

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 23/04/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, CAMPUS DE ARARAQUARA
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

ELIAS CARVALHO PADILHA

**SCREENING FARMACOCINÉTICO E ESTUDOS *IN VITRO* PARA A SELEÇÃO DE
TIAZOLIDINODIONAS PROMISSORAS À ADMINISTRAÇÃO ORAL**

Processo FAPESP nº 2014/20833-0

Araraquara-SP

2017

ELIAS CARVALHO PADILHA

**SCREENING FARMACOCINÉTICO E ESTUDOS *IN VITRO* PARA A SELEÇÃO DE
TIAZOLIDINODIONAS PROMISSORAS À ADMINISTRAÇÃO ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr. Rosângela Gonçalves Peccinini

Processo FAPESP nº 2014/20833-0

Araraquara-SP

2017

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

P123s Padilha, Elias Carvalho
Screening farmacocinético e estudos *In Vitro* para a seleção de tiazolidinodionas promissoras à administração oral / Elias Carvalho Padilha. -- Araraquara, 2017.
158 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho".
Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientadora: Rosângela Gonçalves Peccinini.

1. *Screening* farmacocinético. 2. Caco-2. 3. Estabilidade química. 4. Diabetes Mellitus tipo 2. 5. Absorção. I. Peccinini, Rosângela Gonçalves, orient. II. Título.

CAPES: 4050000

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Screening farmacocinético e estudos in vitro para a seleção de tiazolidinodionas promissoras à administração oral

AUTOR: ELIAS CARVALHO PADILHA

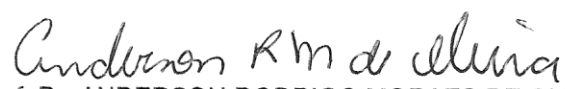
ORIENTADORA: ROSANGELA GONCALVES PECCININI

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: SEM ÁREA DE CONHECIMENTO pela Comissão Examinadora:




Profa. Dra. ROSANGELA GONCALVES PECCININI
Depto de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP


Dra MARINA GALDINO DA ROCHA PITTA
Núcleo de Pesquisa em Inovação Terapêutica Suely Galdino / Universidade Federal de Pernambuco
(Membro participante por meio de vídeo-conferência)



Prof. Dr. ANDERSON RODRIGO MORAES DE OLIVEIRA
Depto de Química / Faculdade de Filosofia Ciências e Letras do Câmpus de Ribeirão Preto da USP



Prof. Dr. MARCELO TADEU MARIN
Depto de Princípios Ativos Naturais e Toxicologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP



Prof. Dr. MARLUS CHORILLI
Depto de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da UNESP

Araraquara, 23 de outubro de 2017

Dedicatória

Dedicado à minha Família que me apoiou e deu suporte ao longo deste trabalho

Agradecimentos

Agradeço a **Deus** pela realização deste trabalho, por me ouvir nos momentos difíceis e me ajudar a compreender da onde vem a minha força.

Aos meus pais, **Fátima Aparecida Carvalho Padilha** e **Jorge Padilha** por todo o apoio durante estes anos de estudo, pelos conselhos valiosos que me abriram minha mente por diversas vezes e por me entenderem independente do caminho profissional que escolhi.

À minha esposa, minha rocha, **Juliana Ferreira de Sousa**. Trilhou comigo diversos caminhos tortuosos nesta jornada. Fizemos diversos sacrifícios para que chegássemos a este momento, tenho certeza que a estrada não será mais fácil de agora em diante, nós que ficaremos mais fortes.

À minha orientadora, professora **Rosângela Gonçalves Peccinini**. Palavras não podem expressar o quanto sou agradecido por tudo que você fez por mim, por ter nos tratado como família, por ser amiga, conselheira e salva vidas. Provavelmente devo minha graduação, mestrado, doutorado e (quixá) pós-doutorado a você e seu esforço para me ajudar sempre que precisei.

I thank **Dr. Xin Xu** for having me at her laboratory at NCATS, I grew and learned a lot during this experience.

To Dr. Xu's group, **Pranav, Amy, Eric & Erik, MD, Kaylee, Katherine, Marc** and laboratory support team for welcoming me and helping me during this learning period.

À equipe do Laboratório de Bioequivalência, Marcos, Kelly e Andréia, etambém a equipe do Laboratório de Toxicologia, Valéria e Maria.

À equipe e amigos de Pesquisa em Farmacocinética Pré-Clínica – UNESP, **Michel, Marco, Caroline, Evelin, Emiliana, Manuel, Jonata, Taísa, Bruna** e aos **novos recrutas e aspirantes**.

Ao INCT-if, a CAPES, e a FAPESP pelo apoio por meio de bolsa e auxílio financeiro, sem os quais, trabalhos como esse não poderiam ser realizados no âmbito acadêmico.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas – UNESP pelo suporte e por ser o continente de realização desse trabalho.

E a todos que contribuíram com a realização de trabalho, seja direta ou indiretamente.

RESUMO

As tiazolidinodionas (TZDs) são fármacos utilizados no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2), seu mecanismo de ação é a ativação dos receptores PPAR- γ do núcleo celular. Além de sua atividade sobre o metabolismo glicídico e lipídico, há um particular interesse em sua atividade sobre a aterosclerose decorrente da síndrome metabólica que acomete estes pacientes. Tendo em vista a ampla aplicação das TZDs e a presença de apenas uma alternativa terapêutica relativamente segura no mercado, a pioglitazona, pesquisadores do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco sintetizaram e selecionaram TZDs promissoras em relação à atividade anti-aterosclerose. Dentre elas destacaram-se as GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177. Tendo em vista a maior aceitação da administração oral de medicamentos, prever a absorção destas novas moléculas para esta via empregando métodos de *screening* farmacocinético pode acelerar o desenvolvimento do produto farmacêutico. Neste estudo utilizou-se o método de *screening* farmacocinético *Cassette Accelerated Rapid Rat Screen* (CARRS), o *screening* físico-químico, principalmente através da avaliação do Log P, e *screening in vitro*, utilizando modelo de monocamadas de células Caco-2, para obter informações preditivas acerca da biodisponibilidade de moléculas. Estas técnicas foram utilizadas para selecionar dentre as TZDs - GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 - o(s) candidato(s) com características mais apropriadas para a continuidade dos estudos pré-clínicos. O *screening* físico químico apontou as GQ-19 e GQ-177 como favoráveis à absorção oral. Contudo, no *screening in vitro*, apenas a GQ-19 apresentou permeação no modelo de células Caco-2. No *screening in vivo*, a GQ-19 apresentou-se instável em plasma animal, degradando-se completamente em menos de 20 minutos. Para as demais moléculas, no *screening in vivo*, foram confirmadas as expectativas decorrentes do comportamento observado nos ensaios *in vitro* e não foram observadas concentrações quantificáveis no plasma dos animais. Desta forma, a priori, nenhuma das moléculas apresenta biodisponibilidade favorável à continuidade dos estudos pré-clínicos sem a avaliação de metabólitos ou a elaboração de formulações para viabilizar sua utilização pela via oral. Os métodos utilizados para *screening in vitro* forneceram informações importantes para a compreensão do perfil *in vivo* observado e para propor

estratégias que viabilizem a continuidade do desenvolvimento de produtos com estas novas moléculas.

Palavras-chave: Screening farmacocinético. Caco-2. Estabilidade química. Diabetes Mellitus tipo 2. Absorção.

ABSTRACT

Thiazolidinediones (TZDs) are drugs used to treat type 2 diabetes mellitus (DM2); its mechanism of action is the activation of the cell nucleus receptor PPAR- γ . In addition to its activity on glucose and lipid metabolism, there is a particular interest in its activities on atherosclerosis that is caused by the metabolic syndrome that affects these patients. Given the wide application of TZDs and the presence of a single therapeutic alternative in the market, the pioglitazone, the researchers from the Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos from Universidade Federal de Pernambuco synthesized and selected promising TZDs in relation to anti-atherosclerosis activity. Among them stood out the GQ-2, GQ-11, GQ-19 and GQ-177. Taking into account the greater acceptance oral administered drugs, to predict the absorption of these new molecules for this route using pharmacokinetic *screening* methods can accelerate the development of a pharmaceutical product. In this study we used the *screening* method CARRS (PK), the physico-chemical *screening*, particularly by evaluating the Log P, and *in vitro screening* using Caco-2 cell monolayer model to obtain predictive information regarding the bioavailability of molecules. These techniques were used to select among the TZDs - GQ-2, GQ-11, GQ-19 and GQ-177 - the candidate(s) with the most appropriate characteristics for the continuation of pre-clinical studies. The physico-chemical *screening* showed that the GQ-19 and GQ-177 as favorable oral absorption, but in the *in vitro screening*, only the GQ-19 showed permeation in Caco-2 cell model. In *in vivo screening*, GQ-19 appeared unstable in animal plasma, degraded completely in less than 20 minutes. For other molecules, during the *in vivo screening*, the expectations arisen from the behavior observed in *in vitro* tests were confirmed; the results confirmed the absence of measurable plasma concentrations. Thus, a priori, any of the molecules showed favorable bioavailability for the continuity of preclinical studies without evaluation of metabolites or the preparation of formulations to allow its use by the oral route. The methods used for *in vitro* screening provided important information for the understanding of the *in vivo* profile observed and to propose strategies that allow the continuity of product development with these new molecules.

Keywords: Pharmacokinetic Screening. Caco-2. Chemical Stability. Type 2 Diabetes Mellitus. Absorption.

Lista de abreviaturas

ABC: Cassete de ligação a ATP - *ATP-Binding Cassette*

ACN: Acetonitrila

AMB: Anfotericina B

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASC: Área Sob a Curva

BCS: Sistema de Classificação Biofarmacêutica - *Biopharmaceutic Classification System*

BDDCS: Sistema de Classificação Biofarmacêutica da Disposição de Fármacos - *Biopharmaceutic Drug Disposition Classification System*

BZN: Benzonidazol

CA: Análise em Cassete - *Cassette Analysis*

CARRS: *Cassette Accelerated Rapid Rat Screen*

CD: Dosagem em Cassete - *Cassette Dosing*

CIVIV: Correlações *in vitro in vivo*

Cl: Clearance

CQA: Controle de Qualidade Alto

CQB: Controle de Qualidade Baixo

CQM: Controle de Qualidade Médio

DDT: diclorodifeniltricloroetano

DM2: Diabetes Mellitus tipo 2

eNOS: Liberação de Óxido Nítrico

HTS: High Throughput Screening

LIQ: Limite Inferior de Quantificação

MDCK: Madin-Darby Canine Kidney

MDR: Resistência Múltipla a Fármacos - *Multidrug Resistance*

MMP9: Metaloprotease-9

MRT: Tempo de residência Média – *Mean Residence Time*

NAFLD: Doença Hepática Não Alcoólica – *Non-alcoholic Fatty Liver Disease*

OATPs: Polipeptídeo Transportador de Compostos Orgânicos Aniônicos

OCTs: Transportadores de Cátions Orgânicos

OECD: Organização para a Cooperação Econômica e Desenvolvimento - *Organization for Economic Co-operation and Development*

PAMPA: Ensaio de Permeação em Membrana Artificial - *Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*

Papp: Permeabilidade Aparente

PBS: Tampão fosfato em solução salina - *Phosphate Buffer Saline*

PI: Padrão Interno

PK: Farmacocinética

PPAR: Receptor ativado da proliferação de peroxissomos - *Peroxisome Proliferator Activated Receptor*

QSAR: Relação estrutura atividade quantitativa - *Quantitative Structure-Activity Relationship*

SLCO: Transportadores de Solute

TEER: Resistência elétrica transepitelial - *Transepithelial Electrical Resistance*

TZD: Tiazolidinodionas

UPLC: Cromatografia Líquida de Ultra Desempenho - *Ultra Performance Liquid Chromatography*

Índice de Figuras

Figura 1 – Estrutura das GQ-11, GQ-2, GQ-19 e GQ-177	2
Figura 2 - Cromatograma GQ-11, concentração de 0,625 µg/mL em coluna HSS SB 2,1x50mm com fase móvel acetonitrila:água (75:25) com fluxo de 0,4 µL/min	16
Figura 3 - Curva analítica construída para GQ-11, com equação e r^2	17
Figura 4 -Cromatograma GQ-19 e GQ-177, concentração de 10 µg/mL em coluna HSS SB 2,1x50mm com fase móvel acetonitrila:água (65:35) com fluxo de 0,4 µL/min	18
Figura 5 - Curva analítica construída para GQ-177, com equação e r^2 (n=3).....	19
Figura 6 - Curva analítica construída para GQ-19, com equação e r^2	20
Figura 7 - Estabilidade do GQ-11 em pH 1,2 e 7,4	21
Figura 8 - Estabilidade do GQ-177 em pH 1,2 e 7,4	22
Figura 9 - Estabilidade do GQ-19 em pH 1,2 e 7,4	23
Figura 10 - Gráfico de Log k vs Log P dos padrões juntamente com os fármacos de interesse .	24
Figura 11 – Possíveis Rotas de absorção de fármacos. 1- Transporte transcelular. 2- Transporte paracelular. 3 – Transporte por transporte ativo da membrana apical e basolateral. 4 – Transportadores de efluxo	28
Figura 12 – Resultados de permeabilidade aparente obtidos em monocamadas de células Caco-2. LIQ: Limite Inferior de Quantificação	39
Figura 13–Placa padrão do modelo CARRS adaptado de Korfmacher et al (7)	49
Figura 14 -Estabilidade de GQ-19 em plasma normal e acidificado	56
Figura 15 - Ensaio de estabilidade da GQ-11 em plasma.	58
Figura 16 - Ensaio de estabilidade da GQ-177 em plasma. O * representa diferença estatística em relação ao tempo zero.	59

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Métodos analíticos para a determinação dos GQs 11, 19 e 177.....	12
Tabela 2 - Substâncias utilizadas na curva para a determinação do Log P.	14
Tabela 3 - Precisão e exatidão dos controles de qualidades usados na validação analítica das GQ-11, GQ-177 e GQ-19.....	20
Tabela 4 - Valores de Log P obtidos e outros parâmetros utilizados na regra dos 5 de Lipinski para cada GQ.	25
Tabela 5 -Métodos analíticos para a determinação das substâncias de interesse em PBS para o ensaio de permeação em células Caco-2 (n=3).	37
Tabela 6 - Concentrações utilizadas no teste da resazurina e resultado do teste da resazurina em % de inibição	37
Tabela 7 - Solubilidade a partir de DMSO em PBS	38
Tabela 8 - Curva bioanalítica GQ-11, valores com precisão, exatidão e regressão linear.	54
Tabela 9 - Curva bioanalítica GQ-11, valores com precisão e exatidão	55
Tabela 10 - Precisão e exatidão interensaios das GQ-11 e GQ-177.....	57
Tabela 11 - Áreas obtidas pós processamentos de amostras de animais administrados de GQ-11	60
Tabela 12 - Áreas obtidas pós processamentos de amostras de animais administrados de GQ-177	60

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	1
II.	Histórico das Moléculas	4
1.	GQ-2 - (5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona)	4
2.	GQ-19 - 3-(4-metilbenzil)-5-(4-nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona	6
3.	GQ-11 - (5-(indol-3-il-metileno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona).....	6
4.	GQ-177 - (3-(3-bromobenzil)-5-(4-metilsulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona).....	7
III.	OBJETIVO GERAL	7
	CAPÍTULO 1 - <i>SCREENING</i> FÍSICO-QUÍMICO	9
1.	Introdução	9
2.	Materiais e Métodos	11
2.1	Desenvolvimento e Validação de Métodos Analíticos para a determinação dos GQ-11, 177 e 19.....	11
2.2	Ensaio de estabilidade em pHs 1,2 e 7,4.....	13
2.3	Ensaio de Log P pelo método cromatográfico	14
2.4	Análise estatística	15
3.	Resultados	15
3.1.	Método analítico para a determinação de GQ11	15
3.3.	Método analítico para a determinação de GQ177 e GQ 19	17
3.3.	Validação analítica.....	20
3.4.	Estabilidade química das GQ-11, GQ-177 e GQ-19.....	21
3.5.	Log P	24
4.	Conclusão	25
	CAPÍTULO 2 - <i>SCREENING</i> IN VITRO	27
1.	Introdução	27
2.	Materiais e Métodos	34
2.1.	Determinação de GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 em PBS para estudo de permeação em células Caco-2.....	34
2.2.	Experimento de citotoxicidade pelo teste da resazurina.....	35
2.3.	Experimentos de permeabilidade	35
3.	Resultados	36
3.1.	Adaptação do método analítico para a determinação das GQ-2, GQ-11, GQ-177, GQ-19, benznidazol e anfotericina B em PBS.....	36
3.2.	Citotoxicidade pelo teste da Resazurina	37

3.3.Solubilidade dos candidatos a fármaco em solventes necessários ao teste de permeabilidade	38
3.4.Teste de permeação em Caco-2.....	38
4. Conclusão	40
CAPÍTULO 3 - <i>SCREENINGIN VIVO</i>	43
1. Introdução	43
2. Materiais e Métodos	52
2.1.Métodos bioanalíticos para a determinação da GQ-11, GQ-177 e GQ-19 em plasma. 52	
2.2. <i>Screening</i> Farmacocinético das GQ-2, GQ-11, GQ-177 e GQ-19.....	53
Modelo animal	53
3. Resultados	54
3.1.MétodosBioanalíticos.....	54
3.2. <i>Screeningin vivo</i>	59
4. Conclusão	60
III.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO	62
IV. PERSPECTIVAS	67
APÊNDICE I – FARMACOCINÉTICA DA GQ-11 EM RATOS WISTAR	68
APÊNDICE II – ESTÁGIO DE TREINAMENTO NO NCATS/NIH - INTERNSHIP AT NCATS/NIH	72
APÊNDICE III – MANUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO NA THE JOURNAL OF PHARMACOLOGY AND EXPERIMENTAL THERAPEUTICS	92
REFERÊNCIAS.....	129
ANEXO I – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA A REALIZAÇÃO DO EXPERIMENT EM ANIMAIS	144

I. INTRODUÇÃO

As tiazolidinodionas (TZDs), também conhecidas por glitazonas, são fármacos utilizados no tratamento de Diabetes Mellitus tipo 2 (DM2) e agem principalmente reduzindo a resistência periférica à insulina. As TZDs atuam ativando o receptor do núcleo celular, PPAR- γ (*peroxisome proliferator activated receptor*). Este receptor, quando ativado, regula a expressão de genes que afetam o metabolismo glicídico e lipídico levando ao aumento da captação de glicose mediada por insulina nos tecidos periféricos e diferenciação de pré-adipócitos em adipócitos, ação que demanda captação de ácidos graxos da circulação sanguínea. Desta forma, a ativação dos receptores PPAR- γ resulta em diminuição da glicose e de ácidos graxos da circulação. Ainda, a atividade deste receptor também resulta em ação anti-inflamatória e diminuição da pressão arterial. Portanto, o mecanismo de ação das TZDs não somente se direciona à redução da glicemia em pacientes com DM2, mas também atenua os riscos cardiovasculares decorrentes da doença, principalmente sobre a progressão da aterosclerose decorrente desta síndrome metabólica (1).

Atualmente a única TZD no mercado é a pioglitazona, porém este fármaco está sob monitoramento da ANVISA. Seu uso é contraindicado para pacientes que apresentam insuficiência cardíaca classe III ou IV, doença hepática ou níveis de transaminases séricas aumentados, insuficiência cardíaca sintomática, cetoacidose diabética, DM1 ou hipersensibilidade ao cloridrato de pioglitazona (2, 3).

Tendo em vista a ampla aplicação das TZDs e a restrição de alternativas terapêuticas disponíveis no mercado, pesquisadores do Laboratório de Planejamento e Síntese de Fármacos da Universidade Federal de Pernambuco selecionaram diversos derivados de TZDs promissores em relação à atividade anti-aterosclerose. Entre os compostos com melhores performances destacaram-se as GQ-2 (5-(4-cloro-benzilideno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona), GQ-11 (5-(indol-3-il-metileno)-3-(4-metilbenzil)-tiazolidina-2,4-diona), GQ-19 3-(4-metilbenzil)-5-(4-nitrobenzilideno)tiazolidina-2,4-diona e

GQ-177 (3-(3-bromobenzil)-5-(4-metilsulfonil-benzilideno)-tiazolidina-2,4-diona) cujas estruturas estão expostas na Figura 1 (4-6).

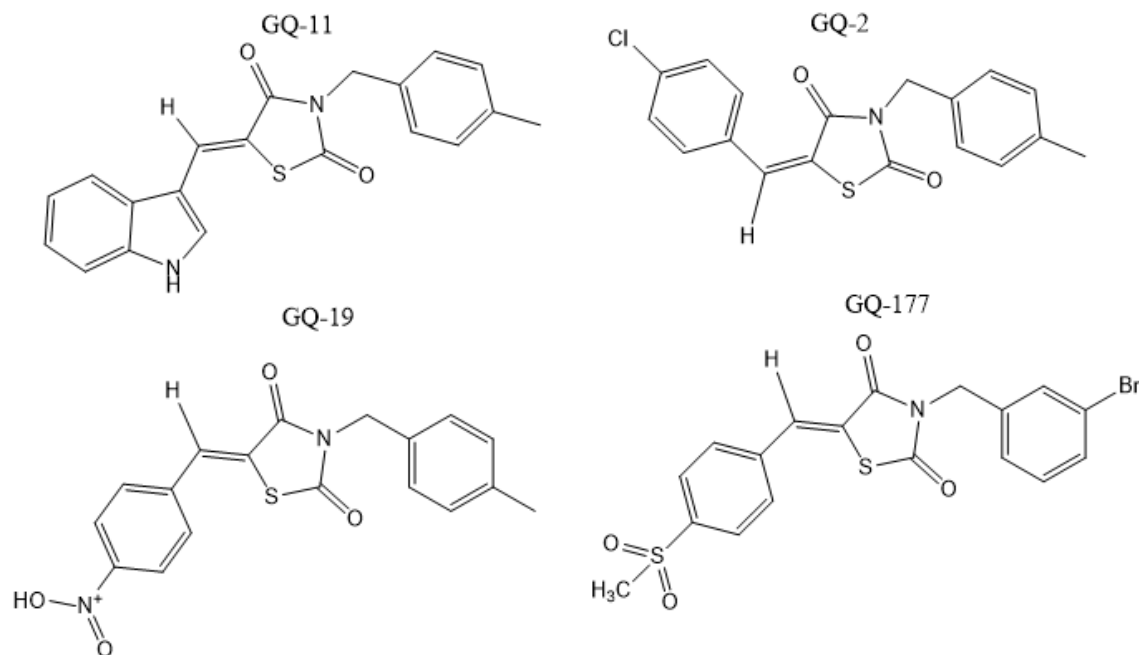


Figura 1 – Estrutura das GQ-11, GQ-2, GQ-19 e GQ-177

A série de GQs selecionada em ensaios anteriores é consequência do estabelecimento de métodos cada vez mais rápidos - como o high throughput *screening* - para a descoberta e síntese de substâncias com potencial aplicação na terapêutica. Para selecionar os melhores candidatos, é premente a aplicação de avaliações sistemáticas para determinar o comportamento destes fármacos no sistema biológico. Estas avaliações podem auxiliar na seleção do candidato a fármaco mais promissor dentro de uma vasta biblioteca e no direcionamento da realização de estudos *in vivo* para aqueles candidatos mais promissores (7, 8).

Segundo Waterbeend e Grifford (9), cerca de 40% do insucesso da introdução de novos fármacos e medicamentos no mercado é devido ao desfavorável perfil farmacocinético. Portanto a farmacocinética deve ser investigada precocemente no desenvolvimento de novos fármacos, pois tende a evidenciar características determinantes para o sucesso de um candidato à fármaco. No entanto, o estudo da farmacocinética completa envolve a administração do composto ao menos pela via intravenosa, oral e intraperitoneal, em cinco réplicas para cada tempo e com pelo menos 10

tempos de coleta, o que o caracteriza como um estudo de longo prazo, com utilização de um grande número de animais e de alto custo (10).

Neste sentido têm sido criados diversos métodos de *screening* farmacocinético para que esses ensaios sejam de maior produtividade e mais fármacos possam ser analisados com menor uso de animais e menor número de amostras. Métodos como "rapid pk", "cassette dosing", "cassette analysis", "cassette accelerated rapid rat screen (CARRS)" e "snapshot pk" tem sido empregados por indústrias farmacêuticas para aumentar a produtividade dos *screenings* farmacocinéticos com bons resultados (7, 10).

Entre os métodos de *screening* que utilizam menor número de animais e que não apresentam riscos de interações entre substâncias está o CARRS, descrito por Korfmacher e colaboradores do Instituto de Pesquisa da Schering-Plough (7). Neste método utilizam-se apenas 2 animais por fármaco, administrado pela via oral, e 6 tempos de coleta ao longo de 6 horas.

Considerando que a disposição cinética de um fármaco possui estreita relação com algumas de suas propriedades físico-químicas, a investigação destas propriedades pode ter valor preditivo do seu comportamento no organismo. O Log P, por exemplo, tem influência direta nos eventos que sucedem a administração enteral dos fármacos, pois relaciona-se diretamente com a solubilidade do composto nos fluidos gástricos e intestinais e, ainda, influencia na permeabilidade do fármaco através das membranas celulares envolvidas no processo de absorção (9). A estabilidade química é também uma característica determinante a ser observada para propor a administração do produto pela via oral, pois um perfil farmacocinético desfavorável pode ser explicado por suas características de estabilidade química (11).

Enquanto o Log P oferece informações teóricas sobre como uma molécula tende a reagir no meio biológico, os testes *in vitro* demonstram com maior precisão como estas moléculas se comportam frente a membranas biológicas semelhantes às que farão oposição à absorção do fármaco quando inserido num organismo. O modelo de monocamadas de células Caco-2 mimetiza a parede intestinal em diversos aspectos, como a expressão das junções celulares, borda em escova, expressam proteínas de transporte na

membrana além de enzimas metabolizadoras, constituindo um modelo com alta correlação com as características de absorção observadas em ensaios de farmacocinética. Sua relevância para o desenvolvimento de fármacos é reconhecida pelas principais agências reguladoras, que indicam este teste para prever a absorção oral de fármacos (12-14).

Para atingir as expectativas do mercado, esta nova série de moléculas necessitam que sua forma farmacêutica final seja de liberação compatível com a via oral, uma vez que se trata da terapêutica da diabetes ou da aterosclerose decorrente da evolução da síndrome. A vasta gama de alternativas terapêuticas disponíveis no mercado para o tratamento destas doenças são de administração não invasiva (via oral) e portanto bem aceitas pelos pacientes, o que faz com que novos medicamentos necessitem destas características para apresentar alguma vantagem competitiva em relação aos seus pares (15).

O presente trabalho tem como objetivo utilizar o *screening* farmacocinético por CARRS, o modelo de monocamadas de células Caco-2 e características físico químicas para selecionar dentre os compostos derivados de tiazolidinodionas - GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 - o(s) candidato(s) com características mais apropriadas para a continuidade dos estudos pré-clínicos. Este texto foi organizado em três capítulos (Capítulo 1: *screening* físico-químico; Capítulo 2: *screening in vitro* e; Capítulo 3, *screening in vivo*) com o objetivo de melhorar a compreensão das metodologias utilizadas em cada etapa com resultados e discussão preliminar dispostos nos capítulos específicos.

III.DISSCUSSÃO E CONCLUSÃO

Os métodos analíticos e bioanalíticos desenvolvidos apresentaram limites de confiança adequados para a aplicação nos estudos *in vitro* e *in vivo* das tiazolidinodionas. A partir dos estudos de estabilidade química foi possível observar resultados mais promissores à molécula GQ-19 em pH ácido e à molécula GQ-11 em pH 7.4. A molécula GQ-19 apresentou, ainda, o valor de Log P favorável à absorção oral e permeação quantificável no estudo com monocamadas de Caco-2.

A instabilidade de GQ-19 em plasma sugere que a molécula sofre ação de enzimas plasmáticas e deve apresentar clearance elevado.

Assim como foi observado no estudo de farmacocinética da GQ-2 anteriormente (19), as GQ-11 e GQ-177 também não apresentaram concentrações quantificáveis no plasma quando administradas pela via oral e, portanto, requerem o desenvolvimento de formulações apropriadas antes de avançar para ensaios pré-clínicos. É importante ressaltar que, assim como a GQ-2, as mesmas possuem atividade pela via oral (6, 16, 17, 21, 87), contudo, as evidências aqui documentadas apontam que a GQ-11 e GQ-177 não são capazes de permear monocamadas de células intestinais do tipo Caco-2 além de não apresentarem concentrações plasmáticas quantificáveis quando administradas pela via oral à ratos Wistar.

No Capítulo 2 foi levantada a hipótese das TZDs avaliadas estarem sujeitas à ação de transportadores de efluxo. É importante ressaltar que a pioglitazona já foi demonstrada como inibidora e substrato de P-gp (88, 89). Assim como no caso da pioglitazona, estes transportadores podem ser responsáveis pela limitada biodisponibilidade das moléculas em animais e a baixa permeabilidade através de monocamadas de células Caco-2. Para prever o comportamento de fármacos em relação à sua interação com transportadores podemos utilizar um desdobramento da Classificação Biofarmacêutica, a *Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System* (BDDCS). Esta classificação proposta por Wu e Benet (90) utiliza os parâmetros utilizados para a classificação biofarmacêutica, permeabilidade e solubilidade, e correlaciona

com a afinidade por transportadores e via de eliminação preferencial de cada classe.

Na proposta da BDDCS, fármacos de BCS Classe 1, de alta solubilidade e alta permeabilidade, não seriam muito influenciados pela atividade de transportadores, pois, a solubilização rápida implica que altas concentrações do composto estarão disponíveis no lúmen intestinal, saturando qualquer processo de absorção ativa que possa influenciar na absorção da molécula. Em seguida, devido à alta permeabilidade, o composto atingirá altas concentrações dentro do enterócito, assim, qualquer processo de transporte de efluxo e enzimas metabólicas que possam influenciar a molécula serão saturados, e a molécula poderá chegar a circulação sanguínea também em altas concentrações, e rapidamente. Contudo, compostos de Classe 2, de alta permeabilidade e baixa solubilidade, serão mais afetados por transportadores de efluxo. Isso ocorre pois, devido à baixa solubilidade, haverá concentrações limitadas do composto na luz intestinal que rapidamente permearão a membrana apical dos enterócitos, contudo atingindo concentrações intracelulares baixas. Assim, transportadores de efluxo não serão saturados e podem afetar de forma mais eficaz a biodisponibilidade de compostos de Classe 2. Ainda, ao atingir concentrações intracelulares baixas, outros processos enzimáticos também terão mais influência sobre fármacos desta classe, assim, metabolismo de enterócitos também pode influenciar a biodisponibilidade destas moléculas.

Compostos de Classe 3, de baixa permeabilidade e alta solubilidade serão mais afetados por transportadores de absorção, pois altas concentrações estarão disponíveis no lúmen devido à alta concentração, porém a permeabilidade transcelular será baixa, assim os transportadores de influxo serão impactantes para a biodisponibilidade. Ainda, devido às concentrações intracelulares serem influenciadas por baixa permeabilidade passiva e a atividade de algum transportador ativo, pode-se esperar baixas concentrações intracelulares, assim também é esperado que metabolismo e transportadores de efluxo sejam capazes de influenciar a biodisponibilidade de fármacos de Classe 3. Enquanto os de Classe 4 serão bastante influenciados por ambos os transportadores e metabolismo de parede intestinal.

Se traçarmos uma divisão clara em relação ao Log P das TZDs estudadas aqui, teremos que a GQ-2 e GQ-11 são de alto Log P ou seja, há baixa expectativa de solubilidade e boa expectativa de permeabilidade, embora solubilidade não tenha sido rigorosamente estudada neste trabalho. Enquanto as GQ-19 e GQ-177, devido ao baixo Log P, teriam solubilidade considerável e permeabilidade limitada.

Desta forma, a GQ-2 e GQ-11 seriam consideradas de Classe 2, portanto espera-se que teriam alta influência de transportadores de efluxo, que são expressos por células Caco-2, assim, os resultados observados no teste de permeação podem ter sido resultado deste fenômeno. Transportadores de efluxo também podem ter influenciado os resultados observados *in vivo*. Após administração de uma suspensão à animais pela via oral, é esperado que o fator solubilidade seja importante para a biodisponibilidade destes compostos. Contudo, há de se ressaltar que no teste de permeabilidade em Caco-2, as moléculas foram previamente solubilizadas em tampão, portanto atribuir unicamente à solubilidade os efeitos observados no ensaio é leviano. Na situação na qual os fármacos estão previamente solubilizados no compartimento doador do ensaio em células Caco-2, há alta concentração das moléculas disponíveis para a permeação e mesmo assim não observamos concentrações quantificáveis no compartimento receptor, assim podemos considerar que, mesmo com a expectativa do Log P apontando para uma boa permeabilidade destas moléculas, elas na verdade possuem baixa permeabilidade, se classificando na Classe 4 da Classificação Biofarmacêutica, assim há muitas variáveis influenciando sua biodisponibilidade.

A GQ-19 e GQ-177 por apresentarem Log P menor, há expectativa que tenham melhor solubilidade e permeabilidade limitada. *In vivo*, elas se solubilizariam mais rapidamente no lúmen intestinal e estariam disponíveis para a absorção. No caso específico da GQ-177 que foi administrada pela via oral à ratos Wistar, a ausência de concentrações plasmáticas quantificáveis pode ter sido devido à baixa permeabilidade, assim, transportadores ativos de absorção serão importantes para a absorção desta molécula e metabolismo de parede intestinal, tanto na Caco-2 quanto no modelo animal, podem ter influenciado na sua biodisponibilidade.

No caso da GQ-177 há a influência de um segundo fator. Durante sua farmacocinética pela via intravenosa, não foi possível quantificar este composto no plasma de ratos Wistar (resultados em Anexo I). O método bioanalítico foi validado em plasma de ratos com limite de quantificação em 80 ng/mL, contudo não foi capaz de quantificar a GQ-177 mesmo quando administrada pela via intravenosa. Há a possibilidade desta molécula não se distribuir igualmente entre o sangue e o plasma dos animais, no caso, penetrar nos eritrócitos e ser precipitada durante a centrifugação das amostras. Mesmo que esta hipótese seja verdadeira, alguma partição desta molécula deveria estar presente no plasma para a quantificação. Outra possibilidade é a instabilidade desta molécula em sangue animal, de forma que houve degradação do composto no período entre o procedimento de coleta até a extração da molécula do plasma das amostras. Todo o procedimento da coleta das amostras dos animais até a injeção no sistema cromatográfico foi realizado no mesmo dia, contudo, ainda não foi possível quantificar o composto. É importante ressaltar que durante a validação bioanalítica houve diferenças significativas na estabilidade de curta duração (18 horas) e em ciclo de congelamento de descongelamento em plasma de ratos (Figura 16), revelando que há possibilidade desta molécula apresentar metabolismo plasmático, possibilidade que não afetou a execução do método bioanalítico, como ocorreu com a GQ-19, mas pode ter influenciado a disposição cinética do composto *in vivo*. Assim, ao se interpretar os resultados de absorção oral desta molécula, há possibilidade do método bioanalítico, desenvolvido em plasma e não em sangue total, não ser capaz de quantificar esta molécula na circulação do modelo animal, por motivo de partição sangue/plasma ou por motivo de estabilidade. De qualquer forma, os resultados obtidos durante o teste da Caco-2, sem a participação de sangue ou plasma e com o candidato a fármaco previamente solubilizado, apontam para a baixa absorção da molécula.

Para GQ-19, devido ao seu baixo Log P, há expectativa de boa solubilidade e permeabilidade limitada. Desta forma seria esperado que, *in vivo*, ela dependa de transportadores para ser absorvida. Contudo, no ensaio com Caco-2, observamos uma rápida permeação desta molécula, assim além de uma boa solubilidade, apresentou também uma boa permeabilidade,

caracterizando o composto como Classe 1 na Classificação Biofarmacêutica. Contudo, nossos resultados apontam que a limitação observada na GQ-19 foi a estabilidade química e *ex vivo* deste composto. Baixa estabilidade em plasma e baixa estabilidade em pH 7.4 são os fatores limitantes para o sucesso farmacocinético deste composto.

Este estudo teve como objetivo utilizar métodos de *screening* para selecionar entre as TZDs GQ-2, GQ-11, GQ-19 e GQ-177 aquelas com capacidade de serem absorvidas pela via oral. *Screenings* tem como objetivo facilitar e agilizar a avaliação de candidatos a fármacos para que se possa investir em candidatos mais promissores. Os *screenings* físico-químico e *in vitro* em células Caco-2 foram importantes para auxiliar na interpretação dos resultados obtidos *in vivo*, contudo nenhum dos compostos avaliados passaram para a avaliação da farmacocinética completa. Mesmo assim, foi realizado um estudo para a avaliação dos parâmetros farmacocinéticos pela via intravenosa das GQ-11 e GQ-177 (em Apêndice I). Este experimento foi importante principalmente para observar uma característica peculiar da GQ-177 em relação à sua quantificação *in vivo*. Em geral, as moléculas intactas não foram capazes de serem absorvidas em concentrações quantificáveis, contudo há diversos estudos relatando sua atividade pela via oral. Assim, é possível que metabólitos ou produtos de degradação que podem ser formados devido à baixa estabilidade química destes compostos podem ser os responsáveis pela atividade observada. A pioglitazona apresenta metabólitos ativos, ambos oriundos de oxidação da estrutura primária através do metabolismo microsomal hepático (91), é importante ressaltar que tanto a pioglitazona quanto seus metabólitos são detectados na circulação sistêmica após a administração oral do medicamento (92). O metabolismo de parede intestinal também pode ter sido importante para a GQ-177 e talvez para GQ-11 e GQ-2, de acordo com suas características físico-químicas. Uma conclusão importante deste trabalho foi a importância da avaliação da estabilidade química na triagem de fármacos, esta característica foi importante para a interpretação durante todo o trabalho.

IV. PERSPECTIVAS

Tendo em vista os resultados de *screening* físico-químico, *in vitro* e *in vivo*, não foram observadas concentrações plasmáticas quantificáveis de nenhuma das moléculas. Contudo, devido a atividade evidenciada de todos os candidatos a fármaco em trabalhos anteriores, é necessária a investigação dos metabólitos destas moléculas que podem ser os compostos ativos após administração oral destes compostos. Neste sentido, durante o último ano do Doutorado, realizei um estágio de treinamento no *National Institutes of Health* nos Estados Unidos. O objetivo do estágio foi a capacitação nas técnicas de identificação de metabólitos através de ensaios *in vitro* e uso da espectrometria de massas de alta resolução. O relatório deste estágio pode ser encontrado no Apêndice II.

Ainda, devido aos métodos bioanalíticos desenvolvidos para este trabalho tornou-se possível a administração intravenosa das moléculas. A GQ-11 e GQ-177 foram administradas pela via intravenosa em ratos Wistar e sua farmacocinética foi descrita. Os resultados podem ser encontrados no Apêndice I.

Este projeto compreendeu a execução de protocolos de *screening*, contudo, há evidências terapêuticas que justificam a investigação mais aprofundada destes compostos. Assim, a investigação dos metabólitos destas moléculas, assim como o desenvolvimento de método bioanalítico capaz de quantificar a GQ-177 após administração intravenosa em ratos Wistar, podem elucidar se os efeitos terapêuticos descritos na literatura são oriundos de um metabólito ou produto de degradação destas moléculas.

REFERÊNCIAS

1. Yki-Jarvinen H. Thiazolidinediones. *The New England journal of medicine*. 2004;351(11):1106-18.
2. Brasil. Farmacopéia Brasileira – 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. 2010;1.
3. Ferwana M, Firwana B, Hasan R, Al-Mallah MH, Kim S, Montori VM, et al. Pioglitazone and risk of bladder cancer: a meta-analysis of controlled studies. *Diabet Med*. 2013;30(9):1026-32.
4. Silva JC, Cesar FA, de Oliveira EM, Turato WM, Tripodi GL, Castilho G, et al. New PPARgamma partial agonist improves obesity-induced metabolic alterations and atherosclerosis in LDLr(-/-) mice. *Pharmacol Res*. 2016;104:49-60.
5. Marques MJDP, Oliveira LCL, Galdino SL, Lima MC A, Duarte GIBP. Síntese, Caracterização Estrutural E Avaliação Da Atividade Hipoglicemiante De Um Novo Derivado Tiazolidínico. in: 3º Encontro Brasileiro para Inovação Terapêutica. 2013.
6. Mourao RH, Silva TG, Soares AL, Vieira ES, Santos JN, Lima MC, et al. Synthesis and biological activity of novel acridinylidene and benzylidene thiazolidinediones. *Eur J Med Chem*. 2005;40(11):1129-33.
7. Korfmacher WA, Cox KA, Ng KJ, Veals J, Hsieh Y, Wainhaus S, et al. Cassette-accelerated rapid rat screen: a systematic procedure for the dosing and liquid chromatography/atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometric analysis of new chemical entities as part of new drug discovery. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2001;15(5):335-40.
8. van de Waterbeemd H, Smith DA, Jones BC. Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. *Journal of computer-aided molecular design*. 2001;15(3):273-86.
9. van de Waterbeemd H, Gifford E. ADMET in silico modelling: towards prediction paradise? *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2(3):192-204.
10. Liu B, Chang J, Gordon WP, Isbell J, Zhou Y, Tuntland T. Snapshot PK: a rapid rodent in vivo preclinical screening approach. *Drug Discov Today*. 2008;13(7-8):360-7.

11. Kong LT, Wang Q, Xiao BX, Liao YH, He XX, Ye LH, et al. Different pharmacokinetics of the two structurally similar dammarane sapogenins, protopanaxatriol and protopanaxadiol, in rats. *Fitoterapia*. 2013;86:48-53.
12. Wan H, Holmen AG. High throughput screening of physicochemical properties and in vitro ADME profiling in drug discovery. *Combinatorial chemistry & high throughput screening*. 2009;12(3):315-29.
13. FDA. Waiver of In Vivo Bioavailability and Bioequivalence Studies for Immediate-Release Solid Oral Dosage Forms Based on a Biopharmaceutics Classification System. Guidance for Industry. 2015.
14. Artursson P, Karlsson J. Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochemical and biophysical research communications*. 1991;175(3):880-5.
15. Bolen S, Feldman L, Vassy J, Wilson L, Yeh HC, Marinopoulos S, et al. Systematic review: comparative effectiveness and safety of oral medications for type 2 diabetes mellitus. *Annals of internal medicine*. 2007;147(6):386-99.
16. Soares ESAK, de Oliveira Cipriano Torres D, Santos Rocha SW, dos Santos Gomes FO, dos Santos Silva B, Donato MA, et al. Effect of new thiazolidine derivatives LPSF/GQ-02 and LPSF/GQ-16 on atherosclerotic lesions in LDL receptor-deficient mice (LDLR^{-/-}). *Cardiovasc Pathol*. 2013;22(1):81-90.
17. Soares e Silva AK, de Oliveira Cipriano Torres D, dos Santos Gomes FO, dos Santos Silva B, Lima Ribeiro E, Costa Oliveira A, et al. LPSF/GQ-02 inhibits the development of hepatic steatosis and inflammation in a mouse model of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *PLoS One*. 2015;10(4):e0123787.
18. Araujo S, Soares ESA, Gomes F, Ribeiro E, Oliveira W, Oliveira A, et al. Effects of the new thiazolidine derivative LPSF/GQ-02 on hepatic lipid metabolism pathways in non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD). *Eur J Pharmacol*. 2016;788:306-14.
19. Vieira CM, Campos ML, Padilha EC, Pitta M, Pitta ID, de Lima MD, et al. UHPLC Quantitation Method for New Thiazolidinedione LPSF/GQ-02 and In Vitro/In Vivo Kinetic Studies. *Drug metabolism letters*. 2016;10(3):206-12.

20. Silva AK, Gomes FO, Santos Silva BD, Ribeiro EL, Oliveira AC, Araujo SM, et al. Chronic LPSF/GQ-02 treatment attenuates inflammation and atherosclerosis development in LDLr^{-/-} mice. *Eur J Pharmacol*. 2016;791:622-31.
21. da Costa Leite LF, Veras Mourao RH, de Lima Mdo C, Galdino SL, Hernandez MZ, de Assis Rocha Neves F, et al. Synthesis, biological evaluation and molecular modeling studies of arylidene-thiazolidinediones with potential hypoglycemic and hypolipidemic activities. *Eur J Med Chem*. 2007;42(10):1263-71.
22. Toutain PL, Bousquet-Melou A. Bioavailability and its assessment. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*. 2004;27(6):455-66.
23. Taylor JB, Triggle DJ. *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Amsterdam: Elsevier. 2007.
24. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1997;23(1):3-25.
25. Markopoulos C, Andreas CJ, Vertzoni M, Dressman J, Reppas C. In-vitro simulation of luminal conditions for evaluation of performance of oral drug products: Choosing the appropriate test media. *Eur J Pharm Biopharm*. 2015;93:173-82.
26. Veith GD, Austin NM, Morris RT. A rapid method for estimating log P for organic chemicals. *Water Research*. 1979;13(1):5.
27. Brasil. RE 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. ANVISA Agência nacional de Vigilância Sanitária. 2003.
28. Gimenez BG, Santos MS, Ferrarini M, Fernandes JP. Evaluation of blockbuster drugs under the rule-of-five. *Die Pharmazie*. 2010;65(2):148-52.
29. Bohets H, Annaert P, Mannens G, Van Beijsterveldt L, Anciaux K, Verboven P, et al. Strategies for absorption screening in drug discovery and development. *Current topics in medicinal chemistry*. 2001;1(5):367-83.
30. Artursson P, Palm K, Luthman K. Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport. *Adv Drug Deliv Rev*. 2001;46(1-3):27-43.
31. Alqahtani S, Mohamed LA, Kaddoumi A. Experimental models for predicting drug absorption and metabolism. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(10):1241-54.

32. Shugarts S, Benet LZ. The role of transporters in the pharmacokinetics of orally administered drugs. *Pharmaceutical research*. 2009;26(9):2039-54.
33. Kansy M, Senner F, Gubernator K. Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes. *Journal of medicinal chemistry*. 1998;41(7):1007-10.
34. Avdeef A. The rise of PAMPA. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2005;1(2):325-42.
35. Balimane PV, Chong S. Cell culture-based models for intestinal permeability: A critique. *Drug Discovery Today*. 2005;10(5):335-43.
36. Ekins S, Waller CL, Swaan PW, Cruciani G, Wrighton SA, Wikel JH. Progress in predicting human ADME parameters in silico. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*. 2000;44(1):251-72.
37. Ussing HH, Zerahn K. Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta physiologica Scandinavica*. 1951;23(2-3):110-27.
38. Sjoberg A, Lutz M, Tannergren C, Wingolf C, Borde A, Ungell AL. Comprehensive study on regional human intestinal permeability and prediction of fraction absorbed of drugs using the Ussing chamber technique. *Eur J Pharm Sci*. 2013;48(1-2):166-80.
39. Ungell AL, Nylander S, Bergstrand S, Sjoberg A, Lennernas H. Membrane transport of drugs in different regions of the intestinal tract of the rat. *J Pharm Sci*. 1998;87(3):360-6.
40. Rozehnal V, Nakai D, Hoepner U, Fischer T, Kamiyama E, Takahashi M, et al. Human small intestinal and colonic tissue mounted in the Ussing chamber as a tool for characterizing the intestinal absorption of drugs. *Eur J Pharm Sci*. 2012;46(5):367-73.
41. Barthe L, Woodley J, Houin G. Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental & clinical pharmacology*. 1999;13(2):154-68.
42. Perrone MG, Inglese C, Berardi F, Leopoldo M, Perrone R, Colabufo NA. Comparative evaluation of two dye probes in the rat everted gut sac model for unambiguous classification of P-gp substrate and inhibitor. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013;67(1):5-8.
43. Fagerholm U, Johansson M, Lennernas H. Comparison Between Permeability Coefficients in Rat and Human Jejunum. *Pharmaceutical research*. 1996;13(9):1336-42.

44. Moyer MP. Culture of human gastrointestinal epithelial cells. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine* (New York, NY). 1983;174(1):12-5.
45. Hidalgo IJ, Raub TJ, Borchardt RT. Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*. 1989;96(3):736-49.
46. Dressman JB, Thelen K, Jantravid E. Towards quantitative prediction of oral drug absorption. *Clinical pharmacokinetics*. 2008;47(10):655-67.
47. Nigsch F, Klaffke W, Miret S. In vitro models for processes involved in intestinal absorption. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2007;3(4):545-56.
48. Hill CR, Jamieson D, Thomas HD, Brown CD, Boddy AV, Veal GJ. Characterisation of the roles of ABCB1, ABCC1, ABCC2 and ABCG2 in the transport and pharmacokinetics of actinomycin D in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2013;85(1):29-37.
49. Sun H, Pang KS. Permeability, transport, and metabolism of solutes in Caco-2 cell monolayers: a theoretical study. *Drug Metab Dispos*. 2008;36(1):102-23.
50. Rubas W, Cromwell ME, Shahrokh Z, Villagran J, Nguyen TN, Wellton M, et al. Flux measurements across Caco-2 monolayers may predict transport in human large intestinal tissue. *J Pharm Sci*. 1996;85(2):165-9.
51. Hubatsch I, Ragnarsson EG, Artursson P. Determination of drug permeability and prediction of drug absorption in Caco-2 monolayers. *Nat Protoc*. 2007;2(9):2111-9.
52. Juliano RL, Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochimica et biophysica acta*. 1976;455(1):152-62.
53. Okabe M, Szakacs G, Reimers MA, Suzuki T, Hall MD, Abe T, et al. Profiling SLCO and SLC22 genes in the NCI-60 cancer cell lines to identify drug uptake transporters. *Mol Cancer Ther*. 2008;7(9):3081-91.
54. Szakacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C, Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat Rev Drug Discov*. 2006;5(3):219-34.

55. Chong S, Dando SA, Soucek KM, Morrison RA. In vitro permeability through caco-2 cells is not quantitatively predictive of in vivo absorption for peptide-like drugs absorbed via the dipeptide transporter system. *Pharmaceutical research*. 1996;13(1):120-3.
56. Liu D. A rapid biochemical test for measuring chemical toxicity. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*. 1981;26(2):145-9.
57. Da Violante G, Zerrouk N, Richard I, Provot G, Chaumeil JC, Arnaud P. Evaluation of the cytotoxicity effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on Caco2/TC7 colon tumor cell cultures. *Biological & pharmaceutical bulletin*. 2002;25(12):1600-3.
58. Davanco MG, Campos ML, Rosa TA, Padilha EC, Alzate AH, Rolim LA, et al. Benznidazole Extended-Release Tablets for Improved Treatment of Chagas Disease: Preclinical Pharmacokinetic Study. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016;60(4):2492-8.
59. Anderle P, Niederer E, Rubas W, Hilgendorf C, Spahn-Langguth H, Wunderli-Allenspach H, et al. P-Glycoprotein (P-gp) mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: the influence of culturing conditions and drug exposure on P-gp expression levels. *J Pharm Sci*. 1998;87(6):757-62.
60. Han Y, Tan TM, Lim LY. Effects of capsaicin on P-gp function and expression in Caco-2 cells. *Biochem Pharmacol*. 2006;71(12):1727-34.
61. Crespi CL, Fox L, Stocker P, Hu M, Steimel DT. Analysis of drug transport and metabolism in cell monolayer systems that have been modified by cytochrome P4503A4 cDNA-expression. *Eur J Pharm Sci*. 2000;12(1):63-8.
62. Schmiedlin-Ren P, Thummel KE, Fisher JM, Paine MF, Lown KS, Watkins PB. Expression of enzymatically active CYP3A4 by Caco-2 cells grown on extracellular matrix-coated permeable supports in the presence of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃. *Molecular pharmacology*. 1997;51(5):741-54.
63. Liu G, Franssen E, Fitch MI, Warner E. Patient preferences for oral versus intravenous palliative chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(1):110-5.
64. Martinez MN, Amidon GL. A mechanistic approach to understanding the factors affecting drug absorption: a review of fundamentals. *Journal of clinical pharmacology*. 2002;42(6):620-43.

65. Amidon GL, Lennernas H, Shah VP, Crison JR. A theoretical basis for a biopharmaceutical drug classification: the correlation of in vitro drug product dissolution and in vivo bioavailability. *Pharmaceutical research*. 1995;12(3):413-20.
66. Yazdani M, Briggs K, Jankovsky C, Hawi A. The "high solubility" definition of the current FDA Guidance on Biopharmaceutical Classification System may be too strict for acidic drugs. *Pharmaceutical research*. 2004;21(2):293-9.
67. Benet LZ. The role of BCS (biopharmaceutics classification system) and BDDCS (biopharmaceutics drug disposition classification system) in drug development. *J Pharm Sci*. 2013;102(1):34-42.
68. Ku MS. Use of the Biopharmaceutical Classification System in early drug development. *The AAPS journal*. 2008;10(1):208-12.
69. Kerns EH, Di L. Multivariate pharmaceutical profiling for drug discovery. *Current topics in medicinal chemistry*. 2002;2(1):87-98.
70. Wagner AD, Elkin L, Mosure K, Gallagher L, Stavola LK, Soars MG, et al. Development of a high-throughput mass spectrometry based analytical method to support an in vitro OATP1B1 inhibition screening assay. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*. 2016;30(15):1787-96.
71. da Silva Junior JB, Dezani TM, Dezani AB, dos Reis Serra CH. Evaluating Potential P-gp Substrates: Main Aspects to Choose the Adequate Permeability Model for Assessing Gastrointestinal Drug Absorption. *Mini reviews in medicinal chemistry*. 2015;15(10):858-71.
72. Karlgren M, Simoff I, Backlund M, Wegler C, Keiser M, Handin N, et al. A CRISPR-Cas9 Generated MDCK Cell Line Expressing Human MDR1 Without Endogenous Canine MDR1 (cABCB1): An Improved Tool for Drug Efflux Studies. *J Pharm Sci*. 2017;106(9):2909-13.
73. Eglén RM, Randle DH. Drug Discovery Goes Three-Dimensional: Goodbye to Flat High-Throughput Screening? *Assay Drug Dev Technol*. 2015;13(5):262-5.
74. White RE, Manitpisitkul P. Pharmacokinetic theory of cassette dosing in drug discovery screening. *Drug Metab Dispos*. 2001;29(7):957-66.
75. Berman J, Halm K, Adkison K, Shaffer J. Simultaneous pharmacokinetic screening of a mixture of compounds in the dog using API LC/MS/MS analysis for increased throughput. *Journal of medicinal chemistry*. 1997;40(6):827-9.

76. Nagilla R, Nord M, McAtee JJ, Jolivette LJ. Cassette dosing for pharmacokinetic screening in drug discovery: comparison of clearance, volume of distribution, half-life, mean residence time, and oral bioavailability obtained by cassette and discrete dosing in rats. *J Pharm Sci.* 2011;100(9):3862-74.
77. Lee MS, Kerns EH. LC/MS applications in drug development. *Mass spectrometry reviews.* 1999;18(3-4):187-279.
78. Hsieh Y, Korfmacher WA. Increasing speed and throughput when using HPLC-MS/MS systems for drug metabolism and pharmacokinetic screening. *Current drug metabolism.* 2006;7(5):479-89.
79. Olah TV, McLoughlin DA, Gilbert JD. The simultaneous determination of mixtures of drug candidates by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as an in vivo drug screening procedure. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 1997;11(1):17-23.
80. Manitpisitkul P, White RE. Whatever happened to cassette-dosing pharmacokinetics? *Drug Discovery Today.* 2004;9(15):652-8.
81. Kuo BS, Van Noord T, Feng MR, Wright DS. Sample pooling to expedite bioanalysis and pharmacokinetic research. *J Pharm Biomed Anal.* 1998;16(5):837-46.
82. Bueters T, Dahlstrom J, Kvalvagnaes K, Betner I, Briem S. High-throughput analysis of standardized pharmacokinetic studies in the rat using sample pooling and UPLC-MS/MS. *J Pharm Biomed Anal.* 2011;55(5):1120-6.
83. Cai Z, Sinhababu AK, Harrelson S. Simultaneous quantitative cassette analysis of drugs and detection of their metabolites by high performance liquid chromatography/ion trap mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM.* 2000;14(18):1637-43.
84. Cox PJ, Ryan DA, Hollis FJ, Harris AM, Miller AK, Vousden M, et al. Absorption, disposition, and metabolism of rosiglitazone, a potent thiazolidinedione insulin sensitizer, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2000;28(7):772-80.
85. Mei H, Korfmacher W, Morrison R. Rapid in vivo oral screening in rats: reliability, acceptance criteria, and filtering efficiency. *The AAPS journal.* 2006;8(3):E493-500.

86. Arns S, Tan J, Sun S, Galey A, Zisman N, Ross F, et al. Assessing the oral bioavailability of difluorosialic acid prodrugs, potent viral neuraminidase inhibitors, using a snapshot PK screening assay. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(12):2505-9.
87. Araújo TG, Carvalho BM, Martins da Fonseca CS, de Lima MdCA, Galdino SL, da Rocha Pitta I, et al. Metabolic effects of benzylidene thiazolidinedione derivatives in high-fat fed mice. *Medicinal Chemistry Research*. 2011;21(9):2408-14.
88. Abbasi MM, Valizadeh H, Hamishehkar H, Zakeri-Milani P. Inhibition of P-glycoprotein expression and function by anti-diabetic drugs gliclazide, metformin, and pioglitazone in vitro and in situ. *Research in pharmaceutical sciences*. 2016;11(3):177-86.
89. Chang KL, Pee HN, Yang S, Ho PC. Influence of drug transporters and stereoselectivity on the brain penetration of pioglitazone as a potential medicine against Alzheimer's disease. *Scientific reports*. 2015;5:9000.
90. Wu C-Y, Benet LZ. Predicting Drug Disposition via Application of BCS: Transport/Absorption/ Elimination Interplay and Development of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Pharmaceutical research*. 2005;22(1):11-23.
91. Budde K, Neumayer HH, Fritsche L, Sulowicz W, Stompor T, Eckland D. The pharmacokinetics of pioglitazone in patients with impaired renal function. *British journal of clinical pharmacology*. 2003;55(4):368-74.
92. Kawaguchi-Suzuki M, Bril F, Sanchez PP, Cusi K, Frye RF. A validated liquid chromatography tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of pioglitazone, hydroxypioglitazone, and ketopioglitazone in human plasma and its application to a clinical study. *Journal of Chromatography B*. 2014;969(Supplement C):219-23.
93. Gall Z, Vancea S, Szilagyi T, Gall O, Kolcsar M. Dose-dependent pharmacokinetics and brain penetration of rufinamide following intravenous and oral administration to rats. *Eur J Pharm Sci*. 2015;68:106-13.
94. Buyse G, Silberstein J, Goemans N, Casaer P. Fibrodysplasia ossificans progressiva: Still turning into wood after 300 years? *European Journal of Pediatrics*. 1995;154(9):694-9.
95. Shore EM, Kaplan FS. Insights from a rare genetic disorder of extra-skeletal bone formation, fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). *Bone*. 2008;43(3):427-33.

96. Pignolo RJ, Shore EM, Kaplan FS. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: Diagnosis, Management, and Therapeutic Horizons. *Pediatric endocrinology reviews* : PER. 2013;10(02):437-48.
97. Yu PB, Deng DY, Lai CS, Hong CC, Cuny GD, Boussein ML, et al. BMP type I receptor inhibition reduces heterotopic [corrected] ossification. *Nat Med*. 2008;14(12):1363-9.
98. Shore EM, Xu M, Feldman GJ, Fenstermacher DA, Cho TJ, Choi IH, et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic fibrodysplasia ossificans progressiva. *Nat Genet*. 2006;38(5):525-7.
99. Groppe JC, Shore EM, Kaplan FS. Functional modeling of the ACVR1 (R206H) mutation in FOP. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;462:87-92.
100. Hatsell SJ, Idone V, Wolken DM, Huang L, Kim HJ, Wang L, et al. ACVR1R206H receptor mutation causes fibrodysplasia ossificans progressiva by imparting responsiveness to activin A. *Science translational medicine*. 2015;7(303):303ra137.
101. Hino K, Ikeya M, Horigome K, Matsumoto Y, Ebise H, Nishio M, et al. Neofunction of ACVR1 in fibrodysplasia ossificans progressiva. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(50):15438-43.
102. Alessi Wolken DM, Idone V, Hatsell SJ, Yu PB, Economides AN. The obligatory role of Activin A in the formation of heterotopic bone in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. *Bone*. 2017.
103. Yu PB, Hong CC, Sachidanandan C, Babitt JL, Deng DY, Hoyng SA, et al. Dorsomorphin inhibits BMP signals required for embryogenesis and iron metabolism. *Nat Chem Biol*. 2008;4(1):33-41.
104. Cuny GD, Yu PB, Laha JK, Xing X, Liu JF, Lai CS, et al. Structure-activity relationship study of bone morphogenetic protein (BMP) signaling inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*. 2008;18(15):4388-92.
105. Gunaratna C. Drug Metabolism & Pharmacokinetics in Drug Discovery: A Primer for Bioanalytical Chemists, Part I. *Current Separations*. 2001;19(3):5.
106. Hyland R, Jones B, van de Waterbeemd H. Utility of human/human-derived reagents in drug discovery and development: An industrial perspective. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 2006;21(2):179-83.

107. Zhang Z, Zhu M, Tang W. Metabolite identification and profiling in drug design: current practice and future directions. *Current pharmaceutical design*. 2009;15(19):2220-35.
108. Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *J Med Chem*. 2010;53(24):8441-60.
109. Hutzler JM, Obach RS, Dalvie D, Zientek MA. Strategies for a comprehensive understanding of metabolism by aldehyde oxidase. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2013;9(2):153-68.
110. Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs. *J Clin Pharmacol*. 2004;44(1):7-19.
111. Garattini E, Terao M. Increasing recognition of the importance of aldehyde oxidase in drug development and discovery. *Drug Metab Rev*. 2011;43(3):374-86.
112. Zetterberg C, Maltais F, Laitinen L, Liao S, Tsao H, Chakilam A, et al. VX-509 (Decernotinib)-Mediated CYP3A Time-Dependent Inhibition: An Aldehyde Oxidase Metabolite as a Perpetrator of Drug-Drug Interactions. *Drug Metab Dispos*. 2016;44(8):1286-95.
113. Rousu T, Pelkonen O, Tolonen A. Rapid detection and characterization of reactive drug metabolites in vitro using several isotope-labeled trapping agents and ultra-performance liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2009;23(6):843-55.
114. Ma S, Subramanian R. Detecting and characterizing reactive metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom*. 2006;41(9):1121-39.
115. Olsen J, Li C, Bjørnsdóttir I, Sidenius U, Hansen SH, Benet LZ. In Vitro and in Vivo Studies on Acyl-Coenzyme A-Dependent Bioactivation of Zomepirac in Rats. *Chemical Research in Toxicology*. 2005;18(11):1729-36.
116. Alvarez-Sánchez R, Montavon F, Hartung T, Pähler A. Thiazolidinedione Bioactivation: A Comparison of the Bioactivation Potentials of Troglitazone, Rosiglitazone, and Pioglitazone Using Stable Isotope-Labeled Analogues and Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Chemical Research in Toxicology*. 2006;19(8):1106-16.
117. Kassahun K, Pearson PG, Tang W, McIntosh I, Leung K, Elmore C, et al. Studies on the Metabolism of Troglitazone to Reactive Intermediates in Vitro and in Vivo. Evidence for Novel

Biotransformation Pathways Involving Quinone Methide Formation and Thiazolidinedione Ring Scission. *Chemical Research in Toxicology*. 2001;14(1):62-70.

118. Ju C, Uetrecht JP. Mechanism of Idiosyncratic Drug Reactions: Reactive Metabolites Formation, Protein Binding and the Regulation of the Immune System. *Current Drug Metabolism*. 2002;3(4):367-77.

119. Kalgutkar AS FG, Didiuk MT, Bauman J. Toxicophores reactive metabolites and drug safety when is it a cause for concern? *Expert Review of Clinical Pharmacology*. 2008;1(4):17.

120. Alimardanov A, Cuny GD, Grewal GS, Lee A, Mckew JC, Mohedas AH, et al. Bmp inhibitors and methods of use thereof. *Google Patents*; 2014.

121. Bentzien J HE, Kemper RA, Brewer ML, Dyekjaer JD, East SP, Whittaker M. An in silico method for predicting Ames activities of primary aromatic amines by calculating the stabilities of nitrenium ions. *J Chem Inf Model*. 2010;50(2):23.

122. Hutzler JM, Yang Y-S, Brown C, Heyward S, Moeller T. Aldehyde Oxidase Activity in Donor-Matched Fresh and Cryopreserved Human Hepatocytes and Assessment of Variability in 75 Donors. *Drug Metabolism and Disposition*. 2014;42(6):1090-7.

123. Terao M, Kurosaki M, Barzago MM, Varasano E, Boldetti A, Bastone A, et al. Avian and canine aldehyde oxidases. Novel insights into the biology and evolution of molybdo-flavoenzymes. *J Biol Chem*. 2006;281(28):19748-61.

124. Choughule KV, Barr JT, Jones JP. Evaluation of rhesus monkey and guinea pig hepatic cytosol fractions as models for human aldehyde oxidase. *Drug Metab Dispos*. 2013;41(10):1852-8.

125. Dalvie D, Xiang C, Kang P, Zhou S. Interspecies variation in the metabolism of zoniporide by aldehyde oxidase. *Xenobiotica*. 2013;43(5):399-408.

126. Jensen KG, Jacobsen AM, Bundgaard C, Nilausen DO, Thale Z, Chandrasena G, et al. Lack of exposure in a first-in-man study due to aldehyde oxidase metabolism: Investigated by use of ¹⁴C-microdose, humanized mice, monkey pharmacokinetics and in vitro methods. *Drug Metab Dispos*. 2016.

127. Murphy PJ. Enzymatic Oxidation of Nicotine to Nicotine $\Delta 1'(5')$ Iminium Ion : A Newly Discovered Intermediate in the Metabolism of Nicotine. *Journal of Biological Chemistry*. 1973;248(8):2796-800.

128. Gorrod JW, Aislaintner G. The metabolism of alicyclic amines to reactive iminium ion intermediates. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1994;19(3):9.
129. Harrison JH, Jollow DJ. Role of aniline metabolites in aniline-induced hemolytic anemia. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 1986;238(3):1045.
130. Shinkai Y, Li S, Kikuchi T, Kumagai Y. Participation of metabolic activation of 2,4,6-trinitrotoluene to 4-hydroxylamino-2,6-dinitrotoluene in hematotoxicity. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2015;40(5):597-604.
131. Mašič LP. Role of cyclic tertiary amine bioactivation to reactive iminium species: Structure toxicity relationship. *Current Drug Metabolism*. 2011;12(1):16.
132. Zak M, Liederer BM, Sampath D, Yuen PW, Bair KW, Baumeister T, et al. Identification of nicotinamide phosphoribosyltransferase (NAMPT) inhibitors with no evidence of CYP3A4 time-dependent inhibition and improved aqueous solubility. *Bioorg Med Chem Lett*. 2015;25(3):529-41.
133. Kalgutkar AS. Should the incorporation of structural alerts be restricted in drug design? An analysis of structure-toxicity trends with aniline-based drugs. *Current Medicinal Chemistry*. 2015;22:27.
134. Di Girolamo F, Campanella L, Samperi R, Bachi A. Mass spectrometric identification of hemoglobin modifications induced by nitrosobenzene. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2009;72(5):1601-8.
135. Wang Y, Gao H, Na XL, Dong SY, Dong HW, Yu J, et al. Aniline Induces Oxidative Stress and Apoptosis of Primary Cultured Hepatocytes. *Int J Environ Res Public Health*. 2016;13(12).
136. Bentzien J, Hickey ER, Kemper RA, Brewer ML, Dyekjaer JD, East SP, et al. An in silico method for predicting Ames activities of primary aromatic amines by calculating the stabilities of nitrenium ions. *Journal of chemical information and modeling*. 2010;50(2):274-97.
137. Mesaros EF, Thieu TV, Wells GJ, Zifcsak CA, Wagner JC, Breslin HJ, et al. Strategies to mitigate the bioactivation of 2-anilino-7-aryl-pyrrolo[2,1-f][1,2,4]triazines: identification of orally bioavailable, efficacious ALK inhibitors. *J Med Chem*. 2012;55(1):115-25.
138. Obach RS, LaChapelle EA, Brodney MA, Vanase-Frawley M, Kauffman GW, Sawant-Basak A. Strategies toward optimization of the metabolism of a series of serotonin-4 partial agonists: investigation of azetidines as piperidine isosteres. *Xenobiotica*. 2016;46(12):1112-21.

139. Mohedas AH, Wang Y, Sanvitale CE, Canning P, Choi S, Xing X, et al. Structure-activity relationship of 3,5-diaryl-2-aminopyridine ALK2 inhibitors reveals unaltered binding affinity for fibrodysplasia ossificans progressiva causing mutants. *J Med Chem.* 2014;57(19):7900-15.
140. Mohedas AH, Xing X, Armstrong KA, Bullock AN, Cuny GD, Yu PB. Development of an ALK2-biased BMP type I receptor kinase inhibitor. *ACS Chem Biol.* 2013;8(6):1291-302.
141. Cappato S, Tonachini L, Giacomelli F, Tirone M, Galiotta LJ, Sormani M, et al. High-throughput screening for modulators of ACVR1 transcription: discovery of potential therapeutics for fibrodysplasia ossificans progressiva. *Dis Model Mech.* 2016;9(6):685-96.
142. Chakkalakal SA, Uchibe K, Convente MR, Zhang D, Economides AN, Kaplan FS, et al. Palovarotene Inhibits Heterotopic Ossification and Maintains Limb Mobility and Growth in Mice With the Human ACVR1(R206H) Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) Mutation. *J Bone Miner Res.* 2016;31(9):1666-75.
143. Dormandy J, Bhattacharya M, van Troostenburg de Bruyn AR. Safety and tolerability of pioglitazone in high-risk patients with type 2 diabetes: an overview of data from PROactive. *Drug safety.* 2009;32(3):187-202.
144. Kong AP, Yamasaki A, Ozaki R, Saito H, Asami T, Ohwada S, et al. A randomized-controlled trial to investigate the effects of rivoglitazone, a novel PPAR gamma agonist on glucose-lipid control in type 2 diabetes. *Diabetes Obes Metab.* 2011;13(9):806-13.
145. Truitt KE, Goldberg RB, Rosenstock J, Chou HS, Merante D, Triscari J, et al. A 26-week, placebo- and pioglitazone-controlled, dose-ranging study of rivoglitazone, a novel thiazolidinedione for the treatment of type 2 diabetes. *Curr Med Res Opin.* 2010;26(6):1321-31.
146. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Adopted by the Council on 30th March 1989. 1989.
147. Pan XM, Li J, Gan R, Hu XN. Preparation and in vitro evaluation of enteric-coated tablets of rosiglitazone sodium. *Saudi Pharm J.* 2015;23(5):581-6.
148. Kulkarni AP, Shahnawaz M, Zaheer Z, Dehghan MHG. Development and Validation of a Dissolution Method for Pioglitazone Tablets. *Dissolution Technologies.* 2012;19(4):36-46.
149. Wring SA, Randolph R, Park S, Abruzzo G, Chen Q, Flattery A, et al. Preclinical Pharmacokinetics and Pharmacodynamic Target of SCY-078, a First-in-Class Orally Active

Antifungal Glucan Synthesis Inhibitor, in Murine Models of Disseminated Candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(4).

150. Petersen AB, Andersen NS, Konotop G, Hanafiah NH, Raab MS, Kramer A, et al. Synthesis and formulation studies of griseofulvin analogues with improved solubility and metabolic stability. *Eur J Med Chem.* 2017;130:240-7.

151. Giaginis C, Theocharis S, Tsantili-Kakoulidou A. Investigation of the lipophilic behaviour of some thiazolidinediones. Relationships with PPAR-gamma activity. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2007;857(2):181-7.

152. Umathe SN, Dixit PV, Kumar V, Bansod KU, Wanjari MM. Quercetin pretreatment increases the bioavailability of pioglitazone in rats: involvement of CYP3A inhibition. *Biochem Pharmacol.* 2008;75(8):1670-6.

153. Bolton GC, Keogh JP, East PD, Hollis FJ, Shore AD. The fate of a thiazolidinedione antidiabetic agent in rat and dog. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems.* 1996;26(6):627-36.