

博士学位論文

創薬探索段階でのフラビン含有酸素添加酵素の
薬物酸化反応への寄与評価と
基質認識予測に関する研究

令和3年度

谷口（瀧澤）友美

目次

略号.....	iii
序論.....	1
第 I 章 フラビン含有酸素添加酵素の寄与を考慮した薬物酸化的代謝反応条件.....	4
第 1 節 緒言.....	4
第 2 節 実験材料および実験方法.....	5
I-2-i 試薬および実験材料.....	5
I-2-ii Benzydamine の酸化酵素活性の測定と代謝活性値の算出.....	6
第 3 節 結果.....	8
I-3-i 探索段階での FMO の寄与を考慮した薬物酸化的代謝反応条件.....	8
I-3-ii ヒト肝 benzydamine <i>N</i> -酸化および <i>N</i> -脱メチル化に寄与する酵素分子種の推定	15
第 4 節 考察.....	18
第 5 節 小括.....	21
第 II 章 化合物構造由来物性値に基づく FMO 基質該当予測とその実証.....	22
第 1 節 緒言.....	22
第 2 節 方法.....	22
第 3 節 結果.....	24
II-3-i 構造由来物性値に基づく FMO 基質該当予測.....	24
II-3-ii 酸解離定数に基づく FMO 寄与予測の実験的検証.....	31
第 4 節 考察.....	35
第 5 節 小括.....	38
総括.....	39
本論文内容の誌上発表.....	42

謝辞.....	4 3
参考文献	4 4

略号

1-ABT	1-aminobenzotriazole
CYP	individual form of cytochrome P450
DMSO	dimethyl sulfoxide
FAD	flavin adenine dinucleotide
FDA	Food and Drug Administration
FMO	flavin-containing monooxygenase (EC 1.14.13.8)
K_m	Michaelis constant
LC	liquid chromatography
LC-MS/MS	liquid chromatography-tandem mass spectrometry
NADPH	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate
P450	general term for cytochrome P450 (EC.1.14.14.1)
pH	power of hydrogen
pKa	acidity constant
SD	standard deviation
V_{max}	maximum velocity

序論

医薬品開発において、その代謝反応に関与する薬物代謝酵素の同定は重要である。米国で 2002 年に処方された上位 200 医薬品の代謝酵素を調査した結果、cytochrome P450 (総称を P450、個別分子種を CYP と記す) により代謝消失される医薬品の割合が最も多かった (Williams et al., 2004)。2015 年から 2020 年に米国食品医薬品局 (Food and Drug Administration、FDA) により新たに承認された医薬品の統計 (Bhutani et al., 2021) においても、P450 により代謝消失される医薬品の割合が依然最も高いことが報告された。P450 に次いで医薬品代謝に関与する酵素としては、uridine 5'-diphosphate - グルクロン酸抱合酵素、エステラーゼおよびフラビン含有酸素添加酵素 (FMO) などが報告されている (Williams et al., 2004; Bhutani et al., 2021)。

日本の厚生労働省が 2018 年 7 月に発信した「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」 (<https://www.mhlw.go.jp/hourei/doc/tsuchi/T180724I0150.pdf>、以下薬物相互作用ガイドラインと記す) では、医薬品開発時における薬物間相互作用の評価にあたり、現時点において科学的に妥当である一般的な検討の手順が提示されている。米国 FDA および欧州 European Medicines Agency においても同様のガイダンスおよびガイドラインが、それぞれ 2020 年 1 月および 2012 年 6 月に発出されている (<https://www.fda.gov/media/134582/download>、https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-investigation-drug-interactions_en.pdf)。いずれのガイダンスあるいはガイドラインにおいても、開発する医薬品の体内からの消失に関わる薬物代謝酵素の同定方法が記載されている。それぞれ検討を必要とする多くの薬物代謝酵素およびその分子種が具体的に記載され、それぞれの酵素の被験薬消失への寄与の見積りが求められている。検討の結果、体内からの消失の 25% 以上を担う代謝酵素が存在する場合、その代謝酵素を阻害する医薬品との薬物間相互作用を確認する臨床試験の実施が要求される。したがって、化合物の

消失に関わる各代謝酵素の寄与率を早期に明らかにすることは、医薬品開発の臨床試験計画策定に重要である。さらに、同ガイダンスでは、代謝酵素同定試験実施にあたり、実験系の陽性対照となるプローブ基質の組み込みが推奨されているが、具体的な記載はない。代謝酵素により生成する代謝物が異なる場合は、臨床試験で代謝物を定量することで酵素の寄与が推定可能であるが、異なる代謝酵素が同一の代謝物生成に関与する場合、*in vitro* 実験での寄与の評価が必要となる。FMO が関与する酸化代謝反応は、FMO 単独で触媒される場合もあるが、同時に P450 が寄与する報告例も多い (Nakamaru et al., 2014a; Yamazaki et al., 2014)。各酵素種により至適反応条件は異なるため、スクリーニングでの *in vitro* の実験条件の設定は慎重に行う必要がある (Williams et al., 2004)。代謝酵素として最も報告例が多い P450 に関しては、酵素活性に及ぼす有機溶媒の影響など、代謝実験条件を設定するための酵素特性に関する知見が多数報告されているが (Hickman et al., 1998)、基本的な特性が詳細に検討されていない薬物代謝酵素も多い。

FMO (EC 1.14.13.8) は窒素、硫黄、リンまたはセレン原子を含む広範囲の求核ヘテロ原子へ NADPH 依存的に分子状酸素を添加する反応を触媒する酸素原子添加酵素である (Krueger and Williams, 2005; Cashman and Zhang, 2006; Phillips and Shephard, 2020)。ヒトにおいては FMO1-FMO5 分子種が存在し (Hernandez et al., 2004)、FMO1 は胎児の肝臓 (Koukouritaki et al., 2002) および成人の腎臓 (Yeung et al., 2000) で発現している。FMO3 および FMO5 は成人肝臓の小胞体膜に局在しており、FMO3 のヒト肝臓での発現量は、医薬品代謝にかかわる薬物代謝酵素として最も報告の多い CYP3A4 に匹敵する (Koukouritaki and Hines, 2005; Shimizu et al., 2011)。しかし、FMO 酵素を介する臨床での薬物相互作用報告は少ない (Cashman, 2008)。さらに、P450 とは対照的に酵素誘導を受けにくい FMO 酵素の代謝反応への寄与を明らかにし、創薬に活用することは、医薬品の開発にとって有益な情報となる (Krueger and Williams, 2005; Cashman, 2008)。しかしながら、P450 に比べ FMO の認知度は低く、開発後期になるまで代謝への寄与に気付けない場合も想定される (Liu et al., 2018)。

一般に医薬品のハイスループット代謝スクリーニング系は、大規模分注ロボット等を活用し、医薬品の代謝消失への関与報告が最も多い P450 が触媒する酵素反応に最適化した反応条件に設定されている (Williams et al., 2004; Wienkers and Heath, 2005)。製薬企業各社は化合物溶液を保存し易く、取り扱いが容易な有機溶媒である dimethyl sulfoxide (DMSO) で調製し、保管、使用している (Bowes et al., 2006)。しかしながら、P450 に最適化された実験条件や有機溶媒 DMSO などが FMO 酵素活性におよぼす影響は詳細には検討されていない。最適化されていない条件下での代謝酵素同定試験の実施は、FMO 酵素の寄与を著しく見誤る危険性がある。

以上の背景から、本研究は酸化的薬物代謝への FMO 寄与を推定する *in vitro* 代謝実験条件および化合物の構造由来物性値に基づく *in silico* FMO 基質該当予測法提案を目的とした。第 I 章では、FMO 酵素の特性を明らかにし、代謝反応への FMO および P450 それぞれの寄与を精度よく推定できる *in vitro* 実験条件の設定を行った。さらに、薬物代謝酵素同定に関する 3 極ガイダンスにて未記載の FMO が代謝に寄与する場合の陽性対照化合物候補として benzydamine を推奨する知見を得た。一方、医薬品の大規模代謝スクリーニング実験は、P450 に至適な条件にて候補化合物選択を行わざるを得ないことから (Wienkers and Heath, 2005)、FMO が代謝に関与する可能性を簡便に予測する方法の開発に期待が寄せられている。そこで、第 II 章では FMO 酵素の代謝への寄与について、構造情報を用いて *in silico* により推定する方法を探索した。化合物構造の塩基性を算出し、pKa(base) 8.4 以上を指標とすることで、FMO 酵素の酸化的代謝への寄与を推察できる可能性を見出した。FMO 寄与推定のための簡便な *in vitro* 実験系を用いて、*in silico* 予測の妥当性を実験的に検証し、*in silico* pKa (base) 値を用いることで FMO の酸化的代謝の寄与が予測可能であることを実証した。以上、FMO 酵素が関わる薬物代謝の寄与を正確に算出する実験条件の設定とその実験系陽性対照化合物を提案し、ソフトウェアによる事前予測法の活用も含めた医薬品スクリーニング時における FMO 酵素の寄与同定を目的とした推奨手順を統合して提示できたので、これらの新知見を以下に詳述する。

第I章 フラビン含有酸素添加酵素の寄与を考慮した薬物酸化的代謝反応条件

第1節 緒言

薬物代謝酵素同定に関する米国および日本当局が発布するガイドラインあるいはガイダンス内において、FMO は検討を要する代謝酵素として明記されている。FMO は抗癌薬 tozasertib (Catucci et al., 2012) や dipeptidyl peptidase-IV (DPP-IV) 阻害剤 teneligliptin (Nakamaru et al., 2014a) などの医薬品代謝に関与することが報告されている。しかし、FMO は P450 と比較するとその注目度は低く、医薬品酸化反応への寄与の可能性すら検討されない場合も想定される (Barbier et al., 2015)。FMO は酵素タンパク質に NADPH が結合することにより、その酸化サイクルが開始され、医薬品に対する見かけの K_m 値が高い。これらの知見から、FMO が関与する臨床薬物相互作用報告が少ないとされている (Krueger and Williams, 2005; Cashman, 2008)。一方、P450 とは対照的に酵素誘導を受けにくい FMO の代謝への寄与を明らかにすることは、医薬品の開発計画および市販後の使用方法を決定する上で有益な情報となる (Krueger and Williams, 2005; Cashman, 2008)。

一般に、医薬品開発における薬物代謝酵素同定の実験系は P450 に重きを置いて各種条件が設定されている場合が多い (Wienkers and Heath, 2005)。P450 に最適化された条件下での FMO 酵素の活性については、十分に明らかにされておらず、熱安定性や使用可能な有機溶媒の種類などに関する実験の注意点は明らかとなっていない (Grothusen et al., 1996; Yeung et al., 2000)。FMO にとって適切ではない実験条件での代謝酵素同定試験の実施は、開発医薬品の代謝分子種推定を誤った結論に導く懸念が持たれる。

非ステロイド性抗炎症薬 benzydamine の代謝には、*N*-酸化と *N*-脱メチル化の両酸化経路がある (Stormer et al., 2000; Yeung et al., 2000) (Fig. I-1)。そこで、第 I 章では、主にヒト肝ミクロゾームならびに遺伝子組換えヒト FMO 酵素およびヒト P450 酵

素を用い、FMO および P450 活性の指標として benzydamine 代謝を指標に網羅的に検討し、酵素学的特徴を明らかにした。

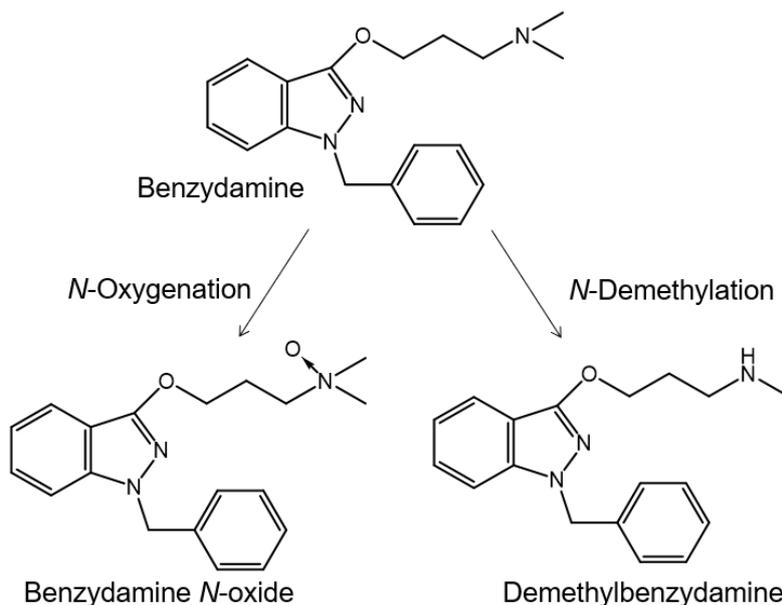


Fig. I-1. Benzydamine *N*-oxygenation and *N*-demethylation pathways mediated by liver microsomes.

第2節 実験材料および実験方法

I-2-i 試薬および実験材料

Benzydamine hydrochloride、benzydamine *N*-oxide、1-aminobenzotriazol、methimazole および quinidine hydrochloride monohydrate は、Sigma-Aldrich (St. Louis、MO) から入手した。Demethylbenzydamine hydrochloride および benzydamine-d6 *N*-oxide (分析内標準物質) は Toronto Research Chemicals (North York、ON、Canada) から購入し、ketoconazole および dimethyl sulfoxide (DMSO、純度 100.0%) は富士フィルム和光純薬 (大阪) から購入した。雄 Sprague-Dawley ラット、雄ビーグル犬、雄カニクイザルおよびヒト肝ミクロゾーム (200 ドナーのプール)、ヒト腎ミクロゾーム (8 ドナー

のプール) は SEKISUI XenoTech (Lenexa, KS, USA) から購入した。大腸菌発現系ラット、サルおよびヒト FMO1 および FMO3 酵素は、昭和薬科大学薬物動態学研究室より提供いただいた。ヒト P450 発現系酵素は Human CYP Bactosome (Cypex, Scotland, UK) を使用した。その他の試薬は市販品の最高グレードのものを使用した。

I-2-ii Benzydamine の酸化酵素活性の測定と代謝活性値の算出

Benzydamine 酸化反応は既報 (Uno et al., 2013; Yamazaki et al., 2014) を一部改良した条件で実施した。基本的な酵素反応は、0.1 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) の緩衝液条件、マイクロゾームタンパク質は 0.05 - 0.2 mg/mL、大腸菌発現 FMO 酵素あるいは P450 酵素は 0.6 - 20 nmol にて実施し、補酵素として NADPH 生成系を用いた。NADPH 生成系は、最終濃度 1.3 mmol/L NADP⁺、3.3 mmol/L glucose-6-phosphate、3.3 mmol/L MgCl₂、および 0.4 U/mL glucose-6-phosphate 脱水素酵素とした。基本的な反応は 5 分間、37°C でプレインキュベーションした後、基質 (0 - 1000 μmol/L) を添加して開始し、37°C で 6 - 30 分間反応させた。検討内容により一部添加順やプレインキュベーション時間を変更した。反応系に用いるタンパク量および反応時間については、各動物種に対し反応条件の最適化を行いそれぞれの種において、反応の直線性がある条件を用いた。

熱処理の影響は、0.05 - 0.2 mg/mL のマイクロゾームタンパク質を NADPH 生成系非存在下、45°C で 0、1、3、5 または 10 分間予熱する条件で検討した。熱処理後、混合物を 15 分間氷上で冷却した。その後、NADPH 生成系を添加し、5 分間 37°C でプレインキュベーションした後、基質 (5 μmol/L) を添加して反応を開始し、37°C で 6 分間 (ラット、イヌ) あるいは 30 分間 (サル、ヒト) 後に反応を停止した。*In vitro* 実験で汎用される有機溶媒および P450 と FMO に対する各阻害剤の影響を検討するため、DMSO (最終濃度 0.1% または 0.5%、14 mM または 70 mM)、methanol (0.5%)、acetonitrile (0.5%)、1-aminobenzotriazole (1-ABT、分子種非特異的 P450

阻害薬、1-2 mM)、quinidine (CYP2D6 阻害薬、1.0 μ M)、ketoconazole (CYP3A 阻害薬、0.5 μ M) および methimazole (FMO 阻害剤、200 μ M) を用いた (Hucker et al., 1967; Mori et al., 1985; Otton et al., 1988; Guo et al., 1997; Hamman et al., 2000)。いずれも反応液の 2 倍量のメタノールを添加して反応を停止した。反応混合物に内部標準物質として benzydamine-d₆ N-oxide 溶液を加えた後、遠心分離によりタンパク質を沈殿させ、上清を液体クロマトグラフィー (LC) を接続した質量分析装置で定量した。

Benzydamine N-oxide および demethylbenzydamine (脱メチル benzydamine) のクロマトグラフィー分離は、Waters Acquity UPLC システム (日本、東京、日本ウォーターズ株式会社) に接続した Acquity UPLC BEH C18 カラム (1.7 μ m、2.1 \times 50 mm) で行った。移動相には 10 mM ammonium acetate および acetonitrile を用いた。化合物の定量は Waters Quattro Premier Tandem Quadrupole Mass Spectrometer を用いて陽イオンモード下、multiple reaction monitor 法で分析した。Benzydamine N-oxide (m/z 326 \rightarrow 102)、脱メチル benzydamine (m/z 296 \rightarrow 72)、および benzydamine-d₆ N-oxide (m/z 332 \rightarrow 108) の条件で検出を行った。Benzydamine N-oxide および脱メチル benzydamine の定量は、内標準物質 benzydamine-d₆ N-oxide に対する標準物質のピーク面積比を用い、3 - 3000 nmol/L の濃度範囲で定量できることを、選択性、直線性、および定量限界の真度の指標で確認した。

反応により生成した代謝物濃度を反応時間 (min) および反応に用いた肝ミクロゾーム濃度 (mg protein/mL) あるいは発現系酵素量 (nmol/mL) で除し、それぞれの代謝物の生成速度を算出した。一部の実験においては、それぞれのゼロ (0) 分あるいはコントロール試料の活性値を 100% とし、活性残存率 (%) を算出した。

第3節 結果

I-3-i 探索段階での FMO の寄与を考慮した薬物酸化的代謝反応条件

ラット、イヌ、サルおよびヒト肝マイクロゾームを用いて benzydamine *N*-酸化および *N*-脱メチル化活性を測定した (Fig. I-2)。ヒトおよびサルに比べ、イヌとラットの肝マイクロゾームの benzydamine *N*-酸化活性は高値を示した (Fig. I-2 A)。検討した 4 動物種すべての肝マイクロゾームで benzydamine *N*-脱メチル化活性が認められた (Fig. I-2 B)。肝マイクロゾームの benzydamine *N*-酸化および *N*-脱メチル化活性の最大速度 (V_{max}) およびミカエリス定数 (K_m) を Table I-1 にまとめた。各動物種の肝マイクロゾームにおける *N*-脱メチル化活性の V_{max}/K_m 値はほぼ同等であったが、*N*-酸化活性は、サルおよびヒトに比べ、ラットが 10 倍以上、イヌにおいては 100 倍以上高く、*N*-酸化活性には種差が認められた (Table I-1)。

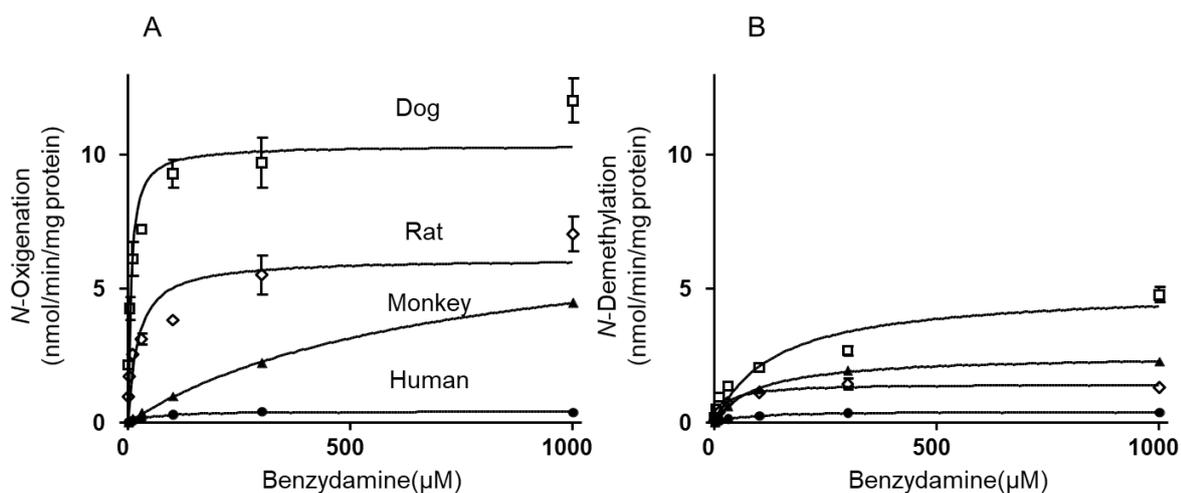


Fig. I-2. Benzydamine *N*-oxidation (A) and *N*-demethylation (B) by liver microsomes from rats, dogs, monkeys and humans.

Benzydamine (0–1000 μ M) was incubated with liver microsomes (0.050 mg protein/mL) from dogs (squares) and rats (diamonds) for 6 min and liver microsomes (0.20 mg protein/mL) from monkeys (triangles), and humans (circles) for 30 min, respectively, in the presence of an NADPH-generating system at 37°C. Data points represent means \pm SD of triplicate determinations. Kinetic parameters were calculated by non-linear regression and are shown in Table I-1.

Table I-1. Kinetic parameters for *N*-oxygenation and *N*-demethylation activities of benzydamine mediated by liver microsomes from rats, dogs, monkeys, and humans.

	<i>N</i> -Oxygenation			<i>N</i> -Demethylation		
	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m	K_m	V_{max}	V_{max}/K_m
Rat	22	6.1	280	26	1.4	55
Dog	6.2	10	1700	140	5.0	36
Monkey	710	7.7	11	95	2.5	26
Human	45	0.42	9.2	63	0.41	6.5

K_m , μM ; V_{max} , $\text{nmol}/\text{min}/\text{mg}$ protein; V_{max}/K_m , $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein.

大腸菌発現ラット、サルおよびヒト FMO1 および FMO3 酵素を用いて benzydamine *N*-酸化および *N*-脱メチル化活性を測定した。*N*-脱メチル体はすべて検出限界未満 (< 0.01 nmol/mg protein/min) であり、FMO 酵素が benzydamine *N*-脱メチル化に関与しなかった (data not shown)。得られた benzydamine *N*-酸化活性を Fig. I-3 および Table I-2 に示す。ラットにおいては FMO1、サルにおいては FMO3 とそれぞれの肝ミクロゾームの K_m 値が近値を示した (Table I-1、Table I-2)。

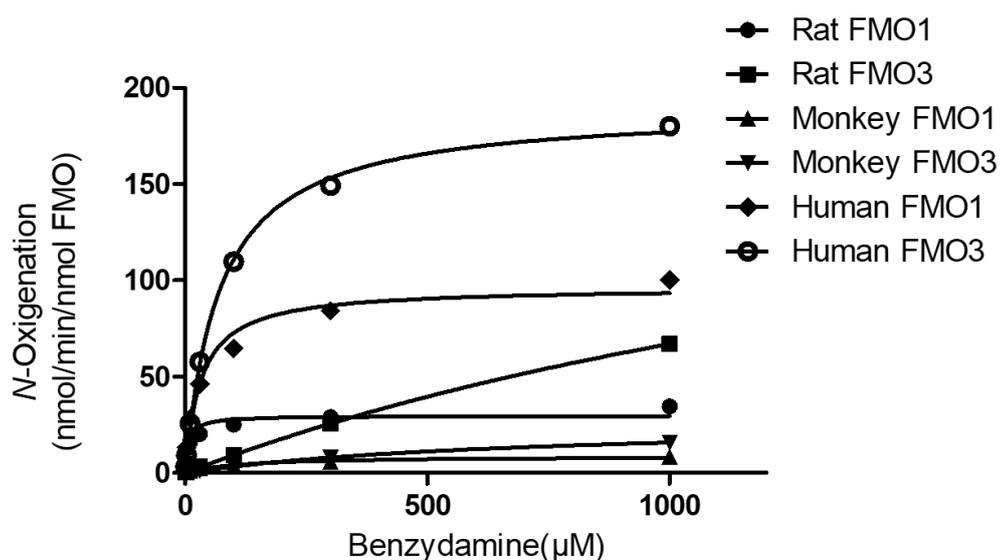


Fig. I-3. Benzylamine *N*-oxygenation by recombinant FMO1 or FMO3 from rats, monkeys, and humans.

Benzylamine (0–1000 μM) was incubated with bacterial membranes expressing enzymes from rat, monkey and human FMO1 or 3 (2 nmol/mL) for 10min, in the presence of an NADPH-generating system at 37°C. Data points represent means of duplicate determinations. Kinetic parameters were calculated by non-linear regression and are shown in Table I-2.

Table I-2. Kinetic parameters of benzylamine *N*-oxygenation in recombinant FMO1 and FMO3.

Species		K_m (μM)	V_{max} (nmol/min/nmol FMO)
Rat	FMO1	6.96	29.7
	FMO3	>1000	-
Monkey	FMO1	115	8.81
	FMO3	708	26.9
Human	FMO1	32.7	96.4
	FMO3	71.1	189

ラット、イヌ、サルおよびヒト肝マイクロゾームを用いて benzydamine *N*-酸化および *N*-脱メチル化活性への熱処理の影響を検討した。ラットおよびイヌ肝マイクロゾームの benzydamine *N*-酸化は、肝マイクロゾームを 45°C で 3 分間予熱することにより 80% 以上低下した (Fig. I-4 A)。サルおよびヒト肝マイクロゾームの benzydamine *N*-酸化活性は、45°C で 5 分間の熱処理により約 70% 低下した (Fig. I-4 A)。いずれの動物種においても、FMO 活性は補酵素 NADPH 非存在下で 45°C の熱処理により著しく影響を受けた。一方、検討したすべての動物種の肝マイクロゾームの benzydamine *N*-脱メチル化活性は 45°C、3-5 分間の熱処理で 70% 以上維持し、P450 活性は影響を受けにくかった (Fig. I-4 B)。

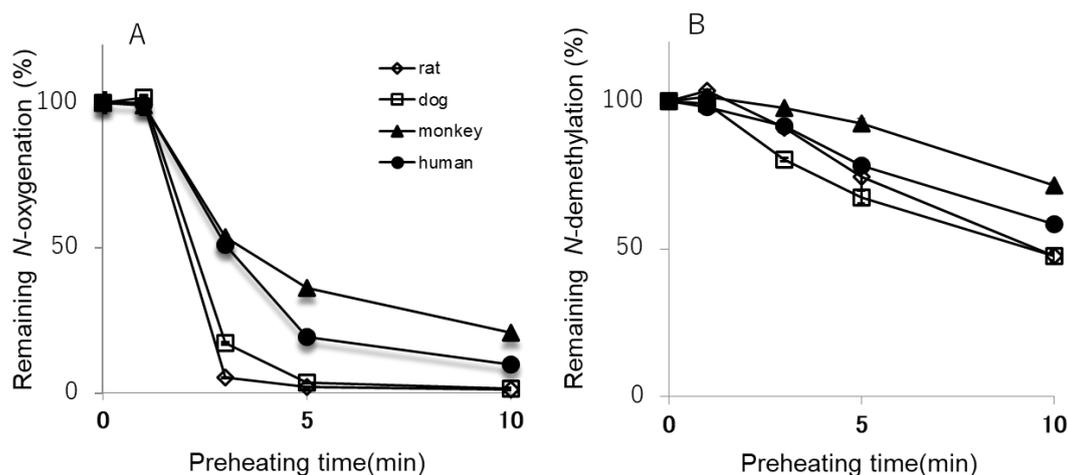


Fig. I-4. Effects on benzydamine *N*-oxygenation (A) and *N*-demethylation (B) of preheating liver microsomes at 45°C.

Liver microsomes from rats (diamonds), dogs (squares), monkeys (triangles), and humans (circles) were preheated at 45°C for 0–10 min without an NADPH-generating system. Then the percentage of remaining benzydamine *N*-oxygenation (A) and *N*-demethylation (B) activities were determined at a substrate concentration of 5.0 μ M. Control (100%) *N*-oxygenation activities of liver microsomes from rats, dogs, monkeys, and humans were 2.3, 6.2, 0.097, and 0.062 nmol/min/mg protein and control *N*-demethylation activities were 0.27, 0.82, 0.19, and 0.056 nmol/min/mg protein, respectively. Data points represent means \pm SD of triplicate determinations. Other details are the same as those in Fig. I-2.

ラット、イヌ、サルおよびヒト肝ミクロゾームに P450 分子種非特異的阻害剤である 1-ABT (Emoto et al., 2003) を添加し、benzylamine *N*-酸化活性および *N*-脱メチル化活性を測定した。Benzylamine *N*-酸化活性は、検討した 4 動物種すべての肝ミクロゾームにおいて 1-ABT の影響をほとんど受けなかったが (Fig. I-5 A)、benzylamine *N*-脱メチル化活性は 1 mmol/L の 1-ABT の添加ですべての種で 90 % 以上、ヒト肝ミクロゾームにおいては 95% 以上阻害された (Fig. I-5 B)。

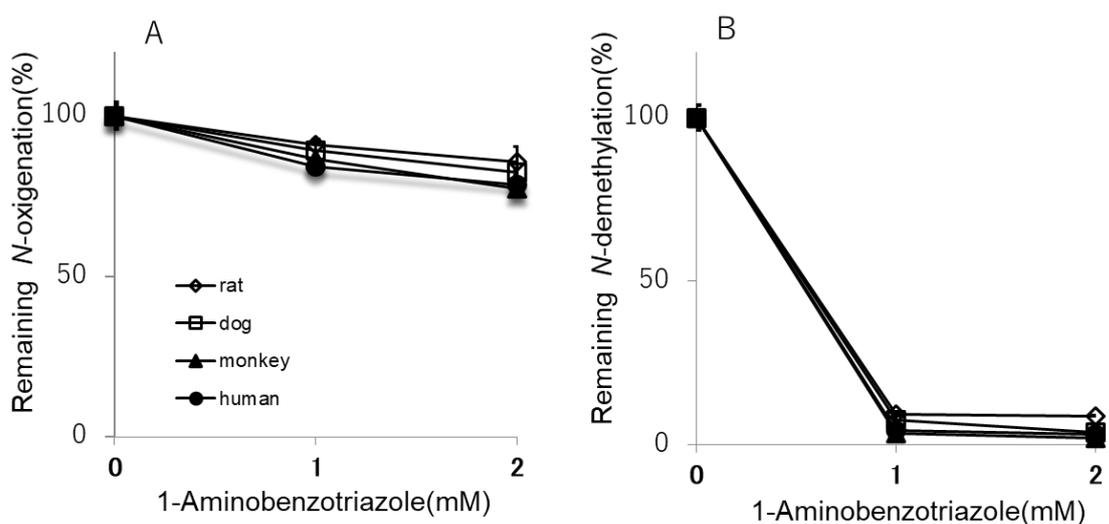


Fig. I-5. Effects on benzylamine *N*-oxygenation (A) and *N*-demethylation (B) of preincubation of liver microsomes with 1-aminobenzotriazole, a general P450 inhibitor, at 37°C.

Liver microsomes from rats (diamonds), dogs (squares), monkeys (triangles), and humans (circles) were pretreated with 1-aminobenzotriazole at 37°C for 30 min in the presence of an NADPH-generating system. Then the remaining benzylamine *N*-oxygenation (A) and *N*-demethylation (B) activities of liver microsomes were determined at a substrate concentration of 5.0 μ M. Control (100%) *N*-oxygenation activities of liver microsomes from rats, dogs, monkeys, and humans were 2.1, 5.4, 0.067, and 0.044 nmol/min/mg protein and control *N*-demethylation activities were 0.12, 0.56, 0.12, and 0.024 nmol/min/mg protein, respectively. Data points represent means \pm SD of triplicate determinations. Other details are the same as those in Fig. I-2.

各種動物およびヒト肝ミクロゾームの benzylamine 酸化活性に及ぼす熱処理および 1-ABT の添加の影響は類似していたことから、さらなる評価はヒト肝ミクロゾー

ムおよびヒト肝臓に発現する FMO3 組換え酵素 (Koukouritaki and Hines, 2005; Shimizu et al., 2011) に焦点を当てて実施した。In vitro 実験に一般的に使用する有機溶媒 (Hickman et al., 1998; Busby et al., 1999) の benzydamine 酸化活性への影響を、ヒト肝マイクロゾームを用いて検討した (Fig. I-6)。検討する有機溶媒には、医薬品の候補化合物の保存溶液として汎用される DMSO と、in vitro 実験で用いられる methanol および acetonitrile を用いた。DMSO (0.1%および0.5%) は benzydamine N-酸化活性を用量依存的に阻害し、0.5% においては 50% 以上の活性を阻害した (Fig. I-6 A)。Methanol および acetonitrile は影響を及ぼさなかった。同様にヒト FMO3 発現系酵素を用いて検討した結果、ヒト肝マイクロゾームと同様に、DMSO によって活性が低下することが明らかとなった (Fig. I-6 C)。一方、検討した 3 種の有機溶媒は、最終濃度 0.5% までの濃度範囲において、ヒト肝マイクロゾームの benzydamine N-脱メチル化活性に影響を及ぼさなかった (Fig. I-6 B)。

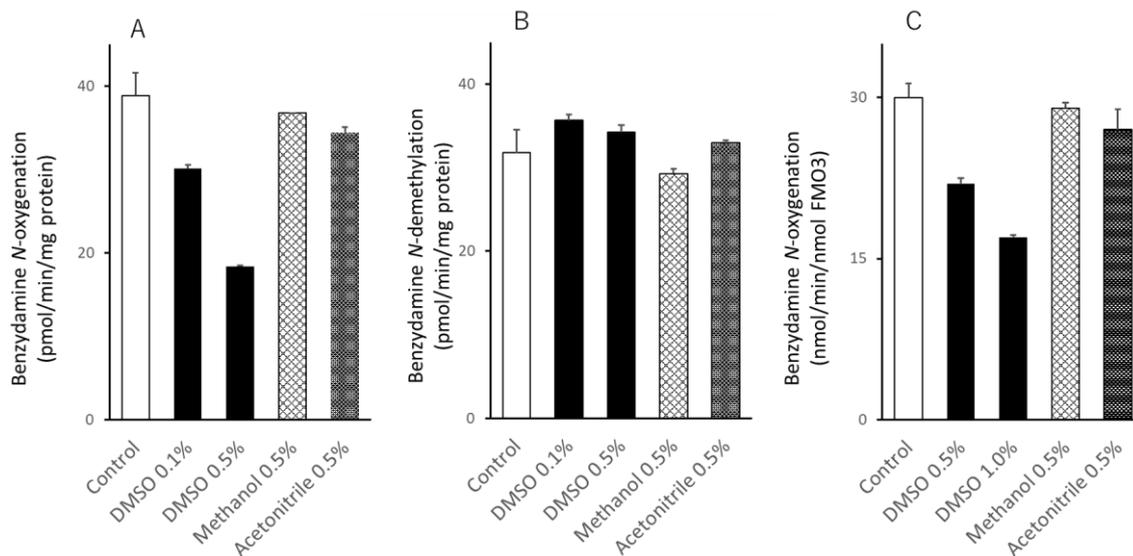


Fig. I-6. Effects of common organic solvents on benzydamine N-oxygenation (A, C) and N-demethylation (B) activities of human liver microsomes (A, B) and recombinant human FMO3 (C).

Benzydamine N-oxygenation and/or N-demethylation by human liver microsomes and recombinant human FMO3 were determined at a substrate concentration of 5.0 μ M. Data represent means \pm SD of triplicate determinations.

ヒト肝ミクロゾームを用い、*in vitro* 実験時の補酵素 NADPH や基質の添加順の影響について検討した。ヒト肝ミクロゾームの benzydamine *N*-酸化活性は、NADPH 非存在下で 37°C、5 分間あるいは 10 分間のプレインキュベーションにより、それぞれ約 30% および 50% 低下したが、NADPH 存在下では変化しなかった (Fig. I-7 A)。一方、NADPH の添加順序は benzydamine *N*-脱メチル化活性に影響しなかった (Fig. I-7 B)。このことから、FMO 酵素の活性を維持するためには、酵素源と NADPH を常に共存させる手順策定が必要であることが示された。

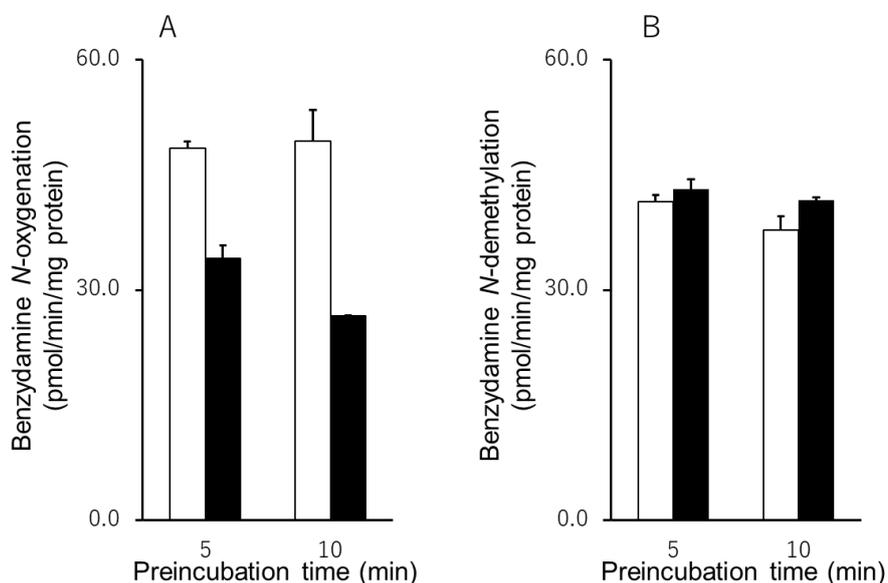


Fig. I-7. Effects of NADPH in the preincubation mixtures on benzydamine *N*-oxygenation (A) and *N*-demethylation (B) catalyzed by human liver microsomes.

Human liver microsomes were pretreated at 37°C for 5 or 10 min in the absence (filled bars) and presence (open bars) of an NADPH-generating system. Then benzydamine *N*-oxygenation and *N*-demethylation activities by human liver microsomes were determined at a substrate concentration of 5.0 μ M for 30 min. Data represent means \pm SD of triplicate determinations.

I-3- ii ヒト肝 benzydamine *N*-酸化および *N*-脱メチル化に寄与する酵素分子種の推定

ヒト肝および腎ミクロゾーム、大腸菌発現ヒト FMO1 および FMO3 酵素と主要 P450 代謝酵素である CYP1A2、CYP2C19、CYP2D6 および CYP3A4 の大腸菌発現酵素を用い、各酵素の benzydamine *N*-酸化および *N*-脱メチル化への寄与を検討した (Table I-3)。ヒト腎ミクロゾームの benzydamine *N*-酸化活性は、肝ミクロゾームに比較して高く、いずれの活性も pH 8.4 の条件で活性がより高値を示した。組換え酵素を用いた検討では、benzydamine *N*-酸化活性は FMO1 および FMO3 で高値を示し、それぞれ、9.2 nmol/min/nmol および 1.9 nmol/min/nmol を示した。CYP2D6 においても活性が認められ、1.5 nmol/min/nmol であった。FMO1 および FMO3 の benzydamine *N*-酸化活性は pH 7.4 条件と比較して pH 8.4 条件にて 2-2.4 倍上昇した。その他の P450 分子種の活性は 0.1–0.4 nmol/min/nmol と低値を示した。Benzydamine *N*-脱メチル化活性は腎ミクロゾームでは検出されず (<0.01 nmol/min/mg protein)、肝ミクロゾームにて検出された。組換え酵素を用いた検討では、benzydamine *N*-脱メチル化は FMO 酵素では定量限界未満 (< 0.1 nmol/min/nmol) であり、CYP2D6 において最も高値を示した。各酵素の肝臓での発現量 (Rodrigues, 1999) を考慮し、補正した結果、benzydamine *N*-酸化活性は FMO3 の寄与が最も高く、pH 8.4 条件下でより高値を示した。一方、benzydamine *N*-脱メチル化活性は CYP2D6 と CYP3A4 の寄与が高かった (Fig. I-8)。

Benzydamine *N*-酸化活性は FMO の阻害剤である methimazole により 80% 以上阻害され、CYP2D6 の阻害剤 quinidine や CYP3A4 阻害剤 ketoconazole では阻害されなかった (Fig. I-9 A)。一方、benzydamine *N*-脱メチル化活性は CYP2D6 阻害剤である quinidine によって約 50% 阻害された (Fig. I-9 B) が、単独の阻害剤で完全に阻害されることはなかった。

Table I-3. Benzydamine *N*-oxygenation and *N*-demethylation activities of recombinant enzymes and human liver and kidney microsomes.

Enzyme source	pH 7.4		pH 8.4	
	<i>N</i> -Oxygenation	<i>N</i> -Demethylation	<i>N</i> -Oxygenation	<i>N</i> -Demethylation
	<i>nmol/min/ mg protein</i>		<i>nmol/min/ mg protein</i>	
Liver microsomes	0.02	0.03	0.05	0.06
Kidney microsomes	0.39	<0.01	0.90	<0.01
	<i>nmol/min/ nmol P450 or FMO</i>		<i>nmol/min/ nmol P450 or FMO</i>	
CYP1A2	0.4	0.9	0.5	1.3
CYP2C19	0.3	1.1	0.5	2.5
CYP2D6	1.5	11	2.1	7.2
CYP3A4	0.1	0.5	0.1	1.1
FMO1	9.2	< 0.1	18	< 0.1
FMO3	1.9	< 0.1	4.6	< 0.1

Benzydamine (5.0 μ M) was incubated with human liver or kidney microsomes (0.10 mg/mL) or recombinant enzymes (2.5–25 pmol equivalent/mL) for 10 min in the presence of an NADPH-generating system at 37°C.

Data represent means of triplicate determinations.

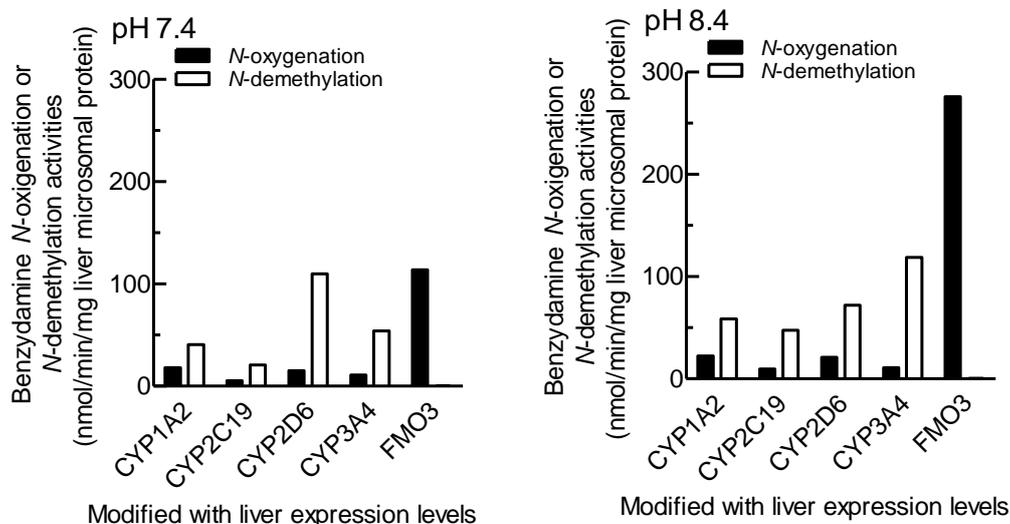


Fig. I-8. Benzydamine *N*-oxygenation and *N*-demethylation activities of human liver microsomal P450 or FMO enzymes.

The activities of recombinant enzymes shown in **Table I-3** were modified and expressed with reported expression levels (Rodrigues, 1999) in human liver microsomes.

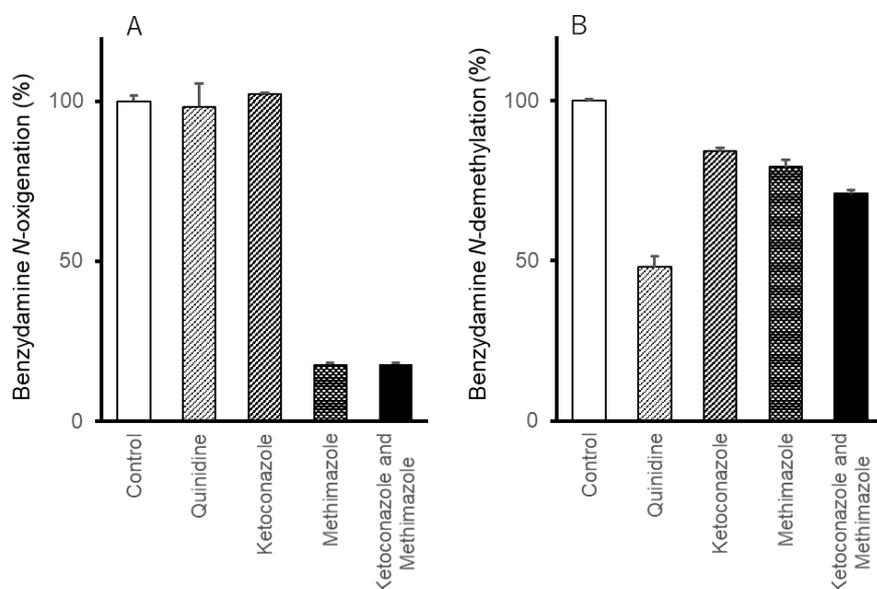


Fig. I-9. Effects of typical P450 or FMO inhibitors on benzydamine *N*-oxygenation (A) and *N*-demethylation (B) by human liver microsomes.

Benzydamine *N*-oxygenation and *N*-demethylation by human liver microsomes were determined at a substrate concentration of 5.0 μM in the presence or absence of quinidine (a CYP2D6 inhibitor, 1 μM), ketoconazole (a CYP3A inhibitor, 0.5 μM), methimazole (a FMO inhibitor, 200 μM), or both ketoconazole and methimazole. Control *N*-oxygenation and *N*-demethylation activities of human liver microsomes were 0.19 and 0.04 nmol/min/mg protein, respectively. Data represent means \pm SD of triplicate determinations.

第4節 考察

FMO 分子種の動物種間のアミノ酸相同性は高いことが知られているが、その臓器分布には大きな種差がある (Fagerberg et al., 2014; Yu et al., 2014; Yue et al., 2014)。医薬品開発の *in vivo* 実験に供されるラットおよびイヌの肝臓では FMO1 が、サルおよびヒトにおいては FMO3 が主に発現しており、その種差が医薬品開発の際に課題となる場合もある。FMO 分子種局在の種差が理由で、動物種により化合物の血漿中濃度が大きく異なる場合がある (Zhou et al., 2011)。FMO の関与に気付かず毒性試験に供する動物種を選択を見誤った場合、十分な血中濃度が得られず、また臨床試験実施に必要な安全域の担保ができない場合も想定される。

本研究では、benzylamine を用いて、各動物種の肝臓での *N*-酸化活性および *N*-脱メチル化活性について検討した。ラット、イヌ、サルおよびヒト肝ミクロゾームの benzylamine *N*-酸化活性には動物種差が認められ、イヌ、ラット、サル、ヒトの順に高値を示した (Fig. I-2A、Table I-1)。一方、benzylamine *N*-脱メチル化活性の種差は小さかった (Fig. I-2B、Table I-1)。ラット、サルおよびヒトの FMO 大腸菌発現酵素を用いた検討の結果、benzylamine *N*-脱メチル化活性は検出されず、benzylamine *N*-酸化活性のみ検出された (Fig. I-3、Table I-2)。発現酵素と肝ミクロゾームの速度論的解析結果を比較したところ、ラット肝ミクロゾームの K_m 値はラット FMO1 組換え酵素の K_m 値と近似した (Table I-1、I-2)。一方、サルおよびヒト肝ミクロゾームの K_m 値はサルおよびヒトの FMO3 組換え酵素の K_m 値に近似した (Table I-1、I-2)。以上のことから、肝ミクロゾームの benzylamine *N*-酸化を担う主な酵素は、ラットは FMO1、サルおよびヒトは FMO3 と考えられた。

ヒト肝ミクロゾームの benzylamine *N*-酸化活性は、45°C、5 分の熱処理により阻害され (Fig. I-4 A)、P450 分子種非特異的阻害剤 1-ABT (Emoto et al., 2003) の影響をほとんど受けなかった (Fig. I-5A)。さらに、FMO 阻害剤である methimazole (Nace et al., 1997; Hamman et al., 2000) により 80% 以上阻害された (Fig. I-9 A)。一方、benzylamine

N-脱メチル化活性は 45°C、5 分の熱処理により影響を受けず (Fig. I-4 B)、1 mmol/L の P450 分子種非特異的阻害剤 1-ABT によりほぼ完全に活性が阻害された (Fig. I-5B)。このことから、benzylamine *N*-酸化活性は FMO により、*N*-脱メチル化活性は P450 により担われていることが推察された。同様に、発現酵素を用いた代謝反応および肝臓での酵素の発現量を考慮した結果も、ヒト肝臓で benzylamine *N*-酸化は FMO3 に、benzylamine *N*-脱メチル化は複数の P450 分子種、主に CYP2D6 および CYP3A4 が担っていることを支持した。このことから、benzylamine を基質とし、*N*-酸化活性および *N*-脱メチル化活性を同時に測定することは、FMO および P450 活性を同時にモニターできる良い指標となることが示唆された。

FMO 酵素の特性を考慮し、医薬品スクリーニング代謝実験条件での FMO 活性について検討した。最終濃度 0.5% の DMSO、methanol および acetonitrile は P450 活性に対しては 10% 以内の変動であり、大きな影響を示さなかったが、FMO 活性は 0.1% DMSO の添加より影響を受け、最終濃度 0.5% では 50% 以上活性が低下した (Fig. I-6)。一方、methanol および acetonitrile は 0.5% の濃度において FMO 活性に影響を及ぼさなかった。DMSO は製薬会社の大規模スクリーニング時の化合物溶解溶媒として最も汎用される有機溶媒であるが (Bowes et al., 2006)、高濃度 (4%) において DMSO は P450 の活性を阻害することが報告されている (Mori et al., 1985; Hickman et al., 1998; Busby et al., 1999)。今回の研究は、FMO は P450 に比べ低用量 (0.1% および 0.5%) から阻害が認められることを明らかにした。DMSO は抗炎症作用などの薬理作用が知られ (Stewart et al., 1967)、過去に膀胱炎の治療薬等として臨床利用された実績がある。ヒトに経口投与した際、DMSO が酸化された dimethyl sulfone が尿中に投与量の約 15% 排泄されることが報告されている (Hucker et al., 1967)。このことから、DMSO は FMO 酵素に基質として認識され、代謝反応系内で評価化合物の代謝を競合的に阻害していると推察された。今回の結果より外挿して考察すると、DMSO 最終濃度 0.01% (1.4 mM) まで低下させるなどの工夫が必要であると考えられた。

さらに、代謝反応系の構成要素の添加順を検討した。補酵素 NADPH を非添加の条件で、酵素反応実施時の一般的な反応開始前加温（プレインキュベーション）（37°C、5-10 分）を行うと、FMO 活性は著しく低下し、P450 活性は変化しなかった（Fig. I-7）。一方、NADPH を含有した条件でプレインキュベーションを行った場合は FMO 活性の低下は認められなかった。FMO 酵素は、活性中心に補欠分子族として flavin adenine dinucleotide (FAD) を含有している。FAD は NADPH と複合体を形成することで安定化および活性化することが知られていることから（Eswaramoorthy et al., 2006）、FMO 酵素の安定化に NADPH は重要な因子であると推察された。このことから、FMO 酵素が関与する代謝実験は、プレインキュベーション時に NADPH を含有させておくことが重要であり、反応を基質添加スタートにするなどの工夫が必要であることが示唆された。本結果は、有機溶媒の選定およびプレインキュベーション時の補酵素の有無、いずれも FMO 活性に大きく影響をする要素であり、条件によっては FMO の代謝への寄与を過小評価する可能性があることを示した。

製薬企業等の大量スクリーニングは、主にロボット分注機を用いて実験を行うが、その際分注精度等の問題から、微量の被験物質添加ではなく、補酵素 NADPH 添加にて反応開始を行うことが通例である（Wienkers and Heath, 2005）。しかし、補酵素 NADPH 非存在下では、プレインキュベーション中に、FMO 活性が低下することから、FMO 酵素源と NADPH を常に共存させ、酵素機能を保持する手順策定が必要であることが示唆された。さらに、スクリーニングでは膨大な被験物質溶液を、溶解度および不揮発性の観点から DMSO で調製し、長期保管して各種実験に使用するが、FMO 活性は DMSO の添加により著しく影響を受けた。医薬品候補化合物の一般的な迅速スクリーニング条件（Wienkers and Heath, 2005）では、DMSO の添加や補酵素の添加タイミングによって、検討対象化合物の薬物酸化反応に対する FMO の寄与を過小評価することが示された。

薬物酸化反応に関与する FMO 酵素の過小評価は、場合によっては、P450 などの特

定の薬物代謝酵素分子種の至適条件で実施した結果を過大評価し、責任酵素分子種の寄与を見かけ上高く見積ることにつながる可能性がある。体外消失への寄与が 25% 未満の酵素を 25% 以上と見誤った場合、薬物相互検討ガイダンスに従うために、本来不要である臨床試験を実施が求められる事態となり得る。以上のことから、創薬段階にて FMO が酸化的代謝に関与する薬物代謝酵素の寄与を定量的に評価する際は、本研究で提案する責任酵素に合致させた至適条件での寄与推定実施が重要と推察された。

第5節 小括

ヒト肝ミクロゾームの benzydamine *N*-酸化と *N*-脱メチル化は、それぞれ主に FMO3、CYP2D6 および CYP3A4 により触媒された。DMSO 添加やロボット分注機を使用する一般的な迅速スクリーニング条件では、薬物酸化反応への FMO 酵素の寄与を過小評価することを示した。そのため、FMO 酵素が代謝に関与する医薬品の代謝酵素の寄与を推定する際は、適切な有機溶媒を使用し、補酵素の添加タイミングを変更するなど、酵素が失活しないための配慮が必要であることを示した。FMO および P450 の双方が触媒する薬物酸化反応を一基質で確認できることから、3 極相互作用検討ガイダンスが推奨する標準的陽性対照薬として benzydamine の登録を推奨する。

第II章 化合物構造由来物性値に基づく FMO 基質該当予測とその実証

第1節 緒言

FMO 酵素は窒素、硫黄、リンまたはセレン原子を含む広範囲の求核ヘテロ原子部位を代謝する酵素として知られており (Cashman, 2008; Fu and Lin, 2017)、FMO 分子種間の特異性の主な要因は、求核性化合物の分子の大きさと形状であることが示唆されている (Poulsen and Ziegler, 1995)。求核基の大きさの違いが FMO1 基質の予測因子である可能性を示唆する報告もある (Kim and Ziegler, 2000)。しかしながら、FMO 酵素全般の基質を定量的かつ簡便に予測する方法は十分に確立されていない。第 I 章で示したように、医薬品代謝スクリーニング実験系は、FMO 酵素の寄与を過小評価する可能性があることから、*in silico* で FMO 酵素の代謝寄与を予測する方法の提案は、医薬品開発の初期段階で非常に有用である。

第 II 章では、化合物の構造式から窒素含有基の塩基性度 pKa (base) を計算し、酸化的代謝への FMO 酵素の寄与を予測することを目的とした。*In silico* FMO 寄与予測に pKa (base) 推定値の活用を提案し、入手可能かつヒト肝マイクロゾームを用いた実験で未変化体の消失によりクリアランス算出が可能であった 11 化合物の pH 7.4 および pH 8.4 (FMO 至適条件) でのヒト肝マイクロゾーム代謝実験を行い、各化合物の pH 8.4 と pH 7.4 での代謝クリアランスの比を算出し、pH の影響および FMO の寄与について検証を行った (Shimizu et al., 2015)。これらをまとめ、FMO 基質は pH 8.4 の条件下で、優位に代謝クリアランスが増加し、FMO 酵素が酸化的代謝に寄与するか否かの予測となりうる手法を提唱する。

第2節 方法

第 I-2 項に記したヒト肝マイクロゾーム画分 0.5 mg/mL を酵素源とし、補酵素

NADPH 生成系とリン酸緩衝液 (pH 7.4 あるいは pH 8.4、0.1 mol/L) を含む反応混液にて、benzylamine に加え、trimethylamine、clomipramine、imipramine、olopatadine、vandetanib、diphenhydramine、tamoxifen、ranitidine、itropride、loxapine、xanomeline、tozasertib、dasatinib、moclobemide、olanzapine、clozapine および voriconazole (Sigma-Aldrich) ならびに chlorpromazine および midazolam (富士フィルム和光純薬) の計 20 化合物のヒト肝代謝消失速度を実測した。薬物酸化反応は、既報 (Uno et al., 2013; Yamazaki et al., 2014) を一部改良し、反応混液を 5 分間、37°C でプレインキュベーションした後、各基質 (1.0 $\mu\text{mol/L}$) を添加して酸化反応を開始し、37°C で 3、6、12、24 および 48 分間後に一部採取し反応を停止した。反応停止には内部標準物質 indomethacin (富士フィルム和光純薬) を含有する 2 倍量の有機溶媒 (methanol / acetonitrile (1:1)) を用い、それらの遠心分離後の上清画分を分析試料とした。各化合物の分離分析は、第 I-2 項に述べた方法に準じ、移動相は 0.1% formic acid および acetonitrile、あるいは 10 mM ammonium acetate および acetonitrile を用いて行った。各化合物の定量分析は、内標準物質に対する標準物質のピーク面積比を用い、Waters TQD Tandem Quadrupole Mass Spectrometer を用いて陽イオンモードあるいは陰イオンモード下、multiple reaction monitor mode で実施した。

In vitro ヒト肝代謝消失クリアランス値は、化合物それぞれの反応開始ゼロ時点の化合物濃度を 100% とし、各時点の残存率 (%) の対数値と反応時間を用いて線形回帰分析より算出した。緩衝溶液 pH 条件を変動させた化合物の *in vitro* 肝代謝クリアランス値の変化率と、ACD/Percepta ソフトウェア (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canada) の pKa Classic Module を用いて算出した各化合物の窒素含有基の酸および塩基解離定数の関係は、Prism (GraphPad Prism, La Jolla, CA) を用いて評価した。

第3節 結果

II-3- i 構造由来物性値に基づく FMO 基質該当予測

In vitro 代謝実験で、FMO 酵素の関与の有無について検討されている化合物を文献検索したところ、38 化合物が抽出された。その中には、FMO 酵素の寄与を検討したものの、関与がない化合物も含まれていた。そのうち、窒素含有基を有する 30 化合物についてソフトウェアを用いて 窒素含有基の pKa (base) を計算した。pH 8.4 が FMO 酵素の至適条件であることから、化合物内の最も高い pKa 値が 8.4 以上を示す化合物を Table II-1 に、8.4 以下を示す化合物を Table II-2 に示し、主に文献に記されている触媒酵素を示した。各化合物の窒素含有基の pKa (base) 値について Fig. II-1 に図示する。

Table II-1 に示す 18 化合物 trimethylamine (Shimizu et al., 2007)、AZD328 (Zhou et al., 2011)、C-1305 (Fedejko-Kap et al., 2011)、cevimeline (Washio et al., 2001)、clomipramine (Nielsen et al., 1994)、imipramine (Rouer et al., 1987)、chlorpromazine (Stevens et al., 1993)、benzylamine (Stormer et al., 2000; Shimizu et al., 2007)、pyrazoloacridine (Reid et al., 2004)、*N,N*-Dimethylamphetamine (Lee et al., 2009)、olopatadine (Kajita et al., 2002)、darexaban glucuronide (Shiraga et al., 2012)、*N*-deacetyl ketoconazole (Rodriguez and Miranda, 2000)、vandetanib (Indra et al., 2020)、diphenhydramine (Sharma and Hamelin, 2003)、itopride (Mushiroda et al., 2000)、tamoxifen (Hodgson et al., 2000) および ranitidine (Chung et al., 2000) は pKa (base) 値が 8.4-9.8 と強い塩基性と推定され、窒素部位でのすべての代謝物生成は FMO によって触媒されることが報告されている。

一方、Table II-2 に示す 12 化合物 nomifensine (Yu et al., 2010)、loxapine (Luo et al., 2011)、xanomeline (Ring et al., 1999)、L-775,606 (Prueksaritanont et al., 2000)、tozasertib (Yamazaki et al., 2014)、K11777 (Jacobsen et al., 2000)、dasatinib (Christopher et al., 2008)、moclobemide (Polasek et al., 2006)、olanzapine (Ring et al., 1996)、clozapine (Pirmohamed et al., 1995; Fang et al., 1998)、voriconazole (Murayama et al., 2007; Yanni et al., 2008; Yanni

et al., 2010) および T-1032 (Li et al., 2014)の pKa (base) の最高値は 8.4 未満と推定された。これらの pKa (base) 値が 2.7-7.9 の 12 基質のうち、3 化合物 (xanomeline、L-775,606 および tozasertib) のみが FMO により中程度に *N*-酸化され、P450 においても代謝された(Ring et al., 1999; Prueksaritanont et al., 2000; Yamazaki et al., 2014)。他の 9 基質の *N*-酸化は、FMO の寄与が低いかあるいは寄与が認められず、P450 酵素によって代謝されていた。L-775,606 (Prueksaritanont et al., 2000) の pKa (base) 3.9 の窒素含有基は主に CYP3A4 により代謝され、pKa (base) 7.7 の窒素含有基では主に FMO3 により代謝されると報告されている。T-1032 の窒素含有基の pKa (base) 4.8 は主に CYP3A5 が触媒しており、FMO 酵素の関与は小さい (Li et al., 2014)。P450 の代表的基質である Midazolam の窒素含有基 pKa (base) 値は 6.0 と 1.0 であった。これらのことから代謝部位の pKa (base) によって FMO 酵素の基質該当予測が可能と推察された。

Table II-1. Model drugs with the highest pKa (base) values of ≥ 8.4 and their reported oxidative pathways for *N*-oxygenations.

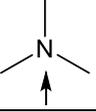
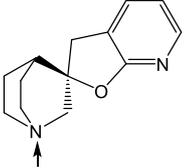
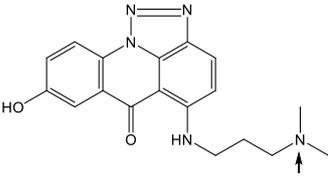
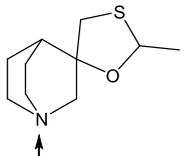
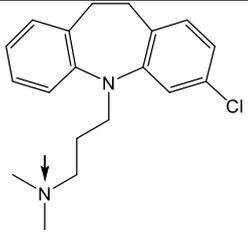
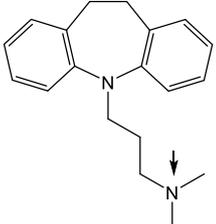
Compound	Structure	Main metabolic site	Minor metabolic site		Highest pKa (base)
		pKa (base)	pKa (base)	pKa (acid)	
Trimethylamine (Shimizu et al., 2007)		9.8 [by FMO3]			9.8
AZD328 (Zhou et al., 2011)		9.6 [by FMO1]	3.4		9.6
C-1305 (Fedejko-Kap et al., 2011; Shimizu et al., 2007)		9.5 [by FMO3]	-0.2		9.5
Cevimeline (Washio et al., 2001)		9.5 [by FMO1]		[<i>S</i> -oxidation by P450 2D6/3A4]	9.5
Clomipramine (Nielsen et al., 1994)		9.5 [by FMO3]	0.6		9.5
Imipramine (Rouer et al., 1987)		9.5 [by FMO3]	1.8		9.5

Table II-1. Continued

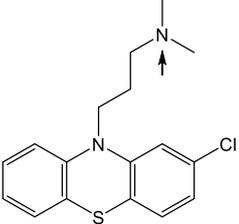
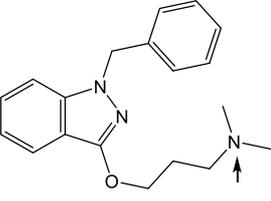
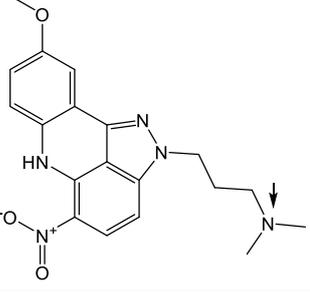
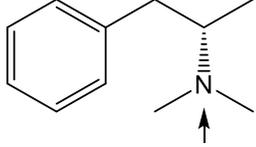
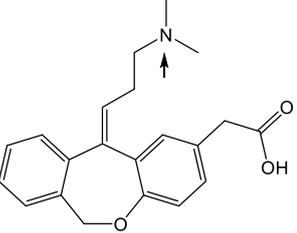
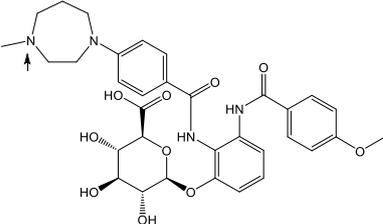
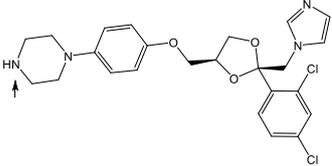
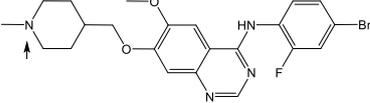
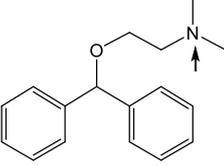
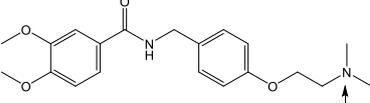
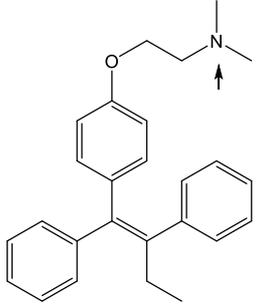
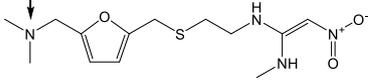
Compound	Structure	Main metabolic site	Minor metabolic site		Highest pKa (base)
		pKa (base)	pKa (base)	pKa (acid)	
Chlorpromazine (Stevens et al., 1993; Bhamre et al., 1995)		9.4 [by FMO3]	-1.3		9.4
Benzydamine (Stormer et al., 2000; Shimizu et al., 2007)		9.3 [by FMO3] [N-demethylation by P450 2D6]	1.2		9.3
Pyrazoloacridine (Reid et al., 2004)		9.3 [by FMO3]	6.7		9.3
<i>N,N</i> -Dimethylamphetamine (Lee et al., 2009)		9.3 [by FMO1]			9.3
Olopatadine (Kajita et al., 2002; Lee et al., 2009)		9.2 [by FMO1/3]			9.2
Darexaban glucuronide (Shiraga et al., 2012)		9.0 [by FMO1/3]	2.1 -3.2	14.4	9.0

Table II-1. Continued

Compound	Structure	Main metabolic site	Minor metabolic site		Highest pKa (base)
		pKa (base)	pKa (base)	pKa (acid)	
<i>N</i> -Deacetyl ketoconazole (Rodriguez and Miranda, 2000)		9.0 [by FMO1/3]	4.2 6.9		9.0
Vandetanib (Indra et al., 2020)		8.9 [by FMO3 and P450 3A4]	5.4		8.9
Diphenhydramine (Sharma and Hamelin, 2003)		8.8 [by FMO3]			8.8
Itopride (Mushiroda et al., 2000)		8.7 [by FMO1/3]	-1.5	14	8.7
Tamoxifen (Hodgson et al., 2000)		8.7 [by FMO3]			8.7
Ranitidine (Chung et al., 2000)		8.4 [by FMO3]	2.4 -2.6		8.4

Arrows indicate the metabolic site for *N*-oxygenations.

Table II-2. Model drugs with the highest pKa (base) values of <8.4 and their reported oxidative pathways for N-oxygenations.

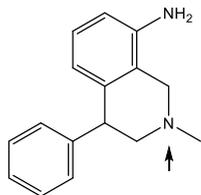
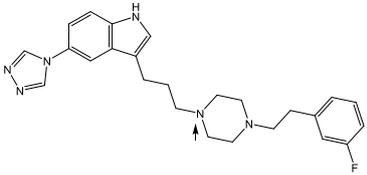
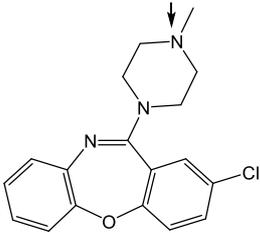
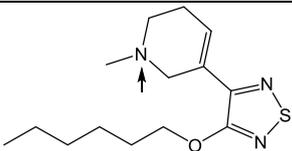
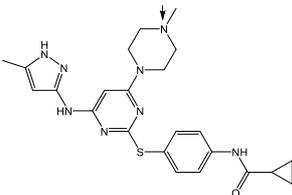
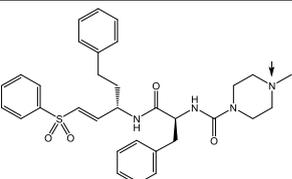
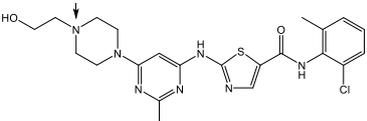
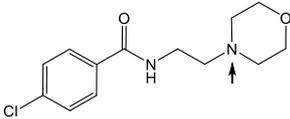
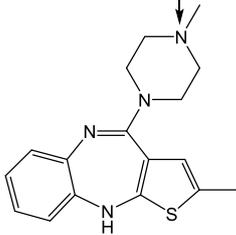
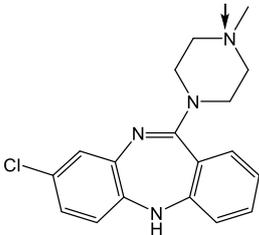
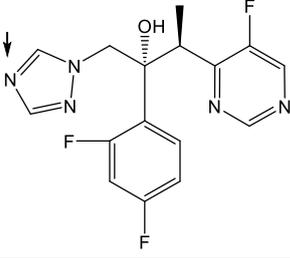
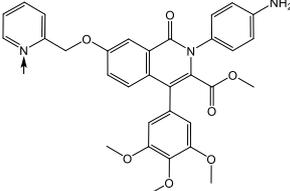
Compound	Structure	Metabolic site	Non-metabolic site		Highest pKa (base)
		pKa (base)	pKa (base)	pKa (acid)	
Nomifensine (Yu et al., 2010)		7.9 [by P450 3A4]	2.9		7.9
L-775,606 (Prueksaritanont et al., 2000)		7.7 [by FMO3], minor	3.9 [by P450 3A4], major	2.7	7.7
Loxapine (Luo et al., 2011)		7.3 [by P450 3A4]	3.9		7.3
Xanomeline (Ring et al., 1999)		7.3 [by FMO3]	-1.4		7.3
Tozasertib (Yamazaki et al., 2014)		7.1 [by FMO3 and P450 3A4]	5.1 1.2	14.1	7.1
K11777 (Jacobsen et al., 2000)		7.0 [by P450 3A4]	-4.3	12.4	7.0
Dasatinib (Christopher et al., 2008)		6.8 [by P450 3A4]	7.3 -2.5	0.0 10.9	7.3

Table II-2. Continued

Compound	Structure	Metabolic site	Non-metabolic site		Highest pKa (base)
		pKa (base)	pKa (base)	pKa (acid)	
Moclobemide (Polasek et al., 2006)		6.5 [by P450 2C19]	-2.3	14.3	6.5
Olanzapine (Ring et al., 1996)		6.0 [by P450 1A2/2D6]	7.8 -2.9		7.8
Clozapine (Pirmohamed et al., 1995; Fang et al., 1998)		5.9 [by P450 1A2/3A4]	7.3		7.3
Voriconazole (Murayama et al., 2007; Yanni et al., 2008; Yanni et al., 2010)		0.6 [by P450 2C19/3A4]	2.7		2.7
T-1032 (Li et al., 2014)		4.3 [by P450 3A5]	4.8 -5.8		4.8

Arrows indicate the metabolic site for *N*-oxygenations.

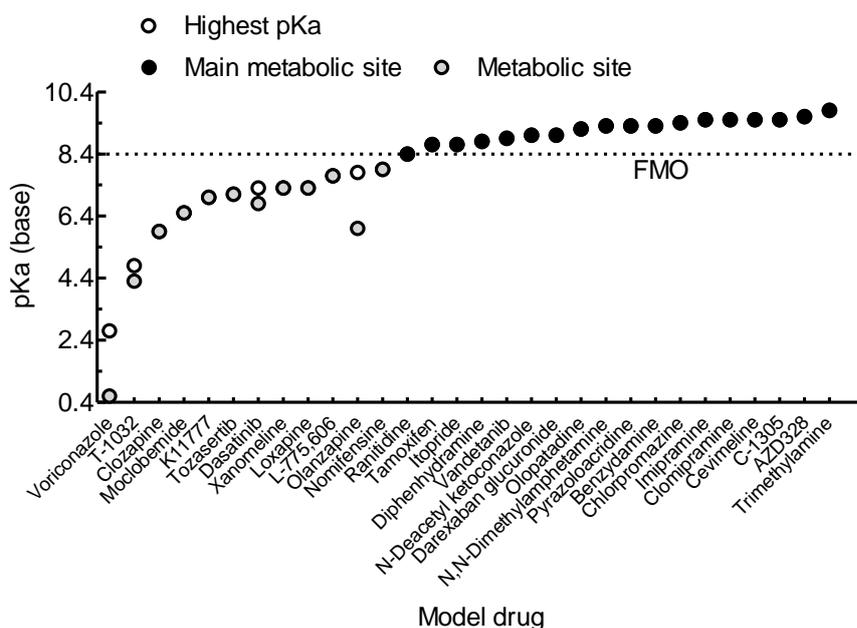


Fig. II-1. Model drugs with highest pKa (base) values and their reported oxidative pathways for N-oxygenations.

II-3-ii 酸解離定数に基づく FMO 寄与予測の実験的検証

pH 7.4 および pH 8.4 のいずれか、あるいは両条件において代謝クリアランス値が 10 μ L/min/mg protein 未満の 8 検体 (imipramine、olopatadine、ranitidine、vandetanib、diphenhydramine、moclobemide、olanzapine および voriconazole) は未変化体の減少での正確なクリアランス値の算出は困難であると考え採用しなかった。クリアランス値算出が可能であった 11 検体 (trimethylamine、benzydamine、clomipramine、chlorpromazine、tamoxifen、itopride、loxapine、xanomeline、tozasertib、dasatinib および clozapine) の pKa (base) 値を Fig. II-2 に示した。11 化合物のうち 6 化合物が pKa (base) 8.4 以上を示し、5 化合物が 8.4 以下であった。

代表的な化合物の pH 7.4 と pH 8.4 の反応条件下の未変化体の残存推移を調べた結果として、benzydamine と trimethylamine の例を Fig. II-3 に示す。11 化合物およ

び P450 基質である midazolam の pH 7.4 および pH 8.4 反応条件下のクリアランス値を Table II-3 に示す。

Trimethylamine、benzylamine および itropride の pH 8.4 での代謝クリアランス値 ($\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg protein}$) は、pH 7.4 と比較して 2–4 倍高く、各化合物とも pH 7.4 に比べ pH 8.4 において代謝クリアランスが増加した。対照的に、pH 8.4 での対照薬 midazolam の代謝クリアランスは pH 7.4 の約半分であった。pH による代謝クリアランス速度の変化を比較するため、それぞれの化合物の pH 8.4 の代謝クリアランス値を pH 7.4 の代謝クリアランス値で除した値 ($\text{pH } 8.4/\text{pH } 7.4$) を算出した (Table II-3)。FMO が主に代謝に関与すると報告がある化合物は、pH 8.4 で高い代謝クリアランスを示した。一方、P450 基質 midazolam の代謝クリアランス比は 0.56 であった。なお、chlorpromazine が低いクリアランス比を示した理由は、現時点では明らかではない。*In silico* pKa (base)が 8.4 を超える化合物は、pH 8.4 条件下の代謝クリアランスが pH 7.4 条件下に比較して高くなり、クリアランス比 ($\text{pH } 8.4/\text{pH } 7.4$) と pKa (base) 値は有意に相関した ($r=0.61$ 、 $p<0.05$ 、 $n=11$) (Fig. II-4)。

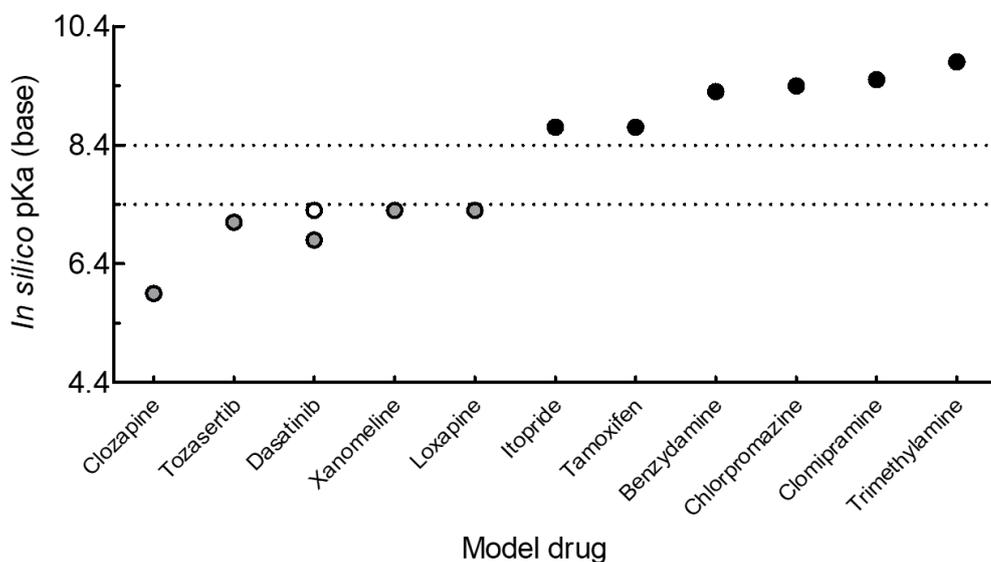


Fig. II-2. pKa (base) of the model drugs used for verification.

The highest pKa (base) values (open circles) of the selected model drugs are shown; those with metabolic sites susceptible to *N*-oxygenations reportedly mediated by FMO3 are shown in black and those reportedly mediated by P450s are shown in gray.

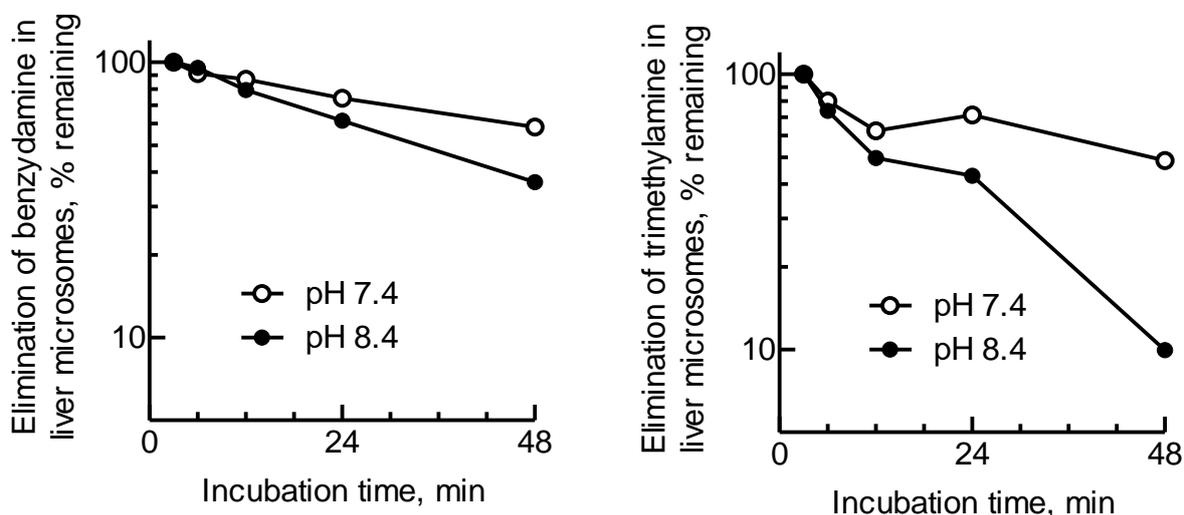


Fig. II-3. Representative pH-dependent metabolic clearances of benzydamine and trimethylamine in substrate depletion assays mediated by FMO and P450 enzymes in human liver microsomes at pH 7.4 (open circles) and pH 8.4 (solid circles). Intrinsic clearance values were calculated from the slope $-k$ determined by linear regression analyses (5 time points); data points represent means of duplicate determinations.

Table II-3. Metabolic clearance values of model drugs pH-dependently mediated by pooled human liver microsomes.

	Clearance, $\mu\text{L}/\text{min}/\text{mg}$ protein		Ratio of clearance at pH 8.4 to that at pH 7.4
	Determined at pH	Determined at pH	
	7.4	8.4	
Trimethylamine	26	96	3.7
Benzydamine	23	45	2.0
Clomipramine	16	30	1.9
Chlorpromazine	43	57	1.3
Tamoxifen	11	18	1.6
Itopride	11	34	3.1
Loxapine	31	43	1.4
Xanomeline	270	340	1.3
Tozasertib	64	67	1.1
Dasatinib	97	120	1.2
Clozapine	11	15	1.4
Midazolam (control)	670	380	0.56

The clearance values were calculated from the slope of the remaining substrate versus time curve determined in human liver microsomes using linear regression analysis at five time points for 3–48 min in duplicated experiments.

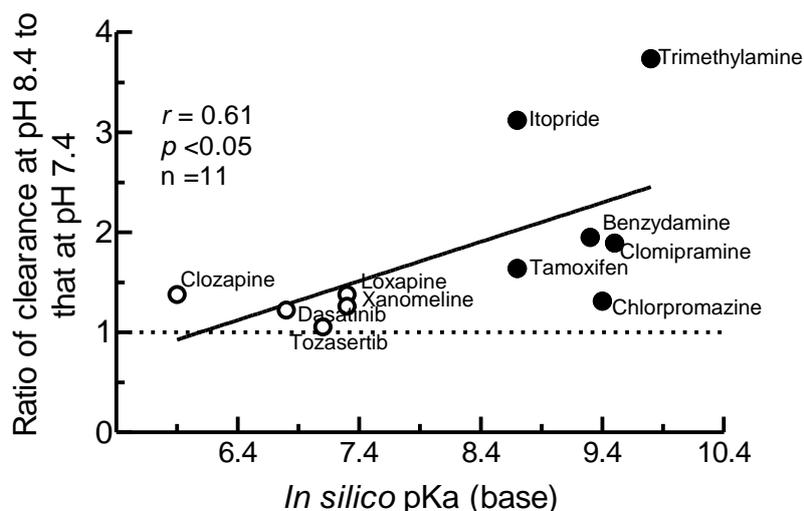


Fig. II-4. Relationship of ratio of clearance at pH 8.4 to that at pH 7.4 and *in silico* pKa (base) values.

The calculated ratios of clearance values at pH 8.4 to those at pH 7.4 shown in Table 1 were plotted against the substrate pKa (base) values. Model drugs with *N*-oxygenation sites reportedly mediated by FMO3 (solid circles) and P450s (open circles) are indicated.

第4節 考察

FMO 酵素が *N*-酸化を担う主代謝部位の pKa (base) 値は、非代謝またはマイナーな代謝窒素含有基より高値を示した (Fig. II-1)。FMO 酵素の活性中心 FAD は、pH により異なる遷移状態を示し、pH 8.5 付近で安定な 4 a-flavin hydroperoxide 中間体 (Fig. II-5B) を形成することが報告されている (Poulsen and Ziegler, 1995)。化合物の非解離型 (イオン化形ではなく) は FMO 触媒サイクルにより優先的に酸化されることから (Jones and Ballou, 1986)、pKa (base) が高値、すなわち pKa (base) 8.4 以上を示す化合物が FMO の基質として認識されていると推察された。この過程の機構的解釈にはさらなる研究が必要であるが、ソフトウェアにより算出された化合物塩基解離定数が医薬品候補の *N*-酸化に対する FMO 酵素の寄与を推察する簡便なマーカーとなることが示唆された。

入手可能な化合物について pH 7.4 および pH 8.4 (FMO 至適条件) で代謝実験を行った (Shimizu et al., 2015)。両 pH 条件で比較可能であった 11 化合物および P450 基質である midazolam について比較検証したところ、*in silico* pKa (base) が 8.4 を超える化合物は、FMO 至適緩衝液 (pH 8.4) 条件にて、汎用 pH 7.4 条件よりも代謝クリアランスが高値を示した。一方、主に P450 で代謝される化合物、あるいは P450 と FMO 両酵素で代謝され FMO 酵素の寄与は比較的少ないとされる化合物のクリアランスの変化は小さかった。典型的な P450 基質である midazolam は pH 8.4 では低いクリアランス値を示した。化合物の *in silico* pKa (base) 値と両緩衝液条件での代謝クリアランス比は有意 ($r=0.61$ 、 $p<0.05$ 、 $n=11$) に相関した。pH 環境に依存して、化合物のイオン型 (解離型) あるいは分子型 (非解離型) の比率は異なる。そのため、FMO 酵素の基質となる化合物は、FMO 酵素の至適 pH において分子型が増加することにより代謝クリアランスが増加したと推察される (Eswaramoorthy et al., 2006)。これらの結果は、pH 8.4 と pH 7.4 での代謝クリアランス値の単純な比較が N-酸化への FMO の寄与を予測するのに有用であることを示唆した。このことから、*in silico* pKa (base) を用いることで、酸化的代謝反応への FMO の寄与が予測可能であると推察された。

大規模代謝スクリーニング実験の条件を変更することは困難であることから、医薬品候補化合物が絞られてきた段階で、化合物の酸塩基解離定数をソフトウェア計算で求め、FMO 基質となる可能性予測を行うことを提案する。予測の結果、窒素含有基の *in silico* pKa (base) が高値を示した化合物は、FMO 酵素および P450 酵素双方を念頭においた緩衝液条件で代謝消失実験を行うことを推奨する。その結果、FMO 酵素の代謝への関与の有無を明確化でき、かつ、化合物の消失に寄与する各代謝酵素の寄与を精度よく推定できると示唆された。

医薬品申請において複数の代謝酵素の寄与、そして薬物相互作用報告の少ない FMO 酵素の寄与を示すことは有益である。臨床において薬物相互作用を引き起こし

にくい性質を有すると認定され、開発や上市後の市場戦略において有利に働く場合がある (Nakamaru et al., 2014a; Nakamaru et al., 2014b)。構造上可能性のある医薬品候補化合物については、積極的に本手法を用いて FMO 酵素の寄与可能性を検証することを推奨する。本研究は、医薬品候補化合物の代謝消失に FMO 酵素が関与するか否かを簡便に予測し、早期に適切な代謝酵素同定の実験条件を設定できる手順を示した。代謝酵素の寄与を精度よく算出することは、医薬品開発における臨床薬物相互作用試験の実施要否判断に貢献するものと期待される。

序論で述べたように、市場に流通する医薬品のうち、P450 によって代謝される医薬品の種類が依然として多い (Bhutani et al., 2021)。あわせて P450 を介する重篤な薬物相互作用に関する文献報告例も極めて多いが、FMO についてはその報告例はほぼない。これらの差異は、両酵素の酸化反応機構に由来するものと推察される。P450 の触媒作用は、第一段階として基質と酵素の結合により開始され (Fig. II-5A)、その後、P450 還元酵素によって活性中心 (三価ヘム鉄) に電子が伝達され、分子状酸素が結合し、二価ヘム鉄が活性化されることにより酸化反応が進行する (Sono et al., 1996)。そのため、第一段階での各基質の P450 に対する親和性の違いが酸化反応全体の見かけの K_m 値に反映されるため、共存併用薬と単一酵素との結合に差異が生じ、薬物相互作用が引き起こされる。一方、FMO は 酵素タンパク質の活性中心 FAD に NADPH が結合して $FADH_2$ となることを契機に、その酸化サイクルが開始される (Fig. II-5B)。分子状酸素の結合に続き、基質薬物が結合するため薬物酸化反応の見かけの K_m 値は第一段階で結合する NADPH により規定されるため高値を示し、個々の薬物の酵素との親和性の違いが顕在化しにくく、薬物相互作用を受けにくい状況にある。P450 に加えて FMO 酵素の関与を示す薬物の開発は、新規に上市する医薬品の薬物相互作用リスクを判断する上で有益な情報となる可能性がある。

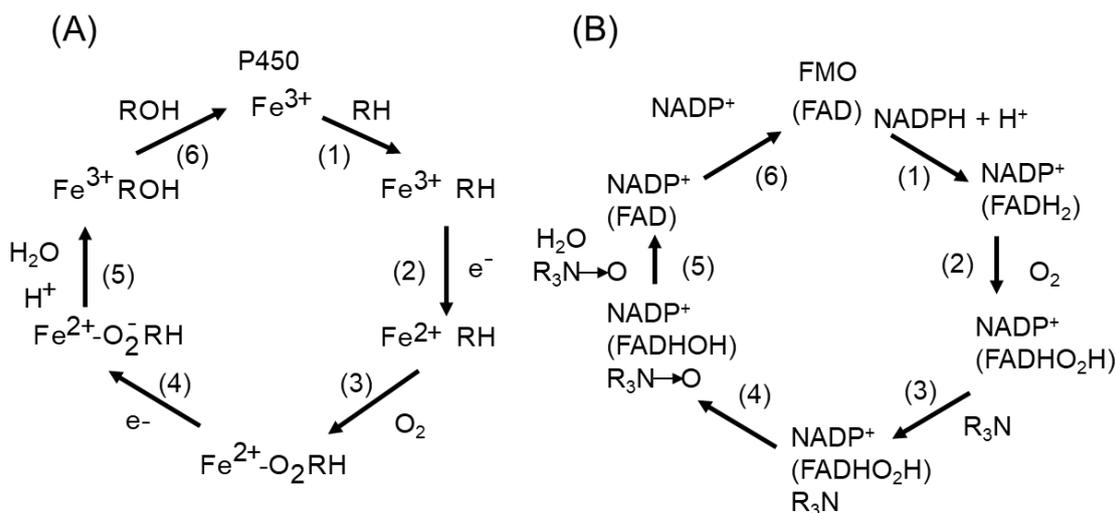


Fig. II-5. P450 (A) and FMO (B) catalytic cycles.

Ferrous P450 can bind substrate in the first step (1) but flavin hydroperoxide intermediate in the third step (3) is capable of oxygenating substrates in the catalytic cycle (Ziegler, 2002).

第 5 節 小括

第 II 章では、FMO および P450 酵素が代謝に関与する化合物を文献調査し、化合物の構造情報から酸化的代謝における FMO 酵素の寄与を予測する方法について検討した。基質候補化合物の構造式より、窒素含有基の塩基性度を計算し、窒素含有基の pKa(base) 値 8.4 以上を指標とすることで、FMO 酵素が酸化的代謝に寄与するかどうかの予測ができることを示した。得られた知見を検証するため、入手可能かつ未変化体の消失で解析可能であった 11 化合物について、pH 7.4 および pH 8.4 の反応条件下で代謝クリアランス値を算出した。*In silico* pKa(base) が 8.4 を超える化合物は、FMO 至適緩衝液 (pH 8.4) 条件にて、汎用 pH 7.4 条件よりも高い代謝クリアランス値を示した。さらに、被験物質の *in silico* pKa(base) 値と両緩衝液条件での代謝クリアランス比 (pH 8.4 / pH 7.4) は有意に相関した。候補化合物の *in silico* pKa(base) 計算値を用いることで、酸化的代謝反応への FMO の寄与が予測可能であることを実証した。

総括

医薬品開発時、代謝反応に関与する酵素分子種の同定は重要である。米国食品医薬品局により承認された新医薬品を経年調査した結果によると、cytochrome P450 (P450) により代謝消失される医薬品の割合が最も多いが、グルクロン酸抱合酵素やフラビン含有酸素添加酵素 (FMO) の寄与も一部報告されている。日米欧 3 極の薬物相互作用検討ガイダンスには、体内消失の 25% 以上を担う各酵素を同定し、臨床薬物相互作用試験で受ける影響を確認する旨が明記されている。さらに同ガイダンスは、いずれも実験系の適切な陽性対照の設定を推奨しているが、現時点にて明確な記載はない。したがって、化合物の代謝消失に関わる酵素分子の寄与を早期にかつ適切に明らかにすることは、医薬品開発の臨床試験計画を考える上で重要である。創薬大規模代謝スクリーニングでは、最も医薬品代謝への関与報告が多い P450 に適した試験条件を選択せざるを得ない状況であることも考慮すべき課題である。

以上の背景から、本研究は酸化的薬物代謝への FMO 寄与を推定する適切な *in vitro* 代謝実験条件および構造由来物性値に基づく *in silico* FMO 基質該当予測法の提案を目的とした。さらに、3 極相互作用ガイダンスに未記載の FMO および P450 両酵素の代謝評価時に適した陽性対照化合物候補の検索を行った。提唱する *in silico* FMO 基質該当予測法を簡便かつ推奨 *in vitro* 評価系にて実証した成果と統合し、以下に詳述する。

第 I 章では、FMO と P450 の寄与を考慮した薬物酸化的代謝条件を詳細に調べた。非ステロイド系抗炎症薬 benzydamine は、複数の酸化経路があり、FMO および P450 双方の陽性対照プローブとなる可能性が考えられた。酵素源熱処理や選択的阻害剤の影響等複数の手法を用い、benzydamine *N*-酸化が FMO 酵素活性および *N*-脱メチル化が P450 酵素活性のそれぞれ良好な指標となることを示した。製薬企業等のロボット分注機等を用いる大量医薬候補品スクリーニングでは、微量分注精度等の問題から、薬物酸素添加反応に必須な補酵素 NADPH 添加にて酵素反応開始を行うことが通例

である。しかし、補酵素 NADPH 非存在下では、37°C での 5-10 分間プレインキュベーション中に FMO 酵素活性が低下することを示し、FMO 酵素源と NADPH を共存させた実験手順の策定が必要であることを示した。創薬段階では、溶解度および不揮発性の観点から、膨大な被験物質溶液をジメチルスルフォキシド (DMSO) で調製し、長期保管して使用する。しかし、酵素反応系の含有 DMSO により FMO 酵素活性は著しく影響を受けた。候補化合物の一般的なスクリーニング条件では、薬物酸化反応への FMO の寄与を過小評価する可能性が示唆され、特に FMO 酵素の酸化的代謝関与を検討する場合、熱安定性、補酵素 NADPH および被験物質用溶媒を含めた一連の操作手順を考慮した上での、適切な *in vitro* 代謝実験の適用が推奨された。

第 II 章では、構造由来物性値に基づく FMO 基質該当予測と検証を実施した。FMO 酵素が代謝に関与あるいは一部寄与する化合物を文献調査し、基質構造情報より ACD/Labs (Advanced Chemistry Development, Toronto, ON, Canada) を用い、*N* 基の塩基性度 $pK_a(\text{base})$ を計算した。FMO 酵素が代謝消失に寄与する化合物の代謝 *N* 基と非代謝 *N* 基の $pK_a(\text{base})$ および非 FMO 基質の *N* 基 $pK_a(\text{base})$ を比較したところ、主に FMO 酵素により代謝される化合物は $pK_a(\text{base})$ 8.4 以上を示す *N* 基を構造に有していた。構造推定塩基性度から、窒素含有基の $pK_a(\text{base})$ 8.4 以上を指標とする化合物の FMO 酵素が触媒する酸化的代謝の予測法を提案し、*in silico* FMO 寄与予測の妥当性を検証した。窒素含有基の塩基性度を計算した 30 化合物のうち、入手可能かつヒト肝ミクロゾームを酵素源とした代謝消失反応時の未変化体減少率が実測可能であった 11 化合物および対照として、P450 典型的基質 midazolam の pH 8.4 (FMO 至適条件) と一般的な pH 7.4 での代謝クリアランスを算出した。*In silico* $pK_a(\text{base})$ が 8.4 を超える化合物は、pH 8.4 条件下の代謝クリアランス値が pH 7.4 条件下に比較して高値を示し、クリアランス比 ($pH_{8.4}/pH_{7.4}$) と $pK_a(\text{base})$ 値は相関した。

以上、FMO および P450 の酸化的代謝への寄与を精度よく推定できる実験条件を

設定し、3 極相互作用検討ガイダンスが設置を推奨する標準的陽性対照薬として双方の代謝経路を持つ benzydamine が活用できることを示した。さらに、被験物質構造情報から市販ソフトウェアを用いた窒素含有基の *in silico* pKa (base) 値に基づく FMO 基質該当予測法を確立し、FMO 用至適緩衝液 (pH 8.4) を加えた代謝消失実験にて予測の有用性を示した。

本研究によって、多くの製薬企業が採用している創薬段階での一般的な迅速スクリーニング評価条件は、有機溶媒 DMSO の汎用やロボット分注機を用いた補酵素 NADPH 添加による反応開始等により FMO 酵素の寄与を過小評価することを示した。創薬段階での医薬品代謝スクリーニング条件を変更することは現状では困難であることから、医薬品候補化合物がある程度絞られた段階で、*in silico* 酸解離定数を計算し、FMO の基質となる可能性を予測することを提案する。N 基の *in silico* pKa (base) が高値を示した化合物は、P450 および FMO 双方の寄与を念頭に置いた試験条件で代謝消失実験を行い、正確な両酵素の寄与を見積もった上で、臨床薬物相互作用試験が必要であるかを適切に判断することを推奨する。

本論文内容の誌上発表

本論文の内容は以下の原著論文に発表した。

1. Taniguchi-Takizawa T, Shimizu M, Kume T, Yamazaki H. Benzydamine *N*-oxygenation as an index for flavin-containing monooxygenase activity and benzydamine *N*-demethylation by cytochrome P450 enzymes in liver microsomes from rats, dogs, monkeys, and humans. *Drug Metab Pharmacokinet* 2015;30 (1):64-9.
2. Taniguchi-Takizawa T, Kato H, Shimizu M, Yamazaki H. Predicted Contributions of Flavin-containing Monooxygenases to the *N*-oxygenation of Drug Candidates Based on their Estimated Base Dissociation Constants. *Curr Drug Metab* 2021;22 (3):208-14.
3. Taniguchi-Takizawa T, Kato N, Shimizu M, Kume T, Yamazaki H. Different substrate elimination rates of model drugs pH-dependently mediated by flavin-containing monooxygenases and cytochromes P450 in human liver microsomes. *Drug Metab Pharmacokinet* 2021;40:100412.

謝辞

稿を終えるにあたり、本学位論文の主査としてご審査賜りました昭和薬科大学 薬理学研究室教授 渡邊 泰男博士に謹んで感謝の意を表します。副査としてご審査賜りました昭和薬科大学 薬物治療学研究室教授 水谷 颯洋博士および衛生化学研究室教授 石井 功博士に感謝申し上げます。くわえて予備審査の労をおとりいただいた微生物学研究室教授 金本 大成博士および薬剤学研究室教授 宇都口 直樹博士に御礼申し上げます。

本研究の遂行および本論文の作成に懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 薬物動態学研究室教授 山崎 浩史博士に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり、数多くのご助言およびサポートを頂きました昭和薬科大学 薬物動態学研究室准教授 清水 万紀子博士をはじめ、ご協力頂きました同研究室の皆様は厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました田辺三菱製薬株式会社 小口 泰博士および久米俊行博士ならびに共に研究を遂行した同所属研究員の皆様に深謝いたします。

最後に、研究生活を継続して支えてくれた夫をはじめ、家族に心より感謝します。

参考文献

- Barbier AJ, Hilhorst M, Van Vliet A, Snyder P, Palfreyman MG, Gawryl M, Dgetluck N, Massaro M, Tiessen R, Timmerman W, and Hilt DC (2015) Pharmacodynamics, pharmacokinetics, safety, and tolerability of encenicline, a selective alpha7 nicotinic receptor partial agonist, in single ascending-dose and bioavailability studies. *Clin Ther* **37**:311-324.
- Bhamre S, Bhagwat SV, Shankar SK, Boyd MR, and Ravindranath V (1995) Flavin-containing monooxygenase mediated metabolism of psychoactive drugs by human brain microsomes. *Brain Res* **672**:276-280.
- Bhutani P, Joshi G, Raja N, Bachhav N, Rajanna PK, Bhutani H, Paul AT, and Kumar R (2021) U.S. FDA Approved Drugs from 2015-June 2020: A Perspective. *J Med Chem* **64**:2339-2381.
- Bowes S, Sun D, Kaffashan A, Zeng C, Chuaqui C, Hronowski X, Buko A, Zhang X, and Josiah S (2006) Quality assessment and analysis of Biogen Idec compound library. *J Biomol Screen* **11**:828-835.
- Busby WF, Jr., Ackermann JM, and Crespi CL (1999) Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* **27**:246-249.
- Cashman JR (2008) Role of flavin-containing monooxygenase in drug development. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **4**:1507-1521.
- Cashman JR and Zhang J (2006) Human flavin-containing monooxygenases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **46**:65-100.
- Catucci G, Gilardi G, Jeuken L, and Sadeghi SJ (2012) In vitro drug metabolism by C-terminally truncated human flavin-containing monooxygenase 3. *Biochem Pharmacol* **83**:551-558.
- Christopher LJ, Cui D, Li W, Barros A, Jr., Arora VK, Zhang H, Wang L, Zhang D, Manning JA, He K, Fletcher AM, Ogan M, Lago M, Bonacorsi SJ, Humphreys WG, and Iyer RA (2008) Biotransformation of [14C]dasatinib: in vitro studies in rat, monkey, and human and disposition after administration to rats and monkeys. *Drug Metab Dispos* **36**:1341-1356.
- Chung WG, Park CS, Roh HK, Lee WK, and Cha YN (2000) Oxidation of ranitidine by isozymes of flavin-containing monooxygenase and cytochrome P450. *Jpn J Pharmacol* **84**:213-220.
- Emoto C, Murase S, Sawada Y, Jones BC, and Iwasaki K (2003) In vitro inhibitory effect of 1-aminobenzotriazole on drug oxidations catalyzed by human cytochrome P450 enzymes: a comparison with SKF-525A and ketoconazole. *Drug Metab Pharmacokinet* **18**:287-

- Eswaramoorthy S, Bonanno JB, Burley SK, and Swaminathan S (2006) Mechanism of action of a flavin-containing monooxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**:9832-9837.
- Fagerberg L, Hallstrom BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, Habuka M, Tahmasebpoor S, Danielsson A, Edlund K, Asplund A, Sjostedt E, Lundberg E, Szigartyo CA, Skogs M, Takanen JO, Berling H, Tegel H, Mulder J, Nilsson P, Schwenk JM, Lindskog C, Danielsson F, Mardinoglu A, Sivertsson A, von Feilitzen K, Forsberg M, Zwahlen M, Olsson I, Navani S, Huss M, Nielsen J, Ponten F, and Uhlen M (2014) Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics* **13**:397-406.
- Fang J, Coutts RT, McKenna KF, and Baker GB (1998) Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* **358**:592-599.
- Fedejko-Kap B, Niemira M, Radomska-Pandya A, and Mazerska Z (2011) Flavin monooxygenases, FMO1 and FMO3, not cytochrome P450 isoenzymes, contribute to metabolism of anti-tumour triazoloacridinone, C-1305, in liver microsomes and HepG2 cells. *Xenobiotica* **41**:1044-1055.
- Fu CW and Lin TH (2017) Predicting the Metabolic Sites by Flavin-Containing Monooxygenase on Drug Molecules Using SVM Classification on Computed Quantum Mechanics and Circular Fingerprints Molecular Descriptors. *PLoS One* **12**:e0169910.
- Grothusen A, Hardt J, Brautigam L, Lang D, and Böcker R (1996) A convenient method to discriminate between cytochrome P450 enzymes and flavin-containing monooxygenases in human liver microsomes. *Arch Toxicol* **71**:64-71.
- Guo Z, Raeissi S, White RB, and Stevens JC (1997) Orphenadrine and methimazole inhibit multiple cytochrome P450 enzymes in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **25**:390-393.
- Hamman MA, Haehner-Daniels BD, Wrighton SA, Rettie AE, and Hall SD (2000) Stereoselective sulfoxidation of sulindac sulfide by flavin-containing monooxygenases. Comparison of human liver and kidney microsomes and mammalian enzymes. *Biochem Pharmacol* **60**:7-17.
- Hernandez D, Janmohamed A, Chandan P, Phillips IR, and Shephard EA (2004) Organization and evolution of the flavin-containing monooxygenase genes of human and mouse: identification of novel gene and pseudogene clusters. *Pharmacogenetics* **14**:117-130.
- Hickman D, Wang JP, Wang Y, and Unadkat JD (1998) Evaluation of the selectivity of In vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metab Dispos* **26**:207-215.
- Hodgson E, Rose RL, Cao Y, Dehal SS, and Kupfer D (2000) Flavin-containing

- monooxygenase isoform specificity for the N-oxidation of tamoxifen determined by product measurement and NADPH oxidation. *J Biochem Mol Toxicol* **14**:118-120.
- Hucker HB, Miller JK, Hochberg A, Brobyn RD, Riordan FH, and Calesnick B (1967) Studies on the absorption, excretion and metabolism of dimethylsulfoxide (DMSO) in man. *J Pharmacol Exp Ther* **155**:309-317.
- Indra R, Pompach P, Vavrova K, Jaklova K, Heger Z, Adam V, Eckschlager T, Kopeckova K, Arlt VM, and Stiborova M (2020) Cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase enzymes are responsible for differential oxidation of the anti-thyroid-cancer drug vandetanib by human and rat hepatic microsomal systems. *Environ Toxicol Pharmacol* **74**:103310.
- Jacobsen W, Christians U, and Benet LZ (2000) In vitro evaluation of the disposition of A novel cysteine protease inhibitor. *Drug Metab Dispos* **28**:1343-1351.
- Jones KC and Ballou DP (1986) Reactions of the 4a-hydroperoxide of liver microsomal flavin-containing monooxygenase with nucleophilic and electrophilic substrates. *J Biol Chem* **261**:2553-2559.
- Kajita J, Inano K, Fuse E, Kuwabara T, and Kobayashi H (2002) Effects of olopatadine, a new antiallergic agent, on human liver microsomal cytochrome P450 activities. *Drug Metab Dispos* **30**:1504-1511.
- Kim YM and Ziegler DM (2000) Size limits of thiocarbamides accepted as substrates by human flavin-containing monooxygenase 1. *Drug Metab Dispos* **28**:1003-1006.
- Koukouritaki SB and Hines RN (2005) Flavin-containing monooxygenase genetic polymorphism: impact on chemical metabolism and drug development. *Pharmacogenomics* **6**:807-822.
- Koukouritaki SB, Simpson P, Yeung CK, Rettie AE, and Hines RN (2002) Human hepatic flavin-containing monooxygenases 1 (FMO1) and 3 (FMO3) developmental expression. *Pediatr Res* **51**:236-243.
- Krueger SK and Williams DE (2005) Mammalian flavin-containing monooxygenases: structure/function, genetic polymorphisms and role in drug metabolism. *Pharmacol Ther* **106**:357-387.
- Lee SK, Kang MJ, Jin C, In MK, Kim DH, and Yoo HH (2009) Flavin-containing monooxygenase 1-catalysed N,N-dimethylamphetamine N-oxidation. *Xenobiotica* **39**:680-686.
- Li X, Jeso V, Heyward S, Walker GS, Sharma R, Micalizio GC, and Cameron MD (2014) Characterization of T-5 N-oxide formation as the first highly selective measure of CYP3A5 activity. *Drug Metab Dispos* **42**:334-342.
- Liu H, Stresser DM, Michmerhuizen MJ, Li X, Othman AA, Reed AD, Schrimpf MR, Sydor J,

- and Lee AJ (2018) Metabolism and Disposition of a Novel Selective α_7 Neuronal Acetylcholine Receptor Agonist ABT-126 in Humans: Characterization of the Major Roles for Flavin-Containing Monooxygenases and UDP-Glucuronosyl Transferase 1A4 and 2B10 in Catalysis. *Drug Metab Dispos* **46**:429-439.
- Luo JP, Vashishtha SC, Hawes EM, McKay G, Midha KK, and Fang J (2011) In vitro identification of the human cytochrome p450 enzymes involved in the oxidative metabolism of loxapine. *Biopharm Drug Dispos* **32**:398-407.
- Mori Y, Yamazaki H, Toyoshi K, Emi Y, Uchida K, Tsutsumi M, and Konishi Y (1985) Inhibitory effect of organic solvents on the mutagenicity of N-nitrosodialkylamines in Salmonella. *Mutat Res* **142**:153-158.
- Murayama N, Imai N, Nakane T, Shimizu M, and Yamazaki H (2007) Roles of CYP3A4 and CYP2C19 in methyl hydroxylated and N-oxidized metabolite formation from voriconazole, a new anti-fungal agent, in human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **73**:2020-2026.
- Mushiroda T, Douya R, Takahara E, and Nagata O (2000) The involvement of flavin-containing monooxygenase but not CYP3A4 in metabolism of itopride hydrochloride, a gastroprokinetic agent: comparison with cisapride and mosapride citrate. *Drug Metab Dispos* **28**:1231-1237.
- Nace CG, Genter MB, Sayre LM, and Crofton KM (1997) Effect of methimazole, an FMO substrate and competitive inhibitor, on the neurotoxicity of 3,3'-iminodipropionitrile in male rats. *Fundam Appl Toxicol* **37**:131-140.
- Nakamaru Y, Hayashi Y, Ikegawa R, Kinoshita S, Perez Madera B, Gunput D, Kawaguchi A, Davies M, Mair S, Yamazaki H, Kume T, and Suzuki M (2014a) Metabolism and disposition of the dipeptidyl peptidase IV inhibitor teneligliptin in humans. *Xenobiotica* **44**:242-253.
- Nakamaru Y, Hayashi Y, Sekine M, Kinoshita S, Thompson J, Kawaguchi A, Davies M, Jurgen Heuer H, Yamazaki H, and Akimoto K (2014b) Effect of ketoconazole on the pharmacokinetics of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor teneligliptin: an open-label study in healthy white subjects in Germany. *Clin Ther* **36**:760-769.
- Nielsen KK, Brosen K, Hansen MG, and Gram LF (1994) Single-dose kinetics of clomipramine: relationship to the sparteine and S-mephenytoin oxidation polymorphisms. *Clin Pharmacol Ther* **55**:518-527.
- Otton SV, Crewe HK, Lennard MS, Tucker GT, and Woods HF (1988) Use of quinidine inhibition to define the role of the sparteine/debrisoquine cytochrome P450 in metoprolol oxidation by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* **247**:242-247.
- Phillips IR and Shephard EA (2020) Flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3): genetic variants and their consequences for drug metabolism and disease. *Xenobiotica* **50**:19-33.

- Pirmohamed M, Williams D, Madden S, Templeton E, and Park BK (1995) Metabolism and bioactivation of clozapine by human liver in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* **272**:984-990.
- Polasek TM, Elliot DJ, Somogyi AA, Gillam EM, Lewis BC, and Miners JO (2006) An evaluation of potential mechanism-based inactivation of human drug metabolizing cytochromes P450 by monoamine oxidase inhibitors, including isoniazid. *Br J Clin Pharmacol* **61**:570-584.
- Poulsen LL and Ziegler DM (1995) Multisubstrate flavin-containing monooxygenases: applications of mechanism to specificity. *Chem Biol Interact* **96**:57-73.
- Prueksaritanont T, Lu P, Gorham L, Sternfeld F, and Vyas KP (2000) Interspecies comparison and role of human cytochrome P450 and flavin-containing monooxygenase in hepatic metabolism of L-775,606, a potent 5-HT(1D) receptor agonist. *Xenobiotica* **30**:47-59.
- Reid JM, Walker DL, Miller JK, Benson LM, Tomlinson AJ, Naylor S, Blajeski AL, LoRusso PM, and Ames MM (2004) The metabolism of pyrazoloacridine (NSC 366140) by cytochromes p450 and flavin monooxygenase in human liver microsomes. *Clin Cancer Res* **10**:1471-1480.
- Ring BJ, Catlow J, Lindsay TJ, Gillespie T, Roskos LK, Cerimele BJ, Swanson SP, Hamman MA, and Wrighton SA (1996) Identification of the human cytochromes P450 responsible for the in vitro formation of the major oxidative metabolites of the antipsychotic agent olanzapine. *J Pharmacol Exp Ther* **276**:658-666.
- Ring BJ, Wrighton SA, Aldridge SL, Hansen K, Haehner B, and Shipley LA (1999) Flavin-containing monooxygenase-mediated N-oxidation of the M(1)-muscarinic agonist xanomeline. *Drug Metab Dispos* **27**:1099-1103.
- Rodrigues AD (1999) Integrated cytochrome P450 reaction phenotyping: attempting to bridge the gap between cDNA-expressed cytochromes P450 and native human liver microsomes. *Biochem Pharmacol* **57**:465-480.
- Rodriguez RJ and Miranda CL (2000) Isoform specificity of N-deacetyl ketoconazole by human and rabbit flavin-containing monooxygenases. *Drug Metab Dispos* **28**:1083-1086.
- Rouer E, Lemoine A, Cresteil T, Rouet P, and Leroux JP (1987) Effects of genetic or chemically induced diabetes on imipramine metabolism. Respective involvement of flavin monooxygenase and cytochrome P-450-dependent monooxygenases. *Drug Metab Dispos* **15**:524-528.
- Sharma A and Hamelin BA (2003) Classic histamine H1 receptor antagonists: a critical review of their metabolic and pharmacokinetic fate from a bird's eye view. *Curr Drug Metab* **4**:105-129.
- Shimizu M, Denton T, Kozono M, Cashman JR, Leeder JS, and Yamazaki H (2011) Developmental variations in metabolic capacity of flavin-containing mono-oxygenase

- 3 in childhood. *Br J Clin Pharmacol* **71**:585-591.
- Shimizu M, Shiraishi A, Sato A, Nagashima S, and Yamazaki H (2015) Potential for drug interactions mediated by polymorphic flavin-containing monooxygenase 3 in human livers. *Drug Metab Pharmacokinet* **30**:70-74.
- Shimizu M, Yano H, Nagashima S, Murayama N, Zhang J, Cashman JR, and Yamazaki H (2007) Effect of genetic variants of the human flavin-containing monooxygenase 3 on N- and S-oxygenation activities. *Drug Metab Dispos* **35**:328-330.
- Shiraga T, Yajima K, Teragaki T, Suzuki K, Hashimoto T, Iwatsubo T, Miyashita A, and Usui T (2012) Identification of enzymes responsible for the N-oxidation of darexaban glucuronide, the pharmacologically active metabolite of darexaban, and the glucuronidation of darexaban N-oxides in human liver microsomes. *Biol Pharm Bull* **35**:413-421.
- Sono M, Roach MP, Coulter ED, and Dawson JH (1996) Heme-Containing Oxygenases. *Chem Rev* **96**:2841-2888.
- Stevens JC, Shipley LA, Cashman JR, Vandenbranden M, and Wrighton SA (1993) Comparison of human and rhesus monkey in vitro phase I and phase II hepatic drug metabolism activities. *Drug Metab Dispos* **21**:753-760.
- Stewart BH, Persky L, and Kiser WS (1967) The use of dihydyl sulfoxide (DMSO) in the treatment of interstitial cystitis. *J Urol* **98**:671-672.
- Stormer E, Roots I, and Brockmoller J (2000) Benzydamine N-oxidation as an index reaction reflecting FMO activity in human liver microsomes and impact of FMO3 polymorphisms on enzyme activity. *Br J Clin Pharmacol* **50**:553-561.
- Uno Y, Shimizu M, and Yamazaki H (2013) Molecular and functional characterization of flavin-containing monooxygenases in cynomolgus macaque. *Biochem Pharmacol* **85**:1837-1847.
- Washio T, Arisawa H, Kohsaka K, and Yasuda H (2001) Identification of human drug-metabolizing enzymes involved in the metabolism of SNI-2011. *Biol Pharm Bull* **24**:1263-1266.
- Wienkers LC and Heath TG (2005) Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov* **4**:825-833.
- Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, and Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC_i/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* **32**:1201-1208.
- Yamazaki M, Shimizu M, Uno Y, and Yamazaki H (2014) Drug oxygenation activities mediated by liver microsomal flavin-containing monooxygenases 1 and 3 in humans, monkeys,

- rats, and minipigs. *Biochem Pharmacol* **90**:159-165.
- Yanni SB, Annaert PP, Augustijns P, Bridges A, Gao Y, Benjamin DK, Jr., and Thakker DR (2008) Role of flavin-containing monooxygenase in oxidative metabolism of voriconazole by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **36**:1119-1125.
- Yanni SB, Annaert PP, Augustijns P, Ibrahim JG, Benjamin DK, Jr., and Thakker DR (2010) In vitro hepatic metabolism explains higher clearance of voriconazole in children versus adults: role of CYP2C19 and flavin-containing monooxygenase 3. *Drug Metab Dispos* **38**:25-31.
- Yeung CK, Lang DH, Thummel KE, and Rettie AE (2000) Immunoquantitation of FMO1 in human liver, kidney, and intestine. *Drug Metab Dispos* **28**:1107-1111.
- Yu J, Brown DG, and Burdette D (2010) In vitro metabolism studies of nomifensine monooxygenation pathways: metabolite identification, reaction phenotyping, and bioactivation mechanism. *Drug Metab Dispos* **38**:1767-1778.
- Yu Y, Fuscoe JC, Zhao C, Guo C, Jia M, Qing T, Bannon DI, Lancashire L, Bao W, Du T, Luo H, Su Z, Jones WD, Moland CL, Branham WS, Qian F, Ning B, Li Y, Hong H, Guo L, Mei N, Shi T, Wang KY, Wolfinger RD, Nikolsky Y, Walker SJ, Duerksen-Hughes P, Mason CE, Tong W, Thierry-Mieg J, Thierry-Mieg D, Shi L, and Wang C (2014) A rat RNA-Seq transcriptomic BodyMap across 11 organs and 4 developmental stages. *Nat Commun* **5**:3230.
- Yue F, Cheng Y, Breschi A, Vierstra J, Wu W, Ryba T, Sandstrom R, Ma Z, Davis C, Pope BD, Shen Y, Pervouchine DD, Djebali S, Thurman RE, Kaul R, Rynes E, Kirilusha A, Marinov GK, Williams BA, Trout D, Amrhein H, Fisher-Aylor K, Antoshechkin I, DeSalvo G, See LH, Fastuca M, Drenkow J, Zaleski C, Dobin A, Prieto P, Lagarde J, Bussotti G, Tanzer A, Denas O, Li K, Bender MA, Zhang M, Byron R, Groudine MT, McCleary D, Pham L, Ye Z, Kuan S, Edsall L, Wu YC, Rasmussen MD, Bansal MS, Kellis M, Keller CA, Morrissey CS, Mishra T, Jain D, Dogan N, Harris RS, Cayting P, Kawli T, Boyle AP, Euskirchen G, Kundaje A, Lin S, Lin Y, Jansen C, Malladi VS, Cline MS, Erickson DT, Kirkup VM, Learned K, Sloan CA, Rosenbloom KR, Lacerda de Sousa B, Beal K, Pignatelli M, Flicek P, Lian J, Kahveci T, Lee D, Kent WJ, Ramalho Santos M, Herrero J, Notredame C, Johnson A, Vong S, Lee K, Bates D, Neri F, Diegel M, Canfield T, Sabo PJ, Wilken MS, Reh TA, Giste E, Shafer A, Kutuyavin T, Haugen E, Dunn D, Reynolds AP, Neph S, Humbert R, Hansen RS, De Bruijn M, Selleri L, Rudensky A, Josefowicz S, Samstein R, Eichler EE, Orkin SH, Levasseur D, Papayannopoulou T, Chang KH, Skoultschi A, Gosh S, Disteche C, Treuting P, Wang Y, Weiss MJ, Blobel GA, Cao X, Zhong S, Wang T, Good PJ, Lowdon RF, Adams LB, Zhou XQ, Pazin MJ, Feingold EA, Wold B, Taylor J, Mortazavi A, Weissman SM, Stamatoyannopoulos JA, Snyder MP, Guigo R, Gingeras TR, Gilbert DM, Hardison RC, Beer MA, Ren B, and Mouse EC (2014) A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**:355-364.
- Zhou D, Zhang M, Ye X, Gu C, Piser TM, Lanoue BA, Schock SA, Cheng YF, and Grimm SW (2011) In vitro metabolism of alpha7 neuronal nicotinic receptor agonist AZD0328 and enzyme identification for its N-oxide metabolite. *Xenobiotica* **41**:232-242.

Ziegler DM (2002) An overview of the mechanism, substrate specificities, and structure of FMOs. *Drug Metab Rev* **34**:503-511.