2.6.4　薬物動態試験の概要文

PT003

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次　　頁

目次 2
略語及び専門用語一覧表 4
2.6.4.1 まとめ 5
2.6.4.2 分析法 7
2.6.4.3 吸収 7
2.6.4.3.1 トキシコキネティクス：グリコピロニウム単独投与 7
2.6.4.3.1.1 ラット 14 日間吸入投与（試験 FY08-076） 7
2.6.4.3.1.2 イヌ 14 日間吸入投与（試験 FY08-077） 8
2.6.4.3.1.3 イヌ 6 カ月間吸入投与（試験 FY12-073） 8
2.6.4.3.2 トキシコキネティクス：グリコピロニウム／ホルモテロール併用投与 9
2.6.4.3.2.1 ラット 14 日間吸入投与（試験 FY09-086） 9
2.6.4.3.2.2 イヌ 14 日間吸入投与（試験 FY09-087） 9
2.6.4.3.2.3 イヌ 3 カ月間吸入投与（試験 FY10-129） 10
2.6.4.4 分布 12
2.6.4.4.1 血漿蛋白結合：グリコピロニウム（試験 BS001265-58） 12
2.6.4.4.2 ラットにおける定量的全身オートラジオグラフィー：グリコピロニウム（試験 8370562） 13
2.6.4.5 代謝 14
2.6.4.5.1 *In vitro* 代謝：グリコピロニウム（試験 BE001294-70） 14
2.6.4.5.2 代謝酵素：グリコピロニウム（試験 BS001884-09） 14
2.6.4.5.3 *In vivo* 代謝：グリコピロニウム（試験 BE002211-07） 15
2.6.4.6 排泄 17
2.6.4.7 薬物動態学的薬物相互作用 17
2.6.4.7.1 グリコピロニウムによる相互作用 17
2.6.4.7.1.1 グリコピロニウムによる CYP 阻害（試験 BS001884-07、BS001884-08、BS002367-13） 18
2.6.4.7.1.2 グリコピロニウムによる CYP 誘導（試験 CYP0750_R45） 18
2.6.4.7.1.3 トランスポーター 18
2.6.4.7.1.3.1 グリコピロニウムによるトランスポーター阻害（試験 BS001265-56、BS001265-54、BS001265-55、16AZTrP2R2） 18
2.6.4.7.1.3.2 グリコピロニウムがトランスポーターの基質となる可能性（試験 16AZTrP2R2、BS000901-62） 20
2.6.4.8 その他の薬物動態試験 21
2.6.4.9 考察及び結論 21

2.6.4.10 参考文献 24

表目次

表 1 分析法の概要 7
表 2 イヌにグリコピロニウムを 14 日間吸入投与したときの TK パラメータ 8
表 3 イヌにグリコピロニウムを 6 カ月間吸入投与したときの TK パラメータ 9
表 4 イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用で 14 日間吸入投与したときのグリコピロニウムの TK パラメータ 10
表 5 イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用で 14 日間吸入投与したときのホルモテロールの TK パラメータ 10
表 6 イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用又はグリコピロニウム単独で 3 カ月間吸入投与したときのグリコピロニウムの TK パラメータ 11
表 7 イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用又はホルモテロール単独で 3 カ月間吸入投与したときのホルモテロールの TK パラメータ 12
表 8 グリコピロニウムの血漿蛋白非結合率 13
表 9 ヒト及び各種動物の肝細胞と[^{14}C]-グリコピロニウムを 240 分インキュベーション後の未変化体及び代謝物組成 14
表 10 グリコピロニウムの各 CYP 分子種における固有クリアランス（CL_{int}） 15
表 11 ラットに[^{14}C]-グリコピロニウム単回静脈内及び経口投与後の尿中代謝物組成（投与後 0～24 時間のプール尿を分析） 16
表 12 ラットに[^{14}C]-グリコピロニウム単回静脈内及び経口投与後の血漿中代謝物組成（投与後 0～8 時間のプール血漿を分析） 17
表 13 グリコピロニウムによる肝取り込みトランスポーターの阻害（IC_{50}） 19
表 14 グリコピロニウムによる腎取り込みトランスポーターの阻害（IC_{50}） 20

図目次

図 1 グリコピロニウムの推定代謝経路（ラット血漿及び尿中代謝物より推定） 16
図 2 イヌにホルモテロール及びグリコピロニウムをそれぞれ単独並びに併用で反復吸入投与したときの定常状態におけるホルモテロール（上）及びグリコピロニウム（下）の AUC 23

略語及び専門用語一覧表

本概要で使用する略語及び専門用語を以下に示す。

略語及び専門用語	用語の説明
AUC	投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積
AUC_{last}	投与後 0 時間から定量可能最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積
BCRP	Breast cancer resistance protein
CL_{int}	固有クリアランス
C_{max}	最高血漿中濃度
CYP	シトクロム P450
HEK-293	ヒト胎児由来腎臓 293 細胞
HLM	ヒト肝ミクロソーム
HPLC-MS/MS	高速液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析
IC_{50}	50%阻害濃度
$[I]_g$	消化管内の最高濃度
$[I]_{inlet,max}$	門脈血漿中最高濃度
K_i	阻害定数
LLOQ	定量下限
MATE	Multidrug and toxin extrusion protein
MDCKII	Madin-Darby イヌ腎臓 II 細胞
MDR1	多剤耐性蛋白質 1（P-糖蛋白質［P-gp］）
MPP^+	1-methyl-4-phenylpyridinium
NADPH	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
OAT	Organic anion transporter
OATP	Organic anion transporting polypeptide
OCT	Organic cation transporter
PAH	Para-aminohippurate
P_{app}	見かけの透過係数
P-gp	P-糖蛋白質
QWBA	定量的全身オートラジオグラフィー
$t_{½}$	消失半減期
TK	トキシコキネティクス
t_{max}	最高血漿中濃度到達時間
UPLC-MS/MS	超高速液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析

2.6.4.1 まとめ

ホルモテロールフマル酸塩水和物（以下、フリー体と区別なくホルモテロールと記載）に関する非臨床薬物動態試験成績はシムビコート®タービュヘイラー®の承認申請時に提出している。グリコピロニウム臭化物（以下、フリー体と区別なくグリコピロニウムと記載）の非臨床薬物動態試験として、分布、代謝及び薬物相互作用に関する検討を実施し、グリコピロニウムの吸収はトキシコキネティクス（TK）の結果より評価した。グリコピロニウム／ホルモテロール併用吸入投与時と各薬物単独吸入投与時の TK の結果に明らかな違いは認められず、グリコピロニウム／ホルモテロール併用の非臨床薬物動態試験は実施していない。

以下にホルモテロール及びグリコピロニウムの非臨床薬物動態成績を要約する。

ホルモテロール（第 1 部 13 項 シムビコート®タービュヘイラー®資料概要より引用）

ラット及びイヌにホルモテロールを吸入投与したとき、速やかに最高血漿中濃度（C_{max}）に達し、C_{max} 及び投与後 0 時間から無限大時間までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC）は投与量の増加に伴って増大した。反復投与しても、蓄積傾向はみられなかった。血漿中濃度推移に顕著な性差は認められなかった。

血漿蛋白結合率は、検討した動物種及びヒトにおいて約 50%と低く、種差は認められなかった。

ラットに[^{3}H]-ホルモテロールを気管内投与したとき、投与部位である気管及び肺に高い放射能分布が認められた。また、放射能は体内に広く認められたが、中枢神経系では低かった。有色ラットを用いた定量的全身オートラジオグラフィー（QWBA）試験では、顕著な残留性を示す組織は認められなかった。メラニン含有組織及び副腎髄質に残留傾向が認められたが、毒性試験ではこれらの組織で組織学的変化及び機能障害は認められていない。

マウス、ラット及びイヌにおける尿中の主代謝物はホルモテロールのフェノール基へのグルクロン酸抱合体（FG）であり、FG はヒトでも主代謝物であった。検討した動物種における代謝物組成はヒトと類似しており、主代謝経路はホルモテロールのグルクロン酸抱合化及び *O*-脱メチル化であった。ヒト肝では、ホルモテロールの *O*-脱メチル体の生成にはシトクロム P450（CYP）2D6 及び CYP2C 分子種が関与すると考えられた。

ラット及びイヌに[^{3}H]-ホルモテロールを静脈内投与したとき、投与後 72 時間までに投与放射能の約 30～40%が尿中に、50～60%が糞中に排泄された。ラットに[^{3}H]-ホルモテロールを経口投与したとき、投与量の 65%が胆汁中に排泄され、糞中へは主に胆汁を介して排泄されると考えられた。経口投与後の未変化体の尿中排泄量は少なかった。

(*R*,*R*)-ホルモテロール及び(*S*,*S*)-ホルモテロールを用い（濃度 1～100 μmol/L）、各種 CYP に対する阻害作用を *in vitro* で検討した。ホルモテロールは濃度 100 μmol/L で CYP2D6 の反応を 40%阻害した。他の CYP（CYP1A2、CYP2A6、CYP2E1 及び CYP3A）に対する阻害率は、25%未満と小さかった。しかしながら、ホルモテロールの臨床用量での血漿中濃度は低いことから、他剤との薬物動態学的相互作用が生じる可能性は低いと考えられる。

グリコピロニウム

TK の結果、ラット、イヌ共にグリコピロニウムの血漿中濃度は、吸入投与後、最初の測定時点で C_{max} を示した。ラットでは血漿中濃度の測定時点が少なく、AUC を評価できなかった。イ

ヌでは AUC は概ね用量に依存して増加した。イヌに 6 カ月間反復吸入投与後、AUC に性差は認められず、血漿から 6.10～12.5 時間の $t_{½}$で消失した。

グリコピロニウムの血漿蛋白結合率は、マウス、ラット、ウサギ及びイヌで約 20～40%、ヒトで約 50%であった。

有色ラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを静脈内投与した QWBA 試験において、放射能は大部分の組織で投与後 4 時間まで検出可能であり、投与後 168 時間以内にブドウ膜、褐色脂肪及び肝臓を除く全組織で定量限界（LLOQ）未満又は検出不能となった。大部分の組織は投与後 0.25 時間に最高放射能濃度を示し、肝臓、腎臓、小腸の順に高かった。ブドウ膜、肝臓及び有色皮膚で長い半減期を示した。眼球の放射能濃度は有色ラットの方が白色ラットより高く、限定的ではあるが、メラニン含有組織への放射能の結合が示された。

ヒト、ラット、イヌ、マウス及びウサギの肝細胞、並びにヒト、ラット及びイヌの肺ミクロソームと[^{14}C]-グリコピロニウムをインキュベーションし、グリコピロニウムの代謝物組成について検討した。多くの動物種でグリコピロニウムの主代謝物は一水酸化体及び二水酸化体、並びに不飽和化を伴う一水酸化体であった。主代謝部位は芳香環及びシクロペンタン環であった。ヒト、ラット及びイヌの肺ミクロソームで[^{14}C]-グリコピロニウムは代謝されなかった。

グリコピロニウムの代謝に関与する CYP 分子種についてヒト CYP 発現系を用いて検討した。グリコピロニウムは主に CYP2D6 で代謝され、僅かに CYP2A6、2C9、2E1、3A4 及び 3A5 による代謝も認められた。CYP1A2、2B6、2C8 及び 2C19 によるグリコピロニウムの代謝は認められなかった。

ラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを単回静脈内及び経口投与し、血漿及び尿中の代謝物について検討した。静脈内投与後の血漿及び尿中放射能は主に未変化体であった。経口投与後の血漿中放射能は M15（グリコピロニウムの加水分解で生じたカルボン酸体）が主であり、尿中放射能は M21 及び M22（いずれも M15 のグルクロン酸抱合体）が主であった。

ラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを静脈内及び経口投与し、尿中放射能排泄率を投与後 48 時間まで測定した。静脈内及び経口投与後の尿中放射能排泄率はそれぞれ投与放射能の約 60%及び約 7.5%であった。尿中排泄は速やかであり、大部分が投与後 24 時間以内に排泄された。なお、ヒトに[^{3}H]-グリコピロニウムを静脈内投与したとき、投与後 48 時間までに投与放射能の平均 85%が尿中に排泄されたとの報告がある（Kaltiala et al 1974）。

ヒト肝ミクロソームを用い、グリコピロニウムによる CYP の可逆的及び時間依存的阻害作用を検討した。ヒト主要 CYP（CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1 及び 3A4/5）に対する可逆的阻害作用は認められなかった。また、時間依存的阻害作用も認められなかった（検討 CYP：CYP1A2、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5）。ヒト肝細胞を用い、グリコピロニウムの CYP 誘導作用を検討した。グリコピロニウムによる CYP1A2、2B6 及び 3A4 の誘導作用は認められなかった。各種トランスポーター発現細胞を用い、グリコピロニウムのトランスポーター阻害作用及び基質である可能性を検討した。グリコピロニウムは OCT1、OCT2、OATP1B1、MATE1 及び MATE2-K を阻害したが、これらトランスポーターに対する阻害濃度と臨床用量における血漿中濃度の比較から、相互作用は生じないと考えられた。グリコピロニウムの P-gp、BCRP、OAT1、OAT3 及び OATP1B3 に対する阻害作用は認められなかった。また、グリコピロニウムは OCT1、OCT2、MATE1、MATE2-K、OATP1B1 及び OATP1B3 の基質であったが、OAT1、OAT3、P-gp 及び BCRP の基質ではなかった。

2.6.4.2 分析法

ラット及びイヌ血漿中のホルモテロール及びグリコピロニウムの定量法の開発及びバリデーションは [redacted] 社（米国）で実施した。グリコピロニウムのみの定量では高速液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析（HPLC-MS/MS）法を用い、ホルモテロール／グリコピロニウムの同時定量では超高速液体クロマトグラフィー／タンデム型質量分析（UPLC-MS/MS）法を用いた。各分析法の概要を表 1に示す。

表 1 分析法の概要

分析法	試料	分析対象	定量下限 (pg/mL)	検量線範囲 (pg/mL)	日内変動 精度(%)	日内変動 真度(%)	報告書番号*
HPLC-MS/MS	ラット血漿	グリコピロニウム	10.0	10.0～20000	2.0～4.1	93.4～101.9	VAL-RPT-963
HPLC-MS/MS	イヌ血漿	グリコピロニウム	10.0	10.0～20000	1.4～4.0	90.4～101.3	VAL-RPT-985
UPLC-MS/MS	ラット血漿	ホルモテロール	10.0	10.0～1000	2.1～5.8	90.2～114.6	VAL-RPT-1073
		グリコピロニウム	10.0	10.0～1000	1.3～7.5	96.1～112.1	
UPLC-MS/MS	イヌ血漿	ホルモテロール	10.0	10.0～1000	2.1～7.2	101.1～107.6	VAL-RPT-1077
		グリコピロニウム	10.0	10.0～1000	2.9～4.8	105.5～108.0	

* 各分析法のバリデーション報告書は各毒性試験報告書の Appendix に添付

2.6.4.3 吸収

2.6.4.3.1 トキシコキネティクス：グリコピロニウム単独投与

2.6.4.3.1.1 ラット 14 日間吸入投与（試験 FY08-076）

ラットにグリコピロニウムを 14 日間吸入投与したときの低用量、中用量及び高用量群における 1 日平均用量は雄ラットでそれぞれ 46、254 及び 514 µg/kg/日、雌ラットでそれぞれ 49、276 及び 555 µg/kg/日であった。なお、本試験における採血時点は少ないため（投与後 0.5、3 及び 24 時間）、最高血漿中濃度到達時間（t_{max}）及び C_{max} のみ評価した。

投与 1 日目において、t_{max} は低用量及び高用量群で投与後 0.5 時間、中用量群で投与後 3 時間であった。低用量、中用量及び高用量群における C_{max} は雄ラットでそれぞれ 0.33、1.46 及び 6.31 ng/mL、雌ラットでそれぞれ 0.54、2.66 及び 6.24 ng/mL であった。C_{max} は雌雄ラット共に概ね用量に相関したが、全体的にある程度の個体間差が認められた。

投与 14 日目において、t_{max} は中用量及び高用量群で投与後 0.5 時間、低用量群で投与後 3 時間（雌）又は 24 時間（雄）であった。低用量、中用量及び高用量群における C_{max} は雄でそれぞれ 0.41、7.29 及び 5.39 ng/mL、雌でそれぞれ 0.68、3.64 及び 3.89 ng/mL であった。投与 1 日目の結果と同様、投与 14 日目でも C_{max} には各用量群内及び雌雄内である程度の個体間差が認められた。

2.6.4.3.1.2 イヌ 14 日間吸入投与（試験 FY08-077）

イヌにグリコピロニウムを 14 日間吸入投与したときの 1 日平均用量及び TK パラメータを表 2 に示す。

投与 1 日目の t_{max} はいずれの用量でも投与後最初の測定時点（0.08 時間）であった。C_{max} は雌雄共に用量に依存して増加したが、全体を通してある程度の個体間差が認められた。投与後 0 時間から定量可能最終時点までの血漿中濃度－時間曲線下面積（AUC_{last}）は用量に依存して増加した。消失半減期（$t_{½}$）は雌雄間及び用量間で同程度であり、0.95～2.55 時間であった。

投与 14 日目の t_{max} は用量間及び雌雄間で僅かに変動した。C_{max} 及び AUC_{last} は雄の中用量を除き用量に依存して増加した。$t_{½}$は雌雄間及び用量間で投与 1 日目に比べてバラツキが大きく、雄で 2.13～12.4 時間、雌で 13.5～21.1 時間であった。

表 2 イヌにグリコピロニウムを 14 日間吸入投与したときの TK パラメータ

用量 (μg/kg/日)		採血日 (日)	t_{max} (h)		C_{max} (pg/mL)		AUC_{last} (pg·h/mL)		$t_{½}$ (h)	
雄	雌		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
16	17	1	0.08	0.08	106	105	91.8	147	0.95	1.55
		14	0.22	0.5	86.5	62.0	215	235	6.14	13.5[1)]
29	31	1	0.08	0.08	283	272	298	401	2.12	2.38
		14	0.22	1.05	70.3	227	86.8	833	2.13	21.1
77	83	1	0.08	0.08	387	1049	623	1708	2.55	1.93
		14	0.39	0.08	340	593	1670	3364	12.4	20.7

平均値（n=3～4）、1) n=1

2.6.4.3.1.3 イヌ 6 カ月間吸入投与（試験 FY12-073）

イヌにグリコピロニウムを 6 カ月間吸入投与したときの 1 日平均用量及び TK パラメータを表 3に示す。

投与 1 日目及び 180 日目共に t_{max} は概ね投与後最初の測定時点（0.083 時間）であった。

投与 1 日目の AUC_{last} は概ね用量に依存して増加したが、高用量群では 1 日目の吸入エアロゾル中のグリコピロニウム濃度が低かったため、それを反映した結果となった。

投与 180 日目の AUC_{last} は概ね用量に依存して増加し、AUC_{last} に性差に関する一貫した相関は認められなかった。C_{max} 到達後、グリコピロニウムは 6.10～12.5 時間の $t_{½}$で消失した。

表 3　　イヌにグリコピロニウムを 6 カ月間吸入投与したときの TK パラメータ

用量 (μg/kg/日)		採血日 (日)	t_{max} (h)		C_{max} (pg/mL)		AUC_{last} (pg·h/mL)		$t_{½}$ (h)	
雄	雌		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
17.72	19.44	1	0.083	0.083	1086	1319	2046	1614	8.74	7.27
		180	0.083	0.292	743	1413	1995	2480	11.3	10.7
59.05	57.41	1	0.083	0.083	3762	2939	6061	6492	9.36	10.9
		180	0.083	0.187	6537	3777	10143	8837	8.58	7.47
76.50	72.77	1	0.083	0.083	3107	1823	6170	3930	8.39	6.93
		180	0.187	0.083	22106	10631	30650	21483	6.10	12.5

平均値（n=4）

2.6.4.3.2　トキシコキネティクス：グリコピロニウム／ホルモテロール併用投与

2.6.4.3.2.1　ラット 14 日間吸入投与（試験 FY09-086）

ラットにグリコピロニウム／ホルモテロール併用で 14 日間吸入投与したときの低用量、中用量及び高用量群における 1 日平均用量（グリコピロニウム／ホルモテロールの用量）は雄ラットでそれぞれ 72/14、226/42 及び 368/69 μg/kg/日、雌ラットでそれぞれ 77/15、241/45 及び 394/73 μg/kg/日であった。なお、採血時点が少ないため（投与後 0.5、3 及び 24 時間）、t_{max} 及び C_{max} のみ評価した。

グリコピロニウム及びホルモテロールの t_{max} は、投与 1 日目及び 14 日目共に全ての用量群で投与後最初の測定時点（0.5 時間）であった。

投与 1 日目において、グリコピロニウムの C_{max} は低用量、中用量及び高用量群の雄ラットでそれぞれ 660、4393 及び 4525 pg/mL、雌ラットでそれぞれ 1390、5163 及び 3768 pg/mL であった。ホルモテロールの C_{max} は低用量、中用量及び高用量群の雄ラットでそれぞれ 503、3849 及び 2062 pg/mL、雌ラットでそれぞれ 531、3324 及び 2698 pg/mL であった。

投与 14 日目において、グリコピロニウムの C_{max} は低用量、中用量及び高用量群の雄ラットでそれぞれ 2025、3557 及び 7687 pg/mL、雌ラットでそれぞれ 1437、5137 及び 7098 pg/mL であった。ホルモテロールの C_{max} は低用量、中用量及び高用量群の雄ラットでそれぞれ 445、1625 及び 2437 pg/mL、雌ラットでそれぞれ 375、2433 及び 4507 pg/mL であった。

グリコピロニウム及びホルモテロール共に投与 1 日目の C_{max} は中用量群の方が高用量群より高い値を示したが、投与 14 日目の C_{max} は用量に依存して増加した。

2.6.4.3.2.2　イヌ 14 日間吸入投与（試験 FY09-087）

イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用で 14 日間吸入投与したときの 1 日平均用量及びグリコピロニウムの TK パラメータを表 4に、ホルモテロールの TK パラメータを表 5に示す。

グリコピロニウム及びホルモテロールの t_{max} は、投与 1 日目では概ね投与後最初の測定時点（0.016 時間）であり、投与後 14 日目では投与後 1 時間以内であった。

グリコピロニウム及びホルモテロール共に C_{max} 及び AUC_{last} は概ね用量に依存して増加した。投与 1 日目の雌の中用量から高用量にかけてのみ用量に依存しなかった。$t_{½}$は雌雄間及び用量間で同程度の値を示し、また投与 1 日目と 14 日目の値も同程度であった。投与 1 日目から 14 日目にかけての蓄積は $t_{½}$から予測される範囲内であった。

表 4　イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用で 14 日間吸入投与したときのグリコピロニウムの TK パラメータ

用量* (μg/kg/日)		採血日 (日)	t_{max} (h)		C_{max} (pg/mL)		AUC_{last} (pg·h/mL)		$t_{½}$ (h)	
雄	雌		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
17.0/3.3	17.3/3.4	1	0.016	0.016	788	533	1398	940	8.46	10.8
		14	0.137	0.137	1121	634	3377	1723	11.2	9.54
51.3/8.8	52.3/9.0	1	0.016	0.016	1500	4688	4344	6435	14.5	8.97
		14	0.629	0.016	4035	5852	9025	8664	12.3	7.38
73.8/12.5	75.4/12.8	1	0.016	0.016	5991	3894	5808	5845	7.61	7.09
		14	0.016	0.137	11553	11083	17046	13437	8.27	10.2

平均値（n=4）、* グリコピロニウム／ホルモテロールの用量

表 5　イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用で 14 日間吸入投与したときのホルモテロールの TK パラメータ

用量* (μg/kg/日)		採血日 (日)	t_{max} (h)		C_{max} (pg/mL)		AUC_{last} (pg·h/mL)		$t_{½}$ (h)	
雄	雌		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
17.0/3.3	17.3/3.4	1	0.262	0.016	191	95.0	768	496	8.06	10.1
		14	0.754	0.271	215	144	1434	782	8.16	8.04
51.3/8.8	52.3/9.0	1	0.016	0.016	374	746	1600	2120	5.97	7.27
		14	0.258	0.137	646	708	2212	2477	5.64	5.86
73.8/12.5	75.4/12.8	1	0.016	0.137	915	677	2309	2407	5.32	5.02
		14	0.016	0.137	1037	1141	3633	4155	5.68	5.54

平均値（n=4）、* グリコピロニウム／ホルモテロールの用量

2.6.4.3.2.3　イヌ 3 カ月間吸入投与（試験 FY10-129）

イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用、グリコピロニウム単独及びホルモテロール単独で 3 カ月間吸入投与した。1 日平均用量及びグリコピロニウムの TK パラメータを表 6に、ホルモテロールの TK パラメータを表 7に示す。

グリコピロニウムの t_{max} は、併用投与及びグリコピロニウム単独投与に関わらず、投与 1 日目、45 日目及び 90 日目のいずれも概ね投与後最初の測定時点（0.083 時間）であった。

併用投与時のグリコピロニウムの C_{max} 及び AUC_{last} はいずれの採血日でも数点を除いて概ね用量に依存して増加した。グリコピロニウムの $t_{½}$は 6.73～11.7 時間であった。同じ用量群・採血日における雄雌の AUC_{last} 比に一貫した傾向は認められなかった。いずれの用量でも投与 1 日目に比べて 45 日目及び 90 日目の方が高い AUC_{last} を示した。

併用及び単独投与時のグリコピロニウムの TK パラメータに顕著な違いは認められず、グリコピロニウムの TK パラメータにホルモテロール併用の影響はないと考えられた。

表 6　イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用又はグリコピロニウム単独で 3 カ月間吸入投与したときのグリコピロニウムの TK パラメータ

用量 (μg/kg/日)		採血日 (日)	t_{max} (h)		C_{max} (pg/mL)		AUC_{last} (pg·h/mL)		$t_{½}$ (h)	
雄	雌		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
グリコピロニウム／ホルモテロール併用*										
17.26/4.36	18.01/4.54	1	0.083	0.083	289	373	589	673	11.7	9.12
		45	0.083	0.083	2050	2310	2600	3050	8.82	10.0
		90	0.083	0.083	1910	1080	3780	2340	10.9	8.71
42.69/10.14	44.08/10.78	1	0.083	0.083	1020	2680	2530	3710	7.27	9.81
		45	0.187	0.083	2420	5810	8440	5340	10.0	10.1
		90	0.083	0.083	4020	11000	12200	9430	10.2	10.0
59.38/14.03	62.11/14.67	1	0.083	0.083	399	3440	1440	4690	9.43	8.18
		45	0.083	0.187	7740	4750	9600	11800	9.96	7.01
		90	0.083	0.083	3670	8330	10300	20200	8.49	6.73
グリコピロニウム単独										
85.10	89.23	1	0.083	0.083	2490	2690	5460	7550	7.94	6.68
		45	0.292	0.083	4900	8720	15500	15500	6.34	6.80
		90	0.187	0.083	5030	7950	11500	11300	6.40	8.45

平均値（n=4）、* グリコピロニウム／ホルモテロールの用量

併用投与時のホルモテロールの C_{max} 及び AUC はいずれの採血日でも数点を除いて概ね用量に依存して増加した。ホルモテロールの $t_{½}$は 5.53～11.1 時間であった。同じ用量群・採血日における雄雌の AUC_{last} 比に一貫した傾向は認められなかった。いずれの用量でも投与 1 日目に比べて 45 日目及び 90 日目の方が高い AUC_{last} を示した。

併用及び単独投与時のホルモテロールの TK パラメータに顕著な違いは認められず、ホルモテロールの TK パラメータにグリコピロニウム併用の影響はないと考えられた。

表 7　イヌにグリコピロニウム／ホルモテロール併用又はホルモテロール単独で 3 カ月間吸入投与したときのホルモテロールの TK パラメータ

用量 (μg/kg/日)		採血日 (日)	t_{max} (h)		C_{max} (pg/mL)		AUC_{last} (pg·h/mL)		$t_{½}$ (h)	
雄	雌		雄	雌	雄	雌	雄	雌	雄	雌
グリコピロニウム／ホルモテロール併用*										
17.26/4.36	18.01/4.54	1	0.083	0.187	116	137	443	527	11.1	10.9
		45	0.312	0.083	365	350	1260	1200	9.79	9.21
		90	0.083	0.083	434	253	1650	1020	7.81	8.41
42.69/10.14	44.08/10.78	1	0.083	0.187	433	800	1300	2160	8.39	6.06
		45	0.187	0.312	690	750	4070	2270	7.02	7.01
		90	0.187	0.187	765	1130	3440	2670	7.96	6.75
59.38/14.03	62.11/14.67	1	0.312	0.312	257	553	1300	2060	6.98	6.51
		45	0.083	0.292	1220	929	3960	3910	8.23	6.62
		90	0.083	0.083	747	2000	4610	4490	6.47	5.53
ホルモテロール単独										
4.36	4.53	1	0.083	0.292	144	163	464	526	11.5	10.3
		45	0.187	0.750	366	256	1080	1100	7.17	7.47
		90	0.312	0.396	408	269	1160	1050	7.22	7.33
10.18	10.46	1	0.083	0.083	314	437	963	1390	8.63	6.79
		45	0.292	0.187	445	383	2070	1450	6.50	5.78
		90	0.187	0.312	1180	807	2480	3510	5.56	5.28
14.05	14.51	1	0.083	0.083	410	495	1100	1480	8.01	6.19
		45	0.312	0.292	714	835	2860	2300	5.16	5.19
		90	0.083	0.312	938	738	3300	2440	4.85	5.50

平均値（n=4）、* グリコピロニウム／ホルモテロールの用量

2.6.4.4　分布

2.6.4.4.1　血漿蛋白結合：グリコピロニウム（試験 BS001265-58）

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血漿におけるグリコピロニウムの蛋白結合率を平衡透析法で測定した。検討濃度 0.2～500 nmol/L におけるグリコピロニウムの血漿蛋白への非結合率を表 8に示す。

ウサギ血漿では平衡透析法でのグリコピロニウム回収率は相対的に低かったため（約 50%）、限外ろ過法で再検討を行った（検討濃度 2、50 及び 500 nmol/L）。ウサギ血漿中でグリコピロニウムは安定でなかったことから、ウサギ血漿における蛋白結合率は平衡透析法より限外ろ過法による結果の方が正確と考えられ、ウサギでは限外ろ過法による結果のみ示した。

マウス、ラット、ウサギ、イヌ及びヒト血漿において、グリコピロニウムの非結合率は 2～500 nmol/L の範囲で濃度に依存しなかった。

表 8　　グリコピロニウムの血漿蛋白非結合率

グリコピロニウム濃度（nmol/L）	非結合率（%）				
	マウス	ラット	ウサギ[b]	イヌ	ヒト
0.2	NC[a]	NC[a]	ND	NC[a]	NC[a]
2	60.6 ± 4.36	78.5 ± 6.27	82.2 ± 5.09	66.0 ± 6.97	45.8 ± 9.57
50	64.9 ± 1.25	68.9 ± 4.99	78.1 ± 2.97	61.5 ± 3.59	52.2 ± 2.99
500	64.4 ± 4.47	70.0 ± 2.37	77.7 ± 3.81	62.3 ± 2.05	56.8 ± 0.370
2～500（平均）	63.3 ± 2.35	72.5 ± 5.24	79.3 ± 2.52	63.3 ± 2.41	51.6 ± 5.57

平均値±標準偏差（n=3）
NC：算出不能、ND：実施せず
a　グリコピロニウムの透析液中濃度が 3 回測定の全てで LLOQ（0.1 nmol/L）未満
b　限外ろ過法

2.6.4.4.2　ラットにおける定量的全身オートラジオグラフィー：グリコピロニウム（試験 8370562）

雌雄の白色ラットに[^{14}C]-グリコピロニウム 4 mg/kg を静脈内投与したとき、放射能は投与後 24 時間では脳及び眼等を除く大部分の組織で検出可能であったが、投与後 168 時間では肝臓以外の全組織で放射能は LLOQ 未満又は検出不能となった。投与後 24 時間で放射能濃度が高かった組織は、盲腸、褐色脂肪及び肝臓であった。投与後 24 時間の肝臓における放射能濃度は投与後 168 時間で約 1/10 に低下した。

雌雄の白色ラットに[^{14}C]-グリコピロニウム 30 mg/kg を経口投与したとき、放射能が分布する組織は限られていた。投与後 24 時間で放射能検出可能な組織は僅かであり、投与後 168 時間では全組織で放射能は LLOQ 未満又は検出不能となった。投与後 24 時間で放射能濃度が高かった組織は、高い順に盲腸、食道、腎臓、大腸、肝臓、脳下垂体、小腸及び胃であった。

雄の有色ラットに[^{14}C]-グリコピロニウム 4 mg/kg を静脈内投与したとき、放射能は大部分の組織で投与後 0.25 時間に最高濃度を示し、投与後 4 時間まで検出可能であった。ブドウ膜、褐色脂肪及び肝臓を除く全組織で投与後 168 時間以内に放射能は LLOQ 未満又は検出不能となった。大部分の組織は投与後 0.25 時間に最高濃度を示し、肝臓、腎臓、小腸の順に高かった。ブドウ膜及び有色皮膚における放射能濃度は投与後 0.25 時間が最も高かった。

雄の有色ラットに[^{14}C]-グリコピロニウム 30 mg/kg を経口投与したとき、放射能が分布する組織は限られていた。概して投与後 1 時間以内に最高濃度に達し、肝臓を除く全組織の放射能濃度は投与後 72 時間までに LLOQ 未満となった。肝臓、胃、小腸、食道、腎臓及び盲腸の放射能濃度が高かった。ブドウ膜及び有色皮膚の放射能は検出不能であった。最も長い半減期は肝臓で算出された。静脈内及び経口投与後の放射能の組織分布は同様であったが、組織中放射能濃度は経口投与後の方が低かった。

静脈内及び経口投与後の眼球の放射能濃度（液体シンチレーションカウンターで測定）は、有色ラットの方が白色ラットより高かった。また QWBA による測定で、ブドウ膜及び有色皮膚の放射能濃度はそれぞれ静脈内投与後 168 時間及び 72 時間まで測定可能であり、長い半減期を示した。したがって、メラニン含有組織への放射能の限定的な結合が示された。

2.6.4.5 代謝

2.6.4.5.1 *In vitro* 代謝：グリコピロニウム（試験 BE001294-70）

ヒト、ラット、イヌ、マウス及びウサギの肝細胞、並びにヒト、ラット及びイヌの肺ミクロソームと[^{14}C]-グリコピロニウムをインキュベーションし、グリコピロニウムの代謝物組成について検討した。

肝細胞と[^{14}C]-グリコピロニウムのインキュベーション 240 分後、未変化体分画はヒト 94.3%、イヌ 94.6%、ラット 6.1%、マウス 49.8%及びウサギ 9.7%であった。未変化体及び生成した各代謝物の放射能比を表 9に示す。

多くの動物種でグリコピロニウムの主代謝物は一水酸化体（M1～M3）及び二水酸化体（M4、M6）、並びに不飽和化を伴う一水酸化体（M13）であった。主代謝部位は芳香環及びシクロペンタン環であった。ヒト、ラット及びイヌの肺ミクロソームで[^{14}C]-グリコピロニウムは代謝されなかった。

表 9　ヒト及び各種動物の肝細胞と[^{14}C]-グリコピロニウムを 240 分インキュベーション後の未変化体及び代謝物組成

代謝物	保持時間（分）	総放射能に対する%				
		ヒト	イヌ	ラット	マウス	ウサギ
未変化体	11.5	94.3	94.6	6.1	49.8	9.7
M1/M9/M10[a]	4.4	NQ/ND/NQ	NQ/ND/NQ	11.2[b]	2.4/NQ/ND	9.8/ND/NQ
M2/M12[a]	5.6	2.1/ND	2.4/ND	25.5[b]	12.0[b]	43.6/NQ
M3/M13[a]	6.8	NQ/ND	1.6/NQ	36.7/ND	30.0[b]	24.4[b]
M4/M5/M6[a]	3.1	ND/ND/ND	ND/ND/ND	11.1[b]	1.0[b]	NQ/ND/NQ
M7	3.5	ND	ND	1.8	1.0	NQ
M8	3.8	ND	ND	1.9	ND	ND
M11	5.1	NQ	ND	2.2	1.6	NQ
M14	8.0	ND	ND	ND	ND	2.3
M15	13.1	ND	ND	ND	NQ	6.7
合計		96.4	98.6	96.6	97.9	96.4

ND：検出不能（総放射能量の 1%未満で、質量分析計でも確認できず）
NQ：定量不能（放射能は検出限界未満であったが、質量分析計では確認可能）
a　共溶出
b　共溶出した代謝物の割合特定できず

2.6.4.5.2 代謝酵素：グリコピロニウム（試験 BS001884-09）

ヒト CYP 発現系を用い、グリコピロニウムの代謝に関与する CYP 分子種（CYP1A2、2A6、2B6、2C8、2C9、2C19、2D6、2E1、3A4 及び 3A5）について検討した。グリコピロニウム（2 μmol/L）と各 CYP 分子種を 30 分間インキュベーションし、反応液中のグリコピロニウム残量を測定した。

グリコピロニウムの代謝に関与する主な CYP 分子種は CYP2D6 であり、僅かに CYP2A6、2C9、2E1、3A4 及び 3A5 も関与した。CYP1A2、2B6、2C8 及び 2C19 によるグリコピロニウムの代謝は認められなかった。

ヒト CYP 発現系を用いて算出したグリコピロニウムの固有クリアランス（CL_{int}）を CYP 分子種毎に表 10に要約する。

表 10　グリコピロニウムの各 CYP 分子種における固有クリアランス（CL_{int}）

分子種	CL_{int} (μL/min/pmol CYP protein)
CYP1A2	NC
CYP2A6 [a]	0.00692 ± 0.0120
CYP2B6	NC
CYP2C8	NC
CYP2C9 [a]	0.00519 ± 0.00898
CYP2C19	NC
CYP2D6	0.990 ± 0.0121
CYP2E1 [a]	0.00315 ± 0.00545
CYP3A4	0.0557 ± 0.00248
CYP3A5 [a]	0.00567 ± 0.00983

平均値±標準偏差（n=3）
NC：CL_{int} 値算出不能（有意な代謝が観察されず[T 検定]、最終測定時点で未変化体が 80%以上）
a　代謝が認められたのは 3 回の検討中 1 回のみ。他の 2 回では十分な代謝が認められず（有意な代謝が観察されず[T 検定]、最終測定時点で未変化体が 80%以上）、この 2 回の CL_{int} 値をゼロとして平均値算出。

2.6.4.5.3　*In vivo* 代謝：グリコピロニウム（試験 BE002211-07）

QWBA 試験の中で採取した尿及び血漿試料を用いて代謝物の検討を行った。すなわち、ラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを単回静脈内及び経口投与後の尿中及び血漿中代謝物を検討した（投与量：静脈内 4 mg/kg、経口 30 mg/kg）。分析には投与後 24 時間までのプール尿及び投与後 8 時間までのプール血漿を用いた。

計 19 種類の代謝物が検出され（M1～M8、M11～M13 及び M15～M22）、17 種類の構造を質量分析により同定した（M16 及び M20 は未同定）。ラット尿中及び血漿中代謝物より推定した代謝経路を図 1に示す。

表 11にラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを単回静脈内及び経口投与後の尿中代謝物組成を示す。静脈内投与後の尿中放射能は主に未変化体であった（投与放射能の 31%）。経口投与後の尿中放射能は M21 及び M22（いずれもグリコピロニウムの加水分解で生じたカルボン酸体[M15]のグルクロン酸抱合体）が主であった（投与放射能の約 1%）。

表 12に雄ラットに[^{14}C]-グリコピロニウムを単回静脈内及び経口投与後の血漿中代謝物組成を示す。静脈内投与後の血漿中放射能は主に未変化体であった（プール血漿中放射能量［time proportional 0-8 h AUC pool］の 36%）。経口投与後の血漿中放射能は M15 が主であった（同じく 40%）。

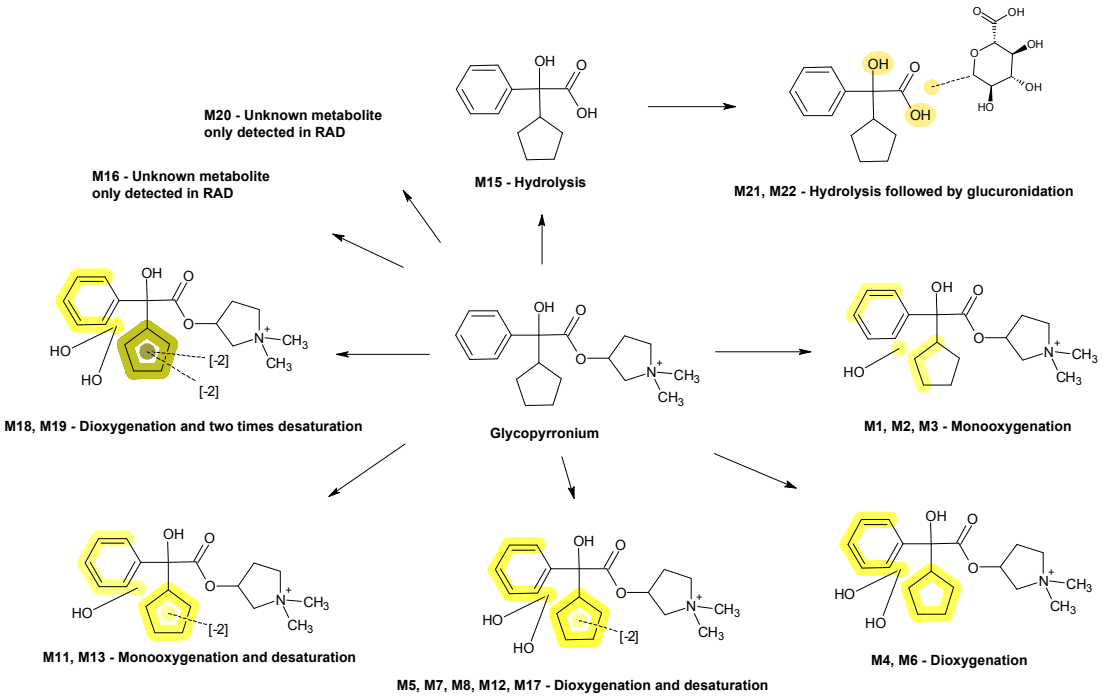


図 1　　グリコピロニウムの推定代謝経路（ラット血漿及び尿中代謝物より推定）

表 11　　ラットに[^{14}C]-グリコピロニウム単回静脈内及び経口投与後の尿中代謝物組成（投与後 0～24 時間のプール尿を分析）

代謝物番号	投与放射能に対する%			
	静脈内投与		経口投与	
	雄	雌	雄	雌
M16	2.5	1.4	1.2	1.0
M4/M5/M6[a]	2.0	2.2	-	-
M7	3.2	3.6	0.5	0.3
M8/M17/M18[a]	4.9	1.5	0.4	0.3
M1	1.5	1.6	-	-
M19	-	-	-	-
M11	-	-	-	-
M2/M12[a]	3.7	2.3	-	-
M20	-	-	-	-
M3/M13[a]	3.0	3.4	-	-
グリコピロニウム（未変化体）	31	31	-	-
M21/M22[a]	-	-	0.7	1.2
M15	-	-	0.1	0.2
計	52.0	47.0	2.9	3.0
尿中放射能排泄率（0～24 時間）[b]	65	57	8.0	5.9

a　共溶出した代謝物
b　尿及びケージ洗浄液の合計

表 12　ラットに[^{14}C]-グリコピロニウム単回静脈内及び経口投与後の血漿中代謝物組成（投与後 0～8 時間のプール血漿を分析）

代謝物番号	プール血漿中放射能量[c]に対する%	
	静脈内投与	経口投与
M16	14.5	5.6
M4/M5/M6[a]	5.2[b]	NQ/NQ/NQ
M7	2.6	NQ
M8/M17/M18[a]	2.8[b]	ND/NQ/ND
M1	2.6	ND
M19	3.1	ND
M11	4.7	ND
M2/M12[a]	4.9[b]	ND
M20	1.7	ND
M3/M13[a]	5.2[b]	ND/NQ
グリコピロニウム（未変化体）	36.3	3.6
M21/M22[a]	ND/ND	ND
M15	4.9	40.4
計	88.4	49.6

ND：検出不能（放射能が検出限界未満で、質量分析計でも確認できず）
NQ：定量不能（放射能は検出限界未満であったが、質量分析計では確認可能）
a　共溶出した代謝物
b　共溶出した代謝物の割合不明
c　time proportional 0-8 h AUC pool（ハミルトンプール法により採血時点に応じてプール血漿容量を調整）

2.6.4.6　排泄

[^{14}C]-グリコピロニウムを雌雄白色ラットに静脈内（4 mg/kg）及び経口（30 mg/kg）投与し、尿中放射能排泄率を投与後 48 時間まで測定した（QWBA 試験の中で評価）。

投与後 48 時間までの尿中放射能排泄率は静脈内投与後で投与放射能の約 60%、経口投与後ではこれより低く投与放射能の約 7.5%であり、いずれの投与経路でも大部分が投与後 24 時間以内に排泄された。尿中放射能排泄率に性差は認められなかった。

2.6.4.7　薬物動態学的薬物相互作用

2.6.4.7.1　グリコピロニウムによる相互作用

慢性閉塞性肺疾患（COPD）患者に本剤 14.4/9.6 µg（グリコピロニウム 14.4 µg／ホルモテロール 9.6 µg）1 日 2 回反復吸入投与したとき、定常状態におけるグリコピロニウムの C_{max} は約 30 pg/mL であった（臨床薬理試験 2.7.2 の表 35 参照）。そのため *in vitro* の結果に基づき臨床に

おける相互作用を評価する際の血漿中濃度は 0.3 nmol/L（約 90 pg/mL 相当）とした。また、消化管内の最高濃度（$[I]_g$）及び門脈血漿中最高濃度（$[I]_{inlet,max}$）は、投与量が全て嚥下されたと仮定し、それぞれ 200 nmol/L 及び 3 nmol/L とした。

2.6.4.7.1.1 グリコピロニウムによる CYP 阻害（試験 BS001884-07、BS001884-08、BS002367-13）

ヒト肝ミクロソーム（HLM）とグリコピロニウム（0.1～30 μmol/L）を各 CYP 分子種の典型基質及び NADPH の存在下でインキュベーションし、グリコピロニウムの可逆的 CYP 阻害作用を検討した。各 CYP 典型基質の代謝物生成速度を K_m 値に相当する基質濃度で測定した。

最初の試験（BS001884-07）では、CYP1A2、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 の阻害を次の典型基質を用いて評価した：ファナセチン（1A2）、ジクロフェナック（2C9）、*S*-メフェニトイン（2C19）、ブフラロール（2D6）及びミダゾラム（3A4/5）。グリコピロニウムは検討濃度範囲（0.1～30 μmol/L）で CYP1A2、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 を阻害しなかった。

次の試験（BS001884-08）では、CYP2A6、2B6、2C8、2E1 及び 3A4/5 の阻害を次の典型基質を用いて評価した：クマリン（2A6）、ブプロピオン（2B6）、アモジアキン（2C8）、クロルゾキサゾン（2E1）及びニフェジピン（3A4/5）。グリコピロニウムは検討濃度範囲（0.1～30 μmol/L）で CYP2A6、2B6、2C8、2E1 及び 3A4/5 を阻害しなかった。

また、HLM を用い、グリコピロニウム 2 濃度（0.1 及び 1 μmol/L）で CYP1A2、2C9、2C19、2D6 及び 3A4/5 に対する時間依存的阻害作用を検討した（BS002367-13）。グリコピロニウムは CYP に対して時間依存的阻害作用を示さなかった。

以上の結果より、グリコピロニウムは臨床的に意味のある CYP 阻害作用を示さないと考えられた。

2.6.4.7.1.2 グリコピロニウムによる CYP 誘導（試験 CYP0750_R45）

グリコピロニウムによる CYP1A2、2B6 及び 3A4 誘導作用を検討した。ヒト肝細胞とグリコピロニウム（0.206～50 nmol/L）を 48 時間インキュベーションし、CYP1A2、2B6 及び 3A4 の mRNA 発現量を測定した。また各 CYP 分子種に特異的な酵素活性を測定した：1A2（ファナセチン *O*-脱エチル化）、2B6（ブプロピオン水酸化）、3A4（ミダゾラム 1 位水酸化）。

グリコピロニウムによる CYP1A2、2B6 及び 3A4 の mRNA 発現量並びに酵素活性に誘導作用は認められなかった。

2.6.4.7.1.3 トランスポーター

2.6.4.7.1.3.1 グリコピロニウムによるトランスポーター阻害（試験 BS001265-56、BS001265-54、BS001265-55、16AZTrP2R2）

<u>肝取り込みトランスポーターの阻害</u>

グリコピロニウムによる OATP1B1 の阻害作用を濃度 0.3～100 μmol/L で評価した（試験 BS001265-56）。OATP1B1 に対する阻害率は最高濃度（100 μmol/L）でも 50%未満であった。

また OATP1B3 及び OCT1 に対する阻害作用を濃度 0.3～100 μmol/L で評価した（試験 16AZTrP2R2）。OATP1B3 に対する阻害作用は認められず、OCT1 に対する阻害率は最高濃度（100 μmol/L）でも 50%未満であった。

グリコピロニウムは *in vitro* で OATP1B1 及び OCT1 を阻害したが、$[I]_{inlet,max}$（3 nmol/L）との比較から、臨床では OATP1B1 及び OCT1 阻害により相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

表 13　グリコピロニウムによる肝取り込みトランスポーターの阻害（IC_{50}）

トランスポーター	試験系	基質	最大阻害率（%）（濃度）	IC_{50} (μmol/L)	$[I]_{inlet,max}/IC_{50}$ [a]	R [a]
OATP1B1	HEK293-OATP1B1	ｴｽﾄﾗｼﾞｵｰﾙ 17βｸﾞﾙｸﾛﾆﾄﾞ	37.9 (100 μmol/L)	>100	$<3 \times 10^{-5}$	<1.1
OATP1B3	HEK293-OATP1B3	ｱﾄﾙﾊﾞｽﾀﾁﾝ	10.7 (10 μmol/L)	NI	NC	NC
OCT1	HEK293-OCT1	MPP^+	45.9 (100 μmol/L)	>100	$<3 \times 10^{-5}$	<1.1

NI：阻害せず、NC：算出不能

a　$R = 1 + f_{u,b} \times [I]_{inlet,max}/K_i$ の算出式で R 値<1.1 の場合、薬物相互作用リスクは低い（MHLW 2018）
$IC_{50} = K_i$、$[I]_{inlet,max}$ = 3 nmol/L、fu,b = 51.6%と仮定

<u>腎取り込みトランスポーターの阻害</u>

グリコピロニウムによるヒト腎トランスポーターOCT2、OAT1、OAT3、MATE1 及び MATE2-K の阻害作用を濃度 0.3～100 μmol/L で評価した（試験 16AZTrP2R2）。

OAT1 及び OAT3 に対する阻害作用は認められなかった。

OCT2 及び MATE1 に対する阻害率は、いずれも最高濃度（100 μmol/L）で約 60%であった。

MATE2-K に対する阻害作用は濃度依存的であったが、最高濃度（100 μmol/L）でも阻害率は 50%未満であった。

グリコピロニウムの臨床用量における非結合形 C_{max} と比較し、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の阻害濃度は十分に高いことから、これらトランスポーター阻害により相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

表 14　グリコピロニウムによる腎取り込みトランスポーターの阻害（IC_{50}）

トランスポーター	試験系	基質	最大阻害率 (%)（濃度）	IC_{50} (μmol/L)	非結合形 C_{max}/IC_{50} [a]	R [a]
OCT2	HEK293-OCT2	メトホルミン	56.3 (100 μmol/L)	ND [b]	NC	NC
OAT1	HEK293-OAT1	PAH	22.8 (0.3 μmol/L)	NI	NC	NC
OAT3	HEK293-OAT3	フロセミド	13.9 (30 μmol/L)	NI	NC	NC
MATE1	HEK293-MATE1	メトホルミン	59.9 (100 μmol/L)	ND [c]	NC	NC
MATE2-K	HEK293-MATE2-K	メトホルミン	33.5 (100 μmol/L)	>100	$<1.5 \times 10^{-6}$	<1.02

ND：算出せず、NI：阻害せず、NC：算出不能

a　R =1+非結合形 C_{max}/IC_{50} の算出式で R 値<1.1（OCT2、OAT1、OAT3）、<1.02（MATE1、MATE2-K）の場合、薬物相互作用リスクは低い（MHLW 2018）、$IC_{50} = K_i$、非結合形 C_{max} を 0.15 nmol/L と仮定（臨床での C_{max} 0.3 nmol/L、ヒト血漿蛋白非結合率 51.6%より算出）

b　グリコピロニウム高濃度（30 及び 100 μmol/L）では濃度依存的阻害であったが、低濃度（0.3～10 μmol/L）では見かけ上活性化したため（コントロールの 100%超）、IC_{50} 値を算出できなかった。

c　低濃度（0.3～10 μmol/L）では濃度依存的阻害であったが、30 μmol/L の阻害率は低濃度より低く、100 μmol/L で最も高い阻害率を示したため IC_{50} 値を算出できなかった。

<u>排出トランスポーター阻害</u>

グリコピロニウムによるヒト排出トランスポーターP-gp（MDR1 又は *ABCB1*）及び BCRP（*ABCG2*）の阻害作用を濃度 1～300 μmol/L で評価した（試験 BS001265-54 及び BS001265-55）。

ジゴキシン（P-gp 典型基質）の見かけの透過係数（P_{app}）値は、グリコピロニウム非存在下で 10.9±0.0983 cm/s ($\times 10^{-6}$)、グリコピロニウム検討最高濃度 300 μmol/L で 9.56±0.607 cm/s ($\times 10^{-6}$) であり、グリコピロニウムは P-gp を阻害しなかった。

ロスバスタチン（BCRP 典型基質）の P_{app} 値は、グリコピロニウム非存在下で 15.1±0.948 cm/s ($\times 10^{-6}$)、グリコピロニウム検討最高濃度 300 μmol/L で 15.9±0.290 cm/s ($\times 10^{-6}$)であり、グリコピロニウムは BCRP を阻害しなかった。

したがって、グリコピロニウムの P-gp 及び BCRP 阻害により相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

2.6.4.7.1.3.2　グリコピロニウムがトランスポーターの基質となる可能性（試験 16AZTrP2R2、BS000901-62）

<u>取り込みトランスポーター</u>

グリコピロニウムが取り込みトランスポーターOAT1、OAT3、OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の基質となる可能性について検討した（試験 16AZTrP2R2）。各トランスポーターを発現させた HEK293 細胞及び非発現細胞におけるグリコピロニウムの取り込みを濃度 0.1～100 μmol/L で評価した。各トランスポーター発現及び非発現細胞における取り込み比が 2 より大きい場合、既知のトランスポーター阻害剤によるグリコピロニウムの取り込み阻害を確認した。

OAT1 及び OAT3 に関する取り込み比は 2.0 より小さく、グリコピロニウムは OAT1 及び OAT3 の基質ではないと考えられた。

OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K に関する取り込み比は 2.0 より大きく、いずれも既知の阻害剤による顕著な取り込み阻害が確認された。したがって、グリコピロニウムは OCT1、OCT2、MATE1 及び MATE2-K の基質と考えられた。

排出トランスポーター

グリコピロニウムが排出トランスポーターP-gp 及び BCRP の基質となる可能性について検討した（試験 16AZTrP2R2）。P-gp 又は BCRP を発現させた MDCK 細胞及び非発現細胞でグリコピロニウムの頂端膜側（A）から基底膜側（B）への P_{app}[A-B]、及び反対方向（B から A）の P_{app}[B-A]を濃度 0.1～100 μmol/L で評価し、P_{app}[A-B]と P_{app}[B-A]の比から efflux ratio（＝P_{app}[B-A]/ P_{app}[A-B]）を算出した。

濃度 0.1 μmol/L では、いずれの細胞系（MDR1-MDCK 細胞、BCRP-MDCK 細胞及び非発現細胞）でもグリコピロニウムは LLOQ（0.25 nmol/L）未満のため P_{app} を評価できなかった。また、濃度 1 μmol/L では非発現細胞系で LLOQ 未満であり、非発現細胞に対する MDR1-MDCK 細胞及び BCRP-MDCK 細胞の efflux ratio の相対比を算出できなかった。濃度 10 及び 100 μmol/L では、非発現細胞に対する MDR1-MDCK 細胞及び BCRP-MDCK 細胞の efflux ratio の相対比はいずれも 2.0 より小さく、グリコピロニウムは P-gp 及び BCRP の基質ではないと考えられた。

ヒト肝細胞取り込み

ヒト肝細胞を用いてグリコピロニウムが肝取り込みトランスポーターOATP1B1/1B3 の基質となる可能性について検討した（試験 BS000901-62）。

ヒト肝細胞とグリコピロニウムを OATP 阻害剤（リファマイシン SV）の存在下／非存在下でインキュベーションした。リファマイシン SV 存在下でグリコピロニウムのヒト肝細胞への取り込みは 26%低下した。これより、グリコピロニウムは肝取り込みトランスポーターOATP1B1/1B3 の弱い基質であることが示唆された。

2.6.4.8 その他の薬物動態試験

その他の試験は実施していない。

2.6.4.9 考察及び結論

イヌにホルモテロール及びグリコピロニウムをそれぞれ単独並びに併用吸入投与し、TK パラメータを評価した。ホルモテロール及びグリコピロニウムのいずれの TK パラメータにも併用による明らかな影響は認められなかった。図 2にホルモテロール及びグリコピロニウムを単独並びに併用で反復吸入投与したときの定常状態における AUC を示す。単独及び併用投与間でホルモテロール及びグリコピロニウムの AUC に明らかな違いは認められなかった。また、単独及び併用投与間でホルモテロール及びグリコピロニウムの反復投与後の $t_{½}$に明らかな違いは認められなかった（ホルモテロール：単独 4.85～7.33 時間［表 7］、併用 5.54～8.16 時間［表 5］及び 5.53～8.41 時間［表 7］、グリコピロニウム：単独 6.10～12.5 時間［表 3］、併用 7.38～12.3 時間

［表 4］及び 6.73～10.9 時間［表 6］）。したがって、イヌにおけるホルモテロール及びグリコピロニウムの曝露量及び消失動態に併用による影響はないと考えられた。

ホルモテロール及びグリコピロニウムの *in vitro* におけるヒト血漿蛋白結合率はいずれも約50%と高くなかった。ホルモテロール及びグリコピロニウムの主代謝経路は異なり、ホルモテロールはグルクロン酸抱合化、グリコピロニウムは CYP2D6 による代謝である。また、ホルモテロールは尿中及び糞中の両経路から排泄されるが、グリコピロニウムの主排泄経路は尿中である。したがって、ホルモテロール及びグリコピロニウムの代謝・排泄経路は同じではないことから、併用により相互作用が生じる可能性は低いと考えられた。

以上より、ホルモテロール及びグリコピロニウム併用吸入投与時の曝露量及び消失動態は、単独吸入投与時と同様と考えられた。

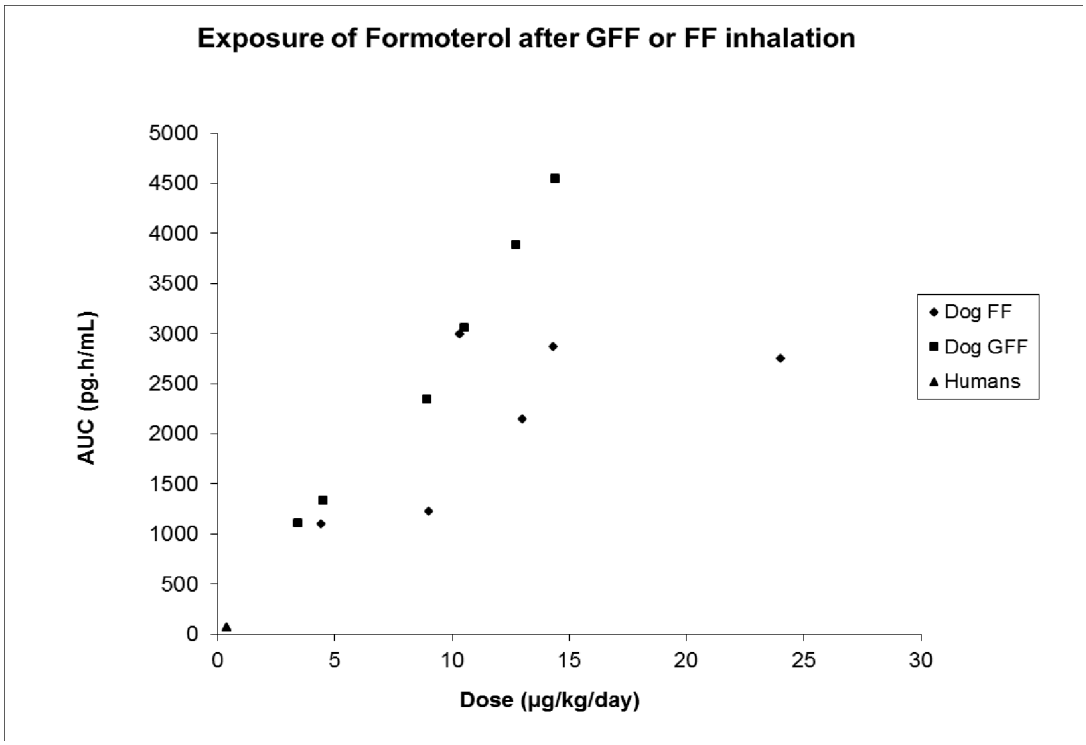


図 2　　イヌにホルモテロール及びグリコピロニウムをそれぞれ単独並びに併用で反復吸入投与したときの定常状態におけるホルモテロール（上）及びグリコピロニウム（下）の AUC

FF：ホルモテロール単独、GP：グリコピロニウム単独、GFF：グリコピロニウム／ホルモテロール併用
毒性試験概要表 2.6.7.3 項より引用

2.6.4.10 参考文献

Kaltiala et al 1974

Kaltiala E, Penttilä A, Vapaatalo H, Larmi T. The fate of intravenous [^{3}H] glycopyrrolate in man. J. Pharm. Pharmac. 1974 May; 26(5):352-4

MHLW 2018

医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン 2018

2.6.5　薬物動態試験概要表

PT003

本資料に記載された情報に係る権利はアストラゼネカ株式会社に帰属します。弊社の事前の承諾なく本資料の内容を他に開示することは禁じられています。

目次　　頁

目次 2
2.6.5.1　薬物動態試験：一覧表 4
2.6.5.1.1　薬物動態試験：グリコピロニウム 4
2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験 5
2.6.5.3　薬物動態試験：単回投与後の吸収 5
2.6.5.4　薬物動態試験：反復投与後の吸収 5
2.6.5.5　薬物動態試験：分布 6
2.6.5.5.1　定量的全身オートラジオグラフィー：グリコピロニウム 6
2.6.5.6　薬物動態試験：蛋白結合 17
2.6.5.6.1　*In vitro* 蛋白結合：グリコピロニウム 17
2.6.5.7　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験 19
2.6.5.8　薬物動態試験：その他の分布試験 19
2.6.5.9　薬物動態試験：代謝：*In Vivo* 20
2.6.5.9.1　ラット尿中及び血漿中代謝物組成：グリコピロニウム 20
2.6.5.10　薬物動態試験：代謝：*In Vitro* 24
2.6.5.10.1　肝細胞及び肺ミクロソームにおける *in vitro* 代謝：グリコピロニウム 24
2.6.5.11　薬物動態試験：推定代謝経路 29
2.6.5.12　薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害 30
2.6.5.12.1　ヒト肝細胞における CYP 誘導（CYP1A2、2B6、3A4）：グリコピロニウム 30
2.6.5.12.2　CYP 発現系における代謝：グリコピロニウム 33
2.6.5.12.3　CYP 阻害（CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4/5）：グリコピロニウム 35
2.6.5.12.4　CYP 阻害（CYP2A6、2B6、2C8、2E1、3A4/5）：グリコピロニウム 37
2.6.5.12.5　時間依存的 CYP 阻害：グリコピロニウム 39
2.6.5.13　薬物動態試験：排泄 41
2.6.5.14　薬物動態試験：胆汁中排泄 41
2.6.5.15　薬物動態試験：薬物相互作用 42

2.6.5.15.1　ヒト肝取り込みトランスポーターOATP1B1 の阻害：グリコピロニウム 42
2.6.5.15.2　ヒト排出トランスポーターP-糖蛋白（MDR1）の阻害：グリコピロニウム 44
2.6.5.15.3　ヒト排出トランスポーターBCRP の阻害：グリコピロニウム 45
2.6.5.15.4　トランスポーター阻害及び基質の可能性：グリコピロニウム 46
2.6.5.15.5　ヒト肝細胞における能動輸送：グリコピロニウム 48
2.6.5.16　薬物動態試験：その他 50

2.6.5.1 薬物動態試験：一覧表

2.6.5.1.1 薬物動態試験：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

Type of Study/Description	GLP	Test System	Testing Facility	Study Number	Location in Module 4/5
Absorption	No studies were conducted.				
Distribution					
Plasma protein binding	No	*In vitro*	[redacted]	BS001265-58	5.3.2.1.1
Quantitative whole body autoradiography	No	*Rat*	[redacted]	8370562	4.2.2.3.1
Metabolism					
In vitro metabolism in hepatocytes and lung microsomes	No	*In vitro*	AstraZeneca	BE001294-70	5.3.2.2.1
In vitro metabolism in expressed human CYPs	No	*In vitro*	[redacted]	BS001884-09	5.3.2.2.2
In vivo metabolism	No	*Rat*	AstraZeneca	BE002211-07	4.2.2.4.1
Drug-drug interaction					
In vitro CYP inhibition	No	*In vitro*	[redacted]	BS001884-07	5.3.2.2.3
In vitro CYP inhibition	No	*In vitro*	[redacted]	BS001884-08	5.3.2.2.4
In vitro CYP inhibition	No	*In vitro*	[redacted]	BS002367-13	5.3.2.2.6
In vitro CYP induction	No	*In vitro*	[redacted]	CYP0750_R45	5.3.2.2.5
In vitro human transporter inhibition and substrate assessment	No	*In vitro*	[redacted]	16AZTrP2R2	5.3.2.3.1
In vitro P-glycoprotein inhibition	No	*In vitro*	[redacted]	BS001265-54	5.3.2.3.3
In vitro BCRP inhibition	No	*In vitro*	[redacted]	BS001265-55	5.3.2.3.4
In vitro OATP1 inhibition	No	*In vitro*	[redacted]	BS001265-56	5.3.2.3.5
In vitro hepatic uptake	No	*In vitro*	AstraZeneca	BS000901-62	5.3.2.3.2
Excretion	No formal studies were conducted (excretion in urine [0-48 h] was investigated in QWBA study).				

2.6.5.2　分析方法及びバリデーション試験

該当なし

2.6.5.3　薬物動態試験：単回投与後の吸収

該当なし

2.6.5.4　薬物動態試験：反復投与後の吸収

該当なし

2.6.5.5　薬物動態試験：分布

2.6.5.5.1　定量的全身オートラジオグラフィー：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：8370562

Species:	Rat
Gender (M/F) / Number of animals:	Group 2: Wistar Hanover 2M & 2F (IV) for QWBA and excretion in urine Group 3: Long Evans 6M (IV) for QWBA Group 5: Wistar Hanover 2M & 2F (PO) for QWBA and excretion in urine Group 6: Long Evans 6M (PO) for QWBA Group 1 (Wistar Hanover, 4M, IV) and Group 4 (Wistar Hanover, 4M, PO) were used for blood collection to evaluate PK parameters from total radioactivity in plasma (see additional information). Plasma and urine samples from Group 1, 2, 4 and 5 were also used for investigation of *in vivo* metabolism (see section 2.6.5.9).
Feeding condition:	IV: fed, PO: fasted
Vehicle/Formulation:	5% glucose in sterile water
Method of Administration:	IV: bolus via tail vein, PO: gavage
Duration of treatment:	Single dose
Dose (mg/kg):	IV: 4, PO: 30
Radionuclide:	^{14}C
Dose radioactivity (μCi/kg):	100
Study type:	QWBA
Analytical method:	Image analysis
Sampling time (T):	Wistar Hanover: 24 and 168 hours, Long Evans: 0.25, 1, 4, 24, 72 and 168 hours for QWBA

	Concentration (ng Equivalents/g)			
	Male		Female	
Tissue	24 h	168 h	24 h	168 h
IV to Wistar Hanover				
Adrenal gland(s)	418[a]	ND	633	ND
Arterial wall	ND	ND	ND	ND
Bile	ND	ND	ND	ND
Blood	BLQ	ND	BLQ	ND
Bone	ND	ND	ND	ND
Bone marrow	BLQ	ND	BLQ	ND
Brain cerebellum	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	ND	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	169	ND	NA	NA
Cecum	1540	ND	7230	ND
Diaphragm	60.7	ND	93.1	ND
Epididymis	65.0	ND	NA	NA
Epiphyseal line	ND	ND	ND	ND
Esophagus	102	ND	92.7	ND
Exorbital lacrimal gland	197	ND	219	ND
Eye lens	ND	ND	ND	ND
Eye uveal tract	ND	ND	ND	ND
Eye(s)	ND	ND	ND	ND
Fat (abdominal)	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	531	ND	933	ND
Harderian gland	126	ND	70.5	ND
Intra-orbital lacrimal gland	93.9	ND	95.2	ND
Kidney cortex	305	BLQ	373	ND
Kidney medulla	490	BLQ	383	ND
Kidney(s)	385	BLQ	378	ND
Large intestine	272	ND	444	ND

Liver	1530	151	977	60.3
Lung(s)	70.4	ND	87.0	ND
Lymph node(s)	BLQ	ND	64.1	ND
Muscle	ND	ND	BLQ	ND
Myocardium	74.4	ND	83.0	ND
Nasal turbinates	182	ND	122	ND
Ovary(ies)	NA	NA	BLQ[a]	ND
Pancreas	239	ND	229	ND
Pituitary gland	138	ND	108	BLQ
Preputial gland	NR	ND	300[a]	ND
Prostate gland	76.9	ND	NA	NA
Salivary gland(s)	249	ND	236	ND
Seminal vesicle(s)	78.3[a]	ND	NA	NA
Skin (nonpigmented)	BLQ	ND	BLQ	ND
Small intestine	54.7	ND	130	ND
Spinal cord	ND	ND	ND	ND
Spleen	BLQ	ND	ND	ND
Stomach	146	ND	185	ND
Testis(es)	BLQ	ND	NA	NA
Thymus	46.9	ND	BLQ	ND
Thyroid	292	ND	309	ND
Urinary bladder	138	ND	46.6	ND
Urine	2370	ND	473	ND
Uterus	NA	NA	BLQ	ND

BLQ	Below the limit of quantitation (<42.8 ng equivalents/g)
NA	Not applicable
ND	Not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue)
NR	Not represented (tissue not present in section)
a	Tissue appeared to be fat soaked

	Concentration (ng Equivalents/g)			
	Male		Female	
Tissue	24 h	168 h	24 h	168 h
PO to Wistar Hanover				
Adrenal gland(s)	BLQ[a]	ND	BLQ	ND
Arterial wall	ND	ND	ND	ND
Bile	ND	ND	ND	ND
Blood	362	ND	BLQ	ND
Bone	ND	ND	ND	ND
Bone marrow	ND	ND	ND	ND
Brain cerebellum	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	ND	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	ND	ND	NA	NA
Cecum	1570	ND	1760	ND
Diaphragm	ND	ND	ND	ND
Epididymis	ND	ND	NA	NA
Epiphyseal line	ND	ND	ND	ND
Esophagus	935	ND	ND	ND
Exorbital lacrimal gland	ND	ND	ND	ND
Eye lens	ND	ND	ND	ND
Eye uveal tract	ND	ND	ND	ND
Eye(s)	ND	ND	ND	ND
Fat (abdominal)	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	ND	ND	ND	ND
Harderian gland	ND	ND	ND	ND
Intra-orbital lacrimal gland	ND	ND	ND	ND
Kidney cortex	593	ND	BLQ	ND
Kidney medulla	683	ND	BLQ	ND
Kidney(s)	641	ND	BLQ	ND
Large intestine	3140	ND	1250	ND

Liver	3590	BLQ	1320	BLQ
Lung(s)	BLQ	ND	ND	ND
Lymph node(s)	ND	ND	ND	ND
Muscle	ND	ND	ND	ND
Myocardium	BLQ	ND	ND	ND
Nasal turbinates	ND	ND	ND	ND
Ovary(ies)	NA	NA	ND	ND
Pancreas	ND	ND	ND	ND
Pituitary gland	975	ND	ND	ND
Preputial gland	ND	ND	ND	ND
Prostate gland	ND	ND	NA	NA
Salivary gland(s)	ND	ND	ND	ND
Seminal vesicle(s)	ND	ND	NA	NA
Skin (nonpigmented)	ND	ND	ND	ND
Small intestine	1810	ND	699	ND
Spinal cord	ND	ND	ND	ND
Spleen	ND	ND	ND	ND
Stomach	801	ND	876	ND
Testis(es)	ND	ND	ND	ND
Thymus	ND	ND	ND	ND
Thyroid	ND	ND	ND	ND
Urinary bladder	ND	ND	NA	ND
Urine	14300	ND	2770	ND
Uterus	NA	NA	ND	ND

BLQ　Below the limit of quantitation (<320 ng equivalents/g)
NA　Not applicable
ND　Not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue)
a　Tissue appeared to be fat soaked

	Concentration (ng Equivalents/g)					
Tissue	0.25 h	1 h	4 h	24 h	72 h	168 h
IV to Long Evans						
Adrenal gland(s)	1210[a]	1060[a]	782[a]	553[a]	50.7[a]	ND
Arterial wall	1850	1010	403	ND	ND	ND
Bile	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Blood	853	477	136	BLQ	ND	ND
Bone	49.9	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Bone marrow	614	309	135	BLQ	ND	ND
Brain cerebellum	108	56.3	BLQ	ND	ND	ND
Brain cerebrum	169	139	52.3	ND	ND	ND
Brain medulla	94.9	49.2	BLQ	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	136	185	59.2	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	NR	689	404	197	ND	ND
Cecum	1110	635	1630	1300	BLQ	ND
Diaphragm	459	1130	155	119	BLQ	ND
Epididymis	875[a]	421[a]	181	63.3	ND	ND
Epiphyseal line	1490	438	162	ND	ND	ND
Esophagus	2690	686	1540	106	ND	ND
Exorbital lacrimal gland	777	576	386	272	ND	ND
Eye lens	54.6	111	BLQ	ND	ND	ND
Eye uveal tract	1680	955	513	251	219	137
Eye(s)	404	282	124	56.1	BLQ	BLQ
Fat (abdominal)	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	1850	958	762	657	144	90.9
Harderian gland	572	385	280	126	53.8	ND
Intra-orbital lacrimal gland	976	323	349	219	BLQ	ND
Kidney cortex	11700	3030	867	299	85.9	BLQ
Kidney medulla	22700	5270	1500	457	161	BLQ
Kidney(s)	16300	3810	1030	364	118	BLQ
Large intestine	1620	944	349	334	BLQ	ND
Liver	25900	12500	5260	1450	467	169

Lung(s)	1480	690	302	71.5	ND	ND
Lymph node(s)	1210	428	173	BLQ	ND	ND
Muscle	238	82.5	BLQ	BLQ	ND	ND
Myocardium	806	366	218	73.9	ND	ND
Nasal turbinates	727	1820	476	260	63.2	ND
Pancreas	1580	1630	1130	202	BLQ	ND
Pituitary gland	1450	1090	586	226	63.1	ND
Preputial gland	1900[a]	1020[a]	843[a]	194[a]	BLQ[a]	ND
Prostate gland	979	398	287	77.5	BLQ	ND
Salivary gland(s)	1920	1460	804	256	BLQ	ND
Seminal vesicle(s)	249[a]	225[a]	103	176	BLQ[a]	ND
Skin (nonpigmented)	868	322	99.3	BLQ	ND	ND
Skin (pigmented)	784	350	140	75.1	43.8	ND
Small intestine	3380	3260	792	94.4	ND	ND
Spinal cord	79.5	64.7	BLQ	ND	ND	ND
Spleen	983	369	129	BLQ	ND	ND
Stomach	1500	1950	602	165	BLQ	ND
Testis(es)	386	159	78.7	BLQ	ND	ND
Thymus	1320	649	344	53.6	ND	ND
Thyroid	2240	1670	1370	623	72.0	ND
Urinary bladder	ND[b]	ND[b]	427	105	BLQ	ND
Urine	387000	115000	83700	3130	99.9	BLQ

BLQ	Below the limit of quantitation (<42.8 ng equivalents /g)
ND	Not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue)
NR	Not represented (tissue not present in section)
a	Tissue appeared to be fat soaked
b	Tissue not detectable due to flare from urine

	Concentration (ng Equivalents/g)					
Tissue	0.25 h	1 h	4 h	24 h	72 h	168 h
PO to Long Evans						
Adrenal gland(s)	1120[a]	480[a]	BLQ[a]	ND	ND	ND
Arterial wall	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bile	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Blood	BLQ	714	513	BLQ	ND	ND
Bone	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bone marrow	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain cerebellum	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain cerebrum	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain medulla	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Brain olfactory lobe	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bulbo-urethral gland	ND	ND	BLQ	ND	ND	ND
Cecum	ND	ND	ND[b]	3130	BLQ	ND
Diaphragm	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Epididymis	ND	ND	BLQ	ND	ND	ND
Epiphyseal line	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Esophagus	ND	5840	1460	ND	ND	ND
Exorbital lacrimal gland	ND	BLQ	ND	ND	ND	ND
Eye lens	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eye uveal tract	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Eye(s)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fat (abdominal)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Fat (brown)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Harderian gland	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Intra-orbital lacrimal gland	ND	BLQ	ND	ND	ND	ND
Kidney cortex	769	2100	1530	BLQ	ND	ND
Kidney medulla	1200	3430	1620	388	BLQ	ND
Kidney(s)	1020	2390	1570	341	ND	ND
Large intestine	ND	BLQ	414	367	ND	ND
Liver	4690	9390	13000	2340	1030	360

Lung(s)	ND	389	341	ND	ND	ND
Lymph node(s)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Muscle	ND	ND	BLQ	ND	ND	ND
Myocardium	ND	BLQ	ND	ND	ND	ND
Nasal turbinates	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pancreas	528	BLQ	BLQ	ND	ND	ND
Pituitary gland	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Preputial gland	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Prostate gland	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Salivary gland(s)	ND	BLQ	ND	ND	ND	ND
Seminal vesicle(s)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Skin (nonpigmented)	ND	BLQ	ND	ND	ND	ND
Skin (pigmented)	ND	BLQ	ND	ND	ND	ND
Small intestine	ND	9450	4900	324	ND	ND
Spleen	BLQ	ND	ND	ND	ND	ND
Stomach	8930	12900	1190	BLQ	ND	ND
Testis(es)	ND	ND	BLQ	ND	ND	ND
Thymus	ND	BLQ	ND	ND	ND	ND
Thyroid	ND	BLQ	ND	ND	ND	ND
Urinary bladder	BLQ	577	518	ND	ND	ND
Urine	2660	21900	90300	1400	BLQ	ND

BLQ	Below the limit of quantitation (<320 ng equivalents /g)
ND	Not detectable (sample shape not discernible from background or surrounding tissue)
a	Tissue appeared to be fat soaked
b	Tissue not detectable due to flare from gastrointestinal contents

Additional information:

Blood was collected from each animal in Group 1(4 M, IV, Wistar Hanover [WH] rats) and 4 (4 M, PO, WH rats) at approximately 0.083, 0.25, 2, 4, 8, 24, 48, 72, and 96 hours postdose.　The mean pharmacokinetic parameters for radioactivity in plasma are presented below.

Dose route (Dose)	t_{max} (h)	C_{max} (ng eq/g)	$t_{½}$ (h)	AUC_{0-t} (ng eq·h/g)	$AUC_{0-\infty}$ (ng eq·h/g)	C_0 (ng eq/g)
IV (4 mg/kg)	0.083	5160	11.9	5560	6420	8230
PO (30 mg/kg)	7.00	1080	NC	13600	NC	NA

NA Not applicable, NC Not calculable

Urine was collected from all surviving animals/sex/group in Groups 2 (IV, WH rats) and 5 (PO, WH rats) at 0-24 and 24-48 hours postdose.
After an intravenous administration of ^{14}C-glycopironium to WH rats, radioactivity excreted in urine was 63.3 (male) and 56.3% (female) of the administered dose over 0 to 48 hours. After an oral administration, the recovery was lower and was 7.76 (male) and 7.16% (female) over the same time period. There did not appear to be any difference in the rate of excretion between the genders.

Dose route (Dose)	Sample	Time Point (h)	Animal (Male)			Animal (Female)		
IV (4 mg/kg)			R0101	R0102	Average	R0601	R0602	Average
	Urine	0 – 24	60.7	64.4	62.6	49.7	61.2	55.4
		24 – 48	-	1.47	NC	-	1.85	NC
		Subtotal	60.7	65.9	63.3	49.7	63.0	56.3
	Cage Rinse	0 – 24	3.00	2.47	2.73	2.25	1.06	1.66
		Subtotal	3.00	2.47	2.73	2.25	1.06	1.66
	Cage Wash	0 – 24	1.99	-	NC	3.08	-	NC
		24 – 48	-	1.44	NC	-	2.51	NC
		Subtotal	1.99	1.44	1.71	3.08	2.51	2.79
	Cage Wipe	0 – 24	0.276	-	NC	0.420	-	NC
		24 – 48	-	0.592	NC	-	0.178	NC
		Subtotal	0.276	0.592	0.434	0.420	0.178	0.299
		Total	66.0	70.4	68.2	55.4	66.7	61.1
PO (30 mg/kg)			R0401	R0402	Average	R0701	R0702	Average
	Urine	0 – 24	9.39	5.59	7.49	4.59	6.22	5.40
		24 – 48	-	0.534	NC	-	3.52[a]	NC
		Subtotal	9.39	6.13	7.76	4.59	9.73	7.16

Cage Rinse	0 – 24	0.268	0.777	0.522	0.328	0.600	0.464
	Subtotal	0.268	0.777	0.522	0.328	0.600	0.464
Cage Wash	0 – 24	1.87	-	NC	0.513	-	NC
	24 – 48	-	2.88	NC	-	0.608	NC
	Subtotal	1.87	2.88	2.38	0.513	0.608	0.560
Cage Wipe	0 – 24	4.40	-	NC	0.177	-	NC
	24 – 48	-	0.200	NC	-	0.0633	NC
	Subtotal	4.40	0.200	2.30	0.177	0.0633	0.120
	Total	15.9	9.99	13.0	5.61	11.0	8.30

Each value represents % of radioactive dose.　NC Not calculated

Study conducted by the applicant: No
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], [redacted], [redacted]
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.6 薬物動態試験：蛋白結合

2.6.5.6.1 *In vitro* 蛋白結合：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS001265-58

Study system: *In vitro*

Target entity, test system and method: Frozen plasma, generated using K_2-EDTA anticoagulant were purchased from Bioreclamation, LLC (123 Frost St. Suite 115 Westbury, NY 11590), Equilibrium Dialysis RED Device

Species (strain): Mouse CD-1, Rat Han Wistar, Rabbit New Zealand White, Dog Beagle and Human

Gender (M/F)/Number of animals: Mouse: male, pool of n>3, Rat: male, pool of n>3, Rabbit: female, pool of n>3, Dog: male, pool of n>3, Human: male, pool of n>3

Substance analyzed: Glycopyrronium

Analytical method: HPLC-MS/MS (Glycopyrronium Iodide-d3 used as internal standard)

Glycopyrronium concentration (nmol/L)	% Free				
	Mouse	Rat	Rabbit[b]	Dog	Human
0.2	NC[a]	NC[a]	NC[a]	NC[a]	NC[a]
2	60.6 ± 4.36	78.5 ± 6.27	114 ± 7.77	66.0 ± 6.97	45.8 ± 9.57
50	64.9 ± 1.25	68.9 ± 4.99	94.0 ± 3.68	61.5 ± 3.59	52.2 ± 2.99
500	64.4 ± 4.47	70.0 ± 2.37	94.3 ± 3.55	62.3 ± 2.05	56.8 ± 0.370
2-500 (Mean)	63.3 ± 2.35	72.5 ± 5.24	101 ± 11.5	63.3 ± 2.41	51.6 ± 5.57

NC Not calculated

a All the buffer concentrations for three replicates were BLOQ (<0.1 nmol/L).

b Values affected by the stability issue in rabbit plasma

Additional Information:

The recovery of glycopyrronium in the rabbit plasma protein binding experiment using equilibrium dialysis methodology was relatively low (~50%). The rabbit was therefore determined again by ultrafiltration. The results in rabbit plasma was considered more accurate when determined using ultrafiltration methodology as the percentage unbound determined using equilibrium dialysis methodology is affected by the stability issue in rabbit plasma.

Glycopyrronium concentration (nmol/L)	% Free
	Rabbit
2	82.2 ± 5.09
50	78.1 ± 2.97
500	77.7 ± 3.81
2-500 (Mean)	79.3 ± 2.52

Study conducted by the applicant: No

If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], P.R. China

Study in compliance with GLP: No

2.6.5.7　　薬物動態試験：妊娠又は授乳動物における試験

該当なし

2.6.5.8　　薬物動態試験：その他の分布試験

該当なし

2.6.5.9 薬物動態試験：代謝：*In Vivo*

2.6.5.9.1 ラット尿中及び血漿中代謝物組成：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BE002211-07

Species:	Rat
Gender (M/F) / Number of animals:	Samples collected from QWBA study (see section 2.6.5.5.1) Group 1: Wistar Hanover 4M (IV) for blood collection Group 2: Wistar Hanover 2M & 2F (IV) for urine collection Group 4: Wistar Hanover 4M (PO) for blood collection Group 5: Wistar Hanover 2M & 2F (PO) for urine collection
Feeding condition:	IV: fed, PO: fasted
Vehicle/Formulation:	5% glucose in sterile water
Method of Administration:	IV: bolus via tail vein, PO: gavage
Duration of treatment:	Single dose
Dose (mg/kg):	IV: 4, PO: 30
Radionuclide:	^{14}C
Dose radioactivity (μCi/kg):	100
Analytical method:	UPLC combined with radioactivity monitoring and mass spectrometry
Sampling time (T):	Urine: pooled 0-24 h, Plasma: pooled 0.25-8 h for PO, pooled 0.083-8 h for IV

Quantitative estimates of glycopyrronium and metabolites in urine collected 0-24 h after single oral administration of ^{14}C-glycopyrronium

Compound	LC RAM t_R (min)	Urine % of excreted radioactivity		Urine % of dose	
		Male	Female	Male	Female
M16	1.0	14.8	17.4	1.2	1.0
M4/M5/M6[a]	2.9	NQ/NQ/NQ	NQ/NQ/NQ	-	-
M7	3.2	6.6	4.9	0.5	0.3
M8/M17/M18[a]	3.5	5.5[b]	NQ/4.7/4.7[b]	0.4	0.3
M1	4.1	NQ	NQ	-	-
M19	4.5	NQ	NQ	-	-
M11	5.0	NQ	NQ	-	-
M2/M12[a]	5.4	NQ/NQ	NQ/NQ	-	-
M20	6.0	ND	ND	-	-
M3/M13[a]	6.4	ND/NQ	NQ/NQ	-	-
^{14}C-Glycopyrronium	11.1	NQ	NQ	-	-
M21/M22[a]	11.8	8.5[b]	20.7[b]	0.7	1.2
M15	13.0	0.8	3.1	0.1	0.2
Sum		36.1	50.8	2.9	3.0
Total radioactive dose				8.0[c]	5.9[c]

ND Not Detected. The radioactivity was below the limit of detection and MS did not indicate any presence of the metabolite corresponding to the given retention time.
NQ Not Quantified. The radioactivity was below limit of detection but the corresponding metabolite formation was confirmed by MS.
a Co-eluting metabolites. The value represents the total radioactivity of the co-eluting fractions.
b Unknown proportion between co-eluting metabolites.
c Total radioactivity in urine collected in the interval 0-24 h (sum of urine and cage rinse) reported in [redacted] study 8370562
t_R Retention time in the radiochromatogram

Quantitative estimates of glycopyrronium and metabolites in urine collected 0-24 h after single intravenous administration of ^{14}C-glycopyrronium

Compound	LC RAM Retention t_R (min)	Urine % of excreted radioactivity		Urine % of dose	
		Male	Female	Male	Female
M16	1.0	3.9	2.5	2.5	1.4
M4/M5/M6[a]	2.9	3.1[b]	3.9/ND/3.9[b]	2.0	2.2
M7	3.2	4.9	6.5	3.2	3.6
M8/M17/M18[a]	3.5	7.5[b]	ND/2.7/2.7[b]	4.9	1.5
M1	4.1	2.3	2.8	1.5	1.6
M19	4.5	NQ	NQ	-	-
M11	5.0	NQ	NQ	-	-
M2/M12[a]	5.4	5.6[b]	4.1[b]	3.7	2.3
M20	6.0	ND	ND	-	-
M3/M13[a]	6.4	4.6[b]	6.1[b]	3.0	3.4
^{14}C-Glycopyrronium	11.1	48.1	56.0	31	31
M21/M22[a]	11.8	ND/ND	ND/ND	-	-
M15	13.0	ND	ND	-	-
Sum		80.0	84.5	52.0	47.0
Total radioactive dose				65[c]	55[c]

ND　Not Detected. The radioactivity was below limit of detection and corresponding metabolite formation was not confirmed by MS.
NQ　Not Quantified. The radioactivity was below limit of detection but the corresponding metabolite formation was confirmed by MS.
a　Co-eluting metabolites. The value represents the total radioactivity of the co-eluting fractions detected.
b　Unknown proportion between co-eluting metabolites.
c　Total radioactivity in urine collected in the interval 0-24h (sum of urine and cage rinse) reported in [redacted] study 8370562

Glycopyrronium and metabolites in plasma collected 0-8 h after a single oral and intravenous administration (% of total radioactivity[c])

Compound	LC RAM Retention t_R (min)	Plasma Male	
		IV	PO
M16	1.0	14.5	5.6
M4/M5/M6[a]	2.9	5.2[b]	NQ/NQ/NQ
M7	3.2	2.6	NQ
M8/M17/M18[a]	3.5	2.8[b]	ND/NQ/ND
M1	4.1	2.6	ND
M19	4.5	3.1	ND
M11	5.0	4.7	ND
M2/M12[a]	5.4	4.9[b]	ND
M20	6.0	1.7	ND
M3/M13[a]	6.4	5.2[b]	ND/NQ
^{14}C-Glycopyrronium	11.1	36.3	3.6
M21/M22[a]	11.8	ND/ND	ND
M15	13.0	4.9	40.4
Sum % of radioactivity		88.4	49.6

ND Not Detected. The radioactivity was below limit of detection and corresponding metabolite formation was not confirmed by MS.
NQ Not Quantified. The radioactivity was below limit of detection but the corresponding metabolite formation was confirmed by MS.
a Co-eluting metabolites. The value represents the total radioactivity of the co-eluting fractions detected.
b Unknown proportion between co-eluting metabolites.
c Time proportional 0-8 h AUC pool (changed pooled plasma volumes depending on sampling time by Hamiltonpool method)

Study conducted by the applicant: Yes
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study:
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.10 薬物動態試験：代謝：*In Vitro*

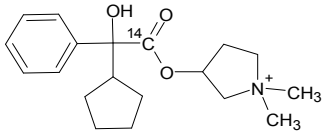
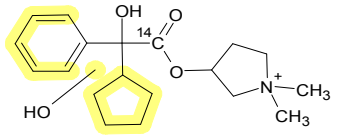
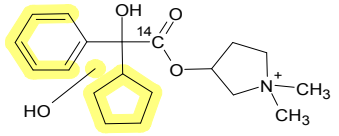
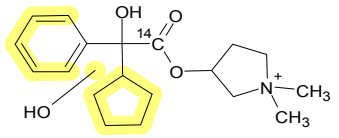
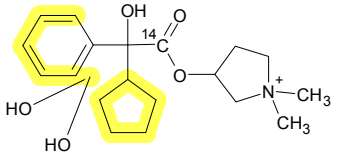
2.6.5.10.1 肝細胞及び肺ミクロソームにおける *in vitro* 代謝：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

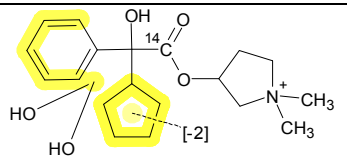
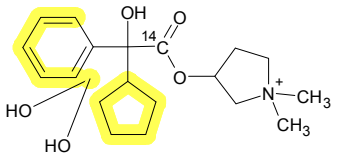
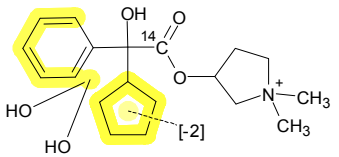
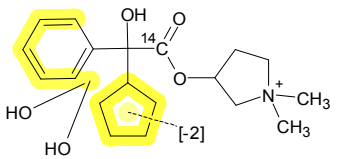
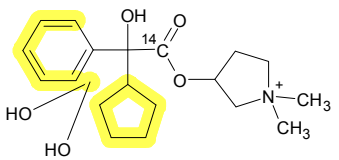
試験番号：BE001294-70

Type of study:
In Vitro Metabolism of [^{14}C]Glycopyrronium in Hepatocytes from Man, Rat, Dog, Mouse and Rabbit and in Lung Microsomal Fractions from Rat, Dog and Human (non-smoker)
Method:
[^{14}C]glycopyrronium (10 µmol/L) was incubated with hepatocytes for 0 and 240 minutes and control compounds for 0 and 60 minutes, also with lung microsomes ([^{14}C]glycopyrronium: 5 µmol/L) for 0 and 60 minutes. Albendazole, dextromethorphan and sildenafil were used as positive controls in the hepatocyte incubations. Albendazole and tacrine were used as positive controls in the lung microsome incubations.
Metabolite profiles of [^{14}C]glycopyrronium from the hepatocyte and lung microsome samples were performed using Ultra-performance liquid chromatography (UPLC) combined with radioactivity monitoring (RAM) and mass spectrometry (MS). Separate sample injections were made for RAM and MS detection respectively. RAM was used for recording of metabolites profiles and quantification and MS for structural elucidation of metabolites. Total radioactivity was measured using static liquid scintillation counting analysis.
The radiochromatograms from all samples were integrated for parent compound and separated metabolites. Average background values were taken at the beginning and the end of each chromatogram. A signal-to-noise ratio ≥ 3 gave limit of detection (LOD) of 0.3 % of total integrated radioactivity. Due to impurities in the human 0 min hepatocyte sample only metabolites representing > 1 % of total integrated radioactivity in at least one species were reported in the metabolite evaluation. For metabolites > 1 % in at least one species, this metabolite is reported as NQ (not quantified) for those species where the metabolite was detected by MS, but was < 1 % of the total integrated radioactivity.

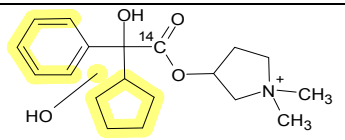
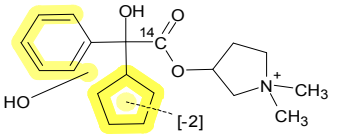
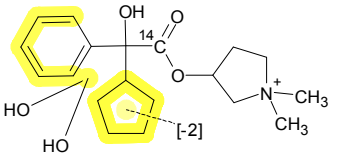
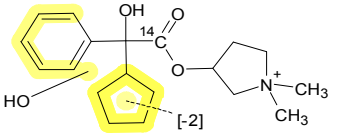
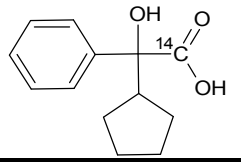
Tabulated results: Observed charged molecules, proposed elemental compositions and transformations of [^{14}C]glycopyrronium and metabolites formed in hepatocytes from human and animals

Metabolite	LC-RAM tR (min)	Observed m/z[a]	Proposed composition	Error (mDa)	Proposed modification	Proposed structure
[^{14}C]Glycopyrronium	11.4	320.2111	[^{14}C]$C_{18}H_{28}NO_3^+$	0.9	Parent	
M1	4.4	336.2041	[^{14}C]$C_{18}H_{28}NO_4^+$	-1.0	Monooxygenation	
M2	5.6	336.2048	[^{14}C]$C_{18}H_{28}NO_4^+$	-0.3	Monooxygenation	
M3	6.8	336.2049	[^{14}C]$C_{18}H_{28}NO_4^+$	-0.2	Monooxygenation	
M4	3.2	352.2003	[^{14}C]$C_{18}H_{28}NO_5^+$	0.3	Dioxygenation	

Tabulated results: Observed charged molecules, proposed elemental compositions and transformations of [^{14}C]glycopyrronium and metabolites formed in hepatocytes from human and animals

Metabolite	LC-RAM tR (min)	Observed m/z[a]	Proposed composition	Error (mDa)	Proposed modification	Proposed structure
M5	3.2	350.1861	$[^{14}C]C_{18}H_{26}NO_5^+$	1.8	Dioxygenation and desaturation	
M6	3.2	352.2003	$[^{14}C]C_{18}H_{28}NO_5^+$	0.3	Dioxygenation	
M7	3.5	350.1842	$[^{14}C]C_{18}H_{26}NO_5^+$	-0.1	Dioxygenation and desaturation	
M8	3.9	350.1842	$[^{14}C]C_{18}H_{26}NO_5^+$	-0.1	Dioxygenation and desaturation	
M9	4.4	352.1996	$[^{14}C]C_{18}H_{28}NO_5^+$	-0.4	Dioxygenation	

Tabulated results: Observed charged molecules, proposed elemental compositions and transformations of [^{14}C]glycopyrronium and metabolites formed in hepatocytes from human and animals

Metabolite	LC-RAM tR (min)	Observed m/z[a]	Proposed composition	Error (mDa)	Proposed modification	Proposed structure
M10	4.4	336.2053	[^{14}C]$C_{18}H_{28}NO_4^+$	0.2	Monooxygenation	
M11	5.1	334.1904	[^{14}C]$C_{18}H_{26}NO_4^+$	1.0	Monooxygenation and desaturation	
M12	5.6	350.1844	[^{14}C]$C_{18}H_{26}NO_5^+$	0.1	Dioxygenation and desaturation	
M13	6.8	334.1900	[^{14}C]$C_{18}H_{26}NO_4^+$	0.6	Monooxygenation and desaturation	
M14	8.0	ND	ND	ND	Unknown	No structure assigned
M15	13.1	221.1029	[^{14}C]$C_{12}H_{16}O_3$	3.0[b]	Hydrolysis (verified with synthesized metabolite AZ11951046)	

a　All observed m/z values were generated in the positive ionization mode and were within 3 mDa accurate mass error of the theoretical value except for M15 that was generated in the negative ionization mode.
b　Calculated from the theoretical mass.
ND　Detected by LC/RAM but no corresponding LC/MS peak detected

Tabulated results: Quantitative estimates (% integrated radioactivity) of [^{14}C]glycopyrronium and metabolites

Compound	LC-RAM tR (min)	% of total radioactivity Human	% of total radioactivity Dog	% of total radioactivity Rat	% of total radioactivity Mouse	% of total radioactivity Rabbit
[^{14}C]Glycopyrronium	11.5	94.3	94.6	6.1	49.8	9.7
M1/M9/M10[a]	4.4	NQ/ND/NQ	NQ/ND/NQ	11.2[b]	2.4/NQ/ND	9.8/ND/NQ
M2/M12[a]	5.6	2.1/ND	2.4/ND	25.5[b]	12.0[b]	43.6/NQ
M3/M13[a]	6.8	NQ/ND	1.6/NQ	36.7/ND	30.0[b]	24.4[b]
M4/M5/M6[a]	3.1	ND/ND/ND	ND/ND/ND	11.1b	1.0b	NQ/ND/NQ
M7	3.5	ND	ND	1.8	1.0	NQ
M8	3.8	ND	ND	1.9	ND	ND
M11	5.1	NQ	ND	2.2	1.6	NQ
M14	8.0	ND	ND	ND	ND	2.3
M15	13.1	ND	ND	ND	NQ	6.7
Sum		96.4	98.6	96.6	97.9	96.4

Important findings:
The remaining fraction of [^{14}C]glycopyrronium after 240 minutes of incubation in hepatocytes accounted for 94.3 % of the radioactivity in human, 94.6 % in dog, 6.1 % in rat, 49.8 % in mouse and 9.7 % in rabbit.
All metabolites observed in the human hepatocyte sample were also observed in at least one of the investigated pre-clinical animal species samples.
Several metabolic pathways were mapped in the hepatocyte incubations and in total 15 metabolites were found. Major metabolic pathways of [^{14}C]glycopyrronium in most species were monooxygenation (M1-M3), dioxygenation (M4, M6) and monooxygenation in combination with desaturation (M13). The proposed predominant metabolic positions are in the aromatic and cyclopentane ring moieties.
[^{14}C]Glycopyrronium showed no turn-over in either human, rat or dog lung microsomes.

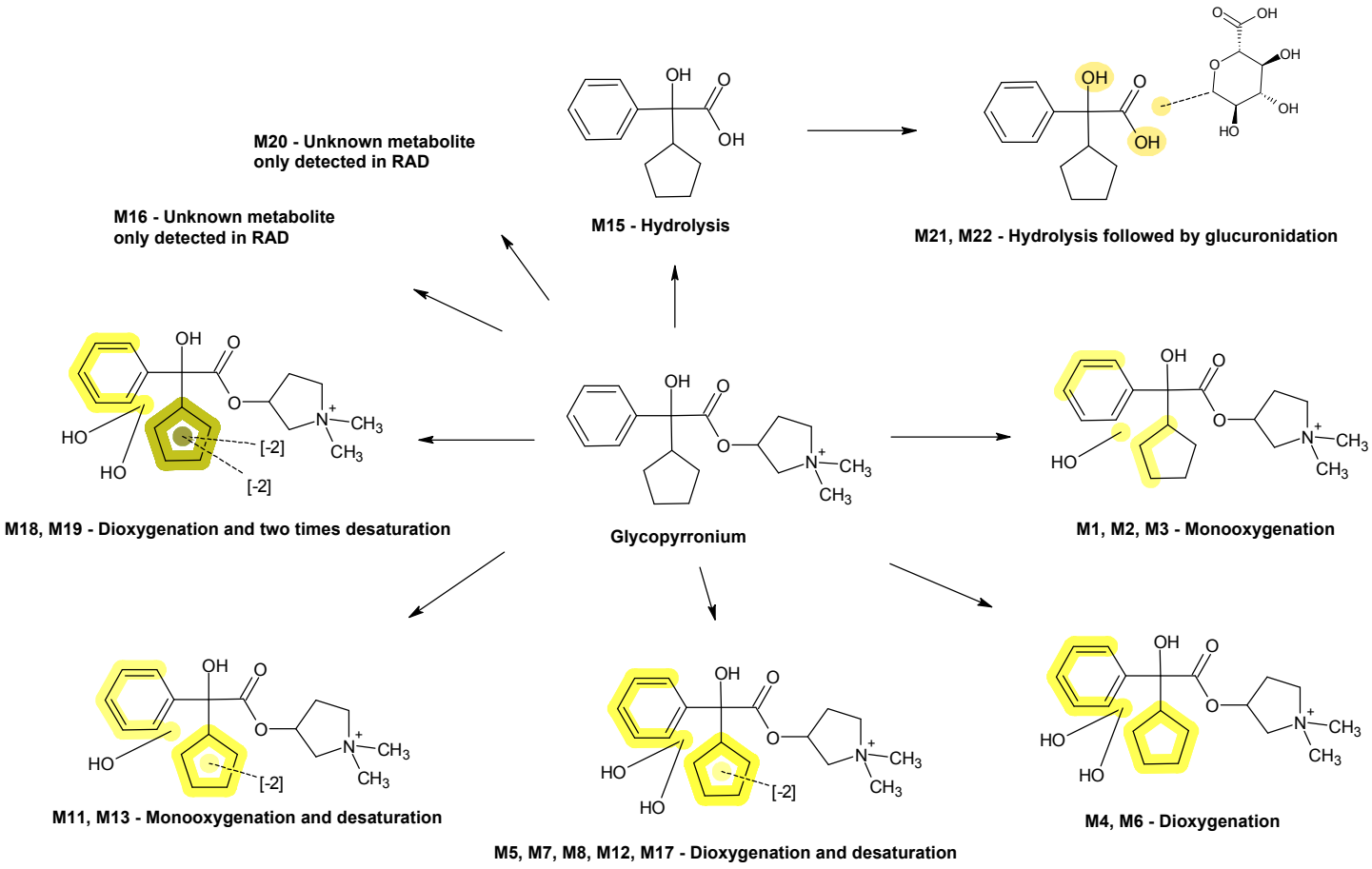
Additional information:
Metabolic phase I and phase II capacity of the hepatocytes and of the lung microsomes were evaluated and confirmed by monitoring the formation of relevant metabolites of the positive controls. The metabolic capacity was accepted in all test systems.

Study conducted by the applicant: Yes
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study:
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.11　　薬物動態試験：推定代謝経路

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BE002211-07



2.6.5.12 薬物動態試験：薬物代謝酵素の誘導／阻害

2.6.5.12.1 ヒト肝細胞における CYP 誘導（CYP1A2、2B6、3A4）：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：CYP0750_R45

Type of study: *In vitro* induction of CYP1A2, 2B6, and 3A4 in primary cultures of human hepatocytes by glycopyrronium. (CYP0750_R45)
Method: Glycopyrronium was incubated in preparations of human hepatocyte cultures prepared from cryopreserved hepatocytes (n=3 donors) at concentrations of 0.206-50 nmol/L. Hepatocytes were also incubated with positive control inducing agents, omeprazole (0.0488-50 µmol/L) for CYP1A2, phenobarbital (1.95-2000 µmol/L) and CITCO (0.000488-0.5 µmol/L) for CYP2B6, and rifampicin (0.00640-20 µmol/L) for CYP3A4. After 48 hours exposure induction of CYP1A2, CYP2B6, and CYP3A4 enzyme activity was determined *in situ* in conjunction with probe substrates selective for these drug-metabolizing enzymes. The mRNA expression levels of these enzymes were evaluated using quantitative RT-PCR. The cytotoxicity potential of glycopyrronium towards hepatocyte cultures was tested using an MTT assay at the end of the 48 hour exposure period.

Tabulated results:

EC_{50}, E_{max}, and F2 values for induction of CYP1A2 mRNA expression and activity by AZ12392010 (Glycopyrronium) and omeprazole

Hepatocyte batch	Assay	AZ12392010 (Glycopyrronium)				Omeprazole		
		EC_{50} (µmol/L)	E_{max}	F2 (µmol/L)	% positive control response	EC_{50} (µmol/L)	E_{max}	F2 (µmol/L)
HUM4055B	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>38.7	NC
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>22.5[a]	NC
HUM4105A	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>19.6	1.41
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>11.5[a]	NC
HUM4113	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>46.3	NC
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>16.7	NC

a Observed E_{max} at 12.5 µmol/L
NC Not calculable
NI No induction

EC_{50}, E_{max}, and F2 values for induction of CYP2B6 mRNA expression and activity by AZ12392010 (Glycopyrronium), phenobarbital and CITCO

Hepatocyte batch	Assay	AZ12392010 (Glycopyrronium)				Phenobarbital			CITCO		
		EC_{50} (µmol/L)	E_{max}	F2 (µmol/L)	% positive control response[a]	EC_{50} (µmol/L)	E_{max}	F2 (µmol/L)	EC_{50} (µmol/L)	E_{max}	F2 (µmol/L)
HUM4055B	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>4.15	NC	NC	>2.92	NC
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>2.96	NC	NC	>2.02	NC
HUM4105A	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>6.20	NC	NC	>4.07	NC
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>12.6	86.4	NC	>4.81	0.0367
HUM4113	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>8.16	NC	NC	>3.19	NC
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>5.71	133	NI	NI	NI

a Percent positive control response is calculated relative to phenobarbital
NC Not calculable
NI No induction

EC_{50}, E_{max}, and F2 values for induction of CYP3A4 mRNA expression and activity by AZ12392010 (Glycopyrronium) and rifampicin

Hepatocyte batch	Assay	AZ12392010 (Glycopyrronium)				Rifampicin		
		EC_{50} (µmol/L)	E_{max}	F2 (µmol/L)	% positive control response	EC_{50} (µmol/L)	E_{max}	F2 (µmol/L)
HUM4055B	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>99.6	NC
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>9.06	0.0945
HUM4105A	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>108	NC
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>14.6	NC
HUM4113	mRNA	NI	NI	NI	NI	NC	>152	NC
	Activity	NI	NI	NI	NI	NC	>7.04	NC

Values are Calculated value ± standard error (where appropriate)
NC Not calculable
NI No induction

Important findings:
Treatment with up to 50 nmol/L glycopyrronium for 48 hours showed no decrease in hepatocyte viability in the cultures from all three donors tested. The viability results were consistent with the observed morphological changes in the hepatocyte monolayers.
Glycopyrronium, at concentrations up to 50 nmol/L, demonstrated no induction of CYP1A2, CYP2B6 and CYP3A4 mRNA expression or enzyme activity.

Study conducted by the applicant: No
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], [redacted], [redacted], [redacted]
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.12.2 CYP 発現系における代謝：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS001884-09

Type of study:
Metabolism of glycopyrronium in ten heterologously expressed human cytochrome P450 (CYP) isoforms.
Method:
Glycopyrronium was incubated with bactosomes prepared from *E. coli* bacteria which heterologously express individual human CYP isoforms. Incubations for 30 minutes at 2 µmol/L of glycopyrronium and 100 pmol/mL of CYP protein.
CYP isoform involvement in glycopyrronium metabolism was confirmed by the assessment of test compound loss by mass spectrometry. Phenacetin, coumarin, bupropion, ibuprofen, metoprolol, chlorzoxazone (2 µmol/L) were used as positive controls for CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2D6 and CYP2E1, respectively. Amitriptyline (2 µmol/L) was used as a positive control for CYP2C8 and CYP2C19. Testosterone (2 µmol/L) was used as a positive control for CYP3A4 and CYP3A5.
Tabulated results:

Isoform	CL_{int} (µL/min/pmol CYP protein)
CYP1A2	NC
CYP2A6[a]	0.00692 ± 0.0120
CYP2B6	NC
CYP2C8	NC
CYP2C9[a]	0.00519 ± 0.00898
CYP2C19	NC
CYP2D6	0.990 ± 0.0121
CYP2E1[a]	0.00315 ± 0.00545
CYP3A4	0.0557 ± 0.00248
CYP3A5[a]	0.00567 ± 0.00983

a Turnover was observed in one experiment. In the other two experiments, CL_{int} was not calculated (turnover not significant (T-test) and the percentage remaining at the last time point was ≥ 80%) and zero was used as the CL_{int} value in the calculation of mean value.
NC CL_{int} not calculated (Turnover not significant (T-test) and the percentage remaining at last time point was ≥ 80%).

Important findings:
Positive control data confirmed the metabolic competency of the test systems used in this study.
CYP2D6 was found to be the predominant CYP isoform involved in the metabolism of glycopyrronium. CYP2A6, CYP2C9, CYP2E1, CYP3A4 and CYP3A5 were also involved to small extent in the metabolism of glycopyrronium. CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8 and CYP2C19 were not shown to metabolise glycopyrronium in this system.

Study conducted by the applicant: No
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], PR China
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.12.3 CYP 阻害（CYP1A2、2C9、2C19、2D6、3A4/5）：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS001884-07

Type of study:

In vitro investigation of the potential of glycopyrronium to act as a reversible inhibitor of human cytochromes P450 (CYP) 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4/5 in human liver microsomes.

Method:

The potential for reversible inhibition of CYP enzymes was investigated by co-incubation of glycopyrronium at six concentrations (0.1-30 µmol/L) with human liver microsomes in the presence of CYP enzyme marker substrates and NADPH, and then monitoring the rate of formation of CYP isoform-specific metabolites (n=3). These activities were measured under linear conditions for time and protein concentration using the following marker substrates in a single cocktail: phenacetin (CYP1A2), diclofenac (CYP2C9), *S*-mephenytoin (CYP2C19), bufuralol (CYP2D6) and midazolam (CYP3A4/5) at concentrations equivalent to their respective K_m values. The metabolism of marker substrates was determined by HPLC-MS/MS methods. Relevant control incubations were performed and CYP isoform-selective reversible inhibitors were used as positive controls (see table below).

Tabulated results:

Assay Reference	CYP1A2	CYP2C9	CYP2C19	CYP2D6	CYP3A4/5
Test Compound					
Glycopyrronium	NI	NI	NI	NI	NI
Glycopyrronium	NI	NI	NI	NI	NI
Glycopyrronium	NI	NI	NI	NI	NI
Mean	NI	NI	NI	NI	NI
Reference Inhibitor:					
α-Naphthoflavone	0.00518				
Sulphaphenazole		0.574			
N-3-Benzylnirvanol			0.272		
Quinidine				0.0291	
Ketoconazole					0.0239

Reference inhibitor is a mean IC_{50} value (n=3)
NI: No Inhibition

Important findings:
There was no evidence that glycopyrronium inhibited CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4/5 over the concentration range tested (0.1-30 μmol/L).

Study conducted by the applicant: No
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], PR China
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.12.4 CYP 阻害（CYP2A6、2B6、2C8、2E1、3A4/5）：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS001884-08

Type of study:

In vitro investigation of the potential of glycopyrronium to act as a reversible inhibitor of human cytochromes (CYP) 2A6, 2B6, 2C8, 2E1 and 3A4/5.

Method:

The potential for reversible inhibition of CYP enzymes was investigated by co-incubation of glycopyrronium at six concentrations (0.1-30 µmol/L) with human liver microsomes in the presence of CYP enzyme marker substrates and NADPH, and then monitoring the rate of formation of CYP isoform-specific metabolites (n=3). These activities were measured under linear conditions for time and protein concentration using the following marker substrates in a single cocktail: coumarin (CYP2A6), bupropion (CYP2B6), amodiaquine (CYP2C8), chlozoxazone (CYP2E1) and nifedipine (CYP3A4/5) at a concentration equivalent to their K_m values.

The metabolism of marker substrates was determined by HPLC-MS/MS methods. Relevant control incubations were performed and CYP isoform-selective reversible inhibitors were used as positive controls (see table below).

Tabulated results:

Assay Reference	CYP2A6	CYP2B6	CYP2C8	CYP2E1	CYP3A4/5
Test Compound					
Glycopyrronium	NI	NI	NI	NI	NI
Glycopyrronium	NI	NI	NI	NI	NI
Glycopyrronium	NI	NI	NI	NI	NI
Mean	NI	NI	NI	NI	NI
Reference Inhibitor:					
Tranylcypromine	0.137				
Quercetin		43.3	5.85	14.3	
Ketoconazole					0.0797

Reference inhibitor is a mean IC_{50} value (n=3)
NI: No Inhibition

Important findings:
There was no evidence that glycopyrronium inhibited CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2E1 and CYP3A4/5 over the concentration range tested (0.1-30 μmol/L).

Study conducted by the applicant: No
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], PR China
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.12.5　時間依存的 CYP 阻害：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS002367-13

Type of study:

In vitro investigation of the potential of glycopyrrolate to inhibit of human cytochromes (CYP) 1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4/5.

Method:

The potential of glycopyrrolate to inhibit of human CYP1A2, 2C9, 2C19, 2D6 and 3A4/5 was assessed by measuring the rate of formation of isoform specific metabolites derived from marker substrates when incubated with metabolically competent pooled human liver microsomes in the presence of NADPH. These activities were measured under linear conditions for time and protein concentration using the following marker substrates in a single cocktail: phenacetin (CYP1A2), diclofenac (CYP2C9), *S*-mephenytoin (CYP2C19), bufuralol (CYP2D6) and midazolam (CYP3A4/5) at 3 times their K_m concentration.

The potential for time dependent inhibition of CYP enzymes was investigated by a preincubation of glycopyrrolate at two concentrations (0.1 and 1 μmol/L) with human liver microsomes in the presence and absence of NADPH, followed by a 10-fold dilution and incubation in the presence of the CYP enzyme marker substrates and NADPH. The rate of formation of CYP isoform-specific metabolites was monitored by HPLC-MS/MS followed by determination of the percentage of time dependent inhibition for each test occasion.

Relevant solvent control incubations were performed and CYP isoform-selective time dependent inhibitors were used as positive controls.

Time dependent inhibition of CYP enzymes by glycopyrrolate

Concentration (μmol/L)	Isoform	%TDI Replicate 1	%TDI Replicate 2	Mean %TDI
0.1	CYP1A2	<20	<20	<20
	CYP2C9	<20	<20	<20
	CYP2C19	<20	<20	<20
	CYP2D6	<20	<20	<20
	CYP3A4/5	<20	<20	<20
1	CYP1A2	<20	<20	<20
	CYP2C9	<20	<20	<20
	CYP2C19	<20	<20	<20
	CYP2D6	<20	<20	<20
	CYP3A4/5	<20	<20	<20

Note: The upper limit of the experiment background caused by the variability of solvent controls is 20%.

Important findings:

There was no time dependent inhibition observed for glycopyrrolate at 0.1 μmol/L or 1 μmol/L for CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4/5.

Study conducted by the applicant: No

If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], PR China

Study in compliance with GLP: No

2.6.5.13　　薬物動態試験：排泄

該当なし

2.6.5.14　　薬物動態試験：胆汁中排泄

該当なし

2.6.5.15 薬物動態試験：薬物相互作用

2.6.5.15.1 ヒト肝取り込みトランスポーターOATP1B1 の阻害：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS001265-56

Type of study:

The potential for glycopyrronium to inhibit the human hepatic transporter OATP1B1 mediated uptake *in vitro*.

Method:

The effect of glycopyrronium on the OATP1B1 mediated uptake of estradiol 17β glucuronide in HEK293 cells expressing human hepatic transporter (OATP1B1) was evaluated in the concentration range 0.3 to 100 µmol/L of glycopyrronium (n=3). Rifamycin SV (0.01-10 µmol/L) and erythromycin (1-300 µmol/L) were used as positive control inhibitors (n=3).

Tabulated results:

Inhibitor	Inhibitor concentration (µmol/L)	OATP1B1 activity (% Control)*		Apparent IC_{50} (µmol/L)
		Mean	SD	
Vehicle (1%DMSO)	N/A	100	4.09	
Glycopyrronium	0.3	94.5	10.5	>100
	1	90.5	2.57	
	3	95.0	4.52	
	10	89.0	3.36	
	30	73.8	2.98	
	100	62.1	1.36	

* Corrected for passive uptake (uptake in presence of 10 µmol/L rifamycin SV when OATP1B1 is completely inhibited)
N/A Not applicable

Important findings:
Inhibition of OATP1B1 mediated uptake of estradiol 17β glucuronide (37.9%) by glycopyrronium was observed at the highest concentration tested, but not sufficient to determine an IC_{50} (IC_{50}>100 µmol/L). The rifamycin SV and erythromycin inhibited OATP1B1 activity in a concentration dependent manner and exhibited IC_{50} values of 0.130 µmol/L and 15.2 µmol/L, respectively. Therefore, the assay results of test compound are acceptable.

Study conducted by the applicant: No
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], PR China
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.15.2 ヒト排出トランスポーターP-糖蛋白（MDR1）の阻害：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS001265-54

Type of study:
The potential for glycopyrronium to inhibit the human efflux transporter P-glycoprotein (MDR1, *ABCB1*) *in vitro*.

Method:
MDCKII cells stably expressing the human efflux transporter P-gp (MDCKII-MDR1) was used and the basolateral-to-apical (B-A) transport of the probe substrate digoxin was measured across MDCKII-MDR1 cell monolayers in the absence and presence of glycopyrronium (0.3-100 µmol/L) in order to determine an apparent IC_{50} value (n=3). Verapamil (0.3-100 µmol/L) was used as positive control inhibitor (n=3).

Tabulated results:

Test compound and concentration	P_{app} B-A (cm/s × 10^{-6})	% Transported	% Inhibition*
Vehicle (no inhibitor)	10.9 ± 0.0983	100	NA
100 µmol/L verapamil	1.80 ± 0.172	0.00	100
1 µmol/L Glycopyrronium	9.66 ± 0.110	86.4	13.6
3 µmol/L Glycopyrronium	10.5 ± 0.475	95.5	4.45
10 µmol/L Glycopyrronium	10.4 ± 0.483	94.4	5.57
30 µmol/L Glycopyrronium	9.97 ± 0.514	89.8	10.2
100 µmol/L Glycopyrronium	9.92 ± 0.503	89.3	10.7
300 µmol/L Glycopyrronium	9.56 ± 0.607	85.3	14.7

* Corrected for passive permeability component (P_{app} in presence of 100 µmol/L verapamil when P-gp completely inhibited)

Important findings:
Glycopyrronium does not inhibit transport via human P-pg when expressed in MDCKII cell system. Functionality of the P-pg transporter was confirmed by the positive control inhibitor verapamil giving an acceptable apparent IC_{50} value of 3.77 µmol/L.

Study conducted by the applicant: No
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], PR China
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.15.3 ヒト排出トランスポーターBCRP の阻害：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS001265-55

Type of study:
The potential for glycopyrronium to inhibit the human efflux transporter BCRP (*ABCG2*) *in vitro*.

Method:
The basolateral-to-apical (B-A) transport of the probe substrate rosuvastatin was measured across Caco-2 cell monolayers in the absence and presence of glycopyrronium (0.3-100 µmol/L) in order to determine an apparent IC_{50} value (n=3). Novobiocin (0.1-30 µmol/L) was used as positive control inhibitor (n=3).

Tabulated results:

Test Compound and Concentration	P_{app} B-A (cm/s × 10^{-6})	% Transported	% Inhibition*
Vehicle (no inhibition)	15.1 ± 0.948	100	NA
30 µmol/L Novobiocin	3.17 ± 0.0588	0.00	100
1 µmol/L Glycopyrronium	14.3 ± 1.15	93.3	6.66
3 µmol/L Glycopyrronium	14.3 ± 1.32	93.5	6.53
10 µmol/L Glycopyrronium	14.2 ± 1.25	92.5	7.46
30 µmol/L Glycopyrronium	15.1 ± 0.904	99.7	0.310
100 µmol/L Glycopyrronium	14.3 ± 0.820	93.2	6.77
300 µmol/L Glycopyrronium	15.9 ± 0.290	107	-6.83

* Corrected for passive permeability component (Papp in presence of 30 µmol/L novobiocin when BCRP completely inhibited)

Important findings:
Glycopyrronium does not inhibit transport via the human BCRP in the Caco-2 cell system. Functionality of the BCRP transporter was confirmed by the positive control inhibitor novobiocin giving an acceptable apparent IC_{50} value of 1.27 µmol/L.

Study conducted by the applicant: No
If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], PR China
Study in compliance with GLP: No

2.6.5.15.4 トランスポーター阻害及び基質の可能性：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：16AZTrP2R2

Type of study:

In vitro assessment of glycopyrronium as an inhibitor of the human transporter proteins OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, OATP1B3, MATE1 and MATE2K, and as a substrate of the human transporter proteins OAT1, OAT3, OCT1, OCT2, MATE1, MATE2K, P-gp and BCRP

Method:

In the inhibition assessment, the *in vitro* transfected test systems were incubated with the probe substrate in the presence and absence of glycopyrronium as presented in the table below. Probe substrate concentrations were measured by LC-MS/MS. Positive inhibitors were used to confirm the functionality of the transporters in the cell systems.

In the substrate assessment, the cells were incubated with glycopyrronium (0.1-100 µmol/L) and a relative efflux- and influx rate ratio was calculated for the efflux and uptake transporters, respectively (i.e. the efflux/influx rate ratio of glycopyrronium in transfected cells over that in non-transfected cells). Positive controls were included confirm the functionality of the transporters in the cell systems. In cases with ratios greater than 2.0 (OCT1, OCT2, MATE1, and MATE2K) the transport could be inhibited with known inhibitors.

Tabulated results: Inhibitor assessment summary of glycopyrronium

Transporter	Test system	Probe substrate	TA concentration range (µmol/L)	Maximum inhibition	Apparent IC_{50} (µmol/L)
OAT1	OAT1- and vector-transfected HEK293 cells	PAH		22.8% at 0.3 µmol/L	no inhibition
OAT3	OAT3- and vector-transfected HEK293 cells	Furosemide		13.9% at 30 µmol/L	no inhibition
OCT1	OCT1- and vector-transfected HEK293 cells	MPP^+		45.9% at 100 µmol/L	>100
OCT2	OCT2- and vector-transfected HEK293 cells	Metformin	0.3-100	56.3% at 100 µmol/L	N.D.[a]
OATP1B3	OATP1B3- and vector-transfected HEK293 cells	Atorvastatin		10.7% at 10 µmol/L	no inhibition
MATE1	MATE1- and vector-transfected HEK293 cells	Metformin		59.9%[b] at 100 µmol/L	N.D.[c]
MATE2K	MATE2K- and vector-transfected HEK293 cells	Metformin		33.5% at 100 µmol/L	> 100

a: At lower concentrations (0.3-10 µmol/L), glycopyrronium showed apparent stimulation towards OCT2. At higher concentration (25 and 100 µmol/L), glycopyrronium showed concentration-dependent inhibition towards OCT2.

b: The mean value of the % of inhibition at 100 µmol/L from Assay Batch 1 (56.6%) and Assay Batch 2 (63.2%).

c: At lower concentrations (0.3-10 µmol/L), glycopyrronium showed concentration-dependent inhibition towards MATE1; at 30 µmol/L, glycopyrronium showed less inhibition than it did at lower concentrations; at 100 µmol/L, glycopyrronium showed greater than 50% inhibition towards MATE1.

N.D.: not determined.

Substrate assessment summary of glycopyrronium

Transporter	Test system	TA concentration range (μmol/L)	Substrate classification
OAT1	OAT1- and vector-transfected HEK293 cells	0.1-100	No
OAT3	OAT3- and vector-transfected HEK293 cells		No
OCT1	OCT1- and vector-transfected HEK293 cells		Yes
OCT2	OCT2- and vector-transfected HEK293 cells		Yes
MATE1	MATE1- and vector-transfected HEK293 cells		Yes
MATE2K	MATE2K- and vector-transfected HEK293 cells		Yes
P-gp	MDR1-MDCK and MDCK cells		No
BCRP	BCRP-MDCK and MDCK cells		No

Important findings: Under the current assay conditions with the *in vitro* transfected test systems utilized in this study

- Glycopyrronium inhibited probe substrate transport via OCT2 and MATE1. Glycopyrronium inhibited probe substrate transport via OCT1 and MATE2K, but inhibition was < 50% at the highest test concentration of 100 μmol/L. Glycopyrronium did not inhibit substrate transport via OAT1, OAT3 and OATP1B3.
- Glycopyrronium is a substrate of OCT1, OCT2, MATE1, and MATE2K, but is not a substrate of OAT1, OAT3, P-gp or BCRP

Study conducted by the applicant: No

If no, indicate the name and address of the institute that conducted the study: [redacted], [redacted], [redacted], [redacted], [redacted], USA

Study in compliance with GLP: No

2.6.5.15.5　　ヒト肝細胞における能動輸送：グリコピロニウム

被験物質：グリコピロニウム

試験番号：BS000901-62

Type of study:
In vitro assessment of the transport characteristics of glycopyrronium and the unbound intracellular to extracellular concentration ratio of drug at steady state in human hepatocytes.

Method:
Concentration-time profiles of glycopyrronium was obtained from serial sampling from incubations run over 2h in human cryopreserved hepatocytes at 1.0 µmol/L in absence and presence of rifamycin SV (50 µmol/L) and 1-ABT (1000 µmol/L). Pooled human hepatocytes (10 donors, mixed gender) were obtained from Bioreclamation IVT (Baltimore, MD). The cellular fraction is separated from that of the medium using an oil-spin method. Incubations with test compound and positive control (1 µmol/L) were performed separately in serum free Leibovitz L-15 medium containing 1% BSA in absence and presence of inhibitors for OATPs (rifamycin SV) and a broad-range of CYP enzymes (1-ABT, 1000 µmol/L) at a final hepatocyte concentration of 1.0 million cells/mL. Each incubation was performed in duplicate and samples were analysed by LC-MS/MS. A compartmental model, built around five adjustable parameters that define active and passive transport ($CL_{int,up}$ and $CL_{int,diff}$, respectively), metabolism ($CL_{int,met}$) and non-specific binding to the cells (K_{mem}) as well as intracellular binding (fu_{cell}) in the system, is fitted to the experimental data. Binding to BSA is determined by equilibrium dialysis in a separate experiment. The known OATP1B1/1B3 substrate pitavastatin (1 µmol/L) was used as a positive control.

Tabulated results:

Parameter estimate values for Glycopyrronium

Parameter	Value [a]	%CV
$CL_{int,up}$ (µL/min/million cells)	1.3	23
$CL_{int,diff}$ (µL/min/million cells)	3.8	8.2
$CL_{int,met}$ (µL/min/million cells)	2.0	14
fu_{cell}	0.079	2.5
K_{mem} (mL/million cells)	0.0089	7.8
$LogK_{BSA}$ (mg/mL)	-1.9	-
K_p	11	-
$K_{p,u,u}$	0.89	-
F_{active} (%)	26	-

a Mean values generated from BE000901-63 (n=2) and BE001176-47 (n=2)

Important findings:

Active transport contributes to 26% of the total uptake of glycopyrronium in human hepatocytes. The contribution of active transport is small but statistically significant.

Metabolic elimination, strong in relation to the active transport, leads to overlapping uptake profiles at inhibited and non-inhibited conditions and drives the unbound cell-to-media concentration ratio of glycopyrronium, < 1 at steady-state ($K_{p,u,u}$=0.89).

Study conducted by the applicant: Yes

Study in compliance with GLP: No

2.6.5.16　　薬物動態試験：その他

該当なし