creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

약학석사 학위논문

Abcb1a의 억제제인 elacridar에 의한 rat에서의 ABN401의 뇌 이행증가

Increased brain penetration of ABN401, an inhibitor for tyrosine kinase, in rats by elacridar, an inhibitor of Abcb1a

2023 년 2 월

서울대학교 대학원

약학대학 약학 전공

김 영

효

Abcb1a의 억제제인 elacridar에 의한 rat에서의 ABN401의 뇌 이행증가

지도 교수 정 석 재

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함
2022년 12월

서울대학교 대학원
약학대학 약학전공
김 영 효

김영효의 약학석사 학위논문을 인준함
2023년 1월

위 원 장 김 대 득

부위원장 이 우 인

위 원 정 석 재

국 문 초 록

ABN401은 tyrosine-protein kinease (c-Met)의 기능을 억제하는 항암물질로 비소세포성 폐암(non-small cell lung cancer, NSCLC) 치료제로서 현재 국내 및 미국에서 임상 1,2상 연구가 진행 중인 신약후보물질이다. 이전 연구에서 NSCLC는 전이율이 43%정도로 매우 높은 암이며 이 중 25~30%의 환자군이 뇌로 전이가 발생한다고 하였다. 이와는 별도로 혈-뇌관문에는 다수 항암제를 순환혈로 배출하는 것으로 알려져 있는 P-glycoprotein (P-gp)를 발현하고 있다. 따라서 뇌 중 ABN401의 약효 발현 여부를 판단하기 위해서는 추가적인 동태학 연구를 통해 이 약물의 뇌이행 과정에서 P-gp의 역할을 연구할 필요가 있다. 먼저 본 연구에서는 ABN401의 P-gp에 대한 기질성을 알아보기 위해, rat P-gp를 기능적으로 발현한 MDCKII 세포주 (MDCK Ⅱ/rP-gp cell)을 이용하여 Transwell® efflux assay 를 진행하였다. 이 연구에서 P-gp에 의한 ABN401 배출 수송의 K_m값은 15.7 μM 정도임을 알았다. 또한 이 in vitro 실험계에서 P-gp의 저해제인 elacridar가 ABN401의 배출수송을 저해하는 K_i값은 34 nM로 평가되었다. rat에서 ABN401을 투여하고 뇌조직과 혈중농도의 AUC 비율로 부터 구한 brain K_p값은 0.123이었으며 elacridar을 전처리 하였을 때 brain K_p값은 4.68로 증가하였다. 종합적으로, 이 결과는 rat에서 ABN401의 뇌이행은 비교적 낮으며 (즉, brain K_p~0.123) 이는 P-gp의 배출수송 때문일 것으로 추정할 수 있었다. 또한, 이 결과는 뇌 중에서 ABN401의 항암효과 발현을 기대하려면, 적절한 P-gp의 inhibition (예, elacridar 등과 같은 P-gp 저해제 처리) 가 필요할 수 있음을 시사하였다.

주요어: 비소세포성 폐암, 뇌, 분포, 소실율, ABN401, Elacridar

학 번: 2021-24820

목 차

1. Introduction 1

2. Materials & Methods 4

2.1. Chemicals 4

2.2. Animals 4

2.3. In vitro study of ABN401 in MDCK II /rP-gp cell line .. 5

2.4. Estimation of K_m of ABN401 and K_i of elacridar at Abcb1a transporter 6

2.5. In vivo pharmacokinetics of elacridar in rat 9

2.6. Estimation of brain K_p of ABN401 in rat without elacridar 10

2.7. Estimation of brain K_p of ABN401 in rat with elacridar 10

2.8. Analytic condition 11

2.8.1 Analytic condition of ABN401 11

2.8.2 Analytic condition of elacridar 12

3. Result 14

3.1. Estimation of K_m of ABN401 and K_i of elacridar at Abcb1a transporter 14

3.2 Estimation of K_m of ABN401 and K_i of elacridar at Abcb1a transporter 16

3.3 In vivo pharmacokinetics of elacridar in rat 17

3.4. Estimation of brain K_p of ABN401 in rat without

Elacridar 19
3.5. Estimation of brain K_p of ABN401 in rat with

elacridar 20

4. Discussion 21

5. Conclusion 31

참고문헌 32

표 목차

[표-1] 16
[표-2] 17
[표-3] 18
[표-4] 22

그림 목차

[그림-1] 14
[그림-2] 15
[그림-3] 17
[그림-4] 18
[그림-5] 19
[그림-6] 20
[그림-7] 25
[그림-8] 27

1. Introduction

Mesenchymal epithelial transition factor (c-MET)은 타이로신 인산화 효소 수용체 (tyrosine kinase receptor)의 일종으로 세포막에 존재하는 하고 있으며 암세포의 성장 및 전이에 관여한다고 알려져 있다. c-MET의 정상적인 발현은 조직의 분화 및 복구를 촉지하는 것으로 알려져 있으나 조절이 되지 않을 경우 종양세포의 성장을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 따라서 종양 억제를 위해서 c-MET의 억제제를 개발하고자 하는 연구가 활발하게 이루어지고 있으며 현재 crizotinib, savolitinib과 같은 약물이 개발되어지고 있다. 본 연구에서 사용된 물질인 ABN401 역시 위 두물질과 유사하게 c-MET의 phosphorylation을 억제하는 mechanism으로 작용한다고 알려져 있으며 현재 폐암의 한 종류인 비소세포암 (Non-small cell lung cancer)에 대한 적응증을 기대로 개발 중인 물질로 임상 1,2상을 진행하고 있는 물질이다. c-MET은 유방암, 결장암, 위암에서 과발현 된다고 알려져 있기에 ABN401은 향후에 c-MET이 과발현 된 암에서도 효과를 기대해 볼 수 있을 것이다. (Kim et al, 2020)

국가암정보센터에 따르면 한국에서 폐암은 가장 사망률 (mortality)가 22.7%로 높은 암이다. Mortality가 2위인 간암의 사망률이 12.9%임을 볼 때 약 2배정도에 해당하는 수치이며 전체 폐암의 약 80%정도가 비소세포암에 해당하고 있다. 비소세포암은 전이 (metastasis)가 빈번한 암으로 알려져 있는데 비소세포암 환자 1542명을 대상으로 한 연구에서 약 47.3%의 환자에서 전이가 일어났으며 이중 약 28.4%의 환자가 뇌로의 전이가 관찰되었다. 따라서 비소세포암에서 뇌로의 전이가 일어났을 경우에도 여전히 ABN401을 사용할 수 있는지에 대한

연구가 필요하다고 하겠다. (Tamura et al, 2015)

뇌는 Blood brain barrier (BBB)라고 부른 장벽으로 둘러 쌓여 있는 장기이며 우리 몸의 신경세포가 가장 많이 분포하고 있다. BBB에는 많은 transporter들이 발현되어 있어 약물 및 외부 물질이 들어오는 것을 차단하고 있으며 이는 뇌로의 약물 이행에 가장 큰 걸림돌이라고 할 수 있다. 필자의 연구실에서 ABN401에 대한 선행연구 결과 SD, rat에서 뇌에서의 특정 시간에서의 장기와 혈장에서의 약물의 농도비 $K_{p,apparent}$값이 뇌에서 0.2로 낮은 값을 보였으며, 이유로 방출수송체(efflux-transporter)에 의한 것으로 추정하고 있다. 실제로 ABN401에 대한 방출 수송체에 대한 연구에서 rat의 Abcb1a 방출수송체가 발현되어 있는 MDCKⅡ cell line에서 Efflux Ratio (ER)값이 Abcb1a의 inhibitor를 처리하였을 경우 유의미하게 감소하는 것으로 볼 때 ABN401이 Abcb1a의 기질이라고 추측하고 있다. 또한 다른 방출 수송체인 Abcg2에 대해서는 실험결과 ER값이 Abcg2의 Inhibitor인 Ko143을 처리하였을 경우 유의미하게 감소하지 않았기 때문에 Abcg2의 기질은 아니라고 추정하고 있다.

Elacridar는 zosuquidar, tariquidar과 함께 3세대 Abcb1a의 inhibitor 로 알려져 있다. 이들은 항암 약제가 암세포로 들어가는 것을 방해하는 중요 요인 중 하나로 주목된 Abcb1a를 억제하기 위해서 인위적으로 개발된 약으로 실제로 임상에서는 크게 사용되지 않고 있으나 연구에서는 Abcb1a의 효과를 억제하기 위해서 많이 사용되고 있는 물질이다. 3세대 Abcb1a의 inhibitor들은 기존의 verapamil과 같은 1세대 Abcb1a inhibitor에 비해서 potent하다고 알려져 있다.

본 연구에서는 in vitro 실험을 통해서 ABN401과 elacridar의 약동학(pharmacokinetics) parameter에 대한 것을 구하고 in vivo에서 약물 동태에 대한 예측을 하고자 하였다. Elacridar에 의해서 Abcb1a

수용체가 억제가 되었을 때 뇌로의 ABN401의 이행이 실제로 얼마나 증가할 것인지 예측하는 연구라고 할 수 있다.

주요어: Abcb1a, 비소세포암 (NSCLC), inhibitor, Efflux Ratio, Mesenchymal epithelial transition factor (c-MET), transporter

2. Materials & Methods

2.1. Chemical

ABN401은 Abion Research Institute (Seoul, Korea)에서 공급받았으며 Formic acid, Dimethyl sulfoxide (DMSO)은 Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA)사에서 구입하였다. Acetonitrile (ACN)은 Fischer Scientific (Waltham, MA, USA)에서 구입하였으며 elacridar는 Tokyo chemical industry (Toshima, Kita-Ku, Tokyo, Japan)에서 구입하였다. Ammonium acetate는 대정화금 (Siheung-city, Gyonggi-do, Korea)에서 구매했으며 Polyethylene glycol 400 (PEG 400)은 덕산 약품공업(Ansan, Gyonggi-do, Korea)의 제품을 사용하였습니다. 세포를 키우기 위해 사용한 배지와 시약은 Dulbecco`s modified eagles medium (DMEM), Dulbecco`s phosphate buffered saline (DPBS), non-essential amino acid (NEAA), penicillin/streptomycin, HEPES 용액은 Welgene (Daegu, Korea)를 사용하였으며 fetal bovine serum (FBS)는 Gibco (USA)를 사용하였다. 또한 zeocin solution은 InvivoGen(San Diego, USA)를 사용하였다.

2.2. Animals

Male Sprague -Dawley (SD) rat(7~8주령, 무게는 200~250 g)을 코아텍 (Gyonggi-do, Korea)에서 주문하여 사용하였습니다. 약동학 연구에서는 50 mg/kg tiletamine HCl/zolazepam HCl (Zoletil 50;

Virbac Laboratories, France)와 10 mg/kg xylazine HCl (Rompun; Byer Korea, Korea)을 intramuscular (IM)으로 투여하여 마취하였습니다.

2.3. Estimation of K_m of ABN401 and K_i of elacridar at Abcb1a transporter

실험에 사용한 cell type은 총 3가지로 먼저 wild type MDCKⅡ cell line (European Collection of Authenticated Cell Culture, Salsbury, UK)을 음성 대조군 (negative control)로 사용하였다. human ABCB1이 발현된 MDCKⅡ cell line은 양성 대조군 (positive control)로 사용하였으며 Netherlands cancer institute (Amsterdam, Netherlands)에서 공여 받은 것이다. 그리고 실험군으로 사용되는 rat Abcb1a가 발현된 MDCKⅡ cell line은 저자의 연구실에서 구축된 cell line이다. 3개의 cell line 중 wild type 과 human ABCB1은 DMEM의 부피의 10%의 FBS, 1%의 NEAA, 100 U/ml의 penicillin, 0.1 mg/ml의 streptomycin 10 mM의 HEPES를 넣은 배지를 사용하여 5% CO_2가 있는 37℃에서 culture하였으며 rat Abcb1a가 발현된 cell line은 위 배지에 zeocin을 5 μg/ml의 농도로 맞추어 사용하였다.

세포의 농도를 1×10^6 cells/ml로 하여서 Transwell® Permeable Supports의 insert 반투과성 막에서 7일간 키웠으며 배지는 3일에 한번씩 갈아주었다. 실험 당일 transport media (TM; 9.7 g/L Hank`s balanced salt solution, 2.38 g/L HEPES와 0.35 g/L sodium bicarbonate)으로 두 번 washing 해주었으며 전부 제거하였다.

Elacridar를 inhibitor로 처리하지 않은 실험군의 경우 ABN401을

1,2,4,8 μM을 basolateral side와 apical side에 각각 처리하였고 각각의 반대편인 apical과 basolateral은 TM media로 채워주었다. 양성 대조군과 음성 대조군의 경우에는 4 μM의 ABN401만 처리하였다. Elacridar를 inhibitor로 처리한 군에 대해서는 basolateral side와 apical side 전부에서 elacridar의 농도가 1 μM이 되도록 하였으며 ABN401의 농도는 elacridar를 처리하지 않은 군과 같게 통일하였다.

Basolateral side에서 volume은 1500 μL이고 apical side에서 volume은 500 μL이며 약물을 넣는 시점부터 5% CO_2가 있는 37℃ incubator에 놓아두었다. Sampling은 30, 60, 90분에 약물을 처리하지 않은 쪽 (receiver side)에서 200 μL씩 하였고 Sampling 후에는 다시 TM 200 μL를 채워주었으며 각각의 군은 (n=3)로 실험하였다. 90분에는 약물을 처리한 쪽 (donor side)에서도 sampling을 하여 recovery를 측정하였다.

각각의 sample은 propranolol 200 ng/ml 농도의 ACN 800 μL에 바로 넣어주었으며 여기서 propranolol은 internal standard로 사용한 물질이다. sample들을 5분간 vortex해준후 4℃, 13200 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며 이후 상층액 100 μL를 취하여 LC-MS/MS를 이용하여 정량 분석을 실시하였다.

2.4. Estimation of K_m of ABN401 and K_i of elacridar at Abcb1a transporter

ABN401의 K_m과 elacridar의 K_i 값은 2.3 실험에서 TM에서의 ABN401의 concentration을 바탕으로 정량이 가능하다. 아래의 P_{app}와

ER값을 먼저 계산을 할 수 있으며 각각의 receiver side와 donor side에서의 mass balance equation을 통하여 ABN401의 K_m과 elacridar의 K_i의 값을 추정할 수 있다.

$$P_{app} = \frac{1}{S \times C_0} \times \frac{dX}{dt} \qquad ER = \frac{P_{app,\ \ B\ to\ A}}{P_{app,\ \ A\ to\ B}}$$

위와 같은 식을 통해서 P_{app}와 ER을 계산할 수 있으며 ER 값이 특정 efflux transporter의 inhibitor의 농도를 처리하였을 경우 처리하지 않았을 때보다 절반 이상으로 감소한다면 기질 (substrate)가 해당 transporter의 기질이라고 말할 수 있다. (FDA guideline., 2020)

또한 mass balance equation을 WinNonlin software를 이용하여 nonlinear regression analysis를 진행하였으며 사용된 mass balance equation은 아래와 같이 표현할 수 있다.

만약 basolateral side가 donor side라면 아래와 같이 식이 쓸 수 있다.

위의 두식은 elacridar가 존재하지 않을 경우의 식이고 elacridar가 있는 경우라면 아래의 두식과 같이 mass balance equation이 세워지게 된다.

$$V_B \times \frac{dC_B}{dt} = -PS \times (C_B - C_A) - \frac{V_{max} \times C_B}{(C_B + K_m)}$$

$$V_A \times \frac{dC_A}{dt} = PS \times (C_B - C_A) + \frac{V_{max} \times C_B}{(C_B + K_m)}$$

$$V_B \times \frac{dC_B}{dt} = PS \times (C_B - C_A) + \frac{V_{max} \times C_B}{(C_B + K_m)(1 + \frac{I}{K_i})}$$

$$V_A \times \frac{dC_A}{dt} = -PS \times (C_B - C_A) - \frac{V_{max} \times C_B}{(C_B + K_m)(1 + \frac{I}{K_i})}$$

만약 apical side가 donor side라면 아래와 같이 식이 쓸 수 있다.

위의 두식은 elacridar가 존재하지 않을 경우의 식이고 elacridar가 있는 경우라면 아래의 두식과 같이 mass balance equation이 세워지게 된다.

$$V_B \times \frac{dC_B}{dt} = PS \times (C_A - C_B) - \frac{V_{max} \times C_B}{(C_B + K_m)}$$

$$V_A \times \frac{dC_A}{dt} = -PS \times (C_A - C_B) + \frac{V_{max} \times C_B}{(C_B + K_m)}$$

$$V_B \times \frac{dC_B}{dt} = PS \times (C_A - C_B) - \frac{V_{max} \times C_B}{(C_B + K_m)(1 + \frac{I}{K_i})}$$

$$V_A \times \frac{dC_A}{dt} = -PS \times (C_A - C_B) + \frac{V_{max} \times C_B}{(C_B + K_m)(1 + \frac{I}{K_i})}$$

이 식에서 V_A와 V_B는 각각 apical side와 basolateral side에서의 volume을 의미하고 C_A와 C_B는 apical side와 basolateral side에서 ABN401의 concentration이다. P는 Transwell® Permeable

Supports의 insert에 존재하는 막에 대한 ABN401의 투과도 (permeability) 이고 S는 막의 면적 (surface area) 이라고 할 수 있다.

2.5. In vivo pharmacokinetics of elacridar in rat

SD male rat를 실험 전날 절식한다. 실험 당일 Zoletil (Zoletil 50, Virbac Laboratories, France) 12 mg/kg와 Rompun HCl (Rompun, Bayer Korea, Korea) 3 mg/kg을 IM (intramuscular)으로 투여한다. 이후 Femoral artery와 Femoral vein을 cannulation한다. 이때 polyethylene tube (PE50, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA를 사용하였으며 artery의 경우 heparin (20 IU/ml)이 포함된 normal saline으로 관을 채워주었고 vein의 경우 normal saline으로 채운 상태로 진행하였다. Rat가 마취되어 있는 약 3시간 동안 이 실험을 수행하였다.

IV (intravenous) bolus로 투여할 때 elacridar를 DMSO, PEG 400, DDW를 (10%:45%:45%, v/v/v)의 formulation을 이용하여 녹였다. 쥐가 깨어난 후 해당 약물을 쥐에게 2 mg/kg가 되도록 투여하였다. 투여 후 sampling의 경우 동맥에서 하였으며 sampling 양은 time point 당 150 μL의 혈액을 취하였으며 sampling time은 5, 15, 30, 60, 120, 240, 480 분에 하였다. (n=4) 각각의 혈액 sample의 경우 4℃, 13200 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며 이후 상층의 plasma 40 μL를 취하여 propranolol 200 ng/ml 농도의 ACN 160 μL에 넣어주었다. 이후 sample들을 5분간 vortex해준후 4℃ 13200 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며 이후 상층액 100 μL를 취하여 LC-

MS/MS를 이용하여 정량 분석을 실시하였다.

2.6. NCA and compartment model analysis of elacridar in rat

Elacridar를 투여한 data를 바탕으로 WinNonlin software를 이용하여 NCA와 compartment model analysis를 이용하여 약동학 parameter를 구한다. 그리고 이 방법으로 구한 약동학 parameter를 바탕으로 elacridar를 정상상태에 빠르게 도달할 수 있게 하는 regimen을 Berkeley Madonna software를 이용하여 작성한다.

2.7. Estimation of brain K_p of ABN401 in rat without elacridar

SD male rat를 실험 전날 절식한다. 실험 당일 Zoletil (Zoletil 50, Virbac Laboratories, France) 12 mg/kg와 Rompun HCl (Rompun, Bayer Korea, Korea) 3 mg/kg을 IM (intramuscular)으로 투여한다. 이후 Femoral artery와 Femoral vein을 cannulation한다. 이때 polyethylene tube (PE50, Clay Adams, Parsippany, NJ, USA를 사용하였으며 artery의 경우 heparin (20 IU/ml)이 포함된 normal saline으로 관을 채워주었고 vein의 경우 normal saline으로 채운

상태로 진행하였다. Rat가 마취되어 있는 약 3시간 동안 이 실험을 수행하였다.

IV bolus로 투여할 때 ABN401을 elacridar를 DMSO, PEG 400, DDW를 (10%:45%:45%, v/v/v)의 formulation을 이용하여 녹였다. 쥐가 깨어난 후 해당 약물을 쥐에게 2 mg/kg가 되도록 투여하였다. 투여 후 sampling의 경우 동맥에서 하였으며 sampling 양은 time point 당 150 μL의 혈액을 취하였다. 또한 각 time point 당 3마리의 쥐를 희생하여 뇌를 적출하였으며 적출한 뇌는 DPBS에서 washing하고 수분을 제거하고 tube에 담았다. Time point는 5, 30 ,60, 240, 420 분이다.

혈액 sample의 경우 4℃, 13200 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며 이후 상층의 plasma 40 μL를 취하여 propranolol 200 ng/ml 농도의 ACN 160 μL에 넣어주었다. 이후 sample들을 5분간 vortex해준후 4℃ 13200 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며 이후 상층액 100 μL를 취하여 LC-MS/MS를 이용하여 정량 분석을 실시하였다.

뇌의 경우 질량을 측정 후 밀도를 1 g/ml로 가정하여 두배의 volume의 DPBS를 넣어준다. Homogenizer를 이용하여 완전히 갈아준다. 갈아진 액체 150 μL를 취하여 propranolol 200 ng/ml 농도의 ACN 600 μL에 넣어주었다. 이후 sample들을 5분간 vortex해준후 4℃ 13200 rpm에서 5분간 원심분리 하였으며 이후 상층액 100 μL를 취하여 LC-MS/MS를 이용하여 정량 분석을 실시하였다.

2.8. Estimation of brain K_p of ABN401 in rat with elacridar

2.5와 2.6 방법과 마찬가지로 쥐 cannulation을 진행하였고 먼저 elacridar를 IV bolus로 elacridar를 DMSO, PEG 400, DDW를 (10%:45%:45%, v/v/v)의 formulation을 이용하여 녹였다. 쥐가 깨어난 후 해당 약물을 쥐에게 5 mg/kg가 되도록 투여하였다. 투여 후 바로 elacridar를 IV infusion으로 쥐에게 2250 μg/min으로 투여하였으며 투여 volume의 경우 10 ul/min으로 하였다. IV infusion을 하기 위해 만든 elacridar formulation의 경우 DMSO, PEG 400, DDW를 (5%:10%:85%, v/v/v)로 녹였다. IV infusion 4시간 진행한 후 IV bolus로 ABN401을 투여하였다. ABN401의 경우에도 DMSO, PEG 400, DDW를 (10%:45%:45%, v/v/v)의 formulation을 이용하여 녹였으며 쥐가 깨어난 후에는 2 mg/kg가 되도록 투여하였다. 이후 다시 elacridar를 IV infusion을 진행하였다. ABN401을 투여한 시점부터 5, 30, 60, 240, 420 분에 혈액 sampling 하였으며 time point 당 3마리의 쥐를 희생하여 뇌를 적출하였으며 DPBS에서 washing하고 수분을 제거하고 tube에 담았다. 이후의 전처리과정은 2.6.에서 뇌와 혈액을 처리한 과정과 동일하게 하였다.

2.9. Analytic condition of ABN401 and elacridar

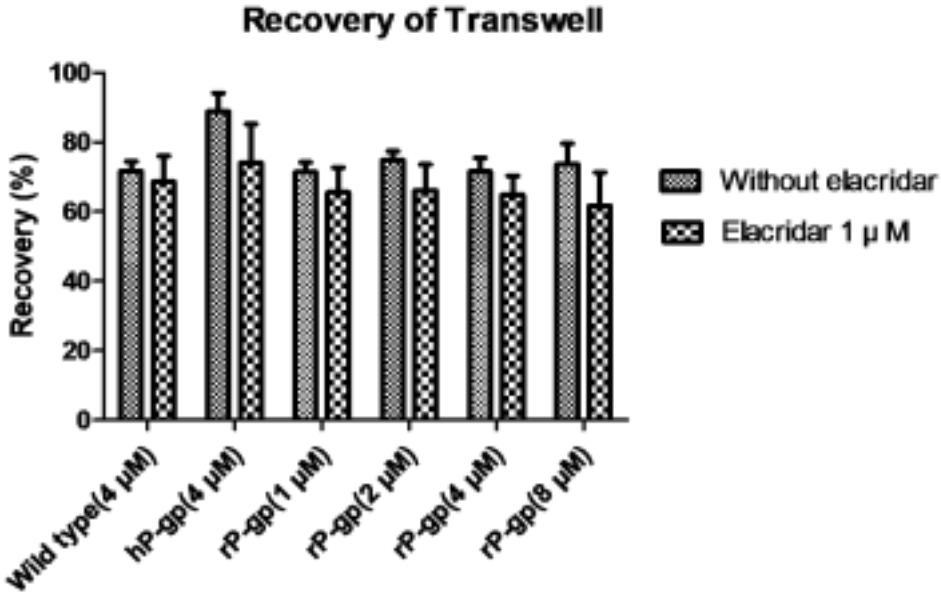
ABN401의 정량 분석은 LC-MS/MS를 이용하였다. HPLC 시스템은 [e2659 module (Waters Corporation, Milford, MA, USA)]을 사용하였으며 사용한 column의 경우 Luna® 3 μm CN (50×2 μm, 100 Å, Phenomenex, Torrance, CA, USA)이다. 사용한 두개의 용매는 Formic acid 0.1% in ACN (Solvent A)와 10 mM ammonium acetate buffer solution (Solvent B)이다. Gradient 조건의 경우 [0 분

~ 0.5분 (A: 30%, B: 70%), 1 분 ~2.5 분 (A: 70%, B: 30%), 6 분 (A: 30%, B: 70%)]이고 delay time은 4 분이다. Flow rate의 경우에는 0.2 mL/min이며 injection volume은 10 μL이다. 사용한 MS/MS system의 경우 AB SCIEX API 3200 QTRAP triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)이다. 사용한 온도조건과 spray voltage의 경우 450℃, 5500V이다. 측정된 MRM의 경우에는 ABN401은 (m.w 567.2 → 467.3), propranolol은 (m.w 260.2 → 116.2)이며 elacridar는 (m.w 564.3 → 252.2)이다.

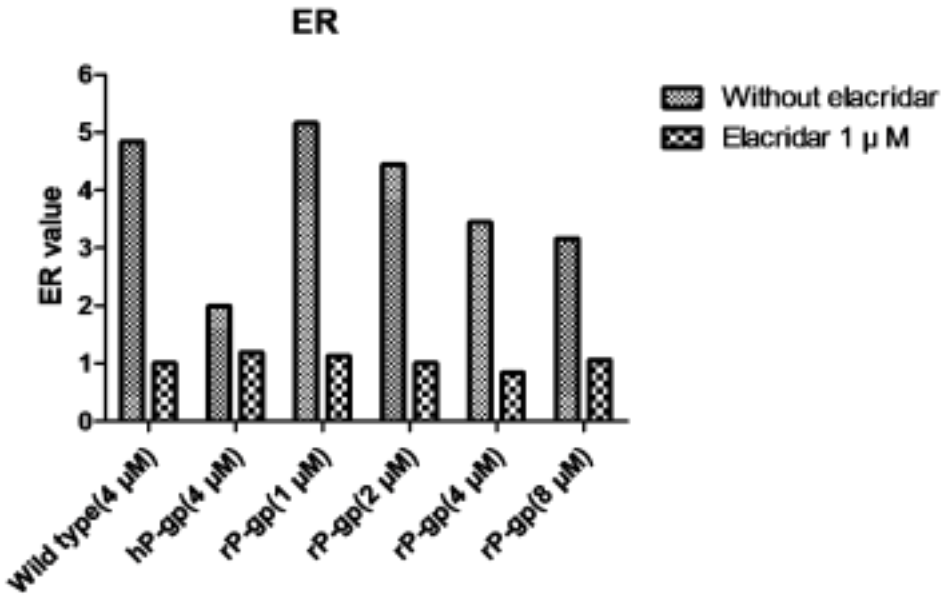
3. Result

3.1. Estimation of K_m of ABN401 and K_i of elacridar at Abcb1a transporter

Transwell® efflux assay에서 basolateral side의 마지막농도와 apical side의 마지막 농도를 토대로 recovery를 각각의 군마다 계산하였고 아래는 그 결과 값이다.



[그림-1] 각각의 group 별로의 recovery 값



[그림-2] 각각 group 별로의 ER값을 표현한 그래프

3.2 Estimation of K_m of ABN401 and K_i of elacridar at Abcb1a transporter

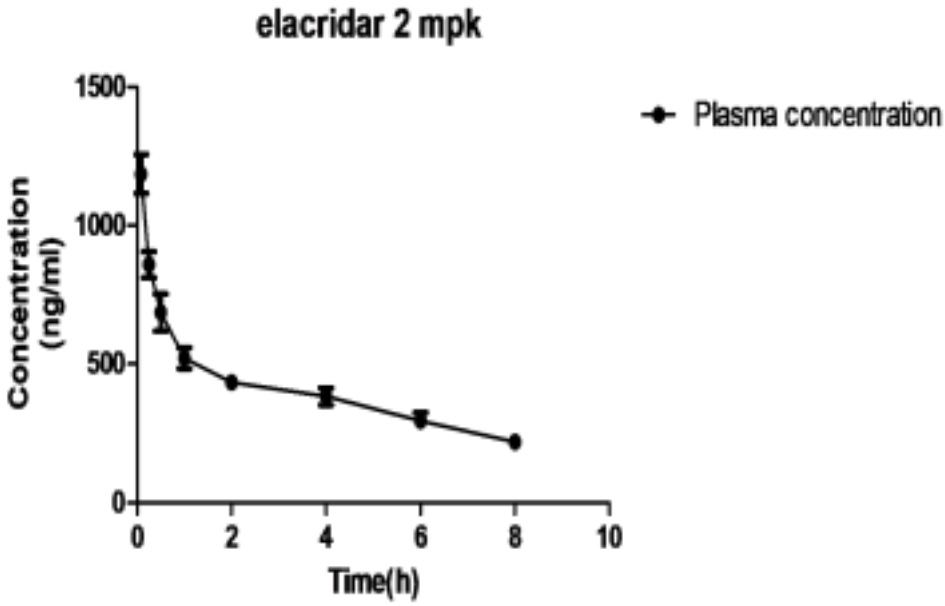
Transwell® efflux assay의 데이터를 기반으로 하여 ABN401의 K_m값과 elacridar의 K_i값을 WinNonlin software를 사용하여 계산한 결과는 다음과 같다.

Parameter	Value	CV (%)
V_{max}	0.0172 (nM/min)	18.2
Permeability	7.12 (10^{-6}cm/s)	4.98
K_m	15.7 (μM)	22.3
K_i	0.034 (μM)	107

[표-1] WinNonlin 프로그램을 이용하여 계산된 약동학 parameter

3.3 In vivo pharmacokinetics of elacridar in rat

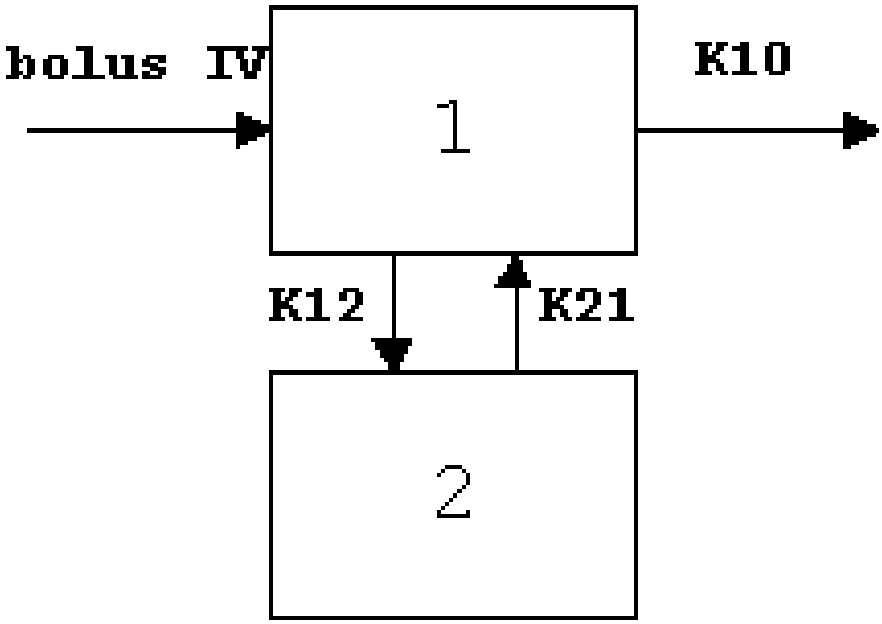
Elacridar를 2 mg/kg로 투여한 다음 혈중농도를 profile을 나타낸 그래프이다. [표-2]는 WinNonlin software를 사용하여 NCA (non-compartment analysis)를 통해 약동학 parameter를 구하였다.



[그림-3] Elacridar의 혈중농도 profile

Parameter	Value
V_{ss} (L/kg)	3.04 ± 0.543
$T_{1/2}$ (h)	5.00
CL (mL/min/kg)	6.81±0.984

[표-2] NCA로 구한 V_{ss} 와 반감기 그리고 clearance



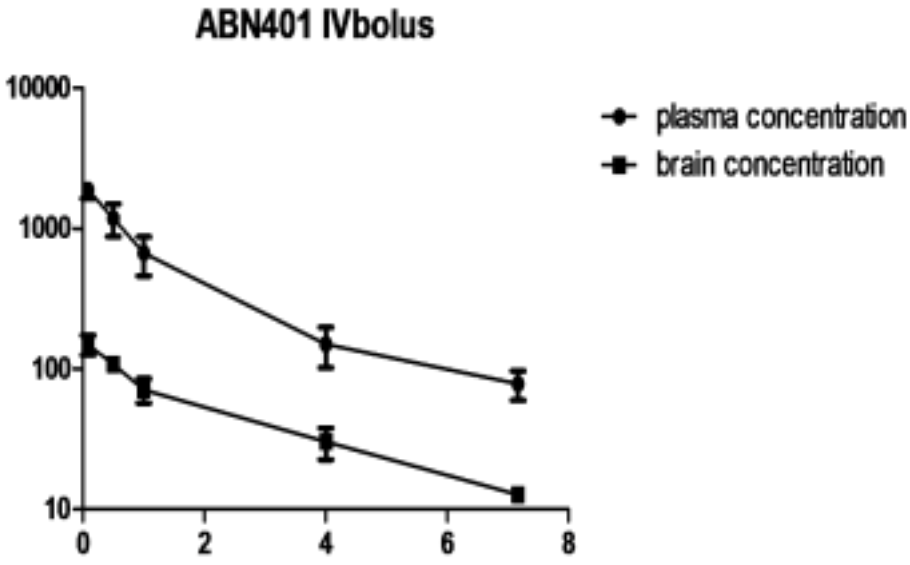
[그림-4] 12-compartment model of elacridar

Parameter	Value	CV%
V_c	1.43 (L/kg)	11.0
k_{10}	0.283 (/h)	13.6
k_{12}	2.15 (/h)	31.3
k_{21}	1.59 (/h)	23.5

[표-2] 2-compartment model analysis를 이용하여 구한 약동학 parameter

3.4. Estimation of brain K_p of ABN401 in rat without elacridar

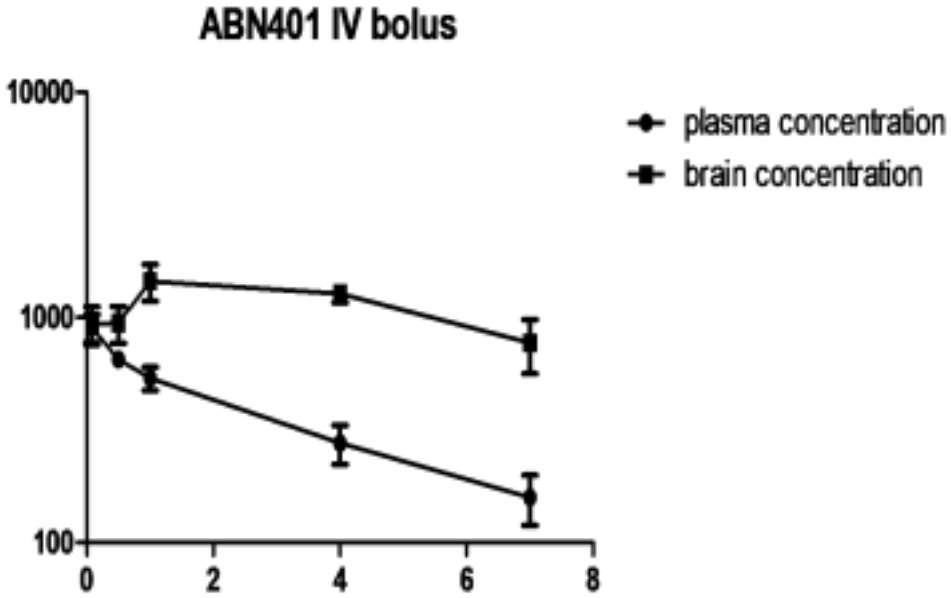
ABN401을 2 mg/kg로 투여하고 얻은 plasma와 brain에서의 농도를 나타낸 그래프이다.



[그림-5] ABN401을 단독 투여하였을 때의 plasma와 brain에서의 농도

3.5. Estimation of brain K_p of ABN401 in rat with elacridar

Elacridar의 농도를 정상상태로 유지한 상황에서 ABN401을 2 mg/kg로 투여하고 얻은 plasma와 brain에서의 농도를 나타낸 그래프이다.



[그림-6] Elacridar의 농도가 정상상태에 도달한 후 ABN401을 단독 투여하였을 때의 plasma와 brain에서의 농도

4. Discussion

본 연구는 ABN401의 뇌의 이행이 Abcb1a 와 연관성이 있을 것이라는 것에서 출발한다. 이전 실험에서 ABN401 5 mg/kg로 투여하였을 때 4시간에서 뇌와 혈장에서의 농도비는 0.2임으로 확인되었다. 이것을 식으로 표현하게 되면 아래와 같다.

$$0.2 = K_{p\ brain} = \frac{C_{T,\ ss}}{C_{p,\ ss}} = \frac{f_{up}}{f_{uT}} \times \frac{PS_{in}}{PS_{out}}$$

K_p는 정상상태 (steady state)에서의 특정 장기의 농도와 혈장에서의 농도비를 의미하는 값이고 이는 f_{up}(혈장에서의 비 결합 비율), f_{uT} (뇌 조직에서의 비 결합 비율)과 PS_{in} (혈장에서 조직으로의 투과도), PS_{out} (조직에서 혈장으로의 투과도)로 표현할 수 있다. 본 연구자의 실험실에서는 f_{up}는 실험을 통해 0.105임을 구하였고 f_{uT}는 Rogers와 Rowland의 방법 (Rogers et al., 2005)을 사용하여 PS_{in}과 PS_{out}의 비가 0.0732 라는 것을 알고 있었고 이를 바탕으로 특정 transporter에 의해서 뇌로의 이행이 감소한다는 것을 추정하였다.

Transwell® Permeable Supports 실험계를 이용한 transwell® assay의 경우 recovery 값을 보면 최저가 68% 최고가 81%이며 평균값은 72%라고 할 수 있다. 세포 안쪽의 약물이 존재하고 있는 것을 감안하였을 때 72%정도의 수치는 mass balance equation을 쓰기에 충분한 수치라고 생각할 수가 있다. 또한 ER 값의 경우 아래와 같이 [표-3]로 나타내고 해석을 해볼 수 있다.

Group	Without elacridar	With elacridar
hP-gp (4 μM, positive control)	4.84	1.00
Wild type (4 μM, negative control)	1.99	1.19
rP-gp (1 μM)	5.16	1.13
rP-gp (2 μM)	4.44	1.09
rP-gp (4 μM)	3.44	0.84
rP-gp (8 μM)	3.15	1.06

[표-3] 각각 group 별로의 ER값

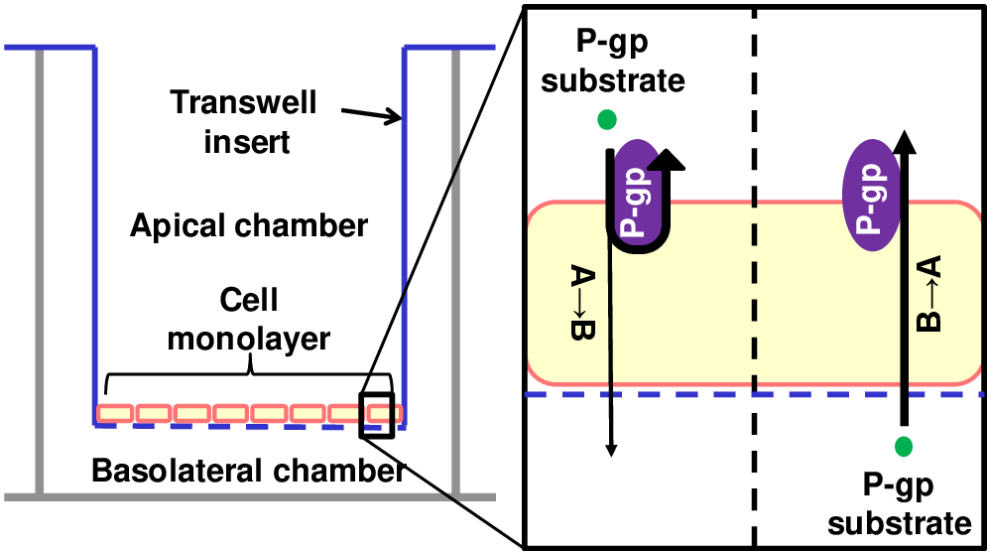
전체적인 값을 보면 elacridar 1 μM 을 넣어준 group 의 경우 ER 값이 1 에 가까운 것을 볼 수가 있다. 이는 elacridar 에 의해서 P-gp 가 100%에 가깝게 inhibition 되었다고 볼 수 있다. 다음으로 elacridar 를 가하지 않은 군에 대해서 확인해 보면 positive control 의 경우 4.84 로 hP-gp 에 의해서 ER 값이 높게 나타난 것을 볼 수 있고 negative control 의 경우 기존에 cell 에 존재하고 있던 canine P-gp 에 영향으로 거의 2 에 가까운 값이 나왔다고 추정해 볼 수 있다. 또한 실험군의 경우에도 ER 값이 2 이상임을 볼 수 있으므로 ABN401 이 P-gP 의 기질이라는 사실을 알 수 있다. (FDA guideline, 2020) ABN401 의 농도가 올라감에 따라서 ER 값이 감소하는 양상을 볼 수가 있다. 이는 ER 값을 계산하는 식을 보면 알 수가 있다.

$$ER = \frac{P_{app,\ \ B\ to\ A}}{P_{app,\ \ A\ to\ B}} = \frac{PS + \frac{V_{max}}{(C_B+K_m)}}{PS - \frac{V_{max}}{(C_B+K_m)}} = 1 + \frac{\frac{2V_{max}}{(C_B+K_m)}}{PS - \frac{V_{max}}{(C_B+K_m)}} = 1 + \frac{2V_{max}}{PS(C_B+K_m) - V_{max}}$$

ER값은 위와 같이 계산될 수 있다. 여기서 C_B의 농도가 올라갈수록 분모의 값이 증가함에 따라서 ER값이 줄어드는 양상이 될 것이라고 추정을 해볼 수 있고 그 경향성은 [그림-1]에서 잘 나타나고 있다.

Mass balance equation을 사용하기 전 가정 세 가지가 필요하다. 첫 번째 가정은 세포안의 volume은 충분히 무시할 수 있다는 가정이다. Apical side의 volume은 500 μL이고 basolateral side의 volume 은 1500 μL임을 고려한다면 monolayer에 존재하고 있는 세포의 전체 volume은 충분히 무시할 만한 수준이라고 할 수 있다. 두번째 가정은 세포안에서의 농도와 basolateral side에서의 농도는 일정하다고

가정하는 것이다. P-gp의 경우 apical side에 발현이 되어있고 세포안의 volume은 apical 과 basolateral side에 비해서 매우 작기 때문이다. 세번째 가정은 세포 표면에 있는 ABN401의 binding은 무시할 수 있는 수준이며 대사는 이루어 지지 않고 또한 P-gp 이외의 transporter들은 충분히 무시할 수 있다는 가정이 요구된다. 이 내용을 도식화 한 것이 아래의 그림 7이다.



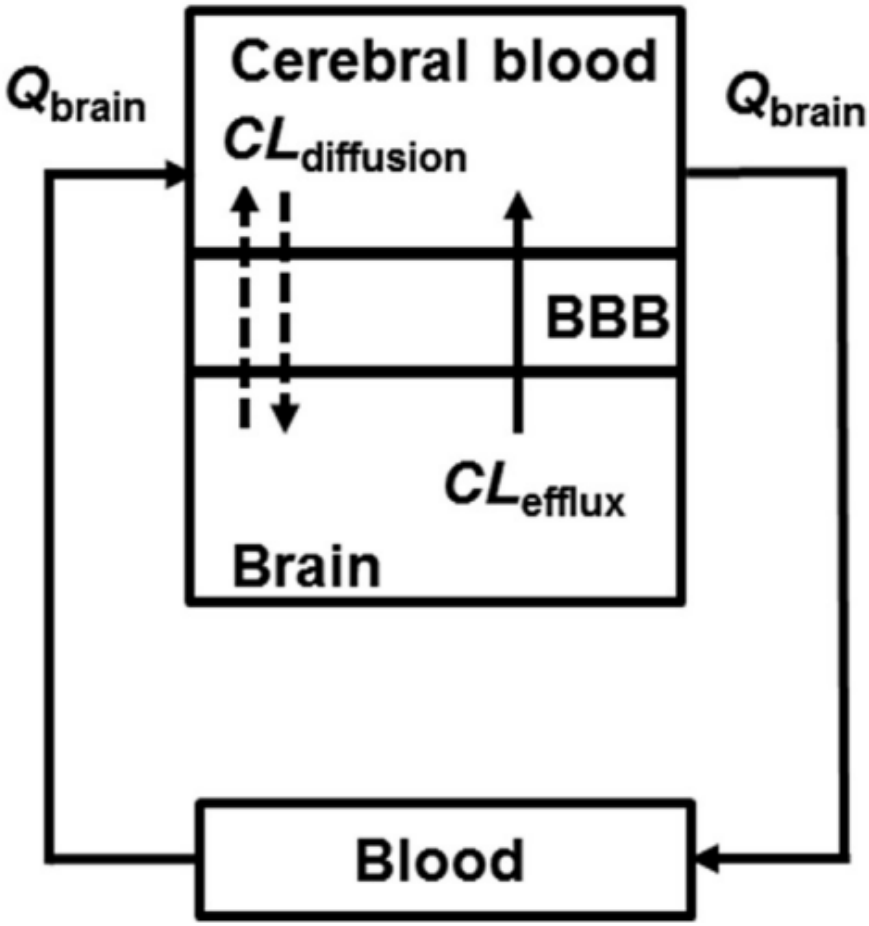
[그림-7] Transwell® Permeable Supports의 모식도(F. Obrien et al., 2013)

WinNonlin을 이용하여 Mass balance equation을 통해 약동학 parameter를 구하였으며 그 결과는 [표-1]과 같다. 여기서 K_i의 CV(%)값이 큰 이유는 K_i값이 상대적으로 매우 작은 값이기 때문이다. 이것의 정확성을 확인하기 위해서는 더 낮은 elacridar의 농도를 사용하여 실험을 진행할 수 있다. 다른 논문에서 elacridar의 K_i값을 보면 0.025 μM (Sugimoto et al., 2010), substrate를 digoxin으로 할 경우 0.0025 μM과 substrate를 amprenavir로 할 경우에는 0.02 μM (Liu et al., 2014) 이다. 따라서 본 실험에서 추정한 0.034 μM의 값은 위 논문 들에서 제시한 값과 비교하여도 큰 차이가 없음을 알 수가 있다.

PS_{in}과 PS_{out}의 비가 0.0732 라는 것을 알고 있었고 아래의 식과 같이 표현할 수 있다. 그리고 이 중 $CL_{diffusion}$은 단순 확산에 의한 CL이고 CL_{effulx}는 Abcb1a에 의한 영향이라고 할 수 있다. 그리고 여기서 ABN401의 K_m값이 15.7 μM이기 때문에 이는 $f_{up}\times C_p$의 값보다 약 100배정도 큰 값이기 때문에 충분히 무시할 만하고 따라서 아래와 같이 근사할 수 있게 된다. [그림-4]에서 2 mg/kg로 ABN401을 투여하였을 경우 혈장에서의 ABN401의 C_{max}는 약 1.3 μM이기 때문에 f_{up}값이 0.105임을 생각하면 $f_{up}\times C_p$값은 K_m의 약 0.01배임을 알 수가 있다.

$$\frac{PS_{in}}{PS_{out}} = \frac{CL_{diffusion}}{CL_{diffusion}+CL_{efflux}}$$

$$CL_{efflux} = \frac{V_{max}}{f_{up}\times C_p + K_M} \approx \frac{V_{max}}{K_M}$$



[그림-8] 뇌에서의 $CL_{diffusion}$과 CL_{efflux}

위 과정을 통하여 CL_{effulx}의 값은 상수형태가 나온다고 추정해 볼 수 있을 것이며 elacridar의 농도에 따라서 brain에서의 ABN401의 K_p값이 어떻게 바뀌는지 아래의 식을 통하여 추정이 가능하다. 기존의 ABN401을 단독으로 투여하였을 때 K_p값을 구하면 식으로 다음과 같이 구할 수 있다.

$$K_{p\ brain} = \frac{C_{T,\ ss}}{C_{p,\ ss}} = \frac{f_{up}}{f_{uT}} \times \frac{PS_{in}}{PS_{out}}$$

$$\frac{PS_{out}}{PS_{in}} = \frac{CL_{diffusion} + CL_{efflux}}{CL_{diffusion}} = 1 + \frac{V_{max}}{CL_{diffusion} \times K_M}$$

$$K_{p\ brain} = \frac{f_{up}}{f_{uT}} \times \frac{1}{1 + \frac{V_{max}}{CL_{diffusion} \times K_M}}$$

이후 elacridar를 투여하였을 경우에는 아래와 같이 식이 변형될 수가 있다.

$$K_{p\ brain\ with\ elacridar} = \frac{f_{up}}{f_{uT}} \times \frac{1}{1 + \frac{V_{max}}{CL_{diffusion} \times K_M \times (1 + \frac{I}{K_i})}}$$

Elacridar가 있는 경우에 위와 같이 식이 세워지는 것은 elacridar가 non-competitive inhibitor라고 알려져 있기 때문이다. (Nosol et al., 2020 and Chen et al., 2017) K_p값을 구하였을 때 V_{max}와 $CL_{diffusion}$의 비율은 동물에서의 상수 값이라고 할 수 있고 따라서 in vitro 실험계에서 구한 K_m과 K_i를 이용하면 elacridar를 투여 하였을 때 K_p를 예측해 볼 수 있다. 해당 실험을 하기 위해서 먼저 elacridar에 대한 in vivo 투여를 통해 elacridar의 약동학적 parameter를 구해야 하였다. [표-2]에 나와있는 NCA를 이용한 방법 이외에 compartment model을 이용하여 elacridar의 약동학적 parameter를 구하였으며 simulation이 잘 맞는 것 또한 확인해보았다. 이를 바탕으로 elacridar를 정상상태로 만들기 위한 regimen을 만들었다. Elacridar를 투여하지 않고 ABN401을 단독으로 투여한 상황인 [그림-5]에서 AUC (area under the curve)를 혈중농도 그래프와 뇌중농도 그래프에서 구하여 그 비율로 K_p값을 구하였고 그 값은 0.123이었다. 이는 Berkeley Madonna를 이용하여 구한 추정치 0.205와 비교하였을 경우 약 40%정도의 오차를 보였다. [그림-6]에서 AUC의 비율을 마찬가지로 elacridar를 투여하였을 때 구한 K_p의 값은 4.68이었다. 이때 elacridar의 혈중 농도는 약 2000 nM에서 3000 nM 사이였다. 따라서 이경우 elacridar의 f_{up}값이 0.019라고 알려져 있기 때문에 이를 이용하여 실제 4.68이라는 수치를 앞서 구한 $K_{p\ brain\ with\ elacridar}$라는 식을 이용하여 구해볼 수가 있다. (Kallem et al., 2012) 이를 이용하여 구한 값은 0.137과 0.2사이가 나와야 한다고 할 수 있다. 하지만 이는 4.68이라는 수치에 비해 약 20배정도 낮은 값이라고 할 수 있으며 예측이 잘 되지 않았다 할 수 있다. 이 이유로는 elacridar의 f_{up}값이 0.019라는 값에

대해서 실험을 통해서 확인해야할 필요가 있다. 또한 K_i로 사용한 0.034 μM의 값의 CV(%)가 크기에 elacridar의 농도를 다시 설정하여 보다 정확한 값을 구해 볼 수도 있을 것이다. 위 실험들을 통해서 보다 정확한 약동학 parameter값을 구하여 elacridar가 특정 농도에 도달하였을 경우에 대해서 ABN401의 뇌중농도를 예측할 수 있을 것이다.

3. Conclusion

본 연구를 통해서 ABN401의 뇌이행이 elacridar에 의해서 증가하였음을 확인하였다. Transwell® Permeable Supports의 실험계를 이용하여 ABN401이 Abcb1a의 기질임을 확인하였으며 elacridar에 의해서 ER값이 감소하는 것을 확인하였고 이를 바탕으로 in vitro에서 약동학 parameter를 계산할 수 있었다. 이후 in vivo 실험을 통해서 ABN401의 K_p값을 혈중과 뇌중 농도의 AUC ratio로 측정하였다. 그 결과 elacridar를 투여하였을 경우에 대해서 ABN401의 K_p값이 증가하는 것을 확인하였으나 그 증가폭에 대한 정량적인 예측은 하기 어려웠다. 하지만 이를 통해서 ABN401의 뇌 이행이 elacridar를 투여하였을 때 K_p값이 약 20배 정도 증가하는 것으로 보아 Abcb1a에 의한 영향이 크다는 것을 시사하고 있다. 따라서 ABN401이 현재 NSCLC를 적응증으로 해서 연구 및 임상 중에 있는 약물이고 향후에 뇌로의 전이에 대해서도 사용하고자 한다면 Abcb1a에 의한 영향을 고려해야 할 것이다. 향후 추가적인 연구를 통해서 ABN401의 뇌중농도에 대한 정확한 예측을 할 수 있을 것이라고 기대해 볼 수 있을 것이라고 생각된다.

참고 문헌

1. Liu, X. R., et al. (2014). "Use of Cassette Dosing Approach to Examine the Effects of P-Glycoprotein on the Brain and Cerebrospinal Fluid Concentrations in Wild-Type and P-Glycoprotein Knockout Rats." Drug Metabolism and Disposition 42(4): 482-491.
2. Kim, N. A., et al. (2020). "New Preclinical Development of a c-Met Inhibitor and Its Combined Anti-Tumor Effect in c-Met-Amplified NSCLC." Pharmaceutics 12(2).
3. Sane, R., et al. (2012). "Brain Distribution and Bioavailability of Elacridar after Different Routes of Administration in the Mouse." Drug Metabolism and Disposition 40(8): 1612-1619.
4. Brown, R. P., et al. (1997). "Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models." Toxicology and Industrial Health 13(4): 407-484.

   Tang, F. X., et al. (2002). "Are MDCK cells transfected with the Human MDR1 gene a good model of the human intestinal mucosa?" Pharmaceutical Research 19(6): 765-772.
5. Sugimoto, H., et al. (2011). "Quantitative Investigation of the Impact of P-Glycoprotein Inhibition on Drug Transport across Blood-Brain Barrier in Rats." Drug Metabolism and

Disposition 39(1): 8-14.

6. Cai, X. M., et al. (2012). "Approach to improve compound recovery in a high-throughput Caco-2 permeability assay supported by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." Journal of Pharmaceutical Sciences 101(8): 2755-2762.
7. Nosol, K., et al. (2020). "Cryo-EM structures reveal distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter ABCB1." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 117(42): 26245-26253.
8. Chen, H. Y., et al. (2017). "Elacridar, a third-generation ABCB1 inhibitor, overcomes resistance to docetaxel in non-small cell lung cancer." Oncology Letters 14(4): 4349-4354.
9. Shirasaka, Y., et al. (2008). "Effect of P-glycoprotein expression levels on the concentration-dependent permeability of drugs to the cell membrane." Journal of Pharmaceutical Sciences 97(1): 553-565.
10. Hyafil, F., et al. (1993). "In-Vitro and in-Vivo Reversal of Multidrug-Resistance by Gf120918, an Acridone carboxamide Derivative." Cancer Research 53(19): 4595-4602.
11. Kelava, T., et al. (2011). "Biological actions of drug solvents." Periodicum Biologorum 113(3): 311-320.
12. Neervannan, S. (2006). "Preclinical formulations for discovery and toxicology: physicochemical challenges." Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology 2(5): 715-

731.

13. Diehl, K. H., et al. (2001). "A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes." Journal of Applied Toxicology 21(1): 15-23.

14. Kodaira, H., et al. (2014). "Quantitative Investigation of the Brain-to-Cerebrospinal Fluid Unbound Drug Concentration Ratio under Steady-State Conditions in Rats Using a Pharmacokinetic Model and Scaling Factors for Active Efflux Transporters." Drug Metabolism and Disposition 42(6): 983-989.

15. Ball, K., et al. (2012). "Development of a physiologically based pharmacokinetic model for the rat central nervous system and determination of an in vitro-in vivo scaling methodology for the blood-brain barrier permeability of two transporter substrates, morphine and oxycodone." Journal of Pharmaceutical Sciences 101(11): 4277-4292.

16. Kodaira, H., et al. (2011). "Quantitative Evaluation of the Impact of Active Efflux by P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein at the Blood-Brain Barrier on the Predictability of the Unbound Concentrations of Drugs in the Brain Using Cerebrospinal Fluid Concentration as a Surrogate." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 339(3): 935-944.

17. Fischer, H., et al. (2021). "Calculation of an Apical Efflux Ratio from P-Glycoprotein (P-gp) In Vitro Transport

Experiments Shows an Improved Correlation with In Vivo Cerebrospinal Fluid Measurements in Rats: Impact on P-gp Screening and Compound Optimization." Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 376(3): 322-329.

18. Ball, K., et al. (2013). "Physiologically Based Pharmacokinetic Modelling of Drug Penetration Across the Blood-Brain Barrier-Towards a Mechanistic IVIVE-Based Approach." Aaps Journal 15(4): 913-932.
19. Di, L., et al. (2003). "High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier." European Journal of Medicinal Chemistry 38(3): 223-232.
20. Di, L., et al. (2009). "Comparison of Blood-Brain Barrier Permeability Assays: In Situ Brain Perfusion, MDR1-MDCKII and PAMPA-BBB." Journal of Pharmaceutical Sciences 98(6): 1980-1991.

Abstract

Increased brain penetration of ABN401, an inhibitor for tyrosine kinase, in rats by elacridar, an inhibitor of Abcb1a

Yeong Hyo Kim

Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

ABN401 guess an anticancer substance that inhibits the function of tyrosine-proton kinase (c-Met), a non-small cell lung cancer (NSCLC) treatment, and is a new drug candidate currently undergoing phase 1 and 2 clinical studies in Korea and the United States. In a previous study, NSCLC is a cancer with a very high metastasis rate of 43%,

of which 25-30% of the patient groups metastasize to the brain. Separately, P-glycoprotein (P-gp), known to discharge multiple anticancer drugs into circulating blood, is expressed in the blood-brain portal. Therefore, in order to determine the effectiveness of ABN401 in the brain, it is necessary to study the role of P-gp in the brain transition process of this drug through additional kinetics research. First, in this study, Transwell® efflux assay was performed using MDCKII cell lines (MDCK II/rP-gp cells) that functionally expressed rat P-gp in order to find out the substrate nature of ABN401 to P-gp. In this study, it was found that the K_m value of ABN401 emission transport by P-gp was about 15.7 uM. In addition, in this in vitro experiment system, the K_i value of elacridar, an inhibitor of P-gp, inhibiting the emission transport of ABN401, was evaluated as 34 nM. The brain K_p value obtained from the AUC ratio of brain tissue and blood concentration after ABN401 was administered in rat was 0.123, and the brain K_p value increased to 4.68 ($p<0.05$; t-test) when elacridar was pretreated. Overall, the results could be estimated that the brain transition of ABN401 in rat was relatively low (i.e., brain K_p~0.123) and this was due to the emission transport of P-gp. In addition, these results suggested that proper P-gp inhibition (e.g., P-gp inhibitor treatment such as elacridar) of P-gp may be required to expect the expression of anticancer effects of ABN401 in the brain.

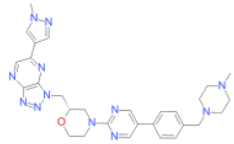
Key words: non-small cell lung cancer, brain, distribution, clearance, ABN401, elacridar

Student number: 2021-24820

Kinetics of Brain Distribution of ABN401, an Inhibitor of Tyrosine Kinase Receptor, in Rats

Seoul National University
College of Pharmacy
Yeonghyo Kim

ABN401

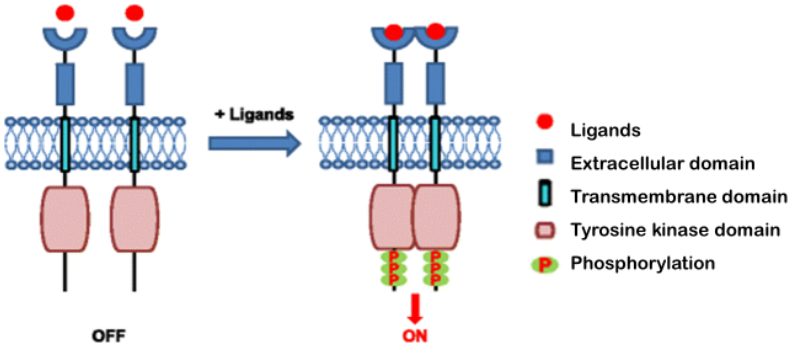


MOA	Selective c-MET inhibitor
Molecular weight	567
pKa	7.49
Log P	2.46
Solubility (Water)	8 μg/mL
Company	Abion Inc. (Korea)
Development stage	Clinical development
Possible indication	Non-small cell lung cancer (NSCLC) Gastric cancer

MOA: mechanism of action

Noh et al, Unpublished.

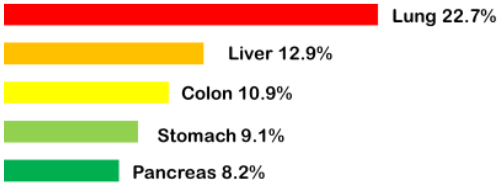
Mechanism of action of ABN401



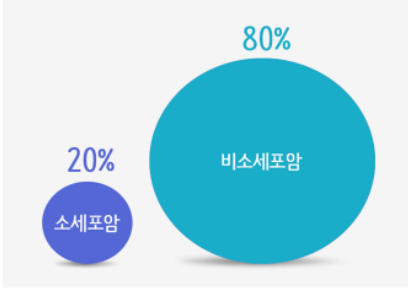
- Mesenchymal-epithelial transition factor (c-Met) is one of tyrosine kinase receptors; c-Met is also referred to as hepatocyte growth factor receptor.
- c-Met is overexpressed in many solid tumors (e.g., liver cancer, gastric cancer and lung cancer).

Lung Cancer

Mortality rate for major cancers in Korea



National Cancer Information Center



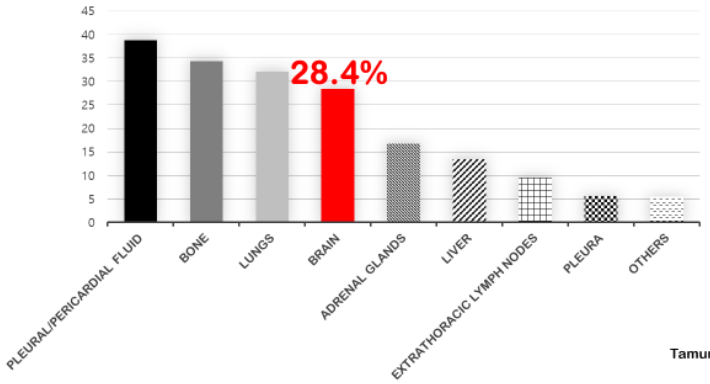
Korea Cancer Rehabilitation Association

Key: NSCLC = 비소세포암, SCLC = 소세포암

- The mortality rate of lung cancer was the highest (22%) in Korea.
- Lung cancer can be largely divided into NSCLC and SCLC, of which 80% is NSCLC.

NSCLC Metastasis

- NSCLC accounts for 84% of all lung cancer diagnoses.
- In 1,542 NSCLC patients diagnosed during the study period, 729 (47.3%) patients presented with distant metastasis.



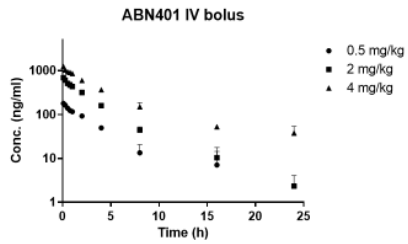
Tamura et al, 2015.

Overall Objective

To study pharmacokinetics of ABN401 brain distribution in rats

Previous study

Systemic pharmacokinetics and tissue distribution of ABN401 in rats



IV	0.5 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
V_{ss} (L/kg)	3.32 ± 0.690	3.39 ± 0.795	4.85 ± 0.161
CL (mL/min/kg)	13.6 ± 1.36	16.3 ± 1.80	12.6 ± 1.43

$K_{p,\ apparent}$

Tissues	$K_{p,\ apparent}$
Spleen	34.9 ± 15.7
Liver	24.0 ± 7.90
Lung	22.2 ± 5.23
Kidney	21.8 ± 5.95
Gut	10.7 ± 3.90
Muscle	7.38 ± 0.69
Heart	5.69 ± 2.04
Adipose	1.53 ± 0.67
Brain	0.22 ± 0.14
Plasma	1

- **Tissue to plasma concentration ratio ($K_{p,\ apparent}$) of ABN401 was determined at 4 hour after intravenous administration at the dose of 5 mg/kg in rats.**

Noh et al, Unpublished. Yeo, Unpublished.

Previous study

Parameters affecting brain Kp: f_{up} and f_{uT}

- Plasma protein binding of ABN401 in rats:

$$f_{up}: 0.105$$

Physiologically Based Pharmacokinetic Modeling 1: Predicting the Tissue Distribution of Moderate-to-Strong Bases

TRUDY RODGERS,[1] DAVID LEAHY,[2] MALCOLM ROWLAND[3]

For compounds with at least one basic pKa≥7

$$\frac{1}{f_{uT}} = \left[\left(\frac{1+X\cdot f_{IW}}{1+Y}\right) + f_{EW} + \left(\frac{Ka_{AP}\cdot[AP]_T\cdot X}{1+Y}\right) + \left(\frac{P\cdot f_{NL}+(0.3P+0.7)\cdot f_{NP}}{1+Y}\right) \right]$$

f: fraction tissue volume
IW: Intercellular water
EW: Extracellular water
NL: Neutral lipid
NP: Neutral phospholipid
$[AP]_T$: Tissue concentration of acidic phospholipid

$$0.219 = K_p = \frac{C_{T,\ ss}}{C_{p,\ ss}} = \frac{f_{up}}{f_{uT}} \times \boxed{\frac{PS_{in}}{PS_{out}}}$$

(*in vivo* PK)

f_{up}/f_{uT}: 3.00 $\quad$ PS_{in}/PS_{out}: 0.0732

$$\frac{PS_{in}}{PS_{out}} = 0.0732$$

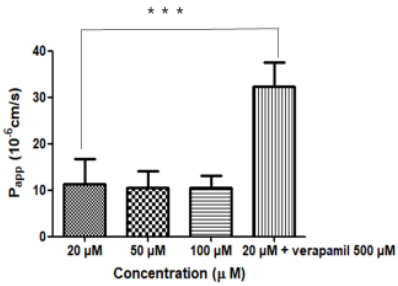
- **Efflux transporters in ABN401 distribution to the brain?**

Noh et al, Unpublished. Rodgers et al, 2005.

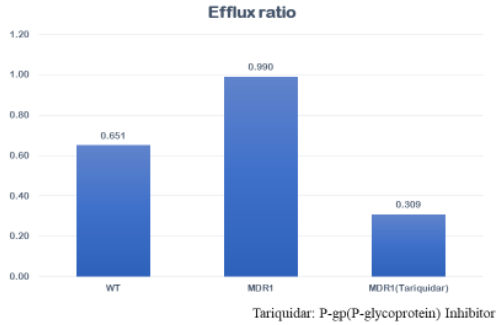
Previous study

Parameters affecting brain K_p: Permeability

Rat intestine



MDCKⅡ/P-gp



Yeo, Unpublished. Ann, Unpublished

Short-term Objective

To characterize *in vitro* kinetics of ABN401 inhibition by elacridar in MDCKII cells expressing rat P-gp

Key: elacridar = P-gp Inhibitor

In vitro assay to determine substability of ABN401 in transfected cells

In Vitro Drug Interaction Studies — Cytochrome P450 Enzyme- and Transporter-Mediated Drug Interactions Guidance for Industry[1]

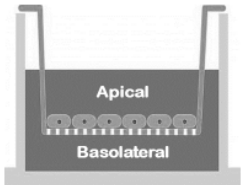
Determining if the Investigational Drug is a Substrate of the Transporters P-gp and BCRP

2. *Data Analysis and Interpretation*

The following results suggest that an investigational drug is an in vitro P-gp substrate:

- A net flux ratio (or efflux ratio (ER)) of ≥ 2 for an investigational drug in cells that express P-gp (e.g., Caco-2 cells or transfected cells overexpressing P-gp)[5]
- A flux that is inhibited by at least one known P-gp inhibitor at a concentration at least 10 times its K_i or IC_{50} (e.g., the ER decreases to < 50% of the ER in the absence of inhibitor or the flux reduced to unity).

January 2020 FDA



$$P_{app} = \frac{1}{S \cdot C_0} \times \frac{dX}{dt}$$

$$ER = \frac{P_{app,B\ to\ A}}{P_{app,A\ to\ B}}$$

- P_{app}: Apparent permeability
- S: Surface area
- X: Amount
- ER: Efflux ratio
- B: Basolateral side
- A: Apical side

Ahn, Unpublished

Mechanism of Inhibition of P-gp by elacridar

Cryo-EM structures reveal distinct mechanisms of inhibition of the human multidrug transporter ABCB1

Nosol et al, 2020.

Elacridar = a non-competitive inhibitor for ABCB1

Elacridar, a third-generation ABCB1 inhibitor, overcomes resistance to docetaxel in non-small cell lung cancer

Chen et al, 2017.

Key: ABCB1=P-gp

Michaelis-Menten equation

$$V = \frac{V_{max} \times C}{C + K_m} \xrightarrow{\text{elacridar}} V = \frac{V_{max} \times C}{\alpha(C + K_m)}$$

Degree of inhibition

$$\alpha = 1 + [I]/K_i$$

What to consider in Transwell® assay

1. Concentration range of substrate — ABN401 concentration: 0 μM ~ 10 μM

2. Concentration of inhibitor — Elacridar concentration: 1 μM

3. LC/MS/MS assay for ABN401 — Concentration range: 5 nM ~ 10 μM

Experimental design for Transwell® study

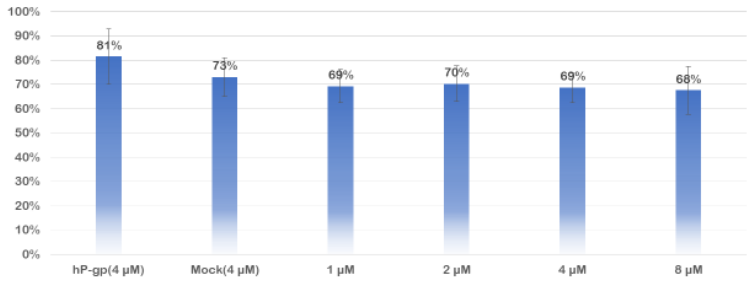
1. Cell lines: MDCK Ⅱ/hP-gp, MDCK Ⅱ/WT, MDCK Ⅱ/rP-gp

2. Substrate: ABN401 (1 μM, 2 μM, 4 μM, 8 μM)

3. Inhibitor: elacridar (None, 1 μM)

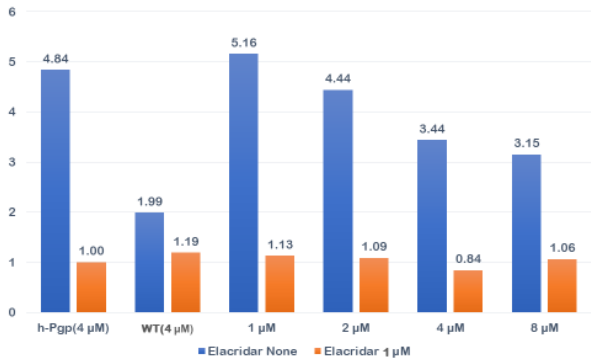
4. Sampling time: 30 min, 60 min, 90 min, recovery (n=3)

Results - Recovery



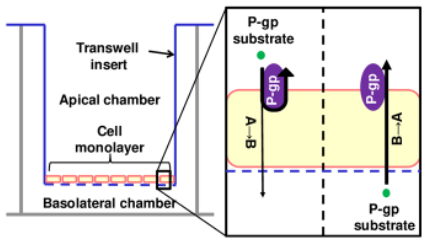
- The two left columns = ABN401 recovery for positive / negative control cells respectively; the four remaining columns = ABN401 recovery in the presence of ABN401 (1~8 μM) in cells expressing rP-gp.
- Range of ABN401 recovery in the cell study = 68 ~ 81% (average of 72%).

Results - Efflux ratio for ABN401



- Positive and negative control groups had ABN401 ER values of 4.84 and 1.99, respectively. The ER was reduced to ~1 by the treatment with 1 μM elacridar in the control study. For negative control cells, the ER of 1.99 may be related to the efflux action of canine P-gp (endogenous) in the control cell.
- ER values were decreased with ABN401 concentration in rP-gp cells. The ER values were reduced to ~1 by the treatment with 1 μM elacridar.

Assumptions



1. Volume of the cell is negligible in comparison to those of the apical and basolateral chambers.
2. Concentration of ABN401 inside the cell is identical to that in the basolateral chamber.
3. Metabolism does not occur in the cell system.
4. Binding of ABN401 to cell surface is negligible.

Mass balance equation

With elacridar

Basolateral is donor

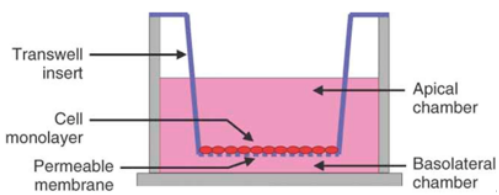
$$V_B * \frac{dC_B}{dt} = PS * (C_B - C_A) + \frac{V_{max} * C_B}{(C_B + K_m)\boxed{(1 + \frac{I}{K_i})}}$$

$$V_A * \frac{dC_A}{dt} = -PS * (C_B - C_A) - \frac{V_{max} * C_B}{(C_B + K_m)\boxed{(1 + \frac{I}{K_i})}}$$

Apical is donor

$$V_B * \frac{dC_B}{dt} = PS * (C_A - C_B) - \frac{V_{max} * C_B}{(C_B + K_m)\boxed{(1 + \frac{I}{K_i})}}$$

$$V_A * \frac{dC_A}{dt} = -PS * (C_A - C_B) + \frac{V_{max} * C_B}{(C_B + K_m)\boxed{(1 + \frac{I}{K_i})}}$$



- C_B = ABN401 concentration in B side
- C_A = ABN401 concentration in A side
- V_B = ABN401 volume in B side
- V_A = ABN401 volume in A side

Results – Nonlinear regression analysis

Parameter	Value	CV%
V_{max}	0.0172 (nM/min)	18.2
Permeability	7.12 (10^{-6}cm/s)	4.98
K_m	15.7 (μM)	22.3
K_i	0.034 (μM)	107

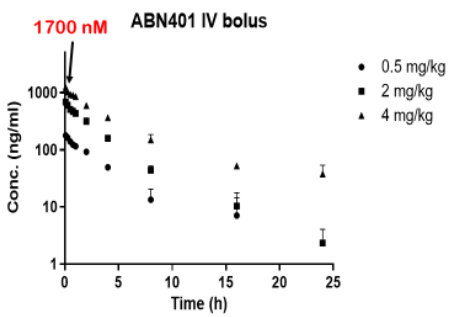
- CV% was high for K_i estimation, probably because of the fact that only two concentration levels of elacridar were studied in the ER measurement.
- Estimated K_m value was higher than the blood concentration in IV bolus injection study [Linear kinetics for ABN401 efflux via rP-gp in vivo? See next slide]

CL_{efflux} term may be considered as a constant

$$\underset{(\textit{in vivo}\ \text{PK})}{0.219} = K_p = \frac{C_{T,ss}}{C_{p,ss}} = \frac{f_{up}}{\underset{3.00}{f_{uT}}} \times \boxed{\frac{PS_{in}}{PS_{out}}}$$

$$\frac{PS_{in}}{PS_{out}} = \frac{CL_{diffusion}}{CL_{diffusion} + CL_{efflux}}$$

$$CL_{efflux} = \frac{V_{max}}{f_{up} \times C_p + K_m} \approx \frac{V_{max}}{K_m}$$



- The unbound fraction (f_{up}) for ABN401 was ~0.105; The highest (total) concentration (Cp) of ABN401 found in IV bolus study was ~1700 nM; Free ABN401 concentration ($f_{up} \times C_p$) = 170 nM; Km (from in vitro cell study) = 34 μM, viz., 34 + 0.170 μM = ~ 34 μM.
- Therefore, K_p value may be considered as a constant.

Predictions for K_p of ABN401 ± Elacridar

No elacridar (Control)

$$CL_{efflux} = \frac{V_{max}}{f_{up} \times C_p + K_m} \approx \frac{V_{max}}{K_m}$$

$$\frac{PS_{out}}{PS_{in}} = \frac{CL_{diffusion} + CL_{efflux}}{CL_{diffusion}} = 1 + \frac{V_{max}}{CL_{diffusion} \times K_m}$$

Elacridar

$$CL_{efflux\,with\,Elacridar} = \frac{V_{max}}{(f_{up} \times C_p + K_m)(1 + \frac{I}{K_i})} \approx \frac{V_{max}}{K_m(1 + \frac{I}{K_i})}$$

$$\frac{PS_{out}}{PS_{in}} = \frac{CL_{diffusion} + CL_{efflux\,with\,Elacridar}}{CL_{diffusion}} = 1 + \frac{V_{max}}{K_m \times CL_{diffusion} \times (1 + \frac{I}{K_i})}$$

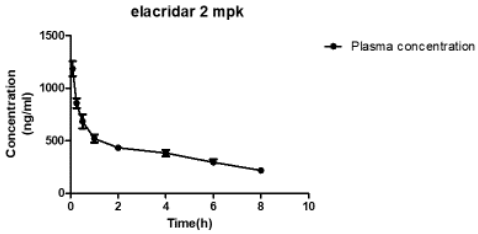
$$K_{p\,with\,elacridar} = \frac{f_{up}}{f_{uT}} \times \frac{1}{1 + \frac{V_{max}}{K_m \times CL_{diffusion} \times (1 + \frac{I}{K_i})}}$$

- **K_p with elacridar may be predicted by obtaining the $\frac{V_{max}}{CL_{diffusion}}$ value from the control group and *in vitro* K_i value.**

Short-term Objective

To determine K_p of ABN401 in the presence and the absence of elacridar in rats

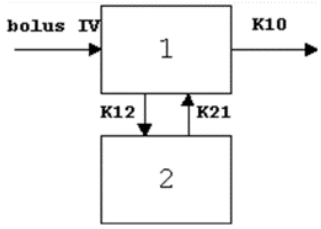
IV bolus administration study for elacridar in rats

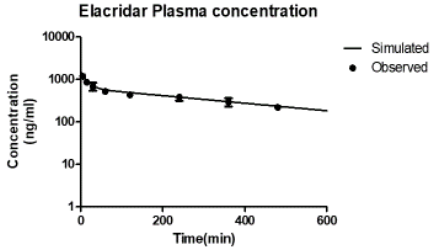


- After IV administration of elacridar (2 mg / kg) to rats, blood sampling was conducted at 5,15,30,60,120,240 and 480 min.
- Non-compartmental analysis was carried out to obtain V_{ss} and CL.

IV	2 mg/kg
V_{ss} (L/kg)	3.04 ± 0.543
$T_{1/2}$	5.00 h
CL (mL/min/kg)	6.81±0.984

WinNonlin fitting

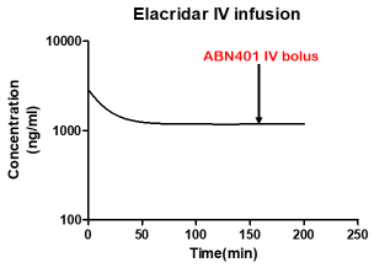




Parameter	Value	CV%
V_c	1.43 (L/kg)	11.0
k_{10}	0.283 (/h)	13.6
k_{12}	2.15 (/h)	31.3
k_{21}	1.59 (/h)	23.5

- Nonlinear regression analysis of elacridar data to estimate the steady state concentration by IV infusion using the estimated parameters.

IV infusion plan for elacridar



Loading dose: 4.2 mg/kg, Infusion rate: 2 μg/min

A Simplified Protocol Employing Elacridar in Rodents: A Screening Model in Drug Discovery to Assess P-gp Mediated Efflux at the Blood Brain Barrier

Rajareddy Kallem[1], Chetan P. Kulkarni[1], Dakshay Patel[1,4], Megha Thakur[1], Michael Sinz[2], Sheelendra P. Singh[1], S. Shahe Mahammad[3] and Sandhya Mandlekar[1,5]

[1]Biocon-Bristol-Myers Squibb Research and Development Center (BBRC), Syngene International Limited, Biocon Park Plot 2 & 3, Bommasandra IV Phase, Bangalore - 560 099, India; [2]Bristol-Myers Squibb, Wallingford, CT, USA; [3]Bristol-Myers Squibb India Ltd., BBRC, Bangalore, India; [4]Current affiliation: Custom Biologics, 2355, Meadowpine Blvd, Mississauga, Toronto, ON L5N 6H9, Canada

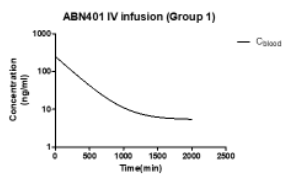
$Elacridar\ f_{up}$ = 0.019

$f_{up} \times C_p$ **= 40 nM > 34 nM (K_i)**

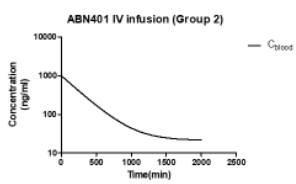
- Using the kinetic model, it was expected that steady state in the (total) plasma concentration of elacridar would be reached at ~1 μg/mL by ~ 100 min with IV infusion involving 4.2 mg/kg loading dose + infusion at 2 μg/min.
- The free concentration of elacridar in the plasma (i.e., f_{up} = 0.019) was expected to be higher than *in vitro* K_i value.

Problems in determining ABN401 K_p in rats

Simulation

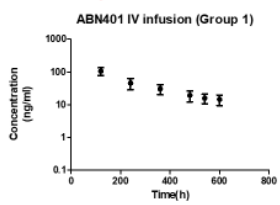


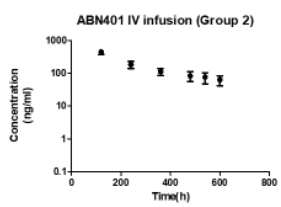
Loading dose: 1 mg/kg, Infusion rate: 20 μg/min



Loading dose: 4 mg/kg, Infusion rate: 80 μg/min

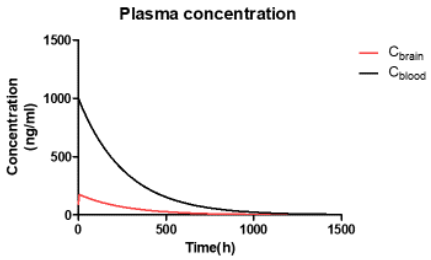
Preliminary





- Toxicity issues with vehicles for ABN401 in rats (i.e., long term infusion)

Determination of brain K_p of ABN401 in rats after IV bolus injection (simulation)



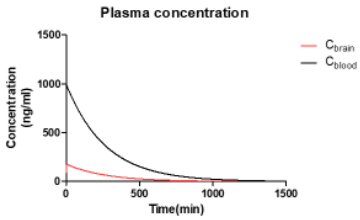
ABN401 IV bolus 4 mg/kg

$$K_p = \frac{AUC_{brain,\infty}}{AUC_{plasma,\infty}}$$

- K_p value may be obtained by the ratio of AUC for the brain to that for the plasma after IV bolus administration.
- Each time point represents data from individual rat.

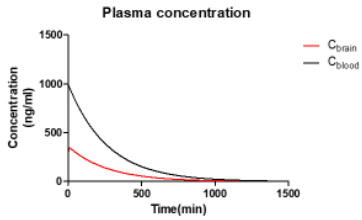
Determination of brain K_p of ABN401 in rats after IV bolus injection ± elacridar infusion (simulation)

Control



e.g., $K_{p,\ predicted}$ = 0.205

with elacridar(40 nM, steady state)



e.g., $K_{p,\ predicted}$ = 0.412

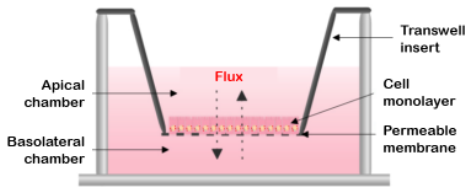
- Inhibitory effect of elacridar will be experimentally verified in rats.

Conclusion

- K_m of ABN401 efflux via rP-gp and K_i of elacridar for the ABN401 efflux were estimated in MDCKII cells expressing the efflux transporter.
- Dosing regimen for elacridar to attained the unbound plasma concentration above the K_i value in rats was estimated. Using this dosing condition, the potential change in brain K_p of ABN401 by elacridar will be studied in rats.

Supplement Slide

Experimental determination of efflux ratio using the Transwell® system



1. Cell seeding (e.g., 0.5 * 10^6 cells/well)
2. Confirming integrity of the cell layer
   - TEER: around 150 Ω*cm^2 for MDCK II[1)]
3. Dissolve the test compound to prepare working solution with or without known inhibitor.
4. Treat the working solution into the donor chamber.
5. Sampling at the receiver chamber to calculate the flux of test compound.
6. Collect samples in the donor chamber at the last sampling time to calculate the recovery.
7. Quantitate the concentration of the test compound using LC-MS/MS.

TEER: transepithelial electrical resistance

1): Lee et al, 2015.

$$ER = \frac{P_{app,B\ to\ A}}{P_{app,A\ to\ B}} = \frac{PS + \frac{V_{max}}{S + K_m}}{PS - \frac{V_{max}}{S + K_m}} = 1 + \frac{\frac{2V_{max}}{S + K_m}}{PS - \frac{V_{max}}{S + K_m}} = 1 + \frac{2V_{max}}{PS(S + K_m) - V_{max}}$$

- As the expression develops as shown above, the ER value decreases as S increases