

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7097697号  
(P7097697)

(45)発行日 令和4年7月8日(2022.7.8)

(24)登録日 令和4年6月30日(2022.6.30)

(51)国際特許分類		F I			
C 1 2 Q	1/02 (2006.01)	C 1 2 Q	1/02		
G 0 1 N	33/15 (2006.01)	G 0 1 N	33/15	Z	
G 0 1 N	33/50 (2006.01)	G 0 1 N	33/50	Z	

請求項の数 4 (全24頁)

(21)出願番号	特願2017-538914(P2017-538914)	(73)特許権者	517123276 クオリスト トランスポーター ソリュ ションズ エルエルシー QUALYST TRANSPORTER SOLUTIONS, LLC アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 2 7713、ダラム、メリディアン パー クウェイ 2810、スイート 100 2810 Meridian Parkw ay, Suite 100, Durha m, North Carolina 27 713, United States o f America
(86)(22)出願日	平成27年10月7日(2015.10.7)	(74)代理人	100110249 弁理士 下田 昭
(65)公表番号	特表2017-532066(P2017-532066 A)		
(43)公表日	平成29年11月2日(2017.11.2)		
(86)国際出願番号	PCT/US2015/054411		
(87)国際公開番号	WO2016/057626		
(87)国際公開日	平成28年4月14日(2016.4.14)		
審査請求日	平成30年9月14日(2018.9.14)		
審判番号	不服2020-9635(P2020-9635/J1)		
審判請求日	令和2年7月9日(2020.7.9)		
(31)優先権主張番号	62/060,916		
(32)優先日	平成26年10月7日(2014.10.7)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 インビボの効果の予測におけるタンパク質の使用

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

候補化合物の胆汁排出感受性を評価する方法であって、

- (a) ヒトの肝細胞の第1のサンドイッチ培養物を確立し、ヒトの肝細胞の第2のサンドイッチ培養物を確立する段階であって、該第1及び第2のサンドイッチ培養物がそれぞれ人工膜システム及び少なくとも一つの毛細胆管を含み、但し、該人工膜システムは、細胞を擬態するように適合されるように、トランスポーターを遺伝子導入又はノックアウトされ、該第1のサンドイッチ培養物が無傷の毛細胆管を有し、該第2のサンドイッチ培養物が崩壊した毛細胆管を有する段階、
- (b) 候補化合物を、候補化合物の取り込みを可能にする十分な時間、該第1のサンドイッチ培養物並びに該第2のサンドイッチ培養物に曝露する段階、
- (c) この第1及び第2のサンドイッチ培養物、並びに候補化合物を、ヒトの肝臓の肝細胞のインビボ環境に近似するために生理学的濃度で該肝臓に存在するタンパク質を含む培地であって、該培地に含まれるタンパク質の濃度が生理学的濃度又は生理的濃度と同様の特性を有する濃度であり、該タンパク質が、アルブミンである培地に、同時に曝露する段階、
- (d) 該第1及び第2のサンドイッチ培養物を洗浄し、溶解する段階、及び
- (e) 段階(d)のそれぞれのサンドイッチ培養物から得られた溶解物中に存在する候補化合物の量を決定し、各サンドイッチ培養物中のこの候補化合物の量を用いて、候補化合物の胆汁排出感受性を評価する段階、
- から成る方法。

## 【請求項 2】

前記段階(e)が下記を含む請求項 1 に記載の方法。

(i) 各第 1 及び第 2 のサンドイッチ培養物から得られた溶解物中に存在する候補化合物の量を決定する段階、

(ii) 毛細胆管中の量を、無傷の毛細胆管を有する第 1 のサンドイッチ培養物と、崩壊した毛細胆管を有する第 2 のサンドイッチ培養物とから得られた 2 つの溶解物中に存在する候補化合物の量の差として計算する段階、及び

(iii) 段階(ii)で計算された量を用いて、候補化合物の胆汁排出感受性を評価する段階

## 【請求項 3】

さらに、同時に複数の候補化合物をスクリーニングする段階を含む請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

生理的濃度のタンパク質を含む培地が、候補化合物の特性を調節する他の化合物を含む請求項 1 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【関連出願の相互参照】

## 【0001】

本出願は、2014年10月7日に出願された米国仮特許出願62/060,916の優先権を主張し、その開示の全体が参照により本明細書に組み込まれる。

## 【技術分野】

## 【0002】

この発明は、いくつかの実施形態において、候補化合物のインピボのディスポジション及び/又は効果を予測するために、インピトロの培養物及び/又は懸濁液中でこの候補化合物のディスポジション及び/又は効果を評価する方法に関する。より具体的には、本発明は、候補化合物のインピボのディスポジション及び/又は効果を予測するために、取込みクリアランス、側底排出クリアランス、涙小管流出クリアランス、細胞内濃度、胆汁クリアランス、代謝クリアランス、並びにインピトロ培養物及び/又は懸濁液中の候補化合物の化合物動力学の総合効果を含む、しかしこれらに限定されない、ディスポジション及び/又は効果を評価する方法に関する。いくつかの実施形態では、この方法は、この培養物及び/又は懸濁液を、インピボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階を含む。この培地は、例えば、生理学的濃度又は生理的濃度と同様の結合特性を有する濃度のタンパク質のような成分を含む培地である。

## 【背景技術】

## 【0003】

典型的には、肝細胞又は関連細胞株（懸濁された、播種された、サンドイッチ培養された、又は他の3Dモデル、Caco-2、MDCK、Opti-Target（登録商標）（Optivia Biotechnology、Menlo Park、California、USA）、及びHepaRG（登録商標）（Biopredic International、Saint Gregoire、France）の商標で入手可能なものを用いてインピトロで実験すると、実験中にタンパク質が存在しないか又は非生理学的レベルでしか存在しない。そのため、これらの実験のすべてにおいて非結合薬物濃度のみが評価されている。これは、実験的な単純性の理由からしばしば行われている。これを臨床的又はインピボ状況に翻訳するために、別個のインピトロタンパク質結合実験を実施して、血漿タンパク質に結合した薬物の画分を決定し、この情報を用いて、インピトロ実験から得られたパラメータをインピボでの状況に適用する。そして、その割合を他の実験の結果に幾分盲目的に適用するために、他の実験の結果にこの割合を掛けることによって、「遊離」化合物による影響を推定する。このような是正措置は、臨床的又はインピボ状況に関連する合理的に正確な結果をもたらすという前提があった。

## 【発明の概要】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

そのため、このような是正措置及び前提に頼らないアプローチが必要とされている。イン

10

20

30

40

50

ピトロの培養物及び/又は懸濁液中で候補化合物のディスポジションを評価して、候補化合物のインビボのディスポジションを予測する方法に対する必要性がある。

【課題を解決するための手段】

【0005】

いくつかの実施形態では、本発明の方法は、細胞の培養物及び/又は懸濁液を提供する段階、候補化合物をこの培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、この培養物及び/又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地（例えば、生理学的濃度又は生理的濃度と同様の結合特性を有する濃度のタンパク質のような成分を含む培地）に曝露する段階、及びこの培養物及び/又は懸濁液に取り込まれた候補化合物の量を決定し、それにより、この候補化合物のディスポジション及び/又は効果を評価して、この候補化合物のインビボのディスポジション及び/又は効果を予測する段階から成る。

10

【0006】

いくつかの実施形態において、この培養物及び/又は懸濁液は、細胞を擬態するように適合した人工膜システムを含む。いくつかの実施形態において、この人工膜システムは、支持細胞と共培養液中の細胞を擬態し、該支持細胞が線維芽細胞及び/又はクッパー細胞からなる。いくつかの実施形態において、この人工膜システムにより擬態される細胞は、小胞、肝細胞、肝臓由来細胞、腎細胞、胃腸細胞、膵臓細胞、心臓細胞、神経細胞、筋細胞、脂肪細胞及び肺細胞から成る群から選択される。いくつかの実施形態において、この人工膜システムにより擬態される細胞は、ひとつの細胞株から成り、任意に、この細胞株は、HepaRG（登録商標）細胞株、Caco-2及びMDCから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、この「この培養物及び/又は懸濁液に取り込まれた候補化合物の量を決定し、それにより、ディスポジションを評価する段階」は、該候補化合物の細胞内濃度を決定する段階、肝臓蓄積を決定する段階、胆汁排出を決定する段階、及び/又は胆汁クリアランスを決定する段階から成る。

20

【0007】

いくつかの実施形態において、候補化合物の胆汁排出感受性を検査する方法が提供される。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞を擬態するように適合した人工膜システム及び少なくとも一つの毛細胆管を含む培養物及び/又は懸濁液を提供する段階、候補化合物をこの培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、この培養物及び/又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、及び該少なくとも一つの毛細胆管中の候補化合物の量を決定し、それにより、候補化合物の胆汁排出感受性を検査する段階から成る。いくつかの実施形態において、この少なくとも一つの毛細胆管中の候補化合物の量を決定する段階は、候補化合物と輸送タンパク質のための標識された予め選択された量の基質とを同時に、取り込みを可能にする十分な時間、細胞培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、該細胞培養物及び/又は懸濁液を洗浄する段階、及び該少なくとも一つの毛細胆管内に存在する標識された基質の量を検出し、該輸送タンパク質による胆汁排出についての候補化合物と標識された基質との間の競合を評価する段階であって、該標識された基質の予め選択された量と比べた該少なくとも一つの毛細胆管中の該標識された基質の減少量の存在が、輸送タンパク質による胆汁中排出に対する候補化合物の感受性を示す、段階から成る。いくつかの実施形態において、この人工膜システムは、支持細胞と共培養液中の細胞を擬態し、該支持細胞が線維芽細胞及び/又はクッパー細胞からなる。いくつかの実施形態において、この人工膜システムにより擬態される細胞は、小胞、肝細胞、肝臓由来細胞、腎細胞、胃腸細胞、膵臓細胞、心臓細胞、神経細胞、筋細胞、脂肪細胞及び肺細胞から成る群から選択される。いくつかの実施形態において、この人工膜システムにより擬態される細胞はひとつの細胞株から成り、任意に、この細胞株は、HepaRG（登録商標）細胞株、Caco-2及びMDCから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、この標識された基質は、蛍光発生的化合物、蛍光化合物、化学発光化合物、比色化合物、放射性標識化合物及びこれらの組み合わせから成る群から選択される化合物を含む。いくつかの実施形態において、この少なくとも一つの毛細胆管中の候補化合物の量は、この培養物及び/又は懸濁液の胆汁クリアランス値を計算することによって決定され

30

40

50

る。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態において、候補化合物の胆汁排出感受性を検査する方法が提供される。いくつかの実施形態において、この方法は、(a) 第 1 及び第 2 の細胞培養物及び / 又は懸濁液を確立する段階であって、該第 1 及び第 2 の培養物及び / 又は懸濁液がそれぞれ細胞を擬態するように適合された人工膜システム及び少なくとも一つの毛細胆管を含み、該第 1 の培養物及び / 又は懸濁液が無傷の毛細胆管を有し、該第 2 の培養物及び / 又は懸濁液が崩壊した毛細胆管を有する段階、(b) 候補化合物を、候補化合物の取り込みを可能にする十分な時間、該第 1 の培養物及び / 又は懸濁液並びに該第 2 の培養物及び / 又は懸濁液に曝露する段階、(c) この第 1 及び第 2 の培養物及び / 又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、(d) 該第 1 及び第 2 の培養物及び / 又は懸濁液を洗浄し、溶解する段階、及び(e) 段階(d)のそれぞれの培養物及び / 又は懸濁液から得られた溶解物中に存在する候補化合物の量を決定し、各培養物及び / 又は懸濁液中のこの候補化合物の量を用いて、候補化合物の胆汁排出感受性を評価する段階、から成る。

10

いくつかの実施形態において、この方法は、(i) 候補化合物を、候補化合物の取り込みを可能にする十分な時間 ( T )、該第 1 及び該第 2 の培養物及び / 又は懸濁液に曝露する段階、(ii) この第 1 及び第 2 の培養物及び / 又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、(iii) 該第 1 及び第 2 の培養物及び / 又は懸濁液の各第 1 及び第 2 の画分を洗浄し、溶解する段階、(iv) 段階(iii)の各第 1 及び第 2 の培養物及び / 又は懸濁液から得られた溶解物中に存在する候補化合物の量を決定する段階、(v) 毛細胆管中の量を、無傷の毛細胆管を有する第 1 の培養物及び / 又は懸濁液と、崩壊した毛細胆管を有する第 2 の培養物及び / 又は懸濁液とから得られた 2 つの溶解物中に存在する候補化合物の量の差として計算する段階、及び(vi) 段階(iv)で計算された量を用いて、候補化合物の胆汁排出感受性を評価する段階を含む。いくつかの実施形態において、この人工膜システムは、支持細胞と共培養液中の細胞を擬態し、該支持細胞が線維芽細胞及び / 又はクッパー細胞を含む。いくつかの実施形態において、この人工膜システムにより擬態された細胞は、小胞、肝細胞、肝由来細胞、腎細胞、胃腸細胞、膵臓細胞、心筋細胞、神経細胞、筋細胞、脂肪細胞、及び肺細胞から成る群から選択される。いくつかの実施形態において、この人工膜システムにより擬態された細胞は、一つの細胞株から成り、任意に、該細胞株は、HepaRG (登録商標) 細胞株、Caco-2、及びMDCから成る群から選択される。

20

30

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態において、候補化合物のインビボでの効果を予測するためにインビトロの培養物及び / 又は懸濁液中の候補化合物の効果を評価する方法が提供される。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞の培養物及び / 又は懸濁液を提供する段階、少なくとも一度この培養物及び / 又は懸濁液を少なくとも一つの候補化合物に曝露する段階、この培養物及び / 又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、及びこの培養物及び / 又は懸濁液を少なくとも一つの候補化合物に曝露した効果を評価して、候補化合物のインビボでの効果を予測する段階から成る。いくつかの実施形態において、この方法は、細胞を擬態するように適合した人工膜システム及び少なくとも一つの毛細胆管を含む培養物及び / 又は懸濁液を提供する段階、を含む。いくつかの実施形態において、この人工膜システムは、支持細胞と共培養液中の細胞を擬態し、該支持細胞が線維芽細胞及び / 又はクッパー細胞からなる。いくつかの実施形態において、この人工膜システムにより擬態される細胞は、小胞、肝細胞、肝臓由来細胞、腎細胞、胃腸細胞、膵臓細胞、心臓細胞、神経細胞、筋細胞、脂肪細胞及び肺細胞から成る群から選択される。いくつかの実施形態において、この人工膜システムにより擬態される細胞は、ひとつの細胞株から成り、任意に、この細胞株は、HepaRG (登録商標) 細胞株、Caco-2及びMDCから成る群から選択される。いくつかの実施形態において、この効果は、伝達及び他のタイプの研究 (代謝、誘導及び毒性) ; 代謝物同定及び代謝安定性 (親寿命) を含む代謝研究 ; 遺伝子調節 (誘導/抑制) ; P450及びトランスポーター薬物相互作用 ; 細胞内蓄積及び遊離又は全ての (結合 + 遊離) 細胞内濃度 (例えば、核、ミトコンドリア) ; 並び

40

50

に毒物学的効果から成る群から選択される。いくつかの実施形態において、この培養物及び/又は懸濁液は、複数の候補化合物に曝露される。いくつかの実施形態において、この培養物及び/又は懸濁液は、一つ又はそれ以上の候補化合物に繰り返し曝露される。

【0010】

本発明のいくつかの実施形態において、この細胞は、マウス、ラット、ウサギ、ヒト、サル、類人猿、ネコ、イヌ、子ブタ、食用ブタ、ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ウマ、シチメンチョウ、鶏、魚、アヒル及びガチョウから成る群から選択される供給源から単離される。本発明のいくつかの実施形態において、この培養物及び/又は懸濁液は、さらに長期の培養物及び/又は懸濁液を含む。本発明のいくつかの実施形態において、この培養物及び/又は懸濁液は、毛細胆管ネットワークを含む。本発明のいくつかの実施形態において、この培養物及び/又は懸濁液は、クラスター、凝集体、細胞の少なくとも一つの層、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される構成を有することを特徴とする。本発明のいくつかの実施形態において、この細胞はマトリックス中に埋め込まれている。本発明のいくつかの実施形態において、この培養物及び/又は懸濁液は、更にサンドイッチ培養物及び/又は懸濁液を含み、該サンドイッチ培養物及び/又は懸濁液が、細胞の少なくとも一つの層を含み、かつ任意に該細胞の少なくとも一つの層内に少なくとも1種の毛細胆管を含む。本発明のいくつかの実施形態において、このサンドイッチ培養物及び/又は懸濁液は、さらに長期のサンドイッチ培養物及び/又は懸濁液を含む。本発明のいくつかの実施形態において、この細胞の少なくとも一つの層は、マトリックスの2つの層の間に挟まれている。本発明のいくつかの実施形態において、このマトリックスは、生物学的マトリックス培地、合成マトリックス培地、支持細胞型の共培養液、及びこれらの組み合わせから成る群から選択される本発明のいくつかの実施形態において、この生物学的マトリックス培地は、コラーゲン、ラミニン、基底膜に由来する複合体、これらの誘導体、及びこれらの組み合わせから成る群から選択される。

【0011】

本発明のいくつかの実施形態において、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地は、生理学的濃度又は生理的濃度と同様の特性を有する濃度の成分を含む培地から成る。本発明のいくつかの実施形態において、この成分は、アルブミン； $\gamma$ -リポタンパク質； $\alpha$ -1-酸性糖タンパク質；マウス、ラット、ウサギ、ヒト、サル、類人猿、ネコ、イヌ、子ブタ、食用ブタ、ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ウマ、シチメンチョウ、鶏、魚、アヒル若しくはガチョウに由来する血漿又は血清；胆汁酸又は胆汁酸の混合物；ビリルビン；及びこれらの組み合わせから成る群から選択される。

本発明のいくつかの実施形態において、この方法は、マルチウェルプレート中の少なくとも一つのウェル中で行われる。本発明のいくつかの実施形態において、この方法は、さらに、同時に複数の候補化合物をスクリーニングする段階を含む。本発明のいくつかの実施形態において、生理的濃度のタンパク質を含む培地は、候補化合物の特性を調節する他の化合物を含む。本発明のいくつかの実施形態において、これらの複数の曝露する段階のいずれかの任意の組み合わせが、同時に又は如何なる順序で行われてもよい。

【0012】

本発明の目的は、候補化合物のインビボのディスポジション及び/又は効果を予測するために、インビトロの培養物及び/又は懸濁液中でこの候補化合物のディスポジション及び/又は効果を評価する方法を提供することである。

ここで開示された主題の目的は、ここに開示された主題によって全体的又は部分的に達成されたものであるが、以下本明細書で最もよく説明される添付の実施例に関連して説明が進むにつれて、他の目的も明らかになるであろう。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

以下、本発明はより完全に記載されるであろう。そこでは、その本発明のいくつかの、しかし全てではない実施形態が記載される。実際、本発明は、多くの異なる形態で実施することが可能であり、本発明は、本明細書に記載の実施形態に限定されるものと解釈される

10

20

30

40

50

べきではない。そうではなく、これらの実施形態は、この開示が適用される法的要件を満たすように提供されている。

#### 【0014】

本発明のいくつかの実施形態によれば、一般に、血漿タンパク質及び/又は他の成分は、薬物、化学物質及び内因性化合物の結合に関与するので、インビボ環境を近似するために、生理学的レベル又は他の関連するレベルの、タンパク質（しばしばアルブミンと称される）のような、細胞外の成分を加える方法が提供される。特に、よりインビボに関連する細胞外環境は、インビボに関連する細胞内濃度及び化合物動態（経時変化）をより規定する。これら細胞内濃度及び動態の両方は、細胞プロセスの変化を評価し、細胞の所為を試験する場合に、これらを導く要因となる。これらのプロセスは、化合物の取り込み、この化合物の流出（肝臓の場合には、側底及び小管）、この化合物の細胞内濃度、この化合物の代謝、この化合物の誘導電位及びこの化合物の毒性を含む。このアプローチで得られた実験結果は、当技術分野で従来の方法を用いては予測することができない驚くべき結果をもたらした。

10

#### 【0015】

典型的には、肝細胞又はその関連細胞株（懸濁、メッキ、サンドイッチ培養又は他の3Dモデル、Caco-2、MDCK、Opti-Target（登録商標）（Optivia Biotechnology、Menlo Park、California、USA）、Hurelflux（登録商標）（Hurel Corporation、North Brunswick、New Jersey、USA）、及びHepaRG（登録商標）（Biopredic International、Saint Gregoire、France）の商標で入手可能な細胞株を用いたインビトロの実験を行う場合、その実験の間、タンパク質のような成分は、存在しないか、又は非生理学的レベルで存在する。従って、これらの実験のすべてにおいて評価されているのは非結合薬物濃度のみである。これを臨床又はインビボ状況に適用するために、インビトロタンパク質結合実験のような別個の実験を行って、例えば血漿タンパク質に結合した薬物の画分を決定し、この情報を、インビトロ実験から得られたパラメータをインビボ状況に適用して推定するために使用する。さらなる例として、平衡透析を使用するなどのタンパク質結合実験は、「遊離割合」又は非結合化合物の割合（Fu）の情報を提供する。そして、この割合を他の実験の結果に幾分盲目的に適用し、他の実験の結果にこの割合を掛けることによって、「遊離」化合物による影響を推定する。

20

#### 【0016】

典型的には、試験化合物の肝臓取り込み及び胆汁排出を評価するための実験は、細胞外にタンパク質が存在しない条件下で評価される。これはしばしば実験的な単純さと典型性の理由で行われ、別々に決定された遊離割合がこれらの結果に適用される。

30

#### 【0017】

本発明によれば、肝細胞の測定（取り込み、胆汁排出、肝胆汁クリアランス、又は細胞内濃度など）に遊離割合の補正因子を盲目的に適用することは、その範囲で生理学的データを提供するものではないと認められる。実際、特定の例では、タンパク質の添加は、化合物の細胞への取り込みの薬物動態を変化させ（しばしば劇的である）、取り込みタンパク質の動力学を変更し、及び熱力学的結合パラメータを変化させることが観察される。遊離割合を別個に決定する場合、これらのパラメータは全く考慮されないか、又は考慮されることができない。最終的には、取り込み量は非結合薬物濃度に比例するという仮定があるが、これは多くの場合に誤っている可能性がある。実際、タンパク質の添加は常には予想効果を有するとは限らないこと、すなわち、化合物の取り込みの観察量及び化合物の細胞内濃度がタンパク質の存在下で予測される取り込み量と一致しないことが、ここで実証される。この観察は予想外である。

40

#### 【0018】

実際、本明細書の実施例で実証され議論されているように、実験データは、驚くべきことに、いくつかの化合物について、インビボ環境（タンパク質の存在下のような）を近似する条件下でのインビボ胆汁クリアランス及び肝細胞内濃度は、別個の研究（2段階法）から得られた遊離割合値を用いてデータを調整することによっては、予測することができな

50

いことを示している。むしろ、評価を、生理学的濃度のタンパク質の存在下などの（但し、これに限定されない）インビボ環境に近い条件下で行うことにより、これらのパラメータのインビボ関連値を決定する。従って、本明細書に示されるように、（観察されるのとは対照的に）推定又は計算された胆汁クリアランス及び肝細胞内濃度は、場合によっては、驚くほど劇的に過大又は過小に予測されている可能性がある。

【0019】

従って、ここでは、いくつかの実施形態において、インビボ関連細胞外環境（例えば、タンパク質及び/又は他の成分結合効果）を、肝細胞のディスポジション及び/又は毒性などの細胞内ディスポジション及び/又は効果評価と組み合わせた統合システムを用いたアプローチが提供される。

10

【0020】

いくつかの実施形態において、本発明は、候補化合物をこの培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、及びこの培養物及び/又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階を含む。この細胞外環境は、例えば、成分（例えば、タンパク質及び/又は他の成分など）を生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性（例えば、結合特性）を有する濃度で含む培地である。本発明のいくつかの実施形態は、取り込み培地中の候補化合物とこの成分の同時曝露を含む。実際、本発明は、複数の曝露段階の任意の組み合わせを、任意の順序又は同時に含む。いくつかの実施形態において、この培地は、タンパク質を含み、かつ候補化合物の特性を調節することができる別の成分を含む。従って、いくつかの実施形態において、タンパク質を含む培地の存在下で培養物及び/又は懸濁液を推定誘導剤又は阻害剤に曝露することができ、次いで候補化合物を含むがタンパク質を含まない培地で評価を行うことができる。さらに、いくつかの実施形態では、このタンパク質は、複数のタンパク質（アルブミン、生理学的濃度の $\alpha$ -1-酸糖タンパク質、又は生理学的タンパク質濃度で観察される結合特性と類似の結合特性を有することが決定された濃度の混合物）関心種から直接得られる。さらに、いくつかの実施形態において、このタンパク質は、生理学的濃度、又は生理学的タンパク質濃度で観察されるものと類似の結合特性を有するように決定された濃度の、タンパク質（アルブミン、 $\alpha$ -1-酸糖タンパク質）の混合物であってもよい。また、これには、関心種から直接得られる血清又は血漿も含まれる。

20

【0021】

本発明のいくつかの実施形態では、サンドイッチ培養肝細胞などの肝細胞培養物を使用して、薬物化合物などの目的の化合物の肝臓取り込み及び胆汁排出を評価することができる。参照によりその全体が本明細書に組み込まれる米国特許第6,780,580号に開示されているように、関心のある化合物（例えば、治療用組成物）のスクリーニングは、このような化合物が取り込まれ、そして胆汁排出プロセスを通して広範に排出されるので、これらが被験体の治療効果を与える可能性が最小限であるので望ましい。従って、初期の評価プロセスにおいて、望ましくない高い感受性を有する化合物を、治療剤としての更なる評価から容易に排除するように、肝細胞の取り込み及び胆汁排出に対する化合物の感受性についてのインビボの試験法を確立することが望ましい。従って、肝細胞の培養物は、インビボの肝細胞を反映する所望の機能的特性を維持するため、胆汁排出に対する感受性について目的の化合物をスクリーニングするためのモデルを提供する。以下の米国特許公報もまたその全体が参照により本明細書に組み込まれる：米国特許第7,601,494号；米国特許第7,682,781号；米国特許第7,604,934号；米国特許第8,367,630号；及び米国特許出願第US-2010-0035293-A1号の公開公報。

30

40

【0022】

当業者に理解されているように、インビボ生物学的プロセスを所望のレベルで正確にモデル化するためには、細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）のインビトロ培養物及び/又は懸濁液は、インビボ細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）に構造的及び機能的に類似しているべきである。従って、いくつかの実施形態における、本発明の培養物及び/又は懸濁液において、インビボで表示される構造的及び機能的特性が確立される。例えば、本発明により、洞様毛細血管若しくは毛細胆管輸送システム、又

50

は洞様毛細血管及び毛細胆管輸送システムの両方、のような輸送システムが確立される。特に、本発明に従って、細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）の培養物及び/又は懸濁液中で少なくとも1つの毛細胆管を確立することが提供される。ひとつの培養物及び/又は懸濁液は、複数の毛細胆管を含むことができる。複数の毛細胆管は、毛細胆管ネットワークを含むことができる。少なくとも1つの胆管又は毛細胆管ネットワークの確立は、培養細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）が、インビボの胆汁排出と同様に、胆汁及び胆汁成分を少なくとも1つの毛細胆管に排出することを可能にする。

#### 【0023】

毛細胆管輸送システムに加えて、インビトロの肝臓又は肝臓に関連する培養液中に特定のトランスポーターの確立が提供される。この肝臓に関連する培養液には、小胞のような細胞、又はヒト特異的タンパク質のために遺伝子導入又はノックアウトされた（例えば、トランスポーター、P450）、HepaRG（登録商標）細胞株、Hureflux（登録商標）細胞株、Opti-Target（登録商標）細胞株、Caco-2、及びMDCKのような細胞株、を模倣するための完全な人工膜システムを含むことができる。典型的なトランスポーターには、Ntcp、cMoat、Oatp1、Oatp2、Mrp2、Mrp3、Pgp、Bsep及びMdr2が含まれるが、これらに限定されない。これらの肝臓トランスポーターの発現及び機能は、インビボ肝細胞で見られるものと実質的に同様であり得る。

10

#### 【0024】

細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない）の培養物及び/又は懸濁液における代謝酵素の発現及び活性を含む正常な代謝能力の確立も、本発明に従って提供される。従って、この培養物は、インビボ細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）の代謝を実質的に反映する代謝能力を有することができる。例えば、種々のP450アイソザイムなどの第I相代謝酵素、UDP-グルクロン酸転移酵素（UGT）などの第II相代謝酵素、及びインビトロ細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）の培養物及び/又は懸濁液中の一次胆汁酸とタウリン及びグリシンとの結合に関与するこの他の酵素の正常な発現、機能及び活性が、本発明において提供される。

20

#### 【0025】

このような方法は、いくつかの実施形態において、細胞の培養物及び/又は懸濁液を提供する段階、候補化合物をこの培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、この培養物及び/又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、及びこの培養物及び/又は懸濁液に取り込まれた候補化合物の量を決定し、それにより、この候補化合物のディスポジションを評価して、この候補化合物のインビボのディスポジションを予測する段階、を含むことができる。この細胞外環境は、例えば、成分（例えば、タンパク質及び/又は他の成分など）を生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性（例えば、結合特性）を有する濃度で含む培地である。培養物及び/又は懸濁液中に取り込まれた候補化合物の量を決定してそれによりディスポジションを評価する段階は、更に、該候補化合物の細胞内濃度を決定する段階、肝臓蓄積を決定する段階、胆汁排出を決定する段階、及び/又は胆汁クリアランスを決定する段階、を含むことができる。

30

#### 【0026】

いくつかの実施形態において、候補化合物の胆汁排出感受性を検査する方法が提供される。このような候補化合物の胆汁排出感受性を検査する方法は、細胞の培養物及び/又は懸濁液（例えば、細胞を擬態するように適合した人工膜システム及び少なくとも一つの毛細胆管を含む細胞の培養物及び/又は懸濁液）を提供する段階、候補化合物をこの細胞の培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、この細胞の培養物及び/又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、及びこの少なくとも一つの毛細胆管中の候補化合物の量を決定し、それにより、候補化合物の胆汁排出感受性を検査する段階、を含むことができる。この細胞外環境は、例えば、成分（例えば、タンパク質及び/又は他の成分など）を生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性（例えば、結合特性）を有する濃度で含む培地である。

40

50

## 【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態において、この少なくとも一つの毛細胆管中の候補化合物の量を決定する段階は、候補化合物と輸送タンパク質のための標識された予め選択された量の基質とを同時に、取り込みを可能にする十分な時間、細胞培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、該細胞培養物及び/又は懸濁液を洗浄する段階、及び該少なくとも一つの毛細胆管内に存在する標識された基質の量を検出し、該輸送タンパク質による胆汁排出についての候補化合物と標識された基質との間の競合を評価する段階、を含むことができる。いくつかの実施形態において、この標識された基質の予め選択された量と比べて、この少なくとも一つの毛細胆管中の該標識された基質の量が減少していたら、それを輸送タンパク質による胆汁中排出に対する候補化合物の感受性示すものとする。いくつかの実施形態において、この少なくとも一つの毛細胆管中の候補化合物の量は、この培養物及び/又は懸濁液の胆汁クリアランス値を計算することによって決定される。

10

## 【 0 0 2 8 】

さらに、いくつかの態様において、上記方法における細胞培養物及び/又は懸濁液は、細胞単独、又は線維芽細胞及び/又はクッパー細胞などの支持細胞と共培養液中の細胞を擬態するように適合した人工膜システムを含んでもよい。人工膜システムによって擬態された細胞は、例えば、小胞、肝細胞、肝臓由来細胞、腎細胞、胃腸細胞、膵臓細胞、心臓細胞、神経細胞、筋細胞、脂肪細胞及び/又は肺細胞であってもよい。更に、いくつかの態様において、人工膜システムにより擬態される細胞はひとつの細胞株から成ってもよい。いくつかの実施形態において、この細胞株は、HepaRG（登録商標）細胞株、Hureflux（登録商標）細胞株、Opti-Target（登録商標）細胞株、Caco-2及び/又はMDCから成る群から選択される。

20

## 【 0 0 2 9 】

標識された基質が本明細書に記載の方法のいずれかで使用される場合、このような標識された基質は、蛍光発生的化合物、蛍光化合物、化学発光化合物、比色化合物、放射性標識化合物及びこれらの組み合わせから成る群から選択される化合物を含むことができる。

## 【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態において、候補化合物の胆汁排出感受性を検査する方法が提供される。このような方法は、第1及び第2の細胞培養物及び/又は懸濁液並びに少なくとも一つの毛細胆管を確立する段階であって、該第1の培養物及び/又は懸濁液が無傷の毛細胆管を有し、該第2の培養物及び/又は懸濁液が崩壊した毛細胆管を有する段階、を含むことができる。このような方法は、更に、候補化合物を、候補化合物の取り込みを可能にする十分な時間、該第1の培養物及び/又は懸濁液並びに該第2の培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、この第1及び第2の培養物及び/又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、該第1及び第2の培養物及び/又は懸濁液を洗浄し、溶解する段階、及びそれぞれの培養物及び/又は懸濁液から得られた溶解物中に存在する候補化合物の量を決定し、各培養物及び/又は懸濁液中のこの候補化合物の量を用いて、候補化合物の胆汁排出感受性を評価する段階、を含むことができる。この細胞外環境は、例えば、成分（例えば、タンパク質及び/又は他の成分など）を生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性（例えば、結合特性）を有する濃度で含む培地である。

30

40

## 【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態において、各第1及び第2の培養物及び/又は懸濁液は、細胞を擬態するように適合した人工膜システムを含んでもよい。更に、いくつかの態様において、上記方法の培養物及び/又は懸濁液は、細胞単独、又は線維芽細胞及び/又はクッパー細胞などの支持細胞と共培養液中の細胞を擬態するように適合した人工膜システムを含んでもよい。人工膜システムによって擬態された細胞は、例えば、小胞、肝細胞、肝臓由来細胞、腎細胞、胃腸細胞、膵臓細胞、心臓細胞、神経細胞、筋細胞、脂肪細胞及び/又は肺細胞であってもよい。更に、いくつかの態様において、人工膜システムにより擬態される細胞はひとつの細胞株から成ってもよい。いくつかの実施形態において、この細胞株は、HepaRG（登録商標）細胞株、Caco-2及び/又はMDCから成る群から選択される。

50

## 【0032】

いくつかの実施形態において、第1及び第2の細胞培養物及び/又は懸濁液を用いるこの方法は、更に、候補化合物を、候補化合物の取り込みを可能にする十分な時間(T)、該第1及び該第2の培養物及び/又は懸濁液に曝露する段階、この第1及び第2の培養物及び/又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、該第1及び第2の培養物及び/又は懸濁液の各第1及び第2の画分を洗浄し、溶解する段階、各第1及び第2の培養物及び/又は懸濁液から得られた溶解物中に存在する候補化合物の量を決定する段階、毛細胆管中の量を、無傷の毛細胆管を有する第1の培養物及び/又は懸濁液と、崩壊した毛細胆管を有する第2の培養物及び/又は懸濁液とから得られた2つの溶解物中に存在する候補化合物の量の差として計算する段階、及びこの計算された量を用いて、候補化合物の胆汁排出感受性を評価する段階を含んでもよい。この細胞外環境は、例えば、成分(例えば、タンパク質及び/又は他の成分など)を生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性(例えば、結合特性)を有する濃度で含む培地である。

10

## 【0033】

いくつかの実施形態において、候補化合物のインビボでの効果を予測するためにインビトロの培養物及び/又は懸濁液中の候補化合物の効果を評価する方法が提供される。これらの方法は、細胞の培養物及び/又は懸濁液を提供する段階、少なくとも一度この培養物及び/又は懸濁液を少なくとも一つの候補化合物に曝露する段階、この培養物及び/又は懸濁液を、インビボの関連する細胞外環境を提供する培地に曝露する段階、及びこの培養物及び/又は懸濁液を少なくとも一つの候補化合物に曝露した効果を評価して、候補化合物のインビボでの効果を予測する段階、を含んでもよい。この細胞外環境は、例えば、成分(例えば、タンパク質及び/又は他の成分など)を生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性(例えば、結合特性)を有する濃度で含む培地である。上記方法において評価される効果には、伝達及び他のタイプの研究(代謝、誘導及び毒性);代謝物同定及び代謝安定性(親寿命)を含む代謝研究;遺伝子調節(誘導/抑制);P450及びトランスポーター薬物相互作用;細胞内蓄積及び遊離又は全ての(結合+遊離)細胞内濃度(例えば、核、ミトコンドリア);及び/又は毒物学的効果を含むことができる。

20

## 【0034】

さらにいくつかの態様において、このような方法は、更に、細胞を擬態するように適合した人工膜システム及び少なくとも一つの毛細胆管を含む細胞の培養物及び/又は懸濁液を提供する段階を含むことができる。いくつかの態様において、上記方法の細胞の培養物及び/又は懸濁液は、例えば、線維芽細胞及び/又はクッパー細胞などの支持細胞と共培養液中の細胞又は単独細胞を擬態するように適合した人工膜システムを含むことができる。人工膜システムによって擬態された細胞は、例えば、この人工膜システムにより擬態される細胞としては、例えば、小胞、肝細胞、肝臓由来細胞、腎細胞、胃腸細胞、膵臓細胞、心臓細胞、神経細胞、筋細胞、脂肪細胞、及び/又は肺細胞が挙げられる。更にいくつかの態様において、人工膜システムによって擬態された細胞は、HepaRG(登録商標)細胞株、Hurelflux(登録商標)細胞株、Opti-Target(登録商標)細胞株、Caco-2、及び/又はMDCから成る群から選択される細胞株のような、ひとつの細胞株から成ってもよいが、これらに限定され無ない。いくつかの実施形態において、このような細胞は、マウス、ラット、ウサギ、ヒト、サル、類人猿、ネコ、イヌ、子ブタ、食用ブタ、ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ウマ、シチメンチョウ、鶏、魚、アヒル及びガチョウから成る群から選択される供給源から単離されてもよい。

30

40

## 【0035】

いくつかの態様において、この方法の培養物及び/又は懸濁液は、さらに長期の培養物及び/又は懸濁液を含むことができる。この培養物及び/又は懸濁液は、毛細胆管ネットワークを含むことができる。この培養物及び/又は懸濁液は、クラスター、凝集体、細胞の少なくとも一つの層、及びこれらの組み合わせからなる群から選択される構成を有することを特徴とすることができる。さらにいくつかの態様において、この細胞は、マトリックス中に埋め込まれていてもよい。

50

## 【0036】

さらに、いくつかの態様において、この培養物及び/又は懸濁液は、更にサンドイッチ培養物及び/又は懸濁液を含むことができ、このサンドイッチ培養物及び/又は懸濁液は、細胞の少なくとも1つの層を含み、かつ任意に該細胞の少なくとも1つの層内に少なくとも1種の毛細胆管を含む。このサンドイッチ培養物及び/又は懸濁液は、さらに長期のサンドイッチ培養物及び/又は懸濁液を含むことができる。この細胞の少なくとも1つの層は、マトリックスの2つの層の間に挟まれていてもよく、このマトリックスは、生物学的マトリックス培地、合成マトリックス培地、支持細胞型の共培養液、及びこれらの組み合わせから成る群から選択されてもよい。この生物学的マトリックス培地は、コラーゲン、ラミニン、基底膜に由来する複合体、これらの誘導體、及びこれらの組み合わせから成る

10

## 【0037】

ここで開示される方法のいずれかにおいて、この培養物及び/又は懸濁液は、複数の候補化合物に曝露されることができる。ここで開示される方法におけるいくつかの実施形態において、この培養物及び/又は懸濁液は、一つ又はそれ以上の候補化合物に繰り返し曝露されることができる。

## 【0038】

ここで開示する方法において、生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性（例えば、結合特性）を有する濃度で添加されることのできる成分（タンパク質など）として、例えば、アルブミン； -1-酸性糖タンパク質； -リポタンパク質；ビリルビン；胆汁酸又は胆汁酸の混合物；及び/又はマウス、ラット、ウサギ、ヒト、サル、類人猿、ネコ、イヌ、子ブタ、食用ブタ、ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ウマ、シチメンチョウ、鶏、魚、アヒル若しくはガチョウなどの代表的な又は所望の被験体に由来する血漿又は血清が挙げられるが、これらに限定されない。さらに、いくつかの態様において、例えば、成分（例えば、タンパク質及び/又は他の成分など）を生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性（例えば、結合特性）を有する濃度で含む培地のような、インビボの関連する細胞外環境の培地は、候補化合物の特性を調節する他の化合物を含むことができる。さらに、胆汁酸又は胆汁酸の混合物；ビリルビン； -リポタンパク質；及びタンパク質又はタンパク質混合物を含む培地は、候補化合物の特性を調節する他の化合物を含むことができる。さらに、生理学的濃度に加えて、成分（例えば、タンパク質及び/又は他の成分など）の濃度は、また、より高く又はより低くてもよいが、同様の効果を有する濃度である。従って、いくつかの実施形態において、同様の結合効果のような同様の効果を有する非生理学的濃度もまた提供される。

20

30

## 【0039】

ここで開示される方法において、このような方法は、マルチウェルプレート中の少なくとも1つのウェル中で行われることができる。このような方法において、同時に複数の候補化合物をスクリーニングしてもよい。更に、ここで開示される方法において、これら複数の曝露する段階のいずれかの任意の組み合わせは、同時に又は如何なる順序で行われてもよい。

## 【0040】

本発明で用いることができる代表的な計算には、胆汁排出指数（BEI）及び胆汁クリアランス値の計算がある。いくつかの実施形態において、この胆汁排出指数は、肝細胞に取り込まれる化合物のうち胆汁中に排出される化合物の割合を示す。いくつかの実施形態において、この胆汁クリアランス値は、化合物が胆汁中に排出される可能性を示し、インビボで化合物の胆汁への除去を最も良く予測する因子である。

40

いくつかの実施形態において、胆汁排出指数（BEI）は、以下のように候補化合物の取り込み及び排出から計算される：

胆汁排出指数（BEI） = 100% × ( ( 培養物中の無傷の毛細胆管への取り込み ) - ( カルシウム ( Ca<sup>2+</sup> ) フリー培地中のみにおける肝細胞への取り込み ) ) / ( 培養物中の無傷の毛細胆管への取り込み )

いくつかの実施形態において、胆汁クリアランスは以下のように計算される：

50

胆汁クリアランス = ( ( 培養物中の無傷の毛細胆管への取り込み ) - ( カルシウム ( Ca<sup>2+</sup> ) フリー培地中のみにおける肝細胞への取り込み ) ) / ( 培養時間に緩衝液中の候補化合物の濃度を掛けたもの )

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態において、胆汁クリアランス値は、培養液中の毛細胆管の量と曲線下面積 ( AUC ) との比として計算することができ、この曲線下面積 ( AUC ) は、時間 0 から時間 T ( 時間は任意の単位で測定することができるが、通常は「分」で測定される。 ) までの培地中の候補化合物の量の積分値を表す。

實際上、この曲線下面積 ( AUC ) は、下式で表すことができる :

【 数 1 】

$$AUC = \int_0^T C \, dT$$

( 式中、C は培地中の濃度を表す。 )

この等式は、Pharmacokinetics, Second Edition (Marcel Dekker, Inc. 1982), by Gibaldi and Perrier, (pp. 13-14) に記載されている。

【 0 0 4 2 】

以下の用語は、当業者は十分に理解すると考えられるが、本発明の説明を容易にするために、以下の定義を示す。

【 0 0 4 3 】

「インビボの関連する細胞外環境」とは、本発明に従ってインビトロでの候補化合物のディスプレイポジション及び/又は効果の評価に関連する、インビボ状態を擬態又は近似する環境を指す。例えば、インビボの関連する細胞外環境は、成分 ( 例えば、タンパク質及び/又は他の成分など ) を生理学的濃度又は生理的濃度に近似の特性 ( 例えば、結合特性 ) を有する濃度で提供することができる。この結合特性は、タンパク質結合の「緊張」 ( Ka ( 結合定数 ) ) 又は Kd ( 解離定数 ) によって示される ) に加えて結合程度を含む。

【 0 0 4 4 】

「ディスプレイポジション及び/又は効果」という用語の組み合わせは、以下を含むが、これらに限定されない : 取り込みクリアランス ; 側底流出クリアランス ; 涙小管流出クリアランス ; 代謝クリアランス ; 細胞内濃度 ; 化合物動力学 ; 毒物学的影響 ; 代謝物 ID 及び代謝安定性 ( 親寿命 ) ; 遺伝子調節 ( 誘導 / 抑制 ) ; P450 及びトランスポーター薬物相互作用 ; 細胞内蓄積及び遊離又は全 ( 結合 + 遊離 ) 細胞内濃度 ( 例えば、核、ミトコンドリア ) ; 及び全体的胆汁クリアランス。この「ディスプレイポジション及び/又は効果」という用語の組み合わせは、薬物動態学 ( PK ) も含み、これは ( 1 ) 生物又はシステムが目的の化合物に作用する仕方、及び ( 2 ) 培養物及び/又は懸濁システムにおける全ての添加物のクリアランス ( 取り込み、流出、代謝 ) として広く定義することができる。実際、この「ディスプレイポジション及び/又は効果」という用語の組み合わせは、本開示をレビューする当業者にとって明らかであるような、任意の所望の評価を含むことができる。

【 0 0 4 5 】

用語「カルシウムフリー緩衝液」は、実質的にカルシウムを含まない如何なる緩衝液をも意味する。カルシウムフリー緩衝液の非限定的な例は、カルシウムフリーハンクス平衡塩溶液 ( calcium-free Hank's balanced salt solution ( HBSS ) ) である。当業者によって理解され得るように、実質的にカルシウムを含まない任意の適切な緩衝液が、本発明の範囲内に入る。カルシウムフリー緩衝液を使用することにより、本発明のいくつかの実施形態に従って、崩壊した毛細胆管が提供される。

【 0 0 4 6 】

「正常な代謝機能」、「正常な代謝活性」及び「所望の代謝特性」という用語は、本明細書において互換的に使用され、インビボの正常な基本的条件下で、細胞 ( 肝細胞などであるが、これに限定されない。 ) における、代謝経路及び代謝反応に關与する酵素の活性、

10

20

30

40

50

機能及び/又は発現を意味する。

【0047】

用語「機能的特性」は、生物、細胞又は生化学反応の生物学に關与する特定の機能を付与する如何なる生物学的特性をも含む。本発明によれば、この機能的特性は、酵素活性、酵素機能、酵素発現、トランスポーター発現及びトランスポーター機能、並びに酵素及びトランスポーターの発現を担う制御経路を含んでもよい。

【0048】

用語「化合物」、「候補化合物」、「目的化合物」又は「薬物化合物」は、本明細書において互換的に使用され、その化合物（外因的に投与されるか又は内因的に生成される）の代謝、毒性、肝臓の取り込み、又は胆汁排出に対する感受性が望ましいような如何なる化合物に関する。典型的な化合物、目的化合物又は薬物化合物には、薬物及び他の治療薬、発癌物質及び環境汚染物質などの外因的生物質、並びにステロイド、胆汁酸、脂肪酸、及びプロスタグランジンなどの内因的生物質が含まれる。

10

【0049】

治療剤である目的化合物は、温血脊椎動物の治療に有用であることができる。従って、本発明は、哺乳動物及び鳥類に関する。

ここでは、ヒト、絶滅の危機に瀕しているため重要な哺乳動物（シベリアトラなど）、経済的に重要な動物（人間により消費されるために飼育された動物）及び/又は社会的に人間にとって重要な動物（動物園で又はペットとして飼われている動物）、例えば、ヒト以外の肉食動物（ネコやイヌなど）、ブタ（子ブタ、食用ブタ、イノシシ）、反芻動物（ウシ、雄ウシ、ヒツジ、キリン、シカ、ヤギ、バイソン、及びラクダなど）、及びウマなどの哺乳動物の治療法が提供される。また、ここでは、絶滅の危機に瀕している鳥類や動物園で飼育されている鳥類、及び禽、より特定的には家畜化された禽、即ち、家禽（例えば、七面鳥、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、モルモットなど）を含む鳥類の治療法が提供される。これらは人間にとって経済的にも重要であるからである。従って、ここでは、家畜化されたブタ（子ブタ及び飼育ブタ）、反芻動物、ウマ、家禽などを含むが、これらに限定されない家畜の治療法が提供される。

20

【0050】

「毒物学的効果を評価する」という語句は、肝細胞のような細胞（但し、これに限定されない。）についてある化合物の一つ又はそれ以上の毒性作用を定量的及び/又は定性的に測定する如何なる適切な方法を指す。

30

【0051】

「胆汁排出」という用語は、物質が、肝細胞によって取り込まれ、及び毛細胆管を介して胆汁中に排出されることによって（すなわち、取り込み及び流出）、被験者の循環系から取り除かれる、生物学的プロセスを指す。例えば、肝細胞への取り込みは、Ntcp、Oatp1及びOatp2等（但し、これらに限定されない。）の肝細胞に内在する輸送システムによって媒介される。毛細胆管への排出は、Mrp2、Mdr3、Pgp及びBsep等（但し、これらに限定されない。）の流出トランスポーターによって媒介される。毛細胆管は、肝細胞から排出された成分を受け取り、胆汁を胆管へ輸送して被験者から除去する肝組織内の構造物である。

40

【0052】

本発明の方法は、少なくとも1つの肝細胞層が2つのマトリックス層の間に形成される、肝細胞のサンドイッチ培養物を確立する段階を含むことができる。サンドイッチ培養物のような構成が培養のために好ましい構成であるが、当業者にこれらから明らかであるような如何なる適切な構成も、本発明の範囲内である。例えば、少なくとも1つの毛細胆管が形成されていて、細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）の機能的特性が確立されているような、培養物及び/又は懸濁液中の、細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）のクラスター、凝集物又は他の会合物若しくは集団は、本発明の範囲内である。クッパー細胞及び線維芽細胞又は原始間葉に由来する他の細胞型のような、他の細胞型との共培養における細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）もまた本発

50

明の範囲内である。任意に、この培養物及び/又は懸濁物の構成は、インビボの肝細胞を反映する複数の毛細胆管を形成するのを容易にする。また、任意に、この培養物の構成は、毛細胆管ネットワークの形成を容易にする。さらに、この培養物の構成は、任意に、インビボの細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）と実質的に同様の所望の代謝特性を有する細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）の培養物の確立を容易にする。同様に、インビボの細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）と実質的に同様の、所望のトランスポーター発現及び機能が任意に確立される。

【0053】

さらに、サンドイッチ構造では、細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）は、2つのマトリクス層の間の単層又は足場で培養されることができる。しかし、この細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）は、マトリクス中に埋め込まれることもできるし、又はマトリクスを垂直方向、水平方向、斜め方向、又はそれらの任意の組み合わせで不均一に伸長して、1次元及び3次元の凝集体を形成することもできる。さらに、培養物及び/又は懸濁液は、三次元フロースルーシステムなどの（但し、これに限定されない）バイオリクターシステム、微小環境又は三次元足場に確立することができる。例えば、Griffith and Naughton, (2002) Science 295:1009-1014を参照されたい。細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）の培養物及び/又は懸濁液は、細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）を適切なマトリクスと混合し、この混合物をマルチウェルプレート又は培養チャンバーのような適切な培養容器に挿入することにより、形成することができる。

【0054】

コラーゲンは、細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）の培養物及び/又は懸濁液のための代表的な基質又は足場であるが、当業者に明らかなような、天然、合成又はこれらの組み合わせのいずれかの適切な基質又は足場は本発明の範囲内である。例えば、この他に、Collaborative Biomedical Products, Inc. (Bedford, Massachusetts, USA)により登録商標MATRIGELで販売されているラミニン及び生物学的細胞培養基質に由来する基底膜を含む生体基質は、適切な基質材料又は足場材料になる。ポリマーなどの様々な材料から典型的に作製される合成マトリクス材料、基材材料又は足場材料も本発明の範囲内に入る。細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）を培養する際に使用するための特定のマトリクスを有する様々な成分物質もまた本発明の方法に従って提供される。

【0055】

本開示をレビューする際に当業者に明らかであるような如何なる適切な細胞源（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）も本発明の範囲内である。例示的な供給源には、上に列挙した温血脊椎動物が含まれる。特に、例示的な供給源には、ヒト、ラット、マウス、サル、類人猿、ネコ、イヌ、子ブタ、食用ブタ、ウシ、雄ウシ、ヒツジ、ウマ、シチメンチョウ、ニワトリ、アヒル及びガチョウが含まれるが、これらに限定されない。

【0056】

培養された細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）は、「長期培養物及び/又は懸濁液」として培養することができる。「長期培養及び/又は懸濁」は、少なくとも約12時間培養された細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）を意味する。任意に、「長期間の培養及び/又は懸濁」は、少なくとも約24時間、少なくとも約48時間、又は少なくとも約72時間培養された細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）をいう。また任意に「長期間の培養及び/又は懸濁」は、少なくとも約96時間、少なくとも約1週間、又は少なくとも約28日間培養された細胞（例えば、肝細胞、但しこれに限定されない。）をいう。長期培養は、毛細胆管の形成並びに培養物及び/又は懸濁液中の代謝経路などの機能的特性の確立を促進する。

【0057】

肝臓細胞の培養物及び/又は懸濁液は、代表的な培養物として本明細書に記載されているが、本発明は、開示された細胞型の機能を調節することができる、対象の任意の細胞又は

10

20

30

40

50

細胞型単独又は細胞型と支持細胞との任意の組み合わせを培養又は使用するために提供する。従って、本開示を参照すると、当業者は、任意の所望の細胞培養物及び/又は懸濁液を使用のために上記の記載及びアプローチを適合させることができる。代表的な細胞の培養物及び/又は懸濁液には、肝細胞、腎細胞、胃腸細胞、膵臓細胞、筋細胞、心臓細胞、神経細胞、及び肺細胞から成る群から選択される細胞を含む細胞の培養物及び/又は懸濁液が含まれるが、これらに限定されない。本発明のいくつかの実施形態によれば、支持マトリックス（例えば、線維芽細胞、但し、これに限定されない。）又は機能（例えば、クッパー細胞、但し、これに限定されない。）を提供する他の細胞と単一又は複数の細胞型との共培養物が提供される。

【0058】

長年にわたる特許法の条約に従い、「a」及び「an」という用語は、クレームを含む本出願で使用される場合、「1つ又はそれ以上」を意味する。

他に指示がない限り、本明細書及び特許請求の範囲で使用される成分の量、反応条件などを表す全ての数字は、すべての場合において「約」という用語によって修飾されるものとして理解されるべきである。従って、そうではないと示されない限り、本明細書及び特許請求の範囲に記載される数値パラメータは、本発明によって得られることが求められる所望の特性に応じて変化し得る近似値である。

本明細書で使用されるように、値、又は質量、重量、時間、体積、濃度又は割合を指す場合の「約」という用語は、その変化が開示された方法の実施に適用になるように、特定された量の、いくつかの実施形態において±20%、いくつかの実施形態において±10%、いくつかの実施形態において±5%、いくつかの実施形態において±1%、いくつかの実施形態において±0.5%、いくつかの実施形態において±0.1%である。

【0059】

本明細書で使用される「及び/又は」は、実在をリストする文脈で使用される場合には、単独又は組み合わせで存在する実在のことをいう。従って、例えば、「A、B、C、及び/又はD」は、個別のA、B、C、及びDが含まれるが、また、A、B、C、及びDのいずれか並びにすべての組み合わせ及びサブコンビネーションが含まれる。

「から成る(comprising)」は、「含有する(including)」、「含む(containing)」又は「で特徴づけられる(characterized by)」と同義語であるが、包括的又はオープンエンドであり、追加的な、列挙されていない要素及び/又は方法の段階を排除するものではない。「から成る(comprising)」は、名付けられた要素及び/又は段階が存在することを意味する用語であるが、他の要素及び/又は段階が追加されても、まだそのクレームの範囲内に入る。

本明細書において用いられる「のみから成る(consisting of)」という用語は、具体的に列挙されていない任意の要素、工程、又は成分を除外することをいう。この「のみから成る(consisting of)」という用語が、プレアンブルに続かないで、クレームの本体に用いられた場合、そこに記載された要素のみに限定され、他の要素は、クレーム全体から除外される。

「consisting essentially of(本質的に、から成る)」は、請求範囲を、明記した材料又は段階に限定して、さらに請求範囲の発明事項の基本的及び新規の特徴に実質的に影響しない材料又は段階を限定する。

「comprising(から成る)」、「consisting of(のみから成る)」及び「consisting essentially of(本質的に、から成る)」に関して、これらの3種の用語の1種が本明細書で用いられた時、本発明は、他の2種の用語のいずれかの使用を含めることができる。

【0060】

本明細書で使用される「有意性/顕著性」又は「有意な/顕著な」は、2つ以上の実体間に非ランダムな関連が存在する確率の統計的分析に関する。その関係が「有意/顕著」であるかどうかを判定するために、データの統計的操作を行い、確率を計算して「p値」として表すことができる。ユーザー定義のカットオフポイントを下回るこれらのp値は「有意/顕著」であるとみなされる。いくつかの実施形態において、0.05以下、いくつかの実

10

20

30

40

50

施形態において0.01未満、いくつかの実施形態において0.005未満、いくつかの実施形態において0.001未満のp値は「有意／顕著」であるとみなされる。従って、0.05以上のp値は「有意／顕著」ではないと考えられる。

【実施例】

【0061】

異なるタイプのタンパク質の非存在下及び存在下における複数の化合物の肝胆汁ディスポジションを比較するいくつかの例示的実験の結果を以下に記載する。以下の実施例は、本発明の代表的な態様を例証するために挙げられたものである。この開示を参照すれば、当業者は、以下の実施例は代表的なものに過ぎず、本発明の精神及び範囲から逸脱することなく多くの変更、修正及び変更を採用できることを理解するであろう。

【0062】

実施例1

選択化合物の遊離割合の評価

最初に、平衡透析法を使用して、ある範囲の遊離割合（非結合割合ともいう）を有する、いくつかの化合物を同定した。この遊離割合は、アルブミンタンパク質に熱力学的に結合すると考えられる量と比較した、溶液中で熱力学的に遊離していると考えられる化合物の量である。例えば、遊離割合0.428は、化合物の約43%が非結合であり、これらの条件下で溶液中で遊離であることを示す。これらの値を表1に示す。

【0063】

【表1】

選択化合物の遊離割合

化合物	4% BSA中の遊離割合	血清中の遊離割合
メトレキサート	0.428	0.499
バルサルタン	0.075	0.004
DPDPE (10 $\mu$ M)	0.786	0.451
プラバスタチン	0.734	0.554
DPDPE (1 $\mu$ M)	0.786	0.451
ジゴキシシン	0.852	0.727
タウロコール酸塩	0.142	0.047
ピタバスタチン	0.047	0.004
ロスバスタチン	0.136	—

【0064】

実施例2

ラット肝細胞の内因性胆汁クリアランスの測定値の評価

生理学的濃度のタンパク質（4%ウシ血清アルブミン、BSA）及びWistarラットから得た血清の存在下及び不存在下で、表1に列挙する9つの化合物の肝臓取り込み、流出、細胞内濃度及び胆汁クリアランスを評価した。緩衝液（タンパク質なし）、4%BSAを含む緩衝液、又はラット血清の中で、各化合物について、濃度1  $\mu$ M及び曝露時間10分間で、サンドイッチ培養したラット肝細胞のこれらのデータを測定した。具体的には、全蓄積（+Ca条件下の取り込みを反映する。）；細胞蓄積（-Ca（カルシウムフリー）条件下の細胞内濃度を反映する。）；胆汁排出指数（BEI：肝細胞に取り込まれる化合物のうち胆汁中に排出される化合物の割合を示す。）；及び内因性胆汁クリアランス（化合物が胆汁中に排出される可能性を示し、インビボで化合物の胆汁への除去を最も良く予測する因子である。）のパラメータが決定された。化合物の取り込みと流出の両方を考慮した内因性胆汁クリアランスの結果を表2に示す。まとめると、これらのデータは、細胞外タンパク質の添加が、緩衝液中で測定した伝統的な結果と比較して、非常に異なる結果を生じ得ることを明確に示している。

【0065】

【表 2】

## 異なる細胞外条件下におけるラット肝細胞の内因性胆汁クリアランス

化合物	タンパク質無し	標準偏差	BSAあり	標準偏差	血清あり	標準偏差
メトトレキサート	0.54	0.4	0.19	0.14	0.91	0.468
バルサルタン	4.73	1.11	3.06	1.57	1.39	1.3
DPDPE (10 $\mu$ M)	5.39	1.33	4.23	1.04	4.09	1.67
プラバスタチン	7.35	1.31	6.47	0.85	2.06	
DPDPE (1 $\mu$ M)	7.24	2.38	3.19	1.79	3.09	0.86
ジゴキシシン	10.4	2.74	9.25	1.83	5.12	1.65
タウロコール酸塩	32.5	16.5	40.4	14.5	27.9	17.1
ピタバスタチン	52	6.05	140	48	277.5	
ロスバスタチン	53.1	1.73	164	17.7		

【0066】

## 実施例 3

ラット肝細胞における胆汁クリアランスの測定値（観測値）と予測値（計算値）の比較次に、細胞外タンパク質存在下でラット肝細胞のこれらの化合物の胆汁クリアランス（測定値）を、タンパク質非存在下で測定し、表 1 に示す適当な遊離割合値を用いて調整した、内因性胆汁クリアランス（予測値）と比較した。後者の方法は現在の業界標準である。表 3 は、これらの結果をまとめたもので、別個の実験に基づく 2 段階プロセスと比較した、胆汁クリアランスを測定するために 1 段階統合システムを用いた効果を示す。この 2 段階プロセスがこの 1 段階統合システムと同等であれば、これらの値は一致する筈である。しかし、ピタバスタチンとロスバスタチンを用いた時にはそうではなく、胆汁クリアランスの予測値は測定値よりも過小評価されており、それは、アルブミンの存在下の予期せぬ変化のためと考えられる。DPDPE (1  $\mu$ M) の胆汁クリアランスの予測値が測定値よりも過大評価していることにも注意されたい。この場合にクリアランスが過大又は過小評価される可能性がある、又は基本的にこれらの値が同等ではないということは、相互作用が予期しない性質のものであることを示し、かつ細胞のディスポジションを評価する際に、統合された方法を使用することが望ましいことを示している。

【0067】

【表 3】

## ラット肝細胞における内因性胆汁クリアランスの測定値と予測値

化合物	測定値 (ml/分/Kg)		予測値 (ml/分/Kg)	
	BSA	標準偏差	HBSS	標準偏差
メトトレキサート	0.083	0.058	0.23	0.17
バルサルタン	0.229	0.118	0.36	0.08
DPDPE (10 $\mu$ M)	3.32	0.817	4.24	1.05
プラバスタチン	4.75	0.0627	5.39	0.96
DPDPE (1 $\mu$ M)	2.51	1.41	5.69	1.87
ジゴキシシン	7.88	1.56	8.85	2.33
タウロコール酸塩	5.73	2.06	4.62	2.34
ピタバスタチン	6.57	2.25	2.44	0.28
ロスバスタチン	22.3	2.41	7.22	0.24

【0068】

通常、胆汁クリアランスについてのこれらの値には差がないことが期待される（この値はタンパク質結合の程度が考慮されているため）。表 2 からわかるように、これは、メトト

レキセート、バルサルタン、DPDPE、プラバスタチン、ジゴキシシン及びタウロコール酸塩など、評価された化合物の多くについて当てはまる。

しかしながら、ピタバスタチン及びロスバスタチンの2つの化合物について、タンパク質の存在下で予測される内因性胆汁クリアランス値は、タンパク質の非存在下で観察されるものよりもはるかに大きい。血清で観察された効果は、同一ではないが、近似しており、このことは、タンパク質組成が化合物のクリアランス予測にも影響を及ぼすことを示唆する。

【0069】

#### 実施例 4

##### ラット肝細胞における細胞内濃度の測定値（観測値）と予測値（計算値）の比較

細胞の取り込み、代謝及び流出のバランスを反映する化合物の肝細胞内濃度（ICC）も、また、タンパク質の非存在下及び存在下で決定することができる。上記の実施例 3 と同様の方法で、そのシステム内でタンパク質を用いる 1 段階法を、肝細胞内濃度（ICC）を決定し、表 1 の遊離割合値を用いて調整した 2 段階法のデータと比較することができる。表 4 は、種々の化合物について 1 段階統合システムを用いて観察された細胞内濃度を、まず実験をタンパク質の非存在下で行い、次に別の実験のタンパク質結合データを用いて調整した予測値と比較した結果を示す。これらの方法が同等であれば、これらの値は厳密に一致する筈である。

【0070】

【表 4】

##### ラット肝細胞における細胞内濃度(ICC)の測定値と予測値の比較

化合物	ICC測定値 (uM)	ICC予測値 (uM)
	BSA	HBSS
メトレキサート	0.47	0.48
バルサルタン	0.22	0.44
DPDPE (10 uM)	15.51	13.63
プラバスタチン	2.36	1.1
DPDPE (1 uM)	1.98	1.42
ジゴキシシン	1.29	1.59
タウロコール酸塩	0.1	0.13
ピタバスタチン	4.15	1.29
ロスバスタチン	6.81	3.09

【0071】

いくつかの化合物について、タンパク質の非存在下で得られた別個の実験からの細胞内濃度データのタンパク質結合情報を統合したもの（ICC予測値）は、細胞内濃度の観察値（ICC測定値）と一致した。しかし、4つの化合物（バルサルタン、プラバスタチン、ピタバスタチン及びロスバスタチン）について、細胞内濃度の観察値は予測値とは異なり、予測値は50%より大きく過大（バルサルタン）又は過小（プラバスタチン、ピタバスタチン及びロスバスタチン）であった。統合システムを用いた測定がなければ、どれくらいの化合物が細胞に取り込まれたか、及びその結果として生じる細胞内濃度を予測することは不可能であろう。

【0072】

いくつかの化合物について、これらのデータ、即ち、インビボ胆汁クリアランス及びタンパク質の存在下（生理学的条件）での肝細胞内濃度は、別個の研究から得られた遊離割合値を用いてデータを調整すること（2段階法）によっては予測することができないことを示している。これらのパラメータのインビボ関連値は、生理学的濃度のタンパク質の存在下で実験を行うことによつてのみ、決定することができる。この効果は、バルサルタン、

ピタバスタチン、及びロスバスタチンはすべてBSAと同程度で結合するので、化合物のタンパク質結合に基づいて予測することはできない。バルサルタンの胆汁クリアランスに対するタンパク質の添加の効果は、別の研究で得られたタンパク質結合データから容易に予測することができた。しかし、ピタバスタチン及びロスバスタチンの胆汁クリアランスに対するタンパク質効果は予想外であり、別個の実験からのタンパク質結合データを使用することによって予測することはできなかった。ピタバスタチン及びロスバスタチンの胆汁クリアランスパラメータの正確な予測は、生理学的濃度のタンパク質の存在下で実験を行った場合にのみ得られた。

#### 【0073】

胆汁クリアランスの正確な見積もりは、ヒトの研究においてインビボでのクリアランスを予測しようとする場合に有益である。真のインビボクリアランスについてのより正確な予測は、より良好な臨床研究デザインと、ヒトにおける実験を行う必要性の減少と、臨床開発時間の短縮をもたらすことができる。

10

#### 【0074】

肝細胞内濃度は、肝細胞内で起こる如何なるプロセスに対しても推進力になる。細胞内濃度の変化は、肝細胞の内部で起こるあらゆるタイプの相互作用に影響を及ぼすことができる。これには、トランスポーターに基づく薬物相互作用；化合物の代謝の程度；代謝相互作用；その化合物の誘導電位（代謝又は輸送）；及びその化合物又はその代謝産物によって生成される毒性を含むことができるが、これらに限定されない。

#### 【0075】

細胞内濃度に対するタンパク質の観察された効果は、化合物の効果の過大又は過小な予測につながり、期待される臨床結果を劇的に変える可能性がある。例えば、本発明者らは、テルミサルタンの場合にこれを観察した。それまで、輸送体阻害プロファイルに基づいてヒト胆汁うっ滞の潜在的可能性があると考えられていたが、データは、アルブミンタンパク質の存在下で、タンパク質の存在下でのヒト肝細胞における細胞内濃度は、タンパク質の非存在下で実施された研究から予測されたデータを用いて、100倍の遊離割合を用いて調整された予測値よりも、大きいことを示した。しかし、その細胞内濃度は、肝毒性効果をもたらすのに十分高いレベルを達成することは決してなかった。インビボのデータは、テルミサルタンがその使用に関連する既知の毒性を有していないので、これらの結論を支持する。タンパク質の効果は予期せぬものであり、また予測できないので、実験中に細胞をタンパク質に曝露することが望ましい。

20

#### 【0076】

さらなる例には、2つの化合物のインビボの毒性の差異を理解するための、生理学的濃度のBSAの存在下及び非存在下における肝臓蓄積実験がある。この実験では、（タンパク質の非存在下で実施される）インビトロの毒性試験及び他の薬理的試験が、2つの密接に関連する化合物がインビボ毒性について同じ可能性を有することを示した。しかし、インビボ試験を行ったところ、2つの化合物は、齧歯類の毒性（肝臓）プロファイルが著しく異なっていた。この研究者らは、全身（血液）曝露に基づいてはその違いを説明することはできなかった。非毒性化合物（AMG-A）は、毒性化合物（AMG-B）の6倍高いCmax濃度及び曲線下面積（AUC）値を有していた。そのため、その研究者らは、細胞内の肝臓濃度を測定し、毒性化合物（AMG-B）が肝臓でより多く蓄積され、AMG-Aよりも約15倍高い細胞内肝臓濃度を有することを解明した。この細胞内濃度の差により、毒性の違いを説明することができた(Hamadeh et. al Chem. Res. Toxicol., 2010, 23 (6), pp 1025-1033)。

30

40

#### 【0077】

##### 実施例 5

生理学的濃度のBSAの存在下 / 非存在下における非毒性化合物（AMG-A）及び毒性化合物（AMG-B）の肝臓取り込み及び細胞内濃度の評価

AMG-A及びAMG-Bの肝臓取り込み及び細胞内濃度を決定するための実験を、本発明に従って、生理学的濃度のタンパク質（4% BSA）の非存在下及び存在下で、サンドイッチ培養

50

させたラット肝細胞中で行った。生理的濃度のタンパク質の非存在下及び存在下の間で、2つの化合物の肝臓蓄積及び細胞内濃度に有意差が観察された。生理的濃度のタンパク質の非存在下で行われた実験では、3及び10 µM用量の非毒性化合物 (AMG-A) の細胞内濃度は、より毒性の高い化合物 (AMG-B) の細胞内濃度よりも高かった (表5)。生理活性濃度のタンパク質 (4% BSA) の存在下で実験を行った場合にのみ、インビボでの細胞内濃度が達成され、より毒性の高い化合物 (AMG-B) の細胞内濃度は、非毒性化合物 (AMG-A) の細胞内濃度よりも顕著に高かった (表6)。これらの結果は、インビボ効果を正確に予測するためには、生理学的濃度のタンパク質の存在が必要であることを示している。2つの化合物の結合パラメータが同じであったように、タンパク質の存在下/非存在下における2つの化合物の肝臓蓄積及び細胞内濃度の差は、タンパク質結合データからは予測できなかった。

10

【0078】

【表5】

**タンパク質(4%BSA)の非存在下で評価した非毒性化合物(AMG-A)及び毒性化合物(AMG-B)の濃度及び時間依存的取り込み**

BSAなし	用量	培養時間	細胞内濃度 (uM)			
			AMG-A	標準偏差	AMG-B	標準偏差
	1 µM	10	51.1	14.2	77.2	8
	3 µM		158	24	125	16
	10 µM		506	57	313	39
	1 µM	20	49.1	5.5	87.2	8.8
	3 µM		169	18	135	9
	10 µM		564	59	364	28

20

【0079】

【表6】

**タンパク質(4%BSA)の存在下で評価した非毒性化合物(AMG-A)及び毒性化合物(AMG-B)の濃度及び時間依存的取り込み**

BSAあり	用量	培養時間	細胞内濃度 (uM)			
			AMG-A	標準偏差	AMG-B	標準偏差
	1 µM	10	15.8	0.2	23.1	0.4
	3 µM		37.3	1.4	53.4	2.4
	10 µM		110	2	131	9
	1 µM	20	17.2	0.3	27.3	1.5
	3 µM		40	2	66.4	0.8
	10 µM		113	4	211	4

30

40

【0080】

本発明は、肝臓系について、インビボ関連の胆汁クリアランス及び細胞内濃度を予測するための肝胆汁ディスポジション及び/又は化合物の効果の評価にタンパク質を使用する能力を提供する。さらに、本発明は、インビボでより予測結果をもたらすことができる伝達及び他のタイプの研究 (代謝、誘導及び毒性) におけるタンパク質の使用を提供する。従って、いくつかの実施形態において、代謝物同定及び代謝安定性 (親寿命) (Kilford et al., Drug Metab Dispos, 36(7): 1 194-1 197, July 2008); 遺伝子調節 (誘導/抑制) (Jackson et al. Chemico-Biological Interactions, 179, 263-272, 2009); P450及びトランスポーター薬物相互作用 (薬草 - 薬物相互作用を含む。); 細胞内蓄積 (Pfeif

50

er et al. Drug Metab Dispos 41 :1949-1956, November 2013)及び遊離又は全(結合+遊離)細胞内濃度(例えば、核、ミトコンドリア)を含む代謝研究が提供される。本開示をレビューする当業者に明らかであるように、代謝、阻害、誘導、調節及び毒性の制御因子であるインビボ関連細胞内濃度に達するために、上記の全てを用いることができる。

【0081】

非肝臓系(例えば、Caco-2、MDCKなどの細胞株、及び腎臓、胃腸、膵臓、心臓、ニューロン、肺の臓器特異的な細胞株)について、本発明は、各生理学的状況を擬態し、化合物の細胞内濃度を測定するための保護された方法論を導き出すために、関連タンパク質レベルの使用を提供する。トランスポータの知識及び細胞内容積を測定する能力は、統合された方法を使用することにより、細胞内濃度及び化合物のディスポジション及び/又は効果(例えば、曝露、流出など)の予測を可能にする。

10

【0082】

#### 実施例6

##### P450薬物代謝酵素のIC<sub>50</sub>の決定に対するタンパク質の添加の効果の評価

新たに単離した肝細胞又は凍結保存した肝細胞を用いて、サンドイッチ培養肝細胞(SCH)を用意した。新たに単離した肝細胞を24ウェル細胞培養プレート上に置き、Qualyst Transporter Solutions(QTS, Durham, North Carolina, USA)の種特異的な適切な培養液(QualGro(商標))ですすぎ、培養した。そして、研究で消費されるまで、細胞を適切な種特異的培地に維持した。

【0083】

凍結保存された肝細胞を、製造者の融解指示に従って解凍した。続いて、凍結保存された肝細胞を、24ウェル細胞培養プレート上のQTS肝細胞用培地(QualGro(商標)培養液)に、0.7~0.8百万生存細胞/mLの密度で懸濁させた。プレーティング後、細胞を2~4時間附着させ、すすぎ、加温(37℃)播種培地で培養した。18~24時間後、細胞に、細胞外マトリックス(ECM)、Matrigel(登録商標)を補充した(0.25mg/mL)、適切な種特異的QTS適性培地(QualGro™)を供給し、覆った。研究で消費されるまで、細胞をQualGro(商標)肝細胞培養培地中で維持した。

20

【0084】

培養6日目まで上記のように細胞を培養した。培養7日目に、使用済み培地を吸引し、4%ウシ血清アルブミン(BSA)を含む又は含まないHBSS培養液と交換した。P450マーカース物質及びフルコナゾール(Fluconazole)又はケトコナゾール(Ketoconazole)のいずれかを含む培養液を、SCHHに直接添加して、総インキュベーション容量を0.5mLとした。インサイチュインキュベーションは、細胞培養用インキュベーター(37℃; CO<sub>2</sub> 5%; 湿度100%)中で、120rpmで20~30分間振盪して行った。インキュベーション後、培養液を回収し、生物分析に使用するまで-80℃で保存した。

30

【0085】

インサイチュインキュベーションしたものを、ミダゾラムからヒドロキシミダゾラムへの、及びイブプロフェンからヒドロキシイブプロフェンへのP450媒介性代謝物形成の検出について分析した。簡潔には、内部標準溶液(25nMのトリアゾラム及びd3-イブプロフェンを含むメタノール溶液)300µl及びHBSS又はHBSS(+4%BSA)100µlを96の深ウェルブロックに積み重ねたタンパク質沈殿プレート(Millipore MDRPNP4; EDM Millipore, Billerica, Massachusetts, USA)に添加した。遠心分離前に、このプレートを1~2分間振とうし、濾過した上清を回収した。このサンプル上清を蒸発乾固させ、サンプルをサンプル希釈剤(40/60メタノール/10mM酢酸アンモニウム)200µLに再構成し、プレートシェーカー上で少なくとも20分間混合した。再構成したサンプルをMillipore 0.45µmフィルタープレート(Millipore MSHVN45)に移し、LC-MS/MS分析の前に、遠心分離によりCostar 3957プレートに濾過し、シリコーンキャップマットで密封した。

40

【0086】

CYP2C9(3-ヒドロキシブチロフェン)及びCYP3A4(ヒドロキシミダゾラム)の酵素活性に対する阻害剤であるフルコナゾール(CYP2C9)及びケトコナゾール(CYP3A4)の

50

SCHH中の直接阻害効果を、4%BSAの存在下及び非存在下で評価した。フルコナゾール（CYP2C9）及びケトコナゾール（CYP3A4）は、CYP2C9及びCYP3A4の酵素活性を、対照のそれぞれ24.4～45.1%及び32.0～71.1%に低下させた。CYP2C9及びCYP3A4の陽性対照阻害剤は、期待されるように用量依存的に酵素活性を低下させた。フルコナゾール（CYP2C9）との培養混合物中のタンパク質（4%BSA）添加の効果の差は、フルコナゾール（CYP2C9）の推定IC<sub>50</sub>が56.2 μMから27.1 μMに減少したが（表7及び8）、ケトコナゾール（CYP3A4）ではケトコナゾール（CYP3A4）の推定IC<sub>50</sub>が、0.0455 μMから0.117 μMに増加した（表9及び10）。これは、タンパク質が、様々な化合物（この場合はプロブ阻害剤又はプロブ基質のミダゾラム及びイブプロフェンのいずれか）の肝臓取り込み及び細胞内濃度について特異な影響を持っていることを強く示す。

【0087】

【表7】

CYP2C9の陽性対照阻害剤 (BSAなし)						
処理	濃度(μM)	平均30HIBU 形成速度†	標準偏差 (形 成速度†)	CYP3A4/5平 均残留度(%)	CYP3A4標準偏 差 (%残留活性)	IC <sub>50</sub> の見積も り (μM)
フルコナゾール	5.00	42.9	1.0	71.1	1.7	56.2
フルコナゾール	100	19.3	5.7	32.0	9.4	

† (pmol/分\*百万細胞)

【0088】

【表8】

CYP2C9の陽性対照阻害剤 (4%BSA)						
処理	濃度(μM)	平均30HIBU 形成速度†	標準偏差 (形 成速度†)	CYP3A4/5平 均残留度(%)	CYP3A4標準偏 差 (%残留活性)	IC <sub>50</sub> の見積も り (μM)
フルコナゾール	5.00	1.87	0.20	60.1	6.5	27.1
フルコナゾール	100	0.525	0.025	16.8	0.8	

† (pmol/分\*百万細胞)

【0089】

【表9】

CYP3A4の陽性対照阻害剤 (BSAなし)						
処理	濃度(μM)	平均OHMDZ 形成速度†	標準偏差 (形 成速度†)	CYP3A4/5平 均残留度(%)	CYP3A4標準偏 差 (%残留活性)	IC <sub>50</sub> の見積も り (μM)
ケトコナゾール	0.050	9.51	0.76	45.1	3.6	0.0455
ケトコナゾール	0.250	5.14	0.042	24.4	0.20	

† (pmol/分\*百万細胞)

【0090】

10

20

30

40

50

【表 10】

CYP3A4の陽性対照阻害剤 (4% BSA)						
処理	濃度(μM)	平均OHMDZ 形成速度†	標準偏差 (形 成速度†)	CYP3A4/5平 均残留度(%)	CYP3A4標準偏 差 (%残留活性)	IC <sub>50</sub> の見積も り (μM)
ケトコナゾール	0.0500	3.36	0.56	54.6	9.1	0.117
ケトコナゾール	0.250	2.51	0.78	40.8	13	

† (pmol/分\*百万細胞)

10

## 【0091】

## 参考文献

本明細書で引用される参考文献は、それらが本明細書で採用される方法、技術及び/又は組成物を、補足し、説明し、その背景技術を提供し、又は教示するために、引用される限りにおいて、本明細書に組み込まれる。

## 【0092】

Griffith and Naughton, (2002) Science, 295:1009-1014  
 Hamadeh et al., (2010) Chem. Res. Toxicol., 23(6):1025-1033  
 Jackson et al., (2009) Chemico-Biological Interactions, 179:263-272  
 Kilford et al., (2008) Drug Metab. Dispos., 36(7):1194-1197  
 Pfeifer et al., (2013) Drug Metab. Dispos., 41:1949-1956  
 U.S. Patent No. 6,780,580  
 U.S. Patent No. 7,601,494  
 U.S. Patent No. 7,604,934  
 U.S. Patent No. 7,682,781  
 U.S. Patent No. 8,367,630  
 U.S. Patent Application Publication No. US-2010-0035293-A1

20

## 【0093】

ここに開示される発明の様々な詳細は、本発明の範囲から逸脱することなく変更され得ることが理解されるであろう。さらに、前述の説明は、例示のみを目的とするものであり、限定を目的とするものではない。

30

40

50

## フロントページの続き

(72)発明者 ケネス アール ブロウワー  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27713、ダラム、メリディアン パークウェイ 281  
0、スイート 100 クオリティ トランスポーター ソリューションズ エルエルシー

(72)発明者 クリストファー ビー ブラック  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27713、ダラム、メリディアン パークウェイ 281  
0、スイート 100 クオリティ トランスポーター ソリューションズ エルエルシー

(72)発明者 ジョナサン ピー ジャクソン  
アメリカ合衆国 ノースカロライナ州 27713、ダラム、メリディアン パークウェイ 281  
0、スイート 100 クオリティ トランスポーター ソリューションズ エルエルシー

## 合議体

審判長 長井 啓子

審判官 福井 悟

審判官 伊藤 良子

(56)参考文献 特開2009-138010(JP,A)  
米国特許第4110077(US,A)  
Drug Metab Dispos, 2008年, vol. 36, no. 10, p. 20  
86-2092  
Drug Metabolism Reviews, 2012年, vol. 44, Supp  
. SUPPL. 1, pp. 44. Abstract Number: P17  
Drug Metab Rev, 2010年, vol. 42, no. 3, p. 446-471

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)  
C12Q1/00-3/00  
CAplus(STN)、MEDLINE(STN)、EMBASE(STN)、BIO  
SIS(STN)