

# 学位論文

## 新規 TRH 類縁体であるロバチレリンの 体内動態に関する研究

2021 年 3 月

小林 薫

# 目次

略号	4
序論	8
第 1 章 非臨床におけるロバチレリンの薬物動態	13
1.1 緒言	13
1.2 材料及び方法	15
1.2.1 試薬	15
1.2.2 動物及び生体試料	16
1.2.3 ラット及びイヌにおける血中動態	17
1.2.4 ラット及びイヌにおける排泄及び代謝物プロファイル	17
1.2.5 ラット及びイヌ試料における放射能の測定	18
1.2.6 血漿中ロバチレリン濃度測定	19
1.2.7 薬物動態パラメータの算出	19
1.2.8 血漿タンパク結合率及び血球移行率	20
1.2.9 ラットにおける臓器及び組織分布	20
1.2.10 ロバチレリン及びタルチレリンの脳への移行性	21
1.2.11 ラット生体試料における安定性	22
1.2.12 肝細胞における <i>in vitro</i> 代謝物プロファイル	23
1.2.13 生体試料における代謝物プロファイル	23
1.2.14 LC-MS/MS を用いた <i>in vitro</i> 及びイヌ生体試料の代謝物プロファイル	23
1.2.15 LC-MS/MS を用いたラット生体試料の代謝物プロファイル	24
1.2.16 HPLC-マイクロシンチレーションを用いた血漿中の高極性未知代謝物の 検索	24
1.3 結果	25
1.3.1 ラット及びイヌにおける薬物動態	25
1.3.2 動物及びヒトの血漿タンパク結合率、血液/血漿中濃度比及び血球移行率	26
1.3.3 ラットに反復投与したときの臓器及び組織分布	27
1.3.4 ラット脳組織へのロバチレリン及びタルチレリンの移行性	29
1.3.5 ラット血漿及び脳ホモジェネートにおける安定性	30
1.3.6 ラット、イヌ及びヒト肝細胞における <i>in vitro</i> 代謝	30
1.3.7 血漿におけるロバチレリンの代謝物プロファイル	32
1.3.8 胆汁、尿及び糞におけるロバチレリンの代謝物プロファイル	34
1.3.9 ラット及びイヌにおけるマスバランス	36
1.4 考察	37
第 2 章 臨床におけるロバチレリンの薬物動態	42
2.1 緒言	42
2.2 材料及び方法	44
2.2.1 試薬等	44
2.2.2 投与液の調製	45

2.2.3	試験デザイン	46
2.2.4	安全性評価	48
2.2.5	試料採取	48
2.2.6	試料の放射能測定	49
2.2.7	血漿及び尿中ロバチレリン及び TAMP 濃度測定	49
2.2.8	薬物動態パラメータの算出	50
2.2.9	代謝物プロファイル用試料の調製	51
2.2.10	血漿、尿及び糞中代謝物プロファイル試験の HPLC 分析条件	52
2.2.11	ロバチレリン及び代謝物同定に用いた LC-MS (MS <sup>n</sup> ) 分析条件	53
2.2.12	ヒト肝試料及び組換えヒト CYP を用いた TAMP 生成反応	53
2.3	結果	54
2.3.1	ヒトマスバランス試験における安全性評価	54
2.3.2	ロバチレリン、TAMP 及び放射能の血中動態	55
2.3.3	放射能、ロバチレリン及び TAMP の排泄量及び回収率	57
2.3.4	血漿、尿及び糞試料の代謝物プロファイル	58
2.3.5	LC-MS (MS <sup>n</sup> ) による血漿、尿及び糞試料の代謝物分析	61
2.3.6	<i>In vitro</i> 試験による TAMP 及び未知代謝物の生成に関与する代謝酵素の同定	64
2.4	考察	66
第 3 章	臨床におけるロバチレリンの薬物相互作用	71
3.1	緒言	71
3.2	材料及び方法	73
3.2.1	倫理	73
3.2.2	試験デザイン	73
3.2.3	安全性評価	75
3.2.4	試料採取及び内分泌学的検査	75
3.2.5	血漿及び尿中ロバチレリン及び TAMP 濃度測定	76
3.2.6	薬物動態パラメータの算出	77
3.2.7	統計解析	77
3.2.8	Caco-2 細胞単層膜を用いた P-gp 及び BCRP への基質性	77
3.3	結果	79
3.3.1	ロバチレリン及び TAMP の薬物動態	79
3.3.2	内分泌学的特性	82
3.3.3	安全性評価	83
3.3.4	P-gp 及び BCRP に対する基質性評価	84
3.4	考察	85
第 4 章	総括	89
	謝辞	92
	参考文献	93

## 略号

$[^3\text{H}]$	Tritium labeled トリチウム標識
$[^{14}\text{C}]$	Carbon 14 labeled 炭素 14 標識
ALDH	Aldehyde dehydrogenase アルデヒド脱水素酵素
AUC	Area under the concentration-time curve 血漿中濃度-時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein 乳がん耐性タンパク質
BMI	Body mass index ボディマス指数
$\text{CL}_{\text{tot}}$	Total clearance 全身クリアランス
$\text{CL}/\text{F}$	Oral clearance 経口クリアランス
$\text{CL}_R$	Renal clearance 腎排泄クリアランス
$C_{\text{max}}$	Maximum plasma concentration 最大血漿中濃度
CYP	Cytochrome P450 シトクロム P450
DDI	Drug-drug interaction 薬物相互作用
EMA	European medicines agency 欧州医薬品庁

$F_a$	Fraction of absorption 吸収率
$FT_3$	Free triiodothyronine トリヨードサイロニン (遊離トリヨードサイロニン)
$FT_4$	Free thyroxine サイロキシシン (遊離サイロキシシン)
FDA	US Food and drug administration 米国食品医薬品局
$f_e$	Fraction of dose excreted 投与量に対する累積排泄率
$f_m$	Fraction of metabolism 代謝寄与率
GCP	Good clinical practice 医薬品の臨床試験の実施基準
GLP	Good laboratory practice 医薬品の安全性試験の実施に関する基準
HLM	Human liver microsomes ヒト肝ミクロソーム
HPLC	High performance liquid chromatography 高速液体クロマトグラフィー
ICH	International council for harmonization of technical requirements for pharmaceuticals for human use 医薬品規制調和国際会議
LC-MS/MS	Liquid chromatography tandem mass spectrometry 液体クロマトグラフィータンデム型質量分析法
MATE	Multidrug and toxin extrusion 多剤及び毒素排出

MRM	Multiple reaction monitoring 多重反応モニタリング
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide oxidized form 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamide adenine dinucleotide oxidized form 酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form 還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸
OAT	Organic anion transporter 有機アニオントランスポーター
OATP	Organic anion transporting polypeptide 有機アニオン輸送ポリペプチド
OCT	Organic cation transporter 有機カチオントランスポーター
PAP	Pyroglutamate amino peptidase ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ
PBS	Phosphate buffered saline リン酸緩衝生理食塩水
P-gp	P-glycoprotein P-糖タンパク質
PRL	Prolactin プロラクチン
QWBA	Quantitative whole-body autoradiography 定量的全身オートラジオグラフィ
R <sub>b</sub>	Blood to plasma ratio 血液/血漿中濃度比
RI	Radioisotope 放射性同位元素

SCD	Spinocerebellar degeneration 脊髄小脳変性症
$t_{1/2}$	Elimination half-life 消失半減期
$t_{max}$	Time of $C_{max}$ 最大血漿中濃度到達時間
TRH	Thyrotropin-releasing hormone 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン
TRHR	TRH receptor TRH 受容体
TSH	thyroid-stimulating hormone 甲状腺刺激ホルモン
$V_{ss}$	Volume of distribution at steady-state 定常状態における分布容積
$V_z/F$	Volume of distribution during the terminal phase 消失相における分布容積

## 序論

甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) は、ピログルタミン酸、ヒスチジン及びプロリンの 3 つのアミノ酸残基から成り、C 末端がアミド化されたペプチドホルモンである。TRH は、ヒツジ又はブタの視床下部組織から単離精製され、視床下部から放出されるホルモンであることが明らかとなった (Guillemin 1987; Schally 1978)。また、TRH は中枢神経 (大脳皮質、脳室周辺、下垂体後葉、松果体及び脊髄) 及び神経終末に局在することから、視床下部の外部で神経伝達物質又は神経調節物質として作用していると考えられる (Morley 1979)。TRH は G タンパク質共役 TRH 受容体 (TRHR) に結合し (Yamada et al., 1993)、最終的に甲状腺刺激ホルモン (TSH) 及びプロラクチンの分泌を制御する。これらの内分泌機能に加えて、TRH は脳神経活性化 (運動機能の刺激)、脊髄機能への影響 (脊髄運動ニューロンの刺激) 及び中枢神経系への影響 (抗うつ薬活性) を含む中枢作用も有している (Daimon et al., 2013; Khomane et al., 2011)。TRH の中枢作用の機序については、未解明な部分があるものの、TRH は大脳皮質、大脳辺縁系、小脳及び脊髄などの中枢神経系に広く作用し、ドパミン、アセチルコリン、ノルアドレナリン及びセロトニンなどの神経伝達物質を介して賦活作用を示すと考えられる (Griffiths, 1987; Horita, 1986; Horita, 1998; O'Leary & O'Connor, 1995)。

脊髄小脳変性症 (SCD) は、小脳や脊髄の神経核や伝導路に病変の主座を持ち、進行性の小脳性運動失調を主徴とする神経変性疾患の 1 つであり、神経難病として特定疾患に指定されている。SCD は若年から高齢に至るまで幅広い年齢層で発症し、SCD 患者は日本国内で 3 万人を超えると推定されるが、SCD は希少疾患の範疇に入り頻度が高い疾患ではない。SCD には、臨床症状、病理又は原因が異なる幾つかの病型が含まれ、孤発性 SCD と遺伝性 SCD に大別される。孤発性の SCD が全体の約 2/3 を占め、遺伝性 SCD が約 1/3 を占める。孤発性 SCD では、約 2/3 が多系統萎縮症 (Multiple system atrophy: MSA) と診断され、小脳症状、パーキンソン症状及び自律神経症状を呈する。残りの約 1/3 は皮質性小脳萎縮症 (Cortical cerebellar atrophy: CCA) に分類されるが、単一疾患ではなく遺伝性のものである。遺伝性 SCD においては、これまでに 50 以上の原因遺伝子が特定されて



おり、ポリグルタミン病を中心にその病態解明は進んでいる。SCD 患者は、眼振、構音障害、筋トーン低下、測定障害、運動分解、リズム異常、企図振戦、体幹失調及び歩行障害などの運動失調症状を示す。SCD は、近年の基礎研究によりその病因が解明されつつあるものの、未だに根治療法はなく、諸症状に対する対症療法が行われているのが現状である。SCD に伴う運動失調は、患者の日常生活動作 (Activities of daily living: ADL) と生活の質 (Quality of life: QOL) を著しく低下させるだけでなく、患者家族の介護負担を増大させることから、SCD の治療において運動失調を改善させる意義は大きいと考えられる。運動失調の対象療法としては、薬物療法とリハビリテーションが中心となる。

TRH が SCD 治療に有効であることがこれまで臨床において示されているため (Sobue et al., 1983)、現在の薬物療法として、プロチレリン酒石酸塩水和物 (合成 TRH) 及びタルチレリン水和物 (TRH 類縁体) のみが日本において保険適用され、SCD 患者に処方されている。プロチレリンは、代謝されやすいために血漿半減期が短いこと (4~5 分)、中枢移行性が低いこと及びバイオアベイラビリティが低いこと (2.0%) から、静脈内又は筋肉内注射で投与される (Bassiri & Utiger, 1973; Griffiths, 1976; Khomane et al., 2011; Kinoshita et al., 1998; Yokohama et al., 1984)。また、用法及び用量に関する欠点として、プロチレリンを成人に対し 1 日 1 回 0.5~2 mg を 2~3 週間連日注射し、休薬期間をおいた後、改めて反復投与するか週 2~3 回間欠投与するため、患者は頻繁に通院する必要があることが挙げられる。これらの欠点を改善したタルチレリンでは、5 mg 錠を 1 日 2 回朝と夕食後に投与する経口剤として臨床使用されている (Kinoshita et al., 1998)。運動失調に対してこれら両薬剤以外には有効性を示す治療薬はなく、両薬剤よりも中枢作用や効果持続性が改善された経口投与可能な TRH 類縁体の早期開発が切望されている。タルチレリンと同様に、バイオアベイラビリティ及び代謝安定性の向上と内分泌作用の低減を試みた類縁体 (アゼチレリン、モンチレリン及びポサチレリン等) が知られるが (Khomane et al., 2011)、開発は中止されている。

ロバチレリン ((4S,5S)-5-メチル-N-{(2S)-1-[(2R)-2-メチルピロリジン-1-イル]-1-オキソ-3-(1,3-チアゾール-4-イル)プロパン-2-イル}-2-オキソ-1,3-オキサゾリジン-4-

カルボキサミド) 水和物は新規 TRH 類縁体として創製され (Kobayashi et al., 2018; Kobayashi et al., 2019)、これまでに非臨床試験及び臨床試験を実施し、経口投与可能な SCD 治療薬として、神経変性疾患に伴う運動失調に対する改善効果が期待されている。健康な成人男性を対象とした第 I 相臨床試験では、ロバチレリンは単回投与において投与量 0.1~10 mg の範囲で線形な薬物動態を示し、1 日 1 回の経口投与が期待できる良好な安全性プロファイルを示した (Shimizu et al., 2018)。さらに、SCD 患者を対象としたロバチレリンの有効性と安全性を評価する第 II 相及び第 III 相臨床試験結果から、ロバチレリンの用量として 1.6 から 3.2 mg/日までが 1 日 1 回の経口剤として有効性と安全性を担保できる投与量であると考えられている (Nishizawa et al., 2020; Shimizu et al., 2018)。非臨床試験においては、ヒト TRHR 発現細胞の膜画分を使用した TRH アナログを基質とする受容体結合試験で、タルチレリン ( $K_i = 3880 \text{ nmol/L}$ ) よりも、ロバチレリンは TRHR に対して高い親和性を示した ( $K_i = 702 \text{ nmol/L}$ )。ラットにおいては、ロバチレリンは内側前頭前野のノルアドレナリンレベルを増加させ、タルチレリンと比較しラットの自発運動を亢進した (Ijiro et al., 2015)。また、遺伝性運動失調モデルマウスであるローリングマウスナゴヤを用いた薬理試験において、ロバチレリンは用量依存的にローリングマウスナゴヤの転倒指数を低下させ、その効果はタルチレリンよりも強力であった (Ijiro et al., 2020)。さらに、2 週間反復投与しても効果の低下は認められず、ロバチレリンによるローリングマウスナゴヤの転倒指数の低下は投与終了後 2 週間持続した。

薬物治療を効果的かつ安全に行うためには、新薬の研究開発過程 (非臨床試験、第 I、II 及び III 相試験) において用法及び用量を適切に確立する必要がある。適切な用法及び用量の確立には、薬物の主薬効 (薬理) 及び副作用 (安全性) を理解するだけでなく、薬物の生体内における動態 (薬物動態) を正しく知る必要がある。薬物動態を正しく知るとは、投与された薬物がどれくらい吸収され、どのように臓器及び組織へ分布し、代謝酵素により分解を受け、どれくらいの速さで体外へ排泄されるかを明らかとすることである。さらに、薬物治療において複数の薬物を安全に併用するためには、薬効の低減又は毒性発現に繋がる薬物相互作用

用 (DDI) が生じる可能性について薬物動態学的な素因をあらかじめ明確にすることが重要である。このような薬物動態の知見は、新薬の研究開発過程で実施される非臨床及び臨床薬物動態試験において詳細に明らかとされる。吸収に関しては、薬物の血中濃度推移から吸収量及び速度が推定される。分布においては、各種臓器及び組織への移行性、経時的変化並びに蓄積性が評価される。代謝については、主たる代謝物及び代謝経路が特定され、代謝の程度と速度が明らかにされる。また、ヒトでの代謝に関与する主たる代謝酵素が特定され、ヒトと動物の類似点と相違点の特徴が明らかとなる。そして、排泄の情報として、薬物とその主要代謝物の排泄経路及び排泄の程度と速度が収集される。薬物動態学的な DDI に関しては、主に薬物代謝酵素の阻害及び誘導能、並びに薬物トランスポーターの阻害能について、受ける側及び及ぼす側の両側面で評価される。特に、多くの薬物代謝に関与するシトクロム P450 については、この DDI の情報が収集される。これらの非臨床及び臨床薬物動態試験から得られた薬物動態の知見を、効力を裏付ける試験や毒性試験で得られた結果と関連づけてヒトへの外挿性を考察することは、非臨床薬理及び毒性試験結果の解釈を適切なものにするだけでなく、その後の臨床試験を適切かつ安全に実施する上で極めて有用な情報となる。

本研究では、新規 TRH 類縁体であるロバチレリンの薬物動態を明らかにすることを目的とし、第 1 章ではラット及びイヌを用いて非臨床における吸収、分布、代謝及び排泄を評価するとともに *in vitro* 試験においてヒトの血漿タンパク結合、血球移行性及び代謝物生成について検討し、吸収量/バイオアベイラビリティ、組織分布、代謝物の種差、代謝経路、マスバランス (物質収支) 及び排泄経路を明らかにした。また、既存薬であるタルチレリンの薬理作用、中枢移行性及び代謝安定性と比較し、代謝部位及び代謝酵素に関する違いを推察することによりロバチレリンの経口 SCD 治療薬としての可能性を評価した。第 2 章では、単回経口投与後の健康成人男性におけるロバチレリンの吸収、代謝及び排泄を評価し、ロバチレリンのヒトにおける吸収量/バイオアベイラビリティ、主要代謝物、代謝経路、マスバランス及び排泄経路を明らかにした。また、*in vitro* 試験においてヒトにおけるロバチレリンの主要代謝物生成酵素を特定した。そして、第 3 章では、

第 2 章の結果から CYP3A4/5 阻害薬との併用による DDI が懸念されたため、臨床 DDI 試験を実施し、ロバチレリンの体内動態に及ぼすイトラコナゾールの影響について評価した。さらに、*in vitro* 輸送試験を行うことで、ロバチレリンの体内動態に及ぼす排出トランスポーター（P-gp 及び BCRP）の影響について評価した。

# 第 1 章 非臨床におけるロバチレリンの薬物動態

## 1.1 緒言

TRH (pGlu-His-Pro-NH<sub>2</sub>) は生体内で速やかに代謝され、その半減期は 4~5 分である。TRH (pyroGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) の主要な代謝経路は、ヒスチジルプロリンアミドへの分解 (His-ProNH<sub>2</sub>)、プロリンアミドの加水分解 (pyroGlu-His-Pro) 及びヒスチジルプロリン結合の切断である (O'Leary & O'Connor, 1995)。ピログルタミン酸アミノペプチダーゼ (PAP) などの酵素は、脱アミノ化の前に His-ProNH<sub>2</sub> を生成する (Cummins & O'Connor, 1998)。TRH と同様な代謝機構が TRH 類縁体 (タルチレリン、モンチレリン及びポサチレリン) の代謝に関与している可能性があり、TRH 類縁体は PAP により代謝されると考えられている (Kodama et al., 1997; Matsunaga et al., 1996; Sugimoto et al., 1996)。PAP には 3 つのサブタイプ (チロリベリナーゼ、PAPI 及び PAPII) が、哺乳類の組織で確認されている。チロリベリナーゼは主に血液に局在し、PAPI 及び PAPII は主に下垂体と脳に分布する。PAP のこれら 3 つのサブタイプは、標的部位において TRH の存在量を制御し受容体への結合を調節していると考えられる。

TRH 類縁体の一つであるタルチレリンのラット及びイヌにおける体内動態が報告されている (Kodama et al., 1997)。単回経口投与時のラット及びイヌにおけるバイオアベイラビリティはそれぞれ 3.9% 及び 18.5% であり、未変化体の消失半減期はそれぞれ 1.6 及び 2.1 時間であった。ラット及びイヌの血漿タンパク結合率はいずれも 12% 以下と低かった。ラットに [<sup>14</sup>C]タルチレリンを単回経口投与したとき 30 分~3 時間で組織中放射能濃度は最高濃度に達し、肝臓、腎臓、脾臓、肺、血液及び皮膚で比較的高い濃度を示した。また、標的部位である大脳及び小脳における濃度は低く、その消失は遅かった。ラット及びイヌにおける血漿中及び尿中代謝物としてタルチレリンのアシド体 (プロリンアミドの脱アミノ化) 及びメチルジヒドロオロチン酸 (MDOA) が認められ、ラットとイヌの間で代謝に定性的な差は認められなかった。いずれの動物においても 48 時間以内に投与放射能の大部分が体外に排泄され、吸収された放射能の主な排泄経路は尿中排泄であった。健常成人におけるタルチレリンの薬物動態も報告されている (Kainuma et al.,

1997a; Kainuma et al., 1997b)。タルチレリン水和物 0.5~40 mg 錠を単回経口投与したときの血漿中タルチレリン濃度は投与後約 3 時間で最高濃度に達し、消失半減期は約 2 時間であった (Kainuma et al., 1997a)。また、 $C_{max}$  及び AUC は用量に比例して増加し、 $t_{max}$  及び消失半減期は投与量に依らずほぼ一定値を示したため、この投与量の範囲においてタルチレリンは線形の体内動態を示すと考えられている。反復経口投与によって蓄積性は認められなかった (Kainuma et al., 1997b)。また、経口投与後 24 時間までの累積尿中排泄量は、ほぼ投与量に比例し、反復投与期間を通じて投与量の 1~2% とほぼ一定であった。血漿及び尿中に代謝物としてアシンド体が認められ尿中排泄量は投与量の 1~2% であったが、一方 MDOA については検討されていない。タルチレリンの代謝に関与する酵素は、PAP 及びプロリルエンドペプチダーゼであると推定されている (セレジスト錠 5 mg. 医薬品インタビューフォーム, 2013)。

非臨床における薬物動態試験は、動物及び *in vitro* 試験結果から医薬品候補化合物の体内動態 (吸収、分布、代謝及び排泄) 及び薬物相互作用の可能性を明確にすることである (厚生省医薬安全局「非臨床薬物動態試験ガイドライン」1998)。体内動態に関するデータは、トキシコキネティクスのデータと併せて考察することにより、動物における毒性及び薬理試験結果を適切に評価することが可能になる。さらに、それらの結果を体内動態の種差を考慮して評価することにより、ヒトの体内動態を予測し、有効性及び安全性の考察に繋がる。また、併用される可能性のある薬物との相互作用を検討する上でも重要な情報となる。吸収、分布、代謝及び排泄については、一般に $[^3H]$ 又は $[^{14}C]$ のような放射性同位元素 (RI) で標識化した医薬品候補化合物を用いて検討される。RI 標識化合物を投与した場合には放射能を測定することにより投与化合物由来の体内動態を容易に確認することが可能であり、RI 標識化合物は血漿中放射能濃度推移、組織分布及び尿糞排泄の物質収支等を評価するために非常に有用である。また、放射能検出器付き HPLC 等を用いて RI 標識化合物由来の放射能を分析することにより、網羅的に代謝物の存在を確認することも可能である。

本章では、1)  $[^{14}C]$ 標識又は非標識のロバチレリンをラット及びイヌに経口投与

し、ロバチレリンの非臨床薬物動態プロファイルを明らかにすること、2) ラット及びイヌで生成されるロバチレリンの主な代謝物を推定すること、3) ラット、イヌ及びヒトの血液、血漿及び肝細胞を使用して *in vitro* におけるロバチレリンの血球移行性、血漿タンパク結合率及び代謝物プロファイルデータを取得し種差を評価すること、4) タルチレリンの非臨床薬物動態プロファイルと比較し、ロバチレリンの経口 SCD 薬物治療としての可能性を評価することを目的として、ロバチレリンの非臨床薬物動態プロファイルを明らかとした。

## 1.2 材料及び方法

### 1.2.1 試薬

[<sup>14</sup>C]ロバチレリン (Figure 1-1)、ロバチレリン水和物、ロバチレリン-*d*<sub>10</sub>、[<sup>14</sup>C]タルチレリン、及びタルチレリン水和物は、塩野義製薬株式会社から提供された。ロバチレリンの代謝物標準品：(チアゾイルアラニル)メチルピロリジン (TAMP) ジトルエンスルホネート、ロバチレリンアミノペンタン酸 (ロバチレリン-アシッド)、ロバチレリンアミノペンタノン (ロバチレリン-ケトン) 及びロバチレリンピロリジン (4S)-ヒドロキシ (ロバチレリン-水酸化体) はキッセイ薬品工業株式会社で合成された。3-(4-チアゾイル)-L-アラニン (TA) は渡辺化学工業株式会社から購入した。[<sup>14</sup>C]イヌリン、可溶化剤 Soluene-350、放射性二酸化炭素吸収剤 Carbo-Sorb E、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 用シンチレーションカクテル Ultima Flo-M 及びシンチレーションカクテル Hionic-Fluor、UltimaGold XR 及び PermafluorE+は、PerkinElmer Life and Analytical Sciences から購入した。使用した他のすべての試薬と溶媒は分析用であり、市販製品を購入した。

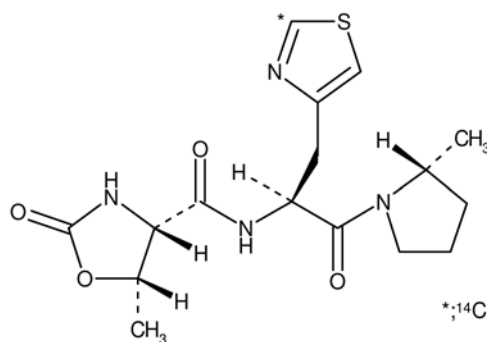


Figure 1-1 Structure of [<sup>14</sup>C]rovatirelin and the position of the <sup>14</sup>C label (\*)

### 1.2.2 動物及び生体試料

Sprague-Dawley ラット (7~8 週齢) は、日本チャールス・リバー株式会社及び日本クレア株式会社から、ビーグル犬 (8~10 ヶ月) はマーシャルバイオ・リソース・ジャパン株式会社から入手した。放射能の胆汁中排出を評価するために、ラットをエーテルで麻酔し、総胆管にポリエチレン管を挿入した (BDC ラット)。ラットは、温度 (20°C~25°C) 及び相対湿度 (45%~65%) が保たれた室内において 12 時間の明暗サイクルで飼育され、順化期間は 7 日間とした。ラットには市販の固形飼料 (CE-2、日本クレア) を与え、飲料水は自由摂取とした。イヌは、温度 (21°C~27°C) 及び相対湿度 (35%~75%) が保たれた室内において 12 時間の明暗サイクルで飼育され、順化期間は 11 日間とした。イヌには市販の固形飼料 (DS-A、オリエンタル酵母株式会社) を与え、飲料水は自由摂取とした。飼育期間中、所定量 (300 g/イヌ) の固形飼料がイヌに与えられ、残った餌はすべて廃棄した。

血球移行性を評価する試験では、ラット及びイヌの血液を、それぞれ雄ラット (8 週齢、日本クレア) 及び雄イヌ (15 ヶ月齢、北山ラベス) から採取した。ヒト血液は、日本人の健康成人男性 (27~49 歳) から採取した。血漿タンパク結合試験には、ラット及びイヌから採取しプールされた血漿を日本エスエルシー株式会社から購入し、プールされたヒト血漿は Biopredic International 社から購入した。凍



結保存されたラット、イヌ及びヒト肝細胞を、SEKISUI XenoTech. LLC から購入し、*in vitro* 代謝物プロファイル試験に用いた。

すべての動物試験は、キッセイ薬品工業株式会社又は試験実施施設の実験動物倫理委員会により審査され、承認された。ヒト試料を使用した *in vitro* 及び *ex vivo* の実験は、キッセイ薬品工業株式会社又は試験実施施設の研究倫理委員会により審査され、承認された。

### 1.2.3 ラット及びイヌにおける血中動態

経口投与液及び静脈内投与液はそれぞれ蒸留水及び生理食塩水を媒体とし、ロバチレリン水和物及び<sup>14</sup>C]ロバチレリンを溶解して調製した。なお、各投与液は必要に応じて、<sup>14</sup>C]ロバチレリン及びロバチレリン三水和物を混合して調製した。

絶食又は非絶食の雄ラット（体重：197～274 g）に、ロバチレリン又は<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 0.3、1、3 及び 10 mg/kg の投与量で胃内へ単回経口投与（投与容量：5 mL/kg）又は 1 mg/kg の投与量で尾静脈へ単回静脈内投与（投与容量：1 mL/kg）した。血液試料（0.25 mL）は、ヘパリン処理した注射器を用いて頸静脈から、投与後 0.033（静脈内投与試験のみ）、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48 及び 72 時間で採取した。

絶食又は非絶食の雄イヌ（体重：7.88～9.66 kg）に、ロバチレリン又は<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 0.1 mg/kg の投与量で胃内へ単回経口投与（投与容量：2 mL/kg）又は 0.1 mg/kg の投与量で左橈側皮静脈へ単回静脈内投与（投与容量：0.2 mL/kg）した。血液試料（4 mL）は、ヘパリン処理した注射器を用いて右橈側皮静脈から、投与後 0.083（静脈内投与試験のみ）、0.25、0.5、1、2、4、6、8、12、24、48 及び 72 時間に採取した。

採血後、血液を速やかに 4°C で遠心分離し、血漿を調製した。すべての血漿試料は、測定まで-20°C にて保管した。

### 1.2.4 ラット及びイヌにおける排泄及び代謝物プロファイル

排泄試験では、<sup>14</sup>C]ロバチレリンを、無処置及び胆管カニューレ（BDC）処置した雄ラットに 3 mg/kg の投与量で単回経口投与（投与容量：5 mL/kg）し、無処置のイヌには 0.1 mg/kg の投与量で単回経口投与（投与容量：2 mL/kg）した。無

処置ラットにおいて、尿及び糞試料は投与後 0～24、24～48、48～72、72～96、96～120、120～144 及び 144～168 時間に採取した。BDC ラットにおいて、胆汁試料は投与後 0～2、2～4、4～6、6～24 及び 24～48 時間に採取し、尿及び糞試料は投与後 0～24 及び 24～48 時間に採取した。無処置のイヌでは、尿試料は投与後 0～8、8～24、24～48、48～72、72～96、96～120、120～144 及び 144～168 時間で採取し、糞試料は投与後 0～24、24～48、48～72、72～96、96～120、120～144 及び 144～168 時間に採取した。すべての試料は、測定まで-20℃又は-30℃にて保管した。

ラットの代謝物プロファイル試験では、無処置及び BDC ラットに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 3 mg/kg の投与量で単回経口投与（投与容量：2 mL/kg）した。無処置ラットの腹部大静脈から投与後 1、4 及び 24 時間に血液を採取し、遠心分離により血漿を調製した。無処置ラットから、尿試料は投与後 0～6、6～24、24～48、48～72 及び 72～96 時間に採取し、糞試料は 0～24、24～48、48～72 及び 72～96 時間に採取した。BDC ラットから胆汁試料を投与後 0～6、6～24 及び 24～48 時間に採取した。すべての試料は測定まで-80℃にて保管した。

ラットの血漿中代謝物曝露量を評価するため、無処置の雄ラットに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 10 mg/kg の投与量で単回経口投与（投与容量：10 mL/kg）した。投与後 0.5、1、2、4、8、24 及び 48 時間に腹部大動脈から採血し、遠心分離により血漿を調製した。すべての血漿試料は、測定まで-20℃にて保管した。

イヌでは、血漿中濃度測定及び排泄試験で得られた血漿、尿及び糞試料を用いて代謝物プロファイルを確認した。すべての試料は、測定まで-20℃にて保管した。

### 1.2.5 ラット及びイヌ試料における放射能の測定

血漿及びイヌ尿試料は、シンチレーションカクテル Ultima Gold XR と混和し、測定試料とした。ラット尿、胆汁及び糞ホモジェネートは小さな紙製カップ中で乾燥させ、各試料をサンプルオキシダイザー System 307 又は 387 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) を用いた燃焼法により調製した。燃焼により生じた <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を放射性二酸化炭素吸収剤 Carbo-Sorb E に吸収させた後、シンチレーションカクテル Permafluor E+と混和し、測定試料とした。血漿、尿、胆汁及び糞試料の放射能は、液体シンチレーションカウンター TRI-CARB 3100TR (PerkinElmer Life and

Analytical Sciences) を用いて測定した。

### 1.2.6 血漿中ロバチレリン濃度測定

血漿試料中 (50  $\mu$ L) のロバチレリンを、OASIS HLB  $\mu$ Elution プレート (Waters) を用いて抽出し、最終媒体を蒸留水/アセトニトリル (70:30, v/v) として測定試料とした。血漿中ロバチレリン濃度は、ポジティブイオンモードでエレクトロスプレーイオン化を行う LC-MS/MS 法により測定した。HPLC による分離は、30°C に保温した Develosil C30-UG-5 カラム (長さ 150 mm  $\times$  内径 2 mm、粒子径 5  $\mu$ m、野村化学株式会社) を用いて行った。移動相として 65%の移動相 A (0.1%(v/v) 酢酸) 及び 35%の移動相 B (アセトニトリル) を用い、0.2 mL/min の流速でアイソクラティックに溶出した。多重反応モニタリング (MRM) により、ロバチレリンの質量電荷比 ( $m/z$  367 $\rightarrow$ 254) 及び内標準 (ロバチレリン- $d_{10}$ ) の質量電荷比 ( $m/z$  377 $\rightarrow$ 254) の遷移をモニターし、ロバチレリン濃度として算出した。ロバチレリンの検量線は、ラットの血漿では 0.1~100 ng/mL、イヌの血漿では 0.05~100 ng/mL の範囲で作成した。試料の測定前に、選択性、直線性、再現性 (真度及び精度) 及び安定性を確認し、この濃度測定法の信頼性について確認した。

### 1.2.7 薬物動態パラメータの算出

ロバチレリンの薬物動態パラメータは、WinNonlin バージョン 5.2 (Pharsight Corporation) を用いたノンコンパートメント解析により算出した。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は台形法によって算出し、消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は利用可能な最大数の濃度 (2 つ以上の非ゼロ濃度) の対数值から得られる線形回帰の傾きから算出した。また、無限大時間まで外挿した AUC ( $AUC_{inf}$ ) を算出した。最大血漿中濃度 ( $C_{max}$ ) と最大血漿中濃度到達時間 ( $t_{max}$ ) は観測値とした。バイオアベイラビリティは、経口投与時の  $AUC_{inf}$  を静脈内投与時の  $AUC_{inf}$  で除して算出した。また、放射能に対する未変化体の  $AUC_{inf}$  比は、未変化体の  $AUC_{inf}$  を放射能の  $AUC_{inf}$  で除して算出した。全身クリアランス ( $CL_{tot}$ ) は投与量を静脈内投与時の  $AUC_{inf}$  で除して算出し、定常状態における分布容積 ( $V_{ss}$ ) は  $CL_{tot}$  に無限大時間までの平均滞留時間 ( $MRT_{inf}$ ) を乗じて算出した。

### 1.2.8 血漿タンパク結合率及び血球移行率

ラット、イヌ及びヒト血漿（抗凝固剤はヘパリンナトリウムを使用）におけるロバチレリンの *in vitro* 血漿タンパク結合率は、限外濾過法により求めた（Wolfer & Rippon, 1987）。37°C で血漿を 5 分間プレインキュベートした後、血漿を<sup>[14C]</sup>ロバチレリン（10、100 及び 1000 ng/mL）とともに 37°C で 5 分間インキュベートした。次に、この血漿を限外ろ過装置 Centrifree YM-30（Merck Millipore）に添加し、37°C で 15 分間、1620 ×g で遠心することにより限外ろ過した。限外ろ過前の血漿及びろ液の放射能を、液体シンチレーションカウンター TRI-CARB 3100TR（PerkinElmer Life and Analytical Sciences）で測定した。ロバチレリンの血漿タンパク結合率は、次式により算出した。

$$\text{血漿タンパク結合率 (\%)} = 100 - [D]_F / [D]_T \times 100$$

ここで、 $[D]_F$ は限外濾過液中濃度、 $[D]_T$ は血漿中濃度である。

<sup>[14C]</sup>ロバチレリンの血球移行率を、ラット、イヌ及びヒト血液（抗凝固剤はヘパリンナトリウムを使用）を用いて求めた。血液を<sup>[14C]</sup>ロバチレリン（10、50 及び 250 ng/mL）とともに 37°C で 15 分間インキュベートし、この血液の一部を採取した。残りの血液を遠心分離して血漿を得た後、液体シンチレーションカウンター TRI-CARB 3100TR（PerkinElmer Life and Analytical Sciences）を用いて血液及び血漿中放射能を測定した。各血液試料の一部をヘマトクリット毛細管（テルモ株式会社）に充填し、ヘマトクリット遠心機 KH-1200S（久保田商事株式会社）を使用して 15000 ×g で 3 分間遠心分離した。その後、ヘマトクリット測定板を用いて、ヘマトクリット値（ $H_t$ ）を測定した。血液/血漿中濃度比（ $R_b$ ）及び血球移行率は、次式により算出した。

$$R_b = C_b / C_p$$

$$\text{血球移行率 (\%)} = [1 - C_p / C_b \times (100 - H_t / H_t)] \times 100$$

ここで、 $C_b$ は血液中濃度であり、 $C_p$ は血漿中濃度である。

### 1.2.9 ラットにおける臓器及び組織分布

定量的全身オートラジオグラフィ（QWBA）により、非絶食の雄ラットに<sup>[14C]</sup>ロバチレリンを 3 mg/kg の投与量で 1 日 1 回 21 日間反復経口投与したときの

放射能の臓器及び組織分布を評価した。動物（一匹／一時点）は、1、7 及び 14 日目の投与後 24 時間、並びに 21 日目の投与後 0.5、4、24、72、168 及び 336 時間に二酸化炭素を吸入させ安楽死させた。その後、動物の全身に 4% (w/v) カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液を塗布し、次にドライアイス／アセトンで凍結して凍結ブロックを作製した。ここで既知濃度（5 濃度）の $^{14}\text{C}$ ロバチレリンを添加した血液試料を、各凍結ブロックに包埋した。凍結したブロックは分析まで冷凍庫（ $-20^{\circ}\text{C}$ ）で保管した。ミクロトーム CM3600XP（Leica Microsystems AG Ltd.）を用いて、各凍結ブロックから適切な位置で全身の凍結切片（厚さ  $40\ \mu\text{m}$ ）を 9～15 枚採取した。凍結切片は凍結乾燥させ、イメージングプレート BAS-MS2025（富士フイルム株式会社）に 5 日間曝露した。投与した放射能に由来する画像は、バイオイメージングアナライザーBAS-1800II（富士フイルム株式会社）を用いて読み取り、各凍結切片のラジオルミノグラムを作製した。各ラジオルミノグラムを RLG 解析ソフトウェア Multi Gauge バージョン 3.2（富士フイルム株式会社）を用いて解析し、血液、臓器及び組織中の放射能濃度を測定した。統計解析ソフトウェア SPSS バージョン 11.5J（日本アイ・ビー・エム株式会社）を用いて、検量線を既知濃度の血液試料の放射能と設定濃度の線形回帰分析により作製した。血液、臓器及び組織中放射能濃度は、 $^{14}\text{C}$ ロバチレリン濃度（ng eq./g）として算出した。

#### 1.2.10 ロバチレリン及びタルチレリンの脳への移行性

絶食の雄ラットに $^{14}\text{C}$ ロバチレリン（1 mg/kg）、 $^{14}\text{C}$ タルチレリン（1 mg/kg）及び $^{14}\text{C}$ イヌリン（50  $\mu\text{Ci}/\text{kg}$ ）を静脈内投与した。投与後 5（イヌリン投与時のみ）又は 60 分において、イソフルラン麻酔下で腹部大動脈からの放血によりラットを安楽死させ、脳及び下垂体を速やかに採取した。血液の一部を、室温にて 1 分間 15000  $\times g$  で遠心分離し、血漿試料を調製した。採取した脳を生理食塩水で洗浄し、脳を皮質（左皮質及び右皮質）、小脳、下垂体、視床下部、海馬、線条体、間脳及び脳幹に分け、各部位の放射能を測定した。すべての試料を組織可溶化剤 Soluene-350 で可溶化後、試料を 30%過酸化水素水で脱色した。次に、試料をシンチレーションカクテル Hionic-Fluor と混和し、液体シンチレーションカウンターで放射能を

測定した。各脳領域の透過性表面積 (permeability-surface area: PS) の値は、次式により算出した。

$$PS \text{ (mL/min/g)} = (C_{\text{brain, 60 min}} - C_{\text{blood, 60 min}} \times \text{各脳領域の血液残存率}) / AUC_{0-60 \text{ min}}$$

ここで、 $C_{\text{brain, 60 min}}$  は投与後 60 分の脳組織中濃度、 $C_{\text{blood, 60 min}}$  は投与後 60 分の血液中濃度、並びに  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  は投与後 60 分までの血中濃度-時間曲線下面積である。各脳領域の血液残存率は、 $[^{14}\text{C}]$ イヌリンを静脈内投与したときの投与後 5 分における脳及び血液中放射能濃度から推定した (Ohno et al., 1978)。

ロバチレリン及びタルチレリンの PS 値の比較は、Prism 4.0 (GraphPad Software, Inc.) を用い、両側スチューデントの  $t$  検定又はウェルチの  $t$  検定により統計解析し、 $p < 0.05$  のとき統計学的有意差があると判断した。

#### 1.2.11 ラット生体試料における安定性

エーテル麻酔下で、非絶食のラットを全血採取で安楽死させ、大脳及び小脳を採取した。血漿は、血液を  $4^{\circ}\text{C}$  で 10 分間、 $1880 \times g$  で遠心分離し調製した。大脳及び小脳を、ガラステフロンホモジナイザーを用いてリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中で均質化した。大脳及び小脳ホモジェネートは、10% (w/v) ホモジェネートとして調製した。血漿及び脳ホモジェネート (2 mL) に  $10 \mu\text{mol/L}$   $[^{14}\text{C}]$ ロバチレリン又は  $[^{14}\text{C}]$ タルチレリンを添加し、 $37^{\circ}\text{C}$  で反応させた。反応開始前並びに反応開始後 0.25、0.5、1、2 及び 3 時間にこの試料の一部 ( $100 \mu\text{L}$ ) を採取し、3 容量のアセトニトリルを添加することにより反応を停止させた。その後、試料を 10 分間  $15000 \times g$  で遠心分離し、上清を窒素ガス気流下で蒸発乾固させた。残渣を初期移動相で溶解した後、放射能検出器付き HPLC (Radiomatic 525TR, PerkinElmer Life and Analytical Sciences; Agilent HPLC 1100 シリーズ, Agilent Technologies) を用いて分析した。HPLC による分離は、Luna Phenyl-Hexyl カラム (長さ 150 × 内径 3.0 mm、粒子サイズ 5  $\mu\text{m}$ 、Phenomenex) を用い、移動相は 20 mmol/L 酢酸アンモニウム及びメタノールを用いて行った。 $[^{14}\text{C}]$ ロバチレリン又は  $[^{14}\text{C}]$ タルチレリンの残存率は、各時点におけるピーク面積を反応開始前におけるピーク面積で除することにより算出した。

### 1.2.12 肝細胞における *in vitro* 代謝物プロファイル

凍結保存後のラット、イヌ及びヒト肝細胞を、肝細胞培養培地 (SEKISUI XenoTech, LLC.) に懸濁した。各肝細胞 ( $1 \times 10^6$  生細胞/mL) と [ $^{14}\text{C}$ ]ロバチレリン (100  $\mu\text{mol/L}$ ) を 37°C の 5%  $\text{CO}_2$  インキュベーター MCO-175 (パナソニックヘルスケア) 内で 0 (インキュベートなし) 及び 24 時間インキュベートした。8 容量のメタノールを添加して反応を停止させ、試料を室温にて 10 分間、1800  $\times g$  で遠心分離した。上清を窒素ガス気流下で蒸発乾固した後、残渣を 3 又は 5% (v/v) アセトニトリルで再溶解し、放射能検出器付き LC-MS/MS (1.2.14 項参照) で分析した。

### 1.2.13 生体試料における代謝物プロファイル

血漿、尿、胆汁及び糞ホモジェネート試料の一部に、3 又は 4 容量のメタノール / アセトニトリル (1:1, v/v) を加え、10 分間 1880  $\times g$  で遠心分離して上清を分取した。上清を窒素ガス気流下又は減圧下で蒸発乾固し、得られた残渣を 10 mmol/L ギ酸アンモニウム / アセトニトリル (98:2, v/v) 又は 5% (v/v) アセトニトリルで溶解した。この試料は、放射能検出器付き LC-MS/MS (1.2.14 及び 1.2.15 項参照) 又は HPLC-マイクロシンチレーション (1.2.16 項参照) により分析した。

### 1.2.14 LC-MS/MS を用いた *in vitro* 及びイヌ生体試料の代謝物プロファイル

HPLC によるピーク分離は、Hitachi L-7000 シリーズ (株式会社 日立ハイテック) を用いて行った。分析カラムは L-column 2 ODS (長さ 150  $\times$  内径 3.0 mm、粒子サイズ 5  $\mu\text{m}$ 、化学物質評価研究機構) を使用し、移動相として移動相 A (10 mmol/L 酢酸アンモニウム pH 7.5) 及び移動相 B (アセトニトリル) を用いた。流速は 0.5 mL/min とし、線形グラジエント (%B) は次のように設定した: 3%B (0 min)  $\rightarrow$  3%B (5 min)  $\rightarrow$  20%B (40 min)  $\rightarrow$  70%B (40.1 min)  $\rightarrow$  70%B (45 min)  $\rightarrow$  3%B (45.1 min)  $\rightarrow$  3%B (60 min)。HPLC からの溶出液を、質量分析計及び放射能検出器 Radiomatic 525TR (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) 間で 2 : 3 の比率で分岐し分析を行った。質量分析は API2000 (AB SCIEX) を用いて、溶出液を正又は負イオンのエレクトロスプレーイオン化後、フルスキャン、選択イオンモニタリング、多重反応モニタリング又はプロダクトイオンスキャンモードで分析対象物質を検出した。試料中の代謝物は、ロバチレリンの代謝物標準品を用いて同定した。

### 1.2.15 LC-MS/MS を用いたラット生体試料の代謝物プロファイル

HPLC によるピーク分離は、Alliance system (Waters) を用いて行った。分析カラムは XTerra RP18 カラム (長さ 150 × 内径 4.6 mm、粒子サイズ 5 μm、Waters) を使用し、移動相として移動相 A (10 mmol/L ギ酸アンモニウム/アセトニトリル (98:2, v/v)) 及び移動相 B (アセトニトリル) を用いた。流速は 1.0 mL/min とし、線形グラジエント (%B) は次のように設定した: 0%B (0 min) → 0%B (40 min) → 30%B (70 min) → 30%B → (90 min)。HPLC からの溶出液を、質量分析計及び放射能検出器 Radiomatic 525TR (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) 間で 1 : 3 の比率で分岐し分析を行った。質量分析は TSQ API2 パフォーマンスパック (Thermo Scientific) を用いて、溶出液を陽イオンでエレクトロスプレーイオン化後、フルスキャン、多重反応モニタリング又はプロダクトイオンスキャンモードで分析対象物質を検出した。試料中の代謝物は、ロバチレリンの代謝物標準品を用いて同定した。

### 1.2.16 HPLC-マイクロシンチレーションを用いた血漿中の高極性未知代謝物の検索

HPLC によるピーク分離は、Hitachi L-7000 シリーズ (株式会社日立ハイテク) を用いて行った。分析カラムは Luna C18 (2) カラム (長さ 250 × 内径 4.6 mm、粒子サイズ 5 μm、Phenomenex) を使用し、移動相として移動相 A (10 mmol/L 酢酸アンモニウム pH 9.0) 及び移動相 B (アセトニトリル) を用いた。流速は 1.0 mL/min とし、線形グラジエント (%B) は次のように設定した: 3%B (0 min) → 3%B (5 min) → 18%B (35 min) → 70%B (45 min) → 70%B (50 min) → 3%B (50.1 min) → 3%B (60 min)。フラクションコレクター FC204 (Gilson Inc.) を用いて、HPLC からの溶出液を 0.2 mL/well で 96 ウェルマイクロプレート Deep-Well LumaPlate (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) に分取した。室温条件下、96 ウェルマイクロプレートから HPLC 溶媒を蒸発乾固させた後、マイクロプレートシンチレーション・ルミネッセンスカウンター TopCount NXT (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) を使用して放射能を測定した。試料中の代謝物は、ロバチレリンの代謝物標準品を用いて同定した。



## 1.3 結果

### 1.3.1 ラット及びイヌにおける薬物動態

絶食の雄ラット及び雄イヌに<sup>14</sup>C標識及び非標識ロバチレリンを単回投与したときの血漿中濃度推移を Figure 1-2 に、薬物動態パラメータを Table 1-1 及び Table 1-2 に示した。同じ投与量（ラット: 3 mg/kg、イヌ: 1 mg/kg）を単回経口投与したとき、<sup>14</sup>C標識体及び非標識体の C<sub>max</sub> と t<sub>max</sub> はほぼ同等であったが、<sup>14</sup>C標識体の t<sub>1/2</sub> と AUC<sub>inf</sub> は非標識体に比べ大きかった。ラット及びイヌの放射能に対する非標識体の AUC 比は、それぞれ 16.2% 及び 13.1% であった。絶食の雄ラットに単回経口投与したとき、0.3~10 mg/kg の用量範囲では、未変化体ロバチレリンの C<sub>max</sub> 及び AUC<sub>inf</sub> は投与量に比例して増加した。ラット及びイヌのバイオアベイラビリティは、それぞれ 7.3% 及び 41.3% であった。非標識体のロバチレリンを経口投与した後、非絶食のラットとイヌで食餌の影響を評価した結果、絶食時に比し非絶食ラットの C<sub>max</sub> 及び AUC<sub>inf</sub> は、それぞれ 34.0% 及び 54.7% であった。また、非絶食のイヌにおける C<sub>max</sub> 及び AUC<sub>inf</sub> は、絶食時に比べ、それぞれ 36.2% 及び 49.3% であった。

Table 1-1 Pharmacokinetic parameters of radioactivity and rovatirelin after single oral and intravenous doses of [<sup>14</sup>C]rovatirelin and rovatirelin to fasted male rats

Pharmacokinetic parameters	Radioactivity (n = 3)	Rovatirelin (n = 4)				
	p.o.	p.o.			i.v.	
	3 mg/kg	0.3 mg/kg	1 mg/kg	3 mg/kg	10 mg/kg	1 mg/kg
C <sub>max</sub> (ng eq./mL or ng/mL)	140.9 ± 26.7	11.19 ± 3.56	26.57 ± 8.96	125.82 ± 51.06	348.10 ± 231.26	NA
t <sub>max</sub> (h)	0.5 ± 0.0	0.6 ± 0.3	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.0	0.4 ± 0.1	NA
t <sub>1/2</sub> (h)	14.5 ± 0.7	7.7 ± 3.2 <sup>a</sup>	3.3 ± 1.4 <sup>a</sup>	4.5 <sup>b</sup> (3.4, 5.5)	3.6 ± 1.0	10.6 ± 6.5
AUC <sub>last</sub> (ng eq.·h/mL or ng·h/mL)	1623 ± 87	31.5 ± 9.9	70.9 ± 5.7	266.1 ± 30.0	1054.1 ± 523.8	981.7 ± 119.8
AUC <sub>inf</sub> (ng eq.·h/mL or ng·h/mL)	1799 ± 132	36.0 ± 13.6 <sup>a</sup>	72.5 ± 9.0 <sup>a</sup>	291.3 <sup>b</sup> (333.7, 248.9)	1059.0 ± 520.1	990.7 ± 125.1
CL <sub>tot</sub> (mL/h/kg)	NA	NA	NA	NA	NA	1022 ± 133
V <sub>ss</sub> (mL/kg)	NA	NA	NA	NA	NA	1174 ± 468
F (%)	NC	NC	7.3	NC	NC	NC

Each parameter represents the mean ± SD (standard deviation).

NA: not applicable; NC: not calculated; p.o.: per os (oral administration); i.v.: intravenous.

<sup>a</sup> Mean ± SD of three animals.

<sup>b</sup> Mean value of two animals and the individual values are given in parentheses.

Table 1-2 Pharmacokinetic parameters of radioactivity and rovatirelin after single oral and intravenous doses of [<sup>14</sup>C]rovatirelin and rovatirelin to fasted male dogs

Pharmacokinetic parameters	Radioactivity (n = 3)		Rovatirelin (n = 3)	
	p.o.		p.o.	i.v.
	0.1 mg/kg		0.1 mg/kg	0.1 mg/kg
C <sub>max</sub> (ng eq. /mL or ng/mL)	40.3 ± 21.6		31.2 ± 15.8	NA
T <sub>max</sub> (h)	1.0 ± 0.0		1.0 ± 0.0	NA
t <sub>1/2</sub> (h)	53.1 ± 9.9		2.69 ± 1.74	2.21 ± 0.42
AUC <sub>last</sub> (ng eq.·h/mL or ng·h/mL)	465 ± 185		86.6 ± 34.7	211 ± 21
AUC <sub>inf</sub> (ng eq.·h/mL or ng·h/mL)	680 ± 213		88.9 ± 32.4	212 ± 21
CL <sub>tot</sub> (mL/h/kg)	NA		NA	476 ± 48
V <sub>ss</sub> (mL/kg)	NA		NA	674 ± 154
F (%)	NC		41.3	NC

Each parameter represents the mean ± standard deviation of three animals.

NA: not applicable; NC: not calculated; p.o.: per os (oral administration); i.v.: intravenous.

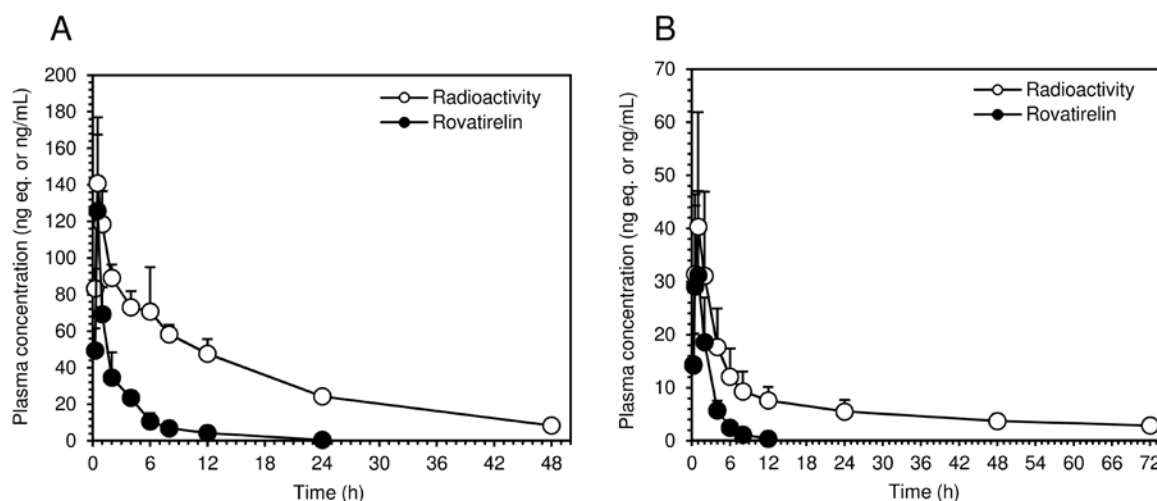


Figure 1-2 Plasma concentration of radioactivity and rovatirelin after a single oral dose of [<sup>14</sup>C]rovatirelin or rovatirelin to male rats (3 mg/kg, A) and male dogs (0.1 mg/kg, B)

Each point and vertical bar represents the mean and standard deviation of three or four animals, respectively.

### 1.3.2 動物及びヒトの血漿タンパク結合率、血液/血漿中濃度比及び血球移行率

[<sup>14</sup>C]ロバチレリンの血漿タンパク結合率、血液/血漿中濃度比 (R<sub>b</sub>) 及び血球移行率を Table 1-3 に示した。血漿タンパク結合率はすべての動物種で低く、[<sup>14</sup>C]ロバチレリン濃度が 10~1000 ng/mL の濃度範囲において濃度依存性は認められなかった。R<sub>b</sub>及び血球移行率も、動物種間で明らかな違いは認められず、[<sup>14</sup>C]ロバチレリンの濃度が 10~250 ng/mL の範囲では濃度依存性は認められなかった。

Table 1-3 Plasma protein binding,  $R_b$  value, and blood cell association of rovatirelin in rats, dogs, and humans *in vitro*

Conc. (ng/mL)	Rat			Dog			Human		
	PPB (%)	$R_b$	BCA (%)	PPB (%)	$R_b$	BCA (%)	PPB (%)	$R_b$	BCA (%)
10 <sup>a, b</sup>	4.7 ± 1.5	0.917 ± 0.051	36.3 ± 3.4	10.3 ± 1.1	0.906 ± 0.051	43.0 ± 3.8	10.9 ± 5.9	0.828 ± 0.041	31.7 ± 1.9
50 <sup>a</sup> /100 <sup>b</sup>	4.7 ± 1.5	0.899 ± 0.016	35.1 ± 1.8	6.0 ± 3.9	0.868 ± 0.011	40.9 ± 0.9	12.4 ± 3.1	0.823 ± 0.023	31.4 ± 1.8
250 <sup>a</sup> /1000 <sup>b</sup>	5.4 ± 2.3	0.910 ± 0.012	35.9 ± 0.3	7.2 ± 2.2	0.875 ± 0.007	41.3 ± 1.0	14.2 ± 0.4	0.815 ± 0.022	30.7 ± 1.5

Each value represents the mean ± standard deviation of three replicates.

<sup>a</sup> Blood to plasma ratio ( $R_b$ ) and blood cell association (BCA) were estimated at 10, 50, and 250 ng/mL.

<sup>b</sup> Plasma protein binding (PPB) was estimated at 10, 100, and 1000 ng/mL.

### 1.3.3 ラットに反復投与したときの臓器及び組織分布

非絶食の雄ラットに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 3 mg/kg の投与量で反復経口投与し (1 日 1 回、21 日間)、臓器及び組織分布を QWBA により評価した (Table 1-4 及び Figure 1-3)。7、14 及び 21 日目における投与後 24 時間の血液中放射能濃度は、1 日目の投与後 24 時間の血液中放射能濃度よりも高く、血液中放射能濃度は反復投与により徐々に増加した。21 日目の投与後、血液中放射能濃度は投与後 0.5 時間において最大濃度に達し、投与後 336 時間まで緩やかに減少した。1、7 及び 14 日目の投与後 24 時間、並びに 21 日目の投与後 0.5、4 及び 24 時間における消化管 (胃、小腸、盲腸及び大腸)、膀胱及び尿中の放射能濃度は、他の臓器及び組織の放射能濃度に比し高かった。腎臓 (髄質及び皮質)、骨髄、脾臓、胸腺、肝臓及び脾臓の放射能濃度も比較的高かった。21 日目の最終投与後、すべての臓器及び組織の放射能濃度は時間の経過とともに投与後 336 時間まで減少した。臓器及び組織中放射能濃度は反復投与により上昇したが、すべての臓器及び組織において明らかな蓄積は認められなかった。

Table 1-4 Radioactivity concentration in tissues after repeated oral doses of [<sup>14</sup>C]rovatirelin (3 mg/kg) to non-fasted male rats

Tissue	Radioactivity concentration (ng eq./g)								
	Day 1	Day 7	Day 14	Day 21					
	24 h	24 h	24 h	0.5 h	4 h	24 h	72 h	168 h	336 h
Blood	15.8 (1.00)	39.1 (1.00)	57.2 (1.00)	123 (1.00)	85.9 (1.00)	66.6 (1.00)	47.8 (1.00)	39.3 (1.00)	37.7 (1.00)
Cerebrum	7.39 (0.47)	20.3 (0.52)	26.9 (0.47)	32.9 (0.27)	41.9 (0.49)	28.3 (0.42)	25.2 (0.53)	21.4 (0.54)	16.9 (0.45)
Cerebellum	10.7 (0.68)	21.1 (0.54)	28.8 (0.50)	39.3 (0.32)	45.1 (0.53)	36.2 (0.54)	27.7 (0.58)	22.0 (0.56)	17.1 (0.45)
Pituitary	ND (NA)	61.9 (1.58)	71.1 (1.24)	126 (1.02)	146 (1.70)	91.0 (1.37)	77.2 (1.62)	46.4 (1.18)	39.3 (1.04)
Medulla oblongata	7.78 (0.49)	19.2 (0.49)	25.5 (0.45)	34.6 (0.28)	35.0 (0.41)	33.1 (0.50)	21.8 (0.46)	24.1 (0.61)	19.3 (0.51)
Eyeball	36.4 (2.30)	45.0 (1.15)	42.3 (0.74)	34.3 (0.28)	51.4 (0.60)	32.4 (0.49)	19.7 (0.41)	19.9 (0.51)	25.9 (0.69)
Thyroid	16.8 (1.06)	63.1 (1.61)	105 (1.84)	140 (1.14)	135 (1.57)	89.9 (1.35)	99.8 (2.09)	63.2 (1.61)	48.1 (1.28)
Thymus	26.4 (1.67)	91.5 (2.34)	107 (1.87)	154 (1.25)	152 (1.77)	99.3 (1.49)	82.1 (1.72)	42.4 (1.08)	20.6 (0.55)
Liver	31.5 (1.99)	81.6 (2.09)	106 (1.85)	285 (2.32)	173 (2.01)	103 (1.55)	74.0 (1.55)	43.5 (1.11)	29.4 (0.78)
Kidney (cortex)	27.3 (1.73)	94.9 (2.43)	88.1 (1.54)	228 (1.85)	176 (2.05)	112 (1.68)	76.8 (1.61)	51.2 (1.30)	34.6 (0.92)
Kidney (medulla)	27.3 (1.73)	94.8 (2.42)	125 (2.19)	261 (2.12)	230 (2.68)	115 (1.73)	106 (2.22)	54.4 (1.38)	33.2 (0.88)
Spleen	22.9 (1.45)	69.7 (1.78)	90.6 (1.58)	190 (1.54)	141 (1.64)	97.4 (1.46)	75.2 (1.57)	56.0 (1.42)	30.4 (0.81)
Pancreas	37.0 (2.34)	89.8 (2.30)	144 (2.52)	235 (1.91)	194 (2.26)	126 (1.89)	83.5 (1.75)	54.5 (1.39)	36.2 (0.96)
Bone marrow	45.3 (2.87)	101 (2.58)	88.0 (1.54)	136 (1.11)	153 (1.78)	89.4 (1.34)	47.3 (0.99)	27.2 (0.69)	12.3 (0.33)
Bladder	28.0 (1.77)	57.6 (1.47)	52.0 (0.91)	775 (6.30)	125 (1.46)	153 (2.30)	66.9 (1.40)	52.8 (1.34)	34.0 (0.90)
Urine in bladder	110 (6.96)	117 (2.99)	119 (2.08)	4530 (36.83)	619 (7.21)	135 (2.03)	245 (5.13)	24.4 (0.62)	7.89 (0.21)
Stomach	40.5 (2.56)	197 (5.04)	255 (4.46)	3310 (26.91)	177 (2.06)	213 (3.20)	129 (2.70)	78.1 (1.99)	67.3 (1.79)
Small intestine	38.8 (2.46)	200 (5.12)	136 (2.38)	6220 (50.57)	368 (4.28)	20.6 (0.31)	63.7 (1.33)	39.8 (1.01)	9.73 (0.26)
Cecum	516 (32.66)	719 (18.39)	1420 (24.83)	837 (6.80)	1870 (21.77)	283 (4.25)	70.3 (1.47)	30.8 (0.78)	19.2 (0.51)
Large intestine	255 (16.14)	607 (15.52)	615 (10.75)	222 (1.80)	839 (9.77)	165 (2.48)	49.0 (1.03)	42.7 (1.09)	44.3 (1.18)

ND: not determined; NA: Not applicable.

Tissue/blood concentration ratios are given in parentheses.

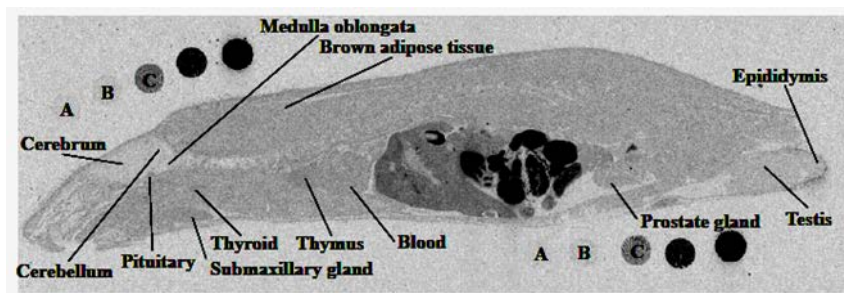


Figure 1-3 Representative whole body radioluminograms at 0.5 h after 21 days repeated oral administrations of [<sup>14</sup>C]rovatirelin (3 mg/kg) to non-fasted male rats

A, B, C, D, and E: Calibration blood sample (18.1, 30.7, 301, 1200, and 12000 ng eq./g, respectively).

### 1.3.4 ラット脳組織へのロバチレリン及びタルチレリンの移行性

雄ラットに[<sup>14</sup>C]ロバチレリン又は[<sup>14</sup>C]タルチレリンを 1 mg/kg の投与量で単回静脈内投与し、透過性表面積 (PS) 値を比較した (Table 1-5)。[<sup>14</sup>C]ロバチレリン及び[<sup>14</sup>C]タルチレリンは、下垂体を除く脳領域にほぼ均一に分布した。すべての脳領域において、[<sup>14</sup>C]ロバチレリンの PS 値は[<sup>14</sup>C]タルチレリンの PS 値よりも顕著に高かった (3.5~9.0 倍)。

Table 1-5 PS values of [<sup>14</sup>C]rovatirelin and [<sup>14</sup>C]taltirelin in brain regions after a single intravenous injection (1 mg/kg) to male rats

Brain region	PS values (μL/min/g)		Ratio (Rovatirelin/Taltirelin)
	Rovatirelin	Taltirelin	
Cortex (R)	1.21 ± 0.17 <sup>***,a</sup>	0.35 ± 0.09	3.5
Cortex (L)	1.24 ± 0.20 <sup>***,a</sup>	0.35 ± 0.10	3.5
Cerebellum	1.17 ± 0.22 <sup>***,b</sup>	0.31 ± 0.06	3.7
Pituitary	6.96 ± 1.31 <sup>***,a</sup>	0.77 ± 0.66	9.0
Hypothalamus	1.29 ± 0.28 <sup>**b</sup>	0.28 ± 0.05	4.6
Hippocampus	1.27 ± 0.22 <sup>***,a</sup>	0.32 ± 0.07	3.9
Striatum	1.13 ± 0.16 <sup>***,a</sup>	0.22 ± 0.04	5.2
Diencephalon	1.12 ± 0.20 <sup>***,a</sup>	0.28 ± 0.06	4.0
Brain stem	1.04 ± 0.14 <sup>***,b</sup>	0.23 ± 0.03	4.5

Permeability-surface area (PS) values of the brain regions were calculated using the following equation:  $PS = (C_{\text{brain}, 60 \text{ min}} - C_{\text{blood}, 60 \text{ min}} \times \text{the percentage of residual blood in brain}) / AUC_{0-60 \text{ min}}$ , where  $C_{\text{brain}, 60 \text{ min}}$  and  $C_{\text{blood}, 60 \text{ min}}$  are concentrations in brain and blood at 60 min after administration, respectively,  $AUC_{0-60 \text{ min}}$  is the area under curve up to 60 min after administration.

Each value represents the mean ± the standard deviation of four animals; \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001 significantly different from taltirelin value.

<sup>a</sup> Student's t-test.

<sup>b</sup> Welch's t-test.

### 1.3.5 ラット血漿及び脳ホモジェネートにおける安定性

[<sup>14</sup>C]ロバチレリンをラットの血漿、大脳又は小脳のホモジェネート中で 37°C で 3 時間インキュベートしたとき、[<sup>14</sup>C]ロバチレリンの残存率は 90%以上であり、ロバチレリンは 3 時間まで安定であった (Figure 1-4 A)。一方、[<sup>14</sup>C]タルチレリンは、ラット大脳及び小脳ホモジェネート中でのインキュベーションにおいて速やかに分解され、0.5 時間後ではほとんど残存しなかった。血漿中では、[<sup>14</sup>C]タルチレリンは 3 時間まで安定であった (Figure 1-4 B)。

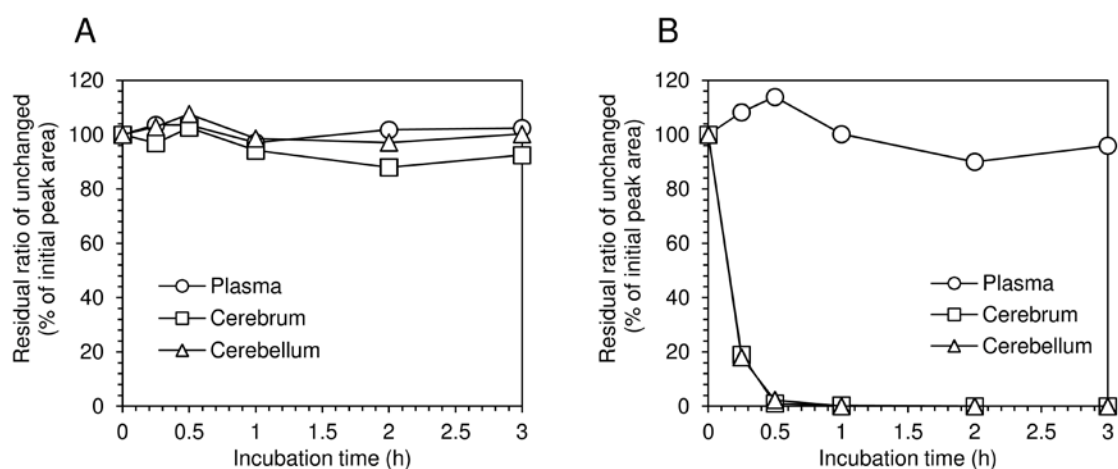


Figure 1-4 Stability of rovatirelin (A) and taltirelin (B) in rat plasma, cerebrum, and cerebellum homogenates

Each point represents the average of two replicates. The two values did not differ by more than 12%.

### 1.3.6 ラット、イヌ及びヒト肝細胞における *in vitro* 代謝

[<sup>14</sup>C]ロバチレリンを凍結保存後のラット、イヌ及びヒト肝細胞とともに 37°C で 24 時間インキュベートしたとき、TAMP、ロバチレリン-アシッド (R-acid)、ロバチレリン-ケトン (R-ketone) 及びロバチレリン-水酸化体 (R-OH) が代謝物として検出された (Figure 1-5)。さらに、未知の代謝物 (保持時間 36 分、*m/z* 401、2 つの酸素原子の付加) が、イヌ肝細胞において認められた。放射能検出器付き HPLC では、ヒト肝細胞においてロバチレリン-水酸化体及びロバチレリン-ケトンは検出されなかった (Table 1-6)。しかしながら、これら代謝物は LC-MS/MS 分析により検出され、得られたフラグメンテーションパターンは代謝物標準品のフラグメンテーションパターンと一致した。ラット、イヌ及びヒト肝細胞存在下で 24

時間インキュベートしたときの $[^{14}\text{C}]$ ロバチレリンのピーク面積は、インキュベートしなかったとき（反応時間 0 分）と比較して、それぞれ 17.7%、8.0%及び 3.0%減少した。

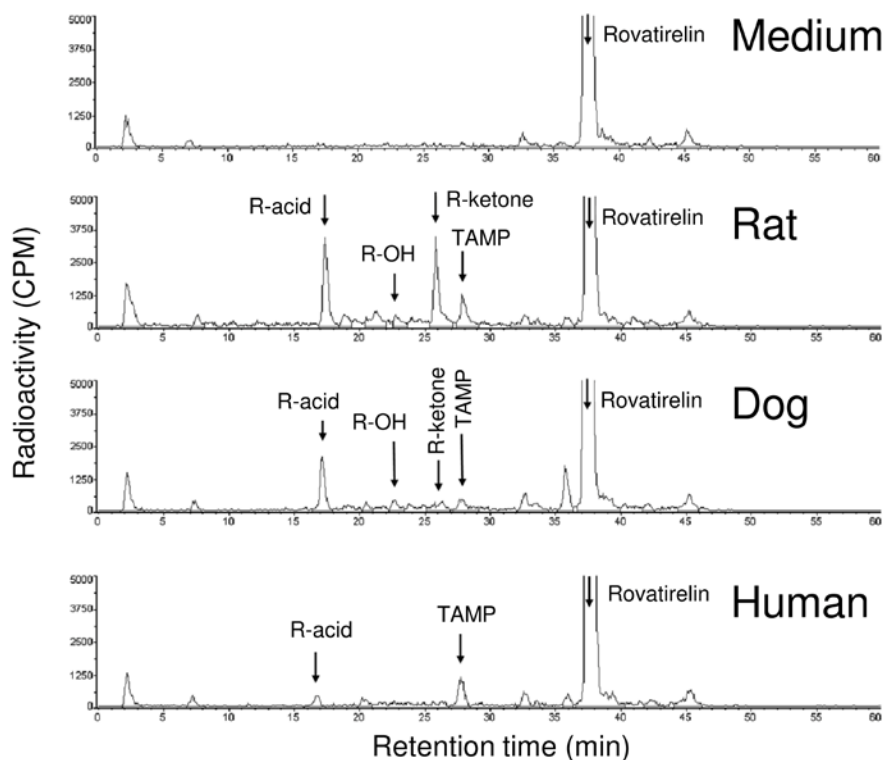


Figure 1-5 Representative radio-chromatograms obtained from incubation of  $[^{14}\text{C}]$ rovatirelin with cryopreserved rat, dog, and human hepatocytes for 24 h

R-acid: rovatirelin aminopentanoic acid; R-OH: rovatirelin pyrrolidine (4S)-hydroxy; R-ketone: rovatirelin aminopentanone.

Table 1-6 Metabolite profiles of  $[^{14}\text{C}]$ rovatirelin incubated with cryopreserved rat, dog, and human hepatocytes for 24 h

Metabolite	RT (min)	Mass difference <sup>a</sup>	Composition <sup>b</sup> (% of peak area)		
			Rat	Dog	Human
Rovatirelin-acid <sup>c</sup>	17	32	4.8	2.8	0.7
Rovatirelin-OH <sup>c</sup>	23	16	0.9	0.7	ND
Rovatirelin-ketone <sup>c</sup>	26	16	5.0	0.9	ND
TAMP <sup>c</sup>	28	-127	2.3	1.1	1.8
Rovatirelin <sup>c</sup>	37	0	76.3	86.1	90.8
Others	—	—	10.8	8.4	6.8

Each sample was pooled from two incubations. ND: not detected; rovatirelin-acid: rovatirelin aminopentanoic acid; rovatirelin-OH: rovatirelin pyrrolidine (4S)-hydroxy; rovatirelin-ketone: rovatirelin aminopentanone; TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

<sup>a</sup> Mass difference was calculated by subtracting the mass of metabolite from the mass of rovatirelin.

<sup>b</sup> Composition was calculated as a percentage of the peak area to the total radio-chromatogram area.

<sup>c</sup> Chemical structures are shown in Figure 1-10.

### 1.3.7 血漿におけるロバチレリンの代謝物プロファイル

ラットに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 3 mg/kg の投与量で単回経口投与し、血漿中代謝物を検索した。投与後 1 時間では未変化体がラット血漿中に最も多く認められ、検出された放射能の 50%~65%を占めた (Figure 1-6)。さらに、少量のロバチレリン-アシッド及び TAMP (それぞれ <5%)、並びに微量のロバチレリン-ケトン (<1%) が認められた。投与後 4 時間及び 24 時間では、血漿中のこれらの代謝物は時間経過とともに減少した。一方で、未知の高極性代謝物 (unknown highly polar metabolites, UHPM) のピークが明らかに認められ、クロマトグラム上に重なって検出された。

UHPM について検討するため、絶食したラットに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 10 mg/kg の投与量で単回経口投与し、投与後 0.5~48 時間の血漿試料を分析した (Figure 1-7)。その結果、UHPM は 3-(4-チアゾイル)-L-アラニン (TA) 及び 2 つの未知代謝物 (RPM1 及び RPM2) であることが示された。投与後 48 時間の血漿においては、未変化体は認められなかったが、これら 3 つの極性代謝物が主に検出された。総放射能に対する TA、未変化体、RPM2 及び RPM1 曝露量の割合は、それぞれ 40%、25%、17% 及び 12% であった (Table 1-7)。LC-MS/MS 分析を行ったが、RPM1、RPM2 及び RPM3 の化学構造は推定できなかった。

イヌに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 0.1 mg/kg の投与量で単回経口投与したときの血漿中には、投与後 0.5、1、2 及び 4 時間のいずれの時点においても未変化体の放射能のみが検出された。LS-MS/MS 分析では、ロバチレリン-アシッド及び TAMP が検出された。



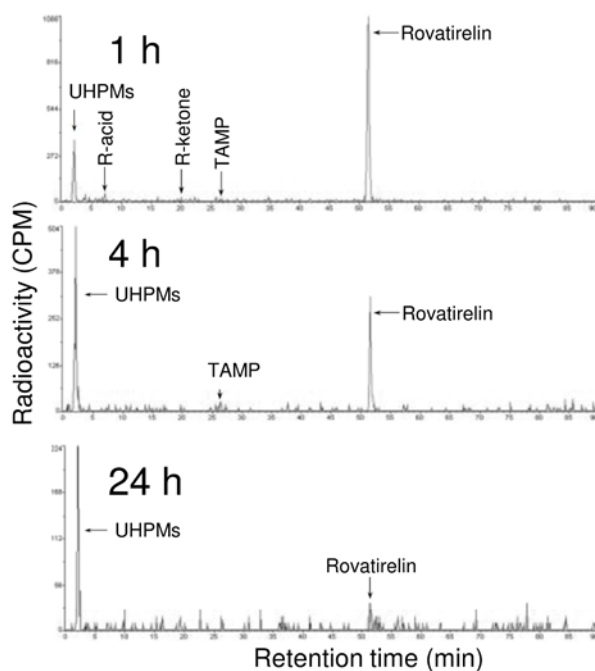


Figure 1-6 Typical radio-HPLC chromatograms of extracts from plasma obtained 1, 4 and 24 h after a single oral dose of [ $^{14}\text{C}$ ]rovatirelin (3 mg/kg) to male rats

UHPMs: unknown highly polar metabolites; R-acid: rovatirelin aminopentanoic acid; R-ketone: rovatirelin aminopentanone; TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

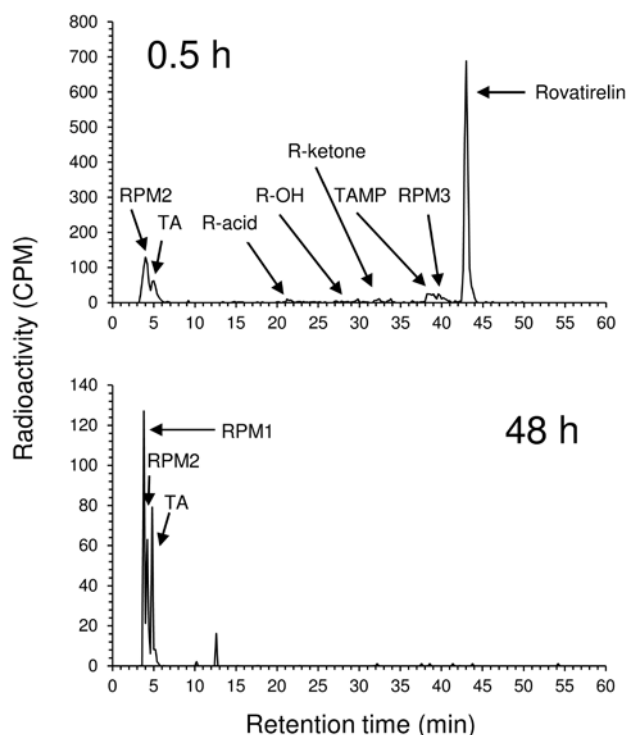


Figure 1-7 Typical Radio-HPLC chromatograms of extracts from plasma obtained after a single oral dose of [ $^{14}\text{C}$ ]rovatirelin (10 mg/kg) to male rats

RPM: rat plasma metabolite (unknown); TA: 3-(4-Thiazoyl)-L-alanine; R-acid: rovatirelin aminopentanoic acid; R-OH: rovatirelin pyrrolidine (4S)-hydroxy; R-ketone: rovatirelin aminopentanone; TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

Table 1-7 Plasma exposure of rovatirelin and its metabolites after oral administration of [<sup>14</sup>C]rovatirelin (10 mg/kg) to male rats

Metabolite	AUC <sub>0-48 h</sub> (ng eq. h/mL)	% of total AUC
RPM1	326.3	12
RPM2	450.9	17
TA <sup>a</sup>	1067.7	40
Rovatiirelin-acid <sup>a</sup>	2.2	0.083
Rovatiirelin-OH <sup>a</sup>	0.5	0.019
Rovatiirelin-ketone <sup>a</sup>	3.7	0.14
TAMP <sup>a</sup>	13.0	0.49
RPM3	9.3	0.35
Rovatiirelin <sup>a</sup>	663.0	25
Total radioactivity	2645.4	NA

AUC<sub>0-48 h</sub> was calculated from plasma concentrations which were estimated by multiplying total radioactivity in plasma by a percentage of the metabolite peak area to the total radio-chromatogram area.

RPM: rat plasma metabolite (unknown); TA: 3-(4-thiazoyl)-L-alanine; rovatirelin-acid: rovatirelin aminopentanoic acid; rovatirelin-OH: rovatirelin pyrrolidine (4S)-hydroxy; rovatirelin-ketone: rovatirelin aminopentanone; TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine; NA: not applicable.

<sup>a</sup>Chemical structures are shown in Figure 1-10.

### 1.3.8 胆汁、尿及び糞におけるロバチレリンの代謝物プロファイル

無処置及び BDC (胆管カニューレ処置) ラットに [<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 3 mg/kg の投与量で単回経口投与したときの尿、糞及び胆汁中代謝物を確認した (Figure 1-8)。

無処置ラットの投与後 6 時間までの尿では、未変化体が最も多く認められ、検出された放射能の 80% を占めた。少量のロバチレリン-アシッド、ロバチレリン-ケトン及び TAMP (<5%) 並びに微量のロバチレリン-水酸化体 (<1%) も検出された。無処置ラットの投与後 24 時間までの糞では、未変化体が最も多く、検出された放射能の 90% であった。少量の TAMP (<5%) 並びに微量のロバチレリン-アシッド、ロバチレリン-ケトン及びロバチレリン-水酸化体 (<1%) も検出された。

BDC ラットの投与後 6 時間までの胆汁では、未変化体が最も多く認められ、検出された放射能の 10%~30% であった。ロバチレリン-アシッド及びロバチレリン-ケトンは、それぞれ 10% 及び 5%~15% であった。少量のロバチレリン-水酸化体 (<5%) 及び微量の TAMP (<1%) も検出された。さらに、UHPM は胆汁中にラット血漿と同程度検出され、尿及び糞にも認められた。

イヌに $[^{14}\text{C}]$ ロバチレリンを 0.1 mg/kg の投与量で単回経口投与し、尿及び糞中の代謝物を検索した (Figure 1-9)。投与後 8 時間までの尿中には、未変化体が最も多く存在し検出された放射能の 70% を占め、ロバチレリン-アシッドは 10% であった。少量の TAMP 及びロバチレリン-水酸化体 (<5%) も検出された。これらの代謝物に加え、LC-MS/MS 分析ではロバチレリン-ケトンの存在も確認された。投与後 24 時間までの糞中では、未変化体が最も多く認められ、検出された放射能の約 90% を占め、寡少のロバチレリン-アシッド、TAMP 及びロバチレリン-水酸化体 (<5%) も検出された。LC-MS/MS 分析では、これら代謝物に加えてロバチレリン-ケトンも確認された。

以上の動物における代謝物プロファイルの結果及び *in vitro* 試験結果に基づいて、ロバチレリンの代謝経路を推定した (Figure 1-10)。

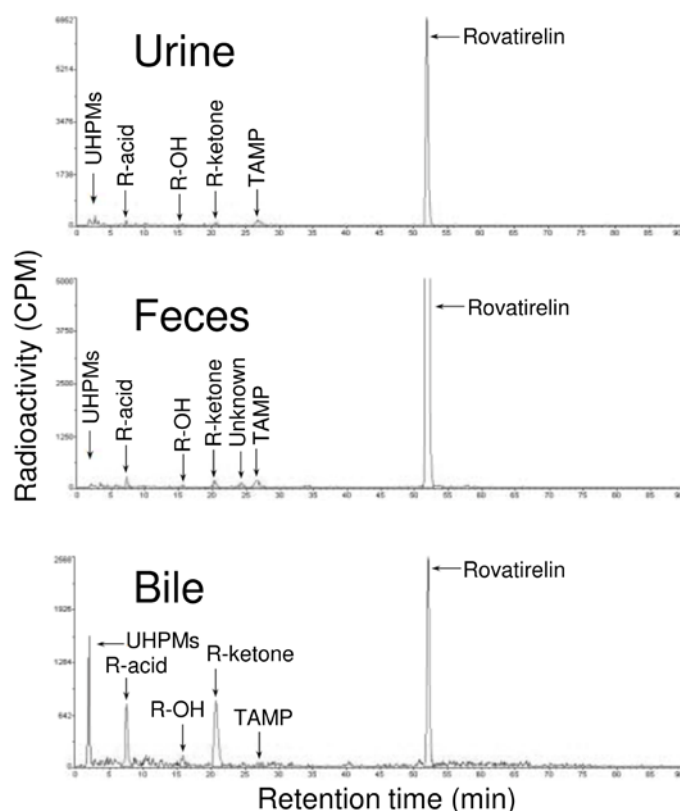


Figure 1-8 Typical radio-HPLC chromatograms of extracts from urine (0–6 h), feces (0–24 h), and bile (0–6 h) obtained after a single oral dose of  $[^{14}\text{C}]$ rovatirelin (3 mg/kg) to intact and BDC male rats

UHPMs: unknown highly polar metabolites; R-acid: rovatirelin aminopentanoic acid; R-OH: rovatirelin pyrrolidine (4S)-hydroxy; R-ketone: rovatirelin aminopentanone; TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

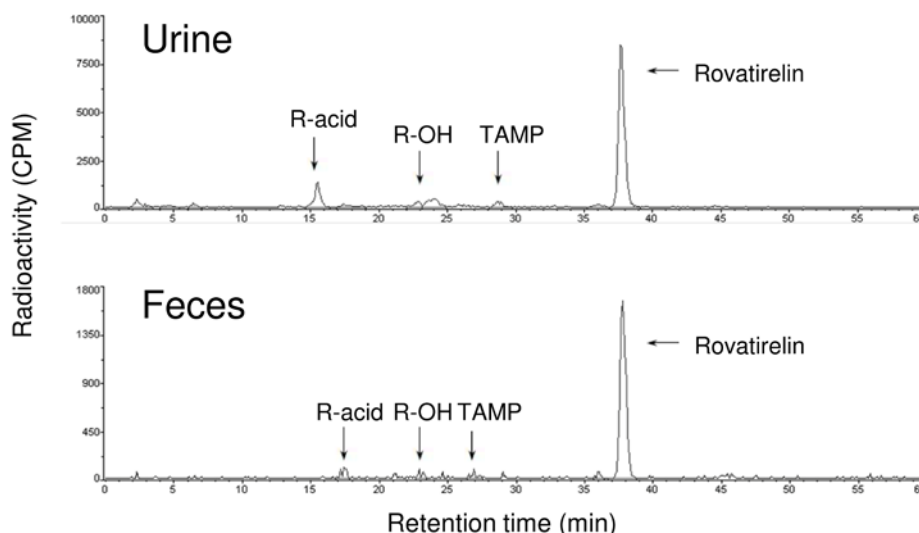


Figure 1-9 Typical radio-HPLC chromatograms of extracts from urine (0–8 h) and feces (0–24 h) obtained after a single oral dose of [<sup>14</sup>C]rovatirelin (0.1 mg/kg) to male dogs

R-acid: rovatirelin aminopentanoic acid; R-OH: rovatirelin pyrrolidine (4S)-hydroxy; TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

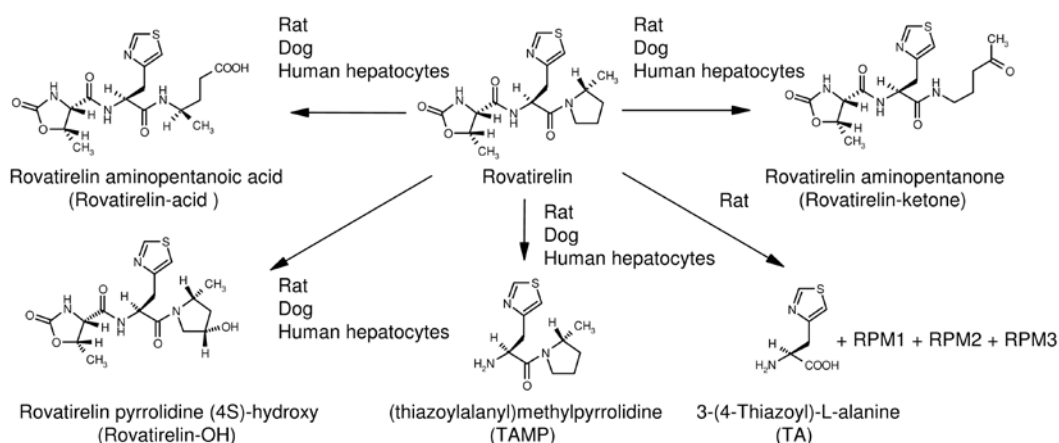


Figure 1-10 Summary of rovatirelin metabolic pathways in animals and human hepatocytes

### 1.3.9 ラット及びイヌにおけるマスバランス

無処置ラットに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 3 mg/kg の投与量で単回経口投与したとき、投与後 168 時間までの尿及び糞中の累積放射能排泄量は、それぞれ投与量の 8.0% 及び 87.9% あった (Table 1-8)。

BDC ラットに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 3 mg/kg の投与量で単回経口投与したとき、投与後 48 時間までの胆汁、尿及び糞中の累積放射能排泄量は、それぞれ投与量の

11.0%、16.3%及び69.6%であった。

イヌに<sup>14</sup>C]ロバチレリンを 0.1 mg/kg の投与量で単回経口投与したとき、投与後 168 時間までの尿及び糞中の累積放射能排泄量は、それぞれ投与量の 23.7%及び 63.1%であった。

Table 1-8 Cumulative excretion of radioactivity after a single oral dose of [<sup>14</sup>C]rovatirelin to rats (3 mg/kg) and dogs (0.1 mg/kg)

	Cumulative excretion (% of dose)		
	Intact male rats (n = 3)	BDC male rats (n = 3)	Intact male dogs (n = 3)
Collection interval (h)	168	48	168
Urine	8.0 ± 0.7	16.3 ± 5.1	23.7 ± 7.3
Feces	87.9 ± 2.3	69.6 ± 15.1	63.1 ± 11.6
Bile	NA	11.0 ± 4.2	NA
Cage Wash	0.3 ± 0.1	NA	1.8 ± 1.0
Gastrointestinal tracts	ND	1.6 ± 1.4	NA
Total	96.2 ± 1.7	98.5 ± 4.9	88.6 ± 4.3

Each value represents the mean ± standard deviation.

BDC: bile duct-cannulated; NA: not applicable; ND: not detected.

#### 1.4 考察

非臨床薬物動態試験は、ロバチレリンの臨床薬物動態を予測し、かつ動物データのヒトへの外挿性を明確にするのに役立つため (Hosea et al., 2009; Penner et al., 2012; Walker et al., 2009)、本章ではロバチレリンの非臨床薬物動態を *in vitro* 及び *in vivo* で評価した。

ロバチレリンをラット及びイヌへの経口投与したとき、速やかに吸収され、バイオアベイラビリティはそれぞれ 7.3%及び 41.3%であった。また、胆汁排泄試験結果から、ラットにおける吸収率は 27.3%と推定された。一方、ラット及びイヌにおけるタルチレリンのバイオアベイラビリティはそれぞれ 3.9%及び 18.5%であり、ラットにおける吸収率は 9%と推定されている (Kodama et al., 1997)。これらのデータから、ヒトにおいてもタルチレリンに比しロバチレリンの吸収は良好であると推察した。ラット及びイヌにおけるロバチレリンの血液/血漿中濃度比及び血球移行率はそれぞれ約 0.9 及び約 40%であり、タルチレリンのそれら数値 (それぞれ 0.6 及び 17%未満) よりも高いため (Kodama et al., 1997)、タルチレリンよりもロバチレリンは良好な膜透過性を有していると考えられた。ラットに<sup>14</sup>C]ロバチレ

リンを反復投与したときの臓器及び組織分布は、ロバチレリンが特定の臓器又は組織に蓄積しないことが示された。

ロバチレリンの脳及び小脳への移行性については、投与後 0.5 時間での血中濃度に対する臓器濃度の比 ( $K_b$ ) は約 0.3 であった。また、同様な結果が単回経口投与時においても認められた (キッセイ薬品工業株式会社 社内資料)。一方、タルチレリンのラット組織分布試験において観察された投与後 0.5 時間の脳  $K_b$  値は 0.09 であった (Kodama et al., 1997)。加えて、ロバチレリンの透過性表面積 (PS) 値はすべての脳領域で同程度であり ( $1.04 \pm 0.14 \sim 1.29 \pm 0.28 \mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ )、タルチレリンの PS 値はすべてのラット脳領域で低かった ( $0.22 \pm 0.04 \sim 0.35 \pm 0.10 \mu\text{L}/\text{min}/\text{g}$ ) ことから、ロバチレリンはタルチレリンに比べて脳移行性が高く、ロバチレリンは脳内に速やかにかつ均一に分布すると考えられた。*In vitro* における安定性試験において、ロバチレリンはタルチレリンと比較してラット脳及び小脳ホモジェネート中で安定であったことから、血液脳関門を通過した後のロバチレリンは脳及び小脳中で安定して存在すると考えられた (Figure 1-4)。

非臨床薬理試験において、ロバチレリン ( $K_i = 702 \text{ nmol}/\text{L}$ ) はタルチレリン ( $K_i = 3880 \text{ nmol}/\text{L}$ ) よりもヒト TRH 受容体に対して高い親和性を示し、ロバチレリンはタルチレリンと比較してラットの内側前頭前皮質及び自発運動におけるノルアドレナリン濃度を増加させた (Ijiro et al., 2015)。また、遺伝性運動失調モデルマウスであるローリングマウスナゴヤを用いた薬理試験において、ロバチレリンは用量依存的にローリングマウスナゴヤの転倒指数を低下させ、その効果はタルチレリンよりも強力であった (Ijiro et al., 2020)。

以上の結果から、ロバチレリンのヒト体内動態は良好であり、かつヒト脳内においても安定に存在するため、ロバチレリンはタルチレリンと比較してより強力な薬理効果を発揮する可能性を有すると考えられた。したがって、ロバチレリンは、SCD 患者を治療するための経口薬として十分な可能性があると考えられた。

ロバチレリンの代謝物を同定し動物における曝露量を評価するため、*in vitro* 及び *in vivo* 代謝物プロファイル試験を行った。凍結保存後のラット、イヌ及びヒト肝細胞とロバチレリンを  $37^\circ\text{C}$  で 24 時間インキュベートしたとき、ロバチレリン

はラット肝細胞（ピーク面積の減少は 24 時間で 17.7%）及びイヌ肝細胞（ピーク面積の減少は 24 時間で 8.0%）で中等度に代謝された。ロバチレリンは、ラット肝細胞では主にロバチレリン-アシッド及びロバチレリン-ケトンに、イヌ肝細胞では主にロバチレリン-アシッドに代謝された。ラット及びイヌ肝細胞に比べ、ヒト肝細胞ではロバチレリンの代謝は低いものの（ピーク面積の減少は 24 時間で 3.0%）、ヒト肝細胞における代謝物プロファイルはラット及びイヌ肝細胞における代謝物プロファイルと定性的には同等であり、ロバチレリンのヒト特異的代謝物は認められなかった。TAMP はヒト肝細胞において主要な代謝物であり、その生成量はラット肝細胞における生成量とほぼ同等であった。

*In vivo* 代謝物プロファイル試験結果から、ラット及びイヌ血漿中には主に未変化体のロバチレリンが認められた。ラット血漿では UHPM（RPM1、RPM2 及び TA）が主要代謝物として検出され、ロバチレリン-アシッド、ロバチレリン-ケトン、RPM3 及び TAMP がわずかに認められた。さらに、微量のロバチレリン-水酸化体が検出された。各代謝物の総 AUC に対する比率から、ラット血漿中の主要代謝物は RPM1、RPM2 及び TA であることが示された（Table 1-7）。ラットの血中動態において、血漿中放射能濃度は未変化体の血漿中濃度よりも高く、これは UHPM がラット血漿から緩やかに消失したことによるものと考えられた。イヌ血漿では、未変化体のみが放射能検出器付き HPLC で検出され、TAMP 及びロバチレリン-アシッドはより検出感度が高い LC-MS/MS 分析により検出された。また、これら代謝物は、尿中にも確認された。さらに、*in vitro* で認められたロバチレリン-水酸化体及び未知代謝物（保持時間 36 分、 $m/z$  401、2 つの酸素原子付加体）もイヌ尿中に検出された。したがって、イヌで認められた放射能の長い消失半減期は、おそらく TAMP、ロバチレリン-水酸化体、ロバチレリン-アシッド及び未知代謝物の血中動態に起因すると考えられた。

ラット及びイヌにおいて、ロバチレリンは主に未変化体として糞中に排泄された。BDC ラットの胆汁及び尿中放射能排泄量から、ラットにおける吸収率は 27.3%であり、投与量の約 70%は吸収されないと推定された。また、BDC ラットの尿及び胆汁中に排泄された放射能は、吸収された放射能に対しそれぞれ約 60%

及び約 40%であった。ラット及びイヌの尿では主に未変化体が認められ、吸収されたロバチレリンが未変化体としてほぼ完全に尿中に排泄されることが示唆された。また、肝細胞で検出されたロバチレリン-アシッドとロバチレリン-ケトンは、それぞれ尿中及び胆汁中に排泄されやすいと考えられた。ラットの胆汁では未変化体及び UHPM が主に認められ、未変化体及び代謝物が胆汁排泄を介して糞中に排泄されることが示された。UHPM の化学構造は不明であるが、代謝物標準品を使用し UHPM の一つは TA であることが明らかとなった。UHPM は、ラットの *in vivo* 代謝物プロファイル試験では認められたが、ラット肝細胞を用いた *in vitro* 代謝物プロファイル試験では生成されなかった。

体内動態及び代謝物プロファイルの結果から、ロバチレリンの代謝物生成は *in vitro* 及び *in vivo* 試験間で定性的にほぼ同等であることが示された。ヒト肝細胞の *in vitro* 代謝物プロファイルでは TAMP が主代謝物であり、*in vivo* でも TAMP がロバチレリンの主代謝物であると考えられるため、ヒトにおけるロバチレリンから TAMP までの代謝経路を明らかにすることは重要である。

TRH (pyroGlu-His-ProNH<sub>2</sub>) の主要代謝経路は、ヒスチジルプロリンアミドへの代謝 (His-ProNH<sub>2</sub>)、プロリンアミドの加水分解 (pyroGlu-His-Pro) 及びヒスチジルプロリン結合の開裂である (O'Leary & O'Connor, 1995)。これら代謝経路にはピログルタミン酸アミノペプチダーゼ (PAP) などの酵素が関与し、脱アミノ化の前に His-ProNH<sub>2</sub> が生成される (Cummins & O'Connor, 1998)。TRH と同様の代謝経路が TRH 類縁体であるタルチレリン、モンチレリン及びポサチレリンの代謝に関与している可能性が報告されており (Kodama et al., 1997; Matsunaga et al., 1996; Sugimoto et al., 1996)、これらの TRH 類縁体は PAP に対して不安定であると考えられている。PAP には 3 つの分子種 (チロリベリナーゼ、PAPI 及び PAPII) が哺乳類の組織で認められている。チロリベリナーゼは主に血中に局在し、PAPI 及び PAPII の両者は主に下垂体及び脳に分布しており、PAP の 3 分子種は TRH の作用部位において受容体への結合を調節していると考えられている。一方で、PAP の 3 分子種の PAP には基質特異性の違いがあると考えられる。事実、タルチレリンはラット血漿中のチロリベリナーゼに耐性であるが、ラット脳ホモジェネート中の



PAPI 及び PAPII により速やかに分解されると考えられる (Figure 1-4)。また、タルチレリンは、脳ホモジェネートに加えてラット下垂体ホモジェネートによっても代謝されることが知られている (Kodama et al., 1997)。したがって、タルチレリンは脳及び下垂体の PAPI 及び PAPII の基質であるが、血中に存在するチロリベリナーゼの基質ではないと推察される。一方、ロバチレリンは、ラットの血漿及び脳ホモジェネート中で安定であり、ロバチレリンがすべての PAP 分子種に耐性であることを示している。したがって、TAMP (ロバチレリンの His-ProNH<sub>2</sub>誘導体) は、TRH 及びこれまでの TRH 類縁体とは異なり PAP により生成されるのではなく、肝臓のシトクロム P450 などの代謝酵素によって生成されると考えられた。

## 第 2 章 臨床におけるロバチレリンの薬物動態

### 2.1 緒言

ヒトマスバランス試験は、新規医薬品候補化合物の薬物動態特性を理解するための必要な臨床薬理試験（単回及び反復用量漸増試験、薬物相互作用試験、特殊集団における薬物動態試験及びヒトマスバランス試験）の中で最も重要な試験と考えられている。ヒトマスバランス試験は、ヒト吸収、代謝及び排泄試験（hAME試験）とも呼ばれ試験評価項目が多くかつ試験費用が高額であるため、通常は医薬品開発の後期（後期第 II 相臨床試験付近）に実施される。

ヒトマスバランス試験の主な目的は、1) 血液循環している未変化体及び代謝物を同定及び定量評価すること、2) 医薬品候補化合物の消失経路を明らかにすることである。一つ目の目的に関しては、医薬品候補化合物の安全性プロファイルを確認するため、非臨床における安全性評価を必要とする代謝物の存在とその曝露量を明らかとすることである。加えて、代謝物が薬理活性に寄与する又は薬物相互作用を惹き起こす可能性がある場合には、*in vitro* での代謝酵素の阻害及び誘導について評価を行う必要がある。二つ目の目的に関しては、吸収率（ $F_a$ ）及び消失過程を明らかにすることと、肝及び腎障害者における臨床薬物動態試験及び臨床薬物相互作用（DDI）試験が必要かどうかを検討することである。

ヒトマスバランス試験は、通常放射性同位元素（RI）で標識した医薬品候補化合物を用いて検討される。RI 標識化合物を投与した場合には、その放射能を測定することにより血漿中放射能濃度推移及び尿糞排泄の物質収支を容易に確認できる。また、放射能検出器付き HPLC 及び高分解能精密質量分析装置等を用いて、網羅的に代謝物の存在を確認することが可能であり、さらに代謝物の化学構造を推定することも可能となる。

ヒト代謝物の安全性に関しては以前から議論されてきたが、代謝物の安全性が強調された初めての規制は、米国食品医薬品局（FDA）によって発出されたガイダンスである（FDA ガイダンス 2008）。このガイダンスでは、安全性上懸念される代謝物は、定常状態での血中曝露において、未変化体 AUC の 10% を超える AUC を示す代謝物として定義された。しかしながら、血液循環している未変化体

を基準とすることの妥当性が疑問視された。特に、高クリアランス化合物の場合には、未変化体の曝露量自体が少なくなるため、懸念する必要のない寡少な代謝物も対象となる。その後、医薬品規制調和国際会議（ICH）ガイドライン M3 (R2) が発出され、臨床での代謝物曝露量が化合物関連物質の総曝露量に対し 10% を超え、かつ臨床における代謝物曝露量が非臨床毒性試験での最大曝露量よりも明らかに高い場合のみ、非臨床試験においてその代謝物の特徴づけを行う必要があると定義された（ICH ガイドライン 2009）。なお、1 日の投与量が 10 mg 未満である医薬品候補化合物の場合は、判断基準の一つである化合物関連物質の総曝露量に対する代謝物の割合を 10% 以上に設定することが可能であるとされている。欧州医薬品庁（EMA）が発出した薬物相互作用ガイドラインには、ヒトマスバランス試験の実施方法とデータの考察に関する記載がある（EMA ガイドライン 2012）。この EMA ガイドラインによると、ヒトマスバランス試験は通常第 III 相臨床試験を開始する前に実施されることが望ましいとある。早い段階でヒトマスバランス試験を実施することは、安全性に関し懸念される代謝物の有無を早期に判定することが可能となり、また時間のかかる主要消失経路の特定（臨床薬物相互作用試験を含むことが多い）に効率よく取り組めるため、製造販売承認申請時のデータパッケージをより充実したものにすることができるという利点がある。

医薬品候補化合物の主要消失経路が、代謝、尿中排泄及び胆汁排泄を介した糞中排泄のいずれの経路であるかを特定することは、薬物相互作用、薬効に寄与する代謝物の特定、人種差による血中動態の変動及び特殊集団における血中動態等の予見を可能とし、薬物動態学的特性を明らかにするのみならず、医薬品の安全性を考慮した用法用量を設定するうえでも重要であると考えられる。多くの薬物は代謝により消失し（～73%）、シトクロム P450 をはじめとする薬物代謝酵素により代謝物となることが知られている（Wienkers & Heath, 2005; Williams, 2004）。また、シトクロム P450 による薬物代謝については、大部分（46%）は CYP3A が関与し、次いで CYP2C9 が 16%、CYP2C19 及び CYP2D6 が 12%、CYP1A が 9%、CYP2B6 及び CYP2E1 が 2% 程度関与すると報告されている。このようにシトクロム P450 の代謝により薬物が消失するケースは多く認められるため、代謝に関与す

るシトクロム P450 分子種が重複する薬物同士の併用は、薬物相互作用を惹き起こす可能性がある。また、シトクロム P450 のうち特に CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP3A5 には遺伝子多型が存在し、かつ人種により不活性なアレル頻度が異なるため (Di, 2014)、薬物の血中動態に個体差及び人種差を生じさせる要因となる。したがって、薬物の消失に寄与する主たるシトクロム P450 を特定し、消失への寄与率 (代謝寄与率:  $f_m$ ) を推定することは、薬物相互作用や血中動態の個体差を推定するために非常に有用である。

非臨床におけるロバチレリンの吸収、分布、代謝及び排泄については明らかにされたが (第 1 章参照)、ヒトにおけるロバチレリンの吸収量、*in vitro* 試験結果から主要代謝物と想定される TAMP の体内動態、安全性上懸念される代謝物の有無及びロバチレリンの消失経路については明らかではなかった。そこで、本章ではヒトマスバランス試験を実施し、血液循環している未変化体及び代謝物の定量評価、並びにそれら尿及び糞中排泄のデータを取得するとともに、*in vitro* 試験により主代謝酵素を特定し、ヒトにおけるロバチレリンの主たる消失経路を明らかにした。

## 2.2 材料及び方法

### 2.2.1 試薬等

[<sup>14</sup>C]ロバチレリンは Selcia Ltd.にて合成し特性分析が行われ、放射化学的純度は 97.7% であり、比放射能は 5.52 MBq/mg であった。この [<sup>14</sup>C]ロバチレリンは、-80°C で保管した。

非標識のロバチレリン水和物並びに標準品のロバチレリン水和物及びロバチレリン-*d*<sub>10</sub>は、塩野義製薬株式会社から提供された。ロバチレリンの代謝物であるロバチレリンアミノペンタン酸 (ロバチレリン-アシッド)、ロバチレリンピロリジン (4S)-ヒドロキシ (ロバチレリン-水酸化体) 及び KP051 の標準品は、キッセイ製薬株式会社において合成された。ロバチレリンアミノペンタノン (ロバチレリン-ケトン)、(チアゾイルアラニル)メチルピロリジン (TAMP) ジトルエンスルホン酸塩及び 3-(4-チアゾイル)-L-アラニン (TA) は、それぞれ住化テクノサービス株式会社、株式会社ナード研究所及び渡辺化学工業株式会社において合成された。

可溶化剤 Soluen-350、放射性二酸化炭素吸収剤 Carbo-Sorb E、HPLC 用シンチレーションカクテル Ultima Flo-M 及びシンチレーションカクテル Emulsifier-Safe 及び Permafluor E+は、PerkinElmer Life and Analytical Sciences から購入した。プールされたヒト肝 S9 画分 (42 ドナーのプール) 及びヒト肝ミクロソーム (24 ドナーのプール) を BD Gentest から購入した。また、組換えヒトシトクロム P450 (CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、3A4 及び 3A5 supersomes) も、BD Gentest から購入した。酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (NADP<sup>+</sup>)、酸化型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD<sup>+</sup>)、グルコース-6-リン酸 (G-6-P) 二ナトリウム水和物及び酵母由来 G-6-P 脱水素酵素 (G-6-P DH) は、オリエンタル酵母株式会社から購入した。その他のすべての試薬及び溶媒は分析用であり、市販品を購入して試験に用いた。

### 2.2.2 投与液の調製

投与液は<sup>[14C]</sup>ロバチレリンのエタノール溶液及び非標識ロバチレリン水和物から調製され、ユニットドーズ型に製剤化された。必要量のロバチレリン (<sup>[14C]</sup>標識体及び非標識体) を滅菌水/エタノール (90:10, v/v) 中に溶解し、投与液中の放射能及びロバチレリン濃度はそれぞれ 43.29 KBq/mL 及び 0.063 mg/mL であった。ユニットドーズ型の製剤には無水物としてロバチレリン 3.2 mg 及び<sup>[14C]</sup>ロバチレリン (2.16 MBq) が含まれ、臨床現場で調製された製剤はすべて製造から 72 時間以内に投与された。このマスバランス試験における放射線量は約 0.48 mSv であり、国際放射線防護委員会ガイドライン (1992) のカテゴリーIIa 試験 (0.1~1 mSv) に該当した。放射性物質の投与量は、英国健康保護庁の放射線・化学・環境ハザードセンターが策定したヒト放射線内部被ばく線量の推定計算に基づいて設定された。<sup>[14C]</sup>ロバチレリンの投与放射エネルギー (2.16 MBq) は、マスバランス、排泄経路並びに血液、血漿及び排泄物中の動態を明らかとするのに十分な放射エネルギーであると考えられた。また、ロバチレリンの投与量 (3.2 mg) は治療用量の範囲内であり、単回経口投与時のロバチレリン及び主要代謝物である TAMP の体内動態を明らかとするのに十分な投与量であった。

### 2.2.3 試験デザイン

本治験（試験計画書番号：KPS1105）は、体重が 65.2～93.1 kg（平均値 78.53 kg）、ボディマス指数（BMI）が 23.1～27.9 kg/m<sup>2</sup>（平均値 25.53 kg/m<sup>2</sup>）、そして年齢が 36～53 歳（平均値 45 歳）である健康な白人男性 6 名における非盲検の単回経口投与試験として実施された。また、本治験は、英国（Leeds）の Covance Clinical Research Unit（CCRU）において GCP のガイドライン、ヘルシンキ宣言の倫理的原則、ICH ガイドライン及び関連法令に準拠して実施した。治験開始前に、研究倫理委員会により治験実施計画書及び同意説明文書が審査され、承認された。

本治験は、英国の医薬品・医療製品規制庁から臨床試験実施許可を取得し、さらに研究倫理委員会の承認を受けた後に開始された。また、英国の放射性物質投与諮問委員会からも本治験の実施許可を得た。

本治験では、年齢が 35～55 歳の範囲で、かつ BMI が 18.5～30 kg/m<sup>2</sup>の範囲である健康な白人男性を対象とした。また、病歴、生理学的検査、12 誘導心電図（ECG）及び臨床検査値により健康状態が良好であると診断された対象者を被験者とした。被験者の主要な選択基準及び除外基準を Table 2-1 に示した。

被験者には、1 日目朝の空腹時に<sup>14</sup>C]ロバチレリン投与液（50 mL）を経口投与した。その後、投与液が入っていた容器を 2 回水道水ですすぎ（100 mL × 2）、このすすぎ液も被験者に投与した（投与時の水分摂取量：250 mL）。

Table 2-1 Inclusion and exclusion criteria for human mass balance study of rovatirelin

Inclusion criteria	Exclusion criteria
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Caucasian males between 35 and 55 years of age.</li> <li>● BMI between 18.5 and 30 kg/m<sup>2</sup> and total body weight within the range of 50 to 100 kg.</li> <li>● In good health, as determined by a medical history, physical examination, 12-lead ECG and clinical laboratory evaluations (congenital non-haemolytic hyperbilirubinaemia is not acceptable).</li> <li>● A minimum of 1 to 2 bowel movements per day.</li> <li>● Written informed consent to participate in this study.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>● History or presence of hyperthyroidism as determined by signs and/or symptoms and/or abnormal thyroid function tests (TSH, FT<sub>3</sub> or FT<sub>4</sub>) at screening or Day -1.</li> <li>● Use of any prescribed systemic or topical medication within 14 days of dose administration.</li> <li>● Use of any non-prescribed systemic or topical medication (including herbal remedies) within 7 days of dose administration (with the exception of vitamin/mineral supplements).</li> <li>● Use of any medications, including St. John's Wort, known to chronically alter drug absorption or elimination processes within 30 days of dose administration.</li> <li>● Donation any blood, plasma or platelets in the 3 months prior to Screening or &gt;2 occasions within the 12 months preceding to dose administration.</li> <li>● Significant history of drug allergy.</li> <li>● Any clinically significant allergic disease (excluding non-active hayfever).</li> <li>● Consumption &gt; 28 units of alcohol per week/Significant history of alcoholism.</li> <li>● Significant history of drug/Chemical dependence or abuse within 6 months prior to the study and/or show a positive urine drug screen at Screening or on Day -1.</li> <li>● Smoking within 12 months prior to dose administration.</li> <li>● Subjects with, or with a history of, any clinically significant neurological, gastrointestinal, renal, hepatic, cardiovascular, psychiatric, respiratory, metabolic, endocrine, haematological or other major disorders.</li> <li>● Clinically significant illness within 4 weeks of dose administration.</li> <li>● Clinically significant central nervous system disorders within 1 year of dose administration.</li> <li>● Serum hepatitis/Carriers of the hepatitis B surface antigen or hepatitis C antibody/Positive result to the test for human immunodeficiency virus antibodies.</li> <li>● Exposure to radiation source as a result of their occupation.</li> <li>● Exposure to X-ray (other than dental X-rays)/Participation in any clinical trial involving a radiolabelled investigational product/Exposure to radiolabelled substances (for treatment or diagnosis) within 12 months prior to dose administration.</li> </ul>

BMI: Body mass index; ECG: electrocardiogram; TSH: thyroid-stimulating hormone; FT<sub>3</sub>: free triiodothyronine; FT<sub>4</sub>: free thyroxine.

各被験者は、-1日目（投与前日）から少なくとも11日目（投与後240時間）まではCCRUに入院した。なお、投与された放射能の回収率が十分でない場合には11～15日目（投与後336時間）まで入院が延長され、さらに21日目（±1日）及び28日目（±1日）にCCRUにて外来診断を行えた。11日目において、連続した2時点の血漿試料から放射能が検出されず、連続した24時間区間に採取された排泄物（尿及び糞）に回収された総放射エネルギーが投与量の1%未満であり、かつ長期滞在を必要とする医学的理由がないと判断されたとき、被験者はCCRUから退院し

た。すべての被験者が本治験を完了したが、1名の被験者が投与後6時間以内に投与量の約50%を嘔吐した。その被験者のデータは、平均値、標準偏差及び数値範囲の算出から除外された。入院期間中、すべての被験者には繊維質が豊富な食事が与えられ、すべての食事で適量の食物が提供された。グレープフルーツ、グレープフルーツジュース、セビリアオレンジ、セビリアオレンジマーマレード、グレープフルーツ/セビリアオレンジを含む食品、ケシの実及びケシの実を含む食品は、投与7日前から退院まで摂取は許可されず、カフェインを含む食品及び飲料は投与の48時間前から退院まで摂取許可されなかった。さらに、この治験ではアルコールの摂取と喫煙は許可されなかった。また、投与の7日前から最終的にCCRUを退院するまで、被験者は過度の運動をしないように求められた。

#### 2.2.4 安全性評価

安全性に関して、臨床検査の評価、体重測定、身体検査、12誘導心電図、生理学的検査及び有害事象のモニタリングを行い、本治験全体を通して評価した。

#### 2.2.5 試料採取

血液及び血漿中放射能濃度測定用の血液(6 mL)並びに血漿中ロバチレリン及びTAMP濃度測定用の血液(4 mL)を、投与前並びに投与後0.5、1、2、3、4、5、6、8、12、24、36、48、72、96、120、144、168、192、216及び240時間に抗凝固剤としてヘパリンリチウム又はナトリウムを含むチューブに採取した。投与後240時間に退院基準を満たさず、CCRUに留まる必要があった1名の被験者について、投与後264、288及び312時間に血液試料を追加採取した。代謝物プロファイル用の血液(10 mL)は、投与前並びに投与後0.5、1、2、3、4、5、6、8、12、24、36、48、72、120及び168時間にヘパリンリチウムを含むチューブに採取した。

血液(2 mL)は冷蔵し、血液中放射能濃度測定に使用した。血漿中放射能濃度測定、血漿ロバチレリン及びTAMP濃度測定及び血漿中代謝物プロファイル用に、血液を4°Cにおいて10分間、1500 ×gで遠心分離した。調製した血漿試料を、4°C(血漿中放射能濃度測定用)又は-70°C(血漿ロバチレリン及びTAMP濃度測定用及び血漿中代謝物プロファイル用)にて保管した。

尿試料を、投与前(-12~0時間)並びに投与後0~6、6~12、12~24、24~48、



48～72、72～96、96～120、120～144、144～168、168～192、192～216 及び 216～240 時間の区間で採取した。一名の被験者については、投与後 312 時間まで 24 時間区間の採尿を継続した。採取期間中の尿は、冷蔵庫に保管された。採取終了後、放射能測定用 (20 mL)、尿中ロバチレリン及び TAMP 濃度測定用 (4 mL) 及び代謝物プロファイル用 (20 mL) の尿を分取し、それぞれ 4°C、-70°C 及び -70°C にて保管した。

糞試料を、投与前 (-24～0 時間) 並びに投与後 0～24、24～48、48～72、72～96、96～120、120～144、144～168、168～192、192～216 及び 216～240 時間の区間で採取した。一名の被験者については、投与後 312 時間まで 24 時間区間の糞採取を継続した。排便直後から放射能の測定及び代謝物プロファイルを行うまで、糞試料を -20°C にて保管した。採取終了後、各時間区間で採取した糞を、適切な量の脱イオン水を用いて均質化した。この糞ホモジェネート試料を、-20°C (放射能測定用) 及び -70°C (代謝物プロファイル用) にて保管した。

血漿、尿及び糞中の放射能を測定後、十分に放射能が検出可能な時点又は時間区間の試料を代謝物プロファイルの評価に用いた。

## 2.2.6 試料の放射能測定

血漿 (最大 800 µL) 及び尿 (最大 1 mL、重量測定実施) 試料には、シンチレーションカクテル Emulsifier-Safe を加え混和後、液体シンチレーション計数法 (LSC) により放射能を測定した。

血液 (400 µL) 及び糞ホモジェネート (0.2～0.5 g) を、サンプルオキシダイザー System 307 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) を用いて燃焼し、得られた <sup>14</sup>CO<sub>2</sub> を放射性二酸化炭素吸収剤 Carbo-sorb E に吸収させ、その後シンチレーションカクテル Permafluor E+ と混和した。燃焼効率の確認は、放射エネルギーが既知である試料の燃焼及び放射能測定により行った。すべての試料の放射能は、液体シンチレーションカウンター 2100TR、2900TR 又は 3100TR (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) を用いて測定した。

## 2.2.7 血漿及び尿中ロバチレリン及び TAMP 濃度測定

血漿試料 (100 µL) 又は尿試料 (50 µL) 中のロバチレリン及び TAMP を、

OASIS HLB  $\mu$ Elution Plate (Waters Corporation) を用いて抽出した。ロバチレリン及び TAMP 濃度は、Acquity HPLC システム (Waters Corporation) 及び API5000 (血漿試料) 又は API4000 (尿試料) (AB Sciex Pte. Ltd.) を用いて、正イオンモードでエレクトロスプレーイオン化を行う LC-MS/MS 法により測定した。HPLC による分離は、50°C (血漿試料) 又は 40°C (尿試料) に保温した Hypersil GOLD PFP カラム (長さ 100 mm  $\times$  内径 3 mm、Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。移動相として、移動相 A (0.2%ギ酸を含む 10 mmol/L ギ酸アンモニウム溶液) 及び移動相 B (0.2%ギ酸を含むアセトニトリル) を用いた。血漿試料分析時の移動相グラジエント及び流量は、30%B (0 min, 0.25 mL/min)  $\rightarrow$  30%B (4.5 min, 0.25 mL/min)  $\rightarrow$  90%B (4.55 min, 0.6 mL/min)  $\rightarrow$  90%B (5.80 min, 0.6 mL/min)  $\rightarrow$  30%B (5.85 min, 0.6 mL/min)  $\rightarrow$  30%B (6.80 min, 0.6 mL/min)  $\rightarrow$  30%B (6.85 min, 0.25 mL/min)  $\rightarrow$  30%B (7.20 min, 0.25 mL/min) と設定した。尿試料分析時の移動相は 70%の移動相 A 及び 30%の移動相 B とし、アイソクラティックに溶出した。流量は、0.3 mL/min (0 min)  $\rightarrow$  0.3 mL/min (3.0 min)  $\rightarrow$  0.6 mL/min (3.1 min)  $\rightarrow$  0.6 mL/min (3.5 min)  $\rightarrow$  0.3 mL/min (3.6 min)  $\rightarrow$  0.3 mL/min (4.0 min) と設定した。多重反応モニタリング (MRM) により、ロバチレリンの質量電荷比 ( $m/z$  367 $\rightarrow$ 254)、TAMP の質量電荷比 ( $m/z$  240 $\rightarrow$ 127) 及び内標準 (ロバチレリン- $d_{10}$ ) の質量電荷比 ( $m/z$  377 $\rightarrow$ 254) の遷移をモニターし、ロバチレリン及び TAMP 濃度として算出した。ロバチレリン及び TAMP の検量線は、血漿試料では 0.02~40 ng/mL、尿試料では 0.5~1000 ng/mL の範囲で作成した。試料の測定前に、選択性、直線性、再現性 (真度及び精度) 及び安定性を確認し、この濃度測定法の信頼性について確認した。さらに、採取した試料の測定値について再現性 (incurred sample reproducibility) を評価した結果、これらのデータは許容範囲内であった。

## 2.2.8 薬物動態パラメータの算出

薬物動態パラメータは、WinNonlin Enterprise Version 5.2 (Pharsight Corporation) を用いて、ノンコンパートメント解析を行い、個々の被験者データから算出した。血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) は線形台形法により算出し、0 から無限大時間までの AUC (AUC<sub>inf</sub>) は終末相の濃度推移を外挿することにより算出した。消

失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は、対数変換した血漿中濃度-時間曲線の終末相における傾き ( $\lambda_z$ ) から算出した。最大濃度 ( $C_{max}$ ) 及び最大濃度到達時間 ( $t_{max}$ ) は実測値とした。経口クリアランス ( $CL/F$ ) は投与量を  $AUC_{inf}$  で除して算出した。終末相における分布容積 ( $V_z/F$ ) は、 $CL/F$  を  $\lambda_z$  で除して算出した。

排泄物 (尿及び糞) 中の放射能濃度に採取区間の重量を乗じて各採取区間の回収量を求め、その合計値 ( $A_e$ ) 及び投与放射エネルギーに対する割合 ( $f_e$ ) を算出した。また、各回収時間区間における尿及び糞中への回収量をそれぞれ合算し、各排泄物の累積排泄量を算出した。腎排泄クリアランス ( $CL_R$ ) は、尿中累積排泄量 ( $A_e$ ) を  $AUC$  で除して算出した。

## 2.2.9 代謝物プロファイル用試料の調製

投与後 3、4、5、6、8 及び 12 時間における 5 人の被験者の血漿試料を、各時点でプールした。さらに、 $AUC$  を反映する血漿試料を、 $AUC$  プール法 (Hamilton et al., 1981) により被験者ごとに調製した。このとき調製にもちいた血漿試料の時点は各被験者の血漿中放射能濃度に依存し、投与後 0.5~12、2~12 又は 3~72 時間とした。これら血漿試料を 4 容量のアセトニトリルと混和し、4°C にて 10 分間遠心分離して上清を分離した。残渣を、最初の抽出と同様の方法により 4 容量のアセトニトリル/メタノール (1:1, v/v) を用いてさらに抽出した。室温で窒素ガス気流により、得られた上清を蒸発乾固させた。この乾固物を 800  $\mu$ L の 10 mmol/L 酢酸アンモニウム pH 9.0/アセトニトリル (97:3, v/v) に溶解し、遠心分離後 HPLC 分析に供した。最終抽出物の放射能を LSC により測定し、放射能の回収率を算出した。抽出物への放射能の回収率は、66.3%~79.0% (平均値: 74.2%) であった。

各時間区間で採取した尿試料を、尿中排泄された放射能の 90%以上が含まれるように被験者ごとに混和した。この尿試料の調製には、各時間区間における尿試料重量の 0.3%を用いた。各尿試料 (2 mL) を遠心分離し、上清を HPLC 分析した。尿試料からの回収率を評価するため、上清の放射能を LSC により測定した結果、回収率は 96.9~102.3% (平均値: 100.6%) であった。

各時間区間で採取した糞試料を、糞中排泄された放射能の 95%以上が含まれるように被験者ごとに混和した。この糞試料の調製には、各時間区間における糞ホ

モジエネート重量の 1.5%を用いた。各糞ホモジエネート試料 (2 g) を 4 容量のアセトニトリル/メタノール (1:1, v/v) で 2 回抽出した。その後、血漿試料と同様に試料を処理後、HPLC 分析に供した。

糞試料からの回収率を評価するため、最終抽出物の放射能を LSC により測定した結果、回収率は 93.2~108.1% (平均値: 100.7%) であった。

#### 2.2.10 血漿、尿及び糞中代謝物プロファイル試験の HPLC 分析条件

HPLC によるピーク分離は、Agilent 1100 HPLC システム (Agilent Technologies) を用いて行った。分析カラムは Luna C18 カラム (長さ 50 mm × 内径 4.6 mm、粒子サイズ 5 µm、Phenomenex) を 40°C に保温して使用し、移動相として移動相 A (10 mmol/L 酢酸アンモニウム、pH 9.0) 及び移動相 B (アセトニトリル) を用いた。流速は 1.0 mL/min とし、線形グラジエント (%B) は、3%B (0 min) → 3%B (5 min) → 18%B (35 min) → 70%B (45 min) → 70%B (50 min) → 3%B (50.1 min) → 3%B (60 min) と設定した。UV 検出器 (検出波長: 210 nm) によりピークを検出し、HPLC からの溶出液は HTC PAL フラクシオンコレクター BLCA124 (CTC Analytics AG) を使用して 96 ウェルマイクロプレート Deep-Well LumaPlate (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) に 10 秒ごとに分画した。マイクロプレートから HPLC の移動相を蒸発乾固した後、放射能をマイクロプレートシンチレーション・ルミネッセンスカウンター TopCount NXT (PerkinElmer Life and Analytical Sciences) を用いて測定した。得られたデータを、Laura ソフトウェア v3.4 (Lablogic Systems Ltd) を用いて解析した。代謝物の同定は、分析試料の放射能のピークと UV 検出における標準品ピークの保持時間を比較することにより行った。さらに、多段階質量分析装置 (MS<sup>n</sup>) を用いた LC-MS/MS 分析 (2.2.11 項参照) においても、分析試料のイオンピークと標準品のイオンピークの保持時間を比較することにより、代謝物の同定を行った。

放射能のカラム回収率は、血漿試料では 89.7%、尿試料では 85.8%、並びに糞試料では 100% であった。したがって、この分析系ではカラム等への放射能の吸着は、ほとんどないと考えられた。

放射能の総ピークエリアに対する比 (% total peak area) を求めるために、クロマ

トグラム上に検出された各放射能のピーク（バックグラウンドの 3 倍以上）を定量した。標準品との比較により同定できなかった代謝物については、HM (human metabolite) という接頭語に保持時間に基づいた番号を順に付し表示した。尿及び糞中のロバチレリン及び代謝物の存在量は、投与量比 (% of dose) で示した。

#### 2.2.11 ロバチレリン及び代謝物同定に用いた LC-MS (MS<sup>n</sup>) 分析条件

採取した血漿、尿及び糞から調製した分析試料を、LC-MS (MS<sup>n</sup>) を用いて分析した。HPLC によるピーク分離は Accela HPLC システム (Thermo Fisher Scientific) を用い、2.2.10 項に示した HPLC 条件により分析を行った。HPLC からの溶出液を、質量分析計及び Beta-RAM 放射能検出器 model 4 (Lablogic Systems Ltd.) 間で 1 : 10 の比率で分岐した。質量分析は、LTQ Orbitrap hybrid mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。質量分析計の分析条件は、大気圧イオン化インターフェース、エレクトロスプレーイオン化、正イオンモードでのフルスキャン、スキャンレンジ 100-750 *m/z* (MS<sup>n</sup>のデータに依存)、ソース電圧 4.2 kV 及びキャピラリー温度 310°C とした。分析試料中の代謝物の保持時間、イオン化した分子及びフラグメントイオンについて標準品のものと比較することにより同定した。また、ロバチレリンに関連した分子イオンは、ラジオクロマトグラム上の保持時間を比較することにより同定された。すべての分析において、検出された分子イオンのうち <sup>12</sup>C のイオンが主要であった。代謝物の精密質量による同定では、測定された精密質量は理論値に対して 5 ppm 以内とした。フラグメンテーションについては、特に記載しない限り、<sup>12</sup>C イオンに基づいて表示した。

#### 2.2.12 ヒト肝試料及び組換えヒト CYP を用いた TAMP 生成反応

TAMP 生成の評価は、100 mmol/L リン酸カリウム緩衝液 pH 7.4、3.3 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、1.3 mmol/L NADP<sup>+</sup>、3.3 mmol/L G-6-P、0.4 unit/mL G-6-P DH、酵素画分 (ヒト肝 S9 の場合は 4.0 mg/mL、HLM の場合は 2.0 mg/mL 並びに組換えヒト CYP の場合は 100 pmol/mL) 及び 200 µmol/L ロバチレリンを含む反応溶液 (100 µL) 中で行った。阻害試験では、反応溶液に CYP 阻害薬又はアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) 阻害薬、すなわち 500 µmol/L 1-アミノベンゾトリアゾール (広範な CYP 阻害薬)、10 µmol/L フラフィリン (CYP1A2 阻害薬)、2 µmol/L *trans*-2-フェニルシ

クロプロピルアミン (CYP2A6 阻害薬)、1  $\mu\text{mol/L}$  チクロピジン (CYP2B6 阻害薬)、0.1  $\mu\text{mol/L}$  モンテルカスト (CYP2C8 阻害薬)、10  $\mu\text{mol/L}$  スルファフェナゾール (CYP2C9 阻害薬)、1  $\mu\text{mol/L}$  (S)-(+)-N-3-ベンジルニルバノール (CYP2C19 阻害薬)、1  $\mu\text{mol/L}$  キニジン (CYP2D6 阻害薬)、50  $\mu\text{mol/L}$  ジエチルジチオカルバミン酸 (CYP2E1/ALDH 阻害薬)、1  $\mu\text{mol/L}$  ケトコナゾール (CYP3A4/5 阻害薬) 又は 100  $\mu\text{mol/L}$  ジスルフィラム (ALDH 阻害薬) を添加した。ロバチレリン水和物は蒸留水に溶解し、すべての阻害薬はアセトニトリル/蒸留水 (1:1, v/v) に溶解した。反応溶液中のアセトニトリル最終濃度は、0.5% (v/v) とした。反応溶液を 37°C で 120 分間インキュベートした後、アセトニトリル (100  $\mu\text{L}$ ) を添加することにより反応を停止させた。この反応溶液を 10 分間 20800  $\times g$  で遠心分離し除タンパク質処理した後、上清を窒素ガス気流下で蒸発させた。残渣を蒸留水 (100  $\mu\text{L}$ ) で溶解した後、この溶液を Ultrafree-MC (孔径 0.22  $\mu\text{m}$ 、Merck KGaA) を用いて 10000  $\times g$  で 2 分間遠心ろ過した。

ろ液中の TAMP 濃度は、HPLC システム Hitachi L-7000 series (日立ハイテックロジーズ株式会社) を用いて測定した。HPLC によるピーク分離は、L-カラム ODS カラム (長さ 250 mm  $\times$  内径 4.6 mm、粒子サイズ 5  $\mu\text{m}$ 、化学物質評価研究機構) を 40°C に保温して使用し、移動相として移動相 A (20 mmol/L リン酸カリウム pH 7.5) 及び移動相 B (アセトニトリル) を用いた。流速は 1.0 mL/min とし、線形グラジエント (%B) は 10%B (0 min)  $\rightarrow$  10%B (5 min)  $\rightarrow$  30%B (20 min)  $\rightarrow$  60%B (20.1 min)  $\rightarrow$  60%B (25 min)  $\rightarrow$  10%B (25.1 min)  $\rightarrow$  10%B (35 min) と設定した。また、UV 検出波長は 220 nm とした。TAMP の検量線を、0.5~50  $\mu\text{mol/L}$  の濃度範囲において直線で作製した。試料の測定前に、選択性、直線性、再現性 (真度及び精度) 及び安定性を確認し、この濃度測定法の信頼性について確認した。

## 2.3 結果

### 2.3.1 ヒトマスバランス試験における安全性評価

ヒトマスバランス試験の被験者 6 名中 2 例以上に認められた有害事象は、「悪心」、「嘔吐」、「便秘」及び「頭痛」であった。有害事象の程度は「頭痛」1 件及び「嘔吐」2 件が中等度であった以外はいずれも軽度と判定され、一過性のものでは

ったため、ロバチレリン (3.2 mg) の単回経口投与は健康成人男性において忍容性があると考えられた。なお、重度又は重篤な有害事象は認められず、有害事象を理由に試験を中止した被験者はいなかった。また、臨床検査、生理学的検査、12誘導心電図、体重変化及び身体検査の結果に基づく安全性上の懸念は認められなかった。

### 2.3.2 ロバチレリン、TAMP 及び放射能の血中動態

[<sup>14</sup>C]ロバチレリンを経口投与したときのロバチレリン、TAMP 並びに放射能の血中濃度推移及び薬物動態パラメータを、それぞれ Figure 2-1 及び Table 2-2 に示した。ロバチレリンの血漿中濃度は 5.02 時間の  $t_{max}$  で  $C_{max}$  (7.92 ng/mL) に達し、その後二相性で消失し 14.9 時間の  $t_{1/2}$  で低下した。放射能に対するロバチレリンの  $C_{max}$ 、 $AUC_{0-8h}$  及び  $AUC_{0-36h}$  の割合は、それぞれ 73.0%、72.7% 及び 43.8% であった。TAMP の血漿中濃度は、放射能及びロバチレリンと比較して、8.00 時間の  $t_{max}$  で緩やかに  $C_{max}$  (0.976 ng/mL) に達した。 $C_{max}$  に達した後、TAMP の血漿中濃度は多相性に低下し、投与後 48 時間で二つ目のピークが認められた。放射能に対する TAMP の  $C_{max}$ 、 $AUC_{0-8h}$  及び  $AUC_{0-36h}$  の割合は、それぞれ 9.0%、6.3% 及び 10.6% であった。血漿及び血液中の放射能濃度の最大濃度はロバチレリンと同様の時間 ( $t_{max}$  6.00 時間) に認められた。TAMP 濃度と同様に多相性の低下が、血漿及び血液中放射能濃度推移においても観察され、投与後 48 時間で二つ目のピークが認められた。また、血液中放射能濃度は血漿中放射能濃度よりも低かった (血液/血漿比：投与後 3~12 時間で 0.713~0.771)。

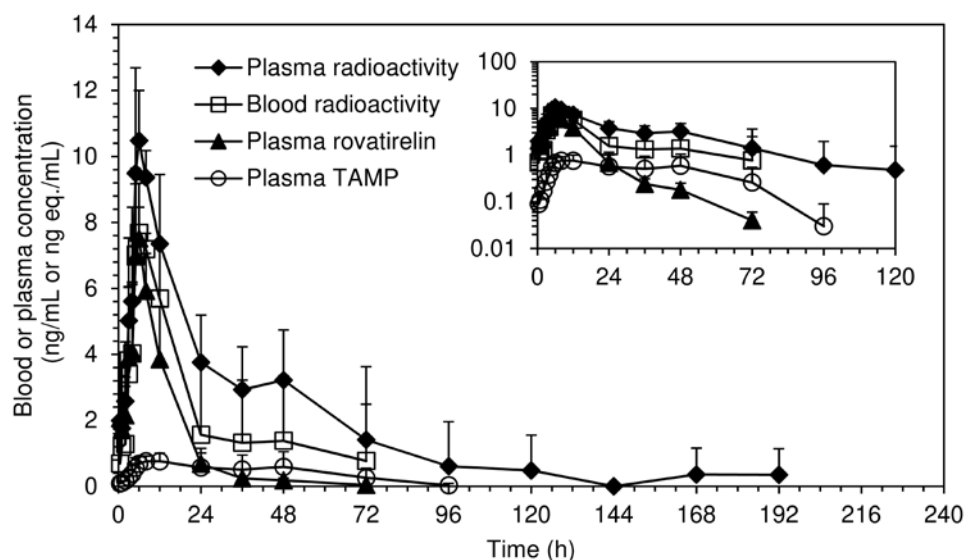


Figure 2-1 Concentrations of radioactivity in plasma and blood, and concentrations of rovatirelin and TAMP in plasma after a single oral dose of [<sup>14</sup>C]rovatirelin (3.2 mg) to healthy male subjects

Each point and vertical bar represents the mean and standard deviation of five subjects, respectively. TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

Table 2-2 Pharmacokinetic parameters of radioactivity, rovatirelin and TAMP after a single oral dose of [<sup>14</sup>C]rovatirelin (3.2 mg) to healthy male subjects

Pharmacokinetic parameters	Radioactivity (n = 5)		Rovatirelin (n = 5)	TAMP (n = 5)
	Plasma	Blood	Plasma	Plasma
C <sub>max</sub> (ng eq./mL or ng/mL)	10.8 (15.3)	8.09 (13.2)	7.92 (23.1)	0.976 (38.3)
t <sub>max</sub> <sup>a</sup> (h)	6.00 (5.00–8.00)	6.00 (5.00–8.00)	5.02 (5.00–6.00)	8.00 (5.02–48.00)
AUC <sub>0-8h</sub> (ng eq.·h/mL or ng·h/mL)	48.8 (24.9)	36.0 (23.2)	35.5 (27.0)	3.09 (39.4)
AUC <sub>0-36h</sub> (ng eq.·h/mL or ng·h/mL)	185 (16.7)	NA	81.1 (17.7)	19.7 (24.0)
AUC <sub>last</sub> (ng eq.·h/mL or ng·h/mL)	278 (59.9)	122 (78.2)	85.9 (15.1)	35.1 (46.9)
AUC <sub>inf</sub> (ng eq.·h/mL or ng·h/mL)	425 (91.8)	NC <sup>b</sup>	87.2 (14.8)	NC <sup>b</sup>
t <sub>1/2</sub> (h)	32.1 (167.1)	NC <sup>b</sup>	14.9 (19.8)	NC <sup>b</sup>
CL/F (L/h)	NA	NA	36.7 (14.8)	NA
V <sub>z</sub> /F (L)	NA	NA	787 (30.7)	NA

Geometric mean (CV%) data are presented.

TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine; C<sub>max</sub>: maximum concentration; t<sub>max</sub>: time of C<sub>max</sub>; AUC: area under the time-concentration curve; t<sub>1/2</sub>: half-life; CL/F: oral clearance; V<sub>z</sub>/F: volume of distribution during the terminal phase; NA: not applicable; NC: not calculated.

<sup>a</sup> t<sub>max</sub> is presented as median (min–max).

<sup>b</sup> The estimation of a reliable AUC<sub>inf</sub> and t<sub>1/2</sub> was not possible.



### 2.3.3 放射能、ロバチレリン及び TAMP の排泄量及び回収率

[<sup>14</sup>C]ロバチレリンを経口投与後 240 時間までの尿及び糞中累積放射能排泄量はそれぞれ投与量の 36.8%及び 50.1%であり (Table 2-3 及び Figure 2-2)、尿及び糞中排泄量の合計は投与量の 89.0%であった。また、ロバチレリン及び TAMP の尿中累積排泄量はそれぞれ投与量の 15.6%及び 15.9%であり、ロバチレリン及び TAMP の CL<sub>R</sub>はそれぞれ 5.80 L/h 及び 9.45 L/h であった。投与後 12 時間までのロバチレリンの尿中排泄量は多く、放射能の尿中排泄量のうち 71%を占めた。

Table 2-3 Cumulative excretion of radioactivity in urine and feces and cumulative excretion of rovatirelin and TAMP in urine after a single oral dose of [<sup>14</sup>C]rovatirelin (3.2 mg) to healthy male subjects

Parameter	Radioactivity (n = 5)			Rovatirelin (n = 5)	TAMP (n = 5)
	Urine	Feces	Total	Urine	Urine
f <sub>e</sub> (% of dose)	36.8 (25.1)	50.1 (24.9)	89.0 (0.7)	15.6 (16.1)	15.9 (51.8)
CL <sub>R</sub> (L/h)	NA	NA	NA	5.80 (19.1)	9.45 (21.8)

The periods of excretion of radioactivity, rovatirelin and TAMP were ≤ 240, 96, and 120 h after administration, respectively. Geometric mean (CV%) data are presented.

TAMP, (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine; f<sub>e</sub>, percentage of the administered dose; CL<sub>R</sub>, renal clearance; NA: not applicable.

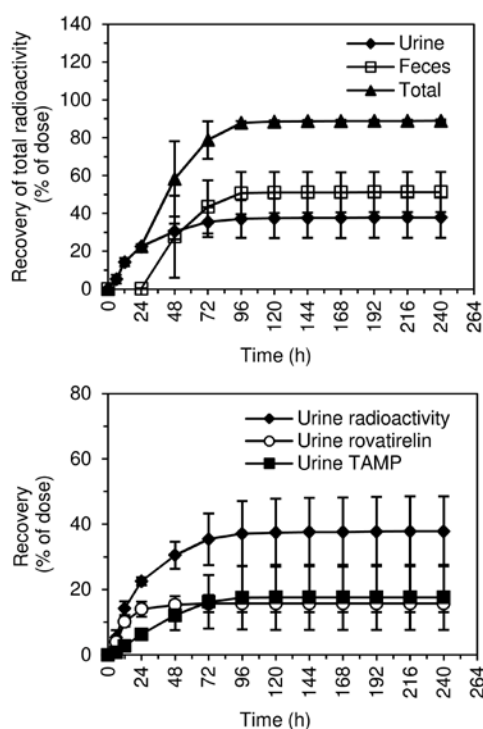


Figure 2-2 Cumulative recovery of radioactivity in urine and feces, and cumulative recovery of rovatirelin and TAMP in urine after a single oral dose of [ $^{14}\text{C}$ ]rovatirelin (3.2 mg) to healthy male subjects

Each point and vertical bar represent the mean and standard deviation of five subjects, respectively. TAMP:(thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

### 2.3.4 血漿、尿及び糞試料の代謝物プロファイル

代表的な血漿、尿及び糞試料のラジオクロマトグラムを Figure 2-3 に示し、これらの定量結果を Table 2-4 に示した。各時点の血漿では、いずれの時点においても未変化体であるロバチレリンが主要成分であり（総ピーク面積の 70%以上）、主に認められた代謝物は TAMP であった（総ピーク面積の 6%以上）。また、2 つの代謝物（TA 及び HM2）がわずかに検出された。AUC を反映する血漿試料では、未変化体が主要であった（74.21%）。TAMP は最も多く認められた代謝物であり、ロバチレリン関連物質の総曝露量の 17.20%を占めた。総ピーク面積の 2.92%を占めた HM2 は、1 人の被験者を除くすべての被験者の血漿試料で検出された。しかしながら、その 1 人の被験者の代謝物プロファイルにおいては、2 つの代謝物（TA 及び HM10）が比較的多く認められた。TA 及び HM10 は、それぞれ総ピーク面積の 3.58%及び 1.19%を占めた。

尿試料においては、血漿と同様に未変化体及び TAMP が主要であった (Figure 2-3)。また、TA、ロバチレリン-アシッド、HM2 及び HM10 はわずかであった。投与放射エネルギーに対して、未変化体及び TAMP はそれぞれ 18.07%及び 16.68%であった (Table 2-4)。尿中にわずかに検出された 5 つの代謝物は、投与放射エネルギーに対していずれも 0.5%以下であった。

糞中に排泄された大部分の放射能は、未変化体であった (Figure 2-3)。代謝物の中では、TAMP が比較的多く検出された。投与放射エネルギーに対し、未変化体及び TAMP はそれぞれ 43.29%及び 3.20%であった。その他の代謝物は、投与放射エネルギーに対していずれも 1%未満であった。

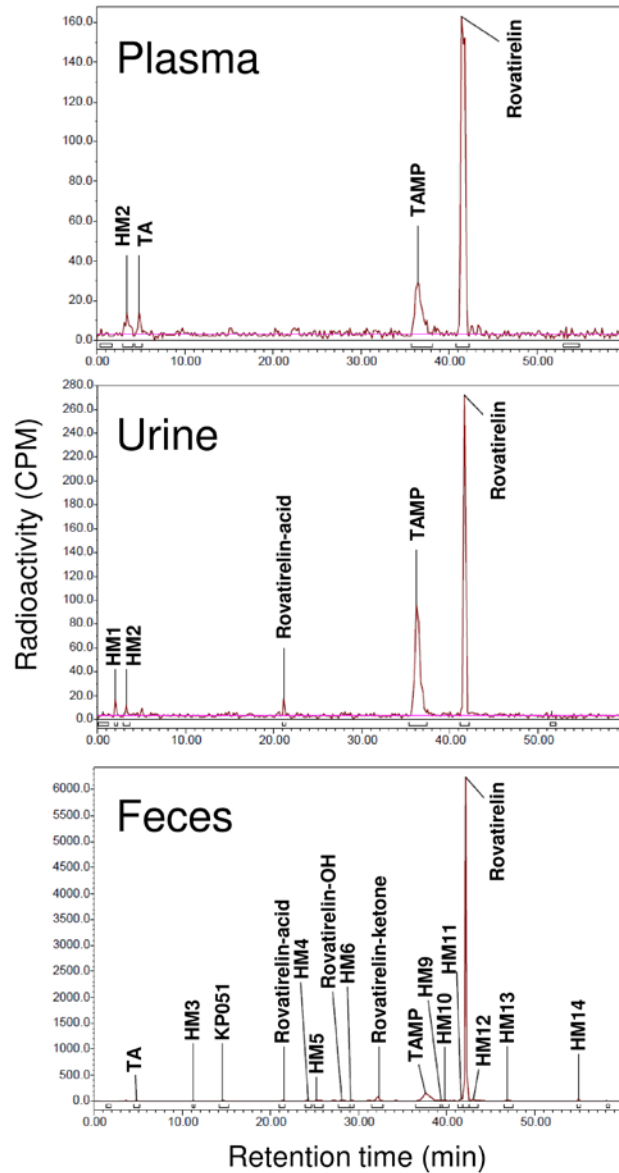


Figure 2-3 Representative radio-HPLC chromatogram of plasma (12 h time-point pool), urine (0–72 h) and feces (24–96 h) after a single oral dose of [ $^{14}\text{C}$ ]rovatirelin (3.2 mg) to healthy male subjects

HM: human metabolite (unknown); TA: 3-(4-thiazoyl)-L-alanine; TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine; rovatirelin-acid: rovatirelin aminopentanoic acid; rovatirelin-OH: rovatirelin pyrrolidine (4S)-hydroxy; rovatirelin-ketone: rovatirelin aminopentanone.

Table 2-4 Rovatirelin and metabolite profiles of rovatirelin in plasma, urine, and feces after a single oral dose of [<sup>14</sup>C]rovatirelin (3.2 mg) to healthy male subjects

	% Total Peak Area							% of Dose	
	Plasma <sup>a</sup>							Urine <sup>c</sup>	Feces <sup>d</sup>
	3 h	4 h	5 h	6 h	8 h	12 h	AUC pool (0-12 h) <sup>b</sup>		
Rovatirelin <sup>e</sup>	88.23	85.80	86.48	86.14	84.95	73.23	74.21	18.07	43.29
TAMP <sup>e</sup>	6.66	8.19	9.99	10.44	12.12	19.60	17.20	16.68	3.20
TA <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	2.52	3.58	0.15	0.07
Rovatirelin-acid <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.50	0.11
Rovatirelin-OH <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.21
Rovatirelin-ketone <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.95
KP051 <sup>e</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.12
HM2	2.79	5.62	2.86	3.09	2.75	4.29	2.92	0.23	ND
HM10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1.19	0.21	0.46
Other HMs	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.09 <sup>f</sup>	1.65 <sup>g</sup>
Total	97.85	99.60	99.33	99.67	99.82	99.64	99.10	36.12	50.36

ND: Not detected (a value of zero was used to calculate means); TAMP, (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine; TA, 3-(4-thiazoyl)-L-alanine; Rovatirelin-acid, rovatirelin aminopentanoic acid; Rovatirelin-OH, rovatirelin pyrrolidine (4S)-hydroxy; Rovatirelin-ketone, rovatirelin aminopentanone; HM, human metabolite (unknown).

<sup>a</sup> Values obtained from a time-point pooling sample from five subjects or a mean of five AUC pooling samples.

<sup>b</sup> Plasma samples were pooled by subject using an established AUC pooling technique (Hamilton pooling method). AUC pooling samples were prepared from plasma samples at 0.5–12, 2–12 or 3–72 h. Values are the means of five subjects.

<sup>c</sup> Values are the means of five subjects. Pooled urinary samples were prepared from each subject samples at 0–48, 0–72 or 0–96 h.

<sup>d</sup> Values are the means of five subjects. Pooled faecal samples were prepared from each subject samples at 24–72 or 24–96 h.

<sup>e</sup> Chemical structures are shown in Figure 2-9.

<sup>f</sup> Urinary excretion of HM1 alone.

<sup>g</sup> Total of HMs (HM3–9 and HM11–14) excreted in feces.

### 2.3.5 LC-MS (MS<sup>n</sup>) による血漿、尿及び糞試料の代謝物分析

ロバチレリン ( $m/z$  367) 及び TAMP ( $m/z$  240) が血漿、尿及び糞試料中に検出され、代表的なフルスキャン及び MS<sup>n</sup>データを取得した。標準品及び糞試料中のロバチレリンの代表的な質量スペクトルを Figure 2-4 に示し、標準品及び糞試料中の TAMP の代表的な質量スペクトルを Figure 2-5 に示した。各試料中の放射能が低いため、いずれの試料においても LC-MS 分析により確認できたのは未変化体のロバチレリン及び TAMP のみであった。その他の代謝物についてはシグナルが低く、構造を特徴づけるロバチレリン関連イオンの検出ができなかった。

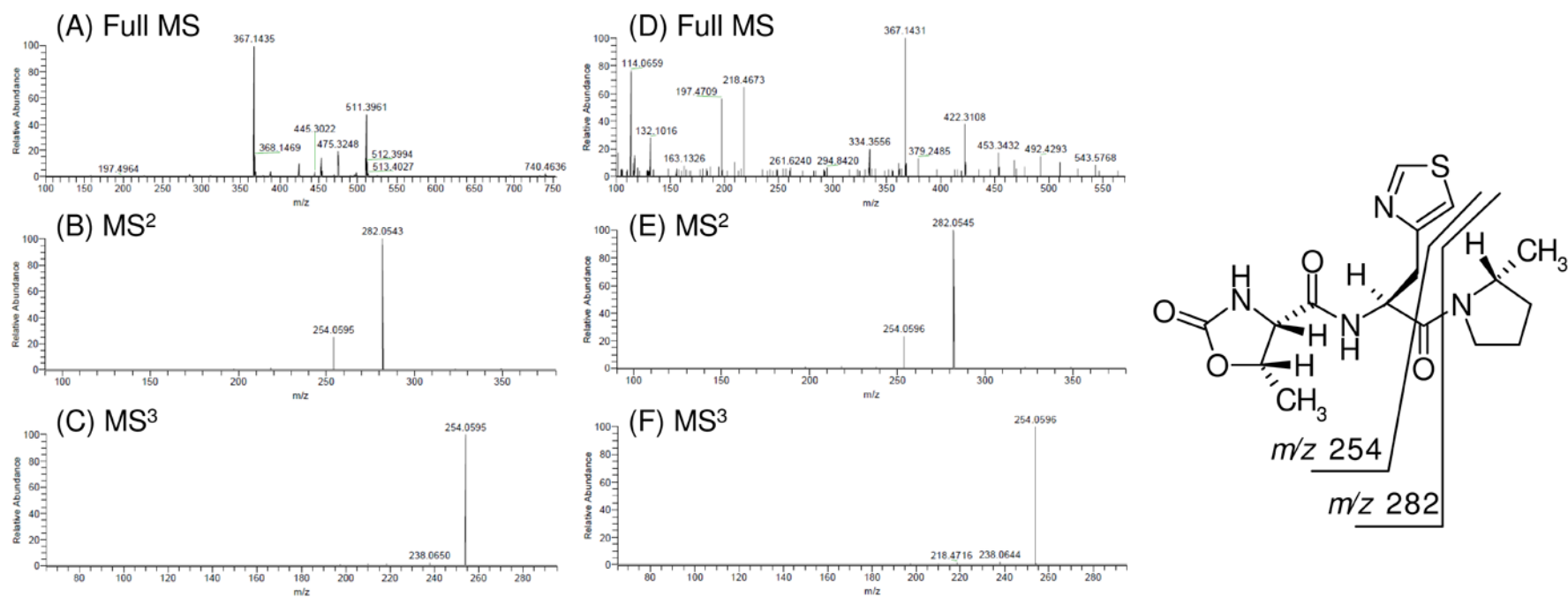


Figure 2-4 Representative mass spectra of full MS (A), MS<sup>2</sup> of [MH]<sup>+</sup> ion at *m/z* 367 (B) and MS<sup>3</sup> of its fragment at *m/z* 282 (C) from rovatirelin reference standard and representative mass spectra of full MS (D), MS<sup>2</sup> of [MH]<sup>+</sup> ion at *m/z* 367 (E) and MS<sup>3</sup> of its fragment at *m/z* 282 (F) from rovatirelin in feces (24–96 h pool).

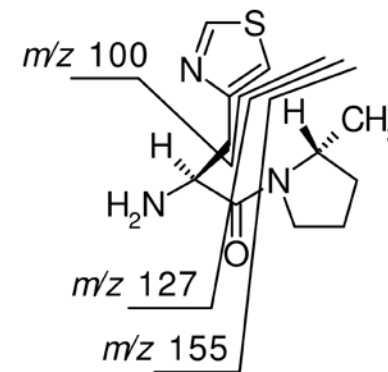
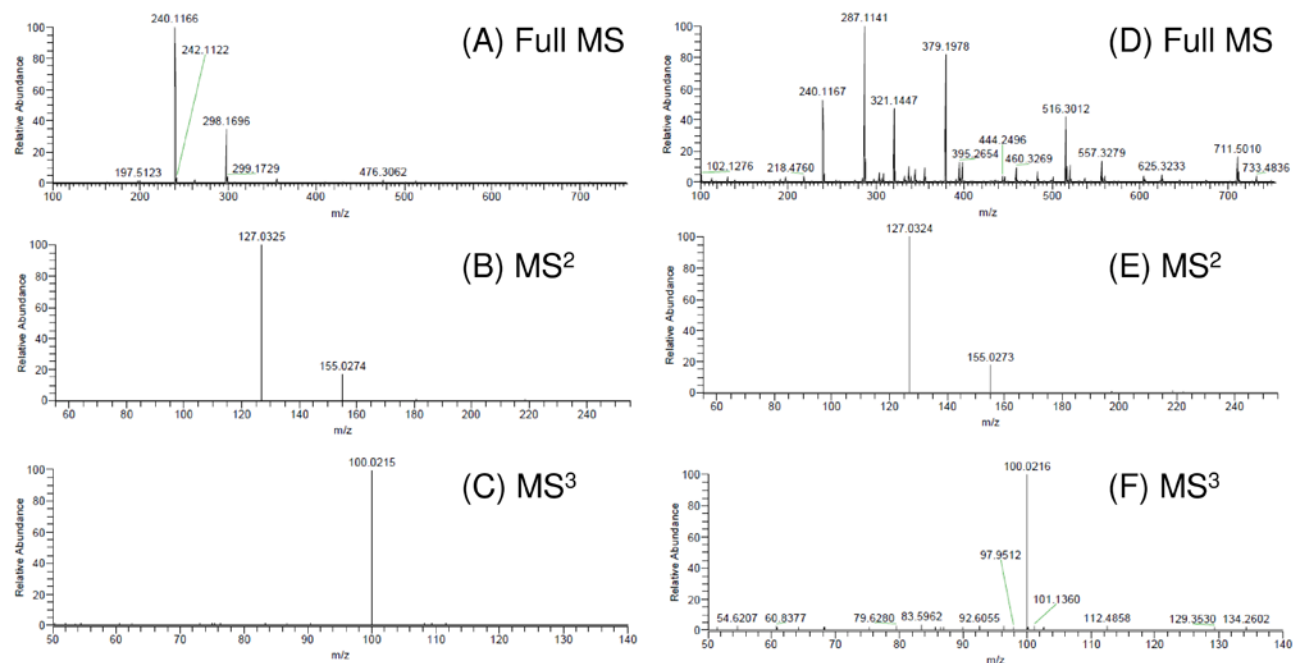


Figure 2-5 Representative mass spectra of full MS (A), MS<sup>2</sup> of [MH]<sup>+</sup> ion at  $m/z$  240 (B) and MS<sup>3</sup> of its fragment at  $m/z$  127 (C) from the TAMP reference standard and representative mass spectra of full MS (D), MS<sup>2</sup> of [MH]<sup>+</sup> ion at  $m/z$  240 (E) and MS<sup>3</sup> of its fragment at  $m/z$  127 (F) from TAMP in feces (24–96 h pool). TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

### 2.3.6 *In vitro* 試験による TAMP 及び未知代謝物の生成に関与する代謝酵素の同定

TAMP 生成に関して、ヒト肝 S9 及びマイクロソーム (HLM) 画分を用いてそれぞれ NAD<sup>+</sup>依存性及び NADPH 依存性 (NADPH 生成系) を確認した結果、TAMP は HLM 及び NADPH の存在下でのみロバチレリンから生成された。さらに、その反応溶液では未知代謝物 (unknown metabolite: UM) も検出された (Figure 2-7)。一方、NAD<sup>+</sup>を添加したヒト肝 S9 画分では TAMP は生成されなかった (未掲載データ)。TAMP 及び未知代謝物の生成に関与する代謝酵素を特定するため、CYP 及び ALDH の阻害薬を HLM 及び NADPH 生成系を含む反応溶液中に加えた (Figure 2-6 及び Figure 2-7)。TAMP 生成は 1-アミノベンゾトリアゾール (広範な CYP 阻害剤) によって阻害され、また加えて未知代謝物の生成も阻害された (未掲載データ)。さらに、ジエチルジチオカルバミン酸 (CYP2E1/ALDH 阻害薬)、ケトコナゾール (CYP3A4/5 阻害薬) 及びジスルフィラム (ALDH 阻害薬) は、HLM による TAMP 生成を阻害した。未知代謝物の生成もケトコナゾールによって阻害されたが、ジエチルジチオカルバミン酸 (未掲載データ) 及びジスルフィラムでは阻害されなかった (Figure 2-7)。組換えヒト CYP を用いた代謝反応では、TAMP 生成は CYP3A4 及び CYP3A5 の存在下でのみ認められ、CYP3A4 による生成は CYP3A5 に比し約 3 倍であった (Figure 2-8)。未知代謝物の生成は CYP3A4 及び CYP3A5 の存在下でも検出され、TAMP に対する未知代謝物の比率は、HLM と比較して高かった (Figure 2-7)。

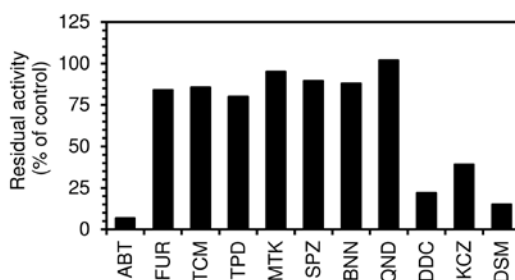


Figure 2-6 Effects of cytochrome P450 and aldehyde dehydrogenase inhibitors on TAMP formation in human liver microsomes

The columns represent the means of two replicates. ABT: 1-aminobenzotriazole (500 µmol/L); FUR: furafylline (10 µmol/L); TCM: trans-2-phenylcyclopropylamine (2 µmol/L); TPD: ticlopidine (1 µmol/L); MTK: montelukast (0.1 µmol/L); SPZ: sulfaphenazole (10 µmol/L); BNN: (S)-(+)-N-3-benzylirivanol (1 µmol/L); QND: quinidine (1 µmol/L); DDC: diethyldithiocarbamate (50 µmol/L); KCZ: ketoconazole (1 µmol/L); DSM: disulphiram (100 µmol/L); TAMP: (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.



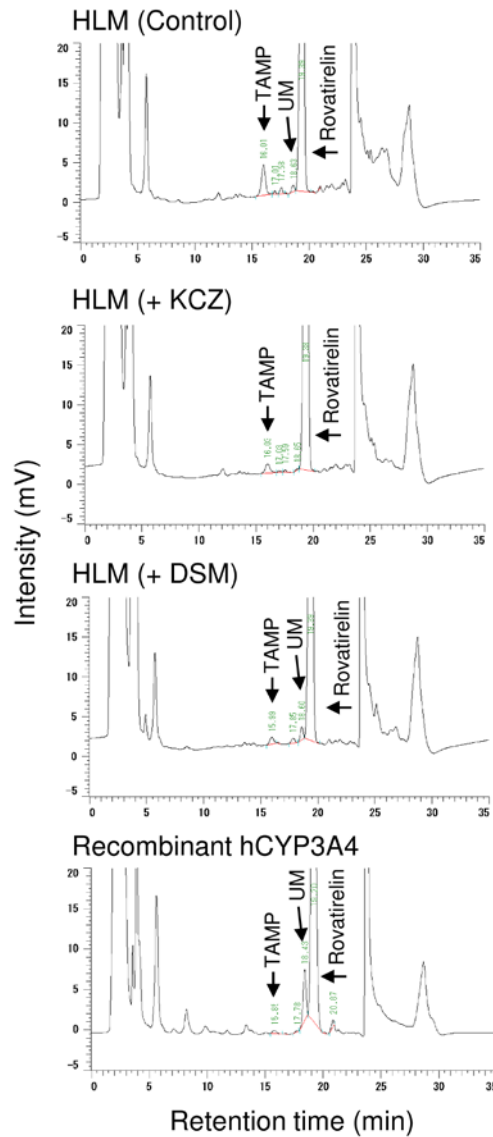


Figure 2-7 Representative HPLC chromatograms for incubation of rovatirelin with human liver microsomes (HLM) and recombinant human CYP3A4

(Thiazolylalanyl)methylpyrrolidine (TAMP) and an unknown metabolite (UM) were formed from rovatirelin in incubation of HLM and recombinant human CYP3A4 for 120 min at 37°C. The effects of ketoconazole (KCZ: 1  $\mu\text{mol/L}$ ) and disulphiram (DSM: 100  $\mu\text{mol/L}$ ) on the activities in HLM were evaluated.

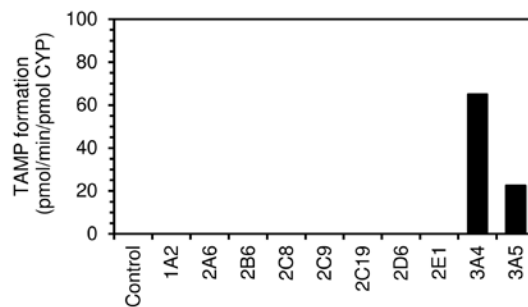


Figure 2-8 Rovatirelin metabolite formations with recombinant human CYPs

The column represent mean of two replicates.

## 2.4 考察

本章では、 $[^{14}\text{C}]$ ロバチレリン (3.2 mg) を健康成人男性に単回経口投与し、ロバチレリンのヒトにおける薬物動態及び安全性について詳細な知見を示した。また、*in vitro* 試験により、ヒトにおけるロバチレリンの主代謝酵素を明らかとした。これらの試験研究は一般に、ヒトにおける医薬品候補化合物の消失経路、薬物相互作用の可能性、並びに非臨床薬理及び毒性試験に使用された動物種の適切性を理解するのに有用である (Isin et al., 2012; Penner et al., 2009, 2012; Walker et al., 2009)。

$[^{14}\text{C}]$ ロバチレリンを単回経口投与したとき、放射能の吸収は良好であり、放射能濃度は投与後 6.00 時間で  $C_{\max}$  に達し、その後消失半減期 32.1 時間で減少した。投与した放射能は主に糞中に排泄され (投与量の 50.1%)、尿中には中等度の放射能が排泄された (投与量の 36.8%)。したがって、ロバチレリンの総放射能回収率は 89.0% と算出され、これまでに実施されたヒトマスバランス試験の結果と比較し高い回収率であると考えられた (Bruderer et al., 2012; Nijenhuis et al., 2016; Roffey et al., 2007)。また、ヒトにおける主要排泄経路は糞中排泄と考えられ、非臨床試験結果と一致した (1.3.9 項参照、Kobayashi et al., 2019a)。尿中排泄は中等度と考えられ、この結果から少なくとも投与量の 36.8% 以上が消化管から吸収されることが考えられた。さらに、糞中代謝物は投与量の 7.07% であったことから、投与量の 43% 以上 (尿中放射能排泄量 + 糞中代謝物) が吸収される可能性があると考えられた。したがって、ヒトの吸収率はラットの吸収率 (27.3%) よりも高いと考えられ、さらにヒトにおけるバイオアベイラビリティはラット (7.3%) よりも高い可能性が示唆された (1.3.1 項参照、Kobayashi et al., 2019a)。

血漿中ロバチレリン濃度は、血漿中放射能濃度とほぼ同様に投与後 5.02 時間に最高血漿中濃度に達し、消失半減期 14.9 時間で低下した (Table 2-2 及び Figure 2-1)。一方、ラット及びイヌに単回経口投与したとき、ロバチレリンは速やかに吸収され (ラットでは  $t_{\max}$  0.4~0.6 時間、イヌでは  $t_{\max}$  1.0 時間)、消失半減期はラットで 3.3~7.7 時間、イヌでは 2.7 時間であった (1.3.1 項参照、Kobayashi et al., 2019a)。これらの結果から、ヒトにおいてロバチレリンは良好に吸収され、血漿から緩やかに消失すると考えられた。

投与後 12 時間までのロバチレリンの尿中排泄量は、放射能の尿中排泄量のうち 71%を占め、投与初期ではロバチレリンが主に尿中排泄されることが明らかになった (Figure 2-2)。

このヒトマスバランス試験における血液/血漿中濃度比 ( $R_b$ ) は 0.713~0.771 と低く、*in vitro* 試験における  $R_b$  (0.815~0.828) と同様であり (1.3.2 項参照、Kobayashi et al., 2019a)、生体内においてもロバチレリンの血球中への移行は限定的であることが示された。

TAMP は、肝細胞を用いた *in vitro* 試験においてヒト主要代謝物であると推定されたため (1.3.6 項参照、Kobayashi et al., 2019a)、ヒトマスバランス試験において血漿及び尿中 TAMP 濃度を測定した (Figure 2-1 及び Figure 2-2)。血漿中 TAMP 濃度は投与後 8.00 時間で最高血漿中濃度に達し、TAMP の累積尿中排泄量は投与後約 72 時間で最大に達したため、ヒト生体内において TAMP は緩やかに生成されたと考えられた。TAMP の平均血漿中濃度推移には、二つ目のピークが認められた。このピークは多くの被験者の血中動態で認められたが、投与後 24~48 時間における血漿中 TAMP 濃度には大きな個体間変動が認められた。また、別の臨床試験における TAMP の血中動態では、二つ目のピークは認められなかった (キッセイ薬品工業株式会社 社内資料)。これらの結果から、二つ目のピークは TAMP 血中動態の個体間変動により生じた可能性が高いと考えられた。TAMP の  $CL_R$  (9.45 L/h) についてはロバチレリンの  $CL_R$  (5.80 L/h) よりも大きく、TAMP はロバチレリンよりも尿中に排泄されやすいと考えられた。

ロバチレリン経口投与後の血漿、尿及び糞試料中には、主にロバチレリン及び TAMP が認められた。血漿中においてはロバチレリンが最も多く認められたが、TAMP は ICH ガイドライン M3 (R2) で定義される循環血中の主要代謝物に該当すると考えられた (ICH ガイドライン 2009)。ICH ガイドラインでは、血漿中の化合物関連物質の総曝露量に対し 10%を超える曝露量を示す代謝物は主要代謝物とされ、非臨床評価が必要であると規定されている。TAMP の曝露量はロバチレリン関連物質の総曝露量に対し 17.20%を占めたが、TAMP はヒト TRH 受容体に対して親和性を示さず、かつその他の薬理的受容体及びイオンチャネルに対して非

常に低い親和性を示すことが明らかとなっている（キッセイ薬品工業株式会社社内資料）。TAMP には薬理作用がないこと及び TAMP の曝露量はロバチレリンの曝露量に比し十分に低いことから、TAMP は *in vivo* においてロバチレリンの薬理作用に寄与しないと推定された。さらに、TAMP は動物においても生成が認められ、非臨床毒性試験においてヒトの曝露量よりも十分大きな量が確認されている（キッセイ薬品工業株式会社 社内資料）。一方、寡少な代謝物として、TA、HM2 及び HM10 が血漿及び排泄物試料に検出された。LC-MS 分析により HM2 及び HM10 の化学構造を推定することはできなかったが、ヒト及びラット代謝物プロファイル試験における HPLC 分析の保持時間を考慮すると、HM2 及び HM10 はそれぞれラットの代謝物 RPM1 及び RPM3 に相当すると推察された（1.3.7 項参照、Kobayashi et al., 2019a）。したがって、ヒト血漿に認められたわずかな代謝物（TA、HM2 及び HM10）はラット血漿中にも存在すると考えられ、ヒト循環血中の代謝物にはヒト特異的代謝物は存在しないと判断された。代謝物の中で、TAMP は循環血中で最も多い代謝物であり、かつ排泄物においても主要代謝物（投与量の約 20%）であるため、*in vivo* におけるロバチレリンの主要代謝経路はロバチレリンからの TAMP 生成であると考えられた（Figure 2-9）。したがって、*in vitro* 試験を実施し、TAMP 生成に関与するヒトの主要代謝酵素を同定した。ヒトマスバランス試験において、TAMP は排泄物中に中等度に認められたものの、*in vitro* 試験では TAMP 生成の検出に高いマイクロソームタンパク濃度と基質濃度が必要であった。この *in vivo* 及び *in vitro* 試験間の相違は、*in vitro* 試験では TAMP 生成反応が遅いことによるものと考えられた。

ヒト肝 S9 及び HLM を用いた *in vitro* 試験の結果から、TAMP は肝臓中に存在する ALDH、アミノペプチダーゼ及びエステラーゼ等の代謝酵素によりロバチレリンから直接的に生成される代謝物ではないことが示唆された。さらに、ロバチレリンは、ラット脳ホモジェネート及びラット血漿中のピログルタミン酸アミノペプチダーゼ活性に耐性を示した（1.3.5 項参照、Kobayashi et al., 2019a）。これらの *in vitro* 試験結果から、TAMP は加水分解が最初の代謝反応となってロバチレリンから生成したものではないと考えられた。HLM においては、NADPH に依存して

TAMP 及び未知代謝物の生成が同時に認められ、これらの生成は CYP3A4/5 阻害薬（ケトコナゾール）によって阻害された。ALDH 阻害薬（ジスルフィラム）及びその活性代謝物（ジエチルジチオカルバミン酸）も、TAMP 生成を阻害したが、未知代謝物の生成は阻害しなかった。さらに、TAMP は組換えヒト CYP3A4 及び CYP3A5 により生成されたが、その他の組換えヒト CYP 分子種では生成されなかった。また、未知代謝物は、組換えヒト CYP3A4 及び CYP3A5 においてのみ顕著な生成が認められた。これらの結果から、TAMP 及び未知代謝物の生成は CYP3A4/5 活性に依存することが考えられた。CYP3A4/5 は TAMP を直接的に生成すると考えられるが、TAMP は未知代謝物の生成に応じて生成されるとも推察され、CYP3A4/5 はロバチレリンからの未知代謝物生成に重要な役割を果たす可能性があると考えられた。また、ALDH 阻害薬は未知代謝物からの TAMP 生成に影響を及ぼすと考えられ、ALDH が未知代謝物からの TAMP 生成過程に寄与していることを示唆している。ALDH は NAD 非依存性のエステラーゼ活性を有することが知られており、また肝細胞中に広く分布しているため（Marchitti et al., 2008; Sidhu & Blair, 1975; Yoshida et al., 1998）、ALDH が未知代謝物のアミド結合を加水分解する可能性があると考えられた。

ヒトにおけるロバチレリンの推定代謝経路を Figure 2-9 に示した。複数の代謝経路が存在するが、ロバチレリンの主要代謝経路は TAMP への代謝であると考えられる。CYP3A4/5 活性は、*in vitro* 試験の結果に基づいて TAMP 生成の律速酵素として大きく寄与していると考えられ、さらに今回のヒトマスバランス試験における代謝物検索の結果から平均の代謝寄与率を 46%（TAMP の尿中及び糞中排泄量の総量/[総排泄量 - 未変化体の糞中排泄量]）と推定した。DDI ガイドライン／ガイダンスでは、*in vitro* 代謝酵素同定試験及びヒトの薬物動態データに基づいて、薬物消失の 25%を超えて寄与する代謝酵素がある場合には、臨床薬物相互作用試験を実施することを推奨している（EMA ガイドライン 2012; FDA ガイダンス 2020; 厚生労働省医薬・生活衛生局「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」2018）。したがって、TAMP 生成に及ぼす併用薬の影響を評価する臨床薬物相互作用試験を実施する必要があると考えられた。

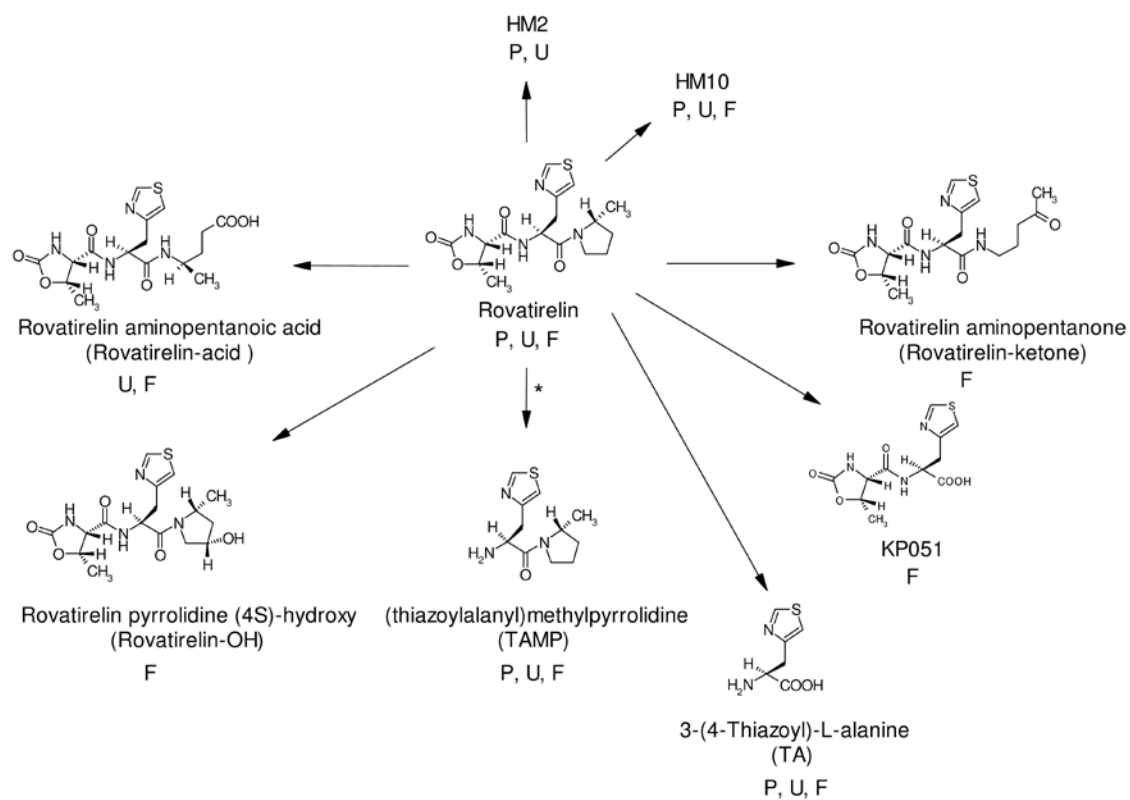


Figure 2-9 Summary of rovatirelin metabolic pathways in humans

P: plasma; U: urine; F: feces; \*: The unknown metabolite observed *in vitro*, which was thought to be formed by CYP3A4/5, may be an intermediate in this metabolic pathway.

## 第3章 臨床におけるロバチレリンの薬物相互作用

### 3.1 緒言

薬物治療において複数の薬物が併用される場合には、併用薬物間でそれぞれの薬理作用又は薬物動態に影響を及ぼす可能性があり、治療効果の減弱や重篤又は致命的な副作用を惹き起こすことがあるため、このような薬物相互作用（DDI）には十分に留意する必要がある。さらに、本邦においては高齢化が進み薬物の併用療法が増えることが予想され、DDIが生じる懸念が高まっている。また、多くの医薬品が、製造販売後に確認されたDDIにより市場から撤退している。新薬の開発過程においては、患者の不利益とならないように医薬品候補化合物がDDIを惹き起こす可能性を十分に検討し、発生機序及びその程度（強度）を適切に評価する必要がある。DDIを評価する際の実施方法及び考え方については、各地域・国の規制当局からガイダンス／ガイドラインが発出され、主に代謝酵素及び薬物トランスポーターに関してほぼ共通の評価及び判断基準が示されている（EMAガイドライン 2012; FDAガイダンス 2020; 厚生労働省医薬・生活衛生局「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」2018）。なお、DDIに関するガイダンス／ガイドラインについては医薬品開発の効率化を目的に国際的な共通化（ICHガイドライン M12 (Step 1) 2019）が、医薬品規制調和国際会議（ICH）により推進されている。

薬物の潜在的なDDIを評価するには、1) 薬物の主要な消失経路を特定すること、2) 薬物の体内動態に関与する代謝酵素及び薬物トランスポーターの寄与を解明すること、3) 薬物の代謝酵素及び薬物トランスポーターへの影響（阻害及び誘導）について明らかにすることが必要となる。これらのDDIに関する評価は多くの場合 *in vitro* 試験から開始され、薬物の体内動態に影響を与える要因の特定を行い、DDIの発生とその機序が推定される。さらに、DDIが生じる可能性が高い場合には、その強度が評価される。そして、臨床薬物動態の知見とともに *in vitro* 試験の情報から、臨床DDI試験の必要性が判断され、試験実施の場合には発生機序を考慮して試験設計を適切に行う必要がある。

代謝酵素と薬物トランスポーターの両者が体内動態に関与するとき、薬物の基

質特異性が重複する場合には複数の機序が関与する DDI（複雑な DDI）が生じる可能性がある。そして、代謝酵素と薬物トランスポーターの両者が阻害される場合には、より複雑かつ重大な影響があらわれることが予想される。代表例として、CYP3A4/5 と P-糖タンパク質（P-gp）の基質特異性が重複することが知られており、両者の基質となる薬物（被相互作用薬）は多数報告されている。CYP3A4/5 及び P-gp は肝臓及び腎臓をはじめ様々な臓器及び組織に発現しており、特に消化管において両者は協調して薬物の吸収を阻害すると考えられている。したがって、CYP3A4/5 及び P-gp の両者を阻害する薬物の併用は、被相互作用薬の血中曝露を大きく上昇させると推測される。しかしながら、この場合複数の機序が関与するため、被相互作用薬の血中曝露を変化させる原因がいずれの過程に起因するかを厳密に特定することは困難であり、慎重に考察する必要がある。

CYP3A4/5 はロバチレリンの主代謝物である TAMP の生成に大きく寄与しており（推定代謝寄与率は 46%）、臨床 DDI 試験の実施が必要であると考えられた（2.4 項参照、Kobayashi et al., 2019b）。CYP3A4/5 に関してロバチレリンが被相互作用薬であることを検証するためには、CYP3A4/5 の阻害薬との併用が臨床 DDI 試験において実施される必要がある。イトラコナゾールは CYP3A4/5、P-gp 及び乳がん抵抗性タンパク質（BCRP）の阻害薬であることが *in vitro* において示されている（Venkatakrisnan et al., 2000; Vermeer et al., 2016）。また、臨床においてイトラコナゾールは CYP3A4/5 及び P-gp 基質薬の血中曝露量を増加させ、それら薬物の薬理作用を増大させることが知られている（Dresser et al., 2000; Venkatakrisnan et al., 2000）。さらに、日米欧の DDI ガイドライン／ガイダンスでは、イトラコナゾールは強い CYP3A4/5 阻害薬として臨床 DDI 試験での使用が推奨されている（EMA ガイドライン 2012; FDA ガイダンス 2020; 厚生労働省医薬・生活衛生局「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」2018）。

そこで、本章では健康成人男性を対象に、ロバチレリンを単独投与並びにイトラコナゾールとロバチレリンを併用投与し、ロバチレリンの体内動態、内分泌学的特性及び安全性について評価した。また、*in vitro* 試験において P-gp 及び BCRP に対するロバチレリンの基質性を評価し、被相互作用薬の DDI が生じる可能性並



びにイトラコナゾール併用により生じた DDI への寄与について考察した。

## 3.2 材料及び方法

### 3.2.1 倫理

本治験は、医療法人社団信濃会左門町クリニック（治験実施医療機関）において実施した。治験開始前に、この治験実施医療機関の治験審査委員会において治験実施計画書、同意説明文書及びその他の書類、並びに治験実施の可否について審査を受け承認を得た。また、本治験は GCP のガイドライン、ヘルシンキ宣言の倫理的原則、ICH ガイドライン及び関連法令に準拠して実施した。なお、治験に組み入れられたすべての被験者について、治験開始前に被験者本人から文書による同意を取得した。

### 3.2.2 試験デザイン

本治験（治験計画書番号: KPS1104）は非盲検の上乗せ併用試験として実施され、ボディマス指数（BMI）が 18.5～25.0 kg/m<sup>2</sup>の健康な日本人男性（20～35 歳）を対象とした。選択基準及び除外基準を Table 3-1 に示した。16 名の健康な日本人男性被験者が本治験に参加し、内科的診察及び問診、生理学的検査、12 誘導心電図並びに臨床検査によって診断された被験者の健康状態はいずれも良好であった。

Table 3-1 Inclusion and exclusion criteria for clinical DDI study between rovatirelin and itraconazole

Inclusion criteria	Exclusion criteria
<ul style="list-style-type: none"> <li>● Japanese males between 20 and 35 years of age.</li> <li>● BMI between 18.5 and 25.0 kg/m<sup>2</sup>.</li> <li>● Written informed consent to participate in this study.</li> </ul>	<p>[At the time of prior examination (within 28 days before the administration of investigational drug in Period I)]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● Not good health, as determined by a medical history, physical examination, 12-lead ECG and clinical laboratory evaluations.</li> <li>● Positive result to the test for the hepatitis B surface antigen, hepatitis C antibody, syphilis serum reaction, or human immunodeficiency virus antigen/antibodies.</li> <li>● Significant history of drug allergy.</li> <li>● Addicted drinker consuming more than 40 g of alcohol/day.</li> <li>● Positive result to the test for urinary abuse drug testing (benzodiazepines, barbiturates, tricyclic antidepressants, stimulant drugs, morphine, cocaine, cannabis, or phencyclidine)</li> <li>● History of liver disease.</li> </ul> <p>[Before the administration of investigational drug in Period I]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● History of thyroid disease or deviation from the upper limit of the standard value in the thyroid function tests (TSH, FT<sub>3</sub> or FT<sub>4</sub>).</li> <li>● Subjects whose blood pressure or pulse rate corresponded to the following criteria: systolic blood pressure (decubitus position), &lt;80 mmHg or &gt;140 mmHg; diastolic blood pressure (decubitus position), &lt;30 mmHg or &gt;90 mmHg; pulse rate, &lt;40 bpm or &gt;110 bpm.</li> <li>● Intake of any foods or supplements including St. John's Wort, within 4 weeks of dose administration.</li> <li>● Smoking or intake of nicotine patch/gum within 12 weeks prior to dose administration.</li> <li>● Use of any medication within one week of dose administration.</li> <li>● Subjects received other investigational drugs within 16 weeks of dose administration.</li> <li>● Donation any blood, plasma or platelets within the 4 weeks (&gt;200 mL) or 16 weeks (&gt;400 mL) preceding to dose administration.</li> <li>● Excessive exercise with fatigue and muscle pain within one week of dose administration.</li> <li>● Subjects who are judged to be ineligible for clinical trial by principal investigator or subinvestigator.</li> </ul>

BMI: Body mass index; ECG: electrocardiogram; TSH: thyroid-stimulating hormone; FT<sub>3</sub>: free triiodothyronine; FT<sub>4</sub>: free thyroxine.

第 I 期において、1 日目の朝に空腹の被験者にロバチレリン 1.6 mg (1.6 mg 錠、塩野義製薬株式会社) を単回経口投与した (Figure 3-1)。7 日間の休薬期間 (一時的に退院) を経て、第 II 期にはイトラコナゾール 200 mg (イトリゾールカプセル 50 [50 mg カプセル] ×4、ヤンセンファーマ株式会社) を朝食直後に 1 日 1 回経口投与し、合計 9 日間反復投与した。イトラコナゾール投与 8 日目において、イトラコナゾール投与後 1 時間に空腹の被験者へロバチレリン 1.6 mg を単回経口投与

した。ロバチレリン及びイトラコナゾールは、150 mL の水とともに経口投与された。被験者の食事及び水分摂取は、それぞれロバチレリン投与後 4 時間及び 1 時間まで禁止された。治験実施医療機関に入院している期間、すべての被験者には同一メニューの適量の食事が提供された。グレープフルーツ、グレープフルーツジュース、カフェイン又はテオブロミンを含む食品及び飲料の摂取を、投与 2 日前から試験終了後の退院まで禁止した。試験期間中、アルコール摂取及び喫煙も許可されなかった。また、被験者は投与の 7 日前から最終の退院まで、過度の運動をしないように求められた。17 日目に、健康診断や問診、入院期間中の各種臨床検査の結果を確認し、被験者は治験実施医療機関から退院した。22 日目に各種臨床検査の結果を確認した後、最終的に被験者は本治験への参加を終了とした。有害事象は、第 I 期の薬物投与から 22 日目まで調査された。

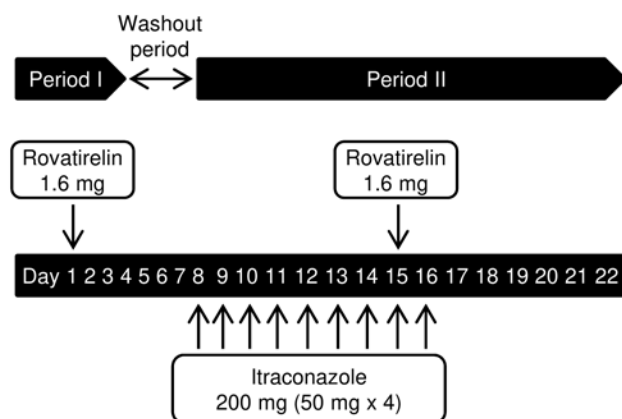


Figure 3-1 Study design

Open-label study designed to determine the effects of itraconazole on rovatirelin pharmacokinetics.

### 3.2.3 安全性評価

安全性に関して、臨床検査、生理学的検査、12 誘導心電図及び有害事象のモニタリング結果から、治験全体を通して評価した。

### 3.2.4 試料採取及び内分泌学的検査

血漿中濃度測定用の血液 (3 mL) を、ロバチレリン投与前並びに投与後 0.5、1、2、3、4、5、6、8、12、16、24、36 及び 48 時間にヘパリン処理したチューブへ採取した。内分泌学的検査用の血液 (3 mL) は、ロバチレリン投与前並びに投与後 2、

4、8、12、16、24、36 及び 48 時間に採取した。血漿中濃度測定では、採取した血液を 4°C にて 10 分間、3000 rpm で遠心分離し、得られた血漿は測定するまで -70°C にて保管した。

尿はロバチレリン投与前（起床から投与前まで）並びに投与後 0~4、4~8、8~12、12~24 及び 24~48 時間の区間で採取し、採尿中の尿は冷蔵庫に保管した。その後、尿を分取し測定まで -70°C にて保管した。

血漿中の TSH、トリヨードサイロニン（遊離トリヨードサイロニン：FT<sub>3</sub>）、サイロキシニン（遊離サイロキシニン：FT<sub>4</sub>）、プロラクチン（PRL）濃度は、株式会社エスアールエルにて市販品を用いた電気化学発光（ECL）イムノアッセイにより測定された。

### 3.2.5 血漿及び尿中ロバチレリン及び TAMP 濃度測定

ロバチレリン水和物及びロバチレリン-*d*<sub>10</sub>の標準品は塩野義製薬株式会社から、ロバチレリンの代謝物である TAMP の標準品は株式会社ナード研究所から提供された。OASIS HLB µElution Plate（Waters Corporation）を用いて、血漿試料（100 µL）又は尿試料（50 µL）中のロバチレリン及び TAMP を抽出した。API4000（AB Sciex LLC）及び Shimadzu LC-10A HPLC system（島津製作所）を用いて、ロバチレリン及び TAMP 濃度をポジティブイオンモードでエレクトロスプレーイオン化を行う LC-MS/MS 法により測定した。HPLC による分離は、40°C 保温した Synergi Polar-RP 80A カラム（長さ 150 mm × 内径 2 mm、粒子径 4 µm、Phenomenex）を用いて行った。移動相として、70%の移動相 A（20 mmol/L ギ酸アンモニウム、pH 4.0）及び 30%の移動相 B（アセトニトリル/メタノール[1:1, v/v]）を用い、0.2 mL/min の流速でアイソクラティックに溶出した。多重反応モニタリング（MRM）により、ロバチレリンの質量電荷比（*m/z* 367 → 254）、TAMP の質量電荷比（*m/z* 240 → 127）及び内標準（ロバチレリン-*d*<sub>10</sub>）の質量電荷比（*m/z* 377 → 254）の遷移をモニターし、ロバチレリン又は TAMP 濃度を測定した。

ロバチレリン及び TAMP の検量線は、血漿試料で 0.02~40 ng/mL、尿試料で 0.5~1000 ng/mL の範囲で作成した。試料の測定前に選択性、直線性、再現性（真度及び精度）、マトリックス効果、希釈の妥当性及び安定性について確認し、この濃

度測定法の信頼性が確認された。

### 3.2.6 薬物動態パラメータの算出

薬物動態パラメータは、WinNonlin Professional Edition Version 6.2 (Pharsight Corporation) を用いてノンコンパートメント解析を行い、個々の被験者データから算出した。血漿中濃度-時間曲線下面積 ( $AUC_{last}$ ) は、リニアアップログダウン台形法を用いて算出した。0 から無限大時間までの AUC ( $AUC_{inf}$ ) は、終末相の濃度推移を外挿することにより算出した。消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は、対数変換した血漿中濃度-時間曲線の終末相における傾き ( $\lambda_z$ ) から算出した。 $C_{max}$  及び最大濃度到達時間 ( $t_{max}$ ) は実測値とした。経口クリアランス ( $CL/F$ ) は投与量を  $AUC_{inf}$  で除して算出した。終末相における分布容積 ( $V_z/F$ ) は、 $CL/F$  を  $\lambda_z$  で除して算出した。

尿中ロバチレリン及び TAMP 濃度に採取区間の尿重量を乗じ、各採取区間における回収量を算出した。回収量は、総排泄量 ( $A_e$ ) 又は投与量に対する割合 ( $f_e$ ) として示した。また、採尿区間ごとに回収量を合算して累積の回収量を算出した。腎排泄クリアランス ( $CL_R$ ) は、尿中累積排泄量 ( $A_{e, 0-48h}$ ) を  $AUC_{last}$  で除して算出した。

### 3.2.7 統計解析

各薬物動態パラメータは幾何学平均及び変動係数 (CV) で示し、 $t_{max}$  は中央値、最大値及び最小値で示した。イトラコナゾール併用によるロバチレリンの体内動態への影響を評価するため、 $t_{max}$  を除きロバチレリン及び TAMP の薬物動態パラメータを対数変換し、薬物投与を固定効果、被験者をランダム効果とした線形混合モデルにより解析した。統計プログラム SAS リリース 9.3 for Windows (SAS Institute Inc.) を用いて投与群間 (ロバチレリン + イトラコナゾール併用投与対ロバチレリン単独投与) の比について、各パラメータの両側 90% 信頼区間 (CI) を推定した。

### 3.2.8 Caco-2 細胞単層膜を用いた P-gp 及び BCRP への基質性

試験に用いた [ $^{14}C$ ]ロバチレリンは Selcia Ltd. で合成し、97.7% の放射化学的純度及び 5.52 MBq/mg の比放射能であった。その他のすべての試薬、培地及び溶媒は、分析用又は研究用であり、市販品を購入して試験に用いた。

Caco-2 細胞は、DS ファーマバイオメディカル株式会社から入手し、継代数 66～67 の細胞を試験に用いた。10%ウシ胎児血清、1%ペニシリン-ストレプトマイシン、1%L-グルタミン及び 1%非必須アミノ酸を含む DMEM 培地を細胞培養に使用し、細胞は CO<sub>2</sub>インキュベーターMCO-175 (5% CO<sub>2</sub>及び 37°C; PHC 株式会社) 内で培養した。Caco-2 細胞 (5.0 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>) は 175 cm<sup>2</sup>の細胞培養フラスコ (Corning Inc.) を用いて継代し、その後 12 ウェルの Transwell プレート (細孔サイズ 0.4 mm、培養面積 1.12 cm<sup>2</sup>; Corning Inc.) に播種して試験に用いた。細胞は 12 ウェルの Transwell プレートに 2.7 × 10<sup>5</sup> cells/cm<sup>2</sup>で播種し、播種の翌日とその後 22 日間 2～3 日ごとに培地を交換して、*in vitro* 輸送試験に供した。

実験日に、Caco-2 細胞単層膜をトランスポート緩衝液 (25 mmol/L HEPES pH 7.4 及び 25 mmol/L D-グルコースを含むハンクス平衡塩溶液) で 2 回洗浄した。洗浄後、Caco-2 細胞単層膜の経上皮電気抵抗 (TEER) を電気抵抗値測定システム Millicell-ERS (Merck KGaA) を用いて測定した。TEER 値が 300 Ω•cm<sup>2</sup>以上の Caco-2 細胞単層膜を *in vitro* 輸送試験に使用した。細胞をトランスポート緩衝液 (基底側に 1.5 mL、頂端側に 0.5 mL) 中で、CO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>及び 37°C) 内で 30 分間プレインキュベートした。トランスポート緩衝液中で 0.02 µmol/L [<sup>3</sup>H]エストロンサルフェート、1 µmol/L [<sup>3</sup>H]ジゴキシン、1 µmol/L [<sup>3</sup>H]マンニトール、1 µmol/L [<sup>3</sup>H]プロプラノロール又は 10 µmol/L [<sup>14</sup>C]ロバチレリンとなるようにドナー溶液を調製した。排出トランスポーターに対する基質性を評価するため、プレインキュベーション用のトランスポート緩衝液及びドナー溶液に、P-gp 阻害薬 (50 µmol/L ベラパミル及び 50 µmol/L キニジン) 又は BCRP 阻害薬 (50 µmol/L ノボピオシン及び 1 µmol/L Ko 143) を添加した。*In vitro* 輸送試験は、細胞単層膜の頂端側 (0.5 mL) 又は基底側 (1.5 mL) のいずれかにドナー溶液を添加することにより開始した。穏やかに振とう (150 rpm、Titramax 100; Heidolph Instruments GmbH & CO, KG) しながら、CO<sub>2</sub>インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>及び 37°C) 内で 120 分間インキュベートした後、アクセプター溶液 (100 µL) を、ドナー溶液を添加した反対側から採取した。すべての *in vitro* 輸送試験は、3 回繰返した。

採取した試料をシンチレーションカクテル Hionic-Fluor (PerkinElmer Life &

Analytical Sciences) と混和し、液体シンチレーションカウンター TRI-CARB 3100TR (PerkinElmer Life & Analytical Sciences) を用いて放射能を測定した。

見かけの透過係数 ( $P_{app}$ ) は、次式を用いて算出した。

$$P_{app} = (dQ/dt) \times (1/A \times C_0)$$

ここで、 $dQ/dt$  は定常状態の透過速度 ( $\mu\text{mol/s}$ )、 $A$  は各ウェルのフィルター面積 ( $\text{cm}^2$ )、並びに  $C_0$  はドナー溶液の初期濃度 ( $\mu\text{mol/L}$ ) である。

排出比 ( $R_E$ ) は、次式を用いて計算した。

$$R_E = P_{B/A} / P_{A/B}$$

ここで、 $P_{B/A}$  は基底側から頂端側方向の見かけの透過係数であり、 $P_{A/B}$  は頂端側から基底側方向の見かけの透過係数である。

阻害率 ( $I_R$ ) は、次式を用いて計算した (Balimane et al., 2008)。

$$I_R = [1 - (P_{B/A, i} - P_{A/B, i}) / (P_{B/A} - P_{A/B})] \times 100$$

ここで、 $P_{B/A, i}$  は阻害薬存在下での基底側から頂端側方向の見かけの透過係数であり、 $P_{A/B, i}$  は阻害薬存在下での頂端側から基底側方向の見かけの透過係数である。

### 3.3 結果

#### 3.3.1 ロバチレリン及び TAMP の薬物動態

ロバチレリン単独投与又はイトラコナゾールとの併用投与後のロバチレリン及び TAMP の血漿中濃度推移、ロバチレリン及び TAMP の累積尿中排泄率を Figure 3-2 及び Figure 3-3 に示した。また、ロバチレリン及び TAMP の薬物動態パラメータをそれぞれ Table 3-2 及び Table 3-3 に示した。イトラコナゾール併用投与時のロバチレリンの血漿中濃度はロバチレリン単独投与時に比し高く、いずれの血漿中濃度推移も独特のピーク形状が認められた (Figure 3-2 A、Figure 3-3 A 及び B)。ロバチレリンの  $C_{max}$  と  $AUC_{inf}$  の幾何平均比はそれぞれ 3.05 と 2.82 であり、 $C_{max}$  比 (2.64~3.52) 及び  $AUC_{inf}$  比 (2.47~3.23) の 90% 信頼区間 (CI) はロバチレリンとイトラコナゾールの併用による薬物相互作用が起きないと判断される 0.8~1.25 の区間外であった。さらに、イトラコナゾール併用時では、すべての被験者でロバチレリンの  $C_{max}$  及び  $AUC_{last}$  の増加が認められた (Figure 3-4 A 及び C)。ロバチレリンの  $t_{1/2}$ 、 $CL/F$ 、及び  $V_z/F$  の幾何平均比 (90% CI) はそれぞれ 0.58 (0.47~0.71)、

0.35 (0.31~0.41) 及び 0.20 (0.16~0.26) であったが、ロバチレリンの  $t_{max}$  は延長しなかった。イトラコナゾールの併用投与時のロバチレリンの累積尿中排泄量は、ロバチレリン単独投与時に比べ多かった (Figure 3-2 C)。ロバチレリンの  $f_{e\ 0-48h}$  及び  $CL_R$  の幾何平均比 (90%CI) はそれぞれ 3.00 (2.65~3.39) 及び 1.04 (0.99~1.09) であり、イトラコナゾール併用投与によりロバチレリンの  $f_{e\ 0-48h}$  は増加したが、 $CL_R$  は変動しなかった。

イトラコナゾール併用投与時の血漿中 TAMP 濃度はロバチレリン単独投与時に比べて低下し (Figure 3-2 B 並びに Figure 3-3 C 及び D)、累積尿中排泄量もイトラコナゾール併用時では低下した (Figure 3-2 D)。TAMP の薬物動態パラメータの幾何平均比 (90%CI) は、 $C_{max}$  が 0.44 (0.37~0.53)、 $AUC_{inf}$  が 0.70 (0.63~0.78)、 $t_{1/2}$  が 0.76 (0.51~1.14)、 $f_{e\ 0-48h}$  が 0.48 (0.41~0.56)、 $CL_R$  が 0.84 (0.79~0.90) であった。

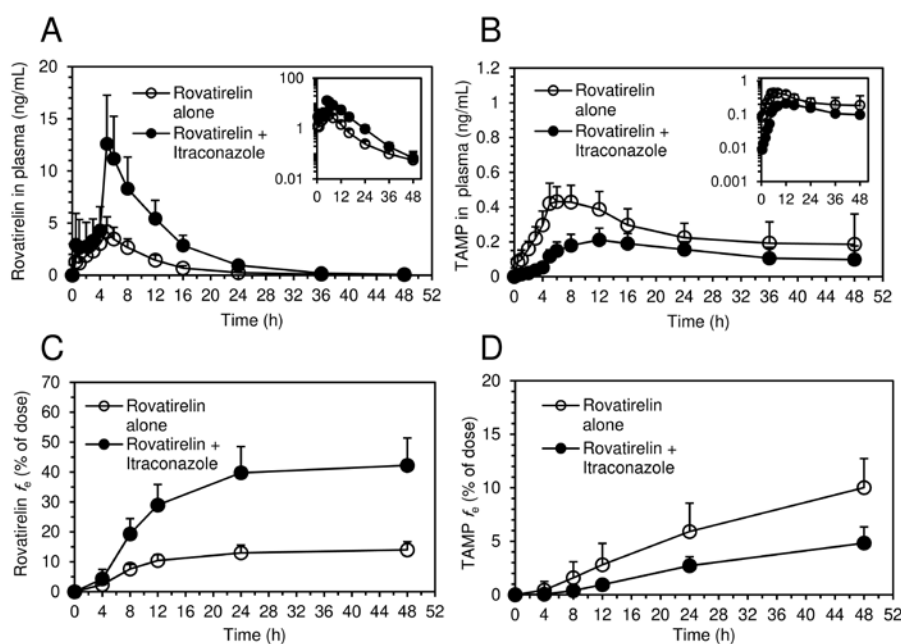


Figure 3-2 Plasma concentration-time profiles of rovatirelin (A) and TAMP (B), and cumulative excretion of rovatirelin (C) and TAMP (D) in urine after administration of rovatirelin alone (1.6 mg) or rovatirelin with itraconazole (200 mg) to 16 healthy male subjects

Each point and each vertical bar represent the mean and SD of 16 subjects, respectively. Insets (A and B) depict the same data on semilogarithmic scales. TAMP indicates (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.



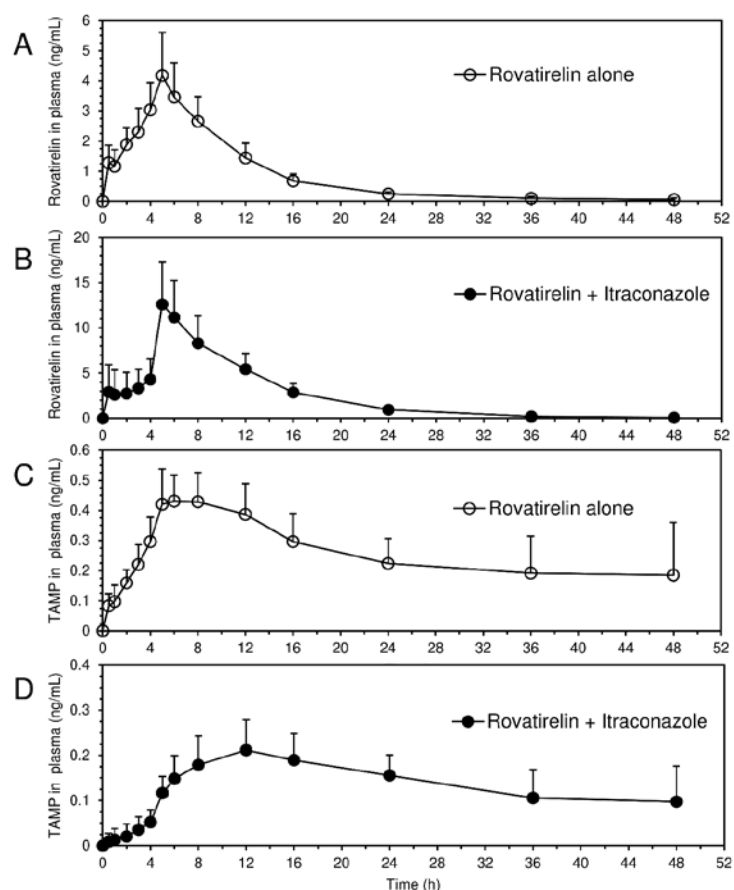


Figure 3-3 Plasma concentration-time profiles of rovatirelin and TAMP after administration of 1.6 mg rovatirelin alone (A and C) or rovatirelin with 200 mg itraconazole (B and D) to 16 healthy males

Each point and vertical bar represents the mean and SD of 16 subjects, respectively. TAMP indicates (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

Table 3-2 Pharmacokinetic parameters of rovatirelin following administration of rovatirelin alone (1.6 mg) or rovatirelin with itraconazole (200 mg)

Parameter	Rovatirelin alone (n = 16)	Rovatirelin + Itraconazole (n = 16)	Ratio <sup>a</sup>	90%CI <sup>a</sup>
C <sub>max</sub> (ng/mL)	4.05 (33.1)	12.36 (41.1)	3.05	2.64–3.52
t <sub>max</sub> (h)	5.0 (4.0–6.0)	5.0 (0.5–6.0)	NA	NA
AUC <sub>last</sub> (ng•h/mL)	37.5 (27.1)	109.9 (34.1)	2.93	2.57–3.35
AUC <sub>inf</sub> (ng•h/mL)	39.2 (27.2)	110.7(34.0)	2.82	2.47–3.23
t <sub>1/2</sub> (h)	10.6 (54.6)	6.1 (31.8)	0.58	0.47–0.71
CL/F (L/h)	40.8 (27.2)	14.5 (34.0)	0.35	0.31–0.41
V <sub>z</sub> /F (L)	621.9 (65.0)	127.4 (54.9)	0.20	0.16–0.26
f <sub>e 0-48h</sub> (% of dose)	13.7 (22.1)	41.1 (26.6)	3.00	2.65–3.39
CL <sub>R</sub> (L/h)	5.4 (15.0)	5.6 (17.7)	1.04	0.99–1.09

AUC indicates area under the concentration-time curve; CL/F, oral clearance; CL<sub>R</sub>, renal clearance; C<sub>max</sub>, maximum concentration; fe, percentage of the administered dose; max, maximum; min, minimum; NA, not applicable; t<sub>max</sub>, time of C<sub>max</sub>; t<sub>1/2</sub>, half-life; V<sub>z</sub>/F, volume of distribution during the terminal phase.

The values are given as geometric mean (geometric CV%) except t<sub>max</sub>, t<sub>max</sub> is presented as median (min–max).

<sup>a</sup> The ratio (rovatirelin + itraconazole versus rovatirelin alone) is estimated with two-sided 90% confidential intervals (CI) of parameter.

Table 3-3 Pharmacokinetic parameters of TAMP following administration of rovatirelin alone (1.6 mg) or rovatirelin with itraconazole (200 mg)

Parameter	Rovatrelin alone (n = 16)	Rovatrelin + Itraconazole (n = 16)	Ratio <sup>a</sup>	90%CI <sup>a</sup>
C <sub>max</sub> (ng/mL)	0.47 (23.3)	0.21 (35.2)	0.44	0.37–0.53
t <sub>max</sub> (h)	8.0 (5.0–48.0)	12.0 (12.0–48.0)	NA	NA
AUC <sub>last</sub> (ng·h/mL)	11.4 (34.0)	6.0 (34.1)	0.53	0.44–0.63
AUC <sub>inf</sub> (ng·h/mL)	11.7 (54.0) <sup>b</sup>	7.6 (59.9) <sup>c</sup>	0.70	0.63–0.78
t <sub>1/2</sub> (h)	15.4 (74.4) <sup>b</sup>	14.6 (82.8) <sup>c</sup>	0.76	0.51–1.14
f <sub>e 0-48h</sub> (% of dose)	9.6 (28.6)	4.6 (32.2)	0.48	0.41–0.56
CL <sub>R</sub> (L/h)	5.4 (30.5)	4.5 (34.5)	0.84	0.79–0.90

AUC indicates area under the concentration-time curve; CL<sub>R</sub>, renal clearance; C<sub>max</sub>, maximum concentration; f<sub>e</sub>, percentage of the administered dose; max, maximum; min, minimum; NA, not applicable; TAMP, (thiazolylalanyl) methylpyrrolidine; t<sub>max</sub>, time of C<sub>max</sub>; t<sub>1/2</sub>, half-life.

The values are given as geometric mean (geometric CV%) except t<sub>max</sub>, t<sub>max</sub> is presented as median (min–max).

<sup>a</sup> The ratio (rovatrelin + itraconazole versus rovatirelin alone) is estimated with two-sided 90% confidential intervals (CI) of parameter.

<sup>b</sup> n = 7.

<sup>c</sup> n = 8.

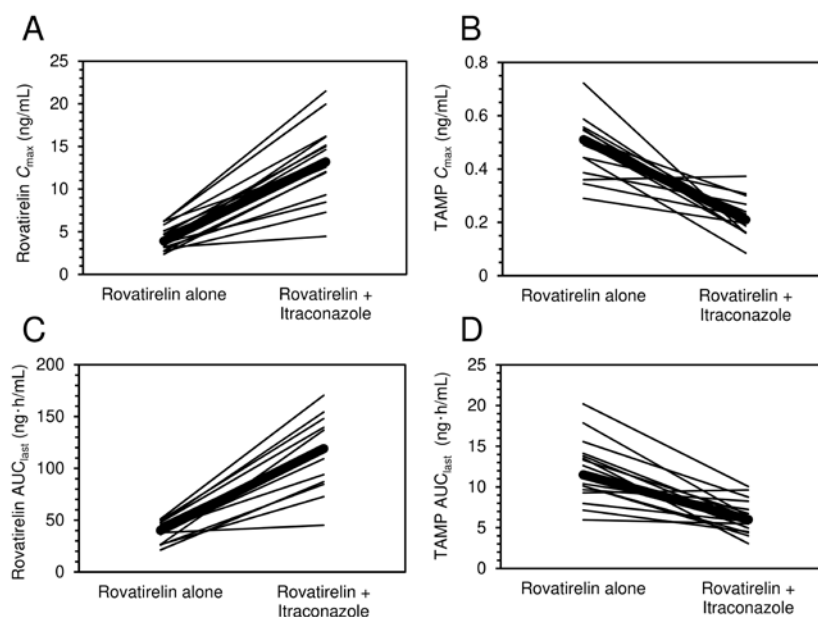


Figure 3-4 Individual C<sub>max</sub> and AUC<sub>last</sub> values of rovatirelin (A and C) and TAMP (B and D) from 16 healthy male subjects administered rovatirelin alone (1.6 mg) or rovatirelin with itraconazole (200 mg)

The bold line indicates the median. AUC<sub>last</sub> indicates area under the concentration-time curve from dose to last measurable concentration; C<sub>max</sub>, maximum concentration; TAMP, (thiazolylalanyl)methylpyrrolidine.

### 3.3.2 内分泌学的特性

ロバチレリン単独投与又はイトラコナゾールとの併用時の TSH、FT<sub>3</sub>、FT<sub>4</sub>及び PRL 濃度推移を Figure 3-5 に示した。イトラコナゾール併用時の TSH、FT<sub>3</sub>及び

FT<sub>4</sub>の濃度は、ロバチレリン単独投与時に比し高かった。PRL 濃度はイトラコナゾール併用投与により変化しなかった。これらの結果は、TSH、FT<sub>3</sub>及び FT<sub>4</sub>濃度上昇がロバチレリンの体内動態の変化によるものであることを示唆した。

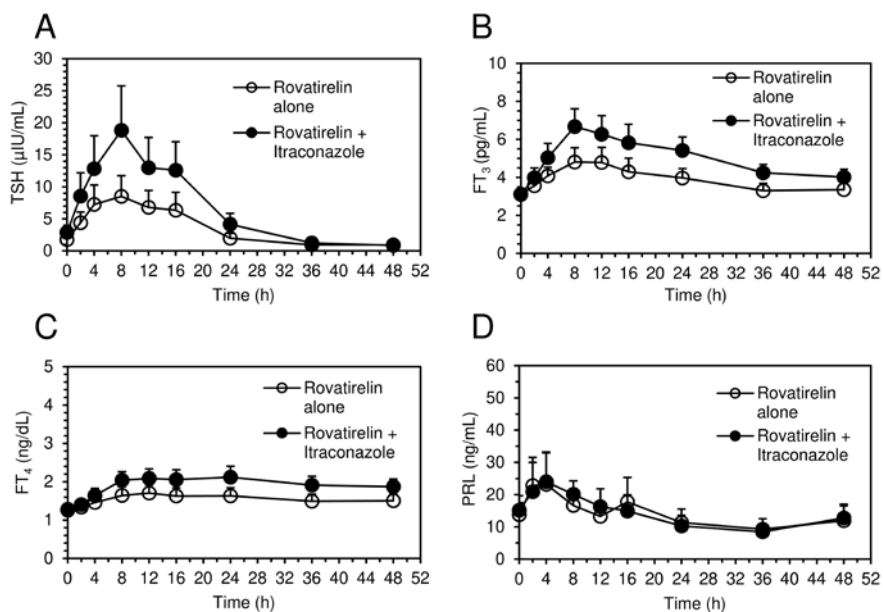


Figure 3-5 Concentration-time profiles of TSH (A), FT<sub>3</sub> (B), FT<sub>4</sub> (C), and PRL (D) following administration of rovatirelin alone (1.6 mg) or rovatirelin with itraconazole (200 mg) to 16 healthy male subjects

Each point and each vertical bar represent the mean and SD from 16 subjects, respectively. FT<sub>3</sub> indicates free triiodothyronine; FT<sub>4</sub>, free thyroxine; PRL, prolactin; TSH, thyroid-stimulating hormone.

### 3.3.3 安全性評価

この臨床 DDI 試験において、重篤な有害事象や死亡例は認められず、有害事象を理由に試験を中止した被験者はいなかった。有害事象はロバチレリンとイトラコナゾールの併用投与後に 16 人中 13 人の被験者に認められたが、ロバチレリン単独投与時及びイトラコナゾール単独投与時には認められなかった。2 例以上の被験者に発現した有害事象は、悪心、倦怠感、消化不良、腹部圧痛及び腹部不快感であった。有害事象は、中等度のアカシジア様症状（アカシジア、蟻走感及び異常感覚）と消化器症状（悪心及び嘔吐）を除き、すべて軽度であった。いずれの有害事象もロバチレリン投与との因果関係が否定されなかったものの、すべての有害事象は併用投与後 48 時間以内に消失した。また、臨床検査値、12 誘導心電図、体重及び生理学的検査の結果について、安全性に関する異常所見は認められなかった。

### 3.3.4 P-gp 及び BCRP に対する基質性評価

Caco-2 細胞単層膜を用いて、 $[^{14}\text{C}]$ ロバチレリンの膜透過に及ぼす P-gp 阻害薬（ベラパミル及びキノジン）及び BCRP 阻害薬（ノボビオシン及び Ko 143）の影響を確認し、ロバチレリンの P-gp 及び BCRP に対する基質性を評価した（Table 3-4 及び Table 3-5）。

ロバチレリンの膜透過には排出方向への方向性が認められ、ロバチレリンの排出比は約 3 であった。ロバチレリンの排出比は P-gp 阻害薬であるベラパミル及びキノジン存在下で減少し、その阻害率はそれぞれ 95.6%及び 78.2%であった。一方、BCRP 阻害薬であるノボビオシン及び Ko 143 存在下では、いずれのロバチレリンの排出比もコントロールとほぼ同等であった。

Table 3-4 Effects of P-gp inhibitors on bi-directional apparent permeability of  $[^{14}\text{C}]$ rovatirelin across Caco-2 cell monolayers

Substrates/ (+ P-gp inhibitor)	$P_{\text{app}} (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$		$R_E$ ( $P_{\text{B/A}} / P_{\text{A/B}}$ )	$I_R$ (%)
	$P_{\text{A/B}}$	$P_{\text{B/A}}$		
$[^{14}\text{C}]$ Rovatirelin	1.11 ± 0.36	3.00 ± 0.04	2.7	0.0
+ 50 µmol/L Verapamil	1.28 ± 0.12	1.37 ± 0.03	1.1	95.6
+ 50 µmol/L Quinidine	1.25 ± 0.13	1.66 ± 0.13	1.3	78.2
$[^3\text{H}]$ Digoxin	1.29 ± 0.12	22.67 ± 1.81	17.5	0.0
+ 50 µmol/L Verapamil	7.00 ± 0.42	8.87 ± 0.17	1.3	91.3
+ 50 µmol/L Quinidine	6.35 ± 0.20	8.72 ± 0.11	1.4	88.9
$[^3\text{H}]$ Mannitol	0.81 ± 0.02	0.33 ± 0.02	0.4	—
$[^3\text{H}]$ Propranolol	32.30 ± 0.74	29.99 ± 1.25	0.9	—

$I_R$  indicates inhibition ratio;  $P_{\text{A/B}}$ , apparent permeability of apical side to basolateral side;  $P_{\text{app}}$ , apparent permeability;  $P_{\text{B/A}}$ , apparent permeability of basolateral side to apical side; P-gp, P-glycoprotein;  $R_E$ , efflux ratio.

$P_{\text{app}}$  values are expressed as the mean ± SD (n = 3). The concentrations of  $[^{14}\text{C}]$ rovatirelin,  $[^3\text{H}]$ digoxin,  $[^3\text{H}]$ mannitol, and  $[^3\text{H}]$ propranolol in transport buffer were 10, 1, 1, and 1 µmol/L, respectively.

Table 3-5 Effects of BCRP inhibitors on bi-directional apparent permeability of  $[^{14}\text{C}]$ rovatirelin across Caco-2 cell monolayers

Substrates/ (+ BCRP inhibitor)	$P_{\text{app}} (\times 10^{-6} \text{ cm/s})$		$R_E$ ( $P_{\text{B/A}} / P_{\text{A/B}}$ )	$I_R$ (%)
	$P_{\text{A/B}}$	$P_{\text{B/A}}$		
$[^{14}\text{C}]$ Rovatirelin	1.03 ± 0.06	2.87 ± 0.15	2.8	0.0
+ 50 µmol/L Novobiocin	1.06 ± 0.09	2.78 ± 0.04	2.6	6.2
+ 1 µmol/L Ko 143	0.94 ± 0.06	3.10 ± 0.24	3.3	-17.1
$[^3\text{H}]$ Estrone sulfate	2.38 ± 0.39	63.41 ± 0.16	26.6	0.0
+ 50 µmol/L Novobiocin	10.65 ± 0.38	3.71 ± 0.16	0.3	111.4
+ 1 µmol/L Ko 143	11.26 ± 0.82	21.82 ± 0.80	1.9	82.7
$[^3\text{H}]$ Mannitol	0.90 ± 0.21	0.28 ± 0.03	0.3	—
$[^3\text{H}]$ Propranolol	32.83 ± 1.02	27.74 ± 3.80	0.8	—

BCRP indicates breast cancer resistance protein;  $I_R$ , inhibition ratio;  $P_{\text{A/B}}$ , apparent permeability of apical side to basolateral side;  $P_{\text{app}}$ , apparent permeability;  $P_{\text{B/A}}$ , apparent permeability of basolateral side to apical side;  $R_E$ , efflux ratio.

$P_{\text{app}}$  values are expressed as the mean ± SD (n = 3). The concentrations of  $[^{14}\text{C}]$ rovatirelin,  $[^3\text{H}]$ estrone sulfate,  $[^3\text{H}]$ mannitol, and  $[^3\text{H}]$ propranolol in transport buffer were 10, 0.02, 1, and 1 µmol/L, respectively.

### 3.4 考察

本章では、健常成人男性を対象に、ロバチレリンを単独投与（1.6 mg）又はロバチレリンとイトラコナゾール（200 mg）を併用投与し、ロバチレリンが被相互作用薬となるときの DDI について評価した。イトラコナゾールは、CYP3A4/5 阻害に加え、薬物トランスポーターを阻害することが知られている。イトラコナゾールのこれら阻害作用がロバチレリンの体内動態へ影響するか否かを明らかにするために、Caco-2 細胞単層膜を用いた *in vitro* 輸送試験を行いロバチレリンが基質となる排出トランスポーターを同定した。これらの研究は、薬物の代謝、排泄及び被相互作用薬の DDI 発生機序を理解するために非常に有用である（Bohnert et al., 2016）。

イトラコナゾールは、*in vitro* 及び *in vivo* において強力な CYP3A4/5 及び P-gp 阻害薬であり（Dresser et al., 2000; Jalava et al., 1997; Jurima-Romet et al., 1994; Marzolini et al., 2004; Olkkola et al., 1994; Templeton et al., 2008; Venkatakrisnan et al., 2000; Wang et al., 2002）、*in vitro* では BCRP 阻害薬であることも示されている（Vermeer et al., 2016）。ロバチレリンは CYP3A4/5 の基質であり、*in vitro* 及び *in vivo* において主に TAMP に代謝されることが示され、TAMP の代謝寄与率 ( $f_m$  TAMP) は 46% と推定された（2.4 項参照、Kobayashi et al., 2019b）。また、ロバチレリンは P-gp の基質であるが、BCRP の基質ではなかった（Table 3-4 及び Table 3-5）。実施した臨床 DDI 試験では、イトラコナゾール（200 mg/日）を 8 日間反復投与し、ロバチレリンとの併用投与を行った。したがって、この臨床 DDI 試験では、イトラコナゾールの CYP3A4/5 及び P-gp 阻害作用に起因したロバチレリンの DDI が十分に確認できると考えられる。

イトラコナゾールの併用投与により、ロバチレリンの  $C_{max}$  及び AUC は約 3 倍に増加し、 $t_{1/2}$  は延長しなかった。また、TAMP の  $C_{max}$  及び AUC は約 1/2 に減少した。さらに、ロバチレリンの  $f_e$  0-48h は増加し、TAMP の  $f_e$  0-48h は減少した。これらの結果から、イトラコナゾールは初回通過効果の過程でロバチレリンと相互作用していることが示唆された。また、ロバチレリンの肝クリアランスは不明であるが、イトラコナゾール併用時では  $t_{1/2}$  の延長は認められなかったことから、肝代謝の阻

害が相互作用の発生機序ではないと考えられた。したがって、イトラコナゾールによる小腸 CYP3A4/5 の阻害が相互作用に寄与している可能性があり、さらに、ロバチレリンは P-gp の基質であるため、イトラコナゾールによる小腸 P-gp の阻害も相互作用の発生に寄与していると考えられた。ヒト十二指腸における CYP3A4 と P-gp の遺伝子発現量は他の CYP 分子の発現量よりも高い又は同程度であり、両遺伝子の発現は中等度の個体間変動を伴うものの相関することが知られている (Lindell et al., 2003)。ロバチレリンとイトラコナゾールの DDI では、 $C_{max}$  が 1.41～5.06 倍、 $AUC_{last}$  が 1.19～5.16 倍に増加し個体間変動が認められた。これらの個体間変動は、その他の CYP3A4 及び P-gp 基質薬のものと比較して小さいと考えられた。この事例として、アリスキレンでは  $C_{max}$  が 1.1～24.3 倍、 $AUC_{inf}$  が 2.6～20.5 倍であり (Tapaninen et al., 2011)、シンバスタチンでは  $C_{max}$  が 7～56 倍、 $AUC_{inf}$  が 13～25 倍であり (Neuvonen et al., 1998)、キニジンでは  $C_{max}$  が 0.1～1.7 倍、 $AUC_{inf}$  が 0.8～3.4 倍 (Kaukonen et al., 1997) 変動したことが知られている。

血漿中ロバチレリン濃度推移の独特なピーク形状については、0 次吸収過程に続く 1 次吸収過程を有する薬物に認められる特徴的なピーク形状と類似していると考えられた (Zhou., 2003)。イトラコナゾール併用投与時では、CYP3A4/5 及び P-gp の阻害によりロバチレリンの一次吸収過程が促進されたと考えられる独特なピーク形状が観察された。ロバチレリンの吸収過程を詳細に理解するためには、モデル解析を追加して考察する必要があると考えられた。

イトラコナゾールは、ジゴキシン、キニジン及びシメチジンの  $CL_R$  をそれぞれ 20% (Jalava et al., 1997)、49% (Kaukonen et al., 1997) 及び 24% (Karyekar et al., 2004) 低下させることが知られている。これらの  $CL_R$  の減少は、P-gp の腎尿細管分泌が阻害されたことによるものと考えられる。一方、イトラコナゾールは、ジゴキシンと同様に *in vivo* の P-gp 基質であるフェキソフェナジンの  $CL_R$  (フェキソフェナジン単独で 55.6 mL/min、イトラコナゾールとの併用で 50.4～58.6 mL/min) には影響を与えずに、血中曝露を上昇させた (Shimizu et al., 2006)。この結果から、イトラコナゾールによる P-gp 阻害に起因した DDI は小腸でのみ起こり、胆汁及び尿中排泄では起こらないことを示唆している (Akamine et al., 2019)。ロバチレリン

のヒトマスバランス試験では、投与量の少なくとも 36.8%が消化管から吸収され、未変化体ロバチレリンの主な排泄は糞中排泄（投与量の約 43.3%）であり、尿中には中等度に排泄（投与量の約 18.1%）されることが明らかになった（2.3.4 及び 2.4 項参照、Kobayashi et al., 2019b）。尿中排泄はロバチレリンの全身クリアランスにある程度寄与すると考えられるが、ロバチレリンの  $CL_R$  はイトラコナゾールとの併用投与により低下せず、フェキソフェナジンと同様に尿中排泄において P-gp による分泌は阻害されないと考えられた。また、ロバチレリンの反復投与後の  $CL_R$ （6.3～7.6 L/h；キッセイ薬品工業株式会社 社内資料）は糸球体濾過率 GFR（7.56 L/h） $\times f_u$ （0.891）（Ito et al., 2013; 1.3.2 項参照、Kobayashi et al., 2019a）とほぼ同等であり、ロバチレリンの尿中排泄には分泌又は再吸収の関与は少なく、糸球体濾過が主に寄与しているものと考えられた。したがって、P-gp、MATE1/2-K、OAT1/3 又は OCT2 等の薬物トランスポーターが阻害されることによりロバチレリンの  $CL_R$  が低下する DDI については、懸念する必要はないと判断された。

イトラコナゾールはロバチレリンの内分泌作用を増大させ、TSH、FT<sub>3</sub> 及び FT<sub>4</sub> 濃度が上昇し、中等度のアカシジア様症状と胃腸症状を惹き起こした。これらの内分泌系への影響は、イトラコナゾールにより初回通過効果が阻害されロバチレリンの血中濃度が上昇したことによる薬理作用の増大によるものと考えられた。有害事象の発現状況は被験者によって異なったが、有害事象はイトラコナゾール併用投与時のロバチレリン血漿中濃度の上昇に起因すると考えられた。したがって、イトラコナゾールとロバチレリンの併用は、臨床では制限されるべきであると考えられた。

*In vitro* 及び *in vivo* のデータに基づいて、ロバチレリンは CYP3A4/5（2.3.6 項参照、Kobayashi et al., 2019b）及び P-gp の基質（被相互作用薬）であることが示された。また、ロバチレリンは、*in vitro* において CYP 活性（CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1 及び 3A4/5）及び薬物トランスポーター（P-gp、BCRP、OATP1B1/1B3、OAT1/3、OCT2 及び MATE1/2-K）の輸送活性を阻害せず、かつ CYP1A2、2B6 及び 3A4/5 活性の誘導作用も示さなかった（キッセイ薬品工業株式会社 社内資料）。したがって、ロバチレリンは、CYP 活性及び薬物トランス

ポーターに関連する DDI について、相互作用を惹起することは無い（相互作用薬にはならない）と考えられた。結論として、ロバチレリンと他の薬物との併用療法においては、ロバチレリンの小腸上皮細胞における CYP3A4/5 による代謝や P-gp による排出が強く阻害されることに起因する DDI について注意する必要があると考えられた。



## 第 4 章 総括

第 1 章では、ラット及びイヌを用いて非臨床における吸収、分布、代謝及び排泄を評価するとともに *in vitro* 試験においてヒトの血漿タンパク結合、血球移行性及び代謝物生成について検討した。経口投与されたロバチレリンは、ラット及びイヌにおいて速やかに吸収され、バイオアベイラビリティはそれぞれ 7.3% 及び 41.3% であった。ラット、イヌ及びヒトにおける血漿タンパク結合率はいずれも低く、15% 未満であった。ラットにおけるロバチレリンの血液から脳への移行性は良好であり、さらにラット血液及び脳中でロバチレリンは安定に存在することが示された。ロバチレリンの代謝物プロファイルは、定性的に *in vitro* 及び *in vivo* 試験間でほぼ同等であった。ラット及びイヌにおいて、代謝物としてロバチレリン-アシッド、ロバチレリン-ケトン、ロバチレリン-水酸化体、TAMP、TA 及び未知代謝物が認められた。ヒト肝細胞においては、TAMP が主代謝物であり、ヒト特異的代謝物は検出されなかった。ラット及びイヌにおいて経口投与されたロバチレリンは主に糞中に排泄された。以上の結果から、ロバチレリンの吸収性、中枢移行性及び脳内安定性は、タルチレリンに比較して良好であることが示された。したがって、ロバチレリンは、経口投与可能な脊髄小脳変性症治療薬としてのポテンシャルを十分に有すると考えられた。

第 2 章では、単回経口投与後の健康成人男性におけるロバチレリンの吸収、代謝及び排泄を評価し、さらに *in vitro* 試験によりヒトにおけるロバチレリンの主要代謝物 TAMP の生成酵素を特定した。[<sup>14</sup>C]ロバチレリンを健康成人男性に単回経口投与したとき、ロバチレリンは良好に吸収され、ロバチレリンと TAMP が主に循環血中に認められた。尿及び糞中に回収された放射能は、投与量の 89.0% であった。主要な排泄経路は糞中排泄（投与量の 50.1%）であり、尿中排泄は中等度（36.8%）であった。ロバチレリン及び TAMP の尿中排泄量は、投与量に対しそれぞれ 15.6% 及び 15.9% であった。ロバチレリンは広範に代謝され、血漿、尿及び糞において計 20 種の代謝物が認められた。これらの代謝物のうち TAMP はロバチレリンの主要代謝物であることが確認され、ロバチレリンの主代謝経路は CYP3A4/5 によるロバチレリンから TAMP への代謝であることが示された。

第3章では、CYP3A4/5 阻害薬との併用による薬物相互作用（DDI）が懸念されたため、臨床 DDI 試験を実施しロバチレリンの体内動態に及ぼすイトラコナゾールの影響について評価した。また、*in vitro* 試験において排出トランスポーター（P-gp 及び BCRP）に対するロバチレリンの基質性を評価した。その結果、ロバチレリンの体内動態の特徴及び被相互作用薬として生じる DDI について明らかとなった。また、一般に知られる強い CYP3A4/5 阻害薬又は P-gp 阻害薬とロバチレリンを併用投与した場合に、ロバチレリンの血漿中濃度が上昇する可能性が示された。イトラコナゾールとの併用では、反復投与によりロバチレリンの血漿中濃度が中等度に上昇し、ロバチレリンの内分泌作用が増大した。このイトラコナゾールによる作用は、主に小腸上皮細胞内でロバチレリンの CYP3A4/5 による代謝及び P-gp を介した輸送が阻害されることに起因するものと推察された。

本研究の非臨床薬物動態試験成績から、ロバチレリンはタルチレリンと比較して良好に体内に吸収され、中枢移行性も良く、速やかに脳内に均一に分布すると考えられた。また、血中での安定性も良好であり、かつ脳内においてはタルチレリンと比較して安定的に存在すると考えられた。臨床薬物動態試験成績から、ヒトにおけるロバチレリンの代謝は、TAMP への代謝経路が主要であると考えられた（推定代謝寄与率：46%）。TAMP 生成には、肝臓や小腸に存在する CYP3A4/5 が主に関与すると考えられた。臨床においてロバチレリンとイトラコナゾールを併用投与した結果、ロバチレリンの血中曝露は約 3 倍に上昇した。このとき、血中及び尿中の TAMP は顕著に低下し、CYP3A4/5 による TAMP 生成がロバチレリンの薬物動態に大きく寄与すると考えられた。また、ロバチレリンは P-gp の基質であることが *in vitro* において示され、イトラコナゾールによる薬物相互作用は、おそらく主に小腸上皮細胞における CYP3A4/5 及び P-gp 阻害に起因したロバチレリン吸収量の増加に起因したものであり、肝臓中の CYP3A4/5 及び P-gp 阻害により生じたものではなく、また腎臓における P-gp 阻害により生じたものでもないかと推察された。

本研究では、新規 TRH 類縁体であるロバチレリンの体内動態を明らかにした。

その結果、TRH 及び多くの TRH 類縁体がピログルタミン酸アミノペプチダーゼ等により代謝されるのに対し、ロバチレリンは主に CYP3A4/5 により代謝され、その体内動態に大きく寄与することが示された。また、ロバチレリンの吸収性、中枢移行性及び脳内安定性は良好であり、消失半減期も長いことから、1 日 1 回投与の経口剤として期待されることが明らかとなった。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、多大なるご指導ご鞭撻を賜りました北里大学薬学部薬学科 薬剤学講座 伊藤 智夫 教授に深甚なる感謝の意を表します。有益なご助言を頂きました同大学薬学部臨床医学大講座 医薬開発学 成川 衛 教授、同大学薬学部臨床医学大講座 生体制御学 鈴木 幸男 教授、同大学薬学部薬学科 生体分子解析学講座 加藤 くみ子 教授に謹んで感謝の意を表します。また、多岐にわたりご助言頂きました同大学薬学部薬学科 生薬学講座 白畑 辰弥 准教授に深く感謝致します。

本研究に際し、多大なご支援と発表の機会を与えてくださいましたキッセイ薬品工業株式会社 代表取締役 神澤 陸雄 会長並びに代表取締役 降籬 喜男 社長に深甚なる感謝の意を表します。

本研究に際し、多大なご支援とご助言を頂きましたキッセイ薬品工業株式会社 取締役研究本部長 菊池 伸次 博士、生産本部顧問 草間 寛 博士、神澤医学研究振興財団常務理事 小林 護 博士、研究統括部参与 村上 真 博士、薬理研究所参事 武田 裕夫 博士、薬物動態研究所所長 遠藤 拓郎 博士、薬物動態研究グループマネジャー 安倍 美和 博士、臨床薬理室室長 降籬 貴生 博士、研究企画グループマネジャー 木口 純好 博士に深く感謝致します。また、本研究にご協力頂きましたキッセイ薬品工業株式会社 品質試験課課長 小嶋 康成 氏、薬物動態研究グループ主任研究員 原田 浩史 氏、臨床開発グループチーフ河合 明日香 女史、薬物動態研究グループ 太田 恵美子 女史並びに薬物動態研究グループの諸氏に感謝致します。

## 参考文献

厚生省医薬安全局. 非臨床薬物動態試験ガイドライン. 平成 10 (1998) 年 6 月 26 日医薬審第 496 号.

厚生労働省医薬・生活衛生局. 医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン. 平成 30 (2018) 年 7 月 23 日薬生薬審発 0723 第 4 号.

田辺三菱製薬株式会社. セレジスト錠 5 mg 医薬品インタビューフォーム 改訂第 5 版. 2013 年 9 月.

Akamine Y, Yasui-Furukori N, Uno T. Drug-Drug Interactions of P-gp Substrates Unrelated to CYP Metabolism. *Curr Drug Metab.* 2019; 20: 124-129.

Balimane PV, Marino A, Chong S. P-gp inhibition potential in cell-based models: which "calculation" method is the most accurate?. *AAPS J.* 2008; 10: 577-586.

Bassiri RM, Utiger RD. Metabolism and excretion of exogenous thyrotropin-releasing hormone in humans. *J Clin Invest.* 1973; 52: 1616-1619.

Bohnert T, Patel A, Templeton I, et al. Evaluation of a New Molecular Entity as a Victim of Metabolic Drug-Drug Interactions-an Industry Perspective. *Drug Metab Dispos.* 2016; 44: 1399-1423.

Bruderer S, Hopfgartner G, Seiberling M. (2012). Absorption, distribution, metabolism, and excretion of macitentan, a dual endothelin receptor antagonist, in humans. *Xenobiotica* 42: 901-10.

Daimon CM, Chirdon P, Maudsley S, Martin B. The role of thyrotropin releasing hormone in aging and neurodegenerative diseases. *Am J Alzheimers Dis (Columbia).* 2013; 1. doi: 10.7726/ajad.2013.1003.

Di L. The role of drug metabolizing enzymes in clearance. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2014; 10: 379-93.

Dresser GK, Spence JD, Bailey DG. Pharmacokinetic pharmacodynamic consequences and clinical relevance of cytochrome P450 3A4 inhibition. *Clin Pharmacokinet.* 2000; 38:41-57.

- European medicines agency (EMA). Guideline on the investigation of drug interactions, June 2012  
[http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/07/WC500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf). [last accessed 28 January 2020].
- Griffiths EC. Clinical applications of thyrotrophin-releasing hormone. *Clinical Sci* 1987; 73: 449-57.
- Griffiths EC. Peptidase inactivation of hypothalamic releasing hormones. *Horm Res*. 1976; 7: 179-191.
- Guillemin, R. Peptides in the brain: the new endocrinology of the neuron. *Science*. 1978; 202: 390-402.
- Hamilton RA, Garnett WR, Kline BJ. Determination of mean valproic acid serum level by assay of a single pooled sample. *Clin Pharmacol Ther*. 1981; 29: 408-13.
- Horita A, Carino MA, Lai H. Pharmacology of thyrotropin-releasing hormone. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*. 1986; 26: 311-32.
- Horita A. An update on the CNS actions of TRH and its analogs. *Life Sci* 1998; 62: 1443-8.
- Hosea NA, Collard WT, Cole S, et al. Prediction of human pharmacokinetics from preclinical information: comparative accuracy of quantitative prediction approaches. *J Clin Pharmacol*. 2009; 49: 513-33.
- Ijiro T, Nakamura K, Ogata M, et al. Effect of rovatirelin, a novel thyrotropin-releasing hormone analog, on the central noradrenergic system. *Eur J Pharmacol*. 2015; 761: 413-22.
- Ijiro T, Yaguchi A, Yokoyama A, Abe Y, Kiguchi S. Ameliorating effect of rovatirelin on the ataxia in rolling mouse Nagoya. *Eur J Pharmacol*. 2020; 882: 173271.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3 (R2), 2009.
- International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use (ICH). Final Concept Paper M12: Drug Interaction Studies, 2019.
- Isin EM, Elmore CS, Nilsson GN, et al. Use of radiolabeled compounds in drug metabolism and pharmacokinetic studies. *Chem Res Toxicol* 2012; 25: 532-42.
- Ito S, Ando H, Ose A, et al. Relationship between the urinary excretion mechanisms of drugs and their physicochemical properties. *J Pharm Sci*. 2013; 102: 3294-3301.

- Jalava KM, Partanen J, Neuvonen PJ. Itraconazole decreases renal clearance of digoxin. *Ther Drug Monit.* 1997; 19: 609-613.
- Jurima-Romet M, Crawford K, Cyr T, Inaba T. Terfenadine metabolism in human liver: *in vitro* inhibition by macrolide antibiotics and azole antifungals. *Drug Metab Dispos.* 1994; 22: 849-857.
- Kainuma T, Morikawa S, Tagawa K et al. Clinical phase I study of TA-0910 –Oral single dose study–. *Rinsyoiyaku.* 1997a; 13: 2501-2515.
- Kainuma T, Morikawa S, Tagawa K et al. Clinical phase I study of TA-0910 –Oral repeated dose study–. *Rinsyoiyaku.* 1997b; 13 (10): 2517-2532.
- Karyekar CS, Eddington ND, Briglia A, Gubbins PO, Dowling TC. Renal interaction between itraconazole and cimetidine. *J Clin Pharmacol.* 2004; 44: 919-927.
- Kaukonen KM, Olkkola KT, Neuvonen PJ. Itraconazole increases plasma concentrations of quinidine. *Clin Pharmacol Ther.* 1997; 62: 510-517.
- Khomane KS, Meena CL, Jain R, Bansal AK. Novel thyrotropin-releasing hormone analogs: a patent review. *Expert Opin Ther Pat.* 2011; 21: 1673–1691.
- Kinoshita K, Yamamura M, Suzuki M, Matsuoka Y, Taltirelin hydrate (TA-0910): an orally active thyrotropin-releasing hormone mimetic agent with multiple actions. *CNS Drug Rev.* 1998; 4: 25–41.
- Kobayashi K, Abe Y, Harada H, et al. Non-clinical pharmacokinetic profiles of rovatirelin, an orally available thyrotropin-releasing hormone analogue. *Xenobiotica.* 2019a; 49: 106-119.
- Kobayashi K, Abe Y, Kawai A, et al. Human mass balance, pharmacokinetics and metabolism of rovatirelin and identification of its metabolic enzymes *in vitro*. *Xenobiotica.* 2019b; 49: 1434-1446.
- Kobayashi N, Sato N, Fujimura Y, et al. Correction to discovery of the Orally Effective Thyrotropin-Releasing Hormone Mimetic: 1-{N-[(4S,5S)-(5-Methyl-2-oxooxazolidine-4-yl)carbonyl]-3-(thiazol-4-yl)-1-alanyl}-(2R)-2-methylpyrrolidine Trihydrate (Rovatiirelin Hydrate). *ACS Omega.* 2019; 4: 6977-6978.
- Kobayashi N, Sato N, Fujimura Y, et al. Discovery of the Orally Effective Thyrotropin-Releasing Hormone Mimetic: 1-{N-[(4S,5S)-(5-Methyl-2-oxooxazolidine-4-yl)carbonyl]-3-(thiazol-4-yl)-1-alanyl}-(2R)-2-methylpyrrolidine Trihydrate (Rovatiirelin Hydrate). *ACS Omega.* 2018; 3: 13647-13666.
- Kodama H, Furuuchi S, Takahashi M, et al. Disposition of taltirelin (1): absorption, distribution, metabolism and excretion in rats and dogs. *Yakubutsudoutai.* 1997; 12: 460-74.

- Lindell M, Karlsson MO, Lennernäs H, Pålman L, Lang MA. Variable expression of CYP and Pgp genes in the human small intestine. *Eur J Clin Invest.* 2003; 33: 493-499.
- Marchitti SA, Brocker C, Stagos D, Vasiliou V. Non-P450 aldehyde oxidizing enzymes: the aldehyde dehydrogenase superfamily. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2008; 4: 697-720.
- Marzolini C, Paus E, Buclin T, Kim RB. Polymorphisms in human MDR1 (P-glycoprotein): recent advances and clinical relevance. *Clin Pharmacol Ther.* 2004; 75: 13-33.
- Matsunaga Y, Morimoto KH, Terauchi Y, et al. Disposition of posatirelin. (3). metabolites in rats. *Yakubutsudoutai.* 1996; 11: 273-9.
- Morley JE. Extrahypothalamic thyrotropin releasing hormone (TRH) - its distribution and its functions. *Life Sci.* 1979; 25: 1539-1550.
- Neuvonen PJ, Kantola T, Kivistö KT. Simvastatin but not pravastatin is very susceptible to interaction with the CYP3A4 inhibitor itraconazole. *Clin Pharmacol Ther.* 1998; 63: 332-341.
- Nijenhuis CM, Schellens JH, Beijnen JH. Regulatory aspects of human radiolabeled mass balance studies in oncology: concise review. *Drug Metab Rev.* 2016; 48: 266-80.
- Nishizawa M, Onodera O, Hirakawa A, Shimizu Y, Yamada M; Rovatirelin Study Group. Effect of rovatirelin in patients with cerebellar ataxia: two randomised double-blind placebo-controlled phase 3 trials. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2020; 91: 254-262.
- Ohno K, Pettigrew KD, Rapoport SI. Lower limits of cerebrovascular permeability to nonelectrolytes in the conscious rat. *Am J Physiol.* 1978; 235: H299-307.
- Olkola KT, Backman JT, Neuvonen PJ. Midazolam should be avoided in patients receiving the systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin Pharmacol Ther.* 1994; 55: 481-485.
- O'Leary R, O'Connor B. Thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem* 1995; 65: 953-63.
- Penner N, Klunk LJ, Prakash C. Human radiolabeled mass balance studies: objectives, utilities and limitations. *Biopharm Drug Dispos* 2009; 30: 185-203.
- Penner N, Xu L, Parakash C. Radiolabeled absorption, distribution, metabolism, and excretion studies in drug development: why, when, and how?. *Chem Res Toxicol.* 2012; 25:513-31.
- Roffey SJ, Obach RS, Gedge JI, Smith DA. What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data in animal and human excretion studies employing radiolabeled drugs. *Drug Metab Rev.* 2007; 39:17-43.



- Schally AV. Aspects of hypothalamic regulation of the pituitary gland. *Science*. 1978; 202: 18-28.
- Shimizu M, Uno T, Sugawara K, Tateishi T. Effects of single and multiple doses of itraconazole on the pharmacokinetics of fexofenadine, a substrate of P-glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol*. 2006; 62: 372-376.
- Shimizu Y, Yamano H, Kiyono Y, Ijiro T. Administration regimen for therapeutic agents for ataxia in spinocerebellar degeneration. United States Patent Application Publication. Publication number: US 2018/0147189 A1. Publication Date: May 31, 2018.
- Sidhu RS, Blair AH. Human liver aldehyde dehydrogenase. Esterase activity. *J Biol Chem*. 1975; 250: 7894-8.
- Sobue I, Takayanagi T, Nakanishi T, et al. Controlled trial of thyrotropin releasing hormone tartrate in ataxia of spinocerebellar degenerations. *J. Neurol. Sci*. 1983; 61: 235-248.
- Sugimoto T, Hayashi T, Okita A, Morino A. Pharmacokinetics of the new thyrotropin releasing hormone analogue montirelin hydrate. 3rd communication: identification of metabolites in rat urine. *Arzneimittelforschung*. 1996; 46: 127-33.
- Tapaninen T, Backman JT, Kurkinen KJ, Neuvonen PJ, Niemi M. Itraconazole, a P-glycoprotein and CYP3A4 inhibitor, markedly raises the plasma concentrations and enhances the renin-inhibiting effect of aliskiren. *J Clin Pharmacol*. 2011; 51: 359-67.
- Templeton IE, Thummel KE, Kharasch ED, et al. Contribution of itraconazole metabolites to inhibition of CYP3A4 *in vivo*. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 83: 77-85.
- U.S. FDA. *In Vitro* Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry, January 2020. <https://www.fda.gov/media/134582/download> [last accessed 28 January 2020].
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). FDA safety testing of drug metabolites guidance for industry, February 2008.
- Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Effects of the antifungal agents on oxidative drug metabolism: clinical relevance. *Clin Pharmacokinet*. 2000; 38: 111-180.
- Vermeer LM, Isringhausen CD, Ogilvie BW, Buckley DB. Evaluation of ketoconazole and its alternative clinical CYP3A4/5 inhibitors as inhibitors of drug transporters: the *in vitro* effects of ketoconazole, ritonavir, clarithromycin, and itraconazole on 13 clinically-relevant drug transporters. *Drug Metab Dispos*. 2016; 44: 453-459.
- Walker D, Brady J, Dalvie D, et al. A holistic strategy for characterizing the safety of metabolites through drug discovery and development. *Chem Res Toxicol*. 2009; 22: 1653-62.

- Wang EJ, Lew K, Casciano CN, Clement RP, Johnson WW. Interaction of common azole antifungals with P glycoprotein. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46: 160-165.
- Wienkers LC, Heath TG. Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov.* 2005; 4: 825-833.
- Williams JA, Hyland R, Jones BC, et al. Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab and Dispos.* 2004; 32: 1201-1208.
- Wolfer GK, Rippon WB. Protocols for use of ultrafiltration in determination of free ligand concentration and of complexity of ligand/protein interactions. *Clin Chem.* 1987; 33: 115-17.
- Yamada M, Monden T, Konaka S, Mori M. Assignment of human thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor gene to chromosome 8. *Somat. Cell Mol. Genet.* 1993; 19: 577-580.
- Yokohama S, Yamashita K, Toguchi H, Takeuchi J, Kitamori N. Absorption of thyrotropin-releasing hormone after oral administration of TRH tartrate monohydrate in the rat, dog and human. *J Pharmacobiodyn.* 1984; 7: 101-11.
- Yoshida A, Rzhetsky A, Hsu LC, Chang C. Human aldehyde dehydrogenase gene family. *Eur J Biochem.* 1998; 251: 549-57.
- Zhou H. Pharmacokinetic strategies in deciphering atypical drug absorption profiles. *J Clin Pharmacol.* 2003; 43: 211-227.