

UNIVERSITÉ DE MONTRÉAL

**Développement et validation de modèles *in silico* pour  
évaluer la variation de clairance hépatique des  
médicaments fortement liés aux protéines plasmatiques**

Par  
Michel Bteich

DÉPARTEMENT DE SANTÉ ENVIRONNEMENTALE ET SANTÉ AU TRAVAIL  
ÉCOLE DE SANTÉ PUBLIQUE

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de doctorat  
en santé publique, option toxicologie et analyse du risque

Novembre 2020

© Bteich Michel, 2020

Université de Montréal

Unité académique : département de santé environnementale et santé au travail, École de santé publique

---

*Cette thèse intitulée*

**Développement et validation de modèles *in silico* pour évaluer la variation de clairance hépatique des médicaments fortement liés aux protéines plasmatiques**

*Présentée par*

**Michel Bteich**

*A été évalué(e) par un jury composé des personnes suivantes*

**Audrey Smargiassi**

Président-rapporteur

**Sami Haddad**

Directeur de recherche

**Patrick Poulin**

Co-directeur de recherche

**France Varin**

Membre du jury

**Frank Burczynski**

Examineur externe

**Fahima Nekka**

Représentante du doyen

## Résumé

La prédiction des paramètres pharmacocinétiques/toxicocinétiques (PK/TK), tels que la clairance intrinsèque ( $CL_{int}$ ) et la clairance hépatique ( $CL_h$ ) des médicaments, demeure un défi majeur en modélisation quantitative. Selon « l'hypothèse du médicament libre », seul le médicament libre peut traverser la membrane plasmique et la  $CL_h$  de ce médicament est calculée en fonction de sa fraction libre ( $f_{up}$ ). Néanmoins, la captation hépatique facilitée par l'albumine (ALB) représente clairement une violation de « l'hypothèse du médicament libre ». Cette captation hépatique se base sur la possibilité que le complexe ALB-médicament puisse assurer un apport supplémentaire en médicament aux hépatocytes. Ainsi, cela pourrait expliquer en grande partie les sous-prédictions observées de  $CL_h$ . Par ailleurs, certains médicaments peuvent se lier fortement à plusieurs protéines plasmatiques telles que l'ALB et l'alpha-1-glycoprotéine acide (AGP). Ainsi, la forte liaison d'un même médicament à l'ALB, à l'AGP, ou aux deux, pourrait avoir des répercussions bien distinctes sur la prédiction de ces paramètres PK/TK. Cependant, aucune étude n'a été faite pour simuler la différence entre leurs effets.

L'objectif principal de cette thèse est donc d'évaluer (avec plus d'exactitude et de précision), pour une série de médicaments, en condition *in vivo* (ou *in situ*), ces répercussions en présence des deux protéines plasmatiques, conjointement ou séparément. En outre, il est indispensable de vérifier si une approche générique en modélisation peut être appliquée. Cette thèse est répartie en trois objectifs spécifiques. Le premier est de proposer un arbre décisionnel pour faciliter la sélection des approches prédictives appropriées de  $CL_{h\ in\ vivo}$  pour des médicaments ayant des caractéristiques différentes. Le second est d'évaluer les répercussions de fortes liaisons aux deux protéines plasmatiques ALB et AGP sur la  $CL_h$  de deux xénobiotiques choisis (perampanel (PER) et fluoxétine (FLU)) ; ces médicaments ont de fortes affinités pour les deux protéines et un métabolisme exclusif (ou prédominant) dans le foie. Et, le dernier est de développer et valider un nouveau modèle prédictif de  $CL_h$  pour les xénobiotiques ayant le potentiel de se lier fortement dans le plasma, à l'ALB ainsi qu'à l'AGP.

Dans un premier temps, des données *in vitro* rapportées chez l'humain ont été colligées pour 19 médicaments (substrats des transporteurs OAT2 et OATP1B1), et ont été ensuite utilisées dans six modèles d'extrapolation *in vitro-in vivo* (IVIVE) pour prédire lesdits paramètres. Après une comparaison statistique, les résultats ont montré que l'approche 2 (c'est-à-dire «  $f_{u,p-adj}$  model ») qui se base sur la captation hépatique facilitée par l'ALB, avait la meilleure performance prédictive. Cependant, l'approche 5 (c'est-à-dire « Extended Clearance Model ») qui se base sur le transport facilité, en était une très pertinente à appliquer pour les substrats de transporteurs membranaires. Lesdits substrats seraient potentiellement moins affectés par l'ALB. Ainsi, un arbre décisionnel a été proposé pour choisir rapidement et judicieusement la meilleure approche IVIVE servant à prédire la  $CL_{h\ in\ vivo}$  pour chaque xénobiotique en présence de l'ALB.

Dans un deuxième temps, les médicaments PER et FLU ont été sélectionnés à partir d'une collecte de données (N= 1907 médicaments) en fonction de certains critères (avoir un métabolisme exclusif ou prédominant dans le foie, pas de transport facilité par les transporteurs membranaires, une haute affinité pour les deux protéines ALB et AGP, et un ratio de liaison à l'AGP sur celle à l'ALB proche de l'unité). Cette sélection a été réalisée pour faire des expériences sur des foies isolés et perfusés de rats (IPRL), en présence et en absence des protéines ALB et AGP (c'est-à-dire quatre scénarios IPRL). Les résultats IPRL ont démontré que PER est faiblement à moyennement métabolisé (extraction hépatique= 0,2-0,7), tandis que FLU est fortement métabolisé (extraction hépatique= 0,8-0,99). Le modèle Michaelis-Menten a été ajusté aux cinétiques métaboliques, et différents paramètres  $V_{max}$ ,  $K_m$  et  $K_{m,u}$  ont été obtenus de ce modèle. À de faibles concentrations libres pour les deux médicaments (c'est-à-dire à des concentrations thérapeutiques) et en présence des protéines plasmatiques, les valeurs de  $CL_{int}$  non liée ont augmenté pour PER (avec l'ALB et le mélange des deux protéines (MIX)) et FLU (avec l'ALB, l'AGP et le MIX) par rapport à celles obtenues du scénario sans protéine (sauf pour PER avec AGP, lesdites valeurs ont diminué). Par ailleurs, les calculs des ratios  $CL_{int}$  (SANS *versus* AVEC protéine) ont permis d'indiquer l'occurrence d'une facilitation de la captation hépatique de médicaments par l'ALB ou l'AGP. Ces ratios ont aussi permis de vérifier si la cinétique métabolique pour PER et FLU suivait soit « l'hypothèse du médicament libre » soit celle de « la captation hépatique facilitée par les protéines plasmatiques ».

Dans un dernier temps, une nouvelle approche prédictive de CLh (approche WO-to-MIX) est développée en se basant sur une nouvelle notion de liaison fractionnelle et en intégrant dans le «  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  model » de nouveaux paramètres tels que la fraction liée à l'ALB ( $f_{B\text{-ALB}}$ ) et celle liée à l'AGP ( $f_{B\text{-AGP}}$ ) à partir du scénario MIX. Ce modèle est basé sur la captation facilitée par l'ALB. Contrairement à l'approche WO-to-MIX, le « well-stirred model » (ou modèle conventionnel) est basé sur l'hypothèse du médicament libre. Ensuite, les paramètres  $V_{\max}$  et  $K_m$  obtenus *in situ* pour PER et FLU lors des expériences IPRL sans protéines, ont été utilisés en combinaison avec le paramètre intrant de la fraction libre ajustée ( $f_{u_p\text{-adjusted}}$ ) pour le «  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  model » ou avec la fraction libre ( $f_{u_p}$ ) pour le « well-stirred model ». Une comparaison des performances prédictives globales des deux modèles a été faite. Les performances prédictives du nouveau modèle étaient prometteuses, en particulier pour FLU qui montrait le plus haut degré de captation hépatique médiée par l'ALB, par rapport au modèle conventionnel. L'approche WO-to-MIX est une première validation d'un nouveau modèle d'extrapolation proposé pour les médicaments comme FLU qui se lient à l'ALB et à l'AGP. Néanmoins, le modèle conventionnel reste utile à utiliser pour les médicaments comme PER. L'exactitude de prédiction était inférieure pour ce dernier médicament probablement parce que la captation hépatique par l'ALB ne semble pas être maximale, et, par conséquent, l'utilisation de  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  a surestimé la  $CLh_{in vivo}$ . Par conséquent, plus de travail est nécessaire en particulier pour PER.

Cette thèse démontre qu'une seule approche générique pour prédire la CLh n'existe pas. Néanmoins, le choix d'une approche IVIVE ayant une performance prédictive satisfaisante est maintenant possible. Les résultats de cette thèse contribuent à : 1) mieux comprendre les répercussions sur les paramètres PK/TK de la forte liaison des médicaments à l'ALB et à l'AGP ; 2) choisir la meilleure approche prédictive de CLh sur la base de l'affinité du xénobiotique (médicament ou contaminant) pour chacune des protéines plasmatiques et des mécanismes impliqués dans le foie ; et 3) prédire la CLh avec précision et exactitude des xénobiotiques qui se lient aux deux protéines plasmatiques. Ces approches IVIVE pour la CLh pourront assurément être intégrées dans des modèles PK/TK à base physiologique pour les xénobiotiques afin d'améliorer la prédiction de leur pharmacocinétique et d'accélérer le processus de développement de médicaments.

**Mots-clés :** Clairance hépatique, fortes liaisons aux protéines plasmatiques, interactions pharmacocinétiques, albumine, alpha-1-glycoprotéine acide, captation facilitée par la protéine, transporteurs membranaires, extrapolation *in vitro-in vivo*, foie isolé et perfusé du rat.

## Abstract

The prediction of pharmacokinetic/toxicokinetic (PK/TK) parameters such as intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) and hepatic clearance ( $CL_h$ ) for highly bound drugs is a major challenge in quantitative modeling. According to the 'free drug hypothesis', only the free drug can pass through the plasma membrane and the  $CL_h$  of this drug is calculated according to its free fraction ( $f_{u,p}$ ). Nevertheless, the hepatic uptake facilitated by albumin (ALB) is a violation of the 'free drug hypothesis'. This facilitated hepatic uptake is based on the possibility that the ALB-drug complex may provide additional drug intake to the hepatocytes. Thus, this could largely explain the underpredictions of  $CL_h$ . In addition, some drugs can bind extensively in plasma, and to several plasma proteins such as ALB and alpha-1-glycoprotein acid (AGP). Thus, the high binding of the same drug to either ALB or AGP, or to both, could have distinct impacts on the prediction of these PK/TK parameters. However, no study has yet explored how to simulate the difference between these impacts.

The main objective of this thesis is therefore to evaluate (with accuracy and precision) for a series of drugs, in the *in vivo* (or *in situ*) condition, these impacts in the presence of the two plasma proteins, jointly or separately. Also, it is important to verify if a generic model can be applied. This thesis is divided into three specific objectives. The first is to propose a decision tree to facilitate the selection of appropriate predictive approaches of  $CL_{h\text{in vivo}}$  for drugs with different characteristics. The second is to assess the impacts of extensive binding to the two plasma proteins ALB and AGP on the  $CL_h$  of two selected xenobiotics (perampanel (PER) and fluoxetine (FLU)); these drugs have strong affinities to both proteins and an exclusive (or predominant) metabolism in the liver. And the last objective is to develop and validate a new predictive model of  $CL_h$  for xenobiotics with the potential to bind extensively to ALB as well as to AGP.

Firstly, *in vitro* data obtained in humans were collected for 19 drugs (i.e. substrates of OAT2 and OATP1B1 transporters) and were then used in six *in vitro*-to-*in vivo* (IVIVE) extrapolation models to predict these PK/TK parameters. After a statistical comparison, the results showed that the approach 2 (i.e. ' $f_{u,p}$ -adjusted model') that is based on the ALB-facilitated hepatic uptake, had the best predictive performance. However, the approach 5 (i.e. 'Extended Clearance Model') that is based on the membrane transporter-mediated uptake, was very relevant to apply for the substrates of membrane transporters. These substrates would

potentially be less affected by ALB. Thus, a decision tree has been proposed to quickly and judiciously select the best IVIVE approach to predict  $CL_{h\ in\ vivo}$  for each xenobiotic in the presence of ALB.

Secondly, the PER and FLU drugs were selected from a data collection of 1907 drugs depending on certain criteria (exclusive or predominant metabolism in the liver, no transport facilitated by membrane transporters, high affinity for the two proteins ALB and AGP, and having a binding ratio between AGP and ALB close to the unity). This selection was made to conduct experiments using the isolated and perfused rat liver (IPRL) apparatus, in the presence, and in the absence of the ALB and AGP proteins (i.e. four IPRL scenarios). The IPRL results showed that PER is low to moderately metabolized (hepatic extraction= 0.2-0.7), while FLU is highly metabolized (hepatic extraction= 0.8-0.99). The Michaelis-Menten model was fitted to the obtained metabolic kinetics, and different parameters  $V_{max}$ ,  $K_m$  and  $K_{m,\ u}$  were obtained from the model. At low free concentrations for both drugs (i.e. therapeutic concentrations) and in the presence of plasma proteins, the values of unbound  $CL_{int}$  increased for PER (with ALB and the mixture of the two proteins (MIX)) and FLU (with ALB, AGP and MIX); when compared to those obtained from the protein-free scenario (except for PER with AGP, the unbound  $CL_{int}$  values decreased). In addition, the calculations of  $CL_{int}$  ratios (WITHOUT *versus* WITH protein) indicated the occurrence of a hepatic uptake facilitated by ALB or AGP. These ratios also helped in verifying whether the metabolic kinetics for PER and FLU followed either 'the free drug hypothesis' or that of 'plasma protein-facilitated hepatic uptake'.

Finally, a new predictive approach of  $CL_h$  (WO-to-MIX approach) was developed based on a new notion of fractional binding and incorporating new parameters such as the ALB bound fraction ( $f_{B-ALB}$ ) and the AGP bound fraction ( $f_{B-AGP}$ ) from the MIX scenario into the ' $f_{u_p}$ -adjusted model'. This model is based on the 'ALB-facilitated hepatic uptake'. Unlike the WO-to-MIX approach, the 'well-stirred model' is based on 'the free drug hypothesis'. Then, the  $V_{max}$  and  $K_m$  parameters that were obtained *in situ* for PER and FLU from the protein-free IPRL experiments, were used in combination with the  $f_{u_p}$ -adjusted input parameter for the ' $f_{u_p}$ -adjusted model' or with the free fraction ( $f_{u_p}$ ) for the 'well-stirred model'. A comparison of the two models' overall predictive performances was made. The predictive performances of the new model were promising for FLU, which showed the highest degree of 'ALB-mediated hepatic uptake', compared to the conventional



model. This WO-to-MIX approach is a first validation of a novel extrapolation model suggested for drugs such as FLU that bind to both ALB and AGP. The well-stirred model remains however a useful tool to predict the clearance for drugs such as PER. The prediction accuracy was lower for the latter drug probably because the ALB-mediated hepatic uptake does not seem to be maximal, and, hence, the use of  $f_{Up-adjusted}$  has overestimated its  $CLh_{in vivo}$ . Therefore, more work is needed particularly for PER.

This thesis shows that a generic approach to predict the  $CLh_{in vivo}$  does not exist. Nevertheless, the choice of an IVIVE approach with satisfactory predictive performances is now possible. The results of this thesis contribute to: 1) better understand the impacts on the PK/TK parameters of extensive drug binding to ALB and AGP; 2) choose the best predictive approach to  $CLh$  based on the affinity of xenobiotic (drug or contaminant) to each of the plasma proteins and the mechanisms involved in the liver; and 3) predict accurately and with precision the output  $CLh$  of xenobiotics that bind to the two plasma proteins. These IVIVE approaches for  $CLh$  can certainly be integrated into physiologically based PK/TK models for xenobiotics to improve the prediction of their pharmacokinetics and to accelerate the drug development process.

**Keywords:** Hepatic clearance, extensive plasma protein binding, pharmacokinetic interactions, albumin, alpha-1-acid glycoprotein, plasma protein-mediated uptake, membrane transporters, *in vitro-in vivo* extrapolation, isolated and perfused rat liver.

# Table des matières

Résumé .....	iii
Abstract .....	vii
Table des matières.....	x
Liste des tableaux .....	xv
Liste des figures .....	xvi
Liste des acronymes et des abréviations .....	xviii
PROBLÉMATIQUE .....	1
ÉTAT DES CONNAISSANCES .....	5
CHAPITRE 1. L'utilité des modèles prédictifs de la clairance hépatique dans le processus de découverte et de développement des médicaments .....	6
1.1. Mise en contexte .....	7
1.1.1. Processus de découverte et de développement d'un médicament.....	7
1.1.2. Hypothèse du médicament libre .....	10
1.1.3. Importance de la fraction libre et nouvelle tendance des médicaments approuvés.....	12
1.1.4. Compilation des données pharmacocinétiques pour les médicaments commercialisés .....	14
1.2. Modèles <i>in silico</i> de la clairance hépatique : définitions des paramètres et nouveaux défis.....	17
1.2.1. Anatomie architecturale et fonctions hépatiques .....	17
1.2.2. Modélisation PK de la clairance hépatique.....	18
1.2.3. Termes de clairance relatifs au foie .....	18
1.2.4. Les extrapolations <i>in vitro-in vivo</i> .....	19
1.3. Caractéristiques physiologiques des hépatocytes et hypothèses décrivant la captation facilitée dans le foie .....	25
1.3.1. La polarité de la membrane plasmique d'un hépatocyte.....	25
1.3.2. Les protéines plasmatiques dans le foie : des sinusoides au parenchyme .....	26
1.3.3. Hypothèses mécanistiques existantes pour expliquer la captation facilitée dans le foie .....	27
1.3.4. Modèles <i>in silico</i> de la clairance hépatique et captation hépatique médiée par les protéines ..	29

CHAPITRE 2. Un aperçu des principales caractéristiques structurales de l'albumine et de l'alpha-1-glycoprotéine acide, ainsi que des acides aminés dans les sites de liaison .....	32
2.1. Introduction .....	33
2.2. Connaissances actuelles sur l'albumine et de l'alpha-1-glycoprotéine acide.....	33
2.2.1. Albumine .....	33
2.2.2. Alpha-1-glycoprotéine acide .....	39
2.3. Liaison aux protéines plasmatiques.....	49
2.3.1 Mesure des fractions libres et liées dans le plasma et le sang .....	49
2.3.2. Liaison non linéaire à une seule protéine plasmatique .....	50
2.3.3. Liaison non linéaire à deux protéines plasmatiques.....	52
2.3.4. Principaux facteurs influençant la liaison aux protéines plasmatiques .....	53
2.3.5. Interactions entre xénobiotiques aux sites de liaison .....	54
2.4. La captation hépatique médiée par les protéines plasmatiques.....	56
2.4.1. Suggestion d'un modèle conceptuel : un résumé sur les mécanismes d'interaction potentiels entre les protéines plasmatiques chargées et la membrane plasmique sinusoïdale.....	56
2.4.2. Un résumé des facteurs potentiels influençant les interactions entre les protéines plasmatiques et les composants de la membrane plasmiques des hépatocytes.....	59
2.5. Variabilités inter-espèces en ALB et en AGP .....	61
2.6. Conclusion du chapitre 2.....	62
CHAPITRE 3. Contexte général de thèse.....	63
3.1. Lacunes dans la littérature .....	64
3.2. Objectifs .....	65
3.2.1. Objectif général.....	65
3.2.2. Objectifs spécifiques .....	65
3.3. Méthodologie générale.....	66
3.3.1. Sélection des médicaments.....	66
3.3.2. Experiences <i>in vitro</i> , <i>in situ</i> , <i>in silico</i> .....	69
ÉTUDES <i>IN VITRO</i> , <i>IN VIVO</i> , <i>IN SITU</i> ET <i>IN SILICO</i> .....	76

CHAPITRE 4. The potential protein-mediated hepatic uptake: discussion on the molecular interactions between albumin and the hepatocyte cell surface and their implications for the <i>in vitro-to-in vivo</i> extrapolations of hepatic clearance of drugs.....	77
4.1. Introduction .....	81
4.2. Albumin-mediated hepatic uptake.....	82
4.3. Integration of albumin-mediated uptake in hepatic clearance IVIVE models .....	92
4.3.1. $f_{Up}$ -adjusted model .....	93
4.3.2. 'Facilitated-dissociation' model (FDM) (revisited).....	94
4.3.3. $f_{Up}$ -adjusted model <i>versus</i> FDM .....	95
4.3.4. Other ALB-facilitated models .....	97
4.4. Molecular interactions .....	99
4.4.1. Albumin–ligand allosteric interactions .....	101
4.4.2. Albumin–lipid interactions .....	101
4.4.3. Albumin–protein interactions .....	103
4.5. New perspectives for more improvements in IVIVE-based predictions.....	106
4.5.1. Biopharmaceutics classification systems: a drug selection utility.....	106
4.5.2. The use of existing IVIVE approaches when accounting for the mediated uptake processes in the prediction of CLh .....	107
4.5.3. Further challenging the mediated- and influx uptake processes in the prediction of CLh.....	108
4.5.4. Fractional plasma binding.....	116
4.5.5. Decision tree: a guide for the use of $f_{Up}$ , $f_{Up}$ -adjusted in the conventional IVIVE model or the use of FDM .....	117
4.5.6. Expert opinion section .....	128
4.6. Conclusion .....	130
CHAPITRE 5. Impact of extensive plasma protein binding on the <i>in situ</i> hepatic uptake and clearance of perampanel and fluoxetine in Sprague Dawley rats. ....	140
5.1. Introduction .....	143
5.2. Methods .....	146

5.2.1. PK data compilation for marketed drugs .....	146
5.2.2. Drug candidates' selection.....	147
5.2.3. Chemicals and materials .....	148
5.2.4. Animals care and handling .....	148
5.2.5. Experimental design .....	150
5.2.6. Chemical analysis.....	153
5.2.7. Pharmacokinetic calculations .....	154
5.3. Results .....	157
5.3.1. In vitro binding kinetics .....	157
5.3.2. In situ metabolic kinetics from IPRL: hepatic rates and clearances .....	157
5.3.3. Protein-mediated uptake: extent of protein binding and hepatic metabolism.....	159
5.4. Discussion.....	160
5.4.1. Plasma protein binding and protein-mediated hepatic uptake .....	160
5.4.2. Impact of plasma proteins on the hepatic uptake and unbound clearances .....	164
5.5. Conclusion .....	166
CHAPITRE 6. Comparative assessment of extrapolation methods based on the conventional free drug hypothesis and plasma protein-mediated hepatic uptake theory for the hepatic clearance predictions of two drugs extensively bound to both albumin and alpha-1-acid glycoprotein.....	186
6.1. Introduction .....	189
6.2. Methods .....	193
6.3. Results .....	196
6.4. Discussion.....	197
6.5. Conclusion .....	201
DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES .....	209
CHAPITRE 7. Discussion.....	210
7.1. Discussion générale des résultats .....	211
7.2. Retombées du projet de thèse .....	218
7.2.1. Discussion de l'importance de la liaison plasmatique dans les études PK/TK .....	218

7.2.2. Approches <i>in silico</i> pour la captation et la clairance hépatiques .....	219
7.2.3. L'utilité des systèmes de classification en PK/TK et de l'arbre décisionnel pour sélectionner la bonne approche.....	220
7.3. Limitations .....	221
7.4. Nouvelles perspectives de recherche .....	223
7.5. Conclusion .....	229
Bibliographie .....	231
Annexes du chapitre 1 .....	i
Annexes du chapitre 2 .....	i
Annexes du chapitre 7 .....	xxxi

## Liste des tableaux

Tableau 1.1. Comparaison entre trois modèles IVIVE.....	30
Tableau 2.1. Résumé des caractéristiques distinctes de l'ALB et de l'AGP chez l'humain. ....	46
Table 4.1. An update on recent IVIVE studies that support an albumin-mediated hepatic uptake/transport phenomenon and albumin-modulating clearance since a previous summary was made by Poulin, Burczynski and Haddad ( <i>J. Pharm. Sci.</i> 105 (2):497-508). ....	84
Table 4.2. IVIVE models for hepatic clearance with the consideration of albumin-mediated uptake.....	93
Table 4.3. Possible explanations for the best predictive performance of CL <sub>h</sub> -IVIVE approaches for each drug according to figure 4.2G and figure 4.3 as well as the sections 4.5.3 and 4.5.5. ....	122
Table 5.1. Measured unbound fraction and binding ratios for perampanel that were determined in the RED experiment.....	172
Table 5.2. Measured unbound fraction and binding ratios for fluoxetine that were determined in the RED experiment.....	172
Table 5.3. Mean values of total clearances and unbound intrinsic clearance for perampanel obtained from IPRL. ....	173
Table 5.4. Mean values of total clearances and unbound intrinsic clearance for fluoxetine obtained from IPRL. ....	174
Table 5.5. Metabolic parameters for perampanel based on the results in Figures 5.3 and 5.5. ....	175
Table 5.6. Metabolic parameters for fluoxetine based on the results in Figures 5.4 and 5.6. ....	175
Table 6.1. A novel quantitative approach for hepatic clearance predictions. ....	204
Table 6.2. The PLR and $f_{U_p}$ -adjusted calculations for perampanel and fluoxetine. ....	205
Table 6.3. The predicted CL <sub>h in situ</sub> values according to the free drug hypothesis and the plasma protein-mediated hepatic uptake. ....	206
Table 6.4. The global predictive performances of CL <sub>h in situ</sub> for the two approaches and all drug concentrations. <sup>a</sup> .....	207

## Liste des figures

Figure 1.1. Le nombre de nouveaux médicaments approuvés et les dépenses en R&D en fonction du temps (tirée de Kaitin (2010)).	8
Figure 1.2. Le processus de développement d'un nouveau médicament (tirée de Andrade et al. (2016)).	10
Figure 1.3. La distribution de tous les médicaments approuvés par la FDA : A) entre 2003 et 2013 (tirée de Liu et al. (2014)) et B) entre janvier 2014 et décembre 2019 (données colligées dans le cadre de cette thèse (© Bteich Michel, Thèse 2020)).	13
Figure 1.4. Pourcentages des médicaments commercialisés selon leurs données pharmacocinétiques (© Bteich Michel, Thèse 2020).	16
Figure 1.5. Modèle conceptuel du foie correspondant au well-stirred model (venous equilibrium model) (tirée de Gabrielsson and Weiner (2016)).	21
Figure 1.6. L'exactitude des prédictions IVIVE en fonction de $f_{up}$ (tirée de C. M. Bowman and Benet (2018)).	23
Figure 1.7. Les différentes hypothèses émises pour expliquer la captation facilitée par l'ALB dans le foie (tirée de C. M. Bowman and Benet (2018)).	28
Figure 2.1. L'albumine humaine.	35
A) Illustration de la structure cristalline de l'ALB humaine (tirée de Sand et al. (2014)), B) le site I de Sudlow (tirée de Filip et al. (2013)) et C) le site II de Sudlow (tirée de Filip et al. (2013)).	35
Figure 2.2. L'alpha-1-glycoprotéine acide humaine non-glycosylée.	40
Figure 2.3. Les complexes de glycanes N-liés à l'alpha-1-glycoprotéine acide humaine (tirée de Fournier et al. (2000)).	43
Figure 2.4. Modèle conceptuel de la captation potentielle médiée par les protéines plasmatiques au niveau des sinusoides hépatiques (© Bteich Michel, Thèse 2020).	57
Figure 3.1. Quatre étapes pour la sélection finale des médicaments (© Bteich Michel, Thèse 2020).	67
Figure 3.2. Quatre scénarios <i>in vitro</i> pour étudier la cinétique de liaison à l'aide de la dialyse à l'équilibre rapide (© Bteich Michel, Thèse 2020).	71



Figure 3.3. Schéma représentatif du système de perfusion du foie isolé de rat (tiré de Bounakta et al. (2018)).	73
Figure 4.1. Total hepatic uptake and clearance of bound and free ligand (X).	100
Figure 4.2. Observed <i>versus</i> predicted plasma hepatic clearance using six CLh-IVIVE approaches.	110
Figure 4.3. Decision tree for predicting the hepatic clearance using either the $f_{up}$ or $f_{up-adjusted}$ parameters in CLh-IVIVE approaches, or using FDM when considering the combination of hepatic metabolism, influx transporters and extent of plasma protein binding.	118
Figure 5.1. Nonlinear binding kinetics for perampanel: Bound [PER] <i>versus</i> Free [PER].	176
Figure 5.2. Nonlinear binding kinetics for fluoxetine: Bound [FLU] <i>versus</i> Free [FLU].	177
Figure 5.3. Nonlinear metabolic kinetics for perampanel: Rate <i>versus</i> Total [PER] <sub>eq.</sub>	178
Figure 5.4. Nonlinear metabolic kinetics for fluoxetine: Rate <i>versus</i> Total [FLU] <sub>eq.</sub>	179
Figure 5.5. Nonlinear metabolic kinetics for perampanel: Rate <i>versus</i> Free [PER] <sub>eq.</sub>	180
Figure 5.6. Nonlinear metabolic kinetics for fluoxetine: Rate <i>versus</i> Free [FLU] <sub>eq.</sub>	181
Figure 6.1. Observed <i>versus</i> predicted <i>in situ</i> hepatic clearance using the conventional and the WO-to-MIX extrapolation approach.	208

## Liste des acronymes et des abréviations

Par souci d'uniformité, seuls les acronymes et les abréviations en anglais sont utilisés.

<b>AA</b>	Amino acids	<b>CL<sub>int</sub></b>	Intrinsic clearance
<b>AAFE</b>	absolute average fold error	<b>CL<sub>int, h</sub></b>	Overall hepatic intrinsic clearance
<b>AFE</b>	Average fold error		
<b>AGP</b>	Alpha-1-acid glycoprotein	<b>CL<sub>int, met</sub></b>	Metabolic intrinsic clearance
<b>ALB</b>	Albumin	<b>CL<sub>int, total uptake</sub></b>	Total uptake clearance that is the sum of passive diffusion and uptake <i>via</i> membrane transporters
<b>ASGP-R</b>	Asialoglycoprotein receptor		
<b>B<sub>max</sub></b>	Maximal binding capacity (binding kinetics for drugs)		
<b>B<sub>max</sub></b>	Capacity of ALB binding sites on the surface of hepatocytes (binding kinetics for ALB molecules in the liver)	<b>CL<sub>int, u</sub></b>	Unbound intrinsic clearance
		<b>E</b>	Hepatic extraction ratio
		<b>ECM</b>	Extended clearance model
		<b>f<sub>bound</sub></b>	Bound fraction of xenobiotic in plasma
<b>BSA</b>	Bovine serum albumin		
<b>C<sub>bound</sub></b>	Bound concentration of xenobiotic to the plasma protein	<b>f<sub>B-AGP</sub></b>	Fractional binding to AGP in the mixture medium
		<b>f<sub>B-ALB</sub></b>	fractional binding to ALB in the mixture medium
<b>C<sub>eq</sub></b>	Measured concentration at equilibrium from IPRL	<b>FcRn</b>	Neonatal Fc receptor
<b>C<sub>free</sub></b>	Free concentration of a xenobiotic	<b>FDM</b>	Facilitated-dissociation model
<b>C<sub>total</sub></b>	Total concentration of the xenobiotic	<b>FLU</b>	Fluoxetine
		<b>f<sub>u,inc</sub></b>	Unbound fraction in the incubation medium
<b>CL<sub>h</sub></b>	Hepatic clearance		
<b>CL<sub>h in vivo</sub></b>	<i>In vivo</i> hepatic clearance	<b>f<sub>u,b</sub></b>	Unbound fraction in blood

<b>fu<sub>inc</sub></b>	Unbound fraction in incubation medium	<b>OAT</b>	Organic anion transporter
<b>fu<sub>inc, mic</sub></b>	Unbound fraction in microsome assay	<b>OATP</b>	Organic anion transport polypeptide
<b>fu<sub>p</sub></b>	Unbound fraction in plasma	<b>ORM</b>	Orosomucoid
<b>fu<sub>p-adjusted</sub></b>	Adjusted unbound fraction in plasma to mimic the whole liver	<b>P<sub>B, influx</sub></b>	Permeability clearance for the unbound ligand dissociated from the ALB-ligand complex at the surface
<b>fu<sub>p-app</sub></b>	Apparent drug unbound fraction in plasma	<b>PD</b>	Pharmacodynamics
<b>HSA</b>	Human serum albumin	<b>PER</b>	Perampanel
<b>IgG</b>	Immunoglobulin G	<b>PK</b>	Pharmacokinetics
<b>IPRL</b>	Isolated and perfused rat liver	<b>PLR</b>	Plasma (or perfusate)-to-liver ratio of albumin concentrations
<b>IVIVE</b>	<i>In vitro-to-in vivo</i> extrapolation	<b>PLR<sub>MIX</sub></b>	Plasma-to-liver ratio of drug concentrations in the mixture scenario
<b>K<sub>A</sub></b>	Association coefficient		
<b>K<sub>D</sub></b>	Dissociation coefficient		
<b>K<sub>d,m</sub></b>	Dissociation constant of the bound ALB from the surface of hepatocytes	<b>P<sub>m</sub></b>	Permeability clearance for the unbound ligand
<b>K<sub>m</sub></b>	Michaelis constant for the total drug	<b>PPB</b>	Plasma protein binding
<b>K<sub>m, u</sub></b>	Michaelis constant for the free drug	<b>PS<sub>Passive</sub></b>	Intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx <i>via</i> simple diffusion
<b>MIX</b>	Mixture of plasma proteins	<b>PS<sub>Transporters</sub></b>	Membrane clearances for hepatic influx <i>via</i> passive and active uptake transporters
<b>N</b>	Maximal number of binding sites		

<b>PS<sub>u,inf</sub> (+)</b>	Uptake clearance for the unbound ligands in the presence of ALB	<b>R<sub>AGP: ALB</sub></b>	Apparent binding ratio between alpha-1-acid glycoprotein and albumin
<b>PS<sub>u,inf</sub> (-)</b>	Uptake clearance for the unbound ligands in the absence of ALB	<b>RMSE</b>	Root mean squared error
<b>PTM</b>	Post-translational modification	<b>R<sub>BP</sub></b>	Ratio of drug concentrations in blood to that in plasma
<b>QL</b>	Hepatic blood flow	<b>RED</b>	Rapid equilibrium dialysis
<b>R</b>	Ratio between total uptake clearance in the presence of ALB to that in the absence of ALB	<b>TK</b>	Toxicokinetics
		<b>V<sub>max</sub></b>	Maximum rate of enzymatic activity
		<b>WO</b>	Without plasma proteins

À Georgette,  
À Maria, Mirna, Misha, Maroun et Marco,  
À Toli, Lara, Bernard et Bacho,  
À Marcelle, Sandra, Tasha, Maya et Tony.

*Durant mon parcours doctoral, chaque jour était considéré comme le premier.*

*Prêt à apprendre, à vérifier et à tout recommencer.*

*Je suis passé au travers ! Alléluia !*

*« Il n'y a pas de but qui, sitôt atteint, ne soit déjà dépassé. » Edmond Jabès*

## Remerciements

Six ans bien investis après mon admission au programme... Voici venu le temps de quelques remerciements.

Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Sami Haddad, mon directeur de recherche à la maîtrise et au doctorat. Il m'a encadré dans la réalisation de plusieurs études passionnantes. Je lui suis reconnaissant pour son aide précieuse, sa supervision, son attitude positive, sa flexibilité et son sens de l'écoute dans les périodes les plus difficiles. Merci au professeur Haddad pour le temps qu'il a bien voulu me consacrer. Ce travail n'aurait jamais été possible sans sa rigueur scientifique et son soutien moral et financier m'ayant permis de représenter, à l'international et au Canada, le centre de recherche en santé publique (CReSP) anciennement connu sous le nom de l'institut de recherche en santé publique de l'Université de Montréal (IRSPUM).

Je remercie également mon codirecteur, Patrick Poulin, pour ses suggestions et ses apports enrichissants.

Merci à mon directeur et à mon codirecteur pour leurs idées novatrices en pharmacologie et en toxicologie. Leur expertise dans le domaine de modélisation pharmacocinétique m'a fait passer d'un simple étudiant en biochimie en un chercheur à esprit critique qui pose les bonnes questions en sciences et en éthique.

Je tiens ensuite à remercier tous mes collègues : Sara Bounakta, Sarah Piette, Honesty, Badr, Jessie, Denis, Rania, Imèn, Sandra, Marc Bossou, Jonathan et Marc Mantha, qui m'ont accompagné pendant mon parcours académique. Merci au groupe interdisciplinaire (Érica, Caline, Lara, Anthony et Inès) avec qui j'ai eu le grand plaisir de collaborer dans le cadre d'un petit projet sur la gouvernance de la nouvelle santé publique.

Merci à tous les professeurs de l'École de santé publique de l'Université de Montréal qui ont su m'orienter vers mes champs d'intérêt à travers leurs conférences, et me donner des références essentielles pour

pouvoir compléter ma formation. Un grand merci à Dre Alexandra Furtos et Louiza Mahrouche qui m'ont accueilli, chaleureusement, pendant deux sessions au Département de chimie. Merci pour leur générosité, leur rigueur scientifique et leur empathie professionnelle ! Je remercie également Dre Catherine Jumarie, directrice du TOXEN, à l'UQAM, et toute son équipe pour nous avoir inclus dans toutes leurs activités et communications (conférences et rencontres annuelles du TOXEN et du Chapitre Saint-Laurent). Leurs échanges favorisent par excellence le transfert de connaissances en santé publique.

Un grand merci à Marco V. le meilleur guide à Montréal, pour sa présence, sa patience, ses mots de sagesse et son empathie sociale. Je remercie très chaleureusement ma cousine Tasha, mes ami(e)s montréalais(es) Sarra (Moh et Frido), Ikram et Mireille ; mes amis ottaviens Fanny et Janvier (et leurs petits cannetons Noah et Raphaël) pour leur soutien indéfectible et leur amitié inconditionnelle.

Mes remerciements les plus cordiaux à ma famille – à qui je dédie cette thèse – qui m'a toujours soutenu et encouragé au cours de mes études. Un merci tout particulier à ma mère pour sa persévérance, sa présence et son amour inconditionnel. Sans ses efforts constants pour nous donner accès à l'instruction, cette thèse n'aurait jamais pu voir le jour. Elle peut en être fière !

Je tiens à remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada pour avoir financé notre projet. Merci à Dr. Jules Brodeur, au CReSP (anciennement connu sous le nom de l'IRSPUM) et à la « Society of Toxicology » de m'avoir accordé des bourses de déplacement afin que je puisse diffuser mes résultats en dehors de Montréal.

Enfin, je remercie les gouvernements du Canada et du Québec ainsi que les agences et les instituts de santé publique pour avoir déployé énormément d'effort pour protéger et sensibiliser la population pendant la pandémie COVID-19. Le virus SARS-CoV-2 nous a été une excellente leçon en santé publique au XXI<sup>e</sup> siècle.

# PROBLÉMATIQUE

La biotransformation d'un xénobiotique<sup>1</sup> dans le foie est un processus parmi les plus pertinents à étudier dans les phases précliniques et cliniques. L'efficacité fonctionnelle du foie, en ce qui concerne la biotransformation d'une substance mère donnée et l'excrétion de ses métabolites, est déterminée par la valeur de sa clairance hépatique. Toutefois, à cause de la multitude des facteurs, la variation de cette clairance hépatique est difficilement prédictible, ce qui est un problème majeur en pharmacocinétique/toxicocinétique (PK/TK). À titre d'exemples, les médicaments à fenêtre thérapeutique étroite (par ex. warfarine, digoxine, propafenone) et les contaminants environnementaux hautement lipophiles et bioaccumulables (par ex. phtalates, pesticides organochlorés, composés perfluorés) devraient être éliminés par le foie sans que leurs clairances hépatiques ne soient réduites, afin d'éviter toute manifestation d'effets néfastes dus à leurs plus longues durées de résidence dans le corps. Dans le cas où la valeur de la clairance est réduite, cela nécessitera un ajustement de dose pour ces médicaments, et une surveillance des doses internes de ces contaminants.

Un des facteurs importants qui sera étudié dans cette thèse est celui de la liaison ou du déplacement d'un xénobiotique des sites de protéines plasmatiques (Bohnert & Gan, 2013), dont la fraction libre ( $f_{u_p}$ ) est estimée par le rapport entre sa concentration libre ( $C_{free}$ ) et sa concentration totale ( $C_{tot}$ ) dans le plasma. Cette  $f_{u_p}$  est un facteur déterminant de l'efficacité du médicament et de la toxicité du contaminant. Par exemple, dans le cas d'un xénobiotique fortement lié aux protéines plasmatiques, sa  $f_{u_p}$  est très petite (0,001 à 0,05). Ainsi, une légère augmentation de la  $f_{u_p}$  dans le plasma, soit une hausse de 0,001 à 0,002, est déjà le double de la  $f_{u_p}$  initiale du xénobiotique. Cette augmentation de la  $f_{u_p}$  pourrait causer des répercussions significatives sur des paramètres pertinents en PK/TK tels que la clairance hépatique. En conséquence, la variation de la clairance hépatique pourrait, à son tour, se traduire en des effets néfastes sur la santé (Liu, Wright, & Hop, 2014).

---

<sup>1</sup> Xénobiotique désigne une substance étrangère au corps d'un être vivant.



Dans la littérature, on retrouve plusieurs modèles mathématiques empiriques qui ont été développés – il y a plus de trente ans – pour prédire la clairance hépatique dans les conditions *in vivo* ( $CL_{in\ vivo}$ ). Ces modèles se basent sur « l'hypothèse du xénobiotique libre », c'est-à-dire que seule la concentration libre ( $C_{free}$ ) d'un xénobiotique est disponible pour diffuser de l'espace extracellulaire à l'espace intracellulaire des hépatocytes. Jusqu'à présent, l'efficacité des modèles d'extrapolations *in vitro-in vivo* (IVIVE) servant à prédire la  $CL_{in\ vivo}$  à partir des tests *in vitro* (par ex. liaison aux protéines plasmatiques, microsomes, hépatocytes suspendus) s'ajoute à celle des premiers modèles empiriques (Houston, 1994; Houston & Carlile, 1997a; Iwatsubo T1, 1996; Iwatsubo et al., 1997; Obach, 1999). Les modèles IVIVE ont fait la preuve de leur utilité pour évaluer, de l'*in vitro* à l'*in vivo*, la valeur initiale de la  $CL_{in\ vivo}$  pour chaque médicament (ou contaminant en toxicologie), de même que la variation de cette valeur.

Malgré l'utilité de ces modèles, plusieurs études ont cependant démontré qu'il existe des divergences entre les valeurs prédites par les modèles IVIVE et celles observées en préclinique et clinique (Hallifax, Foster, & Houston, 2010; Obach, 1999; Riley, McGinnity, & Austin, 2005). Ces divergences sont généralement traduites par des sous-estimations et surestimations des valeurs prédites de  $CL_{in\ vivo}$  (C. M. Bowman & Benet, 2019; Riley et al., 2005). Pour tenter d'expliquer ces divergences et de faire des corrections appropriées, une autre hypothèse réémerge après avoir été mise de côté par les scientifiques. Cette hypothèse porte sur le phénomène de la captation<sup>2</sup> facilitée d'un xénobiotique par l'albumine (ALB) dans les hépatocytes (Forker & Luxon, 1983; Horie, Mizuma, Kasai, & Awazu, 1988; Ichikawa et al., 1992; Tsao, Sugiyama, Sawada, Iga, & Hanano, 1988). Ce phénomène de captation facilitée se base, principalement, sur les trois événements subséquents suivants : 1) l'interaction du complexe ALB-xénobiotique avec la membrane plasmique des hépatocytes ; 2) la dissociation du complexe ; et 3) le transport du xénobiotique libre dans les hépatocytes (c'est-à-dire diffusion simple ou transporteurs membranaires). Récemment, les nouvelles approches IVIVE de Poulin, Kenny, Hop, and Haddad (2012)

---

<sup>2</sup> Dans cette thèse, nous traduisons « uptake » par le terme « captation », lorsqu'il s'agit du processus « facilitated uptake » dans les hépatocytes.

et de Miyauchi et al. (2018) ont intégré cette hypothèse dans leurs modèles IVIVE en y introduisant de nouveaux paramètres intrants. Ces différents auteurs ont pu démontrer qu'il est possible de prédire la  $CLh_{in vivo}$  en considérant que l'ALB contribue à la captation facilitée des xénobiotiques dans les hépatocytes.

Chez les mammifères, on retrouve une grande variété de protéines membranaires et de protéines plasmatiques, incluant l'ALB. Alors, il serait intéressant de rechercher si d'autres protéines membranaires (transporteurs) ou protéines plasmatiques telles que l'alpha-1-glycoprotéine acide (AGP), permettant la liaison et le transport d'une grande variété de xénobiotiques dans le plasma ou au niveau de la membrane plasmique des hépatocytes, peuvent aussi contribuer à la clairance hépatique par un phénomène de captation facilitée dans les hépatocytes. Autrement dit, de pouvoir suggérer qu'un phénomène similaire à celui de l'ALB puisse aussi exister pour l'AGP. Pour ce faire, il serait nécessaire d'évaluer et de prédire les répercussions distinctes des liaisons de médicaments aux deux protéines sur leurs  $CLh_{in vivo}$ . Or, aucun modèle quantitatif PK/TK n'est encore développé pour évaluer l'impact de la forte liaison d'un xénobiotique à de multiples protéines plasmatiques ayant possiblement des mécanismes différents (par ex. ALB et AGP). Une des dimensions de cette recherche est de développer un tel modèle.

En résumé, la caractérisation des répercussions induites par la variation de la  $f_{up}$  sur la  $CLh_{in vivo}$  nécessitera plus de précision. Ainsi, dans le cadre de ce travail de recherche, nous tenterons d'évaluer les répercussions qui sont causées par les fortes liaisons des xénobiotiques dans le plasma, à différentes protéines plasmatiques (par ex. ALB et AGP) sur leurs  $CLh_{in vivo}$ . Les évaluations seront faites à l'aide de nouveaux modèles qui se baseront sur les mêmes principes des approches IVIVE existantes de Poulin, Kenny, et al. (2012) et de Miyauchi et al. (2018), mais en faisant les adaptations nécessaires.

Serait-il possible de raffiner les approches IVIVE existantes et de les adapter en de nouveaux modèles pour les médicaments qui sont des substrats de transporteurs membranaires et des ligands de l'ALB ? Serait-il possible de suggérer une captation facilitée potentielle pour l'AGP comme pour l'ALB ? Quels sont les paramètres nécessaires à intégrer dans le nouveau modèle pour les médicaments qui se lient à l'ALB et l'AGP ? C'est à ces questions que nous essayerons de répondre à travers la revue de littérature présentée dans les chapitres 1 et 2, ainsi qu'à travers la génération et l'utilisation de données *in vitro* (ou *in situ*) et le développement de modèles *in silico* afin de prédire des valeurs  $CLh_{in vivo}$ . Lesdites

valeurs prédites seront comparées avec celles observées *in vivo* (ou *in situ*) dans les chapitres 4, 5 et 6. Le développement, le raffinement ainsi que la validation des modèles *in silico* seront faits tout en mettant l'accent sur les contributions de la captation hépatique médiée par les transporteurs membranaires et les protéines plasmatiques des médicaments fortement liés dans le plasma.

# ÉTAT DES CONNAISSANCES

# **CHAPITRE 1. L'utilité des modèles prédictifs de la clairance hépatique dans le processus de découverte et de développement des médicaments**

## 1.1. Mise en contexte

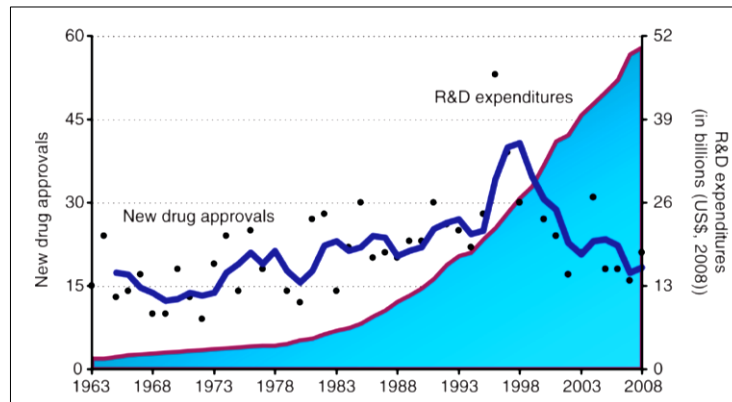
### 1.1.1. Processus de découverte et de développement d'un médicament

Les maladies chroniques, infectieuses et génétiques représentent toujours un fardeau significatif en santé publique. Cela est dû directement au manque de médicaments pour traiter ces maladies ou de les prévenir, et indirectement au manque d'efficacité du processus de découverte et de développement des médicaments. Bien qu'il y ait eu des améliorations pour accélérer l'approbation des nouvelles molécules médicinales, ledit processus reste toujours long, complexe et coûteux depuis la découverte d'un médicament jusqu'à son développement, avec peu de molécules qui sont approuvées et mises en marché (DiMasi, Grabowski, & Hansen, 2016; DiMasi, Hansen, & Grabowski, 2003).

Selon des estimations récentes, les coûts les plus élevés pour les compagnies pharmaceutiques sont attribuables, entre autres, aux multiples tests de toxicités (par ex. *in vivo*), de pharmacocinétique (ou ADME<sup>3</sup>) et aux évaluations de conformité exigées par la « Food and Drug Administration » (FDA) en recherche et au développement (R&D) pour chaque nouveau médicament (Figure 1.1) (DiMasi et al., 2016; DiMasi et al., 2003). Ainsi, le faible taux de réussite en R&D pourrait correspondre au nombre modeste de nouveaux médicaments qui respectent les exigences de conformité, et qui sont en conséquence approuvés par la FDA (Gilbert, Henske, & Singh, 2003).

---

<sup>3</sup> ADME : absorption, distribution, métabolisme et excrétion.



**Figure 1.1. Le nombre de nouveaux médicaments approuvés et les dépenses en R&D en fonction du temps (tirée de Kaitin (2010)).** Le nombre de médicaments approuvés est représenté par des points noirs et les dépenses en R&D (par tranche de 3 ans) sont représentées par la surface sous la courbe (en bleu clair). L'abscisse du nombre de nouveaux médicaments approuvés se trouve à gauche et l'abscisse des dépenses en R&D (en milliards USD) se trouve à droite.

*NOTE.* Figure 1.1 est tirée de Kaitin, K. I. (2010). Deconstructing the drug development process: the new face of innovation. Clin Pharmacol Ther, 87(3), 356-361, Figure 2. Doi: 10.1038/clpt.2009.293. Droit d'auteur © 2010. Reproduite avec l'autorisation de John Wiley and Sons, Inc. ; l'autorisation est obtenue par RightsLink®.

La meilleure stratégie pour réduire l'accroissement des coûts en R&D et d'augmenter la chance pour qu'un nouveau médicament soit approuvé dans des délais raisonnables serait donc en jumelant – dans un réseau d'innovation formé par les corps académiques, pharmaceutiques et agences publiques – les compétences professionnelles (par ex. créativité, crédibilité, savoir-faire et leadership) avec les bonnes méthodes interdisciplinaires (par ex. modélisation *in silico*) et les équipements de pointe (Jones et al., 2015; Kaitin, 2010).

Particulièrement, les modèles *in silico* ont plusieurs avantages liés à leur application. D'abord, lesdits modèles pourraient être appliqués pour simuler les résultats *in vivo* et ce, à différentes étapes du processus de développement d'un nouveau médicament (Figure 1.2). Et, ils s'avèrent utiles pour répondre à différents objectifs expérimentaux (par ex. études de la toxicité, de l'effet thérapeutique ou de la cinétique) dans différentes disciplines (par ex. pharmacologie, génétique, épidémiologie, hygiène, etc.). Ils sont peu coûteux et servent à l'application des stratégies « trois R » (c'est-à-dire raffinement des méthodes, remplacement et réduction du nombre d'animaux utilisés en R&D).

Dans le domaine de la pharmacocinétique<sup>4</sup> (PK), l'étude du métabolisme (et de la clairance hépatique) des médicaments se fait d'une part en phase préclinique chez plusieurs espèces primates et rongeurs pour des buts d'extrapolation, de raffinement des méthodes existantes et de comparaison inter-espèces (Figure 1.2). D'autre part, la PK est étudiée en phase clinique chez des volontaires (ou patients) dans le but de choisir la dose thérapeutique et de faire des ajustements appropriés, ainsi que de comprendre davantage les mécanismes biochimiques/physiologiques et les variabilités interindividuelles impliqués dans la biotransformation d'un médicament quelconque. Pendant ces deux phases, des tests préliminaires *in vitro* avec des protéines plasmatiques, des enzymes hépatiques et des hépatocytes sont souvent réalisés pour bien cerner le devis expérimental dans l'étude du métabolisme *in vivo* (ou *in situ*) et pour ensuite faire des prédictions *in silico* (Figure 1.2), par exemple pour produire des extrapolations *in vitro-in vivo* (IVIVE) des paramètres extrants tels que la clairance hépatique (CLh).

En relation avec le métabolisme hépatique, nous présentons dans les sous-sections suivantes **l'hypothèse du médicament libre (traduction de « free drug hypothesis »)** ainsi que des points saillants sur **la forte liaison** des médicaments aux protéines plasmatiques qui serait un enjeu majeur pour la prédiction *in silico* du métabolisme hépatique (et de la CLh).

---

<sup>4</sup> En toxicologie, on emploie le terme toxicocinétique au lieu de pharmacocinétique puisqu'il s'agit des études cinétiques des xénobiotiques toxiques.



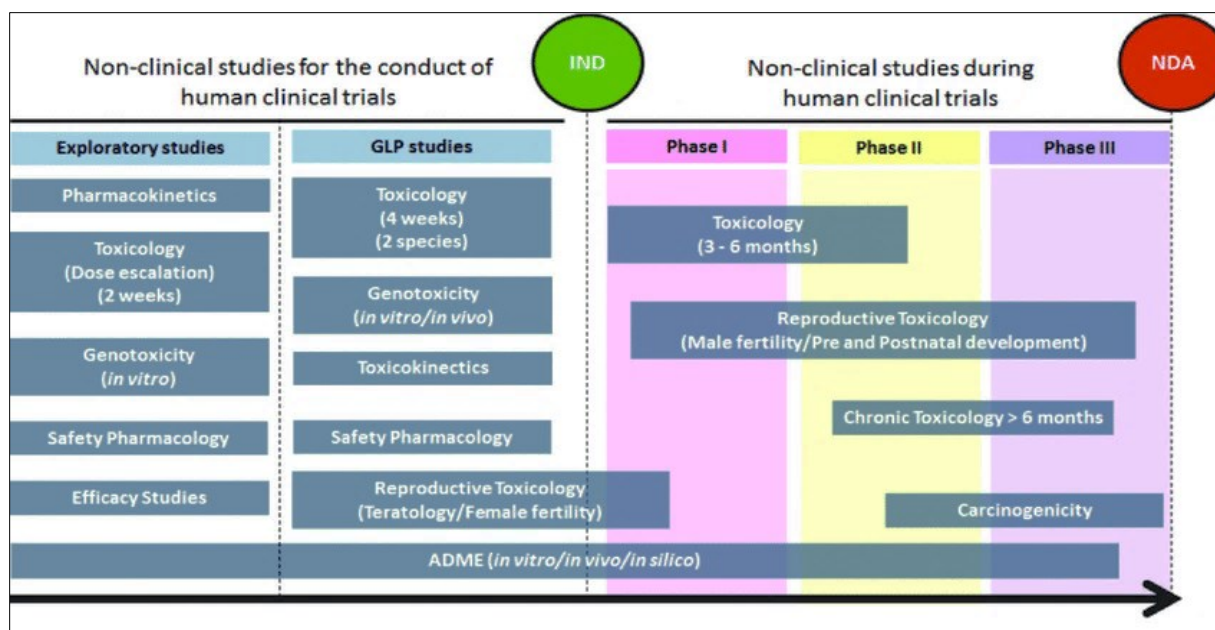


Figure 1.2. Le processus de développement d'un nouveau médicament (tirée de Andrade et al. (2016)).

**En anglais :** GLP Good laboratory practice; IND Investigational new drug; NDA New drug application; ADME absorption, distribution, metabolism and elimination.

NOTE. Figure 1.2 est tirée de Andrade, E. L., Bento, A. F., Cavalli, J., Oliveira, S. K., Schwanke, R. C., Siqueira, J. M., . . . Calixto, J. B. (2016). Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. *Braz J Med Biol Res*, 49(12), e5646, Figure 1. Doi: 10.1590/1414-431X20165646. Droit d'auteur © 2016. Reproduite avec l'autorisation de l'auteur João B. Calixto ; l'autorisation est obtenue par courriel en mars 2021.

### 1.1.2. Hypothèse du médicament libre

Les protéines plasmatiques ont des propriétés structurales et dynamiques qui leur permettent d'avoir une grande solubilité dans l'eau extracellulaire et intracellulaire (Butler, Blatt, & Southgate, 1935; Butler & Montgomery, 1932; Peters Jr., 1996b). Ainsi, un ligand ayant des caractéristiques hydrophobes qui se lie aux protéines plasmatiques peut avoir une solubilité accrue dans l'eau corporelle, qui constitue le composant majeur du plasma (Curry, 2009; Vallner, 1977). Cependant, les protéines plasmatiques ne peuvent pas traverser les membranes plasmiques cellulaires en raison de leur poids moléculaire élevé.

Ainsi, selon l'hypothèse du médicament libre, on présume que seule la concentration libre ( $C_{free}$ ) est disponible pour traverser les barrières biologiques (par ex. les biomembranes) (Brodie, Kurz, &

Schanker, 1960). La  $C_{free}$  est la concentration qui n'est liée ni aux protéines ni aux lipides dans le plasma, le sang ou les tissus ;  $C_{free}$  étant la somme des concentrations libres chargées et non chargées pour un même xénobiotique. Une fois que la molécule non liée traverse la barrière, elle se retrouve dans la matrice intracellulaire. **Un équilibre (ou état stationnaire)** est supposé être rapidement atteint entre les deux matrices, ce qui signifie théoriquement qu'il y aurait la même  $C_{free}$  dans l'espace extracellulaire que dans les cellules (Benet, Kroetz, & Sheiner, 1996).

De plus, selon cette hypothèse, la  $C_{free}$  du xénobiotique distribué exerce ses effets sur des cibles physiologiques (c'est-à-dire récepteurs, cellules, tissus, etc.) en fonction des facteurs influençant l'ampleur des effets, tels que les caractéristiques physico-chimiques du ligand et les conditions physiologiques de l'environnement capillaire/cellulaire (Trainor, 2007). Cependant, pour les médicaments chargés (positivement ou négativement), il a été démontré qu'un effet de gradient de pH influencerait la distribution de la  $C_{free}$  dans la phase aqueuse des deux côtés de la membrane et que, par conséquent, la  $C_{free}$  dans les cellules divergerait de la  $C_{free}$  dans l'espace extracellulaire (Mateus, Matsson, & Artursson, 2013; Poulin, 2015).

De toute évidence, le degré de la liaison aux protéines plasmatiques (PPB) influencerait également la disposition du ligand (distribution, métabolisme et excrétion), après son absorption dans l'organisme (Curry, 2009; Howard, Hill, Galluppi, & McLean, 2010; Jusko & Gretch, 1976). Par exemple, la formation du complexe protéine-ligand augmenterait le temps de rétention *in vivo* du ligand (c'est-à-dire le temps de séjour moyen, la demi-vie) (Trainor, 2007). Ainsi, l'augmentation de l'affinité de la liaison d'un xénobiotique aux protéines plasmatiques diminuerait **l'ampleur de l'effet à court terme** qui est normalement manifesté par ce xénobiotique (Lehman-McKeeman, 2013). En outre, la liaison aux protéines plasmatiques prolongerait **la durée de l'effet thérapeutique** si le ligand est un médicament. Cependant, si le médicament non lié possède une fenêtre thérapeutique étroite et que son temps de résidence moyen dans le corps augmente, un effet toxique peut très probablement se manifester (Howard et al., 2010). Ainsi, la PPB (et ses variations) est un facteur clé à prendre en compte dans le processus de découverte et de développement de médicaments (Bailey & Briggs, 2004; Fanali et al., 2012).

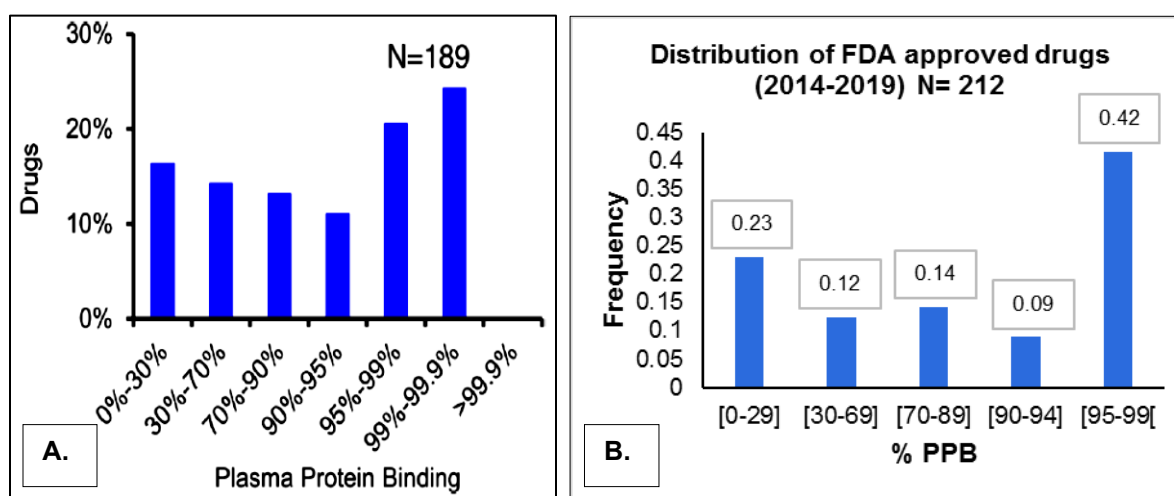
Par ailleurs, les recherches sur la liaison plasmatique doivent être particulièrement axées sur les xénobiotiques qui sont **fortement liés aux protéines plasmatiques** et pour lesquels les modifications les plus minimales de la liaison peuvent entraîner des modifications significatives des profils pharmacocinétiques/pharmacodynamiques (PK/PD) de pertinence clinique. Des observations expérimentales sont maintenant disponibles sur la captation hépatique médiée (ou facilitée) par les protéines plasmatiques (Da-Silva et al., 2018; Miyauchi et al., 2018; Poulin, Burczynski, & Haddad, 2016; Poulin & Haddad, 2018). Ce phénomène de facilitation est en contradiction avec « l'hypothèse du médicament libre » selon laquelle seule la  $C_{free}$  non chargée serait distribuée dans l'espace intracellulaire selon l'équilibre maintenu. En fait, outre l'importance de la  $C_{free}$ , cette facilitation rend encore plus pertinente l'implication de la concentration liée ( $C_{bound}$ ) de médicament aux protéines plasmatiques dans les études PK/PD en raison de la contribution potentielle de la dissociation du complexe protéine-médicament à la captation hépatique du médicament, comme un apport supplémentaire en médicament libre aux hépatocytes (Poulin et al., 2016).

### **1.1.3. Importance de la fraction libre et nouvelle tendance des médicaments approuvés**

En pharmacologie et en toxicologie, l'efficacité du médicament et la toxicité du contaminant sont déterminées par leurs valeurs de  $C_{free}$ , plutôt que leurs concentrations totales ( $C_{tot}$ ) dans le plasma. Le terme  $C_{tot}$  correspond à la somme de  $C_{bound}$  et  $C_{free}$ . De plus, la fraction libre ( $f_{up}$ ) d'un xénobiotique est estimée par le rapport entre sa concentration libre et sa concentration totale dans le sang (ou le plasma). Tel que mentionné, la PPB est l'un de ces facteurs qui pourraient affecter la pharmacocinétique/toxicocinétique (PK/TK) du médicament ou du contaminant, voire l'efficacité ou la toxicité de chacun, respectivement (Bohnert & Gan, 2013).

Plus particulièrement, dans le cas d'un xénobiotique fortement lié aux protéines plasmatiques, sa  $f_{up}$  est très petite (par ex. 0.001). Ainsi, une légère augmentation de la fraction libre dans le sang, soit une hausse de 0.001, est déjà le double de la fraction libre dans le sang. Cette augmentation de fraction libre indique une augmentation importante de la  $C_{free}$ , ce qui pourrait causer des répercussions significatives sur des variables d'importance en PK/TK telles que la valeur *in vivo* de CL<sub>h</sub>. En conséquence, les variations de la CL<sub>h</sub> *in vivo* pourraient, à leur tour, se traduire en des effets néfastes sur la santé (Liu et al., 2014).

Malgré que les fluctuations de la  $f_{up}$  des médicaments fortement liés soient considérées problématiques, les auteurs Liu et al. (2014) mentionnent que plus de 45 % des 189 médicaments approuvés par la FDA, entre 2003 et 2013, sont fortement liés aux protéines plasmatiques chez l'humain (% liaison PPB  $\geq 95\%$ ) (Figure 1.3.A). Tandis qu'avant l'an 2003, seulement 30 % des médicaments approuvés étaient fortement liés aux protéines plasmatiques. Ainsi, cela indique qu'après l'an 2003, les médicaments ayant une caractéristique de forte PPB ont une fréquence de plus en plus importante dans la distribution de médicaments approuvés par la FDA.



**Figure 1.3. La distribution de tous les médicaments approuvés par la FDA : A) entre 2003 et 2013 (tirée de Liu et al. (2014)) et B) entre janvier 2014 et décembre 2019 (données colligées dans le cadre de cette thèse (© Bteich Michel, Thèse 2020)).**

*NOTE.* Figure 1.3.A est tirée de Liu, X., Wright, M., & Hop, C. E. (2014). Rational use of plasma protein and tissue binding data in drug design. *J Med Chem*, 57(20), 8238-8248, Figure 1. Doi: 10.1021/jm5007935. Droit d'auteur © 2014. Reproduite avec l'autorisation de American Chemical Society ; l'autorisation est obtenue par RightsLink®.

Dans la même perspective, nous avons compilé les données PPB pour les médicaments récemment approuvés par la FDA de 2014 à 2019 (N= 212 médicaments ; Figure 1.3.B). Une tendance similaire à celle démontrée par Liu et al. (2014) est observée pour les nouvelles entités moléculaires récemment approuvées. Au cours de cette période (de 2014 à 2019), environ 50 % des médicaments

approuvés ont un taux PPB % supérieur ou égal à 90 %. La fréquence importante des médicaments fortement liés aux protéines plasmatiques vient à l'appui de la nécessité d'examiner l'étendue de la PPB et ses répercussions sur la PK/TK (c'est-à-dire la captation facilitée du médicament dans le foie et les répercussions sur les valeurs de la CLh) dans le processus de découverte et développement des médicaments. Les modèles *in silico* nous semblent un excellent outil pour explorer davantage lesdites répercussions.

Nous identifions dans la sous-section ci-après quels sont, parmi les médicaments déjà commercialisés, ceux qui ont les deux caractéristiques pharmacocinétiques suivantes : 1) fortement liés dans le plasma (et à quelles protéines plasmatiques) et 2) métabolisés majoritairement/exclusivement dans le foie.

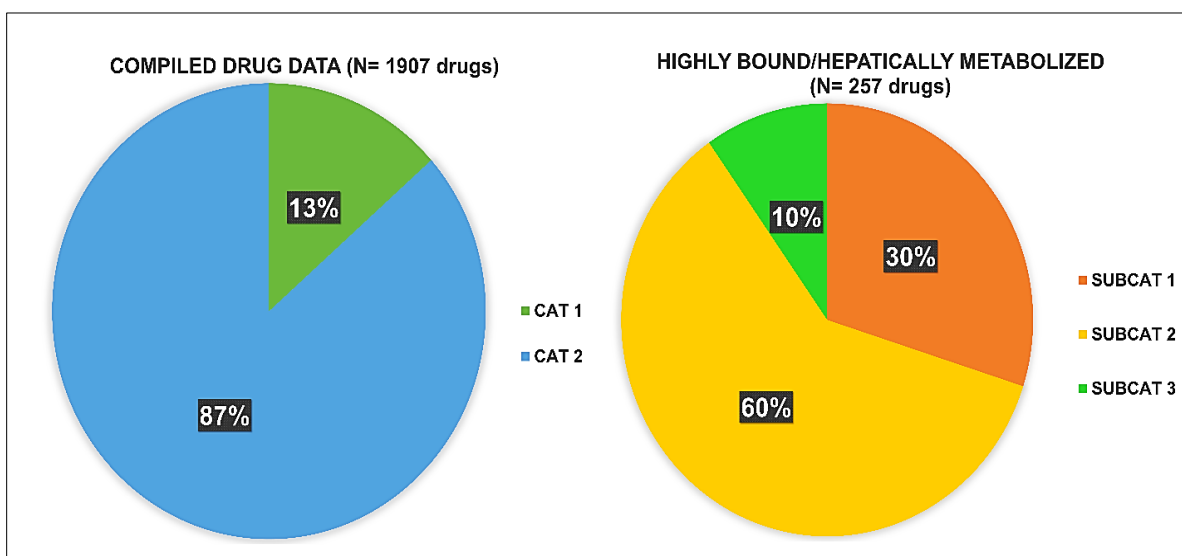
#### **1.1.4. Compilation des données pharmacocinétiques pour les médicaments commercialisés**

Aux fins d'une sélection ultérieure de médicaments candidats dans cette thèse (chapitres 5 et 6), les données PK obtenues chez les humains ayant un bon état de santé, pour des médicaments déjà commercialisés (N= 1907 médicaments), ont été compilées à partir des principales références suivantes : Benet, Broccatelli, and Oprea (2011); Dollery and Boobis (1999); Goodman, Brunton, Chabner, and Knollmann (2011); Hosey, Chan, and Benet (2016); Israili and Dayton (2001); Lexi-Comp (2013, 2016); Manallack (2009); Thummel, Shen, and Isoherranen (2017); C. Y. Wu and Benet (2005). Une recherche avancée a également été effectuée pour de nombreux médicaments afin de trouver les données manquantes du taux PPB %, en utilisant les mots clés suivants dans les bases de données Medline, [www.medicines.org.uk](http://www.medicines.org.uk), [www.accessdata.gov](http://www.accessdata.gov) et google scholar : [drug's NAME] & [albumin]; [drug's NAME] & [orosomucoid]; [drug's NAME] & [alpha-1-acid glycoprotein]; [plasma protein binding]. Cette compilation de données a été débutée à l'automne 2014 et elle a été finalisée à l'automne 2016.

Les médicaments déjà commercialisés sont classés en deux catégories (CAT) principales : la première (CAT 1 ; 13%) renferme les médicaments avec un taux élevé de PPB % ( $\geq 95$  %) et pour lesquels le métabolisme hépatique est la principale voie d'élimination (ou exclusive), et la deuxième (CAT 2 ; 87%) renferme les autres médicaments ayant un faible à moyen taux de PPB % ou n'ayant aucune information

disponible sur leurs valeurs de PPB %. Les critères d'inclusion et d'exclusion sont énumérés dans la [figure 3.1](#) de la section méthodologie générale.

L'albumine (ALB) et l'alpha-1-glycoprotéine acide (AGP) partagent le rôle clé de la liaison réversible et du transport d'une grande variété de ligands exogènes (par ex. des médicaments) et endogènes (par ex. bilirubine) dans la circulation sanguine. Ainsi, les médicaments de « CAT 1 » (N= 257) sont ensuite classés dans les trois sous-catégories (SUBCAT) suivantes : (SUBCAT 1 ; 30 %) cette première renferme les médicaments fortement liés dans le plasma, et principalement à la fois à l'ALB et à l'AGP ; (SUBCAT 2 ; 60 %) cette deuxième renferme les médicaments fortement liés à l'ALB ; et (SUBCAT 3 ; 10 %) cette troisième renferme les médicaments liés à d'autres protéines plasmatiques (par ex. lipoprotéines, transcortine ou autres globulines) ou lorsqu'aucune information n'était pas disponible pour indiquer à quelle protéine plasmatique les médicaments pouvaient se lier. Les pourcentages des médicaments attribués à chacune des catégories et sous-catégories sont présentés dans la figure 1.4 ci-après. Cette figure nous montre que la majorité des médicaments de la CAT 1 qui sont fortement liés dans le plasma préfère se lier spécifiquement à l'ALB.



**Figure 1.4. Pourcentages des médicaments commercialisés selon leurs données pharmacocinétiques (© Bteich Michel, Thèse 2020).**

Le diagramme circulaire (à gauche) représente la classification des médicaments commercialisés (N=1907 médicaments) en deux catégories « CAT 1 et CAT 2 ». La « CAT 1 » renferme environ 13 % des médicaments ayant une valeur élevée de PPB (c'est-à-dire fortement liés dans le plasma) et sont métabolisés majoritairement/exclusivement dans le foie (N= 257 médicaments). Tandis que la « CAT 2 » renferme environ 87 % des médicaments dont le PPB est faible à moyen (ou aucune information sur le PPB n'est disponible). Le diagramme circulaire (à droite) représente la classification des médicaments de « CAT 1 » en trois sous-catégories « SUBCAT 1 » (30%), « SUBCAT 2 » (60%) et « SUBCAT 3 » (10%), selon qu'ils soient respectivement fortement lié dans le plasma (c'est-à-dire à ALB et AGP), à ALB uniquement, et à d'autres protéines plasmatiques.

## 1.2. Modèles *in silico* de la clairance hépatique : définitions des paramètres et nouveaux défis

### 1.2.1. Anatomie architecturale et fonctions hépatiques

Le foie, formé de deux lobes droit et gauche, est une glande volumineuse exocrine et endocrine se situant dans la cavité abdominale sous le pôle diaphragmatique droit (C. R. Gandhi, 2014). Les 75% à 80% de l'apport sanguin (riche en nutriments) sont en provenance de la veine porte et le reste (~25% de sang oxygéné) est apporté par l'artère hépatique en provenance du tronc cœliaque de l'aorte (C. R. Gandhi, 2014; Godoy et al., 2013; Haddad, Poulin, & Funk, 2010; Mitra & Metcalf, 2012). Les deux vaisseaux sanguins fusionnent, en amont de la veine centrale, pour donner naissance à une structure capillaire nommée le sinusoïde ; ils forment une triade avec la voie biliaire (C. R. Gandhi, 2014). Un cylindre de parenchyme hépatique va permettre les échanges de sang dans le sinusoïde et le contrôle de la composition du sang à travers la veine hépatique (C. R. Gandhi, 2014; Godoy et al., 2013). Entre les rangées d'hépatocytes et les sinusoïdes, il y a un espace péricapillaire dénommé l'espace de Disse. Il est traversé par des microvillosités d'hépatocytes qui augmentent la surface d'échange, alors que du côté sinusoidal, il existe une paroi de cellules endothéliales ayant des fenestrations qui facilitent la percolation du plasma vers l'espace de Disse, voire les échanges des substances chimiques avec les hépatocytes (C. R. Gandhi, 2014; Godoy et al., 2013).

Un lobule est l'unité fonctionnelle hépatique, composée des hépatocytes (cellules parenchymateuses) qui représentent les 65% de l'ensemble de ces cellules et 90% du parenchyme hépatique (C. R. Gandhi, 2014). Un lobule hépatique est représenté sous une forme géométrique hexagonale en modélisation PBPK (M. E. Andersen, Eklund, Mills, Barton, & Birnbaum, 1997; C. R. Gandhi, 2014; Godoy et al., 2013; Haddad et al., 2010). Une moyenne de 22 hépatocytes forme une rangée, tout au long de trois zones distinctes (c'est-à-dire zone 1 : périportale, zone 2 : médiolobulaire et zone 3 : centrolobulaire) formant l'acinus. L'acinus hépatique est basé sur les caractères fonctionnels de l'architecture vasculaire du foie ; son axe central (c'est-à-dire zone 3) est formé par les cloisons délimitant la périphérie du lobule. L'acinus hépatique est caractérisé par une régionalisation métabolique due aux différences d'activités métaboliques exercées par les hépatocytes en fonction de leur position. Par exemple, la zone 3 ou centrolobulaire étant la plus riche en enzyme cytochrome P450 (M. E. Andersen et al., 1997; Godoy et al., 2013; Haddad et al., 2010) est spécialisée dans le métabolisme oxydatif et la



néoglucogénèse, alors que la zone 1, riche en enzymes CYP2E1 et en transférases, assure préférentiellement la glycolyse, la biotransformation des xénobiotiques (c'est-à-dire conjugaison) et le métabolisme de l'alcool (Godoy et al., 2013).

### **1.2.2. Modélisation PK de la clairance hépatique**

La modélisation PK est une discipline en émergence depuis quelques dizaines années, impliquant l'élaboration de différents modèles de nature qualitative (c'est-à-dire représentation conceptuelle) et quantitative (c'est-à-dire équation différentielle) (K. Krishnan, Andersen, M., 2010). Un modèle est une représentation simplifiée d'un système, d'une entité ou d'un processus possédant au moins un compartiment, afin de reproduire et/ou de simuler la structure, la fonction et tous les mécanismes interrelationnels possibles dans des circonstances particulières (Jones, Gardner, & Watson, 2009; K. Krishnan, Andersen, M., 2010). Tel que mentionné, le foie est l'organe fonctionnant principalement comme un site de métabolisme et d'excrétion (Wilkinson, 1987), d'où son importance comme un organe (ou compartiment) idéal à impliquer dans une approche de modélisation PK/TK – surtout dans les extrapolations *in vitro-in vivo* (Houston & Carlile, 1997a). Ainsi, nous décrivons ci-après les termes de clairance pour une meilleure compréhension des applications des approches prédictives des clairances relatives au foie.

### **1.2.3. Termes de clairance relatifs au foie**

Les termes de clairance sont développés par des chercheurs en physiologie du système rénal dans les années 1930 pour l'étude du fonctionnement de l'excrétion rénale. Cependant, ce terme a été adopté pour d'autres organes que les reins (Poulin, Kenny, et al., 2012; Wilkinson, 1987). Du fait de la position du foie en aval de la circulation sanguine intestinale, les xénobiotiques pourraient subir un effet de premier passage dans les hépatocytes (Haddad et al., 2010). Donc, la prédiction de ces clairances relatives au foie évalue l'efficacité d'élimination des xénobiotiques dans certaines conditions de biotransformation (G. Camenisch & Umehara, 2012; Haddad et al., 2010; Jones et al., 2009; Kato, Chiba, Ito, Koue, & Sugiyama, 2010; K. Krishnan, Andersen, M., 2010; Poulin & Haddad, 2013; Poulin, Kenny, et al., 2012; Umehara & Camenisch, 2012; Valcke & Krishnan, 2011, 2013; Valcke, Nong, & Krishnan, 2012; Wilkinson, 1987). Deux sortes de clairance sont alors à définir : la clairance intrinsèque ( $CL_{int}$ ) et la clairance hépatique

(CLh). La clairance intrinsèque ( $CL_{int}$ ) est la capacité inhérente du foie à métaboliser les xénobiotiques de l'espace intracellulaire, grâce aux processus de biotransformation exécutés par les enzymes hépatiques (par ex. le cytochrome P450). La  $CL_{int}$  est calculée suivant l'équation 1 (adaptée de celle de Michaelis-Menten) :

$$CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m + S} \quad (\text{L/min}) \quad \text{Équation 1}$$

où le terme S désigne la concentration libre du substrat, le terme  $V_{max}$  est la vitesse maximale de l'activité enzymatique, et le  $K_m$  est la constante de Michaelis pour l'enzyme (inversement proportionnelle à l'affinité du substrat au site de l'enzyme) (Wilkinson, 1987). Lorsque la concentration libre du xénobiotique est plus faible que son  $K_m$  (c'est-à-dire  $S \leq 10\% K_m$  (Houston & Carlile, 1997a)), le terme de clairance intrinsèque équivaut à  $CL_{int} = \frac{V_{max}}{K_m}$  (L/min) et le métabolisme devient un mécanisme linéaire ou de 1<sup>er</sup> ordre (G. Camenisch & Umehara, 2012; Haddad et al., 2010; Houston & Carlile, 1997a; Umehara & Camenisch, 2012; Wilkinson, 1987). Ces conditions de cinétique linéaire s'appliquent sur des xénobiotiques à de basses concentrations (ou thérapeutiques). La CLh, quant à elle, est le volume de sang ou plasma qui est nettoyé du xénobiotique par unité de temps (en L/hr ou L/min) par le foie. En d'autres termes, la CLh représente le taux d'élimination d'un xénobiotique par cet organe et s'exprime comme le produit du débit sanguin hépatique ( $Q_L$ ) et du taux d'extraction E (Éq. 2).

$$CLh = Q_L \times E \quad (\text{L/min}) \quad \text{Équation 2}$$

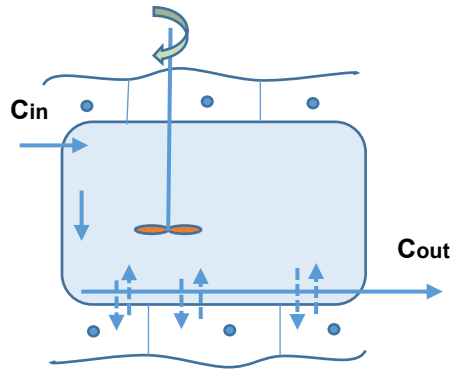
Où E signifie l'extraction hépatique. Le débit hépatique moyen  $Q_L$ , chez l'adulte, est de 1.35 L/min soit 25% du débit cardiaque (K. Krishnan, Andersen, M., 2010).

#### 1.2.4. Les extrapolations *in vitro-in vivo*

Les essais *in vitro* sont considérés comme des méthodes alternatives aux systèmes réels (c'est-à-dire organismes vivants). Les paramètres trouvés *in vitro* sont utilisés comme paramètres intrants dans les modèles IVIVE qui pourraient être optimisés pour réduire l'écart entre les observations *in vitro* et *in vivo*.

Ainsi, beaucoup de progrès dans le domaine de la modélisation quantitative ont été réalisés depuis les premières applications des concepts de clairance hépatique dans les années 70 en utilisant des modèles empiriques : le « well-stirred », le « parallel-tube », ceux de dispersion et de distribution (Pang &

Rowland, 1977a, 1977b; M. Rowland, Benet, & Graham, 1973; Wilkinson, 1987; Wilkinson & Shand, 1975). Le « well-stirred » est souvent appliqué pour simuler la  $CL_{h_{in vivo}}$  grâce à : sa simplicité, sa performance prédictive et le nombre de paramètre intrant à utiliser. Son modèle conceptuel est présenté dans la figure 1.5 ci-après.



**Figure 1.5. Modèle conceptuel du foie correspondant au well-stirred model (venous equilibrium model) (inspirée de Gabrielsson and Weiner (2016)).** Le compartiment représente le sinusoïde dans lequel passe le médicament dissout dans un volume de sang, pour ensuite être distribué et métabolisé dans les hépatocytes où un état stationnaire est supposément maintenu. Les flèches bleues représentent les échanges en molécules de médicament entre le sang (ou plasma) et les hépatocytes qui sont placés en rangée autour du sinusoïde.  $C_{in}$  est la concentration du médicament entrant dans le foie et  $C_{out}$  est la concentration du médicament sortant du foie.

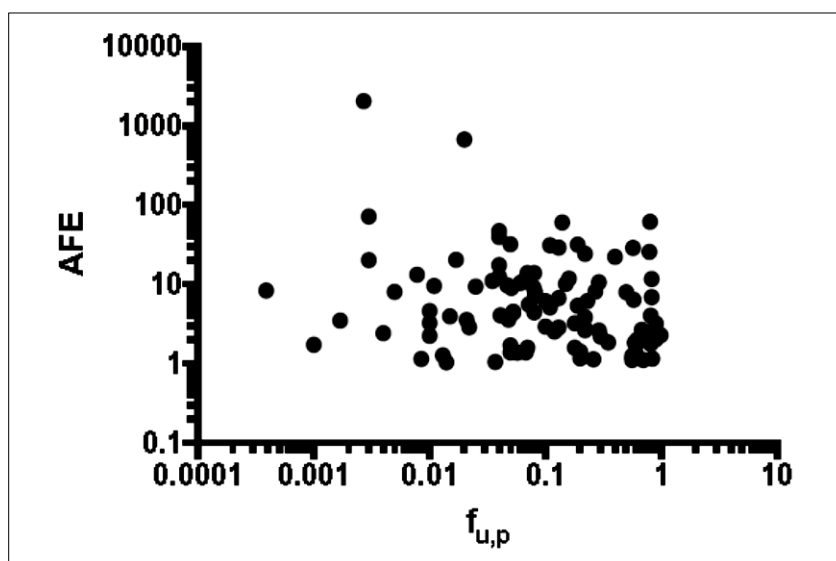
Il est très courant de calculer la  $CL_{int-in vivo}$  et de l'extrapoler aux conditions *in vivo* (Éq. 3), en utilisant des facteurs d'extrapolation (scaling factors) adéquats (c'est-à-dire des valeurs en teneur d'enzymes dans les microsomes ou du nombre d'hépatocytes extrapolées au foie entier) (Pang & Chiba, 1994). À noter, la concentration du substrat dans l'Éq. 1 est substituée par le terme  $C_{eq}$ , soit la concentration plasmatique libre à la sortie du foie qui est présumée être en équilibre avec celle du compartiment hépatique (dans l'Éq. 3). Ensuite, le taux d'extraction hépatique (E) est calculé à partir de la  $CL_{int-in vivo}$ , de la fraction non liée dans le sang ( $f_{ub}$ ) et du débit sanguin hépatique ( $Q_L$ ) (Éq. 4). Cette dernière équation est celle du modèle « well-stirred », une méthode empirique qui donne des résultats satisfaisants d'extrapolation pour le foie entier (Houston & Carlile, 1997a, 1997b).

$$CL_{int-in vivo} = CL_{int-in vitro} \times \text{scaling factors} = \frac{V_{max}}{K_m + C_{eq}} \times \text{scaling factors} \quad \text{Équation 3}$$

$$E = \frac{f_{ub} \cdot CL_{int-in vivo}}{Q_L + f_{ub} \cdot CL_{int-in vivo}} \quad \text{Équation 4}$$

Parmi ses avantages, le modèle « well-stirred » d'élimination est le plus simple des modèles de prédiction du ratio d'extraction. Par ailleurs, les auteurs Benet, Liu, and Wolfe (2017) interprètent et affirment que le ratio d'extraction  $E$  obtenu à partir de modèles isolés et perfusés (par ex. le foie isolé et perfusé qui est une expérience *in situ*) est un concept cohérent avec le modèle « well-stirred ».

Malgré les résultats satisfaisants dans les prédictions IVIVE de  $CL_{int-in vivo}$  en utilisant le modèle « well-stirred » (Ito and Houston 2004), de plus en plus d'études rapportent une sous-estimation significative des valeurs de  $CL_{int}$  (et de  $CL_h$ ) lors de l'utilisation de données *in vitro* (c'est-à-dire microsomes, hépatocytes) (Hallifax et al., 2010; Obach, 1999; Riley et al., 2005). Ces sous-estimations sont plus fréquemment observées pour les médicaments fortement liés dans le plasma (Figure 1.6). Avec le manque de modèles adaptés pour décrire les mécanismes derrière ces sous-estimations, la prédiction des paramètres  $CL_{int}$  et  $CL_h$  est une tâche très difficile pour les chercheurs.



**Figure 1.6. L'exactitude des prédictions IVIVE en fonction de  $f_{u,p}$  (tirée de C. M. Bowman and Benet (2018)).**

La marge d'erreur (AFE) des prédictions de  $CL_{int-in vivo}$  (et de  $CL_{h in vivo}$ ) augmente lorsque les valeurs de la  $f_{u,p}$  des médicaments se trouvent dans l'étendue (0.001-0.01). Cela indique que des sous-estimations de  $CL_{int-in vivo}$  (et de  $CL_{h in vivo}$ ) sont plus probables pour ces médicaments fortement liés dans le plasma.

*NOTE.* Figure 1.6 est tirée de Bowman, C. M., & Benet, L. Z. (2018). An examination of protein binding and protein-facilitated uptake relating to in vitro-in vivo extrapolation. *Eur J Pharm Sci*, 123, 502-514, Figure 4. Doi: 10.1016/j.ejps.2018.08.008. Droit d'auteur © 2018. Reproduite avec l'autorisation de Elsevier ; l'autorisation est obtenue par RightsLink®.

Selon Riley et al. (2005), les sous-estimations à partir des deux méthodes « direct scaling » et conventionnelles se basant sur l'**hypothèse du médicament libre** sont attribuées à une liaison non spécifique dans le milieu d'incubation. Ainsi, des corrections ont été apportées en introduisant, dans le modèle « well-stirred », un nouveau terme représentant la fraction non liée dans le milieu d'incubation ( $f_{u,inc}$ ) (Éq. 5). Ce dernier terme a été introduit pour la première fois dans les prédictions de clairance à l'aide de microsomes par les auteurs Austin, Barton, Cockroft, Wenlock, and Riley (2002). Cependant, ces changements n'ont pas suffisamment amélioré le biais des sous-estimations de la  $CL_{h in vivo}$  (Da-Silva et al., 2018; Poulin, Hop, et al., 2012; Poulin, Kenny, et al., 2012).

$$CL_{h in vivo} = QL \cdot E = QL \cdot \frac{CL_{int-in vivo} \cdot f_{u,b} / f_{u,inc}}{QL + CL_{int-in vivo} \cdot f_{u,b} / f_{u,inc}} \quad \text{Équation 5}$$

Une autre explication possible des sous-estimations de la clairance réside dans le fait que des modèles quantitatifs comme le « well-stirred » reposent sur la simple hypothèse d'un équilibre rapide entre les xénobiotiques non liés dans l'espace extracellulaire et intracellulaire. Ce modèle repose fondamentalement sur **l'hypothèse du médicament libre** selon laquelle seule la  $C_{free}$  serait disponible pour le transfert intracellulaire (Brodie et al., 1960). Les prédictions de métabolisme/clairance hépatique ( $CL_{in vivo}$ ) en utilisant le modèle « well-stirred » sont donc basées uniquement sur les paramètres suivants :  $CL_{int-in vivo}$ ,  $f_u$  et  $Q_L$ . Ainsi, la pratique courante consistant à utiliser uniquement la  $C_{free}$ , après l'atteinte d'un équilibre, dans les approches IVIVE avait été poursuivie sans tenir en considération la complexité du cytosquelette et des membranes plasmiques des hépatocytes, ou même d'autres processus mécanistiques ayant lieu dans l'espace interstitiel. Notamment, le processus de captation hépatique extracellulaire permettant l'entrée des xénobiotiques perméables dans les cellules parenchymateuses et précédant le métabolisme. Ainsi, tout changement dans la captation hépatique influencerait par conséquent la clairance hépatique totale.

En considérant les différentes caractéristiques physicochimiques des médicaments et la complexité physiologique/biochimique du foie, le développement et la validation d'un modèle adéquat qui sera en mesure de simuler le métabolisme d'un médicament comme à l'état physiologique du foie, avec le plus d'exactitude et de précision possibles, comportent un défi majeur pour l'expérimentateur (Roy & Nandi, 2019; Sager, Yu, Ragueneau-Majlessi, & Isoherranen, 2015). C'est pourquoi aborder les raisons sous-jacentes aux divergences exprimées par rapport à « l'hypothèse du médicament libre » éluciderait les variations totales au niveau du métabolisme ou de la clairance hépatique dans l'environnement physiologique du foie.

Nous présenterons en détails, [dans le chapitre 4](#), les principales raisons qui peuvent être responsables d'une violation de **l'hypothèse du médicament libre** et qui mènent, en conséquence, à la divergence entre les valeurs prédites et observées de  $CL_{int}$  (et de  $CL_h$ ).

### **1.3. Caractéristiques physiologiques des hépatocytes et hypothèses décrivant la captation facilitée dans le foie**

#### **1.3.1. La polarité de la membrane plasmique d'un hépatocyte**

Les hépatocytes sont des cellules parenchymateuses entourées par les cellules endothéliales sinusoidales du foie, faisant face à l'espace de Disse et des sinusoides ([Figure A1.1](#)). Et, fait intéressant, les hépatocytes ont une polarité unique (Musch, 2014; Treyer & Musch, 2013). Premièrement, la haute polarité des hépatocytes est établie grâce au cytosquelette complexe composé de microtubules, microfilaments, filaments intermédiaires, vésicules de transport ou de dégradation, et protéines transmembranaires et intégrales associées (Decaens, Durand, Grosse, & Cassio, 2008; Drubin & Nelson, 1996). Deuxièmement, la polarité des hépatocytes est due à l'asymétrie des bicouches lipidiques extracellulaires et intracellulaires des membranes plasmiques (Drubin & Nelson, 1996). Les différences de composition des classes de lipides essentiels (glycérophospholipides et cholestérol), ainsi que leur distribution dans les couches externe et interne des membranes plasmiques des hépatocytes, sont à l'origine de cette asymétrie fonctionnelle (Colbeau, Nachbaur, & Vignais, 1971). Ces différences existent en réponse à des signaux chimiques et physiques liés au foie.

L'établissement et le maintien d'une polarité élevée soutiennent les hépatocytes en maintenant leur phénotype, leur identité et leurs fonctions multiples, de l'endocytose protéique, transcytose et exocytose à la formation de bile, la captation de xénobiotique et l'échange de métabolites (Bastaki, Braiterman, Johns, Chen, & Hubbard, 2002; van & Hoekstra, 1999). Les hépatocytes sont le principal site de synthèse, de recyclage et de catabolisme des protéines (par ex. ALB, AGP et transferrine) (Fries, Gustafsson, & Peterson, 1984a; Miller, Bly, Watson, & Bale, 1951; Redman, 1969; Sarcione, 1963; Seglen, 1976). En outre, les propriétés fonctionnelles (captation et clairance hépatiques) et biochimiques (protéines G, enzymes et récepteurs hormonaux) sont réparties selon trois domaines polarisés principaux de la membrane plasmique des hépatocytes : sinusoidale, contiguë et canaliculaire (Kremmer, Wisher, & Evans, 1976; Treyer & Musch, 2013; Wisher & Evans, 1975).

En particulier dans le domaine sinusoidale, la polarité et la morphologie des hépatocytes jouent un rôle crucial dans la captation (et la clairance) des xénobiotiques et des protéines plasmatiques liés. On



peut constater que les lipides zwitterions<sup>5</sup> (c'est-à-dire la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidyléthanolamine (PE)) et le cholestérol neutre sont les principaux composants des membranes plasmiques des hépatocytes. Ainsi, la distribution particulière dans les groupes de têtes hydrophiles (chargés ou polaires) et les queues hydrophobes (acides gras insaturés et saturés) dans les bicouches de membranes plasmiques est l'un des principaux facteurs de la polarisation des hépatocytes (Mostov, Su, & ter Beest, 2003).

### **1.3.2. Les protéines plasmatiques dans le foie : des sinusoides au parenchyme**

Dans la plupart des organes autres que le foie, les cellules endothéliales forment une barrière entre les espaces vasculaires et interstitiels. Inversement, même si les cellules endothéliales sinusoidales du foie jouent un rôle protecteur des cellules hépatiques parenchymateuses, la paroi sinusoidale constituée par ces cellules endothéliales ne possède pas de membrane basale (Palade, 1988). Ainsi, cette paroi ne limite pas la perméabilité des substances chimiques exogènes et endogènes, ni celle des protéines plasmatiques (Palade, 1988). Pour certaines molécules, la perméabilité dans l'espace intracellulaire des hépatocytes peut même être importante car les cellules endothéliales forment différentes structures de capillaires endothéliaux, également appelées sinusoides : structure continue (pores ouverts ou fenestrations) (De Leeuw, Brouwer, & Knook, 1990) ou structure discontinue (grandes fenestrations ou lacunes) (Palade, 1988).

Le sang provenant de la veine porte et de l'artère hépatique est mélangé à l'entrée des lobules et transmis des sinusoides à la veine cave inférieure après avoir traversé les différentes zones métaboliques (Felmlee, Grun, & Baumert, 2018). Par conséquent, un réseau hautement ramifié de sinusoides fenestrés permet un contact libre entre les substances circulant dans le plasma et les membranes plasmiques sinusoidales des hépatocytes (Koyo et al., 1990; Treyer & Musch, 2013). De plus, les couches épaisses d'hépatocytes, organisées en rangées d'une ou deux cellules, sont disposées vers l'espace sinusoidal (Treyer & Musch, 2013). Ces agencements en plaques d'hépatocytes polarisés

---

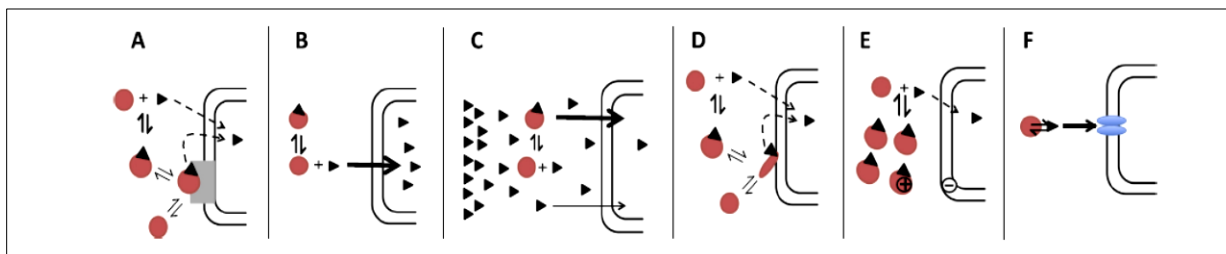
<sup>5</sup> Des zwitterions qui possèdent des groupes amines positifs et phosphates négatifs.

contribuent ainsi aux échanges de micro- et macromolécules entre le plasma et l'espace interstitiel (Treyer & Musch, 2013), et en particulier aux interactions protéines-lipides pouvant survenir au niveau de la membrane plasmique sinusoïdale.

Les interactions protéines-lipides sont impliquées dans tous les processus biologiques (par ex. la fusion, le transport, les récepteurs de signaux) ([Annexe I.2](#)). Elles se produisent principalement à la membrane plasmique des cellules (Saliba, Vonkova, & Gavin, 2015). Les protéines plasmatiques sont un bon exemple de véhicules solubles qui contribuent à la diversité de telles interactions protéines-lipides. Les surfaces multichargées d'ALB et d'AGP rendent les deux protéines très solubles dans le sang et dans l'eau plasmatique. De manière remarquable, leur solubilité et leur emplacement principal (plasma ou espace interstitiel) leur permettent d'interagir avec d'autres ligands, récepteurs et biomembranes (c'est-à-dire les glycérophospholipides).

### **1.3.3. Hypothèses mécanistiques existantes pour expliquer la captation facilitée dans le foie**

Les hypothèses autres que « l'hypothèse du médicament libre », particulièrement celles qui sont décrites comme mécanistiques sont discutées dans les deux revues de littérature Poulin et al. (2016) et C. M. Bowman and Benet (2018) sur le sujet de la captation hépatique des médicaments médiée par la protéine plasmatique (ALB). Ces hypothèses portent sur les mécanismes potentiels qui pourraient avoir lieu en présence du complexe ALB-ligand dans l'espace sinusoïdal de la membrane plasmique.



**Figure 1.7. Les différentes hypothèses émises pour expliquer la captation facilitée par l'ALB dans le foie (tirée de C. M. Bowman and Benet (2018)).**

*NOTE.* Figure 1.7 est tirée de Bowman, C. M., & Benet, L. Z. (2018). An examination of protein binding and protein-facilitated uptake relating to in vitro-in vivo extrapolation. *Eur J Pharm Sci*, 123, 502-514, Figure 5. Doi: 10.1016/j.ejps.2018.08.008. Droit d'auteur © 2018. Reproduite avec l'autorisation de Elsevier ; l'autorisation est obtenue par RightsLink®.

Dans la figure 1.7, nous présentons les mécanismes proposés selon la littérature : A) la présence d'un récepteur de l'ALB où la captation peut se produire en raison de la diffusion simple du ligand non lié à travers la membrane plasmique ou après interaction spécifique du complexe ALB-ligand avec son récepteur ; B) une dissociation limitée du complexe dans le cas où la captation du ligand non lié est plus rapide que la dissociation du ligand de l'ALB ; C) une diffusion limitée du ligand dans l'espace sinusoidal où la diffusion lente de ligand non lié est complétée par la diffusion de ligands liés qui sont rendus plus solubles dans l'eau extracellulaire ; D) un changement conformationnel où la captation totale (ou « total uptake ») est le produit de la captation directe du ligand non lié dans le plasma ou après un changement conformationnel du complexe ALB-ligand dû à sa liaison à la membrane cellulaire catalysant en conséquence la libération du ligand ; E) des interactions ioniques entre le complexe ALB-ligand avec la membrane cellulaire qui pourrait diminuer la distance de diffusion pour le ligand non lié ; et F) un « shift » de l'étendue de PPB induit par un transporteur membranaire, dans le cas où un transporteur à plus haute affinité (que celle pour l'ALB) peut dépouiller le ligand du complexe ALB-ligand.

#### 1.3.4. Modèles *in silico* de la clairance hépatique et captation hépatique médiée par les protéines

Dans le tableau 1.1, nous présentons les équations de trois modèles IVIVE qui servent à prédire la clairance d'un xénobiotique, ainsi que leurs avantages et leurs limitations. Ce qui distingue les trois modèles des autres présentés en début de ce chapitre, c'est qu'ils prédisent la  $CL_{h_{in vivo}}$  en tenant en considération la captation hépatique médiée par l'ALB ou par des transporteurs membranaires.

Grâce à ses nombreux avantages et ses succès récurrents, le premier modèle  $f_{up-adjusted}$  semble intéressant à appliquer dans nos prochaines études *in silico* (résultats présentés dans les chapitres 4 et 6). Ce modèle pourrait être adapté à de nouveaux scénarios pour des médicaments qui se lient fortement soit à l'ALB seulement, soit aux deux protéines (l'ALB et l'AGP).

Dans le chapitre 2, nous présenterons les caractéristiques structurelles et fonctionnelles des deux protéines plasmatiques : l'ALB et l'AGP. Ceci nous aidera à mieux comprendre la nature des interactions qu'elles pourraient avoir avec la membrane plasmique des hépatocytes, ainsi que les mécanismes impliqués.

Tableau 1.1. Comparaison entre trois modèles IVIVE.

Modèle *	Equation	Avantages	Limitations	Réfs.
<b>fu<sub>p</sub>-adjusted</b>	$CLh_{in vivo} = Q_L \times R_{BP} \cdot \frac{fu_p\text{-adjusted}/fu_{inc} \cdot CL_{int- in vivo}}{Q_L \times R_{BP} + fu_p\text{-adjusted}/fu_{inc} \cdot CL_{int- in vivo}}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Moins de paramètres intrants que les deux autres</li> <li>➤ Un modèle basé sur une liaison isotherme</li> <li>➤ Le paramètre fu<sub>p</sub>-adjusted est l'ajustement des valeurs fu<sub>p</sub></li> <li>➤ Un modèle simple et facilement adapté au scénario PK/TK dans le foie</li> <li>➤ Un modèle validé pour une longue liste de médicaments qui ont la captation hépatique facilitée par l'ALB</li> <li>➤ Intégration possible de la captation facilitée par les transporteurs</li> <li>➤ Le modèle tient en considération l'effet du pH sur la captation hépatique d'un xénobiotique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Nous présumons que les interactions entre complexe ALB-xénobiotique et hépatocytes ainsi que la dissociation du complexe sont maximaux. Ce modèle pourrait donc surestimer la clairance des médicaments ayant ces interactions d'une ampleur minimale à moyenne (par ex. en cas d'allostérie positive)</li> </ul>	Poulin, Kenny, et al. (2012)
<b>FDM</b>	$R = \frac{PS_{u,inf (+)}}{PS_{u,inf (-)}} = 1 + \frac{P_{B,inf}}{P_m} \times B_{max} \cdot [ALB] \cdot \frac{n}{K_d}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Modèle mécanistique qui peut être utilisé pour les interactions entre complexe ALB-xénobiotique et hépatocytes ainsi que la dissociation du complexe sont maximaux</li> <li>➤ Un modèle basé sur une liaison isotherme avec des paramètres spécifiques (B<sub>max</sub> and K<sub>d, m</sub>) à l'interaction ALB et membrane plasmique</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Plusieurs paramètres intrants sont à trouver pour chaque complexe ALB-xénobiotique</li> </ul>	Miyauchi et al. (2018)
<b>ECM</b>	$CLh_{in vivo} = Q_L \times R_{BP} \cdot \frac{fu_p \cdot CL_{int, liver-ECCS}}{Q_L \times R_{BP} + fu_p \cdot CL_{int, liver-ECCS}}$	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Combinaison Transport/Enzyme</li> <li>➤ Un modèle qui est validé pour les xénobiotiques qui ont une captation hépatique importante facilitée par les transporteurs membranaires</li> <li>➤ Le paramètre intrant fu<sub>p</sub> ou fu<sub>p</sub>-adjusted pourrait être utilisé dans ECM</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Il exige l'ajout de l'ALB dans les tests <i>in vitro</i> avec les hépatocytes pour tenir en considération de l'effet de la liaison à l'ALB sur la captation hépatique (quand seulement l'utilisation de la fu<sub>p</sub> est possible)</li> <li>➤ L'ajout de l'ALB dans les <i>in vitro</i> pourrait empêcher la mesure précise des concentrations libres de certains médicaments qui lient fortement à l'ALB, et pour lesquels nous ne pouvons pas évaluer leur CL<sub>int</sub></li> </ul>	Kimoto et al. (2018)

\* **fu<sub>p-adjusted</sub>** le modèle de la fraction libre ajustée, **FDM** le modèle de dissociation facilitée, **ECM** le modèle de clairance globale. Pour les prédictions de CLh en utilisant le modèle fu<sub>p-adjusted</sub>, le paramètre intrant fu<sub>p-adjusted</sub> est calculé selon l'équation suivante :

$$fu_{p-adjusted} = \frac{PLR \cdot fu_{p-app}}{1 + (PLR-1) \cdot fu_{p-app}}$$
 Pour les prédictions de CLh en utilisant ECM, le paramètre intrant CL<sub>int, liver-ECCS</sub> est calculé selon l'équation suivante :

$$CL_{int, liver-ECCS} = CL_{int, total\ uptake} \times \frac{CL_{int, met}}{[CL_{int, met} + PS_{passive}]}$$
 Pour obtenir plus d'informations sur les tous les paramètres intrants des trois modèles, il faut

consulter les sections 4.3 et 4.5 du [chapitre 4](#).

## **CHAPITRE 2. Un aperçu des principales caractéristiques structurelles de l'albumine et de l'alpha-1-glycoprotéine acide, ainsi que des acides aminés dans les sites de liaison**

Certaines notions présentées dans le chapitre 2 sont aussi trouvables dans une revue de littérature publiée en anglais et révisée par les pairs. Cette revue de littérature qui a été acceptée et publiée en ligne en novembre 2019 dans le journal Heliyon (voir référence ci-dessous), est aussi trouvable dans [l'annexe II.1](#).

Bteich M. Heliyon (2019). An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02879>

## **2.1. Introduction**

Dans le corps humain, comme pour la majorité des mammifères, il existe une grande variété de protéines plasmatiques qui permettent la liaison des xénobiotiques (médicaments et contaminants) : albumine (ALB), alpha-1-glycoprotéine acide (AGP), lipoprotéines (HDL, LDL, VLDL et chylomicrons), fibrinogène, protéine C réactive, transferrine,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -globulines, etc. (B. H. Bowman, 1993; Kerns & Di, 2008; Putnam, 1984). L'ALB et l'AGP sont parmi les protéines plasmatiques les plus importantes pour deux raisons. Premièrement, le rôle principal de ces deux protéines plasmatiques est de transporter et d'entreposer la majorité des substances exogènes et endogènes dans la circulation sanguine (Lehman-McKeeman, 2013). Deuxièmement, l'ALB et l'AGP sont de bons biomarqueurs pour l'inflammation et les maladies du foie (K. Fischer et al., 2014). Bien que les deux protéines ALB et AGP jouent un rôle clé en pharmacocinétique (PK) et pharmacodynamique (PD) dans les études cliniques, ces protéines plasmatiques n'ont jamais été présentées en mettant en contraste, de façon rigoureuse, leurs principales caractéristiques.

Dans ce chapitre, il s'agit donc de : 1) donner un aperçu des connaissances actuelles sur l'ALB et l'AGP chez l'humain en explicitant leurs caractéristiques structurales et fonctionnelles respectives ; 2) décrire comment mesurer la fraction non liée dans le sang (ou le plasma) pour des médicaments qui suivent une cinétique non linéaire typique de liaison aux protéines plasmatiques ; 3) présenter la notion de déplacement d'un xénobiotique à partir des cavités de hautes affinités pour la liaison plasmatique ; et 4) proposer un nouveau modèle conceptuel de la captation potentielle médiée par les protéines plasmatiques au niveau des sinusoides hépatiques.

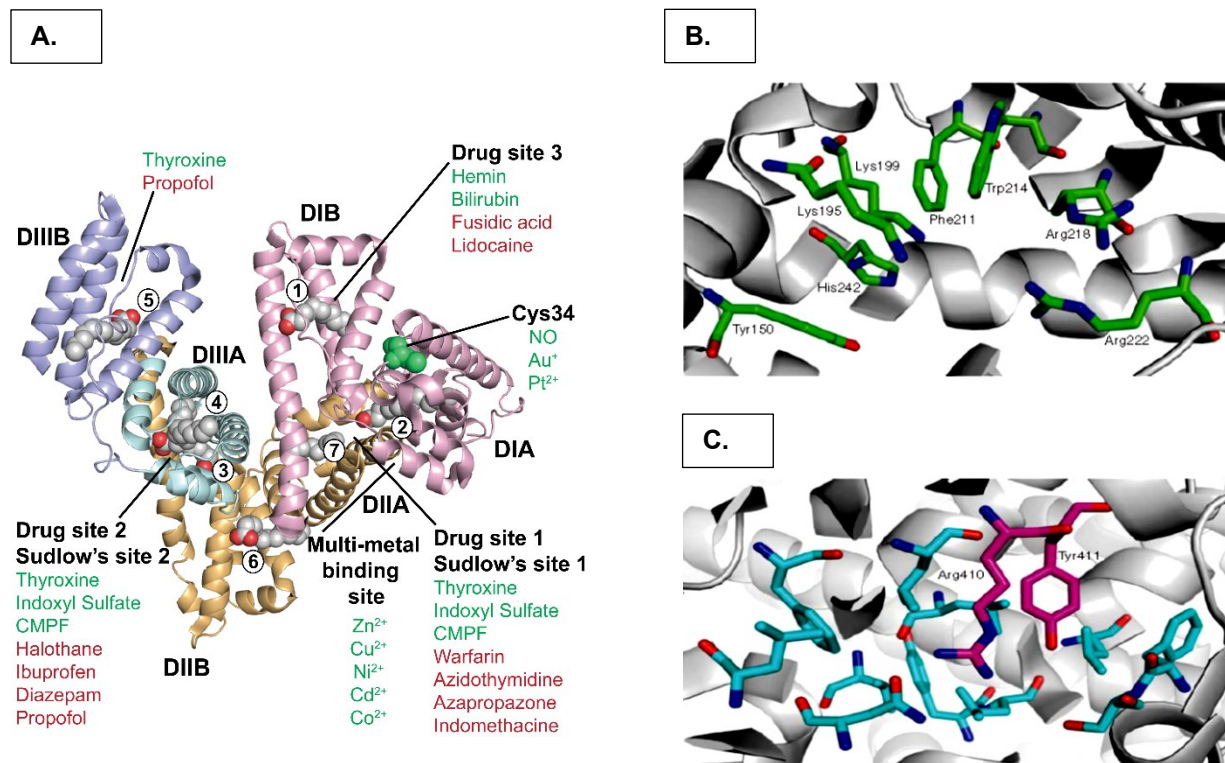
## **2.2. Connaissances actuelles sur l'albumine et de l'alpha-1-glycoprotéine acide**

### **2.2.1. Albumine**

L'ALB est une protéine non glycosylée à une seule chaîne (Figure 2.1). Elle est principalement synthétisée dans le foie (Miller et al., 1951; Peters & Anfinsen, 1950) et rapidement sécrétée (13,3 g par jour) dans l'espace extracellulaire (Fries, Gustafsson, & Peterson, 1984b; Peters Jr., 1996b). Chez l'humain, la séquence d'une ALB mature renferme 585 acides aminés (AA) (Meloun, Moravek, & Kostka, 1975; Minghetti et al., 1986) et elle a un poids moléculaire de 66,5 KDa (Putnam, 1984) avec des



similitudes et des variabilités inter-espèces en termes de résidus (J. R. Brown, 1976; Majorek et al., 2012). L'ALB est la protéine la plus abondante chez les mammifères puisqu'elle représente près de 60% de la quantité totale des protéines plasmatiques, alors que sa concentration physiologique peut varier entre 3,0 et 5,0 g/dL (500  $\mu$ M-750  $\mu$ M, valeur moyenne  $\sim$ 600  $\mu$ M ou  $\sim$ 4,5% w/w) (Peters Jr., 1996b). Cette protéine a des caractéristiques acides, une charge nette négative (-15 chez l'humain) au pH physiologique de 7,4 et un point isoélectrique de 4,7 (Peters Jr., 1996b; Rothschild, Oratz, & Schreiber, 1988).



**Figure 2.1. L'albumine humaine.**

**A) Illustration de la structure cristalline de l'ALB humaine (tirée de Sand et al. (2014)), B) le site I de Sudlow (tirée de Filip et al. (2013)) et C) le site II de Sudlow (tirée de Filip et al. (2013)).**

Les numéros de 1 à 7 désignent les sept sites d'acides gras (FAs) ; DIA et DIB sont respectivement les sous-domaines A et B du domaine I (couleur violet) ; DIIA et DIIB sont respectivement les sous-domaines A et B du domaine II (couleur orange) ; DIIIA et DIIIB sont respectivement les sous-domaines A et B du domaine III (couleurs indigo et turquoise).

*NOTE.* Figure 2.1. A) est tirée de Sand KMK, Bern M, Nilsen J, Noordzij HT, Sandlie I and Andersen JT (2014). Unraveling the interaction between FcRn and albumin: opportunities for design of albumin-based therapeutics. *Front. Immunol.* 5:682, Figure 2. Doi: 10.3389/fimmu.2014.00682. Droit d'auteur © 2014. Reproduite avec l'autorisation de la première autrice Sand KMK ; l'autorisation est obtenue par courriel en mars 2021.

Figure 2.1. B) and C) sont tirées de Filip, Z., Jan, K., Vendula, S., Jana, K. Z., Kamil, M., & Kamil, K. (2013). Albumin and alpha1-acid glycoprotein: old acquaintances. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 9(8), 943-954, Figures 2 et 3. Doi: 10.1517/17425255.2013.790364. Droit d'auteur © 2013. Reproduite avec l'autorisation de Taylor & Francis ; l'autorisation est obtenue par RightsLink®.

Les 17 ponts disulfures de l'ALB sont bien conservés chez les mammifères. Ces ponts assurent la flexibilité de sa conformation (état normal ou N) (Weber, 1975) et la stabilité de sa structure à un pH physiologique de 7,4 (Markus & Karush, 1957), même dans des conditions extrêmes. De plus, ces ponts contribuent à prolonger sa durée de vie biologique (Peters Jr., 1996b) et à conserver sa structure tridimensionnelle (Nurdiansyah, Rifa'i, & Widodo, 2016). Le rôle important de ces ponts est notamment observable dans toutes les ALB de mammifères (Majorek et al., 2012). En outre, la durée de vie de l'ALB pourrait aussi être prolongée par son interaction avec le récepteur Fc néonatal (FcRn) se situant sur la membrane des hépatocytes (Chaudhury et al., 2003). En effet, l'ALB (domaine III) avec l'immunoglobuline G (IgG) se lie au FcRn pendant le processus d'internalisation du complexe (ALB-IgG-FcRn) (J. T. Andersen, Dee Qian, & Sandlie, 2006; Goebel et al., 2008; Sand et al., 2014). Le récepteur FcRn jouerait donc un rôle fondamental dans la régulation homéostatique des IgG et de l'ALB, puisqu'il permet aux deux protéines d'échapper à la dégradation intracellulaire en les recyclant dans la circulation systémique (Chaudhury et al., 2003; Sand et al., 2014).

De plus, les liaisons disulfures confèrent à l'ALB une structure qui prend la forme d'un cœur ayant une résolution de 3,2 Å chez les humains (He & Carter, 1992), mais qui pourrait être encore mieux résolue à 2,5 Å (Curry, Mandelkow, Brick, & Franks, 1998). L'ALB renferme environ 67% d'hélices  $\alpha$ , 10% de coudes  $\beta$ , mais elle ne contient pas de feuillets  $\beta$  (Peters Jr., 1996b). La flexibilité de l'ALB permet la liaison avec une grande affinité d'une grande variété de xénobiotiques à ses deux sites principaux I et II de Sudlow (Fanali et al., 2012; Peters Jr., 1996b; Sudlow, Birkett, & Wade, 1975; Sudlow, Birkett, & Wade, 1976). Le site I de Sudlow est aussi connu comme étant le site de liaison pour « warfarine/azapropazone » (Fehske, Schlafer, Wollert, & Muller, 1982), tandis que le site II de Sudlow est connu comme étant l'endroit où se lie « ibuprofène/diazépam » ou « indole/benzodiazépine » (Ascenzi & Fasano, 2010; Fanali et al., 2012; Fasano et al., 2005).

La représentation structurale contient trois domaines homologues (J. R. Brown, 1976; Dockal, Carter, & Ruker, 1999) : domaine I (25-222 AA), domaine II (223-414 AA) et domaine III (415-609 AA). Ces domaines sont représentés par neuf boucles doubles qui sont répétées en triplet (Peters Jr., 1996b; Rothschild et al., 1988). Les boucles doubles 1-2, 4-5 et 7-8 sont, respectivement, regroupées en sous-

domaines IA, IIA et IIIA. Tandis que les boucles uniques 3, 6 et 9 sont, respectivement, représentées par les sous-domaines IB, IIB et IIIB. Dans chaque domaine constitué d'environ 10 hélices  $\alpha$ , il y a une paire de sous-domaines hélicoïdaux nommés A (6 hélices  $\alpha$ ) et B (4 hélices  $\alpha$ ) qui sont reliés par des cylindres aléatoires (Ascenzi & Fasano, 2010). Les interactions entre les domaines favorisent un environnement asymétrique pour le ligand allostérique (Curry et al., 1998; Fasano et al., 2005; Peters Jr., 1996b).

L'ALB est caractérisée par ses deux cavités hydrophobes au site I (sous-domaine IIA) et au site II (sous-domaine IIIA), avec des résidus polaires dans son environnement interne et à l'entrée de ses deux sites de liaison (Ghuman et al., 2005). Les anions hétérocycliques encombrants se lient préférentiellement au premier site principal, alors que les carboxylates aliphatiques et aromatiques se lient préférentiellement au second site (Ascenzi & Fasano, 2010). Bien qu'un troisième site majeur de liaison (sous-domaine IB) ait été récemment suggéré par Zsila (2013), d'autres études sur la liaison avec une forte affinité pour ce site sont nécessaires avant que l'ALB puisse être représentée par un modèle de protéine à trois sites principaux.

L'ALB présente jusqu'à sept sites de liaison dans lesquels les acides gras libres à longue chaîne (par ex. acide palmitique, acide oléique et acide arachidonique) se lient selon différentes affinités : les sites FA1 à FA7. La présence de ces acides gras peut être associée à un changement conformationnel local de la structure secondaire de la protéine plasmique (Fanali et al., 2012; Ghuman et al., 2005). En conséquence, ces sites occupés *a priori* par des acides gras pourraient accommoder la liaison d'autres substances endogènes et exogènes aux sites primaires I et II (Ascenzi & Fasano, 2010; Fanali et al., 2012). Ce type d'accommodation augmenterait l'affinité du ligand, et cet événement serait défini par une interaction coopérative (Lehman-McKeeman, 2013). En revanche, certaines études ont signalé une possible compétition entre les acides gras et certains ligands (Chakrabarti, 1978), impliquant ainsi un déplacement possible du site de liaison causé par la modulation allostérique (Ascenzi & Fasano, 2010; Fasano et al., 2005). Par ailleurs, les ligands de petites tailles moléculaires ne remplissent pas complètement la poche hydrophobe dans le site I de Sudlow. Dans de tels cas particuliers, le site sera donc prédisposé à l'insertion de molécules d'eau et de résidus polaires attirés par la liaison hydrogène (liaisons H), ce qui pourrait influencer la liaison des autres ligands à ce site (Curry, 2009; Ghuman et al.,

2005). De plus, de multiples monocouches de molécules d'eau lient, de manière réversible, leurs atomes d'hydrogène aux résidus se trouvant à la surface de la protéine. Ces molécules d'eau pourraient ensuite naviguer avec l'ALB dans l'espace extracellulaire (Peters Jr., 1996b).

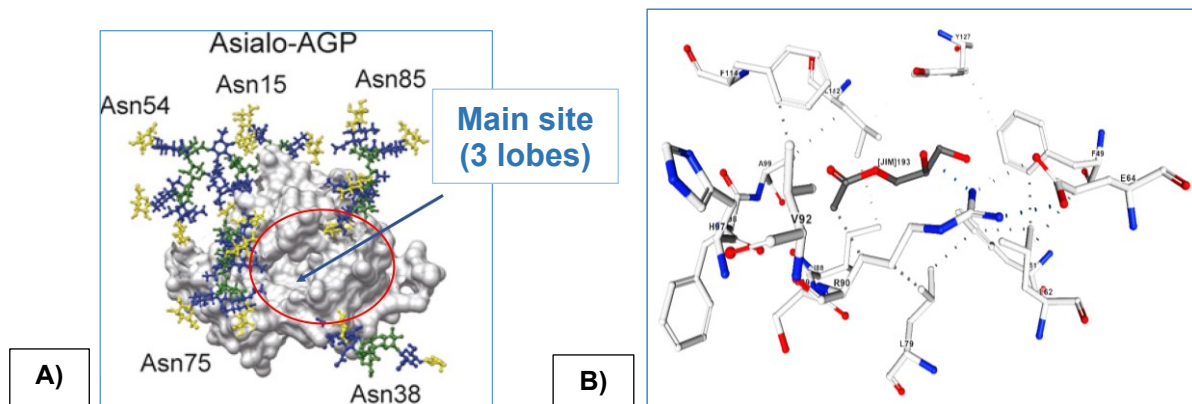
L'ALB a de nombreuses fonctions physiologiques importantes (Peters Jr., 1996b). C'est un transporteur de premier plan et un véhicule de dépôt dans la circulation sanguine des substances endogènes (par ex. bilirubine, acides gras, hormones, acides biliaires) (Fanali et al., 2012; Kurtzhals, Havelund, Jonassen, & Markussen, 1997; Roda, Cappelleri, Aldini, Roda, & Barbara, 1982), des substances exogènes (par ex. métaux lourds Hg, Cd et Pb, médicaments, contaminants) (Y. Li, Yan, Chen, Xia, & Jiang, 2007) et d'autres ligands essentiels (par ex.  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , oxyde nitrique, métallothionéine, vitamines, hème) (Ascenzi & Fasano, 2009; Bal, Sokolowska, Kurowska, & Faller, 2013; Hou et al., 2008; Quiming, Vergel, Nicolas, & Villanueva, 2005; Sadler & Viles, 1996). L'ALB régule la pression osmotique colloïdale avec sa concentration élevée dans le plasma en gardant le sang dans les vaisseaux, et elle possède des propriétés enzymatiques qui sont utiles dans le métabolisme et la détoxification de ligands exogènes et endogènes (Fitzpatrick & Wynalda, 1983; Kragh-Hansen, Chuang, & Otagiri, 2002; J. Yang, Petersen, Ha, & Bhagavan, 2002). L'ALB est aussi caractérisée par une capacité tampon du sang, mais dans une moindre mesure que l'hémoglobine (Pettifer, 2003). L'ALB possède le plus grand pool de thiols dans le plasma (Turell, Radi, & Alvarez, 2013). Cette protéine joue alors un rôle antioxydant (Hu, 1994) en piégeant les espèces réactives de l'oxygène et les espèces réactives de l'azote (Quinlan, Martin, & Evans, 2005). Cette activité de piégeage de l'ALB dépend largement de l'état rédox du résidu Cys34 (Anraku, Chuang, Maruyama, & Otagiri, 2013; Stamler et al., 1992).

L'ALB est une protéine de phase aiguë négative (B. H. Bowman, 1993), puisqu'en cas d'inflammation sa concentration diminue sous l'influence des cytokines (IL6, IL1 et TNF $\alpha$ ) (Kmiec, 2001). Grâce aux nombreuses caractéristiques appréciables de l'ALB (par ex. la demi-vie *in vivo* (~19 jours), la stabilité et la polyvalence de liaison (Peters Jr., 1996b)), les applications médicales et pharmaceutiques *in vitro* et *in vivo* incluant l'ALB (par ex. nanomatériaux, biomarqueurs, toxicocinétique, précliniques) deviennent de plus en plus nombreuses avec les progrès technologiques dans les multiples disciplines des sciences de la santé (par ex. génétique, oncologie, nanotechnologie, thérapeutique). Pour une

exploration plus approfondie des utilisations de l'ALB en recherche, des exemples sont donnés dans deux revues de littérature de Peters Jr. (1996b) et d'Otagiri and Chuang (2016).

### **2.2.2. Alpha-1-glycoprotéine acide**

La protéine plasmatique AGP (Figure 2.2), également connue sous le nom d'orosomucoïde (ORM), est une protéine à chaîne unique glycosylée (Fournier, Medjoubi, & Porquet, 2000; Kremer, Wilting, & Janssen, 1988; Schmid, 1950, 1989; Weimer, Mehl, & Winzler, 1950). Comme l'ALB, l'AGP est principalement synthétisée (10 mg/kg/jour) (Lentner, 1984) et catabolisée dans le foie (Sarcione, 1963). Cependant, l'asialo- ou l'agalacto-AGP est internalisée dans les hépatocytes en utilisant un récepteur d'asialo-glycoprotéine membranaire spécifique (ASGP-R) pour sa dégradation (Taguchi, Nishi, Giam Chuang, Maruyama, & Otagiri, 2013a). Ce processus d'internalisation n'est possible que lorsque le site de liaison dans la protéine asialo-AGP est vacant, et après la modification de sa conformation (D. K. Meijer & van der Sluijs, 1989; D. K. F. Meijer & Nijssen, 1991). Sa demi-vie est de 2 à 3 jours, ce qui veut dire qu'une concentration élevée en AGP est facilement éliminée du corps même après sa synthèse induite (Bree et al., 1986).



**Figure 2.2. L'alpha-1-glycoprotéine acide humaine non-glycosylée.**

**A) La structure cristalline enrobée et le site principal de liaison de l'asialo-AGP humaine (tirée de D. Wu, Struwe, Harvey, Ferguson, and Robinson (2018)), B) des interactions pont-hydrogène (ponts en bleu) et des interactions hydrophobes (ponts en gris) entre les résidus du site principal et le (1R)-1-glycérol acétate (un ligand donné à titre d'exemple) (Rose et al., 2018).**

*NOTE.* Figure 2.2.A) est adaptée de Wu, D., Struwe, W. B., Harvey, D. J., Ferguson, M. A. J., & Robinson, C. V. (2018). N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(35), 8763-8768, Figure 1. Doi: 10.1073/pnas.1807439115. Droit d'auteur © 2018. Reproduite avec l'autorisation de l'autrice Carol Robinson ; l'autorisation est obtenue par courriel en mars 2021.

Contrairement à l'ALB, l'AGP est une protéine peu abondante dans le plasma, car elle ne représente que 3% des protéines plasmatiques. Chez les adultes en santé, la concentration physiologique varie entre 0,05 et 0,1 g/dL (10  $\mu$ M-20  $\mu$ M, valeur moyenne  $\sim$ 15  $\mu$ M) (Kremer et al., 1988) ; certaines références donnent une valeur normale maximale de 0,140 g/dL (31  $\mu$ M). La concentration plasmatique d'AGP augmente avec l'âge et dépend du sexe (Israili & Dayton, 2001). L'AGP est une protéine acide (pKa= 2,6) qui est hautement soluble dans l'eau et dans d'autres solvants organiques polaires (Schmid, 1989). Sa charge nette est négative au pH physiologique et dépend énormément de la nature de ses entités glucidiques. Son point isoélectrique varie entre 2,8 et 3,8 (Fournier et al., 2000).

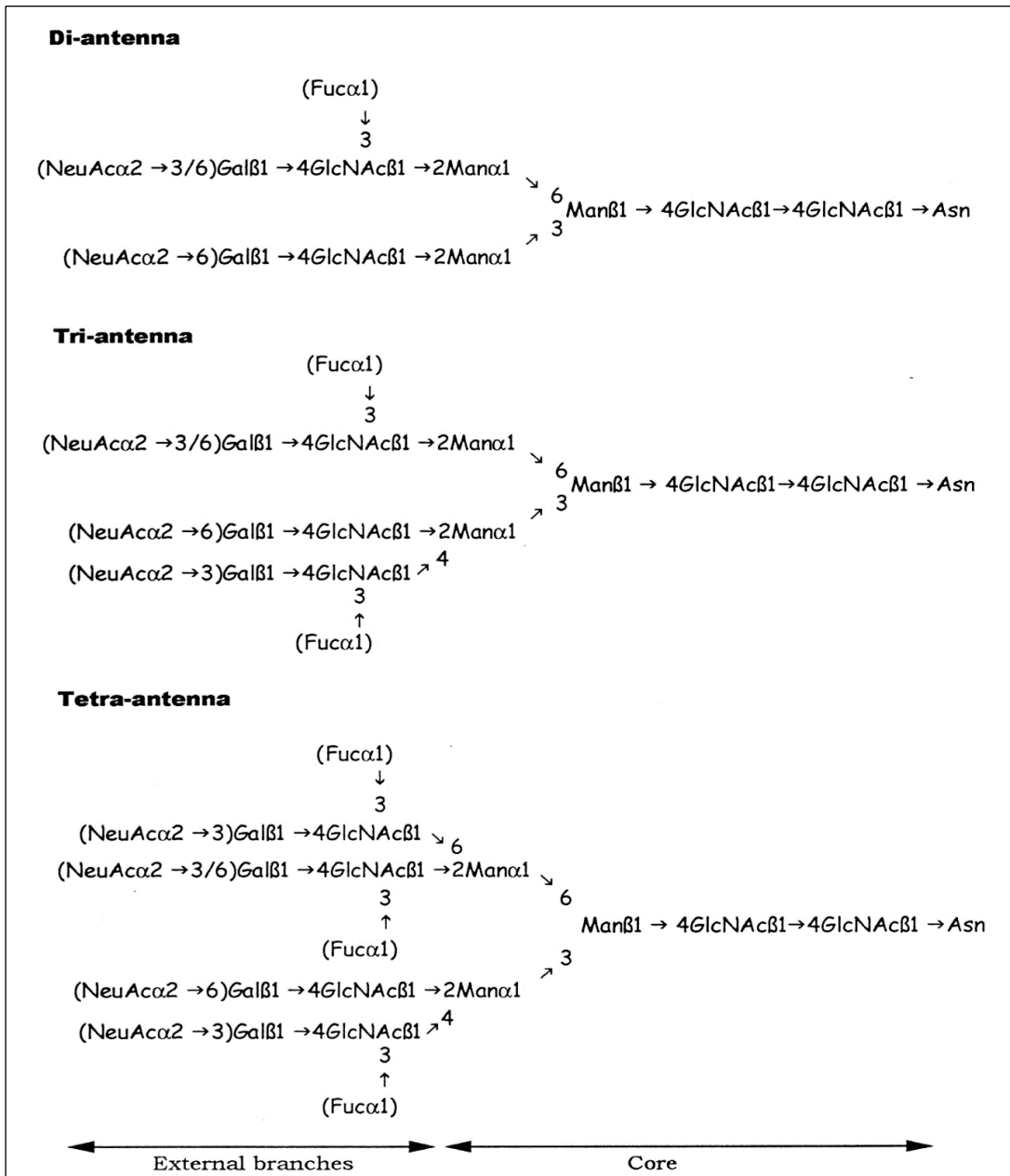
Chez l'humain, la forme mature de l'AGP est constituée de 183 AA. Cette protéine a un poids moléculaire d'environ 44 kDa (Kremer et al., 1988) (ou 41-43 kDa selon Hoche pied, Berger, Baumann, and Libert (2003)). La protéine AGP comprend environ 59% de résidus peptidiques et 41% de glucides – dont environ 11% sont des acides sialiques (ou 12% selon Hoche pied et al. (2003)). Ce contenu sialique étant élevé, il contribue à la charge négative sur la surface de l'AGP (Kremer et al., 1988; Schmid, Nimerg, Kimura, Yamaguchi, & Binette, 1977) et il détermine la nature des interactions que cette glycoprotéine peut avoir avec les membranes biologiques.

Il y a cinq entités glucidiques structurellement hétérogènes (cinq N-glycanes) avec des glycanes mono-, bi-, tri- et tétra-antennaires liés de manière covalente à cinq résidus d'asparagine (Asn) (Figure 2.2.A), qui forment des sites de N-glycosylation (Asn-15, Asn-38, Asn-54, Asn-75, Asn-85) pour le gène le plus actif ORM1 (variante F1\*S) parmi les deux gènes principaux de l'AGP (ORM1 et ORM2) (Dente, Pizza, Metspalu, & Cortese, 1987; Fournier et al., 2000; Taguchi et al., 2013a; Yoshima, Matsumoto, Mizuochi, Kawasaki, & Kob, 1981; Yuasa et al., 1997).

Les conditions physiologiques et environnementales, ainsi que l'état de santé (par ex. une inflammation) influencent la variabilité des ramifications glycosylées (Gornik et al., 2009). L'hétérogénéité de la glycosylation (Figure 2.3), quant à elle, influence non seulement la liaison des xénobiotiques, mais affecte aussi la cinétique de la protéine elle-même (c'est-à-dire demi-vie, absorption et catabolisme) (Gross et al., 1989). Le groupement glycosylé contribue à la stabilité de cette protéine, à sa structure



conformationnelle native et à sa solubilité (Bürgi, 1989). Par ailleurs, il est possible que cette partie glycosylée d'asialo-AGP (sans groupement d'acide sialique) interagisse avec les constituants de membranes plasmiques tels que les récepteurs membranaires (par ex. ASGP-R exprimés sur les hépatocytes), pour qu'ensuite cette protéine soit internalisée dans des endosomes sous une action lysosomale ou recyclée vers l'espace extracellulaire (D. K. Meijer & van der Sluijs, 1989; Taguchi et al., 2013a).



**Figure 2.3. Les complexes de glycanes N-liés à l'alpha-1-glycoprotéine acide humaine (tirée de Fournier et al. (2000)).** *En anglais* : Man mannose ; GlcNAc N-acetylglucosamine ; Fuc fucose; NeuAc neuraminic acid (sialic acid); Gal galactose.

*NOTE.* Figure 2.3 est tirée de Fournier, T., Medjoubi, N. N., & Porquet, D. (2000). Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1482(1-2), 157-171, Figure 1. Doi: 10.1016/s0167-4838(00)00153-9. Droit d'auteur © 2000. Reproduite avec l'autorisation de Elsevier ; l'autorisation est obtenue par RightsLink®.

Il existe deux variantes principales (F1\*S et A) impliquées dans la liaison de haute affinité (Eap, Cuendet, & Baumann, 1988). La différence de résidus AA entre ces variantes est due à 21 substitutions AA, ce qui affecte l'affinité et la stéréosélectivité de la liaison à l'AGP (Dente et al., 1987; Fitos, Visy, Simonyi, Mady, & Zsila, 2010; Herve et al., 1998; Herve, Gomas, Duche, & Tillement, 1993). La variante F1\*S est prédominante (Montiel, Carracedo, Blazquez-Caeiro, & Andrade-Vide, 1990), et dans des conditions physiologiques normales, son expression est deux à trois fois supérieure à celle de la variante A (Yuasa et al., 1997).

L'AGP contient deux liaisons disulfures dans toutes ses variantes alléliques principales qui soutiennent la stabilité de sa structure secondaire (Kremer et al., 1988; Schmid et al., 1973). Ces liaisons, comme les acides sialiques, contribuent aux interactions potentielles de l'AGP avec les biomembranes (Nishi et al., 2006). La protéine native comprend 15% d'hélices  $\alpha$ , 41% de feuillets  $\beta$ , 12% de coudes  $\beta$ , 8% de « bends » et 24% de structure non ordonnée (Kopecký, Ettrich, Hofbauerová, & Baumruk, 2003). La teneur en hélices  $\alpha$  peut augmenter soit après la réduction des ponts disulfures, soit au contact de la protéine avec des biomembranes (Nishi et al., 2006). L'AGP n'a qu'un site principal qui peut être saturable de haute affinité et de faible capacité (Müller, 1989), et qui est situé dans la poche hydrophobe composée de trois lobes (Maruyama, Otagiri, & Takadate, 1990; Schonfeld, Ravelli, Mueller, & Skerra, 2008). De nombreux autres sites ayant des capacités différentes et des faibles affinités peuvent aussi exister. Toutefois, jusqu'à présent, seul le site principal est cliniquement pertinent (Müller, 1989; Taguchi et al., 2013a).

Bien que les fonctions biologiques de l'AGP ne soient pas claires, il convient de noter quelques-unes de ses activités physiologiques. Comme l'ALB, l'AGP est une protéine plasmatique importante dans le transport de divers ligands endogènes (par ex. sérotonine, facteur d'activation plaquettaire, histamine, mélatonine) et exogènes (médicaments et contaminants) (Baumann, Eap, Müller, & Tillement, 1989; Fournier et al., 2000; Israili & Dayton, 2001). C'est une protéine de phase aiguë positive (B. H. Bowman, 1993; Kushner, 1982). Elle appartient à la famille immunocaline, c'est-à-dire de la sous-famille des lipocalines puisqu'elle a un rôle anti-inflammatoire et immunomodulateur chez tous les mammifères (Bennett & Schmid, 1980; Hochepped et al., 2003). L'AGP a un effet inhibiteur sur les cellules immunitaires

(par ex. lymphocyte T) et l'agrégation plaquettaire, et elle provoque l'induction de certaines cytokines (Hoche pied et al., 2003).

L'augmentation de la concentration physiologique de l'AGP dépend de l'espèce. Cette concentration pourrait plus que quadrupler chez les humains (normale : 1 g/L), et augmenter jusqu'à 100 fois chez les rats (normale : 0,2 g/L) (Baumann & Held, 1981; Fournier et al., 2000; Hoche pied et al., 2003) en cas de pathologies (par ex. infarctus du myocarde, néphrite), d'inflammation, d'infection ou de cancer (Z. Huang & Ung, 2013; Israili & Dayton, 2001). Des organes autres que le foie et des cellules autres que les hépatocytes (par ex. les leucocytes) peuvent synthétiser l'AGP – notamment sous l'action des cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6), du TNF $\alpha$  et des glucocorticoïdes (Baumann et al., 1989; Israili & Dayton, 2001; van Dijk et al., 1991), ou en réponse à divers stimuli de stress (par ex. infection, brûlure, chirurgie, traumatisme ou cancer) (Israili & Dayton, 2001; Jackson, Tucker, & Woods, 1982; Kremer et al., 1988; Piasfsky, 1980). Dans le cas de réactions en phase aiguë, le rapport normal entre les deux variantes principales (F1\*S versus A) augmente plus de trois fois, marquant une production significative de la variante F1\*S (Taguchi et al., 2013a). Cette variation pourrait être environ huit fois plus élevée en cas de lymphome, de mélanome et de cancer de l'ovaire (Taguchi et al., 2013a). Dans la biosurveillance du cancer, des glycanes spécifiques sur la surface de l'AGP pourraient être utilisés comme biomarqueurs dans la progression du cancer du sein (Abd Hamid et al., 2008).

**Tableau 2.1. Résumé des caractéristiques distinctes de l'ALB et de l'AGP chez l'humain.**

Caractéristiques	Protéines plasmatiques humaines	
	ALB <sup>a</sup>	AGP <sup>b</sup>
<b>Gène (variantes alléliques) ; chromosome location</b>	1 gène ALB (nombre de variantes dépend du groupe ethnique) ; le gène est situé sur le chromosome 4 (4q11-q13)	Deux gènes avec des variantes principales et 21 différences d'acides aminés : ORM1 ou AGP-A (variantes F1, F2 et S), désignés collectivement par F1*S ; ORM2 ou AGP-B/B' (variante A) ayant différentes propriétés que celle du premier gène ; les deux gènes sont situés sur le chromosome humain 9 (9q31-34.1)
<b>Séquence native de polypeptide (peptide de signal au N-terminal ; propeptide ; protéine mature)</b>	609 AA (18 AA ; 6 AA ; 585 AA)	201 AA (18 AA ; 183 AA) ; pas de propeptide
<b>Famille</b>	Superfamille d'ALB	Sous-famille de lipocalines, famille d'immunocalines
<b>Synthèse</b>	Synthétisé par le foie (13,3 g/jour) et une autre synthèse extra-hépatique mineure	Synthétisée par le foie et une autre synthèse extra-hépatique (20 mg/kg/jour) dans des conditions normales ; la synthèse est accrue dans le cas d'une inflammation, d'une infection ou d'une maladie
<b>Demi-vie</b>	Environ 19 jours	Au moins 2-3 jours, environ 5 jours
<b>Structure</b>	67% d'hélices $\alpha$ , 10% de coudes $\beta$ , mais pas de feuillets $\beta$	15% d'hélices $\alpha$ , 41% de feuillets $\beta$ , 12% de coudes $\beta$ , 8% de « bends » et 24% de structure non ordonnée (la teneur en hélice $\alpha$ peut augmenter en cas de réduction des ponts disulfures et après contact avec les biomembranes)
<b>Résidus glycosidiques</b>	Non : 100% de résidus peptidiques. Cependant, en cas de pathologie, certains résidus glycosidiques peuvent être présents sur la protéine	- Oui : 59% de résidus peptidiques et 41% de glucides, dont environ 11% sont des acides sialiques, 14% d'hexoses neutres, 14% d'hexosamine et 1% de fructose - Cinq entités glucidiques (N-glycanes) liées de manière covalente aux résidus Asn (Asn15, Asn38, Asn54, Asn75, Asn85)
<b>Mécanisme d'internalisation</b>	- Internalisation qui comprend un complexe FcRn-IgG-ALB pour sa dégradation ou son recyclage - Autres récepteurs de glycoprotéines sur les LSEC (par ex., gp60)	- Internalisation après la liaison à l'ASGP-R au niveau sinusoidal pour sa dégradation dans les endosomes - D'autres récepteurs membranaires peuvent être impliqués

**Suite du Tableau 2.1.**

<b>Concentration</b>	3,0 à 5,0 g/dL (500 µM-750 µM) ; 60% du total des protéines plasmatiques	0,05 à 0,1 g/dL (10 µM-20 µM) ; 3% du total des protéines plasmatiques
<b>Sites principaux de liaison</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deux sites principaux de haute affinité, de faible capacité ; sites secondaires de faible affinité</li> <li>- Sept sites d'acides gras</li> </ul>	Un site principal de haute affinité et de faible capacité ; de nombreux sites secondaires de faible affinité (cinq sites pour les endogènes et certains médicaments, un site pour les médicaments et l'autre pour les stéroïdes)
<b>Domaines</b>	Domaine I (25-222 AA), domaine II (223-414 AA) et domaine III (415-609 AA) ; structures secondaire et tertiaire	Variante F1*S (3 lobes ; lobe I principal et deux plus petits lobes II et III) et variante A (2 lobes) ; structures secondaire et tertiaire
<b>Charge nette</b>	(-15) au pH égal à 7.4	Dépend de la glycosylation (jusqu'à 20 types de structures de glycanes)
<b>Point isoélectrique</b>	4.7	Entre 2,8 et 3,8 pour AGP avec une teneur élevée en acide sialique
<b>Rôles principaux</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Protéine de phase aiguë négative ; sa concentration diminue de manière significative</li> <li>- Activité antioxydante, protégeant les cellules et les tissus</li> <li>- Protéine ayant un rôle prédominant de liaison pour le transport et le dépôt des xénobiotiques</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Les activités dépendent de la composition en glucides</li> <li>- Protéine de phase aiguë positive ; sa concentration augmente de manière significative</li> <li>- Activité immunomodulatrice</li> <li>- Activité antioxydante, protection des cellules (par ex. érythrocytes) et des tissus contre le choc septique et l'ischémie, inhibition du TNFα</li> <li>- Activités directes de l'AGP contre les bactéries pathogènes</li> <li>- Effet sensibilisant (colite aiguë)</li> <li>- Protéine ayant un rôle prédominant de liaison pour le transport et le dépôt des xénobiotiques</li> <li>- Inhibition des plaquettes d'agrégation</li> </ul>
<b>Xénobiotiques ayant une haute affinité aux sites principaux</b>	Caractéristiques acides (anioniques)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Caractéristiques basiques (cationiques) et neutres</li> <li>- La liaison stéréosélective dépend de la glycosylation</li> <li>- Le type de variante F1*S se lie à une plus large gamme de médicaments</li> </ul>

**Suite du Tableau 2.1.**

<p><b>Modifications post-transcriptionnelles (PTM)</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 17 liaisons disulfures ; groupe sulfhydrile libre de Cys34</li> <li>- Un tryptophane (W214)</li> <li>- Des interactions électrostatiques, polaires et hydrophobes avec les ligands ou avec les phospholipides membranaires qui peuvent induire des changements conformationnels</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Deux liaisons disulfures (C5-C147 ; C72-165)</li> <li>- Trois tryptophanes (W25, W122 et W160)</li> <li>- Des interactions électrostatiques, polaires et hydrophobes avec des ligands ou avec des phospholipides membranaires qui peuvent induire des changements conformationnels</li> </ul>
<p><b>Rôle de biomarqueurs</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cys34 (rôle antioxydant et ROS, capteur de RNS)</li> <li>- Un faible ratio de l'ALB sur la globuline est un biomarqueur pour plusieurs types de cancer (cou, sein, prostate, poumon, gastrique, etc.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Biomarqueur d'effet pour l'inflammation, le cancer et diverses pathologies</li> <li>- Ratio de l'AGP sur la préalbumine est un biomarqueur pour le carcinome de la prostate</li> </ul>
<p><b>Facteurs importants influençant la liaison aux protéines plasmatiques</b></p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentration de protéines plasmatiques (régulation et rétrocontrôle)</li> <li>- Faible niveau chez le fœtus, le nourrisson et les personnes âgées</li> <li>- Diminution de l'ALB avec le vieillissement de la personne</li> <li>- Diminution de l'ALB sous l'effet des cytokines et en cas de maladies (par ex. foie)</li> <li>- Diminution de l'ALB en cas de brûlures, infections, cancer, inflammation (par ex. polyarthrite rhumatoïde), grossesse et autres stimuli de stress</li> <li>- Analbuminémie : concentration extrêmement faible s'il n'y a pas d'expression de l'ARNm à cause de certaines mutations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Concentration en protéines plasmatiques (régulation et rétrocontrôle)</li> <li>- Faible niveau chez le fœtus, le nourrisson et la femme enceinte</li> <li>- Augmentation du vieillissement</li> <li>- Augmentation de l'AGP sous l'effet des cytokines et de diverses maladies</li> <li>- Augmentation en cas de brûlures, infections, cancers, inflammations (par ex. arthrite) et d'autres stimuli de stress</li> <li>- Diminution de l'AGP en cas de maladie du foie, utilisation de contraceptifs oraux et pendant la grossesse</li> <li>- La synthèse d'ARNm <i>de novo</i> induit la synthèse d'AGP en cas d'inflammation ou de maladies</li> </ul>

**Abréviations (en anglais) :** AA amino acids; AGP alpha-1-acid glycoprotein; ALB albumin; Asn asparagine; ASGP-R asialoglycoprotein receptor; Cys cysteine; IgG immunoglobulin G; LSEC liver endothelial cells; ORM orosomucoid; PTM post-translational modifications; ROS reactive oxygen species; RNS reactive nitrogen species.

<sup>a</sup> (Ascenzi & Fasano, 2009; Fanali et al., 2012; Fasano et al., 2005; He & Carter, 1992; Kragh-Hansen, 2016; Otagiri & Chuang, 2016; Peters Jr., 1996b).

<sup>b</sup> (Baumann et al., 1989; Fournier et al., 2000; Hochepped et al., 2003; Israili & Dayton, 2001; Kremer et al., 1988; Piafsky, 1980; Piafsky & Borgia, 1977; Schmid et al., 1977; Schonfeld et al., 2008; Taguchi et al., 2013a).

Dans le tableau 2.1., nous comparons les caractéristiques biochimiques et structurales des deux protéines plasmatiques ALB et AGP. Les informations présentées dans ce tableau seraient utiles pour la

compréhension des prochaines sections qui portent sur : la liaison d'un xénobiotique aux protéines plasmatiques, l'implication des deux protéines dans la captation hépatique facilitée et la variabilité inter-espèce des deux protéines.

## **2.3. Liaison aux protéines plasmatiques**

### **2.3.1 Mesure des fractions libres et liées dans le plasma et le sang**

La liaison des médicaments aux protéines plasmatiques est un paramètre important dans les études en pharmacologie et en toxicologie, en particulier dans la compréhension de la PK/PD des xénobiotiques qui y sont fortement liés (Banker & Clark, 2008; Z. Huang & Ung, 2013; Kremer et al., 1988; Liu, Chen, & Hop, 2011; Liu et al., 2014). La liaison aux protéines plasmatiques est normalement considérée comme un facteur limitant pour la distribution des xénobiotiques, puisqu'on suppose que les xénobiotiques fortement liés ont généralement un faible volume de distribution (Lehman-McKeeman, 2013). Cependant, certains médicaments peuvent avoir une large distribution tout en étant fortement liés aux protéines plasmatiques (par ex. ivacaftor, perphénazine, olanzapine, chlorpromazine).

La concentration libre d'un xénobiotique ( $C_{free}$ ) est la concentration qui n'est pas liée aux protéines et aux lipides dans le plasma, le sang et les tissus. Selon **l'hypothèse du xénobiotique libre**, seule la  $C_{free}$  est disponible pour traverser les barrières biologiques (c'est-à-dire les biomembranes) (Brodie et al., 1960). Quand une molécule non liée traverse la barrière et entre dans la matrice intracellulaire, on présume qu'un équilibre (ou état stable) s'établit rapidement entre les  $C_{free}$  intracellulaire et extracellulaire. Dans ce cas, la même  $C_{free}$  est théoriquement présente dans l'espace extracellulaire que dans les cellules (Benet et al., 1996). Ainsi, la  $C_{free}$  distribuée du xénobiotique peut interagir avec les cibles physiologiques (c'est-à-dire récepteurs, tissus, etc.) (Trainor, 2007).

De nombreuses techniques sont utilisées dans des études de découverte de médicaments pour déterminer les affinités de liaison aux protéines plasmatiques et les fractions libres et liées de ces xénobiotiques ([Annexe II.2](#)). Par exemple, la dialyse à l'équilibre rapide (RED), l'ultracentrifugation et l'ultrafiltration sont des méthodes couramment utilisées dans les études *in vitro* et *in vivo* (Cohen & Nicoll-Griffith, 2012). Il existe aussi d'autres techniques qui ont leurs avantages et inconvénients (Deitchman,



Singh, & Derendorf, 2018) ([Annexe II.2](#)). Cependant, seule la technique RED est décrite dans cette thèse puisqu'elle se distingue par ses nombreux avantages : test à haut débit (équilibre atteint sur une courte période de temps), analyse après l'équilibre, réduction de la liaison non spécifique (van Liempd, Morrison, Sysmans, Nelis, & Mortishire-Smith, 2011), utilisation de très petits volumes, et choix du seuil de coupure de poids moléculaire (molecular weight cut-off) pour les membranes. La technique RED est recommandée particulièrement pour presque tous les composés à petites tailles moléculaires (Buscher et al., 2014). Israili and Dayton (2001) rapportent l'utilisation d'autres techniques pour le même but, et ayant quelques avantages en commun (par ex. dichroïsme circulaire, HPLC, calorimétrie isotherme). Par ailleurs, Buscher et al. (2014) soulignent la nécessité d'inclure certains aspects bioanalytiques importants (tels que l'évaluation et l'optimisation de la liaison aux protéines plasmatiques) dans le processus de développement de médicaments. Ils recommandent aussi de travailler dans des conditions expérimentales standardisées et de suivre des critères de validation pour la détermination de la liaison aux protéines plasmatiques pour les médicaments qui s'avèrent cliniquement pertinents.

Quand il s'agit de lier un xénobiotique, les protéines plasmatiques ALB et AGP partagent le même rôle clé de transport de leurs ligands dans la circulation sanguine. Ces deux protéines sont donc utiles dans le développement de tests *in vitro* pour les études PK/PD (Bailey & Briggs, 2004; Fanali et al., 2012), surtout qu'une grande variété de xénobiotiques s'y lie de manière réversible. De plus, certains xénobiotiques se lient préférentiellement à l'une des deux protéines (ALB ou AGP) et d'autres se lient aux deux.

### **2.3.2. Liaison non linéaire à une seule protéine plasmatique**

Dans la plupart des cas de liaison aux protéines plasmatiques, des cinétiques linéaires et non linéaires typiques, selon l'isotherme de Langmuir, sont documentées pour les xénobiotiques. Mais, des cinétiques de liaison non linéaires atypiques peuvent également exister (par ex. la tigécycline) (Deitchman et al., 2018). Les médicaments les plus fortement liés aux sites de haute affinité auraient un coefficient d'association (KA) de l'ordre de  $10^4$  et  $10^6$  M<sup>-1</sup> (Kragh-Hansen et al., 2002). Cette liaison peut induire un changement conformationnel dans chacune des structures tertiaires et secondaires de la protéine (par ex. fragment de glycosylation, hélices  $\alpha$  et feuillets  $\beta$ ) (Anand & Mukherjee, 2013; Taguchi et al., 2013a). Les

interactions protéine-ligand se produisent en raison des forces électrostatiques, hydrophobes et de van der Waals, et en raison de la formation de liaisons hydrogène (Lehman-McKeeman, 2013).

Ces interactions pourraient être examinées en mesurant les paramètres énergétiques et thermodynamiques ( $\Delta G^\circ$ ,  $\Delta H^\circ$  et  $\Delta S^\circ$ ), et en utilisant le dichroïsme circulaire, la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FT-IR), la spectroscopie ultraviolet-visible (UV-Vis) (J. X. Huang et al., 2012; Xie, Wang, Xu, Sun, & Chen, 2010; Xie, Wang, Zhou, Wang, & Chen, 2011) et l'extinction de la fluorescence des fluorophores des protéines (Trp, Tyr) (Sułkowska, 2002). Les résultats thermodynamiques *in vitro* valideraient les interactions simulées et les changements conformationnels dans l'amarrage moléculaire ou « molecular docking » (J. X. Huang et al., 2012; Leach, 2001). La plupart des xénobiotiques acides (anions) et certains neutres se lient préférentiellement à l'ALB (Peters Jr., 1996b) ; tandis que la plupart ayant des caractéristiques basiques (des cations) et quelques autres caractéristiques neutres ont une plus grande affinité pour l'AGP (Piafsky & Borga, 1977; Routledge, 1988). La formation d'un complexe à partir d'un ligand et d'une protéine unique à l'équilibre est représentée dans l'interaction 1 selon la base théorique de « l'hypothèse du xénobiotique libre » (Toutain & Bousquet-Melou, 2002; Trainor, 2007).



**Interaction 1**

Dans le scénario d'interaction 1, les termes X, P et XP désignent, respectivement, un xénobiotique libre, une protéine plasmatique avec des sites vacants et un complexe protéine-xénobiotique. Cette relation nous permet de déterminer les paramètres suivants dans les Eqs. 1 à 6 pour la cinétique non linéaire typique (Deitchman et al., 2018; Wright, Boudinot, & Ujhelyi, 1996) : le coefficient d'association ( $K_A = k_1/k_2$ ) ; le coefficient de dissociation ( $K_D = k_2/k_1$ ) ; la capacité maximale de liaison ( $B_{max}$ ) ; et le nombre maximal de sites de liaison (N). À partir de l'interaction 1, les variables suivantes sont également déterminées : la concentration liée de xénobiotique à la protéine plasmatique ( $C_{bound}$ ), la concentration libre ( $C_{free}$ ), la concentration totale du xénobiotique ( $C_{total}$ ) dans le milieu, permettant ainsi de déduire la fraction liée de xénobiotique dans le plasma ( $f_{bound}$ ) et la fraction libre de xénobiotique dans le plasma ( $f_{up}$ ). Le  $R_{BP}$  représente le rapport de la concentration libre dans le sang sur celle libre dans le plasma. Si les valeurs

de  $R_{BP}$  et de  $f_{up}$  sont connues, cela nous permet d'estimer la fraction libre du xénobiotique dans le sang ( $f_{ub}$ ).

$$K_A = \frac{[XP]}{[X].[P]} = \frac{C_{bound}}{C_{free}.[P]} = \frac{1}{K_D} \quad (\mathbf{M^{-1}}) \quad \text{Equation 1}$$

$$C_{bound} = \frac{B_{max} \times C_{free}}{K_D + C_{free}} = \frac{B_{max} \times K_A \cdot C_{free}}{1 + K_A \cdot C_{free}} = \sum \frac{N_i \cdot P_i \cdot C_{free}}{K_D + C_{free}} \quad (\mathbf{M}) \quad \text{Equation 2}$$

$$C_{total} = [X] + [XP] = C_{free} + C_{bound} = C_{free} + \frac{B_{max} \times C_{free}}{K_D + C_{free}} \quad (\mathbf{M}) \quad \text{Equation 3}$$

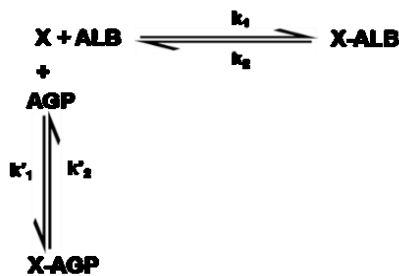
$$f_{bound} = \frac{[XP]}{[X] + [XP]} = \frac{C_{bound}}{C_{total}} = \frac{C_{bound}}{C_{free} + C_{bound}} \quad \text{Equation 4}$$

$$f_{up} = \frac{[X]}{[X] + [XP]} = \frac{C_{free}}{C_{total}} = \frac{C_{free}}{C_{free} + C_{bound}} = \frac{1}{1 + \frac{N_i [P]}{K_D}} \quad \text{Equation 5}$$

$$f_{ub} = \frac{f_{up}}{R_{BP}} \quad \text{Equation 6}$$

### 2.3.3. Liaison non linéaire à deux protéines plasmatiques

Il existe des xénobiotiques ayant la capacité de se lier à de multiples protéines plasmatiques (c'est-à-dire ALB et AGP). Certains xénobiotiques avec des groupes acides peuvent se lier à l'AGP (par ex. indométacine) et d'autres avec des groupes alcalins peuvent se lier à l'ALB (par ex. mésylate d'imatinib) et ce, malgré la particularité de la liaison préférentielle des xénobiotiques acides, basiques et neutres (Barnaby & Bottacini, 2004; Kremer et al., 1988). Il est donc possible de trouver une autre catégorie de xénobiotiques pouvant se lier à plusieurs protéines plasmatiques, tels que les inhibiteurs de la tyrosine kinase (Zsila, Fitos, Bencze, Keri, & Orfi, 2009). Cette adaptabilité de liaison est illustrée ci-dessous dans l'interaction 2. Les paramètres  $K_A$  (égal à  $k_1/k_2$ ) et  $K_D$  (égal à  $k_2/k_1$ ) désignent respectivement le coefficient d'association et le coefficient de dissociation de l'ALB, tandis que  $K'_A$  (égal à  $k'_1/k'_2$ ) et  $K'_D$  (égal à  $k'_2/k'_1$ ) sont ceux de l'AGP.



Interaction 2

Les paramètres  $C_{\text{total}}$ ,  $f_{\text{bound}}$  et  $f_{\text{up}}$  sont, respectivement, exprimés dans les équations 7, 8 et 9, pour le scénario d'interaction 2 entre le même xénobiotique et un mélange d'ALB et d'AGP.  $N_1$  et  $N_2$  dans l'équation 9 sont, respectivement, les nombres maximaux de sites de liaison pour chacune des deux protéines plasmatiques.

$$C_{\text{total}} = [X] + [X.ALB] + [X.AGP] = C_{\text{free}} + C_{\text{bound}} \quad \text{Equation 7}$$

$$f_{\text{bound}} = \frac{[X.ALB] + [X.AGP]}{[X] + [X.ALB] + [X.AGP]} = \frac{C_{\text{bound}}}{C_{\text{total}}} = \frac{C_{\text{bound}}}{C_{\text{free}} + C_{\text{bound}}} \quad \text{Equation 8}$$

$$f_{\text{up}} = \frac{[X]}{[X] + [X.ALB] + [X.AGP]} = \frac{C_{\text{free}}}{C_{\text{total}}} = \frac{C_{\text{free}}}{C_{\text{free}} + C_{\text{bound}}} = \frac{1}{1 + \frac{N_1[ALB]}{K_D} + \frac{N_2[AGP]}{K'_D}} \quad \text{Equation 9}$$

#### 2.3.4. Principaux facteurs influençant la liaison aux protéines plasmatiques

L'étendue de la liaison aux protéines plasmatiques peut varier en fonction des facteurs liés au ligand et aux protéines. Certains de ces facteurs principaux sont la concentration du ligand, sa stéréosélectivité et ses caractéristiques physicochimiques (par ex. pKa, pKb, lipophile, hydrophile) ; les concentrations des protéines plasmatiques et leurs natures natives ou non glycosylées. S'ajoutent également de nombreux facteurs confondants pendant la manipulation des techniques de liaison, tels que : l'adhésion non spécifique de xénobiotiques dans le milieu d'incubation, l'adhésion à l'appareil de dialyse, la fuite de protéines dans le dialysat (Kwong, 1985), etc. D'autres facteurs expérimentaux peuvent influencer l'étendue de la liaison protéique comme le pH, la température, le temps nécessaire pour atteindre l'équilibre d'un complexe protéine-ligand, l'insolubilité et l'instabilité du ligand et la présence d'autres produits chimiques dans le milieu d'incubation pouvant déplacer le ligand initial du site de liaison.

D'autres facteurs biologiques affectent également la liaison du ligand aux protéines plasmatiques. Une variabilité ontogénique a été rapportée pour la concentration plasmatique à la fois en ALB et en AGP, et pour la fraction liée du ligand (Clewell et al., 2002; Hill & Abramson, 1988; McNamara & Alcorn, 2002; Peters Jr., 1996c). Les variantes des protéines plasmatiques et l'hétérogénéité des entités glucidiques contribuent à la variabilité de la liaison du ligand au sein d'une population (Madison et al., 1994) ou entre des populations (Arai, Ishioka, Huss, Madison, & Putnam, 1989; Kragh-Hansen, Brennan, Galliano, & Sugita, 1990; Weitkamp et al., 1973).

Bien que les niveaux d'ALB ne varient pas significativement selon le sexe, l'AGP a une variation basée sur le sexe puisque sa concentration est influencée par les hormones sexuelles (par ex. œstrogènes) (M. Gandhi, Aweeka, Greenblatt, & Blaschke, 2004; Israili & Dayton, 2001). Ainsi, la grossesse et l'utilisation de contraceptifs oraux peuvent diminuer les concentrations d'AGP (Piasky & Borga, 1977). Finalement, l'état de santé du foie affecte la liaison au ligand, car les concentrations plasmatiques d'ALB et d'AGP peuvent significativement diminuer dans le cas d'une insuffisance hépatique (Pinquier, Urien, Chaumet-Riffaud, & Tillement, 1989). En revanche, dans le cas d'une inflammation aiguë, la concentration d'ALB diminuerait, tandis que l'AGP augmenterait significativement (B. H. Bowman, 1993; Piasky, 1980).

### **2.3.5. Interactions entre xénobiotiques aux sites de liaison**

La liaison de deux xénobiotiques à la même protéine plasmatique pourrait induire des interactions pharmacocinétiques/toxicocinétiques (PK/TK) (Christensen, Baker, Tucker, & Rostami-Hodjegan, 2006; McElnay & D'Arcy, 1983). De telles interactions nécessitent un examen plus approfondi pour évaluer l'impact de la liaison à la protéine plasmatique ou du déplacement sur la clairance *in vivo* du ligand. Dans d'autres cas, la liaison simultanée peut être indépendante sans induire d'interaction. Le déplacement à partir de sites de liaison de haute affinité/faible capacité est cependant dû à une interaction entre deux xénobiotiques au niveau des sites de liaison de la même protéine plasmatique (Pike et al., 1981).

Il existe trois types d'interactions au niveau du site de liaison des protéines. Une interaction compétitive se produit si un xénobiotique B (déplaceur ou compétiteur) a une forte affinité pour un site de liaison de la protéine. En conséquence sa liaison déplacera le xénobiotique A (de moindre affinité) de ce même site de liaison (Lehman-McKeeman, 2013). Une interaction anti-coopérative se produit lorsque des ligands se lient à des sites différents. Dans ce cas, le déplaceur diminue l'affinité du xénobiotique déplacé qui était lié à un site différent. Une interaction coopérative est possible si la liaison d'un ligand augmente l'affinité de l'autre (Lehman-McKeeman, 2013). Comme mentionné précédemment, ALB a deux principaux sites de liaison (Sudlow I et II) et AGP a un site de liaison principal avec une forte affinité. Ainsi, un déplacement potentiel de xénobiotique A pourrait se produire en présence de xénobiotique B aux sites de

liaison avec de fortes affinités d'ALB et d'AGP. Dans ce cas, le paramètre  $f_{u_p}$  du xénobiotique A (substrat) augmente, et il pourrait avoir un impact sur sa clairance *in vivo*. L'ampleur de cet impact dépendra du fait que le xénobiotique est lentement ou rapidement éliminé.

Un phénomène de déplacement au niveau de l'ALB a été documenté pour la première fois par le chercheur Sudlow et ses collègues qui avaient utilisé la méthode de la sonde fluorescente pour détecter ce déplacement (Sudlow et al., 1975; Sudlow et al., 1976). Grâce à leur travail, ils ont démontré l'existence de deux sites principaux spécifiques (I et II) dans l'ALB. Tandis que pour l'AGP, Westphal (1971) a rapporté la première étude sur le déplacement des ligands endogènes du site unique de haute affinité de cette protéine. En outre, Müller (1989) a résumé de nombreux cas de déplacement de ligands exogènes en présence de ligands endogènes. L'auteur a signalé une compétition possible entre les acides gras libres (acides oléique et palmitique), la bilirubine et un autre médicament (3H-chlorpromazine). Il a souligné aussi l'importance de la stéréosélectivité du ligand qui pourrait influencer sur l'étendue de la liaison dans le plasma. D'après Maruyama et al. (1990), les sondes acides et basiques ne partagent pas la même région de liaison, car les médicaments basiques ont fortement déplacé les sondes basiques et acides du site de liaison de l'AGP. Cependant, les sondes acides n'ont eu aucun effet sur la plupart des sondes basiques. De plus, le déplacement du ligand peut être dû à des modifications conformationnelles des protéines plasmatiques (c'est-à-dire la réduction ou l'augmentation des hélices  $\alpha$ , feuillets  $\beta$  et tonneaux  $\beta$ ) (Otagiri & Chuang, 2016; Taguchi et al., 2013a). Le déplacement du ligand serait mieux évalué si les environnements des sites de liaison aux protéines plasmatiques étaient examinés au niveau moléculaire (par ex. les résidus polaires, chargés et hydrophobes).

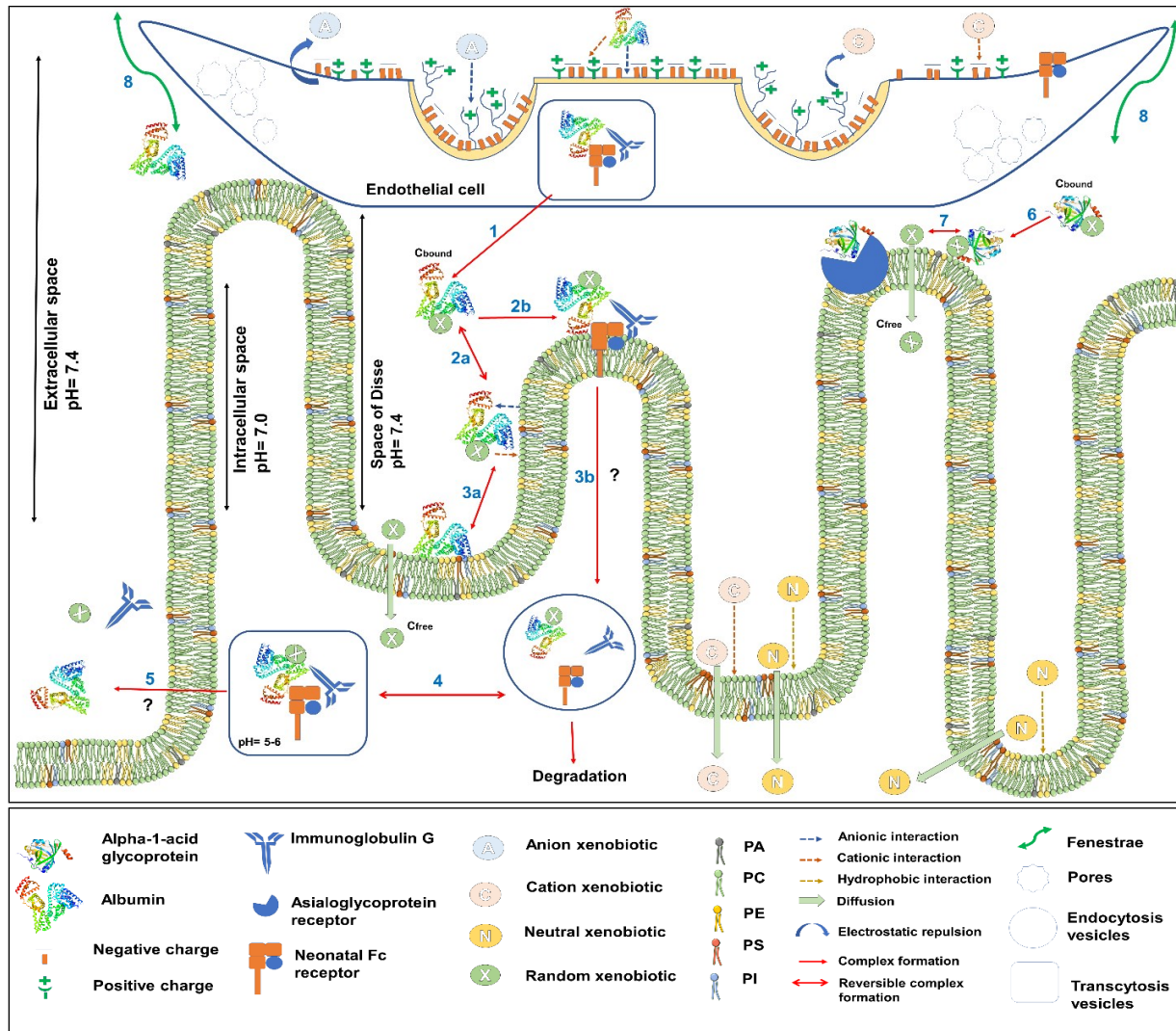
## **2.4. La captation hépatique médiée par les protéines plasmatiques**

### **2.4.1. Suggestion d'un modèle conceptuel : un résumé sur les mécanismes d'interaction potentiels entre les protéines plasmatiques chargées et la membrane plasmique sinusoïdale**

Dans la figure 2.4, nous suggérons un modèle conceptuel, en nous basant sur les notions et les théories présentées dans les chapitres 1 et 2, pour illustrer schématiquement les interactions extracellulaires entre les protéines plasmatiques multichargées (ALB et AGP) et la membrane plasmique sinusoïdale d'un hépatocyte polarisé. Le passage de telles macromolécules dans tout l'espace interstitiel est retardé en raison de la présence de microvillosités parenchymateuses. Les deux protéines ALB et AGP résideraient alors suffisamment dans l'espace interstitiel pour qu'elles puissent entrer en contact avec la membrane plasmique des hépatocytes. Par conséquent, outre l'augmentation de la polarité, l'asymétrie et les courbures des biomembranes, prises ensemble, augmentent l'accessibilité à la matrice intracellulaire des hépatocytes pour les substances chimiques endogènes/exogènes et les protéines extracellulaires, en les attirant vers des groupes fonctionnels à la tête des phospholipides (Drubin & Nelson, 1996). En conséquence, l'ALB et l'AGP pourraient soit se lier à des récepteurs spécifiques sur les membranes plasmiques des hépatocytes, ce qui conduirait à leur endocytose et transcytose dans le cytosol ; soit s'adhérer temporairement aux phospholipides avant de recirculer à travers les fenêtres dans les sinusoïdes. Les deux mécanismes d'interaction documentés pour l'ALB et l'AGP sont résumés dans la figure 2.4.

Dans un premier temps, nous expliquons les mécanismes de liaison de ces protéines solubles à leurs récepteurs membranaires spécifiques. Comme le montre la figure 2.4, l'ALB (C-terminal, domaine III) s'approcherait, simultanément avec les IgG, des sites de liaison indépendants de FcRn (J. T. Andersen et al., 2006; Sand et al., 2014). Dans une réponse homéostatique, le complexe ternaire (FcRn-IgG-ALB) est intériorisé là où les ALB et les IgG sont soit dégradés sous effet lysosomal, soit recyclés dans des cellules parenchymateuses et non parenchymateuses. Dans les endosomes, l'ALB se lie fortement au FcRn saturable dans un rapport stœchiométrique de 1:1, dans des conditions acides douces (pH= 5-6) (J. Kim, Hayton, Robinson, & Anderson, 2007). Ensuite, le complexe ternaire se décompose une fois que la vésicule de transcytose atteint la surface cellulaire, où le pH augmente à nouveau jusqu'à 7,4, libérant ainsi de l'ALB et des IgG dans l'espace interstitiel (J. T. Andersen et al., 2014). La formation du complexe FcRn-IgG-FcRn

se produit chez les humains, les rats et les souris (Sand et al., 2014). De plus, la substitution des résidus dans l'ALB influera très probablement sur sa propre captation, son endocytose et sa clairance, en particulier dans le foie (J. T. Andersen et al., 2014; Otagiri & Chuang, 2016).



**Figure 2.4. Modèle conceptuel de la captation potentielle médiée par les protéines plasmatiques au niveau des sinusoides hépatiques (© Bteich Michel, Thèse 2020).**

**En anglais :** PA phosphatidic acid ; PC phosphatidylcholine ; PE phosphatidylethanolamine ; PI phosphatidylinositol ; PS phosphatidylserine.

Dans la figure 2.4, nous présentons l'illustration des interactions extracellulaires pouvant survenir entre les deux protéines plasmatiques multichargées (ALB et AGP) présentes dans l'espace interstitiel et à proximité de la membrane plasmique sinusoidale d'un hépatocyte (microvillosités sinusoidales). 1) Exocytose du complexe ternaire des LSEC et fixation d'un xénobiotique à l'ALB



dans l'espace de Disse, 2a) attractions électrostatiques et autres interactions faibles entre les résidus de surface d'ALB et les groupes de phospholipides, 3a) réduction de la distance de diffusion, adsorption d'ALB sur les phospholipides peut induire un changement conformationnel de l'ALB (Horie et al., 1988) et la libération du ligand à proximité de la membrane facilitant sa diffusion ou sa captation via des transporteurs membranaires (Burczynski et al., 2001; Forker & Luxon, 1983; Tsao et al., 1988) 2b) le complexe ALB-xénobiotique entre en contact avec le FcRn pour l'internalisation, 3b) endocytose de l'ALB via le complexe ternaire ; le point d'interrogation représente la possibilité de captation d'un xénobiotique lié – à des domaines autres que le domaine III – ou fusionné à l'ALB avec la vésicule d'endocytose, 4) un catabolisme possible du complexe ternaire et du xénobiotique dans l'endosome (ou dégradation lysosomale), 5) l'ALB (C-terminal, domaine III) se lie au FcRn dans des conditions acides douces dans les endosomes (pH= 5-6) en raison de la protonation des résidus histidine (Nilsen, Sandlie, Roopenian, & Andersen, 2018). Le recyclage de l'ALB et de l'IgG via la vésicule d'exocytose en ciblant le domaine basolatéral de l'hépatocyte polarisé ; le point d'interrogation représente la possibilité de recyclage de xénobiotiques avec ALB, 6) adsorption d'asialo- ou d'agalacto-AGP sur les phospholipides et réduction de la distance de diffusion pour le complexe AGP-xénobiotique, 7) diminution de la capacité de liaison due au changement de la conformation de l'asialo- ou agalacto-AGP, ce qui permettrait en conséquence la liaison de la protéine à l'ASGP-R saturable et la libération du ligand près de la membrane, contribuant ainsi à la captation intracellulaire du xénobiotique, 8) les protéines plasmiques sont échangées entre le sang et l'espace de Disse à travers les fenestrations.

Les deux structures cristallines de l'ALB et de l'AGP sont conçues en utilisant PyMol. Les données de structure cristalline de l'ALB humain sont résolues en utilisant le fichier PDB 1HK4, alors que les données de structure cristalline de l'AGP humain sont résolues avec l'utilisation du fichier PDB 3KQ0. En outre, il est confirmé que les récepteurs membranaires de la membrane de l'endothélium facilitent la transcytose cellulaire de l'ALB dans l'espace interstitiel, assurant ainsi son échappement à la dégradation lysosomale dans les LSEC (Ghitescu & Fixman, 1984). Bien que le récepteur gp60 soit responsable de 50 % de la transcytose d'ALB dans les LSEC (Schnitzer & Oh, 1992), seul le FcRn est inclus dans notre modèle conceptuel pour deux raisons. Premièrement, le FcRn ne se trouve pas seulement sur les LSEC, mais également sur les cellules parenchymateuses, alors que le gp60 ne se trouve pas sur les hépatocytes et, deuxièmement, le recyclage par le FcRn contribue largement aux concentrations endogènes d'ALB (J. Kim et al., 2007).

En effet, de tels mécanismes de liaison aux récepteurs membranaires valorisent le rôle clé de l'ALB en tant que véhicule intéressant pour la livraison intracellulaire des médicaments et la prolongation de leurs effets thérapeutiques (Larsen, Kuhlmann, Hvam, & Howard, 2016; Sockolosky & Szoka, 2015). Cependant, d'autres études sur la livraison ciblée de médicaments sont nécessaires pour mieux comprendre l'implication de FcRn et des autres récepteurs pour l'ALB (par ex. gp60, gp30, gp18) dans la potentialisation de la captation cellulaire de xénobiotiques (Larsen et al., 2016). Quant à l'AGP, seule l'asialo- ou l'agalacto-AGP se lieraient au récepteur d'asialo-glycoprotéine saturable (ASGP-R) après avoir induit la transition de conformation de la protéine plasmique entre les structures du feuillet  $\beta$  et de l'hélice  $\alpha$ . Selon Nishi et al. (2006), les liaisons disulfures sont un facteur clé pour cette transition conformationnelle. Ce changement diminuerait la capacité de liaison et induirait par conséquent la libération du ligand près de la membrane (Nishi et al., 2006; Taguchi et al., 2013a). Le xénobiotique peut alors diffuser potentiellement à travers la bicouche lipidique.

Dans un second temps, nous expliquons comment les résidus chargés à la surface de protéines solubles (ALB et AGP) adhèreraient aux biomembranes ([Annexe I.2](#)), à la suite de leurs interactions électrostatiques avec des charges opposées de groupes fonctionnels à la tête des phospholipides. Il est bien connu qu'une biomembrane a une charge nette négative puisque tous ses phospholipides ont des groupes phosphate chargés négativement ( $\text{PO}_4^-$ ). Exclusivement dans les phospholipides zwitterions PC [ $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ ] et PE ( $\text{NH}_3^+$ ), il existe également des groupes aminés positifs. De nombreuses études ont démontré que les interactions électrostatiques – provoquant l'adsorption ou la répulsion des cations et des anions libres – sont absolument fondamentales pour : la stabilité de la membrane plasmique, le phénomène de fusion vésiculaire, la liaison non spécifique ou l'adsorption de protéines aux constituants de la membrane plasmique et la diffusion de petites molécules à travers la bicouche lipidique (Bockmann & Grubmuller, 2004; Eisenberg, Gresalfi, Riccio, & McLaughlin, 1979; A. McLaughlin, Grathwohl, & McLaughlin, 1978; S. McLaughlin, Mulrine, Gresalfi, Vaio, & McLaughlin, 1981).

#### **2.4.2. Un résumé des facteurs potentiels influençant les interactions entre les protéines plasmatiques et les composants de la membrane plasmiques des hépatocytes.**

Les changements dans les caractéristiques des solutions plasmatiques (force ionique, concentration minérale, pH ou température) influencent significativement la charge nette, les conformations et la solubilité des protéines plasmatiques (Butler et al., 1935; Butler & Montgomery, 1932; Constable & Stämpfli, 2005; Murayama & Tomida, 2004; Sengupta, Das, & Sen, 2017; Zhao & Lappalainen, 2012). Ces derniers changements influencent également les caractéristiques des bicouches membranaires (potentiel de charge, fluidité, épaisseur et perméabilité) (Papahadjopoulos & Miller, 1967; Szekely et al., 2011). D'autre part, de nombreux facteurs influencent le degré des interactions entre les protéines interstitielles (par ex. ALB) et les lipides de la membrane plasmique sinusoidale des hépatocytes : 1) abondance ou concentration de la protéine dans le plasma par rapport à l'espace intracellulaire ; 2) emplacement de la protéine plasmatique (prédominant dans l'espace interstitiel ou dans le plasma) ; 3) type glycosylé ou non glycosylé d'une protéine plasmatique et sa taille moléculaire pouvant moduler la forme et la dynamique des bicouches lipidiques (Zhao & Lappalainen, 2012) ; 4) nombre, taille et conformation des domaines peptidiques dans une protéine plasmatique (par ex. trois grands domaines d'hélices dans l'ALB) ; 5)

abondance de résidus chargés dans la chaîne peptidique ; 6) position des résidus chargés et hydrophobes des protéines (surface ou poches) favorisant la liaison du ligand et interactions avec des charges opposées distribuées sur la biomembrane ; 7) présence de rainures peu profondes, de crevasses et de protrusions dans la protéine dans lesquelles un phospholipide ne peut pas se lier spécifiquement, mais interagirait plutôt faiblement (Lee, 2005) ; 8) analyse des glycérophospholipides zwitterions PE et PC contribuant aux attractions électrostatiques (Fajardo, McMeekin, & LeBlanc, 2011) ; 9) omniprésence de microvillosités tout autour du périmètre de la couche sinusoïdale, ce qui augmenterait la rétention des protéines plasmatiques et en conséquence la chance d'avoir des interactions protéine-lipide dans les plis de la membrane plasmique ; 10) la longueur et le niveau d'insaturation des FA (par ex. pour l'acide stéarique, l'acide linoléique et l'acide oléique) qui constituent les glycérophospholipides et les sphingolipides, et qui influent sur l'épaisseur et la fluidité de la membrane plasmique ; les caractéristiques des FA sont donc directement reliées aux fonctions membranaires (Holub & Kuksis, 1971; Saliba et al., 2015; R. Wood & Harlow, 1969) ; 11) amélioration de la perméabilité des protéines plasmatiques due à la présence de fenestrations dans les LSEC (Cheng, Morsch, Shami, Chung, & Braet, 2019; Herrnberger et al., 2014) et à la présence des vésicules enrobées contenant des récepteurs membranaires ; ces vésicules fonctionnent comme navettes pour les protéines plasmatiques (Ghitescu & Fixman, 1984; Renkin, 1988) ; 12) mutation des résidus de protéines plasmatiques ou substitution de phospholipides ; 13) la présence des molécules d'eau formant des couches autour des protéines plasmatiques contribuant aux échanges polaires interstitiels ; 14) pression osmotique exercée par les protéines plasmatiques (c'est-à-dire ALB et AGP) et pression hydrostatique du sang qui dicte le mouvement des protéines dans l'espace interstitiel (Renkin, 1988) ; 15) la présence des récepteurs membranaires et la possibilité de captation des complexes protéine-ligand par internalisation (c'est-à-dire récepteur fœtal (FcRn) pour l'ALB et récepteur asialo-glycoprotéine (ASGP-R) pour l'asialo-AGP) ; et 16) d'autres facteurs pathophysiologiques ayant des influences indirectes (par ex. vieillissement, sexe, pathologies hépatiques et régime alimentaire).

## 2.5. Variabilités inter-espèces en ALB et en AGP

La variabilité inter-espèce des caractéristiques des protéines plasmatiques (par ex. structure, composition et concentration) est assez courante dans la nature. La variabilité inter-espèce de la composition des protéines plasmatiques, tout comme le polymorphisme inter-espèce (Yuasa et al., 1990; Yuasa et al., 1997), résulte principalement des changements de nucléotides et des acides aminés au cours du temps, puisque l'évolution moléculaire exige des divergences d'un ancêtre commun (Russell F. Doolittle, 1984). Les protéines plasmatiques changent les résidus dans leurs séquences à des vitesses différentes. L'ALB est la séquence qui change le plus rapidement, ayant remplacé environ 70-80% de ses acides aminés en 500 millions d'années (R. F. Doolittle, 1992). Elle a étendu sa séquence unique pour devenir une configuration en forme de cœur, composée de trois domaines, chez les mammifères et d'autres vertébrés. La séquence ALB moderne est donc très différente de son gène ancestral inactif (Peters Jr., 1996b). Comme pour l'AGP, le gène ORM1 montre un taux évolutif assez élevé (en particulier chez les rongeurs) selon une comparaison de résidus entre différentes espèces (Yuasa et al., 1990).

Les changements d'acides aminés se trouvant dans les cavités de liaison de l'ALB et de l'AGP sont des facteurs importants devant être étudiés dans toute nouvelle recherche en pharmacologie et en toxicologie ([Annexe II.3](#)). En outre, les différences intra-espèces et inter-espèces entre les résidus d'une même protéine entraînent une variabilité de la cinétique de liaison. Par conséquent, pour l'extrapolation inter-espèce, l'amarrage moléculaire des ligands et la modélisation quantitative, les études précliniques et cliniques devraient tenir compte de telles différences au niveau de la liaison aux protéines plasmatiques (c'est-à-dire le type d'attraction moléculaire). Et ce, en utilisant des données moléculaires sur les résidus qui composent les poches de liaison et leurs entourages dans les protéines.

## 2.6. Conclusion du chapitre 2

L'ALB et l'AGP ont des rôles clés comme biomarqueurs d'effets, et comme véhicule pour le transport et le stockage de xénobiotiques (médicaments et contaminants) dans le plasma. Certains des résidus qui existent dans les poches de liaison de ces protéines ont une influence directe sur la cinétique de liaison des xénobiotiques. Il existe trois types de cinétique de liaison : typique linéaire, typique non linéaire et atypique. Plusieurs méthodes nous permettent de mesurer la  $C_{free}$  et la  $f_u$  dans le plasma ainsi que d'identifier le type de cinétique pour un ligand particulier. De plus, la variabilité inter-espèce des protéines plasmatiques est un facteur à considérer dans les études cinétiques qui incluent plusieurs espèces.

## **CHAPITRE 3. Contexte général de thèse**

### 3.1. Lacunes dans la littérature

Tel que mentionné précédemment, l'industrie pharmaceutique aura besoin de nouveaux modèles prédictifs afin d'accélérer le processus de découverte et de développement des médicaments, tout en réduisant les coûts colossaux. Pour éviter ou réduire les sous-estimations (et surestimations) des paramètres PK/TK des médicaments fortement liés (par ex. la  $CL_{in vivo}$ ), il faudrait comprendre les interactions qui ont lieu entre chaque médicament et les protéines plasmatiques, et entre les complexes (protéines plasmatiques-médicament) et les constituants des membranes plasmiques d'hépatocytes. C'est pourquoi une revue de littérature exhaustive sera requise sur ces interactions et les mécanismes qui en découlent. Cette revue pourrait nous aider à mieux choisir les paramètres nécessaires pour les modèles quantitatifs de  $CL_{in vivo}$  ainsi que de vérifier si une approche générique peut être utilisée pour une série de médicaments.

Parmi les paramètres sur lesquels les prédictions des modèles dépendent, le terme  $f_{up}$  a bien évolué avec notre compréhension qui s'accroît sur la facilitation de la captation hépatique (ou « hepatic uptake ») d'un médicament par la protéine plasmatique (par ex. ALB). Toutefois, les sous-prédictions existantes de la  $CL_{in vivo}$  exigent de développer de nouvelles approches prédictives ou bien de raffiner celles qui existent déjà. Cela implique que le paramètre  $f_{up}$  devrait probablement être ajusté quand il sera utilisé dans les futures prédictions de la  $CL_{in vivo}$  de certains médicaments.

En outre, des médicaments peuvent se lier fortement dans le plasma, à l'ALB et à l'AGP. Ces deux protéines plasmatiques ont certaines caractéristiques similaires et d'autres distinctes. Or, aucune étude n'a exploré jusqu'à présent les répercussions distinctives de la liaison à ces protéines sur les paramètres extrants PK/TK (c'est-à-dire la  $CL_{int}$  et la  $CL_h$ ). De ce fait, aucun modèle prédictif de  $CL_{in vivo}$  n'est encore développé pour évaluer ces répercussions.

L'hypothèse qui sera vérifiée est la possibilité d'améliorer les prédictions de la clairance hépatique des médicaments qui ont une forte liaison dans le plasma. De plus, nous vérifierons si de nouveaux paramètres intrants peuvent être utiles et si une approche générique peut être développée. Finalement, les deux protéines ALB et AGP ont de caractéristiques différentes, nous vérifierons donc si leurs impacts sur la clairance sont différents et s'il est possible de simuler la  $CL_{in vivo}$  en présence de ces deux protéines.

## **3.2. Objectifs**

### **3.2.1. Objectif général**

L'objectif général de cette thèse est d'adapter des approches prédictives existantes ou d'en développer et d'en valider des nouvelles afin d'estimer la  $CLh_{in vivo}$  ainsi que sa variation pour des médicaments fortement liés dans le plasma, à partir des données *in vitro* (ou *in situ*) qui seront comparées à celles déjà obtenues *in vivo* (ou *in situ*).

### **3.2.2. Objectifs spécifiques**

Le projet de recherche est réparti en trois objectifs spécifiques :

- 1) Présenter une revue de littérature complémentaire à celles déjà publiées autour de la captation facilitée par les protéines dans le foie (c'est-à-dire protéines plasmatiques, transporteurs et récepteurs membranaires), ainsi que de proposer un arbre décisionnel pour faciliter la sélection des approches prédictives appropriées de  $CLh_{in vivo}$  pour des médicaments ayant des caractéristiques différentes.
- 2) Évaluer les répercussions de fortes liaisons aux deux protéines plasmatiques ALB et AGP sur la clairance hépatique de deux xénobiotiques choisis (perampanel et fluoxétine) ayant de fortes affinités aux deux protéines et un métabolisme exclusif (ou prédominant) dans le foie.
- 3) Développer et valider un nouveau modèle prédictif de  $CLh_{in situ}$  pour les xénobiotiques ayant le potentiel de se lier fortement dans le plasma, à l'ALB ainsi qu'à l'AGP.



### 3.3. Méthodologie générale

#### 3.3.1. Sélection des médicaments

Dans le chapitre 4, les données de  $CL_{int}$ , « uptake » et  $CL_h$  pour 19 médicaments publiées dans Kimoto et al. (2018) ont été reprises pour valider de nouvelles approches IVIVE. Ces médicaments (de la classe ECCS 1A en se basant sur l' « Extended Clearance Classification System ») ont été sélectionnés parce qu'ils sont majoritairement métabolisés dans le foie et transportés dans les hépatocytes par le biais des transporteurs membranaires, et parmi ces médicaments, la grande majorité est fortement liée aux protéines plasmatiques.

Dans le but de sélectionner des médicaments ayant les caractéristiques spécifiques d'être fortement liés dans le plasma, à la fois à l'ALB et à l'AGP, la collecte de données obtenues chez les humains en bonne santé pour des médicaments commercialisés (N = 1907 médicaments) ayant des caractéristiques pharmacocinétiques différentes a été compilée à partir des références suivantes : Benet et al. (2011); Dollery and Boobis (1999); Goodman et al. (2011); Hosey et al. (2016); Israili and Dayton (2001); Lexi-Comp (2013, 2016); Manallack (2009); Thummel et al. (2017); C. Y. Wu and Benet (2005).

Une recherche avancée a été faite pour plusieurs médicaments afin de compléter les données sur les caractéristiques de liaison plasmatique, dans les bases de données suivantes : PubMed®, [www.medicines.org.uk](http://www.medicines.org.uk), [www.accessdata.gov](http://www.accessdata.gov) et Google Scholar. Pour ce faire, les mots-clés suivants ont été utilisés : [drug's NAME] & [albumin] ; [drug's NAME] & [orosomucoïd] ; [drug's NAME] & [alpha-1-acid glycoprotein] ; [plasma protein binding]. Une autre recherche avancée a été faite au sujet de la perfusion des organes et particulièrement du foie en utilisant les mots-clés suivants : [perfused organs] ; [perfused liver] ; [isolated and perfused rat liver] ; [perfusion] ; [rat dissection]. Cette compilation de données a été débutée à l'automne 2014 et elle a été finalisée à l'automne 2016.

Dans les chapitres 5 et 6, après la construction d'une banque de données pour 1907 médicaments ([Figure 1.4](#)), nous avons groupé ces derniers dans deux catégories (CAT1 et CAT2). La CAT1 renferme les médicaments qui sont fortement liés dans le plasma et qui sont métabolisés majoritairement (ou exclusivement) dans le foie. Cette CAT1 est ensuite divisée en trois sous-catégories

(SUBCAT1, 2 et 3). La sous-catégorie SUBCAT1 renferme les médicaments qui sont liés aux deux protéines plasmatiques ALB et AGP, en plus d'être métabolisés dans le foie.

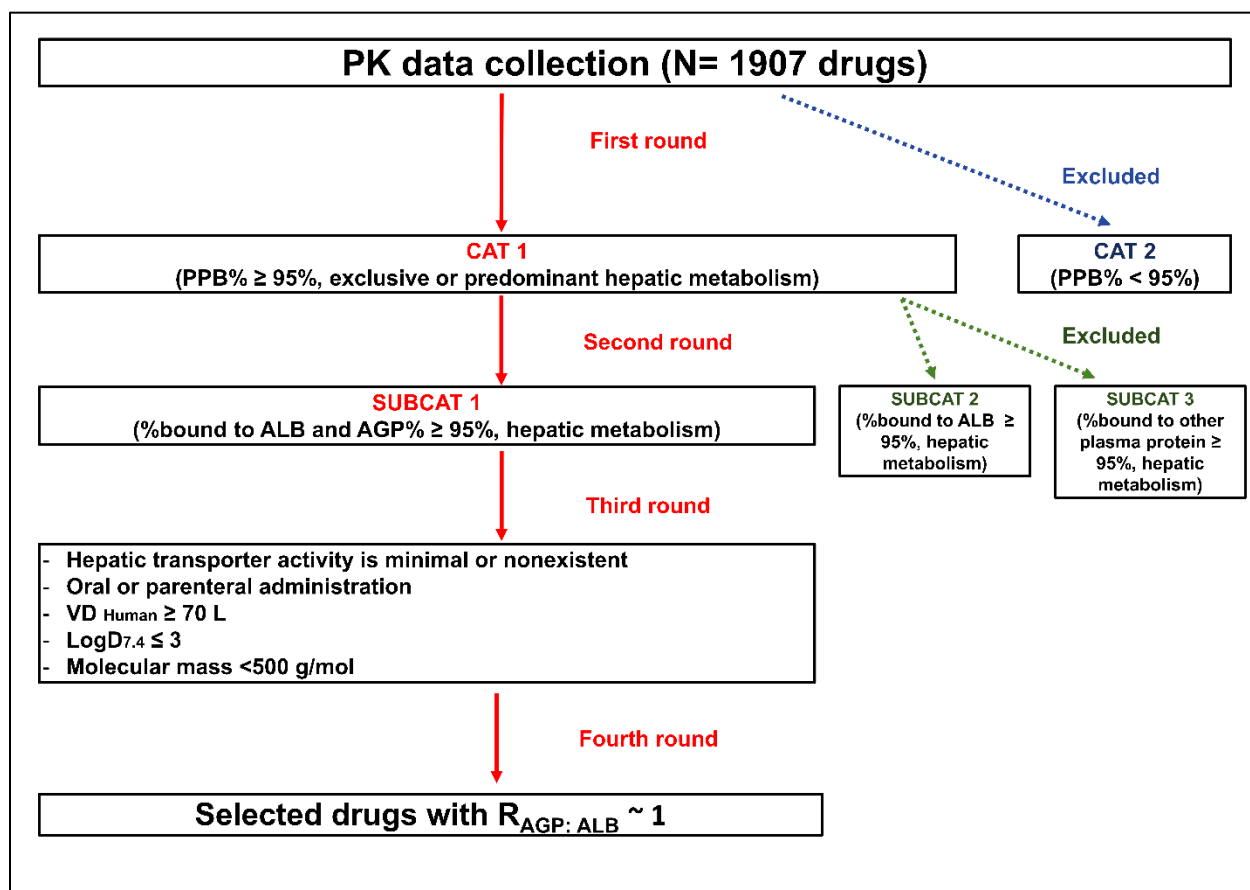


Figure 3.1. Quatre étapes pour la sélection finale des médicaments (© Bteich Michel, Thèse 2020).

**En anglais:** CAT category ; PPB plasma protein binding ; SUBCAT subcategory ; R<sub>AGP:ALB</sub> apparent binding ratio between alpha-1-acid glycoprotein and albumin.

Des étapes 3 et 4 (Figure 3.1), les deux médicaments perampanel (PER) et fluoxétine (FLU) ont été sélectionnés pour les expériences *in situ* (c'est-à-dire foie isolé et perfusé du rat (IPRL)) grâce à leurs coefficients d'affinités et de leurs caractéristiques métaboliques et physicochimiques. Parmi ces caractéristiques, nous citons :

➤ **Caractéristiques pharmacocinétiques**

- Les médicaments sont administrés par voie orale ou parentérale (intramusculaire, intrapéritonéale ou intraveineuse).

- Les médicaments sont fortement liés à ALB et AGP (PPB %  $\geq$  95 %).
- Leur métabolisme principal a lieu au niveau hépatique.
- L'activité des transporteurs de membrane hépatique pour la captation des médicaments est minimale ou inexistante.
- Les médicaments sont fortement répartis dans les cellules (volume de distribution [VD] chez l'homme  $\geq$  70 L) pour éviter de travailler avec des médicaments qui s'accumulent dans l'environnement extracellulaire et qui se diffusent moins dans le milieu intracellulaire (Klaassen, 2013).

➤ **Caractéristiques physicochimiques**

- Les médicaments sont hydrophiles (ou faiblement hydrophobes) avec  $\text{LogD}_{7.4} \leq 3$  pour éviter une forte liaison non spécifique (par ex. parois en plastique) dans le milieu *in vitro* (Lombardo, Shalaeva, Tupper, & Gao, 2001).
- Les médicaments qui ont une masse moléculaire  $< 500$  g/mol, pour minimiser l'adsorption sur la membrane de dialyse des inserts *in vitro*.

➤ **Critères d'exclusion des médicaments**

- Les médicaments dont l'étendue de liaison est faible à moyenne (c'est-à-dire CAT 2).
- Les médicaments dont leur degré de PPB est élevé et qui sont liés à l'ALB uniquement (c'est-à-dire SUBCAT 2) ou à d'autres protéines plasmatiques (c'est-à-dire SUBCAT 3).
- Les médicaments qui sont métabolisés par voies métaboliques extrahépatiques primaires.
- Protéines thérapeutiques recombinantes, sels et vaccins.
- Administrations cutanées ou oculaires.

### 3.3.2. Expériences *in vitro*, *in situ*, *in silico*

#### 3.3.2.1. Choix des concentrations

Dans le [chapitre 5](#), les concentrations physiologiques humaines (adulte) des protéines plasmatiques ont été choisies au niveau physiologique pour les perfusions de foie (IPRL) ; soit 40 g/L (~600  $\mu$ M) pour l'ALB (Peters Jr., 1996b) et 1 g/L (~20  $\mu$ M) pour l'AGP [15]. Quant aux concentrations de médicaments de PER et de FLU, elles variaient de 2,5  $\mu$ M à 35  $\mu$ M. Nous avons choisi cette gamme de concentrations de médicaments pour deux raisons : 1) les concentrations de médicaments sortant du foie devraient couvrir les niveaux de concentration thérapeutique des deux médicaments (PER et FLU) – d'après les études cliniques, les concentrations plasmatiques maximales pour le PER varient de 36,8  $\mu$ g/L à 335,7  $\mu$ g/L (c'est-à-dire de 0,11  $\mu$ M à 0,96  $\mu$ M) (Patsalos, 2015) et pour le FLU de 15  $\mu$ g/L à 55  $\mu$ g/L (c'est-à-dire de 0,043  $\mu$ M à 0,16  $\mu$ M) (FDA, 2017b) ; et 2) l'étendue de concentrations choisies est suffisamment élevée pour obtenir une cinétique de liaison non linéaire (c'est-à-dire au niveau de saturation des sites de protéines plasmatiques).

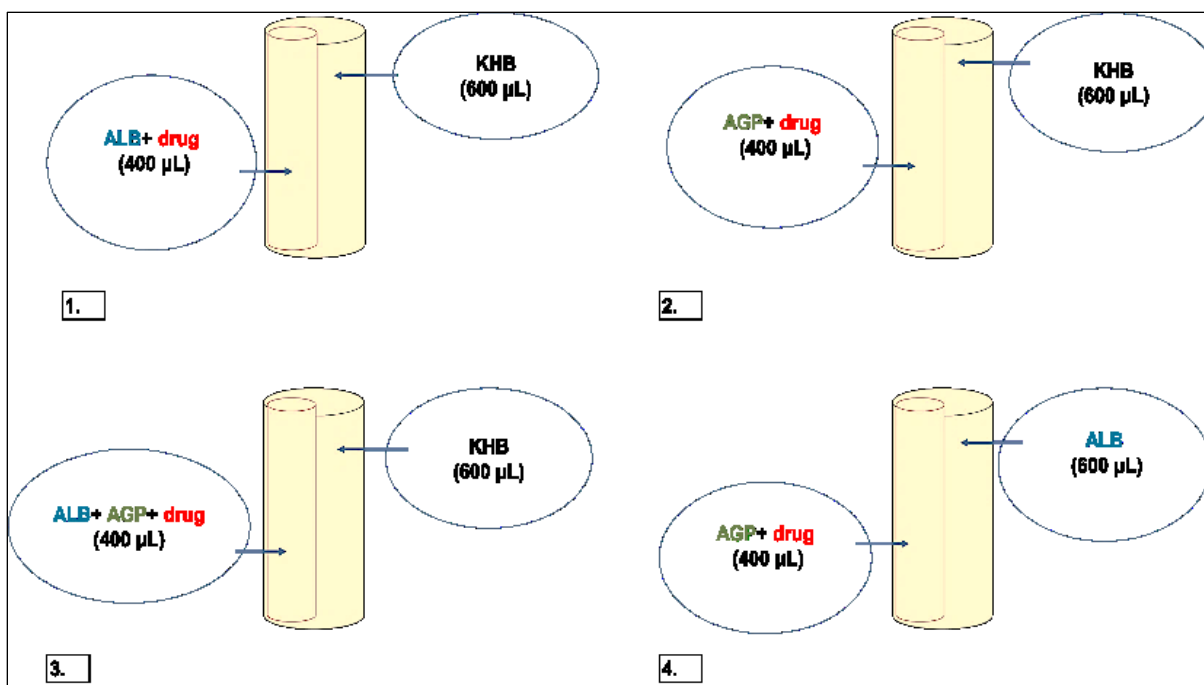
#### 3.3.2.2. Dialyse à l'équilibre rapide

Pour obtenir les valeurs de  $C_{free}$ ,  $C_{total}$ ,  $f_{up}$  et  $R_{AGP:ALB}$  pour chaque médicament à des concentrations différentes dans les chapitres 5 et 6, des tests de liaison ont été effectués *in vitro* (en *duplicata*) selon le protocole de dialyse à l'équilibre rapide (RED) de 96 puits suggéré par la compagnie (Thermo scientific™, Watham MA) (Banker & Clark, 2008; van Liempd et al., 2011; Zamek-Gliszczyński et al., 2011) (Figure 3.2).

Avant les expériences de dialyse, le temps d'incubation correspondant à l'équilibre approprié de 6 heures a été déterminé en effectuant des essais préliminaires à des moments différents variant de 1 h à 24 h (en *duplicata*) pour le PER (2,5  $\mu$ M) et le FLU (2,5  $\mu$ M). Pendant les incubations à 37°C d'une durée de six heures, les échantillons ont été agités à 200 tr/min. Un volume de 400  $\mu$ L de solutions de protéines plasmatiques a été inséré dans des chambres rouges avec des concentrations de PER ou de FLU (2,5  $\mu$ M, 7,5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M, 35  $\mu$ M ;  $\leq$  0,1 % DMSO) ; c'est-à-dire pour les trois scénarios qui contenaient 1) ALB bovine (40 g/L), 2) AGP bovine (1 g/L), 3) Mélange ou MIX (contenant 40 g/L d'ALB et 1 g/L d'AGP).

Et, pour les trois scénarios, un volume de 600  $\mu$ L de solution tampon de Krebs-Henseleit (KHB ; pH 7.4) a été inséré dans chacune des chambres adjacentes de solution tampon.

Le quatrième scénario RED a été réalisé pour déterminer la liaison fractionnaire ou le  $R_{AGP:ALB}$ . D'après Poulin, Hop, et al. (2012), le  $R_{AGP:ALB}$  est un terme qui pourrait être utile : 1) dans l'évaluation de l'étendue de la liaison à chaque protéine plasmatique, et 2) comme un paramètre cinétique pour les modèles de clairance hépatique des xénobiotiques fortement liés. Par conséquent, pour ce scénario, un volume de 400  $\mu$ L d'AGP (1 g/L) avec un médicament (PER ou FLU) a été injecté dans la chambre rouge, et dans la chambre tampon opposée du même insert (c'est-à-dire dans la chambre blanche), un volume de 600  $\mu$ L de solution ALB (40 g/L) a été injecté uniquement, dans les mêmes conditions d'incubation que précédemment décrites selon le même protocole RED précédemment décrit (Figure 3.2). Tous les échantillons ont été stockés dans un congélateur (à -20°C) pour l'analyse ultérieure des échantillons dans les tubes d'Eppendorf (pour le PER) et dans des flacons en verre (pour le FLU) ([méthodologie détaillée](#) à consulter au chapitre 5).



**Figure 3.2. Quatre scénarios *in vitro* pour étudier la cinétique de liaison à l'aide de la dialyse à l'équilibre rapide (© Bteich Michel, Thèse 2020).**

**En anglais :** AGP alpha-1acid glycoprotein; ALB albumin; KHB Krebs-Henseleit buffer.

Dans les quatre scénarios de la Figure 3.2, les protéines plasmatiques ALB (40 g/L) et AGP (1g/L) sont dissoutes dans la solution tampon KHB afin de préparer les solutions de protéines. Et, les médicaments PER et FLU ont toujours été injectés dans les chambres rouges (les petits cylindres dans la figure) avec les protéines tel qu'indiqué dans les quatre scénarios. Dans les chambres blanches (les plus grands cylindres dans la figure), 600 µL de la solution KHB ont été injectés, sauf dans le quatrième scénario, 600 µL de la solution ALB (40 g/L) a été injecté dans la chambre blanche à la place KHB.

### 3.3.2.3. Expériences *in situ* pour le chapitre 5

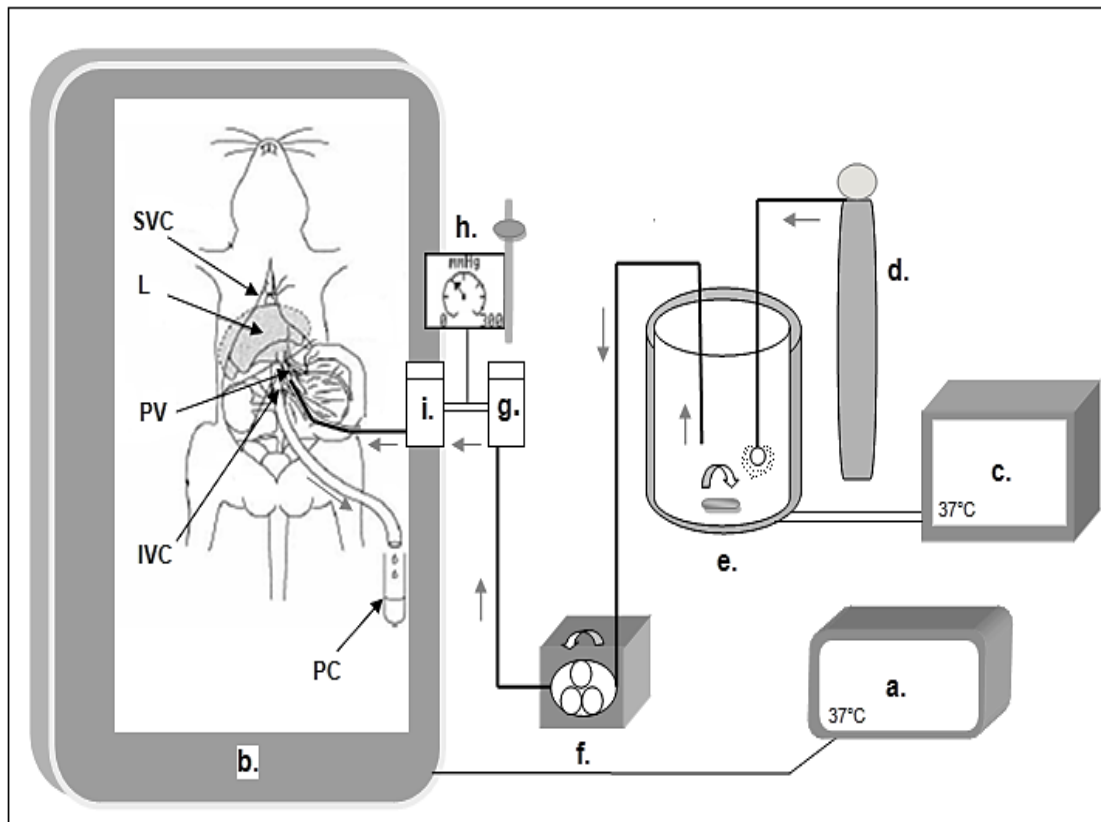
#### 3.3.2.3.1. Utilisation et soins des animaux

Des rats mâles Sprague Dawley (250 à 300 g) ont été achetés des laboratoires de Charles Rivers (St-Constant, Québec, Canada), avec la permission du Comité d'éthique de l'expérimentation animale (CDEA-DV) de l'Université de Montréal. Les rats ont été hébergés dans des conditions optimales pendant leur séjour à la Division des soins aux animaux (DV), et les soins aux animaux ont été appliqués conformément aux lignes directrices du Conseil canadien sur les soins aux animaux en science (CCPA). Une période d'acclimatation de 72 h minimum dans un environnement enrichi a été respectée avant toute expérience chirurgicale, en contrôlant la température ambiante (20°C), l'humidité relative (45 %) et

l'éclairage (cycle jour-nuit ; 12 h de lumière, 12 h d'obscurité). Les rats ont reçu de la nourriture et de l'eau ad libitum certifiés et stérilisés. Le protocole expérimental a été mis à jour chaque année et accepté par le comité de déontologie de l'expérimentation sur les animaux.

### **3.3.2.3.2 Procédure et conditions expérimentales pour les foies isolés et perfusés de rats**

En utilisant des rats mâles Sprague Dawley (n= 3 rats/scénario/médicament), les expériences IPRL ont été réalisées pour obtenir les valeurs *in situ* de  $CL_{int, h}$  et  $CL_h$  pour les deux médicaments (calculs indiqués au paragraphe 5.2.7 dans le chapitre 5). Le protocole expérimental IPRL suivi ici est tiré de Bounakta, Bteich, Mantha, Poulin, and Haddad (2018) (Figure 3.3). En bref, les rats ont été anesthésiés avec 3 % v/v isoflurane : O<sub>2</sub>. Les étapes suivantes étaient : 1) la cannulation de la veine porte (entrée) et la veine cave inférieure (sortie), 2) le lavage du foie (5 mL/min) pendant 5 min avec une solution KHB préchauffée pour enlever les éléments sanguins, 3) l'euthanasie des rats a été induite par l'exsanguination, 4) l'équilibration pendant 15 min en perfusant le foie avec le perfusé préchauffé à un débit de 20 mL/min, et finalement 5) la perfusion du foie de rat avec les solutions d'essai préchauffées à 38°C dans lesquelles les médicaments étaient dissouts.



**Figure 3.3. Schéma représentatif du système de perfusion du foie isolé de rat (tiré de Bounakta et al. (2018)).** *En anglais* : IVC inferior vena cava ; L liver ; PC perfusate collection ; PV portal vein ; SVC superior vena cava.

L'annotation en français présentée ici correspond à celle de la figure 1 dans la publication de (Bounakta et al., 2018). Cependant, les conditions expérimentales contrôlées pour effectuer notre recherche sont présentées après la figure 3.3. Ce système est constitué de : a. un contrôleur homéotherme pour la table d'opération, b. une table d'opération chauffée, c. un thermocirculateur qui fait circuler de l'eau chaude dans le réservoir à double paroi, d. une bonbonne de carbogène (95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>) munie d'un oxygénateur en verre fritté, e. un réservoir à double paroi contenant le perfusate thermorégulé qui est gazéifié par du carbogène, f. une pompe péristaltique réglable à un débit constant, g. un windkessel qui réduit la pulsation provoquée par la pompe et agit comme un piège à bulles d'air, h. un manomètre pour régler la pression dans le système et éviter le retour du perfusate, i. un échangeur de chaleur et piège à bulles d'air et amortit la pulsation. Ce dernier est raccordé à la canule de cathéter fixée dans la veine porte. Les flèches sur le schéma indiquent le flux du carbogène entrant dans le réservoir à double paroi ainsi que celui du perfusate sortant de ce réservoir et allant en direction du foie.

La concentration du médicament a été graduellement augmentée pendant la perfusion. Chacune des concentrations de 2,5 µM, 7,5 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM à 35 µM a été administrée, séparément,



pendant 5 min à travers la veine porte du foie. Il convient de noter que les vérifications du temps approprié de perfusion pour le PER et le FLU ont été effectuées durant les essais préliminaires de l'IPRL et avant d'utiliser de nombreux animaux pour les expériences IPRL. Les solutions de perfusion dans lesquelles le médicament a été dissout varient selon les quatre scénarios IPRL : 1) solution physiologique sans protéines plasmatiques (WO), 2) solution d'ALB bovine (40 g/L), 3) solution d'AGP bovine (1 g/L), et 4) solution MIX (contenant 40 g/L d'ALB et 1 g/L d'AGP). Les conditions expérimentales de l'IPRL ont été méticuleusement contrôlées (pH 7,4, température du foie ~33°C-37°C, table chirurgicale chauffée à 38°C, niveau d'oxygénation maintenu, pression veineuse de la veine porte (idéalement autour de 10 mmHg), débit de la pompe à 20 mL/min). Les solutions de perfusion ont été continuellement chauffées à 38°C et gazéifiées à 95 % : 5 % v/v O<sub>2</sub> : CO<sub>2</sub> (en prenant soin d'éviter la production de mousse dans des solutions contenant des protéines plasmatiques et des acides gras). Le perfusé a été récolté en *triplicata* dans trois tubes d'Eppendorf (pour PER) et trois flacons en verre (pour FLU) à chaque minute (volume d'environ 1 mL dans chacun des tubes et des flacons en verre), à la sortie de la veine cave inférieure. Tous ces tubes et flacons ont été ensuite stockés dans un congélateur (à -20°C) pour l'analyse ultérieure de l'échantillon. À la fin de chaque perfusion, le poids du foie a été mesuré, et il a été inclus dans les calculs des taux métaboliques (voir la [section 5.2.7](#) dans le chapitre 5).

#### 3.3.2.4. Approches *in silico*

Plusieurs modèles quantitatifs de clairance hépatique sont maintenant disponibles et ils fournissent des prédictions améliorées du paramètre  $CL_{H_{in vivo}}$  pour les médicaments qui sont fortement et uniquement liés à l'ALB et pour lesquels une captation hépatique médiée par une protéine peut se produire *in vivo* (c'est-à-dire par l'intermédiaire des transporteurs membranaires ou des protéines plasmatiques). Nous citons : le modèle de  $f_{up-adjusted}$ , le modèle de FDM et le modèle d'ECM ([Tableau 1.1](#)).

Dans le chapitre 4, nous comparons plus amplement les trois modèles sur le plan théorique et nous proposons de nouvelles approches ainsi qu'un arbre décisionnel afin de faciliter la prédiction de la  $CL_{H_{in vivo}}$  des médicaments qui sont fortement liés dans le plasma, substrats de transporteurs membranaires et qui sont métabolisés majoritairement dans le foie. Ainsi nous proposons le jumelage ou l'alternance de plusieurs termes tels que la  $f_{up-adjusted}$  et le transport facilité par les transporteurs membranaires dans six modèles de  $CL_{H_{in vivo}}$ . Par ailleurs, nous utilisons les données *in vitro* pour 19 médicaments afin de prédire la  $CL_{H_{in vivo}}$ , de comparer les performances prédictives et de valider des modèles IVIVE.

Dans le chapitre 5, nous ajustons des équations des cinétiques non linéaires de liaison plasmatique (avec le modèle de liaison à un seul site) aux données *in vitro* et des équations de métabolisme hépatique (avec le modèle de Michaelis-Menten) aux données *in situ*. Ces ajustements nous servent à trouver des paramètres essentiels en cinétique tels que la liaison maximale ( $B_{max}$ ) et le coefficient de dissociation ( $K_D$ ) ainsi que la vitesse enzymatique maximale ( $V_{max}$ ) et la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ). Les ajustements des équations ont été faits en utilisant le logiciel SigmaPlot 13.0. Ink, 2019.

Dans le chapitre 6, nous proposons de nouveaux paramètres intrants en nous basant sur le ratio de liaison fractionnaire ( $R_{AGP : ALB}$ ) afin de prédire la  $CL_{H_{in situ}}$  de PER et de FLU. Ce ratio entre la concentration du xénobiotique qui se trouve dans la chambre rouge contenant de l'AGP sur celle qui se trouve dans l'autre chambre contenant de l'ALB est déterminé par la dialyse à l'équilibre (scénario 4), tel que mentionné plus haut. Ensuite, nous comparons les performances prédictives du nouveau modèle et de l'autre conventionnel (soit celui qui est conforme à l'hypothèse du médicament libre). Cette méthode de prédiction devrait être considérée comme un premier pas vers une prédiction précise et exacte de la clairance hépatique pour les médicaments qui se lient à l'ALB et à l'AGP (c'est-à-dire SUBCAT1).

**ÉTUDES *IN VITRO*, *IN VIVO*, *IN*  
*SITU* ET *IN SILICO***

**CHAPITRE 4. The potential protein-mediated hepatic uptake:  
discussion on the molecular interactions between albumin  
and the hepatocyte cell surface and their implications for the  
*in vitro-to-in vivo* extrapolations of hepatic clearance of drugs**

**The potential protein-mediated hepatic uptake: discussion on the molecular interactions between albumin and the hepatocyte cell surface and their implications for the *in vitro-to-in vivo* extrapolations of hepatic clearance of drugs**

**Michel Bteich <sup>a</sup>, Patrick Poulin <sup>a, b</sup> and Sami Haddad <sup>a</sup>**

<sup>a</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada; <sup>b</sup> Consultant Patrick Poulin Inc., Québec city, Canada

***Corresponding author:***

Sami Haddad, Department of Environmental and Occupational Health, IRSPUM, Université de Montréal, PO Box 6128, Main Station, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada. Tel: (+1) 514-343-6111 Ext. 38166. Fax: (+1) 514-343-2200.

Email: [sami.haddad@umontreal.ca](mailto:sami.haddad@umontreal.ca)

**Received on the 10<sup>th</sup> of May 2019, accepted on the 3rd of July 2019, published online on the 18<sup>th</sup> of July 2019 in the Journal of Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology.**  
<https://doi.org/10.1080/17425255.2019.1640679>

**Funding**

This paper was funded by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, grant no. RGPIN-2015-05577. A financial support from the Consultant Patrick Poulin Inc. (P.P.) is also acknowledged.

**Abstract:**

**Introduction:** In quantitative modeling, the resolving of underpredictions and overpredictions of hepatic clearance (CL<sub>h</sub>) makes a top priority for pharmacokinetic modelers. Clearly, the ‘protein-mediated hepatic uptake’ is a violation of ‘the free drug hypothesis’, but the lack of its consideration in CL<sub>h</sub>-predictive approaches may be one of the reasons to explain the discrepancies between predicted and observed values.

**Areas covered:** We first review the two ‘albumin-facilitated hepatic uptake’ models that were recently challenged to improve the *in vitro-to-in vivo* extrapolation (IVIVE) of CL<sub>h</sub> by reducing the underprediction bias, particularly in the absence of albumin (ALB) *in vitro* compared to the presence of ALB *in vivo*. Second, we identify three types of interactions related to the ALB-bound drug moiety (i.e., ALB-lipids, ALB-proteins, and ALB-ligand allosteric interactions) that may be behind the ‘ALB-mediated hepatic uptake’ mechanism(s) for highly bound drugs. Main keywords used in our search are IVIVE; albumin; allostery; protein-mediated uptake; hepatic clearance; polarized hepatocytes.

**Expert opinion:** Understanding the implication of these interactions and the enzyme/transporter interplay for each drug would help selecting the appropriate IVIVE model. Therefore, we have proposed a tree of decision for guidance. The next step is to improve the ‘ALB-facilitated hepatic uptake’ models to cover the remaining uncertainties.

**Keywords**

Albumin, protein-ligand complex, protein-mediated hepatic uptake, pharmacokinetics, biopharmaceutics classification system, *in vitro-to-in vivo* extrapolations, fractional plasma binding, PBPK.

## Highlights

- For the ligands that are highly bound to albumin (ALB), the bound drug moiety may also contribute to its total hepatic uptake and clearance.
- One or many process(es) may be behind the ALB-mediated hepatic uptake mechanism(s); they are grouped into three types of interactions at the molecular level: ALB-ligand allosteric interactions, ALB-lipid, and ALB-protein interactions. Hence, the presence of these three types of interactions suggests that, for particular drugs, the ALB-bound drug moiety may interact with the components of the hepatocyte plasma membrane.
- Allosteric interactions and conformational changes of ALB following the binding of a drug may change the extent of the ALB-drug complex interaction with the plasma membranes of sinusoidal hepatocytes, thus affecting the desorption/retention of the ligand in the interstitial space. These specific effects could potentially explain why, for some highly bound drugs, the ALB-bound drug moiety showed a higher degree of ALB-mediated CL<sub>h</sub> than others.
- Choosing the best IVIVE-based model would depend on the drug properties and whether ALB is added to the incubation medium in the *in vitro* versus the *in vivo* conditions.

#### 4.1. Introduction

The phenomenon of protein-mediated hepatic uptake stands for the possibility that binding to proteins in the sinusoids might make some highly bound endogenous and exogenous ligands more readily available than others for hepatic uptake and clearance. The first observations documenting a potential protein-mediated hepatic uptake, without naming the phenomenon or describing it any further, were made by Rosenthal and White (1924) for a few liver dyes (i.e., rose bengal, sulfobromophthalein) which, according to the authors, had exceptional kinetics. These phthaleins are known today to be highly bound in plasma, and those for which an albumin-mediated hepatic uptake has been suggested (Forker & Luxon, 1983; Weisiger, Zacks, Smith, & Boyer, 1984). The observations of Rosenthal and White (1924) came many years before the two important discoveries for major plasma proteins (i.e., albumin (ALB) and alpha-1-acid glycoprotein (AGP)): 1) their isolation and purification, and 2) the characterization of their crystal structures.

Later, during expansion in research on plasma proteins, 'the free drug hypothesis' made its entrance in pharmacokinetics (PK), first suggested by Brodie et al. (1960). According to this widely accepted hypothesis, it is assumed that only the free drug concentration ( $C_{free}$ ) in plasma is permeable across biological barriers (e.g., plasma membranes). A rapid equilibrium (or steady-state) is supposedly reached, which theoretically means that there would be the same  $C_{free}$  in the extracellular space as in the intracellular space (Benet et al., 1996). Consequently, it is the distributed  $C_{free}$  of the ligand that exerts its effect upon interactions with physiological targets (e.g., receptors, tissues), depending on factors like the physicochemical characteristics of the ligand and the physiological conditions of the capillary/cellular environment (Trainor, 2007).

Conversely, K. J. Baker and Bradley (1966) were the first scientists to clearly document an observation about a potential mechanism of a plasma protein-mediated hepatic uptake due to the presence of ALB. According to the authors, this phenomenon is a violation of 'the free drug hypothesis', since there is a shift for the ligand, from its bound concentration ( $C_{bound}$ ) to its free concentration ( $C_{free}$ ) at the hepatocyte plasma membrane, which marks the contributions to a hepatic uptake more efficient than a traditional description of reversible ALB-ligand complex could achieve.

Two literature reviews were recently made by Poulin et al. (2016) and C. M. Bowman and Benet (2018), in which they present thorough summaries on the relevance of the plasma protein binding and the



protein-mediated hepatic uptake in the extrapolation of the hepatic clearance (CL<sub>h</sub>) of drugs in the absence of ALB *in vitro* to the *in vivo* situation (i.e., in the *in vitro-to-in vivo* extrapolations (IVIVE)). The present study is therefore a complement to what has already been documented so far by these authors. Moreover, the latest publications on this topic, and, further discussions on the presence of molecular interactions between ALB and the components of the hepatocyte cell surface (i.e., lipids and membrane proteins) are presented. Some new ideas are also proposed to improve the IVIVE of CL<sub>h</sub> for drugs that are extensively bound to plasma proteins.

#### **4.2. Albumin-mediated hepatic uptake**

ALB is a plasma protein rich in charged amino acids (i.e., lysine, arginine, aspartic acid and glutamic acid) in its binding pockets and on its surface (Peters Jr., 1996a). It is an abundant interstitial protein: about 60% of total ALB is localized in the interstitial space and the rest is found in plasma (Berson & Yalow, 1957; Lönsmann Poulsen, 2009). Taken together, these two characteristics of ALB support high-solubility for this plasma protein, and a flexible structure which allows it to interact vividly at the molecular level during its passage through the interstitial space (Anand & Mukherjee, 2013).

Many observations suggesting that the ALB molecules may interact with the hepatocyte cell surface are now documented for a variety of drugs using different *in vitro* assays (e.g., isolated hepatocytes and primary cultured hepatocytes) and *in situ* systems (e.g., isolated and perfused liver). In these studies, it has been demonstrated that the addition of ALB enhanced the hepatocellular uptake of organic anions such as: free fatty acids (Burczynski et al., 2001; Burczynski, Wang, & Hnatowich, 1997); bilirubin (Zucker, Goessling, & Gollan, 1995); rose Bengal (Forker & Luxon, 1983); drugs with high permeability like warfarin (Ichikawa et al., 1992; Tsao et al., 1988), or with medium permeability like tolbutamide (Ichikawa et al., 1992); and drugs with basic probes like tyrosine kinase inhibitors (Mao et al., 2016). After reviewing the literature on ALB's use in *in-vitro* and *in-vivo* experiments, the most recent examples are presented in table 4.1 to support the following highlights: 1) the presence of extracellular ALB-mediated hepatic uptake mechanism(s) under *in vivo* condition; 2) the ALB-modulating CL<sub>h</sub> *in vitro*; and 3) the advantage of using ALB as a delivery system in therapeutics. Furthermore, Kratochwil et al. (2017) and Da-Silva et al. (2018)

demonstrated that the CLh of several drugs were probably governed by the presence of ALB, using an advanced *in vitro* system (hepatocyte 'islands' surrounded with supportive stromal cells in the Hepatopac® technology). The main reason could be that this experimental setting synthesizes ALB at levels that are more similar to the *in vivo* condition in the liver. Moreover, the prediction accuracy of CLh of several drugs bound to ALB in plasma significantly increased by using the data generated from this new *in vitro* assay in the IVIVEs compared to using the data generated from other *in vitro* assays that do not produce any ALB molecule (and/or contains ALB at levels much lower than the physiological conditions).

**Table 4.1. An update on recent IVIVE studies that support an albumin-mediated hepatic uptake/transport phenomenon and albumin-modulating clearance since a previous summary was made by Poulin, Burczynski and Haddad (*J. Pharm. Sci.* 105 (2):497-508).**

Aim of study	<i>In vitro</i> or <i>in vivo</i> systems used	IVIVE approaches applied for Hepatic clearance predictions	Observations and conclusions	Potential mechanisms proposed by the reference authors	References	
<b>A. Extracellular ALB-mediated uptake</b>	1. To improve predictions of hepatic clearance (CL <sub>h</sub> ) for drugs with low <i>in vitro</i> hepatic clearance using a long- and short-term liver models	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In Kratochwil et al. (2017): the cell line HepG2, iPSC-derived hepatocytes (iCell®), the hepatic stem cell line HepaRG™, the human hepatocyte micropatterned co-cultures (HµREL™ and HepatoPac®) and the suspended hepatocytes</li> <li>- Da-Silva et al., (2018): the human hepatocyte micropatterned co-cultures Hepatopac® system, cryopreserved human hepatocytes and monolayer hepatocytes</li> </ul>	Poulin-based IVIVE approach corrected for the potential ALB-mediated uptake (f <sub>u,p</sub> -adjusted method), direct scaling and conventional methods	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The <i>in vitro</i> system Hepatopac® gave the most accurate predictions of CL<sub>h</sub> compared to the two other <i>in vitro</i> systems</li> <li>- The CL<sub>int</sub> values generally increased or remained constant in the presence of more ALB, which does not follow the notion of the free drug hypothesis</li> <li>- Reduction of under-predictions bias of metabolic clearance using the Poulin-based IVIVE approach that considers the ALB-mediated uptake while combined to the data obtained from the Hepatopac® system compared to the other IVIVE methods</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The number of ALB molecule per hepatocyte in the Hepatopac® system <i>in vitro</i> is the closest to the <i>in vivo</i> condition in liver, which supports the notion of an ALB-mediated uptake compared to other <i>in vitro</i> systems</li> </ul>	(Da-Silva et al., 2018; Kratochwil et al., 2017)
	2. To investigate the phenomenon of ALB-mediated hepatic uptake of two organic anion transport polypeptide substrates, and, hence, to improve the extrapolation of their CL <sub>h</sub> <i>in vitro</i> in the absence of ALB to the presence of ALB <i>in vivo</i>	Primary cultured rat hepatocytes and isolated human hepatocytes incubated in the absence and in the presence of human and bovine ALB (5%)	'Facilitated-dissociation model' based on the theory of the presence of interactions and binding effects between the ALB and the hepatocytes plasma membrane	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Uptake into hepatocytes was enhanced for both drugs in the presence of ALB</li> <li>- Saturation of hepatic uptake enhancement at high concentration of ALB</li> <li>- Successful extrapolation of the unbound CL<sub>int</sub> in the absence of ALB <i>in vitro</i> to the presence of ALB <i>in vivo</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Interaction of the ALB-drug complex with the hepatocyte surface and/or transporters may induce the conformational change of ALB and enhance the dissociation of that complex to provide more unbound ligand for uptake to the hepatocytes</li> <li>- Uptake of unbound organic anions into hepatocytes <i>via</i> diffusion and organic anion transporters</li> <li>- Contribution of influx <i>via</i> transporters to hepatic uptake/metabolism</li> </ul>	(Miyachi et al., 2018)

Table 4.1. (continued)

Aim of study	<i>In vitro</i> or <i>in vivo</i> systems used	IVIVE approaches applied for Hepatic clearance predictions	Observations and conclusions	Potential mechanisms proposed by the reference authors	References	
<b>A. Extracellular ALB-mediated uptake</b>	3. To predict the ratio of hepatic $CL_{int}$ in the absence of ALB <i>in vitro</i> to that in the presence of ALB <i>in vivo</i> - To compare 2 existing models that account for the ALB-mediated hepatic uptake phenomenon	- <i>In vitro</i> data on unbound $CL_{int}$ determined with and without ALB - <i>In vitro</i> data taken from Miyauchi et al. (2018) that used human and rat hepatocytes for two xenobiotics	- Poulin-based IVIVE model correcting for the ALB-mediated hepatic uptake phenomenon (model of $f_{up-adjusted}$ ) - Old ALB facilitated-dissociation model	- The 2 models are conceptually and mathematically equivalent. - The 2 models predicted the changes of unbound $CL_{int}$ in the absence of ALB <i>in vitro</i> to that in the presence of ALB <i>in vivo</i> at a physiological concentration of ALB, but the accuracy of predictions for ANS indicate an overprediction using the $f_{up-adjusted}$ model - The Poulin-based model can be used to predict the maximal ALB-mediated effect using less input parameters, whereas the old facilitated-dissociation model would be more specific by using more input parameters on binding. - Both models can be used to describe the enhancement in the metabolism of these two drugs studied due to plasma ALB-mediated uptake phenomenon.	- Possible differences in the binding to the ALB for the two xenobiotics may explain the differences in the ratios <i>in vitro-to-in vivo</i> of $CL_{int}$ that were observed between the two drugs and two ALB concentrations, and, hence, would explain the differences in the prediction accuracy between the 2 models tested. The differences in $CL_{int}$ ratios may also be due to OATP-mediated hepatic uptake, since ANS displayed a lower affinity toward OATP compared with pitavastatin. - It seems that when the capacity of interactions of each drug with the hepatocyte membrane and the number of binding sites are included in the facilitated-dissociation model, the prediction accuracy may significantly be improved. - ALB-mediated hepatic uptake must be further addressed in the extrapolation of hepatic uptake between two ALB concentrations.	(Poulin & Haddad, 2018)

<p>4. To investigate the impact of high binding to ALB and of co-administration with naproxen on the hepatic clearance of bisphenol A</p>	<p><i>In situ</i> perfused rat liver (IPRL) performed in the absence and in the presence of bovine ALB (3%)</p>	<p>Direct scaling and conventional IVIVE methods, Poulin-based IVIVE method correcting for the ALB-mediated uptake phenomenon (<math>f_{u,p}</math>-adjusted model)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The data analysis showed a greater decrease in unbound <math>K_m</math> than in <math>V_{max}</math> resulting in increased uptake <math>CL_{int}</math> of the unbound drug (<math>V_{max}/unbound K_m</math>) with increased ALB concentration at a given substrate concentration, which is compatible with an ALB facilitated hepatic uptake phenomenon</li> <li>- Only the <math>f_{u,p}</math>-adjusted model accurately predicted the change of unbound <math>CL_{int}</math> in the presence and absence of ALB for both the single drug formulation and binary mixtures</li> <li>- The presence of free naproxen inhibits the metabolism of bisphenol A but this does not follow the free drug concentration hypothesis</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The high binding to ALB influences the glucuronidation of the main substrate by uridine diphosphate glucuronosyltransferase 2B1</li> <li>- ALB-mediated mechanism was suggested to be predominant in hepatic uptake for both drugs</li> </ul>	<p>(Bounakta et al., 2018; Poulin, Bteich, &amp; Haddad, 2017)</p>
---	---	---	---	--	--

---

Table 4.1. (continued)

	Aim of study	<i>In vitro</i> or <i>in vivo</i> systems used	IVIVE approaches applied for Hepatic clearance predictions	Observations and conclusions	Potential mechanisms proposed by the reference authors	References
<b>A. Extracellular ALB-mediated uptake</b>	5. To develop and apply a method capable of providing real-time <i>in vitro</i> intracellular exposure quantification by fluorescence microscopy coupled with bright-field image acquisition	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The MCF-7 human breast cancer 73 cell line</li> <li>- The HEK293T human embryonic kidney cell line</li> </ul>	First order uptake kinetics	<ul style="list-style-type: none"> <li>- In the absence of the fetal bovine serum (FBS), the neutral chemicals have a higher uptake than the charged chemicals, probably because neutral chemicals have better diffusion through the bilayer membrane of hepatocytes that is rich in long-chain fatty-acids</li> <li>- Neutral chemicals are the most accumulated compounds in the intracellular space</li> <li>- Positively charged compounds had a greater uptake rate than negatively charged ones in the presence of the FBS</li> <li>- Increasing medium with the FBS concentrations has accelerated the uptake due to FBS-facilitated transport, but increasing the FBS concentration also led to lower intracellular concentrations because of increased sorption to medium proteins and lipids</li> <li>- FBS-mediated uptake and intracellular transport <i>via</i> endocytosis are relevant for several types of cells, but these observations differed between the cell lines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- FBS may enhance the uptake of charged compounds</li> <li>- Endocytosis of xenobiotics with ALB may also be a possibility for the enhanced uptake</li> <li>- Diffusion of the charged species through the hydrophobic center of the membrane is expected to be much slower</li> <li>- Charged species often exhibits reduced affinity to cell membranes, particularly if the compounds are negatively charged</li> <li>- Charged organic molecules can be passively taken up <i>via</i> ion transport channels or actively taken up by transport proteins</li> </ul>	(F. C. Fischer et al., 2018)
	6. To investigate whether human serum albumin (HSA) would affect the uptake clearance of anionic drugs with high binding to HSA  - To improve the IVIVE of CLh from <i>in vitro</i> uptake clearance by the hepatocytes via the 'albumin-mediated' hepatic uptake mechanism	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Suspended human hepatocytes</li> </ul>	'Facilitated-dissociation model'	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Hepatic uptake of anionic drugs is mediated by OATPs</li> <li>- The unbound uptake clearances of highly bound drugs increased significantly in the presence of HSA</li> <li>- Pravastatin (PRV) is not highly bound to ALB. No facilitated uptake was observed for PRV</li> <li>- HSA also contributes to hepatic uptake due to the dissociation of the ALB-drug complex after potential interactions of the complex with the components of plasma membranes of suspended hepatocytes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Two mechanisms are omnipresent: 1) 'ALB-mediated hepatic uptake' 2) 'OATP-mediated hepatic uptake'</li> </ul>	(S. J. Kim, Lee, Miyauchi, & Sugiyama, 2019)

Table 4.1. (continued)

Aim of study	<i>In vitro</i> or <i>in vivo</i> systems used	IVIVE approaches applied for Hepatic clearance predictions	Observations and conclusions	Potential mechanisms proposed by the reference authors	References	
<b>A. Extracellular ALB-mediated uptake</b>	7. To investigate nonlinear kinetics for a new compound using bottom-up (from <i>in vitro</i> to <i>in vivo</i> ) and top-down (fitting PBPK to PK data) approaches	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Healthy adult volunteers <i>versus</i> adults with liver impairment (Single oral dose)</li> <li>- Recombinant cytochromes and UDP-glucuronyl <i>transferase</i></li> <li>- OATP1B-expressing cells</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Noncompartmental method (for clinical trial data)</li> <li>- PBPK model described with a 5-liver model (for IVIVE extrapolations)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- The studied compound A is eliminated mainly by the liver</li> <li>- The increase in human ALB concentration caused a greater decrease of unbound <math>K_m</math> than <math>V_{max}</math> for OATP1B3</li> <li>- The enzymes CYP3A4, UGT1A1 and UGT1A3 can metabolize the compound</li> <li>- The unbound <math>K_m</math> for metabolizing enzymes was higher than <math>K_m</math> for OATP1B3, which may indicate that the Organic anion polypeptide transporter OATP1B3 is mainly involved in saturable hepatic uptake</li> <li>- The uptake velocity and clearance of the unbound drug concentration increased with the increase of human ALB concentration</li> <li>- ALB has an important effect in <i>in-vivo</i> predictions from <i>in vitro</i> data for transporters substrates, which is an effect that should be considered more often in IVIVE extrapolations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- ALB-mediated uptake may be implicated in the uptake of the compound by OATP1B3-expressing cells</li> <li>- The compound is metabolized in phase I (CYP3A4), and phase II (UGT1A1 and UGT1A3), but its metabolism is dependent on the activity of the transporter OATP1B3</li> <li>- Enhancement of metabolism in the presence of ALB with microsomes (or supersomes) may only be an indication of a potential intracellular plasma ALB-mediated transport</li> <li>- The dissociation of ALB-compound in the presence of OATP1B-expressing cells may be due to extracellular interactions between ALB and the hepatocyte plasma membrane (e.g., dissociation from ALB or membrane receptor)</li> <li>- Other mechanisms may be implicated (e.g., enterohepatic circulation)</li> </ul>	(Fukuchi et al., 2017)

Table 4.1. (continued)

	Aim of study	<i>In vitro</i> or <i>in vivo</i> systems used	IVIVE approaches applied for Hepatic clearance predictions	Observations and conclusions	Potential mechanisms proposed by the reference authors	References
<b>B. <i>In vitro</i> ALB-modulating clearance</b>	1. To experimentally determine suitable ALB concentrations for elevated cytochrome P450 activities of diclofenac, warfarin, tolbutamide, phenytoin and flurbiprofen in the presence and absence of ALB (0.05%-4%)	Human liver microsomes	Multivariate and univariate linear regression by studying the correlations between suitable ALB concentrations and physicochemical drug properties (e.g., logP, pKa, molecular weight, etc.)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- At suitable ALB concentrations, metabolism for diclofenac, warfarin, tolbutamide and phenytoin was enhanced, but the metabolism of flurbiprofen was reduced in the presence of ALB in the concentration range of 0.10%-1%</li> <li>- Suitable ALB concentrations were correlated with the physicochemical properties using multivariate linear regression</li> <li>- Henceforth, the regression method could be used to choose a suitable ALB concentration for <i>in vitro</i> studies</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzyme-mediated oxidation</li> <li>- ALB improves aqueous solubility and penetration of substrates into smooth endoplasmic reticulum</li> <li>- Enhanced drug oxidation due to the presence of ALB with microsomes (CYP450) in <i>in-vitro</i> medium could be explained as an intracellular ALB-modulating clearance which should not be mixed with extracellular plasma protein-mediated uptake</li> </ul>	(Shimura, Murayama, Tanaka, Onozeki, & Yamazaki, 2019)
	2. To assess the effect of bovine ALB on enzyme kinetics of a new drug glucuronidation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Microsomes</li> <li>- Recombinant UGTs</li> </ul>	Substrate inhibition model	<ul style="list-style-type: none"> <li>- After adding low concentrations of bovine ALB, the intrinsic clearance increases</li> <li>- The addition of ALB significantly decreased the <math>K_m</math> and increased <math>CL_{int}</math>, which could be described as a positive effect on enzyme kinetic parameters</li> <li>- However, at high concentrations of ALB, the protein has negative effects on <math>V_{max}</math> and this requires further investigations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Enzyme-mediated glucuronidation is an important pathway of metabolism</li> <li>- The mechanisms behind the effects of ALB on enzyme kinetics are to be investigated</li> <li>- Enhanced intrinsic clearance due to the presence of ALB in the <i>in-vitro</i> medium could be explained as an ALB-modulating clearance</li> </ul>	(Peng et al., 2018)



**Table 4.1. (continued)**

<b>C. ALB-based delivery systems</b>	<b>References</b>
<p>1. ALB has been utilized for its distinguished structural and physicochemical properties in drug delivery technologies such as to increase drug accumulation/uptake in tumors and hepatocytes. The latest observations are presented below:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- The lactose residue bound ubiquitously to the bovine albumin (Lac-BSA) has a high affinity for the asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) found on the plasma membranes of hepatocytes, which makes this residue one of the most selective ASGP-R ligands.</li> <li>- The co-bound doxorubicin (Dox) and paclitaxel (Pac) nanoparticles were made of Lac-BSA (Dox/Pac Lac-BSA NPs), and the hepatocellular carcinoma targeting was studied for the antineoplastic drugs.</li> <li>- The lactose moiety presence on the surface of Dox/Pac Lac-BSA NPs contribute to the internalization of the NPs into hepatocytes, which demonstrated the potential of these NPs to suppress hepatocellular carcinoma (<i>in vitro</i> Hep G2 cells).</li> <li>- Using the techniques of flow cytometry and confocal laser scanning microscopy, it was demonstrated that Dox/Pac Lac-BSA NPs were indeed taken into Hep G2 cells, resulting in higher cytotoxicity compared to plain Dox/Pac BSA NPs. This means that the lactose moiety helps targeting the hepatocytes plasma membranes that are rich in ASGP-R.</li> <li>- Using <i>in vivo</i> imaging of the body of mice and excised livers from ICR mice, it was confirmed that Dox/Pac Lac-BSA NPs could be a promising system for liver targeting and intracellular delivery.</li> </ul>	(Thao et al., 2017)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- PEGylated cationic ALB nanoparticles act through membranolytic mechanism of bacteria membrane cells. These nanoparticles could be useful as a new class of broad-spectrum antimicrobial therapeutics against the imminent threat of drug resistance and biofilm-related infections.</li> </ul>	(Obuobi et al., 2018)
<ul style="list-style-type: none"> <li>- From many <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> studies, the ALB nanoparticles make a promising protein-based delivery system.</li> <li>- This ALB-based delivery system provides controlled release of drugs and ease of modification such as high drug holding capacity, ability to protect entrapped cargo molecules from degradation, improved solubility and bioavailability of drugs, enhanced cellular uptake, biocompatible and non-immunogenic nature.</li> <li>- The drug could be encapsulated into ALB nanoparticles in the process of a conventional therapy for cancer.</li> <li>- The charged functional groups (i.e., carboxylic and amino groups) are present on the surface of the ALB (human or bovine serum ALBs).</li> <li>- The amphiphilic/zwitterionic properties allow the ALB to modify the residue on its surface and to interact with various endogenous and exogenous substrates (i.e., nanoparticles and therapeutic drugs), as well as with the surrounding solvent.</li> <li>- Protein-based systems have inherent property of preferential uptake in tumor and inflamed tissue, biodegradability, lack of toxicity and immunogenicity.</li> </ul>	(Bhushan, Khanadeev, Khlebtsov, Khlebtsov, & Gopinath, 2017; Elzoghby, Samy, & Elgindy, 2012; Singh et al., 2017)
<p>2. Different delivery systems using ALB:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Genetic fusion of the pharmacologically active peptide or protein to the N- or C-terminal end of ALB (e.g., coagulation factors and cytokines)</li> <li>- Chemical coupling to ALB of low molecular weight drugs</li> <li>- Reversible binding of lipophilic drugs to the two main hydrophobic sites of ALB</li> <li>- ALB-binding domains that are genetically fused to drugs</li> <li>- Encapsulation of drugs into ALB nanoparticles for a more efficient intracellular delivery</li> </ul>	(Elsadek & Kratz, 2012; Kratz, 2014; Kratz & Elsadek, 2012; Sand et al., 2014)

3. The involvement of ALB in delivering a ligand, in the presence of a 'transporter-induced binding shift'
- Hypothesis: a higher affinity binding of a ligand to cell membrane transporters (e.g., OATPs) than for ALB may change the equilibrium of the nonspecific binding between the ligand and the plasma protein (ALB-ligand complex) (Baik & Huang, 2015)
  - Observations included in the review (C. M. Bowman & Benet, 2018):
    - 1- using statins, known substrates of OATP1B1 transporter, preliminary results show an expected increase in affinity (decrease in measured  $K_m$ ) for uptake in serum vs. protein-free with highly bound drugs
    - 2- minimal change in unbound  $K_m$  values for drugs with low binding for which the transporter induced shift does not need to occur
    - 3- According to the calculated fold-difference in table 3, from C. M. Bowman and Benet (2018), the unbound  $k_m$  for bisphenol A decreases significantly with the addition of ALB than that for naproxen with lower protein binding
  - OATP substrates that have high affinities to ALB and to membrane transporters, may be subjected to a competitive inhibition for the drug between ALB and the transporter (C. M. Bowman, Okochi, & Benet, 2019)

(Baik & Huang, 2015; C. M. Bowman & Benet, 2018; C. M. Bowman et al., 2019)

**Table 4.1. (continued)**

D. Other plausible explanations	References
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Desorption kinetics of xenobiotics from the ALB in plasma could also be an explanation of the hepatic uptake rate <i>in vivo</i>.</li> <li>- The apparatus used as a time-resolved extraction method and an artificial noncharged membrane that does not represent the physiological conditions of the charged plasma membranes of hepatocytes <i>in vivo</i>. Therefore, this system could not be used to study protein-mediated uptake in a living system where charged interactions between ALB and the hepatocyte membrane are quite frequent.</li> <li>- The desorption kinetics appeared to be important mostly for the highly bound and highly metabolized drugs, which is not in conflict with the ALB-mediated uptake phenomenon that is expected to be predominant particularly for the highly bound but slowly metabolized drugs.</li> <li>- Unfortunately, Krause and Goss (2018) only presented theoretical calculations without validating the calculations with <i>in vivo</i> observations.</li> </ul>	<p>(Krause &amp; Goss, 2018; Krause, Ulrich, &amp; Goss, 2018)</p>

### 4.3. Integration of albumin-mediated uptake in hepatic clearance IVIVE models

Prediction biases of the total hepatic uptake and clearance are most probably related to the use of the unbound fraction in plasma ( $f_{up}$ ) in the IVIVE models; a parameter that is obtained at equilibrium (C. M. Bowman & Benet, 2018). However, since the first IVIVE models for CLh developed in the '70s, equations describing the CLh have evolved, with the adaptation of the input  $f_{up}$  parameter in the IVIVE models, to achieve higher levels of accuracy for the extrapolations of CLh in the absence of ALB *in vitro* to the levels of ALB found *in vivo*.

Novel IVIVE models of CLh are now considering the multiple factors/mechanisms that could violate 'the free drug hypothesis' by causing a shift to the term  $f_{up}$  from its equilibrium value in plasma. Some of these factors/mechanisms are the following: 1) the diffusion according to a pH gradient in plasma *versus* the intracellular space (Berezhkovskiy, 2011); 2) the nonspecific binding to the incubation medium (Obach, 1999); 3) the contributions of the ALB-bound drug moiety (Poulin et al., 2016; Poulin, Kenny, et al., 2012); and 4) other contributions to uptake (e.g., membrane transporters) (Miyauchi et al., 2018). In this context, Table 4.2 summarizes the two available IVIVE-based models on ALB-mediated hepatic uptake: the revisited 'facilitated-dissociation' model (FDM), and a novel  $f_{up}$ -adjusted model.

Both models have the objective of correcting the use of the free drug moiety by including new binding parameters that also describe the hepatocyte uptake of the bound drug moiety in the space of Disse. Hence, the drug concentration assumed to be available for hepatic uptake is the sum of its  $C_{free}$  and the portion of the concentration of the ALB-ligand complex that is available for either 'transporter-mediated uptake', passive diffusion, or both. Overall, more accurate extrapolations of CLh of drugs are expected between the *in vivo* conditions (i.e., containing ALB at physiological concentrations) and *in vitro* assays using no ALB or considering ALB concentration far below the physiological conditions. This is discussed in the following subsections.

**Table 4.2. IVIVE models for hepatic clearance with the consideration of albumin-mediated uptake.**

Model	Hepatic clearance equation	Reference
$f_{u,p\text{-adjusted}}$	$CL_{h\text{ in vivo}} = Q_L \times R_{BP} \cdot \frac{f_{u,p\text{-adjusted}}/f_{u,inc} \cdot CL_{int\text{- in vivo}}}{Q_L \times R_{BP} + f_{u,p\text{-adjusted}}/f_{u,inc} \cdot CL_{int\text{- in vivo}}}$	(Poulin, Kenny, et al., 2012)
Old 'facilitated-dissociation' model (FDM)-revisited <sup>b</sup>	$R = \frac{PS_{u,inf}(+)}{PS_{u,inf}(-)} = 1 + \frac{P_{B,inf} \times B_{max} \cdot [ALB] \cdot \frac{n}{K_d}}{K_{d,m} + [ALB]}$	(Miyachi et al., 2018)

- <sup>a</sup>. For the  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  model:  $CL_{h\text{ in vivo}}$  is the predicted *in vivo* hepatic clearance from *in vitro* data,  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  is the adjusted-unbound fraction in plasma,  $Q_L$  hepatic blood flow,  $CL_{int}$  (L/hr) reflects the intrinsic capacity of the liver to eliminate the xenobiotic from the intracellular space, through the bioactivation/detoxification processes mediated by hepatic enzymes (e.g., cytochrome P450);  $R_{BP}$  ratio of drug concentrations in blood to that in plasma; and  $f_{u,inc}$  is for unbound fraction in the incubation medium. The calculation methods of  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  are found in table 4.S5 (supplemental material). The term  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  is only used when extrapolating from *in vitro* assays that do not contain ALB to the *in vivo* conditions where ALB is synthesized and secreted by the liver. Conversely, the term  $f_{u,p}$  is used in IVIVE-based predictions either in the absence of ALB and/or when the ALB's potential to mediate a hepatic uptake is negligible.
- <sup>b</sup>. For the FDM:  $R$  is the ratio between total uptake clearance in the presence of ALB to that in the absence of ALB,  $PS_{u,inf}(+)$ ,  $PS_{u,inf}(-)$  represent the uptake clearances for the unbound ligands in the presence and in the absence of ALB, respectively.  $P_m$  and  $P_{B,inf}$  represent the permeability clearances for the unbound ligand, and the unbound ligand dissociated from the ALB-ligand complex at the surface, respectively.  $B_{max}$  and  $K_{d,m}$  represent, respectively, the capacity of ALB binding sites on the surface of hepatocytes and the dissociation constant of the bound ALB from the surface, and both terms include the transporter-mediated uptake and the passive diffusion.  $[ALB]$  represents the concentration of ALB. The terms  $n$  and  $K_d$  represent the number of binding sites where the xenobiotic is bound to ALB and the dissociation constant of the ligand.

#### 4.3.1. $f_{u,p\text{-adjusted}}$ model

For the first time, Poulin, Kenny, et al. (2012) proposed, in the well-stirred model, the use of the unbound fraction of a xenobiotic in the whole liver (i.e.,  $f_{u,p\text{-adjusted}}$ ), which accounts for the adjustments of the traditional values of  $f_{u,p}$  for plasma determined *in vitro*, with consideration given to two factors. First, the  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  model assumes that an ALB-mediated hepatic uptake mechanism may occur due to the total dissociation of the ALB-drug complex after its interaction with the plasma membranes of hepatocytes. In other words, this model assumes that the bound drug moiety is, to a certain extent, available for hepatic uptake, and, hence, the capacity of interaction with the hepatocyte plasma membrane and the capacity of dissociation of the drug from the ALB–drug complex are maximal for each drug that is highly bound to ALB. Thus, a new term, the plasma-to-liver concentration ratio (PLR) of ALB has been integrated into a binding isotherm to calculate the parameter  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  from  $f_{u,p}$  (Table 4.2). Therefore, the differential of physiological concentrations of ALB between the plasma and the liver in the *in vivo* conditions was considered, which estimates the differential of the additionally bound drug moiety that was also assumed to be available for the hepatic uptake *in vivo* in liver compared to *in vitro* in plasma. Second, this model of  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  also

corrected the value of  $f_{up}$  *in vitro* for the drug ionization effect in the aqueous phase, and, hence, for the corresponding hepatocyte-to-plasma pH gradient effect on the unbound drug moiety. The contribution of ALB to hepatic uptake was evaluated by comparing the use of  $f_{up-adjusted}$  versus  $f_{up}$  in conventional IVIVE-based models, most notably when the *in vitro* assays used no ALB in the incubation medium. Moreover, in the scaling of  $CL_{int}$ , the unbound fraction in the incubation mediums (i.e., with plasma proteins or with microsomes) is used to correct  $f_{up-adjusted}$  (i.e.,  $f_{up-adjusted}/f_{uinc}$ ) for non-specific binding effect.

The Poulin et al. new IVIVE approach demonstrated a much higher degree of accuracy in predicting the  $CL_h$  under *in vivo* conditions for several drugs highly bound to ALB compared to the performance of the conventional and direct-scaling IVIVE approaches (Da-Silva et al., 2018; Poulin & Haddad, 2018; Poulin, Hop, et al., 2012; Poulin, Kenny, et al., 2012). For a robust validation exercise, these IVIVE-based models were challenged using data obtained from several experimental settings, several species and for drugs that are substrates to both enzyme and transporters. Overall, the  $f_{up-adjusted}$  model simply consisted of replacing the value of  $f_{up}$  determined *in vitro* with the calculated value of  $f_{up-adjusted}$  in any IVIVE model. The contribution of ALB in the hepatic uptake was evaluated by a ratio (R) i.e., by dividing the  $CL_h$  value predicted using  $f_{up-adjusted}$  in the presence of ALB to that  $CL_h$  predicted with  $f_{up}$  without ALB (Poulin & Haddad, 2018).

#### **4.3.2. 'Facilitated-dissociation' model (FDM) (revisited)**

Miyauchi et al. (2018) revisited a previously developed FDM of Tsao et al. (1988) to predict the initial hepatic uptake rate ( $PS_{u, int}$ ) *in vivo* from *in vitro* data. To attain their objective, Miyauchi et al. (2018) used the FDM that is more specific because it includes the binding parameters quantifying the interactions between the ALB molecules and hepatocytes plasma membranes, as well as the consequent dissociation of the ALB-drug complex upon contact with sinusoidal hepatocytes, which would explain the enhancement in total hepatic uptake. Therefore, the FDM is based on a binding isotherm defined by specific binding parameters (i.e.,  $B_{max}$  and  $K_{d, m}$ ) for the ALB-plasma membrane interactions. However, this model requires several optimization exercises from experimental-determined *in vitro* data to estimate these additional binding input parameters prior to the  $CL_h$ -IVIVE predictions. The authors have investigated two organic anion transporting polypeptide (OATP) substrates (pitavastatin and 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS)). Miyauchi et al. (2018) have demonstrated that the presence of ALB does, indeed, have a role in

facilitating the hepatic uptake of the two substrates in the rat and human hepatocytes, and that the enhancement is saturable at high concentrations of ALB (Table 4.1, Section A. 2.). The contribution of ALB in the hepatic uptake was evaluated according to the variations of the output R (Table 4.2); i.e., by dividing the uptake in the presence of ALB ( $PS_{u,inf}(+)$ ) to that observed without ALB ( $PS_{u,inf}(-)$ ). In a more recent study for a series of anionic drugs, Kim et al. (S. J. Kim et al., 2019) demonstrated that the ALB-mediated was not observed for low bound drugs such as pravastatin, however, the OATP-mediated uptake mechanism can be combined to the ALB-mediated uptake for anionic drugs highly bound to ALB to explain the increased uptake of these drugs into hepatocytes. To predict the increased uptake/clearance in the liver, the FDM was challenged and it is deemed appropriate to obtain accurate CL<sub>h</sub>-IVIVE predictions.

#### 4.3.3. $f_{up}$ -adjusted model versus FDM

The model of  $f_{up}$ -adjusted requires fewer input parameters (i.e., pKa, PLR and  $f_{up}$ ) than the FDM (seven input parameters as illustrated in Table 4.2) to quantify the binding and interactions of ALB with the membrane of the hepatocytes. Recently, Poulin and Haddad (2018) compared the performance of the  $f_{up}$ -adjusted model to that of FDM, using the data for the two drugs, pitavastatin and ANS, that were compiled by Miyauchi et al. (2018). From the results for pitavastatin, it has been demonstrated that both models are mathematically and conceptually similar since each model successfully predicted the ratios of unbound intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) in the absence of ALB *in vitro* to the  $CL_{int}$  measured *in vivo*. In other words, for pitavastatin each model predicted a similar ratio of unbound  $CL_{int}$  between the *in vitro* (no ALB) and *in vivo* (with ALB) conditions because the maximal facilitated dissociation effect has probably been observed for this drug. Moreover, these two ALB-mediated hepatic uptake models should be equivalent only when the maximal ALB facilitated-dissociation effect is observed. The main reason is that both models are based on the binding isotherm. Consequently, when a drug shows a maximal effect of the ALB-mediated hepatic uptake, the difference in the value of the unbound  $CL_{int}$  of a drug between the *in vitro* and *in vivo* conditions should depend only on the differential of ALB molecules between these two experimental conditions. In other words, the number of ALB-bound drug moiety available for the hepatic uptake between the *in vitro* and *in vivo* conditions cannot be greater than the corresponding differential of ALB molecules. Consequently, the plasma-to-liver concentration ratio of ALB (or *in vitro*-to-*in vivo* concentration ratio of

ALB) used in the IVIVE model based on  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  approximated the corresponding ratio of maximal binding capacity according to the model FDM for pitavastatin.

Conversely, the model of  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  significantly overestimated the experimentally determined ratio of unbound  $CL_{int}$  between the *in vitro* and *in vivo* conditions for ANS; however, this ratio was more accurately predicted using the FDM proposed by Miyauchi et al. (2018). The explanation for the overestimation observed for ANS with the  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  model is because it presumes that 'each interaction between the ALB-drug complex and the hepatocyte surface would at all times enhance and deliver the dissociated bound drug moiety into the hepatocytes' (Poulin & Haddad, 2018), which is probably not always the case. In other words, the ALB-mediated hepatic uptake of the ALB-bound drug moiety is always assumed maximal with the model  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  compared to the FDM, since the capacity of interaction between the ALB-ligand complex and the hepatocyte plasma membrane is presumed to be saturated. Whereas the model FDM was optimized from real experimental values; consequently, this model can accurately predict the ratio of unbound  $CL_{int}$  between the *in vitro* and *in vivo* conditions when the ALB-mediated uptake is lower than expected for drugs such as ANS.

In this context, an ALB-mediated hepatic uptake is not omnipresent for all ligands (endogenous substances or xenobiotics). For example, the observed interaction for the ALB-ANS complex with the plasma membrane is much lower than what was presumed by using the  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  model, in comparison to the FDM. Therefore, for ANS, the binding parameters of the ALB-ANS complex used in the FDM model predicted lower ratios of unbound  $CL_{int}$  between the *in vitro* and *in vivo* conditions compared to the  $f_{u,p\text{-adjusted}}$  model as demonstrated by Poulin and Haddad (2018).

According to Poulin and Haddad (2018), ANS is a protein conformational-tightening agent that increases the stability of the ALB-ANS complex. Therefore, compared to pitavastatin, the interactions of the ALB-ligand complex with plasma membranes of hepatocytes are apparently lower due to the conformational changes caused by the ANS binding to the ALB. These changes may also decrease the ability of ANS to dissociate easily from ALB. Furthermore, ANS has lower affinity to the membrane transporter OATP than pitavastatin, which could be another explanation for the apparently lower ALB-plasma membrane interaction and ALB-mediated hepatic uptake for ANS, as compared to pitavastatin. Thus, differences in

$CL_{int}$  ratios may also be due to the presence or absence of the OATP-mediated hepatic uptake which could affect the extent of interactions (e.g., ALB and the ligand, ALB-ligand complex and OATPs).

Overall, the FDM is a mechanistic model where the specific binding parameters  $B_{max}$  and  $K_d$  are previously optimized from real experimental data prior to the prediction of the output R (i.e., uptake ratio). It is therefore more specific and less speculative, as it probably describes the real capacity of interactions between the ALB-ligand complex and the surfaces of hepatocytes, similar to the *in vivo* conditions. It can be useful particularly to estimate any intermediate effect of the ALB-mediated hepatic uptake effect that cannot be captured by the use of  $fu_p$  (minimal effect) or  $fu_{p-adjusted}$  (maximal effect). The  $fu_{p-adjusted}$  model, on the other hand, does not require any optimization exercise since it only replaces  $fu_p$  with  $fu_{p-adjusted}$  in the conventional IVIVE model, but this model performs well only when the ALB-ligand complex interactions with the hepatocyte plasma membranes are assumed maximal. A correction to the  $fu_{p-adjusted}$  model (e.g., by correcting the main input parameter PLR) could be performed by considering lowering the number of ALB molecules that interacted with the hepatocyte plasma membrane (in other words by which percentage the surface of the plasma membrane oriented towards the interstitial space interacted with the ALB-ligand complex). This aspect remains to be further explored.

Both the FDM and  $fu_{p-adjusted}$  IVIVE-based models can be used to accurately predict the ratio of CLh in the absence of ALB to that in the presence of ALB; however more work could still lead to a better understanding of the ALB facilitated-dissociation process(es) and of its quantification. In the following sections, additional aspects in that area are discussed, which could facilitate understanding the ALB-mediated uptake phenomenon for a more accurate prediction of CLh, and orient PK modelers towards additional improvements to the current IVIVE models.

#### **4.3.4. Other ALB-facilitated models**

Recently, Riccardi et al. (2019) hypothesized that, once *in vitro* metabolic stability is scaled by partition coefficients between hepatocytes and buffer with 4% ALB, it can better predict *in vivo* CLh. Therefore, these authors suggested a new correction factor to be used with the conventional IVIVE-based method while extrapolating CLh in the absence of ALB *in vitro* to the presence of ALB *in vivo*. To overcome the standard approach of not using ALB in the incubation mediums of hepatocytes used to determine the  $CL_{int}$  of both enzyme- and transporter-mediated substrates, these authors suggested estimating the hepatocyte-to-

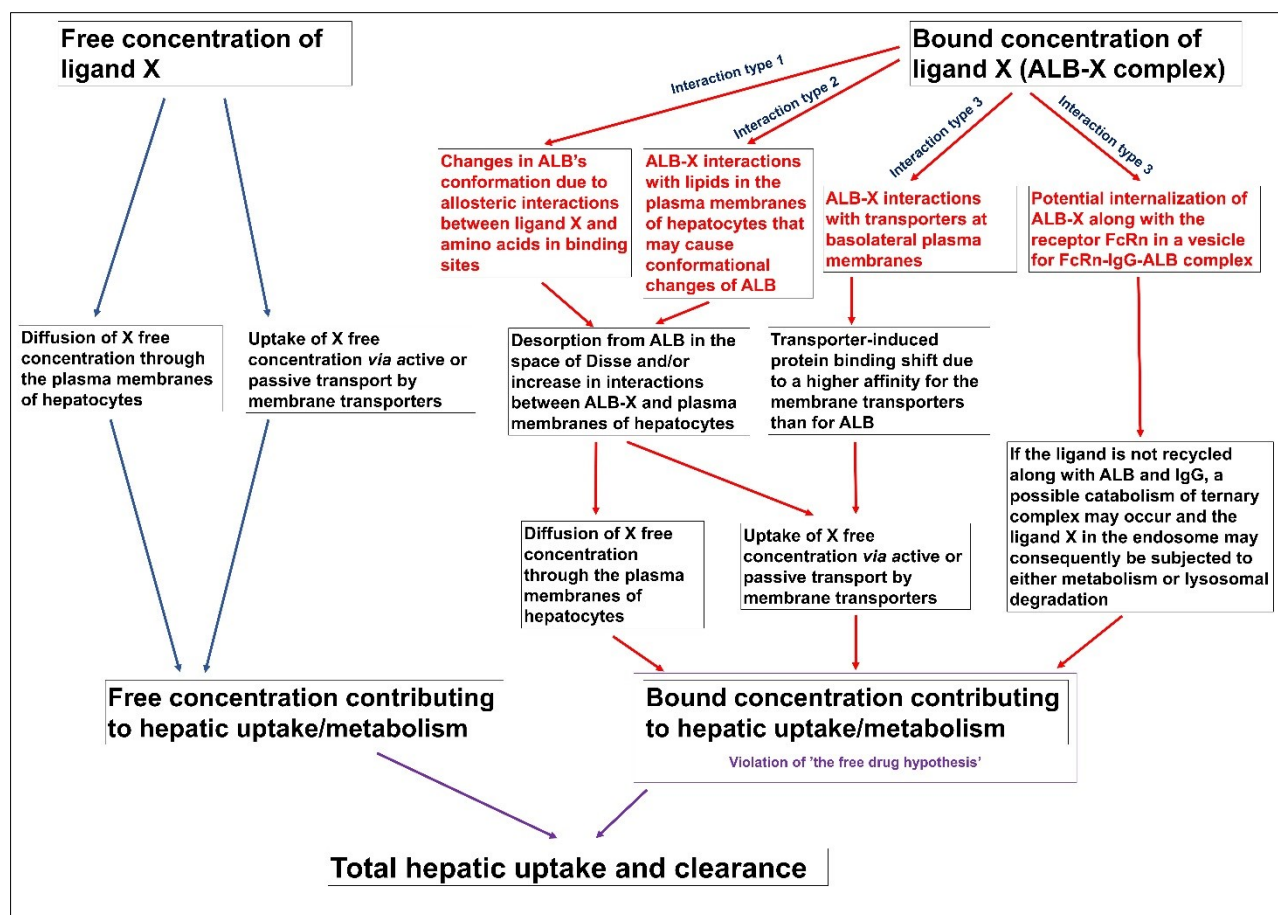


buffer ratio *in vitro* in the presence of 4% of ALB in the incubation medium. This was made to combine the consideration of the active uptake and passive permeability effects together with the effect of ALB to correct the  $CL_{int}$  used for metabolism in the well-stirred model. In other words, the apparent  $CL_{int}$  for the total hepatic uptake *in vitro* is obtained by correcting the  $CL_{int}$  of the metabolism with the hepatocyte-to-buffer ratio, and, hence, potentially estimating more accurately the *in vivo* condition in liver. Thus, they assumed that: 1) ALB is only required for the hepatic active uptake *in vitro*-to-*in vivo* ratio to be one (i.e., without ALB, the *in vitro* assay under-predicts *in vivo* active uptake), and 2) *in vitro* metabolism (and passive diffusion) values with and without ALB are the same, hence the *in vitro*-to-*in vivo* ratios are one regardless of using BSA in the assay.

Since this new binding correction parameter is based on real measurements under *in vitro* conditions at the physiological ALB concentration that should mimic the *in vivo* conditions in liver for each drug, it could quantify any effect of the ALB-mediated hepatic uptake (i.e., minimal, intermediate and/or maximal effect). Hence, this should be similar to the model FDM that is also driven from additional hepatocyte data, which may become an advantage to quantify particularly an intermediate ALB-mediated hepatic uptake effect that cannot be covered by the other binding correction parameter  $f_{u_p}$  (assumed to cover a minimal effect only) or  $f_{u_{p-adjusted}}$  (assumed to cover a maximal effect only), but a comparative assessment of this new parameter hepatocyte-to-buffer ratio compared to the other models of FDM and  $f_{u_{p-adjusted}}$  still needs to be made (see section 4.5.2 for further discussion in that domain).

#### 4.4. Molecular interactions

To explain how an ALB-mediated hepatic uptake mechanism can be present *in vivo*, Poulin et al. (2016) and C. M. Bowman and Benet (2018) presented several hypotheses that may be behind the occurrence of this facilitation phenomenon (i.e., conformational changes, reduction of diffusional distance, rate-limiting dissociation *versus* rate-limiting diffusion, transporter uptake, and electrostatic interactions). These mechanisms may occur between the ALB-ligand complex and the constituents of the sinusoidal plasma membranes of hepatocytes (i.e., ALB receptor, ligand transporters and lipids). To note, these mechanisms can be interrelated, which means that one mechanism can probably be the cause of another one, e.g., conformational changes leading to increased desorption from ALB, then to a transporter uptake. In figure 4.1, these mediated hepatic uptake mechanisms can be a result of three types of molecular interactions that include the ALB-ligand complex: 1) protein–ligand allosteric interactions, 2) protein–lipid interactions and 3) protein–protein interactions.



**Figure 4.1. Total hepatic uptake and clearance of bound and free ligand (X).**

The protein-mediated hepatic uptake represents all contributions of the bound concentration of the ligand (X) to total hepatic uptake and clearance. The ALB-X complex could be implicated in three types of molecular interactions as it follows: type 1 is for the protein–ligand allosteric interactions, type 2 is for the protein–lipid interactions and type 3 is for the protein–protein interactions. The red text boxes describe the four hypotheses on the various mechanisms that an ALB-ligand complex can go through after interacting, at the molecular level, with the components of the plasma membranes of hepatocytes. This schematic shows how the complex (i.e., bound concentration of X) may violate 'the free drug hypothesis' by contributing to a hepatic uptake/metabolism which should be considered in quantitative modeling on top of the free concentration of X.

#### **4.4.1. Albumin–ligand allosteric interactions**

Some charged, polar and mainly hydrophobic amino acids are found either at the entrance or buried in the inner surrounding of the two predominantly hydrophobic Sudlow sites of ALB (Ghuman et al., 2005). The variety of residues makes the ALB binding sites propitious for some allosteric interactions between the residues of the plasma protein and a solute in plasma (e.g., fatty acids, bilirubin). The binding of this solute to site A would consequently lead to conformational changes in ALB (Chen & Hage, 2004), and to an increased or decreased desorption of a second ligand from another binding site of ALB (Interaction type 1, Figure 4.1). The desorption kinetics of the second ligand would then become the limiting step for hepatic uptake and metabolism (Krause et al., 2018). For example, the binding of long-chain fatty acids to multiple sites (FA1 to FA7) can affect the extent of desorption of a ligand from ALB. Fatty acids accommodate the binding of other endogenous (e.g., bilirubin) and exogenous substances to the primary sites I and II (Ascenzi & Fasano, 2010; Fanali et al., 2012). This kind of accommodation would increase the affinity of the ligand and decrease desorption, which is known as a cooperative interaction (Lehman-McKeeman, 2013). Conversely, due to allosteric modulation, competition for the same binding site between FAs and some ligands is also possible (Chakrabarti, 1978), implicating a possible displacement of the ligand (Ascenzi & Fasano, 2010; Fasano et al., 2005). Furthermore, drugs (e.g., warfarin, ibuprofen) may also cause allosteric interactions in ALB sites, and may lower affinity or prevent the binding for some endogenous ligands (e.g., heme or nitric oxide) to the protein (Ascenzi, di Masi, De Sanctis, Coletta, & Fasano, 2009; Baroni et al., 2001). Elsewhere, allosteric interactions occur due to drug binding (e.g., ANS), which may also reduce the interaction capacity of ALB-ligand complex with the plasma membranes, and, consequently, decrease the drug desorption from ALB.

#### **4.4.2. Albumin–lipid interactions**

It has been demonstrated that depolarization/hyperpolarization of the plasma membrane (Weisiger, Fitz, & Scharschmidt, 1989) and the cationized/anionized feature of the plasma protein (Burczynski et al., 2001; Elmadhoun, Wang, Kirshenbaum, & Burczynski, 2001) are high influencers of hepatic uptake. Therefore, the surface charge potential of both sinusoidal plasma membrane and ALB may be crucial for protein–lipid interactions. The plasma membrane of polarized hepatocytes is rich in negatively charged acidic phospholipids (e.g., phosphatidylserine) and zwitterionic phospholipids (e.g.,

phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine). Therefore, in the space of Disse, the charged residues on the surface of ALB should favor strong ionic forces bonding the plasma protein to these phospholipids (Interaction type 2, Figure 4.1). Four events related to protein-mediated hepatic uptake may then result from these electrostatic attractions: 1) reduction of the diffusional distance for the ALB-ligand complex (Burczynski et al., 1997); 2) adsorption onto the phospholipid membrane of hepatocytes (Horie et al., 1988); 3) mild changes in the conformations of both ALB and phospholipid headgroups (Horie et al., 1988); and 4) increased desorption from ALB of the ligand for its simple diffusion through the sinusoidal plasma membrane, or transporter uptake, under its free state (Figure 4.1), which is different from the  $C_{free}$  of the ligand initially found at equilibrium in the extracellular space.

The asymmetry and the curvatures of microvilli in the sinusoidal phospholipid layer, taken together, heighten accessibility into the intracellular matrix of hepatocytes for endogenous/exogenous substances and extracellular proteins, by luring them towards functional headgroups (and/or tails) of phospholipids (Drubin & Nelson, 1996). Electrostatic interactions can be combined with other, weaker interactions, such as hydrophobic, H-bonds and Van der Waals interactions. Taken together, these forces may very likely help differently charged residues get closer to rotatable headgroups of phospholipids (Hauser, Guyer, Pascher, Skrabal, & Sundell, 1980) and contribute to protein–lipid interactions (Lee, 2003, 2005). According to Scherer and Seelig (1989), the adsorption of cationic, anionic or amphiphilic substances/residues can affect in various ways the spatial orientation of the phosphate ( $PO_4^-$ ) and the positive nitrogen ( $N^+$ ) in the headgroups of phospholipids.

Earlier, Horie et al. (1988) demonstrated in spectroscopy that conformational changes occurred in ALB due to direct weak interactions with isolated rat hepatocytes. The type of adsorption onto the phospholipids is considered nonspecific (Horie et al., 1988). Using FT-IR spectroscopy and infrared spectra, F. Wang et al. (2006) demonstrated that bovine ALB does adsorb, particularly, to phosphatidylcholine vesicles in aqueous solutions and in protein-lipid systems. According to the authors, the adsorption causes mutual conformational changes to both the secondary structure of the plasma protein and to functional groups of phosphatidylcholines. Another example unravels the release of an anticancer drug (ellipticine) from phosphatidylcholine vesicles, after the interaction of human ALB with liposomes due to hydrophobic interactions (Thakur, Das, & Chakraborty, 2014). Furthermore, F. C. Fischer et al. (2018) demonstrated

that the ALB-mediated uptake is optimal, for xenobiotics with different physicochemical properties (Table 4.1, section A. 5.), particularly when the concentration of fetal bovine serum is lower than 2% *in vitro*, which makes the phenomenon saturable and dependent on the protein concentration.

#### **4.4.3. Albumin–protein interactions**

Protein–protein interactions may also be behind the reduction of the diffusional distance of highly bound xenobiotics, after the ALB–ligand complex enters in direct contact with another membrane protein (i.e., transporters or receptors) (Interaction type 3, Figure 4.1). The events that can result from protein–protein interactions may depend on: 1) whether the other protein is a membrane transporter for the ligand or a specific receptor for ALB; 2) the affinity of the membrane protein for ALB or for the ligand; 3) time of contact of the ALB–ligand complex with the other membrane protein; and 4) the preferred binding site in ALB for the endo- or exogenous ligand.

##### **4.4.3.1. Transporter-mediated hepatic uptake**

The transporter-mediated uptake of the ligand may be considered another violation of ‘the free drug hypothesis’ (Trainor, 2007). Theoretically, the interaction between the ALB–ligand complex and another membrane transporter of the ligand is possible. Therefore, the violation of ‘the free drug hypothesis’ is only true when the hepatic uptake of the ligand is mediated by the membrane transporter after its interaction with the ALB–ligand complex. Fukuchi et al. (2017) demonstrated that the presence of ALB influenced the hepatic uptake *in vitro* of a highly ALB-bound compound, under saturable conditions of organic anion transport polypeptide (OATP1B3). The authors concluded that the influence of ALB on the ‘transporter-mediated uptake’ may be due to a complementary ‘ALB-mediated hepatic uptake’ effect.

Furthermore, in an effort to explain IVIVE-based underpredictions for drugs highly bound to ALB, a transporter-mediated uptake could be involved in violating ‘the free drug hypothesis’, Baik and Huang (2015) suggested a new hypothesis described as ‘the transporter-induced protein binding shift’. This concept is based on the possibility that a membrane transporter (e.g., OATPs or OATs) may be able to directly strip the drug from the plasma protein before the ligand dissociates itself, under physiological conditions in the space of Disse, if the affinity binding for a highly bound ligand is higher to the hepatocyte membrane transporter (e.g., OATPs) than to ALB (C. M. Bowman & Benet, 2018). The predominance of

the drug binding to a transporter may then induce a shift in the equilibrium that supposedly exists between the free drug and its bound moiety to ALB. This could be explained in terms of a potential competition between ALB and the membrane transporter for the same substrate, particularly when yielding a decrease in ALB-drug complex in favor of an increase of a transporter-drug complex that may also mediate a hepatic uptake (C. M. Bowman & Benet, 2018). C. M. Bowman et al. (2019) reported for OATP substrates that the drugs highly bound to ALB (i.e., atorvastatin and pitavastatin) had increased values of total uptake  $CL_{int}$  ( $CL_{int, total\ uptake}$ ) compared to other drugs with higher  $f_{up}$  values (i.e., pravastatin and rosuvastatin). The authors concluded that 'the transporter-induced binding shift' might be behind this observation, in terms of a competitive inhibition between the ALB and the OATPs for the same substrates with high affinities to both proteins. This should particularly be true when the ALB is added in the incubation medium *in vitro* at relevant physiological concentrations in estimating the  $CL_{int}$  *in vitro* for the transporter effect. More studies are however required to 'differentiate transporter uptake vs. transporter binding'.

Recently, Kimoto et al. (2018) concluded that 'the transporter-mediated uptake' can be more apparent for acidic xenobiotics with high permeability. Here are a few explanations why this statement can be plausible: 1) acidic molecules preferentially bind to ALB due to the presence of specific basic residue clusters at the entrance and bottom of ALB's binding pockets (Ghuman et al., 2005); 2) when organic anionic compounds are bound to ALB, they can escape the positively charged coated pits (i.e., Clathrins) on sinusoidal endothelial cells *via* ALB transcytosis process, and so can reach the parenchymal cells (Ghitescu & Fixman, 1984); 3) there is an extensive expression of organic anion transporters (OATs) for anionic molecules in hepatocytes (Nigam et al., 2015). OAT2 transporters are highly (and OAT7 exclusively) expressed on the human hepatocytes' basolateral domains (Nigam et al., 2015; Roth, Obaidat, & Hagenbuch, 2012).

#### **4.4.3.2. Neonatal Fc receptor: internalization of the albumin-drug entity**

Associated (Levemir®), covalently attached (e.g., Aldoxorubicin, Methotrexate) or fused (e.g., Eperzan®/Tanzeum®, albinterferon drugs) to ALB (Larsen et al., 2016), are now approved for clinical use. These drugs would form a single entity with ALB and not just a reversible complex, so that drugs can have prolonged therapeutic effects. Furthermore, the ALB-drug entity may possibly enter the hepatocytes from

the interstitial space during the protein's endocytosis *via* the neonatal Fc receptor (FcRn) internalization process (D. K. Meijer & van der Sluijs, 1989; Sand et al., 2014). In this case, an enhanced hepatic uptake of the drug can be observed after the internalization of the ALB-drug entity along with FcRn and the immunoglobulin G; therefore, the mechanism is called 'receptor-mediated uptake'.

Two independent events are therefore possible during a 'receptor-mediated uptake': 1) the recycling of the ALB-drug entity back into the extracellular space, which increases the half-life of the therapeutic molecule that is linked to ALB (Sleep, Cameron, & Evans, 2013); or 2) the metabolism or degradation of the ALB-drug entity *via* the lysosomal pathway (Humphries & Payne, 2012). In other words, the (ALB-drug)-IgG-FcRn complex internalization may influence (increase or decrease) the hepatic uptake and clearance of fused, associated or covalently attached drugs. Indeed, because of such receptor internalization and binding between ALB and FcRn, ALB is deemed as an attractive vehicle for intracellular delivery and effects the prolongation of therapeutic ligands (Larsen et al., 2016; Sockolosky & Szoka, 2015). In table 4.1 (section C), some other examples for ALB-based delivery systems are also given to highlight the current uses of ALB and the importance of this plasma protein in advanced clinical technology (e.g., nanotechnology, microbiology).

However, more studies on targeted drug delivery are required to better understand the implication of FcRn and other membrane receptors for ALB (e.g., gp60, gp30, gp18) in potentiating hepatic uptake of drugs (Larsen et al., 2016). Also of interest would be to explore whether a reversible ALB-ligand complex can go through the same internalization mechanism of 'receptor-mediated uptake' like the fused, associated and covalently attached drugs.



## **4.5. New perspectives for more improvements in IVIVE-based predictions**

### **4.5.1. Biopharmaceutics classification systems: a drug selection utility**

In drug development process, candidate drug selection is essential to develop a new molecule that holds the best pharmacological and clinical safety characteristics among a range of selected molecules (Gibson, 2009). Drug selection is also useful in the development of IVIVE models. Depending on the objective and the design of the study (e.g., metabolism, uptake, and clearance predictions), criteria for drug selection could be based on powerful tools such as the biopharmaceutics classification system (BCS) of Amidon, Lennernas, Shah, and Crison (1995), the biopharmaceutics drug disposition classification system (BDDCS) of C. Y. Wu and Benet (2005), the total hepatic method of G. Camenisch and Umehara (2012) (known as EC3S (G. P. Camenisch, 2016)) and the extended clearance classification system (ECCS) of Varma, Steyn, Allerton, and El-Kattan (2015). Based on these drug classification systems, here are the main criteria for drug selection: 1) permeability, 2) solubility, 3) charge (pKa), 4) lipophilicity (LogP or LogD<sub>7.4</sub>), 5) molecular weight, 6) P-glycoprotein substrates or other membrane transporters-substrates, 7) subjection to efflux, 8) subjection to biliary excretion, 9) extent of plasma protein binding (high or low), and 10) volume of distribution. The extent of the ALB-protein facilitated hepatic uptake can also become a criterion for classification since it may have impacts on the hepatic metabolism and clearance; hence, this was challenged further in this present study.

In the following subsections, six IVIVE approaches are presented and challenged by predicting CL<sub>h</sub> in humans for drugs showing properties that fit these classification systems. The input CL<sub>int, h</sub> was calculated either by considering the metabolism solely, the total uptake solely or the metabolism combined with the transporter effect, and either by considering an ALB-mediated uptake mechanism or not. This comparative assessment was made for the same dataset of drugs to verify if one IVIVE approach could be more accurate than others and could thus work as a generic IVIVE approach. Finally, a decision tree is proposed to maximize the prediction of CL<sub>h</sub> in humans based on the current findings.

#### 4.5.2. The use of existing IVIVE approaches when accounting for the mediated uptake processes in the prediction of CL<sub>h</sub>

In the new drug development phase, the overall CL<sub>h</sub> should be optimized to attain the desired dosage and half-life of the drug. Hepatic efflux and biliary excretion have already been used along with the hepatic uptake processes (i.e., passive diffusion and passive/active transport) as parameters in IVIVE models for predicting the total CL<sub>h</sub> of drugs (M. Baker & Parton, 2007). However, little work in IVIVE modeling has been done that included the mechanisms of diffusion and active or passive hepatic uptake *via* transporters, with the consideration to both processes 'ALB-mediated uptake' and 'transporter-mediated uptake'.

According to recent studies (Miyachi et al., 2018; Poulin, 2013), all hepatic uptake processes, even when an uptake is considerably mediated by a certain protein (e.g., plasma protein, membrane transporter), should be combined to predict more accurately the total hepatic uptake and clearance of drugs. As mentioned in previous sections, Poulin (2013) simply replaced  $f_{up}$  with the novel binding parameter  $f_{up-adjusted}$  in the conventional IVIVE model to correct the apparent CL<sub>int</sub> of the free drug moiety that combined all hepatic processes (permeability, transporter and metabolism), when transporters and/or permeability governed the CL<sub>int</sub>, along with metabolism. Remarkably, the author demonstrated that the accuracy for the predictions of *in vivo* CL<sub>h</sub> for several ALB-bound drugs was significantly improved by considering the ALB-mediated hepatic uptake phenomenon in the conventional IVIVE model compared to using only  $f_{up}$  in that IVIVE model, which had not considered this hepatic uptake phenomenon.

As mentioned in the previous section, Riccardi et al. (2019) have recently developed a novel experimental approach to predict human CL<sub>h</sub> for enzyme- and transporter-mediated mechanisms. This method was developed based on hepatocyte-to-plasma ratio. Based on the hypotheses that (1) the passive and uptake intrinsic clearance rates in the *in vitro* hepatocyte assay, in the presence of 4% ALB, are equivalent to *in vivo* rates, and (2) the CL<sub>int, met</sub> rates in the *in vitro* hepatocyte assay, in the absence of 4% ALB, are equivalent to *in vivo* rates. A large set of structurally diverse compounds with different clearance mechanisms and transporter involvement (i.e., OATPs, NTCP, OATs) were used for the method validation.

This novel method incorporating the extended clearance concept with transporter effects provides a much better prediction of overall CL<sub>h</sub> than using the traditional metabolic clearance alone in humans. In

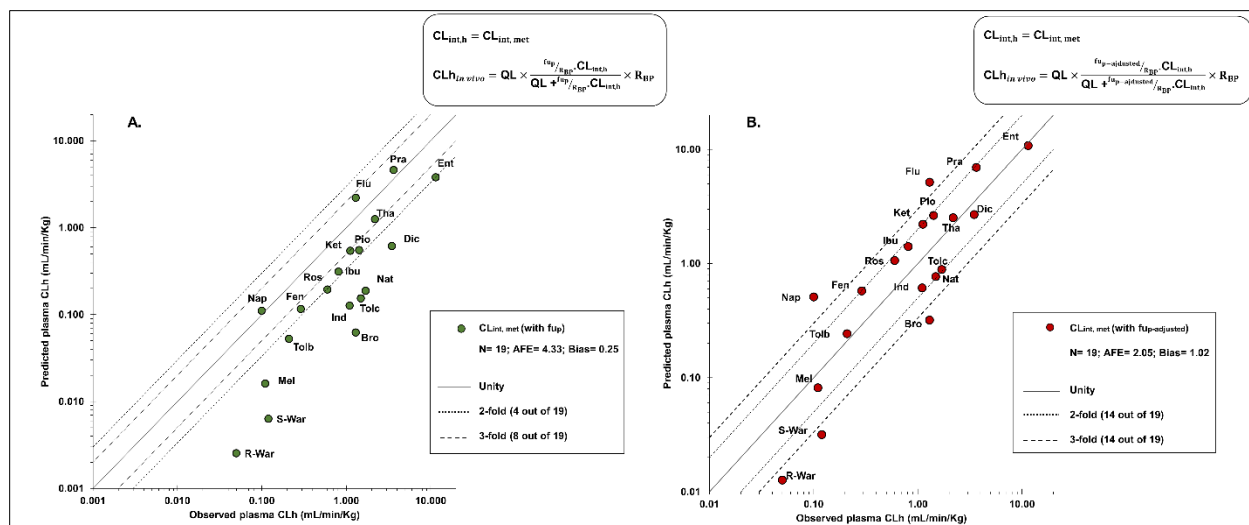
this case, considering the hepatocyte-to-buffer (plasma) ratio in IVIVEs showed some improvements compared to using the traditional binding correction factor  $f_{up}/f_{u_{inc}}$  in the well-stirred model. However, while predicting the total CL<sub>h</sub> by combining specific data on CL<sub>int</sub> for the metabolism, transport, and permeability in the well-stirred model, which the resulting apparent CL<sub>int</sub> was corrected from  $f_{up-adjusted}/f_{u_{inc}}$  instead, Poulin (2013) showed similar predicted values of CL<sub>h</sub> compared to Riccardi et al. (2019) when the same drugs are compared in both studies (e.g., statins) (not shown). For this reason, this new scaling factor proposed by Riccardi et al. (2019) was not studied further in this present study since it still needs more validation; however, it is recognized that it also represents an interesting approach.

Furthermore, Fukuchi et al. (2017) demonstrated that the presence of ALB has influenced the uptake *in vitro* into hepatocytes of a highly ALB-bound compound, under saturable conditions of OATP1B3 transporters. The authors concluded that the influence of ALB on ‘transporter-mediated uptake’ may be due to a complementary ‘ALB-mediated uptake’. However, their model did not combine the contributions from the dissociation of ALB-drug complex in hepatic uptake, along with the transporter-mediated influx and the diffusion of the initially free drug. Recently, Miyauchi et al. (2018) also demonstrated that a shift from C<sub>bound</sub> to C<sub>free</sub> of a ligand can more accurately describe its uptake *via* OATs or OATPs compared to C<sub>free</sub> in the description of total hepatic uptake and clearance.

#### **4.5.3. Further challenging the mediated- and influx uptake processes in the prediction of CL<sub>h</sub>**

Using a newly published dataset of 25 drugs from Kimoto et al. (2018) (ECCS class 1A drugs; i.e., metabolism is a primary clearance route; high permeability acids/zwitterions with molecular weight (MW)  $\leq 400$  Da), six different IVIVE approaches to predict CL<sub>h</sub> were challenged. Kimoto et al. (2018) demonstrated that these 25 drugs, additionally to undergoing extensive hepatic metabolism, most of them are also substrates for OAT2 transporters (17 out of 25 drugs). Four drugs had an affinity for the two transporters OAT2 and OATP1B1 (i.e., bromfenac, entacapone, fluorescein and nateglinide) (Kimoto et al., 2018). While four others had either minimal or no affinity for transporters (i.e., clinafloxacin, naproxen, thalidomide and tiagabine) (Kimoto et al., 2018). The intentions behind this IVIVE-based exercise are to highlight cases where plasma protein binding (and its alteration) in PK/PD and particularly IVIVE modeling studies may be relevant even in the context of substrates of membrane transporters.

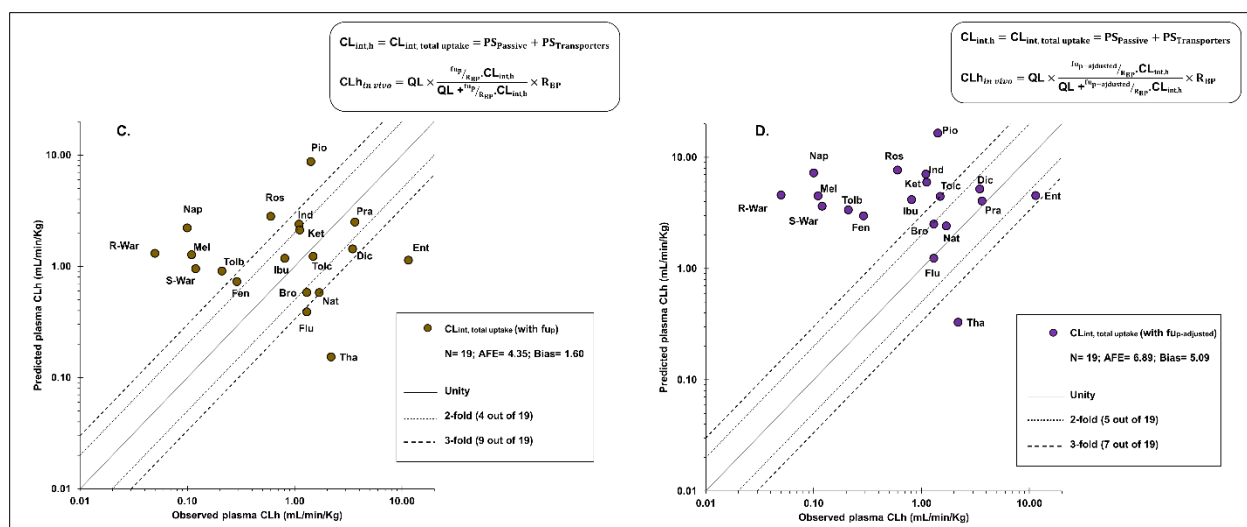
The six proposed IVIVE approaches challenged herein are the following: prediction of CL<sub>h</sub> considering only metabolism by using the conventional approach with the term  $f_{u_p}$  (Approach 1; Figure 4.2A), prediction of CL<sub>h</sub> considering only metabolism by using the conventional approach with the terms  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  (Approach 2; Figure 4.2B), prediction of CL<sub>h</sub> considering only total uptake (transport and passive diffusion) with the term  $f_{u_p}$  (Approach 3; Figure 4.2C), prediction of CL<sub>h</sub> considering only total uptake (transport and passive diffusion) with the term  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  (Approach 4; Figure 4.2D), prediction of CL<sub>h</sub> by using the extended clearance model (ECM) considering the interplay between the total uptake (transport and passive diffusion) and metabolism with the term  $f_{u_p}$  (Approach 5; Figure 4.2E), and prediction of CL<sub>h</sub> using the ECM considering interplay between the total uptake (transport and passive diffusion) and metabolism with the term  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  (Approach 6; Figure 4.2F) (note that all corresponding equations and calculations are found in the supplemental material, Table 4.S5). The predictions of the plasma CL<sub>h</sub> (mL/min/Kg) *in vivo* in humans by using these six IVIVE-based approaches were possible for only 19 drugs of the Kimoto et al. (Kimoto et al., 2018) dataset which had measurable intrinsic metabolic clearance (CL<sub>int,met</sub>) using the *in vitro* microsome assay, i.e., data for six drugs were not used: Gliclazide, Isoxicam, Piroxicam, Tiagabine, Clinafloxacin, and Sulfamethoxazole. Note that the IVIVE-based approaches 1, 3, and 5 are the same as those challenged in Kimoto et al. (Kimoto et al., 2018). Whereas in the IVIVE-based approaches 2, 4, and 6, we have simply substituted the  $f_{u_p}$  term with the  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  term that was calculated according to Poulin et al. (2012) (Table 4.S5, Eq. 1).



**Figure 4.2. Observed versus predicted plasma hepatic clearance using six CLh-IVIVE approaches.**

The observed plasma CLh (mL/min/Kg) are presented for 19 drugs (ECCS class 1A) versus their predicted values that are obtained using six CLh-IVIVE approaches based on the well-stirred model. The six prediction approaches differ with their  $CL_{int, h}$  and the use of either the  $f_{u_p}$  or  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  parameters in the well-stirred equation: A)  $CL_{int, met}$  (with  $f_{u_p}$ ), B)  $CL_{int, met}$  (with  $f_{u_p\text{-adjusted}}$ ), C)  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $f_{u_p}$ ), D)  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $f_{u_p\text{-adjusted}}$ ), E)  $CL_{int, met}$  and  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $f_{u_p}$ ), F)  $CL_{int, met}$  and  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $f_{u_p\text{-adjusted}}$ ), and G) the best predictive performance among the six CLh-IVIVE approaches is shown for each drug, and the table shown in Figure 4.2 corresponds only to graph G. This table shows the number of drugs for each approach that gave the best predictive performance within twofold and threefold ranges. Solid, dashed squares and dashed lines represent, respectively, the unity, twofold and threefold ranges. For all graphs, the data of observed values for plasma CLh (mL/min/Kg) for the 19 drugs with measurable  $CL_{int, met}$  are taken from Kimoto et al. (2018). The parameter  $CL_{int, met}$  has been estimated without using ALB in the microsomal assay, whereas the  $CL_{int, total\ uptake}$  for the active uptake has been determined by using 10% bovine serum in the incubation medium of hepatocytes assay. The overpredicted values of plasma CLh are above the upper threefold line and the underpredicted values are below the lower threefold line. The overall performance for each approach is indicated by both AFE and bias on their corresponding graph. To note that the terms  $f_{u_p}$  and  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  were not divided by  $f_{u_{inc}}$  as conventionally calculated in the CLh equations as the values for  $f_{u_{inc}}$  are not provided. Moreover, the  $CL_{int, met\ apparent}$  ( $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$  microsomal protein) was divided by the term  $f_{u_{inc, mic}}$  to obtain the  $CL_{int, met}$  in four CLh equations; i.e., approaches 1, 2, 5 and 6 (for more details on calculations made, to consult Table 4.S5 in supplemental material).

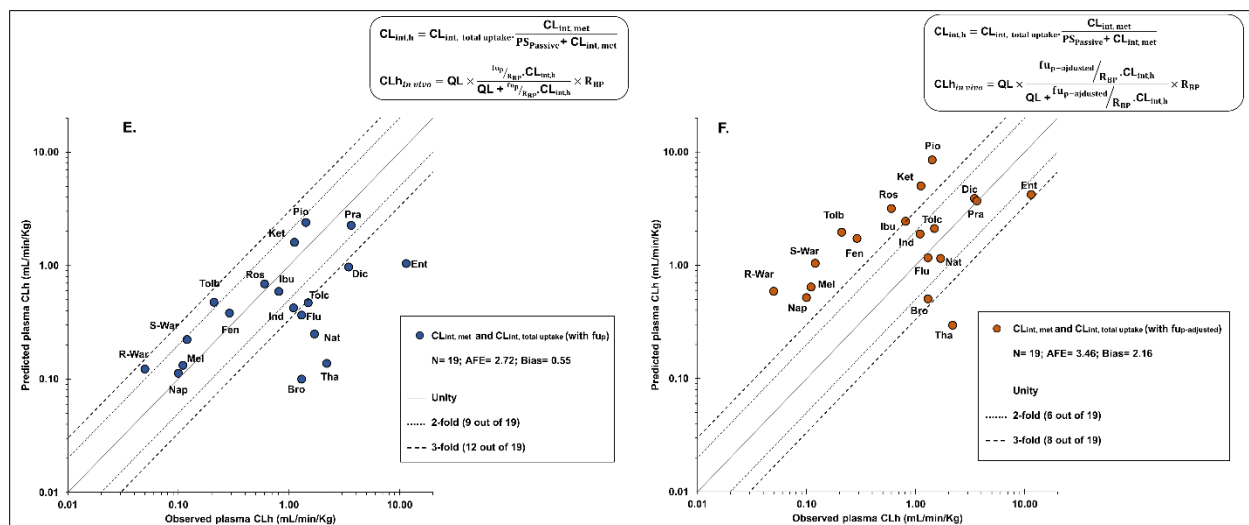
**Abbreviations:** AFE average fold error; CLh hepatic clearance;  $CL_{int, h}$  overall hepatic intrinsic clearance;  $CL_{int, met}$  metabolic intrinsic clearance;  $CL_{int, total\ uptake}$  total uptake clearance that is the sum of passive diffusion and uptake via membrane transporters;  $f_{u_{inc, mic}}$  unbound fraction in microsomal assay;  $f_{u_p}$  unbound fraction in plasma;  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  adjusted-unbound fraction in plasma; N number of drugs;  $PS_{passive}$  intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx via simple diffusion;  $PS_{transporters}$  membrane clearances for hepatic influx via passive and active uptake transporters;  $Q_L$  liver blood flow. The abbreviations matching the generic names of the drugs are given in Table 4.3.



**Figure 4.2. (continued).**

The observed plasma CLh (mL/min/Kg) are presented for 19 drugs (ECCS class 1A) *versus* their predicted values that are obtained using six CLh-IVIVE approaches based on the well-stirred model. The six prediction approaches differ with their  $CL_{int, h}$  and the use of either the  $fu_p$  or  $fu_{p-adjusted}$  parameters in the well-stirred equation: A)  $CL_{int, met}$  (with  $fu_p$ ), B)  $CL_{int, met}$  (with  $fu_{p-adjusted}$ ), C)  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $fu_p$ ), D)  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $fu_{p-adjusted}$ ), E)  $CL_{int, met}$  and  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $fu_p$ ), F)  $CL_{int, met}$  and  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $fu_{p-adjusted}$ ), and G) the best predictive performance among the six CLh-IVIVE approaches is shown for each drug, and the table shown in Figure 4.2 corresponds only to graph G. This table shows the number of drugs for each approach that gave the best predictive performance within twofold and threefold ranges. Solid, dashed squares and dashed lines represent, respectively, the unity, twofold and threefold ranges. For all graphs, the data of observed values for plasma CLh (mL/min/Kg) for the 19 drugs with measurable  $CL_{int, met}$  are taken from Kimoto et al. (2018). The parameter  $CL_{int, met}$  has been estimated without using ALB in the microsome assay, whereas the  $CL_{int, total\ uptake}$  for the active uptake has been determined by using 10% bovine serum in the incubation medium of hepatocytes assay. The overpredicted values of plasma CLh are above the upper threefold line and the underpredicted values are below the lower threefold line. The overall performance for each approach is indicated by both AFE and bias on their corresponding graph. To note that the terms  $fu_p$  and  $fu_{p-adjusted}$  were not divided by  $fu_{inc}$  as conventionally calculated in the CLh equations as the values for  $fu_{inc}$  are not provided. Moreover, the  $CL_{int, met\ apparent}$  ( $\mu L / \text{min} / \text{mg}$  microsomal protein) was divided by the term  $fu_{inc, mic}$  to obtain the  $CL_{int, met}$  in four CLh equations; i.e., approaches 1, 2, 5 and 6 (for more details on calculations made, to consult Table S5 in supplemental material).

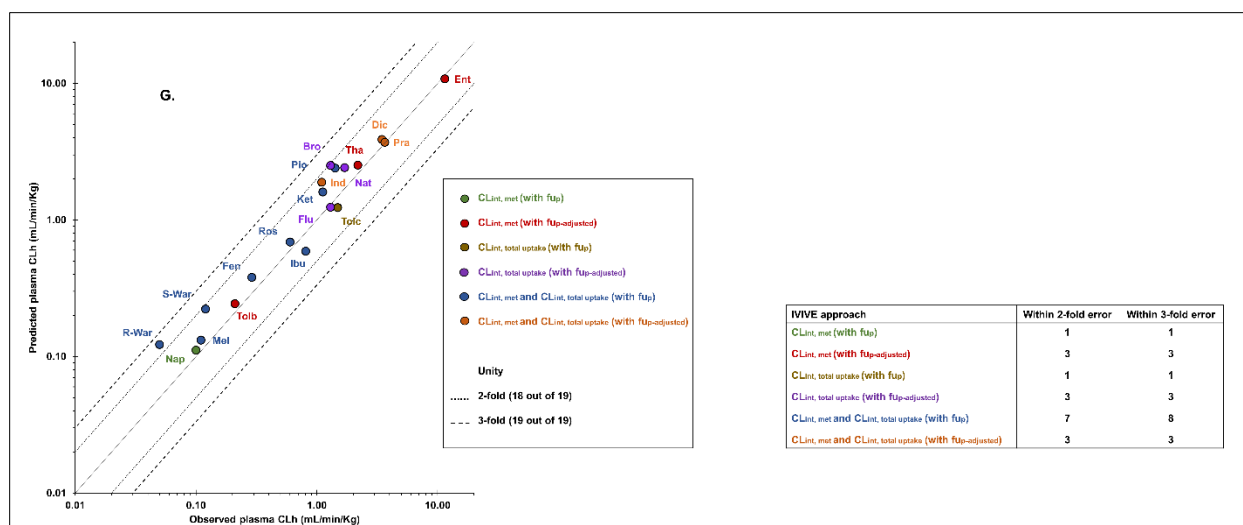
**Abbreviations:** AFE average fold error; CLh hepatic clearance;  $CL_{int, h}$  overall hepatic intrinsic clearance;  $CL_{int, met}$  metabolic intrinsic clearance;  $CL_{int, total\ uptake}$  total uptake clearance that is the sum of passive diffusion and uptake *via* membrane transporters;  $fu_{inc, mic}$  unbound fraction in microsome assay;  $fu_p$  unbound fraction in plasma;  $fu_{p-adjusted}$  adjusted-unbound fraction in plasma; N number of drugs;  $PS_{Passive}$  intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx *via* simple diffusion;  $PS_{Transporters}$  membrane clearances for hepatic influx *via* passive and active uptake transporters;  $QL$  liver blood flow. The abbreviations matching the generic names of the drugs are given in Table 4.3.



**Figure 4.2. (continued).**

The observed plasma CLh (mL/min/Kg) are presented for 19 drugs (ECCS class 1A) *versus* their predicted values that are obtained using six CLh-IVIVE approaches based on the well-stirred model. The six prediction approaches differ with their  $CL_{int, h}$  and the use of either the  $f_{up}$  or  $f_{up-adjusted}$  parameters in the well-stirred equation: A)  $CL_{int, met}$  (with  $f_{up}$ ), B)  $CL_{int, met}$  (with  $f_{up-adjusted}$ ), C)  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $f_{up}$ ), D)  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $f_{up-adjusted}$ ), E)  $CL_{int, met}$  and  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $f_{up}$ ), F)  $CL_{int, met}$  and  $CL_{int, total\ uptake}$  (with  $f_{up-adjusted}$ ), and G) the best predictive performance among the six CLh-IVIVE approaches is shown for each drug, and the table shown in Figure 4.2 corresponds only to graph G. This table shows the number of drugs for each approach that gave the best predictive performance within twofold and threefold ranges. Solid, dashed squares and dashed lines represent, respectively, the unity, twofold and threefold ranges. For all graphs, the data of observed values for plasma CLh (mL/min/Kg) for the 19 drugs with measurable  $CL_{int, met}$  are taken from Kimoto et al. (2018). The parameter  $CL_{int, met}$  has been estimated without using ALB in the microsome assay, whereas the  $CL_{int, total\ uptake}$  for the active uptake has been determined by using 10% bovine serum in the incubation medium of hepatocytes assay. The overpredicted values of plasma CLh are above the upper threefold line and the underpredicted values are below the lower threefold line. The overall performance for each approach is indicated by both AFE and bias on their corresponding graph. To note that the terms  $f_{up}$  and  $f_{up-adjusted}$  were not divided by  $f_{inc}$  as conventionally calculated in the CLh equations as the values for  $f_{inc}$  are not provided. Moreover, the  $CL_{int, met}$  apparent ( $\mu L/min/mg$  microsomal protein) was divided by the term  $f_{inc, mic}$  to obtain the  $CL_{int, met}$  in four CLh equations; i.e., approaches 1, 2, 5 and 6 (for more details on calculations made, to consult Table 4.S5 in supplemental material).

**Abbreviations:** AFE average fold error; CLh hepatic clearance;  $CL_{int, h}$  overall hepatic intrinsic clearance;  $CL_{int, met}$  metabolic intrinsic clearance;  $CL_{int, total\ uptake}$  total uptake clearance that is the sum of passive diffusion and uptake *via* membrane transporters;  $f_{inc, mic}$  unbound fraction in microsome assay;  $f_{up}$  unbound fraction in plasma;  $f_{up-adjusted}$  adjusted-unbound fraction in plasma; N number of drugs;  $PS_{passive}$  intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx *via* simple diffusion;  $PS_{transporters}$  membrane clearances for hepatic influx *via* passive and active uptake transporters;  $QL$  liver blood flow. The abbreviations matching the generic names of the drugs are given in Table 4.3.



**Figure 4.2. (continued).**

The observed plasma CLh (mL/min/Kg) are presented for 19 drugs (ECCS class 1A) *versus* their predicted values that are obtained using six CLh-IVIVE approaches based on the well-stirred model. The six prediction approaches differ with their CL<sub>int, h</sub> and the use of either the fu<sub>p</sub> or fu<sub>p-adjusted</sub> parameters in the well-stirred equation: A) CL<sub>int, met</sub> (with fu<sub>p</sub>), B) CL<sub>int, met</sub> (with fu<sub>p-adjusted</sub>), C) CL<sub>int, total uptake</sub> (with fu<sub>p</sub>), D) CL<sub>int, total uptake</sub> (with fu<sub>p-adjusted</sub>), E) CL<sub>int, met</sub> and CL<sub>int, total uptake</sub> (with fu<sub>p</sub>), F) CL<sub>int, met</sub> and CL<sub>int, total uptake</sub> (with fu<sub>p-adjusted</sub>), and G) the best predictive performance among the six CLh-IVIVE approaches is shown for each drug, and the table shown in Figure 4.2 corresponds only to graph G. This table shows the number of drugs for each approach that gave the best predictive performance within twofold and threefold ranges. Solid, dashed squares and dashed lines represent, respectively, the unity, twofold and threefold ranges. For all graphs, the data of observed values for plasma CLh (mL/min/Kg) for the 19 drugs with measurable CL<sub>int, met</sub> are taken from Kimoto et al. (2018). The parameter CL<sub>int, met</sub> has been estimated without using ALB in the microsome assay, whereas the CL<sub>int, total uptake</sub> for the active uptake has been determined by using 10% bovine serum in the incubation medium of hepatocytes assay. The overpredicted values of plasma CLh are above the upper threefold line and the underpredicted values are below the lower threefold line. The overall performance for each approach is indicated by both AFE and bias on their corresponding graph. To note that the terms fu<sub>p</sub> and fu<sub>p-adjusted</sub> were not divided by fu<sub>inc</sub> as conventionally calculated in the CLh equations as the values for fu<sub>inc</sub> are not provided. Moreover, the CL<sub>int, met</sub> apparent (μL/min/mg microsomal protein) was divided by the term fu<sub>inc, mic</sub> to obtain the CL<sub>int, met</sub> in four CLh equations; i.e., approaches 1, 2, 5 and 6 (for more details on calculations made, to consult Table 4.S5 in supplemental material).

**Abbreviations:** AFE average fold error; CLh hepatic clearance; CL<sub>int, h</sub> overall hepatic intrinsic clearance; CL<sub>int, met</sub> metabolic intrinsic clearance; CL<sub>int, total uptake</sub> total uptake clearance that is the sum of passive diffusion and uptake *via* membrane transporters; fu<sub>inc, mic</sub> unbound fraction in microsome assay; fu<sub>p</sub> unbound fraction in plasma; fu<sub>p-adjusted</sub> adjusted-unbound fraction in plasma; N number of drugs; PS<sub>passive</sub> intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx *via* simple diffusion; PS<sub>transporters</sub> membrane clearances for hepatic influx *via* passive and active uptake transporters; Q<sub>L</sub> liver blood flow. The abbreviations matching the generic names of the drugs are given in Table 4.3.



When considering metabolism only with IVIVE-based approaches 1 and 2 (Figures 4.2A and 4.2B), it can be observed that the predictive performance is much better using the  $f_{U_{p-adj}}$  than  $f_{U_p}$ . The AFE was 4.33 when  $f_{U_p}$  is used whereas it dropped to 2.05 when  $f_{U_{p-adj}}$  is used. The bias was closer to unity for the predictions using  $f_{U_{p-adj}}$  compared to those with  $f_{U_p}$ , 1.02 vs 0.25, respectively. Furthermore, the number of predictions that fall within a twofold error range was much greater with  $f_{U_{p-adj}}$  (14 out of 19) compared to  $f_{U_p}$  (4 out of 19).

When considering the total hepatic uptake only in the IVIVE-based approaches 3 and 4 (Figure 4.2C and 4.2D), it can be observed that the predictive performance was poorer using the  $f_{U_{p-adj}}$  than  $f_{U_p}$ . The AFE was 4.35 when  $f_{U_p}$  is used whereas it increased to 6.89 when  $f_{U_{p-adj}}$  is used. The bias was closer to unity for the predictions using  $f_{U_p}$ , 1.60 (with  $f_{U_p}$ ) vs 5.09 (with  $f_{U_{p-adj}}$ ). The number of predictions falling within twofold error range was low in both cases, 4 out of 19 with  $f_{U_p}$  and 5 out of 19 with  $f_{U_{p-adj}}$ .

When using the ECM considering both the total hepatic uptake and metabolism with the IVIVE-based approaches 5 and 6 (Figures 4.2E and 4.2F), it can be observed that the predictive performance is better using  $f_{U_p}$  rather than  $f_{U_{p-adj}}$ . The AFE was 2.72 when  $f_{U_p}$  is used whereas it increased to 3.46 when  $f_{U_{p-adj}}$  is used. The bias for the predictions was 0.55 (with  $f_{U_p}$ ) vs. 2.16 (with  $f_{U_{p-adj}}$ ). The number of predictions falling within twofold error range was 9 out of 19 with  $f_{U_p}$  and 6 out of 19 with  $f_{U_{p-adj}}$ .

Overall, the IVIVE approach that gave the best predictive performance of CLh *in vivo* in humans was the conventional IVIVE approach 2 (AFE of 2.05 and bias of 1.02) where only the metabolism is considered and when the term  $f_{U_{p-adj}}$  is used as the main scaling factor. This might be because the dataset of highly bound acid drugs showed a CLh for which the implication of an ALB-facilitated hepatic uptake effect may be mainly behind the increased metabolic activity in hepatocytes. However, this does not nullify the role of OATs and OATPs in the hepatic uptake of drugs, as per the good predictive performance of approach 5. Hence, the use of  $f_{U_{p-adj}}$  in the conventional IVIVE model provided more accurate CLh predictions compared to  $f_{U_p}$ . This is because the microsomal data used to estimate the metabolic CL<sub>int</sub> *in vitro* have not been incubated with ALB under the *in vitro* conditions, which is not similar to the *in vivo* condition in the liver extracellular space where ALB is present. The second IVIVE approach that gave the best predictive performance of CLh *in vivo* in humans is the one based on the model ECM using the term  $f_{U_p}$ . Moreover, other highly bound acid drugs showed a CLh governed mainly by the transporter effect for

which the use of  $f_{u,p}$  in the IVIVE model was more accurate compared to using  $f_{u,p\text{-adjusted}}$ ; this is potentially because the transporters induced a binding shift *in vitro* from the ALB-drug complex in plasma to the transporters present on the surface of the hepatocyte membrane, since the hepatocytes were incubated with 10% of fetal bovine serum in estimating the corresponding  $CL_{int}$ , as mentioned previously. This way the influence of ALB on the transporter-mediated uptake may have captured an ALB-mediated hepatic uptake effect.

Furthermore, it is interesting to note that for the current dataset of 19 drugs, the most accurate IVIVE approach among the six IVIVE approaches tested, that has succeeded to predict  $CL_h$  within a twofold error range, was not the same for each drug as presented in Figure 4.2G. In other words, the IVIVE approach that gave the most accurate prediction for each drug is presented in the latter figure. From this comparative assessment, we may also conclude that there is no generic IVIVE approach that may be accurate for all drugs. This is true even if drugs of the current dataset are categorized in the same biopharmaceutics class (i.e., ECCS class 1A). Additional explanations for each drug concerning the observations of Figure 4.2G were proposed later in section 4.5.5, and this was combined with a decision tree to choose the potentially more accurate IVIVE approach for any untested drug (see also section 4.5.4); therefore, this would be pertinent and useful for a fast decision-making process. However, the IVIVE approach 2, reduced the trends of underpredictions of  $CL_h$  compared to the other approaches (Figure 4.2, A-F). Therefore, the approach 2 could be used as a high-throughput predictive method to reduce research spending, during new drug discovery and development processes, for drugs that are mainly metabolized in the liver and that are highly bound to ALB. Hence, when drugs are in the development process and more pertinent mechanistic information on protein-mediated hepatic uptake is being collected for drugs, this information could be used to make more accurate predictions of  $CL_h$ .

Choosing the right IVIVE approach to accurately predict  $CL_h$  under *in-vivo* conditions is not an easy task. First, the complexity of interactions/mechanisms that contribute to a mediated hepatic uptake makes the extent of facilitation processes variable for all drugs (e.g., predominant roles of transporters or ALB in mediating uptake). Second, the diversity of plasma proteins (e.g., ALB, AGP, lipoproteins, globulins, transcortin, etc.) and their binding characteristics add to the variability in the quantification of the hepatic uptake, which would make the importance of ALB in mediating such an uptake distinct between drugs. The

ALB-mediated hepatic uptake would vary from maximal to minimal, depending on the type of interactions to which the ALB-ligand complex may be subjected. To make improvements in IVIVE-based predictions, this would require the understanding of not only the roles of membrane transporters in uptake but also the binding kinetics to each plasma protein and the determination of the fractional plasma binding for drugs that bind to more than one protein in plasma.

#### 4.5.4. Fractional plasma binding

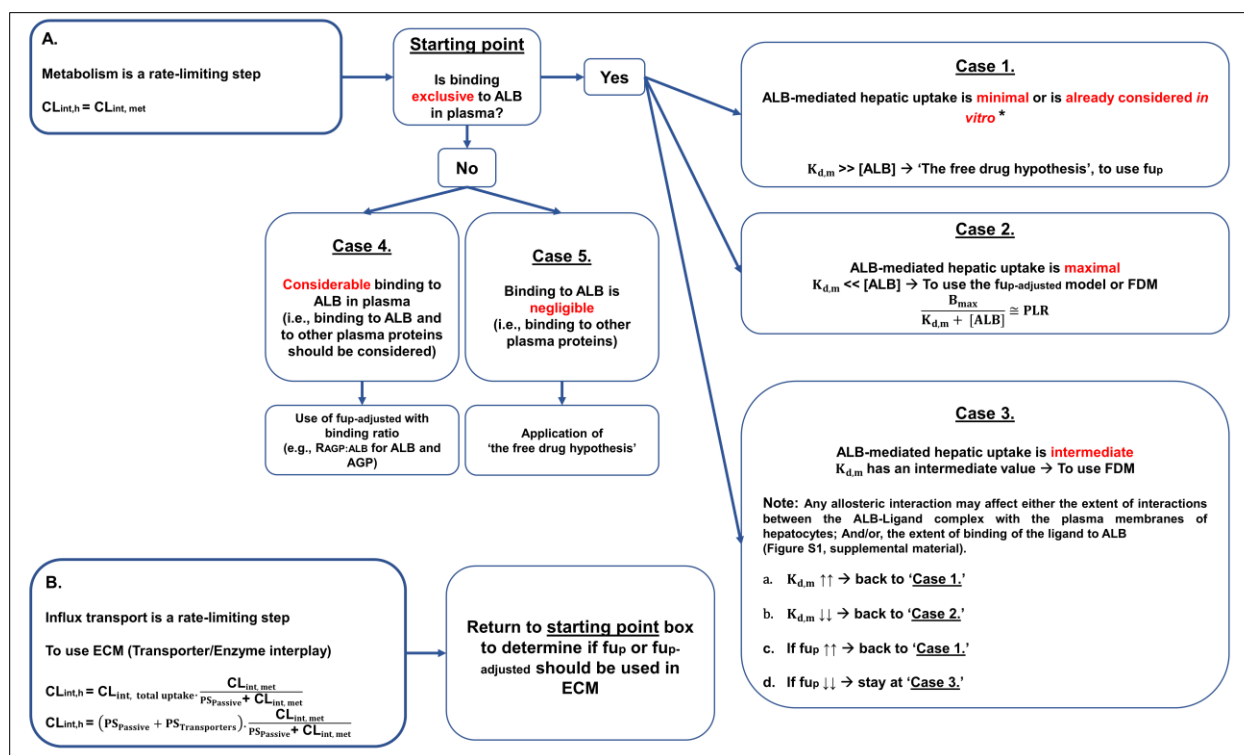
Plasma proteins have different structural, physiological and functional characteristics. To this day, most evidence that reports a plasma protein mediating an uptake of a ligand in the liver has been reserved to ALB. It is, however, interesting to investigate if other prominent plasma proteins such as AGP would also play a role as a mediator for an enhanced uptake. The protein AGP is highly glycosylated (Fournier et al., 2000), and interacts differently with the components of the plasma membranes of hepatocytes than ALB (Z. Huang & Ung, 2013). Therefore, the exclusive binding of a drug to one of the two prominent plasma proteins (i.e., ALB or AGP) should be elucidated in the drug development process. In the case of a drug that binds to both plasma proteins, the fractional binding effect needs more investigation, to better characterize the impact of a significant protein-mediated uptake for one plasma protein (i.e., ALB) and probably not for the other (i.e., AGP) (Bilello et al., 1996; Burczynski et al., 1997). Thus, a binding ratio ( $R_{AGP:ALB}$ ) that describes the predominant fraction of drug binding to AGP over that of ALB should be measured.

A binding competition study is now feasible using the rapid equilibrium dialysis apparatus for the measurement of  $R_{AGP:ALB}$  of several drugs (e.g., chlorpromazine, indomethacin, warfarin and ivacaftor) that bind to both proteins (ALB or AGP) (Poulin, Hop, et al., 2012). Recalling how the consideration of an ALB-facilitated hepatic uptake mechanism in IVIVE provided a better prediction accuracy compared to when this mechanism was neglected, it would be important to evaluate if the extent of binding to ALB is more than AGP, and *vice versa*. This should be made before *in vivo* studies and IVIVE-based predictions. Also, the right value of  $R_{AGP:ALB}$  should be also measured where the ALB-facilitated uptake phenomenon may become relevant under *in vivo* conditions. Hence, a value of  $R_{AGP:ALB}$  can be useful in the calculation of CL<sub>h</sub> using IVIVE methods. One of the possible options is to integrate the  $R_{AGP:ALB}$  as an input parameter in both the

FDM and  $f_{u_p}$ -adjusted models. Furthermore, the inclusion of the lipoproteins fraction can also be of importance considering that: 1) numerous drugs also bind to lipoproteins and 2) lipoproteins may also interact to some extent with the hepatocyte surface (e.g., fusion into plasma membranes).

#### **4.5.5. Decision tree: a guide for the use of $f_{u_p}$ , $f_{u_p}$ -adjusted in the conventional IVIVE model or the use of FDM**

Making improvements to CLh-IVIVE predictions is without any doubt a priority in PK/PD studies. In Figure 4.2, we have demonstrated that several CLh-IVIVE models give accurate predictions of CLh in *in-vivo* conditions for the same drug. However, testing many approaches to eventually choose the one with the best predictive performance for each drug would be often time-consuming. In Figure 4.3, a decision tree is proposed with the objectives: 1) to achieve acceptable levels in accuracy and precision; 2) to help in making fast and judicious decisions about which IVIVE approach to apply first for IVIVE-based predictions of CLh *a priori* of preclinical and clinical trials; and 3) to better guide any future research in quantitative modeling of CLh. This decision tree would be particularly useful in decision-making about which IVIVE approach and/or input parameters to use, when a protein-mediated uptake (i.e., *via* membrane transporters and/or ALB) is expected to occur or not, for drugs that are mainly metabolized in the liver and highly bound to plasma proteins.



**Figure 4.3. Decision tree for predicting the hepatic clearance using either the  $f_{up}$  or  $f_{up}$ -adjusted parameters in CLh-IVIVE approaches, or using FDM when considering the combination of hepatic metabolism, influx transporters and extent of plasma protein binding.**

The decision tree is proposed to help in making fast and judicious decisions about which IVIVE approach to apply for CLh-IVIVE predictions of drugs that are mainly metabolized in the liver and highly bound to plasma proteins (i.e., ALB). The decision tree is divided into two main boxes to separate the drugs into two categories for which: A) metabolism is a rate-limiting step, and B) influx transport is a rate-limiting step. For the first category drugs, the 'Starting point' should be by asking a crucial question if the drugs are exclusively bound to ALB. Drugs that are essentially bound to ALB are most likely subjected to an ALB-mediated uptake. For these drugs, the cases 1, 2 and 3 are thus suggested where the ALB-mediated hepatic uptake is minimal, maximal or intermediate, respectively. Otherwise, when ALB is not the only plasma protein to which a drug might bind, the cases 4 and 5 are suggested to cover the CLh predictions for drugs that have considerable or negligible binding to ALB, respectively. For all cases, the suitable IVIVE models (i.e., FDM or  $f_{up}$ -adjusted model) and novel parameters are suggested to be applied and get the best fit between observed and predicted values. For the second category, the influence of influx transporters is supposed to be significant in the

total hepatic uptake. Therefore, the use of ECM is best. However, when choosing to use ECM, it is recommended to head back to the 'Starting point' to investigate further which of the two parameters (i.e., the  $f_{u,p}$  or  $f_{u,p-adjusted}$ ) to integrate into the CLh-IVIVE applications. Symbols  $\uparrow\uparrow$  refer to a significant increase, whereas  $\downarrow\downarrow$  refers to a significant decrease.

**Abbreviations:** **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **ALB** albumin; **[ALB]** albumin concentration in plasma; **B<sub>max</sub>** capacity of ALB binding sites on the surface of hepatocytes; **CL<sub>h</sub>** hepatic clearance; **CL<sub>int, h</sub>** overall hepatic intrinsic clearance; **CL<sub>int, met</sub>** metabolic intrinsic clearance; **CL<sub>int, total uptake</sub>** total uptake clearance that is the sum of passive diffusion and uptake *via* membrane transporters; **ECM** extended clearance model; **FDM** facilitated dissociation model; **K<sub>d,m</sub>** dissociation constant of the bound ALB from the surface of hepatocytes; **f<sub>u,p</sub>** unbound fraction in plasma; **f<sub>u,p-adjusted</sub>** the adjusted-unbound fraction in plasma; **PS<sub>Passive</sub>** intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx *via* simple diffusion; **PS<sub>Transporters</sub>** membrane clearances for hepatic influx *via* passive and active uptake transporters; **R<sub>AGP:ALB</sub>** binding ratio between AGP and ALB proteins. \* ALB concentrations are used at relevant physiological levels in the *in vitro* hepatocytes' assays.

Two categories of drugs highly bound in plasma are identified for which either the metabolism (A)  $CL_{int, met} \gg PS_{Transporters}$  or influx transport (B)  $PS_{Transporters} \gg CL_{int, met}$  is the rate-limiting step (Figure 4.3). For each category, an equation is suggested to calculate the parameter of the overall  $CL_{int, h}$ . The drugs that are essentially bound to ALB are most likely subjected to an ALB-mediated uptake. As mentioned in subsection 4.5.3., the extent of hepatic uptake facilitation is not the same for all drugs due to biochemical factors (i.e., interactions type 1, 2 and/or 3; variety of plasma proteins as illustrated in figure 4.1, as well as metabolized drug *versus* transported drug). Therefore, for each drug highly bound in plasma, it is crucial to determine whether it is exclusively bound to ALB and whether it is metabolized and/or transported, and then to evaluate the extent of the ALB-mediated hepatic uptake for each ALB-drug complex.

If the hepatic metabolism predominates and the uptake mediated by ALB is minimal (or nonexistent) or maximal, then it is recommended to use, respectively, the parameters  $f_{up}$  or  $f_{up-adjusted}$  to scale the  $CL_{int}$  in the well-stirred model from the absence of ALB *in vitro* to the presence of ALB *in vivo*. Otherwise, if the membrane transporters (e.g., OAT2 or OATP1B1) have predominant effects on the prediction of  $CL_h$  with ECM, it is then more rational to use either  $f_{up}$  (i.e., if the transporters may induce a binding shift from the plasma to the transporter found at the surface of the hepatocyte membrane in the presence of ALB in *in-vitro* incubations) or  $f_{up-adjusted}$  (i.e., if the transporters do not induce a binding shift in the absence of ALB in the incubations, however the ALB-phospholipids and allosteric interactions should be taken into considerations as contributors for a facilitated uptake of a drug). Elsewhere, if the ALB-mediated hepatic uptake is not maximal (i.e., has an intermediate effect) for drugs highly bound to ALB, this cannot be captured by  $f_{up}$  (consider a minimal effect only) or  $f_{up-adjusted}$  (consider a maximal effect only). In this case, it is recommended to use FDM instead of ECM or the well stirred. However, the specific corresponding binding parameters (i.e.,  $B_{max}$  and  $K_{d,m}$ ) should be experimentally obtained in the presence of ALB to determine the additional binding kinetics used in the model FDM for considering the ALB-ligand complex at the surfaces of hepatocytes.

Inspired from the interpretations of Poulin and Haddad (2018) on ANS binding preventing its desorption from ALB, a positive allosteric effect may be translated as a decrease in drug's desorption from ALB sites, while a negative allosteric effect may increase drug's desorption in ALB site. Therefore, allosteric interactions may directly affect the extent of binding of a drug to the primary sites of ALB (Figure 4.S1,

supplemental material). Consequently, changes in the conformation and sites flexibility of ALB may occur depending on the type of the allosteric effector. Allosterism is an interaction of type 1 (Figure 4.1) that may in turn impact: 1) the extent of desorption/retention of a drug from ALB in the sinusoidal space, and/or 2) the extent of interactions between the ALB-drug complex with the basolateral membranes of hepatocytes. If the ALB-hepatic uptake facilitation is assumed intermediate because the binding of the drug is highly affected by the allosteric effect but that this effect cannot be either neglected or considered maximal, then the prediction of  $CL_h$  from  $CL_{int}$  data obtained from incubation mediums not using ALB could be more accurate using the model FDM only. In the case where the affinity of the ALB-ligand complex to the hepatocyte membrane becomes negligible because the allosteric effect leads to a drop in its affinity (i.e., increased  $K_{d,m}$ ) to minimize the facilitated-uptake, the use of  $f_{up}$  in the well-stirred or ECM model would be sufficient (i.e., case 1 in Figure 4.3). Conversely, if this complex's affinity becomes very important (i.e., significantly decreased  $K_{d,m}$ ) then the use of  $f_{up-adjusted}$  should be considered instead to predict the ALB-facilitation uptake (i.e., case 2 in Figure 4.3).

For the cases where ALB is not the only plasma protein to which a drug might bind, drugs may have either considerable or negligible binding to ALB. A protein binding ratio can then be used along with  $f_{up-adjusted}$  when the binding to ALB is considerable in the presence of binding to another plasma protein. The inclusion of a binding ratio will theoretically give a better estimate of the bound fraction that is subjected to a plasma protein-mediated hepatic uptake. For example, as previously mentioned, the value of  $R_{AGP:ALB}$  should be experimentally determined for drugs that bind to both AGP and ALB. This ratio will determine, on the one hand, how much of the drug is bound to ALB in plasma compared to AGP. On the second hand, it will help estimate the contribution of its desorption from ALB to a potentially enhanced uptake. If the predominant binding is to another plasma protein than ALB, then in this case, it is suitable to use the traditional parameter  $f_{up}$  in the well stirred or in ECM, as an enhanced uptake may no longer be significantly apparent.



**Table 4.3. Possible explanations for the best predictive performance of CLh-IVIVE approaches for each drug according to figure 4.2G and figure 4.3 as well as the sections 4.5.3 and 4.5.5.**

Drug name	Abbreviation	Best predictive performance <sup>a</sup>	Possible explanations for the best predictive performance <sup>b</sup>	Metabolism or influx transport is rate-limiting	Probable case <sup>c</sup>
Bromfenac	Bro	Approach 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- <math>PS_{Passive} &gt; PS_{Transporters} &gt; CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 2
Entacapone	Ent	Approach 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- <math>CL_{int, met} &gt; PS_{Passive} \cong PS_{Transporters}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Metabolism	Case 2
Fluorescein	Flu	Approach 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low binding</li> <li>- <math>CL_{int, met} &gt; PS_{Passive} \cong PS_{Transporters}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Metabolism	Case 1 <sup>d</sup>
Nateglinide	Nat	Approach 4	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Considerable binding to ALB</li> <li>- <math>PS_{Passive} &gt; CL_{int, met} \cong PS_{Transporters}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Metabolism	Case 4 <sup>e</sup>
Diclofenac	Dic	Approach 6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- A total of three diclofenac molecules in two binding sites in HSA (Zhang et al., 2015)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; CL_{int, met} &gt; PS_{Passive}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 2 <sup>g</sup>
Fenoprofen	Fen	Approach 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- 2.5 molecules per primary binding site and 10 molecules per secondary site (H. Wang, Zou, &amp; Zhang, 1998)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} \cong CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1 <sup>g</sup>
Ibuprofen	Ibu	Approach 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- Binding to primary site II and to secondary sites in HSA domains I and II (Ghuman et al., 2005), (e.g., ibuprofen is suggested to bind to site FA6 and to be allosterically-coupled with the heme site (Ascenzi et al., 2009))</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} \cong CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1 <sup>f</sup>

**Table 4.3. (continued)**

Drug name	Abbreviation	Best predictive performance <sup>a</sup>	Possible explanations for the best predictive performance <sup>b</sup>	Metabolism or influx transport is rate-limiting	Probable case <sup>c</sup>
Indomethacin	Ind	Approach 6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Considerable binding to ALB</li> <li>- Heme decreases the association affinity of indomethacin to HSA; the first ligand has an allosteric negative effect on the second (Ascenzi, Bocedi, Notari, Menegatti, &amp; Fasano, 2005)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} &gt; CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 4 <sup>e</sup>
Ketoprofen	Ket	Approach 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- When myristate is present, the binding of ketoprofen to subdomain IA of HSA was increased, indicating that, when myristate exerted a positive effect on the binding of ketoprofen (Chuang &amp; Otagiri, 2002)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; CL_{int, met} &gt; PS_{Passive}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1 <sup>f</sup>
Meloxicam	Mel	Approach 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- The interaction of meloxicam with HSA causes a conformational change of the hydrophobic binding pocket in subdomain IIA with the loss of helical stability of the protein due to the strong quenching of the Trp 214 fluorescence (Trynda-Lemiesz &amp; Wiglusz, 2010)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} &gt; CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1 <sup>f</sup>
Pioglitazone	Pio	Approach 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} &gt; CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1
Pralidoxime	Pra	Approach 6	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low binding (Kimoto et al., 2018); other references document no binding in plasma (FDA, 2010)</li> <li>- <math>CL_{int, met} &gt; PS_{Passive} \cong PS_{Transporters}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Metabolism	Case 1 <sup>d</sup>
Rosiglitazone	Ros	Approach 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- Potential covalent binding <i>in vitro</i> (research, 1999)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} &gt; CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1
R-Warfarin	R-War	Approach 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Considerable binding to ALB</li> <li>- After the binding of two myristate molecules to the sites with the highest and second-highest affinities, an allosteric modulation enhanced electrostatic interactions between warfarin and some of the amino acid residues around the warfarin binding site is observed (Fujiwara &amp; Amisaki, 2011). Elsewhere, the heme has negative allosteric effects on warfarin binding to Sudlow's site I in HSA (Fasano et al., 2005)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} &gt; CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1 <sup>f</sup>

**Table 4.3. (continued)**

Drug name	Abbreviation	Best predictive performance <sup>a</sup>	Possible explanations for the best predictive performance <sup>b</sup>	Metabolism or influx transport is rate-limiting	Probable case <sup>c</sup>
S-Warfarin	S-War	Approach 5	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Considerable binding to ALB</li> <li>- After the binding of two myristate molecules to the sites with the highest and second-highest affinities, an allosteric modulation enhanced electrostatic interactions between warfarin and some of the amino acid residues around the warfarin binding site is observed (Fujiwara &amp; Amisaki, 2011). Elsewhere, the heme has negative allosteric effects on warfarin binding to Sudlow's site I in HSA (Fasano et al., 2005)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} &gt; CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1 <sup>f</sup>
Tolbutamide	Tolb	Approach 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- The binding of heme has negative allosteric effects on tolbutamide binding to HSA (Ascenzi et al., 2005)</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} \cong CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 2 <sup>f</sup>
Tolcapone	Tolc	Approach 3	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- <math>PS_{Transporters} &gt; PS_{Passive} &gt; CL_{int, met}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1
Naproxen	Nap	Approach 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>- High binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- Only 0.75 and 3 naproxen molecules bind to BSA and HSA that contained free fatty acids, respectively (Bou-Abdallah, Sprague, Smith, &amp; Giffune, 2016). According to another reference, defatted BSA binds three molecules of naproxen (Bujacz, Zielinski, &amp; Sekula, 2014)</li> <li>- <math>PS_{Passive} &gt; CL_{int, met} \cong PS_{Transporters}</math> (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Transport	Case 1 (for HSA) and case 2 (for BSA) <sup>g</sup>
Thalidomide	Tha	Approach 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Low binding</li> <li>- Binding exclusively to ALB</li> <li>- Thalidomide goes through a chiral inversion after its binding to HSA; this interconversion is fast and is thus subject to specific and general base catalysis, and it is suggested that HSA catalyzes the reaction due to the basic groups of the amino acids Arg and Lys (Reist, Carrupt, Francotte, &amp; Testa, 1998)</li> <li>- <math>CL_{int, met} &gt; PS_{Passive}</math> (and <math>PS_{Transporters} = 0</math>) (Kimoto et al., 2018)</li> </ul>	Metabolism	Case 1 <sup>d</sup>

**Abbreviations:** ALB albumin; BSA bovine serum albumin; FA6 site Site 6 for fatty acids in albumin; HSA human serum albumin;  $CL_{int, met}$  metabolic intrinsic clearance;  $PS_{Passive}$  intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx *via* simple diffusion;  $PS_{Transporters}$  membrane clearances for hepatic influx *via* passive and active uptake transporters.

<sup>a</sup>. Approach 1:  $CL_{int, met}$  (with  $f_{up}$ ), Approach 2:  $CL_{int, met}$  (with  $f_{up-adjusted}$ ), Approach 3:  $CL_{int, total uptake}$  (with  $f_{up}$ ), Approach 4:  $CL_{int, total uptake}$  (with  $f_{up-adjusted}$ ), Approach 5:  $CL_{int, met} + CL_{int, total uptake}$  (with  $f_{up}$ ), Approach 6:  $CL_{int, met} + CL_{int, total uptake}$  (with  $f_{up-adjusted}$ ). Only the CLh-IVIVE approach that has the best predictive performance for each drug is mentioned (Figure 4.2G).

<sup>b</sup>. High and low binding characteristics are given to each drug based on the  $f_{up}$  values found in Kimoto et al. (2018). If the  $f_{up} \leq 0.1$ , then high protein plasma binding characterizes the drug, otherwise, if the  $f_{up} > 0.1$ , then low protein plasma binding characterizes the drug.

- c. Following the steps in the decision tree (Figure 4.3), probable cases are assigned to 19 drugs after reviewing the information provided as possible explanations for the best predictive performance, when comparing the results for the six CLh-IVIVE approaches.
- d. A probable case 1 is associated to the drugs that are weakly bound to ALB and their  $f_{u_p}$  values are higher than 0.1, since we assume that the  $C_{free}$  of the drug follows 'the free drug hypothesis', regardless of the approach with the best predictive performance.
- e. A probable case 4 is associated to the drugs that bind to both ALB and AGP, therefore a binding ratio  $R_{AGP:ALB}$  may be added with  $f_{u_p-adjusted}$  for improved IVIVE-based prediction of CLh.
- f. The allosteric interactions may be an important factor that influences the dissociation/association of the ligand from ALB's binding sites and to the interactions of the ALB-ligand complex and the surface of hepatocytes. If a mediated uptake is observed after negative allosteric effects, then a case 2 is associated to drugs and the term  $f_{u_p-adjusted}$  should be used. Conversely, if positive allosteric effects occur, then a case 1 is associated to drugs and the term  $f_{u_p}$  is used in IVIVE-based predictions.
- g. The number of ligands that may bind to ALB sites may be an important factor that affects the extent of the interactions between ALB-ligand complex and plasma membranes of hepatocytes, which may consequently affect the extent of ALB-mediated hepatic uptake.

Finally, in an effort to interpret the predictive performance of the previous six IVIVE approaches (Figure 4.2, graph G), Table 4.3 presents potential explanations for the discrepancy in the prediction of CL<sub>h</sub> for each of the 19 drugs tested, when it was possible to document the explanation. The main explanations are classified in the following criteria: 1) the extent of binding to ALB (i.e., exclusive or considerable binding), 2) allosteric interactions and conformational changes in human ALB in *in-vivo* conditions (i.e., in the presence of endogenous ligands), and 3) the predominance of either metabolism (CL<sub>int, met</sub>) or transporters (PS<sub>Transporters</sub>) according to *in vitro* assays (Kimoto et al., 2018). Therefore, this is combined with the decision tree presented in Figure 4.3 to maximize the explanation in the followings.

In this context, when the effect of PS<sub>Transporters</sub> >> CL<sub>int, met</sub> for a drug and there is ALB added in the incubation medium, the influx transport and a transporter binding shift capturing an ALB-mediated hepatic uptake might become the predominant driver of CL<sub>h</sub> *in vivo*; this would explain why the IVIVE-based approach 5 (ECM model considering the correction from fu<sub>p</sub>) gave the best predictions of CL<sub>h</sub> for two tested drugs (e.g., pioglitazone and rosiglitazone), and case 1 in Figure 4.3 could be associated to these drugs. When the predominance of transporters effect is combined with significant positive allosteric effects (decreased desorption from the ALB-drug complex), caused by endogenous molecules *in vivo* (e.g., myristate), case 1 in Figure 4.3 could also become the most fit scenario than case 2 or 3 that most likely corresponds to several tested drugs (e.g., ibuprofen, fenoprofen, ketoprofen, meloxicam and R-, S-warfarin). For these drugs, approach 5 (i.e., ECM) gave the best CL<sub>h</sub> predictions, particularly because the effect of membrane transporters predominates the effect of enzymes, and the uptake facilitated by ALB is minimal.

Conversely, when the predominance of transporters effect is combined with negative allosteric effects (i.e., increased desorption from ALB's binding sites), the case 2 in Figure 4.3 could become the most fit scenario to best describe the uptake/transport mechanisms for drugs than case 1 or 3 (e.g., tolbutamide). For this drug, approach 2 gave the best predictive performance, this could be explained by the increase in hepatic uptake of the drug after their dissociation from ALB.

Whereas when the effect of CL<sub>int, met</sub> >> PS<sub>Transporters</sub> and no ALB is added in the incubation medium as well as enhanced hepatic uptake is observed *in vivo* for a drug, the case 2 in Figure 4.3 could be associated to one drug (e.g., entacapone). For this drug, the metabolism was the rate-limiting step and an

enhanced hepatic uptake could be observed for this drug, which would explain why the approach 2 gave the best predictive performance.

The case 4 was only associated to drugs that bind to both ALB and AGP, e.g., indomethacin and nateglinide. The approaches 6 and 4 (with  $f_{u_p}$ -adjusted) gave, respectively, the best predictive performances, which implies that an ALB-mediated hepatic uptake should be considered even when plasma binding to ALB is considerable and not necessarily exclusive.

The other possibilities refer particularly to an intermediate effect of the ALB-mediated hepatic uptake that would refer to the case 3 in Figure 4.3. In this context, the model FDM is assumed to be the most accurate model. This is because the FDM is optimized from real experimental data at the level of the hepatocyte for each drug, which cannot be captured by the standard binding correction parameters  $f_{u_p}$  (considers a minimal effect only) nor with  $f_{u_p}$ -adjusted (considers a maximal effect only). Moreover, the new binding correction parameter recently proposed by Riccardi et al. (2019), the hepatocyte-to-plasma ratio determined *in vitro* using 4% ALB in the incubations, should also cover any potential effect of the ALB-mediated hepatic uptake (particularly intermediate, minimal and/or maximal), but this still need to be challenged further. Hence, it might be that our comments referring to the model FDM are also applicable to the new IVIVE approach based on the hepatocyte-to-plasma ratio.

Interspecies variability in plasma proteins could be another explanation for differences in the extent of enhanced hepatic uptake. For example, naproxen had its hepatic uptake mediated by bovine ALB that contained fatty acids (Poulin et al., 2017), but not in the presence of human ALB (with fatty acids) as found in this study. Another example on interspecies variability, it has been demonstrated that the ALB of rat mimics much better the human ALB compared to bovine ALB, at least with regard to bilirubin binding (Zucker et al., 1995). The binding specificity of bilirubin to distinct ALB molecules could be of significance for accurate IVIVEs in the presence of ALB-mediated hepatic uptake. Therefore, predicting human  $CL_h$  *in vivo* using either bovine or human ALB still needs some caution.

Furthermore, the presence of fatty acids in binding assays should be documented because according to Bujacz et al. (Bujacz et al., 2014) there are three molecules of naproxen per site in defatted ALB compared to about one molecule in ALB (with free fatty acids). And, the number of molecules per main or secondary sites reserved for a drug may also affect desorption/retention in ALB sites. This variability in

vacant/occupied sites is also important in PK studies, since it is now evident that ALB plays the role of a plasma transporter for some endogenous/exogenous ligands.

#### 4.5.6. Expert opinion section

We have demonstrated in Figure 4.2 that there is currently no generic IVIVE calculation method of CL<sub>h</sub> *in vivo* applicable to all drugs. However, in the previous section 4.5.3, we were able to match most drugs to a single case among the five proposed in the decision tree (Figure 4.3). This matching was possible since we were able to determine which of the metabolism or transporter effect should be the rate-limiting step of CL<sub>h</sub> *in vivo*. In most cases, when the CL<sub>int, met</sub> predominated, the metabolism is the rate-limiting step and the IVIVE approach that gave the best predictive performance was the one that did not consider the input PS<sub>Transporters</sub> nor CL<sub>int, total uptake</sub> but did consider the CL<sub>int, met</sub> and the ALB-facilitated uptake mechanism (i.e., by using fu<sub>p-adjusted</sub>). However, for one case, the IVIVE approach that gave the best predictive performance of the *in vivo* CL<sub>h</sub> was not compatible with the rate-limiting step assumed for the drug. For example, the IVIVE approach 2 considering only the metabolism and ALB-facilitated-uptake (i.e., which did not use the PS<sub>transporters</sub> as an input) gave the closest predicted CL<sub>h</sub> value to that observed *in vivo* for tolbutamide, even though this drug is subjected to OAT2 transporters effect. This indicates that the role of ALB may become more apparent under the *in vivo* hepatic uptake condition compared to a transporter effect.

As a first step, it is essential to determine whether metabolism or membrane transporters are the rate-limiting step. For this purpose, the drug classification systems, such as the ECCS, are powerful tools to determine the rate-limiting step for drugs (Kimoto et al., 2018; Riccardi et al., 2019). Recently, the authors Riede et al. (2019) also acclaimed the usefulness of the BDDCS when the hepatic efflux mechanism is another rate-limiting step. Furthermore, choosing the best IVIVE-based model would also depend on whether ALB is added to the incubation medium in the *in vitro* versus the *in vivo* conditions whether to consider or not the ALB-mediated hepatic uptake mechanism (Da-Silva et al., 2018). From the Poulin and Haddad (2018) study, we have also learned that we should identify and assess the involvement of the ALB molecules and their conformational changes in plasma binding and in hepatic uptake, which may affect the magnitude of the ALB facilitated-hepatic uptake of some drugs, as a following step for *a priori* of predictions.

We therefore recommend using the decision tree presented in Figure 4.3 depending on the transporter/enzyme interplay measured and depending on the ALB effect that is expected for each drug to guide the evaluation of prediction of CLh *in vivo*. This Figure 4.3 should apply when there is no ALB added in the incubation medium of the *in vitro* assays compared to the *in vivo* condition in the liver. In other words, this figure should facilitate the IVIVE for scaling CLh in the absence of ALB *in vitro* to the presence of ALB *in vivo*. Note that if there is no ALB added in the incubation medium with hepatocytes (and/or there is no relevant ALB-facilitated uptake) the case 1 of Figure 4.3 should apply. Alternatively, we also suggest using directly physiological ALB concentration in the *in vitro* hepatocytes assays and/or use an *in vitro* assay producing ALB at a level that is similar to the liver *in vivo* (i.e., Hepatopac system®) (Da-Silva et al., 2018), which will also meet the criteria of the case 1 in our tree of decision in Figure 4.3. The addition of ALB is also recommended for microsomal incubations since the ALB molecules sequester the long-chain fatty acids, which may consequently enhance the activity of cytochrome P450 and transferases as it may affect the  $K_m$  and  $CL_{int, met}$  values (A. Rowland, Elliot, Knights, Mackenzie, & Miners, 2008; A. Rowland et al., 2007).

From the literature review sections (4.1-4.4), one or many process(es) appear to be contributors to the ALB-mediated hepatic uptake mechanism(s) due to the ALB-ligand allosteric interactions, ALB-lipid, and ALB-protein interactions. In this perspective, we have tried to document the main processes governing the CLh *in vivo* of each drug in Table 4.3 in order to match them with the corresponding cases in figure 4.3 *versus* the results of the comparative assessment of IVIVE approaches in Figure 4.2, but this was not an easy task since the information is scarce particularly on the effect of allosteric interactions and conformational changes of ALB following the binding of the drug. The ALB effect assessment on clearance and total uptake in the liver is needed in the drug discovery phase then the allosteric effects, particularly the negative effects, should be consequently included to better understand the influence of ALB on the hepatic uptake and clearance.

Today, we may have not been able to obtain a complete metabolic profile for all drugs (i.e., data on interactions and mechanisms are insufficient); thus, for a few drugs, we were not able to give tangible conclusions about which factors are affecting the desorption/retention of the ligand in the interstitial space of the liver, and, hence, whether the extent of the ALB-mediated hepatic uptake has been influenced.



Nonetheless, to resolve the underpredictions and overpredictions of CLh *in vivo* observed in Figure 4.2, we emphasize that PK modelers need not only to understand the drug properties but also to identify which interactions/mechanisms are involved in the hepatic uptake/clearance for each drug. Development of quantitative structure–property relationships (QSPR) may eventually help in predicting which interactions/mechanisms should be involved; furthermore, at present, *in vitro* assays are becoming more advanced to cover metabolism, uptake, binding and even internalization in the liver of the bound moiety of the drug. This interactions/mechanisms identification step helps them in selecting the appropriate IVIVE-based model. In the future, the two models of ALB-facilitated hepatic uptake should be improved. Accordingly, the model of  $f_{up-adjusted}$  model should integrate new parameters when necessary (e.g., ALB-AGP binding ratio, and impact of allostery), whereas the FDM model may need to be refined to predict (estimate) the number of input parameters more rapidly in the early drug discovery. Up to now, the FDM is the best available model to predict CLh *in vivo* when the ALB-mediated hepatic uptake is low, intermediate or maximal. The parameters of FDM are based on measured values. In Figure 4.3, we show how the  $f_{up-adjusted}$  model will be equivalent to FDM only when the ALB-mediated hepatic uptake is maximal, which means that the  $f_{up-adjusted}$  model can replace the FDM only when the  $B_{max}$  and  $K_{d,m}$  are not available to describe a maximal ALB-mediated uptake, since they are values that need to be calculated for each ALB-drug complex. As an example of calculations from Figure 4.3 for the maximal ALB-mediated hepatic uptake (i.e., case 2); when  $K_{d,m} \ll [ALB]$ , we suggest to use the  $f_{up-adjusted}$  model or FDM since the ratio  $\frac{B_{max}}{K_{d,m} + [ALB]} \cong$  PLR. As for the intermediate and low mediated uptake, it is the same equation of FDM from Miyauchi et al. (2018) that is used for the calculations of the CLh *in vivo* and the output R.

#### 4.6. Conclusion

To date, the use of binding correction parameters (either  $f_{up-adjusted}$ ,  $f_{up}$  or the hepatocyte-to-plasma ratio) in the well-stirred or ECM and the specific model FDM is currently the only approach that can be used to extrapolate the total hepatic uptake and/or clearance from *in vitro* (no ALB)-to-*in vivo* (with ALB) conditions, with considerations of the contributions of the ALB-bound drugs moiety to mimic a superior hepatic uptake. Increasing the accuracy and precision for the predictions of CLh in the presence of ALB is

not an easy task, since many potential mechanisms may be implicated in a protein-mediated hepatic uptake. This can be due to the presence of different proteins: plasma proteins (i.e., ALB), membrane transporters (i.e., OATs and OATPs) and membrane receptors (i.e., FcRn), and to the affinity of the drug to them. Bound and unbound concentrations of the drug may reach the sinusoidal plasma membrane of hepatocytes and both are subjected to one or many mechanisms facilitating its entry into cells. Thus, the sum of these concentrations should be accounted for in the total hepatic uptake and clearance predictions instead of solely considering the  $C_{free}$ ; this in fact would violate the 'the free drug hypothesis'.

Regarding the ALB-mediated hepatic uptake, the interactions between the ALB-ligand complex and the plasma membranes of hepatocytes are probably also influenced by allosteric changes, among other types of molecular interactions, that may affect the ALB structure depending on the ligand and to which site it binds. When the latter interactions cause a decrease in the desorption of the drug, then the ALB-mediated hepatic uptake is presumed to be negligible, and inversely. Furthermore, when drugs are also ligands to other plasma proteins such as glycoproteins, ALB may have a reduced role in hepatic uptake. Additional studies are thus needed to elucidate the influence of allosteric changes on the interactions between extracellular ALB and sinusoidal hepatocytes, and to better evaluate the effect of the fractional plasma binding on the ALB-mediated hepatic uptake. To improve the CLh predictions, novel quantitative IVIVE-based models should be developed with considerations to the complexity of molecular interactions (i.e., binding and metabolic kinetics), the combination of several uptake processes, the interspecies differences in ALB molecules, the drug selection criteria and the fractional binding in plasma. Overall, this study presents a decision tree that can be of help in predicting CLh of a drug prior to the development of an IVIVE-based approach by including the ALB-mediated hepatic uptake effect according to the drug's affinity to transporters, plasma proteins and enzymes, as well as based on the presence or absence of ALB in the incubation medium.

**Declaration of interest**

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

**Reviewer disclosures**

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

## SUPPLEMENTAL MATERIAL

### **The potential protein-mediated hepatic uptake: discussion on the molecular interactions between albumin and the hepatocyte cell surface and their implications for the *in vitro-to-in vivo* extrapolations of hepatic clearance of drugs**

Michel Bteich <sup>1</sup>, Patrick Poulin <sup>1,2</sup> and Sami Haddad <sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>2</sup> Consultant Patrick Poulin Inc., Québec city, Québec, Canada.

**\*Address for correspondence:**

Sami Haddad, Department of Environmental and Occupational Health, Université de Montréal, PO Box 6128, Main Station, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada. Tel: (+1) 514-343-6111 Ext. 38166. Fax: (+1) 514-343-2200.

Email: [sami.haddad@umontreal.ca](mailto:sami.haddad@umontreal.ca)

**Table 4.S.1. The calculations of uptake and intrinsic clearances for 19 drugs.**

Drug generic name	Abbreviations	PS <sub>Passive</sub> (mL/min/kg) (Eq. 2) <sup>a</sup>	PS <sub>Transporters</sub> (mL/min/kg) (Eq. 3) <sup>a</sup>	CL <sub>int, total uptake</sub> (ml/min/kg) (Eq. 4) <sup>b</sup>	CL <sub>int, met</sub> (ml/min/kg) (Eq. 5) <sup>b</sup>	CL <sub>int, liver-ECCS</sub> (mL/min/Kg) (Eq. 6) <sup>b</sup>
Bromfenac	Bro	159.39	73.43	306.25	31.27	50.23
Entacapone	Ent	22.16	18.89	59.94	233.09	54.74
Fluorescein	Flu	1.73	0.96	3.66	24.94	3.42
Nateglinide	Nat	24.28	15.61	55.51	17.35	23.13
Diclofenac	Dic	85.96	174.81	400.62	160.60	260.95
Fenoprofen	Fen	22.94	73.62	155.46	23.40	78.51
Ibuprofen	Ibu	29.68	44.33	109.47	26.69	51.83
Indomethacin	Ind	60.13	100.99	241.92	10.64	36.36
Ketoprofen	Ket	10.79	62.83	123.89	27.10	88.60
Meloxicam	Mel	19.47	87.89	177.66	2.01	16.66
Pioglitazone	Pio	215.86	578.20	1256.62	47.24	225.63
Pralidoxime	Pra	1.35	2.31	5.51	11.48	4.93
Rosiglitazone	Ros	265.97	535.80	1230.41	65.70	243.74
R-Warfarin	R-War	2.12	61.48	112.79	0.20	9.50
S-Warfarin	S-War	1.73	43.17	79.44	0.49	17.43
Tolbutamide	Tolb	1.93	19.08	36.27	1.95	18.24
Tolcapone	Tolc	141.66	304.52	689.79	78.01	244.96
Naproxen	Nap	90.97	3.08	96.52	4.29	4.35
Thalidomide	Tha	0.39	0.00	0.39	3.35	0.35

**Abbreviations:** CL<sub>int, met</sub> metabolic intrinsic clearance; CL<sub>int, total uptake</sub> intrinsic clearance for total uptake; CL<sub>int, liver-ECCS</sub> intrinsic clearance for the extended clearance classification system; ECCS extended clearance classification system; PS<sub>Passive</sub> intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx *via* simple diffusion; PS<sub>Transporters</sub> membrane clearances for hepatic influx *via* passive and active uptake transporters.

<sup>a</sup>. The CL<sub>met, int app</sub> (μL/min/ mg Protein), PS<sub>Passive</sub> (μL/min/ mg Protein), PS<sub>Transporters</sub> (μL/min/ mg Protein) and REF values are taken from Kimoto et al. (2018). The PS<sub>Passive</sub> (μL/min/ mg Protein) and PS<sub>Transporters</sub> (μL/min/ mg Protein) values are converted to (mL/min/Kg) by using the equations 2 and 3, respectively.

<sup>b</sup>. The calculations of CL<sub>int, total uptake</sub>, CL<sub>int, met</sub> and CL<sub>int, Liver-ECCS</sub> are calculated using equations 4, 5 and 6, respectively.

**Table 4.S2. *In vitro-to-in vivo* of plasma hepatic clearance for 19 drugs with  $CL_{int, met}$  using six equations.**

Drug generic name	Abbreviations	Observed plasma CLh (mL/min/Kg) <sup>a</sup>	Predicted plasma CLh (mL/min/Kg)					
			$CL_{int, met}$ (with $fu_p$ ) <sup>b, c</sup> (Eq. 7)	$CL_{int, met}$ (with $fu_{p-adjusted}$ ) <sup>b, d</sup> (Eq. 8)	$CL_{int, total\ uptake}$ (with $fu_p$ ) <sup>b, c</sup> (Eq. 9)	$CL_{int, total\ uptake}$ (with $fu_{p-adjusted}$ ) <sup>b, d</sup> (Eq. 10)	$CL_{int, met}+CL_{int, total\ uptake}$ (with $fu_p$ ) <sup>b, c</sup> (Eq. 11)	$CL_{int, met}+CL_{int, total\ uptake}$ (with $fu_{p-adjusted}$ ) <sup>b, d</sup> (Eq. 12)
Bromfenac	Bro	1.3	0.06	0.32	0.58	2.51	0.10	0.50
Entacapone	Ent	11.5	3.80	10.78	1.13	4.52	1.04	4.21
Fluorescein	Flu	1.3	2.21	5.17	0.39	1.24	0.36	1.16
Nateglinide	Nat	1.7	0.19	0.88	0.58	2.42	0.25	1.15
Diclofenac	Dic	3.47	0.61	2.68	1.43	5.18	0.97	3.88
Fenopropfen	Fen	0.29	0.12	0.58	0.73	2.97	0.38	1.72
Ibuprofen	Ibu	0.81	0.31	1.41	1.18	4.17	0.59	2.45
Indomethacin	Ind	1.1	0.13	0.61	2.39	7.04	0.42	1.88
Ketoprofen	Ket	1.12	0.54	2.20	2.12	5.96	1.60	5.01
Meloxicam	Mel	0.11	0.02	0.08	1.27	4.49	0.13	0.64
Pioglitazone	Pio	1.42	0.55	2.64	8.72	16.47	2.39	8.51
Pralidoxime	Pra	3.65	4.60	6.96	2.50	4.05	2.26	3.70
Rosiglitazone	Ros	0.6	0.19	1.06	2.81	7.66	0.69	3.17
R-Warfarin	R-War	0.05	0.00	0.01	1.31	4.58	0.12	0.59
S-Warfarin	S-War	0.12	0.01	0.03	0.95	3.63	0.22	1.04
Tolbutamide	Tolb	0.21	0.05	0.24	0.91	3.36	0.47	1.95
Tolcapone	Tolc	1.49	0.15	0.77	1.23	4.44	0.47	2.11
Naproxen	Nap	0.1	0.11	0.51	2.21	7.22	0.11	0.52
Thalidomide	Tha	2.19	1.25	2.52	0.15	0.33	0.14	0.30

**Abbreviations:** CLh hepatic clearance;  $CL_{int, met}$  metabolic intrinsic clearance;  $CL_{int, total\ uptake}$  intrinsic clearance for total uptake;  $fu_p$  unbound fraction in plasma;  $fu_{p-adjusted}$  the adjusted unbound fraction in plasma.

<sup>a</sup> The observed plasma CLh (mL/min/Kg) values are taken from Kimoto et al. (2018).

<sup>b</sup> The *in vitro-to-in vivo* calculations of predicted plasma CLh (mL/min/Kg) are made according to equations 7 to 12 (Table 4.S5).

<sup>c</sup> The  $fu_p$  values are taken from Kimoto et al. (2018).

<sup>d</sup> The  $fu_{p-adjusted}$  values are calculated according to the equation found in Poulin et al. (2016) (also presented in Table 4.S5).

**Table 4.S3. The calculations of  $f_{u_{p\text{-adjusted}}}$** 

Drug generic name	Abbreviations	pKa	$f_{u_p}$	$f_{u_{p\text{-adjusted}}}$ <sup>a</sup>
Bromfenac	Bro	4.1	0.002	0.01
Entacapone	Ent	4	0.02	0.09
Fluorescein	Flu	4.5	0.11	0.38
Nateglinide	Nat	3.8	0.011	0.05
Diclofenac	Dic	4.4	0.004	0.02
Fenoprofen	Fen	4.4	0.005	0.02
Ibuprofen	Ibu	4.4	0.012	0.06
Indomethacin	Ind	4.4	0.012	0.06
Ketoprofen	Ket	4.1	0.021	0.10
Meloxicam	Mel	3.8	0.008	0.04
Pioglitazone	Pio	6.1	0.012	0.06
Pralidoxime	Pra	7.9	0.515	0.91
Rosiglitazone	Ros	6.3 (Z)	0.003	0.01
R-Warfarin	R-War	5	0.013	0.06
S-Warfarin	S-War	5	0.013	0.06
Tolbutamide	Tolb	5.1	0.027	0.12
Tolcapone	Tolc	5	0.002	0.01
Naproxen	Nap	4.3	0.026	0.12
Thalidomide	Tha	7.8	0.4	0.86

**Abbreviations:** Z zwitterion;  $f_{u_p}$  unbound fraction in plasma;  $f_{u_{p\text{-adjusted}}}$  the adjusted unbound fraction in plasma.

<sup>a</sup>. The calculations of  $f_{u_{p\text{-adjusted}}}$  are made according to Eq. 1 in Table 4.S5.

**Table 4.S4. Summary of predictive performances for the six equations**

	CL <sub>int, met</sub> (with fu <sub>p</sub> ) (Eq. 7)	CL <sub>int, met</sub> (with fu <sub>p-adjusted</sub> ) (Eq. 8)	CL <sub>int, total uptake</sub> (with fu <sub>p</sub> ) (Eq. 9)	CL <sub>int, total uptake</sub> (with fu <sub>p-adjusted</sub> ) (Eq. 10)	CL <sub>int, met</sub> +CL <sub>int, total uptake</sub> (with fu <sub>p</sub> ) (Eq. 11)	CL <sub>int, met</sub> +CL <sub>int, total uptake</sub> (with fu <sub>p-adjusted</sub> ) (Eq. 12)
<b>N</b>	19	19	19	19	19	19
<b>AFE<sup>a</sup></b>	4.33	<b>2.05</b>	4.35	6.89	2.72	3.46
<b>Bias<sup>a</sup></b>	0.25	<b>1.02</b>	1.60	5.09	0.55	2.16
<b>Within 2-fold error (%)</b>	21.05	<b>73.68</b>	21.05	26.32	47.37	31.58
<b>Within 3-fold error (%)</b>	47.37	<b>73.68</b>	47.37	36.84	63.16	42.11

**Abbreviations:** **N** number of drugs; **AFE** average fold error; **CL<sub>int, met</sub>** metabolic intrinsic clearance; **CL<sub>int, total uptake</sub>** intrinsic clearance for total uptake; **fu<sub>p</sub>** unbound fraction in plasma; **fu<sub>p-adjusted</sub>** the adjusted unbound fraction in plasma.

\* Equation 8 is based only on the parameters fu<sub>p-adjusted</sub> and CL<sub>int, met</sub> gave the best overall performance for all 19 drugs.

<sup>a</sup> AFE and bias are calculated according to equations 13 and 14 (Table 4.S5).

**Table 4.S5. Scaling factors and equations used for IVIVE calculations**

SF1	S1 = 1.5 x 10 <sup>6</sup> cells/mg protein		
SF2	S2 = 118 x 10 <sup>6</sup> cells/g liver		
SF3	S3 = 39.8 mg microsomal protein/g liver		
SF4	S4 = 24.5 g liver/Kg body weight		
fu <sub>p-adjusted</sub>	$fu_{p-adjusted} = \frac{PLR \cdot fu_{p-app}}{1 + (PLR - 1) \cdot fu_{p-app}}$		Eq. 1
PS <sub>Passive</sub>	$PS_{Passive} \left( \frac{mL}{min} \right) = [PS_{Passive} (\mu L/min/mg \text{ protein}) \times SF2 \times SF4 \div SF1] / 1000$		Eq. 2
PS <sub>Transporters</sub>	$PS_{Transporters} \left( \frac{mL}{min} \right) = [PS_{Transporters} (\mu L/min/mg \text{ protein}) \times SF2 \times SF4 \div SF1] / 1000$		Eq. 3
CL <sub>int, total uptake</sub>	$CL_{int, total \ uptake} \left( \frac{mL}{min} \right) = PS_{Passive} \left( \frac{mL}{min} \right) + [PS_{Transporters} \left( \frac{mL}{min} \right) \times REF]$		Eq. 4
CL <sub>int, met</sub>	$CL_{int, met} \left( \frac{mL}{min} \right) = \frac{CL_{int, met \ apparent} \left( \frac{\mu L}{min} \right) \times SF3 \times SF4}{1000 \times fu_{inc, mic}}$		Eq. 5
CL <sub>int, liver-ECCS</sub>	$CL_{int, liver-ECCS} \left( \frac{mL}{min} \right) = CL_{int, total \ uptake} \left( \frac{mL}{min} \right) \times \frac{CL_{int, met} \left( \frac{mL}{min} \right)}{CL_{int, met} \left( \frac{mL}{min} \right) + PS_{Passive} \left( \frac{mL}{min} \right)}$		Eq. 6



Plasma CLh ( $f_{u_p}$ +metabolism- only)	$\text{Plasma CLh} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = Q_L \cdot \frac{f_{u_p}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, met}} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right)}{Q_L + f_{u_p}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, met}} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right)} \times R_{BP}$	Eq. 7
Plasma CLh ( $f_{u_p}$ -adjusted + metabolism-only)	$\text{Plasma CLh} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = Q_L \cdot \frac{f_{u_p\text{-adjusted}}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, met}} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right)}{Q_L + f_{u_p\text{-adjusted}}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, met}} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right)} \times R_{BP}$	Eq. 8
Plasma CLh ( $f_{u_p}$ + total uptake-only)	$\text{Plasma CLh} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = Q_L \cdot \frac{f_{u_p}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, total uptake}}}{Q_L + f_{u_p}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, total uptake}}} \times R_{BP}$	Eq. 9
Plasma CLh ( $f_{u_p}$ - adjusted+ total uptake-only)	$\text{Plasma CLh} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = Q_L \cdot \frac{f_{u_p\text{-adjusted}}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, total uptake}}}{Q_L + f_{u_p\text{-adjusted}}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, total uptake}}} \times R_{BP}$	Eq. 10
Plasma CLh ( $f_{u_p}$ + Transport/Enzyme interplay)	$\text{Plasma CLh} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = Q_L \cdot \frac{f_{u_p}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, liver-ECCS}}}{Q_L + f_{u_p}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, liver-ECCS}}} \times R_{BP}$	Eq. 11
Plasma CLh ( $f_{u_p}$ -adjusted + Transport/Enzyme interplay)	$\text{Plasma CLh} \left( \frac{\text{mL}}{\text{min}} \right) = Q_L \cdot \frac{f_{u_p\text{-adjusted}}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, liver-ECCS}}}{Q_L + f_{u_p\text{-adjusted}}/R_{BP} \cdot \text{CL}_{\text{int, liver-ECCS}}} \times R_{BP}$	Eq. 12
AFE	$\text{AFE} = 10^{\frac{1}{N} \sum \left  \log_{10} \frac{\text{Predicted CLh}}{\text{Observed CLh}} \right }$	Eq. 13
Bias	$\text{Bias} = 10^{\frac{1}{N} \sum \log_{10} \frac{\text{Predicted CLh}}{\text{Observed CLh}}}$	Eq. 14

**Abbreviations:** **AFE** average fold error; **CLh** hepatic clearance; **CL<sub>int, met</sub>** metabolic intrinsic clearance; **CL<sub>int, total uptake</sub>** intrinsic clearance for total uptake; **f<sub>u<sub>p</sub></sub>** unbound fraction in plasma; **f<sub>u<sub>inc, mic</sub></sub>** unbound fraction in microsome assay; **f<sub>u<sub>p</sub>-adjusted</sub>** the adjusted unbound fraction in plasma; **CL<sub>int, liver-ECCS</sub>** intrinsic clearance for the extended clearance classification system; **ECCS** extended clearance classification system; **PS<sub>Passive</sub>** intrinsic membrane clearance for basolateral (sinusoidal) influx *via* simple diffusion; **PS<sub>Transporters</sub>** membrane clearances for hepatic influx *via* passive and active uptake transporters; **Q<sub>L</sub>** hepatic blood flow; **R<sub>BP</sub>** ratio of drug concentrations in blood to that in plasma; **SF** scaling factors.

$f_{u_{p\text{-app}}}$  is calculated according to  $f_{u_{p\text{-app}}} = \frac{F1 \cdot f_{u_p}}{1 + (F1 - 1) \cdot f_{u_p}}$  where  $F1 = \frac{f_{\text{unionized fraction in plasma}}}{f_{\text{unionized fraction in liver cells}}}$  according to the equations that are found in Poulin, Hop, et al. (2012). The  $Q_L$ ,  $R_{BP}$  and REF values are taken from Kimoto et al. (2018).  $Q_L$  is 20.7 mL/min/Kg, REF is 2 for OAT2/OATP1B1 dual substrates and it is 1.8 for OAT2 substrates.

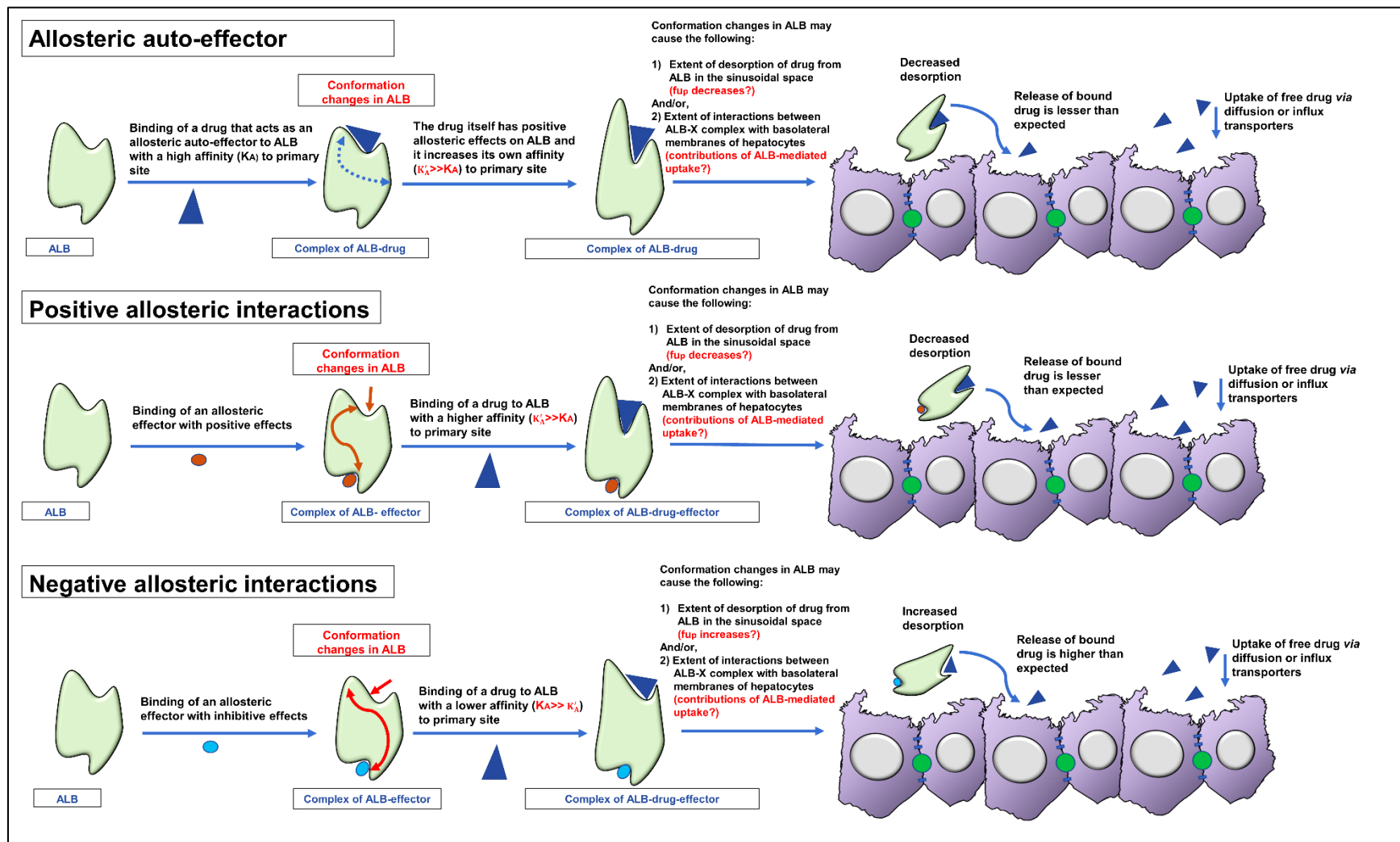


Figure 4.S1. The potential impacts of allosteric interactions on hepatic uptake of a ligand bound to ALB

Abbreviations: ALB albumin;  $K_A$  initial association coefficient;  $K'_A$  changed association coefficient;  $f_{up}$  unbound fraction in plasma; X ligand.

**CHAPITRE 5. Impact of extensive plasma protein binding  
on the *in situ* hepatic uptake and clearance of  
perampanel and fluoxetine in Sprague Dawley rats**

# Impact of extensive plasma protein binding on the *in situ* hepatic uptake and clearance of perampanel and fluoxetine in Sprague Dawley rats

Michel Bteich <sup>1,2</sup>, Patrick Poulin <sup>1,3</sup>, Sarah Piette <sup>1</sup> and Sami Haddad <sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

<sup>2</sup> Centre de recherche en santé publique (CRéSP), Montreal, Quebec, Canada

<sup>3</sup> Consultant Patrick Poulin Inc., Quebec City, Quebec, Canada.

## **\*Address for correspondence:**

Sami Haddad, Department of Environmental and Occupational Health, Université de Montréal, PO Box 6128, Main Station, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada. Tel: (+1) 514-343-6111 post 38166. Fax: (+1) 514-343-2200.

Email: [sami.haddad@umontreal.ca](mailto:sami.haddad@umontreal.ca)

Received on the 14<sup>th</sup> of May 2020, accepted on the 6<sup>th</sup> of July 2020, published online on the 8<sup>th</sup> of July 2020 in the Journal of Pharmaceutical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.07.003>

## **Acknowledgements**

The authors would like to thank Dr. Alexandra Furtos and Ms. Louiza Mahrouche for their help on the chemical analysis of fluoxetine. The authors would also like to thank Ms. Sara Bounakta and Dr. Badr El Aroussi for their technical support. This work is part of Mr. Michel Bteich's doctoral thesis and the Dr. Haddad's research program supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, Discovery grant no. RGPIN-2015-05577. A financial support from the Consultant Patrick Poulin Inc. (P.P.) is also acknowledged.

## **Abstract**

The main objective was to investigate the effect of albumin (ALB) and/or alpha-1-acid glycoprotein (AGP) on the hepatic uptake and clearance (CL<sub>h</sub>) of the drugs that bind, extensively, to both proteins.

Using male Sprague Dawley rats (n= 3 rats/scenario/drug), four isolated perfused rat livers (IPRL) scenarios were performed for perampanel (PER) and fluoxetine (FLU), using physiological solutions: 1) without plasma proteins (WO), 2) with bovine ALB (40 g/L), 3) with bovine AGP (1 g/L), and 4) with mixture of both proteins (MIX).

PER is poorly to moderately metabolized (hepatic extraction= 0.2-0.7), while FLU is highly metabolized (hepatic extraction= 0.8-0.99). The metabolic kinetics were fitted to the Michaelis-Menten model. For the PER, the parameters were  $V_{max}$ = 90, 16.4, 86.1 and 16.9 (nmol/min/g liver) and unbound  $K_m$ = 17, 1.7, 38.3 and 1.4 (mM) for the scenarios WO, with ALB, with AGP and with MIX, respectively. As for FLU, the parameters were  $V_{max}$ = 65.5, 18.5, 33.8 and 12.2 (nmol/min/g liver) and unbound  $K_m$ = 1.5, 0.03, 0.14 and 0.046 (mM) in all four scenarios, respectively.

In conclusion, a protein-mediated hepatic uptake likely occurred only at low concentrations for both drugs (i.e., therapeutic concentrations) in the presence of plasma proteins (except for the scenario of PER with AGP).

## **Key words**

Albumin, alpha-1-acid glycoprotein, protein-mediated hepatic uptake, hepatic clearance, isolated and perfused rat liver, perampanel, fluoxetine, pharmacokinetics, PBPK.

## 5.1. Introduction

The two plasma proteins albumin (ALB) and alpha-1-glycoprotein (AGP) are among the most implicated in the plasma protein binding (PPB), and their presence in the plasma directly influences the pharmacokinetics/toxicokinetics (PK/TK) of a large variety of drugs (Filip et al., 2013; Z. Huang & Ung, 2013; Israili & Dayton, 2001; McNamara & Alcorn, 2002; Schmidt, Gonzalez, & Derendorf, 2010; Toyama et al., 2014). The proteins ALB and AGP have key roles as carriers and storage depot of their ligands (Lehman-McKeeman, 2013). However, it is yet unclear how the binding to ALB influences differently the hepatic uptake and clearance (CL<sub>h</sub>) of ALB-bound drugs compared to when the same drugs are bound to other plasma proteins (i.e., AGP).

The two proteins ALB and AGP have some similarities but many different structural and molecular characteristics (Bteich, 2019; Filip et al., 2013). For the similarities, ALB and AGP are single chain proteins primarily synthesized/catalyzed in the liver and they are internalized and secreted/recycled *via* a membrane receptor specific to each protein. They both have acidic characteristics; they have negative net charges at the physiological pH of 7.4 and they are highly soluble proteins in water and other polar organic solvents.

As for the differences, ALB is physiologically non-glycosylated, it has a molecular weight of 66.5 kDa and it is the most abundant protein in mammals, with almost 60% of the total amount of plasma proteins, and its physiological concentration varies between 30 to 50 g/L (i.e., 500  $\mu$ M-750  $\mu$ M). Unlike ALB, the AGP protein is glycosylated and it consists of about 59% peptide residues and 41% carbohydrates – of which about 11% are sialic acids. The glycosylated entities contribute to a more important negative charge on the protein's surface that would determine the type of molecular interactions that may occur between AGP and biomembranes. AGP accounts for only 3% of the plasma proteins' total, it has a molecular weight of 44 kDa and it is scarce in plasma since its physiological concentration varies between 0.5 to 1 g/dL (10  $\mu$ M-20  $\mu$ M).

Regarding the binding sites of high-affinity and low-capacity characteristics, ALB is characterized by its two hydrophobic cavities in site I (subdomain IIA) and site II (subdomain IIIA). While AGP only has one known primary saturable site located in the hydrophobic crevice consisted of three lobes. For both

proteins, charged and polar residues may also be physiologically found in the inner environment and at the entrance of their binding pockets.

From the studies on hepatic metabolism, it is now well documented that the presence of ALB in the *in vitro* hepatocytes and microsome assays can be an important factor to simulate the hepatic uptake and CL<sub>h</sub> in the *in vivo* conditions (Blanchard et al., 2006; Blanchard et al., 2004; Poulin et al., 2016; Ring et al., 2011). Using the HepatoPac® *in vitro* system, the production of ALB molecules may have facilitated the hepatic uptake of several bound drugs because their hepatic intrinsic clearance (CL<sub>int, h</sub>) which was significantly increased compared to other *in vitro* assays that did not produce ALB (Da-Silva et al., 2018).

However, ALB did not always play a role of a facilitator of drugs' uptake into hepatocytes. It has been recently suggested that the ALB molecules may either mediate or decrease the hepatic uptake (i.e., *via* simple diffusion and/or transporters) and hence influence the observed CL<sub>h, in vivo</sub> values (S. J. Kim et al., 2019; Miyauchi et al., 2018; Poulin, 2013; Poulin et al., 2017; Poulin et al., 2016; Poulin & Haddad, 2015). This facilitation/retention phenomenon would be, particularly, observed for the highly bound drugs, as the slightest change in the extensive PPB may lead to significant changes in the CL<sub>h, in vivo</sub> values (Poulin & Haddad, 2013). For example, when the high binding affinities of the drug for ALB weaken and the dissociation of the ALB-drug complexes is induced, then more drug molecules are assumed to be free and available for hepatic uptake, hence, the CL<sub>h, in vivo</sub> will be of higher values (Poulin & Haddad, 2018). Conversely, when the binding affinities increase due to conformational changes in ALB, then the values of uptake and clearance are assumed to decrease (Poulin & Haddad, 2018).

The effect of ALB molecules was determined by comparing the unbound intrinsic clearance (CL<sub>int, u</sub>) values in the absence of plasma proteins to that in their presence in the medium. An increase in the CL<sub>int, u</sub> values of the drug was interpreted as a hepatic uptake enhanced by ALB molecules (S. J. Kim et al., 2019; Poulin et al., 2017), but a decrease was interpreted as a retention of the drug due to molecular interactions (i.e., conformational changes in ALB) (Miyauchi et al., 2018; Poulin & Haddad, 2018).

Moreover, the extent of the drug's hepatic uptake mediation/retention may depend on the type of interactions between the ALB-drug complexes and other constituents of the hepatic plasma membranes

(e.g., phospholipids, membrane transporters and/or receptors) (C. M. Bowman & Benet, 2018; Bteich, Poulin, & Haddad, 2019; Poulin et al., 2016). These molecular interactions may lead to the occurrence of some hepatic mechanisms that were recently presented as potential events leading to violations of 'the free drug hypothesis' (Bteich et al., 2019). Therefore, for some drugs that are highly bound to ALB, the uptake of the free concentration at equilibrium ( $C_{free}$ ), as per the latter hypothesis, is insufficient to explain their rate of hepatic uptake/metabolism. And, the contributions of the ALB-drugs complexes to the hepatic uptake/clearance need to be also addressed and considered in PK/TK studies.

When comparing the PPB for the same drugs to different plasma proteins such as ALB and AGP, the affinities and capacities related to their binding sites are variable. Furthermore, the distinct plasma proteins and their ligands that form together the protein-ligand complexes are probably able to interact with the components of the hepatocytes' plasma membrane, but these complexes do not necessarily follow the same mechanisms when interacting with the membrane (Burczynski et al., 1997; Otagiri & Chuang, 2016; Taguchi et al., 2013a). Therefore, the extent of hepatic uptake facilitation/retention may be variable between the plasma protein-drug complexes depending on both the plasma proteins' biochemical features (Burczynski et al., 2001; Burczynski et al., 1997) and the drug's physicochemical characteristics (Poulin & Haddad, 2018). For example, it has been demonstrated that the facilitated uptake into cells may occur for drugs that are bound to proteins other than plasma ALB, such as in the presence of ligandin (Stollman, Gartner, Theilmann, Ohmi, & Wolkoff, 1983) or the  $\beta$ -lactoglobulin (Burczynski, Moran, Cai, & Forker, 1990), but not in the presence of AGP (Burczynski et al., 1997). Hence, we suggest that the high affinity binding of a drug to ALB may affect the hepatic uptake and the  $CL_{in vivo}$  differently than does its binding to AGP.

The main objective of this study is to evaluate the impact of the extensive binding to these two plasma proteins on the *in situ* hepatic uptake and  $CL_h$  as well as on the  $CL_{int, u}$  values, in male Sprague Dawley rats, for two selected drugs that have the potential to extensively bind to both plasma proteins ALB and AGP, and that are exclusively (or predominantly) metabolized in the liver. Interestingly, the proportion of the bound drug moiety to each plasma protein (i.e., ALB and AGP) needs also to be explored when both proteins are present in the same medium (i.e., plasma). Quantitating this proportion for the drug may help



the researchers answer how to adjust the unbound fraction in plasma ( $f_{u_p}$ ) parameter in the *in vitro-to-in vivo* extrapolation models, and how to improve the  $CL_{in vivo}$  predictions for the category of drugs that extensively bind in plasma; i.e., binding to more than one plasma protein. Hence, as a secondary objective, the apparent proportion of the bound drug moiety to AGP and ALB will be determined experimentally.

The following two drugs have extensive PPB at clinically relevant concentrations, particularly to ALB and AGP: Perampanel (PER) and Fluoxetine (FLU). Thus, they are selected for this study. PER (or Fycompa®) is a novel AMPA receptor antagonist; i.e., the first approved antiepileptic drug to inhibit excitation of postsynaptic membranes through the selective inhibition of glutamate receptors (T. Hanada, 2014). According to clinical studies, PER is metabolized extensively (>90%) in the liver primarily *via* oxidation (phase I) and subsequent glucuronidation (phase II) may occur (Patsalos, 2015). According to *in vitro* studies (i.e., microsomes), the cytochrome P450 (CYP3A) metabolizes PER and it makes the primary oxidative metabolic route (Patsalos, 2015). FLU (or Prozac®) is the first molecule of a new generation of selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI) antidepressants, and it is one of the most widely prescribed drugs on the market (Rossi, Barraco, & Donda, 2004). From the clinical studies, the metabolism of FLU is yielded *via* different CYP450 isoforms, however, the main active metabolite, norfluoxetine, is produced by the CYP2D6 (Mandrioli, Forti, & Raggi, 2006).

## **5.2. Methods**

### **5.2.1. PK data compilation for marketed drugs**

For the purpose to select drugs with the specific characteristics to bind extensively in plasma, and mainly to both ALB and AGP, the data collection for marketed drugs (N= 1907 drugs) with different PK characteristics in healthy humans was compiled from the following main references: Benet et al. (2011); Dollery and Boobis (1999); Goodman et al. (2011); Hosey et al. (2016); Israili and Dayton (2001); Lexi-Comp (2013, 2016); Manallack (2009); Thummel et al. (2017); C. Y. Wu and Benet (2005). An advanced search was also completed for several drugs to find the missing PPB data in the databases PubMed®, [www.medicines.org.uk](http://www.medicines.org.uk), [www.accessdata.gov](http://www.accessdata.gov) and Google Scholar, by using the following keywords: [drug's

NAME] & [albumin]; [drug's NAME] & [orosomuroid]; [drug's NAME] & [alpha-1-acid glycoprotein]; [plasma protein binding].

### 5.2.2. Drug candidates' selection

From the compiled PK data collection for marketed drugs, the two drug candidates PER and FLU are selected for their binding affinities, metabolic and physicochemical properties. Both PER (FDA, 2017a) and FLU (FDA, 2017b) have the following PK and physicochemical characteristics which were set as requirements to select the drug candidates for this study.

#### - PK characteristics

- a. Administrated orally and/or parenterally (i.e., intramuscular, intraperitoneal and/or intravenously).
- b. Strongly bound to ALB and AGP (PPB%  $\geq$  95%).
- c. Main metabolism is yielded at the hepatic level.
- d. Activity of hepatic membrane transporters for drug uptake is either minimal or nonexistent.
- e. Highly distributed into cells (volume of distribution ( $V_D$ ) in humans  $\geq$  70 L) to avoid working with drug molecules that accumulate in the extracellular environment and that do not diffuse in the intracellular medium (Klaassen, 2013).
- f. The apparent fractional binding is represented by the binding ratio between AGP and ALB ( $R_{AGP:ALB}$ ). The latter ratio was experimentally determined (see subsection 5.2.5.2). PER and FLU have  $R_{AGP:ALB}$  values that approached the value of unity at the drugs' therapeutic concentration levels, and this may indicate that the drug bound moiety to AGP is equivalent to that bound to ALB when the two plasma proteins are present in the same medium.

#### - Physicochemical characteristics

- a. Hydrophilic to mildly hydrophobic drugs with  $\text{LogD}_{7.4} \leq 3$  to avoid strong non-specific binding (e.g., plastic walls) in the *in vitro* medium (Lombardo et al., 2001).
- b. Molecular mass < 500 g/mol, to decrease adsorption onto the dialysis membrane of *in vitro* inserts.

### 5.2.3. Chemicals and materials

Perampanel or Fycompa® (98% purity, AdooQ® Bioscience, California, USA), propranolol hydrochloride (99% purity, Sigma Aldrich, Millipore®, USA), fluoxetine hydrochloride or Prozac® (≥98% purity, Sigma Aldrich, Millipore®, Canada), deuterated-fluoxetine (≥98% purity, Sigma-Aldrich, Millipore®, Canada), bovine ALB (≥95% purity, Sigma Aldrich, Millipore®, Canada), bovine AGP (≥99% purity, Sigma-Aldrich, Millipore®, Canada), Krebs-Henseleit buffer (KHB) (10x1L, Sigma-Aldrich, Millipore®, Canada), isoflurane (USP 99% purity, Abbott Animal Health Laboratories®, North Chicago, IL), Charcoal Omnicom (f/air) (Veterinary Product, Bickford Inc., Wales Center, NY, USA), calibrated carbogen tanks (certified standard, v/v, 95%:5% O<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub>, Praxair®, Toronto, ON), sodium chloride (0.9%, 20 mL bottles, Hospira®), heparin sodium (99% purity, Fischer chemicals, USA), isopropyl alcohol (70%, 4L, Hemochem Inc. USA), denatured alcohol (85.45% ethanol, Fischer chemicals) and dimethyl sulfoxide (DMSO) (99.9%, 1L, VWR analytical®, USA). The solvents acetonitrile, methanol (HPLC grade ≥99.9%, 4L) and glacial acetic acid were obtained from Thermo Fisher scientific Inc. (St. Louis, MO). For the binding kinetics experiments, the rapid equilibrium dialysis (RED) device inserts (dialysis cylinder membrane 8kDa MWCO, 50 inserts/pack), the reusable Teflon plate (96 wells), the immunoware™ sealing tape and the RED insert removal tool were obtained from Thermo Scientific® (Rockford, IL, USA). The isolated perfused rat liver (IPRL) surgical kit and data acquisition software were purchased from Harvard Apparatus Canada® (Saint-Laurent, Quebec, Canada). Other materials: the pH Benchtop meter, Symphony pH meter (VWR analytical®, USA), orbital rotator and centrifuge (Thermo Fisher Brand®, Massachusetts, USA), vacuum manifold (Waters, USA), Impact™ protein precipitation plate (CEO-7565, Phenomenex®, CA, USA).

### 5.2.4. Animals care and handling

Male Sprague Dawley rats (250–300 g) were purchased from Charles River laboratories (St-Constant, Quebec, Canada), with the permission of the Animal Experimentation Ethics Committee (CDEA-DV) of Université de Montréal. The rats were kept under optimal conditions during their accommodation at the animal care division (DV), and the animal care was applied in accordance with the guidelines of the

Canadian Council on animal care in science (CCAC). A period of acclimation of 72 h minimum in an enriched environment was respected before any surgical experiment, by controlling the room temperature (20°C), the relative humidity (45%) and lighting (cycle day–night; 12 h of light, 12 h of dark). The rats were provided with food and water ad libitum (certified and sterilized). The experimental protocol was yearly updated and submitted to the CDEA-DV at Université de Montréal. During the experiments, the animals were treated in accordance with the guidelines dictated by this institutional Committee that made several follow-ups and recommendations in respect to the 3Rs concept (i.e., replacement, reduction and refinement).

## 5.2.5. Experimental design

### 5.2.5.1. Solutions preparation, choice of concentrations and sampling

- **Solutions preparation**

Stock solutions (1 mM) of PER and FLU were prepared in DMSO (100%). The KHB solutions (pH 7.4) were freshly prepared, gassed by carbogen for 5 min and then filtered. Three other solutions containing plasma proteins were freshly prepared in 1L of KHB solution by dissolving, separately, the respective proteins weights: 40 g of ALB, 1 g of AGP, and a mixture (MIX) of 40 g of ALB and 1 g of AGP. The matrixes of KHB, ALB, AGP and MIX were used for *in vitro* binding tests, IPRL (i.e., *in situ*) and quality control. The drugs test concentrations, standards (i.e., for analytical methods validation) and quality control samples ( $\leq$  0.1% DMSO) were prepared by diluting the stock drug solutions in the four matrixes. The calibration curve concentrations for analytical methods development were prepared by making the appropriate dilutions of drug stock PER in acetonitrile (100%) and of FLU in methanol (100%). The chemical stability of analytes in all matrixes was assessed under various conditions (e.g., freeze/thaw cycles, ambient temperature, short-time and long-term stability, matrix effect, stock in Eppendorf tubes or glass vials).

- **Choice of concentrations**

The plasma proteins concentrations were chosen to be at the physiological mean levels in human adults; i.e., 40 g/L or  $\sim$ 600  $\mu$ M for ALB (Peters Jr., 1996b) and 1 g/L or  $\sim$ 20  $\mu$ M for AGP (Kremer et al., 1988). As for the drug test concentrations for PER and FLU, they ranged from 2.5  $\mu$ M to 35  $\mu$ M. We have chosen this range of drug concentrations for two reasons: 1) the drug concentrations exiting the liver should cover the therapeutic concentration levels of the two drug candidates; i.e., from clinical studies, the maximum plasma concentrations for PER vary from 36.8  $\mu$ g/L to 335.7  $\mu$ g/L (i.e., from 0.11  $\mu$ M to 0.96  $\mu$ M) (Patsalos, 2015) and for FLU from 15  $\mu$ g/L to 55  $\mu$ g/L (i.e., from 0.043  $\mu$ M to 0.16  $\mu$ M) (FDA, 2017b) and 2) the chosen range is sufficiently high to obtain nonlinear binding kinetics, but without oversaturating the proteins particularly when investigating the extent of binding to AGP solely.

- **Sampling and extraction methods for perampanel and fluoxetine**

For PER and FLU, the samples from *in vitro* and *in situ* experiments were collected and kept at -20°C in Eppendorf tubes (for PER) and in glass vials (for FLU) until ready for extraction and analysis. After thawing, 100 µL of each PER sample with or without proteins was precipitated (4:1, ACN (100%): PER sample). The precipitation solutions contained 5 µM of internal standard (propranolol) *a priori* of extraction. The samples were then vortexed (3 min), incubated for 1 hour in an ice bath and centrifuged (10 min, 9000 g). The surfactant was extracted, evaporated by nitrogen and the solution was reconstituted with 100 µL of pure acetonitrile and vortexed for 1 min then agitated for 15 min (at 550 rpm).

After thawing the FLU samples, a volume of 100 µL was injected in a 96-well Phenomenex® precipitation plate. The FLU samples with ALB and MIX were precipitated according to the method 3:1 v/v (66.6%:33.3% methanol: acetonitrile): FLU sample. However, the FLU samples without ALB or with AGP solely were precipitated according to a different method 2:1 v/v methanol: FLU sample. The precipitation solutions contained 75 nM of internal standard (deuterated-FLU). All precipitation plates were incubated for 1 hour at -20°C, vortexed for 15 min and then filtrated before analysis. The same precipitation and extraction methods were followed for the standard and quality control concentrations corresponding to either PER or FLU.

#### **5.2.5.2. Rapid equilibrium dialysis**

To obtain the  $C_{free}$ ,  $C_{total}$ ,  $f_{up}$  and  $R_{AGP:ALB}$  values for each drug at different concentrations, *in vitro* binding tests were performed (in duplicates) according to the 96-well rapid equilibrium dialysis (RED) protocol suggested by the company (Banker & Clark, 2008; van Liempd et al., 2011; Zamek-Gliszczyński et al., 2011). Prior to dialysis tests, the appropriate equilibrium incubation time of 6 hours was determined by performing preliminary tests at different times varying from 1 h to 24 h (in duplicates) for PER (2.5 µM) and FLU (2.5 µM). During incubations at 37°C for 6 hours, the samples were agitated at 200 rpm. A volume of 400 µL of plasma proteins solutions was inserted in red chambers spiked with PER or FLU working concentrations (2.5 µM, 7.5 µM, 15 µM, 20 µM, 25 µM, 35 µM; ≤ 0.1% DMSO); i.e., for the three binding scenarios that contained: 1) bovine ALB (40 g/L), 2) bovine AGP (1 g/L), 3) Mix (containing 40g/L of ALB

and 1 g/L of AGP). And, for the three scenarios, a volume 600  $\mu$ L of KHB solution (pH 7.4) was inserted in each of the buffer chambers.

The fourth RED scenario was performed to determine the fractional binding or the  $R_{AGP:ALB}$ . According to Poulin, Hop, et al. (2012), the  $R_{AGP:ALB}$  could be useful: 1) in evaluating the extent of binding to each plasma protein, and 2) as a useful kinetic parameter for hepatic clearance models of highly bound xenobiotics. Therefore, for this scenario, a volume of 400  $\mu$ L AGP (1g/L) spiked with drug (PER or FLU) was injected in the red chamber and 600  $\mu$ L of ALB solution (40 g/L) was solely injected in the opposite buffer chamber of the same insert, under the same incubation conditions as previously described according to the same RED protocol previously cited. All the samples were stocked in a freezer (at  $-20^{\circ}\text{C}$ ) for later sample analysis in Eppendorf tubes (for PER) and in glass vials (for FLU).

### **5.2.5.3. Isolated and perfused rat liver experiments**

Using male Sprague Dawley rats ( $n= 3$  rats/scenario/drug), the IPRL experiments were performed to obtain the *in situ*  $CL_{int, h}$  and  $CL_h$  values for the two drugs (calculations shown in subsection 5.2.7). The IPRL experimental protocol followed here is taken from Bounakta et al. (2018). Briefly, the rats were anesthetized with 3% v/v isoflurane: O<sub>2</sub>. The next IPRL steps were the following: 1) cannulating the portal vein (inlet) and the inferior vena cava (outlet), 2) the liver wash with prewarmed KHB for 5 min to remove the blood elements (at 5 mL/min), 3) after the cannulation of the two veins was successful, the rats euthanasia was induced by exsanguination, 4) the equilibration for 15 min with prewarmed perfusate solution at a flow rate of 20 mL/min, and finally 5) the perfusion of the rat liver with the prewarmed test solutions spiked with drugs.

The drug concentration was gradually increased during perfusion. Each of the concentrations from 2.5  $\mu$ M, 7.5  $\mu$ M, 15  $\mu$ M, 20  $\mu$ M, 25  $\mu$ M to 35  $\mu$ M were administered, separately, for 5 min through the portal vein into the liver. To note that the verifications of appropriate perfusion time for FLU and PER were made in preliminary IPRL trials before using many animals for IPRL experiments. The perfusate solutions in which the drug was dissolved varied depending on the four IPRL scenarios: 1) physiological solution

without plasma proteins (WO), 2) solution with bovine ALB (40 g/L), 3) solution with bovine AGP (1 g/L), and 4) MIX solution (containing 40 g/L of ALB and 1 g/L of AGP). The experimental conditions for IPRL were meticulously controlled (i.e., pH 7.4, liver temperature ~33°C-37°C, surgical table heated at 38°C, maintained oxygenation level, portal vein pressure and pump flow at 20 mL/min). The perfusate solutions were continuously heated at 38°C and gassed with 95%: 5% v/v O<sub>2</sub>: CO<sub>2</sub> (with the least possible of produced foam in solutions containing plasma proteins). The perfusate was harvested in triplicates every 1 min at the outlet of the inferior vena cava in Eppendorf tubes (for PER) and in glass vials (for FLU) that were subsequently stocked in a freezer (at -20°C) for later sample analysis. At the end of each perfusion, the weight of the perfused rat liver was measured, and it was included in the metabolic rates calculations (see section 5.2.7).

#### **5.2.6. Chemical analysis**

The PER samples were analyzed with UHPLC infinity 1290 series coupled to fluorescence detector (Agilent®, California, USA). The fluorescence analysis method for PER was developed and validated using a column Zorbax rapid resolution HD (Eclipse Plus-C18; 1200 bar; 2.1x50 mm; 1.8 µm), with a mobile phase consisted of 65%:35% acetonitrile: phosphate buffer ([K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>2-</sup>]= 20 mM; pH 3). The elution was done at an isocratic flow rate of 0.4 mL/min for 6 min, an injection volume of 2 µL. The peaks for propranolol (internal standard, RT= 0.6 min) and PER (analyte, RT= 4.5 min) were obtained by setting the wavelengths of 231 nm/341 nm for excitation/emission (from 0 to 3 min), which were changed to 287 nm/431nm for excitation/emission (from 3 to 6 min).

The FLU samples were analyzed with UltiMate 3000 coupled to a TSQ Quantum Ultra (Thermo Fischer Scientific®, Massachusetts, USA). The MRM analysis method for FLU was developed and validated using a column Waters BEH (C18, 2.1x50 mm, 1.8 µm), with a mobile phase consisted of 65%:35%:1% v/v/v acetonitrile: water: formic acid. The elution was done at an isocratic flow rate of 0.5 mL/min for 3 min and the injection volume was of 2 µL. The peaks for FLU (analyte, RT= 1.35 min) and deuterated-FLU (internal standard, RT= 1.35 min) were obtained in positive ESI voltage mode and the transitions 309.9>44.27 and 314.9>44.27 were measured, respectively.



Data analysis was performed using the peak area ratio of each analyte PER and FLU to the internal standard (propranolol) and (deuterated-FLU), respectively. For the PER analytical method (in the four matrixes), recovery>90%, LOQ= 200 nM and  $r^2>0.999$ . For PER, the calibration range used for samples with acetonitrile was from 0.25  $\mu\text{M}$  to 55  $\mu\text{M}$ .

For the FLU analytical method (with two precipitation methods), recovery between 90% to 110%, LOQ= 7nM and  $r^2>0.999$ . For FLU, the calibration range used for samples with acetonitrile/methanol or with methanol was from 0.098  $\mu\text{M}$  to 40  $\mu\text{M}$ . The overall reproducibility of the analytical methods was excellent, and most samples were within the calibration range of the methods for the two drugs.

## 5.2.7. Pharmacokinetic calculations

### 5.2.7.1. Fitting binding data to the nonlinear model and calculation of the fractional binding

The values of  $C_{\text{free}}$  and  $C_{\text{total}}$  were obtained from the analysis of drug concentrations at equilibrium (6 h) in buffer and red chambers in RED inserts, respectively. The  $f_{\text{u}_p}$  and  $C_{\text{bound}}$  values were calculated for each drug concentration according to equations 1 and 2, respectively. Equation 3 represents the relationship of  $C_{\text{bound}}$  versus  $C_{\text{free}}$  which determines the nonlinear binding kinetics shown for PER and FLU that are bound to the plasma proteins (i.e., ALB, AGP or MIX). The fitting of binding data to the nonlinear model (or 'single ligand model') was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019. Equation 6 shows how to calculate the  $R_{\text{AGP:ALB}}$  from the obtained  $C_{\text{total\_AGP}}$  and  $C_{\text{total\_ALB}}$  values, and which determines the apparent fractional binding between AGP and ALB. In equation 6, the  $C_{\text{total\_AGP}}$  and  $C_{\text{total\_ALB}}$  are, respectively, the total concentrations that were recuperated and analyzed from the red and buffer chambers in the fourth RED scenario.

$$f_{\text{u}_p} = \frac{C_{\text{free}}}{C_{\text{total}}} \quad \text{Equation 1}$$

$$C_{\text{bound}} = C_{\text{total}} - C_{\text{free}} \quad \text{Equation 2}$$

$$C_{\text{bound}} = \frac{B_{\text{max}} \times C_{\text{free}}}{K_D + C_{\text{free}}} \quad \text{Equation 3}$$

$$f_{\text{bound}} = \frac{C_{\text{bound}}}{C_{\text{total}}} = 1 - f_{\text{u}_p} \quad \text{Equation 4}$$

$$f_{u_{\text{blood}}} = \frac{f_{u_p}}{R_{BP}} \quad \text{Equation 5}$$

$$R_{AGP: ALB} = \frac{C_{\text{total\_AGP}}}{C_{\text{total\_ALB}}} \quad \text{Equation 6}$$

## 5.2.7.2. Kinetics of hepatic metabolism

### 5.2.7.2.1. Calculations of *in situ* PK/TK parameters

The calculations of *in situ* PK/TK parameters related to the measured drug concentrations were made according to the equations 7 to 10 (Derendorf, Schmidt, Rowland, & Tozer, 2020a; Gabrielsson & Weiner, 2016; Sodhi, Wang, & Benet, 2020). In the latter equations, each of the parameters are determined according to the following: E is the hepatic extraction (no units),  $C_{in}$  is the concentration of the drug at the inlet ( $\mu\text{M}$ ),  $C_{out}$  is the concentration of the drug at the outlet ( $\mu\text{M}$ ),  $Q_L$  is the blood flow in the portal vein (mL/min), however, in this study it represented the perfusion flow fixed at 20 mL/min,  $C_{eq}$  is the measured concentration of the drug ( $\mu\text{M}$ ) exiting the inferior *vena cava* of the rat liver at equilibrium (i.e., equivalent to  $C_{out}$  at equilibrium).

$$E = \frac{C_{in} - C_{out}}{C_{in}} \quad \text{Equation 7}$$

$$CL_h = Q_L \cdot E \text{ (mL/min)} \quad \text{Equation 8}$$

$$CL_{int, h} = \frac{Q_L \cdot E}{1 - E} \text{ (ml/min/g liver)} \quad \text{Equation 9}$$

$$\text{Rate} = C_{eq} \cdot CL_{int, h} \text{ (nmol/min/g liver)} \quad \text{Equation 10}$$

### 5.2.7.2.2. Analysis of perampanel and fluoxetine *in situ* kinetics

The fitting of *in situ* metabolic rates *versus* unbound and total drugs' concentrations to the Michaelis-Menten model for PER and FLU according to the equations 11 to 12 (Derendorf, Schmidt, Rowland, & Tozer, 2020b; Gabrielsson & Weiner, 2016) using SigmaPlot 13.0. Ink, 2019. From the fitted nonlinear kinetics, the following kinetics parameters were obtained:  $V_{max}$  is the maximum rate of enzymatic activity (nmol/min/g liver),  $K_m$  is the Michaelis constant for the total concentration at equilibrium ( $\mu\text{M}$ ),  $K_{m,u}$  Michaelis constant for the free concentration at equilibrium ( $\mu\text{M}$ ).

#### - Rate *versus* $C_{eq\_free}$

$$\text{Rate} = \frac{V_{max} \cdot C_{eq\_free}}{K_{m,u} + C_{eq\_free}} \quad (\text{nmol/min/g liver}) \quad \text{Equation 11A}$$

$$CL_{int, u} = \frac{V_{max}}{K_{m,u} + C_{eq\_free}} \quad (\text{mL/min/g liver}) \quad \text{Equation 11B}$$

#### - Rate *versus* $C_{eq\_total}$

$$\text{Rate} = \frac{V_{max} \cdot C_{eq\_total}}{K_m + C_{eq\_total}} \quad (\text{nmol/min/g liver}) \quad \text{Equation 12A}$$

$$CL_{int, h} = \frac{V_{max}}{K_m + C_{eq\_total}} \quad (\text{mL/min/g liver}) \quad \text{Equation 12B}$$

### 5.3. Results

#### 5.3.1. *In vitro* binding kinetics

The two drugs PER and FLU selected for this study are both highly bound in plasma, to both ALB and AGP. The binding of both drugs PER and FLU showed saturable nonlinear kinetics in the presence of ALB (40 g/L), AGP (1 g/L) and MIX (i.e., ALB (40 g/L) and AGP (1 g/L)). The binding parameters of PER were the following:  $B_{max}$  = 57.52  $\mu$ M, 7.60  $\mu$ M and 84.31  $\mu$ M, and  $K_D$  = 6.74  $\mu$ M, 7.25  $\mu$ M and 8.54  $\mu$ M in the presence of ALB, AGP and MIX, respectively (Figure 5.1). As for FLU, the binding parameters were the following:  $B_{max}$  = 117.75  $\mu$ M, 21.50  $\mu$ M, and 23.65  $\mu$ M, and  $K_D$  = 1.51  $\mu$ M, 5.40  $\mu$ M, and 0.22  $\mu$ M, also respectively (Figure 5.2).

The  $f_{up}$  and apparent  $R_{AGP:ALB}$  values for PER and FLU are presented in Tables 5.1 and 5.2, respectively. For PER concentrations ranging from 2.5  $\mu$ M to 35  $\mu$ M, the  $f_{up}$  values increased from 0.08 to 0.16 for PER spiked with ALB, from 0.42 to 0.88 with AGP, and from 0.05 to 0.12 with MIX (Table 5.1). For FLU concentrations ranging from 2.5  $\mu$ M to 35  $\mu$ M, the  $f_{up}$  values increased from 0.008 to 0.018 when the drug was spiked with ALB, from 0.13 to 0.33 with AGP, and from 0.009 to 0.044 with MIX (Table 5.2). The apparent  $R_{AGP:ALB}$  values decreased from 0.95 to 0.33 for PER concentrations ranging from 2.5  $\mu$ M to 35  $\mu$ M (Table 5.1), whereas the  $R_{AGP:ALB}$  values slightly changed from 1.25 to 1.42 for FLU concentrations ranging from 2.5  $\mu$ M to 35  $\mu$ M (Table 5.2).

#### 5.3.2. *In situ* metabolic kinetics from IPRL: hepatic rates and clearances

In the rat liver, the hepatic extraction ratios of the drug PER decreased from 0.7 to 0.2, but these values decreased less for FLU, i.e., from 0.99 to 0.8, at the drugs' total concentrations ranging from 2.5  $\mu$ M to 7.5  $\mu$ M. The *in-situ* parameters  $CL_h$  and  $CL_{int, h}$  were, respectively, calculated according to equations 8 and 9, after calculating the extraction ratios according to equation 7 for the four scenarios from values in Tables 5.A3 and 5.A4. The total  $CL_h$  and  $CL_{int, h}$  values were presented for PER in Table 5.3 and for FLU in Table 5.4, where the values of both parameters decreased with the increase of the drugs' total concentrations at the inlet. Interestingly, the total  $CL_h$  values for FLU approached the perfusion flow value

(i.e., 20 mL/min) in the WO and AGP scenarios, particularly at the lowest total concentrations of the drug (Table 5.4).

When compared to the WO scenario for PER (Table 5.3), the total CL<sub>h</sub> values decreased twofold to threefold for PER with ALB and MIX and less than twofold for PER with AGP. As for the CL<sub>int, h</sub> values when compared to those of the WO scenario (Table 5.3), the total CL<sub>int, h</sub> values decreased by tenfold for PER with ALB and MIX and between threefold to fivefold for PER with AGP. In Table 5.4 for FLU, the CL<sub>h</sub> values decreased when compared to the WO scenario, less than twofold with ALB, AGP and MIX. As for the CL<sub>int, h</sub> values decreased when compared to those of the WO scenario, between sixfold to a hundredfold for FLU with ALB and MIX and between twofold to tenfold for FLU with AGP.

The hepatic rates were calculated according to equation 10 for both drugs. And, the metabolic kinetics were obtained in Figures 5.3 and 5.4 from the mean rates values (n= 3 rats) *versus* the total drug concentrations measured at the outlet (i.e., the total concentration at equilibrium sampled from IPRL experiments). In Figures 5.3 and 5.4, the metabolic kinetics of PER and FLU at equilibrium were best fitted to the Michaelis-Menten model in all four scenarios. Overall, the rate values increased with the drugs' total concentrations measured at the outlet in the perfusate solutions. However, for PER in the AGP scenario, the kinetics observed did not seem to reach saturation at the concentrations used (i.e., 2.5 μM to 35 μM) and therefore were linear. Because of this linearity, no confidence can be bestowed on the estimated values of V<sub>max</sub> and K<sub>m</sub> in this condition.

For PER, the values of the Michaelis-Menten parameters differed across the scenarios and respectively as follows for WO, with ALB, and with MIX: V<sub>max</sub>= 90, 20.9 and 19.75 (nmol/min/g liver) and K<sub>m</sub>= 17, 20.8 and 18.24 (μM) (Figure 5.3 and Table 5.5). For the AGP scenario, accurate values of V<sub>max</sub> and K<sub>m</sub> could not be estimated since saturation was not observed, however these values were included in Table 5.5 for information. For this drug, the ratios V<sub>max</sub>/K<sub>m</sub> were (in mL/min/g liver): 5.29 (WO), 1.0 (ALB), 1.24 (AGP) and 1.08 (MIX). As for FLU, the estimated metabolic parameters for the scenarios WO, with ALB, with AGP and with MIX were respectively as follows: V<sub>max</sub>= 65.5, 18.83, 34.5 and 15.3 (nmol/min/g

liver) and  $K_m = 1.5, 2.40, 0.69$  and  $6.31$  ( $\mu\text{M}$ ) (Figure 5.4 and Table 5.6). The corresponding  $V_{\max}/K_m$  ratios were (in  $\text{mL}/\text{min}/\text{g}$  liver):  $43.67$  (WO);  $7.83$  (ALB);  $50$  (AGP) and  $2.42$  (MIX). Overall, the  $V_{\max}/K_m$  ratios of both drugs in the presence of either ALB, AGP or MIX were inferior compared to the WO scenario.

### 5.3.3. Protein-mediated uptake: extent of protein binding and hepatic metabolism

When the kinetics were evaluated by using the  $C_{\text{eq\_free}}$ , rather than  $C_{\text{eq\_total}}$ , all kinetics were nonlinear for PER and FLU without exception (Figures 5.5 and 5.6). From the Michaelis-Menten curves, the estimated metabolic parameters were presented in Tables 5.5 and 5.6 for the unbound concentrations of PER and FLU, respectively. Of course,  $V_{\max}$  values did not change using  $C_{\text{eq\_free}}$  for both drugs compared to those obtained for the  $C_{\text{eq\_total}}$ , with the exception of PER in the presence of AGP ( $V_{\max} = 86.1$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{g}$  liver) where it became saturated at a  $V_{\max}$  comparable to the WO scenario ( $V_{\max} = 90$   $\text{nmol}/\text{min}/\text{g}$  liver). When considering the free drug concentrations in IPRL, the unbound Michaelis constants for PER and FLU (i.e.,  $K_{m,u}$ ) were lower than  $K_m$  by a factor equivalent to the measured  $f_{u,p}$  in their corresponding scenarios.

Interestingly, all the unbound  $V_{\max}/K_{m,u}$  ratios in the presence of plasma proteins (but not the one for unbound PER with AGP) were increased up to twofold for PER and between fivefold to less than fifteenfold for FLU when compared to the unbound ratio of  $V_{\max}/K_m$  from WO. Hence, when comparing the kinetics of the IPRL scenarios with proteins to the scenario WO, the metabolic rates for both drugs were of higher values than those obtained from WO but particularly at the lowest free drug concentrations (i.e., free  $[\text{drug}]_{\text{eq}}$ ) (Figures 5.5 and 5.6). Visually, the dotted curves (in black) for PER (with ALB and MIX) and FLU (with ALB, AGP and MIX) surpassed the dashed lines from WO (in green). However, the dotted curve for unbound PER with AGP was lower than that from WO (Figure 5.5). Also, noteworthy, the rates observed in the presence of proteins at the highest drug concentrations were surprisingly inferior to the rates determined in WO (Figures 5.5 and 5.6), except for the IPRL scenario for PER where perfusate contained AGP since the rates in the presence of AGP were inferior to the WO for all unbound PER concentrations (Figure 5.5).

## 5.4. Discussion

### 5.4.1. Plasma protein binding and protein-mediated hepatic uptake

The PPB is known to have significant repercussions on the PK/TK of some drugs and contaminants (Toyama et al., 2014; Wanat, 2020). For ligands that are extensively bound in plasma, if any mild change in the PPB extent occurs, then it may have a great impact on their PK/TK, particularly on the hepatic uptake and CL<sub>h</sub> values (Barnaby & Bottacini, 2004; Liu et al., 2014). The ALB-mediated hepatic uptake can be considered as one of the phenomena related to PPB that violates 'the free drug hypothesis' (C. M. Bowman et al., 2019; Bteich et al., 2019; Fukuchi et al., 2017; Mayumi, Ohnishi, & Hasegawa, 2019; Poulin et al., 2016; Poulin, Kenny, et al., 2012). However, since the plasma proteins have different characteristics, the extent of binding of the same drug to ALB or AGP may differ. To date, it is not clear if extensive binding to other plasma proteins such as AGP also exerts a hepatic uptake facilitation and if this impact is greater or lesser than what is observed for ALB. The aim of this study was therefore to assess the difference in the impact of ALB and AGP binding of the same drug on their CL<sub>h</sub> values. The purpose was also to investigate if there was any hepatic uptake violating 'the free drug hypothesis' in the presence of AGP.

As previously mentioned, from the list of drug candidates that bind to both ALB and AGP, the two drugs PER and FLU were selected based, *inter alia*, on two main criteria 1) at low concentrations of the drug (i.e., therapeutic range), the  $R_{AGP:ALB}$  was close to the unity value and 2) their primary pathway of excretion is hepatic metabolism. To note that the %PPB of PER to MIX (containing ALB and AGP of the bovine species) varied between 90% and 95% which is very similar to that in human (Rogawski & Hanada, 2013). While the %PPB for FLU bound to MIX ranged from 98% to 99% which was also very close to the 94.5% in human plasma (FDA, 2017b). Furthermore, the total therapeutic concentrations ranged from 0.11  $\mu$ M to 0.96  $\mu$ M and from 0.043  $\mu$ M to 0.16  $\mu$ M for PER and FLU, respectively (see subsection 5.2.5.1). Using the  $B_{max}$  and  $K_D$  of the MIX binding scenario for each drug, the corresponding bound therapeutic concentrations were simulated according to equation 3 (with arbitrary  $C_{free}$  values). Then, the free therapeutic concentrations that were found to correspond to the total therapeutic concentrations mentioned above ranged from 0.01  $\mu$ M to 0.09  $\mu$ M for PER and from 0.0004  $\mu$ M to 0.0015  $\mu$ M for FLU.

The  $R_{AGP:ALB}$  is an apparent binding parameter because it was not possible to measure directly and with precision the bound fraction to each protein with the RED apparatus. When the drugs PER and FLU had  $R_{AGP:ALB}$  values that approached the value of unity at certain drug concentration levels, this should indicate that the drug bound moiety to AGP is equivalent to that bound to ALB. In Table 5.1, the only  $R_{AGP:ALB}$  value that was close to the unity was observed for 2.5  $\mu\text{M}$  of PER. Whereas, at higher drug concentrations, the  $R_{AGP:ALB}$  became lower than unity. This suggests that the AGP in the red chambers (i.e., fourth RED scenario) was having its binding site(s) saturated at given drug concentrations which consequently has led to a displacement towards the white chamber containing ALB. The  $R_{AGP:ALB}$  values for PER, suggest that, at concentrations higher than 2.5  $\mu\text{M}$ , binding to ALB predominated in the same medium. In Table 5.2, the  $R_{AGP:ALB}$  values for FLU revolved around a mean value of 1.26 for drug concentrations ranging from 2.5  $\mu\text{M}$  to 35  $\mu\text{M}$ . This means that the binding to AGP was not easily saturated since the bound concentrations were less than  $B_{\text{max}} = 21.50 \mu\text{M}$  for the range of FLU concentrations. Also, the affinity coefficient to AGP was high, which means that the FLU may not have dissociated easily from the AGP's binding site(s). Conversely, more FLU molecules were bound to AGP and less diffusing across the insert membrane to bind to ALB and attain an equilibrium. Thus, the AGP protein may have had a predominant role in binding FLU compared to ALB, when the two proteins were in the same insert.

Although the  $R_{AGP:ALB}$  values that were observed at the lowest drug concentrations using the RED apparatus were close to unity (Tables 5.1 and 5.2), the bound fraction values (i.e.,  $f_{\text{bound}} = 1 - f_{\text{up}}$ ) for PER and FLU from the ALB, AGP and MIX scenarios were different. Knowing that these two drugs are highly bound to the plasma proteins in physiological conditions, it would be expected that, for a total drug concentration of 2.5  $\mu\text{M}$ , the ratios of  $f_{\text{bound}}$  (i.e.,  $f_{\text{bound}} = 1 - f_{\text{up}}$ ) from the RED scenarios one and two ( $1 - f_{\text{up,AGP}} : 1 - f_{\text{up,ALB}}$ ) would be also close to the unity, i.e., similar to  $R_{AGP:ALB}$ . This was not the case neither for PER ( $f_{\text{bound,AGP}} : f_{\text{bound,ALB}} = 0.63$ ) nor for FLU ( $f_{\text{bound,AGP}} : f_{\text{bound,ALB}} = 0.88$ ). Therefore, when using the measured binding kinetic parameters (i.e.,  $B_{\text{max}}$  and  $K_D$ ) for AGP and ALB,  $R_{AGP:ALB}$  is estimated to be 0.63 for PER and 0.88 for FLU indicating a higher binding to the ALB compared to AGP binding, which relatively differs from the  $R_{AGP:ALB}$  values that were directly measured in the scenario four using the RED



apparatus (Tables 5.1 and 5.2). So far, we do not have an explanation for this discrepancy, and we need to explore this further.

The RED apparatus is probably not the best assay test to determine the exact  $R_{AGP:ALB}$  values for two reasons. First, the inserts' membrane that forms the red chamber prevented the direct interactions between ALB and AGP, therefore it does not necessarily reflect if there were any interactions occurring in MIX in IPRL. Second, for the fourth scenario, measuring the total drug concentrations (i.e.,  $C_{total\_AGP}$  and  $C_{total\_ALB}$ ) at equilibrium in both chambers gave an apparent ratio  $R_{AGP:ALB}$  from which we can estimate the bound drug concentration to each protein when AGP and ALB are found in the same medium.

According to many reviews, the IPRL apparatus could be used as a proxy for the *in vivo* due to its many advantages (Bessemers et al., 2006; D, 1987; Godoy et al., 2013; Gores, Kost, & LaRusso, 1986; Haddad et al., 2010; Sahin & Rowland, 1998). Furthermore, Sodhi et al. (2020) concluded that the well-stirred model is the only model that can describe experimental perfusion data for highly cleared drugs (i.e., IPRL). Thus, in this study, an anterograde IPRL system was used to obtain the  $C_{eq}$  and then calculate the metabolic rates when equilibrium was reached according to the equations 7 to 10 which would fit a well-stirred model. In the rat liver, the observed range of hepatic extraction values was between 0.2 to 0.7 for PER, depending on the tested drug concentration. Hence, PER is considered a poorly to moderately metabolized drug (Derendorf et al., 2020a; Gabrielsson & Weiner, 2016). Whereas, FLU is found to be an extensively metabolized drug in the rat liver, since the range of hepatic extraction varied between 0.8 to 0.99 (Derendorf et al., 2020a; Gabrielsson & Weiner, 2016). This was confirmed in this present study since similar extraction ratios were observed. Except for the kinetics of PER with the AGP scenario, all kinetics could be presented as rates *versus* total drug concentrations of PER and FLU which were best fitted with a Michaelis-Menten model.

The presence of plasma proteins reduced the hepatic clearance of both drugs (Figures 5.3 and 5.4). This explains why in Tables 5.5 and 5.6, the  $V_{max}/K_m$  ratios which are equivalent to the  $CL_{int, h}$  at total drug concentrations  $\ll K_m$ , decreased for both PER and FLU in the presence of ALB, AGP and MIX compared to the WO scenario. However, when examining the unbound  $CL_{int, u}$  that were estimated from the

nonlinear kinetics *versus* the drugs' free concentrations (Figures 5.5 and 5.6), the rates in the presence of plasma proteins at the lowest free drug concentrations exceeded the rates for the WO scenario at the same free drug concentrations, with the exception of PER in the AGP scenario which has a lower unbound  $CL_{int, u}$  at all drug concentrations tested. Thus, a protein-mediated uptake in the low free drug concentrations range  $\ll K_{m, u}$  (i.e., including the therapeutic concentrations (Rogawski & Hanada, 2013)) may have occurred for FLU (with ALB and MIX) and to a lesser extent PER (with ALB, AGP, and MIX). Hence, the unbound  $V_{max}/K_{m, u}$  ratios which represented the values of unbound  $CL_{int, u}$  when the free drug concentrations  $\ll K_{m, u}$  exceeded that from the WO. This observation suggests an enhanced hepatic uptake. This was also observed even when the free  $[FLU]_{eq}$  was more than fivefold higher than the unbound  $K_{m, u}$ .

In the same perspective, the unbound  $CL_{int, u}$  was also calculated from  $V_{max}$  and unbound  $K_{m, u}$  for each drug concentration and protein scenario, and they were presented in the appendices section (Tables 5.A1 and 5.A2). The increase in the values of unbound  $CL_{int, u}$  for PER and FLU in the presence of plasma proteins should be considered as an evidence of the observed protein-mediated hepatic uptake. Interestingly in this study, an AGP-facilitated hepatic uptake was observed for the FLU that had a high affinity even with an AGP concentration of 1 g/L that was forty times lesser than the ALB concentration. However, this enhanced uptake was not observed for all scenarios that contained the plasma proteins. In this case, this was not possible for PER with AGP (i.e., the unbound  $CL_{int, u}$  had lower values instead); this is maybe because the PER showed the highest dissociation constant  $K_D$  in the presence of AGP, as reported earlier in the results. Hence, its greater ability to dissociate of the AGP may not have conserved a protein-drug complex to potentially interact significantly with the hepatocyte membrane. The latter means that even if the low  $f_{up}$  values indicate a high protein binding of PER to AGP, it did not nonetheless increase the hepatic uptake and the unbound  $CL_{int, u}$ .

Our observations also suggest that surprisingly the unbound  $CL_{int, u}$  values of both drugs decrease at the highest drugs' concentrations in the perfusate with the addition of ALB and AGP compared to WO. We do not have an explanation. However, it might be that these two drugs are bound to low capacity/high

affinity binding site on the plasma proteins; hence, at the highest drugs' concentrations, there may have been a displacement of the drugs to other binding sites for which there is less interactions with the hepatic membrane for lower mediated uptake. Another explanation could be that at the highest drug concentrations, such drug concentrations may cause a change in the allosteric conformation of the ALB and AGP for potentially lower interactions with the hepatic membrane.

In this context, based on Bteich et al. (2019), many molecular interactions may cause a protein-mediated uptake (i.e., protein-lipid and protein-protein interactions, and changes in plasma proteins' conformations). Nonetheless, according to the data available at present, PER and FLU do not undergo any known transport or efflux, and both are eliminated primarily by the liver. Therefore, the molecular interactions that might have been behind the plasma protein-facilitated hepatic uptake would be the plasma protein-phospholipids interactions, the protein-drug complex allosteric interactions and/or the plasma protein-receptor internalization.

#### **5.4.2. Impact of plasma proteins on the hepatic uptake and unbound clearances**

The free drug hypothesis that promotes the use of  $C_{free}$  which is thought to be the only fraction of drug that is available for diffusion across biomembranes and which is directly related to *in vivo* efficacy has been widely accepted for a few decades (Brodie et al., 1960). However, in an effort to explain the violations of 'the free drug hypothesis', many other hypotheses were suggested to promote the role of extracellular ALB in enhancing the hepatic uptake and CL<sub>h</sub> from the dissociation of the ALB-drug complexes near the hepatic plasma membrane (C. M. Bowman & Benet, 2018; Bteich et al., 2019; Poulin et al., 2016).

The current state of knowledge is that there is no known transporter activity for both drugs. Therefore, the recent hypothesis called 'the transporter-induced protein-binding shift' (TIPBS) was excluded in this study as an interpretation of the increases in rates and unbound CL<sub>int, u</sub> at very low concentrations of the drug (Baik & Huang, 2015; C. M. Bowman et al., 2019). However, the activity of membrane transporters should be further explored for these two drugs to investigate if any transporter is significantly implicated in the hepatic uptake. In the future, if it is demonstrated that membrane proteins are implicated in the transport

either PER or FLU into hepatocytes, many studies have covered how to address the enzyme/transporter interplay along with extensive protein binding (C. M. Bowman et al., 2019; Kimoto et al., 2018; Miyauchi et al., 2018).

For now, three hypotheses may explain this mediated uptake in the presence of ALB and AGP. First, the electrostatic attractions between the plasma proteins and the zwitterionic phospholipids which might have reduced the diffusional distance for the drugs (i.e., PER and FLU). Second, the plasma protein-phospholipids that might have induced the dissociation of protein-ligand complexes and may have freed more drugs, hence increasing uptake (i.e., PER and FLU). Third, the plasma protein-drug complexes might have interacted with a membrane receptor and then internalized in endosomes into hepatocytes for degradation or recycling. According to Taguchi, Nishi, Giam Chuang, Maruyama, and Otagiri (2013b), ASGP-R does not contribute to the drug's uptake. Free xenobiotics can only be taken by hepatocytes after the complex AGP-drug dissociates prior to the AGP's endocytosis. Conversely, covalently linked xenobiotics to AGP may possibly internalize with the protein and be subjected to lysosomal action (D. K. Meijer & van der Sluijs, 1989). We emphasize that studies at the molecular level should follow to elucidate which are the mechanisms occurring for each of the plasma protein-drug complexes in the liver. The latter data can be combined to the PK/TK data (this study) to build a better understanding of the plasma protein-mediated hepatic uptake and to improve the predictive performances in PK/TK modeling.

Interestingly, in the present study, the hepatic uptake and the unbound  $CL_{int, u}$  were increased not just in the presence of ALB, but also in the presence of AGP compared to those from the WO scenario. However, the role of ALB in the metabolic kinetics predominated over that of AGP even for FLU (i.e., with  $R_{AGP: ALB}$  slightly greater than the unity). When the two plasma proteins were in MIX, the kinetics were similar to those found for both drugs with ALB alone. This predominance in metabolic kinetics would grant the ALB molecules the lead role in influencing the hepatic uptake and unbound clearances. To note that for PER, the ALB-mediated hepatic uptake seems to be less important than that observed for FLU. It is the case probably because PER has a high  $K_D$  value and FLU has a smaller  $K_D$  value (the dissociation from ALB makes the complex ALB-drug may occur even before the complex interacts with the plasma, thus the contributions of the complex for a protein-mediated hepatic uptake may become less important).

The extracellular ALB and AGP can obviously impact the hepatic uptake of PER and FLU. For drugs that have little binding preference between ALB and AGP, the contribution of AGP in a mediated uptake appears to be less important than that of ALB. There would be lesser interactions between AGP and plasma membrane for many reasons. AGP is a heterogeneous glycoprotein (with/without the sialic acids), however, the glycation or changes in the net charge were not considered in this study. AGP has lower plasma concentrations than ALB which would make saturation of its site easily attainable. Finally, AGP has a smaller molecular size and lesser peptide domains with fewer positively charged residues on its surface (Bteich, 2019). As mentioned, the dissociation constant  $K_D$  of a drug bound to ALB *versus* AGP may have also played a role influencing the extent of molecular interactions between the protein-drug complex and the hepatocyte membrane.

Finally, the intracellular drug concentrations were not measured to capture with precision how much the presence of ALB and AGP may influence the uptake and extent in intracellular free concentrations. However, the drug's concentration measurement was strictly for the extracellular drug exiting the liver and it was for the calculations of the PK/TK parameters. Only the macroscopic observations of the liver were made and IPRL settings were controlled to ensure successful perfusions. The portal vein pressure was monitored, and its value *in situ* was acceptable (15-30 mmHg) in twenty experiments (i.e., close to the *in vivo* value of 10 mmHg), but it was high ( $\geq 50$  mmHg) at the end of experiments in four out of the 24 IPRL experiments which may have implicated the formation of an edema or cell injury. Henceforth, we recommend histology of hepatocytes and biochemical studies during the IPRL experiments (with controlled settings) to observe if there was any mitochondrial, hepatocytes or endothelial cells injury (Ferrigno, Richelmi, & Vairetti, 2013).

## 5.5. Conclusion

In conclusion, the plasma protein-mediated hepatic uptake was documented for PER (with ALB and MIX) and for FLU (with ALB, AGP and MIX) where a potential dissociation of the drug from the protein-drug complex may have increased the hepatic uptake and the unbound  $CL_{int, u}$ , particularly at the lowest drug concentrations range (i.e., therapeutic range). However, for PER with AGP, no mediated hepatic

uptake can be suspected, since the unbound  $CL_{int, u}$  values that were observed in this IPRL scenario were lower than those found in WO. Accordingly, this study is the first to demonstrate that the unbound  $CL_{int, u}$  can also become lower in the presence of these proteins compared to WO as seen for PER with AGP, as well as for PER and FLU in the presence of ALB, AGP and MIX at the highest drug concentrations. In general, ALB had a predominant role in the metabolic kinetics when both proteins (ALB and AGP) were in MIX even for FLU where the  $R_{AGP:ALB}$  that was derived from the RED apparatus was slightly higher than the unity (i.e., AGP had supposedly predominant role in the binding kinetics when AGP and ALB were in the same medium but other calculations from  $B_{max}$  and  $K_D$  suggested that ALB showed the predominant binding for both drugs). As a future perspective, the binding and metabolic data will help us come closer to understand the interplay between the binding and metabolism of a drug, and to develop novel *in vitro-to-in vivo* extrapolation models for drugs that bind extensively to both AGP and ALB to a similar extent.

**Disclosure Statement**

The authors report no conflicts of interest.

## **Tables captions**

**Table 5.1. Measured unbound fraction and binding ratios for perampanel that were determined in the RED experiment.**

**Table 5.2. Measured unbound fraction and binding ratios for fluoxetine that were determined in the RED experiment.**

**Table 5.3. Mean values of total clearances and unbound intrinsic clearance for perampanel obtained from IPRL.**

**Table 5.4. Mean values of total clearances and unbound intrinsic clearance for fluoxetine obtained from IPRL.**

**Table 5.5. Metabolic parameters for perampanel based on the results in Figures 5.3 and 5.5.**

**Table 5.6. Metabolic parameters for fluoxetine based on the results in Figures 5.4 and 5.6.**



## Figures captions

### Figure 5.1. Nonlinear binding kinetics for perampanel: Bound [PER] versus Free [PER].

The bound and free PER concentrations were obtained from RED assays at equilibrium. The drug PER binding kinetics were presented with ALB (red squares); with AGP (blue squares); and with MIX (yellow squares). Fitting to the 'Single ligand model' for PER was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019 (dashed curves). *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **B<sub>max</sub>** maximal binding; **[PER]** concentration of perampanel; **K<sub>D</sub>** dissociation coefficient; **MIX** mixture.

### Figure 5.2. Nonlinear binding kinetics for fluoxetine: Bound [FLU] versus Free [FLU].

The bound and free FLU concentrations were obtained from RED assays at equilibrium. The drug FLU binding kinetics were presented with ALB (red squares); with AGP (blue squares); and with MIX (yellow squares). Fitting to the 'Single ligand model' for FLU was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019 (dashed curves). *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **B<sub>max</sub>** maximal binding; **[FLU]** concentration of fluoxetine; **K<sub>D</sub>** dissociation coefficient; **MIX** mixture.

### Figure 5.3. Nonlinear metabolic kinetics for perampanel: Rate versus Total [PER]<sub>eq</sub>.

The metabolic kinetics were obtained from the mean rates values (n=3 rats) versus the total PER concentrations measured at the outlet (i.e., the perfusate) without plasma proteins (WO) (green circles); with ALB (40 g/L) (red circles); with AGP (1 g/L) (blue circles); and with MIX of ALB (40 g/L) and AGP (1g/L) (yellow circles). Fitting of *in situ* data to the 'Michaelis-Menten model' for PER was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019 (black dashed curves). *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **K<sub>m</sub>** Michaelis constant; **MIX** mixture; **Total [PER]<sub>eq</sub>** total concentration of perampanel at equilibrium; **WO** without plasma proteins; **V<sub>max</sub>** maximum rate of enzymatic activity.

### Figure 5.4. Nonlinear metabolic kinetics for fluoxetine: Rate versus Total [FLU]<sub>eq</sub>.

The metabolic kinetics were obtained from the mean rates values (n=3 rats) versus the total FLU concentrations measured at the outlet (i.e., the perfusate) without plasma proteins (WO) (green circles); with ALB (40 g/L) (red circles); with AGP (1 g/L) (blue circles); and with MIX of ALB (40 g/L) and AGP (1g/L) (yellow circles). Fitting of *in situ* data to the 'Michaelis-Menten model' for FLU was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019 (black dashed curves). *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **K<sub>m</sub>** Michaelis constant; **MIX** mixture; **Total [FLU]<sub>eq</sub>** total concentration of fluoxetine at equilibrium; **WO** without plasma proteins; **V<sub>max</sub>** maximum rate of enzymatic activity.

**Figure 5.5. Nonlinear metabolic kinetics for perampanel: Rate versus Free [PER]<sub>eq</sub>.**

The metabolic kinetics (n= 3 rats) for the free drug PER in the perfusate were presented with ALB (40 g/L) (red circles); with AGP (1 g/L) (blue circles); and with MIX of ALB (40 g/L) and AGP (1g/L) (yellow circles). Black dotted curves were from fitting the *in-situ* data to the 'Michaelis-Menten model' for free [PER]<sub>eq</sub> which was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019. Green dashed curves were obtained using  $V_{max}$  and  $K_m$  values from the WO scenario. *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **MIX** mixture; **Free [PER]<sub>eq</sub>** free concentration of perampanel at equilibrium; **WO** without plasma proteins.

**Figure 5.6. Nonlinear metabolic kinetics for fluoxetine: Rate versus Free [FLU]<sub>eq</sub>.**

The metabolic kinetics (n= 3 rats) for the free drug FLU in the perfusate were presented with ALB (40 g/L) (red circles); with AGP (1 g/L) (blue circles); and with MIX of ALB (40 g/L) and AGP (1g/L) (yellow circles). Black dotted curves were from fitting the *in-situ* data to the 'Michaelis-Menten model' for free [FLU]<sub>eq</sub> which was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019. Green dashed curves were obtained using  $V_{max}$ , and  $K_m$  values from the WO scenario. *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **Free [FLU]<sub>eq</sub>** free concentration of fluoxetine at equilibrium; **MIX** mixture; **WO** without plasma proteins.

## Tables

**Table 5.1. Measured unbound fraction and binding ratios for perampanel that were determined in the RED experiment.**

Concentration ( $\mu\text{M}$ )	$f_{u_p}$ (with ALB)	$f_{u_p}$ (with AGP)	$f_{u_p}$ (with MIX)	$R_{\text{AGP: ALB}}$
2.5	0.08	0.42	0.05	0.95
7.5	0.13	0.53	0.10	0.67
15	0.13	0.71	0.10	0.51
20	0.13	0.65	0.11	0.46
25	0.13	0.65	0.12	0.35
35	0.16	0.88	0.12	0.33

**Table 5.2. Measured unbound fraction and binding ratios for fluoxetine that were determined in the RED experiment.**

Concentration ( $\mu\text{M}$ )	$f_{u_p}$ (with ALB)	$f_{u_p}$ (with AGP)	$f_{u_p}$ (with MIX)	$R_{\text{AGP: ALB}}$
2.5	0.008	0.13	0.009	1.25
7.5	0.009	0.17	0.022	1.33
15	0.012	0.25	0.029	0.92*
20	0.017	0.29	0.044	1.42
25	0.017	0.30	0.031	1.32
35	0.018	0.33	0.023	1.34

\* This  $R_{\text{AGP: ALB}}$  value was 26% different from the mean value (1.26).

**Table 5.3. Mean values of total clearances and unbound intrinsic clearance for perampanel obtained from IPRL.**

Total drug concentration in perfusate at inlet ( $\mu\text{M}$ )	WO		ALB				AGP				MIX			
	CLh	CL <sub>int, h</sub>	CLh	CL <sub>int, h</sub>	CL <sub>int, u</sub>	f <sub>u,p</sub> <sup>c</sup>	CLh	CL <sub>int, h</sub>	CL <sub>int, u</sub>	f <sub>u,p</sub> <sup>c</sup>	CLh	CL <sub>int, h</sub>	CL <sub>int, u</sub>	f <sub>u,p</sub> <sup>c</sup>
	(mL/min) a	(mL/min/g liver) <sup>a</sup>	(mL/min) a	(mL/min/g liver) <sup>a</sup>	(mL/min/g liver) <sup>b</sup>		(mL/min) a	(mL/min/g liver) <sup>a</sup>	(mL/min/g liver) <sup>b</sup>		(mL/min) a	(mL/min/g liver) <sup>a</sup>	(mL/min/g liver) <sup>b</sup>	
<b>2.5</b>	16.30	7.54	5.81	0.62	5.78	0.11	8.79	1.11	2.18	0.51	8.46	1.36	14.57	0.09
<b>7.5</b>	16.06	7.12	7.40	0.87	7.71	0.11	10.24	1.30	2.32	0.56	6.80	0.81	8.41	0.10
<b>15</b>	15.99	7.61	7.00	0.78	6.35	0.12	10.74	1.45	2.34	0.62	6.40	0.73	7.11	0.10
<b>20</b>	13.44	4.44	5.40	0.53	4.00	0.13	9.70	1.17	1.74	0.67	5.59	0.60	5.60	0.11
<b>25</b>	13.15	3.38	4.94	0.47	3.29	0.14	9.58	1.15	1.63	0.70	4.56	0.46	4.00	0.11
<b>35</b>	14.70	4.47	4.85	0.46	2.81	0.16	10.11	1.28	1.73	0.74	4.63	0.47	3.82	0.12

Abbreviations: **AGP** alpha-1-acid glycoprotein, **ALB** albumin, **MIX** mixture, **CLh** hepatic clearance, **CL<sub>int, h</sub>** hepatic intrinsic clearance, **WO** without plasma proteins.

<sup>a</sup>. The CLh and CL<sub>int, h</sub> values were calculated according to equations 8 and 9, respectively.

<sup>b</sup>. The CL<sub>int, u</sub> values were calculated according to the following equation: CL<sub>int, u</sub> = CL<sub>int, h</sub> / f<sub>u,p</sub> (mL/min) for each scenario with plasma proteins.

<sup>c</sup>. The equation 3 was applied using the parameters B<sub>max</sub>, K<sub>D</sub> (Figure 5.1) and arbitrary values C<sub>eq, free</sub> (from 0 to 35  $\mu\text{M}$ ) to simulate the C<sub>bound</sub> values for each scenario with plasma proteins. Then the C<sub>eq, total</sub> and the f<sub>u,p</sub> values were calculated according to equation 2 and 1, respectively. Then, only the f<sub>u,p</sub> values for which the calculated C<sub>eq, total</sub> matched the measured C<sub>eq, total</sub> from IPRL experiments are presented here.

**Table 5.4. Mean values of total clearances and unbound intrinsic clearance for fluoxetine obtained from IPRL.**

Total drug concentration in perfusate at inlet ( $\mu\text{M}$ )	WO		ALB				AGP				MIX			
	CLh	CL <sub>int, h</sub>	CLh	CL <sub>int, h</sub>	CL <sub>int, u</sub>	f <sub>u,p</sub> <sup>c</sup>	CLh	CL <sub>int, h</sub>	CL <sub>int, u</sub>	f <sub>u,p</sub> <sup>c</sup>	CLh	CL <sub>int, h</sub>	CL <sub>int, u</sub>	f <sub>u,p</sub> <sup>c</sup>
	(mL/min) a	(mL/min/g liver) <sup>a</sup>	(mL/min) a	(mL/min/g liver) <sup>a</sup>	(mL/min/g liver) <sup>b</sup>		(mL/min) a	(mL/min/g liver) <sup>a</sup>	(mL/min/g liver) <sup>b</sup>		(mL/min) a	(mL/min/g liver) <sup>a</sup>	(mL/min/g liver) <sup>b</sup>	
<b>2.5</b>	19.37	44.89	16.93	10.88	856.71	0.013	19.32	39.99	198.98	0.20	16.06	7.71	820.23	0.009
<b>7.5</b>	19.79	145.20	15.33	7.02	548.49	0.013	19.64	245.79	1219.80	0.20	13.11	3.16	309.42	0.010
<b>15</b>	19.14	115.03	12.08	2.58	195.12	0.013	18.83	43.79	212.23	0.21	9.80	1.09	83.88	0.013
<b>20</b>	18.95	55.24	12.55	2.46	183.51	0.013	17.99	15.69	73.59	0.21	8.70	0.87	54.14	0.016
<b>25</b>	18.43	54.82	10.49	1.54	110.56	0.014	16.92	7.62	33.64	0.23	6.93	0.60	26.26	0.023
<b>35</b>	18.32	42.07	7.10	0.80	52.31	0.015	15.19	5.02	19.18	0.26	7.69	0.71	16.33	0.043

Abbreviations: **AGP** alpha-1-acid glycoprotein, **ALB** albumin, **MIX** mixture, **CLh** hepatic clearance, **CL<sub>int, h</sub>** hepatic intrinsic clearance, **WO** without plasma proteins.

<sup>a</sup>. The CLh and CL<sub>int, h</sub> values were calculated according to equations 8 and 9, respectively.

<sup>b</sup>. The CL<sub>int, u</sub> values were calculated according to the following equation: CL<sub>int, u</sub> = CL<sub>int, h</sub> / f<sub>u,p</sub> (mL/min) for each scenario with plasma proteins.

<sup>c</sup>. The equation 3 was applied using the parameters B<sub>max</sub>, K<sub>D</sub> (Figure 5.2) and arbitrary values C<sub>eq, free</sub> (from 0 to 35  $\mu\text{M}$ ) to simulate the C<sub>bound</sub> values for each scenario with plasma proteins. Then the C<sub>eq, total</sub> and the f<sub>u,p</sub> values were calculated according to equation 2 and 1, respectively. Then, only the f<sub>u,p</sub> values for which the calculated C<sub>eq, total</sub> matched the measured C<sub>eq, total</sub> from the IPRL experiments are presented here.

**Table 5.5. Metabolic parameters for perampanel based on the results in Figures 5.3 and 5.5.**

IPRL scenario	Rate versus Free [PER] <sub>eq</sub>			Rate versus Total [PER] <sub>eq</sub>		
	V <sub>max</sub> (nmol/min/g liver)	K <sub>m, u</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m, u</sub> (mL/min/g liver)	V <sub>max</sub> (nmol/min/g liver)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (mL/min/g liver)
WO	90 (± 66.4)	17 (± 18.1)	5.3	90 (± 66.4)	17 (± 18.1)	5.3
ALB	16.4 (± 1.8)	1.7 (± 0.5)	9.7	20.9 (± 3.7)	20.8 (± 6.8)	1.0
AGP	86.1 (± 38.3)	38.3 (± 21.9)	2.3	1152.3* (± 8131)	926.5* (± 6650)	1.24
MIX	16.9 (± 3.4)	1.4 (± 0.7)	12	19.8 (± 5.5)	18.2 (± 9.9)	1.08

Abbreviations: K<sub>m</sub> Michaelis constant for the total drug; K<sub>m, u</sub> Michaelis constant for the free drug; V<sub>max</sub> maximum rate of enzymatic activity. The standard error values for V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> and K<sub>m, u</sub> are provided between parenthesis.

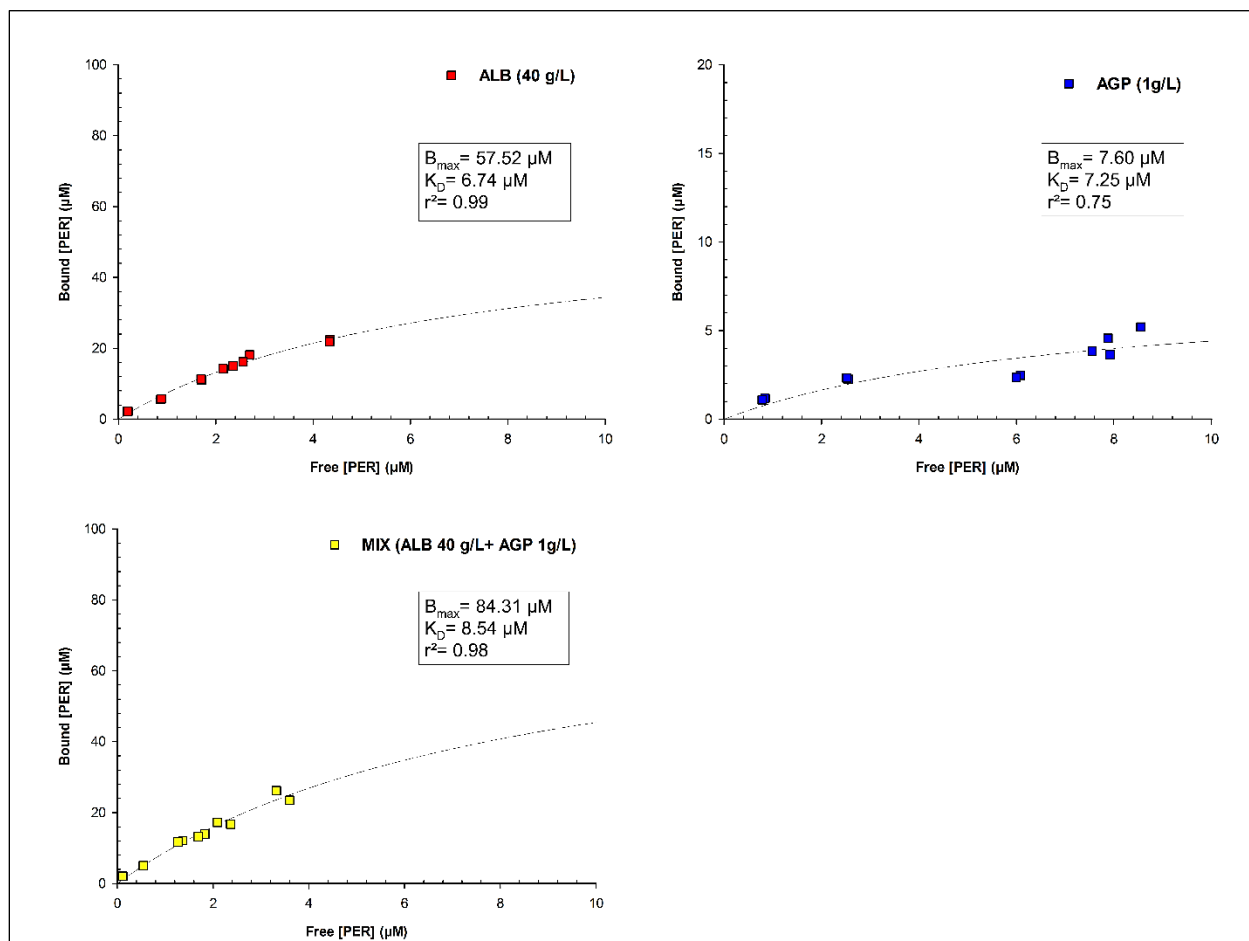
\* Estimates are not conclusive since no saturation was observed.

**Table 5.6. Metabolic parameters for fluoxetine based on the results in Figures 5.4 and 5.6.**

IPRL scenario	Rate versus Free [FLU] <sub>eq</sub>			Rate versus Total [FLU] <sub>eq</sub>		
	V <sub>max</sub> (nmol/min/g liver)	K <sub>m, u</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m, u</sub> (mL/min/g liver)	V <sub>max</sub> (nmol/min/g liver)	K <sub>m</sub> (μM)	V <sub>max</sub> /K <sub>m</sub> (mL/min/g liver)
WO	65.5 (± 11.6)	1.5 (± 0.6)	43.7	65.5 (± 11.6)	1.5 (± 0.6)	43.7
ALB	18.5 (± 1.7)	0.03 (± 0.01)	616.7	18.8 (± 1.9)	2.4 (± 0.9)	7.8
AGP	33.8 (± 1.7)	0.14 (± 0.03)	241.4	34.5 (± 1.8)	0.69 (± 0.2)	50
MIX	12.2 (± 1.0)	0.046 (± 0.02)	265.2	15.3 (± 2.34)	6.3 (± 2.6)	2.4

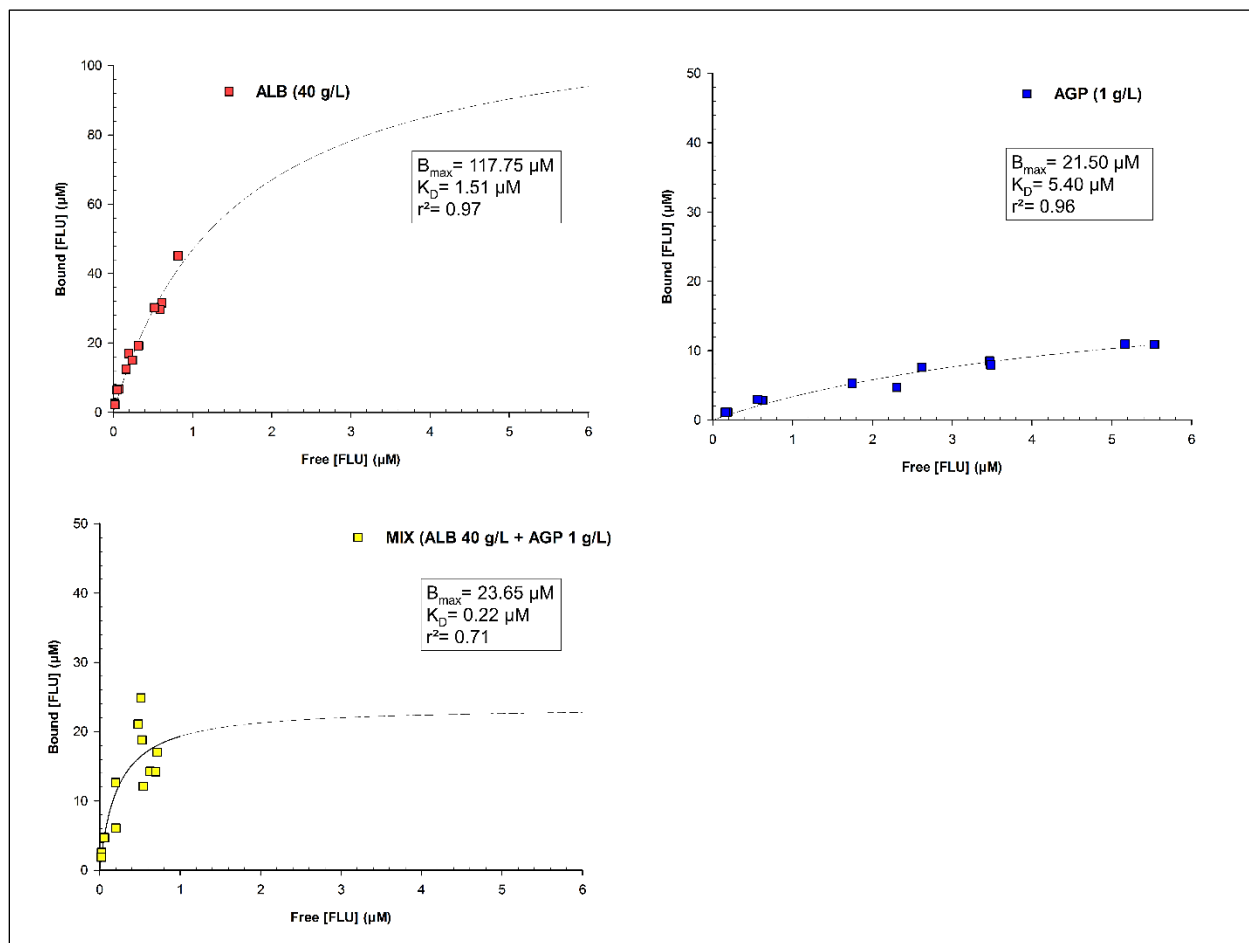
Abbreviations: K<sub>m</sub> Michaelis constant for the total drug; K<sub>m, u</sub> Michaelis constant for the free drug; V<sub>max</sub> maximum rate of enzymatic activity. The standard error values for V<sub>max</sub>, K<sub>m</sub> and K<sub>m, u</sub> are provided between parenthesis.

## Figures



**Figure 5.1. Nonlinear binding kinetics for perampanel: Bound [PER] versus Free [PER].**

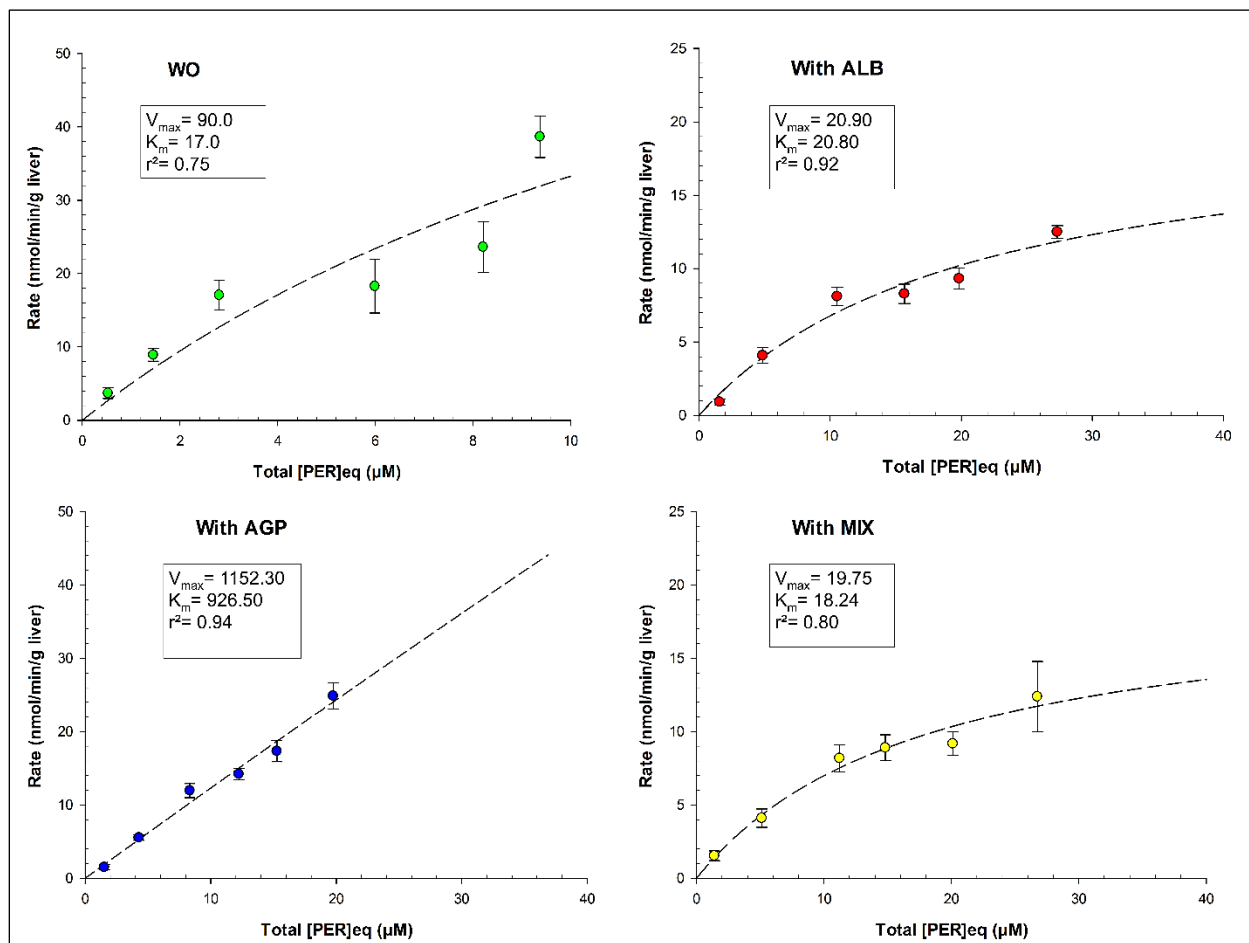
The bound and free PER concentrations were obtained from RED assays at equilibrium. The drug PER binding kinetics were presented with ALB (red squares); with AGP (blue squares); and with MIX (yellow squares). Fitting to the 'Single ligand model' for PER was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019 (dashed curves). *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein;  **$B_{max}$**  maximal binding; **[PER]** concentration of perampanel;  **$K_D$**  dissociation coefficient; **MIX** mixture.



**Figure 5.2. Nonlinear binding kinetics for fluoxetine: Bound [FLU] versus Free [FLU].**

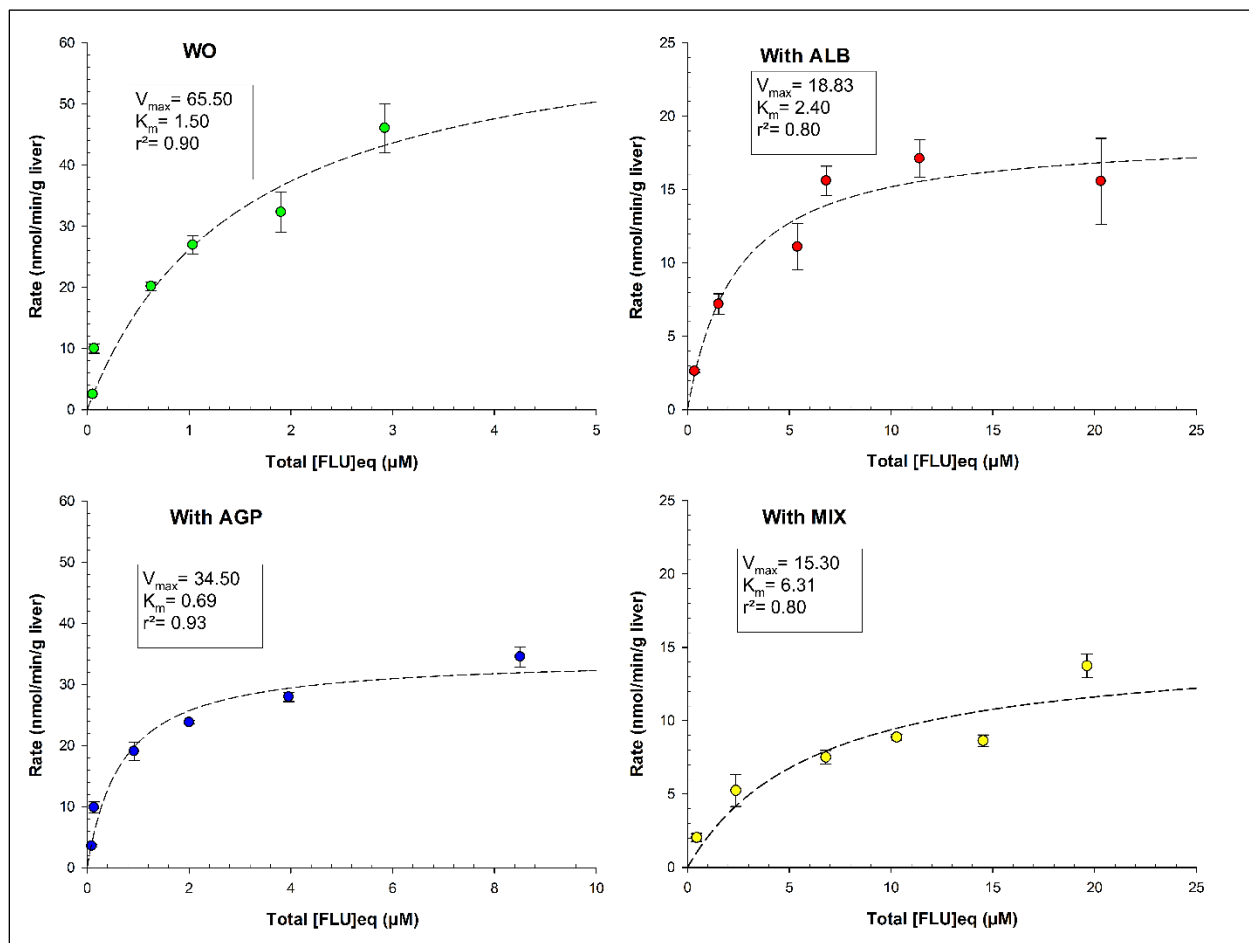
The bound and free FLU concentrations were obtained from RED assays at equilibrium. The drug FLU binding kinetics were presented with ALB (red squares); with AGP (blue squares); and with MIX (yellow squares). Fitting to the 'Single ligand model' for FLU was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019 (dashed curves). *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **B<sub>max</sub>** maximal binding; **[FLU]** concentration of fluoxetine; **K<sub>D</sub>** dissociation coefficient; **MIX** mixture.





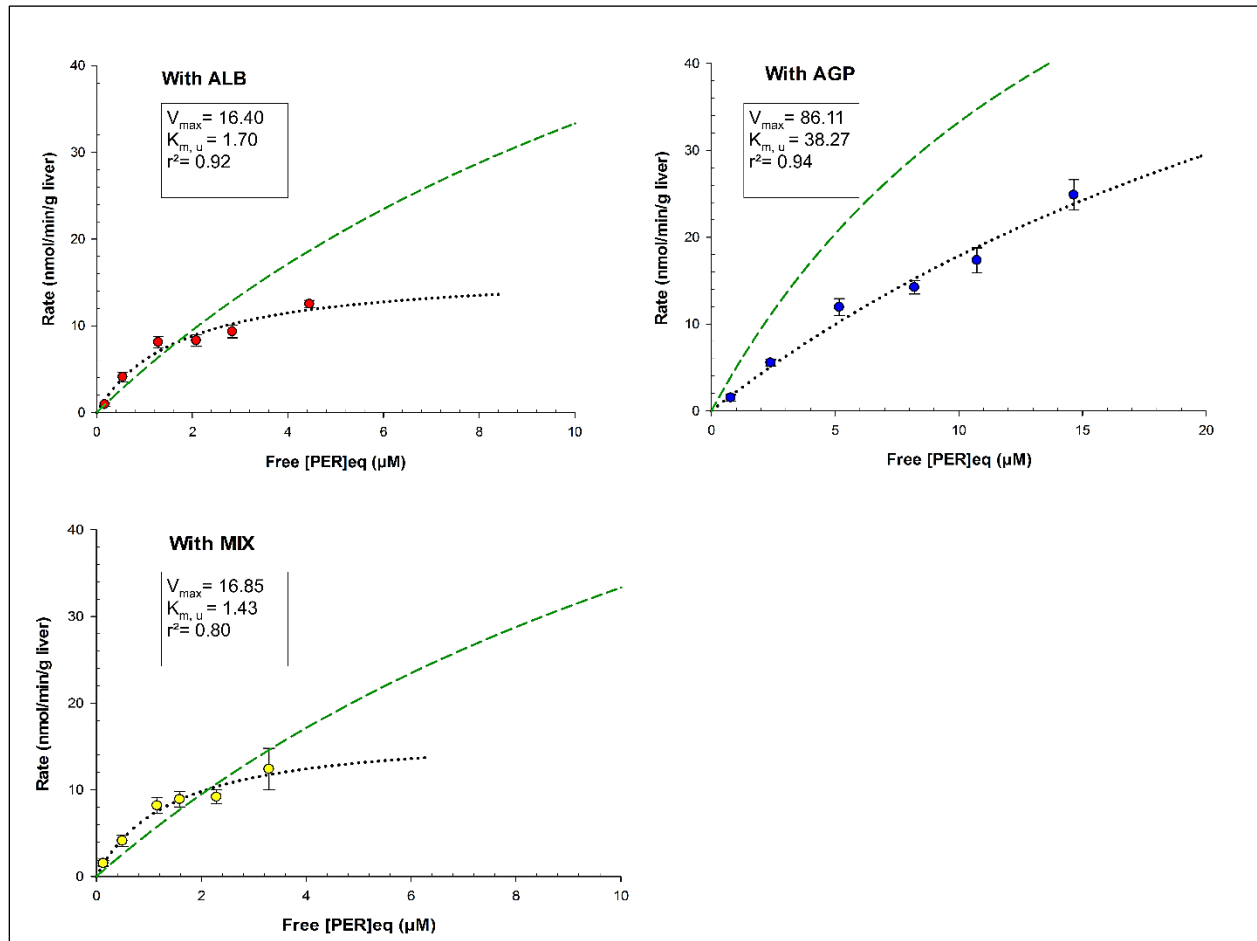
**Figure 5.3. Nonlinear metabolic kinetics for perampanel: Rate versus Total [PER]<sub>eq</sub>.**

The metabolic kinetics were obtained from the mean rates values (n=3 rats) versus the total PER concentrations measured at the outlet (i.e., the perfusate) without plasma proteins (WO) (green circles); with ALB (40 g/L) (red circles); with AGP (1 g/L) (blue circles); and with MIX of ALB (40 g/L) and AGP (1g/L) (yellow circles). Fitting of *in situ* data to the 'Michaelis-Menten model' for PER was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019 (black dashed curves). *Abbreviations:* ALB albumin; AGP alpha-1-acid glycoprotein;  $K_m$  Michaelis constant; MIX mixture; Total [PER]<sub>eq</sub> total concentration of perampanel at equilibrium;  $V_{max}$  maximum rate of enzymatic activity.



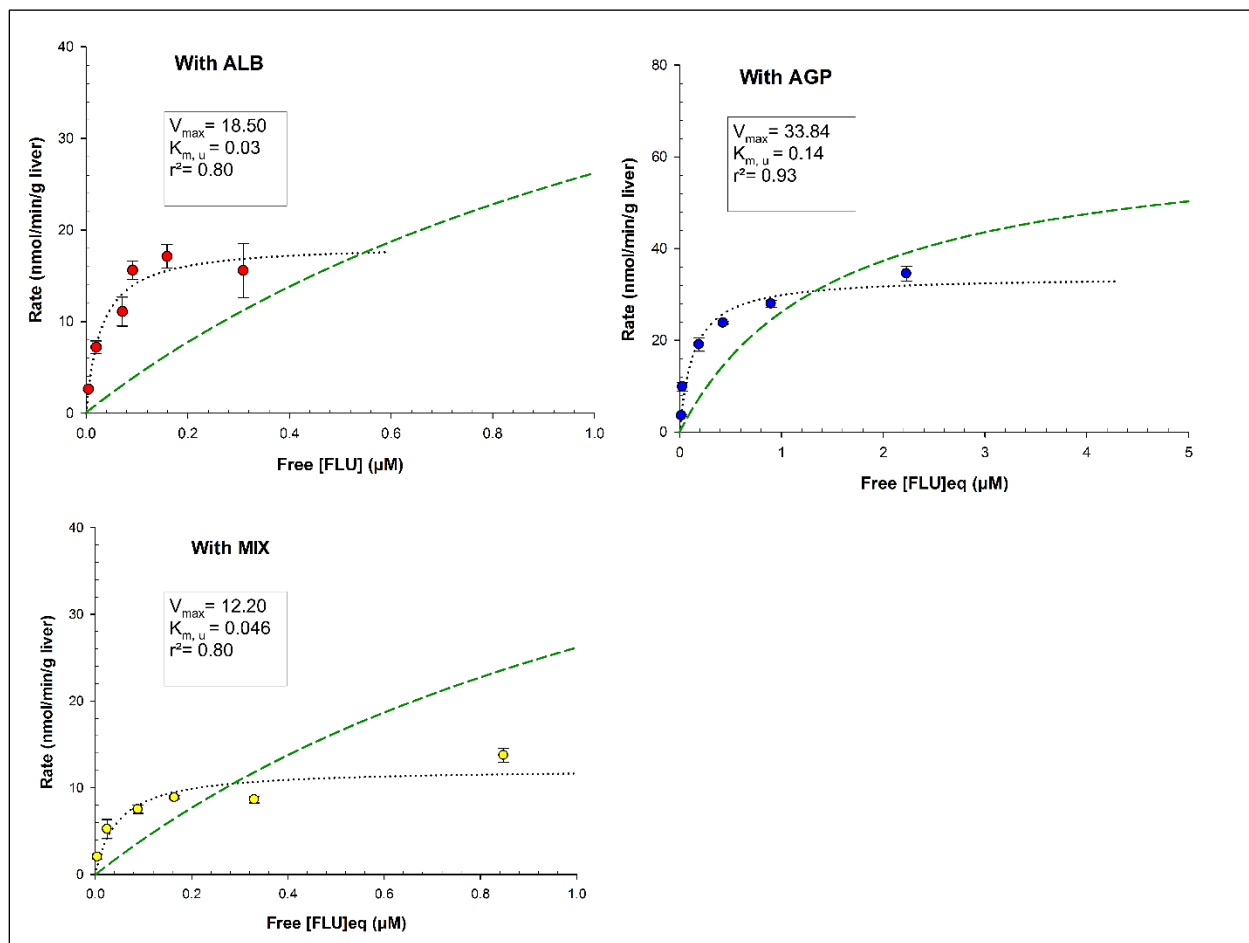
**Figure 5.4. Nonlinear metabolic kinetics for fluoxetine: Rate versus Total [FLU]<sub>eq</sub>.**

The metabolic kinetics were obtained from the mean rates values (n=3 rats) versus the total FLU concentrations measured at the outlet (i.e., the perfusate) without plasma proteins (WO) (green circles); with ALB (40 g/L) (red circles); with AGP (1 g/L) (blue circles); and with MIX of ALB (40 g/L) and AGP (1g/L) (yellow circles). Fitting of *in situ* data to the 'Michaelis-Menten model' for FLU was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019 (black dashed curves). *Abbreviations:* ALB albumin; AGP alpha-1-acid glycoprotein;  $K_m$  Michaelis constant; MIX mixture; Total [FLU]<sub>eq</sub> total concentration of fluoxetine at equilibrium;  $V_{max}$  maximum rate of enzymatic activity.



**Figure 5.5. Nonlinear metabolic kinetics for perampanel: Rate versus Free [PER]<sub>eq</sub>.**

The metabolic kinetics (n= 3 rats) for the free drug PER in the perfusate were presented with ALB (40 g/L) (red circles); with AGP (1 g/L) (blue circles); and with MIX of ALB (40 g/L) and AGP (1g/L) (yellow circles). Black dotted curves were from fitting the *in-situ* data to the 'Michaelis-Menten model' for free [PER]<sub>eq</sub> which was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019. Green dashed curves were obtained using  $V_{max}$  and  $K_m$  values from the WO scenario. *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **MIX** mixture; **Free [PER]<sub>eq</sub>** free concentration of perampanel at equilibrium; **WO** without plasma proteins.



**Figure 5.6. Nonlinear metabolic kinetics for fluoxetine: Rate versus Free [FLU]<sub>eq</sub>.**

The metabolic kinetics (n= 3 rats) for the free drug FLU in the perfusate were presented with ALB (40 g/L) (red circles); with AGP (1 g/L) (blue circles); and with MIX of ALB (40 g/L) and AGP (1g/L) (yellow circles). Black dotted curves were from fitting the *in-situ* data to the 'Michaelis-Menten model' for free [FLU]<sub>eq</sub> which was made using the software SigmaPlot 13.0. Ink, 2019. Green dashed curves were obtained using  $V_{max}$ , and  $K_m$  values from the WO scenario. *Abbreviations:* **ALB** albumin; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **Free [FLU]<sub>eq</sub>** free concentration of fluoxetine at equilibrium; **MIX** mixture; **WO** without plasma proteins.

## Appendices

**Table 5.A1. The predictions of unbound  $CL_{int}$  for PER in the absence and presence of plasma proteins**

Free [PER] ( $\mu\text{M}$ )	$CL_{int}$ (WO) (mL/min/g liver)	$CL_{int, u}$ (ALB) (mL/min/g liver)	R ( $CL_{int, u}$ WO/ALB)	$CL_{int, u}$ (AGP) (mL/min/g liver)	R ( $CL_{int, u}$ WO/AGP)	$CL_{int, u}$ (MIX) (mL/min/g liver)	R ( $CL_{int, u}$ WO/MIX)
0.1	5.26	9.28	0.57	2.24	2.35	11.27	0.47
0.15	5.25	9.03	0.58	2.24	2.34	10.90	0.48
0.2	5.23	8.79	0.6	2.24	2.34	10.56	0.50
0.25	5.22	8.56	0.61	2.23	2.34	10.24	0.51
0.5	5.14	7.59	0.68	2.22	2.32	8.89	0.58
0.55	5.13	7.42	0.69	2.22	2.31	8.67	0.59
0.6	5.11	7.26	0.7	2.21	2.31	8.45	0.61
0.7	5.08	6.96	0.73	2.21	2.3	8.05	0.63
0.8	5.06	6.68	0.76	2.2	2.3	7.68	0.66
0.9	5.03	6.42	0.78	2.2	2.29	7.35	0.68
1	5	6.19	0.81	2.19	2.28	7.04	0.71
1.25	4.93	5.66	0.87	2.18	2.27	6.38	0.77
1.5	4.86	5.22	0.93	2.16	2.25	5.83	0.83
1.75	4.8	4.84	0.99	2.15	2.23	5.37	0.89
2	4.74	4.51	1.05	2.14	2.22	4.97	0.95
2.25	4.68	4.23	1.11	2.12	2.2	4.63	1.01
2.5	4.62	3.98	1.16	2.11	2.19	4.33	1.07
5	4.09	2.49	1.64	1.99	2.06	2.64	1.55
7.5	3.67	1.82	2.02	1.88	1.95	1.90	1.93
10	3.33	1.43	2.34	1.78	1.87	1.48	2.25
15	2.81	1	2.81	1.62	1.74	1.03	2.73
20	2.43	0.77	3.16	1.48	1.65	0.79	3.08
25	2.14	0.63	3.43	1.36	1.58	0.64	3.35
35	1.73	0.46	3.8	1.17	1.47	0.46	3.73

*Abbreviations:* **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **ALB** albumin;  **$CL_{int, u}$**  unbound intrinsic clearance; **MIX** mixture; **R** ratio between intrinsic clearance from WO over the intrinsic clearance from the scenario with plasma protein; **PER** perampanel; **WO** without plasma proteins.

The unbound  $CL_{int, u}$  values were estimated for arbitrary free PER concentrations (i.e., arbitrary  $C_{eq\_free}$ ). The calculations were made according to the equation 11B and using the metabolic parameters  $V_{max}$  and  $K_{m, u}$  corresponding to each scenario with plasma proteins (Table 5.5 and Figure 5.5).

**Table 5.A2. The predictions of unbound  $CL_{int}$  for FLU in the absence and presence of plasma proteins**

Free [FLU] ( $\mu$ M)	$CL_{int}$ (WO) (mL/min/g liver)	$CL_{int, u}$ (ALB) (mL/min/g liver)	R ( $CL_{int, u}$ WO/ALB)	$CL_{int, u}$ (AGP) (mL/min/g liver)	R ( $CL_{int, u}$ WO/AGP)	$CL_{int, u}$ (MIX) (mL/min/g liver)	R ( $CL_{int, u}$ WO/MIX)
0.001	43.64	596.77	0.07	239.72	0.18	259.57	0.17
0.005	43.52	528.57	0.08	233.10	0.19	239.22	0.18
0.01	43.38	462.50	0.09	225.33	0.19	217.86	0.20
0.05	42.26	231.25	0.18	177.89	0.24	127.08	0.33
0.1	40.94	142.31	0.29	140.83	0.29	83.56	0.49
0.15	39.70	102.78	0.39	116.55	0.34	62.24	0.64
0.2	38.53	80.43	0.48	99.41	0.39	49.59	0.78
0.25	37.43	66.07	0.57	86.67	0.43	41.22	0.91
0.3	36.39	56.06	0.65	76.82	0.47	35.26	1.03
0.35	35.41	48.68	0.73	68.98	0.51	30.81	1.15
0.4	34.47	43.02	0.80	62.59	0.55	27.35	1.26
0.45	33.59	38.54	0.87	57.29	0.59	24.60	1.37
0.5	32.75	34.91	0.94	52.81	0.62	22.34	1.47
0.55	31.95	31.90	1.00	48.99	0.65	20.47	1.56
0.7	29.77	25.34	1.17	40.24	0.74	16.35	1.82
0.75	29.11	23.72	1.23	37.98	0.77	15.33	1.90
1	26.20	17.96	1.46	29.65	0.88	11.66	2.25
1.25	23.82	14.45	1.65	24.32	0.98	9.41	2.53
1.3	23.39	13.91	1.68	23.47	1.00	9.06	2.58
1.35	22.98	13.41	1.71	22.68	1.01	8.74	2.63
1.5	21.83	12.09	1.81	20.61	1.06	7.89	2.77
2	18.71	9.11	2.05	15.79	1.18	5.96	3.14
2.5	16.38	7.31	2.24	12.80	1.28	4.79	3.42
7.5	7.28	3.68	2.74	6.58	1.53	2.42	4.17
15	3.97	2.46	2.96	4.42	1.65	1.62	4.50
20	3.05	1.84	3.09	3.33	1.71	1.21	4.69
25	2.47	1.23	3.23	2.23	1.78	0.81	4.90
35	1.79	1.06	3.27	1.92	1.80	0.70	4.96

*Abbreviations:* **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **ALB** albumin;  **$CL_{int, u}$**  unbound intrinsic clearance; **MIX** mixture; **R** ratio between intrinsic clearance from WO over the intrinsic clearance from the scenario with plasma protein; **FLU** fluoxetine; **WO** without plasma proteins.

The unbound  $CL_{int, u}$  values were estimated for arbitrary free FLU concentrations (i.e., arbitrary  $C_{eq\_free}$ ). The calculations were made according to the equation 11B and using the metabolic parameters  $V_{max}$  and  $K_m$ ,  $u$  corresponding to each scenario with plasma proteins (Table 5.6 and Figure 5.6).

**Table 5.A3. The measured concentrations for perampanel from IPRL**

Rat #	WO			ALB			AGP			MIX		
	$C_{eq\_total}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$fu_p^a$	$C_{eq\_free}^b$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$C_{eq\_total}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$fu_p^a$	$C_{eq\_free}^b$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$C_{eq\_total}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$fu_p^a$	$C_{eq\_free}^b$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$C_{eq\_total}$ ( $\mu\text{mol/L}$ )	$fu_p^a$	$C_{eq\_free}^b$ ( $\mu\text{mol/L}$ )
Rat 1	0.53	1.00	0.53	1.28	0.11	0.14	1.38	0.51	0.70	1.86	0.09	0.17
Rat 2	0.42	1.00	0.42	1.63	0.11	0.17	1.18	0.51	0.60	1.50	0.09	0.14
Rat 3	0.63	1.00	0.63	1.79	0.11	0.19	2.02	0.51	1.03	0.84	0.09	0.08
Rat 1	2.18	1.00	2.18	4.22	0.11	0.47	4.23	0.56	2.37	5.55	0.10	0.54
Rat 2	0.99	1.00	0.99	4.87	0.11	0.55	4.24	0.56	2.37	5.15	0.10	0.50
Rat 3	1.19	1.00	1.19	5.44	0.11	0.61	4.35	0.56	2.43	4.66	0.10	0.45
Rat 1	4.53	1.00	4.53	9.81	0.12	1.20	8.83	0.62	5.48	11.75	0.10	1.21
Rat 2	1.73	1.00	1.73	10.35	0.12	1.27	7.45	0.62	4.62	11.13	0.10	1.15
Rat 3	2.15	1.00	2.15	11.42	0.12	1.40	8.70	0.62	5.39	10.77	0.10	1.11
Rat 1	10.82	1.00	10.82	15.11	0.13	2.01	12.80	0.67	8.58	15.16	0.11	1.62
Rat 2	3.37	1.00	3.37	15.12	0.13	2.01	11.26	0.67	7.55	15.05	0.11	1.61
Rat 3	3.79	1.00	3.79	16.74	0.13	2.22	12.66	0.67	8.48	14.24	0.11	1.53
Rat 1	12.28	1.00	12.28	19.39	0.14	2.77	16.90	0.70	11.88	19.56	0.11	2.23
Rat 2	6.04	1.00	6.04	19.63	0.14	2.81	13.78	0.70	9.68	20.70	0.11	2.36
Rat 3	6.31	1.00	6.31	20.47	0.14	2.93	15.14	0.70	10.64	20.10	0.11	2.29
Rat 1	12.65	1.00	12.65	26.52	0.16	4.32	22.10	0.74	16.40	24.12	0.12	2.97
Rat 2	7.14	1.00	7.14	28.31	0.16	4.61	17.40	0.74	12.91	28.94	0.12	3.56
Rat 3	8.34	1.00	8.34	27.14	0.16	4.42	19.74	0.74	14.65	27.19	0.12	3.34

**Abbreviations:** **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **ALB** albumin;  **$C_{eq}$**  measured concentration at equilibrium from IPRL; **MIX** mixture; **WO** without plasma proteins.

<sup>a</sup>. The equation 3 was applied using the parameters  $B_{max}$ ,  $K_D$  (Figure 5.1) and arbitrary values  $C_{eq\_free}$  (from 0 to 35  $\mu\text{M}$ ) to simulate the  $C_{bound}$  values for each scenario with plasma proteins. Then the  $C_{eq\_total}$  and the  $fu_p$  values were calculated according to equation 2 and 1 respectively. Then, only the  $fu_p$  values for which the calculated  $C_{eq\_total}$  matched the measured  $C_{eq\_total}$  from IPRL experiments are presented here.

<sup>b</sup>. The values of  $C_{eq\_free}$  were calculated according to the following equation:  $C_{eq\_free} = C_{eq\_total} \times fu_p$ .

**Table 5.A4. The measured concentrations for fluoxetine from IPRL**

Rat #	WO			ALB			AGP			MIX		
	C <sub>eq_total</sub> (µmol/L)	f <sub>u<sub>p</sub></sub> <sup>a</sup>	C <sub>eq_free</sub> (µmol/L) <sup>b</sup>	C <sub>eq_total</sub> (µmol/L)	f <sub>u<sub>p</sub></sub> <sup>a</sup>	C <sub>eq_free</sub> (µmol/L) <sup>b</sup>	C <sub>eq_total</sub> (µmol/L)	f <sub>u<sub>p</sub></sub> <sup>a</sup>	C <sub>eq_free</sub> (µmol/L) <sup>b</sup>	C <sub>eq_total</sub> (µmol/L)	f <sub>u<sub>p</sub></sub> <sup>a</sup>	C <sub>eq_free</sub> (µmol/L) <sup>b</sup>
Rat 1	0.056	1.000	0.056	0.142	0.013	0.002	0.077	0.201	0.015	0.231	0.009	0.002
Rat 2	< LLOQ	1.000	-	0.295	0.013	0.004	0.104	0.201	0.021	0.898	0.009	0.008
Rat 3	< LLOQ	1.000	-	0.607	0.013	0.008	< LLOQ	0.201	-	0.202	0.009	0.002
Rat 1	0.066	1.000	0.066	0.636	0.013	0.008	0.313	0.202	0.063	1.129	0.010	0.012
Rat 2	0.071	1.000	0.071	1.233	0.013	0.016	0.082	0.202	0.016	3.673	0.010	0.038
Rat 3	< LLOQ	1.000	-	2.892	0.013	0.037	0.015	0.202	0.003	2.315	0.010	0.024
Rat 1	0.472	1.000	0.472	5.286	0.013	0.070	1.432	0.206	0.296	6.209	0.013	0.081
Rat 2	1.342	1.000	1.342	3.046	0.013	0.040	1.145	0.206	0.236	7.379	0.013	0.096
Rat 3	0.069	1.000	0.069	7.875	0.013	0.104	0.169	0.206	0.035	7.099	0.013	0.092
Rat 1	0.330	1.000	0.330	5.688	0.013	0.076	2.083	0.213	0.444	9.975	0.016	0.160
Rat 2	0.403	1.000	0.403	5.581	0.013	0.075	3.045	0.213	0.649	10.563	0.016	0.169
Rat 3	2.379	1.000	2.379	9.169	0.013	0.123	0.868	0.213	0.185	10.253	0.016	0.164
Rat 1	0.464	1.000	0.464	13.398	0.014	0.187	3.321	0.227	0.752	13.854	0.023	0.315
Rat 2	0.423	1.000	0.423	9.015	0.014	0.126	5.606	0.227	1.270	14.996	0.023	0.341
Rat 3	4.828	1.000	4.828	11.777	0.014	0.164	2.896	0.227	0.656	14.714	0.023	0.334
Rat 1	0.745	1.000	0.745	20.792	0.015	0.316	11.016	0.262	2.885	18.578	0.043	0.803
Rat 2	0.918	1.000	0.918	22.468	0.015	0.342	10.109	0.262	2.647	19.250	0.043	0.832
Rat 3	7.112	1.000	7.112	17.685	0.015	0.269	4.146	0.262	1.086	21.034	0.043	0.909

**Abbreviations:** **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **ALB** albumin; **C<sub>eq</sub>** measured concentration at equilibrium from IPRL; **MIX** mixture; **WO** without plasma proteins.

<sup>a</sup>. The equation 3 was applied using the parameters B<sub>max</sub>, K<sub>D</sub> (Figure 5.2) and arbitrary values C<sub>eq\_free</sub> (from 0 to 35 µM) to simulate the C<sub>bound</sub> values for each scenario with plasma proteins. Then the C<sub>eq\_total</sub> and the f<sub>u<sub>p</sub></sub> values were calculated according to equation 2 and 1 respectively. Then, only the f<sub>u<sub>p</sub></sub> values for which the calculated C<sub>eq\_total</sub> matched the measured C<sub>eq\_total</sub> from the IPRL experiments are presented here.

<sup>b</sup>. The values of C<sub>eq\_free</sub> were calculated according to the following equation: C<sub>eq\_free</sub> = C<sub>eq\_total</sub> × f<sub>u<sub>p</sub></sub>.



**CHAPITRE 6. Comparative assessment of extrapolation methods based on the conventional free drug hypothesis and plasma protein-mediated hepatic uptake theory for the hepatic clearance predictions of two drugs extensively bound to both albumin and alpha-1-acid glycoprotein.**

**COMPARATIVE ASSESSMENT OF EXTRAPOLATION METHODS BASED ON THE CONVENTIONAL FREE DRUG HYPOTHESIS AND PLASMA PROTEIN-MEDIATED HEPATIC UPTAKE THEORY FOR THE HEPATIC CLEARANCE PREDICTIONS OF TWO DRUGS EXTENSIVELY BOUND TO BOTH THE ALBUMIN AND ALPHA-1-ACID GLYCOPROTEIN**

Michel Bteich <sup>1,2</sup>, Patrick Poulin <sup>1,3</sup> and Sami Haddad <sup>1,2\*</sup>

1 Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Université de Montréal, Montreal, Quebec, Canada.

2 Centre de recherche en santé publique (CRéSP), Montreal, Quebec, Canada.

3 Consultant Patrick Poulin Inc., Quebec City, Quebec, Canada.

***\*Address for correspondence:***

Sami Haddad, Department of Environmental and Occupational Health, Université de Montréal, PO Box 6128, Main Station, Montreal, Quebec H3C 3J7, Canada. Tel: (+1) 514-343-6111 post 38166. Fax: (+1) 514-343-2200.

Email: [sami.haddad@umontreal.ca](mailto:sami.haddad@umontreal.ca)

**Received on the 15<sup>th</sup> of October 2020, accepted on November 10, 2020, published online on November 18, 2020, in the Journal of Pharmaceutical Sciences.**  
<https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.11.009>

**Acknowledgements**

The authors contributed equally to this paper. This work is part of Mr. Michel Bteich's doctoral thesis and Dr. Haddad's research program supported by the Natural Science and Engineering Research Council of Canada, Discovery grant no. RGPIN-2015-05577, and Dr. Poulin's research program supported by the Consultant Patrick Poulin Inc.

## **Abstract**

Bteich and coworkers recently demonstrated in a companion manuscript (J Pharm Sci 109: <https://doi.org/10.1016/j.xphs.2020.07.003>) that a protein-mediated hepatic uptake have occurred in an isolated perfused rat liver (IPRL) model for two drugs (Perampanel; PER and Fluoxetine; FLU) that bind extensively to the albumin (ALB) and alpha-1-acid glycoprotein (AGP). However, to our knowledge, there is no quantitative model available to predict the impact of a plasma protein-mediated hepatic uptake on the extent of hepatic clearance (CL<sub>h</sub>) for a drug binding extensively to these two proteins. Therefore, the main objective was to predict the corresponding CL<sub>h</sub>, which is an extension of the companion manuscript. The method consisted of extrapolating the intrinsic clearance from the unbound fraction measured in the perfusate or the unbound fraction extrapolated to the surface of the hepatocyte membrane by adapting an existing model of protein-mediated hepatic uptake (i.e., the  $f_{up-adjusted}$  model) to include a binding ratio between the ALB and AGP. This new approach showed a relevant improvement compared to the free drug hypothesis particularly for FLU that showed the highest degree of ALB-mediated uptake. Overall, this study is a first step towards the development of predictive methods of CL<sub>h</sub> by considering the binding to ALB and AGP.

## **Key words**

Albumin, alpha-1-acid glycoprotein, fractional binding, hepatic clearance, quantitative modeling, IVIVE, PBPK.

## 6.1. Introduction

Underpredictions and overpredictions in pharmacokinetics/toxicokinetics (PK/TK) modeling of hepatic clearance (CL<sub>h</sub>) remain a big challenge to be resolved (H. S. Brown, Griffin, & Houston, 2007; Riley et al., 2005; Stringer, Nicklin, & Houston, 2008). According to recent studies, discrepancies exist between the observed drug clearance data in the *in vivo* conditions and their predictions from *in vitro* data; i.e., microsomes and hepatocytes data (C. M. Bowman & Benet, 2019; Sawada, Sugiyama, Miyamoto, Iga, & Hanano, 1985; Zuegge, Schneider, Coassolo, & Lave, 2001) and they need to be addressed particularly for drugs that are highly bound in plasma (C. M. Bowman & Benet, 2016; Poulin et al., 2016).

Since the 1970s, empirical models have offered good predictions to simulate two parameters among the most important in PK/TK: the hepatic intrinsic clearance (CL<sub>int, h</sub>) and the *in vivo* hepatic clearance (CL<sub>h, in vivo</sub>) (Ito, Brown, & Houston, 2004; Pang & Rowland, 1977a, 1977b; M. Rowland et al., 1973; Wilkinson, 1987). The unbound fraction of the drug in plasma (f<sub>u,p</sub>) is a commonly used parameter in PK/TK quantitative modeling, particularly for the CL<sub>h, in vivo</sub> predictions (Blanchard et al., 2006; Blanchard et al., 2004). To the latter objective, the parameter CL<sub>int, h</sub> is normally scaled from the *in vitro* conditions (i.e., cells, enzymes assays) in the absence of plasma proteins to the *in vivo* (i.e., whole liver) where the plasma protein binding (PPB) is often present. Thus, the parameter CL<sub>int, h</sub> is multiplied by f<sub>u,p</sub> to predict the CL<sub>h, in vivo</sub> using *in vitro-to-in vivo* extrapolations (IVIVE) approaches. Accordingly, this scaling of the CL<sub>int, h</sub> would reflect the inherent capacity of the liver to eliminate the free drug concentration at equilibrium (C<sub>eq</sub>) in the *in vivo* conditions as per 'the free drug hypothesis'.

However, according to recent IVIVE studies, approximately 66.5% (C. M. Bowman & Benet, 2016) and 75.0% (F. L. Wood, Houston, & Hallifax, 2017) of predictions from human microsome and hepatocyte data fell more than 2-fold outside measured *in vivo* values. To address these discrepancies in this study, the extent of PPB is presented as a key factor that would influence the CL<sub>h, in vivo</sub> of drugs; i.e., the metabolic disposition (M. Baker & Parton, 2007; A. Rowland, Elliot, et al., 2008; A. Rowland, Knights, Mackenzie, & Miners, 2008; M. Rowland, 1984; Trainor, 2007). Hence, the presence of the albumin molecules (ALB) directly in the *in vitro* hepatic assays like in the *in vivo* condition could be a crucial factor influencing the

accuracy and the precision of the IVIVE methods (Blanchard et al., 2006; Blanchard et al., 2004; Poulin et al., 2016; Ring et al., 2011).

In the case of drugs that are highly bound in plasma, ALB molecules present in the interstitial space may enhance the hepatic uptake and their free drug concentration ( $C_{free}$ ) in the cells is presumed to no longer follow 'the free drug hypothesis'. Hence, the use of the  $f_{up}$  parameter may become inappropriate to use for IVIVE predictions (C. M. Bowman & Benet, 2018; Miyauchi et al., 2018; Poulin & Haddad, 2013). In other words, the slightest change in small values of  $f_{up}$  leads directly to a significant change in the extensive PPB and most particularly in the drug plasma binding and liver with high affinity to ALB. Thus, these changes may be implicated in influencing the extent of the hepatic uptake and consequently the values of CLh for 'the free drug hypothesis' versus 'the potential ALB-mediated hepatic uptake' (Poulin, Hop, et al., 2012; Poulin, Kenny, et al., 2012). Furthermore, the  $C_{free}$  of a drug is determined by  $f_{up}$  in the equation of the well-stirred liver model of CLh; it is therefore necessary to adjust the term  $f_{up}$  to reflect the total intracellular drug concentration more accurately in the liver, particularly when a plasma protein-mediated hepatic uptake may occur *in vivo*.

In this context, several clearance models are now available and they provide improved predictions of the CLh<sub>*in vivo*</sub> for drugs that are exclusively highly bound to ALB and for which a protein-mediated hepatic uptake may occur *in vivo* (i.e., *via* the membrane transporters or the plasma protein-mediated hepatic uptake), namely the  $f_{up-adjusted}$  model, the facilitated-dissociation model (FDM) (S. J. Kim et al., 2019) and the Extended Clearance model (ECM) (Kimoto et al., 2018). The ECM model often used empirical scaling factors, and hence, it is not fully mechanistic, whereas the FDM model necessitates to estimate several input *in vitro* parameters from diverse metabolic studies. Alternatively, the  $f_{up-adjusted}$  model only requires the knowledge of the routinely-available  $f_{up}$  for its application in the CLh predictions and it can potentially be adapted to include the binding effect of both the ALB and any other plasma proteins as investigated in this present study. Therefore, this model should be prioritized. Consequently, we focus on the IVIVE model of  $f_{up-adjusted}$  proposed by Poulin et al. (Poulin, Hop, et al., 2012; Poulin, Kenny, et al., 2012) in which any potential ALB-mediated hepatic uptake was quantified by replacing the  $f_{up}$  of each drug measured *in vitro*

in the well-stirred model with an  $f_{up}$  that was adjusted for a pH gradient effect (plasma *versus* intracellular) and the plasma (or perfusate)-to-liver physiological concentration ratio of ALB (i.e., the PLR parameter) to mimic more accurately the *in vivo* condition at the surface of the hepatocyte membrane. According to the  $f_{up-adjusted}$  model, each ALB molecule may bring the bound drug moiety from the plasma to the liver at the hepatocyte cell surface where it dissociates to the unbound form for more hepatic uptake and, hence, leads to a higher value of clearance. In other words, the dissociated drug from the ALB-drug complex, like the free drug, may also become available for hepatic uptake at the hepatocyte cell surface, and it may be subjected to the membrane transporter and/or enzyme interplay (Bteich et al. 2019). Accordingly, while the PLR value is larger than 1, the bound drug in the plasma *versus* the one in the liver is also considered, in part, as readily available at the hepatocyte cell surface in addition to the free drug moiety. For ALB, the maximal measured physiological PLR value is equal to about 13 based on the literature (Poulin, Hop, et al., 2012). In other words, while the PLR value is 13 this indicates that the concentration of the ALB-bound drug complex is 13-fold lower in the liver compared to plasma; this differential is taken into account to adjust the unbound fraction  $f_{up}$  measured *in vitro* to add the effect of the ALB-bound drug complex in addition to the free drug concentration. Because this new IVIVE model based on  $f_{up-adjusted}$  already demonstrated a superior level of accuracy compared to 'the free drug hypothesis' based on  $f_{up}$  *in vitro*, an extension of the recently developed model for drugs binding to mainly ALB to drugs binding to other multiple plasma proteins (including ALB) was necessary.

In this context, several drugs may bind to multiple plasma proteins and the total PPB represents the sum of the corresponding fractional binding to each protein in plasma. Particularly, the two plasma proteins such as ALB and AGP are among the most implicated in the PPB of a large variety of drugs (Filip et al., 2013; Z. Huang & Ung, 2013; Israili & Dayton, 2001; McNamara & Alcorn, 2002; Toyama et al., 2014). In a companion manuscript we have recently demonstrated using the isolated perfused rat liver (IPRL) (Bteich, Poulin, Piette, & Haddad, 2020), that the binding of the same drug (i.e., either perampanel (PER) or fluoxetine (FLU)) to ALB at the physiological concentration in the perfusate affected the clearance parameter differently than its binding to AGP at both the low and high concentrations of the drug, even though the binding of these drugs to each protein is of a similar degree (i.e., the apparent ratio of bound

drug between AGP and ALB ( $R_{AGP:ALB}$ ) was close to the unity at therapeutic concentrations). However, when the two plasma proteins were added in mixtures in the perfusate (MIX), the CLh found for both drugs were like those with ALB alone in the perfusate. This predominance in metabolic kinetics would grant the ALB molecules the lead role in influencing the mediated hepatic uptake and unbound clearances of these two drugs. However, to our knowledge, there is no quantitative IVIVE model available to predict the impact of a plasma protein-mediated hepatic uptake on the extent of CLh of an ALB-bound drug that can simultaneously have a considerable binding affinity to AGP.

The two drugs PER and FLU that were previously investigated in our companion manuscript were chosen because of their ability to bind extensively to both ALB and AGP (with a  $R_{AGP:ALB}$  close to the unity at the therapeutic concentrations) (Bteich et al., 2020); hence, they were also studied for the purpose of this present study. And, these two drugs are exclusively (or predominantly) metabolized in the liver with no known transporter activity for their uptake. The main objective of this study is therefore to challenge the prediction model of  $f_{up-adjusted}$  into which the importance of the binding to ALB and AGP will be considered, separately, in order to improve the prediction accuracy of the  $CLh_{in situ}$  of each drug using the *in-situ* metabolic data and plasma protein binding *in vitro* data of the two drugs PER and FLU, as per the recent datasets published by Bteich et al. (2020). Overall, our companion manuscript presented the experimental settings and datasets, whereas the present study was made to update the existing model of  $f_{up-adjusted}$  to predict the corresponding experimental values of  $CLh_{in situ}$  of PER and FLU that were measured in the IPRL model in a context of a protein-mediated hepatic uptake; this by incorporating the effect of both the ALB and AGP binding, which is a logical extension of the companion manuscript.

## 6.2. Methods

As a reminder, the following four IPRL scenarios were investigated for PER and FLU in our companion manuscript: 1) without plasma proteins (WO), 2) with 40 g/L of ALB, 3) with 1 g/L AGP and 4) with a MIX of proteins (i.e., 40 g/L of ALB and 1 g/L of AGP). For the extrapolations from the WO scenario to the MIX scenario (WO-to-MIX) of  $CL_{h\text{ in situ}}$ , the  $CL_{\text{int, h}}$  values are estimated according to equation 3 from the Michaelis-Menten parameters (i.e.,  $V_{\text{max}}$  and  $K_m$ ) obtained in the WO scenario and the total  $C_{\text{eq}}$  measured in the MIX scenario (i.e., IPRL) (Table 6.1). Therefore, these metabolic data obtained without any plasma proteins were extrapolated to the corresponding clearance that would be observed in the realistic *in vivo* situation, i.e., the *in-situ* situation containing the mixture of proteins in the perfusate.

The authors Poulin, Hop, et al. (2012) replaced  $f_{u_p}$  by  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  in the well-stirred liver model (Eq. 4 in Table 6.1) to describe an ALB-mediated hepatic uptake. For the purpose of the present study, we propose to challenge the term  $f_{u_p}$  (i.e., free drug hypothesis) and the term  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  (i.e., plasma protein-mediated hepatic uptake theory) to verify which of these two parameters would fit more accurately the obtained *in-situ* values of  $CL_h$  for the two drugs that were incubated with a mixture of two plasma proteins at the physiological concentrations; hence, representing the realistic *in situ* condition (i.e., MIX scenario). In our companion paper (Bteich et al., 2020), a single binding site model was used to describe measured *in vitro* plasma binding data for both drugs. Therefore, the  $B_{\text{max}}$  and  $K_D$  for PER and FLU with ALB, with AGP and MIX were obtained from curve fitting and these binding parameters were used to calculate the  $f_{u_p}$  values corresponding to the total drug  $C_{\text{eq}}$  (Bteich et al., 2020). The same calculated  $f_{u_p}$  values were used in this study (Table 6.2). The calculated  $f_{u_p}$  values were coherent with the measured values *in vitro*.

As presented in the introduction section, the  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  parameter based on the binding isotherm is a composite of two parameters, namely the PLR and apparent  $f_{u_p}$  ( $f_{u_p\text{-app}}$  that is used to quantify the pH gradient effect). The PLR is a physiological parameter quantifying the ratio of ALB concentration between the plasma (or perfusate) and liver to estimate the differential of ALB-bound drug available at the hepatocyte surface versus the plasma, whereas  $f_{u_p\text{-app}}$  is quantifying the pH gradient effect on the unbound fraction between the plasma and hepatocytes. These are used to extrapolate more accurately the drug



concentration available in the hepatocytes versus the plasma according to the ALB-mediated hepatic uptake and pH gradient theories by contrast to the free drug hypothesis. In other words, the PLR of the protein's concentration ratios was used to take into account the facilitated exchange of a drug between the plasma proteins-drug complex and the hepatocyte cell surface, whereas the other input parameter on the apparent unbound fraction ( $f_{u_{p-app}}$ ) takes into account for the pH gradient effect, i.e., the unionized fraction of the free drug moiety that can move from the extracellular space (pH 7.4) to the intracellular space (pH ~ 7.0) of the liver. The input PLR value that was used in the  $f_{u_{p-adjusted}}$  model determines the real protein concentrations ratio of a single plasma protein (i.e., ALB or AGP) between the perfusate (or plasma) and liver, with a maximal value of 13 for ALB and 1 for AGP. Accordingly, the commonly reported value of PLR = 13 was obtained at the physiological concentration of ALB in the rat after a review of the literature since we are also using physiological concentrations of ALB as stated in our companion manuscript. A default value of 1 has been used for the PLR value for AGP as explained in the following since it is not expected that AGP had a relevant impact on the current predictions while a protein-mediated hepatic uptake process is considered. Note that the calculations of  $f_{u_{p-adjusted}}$  are detailed in the Table 6.1.

However, since the two drugs (i.e., PER and FLU) bind extensively to both ALB and AGP, the PLR value of the mixture scenario ( $PLR_{MIX}$ ) is used instead of the common PLR value equal to 13 while a drug is bound exclusively to the ALB as explained in the introduction, or equal to 1 for a drug bound to AGP since a protein-mediated hepatic uptake seems less important with this second protein according to our previous studies (Bteich, 2019; Poulin et al., 2016). To note that our companion manuscript reported that when the two plasma proteins were added at the physiological concentrations in the protein-mixed perfusate, the Michaelis-Menten constant values that were measured from the IPRL studies were comparable to those constants measured with the ALB alone in the perfusate for each drug (Bteich et al., 2020). Consequently, here we have assumed that each plasma protein (ALB and AGP) may have contributed to the mediated hepatic uptake but with a predominance role for the ALB molecules. In other words, because it is anticipated that the mediated hepatic uptake could be maximal ( $PLR_{MIX} = 13$ ; hence,  $f_{u_{p-adjusted}} > f_{u_p}$ ) or minimal ( $PLR_{MIX} = 1$ ; hence,  $f_{u_{p-adjusted}} = f_{u_p}$ ), the real value of  $PLR_{MIX}$  for a drug binding extensively to both proteins in plasma *in situ (in vivo)* should be somewhere between these two limit values.

Accordingly, the measured values of  $CL_{h\ in\ situ}$  of each drug corresponding to the mixtures of plasma proteins would be somewhere between the values predicted by using the common PLR value = 1 or 13, but should be closer to the values of CL<sub>h</sub> predicted by using the real value of  $PLR_{MIX}$  that was estimated specifically in this present study.

The calculations of the input value of  $PLR_{MIX}$  is thus made with the use of equation 5 using the *in-situ* data and the PPB data for the four binding scenarios that were investigated in our companion manuscript (Bteich et al., 2020) (Table 6.1). The  $PLR_{MIX}$  values derived from equation 5 (Table 6.1) are presumed to describe the sum of the drug exchanges between the plasma proteins-drug complexes (i.e., AGP and ALB) with the hepatocyte cell surface, in the extracellular space. A simple fractional approach was considered depending of the importance of the binding of the drug to the ALB or AGP (Eq. 5): the  $PLR_{ALB}$  is found to have a value of 13 for bovine ALB (Poulin & Haddad, 2015; Poulin, Kenny, et al., 2012). While for AGP having the negative surface of sialic acids, it is suggested that it has a  $PLR_{AGP}$  equal to 1 because this protein should have no significant impact on the protein-mediated hepatic uptake (Poulin et al., 2016; Taguchi et al., 2013a). As for the  $f_{B-ALB}$  and  $f_{B-AGP}$ , they are the bound fractions to ALB and AGP in the MIX scenario, respectively. For the calculation of these bound fractions, we needed to find two parameters obtained using the rapid equilibrium device (Bteich et al., 2020); the total bound concentration of the drug in the MIX scenario ( $C_{bound\_MIX}$  from the red chamber only) and the  $C_{bound}$  of the drug to each protein in the scenario measuring the  $R_{AGP:ALB}$  (i.e.,  $C_{bound\_AGP}$  from the red chamber and  $C_{bound\_ALB}$  from the white chamber). To note, we assumed that the measured  $C_{free}$  of the drug at equilibrium in the MIX scenario was the same as in the  $R_{AGP:ALB}$  scenario since the protein concentrations were the same in the total volume of the insert. Therefore, we were able to obtain the corresponding bound concentrations (i.e.,  $C_{bound\_MIX}$ ,  $C_{bound\_AGP}$ ,  $C_{bound\_ALB}$ ) by subtracting the  $C_{free}$  from the total concentrations measured *in vitro* and corresponding to each of the two scenarios. In other words, the values of  $f_{B-ALB}$  and  $f_{B-AGP}$  were calculated from the ratio of  $C_{bound\_ALB}/C_{bound\_MIX}$  and  $C_{bound\_AGP}/C_{bound\_MIX}$ , respectively.

To assess, respectively, the accuracy and precision of the predictions, the statistical calculations of the absolute average fold-error (AAFE), average fold-error (AFE) and the root mean squared error (RMSE) were calculated according to the equations presented by Poulin, Kenny, et al., (2012).

### 6.3. Results

The overall summary in terms of predicted and observed values, accuracy and precision is listed in Tables 6.2, 6.3 and 6.4. The plot of observed versus predicted CLh values is shown in Figure 6.1. The calculated values of  $f_{B-AGP}$ ,  $f_{B-ALB}$ ,  $PLR_{MIX}$  and  $f_{u_p-adjusted}$  for PER and FLU are presented in Table 6.2. For PER, the  $f_{B-AGP}$  varied from 0.17 to 0.48 and the  $f_{B-ALB}$  varied from 0.52 to 0.83 across the various drug concentrations studied. As for FLU, the  $f_{B-AGP}$  varied from 0.48 to 0.60 and the  $f_{B-ALB}$  varied from 0.40 to 0.52 for the different FLU concentrations tested. In all cases, the calculated  $f_{u_p-adjusted}$  had higher values than those for the measured  $f_{u_p}$  which follows the concept of a plasma protein-mediated hepatic uptake.

In Table 6.3, based on 'the free drug hypothesis', the predicted  $CLh_{in situ}$  values were about twofold lower than the observed values for PER, while they were fourfold to fivefold lower for FLU which indicates a great deal of underprediction for the second drug.

Based on 'the plasma protein-mediated hepatic uptake', using the WO-to-MIX extrapolation approach, the predicted  $CLh_{in situ}$  values were less than twofold higher at low concentrations of PER and about twofold higher at high concentrations of PER when compared with the observed values of  $CLh_{in situ}$ . As for FLU, all predicted  $CLh_{in situ}$  values were less than twofold higher than the observed values at all FLU concentrations.

Overall, we observe that the prediction accuracy was significantly improved by using the  $f_{u_p-adjusted}$  correction particularly for FLU that showed the highest degree of ALB-mediated hepatic uptake in our companion manuscript, which was expected. For PER, the correction from either the  $f_{u_p}$  or  $f_{u_p-adjusted}$  model provided a relatively similar accuracy probably because the degree of ALB-mediated hepatic uptake was less apparent as also reported in our companion manuscript (Table 6.4).

#### 6.4. Discussion

This study is part of recent efforts to address the appropriateness of the use of  $f_{up}$  in IVIVE methods for the prediction of CL<sub>h</sub>. The term  $f_{up}$  relies on the simple assumption of hepatic uptake and clearance of unbound drug solely. In the past, for the IVIVE predictions of CL<sub>h</sub>, the CL<sub>int, h</sub> was determined *in vitro* in the absence of plasma (i.e., plasma proteins) then it was scaled to the *in vivo* condition by a simple correction from  $f_{up}$  (Rane, Wilkinson, & Shand, 1977; Wilkinson, 1987; Wilkinson & Shand, 1975). However, this has caused concerns about significant underpredictions of CL<sub>h</sub> since the CL<sub>int, h</sub> may not be dependent on the  $f_{up}$  (Blanchard et al., 2006; Blanchard et al., 2004; Poulin et al., 2016). Recently, a few publications advocated that the extensive PPB of drugs, particularly to the most abundant protein (i.e., ALB) may contribute to a mediated hepatic uptake of highly bound drugs (C. M. Bowman et al., 2019; Bteich et al., 2019; Miyauchi et al., 2018; Poulin & Haddad, 2013, 2015). Therefore, this study represents a significant step towards the improvement of the prediction of CL<sub>h</sub> for the drugs that are highly bound in plasma and has considered the binding of the drugs to two important plasma proteins instead of only one protein.

To the explanations provided in previous reviews (C. M. Bowman & Benet, 2018; Bteich et al., 2019; Poulin et al., 2016), we add that the extensive PPB and particularly to two proteins (i.e., ALB and AGP) may be another factor that would influence the accuracy and precision of the IVIVE methods. However, the fractional binding to both proteins with different characteristics and mechanisms was not considered in the past (Bteich et al., 2019; Bteich et al., 2020). Therefore, in this study, the fractional binding was quantified by considering new terms in the predictive equations (i.e.,  $f_{B-AGP}$  and  $f_{B-ALB}$ ) used to calculate the parameter  $f_{up-adjusted}$  according to the Poulin et al. mediated hepatic uptake model. The values of these terms can easily be measured *in vitro* (Bteich et al., 2020).

From Bteich et al. (2020), the two drugs PER and FLU have no known transporter activity for their uptake into hepatocytes. Therefore, if there is a protein-mediated hepatic uptake as suggested at low drug concentrations, it would be related directly to the plasma proteins and not to the transporter proteins for these two drugs.

In this study, we compare the predictive performances using a conventional method (i.e., using the  $f_{up}$  parameter based on 'the free drug hypothesis') and of WO-to-MIX extrapolation approach that includes the use of the  $f_{up-adjusted}$  and the input  $PLR_{MIX}$  according to the mediated hepatic uptake theory for PER and FLU incubated with both proteins (i.e., 40 g/L ALB and 1g/L AGP).

The WO-to-MIX approach was proposed to be a pure *a priori* prediction method of  $PLR_{MIX}$ , and, hence, of  $f_{up-adjusted}$  because there is no need of using metabolic data determined with and without the plasma proteins, as explained in the Method. Accordingly, the WO-to-MIX extrapolations from the conventional  $f_{up}$  hypothesis and  $f_{up-adjusted}$  gave accurate and comparable predictive performances for PER at all drug concentrations tested (Tables 6.3 and 6.4); this would be explained by the fact the PER showed a less relevant impact of the protein-mediated hepatic uptake *in situ* compared to FLU (Bteich et al., 2020). Therefore, we have demonstrated experimentally that the protein-mediated hepatic uptake for PER was not as significant as in the case of FLU, thus 'the free drug hypothesis' would be still acceptable for PER unlike for FLU. Accordingly, the dissociation coefficient ( $K_D$ ) of PER related to the ALB-PER complex was previously found to be higher than that of ALB-FLU complex (Bteich et al., 2020). Therefore, the ALB-PER complex may most likely dissociate even before reaching the hepatocytes plasma membrane, which may result to a less relevant protein-mediated hepatic uptake for PER versus FLU. Furthermore, the literature also indicates that PER did not displace the ALB binding of other highly bound drugs in drug-drug interaction studies (i.e., PER has low potential for drug interactions resulting from protein-binding displacement); again, this suggests that PER does not seem to have a stable ALB-bound drug complex compared to other drugs (Gidal, Ferry, Laurenza, & Ueno, 2019). Consequently, the measured  $CL_h$  values of PER are somewhere between the values projected by the  $f_{up}$  hypothesis (considering a minimal mediated hepatic uptake effect) or  $f_{up-adjusted}$  (considering the presence of a maximal mediated hepatic uptake effect). In addition, this is also well demonstrated for FLU by a much superior predictive performance for the WO-to-MIX extrapolation from  $f_{up-adjusted}$  compared to the conventional  $f_{up}$  hypothesis; again, this for all drug concentrations tested in this study. Remember that the FLU showed a much higher degree of ALB-mediated hepatic uptake compared to PER as demonstrated in our companion manuscript; hence it was expected that the prediction accuracy was improved for this drug by using the current  $f_{up-adjusted}$  model. Based on the decision tree that

has been previously proposed by Bteich et al. (2019) to improve the IVIVE-based prediction of CL<sub>h</sub>, we were able to classify both PER and FLU in the case 4 (i.e., considerable binding to the ALB and other proteins should be considered), but the case 1 (i.e., ALB-mediated hepatic uptake is minimal) would be more appropriate for PER compared to FLU.

Therefore, the new WO-to-MIX extrapolation approach likely represents an interesting opportunity to estimate the CL<sub>h</sub> *in situ* (*in vivo*) of a drug extensively bound to these two plasma proteins under *in vivo* conditions; however, we agree that more than two drugs need to be tested before reaching a final and conclusive outcome on the predictive performance of this WO-to-MIX extrapolation approach. Nevertheless, if we had not known whether a drug would be driven by a significant plasma protein-mediated hepatic uptake or not, like for PER compared to FLU (Bteich et al., 2020), one may consider that for any other untested drug the measured CL<sub>h</sub> *in situ* (*in vivo*) values would be within the range of CL<sub>h</sub> values predicted by using either the  $f_{u_p}$  hypothesis (considering a minimal mediated hepatic uptake effect) or  $f_{u_p}$ -adjusted (considering a maximal mediated hepatic uptake effect). Hence, the prediction of CL<sub>h</sub> for any untested drug can probably be captured within a certain range of confidence. This has been proven in this present study where, for PER and FLU, the measured CL<sub>h</sub> values are mostly covered (or very close) by the boundaries from these two approaches (Tables 6.3-6.4 and Figure 6.1).

Overall, the next step would be to test more drugs that can extensively bind to these two plasma proteins and/or to use independent datasets for further validations. Once the WO-to-MIX extrapolation approach is further challenged for these drugs and validated, it is then appropriate to integrate this approach in a physiologically-based PK model descriptive of the PK/TK in a full body to check whether we can describe the full plasma concentration-time profiles correctly. It would also be interesting to obtain the CL<sub>int,h</sub> *in vitro* with human microsomes or hepatocytes assays to predict the CL<sub>h</sub> *in vivo* in humans and further challenge the approach suggested in this study while the drugs are also incubated with mixtures of plasma proteins.

Furthermore, species differences in bovine versus rat and human serum ALB also needs to be further investigated. There is no doubt that human serum ALB would be the best choice to represent the physiological condition in human; however, the bovine ALB is more commonly used as an alternative of human or any other animal ALB (or plasma) to mimic the physiological condition in *in-situ* and/or *in vitro* experiments. The data from this study evaluated the utility of 4% bovine ALB to mimic the ALB-mediated uptake in the IPRL model, aiming to develop a practical IVIVE strategy to predict the CL<sub>h</sub>; particularly for a drug bound extensively to both the ALB and AGP. Nevertheless, differences in PPB were reported in the literature between bovine and human ALB for some drugs (Bteich, 2019). The latter suggests that bovine ALB (4%) may not always represent the physiologically relevant condition in other preclinical and clinical species such as rats and human depending on the compound. Consequently, this requires further *in vitro* investigations in humans too. On the other hand, the results of this present study indicate that our suggested extrapolation approach of CL<sub>h</sub> for the MIX solution (i.e., the bovine ALB and AGP) may appear promising to predict the *in vivo* condition, by considering the fractional binding approach.

Recently, Benet and Sodhi (2020) suggested that the reported underpredictions of CL<sub>h</sub> may also be governed by (a) suboptimal *in vitro* metabolic stability assay conditions, (b) significant error in the assumption that *in vitro* intrinsic clearance determinations will predict *in vivo* intrinsic clearance simply by scaling-up the amount of enzyme (*in vitro* incubation to *in vivo* liver), and/or (c) the methods of determining fraction unbound and/or liver blood flow rate are incorrect. We agree that these explanations could be valid; for IVIVE predictions (i.e., especially when the intrinsic clearance is obtained from *in vitro* metabolic assays, that is not the case in our present study); therefore, our companion manuscript and this present study have demonstrated that a plasma protein-mediated hepatic uptake effect can also be an additional plausible explanation to the underprediction of CL<sub>h<sub>in situ</sub></sub>.

## 6.5. Conclusion

This study is a first step in predictive modelling toward a better understanding of the fractional binding role in improving the  $CL_{in\ vivo}$  predictions. Even though the new WO-to-MIX extrapolation approach has offered good predictive performances, it needs to be further challenged before getting to a conclusive outcome. Other spectroscopic methods would help elucidate the changes in molecular interactions of protein-ligand complexes and they would offer some clues for better predictions of the *in vivo* kinetics.



**Disclosure Statement**

The authors report no conflicts of interest.

## Tables captions:

**Table 6.1. A novel quantitative approach for hepatic clearance predictions.**

**Table 6.2. The PLR and  $f_{u_{p\text{-adjusted}}}$  calculations for perampanel and fluoxetine.**

**Table 6.3. The predicted  $CL_{H_{in situ}}$  values according to the free drug hypothesis and the plasma protein-mediated hepatic uptake.**

**Table 6.4. The global predictive performances of  $CL_{H_{in situ}}$  for the two approaches and all drug concentrations.**

## Figure caption:

**Figure 6.1. Observed versus predicted *in situ* hepatic clearance using the conventional and the WO-to-MIX extrapolation approach.**

Solid, dashed squares and dashed lines represent, respectively, the unity, 2-fold and 3-fold ranges. The circles in blue and red represent, respectively, the data from the conventional (i.e.,  $f_{u_p}$ ) and the WO-to-MIX extrapolation approach (i.e.,  $f_{u_{p\text{-adjusted}}}$ ).

## Tables:

**Table 6.1. A novel quantitative approach for hepatic clearance predictions.**

Output parameter	Hypothesis	Quantitative models	
<b>Predicted CLh<sup>a</sup></b>	Free drug hypothesis	$CL_h = \frac{Q_L \cdot f_{u_p} / R_{BP} \cdot CL_{int, h}}{Q_L + f_{u_p} / R_{BP} \cdot CL_{int, h}} \text{ (mL/min)}$	Eq. 1
	Plasma protein-mediated hepatic uptake	$CL_h = \frac{Q_L \cdot f_{u_p\text{-adjusted}} / R_{BP} \cdot CL_{int, h}}{Q_L + f_{u_p\text{-adjusted}} / R_{BP} \cdot CL_{int, h}} \text{ (mL/min)}$	Eq. 2
<b>Input parameters</b>			
<b>Predicted metabolic clearance</b>		$CL_{int, h} = \frac{(V_{max})_{WO} \cdot LW}{(K_m)_{WO} + (Total C_{eq})_{MIX}} \text{ (mL/min)}$	Eq. 3
<b>f<sub>u<sub>p</sub>-adjusted</sub> for the MIX scenario<sup>b</sup></b>		$f_{u_p\text{-adjusted}} = \frac{PLR_{MIX} \cdot f_{u_p\text{-app}}}{1 + (PLR_{MIX} - 1) \cdot f_{u_p\text{-app}}}$	Eq. 4
<b>PLR for the MIX scenario<sup>c</sup></b>	WO-to-MIX approach	$PLR_{MIX} = PLR_{ALB} \times f_{B-ALB} + PLR_{AGP} \times f_{B-AGP} \text{ (no unit)}$ where $PLR_{ALB} = 13$ (no unit) and $PLR_{AGP} = 1$ (no unit)	Eq. 5

**Abbreviations:** **AGP** alpha-1-acid glycoprotein, **ALB** albumin, **CL<sub>h in situ</sub>** *in situ* hepatic clearance, **CL<sub>int, h</sub>** hepatic intrinsic clearance, **CL<sub>int, u</sub>** unbound hepatic intrinsic clearance, **f<sub>B-ALB</sub>** fractional binding to ALB in the mixture medium, **f<sub>B-AGP</sub>** fractional binding to AGP in the mixture medium, **f<sub>u<sub>p</sub></sub>** drug unbound fraction in plasma, **f<sub>u<sub>p</sub>-app</sub>** apparent drug unbound fraction in plasma, **K<sub>m</sub>** Michaelis constant, **LW** rat liver weight (mean values), **PLR** plasma (or perfusate)-to-liver ratio, **Q<sub>L</sub>** liver perfusate flow in IPRL, **MIX** mixture, **V<sub>max</sub>** maximum rate of enzyme activity, **WO** without plasma proteins.

- The  $R_{BP}$  was presumed to be equal to the unity. In IPRL experiments, the  $Q_L$  was set at 20 mL/min.
- The  $PLR_{MIX}$  values were calculated according to the WO-to-MIX extrapolation approach as described in the Methods section. Thus, the predicted values of  $CL_{h \text{ in situ}}$  were obtained based on the plasma protein-mediated hepatic uptake approach. The  $f_{u_p\text{-app}}$  were calculated according to the equation  $f_{u_p\text{-app}} = \frac{f_{u_p} \cdot F1}{1 + (F1 - 1) \cdot f_{u_p}}$  (Poulin, Hop, et al., 2012), where F1 is equal to the unity for PER (neutral drug) and to 2 for FLU (weak base; pKa= 9.8) according to the pH gradient effect. The F1 value for FLU was calculated according to the following equation  $F1 = \frac{\text{unionized fraction in plasma}}{\text{unionized fraction in cells}} = \frac{1}{1 + 10^{(pKa - 7.4)}}$  (the pH in the extracellular and in the intracellular has the value of 7.4 and 7.1, respectively). Note that in our most recent publications we have also calculated  $f_{u_p\text{-app}} = f_{u_p} \times F1$ . The first approach assumes that the pH gradient effect also follows the binding isotherm, whereas the second approach not. However, the calculated values of  $f_{u_p\text{-app}}$  of FLU are almost identical by these approaches.
- The  $f_{B-ALB}$  and  $f_{B-AGP}$  are the bound fractions to ALB and AGP in the MIX scenario, respectively. The bound fractions' values were calculated according to  $f_{B-AGP} = \frac{C_{bound\_AGP}}{C_{bound\_MIX}}$  and  $f_{B-ALB} = \frac{C_{bound\_ALB}}{C_{bound\_MIX}}$  where  $C_{bound\_AGP}$ ,  $C_{bound\_ALB}$  and  $C_{bound\_MIX}$  were obtained from the rapid equilibrium device (Bteich et al., 2020).

**Table 6.2. The PLR and  $f_{p\text{-adjusted}}$  calculations for perampanel and fluoxetine.**

PERAMPANEL (PER)						
Total drug $C_{\text{eq}}$ ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>a</sup>	$f_{p\text{-app}}$ <sup>b</sup>	$f_{p\text{-app}}$	$f_{B\text{-AGP}}$ in MIX	$f_{B\text{-ALB}}$ in MIX	$\text{PLR}_{\text{MIX}}$ <sup>c</sup>	$f_{p\text{-adjusted}}$ ( $\text{PLR}_{\text{MIX}}$ ) <sup>d</sup>
1.40	0.09	0.09	0.48	0.52	7.19	0.42
5.12	0.10	0.10	0.36	0.64	8.71	0.48
11.22	0.10	0.10	0.30	0.70	9.40	0.52
14.82	0.11	0.11	0.26	0.74	9.86	0.54
20.12	0.11	0.11	0.19	0.81	10.74	0.58
26.75	0.12	0.12	0.17	0.83	11.01	0.61
FLUOXETINE (FLU)						
Total drug $C_{\text{eq}}$ ( $\mu\text{mol/L}$ ) <sup>a</sup>	$f_{p\text{-app}}$ <sup>b</sup>	$f_{p\text{-app}}$	$f_{B\text{-AGP}}$ in MIX	$f_{B\text{-ALB}}$ in MIX	$\text{PLR}_{\text{MIX}}$ <sup>c</sup>	$f_{p\text{-adjusted}}$ ( $\text{PLR}_{\text{MIX}}$ ) <sup>d</sup>
0.44	0.009	0.02	0.56	0.44	6.34	0.11
2.37	0.010	0.02	0.58	0.42	6.09	0.11
8.08	0.013	0.03	0.48	0.52	7.27	0.16
11.47	0.016	0.03	0.60	0.40	5.84	0.16
14.63	0.023	0.04	0.57	0.43	6.11	0.22
19.62	0.043	0.08	0.58	0.42	6.09	0.35

a. The Total  $C_{\text{eq}}$  values were taken from the previous study Bteich et al. (2020). These values represent the mean values of measured concentrations at the outlet of the IPRL.

b. The  $f_{p\text{-app}}$  values were taken, respectively, from tables 5.3 and 5.4 for PER and FLU that are found in Bteich et al. (2020).

c. The  $\text{PLR}_{\text{MIX}}$  values for each scenario were calculated according to equation 5 in Table 6.1.

d. The  $f_{p\text{-adjusted}}$  values were calculated according to equation 4 in Table 6.1.

**Table 6.3. The predicted  $CL_{h\ in\ situ}$  values according to the free drug hypothesis and the plasma protein-mediated hepatic uptake.**

PERAMPANEL (PER)			
	Observed <i>in situ</i>	Predicted (free drug hypothesis)	Predicted (WO-to-MIX extrapolation)
Total drug $C_{eq}^a$	$CL_{h\ in\ situ}^a$	$CL_{h\ in\ situ}^{b,c}$	$CL_{h\ in\ situ}^{b,c}$
$\mu\text{mol/L}$	$\text{mL/min}$	$\text{mL/min}$	$\text{mL/min}$
1.40	8.46	4.61	11.55
5.12	6.80	4.12	11.28
11.22	6.40	3.56	10.43
14.82	5.59	3.33	10.05
20.12	4.56	3.08	9.61
26.75	4.63	2.86	9.02
FLUOXETINE (FLU)			
	Observed <i>in situ</i>	Predicted (free drug hypothesis)	Predicted (WO-to-MIX extrapolation)
Total drug $C_{eq}^a$	$CL_{h\ in\ situ}^a$	$CL_{h\ in\ situ}^{b,c}$	$CL_{h\ in\ situ}^{b,c}$
$\mu\text{mol/L}$	$\text{mL/min}$	$\text{mL/min}$	$\text{mL/min}$
0.44	16.06	4.40	15.26
2.37	13.11	2.67	12.54
8.08	9.80	1.47	9.88
11.47	8.70	1.34	8.35
14.63	6.93	1.53	8.93
19.62	7.69	2.13	9.89

a. The Total  $C_{eq}$ ,  $CL_{int, h}$  and  $CL_{h\ in\ situ}$  observed values for the drugs PER and FLU with MIX were taken, respectively, from tables 5.3 and 5.4 in Bteich et al. (2020). The  $CL_{int, h}$  ( $\text{mL/min/g}$  liver) were multiplied with the mean values of LW (13.17 g for PER and 17.82 for FLU) to have the values in  $\text{mL/min}$ .

b. The predicted  $CL_{int, h}$  values were calculated according to equation 3 (Table 6.1).

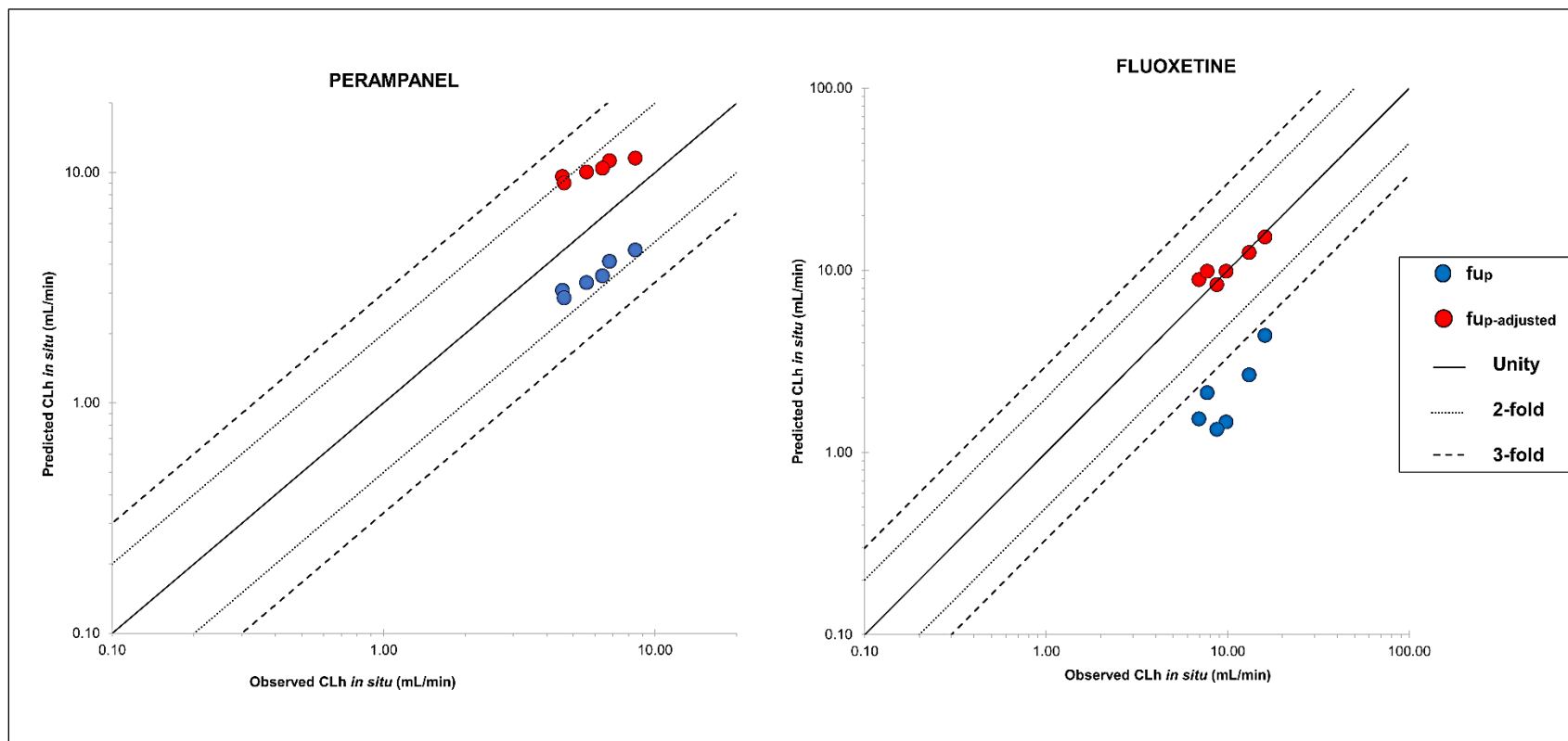
c. The predicted  $CL_{h\ in\ situ}$  values were calculated according to equations 1 and 2 (Table 6.1) after using either the  $f_{up}$  or the  $f_{up-adjusted}$  (i.e., as per the WO-to-MIX method for  $PLR_{MIX}$ ).

**Table 6.4. The global predictive performances of  $CL_{h\ in\ situ}$  for the two approaches and all drug concentrations. <sup>a</sup>**

	PERAMPANEL					FLUOXETINE				
	AAFE	AFE	RMSE	2-fold (%)	3-fold (%)	AAFE	AFE	RMSE	2-fold (%)	3-fold (%)
<b>Free drug hypothesis</b>	1.67	0.60	0.23	100	100	4.83	0.21	0.69	0	0
<b>Plasma protein-mediated hepatic uptake</b>	1.73	1.73	0.25	83.3	100	1.11	1.06	0.06	100	100

<sup>a</sup>. The calculations of 2-fold (%), 3-fold (%), AAFE, AFE and RMSE were made using N = 6 observed mean values of  $CL_{h\ in\ situ}$  per drug.

## Figures:



**Figure 6.1. Observed versus predicted *in situ* hepatic clearance using the conventional and the WO-to-MIX extrapolation approach.**

Solid, dashed squares and dashed lines represent, respectively, the unity, 2-fold and 3-fold ranges. The circles in blue and red represent, respectively, the data from the conventional (i.e.,  $f_{up}$ ) and the WO-to-MIX extrapolation approach (i.e.,  $f_{up}$ -adjusted).

# **DISCUSSION ET CONCLUSION GÉNÉRALES**



## CHAPITRE 7. Discussion

## 7.1. Discussion générale des résultats

Les modèles empiriques en PK/TK n'ont pas toujours assuré de bonnes performances prédictives des paramètres extrants (c'est-à-dire la  $CL_{int}$ , la  $CL_h$ ) (H. S. Brown et al., 2007; Riley et al., 2005; Stringer et al., 2008). Des sous-prédictions sont notamment documentées pour les médicaments (et contaminants) fortement liés aux protéines plasmatiques telles que l'ALB puisque les prédictions dépendent du paramètre intrant «  $f_{up}$  » d'un médicament (ou d'un contaminant) obtenu à l'état d'équilibre (Blanchard et al., 2006; Blanchard et al., 2004). Or, la moindre variation affectant ce dernier paramètre signifie que la valeur  $C_{free}$  du médicament s'est éloignée de celle attendue à l'état d'équilibre puisqu'il y a eu une transition de  $C_{bound}$  à  $C_{free}$  (Poulin et al., 2016). En conséquence, cela affecte directement les valeurs réelles (*in vivo* ou *in situ*) de la captation hépatique, la  $CL_{int}$  et la  $CL_h$  (Bounakta et al., 2018; Poulin, Hop, et al., 2012). Les modèles empiriques ne prennent donc pas en considération la variation de  $f_{up}$  apparente qui est mise en cause dans ces sous-prédictions (C. M. Bowman & Benet, 2018). Toutefois, dans les conditions *in vivo* du foie, outre une captation médiée de ces médicaments par les transporteurs membranaires (avec ou sans ATP) (C. M. Bowman et al., 2019), une captation facilitée par les protéines plasmatiques extracellulaires pourrait causer une variation de la  $f_{up}$  d'un médicament au niveau des hépatocytes sinusoidaux (Poulin et al., 2016; Poulin & Haddad, 2015). Ainsi, ces deux types de médiations par les protéines (c'est-à-dire transporteurs membranaires et protéines plasmatiques) expliquent en grande partie ces sous-prédictions. De nouveaux modèles *in silico* qui prennent en considération l'hypothèse émergente de « la captation hépatique facilitée par les protéines plasmatiques » étaient donc nécessaires.

L'objectif général de cette thèse était d'adapter des approches prédictives existantes (c'est-à-dire le modèle  $f_{up-adjusted}$  et le FDM) ou d'en développer des nouvelles afin d'estimer la  $CL_{in vivo}$  ainsi que sa variation pour des médicaments fortement liés dans le plasma, et ce, en comparant les prédictions à partir des données *in vitro* (ou *in situ*) à celles obtenues *in vivo* (ou *in situ*). Le projet de recherche était réparti en trois objectifs spécifiques.

**Dans la première étude (chapitre 4)**, il s'agit de présenter une revue de littérature complémentaire à celles déjà publiées autour de la captation facilitée par les protéines dans le foie (c'est-à-dire protéines plasmatiques, transporteurs et récepteurs membranaires) dans Poulin et al. (2016) et C.

M. Bowman and Benet (2018), ainsi que de proposer un arbre décisionnel pour faciliter la sélection des approches prédictives appropriées de  $CL_{h\ in\ vivo}$  pour chaque médicament ayant des caractéristiques différentes.

De la revue de littérature, nous tirons qu'il existe trois types d'interactions moléculaires qui auraient lieu en présence du complexe protéine plasmatique-ligand : protéine-protéine, protéine-lipide et interaction allostérique. Ces trois types sont possiblement derrière les mécanismes qui ont lieu dans le foie et qui font augmenter en conséquence la captation hépatique d'un médicament ([Figure 4.1, chapitre 4](#)).

Par ailleurs, les deux modèles «  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  » et « FDM » sont les seuls, jusqu'à présent, à prendre en considération le phénomène « ALB-mediated hepatic uptake » dans leurs équations. En utilisant lesdits modèles pour prédire la  $CL_{h\ in\ vivo}$  pour les deux substrats de OATP fortement liés à l'ALB : la pitavastatine et la molécule 1-anilino-8-naphthalene sulfonate ; une comparaison de leurs performances prédictives était possible (Poulin & Haddad, 2018). Les deux modèles ont prédit avec exactitude pour la pitavastatine, pour laquelle le « hepatic uptake » était médié par son transporteur OATP et l'ALB. Cependant, pour la molécule 1-anilino-8-naphthalene sulfonate, les prédictions par le FDM étaient plus proches des valeurs observées par comparaison aux prédictions surestimées obtenues par le modèle «  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  ». Cela pourrait être expliqué par le fait que cette molécule engorge le site de liaison de l'ALB et lui cause des changements allostériques, favorisant ainsi la rétention de la molécule dans ce site.

D'une part, le FDM est un modèle mécaniste où les paramètres spécifiques de liaison entre l'ALB et les hépatocytes  $B_{max}$  et  $K_d$  sont optimisés à partir de données expérimentales qui doivent être mesurées avant la prédiction du paramètre extrant R (c'est-à-dire rapport de captation hépatique). Il est donc plus spécifique et moins spéculatif, car il décrit probablement la capacité réelle (*in vivo*) des interactions entre le complexe ALB-ligand et les surfaces des hépatocytes. Il peut être particulièrement utile pour estimer tout effet intermédiaire de la captation hépatique facilitée par ALB qui ne peut pas être capturé par l'utilisation du paramètre  $f_{u_p}$  (effet minimal) ou du paramètre  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  (effet maximal).

Le modèle «  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  », d'autre part, ne nécessite aucun exercice d'optimisation, car il ne remplace que le paramètre  $f_{u_p}$  par le «  $f_{u_p\text{-adjusted}}$  » dans le modèle IVIVE classique, c'est-à-dire qu'il requiert

moins de paramètres spécifiques pour chaque médicament à trouver expérimentalement. Mais, le modèle «  $f_{up-adjusted}$  » présente de bonnes performances prédictives uniquement quand les interactions complexes ALB-ligand avec les membranes plasmiques d'hépatocytes sont supposées être maximales.

Six approches IVIVE ont été utilisées afin de prédire la  $CL_{h\ in\ vivo}$  pour 19 médicaments (appartenant à la classe 1A selon le système de classification biopharmaceutique ECCS) qui sont métabolisés principalement dans le foie et transportés par OAT2 et OATP1B1 (Kimoto et al., 2018). Ces approches IVIVE sont basées soit sur l'approche conventionnelle « well-stirred » soit sur le « extended clearance model ou ECM ». À noter que la majorité des médicaments étaient fortement et exclusivement liés à l'ALB, tandis que R- et S-warfarine et natéglinide se liaient à l'ALB et à l'AGP et les trois derniers (fluorescéine, pralidoxime et thalidomide) se liaient faiblement ou pas du tout dans le plasma. Dans la [figure 4.2 du chapitre 4](#), les résultats sont présentés et plusieurs approches ont pu bien prédire la  $CL_{h\ in\ vivo}$  pour le même médicament. Dans la [figure 4.3G \(du chapitre 4\)](#), la meilleure approche selon sa performance prédictive a été présentée pour chaque médicament (c'est-à-dire l'approche ayant la valeur prédite dans un encadré d'une marge d'erreur « AFE 2-fold »). Par exemple, l'approche 1 était la meilleure pour naproxène, l'approche 2 pour thalidomide, entacapone et tolbutamide, l'approche 3 pour tolcapone, l'approche 4 pour natéglinide, bromfénac et fluorescéine, l'approche 5 pour R- et S-warfarine, kétoprofène, méloxicam, rosiglitazone, pioglitazone, fenoprofène et ibuprofène, l'approche 6 pour indométacine, diclofénac et pralidoxime.

De ces résultats, nous concluons qu'une seule approche générique IVIVE n'existe pas pour tous les médicaments bien qu'ils appartiennent à la même classe biopharmaceutique (Classe 1A-ECCS). Pour chaque médicament, il fallait préciser si c'est la biotransformation ou bien le transport membranaire par OAT ou OATP qui prédomine dans le foie. Pour la première fois, nous avons inclus ensemble la captation hépatique facilitée par l'ALB et la captation hépatique facilitée par un transporteur membranaire, soulignant ainsi le rôle crucial de la forte liaison des médicaments à l'ALB dans la prédiction de  $CL_{h\ in\ vivo}$ . Par ailleurs, un arbre décisionnel a été proposé pour sélectionner la meilleure approche prédictive pour chaque médicament ainsi que pour lui accorder un profil PK/TK parmi cinq possibles (Figure 4.3, chapitre 4). L'application de cet arbre décisionnel a été possible pour ces 19 médicaments qui sont transportés dans

l'espace intracellulaire par le biais des OATs ou bien des OATPs en présence de l'ALB. Pour chaque médicament, nous avons vérifié si le transport ou de la biotransformation était le facteur limitant de la clairance hépatique. Ensuite, tout dépendamment des données sur le degré de leurs liaisons dans le plasma, nous avons établi le cas et l'approche qui correspondent le mieux à chaque médicament. Nous recommandons l'utilisation de l'arbre décisionnel pour sélectionner rapidement et judicieusement la meilleure approche prédictive d'un médicament (ECM, approche conventionnelle ou FDM, en insérant soit le paramètre  $f_{up}$  ou  $f_{up-adjusted}$ ) et ce, avant la réalisation des expériences *in vivo* ou *in situ* dans les phases préclinique et clinique.

Dans la [Figure 1.3 du chapitre 1](#), le groupe de médicaments fortement liés dans le plasma avait la fréquence la plus élevée parmi tous les médicaments approuvés par la FDA entre 2003 et 2019. Et, certains médicaments déjà mis en marché se lient aux deux protéines plasmatiques (ALB et AGP) ([Figure 1.4, chapitre 1](#)). Ces deux protéines plasmatiques ont des caractéristiques biochimiques et structurales différentes ([Tableau 2.1, chapitre 2](#)). Par ailleurs, la présence simultanée d'une forte liaison du médicament aux deux protéines plasmatiques ALB et AGP pourrait avoir des répercussions distinctes sur la prédiction de la captation hépatique et de la clairance hépatique. Cependant, cela n'a jamais été étudié.

Ainsi, **dans la deuxième étude (chapitre 5)**, nous avons évalué lesdites répercussions. Pour ce faire, à partir de la collecte de données des 1907 médicaments ([Figure 1.4, chapitre 1](#)), deux médicaments ont d'abord été sélectionnés comme candidats en fonction de leurs propriétés physicochimiques, métaboliques et liaisons aux protéines plasmatiques (Ratio  $_{AGP:ALB}$  proche de l'unité) : le perampanel (PER) et la fluoxétine (FLU). Ensuite, en utilisant des rats mâles Sprague Dawley ( $n= 3$  rats/scénario/médicament), des expériences sur le foie isolé et perfusé de rat (IPRL) ont été réalisées pour obtenir les valeurs de  $CL_{int}$  et  $CL_h$  pour les deux médicaments à diverses concentrations en solution physiologique sans protéines plasmatiques (WO), en solution avec l'ALB bovine (40 g/L) (ALB), en solution avec l'AGP bovine (1 g/L) (AGP), et en solution contenant les deux protéines aux dites concentrations (MIX).

Dans le foie de rat, PER est faiblement métabolisé (extraction hépatique= 0,2-0,7), tandis que FLU est fortement métabolisé (extraction hépatique= 0,8-0,99). Différents paramètres métaboliques ont été obtenus pour chaque scénario en ajustant le modèle de Michaelis-Menten aux données *in situ* (Figures 5.3 et 5.4). Pour les concentrations totales de PER, les paramètres métaboliques pour les scénarios WO, avec ALB et MIX étaient  $V_{max}$ = 90 ; 20,9 et 19,75 (nmol/min/g foie) et  $K_m$ = 17 ; 20,8 et 18,24 ( $\mu$ M), respectivement. Les valeurs  $V_{max}$  et  $K_m$  de PER avec AGP n'ont pas été estimées avec précision puisqu'il n'y avait pas de saturation métabolique observée pour ce scénario, tel qu'exigé par le modèle Michaelis-Menten. En ce qui concerne les concentrations totales de FLU, une saturation métabolique a été observée pour tous les scénarios. Donc, les paramètres métaboliques pour FLU étaient  $V_{max}$ = 65,5 ; 18,2 ; 37,2 et 15,8 (nmol/min/g foie) et  $K_m$ = 1,5 ; 2,2 ; 1,1 et 7,4 ( $\mu$ M) dans les quatre scénarios, respectivement.

Les ratios  $V_{max}/K_m$  (c'est-à-dire  $CL_{int, h}$  totale) ont diminué pour PER et pour FLU en présence d'ALB, AGP et MIX par rapport au scénario WO. Néanmoins, les valeurs de clairance intrinsèque non liée ( $CL_{int, u}$ ) et des taux métaboliques des deux médicaments ont augmenté pour les scénarios IPRL avec les protéines plasmatiques par rapport à celles du scénario WO, en particulier aux faibles concentrations libres de médicaments (c'est-à-dire concentrations thérapeutiques) (Figure 5.5 et 5.6 du chapitre 5). Par conséquent, les ratios de vitesse maximale enzymatique sur la constante de Michaelis ( $V_{max}/K_m, u$ ) ont augmenté tel qu'indiqué dans les tableaux 5.5 et 5.6 du chapitre 5, ce qui suggère une captation hépatique médiée par la protéine plasmatique en présence d'ALB ou d'AGP. En revanche, les valeurs de taux métaboliques et de  $CL_{int, u}$  observées avec les protéines plasmatiques aux concentrations libres plus élevées de médicaments deviennent plus faibles que celles pour le scénario WO. Exceptionnellement, pour le médicament PER avec AGP, les valeurs de taux et de  $CL_{int, u}$  étaient plus faibles, quelle que soit l'échelle de concentrations libres de médicaments (basses ou hautes). Cela est peut-être dû à la faible affinité de PER à l'AGP qui n'a joué aucun rôle dans la médiation de sa captation hépatique, bien que le %PPB de ce médicament dans le plasma soit d'environ 95 %.

Les conclusions que nous tirons de ces résultats, et pour la première fois, indiquent que les répercussions d'une forte liaison plasmatique sur les paramètres PK/TK diffèrent entre les niveaux de concentrations de médicaments selon que ces derniers soient bas *versus* élevés. Ces répercussions sont

aussi différentes entre les deux complexes protéine-médicament (c'est-à-dire ALB-médicament et AGP-médicament). Nous concluons qu'une captation hépatique médiée par les protéines plasmatiques est suspectée pour PER (avec ALB et MIX) et FLU (avec ALB, AGP et MIX) à l'échelle des concentrations thérapeutiques, à l'exception du scénario IRPL où PER a été testé avec AGP seulement.

Aucune explication ne pourra être donnée pour le moment en se basant seulement sur les résultats de cette étude puisque les mécanismes facilitant ou empêchant une captation hépatique de médicaments sont multiples. Par exemple, l'ampleur de dissociation des complexes protéines-médicaments au niveau de la membrane hépatocyte aurait pu avoir lieu grâce à la réduction diffusionnelle du médicament quand l'ALB est attirée par la membrane plasmique polarisée, et, en conséquence, augmenter la captation hépatique pour les deux médicaments. Mais, cela reste à explorer.

**Dans la troisième étude** (chapitre 6), il s'agissait de développer et de valider un nouveau modèle IVIVE prédictif de  $CL_{h\ in\ vivo}$  pour les xénobiotiques ayant le potentiel de se lier fortement dans le plasma, à l'ALB ainsi qu'à l'AGP. En utilisant les nouveaux termes  $f_{B\_ALB}$  et  $f_{B\_AGP}$  et les valeurs  $PLR_{ALB}=13$  et  $PLR_{AGP}=1$ , nous avons réussi à calculer le terme  $PLR_{MIX}$  et ce, pour chacune des concentrations de FLU et de PER. Ce dernier terme a ensuite été utilisé pour calculer les valeurs de  $f_{up\_adjusted}$  qui étaient utilisées dans le calcul de la clairance hépatique *in situ* selon la nouvelle approche WO-to-MIX ([Table 6.1](#)). Ladite approche est une adaptation du modèle  $f_{up\_adjusted}$  au scénario de liaison simultanée d'un xénobiotique à ALB et à AGP. Le calcul de la clairance hépatique *in situ* a aussi été fait en utilisant le modèle conventionnel qui se base sur l'hypothèse du médicament libre. Nos résultats dans le [tableau 6.4](#) et la [figure 6.1](#), démontrent que le modèle conventionnel offre des prédictions adéquates pour PER, mais des sous-prédictions pour FLU. D'après les résultats *in vitro* pour FLU ([Figure 5.2 du chapitre 5](#)), ce médicament est plus fortement lié à l'ALB que PER. En outre, selon les résultats *in situ*, FLU montrait le plus haut degré de captation hépatique médiée par l'ALB ([Figure 5.5 et 5.6 du chapitre 5](#)). En revanche, les performances prédictives du nouveau modèle étaient prometteuses par rapport au modèle conventionnel, en particulier pour le médicament FLU (au niveau de l'exactitude et de la précision). Grâce à cette première validation de la nouvelle approche WO-to-MIX, nous démontrons encore une fois que le modèle  $f_{up\_adjusted}$  est facile à adapter pour décrire des scénarios PK/TK et sert à améliorer les prédictions

de CLh. L'approche WO-to-MIX est donc une première pour les xénobiotiques qui se lient à l'ALB et à l'AGP, elle reste toutefois à valider en utilisant des données externes obtenues chez l'humain et les animaux.



## 7.2. Retombées du projet de thèse

La réussite de la prédiction de la clairance hépatique augmentera la confiance dans l'utilisation routinière des modèles IVIVE, en insérant les données *in vitro* (ou *in situ*) des séries de xénobiotiques nouvellement développés ou découverts (médicament ou substance chimique devenant contaminant). Ainsi, leur utilisation contribuera significativement à l'efficacité des prises de décisions dans les programmes d'analyse et de gestion du risque dans les domaines environnemental, pharmaceutique (R&D) et de la santé publique (par ex. US FDA, US EPA, Santé Canada, IRSST, INSPQ, etc.) – surtout en matière de réglementation de l'exposition à des xénobiotiques fortement liés aux protéines plasmatiques et métabolisés principalement par le foie. Nous discuterons plus amplement, dans les paragraphes suivants, des retombées importantes recueillies à la suite de l'obtention de nos résultats.

### 7.2.1. Discussion de l'importance de la liaison plasmatique dans les études PK/TK

Plusieurs notions théoriques sur la liaison aux protéines plasmatiques (ALB et AGP) ont été colligées et présentées dans les chapitres 1 et 2. Une comparaison exhaustive entre ALB et AGP, allant jusqu'à la pertinence des acides aminés dans les sites de liaison (high affinity/low capacity) a été faite pour la première fois dans le domaine de la pharmacologie/toxicologie ([Tableau 2.1, chapitre 2](#)).

En bref, le complexe de protéine-médicament est souvent réversible (conditions *in vitro*, *in situ* ou *in vivo*) et les molécules d'un médicament peuvent se lier à plusieurs sites d'une même protéine ou bien à différentes protéines plasmatiques (par ex. ALB et AGP). Des résultats obtenus pour les médicaments PER et FLU, nous documentons pour la première fois une captation hépatique médiée uniquement par les protéines plasmatiques dans l'intervalle thérapeutique des concentrations des médicaments. Ces observations soulignent l'importance de la réversibilité des complexes protéines-médicaments et du degré de la liaison plasmatique en PK/TK. Ainsi, nous recommandons l'inclusion de ces complexes dans les études *in silico* quand nous devrons désormais discuter des violations de **l'hypothèse du médicament libre** et des contributions supplémentaires des fractions liées à l'ALB ou l'AGP à la captation hépatique.

D'autres notions ont été mises en pratique lors des expériences *in vitro*, telles que la liaison fractionnaire ( $R_{AGP:ALB}$ ) et le type de liaison d'un médicament (typique ou atypique). Ces tests *in vitro* ont été réalisés pour une série de six médicaments qui ont été sélectionnés à partir de la base de données

figurant dans le [chapitre 1](#) puisque ces médicaments se lient à l'ALB et à l'AGP, et qu'ils sont métabolisés principalement/exclusivement dans le foie ([Figure 1.4](#)). Une valeur de  $R_{AGP:ALB}$  proche de l'unité signifie que la concentration liée d'un médicament à l'AGP équivaut celle observée pour l'ALB. Parmi ces six médicaments se liant à l'AGP et à l'ALB, uniquement PER et FLU ont eu une valeur de  $R_{AGP:ALB}$  s'approchant de l'unité, particulièrement aux basses concentrations de chaque médicament. Par ailleurs, le type de cinétique pour la majorité des médicaments testés était typique (ou non linéaire), sauf pour un seul médicament, le ziprasidone, pour lequel le type de cinétique observé au cours des études de liaison était atypique (c'est-à-dire la fraction non liée était diminuée en fonction de sa concentration totale). Ces derniers résultats n'ont pas été publiés.

### 7.2.2. Approches *in silico* pour la captation et la clairance hépatiques

Dans le [chapitre 4](#), nous étions en mesure de proposer un arbre décisionnel afin d'intégrer les paramètres de captation nécessaires pour une meilleure prédiction de la clairance hépatique, tout en considérant le rôle des transporteurs membranaires et celui des protéines plasmatiques. Dans le [chapitre 5](#), la sélection des médicaments PER et FLU a été utile pour évaluer les répercussions des protéines plasmatiques sur la captation et la clairance hépatiques. Cette sélection était nécessaire pour le développement d'une nouvelle approche d'extrapolation WO-to-MIX que nous avons décrite dans le [chapitre 6](#).

Ainsi, dans cette thèse, nous avons pu adapter le **modèle  $f_{up}$ -adjusted** pour les médicaments qui ont une captation facilitée par l'ALB et par les transporteurs (Chapitre 4). De plus, ce modèle était facile à adapter pour estimer la clairance hépatique pour les xénobiotiques qui ont une forte affinité pour les deux protéines ALB et AGP et qui sont métabolisés dans le foie (Chapitre 6). Grâce à ses performances prédictives, nous avons confiance que la prédiction de la clairance hépatique pourrait être améliorée en utilisant ce modèle soit pour des médicaments qui se lient fortement à l'ALB seulement, soit pour des médicaments qui se lient aux deux protéines ALB et AGP. Cependant, d'autres validations du modèle seront nécessaires.

### 7.2.3. L'utilité des systèmes de classification en PK/TK et de l'arbre décisionnel pour sélectionner la bonne approche

Tel que discuté dans le [chapitre 4](#), les critères de sélection des médicaments pourraient être basés sur des outils puissants tels que les systèmes de classification biopharmaceutique (BCS, BDDCS, EC3S et ECCS). Ces critères dépendent évidemment de l'objectif et de la conception de l'étude (par ex., le métabolisme, la captation et les prédictions de clairance). Nous rappelons les principaux critères de sélection des médicaments : 1) perméabilité, 2) solubilité, 3) charge (pKa), 4) lipophilie (LogP ou LogD7.4), 5) poids moléculaire, 6) substrats de P-glycoprotéine ou autres transporteurs-substrats de membrane, 7) subjection à l'efflux, 8) subjection à l'excrétion biliaire, 9) étendue de % PPB (liaison forte *versus* liaison faible), et 10) volume de distribution. Nous ajoutons que l'étendue de la captation hépatique facilitée par les protéines plasmatiques peut également devenir un critère de classification puisqu'advenant la dissociation des complexes protéines-médicaments, un surplus de médicament peut avoir des répercussions sur le métabolisme et la clairance hépatique.

D'après les résultats obtenus dans les chapitres 5 et 6, nous avons pu aussi identifier le cas le plus approprié pour chacun des deux médicaments sélectionnés (PER et FLU) en se basant sur le même arbre décisionnel, et tout particulièrement sur la caractéristique de liaisons aux deux protéines ALB et AGP. Le cas 4 (pour un ligand ayant une liaison considérable à l'ALB) pourrait être associé aux deux médicaments PER et FLU puisque les deux médicaments se lient à l'ALB et à l'AGP avec un  $R_{AGP:ALB}$  proche de l'unité, à des concentrations thérapeutiques ([figure 6.1 et table 6.4 du chapitre 6](#)). Pour les médicaments associés au cas 4, c'est la nouvelle approche de la captation hépatique facilitée par l'ALB (WO-to-MIX) basée qui se base sur la liaison fractionnaire qui a assuré de bonnes performances prédictives. Toutefois, le cas 1 pourrait aussi correspondre à des médicaments comme PER puisque l'approche conventionnelle (ou celle du médicament libre) a aussi assuré de bonnes performances prédictives, à des concentrations thérapeutiques de PER.

### 7.3. Limitations

Les limitations discutées ci-dessous sont reliées aux méthodes suivies dans les chapitres 4, 5 et 6.

- Concernant l'assignation de profils PK/TK aux 19 médicaments dans le chapitre 4, les données disponibles dans la littérature sur le changement de conformation et l'allostérie n'étaient pas suffisantes pour le complexe ALB-médicament. Or, afin de sélectionner l'approche de prédiction adéquate des paramètres PK/TK, il est souhaitable de connaître les interactions moléculaires que ce médicament peut avoir dans le foie. Par conséquent, pour la première étude, nous nous sommes fiés uniquement aux données disponibles dans la littérature.
- Selon les auteurs Cohen and Nicoll-Griffith (2012), il y a plusieurs limitations aux méthodes *in vitro* qui servent à mesurer la liaison aux protéines plasmatiques (PPB). Nous mentionnons, entre autres, l'incapacité de déterminer avec précision le PPB pour les médicaments fortement liés. Malheureusement, il n'est pas toujours possible d'avoir des méthodes analytiques qui offrent une sensibilité adéquate et une limite de quantification (LOQ) assez basse pour déterminer la fraction libre correspondante à 0.01 ou moins. Par exemple, la différence de pourcentage en concentration libre est un facteur de 2 quand la PPB change entre 99,0 % et 99,5 % ; 1 % contre 0,5 % de médicament libre. Cette différence prononcée entre la valeur mesurée *in vitro* et la valeur réelle est problématique puisque la  $f_{up}$  est cruciale pour la détermination exacte des profils PK/TK et des effets de médicaments ainsi que de leurs marges d'innocuité.
- Ni les concentrations intracellulaires de médicament (substance mère) ni les concentrations des métabolites n'ont été mesurées dans la deuxième étude. Ces données auraient pu servir à capter avec précision l'ampleur des contributions des protéines ALB et AGP à la captation hépatique. Cette quantification aurait pourtant été intéressante afin d'évaluer si la concentration intracellulaire de la substance mère correspondait à la concentration extracellulaire du médicament qui a disparu dans le sinusoiide hépatique.
- Seules les observations macroscopiques du foie et les calibrations journalières du système IPRL ont été suivies selon notre protocole pour un meilleur contrôle des perfusions de foies. Par exemple, la pression de la veine portale a été surveillée pendant les perfusions, et sa valeur était acceptable (entre 15-30 mmHg) dans vingt expériences (ce qui est proche de la valeur *in vivo* de

10 mmHg) ([Annexe VII.1](#)), mais elle s'était accrue au-delà de 50 mmHg en fonction du temps dans quatre des 24 expériences IPRL (deux avec PER et deux rats avec FLU), ce qui aurait pu impliquer la formation d'un œdème ou d'un dommage cellulaire. Néanmoins, les concentrations mesurées de PER et de FLU des 24 rats ont été acceptées et incluses dans nos résultats puisque le modèle de Michaelis-Menten a donné une convergence acceptable aux données obtenues des IPRL, le coefficient de détermination  $r^2$  se trouvait entre 0.75-0.94. Des caillots sanguins de petits volumes ont été observés dans ces foies à la suite de coupes longitudinales des lobes, ceci pourrait expliquer l'augmentation de la pression. Cela aurait pu être évité par une injection supplémentaire d'héparine. La pression aurait pu être influencée par les concentrations de l'ALB (40 g/L) et de l'AGP (1 g/L) utilisées dans les expériences IPRL et qui sont plus élevées que les concentrations normales trouvées chez un rat en santé. Par ailleurs, les expériences *in situ* comme celle d'IPRL peuvent être accompagnées par des études histologiques et biochimiques (enzymes hépatiques) pour mieux documenter les dommages potentiels produits par la pression élevée et la présence de lésions mitochondriales, hépatiques ou des dommages aux cellules endothéliales dans l'espace de Disse (Ferrigno et al., 2013).

#### 7.4. Nouvelles perspectives de recherche

Alors que nous finalisons ce projet sur l'hypothèse de la captation hépatique médiée par les protéines plasmatiques et que nos objectifs sont atteints, nos résultats peuvent être considérés comme des piliers pour mener à bien d'autres recherches en PK/TK. En plus du laboratoire du Dr. Sami Haddad qui poursuit toujours ses recherches sur ladite hypothèse en collaboration avec Dr. Patrick Poulin (laboratoire de recherche en DMPK computationnelle et quantitative), nous notons, entre autres, que deux laboratoires à l'international y travaillent : celui du Dr. Yuichi Sugiyama (Japon) et celui du Dr. Leslie Z. Benet (États-Unis).

Nous proposons l'utilisation de l'arbre décisionnel (chapitre 4) comme un outil pour accélérer la prise de décision en R&D des médicaments. Son application nous semble à préconiser même si nous n'avons pas pu obtenir, pour les 19 médicaments étudiés, un profil métabolique complet qui inclut les interactions (protéine-protéine, protéine-lipide, protéine-ligand) et les mécanismes impliqués. Ainsi, nous n'avons pas été en mesure de donner des conclusions tangibles sur les facteurs qui affectent la désorption/rétention du ligand dans l'espace interstitiel du foie. Par conséquent, il était difficile de préciser dans quelle mesure le degré de facilitation de la captation hépatique par l'ALB a été influencé par ces facteurs. Pour affronter ce défi lors des prédictions IVIVE de CL<sub>h</sub>, il faudrait désormais non seulement comprendre les propriétés du médicament, mais aussi identifier quelles interactions et quels mécanismes sont impliqués dans la captation/clairance hépatiques pour chaque médicament. L'élaboration de relations quantitatives entre structures et propriétés (QSPR) pourrait éventuellement aider à prédire quelles interactions/mécanismes devraient être impliqués ; en outre, à l'heure actuelle, les essais *in vitro* sont de plus en plus avancés pour couvrir le métabolisme, la captation et la liaison plasmatique du médicament d'intérêt, de même que l'internalisation des protéines plasmatiques dans le foie. Cette étape d'identification des interactions/mécanismes aidera les spécialistes en modélisation à choisir avec plus de confiance le modèle IVIVE approprié.

Dans les prochains paragraphes, nous énumérons de nouvelles perspectives dans la même thématique (l'amélioration des prédictions de la clairance hépatique) qui sont interreliées et qui pourraient éventuellement faire suite à ce projet.

Dans un premier temps, une autre validation des équations présentées dans le [chapitre 6](#) pourrait être faite pour les différents scénarios (ALB, AGP et MIX). Alors, nous suggérons que la validation cette fois-ci soit faite en utilisant des données *in vitro* (par ex. microsomes et hépatocytes) combinées à des facteurs d'extrapolation pour des prédictions IVIVE de la clairance  $CL_{h_{in vivo}}$  pour une série de médicaments comme PER et FLU qui se lient fortement autant à l'ALB et qu'à l'AGP (à des concentrations thérapeutiques).

Dans un deuxième temps, il sera aussi important d'améliorer les méthodes de modélisation IVIVE dans le cas où il y a un déplacement du substrat au niveau des sites de liaison de protéines plasmatiques, par un autre xénobiotique déplaceur. Ainsi, il s'agira dans cette partie d'évaluer les répercussions sur la  $CL_h$  (et autres paramètres PK/TK) du substrat lorsque les deux xénobiotiques 1) compétitionnent pour le même site de liaison, ou 2) se lient à des sites différents de l'ALB et 3) compétitionnent au niveau des sites de liaison à basses concentrations *versus* à fortes concentrations. Cela pourrait être possible en intégrant un nouveau paramètre dans le terme  $f_{up}$  pour marquer le déplacement et la variation en  $f_{up}$  du substrat. Par exemple, il serait intéressant 1) d'investiguer *a priori* dans quels sites les médicaments PER et FLU se lient à l'ALB et à l'AGP et 2) de tester si la présence d'un autre médicament tel que la warfarine ou l'ibuprofène, ou d'une substance endogène (acides gras, bilirubine) pourrait induire un déplacement de PER ou FLU. Le modèle  $f_{up-adjusted}$  pourrait être adapté pour répondre à cet objectif. La validation du modèle IVIVE servira à évaluer le déplacement du substrat du (des) site(s) primaire(s) de l'ALB ou de l'AGP, ce qui contribuera à améliorer les prédictions de  $CL_{h_{in vivo}}$  du substrat déplacé.

Dans un troisième temps, le terme  $f_{up}$  pourrait présenter une variabilité inter-espèce et intra-espèce (c'est-à-dire interindividuelle). Par exemple, chez l'humain, cette variabilité de liaison plasmatique existe entre les mères *versus* leurs nouveau-nés (McNamara & Alcorn, 2002), de même qu'entre les adultes en santé *versus* ceux qui ont une pathologie hépatique ou rénale et *versus* les personnes âgées (McNamara & Meiman, 2019). Il sera donc intéressant de prendre en compte la variabilité intra-espèce de  $f_{up}$  (et du degré de la captation hépatique médiée par les protéines plasmatiques pour les xénobiotiques fortement liés), dans la prédiction de la clairance hépatique. Toutefois, ladite variabilité n'est pas la seule existante pour les différentes sous-populations. Des paramètres biochimiques et physiologiques peuvent

exister (par ex. le débit du sang dans le foie, la concentration des enzymes). En conséquence, des distributions statistiques relatives à chaque sous-population devraient être construites pour tous ces paramètres intrants. Une fois que toutes les distributions d'un échantillon adéquat (représentatif de la sous-population) sont construites, il sera ensuite souhaitable d'intégrer la variabilité de tous les paramètres (incluant celle de la  $f_{up}$ ) dans les équations de CLh (ou autres paramètres PK/TK) combinées aux méthodes « Markov Chain Monte Carlo » afin de produire des simulations populationnelles.

Aux trois hypothèses précédentes, nous ajoutons qu'il sera aussi possible d'intégrer chacun des modèles développés pour la cinétique hépatique dans un autre modèle à base physiologique (PBPK) qui sera représentatif de l'organisme. Les modèles PBPK, à leur tour, pourraient être aussi combinés aux méthodes « Markov Chain Monte Carlo » pour des simulations populationnelles.

Dans un quatrième temps, étant donné que les formes glycosylées et les variantes phénotypiques de protéines plasmatiques (et de transporteurs membranaires) ainsi que les types de cinétique de liaison (typique ou atypique) pourraient avoir des répercussions sur les paramètres PK/TK, celles-ci devraient être évaluées dans des études précliniques et cliniques distinctes. En outre, le  $R_{AGP:ALB}$  semble être un paramètre de liaison protéique qui donne l'information sur la distribution, en termes de liaison, d'un médicament entre deux protéines plasmatiques. Ce ratio est fortement utile en modélisation PK/TK. Ainsi, de futurs projets pourraient porter sur la mesure des liaisons fractionnaires en utilisant le système RED et d'autres méthodes *in vitro* complémentaires (par ex. HPLC pour analyser les protéines et spectroscopie) (Cohen & Nicoll-Griffith, 2012). Ces projets aborderaient aussi le développement et la validation d'un nouveau modèle prédictif du ratio  $R_{AGP:ALB}$  pour la sous-catégorie de médicaments se liant à l'ALB et à l'AGP, à laquelle appartiennent PER et FLU ([Figure 1.4, Chapitre 1](#)). Une comparaison des résultats observés entre les différentes méthodes *in vitro* (incluant ceux du système RED) serait aussi intéressante à réaliser.

Dans un cinquième temps, un médicament peut se lier à différents éléments figurés du sang tels que les globules rouges et à d'autres protéines plasmatiques telles que les lipoprotéines et la globuline ([chapitre 2](#)). Par ailleurs, l'ALB peut aussi avoir une interaction avec les lipides se trouvant dans le plasma tels que les acides gras libres et les lipoprotéines plasmatiques ([Annexe 1.2](#)). L'ALB pourrait aussi faciliter



la captation hépatique des acides gras comme le palmitate (Burczynski et al., 2001; Burczynski et al., 1997; Elmadhoun et al., 2001). L'hypothèse qui sera intéressante à tester est de vérifier s'il existe un facteur majeur autre que l'ALB qui serait impliqué dans la captation facilitée du médicament dans le foie, dans le cas où la clairance hépatique est plus grande que celle prévue pour la concentration libre du médicament. Dans le cas des acides gras, plusieurs sont des ligands de l'ALB ([Figure 2.1](#)) et leur liaison aux sites peuvent affecter l'affinité d'un médicament. En conséquence, cette liaison d'acide gras pourrait influencer la formation/dissociation du complexe ALB-médicament en modifiant l'allostérie de la protéine plasmatique. Un déplacement du médicament pourrait donc favoriser sa captation hépatique, contrairement à la rétention du médicament dans le site de l'ALB qui est favorisée dans le cas d'une allostérie positive ([Figure 4.S1, supplemental du chapitre 4](#)). Pour tester cette hypothèse, les expériences *in vitro* et *in situ* pourraient être faites pour un médicament fortement lié à l'ALB en présence et en absence des acides gras. Nous rappelons qu'une autre théorie pourrait entrer en jeu telle que la transition de liaison induite par un transporteur (transporter-induced protein binding shift) (Baik & Huang, 2015; C. M. Bowman et al., 2019). L'activité de la protéine de transport des acides gras (Fatty Acid Binding Protein 1 ou FABP1) s'est avérée importante pour leur captation hépatique (Wang, Bonkovsky, de Lemos, & Burczynski, 2015). Le rôle de la FABP1 dans la captation hépatique des médicaments pourrait être étudié en présence de l'ALB et des médicaments d'intérêt. Une nouvelle hypothèse sera donc de vérifier si la FABP1 favorise une transition de liaison directe des acides gras de l'ALB vers la FABP1 et si la dissociation des acides gras de l'ALB rend la protéine plasmatique moins compacte favorisant ainsi la libération du médicament lié. Si ces mécanismes ont lieu *in vivo*, leur occurrence pourrait affecter négativement l'allostérie de l'ALB et en conséquence causeraient la dissociation du médicament de l'ALB. Une autre hypothèse pour vérifier si des lipoprotéines sont impliquées à faciliter la captation hépatique d'un médicament au lieu de l'ALB sera fort intéressante à explorer. Pour tester cette hypothèse, la méthodologie du chapitre 5 pourrait être suivie, mais en adaptant le devis pour inclure les lipoprotéines. Ainsi, le plasma pourrait être utilisé au lieu de dissoudre les protéines plasmatiques dans une solution physiologique.

D'autres laboratoires pourraient tester plusieurs autres hypothèses portant sur les interactions moléculaires citées dans le chapitre 4 en utilisant des méthodes novatrices. Par exemple, la modélisation 3D d'un complexe protéine-médicament pourrait servir à simuler l'emplacement du ligand dans le site de

liaison et les interactions allostériques potentielles qui en découlent (Schuetz et al., 2017). Autre exemple, la microscopie de fluorescence pourrait servir à mesurer par imagerie moléculaire à haute définition, avec une grande précision et en temps réel, les altérations de propriétés électrostatiques et conformationnelles des protéines plasmatiques en solution telles que l'ALB et l'AGP (M. Krishnan, Mojarad, Kukura, & Sandoghdar, 2010). Ces mesures pourraient être prises en présence d'un ligand ou même d'une membrane plasmique d'un hépatocyte (physiologiquement polarisé) avec les protéines plasmatiques. La microscopie par imagerie en direct pourrait aussi être utilisée pour capturer les molécules d'ALB en mouvance dans l'espace sinusoidal du foie et pour évaluer leurs distribution et captation hépatique en fonction du temps (Cheng et al., 2019). Par ailleurs l'intelligence artificielle, qui prend présentement de l'ampleur dans tous les domaines, pourrait aussi être utile afin de prédire les paramètres PK/TK (Kosugi & Hosea, 2020).

Finalement, il faut souligner que les modèles IVIVE et les tests *in vitro* servent de méthodes alternatives pour réduire le nombre d'animaux utilisés en recherche. Dans le cadre de ce projet de thèse, les approches développées et appliquées serviront à prédire, d'une façon courante, le métabolisme et la clairance hépatique des substances chimiques. Elles pourront donc remplacer en grande partie l'utilisation des animaux, ce qui est en concordance avec les stratégies Trois R (remplacement et réduction de l'utilisation des animaux et raffinement des méthodes précliniques).

Ainsi, en nous basant sur l'entièreté du présent travail, nous proposons l'adoption d'une nouvelle approche holistique de PK/TK dans le processus de R&D d'un médicament qui serait majoritairement métabolisé dans le foie. Cette approche valoriserait l'importance de la forte liaison plasmatique des xénobiotiques (médicaments et contaminants) provenant de la complexité des facteurs dans le milieu physiologique qui peuvent altérer l'étendue de cette liaison. Des compétences essentielles et des efforts interdisciplinaires seront donc à déployer dans le but d'évaluer *in vivo* la PK/TK d'un xénobiotique (médicament ou contaminant) dans le foie à un niveau acceptable de précision et d'exactitude. Dans le cadre de cette approche, plusieurs étapes seraient à réaliser en utilisant les méthodes discutées précédemment. Parmi celles-ci, nous énumérons les étapes suivantes :

1. Si les données *in vitro*, *in vivo* (ou *in situ*) sont disponibles pour un xénobiotique, il faudrait utiliser l'arbre décisionnel et passer à l'étape « 7 » qui est celle de la modélisation PK/TK. Sinon, il faudrait poursuivre avec l'étape « 2 » et ainsi de suite.
2. Identifier quelles interactions et quels mécanismes les complexes protéines plasmatiques-ligand sont susceptibles de subir dans le foie (interaction électrostatique, allostérie, « transporter-induced protein binding shift », internalisation) ;
3. Évaluer *in vitro* l'étendue de la captation hépatique médiée par les protéines ;
4. Évaluer les cinétiques de liaison (c'est-à-dire estimer les affinités d'un médicament aux transporteurs membranaires et aux protéines plasmatiques, et le ratio de liaison) et de métabolisme hépatique dans les conditions *in vitro* et *in situ* (médicament en mélange ou en individuel, avec ou sans protéines plasmatiques) ;
5. Évaluer les cinétiques de liaison (si possible) et de métabolisme hépatique dans le milieu *in vivo* (médicament en mélange ou en individuel, avec des concentrations physiologiques de protéines plasmatiques ou sans protéines plasmatiques par ex. en cas d'analbuminémie, ou avec des concentrations anormales en cas de maladies inflammatoires ou pathologies du foie) ;
6. Dans les étapes 3 et 4, mesurer les concentrations extracellulaires et intracellulaires de la substance mère ;
7. Faire des prédictions IVIVE en présence de protéines plasmatiques (sans ajustement) ou en leur absence (en incluant des paramètres d'ajustement). Les modèles  $f_{up-adjusted}$ , FDM et ECM pourraient être utilisés pour faire ces prédictions IVIVE. Le modèle  $f_{up-adjusted}$  nous offre l'opportunité d'atteindre des niveaux supérieurs d'exactitude et de précision quand les interactions entre le complexe ALB-xénobiotique et les hépatocytes sont maximales, ce qui rend ce modèle intéressant pour la prédiction de la clairance pour d'autres médicaments ;
8. Comparer les performances prédictives des modèles et obtenir une meilleure estimation de PK/TK dans le foie. Cela permettrait de mieux comprendre la relation entre la cinétique d'un xénobiotique et ses effets hépatotoxiques (c'est-à-dire la relation PK/PD).

## 7.5. Conclusion

La modélisation *in silico* est toujours utile en R&D pour prédire la clairance hépatique. Cependant, une approche générique IVIVE n'existe pas à cause de l'influence d'une multitude de mécanismes de captation facilitée et de types d'interactions entre le ligand et les protéines (c'est-à-dire transporteurs, protéines plasmatiques et allostérie). Néanmoins, il est désormais possible de sélectionner la meilleure approche prédictive de clairance hépatique pour chaque xénobiotique quand les données *in vitro* nécessaires sont disponibles. De plus, cette sélection de la meilleure approche sera plus précise en autant qu'il y ait des données suffisantes sur les interactions et les mécanismes qui ont lieu dans le foie.

Concernant la nouvelle approche prédictive pour les médicaments qui se lient à l'ALB et à l'AGP, elle pourrait être considérée comme un premier pas en modélisation PK/TK pour cette sous-catégorie de médicaments. Il importe toutefois de poursuivre les recherches avec d'autres médicaments de cette sous-catégorie afin d'effectuer des validations externes pour le modèle suggéré.

Finalement, les approches de CLh dans cette thèse pourraient être éventuellement intégrées dans des modèles PK/TK à base physiologique pour mieux prédire le devenir du xénobiotique dans l'organisme.

*Fin !*

## Bibliographie

- Abd Hamid, U. M., Royle, L., Saldova, R., Radcliffe, C. M., Harvey, D. J., Storr, S. J., . . . Rudd, P. M. (2008). A strategy to reveal potential glycan markers from serum glycoproteins associated with breast cancer progression. *Glycobiology*, *18*(12), 1105-1118. doi: 10.1093/glycob/cwn095
- Ajmal, M. R., Nusrat, S., Alam, P., Zaidi, N., Khan, M. V., Zaman, M., . . . Khan, R. H. (2017). Interaction of anticancer drug clofarabine with human serum albumin and human alpha-1 acid glycoprotein. Spectroscopic and molecular docking approach. *J Pharm Biomed Anal*, *135*, 106-115. doi: 10.1016/j.jpba.2016.12.001
- Ajmal, M. R., Zaidi, N., Alam, P., Nusrat, S., Siddiqi, M. K., Badr, G., . . . Khan, R. H. (2017). Insight into the interaction of antitubercular and anticancer compound clofazimine with human serum albumin: spectroscopy and molecular modelling. *J Biomol Struct Dyn*, *35*(1), 46-57. doi: 10.1080/07391102.2015.1132258
- Amidon, G. L., Lennernas, H., Shah, V. P., & Crison, J. R. (1995). A theoretical basis for a biopharmaceutic drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharm Res*, *12*(3), 413-420. doi: 10.1023/A:1016212804288
- Anand, U., & Mukherjee, S. (2013). Binding, unfolding and refolding dynamics of serum albumins. *Biochim Biophys Acta*, *1830*(12), 5394-5404. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.05.017
- Andersen, J. T., Dalhus, B., Viuff, D., Ravn, B. T., Gunnarsen, K. S., Plumridge, A., . . . Cameron, J. (2014). Extending serum half-life of albumin by engineering neonatal Fc receptor (FcRn) binding. *J Biol Chem*, *289*(19), 13492-13502. doi: 10.1074/jbc.M114.549832
- Andersen, J. T., Dee Qian, J., & Sandlie, I. (2006). The conserved histidine 166 residue of the human neonatal Fc receptor heavy chain is critical for the pH-dependent binding to albumin. *Eur J Immunol*, *36*(11), 3044-3051. doi: 10.1002/eji.200636556
- Andersen, M. E., Eklund, C. R., Mills, J. J., Barton, H. A., & Birnbaum, L. S. (1997). A multicompartiment geometric model of the liver in relation to regional induction of cytochrome P450s. *Toxicol Appl Pharmacol*, *144*(1), 135-144. doi: 10.1006/taap.1996.8066
- Andrade, E. L., Bento, A. F., Cavalli, J., Oliveira, S. K., Schwanke, R. C., Siqueira, J. M., . . . Calixto, J. B. (2016). Non-clinical studies in the process of new drug development - Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. *Braz J Med Biol Res*, *49*(12), e5646. doi: 10.1590/1414-431X20165646
- Anraku, M., Chuang, V. T., Maruyama, T., & Otagiri, M. (2013). Redox properties of serum albumin. *Biochim Biophys Acta*, *1830*(12), 5465-5472. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.036
- Arai, K., Ishioka, N., Huss, K., Madison, J., & Putnam, F. W. (1989). Identical structural changes in inherited albumin variants from different populations. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *86*(2), 434-438.
- Ascenzi, P., Bocedi, A., Notari, S., Menegatti, E., & Fasano, M. (2005). Heme impairs allosterically drug binding to human serum albumin Sudlow's site I. *Biochem Biophys Res Commun*, *334*(2), 481-486. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.06.127

- Ascenzi, P., di Masi, A., De Sanctis, G., Coletta, M., & Fasano, M. (2009). Ibuprofen modulates allosterically NO dissociation from ferrous nitrosylated human serum heme-albumin by binding to three sites. *Biochem Biophys Res Commun*, 387(1), 83-86. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.06.117>
- Ascenzi, P., & Fasano, M. (2009). Serum heme-albumin: an allosteric protein. *IUBMB Life*, 61(12), 1118-1122. doi: 10.1002/iub.263
- Ascenzi, P., & Fasano, M. (2010). Allostery in a monomeric protein: the case of human serum albumin. *Biophys Chem*, 148(1-3), 16-22. doi: 10.1016/j.bpc.2010.03.001
- Audagnotto, M., & Dal Peraro, M. (2017). Protein post-translational modifications: In silico prediction tools and molecular modeling. *Comput Struct Biotechnol J*, 15, 307-319. doi: 10.1016/j.csbj.2017.03.004
- Austin, R. P., Barton, P., Cockroft, S. L., Wenlock, M. C., & Riley, R. J. (2002). The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties. *Drug Metab Dispos*, 30(12), 1497-1503. doi: 10.1124/dmd.30.12.1497
- Baik, J., & Huang, Y. (2015). *Transporter-induced protein binding shift (TIPBS) hypothesis and modeling*. Paper presented at the 20th North American ISSX Meeting.
- Bailey, D., & Briggs, J. (2004). The binding of selected therapeutic drugs to human serum alpha-1 acid glycoprotein and to human serum albumin in vitro. *Ther Drug Monit.*, 26(1), 40-43.
- Baker, K. J., & Bradley, S. E. (1966). Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium by plasma albumin. Its role in hepatic BSP extraction. *J Clin Invest*, 45(2), 281-287. doi: 10.1172/JCI105341
- Baker, M., & Parton, T. (2007). Kinetic determinants of hepatic clearance: plasma protein binding and hepatic uptake. *Xenobiotica*, 37(10-11), 1110-1134. doi: 10.1080/00498250701658296
- Bal, W., Sokolowska, M., Kurowska, E., & Faller, P. (2013). Binding of transition metal ions to albumin: sites, affinities and rates. *Biochim Biophys Acta*, 1830(12), 5444-5455. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.06.018
- Banker, M., & Clark, T. (2008). Plasma / Serum Protein Binding Determinations. *Current Drug Metabolism*, 9(9), 854-859. doi: 10.2174/138920008786485065
- Barnaby, R. J., & Bottacini, M. (2004). Protein binding in plasma: a case history of a highly protein-bound drug. In G. Evans (Ed.), *A HANDBOOK OF BIOANALYSIS AND DRUG METABOLISM* (pp. 172-191). USA: CRC.
- Baroni, S., Mattu, M., Vannini, A., Cipollone, R., Aime, S., Ascenzi, P., & Fasano, M. (2001). Effect of ibuprofen and warfarin on the allosteric properties of haem-human serum albumin. *European Journal of Biochemistry*, 268(23), 6214-6220. doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02569.x
- Bastaki, M., Braiterman, L. T., Johns, D. C., Chen, Y. H., & Hubbard, A. L. (2002). Absence of direct delivery for single transmembrane apical proteins or their "Secretory" forms in polarized hepatic cells. *Mol Biol Cell*, 13(1), 225-237. doi: 10.1091/mbc.01-07-0376
- Baumann, Eap, G. B., Müller, W. E., & Tillement, J. P. (1989). *Alpha1 – Acid Glycoprotein (Genetics, Biochemistry, Physiological Functions and Pharmacology)*. New York: Alan R. Liss.
- Baumann, & Held, W. A. (1981). Biosynthesis and hormone-regulated expression of secretory glycoproteins in rat liver and hepatoma cells. Effect of glucocorticoids and inflammation. *Journal of Biological Chemistry*, 256(19), 10145-10155.

- Benet, L. Z., Broccatelli, F., & Oprea, T. I. (2011). BDDCS applied to over 900 drugs. *AAPS J*, 13(4), 519-547. doi: DOI: 10.1208/s12248-011-9290-9
- Benet, L. Z., Kroetz, D. L., & Sheiner, L. B. (1996). Pharmacokinetics: the dynamics of drug absorption, distribution, and elimination. In J. Hardman & L. Limbird (Eds.), *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (9th (edn) ed., Vol. 10). New York, USA: McGraw-Hill.
- Benet, L. Z., Liu, S., & Wolfe, A. R. (2017). The Universally Unrecognized Assumption in Predicting Drug Clearance and Organ Extraction Ratio. *Clin Pharmacol Ther.* doi: 10.1002/cpt.802
- Benet, L. Z., & Sodhi, J. K. (2020). Investigating the Theoretical Basis for In Vitro-In Vivo Extrapolation (IVIVE) in Predicting Drug Metabolic Clearance and Proposing Future Experimental Pathways. *AAPS J*, 22(5), 120. doi: 10.1208/s12248-020-00501-9
- Bennett, M., & Schmid, K. (1980). Immunosuppression by human plasma alpha 1-acid glycoprotein: importance of the carbohydrate moiety. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77(10), 6109-6113.
- Berezhkovskiy, L. M. (2011). The Corrected Traditional Equations for Calculation of Hepatic Clearance that Account for the Difference in Drug Ionization in Extracellular and Intracellular Tissue Water and the Corresponding Corrected PBPK Equation. *J Pharm Sci*, 100(3), 1167-1183. doi: 10.1002/jps.22324
- Berson, S. A., & Yalow, R. S. (1957). Distribution and metabolism of I131 labeled proteins in man. *Fed Proc*, 16(2), suppl 13-18.
- Bessems, M., t Hart, N. A., Tolba, R., Doorschodt, B. M., Leuvenink, H. G., Ploeg, R. J., . . . van Gulik, T. M. (2006). The isolated perfused rat liver: standardization of a time-honoured model. *Lab Anim*, 40(3), 236-246. doi: 10.1258/002367706777611460
- Bhushan, B., Khanadeev, V., Khlebtsov, B., Khlebtsov, N., & Gopinath, P. (2017). Impact of albumin based approaches in nanomedicine: Imaging, targeting and drug delivery. *Adv Colloid Interface Sci*, 246, 13-39. doi: 10.1016/j.cis.2017.06.012
- Bilello, J. A., Bilello, P. A., Stellrecht, K., Leonard, J., Norbeck, D. W., Kempf, D. J., . . . Drusano, G. L. (1996). Human serum alpha 1 acid glycoprotein reduces uptake, intracellular concentration, and antiviral activity of A-80987, an inhibitor of the human immunodeficiency virus type 1 protease. *Antimicrob Agents Chemother*, 40(6), 1491-1497.
- Black, S., Kushner, I., & Samols, D. (2004). C-reactive Protein. *J Biol Chem*, 279(47), 48487-48490. doi: 10.1074/jbc.R400025200
- Blanchard, N., Hewitt, N. J., Silber, P., Jones, H., Coassolo, P., & Lave, T. (2006). Prediction of hepatic clearance using cryopreserved human hepatocytes: a comparison of serum and serum-free incubations. *J Pharm Pharmacol*, 58(5), 633-641. doi: 10.1211/jpp.58.5.0008
- Blanchard, N., Richert, L., Notter, B., Delobel, F., David, P., Coassolo, P., & Lave, T. (2004). Impact of serum on clearance predictions obtained from suspensions and primary cultures of rat hepatocytes. *Eur J Pharm Sci*, 23(2), 189-199. doi: 10.1016/j.ejps.2004.07.007
- Bockmann, R. A., & Grubmuller, H. (2004). Multistep binding of divalent cations to phospholipid bilayers: a molecular dynamics study. *Angew Chem Int Ed Engl*, 43(8), 1021-1024. doi: 10.1002/anie.200352784
- Bohnert, T., & Gan, L. S. (2013). Plasma protein binding: from discovery to development. *J Pharm Sci*, 102(9), 2953-2994. doi: 10.1002/jps.23614
- Bou-Abdallah, F., Sprague, S. E., Smith, B. M., & Giffune, T. R. (2016). Binding thermodynamics of Diclofenac and Naproxen with human and bovine serum albumins: A calorimetric and



- spectroscopic study. *The Journal of Chemical Thermodynamics*, 103, 299-309. doi: 10.1016/j.jct.2016.08.020
- Bounakta, S., Bteich, M., Mantha, M., Poulin, P., & Haddad, S. (2018). Predictions of bisphenol A hepatic clearance in the isolated perfused rat liver (IPRL): impact of albumin binding and of co-administration with naproxen. *Xenobiotica*, 48(2), 135-147. doi: 10.1080/00498254.2017.1294276
- Bowman, B. H. (1993). *Hepatic Plasma Proteins: Mechanisms of Function and Regulation*. California : USA: Academic Press Inc.
- Bowman, C. M., & Benet, L. Z. (2016). Hepatic Clearance Predictions from In Vitro-In Vivo Extrapolation and the Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Drug Metab Dispos*, 44(11), 1731-1735. doi: 10.1124/dmd.116.071514
- Bowman, C. M., & Benet, L. Z. (2018). An examination of protein binding and protein-facilitated uptake relating to in vitro-in vivo extrapolation. *Eur J Pharm Sci*, 123, 502-514. doi: 10.1016/j.ejps.2018.08.008
- Bowman, C. M., & Benet, L. Z. (2019). In Vitro-In Vivo Extrapolation and Hepatic Clearance-Dependent Underprediction. *J Pharm Sci*, 108(7), 2500-2504. doi: 10.1016/j.xphs.2019.02.009
- Bowman, C. M., Okochi, H., & Benet, L. Z. (2019). The Presence of a Transporter-Induced Protein Binding Shift: A New Explanation for Protein-Facilitated Uptake and Improvement for In Vitro-In Vivo Extrapolation. *Drug Metab Dispos*, 47(4), 358-363. doi: 10.1124/dmd.118.085779
- Bree, F., Houin, G., Barre, J., Moretti, J. L., Wirquin, V., & Tillement, J. P. (1986). Pharmacokinetics of intravenously administered 125I-labelled human alpha 1-acid glycoprotein. *Clin Pharmacokinet*, 11(4), 336-342. doi: 10.2165/00003088-198611040-00006
- Brodie, B. B., Kurz, H., & Schanker, L. S. (1960). THE IMPORTANCE OF DISSOCIATION CONSTANT AND LIPID-SOLUBILITY IN INFLUENCING THE PASSAGE OF DRUGS INTO THE CEREBROSPINAL FLUID. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 130(1), 20-25.
- Brown, H. S., Griffin, M., & Houston, J. B. (2007). Evaluation of cryopreserved human hepatocytes as an alternative in vitro system to microsomes for the prediction of metabolic clearance. *Drug Metab Dispos*, 35(2), 293-301. doi: 10.1124/dmd.106.011569
- Brown, J. R. (1976). Structural origins of mammalian albumin. *Fed Proc*, 35(10), 2141-2144.
- Bteich, M. (2019). An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. *Heliyon*, 5(11), e02879. doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02879
- Bteich, M., Poulin, P., & Haddad, S. (2019). The potential protein-mediated hepatic uptake: discussion on the molecular interactions between albumin and the hepatocyte cell surface and their implications for the in vitro-to-in vivo extrapolations of hepatic clearance of drugs. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 15(8), 633-658. doi: 10.1080/17425255.2019.1640679
- Bteich, M., Poulin, P., Piette, S., & Haddad, S. (2020). Impact of Extensive Plasma Protein Binding on the In Situ Hepatic Uptake and Clearance of Perampanel and Fluoxetine in Sprague Dawley Rats. *J Pharm Sci*, 109(10), 3190-3205. doi: 10.1016/j.xphs.2020.07.003

- Bujacz, A., Zielinski, K., & Sekula, B. (2014). Structural studies of bovine, equine, and leporine serum albumin complexes with naproxen. *Proteins*, 82(9), 2199-2208. doi: 10.1002/prot.24583
- Burczynski, F. J., Moran, J. B., Cai, Z. S., & Forker, E. L. (1990). Beta-lactoglobulin enhances the uptake of free palmitate by hepatocyte monolayers: the relative importance of diffusion and facilitated dissociation. *Can J Physiol Pharmacol*, 68(2), 201-206. doi: 10.1139/y90-031
- Burczynski, F. J., Wang, G. Q., Elmadhoun, B., She, Y. M., Roberts, M. S., & Standing, K. G. (2001). Hepatocyte [3H]-palmitate uptake: effect of albumin surface charge modification. *Can J Physiol Pharmacol*, 79(10), 868-875.
- Burczynski, F. J., Wang, G. Q., & Hnatowich, M. (1997). Effect of binding protein surface charge on palmitate uptake by hepatocyte suspensions. *Br J Pharmacol*, 120(7), 1215-1220. doi: 10.1038/sj.bjp.0701030
- Bürgi, W. (1989). The biological role of the carbohydrate moiety of human plasma glycoproteins. In P. Baumann, C. B. Eap, W. Muller, & J. P. Tillement (Eds.), *Prog Clin Biol Res* (Vol. 300, pp. 23-45.). New York: USA: ALAN R. LISS.
- Buscher, B., Laakso, S., Mascher, H., Pusecker, K., Doig, M., Dillen, L., . . . Timmerman, P. (2014). Bioanalysis for plasma protein binding studies in drug discovery and drug development: views and recommendations of the European Bioanalysis Forum. *Bioanalysis*, 6(5), 673-682. doi: 10.4155/bio.13.338
- Butler, A. M., Blatt, H., & Southgate, H. (1935). THE SOLUBILITY OF THE PLASMA PROTEINS: II. DEPENDENCE ON pH, TEMPERATURE, AND LIPID CONTENT IN CONCENTRATED SOLUTIONS OF POTASSIUM PHOSPHATE AND APPLICATION TO THEIR SEPARATE PRECIPITATION. *Journal of Biological Chemistry*, 109(2), 755-767.
- Butler, A. M., & Montgomery, H. (1932). THE SOLUBILITY OF THE PLASMA PROTEINS I. DEPENDENCE ON SALT AND PLASMA CONCENTRATIONS IN CONCENTRATED SOLUTIONS OF POTASSIUM PHOSPHATE. *Journal of Biological Chemistry*, 99(1), 173-195.
- Camenisch, G., & Umehara, K. (2012). Predicting human hepatic clearance from in vitro drug metabolism and transport data: a scientific and pharmaceutical perspective for assessing drug-drug interactions. *Biopharm Drug Dispos*, 33(4), 179-194. doi: 10.1002/bdd.1784
- Camenisch, G. P. (2016). Drug Disposition Classification Systems in Discovery and Development: A Comparative Review of the BDDCS, ECCS and ECCCS Concepts. *Pharm Res*, 33(11), 2583-2593. doi: 10.1007/s11095-016-2001-6
- Carter, D. C., & Ho, J. X. (1994). Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem*, 45, 153-203. doi: 10.1016/s0065-3233(08)60640-3
- Chakrabarti, S. K. (1978). Cooperativity of warfarin binding with human serum albumin induced by free fatty acid anion. *Biochem Pharmacol*, 27(5), 739-743. doi: 10.1016/0006-2952(78)90513-0
- Chaudhury, C., Mehnaz, S., Robinson, J. M., Hayton, W. L., Pearl, D. K., Roopenian, D. C., & Anderson, C. L. (2003). The major histocompatibility complex-related Fc receptor for IgG (FcRn) binds albumin and prolongs its lifespan. *J Exp Med*, 197(3), 315-322. doi: 10.1084/jem.20021829
- Chen, J., & Hage, D. S. (2004). Quantitative analysis of allosteric drug-protein binding by biointeraction chromatography. *Nat Biotechnol*, 22(11), 1445-1448. doi: 10.1038/nbt1022

- Cheng, D., Morsch, M., Shami, G. J., Chung, R. S., & Braet, F. (2019). Albumin uptake and distribution in the zebrafish liver as observed via correlative imaging. *Exp Cell Res*, 374(1), 162-171. doi: 10.1016/j.yexcr.2018.11.020
- Cheresh, D. A., Haynes, D. H., & Distasio, J. A. (1984). Interaction of an acute phase reactant, alpha 1-acid glycoprotein (orosomucoid), with the lymphoid cell surface: a model for non-specific immune suppression. *Immunology*, 51(3), 541-548.
- Christensen, H., Baker, M., Tucker, G. T., & Rostami-Hodjegan, A. (2006). Prediction of plasma protein binding displacement and its implications for quantitative assessment of metabolic drug-drug interactions from in vitro data. *J Pharm Sci*, 95(12), 2778-2787. doi: 10.1002/jps.20733
- Christie, W. W. (1985). Rapid separation and quantification of lipid classes by high performance liquid chromatography and mass (light-scattering) detection. *J Lipid Res*, 26(4), 507-512.
- Chuang, V. T., & Otagiri, M. (2002). How do fatty acids cause allosteric binding of drugs to human serum albumin? *Pharm Res*, 19(10), 1458-1464. doi: 10.1023/a:1020496314081
- Clewell, H. J., Teegarden, J., McDonald, T., Sarangapani, R., Lawrence, G., Covington, T., . . . Shipp, A. (2002). Review and evaluation of the potential impact of age- and gender-specific pharmacokinetic differences on tissue dosimetry. *Crit Rev Toxicol*, 32(5), 329-389. doi: 10.1080/20024091064264
- Cohen, L. H., & Nicoll-Griffith, D. A. (2012). Plasma Protein Binding Methods in Drug Discovery and Development: Bioanalysis *Encyclopedia of Drug Metabolism and Interactions*.
- Colbeau, A., Nachbaur, J., & Vignais, P. M. (1971). Enzymic characterization and lipid composition of rat liver subcellular membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 249(2), 462-492. doi: 10.1016/0005-2736(71)90123-4
- Constable, P. D., & Stämpfli, H. R. (2005). Experimental Determination of Net Protein Charge and AtotandKaof Nonvolatile Buffers in Canine Plasma. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19(4), 507-514. doi: 10.1111/j.1939-1676.2005.tb02719.x
- Curry, S. (2009). Lessons from the crystallographic analysis of small molecule binding to human serum albumin. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24(4), 342-357. doi: 10.2133/dmpk.24.342
- Curry, S., Mandelkow, H., Brick, P., & Franks, N. (1998). Crystal structure of human serum albumin complexed with fatty acid reveals an asymmetric distribution of binding sites. *Nat Struct Biol*, 5(9), 827-835. doi: 10.1038/1869
- D, H. (1987). Isolated perfused rat liver: an experimental model for studies on ammonium and amino acid metabolism. *Infusionsther Klin Ernahr*, 14(14), 174-178.
- Da-Silva, F., Boulenc, X., Vermet, H., Compigne, P., Gerbal-Chaloin, S., Daujat-Chavanieu, M., . . . Poulin, P. (2018). Improving Prediction of Metabolic Clearance Using Quantitative Extrapolation of Results Obtained From Human Hepatic Micropatterned Cocultures Model and by Considering the Impact of Albumin Binding. *J Pharm Sci*, 107(7), 1957-1972. doi: 10.1016/j.xphs.2018.03.001
- Dargo, G., Bajusz, D., Simon, K., Muller, J., & Balogh, G. T. (2020). Human Serum Albumin Binding in a Vial: A Novel UV-pH Titration Method To Assist Drug Design. *J Med Chem*, 63(4), 1763-1774. doi: 10.1021/acs.jmedchem.0c00046
- De Leeuw, A. M., Brouwer, A., & Knook, D. L. (1990). Sinusoidal endothelial cells of the liver: fine structure and function in relation to age. *J Electron Microscop Tech*, 14(3), 218-236. doi: 10.1002/jemt.1060140304
- Decaens, C., Durand, M., Grosse, B., & Cassio, D. (2008). Which in vitro models could be best used to study hepatocyte polarity? *Biol Cell*, 100(7), 387-398. doi: 10.1042/BC20070127

- Deitchman, A. N., Singh, R. S. P., & Derendorf, H. (2018). Nonlinear Protein Binding: Not What You Think. *J Pharm Sci*, *107*(7), 1754-1760. doi: 10.1016/j.xphs.2018.03.023
- Dente, L., Pizza, M. G., Metspalu, A., & Cortese, R. (1987). Structure and expression of the genes coding for human alpha 1-acid glycoprotein. *Embo j*, *6*(8), 2289-2296.
- Derendorf, H., Schmidt, S., Rowland, M., & Tozer, T. N. (2020a). Chapter 5: Elimination *Rowland and Tozer's Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications* (5th Edition ed., pp. p119-168): Wolters Kluwer.
- Derendorf, H., Schmidt, S., Rowland, M., & Tozer, T. N. (2020b). Chapter 16: Nonlinearities *Rowland and Tozer's Clinical pharmacokinetics and pharmacodynamics : concepts and applications* (5th Edition ed., pp. p491-530): Wolters Kluwer.
- DiMasi, J. A., Grabowski, H. G., & Hansen, R. W. (2016). Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ*, *47*, 20-33. doi: 10.1016/j.jhealeco.2016.01.012
- DiMasi, J. A., Hansen, R. W., & Grabowski, H. G. (2003). The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ*, *22*(2), 151-185. doi: 10.1016/S0167-6296(02)00126-1
- Dockal, M., Carter, D. C., & Ruker, F. (1999). The three recombinant domains of human serum albumin. Structural characterization and ligand binding properties. *J Biol Chem*, *274*(41), 29303-29310. doi: 10.1074/jbc.274.41.29303
- Dod, B. J., & Gray, G. M. (1968). The lipid composition of rat-liver plasma membranes. *Biochim Biophys Acta*, *150*(3), 397-404. doi: 10.1016/0005-2736(68)90138-7
- Dollery, C., & Boobis, A. R. (1999). *Therapeutic drugs*. Edinburgh: Churchill Livingstone.
- Doolittle, R. F. (1984). Evolution of the Vertebrate Plasma Proteins. 317-360. doi: 10.1016/b978-0-12-568404-0.50013-2
- Doolittle, R. F. (1992). Stein and Moore Award address. Reconstructing history with amino acid sequences. *Protein Sci*, *1*(2), 191-200. doi: 10.1002/pro.5560010201
- Drubin, D. G., & Nelson, W. J. (1996). Origins of cell polarity. *Cell*, *84*(3), 335-344. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81278-7
- Eap, C. B., Cuendet, C., & Baumann, P. (1988). Selectivity in the binding of psychotropic drugs to the variants of alpha-1 acid glycoprotein. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, *337*(2), 220-224. doi: 10.1007/BF00169251
- Eisenberg, M., Gresalfi, T., Riccio, T., & McLaughlin, S. (1979). Adsorption of monovalent cations to bilayer membranes containing negative phospholipids. *Biochemistry*, *18*(23), 5213-5223. doi: 10.1021/bi00590a028
- Elmadhoun, B. M., Wang, G. Q., Kirshenbaum, L. A., & Burczynski, F. J. (2001). Palmitate uptake by neonatal rat myocytes and hepatocytes. Role of extracellular protein. *Eur J Biochem*, *268*(11), 3145-3153. doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02190.x
- Elsadek, B., & Kratz, F. (2012). Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon. *J Control Release*, *157*(1), 4-28. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.09.069
- Elzoghby, A. O., Samy, W. M., & Elgindy, N. A. (2012). Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems. *J Control Release*, *157*(2), 168-182. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.07.031
- Fajardo, V. A., McMeekin, L., & LeBlanc, P. J. (2011). Influence of phospholipid species on membrane fluidity: a meta-analysis for a novel phospholipid fluidity index. *J Membr Biol*, *244*(2), 97-103. doi: 10.1007/s00232-011-9401-7

- Fanali, G., di Masi, A., Trezza, V., Marino, M., Fasano, M., & Ascenzi, P. (2012). Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med*, 33(3), 209-290. doi: 10.1016/j.mam.2011.12.002
- Fasano, M., Curry, S., Terreno, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., . . . Ascenzi, P. (2005). The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, 57(12), 787-796. doi: 10.1080/15216540500404093
- FDA. (2010). PROTOPAM Chloride (pralidoxime chloride) for Injection Retrieved 28th of January 2019, 2019, from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2010/014134s022lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2010/014134s022lbl.pdf)
- FDA. (2017a). *Label for Fycompa (perampanel)*. (Reference ID: 4130133). Retrieved from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/202834s012\\_208277s001lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/202834s012_208277s001lbl.pdf).
- FDA. (2017b). *Label for Prozac (fluoxetine)*. (Reference ID: 4036401 ). Retrieved from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2017/018936s108lbl.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/018936s108lbl.pdf).
- Fehske, K. J., Schlafer, U., Wollert, U., & Muller, W. E. (1982). Characterization of an important drug binding area on human serum albumin including the high-affinity binding sites of warfarin and azapropazone. *Mol Pharmacol*, 21(2), 387-393.
- Felmlee, D. J., Grun, D., & Baumert, T. F. (2018). Zooming in on liver zonation. *Hepatology*, 67(2), 784-787. doi: 10.1002/hep.29554
- Fernandes, C. L., Ligabue-Braun, R., & Verli, H. (2015). Structural glycobiology of human alpha1-acid glycoprotein and its implications for pharmacokinetics and inflammation. *Glycobiology*, 25(10), 1125-1133. doi: 10.1093/glycob/cwv041
- Ferrigno, A., Richelmi, P., & Vairetti, M. (2013). Troubleshooting and improving the mouse and rat isolated perfused liver preparation. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 67(2), 107-114. doi: 10.1016/j.vascn.2012.10.001
- Filip, Z., Jan, K., Vendula, S., Jana, K. Z., Kamil, M., & Kamil, K. (2013). Albumin and alpha1-acid glycoprotein: old acquaintances. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 9(8), 943-954. doi: 10.1517/17425255.2013.790364
- Fischer, F. C., Abele, C., Droge, S. T. J., Henneberger, L., Konig, M., Schlichting, R., . . . Escher, B. I. (2018). Cellular Uptake Kinetics of Neutral and Charged Chemicals in in Vitro Assays Measured by Fluorescence Microscopy. *Chem Res Toxicol*, 31(8), 646-657. doi: 10.1021/acs.chemrestox.8b00019
- Fischer, K., Kettunen, J., Wurtz, P., Haller, T., Havulinna, A. S., Kangas, A. J., . . . Metspalu, A. (2014). Biomarker profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy for the prediction of all-cause mortality: an observational study of 17,345 persons. *PLoS Med*, 11(2), e1001606. doi: 10.1371/journal.pmed.1001606
- Fitos, I., Visy, J., Simonyi, M., Mady, G., & Zsila, F. (2010). Selective binding interactions of deramciclone to the genetic variants of human alpha(1)-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1800(3), 367-372. doi: 10.1016/j.bbagen.2009.08.006
- Fitzpatrick, F. A., & Wynalda, M. A. (1983). Albumin-catalyzed metabolism of prostaglandin D2. Identification of products formed in vitro. *J Biol Chem*, 258(19), 11713-11718.
- Forker, E. L., & Luxon, B. A. (1983). Albumin-mediated transport of rose bengal by perfused rat liver. Kinetics of the reaction at the cell surface. *J Clin Invest*, 72(5), 1764-1771. doi: 10.1172/JCI111136
- Fournier, T., Medjoubi, N. N., & Porquet, D. (2000). Alpha-1-acid glycoprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1482(1-2), 157-171. doi: 10.1016/s0167-4838(00)00153-9

- Fries, E., Gustafsson, L., & Peterson, P. A. (1984a). Four secretory proteins synthesized by hepatocytes are transported from endoplasmic reticulum to Golgi complex at different rates. *Embo j*, 3(1), 147-152.
- Fries, E., Gustafsson, L., & Peterson, P. A. (1984b). Four secretory proteins synthesized by hepatocytes are transported from endoplasmic reticulum to Golgi complex at different rates. *EMBO Journal*, 3(1).
- Fujiwara, S., & Amisaki, T. (2011). Steric and allosteric effects of fatty acids on the binding of warfarin to human serum albumin revealed by molecular dynamics and free energy calculations. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 59(7), 860-867. doi: 10.1248/cpb.59.860
- Fukuchi, Y., Toshimoto, K., Mori, T., Kakimoto, K., Tobe, Y., Sawada, T., . . . Sugiyam, Y. (2017). Analysis of Nonlinear Pharmacokinetics of a Highly Albumin-Bound Compound: Contribution of Albumin-Mediated Hepatic Uptake Mechanism. *J Pharm Sci*, 106(9), 2704-2714. doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.052
- Gabrielsson, J., & Weiner, D. (2016). Pharmacokinetics Concepts. In J. Gabrielsson (Ed.), *Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Data Analysis: Concepts and Applications* (Fifth ed., pp. 13-198). Stockholm, Sweden: Apotekarsocieteten.
- Gandhi, C. R. (2014). Cellular Anatomy of the Liver (Hepatocyte, Biliary Epithelial Cells, Endothelial Cells, Kupffer Cells and Hepatic Stellate Cells) (pp. 1759-1769).
- Gandhi, M., Aweeka, F., Greenblatt, R. M., & Blaschke, T. F. (2004). Sex differences in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 499-523. doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121453
- Ghitescu, L., & Fixman, A. (1984). Surface charge distribution on the endothelial cell of liver sinusoids. *J Cell Biol*, 99(2), 639-647. doi: 10.1083/jcb.99.2.639
- Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., & Curry, S. (2005). Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J Mol Biol*, 353(1), 38-52. doi: 10.1016/j.jmb.2005.07.075
- Gibson, M. (2009). Aiding Candidate Drug Selection: Introduction and Objectives. In M. Gibson (Ed.), *Pharmaceutical Preformulation and Formulation: A Practical Guide from Candidate Drug Selection to Commercial Dosage Form* (Second ed., Vol. 199, pp. 11-16). New York: USA: Informa Healthcare.
- Gidal, B. E., Ferry, J., Laurenza, A., & Ueno, T. (2019). Potential protein-binding displacement interactions with perampanel: An in vitro analysis. *Epilepsy Res*, 149, 102-106. doi: 10.1016/j.eplesyres.2018.12.003
- Gilbert, J., Henske, P., & Singh, A. (2003). Rebuilding big pharma's business model. *The business and medicine report. Windhover Inf. Inc.*, 21(10), 1-10.
- Godoy, P., Hewitt, N. J., Albrecht, U., Andersen, M. E., Ansari, N., Bhattacharya, S., . . . Hengstler, J. G. (2013). Recent advances in 2D and 3D in vitro systems using primary hepatocytes, alternative hepatocyte sources and non-parenchymal liver cells and their use in investigating mechanisms of hepatotoxicity, cell signaling and ADME. *Arch Toxicol*, 87(8), 1315-1530. doi: 10.1007/s00204-013-1078-5
- Goebel, N. A., Babbey, C. M., Datta-Mannan, A., Witcher, D. R., Wroblewski, V. J., & Dunn, K. W. (2008). Neonatal Fc receptor mediates internalization of Fc in transfected human endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 19(12), 5490-5505. doi: 10.1091/mbc.E07-02-0101
- Goodman, L. S., Brunton, L. L., Chabner, B., & Knollmann, B. r. C. (2011). *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. New York: McGraw-Hill.

- Gores, G. J., Kost, L. J., & LaRusso, N. F. (1986). The isolated perfused rat liver: conceptual and practical considerations. *Hepatology*, *6*(3), 511-517. doi: 10.1002/hep.1840060331
- Gornik, O., Wagner, J., Pucic, M., Knezevic, A., Redzic, I., & Lauc, G. (2009). Stability of N-glycan profiles in human plasma. *Glycobiology*, *19*(12), 1547-1553. doi: 10.1093/glycob/cwp134
- Gross, V., Heinrich, P. C., Berg, D., Steube, K., Tran-Thi, T. A., Decker, K., & Gerok, W. (1989). Circulatory life time and organ distribution of differently glycosylated forms (unglycosylated, high-mannose type, hybrid type, complex type) of rat alpha-1-acid glycoprotein. In P. Baumann, C. B. Eap, W. Muller, & J. P. Tillement (Eds.), *Alpha-1-acid glycoprotein: genetics, biochemistry, physiological functions, and pharmacology* (Vol. 300, pp. 231-234). New York: USA: Alan R. Liss, Inc.
- Haddad, S., Poulin, P., & Funk, C. (2010). Extrapolating in vitro metabolic interactions to isolated perfused liver: predictions of metabolic interactions between R-bufuralol, bunitrolol, and debrisoquine. *J Pharm Sci*, *99*(10), 4406-4426. doi: 10.1002/jps.22136
- Haleva, E., Ben-Tal, N., & Diamant, H. (2004). Increased concentration of polyvalent phospholipids in the adsorption domain of a charged protein. *Biophys J*, *86*(4), 2165-2178. doi: 10.1016/S0006-3495(04)74276-9
- Hallifax, D., Foster, J. A., & Houston, J. B. (2010). Prediction of human metabolic clearance from in vitro systems: retrospective analysis and prospective view. *Pharm Res*, *27*(10), 2150-2161. doi: 10.1007/s11095-010-0218-3
- Hanada, K. (2017). Lipophilicity Influences Drug Binding to alpha1-Acid Glycoprotein F1/S Variants But Not to the A Variant. *Drugs R D*, *17*(3), 475-480. doi: 10.1007/s40268-017-0193-9
- Hanada, T. (2014). The discovery and development of perampanel for the treatment of epilepsy. *Expert Opin Drug Discov*, *9*(4), 449-458. doi: 10.1517/17460441.2014.891580
- Hauser, H., Guyer, W., Pascher, I., Skrabal, P., & Sundell, S. (1980). Polar group conformation of phosphatidylcholine. Effect of solvent and aggregation. *Biochemistry*, *19*(2), 366-373. doi: 10.1021/bi00543a018
- He, X. M., & Carter, D. C. (1992). Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, *358*(6383), 209-215. doi: 10.1038/358209a0
- Hein, K. L., Kragh-Hansen, U., Morth, J. P., Jeppesen, M. D., Otzen, D., Moller, J. V., & Nissen, P. (2010). Crystallographic analysis reveals a unique lidocaine binding site on human serum albumin. *J Struct Biol*, *171*(3), 353-360. doi: 10.1016/j.jsb.2010.03.014
- Herrnberger, L., Hennig, R., Kremer, W., Hellerbrand, C., Goepferich, A., Kalbitzer, H. R., & Tamm, E. R. (2014). Formation of fenestrae in murine liver sinusoids depends on plasmalemma vesicle-associated protein and is required for lipoprotein passage. *PLoS One*, *9*(12), e115005. doi: 10.1371/journal.pone.0115005
- Herve, F., Caron, G., Duche, J. C., Gaillard, P., Abd Rahman, N., Tsantili-Kakoulidou, A., . . . Testa, B. (1998). Ligand specificity of the genetic variants of human alpha1-acid glycoprotein: generation of a three-dimensional quantitative structure-activity relationship model for drug binding to the A variant. *Mol Pharmacol*, *54*(1), 129-138. doi: 10.1124/mol.54.1.129
- Herve, F., Gomas, E., Duche, J. C., & Tillement, J. P. (1993). Evidence for differences in the binding of drugs to the two main genetic variants of human alpha 1-acid glycoprotein. *Br J Clin Pharmacol*, *36*(3), 241-249. doi: 10.1111/j.1365-2125.1993.tb04224.x

- Hill, M. D., & Abramson, F. P. (1988). The significance of plasma protein binding on the fetal/maternal distribution of drugs at steady-state. *Clin Pharmacokinet*, *14*(3), 156-170. doi: 10.2165/00003088-198814030-00004
- Hochepped, T., Berger, F. G., Baumann, H., & Libert, C. (2003). Alpha(1)-acid glycoprotein: an acute phase protein with inflammatory and immunomodulating properties. *Cytokine Growth Factor Rev*, *14*(1), 25-34. doi: 10.1016/s1359-6101(02)00054-0
- Hoehme, S., Brulport, M., Bauer, A., Bedawy, E., Schormann, W., Hermes, M., . . . Drasdo, D. (2010). Prediction and validation of cell alignment along microvessels as order principle to restore tissue architecture in liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *107*(23), 10371-10376. doi: 10.1073/pnas.0909374107
- Holub, B. J., & Kuksis, A. (1971). Differential distribution of orthophosphate-32P and glycerol-14C among molecular species of phosphatidylinositols of rat liver in vivo. *Journal of Lipid Research*, *12*(6), 699-705.
- Horie, T., Mizuma, T., Kasai, S., & Awazu, S. (1988). Conformational change in plasma albumin due to interaction with isolated rat hepatocyte. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*, *254*(4), G465-G470.
- Hosey, C. M., Chan, R., & Benet, L. Z. (2016). BDDCS Predictions, Self-Correcting Aspects of BDDCS Assignments, BDDCS Assignment Corrections, and Classification for more than 175 Additional Drugs. *AAPS J*, *18*(1), 251-260. doi: 10.1208/s12248-015-9845-2
- Hou, H. N., Qi, Z. D., Ouyang, Y. W., Liao, F. L., Zhang, Y., & Liu, Y. (2008). Studies on interaction between Vitamin B12 and human serum albumin. *J Pharm Biomed Anal*, *47*(1), 134-139. doi: 10.1016/j.jpba.2007.12.029
- Houston, J. B. (1994). Utility of in vitro drug metabolism data in predicting in vivo metabolic clearance. *Biochem Pharmacol*, *47*(9), 1469-1479. doi: 10.1016/0006-2952(94)90520-7
- Houston, J. B., & Carlile, D. J. (1997a). Incorporation of in vitro drug metabolism data into physiologically-based pharmacokinetic models. *Toxicology in Vitro*, *11*(5), 473-478. doi: 10.1016/s0887-2333(97)00056-8
- Houston, J. B., & Carlile, D. J. (1997b). Prediction of hepatic clearance from microsomes, hepatocytes, and liver slices. *Drug Metab Rev*, *29*(4), 891-922. doi: 10.3109/03602539709002237
- Howard, M. L., Hill, J. J., Galluppi, G. R., & McLean, M. A. (2010). Plasma protein binding in drug discovery and development. *Comb Chem High Throughput Screen*, *13*(2), 170-187. doi: 10.2174/138620710790596745
- Hu, M.-L. (1994). [41] Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. 233, 380-385. doi: 10.1016/s0076-6879(94)33044-1
- Huang, J. X., Cooper, M. A., Baker, M. A., Azad, M. A., Nation, R. L., Li, J., & Velkov, T. (2012). Drug-binding energetics of human alpha-1-acid glycoprotein assessed by isothermal titration calorimetry and molecular docking simulations. *J Mol Recognit*, *25*(12), 642-656. doi: 10.1002/jmr.2221
- Huang, Z., & Ung, T. (2013). Effect of alpha-1-acid glycoprotein binding on pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Curr Drug Metab*, *14*(2), 226-238.
- Humphries, W. H. t., & Payne, C. K. (2012). Imaging lysosomal enzyme activity in live cells using self-quenched substrates. *Anal Biochem*, *424*(2), 178-183. doi: 10.1016/j.ab.2012.02.033
- Ichikawa, M., Tsao, S. C., Lin, T.-H., Miyauchi, S., Sawada, Y., Iga, T., . . . Sugiyama, Y. (1992). 'Albumin-mediated transport phenomenon' observed for ligands with high membrane



- permeability. *Journal of Hepatology*, 16(1-2), 38-49. doi: 10.1016/s0168-8278(05)80092-3
- Israili, Z. H., & Dayton, P. G. (2001). Human alpha-1-glycoprotein and its interactions with drugs. *Drug Metab Rev*, 33(2), 161-235. doi: 10.1081/dmr-100104402
- Ito, K., Brown, H. S., & Houston, J. B. (2004). Database analyses for the prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data. *Br J Clin Pharmacol*, 57(4), 473-486. doi: 10.1111/j.1365-2125.2003.02041.x
- Iwatsubo T1, H. N., Ooie T, Suzuki H, Sugiyama Y. (1996). Prediction of in vivo drug disposition from in vitro data based on physiological pharmacokinetics. *Biopharm Drug Dispos*, 17 273-310.
- Iwatsubo, T., Hirota, N., Ooie, T., Suzuki, H., Shimada, N., Chiba, K., . . . Sugiyama, Y. (1997). Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol Ther*, 73(2), 147-171. doi: 10.1016/s0163-7258(96)00184-2
- Jackson, P. R., Tucker, G. T., & Woods, H. F. (1982). Altered plasma drug binding in cancer: role of alpha 1-acid glycoprotein and albumin. *Clin Pharmacol Ther*, 32(3), 295-302. doi: 10.1038/clpt.1982.163
- Jonas, A. (1975). Phosphatidyl choline interaction with bovine serum albumin: effect of the physical state of the lipid on protein-lipid complex formation. *Biochem Biophys Res Commun*, 64(3), 1003-1008. doi: 10.1016/0006-291x(75)90147-3
- Jonas, A. (1976). Interaction of phosphatidylcholine with bovine serum albumin. Specificity and properties of the complexes. *Biochim Biophys Acta*, 427(1), 325-336. doi: 10.1016/0005-2795(76)90308-1
- Jones, H. M., Chen, Y., Gibson, C., Heimbach, T., Parrott, N., Peters, S. A., . . . Hall, S. D. (2015). Physiologically based pharmacokinetic modeling in drug discovery and development: a pharmaceutical industry perspective. *Clin Pharmacol Ther*, 97(3), 247-262. doi: 10.1002/cpt.37
- Jones, H. M., Gardner, I. B., & Watson, K. J. (2009). Modelling and PBPK simulation in drug discovery. *AAPS J*, 11(1), 155-166. doi: 10.1208/s12248-009-9088-1
- Jusko, W. J., & Gretch, M. (1976). Plasma and tissue protein binding of drugs in pharmacokinetics. *Drug Metab Rev*, 5(1), 43-140. doi: 10.3109/03602537608995839
- Kaitin, K. I. (2010). Deconstructing the drug development process: the new face of innovation. *Clin Pharmacol Ther*, 87(3), 356-361. doi: 10.1038/clpt.2009.293
- Kato, M., Chiba, K., Ito, T., Koue, T., & Sugiyama, Y. (2010). Prediction of interindividual variability in pharmacokinetics for CYP3A4 substrates in humans. *Drug Metab Pharmacokinet*, 25(4), 367-378. doi: 10.2133/dmpk.dmpk-09-rg-038
- Kerns, E. H., & Di, L. (2008). Barriers to Drug Exposure in Living Systems *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods* (pp. 38-54). USA: Elsevier's Science & Technology.
- Kim, J., Hayton, W. L., Robinson, J. M., & Anderson, C. L. (2007). Kinetics of FcRn-mediated recycling of IgG and albumin in human: pathophysiology and therapeutic implications using a simplified mechanism-based model. *Clin Immunol*, 122(2), 146-155. doi: 10.1016/j.clim.2006.09.001
- Kim, K., Utoh, R., Ohashi, K., Kikuchi, T., & Okano, T. (2017). Fabrication of functional 3D hepatic tissues with polarized hepatocytes by stacking endothelial cell sheets in vitro. *J Tissue Eng Regen Med*, 11(7), 2071-2080. doi: 10.1002/term.2102

- Kim, S. J., Lee, K. R., Miyauchi, S., & Sugiyama, Y. (2019). Extrapolation of In Vivo Hepatic Clearance from In Vitro Uptake Clearance by Suspended Human Hepatocytes for Anionic Drugs with High Binding to Human Albumin: Improvement of In Vitro-to-In Vivo Extrapolation by Considering the "Albumin-Mediated" Hepatic Uptake Mechanism on the Basis of the "Facilitated-Dissociation Model". *Drug Metab Dispos*, 47(2), 94-103. doi: 10.1124/dmd.118.083733
- Kimoto, E., Mathialagan, S., Tylaska, L., Niosi, M., Lin, J., Carlo, A. A., . . . Varma, M. V. S. (2018). Organic Anion Transporter 2-Mediated Hepatic Uptake Contributes to the Clearance of High-Permeability-Low-Molecular-Weight Acid and Zwitterion Drugs: Evaluation Using 25 Drugs. *J Pharmacol Exp Ther*, 367(2), 322-334. doi: 10.1124/jpet.118.252049
- Klaassen, C. (2013). *Casarett & Doull's Toxicology: The Basic Science of Poison* (8 ed.): McGraw-Hill Education.
- Kmiec, Z. (2001). Cooperation of liver cells in the regulation of sinusoidal contractility *Cooperation of Liver Cells in Health and Disease: With 18 Tables* (pp. 94). Germany: Springer Science & Business Media.
- Kopecký, V. r., Ettrich, R., Hofbauerová, K., & Baumruk, V. r. (2003). Structure of human  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and its high-affinity binding site. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 300(1), 41-46. doi: 10.1016/s0006-291x(02)02765-1
- Kosugi, Y., & Hosea, N. (2020). Direct Comparison of Total Clearance Prediction: Computational Machine Learning Model versus Bottom-Up Approach Using In Vitro Assay. *Mol Pharm*, 17(7), 2299-2309. doi: 10.1021/acs.molpharmaceut.9b01294
- Koyo, N., Chiaki, T., Sachi, N., Yoshinobu, T., Mitsuru, H., & Hitoshi, S. (1990). Effect of electric charge on the hepatic uptake of macromolecules in the rat liver. *International Journal of Pharmaceutics*, 65(1-2), 7-17. doi: 10.1016/0378-5173(90)90003-m
- Kragh-Hansen, U. (2016). Albumin.org. Retrieved 03/04/2017, from <http://albumin.org/>
- Kragh-Hansen, U., Brennan, S. O., Galliano, M., & Sugita, O. (1990). Binding of warfarin, salicylate, and diazepam to genetic variants of human serum albumin with known mutations. *Mol Pharmacol*, 37(2), 238-242.
- Kragh-Hansen, U., Chuang, V. T., & Otagiri, M. (2002). Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol Pharm Bull*, 25(6), 695-704. doi: 10.1248/bpb.25.695
- Kratochwil, N. A., Meille, C., Fowler, S., Klammers, F., Ekiciler, A., Molitor, B., . . . Parrott, N. J. (2017). Metabolic Profiling of Human Long-Term Liver Models and Hepatic Clearance Predictions from In Vitro Data Using Nonlinear Mixed-Effects Modeling. *AAPS J*, 19(2), 534-550. doi: 10.1208/s12248-016-0019-7
- Kratz, F. (2014). A clinical update of using albumin as a drug vehicle - a commentary. *J Control Release*, 190, 331-336. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.03.013
- Kratz, F., & Elsadek, B. (2012). Clinical impact of serum proteins on drug delivery. *J Control Release*, 161(2), 429-445. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.11.028
- Krause, S., & Goss, K. U. (2018). The impact of desorption kinetics from albumin on hepatic extraction efficiency and hepatic clearance: a model study. *Arch Toxicol*, 92(7), 2175-2182. doi: 10.1007/s00204-018-2224-x
- Krause, S., Ulrich, N., & Goss, K. U. (2018). Desorption kinetics of organic chemicals from albumin. *Arch Toxicol*, 92(3), 1065-1074. doi: 10.1007/s00204-017-2117-4

- Kremer, J. M., Wilting, J., & Janssen, L. H. (1988). Drug binding to human alpha-1-acid glycoprotein in health and disease. *Pharmacol Rev*, 40(1), 1-47.
- Kremmer, T., Wisher, M. H., & Evans, W. H. (1976). The lipid composition of plasma membrane subfractions originating from the three major functional domains of the rat hepatocyte cell surface. *Biochim Biophys Acta*, 455(3), 655-664. doi: 10.1016/0005-2736(76)90039-0
- Krishnan, K., Andersen, M. (2010). *Quantitative Modeling in Toxicology*. Hoboken, New Jersey: John Wiley and Sons.
- Krishnan, M., Mojarad, N., Kukura, P., & Sandoghdar, V. (2010). Geometry-induced electrostatic trapping of nanometric objects in a fluid. *Nature*, 467(7316), 692-695. doi: 10.1038/nature09404
- Kurtzhals, P., Havelund, S., Jonassen, I., & Markussen, J. (1997). Effect of fatty acids and selected drugs on the albumin binding of a long-acting, acylated insulin analogue. *J Pharm Sci*, 86(12), 1365-1368. doi: 10.1021/js9701768
- Kushner, I. (1982). The phenomenon of the acute phase response. *Ann N Y Acad Sci*, 389(1 C- Reactive Pr), 39-48. doi: 10.1111/j.1749-6632.1982.tb22124.x
- Kwong, T. C. (1985). Free drug measurements: methodology and clinical significance. *Clin Chim Acta*, 151(3), 193-216. doi: 10.1016/0009-8981(85)90082-8
- Larsen, M. T., Kuhlmann, M., Hvam, M. L., & Howard, K. A. (2016). Albumin-based drug delivery: harnessing nature to cure disease. *Mol Cell Ther*, 4, 3. doi: 10.1186/s40591-016-0048-8
- Leach, A. R. (2001). *Molecular Modelling: Principles and Applications* (2nd (Ed.) ed.). England: Pearson Education.
- Lee, A. G. (2003). Lipid-protein interactions in biological membranes: a structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1612(1), 1-40. doi: 10.1016/s0005-2736(03)00056-7
- Lee, A. G. (2005). How lipids and proteins interact in a membrane: a molecular approach. *Mol Biosyst*, 1(3), 203-212. doi: 10.1039/b504527d
- Lee, A. G. (2011). Lipid-protein interactions. *Biochem Soc Trans*, 39(3), 761-766. doi: 10.1042/BST0390761
- Lehman-McKeeman. (2013). Absorption, Distribution, and Excretion of toxicants. In C. Klaassen (Ed.), *Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons* (8th Ed. ed., pp. 151-180). New York: United States: McGraw-Hill Education, c2013.
- Lentner, C. (1984). Geigy scientific tables In C. Lentner (Ed.), *Physical chemistry, composition of blood, hematology, somatometric data*. (8th review and Engl. ed., Vol. 3, pp. 135-137, 140-142). West Caldwell, NJ: CIBA-GEIGY.
- Lexi-Comp, I. (2013). *Drug information handbook : a comprehensive resource for all clinicians and healthcare professionals*. Hudson, Ohio: Lexi-Comp.
- Lexi-Comp, I. (2016). *Drug information handbook*. [Place of publication not identified]: Lexi-Comp.
- Li, L., Vorobyov, I., & Allen, T. W. (2013). The different interactions of lysine and arginine side chains with lipid membranes. *J Phys Chem B*, 117(40), 11906-11920. doi: 10.1021/jp405418y
- Li, Y., Yan, X. P., Chen, C., Xia, Y. L., & Jiang, Y. (2007). Human serum albumin-mercurial species interactions. *J Proteome Res*, 6(6), 2277-2286. doi: 10.1021/pr0700403

- Liu, X., Chen, C., & Hop, C. E. (2011). Do we need to optimize plasma protein and tissue binding in drug discovery? *Curr Top Med Chem*, *11*(4), 450-466. doi: 10.2174/156802611794480918
- Liu, X., Wright, M., & Hop, C. E. (2014). Rational use of plasma protein and tissue binding data in drug design. *J Med Chem*, *57*(20), 8238-8248. doi: 10.1021/jm5007935
- Lombardo, F., Shalaeva, M. Y., Tupper, K. A., & Gao, F. (2001). ElogD(oct): a tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds. *J Med Chem*, *44*(15), 2490-2497. doi: 10.1021/jm0100990
- Lönsmann Poulsen, H. (2009). Interstitial Fluid Concentrations of Albumin and Immunoglobulin G in Normal Men. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, *34*(2), 119-122. doi: 10.1080/00365517409050824
- Maciazek-Jurczyk, M., Szkudlarek, A., Chudzik, M., Pozycka, J., & Sulkowska, A. (2018). Alteration of human serum albumin binding properties induced by modifications: A review. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc*, *188*, 675-683. doi: 10.1016/j.saa.2017.05.023
- Madison, J., Galliano, M., Watkins, S., Minchiotti, L., Porta, F., Rossi, A., & Putnam, F. W. (1994). Genetic variants of human serum albumin in Italy: point mutants and a carboxyl-terminal variant. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *91*(14), 6476-6480. doi: 10.1073/pnas.91.14.6476
- Maeda, H., Morinaga, T., Mori, I., & Nishi, K. (1984). Further characterization of the effects of alpha-1-acid glycoprotein on the passage of human erythrocytes through micropores. *Cell Struct Funct*, *9*(3), 279-290. doi: 10.1247/csf.9.279
- Maeda, H., Nishi, K., & Mori, I. (1980). Facilitating effects of alpha-1 acid glycoprotein on the passage of erythrocytes through the membrane-filter. *Life Sciences*, *27*(2), 157-161. doi: 10.1016/0024-3205(80)90458-0
- Majorek, K. A., Porebski, P. J., Dayal, A., Zimmerman, M. D., Jablonska, K., Stewart, A. J., . . . Minor, W. (2012). Structural and immunologic characterization of bovine, horse, and rabbit serum albumins. *Mol Immunol*, *52*(3-4), 174-182. doi: 10.1016/j.molimm.2012.05.011
- Manallack, D. T. (2009). The acid-base profile of a contemporary set of drugs: implications for drug discovery. *SAR QSAR Environ Res*, *20*(7-8), 611-655. doi: 10.1080/10629360903438313
- Mandrioli, R., Forti, G. C., & Raggi, M. A. (2006). Fluoxetine metabolism and pharmacological interactions: the role of cytochrome p450. *Curr Drug Metab*, *7*(2), 127-133. doi: 10.2174/138920006775541561
- Mao, J., Tay, S., Khojasteh, C. S., Chen, Y., Hop, C. E., & Kenny, J. R. (2016). Evaluation of Time Dependent Inhibition Assays for Marketed Oncology Drugs: Comparison of Human Hepatocytes and Liver Microsomes in the Presence and Absence of Human Plasma. *Pharm Res*, *33*(5), 1204-1219. doi: 10.1007/s11095-016-1865-9
- Markus, G., & Karush, F. (1957). The Disulfide Bonds of Human Serum Albumin and Bovine  $\gamma$ -Globulin. *Journal of the American Chemical Society*, *79*(1), 134-139. doi: 10.1021/ja01558a034
- Maruyama, T., Otagiri, M., & Takadate, A. (1990). Characterization of drug binding sites on alpha 1-acid glycoprotein. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, *38*(6), 1688-1691. doi: 10.1248/cpb.38.1688

- Mateus, A., Matsson, P., & Artursson, P. (2013). Rapid measurement of intracellular unbound drug concentrations. *Mol Pharm*, *10*(6), 2467-2478. doi: 10.1021/mp4000822
- Mayumi, K., Ohnishi, S., & Hasegawa, H. (2019). Successful Prediction of Human Pharmacokinetics by Improving Calculation Processes of Physiologically Based Pharmacokinetic Approach. *J Pharm Sci*, *108*(8), 2718-2727. doi: 10.1016/j.xphs.2019.03.002
- McElnay, J. C., & D'Arcy, P. F. (1983). Protein binding displacement interactions and their clinical importance. *Drugs*, *25*(5), 495-513. doi: 10.2165/00003495-198325050-00003
- McLaughlin, A., Grathwohl, C., & McLaughlin, S. (1978). The adsorption of divalent cations to phosphatidylcholine bilayer membranes. *Biochim Biophys Acta*, *513*(3), 338-357. doi: 10.1016/0005-2736(78)90203-1
- McLaughlin, S., Mulrine, N., Gresalfi, T., Vaio, G., & McLaughlin, A. (1981). Adsorption of divalent cations to bilayer membranes containing phosphatidylserine. *J Gen Physiol*, *77*(4), 445-473. doi: 10.1085/jgp.77.4.445
- McNamara, P. J., & Alcorn, J. (2002). Protein binding predictions in infants. *AAPS PharmSci*, *4*(1), E4. doi: 10.1208/ps040104
- McNamara, P. J., & Meiman, D. (2019). Predicting Drug Binding to Human Serum Albumin and Alpha One Acid Glycoprotein in Diseased and Age Patient Populations. *J Pharm Sci*, *108*(8), 2737-2747. doi: 10.1016/j.xphs.2019.03.018
- Meijer, D. K., & van der Sluijs, P. (1989). Covalent and noncovalent protein binding of drugs: implications for hepatic clearance, storage, and cell-specific drug delivery. *Pharm Res*, *6*(2), 105-118. doi: 10.1023/a:1015961424122
- Meijer, D. K. F., & Nijssen. (1991). Transport of drugs, proteins and drug-protein conjugates. In F. Ballet & R. G. Thurman (Eds.), *Research in perfused liver* (pp. 165-208). England, France and Italy: John Libbey & Company Ltd.
- Meloun, B., Moravek, L., & Kostka, V. (1975). Complete amino acid sequence of human serum albumin. *FEBS Lett*, *58*(1), 134-137. doi: 10.1016/0014-5793(75)80242-0
- Miller, L. L., Bly, C. G., Watson, M. L., & Bale, W. F. (1951). The dominant role of the liver in plasma protein synthesis; a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine-epsilon-C14. *J Exp Med*, *94*(5), 431-453. doi: 10.1084/jem.94.5.431
- Minghetti, P., Ruffner, D., Kuang, W., Dennison, O., Hawkins, J., Beattie, W., & Dugaiczky, A. (1986). Molecular Structure of the Human Albumin Gene Is Revealed by Nucleotide Sequence within 911-22 of Chromosome 4" *The Journal of Biological Chemistry*, *261*(15), 6747-6757.
- Mitra, V., & Metcalf, J. (2012). Functional anatomy and blood supply of the liver. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, *13*(2), 52-53. doi: 10.1016/j.mpaic.2011.11.005
- Miyauchi, S., Masuda, M., Kim, S. J., Tanaka, Y., Lee, K. R., Iwakado, S., . . . Sugiyama, Y. (2018). The Phenomenon of Albumin-Mediated Hepatic Uptake of Organic Anion Transport Polypeptide Substrates: Prediction of the In Vivo Uptake Clearance from the In Vitro Uptake by Isolated Hepatocytes Using a Facilitated-Dissociation Model. *Drug Metab Dispos*, *46*(3), 259-267. doi: 10.1124/dmd.117.077115
- Montiel, M. D., Carracedo, A., Blazquez-Caeiro, J. L., & Andrade-Vide, C. (1990). Orosomucoid (ORM1 and ORM2) types in the Spanish Basque Country, Galicia and northern Portugal. *Hum Hered*, *40*(6), 330-334. doi: 10.1159/000153956
- Mostov, K., Su, T., & ter Beest, M. (2003). Polarized epithelial membrane traffic: conservation and plasticity. *Nat Cell Biol*, *5*(4), 287-293. doi: 10.1038/ncb0403-287

- Müller, W. E. (1989). Drug binding sites on human alpha-1-acid glycoprotein. *Prog Clin Biol Res*, 300, 363-378.
- Murayama, K., & Tomida, M. (2004). Heat-induced secondary structure and conformation change of bovine serum albumin investigated by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry*, 43(36), 11526-11532. doi: 10.1021/bi0489154
- Musch, A. (2014). The unique polarity phenotype of hepatocytes. *Exp Cell Res*, 328(2), 276-283. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.006
- Nigam, S. K., Bush, K. T., Martovetsky, G., Ahn, S. Y., Liu, H. C., Richard, E., . . . Wu, W. (2015). The organic anion transporter (OAT) family: a systems biology perspective. *Physiol Rev*, 95(1), 83-123. doi: 10.1152/physrev.00025.2013
- Nilsen, J., Sandlie, I., Roopenian, D. C., & Andersen, J. T. (2018). Animal models for evaluation of albumin-based therapeutics. *Current Opinion in Chemical Engineering*, 19, 68-76. doi: 10.1016/j.coche.2017.11.007
- Nishi, K., Komine, Y., Fukunaga, N., Maruyama, T., Suenaga, A., & Otagiri, M. (2006). Involvement of disulfide bonds and histidine 172 in a unique beta-sheet to alpha-helix transition of alpha 1-acid glycoprotein at the biomembrane interface. *Proteins*, 63(3), 611-620. doi: 10.1002/prot.20923
- Nishi, K., Sakai, N., Komine, Y., Maruyama, T., Halsall, H. B., & Otagiri, M. (2002). Structural and drug-binding properties of alpha(1)-acid glycoprotein in reverse micelles. *Biochim Biophys Acta*, 1601(2), 185-191. doi: 10.1016/s1570-9639(02)00465-x
- Nurdiansyah, R., Rifa'i, M., & Widodo. (2016). A comparative analysis of serum albumin from different species to determine a natural source of albumin that might be useful for human therapy. *Journal of Taibah University Medical Sciences*, 11(3), 243-249. doi: 10.1016/j.jtumed.2016.04.003
- Obach, R. S. (1999). Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of in vitro half-life approach and nonspecific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos*, 27(11), 1350-1359.
- Obuobi, S., Wang, Y., Khara, J. S., Riegger, A., Kuan, S. L., & Ee, P. L. R. (2018). Antimicrobial and Anti-Biofilm Activities of Surface Engineered Polycationic Albumin Nanoparticles with Reduced Hemolytic Activity. *Macromol Biosci*, 18(10), e1800196. doi: 10.1002/mabi.201800196
- Oettl, K., & Stauber, R. E. (2007). Physiological and pathological changes in the redox state of human serum albumin critically influence its binding properties. *Br J Pharmacol*, 151(5), 580-590. doi: 10.1038/sj.bjp.0707251
- Otagiri, M., & Chuang, V. T. G. (2016). *Albumin in Medicine Pathological and Clinical Applications* (M. Otagiri & V. T. G. Chuang Eds.). Singapore: Springer Nature.
- Palade, G. E. (1988). The Microvascular Endothelium Revisited. In N. Simionescu & M. Simionescu (Eds.), *Endothelial Cell Biology in Health and Disease* (pp. 3-22). Boston, MA: Springer US.
- Pang, K. S., & Chiba, M. (1994). Metabolism: Scaling-up from In Vitro to Organ and Whole Body. In P. G. Welling & L. P. Balant (Eds.), *Pharmacokinetics of Drugs* (pp. 101-187). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Pang, K. S., & Rowland, M. (1977a). Hepatic clearance of drugs. I. Theoretical considerations of a "well-stirred" model and a "parallel tube" model. Influence of hepatic blood flow, plasma and blood cell binding, and the hepatocellular enzymatic activity on hepatic drug clearance. *J Pharmacokinetic Biopharm*, 5(6), 625-653. doi: 10.1007/BF01059688

- Pang, K. S., & Rowland, M. (1977b). Hepatic clearance of drugs: II. Experimental evidence for acceptance of the “well-stirred” model over the “parallel-tube” model using lidocaine in the perfused rat liver in situ preparation. *J. Pharmacokinet. Biopharm.*, 5, 655-680.
- Papahadjopoulos, D., & Miller, N. (1967). Phospholipid model membranes. I. Structural characteristics of hydrated liquid crystals. *Biochim Biophys Acta*, 135(4), 624-638. doi: 10.1016/0005-2736(67)90094-6
- Pardridge, W. M. (1981). Transport of protein-bound hormones into tissues in vivo. *Endocr Rev*, 2(1), 103-123. doi: 10.1210/edrv-2-1-103
- Patsalos, P. N. (2015). The clinical pharmacology profile of the new antiepileptic drug perampanel: A novel noncompetitive AMPA receptor antagonist. *Epilepsia*, 56(1), 12-27. doi: 10.1111/epi.12865
- Peng, Y., Zhang, X., Zhu, Y., Wu, H., Gu, S., Chang, Q., . . . Sun, J. (2018). Atypical Kinetics and Albumin Effect of Glucuronidation of 5-n-Butyl-4-{4-[2-(1H-tetrazole-5-yl)-1H-pyrrol-1-yl]phenylmethyl}-2,4-dihydro-2-(2,6-dichlorophenyl)-3H-1,2,4-triazol-3-one, a Novel Nonpeptide Angiotensin Type 1 Receptor Antagonist, in Liver Microsomes and UDP-Glucuronosyl-transferase. *Molecules*, 23(3). doi: 10.3390/molecules23030688
- Peters Jr., T. (1996a). The albumin molecule: its structure and chemical properties *All about Albumin* (pp. 24-75). USA: Academic Press.
- Peters Jr., T. (1996b). *All About Albumin: Biochemistry, Genetics, and Medical Applications* (T. Peters Jr. Ed.). United States of America: Academic Press.
- Peters Jr., T. (1996c). Clinical Aspects: Albumin in medicine *All about Albumin* (pp. 251-284). USA: Academic Press.
- Peters, T., Jr., & Anfinsen, C. B. (1950). Net production of serum albumin by liver slices. *J Biol Chem*, 186(2), 805-813.
- Pettifer, G. (2003). Fluids, Electrolytes, and Acid-Base Therapy. In D. H. Slatter (Ed.), *Textbook of Small Animal Surgery* (3rd ed., Vol. Volume 1, pp. 17-43).
- Piafsky, K. M. (1980). Disease-induced changes in the plasma binding of basic drugs. *Clin Pharmacokinet*, 5(3), 246-262. doi: 10.2165/00003088-198005030-00004
- Piafsky, K. M., & Borga, O. (1977). Plasma protein binding of basic drugs. II. Importance of alpha 1-acid glycoprotein for interindividual variation. *Clin Pharmacol Ther*, 22(5 Pt 1), 545-549. doi: 10.1002/cpt1977225part1545
- Pike, E., Skuterud, B., Kierulf, P., Fremstad, D., Abdel Sayed, S. M., & Lunde, P. K. (1981). Binding and displacement of basic, acidic and neutral drugs in normal and orosomucoid-deficient plasma. *Clin Pharmacokinet*, 6(5), 367-374. doi: 10.2165/00003088-198106050-00003
- Pinquier, J. L., Urien, S., Chaumet-Riffaud, P., & Tillement, J. P. (1989). Differences in the serum binding determinants of isradipine and darodipine--consequences for serum protein binding in various diseases. *Br J Clin Pharmacol*, 28(5), 587-592. doi: 10.1111/j.1365-2125.1989.tb03546.x
- Poulin, P. (2013). Prediction of total hepatic clearance by combining metabolism, transport, and permeability data in the in vitro-in vivo extrapolation methods: emphasis on an apparent fraction unbound in liver for drugs. *J Pharm Sci*, 102(7), 2085-2095. doi: 10.1002/jps.23562
- Poulin, P. (2015). Drug Distribution to Human Tissues: Prediction and Examination of the Basic Assumption in In Vivo Pharmacokinetics-Pharmacodynamics (PK/PD) Research. *J Pharm Sci*, 104(6), 2110-2118. doi: 10.1002/jps.24427

- Poulin, P., Bteich, M., & Haddad, S. (2017). Supplemental Analysis of the Prediction of Hepatic Clearance of Binary Mixtures of Bisphenol A and Naproxen Determined in an Isolated Perfused Rat Liver Model to Promote the Understanding of Potential Albumin-Facilitated Hepatic Uptake Mechanism. *J Pharm Sci*, *106*(11), 3207-3214. doi: 10.1016/j.xphs.2017.07.004
- Poulin, P., Burczynski, F. J., & Haddad, S. (2016). The Role of Extracellular Binding Proteins in the Cellular Uptake of Drugs: Impact on Quantitative In Vitro-to-In Vivo Extrapolations of Toxicity and Efficacy in Physiologically Based Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Research. *J Pharm Sci*, *105*(2), 497-508. doi: 10.1002/jps.24571
- Poulin, P., & Haddad, S. (2013). Toward a new paradigm for the efficient in vitro-in vivo extrapolation of metabolic clearance in humans from hepatocyte data. *J Pharm Sci*, *102*(9), 3239-3251. doi: 10.1002/jps.23502
- Poulin, P., & Haddad, S. (2015). Albumin and Uptake of Drugs in Cells: Additional Validation Exercises of a Recently Published Equation that Quantifies the Albumin-Facilitated Uptake Mechanism(s) in Physiologically Based Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Modeling Research. *J Pharm Sci*, *104*(12), 4448-4458. doi: 10.1002/jps.24676
- Poulin, P., & Haddad, S. (2018). Extrapolation of the Hepatic Clearance of Drugs in the Absence of Albumin In Vitro to That in the Presence of Albumin In Vivo: Comparative Assessment of 2 Extrapolation Models Based on the Albumin-Mediated Hepatic Uptake Theory and Limitations and Mechanistic Insights. *J Pharm Sci*, *107*(7), 1791-1797. doi: 10.1016/j.xphs.2018.03.012
- Poulin, P., Hop, C. E., Ho, Q., Halladay, J. S., Haddad, S., & Kenny, J. R. (2012). Comparative assessment of In Vitro-In Vivo extrapolation methods used for predicting hepatic metabolic clearance of drugs. *J Pharm Sci*, *101*(11), 4308-4326. doi: 10.1002/jps.23288
- Poulin, P., Kenny, J. R., Hop, C. E., & Haddad, S. (2012). In vitro-in vivo extrapolation of clearance: modeling hepatic metabolic clearance of highly bound drugs and comparative assessment with existing calculation methods. *J Pharm Sci*, *101*(2), 838-851. doi: 10.1002/jps.22792
- Putnam, F. W. (1984). Alpha, beta, gamma, omega – the structure of the plasma proteins *The plasma proteins: Structure, Function, and Genetic Control* (Second ed., Vol. 4, pp. 45-166). Orlando: Academic Press.
- Quiming, N. S., Vergel, R. B., Nicolas, M. G., & Villanueva, J. A. (2005). Interaction of Bovine Serum Albumin and Metallothionein. *Journal of Health Science*, *51*(1), 8-15. doi: 10.1248/jhs.51.8
- Quinlan, G. J., Martin, G. S., & Evans, T. W. (2005). Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. *Hepatology*, *41*(6), 1211-1219. doi: 10.1002/hep.20720
- Rane, A., Wilkinson, G. R., & Shand, D. G. (1977). Prediction of hepatic extraction ratio from in vitro measurement of intrinsic clearance. *J Pharmacol Exp Ther*, *200*(2), 420-424.
- Ray, T. K., Skipski, V. P., Barclay, M., Essner, E., & Archibald, F. M. (1969). Lipid composition of rat liver plasma membranes. *J Biol Chem*, *244*(20), 5528-5536.
- Redman, C. M. (1969). Biosynthesis of serum proteins and ferritin by free and attached ribosomes of rat liver. *J Biol Chem*, *244*(16), 4308-4315.
- Reist, M., Carrupt, P. A., Francotte, E., & Testa, B. (1998). Chiral inversion and hydrolysis of thalidomide: mechanisms and catalysis by bases and serum albumin, and chiral stability of teratogenic metabolites. *Chem Res Toxicol*, *11*(12), 1521-1528. doi: 10.1021/tx9801817



- Renkin, E. M. (1988). Transport Pathways and Processes. In N. Simionescu & M. Simionescu (Eds.), *Endothelial Cell Biology in Health and Disease* (pp. 51-68). Boston, MA: Springer US.
- research, C. f. d. e. a. (1999). Application number : 021071. Retrieved the 28th of January 2019, from [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/99/21071\\_Avandia\\_pharmr\\_P1.pdf](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/99/21071_Avandia_pharmr_P1.pdf)
- Riccardi, K. A., Tess, D. A., Lin, J., Patel, R., Ryu, S., Atkinson, K., . . . Li, R. (2019). A Novel Unified Approach to Predict Human Hepatic Clearance for Both Enzyme- and Transporter-Mediated Mechanisms Using Suspended Human Hepatocytes. *Drug Metab Dispos*, *47*(5), 484-492. doi: 10.1124/dmd.118.085639
- Riede, J., Umehara, K. I., Schweigler, P., Huth, F., Schiller, H., Camenisch, G., & Poller, B. (2019). Examining P-gp efflux kinetics guided by the BDDCS - Rational selection of in vitro assay designs and mathematical models. *Eur J Pharm Sci*, *132*, 132-141. doi: 10.1016/j.ejps.2019.03.005
- Riley, R. J., McGinnity, D. F., & Austin, R. P. (2005). A unified model for predicting human hepatic, metabolic clearance from in vitro intrinsic clearance data in hepatocytes and microsomes. *Drug Metab Dispos*, *33*(9), 1304-1311. doi: 10.1124/dmd.105.004259
- Ring, B. J., Chien, J. Y., Adkison, K. K., Jones, H. M., Rowland, M., Jones, R. D., . . . Poulin, P. (2011). PhRMA CPCDC initiative on predictive models of human pharmacokinetics, part 3: comparative assesment of prediction methods of human clearance. *J Pharm Sci*, *100*(10), 4090-4110. doi: 10.1002/jps.22552
- Roda, A., Cappelleri, G., Aldini, R., Roda, E., & Barbara, L. (1982). Quantitative aspects of the interaction of bile acids with human serum albumin. *J Lipid Res*, *23*(3), 490-495.
- Rogawski, M. A., & Hanada, T. (2013). Preclinical pharmacology of perampanel, a selective non-competitive AMPA receptor antagonist. *Acta Neurol Scand Suppl*(197), 19-24. doi: 10.1111/ane.12100
- Rose, A. S., Bradley, A. R., Valasatava, Y., Duarte, J. M., Prlic, A., & Rose, P. W. (2018). NGL viewer: web-based molecular graphics for large complexes. *Bioinformatics*, *34*(21), 3755-3758. doi: 10.1093/bioinformatics/bty419
- Rosenthal, S. M., & White, E. C. (1924). Studies in Hepatic Function; VI. A. The Pharmacological Behavior of Certain Phthalein Dyes; B. The Value of Selected Phthalein Compounds in the Estimation of Hepatic Function. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, *24*(4), 265-288.
- Rossi, A., Barraco, A., & Donda, P. (2004). Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *Ann Gen Hosp Psychiatry*, *3*(1), 2. doi: 10.1186/1475-2832-3-2
- Roth, M., Obaidat, A., & Hagenbuch, B. (2012). OATPs, OATs and OCTs: the organic anion and cation transporters of the SLCO and SLC22A gene superfamilies. *Br J Pharmacol*, *165*(5), 1260-1287. doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01724.x
- Rothschild, M. A., Oratz, M., & Schreiber, S. S. (1988). Serum albumin. *Hepatology*, *8*(2), 385-401. doi: 10.1002/hep.1840080234
- Routledge. (1988). The plasma protein binding of basic drugs. *Br J Clin Pharmacol.*, *22*(5), 499–506.
- Routledge. (1989). Clinical relevance of alpha 1 acid glycoprotein in health and disease. In P. Baumann, B. C. Eap, W. Muller, & J. P. Tillement (Eds.), *Alpha-1-acid glycoprotein: genetics, biochemistry, physiological functions and pharmacology* (Vol. 300:, pp. 185-198). New York: USA: Alan R. Liss.

- Rowland, A., Elliot, D. J., Knights, K. M., Mackenzie, P. I., & Miners, J. O. (2008). The "albumin effect" and in vitro-in vivo extrapolation: sequestration of long-chain unsaturated fatty acids enhances phenytoin hydroxylation by human liver microsomal and recombinant cytochrome P450 2C9. *Drug Metab Dispos*, 36(5), 870-877. doi: 10.1124/dmd.107.019885
- Rowland, A., Gaganis, P., Elliot, D. J., Mackenzie, P. I., Knights, K. M., & Miners, J. O. (2007). Binding of inhibitory fatty acids is responsible for the enhancement of UDP-glucuronosyltransferase 2B7 activity by albumin: implications for in vitro-in vivo extrapolation. *J Pharmacol Exp Ther*, 321(1), 137-147. doi: 10.1124/jpet.106.118216
- Rowland, A., Knights, K. M., Mackenzie, P. I., & Miners, J. O. (2008). The "albumin effect" and drug glucuronidation: bovine serum albumin and fatty acid-free human serum albumin enhance the glucuronidation of UDP-glucuronosyltransferase (UGT) 1A9 substrates but not UGT1A1 and UGT1A6 activities. *Drug Metab Dispos*, 36(6), 1056-1062. doi: 10.1124/dmd.108.021105
- Rowland, M. (1984). Protein binding and drug clearance. *Clin Pharmacokinet*, 9 Suppl 1(1), 10-17. doi: 10.2165/00003088-198400091-00002
- Rowland, M., Benet, L. Z., & Graham, G. G. (1973). Clearance concepts in pharmacokinetics. *J Pharmacokinet Biopharm*, 1(2), 123-136. doi: 10.1007/BF01059626
- Roy, H., & Nandi, S. (2019). In-Silico Modeling in Drug Metabolism and Interaction: Current Strategies of Lead Discovery. *Curr Pharm Des*, 25(31), 3292-3305. doi: 10.2174/1381612825666190903155935
- Sadler, P. J., & Viles, J. H. (1996). <sup>1</sup>H and (113)Cd NMR Investigations of Cd(2+) and Zn(2+) Binding Sites on Serum Albumin: Competition with Ca(2+), Ni(2+), Cu(2+), and Zn(2+). *Inorg Chem*, 35(15), 4490-4496. doi: 10.1021/ic951005d
- Sager, J. E., Yu, J., Ragueneau-Majlessi, I., & Isoherranen, N. (2015). Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulation Approaches: A Systematic Review of Published Models, Applications, and Model Verification. *Drug Metab Dispos*, 43(11), 1823-1837. doi: 10.1124/dmd.115.065920
- Sahin, S., & Rowland, M. (1998). Development of an optimal method for the dual perfusion of the isolated rat liver. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 39(1), 35-43. doi: 10.1016/s1056-8719(97)00100-7
- Saliba, A. E., Vonkova, I., & Gavin, A. C. (2015). The systematic analysis of protein-lipid interactions comes of age. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 16(12), 753-761. doi: 10.1038/nrm4080
- Sand, K. M., Bern, M., Nilsen, J., Noordzij, H. T., Sandlie, I., & Andersen, J. T. (2014). Unraveling the Interaction between FcRn and Albumin: Opportunities for Design of Albumin-Based Therapeutics. *Front Immunol*, 5, 682. doi: 10.3389/fimmu.2014.00682
- Sarcione, E. J. (1963). Synthesis of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein by the isolated perfused rat liver. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 100(3), 516-519. doi: 10.1016/0003-9861(63)90120-6
- Sawada, Y., Sugiyama, Y., Miyamoto, Y., Iga, T., & Hanano, M. (1985). Hepatic drug clearance model: comparison among the distributed, parallel-tube and well-stirred models. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 33(1), 319-326. doi: 10.1248/cpb.33.319
- Scherer, P. G., & Seelig, J. (1989). Electric charge effects on phospholipid headgroups. Phosphatidylcholine in mixtures with cationic and anionic amphiphiles. *Biochemistry*, 28(19), 7720-7728. doi: 10.1021/bi00445a030
- Schmid. (1950). Preparation and properties of an acid glycoprotein prepared from human plasma. *Journal of the American Chemical Society*, 72(6), 2816-2816.

- Schmid. (1989). Human plasma alpha1-acid glycoprotein-Biochemical properties, the amino acid sequence and the structure of the carbohydrate moiety, variants and polymorphism. In P. Baumann, B. C. Eap, M. Walter, & J. P. Tillement (Eds.), *Alpha1-acid Glycoprotein* (Vol. 300, pp. 7-22). New York: USA: Alan R Liss.
- Schmid, Kaufmann, H., Isemura, S., Bauer, F., Emura, J., Motoyama, T., . . . Nanno, S. (1973). Structure of a1-acid glycoprotein. The complete amino acid sequence, multiple amino acid substitutions, and homology with immunoglobulins. *Biochemistry*, *12*, 2711–2724.
- Schmid, Nimerg, R. B., Kimura, A., Yamaguchi, H., & Binette, J. P. (1977). The carbohydrate units of human plasma  $\alpha$ 1-acid glycoprotein. *Biochim. Biophys. Acta*, *492*, 291–302.
- Schmidt, S., Gonzalez, D., & Derendorf, H. (2010). Significance of protein binding in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *J Pharm Sci*, *99*(3), 1107-1122. doi: 10.1002/jps.21916
- Schnitzer, J. E., & Oh, P. (1992). Antibodies to SPARC inhibit albumin binding to SPARC, gp60, and microvascular endothelium. *Am J Physiol*, *263*(6 Pt 2), H1872-1879. doi: 10.1152/ajpheart.1992.263.6.H1872
- Schonfeld, D. L., Ravelli, R. B., Mueller, U., & Skerra, A. (2008). The 1.8-Å crystal structure of alpha1-acid glycoprotein (Orosomuroid) solved by UV RIP reveals the broad drug-binding activity of this human plasma lipocalin. *J Mol Biol*, *384*(2), 393-405. doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.020
- Schuetz, D. A., de Witte, W. E. A., Wong, Y. C., Knasmueller, B., Richter, L., Kokh, D. B., . . . Ecker, G. F. (2017). Kinetics for Drug Discovery: an industry-driven effort to target drug residence time. *Drug Discov Today*, *22*(6), 896-911. doi: 10.1016/j.drudis.2017.02.002
- Seglen, P. O. (1976). Incorporation of radioactive amino acids into protein in isolated rat hepatocytes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Nucleic Acids and Protein Synthesis*, *442*(3), 391-404. doi: 10.1016/0005-2787(76)90313-0
- Sengupta, B., Das, N., & Sen, P. (2017). Elucidation of mus dynamics of domain-III of human serum albumin during the chemical and thermal unfolding: A fluorescence correlation spectroscopic investigation. *Biophys Chem*, *221*, 17-25. doi: 10.1016/j.bpc.2016.11.006
- Sheng, Y., Sali, A., Herzog, H., Lahnstein, J., & Krilis, S. A. (1996). Site-directed mutagenesis of recombinant human beta 2-glycoprotein I identifies a cluster of lysine residues that are critical for phospholipid binding and anti-cardiolipin antibody activity. *The Journal of Immunology*, *157*(8), 3744-3751.
- Shimura, K., Murayama, N., Tanaka, S., Onozeki, S., & Yamazaki, H. (2019). Suitable albumin concentrations for enhanced drug oxidation activities mediated by human liver microsomal cytochrome P450 2C9 and other forms predicted with unbound fractions and partition/distribution coefficients of model substrates. *Xenobiotica*, *49*(5), 557-562. doi: 10.1080/00498254.2018.1482576
- Silva, D., Cortez, C. M., Cunha-Bastos, J., & Louro, S. R. (2004). Methyl parathion interaction with human and bovine serum albumin. *Toxicol Lett*, *147*(1), 53-61. doi: 10.1016/j.toxlet.2003.10.014
- Singh-Manoux, A., Shipley, M. J., Bell, J. A., Canonico, M., Elbaz, A., & Kivimaki, M. (2017). Association between inflammatory biomarkers and all-cause, cardiovascular and cancer-related mortality. *CMAJ*, *189*(10), E384-E390. doi: 10.1503/cmaj.160313
- Singh, P., Singh, H., Castro-Aceituno, V., Ahn, S., Kim, Y. J., & Yang, D. C. (2017). Bovine serum albumin as a nanocarrier for the efficient delivery of ginsenoside compound K:

- preparation, physicochemical characterizations and in vitro biological studies. *RSC Advances*, 7(25), 15397-15407. doi: 10.1039/c6ra25264h
- Sleep, D., Cameron, J., & Evans, L. R. (2013). Albumin as a versatile platform for drug half-life extension. *Biochim Biophys Acta*, 1830(12), 5526-5534. doi: 10.1016/j.bbagen.2013.04.023
- Sockolosky, J. T., & Szoka, F. C. (2015). The neonatal Fc receptor, FcRn, as a target for drug delivery and therapy. *Adv Drug Deliv Rev*, 91, 109-124. doi: 10.1016/j.addr.2015.02.005
- Sodhi, J. K., Wang, H. J., & Benet, L. Z. (2020). Are There Any Experimental Perfusion Data that Preferentially Support the Dispersion and Parallel-Tube Models over the Well-Stirred Model of Organ Elimination? *Drug Metab Dispos*, 48(7), 537-543. doi: 10.1124/dmd.120.090530
- Stamler, J. S., Jaraki, O., Osborne, J., Simon, D. I., Keaney, J., Vita, J., . . . Loscalzo, J. (1992). Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(16), 7674-7677. doi: 10.1073/pnas.89.16.7674
- Stollman, Y. R., Gartner, U., Theilmann, L., Ohmi, N., & Wolkoff, A. W. (1983). Hepatic bilirubin uptake in the isolated perfused rat liver is not facilitated by albumin binding. *J Clin Invest*, 72(2), 718-723. doi: 10.1172/JCI111021
- Stringer, R., Nicklin, P. L., & Houston, J. B. (2008). Reliability of human cryopreserved hepatocytes and liver microsomes as in vitro systems to predict metabolic clearance. *Xenobiotica*, 38(10), 1313-1329. doi: 10.1080/00498250802446286
- Sudlow, G., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1975). The characterization of two specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol Pharmacol*, 11(6), 824-832.
- Sudlow, G., Birkett, D. J., & Wade, D. N. (1976). Further characterization of specific drug binding sites on human serum albumin. *Mol. Pharmacol.*, 12 1052–1061.
- Sułkowska, A. (2002). Interaction of drugs with bovine and human serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 614(1-3), 227-232. doi: 10.1016/s0022-2860(02)00256-9
- Szekely, P., Dvir, T., Asor, R., Resh, R., Steiner, A., Szekely, O., . . . Raviv, U. (2011). Effect of temperature on the structure of charged membranes. *J Phys Chem B*, 115(49), 14501-14506. doi: 10.1021/jp207566n
- Taguchi, K., Nishi, K., Giam Chuang, V. T., Maruyama, T., & Otagiri, M. (2013a). Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function. In S. Janciauskiene (Ed.), *Acute Phase Proteins* (pp. 139-162): IntechOpen.
- Taguchi, K., Nishi, K., Giam Chuang, V. T., Maruyama, T., & Otagiri, M. (2013b). Molecular Aspects of Human Alpha-1 Acid Glycoprotein — Structure and Function. doi: 10.5772/56101
- Tantipolphan, R., Rades, T., McQuillan, A. J., & Medicott, N. J. (2007). Adsorption of bovine serum albumin (BSA) onto lecithin studied by attenuated total reflectance Fourier transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy. *Int J Pharm*, 337(1-2), 40-47. doi: 10.1016/j.ijpharm.2006.12.021
- Tayeh, N., Rungassamy, T., & Albani, J. R. (2009). Fluorescence spectral resolution of tryptophan residues in bovine and human serum albumins. *J Pharm Biomed Anal*, 50(2), 107-116. doi: 10.1016/j.jpba.2009.03.015
- Thakur, R., Das, A., & Chakraborty, A. (2014). The fate of anticancer drug, ellipticine in DPPC and DMPC liposomes upon interaction with HSA: a photophysical approach. *J Photochem Photobiol B*, 130, 122-131. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2013.10.016

- Thao, L. Q., Lee, C., Kim, B., Lee, S., Kim, T. H., Kim, J. O., . . . Youn, Y. S. (2017). Doxorubicin and paclitaxel co-bound lactosylated albumin nanoparticles having targetability to hepatocellular carcinoma. *Colloids Surf B Biointerfaces*, *152*, 183-191. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.01.017
- Thummel, K. E., Shen, D. D., & Isoherranen, N. (2017). Design and Optimization of Dosage Regimens: Pharmacokinetic Data. In L. L. Brunton, R. Hilal-Dandan, & B. C. Knollmann (Eds.), *Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 13e. New York, NY: McGraw-Hill Education.
- Toutain, P. L., & Bousquet-Melou, A. (2002). Free drug fraction vs free drug concentration: a matter of frequent confusion. *J Vet Pharmacol Ther*, *25*(6), 460-463. doi: 10.1046/j.1365-2885.2002.00442.x
- Toyama, Y., Ueyama, J., Nomura, H., Tsukiyama, I., Saito, H., Hisada, T., . . . Hasegawa, T. (2014). Contribution of plasma proteins, albumin and alpha 1-acid glycoprotein, to pharmacokinetics of a multi-targeted receptor tyrosine kinase inhibitor, sunitinib, in albuminemic rats. *Anticancer Res*, *34*(5), 2283-2289.
- Trainor, G. L. (2007). The importance of plasma protein binding in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov*, *2*(1), 51-64. doi: 10.1517/17460441.2.1.51
- Treyer, A., & Musch, A. (2013). Hepatocyte polarity. *Compr Physiol*, *3*(1), 243-287. doi: 10.1002/cphy.c120009
- Trynda-Lemiesz, L., & Wiglusz, K. (2010). Interactions of human serum albumin with meloxicam: characterization of binding site. *J Pharm Biomed Anal*, *52*(2), 300-304. doi: 10.1016/j.jpba.2009.12.025
- Tsao, S. C., Sugiyama, Y., Sawada, Y., Iga, T., & Hanano, M. (1988). Kinetic analysis of albumin-mediated uptake of warfarin by perfused rat liver. *J Pharmacokinet Biopharm*, *16*(2), 165-181. doi: 10.1007/BF01062259
- Turell, L., Radi, R., & Alvarez, B. (2013). The thiol pool in human plasma: the central contribution of albumin to redox processes. *Free Radic Biol Med*, *65*, 244-253. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2013.05.050
- Umehara, K., & Camenisch, G. (2012). Novel in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE) method to predict hepatic organ clearance in rat. *Pharm Res*, *29*(2), 603-617. doi: 10.1007/s11095-011-0607-2
- Valcke, M., & Krishnan, K. (2011). Evaluation of the impact of the exposure route on the human kinetic adjustment factor. *Regul Toxicol Pharmacol*, *59*(2), 258-269. doi: 10.1016/j.yrtph.2010.10.008
- Valcke, M., & Krishnan, K. (2013). Assessing the impact of child/adult differences in hepatic first-pass effect on the human kinetic adjustment factor for ingested toxicants. *Regul Toxicol Pharmacol*, *65*(1), 126-134. doi: 10.1016/j.yrtph.2012.11.006
- Valcke, M., Nong, A., & Krishnan, K. (2012). Modeling the Human Kinetic Adjustment Factor for Inhaled Volatile Organic Chemicals: Whole Population Approach versus Distinct Subpopulation Approach. *J Toxicol*, *2012*, 404329. doi: 10.1155/2012/404329
- Vallner, J. J. (1977). Binding of drugs by albumin and plasma protein. *J Pharm Sci*, *66*(4), 447-465. doi: 10.1002/jps.2600660402
- van Dijk, W., Pos, O., van der Stelt, M., Moshage, H., Yap, S., Dente, L., . . . Eap, C. (1991). Inflammation-induced changes in expression and glycosylation of genetic variants of alpha-1-acid glycoprotein. *Biochem J*, *1*(276), 343-347.

- van, I. S. C., & Hoekstra, D. (1999). The subapical compartment: a novel sorting centre? *Trends Cell Biol*, 9(4), 144-149. doi: 10.1016/s0962-8924(99)01512-3
- van Liempd, S., Morrison, D., Sysmans, L., Nelis, P., & Mortishire-Smith, R. (2011). Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding. *J Lab Autom*, 16(1), 56-67. doi: 10.1016/j.jala.2010.06.002
- Varki, A. (2008). Sialic acids in human health and disease. *Trends Mol Med*, 14(8), 351-360. doi: 10.1016/j.molmed.2008.06.002
- Varma, M. V., Steyn, S. J., Allerton, C., & El-Kattan, A. F. (2015). Predicting Clearance Mechanism in Drug Discovery: Extended Clearance Classification System (ECCS). *Pharm Res*, 32(12), 3785-3802. doi: 10.1007/s11095-015-1749-4
- Walsh, C. T., Garneau-Tsodikova, S., & Gatto, G. J., Jr. (2005). Protein posttranslational modifications: the chemistry of proteome diversifications. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44(45), 7342-7372. doi: 10.1002/anie.200501023
- Wanat, K. (2020). Biological barriers, and the influence of protein binding on the passage of drugs across them. *Mol Biol Rep*, 47(4), 3221-3231. doi: 10.1007/s11033-020-05361-2
- Wanat, K., Brzezinska, E., & Sobanska, A. W. (2018). Aspects of Drug-Protein Binding and Methods of Analyzing the Phenomenon. *Curr Pharm Des*, 24(25), 2974-2985. doi: 10.2174/1381612824666180808145320
- Wang, Bonkovsky, H. L., de Lemos, A., & Burczynski, F. J. (2015). Recent insights into the biological functions of liver fatty acid binding protein 1. *J Lipid Res*, 56(12), 2238-2247. doi: 10.1194/jlr.R056705
- Wang, F., Yang, Z., Zhou, Y., Weng, S., Zhang, L., & Wu, J. (2006). Influence of metal ions on phosphatidylcholine-bovine serum albumin model membrane, an FTIR study. *Journal of Molecular Structure*, 794(1-3), 1-11. doi: 10.1016/j.molstruc.2006.01.021
- Wang, H., Zou, H., & Zhang, Y. (1998). Multi-site binding of fenoprofen to human serum albumin studied by a combined technique of microdialysis with high performance liquid chromatography. *Biomed Chromatogr*, 12(1), 4-7. doi: 10.1002/(SICI)1099-0801(199801/02)12:1<4::AID-BMC707>3.0.CO;2-K
- Wang, Y. C., Peterson, S. E., & Loring, J. F. (2014). Protein post-translational modifications and regulation of pluripotency in human stem cells. *Cell Res*, 24(2), 143-160. doi: 10.1038/cr.2013.151
- Weber, G. (1975). Energetics of ligand binding to proteins. *Adv Protein Chem*, 29, 1-83. doi: 10.1016/s0065-3233(08)60410-6
- Weimer, H. E., Mehl, J. W., & Winzler, R. J. (1950). Studies on the mucoproteins of human plasma. V. Isolation and characterization of a homogeneous mucoprotein. *J Biol Chem*, 185(2), 561-568.
- Weisiger, R. A., Fitz, J. G., & Scharschmidt, B. F. (1989). Hepatic oleate uptake. Electrochemical driving forces in intact rat liver. *J Clin Invest*, 83(2), 411-420. doi: 10.1172/JCI113899
- Weisiger, R. A., Zacks, C. M., Smith, N. D., & Boyer, J. L. (1984). Effect of albumin binding on extraction of sulfobromophthalein by perfused elasmobranch liver: evidence for dissociation-limited uptake. *Hepatology*, 4(3), 492-501. doi: 10.1002/hep.1840040323
- Weitkamp, L. R., Salzano, F. M., Neel, J. V., Porta, F., Geerdink, R. A., & Tarnoky, A. L. (1973). Human serum albumin: twenty-three genetic variants and their population distribution. *Ann Hum Genet*, 36(4), 381-392. doi: 10.1111/j.1469-1809.1973.tb00602.x
- Westphal, U. (1971). Interaction of Progesterone and Other Steroids with  $\alpha$ 1-Acid Glycoprotein. *J Biol Chem*, 246, 375-433. doi: 10.1007/978-3-642-46262-7\_13

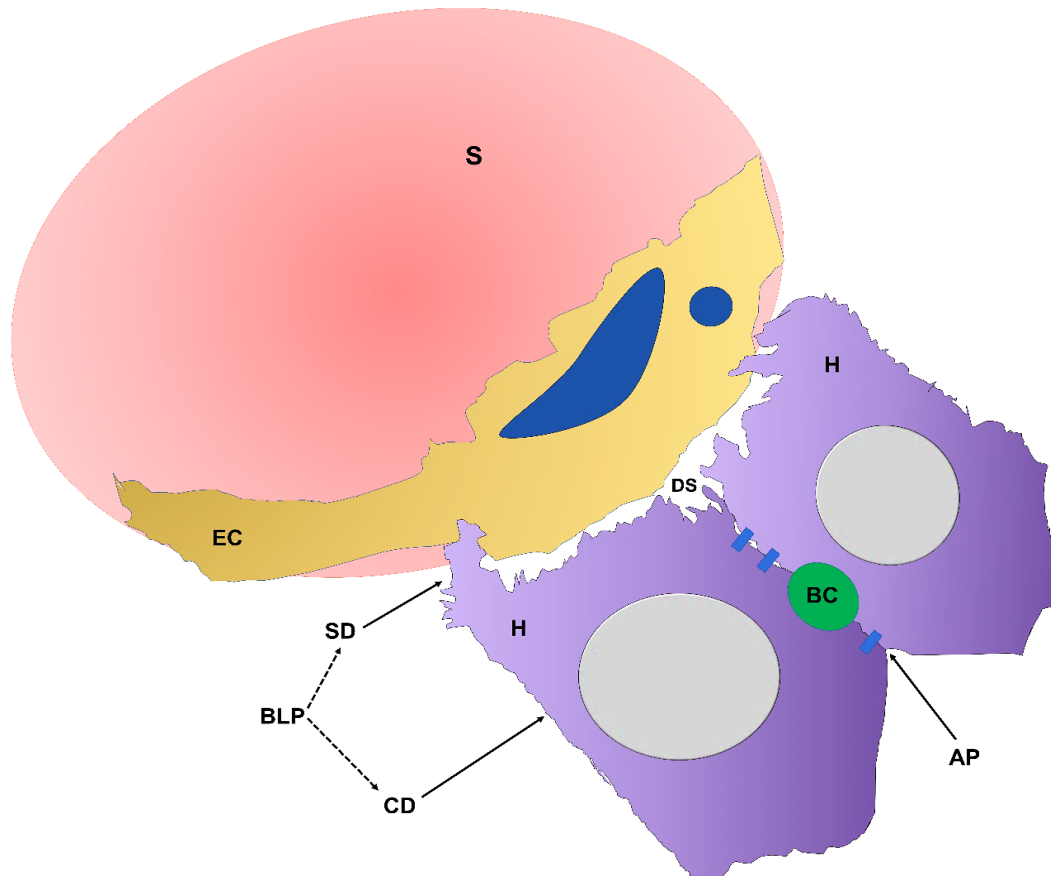
- Wilkinson, G. R. (1987). Clearance approaches in pharmacology. *Pharmacol Rev*, 39(1), 1-47.
- Wilkinson, G. R., & Shand, D. G. (1975). Commentary: a physiological approach to hepatic drug clearance. *Clin Pharmacol Ther*, 18(4), 377-390. doi: 10.1002/cpt1975184377
- Wisher, M. H., & Evans, W. H. (1975). Functional polarity of the rat hepatocyte surface membrane. Isolation and characterization of plasma-membrane subfractions from the blood-sinusoidal, bile-Canalicular and contiguous surfaces of the hepatocyte. *Biochem J*, 146(2), 375-388. doi: 10.1042/bj1460375
- Wood, F. L., Houston, J. B., & Hallifax, D. (2017). Clearance Prediction Methodology Needs Fundamental Improvement: Trends Common to Rat and Human Hepatocytes/Microsomes and Implications for Experimental Methodology. *Drug Metab Dispos*, 45(11), 1178-1188. doi: 10.1124/dmd.117.077040
- Wood, R., & Harlow, R. D. (1969). Structural studies of neutral glycerides and phosphoglycerides of rat liver. *Arch Biochem Biophys*, 131(2), 495-501. doi: 10.1016/0003-9861(69)90421-4
- Wright, J. D., Boudinot, F. D., & Ujhelyi, M. R. (1996). Measurement and analysis of unbound drug concentrations. *Clin Pharmacokinet*, 30(6), 445-462. doi: 10.2165/00003088-199630060-00003
- Wu, C. Y., & Benet, L. Z. (2005). Predicting drug disposition via application of BCS: transport/absorption/ elimination interplay and development of a biopharmaceutics drug disposition classification system. *Pharm Res*, 22(1), 11-23. doi: 10.1007/s11095-004-9004-4
- Wu, D., Struwe, W. B., Harvey, D. J., Ferguson, M. A. J., & Robinson, C. V. (2018). N-glycan microheterogeneity regulates interactions of plasma proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(35), 8763-8768. doi: 10.1073/pnas.1807439115
- Wuthier, R. E. (1966). Two-dimensional chromatography on silica gel-loaded paper for the microanalysis of polar lipids. *J Lipid Res*, 7(4), 544-550.
- Xie, X., Wang, X., Xu, X., Sun, H., & Chen, X. (2010). Investigation of the interaction between endocrine disruptor bisphenol A and human serum albumin. *Chemosphere*, 80(9), 1075-1080. doi: 10.1016/j.chemosphere.2010.04.076
- Xie, X., Wang, Z., Zhou, X., Wang, X., & Chen, X. (2011). Study on the interaction of phthalate esters to human serum albumin by steady-state and time-resolved fluorescence and circular dichroism spectroscopy. *J Hazard Mater*, 192(3), 1291-1298. doi: 10.1016/j.jhazmat.2011.06.038
- Yang, F., Zhang, Y., & Liang, H. (2014). Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *Int J Mol Sci*, 15(3), 3580-3595. doi: 10.3390/ijms15033580
- Yang, J., Petersen, C. E., Ha, C. E., & Bhagavan, N. V. (2002). Structural insights into human serum albumin-mediated prostaglandin catalysis. *Protein Sci*, 11(3), 538-545. doi: 10.1110/ps.28702
- Yeggoni, D. P., Manidhar, D. M., Suresh Reddy, C., & Subramanyam, R. (2016). Investigation of binding mechanism of novel 8-substituted coumarin derivatives with human serum albumin and alpha-1-glycoprotein. *J Biomol Struct Dyn*, 34(9), 2023-2036. doi: 10.1080/07391102.2015.1104264
- Yeggoni, D. P., Rachamalla, A., & Subramanyam, R. (2016). A comparative binding mechanism between human serum albumin and  $\alpha$ -1-acid glycoprotein with corilagin: biophysical and computational approach. *RSC Advances*, 6(46), 40225-40237. doi: 10.1039/c6ra06837e

- Yoshima, H., Matsumoto, A., Mizuochi, T., Kawasaki, T., & Kob, A. (1981). Comparative Study of the Carbohydrate Moieties of Rat and Human Plasma  $\alpha$ -Acid Glycoproteins. *Journal of Biological Chemistry*, 256(16), 8476-8484.
- Yuasa, I., Umetsu, K., Shotake, T., Ishida, T., Takenaka, O., Terao, K., & Kawamoto, Y. (1990). Orosomucoid typing by isoelectric focusing: genetic variation of orosomucoid in Asian macaques (genus *Macaca*). *Electrophoresis*, 11(10), 840-845. doi: 10.1002/elps.1150111012
- Yuasa, I., Umetsu, K., Vogt, U., Nakamura, H., Nanba, E., Tamaki, N., & Irizawa, Y. (1997). Human orosomucoid polymorphism: molecular basis of the three common ORM1 alleles, ORM1\*F1, ORM1\*F2, and ORM1\*S. *Hum Genet*, 99(3), 393-398. doi: 10.1007/s004390050378
- Zamek-Gliszczyński, M. J., Ruterbories, K. J., Ajamie, R. T., Wickremsinhe, E. R., Pothuri, L., Rao, M. V., . . . Chaudhary, A. K. (2011). Validation of 96-well equilibrium dialysis with non-radiolabeled drug for definitive measurement of protein binding and application to clinical development of highly-bound drugs. *J Pharm Sci*, 100(6), 2498-2507. doi: 10.1002/jps.22452
- Zhang, Y., Lee, P., Liang, S., Zhou, Z., Wu, X., Yang, F., & Liang, H. (2015). Structural basis of non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac binding to human serum albumin. *Chem Biol Drug Des*, 86(5), 1178-1184. doi: 10.1111/cbdd.12583
- Zhao, H., & Lappalainen, P. (2012). A simple guide to biochemical approaches for analyzing protein-lipid interactions. *Mol Biol Cell*, 23(15), 2823-2830. doi: 10.1091/mbc.E11-07-0645
- Zsila, F. (2013). Subdomain IB is the third major drug binding region of human serum albumin: toward the three-sites model. *Mol Pharm*, 10(5), 1668-1682. doi: 10.1021/mp400027q
- Zsila, F., Fitos, I., Bencze, G., Keri, G., & Orfi, L. (2009). Determination of human serum  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and albumin binding of various marketed and preclinical kinase inhibitors. *Curr Med Chem*, 16(16), 1964-1977. doi: 10.2174/092986709788682191
- Zucker, S. D., Goessling, W., & Gollan, J. L. (1995). Kinetics of bilirubin transfer between serum albumin and membrane vesicles. Insight into the mechanism of organic anion delivery to the hepatocyte plasma membrane. *J Biol Chem*, 270(3), 1074-1081. doi: 10.1074/jbc.270.3.1074
- Zuegge, J., Schneider, G., Coassolo, P., & Lave, T. (2001). Prediction of hepatic metabolic clearance: comparison and assessment of prediction models. *Clin Pharmacokinet*, 40(7), 553-563. doi: 10.2165/00003088-200140070-00006



# Annexes du chapitre 1

## Annexe I.1. Architecture physiologique du foie



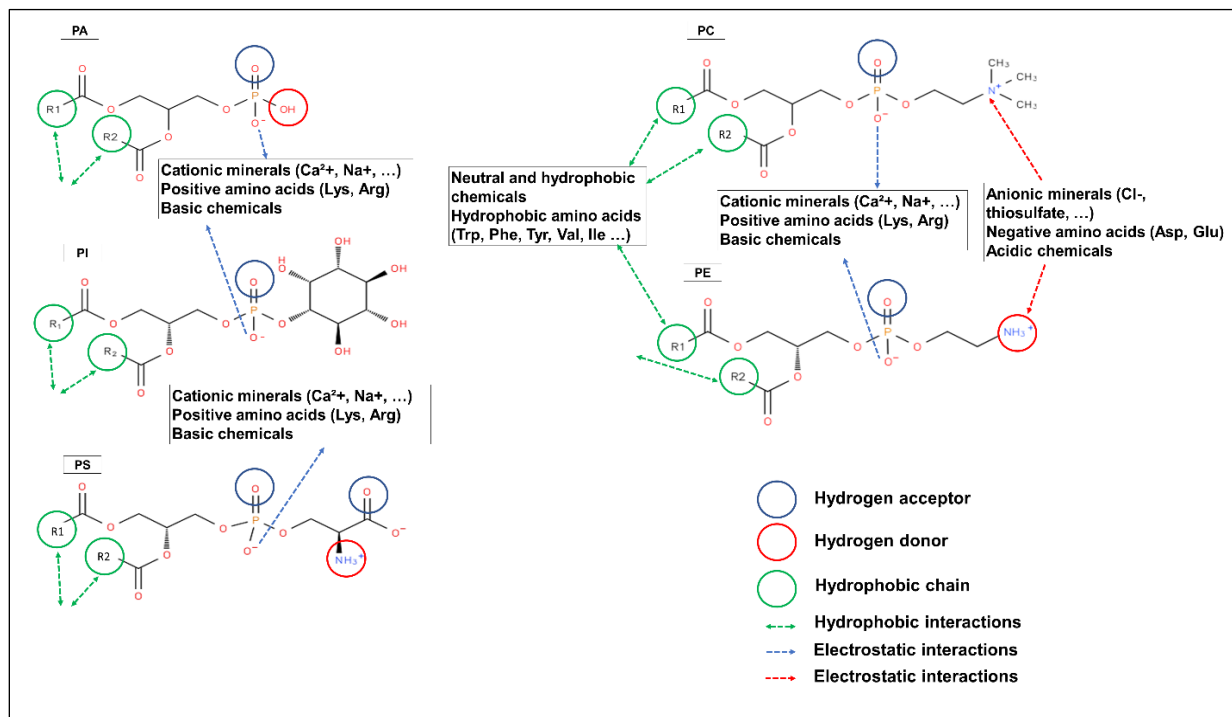
**Figure A1.1. Espace extracellulaire et les trois domaines principaux des hépatocytes (© Bteich Michel, Thèse 2020).**

**En anglais:** AP apical poles; BC bile canaliculus; BLP basolateral poles; CD contiguous domain; DS space of Disse; EC endothelial cells; H hepatocytes; S sinusoids; SD sinusoidal domain. Cette illustration est produite en se basant sur les informations trouvées dans la publication de K. Kim, Utoh, Ohashi, Kikuchi, and Okano (2017). Both functional (uptake and clearance) and biochemical properties (protein G, enzymes and hormones receptors) are distributed according to three main polarized domains of the hepatocyte plasma membrane: sinusoidal, contiguous, and canalicular (Kremmer et al., 1976; Treyer & Musch, 2013; Wisher & Evans, 1975). The first domain is characterized by the omnipresence of microvilli prolonging parenchymal cells into the space of Disse (aqueous phase), and the second is characterized by the implication of desmosomes and tight junctions between neighbouring cells. Taken together, the first two domains are known as the basolateral pole. The third domain is known as the apical pole. The latter domain also contains some microvilli and it is highly rich in tight junctions and in transporters (active and passive transport) establishing the bile canaliculi between adjacent hepatocytes for biliary clearance. Furthermore, a recent study has demonstrated that regenerative hepatocytes reorient their domains in respect to the sinusoidal space according to the process of 'hepatocyte-sinusoid alignment', where LSEC serve as a 'lighthouse' for a coordinated regeneration and migration of hepatocytes (Hoehme et al., 2010).

## **Annexe I.2. Les interactions protéines-lipides**

### **1. Attractions électrostatiques entre les résidus peptidiques et les phospholipides**

Dans la figure A1.2, nous mettons en évidence les interactions électrostatiques et autres interactions plus faibles, telles que les interactions hydrophobes et les liaisons H, susceptibles d'aider les différentes espèces chargées (acides aminés) à se rapprocher de groupes de phospholipides rotatifs (Hauser et al., 1980) et ainsi contribuent à la liaison protéine-lipide (Lee, 2003, 2005). Selon Scherer and Seelig (1989), le dipôle P-N est affiché en position parallèle à la surface de la membrane dans la membrane phospholipidique. L'ajout de molécules amphiphiles ou cationiques chargées positivement déplace l'azote positif ( $N^+$ ) de l'extrémité du dipôle vers la phase aqueuse dans l'espace interstitiel, loin du groupe  $PO_4^-$  (Scherer & Seelig, 1989). Ainsi, cela changerait l'orientation spatiale de la  $PO_4^-$  de plus de  $30^\circ$  à la concentration la plus élevée en molécules amphiphiles ou cationiques (Scherer & Seelig, 1989). Cependant, une charge négative adsorbée sur la surface de la membrane produit l'effet inverse, forçant l'extrémité  $N^+$  vers la membrane (Scherer & Seelig, 1989).



**Figure A1.2. Interactions possibles entre les acides aminés distincts et les phospholipides de la membrane plasmique (© Bteich Michel, Thèse 2020). *En anglais* :** PA phosphatidic acid ; PC phosphatidylcholine ; PE phosphatidylethanolamine ; PI phosphatidylinositol ; PS phosphatidylserine.

Les deux PC et le PE sont des glycérophospholipides zwitterions, tandis que les PA, PI et PS sont des glycérophospholipides acides chargés. Les structures des phospholipides se trouvent sur le site Web suivant : <http://www.ebi.ac.uk>.

En conséquence, les résidus Glu [(CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>] et Asp (CH<sub>2</sub>COO<sup>-</sup>) chargés négativement, par ex. sur les surfaces ALB et AGP, interagiraient plus probablement avec le groupe de tête d'éthanolamine (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) qu'avec la choline qui a un groupe amine encombré, i.e. [N<sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>]. Alors que le groupe ε-ammonium chargé positivement de Lys [(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>] et le groupe guanidinium d'Arg [(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH-C(NH)NH<sub>2</sub><sup>+</sup>] interagiraient fort probablement avec les groupes de têtes (PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) chargés négativement de tous les phospholipides (L. Li, Vorobyov, & Allen, 2013). Les interactions de Lys et de Arg avec PI sont d'une moindre mesure en raison de la présence d'une forme cyclique importante (l'inositol). D'autres attractions intermoléculaires relativement faibles comme Van der Waals sont également possibles, plus particulièrement entre les molécules neutres (ou les résidus neutres tels que Trp) et les FA hydrophobes

rotatifs dans les queues de phospholipides. Lee (2003) a illustré plusieurs exemples de dynamique moléculaire de diverses chaînes peptidiques transmembranaires (par ex. la bactériorhodopsine, la cytochrome c oxydase) qui interagissent avec les lipides essentiels (par ex. PE, PC et PI).

## **2. Rôle des interactions protéines plasmiques-phospholipides dans la réduction de la distance de diffusion**

Malgré la variabilité de la dynamique et des interactions protéine-lipide, les attractions électrostatiques entre des groupes de résidus chargés et des groupes de têtes de glycérophospholipides sont assez fréquentes. Ainsi, elles peuvent avoir lieu non seulement pour les protéines transmembranaires, mais également pour les protéines plasmiques (par ex. la  $\beta$ 2-glycoprotéine I) (Sheng, Sali, Herzog, Lahnstein, & Krilis, 1996). En théorie, les phospholipides sinusoïdaux sont en échange rapide avec la surface des protéines plasmiques (par ex. ALB, AGP) dans l'espace interstitiel, si bien que le contact direct des protéines peut entraîner des interactions non collantes, comme pour les protéines transmembranaires (Lee, 2011). Les surfaces des protéines plasmiques sont recouvertes de minuscules interstices (fentes) où les molécules lipidiques peuvent avoir un contact rapide et temporel d'attachement/détachement. Pour de tels échanges rapides, les liaisons H sont essentielles et peuvent être ajoutées à la catégorie des interactions typiques. Par exemple, le groupe de tête  $PO_4^-$  dans tous les phospholipides agissent comme un accepteur d'hydrogène (L. Li et al., 2013), mais seul le groupe de tête ( $NH_3^+$ ) de PE agit comme donneur d'hydrogène pour les produits chimiques et résidus polaires (Lee, 2005).

Bien que les membranes plasmiques d'hépatocytes aient une charge nette négative dépendante de son environnement physiologique, les phospholipides zwitterions soient les plus abondants (Annexe II, Tableau A2.6) et dispersés sur toute la couche sinusoïdale. Ils peuvent donc s'adapter aux protéines plasmiques chargées négativement (par ex. ALB, AGP). D'une part, ces protéines négatives ont plusieurs grappes (ou clusters) d'AA basique (Lys et Arg) sur leurs surfaces, ce qui leur permet de se rapprocher des phospholipides acides (PA et PS plus que PI) (Haleva, Ben-Tal, & Diamant, 2004; L. Li et al., 2013; Sheng et al., 1996). Dans cette perspective, les « clusters » acides (Glu et Asp) sur la surface des protéines plasmiques sont attirés par les groupes amines des phospholipides zwitterions (pour le PE plus que le

PC). Ainsi, nous suggérons que les attractions électrostatiques et les liaisons H sont très susceptibles d'apparaître entre des résidus distincts situés sur les surfaces des protéines plasmatiques et les phospholipides (PC, PE, PI ou PS) et que ces attractions pourraient prédominer dans l'espace interstitiel (Figure A1.1).

Comme l'illustre [la figure 2.4](#), les deux types d'interactions (protéines-lipides et protéines-récepteurs) réduiraient la distance entre les protéines extracellulaires et la couche sinusoïdale (Burczynski et al., 2001). En outre, la pression hémodynamique permet un contact entre le complexe réversible de protéine-xénobiotiques et les phospholipides interstitiels. Par conséquent, on peut suggérer que le complexe protéine-xénobiotique entre en collision avec la couche lipidique sinusoïdale polarisée pendant le temps de transit de 5 secondes de l'échange capillaire dans la sinusoïde (Pardridge, 1981). Bien que la durée de telles interactions soit présumée brève, elle serait cependant suffisamment longue pour réduire la distance de diffusion des xénobiotiques qui se rapprochent de la membrane tout en restant liés aux protéines plasmatiques (Burczynski et al., 2001).

De plus, Lee (2011) a démontré que les protéines transmembranaires subissaient des mouvements de flexion en se penchant, s'enroulant et se déroulant au niveau des faisceaux d'hélices. Dans Peters Jr. (1996a), il est rapporté que l'ALB subissait des mouvements similaires connus sous le nom « d'action respiratoire », avec de nombreux résidus constamment en mouvement et une forte capacité d'échange des hydrogènes. De ces observations, on peut également suggérer que lorsque les protéines plasmatiques avec leurs « clusters » de résidus basiques sont suffisamment proches de la membrane plasmatique, elles pourraient entrer en contact perpétuel avec les phospholipides et leurs structures peptidiques subiraient des mouvements de flexion mineurs. En conséquence, ce dernier mouvement forcerait la protéine à étirer sa structure. Ainsi, les mouvements de flexion induiraient éventuellement une modification des structures tertiaires et secondaires. Cela entraînerait simultanément la libération des ligands à proximité de la membrane plasmatique, même lorsqu'ils sont fortement liés aux cavités des protéines plasmatiques. Sur cette base, on peut clairement suggérer que les interactions protéines plasmatiques-lipides devraient être ajoutées en tant que phénomène important contribuant à une captation hépatique supplémentaire à la suite de la libération du ligand par les protéines plasmatiques.

### **3. Études *in vitro* : preuves probantes sur l'adsorption de l'ALB et de l'AGP sur les phospholipides**

L'ALB s'adsorbe différemment sur des vésicules phospholipidiques que des monocouches ou des biomembranes. La protéine forme un complexe stable *in vitro* uniquement avec un PC monodispersé, mais il n'y avait aucune preuve de formation de complexes avec des vésicules de PC ayant de fortes interactions lipides-lipides internes (Jonas, 1975, 1976). Inversement, une autre étude récente utilisant la spectroscopie FT-IR et les spectres infrarouges a révélé que l'ALB bovine s'adsorbe sur les vésicules de PC dans des solutions aqueuses et dans des systèmes lipides-protéines (F. Wang et al., 2006). En outre, Horie et al. (1988) ont démontré en spectroscopie que des changements conformationnels se produisaient dans l'ALB en raison d'interactions faibles avec des hépatocytes isolés de rats. Le type d'adsorption est considéré non spécifique (Horie et al., 1988). Cette adsorption entraîne des modifications conformationnelles mutuelles de la structure secondaire de la protéine plasmatique et des groupes fonctionnels des PC (groupes phosphate-ester) (F. Wang et al., 2006). Un autre exemple révèle la libération d'un médicament anticancéreux (ellipticine) à partir de vésicules PC, après le contact de l'ALB humain avec des liposomes en raison d'interactions hydrophobes (Thakur et al., 2014).

L'adsorption d'ALB sur PC est influencée, entre autres, par la concentration de cations ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Eu}^{3+}$  et  $\text{K}^+$ ) (Tantipolphan, Rades, McQuillan, & Medlicott, 2007; F. Wang et al., 2006). En particulier, cette adsorption est apparue plus importante à une concentration de 0,1 M (à la concentration la plus faible) pour les deux cations en raison du phénomène de relargage, notamment que les ions minéraux attirent les couches de molécules d'eau qui accompagnent l'ALB dans le plasma (Tantipolphan et al., 2007). De toute évidence, les cations trivalents ont la plus grande influence sur l'adsorption (F. Wang et al., 2006) et l'ALB bovine est dénaturée à de très fortes concentrations de cations minéraux (Tantipolphan et al., 2007).

En ce qui concerne l'AGP, elle peut également interagir avec les vésicules phospholipidiques et les membranes de différentes cellules (par ex. lymphocytes, érythrocytes) (Cheresh, Haynes, & Distasio, 1984; H. Maeda, Morinaga, Mori, & Nishi, 1984; Hiroshi Maeda, Nishi, & Mori, 1980). Cependant, comme mentionné précédemment, seul l'asialo-AGP s'adsorbe et interagit avec la biomembrane (Taguchi et al.,

2013a). L'AGP native contenant des acides sialiques est soumise à une répulsion électrostatique et s'éloigne des phospholipides chargés négativement (Cheresh et al., 1984), ce qui prolongerait la demi-vie de la protéine (Varki, 2008). Ainsi, les interactions électrostatiques et hydrophobes entre les asialo-AGP et les lipides peuvent entraîner des modifications conformationnelles de la protéine (des feuillets  $\beta$  en des hélices  $\alpha$ ) et une diminution de la liaison du ligand par rapport à la cinétique de liaison initiale sans lipides (Nishi et al., 2006; Nishi et al., 2002).

## Annexes du chapitre 2

---

### Annexe II.1

*Original Review manuscript*

**An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics:  
highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular  
interactions**

Michel Bteich <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental and Occupational Health, School of Public Health, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

***Address for correspondence:***

Michel Bteich, Department of Environmental and Occupational Health, School of public health, Université de Montréal.

Email: [michel.bteich@umontreal.ca](mailto:michel.bteich@umontreal.ca)

Bteich M. Heliyon (2019). An overview of albumin and alpha-1-acid glycoprotein main characteristics: highlighting the roles of amino acids in binding kinetics and molecular interactions. Published in Heliyon, November 2019. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02879>



## **Abstract**

Although Albumin (ALB) and alpha-1-acid glycoprotein (AGP) have distinctive structural and functional characteristics, they both play a key role in binding a large variety of endogenous and exogenous ligands. An extensive binding to these plasma proteins could have a potential impact on drugs disposition (e.g. bioavailability, distribution and clearance), on their innocuity and their efficacy. This review summarizes the common knowledge about the structural and molecular characteristics of both ALB and AGP in humans, and about the most involved amino acids in their high-affinity binding pockets. However, the variability in residues found in binding pockets, for the same species, allows each plasma protein to interact differently with the ligands. The protein-ligand interaction influences differently the disposition of drugs that bind to either of these plasma proteins. The content of this review is useful for the design of new drug entities with high-binding characteristics, in qualitative and quantitative modelling (e.g. *in vitro-in vivo* extrapolations, 3D molecular docking, interspecies extrapolations), and for other interdisciplinary research.

## **1. Introduction**

In the human body, there are many plasma proteins that allow the binding of xenobiotics (drugs and/or contaminants) such as albumin (ALB), alpha-1-acid glycoprotein (AGP), lipoproteins (HDL, LDL, VLDL, and chylomicrons), fibrinogen, C-reactive protein, transferrin,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -globulins, etc. (B. H. Bowman, 1993; Kerns & Di, 2008; Putnam, 1984). ALB and AGP are the most important for two reasons: first, their main role is carriers and storage depot of the majority of exogenous and endogenous substances into the bloodstream (Lehman-McKeeman, 2013); second, ALB and AGP may be good biomarkers for inflammation and liver disease. They are also potential biomarkers for all-cause mortality, along with citrate and VLDL particle size (K. Fischer et al., 2014). Although both ALB and AGP have a key role in clinical pharmacokinetics (PK) and pharmacodynamics (PD) research, these plasma proteins have never been presented by contrasting their main characteristics from top to bottom. Therefore, the main objective of this review is to give an overview of the common knowledge about ALB and AGP in humans by contrasting their structural and functional characteristics. The composition in amino acids is also addressed for main sites of both plasma proteins, in an effort to better understand the differences in the molecular interactions occurring between each plasma protein and its ligands.

## **2. Common knowledge about albumin and alpha-1-acid glycoprotein**

### **2.1. Albumin**

ALB is a single chain, non-glycosylated protein, primarily synthesized in the liver (Miller et al., 1951; Peters & Anfinsen, 1950) and rapidly secreted in vesicles (13.3 g per day) to the extracellular space (Fries et al., 1984b; Peters Jr., 1996b). In humans, a mature ALB has 585 amino acids (AA) (Meloun et al., 1975; Minghetti et al., 1986) and a molecular weight of 66.5 KDa (Putnam, 1984) with great interspecies similarities despite the variability in some residues (J. R. Brown, 1976; Majorek et al., 2012). It is the most abundant protein in mammals, with almost 60% of the total amount of plasma proteins, and a physiological concentration varying between 3.0 to 5.0 g/dL (500  $\mu$ M-750  $\mu$ M, mean value  $\sim$ 600  $\mu$ M or  $\sim$ 4.5 % w/w) (Peters Jr., 1996b). It has acidic characteristics, a negative net charge (-15 for humans) at the physiological pH of 7.4, and an isoelectric point of 4.7 (Peters Jr., 1996b; Rothschild et al., 1988).

The 17 conserved disulfide bridges of cysteine (Cys) bonds ensure the flexibility of its conformation (normal or N state) (Weber, 1975) and the stability of its structure at pH 7.4 (Markus & Karush, 1957), even in extreme conditions, noticeably in all mammalian serum ALB (Majorek et al., 2012). These bridges contribute in prolonging its biological lifetime (Peters Jr., 1996b), and in conserving the three-dimensional structure among different species (Nurdiansyah et al., 2016). The neonatal Fc receptor (FcRn) may also have a role in prolonging the lifespan of ALB (Chaudhury et al., 2003), as it binds to ALB (domain III) in a pH-dependent internalization process of the complex with immunoglobulin G (IgG) (J. T. Andersen et al., 2006; Goebel et al., 2008; Sand et al., 2014). Thus, FcRn receptor plays a fundamental role in homeostatic regulation of both IgG and ALB, and in helping these proteins escape intracellular degradation by recycling them back to the systemic circulation (Chaudhury et al., 2003; Sand et al., 2014).

The disulfide bonding patterns give ALB a heart-like crystal structure in humans (3.2 Å) (He & Carter, 1992) and resolved at higher resolution (2.5 Å) (Curry et al., 1998). It has about 67% of  $\alpha$ -helices, 10%  $\beta$  turns, but no  $\beta$ -sheet (Peters Jr., 1996b). The flexibility of ALB allows for the binding with a high affinity of a wide variety of xenobiotics at its two primary sites: Sudlow I and II (Fanali et al., 2012; Peters Jr., 1996b; Sudlow et al., 1975; Sudlow et al., 1976). Sudlow's site I is known as the warfarin-azapropazone binding cleft (Fehske et al., 1982), while Sudlow's site II is the ibuprofen-diazepam (or indole/benzodiazepine) binding cleft (Ascenzi & Fasano, 2010; Fanali et al., 2012; Fasano et al., 2005).

The structural representation contains three homologous domains (J. R. Brown, 1976; Dockal et al., 1999): I (25 – 222 AA), II (223 – 414 AA), and III (415 – 609 AA) with nine double loops repeated in triplet fashion (Peters Jr., 1996b; Rothschild et al., 1988). Double loops 1-2, 4-5, and 7-8 are grouped as subdomains IA, IIA, and IIIA, respectively. Single loops 3, 6, and 9 are represented by subdomains IB, IIB, and IIIB, respectively. In each domain consisting of about 10  $\alpha$ -helices, there is a pair of helicoidal subdomains named A (6  $\alpha$ -helices) and B (4  $\alpha$ -helices) that are connected by random coils (Ascenzi & Fasano, 2010). Interactions in-between domains favour an asymmetrical environment for allosteric ligand binding (Curry et al., 1998; Fasano et al., 2005; Peters Jr., 1996b).

ALB is characterized by its two hydrophobic cavities in site I (subdomain IIA) and site II (subdomain IIIA), with polar residues in the inner surroundings and at the entrance of the two pockets (Ghuman et al., 2005). Bulky heterocyclic anions preferentially bind to the first main site, and the second is preferred by aliphatic and aromatic carboxylates (Ascenzi & Fasano, 2010). Although a third major binding site (subdomain IB, or lidocaine site) has been recently suggested to exist by Zsila (2013); further studies on binding with a high affinity to this site are needed before ALB can be represented as a conventional three-site model.

ALB displays up to seven binding sites with different affinities for free long-chain fatty acids (FAs) which may be associated to a local conformational change of the secondary structure (e.g. palmitic acid, oleic acid and arachidonic acid) (Fanali et al., 2012; Ghuman et al., 2005). The FA1 to FA7-occupied sites accommodate the binding of endogenous and exogenous substances to the primary sites I and II (Ascenzi & Fasano, 2010; Fanali et al., 2012). This kind of accommodation would increase the affinity of the ligand, making it a cooperative interaction (Lehman-McKeeman, 2013). Conversely, some studies reported a possible competition between FAs and some ligands (Chakrabarti, 1978), implicating a possible displacement from the binding site due to allosteric modulation (Ascenzi & Fasano, 2010; Fasano et al., 2005). Because the binding of small ligands might not completely fill the hydrophobic pocket in Sudlow's site I; the site is predisposed to the insertion of water molecules, and thus the polar residues by hydrogen bonding (H-bonds) (Curry, 2009; Ghuman et al., 2005). This effect influences the adaptability of the site to the binding interaction. Multiple monolayers of water molecules reversibly bond their hydrogen atoms to the residues at the surface of the protein and navigate along with it in the extracellular space (Peters Jr., 1996b).

ALB has many prominent physiological functions (Peters Jr., 1996b). It is a leading carrier and a depot in blood circulation for endogenous substances (e.g. bilirubin, FAs, hormones, bile acids, etc.) (Fanali et al., 2012; Kurtzhals et al., 1997; Roda et al., 1982), exogenous substances (e.g. heavy metals Hg, Cd and Pb, drugs, contaminants) (Y. Li et al., 2007) and other essential ligands (e.g. transition metal ions  $Zn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , nitric oxide, metallothionein, vitamins, haem) (Ascenzi & Fasano, 2009; Bal et al., 2013; Hou et al., 2008; Quiming et al., 2005; Sadler & Viles, 1996). ALB regulates the colloidal osmotic pressure with its high

concentration in plasma by keeping the blood within vessels. It has enzymatic properties that are useful in metabolism and detoxification of exogenous and endogenous ligands (Fitzpatrick & Wynalda, 1983; Kragh-Hansen et al., 2002; J. Yang et al., 2002). ALB has a buffering capacity of the blood but to a lesser extent than haemoglobin (Pettifer, 2003). ALB has the largest thiol pool in plasma (Turell et al., 2013). It plays an antioxidant role (Hu, 1994) as it scavenges reactive oxygen species and reactive nitrogen species (Quinlan et al., 2005). This scavenging activity of ALB is largely dependent on the redox state of the residue Cys34 (Anraku et al., 2013; Stamler et al., 1992).

ALB is a negative acute-phase protein (B. H. Bowman, 1993), as its concentration decreases in case of inflammation under the influence of cytokines (IL6, IL1 and TNF $\alpha$ ) (Kmiec, 2001). Thanks to ALB's many appreciable characteristics, *inter alia*, *in vivo* half-life (~19 days), stability, and binding versatility (Peters Jr., 1996b); medical and pharmaceutical applications that include ALB in *in-vitro* and *in vivo* conditions (e.g. nanomaterials, biomarkers, toxicokinetics, preclinical, etc.) are becoming numerous with technological advancements in health science disciplines (e.g. genetics, oncology, nanotechnology, biochemistry, toxicology, therapeutics, etc.). For further exploration of the use of ALB, examples are given in two reviews by Peters Jr. (1996b) and Otagiri and Chuang (2016).

## **2.2. Alpha-1-acid Glycoprotein**

The plasma protein AGP, also known as orosomucoid (ORM), is a glycosylated single chain protein (Fournier et al., 2000; Kremer et al., 1988; Schmid, 1950, 1989; Weimer et al., 1950). Like ALB, AGP is mainly synthesized (10 mg/Kg/day) (Lentner, 1984) and catalysed in the liver (Sarcione, 1963). However, asialo- or agalacto-AGP is internalized into hepatocytes using a specific membrane asialoglycoprotein receptor (ASGP-R) for its degradation (Taguchi et al., 2013a). This process is only possible when its binding site is vacant and after AGP's conformation changes (D. K. Meijer & van der Sluijs, 1989; D. K. F. Meijer & Nijssen, 1991). Its half-life is 2-3 days, so a high AGP concentration is easily cleared from the body even after its induced synthesis (Bree et al., 1986). Unlike ALB, AGP is scarce in plasma as it accounts for only 3% of plasma proteins. In healthy adults, the physiological concentration varies between 0.05 to 0.1 g/dL (10  $\mu$ M-20  $\mu$ M; mean value ~15  $\mu$ M) (Kremer et al., 1988); some references even give a

maximum normal value of 0.140 g/dL (31  $\mu$ M). The plasma concentration of AGP increases with age and is sex-dependent (Israili & Dayton, 2001). AGP is an acidic ( $pK_a = 2.6$ ) and highly soluble protein in water and other polar organic solvents (Schmid, 1989). Its net charge is negative and depends on the nature of its carbohydrate entities. Its isoelectric point varies between 2.8 and 3.8, at the physiological pH of 7.4 (Fournier et al., 2000).

In humans, the mature form of AGP consists of 183 AA. It has a molecular weight of about 44 KDa (Kremer et al., 1988) (or 41-43 KDa according to Hocheplied et al. (2003)). The AGP protein consists of about 59% peptide residues and 41% carbohydrates - of which about 11% are sialic acids (or 12% according to Hocheplied et al. (2003)). This high sialic content contributes to the negative charge on its surface (Kremer et al., 1988; Schmid et al., 1977) and determines the nature of interactions that this glycoprotein can have with biological membranes.

There are five structurally heterogeneous carbohydrate entities (five N-glycans) with mono-, bi-, tri-, and tetra-antennary glycans covalently linked to five asparagine (Asn) residues, which form N-glycosylation sites (Asn-15, Asn-38, Asn-54, Asn-75, Asn-85) to the most active gene ORM1 (variant F1\*S) between the two main genes of AGP (i.e. ORM1 and ORM2) (Dente et al., 1987; Fournier et al., 2000; Taguchi et al., 2013a; Yoshima et al., 1981; Yuasa et al., 1997).

Physiological (e.g. inflammation vs healthy status) and environmental conditions influence the variability in glycosyl branching (Gornik et al., 2009). The heterogeneity of glycosylation does not only influence the binding of xenobiotics but also affects the kinetics of the protein itself (half-life, uptake, and catabolism) (Fernandes, Ligabue-Braun, & Verli, 2015; Gross et al., 1989). The carbohydrate moiety contributes to this protein's stability, native conformational structure, and solubility (Bürgi, 1989). This moiety of asialo-AGP interacts with plasma membranes and receptors (i.e. ASGP-R), and is internalised by endosomes under lysosomal action or recycled to the extracellular space (D. K. Meijer & van der Sluijs, 1989; Taguchi et al., 2013a).

There are two main variants (F1\*S and A) implicated in high affinity binding (Eap et al., 1988). The difference in AA residues between these variants is due to 21 AA substitutions, which affects the affinity and the stereoselectivity of the binding to AGP (Dente et al., 1987; Fitos et al., 2010; Herve et al., 1998; Herve et al., 1993). The variant F1\*S is predominant (Montiel et al., 1990), and in normal conditions its expression is two- to three-fold higher than variant A (Yuasa et al., 1997).

AGP contains two disulfide bonds in all its main allelic variants that sustain the stability of its secondary structure (Kremer et al., 1988; Schmid et al., 1973). These bonds, like sialic acids, contribute to AGP's potential interactions with biomembranes (Nishi et al., 2006). The native protein consists of 15%  $\alpha$ -helices, 41%  $\beta$ -sheets, 12%  $\beta$ -turns, 8% bends, and 24% unordered structure at pH 7.4 (Kopecký et al., 2003). The  $\alpha$ -helical content may increase upon disulfide reduction and in the presence of biomembranes (Nishi et al., 2006). AGP only has one primary saturable site that could be for some ligands of high-affinity and low-capacity characteristics formed by the tertiary structure (Müller, 1989), and located in the hydrophobic crevice consisted of three lobes (Maruyama et al., 1990; Schonfeld et al., 2008). While many other sites with different capacities and low affinities exist, only the main site is of clinical relevance (Müller, 1989).

Although the biological functions of AGP are not clear, it is worth noting a few of its physiological activities. Like ALB, AGP is a leading plasma protein in transporting various endogenous (e.g. serotonin, platelet activating factor, histamine, melatonin) and exogenous ligands (e.g. drugs and contaminants) (Baumann et al., 1989; Fournier et al., 2000; Israili & Dayton, 2001). It is a positive acute-phase protein (B. H. Bowman, 1993; Kushner, 1982). It is classified as a member of the immunocalin family (i.e. lipocalin subfamily), as it has an anti-inflammatory and immunomodulation role in all mammals (Bennett & Schmid, 1980; Hochepped et al., 2003). It has an inhibitory effect on immune cells (e.g. lymphocyte T) and platelet aggregation, and it causes the induction of certain cytokines (Hochepped et al., 2003). It could be used as an effect biomarker (Routledge, 1989), and to serve in prediction of all-cause mortality (K. Fischer et al., 2014). However, some authors argue that AGP is not a better marker of short- or long-term mortality risk than the more commonly used biomarkers IL-6 and CRP (Singh-Manoux et al., 2017). This could be true

since in cases of acute inflammation in humans, plasma levels of CRP may rapidly rise by about 1000-fold or more (Black, Kushner, & Samols, 2004).

The increase of AGP's physiological concentration is species dependent. It may increase more than four times the normal concentration (1 g/L) in humans and from 0.2 g/L up to 100-fold in rats (Baumann & Held, 1981; Fournier et al., 2000; Hochepped et al., 2003) in case of pathologies (e.g. myocardial infarction, nephritis), inflammation, infection, or cancer (Z. Huang & Ung, 2013; Israili & Dayton, 2001). Organs other than the liver and cells other than hepatocytes (i.e. leukocytes) can synthesize AGP, especially under the action of cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6), TNF $\alpha$ , and glucocorticoids (Baumann et al., 1989; Israili & Dayton, 2001; van Dijk et al., 1991), or in response to various stress stimuli (e.g. infection, burn, surgery, trauma, or cancer) (Israili & Dayton, 2001; Jackson et al., 1982; Kremer et al., 1988; Piafsky, 1980). In the case of acute phase reactions, the normal ratio between the two main variants (F1\*S and A) increases more than three-fold, marking a significant production of the F1\*S variant (Taguchi et al., 2013a). This variation could be about eight times higher in case of lymphoma, melanoma, and ovarian cancer (Taguchi et al., 2013a). In cancer biomonitoring, specific glycans on the surface of AGP could be used as biomarkers in the progression of breast cancer (Abd Hamid et al., 2008).



**Table A2.1. Summary of distinct characteristics of ALB and AGP in humans**

Characteristics	Human plasma proteins	
	ALB <sup>a</sup>	AGP <sup>b</sup>
<b>Gene (allelic variants); chromosome location</b>	1 gene ALB (number of variants depends on ethnic group); Located on chromosome 4 (4q11-q13)	2 genes with main variants and 21 amino acid differences: ORM1 or AGP-A (variants F1, F2 and/or S), collectively referred as F1*S; ORM2 or AGP-B/B' (variant A) with different drug properties; Located on human chromosome 9 (9q31-34.1)
<b>Native polypeptide sequence (N-terminal signal peptide; propeptide; mature protein)</b>	609 AA (18 AA; 6 AA; 585 AA)	201 AA (18 AA; 183 AA)
<b>Family</b>	Albumin superfamily	Lipocalin subfamily (immunocalin family)
<b>Synthesis</b>	Synthesized by the liver (13.3 g/ day) with mild extrahepatic synthesis	Synthesized by the liver (20 mg/Kg/day) with extrahepatic synthesis in normal conditions and increased synthesis in case of inflammation, infection or disease
<b>Half-life</b>	Around 19 days	At least 2-3 days, around 5 days
<b>Structure</b>	67% of $\alpha$ -helices, 10% $\beta$ turns, but no $\beta$ -sheet	15% $\alpha$ -helices, 41% $\beta$ -sheets, 12% $\beta$ -turns, 8% bends and 24 % unordered structure ( $\alpha$ -helical content may increase upon disulfide reduction and in the presence of biomembranes)
<b>Glycosidic residues</b>	No, 100% peptide residues. In the case of pathology, some glycosidic residues may be present on the protein	- Yes, 59% peptide residues and 41% carbohydrates, of which about 11% are sialic acids, 14% neutral hexoses, 14% hexosamine, and 1% fructose. - Five carbohydrate entities (N-glycans) covalently linked to Asn residues (Asn15, Asn38, Asn54, Asn75, Asn85)
<b>Internalization mechanism</b>	Internalisation that includes a FcRn- IgG-ALB complex for its degradation or recycling Other glycoprotein receptors on LSEC (e.g. gp60)	- Internalization after binding to ASGP-R at the sinusoidal for its degradation in endosomes - Other membrane receptors may be implicated
<b>Concentration</b>	3.0 to 5.0 g/dL (500 $\mu$ M-750 $\mu$ M); 60% of total plasma proteins	0.05 and 0.1 g/dL (10 $\mu$ M-20 $\mu$ M); 3% of total plasma proteins
<b>Main binding sites</b>	- Two primary sites with high affinity, low capacity; secondary sites with low affinity - Seven Fatty acids' sites	One primary site with high affinity and low capacity; many secondary sites with low affinity (five sites for endogenous and some drugs, one site for drugs and the other for steroids)
<b>Domains</b>	Domain I (25-222 AA), domain II (223-414 AA) and domain III (415-609 AA); secondary and tertiary structures	Variant F1*S (3 lobes; main lobe I and two smaller lobes II and III) and variant A (2 lobes); secondary and tertiary structures
<b>Net charge</b>	(-15) at pH 7.4	Depends on glycosylation (up to 20 types of glycans structures)
<b>Isoelectric point</b>	4.7	Between 2.8 and 3.8 for AGP with high content of sialic acid
<b>Main roles</b>	- Negative acute-phase protein; its concentration decreases significantly	- Activities are dependent on the carbohydrates' composition - Positive acute-phase protein; its concentration increases significantly

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Antioxidant activity, protecting cells and tissues</li> <li>- Predominant binding protein for transport and depot</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Immunomodulatory activities</li> <li>- Antioxidant activity, protecting cells (e.g. erythrocytes) and tissues against septic shock and ischemia, inhibition of TNF<math>\alpha</math></li> <li>- Direct activities of AGP against bacterial pathogens</li> <li>- Sensitizing effect (e.g. acute colitis)</li> <li>- Predominant binding protein for transport and depot</li> <li>- Inhibition of platelet aggregation</li> </ul>
<b>Main binding and common high Affinity of xenobiotics with</b>	Acidic (anionic) characteristics	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Basic (cationic) and neutral characteristics</li> <li>- Stereoselective Binding depends on glycosylation and variant type</li> <li>- F1*S binds a wider range of drugs</li> </ul>
<b>Notable features for PTMs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 17 disulfide bonding; free sulfhydryl group of Cys34;</li> <li>- one Tryptophan (W214)</li> <li>- Electrostatic, polar and hydrophobic interactions with ligands or membrane phospholipids may induce conformational changes</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Two disulfide bonding (C5-C147; C72-165)</li> <li>- Three Tryptophan (W25, W122 and W160)</li> <li>- Electrostatic, polar and hydrophobic interactions with ligands or membrane phospholipids may induce conformational changes</li> </ul>
<b>Biomarker</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Cys34 (antioxidant role and ROS, RNS scavenger)</li> <li>- Low ratio of ALB to globulin is a biomarker for several types of cancer (neck, breast, prostate, lung, gastric etc.)</li> <li>- Biomarker for all-cause mortality</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Effect biomarker for inflammation, cancer and various pathologies</li> <li>- Ratio of AGP to prealbumin biomarker for carcinoma of the prostate</li> <li>- Biomarker for all-cause mortality</li> </ul>
<b>Main factors influencing the binding</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasma protein concentration itself (regulation and feed-back)</li> <li>- Low levels in foetus, infants and elderly</li> <li>- Decrease during aging</li> <li>- Decrease of ALB under the effect of cytokines and in case of diseases (e.g. liver)</li> <li>- Decrease in case of burns, infections, cancer, inflammation (e.g rheumatoid arthritis), pregnancy and other stress stimuli</li> <li>- Analbuminemia: extremely low concentration if there is no expression of mRNA due to mutations</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Plasma protein concentration itself (regulation and feed-back)</li> <li>- Low levels in foetus and infants, and in pregnant women</li> <li>- Increase during aging</li> <li>- Increase of AGP under the effect of cytokines and various diseases</li> <li>- Increase in case of burns, infections, cancer, inflammation (e.g rheumatoid arthritis), and other stress stimuli</li> <li>- Decrease of AGP levels in case of liver disease, use of oral contraceptive, and in pregnancy</li> <li>- <i>De novo</i> mRNA synthesis induces the synthesis of AGP in case of inflammation or diseases</li> </ul>

**AA** amino acids; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **ALB** albumin; **Asn** asparagine; **ASGP-R** asialoglycoprotein receptor; **Cys** cysteine; **IgG** immunoglobulin G; **LSEC** liver endothelial cells; **ORM** orosomucoid; **PTMs** post-translational modifications; **ROS** reactive oxygen species; **RNS** reactive nitrogen species.

<sup>a</sup> (Ascenzi & Fasano, 2009; Fanali et al., 2012; Fasano et al., 2005; He & Carter, 1992; Kragh-Hansen, 2016; Otagiri & Chuang, 2016; Peters Jr., 1996b).

<sup>b</sup> (Baumann et al., 1989; Fournier et al., 2000; Hochepped et al., 2003; Israili & Dayton, 2001; Kremer et al., 1988; Piafsky, 1980;

Piafsky & Borga, 1977; Schmid et al., 1977; Schonfeld et al., 2008; Taguchi et al., 2013a)

### 3. Amino acids in high affinity binding sites

The affinity binding is a descriptive characteristic estimated for a bundle of amino acids, in a site of a plasma protein, that interacts and accommodates ligands to bind into binding cavities. In plasma proteins, some residues have a more important role than others for binding ligands in high-affinity binding cavities, and this discrepancy in importance depends, *inter alia*, on the functional groups of each ligand. Also, some changes in residues may occur and significantly modulate the inner composition of high-affinity binding pockets and their peptide outer surroundings. For example, polar AAs may be replaced with neutral or hydrophobic ones, or positive residues may be replaced with negative ones and vice versa. Consequently, the alteration of nucleotides and peptides influences the extent of binding to plasma proteins (Z. Huang & Ung, 2013; Otagiri & Chuang, 2016). To better understand this influence, the composition in AAs of high-affinity binding sites of most frequent variants for human ALB and AGP is discussed next (see Tables A2.1 and A2.2).

#### 3.1. Mature ALB in humans

The free Cys34, known for its antioxidant role, is well conserved in humans (position 58 in native ALB). About 70-80% of Cys34 in plasma contains a free sulfhydryl group, while the other 25% forms a disulfide bond with small sulfhydryl compounds, such as cysteine, homocysteine, or glutathione (Oettl & Stauber, 2007). Another well-conserved residue in ALB is Trp214. It is situated in a major interdomain cluster of hydrophobic residues (position 238 in native ALB), and precisely in a conserved sequence of loop 4 (binding pocket of Sudlow I). This hydrophobic residue is important, just like disulfide bridges, for holding together the two halves of the heart-shaped ALB (Carter & Ho, 1994). The absorption of UV light by ALB is particularly attributed to Trp214, which is quite appreciated as a fluorescent residue in binding studies for the measurement of thermodynamic parameters (e.g. fluorescence quenching) (Tayeh, Rungassamy, & Albani, 2009) (Table A2.1).

In subdomain IIA of the mature ALB, site I has the voluminous cavity and it is constituted from 177 AA to 291 AA. In subdomain IIIA, site II has the smaller cavity and it is constituted from 367 AA to 491 AA. The residues most involved in binding ligands to the two high-affinity binding cavities of human ALB, other than Trp214 and Cys34, are presented in table A2.2. Each binding site includes a hydrophobic cavity with distinct

polar or ionic residues within it or its surroundings. Therefore, hydrophobic, polar, and electrostatic interactions play a key role in determining the affinity of ligands for both sites I and II. The interior Site I's pocket cavity is predominantly hydrophobic delimited by residues Trp214, Leu219, Phe223, Leu238, His242, Leu260, Ile264, Ser287, Ile290, and Ala291; so mainly hydrophobic interactions are dominant (F. Yang, Zhang, & Liang, 2014). The site also contains two clusters of polar or ionic residues, an inner one towards the bottom of the pocket composed of Tyr150, His242, and Arg257; and an outer strictly-cationic cluster at the cavity entrance composed of Lys195, Lys199, Arg218, Arg222 (Ghuman et al., 2005). Such placement of residues orchestrates binding of aromatic compounds with centrally located negative or electronegative features (Curry, 2009). Thus, bulky heterocyclic anions preferentially bind to site I between apolar Leu238 and Ala291 in the centre of the pocket.

Regarding the site II, only one main cluster of polar or cationic residues is near the pocket entrance which makes it more exposed to the solvent; it is composed of Arg410, Tyr411, Lys414, and Ser489. Therefore, a combination of hydrophobic, hydrogen bonding, and electrostatic interactions play a crucial role in preferentially binding aliphatic and aromatic carboxylates with peripherally located negative or electronegative features to site II (Curry, 2009).

Additionally, there is a third unique site formed by residues from subdomain IB facing the central interdomain crevice (Zsila, 2013). For example, the binding of lidocaine (cationic drug) to this site is mainly the result of cation- $\pi$  interaction with Arg114, polar interaction with Lys190, and electrostatic attraction to Asp187 (Hein et al., 2010). According to Carter and Ho (1994), other potential salt bridges exist between Lys190-Glu425; Lys205-Glu465; Asp451-Arg218; and Asp187-Lys432-Arg521; with other hydrophobic interactions that involve the interdomain cluster (Phe206, Leu481, Val482, Trp214, Leu347, Val343, Val344, Leu331, Ala217, and Tyr452)—these should be considered when assessing ALB binding. Plasma proteins of distinct species have antigenic variants, which induce immunological reactions. According to Majorek et al. (2012), subdomain IB has two regions with significant differences between human and bovine ALB. Residues in these two regions are surface-exposed and may be recognized as

epitopes by human immunoglobulins (e.g. in allergies). Other species such as rabbits have different regions that can induce the cross-reactivity of alloantibodies to its antigenic variants.

### **3.2. Mature AGP in humans**

Human AGP's sequence is less conserved than that of human ALB. In the solely high-affinity and low-capacity site of AGP, there are three distinct lobes (Nishi et al., 2006). The deep main lobe I is voluminous and apolar; it provides sufficient space to accommodate ligands with hydrophobic characteristics. The entrance of the cavity has two positively charged side residues, Arg68 and Arg90, which favour interactions with ligands having polar and negative characteristics. The entrance of human AGP-variant A is narrower than that of F1\*S (Taguchi et al., 2013a). Thus, the variant F1\*S binds a larger variety of ligands.

AGP's lobe I is approximately 18 Å deep and is constituted of Tyr27, Phe49, Phe51, Leu62, Leu79, Ile88, Leu101, Tyr110, Leu112, and Tyr127 (Table A2.2). Other apolar residues Ile13, Leu18, and Val81 form its bottom. The hydrophobic lobe I in AGP is located between two negatively charged smaller lobes (lobes II and III). Because the overall surface of AGP is negatively charged, it is highly soluble in the extracellular space. Sialic acids and carbohydrate moiety contribute to the negative charge of glycosylated AGP, consequently attracting xenobiotics with positive charges at pH 7.4. The negative charge of peptide sequence is sufficiently exposed in non-glycosylated human AGP due to the presence of nine Asp and eight Glu side chains that surround the  $\beta$ -barrel (Nishi et al., 2006). The negative charge of lobe II is due to residue Glu64 in its lower part, while the negative charge in lobe III is due to Asp115. All these residues are responsible for the strong binding of basic-characteristic ligands into AGP pockets.

**Table A2.2. Summary of most involved amino acids in high-affinity binding sites**

Human ALB <sup>a</sup>				Human AGP <sup>c</sup>	
Sudlow's site I: warfarin-binding site (subdomain IIA)		Sudlow's site II: indole/benzodiazepine site (subdomain IIIA)		One main site	
Helix	Residue	Helix	Residue	Stranded $\beta$ -barrel	Residue
H1	- Asp187 - Lys190 - Lys195 - Lys199	H1	- Pro384 - Leu387 - Ile388 - Asn391 - Cys392 - Phe395	BB1	- Tyr27
H2	- Phe211 - Trp214 - Ala215 - Arg218 - Leu219 - Arg222 - Phe223	H2	- Arg410 - Tyr411 - Lys414	BB2	- Phe49 - Phe51
H3	- Leu234 - Leu238 - His242	H3	- Leu430 - Val433 - Cys438	BB3	- Glu64 - Leu62 - Arg68
H4	- Arg257 - Leu260 - Ala261 - Ile264	H4	- Ala449 - Glu450 - Leu453	BB4	- Leu79 - Val81
H5	-	H5	-	BB5	- Ile88 - Ser89 - Arg90 - Val92
H6	- Ile290 - Ala291	H6	- Arg485 - Ser489	BB6	- His97 - His100 - Leu101
None <sup>b</sup>	- Arg114 - Tyr150 - Glu292	-		BB7	- Tyr110 - Leu112 - Ala113 - Phe114
				BB8	- Tyr127
				<b>Helices</b>	- Ile13 - Leu18 - Ser40 - Asp115 - His172

**Ala** alanine; **AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **ALB** albumin; **Arg** arginine; **Asp** aspartic acid; **BB**  $\beta$ -barrel; **Glu** glutamic acid; **H1-6** Helix 1-6; **His** histidine; **Ile** isoleucine; **Leu** leucine; **Lys** lysine; **Ser** serine; **Trp** tryptophan; **Tyr** tyrosine; **Phe** Phenylalanine; **Pro** proline.

<sup>a</sup> Adapted from Peters Jr. (1996b) page 37. The information for human ALB is completed from Ascenzi and Fasano (2010), Curry (2009), Hein et al. (2010) and Ghuman et al. (2005).

<sup>b</sup> Residues that are not found in a helix nor in a  $\beta$  sheet of ALB site I.

<sup>c</sup> Information for AGP-F1\*S in humans is found in Nishi et al. (2006) and Taguchi et al. (2013a). The same important AAs constituting and surrounding AGP's main binding site can be viewed in the 3D crystal structure of human AGP (pdb 3KQ0) at: <http://www.rcsb.org/pdb/ngl/ngl.do?pdbid=3KQ0&preset=validationReport>.

## 4. Differences in the plasma protein binding

### 4.1. Factors related to the structural characteristics of the plasma proteins

Many factors could be behind the differences in the binding kinetics of drugs to the same plasma protein or to different plasma proteins. As presented in section 2, these factors could be related, *inter alia*, to the health status of the individual, the species (e.g. human, rat or bovine), the medium conditions (e.g. pH, temperature, salinity and presence of FAs), the structural characteristics, the physiological abundance, the polymorphism and the variants of the plasma proteins, and to the physicochemical of the drugs.

In this review, there is an emphasis on the structural and molecular characteristics (i.e. glycosylated/non-glycosylated forms (D. Wu et al., 2018), the charge/polarity of residues and the molecular volume of the site). In studies on binding kinetics, the type of ligands (i.e. base, acid or neutral), the type of molecular attractions and the values of their affinity coefficients to the binding cavities depend mainly on the structural characteristics of ALB and AGP. Particularly, the ionic, polar and hydrophobic clusters constituting high-affinity binding pockets and their surroundings play a major role in plasma protein binding for both proteins. For example, the sites of ALB and AGP have hydrophobic characteristics which make these pockets propitious for binding organic compounds (Ajmal, Nusrat, et al., 2017; K. Hanada, 2017; F. Yang et al., 2014).

The in-site interactions would depend on the functional groups of the ligands. Therefore, acidic, base or neutral molecules may have either hydrophobic or hydrophilic characteristics (e.g. drugs, organic contaminants and heavy metals). Despite their differences in functional groups, the distinct molecules may bound to the same site if the accommodating-bundle of residues is found. For example, the drugs that preferentially bind to site II may be an acidic molecule like ibuprofen (Ascenzi et al., 2009), or a basic molecule like clofazimine (Ajmal, Zaidi, et al., 2017). As presented in section 3, the charged residues found in binding cavities for both proteins influence the extent of binding of each ligand. It is most likely possible that the charged residues on the surfaces of both proteins may also have a role in attracting ligands with opposite charges towards sites. On their surfaces, an ALB molecule is rich in clusters of charged residues (Lys and Arg) which attracts acidic probes, while AGP has glycosyl groups that mainly attract base probes

and influence their binding affinities (Fernandes et al., 2015). Thus, base drugs may have high affinities for AGP (Asp and Glu residues), and most probably low affinities for ALB (Lys and Arg). Conversely, acidic drugs may have higher affinities to ALB than to AGP.

The computational methods and molecular modelling are powerful tools to estimate protein binding affinity and to simulate the potential interactions in the binding pockets based on the physicochemical properties of compounds, and of the residues involved in the plasma protein binding (Wanat, Brzezinska, & Sobanska, 2018). These tools may also give an idea on how different the binding of a ligand to human ALB from its binding to AGP and which protein-ligand complex is more stable under the same experimental conditions, particularly that the residues involved in the molecular interactions are not the same for the two proteins (Ajmal, Nusrat, et al., 2017; D. P. Yeggoni, Manidhar, Suresh Reddy, & Subramanyam, 2016; Daniel Pushparaju Yeggoni, Rachamalla, & Subramanyam, 2016). Consequently, the interactions simulated between functional groups of the ligand and the residues of the plasma proteins are distinct which could be interesting to explore a priori of PK/PD studies in different species.

#### **4.2. Post-translational modifications**

The plasma proteins go through post-translational modifications (PTMs) which may affect molecular interactions between residues in binding residues and their ligands. PTMs are biochemical mechanisms that are crucial for normal cell differentiation (Y. C. Wang, Peterson, & Loring, 2014), and during which residues at the side chains covalently modify their properties (Walsh, Garneau-Tsodikova, & Gatto, 2005). The PTMs may thus affect binding of ligands to plasma protein (i.e. stereoselective allosteric binding) and/or may be used as biomarkers for some diseases (e.g. glycation of ALB) (Maciazek-Jurczyk, Szkudlarek, Chudzik, Pozycka, & Sulkowska, 2018). Therefore, we also emphasize the consideration of PTMs of plasma proteins (e.g. disulphide bridges and N-linked glycosylation) in binding and PK/PD studies. Their inclusion could further guide *in vitro* and *in vivo* experiments (Audagnotto & Dal Peraro, 2017), computational approaches and molecular docking. The most common types of PTMs are phosphorylation, acetylation, N-linked and O-linked glycosylation, methylation, and ubiquitylation (Walsh et al., 2005; Y. C. Wang et al., 2014). PTMs can be classified according to the type of residue (i.e. Lys, Cys, Asn, Arg, Ser,



Thr and Tyr); the category of the enzyme making one of the two covalent modifications (i.e. additions, cleavage); and the extent of reversibility of the modification.

## **5. Summary**

Both plasma proteins ALB and AGP have key roles in the transporting and storing of drugs and contaminants in plasma. Structural and molecular characteristics of ALB and AGP may have a direct influence on binding kinetics of xenobiotics (i.e. drugs and contaminants). Change in binding kinetics would cause some alterations in drugs disposition (i.e. distribution, uptake, clearance) and efficacy. Thus, understanding the differences in the functions and the structural and molecular characteristics of these plasma proteins, and addressing the changes in their residues are necessary for interdisciplinary research in PK/PD that is gaining place in the 21<sup>st</sup> century. For qualitative/quantitative modelling purposes, researchers designing new preclinical and clinical studies should address the intra- and interspecies differences (i.e. type of molecular attractions) not only in plasma protein binding extent, but more particularly in the composition of binding cavities and their peptide surroundings.

## **Acknowledgements**

This review makes a part of the author's Ph.D. thesis. The author acknowledges the support given by his main supervisor Dr. Sami Haddad and co-supervisor Dr. Patrick Poulin.

## Annexe II.2.

**Table A2.3. Sommaire des techniques sont utilisées dans le processus R&D des médicaments pour déterminer leurs affinités de liaison aux protéines plasmatiques et leurs fractions libres et liées (tiré de Dargo, Bajusz, Simon, Muller, and Balogh (2020)).**

method type	measurement time/ throughput	pros	cons
Quantitative Binding Data chromatography and capillary electrophoresis <sup>32–35,37</sup>	0.5 h/API HT	accurate results no NSB, volume shift, or membrane leakage	nonbiological systems calibration of immobilized HSA column is needed before measurements high solvent consumption and waste generation poor sensitivity for low-binding APIs expensive chiral columns
membrane separation methods		reliable results	Gibbs–Donnan effects NSB on filter membranes and plastic devices possible leakage of membrane subsequent HPLC measurements
equilibrium dialysis (ED)	3 to 24 h		long time to reach equilibrium volume shifts during incubation dilution effects
rapid equilibrium dialysis (RED) <sup>28,29</sup>	2–7 h HT	reaching equilibrium faster than ED small volumes can be measured NSB and volume shifts minimized	possible leakage of membrane plate accessories can be expensive (although inexpensive devices have been developed <sup>41</sup> )
ultrafiltration (UF) <sup>30</sup>	1–2 h HT	fast separation of free and protein- bound API small volumes can be measured good approximation of physiological conditions	NSB on filter membrane and device possibility of molecular sieving pH and temperature controls are more difficult
ultracentrifugation <sup>31,42</sup>	10–24 h MT	moderate NSB and Donnan effect	time-consuming, careful pH and temperature controls are needed errors due to the Johnston–Ogston effect sedimentation of unbound API may occur sample harvesting is difficult due to the floating lipid layer expensive instrumentation
Structural Information X-ray crystallography <sup>38</sup>	days to months, LT	yields the most accurate structural information binding sites can be identified	impurities of the protein may hinder crystallization difficulty to determine correct crystallization conditions solubility problems of API may arise precipitation or growth of tiny crystals may occur
Binding and Structural Information NMR <sup>36,37</sup>	hours to days, LT	noninvasive technique no separation step or subsequent measurement needed	APIs with low aqueous solubility cannot be measured in physiological buffers
UV-pH titration	0.5 h <sup>b</sup> to 1–2 h MT	fast method for screening may provide additional structural information of binding APIs with low aqueous solubility can be measured	only ionizable molecules can be measured absorbance of HSA may interfere

<sup>a</sup>API, active pharmaceutical ingredient; NSB, nonspecific binding; HT, high throughput; MT, medium throughput; and LT, low throughput. <sup>b</sup>If aqueous p*K*<sub>a</sub> values without HSA have already been determined.

**NOTE.** [Table A2.3 is originally published in Dargo, G., Bajusz, D., Simon, K., Muller, J., & Balogh, G. T. (2020). Human Serum Albumin Binding in a Vial: A Novel UV-pH Titration Method To Assist Drug Design. *J Med Chem*, 63(4), 1763-1774.

<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.jmedchem.0c00046>, Copyright © 2020; reused with the permission of ACS Publications; permission obtained through email received on March 14, 2021. Please note that to obtain further permissions related to the material excerpted should be directed to the ACS.]

### **Annexe II.3. Variabilités inter-espèces en ALB et en AGP**

Dans cette section, une évaluation des différences inter-espèces bovine, humaine et rat des résidus sera réalisée. Pour ce faire, des exercices sur les alignements multi-séquences ALB et AGP seront faits.

#### **1. Résultats d'alignements des protéines plasmatiques natives**

Les protéines plasmatiques de bovins et de rats sont les plus utilisées dans les études précliniques et pour l'extrapolation inter-espèce. Ainsi, les deux séquences des protéines ALB et AGP de bovins et de rats ont été sélectionnées pour être alignées avec les deux ALB et AGP des humains. Les alignements de séquences multiples sont alors effectués en utilisant le programme Clustal-Omega disponible sur [Uniprot.org](http://Uniprot.org). D'après la comparaison inter-espèce, il existe de nombreuses positions identiques partagées par les trois séquences pour chaque protéine plasmatique (Figures A2.1 et A2.2). La séquence d'ALB native de 609 résidus chez l'humain ne partage que 465 AA (76,40%) identiques avec les bovins et 446 AA (73,24%) identiques avec les rats (Tableau A2.4). Alors que la variante AGP-F1\*S native ayant 201 résidus chez l'humain ne partage que 112 AA (55,45%) identiques avec les bovins et 100 AA (48,54%) identiques avec les rats (Tableau A2.5).

Les résidus de propriétés similaires partagent des positions similaires (Figures A2.1 et A2.2). L'ALB humaine a 106 et 128 résidus similaires à ceux trouvés, respectivement, chez les bovins et les rats. Quant à l'AGP humaine, elle partage 57 et 61 résidus similaires avec les deux autres espèces. Lorsque nous alignons les séquences d'ALB (Figure A2.1 et Tableau A2.4) ou d'AGP (Figure A2.2 et Tableau A2.5) pour les trois espèces, le pourcentage de résidus identiques diminue, mais la similarité dans les résidus augmente. Malgré la variabilité inter-espèce dans la distribution des charges et dans les positions des résidus apolaires, que ce soit dans les poches de liaison ou sur la surface des protéines, certains résidus non identiques peuvent toujours partager des caractéristiques proches (par ex. hydrophobie, polarité). De fortes similitudes structurales sont également trouvées pour les ALB d'équidé et léporidé lorsqu'elles sont alignées avec l'ALB humaine (Majorek et al., 2012).

## **2. Acides aminés des sites de hautes affinités**

Dans les protéines plasmatiques, certains résidus sont plus importants que d'autres pour les ligands de liaison dans les cavités de liaison de haute affinité. De plus, les AA polaires peuvent être remplacés par des AA neutres ou hydrophobes, ou les résidus positifs peuvent être remplacés par des résidus négatifs et *vice versa*. De tels changements peuvent moduler de manière significative la composition interne des poches de liaison ainsi que de leur environnement externe de peptides sur les surfaces des protéines. Par conséquent, l'altération des nucléotides et des peptides influe sur l'étendue de la liaison aux protéines plasmatiques (Z. Huang & Ung, 2013; Otagiri & Chuang, 2016). La composition des sites de hautes affinités de l'ALB et de l'AGP humains sera discutée par la suite.

### **2.1. L'albumine mature chez les humains**

Comme toute autre protéine, l'ALB possède une variabilité inter-espèce dans la composition et la charge de ses résidus, ce qui façonne sa conformation structurelle (Fasano et al., 2005). Cette variabilité est plus importante sur la surface des protéines ALB que dans ses deux sites de liaison (Majorek et al., 2012). Quatre résidus contribuent le plus au pourcentage d'identité d'ALB parmi ces mammifères – qui sont Cys, Asp, Glu et Lys (Figure A2.1, Tableau A2.4). De plus, le Cys34 libre, connu pour son rôle antioxydant, est présent dans les trois espèces (position 58 dans l'ALB native, figure A2.1). Environ 70-80% de Cys34 dans le plasma contient un groupe sulfhydrile libre, tandis que l'autre 25% forme une liaison disulfure avec de petits composés sulfhydriles, tels que la cystéine, l'homocystéine ou le glutathion (Oettl & Stauber, 2007).

Un autre résidu bien conservé et identique dans ALB est Trp214. Il est situé dans une importante grappe (ou cluster) interdomaine de résidus hydrophobes (position 238 dans l'ALB native), et précisément dans une séquence conservée de la boucle 4 (site I de Sudlow). Ce résidu hydrophobe est important, tout comme les ponts disulfures, pour maintenir ensemble les deux moitiés de l'ALB en forme de cœur (Carter & Ho, 1994). L'absorption de la lumière UV par l'ALB, particulièrement attribuée au résidu Trp214, est une caractéristique très utile chez le résidu fluorescent dans les études de liaison ayant pour but de mesurer les paramètres thermodynamiques (par ex. « quenching » de fluorescence) (Tayeh et al., 2009). L'ALB

bovine possède un autre Trp134 sur sa surface (résidu en position 158 de la protéine native), ce résidu peut également contribuer à la fluorescence de la protéine.

Dans le sous-domaine IIA de l'ALB mature, le site I possède une cavité volumineuse et il est constitué de 177 AA à 291 AA. Dans le sous-domaine IIIA, le site II possède la plus petite cavité et il est constitué de 367 AA à 491 AA. Selon les résultats d'alignements de séquences ALB (Figure S1), les résidus des deux sites appartiennent aux hélices les plus conservées. Ces sites sont homologues pour les trois espèces, bien que l'affinité des ligands puisse différer entre eux (Silva, Cortez, Cunha-Bastos, & Louro, 2004; Sułkowska, 2002). Les résidus les plus impliqués dans la liaison aux deux cavités de hautes affinités, autres que Trp214 et Cys34, sont présentés dans (Bteich, 2019).

Chaque site de liaison comprend une cavité hydrophobe avec des résidus polaires ou ioniques distincts dans son environnement. Par conséquent, les interactions hydrophobes, polaires et électrostatiques jouent un rôle clé dans la détermination de l'affinité des ligands pour les deux sites I et II. La cavité de poche du site intérieur I est principalement hydrophobe et délimitée par les résidus Trp214, Leu219, Phe223, Leu238, His242, Leu260, Ile264, Ser287, Ile290 et Ala291. Les interactions principalement hydrophobes sont donc dominantes (F. Yang et al., 2014). Le site contient également deux groupes de résidus polaires ou ioniques ; un groupe interne vers le fond de la poche composé de Tyr150, His242 et Arg257 ; et une grappe (ou cluster) externe strictement cationique à l'entrée de la cavité composée de Lys195, Lys199, Arg218, Arg222 (Ghuman et al., 2005). Un tel placement de résidus orchestre la liaison de composés aromatiques avec des caractéristiques négatives ou électronégatives situées au centre (Curry, 2009). Ainsi, des anions hétérocycliques volumineux se lient préférentiellement au site I entre Leu238 apolaire et Ala291 au centre de la poche.

En ce qui concerne le site II, un seul groupe principal de résidus polaires ou cationiques se trouve près de l'entrée de la poche, ce qui rend ce site plus exposé au solvant. Il est composé des acides aminés suivants : Arg410, Tyr411, Lys414 et Ser489. Par conséquent, une combinaison d'interactions hydrophobes, de liaisons hydrogène et électrostatiques, joue un rôle crucial dans la liaison préférentielle

des carboxylates aliphatiques et aromatiques avec des caractéristiques négatives situées au niveau du site II (Curry, 2009).

De plus, il existe un troisième site unique, formé de résidus du sous-domaine IB, faisant face à la fente interdomaine centrale (Zsila, 2013). Par exemple, la liaison de la lidocaïne (médicament cationique) à ce site résulte principalement de l'interaction cation- $\pi$  avec Arg114, de l'interaction polaire avec Lys190 et de l'attraction électrostatique de Asp187 (Hein et al., 2010). Selon Carter and Ho (1994), d'autres ponts salins potentiels existent entre Lys190-Glu425, Lys205-Glu465, Asp451-Arg218 et Asp187-Lys432-Arg521 avec d'autres interactions hydrophobes qui impliquent le « cluster » interdomaine (Phe206, Leu481, Val482, Trp214, Leu347, Val343, Val344, Leu331, Ala217 et Tyr452). Tous ces ponts salins et interactions hydrophobes doivent être pris en compte lors de l'évaluation de la liaison d'un xénobiotique à l'ALB.

Par ailleurs, les protéines plasmatiques d'espèces distinctes ont des variantes antigéniques qui induisent des réactions immunologiques. Selon Majorek et al. (2012), le sous-domaine IB a deux régions comportant des différences significatives entre les ALB humaine et bovine. Les résidus dans ces deux régions sont exposés à la surface et peuvent être reconnus comme des épitopes par des immunoglobulines humaines (par ex. les cas d'allergies). Les régions représentant l'épitope sont variables entre les espèces, en conséquence cela induit la réactivité croisée des allo-anticorps contre leurs variantes antigéniques.

## **2.2. L'alpha-1-glycoprotéine acide mature chez les humains**

Selon les résultats d'alignement, la séquence AGP est moins conservée que celle d'ALB chez les trois espèces (Figure A2.2 et Tableau A2.5). Dans le site de haute affinité et de faible capacité d'AGP, il existe trois lobes distincts (Nishi et al., 2006). Le lobe principal profond I est volumineux et apolaire. Il fournit un espace suffisant pour accueillir des ligands ayant des caractéristiques hydrophobes. L'entrée de la cavité a deux résidus latéraux chargés positivement, Arg68 et Arg90, qui favorisent les interactions avec des ligands ayant des caractéristiques polaires et négatives. L'entrée de la variante A de l'AGP humaine est plus étroite que celle de la variante F1\*S (Taguchi et al., 2013a). Ainsi, la variante F1\*S peut lier une plus grande variété de ligands.

Le lobe I d'AGP a une profondeur d'environ 18 Å et est constitué de Tyr27, Phe49, Phe51, Leu62, Leu79, Ile88, Leu101, Tyr110, Leu112 et Tyr127 (Bteich, 2019). D'autres résidus apolaires Ile13, Leu18 et Val81 forment son fond. Le lobe hydrophobe I de l'AGP est situé entre deux lobes plus petits chargés négativement (lobes II et III). Parce que la surface globale de l'AGP est chargée négativement, il est très soluble dans l'espace extracellulaire. Les acides sialiques et le groupement hydrate de carbone contribuent à la charge négative de l'AGP glycosylée, attirant par conséquent les xénobiotiques avec des charges positives à pH égal à 7,4. La charge négative de la séquence peptidique est suffisamment exposée dans l'AGP humaine non glycosylée en raison de la présence de neuf chaînes latérales Asp et de huit Glu qui entourent le cylindre  $\beta$  (Nishi et al., 2006). Le résidu Glu64 confère à l'AGP la charge négative de son lobe II dans sa partie inférieure, tandis que le résidu Asp115 lui confère la charge négative dans le lobe III. Tous ces résidus sont responsables de la forte liaison des ligands ayant des caractéristiques basiques dans les lobes de l'AGP.



**Table A2.4. Native ALB in three species**

<b>ALB aligned sequences <sup>a</sup></b>	<b>B1+H1</b>	<b>H1+R1</b>	<b>B1+H1+R1</b>
<b>Identical positions</b>	465	446	383
<b>Identity %</b>	76.355 %	73.235 %	62.89 %
<b>Similar positions</b>	106	128	163

**ALB** albumin; **B1** bovine sequence, UniProtKB entry: P02769, entry name: ALBU\_BOVINE; **H1** human sequence, UniProtKB entry: P02768, entry name: ALBU\_HUMAN; **R1** rat sequence, UniProtKB entry: P02770, entry name: ALBU\_RAT.

<sup>a</sup> All alignments were executed on the 10<sup>th</sup> of May 2017 using Clustal-Omega program available on [Uniprot.org](http://Uniprot.org).

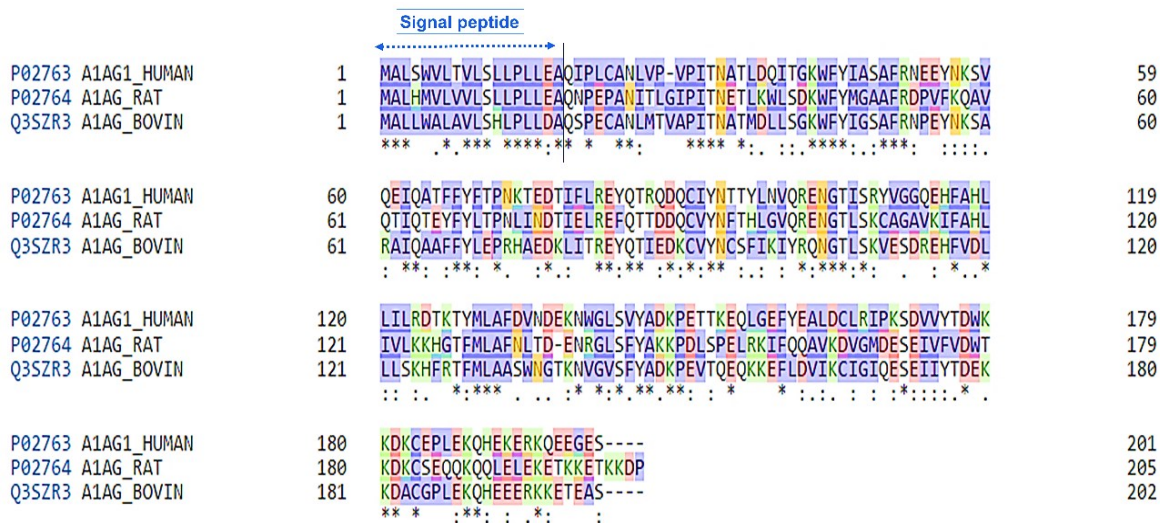
**Table A2.5. Native AGP in three species**

<b>AGP-F1*S (ORM1) aligned sequences <sup>a</sup></b>	<b>B2+H2</b>	<b>H2+R2</b>	<b>B2+H2+R2</b>
<b>Identical positions</b>	112	100	70
<b>Identity %</b>	55.446 %	48.544 %	33.981 %
<b>Similar positions</b>	57	61	74

**AGP** alpha-1-acid glycoprotein; **B2** bovine sequence, UniProtKB entry: Q3SZR3, entry name: A1AG\_BOVIN; **H2** human sequence, UniProtKB entry: P02763, entry name: A1AG\_HUMAN; **R2** rat sequence, UniProtKB entry: P02764, entry name: A1AG\_RAT.

<sup>a</sup> All alignments were executed on the 10<sup>th</sup> of May 2017 using Clustal-Omega program available on [Uniprot.org](http://Uniprot.org).





**Figure A2.2. Alignment of three AGP sequences in bovine, human and rat species (© Bteich Michel, Thèse 2020).**  
 Positive AA residues are highlighted in green, negative residues are in pink and mainly hydrophobic residues are in violet. N-glycosylation sites at Asp (N) positions are highlighted in orange. (\*) indicates positions which have a single, fully conserved residue; (:) indicates conservation between groups of strongly similar properties - scoring > 0.5 in the Gonnet PAM 250 matrix; (.) indicates conservation between groups of weakly similar properties - scoring ≤ 0.5 in the Gonnet PAM 250 matrix.

## Annexe II.4. Lipid classes

**Table A2.6. The composition of lipid classes in rat liver and plasma membrane**

Lipid class	Whole liver	Plasma membrane
Cholesterol esters	1.47 ± 0.102 <sup>a</sup>	11.0 <sup>f</sup> 17 <sup>h</sup>
Triacylglycerols	6.66 ± 0.151 <sup>a</sup>	25.6 <sup>f</sup> 17 <sup>h</sup>
Cholesterol	5.40 ± 0.130 <sup>a</sup>	51 <sup>f</sup> 17 <sup>h</sup> 18.1 <sup>i</sup>
Diacylglycerols	-	-
Free fatty acids (FFA)	0.32 ± 0.031 <sup>a</sup>	12.0 <sup>f</sup> 17 <sup>h</sup> 7.9 <sup>i</sup>
Cardiolipin	4.54 ± 0.045 <sup>a, d</sup> [0.5 ± 0.0] <sup>b, d</sup> [4.8 ± 0.1] <sup>b, e</sup>	1.8 ± 0.51 <sup>g</sup> Traces <sup>i</sup>
Phosphatidic acid (PA)	-	1.9 ± 0.7 <sup>g</sup> 4.4 <sup>i</sup>
Phosphatidylcholine (PC)	55.18 ± 0.126 <sup>a</sup> 50.8 ± 0.4 <sup>b</sup>	43.1 <sup>c</sup> 46.7 ± 3.8 <sup>g</sup> 41 <sup>h</sup> 34.9 <sup>i</sup>
Phosphatidylethanolamine (PE)	19.91 ± 0.080 <sup>a</sup> 25.2 ± 0.5 <sup>b</sup>	19.8 <sup>c</sup> 14.8 ± 0.2 <sup>g</sup> 11 <sup>h</sup> 18.5 <sup>i</sup>
Phosphatidylinositol (PI)	4.43 ± 0.077 <sup>a</sup> 7.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	6.5 <sup>c</sup> 10.3 ± 0.9 <sup>g</sup> 6 <sup>h</sup>

		7.3 <sup>i</sup>
Phosphatidylserine (PS)	3.2 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.7 <sup>c</sup> 4.1 ± 0.8 <sup>g</sup> 6 <sup>h</sup> 9 <sup>i</sup>
Sphingomyelin	2.09 ± 0.060 <sup>a</sup> 4.2 ± 0.2 <sup>b</sup>	23.1 <sup>c</sup> 12.8 ± 0.9 <sup>g</sup> 33 <sup>h</sup> 17.7 <sup>i</sup>
Lysophosphatidylcholine (LPC)	1.4 ± 0.2 <sup>b</sup>	1.8 <sup>c</sup> 1.1 ± 1.0 <sup>g</sup> 3.3 <sup>i</sup>

<sup>a</sup> Christie (1985), these data are expressed in % of the total weight. All data of lipid classes is also found at: <http://www.lipidhome.co.uk/>.

<sup>b</sup> Wuthier (1966), the values are expressed in % total phosphorus.

<sup>c</sup> Colbeau et al. (1971), the values are expressed in % total phosphorus.

<sup>d</sup> also contains cerebrosides and phosphatidylglycerol.

<sup>e</sup> contains diphosphatidylglycerol.

<sup>f</sup> Kremmer et al. (1976), the data given here are only for neutral lipids in the sinusoidal region (% by weight).

<sup>g</sup> Kremmer et al. (1976), the data given here are only for phospholipids in the sinusoidal region (Mol% of phospholipids).

<sup>h</sup> Dod and Gray (1968), the value 17 % of total lipids includes FFA, cholesterol esters and triacylglycerols taken together. Cholesterol, taken alone represents only 17 % of total lipids. The values given for PC, PE, PI, PS and sphingomyelin are expressed in % of total phospholipids. All phospholipids represent 59% of total lipids in the plasma membrane of rat liver.

<sup>i</sup> Ray, Skipski, Barclay, Essner, and Archibald (1969), total essential lipids represent 39.8 % of the total dry weight of plasma membranes in rat liver. Particularly, neutral lipids and phospholipids constitute about 39 % and 55.4 % of total lipids, respectively. The mean values given for free cholesterol are expressed in % of total lipids. Mean values of LPC, PA, PC, PE, PI, PS and sphingomyelin are expressed in % phospholipids.

# Annexes du chapitre 7

## Annexe VII.1. Un exemple d'enregistrement des valeurs de paramètres expérimentaux pendant la perfusion du foie isolé d'un rat.

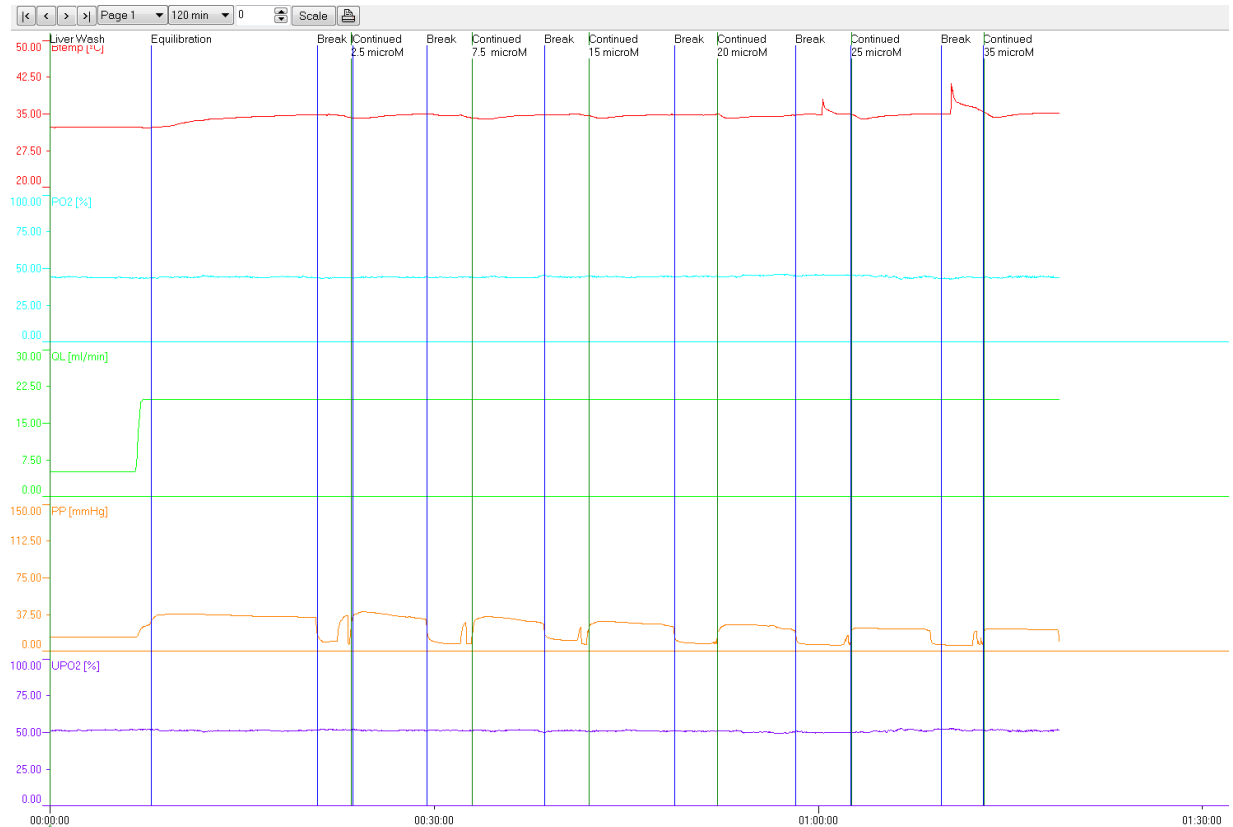


Figure A7.1. La variation des valeurs de paramètres expérimentaux en fonction du temps pour le rat 11 (perampanel avec MIX) (© Bteich Michel, Thèse 2020).