフィブラートの *in vitro* 消化管吸収性の評価

ヒト結腸がん由来細胞株 (Caco-2 細胞) の単層膜の調製は、既報の一般的な方法に従った (Kamiya et al., 2019)。Caco-2 細胞 (American Type Culture Collection 社) を Transwell 透過性プレート (12-well, Corning 社) に  $1.0 \times 10^5$  cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、非必須アミノ酸、ペニシリンーストレプトマイシン-アムホテリシン B およびウシ胎児血清 (富士フィルム和光純薬社) を添加した DMEM 中で、5% CO<sub>2</sub> 下、37°C で 28 日間培養した。Caco-2 細胞の単層膜における頂端膜側の HBSS [10 mM MES (pH 6.0) または 10 mM HEPES (pH 7.4) を含む] から基底膜側の HBSS [10 mM HEPES (pH 7.4) を含む] への時間依存的な透過量またはその逆の透過量 (0, 1, 2 および 4 時間) から、ペマフィブラートの見かけの *in vitro* 透過係数 ( $P_{app}$ , 10<sup>6</sup> cm/s) を算出した。リファンピシン (160 μM) の添加または非添加下の両条件にて、ペマフィブラート (1.0 μM) を Transwell 透過性プレートで培養した Caco-2 細胞の頂端膜側または基底膜側に添加した。ペマフィブラートの基底膜側または頂端膜側からの透過量を以下の液体クロマトグラフィー-質量分析計 (LC-MS/MS) で測定した。Nexera MP UHPLC システム (Shimadzu 社) に設置した Kinetex C18 カラム (2.1×50 mm, 粒子サイズ: 2.6 μm, Phenomenex 社) を用いたクロマトグラフィーにより分析対象を分離した。移動相として 0.1% ギ酸 (移動相 A) およびアセトニトリル (移動相 B) を用い、移動相の流速を 0.6 mL/min とし、次のグラジエント溶出プログラムを使用した: 注入後 0 分から 0.2 分までは移動相 B の割合 (以下 B%) を 20% と一定とし、0.21 分から 2 分までは 20% から 80% まで直線的に上昇させ、2.01 分から 3 分までは 20% と一定とした。API 5500 Q TRAP 質量分析計 (AB Sciex 社) の TurboIonSpray インターフェイスを用いた正イオンモードによる質量分析により、分析対象を検出した。分析対象のレスポンスは各化合物の選択的多重反応モニタリングによって測定した。プロトン化された前駆イオンから選択されたプロダクトイオンへの遷移は、ペマフィブラートは  $m/z$  491→ $m/z$  107, ペマフィブラート-*d*<sub>11</sub> (内標準物質) は  $m/z$  502→ $m/z$  107 であった。頂端膜側の pH 6.0 および 7.4 における対数変換された  $P_{app}$  に関しては、SAS ソフトウェア (SAS Institute 社) のスチューデントの両側 *t* 検定を実施した。

## I-2-iii) ヒト肝細胞移植マウスおよび OATP1B1 の遺伝子型が既知のカニクイザルを用いた OATP1B1 阻害剤併用時のペマフィブラート血漿中濃度の評価

5 匹のコントロール TK-NOG 雄性マウス (実験動物中央研究所, 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 受容体ガンマ欠損マウス，体重：約 30 g）（Hasegawa et al., 2011）およびヒト肝細胞移植 TK-NOG マウス（約 25 g，ヒト肝細胞による肝臓の置換指数：>95%）に，1.5 モル当量の水酸化ナトリウムを含む生理食塩水を投与媒体とし，1.0 mg/kg のペマフィブラートを静脈内投与した。2 週間後に，リファンピシンを 10% (v/v) の 0.1 M 塩酸を含む生理食塩水を投与媒体として，20 mg/kg の投与量でペマフィブラート投与の 1 時間前に経口投与し，ペマフィブラートとリファンピシンの併用投与を行った。本投与試験は実験動物中央研究所の動物管理委員会によって承認され，実施された。

Guangxi Grandforest Science Primate（Guangxi 社）由来の 3 匹の雄性カニクイザル（6～10 歳，体重：4.0～5.6 kg）の全血サンプルから，Puregene DNA 分離キット（Qiagen 社）を用いて，ゲノム DNA を調製した。カニクイザルの OATP1B1 をコードする *SLCO1B1* 遺伝子のエクソン 2～15 に対して既報のプライマーを用いてダイレクトシーケンスし，カニクイザル *SLCO1B1* cDNA 配列（GenBank accession no. NM\_001284540）と比較した。動物 1 と 2 は野生型であり，動物 3 はエクソン 2 における c.13A> C（K5Q）のヘテロ接合型であった。このヘテロ接合型は OATP1B1 機能に影響を及ぼさないと推察されるため（Takahashi et al., 2019），これらの 3 匹のサルを用いて，OATP1B1 を介した薬物相互作用を検討した。本投与試験は株式会社新日本科学の動物管理委員会によって承認され，実施された。

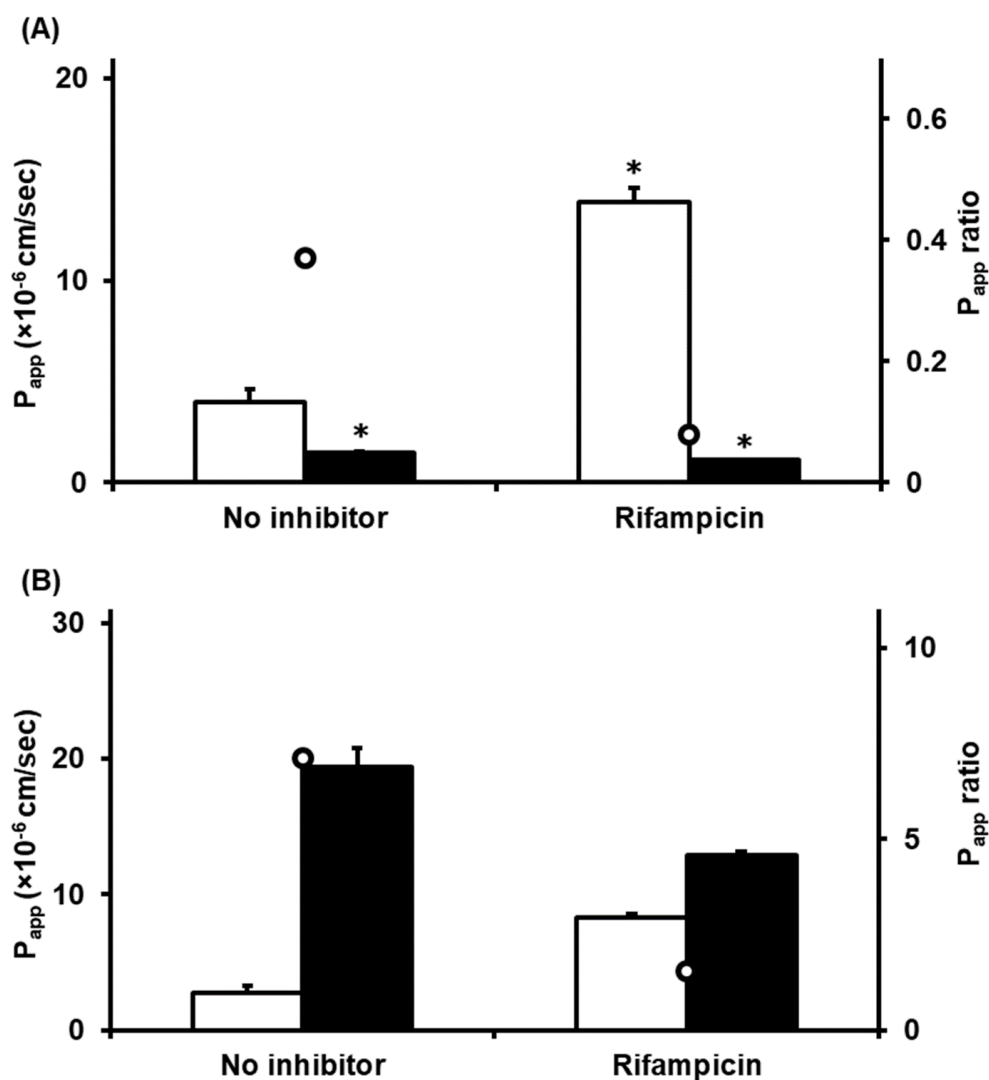
ペマフィブラートを 1.1% (v/v) 2 M 水酸化ナトリウムおよび 5% (v/v) エタノール含有リン酸緩衝生理食塩水 (-) を投与媒体とし，1.0 mg/kg の投与量で，カニクイザルに静脈内投与した。1 週間後に，シクロスポリン A（75 mg/kg）をペマフィブラート投与の 4 時間前に経口投与し，ペマフィブラートとシクロスポリン A の併用投与を行った。次に，リファンピシンを 10% (v/v) 0.1 M 塩酸含有生理食塩水を投与媒体として，20 mg/kg の投与量でペマフィブラート投与の 1 時間前に経口投与し，ペマフィブラートとリファンピシンの併用投与を行った。シクロスポリン A の投与には，市販の医薬品内服液（100 mg/mL）を用いた。血液試料を遠心分離（3,000 ×g，4°C，15 分）して得た血漿試料は分析まで -20°C で保存した。血漿中のペマフィブラートとその代謝物の濃度は，除蛋白後に I-2-ii の方法に従い LC-MS/MS で測定した。ただし，以下のグラジエント溶出プログラムを使用した：注入後 0 分から 0.5 分までは移動相 B の割合（以下 B%）を 15% と一定とし，0.5 分から 3 分までは 15% から 65% まで直線的に上昇させ，3.01 分から 5.50 分までは 90% と一定とし，5.51 分から 8.00 分までは 15% と一定

とした。Phoenix WinNonlin (Certara 社) のノンコンパートメント解析により、血漿濃度－時間曲線から薬物動態パラメータ値を算出した。阻害剤の有無における対数変換された薬物動態パラメータ値に関しては、SAS ソフトウェア (SAS Institute 社) のスチューデントの両側 t 検定を実施した。

### 第3節 結果

#### I-3-i) ヒト結腸がん由来細胞株を用いたペマフィブラートの *in vitro* 消化管吸収性の評価

頂端膜側および基底膜側間の pH 勾配ありまたはなしの両条件で、Caco-2 単層膜におけるペマフィブラートの *in vitro* 透過性を検討した (Fig. I-2)。ペマフィブラートの頂端膜側から基底膜側および基底膜側から頂端膜側への  $P_{app}$  値はそれぞれ  $4.0 \times 10^6$  cm/s および  $1.5 \times 10^6$  cm/s (Fig. I-2, A) であり、pH 勾配がない場合は  $2.7 \times 10^6$  cm/s および  $19 \times 10^6$  cm/s であった (Fig. I-2, B)。リファンピシンにより、 $P_{app}$  の比 (基底膜側から頂端膜側への  $P_{app}$  / 頂端膜側から基底膜側への  $P_{app}$ ) は 0.37 から 0.080 に減少し、pH 勾配がない場合は、7.1 から 1.6 に減少した。なお、リファンピシンの終濃度は、Caco-2 細胞における P-糖蛋白質 (P-gp) に対する既報の阻害定数 ( $K_i$ : 164  $\mu$ M) を参考に、160  $\mu$ M に設定した (Neuhoff et al., 2013)。両 pH 条件下で、リファンピシンはペマフィブラートの頂端膜側から基底膜側への透過性を示す  $P_{app}$  を 3.0~3.5 倍増加させた。以上から、ヒト小腸様細胞株 Caco-2 細胞の単層膜において、ペマフィブラートは基底膜側から頂端膜側へ能動的に輸送され、リファンピシンによりその能動輸送が阻害されることが明らかとなった。



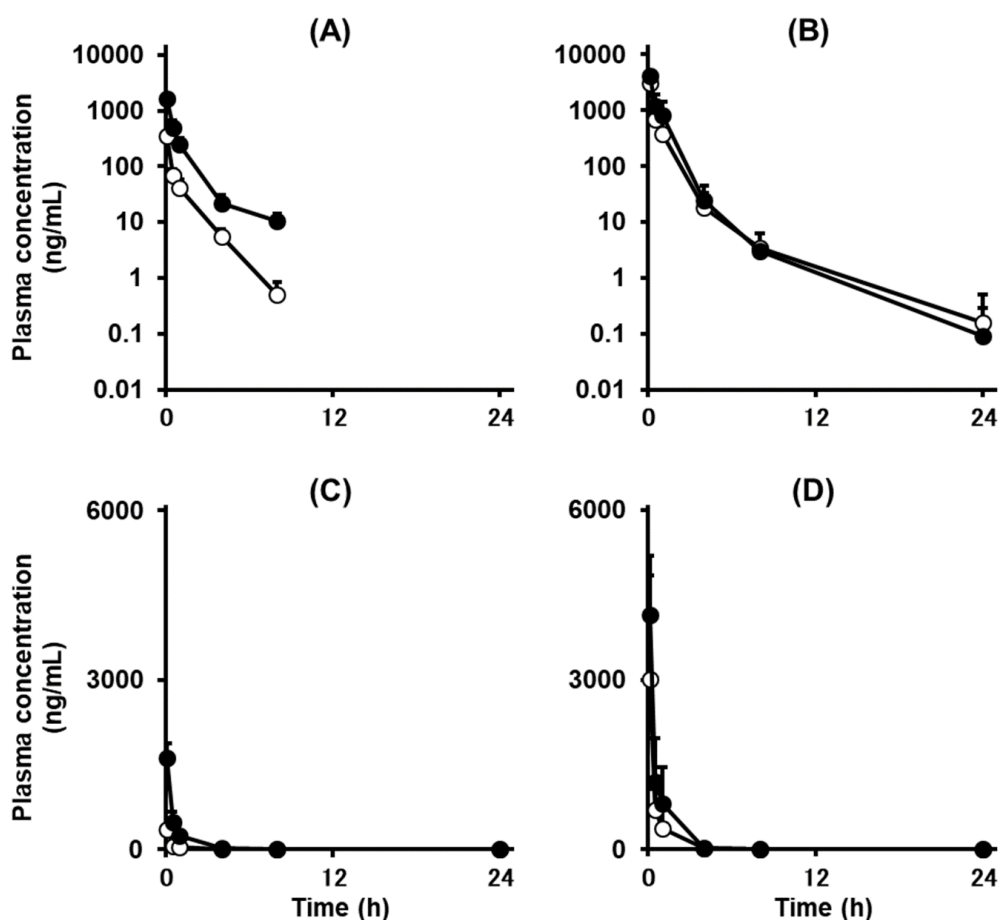
**Fig. I-2. Effects of rifampicin on the permeability of pemafibrate across Caco-2 monolayers at pH 6.0 (A) or 7.4 (B) on the apical side.** The concentrations of pemafibrate and rifampicin were 1.0 and 160  $\mu$ M, respectively. Boxes and bars represent the mean  $P_{app}$  values with standard deviations from triplicate determinations. Ratios for basal to apical  $P_{app}$  (solid bars) over apical to basal  $P_{app}$  (open bars) were calculated and are indicated as open circles. \*  $p < 0.001$ , compared with the  $P_{app}$  at pH 7.4 on the apical side.

I-3-ii) ヒト肝細胞移植マウスおよび OATP1B1 の遺伝子型が既知のカニクイザルを用いた OATP1B1 阻害剤併用時のペマフィブラート血漿中濃度の評価

ペマフィブラート単独静脈内投与およびペマフィブラート投与の 1 時間前にリファンピシンを経口投与した場合の両条件で、対照マウスおよびヒト肝細胞



移植 TK-NOG マウスにおけるペマフィブラートの血漿中濃度を測定した (Fig. I-3)。対照マウスでは、ペマフィブラート単独投与およびペマフィブラート投与の1時間前にリファンピシンを投与した場合のマウスのペマフィブラートの血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{0-inf}$ ) は、それぞれ 230 および 1300 ng·h/mL であり、リファンピシンの事前投与によって有意に増加した (5.7 倍,  $p < 0.001$ )。一方、ヒト肝細胞移植マウスでは  $AUC_{0-inf}$  は、それぞれ 2,000 および 3,300 ng·h/mL と、わずかな増加にとどまり (1.7 倍), 有意な差は認められなかった。



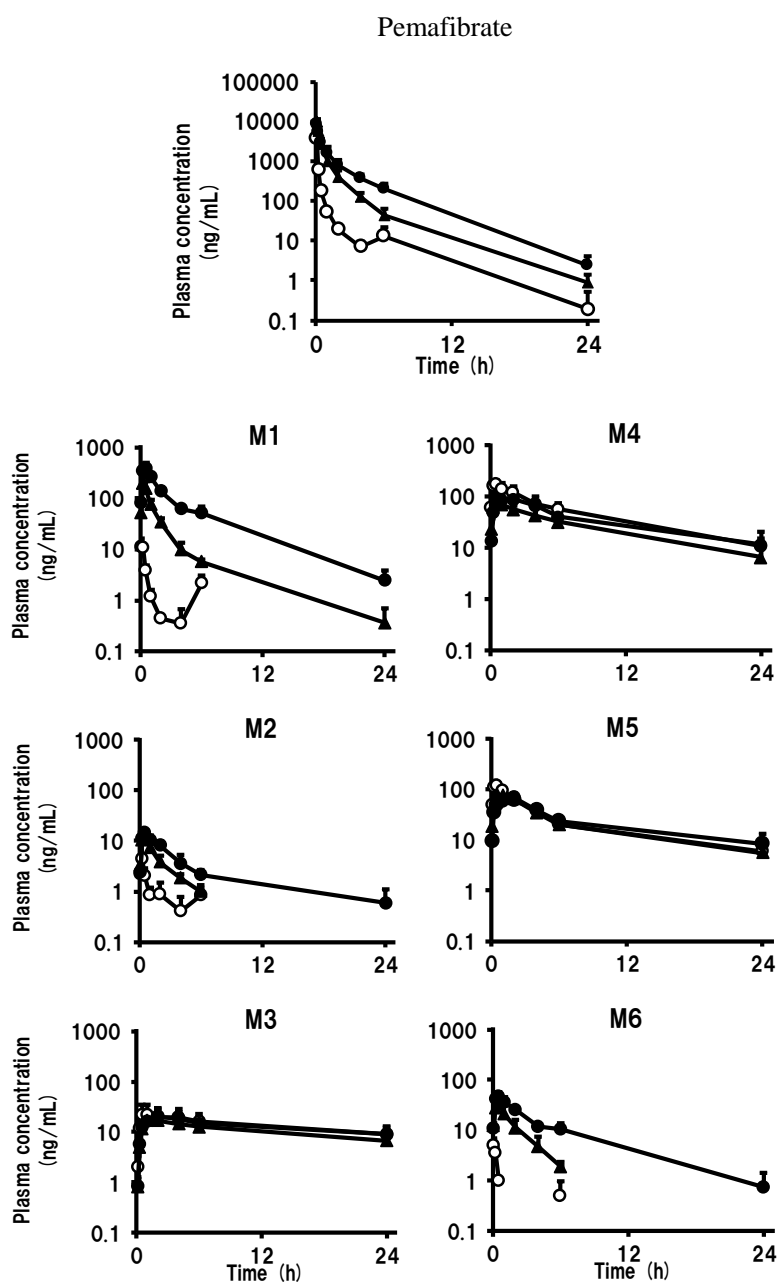
**Fig. I-3. Plasma concentration–time curves of pemafibrate after single intravenous administrations to control mice (A, C) and humanized-liver TK-NOG mice (B, D) untreated or pretreated with rifampicin.** Plots and bars represent the mean and standard deviation values for five animals in untreated mice (open circles) and mice orally pretreated with rifampicin (20 mg/kg, closed circles) 1 h before the intravenous administration of pemafibrate (1.0 mg/kg). The X axes in (A, B) and (C, D) are logarithmic and linear scales, respectively.

ペマフィブラート単独静脈内投与、ペマフィブラート投与の 4 時間前にシクロスポリン A を経口投与またはペマフィブラート投与の 1 時間前にリファンピシンを経口投与の 3 つの条件で、サルにおけるペマフィブラートおよびその代謝物の血漿中濃度を測定した (Table I-1, Table I-2 および Fig. I-4)。典型的な OATP 阻害薬であるシクロスポリン A およびリファンピシンを事前に投与することにより、カニクイザルにペマフィブラートを静脈内投与した際の  $AUC_{0-inf}$  はそれぞれ 4.9 および 7.4 倍に有意に増加した (Table I-1)。ペマフィブラート代謝物 M1, M2 および M6 の血漿中 AUC も、シクロスポリン A またはリファンピシンの事前投与により増加した (それぞれ 28~140, 4.4~10 および 31~92 倍, Table I-2)。対照的に、代謝物 M3, M4 および M5 の血漿中濃度は、シクロスポリン A またはリファンピシンによる事前投与の影響をほとんど受けなかった (0.52~0.96 倍, Table I-2)。

**Table I-1. Pharmacokinetic parameters for pemaflibrate after single intravenous administration in cynomolgus monkeys either untreated or pretreated with cyclosporine A or rifampicin.**

Pretreatment	$AUC_{0-inf}$ (ng·h/mL)			$CL_{total}$ (mL/h·kg)			$CL_{total}/CL_{total}'$			$F_H$			$F_H'/F_H$			$(F_H'/F_H) \cdot (CL_{total}/CL_{total}')$		
Untreated	120	±	100	820	±	60				0.54	±	0.03						
Cyclosporine A	590	±	1500 <sup>a</sup>	180	±	40 <sup>a</sup>	4.8	±	0.9	0.90	±	0.02 <sup>a</sup>	1.7	±	0.1	7.9	±	1.3
Rifampicin	890	±	2400 <sup>b</sup>	120	±	40 <sup>a</sup>	7.2	±	1.5	0.93	±	0.02 <sup>a</sup>	1.7	±	0.1	12	±	2

Pharmacokinetic parameters (means ± standard deviations for three animals) were calculated for untreated cynomolgus monkeys and for those orally pretreated with cyclosporine A (75 mg/kg,) 4 h before or rifampicin (20 mg/kg) 1 h before the intravenous administration of pemaflibrate (1.0 mg/kg). The hepatic availability ( $F_H$ ) was estimated using the following equation:  $F_H = 1 - CL_{total} / (R_B \times Q_H)$ ;  $R_B$ , the blood/plasma concentration ratio (0.68); and  $Q_H$ , the hepatic blood flow rate (44 mL/min/kg) (Hosea et al., 2009). The contribution of non-hepatic (renal) clearance to the systemic clearance was negligible; therefore, hepatic blood clearance was assumed to be equal to total blood clearance (Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2018; <http://www.pmda.go.jp/>).  $CL_{total}'$  and  $F_H'$  are values in the presence of OATP1B1 inhibitor. <sup>a</sup> $p < 0.001$  and <sup>b</sup> $p < 0.01$ , compared with the untreated group.



**Fig. I-4. Plasma concentration–time curves of pemafibrate after single intravenous administrations in cynomolgus monkeys untreated or pretreated with cyclosporine A or rifampicin.** Plots and bars represent the mean and standard deviation values for three animals in untreated cynomolgus monkeys (open circles) and those orally pretreated with cyclosporine A (75 mg/kg, triangles) 4 h before or rifampicin (20 mg/kg, closed circles) 1 h before the intravenous administration of pemafibrate (1.0 mg/kg)

**Table I-2. Fold changes in AUC of pemaflibrate metabolites after single intravenous administrations of pemaflibrate at 1.0 mg/kg to mice and monkeys pretreated with cyclosporine A or rifampicin.**

	Mouse		Monkey	
	Control	Humanized-liver		
	Rifampicin	Rifampicin	Cyclosporine A	Rifampicin
M1	not available	1.9	28	140
M2	4.9	1.2	4.4	10
M3	4.8	1.3	0.77	0.96
M4	1.7	0.68	0.52	0.70
M5	not available	0.97	0.88	0.96
M6	9.1	2.5	31	92

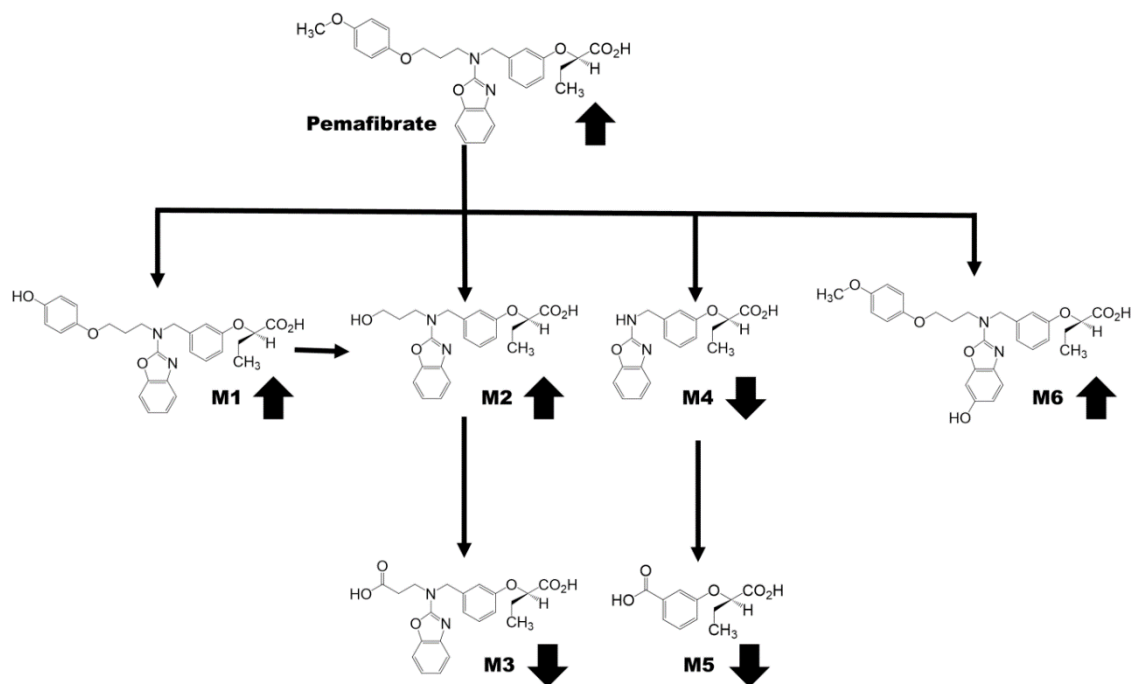
M1, 4-methoxyphenyl demethylated form of pemaflibrate; M2, de-4-methoxyphenylated form; M3, dicarboxylic acid form; M4, *N*-dealkylated form; M5, benzylic oxidized form; M6, benzoxazole 6-hydroxylated form. Chemical structures are shown in Fig I-5. Not available, the AUC was not calculated because the plasma concentrations were under the lower limits of quantification at all sampling points.

#### 第4節 考察

本章では、ヒト肝細胞移植マウスおよびサルを用いて、OATP1B1により肝に取り込まれるペマフィブレートとの薬物相互作用の予測を試み、それらの有用性を検証した。OATP1B1 阻害剤であるリファンピシンは P-gp 阻害作用も有するため、消化管におけるリファンピシンの阻害作用を検討した。Caco-2 細胞における頂端膜側から基底膜側へのペマフィブレートの *in vitro* 見かけの透過係数 ( $P_{app}$ ) は、頂端膜側および基底膜側間の pH 勾配がない場合と比較して pH 勾配ありの場合で高値を示した (Fig. I-2)。このような Caco-2 細胞における pH 依存性の輸送は、2 つの酸性薬物インドメタシン ( $pK_a:4.5$ ) およびサリチル酸 ( $pK_a:3.0$  および 13) でも同様に認められており、pH により化合物のイオン化および非イオン化型の割合が変わることに起因すると推察されている (Neuhoff et al., 2005)。P-gp 阻害剤リファンピシンにより、 $P_{app}$  の比は 0.37 から 0.080 に減少したことから (pH 勾配なしの場合は、7.1 から 1.6 に減少)、リファンピシンが P-gp によるペマフィブレートの輸送を阻害したと推察された。pH 勾配の有無によ

らず、リファンピシンによりペマフィブラートの頂端膜側から基底膜側への透過性  $P_{app}$  の同程度の増加が認められた (3.0~3.5 倍)。頂端膜側の pH はリファンピシンの透過性に影響を及ぼすものの、両 pH 条件でのその細胞内濃度は P-gp に対する  $K_i$  値よりも十分に高く、完全に阻害すると推察され、リファンピシンは生理的 pH 条件下でペマフィブラートの吸収を増加させると推察された。

二種のモデル動物であるヒト肝細胞移植マウスとカニクイザルで *in vivo* 薬物相互作用を検討した。ペマフィブラートは静脈内投与後、両モデル動物において血漿から速やかに消失した。リファンピシンの事前投与により OATP1B1 を阻害した際の対照マウス (Fig. I-3, A, closed circles) と事前投与なしのヒト肝細胞移植マウス (Fig. I-3, B, open circles) のペマフィブラートの血漿曝露に有意な差は認められなかった。さらに、ヒト肝細胞移植マウスにおいてはリファンピシンの事前投与の影響をあまり受けなかったことから (Fig. I-3, B, open circles and closed circles), ヒト肝細胞移植マウスにおけるヒト OATP1B1 の寄与は低く、阻害の影響を受けにくいと推察された。一方、サルでは、OATP 阻害剤であるシクロスポリン A またはリファンピシンによって、ペマフィブラートの血漿中曝露の顕著な増加が認められ、ペマフィブラートはカニクイザルの OATP により肝臓に能動的に取り込まれ、その寄与率は高いものと推察された (Fig. I-4)。代謝物 (M1, M2 および M6, Fig. I-4) もこれら OATP 阻害作用を有する薬剤による曝露量の増加が認められた。これらの代謝物は、ペマフィブラートと比較的類似した構造を有することから (Fig. I-5), 未変化体と同様に OATP により取り込まれ、阻害による影響を受けたものと推察された。ペマフィブラートならびにその代謝物 M1, M2 および M6 は、消失相における血漿濃度の再上昇が認められたが、腸肝循環を受けるペマフィブラートと構造が類似しているため、これら代謝物も同様の体内動態プロファイルを有しており、腸肝循環を受けたと推察された。



**Fig I-5. Putative metabolic pathways of pemafibrate suppressible by OATP1B1 inhibitors.** Up and down arrows indicate increasing and decreasing concentrations of pemafibrate metabolites, respectively, in the presence of OATP1B1 inhibitors.

HMG-CoA 還元酵素の阻害剤であるピタバスタチンはカニクイザルにおける OATP1B1 の基質である。ピタバスタチンの AUC は、OATP1B1 阻害作用を有するシクロスポリン A またはリファンピシンの事前投与により、静脈内投与 (0.3 mg/kg) でそれぞれ 3.2 および 3.6 倍、経口投与 (0.3 mg/kg) でそれぞれ 10.6 および 14.8 倍の上昇が認められており (Takahashi et al., 2013)、これらのサルの結果はヒトにおける臨床薬物相互作用の結果と一致している (Chen et al., 2013)。ピタバスタチンは生体内での代謝の寄与は低く、主に肝取り込みを介して血漿から消失するため、OATP1B1 の *in vivo* 典型的基質として広く利用される (Elsby et al., 2012; MHLW, 2018)。一方、ペマフィブラートはサルおよびヒト生体内でほぼ完全に代謝される代謝型薬物であり、かつ、尿中にほとんど排泄されないため、代謝および肝取り込みの両過程を考慮した複雑な薬物相互作用が検討可能である。シクロスポリン A またはリファンピシンの事前投与によるペマフィブラートを静脈内投与した際の AUC の増加率から、経口投与時の薬物相互作用における肝臓の寄与を推定した。シクロスポリン A およびリファンピシン併用による総クリアランスの増加率 (それぞれ 4.8 および 7.2 倍) と肝利用率 ( $F_H$ ) の増加

率（それぞれ 1.7 および 1.7 倍）の積である総変化率は、それぞれ 7.9 および 12 倍と算出された（Table I-1）。ピタバスタチンでは、総クリアランスの増加率は 3.2 および 3.6 倍、 $F_H$  の増加率はそれぞれ 1.4 および 1.4 倍、総変化率はそれぞれ 4.5 および 5.0 倍であった（Takahashi et al., 2013）。ペマフィブラートおよびピタバスタチンの  $F_H$  の変動は比較的低いが、阻害剤の存在下での  $F_H$  ( $F_H'$ ) はほぼ 1（それぞれ 0.90~0.93 と 0.87~0.88）であることから、肝での抽出がほぼ完全に阻害されていると推察された。シクロスポリン A およびリファンピシンは消化管でトランスポーターや代謝を阻害する可能性があり（Takahashi et al., 2013）、吸収率や小腸利用率を増加させる可能性があるが、サルでのペマフィブラートの生物学的利用率（0.87）は高値であるため、サルの消化管におけるシクロスポリン A とリファンピシンによる阻害による影響は限定的であると推察された。

## 第5節 小括

ペマフィブラートは血漿から速やかに消失するが、この速やかな消失はカニクイザルにおいて OATP1B1 阻害薬であるシクロスポリン A およびリファンピシンにより阻害されることを明らかにした。ペマフィブラートのような肝取り込みを介したヒト薬物相互作用の予測には、肝取り込み機能がヒト型であるカニクイザルが有用であると推察された。

## 第 II 章 実験動物を用いた循環血中代謝物の予測

### 第1節 緒言

医薬品代謝物の安全性試験ガイダンスでは定常状態における総曝露の 10% を超える代謝物の安全性評価が必要とされており (FDA, 2020b), ヒト循環血中主要代謝物を早期に特定することは, 効率的な医薬品開発に必須である。肝ミクロゾームまたは肝細胞を用いた *in vitro* 系は簡便に潜在的な代謝物を特定できるが, ヒト循環血中代謝物, 特に二次代謝物の予測は困難である (Dalvie et al., 2009)。霊長類であり, 生物学 (遺伝学) 的にヒトに近いサルはヒト血漿中代謝物検索における動物モデルに適している。しかし, サルは倫理的な観点から使用が限定されるだけでなく, 多量の被験物質が必要とされるため, 医薬品の研究開発の初期には利用しにくい。そのような中, 小型な実験動物であるヒト肝細胞移植マウスを用いたヒト循環血中代謝物の予測の成功例が近年報告されつつある (Bateman et al., 2014; Kamimura et al., 2017)。

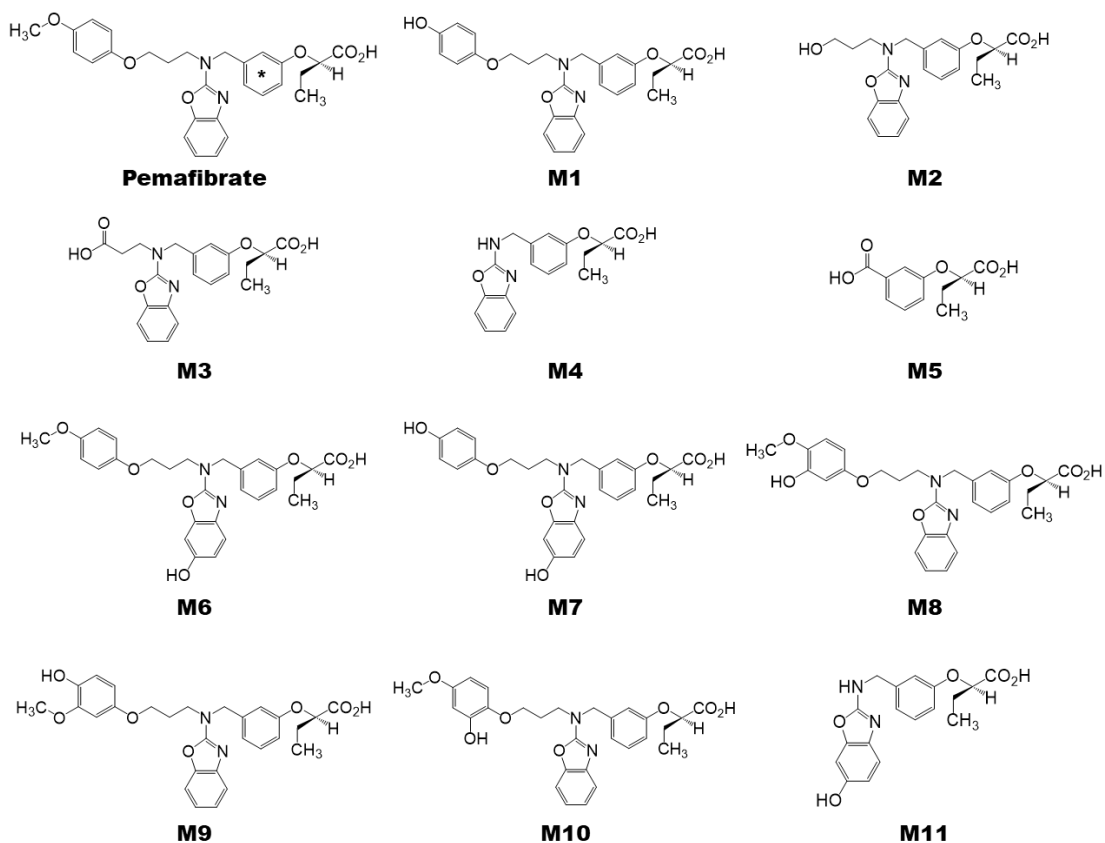
ペマフィブラートの同種同効薬であるフェノフィブラートおよび他の脂質低下薬は, 安全性評価の一環として, ラット, モルモット, イヌおよびヒトにおける分布が比較検討されている (Weil et al., 1988, 1990)。一方, ペマフィブラートは脂質異常症治療薬として上市されて間もなく, 基本的な薬物動態プロファイル情報は未解明の部分が多い。そこで, ペマフィブラートおよびその代謝物の薬物動態を解明するため, ラット, サルおよびヒトの肝細胞中における *in vitro* 代謝物プロファイルを検討した。さらに, ペマフィブラートをヒト肝細胞移植マウス, ラットおよびサルへ経口および静脈内投与した後の血漿中濃度-時間推移および代謝プロファイルを明らかにし, 血中代謝物の予測に適した方法を検討した。

### 第2節 実験材料および実験方法

#### II-2-i) 化合物および試薬

ペマフィブラートおよび代謝物の標品 M1~M11 は興和株式会社で, フリー体 [ベンジル環- $U-^{14}C$ ] ペマフィブラートは Pharmaron UK 社で合成された (Fig. II-1)。放射化学的純度は 97% 以上で, 比放射能は 2.37 GBq/mmol であった。代謝物 M8 は 4-メトキシフェニル基 (3 位) 水酸化体である。他の試薬は高品質の市販品を使用した。





**Fig. II-1. Structures of [<sup>14</sup>C]pemafibrate and its metabolites.** The asterisk denotes the position of the <sup>14</sup>C label.

II-2-ii) マウス, ラット, サルおよびヒトにおけるペマフィブラートの *in vitro* 血漿蛋白結合率の評価

終濃度 500, 2,500 および 10,000 ng/mL の[<sup>14</sup>C]ペマフィブラートを添加した ICR 雄性マウス血漿, Sprague Dawley 雄性ラット血漿, 雄性カニクイザル血漿, 男性ヒト血漿, 4% ヒト血清アルブミンまたは 0.1% α<sub>1</sub>-酸性糖蛋白を平衡透析セルの片側のセルに添加し, 平衡透析膜 (Spectra/Por 2 膜透析 RC チューブ, 分画分子量: 12~14 kD, Spectrum Laboratories 社) を介して 37°C で 6 時間透析した。なお, ヒト血漿を用いて 2, 4, 6 および 8 時間インキュベーションした予備検討結果を考慮し, 透析時間は平衡に達するまでの 6 時間に設定した。試料からの放射能の回収率は 95%~101%であった。血漿側セルの[<sup>14</sup>C]ペマフィブラートの総濃度 (非結合型と結合型の和) および緩衝液側セルの非結合型濃度を液体シンチレーションカウンターで測定し, ペマフィブラートの蛋白非結合率を算出した。蛋白非結合率は次式から算出した: 蛋白非結合率 = 非結合型濃度 / 総濃度 (非結合型と結合型の和)。

II-2-iii) ラット, サルおよびヒト肝細胞を用いたペマフィブラートの *in vitro* 代謝物検索

Sprague-Dawley 雄性ラット, 雄性カニクイザルならびに男性および女性ヒトの凍結保存肝細胞 (Sekisui XenoTech 社) を融解後, Krebs-Henseleit バッファーに再懸濁した。トリパンブルーで染色された生細胞数を計数した後,  $6 \times 10^5$  cells/mL の細胞密度に調製した。24 ウェルプレート (Corning 社) に [ $^{14}\text{C}$ ] ペマフィブラート (最終濃度:  $5 \mu\text{M}$ ,  $11.9 \text{ MBq/L}$ , 定量下限を考慮して設定) を肝細胞懸濁液 ( $1.5 \times 10^5$  cells/ $0.25 \text{ mL/well}$ ) に添加し,  $37^\circ\text{C}$  で 4 時間インキュベートした。0.25 mL の Krebs-Henseleit バッファーおよび 0.5 mL のアセトニトリルで洗浄後,  $12,000 \times g$  で 5 分間遠心分離した。0.3 mL の上清を採取し,  $40^\circ\text{C}$  に加温しつつ, 窒素気流下で溶媒を留去した。試料の一部は *Helix pomatia* 由来の  $\beta$ -グルクロニダーゼおよびアリアルスルファターゼ ( $20 \mu\text{L}$ ,  $10,000$  Fishman units/mL および  $800,000$  Roy units/mL, Roche Diagnostics GmbH 社) を添加し, さらに  $37^\circ\text{C}$  で 16 時間インキュベートした。その後, 他の試料と共に 50% メタノールで除蛋白し,  $0.22 \mu\text{m}$  Ultrafree-MC 遠心フィルターユニット (Durapore PVDF, Merck Millipore 社) で濾過した。濾過した試料は高速液体クロマトグラフィー (HPLC) で分離し, オンライン放射能検出器を使用して分析した。試料からの放射能の抽出率は 88%~99% であった。

II-2-iv) ヒト肝細胞移植マウス, ラットおよびサルを用いたペマフィブラートおよびその代謝物の血漿中曝露量の評価

絶食の 3 匹の Sprague-Dawley 雄性ラット ( $220 \sim 330 \text{ g}$ , Charles River Laboratories 社) および 3 匹の雄性カニクイザル (2 歳,  $2 \text{ kg}$ , Nafovanny 社) に,  $0.3 \sim 1.0 \text{ mg/kg}$  ( $1.44 \sim 4.81 \text{ MBq/kg}$ , 定量下限を考慮して設定) の [ $^{14}\text{C}$ ] ペマフィブラートまたはペマフィブラートを静脈内または経口投与した。興和株式会社および Covance 社の動物倫理委員会による承認後に本研究を実施した。血漿 (ラット血液:  $0.25 \text{ mL}$ , サル血液:  $1 \text{ mL}$ ) は, 投与前, 投与後 2, 5, 10 分, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10, 24, 48 または 72 時間にヘパリンとともに採取し, 糞は 24 時間間隔で 2~3 日間採取した。液体シンチレーションカウンターで血漿および糞中の放射能を測定した。*tert*-ブチルメチルエーテルによる液液抽出後, 血漿中のペマフィブラートの濃度を LC-MS/MS で測定した。代謝物プロファイリングの際には, 50%~90% のアセトニトリルまたはアセトニトリル: メタノール (1:1, v/v) による除蛋白後, HPLC で分離し, オンライン放射能検出器またはマイクロプレートシンチレーションカウンターで試料中の放射能を測定した。試料か

らの放射能の抽出率は、ラット血漿で 88%～97%，サル血漿で約 65%～100%，ラット糞で 83%～86%，サル糞で約 66%～81%であった。

10 匹の TK-NOG 雄性マウス（実験動物中央研究所，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している NOD/Shi-scid IL2 受容体ガンマ欠損マウス）（Hasegawa et al., 2011）を本研究に使用した。5 匹の 14 週齢の対照 TK-NOG マウス（体重：約 30 g）および 5 匹の 18 週齢のヒト肝細胞移植 TK-NOG マウス（体重：約 25 g，肝臓のヒト肝細胞による置換指数：>95%）に 1.0 mg/kg のペマフィブラートを静脈内投与した。実験動物中央研究所の動物管理委員会によって本研究は承認された。イソフルラン軽麻酔下で，ヘパリン処理されたマイクロキャピラリーピペットを眼窩洞に穿刺し，投与後 5 分，0.5，1，4，8 および 24 時間後に血液試料（30  $\mu$ L）を採取した。メタノールおよび 0.5% ギ酸/アセトニトリル（1：1）による除蛋白後，ペマフィブラートとその代謝物の血漿中濃度を LC-MS/MS を用いて測定した。

## II-2-v) ペマフィブラートおよびその代謝物の定量分析

HPLC-放射能検出器で定量する際には，以下の条件にて実施した。オートサンプラー，デガッサーおよびカラムオーブンを内蔵した Alliance 2695，2690XE または 2695XE 分離モジュール（Water 社），吸光度検出器（モデル：486，2487 または 2996， $\lambda$ ：280 nm，Waters 社），放射能検出器 525TR（Perkin Elmer 社）から構成された HPLC を使用した。システム A では 10 mM ギ酸（pH 3）（移動相 A）およびアセトニトリル（移動相 B）を，システム B では 0.1%（v/v）ギ酸（移動相 A）および 0.1%（v/v）ギ酸含有アセトニトリル（移動相 B）を移動相に使用し，Inertsil ODS-3 カラム（4.6 $\times$ 150 mm，粒子サイズ：3～5  $\mu$ m，GL Sciences 社）を用いたクロマトグラフィーにより分析対象を分離した。移動相の流速は 1 mL/min とし，次のグラジエント溶出プログラムを使用した。システム A 場合は，注入後 0 分から 5 分までは移動相 B の割合（以下 B%）を 10%から 40%まで，5 分から 35 分までは 40%から 65%まで直線的に上昇させ，35 分から 60 分までは 90%，60 分から 70 分までは 10%と一定とした。システム B の場合は，注入後 0 分から 3 分までは B%を 10%と一定とし，3 分から 30 分までは 10%から 30%まで，30 分から 75 分までは 30%から 65%まで直線的に上昇させ，75 分から 80 分までは 65%と一定にし，80 分から 81 分までは 65%から 90%まで直線的に上昇させ，81 分から 84 分までは 90%と一定とし，84 分から 85 分までは 90%から 10%まで直線的に減少させ，85 分から 90 分までは 10%と一定とした。ペマフィブラートと M1～M11（一部の検討では M3～M5 および M11 を除く）

を標準品として使用し、定量した。

未変化体のみを LC-MS/MS で定量する際には、以下の条件にて実施した。3133 HTS オートサンプラーZ（資生堂社）、Agilent 1100/1200 シリーズ HPLC システム（Agilent Technologies 社）または HPLC LC-20（Shimadzu 社）、API 4000 質量分析計（AB Sciex 社）から構成された LC-MS/MS システムを使用した。0.1%または 0.5%（v/v）ギ酸（移動相 A）ならびにメタノール（移動相 B）を使用し、B%を 80%または 65%と一定とし、Symmetry C18 カラム（2.1×150 または 50 mm, 粒子サイズ：3.5～5  $\mu\text{m}$ , Waters 社）を用いたクロマトグラフィーで分析対象を分離した。TurboIonSpray インターフェイスを用いた正イオンモードによる質量分析により、分析対象を検出した。代謝物も同時に LC-MS/MS で定量する際には、I-2-iii の条件にて実施した。TurboIonSpray インターフェイスを用いた選択的質量遷移の多重反応モニタリングにより分析対象のレスポンスを分析した（Table II-1）。

**Table II-1. Multiple reaction monitoring transitions for pemafibrate, its metabolites and their internal standards.**

Analyte	Ionization mode	Multiple reaction monitoring transition	
		Precursor ion, $m/z$	Product ion, $m/z$
Pemafibrate	Positive	491	107
Pemafibrate- $d_{11}$ (IS)	Positive	502	107
M1	Positive	477	107
M1- $d_{10}$ (IS)	Positive	487	113
M2	Positive	385	107
M2- $d_{10}$ (IS)	Positive	395	113
M3	Positive	399	107
M3- $d_6$ (IS)	Positive	405	113
M4	Positive	327	107
M4- $d_6$ (IS)	Positive	333	113
M5	Negative	223	137
M5- $d_4$ (IS)	Negative	227	141
M6	Positive	507	107
M6- $d_{13}$ (IS)	Positive	520	113
M8	Positive	507	107
M8- $d_{10}$ (IS)	Positive	517	113

IS, internal standard; M1, 4-methoxyphenyl demethylated form; M2, de-4-methoxyphenylated form; M3, dicarboxylic acid form; M4, N-dealkylated form; M5, benzylic oxidized form; M6, benzoxazole 6-hydroxylated form; M8, 4-methoxyphenyl 3-hydroxylated form.

## II-2-vi) ペマフィブラートの薬物動態パラメータ値の解析

Phoenix WinNonlin (Certara 社) のノンコンパートメント解析により、血漿濃度-時間曲線から薬物動態パラメータ値を算出した。SAS ソフトウェア (SAS Institute 社) により、対照マウスおよびヒト肝細胞移植マウスの対数変換された薬物動態パラメータ値を統計的に比較した。両側の Student または Welch の t-検定での p 値が 0.05 未満の場合、統計的有意とした。

## 第3節 結果

### II-3-i) マウス、ラット、サルおよびヒトにおけるペマフィブラートの *in vitro* 血漿蛋白結合率の評価

[<sup>14</sup>C]ペマフィブラートとマウス、ラット、サルおよびヒトの血漿蛋白非結合率はそれぞれ 0.0046~0.0048, 0.0027~0.0029, 0.0017~0.0022 および 0.0015~0.0017 といずれの種においても低値を示した (Table II-2)。

**Table II-2. *In vitro* protein unbound fractions of [<sup>14</sup>C]pemafibrate in mouse, rat, monkey, and human plasma.**

Fraction	Protein unbound fraction		
	[ <sup>14</sup> C]Pemafibrate concentration (ng/mL)		
	500	2500	10,000
Mouse plasma	0.0047 ± 0.0008	0.0046 ± 0.0007	0.0048 ± 0.0007
Rat plasma	0.0028 ± 0.0002	0.0027 ± 0.0002	0.0029 ± 0.0001
Monkey plasma	0.0017 ± 0.0002	0.0021 ± 0.0001	0.0022 ± 0.0002
Human plasma	0.0015 ± 0.0001	0.0017 ± 0.0002	0.0017 ± 0.0001
Human serum albumin (4%)	0.0017 ± 0.0001	0.0019 ± 0.0000	0.0020 ± 0.0002
α <sub>1</sub> -Acid glycoprotein (0.1%)	0.25 ± 0.04	0.26 ± 0.04	0.46 ± 0.02

The values are means ± SDs from triplicate determinations.

### II-3-ii) ラット、サルおよびヒト肝細胞を用いたペマフィブラートの *in vitro* 代謝物検索

ラット、サルおよび 3 個体のヒトの肝細胞中で 4 時間インキュベーションした後の [<sup>14</sup>C]ペマフィブラートの代謝プロファイルを β-グルクロニダーゼおよびアリールスルファターゼ処理の有無の 2 条件で検討した (Table II-3)。その結果、

ラット，サルおよびヒトの肝細胞では，代謝物 **M1** およびその抱合体（17%～36%）が主に検出された。**M1**（非抱合体）はラット肝細胞中では認められなかったことから，ラットではグルクロン酸抱合または硫酸抱合反応が高度に生じていると推察された。その他，一次代謝物 **M2**，**M6** および **M8** ならびに二次代謝物と推察される **M9** はラット，サルおよびヒトの肝細胞中のいずれの種においても検出されたが，その生成量は比較的少なかった。その他の代謝物の生成量は少なかったことから，**M9** を除く二次代謝物はほとんど生成しないと推察された。

**Table II-3. Metabolic profiles of [<sup>14</sup>C]pemafibrate in hepatocytes from rats, monkeys, and humans.**

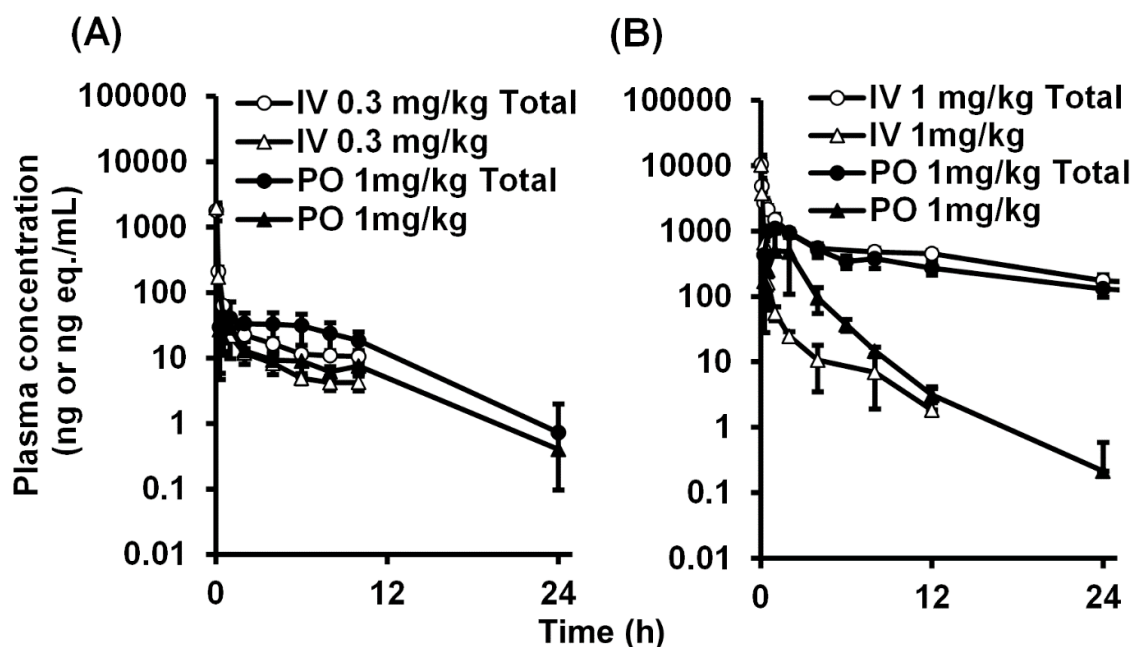
Analyte	Ratio to total radioactivity (%)				
	Rat	Monkey	Human		
			Male-1	Male-2	Female
Pemafibrate	33.67 (22.42)	53.67 (50.35)	69.59 (61.45)	73.07 (65.28)	38.14 (34.53)
M1	21.00 (<1)	22.50 (4.68)	20.47 (12.07)	16.83 (4.21)	35.96 (7.47)
M2	8.11 (5.64)	8.78 (5.73)	2.29 (<1)	1.33 (<1)	7.71 (5.20)
M6	12.76 (3.50)	4.37 (2.45)	3.49 (1.52)	3.95 (2.27)	4.71 (2.62)
M7	1.23 (<1)	<1 (<1)	<1 (<1)	<1 (<1)	5.34 (<1)
M8	5.83 (<1)	1.47 (<1)	<1 (<1)	<1 (<1)	1.17 (<1)
M9	8.49 (<1)	2.06 (<1)	<1 (<1)	<1 (<1)	2.34 (<1)
Any other metabolite	≤2.62 (≤44.96)	≤3.81 (≤21.64)	<1 (≤10.48)	<1 (≤14.93)	≤1.56 (≤34.35)

[<sup>14</sup>C]Pemafibrate (5 μM) was incubated with hepatocytes from rats, monkeys, and humans for 4 h. The metabolites were determined with or without β-glucuronidase/arylsulfatase treatments. The values in parentheses are the ratios to total radioactivity without β-glucuronidase/arylsulfatase treatments. M3-M5 and M11 were not tested. Because M3-M5 and M11 were separated from major metabolite M1, it was assumed that the generated M3-M5 and M11 levels would be low.

II-3-iii) ヒト肝細胞移植マウス，ラットおよびサルを用いたペマフィブラートおよびその代謝物の血漿中曝露量の評価

[<sup>14</sup>C]ペマフィブラートまたはペマフィブラートをラットまたはサルに静脈内または経口投与した後の血漿中濃度と時間の曲線を Fig. II-2 に示した。薬物動態

パラメータ値を Table II-4 に示した。 $[^{14}\text{C}]$ ペマフィブラート (1.0 mg/kg) をラットに経口投与した後の見かけの吸収率は 27%であった。ペマフィブラートの生物学的利用率, 最高血漿中濃度到達時間 ( $T_{\max}$ ) および最高血漿中濃度 ( $C_{\max}$ ) は, それぞれ 15%, 1 時間および 34 ng/mL であった。総放射能の  $\text{AUC}_{0-t}$  (365 ng eq.·h/mL) はペマフィブラート (168 ng·h/mL) の 2.2 倍であった。一方,  $[^{14}\text{C}]$ ペマフィブラートをサルに経口投与した後の見かけの吸収率は 74%であった。ペマフィブラートの生物学的利用率,  $T_{\max}$  および  $C_{\max}$  は, それぞれ 87%, 2 時間および 694 ng/mL であった。総放射能の  $\text{AUC}_{0-t}$  (12,500 ng eq.·h/mL) はペマフィブラートの  $\text{AUC}_{0-\text{inf}}$  (1,560 ng·h/mL) の 8.0 倍であった。



**Fig. II-2. Mean plasma concentration–time curves of total radioactivity (circles) and pemaflibrate (triangles) in rats (A) and monkeys (B) after both intravenous and oral doses.**  $[^{14}\text{C}]$ Pemaflibrate and pemaflibrate were administered intravenously (IV) and orally (PO) to overnight-fasted male Sprague-Dawley rats and to male cynomolgus monkeys. Mean  $\pm$  SD for three animals are shown.

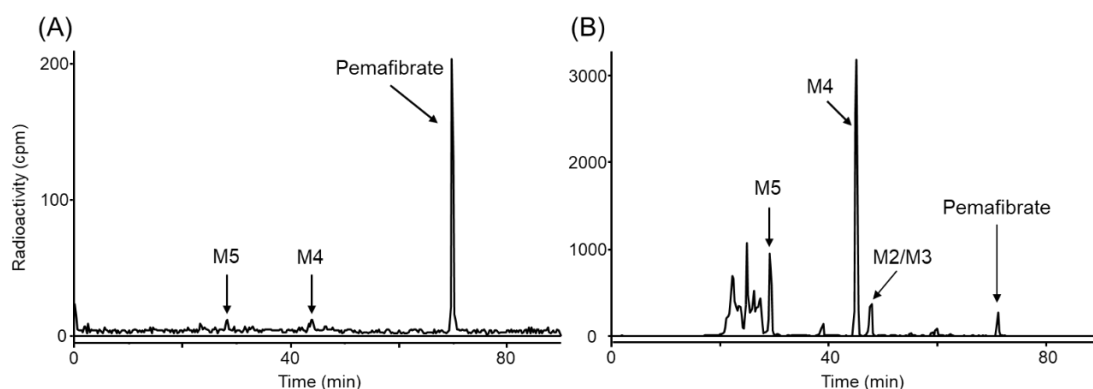
**Table II-4. Pharmacokinetic parameters for total radioactivity and pemafibrate in rats and monkeys after intravenous and oral administrations.**

Species	Analyte	Route	Dose (mg/kg)	AUC <sub>0-t</sub> or AUC <sub>0-inf</sub> (ng or ng eq.·h/mL)	C <sub>max</sub> (ng or ng eq./mL)	T <sub>max</sub> (h)	t <sub>1/2</sub> (h)	F <sub>a</sub> or F (%)
Rat	Total radioactivity	Intravenous	0.3	419 ± 51 <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.C	N.D.
		Oral	1	365 ± 237 <sup>a</sup>	48.4 ± 25.0	2.0	N.C	27.3 ± 19.7 <sup>c</sup>
	Pemafibrate	Intravenous	0.3	348 ± 26 <sup>a</sup>	N.D.	N.D.	N.C	N.D.
		Oral	1	168 ± 33 <sup>a</sup>	33.8 ± 16.6	1.0	N.C	14.5 ± 2.9 <sup>d</sup>
Monkey	Total radioactivity	Intravenous	1	18,600 ± 1,600 <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	22.0	N.D.
		Oral	1	12,500 ± 2,200 <sup>a</sup>	1,100 ± 110	1.0	N.C.	74.0 ± 12.1 <sup>c</sup>
	Pemafibrate	Intravenous	1	1,510 ± 300 <sup>b</sup>	N.D.	N.D.	2.45 ± 1.02	N.D.
		Oral	1	1,560 ± 860 <sup>b</sup>	694 ± 500	2.0	2.45 ± 1.48	87.4 ± 47.9 <sup>d</sup>

[<sup>14</sup>C]Pemafibrate or pemafibrate was administered intravenously in physiological saline containing sodium hydroxide and ethanol (5%, v/v, monkey only) or orally in 0.5% methylcellulose solution to overnight-fasted male Sprague–Dawley rats and male cynomolgus monkeys. C<sub>max</sub>, observed peak plasma concentration after oral dosing; T<sub>max</sub>, time to reach C<sub>max</sub>; F<sub>a</sub>, apparent absorption ratio; F, bioavailability; N.D., not determined, N.C., not calculated. F<sub>a</sub> and F was determined by a relative comparison of the mean AUC values associated with the intravenous and the oral doses. T<sub>max</sub> data are medians. The other parameters are means (± SD) for 2 or 3 animals. <sup>a</sup>AUC<sub>0-t</sub>, <sup>b</sup>AUC<sub>0-inf</sub>, <sup>c</sup>F<sub>a</sub>, <sup>d</sup>F.

ラットおよびサルに[<sup>14</sup>C]ペマフィブラートを単回経口投与した際の血漿中代謝プロファイルを示す代表的なクロマトグラムを Fig. II-3 に、血漿および糞中のペマフィブラートの代謝プロファイルを Table II-5 に示した。ラットでは未変化体ペマフィブラートが総放射能の AUC の 29%を占める主要な放射性成分だったが、サルでは未変化体は 3%であった。ラット血漿中ではペマフィブラート、M2/M3, M4 および M5 がそれぞれ放射能の 29%, 1%, 5%および 3%と代謝物はほとんど検出されなかった。ラット糞中にはペマフィブラート, M1, M2 および M6 がそれぞれ投与量の 40%, 29%, 5%および 7%排泄された。対照的に、サル血漿中ではペマフィブラート, M1, M2/3, M4 および M5 がそれぞれ放射能の 3%, 1%, 15%, 21%および 9%と代謝物がその大部分を占めた。サル糞中には M1, M2/M3, M4, M5 および M6 がそれぞれ投与量の 10%, 14%, 2%, 3%および 4%排泄されたが、ペマフィブラート (0%) はほとんど排泄されなかった。





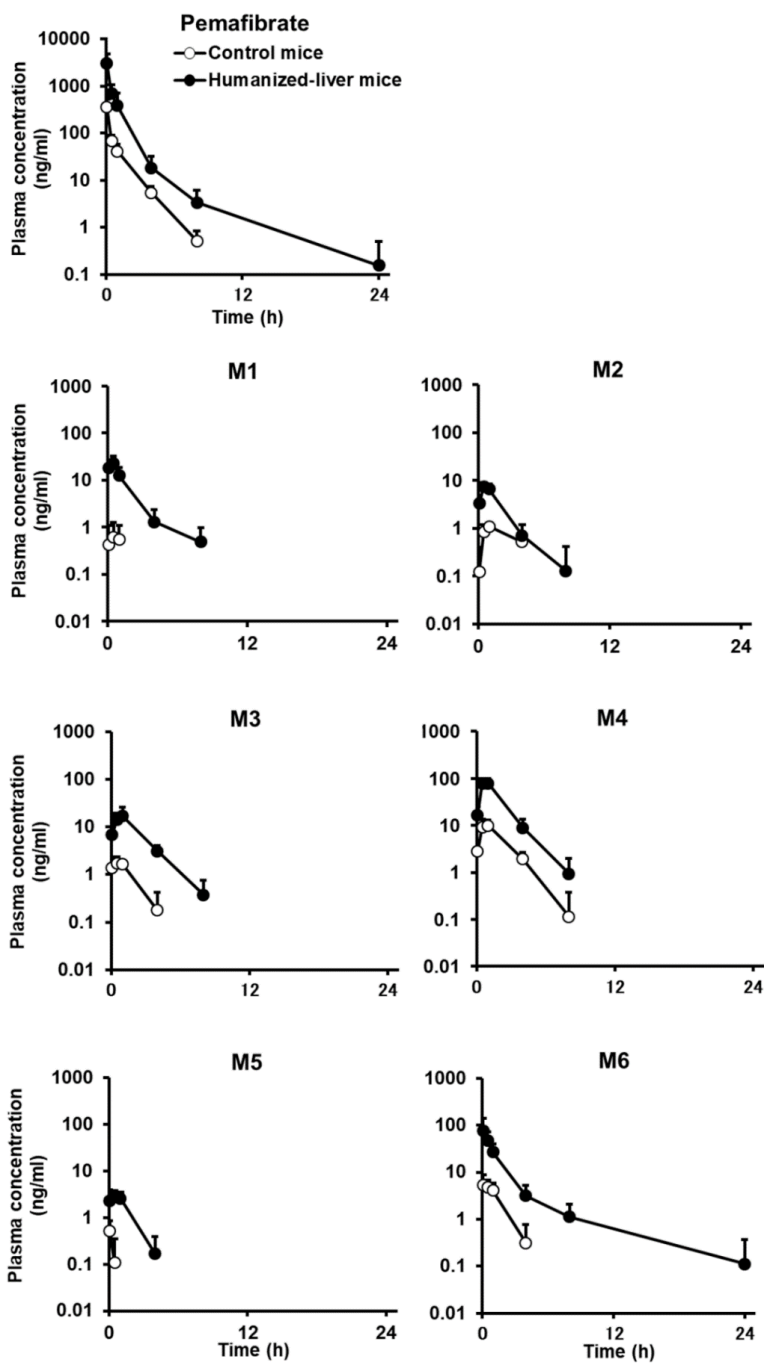
**Fig. II-3. Representative HPLC radiochromatographic profiles of pemaifibrate and its metabolites in plasma of rats (A) and monkeys (B) 1 h after an oral dose of [<sup>14</sup>C]pemaifibrate (1.0 mg/kg).**

**Table II-5. Ratios of AUC to total radioactivity and percentage of dose of pemaifibrate and its metabolites in feces after an oral dose of [<sup>14</sup>C]pemaifibrate (1.0 mg/kg) to rats and monkeys**

Analyte	Ratio of AUC to total radioactivity in plasma (%)		Percentage of dose in feces (%)	
	Rat (pool of 3)	Monkey	Rat	Monkey
Pemaifibrate	29	3 ± 3	40.1 ± 11.4	0.1 ± 0.1
M1	N.D.	1 ± 1	28.6 ± 4.3	10.4 ± 2.5
M2/M3	1	15 ± 11	4.9 ± 0.8/N.T.	14.4 ± 4.0
M4	5	21 ± 8	N.T.	2.3 ± 0.6
M5	3	9 ± 3	N.T.	2.7 ± 0.5
M6	N.D.	0	6.8 ± 1.2	3.5 ± 1.3
M7	N.D.	1	0.5 ± 0.8	0.9 ± 0.5
M8	N.D.	N.D.	0.9 ± 0.8	0.0
M9	N.D.	N.D.	1.5 ± 0.6	0.0
M10	N.D.	0 ± 0	0.0	0.0
M11	N.T.	0	N.T.	2.0 ± 2.0
Any other metabolite	N.D.	≤12	≤1.8	≤5.1
Total	100	100	94.9 ± 5.3 <sup>a</sup>	50.8 ± 1.1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Urinary excretion ratio was 1.9 ± 0.4., <sup>b</sup>Urinary excretion ratio, aqueous cage wash, and cage debris were 11.0 ± 5.5, 3.9 ± 1.4, and 14.7 ± 7.7, respectively., N.D., not detected; N.T., not tested. Data are means (± SD) for 2 or 3 animals.

ペマフィブラートを対照マウスとヒト肝細胞移植マウスに単回静脈内投与した際のペマフィブラートおよびその代謝物の血漿中濃度推移を Fig. II-4 に、ペマフィブラートの薬物動態パラメータ値を Table II-6 に、未変化体に対する代謝物 M1～M6 の AUC の割合 ( $AUC_{Ratio}$ ) および対照マウスに対するヒト肝細胞移植マウスの  $AUC_{Ratio}$  を Table II-7 に示した。ペマフィブラートの血漿中曝露量は対照マウスよりヒト肝細胞移植マウスで高かった。ペマフィブラート (1.0 mg/kg) を静脈内投与した後の見かけの消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は対照マウスおよびヒト肝細胞移植マウス間に差はなかった (それぞれ 1.1 および 1.5 時間)。一方、全身クリアランス ( $CL_{total}$ ) および定常状態における分布容積 ( $V_{ss}$ ) は対照マウス (それぞれ 4,800 mL/h/kg および 4,200 mL/kg) よりヒト肝細胞移植マウス (それぞれ 640 mL/h/kg および 380 mL/kg) で低かった。ペマフィブラートの  $AUC_{0-inf}$  は対照マウス (230 ng·h/mL) に比較してヒト肝細胞移植マウス (2,000 ng·h/mL) が 9 倍高値を示した。 $t_{1/2}$  以外の薬物動態パラメータ値は対照マウスとヒト肝細胞移植マウス間で統計的に有意な差が認められた。ヒト肝細胞移植マウスにおけるペマフィブラートの代謝物 M1～M6 の血漿中曝露量は対照マウスよりも高かった。ヒト肝細胞移植マウスにおける未変化体に対する代謝物 M1 および M5 の  $AUC_{Ratio}$  は対照マウスよりも高く、その差は統計的に有意であった。対照マウスに対するヒト肝細胞移植マウスの M1～M6 の  $AUC_{Ratio}$  はそれぞれ 74, 5.7, 17, 7.8, 52 および 13 であった。



**Fig. II-4. Mean plasma concentration–time curves of pemafibrate and its metabolites in control mice and chimeric mice with humanized liver (humanized-liver mice) after single intravenous administration of pemafibrate at 1.0 mg/kg.** Pemafibrate was administered intravenously in physiological saline containing sodium hydroxide to male control mice and chimeric mice with humanized liver. Data are means and SDs for five animals.

**Table II-6. Pharmacokinetic parameters of pemafibrate after an intravenous administration of pemafibrate at 1.0 mg/kg in control mice, chimeric mice with humanized liver and monkey.**

	$t_{1/2}$ (h)	$CL_{total}$ (mL/h/kg)	$V_{ss}$ (mL/kg)	$AUC_{0-t}$ (ng·h/mL)	$AUC_{0-inf}$ (ng·h/mL)
Control mice	$1.1 \pm 0.1$	$4,800 \pm 1,900$ (1,000,000 $\pm$ 400,000)	$4,200 \pm 2,400$ (900,000 $\pm$ 510,000)	$230 \pm 90$ (1.1 $\pm$ 0.4)	$230 \pm 90$ (1.1 $\pm$ 0.4)
Chimeric mice with humanized liver	$1.5 \pm 1.3$	$640 \pm 270^c$ (390,000 $\pm$ 160,000) <sup>e</sup>	$380 \pm 120^c$ (230,000 $\pm$ 70,000) <sup>d</sup>	$2,000 \pm 1,400^c$ (3.2 $\pm$ 2.3) <sup>e</sup>	$2,000 \pm 1,400^c$ (3.3 $\pm$ 2.3) <sup>e</sup>
Monkey <sup>a</sup>	$2.5 \pm 1.0$	$530 \pm 100$ (270,000 $\pm$ 50,000)	$270 \pm 160$ (130,000 $\pm$ 80,000)	$1,500 \pm 300$ (3.0 $\pm$ 0.6)	$1,500 \pm 300$ (3.0 $\pm$ 0.6)
Ratio <sup>b</sup>	1.4	0.13 (0.39)	0.090 (0.26)	8.7 (2.9)	8.7 (3.0)

The values in parentheses are the values in unbound form. <sup>a</sup>Data were reported previously (Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency, 2018; <http://www.pmda.go.jp/>). <sup>b</sup>Ratios of parameters for chimeric mice with humanized liver to those for control mice. <sup>c</sup> $p < 0.001$ , compared between the pharmacokinetic parameters in chimeric mice with humanized liver and those in control mice. <sup>d</sup> $p < 0.01$ . <sup>e</sup> $p < 0.05$ . The parameters are means  $\pm$  SDs for three or five animals.

**Table II-7. Metabolite/parent  $AUC_{Ratio}$  and chimeric mice with humanized liver/control mice  $AUC_{Ratio}$  of pemafibrate metabolites after an intravenous administration of pemafibrate at 1.0 mg/kg to control mice and chimeric mice with humanized liver.**

Metabolite	Metabolite/parent $AUC_{Ratio}$		$AUC_{Ratio}^c$
	Control mice <sup>a</sup>	Chimeric mice with humanized liver <sup>a</sup>	
M1	$0.0018 \pm 0.0018$	$0.021 \pm 0.00^b$	74
M2	$0.018 \pm 0.005$	$0.014 \pm 0.008$	5.7
M3	$0.017 \pm 0.014$	$0.043 \pm 0.032$	17
M4	$0.19 \pm 0.08$	$0.20 \pm 0.09$	7.8
M5	$0.00057 \pm 0.00092$	$0.0057 \pm 0.0037^b$	52
M6	$0.031 \pm 0.018$	$0.069 \pm 0.055$	13

<sup>a</sup>These were calculated using  $AUC_{0-t}$  (nmol·h/mL). <sup>b</sup> $P < 0.01$ , compared between metabolite/parent  $AUC_{Ratio}$  in chimeric mice with humanized liver and those in control mice. <sup>c</sup>Ratios of  $AUC_{0-t}$  in chimeric mice with humanized liver to those in control mice. Metabolite/parent  $AUC_{Ratio}$  are means  $\pm$  SDs for five animals.

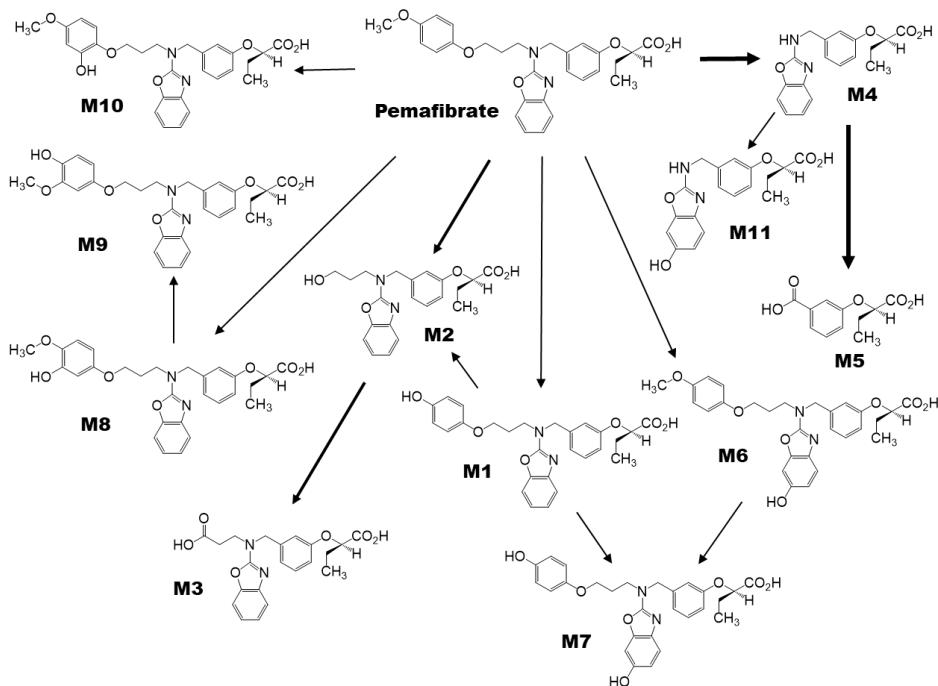
#### 第4節 考察

*In vitro* 肝細胞中ではペマフィブラートから M1 への代謝が主要な代謝経路であると推定され、検討したヒトおよび動物種間に種差は認められなかった。一方、ラットおよびサル血漿中には、M1 はほとんど検出されず、*in vitro* 肝細胞中と *in vivo* 血漿中の代謝物プロファイルに乖離が認められた。さらに、ラットおよびサルの糞からは代謝物として M1 が主に検出されたことから (Table II-5, それぞれ投与量の 29% および 10%), M1 および/または M1 抱合体は肝臓で生成した後、そのまま胆汁中に排泄され、腸内細菌によって脱抱合され、M1 として糞中に排泄されると推察された。一方、M2/3, M4 および M5 に関しては、ラットの血漿ではほとんど検出されなかったが、サルの血漿では高濃度検出された (Fig. II-3)。M2/3, M4 および M5 は、その構造から二次代謝物であり、*in vitro* 系からの予測が困難であったと推察された。これらの生体内での生成量は微量だが、サルでは血漿中に分布しやすいため高濃度になったと推察された。すなわち、循環血中代謝物の薬物動態の決定因子は代謝だけでなく、血漿蛋白結合および肝取り込みに関わる分布も寄与していることが示唆された。さらに、サル血漿中には複数の極性代謝物も検出されていることから、代謝物の網羅的な検索に有用な動物種であることが示唆された。以上から、循環血漿中のペマフィブラートの代謝プロファイルはラットとサルで異なり、サルはヒト循環血中代謝物の予測に適切な動物モデルであると推察された。

ペマフィブラートと同様の血漿代謝プロファイルの種差はフェノフィブラートでも確認されている。フェノフィブラートの代謝には種差があり (Mogi et al., 1995), フェノフィブリン酸 (FA, 活性代謝物) と還元型 FA (RFA) はラットとイヌの両種の血漿で主に検出されるが、総放射能に対する RFA の濃度比はイヌの方がラットよりも約 3 倍高い (ラット: 総放射能の <19.0%, イヌ: 総放射能の 56.2%~66.8%)。一方、尿や糞に関しては、主成分であるフェノフィブラート、FA および RFA の排泄率 (投与量に対する割合) の種差は小さく、フェノフィブラートの代謝プロファイルはラットとイヌで類似している (ラット/イヌの尿: それぞれ検出されず/検出されず, 5.4%/2.0% および 7.2%/9.3%, ラット/イヌの糞: それぞれ 7.8%/5.6%, 20.7%/22.6% および 5.5%/9.1%)。ペマフィブラートとフェノフィブラートの両方の血漿代謝プロファイルの種差は、分布および/または排泄の種差によると推察された。近年、基質特異性、組織分布、トランスポーターの相対的な発現量の種差が報告されているが (Chu et al, 2013), 肝取り込みトランスポーター OATPs の基質および阻害プロファイルはカニクイ

ザルとヒトで類似している (Shen et al., 2013)。さらに、カニクイザルは肝取り込みトランスポーターが関与するピタバスタチンの薬物相互作用の予測に有用であることが報告されている (Takahashi et al., 2013)。以上から、サルは新薬候補品の分布および排泄がヒトに類似しており、ペマフィブラートの循環血中代謝プロファイルもヒトに類似していると推察された。

近年、ヒトにおける肝代謝、分布および排泄の予測にヒト肝細胞移植マウスの有用が示されているため (Bateman et al., 2014; Kamimura et al., 2017; Miyamoto et al., 2017), 本研究でヒト肝細胞移植マウスを用いて、ペマフィブラートの循環血中代謝物の濃度を測定し、その有用性を検討した。ペマフィブラートをヒト肝細胞移植マウスに静脈内投与した際、血漿中主要代謝物として M4 および M6 が検出された (Fig. II-4)。さらに、二次代謝物を含む定量したすべての代謝物の AUC は対照マウスよりもヒト肝細胞移植マウスで統計的に有意に高く、異なる薬物代謝プロファイルを有すると推察された。ただし、本研究における投与経路として、消化管代謝の影響を除外するため、ヒト (経口投与) とは異なる静脈内投与で投与したため、経口投与時は、消化管から吸収された後、循環血中に移行する前に受ける小腸や肝臓などで代謝 (初回通過効果) を考慮する必要があると推察された。以上から、ヒト肝細胞移植マウスはペマフィブラートのヒト薬物動態研究に有用な動物モデルであると推察された。



**Fig. II-5. Proposed metabolic pathways of pemafibrate in rats and monkeys.**

更なる検討として、ヒト肝細胞移植マウスの薬物動態を決定する主要な薬物動態パラメータ値 ( $CL_{total}$ ,  $V_{ss}$  および AUC) を対照マウスおよびサルのパラメータと比較した。ヒト肝細胞移植マウスにおける薬物動態パラメータ値 ( $CL_{total}$ ,  $V_{ss}$  および AUC) は、対照マウスよりもサルに近い値を示した (Table II-6)。ヒト OATP が発現していると推察されるヒト肝移植マウスは野生型マウスよりも一部のスタチンの曝露が高いことから、ヒトの OATP を介した取り込み能はマウスにおける能動的な取り込み能よりも低いと推察される (Salphati et al., 2014)。肝取り込みトランスポーターOATPs の基質および阻害プロファイルはカニクイザルとヒトで類似していることから (Shen et al., 2013), ヒト肝細胞移植マウスの薬物動態パラメータ値がサルに近似していたと推察された。主要な薬物動態の決定因子である血漿蛋白結合も考慮するため、各種の血漿蛋白結合率の影響も検討した (Table II-2)。[ $^{14}C$ ]ペマフィブラートと 4% ヒト血清アルブミンとの蛋白非結合率は 0.0017~0.0020 と低かったが、0.1%  $\alpha$ 1-酸性糖蛋白との蛋白非結合率は 0.25~0.46 と比較的高値を示したことから、ヒト血漿アルブミンが主要な結合蛋白であると推察された。さらに、ペマフィブラートのマウスの血漿非結合率 (0.0046~0.0048) はサルおよびヒト (0.0015~0.0022) よりも高かった。ヒト肝細胞移植マウスの血清アルブミンはヒトアルブミンで大部分が置き換わっているため、ヒト肝細胞移植マウスはヒトと同様の蛋白結合率を有すると推察される。そこで、各種薬物動態パラメータ値を血漿蛋白非結合率により非結合型に補正しても、ヒト肝細胞移植マウスにおける薬物動態パラメータ値 ( $CL_{total}$ ,  $V_{ss}$  および AUC) は、対照マウスよりもサルに近い値を示した (Table II-6)。

以上から、サルおよびヒト肝細胞移植マウスはヒト循環血中代謝物を特定するための有用な動物モデルであると推察された。特に、ヒト肝細胞移植マウスはサルよりも体重が少なく、被験物質の必要量が少なくて済む利点もあるため、ヒト薬物動態研究における更なる有用性の検討が期待される。

## 第5節 小括

肝細胞中における *in vitro* 代謝物プロファイルは、血漿中代謝物プロファイルと異なることが明らかとなった。血漿中代謝物の予測においては、*in vitro* の代謝だけでなく、分布および排泄も考慮した要因を包含するサルまたはヒト肝細胞移植マウスを用いた *in vivo* 予測系が有用であると推察された。

### 第 III 章計算科学手法による臨床薬物相互作用の予測

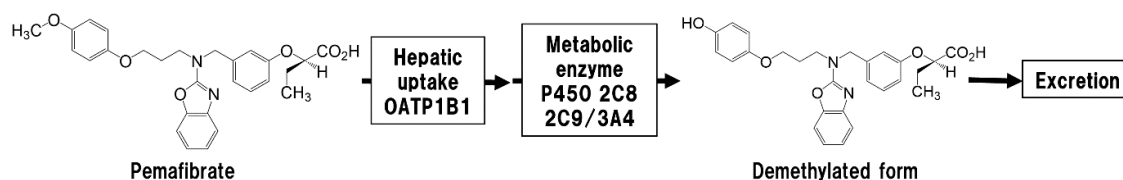
#### 第 1 節 緒言

相互作用薬の肝細胞および消化管上皮細胞中濃度を保守的に理論上の最高濃度に設定する静的モデルによる薬物相互作用のリスク評価は、一般的に過大になる傾向がある。より定量的な手法として、相互作用薬と被相互作用薬の体内での動きを定量的かつ経時的に表す血中および組織中濃度推移を考慮した PBPK モデルが推奨されている (EMA, 2012; FDA, 2020a; MHLW, 2018)。PBPK モデルは、臓器重量、血流量／速度、代謝酵素量等の生理学的用要因、薬剤の脂溶性や酸解離定数等の物理化学的要因ならびに膜透過速度、分布容積および各消失クリアランス等の薬物動態学的要因を踏まえたメカニズムに基づく計算科学的なモデルである (Rowland et al., 2011)。各臓器間の移行は、血流量／速度および分布容積を考慮した物質収支式で記述し、薬物の血中および組織中濃度推移の予測を可能とする。PBPK モデルによる解析結果は、用法・用量および注意喚起の設定に用いることができ、特に、薬物相互作用の予測、ヒト初回投与量の設定および小児における用法・用量の設定に有用である。さらには、PBPK モデルは、*in vitro* と *in vivo* における各パラメータの乖離を明らかにするだけでなく、病態時における各パラメータの変動の推定にも役立つ。

仮想の母集団に基づくシミュレーターである Simcyp は有用な PBPK ツールとして一般的に利用されている (Jamei et al., 2009)。Simcyp 上には人口統計、肝血流の変化、肝臓の大きさ、血漿蛋白量、P450 酵素量および腎機能に関する情報が健常人、腎・肝障害患者 (Child-Pugh 分類による肝障害) の仮想の集団データベースに組み込まれており、肝障害患者では P450 活性の低下等、一部の薬物動態パラメータ値の患者背景に応じた変動が考慮されている (Johnson et al., 2010)。一方で、肝障害時における OATP1B1 の mRNA の低下は報告されているが、OATP1B1 の活性の低下は報告がなく、Simcyp には組み込まれていない (Li et al., 2015)。ペマフィブラートは OATP1B1 により肝臓へ取り込まれ、P450 2C8, 2C9 および 3A4 により代謝されるため (Fig. III-1)、併用薬だけでなく、様々な病態による活性変動の影響を両過程において受ける可能性がある。OATP1B1 はペマフィブラートだけでなく、HMG-CoA 還元酵素の阻害剤スタチンを含む多くの医薬品の輸送に関わるため (MHLW, 2018)、肝障害時における活性低下の推定は医薬品の肝障害時における薬物動態および薬物相互作用の予測に有用である。本章では、ペマフィブラートの PBPK モデルにおける薬物動



態パラメータ値を決定し、未実施の薬物相互作用を予測した。さらに、ヒト血漿中濃度推移を用いて最適化することで、肝障害時における OATP1B1 活性を初めて明らかとし、腎・肝障害患者における薬物相互作用の予測を試みた。



**Fig. III-1. A putative major elimination pathway of pemafibrate.**

## 第 2 節 実験材料および実験方法

### III-2-i) 化合物および試薬

NADPH-P450 レダクターゼ含有の肝ミクロゾーム（27 名の白人，2 名のヒスパニック，2 名のアフリカ系アメリカ人および 2 名のアジア人のドナー）および組換えヒト P450 は Corning 社から入手した。特定の P450 分子種を選択的に不活化したプールドヒト肝ミクロゾーム（Silensomes）と対照ミクロゾーム（60～150 人の白人ドナー）は Biopredic International 社から入手した。DMEM および HBSS は Invitrogen 社から，HEPES はナカライテスク社から， $[^3\text{H}]$ ジゴキシン， $[^3\text{H}]$ エストロン 3-硫酸および $[^3\text{H}]$ コレシストキニンオクタペプチド（ $[^3\text{H}]$ CCK-8）は Perkin Elmer 社から，ベラパミルおよびシクロスポリン A は Sigma-Aldrich 社から，Ko143 は Toronto Research Chemicals 社から入手した。凍結肝細胞（43 名の白人，1 名のヒスパニック，4 名のアフリカ系アメリカ人および 2 名のアジア人）は ThermoFisher Scientific 社から入手した。OATP1B1 または OATP1B3 発現ヒト胚性腎臓細胞（HEK293 細胞）およびベクターを導入した HEK293 細胞は SOLVO Biotechnology 社から入手した。その他の試薬および溶媒は分析用の市販品を使用した。

### III-2-ii) ヒトにおけるペマフィブラートの *in vitro* 血液／血漿濃度比の評価

終濃度 500～10,000 ng/mL の $[^{14}\text{C}]$ ペマフィブラートを添加したヒト血液を 37°C で 30 分間インキュベートした後，遠心分離して血漿を得た。血液および血漿中の放射能濃度を液体シンチレーションカウンターで測定し，ペマフィブラートの血液／血漿濃度比を次式より算出した：血液／血漿濃度比＝（血液中濃度）／（血漿中濃度）。

### III-2-iii) ヒト肝ミクロゾームおよび各ヒト P450 分子種発現系を用いたペマフィブラートの *in vitro* 代謝活性の評価

P450 2C8 活性の指標であるパクリタキセル 6 $\alpha$ -水酸化活性, P450 2C9 活性の指標であるジクロフェナク 4'-水酸化活性および P450 3A4 活性の指標であるテストステロン 6 $\beta$ -水酸化活性が, それぞれ 290, 3,000 および 5,900 pmol/min/mg protein であるヒト肝ミクロゾームを使用した。終濃度 0.5  $\mu$ M の [ $^{14}$ C]ペマフィブラートをヒト肝ミクロゾームおよびヒト cDNA 発現 P450 ミクロゾーム (コントロール, P450 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 および 3A7) ならびに NADPH 再生系 (pH 7.4) と共に 37°C で 0~20 分間インキュベートした。2% ギ酸:アセトニトリル (2:3) を用いて除蛋白し, HPLC で分離した後, オフライン放射能検出器で放射能を測定した。オートサンプラー, デガッサー, カラムオーブン, 吸光度検出器, フラクションコレクター (Agilent Technologies 社) が内蔵された Agilent 1100 シリーズの HPLC システムに設置した Inertsil ODS-3V カラム (4.6  $\times$  150 mm, 粒子サイズ: 5  $\mu$ m, GL Sciences 社) を用いたクロマトグラフィーにより分析対象を分離した。移動相として 0.1% (v/v) ギ酸 (移動相 A) およびアセトニトリル (移動相 B) を使用し, 1 mL/min の流速で, 次の溶出プログラムを使用した: 注入後 0 分から 28 分までは移動相 B の割合 (以下 B%) を 40% から 65% まで直線的に上昇させ, 28.01 分から 32 分までは 40% と一定とした。標準物質としてペマフィブラートを使用し, 定量した。ヒト肝ミクロゾーム中の蛋白非結合率 ( $f_{u, mic}$ ) は超遠心分離法で評価した。ペマフィブラートの対数濃度-時間曲線から最小二乗法を用いて得られた消失速度定数 ( $k_{el, min^{-1}}$ ) から, 固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) を算出し,  $f_{u, mic}$  で補正した ( $CL_{int}/f_{u, mic}$ )。

### III-2-iv) 特定の P450 分子種を選択的に不活化したヒト肝ミクロゾームを用いたペマフィブラートの *in vitro* 寄与率の評価

蛋白濃度 0.2 mg/mL の P450 2C8, 2C9 または 3A4 を不活化したミクロゾーム (Silensome) と対照 Silensomes (P450 を不活化していないミクロゾーム) を用いて, ペマフィブラートを代謝させた (Parmentier et al., 2019)。Silensomes/対照 Silensomes の P450 2C8 活性の指標であるアモジアキンのデスエチル体への代謝活性, P450 2C9 活性の指標であるジクロフェナク 4'水酸化活性, P450 3A4 活性の指標であるテストステロン 6 $\beta$ -水酸化活性および P450 3A4 活性の指標であるニフェジピン酸化活性はそれぞれ 98/850, 380/3,000, 0.0/420 および 89/450  $\mu$ mol/min/mg protein であった。終濃度 0.5  $\mu$ M のペマフィブラートを Silensomes および NADPH 再生系 (pH 7.4) とともに 37°C で 0~60 分間インキ

ュベートした。アセトニトリル／メタノール（1:10）で除蛋白後、液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析器を用いてペマフィブラートの濃度を測定した。Agilent 1100/1200 シリーズ HPLC システム（Agilent Technology 社）に設置した Capcell pak C18 MGII カラム（2.1×35 mm，粒子サイズ：3 μm，Shiseido 社）を用いたクロマトグラフィーにより分析対象を分離した。移動相として 0.1% ギ酸（移動相 A）とアセトニトリル（移動相 B）を使用し，注入後 0～0.5 分および 7.51～8.5 分は 0.3 mL/min ならびに 0.51～7.5 分は 0.4 mL/min の流速で，次の溶出プログラムを使用した：注入後 0～0.5 分および 5.01～8.5 分は移動相 B の割合（以下 B%）を 30%，0.51～5 分は 90%と一定とした。API 4000 質量分析計（AB Sciex 社）を用いた TurboIonSpray インターフェイスを用いた正イオンモードによる質量分析により，分析対象を検出した。ペマフィブラートの対数濃度-時間曲線から最小二乗法を用いて得られた消失速度定数（ $k_{el}$ ,  $\text{min}^{-1}$ ）から  $CL_{int}$  値を算出した。寄与率（CR），各 P450 における  $CL_{int}$ （ $CL_{int, P450 2C8}$ ,  $CL_{int, P450 2C9}$  および  $CL_{int, P450 3A4}$ ）は次式から算出した。

$$CR = 1 - \text{Silensomes における } CL_{int} / \text{対照 Silensomes における } CL_{int}$$

$$CL_{int, P450 2C8}, CL_{int, P450 2C9} \text{ および } CL_{int, P450 3A4} = CL_{int} / f_{u, mic} \times CR$$

### III-2-v) ヒト結腸がん由来細胞株を用いたペマフィブラートの *in vitro* 消化管吸収阻害の評価

I-2-ii に従い，Caco-2 細胞の単層膜を調製した。 $[^{14}\text{C}]$ ペマフィブラート（1.0 μM），P-gp の典型的基質 $[^3\text{H}]$ ジゴキシシン（1.0 μM）または乳癌耐性蛋白質（BCRP）の典型的基質 $[^3\text{H}]$ エストロン-3-硫酸（0.1 μM）を含む HBSS [10 mM HEPES（pH 7.4）を含む] を Caco-2 細胞の頂端膜側または基底膜側に添加し，4 時間インキュベーションした。頂端膜側から基底膜側または基底膜側から頂端膜側への透過量を測定し， $P_{app}$  を算出した。さらに，P-gp および BCRP の典型的阻害剤シクロスポリン A（10 μM， $K_i$ ：それぞれ 1.1 および 6.7～7.8 μM）（Xia et al., 2007）および P-gp の典型的阻害剤ベラパミル（30 μM）または BCRP の典型的阻害剤 Ko143（1 μM）による阻害の影響も検討した。基底膜側および頂端膜側から透過した試料中の放射能濃度は液体シンチレーションカウンターで測定した。

### III-2-vi) ヒト OATP1B1 または OATP1B3 発現系を用いたペマフィブラートの *in vitro* 取り込みクリアランスの評価

$[^{14}\text{C}]$ ペマフィブラート（1.0 μM），OATP1B1 の典型的基質  $[^3\text{H}]$ エストロン-3-

硫酸 (0.05  $\mu\text{M}$ ) または OATP1B3 の典型的基質 [ $^3\text{H}$ ]CCK-8 (0.1  $\mu\text{M}$ ) を含む HBSS (pH 7.4) を OATP1B1 または OATP1B3 発現 HEK293 細胞ならびにベクターを導入した HEK293 細胞に添加し、取り込みを開始した。緩衝液を除去した後、氷冷した HBSS を添加し、0.5 または 2 分を取り込みを終了させた。次に細胞を氷冷した HBSS で洗浄後、0.1% Triton X-100 で可溶化した。緩衝液および細胞中の放射能を液体シンチレーションカウンタで測定した。残りの細胞溶解物を使用して、標準蛋白質としてウシ血清アルブミンを用いたスミス法により蛋白質濃度を測定した。細胞中放射能 (disintegrations per minute/mg protein) を緩衝液中の放射能 (disintegrations per minute/mL) で除して、取り込み量 ( $V_d$ ,  $\mu\text{L}/\text{mg protein}$ ) を算出した。取り込みクリアランス ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ ) は次式から算出した:  $\text{CL} = (V_d, 2 \text{ min} - V_d, 0.5 \text{ min}) / (2 - 0.5)$ 。OATP1B1 または OATP1B3 発現 HEK293 細胞への取り込みクリアランスからベクターを導入した HEK293 細胞への取り込みクリアランスを差し引き、能動取り込みクリアランスを算出した。

### III-2-vii) ヒト凍結肝細胞を用いたペマフィブラートの *in vitro* 取り込み活性の評価

OATP1B1/1B3 の典型的基質エストラジオール 17 $\beta$  グルクロニドの肝細胞中への取り込み速度は、37°C で 14 pmol/min/mg protein, 4°C で 3.0 pmol/min/mg protein である肝細胞を使用した。Krebs–Henseleit 緩衝液 (pH 7.4) を用いて  $2.0 \times 10^6$  viable cells/mL の肝細胞懸濁液を調製した。終濃度で 1~100  $\mu\text{M}$  の [ $^{14}\text{C}$ ]ペマフィブラートを含む緩衝液に等量の細胞懸濁液を添加し、取り込みを開始した。37°C で 0.5 または 2 分間のインキュベーション後、基質を含む溶液から細胞を以下の方法で分離し、反応を停止させた。密度 1.015 g/mL のシリコン油と鉱油の混合油の下層に 2 M 水酸化ナトリウム溶液 (アルカリ溶液) を添加した遠心チューブにインキュベーション混合物の一部を添加した後、遠心分離した (肝細胞は油層を通過してアルカリ溶液に移行した。)。アルカリ溶液中でインキュベーションし肝細胞を溶解した後、遠心チューブを切断し、油層の上層および下層をシンチレーションバイアルに移した。溶解した細胞を含む下層は 2 M 塩酸溶液で中和後、各試料とシンチレーションカクテルを混合し、液体シンチレーションカウンタで放射能を測定した。細胞あたりの放射能 (disintegrations per minute/ $10^6$  cells) をインキュベーション培地の放射能 (disintegrations per minute/ $\mu\text{L}$ ) で除して、取り込み量 ( $V_d$ ,  $\mu\text{L}/10^6 \text{ cells}$ ) を算出した。初期取り込み速度 ( $v$ , pmol/min/ $10^6$  cells) は次式から算出した:  $v = (V_d, 2 \text{ 分} - V_d, 0.5 \text{ 分}) / (2 - 0.5) \times \text{基質濃度 } ([S])$ 。次に、Phoenix WinNonlin (Certara 社) の非線形最小二乗法により下式を用いて

フィッティングし、各種パラメータ値 [ $K_m$ ：ミカエリス定数 ( $\mu\text{M}$ ),  $V_{\max}$ ：最大取り込み速度 ( $\text{pmol}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ),  $\text{PS}_{\text{act}}$ ：能動輸送による取り込みクリアランス ( $\text{pmol}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ),  $\text{CL}_{\text{PD}}$ ：非飽和性の取り込みクリアランス ( $\text{pmol}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ )] を算出した。

$$v = (V_{\max} \times [S]) / (K_m \times [S] + \text{CL}_{\text{PD}} \times [S])$$

$$\text{PS}_{\text{act}} = V_{\max} / K_m$$

III-2-viii) ペマフィブラートの PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値の決定ならびに PBPK モデルの検証および活用

仮想母集団に基づく Simcyp シミュレーター ver.18 (Certara 社) (Jamei et al., 2009) 上で、薬剤の情報および日本におけるペマフィブラートの添付文書およびペマフィブラート 0.1 mg 錠の申請資料概要 (<http://www.pmda.go.jp/>) の血漿中濃度推移を用いて、ペマフィブラートの PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値を決定し、様々なヒト血漿中濃度推移を予測した (Fig. III-2 および Table III-1)。ペマフィブラートの血漿蛋白非結合率、血液／血漿濃度比、P450 2C8, 2C9 および 3A4 による固有クリアランス、 $\text{PS}_{\text{act}}$  および  $\text{CL}_{\text{PD}}$  は、ヒト血液、肝ミクロゾーム、肝細胞および発現系を用いた *in vitro* 系により測定した。ヒト消化管膜透過係数  $P_{\text{eff}}$  の初期値として、ADMET Predictor (Simulations Plus 社) における予測値 ( $1.9 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$  算出) を使用した。OATP1B1 の  $\text{CL}_{\text{int}}$  の初期値として、能動輸送は OATP1B1 による輸送と仮定し、ヒト肝細胞における  $\text{PS}_{\text{act}}$  ( $53 \text{ pmol}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ) を使用した。トランスポーターの  $\text{CL}_{\text{int}}$  はミクロゾーム蛋白 (mg) / 肝臓 (g)、トランスポーター量および肝臓総重量を考慮して、肝臓全体のクリアランスに換算した。仮想の被験者として Simcyp シミュレーターの Sim-healthy volunteers (北ヨーロッパの白人に類似) を設定し、健康人に 0.4 mg のペマフィブラートを経口投与した際のペマフィブラートの血漿中濃度推移を使用して、 $P_{\text{eff}}$  および OATP1B1 の  $\text{CL}_{\text{int}}$  を最適化した。

人種差を検討するために、本 PBPK モデルを用いて日本人 (Sim-Japanese) における血漿中濃度を予測した。さらに、健康人において OATP1B1 阻害剤であるリファンピシンと単回併用した際のペマフィブラートの薬物動態をシミュレーションし、本モデルの妥当性を検証した。 $C_{\max}$ , AUC および経口クリアランスの予測値とペマフィブラート 0.1 mg 錠の申請資料概要に記載の実測値を比較した。検証の判断基準として、各種薬物動態パラメータ値の実測値と予測値の乖離が 2 倍以内であることとした。OATP1B1 の阻害剤として使用したリファンピシ

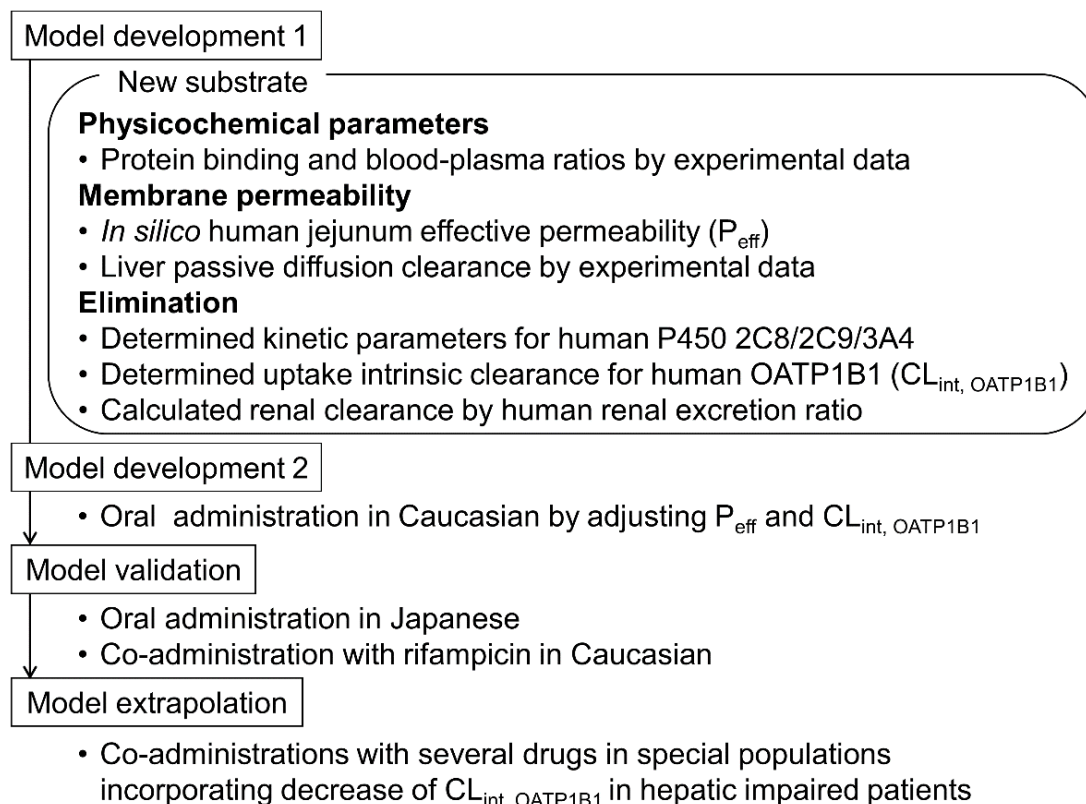
ン（理論消化管濃度：2.9 mM）は消化管の P-gp と BCRP（Simcyp における  $K_i$ ：それぞれ 24 および 2.0  $\mu\text{M}$ ）を完全に阻害し、ペマフィブラートの吸収を促進すると推察された。Caco-2 細胞において、P-gp と BCRP による輸送をシクロスポリン A によりほぼ完全に阻害した際、ペマフィブラートの頂端側から基底側への透過性は 2.4 倍増加した（ $P_{\text{app}}$ ：  $4.9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  から  $12 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  に増加）。ペマフィブラートの P-gp および BCRP に関するパラメータは組み込まれていないため、リファンピシンとの併用時における  $P_{\text{eff}}$  は消化管の P-gp および BCRP を完全に阻害したとし、2.4 倍（ $2.2 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ ）に設定した。

肝障害患者において、OATP1B1 の mRNA は健常人と比べて 0.65 倍に低下することが報告されている（Li et al., 2015）。しかし、肝障害時における肝臓 OATP1B1 の活性は不明であり、Simcyp の Child-Pugh 分類 A および B の肝硬変を伴う仮想の母集団における OATP1B1 の活性は、健常人の値がそのまま使用されている。そこで、Child-Pugh 分類 A および B 患者にペマフィブラートを単回投与した際の薬物動態データを用いて最適化することにより、肝障害時におけるペマフィブラートの肝臓の OATP1B1 の固有クリアランス（ $CL_{\text{int}}$ ）を明らかにした。Simcyp のリファンピシン PBPK モデルに搭載されている OATP1B1 を介した取り込みの *in vitro* 最大速度も肝障害時の程度に依存し、ペマフィブラートと同様の割合で低下した値を設定した。

**Table III-1 Trial design for each simulation**

Process	No.	Subjects	Victim drugs Pemafibrate, QD	Perpetrator Drugs	Age range (years)	Proportion being Females	No. of subject per trial	Duration of study (h)
Development	1	Healthy Caucasian	0.4 mg, Day 1	-	21-45	0.5	20	0-48
Validation	1	Healthy Japanese	0.3 mg, Day 1	-	20-30	0	8	0-48
	2	Healthy Caucasian	0.4 mg, Day 1	Rifampicin, QD (600 mg, Day 1-2)	21-45	0.5	20	0-48
Modification of OATP1B1	1	Child-Pugh A	0.2 mg, Day 1	-	44-62	0	8	0-48
	2	Child-Pugh B		-	54-71	0	8	0-48
Extrapolation for drug-drug interactions								
Rifampicin (OATP1B1 inhibitor)	1	RI <sup>a</sup>	0.2 mg, Day 1	Rifampicin, QD (600 mg, Day 1-2)	57-72	0	7	0-48
	2	Child-Pugh A			44-62	0	8	0-48
	3	Child-Pugh B			54-71	0	8	0-48
Sacubitril (OATP1B1 inhibitor)	1	Healthy Caucasian	0.4 mg, Day 1	Sacubitril, BID (97 mg Day 1-2)	21-45	0.5	20	0-48
	2	RI <sup>a</sup>	57-72		0	7	0-48	
	3	Child-Pugh A	0.2 mg, Day 1		44-62	0	8	0-48
	4	Child-Pugh B	54-71		0	8	0-48	
Clopidogrel (P450 2C8 inhibitor)	1	Healthy Caucasian	0.4 mg, Day 1, 4	Clopidogrel, QD (300 mg, Day 1; 75 mg, Day 2-6)	20-43	0.4	20	0-145
	2	RI <sup>a</sup>	57-72		0	7	0-145	
	3	Child-Pugh A	0.2 mg, Day 1, 4		44-62	0	8	0-145
	4	Child-Pugh B	54-71		0	8	0-145	
Fluconazole (P450 2C9/3A4 inhibitor)	1	Healthy Caucasian	0.4 mg, Day 9	Fluconazole, QD (400 mg, Day 1-10)	19-43	0.5	20	0-240
	2	RI <sup>a</sup>	57-72		0	7	0-240	
	3	Child-Pugh A	0.2 mg, Day 9		44-62	0	8	0-240
	4	Child-Pugh B	54-71		0	8	0-240	
Clarithromycin (P450 3A4 inhibitor)	1	Healthy Caucasian	0.4 mg, Day 6	Clarithromycin, BID (500 mg, Day 1-7)	19-34	0.5	19	0-168
	2	RI <sup>a</sup>	57-72		0	7	0-168	
	3	Child-Pugh A	0.2 mg, Day 6		44-62	0	8	0-168
	4	Child-Pugh B	54-71		0	8	0-168	
Itraconazole (P450 3A4 inhibitor)	1	Healthy Caucasian	0.4 mg, Day 12	Itraconazole <sup>b</sup> , BID (200 mg, Day 1-13)	21-45	0.5	19	0-312
	2	RI <sup>a</sup>	57-72		0	7	0-312	
	3	Child-Pugh A	0.2 mg, Day 12		44-62	0	8	0-312
	4	Child-Pugh B	54-71		0	8	0-312	

QD, once a day; BID, twice a day; No. of trials, 10. <sup>a</sup>Severe renal impairment (GFR < 30 mL/min); <sup>b</sup>The formulations were capsules and solution.



**Fig. III-2. Flow chart of the stages of development of the pemafibrate PBPK model established in this study.**

本研究におけるシミュレーションの被検者背景、投与量、投与方法および投与回数等の試験デザインは臨床試験を基に設定した (Fig. III-3)。リファンピシン、フルコナゾールおよびイトラコナゾールは Simcyp の化合物ライブラリーに搭載された PBPK モデルを用いた。クラリスロマイシンは、同化合物ライブラリーに搭載された PBPK モデルに、既報の OATP1B1 の *in vivo* 阻害定数 ( $0.45 \mu\text{M}$ ) を追加して用いた (Varma et al., 2017)。サクビトリルおよびクロピドグレルは、既報の PBPK モデルを用いた (Lin et al., 2017; Varma et al., 2019)。本研究において検討した各種阻害剤の代謝酵素およびトランスポーターに対する阻害作用に関するパラメータを Table III-2 に示す。

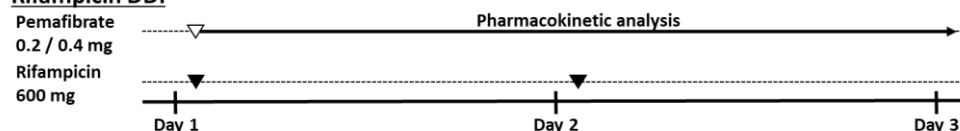


**Table III-2 Inhibitory effects of evaluated drugs**

Enzyme / transporter	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ ) [ $K_i$ ( $\mu\text{M}$ ), $k_{\text{inact}}$ ( $\text{h}^{-1}$ )]						
	Rifampicin	Sacubitril	Clopidogrel	Clopidogrel glucuronide	Fluconazole	Clarithromycin	Itraconazole
P450 2C8	25	-	2.8	0.044 [0.12, 2.8]	-	-	-
P450 2C9	-	-	-	-	18	-	-
P450 3A4	15	-	4.7 [87, 3.2]	0.32	11	8.7 [12, 2.1]	0.001
OATP1B1	0.067	0.076	2.0	5.5	-	0.45	-
P-gp	24	-	-	-	-	4.0	-
BCRP	2.0	-	-	-	-	-	-

$K_i$ , inhibitory constant;  $K_i$ , inhibitor concentration causing half-maximal inactivation;  $k_{\text{inact}}$ , maximal inactivation rate constant.

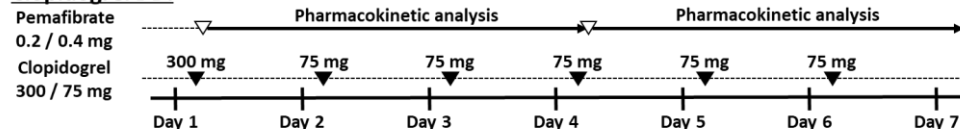
#### Rifampicin DDI



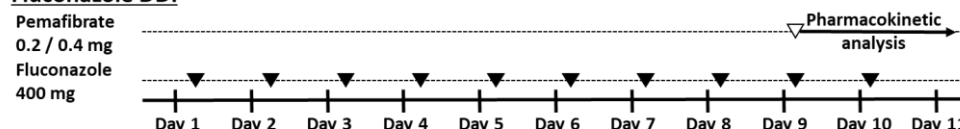
#### Sacubitril DDI



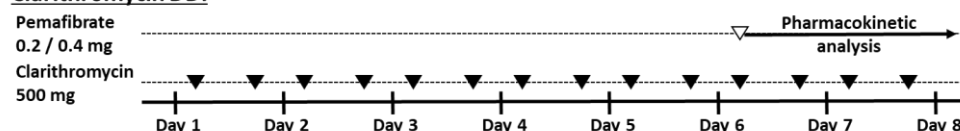
#### Clopidogrel DDI



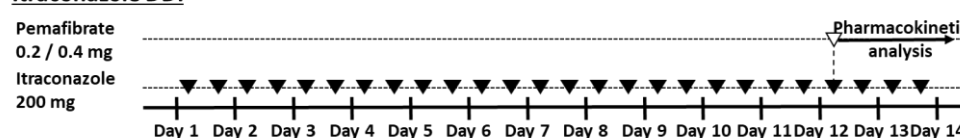
#### Fluconazole DDI



#### Clarithromycin DDI



#### Itraconazole DDI

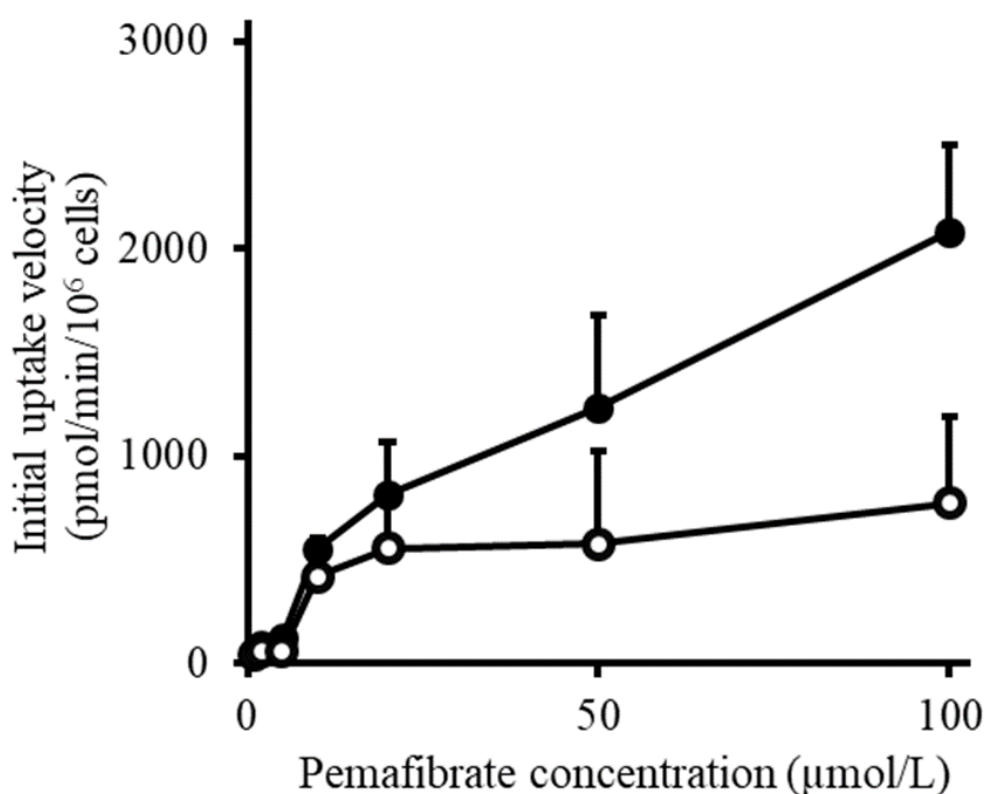


**Figure III-3. Trial design for simulation of co-administration of several inhibitors with pemaifibrate.**

### 第3節 結果

#### III-3-i) ヒトにおけるペマフィブラートの *in vitro* 薬物動態パラメータの評価

[ $^{14}\text{C}$ ]ペマフィブラートの血液/血漿濃度比は 0.55 であった。[ $^{14}\text{C}$ ]ペマフィブラート ( $0.5\ \mu\text{M}$ ) を数種のヒト P450 発現マイクロゾームと反応させたところ、ペマフィブラートの代謝に関与する分子種は、P450 2C8, 2C9, 3A4 および 3A7 (P450 3A7 は胎児のみで発現) であると同定された。P450 2C8, 2C9 および 3A4 の寄与率はそれぞれ 0.395, 0.188 および 0.120 であった。ヒト肝マイクロゾームにおける  $\text{CL}_{\text{int}}$  ( $135.4\ \mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ ) および  $f_{\text{u, mic}}$  (0.648) と上記の寄与率から算出した P450 2C8, 2C9 および 3A4 の  $\text{CL}_{\text{int}}/f_{\text{u, mic}}$  値は, 53.5, 25.5 および 16.2  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$  であった。



**Fig. III-4. Concentration dependency of the uptake of [ $^{14}\text{C}$ ]pemafibrate in pooled cryopreserved human hepatocytes.** The closed and open circles represent the active + passive uptake velocities and active uptake velocities, respectively. The data are presented as mean + standard error (n=3).

*In vitro* トランスポーター発現系を用いた検討において、 $[^{14}\text{C}]$ ペマフィブラートは OATP1B1 を発現する HEK293 細胞に能動的に取り込まれたが（能動輸送による取り込みクリアランス：4.4  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$ ），OATP1B3 を発現する HEK293 細胞には取り込まれなかった。OATP1B1 の典型的基質 $[^3\text{H}]$ エストロン-3-硫酸および OATP1B3 の典型的基質 $[^3\text{H}]$ CCK-8 の能動輸送による取り込みクリアランスは、それぞれ 43.4 および 6.7  $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$  であり、ペマフィブラートは OATP1B1 のみにより能動的に肝に取り込まれていると推察された。ペマフィブラートの肝細胞による能動的な取り込みは、培地中のペマフィブラートの濃度の増加とともに飽和した（Fig. III-4）。ペマフィブラートの  $K_m$ 、 $CL_{act}$  および  $CL_{PD}$  値は、それぞれ 16.7  $\mu\text{M}$ 、52.7  $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$  および 13.1  $\mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$  であった。

### III-3-ii) ヒト結腸がん由来細胞株を用いたペマフィブラートの *in vitro* 消化管吸収阻害の評価

Caco-2 細胞における $[^{14}\text{C}]$ ペマフィブラートの頂端膜側から基底膜側への  $P_{app}$  値 ( $4.9 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$ ) は、P-gp 阻害剤ベラパミル (30  $\mu\text{M}$ )、BCRP 阻害剤 Ko143 (1  $\mu\text{mol/L}$ ) ならびに P-gp および BCRP 阻害剤シクロスポリン A (10  $\mu\text{M}$ ) により、それぞれ 7.1、8.8 および  $12 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$  に増加した。 $[^{14}\text{C}]$ ペマフィブラートの  $P_{app}$  ratio (5.8) は、それぞれ 3.3、2.2 および 1.6 に減少した。

### III-3-iii) ペマフィブラートの PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値の決定ならびに PBPK モデルの検証および活用

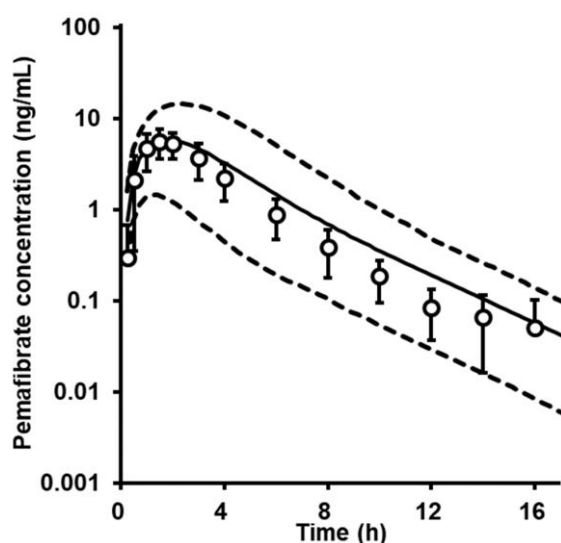
*In silico* による推定パラメータ値、*in vitro* 実験データおよび既報の単回投与時の *in vivo* 薬物動態データを用いて、ペマフィブラートの PBPK における薬物動態パラメータ値を決定した。ペマフィブラートの PBPK モデルに用いた薬物固有のデータを Table III-3 に示す。ヒト血漿中濃度推移を用いてヒト消化管膜透過係数  $P_{eff}$  および OATP1B1 による固有クリアランス ( $CL_{int, OATP1B1}$ ) を最適化し、 $P_{eff}$  を *in silico* における推定値の 0.49 倍に、 $CL_{int, OATP1B1}$  を *in vitro* ヒト肝細胞の能動輸送による取り込みクリアランスの 44 倍に設定した（Fig. III-5）。PBPK モデルの妥当性を検証するため、日本人健常者に単回投与した際、健常人においてリファンピシンを併用投与した際の血漿中濃度推移をシミュレーションし、日本におけるペマフィブラート錠 0.1 mg の添付文書および審査報告書に記載された実測値と比較した（Fig. III-6）。シミュレーションにより得た  $C_{max}$ 、AUC および経口クリアランス値は、ペマフィブラートの添付文書の実測値と一致してい

た (Table III-4)。

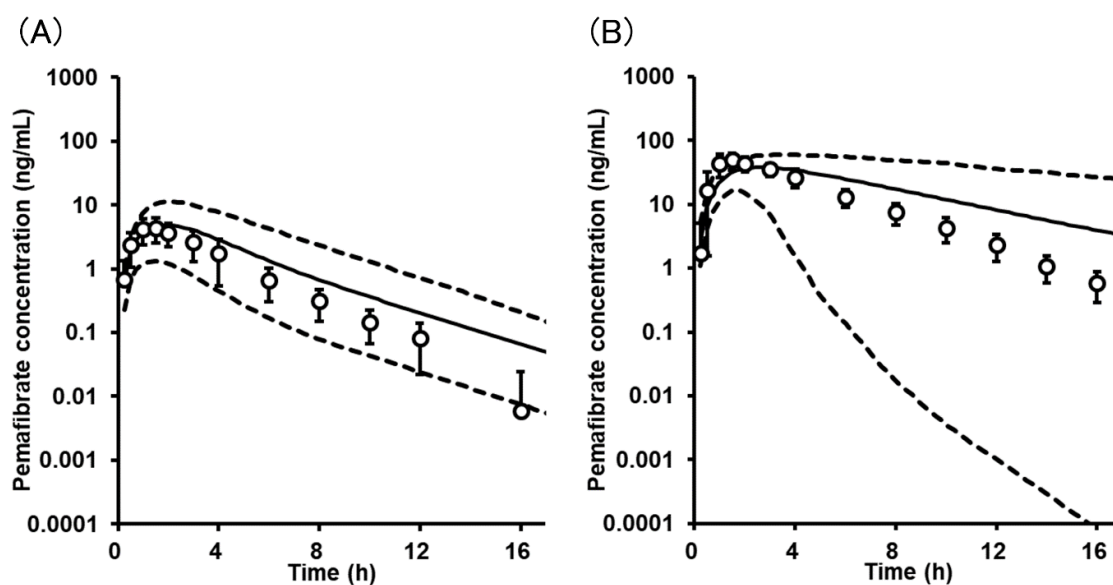
肝障害患者において、OATP1B1 の発現量が mRNA レベルで低下するが (Li et al., 2015), 肝障害時における肝臓 OATP1B1 の活性は不明である。そこで, Child-Pugh 分類 A および B 患者におけるペマフィブラートの血漿中濃度推移を用いて, ペマフィブラートの肝臓の OATP1B1 の固有クリアランス ( $CL_{int}$ ) を最適化したところ, 健常人 ( $2,300 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ) のそれぞれ 0.53 倍 ( $1,200 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ) および 0.31 倍 ( $720 \mu\text{L}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ) であることが初めて明らかとなった。これらの結果は, 既報のトランスポーター mRNA の相対的な減少 (0.65 倍) に相関していた (Li et al., 2015)。同様に, リファンピシンの Child-Pugh 分類 A および B 患者における肝臓の OATP1B1 を介した取り込みの *in vitro* 最大速度も, 健常人 ( $4.0 \text{ pmol}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ) のそれぞれ 0.53 倍 ( $2.1 \text{ pmol}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ) および 0.31 倍 ( $1.2 \text{ pmol}/\text{min}/10^6 \text{ cells}$ ) に設定した。最適化された PBPK モデルを用いて, OATP1B1 阻害剤による影響を予測した。リファンピシンとの併用により, 腎機能障害, Child-Pugh A および Child-Pugh B の肝硬変を有する患者において, ペマフィブラートの血漿曝露量は健常人と同様にそれぞれ 13, 13 および 11 倍増加すると予測された (Table III-4 および Fig. III-7)。サクビトリルと併用により, 健常人, 腎機能障害患者, Child-Pugh 分類 A または B 肝硬変患者におけるペマフィブラートの血漿曝露量はほとんど影響を受けないと予測され (1.1~1.3 倍), リファンピシンとの併用による顕著な曝露増加とは対照的な予測結果であった (Table III-5 および Fig. III-7)。

**Table III-3. Parameters used in constructing the current PBPK model for pemafibrate.**

Parameter	Value	Source
Physicochemical parameters		
Molecular weight, g/mol	490.55	
<i>n</i> -Octanol:water partition coefficient, log P	5.64	ChemDraw
Acid dissociation constant (pK <sub>a</sub> ) as monoprotic acid	3.58	Experimental
Blood-to-plasma partition ratio, R <sub>B</sub>	0.55	Experimental
Fraction unbound in plasma, f <sub>u, p</sub>	0.0016	Experimental
Absorption model: advanced dissolution, absorption and metabolism (ADAM) model		
Human jejunum effective permeability (P <sub>eff</sub> ), 10 <sup>-4</sup> cm/s	0.93	Optimized to clinical data
Fraction unbound in enterocytes, f <sub>u, gut</sub>	0.048	Simcyp predicted
Distribution model: a full PBPK model using Rodgers and Rowland method		
Distribution volume at steady state (V <sub>ss</sub> ), L/kg	0.097	Simcyp predicted
Transporter: permeability-limited liver model		
Hepatic passive diffusion clearance (CL <sub>PD</sub> ), μL/min/10 <sup>6</sup> cells	13.1	Experimental
Uptake intrinsic clearance for OATP1B1 (CL <sub>int, OATP1B1</sub> ), μL/min/10 <sup>6</sup> cells	2,306	Optimized to clinical data
Elimination type: enzyme kinetics		
CL <sub>int, P450 2C8</sub> , μL/min/mg protein	53.5	Experimental
CL <sub>int, P450 2C9</sub> , μL/min/mg protein	25.5	Experimental
CL <sub>int, P450 3A4</sub> , μL/min/mg protein	16.2	Experimental
Renal clearance, L/h	0	Renal excretion ratio ≤ 0.47%



**Fig. III-5. Fitted plasma concentration–time curves after a single oral administration of 0.4 mg pemafibrate in healthy Caucasian.** The circles and solid and dashed lines represent reported mean  $\pm$  standard deviation values and simulated values with 5th and 95th percentiles, respectively.



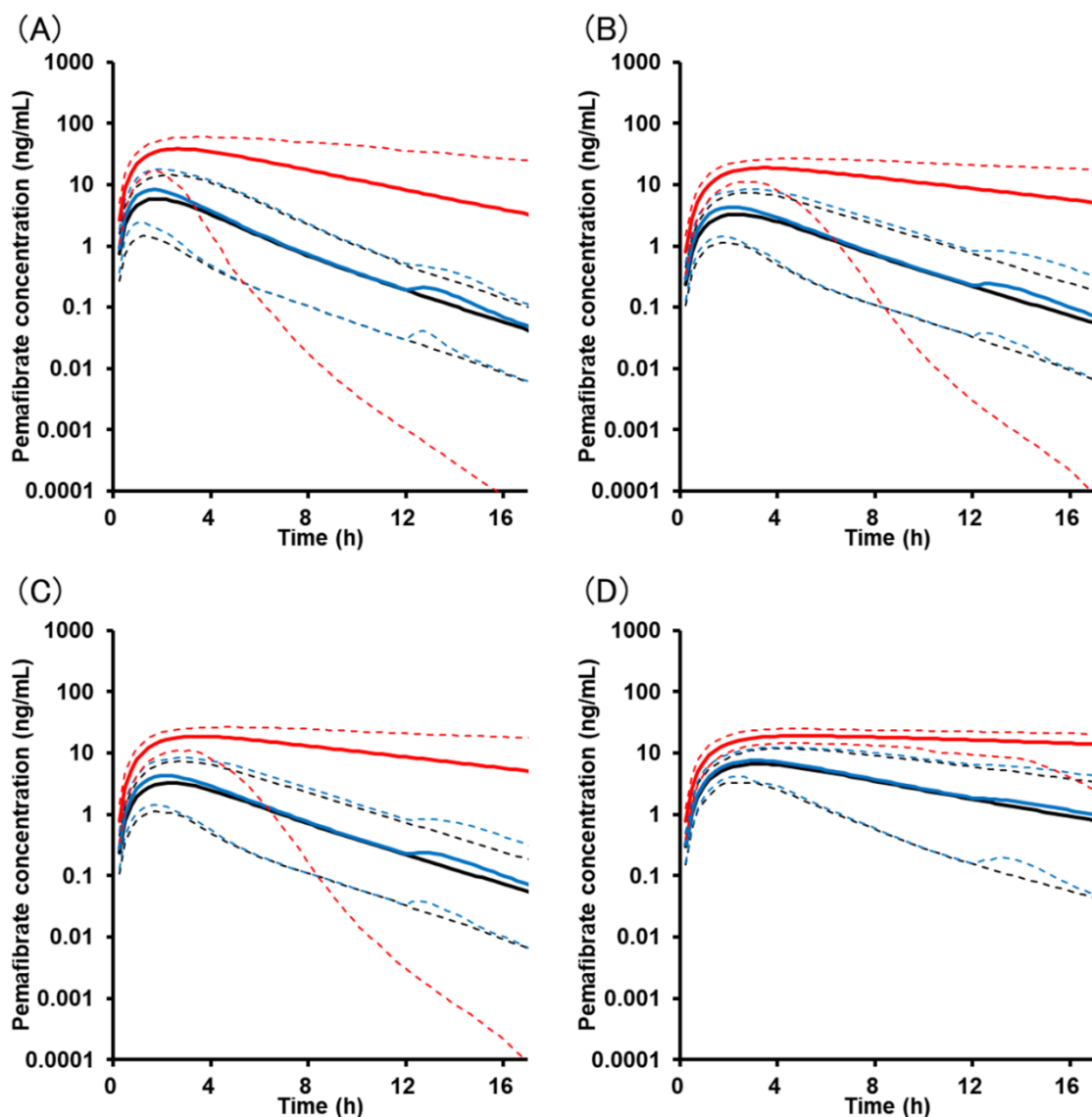
**Fig. III-6. Simulated plasma concentration–time curves after a single oral administration of 0.3 mg pemafibrate in healthy Japanese (A) and 0.4 mg pemafibrate with co-administration of rifampicin (B).** The circles and solid and dashed lines represent reported mean  $\pm$  standard deviation values and simulated values with 5th and 95th percentiles, respectively.

**Table III-4. Simulated and reported (observed) pharmacokinetic parameters for pemafibrate after oral administrations in healthy adults and subjects with renal/liver impairments with and without co-administered rifampicin.**

Parameter	Subjects	Dose, mg	Simulated			Reported			Ratio in control <sup>d</sup>
			Control	With rifampicin	Ratio to control <sup>c</sup>	Control	With rifampicin	Ratio to control <sup>c</sup>	
C <sub>max</sub> , ng/mL <sup>a</sup>	Healthy Caucasian	0.4	4.9 [4.5, 5.3]	37 [35, 39]	7.6 [7.3, 8.0]	5.7	54	9.4 [8.4, 11]	0.86
	Healthy Japanese	0.3	4.2 [3.7, 4.8]	-	-	4.2	-	-	1.0
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	2.9 [2.6, 3.3]	19 [18, 20]	6.5 [6.0, 7.0]	4.5	-	-	0.64
	Child-Pugh A	0.2	4.1 [3.8, 4.5]	19 [19, 20]	4.7 [4.4, 5.1]	6.6	-	-	0.62
	Child-Pugh B	0.2	6.5 [6.0, 7.0]	19 [18, 20]	2.9 [2.7, 3.1]	11	-	-	0.59
AUC, ng·h/mL <sup>a</sup>	Healthy Caucasian	0.4	19 [17, 21]	220 [200, 250]	12 [11, 12]	20	210	11 [9.9, 12]	0.95
	Healthy Japanese	0.3	17 [14, 19]	-	-	15	-	-	1.1
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	14 [12, 16]	190 [160, 220]	13 [13, 14]	12	-	-	1.2
	Child-Pugh A	0.2	21 [19, 24]	270 [240, 300]	13 [12, 13]	18	-	-	1.2
	Child-Pugh B	0.2	48 [42, 54]	530 [480, 570]	11 [10, 12]	37	-	-	1.3
Oral clearance, L/h <sup>a</sup>	Healthy Caucasian	0.4	21 [19, 23]	1.8 [1.6, 2.0]	0.085 [0.082, 0.087]	20	1.9	0.093	1.1
	Healthy Japanese	0.3	18 [15, 21]	-	-	20	-	-	0.90
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	14 [12, 16]	1.1 [0.90, 1.3]	0.075 [0.071, 0.078]	19	-	-	0.74
	Child-Pugh A	0.2	9.4 [8.3, 11]	0.74 [0.66, 0.84]	0.079 [0.076, 0.081]	10	-	-	0.94
	Child-Pugh B	0.2	4.2 [3.7, 4.8]	0.38 [0.35, 0.41]	0.091 [0.085, 0.098]	5.4	-	-	0.78

Healthy and impaired adult populations were virtually treated with 0.2-0.4 mg pemafibrate. <sup>a</sup> Geometric means; <sup>b</sup> A virtual population with glomerular filtration rates <30 mL/min; <sup>c</sup>

Ratios of geometric mean values with rifampicin to those without a co-administered perpetrator drug (control); <sup>d</sup> Ratios of simulated/reported values in control. The numbers in parentheses are the 90% confidence intervals. Each simulation was performed in 10 trials on 7-20 randomly selected virtual subjects corresponding to the reported (observed) subjects in the package insert for pemafibrate.



**Fig. III-7.** Simulated plasma concentration–time curves after single oral administrations of 0.4 mg pemaifibrate in healthy adults (A) and of 0.2 mg pemaifibrate in subjects with severe renal impairment (B), Child-Pugh A liver cirrhosis (C), and Child-Pugh B liver cirrhosis (D) without (in black) and with co-administration of rifampicin once a day (in red) or sacubitril twice a day (in blue). Solid lines show the simulated mean pemaifibrate concentrations and dashed lines represent the 5th and 95th percentiles

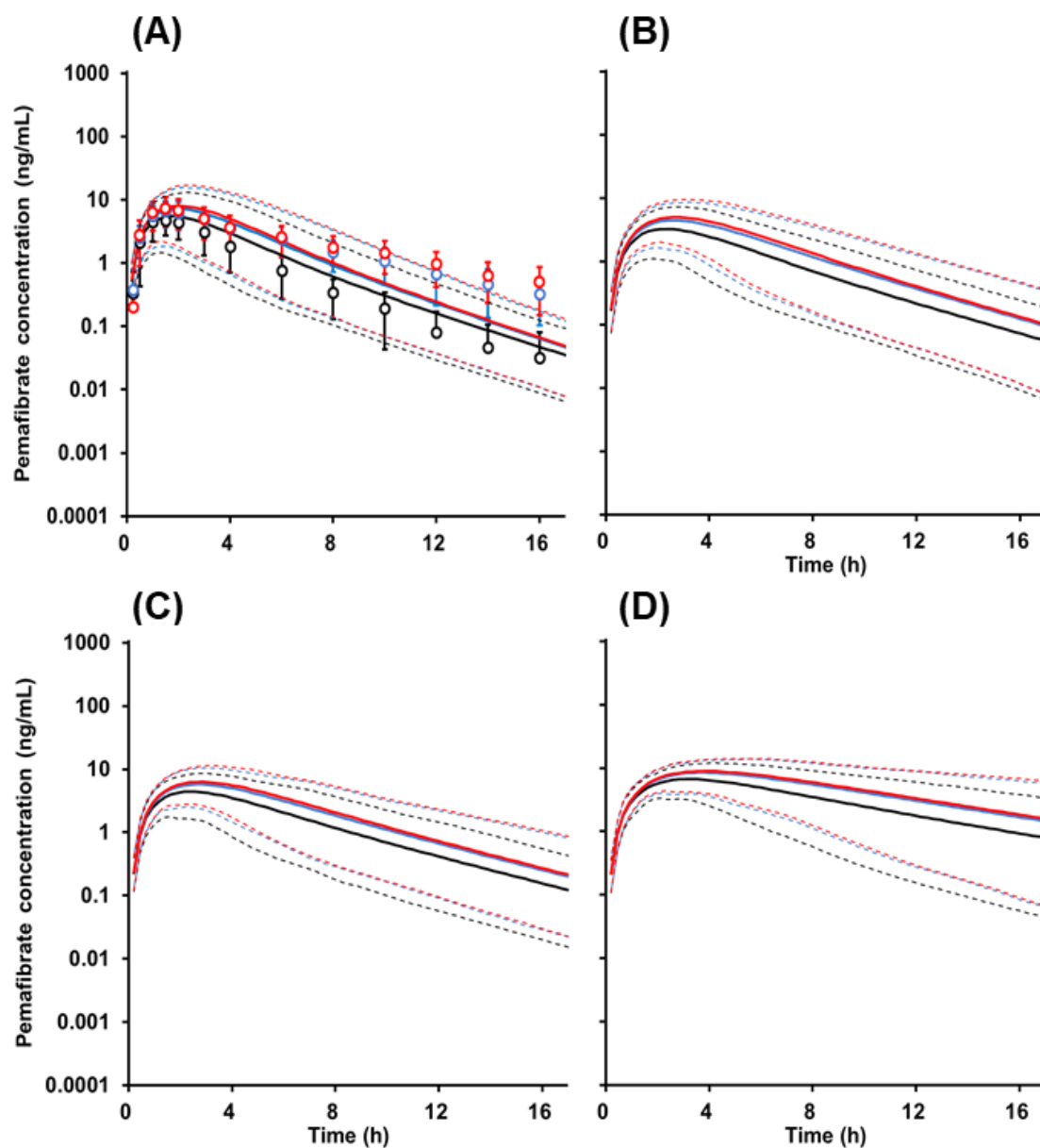


**Table III-5. Simulated pharmacokinetic parameters for pemafigrate in virtual trials with and without co-administered sacubitril.**

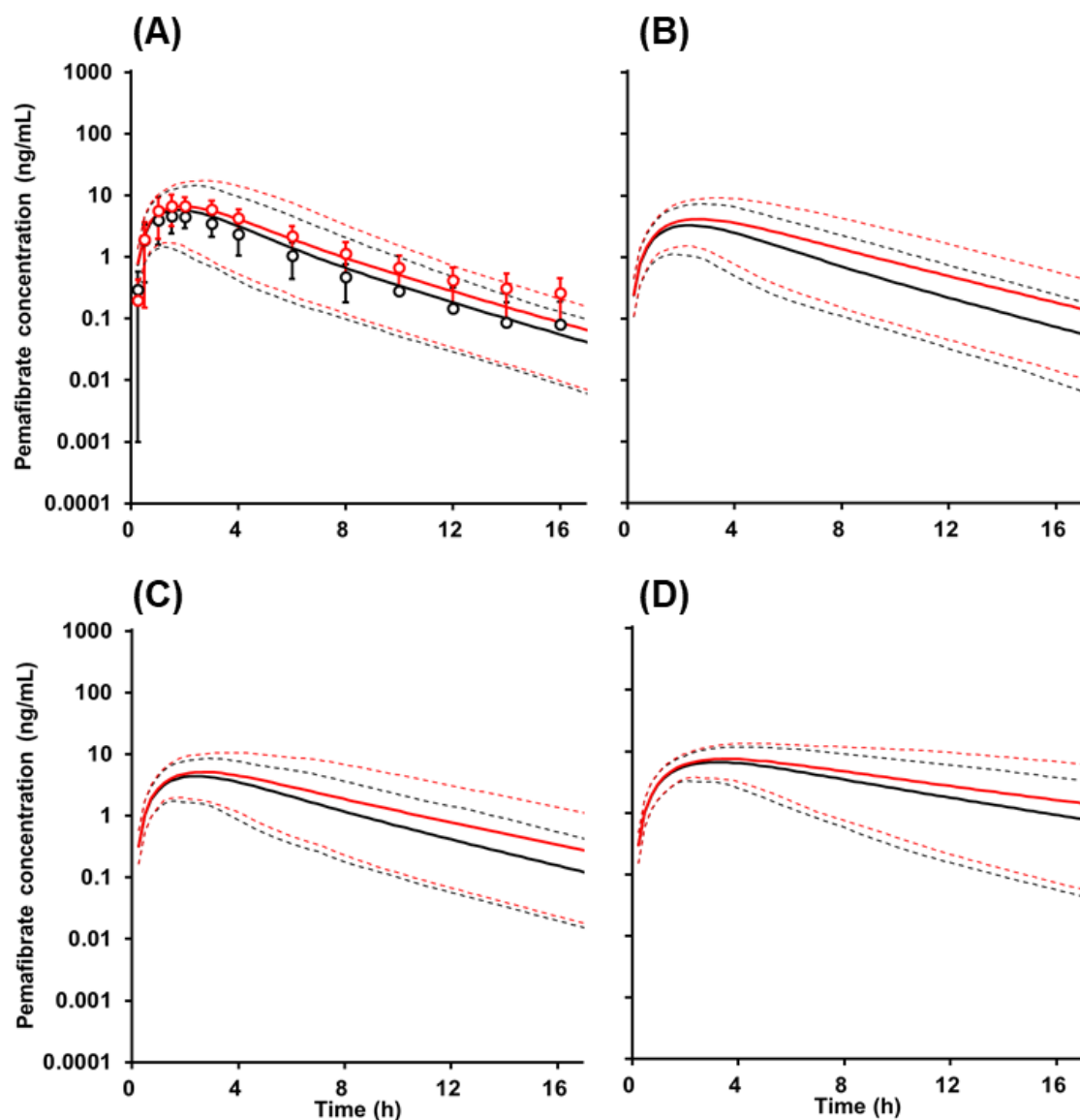
Parameter	Subjects	Dose, mg	Control	With sacubitril	Ratio to control <sup>c</sup>
$C_{max}$ , ng/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	4.9 [4.5, 5.3]	7.3 [6.8, 7.9]	1.5 [1.5, 1.5]
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	2.9 [2.6, 3.3]	3.9 [3.5, 4.4]	1.3 [1.3, 1.4]
	Child-Pugh A	0.2	4.1 [3.8, 4.5]	5.3 [4.9, 5.8]	1.3 [1.3, 1.3]
	Child-Pugh B	0.2	6.5 [6.0, 7.0]	7.5 [7.0, 8.0]	1.2 [1.1, 1.2]
AUC, ng·h/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	19 [17, 21]	24 [22, 27]	1.3 [1.3, 1.3]
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	14 [12, 16]	17 [15, 20]	1.2 [1.2, 1.3]
	Child-Pugh A	0.2	21 [19, 24]	25 [23, 29]	1.2 [1.2, 1.2]
	Child-Pugh B	0.2	48 [42, 54]	54 [48, 62]	1.1 [1.1, 1.2]
Oral clearance, L/h <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	21 [19, 23]	16 [15, 18]	0.77 [0.76, 0.79]
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	14 [12, 16]	12 [10, 13]	0.82 [0.80, 0.84]
	Child-Pugh A	0.2	9.4 [8.3, 11]	7.8 [7.0, 8.8]	0.83 [0.81, 0.85]
	Child-Pugh B	0.2	4.2 [3.7, 4.8]	3.7 [3.3, 4.2]	0.88 [0.87, 0.89]

Healthy and impaired adult populations were virtually treated with 0.4 mg and 0.2 mg pemafigrate, respectively. <sup>a</sup> Geometric means; <sup>b</sup> A virtual population with glomerular filtration rates <30 mL/min. <sup>c</sup> Ratios of geometric mean values with sacubitril to those without a co-administered perpetrator drug (control). The numbers in parentheses are the 90% confidence intervals. Each simulation was performed in 10 trials for 7-20 randomly selected virtual subjects corresponding to the reported (observed) subjects in the package insert for pemafigrate.

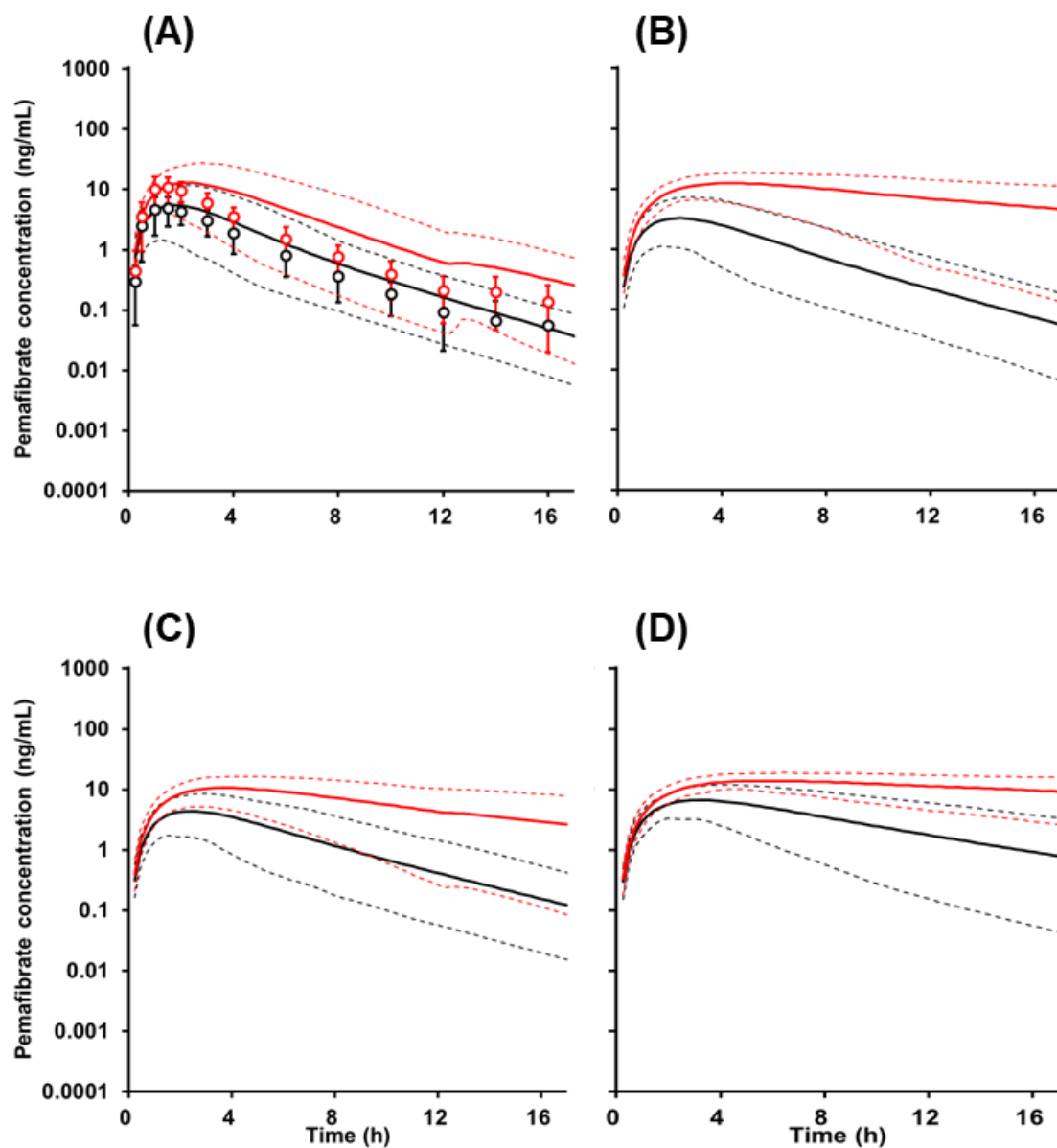
つぎに、代謝酵素 P450 の阻害剤による影響を検討した。健常人にペマフィブラートとクロピドグレル (P450 2C8 阻害剤)、フルコナゾール (P450 2C9 / 3A4 阻害剤)、クラリスロマイシン (P450 3A4 阻害剤) またはイトラコナゾール (P450 3A4 阻害剤) と併用した際の血漿中濃度推移をシミュレーションした (Fig. III-8 ~12)。 $C_{max}$ 、AUC および経口クリアランスの予測値と実測値を比較した (イトラコナゾールを除く、Table III-6~9)。PBPK モデルの検証の判断基準として、各種薬物動態パラメータの実測値と予測値の乖離が 2 倍以内であることとし、いずれもこの基準を満たした。健常人では、ペマフィブラートとクロピドグレル、フルコナゾール、クラリスロマイシンまたはイトラコナゾールとの仮想併用投与により、ペマフィブラートの AUC 値は 1.4~1.6 倍、1.2 倍、2.9 倍または 1.1 倍となると予測された。腎・肝障害患者においては、それぞれ 1.5~1.7 倍、1.3~1.4 倍、4.9~11 倍または 1.1~1.2 倍となると予測された。クラリスロマイシンとの併用投与により、健常人 (2.9 倍) と比べて腎機能障害患者 (11 倍)、Child-Pugh 分類 A (4.9 倍) または B (6.4 倍) 肝硬変患者におけるペマフィブラートの血漿中曝露量が大きくなると予測された。



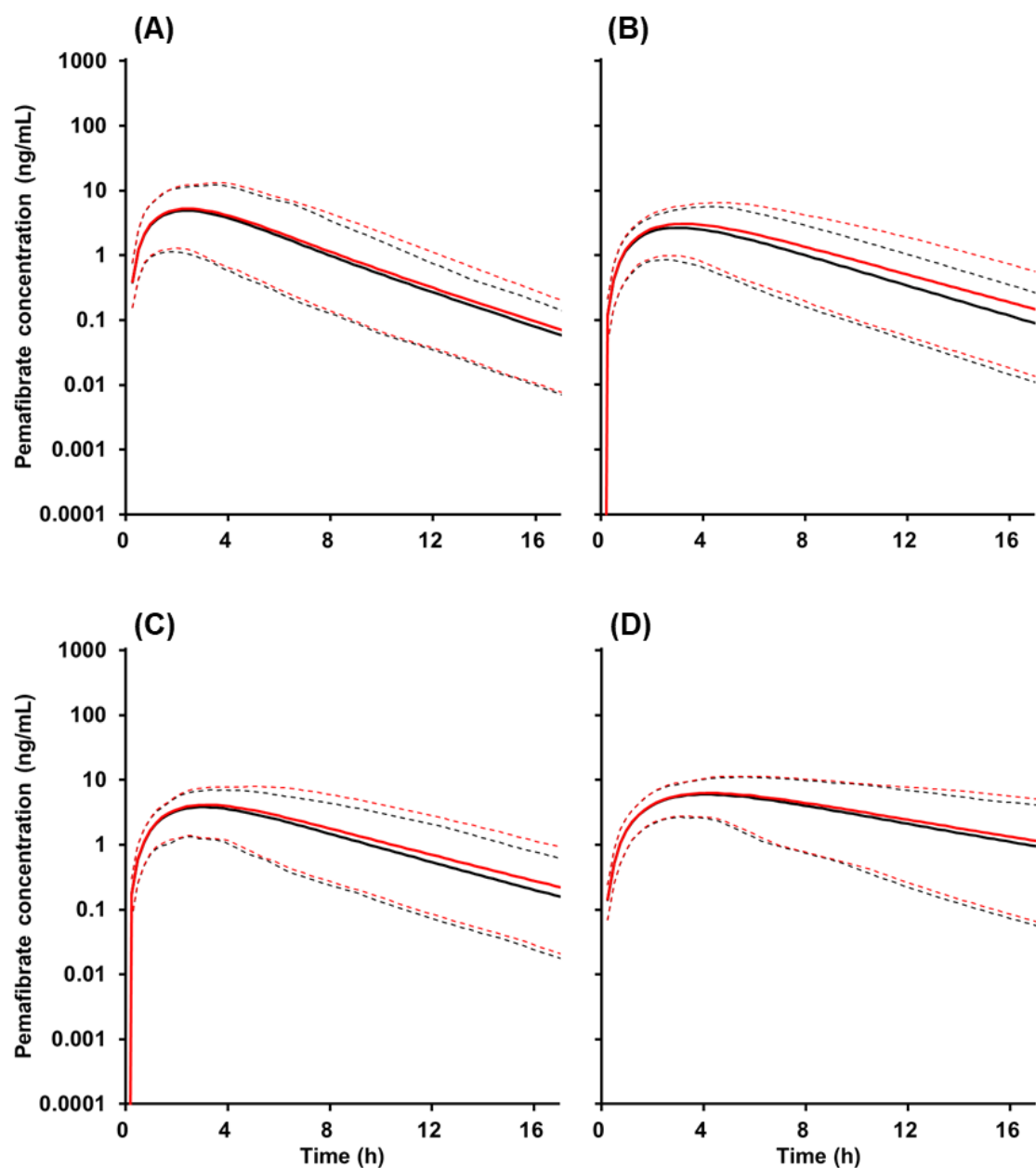
**Fig. III-8. Simulated plasma concentration–time curves after single oral administrations of 0.4 mg pemaifibrate in healthy adults (A) and of 0.2 mg pemaifibrate in subjects with severe renal impairment (B) and Child-Pugh A (C) and B (D) liver cirrhosis without (in black) and with co-administration of clopidogrel once a day at 75 mg (in blue) or 300 mg (in red). The circles represent reported mean  $\pm$  standard deviation values. Solid and dashed lines show the simulated values with 5th and 95th percentiles, respectively.**



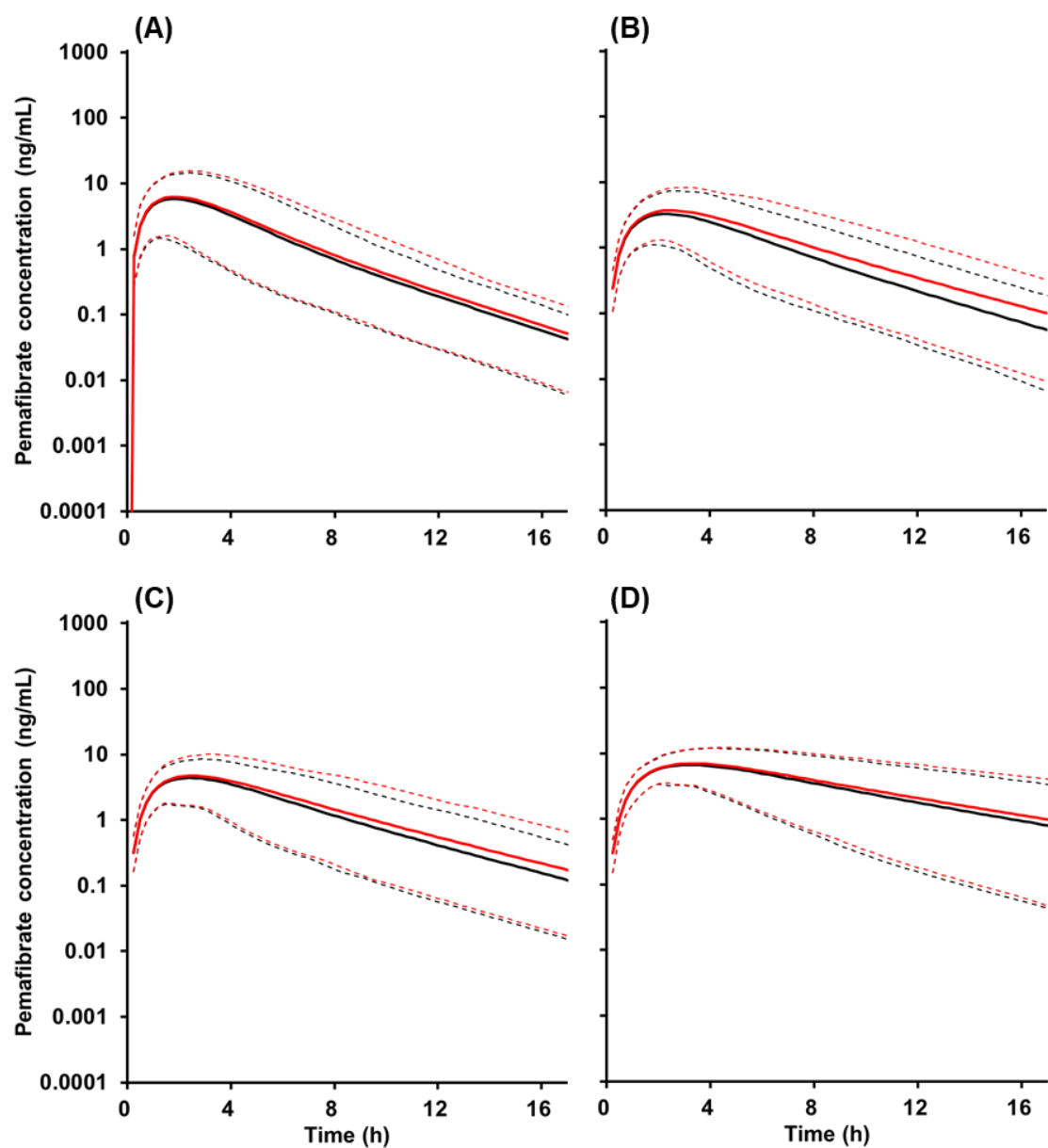
**Fig. III-9.** Simulated plasma concentration–time curves after single oral administrations of 0.4 mg pemaifibrate in healthy adults (A) and of 0.2 mg pemaifibrate in subjects with severe renal impairment (B) and Child-Pugh A (C) and B (D) liver cirrhosis without (in black) and with co-administration of fluconazole once a day (in red). The circles represent reported mean  $\pm$  standard deviation values. Solid and dashed lines show simulated values with 5th and 95th percentiles, respectively.



**Fig. III-10. Simulated plasma concentration–time curves after single oral administrations of 0.4 mg pemafibrate in healthy adults (A) and of 0.2 mg pemafibrate in subjects with severe renal impairment (B) and Child-Pugh A (C) and B (D) liver cirrhosis without (in black) and with co-administration of clarithromycin twice a day (in red). The circles represent reported mean  $\pm$  standard deviation values. Solid and dashed lines show simulated values with 5th and 95th percentiles, respectively.**



**Fig. III-11. Simulated plasma concentration–time curves after single oral administrations of 0.4 mg pemaifibrate in healthy adults (A) and of 0.2 mg pemaifibrate in subjects with severe renal impairment (B) and Child-Pugh A (C) and B (D) liver cirrhosis without (in black) and with co-administration of itraconazole capsules twice a day (in red). The circles represent reported mean  $\pm$  standard deviation values. Solid and dashed lines show simulated values with 5th and 95th percentiles, respectively.**



**Fig. III-12. Simulated plasma concentration–time curves after single oral administrations of 0.4 mg pemaefibrate in healthy adults (A) and of 0.2 mg pemaefibrate in subjects with severe renal impairment (B) and Child-Pugh A (C) and B (D) liver cirrhosis without (in black) and with co-administration of itraconazole solution twice a day (in red). The circles represent reported mean  $\pm$  standard deviation values. Solid and dashed lines show simulated values with 5th and 95th percentiles, respectively.**

**Table III-6. Simulated and reported (observed) pharmacokinetic parameters for pemafibrate after oral administrations in healthy adults and in subjects with renal/liver impairments with and without co-administered clopidogrel once a day at 300 or 75 mg.**

Parameter	Subjects	Dose, mg		Simulated		Reported			Ratio in control <sup>d</sup>
		Pemafibrate / clopidogrel	Control	With clopidogrel	Ratio to control <sup>c</sup>	Control	With clopidogrel	Ratio to control <sup>c</sup>	
C <sub>max</sub> , ng/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4 / 300		7.1 [6.7, 7.7]	1.5 [1.5, 1.6]		7.1	1.5 [1.4, 1.6]	0.96
		0.4 / 75	4.6 [4.3, 5.0]	6.3 [5.9, 6.8]	1.4 [1.3, 1.4]	4.8	6.4	1.3 [1.3, 1.4]	
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2 / 300		4.7 [4.2, 5.2]	1.6 [1.5, 1.7]		-	-	0.64
		0.2 / 75	2.9 [2.6, 3.3]	4.1 [3.7, 4.6]	1.4 [1.3, 1.4]	4.5	-	-	
	Child-Pugh A	0.2 / 300		6.0 [5.6, 6.5]	1.5 [1.4, 1.5]		-	-	0.62
		0.2 / 75	4.1 [3.8, 4.5]	5.5 [5.1, 5.9]	1.3 [1.3, 1.4]	6.6	-	-	
	Child-Pugh B	0.2 / 300		8.8 [8.3, 9.3]	1.4 [1.3, 1.4]		-	-	0.59
		0.2 / 75	6.5 [6.0, 7.0]	8.3 [7.8, 8.8]	1.3 [1.2, 1.3]	11	-	-	
AUC, ng·h/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4 / 300		28 [26, 31]	1.6 [1.5, 1.6]		38	2.4 [2.2, 2.5]	1.1
		0.4 / 75	18 [16, 20]	25 [23, 28]	1.4 [1.4, 1.4]	16	34	2.1 [2.0, 2.2]	
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2 / 300		24 [21, 27]	1.7 [1.6, 1.8]		-	-	1.3
		0.2 / 75	14 [12, 16]	21 [18, 24]	1.5 [1.4, 1.6]	11	-	-	
	Child-Pugh A	0.2 / 300		35 [31, 39]	1.6 [1.6, 1.7]		-	-	1.1
		0.2 / 75	21 [19, 24]	31 [28, 35]	1.5 [1.4, 1.5]	19	-	-	
	Child-Pugh B	0.2 / 300		80 [71, 90]	1.7 [1.6, 1.8]		-	-	1.3
		0.2 / 75	48 [42, 54]	74 [65, 83]	1.5 [1.5, 1.6]	37	-	-	
Oral clearance, L/h <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4 / 300		14 [13, 15]	0.63 [0.62, 0.65]		11	0.44	0.88
		0.4 / 75	22 [20, 24]	16 [14, 17]	0.71 [0.69, 0.72]	25	12	0.48	
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2 / 300		8.4 [7.3, 9.5]	0.58 [0.56, 0.61]		-	-	0.74
		0.2 / 75	14 [12, 16]	9.5 [8.3, 11]	0.66 [0.64, 0.69]	19	-	-	
	Child-Pugh A	0.2 / 300		5.8 [5.2, 6.5]	0.61 [0.59, 0.64]		-	-	0.94
		0.2 / 75	9.4 [8.3, 11]	6.4 [5.8, 7.2]	0.68 [0.66, 0.71]	10	-	-	
	Child-Pugh B	0.2 / 300		2.5 [2.2, 2.8]	0.60 [0.57, 0.62]		-	-	0.78
		0.2 / 75	4.2 [3.7, 4.8]	2.7 [2.4, 3.1]	0.65 [0.62, 0.67]	5.4	-	-	

Healthy and impaired adult populations, respectively, were virtually treated with 0.4 and 0.2 mg pemafibrate. <sup>a</sup> Geometric means. <sup>b</sup> Glomerular filtration rates < 30 mL/min. <sup>c</sup> Ratios of geometric mean values with clopidogrel to those without a co-administered perpetrator drug (control). <sup>d</sup> Ratios of simulated/reported values of controls. The numbers in square brackets are the 90% confidence intervals. Each simulation was performed in 10 trials on 7-20 randomly selected virtual subjects corresponding to the reported (observed) subjects in the package insert for pemafibrate

**Table III-7. Simulated and reported (observed) pharmacokinetic parameters for pemafibrate after oral administrations in healthy adults and in subjects with renal/liver impairments with and without co-administered fluconazole once a day at 400 mg.**

Parameter	Subjects	Dose, mg	Simulated			Reported			Ratio in control <sup>d</sup>
			Control	With fluconazole	Ratio to control <sup>c</sup>	Control	With fluconazole	Ratio to control <sup>c</sup>	
C <sub>max</sub> , ng/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	4.8 [4.4, 5.2]	5.6 [5.1, 6.1]	1.2 [1.2, 1.2]	5.1	7.3	1.4 [1.3, 1.6]	0.94
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2	2.9 [2.6, 3.3]	3.8 [3.4, 4.2]	1.3 [1.2, 1.3]	4.5	-	-	0.64
	Child-Pugh A	0.2	4.1 [3.8, 4.5]	4.8 [4.4, 5.3]	1.2 [1.1, 1.2]	6.6	-	-	0.62
	Child-Pugh B	0.2	6.5 [6.0, 7.0]	7.3 [6.8, 7.9]	1.1 [1.1, 1.1]	11	-	-	0.59
AUC, ng·h/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	18 [17, 20]	22 [20, 25]	1.2 [1.2, 1.2]	19	34	1.8 [1.7, 1.9]	0.95
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2	14 [12, 16]	20 [17, 23]	1.4 [1.4, 1.5]	11	-	-	1.3
	Child-Pugh A	0.2	21 [19, 24]	27 [24, 31]	1.3 [1.2, 1.3]	19	-	-	1.1
	Child-Pugh B	0.2	48 [42, 54]	62 [54, 72]	1.3 [1.3, 1.3]	37	-	-	1.3
Oral clearance, L/h <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	22 [20, 24]	18 [16, 20]	0.82 [0.81, 0.84]	21	12	0.57	1.0
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2	14 [12, 16]	10 [8.5, 12]	0.70 [0.67, 0.73]	19	-	-	0.74
	Child-Pugh A	0.2	9.4 [8.3, 11]	7.3 [6.4, 8.4]	0.78 [0.75, 0.80]	10	-	-	0.94
	Child-Pugh B	0.2	4.2 [3.7, 4.8]	3.2 [2.8, 3.7]	0.77 [0.74, 0.79]	5.4	-	-	0.78

Healthy and impaired adult populations, respectively, were virtually treated with 0.4 and 0.2 mg pemafibrate. <sup>a</sup> Geometric means. <sup>b</sup> A virtual population with glomerular filtration rates <30 mL/min. <sup>c</sup> Ratios of geometric mean values with fluconazole to those without a co-administered perpetrator drug (control). <sup>d</sup> Ratios of simulated/reported values of controls. The numbers in square brackets are the 90% confidence intervals. Each simulation was performed in 10 trials on 7-20 randomly selected virtual subjects corresponding to the reported (observed) subjects in the package insert for pemafibrate.



**Table III-8. Simulated and reported (observed) pharmacokinetic parameters for pemafibrate after oral administrations in healthy adults and in subjects with renal/liver impairments with and without co-administered clarithromycin twice a day at 500 mg.**

Parameter	Subjects	Dose, mg	Simulated			Reported			Ratio in control <sup>d</sup>
			Control	With clarithromycin	Ratio to control <sup>c</sup>	Control	With clarithromycin	Ratio to control <sup>c</sup>	
C <sub>max</sub> , ng/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	4.6 [4.3, 5.0]	12 [11, 13]	2.6 [2.5, 2.6]	4.8	11	2.4 [2.2, 2.7]	0.96
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2	2.9 [2.6, 3.3]	12 [12, 13]	4.2 [3.9, 4.5]	4.5	-	-	0.64
	Child-Pugh A	0.2	4.1 [3.8, 4.5]	11 [9.9, 11]	2.6 [2.4, 2.7]	6.6	-	-	0.62
	Child-Pugh B	0.2	6.5 [6.0, 7.0]	14 [13, 14]	2.1 [2.0, 2.2]	11	-	-	0.59
AUC, ng·h/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	18 [16, 19]	51 [46, 56]	2.9 [2.8, 3.0]	17	35	2.1 [1.9, 2.3]	1.1
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2	14 [12, 16]	150 [130, 180]	11 [10, 12]	11	-	-	1.3
	Child-Pugh A	0.2	21 [19, 24]	100 [90, 120]	4.9 [4.5, 5.2]	19	-	-	1.1
	Child-Pugh B	0.2	48 [42, 54]	310 [280, 340]	6.4 [6.0, 6.8]	37	-	-	1.3
Oral clearance, L/h <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	23 [21, 25]	7.9 [7.2, 8.7]	0.35 [0.34, 0.36]	23	11	0.48	1.0
	Renal impaired <sup>b</sup>	0.2	14 [12, 16]	1.3 [1.1, 1.5]	0.092 [0.085, 0.10]	19	-	-	0.74
	Child-Pugh A	0.2	9.4 [8.3, 11]	1.9 [1.7, 2.2]	0.21 [0.19, 0.22]	10	-	-	0.94
	Child-Pugh B	0.2	4.2 [3.7, 4.8]	0.66 [0.59, 0.72]	0.16 [0.15, 0.17]	5.4	-	-	0.78

Healthy and impaired adult populations, respectively, were virtually treated with 0.4 and 0.2 mg pemafibrate. <sup>a</sup> Geometric means. <sup>b</sup> A virtual population with glomerular filtration rates <30 mL/min. <sup>c</sup> Ratios of geometric mean values with clarithromycin to those without a co-administered perpetrator drug (control). <sup>d</sup> Ratios of simulated/reported values of controls. The numbers in square brackets are the 90% confidence intervals. Each simulation was performed in 10 trials on 7-19 randomly selected virtual subjects corresponding to the reported (observed) subjects in the package insert for pemafibrate.

**Table III-9. Simulated pharmacokinetic parameters for pemafibrate after oral administrations in healthy adults and in subjects with renal/liver impairments with and without co-administered itraconazole twice a day at 200 mg.**

Parameter	Subjects	Dose, mg	Formulation	Control	With itraconazole	Ratio to control <sup>c</sup>
C <sub>max</sub> , ng/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	Capsules	4.0 [3.7, 4.4]	4.3 [3.9, 4.7]	1.1 [1.1, 1.1]
			Solution	4.9 [4.5, 5.3]	5.2 [4.8, 5.7]	1.1 [1.1, 1.1]
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	Capsules	2.4 [2.1, 2.7]	2.7 [2.4, 3.1]	1.2 [1.1, 1.2]
			Solution	2.9 [2.6, 3.3]	3.4 [3.0, 3.8]	1.1 [1.1, 1.2]
	Child-Pugh A	0.2	Capsules	3.5 [3.2, 3.9]	3.8 [3.5, 4.2]	1.1 [1.1, 1.1]
			Solution	4.1 [3.8, 4.5]	4.4 [4.0, 4.9]	1.1 [1.1, 1.1]
	Child-Pugh B	0.2	Capsules	5.8 [5.3, 6.2]	6.1 [5.6, 6.6]	1.0 [1.0, 1.1]
			Solution	6.5 [6.0, 7.0]	6.8 [6.3, 7.3]	1.0 [1.0, 1.1]
AUC, ng·h/mL <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	Capsules	19 [17, 21]	21 [19, 23]	1.1 [1.1, 1.1]
			Solution	19 [17, 21]	20 [18, 23]	1.1 [1.1, 1.1]
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	Capsules	14 [12, 16]	17 [15, 20]	1.2 [1.2, 1.2]
			Solution	14 [12, 16]	17 [15, 20]	1.2 [1.2, 1.2]
	Child-Pugh A	0.2	Capsules	21 [19, 24]	24 [21, 27]	1.1 [1.1, 1.1]
			Solution	21 [19, 24]	24 [21, 27]	1.1 [1.1, 1.1]
	Child-Pugh B	0.2	Capsules	48 [43, 55]	53 [47, 60]	1.1 [1.1, 1.1]
			Solution	48 [42, 54]	52 [46, 60]	1.1 [1.1, 1.1]
Oral clearance, L/h <sup>a</sup>	Healthy adults	0.4	Capsules	21 [19, 23]	19 [18, 21]	0.92 [0.92, 0.93]
			Solution	21 [19, 23]	20 [18, 21]	0.92 [0.91, 0.93]
	Renal impairment <sup>b</sup>	0.2	Capsules	14 [12, 16]	12 [10, 14]	0.83 [0.81, 0.85]
			Solution	14 [12, 16]	12 [10, 14]	0.83 [0.80, 0.85]
	Child-Pugh A	0.2	Capsules	9.4 [8.3, 11]	8.3 [7.3, 9.5]	0.89 [0.88, 0.90]
			Solution	9.4 [8.3, 11]	8.4 [7.4, 9.6]	0.89 [0.88, 0.90]
	Child-Pugh B	0.2	Capsules	4.1 [3.6, 4.7]	3.8 [3.3, 4.3]	0.91 [0.90, 0.92]
			Solution	4.2 [3.7, 4.8]	3.8 [3.3, 4.3]	0.91 [0.90, 0.92]

Healthy and impaired adult populations were virtually treated with 0.4 mg and 0.2 mg pemafibrate, respectively. <sup>a</sup> Geometric means; <sup>b</sup> A virtual population with glomerular filtration rates <30 mL/min. <sup>c</sup> Ratios of geometric mean values with itraconazole to those without a co-administered perpetrator drug (control). The numbers in parentheses are the 90% confidence intervals. Each simulation was performed in 10 trials for 7-20 randomly selected virtual subjects corresponding to the reported (observed) subjects in the package insert for pemafibrate.

## 第4節 考察

薬物相互作用は、ゲムフィブロジルとレパグリニドとの相互作用（OATP1B1／1B3 および P450 2C8 阻害）のように代謝酵素とトランスポーターの両方を含む複数の機構が関与することがある（Tornio et al., 2019）。このような複雑な薬物相互作用を予測することは困難であるが、薬物相互作用に関連する臨床リスクを最小限に抑えるためには、それらを精度良く予測する必要がある。この種の薬物相互作用のリスクに関する理解を深めるためには、薬物相互作用の重要な要素である代謝酵素やトランスポーターを詳細に解明する必要がある。本研究では、ペマフィブラートが関与する P450 酵素と肝取り込みトランスポーター OATP1B1 を詳細に解析し、ヒト血漿中濃度推移を用いて最適化することで、ペマフィブラートの PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値を決定した。トランスポーターを介した *in vitro* クリアランスから *in vivo* クリアランスを外挿するのは困難であることから、PBPK モデルには実測の *in vivo* クリアランスを基にしたスケーリング係数が適用される（Harwood et al., 2013）。本研究においても同様に、最適化された OATP1B1 の  $CL_{int}$  は初期値（ヒト肝細胞における能動輸送の取り込みクリアランス）の 44 倍と *in vitro* と *in vivo* のクリアランスに乖離が認められた（Table III-3）。近年、ヒト浮遊肝細胞を用いて取り込みを検討において、アルブミンへの結合が高いアニオン性薬物の取り込みクリアランスにヒト血清アルブミン濃度が影響を与えることが報告されている（Kim et al., 2019）。ペマフィブラートはヒト血清アルブミンに強く結合しているため、アルブミンを介した肝取り込みが上記の  $CL_{int}$  値の乖離に寄与している可能性がある。予備的検討結果では 4% ヒト血清アルブミンによる取り込みに対する寄与は 97% と高値を示すことが明らかとなっている。

欧米人の実臨床データを用いて薬物動態パラメータ値を決定した PBPK モデルを用いて予測した日本人健常者の  $C_{max}$ 、AUC および経口クリアランス値は実測値の 2 倍以内であったことから（Table III-4）、本 PBPK モデルは人種によらず適応可能であると推察された。腎機能障害患者、Child-Pugh 分類 A および B 肝硬変患者においても、 $C_{max}$ 、AUC および経口クリアランス値の予測値は実測値の 2 倍以内であったが、 $C_{max}$  値は過小に予測される傾向があった（Table III-4）。これらの患者において消化管の P-gp および／または BCRP が低下している可能性が推察された。

腎・肝障害患者のような Special population における薬物相互作用の情報は重要であるものの、倫理的問題および開発費用の観点から一般的に腎・肝障害患者

における薬物相互作用は検討できない。このような情報の入手に PBPK モデリングは有用であるが、現状、Special population で利用可能な生理学的パラメータの情報は不十分である。たとえば、肝障害患者において肝取り込みトランスポーターOATP1B1 の mRNA の低下が報告されているにもかかわらず、活性低下は不明なままである (Li et al., 2015)。そこで、ペマフィブラートの肝障害時の血漿中濃度を用いて最適化することにより Child-Pugh 分類 A および B 肝障害患者における OATP1B1 の取り込みクリアランスを初めて明らかとした。肝障害時の OATP1B1 を介した薬物相互作用が可能となったため、ペマフィブラートの PBPK モデルを用いて、OATP1B1 阻害剤であるリファンピシンまたはサクビト ril がペマフィブラートの血漿中濃度に及ぼす影響をシミュレーションした。リファンピシンの併用により、Child-Pugh 分類 A および B 肝硬変において、 $C_{max}$  の上昇率が健常人に比べて低下傾向が認められたことから、OATP1B1 の活性低下に伴う寄与率の低下により、リファンピシンによる阻害の影響が減少したと推察された (Table III-4)。サクビト ril はアンジオテンシン受容体ネプリライシン阻害剤である慢性心不全の治療薬であり、臨床でペマフィブラートと併用される可能性があるが、ヒトでのペマフィブラートとの薬物相互作用は検討されていない。サクビト ril は *in vitro* で OATP1B1 を阻害し ( $K_i$ : 0.076  $\mu\text{M}$ )、リファンピシン ( $K_i$ : 0.067  $\mu\text{M}$ ) と同程度の強い阻害作用を有している (Table III-2)。さらに、ヒトにおいては、OATP1B1 の基質であるアトルバスタチンとの併用によりアトルバスタチンの  $C_{max}$  および AUC 値を約 2 倍および 1.3 倍に増加させることから (Lin et al., 2017)、ペマフィブラートと併用した際に薬物相互作用を起こす懸念がある。本研究での検討結果からは、サクビト ril との併用により、ペマフィブラートのヒト血漿中曝露はほとんど影響をうけないと予測され、サクビト ril は臨床使用上安全に併用できると推察された (Table III-5 および Fig. III-7)。以上から、PBPK モデリングおよびシミュレーションにより、様々な被験者におけるリファンピシンとの併用によるペマフィブラートに対する薬物相互作用のリスクは高く、サクビト ril との併用によるリスクは低いことが明らかとなった。リファンピシンおよびサクビト ril の OATP1B1 に対する *in vitro* での阻害作用は同程度であるが、遊離体の曝露量 (遊離体の  $C_{max}$ : それぞれ 2.2 および 0.092  $\mu\text{M}$ , 遊離体の  $\text{ACU}_{0-\text{inf}}$ : それぞれ 12 および 0.12  $\mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ ) はサクビト ril よりもリファンピシンで顕著に高値であった。サクビト ril の投与直後にペマフィブラートの曝露量が一過性に上昇したが、サクビト ril の  $t_{1/2}$  (1.4 時間) が非常に短いため、その阻害効果はすぐに消失したと推察された (Lin et al., 2017)。その結果として、リファンピシンとサクビト ril とで異なる阻害作用を示すと

推察された。

さらに、本モデルの妥当性を検証するため、複数の P450 阻害薬によるペマフィブラートに対する影響を予測したところ、健常人におけるクロピドグレル (P450 2C8 阻害剤)、フルコナゾール (P450 2C9 / 3A4 阻害剤) またはクラリスロマイシン (P450 3A4 阻害剤) とペマフィブラートの仮想併用投与によるペマフィブラートの  $C_{max}$ , AUC および経口クリアランスの予測値は実測値と一致していた (Table III-6~8)。ただし、クロピドグレル併用によるペマフィブラートの消失速度の減少は、本 PBPK モデルでは完全には予測できなかった。クロピドグレルを投与した際のクロピドグレル活性代謝物の曝露量は、P450 2C19 / 2C9 の機能喪失型変異と相関した低下が認められている (Brandt et al., 2007)。したがって、クロピドグレルは P450 2C9 を競合的に阻害する可能性があり、本モデルにクロピドグレルによる P450 2C9 の阻害が欠如しているため、予測精度が低かった可能性がある。以上から、これら阻害剤併用時におけるペマフィブラートの血漿中濃度推移は、PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値の決定の際には用いていないことから、ペマフィブラートの OATP1B1 を介した肝取り込みおよび CYPs を介した代謝を組み込んだ PBPK モデルの妥当性が検証できた。腎または肝障害患者にペマフィブラートとクラリスロマイシンの仮想併用投与した際、ペマフィブラートの血漿中曝露量は 4.9~11 倍となり、腎または肝障害により、ペマフィブラートの血漿中曝露量増加が大きくなると予測された (Table III-8 および Fig. III-10)。ペマフィブラートのクリアランスに対する P450 3A4 の寄与率 (12.0%) は低いため、クラリスロマイシンによる P450 3A4 の阻害の影響は小さいと推察される。さらに、健常人、腎または肝障害患者における P450 3A4 阻害薬であるイトラコナゾール 400mg (液体またはカプセルで 200mg BID) の仮想併用投与は、ペマフィブラートの血漿中曝露量にほとんど影響を与えないと予測された (Table III-9 および Fig. III-11~12)。以上から、クラリスロマイシンは OATP1B1 を阻害することにより、ペマフィブラートの曝露量を増加したと推察された。腎機能障害患者、Child-Pugh 分類 A および B 肝硬変患者のクラリスロマイシンの血漿中曝露量は、健常人のそれぞれ 6.6, 2.6 または 4.6 倍であると予測された (データ掲載無し)。クラリスロマイシンの腎からの排泄および P450 3A4 による代謝の減少による曝露量の増加により、その阻害効果が健常人よりも腎または肝障害患者において増強され、ペマフィブラートの曝露量がより増加したものと推察された。

## 第 5 節 小括

ペマフィブラートの各消失経路を考慮した健康成人における PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値を決定し、既報の血漿中濃度推移を再現できた。本モデルを用いて、臨床で未実施の OATP1B1 または P450 3A4 阻害剤との臨床薬物相互作用の予測を可能にした。さらに、肝障害患者における OATP1B1 の活性を最適化した PBPK モデルを用い、腎・肝障害患者におけるペマフィブラートと様々な薬剤との薬物相互作用を初めて予測可能にした。

## 総括

本研究では、新薬候補品の開発および医薬品の安全使用における課題に取り組んだ。近年、薬物動態に起因する開発中止はほとんどないが、安全性に起因する開発中止は減少しておらず、毒性発現の予測には、未変化体とは異なる特性を有する代謝物の理解が必須である。特に、毒性発現に重要なヒト血漿中代謝物の予測は、ヒト由来組織の利用により、*in vitro* から簡易に予測可能とはなったものの、その予測精度は不十分である。構造が大きく異なる二次代謝物は未変化体とは異なる薬物動態特性を有することが要因として推察され、予測精度の向上に向けて、分布や排泄等の他の薬物動態因子を考慮した包括的な予測が必要である。ヒトにおいては、健常人および限られた患者で新薬候補品を服用し、有効性や安全性を検討するが、承認され、一般に使われるようになると、様々な背景の患者に処方されることになる。例えば、肝臓や腎臓の機能の低下が認められる腎・肝障害患者に服用した場合は、薬剤の代謝および排泄が遅くなり、副作用が発現する可能性がある。そのような多様な患者背景における薬物相互作用の予測は複雑で困難であり、特に肝取り込みが関与する薬物相互作用の予測精度は低い。本研究では、これら諸問題を解決すべく、医薬品開発の効率化および医療現場でのより安全な医薬品の使用に向けて、ペマフィブラートをモデル化合物として、基盤となる医薬候補品の体内動態および薬物相互作用の詳細を明らかにする統合予測手法を検討した。

脂質異常症治療薬であるペマフィブラートはヒト生体内ではほぼ完全に代謝され、臨床で取り込みトランスポーターOATP1B1の阻害により顕著な曝露上昇が認められることから、肝取り込み過程と代謝過程の両過程が主要な薬物動態規定因子であると推察される。そのような複雑な消失経路を有するため、毒性予測に重要な血漿中代謝物や薬物相互作用の予測は困難と推察された。さらに、健常人における薬物相互作用および腎・肝障害におけるペマフィブラートの体内動態変動が検討されてきたが、これらは単一の変動要因による影響を検討したのみであり、実際の医療現場で見られる病態時における薬物相互作用のような複数の要因によるペマフィブラートの体内動態変動についてはヒトにおいて検討されていない。そこで本研究ではまず、血漿中代謝物および肝取り込み過程を含む薬物相互作用の予測へのヒト肝細胞移植マウスおよびサルの有用性を検証した。さらに、代謝および肝取り込みの両過程を組み込んだPBPKモデルを用いて、肝障害による消失経路の機能変動を新たに組み込むことで、腎・肝障害および併用薬の両影響を加味した予測を初めて検討した。

第 I 章では、肝取り込みトランスポーターOATP1B1 の阻害による影響を予測しうる実験動物として、ヒト肝細胞移植マウスおよび OATP1B1 の遺伝子型を特定したサルの有用性を検証した。OATP1B1 阻害剤リファンピシンによるペマフィブラートの曝露量に与える影響を検討した結果、ヒト肝細胞移植マウスではほとんど影響が認められなかったが、サルでは、ペマフィブラートの顕著な曝露上昇が認められ、OATP1B1 による阻害作用の影響を受けることが明らかとなった。さらに、化学構造がペマフィブラートに比較的類似しており、OATP1B1 に対する基質認識性が維持されていると推察される一次代謝物もペマフィブラートと同様の顕著な曝露上昇が認められた。一方、大幅な構造変換を介するため、OATP1B1 に対する基質認識性が低下したと推察される二次代謝物の曝露量はほとんど変動しなかった。以上の結果から、代謝だけでなく肝取り込み過程が関与する薬剤との薬物相互作用の予測には、代謝以外の分布および排泄だけでなく、肝取り込みトランスポーターがヒトと類似していると推察されるカニクイザルが有用であることを明らかとした。

第 II 章では、ヒト血漿中代謝物を予測しうる実験動物として、第 I 章と同様にヒト肝細胞移植マウスおよびサルの有用性を検証した。*In vitro* 肝細胞系や医薬品開発の初期に汎用されるラット血漿中では、ペマフィブラートの代謝物はほとんど検出されなかったが、サルでは、複数の二次代謝物が未変化体を超える曝露量で顕著に検出された。ヒト肝細胞移植マウスにおいても、非移植マウスに比べて、ペマフィブラートの血漿中の複数の一次および二次代謝物の曝露量の増加が認められたことから、サルおよびヒト肝細胞移植マウスは網羅的な代謝物の予測に有用なモデル動物であると推察された。さらに、代謝、分布および排泄が関与する重要な薬物動態パラメータである分布容積および血漿クリアランスは、非移植マウスに比べ、ヒト肝細胞移植マウスでよりサルに近い値を有していることから、ヒト肝細胞移植マウスはサルに比較的薬物動態特性が類似していると推察された。以上の結果から、ヒト血漿中主要代謝物の予測には、代謝、分布および排泄がヒトに類似していると推察されるサルまたはヒト肝細胞移植マウスが有用であることを明らかとした。

第 III 章では、新規基盤システムとして PBPK モデルを選択し、ペマフィブラートの代謝および肝取り込みの両過程を包含する PBPK モデルを用いた健常人および腎・肝障害患者における血漿中濃度推移および薬物相互作用の予測を試みた。ペマフィブラートの代謝に関与する分子種の各代謝速度や肝取り込み過程に関与するトランスポーターの取り込み速度等を明らかとし、ペマフィブラートの PBPK モデルにおける薬物動態パラメータ値を決定し、ヒトにおける未



実施の薬物相互作用を予測することを可能とした。その例として、ペマフィブラートと OATP1B1 阻害剤サクビトリルまたは P450 3A4 阻害剤イトラコナゾールと併用によるペマフィブラートの血漿中曝露量に与える影響を予測した結果、ペマフィブラートの血漿中濃度はほとんど影響を受けないと予測された。サクビトリルおよびイトラコナゾールと同程度以下の阻害能を有する医薬品を併用する際には、ペマフィブラートの用量を調整する必要はなく、安全に併用可能であることが示唆された。

さらに、腎・肝障害による各消失経路の機能変動を考慮した PBPK モデルを用いて、腎・肝障害患者におけるペマフィブラートの薬物相互作用を予測した。肝障害時の実臨床データを用いて OATP1B1 による肝取り込み活性を最適化し、OATP1B1 の活性が肝障害の程度に応じて、健常人の 0.53~0.31 倍に低下していることを初めて明らかとした。本活性低下を組み込むことで、ヒトでは検討が困難な肝障害患者における薬物相互作用を予測することが初めて可能となった。その例として、クラリスロマシンの併用によるペマフィブラートの曝露量に与える影響は健常人と比較し、腎・肝障害患者の方が大きいことが予測され、健常人と異なり、用量調節を考慮する等により慎重な投与が必要になることが示唆された。

以上、本研究において、ヒト血漿中代謝物および薬物相互作用の予測方法として、ヒト肝細胞移植マウスおよびサルの有用性を示した。さらに、PBPK モデルを利用し、肝障害時における肝取り込みトランスポーター OATP1B1 の活性を初めて明らかとし、腎・肝疾患時の薬物相互作用の予測を可能とした。

本研究における循環血中代謝物および薬物相互作用の統合予測手法の活用例を以下に示す。ヒトに放射性同位体標識化合物を投与し、放射能を指標に網羅的な血漿中代謝物を検索する際に、未知の血漿中主代謝物が検出されると、代謝物の同定、合成ならびに薬効、毒性および薬物動態評価が必要となり、医薬品開発のスピードに影響を及ぼす可能性がある。化合物の合成量の限られた医薬品開発の初期の段階ではヒト肝細胞移植マウスを用い、その後、化合物量が確保できる段階ではサルを用いた代謝物検索を行うことで、効率的な血漿中代謝物検索が可能となり、ヒトで新たな代謝物が検出される可能性の低減につながる。In vitro 試験等により肝取り込みトランスポーターの関与が認められた場合は、サルを用いた薬物相互作用を実施することで、早期に肝取り込みトランスポーターを含めた薬物相互作用の予測が可能となる。さらに、ヒト血漿中濃度推移が得られる段階では、腎・肝障害等の特殊集団における生体の機能変動を考慮した PBPK モデルを活用することで、人種、年齢、病態および併用薬等様々な影響を

加味した実際の医療現場に合致した細やかな予測が可能となる。本研究において明らかとなった肝障害による OATP1B1 の活性低下の予測は初めての知見であり、肝障害患者における生体学的情報として今後有用である。このような患者背景に応じたデータベースにない新たな生理学的情報を検証し、情報を増やしていくことで、より精度の高い予測が可能となると期待される。

本研究において確立した統合予測系は、題材としたペマフィブラートに限らず適用でき、医薬品開発の効率化に資するとともに、実臨床で多様な患者背景を考慮した医薬品の適正使用に貢献するものと強く期待される。

## 本研究の誌上発表

本学位論文の内容は下記の原著論文として発表した。

Ogawa SI, Tsunenari Y, Kawai H, Yamazaki H. (2019). Pharmacokinetics and metabolism of pemafibrate, a novel selective peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  modulator, in rats and monkeys. *Biopharm Drug Dispos* 40:12-7.

Ogawa SI, Uehara S, Tsunenari Y, Kawai H, Suemizu H, Yamazaki H. (2020). Prediction of circulating human metabolites of pemafibrate, a novel antidyslipidemic drug, using chimeric mice with humanized liver. *Xenobiotica* 50:769-75.

Ogawa SI, Shimizu M, Yamazaki H. (2020). Plasma concentrations of pemafibrate with co-administered drugs predicted by physiologically based pharmacokinetic modeling in virtual populations with renal/ hepatic impairment. *Xenobiotica* 50:1023-31.

Ogawa SI, Shimizu M, Kamiya Y, Uehara S, Suemizu H, Yamazaki H. (2020). Increased plasma concentrations of an antidyslipidemic drug pemafibrate co-administered with rifampicin or cyclosporine A in cynomolgus monkeys genotyped for the organic anion transporting polypeptide 1B1. *Drug Metabol Pharmacokinet* 35:354-60.

Ogawa SI, Shimizu M, Yamazaki H. (2020). Modelled plasma concentrations of pemafibrate with co-administered typical cytochrome P450 inhibitors clopidogrel, fluconazole or clarithromycin predicted by physiologically based pharmacokinetic modelling in virtual populations. *Xenobiotica* 50:1413-22.

## 謝辞

本論文は筆者が昭和薬科大学 薬物動態研究室および興和株式会社 東京創薬研究所において、効率的な医薬品開発および医薬品の適正使用のため、基盤となる医薬品候補品の体内動態および薬物相互作用の統合予測に関する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 薬物治療学研究室教授 水谷顕洋博士に謹んで深謝の意を表します。副査としてご審査賜りました同大学 薬理学研究室教授 渡邊泰男博士、衛生化学研究室教授 石井功博士に深謝の意を表します。

昭和薬科大学 薬物動態学研究室教授 山崎浩史博士には、本論文を作成するにあたってご懇篤なご指導ご鞭撻をいただくとともに、成果発表の貴重な機会を与えていただきました。ここに謹んで深謝致します。同研究室准教授 清水万紀子博士には、論文作成にあたって有益なご助言とご支援をいただきました。ここに深謝の意を表します。同研究室特任教授 神矢佑輔博士および同研究室の皆様には、種々のご便宜をお計らいいただきました。ここに感謝の意を表します。

公益財団法人 実験動物中央研究所にて、ヒト肝細胞移植マウスを用いた動物実験の計画と遂行にご尽力いただき、有益な成果をもって本研究に貢献された末水洋志博士、上原正太郎博士に深謝いたします。サルを用いた動物実験の計画と遂行にご尽力いただきました株式会社新日本科学の諸氏に深謝いたします。

本研究は、筆者が興和株式会社 東京創薬研究所において、山寄行由研究所長、川合博幸主席研究員、恒成嘉彦主任研究員の終始ご懇篤なご指導ご助言のもとに遂行したものであります。研究遂行にあたり、有益なご討論とご助言をいただきました、更に、常日頃変わらぬご支援、ご協力をいただきました興和株式会社 東京創薬研究所 薬物動態研究部 動態グループの諸氏に厚くお礼申し上げます。

## 参考文献

Bateman TJ, Reddy VG, Kakuni M, et al. (2014). Application of chimeric mice with humanized liver for study of human-specific drug metabolism. *Drug Metab Dispos* 42:1055-65.

Brandt JT, Close SL, Iturria SJ, et al. (2007). Common polymorphisms of CYP2C19 and CYP2C9 affect the pharmacokinetic and pharmacodynamic response to clopidogrel but not prasugrel. *J Thromb Haemost* 5:2429-36.

Cheng HS, Tan WR, Low ZS, Marvalim C, Lee JYH, Tan NS. (2019). Exploration and development of PPAR modulators in health and disease: an update of clinical evidence. *Int J Mol Sci* 20:5055.

Chen Y, Zhang W, Huang WH, Tan ZR, Wang YC, Huang X, et al. (2013). Effect of a single-dose rifampin on the pharmacokinetics of pitavastatin in healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 69:1933-8.

Chu X, Bleasby K, Evers R. (2013). Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 9:237-52.

Dalvie D, Obach RS, Kang P, et al. (2009). Assessment of three human in vitro systems in the generation of major human excretory and circulating metabolites. *Chem Res Toxicol* 22:357-68.

Di L. (2017). Reaction phenotyping to assess victim drug-drug interaction risks. *Expert Opin Drug Discov* 12: 1105-15.

Elsby R, Hilgendorf C, Fenner K. (2012). Understanding the critical disposition pathways of statins to assess drug-drug interaction risk during drug development: it's not just about OATP1B1. *Clin Pharmacol Ther* 92:584-98.

European Medicines Agency, Committee for Human Medicinal Products (CHMP). (2012). Guideline on the Investigation of Drug Interactions.

Fruchart JC. (2013). Selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulators (SPPARMalpha): the next generation of peroxisome proliferator activated receptor alpha-agonists. *Cardiovasc Diabetol* 12:82.

Gaedigk A, Ingelman-Sundberg M, Miller NA, Leeder JS, Whirl-Carrillo M, Klein TE. (2018). The pharmacogene variation (PharmVar) consortium: incorporation of the human cytochrome P450 (CYP) allele nomenclature database. *Clin Pharmacol Ther* 103:399-401.

Harwood MD, Neuhoﬀ S, Carlson GL, et al. (2013). Absolute abundance and function of intestinal drug transporters: a prerequisite for fully mechanistic in vitro-in vivo extrapolation of oral drug absorption. *Biopharm Drug Dispos* 34:2-28.

Hasegawa M, Kawai K, Mitsui T, Taniguchi K, Monnai M, Wakui M, et al. (2011). The reconstituted 'humanized liver' in TK-NOG mice is mature and functional. *Biochem Biophys Res Commun* 405:405-10.

Hosea NA, Collard WT, Cole S, Maurer TS, Fang RX, Jones H, et al. (2009). Prediction of human pharmacokinetics from preclinical information: comparative accuracy of quantitative prediction approaches. *J Clin Pharmacol* 49:513-33.

Ishibashi S, Arai H, Yokote K, et al. (2018). Efficacy and safety of pemafibrate (K-877), a selective peroxisome proliferator-activated receptor alpha modulator, in patients with dyslipidemia: Results from a 24-week, randomized, double blind, active-controlled, phase 3 trial. *J Clin Lipidol* 12:173-84.

Ishibashi S, Yamashita S, Arai H, et al. (2016). Effects of K-877, a novel selective PPARalpha modulator (SPPARMalpha), in dyslipidaemic patients: A randomized, double blind, active- and placebo-controlled, phase 2 trial. *Atherosclerosis* 249:36-43.

Jamei M, Marciniak S, Feng K, et al. (2009). The Simcyp population-based ADME simulator. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 5:211-23.

Japanese Ministry of Health, Labour and Welfare. (2018). Guideline on drug interaction for drug development and appropriate provision of information.

Japanese Pharmaceuticals and Medical Devices Agency. Parmodia® (pemafibrate tablet 0.1 mg): Japanese prescribing information. 2018. <http://www.pmda.go.jp/>. [Accessed 2 March 2020].

Johnson TN, Boussery K, Rowland-Yeo K, et al. (2010). A semi-mechanistic model to predict the effects of liver cirrhosis on drug clearance. *Clin Pharmacokinet* 49:189-206.

Kamimura H, Ito S, Chijiwa H, et al. (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* 47:382-93.

Kamiya Y, Otsuka S, Miura T, Takaku H, Yamada R, Nakazato M, et al. (2019). Plasma and hepatic concentrations of chemicals after virtual oral administrations extrapolated using rat plasma data and simple physiologically based pharmacokinetic models. *Chem Res Toxicol* 32:211-8.

Kim SJ, Lee KR, Miyauchi S, Sugiyama Y. (2019). Extrapolation of in vivo hepatic

clearance from in vitro uptake clearance by suspended human hepatocytes for anionic drugs with high binding to human albumin: improvement of in vitro-to-in vivo extrapolation by considering the “albumin-mediated” hepatic uptake mechanism on the basis of the “facilitated-dissociation model”. *Drug Metab Dispos* 47:94-103.

Li R, Barton HA, Maurer TS. (2015). A mechanistic pharmacokinetic model for liver transporter substrates under liver cirrhosis conditions. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol* 4:338-49.

Lin W, Ji T, Einolf H, et al. (2017). Evaluation of drug–drug interaction potential between sacubitril/valsartan (LCZ696) and statins using a physiologically based pharmacokinetic model. *J Pharm Sci* 106:1439-51.

Miyamoto M, Iwasaki S, Chisaki I, et al. (2017). Comparison of predictability for human pharmacokinetics parameters among monkeys, rats, and chimeric mice with humanised liver. *Xenobiotica* 47:1052-63.

Mogi M, Abe S, Hayashi T, et al. (1995). Studies on the metabolic fate of fenofibrate (5) – metabolism in rats and dogs. *Jpn Pharmacol Ther* 23:s1157-68.

Neuhoff S, Ungell AL, Zamora I, Artursson P. (2005). pH-Dependent passive and active transport of acidic drugs across Caco-2 cell monolayers. *Eur J Pharmaceut Sci* 25:211-20.

Neuhoff S, Yeo KR, Barter Z, Jamei M, Turner DB, Rostami-Hodjegan A. (2013). Application of permeability-limited physiologically-based pharmacokinetic models: part II prediction of P-glycoprotein mediated drug-drug interactions with digoxin. *J Pharmaceut Sci* 102:3161-73.

Niemi M, Pasanen MK, Neuvonen PJ. (2011). Organic anion transporting polypeptide 1B1: a genetically polymorphic transporter of major importance for hepatic drug uptake. *Pharmacol Rev* 63:157-81.

Parmentier Y, Pothier C, Hewitt N, et al. (2019). Direct and quantitative evaluation of the major human CYP contribution (fmCYP) to drug clearance using the in vitro Silensomes™ model. *Xenobiotica* 49:22-35.

Raza-Iqbal S, Tanaka T, Anai M, et al. (2015). Transcriptome analysis of K-877 (a novel selective PPARα modulator (SPPARMalphα))-regulated genes in primary human hepatocytes and the mouse liver. *J Atheroscler Thromb* 22:754-72.

Rowland Yeo K, Aarabi M, Jamei M, Rostami-Hodjegan A. (2011). Modeling and predicting drug pharmacokinetics in patients with renal impairment. *Expert Rev Clin Pharmacol* 4:261-74.

Salphati L, Chu X, Chen L, et al. (2014). Evaluation of organic anion transporting polypeptide 1B1 and 1B3 humanized mice as a translational model to study the pharmacokinetics of statins. *Drug Metab Dispos* 42:1301-13.

Shen H, Yang Z, Mintier G, et al. (2013). Cynomolgus monkey as a potential model to assess drug interactions involving hepatic organic anion transporting polypeptides: in vitro, in vivo, and in vitro-to-in vivo extrapolation. *J Pharmacol Exp Ther* 344:673-85.

Takahashi T, Ohtsuka T, Yoshikawa T, Takekawa I, Uno Y, Utoh M, et al. (2013). Pitavastatin as an in vivo probe for studying hepatic organic anion transporting polypeptide-mediated drug-drug interactions in cynomolgus monkey. *Drug Metab Dispos* 41:1875-82.

Takahashi T, Uno Y, Yamazaki H, Kume T. (2019). Functional characterization for polymorphic organic anion transporting polypeptides (OATP/SLCO1B1, 1B3, 2B1) of monkeys recombinantly expressed with various OATP probes. *Biopharm Drug Dispos* 40:62-9.

Tornio A, Filppula AM, Niemi M, Backman JT. (2019). Clinical studies on drug-drug interactions involving metabolism and transport: methodology, pitfalls, and interpretation. *Clin Pharmacol Ther* 105:1345-61.

Treiber A, Schneider R, Hausler S, Stieger B. (2007). Bosentan is a substrate of human OATP1B1 and OATP1B3: inhibition of hepatic uptake as the common mechanism of its interactions with cyclosporin A, rifampicin, and sildenafil. *Drug Metab Dispos* 35:1400-7.

Uno Y, Uehara S, Yamazaki H. (2018). Genetic polymorphisms of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes in cynomolgus and rhesus monkeys and common marmosets in preclinical studies for humans. *Biochem Pharmacol* 153:184-95.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (2020a). Guidance for Industry: In Vitro Drug Interaction Studies -Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions.

U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER). (2020b). Guidance for Industry: Safety Testing of Drug Metabolites.

Varma MVS, Bi YA, Lazzaro S, West M. (2019). Clopidogrel as a perpetrator of drug-drug interactions: a challenge for quantitative predictions? *Clin Pharmacol Ther* 105:1295-9.



Varma MV, Kimoto E, Scialis R, et al. (2017). Transporter-mediated hepatic uptake plays an important role in the pharmacokinetics and drug–drug interactions of montelukast. *Clin Pharmacol Ther* 101:406-15.

Weil A, Caldwell J and Strolin-Benedetti M. (1988). The metabolism and disposition of fenofibrate in rat, guinea pig, and dog. *Drug Metab Dispos* 16:302-9.

Weil A, Caldwell J and Strolin-Benedetti M. (1990). The metabolism and disposition of 14C-fenofibrate in human volunteers. *Drug Metab Dispos* 18:115-20.

Xia CQ, Liu N, Miwa GT, Gan L-S. (2007). Interactions of cyclosporin A with breast cancer resistance protein. *Drug Metab Dispos* 35:576-82.

Yamazaki H, Suemizu H, Mitsui M, Shimizu M, Guengerich FP. (2016). Combining chimeric mice with humanized liver, mass spectrometry, and physiologically-based pharmacokinetic modeling in toxicology. *Chem Res Toxicol* 29:1903-11.

Yu H, Balani SK, Chen W, Cui D, He L, Humphreys WG, et al. (2015). Contribution of metabolites to P450 inhibition-based drug-drug interactions: scholarship from the drug metabolism leadership group of the innovation and quality consortium metabolite group. *Drug Metab Dispos* 43:620-30.

Yu J, Zhou Z, Tay-Sontheimer J, Levy RH, Ragueneau-Majlessi I. (2018). Risk of clinically relevant pharmacokinetic-based drug-drug interactions with drugs approved by the U.S. Food and drug administration between 2013 and 2016. *Drug Metab Dispos* 46:835-45.