

Discovery Drug Disposition & Analysis

試験メニュー

ADME Screening

▶ ADME Screening

- ・純度測定
- ・溶解度
- ・log D
- ・PAMPA
- ・MDR1基質スクリーニング(膜透過性)
- ・代謝安定性
- ・CYP阻害
- ・CYP3A time-dependent inhibition (TDI)
- ・CYP誘導
- ・血漿タンパク結合
- ・カセットドージング(げっ歯類)

Discovery DMPK Studies

▶ Bioanalysis (測定法設定および生体試料分析)

▶ In vitro試験

- ・CYP phenotyping試験
- ・CYP3A time-dependent inhibition (TDI)
- ・CYP誘導
- ・Non-CYP代謝試験
- ・肝細胞代謝クリアランス
- ・代謝物構造解析試験 (in vitro / in vivo)
- ・血球移行性試験
- ・各種トランスポーター発現細胞を用いた基質特異性試験
- ・各種トランスポーター発現細胞を用いた阻害試験
- ・血漿タンパク結合
- ・皮膚透過性試験
- ・GSH/CN トラッピング試験

▶ 各動物種を用いた薬物動態試験

- ・血漿中動態、カセットドージング(大動物)
- ・組織分布、尿・胆汁排泄
- ・非経口投与(経皮、経鼻、経肺、舌下、直腸など)

▶ 化合物最適化・トランスレーショナル研究

- ・構造動態特性相関
- ・DDIリスク評価
- ・ヒトPK・有効濃度・有効量予測
- ・PK/PD/E解析、TK/TD解析、modelling & simulation (Leiden Advanced PK/PD社提携)



<https://lapp.nl/>

Physicochemistry and Preformulation Studies

▶ 物性プロファイリング

- ・純度
- ・結晶形・結晶性
- ・熱特性
- ・吸湿性
- ・粒子径
- ・溶解性 など

▶ 開発形選択

- ▶ 動物実験用投与処方検討
- ▶ 安定性(固体・溶液・投与処方)

試験概要

ADME Screening

▶ 純度測定(化合物QC)

試験概要: 化合物のDMSO溶液を希釈後、質量分析計、多波長UV/Vis検出器、Corona荷電化粒子検出器を備えたHPLCを用いて分析する。

報告値: 純度(%), 質量分析計で得られたm/z

▶ 溶解度

試験概要: 化合物のDMSO溶液を評価溶媒に添加し、インキュベーション後、フィルターろ過して得られたろ液の濃度を吸光プレートリーダーまたはHPLCにより定量する。

報告値: 溶解度($\mu\text{g/mL}$)

▶ log D

試験概要: 評価化合物をHPLC分析して得られた保持時間を既知化合物の保持時間から得られる検量線と比較し、logD値を算出する。

報告値: logD

▶ PAMPA

試験概要: メンブレンフィルター上に調製した人工膜に化合物を透過させ、フィルターの両側の化合物量をLC/MS/MSで測定する。

報告値: 膜透過速度(nm/sec)

▶ MDR1基質スクリーニング(膜透過性)

試験概要: ヒトMDR1を発現させた細胞*を培養したフィルタープレートのApical側およびBasolateral側に化合物を添加して、インキュベーション後の化合物濃度をLC/MS/MSにより測定する。

報告値: 排出比、膜透過速度(nm/sec)

*: 米国National Institutes of Healthよりライセンス供与されたMDCK-MDR1細胞を使用

▶ 代謝安定性

試験概要: 肝ミクロソーム(NADPH添加)に化合物を加えて、37°Cインキュベーション後の化合物をHPLCあるいはLC/MS/MSで測定し、化合物の消失速度を評価する。

報告値: 代謝クリアランス($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$)

▶ CYP阻害

試験概要: ヒト肝ミクロソーム(NADPH添加)にCYP分子種の標準基質および化合物を加え、37°Cインキュベーション後の標準基質の代謝物をLC/MS/MSで測定する。化合物を添加した時の標準基質の代謝活性の阻害率を評価する。

報告値: % inhibition

▶ CYP3A time-dependent inhibition(TDI)

試験概要: ヒト肝ミクロソーム(NADPH添加)に化合物を添加し、37°Cインキュベーション前後のCYP3A活性を評価する。CYP3A活性は標準基質の代謝物をLC/MS/MSで測定し、化合物を添加した時のCYP3A活性の残存率を求める。

報告値: % remaining

▶ CYP誘導

試験概要: HepaRG細胞の培地に化合物を添加して培養した後、HepaRG細胞のCYP3A活性を標準基質の代謝物生成により評価する。化合物を添加した時のCYP3A活性の誘導率を求める。

報告値: % of rifampicin

▶ 血漿タンパク結合

試験概要: 平衡透析膜で区切られた緩衝液と化合物を添加した血漿をインキュベーションし、インキュベーション後の膜の両側の試料中の化合物をLC/MS/MSで測定し、血漿中タンパク結合率を評価する。

報告値: 非結合分率

▶ カセットドージング(げっ歯類)

試験概要: ラットまたはマウスに化合物を静脈内または経口投与し、経時的にサンプリングした血漿中濃度をLC/MS/MSで定量する。

報告値: PKパラメータ(AUCiv, MRTiv, Vdss, CLtotal, Cmax, Tmax, AUCpo, MRTpo, BA)、各時点での濃度(ng/mL)

試験概要

Discovery DMPK Studies

▶ Bioanalysis (測定法設定および生体試料分析)

試験概要: 試料を適切に前処理し、試料中の薬物濃度をLC/MS/MSで測定する。探索レベルでのPK/PD試験のための動物の生体試料中薬物濃度測定を主目的とし、弊社内のジェネリック分析法を第一選択とした迅速な薬物濃度測定が可能。

報告値: 薬物濃度

▶ CYP phenotyping試験

試験概要: CYP発現ミクロソーム(NADPH添加)に化合物を加えて、37°Cインキュベーション後の化合物をHPLCあるいはLC/MS/MSで測定し、化合物の代謝に寄与するCYP分子種を評価する。

報告値: 化合物残存率あるいは代謝クリアランス ($\mu\text{L/h/pmol P450}$)

▶ Non-CYP代謝試験

試験概要: CYP以外の薬物代謝酵素による代謝を評価するため、適切な生体試料に化合物を加えて、37°Cインキュベーション後の化合物をHPLCあるいはLC/MS/MSで測定し、化合物の消失を評価する。

報告値: 化合物残存率あるいは代謝クリアランス ($\mu\text{L/h/mg}$ or 10^6 viable cells)

▶ 肝細胞代謝クリアランス

試験概要: 肝細胞に化合物を加えて、37°Cインキュベーション後の化合物をHPLCあるいはLC/MS/MSで測定し、化合物の消失速度を評価する。

報告値: 化合物残存率あるいは代謝クリアランス ($\mu\text{L/h}/10^6$ viable cells)

▶ 代謝物構造解析試験 (in vitro/in vivo)

試験概要: in vitroでの代謝反応後の試料あるいはin vivo試験で得られた血漿・組織試料中の代謝物について構造解析を実施する。

報告値: (推定)代謝物構造、代謝物のUVピーク値

▶ 血球移行性試験

試験概要: 血液に化合物を添加して、血球・血漿中の化合物の分布割合を評価する。

報告値: R_B 値

▶ 各種トランスポーター発現細胞を用いた基質特異性試験

試験概要: トランスポーター発現細胞を培養したプレートあるいはフィルタープレート上に化合物を添加して、インキュベーション後の化合物濃度をLC/MS/MSにより測定する。

トランスポーター: OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、OCT2、MDR1、BCRP

報告値: 取り込みクリアランス ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)、mockとのクリアランス比、排出比、膜透過速度 (nm/sec)

▶ 各種トランスポーター発現細胞を用いた阻害試験

試験概要: トランスポーター発現細胞を培養したプレートあるいはフィルタープレート上に基質および化合物を添加して、インキュベーション後の基質濃度をLC/MS/MSにより測定する。

トランスポーター: OATP1B1、OATP1B3、OATP2B1、OAT1、OAT3、OCT2、MDR1、BCRP

報告値: 取り込みクリアランス ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$)、mockとのクリアランス比、排出比、膜透過速度 (nm/sec)、阻害率

▶ 皮膚透過性試験

試験概要: 表皮角化細胞を培養したフィルター上あるいは摘出皮膚上に化合物を添加して、インキュベーション後に透過した化合物濃度をLC/MS/MSにより測定する。

報告値: 膜透過速度 (nm/sec、 $\mu\text{g}/\text{h}/\text{cm}^2$)

▶ GSH/CNトラッピング試験

試験概要: 肝ミクロソームでの代謝試験時に生成される反応性代謝物・中間体をとらッピング試薬(シアン、(ダンシル)グルタチオン)を用いて捕捉する。

報告値: トラップ体生成の有無、トラップ体の推定構造

試験概要

▶ 各動物種を用いた薬物動態試験

動物種: マウス、ラット、イヌ、サル、ブタ
投与経路: 経口、静脈、腹腔、筋肉、十二指腸、皮下、舌下、
経鼻、経肺、経皮、直腸

評価項目:

- ・化合物の体内動態評価
- ・各種製剤評価(液体、粉末、パッチなど)
- ・各種組織採取(脳、CSF、消化管、肝、腎臓など)、脳分画
- ・脳マイクロダイアリシス
- ・小腸ループおよび灌流(腸間膜静脈採血可)
- ・門脈血および全身循環血同時採取法(P-S difference法)
- ・覚醒下定速静注試験
- ・覚醒下胆汁排泄試験
- ・浸透圧ポンプもしくは皮下留置カテーテルを用いた皮下持続投与試験

Physicochemistry and Preformulation Studies

▶ 物性プロファイリング

純度

試験概要: 化合物を希釈後、多波長UV/Vis検出器を備えたHPLCを用いて分析する。

報告値: 純度(%)

結晶形・結晶性

試験概要: 粉末X線回折装置によりスペクトルを取得し、Hermans法により結晶化度を算出する。

報告値: 回折スペクトル、結晶化度(%)

熱特性

試験概要: 示差走査熱量計により吸発熱のプロファイルを調べると共に融点を算出する。また、熱天秤により、加温時の重量増減を調べる。

報告値: 融解エンタルピー、融点(°C)、重量増減など

吸湿性

試験概要: 動的水分吸着測定装置を用いて種々の湿度環境下での重量増減を測定する。

報告値: 吸湿プロファイル

粒子径

試験概要: レーザ回折型粒度分布装置を用いて原薬および投与懸濁液の粒度分布を測定する。

報告値: 粒度分布、粒子径(μm)

溶解性

試験概要: 原薬に溶解溶媒を添加し、攪拌後、ろ液の濃度をHPLCで測定する(Thermodynamic solubility)。

報告値: 溶解度($\mu\text{g/mL}$)

▶ 開発形選択

試験概要: プロファイリングの結果から、開発に適した結晶形を選択する。

▶ 動物実験用投与処方検討

試験概要: 血中曝露改善のための可溶化処方や非経口投与での処方検討を行う。

▶ 安定性(固体・溶液・投与処方)

試験概要: 固体状態、溶液状態、投与処方(溶液、懸濁液など)を一定温湿度下で保存し、経時的な分解の有無を確認する。