

第 2 部 CTD の概要

JAN あるいは販売名： チオトロピウム臭化物水和物＋オロダテロール塩酸塩		
剤形・含量： 吸入剤（配合剤）・1 噴霧中チオトロピウム＋オロダテロー ル 2.5 µg/ 2.5 µg		
文書名： 2.6.4. 薬物動態試験の概要文		
文書作成日： 8 September 2014		Page 1 of 81
Proprietary confidential information		
© 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved.		
This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission		

目 次

目 次	2
1. まとめ	8
1.1 チオトロピウム	8
1.2 オロダテロール	8
1.3 チオトロピウム+オロダテロール	12
2. 分析法	14
2.1 分析方法	14
2.1.1 チオトロピウムの定量	14
2.1.1.1 ラット血漿中チオトロピウム濃度の測定（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）	14
2.1.1.2 イヌ血漿中チオトロピウム濃度の測定（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）	15
2.1.2 オロダテロールの定量	15
2.1.2.1 マウス血漿中オロダテロール濃度の測定（オロダテロール単独投与時）	16
2.1.2.2 ラット血漿中オロダテロール濃度の測定（オロダテロール単独投与時）	16
2.1.2.3 ラット血漿中オロダテロール濃度の測定（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）	18
2.1.2.4 ウサギ血漿中オロダテロール濃度の測定（オロダテロール単独投与時）	19
2.1.2.5 イヌ血漿中及び尿中オロダテロール濃度の測定（オロダテロール単独投与時）	19
2.1.2.6 イヌ血漿中オロダテロール濃度の測定（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）	21
2.2 放射性同位元素標識	21
2.2.1 チオトロピウムの放射性同位元素標識	21
2.2.2 オロダテロールの放射性同位元素標識	22
2.2.2.1 オロダテロールの放射性同位元素標識（オロダテロール単独投与時）	22
2.2.2.2 オロダテロールの放射性同位元素標識（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）	22
3. 吸収	23
3.1 チオトロピウム	23
3.2 オロダテロール	23
3.2.1 <i>In vitro</i> 吸収	23
3.2.2 <i>In vivo</i> 吸収	24

3.2.2.1	単回投与後の薬物動態	24
3.2.2.1.1	マウス	24
3.2.2.1.2	ラット	24
3.2.2.1.3	ウサギ	26
3.2.2.1.4	イヌ	26
3.2.2.2	反復投与後の薬物動態	29
3.2.2.2.1	マウス	30
3.2.2.2.2	ラット	30
3.2.2.2.3	ウサギ（胚・胎児発生）	31
3.2.2.2.4	イヌ（成熟及び幼若）	32
3.3	チオトロピウム+オロダテロール	32
3.3.1	配合剤の反復吸入投与毒性試験におけるチオトロピウム及びオロダテロール の薬物動態	32
3.3.1.1	ラットにおけるトキシコキネティクス	33
3.3.1.2	イヌにおけるトキシコキネティクス	33
4.	分布	35
4.1	チオトロピウム	35
4.2	オロダテロール	35
4.2.1	組織分布	35
4.2.1.1	単回投与後の組織分布	36
4.2.1.2	反復投与後の組織分布	38
4.2.2	血球移行	38
4.2.3	血漿蛋白結合	39
4.2.4	胎盤通過	39
5.	代謝（動物種間の比較）	40
5.1	チオトロピウム	40
5.2	オロダテロール	40
5.2.1	<i>In vitro</i> 代謝	40
5.2.2	<i>In vivo</i> 代謝	42
5.2.2.1	血漿中代謝物	42
5.2.2.1.1	非抽出性放射能の評価	43
5.2.2.2	尿中代謝物	44
5.2.2.3	胆汁及び糞中代謝物	44
5.2.2.4	ヒト及び動物における代謝の比較	46

6.	排泄	48
6.1	チオトロピウム	48
6.2	オロダテロール	48
6.2.1	排泄経路及び排泄量	48
6.2.1.1	マウス	48
6.2.1.2	ラット	49
6.2.1.3	ウサギ	49
6.2.1.4	イヌ	50
6.2.2	乳汁排泄	51
7.	薬物動態学的薬物相互作用	52
7.1	チオトロピウム	52
7.1.1	酵素誘導及び酵素阻害	52
7.2	オロダテロール	52
7.2.1	酵素誘導及び酵素阻害	52
7.2.2	薬物トランスポーター阻害作用	53
7.3	<i>In vitro</i> でのチオトロピウムあるいは開発コードE* とオロダテロールの代謝的薬物相互作用	54
7.4	<i>In vivo</i> でのチオトロピウムとオロダテロールの薬物動態学的薬物相互作用	55
7.4.1	ラットにおける薬物動態学的薬物相互作用試験	55
7.4.2	イヌにおける薬物動態学的薬物相互作用試験	55
7.4.3	イヌを用いた 13 週間反復吸入投与毒性試験の一環としての薬物動態学的薬物相互作用試験	56
8.	その他の薬物動態試験	58
8.1	オロダテロール	58
8.2	チオトロピウム+オロダテロール+開発コードE* の併用毒性試験におけるトキシコキネティクス	58
9.	考察及び結論	60
9.1	オロダテロール	60
9.2	チオトロピウム+オロダテロール	63
10.	図表	65
10.1	オロダテロール	66
10.2	チオトロピウム+オロダテロール	74

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

略号及び用語の定義一覧

略語	英語	日本語
ADME	= Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion	吸収, 分布, 代謝, 排泄
AtoB	= apical-to-basal	頂端膜側から基底膜側
AUC _{0-8h}	= area under the concentration-time curve of the analyte in plasma within the time interval 0 to 8 h	0 時間から 8 時間までの血漿中分析物濃度-時間曲線下面積
AUC _{0-24h}	= area under the concentration-time curve of the analyte in plasma within the time interval 0 to 24 h	0 時間から 24 時間までの血漿中分析物濃度-時間曲線下面積
AUC _{0-inf}	= area under the plasma/blood/tissue concentration-time curve from time 0 to infinity	時間 0 から無限大までの血漿中/血中/組織中濃度-時間曲線下面積
AR	= adrenoreceptor	アドレナリン作動性受容体
BA 679	= tiotropium (= active moiety of drug substance)	チオトロピウム (=活性薬物)
BCRP	= breast cancer resistance protein	乳癌耐性蛋白質
BI	= Boehringer Ingelheim, Germany	ベーリンガーインゲルハイム (ドイツ)
BI 1744	= olodaterol (= active moiety of drug substance)	オロダテロール (=活性薬物)
開発コード E*	= Company code of Ciclesonide	シクレソニド
BtoA	= basal-to-apical	基底膜側から頂端膜側
Caco-2	= human colon carcinoma cell line	ヒト結腸癌由来細胞株
C _C /C _P	= concentration ratio of drug-related radioactivity between blood cells (C _C) and plasma (C _P)	血球/血漿中放射能濃度比
C _{xh}	= plasma concentration at time point x hour after administration	投与後 x 時間における血漿中濃度
Chbb:NZW	= New Zealand White rabbit strain bred in house (Chbb = Christoph Heinrich Boehringer Biberach)	自家繁殖 (Chbb) ニュージージーランド白色ウサギ
CD1	= CD1 mouse strain	CD1 マウス
CD 10915	= metabolite M551(2) of olodaterol, isomer of SOM 1522-glucuronide (isomer 2)	オロダテロール代謝物 M551(2), SOM1522 グルクロン酸抱合体 (同位体 2)
CD 11249	= metabolite M551(1) of olodaterol, isomer of SOM 1522-glucuronide (isomer 1)	オロダテロール代謝物 M551(1), SOM1522 グルクロン酸抱合体 (同位体 1)
CD 12656	= metabolite M455(1) of olodaterol, metabolite of olodaterol formed by demethylation of the methoxy-moiety of olodaterol and phase II sulfation	オロダテロール代謝物 M455(1), オロダテロールのメトキシ分子脱メチル化により生ずるオロダテロール代謝物 (SOM1522) の硫酸抱合体 (第Ⅱ相代謝物)
CD 1857	= Active metabolite of 開発コード E*	開発コード E* (シクレソニド) の活性代謝物
CD 992	= metabolite M565(1) of olodaterol formed by phase II glucuronidation of the 6-hydroxy-benzoxazine-moiety of olodaterol	オロダテロール代謝物 M565(1), オロダテロールの 6-hydroxy-Benzoxazine 基へのグルクロン酸抱合体
CL	= total clearance of the analyte in plasma after intravenous administration	静脈内投与後の血漿中分析物の総クリアランス
C _{max}	= maximum concentration of the analyte	最高血漿中/血中分析物濃度

*: 新薬承認情報提供時に置き換えた

	in plasma/blood	
$C_{\max, ss}$	= maximum concentration of the analyte in plasma at steady state	定常状態の最高血漿中分析物濃度
CNS	= central nervous system	中枢神経系
COPD	= chronic obstructive pulmonary disease	慢性閉塞性肺疾患
CRL	= Charles River Laboratories	チャールズリバー研究所
CV	= coefficient of variation	変動係数
CYP	= cytochrome P450	チトクロム P450
EDTA	= ethylenediaminetetraacetic acid	エチレンジアミン四酢酸
f	= female	雌
F	= bioavailability	バイオアベイラビリティ
F_a	= fraction absorbed (= extent of absorption)	吸収相画分
f_B	= bound fraction of analyte in plasma	血漿中分析物の結合率
FDA	= Food and Drug Administration US	米国食品医薬品局
FDC	= Fixed dose combination	固定用量配合剤
GLP	= Good Laboratory Practice	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施に関する基準
gMean	= geometric mean	幾何平均
h	= hour(s)	時間
HPLC	= high performance liquid chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HPLC-MS/MS	= high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry	高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法
IC_{50}	= concentration which achieves a 50% inhibitory effect	50%阻害濃度
i.h.	= inhalation	吸入
i.t.	= intratracheal	気管内
i.v.	= intravenous	静脈内
K_i	= dissociation constant of the enzyme-inhibitor complex for competitive inhibition; inhibition constant	競合阻害のための酵素-阻害剤複合体の解離定数：阻害定数
k_{inact}	= inactivation constant	不活化定数
K_m	= Michaelis-Menten constant; equals the dissociation constant of the enzyme-substrate complex at rapid equilibrium conditions	ミカエリスメンテン定数；迅速平衡状態における酵素基質複合体の解離定数
Ko143	= inhibitor of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)	乳癌耐性蛋白（BCRP）の阻害剤
LLC-PK1	= Lewis-lung cancer porcine kidney 1 cells	
LLOQ	= lower limit of quantification	定量下限
m	= male	雄
MDCKII	= Madin-Darby canine kidney II cells	
M375(1)	= SOM 1522, metabolite of olodaterol (= desmethyl-olodaterol)	オロダテロールの脱メチル代謝物（合成標品 SOM 1522）
M389(1)	= BI 1744 (= olodaterol, active moiety)	BI 1744 (=オロダテロール，活性体)
M455(1)	= CD 12656, metabolite of olodaterol (= sulfate of SOM 1522)	オロダテロール代謝物 (=SOM 1522 の硫酸抱合体，合成標品 CD 12656)
M551(1)	= CD 11249, metabolite of olodaterol (= glucuronide of SOM 1522)	オロダテロール代謝物 (=SOM 1522 のグルクロン酸抱合体，合成標品 CD 11249)
M551(2)	= CD 10915, metabolite of olodaterol (= glucuronide of SOM 1522)	オロダテロール代謝物 (=SOM 1522 のグルクロン酸抱合体，合成

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

チオトロピウム+オロダテロール

M565(1)	=	CD 992, metabolite of olodaterol (= glucuronide of olodaterol)	標品 CD 10915) オロダテロール代謝物 (=オロダテロールのグルクロン酸抱合体, 合成標品 CD 992)
M565(2)	=	metabolite of olodaterol (= glucuronide of olodaterol)	オロダテロール代謝物 (=オロダテロールのグルクロン酸抱合体)
MAT	=	mean absorption time of the analyte molecules	平均吸収時間
MDR1	=	multidrug resistance protein (synonymous to P-gp)	多剤耐性蛋白質 (P-gp と同義語)
min	=	minute(s)	分
MRT	=	mean residence time of the analyte molecules in the body	平均滞留時間
MRT _{disp}	=	disposition mean intrinsic residence time of the analyte molecules in the body	消失平均固有滞留時間
MRT _{tot}	=	total mean residence time of the analyte molecules in the body	総平均滞留時間
MS	=	mass spectrometry	質量分析法
NA	=	not applicable	該当せず
NC	=	not calculated	計算せず
ND	=	not determined	測定せず
NOAEL	=	no observed adverse effect level	無毒性量
NZW	=	New Zealand White – strain of the species rabbit	ニュージーランド白色ウサギ
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
Olo	=	Olodaterol	オロダテロール
P-gp	=	P-glycoprotein (synonymous to MDR1)	P-糖蛋白質 (MDR1 と同義語)
PK	=	pharmacokinetics	薬物動態
pM•h	=	given as [pmol/L•h/L] in reports	pmol/L•h/L
p.o.	=	per os (oral administration)	経口
QC	=	quality control	品質管理
q.d.	=	Once daily	1日1回
RMV	=	respiratory minute volume	分時換気量
SD	=	Sprague Dawley – strain of the species rat	Sprague Dawley 系ラット
SOM 1522	=	M375(1), metabolite of olodaterol	オロダテロール代謝物 (M375(1))
SULT	=	sulfotransferase	標品 硫酸転移酵素
t _{1/2}	=	terminal half-life	終末半減期
t _{max}	=	time to reach C _{max}	最高血漿中濃度到達時間
TK	=	toxicokinetics	トキシコキネティクス
Tio	=	Tiotropium	チオトロピウム
Tio+Olo	=	Tiotropium+olodaterol	チオトロピウム+オロダテロール
Tio+Olo FDC	=	Tiotropium+Olodaterol RESPIMAT solution for inhalation	チオトロピウム+オロダテロール吸入用配合錠
UGT	=	UDP-glucuronosyltransferase	UDP-グルクロン酸転移酵素
V _{ss}	=	apparent volume of distribution at steady state after intravenous administration	静脈内投与後の定常状態における見かけの分布容積

1. まとめ

非臨床動物種におけるチオトロピウム単剤及びオロダテロール単剤の薬物動態は、それぞれの薬物単独での開発プログラムにおいて特徴づけられおり、チオトロピウムについては既申請資料中に記載されている。オロダテロール単剤及びチオトロピウムとオロダテロールの併用(以後、チオトロピウム+オロダテロールと略す)については本概要文中に両薬物の薬物動態特性の概要を記載する。チオトロピウム+オロダテロールレスピマット吸入液については非臨床開発プログラムの一環として、薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験を実施した。これらの試験では、*in vitro* 及び *in vivo* でのチオトロピウムとオロダテロール間の薬物動態学的薬物相互作用の有無を検討するとともに、反復吸入投与毒性試験における両薬物への曝露量を測定した。

表示した用量又は濃度は、特に記載しない限り活性体であるチオトロピウム及びオロダテロールの当量で示す。薬物動態試験及びトキシコキネティクス試験の吸入試験において実際の分時換気量 (RMV) を測定することができなかったため、文献値 (ラット) 又は同時試験で得られた RMV データ (イヌ) により到達吸入用量を推定した。到達吸入用量と名目吸入用量の間に違いがみられるため、吸入投与による薬物動態試験及び後期トキシコキネティクス試験における PK パラメータの用量補正は、到達吸入用量に基づいて行った。名目吸入用量に基づいて用量補正を行ったのは、初期の吸入トキシコキネティクス試験のみである。

1.1 チオトロピウム

チオトロピウム (社内コード BA 679) 単剤のマウス、ラット、ウサギ及びイヌにおける薬物動態及び薬物代謝の概要並びにヒトとの比較は以下のとおりである。

主要な薬物動態特性は：

- － 吸入後の高いバイオアベイラビリティ、経口投与後の低いバイオアベイラビリティ
- － 吸入後の血漿中濃度の用量比例性
- － 速やかで広範な分布
- － 血液脳関門透過性なし
- － 高い全身クリアランス
- － 反復吸入投与後の血漿中における明らかな蓄積なし
- － 主として腎排泄による消失
- － ヒト (71%) と比較して動物での低い蛋白結合率 (20%)
- － 主として非エステラーゼ加水分解開裂による代謝
- － チトクロム P-450 の阻害は認められない

1.2 オロダテロール

マウス、ラット、ウサギ及びイヌにおけるオロダテロール (社内コード BI 1744) 単剤の薬物動態及び薬物代謝について検討し、ヒトと比較した。非臨床試験と臨床試験で同じ塩製剤、すなわち、オロダテロール塩酸塩を使用した。また、薬理試験及び毒性試験においても薬物動

態試験と同じ動物種を使用した。薬物動態試験では、未変化体オロダテロール及び関連放射能の血漿又は血液中濃度時間推移、単回投与後の全身オートラジオグラフィ（白色、有色及び妊娠ラット）、反復投与後の組織分布、血漿蛋白結合、血球移行、乳汁排泄（ラット）、マスバランス及び胆汁排泄を含む ADME 試験、並びに血漿、尿、糞及び胆汁中の代謝物について評価した。すべての投与経路について、薬理試験及び毒性試験と同じオロダテロール水溶性製剤を使用した。主な薬物動態パラメータ（ C_{max} 及び AUC は用量で補正）を動物種ごとに比較して表 1.2: 1 に示す。

オロダテロールを吸入投与（マウス、ラット及びイヌ：毒性試験）、気管内投与（ラットのみ）及び経口投与（マウス、ラット、ウサギ及びイヌ）したときの *in vivo* 吸収率及びバイオアベイラビリティを評価した。吸入投与後の絶対的バイオアベイラビリティ（静脈内投与時のデータを用いて算出）は、マウス（54.4%）で比較的高く、ラット（23.1%）及びイヌ（9.2%）でやや低かった。しかし、気管内投与によりラットの肺に直接投与したときのバイオアベイラビリティは、比較的高かった（58.6%）。経口投与時の放射能（オロダテロール及び代謝物）から算出した吸収率はラット（7%）及びウサギ（13.5%）で低かったが、イヌ（40.5%）では中等度であった。経口投与時の未変化体のバイオアベイラビリティは非常に低く、マウスで 4.0%、ラットで 1.74%、ウサギで 0.03%であった。イヌに経口投与したときのバイオアベイラビリティはやや高い 13.1%ではあったが、依然として低かった。全体として、経口吸収では有意な初回通過効果が認められた。したがって、経口投与後の薬物が全身循環に至り、全身性の作用を及ぼす可能性は低いと考えられた。

定常状態における見かけの分布容積（ V_{ss} ）は検討したすべての動物種で同程度であり、約 9.12～17.6 L/kg であった。このように V_{ss} が大きかったことから、未変化体が血漿中から組織中へと広範に分布することが示された。このことは、ラットに ^{14}C オロダテロールを気管内及び静脈内投与したとき、放射能は中枢神経系（CNS）を除き、組織に広く分布することと一致していた。気管内投与後と静脈内投与後の組織分布は質的及び量的に同等であった。腎臓及び複数の腺組織（下垂体、唾液腺、副腎及び膵臓）に高い放射能濃度が認められた。有色ラットにおいて、 ^{14}C オロダテロール及び代謝物は網膜のメラニン含有組織に対して親和性を示した。 ^{14}C オロダテロール及び代謝物の血液-脳関門通過はごくわずかであり、P-gp 阻害ラット及び P-gp 欠損マウスにおける CNS 透過性も依然低いままであった。反復投与試験における組織分布についても検討した。 ^{14}C オロダテロールを反復気管内投与したとき、血液中に放射能が長時間にわたり滞留したにもかかわらず、組織への蓄積はごく限られていた。

検討したすべての動物種において、血液中でオロダテロールは主に血球中に分布した。 ^{14}C 又は ^3H オロダテロールの血漿蛋白結合率（ f_b ）は、検討したすべての動物種（47.4～78.1%）及びヒト（56.1～68.9%）で低から中等度であった。 ^{14}C は ^3H オロダテロールの血漿蛋白結合率に濃度依存性及び性差は確認されなかった。さらに、腎機能又は肝機能障害患者と健康被験者の間で血漿蛋白結合率に問題となる差は認められなかった。

ラット及びヒト肝細胞、ヒト肺及び肝ミクロソーム、並びに薬物代謝酵素発現系を用いて、オロダテロールの代謝を評価した。第 I 相代謝反応に関して、オロダテロールは CYP2C8 及び

CYP2C9 によって代謝され、CYP3A4 の寄与は無視し得る程度であり、他の CYP 酵素は関与していないことが明らかになった。また、ヒト肺ミクロソームとともにインキュベーションした場合、オロダテロールは安定であることが明らかになり、オロダテロールの代謝全体に対する肺代謝の寄与は無視し得る程度であることが示された。肝細胞による *in vitro* 代謝及び *in vivo* 代謝から、第 II 相代謝反応（主にグルクロン酸抱合化）の寄与が大きいことが明らかになった。さらに、動物及びヒトの血漿試料中に少量の非抽出性放射能が認められたことから、放射能の一部が血漿蛋白質に共有結合していることが示された。全体として、オロダテロールの主要代謝経路は検討した動物種で類似していた。生成した代謝物の比較から、2 種類の抱合代謝物、すなわち、SOM 1522（オロダテロールの酸化的脱メチル化代謝物）のグルクロン酸抱合体（CD 10915）及び SOM 1522 の硫酸抱合体（CD 12656）はヒト特異的不均衡（disproportionate）第 II 相代謝物であることが明らかになった。しかし、ヒト ADME 試験において、血漿中に認められた両代謝物の濃度は非常に低く、それぞれ<5 pM 及び<47 pM であった。代謝物 CD 992, M565(2), CD 11249, SOM 1522 及び非抽出性放射能は、毒性試験で使用した動物種において十分な曝露が認められた。オロダテロールの薬物代謝に関するこれらのデータは、FDA ガイダンス「代謝物の安全性試験」に関して、承認申請を支持するものと考えられた。

ヒト肝ミクロソームにおいて、オロダテロールは CYP2D6 活性を阻害し、 K_i は 1.92 μM であった。しかし、COPD 患者に治療用量のオロダテロールを投与したときの血漿中濃度が pM 範囲であることを考慮すると（オロダテロール 5 μg 投与後の $C_{\text{max,ss}}$ は 10.4 pM に相当する 4.02 pg/mL であった）、治療用量のオロダテロールによって CYP2D6 が阻害される可能性は低いと考えられた。また、CYP3A4 の不可逆的阻害（mechanism based inhibition）を示す徴候も認められなかった。さらに、*in vitro* 薬物相互作用試験を実施した結果、オロダテロールがチオトロピウム及びシクレソニドの代謝に問題となる影響を及ぼさず、また影響を受ける可能性も低いことが明らかになった。また、ラット及びイヌを用いて、オロダテロールとチオトロピウムの *in vivo* 薬物相互作用を検討したが、問題となる変化は認められなかった。

MDR1 発現細胞を使用した試験において、P-gp 阻害剤を用いた評価により、オロダテロールは P-gp に対して低親和性基質であることが明らかになった。また、追加試験において、オロダテロールは BCRP の基質ではないことが明らかになった。

検討したすべての動物種において、未変化体の血漿中からの消失は速やかであった。静脈内投与後の全身血漿クリアランス (CL) は、マウス>ラット>イヌ>ウサギの順で小さくなった。しかし、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを気管内、静脈内又は経口投与したすべての動物種において、血液/血漿及び種々の組織からの放射能の消失半減期は、未変化体に比べて有意に長かった。

オロダテロール及び代謝物の主な排泄経路は、胆汁排泄（ラット気管内及び十二指腸内投与後で投与量の 25.6%）に続く糞を経由したものだ。ラットにおいて、未変化体の腸管内腔への胆汁を経由した能動的分泌がみられたが、薬物由来放射能の腸肝循環は無視し得る程度であった。ラットにおける放射能の尿中排泄は気管内投与後（投与量の 15.3%）及び静脈内投与後（投与量の 23.6%）で中等度であり、経口投与後（投与量の 1.72%）ではごくわずかであった。マウス、ラット、ウサギ又はイヌに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを静脈内及び気管内投与したとき

の尿、胆汁及び糞中では、放射能成分中にはオロダテロールが多くを占めていた。しかし、経口投与したときの経口吸収率は低く、初回通過効果を受けることから、経口投与後の尿及び胆汁中の未変化体量は静脈内及び気管内投与後に比べて少なかった。

妊娠ラット試験において、オロダテロール関連放射能が血液-胎盤関門を通過することが示された。母体血液（心臓中）と比較した放射能濃度は、総胎児中濃度の比で 0.35～1.4、さらに放射能の分布が確認された胎児組織中濃度との比は 0.86～3.3 であった。また、授乳中のラットに [^{14}C] オロダテロールを投与したとき、放射能は乳汁中に分泌された。

オロダテロールの薬物動態には問題となる性差は認められなかった。

表 1.2: 1 オロダテロールを単回吸入，気管内，静脈内及び経口投与したときの血漿中未変化体濃度から算出した用量補正後の薬物動態パラメータの種間比較

		動物種	マウス	ラット		ウサギ	イヌ	ヒト ^{e)}
投与経路	パラメータ	単位	雄	雄及び雌		雌	雄及び雌	男性
吸入 (気管内)	名目用量	µg/kg	200	200	155 気管内	-	60	1 ⁱ⁾
	吸入時間	min	35	35	NA	ND	10	≤2
	C _{max} 用量補正值	pM/(µg/kg)	109 ⁱ⁾	70.5 ⁱ⁾	312 ⁱ⁾	ND	37.8 ⁱ⁾	94.7 ⁱ⁾
	t _{max} (中央値)	h	0.583	0.583	0.333 ⁱ⁾	ND	0.333 ⁱ⁾	0.233
	AUC _{0-∞} 用量補正值	pM•h/(µg/kg)	334 ⁱ⁾	235 ⁱ⁾	601 ⁱ⁾	ND	136 ⁱ⁾	999 ⁱ⁾
	MRT	h	3.65	7.1 ⁱ⁾	4.28	ND	10.8 ⁱ⁾	32.3
	t _{1/2}	h	5.69	6.6 ⁱ⁾	5.44	ND	9.43 ⁱ⁾	25.4 ⁱ⁾
	MAT	h	0 ^{a)}	2.67 ⁱ⁾	0.12	ND	0 ^{a)}	ND
	F	%	54.4 ^{b)}	23.1 ⁱ⁾	58.6	ND	9.2 ⁱ⁾	約 51
静脈内	名目用量	µg/kg	155	155		301	30	0.21 ⁱ⁾
	AUC _{0-∞} 用量補正值	pM•h/(µg/kg)	665 ⁱ⁾	1026 ⁱ⁾		2206 ⁱ⁾	1720 ⁱ⁾	1972 ⁱ⁾
	MRT	h	3.79	4.16		7.75	11.2	13.4
	t _{1/2}	h	13.2	5.81		14.5	17.5	16.4
	CL	mL/min/kg	64.5	43.3		19.7	26.2	22.3 ⁱ⁾
	V _{ss}	L/kg	14.7	10.7		9.12	17.6	17.9 ⁱ⁾
経口	名目用量	µg/kg	155	155		301	100	0.57 ⁱ⁾
	C _{max} 用量補正值	pM/(µg/kg)	3.97 ⁱ⁾	2.77 ⁱ⁾		0.233 ^{i),d)}	22.8 ⁱ⁾	16.6 ⁱ⁾
	t _{max} (中央値)	h	1.0	1.25		0.750 ^{i),d)}	0.5 ⁱ⁾	0.875
	AUC _{0-∞} 用量補正值	pM•h/(µg/kg)	26.5 ⁱ⁾	17.9 ⁱ⁾		0.543 ^{i),h)}	230 ⁱ⁾	39.7 ^{g),i)}
	MRT	h	3.99	6.48		NC ^{d)}	19.8	ND
	t _{1/2}	h	1.84 ^{c)}	4.41		NC ^{d)}	17.6	ND
	MAT	h	0.2	2.32		NC ^{d)}	ND	ND
	F	%	4.0	1.74		0.03 ^{d)}	13.1	約 2

この表に要約したデータは以下の報告書から引用した。

マウス (CTD 4.2.2.2-3_U-1105, CTD 4.2.3.2-2_U-1975), ラット (CTD 4.2.2.2-1_U-2124, CTD 4.2.2.2-5_U-1351), ウサギ (CTD 4.2.2.5-3_U-1337), イヌ (CTD 4.2.2.5-2_U-1739, CTD 4.2.2.2-6_U-1592), ヒト (CTD 5.3.3.1-1_U06-1418, CTD 5.3.3.1-4_U08-1081, CTD 5.3.3.1-6_U08-1060)

- a) 0 未満の計算値 (マウスは-0.14 h, イヌは-0.53 h)。
- b) $(66700 \text{ AUC}_{0-\infty \text{ i.h.}} / 103000 \text{ AUC}_{0-\infty \text{ i.v.}}) \times (400 \text{ nmol/kg} / 476 \text{ nmol/kg}) \times 100 (\%)$
- c) 血漿中濃度が速やかに 25.0 pM 未満に低下したため、過小評価されている可能性がある。
- d) 誤投与があったため、経口投与群の動物 3 例中 1 例を除外した。
- e) $1 \text{ pg/mL} = 2.59 \text{ pM}$, 体重 70 kg として、報告された算術平均データから計算した。
- f) 吸入投与後の限られた時間しか血漿中にオロダテロールが検出されなかったことから、終末半減期を正確に表していない。定常状態条件からより正確な推定値が得られる。
- g) $\text{AUC}_{0-\infty}$ を算出することができなかったため、値は AUC_{0-t_z} を示す。
- h) 誤投与動物 1 例を除外して算出した用量補正後の $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ を示す。
- i) 報告されたデータから計算した。

NA: 該当せず

NC: 計算せず

ND: 測定せず

1.3 チオトロピウム+オロダテロール

チオトロピウム+オロダテロールの非臨床毒性試験において十分な全身曝露を証明するため、また、チオトロピウムとオロダテロールの間の薬物動態学的薬物相互作用の有無を検討するため、薬物動態試験、トキシコキネティクス試験及び *in vitro* 代謝試験を実施した。

チオトロピウム+オロダテロール液体エアロゾルの 1 日 1 回吸入投与によるラットの 4 週間、イヌの最長 13 週間反復併用投与毒性試験における、チオトロピウム及びオロダテロールの曝露量を測定した。トキシコキネティクス試験により、チオトロピウム及びオロダテロールの高い全身曝露量が証明された。さらに、検討した用量範囲でのチオトロピウム及びオロダテロールのトキシコキネティクス試験では、ラット及びイヌにおいて両薬物の顕著な、あるいは一貫した用量比例性からの逸脱、反復投与の影響及び性差は認められなかった。

また、*in vitro* 薬物代謝試験において、治療用量での投与により得られるチオトロピウム及びオロダテロールの濃度範囲で、ヒト肝ミクロソーム及び／又は肺ホモジネートにおいて、お互いの薬剤の酸化的代謝に対する影響は認められなかった。

In vivo でのチオトロピウムとオロダテロールの薬物動態学的薬物相互作用を、ラット及びイヌで検討した。ラットにチオトロピウム+オロダテロールを投与したときのチオトロピウム及びオロダテロールへの用量補正した曝露量は、いずれも個々の薬物を単独投与したときと比較して低かった (1.5 分の 1)。イヌの吸入投与薬物動態試験において、オロダテロールの曝露量は、オロダテロール単独投与後とチオトロピウムとの併用投与後で同程度であったが、チオトロピウムの曝露量は、オロダテロールとの併用投与後の方がチオトロピウム単独投与後よりわずかに低かった。

チオトロピウムとオロダテロールの薬物動態学的薬物相互作用を、イヌを用いた 2 つの 13 週間反復吸入投与毒性試験で検討した。これらの試験のいずれにも、チオトロピウム及びオロダテロールの単独投与群をおいた。最初の試験におけるオロダテロールの曝露量は、チオトロピウム+オロダテロール投与後の方がオロダテロール単独投与後よりわずかに低かった。第 2

の試験におけるオロダテロールの曝露量は、オロダテロール単独投与後の方が、チオトロピウム＋オロダテロール投与後よりわずかに低かった。いずれの試験においても、チオトロピウムへの曝露量は、チオトロピウム＋オロダテロール投与後の方がチオトロピウム単独投与後よりもわずかに低かった。全体として、*in vivo* 試験では、チオトロピウムとオロダテロールの間の薬物動態学的薬物相互作用は認められなかった。

2. 分析法

2.1 分析方法

2.1.1 チオトロピウムの定量

チオトロピウムの特異的かつ高感度の HPLC-MS/MS 法（高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法）を、非臨床プロファイリングに使用した動物種について開発し、バリデーションを行った。すべてのアッセイは、ドイツ、ビーベラハの Drug Metabolism and Pharmacokinetics Germany, Boehringer Ingelheim (BI) Pharma GmbH & Co. KG で確立した。

いずれの方法においても、50～100 µL の血漿を内部標準物質の [D₃]チオトロピウムと混合した。これらの試料について 96 ウェル・プレートフォーマットを用いた固相抽出を行い、HPLC-MS/MS 分析に使用した。分析用 RP18 HPLC カラムを用いて、グラジエント下でクロマトグラフィーによる分離を実施した。チオトロピウムの検出及び定量は、陽性イオン化モードのタンデム質量計を用いて実施した。測定したイオン質量は、チオトロピウムについては 392.0/152.1, [D₃]チオトロピウムについては 395.0/155.1 であった。

下記のバリデートされたすべての分析法に関する真度及び精度は、それぞれの許容基準である 15%以下及び定量下限（LLOQ）の 20%以下の範囲内であった [CTD 4.3-10_R01-0476]。

2.1.1.1 ラット血漿中チオトロピウム濃度の測定（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）

ラット EDTA 血漿中におけるチオトロピウムの定量のためのアッセイを開発し、バリデーションを行った。このアッセイについて、Han Wistar ラットの EDTA 血漿を用いたバリデーションを実施した [CTD 4.2.2.1-9_U-2212]。50 µL の検体を用いた較正範囲は 25.0～25000 pM であった。

分析法バリデーションデータにより、この方法はラット EDTA 血漿中でのチオトロピウムの定量において信頼性及び再現性があることが証明された。真度はアッセイ間で-2.7～4.8%, CV は 5.6%以下であった。併用薬オロダテロールの存在による干渉は認められなかった。チオトロピウムはラット EDTA 血漿中においてやや不安定であることが示された。安定性は約 5°C では 8 時間、室温下では 1 時間に留まった。チオトロピウムの安定性が示されたのは、1 回の凍結／解凍サイクル及び約 5°C, 8 時間以下の保存においてのみである。チオトロピウムは-20°C で 502 日間安定であり、抽出試料はオートサンプラー中で最長 113 時間保存可能と考えられる [CTD 4.2.2.1-9_U-2212]。表 2.1.1.1: 1 に示した試験では、この方法を使用した。

表 2.1.1.1: 1 ラット血漿中のチオトロピウムを測定した試験

資料番号	短縮試験名	投与経路	GLP 適用の有無	使用した方法/版
CTD 4.2.3.2-8 _U-1892	4 週間反復投与毒性	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-9 _U-2212 / 1
CTD 4.2.2.6-2 _U-2470	単回投与 PK	吸入	非 GLP	CTD 4.2.2.1-9 _U-2212 / 1
CTD 4.2.3.2-7 _U-1893	4 週間反復投与毒性	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-9 _U-2212 / 1

2.1.1.2 イヌ血漿中チオトロピウム濃度の測定（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）

イヌ EDTA 血漿中におけるチオトロピウムの定量のためのアッセイを開発し、バリデーションを行った。100 µL の容量の検体を用いた較正範囲は 25.0～25000 pM であった。この方法は、新規の液体ハンドリングシステム導入のため、わずかに修正した（分析法第 1.1 版）[CTD 4.2.2.1-8_U-2164]。分析法バリデーションデータから、イヌ EDTA 血漿中におけるチオトロピウムの定量方法としてのこの方法の信頼性及び再現性が証明された。真度はアッセイ間で -8.2～3.4%であり、CV は 5.2%以下であった。併用薬オロダテロールの存在による干渉は認められなかった。また、イヌ EDTA 血漿中のチオトロピウムは、4 回の凍結／解凍サイクル及び 5°C、2 時間又は室温下 1 時間の保存において安定であった。チオトロピウムは、血漿中において約 5°C で 18 時間又は室温下で 3 時間安定であった。チオトロピウムは -20°C で 502 日間安定であり、抽出試料はオートサンプラー中で最長 82 時間保存が可能である [CTD 4.2.2.1-8_U-2164]。この方法は表 2.1.1.2: 1 に示した試験で使用した。

表 2.1.1.2: 1 イヌ血漿中のチオトロピウムを測定した試験

資料番号	短縮試験名	投与経路	GLP 適用の有無	使用した方法/版
CTD 4.2.3.2-19_U-1388	13 週間反復投与毒性	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-8_U-2164/ 1.1
CTD 4.2.3.2-18_U-2249	13 週間反復投与毒性	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-8_U-2164/ 1
CTD 4.2.1.3-7_U-1898	単回投与	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-8_U-2164/ 1
CTD 4.2.3.2-17_U-1895	4 週間反復投与毒性	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-8_U-2164/ 1
CTD 4.2.2.6-1_U-2446	PK	吸入	非 GLP	CTD 4.2.2.1-8_U-2164/ 1
CTD 4.2.3.2-16_U-1894	4 週間反復投与毒性	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-8_U-2164/ 1
CTD 4.2.3.2-15_n00177290	探索的毒性	吸入	非 GLP	CTD 4.2.2.1-8_U-2164/ 1

2.1.2 オロダテロールの定量

非臨床プロファイリングで使用した動物種のために、オロダテロールの特異的かつ高感度の HPLC-MS/MS 法を開発し、バリデーションを行った。すべてのアッセイはドイツ、ビーベラハの Drug Metabolism and Pharmacokinetics, BI Pharma GmbH & Co. KG で確立した。

いずれの方法においても、100～200 µL の血漿を、内部標準物質の [D₃]オロダテロールと混合した。これらの試料について 96 ウェル・プレートフォーマットを用いた固相抽出を行い、HPLC-MS/MS 法での分析に使用した。分析用 RP18 HPLC カラムを用いて、グラジエント下でクロマトグラフィーによる分離を実施した。オロダテロールの検出及び定量は、正イオンモー

ドのタンデム質量計を用いて実施した。測定したイオン質量は、オロダテロールについては 387.3/163.2, [D₃]オロダテロールについては 390.3/166.2 であった。

下記のバリデーションされたすべての分析アッセイに関する真度及び精度は、それぞれ許容基準の 15%以下、及び定量下限（LLOQ）で 20%以下の範囲内であった [CTD 4.3-10_R01-0476]。

2.1.2.1 マウス血漿中オロダテロール濃度の測定（オロダテロール単独投与時）

マウス EDTA 処理血漿中のオロダテロール濃度定量法を開発し、バリデーションを行った。試料容量 100 µL を使用し、較正範囲は 25.0～12500 pM であった。

定量法の頑健性及び性能を向上させたり、新しい装置を組み込んだりするため、日常的分析の中で初期分析法（バージョン 01）の最適化を図った [CTD 4.2.2.1-6_U-1852]。分析法の開発履歴を表 2.1.2.1: 1 に示す。分析法バリデーションデータから、これらの方法及びその改良版は、マウス EDTA 処理血漿中のオロダテロール濃度を高い信頼性及び再現性で測定できる分析法であることが立証された。さらに、マウス EDTA 処理血漿中で、3 回の凍結／解凍サイクル、24 時間の室温保存、及び少なくとも 342 日間にわたる -20°C での凍結保存を通して、オロダテロールが安定であることが明らかになった。この定量法を使用したマウス試験の一覧を表 2.1.2.1: 2 に示す。

表 2.1.2.1: 1 マウス血漿中オロダテロール濃度定量法の開発履歴

バージョン	解説／改良
方法 01	フルバリデーション
方法 1.1	HPLC パラメータ（流速及び濃度勾配）
方法 1.2	方法の改良なし。バックアップ MS 装置の追加。

表 2.1.2.1: 2 マウス血漿中オロダテロール濃度を測定した試験

試験の表題	投与経路	GLP 適用	資料番号	バージョン
13 週間最大耐量試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.2-1_U-1341	01
薬物動態試験	静脈内、経口	非適用	CTD 4.2.2.2-3_U-1105	1.1
単回投与毒性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.2-2_U-1975	1.1
104 週間がん原性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.4.1-1_U-1065	1.1

2.1.2.2 ラット血漿中オロダテロール濃度の測定（オロダテロール単独投与時）

ラット EDTA 処理血漿中のオロダテロール濃度定量法を開発し、バリデーションを行った。本分析法のバリデーションは、Han Wistar ラットから採取した EDTA 処理血漿 [CTD 4.2.2.1-2_U-1874] 及び Sprague Dawley (SD) ラットから採取した EDTA 処理血漿 [CTD 4.2.2.1-4_U-1960] を用いて実施した。試料容量 100 µL を使用し、較正範囲は 25.0～12500 pM であった。

Han Wistar ラットと SD ラットで定量法は全く同じであり、頑健性及び性能を向上させたり、新しい装置を組み込んだりするため、日常的分析の中で継続的に最適化を図った [CTD

4.2.2.1-2_U-1874, CTD 4.2.2.1-4_U-1960]。方法の開発履歴を表 2.1.2.2: 1 に示す。分析法バリデーションデータから、これらの方法及びその改良版は、ラット EDTA 処理血漿中のオロダテロール濃度を高い信頼性及び再現性で測定できる分析法であることが立証された。さらに、ラット EDTA 処理血漿中で、3 回の凍結／解凍サイクル、23／24 時間の室温保存、及び少なくとも 415／450 日間にわたる -20℃ での凍結保存を通して（それぞれ SD／Han Wistar）、オロダテロールが安定であることが明らかになった [CTD 4.2.2.1-2_U-1874, CTD 4.2.2.1-4_U-1960]。この定量法を使用したラット試験の一覧を表 2.1.2.2: 2 に示す。

表 2.1.2.2: 1 ラット血漿中オロダテロール濃度定量法の開発履歴

バージョン	解説／改良
方法 01	フルバリデーション (Han Wistar ラット)
方法 02	部分バリデーション (SD ラット) : HPLC 移動相の pH 及び MS トランジションの軽微な改良
方法 03	部分バリデーション (Han Wistar ラット) : 新たな HPLC-MS/MS への移行, HPLC パラメータ, MS パラメータ及び固相抽出後の溶解法の改良
方法 03	部分バリデーション (SD ラット) : 新たな HPLC-MS/MS への移行, HPLC パラメータ, MS パラメータ及び固相抽出後の溶解法の改良
方法 3.1	軽微な改良 (Han Wistar ラット) : MS 記録時間及び固相抽出後の溶解液量の減量
方法 3.2	部分バリデーション (Han Wistar ラット) : MS パラメータ (イオン化電圧の低下), HPLC 流速の上昇, グラジエント溶離の軽微な改良
方法 3.2	部分バリデーション (SD ラット) : MS パラメータ (イオン化電圧の低下), HPLC 流速の上昇, グラジエント溶離の軽微な改良
方法 3.3	方法の改良なし。バックアップ MS 装置の追加。

表 2.1.2.2: 2 ラット血漿中オロダテロール濃度を測定した試験

試験の表題	投与経路	GLP 適用	資料番号	方法／バージョン
2 週間用量設定試験	吸入	非適用	CTD 4.2.3.2-3 _U■■-2143	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/01
4 週間毒性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.2-4 _U■■-2133	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/02
Irwin 変法	吸入	適用	CTD 4.2.1.3-3 _U■■-2401	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/02
胚・胎児発生に関する試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.5.2-1 _U■■-2534	CTD 4.2.2.1-4 _U■■-1960/02
薬物動態試験	気管内, 静脈内, 経口	非適用	CTD 4.2.2.2-1 _U■■-2124	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/02
2 週間毒性試験	静脈内	適用	CTD 4.2.3.2-9 _U■■-1375	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/3.1
P-gp による経口吸収の抑制	静脈内, 経口	非適用	CTD 4.2.2.2-4 _U■■-2038	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/3.2
13 週間最大耐量試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.2-5 _U■■-1342	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/3.1
2 週間毒性試験	経口	適用	CTD 4.2.3.2-10 _U■■-2334	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/3.2
受胎能・初期胚発生に関する試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.5.1-1 _U■■-2297	CTD 4.2.2.1-4 _U■■-1960/3.2
26 週間毒性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.2-6 _U■■-1691	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/3.2
造血毒性試験	静脈内	非適用	CTD 4.2.3.3.2-2 _U■■-1845	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/3.2
104 週間がん原性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.4.1-2 _U■■-2661	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/3.2
2 週間 ^[14C] 組織分布試験	気管内	非適用	CTD 4.2.2.3-4 _U■■-1602	CTD 4.2.2.1-2 _U■■-1874/3.3

2.1.2.3 ラット血漿中オロダテロール濃度の測定（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）

ラット EDTA 血漿中におけるオロダテロールの定量のためのアッセイを開発し、バリデーションを行った [CTD 4.2.2.1-2_U■■-1874]。100 µL の検体を用いた較正範囲は 25.0~12500 pM であった。頑健性及び性能の改善のため又は新たな機器を組み入れるため、通常の実験時にこの方法の持続的な最適化を行った [CTD 4.2.2.1-2_U■■-1874]。分析法のバリデーションデータにより、この方法及びその変法はラット EDTA 血漿中でのオロダテロールの定量 において信頼性及び再現性があることが証明された。バージョン 3 における真度はアッセイ間で 0.5~14.3%, CV は 10.8%以下であった。併用薬チオトロピウムの存在による干渉は認められなかった。また、ラット EDTA 血漿中のオロダテロールは、3 回の凍結/解凍サイクル、室温下での 24 時間保存及び-20℃での 450 日間以上の保存において安定であった [CTD 4.2.2.1-2_U■■-1874]。この分析法は表 2.1.2.3: 1 に示した試験で使用した。

表 2.1.2.3: 1 ラット血漿中のオロダテロールを測定した試験

資料番号	短縮試験名	投与経路	GLP 適用の有無	方法/バージョン
CTD 4.2.3.2-8 _U-1892	4 週間反復投与毒性	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-2 _U-1874 / 3
CTD 4.2.2.6-2 _U-2470	単回投与 PK	吸入	非 GLP	CTD 4.2.2.1-2 _U-1874 / 3
CTD 4.2.3.2-7 _U-1893	4 週間反復投与毒性	吸入	GLP	CTD 4.2.2.1-2 _U-1874 / 3

2.1.2.4 ウサギ血漿中オロダテロール濃度の測定（オロダテロール単独投与時）

ウサギ EDTA 処理血漿中のオロダテロール濃度定量法を開発し、バリデーションを行った。試料容量 150 μ L を使用し、較正範囲は 20.0～20000 pM であった [CTD 4.2.2.1-3_U-1888]。方法の開発履歴を表 2.1.2.4: 1 に示す。分析法バリデーションデータから、これらの方法及びその改良版は、ウサギ EDTA 処理血漿中のオロダテロール濃度を高い信頼性及び再現性で測定できる分析法であることが立証された。さらに、ウサギ EDTA 処理血漿中で、3 回の凍結／解凍サイクル、24 時間の室温保存、及び少なくとも 67 日間にわたる -20°C での凍結保存を通して、オロダテロールが安定であることが明らかになった [CTD 4.2.2.1-3_U-1888]。この定量法を使用したウサギ試験の一覧を表 2.1.2.4: 2 に示す。

表 2.1.2.4: 1 ウサギ血漿中オロダテロール濃度定量法の開発履歴

バージョン	解説／改良
方法 01	フルバリデーション
方法 02	方法の改良なし。MS トランジションの改良。

表 2.1.2.4: 2 ウサギ血漿中オロダテロール濃度を測定した試験

試験の表題	投与経路	GLP 適用	資料番号	バージョン
予備胚・胎児発生毒性試験	吸入	非適用	CTD 4.2.3.5.2-2 _U-2535	01
胚・胎児発生毒性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.5.2-3 _U-1019	02
[¹⁴ C]-吸収、分布、代謝、排泄試験	静脈内、経口、十 二指腸内	非適用	CTD 4.2.2.5-3 _U-1337	03

2.1.2.5 イヌ血漿中及び尿中オロダテロール濃度の測定（オロダテロール単独投与時）

イヌ EDTA 処理血漿中のオロダテロール濃度定量法を開発し、バリデーションを行った。試料容量 200 μ L を使用し、較正範囲は 20.0～20000 pM であった。定量法の頑健性及び性能を向上させたり、新しい装置を組み込んだりするため、日常的な分析の中で継続的に最適化を図った [CTD 4.2.2.1-1_U-1855]。方法の開発履歴を表 2.1.2.5: 1 に示す。分析法バリデーションデータから、これらの方法及びその改良版は、イヌ EDTA 処理血漿中のオロダテロール濃度を高い信頼性及び再現性で測定できる分析法であることが立証された。さらに、イヌ EDTA 処理血漿中で、4 回の凍結／解凍サイクル、22 時間の室温保存、及び少なくとも 479 日間にわたる -20°C

での凍結保存を通して、オロダテロールが安定であることが明らかになった [CTD 4.2.2.1-1_U-1855]。この定量法を使用したイヌ試験の一覧を表 2.1.2.5: 2 に示す。

表 2.1.2.5: 1 イヌ血漿中オロダテロール濃度定量法の開発履歴

バージョン	解説／改良
方法 01 及び 02	フルバリデーション
方法 03	軽微な改良：HPLC 移動相の pH 及び固相抽出時の最初の減圧段階
方法 04	軽微な改良：HPLC パラメータに関して、ブランク溶液の注入を追加
方法 05	部分バリデーション：新たな HPLC-MS/MS への移行，HPLC パラメータ，MS パラメータ及び固相抽出後の溶解法の改良，内部標準物質濃度の低下
方法 5.1 及び 5.2	軽微な改良：イオン化電圧の低下，HPLC 流速の上昇，グラジエント溶離の改良
方法 5.3	部分バリデーション：固相抽出用の新たな液体処理システム（Hamilton 分注装置）
方法 5.4	方法の改良なし。バックアップ MS 装置の追加。

表 2.1.2.5: 2 イヌ血漿中オロダテロール濃度を測定した試験の履歴

試験の表題	投与経路	GLP 適用	資料番号	バージョン
2 週間用量設定試験	吸入	非適用	CTD 4.2.3.2-11_U-2134	01
4 週間毒性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.2-12_U-2146	03
テレメトリー試験	吸入	適用	CTD 4.2.1.3-4_U-1058	03
探索的毒性試験	静脈内	非適用	CTD 4.2.3.2-20_U-1625	04
2 週間毒性試験	静脈内	適用	CTD 4.2.3.2-21_U-1051	04
薬物動態試験	静脈内，経口	非適用	CTD 4.2.2.2-2_U-2163	04
探索的毒性試験	経口	非適用	CTD 4.2.3.2-22_U-1139	05
[¹⁴ C]-吸収，分布，代謝，排泄試験	静脈内，経口	非適用	CTD 4.2.2.5-2_U-1739	05 及び 5.2
2 週間毒性試験	経口	適用	CTD 4.2.3.2-23_U-2169	5.2
13 週間毒性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.2-13_U-1317	05
52 週間毒性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.2-14_U-1740	5.2 及び 5.4
テレメトリー試験	経口	適用	CTD 4.2.1.3-5_U-2001	5.4
幼若動物を用いた予備毒性試験	吸入	非適用	CTD 4.2.3.7.7-1_U-1442	5.2
幼若動物を用いた 13 週間毒性試験	吸入	適用	CTD 4.2.3.7.7-2_U-1257	5.4

イヌ血漿中濃度定量法（バージョン 4.0）と類似した方法を用いて，イヌ尿中オロダテロール濃度定量法を開発し，部分バリデーションを行った。この方法の真度及び精度は許容基準範囲内であった[CTD 4.2.2.1-7_U-1647]。試料容量 100 µL を使用し，校正範囲は 100～100000 pM であった。フルバリデーションは行わなかったが，分析法バリデーションデータから，この定量法は，イヌ尿中のオロダテロール濃度を高い信頼性及び再現性で測定できる分析法であることが立証された。

さらに，イヌ尿中で，3 回の凍結／解凍サイクル，及び少なくとも 445 日間にわたる -20℃ での凍結保存を通して，オロダテロールが安定であることが明らかになった。この定量法を使用したイヌ試験の一覧を表 2.1.2.5: 3 に示す。

表 2.1.2.5: 3 イヌ尿中オロダテロール濃度を測定した試験の履歴

試験の表題	投与経路	GLP 適用	資料番号	バージョン
薬物動態試験	静脈内, 経口	非適用	CTD 4.2.2.2-2_U-2163	01
[¹⁴ C]-吸収, 分布, 代謝, 排泄試験	静脈内, 経口	非適用	CTD 4.2.2.5-2_U-1739	01 及び 1.1

2.1.2.6 イヌ血漿中オロダテロール濃度の測定（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）

イヌ EDTA 血漿中におけるオロダテロールの定量のためのアッセイを開発し、バリデーションを行った。200 µL の容量の検体を用いた較正範囲は 20.0~20000 pM であった。頑健性及び性能の改善のため又は新たな機器を組み入れるため、通常の実験時にこの方法の持続的な最適化を行った [CTD 4.2.2.1-1_U-1855]。分析法バリデーションデータにより、この方法及びその変法は、イヌ EDTA 血漿中でのオロダテロールの定量 において信頼性及び再現性があることが証明された。バージョン 5 及び 5.3 における逸脱範囲は-2.3~3.3% (LLOQ については 13.4%), CV は 5.7%以下であった。併用薬チオトロピウムの存在による干渉は認められなかった。また、オロダテロールは、イヌ EDTA 血漿中で 4 回の凍結/解凍サイクル, 室温下で 22 時間及び-20°C で 479 日間以上安定であった [CTD 4.2.2.1-1_U-1855]。これらの方法は表 2.1.2.6: 1 に示した試験で使用した。

表 2.1.2.6: 1 イヌ血漿中のオロダテロールを測定した試験

資料番号	短縮試験名	投与経路	GLP 適用の有無	バージョン
CTD 4.2.3.2-19_U-1388	13 週間反復投与毒性	吸入	GLP	5.4
CTD 4.2.3.2-18_U-2249	13 週間反復投与毒性	吸入	GLP	5.4
CTD 4.2.1.3-7_U-1898	単回投与	吸入	GLP	5
CTD 4.2.3.2-17_U-1895	4 週間反復投与毒性	吸入	GLP	5
CTD 4.2.2.6-1_U-2446	PK	吸入	非 GLP	5
CTD 4.2.3.2-16_U-1894	4 週間反復投与毒性	吸入	GLP	5
CTD 4.2.3.2-15_n00177290	探索的毒性	吸入	非 GLP	5

2.2 放射性同位元素標識

2.2.1 チオトロピウムの放射性同位元素標識

[¹⁴C]チオトロピウムはドイツ、ビーベラハの BI Pharma GmbH & Co. KG で合成した。この分子のジチエニルグリコール酸部分に放射性ラベルを導入した。合成直後のバッチ GOM 489/19 の放射化学的純度は 99%超であり、*in vitro* 代謝試験に使用する前の放射化学的純度は 99%超であることが保証された。オリジナルのバッチ GOM 489/19 の比放射能は 0.6489 MBq/µmol であった。

2.2.2 オロダテロールの放射性同位元素標識

2.2.2.1 オロダテロールの放射性同位元素標識（オロダテロール単独投与時）

ドイツ、ビーベラハにある BI Pharma GmbH & Co. KG において、4 バッチの $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを合成した [CTD 4.2.2.1-5_U-2145]。放射性標識は本分子のベンゾオキサジン部分の 2 位に導入した。すべてのバッチについて、合成直後の放射化学的純度は 98.5%を超え、動物試験及び *in vitro* 試験で使用する前の時点で放射化学的純度が 97%以上であることを確認した。オリジナルバッチの比放射能は 1.74~2.18 MBq/ μmol の範囲であった。放射性標識オロダテロールは動物及びヒトの ADME 試験並びに *in vitro* 試験で使用した。比較を容易にするため、様々な単位で報告された用量を非標識オロダテロールの分子量を用いて $\mu\text{g/kg}$ 単位に統一した [CTD 3.2.S.3.1-3_U-2011]。

これに加えて、スイス、[REDACTED] にある [REDACTED] において、1 バッチの $[^3\text{H}]$ オロダテロールを合成した。合成直後に HPLC 法により測定した放射化学的純度は 98%を超えていた。また、オリジナルバッチの比放射能は 740 GBq/mmol、精製後で 882.08 GBq/mmol であった。 $[^3\text{H}]$ オロダテロールは専ら *in vitro* 血漿蛋白結合試験で使用した。

2.2.2.2 オロダテロールの放射性同位元素標識（チオトロピウム+オロダテロール併用投与時）

$[^{14}\text{C}]$ オロダテロールはドイツ、ビーベラハの BI Pharma GmbH & Co. KG で合成した。この分子のベンゾキサジン部分の第 2 位に放射性ラベルを導入した。合成直後のバッチ GOM 463/18 の放射化学的純度は 99.6%であり、*in vitro* 代謝試験に使用する前の放射化学的純度は 97%以上であることが保証された。オリジナルのバッチ GOM 463/18 の比放射能は 2.173 MBq/ μmol であった。

3. 吸収

3.1 チオトロピウム

チオトロピウムの吸収については、チオトロピウムの申請資料に詳述されている。チオトロピウムの吸収の簡潔な要約を以下に示す。

臨床投与経路（吸入）の模倣として、ラットにおける気管内滴下を実施した。速やかで良好な吸収（76%）がみられ、チオトロピウムのバイオアベイラビリティは高かった。チオトロピウムをマウス、ラット及びウサギに 0.1~10 mg/kg の用量で単回経口投与したときの吸収は低かった（19%未満）。しかし、イヌにおける経口吸収は 46%と中等度であった。マウス及びウサギにおける本薬の吸収は速やかで、最高血漿中濃度には 0.083~1 時間以内に到達した。ラット及びイヌでは吸収相の延長（6~16 時間）が認められた。経口バイオアベイラビリティはマウス、ラット及びウサギで 1%未満、イヌで 6.3%であった。経口吸収率より経口バイオアベイラビリティが低いことから、初回通過代謝（マウス、ウサギ>ラット、イヌ）の存在が示唆された。吸入投与時に嚥下した原薬の吸収による全身曝露による全身作用は無視し得ると考えられた。

3.2 オロダテロール

3.2.1 *In vitro* 吸収

ヒト結腸がん由来細胞株 Caco-2 [CTD 5.3.2.3-1_U-3378] 及びヒト多剤耐性蛋白質（P-gp）発現細胞株 LLC-PK1 [CTD 5.3.2.3-2_U-3424] を用いた *in vitro* 試験を実施し、オロダテロールの受動的膜透過性及び排出トランスポーターである P-糖蛋白質（P-gp/MDR1）との相互作用の可能性について検討した。

Caco-2 細胞系を用いて、オロダテロールの頂端膜側から基底膜側（AtoB, 吸収）及び基底膜側から頂端膜側（BtoA, 分泌）への輸送試験を実施した。この試験において、オロダテロールは中等度で濃度依存的な透過性を示した。薬物濃度 10 μM において、BtoA の見かけの透過係数 (P_{app}) 10.2 $\times 10^{-6}$ cm/s は、AtoB 方向の P_{app} 0.264 $\times 10^{-6}$ cm/s に比べて（排出比）38.9 倍高かった。オロダテロール濃度が高くなると（600 μM ），排出比が 9.45 に低下したことから、能動的な排出メカニズムの飽和が示唆された。シクロスポリン A 及びベラパミルによって P-gp を阻害すると、オロダテロールの排出比が 0.966 及び 1.76 となったことから、オロダテロールが P-gp の基質であることが示された。見かけの平均 K_m は 342 μM であった。算出されたオロダテロールの受動的透過性は 1.45 $\times 10^{-6}$ cm/s であり、低透過性対照物質（マンニトール及びアテノロール）と高透過性対照物質（プロプラノロール）の中間であった [CTD 5.3.2.3-1_U-3378]。MDR1 発現細胞並びにその阻害剤であるシクロスポリン A 及びゾスキダルを用いた試験から、オロダテロールが低親和性の P-gp 基質であることが確認された [CTD 5.3.2.3-2_U-3424]。

BCRP を発現する MDCKII 細胞において、オロダテロール (20 μM) の双方向 (BtoA 及び AtoB) の輸送は一般に低くかつその輸送に差はみられなかった。また、BCRP 阻害剤である Ko143 に

よって方向性輸送の程度に影響が生じなかったことから、オロダテロールは BCRP の基質ではないことが明らかになった [CTD 5.3.2.3-5_U-1586]。

3.2.2 *In vivo* 吸収

本項の吸入投与試験においては薬物の投与量は名目用量で示す。

3.2.2.1 単回投与後の薬物動態

各動物種における未変化体の薬物動態パラメータを表 3.2.2.1.4: 1 に、放射能濃度から算出した薬物動態パラメータを表 3.2.2.1.4: 2 要約して示す。

3.2.2.1.1 マウス

鼻部曝露装置を用いてマウスにオロダテロールを吸入投与したときの最高血漿中濃度 ($C_{\max}$) 及び血漿中濃度-時間曲線下面積 (AUC) データから、それぞれの毒性試験内で十分な全身曝露が達成されたことが立証された [2.6.6 毒性試験の概要文]。さらに、単回吸入投与試験において薬物動態パラメータを算出した [CTD 4.2.3.2-2_U-1975]。マウスにオロダテロールを 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回吸入投与したときの吸収は速やかで (平均吸収時間 [MAT] = 0 時間)、中等度～高い絶対的バイオアベイラビリティ (54.4%) が得られた。吸入投与終了後の最初の試料採取時点 (0.583 時間) に $t_{\max}$ に達した。オロダテロールを単回吸入投与したときの終末半減期 ($t_{1/2}$) 及び平均滞留時間 (MRT) はそれぞれ 5.69 時間及び 3.65 時間であった [CTD 4.2.3.2-2_U-1975]。すべての用量群において、 $t_{1/2}$ は 2.87～6.15 時間、MRT は 2.60～3.83 時間であった。

CD1 雄マウスにオロダテロールを 155 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で静脈内投与したときの定常状態における分布容積 (V_{ss}) は 14.7 L/kg であり、血漿から組織への分布が示唆された。全身血漿クリアランス (CL) は高く、64.5 mL/min/kg であった。固有 MRT は中等度 (3.79 時間) であり、 $t_{1/2}$ は 13.2 時間とやや長かった。

絶食させた CD1 雄マウスにオロダテロールを 155 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で経口投与したとき、血漿中濃度は投与後約 1 時間に最高値に達した [CTD 4.2.2.2-3_U-1105]。経口投与時の吸収は速やかであり、MAT は 0.2 時間と算出されたが、バイオアベイラビリティは低く、4.0%に過ぎなかった。したがって、オロダテロールの吸入投与時に嚥下された薬物が絶対的バイオアベイラビリティに大きく寄与することはないと考えられた。

3.2.2.1.2 ラット

反復投与毒性試験において、鼻部曝露システムを用いてラットにオロダテロールを吸入投与したときの薬物動態パラメータを評価した [CTD 4.2.2.2-5_U-1351]。すべての投与群 (50, 200 及び 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$) から薬物動態パラメータが得られた。ラットにオロダテロールを単回吸入投与したときの MAT は、50 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ における 2.7～5.7 時間から 4000 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ では 0.9 時間へと、用量増加に従って早まり、吸入投与完了後の最初の試料採取時点 (0.583 時間) に $t_{\max}$ に達した。全体として、単回吸入投与後の絶対的バイオアベイラビリティは比較的低く、雄で 27.3%、雌で 17.4%であった。単回投与後の $t_{1/2}$ の総平均値は 6.47 時間、MRT(tot)の総平均値は 7.09 時間と算出された。

絶食させた雌雄の Han Wistar ラットにオロダテロールを気管内、静脈内及び経口投与したときの未変化体の血漿中濃度-時間推移を評価した [CTD 4.2.2.2-1_U-2124]。さらに、 ^{14}C オロダテロールを気管内、静脈内及び経口投与したときの血中放射能濃度を測定した [CTD 4.2.2.5-1_U-1007]。

オロダテロールを気管内投与したときの血漿中未変化体濃度半減期はやや長かった ($t_{1/2}=5.44$ 時間)。気管内投与後の吸収は速やかであり (MAT=0.12 時間)、バイオアベイラビリティは高かった ($F=58.6\%$) [CTD 4.2.2.2-1_U-2124]。気管内及び静脈内投与後の血中放射能濃度の $\text{AUC}_{0-\infty}$ 値を用いて計算した気管内投与後の吸収率は 70.4% と高く、それぞれの尿中排泄データから計算した吸収率 (64.8%) と一致していた [CTD 4.2.2.5-1_U-1007]。肺を標的とした 2 種類の投与手技 (吸入投与及び気管内投与) の間で絶対的バイオアベイラビリティに差が認められたことは、その手技の差によって説明できると考えられる。気管内投与した場合、投与量のほぼすべてが肺に直接投与されるので、基本的に、ほぼ全量が全身循環へと吸収可能な状態になる。一方、吸入投与した場合、吸入した用量の一部のみが肺に沈着し、相当部分が嚥下されるか、呼出されてしまう。したがって、吸入投与後のバイオアベイラビリティは沈着効率及び沈着した化合物の実際の吸収率に左右される。

静脈内投与後の未変化体の薬物動態から、血漿中濃度は初期に急速に低下し、 V_{ss} (10.7 L/kg) 及び CL (43.3 mL/min/kg) は大きいという特徴が明らかになった。また、MRT 及び $t_{1/2}$ はやや長く、それぞれ 4.16 時間及び 5.81 時間であった。

オロダテロール経口投与時の未変化体の血漿中濃度-時間推移では、2 つのピークがみられ、最初のピークは投与後 0.5 時間という早い時点に、2 番目のピークは投与後 4 時間に認められた。吸収は緩やかで、MAT は 2.32 時間であった。経口投与後の $C_{\max}$ は 429 pM、バイオアベイラビリティは 1.74% といずれも非常に低かったのに対して、気管内投与後の $C_{\max}$ は 48400 pM、バイオアベイラビリティは 58.6% であった。オロダテロール経口投与時の血漿中濃度 $t_{1/2}$ (4.41 時間) 及び MRT (6.48 時間) はいずれもやや長かった [CTD 4.2.2.2-1_U-2124]。静脈内及び経口投与後の放射能尿中排泄率 (対投与量%) から計算した吸収率 (F_a) は低く、7.29% であった。経口及び静脈内投与後の放射能の $\text{AUC}_{0-\infty}$ 値を用いて計算した経口投与後の吸収率 (7.39%) も同程度であった。経口投与後の吸収速度は緩やかで、 $t_{\max}$ は 0.25~3 時間の範囲であった [CTD 4.2.2.5-1_U-1007]。

未変化体とは対照的に、血中放射能濃度の $t_{1/2}$ 及び MRT は、どの投与経路による投与においても非常に長く、それぞれ 39~92 時間及び 44~99 時間の範囲であった。 $t_{1/2}$ 及び MRT が最も長かったのは、気管内投与後であった。

これらの結果から、1 種類以上の代謝物の消失速度が未変化体の消失速度に比べて著しく遅いことが示唆され、これは非抽出性放射能によるものであると考えられた (5.2.2.1.1 項参照)。

オロダテロールが低親和性 P-gp 基質であることが明らかになったので (3.2.1 項参照)、別途、P-gp 阻害剤であるゾスキダルを用いた *in vivo* ラット試験を実施し、オロダテロールを経口投与したときの吸収及びバイオアベイラビリティに与える P-gp の影響について検討した [CTD 4.2.2.2-4_U-2038]。ラットにあらかじめゾスキダルを 5 $\mu\text{mol/kg}$ の用量で経口投与した後、

オロダテロール又は $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールのいずれかを経口投与したとき、投与後3時間以内の未変化体及び放射能濃度はいずれも上昇し、オロダテロール及び放射能の $C_{\max}$ 及び $\text{AUC}_{0-8\text{h}}$ は約2.2～3.4倍増加した。したがって、P-gpが阻害されることによって、オロダテロールを経口投与したときの吸収率及びバイオアベイラビリティが有意に増加すると結論された。

3.2.2.1.3 ウサギ

ニュージーランドホワイト種雌ウサギにオロダテロールを静脈内及び経口投与したときの薬物動態を評価した〔CTD 4.2.2.5-3_U-1337〕。

$[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを301 $\mu\text{g/kg}$ の用量で静脈内投与したときの薬物動態の特徴として、未変化体の V_{ss} (9.12 L/kg) は大きく、CL (19.7 mL/min/kg) は中等度であった。このような分布特性及びクリアランスの結果として、MRT及び $t_{1/2}$ は長く、それぞれ7.75時間及び14.5時間であった。

$[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを経口投与したとき、血漿中未変化体濃度は速やかに低下し、4時間後に定量限界 (26.5 pM) 未満となったことから、MRT及び $t_{1/2}$ の算出はできなかった。経口投与群の動物1例で血漿中濃度が非常に高くなったが、これは、誤って気管内に投与されたことによる可能性が高いと考えられた。静脈内及び経口投与後の平均 $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ を用いて算出した経口投与時の絶対的バイオアベイラビリティは0.03%であった (誤投与動物のデータを除く)。静脈内及び経口投与後の同一時間内に尿中に回収された累積放射エネルギーから、吸収率 (F_a) は13.5%と算出された。

この試験においては、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを静脈内及び経口投与したときの血液及び血漿中放射能濃度も測定した。未変化体とは対照的に、血液及び血漿中放射能濃度の $t_{1/2}$ 及びMRTは非常に長かった。血漿の場合、静脈内及び経口投与後の $t_{1/2}$ はそれぞれ37.3時間及び39.3時間、MRTはそれぞれ28.6時間及び40.6時間であった。一方、血液の場合、静脈内及び経口投与後の $t_{1/2}$ はそれぞれ27.5時間及び46.1時間、MRTはそれぞれ23.0時間及び52.2時間であった。これらの結果は、ラット試験で認められた結果と同様であり (3.2.2.1.2 項参照) 〔CTD 4.2.2.5-1_U-1007〕、代謝物が循環血中に長時間にわたり滞留することが示唆された。同様の考察をラットの*in vivo*試験でも行った。

3.2.2.1.4 イヌ

ビーグル犬を用いた反復投与毒性試験において、オロダテロールを (フェイスマスク/吸入チューブ曝露システムを介して) 吸入投与したときの薬物動態パラメータを評価した〔CTD 4.2.2.2-6_U-1592〕。すべての投与群 (15, 60 及び 300 $\mu\text{g/kg/日}$) から薬物動態パラメータが得られた。

イヌにオロダテロールを単回吸入投与 (10 分間) したときの吸収は速やかで、MAT は-0.58 時間～+1.62 時間と非常に短く、吸入投与後の早い時間に $t_{\max}$ が認められた (範囲: 0.250～0.333 時間)。単回投与後の総平均 $t_{1/2}$ は9.90時間、総平均MRT(tot)は11.6時間と算出された。単回吸入投与後の絶対的バイオアベイラビリティは低く5.8～10.9%と推定された。

2つの単回投与試験においてオロダテロールを静脈内及び経口投与したときの薬物動態パラメータを評価した〔CTD 4.2.2.2-2_U-2163, CTD 4.2.2.5-2_U-1739〕。試験U-2163におけ

るオロダテロールの投与量が低かったため（8.93 µg/kg 静脈内及び経口投与），経口投与後の血漿中オロダテロール濃度は急速に定量限界（20 pM）未満にまで低下した。したがって，ここでは，より高用量の ^{14}C オロダテロール（30 µg/kg 静脈内及び 100 µg/kg 経口）を投与した試験 U-1739 で得られたデータについて解説する。

^{14}C オロダテロールを 30 µg/kg の用量で静脈内投与したときの未変化体の薬物動態から， V_{ss} （17.6 L/kg）及び CL（26.2 mL/min/kg）が大きく，MRT（11.2 時間）及び $t_{1/2}$ （17.5 時間）が長いという特徴が示された。

雌雄のビーグル犬に ^{14}C オロダテロールを 100 µg/kg の用量で経口投与したとき，血漿中未変化体濃度は速やかに上昇し，投与後 0.5～2 時間（ t_{max} ）に C_{max} に達した。経口投与後の血漿中オロダテロール濃度の終末相消失半減期（ $t_{1/2}$ ）は 17.6 時間，MRT は 19.8 時間と長かった。いずれの投与経路においてもデータに雌雄差は見られなかった。オロダテロールを経口投与したときのバイオアベイラビリティは低く，13.1%と算出されたが，検討した他の動物種に比べて高い値が得られた。静脈内及び経口投与後の血液中放射能濃度の $AUC_{0-\infty}$ 及び尿中放射能排泄率から，経口吸収率は 40.5～49.7%と推定された。吸収率とバイオアベイラビリティの間に有意な差が認められたことから，イヌに経口投与したとき，初回通過効果を受けることが示唆された。

イヌに ^{14}C オロダテロールを経口又は静脈内投与したときの血液中及び血漿中放射能濃度の $t_{1/2}$ 及び MRT は未変化体に比べて有意に長かった。血液中放射能濃度については，30 µg/kg 静脈内投与後の $t_{1/2}$ 及び MRT はそれぞれ 62.2 時間及び 86.6 時間であり，100 µg/kg 経口投与後ではそれぞれ 91.8 時間及び 134 時間であった。また，血漿中放射能濃度の $t_{1/2}$ 及び MRT はさらに長く，静脈内投与後の $t_{1/2}$ 及び MRT はそれぞれ 171 時間及び 243 時間，経口投与後はそれぞれ 262 時間及び 379 時間であった。これらの所見から，代謝物が循環血中に長時間にわたり滞留することが示唆された。このことについては，ラット及びウサギの *in vivo* 試験でも考察した。

表 3.2.2.1.4: 1 種々の投与経路（吸入／気管内、静脈内、経口）でオロダテロールを単回投与したときの血漿中未変化体濃度から算出した薬物動態パラメータ平均値の種間比較

投与経路	パラメータ	動物種	マウス	ラット		ウサギ	イヌ
		系統	CrI:CD1(ICR)	CrI:WI(Han)		Chbb: NZW	ビーグル
		単位	雄	雄及び雌		雌	雄及び雌
吸入 (気管内)	名目用量	µg/kg	200	200	155 (気管内)	-	60
	C _{max}	pM	21800	16400	48400	ND	2255 ^{b)}
	t _{max} (中央値)	h	0.583	0.583	0.333	ND	0.333
	AUC _{0-∞}	pM•h	66700	53500	93200	ND	9465 ^{b)}
	MRT	h	3.65	7.1	4.28	ND	10.8
	t _{1/2}	h	5.69	6.6	5.44	ND	9.43
	F	%	54.4 ^{a)}	23.1 ^{b)}	58.6	ND	9.2 ^{b)}
静脈内	名目用量	µg/kg	155	155		301	30
	AUC _{0-∞}	pM•h	103000	159000		664000	51600
	MRT	h	3.79	4.16		7.75	11.2
	t _{1/2}	h	13.2	5.81		14.5	17.5
	CL	mL/min/kg	64.5	43.3		19.7	26.2
	V _{ss}	L/kg	14.7	10.7		9.12	17.6
経口	名目用量	µg/kg	155	155		301	100
	C _{max}	pM	616	429		70.3 ^{b) c)}	2280
	t _{max}	h	1.0	1.25		0.750 ^{b) c)}	0.5 ^{b)}
	AUC _{0-∞}	pM•h	4100	2770		163.5 ^{b) c) ,d)}	23000
	MRT	h	3.99	6.48		NC	19.8
	t _{1/2}	h	1.84 ^{e)}	4.41		NC	17.6
	F	%	4.0	1.74		0.03 ^{e)}	13.1

この表に要約したデータは以下の報告書から引用した。

マウス (CTD 4.2.2.2-3_U-1105, CTD 4.2.3.2-2_U-1975), ラット (CTD 4.2.2.2-1_U-2124, CTD 4.2.2.2-5_U-1351), ウサギ (CTD 4.2.2.5-3_U-1337), イヌ (CTD 4.2.2.5-2_U-1739, CTD 4.2.2.2-6_U-1592)

a) バイオアベイラビリティは静脈内投与及び吸入投与試験のデータを用いて計算した。

b) 報告されたデータから計算した。

c) 誤投与があったため、経口投与群の動物 3 例中 1 例を除外した。

d) 投与後 4 時間に血漿中濃度が定量限界未満に低下したため、AUC_{0-24h}を示す。

e) 血漿中濃度が定量限界未満に低下したため、過小評価されている可能性がある。

NC: 計算せず ND: 測定せず

表 3.2.2.1.4: 2 種々の投与経路（気管内，静脈内，経口）で ^{14}C オロダテロールを単回投与したときの血液中放射能濃度から算出した薬物動態パラメータ平均値の種間比較

		動物種	ラット	ウサギ	イヌ
		系統	CrI:WI(Han)	Chbb:NZW	ビーグル
投与経路	パラメータ	単位	雄	雌	雄及び雌
気管内	名目用量	$\mu\text{g/kg}$	311	-	-
	$C_{\max}$	pM	186000	ND	ND
	$t_{\max}$ （中央値）	h	0.333 ^{b)}	ND	ND
	$\text{AUC}_{0-\infty}$	pM $\cdot$ h	2210000	ND	ND
	MRT	h	98.7	ND	ND
	$t_{1/2}$	h	91.9	ND	ND
	F_a	%	64.8（尿）	ND	ND
静脈内	名目用量	$\mu\text{g/kg}$	155	301	30
	$\text{AUC}_{0-\infty}$	pM $\cdot$ h	1570000	3850000	933000
	MRT	h	43.8	23.0	86.6
	$t_{1/2}$	h	39.1	27.5	62.2
経口	名目用量	$\mu\text{g/kg}$	155	301	100
	$C_{\max}$	pM	6130	26050 ^{a), b)}	6660
	$t_{\max}$ （中央値）	h	1.0 ^{b)}	1.0 ^{a), b)}	8.0 ^{b)}
	$\text{AUC}_{0-\infty}$	pM $\cdot$ h	116000	295000 ^{a), b)}	825000
	MRT	h	68.5	63.1 ^{a), b)}	134
	$t_{1/2}$	h	58.6	53.9 ^{a), b)}	91.8
	F_a	%	7.29（尿）	13.5（尿） ^{a)}	40.5（尿）

この表に要約したデータは以下の報告書から引用した。

ラット（CTD 4.2.2.5-1_U■■-1007），ウサギ（CTD 4.2.2.5-3_U■■-1337）イヌ（CTD 4.2.2.5-2_U■■-1739）

a) 誤投与があったため，動物 3 例中 1 例を除外した。

b) 報告されたデータから計算した。

ND：測定せず

3.2.2.2 反復投与後の薬物動態

ラットに ^{14}C オロダテロールを 310 $\mu\text{g/kg}$ /日の用量で気管内投与した 14 日間反復投与試験において，マシバランス及び臓器分布を検討した [CTD 4.2.2.3-4_U■■-1602]。組織分布に関する結果については，4.2.1.2 項で考察し，排泄に関する結果は 6.2.1.2 項で解説する。

マウス（吸入），ラット（吸入，静脈内，経口）及びイヌ（吸入，静脈内，経口）を用いた反復投与毒性試験に付随して，オロダテロールを反復投与したときの薬物動態及びトキシコキネティクスを評価した。また，幼若ビーグル犬（吸入）を用いて追加の反復投与試験を実施した（2.6.6 項「毒性試験の概要文」参照）。全体として，いずれの動物種においても，薬物動態に明白な性差は認められなかった。算出した $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ は，用量に比例して増加することが明らかになった。反復投与による意味のある未変化体の蓄積及び代謝酵素の自己誘導は認められなかった（ $\text{AUC}_{0-24\text{h}}$ に基づく）。

3.2.2.2.1 マウス

マウスを用いて吸入投与による反復投与毒性試験を実施した。反復投与試験は少なくとも 13 週間（50～3200 µg/kg/日）[CTD 4.2.3.2-1_U-1341]，がん原性試験は少なくとも 104 週間（25～250 µg/kg/日）にわたり実施した [CTD 4.2.3.4.1-1_U-1065]。主な結果を表 3.2.2.2.1: 1 に示す。

マウス 13 週間毒性試験において，1 日目と比較して 87 日目の AUC_{0-24h} が見かけ上減少したが [CTD 4.2.3.2-1_U-1341]，血液の採取方法が異なることによる可能性が高いと考えられた（1 日目は動物を屠殺，87 日目は麻酔）。したがって，麻酔中に試料を採取する単回投与試験を実施した結果 [CTD 4.2.3.2-2_U-1975]，13 週間試験の 1 日目と比べて血漿中濃度が低くなった。ただし，87 日目と比較した場合には，依然として単回投与試験の血漿中濃度は高かった。しかし，がん原性試験では，このような AUC_{0-24h} に対する影響は認められず，反復投与を行ってもオロダテロールの曝露量に意味のある変化が生じることはなかった。

表 3.2.2.2.1: 1 マウス反復投与試験でオロダテロールを吸入投与したときのトキシコキネティクス評価

試験の種類	投与経路	曝露量のバラツキ	AUC _{0-24h} の用量比例性	性差	反復投与による変化	資料番号
13 週間毒性試験	吸入	中	1 日目：用量比を下回る増加， 87 日目：用量に比例した増加	雄=雌	87 日目に比べて，1 日目の血漿中濃度は 3～4 倍高かった ^{a)}	CTD 4.2.3.2-1_U-1341 CTD 4.2.3.2-2_U-1975
104 週間がん原性試験	吸入	中	用量に比例した AUC _{0-24h} 増加	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.4.1-1_U-1065

a) この影響については，技術的原因を否定することはできない。

3.2.2.2.2 ラット

ラットを用いて吸入（0.5～4000 µg/kg/日），静脈内（5～100 µg/kg/日）及び経口（500～50000 µg/kg/日）投与で反復投与毒性試験を実施した。反復投与試験は少なくとも 2 週間，がん原性試験は少なくとも 104 週間にわたり実施した。主な結果を表 3.2.2.2.2: 1 に示す。

表 3.2.2.2.2: 1 ラット反復投与試験でオロダテロールを吸入、静脈内又は経口投与したときのトキシコキネティクス評価

試験の種類	投与経路	曝露量のバラツキ	C _t 又はAUC _{0-24h} の用量比例性	性差	反復投与による変化	資料番号
2週間毒性試験	吸入	中	用量に比例した増加	一貫した影響なし	低用量及び中用量で影響なし。高用量で低下。	CTD 4.2.3.2-3 _U■■-2143
2週間毒性試験	静脈内	中	用量に比例した増加	雄=雌	AUC _{0-24h} 減少	CTD 4.2.3.2-9 _U■■-1375
2週間毒性試験	経口	大	低用量～中用量では用量に比例して増加したが、中用量～高用量では用量比を上回る増加を示した（特に14日目）	最終的結論は得られなかった。結果に一貫性がなく、ばらつきが大きかった	用量依存的に増加。ばらつきが大きい。最終的結論は得られなかった	CTD 4.2.3.2-10 _U■■-2334
4週間毒性試験	吸入	中	用量比を上回る増加	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.2-4 _U■■-2133
13週間毒性試験	吸入	中	用量に比例した増加	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.2-5 _U■■-1342
26週間毒性試験	吸入	小～中	用量に比例した増加	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.2-6 _U■■-1691
104週間がん原性試験	吸入	小～中	用量比を上回る増加	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.4.1-2 _U■■-2661
受胎能及び初期胚発生に関する試験	吸入	中	C _{0.583h} 値は用量比を上回る増加を示した	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.5.1-1 _U■■-2297
胚・胎児毒性試験	吸入	中	C _{1h} 値は用量に比例して増加した	NA	NA	CTD 4.2.3.5.2-1 _U■■-2534

NA：該当なし

3.2.2.2.3 ウサギ（胚・胎児発生）

ウサギを用いて吸入投与（274～3706 µg/kg/日）で胚・胎児発生に関する反復投与毒性試験を実施した。反復投与試験は少なくとも5日間、最長14日間にわたり実施した。主な結果を表 3.2.2.2.3: 1 に示す。

表 3.2.2.2.3: 1 ウサギ反復投与試験でオロダテロールを吸入投与したときのトキシコキネティクス評価

試験の種類	投与経路	曝露量のバラツキ	C _t 又はAUC _{0-24h} の用量比例性	妊娠の影響	反復投与による変化	資料番号
予備胚・胎児発生毒性試験	吸入	中～大	C _{8h} 値は用量に比例して増加した	非交配=交配	1日目と5日目の間で血漿中濃度低下	CTD 4.2.3.5.2-2 _U■■-2535
胚・胎児発生毒性試験	吸入	中～大	AUC _{0-24h} 値は用量に比例して増加した	-	5日目のデータのみ	CTD 4.2.3.5.2-3 _U■■-1019

3.2.2.2.4 イヌ（成熟及び幼若）

成熟及び幼若イヌを用いて吸入（成熟イヌ：1～300 µg/kg/日，幼若イヌ：100～1000 µg/kg/日），静脈内（3.28～29.5 µg/kg/日）及び経口投与（5～500 µg/kg/日）で反復投与毒性試験を実施した。反復投与試験は少なくとも2週間（予備試験を除く），最長52週間にわたり実施した。幼若イヌでは，21日間吸入投与実施可能性試験〔CTD 4.2.3.7.7-1_U-1442〕及び13週間吸入投与試験〔CTD 4.2.3.7.7-2_U-1257〕を実施した。

概して，AUC_{0-24h}は用量にほぼ比例して増加し，血漿中濃度は雌雄で類似していた。一部の毒性試験において，雄で曝露量がやや低い傾向が認められた。反復投与によってAUC_{0-24h}が変化することはなかったが，例外として，2週間吸入投与用量設定試験では増加が見られ，4週間吸入投与試験では，問題にならない程度のわずかな増加が認められた。全体として，イヌにオロダテロールを吸入投与したときのトキシコキネティクスは，1～300 µg/kg/日の範囲で用量に比例すると考えられた。

トキシコキネティクスに関する主な結果及びそれぞれの資料番号を表3.2.2.2.4: 1に示す。

表 3.2.2.2.4: 1 イヌ反復投与でオロダテロールを吸入，静脈内又は経口投与したときのトキシコキネティクス評価

試験の種類	投与経路	曝露量のバラツキ	AUC _{0-24h} の用量比例性	性差	反復投与による変化	資料番号
2週間毒性試験	吸入	中	用量比を上回る増加	雄<雌	血漿中濃度の上昇	CTD 4.2.3.2-11_U-2134
2週間毒性試験	静脈内	小	用量に比例して増加	雄=雌	AUC に対する影響なし，C _{max} の低下	CTD 4.2.3.2-21_U-1051
2週間毒性試験	経口	中～大	用量比をわずかに上回る増加	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.2-23_U-2169
4週間毒性試験	吸入	小～中	用量に比例して増加	雄<雌	わずかに増加	CTD 4.2.3.2-12_U-2146
13週間毒性試験	吸入	中	用量に比例して増加	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.2-13_U-1317
13週間毒性試験 ^{a)}	吸入	小～中	用量に比例して増加	雄=雌	AUC に対する影響なし，C _{max} は1日目<91日目	CTD 4.2.3.7.7-2_U-1257
52週間毒性試験	吸入	小～中	用量に比例して増加	雄=雌	影響なし	CTD 4.2.3.2-14_U-1740

a) 幼若動物を用いた試験

3.3 チオトロピウム+オロダテロール

3.3.1 配合剤の反復吸入投与毒性試験におけるチオトロピウム及びオロダテロールの薬物動態

ラット及びイヌを用いた *in vivo* 吸入投与試験では，薬物動態及びトキシコキネティクス検討時の実際の吸入セッションでRMVを評価することができなかったため，文献値（ラット）〔CTD 4.3-31_R97-0663〕又はRMVの測定データ（イヌ）により到達用量を推定した。イヌの後期トキシコキネティクス試験〔CTD 4.2.3.2-18_U-2249, CTD 4.2.3.2-19_U-1388〕におけるトキシ

コキネティクス（TK）パラメータの用量補正は、到達用量に基づいて行った。他のいずれの吸入投与トキシコキネティクス試験においては、用量補正は名目用量に基づいて実施した。

3.3.1.1 ラットにおけるトキシコキネティクス

チオトロピウム+オロダテロール併用毒性試験の一環として、液体エアロゾルをラットに 1 日 1 回、4 週間吸入投与したときのチオトロピウム及びオロダテロールへの曝露量を評価した [CTD 4.2.3.2-8_U-1892, CTD 4.2.3.2-7_U-1893]。

チオトロピウム及びオロダテロールについてのトキシコキネティクス評価の主要な結果を、表 3.3.1.1: 1 及び表 3.3.1.1: 2 に要約する。実際に到達した用量は名目用量と比べて大きな差はないものとみなし、PK パラメータの用量補正は実際の到達用量ではなく名目用量を用いて実施した。これらの試験におけるチオトロピウム及びオロダテロールの用量補正した曝露量データを、それぞれ図 10.2: 1 ～10.2: 4 に図示した。詳細な曝露量データは 2.6.6 毒性試験の概要文に示した。いずれの試験においてもトキシコキネティクスのバラツキは低かった。チオトロピウム及びオロダテロールへの曝露量は、いずれも雌雄間で同程度であった。用量比例性からの顕著な又は一貫した逸脱はみられず、反復投与の影響も認められなかった。高用量における C_{max} 及び AUC_{0-24h} は、28 日目よりも 1 日目の方が高かった。しかし、これは 1 日目の動物における RMV の増加により影響された可能性がある。また、1 日目と 28 日目の差は、少なくとも部分的には到達用量の違いにより説明できる。

表 3.3.1.1: 1 ラットの反復吸入投与毒性試験におけるチオトロピウムのトキシコキネティクス

期間, 用量範囲 [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$]	汚染 ^a	曝露量の バラツキ	AUC_{0-24h} の用量比例性	性差	反復投与による 変化	資料番号
4 週間 12.5～4000	0/53	小	ほぼ用量に比例した増加	雄=雌	一貫性なく 用量に依存	CTD 4.2.3.2-8 _U-1892

a 対照試料の総数のうちチオトロピウムが認められた対照試料の数。

表 3.3.1.1: 2 ラットの反復吸入投与毒性試験におけるオロダテロールのトキシコキネティクス

期間, 用量範囲 [$\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$]	汚染 ^a	曝露量の バラツキ	AUC_{0-24h} の用量比例性	性差	反復投与による 変化	資料番号
4 週間, 75～2000	1/53, ごく微量	小	ほぼ用量に比例した増加	雄=雌	一貫性なく 用量に依存	CTD 4.2.3.2-8 _U-1892
4 週間, 75～2000	0/53	小	ほぼ用量に比例した増加	雄=雌	一貫性なく 用量に依存	CTD 4.2.3.2-7 _U-1893

a 対照試料の総数のうちオロダテロールが認められた対照試料の数。

3.3.1.2 イヌにおけるトキシコキネティクス

チオトロピウム+オロダテロール併用毒性試験の一環として、液体エアロゾルをイヌに 1 日 1 回、最長 13 週間吸入投与したときのチオトロピウム及びオロダテロールへの曝露量を評価し

た [CTD 4.2.3.2-15_n00177290, CTD 4.2.3.2-16_U-1894, CTD 4.2.3.2-17_U-1895, CTD 4.2.1.3-7_U-1898, CTD 4.2.3.2-18_U-2249, CTD 4.2.3.2-19_U-1388]。

イヌにおけるチオトロピウム及びオロダテロールについてのトキシコキネティクス評価の主要な結果を、表 3.3.1.2: 1 及び表 3.3.1.2: 2 に要約する。すべての試験におけるチオトロピウム及びオロダテロールの用量補正した曝露量データを、それぞれ図 10.2: 5 及び図 10.2: 6 並びに図 10.2: 7 及び図 10.2: 8 に図示した。詳細な曝露量データは 2.6.6 毒性試験の概要文に示した。全体として、トキシコキネティクスのバラツキは中等度であった。チオトロピウム及びオロダテロールへの曝露量には、いずれも雌雄間で明らかな違いは認められなかった。用量比例性からの顕著な又は一貫した逸脱はみられず、反復投与の影響も認められなかった。

また、イヌにおけるチオトロピウムとオロダテロールの間の薬物動態学的薬物相互作用の有無を、13 週間反復投与毒性試験の一環として検討した。イヌ 13 週間反復投与毒性試験におけるこの検討結果については、本資料の 7.4.3 章に記載している。

表 3.3.1.2: 1 イヌの反復吸入投与毒性試験におけるチオトロピウムのトキシコキネティクス評価

期間, 用量範囲 [µg/kg/日]	汚染 ^a	曝露量の バラツキ	AUC _{0-24h} の用量 比例性	性差	反復投与に よる変化	資料番号
4 週間, 5~150	21/172, 低い	中	用量に比例した 増加	雄<雌	28 日目 > 1 日目	CTD 4.2.3.2-16 U-1894
4 週間, 2.5~300	4/182, ご く微量	中	用量に比例した 増加	雄=雌	28 日目 ≥ 1 日目	CTD 4.2.3.2-17 U-1895
13 週間, 15~300	2/281, ご く微量	中	用量に比例した 増加	雄=雌	30 及び 86 日 目 ≈ 1 日目	CTD 4.2.3.2-18 U-2249
13 週間, 37.5~300	0/351	中~大	用量に比例した 増加	雄=雌	30 及び 86 日 目 ≥ 1 日目	CTD 4.2.3.2-19 U-1388

a 対照試料の総数のうちチオトロピウムが認められた対照試料の数。

表 3.3.1.2: 2 イヌの反復吸入投与毒性試験におけるオロダテロールのトキシコキネティクス評価

期間, 用量範囲 [µg/kg/日]	汚染 ^a	曝露量の バラツキ	AUC _{0-24h} の用量 比例性	性差	反復投与に よる変化	資料番号
4 週間, 5~150	35/172, 低い	中	用量に比例した 増加	雄<雌	28 日目 > 1 日目	CTD 4.2.3.2-16 U-1894
4 週間, 15~150	16/182, ごく微量	中	用量に比例した 増加	雄=雌	28 日目 ≥ 1 日目	CTD 4.2.3.2-17 U-1895
13 週間, 15~300	3/281, ごく微量	中	用量に比例した 増加	雄=雌	30 及び 86 日 目 ≈ 1 日目	CTD 4.2.3.2-18 U-2249
13 週間, 15~300	0/327	中~大	用量に比例した 増加	雄=雌	30 及び 86 日 目 ≥ 1 日目	CTD 4.2.3.2-19 U-1388

a 対照試料の総数のうちオロダテロールが認められた対照試料の数。

4. 分布

4.1 チオトロピウム

チオトロピウムの薬物動態については、チオトロピウムの申請資料に詳述されている。チオトロピウムの分布の簡潔な要約を以下に示す。

チオトロピウムは、ヒトを含めたすべての動物種において高い分布容積 (32 L/kg) を示したことから、血漿から組織への未変化体の広範な分布が示唆された。これに一致して、 $[^{14}\text{C}]$ チオトロピウムをラットに気管内及び静脈内投与したとき、中枢神経系を除く組織内へのチオトロピウム関連放射能の広範な分布が認められた。気管内及び静脈内投与後の組織内分布は、量的及び質的に同程度であった。 $[^{14}\text{C}]$ チオトロピウムを経口投与したときの薬物関連放射能は、消化管内容物のみに検出された。静脈内投与 24 時間後の薬物関連放射能は、主として肝臓、腎臓、褐色脂肪、心臓及び唾液腺に検出された。有色ラットにおいて、網膜又は皮膚のメラニン含有部分への $[^{14}\text{C}]$ チオトロピウム及びその代謝物の明らかな親和性は認められなかった。妊娠ラットにおいて、薬物関連放射能は胎盤を通過したが、胎児の組織及び器官における濃度は、いずれの時点においても対応する母体組織より低かった。胎児の全身及び各胎児組織における放射能の消失は速やかであった。 $[^{14}\text{C}]$ チオトロピウムを授乳中のラットに 10 mg/kg の用量で単回静脈内投与したとき、2 日間で 1.9%が乳汁中に排泄された。放射能の乳汁／血漿比は 0.4 (投与 0.5 時間後、最初の採血時点) から 24 時間後の 18 までであり、乳汁中の放射能は血漿中放射能と並行して減少した。

動物における $[^{14}\text{C}]$ チオトロピウムの蛋白結合率 (f_b) はヒトと比較して低く、その順序はヒト (71%) > マウス (21.7%) $\approx$ イヌ (21.0%) $\approx$ ラット (19.7%) > ウサギ (15.5%) であった。臨床的に関連ある濃度範囲 (10~300 pg/mL) でのヒトにおける蛋白結合率は、濃度に依存して変化することはなかった。

血中のチオトロピウムは検討したいずれの動物種において主として血球に分布した。

4.2 オロダテロール

3.2.2.1 項で述べたように、オロダテロールの定常状態における分布容積 (V_{ss}) は検討したすべての動物種で大きかった。

ヒトを含めて、検討したすべての動物種で静脈内投与後の V_{ss} が 9.12~17.9 L/kg と大きかったことから、未変化体が血漿から組織へと広範に分布することが示唆された (表 1.2: 1 参照)。このような分布の特徴は、オロダテロールの物理化学的特性として、pH 7.4 における log D が 1.2 の脂溶性薬物であることに起因すると考えられる [CTD 3.2.S.3.1-3_U-2011]。このほかにも、組織分布に関わる追加要因としては、P-gp トランスポーター (3.2.1 項参照) と検討したすべての動物種における低い血漿蛋白結合率 (4.2.3 項参照) が考えられる。

4.2.1 組織分布

白色ラット及び有色ラットを用いた単回投与全身オートラジオグラフィ試験 [CTD 4.2.2.3-1_U-1974] 並びに雄ラットを用いた 14 日間連続反復気管内投与試験 [CTD 4.2.2.3-4_U-1602] において、オロダテロールの様々な組織における分布を検討した。オロダ

テロールの血液-脳関門通過に対する P-gp の影響について評価するため、ヒト P-gp に対応するマウスの *mdr1a* を欠損するトランスジェニックマウス及び P-gp を阻害したラットを用いて単回投与試験を実施した [CTD 4.2.2.3-3_U-1723]。

4.2.1.1 単回投与後の組織分布

雄性白色ラット (Crl:WI(Han)) に $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 773 $\mu\text{g/kg}$ の用量で気管内、静脈内及び経口投与する全身オートラジオグラフィ試験を実施した。また、オロダテロールがメラニンに結合する可能性を評価するため、有色ラット (BN/Crl Br) に $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 773 $\mu\text{g/kg}$ の用量で静脈内投与した [CTD 4.2.2.3-1_U-1974]。

気管内投与したとき、放射能は速やかに組織及び臓器に分布し、投与後 5 分の時点で既に顕著な分布が認められた。放射能は血漿から中枢神経系 (CNS) を除く大部分の組織へと速やかに (5 分) 分布した。血液-脳関門通過はごくわずかであった。腎臓、肝臓及び腺組織 (特に、膵臓、下垂体、唾液腺及び副腎) に高い放射能濃度が認められた。気管内投与では、肺にも高い放射能濃度が認められた。投与後 24 時間において、放射能は CNS を除く組織にほぼ均等に分布していた。膵臓に依然として高い放射能が認められたが、放射能の大部分は下部消化管に分布していた。

静脈内投与後の放射能分布は、質的にも量的にも気管内投与後と同等であった。

一部の組織について、 $t_{1/2}$ に焦点を絞って、静脈内投与後の薬物動態パラメータを概算した。すべての放射能は大部分の組織から $t_{1/2}$ 16~32 時間で排泄された。脈絡叢及び舌では、これより長い $t_{1/2}$ が算出された (それぞれ 81 及び 53 時間)。

有色ラットに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを静脈内投与したとき、眼のメラニン含有組織に対する結合が認められたが、これは塩基性の脂溶性薬物で知られている特徴である [CTD 4.3-9_R00-0033]。

オロダテロールの経口吸収は不良であるため、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 773 $\mu\text{g/kg}$ 経口投与したときの組織中放射能濃度は非常に低かった (図 4.2.1.1: 1)。組織中放射能濃度は投与 8 時間後に最高値に達し、24 時間後の時点で放射能の大部分は消化管に分布していた。概して、経口投与後の吸収はごくわずかで、非常に緩徐であると考えられた。

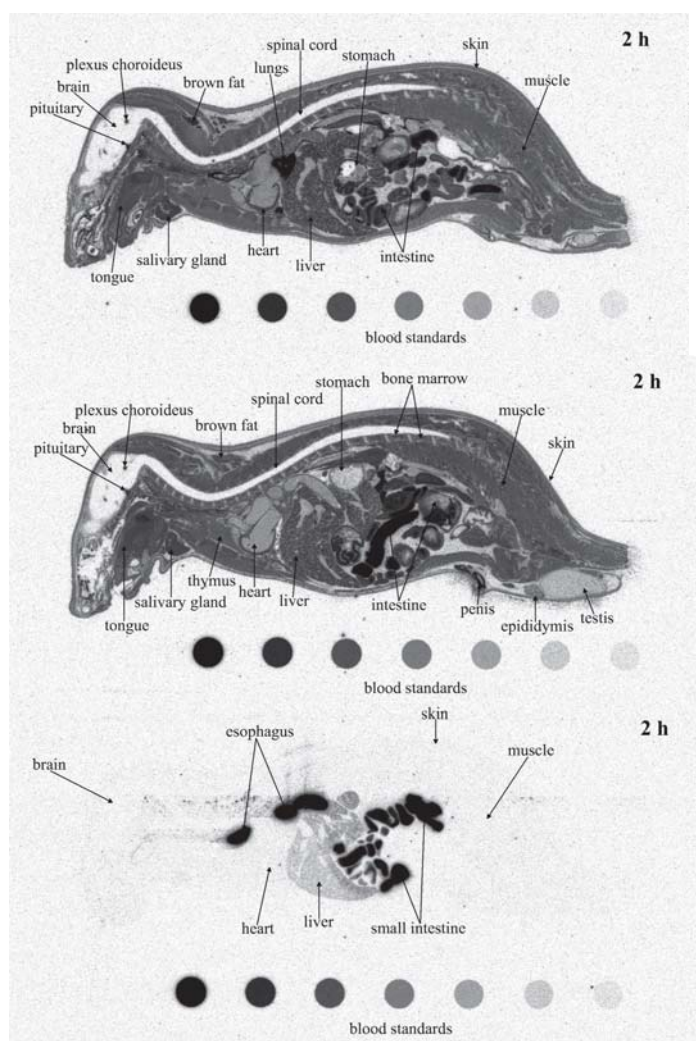


図 4.2.1.1: 1 雄性白色ラットに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 773 $\mu\text{g/kg}$ の用量で気管内（上），静脈内（中央）及び経口（下）投与したときの 2 時間後の全身オートラジオグラム

マウス及びラットを用いた追加 *in vivo* 試験を実施し、オロダテロールの血液-脳関門通過に対する P-gp の影響について検討した [CTD 4.2.2.3-3_U-1723]。Mdr1a を欠損するトランスジェニックマウス及び P-gp 阻害剤であるゾスキダルを前投与したラットを用いて、脳放射能濃度と血中放射能濃度の比を算出した。P-gp を欠く動物に $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを投与した試験から、mdr1a 欠損状態でも、オロダテロール及び代謝物の脳内分布は依然として低いことが明らかになった。

全体として、全身オートラジオグラフィ試験において、大部分の組織に意味のある放射能分布が認められたが、血液-脳関門通過はわずかであった。

4.2.1.2 反復投与後の組織分布

雄ラットを用いた 14 日間反復投与試験において、オロダテロール及びその代謝物の組織分布を検討した。ヒトで予定されている投与経路を模倣して、ラットに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 310 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の用量で気管内投与した [CTD 4.2.2.3-4_U-1602]。

$[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 14 日間連続投与の最終投与後 24 時間におけるトラフ時の組織中放射能濃度を測定した。最も高い放射能濃度が認められたのは肺（投与部位）であり、次いで、脾臓、下垂体及び消化管であった。しかし、この試験で認められた最高濃度でも、総投与量の 0.2% 未満であった。他の選択した組織及び臓器いずれについても、最高濃度は 550 nM 未満であった。大部分の組織において、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールの 4 日間連続投与後に定常状態に達した。また、大部分の組織でトラフ濃度は評価期間を通して一定に維持された。腎臓、顎下腺、胸腺、筋肉、甲状腺、肺、心臓、肝臓、脳など、一部の組織のみで、わずかな蓄積が認められ（蓄積係数 2.0~3.1）、これより高い蓄積係数が認められたのは精巣（10.5）のみであった。これらのデータは、蓄積が認められた組織への分布は緩徐であり、投与期間内に定常状態に達しなかったことを意味している。

これらの臓器の大部分において、どちらかといえば低い放射能濃度で蓄積が起こっていた。

4.2.1.1 項で考察した単回投与オートラジオグラフィ試験と比較して、反復投与によって組織分布パターンが変化することはなかった。

4.2.2 血球移行

様々な動物種を用いて、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールの血球／血漿分配 (C_c/C_p) を *in vitro* 及び *ex vivo* で評価した。

ラット、イヌ及びヒトの血液に最終濃度が 10 nM となるように $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを添加し、37°C でインキュベーションした [CTD 5.3.2.1-1_U-1983]。全体として、 C_c/C_p 平均値は 2.48 ~ 5.73 であり、放射能の血球への意味のある結合が示唆された。イヌとヒトで C_c/C_p 比は類似していたが、ラットではこれより高い値を示した。問題となる性差は認められなかった。

ラットに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 773 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で気管内、静脈内及び経口投与した全身オートラジオグラフィ試験において、*ex vivo* で C_c/C_p 比を測定した [CTD 4.2.2.3-1_U-1974]。気管内投与と静脈内投与後で C_c/C_p 比は類似しており、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロール及び代謝物は主に血球中に分布した。一方、経口投与した場合、放射能は主に血漿中に分布した。ラット ADME 試験において、気管内及び静脈内投与したときの C_c/C_p 比も測定したが、得られた結果は両投与経路で同等であった [CTD 4.2.2.5-1_U-1007]。最も高い C_c/C_p 比が認められたのは投与後 3 時間であり（ C_c/C_p 比は気管内投与後で 4.48、静脈内投与後で 4.75）、放射能の多くが血漿から血球に移行することが示された。雌ウサギに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを静脈内及び経口投与した後、数時点で放射能の C_c/C_p 比を測定した [CTD 4.2.2.5-3_U-1337]。ウサギにおける放射能の *in vivo* 分布は投与経路に依存し、ラットと同様の分布を示した。イヌに静脈内投与したときの C_c/C_p 比平均値は投与後 24 時間まで 1.90~2.85 の範囲であったが、時間経過とともに低下し、血球と血漿の間で均等に分布するようになった [CTD 4.2.2.5-2_U-1739]。 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロー

ルを経口投与したときの最初の試料採取時点における C_c/C_p 比は 5.07 と高かったが、その後の時点における C_c/C_p 比から、投与後 24 時間まで血球と血漿の間で均等に分布することが示された。

4.2.3 血漿蛋白結合

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血漿中でのオロダテロールの *in vitro* 蛋白結合率を測定した [CTD 4.2.2.3-2_U-1533, CTD 5.3.2.1-1_U-1983, CTD 5.3.2.1-2_U-2233]。さらに、軽度及び中等度肝機能障害患者及び高度腎機能障害患者由来の血漿中での *in vitro* 血漿蛋白結合率も測定した [CTD 5.3.2.1-3_U-1883]。

$[^3H]$ 又は $[^{14}C]$ オロダテロールを用いて最低 5 時間にわたり 37°C で平衡透析を行い、蛋白結合率を測定した。添加濃度は 0.01~100 nM の範囲とした。検討したすべての動物種において、オロダテロールの血漿蛋白結合率は中等度であり、マウスでやや高い結合率が認められた。検討したすべての濃度及び動物種において、血漿蛋白結合率は 47.4~78.1%の範囲であった。オロダテロールの血漿蛋白結合率に濃度依存性及び性差は確認されなかった。

$[^3H]$ オロダテロール濃度 0.01 nM において、健康被験者及び腎機能障害又は肝機能障害患者の血漿を用いて、血漿蛋白結合率を測定した。オロダテロールの血漿蛋白結合率は健康被験者で約 60%，腎機能障害又は肝機能障害患者で 56.6~63.7%の範囲であった。したがって、腎機能又は肝機能障害によって、オロダテロールの血漿蛋白結合率が大きく変化することはなかった。

4.2.4 胎盤通過

妊娠ラット（妊娠 12 日又は 17 日）に $[^{14}C]$ オロダテロールを 884 µg/kg（2 µmol/kg に相当）の用量で単回気管内投与し、8、48 及び 72 時間後における母体、胚及び胎児中の放射能分布を検討した。胚段階の妊娠 12、14、15 日及び胎児段階の妊娠 17、19、20 日における評価を行った [CTD 4.2.2.3-5_U-4128]。

母体組織中での放射能分布パターンは、雄性白色ラットの類似組織で認められた分布パターンと同等であった [CTD 4.2.2.3-1_U-1974]。投与後 8 時間における胎盤中の放射能濃度は母体心臓血液中濃度に比べて 3.2 倍（妊娠 12 日）及び 2.5 倍（妊娠 17 日）高かった。気管内投与後の胎児心臓血液中の放射能濃度は、母体心臓血液中の放射能濃度の 86%（8 時間後）~210%（72 時間後）であった。一部の胎児組織は明確に区別可能であり、胎児組織中放射能濃度は対応する母体組織中濃度と比較した。胎児組織では投与 8 時間後に最も高い放射能濃度が認められ、胎児肝臓で 178 nmol/kg（母体肝臓：1320 nmol/kg）、胎児肺で 122 nmol/kg（母体肺：4479 nmol/kg）であった。ラジオルミノグラフィーにより測定した胎児及び母体心臓血液中放射能濃度は、それぞれ 87.6 nmol/kg 及び 102 nmol/kg であった。

これらのデータにより、オロダテロール及び代謝物がラットの血液-胎盤関門を通過することが示され、オロダテロールの毒性試験において、胚/胎児が全身曝露を受けたことが立証された。

5. 代謝（動物種間の比較）

5.1 チオトロピウム

チオトロピウムの薬物動態については、チオトロピウムの申請資料に詳述されている。チオトロピウムの代謝の簡潔な要約を以下に示す

チオトロピウムの *in vitro* 代謝をヒト肝ミクロソーム並びにマウス、ラット及びイヌの肝ミクロソームで検討し、代謝安定性及び代謝パターンを動物種間で比較した。*In vitro* でみられた代謝経路からの代謝物生成は、ラット及びイヌにおける *in vivo* での代謝経路と極めて類似していた。ラット及びマウスの肝ミクロソームにおけるチオトロピウム代謝能はイヌ及びヒトの肝ミクロソームより高く、それにより N-メチルスコピン及び種々の代謝物が生成した。ヒトでの代謝への CYP3A4 及び CYP2D6 の寄与が、遺伝子組換えヒト CYP を用いたキニジン（CYP2D6 阻害剤）、ケトコナゾール及びゲストデン（いずれも CYP3A4 阻害剤）による阻害試験並びに相関性試験により示された。*In vitro* 代謝はラット及びヒトの肝細胞でも検討した。ヒト肝細胞による代謝は緩やかで、HPLC 分離のパターンに基づくと、ラット肝細胞による代謝と同様であった。チオトロピウム代謝物の更なる特異的な構造は同定できなかった。これは個々の代謝物の数が非常に多く、インキュベーション培地中に極めて低い濃度で存在しているためである。ヒトに静脈内投与したチオトロピウムの 73.6%は未変化体として尿中に排泄された。このようにヒトにおけるチオトロピウム未変化体の尿中回収率が高いことから、主要排泄メカニズムは腎排泄であって代謝ではないことが示唆された。尿中回収率に基づくと、ヒトに最も近い動物種はマウス及びイヌであったが、未変化体の比率（イヌで 50%以上、マウスで 60%以上）はヒトより低かった。ラットにチオトロピウム分子の酸部分を標識した [^{14}C]チオトロピウムを静脈内投与したとき、投与量の約 10%が $^{14}\text{CO}_2$ として呼気中に排泄された。

5.2 オロダテロール

5.2.1 *In vitro* 代謝

ラット及びヒト肝細胞、ヒト肺及び肝ミクロソーム、並びにヒトチトクロム P450, UDP グルクロン酸転移酵素（UGT）及び硫酸転移酵素（SULT）発現系を用いて、オロダテロールの *in vitro* 代謝について検討した [CTD 5.3.2.2-2_U-1439, CTD 5.3.2.2-6_U-1659, CTD 5.3.2.2-12_U-1331]。

[^{14}C]オロダテロールをヒト肝ミクロソームとともにインキュベーションし、第 I 相代謝物の生成及びこれに関与する酵素を評価した。このインキュベーションにおいて、オロダテロールのメトキシフェニル部分の酸化的脱メチル化により、主代謝物として SOM 1522 が生成した。このほかの代謝物の放射能はバックグラウンド近くであった。SOM 1522 が生成する反応は CYP2C8 及び CYP2C9 に依存し、CYP3A4 の寄与は無視し得る程度であった。オロダテロールの代謝に他の CYP 酵素が寄与している可能性は示されなかった [CTD 5.3.2.2-2_U-1439]。

ヒト肺ミクロソームを用いたインキュベーション試験において、[^{14}C]オロダテロールは安定であった [CTD 5.3.2.2-2_U-1439]。したがって、オロダテロールを吸入投与したときに肺で活発に第 I 相代謝反応が起こる可能性は低いと考えられる。また、マウス [CTD

4.2.2.4-2_U-1516] 及びラット [CTD 4.2.2.4-1_U-1514] を用いた ADME 試験において、肺での活発な代謝を示す徴候はみられなかった。気管内投与及び静脈内投与後の代謝経路は、質的にも量的にも類似していた。

ラット及びヒト肝細胞とともに^[14C]オロダテロールを *in vitro* でインキュベーションしたときの主代謝反応について検討した [CTD 5.3.2.2-6_U-1659]。6-ヒドロキシベンゾオキサジン部分のグルクロン酸抱合化により CD 992 が生成し、ラット及びヒト肝細胞中の放射能に占める割合はそれぞれ 12.1%及び 10.1%であった。また、オロダテロールの脂肪族水酸基のグルクロン酸抱合化により代謝物 M565(2)が生成し、ラット肝細胞中放射能に占める割合は 1.0%、ヒト肝細胞では極微量であった。SOM 1522 の総放射能に占める割合は、ラット肝細胞で 1.1%、ヒト肝細胞で 5.8%であった。2つの芳香族水酸基を有する SOM 1522 のグルクロン酸抱合化により、CD 11249 又は CD 10915 が生成した。ラット肝細胞では、主に放射能の 15.1%を占める CD 11249 (CD 10915 : 0.5%) が生成し、一方、ヒト肝細胞では主に放射能の 12.3%を占める CD 10915 (CD 11249 : 2.8%) が生成した。SOM 1522 の 6-ヒドロキシベンゾオキサジン部分の硫酸抱合により CD 12656 が生成し、ヒト肝細胞中の放射能に占める割合は 5.4%であったが、ラット肝細胞では、質量分析法により極微量が検出されただけであった。

したがって、*in vitro* インキュベーションで認められたラット及びヒト肝細胞を用いるオロダテロールの代謝反応は本質的に同じであり、*in vivo* 試験のマウス [CTD 4.2.2.4-2_U-1516]、ラット [CTD 4.2.2.4-1_U-1514]、ウサギ [CTD 4.2.2.4-4_U-1317]、イヌ [CTD 4.2.2.4-3_U-1057] 及びヒト [CTD 5.3.2.2-9_U-1129] の結果においてもそれは認められた。代謝経路の概要を図 5.2.2.3: 1 に示す。

ヒト組織ホモジネート、数種のヒト組織由来のミクロソーム、並びにヒト UGT 及び SULT 発現系を用いた *in vitro* 試験において、オロダテロールの第 II 相代謝について詳細に検討した [CTD 5.3.2.2-12_U-1331]。ヒトにおいて、CD 992 は *in vitro* 及び *in vivo* で認められるオロダテロールの主要ヒトグルクロン酸抱合代謝物であることから、CD 992 生成に関与する UGT 酵素について検討した。肝及び腎ミクロソームにおいて、高いグルクロン酸抱合化が認められ、腸管ミクロソームでのグルクロン酸抱合化はこれより低かった。また、肺ミクロソームにおけるグルクロン酸抱合活性は無視し得る程度であった。高いグルクロン酸抱合活性が認められたのは、UGT2B7、1A1、1A7 及び 1A9 であった。

SOM 1522 の硫酸抱合により、ヒト特異的な不均衡代謝物 (disproportionate metabolite) CD 12656 が生成したことから、この反応についてさらに検討した。ヒト肝臓及び腸管サイトゾル、並びにヒト肝臓、肺及び腎臓組織ホモジネートの S9000 画分を使用した。ヒトの腸管は SOM 1522 の硫酸抱合に関与する主要組織と考えられ、肝臓に比べて活性が 20 倍以上高かった。ヒト肝臓及び肺における SOM 1522 の *in vitro* 硫酸抱合化速度は同等である一方、腎臓での活性は最も低かった。非常に高い硫酸抱合活性を示したのは、硫酸転移酵素 SULT1A1 及び SULT1A3 であった。興味深いこととして、SULT1A3 分子種は霊長類のみに存在し、ヒト腸管で高度に発現する [CTD 4.3-11_R10-0397, CTD 4.3-12_R10-0398]。このことが、ヒトで代謝物 CD 12656 の特異的生成を認め、毒性試験に使用した動物種で認めなかった理由と考えられる。

オロダテロールの代謝に関する *in vitro* 試験及び以下に示す *in vivo* 試験から総合的に判断して、オロダテロールを吸入投与したとき、肺においてオロダテロールの酸化的脱メチル化により SOM 1522 が生成し、その後の SOM 1522 の第 II 相抱合化反応による CD 11249, CD 10915 及び CD 12656 の生成は無視し得る程度であると結論される。

5.2.2 *In vivo* 代謝

マウス、ラット、ウサギ（雌）、イヌ及びヒトにおけるオロダテロールの代謝について検討した。^[14C]オロダテロールを単回気管内（マウス及びラットのみ）、単回静脈内、単回経口又は単回十二指腸内投与した後の尿、糞及び胆汁、並びに選択した時点における血漿を用いてデータを収集した。詳細については、[図 5.2.2.3: 1](#) 及び表 10.1: 1～10.1: 4 を参照のこと [CTD 4.2.2.4-2_U-1516, CTD 4.2.2.4-1_U-1514, CTD 4.2.2.4-4_U-1317, CTD 4.2.2.4-3_U-1057, CTD 5.3.2.2-9_U-1129]。

臨床におけるオロダテロールの投与経路は吸入投与である。^[14C]オロダテロールを用いてこの投与経路でヒト ADME 試験を実施することはできなかったため、健康被験者に本薬を静脈内又は経口投与することにより吸入投与を模倣した。すなわち、肺を介した吸収後の薬物代謝は^[14C]オロダテロールの静脈内投与により、吸入投与時の嚥下部分の代謝については、^[14C]オロダテロールの経口投与により検討した。オロダテロールは非常に強力な β_2 -アドレナリン受容体（AR）刺激薬であることから、静脈内及び経口投与のそれぞれについて、20 μg /人及び 40 μg /人の非常に低い用量でヒトにおける代謝を検討する必要があった。分析の検出限界は 2.8～8.0 pM（血漿）、1.5～242 pM（尿）及び 114～1497 pM（糞）であった [CTD 5.3.2.2-9_U-1129]。さらに、第 I 相臨床試験で非放射性標識オロダテロール 70 μg /人を吸入投与したときに得られた血漿及び尿試料中に存在する代謝物についても検討した [CTD 5.3.2.2-3_U-1515]。

血漿、尿、糞及び胆汁（ラット、ウサギ及びイヌのみ）試料について、放射能検出器を接続した HPLC により定量的評価を行い、高分解能質量分析計を接続した HPLC により代謝物を同定した。得られたデータを表 10.1: 1～10.1: 5 に要約して示す。

全体として、動物種間で代謝物プロファイルに大きな差はなかったが、相対的な割合は多様であった。なお、これらの代謝試験では、非臨床毒性試験で使用した動物種及びヒトの *in vivo* 試料について、定量的 HPLC-MS/MS 分析法を用いて評価した。さらに、動物種及びヒトにおいて、キラル反転は検出されなかった [CTD 5.3.2.2-8_U-2170]。

本項では、動物種及びヒトにおけるオロダテロールの *in vivo* 代謝について解説する。特定されたオロダテロールの主な代謝経路を[図 5.2.2.3: 1](#) に描写する。

5.2.2.1 血漿中代謝物

^[14C]オロダテロールを気管内、静脈内及び経口投与したときの血漿中の主要放射能成分は未変化体及びそのグルクロン酸抱合体である CD 992 であった。脂肪族水酸基のグルクロン酸抱合化によって生成する 2 番目のグルクロン酸抱合体 M565(2)の濃度は無視し得る程度の極微量に過ぎなかった。ヒトに^[14C]オロダテロールを静脈内投与したときに M565(2)は認められず、経口投与後の M565(2)/CD 992 比は 0.04～0.13 であった。

SOM 1522 は、ラット及びウサギ血漿中の総放射能に占める割合はほんのわずかであり、マウス、イヌ及びヒト血漿中での存在量は極微量であった（総放射能の 5%未満）。血漿中で SOM 1522 の 2 種類のグルクロン酸抱合体（CD 11249 及び CD 10915）が同定された。CD 11249 はマウス、ウサギ及びイヌのすべての投与経路で、ラットでは静脈内投与後の初期時点において認められた。マウス、ラット及びイヌの血漿中では、CD 11249 のみが検出されたのに対して、ウサギ及びヒトでは CD 11249 及び CD 10915 の両抱合体が生成した。ヒトに静脈内投与したとき、血漿中に CD 992 と同程度の濃度の CD 10915 が認められたが、経口投与後ではそのようなことはなかった。

In vivo 試験において、ヒトのみで CD 12656（SOM 1522 の硫酸抱合体）が検出された（5.2.2.3 項及び 5.2.2.4 項参照）。静脈内及び経口投与後のこの代謝物の血漿中濃度は数ピコモル範囲であり、それぞれ、5 pM 未満及び 4.5 pM 以下であった。したがって、静脈内及び経口投与後の試料中放射能に占める CD 12656 の割合は、それぞれ 5.4%及び 4.6%以下であった。しかし、ラット肝細胞とともにインキュベーションしたときにもごく微量の CD 12656 が認められたことから（5.2.1 項「*In vitro* 代謝」参照）、ヒト固有の代謝物には分類されなかった。

SOM 1522 に対する第 II 相抱合反応により、標的受容体における活性は明らかに低下し、SOM 1522 の活性は β_1 -AR で $EC_{50}=45.7$ nM、 β_2 -AR で $EC_{50}=0.93$ nM であったが、SOM 1522 の両グルクロン酸抱合体（CD 11249 及び CD 10915）では、 β_1 -AR 及び β_2 -AR における生物活性が著しく低下していた（CD 11249 : β_1 -AR で >10000 nM、 β_2 -AR で 282 nM、CD 10915 : β_1 -AR で >10000 nM、 β_2 -AR で 513 nM、2.6.2 項「薬理試験の概要文」参照）。

ヒト特異的な不均衡代謝物 CD 12656 の両 β -AR における活性も無視し得る程度にすぎないことが明らかになった（ヒト β_1 -AR : $EC_{50}=250$ nM、ヒト β_2 -AR : $EC_{50}=13$ nM）。血漿中濃度が低ピコモル範囲であったことから、オロダテロールの薬理作用に CD 12656 は寄与しないと結論することができる（2.6.2 項「薬理試験の概要文」参照）。

検討した動物種の血漿中に存在する代謝物の概要について、濃度 (pM) 及び割合 (対投与量%) を含めて、図 5.2.2.3: 1 および表 10.1: 4 に示す。

5.2.2.1.1 非抽出性放射能の評価

[14 C]オロダテロールの *in vitro* 代謝試験において、使用した基質及び蛋白質濃度に応じて、少量の放射能がミクロソーム蛋白質（最大 2.88%）及びヒト肝細胞（最大 1.27%）に共有結合していた。この結合には NADPH が必要であったことから、[14 C]オロダテロールの代謝に依存することが示唆された [CTD 5.3.2.2-2_U-1439]。

In vivo において、[14 C]オロダテロールを静脈内及び経口投与したとき、試料中の放射能が完全に抽出可能であったのは、ウサギ血漿のみであり、マウス、ラット、イヌ及びヒト血漿からは非抽出性放射能が検出された。各動物種の血漿中に放射能が長時間にわたり滞留したことから、血漿蛋白質に共有結合する代謝物が生成する代謝経路の存在が示唆された。したがって、動物及びヒト血漿試料中の共有結合の評価を行った [CTD 5.3.2.2-6_U-1659]。ヒトを含むすべての動物種の血漿試料の非抽出性放射能に関するデータを表 10.1: 5 に要約して示す。放射能の非抽出性画分は経時的に増加し、投与経路には依存しなかった。概して、非抽出性放射能の

相対的濃度（総血漿中放射能に対する割合%）及び用量で補正した濃度（nM/(μ g/kg)）は、動物に比べてヒトで低かった。ヒトに対する $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールの投与量は非常に低かったため、非抽出性放射能の絶対的濃度は動物に比べて有意に低く、数ピコモル範囲で、総放射能濃度の10%未満であった。ヒトと比較すると非抽出性放射能の曝露量はマウスで 500 倍以上、ラットで少なくとも 100 倍、イヌで約 200 倍以上高い値を示した。毒性試験に使用した動物種は十分な反応性代謝物の曝露を受けたと結論することができる。

血漿中に非抽出性放射能が認められたことは、オロダテロールの代謝において、反応性中間代謝物が生成することを示している。ラット及びヒト肝ミクロソームを用いて、その基本メカニズムについてさらに解明するため *in vitro* 試験を実施した [CTD 5.3.2.2-6_U-1659]。

5.2.2.2 尿中代謝物

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを気管内（マウス及びラットのみ）、静脈内及び経口投与したときの尿中代謝物について検討した。

マウス、ラット及びイヌの尿中に排泄された放射能の大部分は未変化体であった。最も高濃度に存在していた代謝物は CD 992 であり、これより低濃度の代謝物として、SOM 1522、CD 11249 及び M565(2)が検出された。ヒトで認められた SOM 1522 の第 II 相抱合反応生成物である CD 10915 及び CD 12656 の 2 種類の代謝物は、ラット及びイヌの尿中には認められなかった。マウスの尿のみに極微量の CD 10915 が定性的に検出された。マウス及びラットに気管内投与した後の代謝物パターンは、静脈内投与後と同様であった。ウサギの尿中に認められた主要放射能成分は CD 992 であり、次いで未変化体オロダテロールであった。さらに、ウサギの尿中に CD 10915、CD 11249 及び SOM 1522 も認められた。

ヒト尿中の主要放射能成分は未変化体並びにグルクロン酸抱合体 CD 992 及び CD 10915 であった。ヒトにオロダテロールを静脈内及び経口投与したとき、尿中に微量代謝物として CD 11249 及び CD 12656 が検出された。ヒト尿中に存在する SOM 1522 は無視し得る程度であり、オロダテロールのグルクロン酸抱合体である M565(2)は経口投与後のみに認められた。

マウス、ラット、イヌ及びヒトに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを投与したときの尿試料中でのオロダテロールからそのエナンチオマー（不純物^{*}）へのキラル反転の可能性について検討した。この試験において、オロダテロールの代謝的キラル反転は確認されなかった [CTD 5.3.2.2-8_U-2170]。この所見は *in vitro* データと一致していた。

尿中に存在する代謝物及びその存在量(対投与量%)を表 10.1: 1～表 10.1: 3 に要約して示す。

5.2.2.3 胆汁及び糞中代謝物

ラット、雌ウサギ及びイヌに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを気管内（ラットのみ）、静脈内及び経口投与したときの胆汁中代謝物について評価した。特定された主要放射能成分は未変化体並びにグルクロン酸抱合体 CD 992 及び CD 11249 であった。

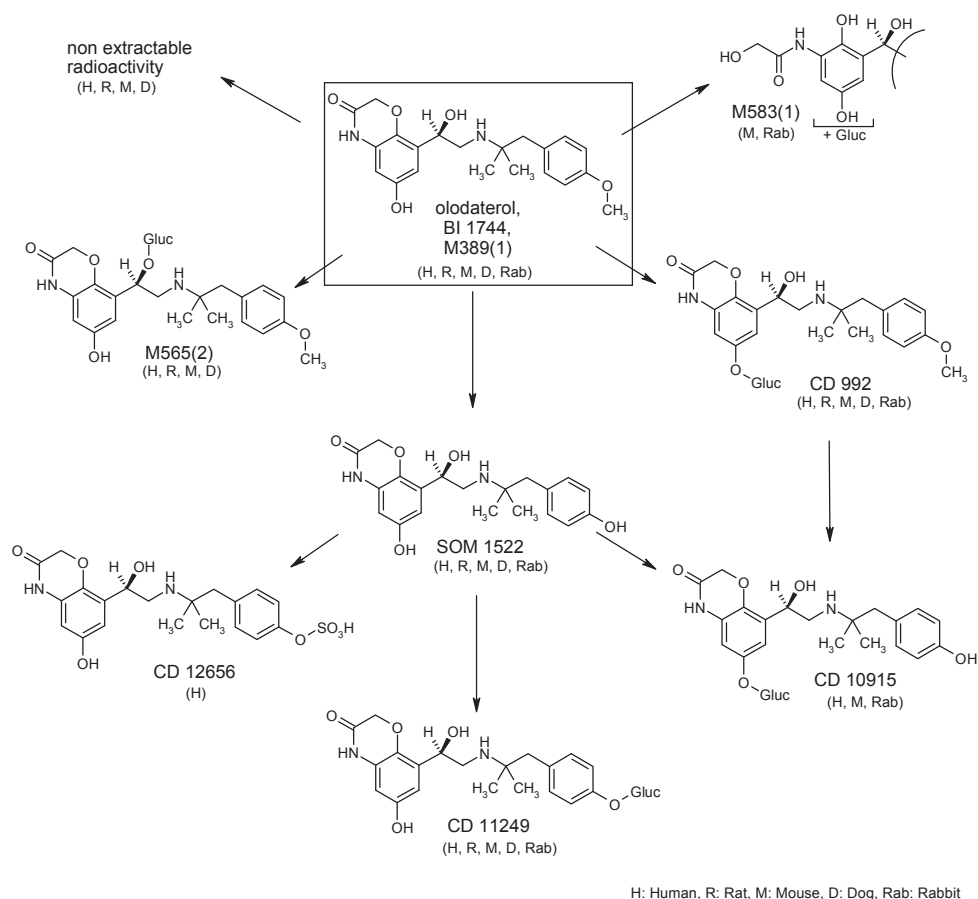
マウス、ラット及びヒト糞中でグルクロン酸抱合体は完全に切断され、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを気管内（マウス及びラットのみ）、静脈内及び経口投与したときの糞中には、アグリコンであるオロダテロール及び SOM 1522 のみが認められた。胆汁中の β -グルクロニダーゼ又は腸管液中の微生物分解によるこの第 II 相グルクロン酸抱合体の脱抱合過程は、排泄における一般的

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

な過程として文献で報告されている [CTD 4.3-78_R10-5265]。ヒト糞中のみで SOM 1522 の硫酸抱合体である CD 12656 が認められ、静脈内及び経口投与後のそれぞれで投与量の 1.0%及び 0.6%を占めていた。尿中排泄と併せた CD 12656 の総排泄量は、静脈内投与後で投与量の 2.6%、経口投与後で投与量の 1.8%であった。硫酸抱合能には一般的に種差が認められているが [CTD 4.3-13_R10-4943, CTD 4.3-14_R10-4944, CTD 4.3-15_R10-4945]，ヒトにおける^{[14]C}オロダテロールの代謝に対する CD 12656 生成の寄与はごくわずかと考えられた。

SOM 1522 はラット及びウサギの血漿中総放射能に寄与せず、マウス、イヌ及びヒト血漿中に極微量存在していただけであったことから（動物及びヒト血漿中の総放射能の 5%未満），SOM 1522 の再吸収による放射能の腸肝循環の可能性は低いと考えられた。その他の代謝物として、静脈内投与後のイヌ糞中及びウサギ（雌）の糞中のみに少量の CD 992, CD 11249 及び CD 10915 が検出された。

胆汁及び糞中に存在する代謝物及びその存在量（対投与量%）を表 10.1: 1～10.1: 3 に要約して示す。



H：ヒト，R：ラット，M：マウス，D：イヌ，Rab：ウサギ

図 5.2.2.3: 1 ヒト及び毒性試験に用いた動物種におけるオロダテロール（四角で囲んで示す）の *in vivo* 代謝経路

5.2.2.4 ヒト及び動物における代謝の比較

オロダテロールの治療用量は1日量として5 µg と非常に低い。その結果、血漿試料中に認められた未変化体及び代謝物濃度は数ピコモル範囲であった。オロダテロールの代謝では、主に第II相抱合反応によってグルクロン酸抱合体が生成することから、毒性試験において、特定の代謝物の曝露量に関する評価は行わなかった。

ラット2週間反復投与試験において、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを気管内投与したときの定常状態における血漿中代謝物について検討した [CTD 4.2.2.4-5_U-1391]。得られた結果は、ラットにオロダテロールを単回気管内、静脈内及び経口投与したときに得られたデータと同等であった [CTD 4.2.2.4-1_U-1514]。

臨床試験において、ヒトにオロダテロールを吸入投与したときの定常状態における未変化体及び主代謝物 CD 992 に関するデータを収集した (2.7.2 項「臨床薬理の概要」参照)。単回投与時のデータと比較して、反復投与したときの蓄積はわずかであり、オロダテロール及び CD 992 の薬物動態は基本的に変化しないことが明らかになった。したがって、特定の試料採取時点における血漿データに基づくオロダテロール及び代謝物の評価及び比較に、動物及びヒト $[^{14}\text{C}]$ -ADME 試験で得られた単回投与時のデータを使用することは妥当であると考えられた。動物及びヒト $[^{14}\text{C}]$ -ADME 試験の特定の試料採取時点における血漿中代謝物及びその濃度の概要を表 10.1: 4 に示す。

さらに、ヒト ADME 試験 [CTD 5.3.2.2-9_U-1129] でオロダテロール 20 µg を静脈内投与及びオロダテロール 40 µg を経口投与したときの代謝物濃度から、線形外挿法により、体重 50 kg のヒトに用量 10 µg を投与したときの代謝物濃度を計算した。一方、動物における代謝物濃度については、 $[^{14}\text{C}]$ -ADME 試験の各用量で得られた代謝物濃度から、線形外挿法により、毒性試験 (2.6.6 項「毒性試験の概要文」参照) で得られた無毒性量 (NOAEL) における代謝物濃度を計算した。反復投与毒性試験において、この用量範囲で動物の未変化体曝露量に用量比例性が認められた (2.6.6 項「毒性試験の概要文」参照)。さらに、各動物種の NOAEL におけるオロダテロールの最高血漿中濃度及び平均血漿中濃度を計算した。算出された血漿中代謝物濃度の概要を表 10.1: 5 に示す。

毒性試験に使用した動物種で認められたオロダテロール及び代謝物 CD 992, M565(2), SOM 1522, CD 11249 の濃度は、ヒトに治療用量である 5 µg を投与したときの濃度に比べて明らかに高かった。したがって、オロダテロール及び上述の代謝物の全般的毒性評価は曝露量の観点から妥当と考えられた。

2 種類のヒト特異的な不均衡代謝物 (CD 10915 及び CD 12656) が認められた。ヒトにおいて、グルクロン酸抱合体 CD 10915 の血漿中総薬物関連成分に占める割合は、すべての試料採取時点で 10% 以上、25% 未満であった [CTD 5.3.2.2-9_U-1129]。CD 10915 は雌ウサギでも認められたが、マウス、ラット及びイヌ血漿中には認められなかった。薬理活性の検討において、CD 10915 は標的受容体で薬理活性を示さないことが明らかになった (2.6.2 項「薬理試験の概要文」参照)。

もうひとつのヒト特異的な不均衡代謝物 CD 12656 に関する *in vivo* 評価では、ヒトに静脈内及び経口投与したときに非常に低い濃度で認められたが、検討した動物種では検出されなかった。*In vitro* 試験において、CD 12656 は主にヒト肝細胞とともにインキュベーションしたときに認められたが、ラット肝細胞とともにインキュベーションしたときにも極微量が検出された [5.2.1 項, CTD 5.3.2.2-6_U-1659 参照]。CD 12656 のヒト血漿中濃度は数ピコモル範囲 (5 pM 未満) であり、総薬物関連成分に占める割合は 5.5% 未満であった。薬理活性の検討において CD 12656 の生物活性を測定した結果、ヒト β_1 -及び β_2 -AR における EC_{50} はそれぞれ 250 及び 13 nM であった (2.6.2 項「薬理試験の概要文」参照)。したがって、SOM 1522 の第 II 相抱合体 (CD 10915, CD 11249, CD 12656) 及びグルクロン酸抱合体 CD 992 すべてがヒト β_1 -及び β_2 -AR において薬理学的に不活性であると判定された (2.6.2 項「薬理試験の概要文」参照)。

血漿中に存在する非抽出性放射能は、総放射能成分の 10% 未満であったヒトに比べて、動物ではるかに高濃度を示した。

6. 排泄

6.1 チオトロピウム

チオトロピウムの排泄については、チオトロピウムの申請資料に詳述されている。チオトロピウムの排泄の概要を以下に示す。

血漿中からのチオトロピウム未変化体の消失速度は、検討したいずれの動物種においても高かった。静脈内投与後の総血漿クリアランス (CL) は以下の順に低下した：マウス > ラット > イヌ > ウサギ。しかし、検討したいずれの動物種においても、 $[^{14}\text{C}]$ チオトロピウムを気管内、静脈内又は経口投与したときの血液／血漿及び種々の組織における薬物関連放射能の半減期は、未変化体の半減期より有意に長かった。

単回投与排泄バランス試験において、 $[^{14}\text{C}]$ チオトロピウム（分子のアルコール部分を標識）をマウス、ラット、ウサギ及びイヌに 0.1～10 mg/kg の用量で静脈内投与したところ、放射能の大部分は尿中に回収され、残りは糞中に認められた。マスバランスは完全であり、動物種における薬物及び／又は代謝物の遺残は示唆されなかった。尿中排泄率はイヌ（75%）及びマウス（67%以上）が最も高く、次いでラット（55%以上）及びウサギ（56%）であったことから、検討したいずれの動物種においても、腎臓が薬物関連物質の最も重要な排泄経路であることが示唆された。ヒトでは、静脈内投与したチオトロピウムの 73.6%が未変化体として排泄された。このようにヒトではチオトロピウム未変化体の回収率が高いことから、主要排泄メカニズムは腎排泄であり代謝ではないことが示唆された。尿中回収率に基づくと、マウス及びイヌが最もヒトに類似した動物種であったが、未変化体の比率はより低かった（イヌで 50%以上、マウスで 60%以上）。ラットに $[^{14}\text{C}]$ チオトロピウム（分子の酸部分を標識）を静脈内投与したとき、投与量の約 10%が呼気中に $^{14}\text{CO}_2$ として排泄された。経口投与後の動物種における腎排泄率は吸収が悪いため低く、2.3～543 mg/kg の用量間で変化がみられなかった。

チオトロピウムを 8.75 mg/kg の用量でラットに静脈内投与したとき、投与後の最も早い時点（0.167 時間）から 24 時間にかけて薬物関連放射能が消化管内に認められたことから、チオトロピウム臭化物の全体的消失における胆汁中排泄の寄与が示唆された。胆管カニューレ挿入ラットにチオトロピウム臭化物を 10 mg/kg の用量で静脈内投与したとき、投与量の 42～53%が胆汁中に排泄され、これはほぼ総糞中排泄量に相当するものであった。

6.2 オロダテロール

6.2.1 排泄経路及び排泄量

$[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを用いて、様々な投与経路（気管内、静脈内、経口及び十二指腸内投与）により、マウス、ラット、ウサギ及びイヌの排泄及びマスバランス試験を実施した。排泄データを表 6.2.1.4: 1 に要約して示す。

6.2.1.1 マウス

雌雄の CD1 マウスに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 1000 $\mu\text{g/kg}$ の用量で単回気管内、静脈内又は経口投与したときの放射能の排泄経路及びマスバランスについて検討した [CTD 4.2.2.5-5_U-2458]。 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを気管内投与したときの放射能の尿中排泄率は 13.6%

と低く、放射能の70%が糞中に排泄された。また、静脈内投与したときには、96時間以内に投与量の25.8%が尿中に、68.4%が糞中に排泄された。尿中排泄率は経口投与後で最も低く5.4%であった（糞中排泄：89.2%）。したがって、投与経路に関係なく、放射能の大部分は糞中に排泄された。

6.2.1.2 ラット

雄性 Han Wistar ラットに ^{14}C オロダテロールを単回気管内、静脈内又は経口投与したときの排泄経路及びマスバランスについて検討した [CTD 4.2.2.5-1_U-1007]。

^{14}C オロダテロールを77.7 $\mu\text{g/kg}$ の用量で気管内投与したときの放射能排泄について、投与後120時間まで追跡した。放射能の大部分は糞中に排泄され(79.2%)、尿中には投与量の15.3%が排泄された。120時間以内に合計96.5%の放射能が回収されたが、総排泄は48時間以内にほぼ完了した。 ^{14}C オロダテロールを77.7 $\mu\text{g/kg}$ の用量で静脈内投与したときの放射能排泄及びマスバランスについても、放射能は主に糞中に排泄され(69.1%)、投与後168時間以内に投与量の23.6%が尿中に排泄された。168時間後の屍体に残存する放射能は1.64%であった。総回収率は168時間後の時点で96.0%であったが、排泄は投与後48時間以内にほぼ完了した。また、 ^{14}C オロダテロールを77.7 $\mu\text{g/kg}$ の用量で経口投与したとき、放射能の98.5%が96時間以内に糞中に排泄され、尿中排泄はわずか1.72%であった。経口投与後の排泄は投与後48時間以内にほぼ完了した。96時間後の総排泄率は投与量の101%であった。

さらに、気管内、静脈内又は十二指腸内投与後の胆汁排泄率についても検討した。動物への ^{14}C オロダテロールの投与量は静脈内投与で38.8 $\mu\text{g/kg}$ 、気管内及び十二指腸内投与で77.7 $\mu\text{g/kg}$ であった。6時間後の胆汁排泄率は、気管内投与後で25.6%、静脈内投与後で39.5%、十二指腸内投与後で25.6%であった。

全体として、ラットに投与した ^{14}C オロダテロールの大部分は48時間以内に胆汁中に排泄された後、糞中に排泄されるが、少量の残存放射能は緩徐に消失した。

さらに、雄性ラットを用いた反復投与試験において、 ^{14}C オロダテロールを310 $\mu\text{g/kg}$ の用量で14日間連続気管内投与したときの排泄率を評価した [CTD 4.2.2.3-4_U-1602]。投与量の約25.8%が尿中に、69.3%が糞中に排泄された。初回投与後3日以内に排泄は定常状態に達した。全体として、放射能の尿及び糞中への相対的排泄量は、単回投与試験及び反復投与試験で類似していた。

6.2.1.3 ウサギ

雌性ニュージーランド白色ウサギに ^{14}C オロダテロールを301 $\mu\text{g/kg}$ の用量で単回経口及び単回静脈内投与したときの排泄経路及びマスバランスについて検討した [CTD 4.2.2.5-3_U-1337]。

経口投与後168時間以内に放射能の約23.1%が尿中に排泄され、静脈内投与後には約54.8%が尿中に排泄された。同じ時間枠における糞中排泄率は、経口投与後で56.9%、静脈内投与後で42.1%であった。

^{14}C オロダテロールを静脈内及び十二指腸内投与したときの放射能の胆汁中排泄について検討した。静脈内投与後では、投与量の約16.1%が胆汁中に排泄され、十二指腸内投与後では

約 2.1%が胆汁中に排泄された。経口投与後の放射能排泄率は投与後 168 時間の時点で 80.8%であり、不完全であった。静脈内投与後の排泄は緩徐であったが、完全であり、72 時間以内に平均で投与量の約 90%、168 時間以内に約 98.1%が回収された。

6.2.1.4 イヌ

イヌ単回投与試験において、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを投与したときの放射能の排泄経路及びマスバランスについて検討した [CTD 4.2.2.5-2_U-1739]。雌雄のビーグル犬に $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回静脈内投与及び 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ の用量で単回経口投与した。

静脈内投与したとき、放射能の約 3 分の 2 (66.3%) が糞中に排泄され、尿中には 16.7%が排泄された。尿中未変化体排泄率は 10.2%であった。 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを経口投与したとき、放射能の大部分は糞中 (87.2%) に排泄されたのに対して、尿中排泄率はわずか 5.7%であった。尿中に排泄された放射能の 2.1%が未変化体であった。イヌに経口投与したときの排泄は 168 時間以内にほぼ完了したが (95.7%)、静脈内投与後の排泄は不完全であった (84.1%)。この試験において、明白な性差は認められなかった。

表 6.2.1.4: 1 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロール又は非標識オロダテロールを投与した後の累積排泄データ (対投与量%) の種間比較 (算術平均値)

資料番号			CTD4.2.2.5-5_U-2458, CTD4.2.2.4-2_U-1516	CTD4.2.2.5-1_U-1007, CTD4.2.2.4-1_U-1514	CTD4.2.2.5-3_U-1337, CTD4.2.2.4-4_U-1317	CTD4.2.2.5-2_U-1739, CTD4.2.2.4-3_U-1057	CTD 5.3.2.2-9_U-1129, CTD 5.3.3.1-1_U06-1418, CTD 5.3.3.1-6_U08-1060, CTD 5.3.3.1-4_U08-1081
投与経路	試料	定量対象物質	マウス (雄及び雌)	ラット (雄) / (雄及び雌)	ウサギ (雌)	イヌ (雄及び雌)	ヒト ^{e)} (男性)
吸入	尿	未変化体	ND	ND	ND	ND	5.63 ^{b)}
気管内	尿	未変化体	6.5 ^{c)}	15.6 ^{d)}	ND	ND	-
	尿	放射能	13.6	15.3	ND	ND	-
	胆汁	未変化体	ND	9.3 ^{d)}	ND	ND	-
	胆汁	放射能	ND	25.6	ND	ND	-
	糞	未変化体	63.1 ^{c)}	53.2 ^{d)}	ND	ND	-
	糞	放射能	70.0	79.2	ND	ND	-
静脈内	尿	未変化体	14.0 ^{c)}	20.7 ^{d)}	12.6 ^{f)}	8.4 ^{g)} -10.2	8.09 ^{b)}
	尿	放射能	25.8	23.6	54.8	16.7	38.4 ^{h)}
	胆汁	未変化体	ND	9.3 ^{d)}	0.4 ^{f)}	3.1 ^{g)}	-
	胆汁	放射能	ND	39.5	16.1	27.0 ^{a), g)}	-
	糞	未変化体	51.4 ^{c)}	35.3 ^{d)}	21.1 ^{f)}	26.9 ^{g)}	-
	糞	放射能	68.4	69.1	42.1	66.3	52.9 ^{h)}
経口	尿	未変化体	3.0 ^{c)}	0.6 ^{d)}	5.6 ^{f)}	2.0 ^{g)} -2.1	0.388 ^{b)}
	尿	放射能	5.4	1.72	23.1	5.7	9.1 ^{h)}
	胆汁	未変化体	ND	2.6 ^{d)}	-	0.4 ^{g)}	-
	胆汁	放射能	ND	25.6	2.1	2.5 ^{a)}	-
	糞	未変化体	82.8 ^{c)}	92.7 ^{d)}	38.6 ^{f)}	76.6 ^{g)}	-
	糞	放射能	89.2	98.5	56.9	87.2	84.3 ^{h)}

- a) 4 時間後の定時試料。
 - b) 40 µg 単回吸入投与, 40 µg 単回経口投与, 又は 25 µg 単回静脈内投与後, それぞれ 96 時間, 48 時間又は 24 時間以内 [CTD 5.3.3.1-1_U06-1418, CTD 5.3.3.1-6_U08-1060 及び CTD 5.3.3.1-4_U08-1081]。
 - c) 代謝試験 [CTD4.2.2.4-2_U-1516] のデータ。
 - d) 別の代謝試験 [CTD4.2.2.4-1_U-1514] のデータ。雄及び雌動物を使用した。雌雄の平均。
 - e) 幾何平均値
 - f) 代謝試験 [CTD4.2.2.4-4_U-1317] のデータ。
 - g) 代謝試験 [CTD4.2.2.4-3_U-1057] のデータ。
 - h) 代謝試験 [CTD 5.3.2.2-9_U-1129] のデータ。静脈内投与の場合, 投与後 0~72 時間の尿及び 0~216 時間の糞を採取し, 経口投与の場合, 投与後 0~72 時間の尿及び 0~168 時間の糞を採取した。
- ND : 測定せず。

6.2.2 乳汁排泄

授乳 Han Wistar ラットに¹⁴C]オロダテロールを 155 µg/kg の用量で授乳 12 日目に単回静脈内投与したときの乳汁排泄について検討した [CTD 4.2.2.5-4_U-1214]。投与後 48 時間まで, 母体の血漿及び乳汁中放射能濃度を測定した。乳汁中放射能濃度の AUC_{0-inf} は, 血漿中濃度の AUC_{0-inf} に比べて約 7 倍高かった。授乳中のラットにおいて, 24 時間以内に投与した放射能の 2.8~4.7%が乳汁中に分泌された。

7. 薬物動態学的薬物相互作用

この章では、チオトロピウム及びオロダテロールの全般的な薬物動態学的薬物相互作用の有無を記述するとともに、*in vitro* 及び *in vivo* でのこれら両薬物間の薬物動態学的薬物相互作用を記述する。チオトロピウム+オロダテロール配合剤と他の併用薬との薬物動態学的薬物相互作用を検討するための特定の薬物間相互作用試験は実施しなかった。

7.1 チオトロピウム

7.1.1 酵素誘導及び酵素阻害

薬物相互作用の有無を調べるため、特定のチトクロム P450 (CYP) 反応に対するチオトロピウムの影響を検討した。ヒト肝ミクロソームにおいては、極めて高濃度のチオトロピウムでも、CYP 1A2, 2B6, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1 及び 3A4 に対する阻害作用は認められなかった。したがって、チオトロピウムの臨床用量では、CYP 酵素の基質である他の薬物の代謝阻害によって临床上問題となる薬物間相互作用が生じる可能性はないと結論された。チオトロピウムを 10 mg/kg の用量で雄ラットに 5 日間反復静脈内投与したときの CYP アイソザイム誘導を評価した。2 つの基本的な誘導剤である 3-メチルコラントレン及びフェノバルビタールを陽性対照として使用した。チオトロピウム投与群のラットの相対肝重量及び相対ミクロソーム蛋白含量には、対照群 (NaCl 投与) の値と比較して差は認められなかった。チオトロピウム投与により、ミクロソーム CYP 含量並びに 7-エトキシレゾルフィン-O-脱アルキル化及びペントキシレゾルフィン-O-脱アルキル化活性に統計学的に有意な増加は認められなかった。これらの酵素誘導試験の結果から、チオトロピウムのチトクロム P450 誘導能は認められなかった。

7.2 オロダテロール

7.2.1 酵素誘導及び酵素阻害

オロダテロールは CYP2D6 が触媒する反応を $K_i=1.92 \mu\text{M}$ で阻害した。検討した他の CYP 分子種に対するオロダテロールの阻害作用は認められず、不可逆的 CYP3A4 阻害を示す徴候も認められなかった。臨床用量における血漿中オロダテロール濃度が $1 \mu\text{M}$ を大きく下回る (COPD 患者にオロダテロールを 10 μg の用量で反復吸入投与したときの $C_{\text{max,ss}}$ 幾何平均値は約 18 pM [7.13 pg/mL] [CTD 5.3.5.1-3_U09-3125]) と仮定すると、 I/K_i 比は 9.4×10^{-6} となる [CTD 4.3-8_P03-04490]。したがって、オロダテロールによって CYP2D6 が阻害される可能性は非常に低いと考えられた。また、他の CYP 分子種についても、濃度 100 μM までのオロダテロールとともにインキュベーションしたときに問題となる阻害が認められなかったことから、これらが阻害される可能性も低いと考えられる [CTD 5.3.2.2-1_U-1043]。

さらに、CYP が触媒する反応の CD 992 による阻害の可能性について、ヒト肝ミクロソームを用いて検討した [CTD 5.3.2.2-10_U-2417]。濃度 100 μM まで、CD 992 による CYP 酵素の可逆的阻害は認められず、検討した最高濃度 (100 μM) の CD 992 のみで軽微な CYP2D6 の不可逆的阻害が認められた。したがって、CD 992 は CYP2D6 の極めて軽微な不可逆的阻害剤にすぎないと結論される。COPD 患者にオロダテロール 10 μg を吸入投与したときの血漿中

CD 992 濃度 ($C_{\max,ss}$ 約 0.01 nM, 5.55 pg/mL) から判断して [CTD 5.3.5.1-3_U09-3125], 併用投与した CYP2D6 基質の固有クリアランスが低下する可能性は非常に低いと考えられる。また, 他の CYP 酵素についても, CD 992 は濃度 100 μ M まで, 問題となる阻害作用を示さなかったことから, これらが阻害される可能性も低いと考えられる。

オロダテロールによる酵素誘導の可能性について評価するため, ヒト肝細胞を用いる *in vitro* 試験を実施し, 酵素活性及び mRNA 発現量を測定した [CTD 5.3.2.2-11_U-1076]。最高濃度 1 nM のオロダテロールを用いて 48 時間にわたり処理しても, チトクロム P450 酵素 CYP1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19 及び 3A4 の活性に意味のある誘導は認められなかった。さらに, 各酵素の mRNA 発現量についても, オロダテロール処理によって意味のある誘導が起こることはなかった。

2 回の連続した 24 時間インキュベーション後, 培養細胞上清中の CD 992 濃度を測定した。この試験で使用した 3 例のドナーすべての肝細胞について, オロダテロール濃度上昇とともに CD 992 の *in situ* 生成量が増加し, 高濃度処理群 (0.05, 0.2 及び 1 nM) で CD 992 が定量可能であった。これらの試料において, 24 時間処理上清中に存在する CD 992 量は, 最初に添加したオロダテロール量の約 7~24%に相当した。したがって, 初代培養肝細胞は酵素誘導検討のための十分な細胞内オロダテロール及び CD 992 曝露を受けていたと考える。結論として, オロダテロール及びそのグルクロン酸抱合体 CD 992 に関して, チトクロム P450 の誘導によって薬物動態学的薬物相互作用が生じることはないと予想される。

7.2.2 薬物トランスポーター阻害作用

Caco-2 単層膜において, オロダテロールは P-糖蛋白質 (P-gp) を介した頂端膜側から基底膜側及び基底膜側から頂端膜側へのジゴキシン輸送を濃度依存的に阻害した。両方向における見かけの IC_{50} 平均値は 365 μ M であったことから, オロダテロールには弱い P-gp 阻害作用があることが示唆された。しかし, 600 μ M までの濃度で, オロダテロールのジゴキシン輸送に対する明らかな阻害作用は認められなかった。小胞内取込みアッセイにおいて, 乳癌耐性蛋白質 (BCRP) を介したエストロン 3 硫酸塩の取込みがオロダテロールにより阻害された。 IC_{50} は 10~100 μ M の範囲と推定された。予想ヒト用量及び最高ヒト血漿中濃度 (数ピコモルの範囲) を考慮すると, P-gp 及び BCRP の阻害作用によって問題となる薬物間相互作用が発現する可能性は低いと考えられる。ヒト有機アニオン輸送ポリペプチド (OATP), 有機アニオントランスポーター (OAT) 及び有機カチオントランスポーター (OCT) の基質又は阻害剤としてのオロダテロールの影響を, 遺伝子導入 HEK293 細胞を用いた *in vitro* 取込み輸送試験で検討した [CTD 5.3.2.3-3_U-3361, CTD 5.3.2.3-4_U-1315]。OATP2 (OATP1B1), OATP8 (OATP1B3), OATP-B (OATP2B1), OCT2 及び OCT3 を発現する細胞において有意に高いオロダテロール取込みはみられなかったが, OAT1, OAT3 及び OCT1 を発現する細胞において, 有意に高い取込みが認められた。オロダテロールはこれらの OATP, OCT2 及び OCT3 アイソフォームの基質ではないが, OAT1, OAT3 及び OCT1 の基質であることが示唆された。これらの OATP, OAT 及び OCT アイソフォームに対するオロダテロールの阻害作用の有無を検討した。オロダテロールは, 最高 100 μ M までの濃度において, OCT1 を除くこれらのアイソフォームに対する明らか

な阻害作用を示さなかった。OCT1 について算出されたオロダテロールの IC₅₀ 値は 14.1 μM であった。臨床で測定された最高ヒト血漿中濃度は数ピコモルの範囲であることから、オロダテロールと OCT1 又は検討した他のいずれかのトランスポーターの基質である併用薬との問題となる薬物間相互作用は発現しないと考えられる。

7.3 *In vitro* でのチオトロピウムあるいは^{開発コードE*} とオロダテロールの代謝的薬物相互作用

チオトロピウムの *in vitro* での酸化的代謝に及ぼすオロダテロールの影響を、ヒト肝ミクロソーム及び男性 1 名、女性 3 名のドナー（喫煙者を含む）からプールしたヒト肺ホモジネートを用いて検討した [CTD 5.3.2.2-13_U-1057]。放射性標識した [¹⁴C]チオトロピウムを用いてインキュベーション試験を実施した。 [¹⁴C]チオトロピウムの代謝を、放射能検出器付き HPLC で検討した。主要な非酵素的開裂（ジチエニルグリコール酸の生成）を除くと、「その他の代謝物」とされる画分の生成量は極めて小さかった。オロダテロールの 10 μM を上回る濃度は、オロダテロールを使用しない対照試験と比較して、「その他の代謝物」の画分生成に弱い阻害を示した。オロダテロールを添加してもジチエニルグリコール酸の生成への影響は認められなかった。

チオトロピウムをヒト肺ホモジネートとともにインキュベートしたとき、非酵素的エステル加水分解によるジチエニルグリコール酸生成はみられたが、酵素的代謝の結果と考えられる「極性代謝物」又は「その他の代謝物」の生成は検出されなかった。ヒト肺は CYP に依存したチオトロピウムの酸化的代謝を示さないと結論された。

オロダテロールを治療用量で吸入投与したときの血漿中濃度は数ピコモルの範囲であったことから（2.7.2 項「臨床薬理試験の要約」参照）、オロダテロールによる CYP 阻害作用に基づくチオトロピウムとオロダテロールの代謝的薬物間相互作用が発現する可能性は非常に低いと考えられる。

オロダテロールとプールしたヒト肝ミクロソームとのインキュベーションにより、オロダテロールの主要代謝物である O-脱メチル代謝物の SOM 1522 が生成した。チオトロピウムによる SOM 1522 生成阻害及びオロダテロールの代謝的枯渇は認められなかった [CTD 5.3.2.2-5_U-1541]。したがって、チオトロピウムによる *in vitro* での酸化的オロダテロール代謝阻害はみられなかった。

[¹⁴C] ^{開発コードE*}（ [¹⁴C] イソ酪酸シクレソニド）の *in vitro* での酸化的代謝に及ぼすオロダテロールの影響を検討した [CTD 5.3.2.2-7_U-1561]。オロダテロールは濃度 100 μM まで、 [¹⁴C] ^{開発コードE*} の代謝物生成に影響しなかった。また、 [¹⁴C] オロダテロールの酸化的代謝に及ぼす ^{開発コードE*}（シクレソニド）の影響についても *in vitro* で評価した [CTD 5.3.2.2-4_U-1534]。^{開発コードE*} は濃度 100 μM まで [¹⁴C] オロダテロールの代謝に影響は認められなかった。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

7.4 *In vivo* でのチオトロピウムとオロダテロールの薬物動態学的薬物相互作用

7.4.1 ラットにおける薬物動態学的薬物相互作用試験

ラットにおけるチオトロピウムとオロダテロールの間での *in vivo* 薬物動態学的薬物相互作用の有無を、チオトロピウム又はオロダテロールの 1 用量及びチオトロピウム+オロダテロールの 1 用量での単回 35 分間吸入投与により検討した [CTD 4.2.2.6-2_U-2470]。チオトロピウム及びオロダテロールの用量は、いずれの群においても 75 µg/kg であった（チオトロピウム+オロダテロールについては 1:1 の用量比）。薬物動態学的薬物相互作用の有無を、チオトロピウム及びオロダテロールの血漿中濃度－時間プロファイルを測定することにより評価した。用量補正した曝露量データの平均値を表 7.4.1:1 に示す。様々な投与群で到達した用量について補正したデータに基づく、チオトロピウム及びオロダテロールへの曝露量は、チオトロピウム及びオロダテロールの単独投与後の方が併用投与後よりもわずかに高かった。しかし、薬物相互作用が AUC に及ぼす影響は最大でも約 1.5 分の 1 にすぎなかった。曝露量のバラツキ及び実際の到達用量の推定における不確実性を考慮すると、単独投与群と併用投与群の間でのチオトロピウム及びオロダテロールへの曝露量の違いは重要ではないと考えられた。

表 7.4.1: 1 ラットにチオトロピウム及びオロダテロールを単回吸入投与したときの用量補正した薬物動態パラメータの平均値 (CTD 4.2.2.6-2_U-2470)

パラメータ	投与	オロダテロール		チオトロピウム	
		雄	雌	雄	雌
C _{max} /用量 [pM]/[nmol/kg]	チオトロピウム	-	-	57.8	31.0
	チオトロピウム+オロダテロール	25.7	23.4	39.9	40.1
	オロダテロール	36.4	27.3	-	-
AUC _{0-inf} /用量 [pM·h]/[nmol/kg]	チオトロピウム	-	-	122	99.7
	チオトロピウム+オロダテロール	99.8	82.2	79.3	68.9
	オロダテロール	107	150	-	-

7.4.2 イヌにおける薬物動態学的薬物相互作用試験

イヌにおけるチオトロピウムとオロダテロールの間での *in vivo* 薬物動態学的薬物相互作用の有無を、チオトロピウム又はオロダテロールの 1 用量及びチオトロピウム+オロダテロールの 1 用量での単回 10 分間吸入投与により検討した [CTD 4.2.2.6-1_U-2446]。チオトロピウム及びオロダテロールの用量は、いずれの群においても 15 µg/kg であった（チオトロピウム+オロダテロールについては 1:1 の用量比）。薬物動態学的薬物相互作用の有無を、チオトロピウム、オロダテロール及びその両方同時投与後の血漿中濃度－時間プロファイルを比較することにより評価した。用量補正した曝露量データの平均値を表 7.4.2:1 に示す。様々な投与群で到達した用量について補正したデータに基づく、オロダテロールへの曝露量は単独投与後とチオトロピウムとの併用投与後で同程度であったが、チオトロピウムへの曝露量は、チオトロピウム単独投与後の方がオロダテロールとの併用投与後よりもわずかに高かった。しかし、観察されたバラツキ及び用量推定法を考慮すると、わずかな違いの有無は重要ではないと考えられた。

表 7.4.2: 1 イヌにチオトロピウム及びオロダテロールを単回吸入投与したときの用量補正した薬物動態パラメータの平均値 (CTD 4.2.2.6-1_U■■-2446)

パラメータ	投与	オロダテロール	チオトロピウム
$C_{\max}$ /用量 [pM]/[nmol/kg]	チオトロピウム	-	65.4
	チオトロピウム+オロダテロール	7.48	53.8
	オロダテロール	10.0	-
$AUC_{0-\infty}$ /用量 [pM·h]/[nmol/kg]	チオトロピウム	-	51.2
	チオトロピウム+オロダテロール	65.1	43.8
	オロダテロール	57.0	-

7.4.3 イヌを用いた 13 週間反復吸入投与毒性試験の一環としての薬物動態学的薬物相互作用試験

チオトロピウムとオロダテロールの間の薬物動態学的薬物相互作用については、イヌを用いたチオトロピウム+オロダテロールの 13 週間反復投与毒性試験の一環としても検討した[CTD 4.2.3.2-18_U■■-2249, CTD 4.2.3.2-19_U■■-1388]。

試験 [CTD 4.2.3.2-18_U■■-2249] では、イヌにおけるチオトロピウムとオロダテロールの間のトキシコキネティクスにおける薬物相互作用を、チオトロピウム又はオロダテロールの 1 用量及びチオトロピウム+オロダテロールの 1 用量での 1 日 1 回 10 分間吸入投与により検討した。チオトロピウム及びオロダテロールの用量は、いずれの群においても 300 µg/kg であった（チオトロピウム+オロダテロールについては 1:1 の用量比）。チオトロピウム及びオロダテロールの血漿中濃度－時間プロファイルを比較することにより、トキシコキネティクス薬物相互作用の有無を評価した。用量補正した曝露量データの平均値を表 7.4.3: 1 に示す。種々の投与群で到達した用量について補正したデータに基づくと、チオトロピウム及びオロダテロールへの曝露量は、併用投与後とチオトロピウム又はオロダテロールの単独投与後との間でわずかに差が認められた。しかし、観察されたバラツキ及び用量推定法を考慮すると、わずかな違いの有無は重要ではないと考えられた。

表 7.4.3: 1 イヌに 13 週間吸入投与したときの単独投与群及び併用投与群におけるチオトロピウム及びオロダテロールの用量補正したトキシコキネティクスパラメータの平均値 (CTD 4.2.3.2-18_U■■-2249)

	日	チオトロピウム		オロダテロール	
		単独 ^a (雄/雌)	Tio+Olo ^b (雄/雌)	単独 ^c (雄/雌)	Tio+Olo ^b (雄/雌)
$C_{\max}$ /用量 [pM]/[µg/kg]	1	106 / 120	112 / 174	49.1 / 41.3	47.5 / 47.9
	30	109 / 73.7	105 / 184	29.7 / 28.1	23.8 / 50.9
	86	63.2 / 82.0	191 / 241	25.6 / 22.8	37.6 / 44.9
AUC_{0-24h} /用量 [pM·h]/[µg/kg]	1	171 / 217	175 / 218	117 / 114	142 / 154
	30	142 / 107	177 / 244	124 / 135	165 / 171
	86	74.8 / 152	213 / 213	107 / 123	171 / 148

- a 300 µg/kg チオトロピウム (名目用量)
 b 300 µg/kg チオトロピウム+300 µg/kg オロダテロール (名目用量)
 c 300 µg/kg オロダテロール (名目用量)

試験 [CTD 4.2.3.2-19_U-1388] では、イヌにおけるチオトロピウムとオロダテロールの間のトキシコキネティクス薬物相互作用を、チオトロピウム又はオロダテロールの1用量及びチオトロピウム+オロダテロールの1用量での1日1回10分間吸入投与により検討した。チオトロピウムの名目用量は、300 µg/kg 単独又は 300 µg/kg+120 µg/kg オロダテロールであった。オロダテロールの名目用量は、300 µg/kg 単独又は 300 µg/kg+150 µg/kg チオトロピウムであった。チオトロピウム及びオロダテロールの血漿中濃度-時間プロファイルを比較することにより、トキシコキネティクス薬物相互作用の有無を評価した。用量補正した曝露量データの平均値を表 7.4.3: 2 に示す。種々の投与群で到達したと推定される用量について補正したデータに基づくと、チオトロピウム単独時およびオロダテロール単独時の曝露量を、チオトロピウム+オロダテロール併用投与後のそれぞれの曝露量と比べるとわずかに差が認められた。しかし、観察されたバラツキ及び用量推定法を考慮すると、わずかな違いの有無は重要ではないと考えられた。

表 7.4.3: 2 イヌに13週間吸入投与したときの単独投与群及び併用投与群におけるチオトロピウム及びオロダテロールの用量補正したトキシコキネティクスパラメータの平均値 (CTD 4.2.3.2-19_U-1388)

	日	チオトロピウム		オロダテロール	
		単独 ^a (雄/雌)	Tio+Olo ^b (雄/雌)	単独 ^c (雄/雌)	Tio+Olo ^d (雄/雌)
C _{max} /用量 [pM]/[µg/kg]	1	81.8 / 88.6	47.3 / 114	36.3 / 28.2	26.6 / 45.1
	30	145 / 176	336 / 79.4	20.4 / 32.4	38.2 / 46.5
	86	173 / 138	119 / 96.4	41.6 / 37.3	32.8 / 36.2
AUC _{0-24h} /用量 [pM·h]/[µg/kg]	1	109 / 147	62.5 / 119	93.3 / 95.9	90.3 / 140
	30	203 / 184	333 / 130	112 / 135	161 / 213
	86	193 / 179	158 / 111	146 / 144	138 / 140

- a 300 µg/kg チオトロピウム (名目用量)
 b 300 µg/kg チオトロピウム+120 µg/kg オロダテロール (名目用量)
 c 300 µg/kg オロダテロール (名目用量)
 d 300 µg/kg オロダテロール+150 µg/kg チオトロピウム (名目用量)

これらをまとめると、イヌに単回又は最長13週間反復吸入投与したとき、チオトロピウム又はオロダテロールの各単独投与群及びチオトロピウム+オロダテロール群の間で、チオトロピウム又はオロダテロールの全身曝露量における顕著な又は一貫した違いは認められなかった。

8. その他の薬物動態試験

8.1 オロダテロール

消化管吸収における P-gp の役割について検討するため、P-gp 阻害剤であるゾスキダルを用いた *in vivo* ラット試験を実施した。この試験の結果については、吸収の項（3.2.2.1.2 項参照）で考察する。また、オロダテロールの血液-脳関門通過に対する P-gp の影響について評価するため、ゾスキダルを用いて P-gp を阻害したラット又は *mdr1a* を欠損するトランスジェニックマウスを用いた試験を実施した。この試験の結果については、分布の項（4.2.1.1 項参照）で考察する。

8.2 チオトロピウム+オロダテロール+開発コードE* の併用毒性試験におけるトキシコキネティクス

チオトロピウム+オロダテロール+開発コードE*（シクレソニド）の併用毒性試験の一環として、ラット [CTD 4.2.3.7.7-3_U-1530] 及びイヌ [CTD 4.2.3.7.7-4_U-2354] に液体エアロゾルを 1 日 1 回、4 週間吸入投与したときのチオトロピウム、オロダテロール、開発コードE* 及び CD 1857（開発コードE* の活性代謝物）への曝露量を評価した。詳細な曝露量データは [2.6.6 毒性試験の概要文] に記載した。

ラットにおけるトキシコキネティクス評価の主要な結果を表 8.2: 1 に要約する。全体として、ラットにおけるトキシコキネティクスのバラツキは中等度であった。いずれの分析物の曝露量においても、明らかな性差は認められなかった。用量比例性からの顕著な又は一貫した逸脱及び反復投与の影響はみられなかった。

表 8.2: 1 ラットの 4 週間反復吸入投与毒性試験におけるチオトロピウム、オロダテロール、開発コードE* 及び CD 1857 のトキシコキネティクス評価（CTD 4.2.3.7.7-3_U-1530）

分析物	汚染 ^a	曝露量のバラツキ	AUC _{0-24h} の用量比例性	性差	反復投与による変化
チオトロピウム	0/64	中等度	ほぼ用量に比例して増加 ^b	雄 ≈ 雌	22 日目 ≈ 1 日目
オロダテロール	0/64	中等度	ほぼ用量に比例して増加 ^b	雄 ≈ 雌	22 日目 > 1 日目 (わずか)
開発コードE*	0/64	中等度	ほぼ用量に比例して増加	雄 ≈ 雌	22 日目 ≈ 1 日目
CD 1857	0/64	中等度	ほぼ用量に比例して増加 ^b	雄 ≈ 雌	22 日目 > 1 日目 (わずか)

a 対照試料の総数のうちチオトロピウムが認められた試料の数

b 低用量群における AUC はわずかに低かったが、おそらくアッセイの感度により過小に推定された。

イヌにおけるトキシコキネティクス評価の主要な結果を表 8.2: 2 に要約する。全体として、イヌにおけるトキシコキネティクスのバラツキは中等度であった。いずれの分析物の曝露量においても、明らかな性差は認められなかった。用量比例性からの顕著な又は一貫した逸脱及び反復投与の影響はみられなかった。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

表 8.2: 2 イヌの 4 週間反復吸入投与毒性試験におけるチオトロピウム、オロダテロール、開発コードE* 及び CD 1857 のトキシコキネティクス評価（CTD 4.2.3.7.7-4_U-2354）

分析物	汚染 ^a	曝露量のバラツキ	AUC _{0-24h} の用量比例性	性差	反復投与による変化
チオトロピウム	0/152	中等度から高度	ほぼ用量に比例して増加 ^b	雄 > 雌 (わずか)	24 日目 ≈ 1 日目
オロダテロール	0/152	中等度	ほぼ用量に比例して増加 ^b	雄 ≈ 雌	24 日目 ≈ 1 日目
開発コードE*	0/152	中等度	ほぼ用量に比例して増加	雄 ≈ 雌	24 日目 ≈ 1 日目
CD 1857	0/152	中等度	ほぼ用量に比例して増加	雄 ≈ 雌	24 日目 ≈ 1 日目

a 対照試料の総数のうちチオトロピウムが認められた試料の数

b 低用量群における AUC はわずかに低かったが、おそらくアッセイの感度により過小に推定された。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

9. 考察及び結論

9.1 オロダテロール

マウス、ラット、ウサギ及びイヌにおけるオロダテロールの薬物動態及び薬物代謝について検討し、ヒトと比較した。薬理試験及び毒性試験で使用した動物種と全く同じものを使用した。

吸収及びバイオアベイラビリティ：

In vitro におけるオロダテロールの受動的腸管膜透過性は中等度であった。*In vitro* 試験において、オロダテロールは低い親和性を有する P-gp 基質 (K_m 平均値=342 μM) であるとともに、弱い P-gp 阻害剤 (IC_{50} 平均値=365 μM) でもあった。しかし、治療用量のオロダテロールを吸入投与したときの全身血漿中濃度は関連する K_m 及び IC_{50} 濃度に比べてはるかに低いことから、オロダテロールが P-gp と相互作用する可能性は極めて低いと考えられる。一方、*in vivo* ラット試験において、P-gp が阻害された状態でオロダテロールを経口投与したときの血漿中濃度は高くなることが明らかになった。このように、P-gp 阻害はラットにおけるオロダテロールの経口吸収率及びバイオアベイラビリティに影響した。

オロダテロールの *in vivo* における吸収及びバイオアベイラビリティは投与経路に大きく左右され、種差が認められた。ラットに気管内投与したときの吸収率は高かったが (64.8~70.4%)、経口投与後の吸収率は低く、わずか 7%であったことから、ラットに経口投与したときの吸収は不完全であることが示唆された。また、経口投与後の吸収率はウサギ (13.5%) で低かったが、イヌ (40.5%) では中等度であった。

吸入投与後のバイオアベイラビリティは、マウスで中等度~高く (54.4%)、ラットでやや低く (23.1%)、イヌで低かった (9.2%)。しかし、ラットに気管内投与を介して投与量全体を肺に直接投与したときには、中等度~高いバイオアベイラビリティを示した (58.6%)。このように、気管内投与後に比べて吸入投与後の絶対的バイオアベイラビリティが低かった理由は、相当量が嚥下又は呼出により消失するためであると考えられた。経口投与後のバイオアベイラビリティは、マウス (4%)、ラット (1.74%) 及びウサギ (0.03%) で低かったが、イヌではやや高かった (13.1%)。

全体として、経口投与後の低い吸収率は、消化管からの吸収が不良であることと初回通過効果が大きいことから予測された。したがって、吸入投与後に嚥下した薬物が全身循環に到達して、全身性の作用を及ぼす可能性は無視し得る程度であると考えられた。

分布：

オロダテロールの定常状態における分布容積 (V_{ss}) は、ヒトを含めて、検討したすべての動物種を通して同程度であり、9.12~17.9 L/kg と大きかったことから、未変化体が血漿から組織へと広範に分布することが示された。このように広範な組織分布は、オロダテロールの既知物理化学的特性 (pH 7.4 における log D が 1.2 の脂溶性薬物) から予想されたことであった。これと一致して、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールをラットに静脈内及び気管内投与したとき、放射能は血漿から大部分の組織に速やかに分布した。肝臓及び腺組織 (特に、膵臓、下垂体、唾液腺及び副腎) に高い放射能濃度が認められた。一方、経口投与したときには、吸収が不良であるため、放射

能の組織分布はごくわずかであった。塩基性の脂溶性薬物で知られている一般的特徴として、有色ラットにおいて、メラニン含有組織に対する結合が認められた。

血液-脳関門通過はごくわずかであり、P-gp 阻害及び欠損モデル動物であっても、オロダテロール及び代謝物の脳内分布は非常に低かった。

さらに、妊娠ラットを用いた試験において、 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロール及びその代謝物が血液-胎盤関門を通過することが示された。

$[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを反復気管内投与したときの組織分布パターンは単回気管内投与後と同様であり、放射能の組織への蓄積はごく限られていた。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト（治療濃度）におけるオロダテロールの血漿蛋白結合率は中等度であり、47.4～78.1%の範囲であった。

代謝：

In vitro 試験及び様々な投与経路による *in vivo* 試験の結果から、オロダテロールの代謝に対して肺代謝はほとんど寄与しないと結論された。オロダテロールの薬物動態特性には、主に肝臓及び腸管での代謝が寄与し、オロダテロールを経口投与したときの初回通過代謝は大きかった。

オロダテロールは CYP2D6 が触媒する代謝反応を $K_i=1.92\ \mu\text{M}$ で阻害した。検討した他の CYP 分子種に対するオロダテロールの阻害作用は認められず、不可逆的 CYP3A4 阻害を示す徴候も認められなかった。ヒトに治療用量のオロダテロールを投与したときの血漿中濃度が非常に低いことを考慮すると、オロダテロールが併用投与した薬剤の薬物動態に影響する可能性は非常に低いと考えられた。このことはオロダテロールの主代謝物である CD 992 にも当てはまる。さらに、ヒト初代培養肝細胞を用いた *in vitro* 試験において、オロダテロール及び CD 992 はチトクロム P450 酵素誘導作用を示さなかった。

ラット及びヒト肝細胞における主な代謝反応はほぼ同等であった。CD 992 はオロダテロールが直接グルクロン酸抱合されて生成する代謝物であり、試料中放射能の 12.1%（ラット）及び 10.1%（ヒト）を占めていた。さらに、オロダテロールのグルクロン酸抱合化により別の代謝物 M565(2)が生成し、試料中放射能に占める割合は 1.0%（ラット）及び極微量（ヒト）であった。また、SOM 1522 が試料中放射能に占める割合はラットで 1.1%、ヒトで 5.8%であった。SOM 1522 のグルクロン酸抱合により、CD 11249 又は CD 10915 が生成し、CD 11249 は主にラット肝細胞（15.1%）によって生成したのに対して、CD 10915 はヒト肝細胞（12.3%）によって生成した。SOM 1522 の硫酸抱合によって生成する CD 12656 は、ヒト肝細胞の試料中放射能の 5.4%を占めていたが、ラット肝細胞では極微量しか検出されなかった。

マウス、ラット、イヌ及びヒトにオロダテロールを投与したときに得られた尿試料、並びにヒト肝細胞とともに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールをインキュベーションしたときの試料において、オロダテロールのキラル反転は認められなかった。

マウス、ラット、ウサギ（雌）、イヌ及びヒトに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを様々な投与経路で投与したときの *in vivo* 代謝について検討した。排泄物中に主な代謝物として CD 992 及び SOM 1522 が同定された。ヒト血漿中では、SOM 1522 は極微量しか認められなかった。次に SOM 1522 のグルクロン酸抱合により、CD 11249 及び CD 10915 が生成した。さらに、オロダ

テロールのグルクロン酸抱合によって M565(2)が生成し、SOM 1522 の硫酸抱合によって CD 12656 が生成した。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒトに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを気管内又は静脈内投与したときの血漿、尿、胆汁及び糞中に存在する主な放射能成分は未変化体であった。これに加えて、これらの動物種における主な *in vivo* 代謝物として、そのグルクロン酸抱合体である CD 992 及び SOM 1522、並びに SOM 1522 のグルクロン酸抱合体である CD 11249 及び CD 10915 が同定された。ヒト ADME 試験及び毒性試験に用いた動物種における $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールの主な代謝反応は、基本的に全く同じであった。活性代謝物 SOM 1522 の硫酸抱合体である CD 12656 及び CD 10915 に加えて、ヒトで認められた *in vivo* 代謝物はすべて、一般毒性試験及びがん原性試験で使用した動物種でも認められた。CD 10915 はウサギで高濃度が検出された。ヒト血漿中で検出された CD 12656 及び CD 10915 は非常に低濃度であり、それぞれ 5 pM 及び 46.9 pM 未満であった。CD 12656 及び CD 10915 はいずれも、 β_1 -及び β_2 -AR において不活性であることが明らかになった。したがって、活性代謝物である SOM 1522 は、抱合反応により不活性になった。血漿中の非抽出性放射能濃度は、動物に比べてヒトではるかに低く、総放射能濃度の 10% 未満であった。

SOM 1522 が生成する反応は CYP2C8 及び CYP2C9 依存性反応であり、CYP3A4 の寄与は無視し得る程度であった。さらに、ヒト由来の複数の組織を用いた *in vitro* 試験において、オロダテロールの第 II 相代謝に関与する酵素を評価した。オロダテロールのグルクロン酸抱合に関与する酵素として、UDP グルクロン酸転移酵素 UGT2B7、UGT1A1、UGT1A7 及び UGT1A9 が特定された。ヒト特異的な不均衡代謝物である CD 12656 (SOM 1522 の硫酸抱合体) の生成に関して、硫酸転移酵素 SULT1A1 及び SULT1A3 が主に寄与している可能性が高いことが明らかになった。SULT1A3 分子種は霊長類以外の動物種には存在せず、SULT1A1 はラットの腸管組織には発現しないことから、代謝物 CD 12656 の生成に種差が認められたことは、これらの酵素の発現の差によって説明できると考えられた。

消失及び排泄：

オロダテロールの消失速度は、動物種によって中等度～速やかであった。静脈内投与後の血漿クリアランス (CL) は、マウス、ラット、イヌ、ウサギの順で低下した。しかし、検討したすべての動物種において、放射能の消失半減期は未変化体に比べて有意に長かったことから、少なくとも 1 種類の代謝物の消失は未変化体に比べて緩徐であると考えられた。ラットの全身オートラジオグラフィデータでも、すべての組織から、放射能の持続的ではあるが緩徐な消失が明らかになり、投与後 3 日目でも濃度測定が可能であった。これらの所見は、マウス、ラット及びヒトの副次的代謝経路に関する兆候と一致し、血漿中に非抽出性放射能が認められた。ヒトで予定されているオロダテロールの治療用量は 5 $\mu\text{g}/\text{日}$ であり、ヒトで生成する可能性のある反応性代謝物の絶対量は極微量であることから、タイプ B の副作用 (特異的副作用) が発現するリスクは非常に低いと考えられる。さらに、ヒトで認められた共有結合は、毒性試験に使用した動物種に比べてはるかに低かった。

マウス、ラット、ウサギ及びイヌに $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを静脈内、気管内（マウス及びラットのみ）、並びに経口投与後の排泄及びマスバランス試験を実施した。静脈内投与後の放射能の尿中排泄率は、マウス、ラット及びイヌで低～中等度であり（16.7～25.8%）、ウサギではこれより高かった（54.8%）。各動物種にオロダテロールを気管内及び経口投与したときの尿中排泄率は静脈内投与した場合より低く、気管内及び経口投与後の吸収が不完全であることが示された。これに対応して、すべての投与経路について、放射能の大部分は糞中に排泄された（ウサギにおける 42.1%から、ラットにおける 98.5%の範囲）。静脈内投与後の糞中排泄は、主に放射能の胆汁排泄によるものであり、ラットで投与後 6 時間以内に投与量の 39.5%が、イヌで投与後 4 時間の定時試料に投与量の 27.0%が胆汁中に排泄された。ラットの胆汁中に排泄された放射能の腸管循環は無視し得る程度であった（3%）。ラット及びイヌにおいて、投与した放射能の大部分は投与後 2～3 日以内に排泄物中に回収された。しかし、残存する放射能の排泄は非常に緩徐であった。

要約すると、ここに示す薬物代謝試験を含むすべての非臨床薬物動態試験において、FDA ガイダンス「代謝物の安全性試験」[CTD 4.3-46_R08-2457] 及び ICH ガイドライン M3 (R2)「医薬品の臨床試験及び製造販売承認申請のための非臨床安全性試験の実施についてのガイダンス」[CTD 4.3-55_R10-5669] の基準を満たしていることからオロダテロールの承認申請を支持すると考えられた。

9.2 チオトロピウム+オロダテロール

チオトロピウム及びオロダテロールのいずれについても、その薬物動態及び代謝の特性について広範な非臨床的及び臨床的特性の検討が実施されており、チオトロピウムについては既申請概要に、オロダテロールについては本 CTD に要約されている。

チオトロピウム+オロダテロール FDC の吸入溶液の開発における非臨床プログラムの一環として、チオトロピウム及びオロダテロールの薬物動態及び代謝を検討したのは、2 つの目的によるものであった。

第 1 の目的は、全身曝露の確認である。非臨床吸入投与毒性試験と同時に実施したトキシコキネティクス試験により、各試験におけるチオトロピウム及びオロダテロールへの高い全身曝露量が証明された。ラット及びイヌでの更なるトキシコキネティクスの解析において、検討した用量範囲での用量比例性からの顕著な又は一貫した逸脱はみられず、反復投与の影響及び性差も認められなかった。

非臨床薬物動態及び代謝プログラムの第 2 の目的は、更なる *in vitro* 及び *in vivo* 試験において、チオトロピウムとオロダテロールの間の薬物動態学的薬物相互作用の有無を検討することであった。

チオトロピウムの *in vitro* での酸化的代謝に対するオロダテロールの影響を、プールしたヒト肝ミクロソーム及びヒト肺ホモジネートを用いて検討した。オロダテロールを使用しない対照試験と比較して、10 μM を上回るオロダテロールの濃度のみにおいて、弱い代謝物生成阻害作用が認められた。治療用量の 5 μg を 1 日 1 回吸入投与したときのオロダテロールの血漿中濃度

は数ピコモルの範囲であるため、オロダテロールの CYP 阻害作用に基づくチオトロピウムとオロダテロールの代謝的薬物間相互作用が発現する可能性は極めて低いと考えられる。

オロダテロールをプールしたヒト肝ミクロソームとともにインキュベートしたところ、主要代謝物としてオロダテロールの O-脱メチル代謝物である SOM 1522 が生成した。チオトロピウムによる SOM 1522 生成阻害作用及びオロダテロールの代謝的枯渇は認められなかった。したがって、チオトロピウムによる *in vitro* でのオロダテロールの酸化的代謝阻害はみられなかった。

イヌに単回吸入投与又は最長 13 週間反復投与したときのチオトロピウム及びオロダテロールの全身曝露量には、チオトロピウム又はオロダテロールの各単独投与群及びチオトロピウム＋オロダテロール群の間で、顕著な又は一貫した違いは認められなかった。

チオトロピウム＋オロダテロール FDC について、チオトロピウム＋オロダテロールと他の併用薬との薬物動態学的薬物相互作用を検討する特異的な薬物間相互作用試験は実施しなかった。いずれの薬物においても、治療用量を投与したときの濃度より遥かに高い濃度で、CYP 酵素との相互作用は認められなかった。

これらをまとめると、チオトロピウムとオロダテロールの間の薬物動態学的薬物相互作用の有無を探索する非臨床 *in vitro* 及び *in vivo* 試験では、臨床においてこれらの薬物の間で顕著な又は一貫した薬物間相互作用が発現する可能性は示唆されなかった。この非臨床所見は、COPD 患者を対象とした臨床的薬物動態学的薬物相互作用試験に一致するものである。この試験では、臨床用量での各薬物の単独投与後又はチオトロピウム＋オロダテロール FDC 投与後において、チオトロピウム及びオロダテロールの薬物動態に明らかな違いは認められなかった。

以上のことから、この薬物動態試験の概要文に記載したすべての動物を用いた薬物動態試験並びに *in vitro* 及び *in vivo* 代謝試験は、ヒトにおける COPD の治療薬としてのチオトロピウム＋オロダテロール FDC の承認申請をサポートするものである。

10. 図表

10.1 オロダテロール

表 10.1: 1 ^[14C]オロダテロールを単回気管内投与したときの排泄物中の代謝物パターン (対投与量%)

動物種	投与量 [μg/kg]	試料	試料採取 間隔	オロダテロール	CD992	M565(2)	SOM 1522	CD 11249	CD 10915	CD 12656	その他(累計) a)	合計
マウス [CTD4.2.2.4-2 U-1516]	1000	尿	0～48 時間	6.5	3.5	0.2	0.4	1.7	-	-	1.0	13.3
		糞		63.1	-	-	4.6	-	-	-	1.3	69.0
		尿+糞		69.6	3.5	0.2	5.0	1.7	-	-	2.4	82.3
ラット [CTD4.2.2.4-1 U-1514]	155	尿	0～48 時間	15.6	1.0	0.3	0.3	0.2	-	-	0.1	17.5
		糞		53.2	-	-	16.6	-	-	-	3.1	72.8
		尿+糞		68.8	1.0	0.3	16.9	0.2	-	-	3.2	90.4
		胆汁		9.3	6.6	0.2	-	8.8	-	-	4.8	29.4

a) 個別には、ヒトで 0.5%未満、ラットで 2.6%未満、マウスで 1.7%未満、イヌで 14%未満、ウサギで 0.6%未満。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

チオトロピウム+オロダテロール

表 10.1: 2 ^{[14]C}オロダテロールを単回静脈内投与したときの排泄物中の代謝物パターン（対投与量％）

動物種	投与量 [μg/kg]	試料	試料採取間隔	オロダテロ ール	CD992	M565(2)	SOM 1522	CD 11249	CD 10915	CD 12656	その他 (累計) a)	合計
マウス [CTD4.2.2.4-2 _U-1516]	1000	尿	0～48 時間	14.0	4.3	0.7	1.0	3.6	-	-	1.9	25.5
		糞		51.4	-	-	12.7	-	-	-	2.8	66.9
		尿+糞		65.4	4.3	0.7	13.7	3.6	-	-	4.7	92.4
ラット [CTD4.2.2.4-1 _U-1514]	155	尿	0～48 時間	20.7	0.7	0.3	0.5	0.3	-	-	0.1	22.7
		糞		35.3	-	-	26.0	-	-	-	5.1	66.5
		尿+糞		56.0	0.7	0.3	26.6	0.3	-	-	5.2	89.1
		胆汁		9.3	7.0	0.3	-	13.3	-	-	6.6	36.5
ウサギ [CTD4.2.2.4-4 _U-1317]	155	尿	0～72 時間	12.6	33.9	-	1.7	2.0	3.2	-	0.5	54.0
		糞		21.1	4.8	-	13.8	0.5	0.1	-	0.5	40.8
		尿+糞		33.7	38.7	-	15.5	2.6	3.4	-	1.0	94.8
		胆汁		0.4	14.5	-	0.1	0.1	0.8	-	0.1	16.1
イヌ [CTD4.2.2.4-3 _U-1057]	30	尿	0～48 時間	8.4	0.3	0.2	0.1	0.2	-	-	2.6	11.6
		糞		26.9	1.3	-	-	0.5	-	-	24.8	53.4
		尿+糞		35.3	1.6	0.2	0.1	0.7	-	-	27.4	65.1
		胆汁		3.1	2.8	1.3	-	1.1	-	-	18.6	27.0
ヒト [CTD 5.3.2.2-9 _U-1129]	0.26	尿	0～72 時間	19.1	9.8	-	0.2	1.5	5.5	1.6	0.6	38.4
		糞		23.5	-	-	28.4	-	-	1.0	0	52.9
		尿+糞		42.6	9.8	-	28.7	1.5	5.5	2.6	0.6	91.3

a) 個別には、ヒトで0.5%未満、ラットで2.6%未満、マウスで1.7%未満、イヌで14%未満、ウサギで0.6%未満。

表 10.1: 3 ^[14C]オロダテロールを単回経口投与したときの排泄物中の代謝物パターン (対投与量%)

動物種	投与量 [μg/kg]	試料	試料採取間隔	オロダテロ ール	CD992	M565(2)	SOM 1522	CD 11249	CD 10915	CD 12656	その他 (累計) a)	合計
マウス [CTD4.2.2.4-2 _U-1516]	1000	尿	0~48 時間	3.0	1.3	0.1	0.2	0.6	-	-	0.3	5.3
		糞		82.8	-	-	3.1	-	-	-	2.9	88.8
		尿+糞		85.7	1.3	0.1	3.3	0.6	-	-	3.1	94.1
ラット [CTD4.2.2.4-1 _U-1514]	155	尿	0~48 時間	0.6	0.8	-	-	0.1	-	-	<0.1	1.6
		糞		92.7	-	-	2.5	-	-	-	0.5	95.7
		尿+糞		93.4	0.8	-	2.5	0.1	-	-	0.5	97.3
		胆汁	0~6 時間	2.6	16.0	-	-	4.3	-	-	2.7	25.6
ウサギ [CTD4.2.2.4-4 _U-1317]	155	尿	0~72 時間	5.6	14.5	-	0.4	0.5	0.8	-	0.1	21.9
		糞	0~120 時間	38.6	3.4	-	12.1	0.1	0.1	-	0.5	54.6
		尿+糞	0~72 (120) 時間	44.1	18.0	-	12.5	0.5	0.9	-	0.5	76.5
		胆汁	0~6 時間	-	2.1	-	-	-	-	-	-	2.1
		尿	0~48 時間	2.0	0.9	0.4	-	0.2	-	-	1.7	5.0
イス [CTD4.2.2.4-3 _U-1057]	100	糞	0~72 時間	76.6	-	-	-	-	-	-	6.6	83.2
		尿+糞	0~48 (72) 時間	78.6	0.9	0.4	-	0.2	-	-	8.3	88.3
		胆汁	4 時間	0.4	0.4	0.3	0.1	0.1	-	-	1.2	2.5
		尿	0~72 時間	0.7	3.7	0.2	0.1	0.7	1.9	1.2	0.6	9.1
ヒト [CTD 5.3.2.2-9 _U-1129]	0.26	糞	0~168 時間	59.7	-	-	24.0	-	-	0.6	0	84.3
		尿+糞	0~72 (216) 時間	60.3	3.7	0.2	24.1	0.7	1.9	1.8	0.6	93.4

a) 個別には, ヒトで 0.5%未満, ラットで 2.6%未満, マウスで 1.7%未満, イヌで 14%未満, ウサギで 0.6%未満。

表 10.1.1: 4 [14C]オロダテロールを様々な投与経路で単回投与したときの血漿中の代謝物パターン (pM 及び対投与量%)

動物種	投与経路	投与量 ^{b)} [μg/kg]	試料採取時間	オロダテロール	CD 992 (グルクロン 酸抱合体)	M565(2) (グルクロン 酸抱合体)	SOM 1522	CD 11249 (グルクロン酸 抱合体)	CD 10915 (グルクロン 酸抱合体)	CD 12656 (硫酸抱 合体)	非抽出性放射能 ^{a)}	その他 (累計) ^{c)}
マウス [CTD 4.2.2.4-2 U ₁₅₁₆]	静脈内	1000	1 時間 4 時間	17200 (4.2) 4800 (4.6)	228600 (55.1) 16600 (16.2)	8600 (2.1) -	6400 (1.5) 1200 (1.2)	14200 (3.4) 15900 (15.5)	- -	- -	139600 (33.7) 63900 (62.4)	- -
	気管内	1000	1 時間 4 時間	15500 (5.2) 3300 (5.9)	208800 (69.8) 15900 (28.5)	- 700 (1.2)	- -	32900 (11.0) 13200 (23.6)	- -	- -	41700 (14.0) 22700 (40.7)	- -
	経口	1000	1 時間 4 時間	3300 (4.1) 1400 (6.8)	27900 (34.6) 5600 (27.4)	3100 (3.8) 500 (2.2)	3800 (4.7) 500 (2.3)	15800 (19.6) 4500 (22.3)	- -	- -	26800 (33.2) 7900 (39.0)	- -
			20 分 3 時間	34200 (64.0) 7500 (30.9)	7200 (13.5) 2800 (11.5)	1000 (1.8) 1100 (4.5)	- -	3800 (7.1) -	- -	- -	5900 (11.1) 12900 (53.0)	1.4 (2.6) -
ラット [CTD 4.2.2.4-1 U ₁₅₁₄]	静脈内	155	20 分 3 時間	102200 (100.0) 4700 (40.6)	- 1900 (16.3)	- 700 (6.4)	- -	- -	- -	- -	- 4000 (34.7)	- 200 (1.9)
	気管内	155	20 分 3 時間	102200 (100.0) 4700 (40.6)	- 1900 (16.3)	- 700 (6.4)	- -	- -	- -	- -	- 4000 (34.7)	- 200 (1.9)
	経口	155	3 時間	100 (4.0)	1900 (61.6)	-	-	100 (4.0)	-	-	1000 (30.5)	-
ウサギ [CTD 4.2.2.4-4 U ₁₃₁₇]	静脈内	301	1 時間 6 時間	19600 (2.3) 48300 (4.9)	642100 (76.8) 782600 (79.6)	- -	- -	68800 (8.2) 61200 (6.2)	98500 (11.8) 84800 (8.6)	- -	- -	7000 (0.8) 6100 (0.6)
	十二指腸内	301	1 時間 6 時間	- -	477800 (98.5) 150900 (98.6)	- -	- -	2700 (0.6) 600 (0.4)	4500 (0.9) 1500 (1.0)	- -	- -	- -
	静脈内	30	20 分	7100 (66.1)	600 (5.6)	100 (1.1)	200 (2.3)	-	-	-	1800 (16.8)	900 (8.1)
	経口	100	4 時間	2100 (23.0)	2100 (23.6)	200 (2.0)	200 (1.9)	200 (2.5)	-	-	3900 (43.3)	500 (3.6)

表 10.1: 4 [¹⁴C]オロダテロールを様々な投与経路で単回投与したときの血漿中の代謝物パターン (pM 及び対投与量%) (続き)

動物種	投与経路	投与量 ^{b)} [μg/kg]	試料採取時間	オロダテロール	CD 992 (グルクロン酸抱合体)	M565(2) (グルクロン酸抱合体)	SOM 1522	CD 11249 (グルクロン酸抱合体)	CD 10915 (グルクロン酸抱合体)	CD 12656 (硫酸抱合体)	非抽出性放射能 ^{a)}	その他 (累計) ^{c)}
ヒト [CTD 5.3.2.2-9 U-1129]	静脈内	0.26	3.17 時間	96.6 (45.2)	52.3 (24.4)	-	-	9.1 (4.2)	46.9 (21.9)	-	9.0 (4.2)	-
			4 時間	36.2 (36.9)	24.7 (25.2)	-	-	7.4 (7.5)	24.1 (24.6)	-	5.7 (5.8)	-
			6 時間	<35 (40.0)	<13 (15.0)	-	<2 (1.7)	<8 (8.5)	<18 (19.9)	<5 (5.4)	<9 (9.5)	-
	経口	0.52	1 時間 2 時間 4 時間	12.9 (13.3) 12.6 (10.8) 9.6 (8.7)	50.2 (51.6) 65.6 (56.2) 61.7 (56.4)	6.3 (6.5) 3.0 (2.6) 2.2 (2.0)	4.8 (4.9) - -	5.3 (5.5) 9.5 (8.1) 10.3 (9.4)	13.2 (13.5) 20.8 (17.8) 21.0 (19.2)	4.5 (4.6) 4.0 (3.4) 4.4 (4.0)	- 1.3 (1.1) 0.3 (0.3)	- - -

a) ヒト血漿中の非抽出性放射能=動物血漿中の非抽出性放射能+m6

b) 実際の体重平均値を用いて計算したヒトデータ：76.5 kg (経口)，78.0 kg (静脈内)。

c) 個別には，ヒトで 0.5%未満，ラットで 2.6%未満，マウスで 1.7%未満，イヌで 14%未満，ウサギで 0.6%未満。

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

チオトロピウム+オロダテロール

表 10.1.5 ヒト (10 µg/50 kg) 及び安全性試験動物種 (NOAEL) におけるオロダテロール由来代謝物の血漿中濃度計算値 (pM)

動物種	投与経路	ADME試験における投与量 [µg/kg]	NOAEL ^{d)} [µg/kg]	NOAEL ^{d)} におけるオロダテロール濃度 ^{d)} (最高値) [pmol/L]	NOAEL ^{d)} におけるオロダテロール濃度 ^{d)} (平均値) [pmol/L]	試験採取時間 [¹⁴ C]ADME	オロダテロール ^{a)}	CD992 ^{a)}	M565(2) ^{a)}	SOM 1522 ^{a)}	CD 11249 ^{a)}	CD 10915 ^{a)}	CD 12656 ^{a)}	非抽出性放射能 ^{a), e)}
マウス	静脈内	1000				1時間 4時間	1090 303	14400 1050	544 -	404 76	897 1000	- -	- -	8820 4040
	気管内/ 吸入 ^{b)}	1000	63.2 (吸入)	4720	573	1時間 4時間	980 209	13200 1000	- 44	- -	2080 834	- -	- -	2640 1430
	経口	1000				1時間 4時間	209 88	1760 354	196 32	240 32	999 284	- -	- -	1690 499
ラット	静脈内	155	25 (静脈内)	19100	640	20分 3時間	5520 1210	1160 452	161 177	- -	613 -	- -	- -	952 2080
	気管内/ 吸入 ^{b)}	155	195 (吸入)	12800	1570	20分 3時間	12900 5910	- 2390	- 881	- -	- -	- -	- -	- 5030
	経口	155	50000 (経口)	1060000	196000	3時間	32300	613000	-	-	32300	-	-	323000
ウサギ	静脈内	301				1時間 6時間	63400 156000	2080000 2530000	- -	- -	223000 198000	319000 274000	- -	- -
	気管内/ 吸入 ^{b)}		974 (吸入)	30400	7583	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	十二指腸 内	301				1時間 6時間	-	1550000 488000	- -	- -	8740 1940	14600 4850	- -	- -
イヌ	静脈内	30	3.28 (静脈内)	21900	211	20分	776	66	11	22	-	-	-	197
	経口	100	⁵ (経口)	130	43	4時間	105	105	10	10	10	-	-	195

表 10.1.1: 5 ヒト (10 µg/50 kg) 及び安全性試験動物種 (NOAEL) におけるオロダテロール由来代謝物の血漿中濃度計算値 [pM]
(続き)

動物種	投与 経路	ADME 試 験におけ る投与量 [µg/kg]	NOAEL ^{e)} [µg/kg]	NOAEL ^{e)} に おけるオロ ダテロール 濃度 ^{d)} (最高値)	NOAEL ^{e)} に おけるオロ ダテロール 濃度 ^{d)} (平均値)	試料採取時 間[¹⁴ C]ADME	オロダテ ロール ^{a)}	CD992 ^{a)}	M565(2) ^{a)}	SOM 1522 ^{a)}	CD 11249 ^{a)}	CD 10915 ^{a)}	CD 12656 ^{a)}	非抽出性 放射能 ^{a), e)}
ヒト	静脈内	0.26 ^{b)}				3.17 時間	74.3	40.2	-	-	7.0	36.1	-	6.9
						4 時間	27.8	19.0	-	-	5.7	18.5	-	4.4
						6 時間	<26.9	<10.0	-	<1.5	<6.2	<13.8	<3.8	<6.9
	経口	0.52 ^{b)}				1 時間	5.0	19.3	2.4	1.8	2.0	5.1	1.7	-
						2 時間	4.8	25.2	1.2	-	3.7	8.0	1.5	0.5
						4 時間	3.7	23.7	0.8	-	4.0	8.1	1.7	0.1

動物データは有効数字 3 桁に丸めた。

- a) [¹⁴C]ADME データに基づいて、ヒトでは 10 µg/50 kg, 安全性試験に用いた動物種では毒性試験の NOAEL に外挿した計算値。
b) 実際の体重平均値を用いて計算したヒトデータ：76.5 kg (経口), 78.0 kg (静脈内)。
c) 毒性試験の雄及び雌の平均値 (マウス：CTD4.2.3.2-1_U-1341/ラット：CTD4.2.3.2-9_U-1375, CTD4.2.3.2-10_U-2334 及び CTD4.2.3.2-6_U-1691/ウサギ：CTD4.2.3.5.2.3_U-1019/イス：CTD4.2.3.2-21_U-1051 及び CTD4.2.3.2-23_U-2169)。
d) 毒性試験の NOAEL における AUC_{0-24h/24}に基づいて計算したオロダテロール濃度平均値 (雄及び雌の平均値)。
e) ヒト血漿中の非抽出性放射能=動物血漿中の非抽出性放射能+^{m6}
f) i.t.：気管内投与 ([¹⁴C]薬物代謝試験), i.h.：吸入投与 (毒性試験)
マウス (気管内, 静脈内及び経口：CTD4.2.2.4-2_U-1516), ラット (気管内, 静脈内及び経口：CTD4.2.2.4-1_U-1514), ウサギ (静脈内及び十二指腸内：CTD4.2.2.4-4_U-1317), イス (静脈内及び経口：CTD4.2.2.4-3_U-1057), ヒト (静脈内及び経口：CTD 5.3.2.2-9_U-1129)

2.6.4. 薬物動態試験の概要文

チオトロピウム+オロダテロール

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

表 10.1: 6 $[^{14}\text{C}]$ オロダテロールを投与したときの放射能の血漿蛋白結合率

動物種	投与経路	投与量 (表示量) [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	試料採取時間	非抽出性放射能		
				[対試料中放射能%]	[nmol/L]	[(nmol/L) / ($\mu\text{g}/\text{kg}$)] ^{a)}
マウス	静脈内	1000	1 時間	33.7	139.6	0.140
			4 時間	62.4	63.9	0.064
	気管内	1000	1 時間	14.0	41.7	0.042
			4 時間	40.7	22.7	0.023
	経口	1000	1 時間	33.2	26.8	0.027
			4 時間	39.0	7.9	0.008
ラット	静脈内	156	20 分	11.1	5.9	0.038
			3 時間	53.0	12.9	0.083
	気管内	156	20 分	-	-	-
			3 時間	34.7	4.0	0.026
	経口	156	3 時間	30.5	1.0	0.006
ウサギ	静脈内	300	1 時間	-	-	-
			6 時間	-	-	-
	十二指腸内	300	1 時間	-	-	-
			6 時間	-	-	-
イヌ	静脈内	30	20 分	16.8	1.8	0.060
	経口	100	4 時間	43.3	3.9	0.039
ヒト	静脈内	0.26 ^{b)}	3.17 時間	4.2	0.009	0.035
			4 時間	5.8	0.006	0.022
			6 時間	9.5	<0.009	<0.03
	経口	0.52 ^{b)}	1 時間	-	-	-
			2 時間	1.1	0.001	0.002
			4 時間	0.3	<0.001	<0.002

a) 投与量で補正。

b) 実際の体重平均値を用いて計算した値：76.5 kg (40 μg , 経口), 78.0 kg (20 μg , 静脈内)
 マウス (CTD4.2.2.4-2_U-1516), ラット (CTD4.2.2.4-1_U-1514), ウサギ (CTD4.2.2.4-4_U-1317),
 イヌ (CTD4.2.2.4-3_U-1057), ヒト (CTD 5.3.2.2-9_U-1129)

10.2 チオトロピウム+オロダテロール

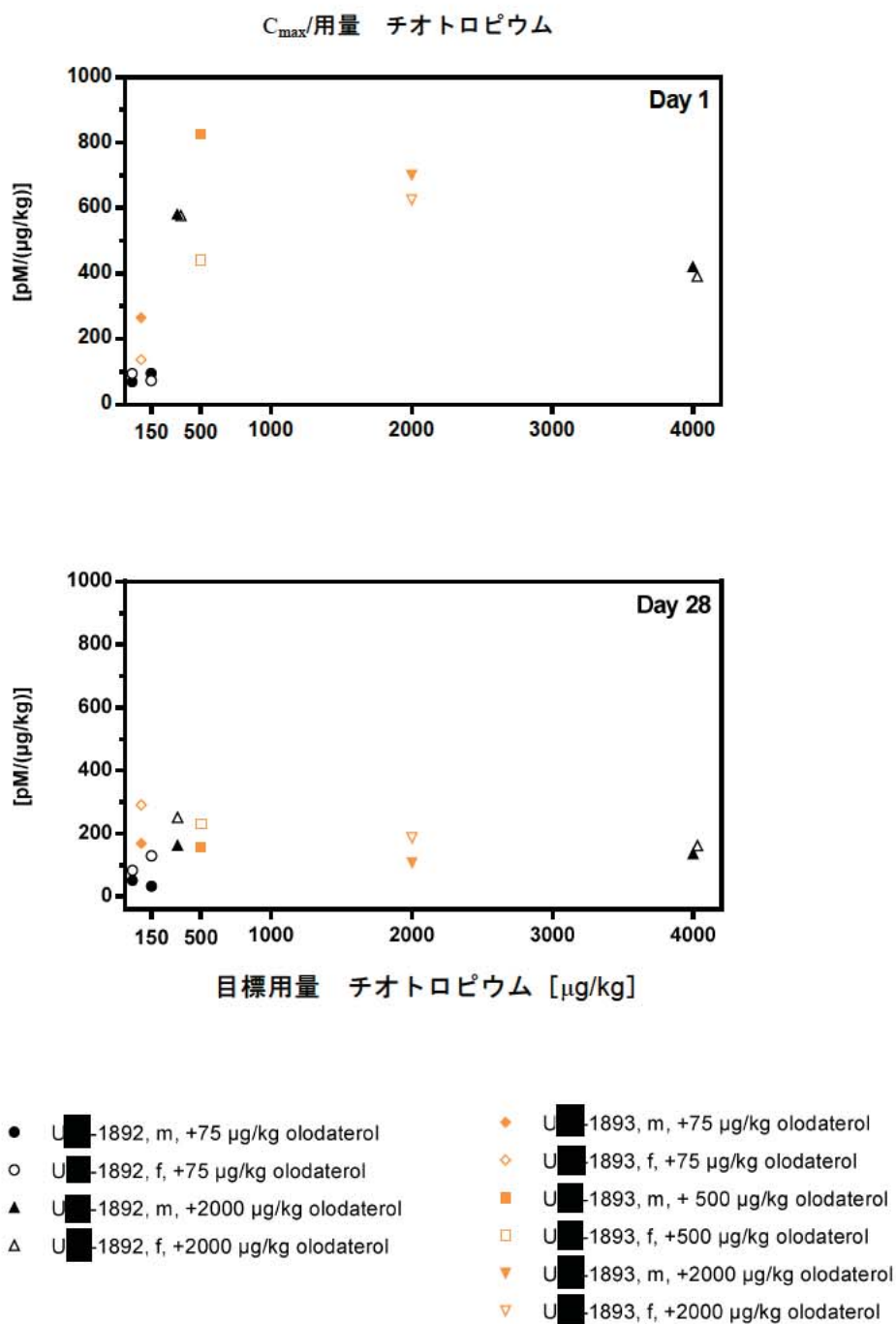


図 10.2: 1 ラット反復吸入投与毒性試験の1日目（上のパネル）及び28日目（下のパネル）におけるチオトロピウムの用量補正した平均最高血漿中濃度（ C_{max} ）の要約（CTD 4.2.3.2-8_U-1892, CTD 4.2.3.2-7_U-1893）

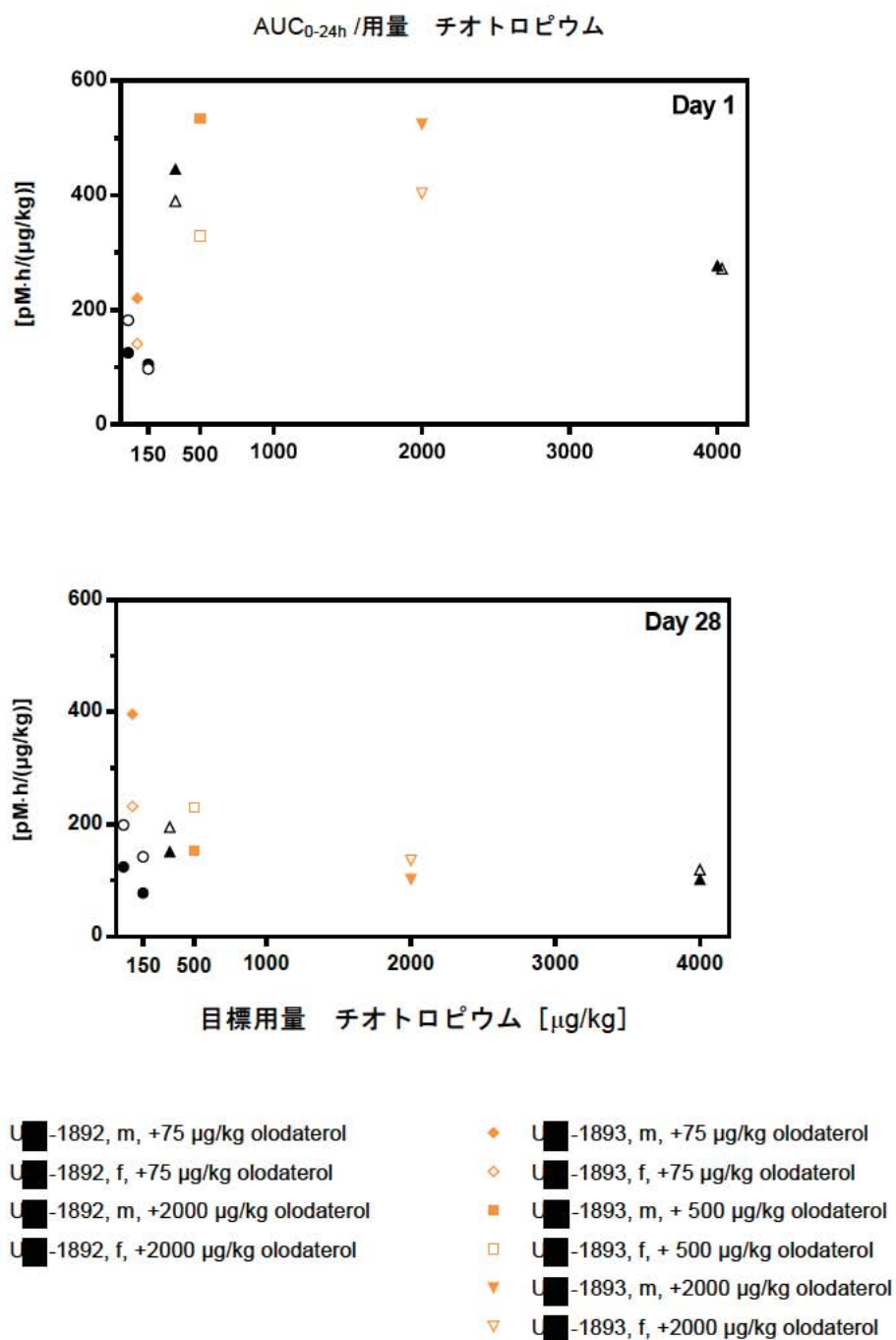


図 10.2: 2

ラット反復吸入投与毒性試験の1日目（上のパネル）及び28日目（下のパネル）におけるチオトロピウムへの用量補正した平均曝露量（AUC_{0-24h}）の要約（CTD 4.2.3.2-8_U-1892, CTD 4.2.3.2-7_U-1893）

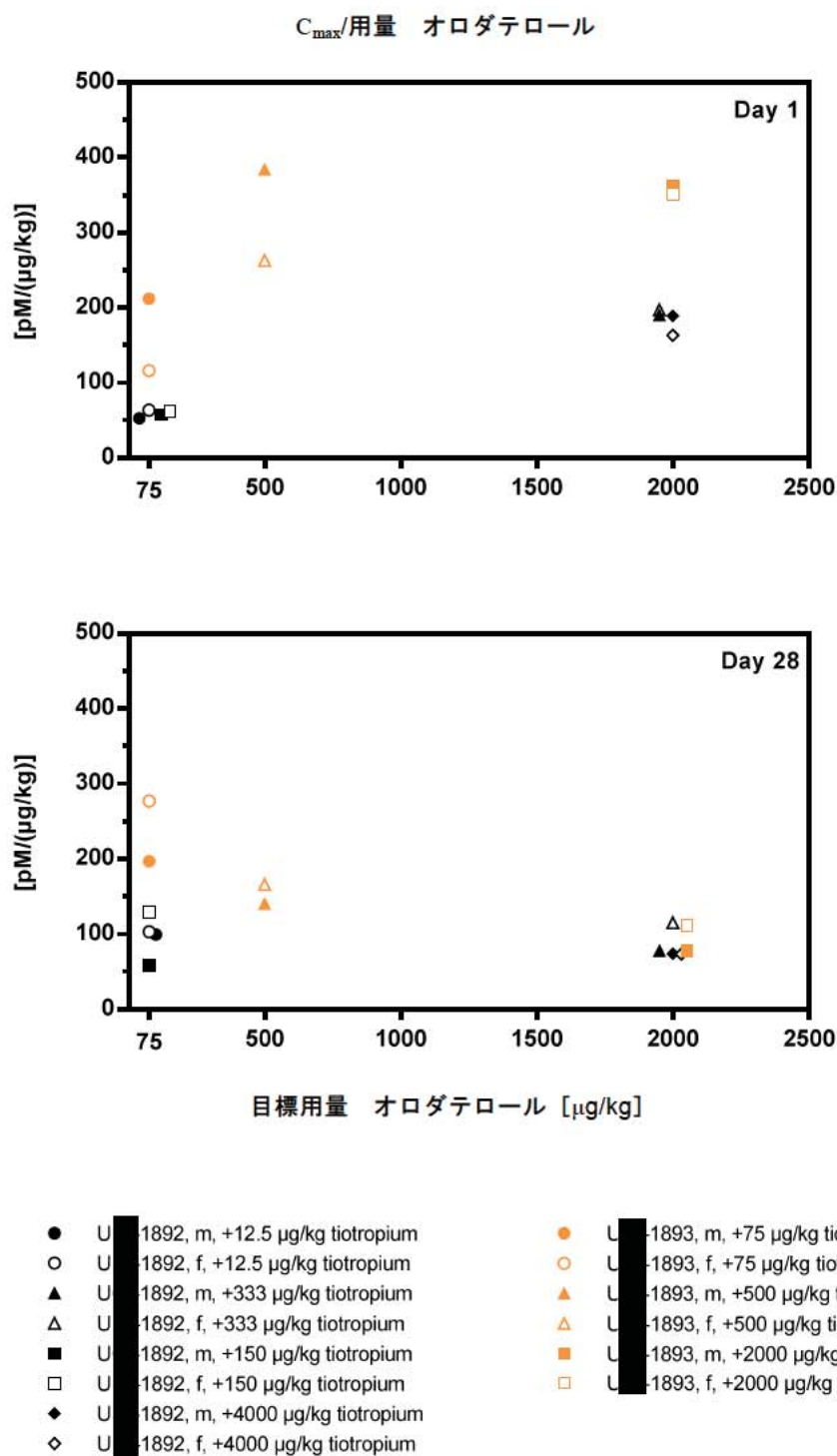


図 10.2: 3 ラット反復吸入投与毒性試験の 1 日目 (上のパネル) 及び 28 日目 (下のパネル) におけるオロダテロールの用量補正した平均最高血漿中濃度 ($C_{\max}$) の要約 (CTD 4.2.3.2-8_U-1892, CTD 4.2.3.2-7_U-1893)

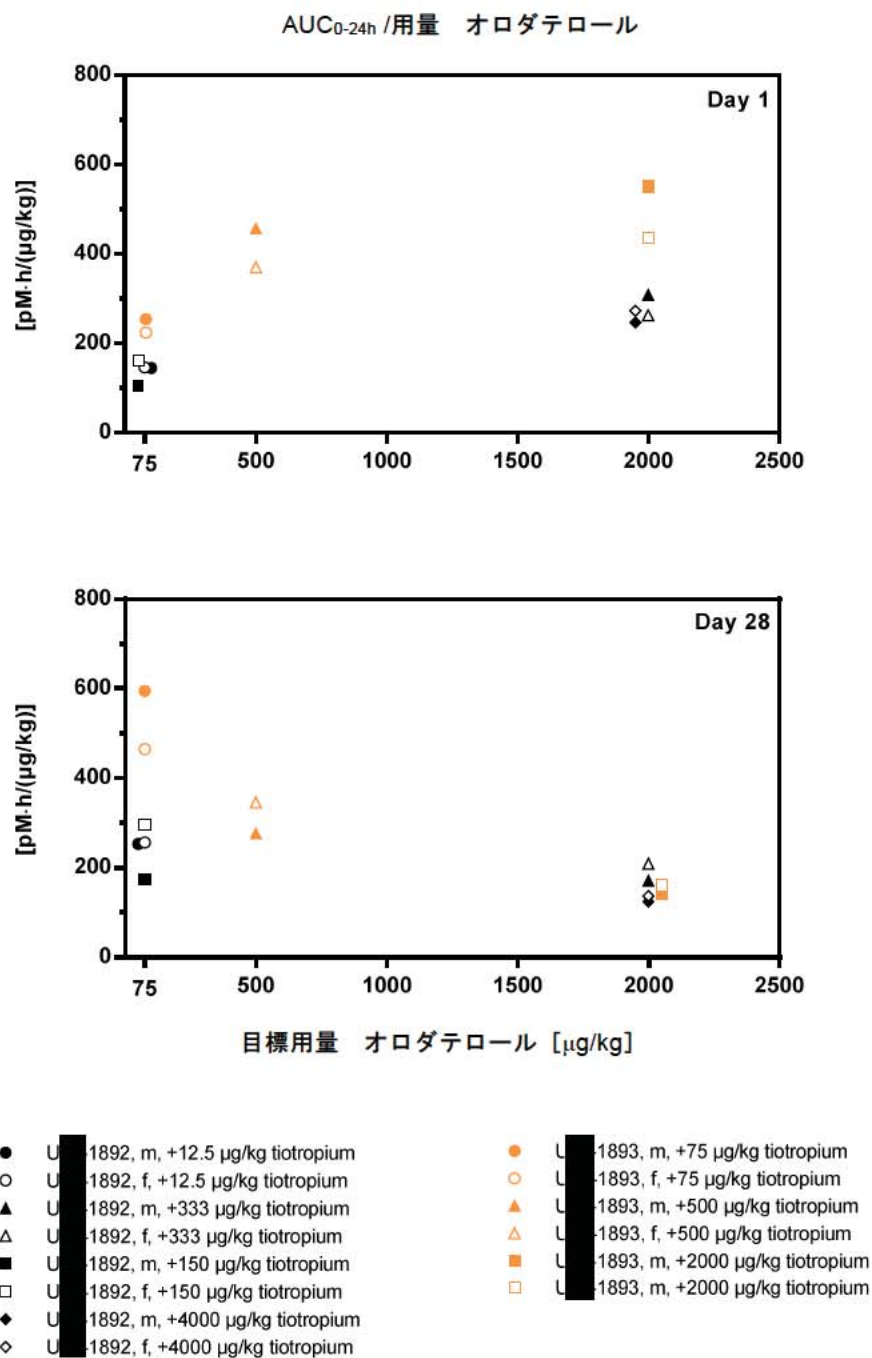


図 10.2: 4

ラット反復吸入投与毒性試験の1日目（上のパネル）及び28日目（下のパネル）におけるオロダテロールへの用量補正した平均曝露量（AUC_{0-24h}）の要約（CTD 4.2.3.2-8_U-1892, CTD 4.2.3.2-7_U-1893）

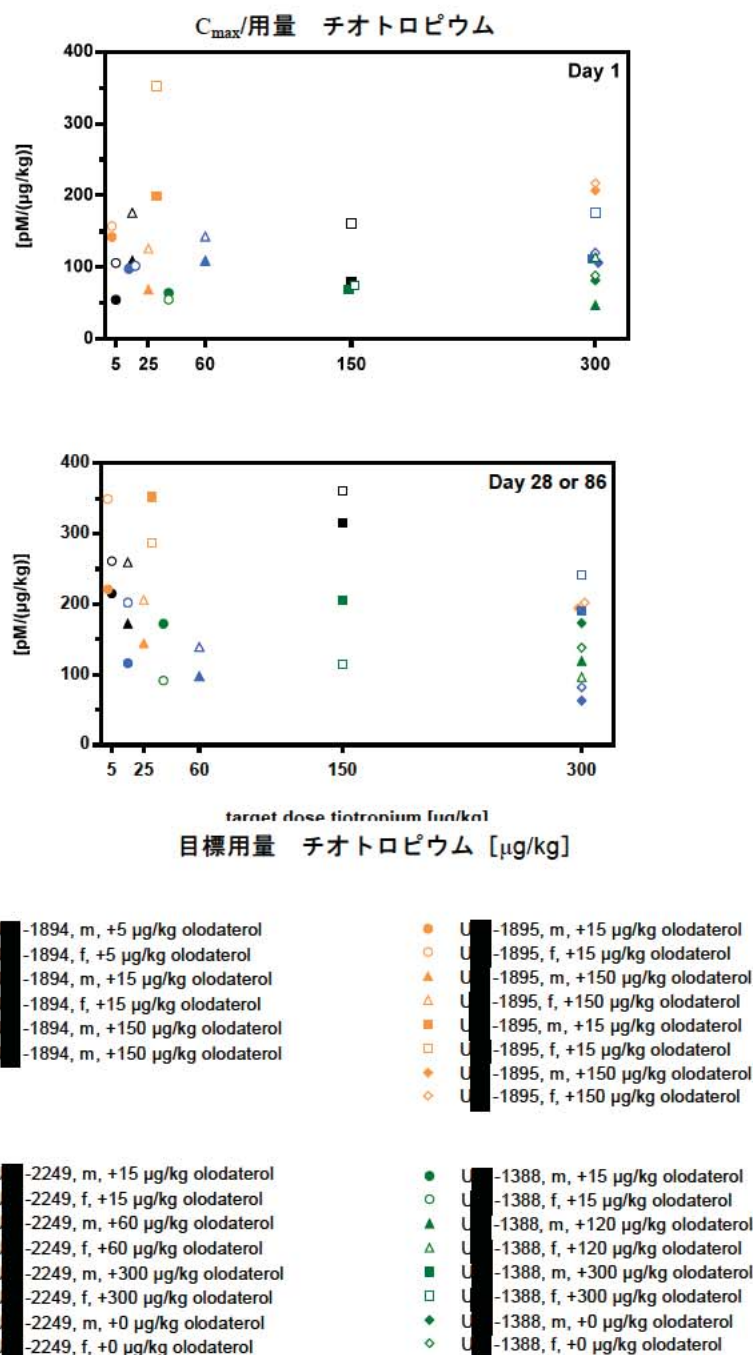


図 10.2: 5

イヌ反復吸入投与毒性試験の1日目（上のパネル）及び定常状態（下のパネル）；CTD 4.2.3.2-16_U-1894 及び CTD 4.2.3.2-17_U-1895：28日目，CTD 4.2.3.2-18_U-2249 及び CTD 4.2.3.2-19_U-1388：86日目におけるチオトロピウムの用量補正した平均最高血漿中濃度（ C_{max} ）の要約

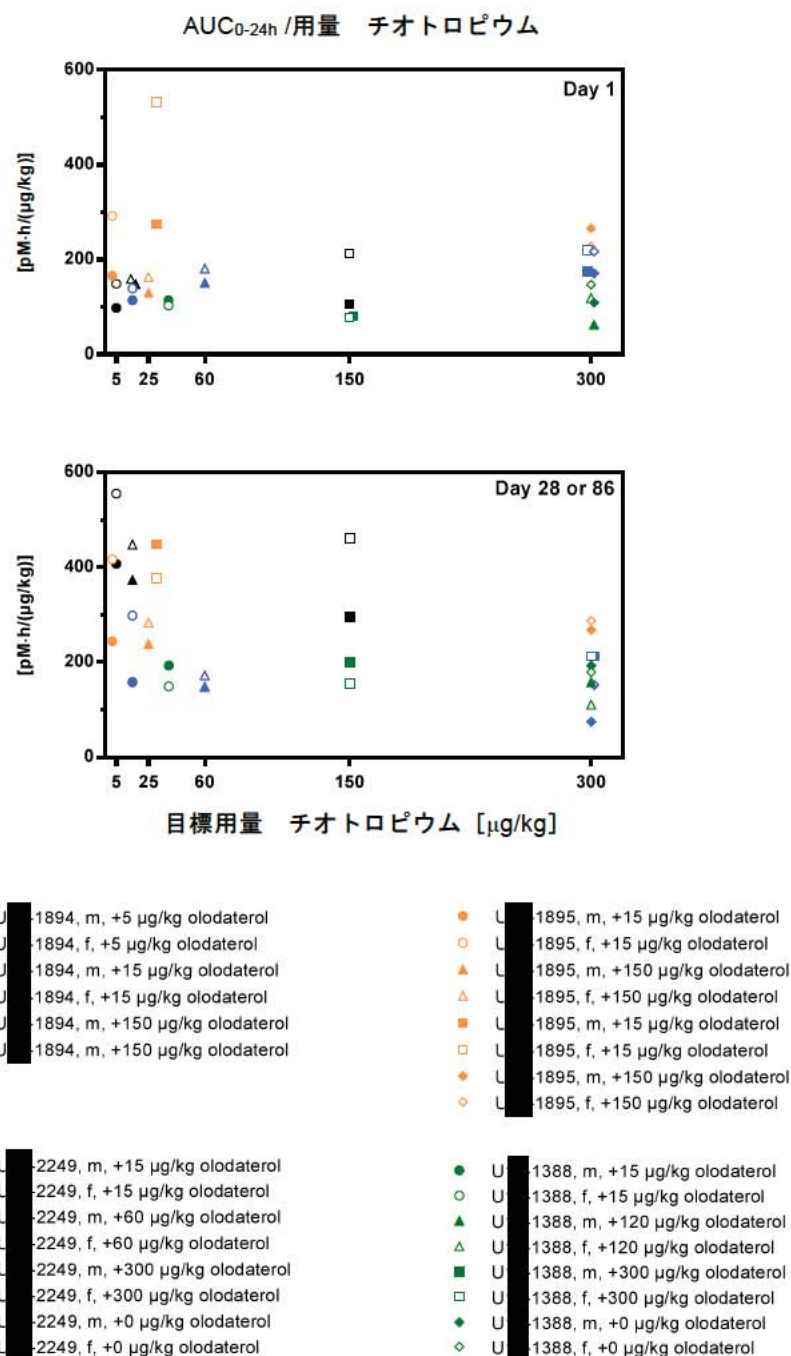


図 10.2: 6

イヌ反復吸入投与毒性試験の 1 日目（上のパネル）及び定常状態（下のパネル）；CTD 4.2.3.2-16_U-1894 及び CTD 4.2.3.2-17_U-1895：28 日目，CTD 4.2.3.2-18_U-2249 及び CTD 4.2.3.2-19_U-1388：86 日目におけるチオトロピウムへの用量補正した平均曝露量（AUC_{0-24h}）の要約

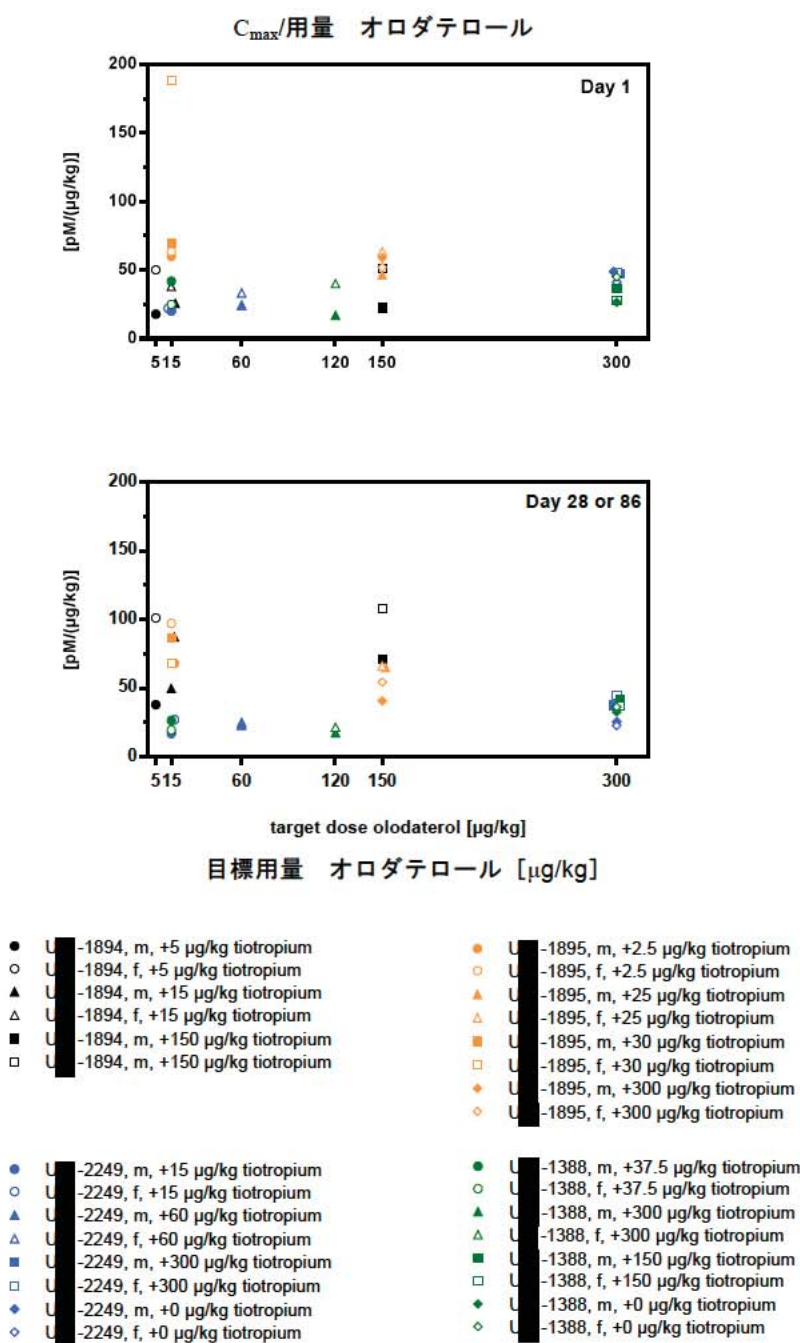
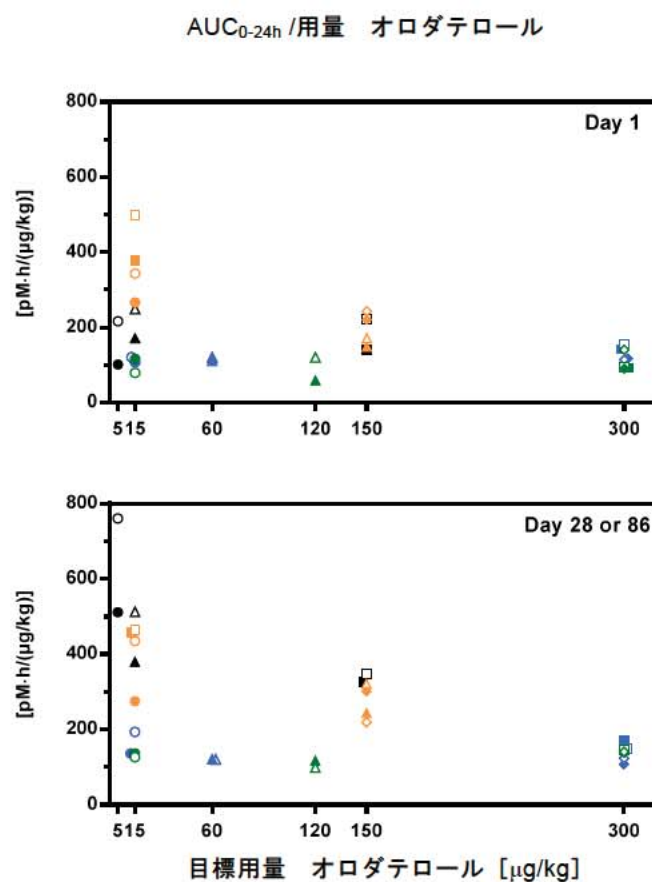


図 10.2: 7

イヌ反復吸入投与毒性試験の 1 日目（上のパネル）及び定常状態（下のパネル）；CTD 4.2.3.2-16_U-1894 及び CTD 4.2.3.2-17_U-1895：28 日目，CTD 4.2.3.2-18_U-2249 及び CTD 4.2.3.2-19_U-1388：86 日目におけるオロダテロールの用量補正した平均最高血漿中濃度（ C_{max} ）の要約



- U-1894, m, +5 μg/kg tiotropium
- U-1894, f, +5 μg/kg tiotropium
- ▲ U-1894, m, +15 μg/kg tiotropium
- △ U-1894, f, +15 μg/kg tiotropium
- U-1894, m, +150 μg/kg tiotropium
- U-1894, m, +150 μg/kg tiotropium

- U-1895, m, +2.5 μg/kg tiotropium
- U-1895, f, +2.5 μg/kg tiotropium
- ▲ U-1895, m, +25 μg/kg tiotropium
- △ U-1895, f, +25 μg/kg tiotropium
- U-1895, m, +30 μg/kg tiotropium
- U-1895, f, +30 μg/kg tiotropium
- ◆ U-1895, m, +300 μg/kg tiotropium
- ◇ U-1895, f, +300 μg/kg tiotropium

- U-2249, m, +15 μg/kg tiotropium
- U-2249, f, +15 μg/kg tiotropium
- ▲ U-2249, m, +60 μg/kg tiotropium
- △ U-2249, f, +60 μg/kg tiotropium
- U-2249, m, +300 μg/kg tiotropium
- U-2249, f, +300 μg/kg tiotropium
- ◆ U-2249, m, +0 μg/kg tiotropium
- ◇ U-2249, f, +0 μg/kg tiotropium

- U-1388, m, +37.5 μg/kg tiotropium
- U-1388, f, +37.5 μg/kg tiotropium
- ▲ U-1388, m, +300 μg/kg tiotropium
- △ U-1388, f, +300 μg/kg tiotropium
- U-1388, m, +150 μg/kg tiotropium
- U-1388, f, +150 μg/kg tiotropium
- ◆ U-1388, m, +0 μg/kg tiotropium
- ◇ U-1388, f, +0 μg/kg tiotropium

図 10.2: 8

イヌ反復吸入投与毒性試験の1日目（上のパネル）及び定常状態（下のパネル）；CTD 4.2.3.2-16_U-1894 及び CTD 4.2.3.2-17_U-1895：28日目，CTD 4.2.3.2-18_U-2249 及び CTD 4.2.3.2-19_U-1388：86日目におけるオロダテロールへの用量補正した平均曝露量（AUC_{0-24h}）の要約

第 2 部 CTD の概要

JAN あるいは販売名：	チオトロピウム臭化物水和物＋オロダテロール塩酸塩	
剤形・含量：	吸入剤（配合剤）・1 噴霧中チオトロピウム＋オロダテロール 2.5 µg/ 2.5 µg	
文書名：	2.6.5. 薬物動態試験概要表	
文書作成日：	1 September 2014	Page 1 of 137
Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies. All rights reserved. This document may not - in full or in part - be passed on, reproduced, published or otherwise used without prior written permission		

目 次

目 次	2
1.A 薬物動態試験の一覧表（オロダテロール単独投与）	4
1.B 薬物動態試験の一覧表（チオトロピウム+オロダテロール）	8
2. 分析方法及びバリデーション試験	9
3.A 薬物動態試験：単回投与後の吸収	10
3.B 薬物動態試験：単回投与後の吸収	13
3.C 薬物動態試験：単回投与後の吸収	15
3.D 薬物動態試験：単回投与後の吸収	17
3.E 薬物動態試験：単回投与後の吸収	20
3.F 薬物動態試験：単回投与後の吸収	22
3.G 薬物動態試験：単回投与後の吸収	24
3.H 薬物動態試験：単回投与後の吸収	26
3.I 薬物動態試験：単回投与後の吸収	28
3.J 薬物動態試験：単回投与後の吸収	32
3.K 薬物動態試験：単回投与後の吸収	34
3.L 薬物動態試験：単回投与後の吸収	36
4. 薬物動態試験：反復投与後の吸収	38
5.A 薬物動態試験：組織分布	39
5.B 薬物動態試験：組織分布	44
5.C 薬物動態試験：組織分布	47
6.A 薬物動態試験：蛋白結合	50
6.B 薬物動態試験：血球分配	53
6.C 薬物動態試験：血球分配	54
6.D 薬物動態試験：血球分配	55
7.A 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験	57
7.B 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験	58
8. 薬物動態試験：その他の分布試験	62
9.A 薬物動態試験：In Vivo 代謝，マウス	63
9.B 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ラット	66
9.C 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ラット反復	70
9.D 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ウサギ	71
9.E 薬物動態試験：In Vivo 代謝，イヌ	73

2.6.5. 薬物動態試験概要表

チオトロピウム+オロダテロール

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.F	薬物動態試験： <i>In Vivo</i> 代謝, ヒト	77
9.G	薬物動態試験： <i>In Vivo</i> 代謝, ヒト	79
9.H	薬物動態試験： <i>In Vivo</i> 代謝	80
10.A	薬物動態試験： <i>In Vitro</i> 代謝	83
10.B	薬物動態試験： <i>In Vitro</i> 代謝	96
10.C	薬物動態試験： <i>In Vitro</i> 代謝	98
11.A	薬物動態試験： 推定代謝経路	100
11.B	薬物動態試験： 推定代謝経路	101
12.A	薬物動態試験： 薬物代謝酵素の誘導／阻害	102
12.B	薬物動態試験： 薬物代謝酵素の誘導／阻害	105
12.C	薬物動態試験： 薬物代謝酵素の誘導／阻害	107
13.A	薬物動態試験： 排泄	109
13.B	薬物動態試験： 排泄	112
13.C	薬物動態試験： 排泄	113
13.D	薬物動態試験： 排泄	115
13.E	薬物動態試験： 排泄	116
14.A	薬物動態試験： 胆汁中排泄	117
14.B	薬物動態試験： 胆汁中排泄	119
14.C	薬物動態試験： 胆汁中排泄	120
15.A	薬物動態試験： 薬物相互作用	121
15.B	薬物動態試験： 薬物相互作用	123
15.C	薬物動態試験： 薬物相互作用	125
15.D	薬物動態試験： 薬物相互作用	126
15.E	薬物動態試験： 薬物相互作用	127
15.F	薬物動態試験： 薬物相互作用	129
15.G	薬物動態試験： 薬物相互作用	131
15.H	薬物動態試験： 薬物相互作用	133
15.I	薬物動態試験： 薬物相互作用	135
16.	薬物動態試験： その他	137

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1.A 薬物動態試験の一覧表（オロダテロール単独投与）

Test Article: Olodaterol

Type of Study	Species	Substance / Analyte	Type of method	Testing Facility	Report Number	Location in Module	
Analytical methods and validation reports	mouse	olodaterol	HPLC-MS/MS	BI	U-1852	CTD 4.2.2.1-6	
	rat, Han Wistar	olodaterol	HPLC-MS/MS	BI	U-1874	CTD 4.2.2.1-2	
	rat, Sprague Dawley	olodaterol	HPLC-MS/MS	BI	U-1960	CTD 4.2.2.1-4	
	rabbit	olodaterol	HPLC-MS/MS	BI	U-1888	CTD 4.2.2.1-3	
	dog	olodaterol	HPLC-MS/MS	BI	U-1855	CTD 4.2.2.1-1	
	dog	olodaterol	HPLC-MS/MS	BI	U-1647	CTD 4.2.2.1-7	
	-	[14C]olodaterol	radio-synthesis	BI	U-2145	CTD 4.2.2.1-5	
	-	-	-	-	-	-	
Type of Study	Test System	Gender	Test item	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Module
Absorption	Human Caco-2	-	olodaterol, [14C]olodaterol	in vitro	BI	U-3378	CTD 5.3.2.3-1
	human MDR1	-	olodaterol, [14C]olodaterol	in vitro	BI	U-3424	CTD 5.3.2.3-2
	mouse	m	olodaterol	intravenous, oral	BI	U-1105	CTD 4.2.2.2-3
	rat	m&f	olodaterol	inhalation	BI	U-1351	CTD 4.2.2.2-5
	rat	m&f	olodaterol	intratracheal, intravenous, oral	BI	U-2124	CTD 4.2.2.2-1
	rat	m	olodaterol, [14C]olodaterol	intravenous, oral	BI	U-2038	CTD 4.2.2.2-4
	dog	m&f	olodaterol	inhalation	BI	U-1592	CTD 4.2.2.2-6
	dog	m&f	olodaterol	intravenous, oral	BI	U-2163	CTD 4.2.2.2-2
	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1.A 薬物動態試験の一覧表（オロダテロール単独投与）（続き）
Test Article: Olodaterol

Type of Study	Test System	Gender	Test item	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Module
Distribution	mouse, rat	m	[¹⁴ C]olodaterol, [¹⁴ C]salmeterol	intravenous	BI	U-1723	CTD 4.2.2.3-3
	mouse, rabbit, human	m&f, f, m&f	[¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-1533	CTD 4.2.2.3-2
	rat, dog, human	m&f	[¹⁴ C]olodaterol	in vitro	[REDACTED]	U-1983 ^a	CTD 5.3.2.1-1
	rat, dog, human	m&f	[³ H]olodaterol	in vitro		U-2233	CTD 5.3.2.1-2
	human	m&f	[³ H]olodaterol	in vitro		U-1883	CTD 5.3.2.1-3
	rat	m	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal, intravenous, oral	BI	U-1974	CTD 4.2.2.3-1
Metabolism	rat	m	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal	BI	U-1602	CTD 4.2.2.3-4
	rat	f	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal	BI	U-4128	CTD 4.2.2.3-5
	human	-	[¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-1439	CTD 5.3.2.2-2
	human	-	olodaterol, SOM1522	in vitro	BI	U-1331	CTD 5.3.2.2-12
	rat, human	-	[¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-1659	CTD 5.3.2.2-6
	human	-	olodaterol	in vitro	BI	U-1043	CTD 5.3.2.2-1
	human	-	olodaterol	in vitro	BI	U-1076	CTD 5.3.2.2-11
	human	-	CD 992	in vitro	BI	U-2417	CTD 5.3.2.2-10
	mouse	m&f	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal, intravenous, oral	BI	U-1516	CTD 4.2.2.4-2
	rat	m&f	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal, intravenous, oral	BI	U-1514	CTD 4.2.2.4-1
	rat	m	[¹⁴ C]olodaterol	intraduodenal	BI	U-1391	CTD 4.2.2.4-5
	rabbit	f	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal		U-1317	CTD 4.2.2.4-4
	dog	m&f	[¹⁴ C]olodaterol	intravenous, oral		U-1057	CTD 4.2.2.4-3

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1.A 薬物動態試験の一覧表（オロダテロール単独投与）（続き）

Test Article: Olodaterol

Type of Study	Test System	Gender	Test item	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Module
Metabolism	human hepatocytes, mouse, rat, dog, human	m&f, m (human)	[¹⁴ C]olodaterol, olodaterol (human)	in vitro (hepatocytes), intratracheal / intravenous /oral (mouse and rat) ; intravenous /oral (dog), inhalation (human) inhalation intravenous, oral	BI	U-2170	CTD 5.3.2.2-8
Excretion	human	m	olodaterol	inhalation	BI	U-1515	CTD 5.3.2.2-3
	human	m	[¹⁴ C]olodaterol	intravenous, oral	BI	U-1129	CTD 5.3.2.2-9
	mouse	m&f	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal, intravenous, oral	BI	U-2458	CTD 4.2.2.5-5
	rat	m	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal, intravenous, oral, intraduodenal	BI	U-1007	CTD 4.2.2.5-1
	rat	f	[¹⁴ C]olodaterol	intravenous	BI	U-1214	CTD 4.2.2.5-4
	rat	m	[¹⁴ C]olodaterol	intratracheal	BI	U-1602	CTD 4.2.2.3-4
	rabbit	f	[¹⁴ C]olodaterol	intravenous, oral, intraduodenal	BI	U-1337	CTD 4.2.2.5-3
	dog	m&f	[¹⁴ C]olodaterol	intravenous, oral	BI	U-1739	CTD 4.2.2.5-2

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1.A 薬物動態試験の一覧表（オロダテロール単独投与）（続き）
Test Article: Olodaterol

Type of Study	Test System	Gender	Test item	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Module
Pharmacokinetic Drug Interactions	human	-	[¹⁴ C]tiotropium	in vitro	BI	U-1057	CTD 5.3.2.2-13
	human	-	[¹⁴ C]開発コード , [¹⁴ C]CD 1857	in vitro	BI	U-1561	CTD 5.3.2.2-7
	human	-	[¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-1534	CTD 5.3.2.2-4
	human	-	[¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-1541	CTD 5.3.2.2-5
	human	-	olodaterol, [¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-3361	CTD 5.3.2.3-3
	human	-	olodaterol, [¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-1315	CTD 5.3.2.3-4
	human	-	[¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-1586	CTD 5.3.2.3-5
	rat	m&f	olodaterol, tiotropium	inhalation	BI	U-2470	CTD 4.2.2.6-2
	dog	m&f	olodaterol, tiotropium	inhalation	BI	U-2446	CTD 4.2.2.6-1
Other	-	-	-	-	-	-	-

a GLP compliant study

Abbreviations:

BI = Boehringer Ingelheim

m = male

f = female

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

1.B 薬物動態試験の一覧表（チオトロピウム+オロダテロール） Test Article: tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

Type of Study	Species	Substance / Analyte	Type of method	Testing Facility	Report Number	Location in Module
Analytical methods and validation reports	rat, Han Wistar	tiotropium	HPLC-MS/MS	BI	U-2212	CTD 4.2.2.1-9
	dog	tiotropium	HPLC-MS/MS	BI	U-2164	CTD 4.2.2.1-8
	rat, Han Wistar	olodaterol	HPLC-MS/MS	BI	U-1874	CTD 4.2.2.1-2
	dog	olodaterol	HPLC-MS/MS	BI	U-1855	CTD 4.2.2.1-1

Type of Study	Test System	Gender	Test item	Method of Administration	Testing Facility	Report Number	Location in Module
Absorption	-	-	-	-	-	-	-
Distribution	-	-	-	-	-	-	-
Metabolism	-	-	-	-	-	-	-
Excretion	-	-	-	-	-	-	-
Pharmacokinetic Drug Interactions	human liver microsomes	-	olodaterol + [¹⁴ C]tiotropium	in vitro	BI	U-1057	CTD 5.3.2.2-13
	human liver microsomes	-	tiotropium + [¹⁴ C]olodaterol	in vitro	BI	U-1541	CTD 5.3.2.2-5
	rat	m & f	tiotropium + olodaterol	inhalation	BI	U-2470	CTD 4.2.2.6-2
	dog	m & f	tiotropium + olodaterol	inhalation	BI	U-2446	CTD 4.2.2.6-1
Other	-	-	-	-	-	-	-

Abbreviations:

BI = Boehringer Ingelheim
m = male
f = female

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

2. 分析方法及びバリデーション試験

Test Article: tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

分析法およびバリデーションについては概要文 [CTD 2.6.4_2 項] に記載した。

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.A 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-1

Report No.: U-3378

Study No.: PK0720T

Test items: olodaterol, reference compounds

Test system: Caco-2, human

Type of study: *In vitro* assessment of the intestinal permeability (passive permeability and active transport) of olodaterol and its interaction with P-glycoprotein (P-gp)

Method: The permeability characteristics of olodaterol was investigated by using the human colon carcinoma derived cell line Caco-2. The Caco-2 cell line constitutively expresses the efflux transporter P-gp. Therefore, the active transport of olodaterol by P-gp and the inhibition of the P-gp-mediated digoxin transport by olodaterol was investigated using Caco-2 cells. *In vitro* apical-to-basal (AtoB) and basal-to-apical (BtoA) permeability studies were performed at 37°C with confluent Caco-2 cell monolayers. Suitability of the Caco-2 cell monolayers was ensured by measuring reference compounds for passive permeability (mannitol, atenolol and propranolol), and the reference P-gp substrate digoxin (with and without the P-gp inhibitors cyclosporin A and verapamil). The flux of radiolabeled olodaterol from apical to basolateral (AtoB = absorptive) or from basolateral to apical (BtoA = secretory) was assessed by measuring radioactivity concentrations in both apical and basolateral compartments and determining the apparent permeability coefficients (Papp) with and without P-gp inhibitors (stated above) and the MRP inhibitor MK-571. Inhibitory effect of olodaterol on P-gp was assessed by measuring Papp of digoxin at increasing olodaterol concentrations. Papp values and efflux ratios were expressed as a mean of N = 3 experiments conducted on three different days.

Tabulated summary:

Substrate	Conc ^a AtoB (μM)	Conc ^a BtoA (μM)	Inhibitor	Conc Inhibitor (μM)	Mean Papp AtoB (x 10 ⁻⁶ cm/s)	Mean Papp BtoA (x 10 ⁻⁶ cm/s)	Efflux ratio (Papp BtoA / Papp AtoB)
[¹⁴ C]mannitol	31.8	34.3	-	-	0.256	0.270	1.08
[³ H]atenolol	4.76	5.07	-	-	0.547	0.403	0.756
[³ H]propranolol	0.612	0.924	-	-	51.8	38.7	0.747
[¹⁴ C]WEB 2086 BS	64.2	70.5	-	-	1.69	15.8	9.51
[³ H]digoxin	0.752	0.894	-	-	1.83	11.3	6.40
[³ H]digoxin	0.722	0.749	cyclosporin A	12	5.43	3.34	0.634
[³ H]digoxin	0.838	0.799	verapamil	200	4.07	3.70	0.942

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.A 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）
Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-1

Report No.: U-3378

Study No.: PK0720T

Tabulated summary:

Substrate	Conc ^a (μM)	Inhibitor	Conc Inhibitor (μM)	Mean Papp AtoB (x 10 ⁻⁶ cm/s)	Mean Papp BtoA (x 10 ⁻⁶ cm/s)	Efflux ratio (Papp BtoA / Papp AtoB)
[¹⁴ C]olodaterol	10	-	-	0.264	10.2	38.9
[¹⁴ C]olodaterol	30	-	-	0.278	9.48	34.9
[¹⁴ C]olodaterol	60	-	-	0.291	9.02	32.3
[¹⁴ C]olodaterol	100	-	-	0.330	7.46	23.1
[¹⁴ C]olodaterol	300	-	-	0.371	6.12	18.0
[¹⁴ C]olodaterol	600	-	-	0.483	4.31	9.45
[¹⁴ C]olodaterol	10	-	-	0.264	9.96	43.5
[¹⁴ C]olodaterol	10	cyclosporin A	12	1.51	1.46	0.966
[¹⁴ C]olodaterol	10	verapamil	200	1.05	1.77	1.76
[¹⁴ C]olodaterol	10	MK-571	25	0.263	9.59	36.7
[³ H]digoxin	1.0	-	-	1.83	11.3	6.40
[³ H]digoxin	1.0	olodaterol	10	1.65	11.6	7.20
[³ H]digoxin	1.0	olodaterol	30	1.82	10.7	6.49
[³ H]digoxin	1.0	olodaterol	60	2.10	10.3	4.98
[³ H]digoxin	1.0	olodaterol	100	2.78	8.90	3.29
[³ H]digoxin	1.0	olodaterol	300	3.92	8.38	2.22
[³ H]digoxin	1.0	olodaterol	600	5.04	5.88	1.17
[³ H]digoxin	1.0	cyclosporin A	12	5.43	3.34	0.634
[³ H]digoxin	1.0	verapamil	200	4.07	3.70	0.942

^a actual or target concentration

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.A 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-1

Report No.: U-3378

Study No.: PK0720T

Transport direction	Kinetic parameters of olodaterol		
	Km (μM)	Intrinsic passive permeability (x10 ⁻⁶ cm/s)	IC ₅₀ (μM)
AtoB	439	0.598	427
BtoA	245	2.25	303
Mean	342	1.42	365

Additional Information:

The apically directed transport of olodaterol showed concentration dependency and P-gp inhibitors diminished this vectorial transport, indicating that olodaterol is a substrate of P-gp.

The apparent Km values, determined by curve-fitting assuming Michaelis-Menten kinetics for the active transport and a non-saturable passive permeability coefficient, were 439 μM in the AtoB direction and 245 μM in the BtoA direction with a mean Km value of 342 μM. These Km values suggest that olodaterol is a substrate for P-gp with low affinity. The intrinsic passive permeability of olodaterol was 0.6 to 2.3x10⁻⁶ cm/s, which ranged between the low permeability references, mannitol and atenolol, and the high permeability reference propranolol.

Olodaterol was found to be a P-gp inhibitor with low affinity and an IC₅₀ value of 365 μM.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.B 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-2

Report No.: U-3424

Study No.: PK0724T

Test item: olodaterol

Test system: Parental LLC-PK1 cells and human MDR1-expressing LLC-PK1 cells (origin of LLC-PK1 cells: porcine)

Type of study:

In vitro study to investigate whether olodaterol is a substrate and/or inhibitor of P-glycoprotein (P-gp)

Method:

By comparing the transport profile of olodaterol between parental and MDR1-expressing LLC-PK1 cells, the presence of the active transport of olodaterol by P-gp was assessed. The inhibition of the P-gp-mediated digoxin transport by olodaterol was investigated. In vitro apical-to-basal (AtoB) and basal-to-apical (BtoA) permeability studies were performed at 37°C with confluent parental and MDR1-expressing cell monolayers.

The flux of radiolabeled olodaterol from apical to basolateral (AtoB = absorptive) or from basolateral to apical (BtoA = secretory) was assessed by measuring radioactivity concentrations in both apical and basolateral compartments and determining the apparent transport with and without P-gp inhibitors (cyclosporine A and zosuquidar). Inhibitory effect of olodaterol on P-gp was assessed by measuring the transport of digoxin at increasing olodaterol concentrations.

Tabulated summary:

Substrate	Conc (μM)	Inhibitor	Conc Inhibitor (μM)	Transport (μL/90 min/cm ²)				ER ^{MDR1} /parent	ER ^{MDR1}
				MDR1 (BtoA)		Parent (BtoA)			
				mean	mean	mean	mean		
[¹⁴ C]olodaterol	20	-	-	38.8	17.6	9.06	1.23	18.9	38.9
[¹⁴ C]olodaterol	60	-	-	41.8	15.8	9.89	0.936	29.0	48.7
[¹⁴ C]olodaterol	100	-	-	44.1	18.6	11.7	2.10	13.6	21.4
[¹⁴ C]olodaterol	200	-	-	38.3	14.4	9.47	1.05	25.6	38.4
[¹⁴ C]olodaterol	300	-	-	39.2	13.2	12.3	2.74	13.9	15.4
[¹⁴ C]olodaterol	600	-	-	40.2	10.1	8.26	1.11	31.0	38.4
[¹⁴ C]olodaterol	20	cyclosporine A	12	10.8	14.0	11.0	11.7	0.791	1.03
[¹⁴ C]olodaterol	20	-	-	60.0	38.2	28.8	2.92	16.4	22.2
[¹⁴ C]olodaterol	20	zosuquidar	0.5	18.1	35.8	28.3	21.1	0.672	0.868

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.B 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-2

Report No.: U-3424

Study No.: PK0724T

Tabulated summary:

Substrate	Conc (μ M)	Inhibitor	Conc Inhibitor (μ M)	Transport (μ L/90 min/ cm^2)				ERMDR1/parent	ERMDR1
				MDR1 (BtoA) mean	Parent (BtoA) mean	Parent (AtoB) mean	MDR1 (AtoB) mean		
^3H]digoxin	0.1	-	-	58.5	30.7	24.5	4.18	11.4	14.3
^3H]digoxin	0.1	olodaterol	10	64.8	34.6	32.0	6.25	9.68	10.4
^3H]digoxin	0.1	olodaterol	60	65.9	34.2	27.8	5.09	10.7	13.0
^3H]digoxin	0.1	olodaterol	100	69.3	35.2	26.8	6.47	8.20	10.8
^3H]digoxin	0.1	olodaterol	300	58.8	29.8	23.3	4.74	9.75	12.5
^3H]digoxin	0.1	olodaterol	600	61.4	37.0	29.6	5.98	8.08	10.2
^3H]digoxin	0.1	cyclosporin A	12	26.2	28.8	24.3	22.0	0.979	1.18
^3H]digoxin	0.1	zosuquidar	0.5	23.9	29.5	22.7	17.7	1.02	1.34

Additional Information:

For this study, a suitable MDR1-expressing cell model was used to investigate whether olodaterol is a substrate and/or an inhibitor of P-gp. A higher BtoA transport of olodaterol was observed in MDR1-expressing cells and was not seen in parental LLC-PK1 cells ($\text{ERMDR1/parent} = 18.9$ or 16.4). Further, the transport of olodaterol was completely blocked by a fully inhibitory concentration of the P-gp inhibitor cyclosporine A or zosuquidar. These results suggest that olodaterol is a substrate of P-gp. Affinity of olodaterol for human P-gp was assessed by measuring bi-directional transport of olodaterol in the concentration range from 20 to 600 μ M. No remarkable change in the bi-directional transport of olodaterol was observed. Therefore, the K_m value is considered to be more than 600 μ M for AtoB and BtoA transport.

The effect of olodaterol on P-gp mediated digoxin transport was evaluated in the concentration range from 10 to 600 μ M. Olodaterol showed almost no inhibitory effect on P-gp mediated digoxin transport, indicating that olodaterol is not an inhibitor of P-gp within this concentration range.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.C 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-3

Report No.: U-1105

Study No.: A006/06JS

Species:		Mouse	Mouse
Strain:		CrI:CD1 (ICR)	CrI:CD1 (ICR)
Gender (M/F) / Number of animals:		24 M	30 M
Feeding condition:		fasted	fasted
Vehicle/Formulation:		phys. saline solution	tap water
Method of Administration:		intravenous bolus	oral (gavage)
Test item:		olodaterol	olodaterol
Dose (µmol/kg):		0.4	0.4
Dose (µg/kg):		155 (active moiety)	155 (active moiety)
Sample:		plasma	plasma
Sampling times:		0.0333, 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24 and 32 h	pre-dose, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8 and 24 h
Analyte:		olodaterol	olodaterol
Assay:		HP LC-MS/MS	HP LC-MS/MS
PK parameters ^a	Unit		
t _{max}	[h]	0.0333	1.0
C _{max}	[nmol/L]	354	0.616
AUC _{0-inf}	[(nmol•h)/L]	103	4.10
AUC _{0-24h}	[(nmol•h)/L]	98.6	4.10
CL or CL/F	[mL/min/kg]	64.5	1630
MRT _{dsp} or MRT _{tot}	[h]	3.79	3.99
t _{1/2}	[h]	13.2	1.84 ^b
V _{ss} or V _{ss} /F	[L/kg]	14.7	389
MAT	[h]	NA	0.2
F	[%]	NA	4.0

^a arithmetic mean of composite profile

^b might be underestimated due to the rapid fall of the plasma levels below LOQ

NA not applicable

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.C 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-3

Report No.: U■■-1105

Study No.: A006/06JS

Additional Information:

A single dose of olodaterol was administered intravenously or orally by gavage to male mice. The pharmacokinetics were assessed by measuring the plasma concentrations of olodaterol. After intravenous administration the plasma concentrations decreased steadily and the pharmacokinetics was characterized by a high distribution and by a high total systemic clearance. MRT_{disp} was moderate and $t_{1/2}$ was long. After oral administration the maximum plasma concentration of olodaterol was reached at 1 h followed by a rapid decrease due to a short half-life. MRT_{ot} was moderate. The calculated oral bioavailability was low.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

3.D 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Location in Module: CTD 4.2.2.2-5

Report No.: U-1351

Study No.: 06B234 PK

Species:	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat
Strain:	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)
Gender (M/F) / Number of animals:	5 M	5 F	5 M	5 F	5 M	5 F
Feeding condition:	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum
Vehicle/Formulation:	aqueous solution	aqueous solution	aqueous solution	aqueous solution	aqueous solution	aqueous solution
Method of Administration:	inhalation	inhalation	inhalation	inhalation	inhalation	inhalation
Test item:	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol
Target Dose (µg/kg):	50	50	200	200	4000	4000
Achieved Dose (µg/kg):	39.6 - 63.8	45.4 - 70.7	158 - 222	181 - 246	2780 - 3450	3110 - 3870
	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)
Sample:	plasma	plasma	plasma	plasma	plasma	plasma
Sampling times:	day 1 and day 177:	day 1 and day 177:	day 1 and day 177:	day 1 and day 177:	day 1 and day 177:	day 1 and day 177:
	0.583, 1, 2, 4, 8, 24 h	0.583, 1, 2, 4, 8, 24 h	0.583, 1, 2, 4, 8, 24 h	0.583, 1, 2, 4, 8, 24 h	0.583, 1, 2, 4, 8, 24 h	0.583, 1, 2, 4, 8, 24 h
Analyte:	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol
Assay:	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS
Group:	Group 2	Group 2	Group 3	Group 3	Group 4	Group 4

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.D 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-5

Report No.: U■■-1351

Study No.: 06B234 PK

Mean (%CV) data for pharmacokinetic parameters (Data with two significant digits):

Parameter	Unit	Day	Group 2 males	Group 2 females	Group 3 males	Group 3 females	Group 4 males	Group 4 females
C _{max} /Dose	[(pmol/L)/(μg/kg)]	1	55 (21)	46 (18)	77 (31)	64 (26)	91 (22)	75 (15)
		177	79 (22)	67 (26)	86 (25)	66 (16)	130 (22)	87 (13)
AUC ₀₋₁₇₇ /Dose	[(pmol·h)/L/(μg/kg)]	1	240 (24)	170 (27)	270 (30)	200 (38)	260 (35)	210 (26)
		177	210 (17)	160 (18)	370 (13)	180 (16)	320 (30)	220 (21)
CL/F	[mL/min/kg]	1	190 (26)	270 (23)	170 (26)	270 (57)	180 (26)	220 (24)
		177	210 (16)	280 (16)	160 (14)	250 (17)	150 (38)	210 (25)
V _{ss} /F	[L/kg]	1	120 (43)	120(29)	74 (20)	100 (36)	57 (35)	68 (19)
		177	120 (33)	150 (44)	110 (24)	140 (57)	92 (31)	90 (24)
t _{1/2}	[h]	1	8.5 (19)	6.6 (22)	6.7 (18)	6.4 (28)	5.0 (22)	5.4 (15)
		177	8.8 (31)	8.7 (32)	10 (23)	8.9 (38)	10 (21)	7.5 (26)
MRT _{tot}	[h]	1	10 (22)	7.2 (23)	7.3 (19)	6.9 (28)	5.3 (13)	5.4 (14)
		177	9.3 (35)	8.7 (35)	12 (29)	9.1 (42)	11 (27)	7.4 (26)
F	[%]	1	25.4	15.2	28.4	17.8	28.0	19.2
		177	NC	NC	NC	NC	NC	NC
MAT	[h]	1	5.68	2.73	2.86	2.47	0.89	0.89
		177	NC	NC	NC	NC	NC	NC

NC not calculated

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.D 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-5

Report No.: U■■-1351

Study No.: 06B234 PK

Additional Information:

Single dose pharmacokinetics (Day 1): The plasma concentrations of olodaterol increased rapidly and maximum plasma concentrations were reached directly after the inhalation administration (0.583 h). Thereafter, plasma concentrations decreased with an initial rapid decline up to about two hours and a slower decline thereafter up to 24 h. An overall mean $t_{1/2}$ of 6.47 h and an overall mean MRT_{tot} of 7.09 h were calculated. The overall mean CL/F was 180 mL/min/kg in males and 245 mL/min/kg in females. The overall mean V_{ss}/F was 89.7 L/kg. The estimated absolute bioavailability (F) was slightly higher in males (25 - 28%) than in females (15 - 19%). The mean absorption time (MAT) decreased with dose from 2.7 - 5.7 h at 50 µg/kg to 0.9 h at 4000 µg/kg. A sex difference might exist regarding CL/F and bioavailability F, whereas $t_{1/2}$, MRT_{tot} and V_{ss}/F were similar in both sexes. $t_{1/2}$, MRT_{tot} and V_{ss}/F decreased with dose. This dose effect, however, was only pronounced for MAT and in consequence somewhat for V_{ss}/F , which depends on MAT.

Steady state pharmacokinetics (Day 177): The plasma concentrations of olodaterol increased rapidly. The maximum plasma concentrations were reached directly at the end of inhalation administration (0.583 h). Thereafter, the plasma concentrations decreased biphasically with an initial rapid decline up to about two hours and a slower decline thereafter up to 24 h. The overall mean $t_{1/2}$ was 9.84 h in males and 7.24 h in females. The overall mean $MRT_{tot,ss}$ was 10.5 h in males and 7.47 h in females. The overall mean CL_{ss}/F was 176 mL/min/kg in males and 245 mL/min/kg in females. The overall mean V_{ss}/F was 117 L/kg. A minor sex difference might exist regarding CL_{ss}/F , $t_{1/2}$ and $MRT_{tot,ss}$, whereas V_{ss}/F was similar in both sexes. CL/F and V_{ss}/F decreased slightly with dose. Comparing Day 177 with Day 1, there might be a slight increase in $t_{1/2}$, MRT_{tot} and V_{ss}/F within the treatment period, whereas CL/F remained almost unchanged.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.E 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-1

Report No.: U-2124

Study No.: A118/04GR

Species:		Rat	Rat	Rat
Strain:		CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)
Gender (M/F) / Number of animals:		4 M / 4 F	4 M / 5 F	4 M / 4 F
Feeding condition:		fasted	fasted	fasted
Vehicle/Formulation:		phys. saline solution	phys. saline solution	water
Method of Administration:		intratracheal bolus	intravenous bolus	oral (gavage)
Test item:		olodaterol	olodaterol	olodaterol
Dose (μmol/kg):		0.4	0.4	0.4
Dose (μg/kg):		155 (active moiety)	155 (active moiety)	155 (active moiety)
Sample:		plasma	plasma	plasma
Sampling times:		0.0333, 0.116, 0.333, 1, 3, 8, 24 h	0.0333, 0.116, 0.333, 1, 3, 8, 24 h	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24 h
Analyte:		olodaterol	olodaterol	olodaterol
Assay:		HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS
PK parameters:	Unit			
t _{max}	[h]	0.166 - 0.333 ^a	0.033 ^a	0.25 - 4 ^a
C _{max}	[pmol/L]	48400	539000	429
AUC _{0-inf}	[pmol•h/L]	93200	159000	2770
CL	[mL/min/kg]	ND	43.3	ND
MRTdisp or MRTtot	[h]	4.28	4.16	6.48
t _{1/2}	[h]	5.44	5.81	4.41
V _{ss} or V _{ss} /F	[L/kg]	ND	10.7	ND
MAT	[h]	0.12	NA	2.32
F	[%]	58.6	NA	1.74

^a range

NA not applicable

ND not determined

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.E 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-1

Report No.: U■■-2124

Study No.: A118/04GR

Additional Information:

A single dose of olodaterol was administered intravenously, intratracheally or orally to male and female rats. The pharmacokinetics were assessed by measuring the plasma concentrations of olodaterol. The pharmacokinetics of olodaterol in males and females were similar with male to female ratios of C_{max} and AUC_{0-24h} between 0.729 and 1.16. After intravenous administration the plasma concentrations decreased triphasically and the pharmacokinetics was characterized by a high distribution and by a high total systemic clearance. MRT_{tot} and $t_{1/2}$ were moderately long. After intratracheal administration the plasma concentration increased rapidly to a C_{max} at 0.116 to 0.333 h. The intratracheal pharmacokinetics were characterized by a rapid and moderate bioavailability and a moderately long half-life in plasma. After oral administration the maximum plasma concentration of olodaterol was reached at 0.25 - 4 h. The oral pharmacokinetics were characterized by a slow and low bioavailability and a moderately long half-life in plasma.

3.F. 藥物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-4

Report No.: U-2038

Study No.: A033/06HH

Species:	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat
Strain:	Crl:WI(Han) 4 M	Crl:WI(Han) 4 M	Crl:WI(Han) 4 M	Crl:WI(Han) 4 M	Crl:WI(Han) 4 M	Crl:WI(Han) 4 M
Gender (M/F) / Number of animals:	fasted	fasted	fasted	fasted	fasted	fasted
Feeding condition:	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution
Vehicle/Formulation:	intravenous bolus olodaterol 0.4 155 (active moiety)	intravenous bolus olodaterol 0.4 155 (active moiety)	intravenous bolus olodaterol 0.4 155 (active moiety)	intravenous bolus olodaterol 0.4 155 (active moiety)	intravenous bolus olodaterol 0.4 155 (active moiety)	intravenous bolus olodaterol 0.4 155 (active moiety)
Method of Administration:	no	yes	no	yes	no	yes
Test item:	-	5% glucose solution	-	5% glucose solution	-	5% glucose solution
Dose (μmol/kg):	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS
Dose (μg/kg):	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS
Pre-Treatment with 5 μmol/kg LY 335979 CL3 (Zosuquidar):	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS
Formulation of Zosuquidar:	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS
Sample:	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS
Sampling times:	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS
Analyte:	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS
Assay:	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS	plasma 0.033, 0.117, 0.33, 1, 3, 8, 24 h olodaterol HPLC-MS/MS
PK parameters:	Unit	Unit	Unit	Unit	Unit	Unit
C _{max}	[pmol/L]	[pmol/L]	[pmol/L]	[pmol/L]	[pmol/L]	[pmol/L]
AUC _{0-8h}	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]
AUC _{0-24h}	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]	[pmol•h/L]

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.F 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-4

Report No.: U■■-2038

Study No.: A033/06HH

Additional Information:

Oral pre-treatment of rats with 5 μmol/kg Zosuquidar resulted in a distinct increase in the plasma concentrations of both, olodaterol and [¹⁴C]olodaterol-related radioactivity within three hours after oral dosing of olodaterol or [¹⁴C]olodaterol, respectively. Therefore, intestinal inhibition of P-gp results in a significant increase in oral absorption and oral bioavailability of olodaterol in the rat.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.G 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-1

Report No.: U-1007

Study No.: A117/04GR

Species:	Rat	Rat	Rat
Strain:	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)
Gender (M/F) / Number of animals:	5 M	5 M	5 M
Feeding condition:	fasted	fasted	fasted
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	phys. saline solution	water
Method of Administration:	intratracheal bolus	intravenous bolus	oral (gavage)
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (μmol/kg):	0.8	0.4	0.4
Dose (μg/kg):	311 (active moiety)	155 (active moiety)	155 (active moiety)
Sample:	blood	blood	blood
Sampling times:	0.0333, 0.117, 0.333, 1, 3, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.0333, 0.117, 0.333, 1, 3, 8, 24, 48 and 72 h	0.25, 0.5, 1, 3, 8, 24, 48 and 72 h
Analyte:	radioactivity	radioactivity	radioactivity
Assay:	LSC	LSC	LSC
PK parameters – radioactivity in blood	Unit		
t _{max} ^a	[h]	0.0333	0.25 - 3
C _{max} / dose	[nmol/L]/[μmol/kg]	1570	15.3
AUC _{0-inf} / dose	[nmol•h/L]/[μmol/kg]	3925	290
MRT _{disp} or MRT _{tot}	[h]	43.8	68.5
t _{1/2}	[h]	39.1	58.6

^a range

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.G 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-1

Report No.: U■■-1007

Study No.: A117/04GR

Additional Information:

The blood concentrations after intravenous administration decreased continuously over time and revealed a long MRT_{disp} and a long $t_{1/2}$ for the drug-related radioactivity. Blood concentrations after intratracheal administration increased rapidly and declined continuously revealing a long MRT_{tot} and a long $t_{1/2}$. Blood concentrations after oral administrations also revealed long MRT_{tot} and $t_{1/2}$.

The AUC values of radioactivity in blood after intravenous, intratracheal and oral administration indicate that olodaterol is poorly absorbed after oral dosing but well absorbed by the lung. The amount absorbed (Fa) calculated from the dose-normalized AUC_{0-inf} values was 7.39% after oral and 70.4% after intratracheal administration. The times to maximum blood concentrations indicate that the rate of absorption was moderate after oral dosing but was fast after intratracheal dosing.

2.6.5. 薬物動態試験概要表

チオトロピウム+オロダテロール

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

3.H 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Location in Module: CTD 4.2.2.5-3

Report No.: U-1337

Study No.: A013/07JS

Species:	Rabbit	Rabbit	Rabbit	Rabbit	Rabbit	Rabbit
Strain:	Chbb: NZW	Chbb: NZW	Chbb: NZW	Chbb: NZW	Chbb: NZW	Chbb: NZW
Gender (M/F) / Number of animals:	3 F	3 F	3 F	3 F	3 F	3 F
Feeding condition:	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution intravenous bolus	phys. saline solution intravenous bolus	phys. saline solution intravenous bolus	phys. saline solution intravenous bolus	water	water
Method of Administration:				oral (gavage)	oral (gavage)	oral (gavage)
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol					
Dose (mg/kg) and (μmol/kg):	0.3 (mg/kg), corresponds to 0.78 μmol/kg					
Dose (μg/kg):	301 (μg/kg) – calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol					
Sample:	blood	plasma	plasma	blood	plasma	plasma
Sampling times:	0.0333, 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.0333, 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.0333, 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h
Analyte:	radioactivity	radioactivity	olodaterol	radioactivity	radioactivity	olodaterol
Assay:	LSC	LSC	HPLC-MS/MS	LSC	LSC	HPLC-MS/MS
PK parameters – radioactivity/parent drug in blood /plasma	Unit					
t _{max} ^a	0.0333	0.0333	0.0333	0.75	0.75	0.583
C _{max}	3340	2260	1920	199	182	82.4 (0.07) ^b
AUC _{0-inf}	3850	2400	664	1130	952	424 (NC) ^b
AUC _{0-96 h}	3650	2190	662	1010	826	141 (0.16) ^b
MRT _{disp} or MRT _{tot}	23.0	28.6	7.75	52.2	40.6	8.46 (NC) ^b
t _{1/2}	27.5	37.3	14.5	46.1	39.3	9.59 (NC) ^b
CL	3.50	5.57	19.7	ND	ND	ND
V _{ss}	4.82	9.51	9.12	ND	ND	ND
F	NA	NA	NA	NA	NA	23.7 (0.03) ^b
a	median	b	the data included one questionable animal.	NA	not applicable	
NC	not calculated	ND	not determined			

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.H 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-3

Report No.: U■■-1337

Study No.: A013/07JS

Additional Information:

b: the data included one questionable animal. If it is excluded from the analysis the calculated bioavailability F would be 0.03%, the C_{max} would be 0.07 nmol/L and the AUC_{0-96 h} would be 0.16 nmol•h/L.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

3.I 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Location in Module: CTD 4.2.2.2-6

Report No.: U-1592

Study No.: 06B121 PK

Species:	Dog	Dog	Dog	Dog	Dog
Strain:	Beagle	Beagle	Beagle	Beagle	Beagle
Gender (M/F) / Number of animals:	4 M	4 F	4 M	4 F	6 M
Feeding condition:	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum	ad libitum
Vehicle/Formulation:	aqueous solution	aqueous solution	aqueous solution	aqueous solution	aqueous solution
Method of Administration:	inhalation	inhalation	inhalation	inhalation	inhalation
Test item:	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol
Target Dose (µg/kg):	15	15	60	60	300
Achieved Dose (µg/kg):	14.3 – 15.7 (active moiety)	13.5 – 16.3 (active moiety)	64.2 – 66.4 (active moiety)	56.8 – 71.3 (active moiety)	319 - 328 (active moiety)
Sample:	plasma	plasma	plasma	plasma	plasma
Sampling times:	day 1, day 72 and day 358: 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24 h	day 1, day 72 and day 358: 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24 h	day 1, day 72 and day 358: 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24 h	day 1, day 72 and day 358: 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24 h	day 1, day 72 and day 358: 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24 h
Analyte:	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol	olodaterol
Assay:	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS
Group:	Group 2	Group 2	Group 3	Group 3	Group 4

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.1 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Location in Module: CTD 4.2.2.2-6

Report No.: U-1592

Study No.: 06B121 PK

Test Article: Olodaterol

Mean (%CV) data for pharmacokinetic parameters (Data with two significant digits):

Parameter	Unit	Day	Group 2 males	Group 2 females	Group 3 males	Group 3 females	Group 4 males	Group 4 females
C _{max} / Dose	[(pmol/L)/ (µg/kg)]	1	13.8 (32.0)	26.6 (18.6)	30.6 (26.6)	44.9 (98.7)	40.8 (33.8)	34.9 (43.0)
		72	21.1 (37.5)	23.2 (14.8)	24.7 (76.8)	17.4 (33.8)	21.6 (50.4)	39.0 (27.9)
		358	24.3 (25.2)	27.3 (38.4)	24.4 (44.4)	20.8 (45.9)	28.2 (25.7)	28.1 (29.0)
AUC _{0-24h} / Dose	[(pmol·h)/L/ (µg/kg)]	1	84.1 (33.4)	143 (18.1)	121 (27.0)	150 (30.2)	156 (40.7)	139 (35.7)
		72	150 (16.5)	201 (24.3)	142 (35.1)	135 (19.3)	113 (17.7)	139 (30.6)
		358	137 (5.9)	230 (41.7)	120 (29.8)	139 (26.2)	144 (10.9)	123 (23.6)
CL/F	[mL/min/ kg]	1	484 (37.3)	252 (14.1)	321 (24.8)	263 (28.3)	272 (40.3)	279 (32.8)
		72	295 (18.8)	234 (20.7)	340 (43.4)	328 (17.2)	394 (17.8)	334 (28.1)
		358	315 (6.0)	207 (29.8)	387 (32.0)	324 (21.5)	302 (10.9)	365 (19.7)
V _{ss} /F	[L/kg]	1	324 (32.3)	197 (30.9)	211 (35.1)	174 (41.2)	163 (32.5)	211 (36.0)
		72	286 (33.2)	190 (39.9)	278 (49.4)	305 (37.9)	290 (31.7)	203 (42.5)
		358	321 (17.2)	210 (40.4)	331 (38.4)	276 (19.5)	208 (17.3)	245 (18.6)

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.1 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Location in Module: CTD 4.2.2.2-6

Report No.: U-1592

Study No.: 06B121 PK

Test Article: Olodaterol

Mean (%CV) data for pharmacokinetic parameters (Data with two significant digits):

Parameter	Unit	Day	Group 2		Group 3		Group 4	
			males	females	males	females	males	females
t _{1/2}		1	8.91 (11.4)	10.4 (17.6)	9.64 (14.6)	9.22 (9.0)	10.0 (22.9)	10.7 (18.0)
	[h]	72	12.4 (18.4)	10.6 (28.2)	11.0 (22.8)	11.8 (19.6)	10.2 (16.0)	9.26 (16.0)
		358	13.7 (18.9)	12.7 (17.7)	11.9 (16.3)	11.6 (16.2)	10.7 (8.8)	10.3 (4.3)
MRT _{tot}		1	11.4 (11.7)	12.9 (21.9)	10.8 (15.2)	10.7 (16.0)	10.7 (32.6)	12.7 (27.5)
	[h]	72	15.9 (18.4)	13.7 (30.9)	13.5 (30.7)	15.2 (24.7)	12.1 (18.4)	9.94 (15.6)
		358	17.0 (14.8)	16.4 (20.5)	14.4 (21.3)	14.4 (14.2)	11.4 (10.7)	11.2 (6.9)
F	[%]	1	5.8	10.1	8.2	10.1	10.9	9.9
MAT	[h]	1	0.12	1.62	-0.48	-0.58	-0.58	1.42

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.1 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-6

Report No.: U■■-1592

Study No.: 06B121 PK

Additional Information:

Single dose pharmacokinetics (Day 1): The plasma concentrations of olodaterol increased rapidly. The maximum plasma concentrations were reached shortly after the inhalation administration (median $t_{max} = 0.250 - 0.333$ h) consistent with a negligible mean absorption time (MAT) of -0.58 h to $+1.62$ h. Thereafter, plasma concentrations decreased in general biphasically with an initial decline up to about three hours and a slower decline thereafter up to 24 h. An overall mean $t_{1/2}$ of 9.90 h and an overall mean MRT_{tot} of 11.6 h were calculated. The overall mean CL/F was 307 mL/min/kg and the overall mean V_{ss}/F was 210 L/kg. The estimated absolute bioavailability (F) was 5.8 – 10.9%. No sex difference in the pharmacokinetics of olodaterol after single inhalation administration was obvious. In addition, the single dose pharmacokinetics was almost dose-proportional.

Steady state pharmacokinetics (Days 72 and 358): The plasma concentrations time-profiles on Day 72 and Day 358 were similar indicating steady state conditions. After inhalation administration of olodaterol, the plasma concentrations of olodaterol increased rapidly. The maximum plasma concentrations were reached shortly after the end of inhalation administration (median $t_{max} = 0.250 - 0.333$ h). Thereafter, the plasma concentrations decreased in general biphasically with an initial decline up to about three hours and a slower decline thereafter up to 24 h. The overall (Day 72&358; m&f) mean $t_{1/2}$ was 11.2 h. The overall mean $MRT_{tot,ss}$ was 13.4 h. The overall mean CL_{ss}/F was 323 mL/min/kg and the overall mean V_{ss}/F was 258 L/kg. No sex difference in the pharmacokinetics of olodaterol after repeated inhalation administration was obvious. In addition, the repeated dose pharmacokinetics was almost dose-proportional. Comparing Day 72 or 358 with Day 1, there might be a slight increase in $t_{1/2}$, MRT, CL/F and V_{ss}/F after repeated dose in comparison to single dose. However overall, there was no relevant change in the pharmacokinetics after repeated dose.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.J 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Location in Module: CTD 4.2.2.2-2

Report No.: U-2163

Study No.: A123/04GR

Test Article: Olodaterol

Species:	Dog	Dog
Strain:	Beagle	Beagle
Gender (M/F) / Number of animals:	2 M / 2 F	2 M / 2 F
Feeding condition:	fasted	fasted
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	tap water
Method of Administration:	intravenous bolus	oral
Test item:	olodaterol	olodaterol
Dose (µg/kg):	8.93 (active moiety)	8.93 (active moiety)
Sample:	plasma, urine	plasma, urine
Sampling times (plasma):	0, 0.0333, 0.117, 0.333, 1, 3, 8, 24, 32 and 48 h	0, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 32 and 48 h
Sampling times (urine):	0-8 h, 8-24 h, 24-32 h, 32-48 h	0-8 h, 8-24 h, 24-32 h, 32-48 h
Analyte:	olodaterol	olodaterol
Assay:	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS
PK parameters	Unit	
t _{max}	[h]	0.5 - 1.0 ^a
C _{max}	[pmol/L]	120
AUC _{0-inf}	[pmol•h/L]	1050
AUC _{0-24h}	[pmol•h/L]	764
CL or CL/F	[mL/min/kg]	ND
MRT _{disp} or MRT _{tot}	[h]	16.1
t _{1/2}	[h]	6.86 ^b
V _{ss} or V _{ss} /F	[L/kg]	ND
MAT	[h]	2.06
F (plasma)	[%]	11.9
Ae _{0-48h}	[%]	1.42
F (urine)	[%]	23.5

a range b might be underestimated due to quantification limit

ND not determined

NA not applicable

Ae(tm-tn) Amount excreted from time tm to time tn (here: excreted in urine)

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.J 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.2-2

Report No.: U■■-2163

Study No.: A123/04GR

Additional Information:

A single dose of olodaterol was administered intravenously or orally to male and female dogs. The pharmacokinetics were assessed by measuring the plasma concentrations of olodaterol. Olodaterol was also measured in urine. After intravenous administration the plasma concentrations decreased triphasically and the pharmacokinetics was characterized by a high distribution into tissues and by a high total systemic clearance resulting in a long MRT_{disp} and $t_{1/2}$. In urine, 7.20% of the dose were recovered as parent drug within 48 h. After oral administration the maximum plasma concentration of olodaterol was reached at 0.5 – 1.0 h. MRT_{tot} and $t_{1/2}$ were calculated but may be underestimated due to the early drop of the plasma level-time curve below LOQ. The extent of oral bioavailability was low. In urine, 1.42% of the dose were recovered as parent drug within 48 h. The pharmacokinetics of olodaterol in males and females were similar with male to female ratios of C_{max} and AUC_{0-48h} between 0.951 and 1.34.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.K 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-2

Report No.: U-1739

Study No.: A127/05GR

Species:	Dog	Dog	Dog	Dog	Dog
Strain:	Beagle	Beagle	Beagle	Beagle	Beagle
Gender (M/F) /	2 M / 2 F	2 M / 2 F	2 M * / 2 F	2 M * / 2 F	2 M * / 2 F
Number of animals:			*= 1M excluded	*= 1M excluded	*= 1M excluded
Feeding condition:	fasted	fasted	fasted	fasted	fasted
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution	water
Method of Administration:	intravenous bolus	intravenous bolus	intravenous bolus	intravenous bolus	oral gavage
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (µg/kg):	30	30	30	100	100
Sample:	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)
Sampling times:	blood	plasma	plasma	plasma	plasma
Analyte:	0.0333, 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.0333, 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.0333, 0.167, 0.333, 1, 3, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h	0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 24, 48, 72 and 96 h
Assay:	radioactivity	radioactivity	radioactivity	radioactivity	radioactivity
	LSC	LSC	LSC	LSC	LSC
					HPLC-MS/MS

PK parameters:	Unit				
t _{max} ^a	[h]	0.0333	0.0333	4 - 8	4 - 24
C _{max}	[pmol/L]	253000	161000	6660	6230
AUC _{0-inf}	[pmol•h/L]	933000	1660000	825000	2210000
MRT _{disp} / MRT _{tot}	[h]	86.6	243	134	379
t _{1/2}	[h]	62.2	171	91.8	262
CL	[mL/min/kg]	-	-	-	-
V _{ss}	[L/kg]	-	-	-	-
F or Fa	[%]	-	-	-	49.7 (Fa)
					13.1 (F)

^a range

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.K 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-2

Report No.: U■■-1739

Study No.: A127/05GR

Additional Information:

Plasma-level time profiles of radioactivity after intravenous and oral administration showed a very long MRT_{tot} and a very long t_{1/2} indicating circulating metabolite(s).
No gender differences are obvious but due to the low number of animals per gender no final conclusion on potential gender differences can be drawn.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.L 薬物動態試験：単回投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

CROSS-SPECIES OVERVIEW:

Location in Module:		CTD 4.2.2.2-3	CTD 4.2.2.2-5	CTD 4.2.2.2-1
Report No.:		U-1105	U-1351	U-2124
Study No.:		A006/06JS	06B234PK	A118/04GR
Species:		Mouse	Rat	Rat
Strain:		CrI:CD1(ICR)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)
Gender (M/F) / Number of animals:		24 M	5 M	4 M/4F
Feeding condition:		fasted	fed	fasted
Vehicle/Formulation:		phys. saline solution intravenous	liquid aerosol inhalation (duration: 0.583 h)	phys. saline solution intratracheal
		olodaterol 155 (active moiety)	olodaterol 200 (= Group 3) (active moiety)	olodaterol 155 (active moiety)
Method of Administration:				phys. saline solution intravenous
Test item:				
Dose (µg/kg):				
Sample:				
Analyte:				
Assay:				
PK parameters:		Unit		
t _{max} (median)		[h]	0.583	0.333
C _{max}		[pmol/L]	17100	48400
AUC _{0-inf}		[pmol•h/L]	59000	93200
AUC _{0-24h}		[pmol•h/L]	54600	ND
MRT _{disp} / MRT _{tot}		[h]	7.28	4.28
t _{1/2}		[h]	6.74	5.44
MAT		[h]	2.86	0.12
CL or CL/F		[mL/min/kg]	173	ND
V _{ss} or V _{ss} /F		[L/kg]	73.5	ND
F		[%]	28.4	58.6
			0.583	0.033
			15700	539000
			48000	159000
			44900	ND
			6.94	4.16
			6.35	5.81
			2.47	NA
			265	43.3
			101	10.7
			17.8	NA

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

3.L 薬物動態試験：単回投与後の吸収（続き）

Test Article: Olodaterol

CROSS-SPECIES OVERVIEW:

Location in Module:	CTD 4.2.2.5-3	CTD 4.2.2.2-6	CTD 4.2.2.5-2
Report No.:	U-1337	U-1592	U-1739
Study No.:	A013/07JS	06B121PK	A127/05GR
Species:	Rabbit	Dog	Dog
Strain:	Chbb: NZW	Beagle	Beagle
Gender (M/F) / Number of animals:	3 F	4 M	2 M / 2 F
Feeding condition:	ad libitum	fed	fasted
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	liquid aerosol	phys. saline solution
Method of Administration:	intravenous	inhalation	intravenous
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (µg/kg):	301	60	30
	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)
Sample:	plasma	plasma	plasma
Analyte:	olodaterol	olodaterol	olodaterol
Assay:	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS	HPLC-MS/MS
PK parameters:	Unit		
t _{max} (median)	[h]	0.333	0.033
C _{max}	[pmol/L]	1920000	185000
AUC _{0-inf}	[pmol•h/L]	664000	51600
AUC _{0-24h}	[pmol•h/L]	586000	43000
MRT _{disp} / MRT _{tot}	[h]	7.75	11.2
t _{1/2}	[h]	14.5	17.5
MAT	[h]	NC	NA
CL or CL/F	[mL/min/kg]	19.7	26.2
V _{ss} or V _{ss} /F	[L/kg]	9.12	17.6
F	[%]	NA	NA
		0.333	NC (range: 0.5 - 2)
		0.250	2280
		1960	23000
		9040	16500
		7750	19.8
		10.8	17.6
		9.64	8.6
		-0.48	ND
		321	ND
		211	ND
		8.2	13.1
		0.583 (mean)	
		70.3 ^a	
		NC ^b	
		163.5 ^{a,b}	
		NC ^b	
		NC ^b	
		NC	
		ND	
		ND	
		0.03 ^a	

a one out of three animals excluded at oral route due to misdosing

b AUC(0-24h) as plasma values dropped below the quantitation limit at 4 h post dose

NA not applicable

NC not calculated

ND not determined

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

4. 薬物動態試験：反復投与後の吸収

Test Article: Olodaterol

A tissue distribution study including excretion data was performed in rats after repeated intratracheal dosing.

The result tables of this study on tissue distribution are given in [2.6.5.5 Pharmacokinetics: Organ distribution (薬物動態試験：組織分布)] of the Pharmacokinetic Tabulated Summaries.

The results on excretion are given in [2.6.5.13 Pharmacokinetics: Excretion (薬物動態試験：排泄)].

A supportive pharmacokinetic evaluation was performed with data of inhalation toxicology studies from rats and dogs. The pharmacokinetic data are listed in section [2.6.5.3 Pharmacokinetics: Absorption after a single dose (薬物動態試験：単回投与後の吸収)].

In addition, toxicokinetic data after repeated dosing are available from mice, rats and dogs. The data are listed in the [2.6.7.7 Repeat dose toxicity (反復投与毒性試験)] of the Toxicology Tabulated Summaries.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.A 薬物動態試験：組織分布

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-1

Report No.: U-1974

Study No.: A070/04UB

Species: Rat

Strain: Crl:WI(Han)

Gender (M/F)/Number of animals: 5 M

Feeding condition: fasted

Vehicle/Formulation: phys. saline solution

Method of Administration: intravenous bolus

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Dose (μmol/kg): 2

Dose (μg/kg): 773 (active moiety) – calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol

Radionuclide: ¹⁴C

Specific Activity: 2.184 MBq/μmol

Sampling times: 0.083, 2, 8, 24 and 72 h

Assay: Whole Body Autoradiography

Mean concentration of radioactivity at respective sampling time	Concentration (nmol/kg tissue)					Estimation of pharmacokinetic parameters in selected tissues			
	0.083 h	2 h	8 h	24 h	72 h	C _{max} [nmol/L]	t _{max} [h]	t _{1/2} [h]	AUC _{0-inf} [(nmol•h)/L]
brain	12	6	9	10	6				
pituitary	10792	3294	3392	1279	359	10800	0.083	26.2	125000
plexus choroideus	2306	4435	5272	2916	1935	5270	8.00	81.1	444000
Harder's gland	1433	1895	1941	1225	258	1940	8.00	21.4	83700
salivary gland	9984	2768	1786	205	47	9980	0.083	22.6	50200
brown fat	1397	1611	2680	475	58	2680	8.00	15.8	55200
thymus	1227	1160	743	110	37	1230	0.083	30.5	20100
lungs	2234	1381	834	215	27	2230	0.083	16.0	25100

2.6.5. 薬物動態試験概要表

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.A 薬物動態試験：組織分布（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-1

Report No.: U-1974

Study No.: A070/04UB

Mean concentration of radioactivity at respective sampling time	Concentration (nmol/kg tissue)					Estimation of pharmacokinetic parameters in selected tissues			
	0.083 h	2 h	8 h	24 h	72 h	C_{max} [nmol/L]	t_{max} [h]	$t_{1/2}$ [h]	AUC_{0-inf} [(nmol•h)/L]
Tissues/organs									
heart muscle	4740	1871	804	97	25	4740	0.083	24.5	25800
blood (heart)	904	228	107	52	24	904	0.083	43.0	6750
liver	4619	1655	869	453	152	4620	0.083	30.5	45700
spleen	4932	2499	1782	597	93	4930	0.083	17.9	58400
pancreas	9933	10039	12327	8176	1945	12300	8.00	23.2	559000
kidney total	23626	3992	948	387	98	-	-	-	-
kidney cortex	42489	3246	763	313	114	-	-	-	-
kidney medulla	7812	5412	1002	492	141	-	-	-	-
kidney pelvis	5154	3664	1267	358	45	-	-	-	-
adrenal total	7848	2837	1340	634	225	7850	0.083	32.1	70300
adrenal cortex	9009	2610	ND	605	ND	-	-	-	-
adrenal medulla	6346	4420	ND	1626	ND	-	-	-	-
fat	100	43	25	28	15	-	-	-	-
testis	82	101	88	90	75	-	-	-	-
epididymis	672	644	802	260	ND	-	-	-	-
skin (total)	538	675	453	167	59	675	2.00	32.0	17700
bone marrow	2345	1527	565	134	31	2350	0.083	22.7	20800
accessory genital gl.	2501	2958	2436	2900	753	-	-	-	-
tongue	5080	2236	961	130	69	5080	0.083	52.5	35800
muscle (cranial)	2579	1746	569	68	23	2580	0.083	30.7	19600
muscle (caudal)	1983	1441	404	72	24	1980	0.083	30.3	16100
blood retroorbital	-	-	-	-	-	986	0.083	45.6	7590
plasma retroorbital	-	-	-	-	-	561	0.083	44.0	5150

ND not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.A 薬物動態試験：組織分布（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-1

Report No.: U-1974

Study No.: A070/04UB

Species:	Rat	Rat	Rat
Strain:	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	BN/Crl Br (pigmented)
Gender (M/F)/Number of animals:	5 M	5 M	3 M
Feeding condition:	fasted	fasted	fasted
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	water	phys. saline solution
Method of Administration:	intratracheal bolus	oral (gavage)	intravenous bolus
Test item	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (μg/kg):	773 (active moiety)	773 (active moiety)	773 (active moiety)
Radionuclide:	¹⁴ C	¹⁴ C	¹⁴ C
Specific Activity:	2.184 MBq/μmol	2.184 MBq/μmol	2.184 MBq/μmol
Sampling times:	0.083, 2, 8, 24 and 72 h	0.5, 2, 8, 24 and 72 h	2, 24, 72 h
Assay:	Whole Body Autoradiography		

Mean concentration of radioactivity at respective sampling time	Concentration [nmol/kg tissue]					Concentration [nmol/kg tissue]					Concentration [nmol/kg tissue]				
	0.083 h	2 h	8 h	24 h	72 h	0.5 h	2 h	8 h	24 h	72 h	2 h	24 h	72 h		
Tissues/organs															
brain	10	7	7	6	6	2	1	2	1	2	10	20	10		
pituitary	294	4641	2410	1189	402	ND	ND	48	ND	ND	4164	1912	854		
plexus choroideus	346	1699	2319	2479	948	ND	ND	39	27	ND	4708	2580	1689		
Harder's gland	103	1198	957	938	372	ND	ND	20	26	9	2168	2030	630		
salivary gland	444	2799	1434	285	81	ND	8	49	16	9	4179	1343	150		
brown fat	182	3446	2032	429	62	ND	ND	46	25	ND	4034	987	105		
thymus	113	937	438	200	54	ND	ND	17	ND	ND	1387	499	75		
lungs	38373	22838	2646	1183	261	16	14	30	10	4	2116	523	72		
heart muscle	569	1873	477	132	30	ND	ND	30	9	ND	2677	476	61		
blood (heart)	632	316	79	38	20	ND	ND	14	5	ND	216	72	36		
liver	653	1665	833	400	171	138	97	238	60	23	2513	617	250		

2.6.5. 薬物動態試験概要表

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.A 薬物動態試験：組織分布（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-1

Report No.: U-1974

Study No.: A070/04UB

Mean concentration of radioactivity at respective sampling time		Concentration [nmol/kg tissue]				Concentration [nmol/kg tissue]				Concentration [nmol/kg tissue]				
Tissues/organs		0.083 h	2 h	8 h	24 h	72 h	0.5 h	2 h	8 h	24 h	72 h	2 h	24 h	72 h
spleen		375	2723	1049	822	86	ND	19	56	21	8	3042	1129	473
pancreas		454	6246	6502	7839	1865	ND	ND	119	152	32	13960	12177	2312
kidney total		3136	3263	1430	304	114	73	36	55	25	8	17530	1130	409
kidney cortex		2633	2460	1164	203	109	ND	ND	ND	ND	ND	11845	1209	472
kidney medulla		4144	4048	1819	344	171	ND	ND	ND	ND	ND	25654	944	519
kidney pelvis		3177	5037	1208	518	40	ND	ND	ND	ND	ND	11094	1255	160
adrenal total		737	3010	888	958	220	ND	ND	45	ND	ND	3794	808	376
adrenal cortex		ND	3012	806	555	247	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	286
adrenal medulla		ND	3430	2138	2568	191	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1238
fat		7	41	30	44	5	ND	ND	2	1	ND	60	20	5
testis		12	34	44	51	55	1	ND	3	3	1	73	161	80
epididymis		39	551	399	196	49	ND	ND	11	ND	ND	614	818	447
skin (total)		35	588	336	140	36	ND	ND	16	7	ND	741	441	219
bone marrow		171	1299	410	130	38	ND	ND	24	ND	ND	1704	251	50
accessory genital gl.		ND	1166	1814	2238	1423	ND	ND	ND	49	ND	2640	3101	1774
tongue		234	1819	776	125	44	6	4	33	10	5	2727	364	69
muscle (cranial)		174	1276	431	55	23	4	3	20	5	2	1629	181	30
muscle (caudal)		138	1041	368	56	22	3	2	16	5	2	1355	164	33
retina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3891	4539	3491

ND not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.A 薬物動態試験：組織分布（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-1

Report No.: U■■-1974

Study No.: A070/04UB

Additional information:

The distribution of drug-related radioactivity was investigated at different times after intravenous, intratracheal and oral administration of [¹⁴C]olodaterol to male rats using whole body autoradiography.

After intravenous administration, the radioactivity distributed into most tissues except of the central nervous system (CNS). The blood-brain barrier was crossed only to a very small extent. Concentration in body fat tissue was also low. High amounts of radioactivity were found in the kidney. The highest concentration of radioactivity in other tissues was found in pituitary, salivary gland, adrenal gland and pancreas. Two hours after administration the bulk of radioactivity was found in small intestine due to its excretion via bile. At 8 h after dosing the bulk of radioactivity was located in the intestinal tract. 72 h after intravenous dosing the radioactivity was eliminated in most of the tissues. Only in pancreas, plexus choroideus and in the accessory genital glands higher concentrations were found. A rough estimation showed that total radioactivity was excreted from most of the tissues within a terminal half-life of 16 - 32 h. A longer half-life was calculated for the plexus choroideus and tongue. After intratracheal administration a quick distribution of radioactivity into most of the tissues could be observed. With exception of the lungs as administration site qualitative distribution of the radioactivity was similar to the findings after intravenous administration. After oral administration the poor absorption of [¹⁴C]olodaterol led to very low tissue concentrations.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.B 薬物動態試験：組織分布

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-3

Report No.: U-1723

Study No.: A092/08FU

Species: Strain:	Mouse FVB/N (wild type) wild type 6 M ad libitum	Mouse FVB.129P2-AbcblatmBorN7 (mdr1a knockout) P-gp knockout (P-gp k/o) 6 M ad libitum	Mouse FVB/N (wild type) wild type 6 M ad libitum	Mouse FVB.129P2-AbcblatmBorN7 (mdr1a knockout) P-gp knockout (P-gp k/o) 6 M ad libitum	Mouse FVB.129P2-AbcblatmBorN7 (mdr1a knockout) P-gp knockout (P-gp k/o) 6 M ad libitum
Condition of P-glycoprotein (P-gp): Gender (M/F)/Number of animals: Feeding condition:					
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution with 2% ethanol	phys. saline solution with 2% ethanol	phys. saline solution with 2% ethanol
Method of Administration:	intravenous bolus	intravenous bolus	intravenous bolus	intravenous bolus	intravenous bolus
Dose (μmol/kg): Dose (μg/kg):	2 773 (active moiety) - calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol	2	2	2	2
Test item: Radionuclide: Specific Activity: Sampling times:	[¹⁴ C]olodaterol 14C 2.007 MBq/μmol 0.0833, 0.5, 1, 2, 4, 8 h LSC	[¹⁴ C]olodaterol 14C 2.007 MBq/μmol 0.0833, 0.5, 1, 2, 4, 8 h LSC	[¹⁴ C]salmeterol 14C 2.012 MBq/μmol 0.0833, 0.5, 1, 2, 4, 8 h LSC	[¹⁴ C]salmeterol 14C 2.012 MBq/μmol 0.0833, 0.5, 1, 2, 4, 8 h LSC	[¹⁴ C]salmeterol 14C 2.012 MBq/μmol 0.0833, 0.5, 1, 2, 4, 8 h LSC
Assay:					

Compound	Time point				
	Strain	0.0833 h	0.5 h	1 h	2 h
		Brain to Blood ratios (in %)			
[¹⁴ C]olodaterol	wild type	3.7	6.1	7.6	10.6
	P-gp knockout	9.2	15.5	20.5	28.7
[¹⁴ C]salmeterol	wild type	8.8	8.3	13.1	NOS
	P-gp knockout	40.7	40.4	55.1	80.2

NOS no sample

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.B 薬物動態試験：組織分布（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-3

Report No.: U-1723

Study No.: A092/08FU

Species: Strain: Condition of P-glycoprotein (P-gp):	Rat CrI: WI(Han) vehicle treatment	Rat CrI: WI(Han) P-gp inhibition co-treatment with P-gp inhibitor zosuquidar	Rat CrI: WI(Han) vehicle treatment	Rat CrI: WI(Han) P-gp inhibition co-treatment with P-gp inhibitor zosuquidar
Gender (M/F)/Number of animals: Feeding condition:	4 M ad libitum	4 M ad libitum	4 M ad libitum	6 M ad libitum
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution with 16.84% ethanol	phys. saline solution with 16.84% ethanol
Method of Administration:	intravenous bolus	intravenous bolus	intravenous bolus	intravenous bolus
Dose (μmol/kg): Dose (μg/kg):	2 773 (active moiety) - calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol	2	2	2
Test item: Sampling time: Radionuclide: Specific Activity: Assay:	[¹⁴ C]olodaterol 1 h 14C 2.007 MBq/μmol LSC	[¹⁴ C]olodaterol 1 h 14C 2.007 MBq/μmol LSC	[¹⁴ C]salmeterol 1 h 14C 2.012 MBq/μmol LSC	[¹⁴ C]salmeterol 1 h 14C 2.012 MBq/μmol LSC

Brain to Blood ratios (in %)	
Compound	mean ± SD
[¹⁴ C]olodaterol	10.8 ± 1.9 (N = 4) 16.8 ± 3.8 (N = 4)
[¹⁴ C]salmeterol	28.2 ± 4.2 (N = 4) 223 ± 44.7 (N = 6)

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.B 薬物動態試験：組織分布（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-3

Report No.: U-1723

Study No.: A092/08FU

Additional information:

Aim of the study was to investigate the effect of P-gp inhibition or absence of P-gp on brain penetration of olodaterol and salmeterol. For this purpose, brain to blood ratios of radioactivity after a single intravenous (bolus) dose of drug substance were determined in wildtype and P-gp (mdr1a) knockout mice or in Wistar rats co-treated with either continuous infusion of vehicle or P-gp inhibitor zosuquidar (LY 335979). Olodaterol and/or metabolites are poorly distributed into the brain under normal conditions. Salmeterol shows a low brain distribution which was, however, higher than that for olodaterol. If P-gp was inhibited or lacking, brain penetration of both compounds increased. However, lack of P-gp or inhibition of P-gp increased the blood to brain ratios (BBR) of salmeterol to a much greater extent than BBR of olodaterol. This resulted in a relevant distribution of salmeterol into brain with brain levels exceeding the blood levels of radioactivity at several time points. This indicates that P-gp only subordinates contributes to the blood brain barrier (BBB) for olodaterol and/or metabolites.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.C 薬物動態試験：組織分布

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-4

Report No.: U-1602

Study No.: A003/09SMB, A004/09SMB

Species:	Rat		Rat		Rat	
Strain:	CrI:WI(Han)		CrI:WI(Han)		CrI:WI(Han)	
Gender (M/F)/Number of animals:	3 M		3 M		3 M	
Feeding condition:	ad libitum					
Vehicle/Formulation:	phys.saline solution					
Method of Administration:	Intratracheal (1, 4, 7, 10 or 14 days)					
Test item:	[14C]olodaterol					
Dose (μmol/kg):	0.8					
Dose (μg/kg):	309 (calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol)					
Radionuclide:	14C					
Specific Activity:	1.877 MBq/μmol					
Sampling time:	24 h	96 h	168 h	240 h	336 h	
Assay:	LSC, HPLC-MS/MS for parent drug in plasma					
Mean concentration of radioactivity at respective sampling time	Concentration [nmol/L]					
Tissues/organs	24 h	96 h	168 h	240 h	336 h	
liver epididymis gastrointestinal tract	176	356	420	452	549	
	101	143	174	200	186	
	1860	827	1100	909	1030	

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.C 薬物動態試験：組織分布（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-4

Report No.: U-1602

Study No.: A003/09SMB, A004/09SMB

Mean concentration of radioactivity at respective sampling time	Concentration [nmol/L]					
Tissues/organs	24 h	96 h	168 h	240 h	336 h	Accumulation-factor RA ^a
lymph node	283	305	318	452	458	1.6
adrenal gland	266	287	398	439	428	1.6
bone marrow	149	166	183	218	207	1.4
thyroid	153	191	247	344	392	2.6
submandibular glands	208	346	291	491	407	2.0
skin (not pigmented)	85.5	103	112	100	137	1.6
pituitary gland	986	965	1000	1230	1617 ^b	1.6
brain	10.2	16.7	18.9	26.0	31.9	3.1
white fat	55	49.2	60	52.9	64.5	1.2
brown fat	297	229	339	322	431	1.5
heart	39.7	58.8	79.7	90.2	124	3.1
lungs	1590	4590	4410	6750	4560	2.9
spleen	323	270	397	413	492	1.5
kidneys	131	157	201	228	261	2.0
thymus	104	114	134	155	206	2.0
testes	30.3	95.8	146	202	319	10.5
pancreas	2980	2250	2990	3690	3640	1.2
muscle	45.3	51.4	72.5	79.9	109	2.4
blood	16.7	25.7	33.2	37.0	49.5	3.0
plasma	12.2	23.2	25.1	26.9	33.1	2.7
plasma (parent drug)	0.986	0.502	0.508	0.869	0.748	0.8

a mean concentration at 336 h after the first dose divided by concentration at 24 h after the first dose

b mean of 5 animals only

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

5.C 薬物動態試験：組織分布（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-4

Report No.: U-1602

Study No.: A003/09SMB, A004/09SMB

Additional information:

[¹⁴C]olodaterol was administered once daily at a dose of 0.8 μmol/kg via intratracheal instillation to five groups of rats. The trough concentrations of radioactivity in tissues and organs, including blood and plasma were determined at 5 different time points. In addition, trough plasma concentrations of parent drug were analyzed and no accumulation was observed. Radioactivity increased over time but with a decreasing slope until the end of the study.

The trough concentrations in tissues and organs showed for many tissues an almost constant level of radioactivity during the dosing period. Some tissues showed a slight accumulation over the dosing period (RA between 2.0 and 3.1). A higher accumulation factor was only observed in testes where the concentrations of radioactivity were rather low. However, accumulation in tissues took place on a relatively low concentration level. The highest amounts were retained in lung, pancreas and liver and were accounting for less than 0.2% of the total dose administered. Thus, the pattern of tissue distribution did not change relevantly upon multiple dosing as compared to single dosing.

For most tissues and organs a steady state was reached after 4 consecutive daily doses.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.A 薬物動態試験：蛋白結合

Test Article: Olodaterol

Study system: in vitro
Target entity, Test system and method: [¹⁴C]olodaterol or [³H]olodaterol, equilibrium dialysis

Species (gender)	Matrix	Test Item	Conc. tested	% Bound	Report No.	Study No.	Location in Module
Mouse (m)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L	78.1	U-1533	A046/05FU	CTD 4.2.2.3-2
			10 nmol/L	66.6			
			100 nmol/L	65.4			
Mouse (f)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L	76.0	U-1533	A046/05FU	CTD 4.2.2.3-2
			10 nmol/L	67.8			
			100 nmol/L	65.1			
Rat (m)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L	49.4	U-1983 ^a	DODF1010	CTD 5.3.2.1-1
			10 nmol/L	52.8			
			100 nmol/L	51.3			
Rat (f)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L	49.7	U-1983 ^b	DODF1010	CTD 5.3.2.1-1
			10 nmol/L	51.2			
			100 nmol/L	49.4			
Rat (m)	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L	56.1	U-2233	PB 08-003	CTD 5.3.2.1-2
			0.1 nmol/L	52.1			
			1 nmol/L	52.4			
Rat (f)	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L	55.7	U-2233	PB 08-003	CTD 5.3.2.1-2
			0.1 nmol/L	47.4			
			1 nmol/L	48.0			
Rabbit (f)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	10 nmol/L	59.5	U-1533	A046/05FU	CTD 4.2.2.3-2
			100 nmol/L	59.5			
			1000 nmol/L	58.6			

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.A 薬物動態試験：蛋白結合（続き）

Test Article: Olodaterol

Species (gender)	Matrix	Test Item	Conc. tested	% Bound	Report No.	Study No.	Location in Module
Dog (m)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L 10 nmol/L 100 nmol/L	63.7 ^a 65.2 ^a 64.4 ^a	U-1983 ^b	DODF1010	CTD 5.3.2.1-1
Dog (f)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L 10 nmol/L 100 nmol/L	64.1 ^a 64.3 ^a 63.9 ^a	U-1983 ^b	DODF1010	CTD 5.3.2.1-1
Dog (m)	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L 0.1 nmol/L	56.4 55.5	U-2233	PB 08-003	CTD 5.3.2.1-2
Dog (f)	Plasma	[³ H]olodaterol	1 nmol/L 0.01 nmol/L 0.1 nmol/L 1 nmol/L	56.4 59.7 57.2 56.5	U-2233	PB 08-003	CTD 5.3.2.1-2
Man (m)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L 10 nmol/L 100 nmol/L	68.9 ^a 67.9 ^a 66.7 ^a	U-1983 ^b	DODF1010	CTD 5.3.2.1-1
Man (f)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L 10 nmol/L 100 nmol/L	62.7 ^a 62.6 ^a 62.7 ^a	U-1983 ^b	DODF1010	CTD 5.3.2.1-1
Man (m&f)	Plasma	[¹⁴ C]olodaterol	1 nmol/L 10 nmol/L 100 nmol/L	56.8 56.9 56.1	U-1533	A046/05FU	CTD 4.2.2.3-2
Man (m)	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L 0.1 nmol/L	60.3 58.4	U-2233	PB 08-003	CTD 5.3.2.1-2
Man (f)	Plasma	[³ H]olodaterol	1 nmol/L 0.01 nmol/L 0.1 nmol/L 1 nmol/L	58.8 62.3 63.7 62.4	U-2233	PB 08-003	CTD 5.3.2.1-2

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.A 薬物動態試験：蛋白結合（続き）

Test Article: Olodaterol

Species (gender)	Matrix	Test Item	Conc. tested	% Bound	Report No.	Study No.	Location in Module
Man healthy volunteers, 1222.20	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L	59.8	U-1883	8222052	CTD 5.3.2.1-3
Man healthy volunteers, 1222.35	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L	60.1	U-1883	8222052	CTD 5.3.2.1-3
Man mild liver impairment, 1222.20	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L	62.8	U-1883	8222052	CTD 5.3.2.1-3
Man moderate liver impairment, 1222.20	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L	56.6	U-1883	8222052	CTD 5.3.2.1-3
Man severe renal impairment, 1222.35	Plasma	[³ H]olodaterol	0.01 nmol/L	63.7	U-1883	8222052	CTD 5.3.2.1-3

a calculated based on reported data

b GLP compliant study

Additional Information:

Overall, the in vitro binding of olodaterol to plasma proteins was moderate in mouse, rat, rabbit, dog and human. No major species differences and no concentration dependence was observed within the concentration range tested. No relevant difference of the plasma protein binding in vitro was observed between renally or hepatically impaired patients and healthy volunteers.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.B 薬物動態試験：血球分配

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.1-1

Report No.: U-1983

Study No.: DODF1010

Study system:

Blood

Target entity, Test system and method:

Aliquots of blood were spiked with [¹⁴C]olodaterol to achieve a final concentration of 10 nmol/L. The aliquots were mixed gently and incubated at 37°C for 0, 30, 60 and 180 minutes. After each incubation, an additional packed cell volume determination was made. Aliquots of whole blood were taken for combustion and measurement of total radioactivity. The remainder of each blood sample was centrifuged and aliquots of the resulting plasma were assayed for radioactivity.

Species	Time [min]				Overall
	0 min	30 min	60 min	180 min	0 - 180 min
Rat (m)	$\frac{C_C}{C_P}$ 3.45	$\frac{C_C}{C_P}$ 5.07	$\frac{C_C}{C_P}$ 5.41	$\frac{C_C}{C_P}$ 4.67	$\frac{C_C}{C_P}$ 4.65
Rat (f)	3.06	6.03	7.65	6.18	5.73
Dog (m)	2.93	2.40	3.19	3.65	3.04
Dog (f)	2.57	2.36	2.95	4.03	2.97
Man (m)	2.14	2.62	3.69	3.42	2.97
Man (f)	0.60	2.57	3.05	3.72	2.48

Additional Information:

All given values are mean values for either 2 (dog) or 3 individuals (man). Blood from rats was pooled. The above given mean values for 0, 30, 60 and 180 minutes of dog and man were calculated based on the reported data. The overall mean for 0 - 180 min was taken from the report directly.

The proportion of radioactivity associated with the blood cells suggest a higher association of [¹⁴C]olodaterol with blood cells. Values were similar in dog and man and higher in rat. In both, male and female animals, a small increase was noted in the association of [¹⁴C]olodaterol to blood cells over the time course tested with the highest binding occurring at either the 60 or 180 minute incubation times. No differences were seen between male and female animals.

GLP compliant study

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.C

薬物動態試験：血球分配

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-1

Report No.: U-1974

Study No.: A070/04UB

Study system:

Blood

Target entity, Test system and method:

Ex vivo after intravenous, intratracheal and oral administration of 2 µmol/kg [¹⁴C]olodaterol to male albino rats. The C_C/C_p ratio was determined at different time points. In addition, C_C/C_p was also determined after intravenous administration of 2 µmol/kg [¹⁴C]olodaterol to male pigmented rats.

Route of Administration	C _C /C _p						
	Time [h]						
	0.083 h	0.5 h	2 h	8 h	24 h	72 h	
intravenous (albino rat)	2.80	-	6.64	3.61	1.33	1.47	
intravenous (pigmented rat)	-	-	3.27	-	1.02	1.13	
intratracheal (albino rat)	2.86	-	5.64	2.23	1.42	1.03	
oral (albino rat)	-	0.37	0.32	0.67	0.58	0.93	

Additional Information:

The ratios of C_C/C_p were measured during the whole body autoradiography study in rat after different routes of administration. After intravenous administration to male albino and pigmented rats [¹⁴C]olodaterol and/or its metabolites distributed preferably into the blood cells. The ratio of C_C/C_p increased from 2.80 measured at the earliest time point (0.083 h) to 6.64 at 2 h post administration. From thereon, the ratios declined to 1.47 at 72 h post administration. The results obtained after intratracheal administration correspond to the results found after intravenous administration. After oral administration [¹⁴C]olodaterol and/or its metabolites distributed preferably into the plasma.

2.6.5. 薬物動態試験概要表

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

6.D 薬物動態試験：血球分配

Test Article: Olodaterol

Study system:		Blood	
Target entity, Test system and method:		Measurement of hematocrit and radioactivity in blood and plasma. The concentration ratio of radioactivity in blood cells and plasma (C_C/C_P) was calculated.	
Species:	Rat (males)	Rabbit (females)	Dog (males & females)
Strain:	CrI:WI(Han)	Chbb: NZW	Beagle
Report No.:	U-1007	U-1337	U-1739
Study No.:	A117/04GR	A013/07JS	A127/05GR
Location in Module:	CTD 4.2.2.5-1	CTD 4.2.2.5-3	CTD 4.2.2.5-2
Conc. tested [pmol/L] - radioactivity:	not reported	intravenous route: 3940000 - 4510 oral route: 546000 - 811	intravenous route: 268000 - 4020 oral route: 7680 - 217
Study design:	ex vivo after intravenous and intratracheal administration of 0.4 $\mu\text{mol/kg}$ (155 $\mu\text{g/kg}$) [^{14}C]olodaterol	ex vivo after intravenous and oral administration of 0.78 $\mu\text{mol/kg}$ (corresponds to 301 $\mu\text{g/kg}$ - calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol) [^{14}C]olodaterol	ex vivo after intravenous and oral administration of 30 $\mu\text{g/kg}$ (i.v.) and 100 $\mu\text{g/kg}$ (p.o.) [^{14}C]olodaterol, respectively
C_C/C_P :	3.65 (overall mean)	After intravenous administration C_C/C_P ratios ranging from 1.09 up to 4.53 showing no dependence on time course. After oral administration [^{14}C]olodaterol was found to prevail slightly in plasma at early time points. Mean C_C/C_P ratios ranged from about 0.47 at 30 minutes to 1.48 at 96 h (1.81 if animal 151 is excluded).	After intravenous administration the mean C_C/C_P ratios ranged from 1.90 to 2.85 up to 24 h after administration. Between 48 h and 72 h the ratio decreased (1.24 and 1.04). Mean C_C/C_P ratios after oral administration ranged from 0.24 to 5.07. At the first sampling time point (0.25 h) the C_C/C_P ratio was high (5.07) but decreased immediately to about 1 between 0.5 h and 24 h, indicating an even distribution in this period. At later time points (48 h - 96 h) the distribution decreased to a ratio of about 0.3.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

6.D 薬物動態試験：血球分配（続き）

Species: Strain: Report No.: Study No.: Location in Module:	Rat (males) Crl:WI(Han) U-1007 A117/04GR CTD 4.2.2.5-1	Rabbit (females) Chbb: NZW U-1337 A013/07JS CTD 4.2.2.5-3	Dog (males&females) Beagle U-1739 A127/05GR CTD 4.2.2.5-2
Summary and additional information:	There was no relevant difference in C_C/C_p between intravenous and intratracheal dosing. The mean ratio C_C/C_p increased from 0.333 to 3 and was slightly decreased at 8 h. The overall mean ratio for C_C/C_p was 3.65 (all animals, all times, all routes combined), indicating an extensive distribution of the drug-related radioactivity from plasma into blood cells.		
	The C_C/C_p-distribution ratios were highly variable over time for both routes of administration. The distribution of radioactivity differed considerably between intravenous and oral administration, indicating a probably different metabolic pattern due to a first-pass metabolism.		
	After intravenous administration, the distribution of drug-related radioactivity between blood cells and plasma ranged between 2 and 3 until 24 h. Afterwards, the ratio decreased to an even distribution with values around one (48 h and 72 h). After oral administration, the distribution between blood cells and plasma was even between 0.5 h and 24 h (except the first time point at 0.25 h).		

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.A 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-4

Report No.: U-1214

Study No.: A199/09RB

Excretion into milk

Species:	Rat
Strain:	Crl:WI(Han)
Lactating date:	day 12
Number of animals:	5 F
Feeding condition:	ad libitum
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution
Method of Administration:	single intravenous bolus
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (µmol/kg):	0.4 (active moiety)
Dose (µg/kg):	155 (active moiety) - calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol
Analyte:	radioactivity
Assay:	LSC

Time	1 h	6 h	24 h	48 h
Concentration	[nmol/L]	[nmol/L]	[nmol/L]	[nmol/L]
Milk	141	169	25.7	2.91
Plasma from dams	26.5	13.2	6.63	3.53
Milk / Plasma ratio ^a	5.3	12.8	3.9	0.82
Neonates:	not detected	not detected	not detected	not detected

a: Calculated based on reported data

Additional Information:

The amount of parent compound excreted via milk within 24 h after drug administration was estimated to be about 2.8 to 4.7% of the dose administered to the dams. The given Milk-to-Plasma ratios were calculated by using the respective concentrations of radioactivity in milk and plasma.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.B 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-5

Report No.: U-4128

Study No.: A054/10JS

Placental transfer

Species / Strain:		Rat / CrI:WI(Han)						
Gestation day / Number of animals:		Gestation days 12, 14, 15 (embryonic stage) / 3			Gestation days 17, 19, 20 (fetal stage) / 3			
Vehicle / Formulation:		Aqueous sodium chloride solution			Aqueous sodium chloride solution			
Method of Administration:		Intratracheal instillation			Intratracheal instillation			
Dose (µmol/kg):		2			2			
Dose (µg/kg):		773 (active moiety) - calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol			773 (active moiety) - calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol			
Analyte:		[¹⁴ C]			[¹⁴ C]			
Assay:		Quantitative whole body autoradiography			Quantitative whole body autoradiography			
Mean concentration of radioactivity		[nmol/kg tissue]			[nmol/kg tissue]			
Time after administration		8 h			8 h			
Organs & tissues of dams		locomotor apparatus						
		muscle cranial	466	24.5	13.1*	448	16.9	16.1
		muscle caudal	437	21.8	11.5*	480	18.4	14.2*
		bone marrow	844	110	21.1	974	50.2	29.4
		digestive apparatus						
		tongue	1056	59.6	27.2	752	38.1	32.1
		salivary glands	1834	98.8	68.7	1001	86.1	58.3
		liver	1249	244	113	1320	181	139.3
		pancreas	10428	4013	1870	13000	2814	1334
		brown fat	2760	77.5	32.4	1853	55.2	34.8
		white fat	79.9	11.5*	0	90.4	13.3*	0
		respiratory apparatus						
		lung	8054	404	478	4479	460	187

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

7.B 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験（続き）

Location in Module: CTD 4.2.2.3-5

Report No.: U-4128

Study No.: A054/10JS

Time after administration		8 hours	48 hours	72 hours	8 hours	48 hours	72 hours
Organs & tissues of dams	urogenital apparatus						
	kidney (total)	1226	94.1	58.9	964	85.1	63.5
	kidney (cortex)	1262	94.3	62.1	990	91.8	65.1
	kidney (outer medulla)	1125	119	89.9	853	103	82.2
	kidney (inner medulla)	1956	53.2	27.2	1222	66.7	38.7
	preputial gland	3091	1733	980	2561	1590	1341
	placenta	334	40.3	26.1	256	31.4	24.6
	endocrine glands						
	adrenal (cortex)	955	378	295	1146	290	193
	adrenal (medulla)	598	228	293	ND	339	130
	pituitary	240	761	738	162	665	92.9
	cardiovascular system						
	myocardium	807	30.8	17.7	514	22.6	18.6
	spleen	1707	200	120	1376	167	84.1
	thymus	651	50.3	32.6	646	44.6	34.3
	central nervous system						
	brain (total)	22.4	11.4*	11.4*	49.2*	0	0
	brain (cerebrum)	0	0	0	12.3*	0	0
	brain (cerebellum)	0	0	0	0	0	0
	choroid plexus	2252	1485	941	2751	1390	1320

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

7.B

薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験（続き）

Location in Module: CTD 4.2.2.3-5

Report No.: U-4128

Study No.: A054/10JS

Time after administration		8 h	48 h	72 h	8 h	48 h	72 h
Organs & tissues of dams	sense organ (eye)						
	retina	670	449	312	714	319	252
	Harderian gland	1543	462	349	1732	323	173
	common integument						
	skin (total)	444	50.2	30.2	316	50.2	27.4
	blood						
	heart blood (RLG)	106	25.9	14.3*	102	18.2	15.2
	plasma (LSC)	42.1	30.0	12.7	59.5	21.3	13.9
	Placenta	334	40.3	26.1	256	31.4	24.6
embryo	total	37.2	35.9	33.4	NA	NA	NA
Organs & tissues of fetus	digestive apparatus						
	tongue	NA	NA	NA	ND	30.8	ND
	liver	NA	NA	NA	178	59.2	40.2
	respiratory apparatus						
	lung	NA	NA	NA	122	37.5	29.4
	urogenital apparatus						
	kidney (total)	NA	NA	NA	ND	ND	33.9
	cardiovascular system						
	myocardium	NA	NA	NA	ND	41.3	32.0
	thymus	NA	NA	NA	ND	ND	35.0
	central nervous system						
	brain (total)	NA	NA	NA	24.7	31.9	26.1
	blood						
	heart blood (RLG)	NA	NA	NA	87.6	38.2	31.9

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

7.B 薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験（続き）
Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-5
Report No.: U-4128
Study No.: A054/10JS

Ratios of radio-exposure in fetal tissues to radio-exposure in maternal heart blood:	Time	day 17 (fetal stage of gestation)		
		8 h post dose	48 h post dose	72 h post dose
	Tissue			
	fetal heart blood	0.86	2.1	2.1
	fetal liver	1.7	3.3	2.7
	fetal myocardium	ND	2.3	2.1
	[fetal brain] ^a	[0.24] ^b	[1.8] ^b	[1.7] ^b
Additional Information:	[fetal lung] ^c	[1.2] ^c	[2.1] ^c	[1.9] ^c
	The general distribution pattern of radioactivity in maternal tissues was in accord with the general distribution pattern of radioactivity in the analogous tissues of male albino rats at identical time points after intratracheal instillation. The concentration of radioactivity was 3.2-times (embryonic stage) and 2.5-times (fetal stage) higher in placenta than in maternal whole blood at 8 hours after administration; the radioactivity levels remained with a mean ratio of about 1.7 slightly higher in placenta than in maternal heart blood throughout later time points on days 12 and 17.			

a value between lower limit of quantification and limit of detection
b fetal brain has a different blood-brain-barrier texture compared to an adult brain
c fetal lung has a different tissue texture / blood perfusion compared to an adult lung
NA not applicable
ND not determined
syst. system

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

8. 薬物動態試験：その他の分布試験

Test Article: Olodaterol

No other preclinical distribution studies were performed.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.A 薬物動態試験：In Vivo 代謝，マウス Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-2

Report No.: U-1516

Study No.: A455/05BC

Metabolite pattern in the mouse

Species / Strain: Mouse / Crl:CD1(ICR)
Gender (m/f)/ No. of animals: m (n = 4) / f (n = 4): urine and feces sampling
m (n = 5-6) / f (n = 5-6): plasma sampling
Feeding condition: ad libitum
Vehicle / Formulation: phys. saline solution
Method of Administration: intratracheal administration
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (µg/kg): 1000 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.173 MBq/µmol

compound code	plasma, 1 h		plasma, 4 h		urine 0 - 48 h	feces 0 - 48 h	urine+ feces
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)			
olodaterol	15.5	(5.2)	3.3	(5.9)	6.5	63.1	69.6
CD 992	208.8	(69.8)	15.9	(28.5)	3.5	-	3.5
M565(2)	-	-	0.7	(1.2)	0.2	-	0.2
SOM 1522	-	-	-	-	0.4	4.6	5.0
CD 11249	32.9	(11.0)	13.2	(23.6)	1.7	-	1.7
M583(1)	-	-	-	-	0.4	-	0.4
m4	-	-	-	-	0.3	-	0.3
m6	37.9	(12.7)	15.4	(27.6)	0.2	0.1	0.4
m9	-	-	-	-	-	0.5	0.5
m10	-	-	-	-	-	0.7	0.7
m13	-	-	-	-	0.1	-	0.1
not extractable radioactivity	3.9	(1.3)	7.3	(13.1)	-	-	-
not extractable radioactivity + m6	41.7	(14.0)	22.7	(40.7)	0.2	0.1	0.4
sum	299.0	(100.0)	55.9	(100.0)	13.3	69.0	82.3

empty cells (-)not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.A 薬物動態試験：In Vivo 代謝，マウス（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-2

Report No.: U-1516

Study No.: A455/05BC

Species / Strain:

Mouse / Crl:CD1(ICR)

Gender (m/f)/ No. of animals:

m (n = 4) / f (n = 4): urine and feces sampling

m (n = 5-6) / f (n = 5-6): plasma sampling

Feeding condition:

ad libitum

Vehicle / Formulation:

phys. saline solution

Method of Administration:

intravenous bolus

Test item

[¹⁴C]olodaterol

Dose (μg/kg):

1000 (active moiety)

Radionuclide / Specific Activity:

[¹⁴C] / 2.173 MBq/μmol

compound code	plasma, 1 h		plasma, 4 h		urine 0 - 48 h	feces 0 - 48 h	urine+ feces
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)			
olodaterol	17.2	(4.2)	4.8	(4.6)	14.0	51.4	65.4
CD 992	228.6	(55.1)	16.6	(16.2)	4.3	-	4.3
M565(2)	8.6	(2.1)	-	-	0.7	-	0.7
SOM 1522	6.4	(1.5)	1.2	(1.2)	1.0	12.7	13.7
CD 11249	14.2	(3.4)	15.9	(15.5)	3.6	-	3.6
M583(1)	-	-	-	-	1.7	-	1.7
m4	-	-	-	-	0.1	-	0.1
m6	131.5	(31.7)	45.0	(44.0)	<0.1	1.5	1.6
m9	-	-	-	-	-	0.1	0.1
m10	-	-	-	-	-	1.2	1.2
m13	-	-	-	-	-	-	-
not extractable radioactivity	8.1	(2.0)	18.9	(18.5)	-	-	-
not extractable radioactivity + m6	139.6	(33.7)	63.9	(62.4)	<0.1	1.5	1.6
sum	414.7	(100.0)	102.4	(100.0)	25.5	66.9	92.4

empty cells (-) not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.A 薬物動態試験：In Vivo 代謝，マウス（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-2

Report No.: U-1516

Study No.: A455/05BC

Species / Strain: Mouse / Crl:CD1(ICR)
Gender (m/f)/No. of animals: m (n = 4) / f (n = 4): urine and feces sampling
m (n = 5-6) / f (n = 5-6): plasma sampling
Feeding condition: ad libitum
Vehicle / Formulation: solution in water
Method of Administration: oral administration
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (μg/kg): 1000 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.173 MBq/μmol

compound code	plasma, 1 h		plasma, 4 h		urine 0 - 48 h	feces 0 - 48 h	urine+ feces
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)			
olodaterol	3.3	(4.1)	1.4	(6.8)	3.0	82.8	85.7
CD 992	27.9	(34.6)	5.6	(27.4)	1.3	-	1.3
M565(2)	3.1	(3.8)	0.5	(2.2)	0.1	-	0.1
SOM 1522	3.8	(4.7)	0.5	(2.3)	0.2	3.1	3.3
CD 11249	15.8	(19.6)	4.5	(22.3)	0.6	-	0.6
M583(1)	-	-	-	-	0.2	-	0.2
m4	-	-	-	-	-	-	-
m6	1.7	(2.1)	4.6	(22.8)	<0.1	-	-
m9	-	-	-	-	-	2.0	2.0
m10	-	-	-	-	-	0.9	0.9
m13	-	-	-	-	-	-	-
not extractable radioactivity	25.1	(31.2)	3.3	(16.2)	-	-	-
not extractable radioactivity + m6	26.8	(33.2)	7.9	(39.0)	<0.1	-	-
sum	80.6	(100.0)	20.3	(100.0)	5.3	88.8	94.1

empty cells (-) not detected

Additional Information:

Mean data of male and female animals is presented since only minor gender related differences of the metabolite pattern in plasma, urine, feces and bile were observed.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

9.B 薬物動態試験：In Vivo 代謝, ラット

Location in Module: CTD 4.2.2.4-1

Report No.: U-1514

Study No.: A432/05BC

Metabolite pattern in the rat

Species / Strain: Rat / Wistar (CrI:WI(Han))
Gender (m/f)/ m (n = 5) / f (n = 5): urine and feces sampling
No. of animals: m (n = 8) / f (n = 8): plasma sampling, m (n = 5) / f (n = 5): bile sampling
Feeding condition: Fasted
Vehicle / Formulation: phys. saline solution
Method of Administration: intratracheal administration
Dose (µg/kg): plasma: 155 (active moiety); excreta and bile: 77.7 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.184 MBq/µmol

compound code	plasma, 20 min [nmol/L] (% of sample radioactivity)	plasma, 3 h [nmol/L] (% of sample radioactivity)	urine 0 - 48 h [% of dose administered]	feces 0 - 48 h	urine+ feces	bile 0-6 h
olodaterol	102.2	(100.0)	15.6	53.2	68.8	9.3
CD 992	-	-	1.0	-	1.0	6.6
M565(2)	-	-	0.3	-	0.3	0.2
SOM 1522	-	-	0.3	16.6	16.9	-
CD 11249	-	-	0.2	-	0.2	8.8
m2	-	-	-	-	-	0.9
m3	-	-	-	-	-	0.7
m4	-	-	-	-	-	0.4
m5	-	-	-	-	-	-
m6	-	2.3 (19.9)	-	-	-	2.6
m9	-	0.2 (1.9)	-	0.4	0.4	-
m10	-	-	-	0.9	0.9	-
m11	-	-	0.1	-	0.1	-
m13	-	-	-	1.8	1.8	-
not extractable radioactivity	-	1.7 (14.8)	-	-	-	-
not extractable radioactivity + m6	-	4.0 (34.7)	-	-	-	2.6
sum	102.2	(100.0)	17.5	72.8	90.4	29.4

empty cells (-)not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.B 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ラット（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-1

Report No.: U-1514

Study No.: A432/05BC

Species / Strain: Rat / Wistar (CrI:WI(Han)
Gender (m/f): m (n = 5) / f (n = 5): urine and feces sampling
No. of animals: m (n = 8) / f (n = 8): plasma sampling, m (n = 5) / f (n = 5): bile sampling
Feeding condition: fasted
Vehicle / Formulation: phys. saline solution
Method of Administration: intravenous administration
Dose (µg/kg): plasma: 155 (active moiety); excreta: 77.7 (active moiety); bile: 38.7 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.184 MBq/µmol

compound code	plasma, 20 min [nmol/L] (% of sample radioactivity)	plasma, 3 h [nmol/L] (% of sample radioactivity)	urine	feces	urine+ feces	bile 0-6 h
			0 - 48 h	0 - 48 h		
			[% of dose administered]			
olodaterol	34.2	(64.0)	20.7	35.3	56.0	9.3
CD 992	7.2	(13.5)	0.7	-	0.7	7.0
M565(2)	1.0	(1.8)	0.3	-	0.3	0.3
SOM 1522	-	-	0.5	26.0	26.6	-
CD 11249	3.8	(7.1)	0.3	-	0.3	13.3
m2	-	-	-	-	-	1.8
m3	-	-	-	-	-	0.7
m4	-	-	-	-	-	0.8
m5	-	-	-	-	-	0.3
m6	-	-	-	-	-	2.6
m9	-	-	-	1.6	1.6	0.4
m10	1.4	(2.6)	-	1.0	1.0	-
m11	-	-	0.1	-	0.1	-
m13	-	-	-	2.5	2.5	-
not extractable radioactivity	5.9	(11.1)	-	-	-	-
not extractable radioactivity + m6	5.9	(11.1)	-	-	-	-
sum	53.4	(100.0)	22.7	66.5	89.1	36.5

empty cells (-) not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.B 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ラット（続き）
Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-1

Report No.: U-1514

Study No.: A432/05BC

Species / strain: Rat / Wistar (CrI:WI(Han)
Gender (m/f): m (n = 5) / f (n = 5): urine and feces sampling
No. of animals: m (n = 8) / f (n = 8): plasma sampling, m (n = 5) / f (n = 5): bile sampling
Feeding condition: fasted
Vehicle / Formulation: solution in water
Method of Administration: oral administration (intraduodenal administration for bile sampling)
Dose (µg/kg): plasma: 155 (active moiety); excreta and bile: 77.7 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.184 MBq/µmol

compound code	plasma, 3 h [nmol/L]	urine 0 - 48 h [% of dose administered]	feces 0 - 48 h [% of dose administered]	urine+ feces	bile 0 - 6 h
olodaterol	0.1	0.6	92.7	93.4	2.6
CD 992	1.9	0.8	-	0.8	16.0
M565(2)	-	-	-	-	-
SOM 1522	-	-	2.5	2.5	-
CD 11249	0.1	0.1	-	0.1	4.3
m2	-	-	-	-	0.5
m3	-	-	-	-	-
m4	-	-	-	-	0.5
m5	-	-	-	-	-
m6	0.4	-	-	-	1.7
m9	-	-	-	-	-
m10	-	-	-	-	-
m11	-	<0.1	-	-	-
m13	-	-	0.5	0.5	-
not extractable radioactivity	0.6	-	-	-	-
not extractable radioactivity + m6	1.0	-	-	-	1.7
sum	3.1	1.6	95.7	97.3	25.6

empty cells (-) not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.B

薬物動態試験： *In Vivo* 代謝, ラット (続き)

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-1

Report No.: U■■-1514

Study No.: A432/05BC

Additional information:
Mean data of male and female animals is presented since only minor gender related differences of the metabolite pattern in plasma, urine, feces and bile were observed.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

9.C 薬物動態試験： *In Vivo* 代謝, ラット反復

Location in Module: CTD 4.2.2.4-5

Report No.: U-1391

Study No.: A571/09BC

Metabolite pattern in the rat after repeat dose

Species / Strain: Rat / Wistar (CrI:WI(Han)
Gender (m/f) / No. of animals: m (n = 4): plasma sampling
Feeding condition: ad libitum
Vehicle / Formulation: phys. saline solution
Method of Administration: intratracheal bolus (14 consecutive days)
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (µg/kg/day): 309 (active moiety) – calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol; plasma sampling at Day 14
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 1.877 MBq/µmol

compound code	Concentration mean (0 - 24 h)	
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)
olodaterol extractable radioactivity, structure unknown not-extractable radioactivity, covalently bound	22.8	52.9
	12.7	29.3
	11.1	25.8
Recovery	46.6	108.1

Additional Information:

A steady state time proportional AUC_{0-24h}-pool of rat plasma following multiple intratracheal administration of [¹⁴C]olodaterol was investigated for metabolites. Radioactivity that could not be extracted by dialysis was considered as being covalently bound radioactivity to plasma proteins (25.8%). In the extractable part olodaterol and a fraction of highly hydrophilic metabolites with unknown structures accounted for 52.9% and for 29.3% of total radioactivity, respectively.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.D 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ウサギ Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-4

Report No.: U-1317

Study No.: A521/07BC

Metabolite pattern in the rabbit

Species / Strain: Rabbit / Chbb: NZW
Gender (m/f)/ f (n = 3): urine and feces sampling
No. of animals: f (n = 1): plasma and bile sampling
Feeding condition: ad libitum
Vehicle / Formulation: phys. saline solution
Method of Administration: intravenous bolus
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (μmol/kg): 0.77
Dose (mg/kg): 0.3 (active moiety)
Dose (μg/kg): 301 (active moiety) – calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.173 MBq/μmol

compound code	plasma, 1 h		plasma, 6 h		urine 0 - 72 h	feces 0 - 120 h	urine+ feces	bile 0 - 6 h
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)				
olodaterol	19.6	(2.3)	48.3	(4.9)	12.6	21.1	33.7	0.4
CD 992	642.1	(76.8)	782.6	(79.6)	33.9	4.8	38.7	14.5
SOM 1522	-	-	-	-	1.7	13.8	15.5	0.1
CD 11249	68.8	(8.2)	61.2	(6.2)	2.0	0.5	2.6	0.1
CD 10915	98.5	(11.8)	84.8	(8.6)	3.2	0.1	3.4	0.8
M583(1)	7.0	(0.8)	6.1	(0.6)	0.3	-	0.3	0.1
m6	-	-	-	-	0.2	0.4	0.6	-
m10	-	-	-	-	-	-	-	-
m13	-	-	-	-	-	0.1	0.1	-
sum	836.0	(100.0)	983.0	(100.0)	54.0	40.8	94.8	16.1

empty cells (-) not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.D 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ウサギ（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-4

Report No.: U-1317

Study No.: A521/07BC

Species / Strain: Rabbit / Chbb: NZW
Gender (m/f): f (n = 3): urine and feces sampling
No. of animals: f (n = 1): plasma and bile sampling
Feeding condition: ad libitum
Vehicle / Formulation: solution in water
Method of Administration: oral administration (intraduodenal administration for plasma and bile sampling)
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (μmol/kg): 0.77
Dose (mg/kg): 0.3 (active moiety)
Dose (μg/kg): 301 (active moiety) – calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.173 MBq/μmol

compound code	plasma, 1 h		plasma, 6 h		urine 0 - 72 h	feces 0 - 120 h	urine+ feces	bile 0 - 6 h
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)				
olodaterol	-	-	-	-	5.6	38.6	44.1	-
CD 992	477.8	(98.5)	150.9	(98.6)	14.5	3.4	18.0	2.1
SOM 1522	-	-	-	-	0.4	12.1	12.5	-
CD 11249	2.7	(0.6)	0.6	(0.4)	0.5	0.1	0.5	-
CD 10915	4.5	(0.9)	1.5	(1.0)	0.8	0.1	0.9	-
M583(1)	-	-	-	-	0.1	-	0.1	-
m6	-	-	-	-	-	0.1	0.1	-
m10	-	-	-	-	-	<0.1	-	-
m13	-	-	-	-	-	0.3	0.3	-
sum	485.0	(100.0)	153.0	(100.0)	21.9	54.6	76.5	2.1

empty cells (-) not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.E 薬物動態試験：In Vivo 代謝，イヌ Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-3

Report No.: U-1057

Study No.: A453/05BC

Metabolite pattern in the dog

Species / Strain: Dog / Beagle
Gender (m/f)/ m (n = 2) / f (n = 2): urine and feces sampling
No. of animals: m (n = 2) / f (n = 2): plasma and bile sampling
Feeding condition: fasted
Vehicle / Formulation: phys. saline solution
Method of Administration: intravenous administration
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (µg/kg): 30 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.173 MBq/µmol

compound code	plasma, 20 min		urine 0 - 48 h [% of dose administered]	feces 0 - 96 h	urine+ feces	bile 4 h
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)				
olodaterol	7.1	(66.1)	8.4	26.9	35.3	3.1
CD 992	0.6	(5.6)	0.3	1.3	1.6	2.8 (CD 992+m4)
M565(2)	0.1	(1.1)	0.2	-	0.2	1.3
SOM 1522	0.2	(2.3)	0.1	-	0.1	-
CD 11249	-	-	0.2	0.5	0.7	1.1
m2	-	-	0.2	-	0.2	0.9
m3	0.3	(2.4)	-	-	-	-
m4	-	-	0.1	-	0.1	2.8 (CD 992+m4)
m5	-	-	<0.1	-	<0.1	1.2
m6	0.6	(5.8)	1.9	12.1	14.0	0.9
m9	0.2	(1.4)	0.2	4.2	4.4	1.8
m10	0.3	(3.2)	-	5.6	5.6	11.2
m12	-	-	-	-	-	2.6
m13	0.1	(1.1)	-	2.9	2.9	-
m14	-	-	<0.1	-	<0.1	-
m15	-	-	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.E 薬物動態試験：In Vivo 代謝，イヌ（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-3

Report No.: U-1057

Study No.: A453/05BC

compound code	plasma, 20 min		urine 0 - 48 h	feces 0 - 96 h	urine+ feces	bile 4 h
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)				
not extractable radioactivity	1.2	(11.0)	-	-	-	-
not extractable radioactivity + m6	1.8	(16.8)	-	-	-	-
sum	10.8	(100.0)	11.6	53.4	65.1	27.0

empty cells (-) not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.E 薬物動態試験：In Vivo 代謝，イヌ（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-3

Report No.: U-1057

Study No.: A453/05BC

Species / Strain: Dog / Beagle
Gender (m/f): m (n = 2) / f (n = 2): urine and feces sampling
No. of animals: m (n = 2) / f (n = 2): plasma and bile sampling
Feeding condition: fasted
Vehicle / Formulation: solution in water
Method of Administration: oral administration
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (µg/kg): 100 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 2.173 MBq/µmol

compound code	plasma, 4 h		urine 0 - 48 h	feces 0 - 72 h	urine+ feces	bile 4 h
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)				
olodaterol	2.1	(23.0)	2.0	76.6	78.6	0.4
CD 992	2.1	(23.6)	0.9	-	0.9	0.4 (CD 992+m4)
M565(2)	0.2	(2.0)	0.4	-	0.4	0.3
SOM 1522	0.2	(1.9)	-	-	-	0.1
CD 11249	0.2	(2.5)	0.2	-	0.2	0.1
m2	<0.1	(0.4)	0.1	-	0.1	-
m3	0.1	(0.7)	-	-	-	0.1
m4	-	-	0.1	-	0.1	0.4 (CD 992+m4)
m5	-	-	-	-	-	0.1
m6	2.8	(31.5)	1.3	2.5	3.8	0.1
m9	0.1	(1.1)	0.1	2.5	2.6	-
m10	<0.1	(0.4)	-	1.6	1.6	0.7
m12	-	-	-	-	-	0.2
m13	-	-	-	-	-	-
m14	0.1	(1.0)	0.1	-	0.1	-
m15	-	-	-	-	-	-

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.E 薬物動態試験：In Vivo 代謝，イヌ（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.4-3

Report No.: U-1057

Study No.: A453/05BC

compound code	plasma, 4 h		urine 0 - 48 h	feces 0 - 72 h	urine+ feces	bile 4 h
	[nmol/L]	(% of sample radioactivity)				
not extractable radioactivity	1.1	(11.8)	-	-	-	-
not extractable radioactivity + m6	3.9	(43.3)	-	-	-	-
sum	9.0	(100.0)	5.0	83.2	88.3	2.5

empty cells (-) not detected

Additional information:

Mean data of male and female animals is presented since only minor gender related differences of the metabolite pattern in plasma, urine, feces and bile were observed.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.F 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ヒト Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-9

Report No.: U-1129

Study No.: A544/08BC

Metabolite pattern in human

Species / Ethnicity: healthy male subjects / caucasian
Gender (m/f) / No. of subjects: m (n = 5): plasma, urine and feces sampling
Feeding condition: fasted
Vehicle / Formulation: phys. saline solution
Method of Administration: intravenous infusion (3 h)
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (μg/subject): 20 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 5.02 MBq/mg
GLP compliance: no

compound code	plasma, 3.17 h		plasma, 4 h		plasma, 6 h		urine		feces		urine+	
	[pmol/L]	(% of sample radioactivity)	[pmol/L]	(% of sample radioactivity)	[pmol/L]	(% of sample radioactivity)	0 - 72 h	[% of dose administered]	0 - 216 h	[% of dose administered]	urine+	feces
olodaterol	96.6	(45.2)	36.2	(36.9)	<35	(40.0)	19.1		23.5		42.6	
CD 992	52.3	(24.4)	24.7	(25.2)	<13	(15.0)	9.8		-		9.8	
M565(2)	-	-	-	-	-	-	-		-		-	
SOM 1522	-	-	-	-	<2	(1.7)	0.2		28.4		28.7	
CD 11249	9.1	(4.2)	7.4	(7.5)	<8	(8.5)	1.5		-		1.5	
CD 10915	46.9	(21.9)	24.1	(24.6)	<18	(19.9)	5.5		-		5.5	
CD 12656	-	-	-	-	<5	(5.4)	1.6		1.0		2.6	
m2	-	-	-	-	-	-	0.1		-		0.1	
m3	-	-	-	-	-	-	0.5		-		0.5	
m4	-	-	-	-	-	-	-		-		-	
m6	-	-	-	-	-	-	-		-		-	
not extractable radioactivity	9.0	(4.2)	5.7	(5.8)	<9	(9.5)	-		-		-	
sum	213.8	(100.0)	98.1	(100.0)	<86 ^a	(100.0)	38.4		52.9		91.3	

^a LOQ of total radioactivity in plasma: 10 dpm/ml = 86 pmol/l

empty cells (-): not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.F 薬物動態試験：In Vivo 代謝，ヒト（続き）
Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-9

Report No.: U-1129

Study No.: A544/08BC

Species / Ethnicity: healthy male subjects / caucasian
Gender (m/f) / No. of subjects: m (n = 6): plasma, urine and feces sampling
Feeding condition: fasted
Vehicle / Formulation: phys. saline solution
Method of Administration: oral
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Dose (µg/subject): 40 (active moiety)
Radionuclide / Specific Activity: [¹⁴C] / 5.02 MBq/mg
GLP compliance: no

compound code	plasma, 1 h		plasma, 2 h		plasma, 4 h		urine 0 - 72 h	feces 0 - 168 h	urine+ feces
	[pmol/L]	(% of sample radioactivity)	[pmol/L]	(% of sample radioactivity)	[pmol/L]	(% of sample radioactivity)	[% of dose administered]		
olodaterol	12.9	(13.3)	12.6	(10.8)	9.6	(8.7)	0.7	59.7	60.3
CD 992	50.2	(51.6)	65.6	(56.2)	61.7	(56.4)	3.7	-	3.7
M565(2)	6.3	(6.5)	3.0	(2.6)	2.2	(2.0)	0.2	-	0.2
SOM 1522	4.8	(4.9)	-	-	-	-	0.1	24.0	24.1
CD 11249	5.3	(5.5)	9.5	(8.1)	10.3	(9.4)	0.7	-	0.7
CD 10915	13.2	(13.5)	20.8	(17.8)	21.0	(19.2)	1.9	-	1.9
CD 12656	4.5	(4.6)	4.0	(3.4)	4.4	(4.0)	1.2	0.6	1.8
m2	-	-	-	-	-	-	0.2	-	0.2
m3	-	-	-	-	-	-	0.2	-	0.2
m4	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1
m6	-	-	-	-	-	-	0.1	-	0.1
not extractable radioactivity	-	-	1.3	(1.1)	0.3	(0.3)	-	-	-
sum	97.2	(100.0)	116.8	(100.0)	109.5	(100.0)	9.1	84.3	93.4

empty cells (-): not detected

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.G	薬物動態試験：In Vivo 代謝，ヒト	Test Article: Olodaterol
Location in Module:	CTD 5.3.2.2-3	
Report No.:	U■■-1515	
Study No.:	A469/05BC	
Species / Ethnicity:	healthy male subjects / caucasian (clinical trial 1222.1, Module 5.3.3.1)	
Gender (m/f) / No. of subjects:	m (n = 5): plasma, urine sampling	
Feeding condition:	fasted	
Vehicle / Formulation:	aqueous solution for inhalation (containing benzalkonium chloride, EDTA)	
Method of Administration:	administration by inhalation	
Test item:	olodaterol	
Dose (µg/subject):	70 (active moiety)	
Radionuclide / Specific Activity:	none / -	
GLP compliance:	no	
Results:	The metabolism of olodaterol following inhalative administration to healthy male volunteers was investigated in urine and plasma samples of the clinical trial No. 1222.1. Samples of the highest dose group with 70 µg/subject were selected for the analysis of the parent compound and other drug related material by means of HPLC/high resolution ESI-QTOF mass spectrometry using a modified parent ion discovery experiment. Optimized sample preparation procedures that were used in [¹⁴ C]-ADME animal studies were adapted. The parent compound was detected in urine fractions up to 12 h post administration. CD 992 was only identified in the first 0 - 2 h fraction. In pooled plasma samples only olodaterol was identified. Other metabolites that were known from [¹⁴ C]-ADME studies in rats and mice could not be detected. However, due to the exceptional low doses of olodaterol and the resulting low concentration of drug related material in the sample material, the presence of additional metabolites could not be excluded.	

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.H

薬物動態試験：In Vivo 代謝

Test Article: Olodaterol

Location in Module:

CTD 5.3.2.2-8

Report No.:

U-2170

Study No.:

A473/06BC

Enantioselective analysis of olodaterol in urine of humans and animal species

Species / ethnicity:

healthy male subjects / caucasian (clinical trials 1222.1, Module 5.3.3.1 and 1222.4)

Gender (m/f) / No. of subjects:

m (n = 5): plasma, urine sampling

Feeding condition:

fasted

Vehicle / Formulation:

aqueous solution for inhalation (containing benzalkonium chloride, Na-EDTA)

Method of Administration:

administration by inhalation

Test item:

olodaterol

Dose (µg/subject):

70 µg (active moiety) – clinical trial 1222.1; 20 µg (active moiety) – clinical trial 1222.4

Radionuclide / Specific Activity:

none / -

GLP compliance:

no

Animal species (Report No.):

Mouse (CTD 4.2.2.4-2_U-1516), Rat (CTD 4.2.2.4-1_U-1514), Dog (CTD 4.2.2.4-3_U-1057)

Feeding condition:

Ad libitum (mouse), fasted (rat, dog)

GLP compliance:

no

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one of its affiliated companies

9.H 薬物動態試験：In Vivo 代謝（続き）
Location in Module: CTD 5.3.2.2-8
Report No.: U-2170
Study No.: A473/06BC

Test Article: Olodaterol

Species	Enantiomeric excess of olodaterol in [%]
mouse, male i.v.	94.4
mouse, male i.tr.	94.5
mouse, male p.o.	94.3
mouse, female i.v.	94
mouse, female i.tr.	94
mouse, female p.o.	93
solution admin., mouse, i.v.	89.7
solution admin., mouse, i.tr.	92.5
rat, male i.v.	92.1
rat, male i.tr.	91.7
rat, female i.v.	92.7
rat, female i.tr.	92.9
solution admin., rat, i.v.	92.4
solution admin., rat, i.tr.	92.8
dog, male i.v.	90.7
dog, female i.v.	89.4
solution admin., dog, i.v.	93.2
human, inhalation (study 1222.1)	> 93.5
human, inhalation (study 1222.4)	> 92.1
human hepatocytes	93.1

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

9.H 薬物動態試験：In Vivo 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-8

Report No.: U-2170

Study No.: A473/06BC

Additional information:

The study was performed to investigate the potential chiral inversion of olodaterol to its enantiomer with *S*-configuration, designated 不純物F*. Due to the exceptionally low concentrations in human plasma an enantioselective HPLC-MS/MS method was developed for the quantitative assessment of olodaterol and 不純物F* in human urine. Samples of the clinical trials with the highest doses of 70 µg (study No. 1222.1, Module 5.3.3.1) and 20 µg (study No. 1222.4) administered by inhalation were analyzed. Additionally, urine samples of the [¹⁴C]-metabolism studies of the species mouse, rat and dog and *in vitro* samples of incubations of [¹⁴C]olodaterol with human hepatocytes were investigated. The assay was developed and validated with the corresponding reference compounds olodaterol and 不純物F* with known absolute configuration. Pooled human urine samples following administration of 70 µg (study No. 1222.1) and 20 µg (study No. 1222.4) olodaterol were investigated. Olodaterol accounted for 3.0 ng/ml and 2.0 ng/ml, respectively; 不純物F* was not detectable. Since the assay limit of quantification was 0.1 ng/ml, the concentration of olodaterol in urine was at least 20 - 30 times higher than the concentration of the enantiomer 不純物F*. These results demonstrate that there was negligible chiral inversion of olodaterol *in vivo* in humans, if all present. Urine samples of [¹⁴C]olodaterol-metabolism studies in the mouse, the rat and the dog were investigated. The relative concentration of [¹⁴C]不純物F* accounted for 2.8% - 5.6%. Solutions which were administered to the animals were additionally analyzed and revealed relative concentration of [¹⁴C]不純物F* in the same range of 3.7% - 5.4% that were present in the [¹⁴C]-labeled drug substance. The analysis of incubations of [¹⁴C]olodaterol with human hepatocytes did not show an elevated relative concentration of [¹⁴C]不純物F* (3.6%).

It was concluded that [¹⁴C]不純物F* was present as an impurity in the drug substance and co-administered together with [¹⁴]olodaterol. [¹⁴C]不純物F* was not formed by metabolic transformations *in vivo* in animals and *in vitro* with human hepatocytes.

Taken together, there was no experimental evidence for the metabolic chiral inversion of olodaterol.

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝 Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2
Report No.: U-1439
Study No.: A180/05LU
Study system: Human liver microsomes
Test item: [¹⁴C]olodaterol
Method: [¹⁴C]olodaterol (50 μM) was incubated with human liver microsomes (0.2 mg protein /mL) in the presence and absence of NADPH at 37°C for up to 45 min.
The formation of metabolites was quantitatively assessed using HPLC with radioactivity detection and metabolites were identified by ESI-QTOF-MS/MS measurement.

Tabulated results:
The in vitro metabolism of olodaterol by pooled human liver microsomes was dependent on NADPH and yielded the formation of one predominant metabolite, the O-demethylated product of olodaterol (SOM 1522, U3) in a time- and concentration dependent manner. Low amounts of additional metabolites were formed at amounts close to background radioactivity and were therefore not further elucidated.

Formation of metabolites:					
time [min]	mean % of total peak areas			turnover rate [pmol/mg protein] ^c	
	SOM 1522	U4	olodaterol	SOM 1522	U6
0	NA	NA	99.44	NA	275 b
10.3	1.82	NA	97.74	4550	NA
20	2.90	NA	96.38	7250	675 b
30	4.10	NA	95.50	10238	NA
45	5.48	0.28 b	93.21	13688	1463 d
45 ^a	NA	NA	99.55	-	-
a	control without NADPH				
b	below the lower limit of linear detection range (BLR)				
c	corrected for control without NADPH				
d	one or more values BLR				
NA	not applicable due to no peak formation observed				

Additional Information:
Incubation experiments at 25 μM [¹⁴C]olodaterol for 15 min in the presence of NADPH resulted in covalent binding of radioactivity to microsomal protein of 1.33% and 2.88% at a microsome protein concentration of 0.2 and 0.5 mg/mL, respectively. In the absence of NADPH it was 1.09% and 1.52%, respectively. This indicated that small amounts of [¹⁴C]olodaterol derived material was covalently bound to microsomal protein in the course of oxidative in vitro metabolism.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U-1439

Study No.: A180/05LU

Study system: Human liver microsomes

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Method: The effect of enzyme specific chemical inhibitors on the metabolism of olodaterol by human liver microsomes was investigated. Human liver microsomes (0.5 mg protein/mL) were incubated with [¹⁴C]olodaterol (50 μM) in the presence and absence of enzyme specific chemical inhibitors. The effect of the inhibitors on the metabolism of olodaterol was quantitatively assessed using HPLC with radioactivity detection.

Tabulated results:

Formation of SOM 1522 (O-demethylated product of olodaterol, U3) was weakly inhibited by sulphaphenazole indicating an involvement of CYP 2C9. Inhibition by ketoconazole was weak at a concentration of 0.5 μM, where ketoconazole is selective for CYP 3A4. The combination of sulphaphenazole and anti CYP 2C8 antibodies had an additive inhibitory effect but did not totally prevent SOM 1522 formation. A combination of sulphaphenazole and ketoconazole reduced SOM 1522 formation to 20% relative to control without inhibitors. These findings indicated that CYP 2C8 and CYP 2C9 were the predominant CYP enzymes responsible for the formation of SOM 1522 with minor contribution of CYP 3A4.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）
Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2
Report No.: U-1439
Study No.: A180/05LU

Effect of enzyme specific inhibitors on the metabolism of olodaterol by human liver microsomes:

inhibitor	inhibitor [μM]	mean % of total peak areas		turnover rate [pmol/min/mg protein]	turnover relative to control (%)
		SOM 1522	olodaterol	SOM 1522	SOM 1522
quinidine	0	6.09	93.15	406	100
	0.1	5.22	93.95	348	85.7
	1	5.22	93.12	348	85.7
	10	5.19	94.10	346	85.3
ketoconazole	0	5.53	93.80	369	100
	0.05	5.01	94.36	334	90.5
	0.5	4.50	95.06	300	81.3
	5	2.59	96.77	173	46.8
sulphaphenazole	0.2	4.68	95.08	312	84.5
	2	4.05	95.32	270	73.1
	20	3.29	96.47	219	59.5
furafylline	0	4.12	95.05	274	100
	0.1	4.47	94.76	298	109
	1	4.32	94.53	288	105
	10	4.23	95.41	282	103

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U-1439

Study No.: A180/05LU

Effect of enzyme specific inhibitors on the metabolism of olodaterol by human liver microsomes:

inhibitor	inhibitor [μM]	mean % of total peak areas SOM 1522	olodaterol	turnover rate [pmol/min/mg protein] SOM 1522	turnover relative to control (%) SOM 1522
orphenadrine	0	5.80	93.30	386	100
	5	5.51	93.70	367	95.0
	50	4.79	94.15	319	82.6
	500	1.84	97.38	122	31.7
tranylepromine	0.1	5.86	92.92	390	101
	1	5.30	94.27	353	91.4
	10	3.71	95.36	247	63.9
montelukast	0.05	5.41	93.77	361	102
	0.5	4.43	94.66	295	83.6
	5	3.06	95.98	204	57.6
ticlopidine	0.1	5.19	93.63	346	97.9
	1	5.15	94.11	343	97.1
	10	4.70	94.49	313	88.7

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U-1439

Study No.: A180/05LU

Study system: Human liver microsomes

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Method: The effect of anti-CYP antibodies on the metabolism of olodaterol by human liver microsomes was investigated. [¹⁴C]olodaterol (50 μM) was incubated with human liver microsomes (0.5 mg protein/mL) in the presence and absence of enzyme specific antibodies (anti-CYP 2B6, anti-CYP 2C8 and anti-CYP 3A4).
The effect of the antibodies on the metabolism of olodaterol was quantitatively assessed using HPLC with radioactivity detection.

Tabulated results:

Anti-CYP 2C8 inhibited SOM 1522 (O-desmethyl olodaterol, U3) formation to about 80% relative to control without antibodies.

Anti-CYP 2B6 and anti-CYP 3A4 antibodies had no effect.

antibody	volume [μL]	mean % of total peak areas SOM 1522	olodaterol	turnover rate [pmol/min/mg protein] SOM 1522	turnover rate relative to control (%) SOM 1522
anti-CYP 2B6	0	6.48	92.21	432	100
	2	6.93	91.77	462	107
	5	7.09	91.74	473	109
	10	6.97	92.53	464	108
	20	7.63	92.38	508	118
anti-CYP 2C8	2	4.99	94.34	333	77.1
	5	4.88	94.25	325	75.4
	10	4.84	94.55	323	74.7
	20	5.18	94.42	345	79.9
anti-CYP 3A4	2	6.56	92.77	437	101
	5	6.08	93.13	405	93.9
	10	6.01	93.67	400	92.7
	20	7.39	91.93	493	114
control without micros	0	NOP	99.27	NDet	0

NOP no peak found

NDet not detectable

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験： *In Vitro* 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U■■-1439

Study No.: A180/05LU

Additional Information:

Inhibition of SOM 1522 (*O*-desmethyl olodaterol, U3) formation by a combination of anti CYP 2C8 antibodies and sulphaphenazole resulted in a decrease of the turnover to about 20% compared to control without inhibitor.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U-1439

Study No.: A180/05LU

Study system: Human liver microsomes

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Method: A correlation analysis of SOM 1522 formation with prototypical and selective CYP test reactions for a panel of 12 individual human liver microsomes was performed. [¹⁴C]Olodaterol (200 µM) was incubated with human liver microsomes (0.5 mg protein/mL) of 12 individual donors. Formation of metabolites was quantitatively assessed using HPLC with radioactivity detection.

Tabulated results:

Formation of SOM 1522 (*O*-desmethyl olodaterol, U3) did not correlate with any of the test reactions. Correlation analysis in the presence of triacetyloleandomycin increased the correlation coefficients for diclofenac 4'-hydroxylation from 0.5391 to 0.7350 and for paclitaxel 6α-hydroxylation from 0.3412 to 0.5223. Correlation analysis in the presence of sulphaphenazole increased the correlation coefficient for paclitaxel 6α-hydroxylation from 0.3412 to 0.6354.

Correlation coefficients for SOM 1522 formation with CYP test reactions:

test reaction	CYP isoenzyme	formation of SOM 1522 (U3, <i>O</i> -desmethyl olodaterol) r ²
7-ethoxyresorufin <i>O</i> -dealkylation	1A2	0.0001
coumarin 7-hydroxylation	2A6	0.0083
<i>S</i> -mephenytoin <i>N</i> -demethylation	2B6	0.5199
paclitaxel 6α-hydroxylation	2C8	0.3412
diclofenac 4'-hydroxylation	2C9	0.5391
<i>S</i> -mephenytoin 4'-hydroxylation	2C19	0.0588
dextromethorphan <i>O</i> -demethylation	2D6	0.1964
chlorzoxazone 6-hydroxylation	2E1	0.0387
testosterone 6β-hydroxylation	3A4/5	0.4229
lauric acid 12-hydroxylation	4A9/11	0.0006
cytochrome P450	total	0.2771

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U-1439

Study No.: A180/05LU

Study system: Human expressed cytochrome CYP enzymes (Supersomes™)

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Method: The metabolism of olodaterol by human expressed CYP enzymes was investigated. [¹⁴C]Olodaterol (200 μM) was incubated with human expressed CYP Supersomes™ (50 pmol CYP/mL). Formation of metabolites was quantitatively assessed using HPLC with radioactivity detection.

Tabulated results:

CYP 2C8 and CYP 2C9 were able to metabolise [¹⁴C]olodaterol under formation of SOM 1522 (O-desmethyl olodaterol, U3). Turnover of [¹⁴C]olodaterol by CYP 3A4, that resulted in the formation of SOM 1522, was only observed in incubations containing CYP 3A4 + b5 Supersomes™.

Metabolism of olodaterol by expressed human CYP enzymes:

CYP isoenzyme	mean % of total peak areas SOM 1522	olodaterol	turnover rate [pmol/min/pmol CYP] SOM 1522
control	NA	99.54	NA
1A1	0.08 ^a	99.20	0.11 ^a
1A2	NA	99.49	NA
2A6 + b5	NA	99.20	NA
2B6 + b5	NA	99.24	NA
2C8 + b5	1.57	97.90	2.09
2C9-Arg	2.27	97.18	3.03
2C19	0.14 ^a	99.17	0.18 ^a
2D6*1	0.27 ^a	99.46	0.36 ^a
2E1 + b5	NA	99.59	NA
3A4+OR	NA	99.72	NA
3A4+OR+b5	0.20 ^a	97.43	0.27 ^a
4A11	NA	99.83	NA

^a below the lower limit of linear detection range

NA not applicable due to no peak formation observed

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U-1439

Study No.: A180/05LU

Study system: Human liver microsomes and expressed cytochrome CYP enzymes (Supersomes™)

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Method: Enzyme kinetics of olodaterol by human liver microsomes and human expressed CYP enzymes were investigated. [¹⁴C]olodaterol (up to 200 μM) was incubated with human liver microsomes (0.2 mg protein/mL) and expressed CYP Supersomes™ (50 pmol CYP/mL) in the presence of NADPH for 20 min. Formation of metabolites was quantitatively assessed using HPLC with radioactivity detection. Turnover rates were used to calculate enzyme kinetic parameters K_m and V_{max}.

Tabulated results:

Formation rates of SOM 1522 (O-desmethyl olodaterol, U3) followed one-enzyme Michaelis-Menten kinetics. Data were analysed by non-linear regression analysis assuming a one-enzyme Michaelis-Menten kinetic model. Single values of two independent experiments were used to calculate the enzyme kinetic parameters. K_m values obtained in CYP 2C8 and CYP 2C9 Supersomes™ were comparable to the K_m obtained in human liver microsomes.

matrix	SOM 1522 formation (O-desmethyl olodaterol, U3)	
	K _m [μM]	V _{max} [pmol/min/mg protein]
human liver microsomes	95.1	944
CYP 2C8 Supersomes™	120	5.25 ^a
CYP 2C9 Supersomes™	88.4	4.93 ^a

^a pmol/min/pmol CYP

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U■■-1439

Study No.: A180/05LU

Study system: Human hepatocytes

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Method: The metabolism of [¹⁴C]olodaterol by human hepatocytes was investigated. [¹⁴C]Olodaterol (50 μM) was incubated with freshly prepared human hepatocytes (10⁶ cells/mL) of three individual donors in suspension cultures for up to 4 h. Duplicate incubations were performed. Formation of metabolites was quantitatively assessed using HPLC with radioactivity detection. Metabolites were identified by ESI-QTOF-MS/MS measurement.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U-1439

Study No.: A180/05LU

Tabulated results:

The metabolism of olodaterol by human hepatocytes resulted in the formation of three predominant metabolites, the O-demethylated product of olodaterol (SOM 1522, U3), SOM 1522-glucuronide (U8) and olodaterol-glucuronide (CD 992, U9). Additional metabolites were formed at low amounts that were usually close to or below the lower limit of linear detection range and that were therefore not further elucidated.

Metabolism of [¹⁴C]olodaterol by human hepatocytes (mean values of up to three individual donors, duplicate incubations; calculated from [U-1439, Tables 11: 33, 11: 35 and 11: 37]).

	time [h]	% of total peak areas			olodaterol	U7	U8	U9	n
		U2	U3	U9					
mean	0	NDet	NDet	NDet	99.35	NDet	NDet	NDet	3
SD		NDet	NDet	NDet	0.33	NDet	NDet	NDet	3
CV %		NC	NC	NC	0.33	NC	NC	NC	3
mean	0.5	0.29 ^a	1.93	0.48 ^a	95.50	NDet	0.48 ^a	0.96 ^a	3
SD		0.33	0.42	0.54	1.95	NDet	0.54	0.81	3
CV %		112	21.7	111	2.04	NC	111	84.5	3
mean	1	1.04 ^a	2.86	2.01	90.27	0.14 ^a	2.01	2.53	3
SD		0.62	0.36	1.17	3.07	0.24	1.17	1.23	3
CV %		59.4	12.7	57.9	3.40	170	57.9	48.7	3
mean	1.5	1.28	3.46	3.17	87.87	NDet	3.17	3.65	2
SD		0.34	0.37	1.23	3.37	NDet	1.23	1.90	2
CV %		26.4	10.7	39.0	3.83	NC	39.0	52.1	2
mean	2	2.49	4.57	5.58	79.02	0.79	5.58	6.08	3
SD		1.04	1.01	2.37	6.92	0.28	2.37	2.77	3
CV %		41.9	22.1	42.5	8.75	36.0	42.5	45.6	3
mean	4	6.66	7.78	20.05	42.70	2.69	20.05	18.6	1
SD		0.49	0.88	0.92	0.59	0.37	0.92	0.28	1
CV %		7.43	11.4	4.58	1.39	14.0	4.58	1.52	1

a one or more values BLR n number of hepatocyte donors

NC not calculated NDet not detectable

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U-1439

Study No.: A180/05LU

Tabulated results: (continued)

	time [h]	turnover rate [pmol/10 ⁶ cells]						n
		U2	U3	U7	U8	U9		
mean	0	0	0	0	0	0	3	
SD		0	0	0	0	0	3	
CV %		NC	NC	NC	NC	NC	3	
mean	0.5	146 ^a	964	0	242 ^a	478 ^a	3	
SD		163	210	0	269	403	3	
CV %		112	21.7	NC	111	84.5	3	
mean	1	519 ^a	1431	71.7 ^a	1007	1263	3	
SD		309	181	122	583	615	3	
CV %		59.4	12.7	170	57.9	48.7	3	
mean	1.5	641	1730	0	1583	1825	2	
SD		170	185	0	617	951	2	
CV %		26.4	10.7	NC	39.0	52.1	2	
mean	2	1245	2283	393	2789	3038	3	
SD		521	505	142	1186	1385	3	
CV %		41.9	22.1	36.0	42.5	45.6	3	
mean	4	3330	3888	1343	10025	9300	1	
SD		247	442	187	460	141	1	
CV %		7.43	11.4	14.0	4.58	1.52	1	

^a one or more values BLR

n number of hepatocyte donors

NC not calculated

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.A 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-2

Report No.: U■■-1439

Study No.: A180/05LU

Study system: Human lung microsomes

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Method: [¹⁴C]olodaterol (50 µM) was incubated with pooled human lung microsomes (1 mg protein/mL) of 3 male and 6 female donors (including smokers) for 1 h. The formation of metabolites was quantitatively assessed using HPLC with radioactivity detection and metabolites were identified by HPLC-MS/MS measurement.

Tabulated results:

There was no metabolism of olodaterol by human lung microsomes.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.B 薬物動態試験：In Vitro 代謝

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-12

Report No.: U-1331

Study No.: A282/08TE

Study system: Human microsomes from liver, lung, kidney and intestine; human cytosol and S9000 tissue homogenates from lung, liver, intestine; expressed human UDP-glucuronosyltransferases (UGT) and human sulphotransferases (SULT)

Test items: olodaterol, SOM 1522

Method: The *in vitro* glucuronidation of olodaterol and the *in vitro* sulphation of its *O*-demethylated metabolite SOM 1522 was investigated by using pooled human liver, lung, kidney and intestinal microsomes (glucuronidation of olodaterol) and pooled human lung, liver and intestinal cytosol and tissue S9000 homogenate (sulphation of SOM 1522). In addition, the involved enzymes were identified by using expressed UGT (glucuronidation) and SULT (sulphation) enzymes.

Tabulated results:

Glucuronidation of olodaterol	Microsome samples	V _{max} [pmol/min/mg]				K _m [μM]	V _{max} /K _m [μL/min/mg]	
		human liver	human kidney	human intestine	human lung			
Expressed UGT enzymes	Expressed UGT enzymes	UGT1A1				137	64	0.47
		UGT1A7				452	123	0.27
		UGT1A9				662	195	0.29
		UGT2B7				124	296	2.39
		UGT2B7 with BSA ^a				81	186	2.30
Sulphation of SOM 1522	Tissues	human liver (S9000)				490	52	9
		human liver (cytosol)				640	58	11
		human lung (S9000)				180	12	15
		human intestine (cytosol)				2900	11	270
	Expressed SULT enzymes	SULT1A1				29000	23	1300
		SULT1A3				20000	12	1700

^a incubation experiments in the presence of bovine serum albumin (BSA)

^b due to very low olodaterol glucuronidation activity in lung microsomes, experiments for the assessment of enzyme kinetics were not performed for this organ

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.B 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-12

Report No.: U-1331

Study No.: A282/08TE

Additional Information:

Glucuronidation of olodaterol:

Only negligible glucuronidation was observed with pooled human lung microsomes. Therefore, enzyme kinetics were assessed for human liver, kidney and intestinal microsomes and standard hyperbolic enzyme kinetics (Michaelis-Menten type) were observed. A higher glucuronidation clearance was observed in liver and kidney microsomes compared to intestinal microsomes and it can be concluded that olodaterol is effectively glucuronidated in liver, kidney and intestine but not in lung. Olodaterol was also incubated with expressed human UGT enzymes. Six UGTs were identified that were able to glucuronidate olodaterol. The highest glucuronidation activity was observed for UGT2B7, UGT1A1, UGT1A7 and UGT1A9 (UGT1A3 and UGT1A8 showed only minor activity). Glucuronidation by expressed UGTs followed hyperbolic Michaelis-Menten enzyme kinetics. The UGTs identified are expressed in the intestine (UGT1A7, UGT1A1), liver (UGT1A1, UGT1A9, UGT2B7) and kidney (UGT1A9).

Sulphation of SOM 1522:

Human intestine exhibited the highest sulphation activity with an intrinsic clearance more than 20-fold higher than that in liver. Comparable rates of sulphation of SOM 1522 were observed for human liver and lung whereas kidney exhibited a lower sulphation activity.

Enzyme kinetics were assessed for human liver, lung and intestinal cytosol / S9000 homogenate and for expressed SULT1A1 and SULT1A3, both exhibiting high sulphation activity. Standard hyperbolic enzyme kinetics (Michaelis-Menten type) were observed and results indicate that the intestine is the major site for sulphation of SOM 1522. As SULT1A1 and 1A3 are both expressed in the intestine it is concluded that both are most likely the major catalysts for this metabolic pathway.

Thus, inhaled olodaterol will most likely undergo only minimal, if any, metabolic conjugation by UGT-catalysed glucuronidation. In marked contrast, swallowed olodaterol will be extensively glucuronidated in intestine and liver and SOM 1522, after formed by oxidative O-demethylation of olodaterol, will be very rapidly and effectively sulphated, in particular in the intestine.

チオトロピウム+オロダテロール

藥物動態試驗: *In Vitro* 代謝

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

10.C 薬物動態試験：In Vitro 代謝（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-6

Report No.: U■■-1659

Study No.: A452/05BC, A646/05BC,

A465/05BC, A467/06BC,

A468/06BC, A470/06BC,

A475/06BC, A476/06BC

Additional Information:

Main metabolic reactions of [¹⁴C]olodaterol with human and rat hepatocytes were identical. The pathways were the glucuronidation of the 6-hydroxybenzoxazine-moiety of olodaterol to CD 992, the demethylation of the methoxyphenyl-moiety of olodaterol to SOM 1522 and the glucuronidation of SOM 1522 to CD 11249 and CD 10915. CD 11249 was predominantly formed by rat hepatocytes; CD 10915 was the dominant glucuronide of SOM 1522 in incubations with human hepatocytes. The metabolite CD 12656 was identified as phase II sulphate of SOM 1522. It was predominantly observed in human hepatocytes. In rat hepatocytes CD 12656 was only detected in trace amounts. The metabolite M389(2) with 3,5-dihydroxy-2,3-dihydrobenzopyrrol structure was detected by mass spectrometry methods in incubations with human and rat hepatocytes. The formation of M389(2) was proposed to occur via an initial metabolic activation by oxidation of the methylene unit of the benzoxazine moiety of olodaterol. Subsequently, an intramolecular cyclization results in the formation of a quinonimine-system that is finally reduced to yield M389(2). Indirect evidence for the chemical reactive quinonimine intermediate was given by the structures of two adducts with glutathione M694(1) and M694(2). The metabolites M389(2), M694(1) and M694(2) were isolated from incubations of dexamethasone induced rat liver microsomes in the presence and without glutathione. The structures of these three metabolites were elucidated by NMR-spectroscopy and mass spectrometry experiments. Due to its reactivity, the quinonimine-intermediate was supposed to be involved in the formation of not extractable covalently bound radioactivity to plasma proteins, that was observed in the *in vivo* metabolism studies including rats (CTD 4.2.2.4-1, U■■-1514) dogs (CTD 4.2.2.4-3, U■■-1057), mice (CTD 4.2.2.4-2, U■■-1516) and humans (CTD 5.3.2.2-9, U■■-1129), M583(1), a metabolite with hydroquinone structure which was stabilized by glucuronidation was only identified *in vitro* in incubations with rat hepatocytes and *in vivo* in urine of mice and rabbits and plasma of rabbits after administration of [¹⁴C]olodaterol (CTD 4.2.2.4-2, U■■-1516, CTD 4.2.2.4-4, U■■-1317). Additional metabolites with unknown structures were identified by radioactivity and mass spectrometry detection in low amounts (< 1.4% of sample radioactivity) in incubations with human and rat hepatocytes. Further trace amounts of *in vitro* metabolites with isomeric structures formed by the combination of oxidation, demethylation and glucuronidation at several positions could be identified by mass spectrometry investigations. The concentrations were below the detection limit of the HPLC/radioactivity detection system. Minute amounts of metabolites of human hepatocytes with unknown structure (M373(1), M391(4), M551(3), M551(4)) which were only identified by mass spectrometry investigations were not detected in incubations with rat hepatocytes. Other minute amounts of metabolites were only identified in incubations with rat hepatocytes.

11.A

Scheme compiled from data of reports:

CTD



2.6.5. 薬物動態試験概要表

チオトロピウム+オロダテロール

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

11.B

薬物動態試験：推定代謝経路

Test Article: Olodaterol

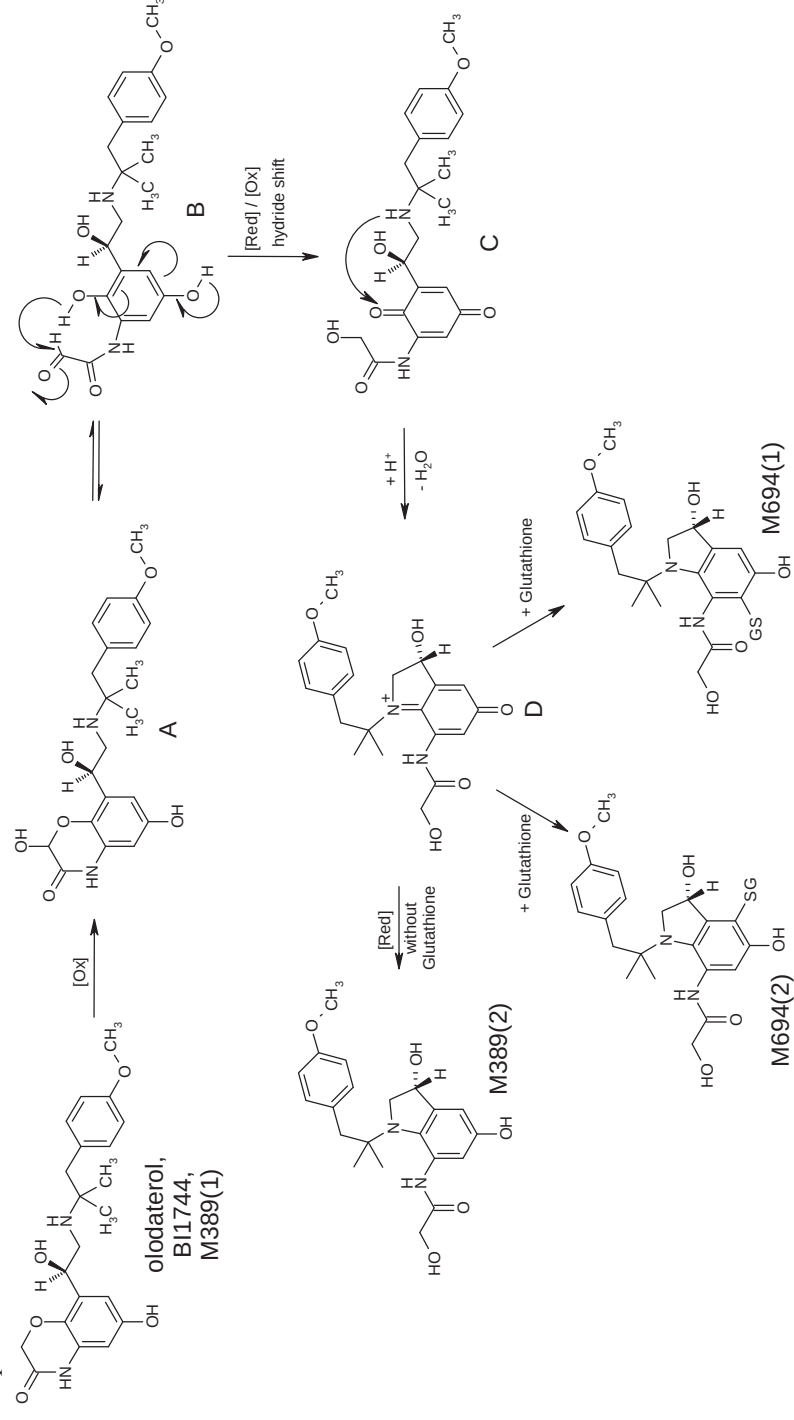
Location in Module: CTD 5.3.2.2-6

Report No.: U-1659

Study No.: A452/05BC, A646/05BC, A465/05BC, A467/06BC, A468/06BC, A470/06BC, A475/06BC, A476/06BC

A479/06BC

Proposed mechanism of metabolic activation:



Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

12.A 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-11

Report No.: U■■-1076

Study No.: A031/09OS

Type of study: *In vitro* cytochrome P450 enzyme induction study using primary human hepatocytes

Test item: olodaterol

Method: The *in vitro* induction potential of olodaterol on 6 cytochrome P450 enzymes was assessed in sandwich cultured primary human hepatocytes from three different donors. Six concentrations of olodaterol ranging from 0.5 - 1000 pM (0.0005 nM, 0.002 nM, 0.01 nM, 0.05 nM, 0.2 nM and 1 nM) in culture medium were tested with regard to the very low circulating plasma concentrations of olodaterol and its metabolites.

In situ enzyme activities of human cytochrome P450 enzymes were assessed using selective test reactions after 48 h of treatment:

phenacetin- <i>O</i> -deethylation	CYP 1A2
bupropion-2-hydroxylation	CYP 2B6
amodiaquine- <i>N</i> -deethylation	CYP 2C8
diclofenac-4'-hydroxylation	CYP 2C9
<i>S</i> -mephenytoin-4'-hydroxylation	CYP 2C19
testosterone-6β-hydroxylation	CYP3A4

In this study also total RNA was isolated from the sandwich cultured hepatocytes and mRNA levels were determined by TaqMan real-time RT-PCR for CYP 1A2, CYP 2B6, CYP 2C8, CYP 2C9, CYP 2C19 and CYP 3A4. The mRNA amounts were normalized to beta-actin as endogenous control and were compared to samples from vehicle control and prototypical inducers (omeprazole (= OME), phenobarbital (= PB), rifampicin (= RIF)).

In parallel, concentrations of the phenol-glucuronide metabolite of olodaterol (CD 992) were measured in cell culture supernatants after two consecutive 24 h incubations using a semi-quantitative HPLC-MS/MS method. Hereby, CD 992 was determined indirectly via quantification of olodaterol in cell culture supernatants before and after glucuronidase treatment.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

12.A 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-11
Report No.: U-1076
Study No.: A031/09OS

Tabulated results:

Fold Induction (Control = 1)	CYP1A2				CYP2B6				CYP2C8			
	Activity		mRNA		Activity		mRNA		Activity		mRNA	
	mean	CV	mean	CV	mean	CV	mean	CV	mean	CV	mean	CV
Assay: Olodaterol	1.05	15	1.11	20	1.13	8	1.03	21	1.07	29	1.20	44
0.0005 nM	0.97	12	1.03	6	0.94	8	0.71	26	1.33	50	0.98	17
0.002 nM	0.91	39	1.05	7	0.89	16	0.68	45	1.40	46	0.90	26
0.01 nM	0.97	16	1.20	19	1.06	12	0.96	16	1.35	40	1.14	56
0.05 nM	1.06	14	1.32	21	1.12	17	1.19	19	2.18	88	1.60	55
0.2 nM	1.01	18	1.25	6	0.93	9	1.03	5	2.28	76	1.52	20
1 nM	18.5	53	43.2	101	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
50 µM OME	NA	NA	NA	NA	18.0	37	47.2	42	NA	NA	NA	NA
1 mM PB	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	6.03	54	14.6	113
25 µM RIF												
Fold Induction (Control = 1)	CYP2C9				CYP2C19				CYP3A4			
	Activity		mRNA		Activity		mRNA		Activity		mRNA	
	mean	CV	mean	CV	mean	CV	mean	CV	mean	CV	mean	CV
Assay: Olodaterol	1.04	19	1.16	16	1.13	18	0.90	9	0.85	8	1.08	46
0.0005 nM	1.04	6	1.11	10	1.06	14	0.68	20	0.81	27	0.87	3
0.002 nM	1.20	23	1.14	8	0.99	22	0.64	39	0.82	23	0.90	14
0.01 nM	1.10	2	1.17	30	0.99	16	0.75	20	0.92	17	0.85	20
0.05 nM	1.11	4	1.28	24	1.09	8	0.92	21	0.85	27	1.05	24
0.2 nM	1.47	39	1.14	6	1.12	13	0.93	32	0.79	23	0.81	41
1 nM	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
50 µM OME	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
1 mM PB	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
25 µM RIF	3.02	39	2.74	57	3.41	43	3.73	90	24.6	69	113	123

NA not applicable

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

12.A 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-11

Report No.: U■■-1076

Study No.: A031/09OS

Additional Information:

No relevant induction of *in vitro* enzyme activity was found for any of the P450 enzymes tested following treatment with up to 1000 pM (1 nM) of olodaterol for 48 hours. No relevant induction of mRNA expression levels was observed for the respective enzymes upon treatment with olodaterol.

In situ formation of CD 992 was measured indirectly using a semi-quantitative HPLC-MS/MS method. In situ formation of CD 992 increased with increasing concentrations of olodaterol and was quantifiable for the 50, 200 and 1000 pM treatment groups. In these samples the relative amount of CD 992 in the 24 h supernatants was 7-24% of the initial olodaterol input. Thus, substantial intracellular exposure of primary hepatocyte cultures to olodaterol and the metabolite CD 992 can be concluded.

Based on the given results, metabolic drug-drug interactions resulting from induction of cytochrome P450 enzymes are not expected for olodaterol and its glucuronide metabolite CD 992.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

12.B 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-1

Report No.: U■■-1043

Study No.: A167/04LU

Type of study: In vitro inhibition of cytochrome P450 enzymes, in vitro drug-drug interaction study

Test item: olodaterol

Method: Experiments with pooled human liver microsomes in the presence of NADPH using test substrates for 10 human cytochrome P450 enzymes:

phenacetin <i>O</i> -deethylation	test for CYP 1A1/1A2;	coumarin 7-hydroxylation	test for CYP 2A6
bupropion hydroxylation	test for CYP 2B6;	paclitaxel 6 α -hydroxylation	test for CYP 2C8
tolbutamide hydroxylation	test for CYP 2C9;	<i>S</i> -mephenytoin 4'-hydroxylation	test for CYP 2C19
bufuralol 1'-hydroxylation	test for CYP 2D6;	lauric acid 11-hydroxylation	test for CYP 2E1
nifedipine oxidation	test for CYP 3A4;	testosterone 6 β -hydroxylation	test for CYP 3A4
midazolam 1'-hydroxylation	test for CYP 3A4	erythromycin <i>N</i> -demethylation	test for CYP 3A4
lauric acid 12-hydroxylation	test for CYP 4A11		

The test substrates were incubated in the presence of 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M and 100 μ M of olodaterol. The potential in vitro inhibition of the selective test reactions was used to assess the potential for drug-drug interactions on comedICATIONS that may be caused by olodaterol. In addition, the potential for mechanism-based inhibition of CYP 3A4 by olodaterol was investigated. CYP 3A4 dependent nifedipine oxidation and testosterone 6 β -hydroxylation was used as test assay.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

12.B 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害（続き）

Location in Module: CTD 5.3.2.2-1
Report No.: U-1043
Study No.: A167/04LU

Tabulated results:

Olodaterol inhibited CYP 2D6 catalysed bufuralol 1'-hydroxylation with a K_i of 1.92 μM . There was no inhibition of other CYP isoenzymes under investigation. For all other assays of the 13 test reactions the IC_{50} was $> 100 \mu\text{M}$. There was no indication of irreversible CYP 3A4 inhibition by olodaterol.

Test reaction	CYP enzyme	IC_{50} [μM]	K_i [μM]
phenacetin <i>O</i> -deethylation	1A1/1A2	> 100	ND
coumarin 7-hydroxylation	2A6	> 100	ND
bupropion hydroxylation	2B6	> 100	ND
paclitaxel 6 α -hydroxylation	2C8	> 100	ND
tolbutamide hydroxylation	2C9	> 100	ND
<i>S</i> -mephenytoin 4'-hydroxylation	2C19	> 100	ND
bufuralol 1'-hydroxylation	2D6	4.25	1.92
lauric acid 11-hydroxylation	2E1	> 100	ND
mifedipine oxidation	3A4	> 100	ND
testosterone 6 β -hydroxylation	3A4	> 100	ND
midazolam 1'-hydroxylation	3A4	> 100	ND
erythromycin <i>N</i> -demethylation	3A4	> 100	ND
lauric acid 12-hydroxylation	4A11	> 100	ND

ND not determined

Additional information:

As the therapeutic olodaterol plasma concentrations are far below 1 μM the I/K_i ratio results in a value of 7.19×10^{-6} . Therefore, an inhibition of CYP 2D6 by olodaterol seems to be highly unlikely. Inhibition of other CYP enzymes is even more unlikely because no relevant inhibition was observed at olodaterol concentrations of up to 100 μM .

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

12.C

薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-10

Report No.: U-2417

Study No.: A258/09LU

Type of study: *In vitro* inhibition of cytochrome P450 enzymes, in vitro drug-drug interaction study

Test item: olodaterol-Glucuronide (CD 992)

Method: Experiments with pooled human liver microsomes in the presence of NADPH using test substrates for 8 human cytochrome P450 enzymes:

phenacetin <i>O</i> -deethylation	test for CYP 1A1/1A2;	bupropion hydroxylation	test for CYP 2B6;
amodiaquine <i>N</i> -deethylation	test for CYP 2C8	diclofenac 4'-hydroxylation	test for CYP 2C9
<i>S</i> -mephenytoin 4'-hydroxylation	test for CYP 2C19	dextromethorphan <i>O</i> -demethylation	test for CYP 2D6
lauric acid 11-hydroxylation	test for CYP 2E1	nifedipine oxidation	test for CYP 3A4
testosterone 6β-hydroxylation	test for CYP 3A4	midazolam 1'-hydroxylation	test for CYP 3A4

The test substrates were incubated in the presence of 0.1 μM, 1 μM, 10 μM and 100 μM of olodaterol-glucuronide (CD 992). The potential in vitro inhibition of the selective test reactions was used to assess the potential for drug-drug interactions on comedications that may be caused by olodaterol-glucuronide (CD 992). In addition, the potential for mechanism-based inhibition of CYP enzymes (1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 3A4) by olodaterol-glucuronide (CD 992) was investigated.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

12.C 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害（続き）

Location in Module: CTD 5.3.2.2-10

Report No.: U-2417

Study No.: A258/09LU

Tabulated results:

There was no reversible inhibition of CYP enzymes under investigation at CD 992 concentrations of up to 100 μ M. CD 992 was a very poor mechanism-based inactivator of CYP 2D6 with K_I and k_{inact} values for the inhibition of dextromethorphan *O*-demethylation in human liver microsomes of 99.0 μ M and 0.044 min^{-1} , respectively.

test reaction	CYP enzyme	IC ₅₀ [μ M]
phenacetin <i>O</i> -deethylation	1A1/1A2	> 100
bupropion hydroxylation	2B6	> 100
amodiaquine <i>N</i> -deethylation	2C8	> 100
diclofenac 4'-hydroxylation	2C9	> 100
<i>S</i> -mephenytoin 4'-hydroxylation	2C19	> 100
dextromethorphan <i>O</i> -demethylation	2D6	> 100
lauric acid 11-hydroxylation	2E1	> 100
nifedipine oxidation	3A4	> 100
testosterone 6 β -hydroxylation	3A4	> 100
midazolam 1'-hydroxylation	3A4	> 100

Additional information:

With the assumption of therapeutic CD 992 plasma concentrations below 1 μ M an inhibition of CYP 2D6 by CD 992 seems to be highly unlikely. Inhibition of other CYP enzymes is even more unlikely because no relevant inhibition was observed at CD 992 concentrations of up to 100 μ M.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.A 薬物動態試験：排泄 Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-5

Report No.: U-2458

Study No.: A128/05GR

Species / Strain:	Mouse CrI:CD1(ICR) 4 m	Mouse CrI:CD1(ICR) 4 m	Mouse CrI:CD1(ICR) 4 f
Gender (m/f) / Number of animals:	4 m	4 m	4 f
Feeding condition:	ad libitum	ad libitum	ad libitum
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution
Method of Administration:	intratracheal bolus	intratracheal bolus	intravenous bolus
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (μmol/kg):	2.58	2.58	2.58
Dose (μg/kg):	1000 (active moiety)	1000 (active moiety)	1000 (active moiety)
Analyte:	radioactivity	radioactivity	radioactivity
Assay:	LSC	LSC	LSC

Excretion route:	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
Time interval [h]:									
0 - 8 h	n.s.			11.7			n.s.		
8 - 24 h	12.5			19.5			18.8		
24 - 48 h	0.6			0.6			0.4		
48 - 72 h	0.2			0.1			0.3		
72 - 96 h	0.1			0.0			0.1		
subtotal	13.4			31.9			19.6		
0 - 24 h		67.1			62.1			63.1	
24 - 48 h		3.5			2.7			5.9	
48 - 72 h		0.6			0.6			1.5	
72 - 96 h		0.2			0.3			0.6	
subtotal:		71.4			65.7			71.1	
Total:		84.8 ^a				97.6 ^c			90.7 ^d

a cage wash accounted for 4.7%
b cage wash accounted for 4.1%
c cage wash accounted for 2.3%
d cage wash accounted for 6.8%
n.s. no sample obtained

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.A 薬物動態試験：排泄（続き）

Location in Module: CTD 4.2.2.5-5
Report No.: U-2458
Study No.: A128/05GR

Species / Strain:	Mouse Cri:CD1(ICR)	Mouse Cri:CD1(ICR)
Strain:	4 m	4 f
Gender (m/f) / Number of animals:	ad libitum	ad libitum
Feeding condition:		
Vehicle/Formulation:	water	water
Method of Administration:	oral gavage	oral gavage
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (μmol/kg):	2.58	2.58
Dose (μg/kg):	1000 (active moiety)	1000 (active moiety)
Analyte:	radioactivity	radioactivity
Assay:	LSC	LSC

Excretion route:	Urine	Feces	Total	Urine	Feces	Total
Time interval [h]:						
0 - 8 h	1.7			0.8 ^b		
8 - 24 h	5.1			2.7		
24 - 48 h	0.4			0.1		
48 - 72 h	0.0			0.0		
72 - 96 h	0.0			0.0		
subtotal	7.2			3.6		
0 - 24 h		75.6			90.2	
24 - 48 h		10.1			1.6	
48 - 72 h		0.7			0.1	
72 - 96 h		0.1			0.0	
subtotal:		86.5			91.9	
Total:			93.7 ^a			95.5 ^c

a cage wash accounted for 1.3%
b based on one aliquot
c cage wash accounted for 1.0%

Test Article: Olodaterol

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.A 薬物動態試験：排泄（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-5

Report No.: U-2458

Study No.: A128/05GR

Additional Information:

Within 96 hours After intravenous administration 31.9% (19.6%) of drug-related radioactivity were excreted into urine in males (females). In the same period 65.7% (71.1%) were excreted into feces in males (females). Within 96 hours after intratracheal administration 13.4% (13.7%) of drug-related radioactivity were excreted via urine while 71.4% (68.5%) were excreted into feces in males (females). After oral administration only 7.2% (3.6%) were excreted into urine in males (females) while 86.5% (91.9%) were excreted into feces in males (females).

The total recovery in excreta was 97.6% for males and 90.7% for females after intravenous administration. After intratracheal administration the total recovery was 84.8% for males and 82.2% for females. Total recovery after oral administration was 93.7% for males and 95.5% for females. For all groups cage wash samples accounted for 1.0 - 6.8% of the dose. For all administration routes, excretion was almost completed after 48 hours.

The ratio of urinary excreted drug-related radioactivity between oral and intravenous administration of 22.6% (18.4%) in males (females) indicate a low absorption after oral administration. The ratio of urinary excreted drug-related radioactivity between intratracheal and intravenous administration of 42.0% (69.9%) in males (females) indicate a moderate absorption after intratracheal instillation.

There was no significant gender effect in terms of excretion balance and routes of excretion observed. Differences were due to the intra-individual variability of the animal experiment.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.B 薬物動態試験：排泄 Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-1

Report No.: U-1007

Study No.: A117/04GR

Species / Strain:

Strain:

Gender (m/f) / Number of animals:

Feeding condition:

Vehicle/Formulation:

Method of Administration:

Test item:

Dose (μmol/kg):

Dose (μg/kg):

Analyte:

Assay:

	Rat Ctrl:WI(Han) 5 m fasted	Rat Ctrl:WI(Han) 5 m fasted	Rat Ctrl:WI(Han) 5 m fasted
	phys. saline solution intratracheal bolus [¹⁴ C]olodaterol 0.2	phys. saline solution intravenous bolus [¹⁴ C]olodaterol 0.2	aqua bidest oral gavage [¹⁴ C]olodaterol 0.2
	77.7 (active moiety) radioactivity LSC	77.7 (active moiety) radioactivity LSC	77.7 (active moiety) radioactivity LSC

Excretion route:	Urine	Feces	Total	Carcass	Feces	Urine	Total	Feces	Total
Time interval [h]:									
0 - 8 h	7.4		7.4			11.6	11.6	1.22	1.2
0 - 24 h	13.9	58.5	72.4		39.8	21.4	61.2	1.64	94.4
0 - 48 h	15	76	91		64.9	22.9	87.8	1.7	99.6
0 - 72 h	15.2	78.3	93.5		67.3	23.2	90.5	1.72	100.1
0 - 96 h	15.3	79	94.3		68.4	23.4	91.8	1.72	100.2
0 - 120 h	15.3	79.2	94.5		69	23.5	92.5		
0 - 144 h					69.1	23.6	94.3		
0 - 168 h									
Data is expressed as cumulative data									

Additional Information:

After intravenous dosing of [¹⁴C]olodaterol the drug-related radioactivity was mainly excreted with feces (69.1%), probably predominantly via biliary excretion (almost 40% within 6 hours, but not completed within this time). Urinary excretion contributed to about 24% to the total excretion within 168 h. Additional 1.64% of radioactivity was found in the carcass at 168 h.

After intratracheal dosing of [¹⁴C]olodaterol the bulk of drug-related radioactivity was excreted via feces and the urinary excretion was 15.3%. The amount absorbed (Fa) calculated from the fraction of dose excreted into the urine following intratracheal and intravenous administration was 64.8%.

After oral administration the bulk of radioactivity was excreted with feces. The urinary excretion was low with 1.72%. The total excretion was almost completed within 48 hours. The amount absorbed (Fa) calculated from the fraction of dose excreted renally following oral and intravenous administration was 7.29%. Overall, the bulk of radioactivity was almost excreted within 2 days but distinct amounts of drug-related radioactivity were excreted slowly.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.C

薬物動態試験：排泄

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-4

Report No.: U-1602

Study No.: A003/08SMB

Species / Strain:

Strain:

Gender (m/f) / Number of animals:

Feeding condition:

Vehicle/Formulation:

Method of Administration:

Test item:

Dose (μmol/kg/day):

Dose (μg/kg/day):

Analyte:

Assay:

Rat	
CrI:WI(Han)	
3 m (one animal was excluded from analysis)	
ad libitum	
phys. saline solution	
daily intratracheal bolus (14 consecutive days)	
[¹⁴ C]olodaterol	
0.8	
309 (active moiety)	
radioactivity	
LSC	

Excretion route:	Urine	Feces	Tissues & Carcass	Total
Time interval [h]:				
0 - 24 h	21.8	11.5		
24 - 48 h	23.6	113		
48 - 72 h	24.4	70.0		
72 - 96 h	24.9	69.4		
96 - 120 h	27.5	71.3		
120 - 144 h	28.0	69.5		
144 - 168 h	28.6	71.2		
168 - 192 h	27.7	69.4		
192 - 216 h	28.6	68.4		
216 - 240 h	27.9	66.6		
240 - 264 h	26.6	74.4		
264 - 288 h	27.7	63.3		
288 - 312 h	15.9	89.4		
312 - 336 h	27.5	62.8		
Subtotal (0 - 336 h)	361	970	37.8	1368.8 ^a
Subtotal (0 - 336 h) divided by number of doses received (14):	25.8	69.3	2.70	97.8 ^a

a data is given with cage wash excluded. Including the results of the cage wash the subtotal (0 - 336 h) would be 1394. Thus, the subtotal (0 - 336 h) divided by the number of doses received would be 99.7%.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.C

薬物動態試験：排泄（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.3-4

Report No.: U-1602

Study No.: A003/09SMB

Additional Information:

After once daily intratracheal administration of 0.8 µmol/kg [¹⁴C]olodaterol a mean of 25.8% of the daily administered dose were recovered in urine whereas 69.3% of the daily administered dose were recovered in feces. The steady state of excretion was reached after about three doses.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

13.D 薬物動態試験：排泄

Location in Module: CTD 4.2.2.5-3
Report No.: U-1337
Study No.: A013/07JS

Species:	Rabbit	Rabbit
Strain:	Chbb: NZW	Chbb: NZW
Gender (m/f) / Number of animals:	3 f	3 f
Feeding condition:	ad libitum	ad libitum
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	water
Method of Administration:	intravenous bolus	oral gavage
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (μmol/kg):	0.78	0.78
Dose (mg/kg):	0.3 (active moiety)	0.3 (active moiety)
Dose (μg/kg):	301 (active moiety) – calculated using the molecular weight of unlabeled olodaterol	301 (active moiety) – calculated using the molecular weight of unlabeled olodaterol
Analyte:	radioactivity	radioactivity
Assay:	LSC	LSC
Excretion route:	Urine ^a	Urine ^a
Time interval [h]:	Feces ^a	Feces ^a
0 - 8 h	NA	NA
8 - 24 h	57.0	6.8
24 - 48 h	32.6	1.5
48 - 72 h	2.4	19.1
72 - 96 h	0.5	0.4
96 - 120 h	0.3	0.7
120 - 144 h	0.1	0.1
144 - 168 h	0.0	0.1
Subtotal (0 - 168 h): mean of all 3 animals in %:	54.8	23.1
a mean value of all animals of the given time frame	42.1	56.9
NA not applicable NOS no sample	96.9	80.0

Additional Information:

The elimination was slow with a mean of about 90% of dosed radioactivity recovered within 72 h and with a mean of about 98% within 168 h after intravenous administration. Elimination after oral dosing was incomplete with a mean of about 80% of dosed radioactivity recovered within 168 h post dose. One animal of the oral route (No. 151) was subjected to another elimination pattern than the other two rabbits. From the cumulated amounts of excreted radioactivity recovered in urine within 0 - 168 h after oral and intravenous administration, a fraction absorbed, (Fa), of 42.2% (including animal No. 151) or 13.5% (excluding animal No. 151) was calculated.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

13.E 薬物動態試験：排泄 Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-2

Report No.: U-1739

Study No.: A127/05GR

Species:	Dog	Dog	Dog	Dog
Strain:	Beagle	Beagle	Beagle	Beagle
Gender (m/f) / Number of animals:	2 m / 2f	2 m / 2f	1 m* / 2f	1 m* / 2f
			* = one animal excluded from analysis	* = one animal excluded from analysis
Feeding condition:	fasted before admin.	fasted before admin.	fasted before admin.	fasted before admin.
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	phys. saline solution	tap water	tap water
Method of Administration:	single intravenous bolus	single intravenous bolus	single oral administration	single oral administration
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (µg/kg):	30 (active moiety)	30 (active moiety)	100 (active moiety)	100 (active moiety)
Analyte:	radioactivity	parent drug	radioactivity	parent drug
Assay:	LSC	HPLC-MS/MS	LSC	HPLC-MS/MS
Excretion route:	Urine	Urine	Urine	Urine
Time interval [h]:				
0 - 8 h	6.3	1.4	NOS	NOS
0 - 24 h	12.7	8.2	45.4	49.6
0 - 48 h	15.4	9.7	70.5	75.9
0 - 72 h	16.0	10.0	85.6	91.2
0 - 96 h	16.4	10.1	86.6	92.3
0 - 120 h	16.5	10.2	86.9	92.6
0 - 144 h	16.6	10.2	87.2	92.9
0 - 168 h	16.7	10.2	87.2	92.9
Data expressed as cumulative data				
NOS no sample				

Additional Information:

After intravenous administration about two thirds of radioactivity were excreted via feces and 16.7% were excreted renally. The respective renally excreted amount of parent drug was 10.2%. Even after the long sampling period of 168 h, the excretion balance was incomplete. After oral administration the bulk of radioactivity was excreted via feces whereas only 5.7% of radioactivity were excreted renally (2.1% of parent drug in urine). The excretion balance after oral administration was almost complete after 168 h (about 95% if the bile samples taken are included).

The calculated bioavailability (F) and fraction absorbed (Fa) of the urinary excretion data was 22.2% and 40.5%, respectively. The significant difference between oral absorption and bioavailability indicated a respective first pass metabolism.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

14.A 薬物動態試験：胆汁中排泄

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-1

Report No.: U-1007

Study No.: A117/04GR

Species:	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat	Rat
Strain:	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)	CrI:WI(Han)
Gender (m/f) / Number of animals:	5 m	5 m	5 m	5 m	3 m	3 m	5 m	5 m
Feeding condition:	fasted	fasted	fasted	fasted	fasted	fasted	fasted	fasted
Vehicle/Formulation:	phys. saline solution	phys. saline solution	phys. saline solution	water	water	phys. saline solution	bile from donor animals	bile from donor animals
Method of Administration:	intratracheal bolus	intravenous bolus	intraduodenal bolus	intraduodenal bolus	intraduodenal bolus	intravenous bolus	intraduodenal bolus (4 mL/kg)	intraduodenal bolus (4 mL/kg)
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (μmol/kg):	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2	0.1	-	-
Dose (μg/kg):	77.7	38.8	77.7	77.7	77.7	38.8	-	-
Analyte:	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)	(active moiety)
Assay:	radioactivity LSC	radioactivity LSC	radioactivity LSC	radioactivity LSC	radioactivity LSC	radioactivity LSC	radioactivity LSC	radioactivity LSC
Excretion route:	Bile	Bile	Bile	Bile	Bile ^a	Bile ^b	Bile ^c	Bile ^c
Time interval:								
0 - 20 m	0.674	5.57	0.778	1.23	1.23		0.151	0.151
0 - 40 m	3.94	10.9	3.4	3.7	3.7		0.353	0.353
0 - 1 h	7.64	14.5	6.71	6.58	6.58		0.562	0.562
0 - 1 h 30 m	13	21.3	10.6	9.89	9.89		0.794	0.794
0 - 2 h	17.4	24.9	13.1	13.3	13.3		1.06	1.06
0 - 2 h 30 m	21.1	27.7	16.7	15.8	15.8		1.37	1.37
0 - 3 h	23.3	30.8	19.9	18.2	18.2		1.61	1.61
0 - 3 h 30 m	24	32.7	21.3	20.5	20.5		1.98	1.98
0 - 4 h	24.4	34.2	22.7	22	22		2.27	2.27
0 - 4 h 30 m	24.7	35.7	23.7	23.5	23.5		2.47	2.47
0 - 5 h	25.1	37	24.3	24.8	24.8		2.84	2.84
0 - 5 h 30 m	25.4	38.1	25	26	26		3.11	3.11
0 - 6 h	25.6	39.5	25.6	27.4	27.4	38.5	3.35	3.35

a repeated experiment, b donor animals, c acceptor animals

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

14.A 薬物動態試験：胆汁中排泄（続き）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-1

Report No.: U■■-1007

Study No.: A117/04GR

Additional Information:

The biliary excretion after intravenous, intratracheal and intraduodenal administration of [¹⁴C]olodaterol was not completed at the end of the experiment. The examined enterohepatic cycling of olodaterol was low and slow.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

14.B 薬物動態試験：胆汁中排泄
Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-3

Report No.: U-1337

Study No.: A013/07JS

Species:	Rabbit	Rabbit
Strain:	Chbb:NZW	Chbb:NZW
Gender (m/f) / Number of animals:	2 f a	2 f a
Feeding condition:	ad libitum	ad libitum
Vehicle/Formulation:	physiological saline solution	water
Method of Administration:	intravenous bolus	intraduodenal bolus
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (μmol/kg):	0.78	0.78
Dose (mg/kg):	0.3 (active moiety)	0.3 (active moiety)
Dose (μg/kg):	301 (active moiety) – calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol	301 (active moiety) – calculated by using the molecular weight of unlabeled olodaterol
Analyte:	radioactivity	radioactivity
Assay:	LSC	LSC
Excretion route:	Bile	Bile
Time interval:		
0 - 1 h	8.3	0.5
1 - 2 h	2.0	0.6
2 - 3 h	1.9	0.4
3 - 4 h	1.9	0.3
4 - 5 h	1.8	0.1
5 - 6 h	1.7	0.2
Total	16.1	2.1

a except for the first time interval (0 - 1 h), values derive from only one animal per route only

Additional Information:

The fraction absorbed (Fa) calculated from the cumulated amounts of excreted radioactivity recovered in bile (0 - 6 h) after intravenous and intraduodenal administration was 12.5%. It is assumed that the biliary excretion after intravenous and intraduodenal administration of [¹⁴C]olodaterol was not completed at the end of the sampling period.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

14.C 薬物動態試験：胆汁中排泄 Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 4.2.2.5-2

Report No.: U■■-1739

Study No.: A127/05GR

Species:	Dog
Strain:	Beagle
Gender (m/f) / Number of animals:	1 m / 1 f
Feeding condition:	fasted
Vehicle/Formulation:	tap water
Method of Administration:	oral administration
Test item:	[¹⁴ C]olodaterol
Dose (µg/kg):	100 (active moiety)
Analyte:	radioactivity
Assay:	LSC
Excretion route:	Bile
Time interval:	
0 - 4 h male:	3.6
0 - 4 h female:	1.3
Mean:	2.5

Additional Information:

After oral administration of the test item bile was collected under Zoletil/Rompun anesthesia in two animals 4 h after drug administration. By using ultrasonic technology the gall bladder was located and punctured using a spinal biopsy needle. Bile fractions contained 3.6% and 1.3% (mean: 2.5%) of drug-related radioactivity.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.A 薬物動態試験：薬物相互作用
Test Article: Olodaterol
tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

Location in Module: CTD 5.3.2.2-13

Report No.: U-1057

Study No.: A206/06LU

Type of study: In vitro study to investigate the effect of olodaterol on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]tiotropium

Test item: Olodaterol, [¹⁴C]Tiotropium

Test system: human liver microsomes and human lung homogenate (smoker and non-smoker)

Method: [¹⁴C]Tiotropium was incubated with pooled human liver microsomes and human lung homogenate in the presence of the cosubstrate NADPH. The metabolism of [¹⁴C]tiotropium was assessed using HPLC with radioactivity detection. The effect of olodaterol at concentrations of 1, 10 and 100 μM on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]tiotropium was investigated and compared with control experiments without olodaterol.

Tabulated results: Incubation of [¹⁴C]tiotropium (10 μM) with human liver microsomes (1.0 mg protein/mL) or human lung homogenate (8.6 mg protein/mL) for 120 min resulted in the formation of low amounts of metabolites that were close to background radioactivity. Apart from predominant non-enzymatic cleavage (formation of dithienylglycolic acid), only very small amounts of a fraction designated as “other metabolites” were formed. At concentrations above 10 μM, olodaterol weakly inhibited the formation of the fraction of “other metabolites” compared to control experiments without olodaterol. Addition of olodaterol had no effect on the formation of dithienylglycolic acid. In human lung homogenate, most probably non-enzymatic ester hydrolysis of [¹⁴C]tiotropium under formation of dithienylglycolic acid dominated the degradation of tiotropium. No formation of “other metabolites” which are considered to be the result of enzymatic metabolism was detected. It was concluded that human lung does not exhibit P450-dependent oxidative metabolism of tiotropium.

Effect of olodaterol on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]tiotropium by human liver microsomes, displayed data are mean values of two incubation experiments.

olodaterol conc. [μM]	mean % of total peak areas			turnover rate [pmol/min/mg protein]		turnover relative to control [%]
	other metabolites	tiotropium	dithienylglycolic acid	other metabolites	other metabolites	
0	2.93	91.14	5.93	2.28	100	
1.0	2.61	91.48	5.92	2.00	88.1	
10	1.89 ^a	92.06	6.06	1.40 ^a	61.7 ^a	
100	1.54 ^a	91.60	6.86	1.12 ^a	49.1 ^a	
control without NADPH	0.20 ^a	92.82	6.99	NA	NA	

^a below the linear detection range

NA not applicable

藥物動態試驗：藥物相互作用(續)(老)

Olodaterol

tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

Location in Module: CTD 5.3.2.2-13

Report No.: U-1057

Study No.: A206/06LU

Incubation of [14 C]tirotripium (10 μ M) with human lung homogenate (8.6 mg protein/mL, 120 min), displayed data are mean values of two incubation experiments.

	mean % of total peak areas		
	other metabolites	tiotropium	dithienylglycolic acid
	NOP	92.52	6.73
	NOP	91.86	7.04
	NOP	92.99	6.34
mean	NOP	92.46	6.70
SD	0.00	0.57	0.35
CV %	NC	0.6	5.2

NC not calculated

NOP no peak found

Additional information:

Because of therapeutic olodaterol plasma concentrations far below 1 μM (a geometric mean C_{max} of about 13.8 pM was measured after single inhalation of 20 μg to males in BI Trial no. 1222.0001, Module 5.3.3.1), a metabolic drug-drug interaction of [^{14}C]tiotropium and olodaterol based on inhibition of CYP by olodaterol is considered to be very unlikely to occur.

In human lung homogenate, most probably non-enzymatic ester hydrolysis of [^{14}C]tiotropium under formation of dithienylglycolic acid dominated the degradation of tiotropium. No formation of "other metabolites" which are considered to be the result of enzymatic metabolism was detected. It was concluded that human lung does not exhibit P450-dependent oxidative metabolism of tiotropium.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

15.B 薬物動態試験：薬物相互作用

Location in Module: CTD 5.3.2.2-7

Report No.: U-1561

Study No.: A212/07LU

Type of study:

In vitro study to investigate the effect of olodaterol on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]ciclesonide isobutyrate) and [¹⁴C]CD 1857 ([¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative)

Test item:

[¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative ; [¹⁴C]CD 1857

Test system:

human liver microsomes and human lung homogenate

Method:

[¹⁴C]CD 1857 and [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative (25 μM) were incubated with pooled human liver microsomes (0.2 mg protein/mL) and human lung homogenate (7.7 mg protein/mL) in the presence of the cosubstrate NADPH. The metabolism of [¹⁴C]CD 1857 and [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative was assessed using HPLC with radioactivity detection. As [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative is rapidly cleaved by ester hydrolysis under formation of the active principle CD 1857 (ciclesonide desisobutyl derivative), experiments were performed with both compounds [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative and [¹⁴C]CD 1857. The effect of olodaterol at concentrations of 0.1, 1, 10 and 100 μM on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]CD 1857 and [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative was investigated and compared with control experiments without olodaterol.

Tabulated results:

In human liver microsomes, [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative was rapidly cleaved to CD 1857 (ciclesonide desisobutyl derivative, independent of NADPH). With the cosubstrate NADPH several other polar metabolites were formed in minor amounts. In human lung homogenate, ester cleavage of [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative resulting in the formation of CD 1857 was observed. There was only marginal formation of other metabolites. In concentrations up to 100 μM, olodaterol neither affected ester cleavage nor the formation of other metabolites of [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative and [¹⁴C]CD 1857, respectively. A metabolic drug-drug interaction of [¹⁴C]ciclesonide desisobutyl derivative based on inhibition of CYP by olodaterol is therefore considered as unlikely to occur.

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.B 薬物動態試験：薬物相互作用（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-7

Report No.: U■■-1561

Study No.: A212/07LU

Effect of olodaterol on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]開発コードE* by human liver microsomes, displayed data are mean values of two incubation experiments.

olodaterol conc. [μM]	mean % of total peak areas					turnover relative to control [%]				
	U6 ^a	U8 ^a	U10 ^a	CD 1857 ^a	U12 ^a 開発コード F* (ciclesonide) ^b	U6	U8	U10	CD1857	U12 開発コード F* (ciclesonide)
0	5.49	5.80	2.26	19.82	2.20	100	100	100	100	100
0.1	5.12	5.80	4.32	16.28	4.13	93.3	100	191	82.1	188
1.0	5.99	6.27	4.22	16.36	4.63	109	108	187	82.5	210
10	6.77	6.90	2.17	17.75	NOP	123	119	95.8	89.5	106
100	5.92	6.36	2.64	16.80	5.28	108	110	117	84.7	103

Effect of olodaterol on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]CD 1857 by human liver microsomes, displayed data are mean values of two incubation experiments.

olodaterol conc. [μM]	mean % of total peak areas								turnover relative to control [%]								
	U2 ^a	U6 ^a	U7 ^a	U8 ^a	U9 ^a	U10 ^a	CD 1857 ^b	開発コード F* (ciclesonide)	U2 ^a	U6 ^a	U7 ^a	U8 ^a	U9 ^a	U10 ^a	CD 1857 ^b	U12 ^a	開発コード F* (ciclesonide)
0	3.37	5.46	5.47	4.67	5.80	4.30	61.77	2.40	100	100	100	100	100	100	100	100	100
0.1	3.59	5.61	5.48	4.83	6.05	4.93	63.69	NOP	107	103	100	103	104	115	103	0	98.6
1.0	3.29	5.72	5.27	4.34	6.01	4.42	63.31	1.35	97.8	105	96.3	93.0	104	103	102	56.2	88.7
10	3.72	5.46	6.03	5.69	5.43	4.73	63.04	NOP	111	100	110	122	93.7	110	102	0	100
100	3.42	6.21	5.09	4.64	5.21	4.83	64.91	NOP	102	114	93.1	99.4	89.9	112	105	0	92.2

a formation of metabolite,

b depletion of substrate

NOP no peak found

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.C 薬物動態試験：薬物相互作用 Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.2-4

Report No.: U■■-1534

Study No.: A180/05LU

Type of study: In vitro study to investigate the effect of開発コード F* (ciclesonide isobutyrate) on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]olodaterol

Test item: [¹⁴C]olodaterol

Test system: human liver microsomes

Method: [¹⁴C]Olodaterol was incubated with pooled human liver microsomes in the presence of the cosubstrate NADPH. The metabolism of [¹⁴C]olodaterol was assessed using HPLC with radioactivity detection. The effect of開発コード F* at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 μM on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]olodaterol was investigated and compared with control experiments without 開発コード F* (ciclesonide isobutyrate).

Tabulated results: Incubation of [¹⁴C]olodaterol (50 μM) with human liver microsomes (0.5 mg protein/mL) for 15 min resulted in the formation of U3, the *O*-desmethyl metabolite of olodaterol, as the principal metabolite that accounted to about 4.3% of sample radioactivity.開発コード F* (ciclesonide isobutyrate) up to a concentration of 100 μM neither inhibited U3 formation nor the metabolic depletion of [¹⁴C]olodaterol. Therefore, inhibition was not observed of the oxidative [¹⁴C]olodaterol in vitro metabolism by開発コード F* .

Effect of開発コード F* on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]olodaterol, displayed data are mean values of three incubation experiments.

開発コード F* conc. [μM]	mean % of total peak areas		turnover rate [pmol/min/mg protein]		turnover relative to control [%]	
	U3 ^a	olodaterol ^b	U3 ^a	U3 ^a	U3	
0	4.29	94.97	286		100	
0.01	4.40	94.89	293		103	
0.1	4.71	94.26	314		110	
1.0	4.88	94.66	326		114	
10	3.93	95.44	262		91.5	
100	4.41	94.87	294		103	

a formation of metabolite
b depletion of substrate

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

CTD 5.3.2.2-5

p.: U-1541

∴ A180/05LU

Type of study:

Test item:

Test system:

Method:

[¹⁴C]olodaterol was assessed using HPLC with radioactivity detection. The effect of tiotropium at concentrations of 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 μM on the oxidative in vitro metabolism of [¹⁴C]olodaterol was investigated and compared with control experiments without tiotropium.

Incubation of [^{14}C]olodaterol (50 μM) with human liver microsomes (0.5 mg protein/mL) for 15 min resulted in the formation of U3, the

O-desmethyl metabolite of olodaterol, as the principal metabolite that accounted to about 5.6% of sample radioactivity. Tiotropium up to a

concentration of 100 μM neither inhibited U3 formation nor the metabolic depletion of [^{14}C]olodaterol. Therefore, inhibition was not observed of the oxidative [^{14}C]olodaterol in vitro metabolism by tiotropium.

Effect of tiotropium on the oxidative in vitro metabolism of [^{14}C]olodaterol, displayed data are mean values of three incubation experiments.

tiotropium conc. [μ M]	mean % of total peak areas		turnover rate [pmol/min/mg protein] U3 ^a	turnover relative to control [%] U3
	U3 ^a	olodaterol ^b		
0	5.64	93.53	376	100
0.01	5.14	94.33	343	91.2
0.1	5.73	93.44	382	102
1.0	5.44	93.50	363	96.6
10	5.63	93.48	376	99.9
100	5.26	93.97	350	93.3

a formation of metabolite

b depletion of substrate

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.E 薬物動態試験：薬物相互作用 Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-3

Report No.: U-3361

Study No.: PK0723T

Type of study:

In vitro study to investigate whether olodaterol is a substrate and/or inhibitor of OATP2, OATP8 and OATP-B olodaterol, [¹⁴C]olodaterol

Test item:

Test system: Vector-transfected HEK293 cells and human OATP2-, OATP8- and OATP-B-expressing HEK293 cells (origin of HEK293 cells: human)

Method:

The presence of active transport of olodaterol by OATP2, OATP8 and OATP-B was investigated by comparing the uptake of olodaterol in the transporter-expressing HEK293 cells with that in the vector-transfected HEK293 cells. The potential of olodaterol to inhibit OATP2, OATP8 and OATP-B activities was assessed by comparing the uptake activity of a suitable probe substrate with that in the absence of olodaterol at increasing olodaterol concentrations. In vitro uptake studies were performed at 37°C. The uptake of radiolabeled olodaterol or probe substrate into HEK293 cells was determined by measuring radioactivity concentrations present in the medium and cells.

Tabulated results:

Substrate	Conc (μM)	Inhibitor	Uptake of olodaterol ^a		
			Vector	OATP2	OATP8 OATP-B
[³ H]E ₂ 17βG	0.1	-	1.20	25.2	3.85 NA
[³ H]E ₂ 17βG	0.1	DHEAS, 100 μM	1.22	2.10	2.17 NA
[³ H]E-sul	0.1	-	4.16	NA	NA 10.7
[³ H]E-sul	0.1	DHEAS, 100 μM	2.92	NA	NA 4.66
[¹⁴ C]olodaterol	2	-	34.5	35.9	39.4 33.2
[¹⁴ C]olodaterol	2	DHEAS, 100 μM	34.6	36.6	38.3 36.3

^a Unit: μL/2 min/mg for E₂17βG, μL/min/mg for E-sul, μL/5 min/mg for olodaterol

E₂17βG: Estradiol 17β-D-glucuronide, E-sul: Estrone 3-sulfate, DHEAS: dehydroisoandrosterone 3-sulfate

NA not assessed

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.E 薬物動態試験：薬物相互作用（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-3

Report No.: U-3361

Study No.: PK0723T

Inhibitor	Conc (μM)	% of control		
		OATP2	OATP8	OATP-B
Olodaterol	0	100	100	99.9
Olodaterol	0.01	104	94.5	93.2
Olodaterol	0.1	109	83.3	84.4
Olodaterol	1	117	83.0	92.0
Olodaterol	10	92.3	100	73.9
Olodaterol	100	57.9	101	48.8
DHEAS	100	3.65	35.8	26.6

Additional Information:

No significant increase in uptake of olodaterol was observed in the cells expressing OATP2, OATP8, and OATP-B compared with that in the vector-transfected cells and the addition of the OATP inhibitor DHEAS did not alter the uptake of olodaterol, indicating that olodaterol is not a substrate of OATP2, OATP8 or OATP-B. Olodaterol did not show strong inhibition of OATP2, OATP8 or OATP-B activity up to the maximum concentration of 100 μM examined.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.F

薬物動態試験：薬物相互作用

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-4

Report No.: U-1315

Study No.: PK1101T

Type of study:

In vitro study to investigate whether olodaterol is a substrate and/or inhibitor of OAT1, OAT3, OCT1, OCT2 and OCT3

Test item:

olodaterol, [¹⁴C]olodaterol

Test system:

Vector-transfected HEK293 cells and human OAT1-, OAT3-, OCT1-, OCT2- and OCT3-expressing HEK293 cells (origin of HEK293 cells: human)

Method:

Active transport of olodaterol by OAT1, OAT3, OCT1, OCT2 and OCT3 was investigated by comparing the uptake of olodaterol in transporter-expressing HEK293 cells with that in vector-transfected HEK293 cells. The potential of olodaterol to inhibit OAT1, OAT3, OCT1, OCT2 and OCT3 activities was assessed by comparing the uptake activity of a suitable probe substrate at increasing olodaterol concentrations. In vitro uptake studies were performed at 37°C. The uptake of radiolabeled olodaterol or probe substrate into HEK293 cells was determined by measuring radioactivity concentrations present in the medium and cells.

Results:

A significant increase in uptake of olodaterol was observed in the cells expressing OAT1, OAT3, and OCT1 compared to vector-transfected cells, which was decreased by specific inhibitors probenecid or corticosterone, indicating that olodaterol is a substrate of OAT1, OAT3 and OCT1. Olodaterol did not show inhibition on OAT1, OAT3 and OCT2 activities up to the maximum concentration of 100 µM examined, but inhibited OCT1 and OCT3 activities in a concentration-dependent manner. The IC₅₀ values of olodaterol for OCT1 and OCT3 were 14.1 µM and >100 µM, respectively.

Tabulated results:

Substrate	Conc (µM)	Inhibitor	Uptake ^a Vector	OAT1	OAT3	OCT1	OCT2	OCT3
[³ H]PAH	0.1	-	0.449	27.0	NA	NA	NA	NA
[³ H]PAH	0.1	Probenecid, 100 µM	0.563	3.08	NA	NA	NA	NA
[³ H]E-sul	0.1	-	2.70	NA	15.7	NA	NA	NA
[³ H]E-sul	0.1	Probenecid, 100 µM	2.51	NA	3.81	NA	NA	NA
[³ H]MPP ⁺	1	-	5.90	NA	NA	67.3	77.6	8.50
[³ H]MPP ⁺	1	Corticosterone, 500 µM	3.39	NA	NA	8.57	9.74	4.96
[¹⁴ C]olodaterol	2	-	24.8	30.9 ^b	40.2 ^b	NA	NA	NA
[¹⁴ C]olodaterol	2	Probenecid, 100 µM	25.0	26.7	24.3	NA	NA	NA
[¹⁴ C]olodaterol	2	-	38.8	NA	NA	96.7 ^b	57.7	62.8
[¹⁴ C]olodaterol	2	Corticosterone, 500 µM	30.9	NA	NA	42.5	49.9	58.8

^a Unit: µL/30 sec/mg for PAH and MPP⁺, µL/min/mg for E-sul, µL/5 min/mg for olodaterol

PAH: Para-aminohippuric acid, E-sul: Estrone-3-sulfate, MPP⁺: 1-methyl-4-phenylpyridinium

^b significant different (p<0.05) uptake of olodaterol from that in vector-transfected HEK293 cells NA not assessed

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.F 薬物動態試験：薬物相互作用（続き） Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-4

Report No.: U-1315

Study No.: PK1101T

Inhibitor	Conc (μM)	% of control OAT1	OAT3	OCT1	OCT2	OCT3
Olodaterol	0	99.9	100	100	100	100
Olodaterol	0.01	89.2	108	101	104	77.7
Olodaterol	0.1	102	106	73.9	54.1	78.6
Olodaterol	1	84.8	108	76.8	51.9	78.3
Olodaterol	10	78.1	102	54.3	57.2	72.9
Olodaterol	100	83.0	64.4	13.0	49.1	41.3
Probenecid or corticosterone	100 or 500	9.46	10.0	8.44	9.74	14.8

Additional Information:

The K_m value of olodaterol for OCT1 was determined to be 29.4 μM.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.G

薬物動態試験：薬物相互作用

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-5

Report No.: U-1586

Study No.: PK1103T

Type of study:

In vitro study to investigate whether olodaterol is a substrate and/or inhibitor of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP)

Test items:

Olodaterol, [¹⁴C]olodaterol

Test system:

Confluent-cultivated cell monolayers and membrane vesicles of parental MDCKII cells and human BCRP-expressing MDCKII cells (origin of MDCKII cells: canine)

Method:

The flux of radiolabeled olodaterol from apical to basolateral (AtoB = absorptive) or from basolateral to apical (BtoA = secretory) was assessed by measuring radioactivity concentrations in both apical and basolateral compartments and determining the apparent transport with and without P-gp inhibitor (zosuquidar) and/or BCRP inhibitor (Ko143). Inhibitory effect of olodaterol on BCRP was assessed by measuring the intravesicular transport of estrone 3-sulfate (E-sul) at increasing olodaterol concentrations.

Tabulated results:

Substrate	Conc (μM)	Inhibitor	Conc Inhibitor (μM)	Transport (μL/90 min/cm ²)		Parent (AtoB)	BCRP (AtoB)	ERBCRP/parent
[³ H]prazosin	0.1	-	-	260	191	162	131	1.66
[³ H]prazosin	0.1	zosuquidar	0.5	258	180	161	122	1.87
[³ H]prazosin	0.1	zosuquidar+Ko143	0.5+1	207	188	154	162	1.04
[¹⁴ C]olodaterol	20	-	-	25.4	18.6	2.92	3.47	1.19
[¹⁴ C]olodaterol	20	zosuquidar	0.5	30.0	33.0	18.8	11.3	2.00
[¹⁴ C]olodaterol	20	zosuquidar+Ko143	0.5+1	13.3	8.97	18.1	9.63	2.53

Substrate	Conc (μM)	Inhibitor	Conc Inhibitor (μM)	Intravesicular uptake (μL/2 min/mg)		% of control ^a
[³ H]E-sul	0.035	-	-	136	64.0	100
[³ H]E-sul	0.035	-ATP	-	43.1	45.8	<0
[³ H]E-sul	0.035	olodaterol	0.1	192	65.3	177
[³ H]E-sul	0.035	olodaterol	1	147	83.3	88.6
[³ H]E-sul	0.035	olodaterol	10	116	67.7	67.2
[³ H]E-sul	0.035	olodaterol	100	93.2	116	<0
[³ H]E-sul	0.035	prazosin	50	73.7	79.9	<0

^a determined by subtracting the uptake in parent membrane vesicle from that in BCRP-expressing membrane vesicle

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.G 薬物動態試験：薬物相互作用（続く）

Test Article: Olodaterol

Location in Module: CTD 5.3.2.3-5

Report No.: U■■-1586

Study No.: PK1103T

Additional Information:

For this study, a BCRP-expressing cell model and membrane vesicle system were used to investigate whether olodaterol is a substrate and/or an inhibitor of BCRP. To suppress the endogenous P-gp activity, the transcellular transport of olodaterol was assessed in the presence of zosuquidar. The efflux ratio of the BCRP probe substrate, prazosin, in the presence of both P-gp and BCRP inhibitor was diminished to the efflux ratio of 1.04. Whereas the efflux ratio of olodaterol in the presence of both P-gp and BCRP inhibitor was comparable or higher than that in the presence of the P-gp inhibitor. This result suggests that olodaterol is not a substrate of BCRP. The effect of olodaterol on BCRP mediated E-sul intravesicular transport was evaluated in the concentration range from 0.1 to 100 μM. Olodaterol showed concentration dependent inhibition, indicating that olodaterol is an inhibitor of BCRP with an estimated IC₅₀ in the range of 10 to 100 μM.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.H 薬物動態試験：薬物相互作用
Test Article: Olodaterol
tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

Location in Module: CTD 4.2.2.6-2

Report No.: U-2470

Study No.: 05B136

Type of study:

In vivo study to investigate the pharmacokinetic interaction potential of olodaterol and tiotropium (Ba 679)

Test items:

Species:

Strain:

Gender:

Feeding condition:

Rat
CrI:WI(Han)
4M and 4F
ad libitum

Rat
CrI:WI(Han)
4M and 4F
ad libitum

Rat
CrI:WI(Han)
4M and 4F
ad libitum

Test item(s) administered:

Olodaterol
(Group 2)
liquid aerosol
inhalation over 35 minutes

Olodaterol and tiotropium (1:1)
(Group 3)

Tiotropium
(Group 4)

Vehicle/Formulation:

Method of administration:

75 µg/kg for both, olodaterol and/or tiotropium (1:1 ratio based on active moieties in the combination group)

Target Dose (µg/kg):

plasma

0, 0.583, 1, 2, 4, 8, 24, 30 h

Sample:

Sampling times:

Analyte:

Assay:

Olodaterol and tiotropium

Tiotropium

HPLC-MS/MS for both test items

PK Parameter olodaterol	Unit:	Group 2 males	Group 2 females	Group 3 males	Group 3 females	Group 4 males	Group 4 females
C _{max} /dose	[pmol/L]/ [nmol/kg]	36.4	27.3	25.7	23.4	-	-
AUC _{0-inf} /dose	[pmol•h/L]/ [nmol/kg]	107	150	99.8	82.2	-	-
PK Parameter tiotropium	Unit:						
C _{max} /dose	[pmol/L]/ [nmol/kg]	-	-	39.9	40.1	57.8	31.0
AUC _{0-inf} /dose	[pmol•h/L]/ [nmol/kg]	-	-	79.3	68.9	122	99.7

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

Test Article: Olodaterol

tiotropium+olodaterol (Ti+Olo)

CTD 4.2.2.6-2

U-2470

05B136

Additional Information:

A single dose of olodaterol, tiotropium or a combination of both (1:1 ratio based on active moieties) was administered via a nose-only inhalation exposure system to male and female rats. The pharmacokinetics were assessed by measuring the plasma concentrations of olodaterol and/or tiotropium. The variability of the plasma concentrations was moderate and the dose-normalized exposures to olodaterol and tiotropium were similar between males and females. The dose-normalized exposures to olodaterol and tiotropium were slightly higher after dosing of olodaterol or tiotropium alone than after dosing as combination. However, the effect of the potential interaction on the total exposure is low (i.e. about a factor of 1.5).

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.1 薬物動態試験：薬物相互作用
Test Article: Olodaterol
tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

Location in Module: CTD 4.2.2.6-1

Report No.: U-2446

Study No.: 05B135

Type of study:

Test items: Species: Strain: Gender:	In vivo study to investigate the pharmacokinetic interaction potential of olodaterol and tiotropium (Ba 679) after single dose Olodaterol and/or tiotropium (Ba 679)		
	Dog Beagle (Marshall) 3m and 2f	Dog Beagle (Marshall) 3m and 3f	Dog Beagle (Marshall) 3m and 3f
	Olodaterol (Group 2) liquid aerosol inhalation over 10 minutes	Olodaterol and tiotropium (1:1) (Group 3)	Tiotropium (Group 4)
	Target Dose (µg/kg): 15 µg/kg for both, olodaterol and/or tiotropium (1:1 ratio based on active moieties in the combination group)		
Sample:	plasma		
Sampling times:	0, 0.167, 0.333, 0.667, 1, 2, 4, 8, 24, 30 h		
Analyte:	Olodaterol		
Assay:	HPLC-MS/MS for both test items		

PK Parameter olodaterol	Unit:	Group 2 (m&f)	Group 3 (m&f)	Group 4 (m&f)
C _{max} /dose	[pmol/L]/ [nmol/kg]	10.0	7.48	-
AUC _{0-inf} /dose	[pmol·h/L]/ [nmol/kg]	57.0	65.1	-
PK Parameter tiotropium	Unit:			
C _{max} /dose	[pmol/L]/ [nmol/kg]	-	53.8	65.4
AUC _{0-inf} /dose	[pmol·h/L]/ [nmol/kg]	-	43.8	51.2

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

15.I 薬物動態試験：薬物相互作用（続き）

Test Article: Olodaterol
tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

Location in Module: CTD 4.2.2.6-1

Report No.: U■■-2446

Study No.: 05B135

Additional Information:

A single dose of olodaterol, tiotropium or a combination of both (1:1 ratio based on active moieties) was administered via a facemask with oropharyngeal tube to male and female Beagle dogs. The pharmacokinetics were assessed by measuring the plasma concentrations of olodaterol and/or tiotropium. Overall, the variability of the plasma concentrations was moderate. The exposure to olodaterol was similar after dosing of olodaterol alone or in combination with tiotropium, whereas the exposure to tiotropium was slightly higher after dosing of tiotropium alone than after dosing the combination. However, this slight difference was regarded as not relevant taking into account the variability.

Proprietary confidential information © 2014 Boehringer Ingelheim International GmbH or one or more of its affiliated companies

16. 薬物動態試験：その他
- Test Article: Olodaterol
tiotropium+olodaterol (Tio+Olo)

No other *in vivo* pharmacokinetic studies were performed.