

Table 4 Distribution of radioactivity to blood cells and the ratio of the concentrations of radioactivity in blood to that in plasma 1, 4, and 24 h after single intravenous bolus administration of [^{14}C]P092 maleate to male monkeys at 1 mg/kg

Time	Hematocrit value (H_t , %)	Radioactivity concentration (ng eq./mL)		Distribution of radioactivity (T, %) ^{a)}	R_B ^{b)}
		Blood (C_b)	Plasma (C_p)		
1 h	44.0	170.9	101.5	66.7	1.68
4 h	40.0	126.0	63.4	69.8	1.99
24 h	36.0	62.9	46.6	52.6	1.35

a) $T (\%) = (1 - C_p/C_b \times [100 - H_t] / 100) \times 100$

b) $R_B = C_b/C_p$

Table 5 Radioactivity concentrations in tissues 1, 24, and 168 h after single intravenous bolus administration of [^{14}C]P092 maleate to male monkeys at 1 mg/kg

Tissue	Radioactivity concentration, ng eq./mL or g (Tissue/plasma ratio)		
	1 h	24 h	168 h
	Blood	168.3 (1.87)	62.9 (1.35)
Plasma	90.2 (1.00)	46.6 (1.00)	34.9 (1.00)
Cerebral cortex	76.0 (0.84)	75.2 (1.61)	166.0 (4.76)
Striatum	50.2 (0.56)	73.0 (1.57)	116.2 (3.33)
Hippocampus	72.1 (0.80)	68.4 (1.47)	193.1 (5.53)
Hypothalamus	303.6 (3.37)	119.9 (2.57)	246.8 (7.07)
Cerebellum	87.1 (0.97)	73.8 (1.58)	187.2 (5.36)
Medulla oblongata	56.3 (0.62)	64.7 (1.39)	154.3 (4.42)
Spinal cord	25.1 (0.28)	34.7 (0.74)	87.1 (2.50)
Pituitary	2924.5 (32.42)	4161.5 (89.30)	5785.9 (165.79)
Eyeball	80.6 (0.89)	283.8 (6.09)	370.0 (10.60)
Submaxillary gland	2096.2 (23.24)	2360.5 (50.65)	3832.9 (109.83)
Mesenteric lymph nodes	1526.5 (16.92)	2270.0 (48.71)	4501.3 (128.98)
Thyroid	4815.7 (53.39)	2417.3 (51.87)	851.4 (24.40)
Thymus	991.7 (10.99)	7492.9 (160.79)	2584.5 (74.05)
Heart	7868.9 (87.24)	4835.8 (103.77)	1735.5 (49.73)
Lung	16588.7 (183.91)	12499.3 (268.23)	12687.8 (363.55)
Liver	7905.0 (87.64)	5410.2 (116.10)	3961.6 (113.51)
Adrenal	7381.2 (81.83)	10530.4 (225.97)	14988.5 (429.47)
Kidney	10277.2 (113.94)	5524.9 (118.56)	3965.6 (113.63)
Spleen	7165.9 (79.44)	10878.9 (233.45)	14009.9 (401.43)
Pancreas	4581.9 (50.80)	4677.2 (100.37)	7198.1 (206.25)
Testis	331.0 (3.67)	244.2 (5.24)	775.9 (22.23)
Artery	345.8 (3.83)	232.8 (5.00)	333.5 (9.56)
Skin	239.4 (2.65)	218.6 (4.69)	327.6 (9.39)
Skeletal muscle	1517.4 (16.82)	1483.2 (31.83)	521.8 (14.95)
Bone marrow	223.8 (2.48)	771.8 (16.56)	863.1 (24.73)
White adipose tissue	804.5 (8.92)	220.4 (4.73)	387.6 (11.11)
Brown adipose tissue	7547.1 (83.67)	9652.2 (207.13)	9032.1 (258.80)
Gallbladder	1271.6 (14.10)	1795.1 (38.52)	1112.6 (31.88)
Bile	3488.0 (38.67)	14772.6 (317.01)	6306.0 (180.69)
Cerebrospinal fluid	2.2 (0.02)	ND (NC)	ND (NC)
Stomach	-- (--)	-- (--)	1190.1 (34.10)
Small intestine	-- (--)	-- (--)	2740.2 (78.52)
Large intestine	-- (--)	-- (--)	1167.0 (33.44)

ND: Not detected

NC: Not calculated

--: Not determined

Table 6 Radioactivity distribution in tissues 1, 24, and 168 h after single intravenous bolus administration of [^{14}C]P092 maleate to male monkeys at 1 mg/kg

Tissue	Radioactivity distribution (% of dose)		
	1 h	24 h	168 h
Blood ^{a)}	0.98	0.38	0.23
Cerebral cortex	0.11	0.09	0.21
Striatum	0.00	0.01	0.01
Hippocampus	0.00	0.00	0.00
Hypothalamus	0.02	0.01	0.02
Cerebellum	0.01	0.01	0.03
Medulla oblongata	0.00	0.01	0.01
Pituitary	0.01	0.01	0.01
Eyeball	0.01	0.06	0.05
Submaxillary gland	0.15	0.17	0.21
Thyroid	0.03	0.03	0.01
Thymus	0.03	0.12	0.11
Heart	2.32	1.45	0.60
Lung	8.08	5.35	4.43
Liver	13.35	9.93	5.48
Adrenal	0.11	0.20	0.20
Kidney	3.59	2.29	1.11
Spleen	0.80	0.79	0.98
Pancreas	0.69	0.92	1.06
Testis	0.09	0.14	0.21
Skin ^{a)}	2.18	2.07	3.15
Skeletal muscle ^{a)}	60.89	61.98	22.10
White adipose tissue ^{a)}	6.08	1.74	3.09
Gallbladder	0.01	0.01	0.01
Bile	0.27	0.68	0.28
Stomach	--	--	0.65
Small intestine	--	--	3.31
Large intestine	--	--	1.25
Contents of stomach	--	--	0.03
Contents of small intestine	--	--	0.37
Contents of large intestine	--	--	2.01
Total	99.81	88.45	51.22

a) The whole weights of the blood, skin, skeletal muscle, and white adipose tissue were assumed as 6.0%, 9.4%, 41.4%, and 7.8% of body weight, respectively.

--: Not determined

Table 7 Cumulative radioactivity excretions in urine and feces after single intravenous bolus administration of [^{14}C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg

Time (h)	Cumulative radioactivity excretion (% of dose)				Total
	Urine	Feces	Cage washing (Purified water)	Cage washing (Methanol)	
0 - 8	0.6	--	0.4	--	1.0
- 24	1.5	3.2	0.6	--	5.3
- 48	3.1	9.4	0.8	--	13.3
- 72	4.5	15.4	0.9	--	20.8
- 96	5.7	19.2	1.1	--	26.0
- 120	6.8	23.2	1.1	--	31.1
- 144	7.7	26.8	1.2	--	35.7
- 168	8.6	30.8	1.4	0.1	40.9

--: Not determined

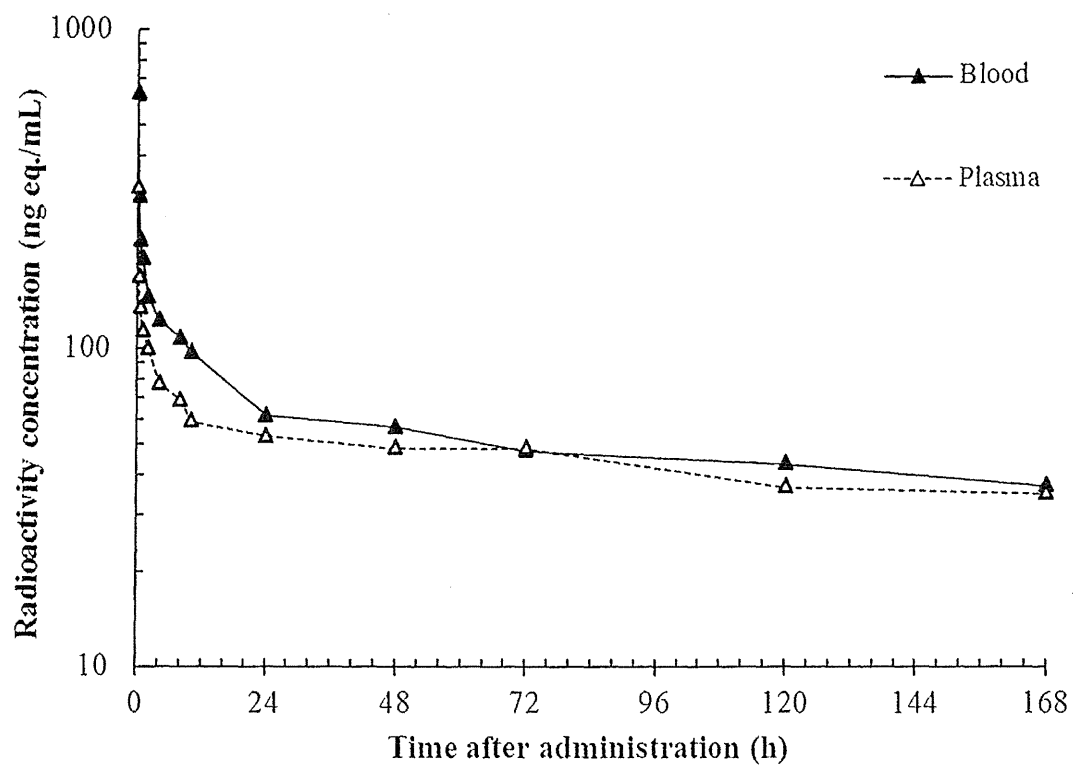


Figure 1 Radioactivity concentrations in blood and plasma after single intravenous bolus administration of [^{14}C]P092 maleate to a male monkey at 1 mg/kg

15. [^{14}C]P092 マレイン酸塩の
In Vitro 代謝予備試験

B141137

本写しは原本と相違ありません
株式会社LSIメディエンス 鹿島研究所 2015年3月12日
試験責任者 榎山博之 印

最終報告書

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩の In Vitro 代謝予備試験

(試験番号：B141137)

株式会社LSIメディエンス

1. 陳述書

表 題： [^{14}C]P092・マレイン酸塩の In Vitro 代謝予備試験

試験番号： B141137

本最終報告書は試験結果を正しく反映したものである。

試験責任者：

2015年 3月 12日 横山 博之

横山 博之

株式会社LSIメディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

分析代謝研究部 薬物動態グループ

2. 目次

1. 陳述書.....	2
2. 目次.....	3
3. 試験実施概要.....	6
3.1 表題.....	6
3.2 試験番号.....	6
3.3 試験目的.....	6
3.4 適用ガイドライン.....	6
3.5 適用 GLP.....	6
3.6 試験委託者.....	6
3.7 試験受託者.....	6
3.8 試験施設.....	6
3.9 試験責任者.....	6
3.10 主な試験従事者.....	7
3.11 試験日程.....	7
3.12 保存.....	7
3.13 保存する資料.....	7
4. 試験責任者署名.....	8
5. 要約.....	9
6. 材料.....	10
6.1 被験物質.....	10
6.1.1 名称.....	10
6.1.2 構造式及び標識位置.....	10
6.1.3 分子量.....	10
6.1.4 ロット番号.....	10
6.1.5 化学的純度.....	10
6.1.6 比放射能.....	10
6.1.7 放射化学的純度.....	10
6.1.8 性状.....	10
6.1.9 放射能濃度.....	10
6.1.10 合成先.....	10
6.1.11 入手量.....	11
6.1.12 保存条件.....	11
6.1.13 保管場所.....	11
6.1.14 取扱上の注意.....	11
6.1.15 残余被験物質の処理.....	11
6.2 標準物質.....	11
6.2.1 名称.....	11

6.2.2	ロット番号	11
6.2.3	性状	11
6.2.4	提供者	11
6.2.5	保存条件	11
6.2.6	保管場所	11
6.2.7	取扱上の注意	11
6.2.8	残余標準物質の処理	11
6.3	肝ミクロソーム	12
6.4	主な使用試薬	12
6.5	主な使用機器, システム, 器材	13
7.	方法	14
7.1	被験物質溶液	14
7.1.1	調製及び保管	14
7.1.2	濃度の確認	14
7.1.3	放射化学的純度の確認	14
7.2	標準溶液の調製	15
7.3	試薬調製	15
7.3.1	0.167 mmol/L EDTA を含む 0.33 mol/L リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4)	15
7.3.2	NADPH 生成系	15
7.3.3	250 mmol/L Sucrose 溶液	15
7.3.4	肝ミクロソーム懸濁液	15
7.4	分析前処理法及び HPLC 条件の確認	15
7.5	肝ミクロソームにおける代謝	16
7.5.1	試験構成	16
7.5.2	反応液組成	16
7.5.3	反応液の調製	16
7.5.4	インキュベーション	16
7.5.5	分析前処理	17
7.5.6	HPLC 測定	17
7.5.7	ラジオクロマトグラム of 解析	18
7.6	放射能の測定	18
7.7	試験結果の算出及び表示	19
7.8	保存試料の取り扱い	19
8.	結果及び考察	20
8.1	分析前処理法及び HPLC 条件の検討	20
8.2	肝ミクロソームにおける代謝	20

Table

Table 1	Metabolism of [¹⁴ C]P092 maleate in liver microsomes	21
---------	--	----

Figures

Figure 1	UV chromatogram of standard substance and radiochromatograms of [¹⁴ C]P092 and its metabolites in incubation mixtures of [¹⁴ C]P092 maleate with human liver microsomes	22
Figure 2	UV chromatogram of standard substance and radiochromatograms of [¹⁴ C]P092 and its metabolites in incubation mixtures of [¹⁴ C]P092 maleate with rat liver microsomes	23
Figure 3	UV chromatogram of standard substance and radiochromatograms of [¹⁴ C]P092 and its metabolites in incubation mixtures of [¹⁴ C]P092 maleate with monkey liver microsomes	24
Figure 4	UV chromatogram of standard substance and radiochromatograms of [¹⁴ C]P092 and its metabolites in incubation mixtures of [¹⁴ C]P092 maleate with human liver microsomes	25

Appendices

Appendix 1	Concentration of [¹⁴ C]P092 maleate in test substance solution.....	26
Appendix 2	Radiochemical purity of [¹⁴ C]P092 maleate in test substance solution.....	26
Appendix 3	Recovery of radioactivity	26

最終ページ : 26

3. 試験実施概要

3.1 表題

[¹⁴C]P092・マレイン酸塩の In Vitro 代謝予備試験

3.2 試験番号

B141137

3.3 試験目的

ラット、サル及びヒト肝ミクロソームにおける[¹⁴C]P092・マレイン酸塩の代謝プロファイルを予備的に検討した。

3.4 適用ガイドライン

なし

3.5 適用 GLP

なし

3.6 試験委託者

国立大学法人岐阜大学

〒501-1193 岐阜県岐阜市柳戸 1 番 1

委託担当者：桑田 一夫

TEL：058-230-6143, FAX：058-230-6144

3.7 試験受託者

株式会社 L S I メディエンス

〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目 13 番 4 号

3.8 試験施設

株式会社 L S I メディエンス 鹿島研究所

〒314-0255 茨城県神栖市砂山 14 番地 1

3.9 試験責任者

横山 博之

株式会社 L S I メディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター 分析代謝研究部 薬物動態グループ

TEL: 0479-46-5392, FAX: 0479-46-7656

E-mail: Yokoyama.Hiroyuki@md.medience.co.jp

3.10 主な試験従事者

被験物質溶液の調製, 分析: 石塚 啓仁, 長谷川 好子, 伊藤まゆみ
代謝実験: 石塚 啓仁, 長谷川 好子

3.11 試験日程

試験開始: 2015年1月16日
実験開始: 2015年1月16日
実験終了: 2015年1月30日
試験終了: 本最終報告書への試験責任者署名日とする

3.12 保存

次項に示す試験関係資料を試験施設の資料保存室に保存する。保存期間は試験終了後10年間とし、以後の保存は試験委託者と協議の上、決定する。

3.13 保存する資料

- (1) 試験計画書
- (2) 被験物質及び標準物質に関する資料
- (3) 肝ミクロソームに関する資料
- (4) 試験結果に関する資料
- (5) 通信文書等の記録文書
- (6) 最終報告書

4. 試験責任者署名

試験責任者：

2015年3月12日

横山博之

横山 博之

株式会社LSIメディエンス

創薬支援事業本部 試験研究センター

分析代謝研究部 薬物動態グループ

5. 要約

ラット、サル及びヒトの肝ミクロソームにおける¹⁴C]P092 maleate の代謝を予備的に検討した。¹⁴C]P092 maleate (5 µmol/L) をラット、サル及びヒト肝ミクロソームと NADPH 存在下で 0, 30 及び 60 分間インキュベーションした。

¹⁴C]P092 maleate の肝ミクロソームの代謝プロファイルには種差が認められ、ラジオクロマトグラム上には全部で9種の代謝物ピーク (M-1~M-9) が検出された。ラットでは5種 (M-2, M-4~M-6, M-8) , サルでは7種 (M-1~M-5, M-7, M-8) , ヒトでは2種 (M-8, M-9) のピークが検出され、主要なピークはラットではM-4 (6.9%) 及びM-8 (4.5%) , サルではM-8 (8.2%) , M-5 (6.8%) 及びM-4 (5.1%) , ヒトではM-9 (3.2%) 及びM-8 (2.9%) であった (括弧内は60分間インキュベーションしたときのピーク面積百分率 (% Peaks)) 。種特異的なピークはラットで1種 (M-6) , サルで3種 (M-1, M-3, M-7) , ヒトで1種 (M-9) 検出された。60分間インキュベーション後のP092のピーク面積百分率 (% Peaks) はラットが81.8% , サルが71.8% , ヒトが93.9%であり、肝ミクロソームにおけるP092の代謝速度はサル、ラット、ヒトの順であった。

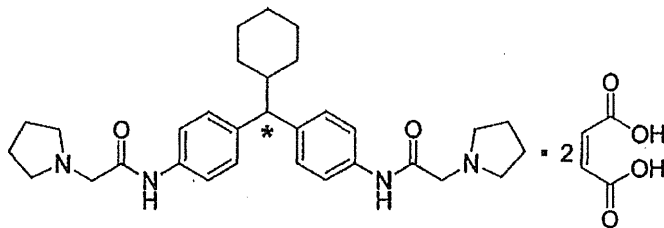
6. 材料

6.1 被験物質

6.1.1 名称

[¹⁴C]P092 maleate ([¹⁴C]P092・マレイン酸塩)

6.1.2 構造式及び標識位置



* : ¹⁴C 標識位置

6.1.3 分子量

736.70 (at this specific activity)

6.1.4 ロット番号

K0348-02

6.1.5 化学的純度

99.5% (UV-HPLC)

6.1.6 比放射能

58.4 mCi/mmol (2.933 MBq/mg)

6.1.7 放射化学的純度

98.9%

6.1.8 性状

エタノール溶液

6.1.9 放射能濃度

5 MBq/mL (被験物質濃度 : 1.705 mg/mL)

6.1.10 合成先

Curachem

6.1.11 入手量

450 MBq

6.1.12 保存条件

冷凍（-80°C，許容範囲：-60°C以下），遮光，気密容器

6.1.13 保管場所

被験物質保管場所（74）

6.1.14 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋着用

6.1.15 残余被験物質の処理

残余の被験物質は関連する薬物動態試験で使用するために試験施設で保管する。

6.2 標準物質

6.2.1 名称

P092・マレイン酸塩

6.2.2 ロット番号

CMPG-RQ

6.2.3 性状

白色の粉末

6.2.4 提供者

国立大学法人岐阜大学

6.2.5 保存条件

冷蔵（許容範囲：1～10°C），遮光，密封（窒素封入）

6.2.6 保管場所

被験物質保管場所（29）

6.2.7 取扱上の注意

保護メガネ，マスク，ゴム手袋着用

6.2.8 残余標準物質の処理

残余の標準物質は関連する薬物動態試験で使用するために試験施設で保管する。

6.3 肝ミクロソーム

製造：	XENOTECH
入手時の状態：	ドライアイス存在下による凍結状態
保存条件：	冷凍（-80°C，許容範囲：-60°C以下）
蛋白濃度：	20 mg protein/mL（製造者が提供する資料の記載値）
凍結・融解の回数：	初回融解のものを用いた。

動物種	系統	性	製品番号	ロット番号	プール数
ラット	Sprague Dawley (SD)	雄	R1000	1310214	454
カニクイザル	-	雄	P2000	1210334	7
ヒト	-	男女混合	H0620	1110473	50

6.4 主な使用試薬

メタノール：	特級（純正化学）
トリフルオロ酢酸（TFA）：	特級（和光純薬工業）
アセトニトリル：	特級及びHPLC用（純正化学）
Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (EDTA·2Na·2H ₂ O)：	試験研究用（同仁化学研究所）
β-Nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate, oxidized form, monosodium salt (β-NADP ⁺ ·Na)：	グレードなし（オリエンタル酵母工業）
Glucose 6-phosphate disodium salt (G-6-P·2Na)：	グレードなし（オリエンタル酵母工業）
塩化マグネシウム・6水和物 (MgCl ₂)：	特級（和光純薬工業株式会社）
Glucose 6-phosphate dehydrogenase (G-6-P DH; from yeast)：	グレードなし（オリエンタル酵母工業）
Sucrose：	特級（和光純薬工業）
炭酸水素アンモニウム：	一級（和光純薬工業）
シンチレーションカクテル (Clear-sol I)：	グレードなし（ナカライテスク）
シンチレーションカクテル (FLO-SCINT II, ULTIMA-FLO M, HIONIC-FLUOR)：	グレードなし（PerkinElmer）
組織溶解剤（バイオメリット専用組織溶解液）：	グレードなし（ナカライテスク）

水は超純水製造システム (Elix-UV 10, Milli-Q Advantage, メルク) で精製したものを用いた。その他の試薬は、用途に応じて市販の一級品、試薬特級又は同等のものを使用した。

6.5 主な使用機器, システム, 器材

pH メーター :	F-52 (堀場製作所)
電子天秤 :	AT261, PM4800 (Mettler-Toledo)
ウォーターバスインキュベーター :	サーモミンダーEX (タイテック)
シェイキングバス :	パーソナル-11 (タイテック)
遠心分離機 :	CF15RXII (日立工機)
HPLC システム :	L-2000 シリーズ (日立ハイテクノロジーズ)
システムマネージャ :	EZ chrom Elite (日立ハイテクノロジーズ) , FLO-ONE (PerkinElmer)
HPLC 用放射能検出器 (RID) :	Radiomatic 625TR (PerkinElmer.)
組織溶解装置 :	バイオメリット (積水メディカル)
液体シンチレーションカウンター :	Tri-Carb 2300TR (PerkinElmer)

7. 方法

7.1 被験物質溶液

7.1.1 調製及び保管

[¹⁴C]P092 maleate を 648 μL はかりとり、窒素気流下で溶媒を留去した。残渣を 3 mL のメタノール/水 (1:1, v/v) に溶解して 0.5 mmol/L の被験物質溶液を調製した。

被験物質溶液は遮光下、冷凍 (-80°C, 許容範囲: -60°C 以下) で保管した。

7.1.2 濃度の確認

被験物質溶液の [¹⁴C]P092 maleate 濃度を調製日に測定した。

被験物質溶液を 10 μL 採取 (n=1) し、放射能を測定した。 [¹⁴C]P092 maleate の比放射能を用いて [¹⁴C]P092 maleate 濃度を算出した (Appendix 1)。

7.1.3 放射化学的純度の確認

被験物質溶液の放射化学的純度を調製日及び使用終了後に測定し、実験期間中の安定性を確認した。

被験物質溶液を以下の HPLC 分析条件により測定した (n=1)。このサンプルのラジオクロマトグラムと P092・マレイン酸塩標準溶液 (7.2 項) を同条件の HPLC で測定したときの UV クロマトグラムを比較して、 [¹⁴C]P092 (フリー体) の保持時間 (Rt) が P092 (フリー体) の Rt に相当することを確認した。

ラジオクロマトグラムにおいて検出された放射能ピークの総和に対する [¹⁴C]P092 (フリー体) の溶出部分の放射能ピークの割合を放射化学的純度として算出した (Appendix 2)。

シンチレーションカクテルを含む全溶出液を回収し、その一部について放射能を測定した。この溶出液中の放射能と、注入した試料中の放射能の値を用いて、HPLC からの放射能の回収率を算出した (Appendix 2)。

【HPLC 条件】

分析カラム	Inertsil ODS-2, 5 μm, 4.6 × 250 mm (ジーエルサイエンス)
カラム温度	40°C
移動相	A: 0.2% TFA Water B: Acetonitrile
グラジエント条件	Time (min) 0 20 50 50.1 60 %B 20 60 60 20 20
流速	1 mL/min
検出	UV 254 nm 放射能 (液体シンチレーションシステム) セル容量: 0.5 mL シンチレーションカクテル: FLO-SCINT II シンチレーションカクテル流速: 3 mL/min