プララトレキサート

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.4　薬物動態試験の概要文

ムンディファーマ株式会社

目次

1　まとめ 8
2　分析法 11
2.1　非標識体分析法 11
2.1.1　マウス血漿中定量法 12
2.1.2　ラット血漿及び尿中定量法 12
2.1.3　ウサギ血漿中定量法 12
2.1.4　イヌ血漿及び尿中定量法 13
2.2　標識体分析法 13
2.2.1　標識化合物 13
2.2.2　分析法 14
3　吸収 15
3.1　単回投与 15
3.1.1　ラット 15
3.1.2　イヌ 17
3.2　反復投与 19
3.2.1　ラット 6 ヵ月反復投与（TK 試験） 19
3.2.2　イヌ 9 ヵ月反復投与（TK 試験） 20
4　分布 21
4.1　組織内分布試験 21
4.2　血漿タンパク結合率 25
4.3　血球移行率 26
4.4　脳内移行 26
4.5　胎盤移行 26
5　代謝 27
5.1　*In vitro* 27
5.1.1　代謝安定性 27

5.1.2 代謝物の探索 27
5.1.3 代謝に関与する CYP 分子種の同定 28
5.2 *In vivo* 28
5.2.1 推定代謝経路 28
6 排泄 29
6.1 尿糞及び呼気中排泄 29
6.2 胆汁中排泄 31
7 薬物動態学的薬物相互作用 31
7.1 タンパク結合を介した相互作用 31
7.2 CYP 阻害作用 32
7.3 CYP 誘導作用 33
7.4 薬物トランスポーターを介した相互作用 34
7.4.1 P-gp 34
7.4.2 BCRP、MRP2 及び MRP3 34
7.4.3 OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2 35
8 その他の薬物動態試験 36
9 考察及び結論 36
10 図表 38
11 参考文献 39

表目次

表 2.6.4- 1　プララトレキサートの薬物動態試験一覧 10

表 2.6.4- 2　LC/MS/MS 定量法（プララトレキサート）のバリデーション試験結果の要約 13

表 2.6.4- 3　*In vivo* 試験で使用した標識化合物の比放射活性及び放射化学的純度 14

表 2.6.4- 4　ラットにプララトレキサートを静脈内投与後の血漿中 PDX-10a 及び PDX-10b の主要 PK パラメーター 16

表 2.6.4- 5　ラットにプララトレキサートを静脈内投与後の尿中 PDX-10a 及び PDX-10b の主要 PK パラメーター 17

表 2.6.4- 6　イヌにプララトレキサートを静脈内投与後の血漿中 PDX-10a 及び PDX-10b の主要 PK パラメーター 18

表 2.6.4- 7　イヌにプララトレキサートを静脈内投与後の尿中 PDX-10a 及び PDX-10b の主要 PK パラメーター 19

表 2.6.4- 8　有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後の組織内放射能分布 25

表 2.6.4- 9　ラット、イヌ及びヒトにプララトレキサートを静脈内投与後の PK パラメーター 38

図目次

図 2.6.4- 1　カルボン酸部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサートの構造式 14

図 2.6.4- 2　プテリジン部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサートの構造式 14

図 2.6.4- 3　有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後 1 時間の全身オートラジオグラム 22

図 2.6.4- 4　有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後 24 時間の全身オートラジオグラム 23

図 2.6.4- 5　有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後 504 時間の全身オートラジオグラム 24

図 2.6.4- 6　雄ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後の累積排泄率 30

図 2.6.4- 7　雌ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後の累積排泄率 30

略号一覧

略号	日本語	英語
AUC_{inf}	時間 0 から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積	area under the concentration time curve from time 0 to infinity
AUC_{last}	時間 0 から定量可能最終時点までの濃度－時間曲線下面積	area under the concentration time curve from time 0 to the last quantifiable time point
BCRP	乳がん耐性タンパク質	breast cancer resistance protein
BLQ	定量下限未満	below the limit of quantification
Caco-2 細胞	ヒト結腸がん由来の細胞株	Caco-2 cell line
CHO	チャイニーズハムスターの卵巣	chinese hamster ovary
CL_{nonren}	腎外クリアランス	non-renal clearance
CL_{ren}	腎クリアランス	renal clearance
CL_{tot}	全身クリアランス	total clearance
C_{max}	最高血漿中濃度	maximum plasma concentration
CYP	シトクロム P450	cytochrome P450
DHFR	ジヒドロ葉酸還元酵素	dihydrofolate reductase
DPM	1 分間あたりの壊変数	decays per minute
fe	尿中未変化体排泄率	fraction of drug excreted unchanged in urine
FPGS	ホリルポリグルタミン酸合成酵素	folylpolyglutamyl synthetase
GLP	医薬品の安全性に関する非臨床試験の実施基準	Good Laboratory Practice
HEK	ヒト胎児由来腎臓	human embryonal kidney
IC_{50}	50%阻害濃度	half maximum inhibitory concentration
Ki	阻害定数	inhibition constant
K_m	ミカエリスメンテン定数	Michaelis-Menten constant
LC/MS/MS	高速液体クロマトグラフィー･タンデムマススペクトロメトリー	high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
LLOQ	定量下限	lower the limit of quantification
LSC	液体シンチレーションカウンター	liquid scintillation counter
MAO	モノアミンオキシダーゼ	monoamine oxidase
MDCK	イヌ腎臓尿細管上皮細胞由来	Madin-Darby canine kidney
MRP	多剤耐性関連タンパク質	multidrug resistance associated protein
MRT_{sys}	平均体内滞留時間	systemic mean residence time
MTX	メトトレキサート	methotrexate
OAT	有機アニオントランスポーター	organic anion transporter
OATP	有機アニオントランスポーターポリペプチド	organic anion transporting polypeptide
OCT	有機カチオントランスポーター	organic cation transporter
PBS	リン酸緩衝生理食塩水	phosphate-buffered saline
P-gp	P-糖タンパク質	P-glycoprotein

略号一覧（続き）

略号	日本語	英語
PK	薬物動態	pharmacokinetics
PTCL	末梢性 T 細胞リンパ腫	peripheral T-cell lymphoma
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー	qunatitative whole body autoradiography
SD	-	Sprague-Dawley
SPE	固相抽出	solid-phase extraction
$t_{1/2}$	消失半減期	estimate of the terminal elimination half-life of the drug calculated by dividing the natural log of 2 by the terminal elimination rate constant (λz)
$t_{1/2urine}$	尿中排泄率から算出した消失半減期	estimate of the terminal elimination half-life of the drug calculated by dividing the natural log of 2 by the terminal elimination rate constant (λz) by urine excretion
TK	トキシコキネティクス	toxicokinetics
Vd_{ss}	定常状態の分布容積	volume of distribution at steady state
V_{max}	最大反応速度	maximum velocity

1　まとめ

プララトレキサート（*N*-{4-[(2*RS*)-1-(2,4-Diaminopteridin-6-yl)pent-4-yn-2-yl]benzoyl}-L-glutamic acid）はメトトレキサート（MTX）の類似体であり、MTX と同様、ジヒドロ葉酸還元酵素（DHFR）の阻害により葉酸代謝拮抗作用を発揮する葉酸アナログである。そのため、さまざまな種類のがん治療に有効である。プララトレキサート注射剤は再発・難治性の末梢性 T 細胞リンパ腫（PTCL）治療薬として開発され、臨床では 30 mg/m^2 を週 1 回、3～5 分かけて 6 週連続静脈内投与した後 1 週休薬し、7 週間を 1 サイクルとして投与される。副作用により 20 mg/m^2/週まで減量が可能である。なお、プララトレキサート注射剤は定常状態で治療効果のある血漿中濃度を得るための間欠投与を意図したものでもなく、経口投与を意図したものでもない。

プララトレキサートは炭素 10 位の立体化学（*RS* 配置）が異なる約 1：1 のジアステレオマー混合物［PDX-10a（*S*-ジアステレオマー）及び PDX-10b（*R*-ジアステレオマー）］であることから（2.6.1.1.1 項）、各ジアステレオマーの定量法はラット及びイヌでは血漿中及び尿中で、マウス及びウサギでは血漿中で確立し、バリデーション試験を実施した（本項 2 章）。また、毒性試験での不純物／分解物測定のために、イヌ血漿中　　不純物A*　　濃度定量法を確立し、バリデーション試験を実施した。

プララトレキサートの非臨床薬物動態（PK）試験一覧を表 2.6.4- 1 に示した。

PK 試験はラット及びイヌを用いて臨床投与経路で実施した。（本項 3 章）。トキシコキネティクス（TK）試験では投与スケジュールも臨床と同様のスケジュールで実施した。ラットにプララトレキサートを単回静脈内投与後の各ジアステレオマーの血漿中濃度推移は二相性を示し、速やかな分布後、長い消失半減期（$t_{1/2}$）を伴って緩慢に消失した。定常状態の分布容積（Vd_{ss}）から、プララトレキサートの広範な組織分布が示された。Vd_{ss} は高用量で上昇したが、これはタンパク結合の飽和によるものと考えられた。全投与量で性差がみられ、雌の全身クリアランス（CL_{tot}）は雄の 2 倍であった。ラットでの反復投与毒性試験では、5～25 mg/kg の範囲で線形性がみられ、各ジアステレオマーの PK に意義のある差はみられなかった。また、性差及び蓄積性もみられなかった。イヌにプララトレキサートを単回静脈内投与後の血漿中濃度推移も二相性を示した。イヌの高用量でも Vd_{ss} の上昇がみられた。イヌでは性差はみられなかったが、ジアステレオマーによる CL_{tot} の差がみられ、PDX-10b で PDX-10a よりも約 2 倍高い値を示した。なお、ヒトでは PDX-10a で PDX-10b よりも高い CL_{tot} を示している（2.7.2.2.4 項）。このように種差が生じる理由については不明であるが、いずれのジアステレオマーも同様の細胞障害活性を示すことから（2.6.2.6.1 項）、本結果は重要な所見ではないと考える。ラット（無毒性量）及びヒト PTCL 患者（最大耐量）でのプララトレキサート投与後の時間 0 から無限大時間までの濃度－時間曲線下面積（AUC_{inf}）は同様であったが、イヌ（最大耐量）ではラット及びヒトの 1/3 であった。イヌでの反復投与毒性試験では、0.1～0.7 mg/kg の範囲で線形性がみられ、性差及び蓄積性もみられなかった。

有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを静脈内投与後の放射能は、骨、脳、脊髄及び白色脂肪を除くほとんどの組織で投与 1 時間後に最高濃度を示し、小腸内容物、膀胱壁、小腸粘膜、肝臓及び腎皮質での放射能濃度が高かった。その後、放射能は速やかに消失し、投与 504 時間後では

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

肝臓及び腎皮質でのみ検出可能であった。なお、ブドウ膜での放射能は 48 時間までに定量下限未満（BLQ）となったことからメラニンへの結合はないと考えられた。また、白色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを静脈内投与 168 時間後の放射能は肝臓及び腎臓で最も高く（投与量の 0.3%未満）、プララトレキサートの消失過程と一致していた（本項 4.1 章）。ヒト血漿タンパク結合率は 63%～88%で中程度を示した（本項 4.2 章）。プララトレキサートは *in vitro* でヒト赤血球に移行しないと考えられた（本項 4.3 章）。ラットでの脳動脈還流試験で、プララトレキサートの脳移行性は少ないことが示された（本項 4.4 章）。

プララトレキサートの代謝を肝細胞、肝ミクロソーム、肝 S9 分画及び発現系を含むヒト試料を用いて *in vitro* で検討した。その結果、プララトレキサートの代謝物は検出されず、代謝物は同定できなかった（本項 5.1 章）。

プララトレキサートのグルタミン酸部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサートをラットに静脈内投与後の排泄試験では、約 44～58%が糞中に、約 21～24%が尿中に排泄され、主要排泄経路は糞中であった。呼気中排泄を評価に含めたラットでの排泄試験でも、放射能は主に糞中に排泄された（糞中排泄率は投与量の約 47%～66%、尿中排泄率は約 23%～31%）。なお、呼気中排泄率は投与量の約 6%～10%、総回収率は約 93%～96%であった。プテリジン部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサートを有色ラットに静脈内投与後の排泄試験では、糞及び尿中排泄率は投与量の約 77%及び約 26%であり、放射能は主に糞中に排泄された。カーカス及び呼気中排泄を含む投与後 96 時間までの総回収率は約 104%であった（本項 6.1 章）。

プララトレキサートはタンパク結合を介した薬物相互作用を示さなかった（本項 7.1 章）。プララトレキサートは、ヒト肝ミクロソーム及び発現系を用いた阻害試験で、シトクロム P450（CYP）（CYP1A2、CYP2A6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2D6、CYP2E1 及び CYP3A4）を阻害しなかった。CYP2B6 に対する 50%阻害濃度（IC_{50}）は 5000 µmol/L 超、CYP2C19 に対する阻害定数（Ki）は 1 mmol/L 超であった（本項 7.2 章）。プララトレキサートはヒト肝細胞で CYP1A2、CYP3A4 及び CYP2C19 を誘導しなかった（本項 7.3 章）。プララトレキサートは P-糖タンパク質（P-gp）、有機カチオントランスポーター（OCT）2、有機アニオントランスポーター（OAT）1、OAT3 の基質ではなかった。プララトレキサートは乳がん耐性タンパク質（BCRP）、有機アニオントランスポーターポリペプチド（OATP）1B1、OATP1B3、多剤耐性関連タンパク質（MRP）2 及び MRP3 に対して中程度から弱い親和性を示し、ミカエリスメンテン定数（K_m 値）はそれぞれ 552.7、62.2、123、500 超及び 195.7 µmol/L であった。プララトレキサートは 500 µmol/L まで P-gp を阻害しなかった。プララトレキサートの BCRP、OCT2、OAT1、OAT3 及び OATP1B3 に対する IC_{50} 値は 100 µmol/L 超であった。プララトレキサートは OATP1B1 の弱い阻害剤であり、100 µmol/L で約 35%の阻害がみられた。また、MRP2 に対する IC_{50} 値は 43.5 µmol/L であった。プララトレキサートの MRP3 に対する IC_{50} 値は 0.3 µmol/L 未満であり強力な阻害作用を示した（本項 7.4 章）。

以上のことから、2 つのジアステレオマーの PK データは動物種、雌雄、投与量を通して概ね一致しており、これらの知見は、PTCL を対象とした臨床開発及び申請をサポートするものであった。

表 2.6.4- 1　プララトレキサートの薬物動態試験一覧

試験の種類	試験系	投与方法	GLP適否	被験物質	試験番号
吸収					
ラット単回投与後の血漿及び尿中濃度	ラット	静脈内	否	プララトレキサート	PDX-K-05010-R
イヌ単回投与後の血漿及び尿中濃度	イヌ	静脈内	否	プララトレキサート	PDX-K-05009-D
ラット 6 ヵ月反復投与試験	ラット	静脈内	適	プララトレキサート	PDX-T-07034-R
イヌ 9 ヵ月反復投与試験	イヌ	静脈内	適	プララトレキサート	PDX-T-07054-D
分布					
有色ラット単回投与後の組織内分布	有色ラット	静脈内	適	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-10077-R
ラット単回投与後の組織内分布	ラット	静脈内	適	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-07052-R
タンパク結合率	ヒト	*In vitro*	否	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-06029-U
タンパク結合率	ヒト	*In vitro*	適	プララトレキサート	PDX-K-08066-U
血球移行率	ヒト	*In vitro*	適	プララトレキサート	PDX-K-08067-U
脳内移行性	ラット	*In situ*	否	プララトレキサート	PDX-P-03001-R
代謝					
S9 での代謝物の同定	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-08061-U
肝細胞及び肝ミクロソームでの代謝安定性	ヒト	*In vitro*	適	プララトレキサート	PDX-K-07030-U
肝ミクロソームでの代謝物の同定	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-06028-U
阻害剤及び発現系を用いた CYP 分子種同定	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-08062-U
排泄					
ラット単回投与後の排泄	ラット	静脈内	適	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-07052-R
ラット単回投与後の排泄	ラット	静脈内	適	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-07053-R
有色ラット単回投与後の排泄	有色ラット	静脈内	適	[^{14}C]-プララトレキサート[a]	PDX-K-10077-R

表 2.6.4-1　プララトレキサートの薬物動態試験一覧（続き）

試験の種類	試験系	投与方法	GLP適否	被験物質	試験番号
薬物動態学的薬物相互作用					
タンパク結合を介した薬物相互作用	ヒト	*In vitro*	否	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-07043-U
タンパク結合を介した薬物相互作用	ヒト	*In vitro*	適	プララトレキサート	PDX-K-07049-U
CYP 阻害作用（肝ミクロソーム）	ヒト	*In vitro*	適	プララトレキサート	PDX-K-07032-U
CYP 阻害作用（発現系）	ヒト	*In vitro*	適	プララトレキサート	PDX-K-07033-U
CYP2C19 に対する Ki	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-07044-U
CYP2C19 に対する IC_{50}	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-11090-U
CYP2B6 に対する IC_{50}	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-11089-U
CYP 誘導作用	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-08060-U
P-gp の基質／阻害剤であるか検討	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-08059-U
BCRP 及び MRP2/3 の基質／阻害剤であるかの検討	ヒト	*In vitro*	否	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-10078-U
BCRP 及び MRP2/3 の基質であるかの検討	ヒト	*In vitro*	否	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-10081-U
OATP1B1 の基質／阻害剤であるかの検討	ヒト	*In vitro*	否	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-10080-U
OATP1B3、OAT1/3 及び OCT2 の基質であるかの検討	ヒト	*In vitro*	否	[^{14}C]-プララトレキサート	PDX-K-11088-U
OATP1B3、OAT1/3 及び OCT2 の阻害剤であるかの検討	ヒト	*In vitro*	否	プララトレキサート	PDX-K-11084-U

a: [^{14}C]-plaratrexate radiolabeled in the pteridin moiety was used
BCRP: Breast cancer resistance protein, CYP: Cytochrome P450, MRP: Multi drug resistance protein, NA: Not applicable, OAT: Organic anion transporter, OATP: Oarganic anion transporting polypeptide, OCT: Organic cation transporter

2　分析法

2.1　非標識体分析法

マウス、ラット、イヌ及びウサギについて、血漿又は尿中プララトレキサート濃度定量法を高速液体クロマトグラフィー・タンデムマススペクトロメトリー（LC/MS/MS）法にて開発し、バリデーション試験を実施した。

プララトレキサートは炭素 10 位の立体化学（*RS* 配置）が異なる約 1：1 のジアステレオマー混合物である。そのため、各ジアステレオマー（PDX-10a 及び PDX-10b）の定量法を開発し、バリデーション試験を実施した。血漿及び尿中の PDX-10a 及び PDX-10b を C18 固相抽出（SPE）カラムで抽出後、塩化アセチルでメチル化することにより誘導体化した。誘導体化したサンプルを LC/MS/MS で測定した。分析カラムにはキラルカラムを使用した。バリデーション試験では特異

性、マトリックス効果、日内及び日間真度（相対誤差［%］）並びに精度（相対標準偏差［%］）、直線性及び回収率を評価した。定量範囲はラットの血漿で 1～1000 ng/mL、それ以外では 0.5～1000 ng/mL であった（表 2.6.4- 2）。また、毒性試験での不純物／分解物測定のために、イヌ血漿中　　不純物A*　　濃度定量法を確立し、バリデーション試験を実施した。

2.1.1　マウス血漿中定量法

（試験番号 PDX-K-08057-M、添付資料 4.2.2.1.1）

マウス血漿中定量法は LC/MS/MS を用いて開発された。内標準物質として MTX を使用した。血漿中 PDX-10a 及び PDX-10b を C18 SPE カラムにより抽出し、抽出物を塩化アセチルで誘導体化した。誘導体化したサンプルをキラルカラムで分離し、LC/MS/MS にて測定した。バリデーション試験では特異性、マトリックス効果、日内及び日間精度並びに真度、直線性を評価した。確立した定量法は特異的であり、PDX-10a、PDX-10b 及び MTX（内標準物質）の保持時間に妨害はみられず、マトリックス効果もみられなかった。日内真度及び精度も許容範囲内であった。定量範囲は 0.5～1000 ng/mL であった。

ヒト血漿及び尿中での安定性試験では、いずれのジアステレオマーでも凍結融解 3 回、室温で 24 時間、抽出物は室温で 5 日間安定であった（15%以下の分解、2.7.1.4.1.1 項）。また、ラット及びイヌでの長期安定性試験では PDX-10a 及び PDX-10b ともに-20°C で少なくとも 12 ヵ月まで安定であると考えられた（ラット及びイヌで 20%以下の分解）（表 2.6.4- 2）ことから、マウスでは長期安定性を含む安定性試験は実施しなかった。

2.1.2　ラット血漿及び尿中定量法

（試験番号 PDX-K-05012-R、添付資料 4.2.2.1.2）

ラット血漿中定量法はマウス血漿中定量法と同様である。本定量法は特異的であり、プララトレキサート及び MTX（内標準物質）の保持時間への妨害はみられなかった。血漿及び尿ともにマトリックス効果もなく、日内及び日間精度並びに真度も許容範囲内であった。定量範囲は 1～1000 ng/mL（血漿）及び 0.5～1000 ng/mL（尿）であった。長期安定性試験では、いずれのジアステレオマーともに-20°C で 13.5 ヵ月（血漿）及び 14.5 ヵ月（尿）まで安定であると考えられた（20%以下の分解）。

2.1.3　ウサギ血漿中定量法

（試験番号 PDX-K-08056-B、添付資料 4.2.2.1.3）

ウサギ血漿中定量法はマウス及びラット血漿中定量法と同様である。本定量法は特異的で妨害はみられなかった。マトリックス効果もなく、日内及び日間精度並びに真度も許容範囲内であった。定量範囲は 0.5～1000 ng/mL であった。長期安定性試験では、いずれのジアステレオマーともに-20°C で 21 ヵ月まで安定であると考えられた（20%以下の分解）。

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.1.4　イヌ血漿及び尿中定量法

（試験番号 PDX-K-05011-D、添付資料 4.2.2.1.4）
（試験番号 PDX-K-08070-D、添付資料 4.2.2.1.5）

イヌ血漿及び尿中定量法はマウス、ラット及びウサギ定量法と同様である（試験番号 PDX-K-05011-D）。本定量法は特異的で妨害はみられなかった。マトリックス効果もなく、日内及び日間精度並びに真度も許容範囲内であった。定量範囲は 0.5～1000 ng/mL であった。長期安定性試験ではいずれのジアステレオマーともに-20°C で 14.75 ヵ月（血漿）及び 13.75 ヵ月（尿）まで安定であると考えられた（20%以下の分解）。また、イヌ血漿中　　不純物A*

定量法を開発しバリデーション試験を実施した（試験番号 PDX-K-08070-D）。血漿中　　不純物A*　　を C18 SPE カラムにて抽出後、LC/MS/MS にて測定した。定量範囲は 1～1000 ng/mL であった。イヌ血漿中　　不純物A*　　は-20°C で 4 ヵ月まで安定であった。

表 2.6.4- 2　LC/MS/MS 定量法（プララトレキサート）のバリデーション試験結果の要約

Species	LLOQ (ng/mL)	Linearity Range (ng/mL)	Plasma Stability[a] (months)	Urine Stability[a] (months)
Mouse	0.5	0.5 – 1000	ND	ND
Rat	1 (Plasma) 0.5 (Urine)	1 – 1000 (Plasma) 0.5 – 1000 (Urine)	≥ 13.5	≥ 14.5
Rabbit	0.5	0.5 – 1000	≥ 21	ND
Dog	0.5	0.5 – 1000	≥ 14.75	≥ 13.75

a: Stability criteria were ≤ 20% deviation from the original concentration for rat, rabbit and dog
LLOQ = lower limit of quantitation, ng = nanogram, mL = milliliter, ND = Not determined

2.2　標識体分析法

2.2.1　標識化合物

非臨床薬物動態試験の *in vivo* 試験では、ラットでの排泄試験（試験番号 PDX-K-07052-R、PDX-K-07053-R 及び PDX-K-10077-R、PDX-K-10077-R は組織内分布試験も含む）で放射性同位元素標識化合物（[^{14}C]-プララトレキサート）を使用した。試験番号 PDX-K-07052-R 及び PDX-K-07053-R ではプララトレキサートのカルボン酸部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサート（図 2.6.4- 1）を、試験番号 PDX-K-10077-R ではプテリジン部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサート（図 2.6.4- 2）を使用した。それぞれの比放射活性及び放射化学的純度を表 2.6.4- 3 に示す。

また、*in vitro* 試験では、ヒト血漿でのタンパク結合試験（試験番号 PDX-K-06029-U 及び PDX-K-07043-U）及びトランスポーターに関する試験（試験番号 PDX-K-10081-U、PDX-K-10080-U、PDX-K-11088-U 及び PDX-K-10078-U）で[^{14}C]-プララトレキサートを使用した。タンパク結合試験

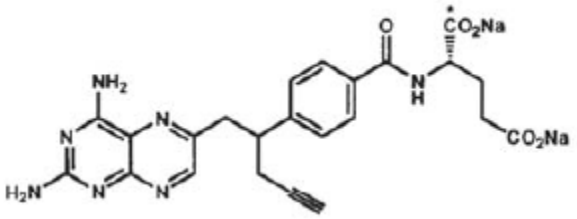
*：新薬承認情報提供時に置き換えた

に使用した標識体の比放射活性は 28.4 mCi/mmol、トランスポーターに関する試験で使用した標識体の比放射活性は 50 mCi/mmol 又は 57.6 mCi/mmol であった。

表 2.6.4- 3　*In vivo* 試験で使用した標識化合物の比放射活性及び放射化学的純度

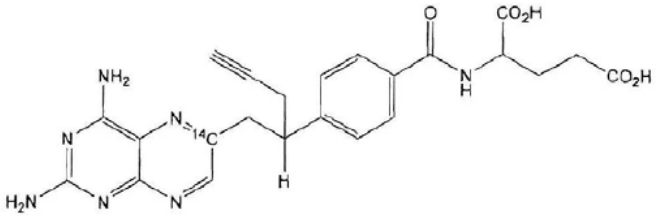
Study number	Lot Number	Specific activity	Radiochemical purity
PDX-K-07052-R PDX-K-07053-R	EPPS-07-014-39-10	53.9 mCi/mmol	≧98%
PDX-K-10077-R	RUS2578	20.07 MBq	97.95%

図 2.6.4- 1　カルボン酸部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサートの構造式



•：^{14}C 標識位置

図 2.6.4- 2　プテリジン部位の炭素を標識した[^{14}C]-プララトレキサートの構造式



2.2.2　分析法

各試験での放射能濃度は、液体シンチレーションカウンター（LSC）で測定した。試料中のクエンチングは外部標準法により自動補正した。組織内放射能濃度は、定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA，FLA-5100 Fluorescent image analyser : FUJIFILM Life Science）で定量を行った。

3　吸収

3.1　単回投与

3.1.1　ラット

（試験番号 PDX-K-05010-R、添付資料 4.2.2.2.1）

雌雄ラットにプララトレキサートを静脈内投与後の PDX-10a 及び PDX-10b の薬物動態を検討した。Sprague-Dawley（SD）ラット（雌雄各 3 匹／群、体重：雄 266～297 g、雌 187～243 g、週齢：約 8 週齢）にプララトレキサートを 5、10 及び 25 mg/kg で単回静脈内投与した。投与媒体にはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）を用い、投与容量 2.0 mL/kg で 5 分かけて投与した。投与後 5、10、20、30 及び 45 分、1、2、4、12、24、36 及び 48 時間に頸静脈より採血し、血漿試料を得た。また、投与前 12 時間及び投与後 48 時間まで 12 時間ごとの尿を採取した。血漿及び尿中 PDX-10a 及 PDX-10b 濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。ノンコンパートメントモデルで算出した PK パラメーターを表 2.6.4- 4、表 2.6.4- 5 及び 2.6.5.3A 項に示した。

静脈内投与後の血漿中濃度推移は二相性を示し、速やかな分布後、緩やかに消失した。緩やかな消失は尿中排泄プロファイルからも確認された。投与量と曝露量との間には線形性がみられた。尿中未変化体排泄率（fe）は低く、腎外クリアランス（CL_{nonren}）が大きいことから、組織での代謝、血漿中での分解及び胆汁排泄が示唆された。また、Vd_{ss} は広範な組織分布を示した。Vd_{ss} は 10 mg/kg 超で上昇したが、これはタンパク結合の飽和によるものと考えられた。

各ジアステレオマーの PK パラメーターに差はほとんどみられなかった（高用量で PDX10a/PDX10b が 12%減少）。雌の全身クリアランス（CL_{tot}）、腎クリアランス（CL_{ren}）、CL_{nonren} は雄の 2 倍を示したが、この理由については明らかではない。なお、ラット及びイヌでの反復投与並びにヒトではクリアランスに性差はみられていない。

表 2.6.4- 4　ラットにプララトレキサートを静脈内投与後の血漿中 PDX-10a 及び PDX-10b の主要 PK パラメーター

	Gender	Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/ml)	AUC_{inf} (ng/ml•min)	CL_{tot} (mL/min)	$t_{1/2}$ (min)	Vd_{ss} (L)
PDX-10a	Male	5	2504	65987	9.5	463	0.7
		10	5169	129177	9.7	307	0.5
		25	19143	394487	7.9	783	2.0
	Female	5	1616	33857	14.8	29	0.5
		10	3655	67776	14.8	132	0.6
		25	6510	164878	15.2	1262	3.8
PDX-10b	Male	5	2647	65655	9.5	435	0.7
		10	5605	136719	9.2	151	0.4
		25	21747	448071	7.0	1267	1.1
	Female	5	1682	36115	13.9	28	0.4
		10	4166	73010	13.7	171	0.5
		25	7150	187209	13.4	930	1.7
Ratio (PDX-10a/PDX-10b)	Male	5	0.95	1.01	0.99	1.06	1.08
		10	0.92	0.94	1.06	2.03	1.43
		25	0.88	0.88	1.14	0.62	1.86
	Female	5	0.96	0.94	1.06	1.04	1.13
		10	0.88	0.93	1.08	0.77	1.10
		25	0.91	0.88	1.13	1.36	2.24

AUC_{inf} = area under the concentration time curve to infinity, CL_{tot} = total clearance, C_{max} = maximum plasma concentration, $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life, Vd_{ss} = volume of distribution at stedy state
Data are represented as the mean, n=3

(Source: PDX-K-05010-R Appendix6 Table)

表 2.6.4- 5　ラットにプララトレキサートを静脈内投与後の尿中 PDX-10a 及び PDX-10b の主要 PK パラメーター

	Gender	Dose (mg/kg)	fe (%)	$t_{1/2urine}$ (min)	CL_{ren} (mL/min)	CL_{nonren} (mL/min)
PDX-10a	Male	5	2.8	876	0.26	9.19
		10	3.1	911	0.30	9.40
		25	3.5	1061	0.28	7.62
	Female	5	4.4	1350	0.65	14.10
		10	3.0	846	0.44	14.31
		25	4.5	888	0.68	14.47
PDX-10b	Male	5	2.8	917	0.27	9.23
		10	3.1	969	0.28	8.87
		25	3.8	890	0.26	6.69
	Female	5	4.6	1148	0.64	13.21
		10	3.0	1047	0.41	13.29
		25	4.5	892	0.60	12.75
Ratio (PDX-10a/PDX-10b)	Male	5	1.00	0.96	0.99	0.99
		10	1.00	0.94	1.06	1.06
		25	0.92	1.19	1.05	1.14
	Female	5	0.96	1.18	1.02	1.07
		10	1.00	0.81	1.08	1.08
		25	1.00	1.00	1.13	1.13

CL_{ren} = renal clearance, CL_{nonren} = non-renal clearance, fe = fraction of drug excreted unchanged in urine, $t_{1/2urine}$ = terminal elimination half-life (urine)
Data are represented as the mean, n=3

(Source: PDX-K-05010-R Appendix6 Table)

3.1.2　イヌ

（試験番号 PDX-K-05009-D、添付資料 4.2.2.2.2）

雌雄イヌにプララトレキサートを静脈内投与後の PDX-10a 及び PDX-10b の薬物動態を検討した。

ビーグル犬（雌雄各 3 匹／群、体重：雄 9.3～10.8 kg、雌 7.1～8.6 kg、月齢：7～9 ヵ月）にプララトレキサートを 0.3、1.0 及び 3.0 mg/kg で単回静脈内投与した。投与媒体には PBS を用い、投与容量 1 mL/kg で 5 分かけて投与した。投与前並びに投与後 5、10、20、30 及び 45 分、1、2、4、12、24、36 及び 48 時間に頸静脈より採血し、血漿試料を得た。また、投与前 12 時間及び投与後 48 時間まで 12 時間ごとの尿を採取した。血漿及び尿中 PDX-10a 及び PDX-10b 濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。ノンコンパートメントモデルで算出した PK パラメーターを表 2.6.4- 6、表 2.6.4- 7 及び 2.6.5.3B 項に示した。

静脈内投与後の血漿中濃度推移は二相性を示し、速やかな分布後、緩やかに消失した。緩やかな消失は尿中排泄プロファイルからも確認された。投与量と曝露量との間には線形性がみられた。fe は低用量（0.3 mg/kg）では約 20%であったが、高用量（3.0 mg/kg）では約 3%であったことか

ら、尿細管分泌の飽和が示唆された。CL_{nonren} が大きいことから、組織での代謝及び胆汁排泄の関与が示唆された。Vd_{ss} からは広範な組織分布が示唆され、1.0 mg/kg 超で上昇した。これはラットと同様にタンパク結合の飽和によるものと考えられた。CL_{tot} が投与量によらず、みかけ上一定になった要因として、タンパク結合の飽和により、腎尿細管分泌、代謝、胆汁排泄の飽和が相殺されたためであると考えられる。PDX-10b の CL_{tot} は PDX-10a に比べて 2 倍高かったが、投与量が高くなるにつれてジアステレオマー間の差は少なくなったことから、ジアステレオマー選択的なタンパク結合、腎尿細管分泌、代謝／胆汁排泄の飽和が示唆された。CL_{tot} 及び Vd_{ss} に性差がみられたが、これは体重の違いによるものと考えられた。

表 2.6.4- 6　イヌにプララトレキサートを静脈内投与後の血漿中 PDX-10a 及び PDX-10b の主要 PK パラメーター

	Gender	Dose (mg/kg)	C_{max} (ng/ml)	AUC_{inf} (ng/ml•min)	CL_{tot} (mL/min)	$t_{1/2}$ (min)	Vd_{ss} (L)
PDX-10a	Male	0.3	250	19959	79	317	22
		1.0	971	56070	107	378	24
		3.0	2469	123826	122	701	38
	Female	0.3	308	20618	59	636	20
		1.0	1275	65647	62	443	17
		3.0	3160	171640	76	720	20
PDX-10b	Male	0.3	157	10268	153	254	33
		1.0	613	34587	244	191	34
		3.0	1923	90288	166	1281	54
	Female	0.3	201	12534	98	253	18
		1.0	857	48050	85	456	24
		3.0	2114	108787	118	823	32
Ratio (PDX-10a/PDX-10b)	Male	0.3	1.62	1.95	0.52	1.56	0.73
		1.0	1.60	1.98	0.56	2.20	0.87
		3.0	1.28	1.38	0.74	0.75	0.74
	Female	0.3	1.53	1.68	0.62	3.10	1.19
		1.0	1.47	1.37	0.73	1.03	0.75
		3.0	1.50	1.56	0.64	0.87	0.62

AUC_{inf} = area under the concentration time curve to infinity, CL_{tot} = total clearance, C_{max} = maximum plasma concentration, $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life, Vd_{ss} = volume of distribution at stedy state
Data are represented as the mean, n=3

(Source: PDX-K-05009-D Appendix7 Table)

表 2.6.4- 7　イヌにプララトレキサートを静脈内投与後の尿中 PDX-10a 及び PDX-10b の主要 PK パラメーター

	Gender	Dose (mg/kg)	fe (%)	$t_{1/2urine}$ (min)	CL_{ren} (mL/min)	CL_{nonren} (mL/min)
PDX-10a	Male	0.3	19.8	959	16	63
		1.0	6.3	443	5	102
		3.0	3.2	695	4	118
	Female	0.3	21.7	627	13	46
		1.0	8.3	1063	5	57
		3.0	6.1	539	4	72
PDX-10b	Male	0.3	18.0	1061	28	125
		1.0	4.8	474	9	235
		3.0	2.4	667	4	162
	Female	0.3	18.9	645	18	79
		1.0	6.3	1531	5	80
		3.0	4.5	575	5	113
Ratio (PDX-10a/PDX-10b)	Male	0.3	1.10	0.89	0.57	0.51
		1.0	1.24	0.94	0.71	0.55
		3.0	1.28	1.01	0.96	0.73
	Female	0.3	1.15	0.98	0.71	0.59
		1.0	1.30	0.81	0.95	0.72
		3.0	1.50	0.94	0.97	0.63

CL_{ren} = renal clearance, CL_{nonren} = non-renal clearance, fe = fraction of drug excreted unchanged in urine, $t_{1/2urine}$ = terminal elimination half-life (urine)
Data are represented as the mean, n=3

(Source: PDX-K-05009-D Appendix7 Table)

3.2　反復投与

3.2.1　ラット 6 ヵ月反復投与（TK 試験）

（試験番号 PDX-T-07034-R、添付資料 4.2.3.2.3）

ラット 6 ヵ月反復投与毒性試験で、臨床と同様の投与スケジュール（1 回／週で 6 週間投与後、1 週間休薬）でプララトレキサート反復投与後の TK 試験を実施した。

SD ラット（雌雄各 3 匹／時点、体重：雄 291～350 g、雌 197～261 g、週齢：6～8 週齢）にプララトレキサートを 5、10 及び 25 mg/kg/day（30、60 及び 150 mg/m^2）で静脈内投与した。投与媒体には PBS を用い、投与容量 1.27 mL/kg で投与した。投与 1、85 及び 183 日の投与前（85 及び 183 日目のみ）並びに投与後 5、15 及び 30（1 日目の雌以外）分、1、1.5（1 日目の雌のみ）2、4（1 日目の雌以外）、5（1 日目の雌のみ）、8、12、24 及び 25 時間（1 日目の雌のみ）に頸静脈より採血し、血漿試料を得た。血漿中 PDX-10a 及び PDX-10b 濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。ノンコンパートメントモデルで算出した PK パラメーターを 2.6.5.4A 項に示した。

採血時点及び測定感度の理由から、消失相を十分に評価することができなかったが、静脈内投与後の血漿中濃度推移は、単回投与試験での血漿中濃度推移と同様に二相性を示し、速やかな分布後、緩やかに消失した。低用量（5 mg/kg）ではジアステレオマー間の PK の差はないか、あっても少なく、血漿中 PDX-10a／PDX-10b の比はほぼ 1 を示した。投与量の増加に伴い、PDX-10a／PDX-10b の比はやや減少したことから、各ジアステレオマーに選択的な消失／分布経路の存在が示唆された。

5～25 mg/kg の範囲で両ジアステレオマー及び雌雄ともに投与 1、85 及び 183 日の CL_{tot} がおおよそ一定であることから、この用量範囲での線形性が示された。なお、本試験で得られた投与 1 日目の CL_{tot} は単回投与試験（試験番号 PDX-K-05010-R）の約 50%であり、血漿中濃度が単回試験時よりも高いことを示していた。

反復投与試験では、CL_{tot} 及びその他の PK パラメーターについて単回投与試験でみられた性差はみられなかった。

両ジアステレオマー、雌雄及び全投与量で投与 183 日目の方が 85 日目に比べて血漿中濃度が高かったが、投与 85 及び 183 日の血漿中トラフ濃度は LLOQ 未満であったことから、反復投与による蓄積性はないと考えられた。反復投与による血漿中濃度の上昇により、CL_{tot} は 50%まで減少したが、イヌ及びヒトではこの現象はみられないことから、ラット特有であると考えられた。

3.2.2　イヌ 9 ヵ月反復投与（TK 試験）

（試験番号 PDX-T-07054-D、添付資料 4.2.3.2.6）

イヌ 9 ヵ月反復投与毒性試験で、臨床と同様の投与スケジュール（1 回／週で 6 週間投与後、1 週間休薬）でプララトレキサート反復投与後の TK 試験を実施した。

ビーグル犬（雌雄各 5 匹／群、体重：雄 7.1～10.9 kg、雌 5.1～8.8 kg、月齢：4～5 ヵ月）にプララトレキサートを 0.1、0.3 及び 0.7 mg/kg（2、6 及び 14 mg/m^2）で静脈内投与した。投与媒体には PBS を用い、投与容量 1 mL/kg で 1～2 分かけて投与した。投与 1、85、183 及び 281 日目の投与前並びに投与後 5（1 日目のみ）、30 分及び 1（1 日目のみ）、2、4、12 及び 24 時間に頸静脈より採血し、血漿試料を得た。血漿中 PDX-10a 及び PDX-10b 濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。なお、試験が延長されたため、183 日に採取した試料の測定は実施しなかった。ノンコンパートメントモデルで算出した PK パラメーターを 2.6.5.4B 項に示した。

採血時点及び測定感度の理由から、消失相を十分に評価することができなかったが、静脈内投与後の血漿中濃度推移は、単回投与試験での血漿中濃度推移と同様に二相性を示し、速やかな分布後、緩やかに消失した。速やかな分布はプララトレキサートが循環血中から速やかに末梢に移行したことが、緩慢な消失はプララトレキサートがこれらの組織から循環血中に再分布されたことが示唆される。0.1～0.7 mg/kg での CL_{tot} は投与 1、85 及び 281 日で両ジアステレオマー及び雌雄ともに一定であり、この用量範囲での線形性が示された。PDX-10b は PDX-10a より速やかに消失した。ジアステレオマー比は投与量及び反復投与によって変わらず一定であった。両ジアステレオマーの PK パラメーターに性差はみられなかった。

PDX-10a 及び PDX-10b ともに蓄積性はみられなかった。雌の投与 85 日目に急激な曝露の減少（0.7 mg/kg で 50%の減少）がみられたが、投与 281 日ではみられなかった。この原因については不明であるが、人為的な要因（投与 85 日目の採血時点を減らしたこと及びばらつき）によると考えられる。

4　分布

4.1　組織内分布試験

（試験番号 PDX-K-10077-R、添付資料 4.2.2.3.1）
（試験番号 PDX-K-07052-R、添付資料 4.2.2.3.2）

有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを単回静脈内投与後の組織内濃度を QWBA により検討した（試験番号 PDX-K-10077-R）。

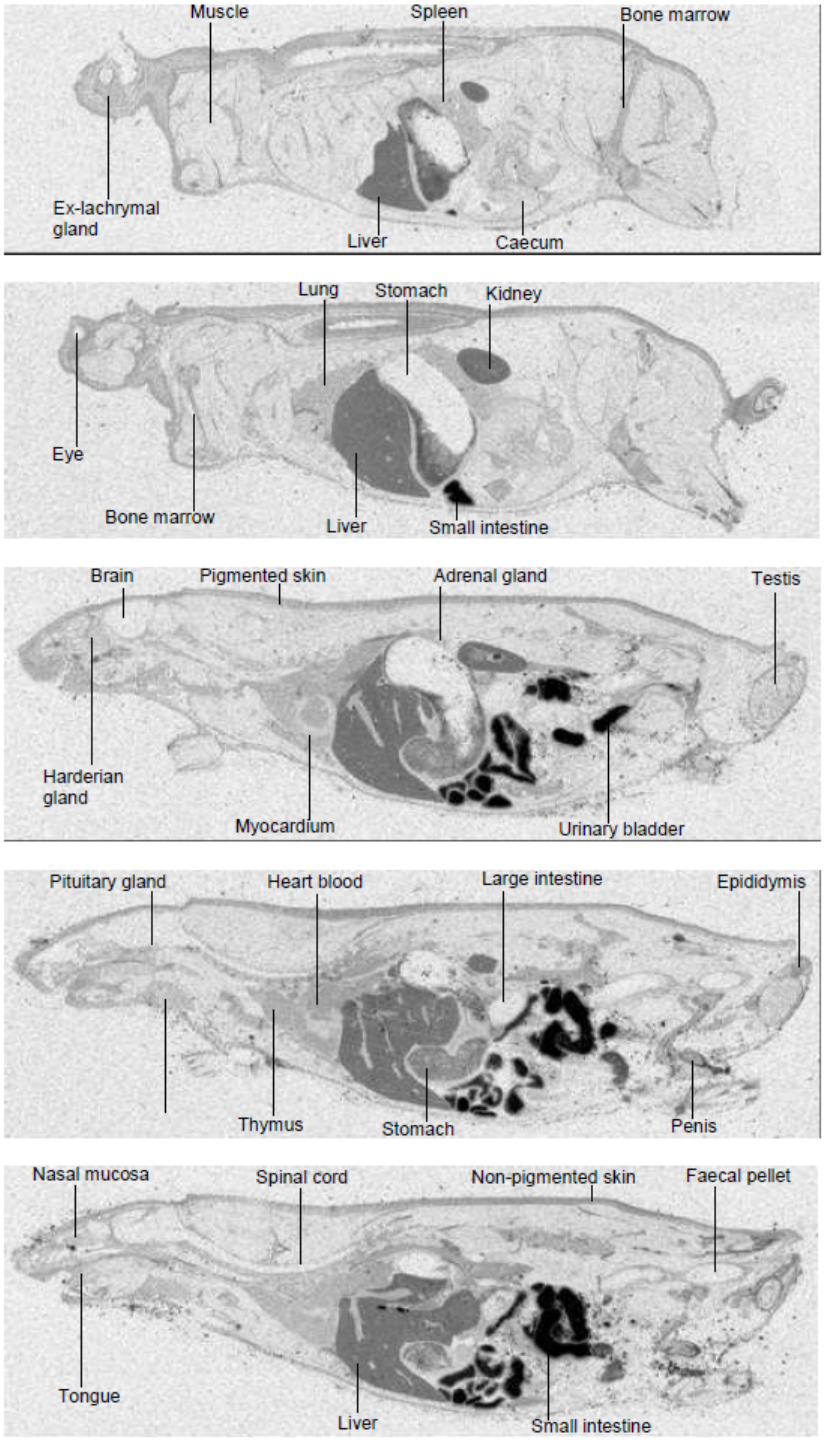
Lister Hooded 系ラット（雄 1 匹／時点、体重：237～272 g、週齢：8～10 週齢）に[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg（100 µCi/kg）で単回静脈内投与した。投与媒体には 10%エタノールを含む生理食塩液を用い、投与容量 1 mL/kg で投与した。投与後 1、4、24、48、168 及び 504 時間に QWBA に供した。静脈内投与後 1、24 及び 504 時間のオートラジオグラムを図 2.6.4- 3、図 2.6.4- 4 及び図 2.6.4- 5 に、各組織中濃度を表 2.6.4- 8 及び 2.6.5.5A 項に示した。

投与後 1 時間では、骨、脳、脊髄、白色脂肪を除く全ての組織で放射能が検出され、ほとんどの組織において、投与後 1 時間で最高放射能濃度が得られた。投与後 1 時間での放射能が高かった組織は、小腸内容物、膀胱壁、小腸粘膜、肝臓及び腎皮質であった。その後、放射能は急激に減少し、投与後 48 時間では約 70%の組織で BLQ となった。投与後 168 時間では腎皮質、肝臓、胸腺及び脾臓でのみ、投与後 504 時間では肝臓及び腎皮質でのみ検出可能であった。白色及び有色部位での放射能濃度に若干の差がみられたが、ブドウ膜での放射能は 48 時間までに BLQ となったことから、メラニンへの結合はないと考えられた。

また、SD ラット（雌雄各 4 匹／時点、雄 205～212 g、雌 171～185 g、週齢：雄 7 週齢、雌 8 週齢）に[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg（50 µCi/kg）で単回静脈内投与した（試験番号 PDX-K-07052-R）。投与媒体には 10%エタノールを含む生理食塩液を用い、投与容量 1.0 mL/kg で静脈内投与した。投与後 168 時間に脳、肝臓、肺、回腸、結腸、骨格筋、腎臓、皮膚、骨髄（大腿骨）及び残りのカーカスを採取後、燃焼法により試料を調製し、LSC にて放射能濃度を測定した。各組織中濃度を 2.6.5.5B 項に示した。

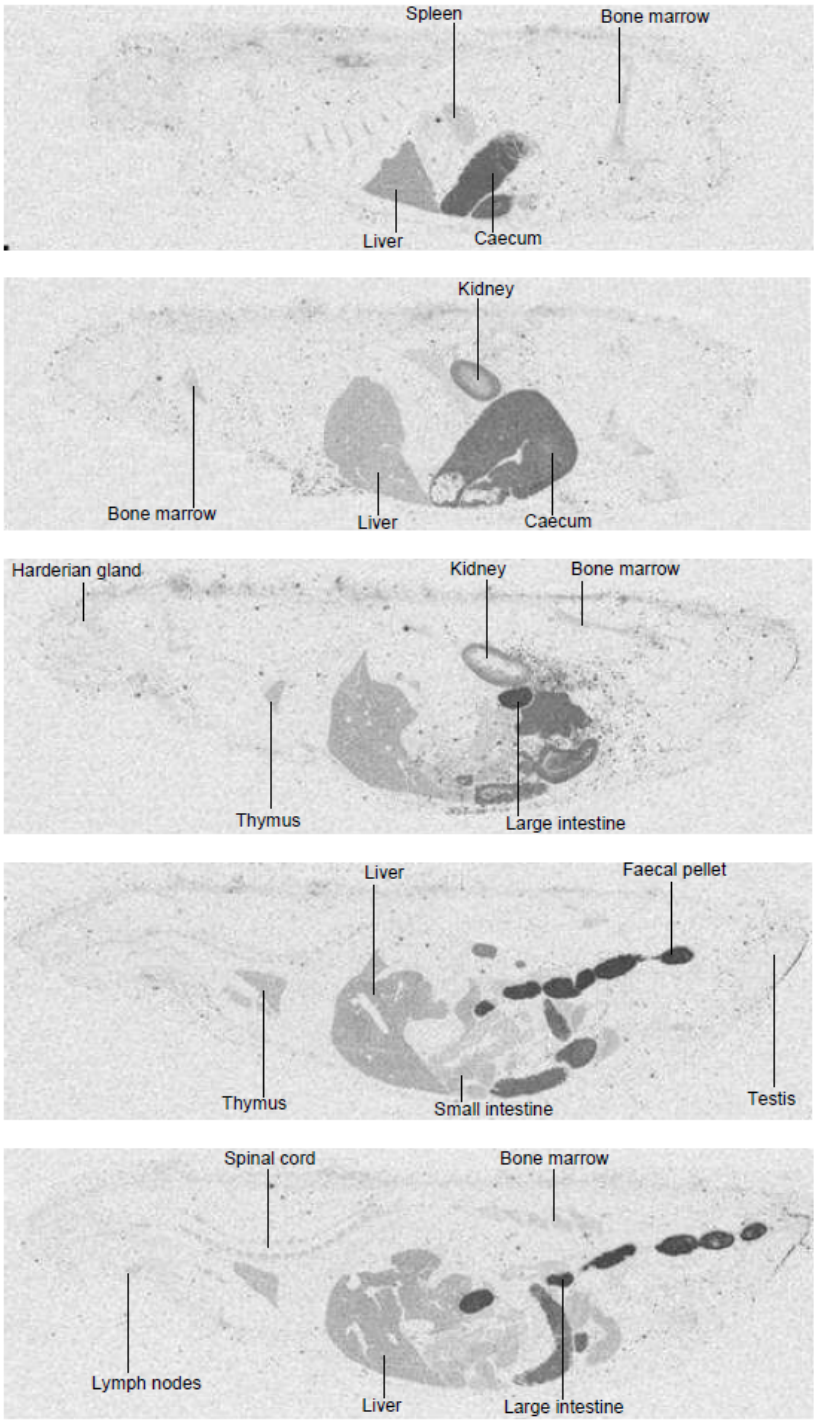
投与後 168 時間の放射能は、肝臓（雄：0.33 µg equiv./g、雌：0.24 µg equiv./g）及び腎臓（雄：0.39 µg equiv./g、雌：0.27 µg equiv./g）で最も高い濃度が検出され、この結果はプララトレキサートの消失過程と一致していた。投与後 168 時間の組織に検出された放射能は雌雄ともに投与量の 0.3%未満で、その大部分が肝臓及び腎臓であった。

図 2.6.4- 3　有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後 1 時間の全身オートラジオグラム



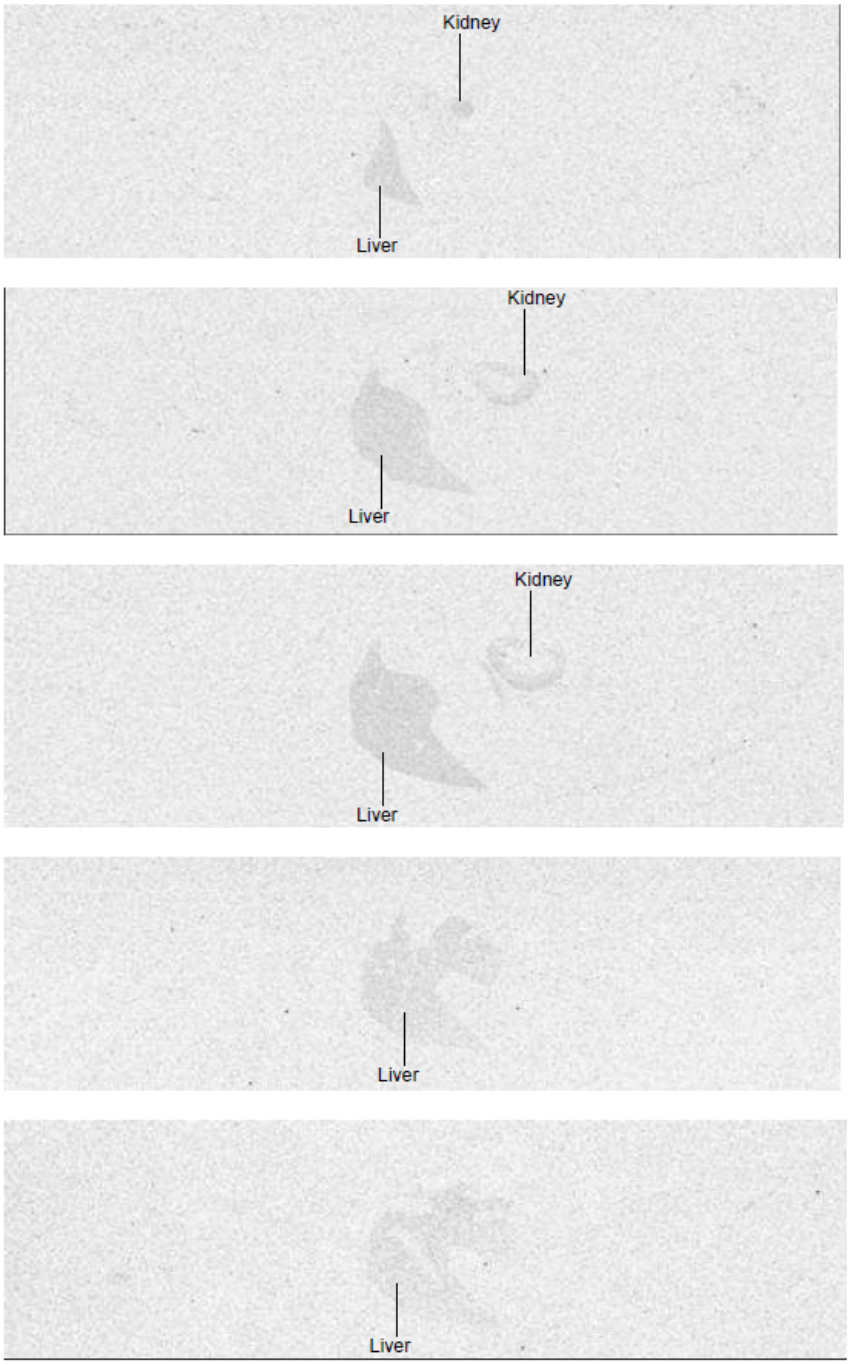
(Source: PDX-K-10077-R Figure 1)

図 2.6.4- 4　有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後 24 時間の全身オートラジオグラム



(Source: PDX-K-10077-R Figure 3)

図 2.6.4- 5　有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後 504 時間の全身オートラジオグラム



(Source: PDX-K-10077-R Figure 6)

表 2.6.4- 8　有色ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後の組織内放射能分布

Tissue	Concentration (µg equiv./g)					
	1 h	4 h	24 h	48 h	168 h	504 h
Blood (heart)	0.440	0.057	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Bone marrow	0.477	0.213	0.166	0.105	BLQ	BLQ
Kidney cortex	2.31	0.715	0.685	0.600	0.238	0.075
Kidney medulla	1.09	0.081	0.064	BLQ	BLQ	BLQ
Liver	2.31	0.445	0.395	0.289	0.206	0.089
Lung	0.472	0.059	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Muscle	0.083	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Skin (nonpigmented)	0.564	0.080	0.063	BLQ	BLQ	BLQ
Skin (pigmented)	0.473	0.102	0.074	0.057	BLQ	BLQ
Spleen	0.333	0.151	0.133	0.100	0.056	BLQ
Thymus	0.379	0.196	0.239	0.176	0.108	BLQ
Uveal tract	0.414	0.083	0.080	BLQ	BLQ	BLQ
Remaining tissue (excl. GI tract)	BLQ-4.28	BLQ-0.330	BLQ-0.142	BLQ-0.088	BLQ	BLQ
GI tract	0.102-280#	BLQ-484#	BLQ-6.36	BLQ-0.493	BLQ	BLQ

BLQ: Below limit of accurate quantitation (< 0.052 µg equivalents/g).
#: Above upper limit of quantitation (89.5 µg equivalents/g).
GI: Gastro intestinal

(Source: PDX-K-10077-R, Summary Table)

4.2　血漿タンパク結合率

（試験番号 PDX-K-06029-U、添付資料 4.2.2.3.3）
（試験番号 PDX-K-08066-U、添付資料 4.2.2.3.4）

プララトレキサートのヒト血漿及び血清タンパク結合率を、平衡透析法及び限外濾過法で検討した。

透析膜で隔離したウェルの一方に PBS をもう一方に[^{14}C]-プララトレキサートを添加した血漿（17 及び 70 µmol equiv./L、70 µmol equiv./L は臨床試験 PDX-008 試験での最高血漿中濃度よりも高い濃度）を入れ、37°C で 24 時間インキュベートした後の各分画中放射能濃度を LSC にて測定し、得られた 1 分あたりの壊変数（DPM）値よりタンパク結合率を算出した（試験番号 PDX-K-06029-U）。結果を 2.6.5.6A 項に示した。平均回収率は 95.1%、17 及び 70 µmol equiv./L でのタンパク結合率は 62.7%及び 69.2%であった。また、限外濾過法によりプララトレキサートのヒト血漿及び血清タンパク結合率を検討した（試験番号 PDX-K-08066-U）。ヒト血漿にプララトレキサートが 5、25 及び 100 µg/mL、ヒト血清にプララトレキサートが 5 及び 100 µg/mL となるように添加し、37°C でインキュベートした。10、35、60 分及び 24 時間にサンプリングし、限外濾過チューブに入れて遠心し、遠心後の濾液を LC/MS/MS にて測定した。結果を 2.6.5.6B 項に示し

た。血漿タンパクへの結合は時間依存的であり、1 時間後に平衡に達した。タンパク結合率は濃度に依存せず 84～88%であった。プララトレキサート濃度 5～100 µg/mL（10～210 µmol/L）でタンパク結合率が一定であることは、この条件下でタンパク結合が飽和しないことを示している。インキュベート 1 時間及び 24 時間での結合パラメーター（nKa）は 0.102 及び 0.115 であり、有意差はみられなかった。プララトレキサートのヒト血清アルブミンへの結合率は 10 分で平衡に達し、91.8%であった。以上のことから、プララトレキサートのヒト血漿タンパク結合率はやや高く（63%～88%）、主にヒト血清アルブミンに結合すると考えられた。

4.3　血球移行率

（試験番号 PDX-K-08067-U、添付資料 4.2.2.3.5）

プララトレキサート（5、25 及び 100 µg/mL）をヒト血液に添加し、37°C でインキュベートした。5、30、60 及び 120 分後にサンプリングし、1500 g で 10 分遠心後の血漿及び血球中プララトレキサート濃度を LC/MS/MS にて測定した。また、コントロールとしてヒト血漿にプララトレキサートを添加し、血漿中プララトレキサート濃度を LC/MS/MS で測定した。（ヒト血液への添加では LC/MS/MS 測定でイオン化が妨害されたため、血漿を使用した）。結果を 2.6.5.8A 項に示した。2 時間までのインキュベートで算出された血球中プララトレキサート濃度から、プララトレキサートは血球に移行しないと考えられた。

4.4　脳内移行

（試験番号 PDX-P-03001-R、添付資料 4.2.2.3.6）

ラット（4 匹／群、体重：366～371 g）の左頸動脈に潅流液（プララトレキサート 600 mg/kg、atenolol 50 µmol/L 及び antipyrine 5 µmol/L を含む）を 20 mL/min で 30 秒かけてインフュージョンした。インフュージョン後に薬液を含まない緩衝液で 30 秒洗浄し、脳を採取した。左脳をホモジネートし、試料中薬物濃度を LC/MS/MS にて測定した。結果を 2.6.5.8B 項に示した。Atenolol の投与量で補正したプララトレキサートの取り込み速度は 0.036±0.009 pmol/mg protein/sec で、高透過性の化合物である antipyrine（1.209 pmol/mg protein/sec）の約 1/34 であり、低透過性の化合物である atenolol（0.049 pmol/mg protein/sec）とほぼ同じであったことから、プララトレキサートの脳への取り込みは低いと考えられた。

4.5　胎盤移行

プララトレキサートの胎盤移行は検討していない、他の葉酸アナログと同様にプララトレキサートは妊娠中の女性に投与されるべきではない。

5　代謝

5.1　*In vitro*

5.1.1　代謝安定性

（試験番号 PDX-K-08061-U、添付資料 4.2.2.4.1）
（試験番号 PDX-K-07030-U、添付資料 4.2.2.4.2）

ヒト肝 S9 分画にプララトレキサートが 2 µmol/L になるように添加し、37°C で 60 分までインキュベートした（試験番号 PDX-K-08061-U）。インキュベート後の試料中濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。陽性対照には testosterone 及び 7-hydroxycoumarin を用いた。結果を 2.6.5.9A 項に示した。60 分間インキュベート後のプララトレキサートの残存率は 96.2±1.4%であり、プララトレキサートがヒト S9 分画中で安定であることが示された。なお、陽性対照として用いた testosterone の残存率は 60 分で 18.2±1.3%、7-hydroxycoumarin の残存率は 60 分で 2.2±0.1%であったことから、本試験系でプララトレキサートの第 1 及び 2 相代謝を適切に評価できたと考えられた。

ヒト肝ミクロソーム又はヒト肝細胞にプララトレキサートを 10 及び 100 µmol/L になるように添加し、37°C で 30、60 及び 120 分（ヒト肝ミクロソーム）又は 60、120 及び 240 分（ヒト肝細胞）インキュベートした（試験番号 PDX-K-07030-U）。臨床試験 PDX-008 試験でのプララトレキサートの最高濃度は 46 µmol/L（被験者 012 のサイクル 1 の 1 日目の投与直後の濃度）、C_{max} の平均は 13 µmol/L である（2.7.2.3.2 項）。なお、PDX-K-06020-U 試験でヒト肝細胞へのプララトレキサート 200 µmol/L 以下の添加では細胞に影響がないことが示されている（2.6.2.2.2.5 項）。インキュベート後の試料中プララトレキサート濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。結果を 2.6.5.9B 項に示した。

肝ミクロソーム及び肝細胞で 120 分又は 240 分インキュベート後のプララトレキサートの減少率は 15%以内であったことから、プララトレキサートは肝臓での第 1 相代謝を受けないと考えられた。なお、陽性対照として用いた benzyresorufin は代謝されていたことから、本試験系で第 1 相代謝を適切に評価できたと考えられた。

5.1.2　代謝物の探索

（試験番号 PDX-K-06028-U、添付資料 4.2.2.4.3）

ヒト肝ミクロソームにプララトレキサートを 100 µmol/L となるように添加し、37°C でインキュベートした。0 及び 120 分後に試料を採取し、試料中の代謝物を LC/MS/MS 法にて探索した。

プララトレキサートのフラグメントイオンとして *m/z*349、331、304 及び 175 が検出されたため、この 4 種類を用いてプレカーサーイオンスキャンを実施した。また、これらフラグメントイオンのニュートラルイオンスキャンも実施した。さらに、これらのフラグメントイオンの+16 units（酸化代謝物）についても探索を行ったが、試料中にこれらの *m/z* を示す代謝物は検出されなかった（2.6.5.9C 項）。

5.1.3　代謝に関与する CYP 分子種の同定

（試験番号 PDX-K-08062-U、添付資料 4.2.2.4.4）

ヒト肝ミクロソームにプララトレキサート（1 μmol/L）及び各 CYP 特異的阻害剤（1A2：furafylline、2A6：8-methoxypsoralen、2B6：Thio-TEPA、2C8：quercetin、2C9：sulfaphenazole、2C19：(+)-N-3-benzylnirvanol、2D6：quinidine、2E1：4-methylpyrazole、3A4：ketoconazole）を添加して 37°C で 60 分間インキュベートした。インキュベート後の試料中濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。結果を 2.6.5.9D 項に示した。いずれの特異的阻害剤添加時においても、プララトレキサートの残存率は 93～110%であったことから、プララトレキサートはヒト肝ミクロソーム中で安定であることが示唆された。また、ヒト CYP 発現系（CYP1A2、CYP2A6、CYP2B6、CYP2C8、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6、CYP2E1、CYP3A4）及びモノアミンオキシダーゼ（MAO）発現系（MAO-A 及び MAO-B）にプララトレキサートを 1 μmol/L になるように添加して 37°C で 60 分間インキュベートした。いずれの発現系中でも、60 分間インキュベート後の試料中プララトレキサート濃度は初濃度と同程度であった。MAO-B とのインキュベーションの 1 サンプルでプララトレキサート濃度がやや低かったが、これは測定によるばらつきであると考えられた。以上の結果から、プララトレキサートは検討したヒト発現系で安定であり、これら分子種の関与はないか少ないと考えられた。

5.2　*In vivo*

ヒト肝細胞及びミクロソームを用いた *in vitro* 試験（第 1 及び 2 相代謝）で意義のある代謝物は検出されなかった。また、表 2.6.4- 9 に示すように PK パラメーターに種差がみられないことから *in vivo* 代謝試験は実施しなかった。

5.2.1　推定代謝経路

葉酸アナログである MTX 及び edatrexate では、ヒトを含む各動物種の *in vitro* 又は *in vivo* 試験で 7-水酸化体が代謝物として検出されている［1、2、3］。しかし、プララトレキサートではヒト肝細胞、肝ミクロソーム及び S9 分画とのインキュベーションで第 1 及び 2 相代謝を含む肝代謝物は検出されなかった。[^{14}C]-プララトレキサートを投与後のヒトでのマスバランス試験の結果については 2.7.2.2.5 項に示した。

6　排泄

6.1　尿糞及び呼気中排泄

（試験番号 PDX-K-07052-R、添付資料 4.2.2.3.2）
（試験番号 PDX-K-07053-R、添付資料 4.2.2.5.1）
（試験番号 PDX-K-10077-R、添付資料 4.2.2.3.1）

ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを単回静脈内投与後の排泄を評価した。

SD ラット（雌雄各 4 匹／時点、体重：雄 205～212 g、雌 171～185 g、週齢：雄 7 週齢、雌 8 週齢）に[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg（50 µCi/kg）で単回静脈内投与した（試験番号 PDX-K-07052-R）。投与媒体には 10%エタノールを含む生理食塩液を用い、投与容量 1.0 mL/kg で投与した。投与前及び投与後 0～8、8～24 時間及び 24 時間ごとに 168 時間までの尿、糞及びケージ洗浄液を採取した。

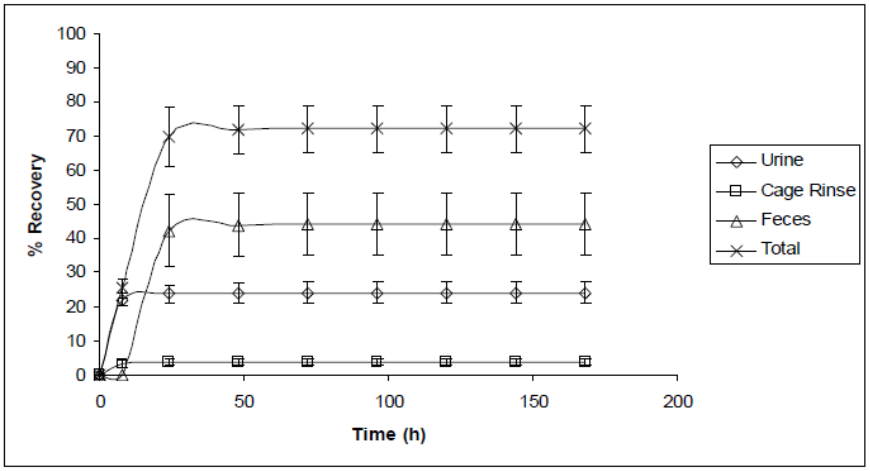
尿、糞、カーカス及びケージ洗浄液中放射能濃度を LSC にて測定した。各排泄率を 2.6.5.13A 項に、累積排泄率を図 2.6.4- 6 及び図 2.6.4- 7 に示した。[^{14}C]-プララトレキサート静脈内投与後の雌雄での糞中排泄率は投与量の約 58%及び 44%、尿中排泄率は約 21%及び 24%であり、放射能は主に糞中に排泄された。ケージ洗浄液中には雌雄で投与量の約 5.4%及び 3.8%が検出された。投与後 24 時間までの糞､尿及びケージ洗浄液への総排泄率は雌雄で投与量の約 83%及び 70%であった。これは総回収率の 98%及び 95%に相当した。投与後 168 時間までの総回収率は雌雄で約 84%及び 73%であった。

呼気中排泄率を評価するための試験を実施した（試験番号 PDX-K-07053-R）。SD ラット（雌雄各 2 匹／時点、体重：雄 218～221 g、雌 184～187 g、週齢：雄 7 週齢、雌 8 週齢）に[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg（50 µCi/kg）で単回静脈内投与した。投与媒体には 10%エタノールを含む生理食塩液を用い、投与容量 1.0 mL/kg で投与した。投与前及び投与後 0～8、8～24、24～48、48～72、72～96 時間に尿、糞及び呼気を採取した。ケージ洗浄液は投与前及び投与後 0～48、48～72、72～96 時間に回収した。尿、糞、呼気、カーカス及びケージ洗浄液中放射能濃度を LSC にて測定した。各排泄率を 2.6.5.13B 項に示した。[^{14}C]-プララトレキサート静脈内投与後の雌雄での糞中排泄率は投与量の約 66%及び 47%、尿中排泄率は約 23%及び 31%であり、放射能は主に糞中に排泄された。ケージ洗浄液中には雌雄で投与量の 0.16%及び 3.67%が検出された。呼気中排泄率は雌雄で投与量の約 6.4%及び 10%であった。投与後 24 時間までの糞、尿及びケージ洗浄液への総排泄率は雌雄で約 92%及び 77%であった。これは総回収率の約 83%～96%に相当した。カーカス及び呼気中排泄を含む投与後 96 時間までの総回収率は雌雄で約 96%及び 93%であった。

上記試験で少ないながらも呼気中排泄が認められた理由として、プララトレキサートのグルタミン側鎖のカルボン酸部位にある炭素が放射能標識されていることによる可能性が考えられた。この部位は代謝又はホリルポリグルタミン酸合成酵素（FPGS）によるポリグルタミン酸化に敏感な部位である（2.6.2.2.1 項）。また、edatrexate 及び MTX と同様に[^{14}C]-プララトレキサートが小腸粘膜におけるバクテリア酵素によって脱グルタミン酸化され、カルボン酸の ^{14}C が乖離及び再吸収されるためと考えられる［2］。そこで、プテリジン部位の炭素を放射能標識した[^{14}C]-プララトレキサートを用いて、有色ラットでの組織内分布試験で尿糞中排泄を評価した（試験番号

PDX-K-10077-R)。有色ラット（雄 3 匹／時点、体重：雄 237～272 g、週齢：8～10 週齢）に[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg（100 μCi/kg）で単回静脈内投与した。投与媒体には 10%エタノールを含む生理食塩液を用い、投与容量 1.0 mL/kg で投与した。投与前並びに投与後 0～6、6～12、12～24 時間及び 24 時間ごとに 168 時間までの尿を採取した。また、投与前及び 24 時間ごとに 168 時間までの糞を採取した。ケージ洗浄液は投与 168 時間後に回収した。尿、糞、カーカス及びケージ洗浄液中放射能濃度を LSC にて測定した。各排泄率を 2.6.5.13C 項に示した。[^{14}C]-プララトレキサート静脈内投与後 168 時間までの糞中排泄率は投与量の約 77%、尿中排泄率は約 26%であり、放射能は主に糞中に排泄された。ケージ洗浄液中には投与量の 0.61%が検出された。投与後 168 時間までの総排泄率は投与量の約 104%で、約 93%が投与後 24 時間以内に排泄された。

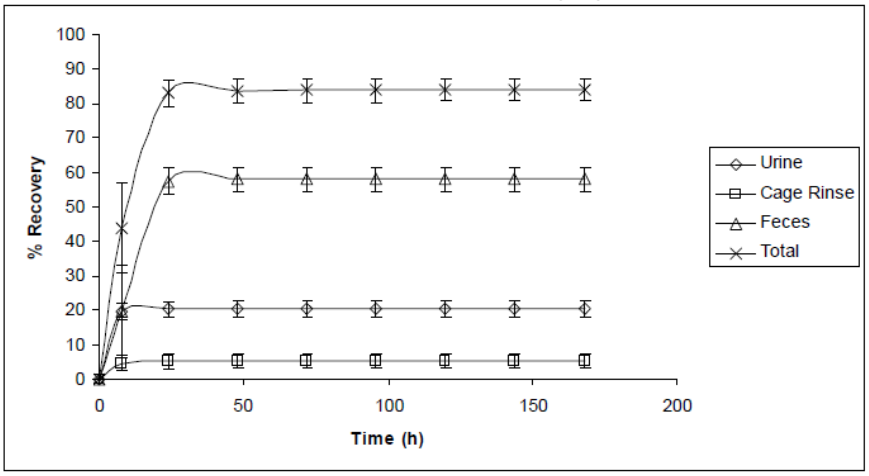
図 2.6.4- 6　雄ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後の累積排泄率



(Mean±SD, n=4)

(Source: PDX-K-07052-R Figure 1)

図 2.6.4- 7　雌ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを 10 mg/kg で単回静脈内投与後の累積排泄率



(Mean±SD, n=4)

(Source: PDX-K-07052-R Figure 2)

6.2　胆汁中排泄

プララトレキサートの胆汁中排泄試験は実施していない。文献によると MTX のラットでの主要排泄経路は胆汁中排泄であり（投与量の 62%）、プララトレキサート及び edatrexate の主要排泄経路が糞中であることと一致する［2、4］。

7　薬物動態学的薬物相互作用

7.1　タンパク結合を介した相互作用

（試験番号 PDX-K-07043-U、添付資料 4.2.2.6.1）
（試験番号 PDX-K-07049-U、添付資料 4.2.2.6.2）

プララトレキサートのタンパク結合を介した薬物相互作用について平衡透析法及び限外濾過法で検討した。

透析膜で隔離したウェルの一方に PBS を、もう一方に評価化合物の存在下／非存在下で[^{14}C]-プララトレキサートを添加した血漿（17 µmol equiv./L）を入れ、37°C で 24 時間インキュベートした。各分画中放射能濃度を LSC にて測定し、得られた DPM 値よりタンパク結合率を算出した（試験番号 PDX-K-07043-U）。結果を 2.6.5.15A 項に示す。評価化合物非存在下でのプララトレキサートのタンパク結合率は約 67%、評価化合物存在下でのタンパク結合率は 56～67%であった。アルブミンのサイト I に結合する phenytoin 又は warfarin 存在下でのタンパク結合率の変化は 3%未満で最も少なかった。アルブミンサイト II に結合する ceftriaxone 存在下でのタンパク結合率の変化は 70 µg/mL で 5%、350 µg/mL で 11%であった。アルブミンサイト III に結合する digoxin 存在下でのタンパク結合率の変化は 2 及び 10 ng/mL で 9%であった。主にα1-酸性糖タンパクに結合し、アルブミンへの結合が少ない disopyramide 存在下でのタンパク結合率の変化は 10 及び 50 µmol/L で 8～10%であった。アルブミン、α-1 酸性糖タンパク及びリポプロテインに結合する propranolol 存在下でのプララトレキサートのタンパク結合率の変化は 40 ng/mL 及び 200 ng/mL で 5%及び 10%であった。以上の結果から、本実験条件下で、プララトレキサートは評価化合物に対して意義のあるタンパク結合の置換を起こさないと考えられた。

プララトレキサートが他の薬剤のタンパク結合に影響を与えるかどうかを、プララトレキサートの予想される臨床最高濃度（32 µg/mL）及びその 5 倍の濃度（160 µg/mL）で限外濾過法により検討した（試験番号 PDX-K-07049-U）。6 化合物（warfarin：アルブミンサイト I、phenytoin：アルブミンサイト I、ibuprofen：アルブミンサイト II、digoxin：アルブミンサイト III、disopyramide：α1-酸性糖タンパク及びアルブミン、propranolol：α1-酸性糖タンパク、アルブミン及びリポプロテイン）について臨床濃度での検討を行った。本法では薬物を含む血漿を透析膜により遠心力で濾過する。濾液中には血漿中の低分子化合物が含まれ、濾液中濃度を測定することで血漿中遊離型濃度がわかる。濾過前の血漿には遊離及び結合型の薬剤が含まれる。これらの値を用いて結合率及び置換率を算出した。結果を 2.6.5.15B 項に示す。これら 6 化合物のプララトレキサート存在下によるタンパク結合率の変化は 2%以下であったことから、プララトレキサートは臨床濃度で他剤のタンパク結合に影響を与えないと考えられた。

7.2　CYP 阻害作用

（試験番号 PDX-K-07032-U、添付資料 4.2.2.6.3）
（試験番号 PDX-K-07033-U、添付資料 4.2.2.6.4）
（試験番号 PDX-K-07044-U、添付資料 4.2.2.6.5）
（試験番号 PDX-K-11090-U、添付資料 4.2.2.6.6）
（試験番号 PDX-K-11089-U、添付資料 4.2.2.6.7）

プララトレキサートの CYP 分子種（CYP1A2、CYP2A6、CYP2C9、CYP2C19、CYP2D6 及び CYP2E1）に対する阻害作用をヒト肝ミクロソームで検討した（試験番号 PDX-K-07032-U）。

プララトレキサート（20、50 及び 100 µmol/L）又は陽性対照をヒト肝ミクロソームに添加し、CYP 特異的基質（1A2：ethoxyresorufin、CYP2A6：coumarin、CYP2C9：tolbutamide、CYP2C19：S-mephenytoin、CYP2D6：dextromethorphan、CYP2E1：chlorzoxazone）に対する阻害作用を検討した。ミクロソーム中の代謝物濃度は LC/MS/MS 法にて測定した。Resorufin の生成は蛍光検出器で測定した。結果を 2.6.5.15C 項に示す。

プララトレキサートによる CYP1A2、CYP2A6、CYP2C9、CYP2D6 及び CYP2E1 に対する濃度依存的な阻害はみられなかったが、CYP2C19 に対しては濃度依存的な阻害を示した。なお、各分子種の陽性対照では予想された阻害作用がみられたため、本実験系は適切であったと考えられる。プララトレキサートは、臨床試験 PDX-008 試験でみられた最高濃度（約 46 µmol/L、C_{max} の平均値は約 13 µmol/L)よりも高濃度において、CYP1A2、2A6、2C9、2D6 及び 2E1 に対する意義のある阻害を示さなかったが、CYP2C19 に対しては 50 µmol/L 以上で阻害を示した。

プララトレキサートによる CYP 阻害作用を、CYP 発現系（CYP1A2、2A6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1 及び 3A4）を用いて検討した（試験番号 PDX-K-07033-U）。プララトレキサート（0～100 µmol/L の範囲で 9 濃度）又は陽性対照をヒト CYP 発現系に添加し、CYP 特異的基質（1A2：7-Ethoxy-3-cyanocoumarin、CYP2A6：coumarin、CYP2C8 及び CYP2C9：dibenzylfluorescein、CYP2C19：3-O-Methylfluorescein、CYP2D6：3-[2-(N,N- diethyl-N-methylamino) ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin、CYP2E1：7-Methoxy-4-trifluoromethylcoumarin、CYP3A4：benzyresorufin）に対する阻害作用を検討した。ミクロソーム中の代謝物濃度は蛍光検出器で測定した。結果を 2.6.5.15D 項に示す。プララトレキサートによる CYP2C19 に対する濃度依存的な阻害がみられ、100 µmol/L で 53%の阻害を示した。CYP2C8、CYP2C9 及び CYP3A4 については濃度依存的な阻害がみられなかったが、CYP2C9 では特異的阻害剤による十分な阻害がみられていないことから、本試験結果から CYP2C9 に対する阻害作用についての結論を示すことはできなかった。一方、CYP2C8 及び CYP3A4 については、特異的阻害剤による十分な阻害作用がみられていた。また、CYP1A2、CYP2A6、CYP2D6 及び CYP2E1 については、プララトレキサートが各特異的基質の測定を妨害したため、本試験結果から適切な評価ができなかった。

プララトレキサートの CYP2C19 に対する Ki 値を算出した（試験番号 PDX-K-07044-U）。ヒト肝ミクロソームにプララトレキサート（0～2500 µmol/L の範囲で 6 濃度）を添加し、37°C で 30 分インキュベートした。CYP2C19 の特異的基質には S-mephenytoin を用いた。結果を 2.6.5.15E 項に示す。CYP2C19 は混合又は非競合阻害を示し、Ki 値は 1142 µmol/L 又は 2063 µmol/L であった。

臨床試験 PDX-008 試験で得られた最高濃度（46 µmol/L：被験者 012 のサイクル 1 の 1 日目の投与直後の濃度）から、C_{max}／Ki は 0.05 未満となるため、プララトレキサートは *in vivo* で CYP2C19 を阻害しないと考えられた。

プララトレキサートの CYP2C19 に対する時間依存的阻害を検討した（試験番号 PDX-K-11090-U）。プララトレキサート（0～5000 µmol/L の範囲で 8 濃度）及び対照化合物をヒト肝ミクロソームに添加し、NADPH 存在下／非存在下で 37°C で 30 分間プレインキュベートした。CYP 特異的基質である S-mephenytoin（基質濃度は K_m 値付近の濃度に設定）を添加し、37°C で 30 分インキュベート後の試料中 4-hydroxymephenytoin 濃度を LC/MS/MS で測定した。結果を 2.6.5.15F 項に示す。プララトレキサートの IC_{50} 値は NADPH 非存在下で 4681 µmol/L、NADPH 存在下で 3556 µmol/L であった。NADPH 非存在下／存在下での IC_{50} 値の比は 1.3 であり、プララトレキサートは CYP2C19 に対して時間依存的な阻害を示さないと考えられた。また、このように可逆及び不可逆的条件下での IC_{50} 値が 3500 µmol/L 超であることから、プララトレキサートの CYP2C19 に対する阻害作用は弱いと考えられた。なお、陽性対照である ticlopidine の IC_{50} 値のシフト（NADPH 非存在下／NADPH 存在下）は 3 以上であったことから本試験系の妥当性が確認された。

プララトレキサートの CYP2B6 に対する IC_{50} 値を算出した（試験番号 PDX-K-11089-U）。ヒト肝ミクロソームにプララトレキサート（0～5000 µmol/L の範囲で 8 濃度）を添加し、37°C で 20 分インキュベートした。CYP2B6 の特異的基質には bupropion を用いた。試料中 hydroxybupropion 濃度は LC/MS/MS で測定した。結果を 2.6.5.15G 項に示す。プララトレキサートの IC_{50} 値は 5000 µmol/L 超であることから、CYP2B6 に対しては非常に弱い阻害作用しか示さないと考えられた。

7.3　CYP 誘導作用

（試験番号 PDX-K-08060-U、添付資料 4.2.2.6.8）

プララトレキサートの CYP1A2、CYP2C19 及び CYP3A4 に対する誘導作用を検討した。

異なる 3 ロットの肝細胞を、溶媒対照、陽性対照（CYP1A2：β-naphthoflavone 10 µmol/L、CYP3A4 及び CYP2C19：rifampicin 50 µmol/L）又はプララトレキサート（2、10 及び 50 µmol/L）で 3 日間処理した。CYP1A2、CYP2C19 及び CYP3A4 に対する誘導作用を各 CYP の特異的基質に対する酸化反応で評価した（CYP1A2：resorufin、CYP2C19：4’-hydroxymephenytoin、CYP3A4：6β-hydroxytestosterone）。各基質の酸化反応は LC/MS/MS にて測定した。なお、プララトレキサートによる細胞への影響はみられなかった（2.6.2.2.2.6 項）。結果を 2.6.5.15H 項に示す。プララトレキサートは臨床試験での最高濃度（46 µmol/L：被験者 012 のサイクル 1 の 1 日目の投与直後の濃度）及び C_{max} の平均値（13 µmol/L）（いずれも PDX-008 試験）よりも高濃度で、評価した CYP に対する誘導作用を示さなかった。CYP2C19 が欠損しているドナー2 で CYP2C19 誘導作用がみられなかった以外は、陽性対照で CYP 誘導作用がみられたことから、本試験系でプララトレキサートの誘導作用は適切に評価されたと考えられた。この結果から、プララトレキサートは臨床用量で他剤に対して CYP を介した誘導作用を示さないと考えられた。

7.4　薬物トランスポーターを介した相互作用

7.4.1　P-gp

（試験番号 PDX-K-08059-U、添付資料 4.2.2.6.9）

プララトレキサートが P-gp の基質／阻害剤であるかどうかを検討するために 2 種類の異なる細胞を用いて双方向の輸送実験を行った。プララトレキサートの緩衝液に対する溶解度は 3850 µmol/L であった。また、プララトレキサートは 600 µmol/L まで、P-gp を発現させたイヌ腎臓尿細管上皮細胞由来（MDCK-MDR1）細胞、非発現 MDCK（MDCK-WT）細胞及びヒト結腸がん由来の細胞株（Caco-2 細胞）に影響を与えなかった。

MDCK-MDR1 細胞及び MDCK-WT 細胞にプララトレキサートを 5、50、500 µmol/L になるように添加後、37°C で 120 分までインキュベートし、プララトレキサートの各細胞への取り込みを評価した。陽性対照として digoxin の取り込みを評価した。また、Caco-2 細胞で基質に digoxin を用いて、プララトレキサート（500 µmol/L）による阻害作用を検討した。陽性対照として cyclosporine A 10 µmol/L 及び ketoconazole 20 µmol/L による阻害も確認した。試料中の各化合物濃度は LC/MS/MS で測定した。結果を 2.6.5.15I 項に示す。

MDCK-MDR1 細胞でのプララトレキサートの Efflux ratio は 2 未満であったことから、プララトレキサートは P-gp の基質ではないと考えられた。なお、同時に実施した digoxin の取り込みは本試験系の妥当性を示していた。また、プララトレキサート（500 µmol/L）は Caco-2 細胞で digoxin に対する意義のある膜透過の阻害作用を示さなかった。陽性対照である cyclosporine A 及び ketoconazole による阻害作用から、本試験系の妥当性が示された。以上のことから、プララトレキサートは臨床試験での最高濃度（46 µmol/L：被験者 012 のサイクル 1 の 1 日目の投与直後の濃度）及び C_{max} の平均値（13 µmol/L）（いずれも PDX-008 試験）を超える濃度で P-gp の基質／阻害剤にはならないと考えられた。

7.4.2　BCRP、MRP2 及び MRP3

（試験番号 PDX-K-10078-U、添付資料 4.2.2.6.10）

（試験番号 PDX-K-10081-U、添付資料 4.2.2.6.11）

プララトレキサートが BCRP、MRP2、MRP3 の基質／阻害剤となるかどうかについて検討した（試験番号 PDX-K-10078-U）。BCRP、MRP2 又は MRP3 を発現させた膜ベシクルに[^{14}C]-プララトレキサートを 1 及び 10 µmol/L となるように添加後、MgATP 又は MgAMP の存在下、37°C で 10 分までインキュベートし、プララトレキサートの取り込みを評価した。MRP2 及び MRP3 ではグルタチオン（最終濃度 2 mmol/L）も添加した。また BCRP の基質である MTX、並びに MRP2 及び MRP3 の基質である estradiol-17β-glucronide に対するプララトレキサートの阻害作用を検討した。各膜ベシクルにプララトレキサート（0.3、1、3、10、30 及び 100 µmol/L）及び estradiol-17β-glucronide（50 µmol/L）、MgAMP 又は MgATP を添加し、37°C でインキュベートした（BCRP：3 分、MRP2：

5 分、MRP3：0.5 分)。MRP2 及び MRP3 ではグルタチオン（最終濃度 2 mmol/L）も添加した。試料中の[^{3}H]- MTX 及び[^{3}H]- estradiol-17β-glucronide 濃度は LSC で測定した。結果を 2.6.5.15J 項に示す。

プララトレキサート 10 µmol/L での輸送比（ATP/AMP）が BCRP、MRP2 及び MRP3 で 2.88、2.86 及び 7.61 であり、2 以上であることから、プララトレキサートはこれらトランスポーターの基質であると考えられた。また、プララトレキサートは 0.3 から 100 µmol/L の範囲で BCRP を阻害しなかったが、MRP2 及び MRP3 を阻害した。MRP2 及び MRP3 に対する IC_{50} 値は 43.5 及び 0.3 µmol/L 未満であった。

プララトレキサートの BCRP、MRP2 及び MRP3 に対する K_m 値及び最大反応速度（V_{max}）値を算出した（試験番号 PDX-K-10081-U)。BCRP、MRP2 又は MRP3 を発現させた膜ベシクルに[^{14}C]-プララトレキサート（0.3～300 µmol/L）を添加し、MgAMP 又は MgATP の存在下 37°C で 5 分間インキュベートした。MRP2 及び MRP3 ではでグルタチオン（最終濃度 2 mmol/L）も添加した。また、各トランスポーターの阻害剤によるプララトレキサート（100 µmol/L）の取り込みに対する阻害を検討した。各膜ベシクルに[^{3}H]-estradiol-17β-glucronide 及びプララトレキサートを添加し、MgAMP 又は MgATP の存在下、37°C でインキュベートした（BCRP：3 分、MRP2：5 分、MRP3：0.5 分)。MRP2 及び MRP3 ではでグルタチオン（最終濃度 2 mmol/L）も添加した。結果を 2.6.5.15K 項に示す。

プララトレキサートの BCRP に対する K_m 値及び V_{max} 値は 552.7 µmol/L 及び 601.4 pmol/min/mg であり、BCRP 対して中程度から弱い親和性を示した。プララトレキサートは BCRP の阻害剤である Fumitremorgin（5 µmol/L）により 19.6%阻害された。プララトレキサートの MRP2 に対する K_m 値及び V_{max} 値は 1.19×10^{8} µmol/L 及び 5.75×10^{7} pmol/min/mg であり、MRP2 に対する親和性は弱かった。プララトレキサートは MRP2 の阻害剤である MK-571（100 µmol/L）により 100%阻害された。プララトレキサートの MRP3 に対する K_m 値及び V_{max} 値は 195.7 µmol/L 及び 493.6 pmol/min/mg であり、MRP2 に対する親和性は中程度か弱かった。プララトレキサートは MRP3 の阻害剤である estrone-3-sulfate（200 µmol/L）により 100%阻害された。以上の結果から、プララトレキサートの BCRP、MRP2 及び MRP3 における輸送比（ATP/AMP）は 2 以上であり、これらトランスポーターに対して中程度から弱い親和性を示した。また、MRP2 及び MRP3 の阻害剤により阻害されることが示された。

7.4.3　OATP1B1、OATP1B3、OAT1、OAT3、OCT2

（試験番号 PDX-K-10080-U、添付資料 4.2.2.6.12）
（試験番号 PDX-K-11088-U、添付資料 4.2.2.6.13）
（試験番号 PDX-K-11084-U、添付資料 4.2.2.6.14）

プララトレキサートが OATP1B1 の基質／阻害剤であるかどうかを検討した（試験番号 PDX-K-10080-U)。OATP1B1 を発現させたヒト胎児由来腎臓（HEK293-OATP1B1）細胞及び非発現（HEK293-WT）細胞に[^{14}C]-プララトレキサートを 10 µmol/L になるように添加後、37°C で 16 分までインキュベートし、プララトレキサートの取り込みを評価した。プララトレキサートの

HEK293-OATP1B1 に対する取り込みは WT よりも高く、OATP1B1 の基質であると考えられた。また、HEK293-OATP1B1 に[^{14}C]-プララトレキサート（0.03～100 µmol/L）を添加し、37°C で 4 分インキュベートした。プララトレキサートの K_m 値及び V_{max} 値は 123 µmol/L 及び 4.73 pmol/min/mg であった。また、プララトレキサートは 100 µmol/L で estradiol-17β-glucronide の取り込みを約 35%阻害したことから OATP1B1 に対する弱い阻害剤であると考えられた（2.6.5.15L 項）。

プララトレキサートが OATP1B3、OAT1、OAT3 及び OCT2 の基質であるかどうかを検討した（試験番号 PDX-K-11088-U）。チャイニーズハムスターの卵巣（CHO）細胞に OATP1B3 発現させた細胞（CHO-OATP1B3）及び OAT1、OAT3 又は OCT2 を発現させた MDCKII 細胞に[^{14}C]-プララトレキサート（0.3～100 µmol/L）を添加し、37°C で 5 分インキュベート後の取り込みを評価した。試料中の放射能濃度は LSC にて測定した。結果を 2.6.5.15M 項に示す。

プララトレキサートは OAT1、OAT3 及び OCT2 に対して濃度依存的な取り込みを示さなかったため、これらの基質ではないと考えられた。プララトレキサートは OATP1B3 について濃度依存的な取り込みを示し、K_m 値及び V_{max} 値は 62.2 µmol/L 及び 181 pmol/min/cm^2 であった。

さらに、CHO-OATP1B3 細胞及び OAT1、OAT3 又は OCT2 を発現させた MDCKII 細胞に各トランスポーターの基質（OATP1B3：[^{3}H]-bromosulfophtalein、OAT1：[^{3}H]-*p*-aminohippurate、OAT3：[^{3}H]-estrone-3-sulfate、OCT2：[^{14}C]-metformin）及びプララトレキサート（0.3～100 µmol/L）を添加し、37°C で 5 分インキュベート後の取り込みを評価した（試験番号 PDX-K-11084-U）。試料中の放射能濃度は LSC にて測定した。結果を 2.6.5.15N 項に示す。

プララトレキサートは OAT1、OAT3、OCT2 及び OATP1B3 に対して 0.3～100 µmol/L で濃度依存的な阻害を示さなかった。IC_{50} 値は 100 µmol/L 超と考えられた。

8　その他の薬物動態試験

該当する資料はない。

9　考察及び結論

プララトレキサート注射剤は再発・難治性の PTCL 治療薬であり、30 mg/m^2 を週 1 回、3～5 分かけて 6 週連続静脈内投与した後 1 週休薬し、7 週間を 1 サイクルとして投与される。プララトレキサートは抗腫瘍性を示す葉酸アナログであり、週 1 回投与は定常状態を意図したものではない。

プララトレキサートは炭素 10 位の立体化学（*RS* 配置）が異なる約 1：1 のジアステレオマー混合物であることから、*S*-及び *R*-ジアステレオマー（PDX-10a 及び PDX-10b）の定量法を確立し、バリデーション試験を行った。

ラット及びイヌでのプララトレキサート静脈内投与後の PDX-10a 及び PDX-10b の CL_{tot} には種差があることが明らかとなった。ラットでは PDX-10a 及び PDX-10b の PK パラメーターに差はないかあっても小さかった（試験番号 PDX-K-05010-R）。イヌでは、PDX-10a の曝露は PDX-10b の 2 倍であり、その結果 PDX-10b の CL_{tot} が PDX-10a の 2 倍となった（試験番号 PDX-K-05009-D）。

この差は高用量では少なくなっていることから、消失経路でのジアステレオマー特異的な飽和が考えられた。なお、ヒトでは PDX-10a の CL_{tot} が PDX-10b よりも大きい（2.7.2.2.4 項）。しかし、2 つのジアステレオマーの *in vitro* での細胞障害活性は同様であることから（2.6.2.6.1 項）、これらの所見は臨床上重要ではないと考えられた。また、Vd_{ss} からプララトレキサートの広範な組織内分布が示唆され、長い $t_{1/2}$ は組織に移行したプララトレキサートが再び循環血へ移行する時間が遅いことを示していたが、その結果として得られる血漿中濃度推移の終末相が総曝露に与える影響は少なかった（10%未満）。CL_{ren} の CL_{tot} に対する寄与はイヌ及びヒトよりもラットで低かった。

反復投与毒性試験でのラット（試験番号 PDX-T-07034-R）及びイヌ（試験番号 PDX-T-07054-D）並びに主要な臨床試験（PDX-008 試験）での PK パラメーターの要約を表 2.6.4- 9 に示した。各ジアステレオマーの細胞障害活性は同様であり（2.6.2.6.1 項）、各投与量での曝露量のジアステレオマー比もほぼ一定であるため（本項 3 章）、ここではジアステレオマー混合物としての曝露について考察する。投与量は 7 週間サイクル（6 週間投与後に 1 週間の休薬）での無毒性量（ラット）及び最大耐量（イヌ及びヒト）である。イヌ及びヒトではビタミン剤（葉酸及びビタミン B_{12}）も投与している。C_{max} 及び AUC_{inf} はジアステレオマー混合物としての値、すなわち PDX-10a 及び PDX-10b の合計の値を示し、その他は各ジアステレオマー及び雌雄の範囲を示した。なお、性差がみられなかった C_{max} 及び AUC_{inf} は雌雄の平均値を示した。ラット及びヒトでの曝露（AUC_{inf}）は同様であったが、イヌではヒトの 1/3 であった。C_{max} についての種差が大きかったが、血漿中濃度が初期に急速に減少するため、インフュージョン時間及びインフュージョン直後の血液採取時間が C_{max} の種差に影響している可能性も考えられる。プララトレキサートはいずれの動物種でも検討した用量範囲内で用量依存性を示し、1 回／週投与で反復投与による蓄積性及び PK パラメーターの意義のある変化はみられなかった。

PDX-10a 及び PDX-10b の投与後 48 時間までの fe は両ジアステレオマーで同様であり、ラットで 3%～5%、イヌで 2%～22%、ヒトで約 34%（2.7.2.2.4 項）であった。ラットに[^{14}C]-プララトレキサートを投与後の排泄試験では投与量の 66%が糞中に排泄された。残りのプララトレキサートは胆汁を介して糞中に排泄されると考えられる。ヒトでのプララトレキサートの尿中排泄率はラットよりも若干高く、プララトレキサートの CL_{tot} に対する腎排泄の寄与から、腎機能が不十分な患者への投与には注意が必要である。プララトレキサートでみられた尿中排泄率の種差は、10-デザアミノプテリン葉酸アナログである edatrexate でもみられている。[^{3}H]-edatrexate を用いたラットの排泄試験では、放射能の約 18%が尿中に、約 62%が糞中に排泄されているが、ヒトでは投与量の 13～55%（平均で 33%）が未変化体として尿中に排泄されている［2、5］。

プララトレキサートはヒト肝代謝に関する *in vitro* 試験系で意義のある代謝を受けなかった。プララトレキサートのタンパク結合は中程度であり（63～88%）、検討した化合物（phenytoin、warfarin、ceftriaxone、digoxin、disopyramide、propranolol 及び ibuprofen）との間でタンパク結合を介した相互作用を示さなかった。さらに、プララトレキサートは CYP に対する阻害及び誘導作用を示さなかったため、これらのメカニズムを介した意義のある薬物相互作用を示さないと考えられる。プララトレキサートは P-gp、OCT2、OAT1、OAT3 の基質ではなかったが、BCRP、OATP1B1、OATP1B3、MRP2 及び MRP3 に対しては中程度から弱い親和性を示した。プララトレキサートの BCRP、OCT2、OAT1、OAT3 及び OATP1B3 に対する IC_{50} 値は 100 μmol/L 超であった。プララトレキサートは

OATP1B1 の弱い阻害剤であり（100 µmol/L で約 35%の阻害）、MRP2 に対する IC_{50} 値は 43.5 µmol/L であった。プララトレキサートの MRP3 に対する IC_{50} 値は 0.3 µmol/L 未満であり強力な阻害作用を示した。

以上のことから、2 つのジアステレオマーの PK データは動物種、雌雄、投与量を通して概ね一致しており、これらの知見は、PTCL を対象とした臨床開発及び申請をサポートするものであった。

表 2.6.4- 9　ラット、イヌ及びヒトにプララトレキサートを静脈内投与後の PK パラメーター

PK parameters	Rat (PDX-T-07034-R)		Dog (PDX-T-07054-D)		Human (PDX-008)[a]	
	Day1	Day85	Day1	Day281	C1D1	C1D6 or C2D6
dose[b] (mg/kg)	5	5	0.7	0.7	0.81	0.81
dose[b] (mg/m^2)	30	30	14	14	30	30
C_{max}[c] (ng/mL)	19245	14257	1793	649	5815	4963
AUC_{inf}[c] (ng/mL.min)	292162	270127	93812	80369	267854	211555
CL_{tot}[d] (mL/min)	2.9 - 4.0	3.4 - 3.9	50 - 75	58 - 95	191 - 417	227 - 495
Vd_{ss}[d] (L)	0.07 - 0.89	0.15 - 0.18	8 - 16	15 - 29	37 - 105	48 - 162
$t_{1/2}$[d] (h)	1 - 20	1 - 6	4 - 5	5	12 - 18	11 - 16

a: PK data from intense sampled patients (N = 10 [C1D1] and N = 6 [C1D6/C2D6])
b: The selected doses represent the NOAEL for rats and MTDs for dogs and human.
c: Racemic mixture (PDX-10a + PDX-10), males and females (mean)
d: Range observed for males/females and PDX-10a/PDX-10b
C_{max} = maximum plasma concentration, AUC_{inf} = area under the concentration time curve to infinity, CL_{tot} = total clearance, Vd_{ss} = volume of distribution at stedy state, $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life, mg = milligram, kg = kilogram, m^2 = square meter, ng = nanogram, mL = milliliter, min = minute, L = liter, h = hour

10　図表

図表は本文中に示した。

11　参考文献

1. Kitamura S, Sugihara K, Nakatani K, Ohta S, Oh-hara T, Ninomiya S et al. Variation of hepatic methotrexate 7-hydroxylase activity in animals and humans. IUBMB Life 1999;48(6):607-11. (4.3.4)
2. Fanucchi MP, Kinahan JJ, Samuels LL, Hancock C, Chou T-C, Niedzwiecki D et al. Toxicity, elimination, and metabolism of 10-ethyl-10-deazaaminopterin in rats and dogs. Cancer Res 1987;47(9):2334-9. (4.3.3)
3. Fabre G, Fabre I, Gewirtz DA, Goldman D. Characteristics of the formation and membrane transport of 7-hydroxymethotrexate in freshly isolated rabbit hepatocytes. Cancer Res 1985;45(3):1086-91. (4.3.2)
4. Masuda M, I'izuka Y, Yamazaki M, Nishigaki R, Kato Y, Ni'inuma H et al. Methotrexate is excreted into the bile by canalicular multispecific organic anion transporter in rats. Cancer Res 1997;57(16):3506-10. (4.3.6)
5. Kris MG, Kinahan JJ, Gralla RJ, Fanucchi MP, Wertheim MS, O'Connell JP et al. Phase I trial and clinical pharmacological evaluation of 10-ethyl-10- deazaaminopterin in adult patients with advanced cancer. Cancer Res 1988;48(19):5573-9. (4.3.5)

プララトレキサート

第 2 部（モジュール 2）: CTD の概要（サマリー）

2.6.5　薬物動態試験概要表

ムンディファーマ株式会社

目次

2.6.5.1　薬物動態試験一覧表　　一覧 3
2.6.5.2　分析法 7
2.6.5.3　薬物動態試験：吸収：単回 14
2.6.5.4　薬物動態試験：吸収：反復 20
2.6.5.5　薬物動態試験：分布 28
2.6.5.6　薬物動態試験：血漿タンパク結合 33
2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠及び授乳動物における試験 35
2.6.5.8　薬物動態試験：その他の分布試験 36
2.6.5.9　薬物動態試験：代謝：*In vitro* 39
2.6.5.10　薬物動態試験：代謝：*In vivo* 43
2.6.5.11　薬物動態試験：推定代謝経路 44
2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 45
2.6.5.13　薬物動態試験：排泄 46
2.6.5.14　薬物動態試験：排泄：胆汁中排泄 51
2.6.5.15　薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用 52
2.6.5.16　薬物動態試験：その他 75

2.6.5.1　　薬物動態試験一覧表　　一覧

Test Article: Pralatrexate,　　Impurity A*

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Analytical Method Validation						
Method validation	Y	Mouse plasma	NA	[redacted] USA	PDX-K-08057-M	4.2.2.1.1
Method validation	Y	Rat plasma and urine	NA	[redacted] USA	PDX-K-05012-R	4.2.2.1.2
Method validation	Y	Rabbit plasma	NA	[redacted] USA	PDX-K-08056-B	4.2.2.1.3
Method validation	Y	Dog plasma and urine	NA	[redacted] USA	PDX-K-05011-D	4.2.2.1.4
Method validation	Y	Dog plasma	NA	[redacted] USA	PDX-K-08070-D	4.2.2.1.5
Absorption						
PK study of pralatrexate in rats following IV administration	N	Male and female SD rats	IV	[redacted] USA	PDX-K-05010-R	4.2.2.2.1
PK study of pralatrexate in dogs following IV administration	N	Male and female Beagle dogs	IV	[redacted] USA	PDX-K-05009-D	4.2.2.2.2
TK study of pralatrexate in rats following IV administration (6 months)	Y	Male and female SD rats	IV	[redacted] USA	PDX-T-07034-R	4.2.3.2.3
TK study of pralatrexate in dogs following IV administration (9 months)	Y	Male and female Beagle dogs	IV	[redacted] USA	PDX-T-07054-D	4.2.3.2.6

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.5.1　薬物動態試験一覧表　一覧（続き）

Test Article: Pralatrexate

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
Distribution						
Mass balance study with ^{14}C-pralatrexate in rats	Y	Male partially pigmented rats	IV	[redacted] UK	PDX-K-10077-R	4.2.2.3.1
Mass balance study with ^{14}C-pralatrexate in rats	Y	Male and female SD rats	IV	[redacted] USA	PDX-K-07052-R	4.2.2.3.2
Plasma protein binding	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-06029-U	4.2.2.3.3
Plasma protein binding	Y	*In vitro*	NA	[redacted] France	PDX-K-08066-U	4.2.2.3.4
Binding and partitioning into human red blood cells	Y	*In vitro*	NA	[redacted] France	PDX-K-08067-U	4.2.2.3.5
Brain penetration potential of pralatrexate in rats	N	Male SD rats	*In situ* brain perfusion via the left carotid artery	[redacted] USA	PDX-P-03001-R	4.2.2.3.6
Metabolism						
Identification of metabolites (S9)	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-08061-U	4.2.2.4.1
Metabolic stability	Y	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-07030-U	4.2.2.4.2
Identification of metabolites (Liver microsome)	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-06028-U	4.2.2.4.3

2.6.5.1　薬物動態試験一覧表　一覧（続き）

Test Article: Pralatrexate

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
CYP phenotyping	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-08062-U	4.2.2.4.4
Excretion						
Mass balance study with ^{14}C-pralatrexate in rats	Y	Male and female SD rats	IV	[redacted] USA	PDX-K-07052-R	4.2.2.3.2
Mass balance study (incl. expired air) with ^{14}C-pralatrexate in rats	Y	Male and female SD rats	IV	[redacted] USA	PDX-K-07053-R	4.2.2.5.1
Mass balance study with ^{14}C-pralatrexate in rats	Y	Male partially pigmented rats	IV	[redacted] UK	PDX-K-10077-R	4.2.2.3.1
Drug-drug interaction						
Plasma protein	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-07043-U	4.2.2.6.1
Plasma protein	Y	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-07049-U	4.2.2.6.2
CYP inhibition (microsome)	Y	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-07032-U	4.2.2.6.3
CYP inhibition (c-DNA expression)	Y	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-07033-U	4.2.2.6.4
Inhibition of CYP2C19 (Ki)	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-07044-U	4.2.2.6.5
Time-dependent inhibition for CYP2C19	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-11090-U	4.2.2.4.6
Inhibition of CYP2B6 (IC_{50})	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-11089-U	4.2.2.6.7

2.6.5.1　薬物動態試験一覧表　　一覧（続き）

Test Article: Pralatrexate

Type of Study/Description	GLP[a]	Test System	Method of Administration	Testing Facility	Study Number	Location
CYP induction	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-08060-U	4.2.2.6.8
P-gp substrate/inhibitor	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-08059-U	4.2.2.6.9
BCRP, MRP2, MRP3 substrate/inhibitor	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-10078-U	4.2.2.6.10
BCRP, MRP2, MRP3 substrate	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-10081-U	4.2.2.6.11
OATP1B1 substrate/inhibitor	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-10080-U	4.2.2.6.12
OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2 substrate	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-11088-U	4.2.2.6.13
OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2 inhibitor	N	*In vitro*	NA	[redacted] USA	PDX-K-11084-U	4.2.2.6.14

a: An entry of "Y" indicates that the study was performed in compliance with GLP
BCRP = breast cancer resistance protein, ^{14}C = radioactive carbon-14, cDNA = complementary deoxyribonucleic acid, CYP = cytochrome P450, GLP = Good Laboratory Practice, IV = intravenous, MRP = multi drug resistance associated protein, NA = Not applicable, OAT = organic anion transporter, OATP = organic anion transporter polypeptide, OCT = organic cation transporter, P-gp = P-glycoprotein, PK = pharmacokinetics, SD = Sprague-Dawley

2.6.5.2　　分析法

マウス血漿中定量法

Report Number: PDX-K-08057-M　　Location: 4.2.2.1.1　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Validation of a Method for the Determination of PDX Enantiomers in Mouse Plasma

Biological Sample		Analytes	Methods	Validation Items	Concentrations (ng/mL)	Results		
Species	Matrix					R	Precision (%RSD)	Accuracy (%RE)
Mouse	Plasma	PDX-10a	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	0.9960	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	14	3.4
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤10	-11 to 13
			Weight: $1/X^2$					
		PDX-10b	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	0.9955	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	17	3.4
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤11	-4.3 to 13
			Weight: $1/X^2$					

NA = Not applicable, PDX = Pralatrexate

2.6.5.2　　分析法（続き）

ラット血漿及び尿中定量法

Report Number: PDX-K-05012-R　　Location: 4.2.2.1.2　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Validation of a Method for the Determination of PDX Enantiomers in Rat Plasma and Urine

Biological Sample		Analytes	Methods	Validation Items	Concentrations (ng/mL)	Results		
Species	Matrix					R	Precision (%RSD)	Accuracy (%RE)
Rat	Plasma	PDX-10a	Solid phase extraction	Calibration range	1 - 1000	≥0.9906	NA	NA
				Intra-day	1	NA	≤11	-10 to18
			LC/MS/MS		3, 75, 750	NA	≤12	-16 to 11
				Inter-day	1	NA	14	4.5
			Weight: $1/X^2$		3, 75, 750	NA	≤13	-6.8 to 2.2
				Long-term stability	3, 750	13.5 months at -20°C		
		PDX-10b	Solid phase extraction	Calibration range	1 - 1000	≥0.9911	NA	NA
				Intra-day	1	NA	≤20	-6.2 to17
			LC/MS/MS		3, 75, 750	NA	≤11	-16 to 10
				Inter-day	1	NA	15	4.6
			Weight: $1/X^2$		3, 75, 750	NA	≤13	-9.1 to 1.3
				Long-term stability	3, 750	13.5 months at -20°C		

2.6.5.2　　分析法（続き）

ラット血漿及び尿中定量法（続き）

Report Number: PDX-K-05012-R　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Validation of a Method for the Determination of PDX Enantiomers in Rat Plasma and Urine

Biological Sample		Analytes	Methods	Validation Items	Concentrations (ng/mL)	Results		
Species	Matrix					R	Precision (%RSD)	Accuracy (%RE)
Rat	Urine	PDX-10a	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	≥0.9944	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	≤9.2	-15 to17
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤13	-14 to 11
				Inter-day	0.5	NA	16	-3.2
			Weight: $1/X^2$		1.5, 75, 750	NA	≤13	-5.6 to -2.2
				Long-term stability	1.5, 750	14.5 months at -20°C		
		PDX-10b	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	≥0.9950	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	≤11	-12 to 6.8
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤15	-10 to 8.7
				Inter-day	0.5	NA	11	-0.7
			Weight: $1/X^2$		1.5, 75, 750	NA	≤13	-7.2 to –1.7
				Long-term stability	1.5, 750	14.5 months at -20°C		

NA = Not applicable, PDX = Pralatrexate

2.6.5.2　　分析法（続き）

ウサギ血漿中定量法

Report Number: PDX-K-08056-B　　Location: 4.2.2.1.3　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Validation of a Method for the Determination of PDX Enantiomers in Rabbit Plasma

Biological Sample		Analytes	Methods	Validation Items	Concentrations (ng/mL)	Results		
Species	Matrix					R	Precision (%RSD)	Accuracy (%RE)
Rabbit	Plasma	PDX-10a	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	0.9928	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	4.2	-8.6
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤11	-10 to -5.5
			Weight: $1/X^2$					
		PDX-10b	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	0.9975	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	11	-2.6
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤13	-6.9 to 1.3
			Weight: $1/X^2$					

NA = Not applicable, PDX = Pralatrexate

2.6.5.2　　分析法（続き）

イヌ血漿及び尿中定量法

Report Number: PDX-K-05011-D　　Location: 4.2.2.1.4　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Validation of a Method for the Determination of PDX Enantiomers in Canine Plasma and Urine

Biological Sample		Analytes	Methods	Validation Items	Concentrations (ng/mL)	Results		
Species	Matrix					R	Precision (%RSD)	Accuracy (%RE)
Dog	Plasma	PDX-10a	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	≥0.9941	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	≤19	8.4 to 20
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤10	-11 to 9.9
				Inter-day	0.5	NA	14	13
			Weight: $1/X^2$		1.5, 75, 750	NA	≤9.5	-6.0 to 4.7
				Long-term stability	1.5, 750	14.75 months at -20°C		
		PDX-10b	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	≥0.9970	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	≤14	-0.8 to 8.0
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤12	-12 to 7.7
				Inter-day	0.5	NA	13	2.1
			Weight: $1/X^2$		1.5, 75, 750	NA	≤10	-4.9 to1.2
				Long-term stability	1.5, 750	14.75 months at -20°C		

2.6.5.2　　分析法（続き）

イヌ血漿及び尿中定量法（続き）

Report Number: PDX-K-05011-D　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Validation of a Method for the Determination of PDX Enantiomers in Canine Plasma and Urine

Biological Sample		Analytes	Methods	Validation Items	Concentrations (ng/mL)	Results		
Species	Matrix					R	Precision (%RSD)	Accuracy (%RE)
Dog	Urine	PDX-10a	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	≥0.9935	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	≤16	-18 to 13
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤13	-10.4 to 15
				Inter-day	0.5	NA	20	-6.6
			Weight: $1/X^2$		1.5, 75, 750	NA	≤13	-4.0 to 0.2
				Long-term stability	1.5, 750	13.75 months at -20°C		
		PDX-10b	Solid phase extraction	Calibration range	0.5 - 1000	≥0.9926	NA	NA
				Intra-day	0.5	NA	≤18	-8.4 to 4.5
			LC/MS/MS		1.5, 75, 750	NA	≤14	-12 to 12
				Inter-day	0.5	NA	14	-2.1
			Weight: $1/X^2$		1.5, 75, 750	NA	≤13	-5.9 to 0.6
				Long-term stability	1.5, 750	13.75 months at -20°C		

NA = Not applicable, PDX = Pralatrexate

2.6.5.2　　分析法（続き）

イヌ血漿中定量法

Report Number: PDX-K-08070-D　　Location: 4.2.2.1.5　　Test Article:　Impurity A*

Report Title: Validation of an LC/MS/MS Method for the Quantitation of Impurity A*in Canine Plasma

Biological Sample		Analyte	Methods	Validation Items	Concentrations (ng/mL)	Results		
Species	Matrix					R	Precision (%RSD)	Accuracy (%RE)
Dog	Plasma	Impurity A*	Solid phase extraction	Calibration range	1 - 1000	≥0.9947	NA	NA
				Intra-day	1	NA	≤15.6	-9.1 to 15.0
			LC/MS/MS		3, 100, 750	NA	≤12.3	-13.3 to 8.0
				Inter-day	1	NA	15.3	-0.3
			Weight: $1/X^2$		3, 100, 750	NA	≤10.1	-8.7 to 5.0
				Long-term stability	3, 100, 750	4 months at -20°C		

NA = Not applicable, PDX = Pralatrexate

*：新薬承認情報提供時に置き換えた

2.6.5.3　　A 薬物動態試験：吸収：単回

ラットでの単回投与

Report Number: PDX-K-05010-R　　Location: 4.2.2.2.1　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: PDX (10-propargyl-10-deazaaminopterin): Pharmacokinetic Study of PDX Following Intravenous Administration to Male and Female Sprague Dawley Rats

Species	Sprague-Dawley Rat					
Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Feeding Condition	Fed					
Vehicle/Formulation	PBS/Solution					
Method of Administration	IV bolus					
Sampling Points	Plasma: 5, 10, 20, 30, 45 min, 1, 2, 4, 12, 24, 36, 48 h Urine: Pre and 12 h intervals over the 48-hour					
Sample	Plasma and urine					
Dose (mg/kg) (dose in mg/m^2)	5 (30)	10 (60)	25 (150)	5 (30)	10 (60)	25 (150)
Analyte	Pralatrexate[a]					
Assay	LC/MS/MS					

2.6.5.3　　A 薬物動態試験：吸収：単回（続き）

ラットでの単回投与（続き）

Report Number: PDX-K-05010-R　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: PDX (10-propargyl-10-deazaaminopterin): Pharmacokinetic Study of PDX Following Intravenous Administration to Male and Female Sprague Dawley Rats

Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Dose (mg/kg) (dose in mg/m^2)	5 (30)	10 (60)	25 (150)	5 (30)	10 (60)	25 (150)
PK Parameters (Mean)	PDX-10a					
C_{max} (ng/mL)	2504	5169	19143	1616	3655	6510
AUC_{inf} (ng/mL•min)	65987	129177	394487	33857	67776	164878
CL_{tot} (mL/min)	9.5	9.7	7.9	14.8	14.8	15.2
$t_{1/2}$ (min)[c]	463	307	783	29	132	1262
MRT_{sys} (min)	75	54	246	29	38	250
Vd_{ss} (L)	0.7	0.5	2.0	0.5	0.6	3.8
Vdp_{ss} (L)	6.4	4.2	9.0	0.6	2.8	27.6
fe (%)	2.8	3.1	3.5	4.4	3.0	4.5
$t_{1/2urine}$ (min)	876	911	1061	1350	846	888
CL_{ren} (mL/min)	0.26	0.30	0.28	0.65	0.44	0.68
CL_{nonren} (mL/min)	9.19	9.40	7.62	14.10	14.31	14.47

2.6.5.3　　A 薬物動態試験：吸収：単回（続き）

ラットでの単回投与（続き）

Report Number: PDX-K-05010-R　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: PDX (10-propargyl-10-deazaaminopterin): Pharmacokinetic Study of PDX Following Intravenous Administration to Male and Female Sprague Dawley Rats

Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Dose (mg/kg) (dose in mg/m^2)	5 (30)	10 (60)	25 (150)	5 (30)	10 (60)	25 (150)
PK Parameters (Mean)	PDX-10b					
C_{max} (ng/mL)	2647	5605	21747	1682	4166	7150
AUC_{inf} (ng/mL•min)	65655	136719	448071	36115	73010	187209
CL_{tot} (mL/min)	9.5	9.2	7.0	13.9	13.7	13.4
$t_{1/2}$ (min)[c]	435	151	1267	28	171	930
MRT_{sys} (min)	69	42	154	28	35	126
Vd_{ss} (L)	0.7	0.4	1.1	0.4	0.5	1.7
Vdp_{ss} (L)	6.0	2.0	12.8	5.5	3.4	17.9
fe (%)	2.8	3.1	3.8	4.6	3.0	4.5
$t_{1/2urine}$ (min)	917	969	890	1148	1047	892
CL_{ren} (mL/min)	0.27	0.28	0.26	0.64	0.41	0.60
CL_{nonren} (mL/min)	9.23	8.87	6.69	13.21	13.29	12.75

a: Individual pralatrexate diastereomers (ie, PDX-10a and PDX-10b) were analyzed. AUC_{inf} = area under the concentration time curve to infinity, CL_{tot} = total clearance, CL_{ren} = renal clearance, CL_{nonren} = non-renal clearance, C_{max} = maximum plasma concentration, F = female, fe = fraction of drug excreted unchanged in urine, h = hour, IV = intravenous, mg = milligram, kg = kilogram, m^2 = square meter, LC/MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry, M = male, MRT_{sys} = systemic mean residence time, mL = milliliter, ng = nanogram, PBS = phosphate-buffered saline, PDX = Pralatrexate, PK = pharmacokinetic, min = minute, $t_{1/2}$ = terminal half-life, $t_{1/2urine}$ = apparent terminal (urinary) half-life, Vd_{ss} = volume of distribution at steady state, Vdp_{ss} = pseudo-steady-state volume of distribution

2.6.5.3　　B 薬物動態試験：吸収：単回（続き）

イヌでの単回投与

Report Number: PDX-K-05009-D　　Location: 4.2.2.2.2　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: PDX (10-propargyl-10-deazaaminopterin): Pharmacokinetic Study of PDX Following Intravenous Administration to Male and Female Beagle Dogs

Species	Beagle dog					
Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Feeding Condition	Fed					
Vehicle/Formulation	PBS/Solution					
Method of Administration	IV bolus					
Sampling Points (h)	Plasma: Pre and 5, 10, 20, 30, 45 min, 1, 2, 4, 12, 24, 36, 48 h Urine: Pre and 12 h intervals over the 48-hour					
Sample	Plasma and urine					
Dose (mg/kg) (dose in mg/m^2)	0.3 (6)	1.0 (20)	3.0 (60)	0.3 (6)	1.0 (20)	3.0 (60)
Analyte	Pralatrexate[a]					
Assay	LC/MS/MS					

2.6.5.3　　B 薬物動態試験：吸収：単回（続き）

イヌでの単回投与（続き）

Report Number: PDX-K-05009-D　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: PDX (10-propargyl-10-deazaaminopterin): Pharmacokinetic Study of PDX Following Intravenous Administration to Male and Female Beagle Dogs

Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Dose (mg/kg) (dose in mg/m^2)	0.3 (6)	1.0 (20)	3.0 (60)	0.3 (6)	1.0 (20)	3.0 (60)
PK Parameters (Mean, COV%)	PDX-10a					
C_{max} (ng/mL)	250 (20)	971 (19)	2469 (12)	308 (14)	1275 (31)	3160 (30)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	19959 (26)	56070 (44)	123826 (12)	20618 (12)	65647 (17)	171640 (33)
CL_{tot} (mL/min)	79 (28)	107 (57)	122 (13)	59 (13)	62 (17)	76 (39)
$t_{1/2}$ (min)[c]	317 (84)	378 (3)	701 (24)	636 (107)	443 (37)	720 (33)
MRT_{sys} (min)	321 (89)	213 (12)	325 (46)	350 (78)	267 (55)	258 (18)
Vd_{ss} (L)	22 (68)	24 (70)	38 (39)	20 (75)	17 (69)	20 (36)
Vd_{pss} (L)	32 (62)	58 (56)	122 (16)	52 (106)	41 (52)	76 (33)
fe (%)	19.8 (24)	6.3 (75)	3.2 (69)	21.7 (2)	8.3 (45)	6.1 (60)
$t_{1/2urine}$ (min)	959 (96)	443 (37)	695 (47)	627 (9)	1063 (116)	539 (25)
CL_{ren} (mL/min)	16 (36)	5 (44)	4 (83)	13 (12)	5 (44)	4 (35)
CL_{nonren} (mL/min)	63 (29)	102 (61)	118 (11)	46 (13)	57 (19)	72 (42)

2.6.5.3　　B 薬物動態試験：吸収：単回（続き）

イヌでの単回投与（続き）

Report Number: PDX-K-05009-D　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: PDX (10-propargyl-10-deazaaminopterin): Pharmacokinetic Study of PDX Following Intravenous Administration to Male and Female Beagle Dogs

Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Dose (mg/kg) (dose in mg/m^2)	0.3 (6)	1.0 (20)	3.0 (60)	0.3 (6)	1.0 (20)	3.0 (60)
PK Parameters (Mean, COV%)	PDX-10b					
C_{max} (ng/mL)	157 (28)	613 (7)	1923 (8)	201 (11)	857 (19)	2114 (30)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	10268 (28)	34587 (69)	90288 (4)	12534 (16)	48050 (18)	108787 (30)
CL_{tot} (mL/min)	153 (25)	244 (94)	166 (4)	98 (17)	85 (16)	118 (33)
$t_{1/2}$ (min)[c]	254 (94)	191 (37)	1281 (69)	253 (59)	456 (54)	823 (30)
MRT_{sys} (min)	253 (90)	143 (33)	324 (27)	196 (48)	272 (66)	267 (13)
Vd_{ss} (L)	33 (67)	34 (84)	54 (26)	18 (38)	24 (78)	32 (35)
Vd_{pss} (L)	47 (72)	72 (99)	303 (65)	35 (50)	58 (66)	134 (26)
fe (%)	18.0 (25)	4.8 (63)	2.4 (56)	18.9 (1)	6.3 (38)	4.5 (79)
$t_{1/2urine}$ (min)	1061 (92)	474 (37)	667 (25)	645 (14)	1531 (128)	575 (24)
CL_{ren} (mL/min)	28 (40)	9 (54)	4 (53)	18 (18)	5 (44)	5 (54)
CL_{nonren} (mL/min)	125 (23)	235 (96)	162 (5)	79 (17)	80 (16)	113 (36)

a: Individual pralatrexate diastereomers (ie, PDX-10a and PDX-10b) were analyzed. AUC_{inf} = area under the concentration time curve to infinity, CL_{tot} = total clearance, CL_{ren} = renal clearance, CL_{nonren} = non-renal clearancec, C_{max} = maximum plasma concentration, COV = coefficient of variation, F = female, fe = fraction of drug excreted unchanged in urine, h = hour, IV = intravenous, mg = milligram, kg = kilogram, m^2 = square meter, LC/MS/MS = liquid chromatography-tandem mass spectrometry, M = male, MRT_{sys} = systemic mean residence time, mL = milliliter, ng = nanogram, PBS = phosphate-buffered saline, PK = pharmacokinetic, min = minute, $t_{1/2}$ = terminal half-life, $t_{1/2urine}$ = terminal half-life (urine), Vd_{ss} = volume of distribution at steady state, Vdp_{ss} = pseudo-steady-state volume of distribution

2.6.5.4　　A 薬物動態試験：吸収：反復

ラット 6 ヵ月反復投与試験（TK 試験）

Report Number: PDX-T-07034-R　　Location: 4.2.3.2.3　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Six-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Sprague Dawley Rats with a Two-Week Recovery Interval

Species/Strain	Sprague-Dawley rat					
Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Feeding Condition	Fed					
Vehicle/Formulation	PBS/Solution					
Method of Administration	IV bolus					
Sampling Time	Day 1 (male) : 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h Day 1 (female) : 5, 15 min, 1, 1.5, 2, 5, 8, 12, 25 h Day 85 and 183: Pre-dose, 5, 15, 30 min, 1, 2, 4, 8, 12, 24 h					
Sample	Plasma					
Dose (mg/kg/day)	5	10	25	5	10	25
Analyte	Pralatrexate[a]					
Assay	LC/MS/MS					

2.6.5.4　　A 薬物動態試験：吸収：反復（続き）

ラット 6 ヵ月反復投与試験（TK 試験）（続き）

Report Number: PDX-T-07034-R　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Six-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Sprague Dawley Rats with a Two-Week Recovery Interval

PK Parameters (Mean)	PDX-10a					
Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Dose (mg/kg/day)	5	10	25	5	10	25
	Day 1					
C_{max} (ng/mL)	9139	20257	55639	9380	13743	39414
AUC_{inf} (ng/mL•min)	125298	242293	709114	155396	179100	455672
$t_{1/2}$ (min)	777	450	391	1181	1086	625
CL_{tot} (mL/min)	4.0	4.1	3.5	3.2	5.6	5.5
	Day 85					
C_{max} (ng/mL)	7587	8622	30866	5950	8307	30569
AUC_{inf} (ng/mL•min)	127756	213074	634420	126775	262489	587145
$t_{1/2}$ (min)	345	404	1480	58	664	96
CL_{tot} (mL/min)	3.9	4.7	3.9	3.9	3.8	4.3
	Day 183					
C_{max} (ng/mL)	4457	19237	31658	9869	20243	31563
AUC_{inf} (ng/mL•min)	183094	473967	1203351	156786	333499	919150
$t_{1/2}$ (min)	380	334	228	80	299	245
CL_{tot} (mL/min)	2.7	2.1	2.1	3.2	3.0	2.7

2.6.5.4　　A 薬物動態試験：吸収：反復（続き）

ラット 6 ヵ月反復投与試験（TK 試験）（続き）

Report Number: PDX-T-07034-R　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Six-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Sprague Dawley Rats with a Two-Week Recovery Interval

PK Parameters (Mean)	PDX-10b					
Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Dose (mg/kg/day)	5	10	25	5	10	25
	Day 1					
C_{max} (ng/mL)	9729	22496	61283	10242	14834	43910
AUC_{inf} (ng/mL•min)	133826	271558	810899	169803	197833	511917
$t_{1/2}$ (min)	84	421	614	878	1187	551
CL_{tot} (mL/min)	3.7	3.7	3.1	2.9	5.1	4.9
	Day 85					
C_{max} (ng/mL)	8399	9423	34872	6577	9053	33599
AUC_{inf} (ng/mL•min)	140226	235099	745424	145496	301177	711174
$t_{1/2}$ (min)	346	71	1099	54	183	88
CL_{tot} (mL/min)	3.6	4.3	3.4	3.4	3.3	3.5
	Day 183					
C_{max} (ng/mL)	4649	19964	32419	10794	22236	34097
AUC_{inf} (ng/mL•min)	191732	498942	1315815	180115	376556	1101506
$t_{1/2}$ (min)	337	313	222	86	286	223
CL_{tot} (mL/min)	2.6	2.0	1.9	2.8	2.7	2.3

2.6.5.4　　A 薬物動態試験：吸収：反復（続き）

ラット 6 ヵ月反復投与試験（TK 試験）（続き）

Report Number: PDX-T-07034-R　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Six-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Sprague Dawley Rats with a Two-Week Recovery Interval

PK Parameters (Mean)	PDX-10a/PDX-10b					
Animals per Gender (M/F) per Dose	3M	3M	3M	3F	3F	3F
Dose (mg/kg/day)	5	10	25	5	10	25
	Day 1					
C_{max} (ng/mL)	0.94	0.90	0.91	0.92	0.93	0.90
AUC_{inf} (ng/mL•min)	0.94	0.89	0.87	0.92	0.91	0.89
	Day 85					
C_{max} (ng/mL)	0.90	0.91	0.89	0.90	0.92	0.91
AUC_{inf} (ng/mL•min)	0.91	0.91	0.85	0.87	0.87	0.83
	Day 183					
C_{max} (ng/mL)	0.96	0.96	0.98	0.91	0.91	0.93
AUC_{inf} (ng/mL•min)	0.95	0.95	0.91	0.87	0.89	0.83

a: Individual pralatrexate diastereomers (ie, PDX-10a and PDX-10b) were analyzed.
AUC_{inf} = area under the concentration time curve to infinity, C_{max} = maximum plasma concentration, CL_{tot} = total clearance, F = female; h = hour, IV = intravenous, kg = kilogram, mg = milligram, M = male, mL = milliliter, ng = nanogram, PBS = phosphate-buffered saline, PK = pharmacokinetic, min = minute, M = male; PK = pharmacokinetic, $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life

2.6.5.4　　B 薬物動態試験：吸収：反復（続き）

イヌ 9 ヵ月反復投与試験（TK 試験）

Report Number: PDX-T-07054-D　　Location: 4.2.3.2.6　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Nine-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Beagle Dogs with a Four-Week Recovery Interval

Species/Strain	Beagle dog					
Animals per Gender (M/F) per Dose	5M	5M	5M	5F	5F	5F
Feeding Condition	Fed					
Vehicle/Formulation	PBS/Solution					
Method of Administration	IV bolus					
Sampling Time	Day 1: Pre, 5, 30 min, 1, 2, 4, 12, 24 h Day 85, 183 and 281: Pre, 30 min, 2, 4, 12, 24 h					
Sample	Plasma					
Dose (mg/kg/day)	0.1	0.3	0.7	0.1	0.3	0.7
Analyte	Pralatrexate[a]					
Assay	LC/MS/MS					

2.6.5.4　　B 薬物動態試験：吸収：反復（続き）

イヌ 9 ヵ月反復投与試験（TK 試験）（続き）

Report Number: PDX-T-07054-D　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Nine-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Beagle Dogs with a Four-Week Recovery Interval

Animals per Gender (M/F) per Dose	5M	5M	5M	5F	5F	5F
Dose (mg/kg/day)	0.1	0.3	0.7	0.1	0.3	0.7
PK Parameters (Mean, COV%)	PDX-10a					
	Day 1					
C_{max} (ng/mL)	169 (37)	351 (38)	1367 (34)	91 (40)	419 (16)	703 (15)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	11126 (19)	22633 (24)	62668 (29)	8794 (20)	29067 (23)	48570 (33)
$t_{1/2}$ (min)	247 (26)	280 (36)	288 (14)	167 (17)	245 (24)	294 (6)
CL_{tot} (mL/min)	39.4 (21)	59.3 (26)	50.4 (26)	41.0 (18)	38.1 (29)	55.1 (33)
	Day 85					
C_{max} (ng/mL)	75 (22)	176 (22)	378 (38)	64 (39)	124 (29)	175 (16)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	7933 (19)	22080 (20)	48544 (30)	7188 (30)	17928 (25)	21044 (10)
$t_{1/2}$ (min)	60 (23)	143 (67)	269 (19)	80 (22)	301 (38)	371 (64)
CL_{tot} (mL/min)	55.6 (24)	59.5 (19)	65.8(29)	52.7 (32)	61.4 (23)	117.3 (10)
	Day 281					
C_{max} (ng/mL)	92 (19)	252 (40)	502 (77)	58 (18)	137 (27)	332 (28)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	13111 (10)	35093 (32)	56958 (43)	8686 (36)	18436 (10)	41038 (11)
$t_{1/2}$ (min)	147 (74)	263 (15)	284 (48)	349 (54)	544 (103)	327 (28)
CL_{tot} (mL/min)	32.7 (10)	41.1 (47)	58.0 (30)	47.6 (55)	57.5 (11)	60.3 (12)

2.6.5.4　　B 薬物動態試験：吸収：反復（続き）

イヌ 9 ヵ月反復投与試験（TK 試験）（続き）

Report Number: PDX-T-07054-D　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Nine-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Beagle Dogs with a Four-Week Recovery Interval

Animals per Gender (M/F) per Dose	5M	5M	5M	5F	5F	5F
Dose (mg/kg/day)	0.1	0.3	0.7	0.1	0.3	0.7
PK Parameters (Mean, COV%)	PDX-10b					
	Day 1					
C_{max} (ng/mL)	139 (41)	275 (37)	939 (28)	66 (39)	306 (12)	576 (11)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	7191 (15)	16030 (22)	41024 (21)	5366 (18)	18983 (19)	35362 (26)
$t_{1/2}$ (min)	214 (29)	193 (58)	264 (6)	166 (21)	214 (16)	279 (5)
CL_{tot} (mL/min)	60.3 (17)	82.6 (22)	74.8 (18)	66.8 (17)	57.2 (22)	73.2 (26)
	Day 85					
C_{max} (ng/mL)	49 (22)	148 (20)	384 (49)	47 (32)	118 (30)	175 (16)
AUC_{inf}(ng/mL•min)	5250 (20)	19436 (16)	44761 (37)	4808 (21)	17453 (27)	18835 (17)
$t_{1/2}$ (min)	60 (17)	96 (27)	215 (37)	73 (31)	241 (40)	140 (49)
CL_{tot} (mL/min)	84.2 (24)	66.8 (14)	74.4 (37)	76.0 (25)	64.3 (30)	133.8 (20)
	Day 281					
C_{max} (ng/mL)	57 (12)	152 (32)	211 (27)	43 (20)	92 (28)	253 (41)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	7852 (13)	23315 (23)	31751 (14)	6069 (34)	11636 (13)	30991 (21)
$t_{1/2}$ (min)	127 (71)	253 (33)	313 (48)	341 (44)	419 (55)	312 (29)
CL_{tot} (mL/min)	54.9 (13)	57.8 (30)	95.0 (12)	65.8 (48)	91.5 (13)	81.4 (17)

2.6.5.4　　B 薬物動態試験：吸収：反復（続き）

イヌ 9 ヵ月反復投与試験（TK 試験）（続き）

Report Number: PDX-T-07054-D　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Pralatrexate (PDX): A Nine-Month Intravenous Toxicity and Toxicokinetic Study in Beagle Dogs with a Four-Week Recovery Interval

Animals per Gender (M/F) per Dose	5M	5M	5M	5F	5F	5F
Dose (mg/kg/day)	0.1	0.3	0.7	0.1	0.3	0.7
PK Parameters (Mean, COV%)	PDX-10a/PDX-10b					
	Day 1					
C_{max} (ng/mL)	1.23 (7)	1.27 (6)	1.44 (14)	1.39 (6)	1.37 (6)	1.22 (7)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	1.54 (9)	1.40 (5)	1.51 (9)	1.64 (2)	1.52 (9)	1.35 (7)
$t_{1/2}$ (min)	1.17 (12)	1.60 (37)	1.09 (9)	1.01 (7)	1.14 (19)	1.05 (4)
CL_{tot} (mL/min)	0.65 (9)	0.71 (5)	0.67 (9)	0.61 (2)	0.66 (9)	0.74 (7)
	Day 85					
C_{max} (ng/mL)	1.52 (13)	1.19 (3)	1.02 (11)	1.35 (13)	1.06 (3)	1.00 (4)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	1.52 (14)	1.13 (11)	1.11 (9)	1.48 (11)	1.05 (16)	1.14 (15)
$t_{1/2}$ (min)	1.00 (12)	1.50 (60)	1.36 (30)	1.11 (11)	1.21 (14)	3.24 (71)
CL_{tot} (mL/min)	0.67 (12)	0.89 (11)	0.91 (9)	0.68 (11)	0.98 (20)	0.89 (13)
	Day 281					
C_{max} (ng/mL)	1.60 (10)	1.61 (15)	2.35 (65)	1.37 (19)	1.49 (8)	1.36 (13)
AUC_{inf} (ng/mL•min)	1.69 (15)	1.47 (13)	1.80 (42)	1.43 (18)	1.60 (13)	1.35 (13)
$t_{1/2}$ (min)	1.18 (28)	1.17 (43)	0.91 (4)	1.04 (25)	1.09 (43)	1.05 (5)
CL_{tot} (mL/min)	0.60 (14)	0.69 (15)	0.61 (28)	0.72 (19)	0.63 (12)	0.75 (14)

a: Individual pralatrexate diastereomers (ie, PDX-10a and PDX-10b) were analyzed.
AUC_{inf} = area under the concentration time curve to infinity, C_{max} = maximum plasma concentration, CL_{tot} = total clearance, COV = coefficient of variation, F= female; h = hour, IV = intravenous, kg = kilogram, mg = milligram, M = male, mL = milliliter, ng = nanogram, PBS = phosphate-buffered saline, PK = pharmacokinetic, min = minute, M = male, PK = pharmacokinetic, $t_{1/2}$ = terminal elimination half-life

2.6.5.5　　A 薬物動態試験：分布

ラットでの組織内分布

Report Number: PDX-K-10077-R　　Location: 4.2.2.3.1　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: [^{14}C]-PDX: Tissue distribution and Excretion in the Pigmented Rat

Species	Partially pigmented rats					
Animals per Gender (M/F) per Dose	1M					
Feeding Condition	Fed					
Vehicle/Formulation	10% ethanol in 0.9% saline					
Method of Administration	IV					
Dose	10 mg/kg, 100 µCi/kg					
Specific Activity	20.07 MBq					
Sampling Time (h)	1, 4, 24, 48, 168 and 504 h					
Assay	Quantitative Whole Body Autoradiography					
	Tissue Concentration of Radioactivity in Rat (µg equivalents/g)					
Tissues/Organs	1 h	4 h	24 h	48 h	168 h	504 h
Adrenal gland	0.241	0.056	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Aorta	0.821	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Blood	0.440	0.057	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Bone	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Bone marrow	0.477	0.213	0.166	0.105	BLQ	BLQ
Brain	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Bulbo-urethral gland	0.422	0.061	0.054	0.054	BLQ	BLQ
Caecum contents	0.122	484[#]	2.41	0.201	BLQ	BLQ
Caecum mucosa	0.355	5.24	0.271	0.063	BLQ	BLQ
Cartilage	0.216	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Choroid plexus	0.217	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ

2.6.5.5　　A 薬物動態試験：分布（続き）

ラットでの組織内分布（続き）

Report Number: PDX-K-10077-R　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: [^{14}C]-PDX: Tissue distribution and Excretion in the Pigmented Rat

Tissues/Organs	Tissue Concentration of Radioactivity in Rat (μg equivalents/g)					
	1 h	4 h	24 h	48 h	168 h	504 h
Epididymis	0.247	0.053	0.064	BLQ	BLQ	BLQ
Epimysium	0.319	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Ex-orbital lachrymal gland	0.361	0.120	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Eye	0.215	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Fat (brown)	0.125	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Fat (white)	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Harderian gland	0.217	0.121	0.085	0.065	BLQ	BLQ
Intra-orbital lachrymal gland	0.358	0.097	0.054	BLQ	BLQ	BLQ
Kidney	2.29	0.454	0.443	0.380	0.207	BLQ
Kidney cortex	2.31	0.715	0.685	0.600	0.238	0.075
Kidney medulla	1.09	0.081	0.064	BLQ	BLQ	BLQ
Large intestine contents	0.102	0.189	6.36	0.493	BLQ	BLQ
Large intestine mucosa	0.295	0.075	0.328	0.112	BLQ	BLQ
Liver	2.31	0.445	0.395	0.289	0.206	0.089
Lung	0.472	0.059	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Lymph nodes	0.352	0.093	0.142	0.065	BLQ	BLQ
Muscle	0.083	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Myocardium	0.187	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Nasal mucosa	0.184	0.079	0.054	0.088	BLQ	BLQ

2.6.5.5　　A 薬物動態試験：分布（続き）

ラットでの組織内分布（続き）

Report Number: PDX-K-10077-R　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: [^{14}C]-PDX: Tissue distribution and Excretion in the Pigmented Rat

Tissues/Organs	Tissue Concentration of Radioactivity in Rat (μg equivalents/g)					
	1 h	4 h	24 h	48 h	168 h	504 h
Pancreas	0.221	0.059	0.053	BLQ	BLQ	BLQ
Peridontal membrane	0.244	0.330	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Pineal body	0.181	0.063	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Pituitary gland	0.179	0.077	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Preputial gland	0.176	0.075	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Prostate	0.328	NS	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Salivary gland	0.256	0.094	0.059	BLQ	BLQ	BLQ
Seminal vesicles	0.130	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Skin (non-pigmented)	0.564	0.080	0.063	BLQ	BLQ	BLQ
Skin (pigmented)	0.473	0.102	0.074	0.057	BLQ	BLQ
Small intestine contents	280[#]	2.11	0.211	0.055	BLQ	BLQ
Small intestine mucsa	3.79	0.327	0.092	0.081	BLQ	BLQ
Spinal cord	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Spleen	0.333	0.151	0.133	0.100	0.056	BLQ
Stomach contents	0.816	0.118	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Stomach mucosa: Fundic	0.380	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Stomach mucosa: Non-fundic	0.279	0.056	0.058	BLQ	BLQ	BLQ

2.6.5.5　　A 薬物動態試験：分布（続き）

ラットでの組織内分布（続き）

Report Number: PDX-K-10077-R　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: [^{14}C]-PDX: Tissue distribution and Excretion in the Pigmented Rat

Tissues/Organs	Tissue Concentration of Radioactivity in Rat (µg equivalents/g)					
	1 h	4 h	24 h	48 h	168 h	504 h
Testis	0.205	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Thymus	0.379	0.196	0.239	0.176	0.108	BLQ
Thyroid gland	0.245	0.076	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Tongue	0.218	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Tooth pulp	0.299	0.076	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Urinary bladder	4.28	NS	BLQ	BLQ	BLQ	BLQ
Uveal tract	0.414	0.083	0.080	BLQ	BLQ	BLQ

BLQ = Below limit of accurate quantitation (0.052 µg equivalents/g), # = Above limit of accurate quantification (89.5 µg equivalents/g), NS = No sample (Sample not visible at any level)

2.6.5.5　　B 薬物動態試験：分布（続き）

ラットでの組織内分布

Report Number: PDX-K-07052-R　　Location: 4.2.2.3.2　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: Mass Balance and Tissue Distribution of ^{14}C-PDX Administered Intravenously in Male and Female Sprague Dawley Rats

Species	Sprague Dawley rats	
Gender (M/F)/No. of Animals	4M/4F	
Feeding Condition	Fed	
Vehicle/Formulation	0.9% saline and 10% ethanol	
Method of Administration	IV bolus	
Dose	10 mg/kg, 50 µCi/kg	
Specific Activity	53.9 mCi/mmol	
Sampling Time (h)	168 h	
Assay	Liquid scintillation counter	
	Tissue Concentration of Radioactivity in Rat (µg equivalents/g)	
Tissues/Organs	Male	Female
Liver	0.33 ± 0.10	0.24 ± 0.03
Ileum	0.04 ± 0.04	0.01 ± 0.01
Colon	0.09 ± 0.05	0.03 ± 0.03
Bone Marrow	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
Brain	0.04 ± 0.02	0.01 ± 0.01
Skeletal Muscle	0.01 ± 0.02	0.00 ± 0.00
Lung	0.12 ± 0.04	0.04 ± 0.02
Kidney	0.39 ± 0.05	0.27 ± 0.05
Skin	0.12 ± 0.04	0.04 ± 0.03

Maen ± SD, M = male, F = female

2.6.5.6　　A 薬物動態試験：血漿タンパク結合

ヒトでのタンパク結合

Report Number: PDX-K-06029-U　　Location: 4.2.2.3.3　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: Equilibrium Dialysis

Study System:	Human plasma
Method:	Equilibrium Dialysis at 37°C for 24 hours with [^{14}C]-pralatrexate final concentration at 17 and 70 µmol equivalent./L

PDX Concentration (µmol equivalent./L)	% bound Mean ± SD	% recovery Mean ± SD
70	69.2 ± 0.82	98.3 ± 2.13
17	62.8 ± 1.18	91.3 ± 1.97
17	62.5 ± 1.45	95.7 ± 3.91

Values are mean ± standard deviation from 3 determinations.

2.6.5.6　　B 薬物動態試験：血漿タンパク結合（続き）

ヒトでのタンパク結合

Report Number: PDX-K-08066-U　　Location: 4.2.2.3.4　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: *In vitro* Binding of Pralatrexate to Human Plasma Proteins

Study System:	Human plasma and serum albumin			
Method:	Ultrafiltration after the incubation at 37°C for 10, 35, 60 minutes and 24 hours with pralatrexate final concentration at 5, 25 and 100 µg/mL (5 and 100 µg/mL for serum albumin)			
	Human Plasma			Human Serum Albumin[a]
	5 µg/mL	25 µg/mL	100 µg/mL	5 and 100 µg/mL
10 min	0.75 ± 0.06	0.78 ± 0.05	0.78 ± 0.07	0.92 ± 0.01
35 min	0.71 ± 0.09	0.77 ± 0.03	0.77 ± 0.06	0.91 ± 0.01
60 min	0.88 ± 0.03	0.84 ± 0.04	0.86 ± 0.05	0.93 ± 0.01
24 h	0.88 ± 0.04	0.87 ± 0.03	0.87 ± 0.03	0.91 ± 0.01

Values are mean ± standard deviation from 5 different plasma batch.
a: mean of 5 µg/mL (n=3) and 100 µg/mL (n=1)

2.6.5.7　　薬物動態試験：妊娠及び授乳動物における試験

該当資料なし。

2.6.5.8　　A 薬物動態試験：その他の分布試験

ヒトでの血球移行

Report Number: PDX-K-08067-U　　Location: 4.2.2.3.5　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: *In vitro* Study of Binding and Partitioning of Pralatrexate into Humans Red Blood Cells

Study System:	Human whole blood			
Method:	Ultrafiltration after the incubation at 37°C for 5, 30, 60 and 120 minutes with Pralatrexate final concentration at 5, 25 and 100 µg/mL			
	Plasma-control Concentration (µg/mL)	Plasma from Whole Blood Concentration (µg/mL) (Cp)	Cp×(1-Hc) (µg/mL)	RBC Concentration (µg/mL)
5 µg/mL				
5 min	3.1	9.4	5.0	0.00
30 min	3.5	8.9	4.8	0.00
60 min	3.1	15.3	8.2	0.00
120 min	2.9	10.4	5.6	0.00
Mean ± SD	3.15 ± 0.252	11 ± 2.934	5.907 ± 1.575	0.00 ± NA
25 µg/mL				
5 min	22.7	37.9	22.3	0.98
30 min	22.3	39.1	23.1	0.00
60 min	22.0	36.0	21.2	1.95
120 min	20.6	34.7	20.5	0.24
Mean ± SD	21.9 ± 0.913	36.9 ± 1.957	21.8 ± 1.153	0.79 ± NA

2.6.5.8　　A 薬物動態試験：その他の分布試験（続き）

ヒトでの血球移行（続き）

Report Number: PDX-K-08067-U　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: *In vitro* Study of Binding and Partitioning of Pralatrexate into Humans Red Blood Cells

	Plasma-control Concentration (µg/mL)	Plasma from Whole Blood Concentration (µg/mL) (Cp)	Cp×(1-Hc) (µg/mL)	RBC Concentration (µg/mL)
100 µg/mL				
5 min	87.7	170	92.0	0.00
30 min	97.9	200	108	0.00
60 min	81.3	162	87.6	0.00
120 min	90.6	155	83.9	14.6[a]
Mean ± SD	89.4 ± 6.884	171.8 ± 19.805	92.9 ± 10.715	0.00 ± NA

a: This value was excluded to technical problems.
NA = Not applicable, Hc = 0.463, 0.41, 0.459 for 5, 23.5, 100 µg/mL, RBC = red blood cell, SD = standard deviation

2.6.5.8　　B 薬物動態試験：その他の分布試験（続き）

ラットでの脳内移行

Report Number: PDX-P-03001-R　　Location: 4.2.2.3.6　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Evaluation of the Brain Penetration Potential of Methotrexate and 10-propargyl-10-deazaaminopterin (PDX) via *in situ* Rat Brain Perfusion

Species	Sprague-Dawley Rat
Animals per Gender (M/F) per Dose	4M
Feeding Condition	Fed
Vehicle/Formulation	Krebs-Ringer Solution
Method of Administration	In situ brain perfusion via the left carotid artery
Sampling Points	After the end of infusion
Sample	Brain
Dose	600 mg/kg
Analyte	Pralatrexate[a]
Assay	LC/MS/MS
Brain uptake rate	2.68 ± 0.66 nmol/g brain/sec
Brain uptake rate (Normalized uptake rate)	0.036 ± 0.009 pmol/mg protein/sec (antipyrine: 1.209 ± 0.224 pmol/mg protein/sec, atenolol: 0.049 ± 0.010 pmol/mg protein/sec)

In this exploratory brain penetration assessment, pralatrexate was found to have low brain penetration potential. The observed brain uptake rate for pralatrexate was similar to that observed for methotrexate and the low brain penetration control atenolol.
a:Racemic mixture (PDX-10a + PDX-10b)
mg = milligram, kg = kilogram, nmol = nanomole, g = gram, sec = second

2.6.5.9　　A 薬物動態試験：代謝：*In vitro*

ヒト肝 S9 での安定性

Report Number: PDX-K-08061-U　　Location: 4.2.2.4.1　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Metabolic Profiling of PDX in Pooled Human S9 Fractions

Study System	Metabolic stabilities in pooled human S9 fraction		
Method:	Pralatrexate and positive controls (testosterone and 7-hydroxycoumarin) were incubated in triplicate over 60 min at 37°C in the presence of cofactor (1 mmol/L NADPH, 1 mmol/L UDPGA, 1 mmol/L PAPS 1 mmol/L GSH and 10 mmol/L $MgCl_2$) in 100 mmol/L Potassium phosphate buffer, pH7.4. Final concentration of S9 fraction in the incubations was 2 µmol/L of Pralatrexate and positive controls.		
	Remaining (% to T=0 min), Mean (RSTD%)		
	Pralatrexate	Testosterone	7-hydroxycoumarin
0 min	100 (3.9)	100 (4.5)	100 (7.2)
15 min	94.4 (0.8)	60.9 (2.0)	42.9 (1.3)
30 min	97.9 (4.3)	38.8 (1.5)	16.8 (0.7)
60 min	96.2 (1.4)	18.2 (1.3)	2.2 (0.1)

NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, UDPGA = uridine diphosphate glucuronic acid, PAPS = 3'-phosphoadenosine 5'- phosphosulfate, GSH = Glutathione, $MgCl_2$ = magnesium chloride

2.6.5.9　B 薬物動態試験：代謝：*In vitro*（続き）

ヒト肝ミクロソーム及び肝細胞での安定性

Report Number: PDX-K-07030-U　　Location: 4.2.2.4.2　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Evaluation of Metabolic Stability of Pralatrexate (PDX) in Human Hepatocytes and Human Liver Microsomes

Study System	Metabolic stabilities in pooled human liver microsome and hepatocyte.
Method:	Pralatrexate and positive controls (benzyresorufin) were incubated in triplicate over 120 min (microsome) or 240 min (hepatocyte) at 37°C in the presence of generating system.　Final concentration of human liver microsome and hepatocyte in the incubations was 10 and 100 µmol/L of pralatrexate.

	Human Liver Microsome, Mean (SD)							Human Hepatocyte, Mean (SD)						
	10 µmol/L % of control			100 µmol/L % of control			5 µmol/L Activity[a]	10 µmol/L % of control			100 µmol/L % of control			5 µmol/L Activity[b]
Time	PDX -10a	PDX -10b	PDX	PDX -10a	PDX -10b	PDX	Positive Control[c]	PDX -10a	PDX -10b	PDX	PDX -10a	PDX -10b	PDX	Positive Control[c]
0 min	115.24 (11.39)	115.91 (8.34)	115.55 (9.93)	96.86 (7.15)	100.35 (8.82)	98.53 (7.94)	10.4 (0.76)	119.34 (4.69)	114.01 (5.04)	116.55 (4.81)	107.20 (2.84)	105.78 (1.95)	106.45 (2.36)	7.25 (0.34)
30 min	108.57 (1.69)	110.12 (1.37)	109.30 (1.54)	93.47 (11.88)	97.17 (9.11)	95.23 (10.57)	102.69 (14.92)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	10.98 (1.29)
60 min	80.91 (4.63)	79.73 (4.62)	80.35 (4.62)	93.62 (1.24)	93.30 (1.29)	93.47 (1.19)	124.03 (8.45)	117.33 (9.08)	113.92 (7.23)	115.56 (8.12)	99.28 (9.02)	99.16 (7.96)	99.22 (8.46)	12.75 (1.16)
120 min	104.55 (4.22)	106.78 (8.21)	105.60 (6.05)	85.88 (11.36)	85.26 (10.47)	85.57 (10.91)	119.01 (12.42)	103.96 (6.51)	106.33 (5.13)	105.18 (5.77)	108.18 (10.70)	106.38 (6.93)	107.24 (8.71)	NA
240 min	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	97.04 (7.23)	99.89 (4.50)	98.11 (5.77)	86.12 (2.47)	88.17 (3.14)	93.06 (5.19)	12.37 (1.18)

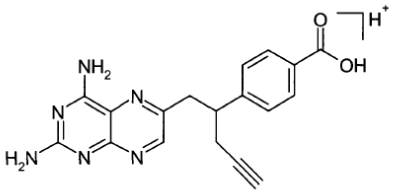
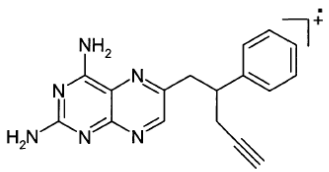
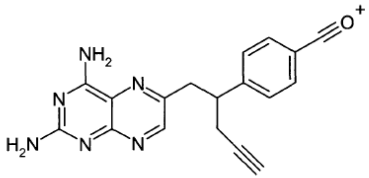
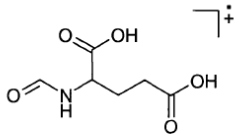
a: pmol/mg protein, b: pmol/million cells, c: benzyresorufin
NA = Not applicable, PDX = Pralatrexate

2.6.5.9　C 薬物動態試験：代謝：*In vitro*（続き）

ヒト肝ミクロソームでの代謝物の探索

Report Number: PDX-K-06028-U	Location: 4.2.2.4.3	Test Article: Pralatrexate

Report Title: Identifying Metabolites of the Customer's Test Compound in Pooled Human Liver Microsomal Incubates Using LC-MS/MS

Method:	Metabolic stabilities in pooled human liver microsome and Identifying metabolites by LC-MS/MS.　Pralatrexate were incubated in triplicate over 120 min at 37°C in the presence of generating system.　Final concentration of human liver microsome in the incubations was 100 µmol/L of Pralatrexate.
Results:	Fragment ion of pralatrexate  m/z 349  m/z 304  m/z 331  m/z 175 No metabolites correspond to above fragment ions including oxidation products of these ions were observed.

2.6.5.9　D 薬物動態試験：代謝：*In vitro*（続き）

ヒト肝ミクロソーム及び肝細胞での安定性

Report Number: PDX-K-08062-U　　Location: 4.2.2.4.4　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Cytochrome P450 phenotyping of PDX using chemical inhibitors and cDNA expressed Supersomes

Test System	CYP reaction phenotyping using chemical inhibitors and cDNA expressed supersomes
Method:	Pralatrexate (1 µmol/L) was incubated with chemical inhibitors (CYP1A2: furafylline, CYP2A6: 8-methoxypsoralen, CYP2B6: Thio-TEPA, CYP2C8: Quercetin, CYP2C9: Sulfaphenazole, CYP2C19: (+)-N-3-benzylnirvanol, CYP2D6: Quinidine, CYP2E1: 4-methylpyrazole, CYP3A4: ketoconazole) at 37°C in the presence of NADPH. Pralatrexate (1 µmol/L) was incubated with each cDNA expressed human supersomes at 37°C.

Reaction Phenotyping of Pralatrexate by Chemical Inhibitors

% remaining at 60 min

CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
104	110	93	98	104	98	99	105	104

Metabolic stability of Pralatrexate in Human Supersomes

% remaining at 60 min

CYP1A2	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4	MAO-A	MAO-B
115	106	112	108	108	113	107	106	103	109	91

NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, MAO-A = monoamine oxidase A, MAO-B = monoamine oxidase B

2.6.5.10　　薬物動態試験：代謝：*In vivo*

該当資料なし。

2.6.5.11　　薬物動態試験：推定代謝経路

該当資料なし。

2.6.5.12　　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

薬物相互作用の項に記載。

2.6.5.13　A 薬物動態試験：排泄

ラットでの排泄

Report Number: PDX-K-07052-R　　Location: 4.2.2.3.2　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: Mass Balance and Tissue Distribution of ^{14}C-PDX Administered Intravenously in Male and Female Sprague Dawley Rats

Species	Sprague-Dawley Rat
Animals per Gender (M/F) per Dose	4M/4F
Feeding Condition	Fed
Vehicle/Formulation	0.9% saline and 10% ethanol
Method of Administration	IV bolus
Target Dose	10 mg/kg (50 µCi/kg)
Specific Activity	53.9 mCi/mol
Sampling Time	Pre, 0-8, 8-24 h and 24 h-intervals through 168 h
Assay	Liquid scintillation counting

	Recovery of Total Radioactivity (% Dose) in male rat					
Collection Period (h)	Urine	Feces	Cage wash	Tissue	Carcass	Total
0–8	21.97 ± 1.89	NA[a]	3.46 ± 1.25	NA	NA	NA
0–24	23.82 ± 2.59	42.24 ± 10.51	3.78 ± 1.04	NA	NA	NA
0–48	24.14 ± 2.92	44.00 ± 9.29	3.81 ± 1.00	NA	NA	NA
0–72	24.15 ± 2.94	44.19 ± 9.20	3.81 ± 1.00	NA	NA	NA
0–96	24.16 ± 2.95	44.22 ± 9.19	3.81 ± 1.00	NA	NA	NA
0–120	24.16 ± 2.95	44.23 ± 9.17	3.81 ± 1.00	NA	NA	NA
0–144	24.16 ± 2.95	44.23 ± 9.17	3.81 ± 1.00	NA	NA	NA
0–168	24.16 ± 2.95	44.23 ± 9.17	3.81 ± 1.00	0.26 ± 0.10	0.79 ± 0.36	73.24 ± 6.30

2.6.5.13　A 薬物動態試験：排泄（続き）

ラットでの排泄（続き）

Report Number: PDX-K-07052-R　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: Mass Balance and Tissue Distribution of ^{14}C-PDX Administered Intravenously in Male and Female Sprague Dawley Rats

Collection Period (h)	Recovery of Total Radioactivity (% Dose) in female rat					
	Urine	Feces	Cage wash	Tissue	Carcass	Total
0–8	19.54 ± 2.53	19.65 ± 13.62	4.64 ± 2.29	NA	NA	NA
0–24	20.29 ± 2.45	57.58 ± 3.83	5.21 ± 2.20	NA	NA	NA
0–48	20.41 ± 2.49	58.00 ± 3.53	5.31 ± 2.14	NA	NA	NA
0–72	20.47 ± 2.52	58.05 ± 3.51	5.35 ± 2.12	NA	NA	NA
0–96	20.51 ± 2.55	58.05 ± 3.51	5.38 ± 2.10	NA	NA	NA
0–120	20.52 ± 2.56	58.05 ± 3.51	5.39 ± 2.09	NA	NA	NA
0–144	20.55± 2.57	58.05 ± 3.51	5.41 ± 2.07	NA	NA	NA
0–168	20.55± 2.57	58.05 ± 3.51	5.41 ± 2.07	0.14 ± 0.02	0.19 ± 0.10	84.34 ± 3.26

Mean ± SD
a: 3 of 4 animals were no sample
NA = Not applicable

2.6.5.13　B 薬物動態試験：排泄（続き）

ラットでの排泄

Report Number: PDX-K-07053-R　　Location: 4.2.2.5.1　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: Mass Balance (Including CO_2 Capture) of ^{14}C-PDX Administered Intravenously in Male and Female Sprague Dawley Rats

Species	Sprague-Dawley Rat
Animals per Gender (M/F) per Dose	2M/2F
Feeding Condition	Fed
Vehicle/Formulation	0.9% saline and 10% ethanol
Method of Administration	IV bolus
Target Dose	10 mg/kg (50 µCi/kg)
Specific Activity	53.9 mCi/mmol
Sampling Time	Urine, feces and expired air: Pre, 0-8, 8-24 h and 24 h-intervals through 96 h Cage Wash: Pre, 0-48, 48-72, 72-96 h
Assay	Liquid scintillation counting

	Recovery of Total Radioactivity (% Dose) in male rat					
Collection Period (h)	Urine	Feces	Cage wash	CO_2 trap1	CO_2 trap2	Total
0–8	25.18	0.02	NA	0.78	<MDA	NA
0–24	28.97	39.85	NA	8.40	<MDA, 0.03[a]	NA
0–48	30.72	46.51	3.48	9.87	0.12	NA
0–72	30.81	46.67	3.54	10.13	0.12	NA
0–96	30.83	46.74	3.67	10.23	0.17	91.64

2.6.5.13　B 薬物動態試験：排泄（続き）

ラットでの排泄（続き）

Report Number: PDX-K-07053-R　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: Mass Balance (Including CO_2 Capture) of ^{14}C-PDX Administered Intravenously in Male and Female Sprague Dawley Rats

Collection Period (h)	Recovery of Total Radioactivity (% Dose) in female rat					
	Urine	Feces	Cage wash	CO_2 trap1	CO_2 trap2	Total
0–8	19.38	0.01	NA	1.67	<MDA	NA
0–24	22.16	64.64	NA	5.65	<MDA	NA
0–48	22.66	65.67	0.16	6.19	<MDA	NA
0–72	22.71	65.74	0.16	6.32	<MDA	NA
0–96	22.73	65.78	0.16	6.37	<MDA	95.04

a: each value is presented. <MDA = Less than minimal detectable activity, NA = Not applicable

2.6.5.13　C 薬物動態試験：排泄（続き）

ラットでの排泄

Report Number: PDX-K-10077-R　　Location: 4.2.2.3.1　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title:[^{14}C]-PDX: Tissue distribution and Excretion in the Pigmented Rat

Species	Partially pigmented Rat
Animals per Gender (M/F) per Dose	3M
Feeding Condition	Fed
Vehicle/Formulation	0.9% saline and 10% ethanol
Method of Administration	IV
Target Dose	10 mg/kg (100 µCi/kg)
Specific Activity	8.88 MBq/mL
Sampling Time	Urine: Pre, 0-6, 6-12, 12-24 and 24 h-intervals through 168 h Feces: Pre and 24 h-intervals through 168 h Cage wash: 168 h
Assay	Liquid scintillation counting

	Recovery of Total Radioactivity (% Dose) in male rat (Mean)				
Collection Period (h)	Urine	Feces	Cage wash	Carcass	Total
0-6	18.43	NA	NA	NA	NA
0-12	20.55	NA	NA	NA	NA
0-24	21.92	71.45	NA	NA	NA
0-48	23.38	74.19	NA	NA	NA
0-72	24.61	75.66	NA	NA	NA
0-96	25.77	75.70	NA	NA	NA
0-120	26.12	76.43	NA	NA	NA
0-144	26.30	76.61	NA	NA	NA
0-168	26.42	77.01	0.61	0.29	104.33

NA = Not applicable

2.6.5.14　　薬物動態試験：排泄：胆汁中排泄

該当資料なし。

2.6.5.15　A 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用

タンパク結合を介した薬物相互作用

Report Number: PDX-K-07043-U　　Location: 4.2.2.6.1　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: Equilibrium Dialysis

Study System:	Human plasma
Method:	Ultrafiltration after the incubation of pralatrexate (17 μmol equivalent/L) and reference compounds (phenytoin, warfarin, ceftriaxone, digoxin, disopyramide and propranolol) at 37°C for 24 hours.

%Bound (sd)

Control	+Phenytoin (μg/mL)		+Warfarin (μg/mL)		+Ceftriaxone (μg/mL)		+Digoxin (ng/mL)		+Disopyramide (μmol/L)		+Propranolol (ng/mL)	
	20	100	3	15	70	350	2	10	10	50	40	200
66.7 (1.0)	66.7 (1.4)	66.4 (0.6)	65.4 (1.0)	64.1 (2.6)	62.1 (1.2)	55.8 (0.4)	57.8 (1.8)	58.2 (0.9)	57.0 (1.9)	58.8 (1.2)	61.5 (3.8)	56.5 (0.1)
Change in % bounds	-0.1	-0.3	-1.3	-2.6	-4.7	-11	-8.9	-8.5	-9.7	-7.9	-5.2	-10

Values are mean ± standard deviation from 3 determinations.

2.6.5.15　B 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

タンパク結合を介した薬物相互作用

Report Number: PDX-K-07049-U　　Location: 4.2.2.6.2　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Evaluation of the Ability of PDX for Displacement of Bound Reference Compounds from Human Plasma Proteins using an Ultrafiltration Assay

Study System:	Human plasma
Method:	Human plasma containing a reference compound (warfarin, phenytoin, ibuprofen, digoxin, disopyramide and propranolol) was incubated at 37°C for 10 minutes, then six aliquots of plasma mixture were collected for determining the reference compound concentration in unfiltered plasma. Afterwards pralatrexate was added to a final concentration of 0 (control), 32 µg/mL (the upper limit of clinical concentration), or 160 µg/mL (five times the upper limit of clinical concentration). The incubation was continued for additional 10, 20, or 30 minutes.

%Unbound (sd)

Reference compounds	Primary binding site in plasma	PDX (µg/mL)	Incubation time (minutes)			Mean	Change of unbound (%)[a]
			10	20	30		
Warfarin 3 µg/mL	Albumin site I	0	1.0 (0.0)	1.0 (0.0)	1.3 (0.8)	1.1	NA
		32	1.0 (0.0)	1.6 (1.4)	0.9 (0.0)	1.2	0.1
		160	0.9 (0.0)	1.0 (0.0)	0.9 (0.0)	0.9	-0.1
Phenytoin 20 µg/mL	Albumin site I	0	16.6 (0.4)	17.0 (0.3)	17.4 (0.3)	17.0	NA
		32	17.2 (0.3)	17.7 (0.9)	17.6 (0.5)	17.5	0.5
		160	19.4 (1.8)	18.7 (0.3)	19.1 (0.2)	19.1	2.0
Ibuprofen 10 µg/mL	Albumin site II	0	0.3 (0.0)	0.6 (0.5)	0.3 (0.0)	0.4	NA
		32	0.3 (0.0)	0.3 (0.0)	0.4 (0.2)	0.4	-0.1
		160	0.3 (0.0)	0.3 (0.0)	0.3 (0.0)	0.3	-0.1
Digoxin 2 ng/mL	Albumin site III	0	88.8 (5.1)	84.2 (5.4)	86.4 (3.7)	86.5	NA
		32	81.2 (3.2)	87.5 (4.1)	88.6 (6.0)	85.8	-0.7
		160	84.7 (9.4)	87.9 (4.6)	89.8 (13.0)	87.5	1.0
Disopyramide 10 µg/mL	AGP (major), Albumin (minor)	0	71.0 (1.6)	71.6 (1.6)	72.0 (4.2)	71.5	NA
		32	71.3 (2.0)	72.5 (1.0)	73.1 (2.6)	72.3	0.8
		160	75.3 (2.1)	72.2 (1.7)	70.7 (2.2)	72.8	1.2

2.6.5.15　B 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

タンパク結合を介した薬物相互作用（続き）

Report Number: PDX-K-07049-U　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Evaluation of the Ability of PDX for Displacement of Bound Reference Compounds from Human Plasma Proteins using an Ultrafiltration Assay

%Unbound (sd)

Reference compounds	Primary binding site in plasma	PDX (μg/mL)	Incubation time (minutes)			Mean	Change of unbound (%)[a]
			10	20	30		
Propranolol 40 μg/mL	AGP, Albumin, Lipoprotein	0	32.3 (1.3)	30.8 (0.9)	28.2 (0.8)	30.4	NA
		32	32.2 (1.5)	31.5 (0.9)	29.0 (2.0)	30.9	0.5
		160	30.0 (1.2)	31.6 (1.0)	29.5 (1.9)	30.4	-0.1

a: Percent changes of bound drug in the presence of PDX relative to that in the absence of PDX.
AGP = α1-acid glycoproteins, NA =Not applicable, PDX = Pralatrexate

2.6.5.15　C 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

CYP 阻害作用

Report Number: PDX-K-07032-U　　Location: 4.2.2.6.3　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Evaluation of P450 Inhibition Potential of Pralatrexate (PDX) in Human Liver Microsomes

Study System:	Human liver microsome
Method:	After the preincubation of human liver microsome and NADPH-cofactors (1.3 mmol/L $NADP^+$, 3.3 mmol/L glucose 6-phosphate, 3.3 mmol/L magnesium chloride, 0.4 units/mL of glucose 6-phosphate dehydrogenase, 100 mmol/L potassium phosphate, pH 7.4) with pralatrexate (final concentration of 20, 50 and 100 µmol/L), positive control or solvent at 37°C for 15 minutes, reaction was initiated by the addition of each CYP substrates (5 µmol/L ethoxyresorufin, 100 µmol/L coumarin, 50 µmol/L tolbutamide, 100 µmol/L s-mephenytoin, 16 µmol/L dextromethorphan, or 300 µmol/L chlorzoxazone, each at final concentration). After 60 minutes incubation, the reaction was terminated with acetonitrile.

Relative Activity (%)

	CYP1A2	CYP2A6	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1
Solvent Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
PDX 20 µmol/L	102.73	79.25	110.02	71.05	111.71	94.95
PDX 50 µmol/L	91.81	76.56	119.61	NA	106.45	68.13
PDX 100 µmol/L	102.73	77.00	106.07	NA	112.53	72.49
Positive control[a]	35.12	NA	NA	NA	NA	11.63

CYP = cytochrome P450, NA = Not applicable (activity is below the lowest level of quantification)
Values represent the mean of 2 determinations
a: Control Inhibitors: CYP1A2, Furafylline (10 µmol/L); CYP2A6, Diethyldithiocarbamate (50 µmol/L); CYP2C9, Sulfaphenazole (10 µmol/L); CYP2C19, Omeprazole (10 µmol/L); CYP2D6, Quinidine (1 µmol/L); CYP2E1, 4-Methylpyrazole (100 µmol/L)

2.6.5.15　D 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

CYP 阻害作用

Report Number: PDX-K-07033-U　　Location: 4.2.2.6.4　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Drug-Drug Interaction Study: Evaluation of CYP450 Inhibition Potential of Pralatrexate (PDX) in cDNA-expressed CYP450 Isoforms

Study System:	cDNA-expressed CYP450 isoforms
Method:	After the preincubation of NADPH-cofactors (8.1 µmol/L $NADP^+$, 0.4 mmol/L glucose 6-phosphate, 0.4 mmol/L magnesium chloride) containing test article, positive control or solvent at 37°C for 10 minutes, reaction was initiated by addition of CYP substrates (CYP1A2: 7-Ethoxy-3-cyanocoumarin, CYP2A6: Coumarin, CYP2C8 and 2C9: Dibenzylfluorescein, CYP2C19: 3-O-Methylfluorescein, CYP2D6: 3-[2-(N,N diethyl-N-methylamino)ethyl]-7-methoxy-4-methylcoumarin, CYP2E1: 7-Methoxy-4-trifluoromethylcoumarin , CYP3A4: Benzyresorufin). After appropriate incubation for each isoform, the reaction was terminated.

Relative Activity (%) (Mean±SD)

PDX (µmol/L)	CYP1A2	CYP2A6	CYP2C8	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP2E1	CYP3A4
0	100.00 ± 3.32	100.00 ± 5.42	100.00 ± 4.03	100.00 ± 10.07	100.00 ± 8.58	100.00± 5.74	100.00 ± 5.57	100.00 ± 7.74
0.046	97.11 ± 3.02	110.42 ± 6.03	102.32 ± 3.76	112.01 ± 5.42	98.05 ± 1.28	148.94 ± 16.12	100.59 ± 5.46	107.32 ± 10.28
0.137	95.44 ± 2.99	130.04 ± 12.14	106.02 ± 3.07	113.83 ± 3.48	119.74 ± 10.69	233.46 ± 31.06	104.61 ± 4.65	104.51 ± 8.35
0.412	96.72 ± 2.62	179.88 ± 25.53	111.59 ± 3.08	121.33 ± 2.74	92.47 ± 8.80	488.65 ± 62.63	375.85 ± 442.16	103.74 ± 2.51
1.235	100.15 ± 3.07	309.43 ± 67.25	116.77 ± 2.96	123.60 ± 6.03	119.18 ± 5.15	1256.66± 196.57	164.92 ± 4.71	105.96 ± 13.25
3.704	109.78 ± 2.59	637.51 ± 168.96	112.91 ± 5.06	133.37 ± 7.55	105.32 ± 12.53	3478.60 ± 504.80	282.96 ± 29.02	102.04 ± 18.23
11.111	134.53 ± 5.29	1418.62 ± 360.17	106.77 ± 6.79	121.16 ± 9.50	97.28 ± 5.56	9567.72 ± 1285.98	611.27 ± 81.58	104.68 ± 5.54
33.333	193.86 ± 4.70	3539.88 ± 796.65	115.57 ± 0.91	125.53 ± 5.32	90.18 ± 0.64	23689.12 ± 2455.73	1606.00 ± 243.00	95.66 ± 0.64
100.000	314.59 ± 5.55	7048.19 ± 1325.59	118.14 ± 7.27	148.82 ± 8.53	47.49[a]± 3.73	55087.58 ± 4526.25	2559.26 ± 245.05	87.40 ± 9.67

a : statistically significant to be lower ($p < 0.05$) than control (0 µmol/L) values
CYP = cytochrome P450; PDX = Pralatrexate
Values represent the mean of 3 determinations.
Control Inhibitors: CYP1A2 = Furafylline, CYP2A6 = Tranylcypromine, CYP2C8 = Quercetin, CYP2C9 = Sulfaphenazole, CYP2C19 = Tranylcypromine, CYP2D6 = Quinidine, CYP2E1 = Tranylcypromine, CYP3A4 = Ketoconazole

2.6.5.15　E 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

CYP2C19 阻害作用

Report Number: PDX-K-07044-U　　Location: 4.2.2.6.5　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Determination of the PDX Ki Value on CYP2C19

Study System:	Human liver microsome
Method:	Substrate (s-mephenytoin: 3.2, 9.6, 32, 64, 96, 320 µmol/L) and inhibitor (pralatrexate: 0, 167, 417, 833, 1667, 2500 µmol/L) were dosed into the microsomal reaction mixture and incubated at 37°C for 2 minutes.　Reactions were initiated by the addition of NADPH and incubated at 37°C for 30 minutes. The reactions were terminated by adding 60% acetonitrile.

Models	Vmax	Km		Ki		α
	(pmol/min/mg)	µmol/L	µg/mL	µmol/L	µg/mL	
Mixed (full)	32.6	43.3	20.7	1142	545.3	2.5
Noncometitive (full)	34.2	51.2	24.4	2063	985.0	NA

NA = Not applicable, NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

2.6.5.15　F 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

CYP2C19 に対する時間依存的阻害

Report Number: PDX-K-11090-U　　Location: 4.2.2.6.6　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Evaluation of Time-Dependent Inhibition of Pralatreate for CYP2C19 Enzyme Activity in Human Liver Microsomes by IC_{50} Shift Approach

Test System:			Human liver microsome								
Method:			The test compound at eight concentration levels was pre-incubated at 37°C for 30 minutes with human liver microsome (0.25 mg protein/mL) containing phosphate buffer (100 mmol/L, pH 7.4) and $MgCl_2$ (5 mmol/L) in the presence and absence of NADPH (1 mmol/L). CYP reactions were initiated by the addition of CYP probe substrates (at approximately K_m) without and with NADPH (1 mmol/L). The reaction mixture was incubated at 37°C for 30 minutes for CYP2C19, and the reaction was terminated with ice-cold acetonitrile containing 0.1% formic acid.								
Pralatrexate	Pre-incubation (30 min)		% Enzyme Activity of Control							IC_{50} (µmol/L)	IC_{50} Shift
		Concentration (µmol/L)	0	6.86	20.6	61.7	185	556	1667	5000	
	-NADPH	Mean	100	100	98.9	92.4	93.5	96.4	86.3	44.9	4681	1.3
		SD	18	5.1	4.1	6.2	10	9.4	2.2	6.5		
	+NADPH	Mean	100	83.0	82.0	79.6	75.8	74.2	65.8	40.4	3556	
		SD	14	6.3	3.5	6.7	5.0	8.3	5.0	7.1		
Ticlopidine	Pre-incubation (30 min)	Concentration (µmol/L)	% Enzyme Activity of Control								IC_{50} (µmol/L)	IC_{50} Shift
			0	0.0412	0.123	0.370	1.11	3.33	10.0	30.0		
	-NADPH	Mean	100	91.0	82.9	76.9	60.2	34.6	15.9	6.63	1.7	4.6
		SD	12	7.7	7.4	6.0	1.4	1.2	1.1	0.39		
	+NADPH	Mean	100	86.6	75.9	51.2	23.0	9.46	3.44	1.36	0.37	
		SD	6.6	12	5.7	2.6	2.0	1.3	1.0	1.0		

All experiments were performed in triplicate (n=3).
NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate

2.6.5.15　G 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

CYP2B6 に対する IC_{50}

Report Number: PDX-K-11089-U　　Location: 4.2.2.6.7　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Determination of IC_{50} of Pralatrexate for CYP2B6 Enzyme Activity in Human Liver Microsomes

Test System:	Human liver microsome
Method:	The test compound at eight concentration levels was incubated with human liver microsome (0.25 mg protein/mL) containing phosphate buffer (100 mmol/L, pH 7.4), $MgCl_2$ (5 mmol/L), NADPH (1 mmol/L), and CYP2B6 probe substrate (bupropion, 100 µmol/L). The reaction mixture was pre-incubated in a shaking water bath at 37ºC for 5 minutes, and then the reaction was initiated by the addition of NADPH. The reaction mixture was incubated at 37ºC for 20 minutes. The reaction was terminated by the addition of acetonitrile containing 0.1% formic acid.

CYP2B6	% Enzyme Activity of Control (n=3)								IC_{50} (µmol/L)
	PDX Concentration (µmol/L)	0	6.86	20.6	61.7	185	556	1667	5000	
	Mean	100	97.3	101	99.5	95.2	93.6	83.4	72.8	>5000
	SD	2.80	1.14	3.98	0.71	2.34	1.14	1.39	4.73	
	% Enzyme Activity of Control (n=3)									IC_{50} (µmol/L)
	Tranylcypromine Concentration (µmol/L)	0	0.0412	0.123	0.370	1.11	3.33	10.0	30.0	
	Mean	100	97.4	95.6	90.2	75.8	56.5	33.2	14.2	4.3
	SD	1.88	1.07	2.05	0.85	1.91	1.10	2.25	0.47	

NADPH = nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, $MgCl_2$ = Magnesium chloride

2.6.5.15　H 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

代謝酵素誘導作用

Report Number: PDX-K-08060-U　　Location: 4.2.2.6.8　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Induction Assessment of CYP1A2, 3A4, and 2C19 by PDX in Fresh Human Hepatocytes

Test System:	Human hepatocyte
Method:	Hepatocytes were incubated with William's E media in a 37°C tissue culture incubator for 24 hours prior to the experiments. On the second day, the PDX solutions were added into the hepatocyte culture media (final concentrations of PDX were 2, 10 and 50 µmol/L). Parallel cultures were treated with either β-naphthoflavone at 10 µmol/L (BNF, CYP1A2 inducer) or rifampicin at 50 µmol/L (RIF, CYP3A4 and CYP2C19 inducer) as positive controls. The treatment lasted for three days. The CYP1A2 activity was determined by measuring the de-ethlyation of ethoxyresorufin to form resorufin; the CYP3A4 activity was determined by measuring the hydroxylation of testosterone to form 6β-hydroxytestosterone; the CYP2C19 activity was determined by measuring the hydroxylation of S-mephenytoin to form 4'-hydroxymephenytoin.

Donor	Treatment	CYP1A2		CYP3A4		CYP2C19	
		% to control[a]	% to BNF[b]	% to control[a]	% to RIF[b]	% to control[a]	% to RIF[b]
1	Vehicle	100	0	100	0	100	0
	Positive control	577	100	381	100	747	100
	2 µmol/L PDX	124	5.0	99.2	~0	118	2.8
	10 µmol/L PDX	114	2.9	96.7	~0	117	2.6
	50 µmol/L PDX	119	4.1	99.4	~0	117	2.6
2	Vehicle	100	0	100	0	NA[c]	NA[c]
	Positive control	927	100	1163	100	NA[c]	NA[c]
	2 µmol/L PDX	110	1.2	112	1.1	NA[c]	NA[c]
	10 µmol/L PDX	120	2.4	105	0.5	NA[c]	NA[c]
	50 µmol/L PDX	125	3.1	100	~0	NA[c]	NA[c]

2.6.5.15　H 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

代謝酵素誘導作用（続き）

Report Number: PDX-K-08060-U　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Induction Assessment of CYP1A2, 3A4, and 2C19 by PDX in Fresh Human Hepatocytes

Donor	Treatment	CYP1A2		CYP3A4		CYP2C19	
		% to control	% to BNF	% to control	% to RIF	% to control	% to RIF
3	Vehicle	100	0	100	0	100	0
	Positive control	396	100	553	100	1474	100
	2 µmol/L PDX	102	0.7	99.3	~0	103	0.3
	10 µmol/L PDX	61	~0	83.9	~0	74.8	~0
	50 µmol/L PDX	79	~0	79.8	~0	70.1	~0

a: Percentage of activity relative to the vehicle-treated hepatocytes.
b: Percentage of activity relative to the positive control-treated hepatocytes.
c: The formation of 4'-OH Mephenytoin is below the lowest quantification limit.
Positive control = β-naphthoflavone (CYP1A2) and Rifampicin (CYP2C19 and CYP3A4), NA = not applicable, PDX = pralatrexate, RIF = rifampicin

2.6.5.15　I 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

P-gp を介した相互作用試験

Report Number: PDX-K-08059-U　　Location: 4.2.2.6.9　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Assessment of PDX as a Substrate and an Inhibitor of P-glycoproteins in Different Cell Systems

Test System:	P-gp-overexpressing MDCK cells and Caco-2 cells
Method:	For AP to BL transport, dosing solutions of PDX were added to the AP side, and HBSS was added to the BL side. For BL to AP transport, PDX dosing solution were added to the BL side, and HBSS was added to the AP side. Then the cell monolayers were incubated at 37°C for 120 minutes. Aliquots were taken from the receiver compartment at 30, 60, and 120 minutes and donor compartment at 0, 60, and 120 minutes. For inhibition study, after 20-minute preincubation with 500 µmol/L PDX or positive control, the same procedure as above mentioned was performed. Digoxin was used as substrate of P-gp and the Caco-2 plates were incubated at 37°C for 120 minutes.

Papp ($\times 10^{-6}$cm/s)

Treatment	MDR1-MDCK Cells			MDCK Cells		
	A-B Direction	B-A Direction	Efflux ratio	A-B Direction	B-A Direction	Efflux ratio
PDX 5 µmol/L	0.06[a]	0.08 ± 0.03	ND	0.06[a]	0.06[a]	ND
PDX 50 µmol/L	0.08 ± 0.01	0.12 ± 0.02	1.5	0.03 ± 0.01	0.04 ± 0.01	1.4
PDX 500 µmol/L[b]	0.07 ± 0.01	0.12 ± 0.01	1.6	0.02 ± 0.01	0.03 ± 0.01	1.7
Digoxin 10 µmol/L[b]	0.218 ± 0.040	8.26 ± 0.44	37.8	0.72 ± 0.57	2.40 ± 0.05	3.3

2.6.5.15　I 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

P-gp を介した相互作用試験（続き）

Report Number: PDX-K-08059-U　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: Assessment of PDX as a Substrate and an Inhibitor of P-glycoproteins in Different Cell Systems

	Papp ($\times 10^{-6}$cm/s)		
Treatment	A-B Direction	B-A Direction	Efflux ratio
Digoxin 10 µmol/L	0.84 ± 0.11	14.4 ± 1.30	17.1
Digoxin + PDX 500 µmol/L	1.23 ± 0.39	13.0 ± 2.65	10.6
Digoxin + CsA 10 µmol/L	3.74 ± 1.00	4.06 ± 0.58	1.1
Digoxin + Ketoconazole 20 µmol/L	4.26 ± 0.55	3.74 ± 0.31	0.9

a: The concentrations of the test compound were below the lowest quantification limit (5 nmol/L); the value of 5 nmol/L was used to estimate the permeability and recovery values.
b: The measured receiver concentrations were statistical outliers; these values were excluded from average calculations (n=2).
CsA = Cyclosporine A, MDCK = Madin-Darby canine kidney, ND = Not determined. Because reliable Papp value was not obtained, the efflux ratio was not available, P-gp = P-glycoprotein
Each determination was performed in triplicate.

2.6.5.15　J 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

BCRP、MRP2 及び MRP3 の基質又は阻害剤であるかの検討

Report Number: PDX-K-10078-U　　Location: 4.2.2.6.10　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of the Substrate, and Inhibition Potential of Pralatrexate and Methotrexate with Membrane Vesicles Transfected with Efflux Transporters

Test System:	BCRP, MRP2 and MRP3 vesicles
Method:	Pralatrexate, methotrexate and positive control substrates were mixed with either MgATP or MgAMP (4 mmol/L final) solution at room temperature to make the incubation buffer. In addition, glutathione (2 mmol/L final) was added specifically for studies involving MRP2 and MRP3 vesicles. Vesicular preparations were done separately in the reaction buffer on ice such that final protein concentration was 50 µg/well of a 96-well plate. All the reagents (incubation buffer and vesicular preparation) were pre-incubated separately at 37°C for 5 minutes. The assay was initiated by adding the incubation buffer to the vesicular preparation. The plates were incubated at 37 °C for 0.5, 1, 2, 5 and 10 minutes. The positive control vesicles were incubated for 3, 5, and 0.5 minutes for BCRP, MRP2, and MRP3, respectively. The reaction was then quickly stopped by the addition of chilled stopping buffer on ice. For inhibition study, Pralatrexate and methotrexate at 0.3, 1, 3, 10, 30, and 100 µmol/L and prototypical substrates were mixed with either MgATP or MgAMP (4 mmol/L final) solution at room temperature to make the incubation buffer. The same procedures mentioned above were performed.

Transporter	Test Article	Concentration (µmol/L)	Incubation Time (min)	ATP-dependent transport ATP-AMP (pmol/mg/min)	Transport ratio ATP/AMP
BCRP	PDX	1	5	4.28	1.37
		10	5	40.7	2.88
	MTX	1	5	14.6	3.53
		10	5	163	17.4
	Positive control (^{3}H-MTX)	100	3	1728	13.2
MRP2	PDX	1	10	5.53	1.45
		10	10	46.2	2.86
	MTX	1	5	0.96	1.17
		10	5	12.4	2.04
	Positive control (^{3}H-E_2-17β-G)	100	5	2349	9.24

2.6.5.15　J 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

BCRP、MRP2 及び MRP3 の基質又は阻害剤であるかの検討（続き）

Report Number: PDX-K-10078-U　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of the Substrate, and Inhibition Potential of Pralatrexate and Methotrexate with Membrane Vesicles Transfected with Efflux Transporters

Transporter	Test Article	Concentration (μmol/L)	Incubation Time (min)	ATP-dependent transport ATP-AMP (pmol/mg/min)	Transport ratio ATP/AMP
MRP3	PDX	1	10	23.1	3.03
		10	10	185	7.61
	MTX	1	5	9.32	2.86
		10	5	70.2	5.58
	Positive control (^{3}H-E_2-17β-G)	100	0.5	123	5.50

2.6.5.15　J 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

BCRP、MRP2 及び MRP3 の基質又は阻害剤であるかの検討（続き）

Report Number: PDX-K-10078-U　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of the Substrate, and Inhibition Potential of Pralatrexate and Methotrexate with Membrane Vesicles Transfected with Efflux Transporters

Inhibitor	BCRP % Remaining Activity	MRP2 % Remaining Activity	MRP3 % Remaining Activity
Solvent	100	100	100
PDX 0.3 µmol/L	128	71.6	36.8
PDX 1 µmol/L	120	-8.9[a]	29.8
PDX 3 µmol/L	105	66.8	23.7
PDX 10 µmol/L	102	60.5	19.4
PDX 30 µmol/L	85.5	58.5	17.7
PDX 100 µmol/L	88.1	33.6	19.6
Positive control Inhibitor	7.8	13.0	11.3

a : Not included in calculation of IC_{50}
BCRP = breast cancer resistance protein, E_2-17β-G = Estradiol-17β-D-glucuronide, MRP = multi drug resistance protein, MTX = Methotrexate, PDX = Pralatrexate

2.6.5.15　K 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

BCRP、MRP2 及び MRP3 の基質であるかの検討

Report Number: PDX-K-10081-U　　Location: 4.2.2.6.11　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of Substrate Potential of Pralatrexate for Efflux Transporters in Membrane Vesicles

Test System:	BCRP, MRP2 and MRP3 vesicles
Method:	Pralatrexate and positive control substrates were mixed with either MgATP or MgAMP (4 mmol/L final) solution at room temperature to make the incubation buffer. In addition, glutathione (2 mmol/L final) was added specifically for studies involving MRP2 and MRP3 vesicles. Vesicular preparations were done separately in the reaction buffer on ice such that final protein concentration was 50 µg/well of a 96-well plate. All the reagents (incubation buffer and vesicular preparation) were pre-incubated separately at 37°C for 5 minutes. The assay was initiated by adding the incubation buffer to the vesicular preparation. The plates were incubated at 37°C for 5 minutes. The positive control vesicles were incubated for 3, 5, and 0.5 minutes for BCRP, MRP2, and MRP3, respectively. The reaction was then quickly stopped by the addition of chilled stopping buffer on ice. For inhibition study, pralatrexate at 100 µmol/L and positive control inhibitors were mixed with either MgATP or MgAMP (4 mmol/L final) solution at room temperature to make the incubation buffer. The same procedures mentioned above were performed.

Sample	Concentration (µmol/L)	Time (min)	Corrected transporter Substrate Potential of Pralatrexate - ATP-dependent transport			
			AMP (pmol/mg/min)	ATP (pmol/mg/min)	ATP-AMP (pmol/mg/min)	ATP/AMP (pmol/mg/min)
BCRP Vesicle (PDX)	1.45	5	0.00	1.70	1.70	NA
	3	5	0.315	3.54	3.22	11.2
	14.5	5	2.36	17.7	15.4	7.51
	20	5	3.10	26.1	23.0	8.41
	50	5	8.01	54.3	46.3	6.79
	100	5	0.00	94.2	94.2	NA
	300	5	21.8	233	211	10.7
BCRP Vesicle (MTX)	100	3	19.4	426	406	22.0

2.6.5.15　K 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

BCRP、MRP2 及び MRP3 の基質であるかの検討（続き）

Report Number: PDX-K-10081-U　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of Substrate Potential of Pralatrexate for Efflux Transporters in Membrane Vesicles

Sample	Concentration (µmol/L)	Time (min)	Corrected transporter Substrate Potential of Pralatrexate - ATP-dependent transport			
			AMP (pmol/mg/min)	ATP (pmol/mg/min)	ATP-AMP (pmol/mg/min)	ATP/AMP (pmol/mg/min)
MRP2 Vesicle (PDX)	0.3	5	2.10	0.181	0.00	0.0860
	1	5	0.908	0.00	0.00	0.00
	3	5	0.0426	4.13	4.09	97.0
	10	5	0.818	9.98	9.16	12.2
	20	5	4.55	18.8	14.2	4.12
	50	5	19.4	18.1	0.00	0.933
	100	5	22.0	66.4	44.3	3.01
	300	5	38.8	184	146	4.75
MRP2 Vesicle (E_2-17β-G)	50	5	0.00	318	318	NA

2.6.5.15　K 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

BCRP、MRP2 及び MRP3 の基質であるかの検討（続き）

Report Number: PDX-K-10081-U　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of Substrate Potential of Pralatrexate for Efflux Transporters in Membrane Vesicles

Sample	Concentration (µmol/L)	Time (min)	Corrected transporter Substrate Potential of Pralatrexate - ATP-dependent transport			
			AMP (pmol/mg/min)	ATP (pmol/mg/min)	ATP-AMP (pmol/mg/min)	ATP/AMP (pmol/mg/min)
MRP3 Vesicle (PDX)	0.3	5	0.00	0.343	0.343	NA
	1	5	0.00	0.849	0.849	NA
	3	5	1.98	10.9	8.87	5.47
	10	5	1.15	36.8	35.7	32.1
	20	5	3.29	56.8	53.5	17.3
	50	5	5.81	103	97.1	17.7
	100	5	29.6	192	162	6.48
	300	5	52.9	353	300	6.68
MRP3 Vesicle (E_2-17β-G)	362	0.5	0.00	4190	4190	NA

2.6.5.15　K 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

BCRP、MRP2 及び MRP3 基質であるかの検討（続き）

Report Number: PDX-K-10081-U　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of Substrate Potential of Pralatrexate for Efflux Transporters in Membrane Vesicles

Sample	Substrates	Inhibitor	Time (min)	AMP (pmol/mg/min)	ATP (pmol/mg/min)	ATP-AMP (pmol/mg/min)	ATP/AMP (pmol/mg/min)	Inhibition (%)
BCRP Vesicle	100 µmol/L PDX	No Inhibitor	3	0.00	34.1	34.1	NA	NA
		+ 5 µmol/L SSZ	3	0.00	85.3	85.3	NA	-150
		+ 200 µmol/L OMP	3	13.4	54.8	41.4	4.09	-21.4
		+ 5 µmol/L FTC	3	11.6	39.0	27.4	3.37	19.6
	100 µmol/L MTX	No Inhibitor	3	6.33	157	151	24.8	NA
		+ 5 µmol/L SSZ	3	32.2	0.00	0.00	0.00	100
		+ 200 µmol/L OMP	3	0.00	58.0	58.0	NA	61.5
		+ 5 µmol/L FTC	3	0.00	59.0	59.0	NA	60.8
MRP2 Vesicle	100 µmol/L PDX	No Inhibitor	5	28.7	59.4	30.7	2.07	NA
		+ 100 µmol/L MK-571	5	18.5	16.6	0.00	0.895	100
	50 µmol/L E_2-17β-G	No Inhibitor	5	0.00	157	157	NA	NA
		+ 100 µmol/L MK-571	5	5.79	59.9	54.1	10.3	65.6
MRP3 Vesicle	100 µmol/L PDX	No Inhibitor	0.5	203	281	78.2	1.38	NA
		+ 200 µmol/L ES	0.5	81.0	66.8	0.00	0.825	100
MRP3 Vesicle	5 µmol/L E_2-17β-G	No Inhibitor	0.5	0.00	73.6	73.6	NA	NA
		+ 200 µmol/L ES	0.5	4.23	37.3	33.1	8.82	55.1

BCRP = breast cancer resistance protein, E_2-17β-G = estradiol-17β-D-glucuronide, ES = estrone sulfate, FTC = fumitremorgin C, MDCK = Madin-Darby canine kidney, MRP = multi drug resistance protein, MTX = Methotrexate, NA = Not applicable, OMP = omeprazole, PDX = Pralatrexate, P-gp = p-glycoprotein, SSZ = sulfasalazine

2.6.5.15　L 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

OATP1B1 基質又は阻害剤であるかの検討

Report Number: PDX-K-10080-U　　Location: 4.2.2.6.12　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of Substrate and Inhibitory Potential of Pralatrexate and Methotrexate to OATP1B1 in a Stably Transfected Cell Line

Test System:	HEK-293 wild type cells (HEK-WT) and human OATP1B1 stably-transfected HEK-293 cells (HEK-SLCO1B1)
Method:	Uptake over time: Cells were washed and pre-incubated for 10 minutes in pre-warmed buffer. Pre-incubation buffer was removed and pralatrexate (10 µmol/L) in buffer were added to wells for 0.5, 1, 2, 4, 8, and 16 minute incubation times. Uptake over concentration range: Pre-incubation buffer was removed and control and test article solutions, at indicated concentrations in buffer, were added to wells for the appropriate incubation times. Inhibition study: Cells were pre-incubated for 10 minutes in pre-warmed buffer. Pre-incubation buffer was removed and 1 µmol/L [^{3}H]-$E_2$17β-G alone or with inhibitor/test article solutions at indicated concentrations in buffer were added to culture plates for 5 min. Cyclosporin A was tested as a positive control inhibitor of OATP1B1.

Sample	Concentration (µmol/L)	Incubation Time (min)	Uptake (Mean±SE, n=3) (pmol/mg)	OATP1B1-dependent Uptake (pmol/mg)	Fold Difference (1B1/WT Uptake)
HEK-SLCO1B1 (PDX)	10	0.5	2.53 ± 0.37	0.283	1.13
	10	1	2.67 ± 0.09	0.357	1.15
	10	2	2.92 ± 0.26	0.388	1.15
	10	4	4.18 ± 0.41	0.924	1.28
	10	8	3.40 ± 0.04	0.153	1.05
	10	16	3.69 ± 0.39	0775	1.27
HEK-293 (PDX)	10	0.5	2.25 ± 0.32	NA	NA
	10	1	2.31 ± 0.21	NA	NA
	10	2	2.54 ± 0.22	NA	NA
	10	4	3.26 ± 0.13	NA	NA
	10	8	3.25 ± 0.52	NA	NA
	10	16	2.92 ± 0.05	NA	NA

2.6.5.15　L 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

OATP1B1 基質又は阻害剤であるかの検討（続き）

Report Number: PDX-K-10080-U　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: *In Vitro* Assessment of Substrate and Inhibitory Potential of Pralatrexate and Methotrexate to OATP1B1 in a Stably Transfected Cell Line

Sample	Concentration of PDX (µmol/L)	Incubation Time (min)	Uptake (Mean±SE, n=3) (pmol/mg/min)	% Remaining Activity
HEK-SLCO1B1 (E_2-17β-G 1 µmol/L)	0	5	6.51 ± 0.20	100
	0.1	5	9.56 ± 0.16	147
	0.3	5	7.52 ± 0.38	115
	1	5	6.04 ± 0.38	92.7
	3	5	5.39 ± 0.13	82.7
	10	5	7.30 ± 0.73	112
	30	5	5.93 ± 0.13	91.1
	100	5	4.21 ± 0.06	64.6

E_2-17β-G = Estradiol-17β-D-glucuronide, NA = Not applicable, PDX = Pralatrexate

2.6.5.15　M 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

OAT1、OAT3、OCT2 及び OATP1B3 の基質であるかの検討

Report Number: PDX-K-11088-U　　Location: 4.2.2.6.13　　Test Article: [^{14}C]-Pralatrexate

Report Title: Assessment of OAT1, OAT3, OCT2 and OATP1B3 Transport Kinetics of Pralatrexate and Methotrexate

Test System:	MDCK-II cells transfected with human transporters OAT1, OAT3 and OCT2. CHO cells stably expressing human OATP1B3
Method:	Each cell was incubated at 37°C for 5 minutes after addition of pralatrexate (0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µmol/L).

Pralatrexate (µmol/L)	Net Transporter Mediated Cellular Accumulation (pmol/min/cm^2) (Mean±SD, n=3)			
	OAT1	OAT3	OCT2	OATP1B3
0	-0.0105 ± 0.0316	-0.0631 ± 0.0482	-0.0526 ± 0.0182	0.0210 ± 0.0182
0.3	-0.0631 ± 0.0794	0.105 ± 0.0835	-0.0526 ± 0.0631	1.72 ± 0.449
1	-0.105 ± 0.0964	0.0421 ± 0.0835	-0.126 ± 0.142	4.93 ± 0.146
3	-0.263 ± 0.273	0.0737 ± 0.179	-0.200 ± 0.0547	9.50 ± 1.18
10	-1.25 ± 0.0794	-0.41 ± 0.126	-0.631 ± 0.352	25.6 ± 1.99
30	-1.46 ± 2.14	1.43 ± 0.649	0.516 ± 1.06	58.0 ± 2.95
100	-7.92 ± 2.35	2.54 ± 3.53	5.44 ± 2.58	112 ± 10.0
Positive control	1.70 ± 0.155	0.788 ± 0.112	11.1 ± 0.373	121 ± 4.780

CHO = Chinese hamster ovary, OAT = organic anion transporter, OCT = organic cation transporter, OATP = organic anion transporter polypeptide
Positive controls: OAT1 = [^{3}H]-p-aminohippurate, OAT3 = [^{3}H]-estrone-3-sulfate, OCT2 = [^{14}C]-metformin, OATP1B3 = [^{3}H]-bromosulfophthalein

2.6.5.15　N 薬物動態試験：薬物動態学的薬物相互作用（続き）

OAT1、OAT3、OCT2 及び OATP1B3 に対する阻害作用

Report Number: PDX-K-11084-U　　Location: 4.2.2.6.14　　Test Article: Pralatrexate

Report Title: The Determination of IC_{50} values for Pralatrexate Against Human OAT1, OAT3, OCT2 and OATP1B3 Mediated Transport of Substrate.

Test System:	MDCK-II cells transfected with human transporters OAT1, OAT3 and OCT2. CHO cells stably expressing human OATP1B3
Method:	Each cell was incubated at 37°C for 5 minutes after addition of each substrate and pralatrexate (0, 0.3, 1, 3, 10, 30, 100 µmol/L)/positive control

Pralatrexate (µmol/L)	Inhibition (%) (Mean±SD, n=3)			
	OAT1	OAT3	OCT2	OATP1B3
0	0.00 ± 7.33	0.00 ± 3.87	0.00 ± 17.9	0.00 ± 5.33
0.3	4.28 ± 3.12	4.63 ± 10.3	-0.952 ± 20.9	-4.08 ± 2.72
1	3.49 ± 7.82	17.6 ± 9.15	5.90 ± 16.3	-1.34 ± 2.73
3	5.15 ± 5.41	22.4 ± 9.41	-0.571 ± 15.8	6.57 ± 2.40
10	12.8 ± 4.34	22.7 ± 2.64	22.1 ± 20.2	-1.36 ± 7.05
30	-6.98 ± 2.80	49.0 ± 5.12	36.0 ± 8.11	7.90 ± 9.31
100	16.8 ± 4.69	29.0 ± 4.03	26.9 ± 11.7	24.5 ± 12.4
Positive control	74.7 ± 7.33	92.9 ± 5.87	98.3 ± 7.92	99.5 ± 1.65

OAT = organic anion transporter, OCT = organic cation transporter, OATP = organic anion transporter polypeptide
Positive controls: OCT2 = quinidine, OAT1 = probenecid, OAT3 = probenecid, OATP1B3 = rifampicin
Substrates: OAT1 = [^{3}H]-p-aminohippurate, OAT3 = [^{3}H]-estrone-3-sulfate, OCT2 = [^{14}C]-metformin, OATP1B3 = [^{3}H]-bromosulfophthalein

2.6.5.16　　薬物動態試験：その他

該当資料なし。