

CB11 は 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 38.3 分に検出され, $[M-H]^-$ として m/z .09229 を示し, 組成式は $C_{20}O_9$ と推定された。主なフラグメントイオンとして, m/z を生成した (Figure 47)。CB11 はグルクロン酸抱合体と推定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 24に示す。

CB12 は 5 mg/kg投与群の胆汁において保持時間 40.5 分に検出され, $[M+H]^+$ として m/z .06157 を示し, 組成式は $C_{20}O_2$ と推定された。主なフラグメントイオンとして, m/z を生成した (Figure 48)。CB12 は環化体と推定された。検出されたフラグメンテーションの帰属を Appendix 25に示す。

15 考察

サルに ^{14}C -TM5509 を単回経口投与して得られた胆汁中には, 5 mg/kg 投与群, 20 mg/kg 投与群, 80 mg/kg 投与群及び 300 mg/kg 投与群のいずれにおいても, 未変化体 TM5509 が主成分の 1 つとして検出された他, 投与後 0~8 時間において, CB05 (酸化的脱塩素体とグルクロン酸抱合体の混合物), CB06 (グルクロン酸抱合体) 及び CB12 (環化体) が, 投与後 8~48 時間において CB01 (酸化体のグルクロン酸抱合体, 酸化体のグルクロン酸及び硫酸抱合体の混合物, 酸化及び水和された代謝物, 2 酸化及び水和された代謝物の混合物), CB03 (2 酸化及び水和された代謝物 2 種, 4'-sulfooxy TM5509, グルクロン酸抱合体, 酸化及び水和された代謝物の混合物) 及び CB06 がそれぞれ主代謝物として認められた。

80 mg/kg 投与群の肝臓中には未変化体 TM5509 が主成分の 1 つとして検出された他, CL04 (CB01), CL05 (CB03 の 4 種+酸化体のグルクロン酸抱合体の混合物) が主代謝物として認められた。構造を推定した代謝物のうち, CB10 及び CB11 はグルクロン酸抱合体と推定されたが, 逆相系の HPLC 分析系において, 未変化体 TM5509 よりも溶出が遅く, 親水性が低いと考えられる。そのため, 単純に TM5509 にグルクロン酸抱合しているのではなく, 例えば CB12 のように脱水を伴って環化した構造にさらに水和した代謝物のグルクロン酸抱合体ということも想定される。

TM5509 は構造中に水酸基を含まないため, CB06 をはじめとする, いくつかの TM5509 のグルクロン酸抱合体と推定された代謝物は, アシルグルクロニドとその転位体の可能性も考えられる。また, CB05aは酸化的脱塩素反応によりキノンイミンを形成している。先に実施された ^{14}C -TM5509 のサルにおける組織分布試験 (AE-7287-G) において, 300 mg/kg投与群の投与後 48 時間における肝臓中への放射能の残存率は投与量の 3.46%であった。一方, 本試験において, 80 mg/kg投与群の投与後 48 時間における肝臓からの放射能の抽出率は比較的 low 値 (71.7%) であった。アシルグルクロニドやキノンイミンといった高い反応性が懸念される代謝物が肝臓中のタンパクと共有結合している可能性も想定されるが, 肝臓からの抽出画分中にもこれらの代謝物 (CL06a, CL07) は認め

られていることから、これらの代謝物の共有結合と肝臓の放射能残存率との関連性は低いと考えられる。

16 資料保存

試験に関する試験記録文書、試験計画書 (正本 1 部)、試験計画書変更書 (各正本 1 部)、交信記録、試験成績に関する記録 (生データ) 及び最終報告書 (正本 1 部) については、積水メディカル株式会社が定める資料保存施設にて試験終了後 10 年間保存する。その後の処置については、試験委託者と協議する。

17 適用基準

当試験実施の適用基準は薬事法施行規則第 43 条の「申請資料の信頼性の基準」に従った。また、当試験方法及び操作は、積水メディカル株式会社の定める標準操作手順書に従って実施した。

18 適用ガイドライン

当試験は 1998 年 6 月 26 日付厚生省医薬審第 496 号「非臨床薬物動態試験ガイドライン」に基づいて実施した。

19 参考文献

三次孝一, ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務 (^{14}C -TM5509 のサルにおける胆汁中排泄率の測定), 最終報告書, 積水メディカル (株) 薬物動態研究所, 2014 年, AE-7245-G

三次孝一, ^{14}C -TM5509 の薬物動態試験業務 (^{14}C -TM5509 のサルにおける組織内分布率の測定), 最終報告書, 積水メディカル (株) 薬物動態研究所, 2014 年, AE-7287-G

20 TABLES AND FIGURES

Table 1 Recovery of radioactivity in bile after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys

Time (h)	Dose (mg/kg)	Animals	Recovery (%) of radioactivity	
			Recovery ¹⁾	Column ²⁾
0-8	5	No.S2	102.2	96.0
		No.S3	97.1	–
		No.S13	95.5	–
	20	No.S4	97.5	102.0
		No.S5	98.4	–
		No.S6	95.2	–
	80	No.S7	100.1	103.1
		No.S8	95.3	–
		No.S9	96.5	–
	300	No.S10	95.7	100.6
		No.S11	96.2	–
		No.S12	95.0	–
8-48	5	No.S2	94.0	99.2
		No.S3	98.5	–
		No.S13	99.1	–
	20	No.S4	95.5	102.5
		No.S5	96.4	–
		No.S6	100.8	–
	80	No.S7	101.7	99.2
		No.S8	98.6	–
		No.S9	97.6	–
	300	No.S10	101.3	100.4
		No.S11	92.7	–
		No.S12	100.7	–

1): Recovery of radioactivity through sample processing

2): Representative value of the group

Table 2 Recovery of radioactivity in liver after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys

Time (h)	Dose (mg/kg)	Recovery (%) of radioactivity			Column
		Extraction	Reconstitution	Recovery ¹⁾	
48	80	71.7	83.0	59.5	103.5

1): Recovery of radioactivity through sample processing

Table 3 Composition of TM5509 and its metabolites in bile 0-8 h, after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys

Peak name	% in sample				% of dose			
	Group1	Group2	Group3	Group4	Group1	Group2	Group3	Group4
CB01	7.8 ± 3.5	3.7 ± 0.8	7.7 ± 1.6	5.8 ± 5.6	1.1 ± 0.6	0.2 ± 0.2	1.1 ± 0.6	0.8 ± 0.9
CB02	6.3 ± 1.9	5.1 ± 0.5	3.0 ± 2.7	ND	0.8 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.5	ND
CB03	4.6 ± 1.8	6.8 ± 3.3	2.8 ± 3.0	3.1 ± 2.7	0.6 ± 0.3	0.5 ± 0.4	0.3 ± 0.2	0.3 ± 0.3
CB04	2.3 ± 1.0	0.5 ± 0.9	1.4 ± 1.6	0.5 ± 0.9	0.3 ± 0.2	0.0 ¹⁾ ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.0 ¹⁾ ± 0.1
CB05	11.1 ± 3.8	11.0 ± 7.2	16.2 ± 9.1	28.6 ± 10.0	1.4 ± 0.4	0.5 ± 0.3	2.7 ± 2.1	3.4 ± 2.1
CB06	21.9 ± 5.3	29.8 ± 1.5	24.6 ± 6.5	21.1 ± 6.5	2.7 ± 0.8	1.8 ± 1.2	3.2 ± 1.3	2.3 ± 0.3
CB07	1.3 ± 1.1	ND	ND	ND	0.2 ± 0.2	ND	ND	ND
CB08	1.8 ± 0.7	0.3 ± 0.6	0.5 ± 0.9	ND	0.3 ± 0.1	ND	0.1 ± 0.2	ND
CB09 ²⁾	7.9 ± 3.5	7.8 ± 3.5	4.7 ± 1.4	4.2 ± 1.3	1.0 ± 0.6	0.4 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.5 ± 0.1
CB10	0.4 ± 0.8	0.8 ± 1.3	2.2 ± 1.0	1.9 ± 0.7	0.1 ± 0.1	0.1 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.0
CB11	2.5 ± 0.5	2.7 ± 1.4	5.2 ± 1.5	5.3 ± 0.5	0.3 ± 0.1	0.2 ± 0.2	0.7 ± 0.3	0.6 ± 0.1
CB12	13.1 ± 5.6	13.9 ± 3.3	16.4 ± 1.6	19.2 ± 5.3	1.6 ± 0.4	0.9 ± 0.7	2.3 ± 1.2	2.2 ± 0.6

1): < 0.05%

2): TM5509

ND: Not detected as radioactive peak or unclear peak

Data obtained from individual samples of 3 animals/group was expressed as Mean ± S.D.

Table 4 Composition of TM5509 and its metabolites in bile 8-48 h, after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys

Peak name	% in sample				% of dose			
	Group1	Group2	Group3	Group4	Group1	Group2	Group3	Group4
CB01	30.8 ± 6.0	26.4 ± 1.0	25.3 ± 8.4	19.2 ± 4.5	10.0 ± 3.2	9.5 ± 1.3	6.8 ± 2.0	5.7 ± 1.6
CB02	3.2 ± 3.8	8.2 ± 2.2	4.7 ± 8.2	15.0 ± 13.5	1.0 ± 1.3	2.9 ± 0.8	1.4 ± 2.4	4.5 ± 3.9
CB03	12.7 ± 1.0	15.0 ± 4.5	13.8 ± 4.3	8.5 ± 2.0	4.1 ± 0.4	5.5 ± 2.4	4.0 ± 1.9	2.5 ± 0.7
CB04	2.9 ± 0.2	2.2 ± 0.3	0.8 ± 1.3	2.1 ± 1.9	0.9 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.3 ± 0.5	0.6 ± 0.5
CB05	2.9 ± 1.0	2.0 ± 0.8	1.6 ± 1.6	2.2 ± 1.3	1.0 ± 0.4	0.7 ± 0.2	0.4 ± 0.4	0.6 ± 0.3
CB06	12.7 ± 5.5	10.1 ± 1.3	11.2 ± 0.4	14.9 ± 3.5	3.9 ± 1.2	3.6 ± 0.8	3.2 ± 1.3	4.5 ± 1.1
CB07	3.4 ± 0.8	2.4 ± 0.5	2.1 ± 1.9	ND	1.1 ± 0.3	0.8 ± 0.1	0.5 ± 0.5	ND
CB08	0.9 ± 0.8	ND	ND	ND	0.2 ± 0.2	ND	ND	ND
CB09 ¹⁾	8.5 ± 1.8	4.3 ± 0.8	4.0 ± 0.5	4.6 ± 0.3	2.8 ± 1.0	1.5 ± 0.3	1.2 ± 0.6	1.4 ± 0.3
CB10	ND	ND	ND	2.0 ± 0.1	ND	ND	ND	0.6 ± 0.1
CB11	1.2 ± 1.2	0.3 ± 0.6	2.5 ± 0.6	3.1 ± 0.1	0.3 ± 0.3	0.1 ± 0.2	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.1
CB12	1.4 ± 1.5	0.8 ± 0.7	2.0 ± 0.8	3.5 ± 1.1	0.4 ± 0.4	0.3 ± 0.3	0.5 ± 0.1	1.0 ± 0.3

1): TM5509

ND: Not detected as radioactive peak or unclear peak

Data obtained from individual samples of 3 animals/group was expressed as Mean ± S.D.

Table 5 Composition of TM5509 and its metabolites in liver 48 h, after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys

Peak name	% in sample
CL01	1.2
CL02	0.9
CL03	2.8
CL04	15.5
CL05	16.3
CL06	1.8
CL07	1.4
CL08	1.5
CL09 (TM5509)	8.9

Data was obtained from the pooled sample of three animals.

Table 6 Summary of accurate mass data of TM5509 and its metabolites in bile 0-48 h, after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 5 mg/kg)

Peak name	Molecular formula [M-H] ⁻	Accurate mass (<i>m/z</i>)		Δ		Nominal mass shift (Da)
		exact	accurate	mDa	ppm	
CB01a				+0.67	+1.24	+192
CB01b				+0.85	+1.37	+272
CB01c				-0.11	-0.29	+34
CB01d				+0.13	+0.32	+50
CB02				-0.06	-0.16	+34
CB03a				-0.75	-1.87	+50
CB03b (4'-sulfooxy TM5509)				+0.47	+1.05	+96
CB03c				+0.42	+1.05	+50
CB03d				+0.35	+0.67	+176
CB03e				-0.18	-0.47	+34
CB04				-0.01	-0.02	+192
CB05a				-0.42	-1.26	-18
CB05b				+0.41	+0.78	+176
CB06				+0.52	+0.99	+176
CB07 (4'-hydroxy TM5509)				-0.12	-0.33	+16
CB08 (3'-hydroxy TM5509)				+0.03	+0.08	+16
CB09 (TM5509)				-0.02	-0.06	-
CB11				+1.26	+2.40	+176
CB12				-1.36	-4.07	-16

ppm = [accurate / exact - 1] × 10⁶

1): The protonated molecule was detected ([M+H]⁺).

Table 7 Summary of accurate mass data of TM5509 and its metabolites in bile 0-48 h, after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 20 mg/kg)

Peak name	Molecular formula [M-H] ⁻	Accurate mass (<i>m/z</i>)		Δ		Nominal mass shift (Da)
		exact	accurate	mDa	ppm	
CB01a	—	—	—	+0.44	+0.81	+192
CB01b	—	—	—	+0.50	+0.80	+272
CB01c	—	—	—	-0.09	-0.23	+34
CB01d	—	—	—	-0.04	-0.10	+50
CB02	—	—	—	+0.15	+0.39	+34
CB03a	—	—	—	-0.94	-2.35	+50
CB03b (4'-sulfooxy TM5509)	—	—	—	+0.35	+0.78	+96
CB03c	—	—	—	+0.64	+1.60	+50
CB03d	—	—	—	+0.69	+1.31	+176
CB03e	—	—	—	+0.27	+0.70	+34
CB04	—	—	—	-0.09	-0.17	+192
CB05a	—	—	—	-0.45	-1.36	-18
CB05b	—	—	—	+0.86	+1.63	+176
CB06	—	—	—	+0.46	+0.87	+176
CB07 (4'-hydroxy TM5509)	—	—	—	-0.20	-0.55	+16
CB08 (3'-hydroxy TM5509)	—	—	—	0.26	-0.71	+16
CB09 (TM5509)	—	—	—	-0.12	-0.34	-
CB10	—	—	—	+1.10	+2.09	+176
CB11	—	—	—	+0.80	+1.52	+176
CB12	—	—	—	-0.72	-2.16	-16

$$\text{ppm} = [\text{accurate} / \text{exact} - 1] \times 10^6$$

1): The protonated molecule was detected ([M+H]⁺).

Table 8 Summary of accurate mass data of TM5509 and its metabolites in bile 0-48 h, after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 80 mg/kg)

Peak name	Molecular formula [M-H] ⁻	Accurate mass (<i>m/z</i>)		Δ		Nominal mass shift (Da)
		exact	accurate	mDa	ppm	
CB01a				+0.34	+0.63	+192
CB01b				+0.54	+0.87	+272
CB01c				+0.03	+0.08	+34
CB01d				+0.11	+0.27	+50
CB02				-0.12	-0.31	+34
CB03a				-0.82	-2.05	+50
CB03b (4'-sulfooxy TM5509)				+0.22	+0.49	+96
CB03c				+0.25	+0.62	+50
CB03d				+0.71	+1.35	+176
CB03e				+0.34	+0.89	+34
CB04				+0.34	+0.63	+192
CB05a				-0.08	-0.24	-18
CB05b				+1.02	+1.94	+176
CB06				+0.37	+0.70	+176
CB07 (4'-hydroxy TM5509)				+0.11	+0.30	+16
CB08 (3'-hydroxy TM5509)				-0.21	-0.57	+16
CB09 (TM5509)				-0.03	-0.09	-
CB10				+0.86	+1.63	+176
CB11				+0.92	+1.75	+176
CB12				-0.96	-2.87	-16

$$\text{ppm} = [\text{accurate} / \text{exact} - 1] \times 10^6$$

1): The protonated molecule was detected ([M+H]⁺).

Table 9 Summary of accurate mass data of TM5509 and its metabolites in bile 0-48 h, after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 300 mg/kg)

Peak name	Molecular formula [M-H] ⁻	Accurate mass (<i>m/z</i>)		Δ		Nominal mass shift (Da)
		exact	accurate	mDa	ppm	
CB01a				+0.81	+1.49	+192
CB01b				+1.00	+1.61	+272
CB01c				+0.47	+1.22	+34
CB01d				+0.47	+1.17	+50
CB02				+0.59	+1.54	+34
CB03a				-0.63	-1.57	+50
CB03b (4'-sulfooxy TM5509)				+0.82	+1.84	+96
CB03c				+0.85	+2.12	+50
CB03d				+1.39	+2.64	+176
CB03e				+0.77	+2.00	+34
CB04				+0.56	+1.03	+192
CB05a				+0.18	+0.54	-18
CB05b				+0.93	+1.77	+176
CB06				+0.76	+1.44	+176
CB07 (4'-hydroxy TM5509)				+0.24	+0.66	+16
CB08 (3'-hydroxy TM5509)				+0.11	+0.30	+16
CB09 (TM5509)				+0.29	+0.83	-
CB10				+1.36	+2.59	+176
CB11				+1.57	+2.98	+176
CB12				-1.04	-3.11	-16

$$\text{ppm} = [\text{accurate} / \text{exact} - 1] \times 10^6$$

1): The protonated molecule was detected ([M+H]⁺).

Table 10 Summary of accurate mass data of TM5509 and its metabolites in liver 48 h, after a single oral administration of ^{14}C -TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 80 mg/kg)

Peak name	Molecular formula [M-H] ⁻	Accurate mass (<i>m/z</i>)		Δ		Nominal mass shift (Da)
		exact	accurate	mDa	ppm	
CL04a				-0.53	-0.98	+192
CL04b				-0.41	-0.66	+272
CL04c				-0.44	-1.15	+34
CL04d				-0.51	-1.27	+50
CL05a				-0.71	-1.77	+50
CL05b (4'-sulfooxy TM5509)				-0.55	-1.23	+96
CL05c				-0.52	-1.30	+50
CL05d				-0.69	-1.27	+192
CL05e				-1.21	-2.23	+192
CL06a				-0.87	-2.62	-18
CL06b				-0.90	-1.71	+176
CL07				-0.35	-0.67	+176
CL08a (4'-hydroxy TM5509)				-0.69	-1.88	+16
CL08b (3'-hydroxy TM5509)				-0.45	-1.23	+16
CL09 (TM5509)				-0.54	-1.54	-

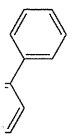

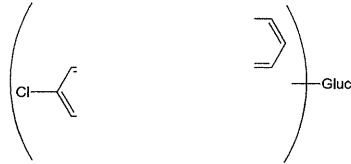



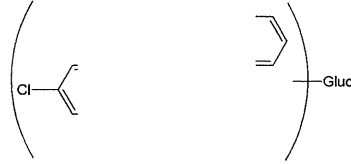

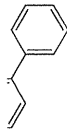
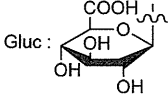
$$\text{ppm} = [\text{accurate} / \text{exact} - 1] \times 10^6$$

Table 11 Estimated chemical structures of TM5509 metabolites

Peak name	Structure	Peak name	Structure
CB01a, CL04a		CB01b, CL04b	
CB01c, CL04c		CB01d, CL04d	
CB02		CB03a, CL05a	
CB03b, CL05b (4'-sulfooxy TM5509)		CB03c, CL05c	
CL05d		CB03d	
CB03e		CB04, CL05e	

Continued

Table 11 Continued

Peak name	Structure	Peak name	Structure
CB05a, CL06a	- 	CB05b, CL06b	
CB06, CL07		CB07, CL08a (4'-hydroxy TM5509)	
CB08, CL08b (3'-hydroxy TM5509)		CB09, CL09 (TM5509)	
CB10		CB11	
CB12			

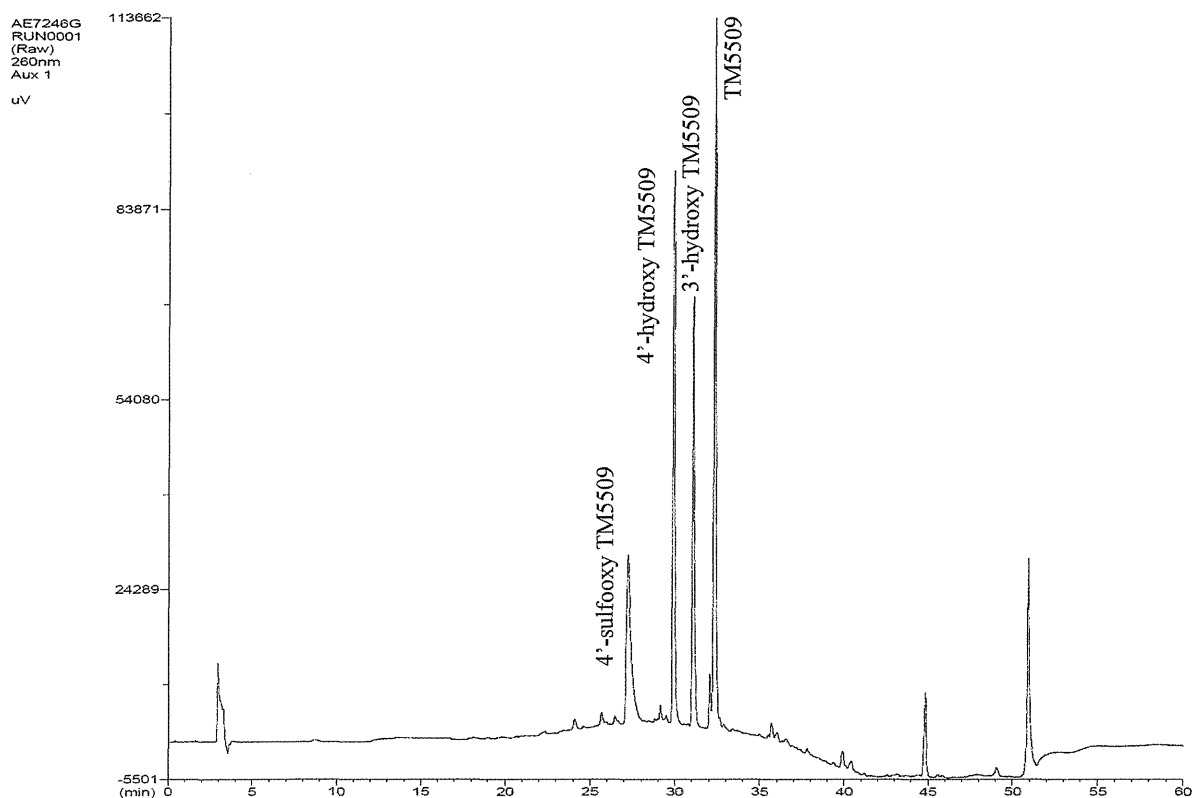


Figure 1 HPLC-UV chromatogram of authentic standards

HPLC conditions

Column : XBridge Shield RP18, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm L (Waters)
 Mobile phase : A; 10 mmol/L ammonium acetate containing 0.1% acetic acid
 B; Acetonitrile

Gradient :

Time (min)	0	5	20	35	45	45.1	60
B%	5	5	40	90	90	5	5

Flow rate : 1.0 mL/min

Column temperature : 40°C

UV detection : 260 nm

Run time : 60 min

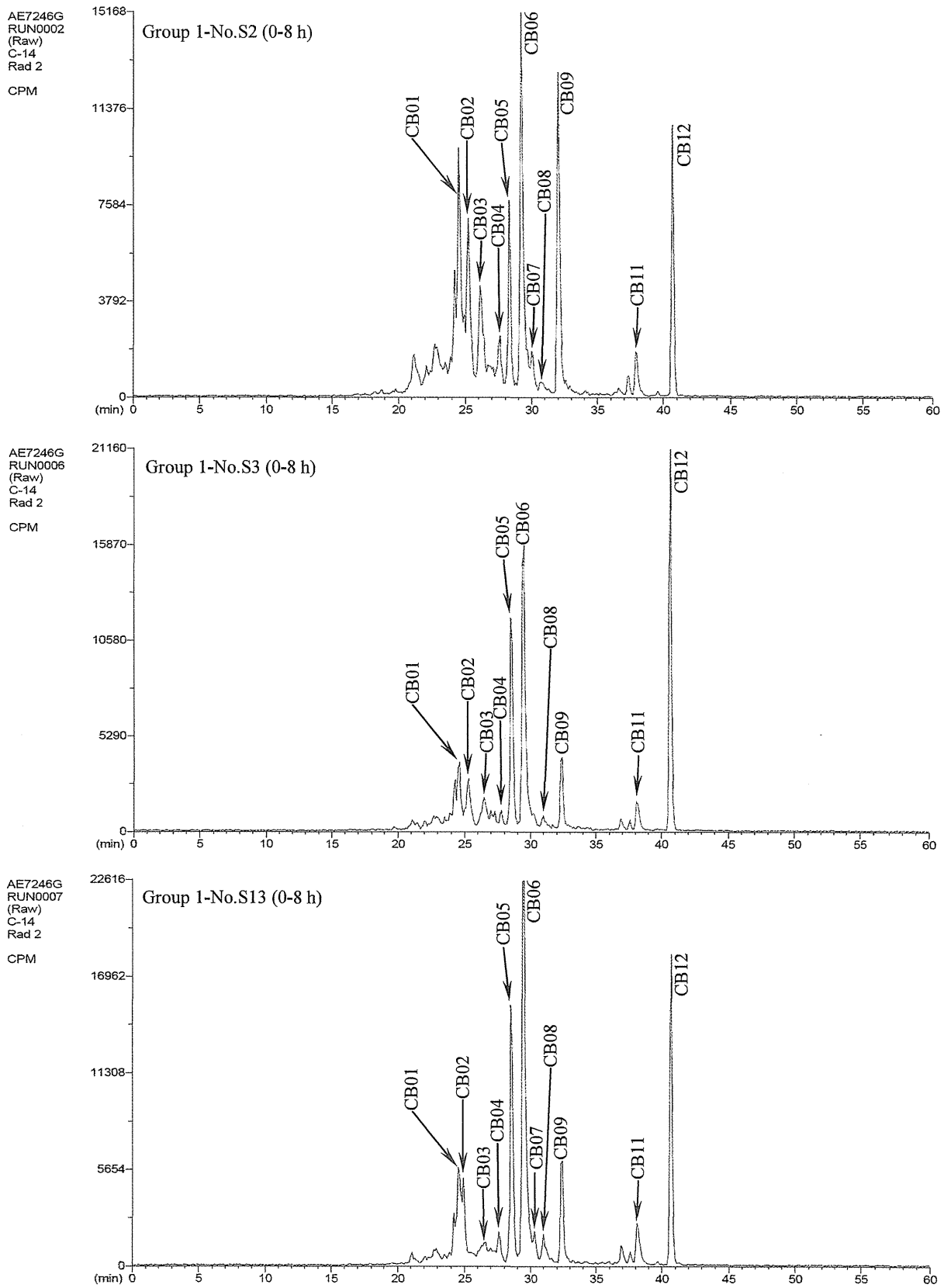


Figure 2 Radiochromatograms of TM5509 and its metabolites in bile after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 5 mg/kg)

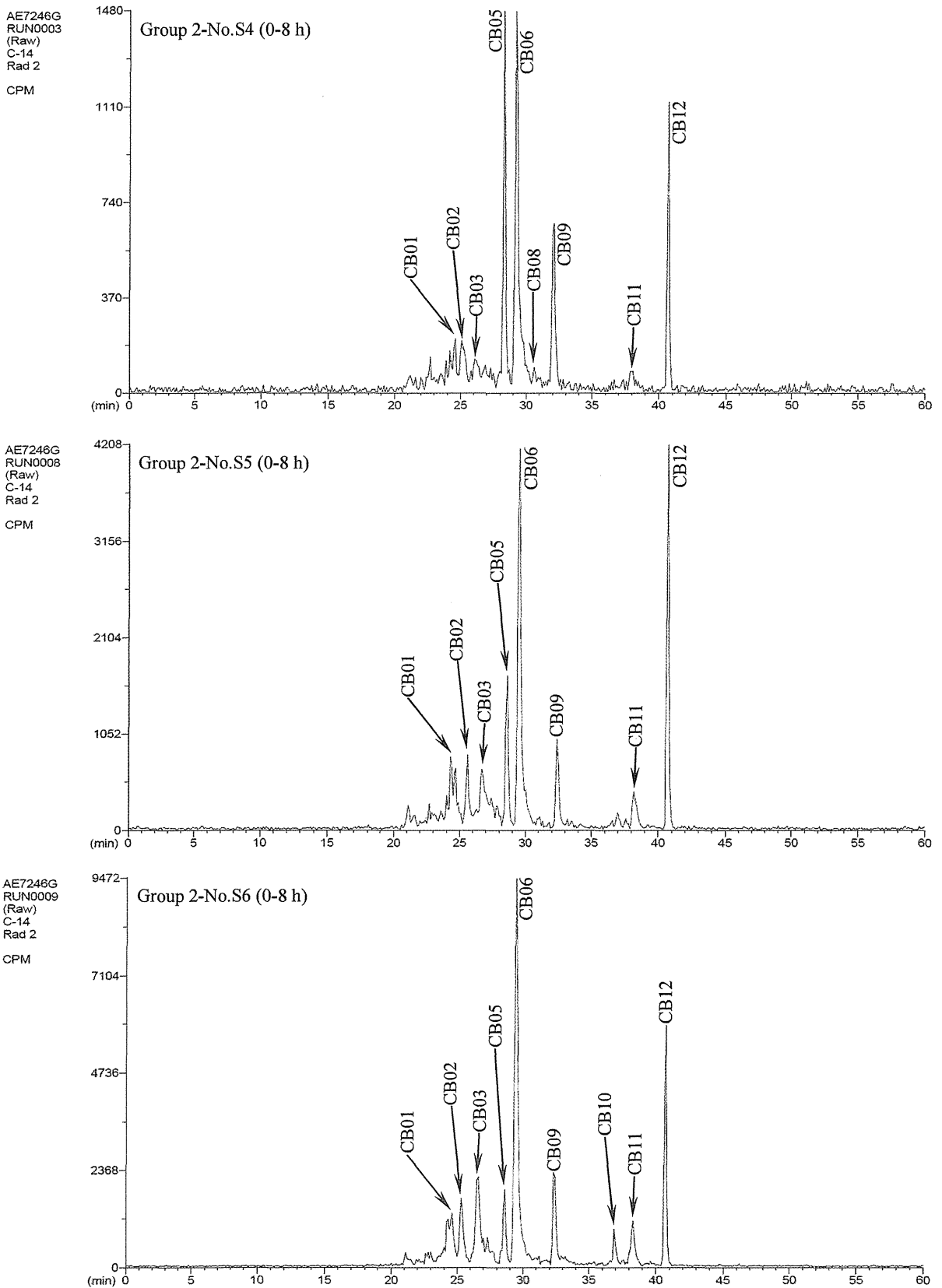


Figure 3 Radiochromatograms of TM559 and its metabolites in bile after a single oral administration of ¹⁴C-TM559 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 20 mg/kg)

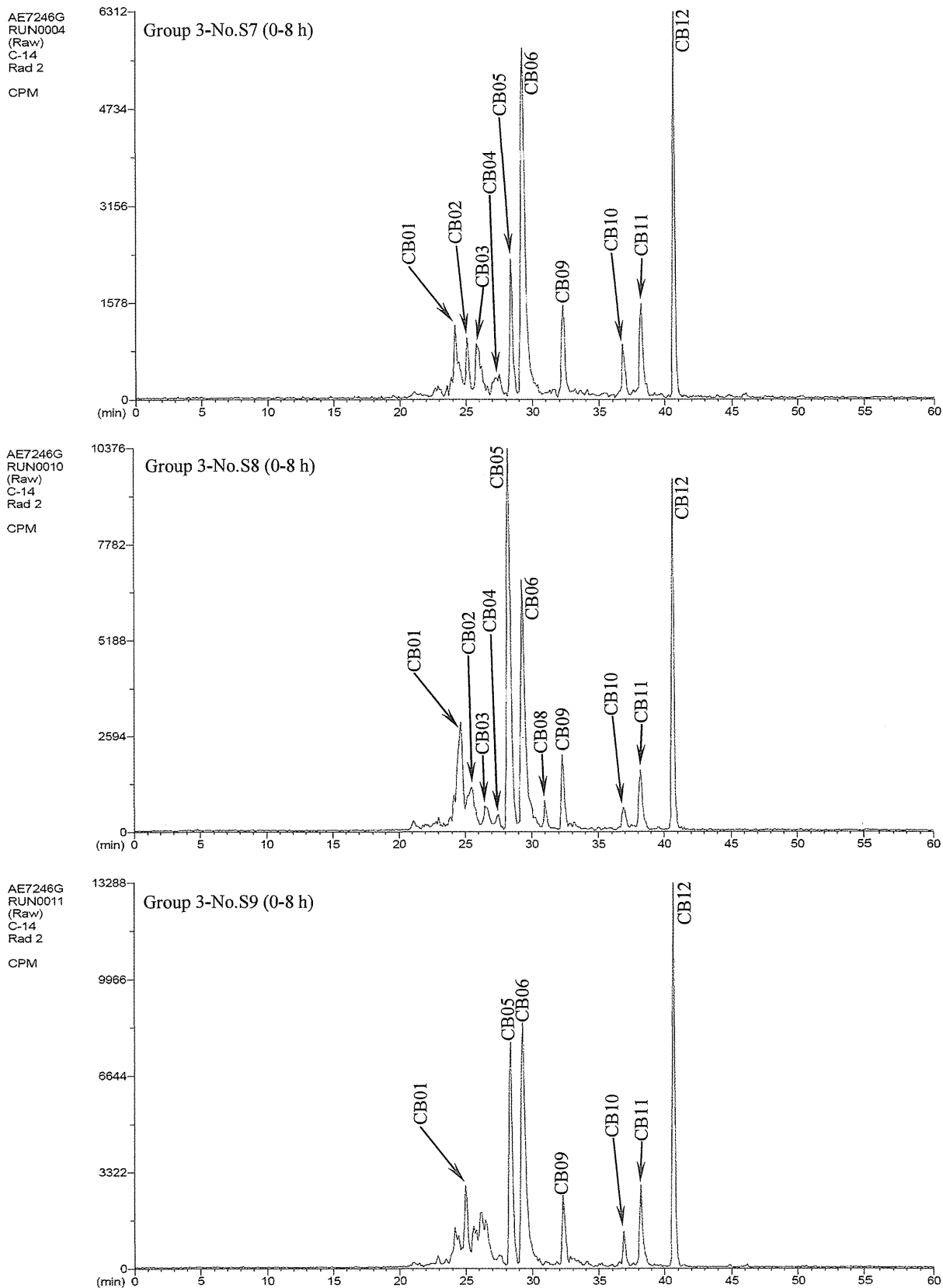


Figure 4 Radiochromatograms of TM5509 and its metabolites in bile after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 80 mg/kg)

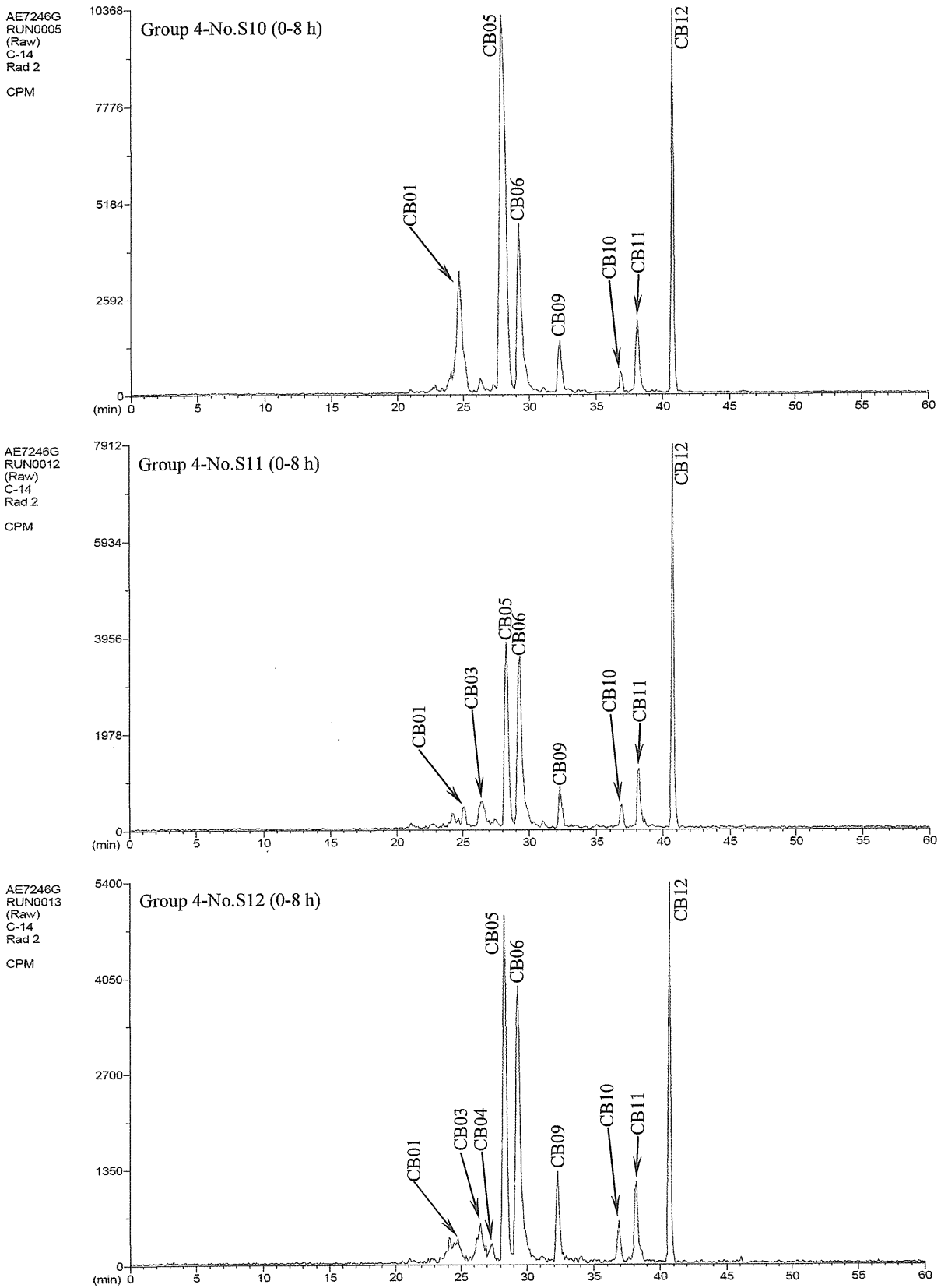


Figure 5 Radiochromatograms of TM5509 and its metabolites in bile after a single oral administration of ¹⁴C-TM5509 to fasting male cynomolgus monkeys (dose: 300 mg/kg)