

博士論文

創薬プロセスにおける P450 を介した薬物間相互作用予測
に関する研究

平成 27 年度

小杉 洋平

目次

略語一覧	1
序論	3
第 I 章 当局ガイドラインおよびガイダンスの薬物間相互作用リスク評価の比較	7
第 1 節 緒言	7
第 2 節 実験材料と実験方法	8
I-2-i) 試薬	8
I-2-ii)-a 競合阻害試験	9
I-2-ii)-b 代謝物分析	10
I-2-ii)-c 阻害形式および K_i の算出	11
I-2-iii)-a ミクロソーム反応液中の非結合型分率測定	11
I-2-iii)-b 阻害剤濃度測定	12
I-2-iii)-c ミクロソーム反応液中非結合型分率の計算	13
I-2-iv) 臨床薬物間相互作用データの収集	13
I-2-v) 臨床 DDI の分類	14
第 3 節 結果	15
I-3-i) K_i および $f_{u,mic}$ の算出	15
I-3-ii) EMA のドラフトガイドラインにおける DDI ポテンシャルの評価	18
I-3-iii) FDA ドラフトガイダンスと EMA ドラフトガイドラインの差異	22
第 4 節 考察	22
第 5 節 小括	26
第 II 章 血清添加凍結肝細胞を用いた DDI の定量的予測	27
第 1 節 緒言	27
第 2 節 実験材料と実験方法	28
II-2-i) 試薬	28
II-2-ii)-a 凍結肝細胞の融解	29
II-2-ii)-b 凍結肝細胞を使った速度論解析	29
II-2-ii)-c 凍結肝細胞を使った阻害試験	30
II-2-ii)-d 代謝物濃度の測定	30
II-2-ii)-e 速度論パラメータおよび阻害定数の算出	31
II-2-iii) 臨床薬物間相互作用データの収集	32

II-2-iv) モデルの予測精度比較	34
II-2-v) IC ₅₀ 値に基づく臨床 DDI の分類	34
第 3 節 結果.....	35
II -3-i) 阻害定数の算出.....	35
II -3-ii) <i>In vitro</i> IC ₅₀ および K _i に基づく DDI ポテンシャルの評価.....	39
II -3-iii) Static model による定量的な DDI 予測	40
第 4 節 考察.....	42
第 5 節 小括.....	45
第 III 章 CYP3A の活性化の <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> 評価	46
第 1 節 緒言.....	46
第 2 節 実験材料と実験方法	47
III-2-i) 試薬.....	47
III-2-ii) 肝ミクロソームおよび CYP3A 発現系を用いた <i>in vitro</i> 試験	48
III-2-iii)-a カニクイザルを用いた薬物動態試験	49
III-2-iii)-b サンプルの前処理	50
III-2-iv) 代謝物濃度の測定.....	50
III-2-v) 薬物動態パラメータ解析	51
III-2-vi) 統計解析.....	51
第 3 節 結果.....	51
III -3-i) CYP3A を介した代謝に及ぼす efavirenz の影響.....	51
III -3-ii) Efavirenz による CYP3A を介した midazolam 代謝の活性化.....	52
III -3-iii) CYP3A4 および CYP3A5 発現系における活性化	53
III -3-iv) カニクイザルにおける midazolam の薬物動態に与える efavirenz の影響	54
第 4 節 考察.....	57
第 5 節 小括.....	61
総括	62
本論文内容の誌上発表	66
謝辞	67
参考文献	68

略語一覧

AFE	Average fold error
AIC	Akaike's Information Criterion
AUC	血漿中濃度曲線下面積
AUC _i /AUC	基質濃度の AUC 上昇率
β-NADP+	β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
CL/F	経口クリアランス
C _{max}	循環血漿中最大濃度
CYP	シトクロム P450 の個別分子種
DDI	薬物間相互作用
DMSO	Dimethylsulphoxide
Dose	阻害剤の投与量
EMA	欧州薬品庁
F _a	消化管吸収率
FDA	米国食品薬品局
f _{mCYP}	基質の代謝における各 P450 寄与率
f _p	血漿の非結合型分率
f _{u,mic}	ミクロソーム反応液中非結合型分率
G-6-P	Glucose-6-phosphate
G-6-PDH	Glucose-6-phosphate dehydrogenase
HHSS	血清添加凍結肝細胞
[I]	阻害剤の血漿中濃度
[I] _{av}	平均血漿中濃度

$[I]_{in}$	最大門脈血漿中濃度
$[I]_{max}$	阻害剤の最大循環血漿中濃度
k_a	吸収速度定数
K_i	阻害定数
LC/MS/MS	高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置
MBI	Mechanism-based P450 inactivation
MRT	平均滞留時間
OATP	有機アニオントランスポーター
P450	シトクロム P450 の総称
P-gp	P 糖タンパク質
PK	薬物動態
Q_h	ヒト肝血流
Q_g	ヒト小腸血流
rhCYP	CYP 分子種発現系
RMSE	Root-mean-square error
UGT	UDP-グルクロン酸転移酵素
UPLC	超液体クロマトグラフ
τ	投与間隔

序論

薬物間相互作用 (DDI)は、薬物同士の併用による薬効の増強、減弱および副作用を生じさせることを指し、主に薬力学的相互作用と薬物動態学的相互作用に分類されている。薬力学的相互作用は、薬物の体内動態には変化がないものの受容体や酵素の作用部位を介した相互作用により、薬理効果の増強や減弱が起こることである。一方、薬物動態学的相互作用は、薬物の体内動態における吸収、分布、代謝および排泄過程に影響を及ぼし血中や組織中の薬物濃度の変化が生じるものである。DDI の約 70%が薬物動態学的相互作用であり、その中でも薬物代謝を介した相互作用が大半を占めることが報告されている (千葉, 1995)。

薬物の代謝過程は、シトクロム P450 (総称を P450, 個別分子種を CYP と略す)を介するものと介さない場合とに分類される。P450 は、生体内の様々な代謝に関与するヘムタンパク質であり、上市されている医薬品の約 75%の代謝に関与していることが報告されている (Williams et al., 2004)。残りの 25%を占める P450 を介さない non-P450 薬物代謝酵素としては、アルデヒド還元酵素などによる還元反応、エステラーゼなどによる加水分解反応、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)や硫酸転移酵素による抱合反応、アルデヒドオキシダーゼやキサンチンオキシダーゼによる酸化代謝が知られている。これら non-P450 薬物代謝酵素に関する報告は、近年増えつつあるものの、臨床における薬物相互作用の報告は限定的である (Oda et al., 2015; Williams et al., 2004)。代謝部位における臨床の薬物相互作用を代謝酵素別に分類した場合、その 90%以上に P450 が関与していることが報告されており (千葉, 1995)、P450 を介した DDI 予測の重要性は極めて高い。

P450 を介した DDI には、酵素阻害によって併用基質濃度を上昇させる場合

や酵素の活性化および誘導によって併用基質濃度を減少させる場合がある。薬効の減弱や副作用の増強の程度によっては併用を制限されるのみならず mibefradil, terfenadine, cisapride, cerivastatin, astemizole などのように市場から姿を消すことになる (Ajayi et al., 2000)。従って、創薬段階において P450 に対する阻害、誘導および活性化のリスクが小さい化合物を選択することは極めて重要である。

これまでに P450 の阻害について多くの DDI 予測事例が報告されている (Bachmann and Lewis, 2005; Blanchard et al., 2004; Einolf, 2007; Ito et al., 2004)。しかしながら、多くの研究機関が文献から *in vitro* 試験の阻害率 (IC_{50} や K_i) を引用しており、正確な DDI 予測を困難にしている。また、予測結果に大きく影響を与える血漿タンパク結合率や *in vitro* 試験時の反応液中のタンパク結合率を考慮した場合、実験時のわずかな誤差が予測結果に大きな影響を与える。特に化合物の活性を上げるため脂溶性の高い構造変化が行われると、タンパク結合率は増加する傾向があり、高いタンパク結合率を有する化合物ほど DDI の予測結果にタンパク結合測定の実験誤差が大きな影響を及ぼす可能性がある。

医薬品開発における P450 に対する阻害について、2006 年に発出された米国食品薬品局 (FDA) のドラフトガイダンスや 2010 年に発出された欧州薬品庁 (EMA) のドラフトガイドラインは、肝ミクロソームなど *in vitro* 試験から算出された阻害定数と阻害剤の血漿中濃度の比 ($[I]/K_i$) を用いて臨床相互作用試験実施の有無を判断するよう記載されている。EMA はタンパク結合で補正する非結合型濃度の基準の $[I]/K_i$ を、FDA は総濃度基準の $[I]/K_i$ の使用を要求しており、臨床相互作用実施の基準が両機関で異なっている。この違いがどのようにリスク評価に影響するかは明らかになっておらず、その違いを明らかにすることは医薬品開発を進める上で極めて重要である。日本では、薬物相互作用のガイドラ

インが 10 年ぶりに改定され、厚生労働省から 2014 年 7 月に薬物相互作用ガイドラインが発出された。[I]については総濃度基準を用い、反応液における阻害剤の非結合型濃度が総濃度よりも顕著に低い場合、 K_i については非結合型基準を用いるよう記載されている。[I]/ K_i が 0.1 以上の場合に DDI のリスクがあると判断されるため、FDA のドラフトガイドラインに近い評価基準となっている。

P450 の誘導については DDI の予測事例が数多く報告されている (Almond et al., 2009; Einolf et al., 2014; Fahmi et al., 2008; Guo et al., 2013; Hewitt et al., 2007; Kato et al., 2005; Shou et al., 2008)。一方、誘導と同じように併用基質濃度を減少させる可能性がある活性化については十分な臨床事例がなく、かつ基質特異性や種差等も明らかになっていない。しかしながら、*in vitro* 試験では多くの化合物が P450 代謝を活性することが報告されており (Hutzler and Tracy, 2002; Kerr et al., 1994; Maenpaa et al., 1998; Ngui et al., 2000; Schwab et al., 1988; Shou et al., 1994; Wang et al., 2000; Wiebel et al., 1971), 創薬プロセスにおいてどのようにリスク評価するかが問題となっている。

本研究では、P450 の阻害と活性化に着目し、レトロスペクティブ研究によって DDI のリスク評価の妥当性を検証することで、創薬プロセスにおける正確かつ実践的な DDI 評価法を構築することを目的とした。第 I 章では、実測データに基づいた両基準の比較から、それぞれの DDI リスク評価の妥当性について検証するとともに、それらの基準が創薬プロセスに適用できるか評価した。第 II 章では、FDA ガイダンスと EMA ガイドラインの基準の違いの原因となっている血漿およびマイクロソームタンパク結合に着目し、タンパク結合の影響を *in vitro* 試験に組み入れた血清添加凍結肝細胞を用いた P450 阻害試験の DDI 予測精度を検証した。第 III 章では、創薬プロセスにおける活性化のリスク評価のため、基質特異性および種差を明らかにし、動物を用いた *in vivo* 試験の実践的な

利用法について検討した。本研究によって当局のリスク評価の妥当性を明らかにするとともに、創薬段階における P450 阻害および活性化の正確かつ実践的なリスク評価法を構築したので、以下に詳述する。

第 I 章 当局ガイドラインおよびガイダンスの薬物間相互作用リスク評価の比較

第 1 節 緒言

P450 を介した DDI について 2006 年に FDA より薬物間相互作用のドラフトガイダンス、2010 年に EMA より薬物間相互作用のドラフトガイドラインが発出された。両機関は、DDI リスクの指標として、阻害剤の血漿中濃度 ($[I]$) と肝ミクロソームなど *in vitro* 試験から算出された阻害定数 (K_i) の比を推奨した。しかしながら、EMA は非結合型濃度の基づく K_i および最大循環血漿中濃度 ($[I]_{\max}$) の使用を、FDA は総濃度基準の K_i および $[I]_{\max}$ の使用を要求しており、この違いがどのようにリスク評価に影響するかは明らかになっていない。

$[I]_{\max}/K_i$ を使った DDI 予測についていくつかのレトロスペクティブ研究が報告されているが (Bachmann and Lewis, 2005; Blanchard et al., 2004; Einolf, 2007; Ito et al., 2004), 大半の研究が文献から K_i を引用していることが多い。最近の報告では、非特異的なミクロソームへの結合が P450 阻害試験における阻害ポテンシャルの推定に大きな影響を与えることが明らかになっており (Brown et al., 2006; Grime and Riley, 2006; Margolis and Obach, 2003; Tran et al., 2002), 異なる実験条件で実施された fluconazole, ketoconazole および itraconazole の K_i は、10 倍以上違うことが報告されている (Brown et al., 2006)。従って、研究室間の K_i のばらつきが、レトロスペクティブ研究において正確な DDI 予測を困難にしている可能性がある。本研究において我々は、非結合型および総濃度基準の K_i を実測し、EMA と FDA の DDI に対するリスク評価の違いを明らかにした。

小腸において CYP3A と排出トランスポーターである P 糖タンパク質 (P-gp)

が、薬物の吸収に大きな影響を与えることが報告されている。特に CYP3A の阻害は、肝臓よりも小腸において寄与が大きいことが複数の臨床研究において示唆されており、定量的な DDI リスク評価において小腸の DDI を考慮することは重要である (Galetin et al., 2010; Galetin et al., 2007; Kato et al., 2003; Rostami-Hodjegan and Tucker, 2004; Tachibana et al., 2009)。2006 年に発出された FDA ドラフトガイダンスでは小腸の DDI に対する記述がなかったが、EMA は経口剤に対しては CYP3A4 阻害を介した小腸の DDI リスク評価を実施するよう記載している。これまでのところ、EMA の小腸に対する DDI のリスク評価の妥当性に関する研究は実施されていない。

本研究では、小腸の DDI を含む EMA のドラフトガイドラインの妥当性を明らかにするとともに、FDA の DDI リスク評価法による結果との違いについて言及した。また、適切な $[I]/K_i$ のクライテリアを設定し、その DDI 評価の創薬プロセスにおける有用性を調べた。

第 2 節 実験材料と実験方法

I-2-i) 試薬

バキュロウイルスを用いた昆虫細胞由来のヒト CYP 分子種発現系 (rhCYP) およびコントロールミクロソームは BD Biosciences 社 (San Jose, CA, USA) から購入した。Ranitidine hydrochloride, ketoconazole, terbinafine, nifedipine, roxithromycin, diltiazem hydrochloride, omeprazole, diphenhydramine hydrochloride, sulphamethizole, amitriptyline hydrochloride, tolbutamide および testosterone は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan) から購入した。Fluvoxamine, verapamil, labetalol hydrochloride, mexiletine hydrochloride, fluoxetine, miconazole, sulphaphenazole および benzbromarone は Sigma Chemicals 社 (St. Louis, MO, USA) から購入した。

Felodipine, cyclosporine, sertraline および citalopram hydrobromide は Toronto Research Chemicals 社 (Toronto, Ontario, Canada) から購入した。Fluconazole は LKT Laboratories 社 (St. Paul, MN, USA) から購入した。Itraconazole および amiodarone は MP Biomedical 社 (Irvine, CA, USA) から購入した。Propafenone hydrochloride および sulphinpyrazone は ICN Biomedicals 社 (Aurora, Ohio, USA) から購入した。Isradipine は USP The United States Pharmacopeial Convention 社 (Rockville, MD, USA) から購入した。Fluvastatin は Calbiochem 社 (San Diego, CA, USA) から購入した。Azithromycin は Astatech 社 (Bristol, PA, USA) から購入した。Quinidine sulphate および bufuralol hydrochloride は Ultrafine chemicals 社 (Manchester, UK) から購入した。β-nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β-NADP⁺), glucose-6-phosphate (G-6-P) および glucose-6-phosphate dehydrogenase (G-6-PDH) は Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。その他の試薬は HPLC 用試薬, 試薬特級またはそれに相当する試薬を使用した。

I-2-ii)-a 競合阻害試験

Tolbutamide, bufuralol および testosterone はそれぞれ CYP2C9, CYP2D6 および CYP3A4 の代表的基質として使用した。反応容量は 100 μL で, 各試薬の反応液中の組成は, CYP 発現系 (100 nmol/L CYP2C9, 2 nmol/L CYP2D6, 10 nmol/L CYP3A4), リン酸緩衝液 (pH 7.4, 50 mmol/L), NADPH 生成系として MgCl₂ (5 mmol/L), β-NADP⁺ (0.5 mmol/L), G-6-P (5 mmol/L) および G-6-PDH (1.5 unit/mL) とした。総タンパク質量は, コントロールミクロソームを用いて 0.5 mg/mL に調製した。基質濃度は, tolbutamide (53, 107, 213 および 427 μmol/L), bufuralol (2.2, 4.4, 8.8 および 35 μmol/L), testosterone (20, 40, 120 および 240 μmol/L) に設定した。K_i を決定する際の阻害剤濃度は 0, 1, 3, 10, 30, 100 μmol/L

を基準に適宜阻害剤ごとに調製した。基質および阻害剤はそれぞれメタノールおよびジメチルスルホキシド (DMSO)に溶解し、それぞれの有機溶媒濃度は0.5% (v/v)とした。CYP2D6, CYP2C9 および CYP3A4 の反応時間はそれぞれ 20, 30 および 15 min に設定し、37°Cの水浴でインキュベーションした後、100 μ L のアセトニトリルの添加により反応を停止した。反応後のサンプルは、1,500g で 10 min 遠心分離し、その上清を分析に供した。

I-2-ii)-b 代謝物分析

超液体クロマトグラフ (UPLC; Waters, Milford, MA)を用いて代謝物の分離分析を行い、4'-hydroxytolbutamide、1'-hydroxybufuralol および 6 β -hydroxytestosterone の紫外 (UV) 吸収スペクトルを測定した。LC の分析条件は以下の通りである。

カラム: Acquity BEH C18 column (100 \times 2.1 mm, 1.7 μ m, Waters, Milford, MA)

移動相 A: 20 mmol/L phosphate buffer (pH 7)/acetonitrile (9 : 1, v/v)

移動相 B: 20 mmol/L phosphate buffer (pH 7)/acetonitrile (3 : 7, v/v)

流速: 0.5 mL/min.

カラム温度: 50°C

UV 検出: 250 nm (6 β -hydroxytestosterone), 230 および 250 nm (4'-hydroxytolbutamide), 247 nm (1'-hydroxybufuralol).

グラジエント条件(移動相 B の%): 4'-hydroxytolbutamide 8-24% (0-2.2 min), 95% (2.21-3.9 min), 8% (3.91-4.1 min); 1'-hydroxybufuralol 12-24% (0-2.2 min), 95% (2.21-3.9 min), 12% (3.91-4.1 min); 6 β -hydroxytestosterone 35% (0-1 min), 95% (1.01-2.48 min), 35% (2.49-2.5 min).

I-2-ii)-c 阻害形式および K_i の算出

阻害形式および K_i 値は GraphPad PRISM ver 5 (La Jolla, CA, USA)を用いて決定した。 K_i 値は非線形最小 2 乗法で重み $1/v^2$ を用いて下記の式より算出した。

$$\text{競合阻害 } [v = V_{\max} \cdot S / (K_m \cdot [1 + [I]/K_i] + S)]$$

$$\text{非競合阻害 } [v = V_{\max} \cdot S / ((K_m + S) \cdot [1 + [I]/K_i])]$$

$$\text{不競合阻害 } [v = V_{\max} \cdot S / ((K_m / (1 + [I]/\alpha K_i) + S) \cdot (1 + [I]/\alpha K_i))]$$

$$\text{混合阻害 } [v = V_{\max} \cdot S / ((K_m \cdot [1 + [I]/K_i] + S \cdot [1 + [I]/\alpha K_i]))]$$

なお, testosterone については下記式に従い, hill 係数を考慮した。

$$\text{競合阻害 } [v = V_{\max} \cdot S^n / (K_m^n \cdot [1 + [I]/K_i] + S^n)],$$

$$\text{非競合阻害 } [v = V_{\max} \cdot S^n / ((K_m^n + S^n) \cdot [1 + [I]/K_i])],$$

$$\text{不競合阻害 } [v = V_{\max} \cdot S^n / ((K_m / (1 + [I]/\alpha K_i) + S^n) \cdot (1 + [I]/\alpha K_i))]$$

$$\text{混合阻害 } [v = V_{\max} \cdot S^n / ((K_m^n \cdot [1 + [I]/K_i] + S^n \cdot [1 + [I]/\alpha K_i]))]$$

適切なモデルを決定するために, Akaike's Information Criterion (AIC) を使用した。Ranitidine の K_i 値は, 溶解性のため正確に算出できなかったため $K_i = IC_{50}/2$ とした。

I-2-iii)-a ミクロソーム反応液中の非結合型分率測定

阻害剤のミクロソーム反応液中の非結合型分率を平衡透析法 (HTD96a; HTDialysis, CT, USA)によって測定した。NADPH 産生系の $MgCl_2$ を精製水に変えた以外は, 上記と同様の反応液組成で実施した。平衡透析プレートの各ウェルは透析膜で 2 分されており, 片側 (ミクロソーム側)には反応液 150 μ L を, もう片側 (緩衝液側)には 50 mmol/L リン酸緩衝液 150 μ L を添加した。各々の化合物は終濃度として 10 μ mol/L になるようミクロソーム側に添加した (ただし, fluconazole, itraconazole, azithromycin, amiodarone, sulphaphenazole および sulphamethizole の終濃度は 1 μ mol/L とした)。平衡透析プレートは, 87 rpm (Type

NR-1; TAI TEC, Tokyo, Japan)室温下で 20 h 振とうした. アセトニトリルで除タンパク後, 1,500g で 10 min 遠心分離し, 上清中の fluconazole, cyclosporine, itraconazole, azithromycin, amiodarone, sulphaphenazole および sulphamethizole の濃度は, 高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS)で, その他の阻害剤については UPLC-UV で測定した. LC/MS/MS 分析時の内部標準物質には 100 ng/mL の alprenolol を用いた (ただし, simvastatin 分析時には cyclosporine を使用した).

I-2-iii)-b 阻害剤濃度測定

LC/MS/MS は, LC 部に Prominence UFLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan) を用い, 脱気装置は DGU-20A, 送液ポンプは 10AD-VP または LC-20AD, オートサンプラーは SIL-20ACHT, カラムオーブンは CTO-20AC を使用した. MS 部は API 3000 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA)を使用した. 解析には Analyst softwareTM (version 1.4.2) を使用した. LC および MS の分析条件は以下の通りである.

カラム: Shim-pack XR-ODS (2.0 mm i.d. × 30 mm, 2.2 μm; Shimadzu, Tokyo, Japan)

移動相 A: 0.2% (v/v) formic acid in 0.01 mol/L ammonium formate (pH 3.0)

移動相 B: 0.2% (v/v) formic acid in acetonitrile

流速: 0.5 mL/min.

カラム温度: 50°C

グラジエント条件(移動相 B の%): 10% (0-0.2 min), 10- 99% (0.2-0.4 min), 99% (0.4-2.5 min), 10% (2.6-3.7 min)

マスマスペクトロメトリー: Cyclosporine, m/z 1202.8→100.3; fluconazole, m/z 306.9→220.3; itraconazole, m/z 707.3→392.2; azithromycin, m/z 749.5→591.4;

amiodarone, m/z 646.0→100.1; sulphaphenazole, m/z 315.1→157.8; sulphamethizole, m/z 271.0→155.9; simvastatin, m/z 419.2→199.2; alprenolol, m/z 250.3→116.3.

UPLC-UV の分析条件は以下の通りである.

カラム: Acquity BEH C18 column (100 × 2.1 mm, 1.7 μm, Waters , Milford, MA)

移動相 A: 10 mmol/L ammonium acetate/water/acetonitrile (1:8:1, v/v/v)

移動相 B: 10 mmol/L ammonium acetate/acetonitrile (1:9, v/v)

流速: 0.5 mL/min.

カラム温度: 40°C

UV 検出: 220 nm (miconazole, mexiletine), 222 nm (sertraline, roxithromycin, diphenhydramine, fluoxetine), 250 nm (other drugs) .

Gradient (移動相 B の%): 25-95% (0-1.5 min), 95% (1.5-2.7 min), 25% (2.71-3.5 min) .

I-2-iii)-c ミクロソーム反応液中非結合型分率の計算

ミクロソーム反応液中非結合型分率 ($f_{u,mic}$) は下記式より算出した.

$$f_{u,mic} = \frac{C_{buffer}}{C_{mixture}} \quad (1)$$

$C_{mixture}$: ミクロソーム側の化合物濃度, C_{buffer} : 緩衝液側

なお, 非結合型の K_i 値 ($K_{i,u}$) は下記の式により計算した.

$$K_{i,u} = K_i \cdot f_{u,mic} \quad (2)$$

I-2-iv) 臨床薬物間相互作用データの収集

臨床の薬物間相互作用試験データは, 2004 年に Ito らが報告した論文から

抽出した (Ito et al., 2004). 一つの阻害剤について複数の DDI 事例がある場合は最も AUC の変化が大きいデータをワーストケースとして採用した. ただし, cyclosporine に関しては CYP3A4 の阻害剤としてだけでなく, 有機アニオントランスポーター (OATP) や P-gp の阻害剤として知られているため (Shitara et al., 2003; Terao et al., 1996), OATP や P-gp の基質でない felodipine との相互作用事例を採用した. 循環血漿中最大濃度 ($[I]_{\max}$)およびその非結合型濃度 ($[I]_{\max,u}$)を $[I]/K_i$ 比の算出に使用した.

小腸における DDI リスク評価は, 小腸管腔内濃度と K_i の比である $[I]_{g1}/K_i$ もしくは $[I]_{g2}/K_i$ に基づいて実施した. $[I]_{g1}$ は経口投与時に摂取する水量 (250 mL)から最大値として計算した. $[I]_{g2}$ は下記式より算出した.

$$[I]_{g2} = \frac{F_a \cdot k_a \cdot \text{Dose}}{Q_g} \quad (3)$$

F_a は消化管吸収率, k_a は吸収速度定数, Q_g は小腸血流とし, それぞれ 1, 0.1 min^{-1} , 248 mL/min とした (Obach et al., 2006; Rostami-Hodjegan and Tucker, 2004).

I-2-v) 臨床 DDI の分類

FDA および EMA は薬物併用による AUC の変化が 80-125%以内であれば相互作用がないとみなしている (Tucker et al., 2001). Bjornsson *et al.*らの報告に基づき (Bjornsson et al., 2003), 基質の AUC 増加の程度に応じて“strong”, “moderate”, “weak”の3つのグレードに分類した (strong inhibition, $AUC_i/AUC \geq 5$; moderate inhibition, $AUC_i/AUC < 5$ to > 2 ; weak inhibition, $AUC_i/AUC \leq 2$ to > 1.25).

$[I]/K_i$ を使った DDI リスクの予測精度については下記に示した true-positive, true-negative, false-negative および false-positive を指標にし, $[I]/K_i$ の適切なクラ

イテリアは false-negative および false-positive を最小限にするよう設定した.

	$[I]/K_i > \text{cutoff value}$	$[I]/K_i < \text{cutoff value}$
AUC ratio $> R$	True Positive	False Negative
AUC ratio $< R$	False Positive	True Negative

$R = 1.25, 2, \text{ and } 5.$

Accuracy, false-negative および false-positive rate は以下のように定義した.

$$\text{Accuracy rate} = (\text{true positive} + \text{true negative})/(\text{total studies})$$

$$\text{False-negative rate} = \text{false negative}/(\text{true positive} + \text{false negative})$$

$$\text{False-positive rate} = \text{false positive}/(\text{true negative} + \text{false positive})$$

第3節 結果

I-3-i) K_i および $f_{u,mic}$ の算出

臨床での薬物相互作用事例がある 35 の阻害剤について *in vitro* における K_i および阻害形式を Table I-1 に示した. CYP に対する不競合阻害の報告は稀であることが報告されており (Zhang and Wong, 2005), 今回試験した阻害剤において不競合阻害は観察されなかった. 測定された $f_{u,mic}$ は amiodarone の 0.004 から fluconazole の 1.00 まで幅広い値を示した. Felodipine, terbinafine, itraconazole, sertraline, amiodarone および miconazole の $f_{u,mic}$ は <0.2 以下であり, 強い結合が認められた. タンパク濃度 0.5 mg/mL で測定した $f_{u,mic}$ は, 全体的に血漿の非結合型分率 (f_p) より高い傾向であった.

Table I-1 *In vitro* and *in vivo* data for DDI prediction used in this study

CYP	Substrate	Inhibitor	[I] _{max}	References	f _p	References	AUC	References	Inhibition mode	K _i	f _{u,mic}	f _p /f _{u,mic}
			(μM)		ratio		(μM)					
CYP3A4	Felodipine	Cyclosporine	0.76	(Madsen et al., 1996)	0.07	(Obach et al., 2006)	1.58	(Madsen et al., 1996)	Competitive	9.4	0.35	0.20
	Midazolam	Azithromycin	1.0	(Hardman et al., 2001)	0.69	(Kato et al., 2008)	1.27 ± 0.25	(Zimmermann et al., 1996)	ND	408	0.92	0.75
	Midazolam	Ranitidine	1.5	(Muirhead et al., 1988)	0.85	(Obach et al., 2006)	1.66 ± 0.22	(Elwood et al., 1983)	ND	500 ^a	0.98	0.87
	Midazolam	Roxithromycin	13	(Kees et al., 2000)	0.14	(Obach et al., 2006)	1.47 ± 0.25	(Backman et al., 1994)	Competitive	98.7	0.93	0.15
	Nifedipine	Quinidine	4.1	(Ito et al., 1998)	0.13	(Obach et al., 2006)	1.37 ± 0.83	(Bowles et al., 1993)	Mixed	38.8	0.91	0.14
	Nisoldipine	Ketoconazole	7.9	(Einolf, 2007)	0.01	(Obach et al., 2006)	24.4 ± 45	(Heinig et al., 1999)	Competitive	0.01	0.60	0.02
	Quinidine	Felodipine	0.0091	(Hardman et al., 2001)	0.004	(Obach et al., 2006)	1.07 ± 0.12	(Bailey et al., 1993)	Competitive	4.9	0.11	0.03
	Quinidine	Nifedipine	0.23	(Ito et al., 2002)	0.044	(Kato et al., 2008)	1.15 ± 0.15	(Bailey et al., 1993)	Mixed	6.4	0.74	0.06
	Triazolam	Fluconazole	35	(Einolf, 2007)	0.89	(Obach et al., 2006)	4.42 ± 0.97	(Varhe et al., 1996a)	Competitive	9.6	1.00	0.89
	Triazolam	Isradipine	0.03	(Hardman et al., 2001)	0.04	(Obach et al., 2008a)	0.77 ± 0.14	(Backman et al., 1999)	Mixed	2.8	0.56	0.07
	Triazolam	Itraconazole	0.48	(Einolf, 2007)	0.002	(Obach et al., 2006)	27.1 ± 12	(Varhe et al., 1994)	Competitive	0.04	0.09	0.02
	Triazolam	Terbinafine	4.0	(Einolf, 2007)	0.004	Product Label	0.81 ± 0.14	(Varhe et al., 1996b)	Noncompetitive	204	0.17	0.02
CYP2D6	Desipramine	Fluoxetine	0.46	(Einolf, 2007)	0.050	(Obach et al., 2006)	7.43 ± 7.13	(Bergstrom et al., 1992)	Competitive	1.02	0.34	0.15
	Desipramine	Sertraline	0.11	(Ito et al., 2002)	0.014	(DeVane et al., 2002)	1.54 ± 1.05	(Kurtz et al., 1997)	Competitive	2.45	0.10	0.15
	Encainide	Quinidine	1.23	(Ito et al., 1998)	0.13	(Obach et al., 2006)	11.4 ± 17	(Turgeon et al., 1990)	Competitive	0.0015	0.91	0.14
	Flecainide	Amiodarone	1.1	(Hardman et al., 2001)	0.0027	(McGinnity et al., 2005)	1.37 ± 0.77	(Funck-Brentano et al., 1994)	Mixed	201.9	0.004	0.62
	Imipramine	Citalopram	0.4	(Pelkonen et al., 1998)	0.20	(Obach et al., 2006)	1.15	(Gram et al., 1993)	Competitive	8.01	0.87	0.23
	Imipramine	Fluvoxamine	0.43	(Hardman et al., 2001)	0.23	(Obach et al., 2006)	3.63 ± 1.12	(Spina et al., 1993)	Competitive	3.97	0.63	0.37
	Imipramine	Labetalol	0.70	(Daneshmend and Roberts, 1984)	0.50	(Obach et al., 2006)	1.53 ± 1.75	(Hermann et al., 1992)	Competitive	0.49	0.84	0.59

Metoprolol	Amitriptyline	0.20	(Sennef et al., 2003)	0.01	(McGinnity et al., 2008)	1.44 ± 0.38	(Kirch et al., 1984)	Competitive	1.81	0.55	0.02	
Metoprolol	Diphenhydramine	0.26	(Einolf, 2007)	0.36	(McGinnity et al., 2008)	1.61 ± 0.80	(Hamelin et al., 2000)	Competitive	0.93	0.94	0.38	
Metoprolol	Mexiletine	1.83	(Kusumoto et al., 1998)	0.58	(McGinnity et al., 2008)	1.82 ± 0.73	(Sakamoto and Ohashi, 1995)	Competitive	11.2	0.89	0.65	
Propranolol	Diltiazem	0.13	(Einolf, 2007)	0.22	(Obach et al., 2006)	1.48 ± 1.00	(Tateishi et al., 1989)	Competitive	32.6	0.94	0.23	
Propranolol	Omeprazole	0.90	(Kang et al., 2002)	0.05	(Obach et al., 2006)	1.02 ± 0.59	(Henry et al., 1987)	Competitive	181.8	0.99	0.05	
Propranolol	Propafenone	2.6	(Kowey et al., 1989)	0.04	(Kato et al., 2008)	2.13 ± 1.14	(Kowey et al., 1989)	Mixed	0.014	0.72	0.06	
Propranolol	Verapamil	0.73	(Einolf, 2007)	0.10	(Obach et al., 2006)	1.42	(Hunt et al., 1990)	Competitive	23.5	0.85	0.12	
CYP2C9	Diclofenac	Fluvastatin	4.5	(Transon et al., 1995)	0.006	(Kato et al., 2008)	1.25 ± 0.91	(Transon et al., 1995)	Competitive	1.08	0.74	0.01
	Phenytoin	Sertraline	0.14	(Ito et al., 2002)	0.014	(DeVane et al., 2002)	1.12 ± 0.55	(Rapeport et al., 1996)	Noncompetitive	181.3	0.10	0.15
	S-Warfarin	Benzbromarone	4.7	(Takahashi et al., 1999)	0.0005	(McGinnity et al., 2005)	2.15 ± 1.22	(Takahashi et al., 1999)	Competitive	0.182	0.27	0.00
	S-Warfarin	Fluconazole	70	(Einolf, 2007)	0.89	(Obach et al., 2006)	2.84 ± 1.37	(Black et al., 1996)	Competitive	22.4	1.00	0.89
	S-Warfarin	Miconazole	0.56	(Ito et al., 2002)	0.02	(Ito et al., 2002)	4.72 ± 0.70	(O'Reilly et al., 1992)	Competitive	1.1	0.16	0.12
	S-Warfarin	Sulphinpyrazone	33	(Ito et al., 2002)	0.007	(McGinnity et al., 2005)	1.93 ± 0.35	(O'Reilly, 1982)	Competitive	85.3	0.98	0.01
	Tolbutamide	Ketoconazole	7.9	(Einolf, 2007)	0.01	(Obach et al., 2006)	1.77 ± 0.17	(Krishnaiah et al., 1994)	Mixed	3.4	0.60	0.02
	Tolbutamide	Sulphamethizole	222	(Komatsu et al., 2000)	0.14	(Komatsu et al., 2000)	1.62 ± 0.55	(Lumholtz et al., 1975)	Competitive	70.4	1.00	0.14
	Tolbutamide	Sulphaphenazole	77.9	(Komatsu et al., 2000)	0.32	(Komatsu et al., 2000)	5.28 ± 1.84	(Veronese et al., 1990)	Mixed	0.22	1.00	0.32

ND: Not determined.

^a As the IC₅₀ value of ranitidine was > 1000 µmol/L, the K_i value was presumed to be 500 µmol/L.

I-3-ii) EMA のドラフトガイドラインにおける DDI ポテンシャルの評価

程度の異なる DDI (weak, moderate-to-strong, strong) に対して false-negative rate を最小限にするような適切な $[I]/K_i$ のクライテリアを調べた。 $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ の値を 0.00006 から 6 まで変化させたときの false-negative, false-positive および accuracy rates を Fig. I-1 に示した。 EMA が指定している 0.02 をクライテリアとし、臨床で moderate および strong DDI を示す化合物を評価した場合、false-positive および false-negative rates はそれぞれ 25% および 0%であった (Fig. I-1b)。 その 0.02 を臨床で weak DDI を示す化合物を評価した場合、the false-negative rate は 39%であった (Fig. I-1a)。 Weak DDI を評価した場合、false-negatives rates を 0 にするような $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ 値は 0.0006 であった。 $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ が 0.0006 未満であった阻害剤は terbinafine, felodipine, omeprazole および sertraline であった。 Strong DDI を評価した場合、0.06 をクライテリアとした場合 false-negatives が 0 となった (Fig. I-1c)。

EMA のドラフトガイドラインにおいて高い血漿タンパク結合 (>99.0%) を有する薬物の DDI リスクは、 $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ 値として 0.004 を使用するよう記載されている。 今回使用したデータセットにおいては、7 つ阻害剤 (terbinafine, felodipine, itraconazole, fluvastatin, amiodarone, sulphinpyrazone, benzbromarone) の血漿タンパク結合が 99%以上であった。 その DDI リスクを評価したところ、 $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ 値が 0.004 と 0.02 で同様の結果であった (Table I-2)。 次に EMA のドラフトガイドラインに従い、小腸の CYP3A4 に対する DDI リスクを評価した (Table I-3)。 $[I]_{g1}$ および $[I]_{g2}$ を用いた両方法は、今回評価した全ての CYP3A4 阻害剤を DDI リスクがあると判定した。 特に、臨床で CYP3A4 基質の AUC 増加を誘発しない terbinafine, nifedipine, felodipine, isradipine の DDI リスクが過大評価される結果であった。

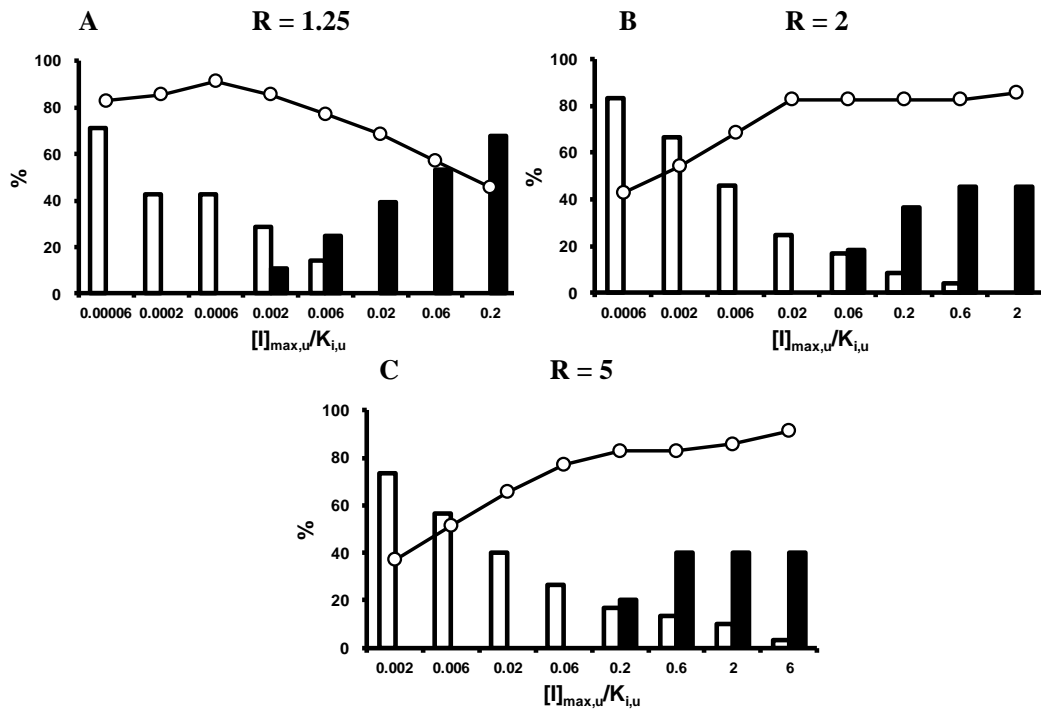


Figure I-1. Results of accuracy, false-negative, and false-positive rates evaluated using each cutoff value.

R = 1.25, 2 and 5 represent that DDIs with $AUC_i/AUC > 1.25$, 2, and 5 were considered as “positive”. Open column: false-positive rate (%), solid column: false-negative rate (%), open circle: accuracy (%).

Table I-2 Comparison of risk assessment for inhibitors with high protein binding

Substrate	Inhibitor	AUC		$[I]_{\max,u}/K_{i,u}$	DDI potential	
		ratio			0.02 ^a	0.004 ^b
Diclofenac	Fluvastatin	1.25	± 0.91	0.03	Positive	Positive
Flecainide	Amiodarone	1.37	± 0.77	0.003	Negative	Negative
Quinidine	Felodipine	1.07	± 0.12	0.00006	Negative	Negative
S-Warfarin	Benzbromarone	2.15	± 1.22	0.05	Positive	Positive
S-Warfarin	Sulphinpyrazone	1.93	± 0.35	0.003	Negative	Negative
Triazolam	Itraconazole	27.1	± 12	0.28	Positive	Positive
Triazolam	Terbinafine	0.81	± 0.14	0.00046	Negative	Negative

^aAn *in vivo* interaction study with a sensitive probe substrate is recommended if $K_i < 50$ -fold the unbound C_{\max} obtained during treatment with the highest dose, which means that an $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ ratio greater than 0.02 would be considered as “positive.”

^bAn *in vivo* interaction study is recommended if $K_i < 250$ -fold the unbound C_{\max} for drugs with a plasma protein binding $>99.0\%$, which means that an $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ ratio greater than 0.004 would be considered as “positive.”

Table I-3 Comparison of risk assessment by different methods for CYP3A4 inhibitors

Substrate	Inhibitor	Inhibitor dose (mg)	AUC ratio	$[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ ^a		$[I]_{g1}/K_i$ ^b		$[I]_{g2}/K_i$ ^c	
				value	potential	value	potential	value	potential
Lovastatin	Cyclosporin	350	1.58	0.016	Negative	123	Positive	12.4	Positive
Midazolam	Azithromycin	500	1.27 ± 0.25	0.0018	Negative	7	Positive	0.7	Positive
Midazolam	Ranitidine	150	1.66 ± 0.22	0.0026	Negative	4	Positive	0.4	Positive
Midazolam	Roxithromycin	300	1.47 ± 0.25	0.019	Negative	15	Positive	1.5	Positive
Nifedipine	Quinidine	200	1.37 ± 0.83	0.015	Negative	28	Positive	2.8	Positive
Nisoldipine	Ketoconazole	200	24.4 ± 45	9.4	Positive	107525	Positive	10839.2	Positive
Quinidine	Felodipine	10	1.07 ± 0.12	0.00006	Negative	21	Positive	2.1	Positive
Quinidine	Nifedipine	20	1.15 ± 0.15	0.0021	Negative	36	Positive	3.6	Positive
Triazolam	Fluconazole	200	4.42 ± 0.97	3.2	Positive	271	Positive	27.3	Positive
Triazolam	Isradipine	5	0.77 ± 0.14	0.00076	Negative	19	Positive	1.9	Positive
Triazolam	Itraconazole	200	27.1 ± 12	0.28	Positive	31422	Positive	3167.6	Positive
Triazolam	Terbinafine	250	0.81 ± 0.14	0.00046	Negative	15	Positive	1.5	Positive

^aThe $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ ratio greater than 0.02 would be considered as “positive.”

^bAn *in vivo* interaction study with a sensitive probe substrate is recommended if $K_i < 10$ -fold the maximum dose taken at one occasion/250 mL, which means $[I]_{g1}/K_i$ ratio greater than 0.1 would be considered as “positive.”

^cAn *in vivo* interaction study with a sensitive probe substrate is recommended if 50-fold the maximum concentration predicted in the enterocyte using equation 3, which means $[I]_{g2}/K_i$ ratio greater than 0.02 would be considered as “positive.”

I-3-iii) FDA ドラフトガイダンスと EMA ドラフトガイドラインの差異

これまでのところ、小腸における CYP3A を介した DDI リスクを正確に評価するのは難しい。そこで、小腸での DDI が無視できる CYP2D6 および CYP2C9 の阻害剤について FDA と EMA が提唱している方法に従い DDI リスクを評価した。評価した 23 の相互作用事例のうち 2 つの事例において FDA と EMA の評価法で差が認められた (Table I-4)。FDA の評価法は sulphinpyrazone と amitriptyline を DDI リスクがあると判定したが、EMA の評価法は DDI リスクがないと判定した。

Table I-4 Comparison of risk assessment for CYP2C9 and CYP2D6 inhibitors with different results in the prediction based on the FDA draft guidance and EMA draft guideline

Substrate	Inhibitor	AUC		$[I]_{\max}/K_i$		$[I]_{\max,u}/K_{i,u}$	
		ratio		value	potential	value	potential
Metoprolol	Amitriptyline	1.44	± 0.38	0.111	Positive	0.002	Negative
S-Warfarin	Sulphinpyrazone	1.93	± 0.35	0.383	Positive	0.003	Negative

The $[I]_{\max}/K_i$ and $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ ratios greater than 0.1 and 0.02, respectively, would be considered as “positive,” and a follow-up *in vivo* study is recommended by the FDA and EMA.

第 4 節 考察

DDI のリスク評価に使用する $[I]/K_i$ について、EMA のドラフトガイドラインは阻害剤の血漿中濃度だけでなく K_i についても非結合型基準で評価するよう要求しているが、FDA ドラフトガイダンス (2006 年) では総濃度基準での評価法が記載されている。これまでに、反応液中の化合物の非特異的結合が IC_{50} や K_i 値に大きく影響することが複数の研究機関で報告されており (Brown et

al., 2006; Grime and Riley, 2006; Margolis and Obach, 2003; Tran et al., 2002), 総濃度を用いた試験では実験条件によって異なる阻害率を導く可能性が高い。実際、今回の検討で評価した miconazole の tolbutamide 1'-hydroxylation に対する K_i 値は、文献値と比較して 10 倍以上低い値を示した (Kumar et al., 2006)。Miconazole の $f_{u,mic}$ は 0.16 と低い値を示したことから、研究機関間の K_i のばらつきの要因の 1 つとして反応液中の非特異的な結合が関与していることが示唆された。従って、研究機関間の違いを軽減する上では非結合型基準の K_i を使用すべきであり、EMA の評価法の方が FDA より適切と考えられる。

これまで、代謝酵素近傍中の阻害剤濃度を直接測定することは難しいため、DDI リスクを評価する上でどこの阻害剤濃度をサロゲートとして使用すべきか議論されてきた (Brown et al., 2006; Einolf, 2007; Ito et al., 2004; McGinnity et al., 2005; Obach et al., 2006)。しかしながら、基質の消失経路、小腸代謝の有無、トランスポーターの寄与、代謝物の阻害といった種々の要因を考慮しないと、血漿中阻害剤濃度を用いた DDI 予測は間違った解釈を導く可能性がある。そこで、本章では適切な阻害剤濃度を探索する代わりに、定性的な評価として新しい $[I]/K_i$ のクライテリアを設定することにした。 $[I]/K_i$ を使った DDI 予測において、mechanism-based P450 inactivation (MBI) を有する阻害剤は DDI リスクを過小評価することが報告されているため (Obach et al., 2006)、MBI が報告されている阻害剤はデータセットから除外した。

EMA のドラフトガイドラインでは、臨床相互作用試験の実施を要求する $[I]_{max,u}/K_{i,u}$ のクライテリアとして 0.02 を提示している。そのクライテリアを使用した場合、moderate および strong DDI については false-negative を出さずに評価できるものの、weak DDI については過小評価することが示された (Fig. I-1a, b)。従って、創薬プロセスにおいて moderate および strong DDI を有する化合物

のリスクを予測する上では EMA のリスク評価は効果的であると考えられる。探索段階において 1.25-2 倍程度の AUC 変化をとまなう weak DDI を考慮する必要があるか議論が必要だが, theophylline, cyclosporine, tacrolimus, tricyclic antidepressants, warfarin およびプロテアーゼ阻害剤などのように治療域が狭い薬剤については, 軽微な AUC 変化についても注意が必要である。False-negative を出さずかつ最小限の false-positive で weak DDI を評価する上では, $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ のクライテリアとして 0.0006 が適切であった (Fig. I-1a)。一方, $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ が 0.06 以上を示す阻害剤は, strong DDI を引き起こす確率が高いこと示唆された。これらのクライテリアを考慮することで, EMA のドラフトガイドラインに基づく DDI 評価は, 臨床相互作用試験の有無を決めるのみならず, DDI の程度を創薬段階で分類するのに有益であると考えられた。

EMA は, 血漿タンパク結合が強い (> 99.0%) 薬剤に対してはタンパク結合のばらつきを考慮して, 臨床相互作用試験実施のクライテリアに $[I]_{\max,u}$ と $K_{i,u}$ に 250 倍の乖離 ($[I]_{\max,u}/K_{i,u} > 0.004$) を要求している。本研究で使用したデータセットでは, 血漿タンパク結合が強い薬剤について $[I]_{\max,u}/K_{i,u} > 0.004$ を用いても $[I]_{\max,u}/K_{i,u} > 0.02$ を使用した場合のリスク評価と変わらなかった。このことから, 本データセットでは, クライテリアが妥当かどうか判断できなかった (Table I-2)。タンパク質への結合補正を必要としない DDI 評価法として血漿および血清に肝細胞を直接懸濁し, P450 阻害リスクを評価する方法が報告されており (Lu et al., 2007; Mao et al., 2011a; Shibata et al., 2008), 血漿やミクロソームタンパク質への結合が強い化合物の評価には有用な可能性がある。この評価法の有用性については第 II 章で報告する。

CYP3A の阻害剤について, EMA が提示している 2 つの小腸濃度 ($[I]_{g1}$ および $[I]_{g2}$) を用いて DDI リスクを評価したところ, 臨床における DDI が認められ

なかった4つの薬剤のDDIリスクを過大評価した (Table I-3). EMA が提示している $[I]_{g1}$ および $[I]_{g2}$ を用いた DDI リスクの評価は, 不必要な臨床相互作用試験を要求させる可能性があり, 改善の余地があることが示唆された. このような false-negative を軽減するには, 臨床投与量における溶解性の影響等を考慮するなどより実践的なクライテリアが必要と考えられる.

肝臓における DDI リスク評価の指標として, EMA は $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ が 0.02 以上, FDA は $[I]_{\max}/K_i$ が 0.1 以上の場合に臨床相互作用試験を要求している. EMA と FDA で DDI リスク評価が違う場合, それらは f_p と $f_{u,mic}$ の違いで説明可能であり, 阻害剤の $f_p/f_{u,mic}$ の比が 0.2 であれば両者のリスク評価は同等な結果となる. 肝臓のみの P450 阻害を考慮した場合, 評価した阻害剤の 63% (35のうち25の阻害剤)は $f_p/f_{u,mic}$ の比が 0.2 以下であった. したがって, FDA が提示している $[I]_{\max}/K_i$ のクライテリアの方が, EMA が提示している $[I]_{\max,u}/K_{i,u}$ のクライテリアより厳しい基準であることが示唆された. 大半の薬物が $f_p < f_{u,mic}$ であることを考慮すると, $f_p < 0.2$ を示す化合物は FDA のドラフトガイダンスの方が, EMA のドラフトガイドラインより厳しい評価となり, false positive results が発生しやすくなると考えられる. 実際, sulphinpyrazone や amitriptyline は FDA の評価に従うと DDI リスクがあると判定されるのに対し, EMA では DDI リスクがないとの判定であった (Table I-4).

結論として, EMA の評価法は小腸での DDI や weak DDI に対しては改善の余地があるものの, AUC_i/AUC が 2 倍以上を示す化合物のリスク評価に適していることが示された. また, FDA と EMA の DDI リスクに対する評価基準は, 化合物の血漿およびマイクロソームタンパク結合に依存し, 異なる結果を誘発しうることを示した. 今回解析に用いたデータセットにおいて, 肝臓のみに発現する P450 酵素に対しては, FDA のドラフトガイダンスの方が EMA のドラフ

トガイドラインより厳しい評価となり, CYP3A 阻害剤のように小腸の阻害を考慮すべき場合は, EMA のドラフトガイドラインがより厳しい評価になることが示唆された.

第5節 小括

レトロスペクティブ研究を通して, EMA と FDA のリスク評価の違いを明らかにし, それらの DDI 評価法には改善の余地があることを示した. EMA が提示しているように非結合型分率での補正は創薬プロセスに応用できる可能性があるが, その有効性についてはより定量的な DDI 予測で検証する必要性が考えられた.

第 II 章 血清添加凍結肝細胞を用いた DDI の定量的予測

第 1 節 緒言

前述のように、創薬プロセスにおいて DDI ポテンシャルの評価は重要であり、P450 阻害ポテンシャルを評価するため、*in vitro* 試験が実施されている (Bjornsson et al., 2003; Foti et al., 2010; McGinnity, 2005; Obach et al., 2005; Rioux et al., 2013; Turpeinen et al., 2006). *In vitro* 試験で測定された IC_{50} や K_i 値は、酵素近傍濃度の代替となる阻害剤濃度 ($[I]$) を組み合わせることで DDI の強度予測に使用されている (Blanchard et al., 2004; Brown et al., 2006; Grime and Riley, 2006; Ito et al., 2004; Obach et al., 2006).

タンパク質への結合は、阻害剤の薬物動態 (PK) プロファイルや *in vitro* における K_i 値に大きな影響を与えることが報告されている (Brown et al., 2006; Grime and Riley, 2006; Margolis and Obach, 2003; Sugita et al., 1981; Tran et al., 2002). フリー体仮説に従うと、非特異的にタンパク質へ結合した薬剤はターゲット酵素に作用することができず、非結合型の化合物のみがターゲット酵素に直接作用できると考えられている (Gillette and Pang, 1977). しかしながら、瞬時平衡を仮定した static モデルを使った場合、循環血漿中の平均総濃度と非結合型分率で補正した K_i の組み合わせが最も精度よく DDI を予測できると報告されている (Brown et al., 2006). また、非結合型分率を測定する際に超遠心法、平衡透析法、限外ろ過法などが使用されるが、遠心や平衡透析に用いる器材への吸着や反応液中の溶解性などいくつかの問題がある。タンパク結合率が 99.9% と 99.8% では非結合型濃度は 2 倍変化するため、特に血漿中や反応液中で高い結合率を正確に評価するのは非常に難しい。従って、タンパク結合補正による複雑性や DDI 予測の精度を改善するには、結合補正を必要としない DDI 評価法が有用である。

近年, *in vivo* における代謝酵素の状況を *in vitro* で再現した評価系として, 凍結肝細胞をヒト血清もしくは血漿に懸濁し P450 の阻害試験を実施する方法が報告された (Lu et al., 2006; Mao et al., 2011b; Shibata et al., 2008). この方法は, 血漿中タンパク質, 膜タンパク質, 細胞内オルガネラおよびミクロソームタンパク質への結合を同時に考慮することが可能である. しかしながら, 報告された方法は 瞬時平衡を仮定した static model すなわち[I] を必要とするため, [I] の情報が欠乏した創薬初期段階においては実践的ではない. 開発が進むにつれ, [I]はサロゲートとして利用可能になるが, 複数の研究機関により異なる[I]を使った DDI 予測結果が報告されており (Lu et al., 2008; Lu et al., 2006; Mao et al., 2012; Mao et al., 2011b; Shibata et al., 2008), ヒト血清または血漿懸濁凍結肝細胞を用いた P450 阻害法を使用した場合, どの阻害剤濃度との組み合わせが適切かは明らかになっていない.

本章では, 最初に, リード化合物探索時の創薬初期段階のように[I]の情報がない場合の DDI ポテンシャルを定性的に評価するため, 最適な IC₅₀ のクライテリアを探索した. 次に, 適切な[I]を決めることによって, [I]/K_iに基づく static model を使った定量的な DDI 予測法の最適化を検討した. これらの結果から, 創薬初期および後期における適切な DDI のリスク評価法について提案する.

第 2 節 実験材料と実験方法

II-2-i) 試薬

Midazolam および 1'-hydroxymidazolam は和光純薬工業株式会社 (Osaka, Japan)から購入した. Amodiaquine は Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA)から購入した. N-desethylamodiaquine は Synfine Research Inc. (Ontario, Canada)から購入した. 内部標準物質に使用した各種安定同位体は BD Bioscience

(Bedford, MA) から購入した。凍結肝細胞 (Lot. CHA and JYT, pool of 10 to 20 individuals) および InVitroGRO HT Medium は Celsis In Vitro Technologies (Baltimore, MD, USA) から購入した。非血清培地 (5100 培地) は KAC Co. (Kyoto, Japan) から購入した。ヒト血清は Biopredic International (Rennes, France) から購入した。その他の試薬は HPLC 用試薬, 試薬特級またはそれに相当する試薬を使用した。

II-2-ii)-a 凍結肝細胞の融解

ヒト凍結肝細胞は 37°C の温浴で溶かした後, 温めておいた InVitroGRO HT Medium に全量を移した。25°C, 40g で 3 min 遠心分離した後, 上清を廃棄し, 沈殿した細胞を 5100 培地で再懸濁した。トリパンブルー染色により生細胞数を数え, 生存率が 70% 以上の場合実験に使用した。再度 25°C, 40g で 3 min 遠心分離した後, 沈殿した細胞を目的濃度 (3.5×10^5 viable cells per mL) にするため冷やしておいた 100% のヒト血清に懸濁した。

II-2-ii)-b 凍結肝細胞を使った速度論解析

Amodiaquine, tolbutamide, bufuralol および midazolam の酸化代謝における V_{max} および K_m 値を算出した。Amodiaquine, tolbutamide, bufuralol および midazolam の基質濃度はそれぞれ 0.075~50, 5~900, 0.1~160 および 0.5~100 $\mu\text{mol/L}$ を使用した。すべての基質はメタノールに溶解させ, インキュベーション時の有機溶媒濃度は 0.5% (v/v) とした。基質の添加前に肝細胞を 37°C の温浴で 5 min プレインキュベーションした。基質の添加により反応を開始し, 37°C の温浴で 15 min 反応させた。等量のアセトニトリルの添加により反応を停止させた。すべてのサンプルは 13,000g で 10 min 遠心分離した後, 上清中の代謝物濃度を高速液体クロマトグラフ-タンデム質量分析装置 (LC/MS/MS) で測定し

た.

II-2-ii)-c 凍結肝細胞を使った阻害試験

基質の添加前に阻害剤を添加した肝細胞を 37°C の温浴で 5 min プレインキュベーションした。基本的に IC₅₀ 値は 0, 1, 3, 10, 30, 100 µmol/L の 6 濃度で算出したが, IC₅₀ 値に応じてその濃度域は適宜調製した。基質および阻害剤はそれぞれメタノールおよび DMSO に溶解させ, 有機溶媒の終濃度が 1% (v/v) となるよう反応溶液に添加した。基質の添加により反応を開始し, 37°C の温浴で 15 min 反応させた。Amodiaquine, tolbutamide, bufuralol および midazolam の基質濃度はそれぞれ 1, 500, 4 および 5 µmol/L を用いた。すべてのサンプルは 13,000g で 10 min 遠心分離した後, 上記と同様に上清中の代謝物濃度を LC/MS/MS で測定した。

II-2-ii)-d 代謝物濃度の測定

N-desethylamodiaquine, 1'-hydroxybufuralol, 4'-hydroxytolbutamide および 1'-hydroxymidazolam を LC/MS/MS で定量した。高速液体クロマトグラフ (LC) は Shimadzu series 20AD-VP (Shimadzu, Kyoto, Japan) を使用した。タンデム質量分析装置 (MS) は PE-Sciex API 4000 instrument (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) を使用した。データ解析には Analyst software version 1.4.2 (Applied Biosystem) を使用した。LC および MS の分析条件は以下の通りである。

カラム: Shim-pack XR-ODS (2.0 mm i.d. × 30 mm, 2.2 µm; Shimadzu, Tokyo, Japan)

移動相 A: 0.2% (v/v) formic acid in 0.01 mol/L ammonium formate (pH 3.0)

移動相 B: Acetonitrile

流速: 0.5 mL/min.

カラム温度: 50°C

グラジエント条件 (移動相 B の%): N-desethylamodiaquine 5% (0-0.2 min), 5-20% (0.2-1.0 min), 20-90% (1.0 -1.1 min), 90% (1.1 -1.4 min), 90-5% (1.4-1.5 min), 5% (1.5-3.0 min); 1'-hydroxymidazolam 20% (0-2.6 min), 20-90% (2.6-2.7 min), 90% (2.7-3.5 min), 20% (3.51-5.0 min); 1'-hydroxybufuralol および 4'-hydroxytolbutamide; 15% (0-0.2 min), 15-60% (0.2-1.0 min), 60-90% (1.1-1.4 min), 90-15% (1.4-1.5 min), 15% (1.5-3.0 min).

マススペクトロメトリー: N-desethylamodiaquine , m/z 328.5 →283.1; N-desethylamodiaquine- d_3 , m/z 331.1 →283.1; 1'-hydroxybufuralol , m/z 278.2→186.1; 1'-hydroxybufuralol- d_9 , m/z 287.0→186.0; 4'-hydroxytolbutamide, m/z 285.1→285.8; 4'-hydroxytolbutamide- d_9 , m/z 294.9→186.9; 1'-hydroxymidazolam, m/z 341.9→287.2; 1'-hydroxymidazolam- $^{13}C_3$, m/z 345.0→171.2.

II-2-ii)-e 速度論パラメータおよび阻害定数の算出

カーブフィッティングには GraphPad PRISM ver 5 (La Jolla, CA, USA)を用いた。K_m および V_{max} 値は、線形最小 2 乗法で重み 1/S² を用いて下記の式より算出した。

Simple Michaelis-Menten [$v = V_{\max} \cdot S / (K_m + S)$]

Biphasic Michaelis-Menten [$v = V_{\max 1} \cdot S / (K_{m1} + S) + V_{\max 2} \cdot S / (K_{m2} + S)$]

Sigmoidal equation [$v = V_{\max} \cdot S^n / (K_m^n + S^n)$]

適切なモデルを決定するために、Akaike's Information Criterion (AIC) を使用した。算出したパラメータを Table II-1 に示した。

Table II-1 Kinetic parameters for amodiaquine, tolbutamide, bufuralol and midazolam hydroxylation activities

P450	Substrate	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	V_{max} (pmol/min/ 10^6 cells)
CYP2C8	amodiaquine N-desalkylation	58.8 \pm 30.6	3234 \pm 1604
CYP2C9	tolbutamide 4'-hydroxylation ^a	-	-
CYP2D6	bufuralol 1-hydroxylation	25.2 \pm 5.0	22.5 \pm 4.0
CYP3A4	midazolam 1'-hydroxylation	137.5 \pm 28.7	146.4 \pm 28.4

The data represent the mean \pm computer-calculated S.E.

^aThe formation of 4'-hydroxytolbutamide was not saturated over the drug concentration range studied.

IC_{50} 値は GraphPad PRISM ver 5 の sigmoidal dose-response 機能を使用し算出された。血清添加凍結肝細胞 (HHSS)を用いた阻害試験は、 K_m より低い基質濃度を用いて実施しており、競合、非競合および混合阻害の場合、 IC_{50} は K_i 値に近似することができる (Cheng and Prusoff, 1973)。従って、HHSSを用いた阻害試験では $K_i = IC_{50}$ とした。

II-2-iii) 臨床薬物間相互作用データの収集

CYP2C9, CYP2D6 および CYP3A4 に対する阻害剤の臨床の薬物間相互作用試験データは 第 I 章で使用したものとほぼ同様のデータセットを使用した。CYP2C8 に対する阻害剤の臨床の薬物間相互作用試験データは、ワシントン大学の薬物間相互作用データベースから引用した (Copyright University of Washington 1999-2013. UW Metabolism and Transport Drug Interaction Database accessed: April, 2013.)。DDI の程度は阻害剤併用時における基質濃度の AUC 上昇率 (AUC_i/AUC)で表わした。基質の代謝経路に複数の P450 が関与する場合、 AUC_i/AUC は式 1 で表わすことができる (Brown et al., 2005; Ito et al., 2005; Ito et

al., 1998).

$$\frac{AUC_i}{AUC} = \frac{1}{\frac{f_{mCYP}}{1 + \frac{[I]}{K_i}} + (1 - f_{mCYP})} \quad (1)$$

ここで f_{mCYP} は基質の代謝における各 P450 寄与率を表わしており, tolbutamide, S-warfarin, phenytoin, midazolam, triazolam, nifedipine, nisoldipine, quinidine および felodipine の f_{mCYP} は, それぞれ 0.80, 0.87, 0.75, 0.94, 0.92, 0.71, 0.99, 0.76 および 0.99 を使用した (Brown et al., 2005). Desipramine, encainide, metoprolol および flecainide の f_{mCYP} は, それぞれ 0.88, 0.86, 0.83 および 0.41 を使用した (Ito et al., 2005). Diclofenac の f_{mCYP} は 0.95 を (Kusama et al., 2009), pioglitazone および rosiglitazone の f_{mCYP} はそれぞれ 0.63 および 0.50 を使用した (Hinton et al., 2008). 臨床相互作用試験における血漿中の阻害剤濃度 ($[I]$)には, 循環血漿中最大濃度 ($[I]_{max}$), 平均血漿中濃度 ($[I]_{av}$) および最大門脈血漿中濃度 ($[I]_{in}$) を使用した. $[I]_{av}$ および $[I]_{in}$ は下記式より算出した.

$$[I]_{av} = \frac{Dose \cdot F}{CL \cdot \tau} \quad (2)$$

$$[I]_{in} = [I]_{av} + \frac{Dose \cdot F_a \cdot k_a}{Q_h} \quad (3)$$

Dose は阻害剤の投与量, τ は投与間隔, CL/F は経口クリアランス, Q_h はヒトの肝血流, F_a は消化管吸収率, k_a は吸収速度定数を表わす. Quinidine, fluconazole, nifedipine, itraconazole, diltiazem, omeprazole, sertraline, fluvoxamine および fluoxetine の k_a は, それぞれ 0.014, 0.061, 0.056, 0.02, 0.028, 0.1, 0.007, 0.008 および 0.009 min^{-1} を用いた (Brown et al., 2005; McGinnity et al., 2008). Quinidine,

cyclosporin, nifedipine, felodipine, diltiazem, omeprazole, sertraline, fluvoxamine および fluoxetine の F_a は, 0.9, 0.282, 0.78, 0.258, 0.9, 0.7, 1.0, 1.0 および 1.0 を用いた (Galetin et al., 2007; McGinnity et al., 2008; Tachibana et al., 2009). その他の阻害剤の F_a および k_a 値は 1 および 0.1 min^{-1} を用いた. Q_h は 1610 mL/min を使用した (Ito et al., 2004).

II-2-iv) モデルの予測精度比較

DDI 予測精度の指標として式 4, 5 に記載した AFE (average fold error) と RMSE (root-mean-square error) を使用した (Brown et al., 2005; Obach et al., 2006).

$$\text{AFE} = 10 \left| \frac{1}{n} \sum \log \frac{\text{Predicted}}{\text{Observed}} \right| \quad (4)$$

$$\text{RMSE} = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (\text{Predicted} - \text{Observed})^2} \quad (5)$$

II-2-v) IC_{50} 値に基づく臨床 DDI の分類

臨床 DDI の分類は第 I 章と同様に実施した. ただし, 2 倍以上の AUC 増加を DDI リスクがあるとみなし, IC_{50} および K_i を使った DDI リスクの予測精度については以下に示した true-positive, true-negative, false-negative および false-positive を指標にし, false-negative および false-positive を最小限にするようなクライテリア探索した.

	$IC_{50} < \text{cutoff value}$	$IC_{50} \geq \text{cutoff value}$
AUC ratio > 2	True Positive	False Negative
AUC ratio \leq 2	False Positive	True Negative

なお, false-negative および false-positive rates は以下のように定義した.

$$\text{False-negative rate} = \text{false negative} / (\text{true positive} + \text{false negative})$$

$$\text{False-positive rate} = \text{false positive} / (\text{true negative} + \text{false positive})$$

第3節 結果

II-3-i) 阻害定数の算出

CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 および CYP3A4 に対する 32 の阻害剤について, 血清添加凍結肝細胞 (HHSS) を用いて *in vitro* IC_{50} 値を算出した (Table II-2). 評価した化合物の 44% (評価した 32 の阻害剤中 14 の阻害剤) は, 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上の IC_{50} 値を示した. また, 本研究に使用したデータセットは, 血漿中非結合型分率 (f_p) が 0.0005 (benzbromarone) から 0.89 (fluconazole) と幅広い値を有する阻害剤を含んでいることが示された.

Table II-2 *In vitro* and *in vivo* data for DDI prediction used in this study

CYP	Substrate	Inhibitor	[I] _{max} ^a μM	[I] _{av} μM	[I] _{av} reference	[I] _{in} μM	f _p ^a	Observed AUC ratio ^a	rhCYPs		HHSS
									K _i ^a μM	f _{u,mic} ^a	IC ₅₀ μM
CYP3A4	Midazolam	Ranitidine	1.5	0.61	(Muirhead et al., 1988)	30	0.85	1.66	500	0.98	1177
	Midazolam	Azithromycin	1.0	0.29	(Hardman et al., 2001)	42	0.69	1.27	408	0.92	108
	Midazolam	Roxithromycin	13	4.3	(Kees et al., 2000)	27	0.14	1.47	98.7	0.93	54.0
	Nifedipine	Quinidine	4.1	3.7	(Bowles et al., 1993)	7	0.13	1.37	38.8	0.91	69.1
	Triazolam	Fluconazole	35	23	(Mao et al., 2012)	48	0.89	4.42	9.6	1.00	24.1
	Felodipine	Cyclosporin	0.76	0.2	(Madsen et al., 1996)	5	0.07	1.58	9.4	0.35	13.7
	Quinidine	Nifedipine	0.23	0.1	(Smith et al., 1987)	1.7	0.044	1.15	6.4	0.74	176
	Quinidine	Felodipine	0.0091	0.004	(Lundahl et al., 1995)	0.4	0.004	1.07	4.9	0.11	127
	Triazolam	Isradipine	0.03	0.002	(Sommers et al., 1993)	0.8	0.04	0.77	2.8	0.56	127
	Triazolam	Itraconazole	0.48	0.22	(Stass et al., 2004)	4	0.002	27.1	0.04	0.09	2.88
Nisoldipine	Ketoconazole	7.9	1.16	(Huang et al., 1986)	25	0.01	24.4	0.01	0.60	1.12	
CYP2D6	Metoprolol	Diltiazem	0.13	0.11	(Hoglund and Nilsson, 1989)	1.2	0.22	1.33 ^c	32.6	0.94	554
	Metoprolol	Omeprazole	1.80	0.12	(Kang et al., 2002)	5.2	0.05	1.01 ^d	181.8	0.99	>300
	Desipramine	Sertraline	0.11	0.11	(Ueda et al., 2009)	2	0.014	1.54	2.45	0.10	9.40
	Metoprolol	Diphenhydramine	0.26	0.26	(Mao et al., 2012)	11	0.36	1.61	0.93	0.94	9.81
	Desipramine	Fluvoxamine	0.43	0.23	(Fleishaker and Hulst, 1994)	2	0.23	1.14 ^e	3.97	0.63	5.28
	Flecainide	Amiodarone	1.1	2.7	(Shoaf et al., 2005)	22	0.0027	1.37	201.9	0.004	>300
	Metoprolol	Amitriptyline	0.2	0.1	(Sennef et al., 2003)	17	0.01	1.44	1.81	0.55	30.6

	Desipramine	Fluoxetine	0.69 ^b	0.6	(Gupta et al., 2004)	2	0.05	7.43	1.02	0.34	1.68
	Encainide	Quinidine	1.23	1.1	(Bowles et al., 1993)	2	0.13	11.4	0.0015	0.91	0.0718
	Metoprolol	Propafenone	1.7	0.11	(Wagner et al., 1987)	25	0.04	1.71 ^f	0.014	0.72	0.122
CYP2C9	Tolbutamide	Sulphamethizole	222	0.09	(Ito et al., 2004)	230	0.14	1.62	70.4	1.00	>1000
	Phenytoin	Sertraline	0.14	0.15	(Ueda et al., 2009)	3	0.014	1.12	181.3	0.10	>1000
	S-Warfarin	Miconazole	0.56	0.27	(Ito et al., 2004)	19	0.02	4.72	1.1	0.16	5.48
	Tolbutamide	Ketoconazole	7.9	1.16	(Huang et al., 1986)	25	0.01	1.77	3.4	0.60	>100
	Diclofenac	Fluvastatin	4.5	0.12	(Transon et al., 1995)	6.2	0.006	1.25	1.08	0.74	24.2
	S-Warfarin	Fluconazole	70	46.5	(Mao et al., 2012)	96	0.89	2.84	22.4	1.00	26.0
	Tolbutamide	Sulphaphenazole	77.9	70	(Ito et al., 2004)	169	0.32	5.28	0.22	1.00	36.3
	S-Warfarin	Benzbromarone	4.7	4.7	(Takahashi et al., 1999)	12	0.0005	2.15	0.182	0.27	94.6
CYP2C8	Rosiglitazone	Montelukast	0.89 ^g	0.24	(Karonen et al., 2010)	1.3	0.002 ^j	1.02 ^l	0.081 ^k	0.027 ^k	159
	Pioglitazone	Zafirlukast	0.52 ^h	0.26	(Karonen et al., 2012)	2.4	0.01 ^g	1.03 ^h	0.30 ^k	0.12 ^k	>100
	Rosiglitazone	Trimethoprim	10.3 ⁱ	7.29	(Tornio et al., 2008)	42	0.63 ^g	1.37 ^m	39.5 ^k	0.96 ^k	122

^aData were obtained from published literature (Kosugi et al., 2012). The $f_{u,mic}$ represents the unbound fraction in the incubation mixture containing rhCYPs.

^bData were obtained from published literature (Gupta et al., 2004).

^cData were obtained from published literature (Tateishi et al., 1989).

^dData were obtained from published literature (Andersson et al., 1991).

^eData were obtained from published literature (Spina et al., 1993).

^fData were obtained from published literature (Wagner et al., 1987).

^gData were obtained from Goodman & Gilman 2001.

^hData were obtained from published literature (Jaakkola et al., 2006).

ⁱData were obtained from published literature (Tornio et al., 2008).

^jData were obtained from published literature (Obach et al., 2008a).

^kData were determined using previously described methods (Kosugi et al., 2012).

^lData were obtained from published literature (Kim et al., 2007).

^mData were obtained from published literature (Niemi et al., 2004).

II -3-ii) *In vitro* IC₅₀ および K_i に基づく DDI ポテンシャルの評価

2倍以上のDDI (moderateおよびstrong) に対してfalse-negative rate (*in vitro*からの予測が臨床のDDIを過小評価する)およびfalse-positive rate (*in vitro*からの予測が臨床のDDIを過大評価する)を最小限にするようなIC₅₀のクライテリアを探索した. HHSSから得られたIC₅₀のカットオフ値を1から300 まで変化させたときのfalse-negativeおよびfalse-positiveをFig. II-1Aに示した. IC₅₀が100 μmol/Lをクライテリアとした場合, false-positiveおよび false-negative ratesはそれぞれ39% および0%であった. Roxithromycin, quinidine, cyclosporin, labetalol, sertraline, diphenhydramine, amitriptyline, fluvastatin および fluvoxamine がfalse-positiveであったが, fluvoxamine 以外の阻害剤はAUCの増加率が2倍以内であるweak DDIを有していた.

同様に, CYP 分子種発現系ミクロソーム (rhCYP)から算出した K_iを用いて適切なクライテリアを探索した. K_iのカットオフ値を 0.3 から 100 まで変化させたときの false-negative および false-positive を Fig. II-1B に示した. 経験的なカットオフ値として知られている 1 μmol/L (Obach et al., 2005)を用いた場合, false-positive および false-negative rates はそれぞれ 17% および 44%であった. Propafenone, diphenhydramine, montelukast および zafirlukast が false-positive であり, fluconazole, fluoxetine および miconazole が false-negative であった. カットオフ値を 30 μmol/L にすることにより false-negative rate は 0%であったが, false-positive rate は 57%であった. 臨床相互作用が認められない nifedipine, felodipine, isradipine, fluvoxamine, montelukast および zafirlukast が false-positive であった.

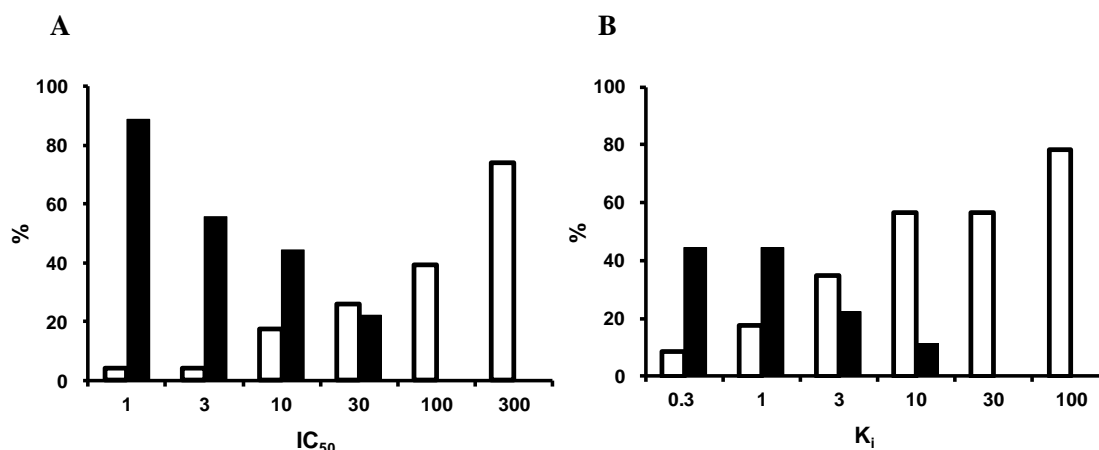


Figure II-1. Results of false-negative and false-positive rates evaluated using each cut-off value of IC₅₀ in HHSS (A) and K_i in rhCYPs (B).

A greater than 2-fold increase in AUC is taken as a boundary between a positive and negative finding. Open column: False-positive rate (%), Solid column: False-negative rate (%).

II -3-iii) Static model による定量的な DDI 予測

CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 および CYP3A4 阻害剤の定量的な DDI 予測を行うため, HHSS および rhCYP から算出した K_i を static model に適用した (Table II-3). HHSS から算出した K_i を用いた場合, [I]_{in} と組み合わせることによって最も精度良く DDI を予測し, 93.8% の阻害剤について予測した AUC_i/AUC が実測の 2 倍以内であった. 一方, [I]_{av} や [I]_{max} と組み合わせさせた場合, AUC_i/AUC を過小評価する傾向が認められ (Fig. II-2A および 2B), 75.0% の阻害剤について予測した AUC_i/AUC が実測の 2 倍以内であった.

rhCYPs から得られた非結合型の K_i を用いた場合, 非結合型の [I]_{in} を組み合わせることによって最も精度良く DDI を予測し, 93.8% の阻害剤について予測した AUC_i/AUC が実測の 2 倍以内であった (Table II-3). 非結合型の [I]_{av} や [I]_{max} と組み合わせさせた場合, 32 の阻害剤のうち 5 つについて AUC_i/AUC を過小評価する傾向が認められた. rhCYP と HHSS で DDI の予測精度は概ね同等であった.

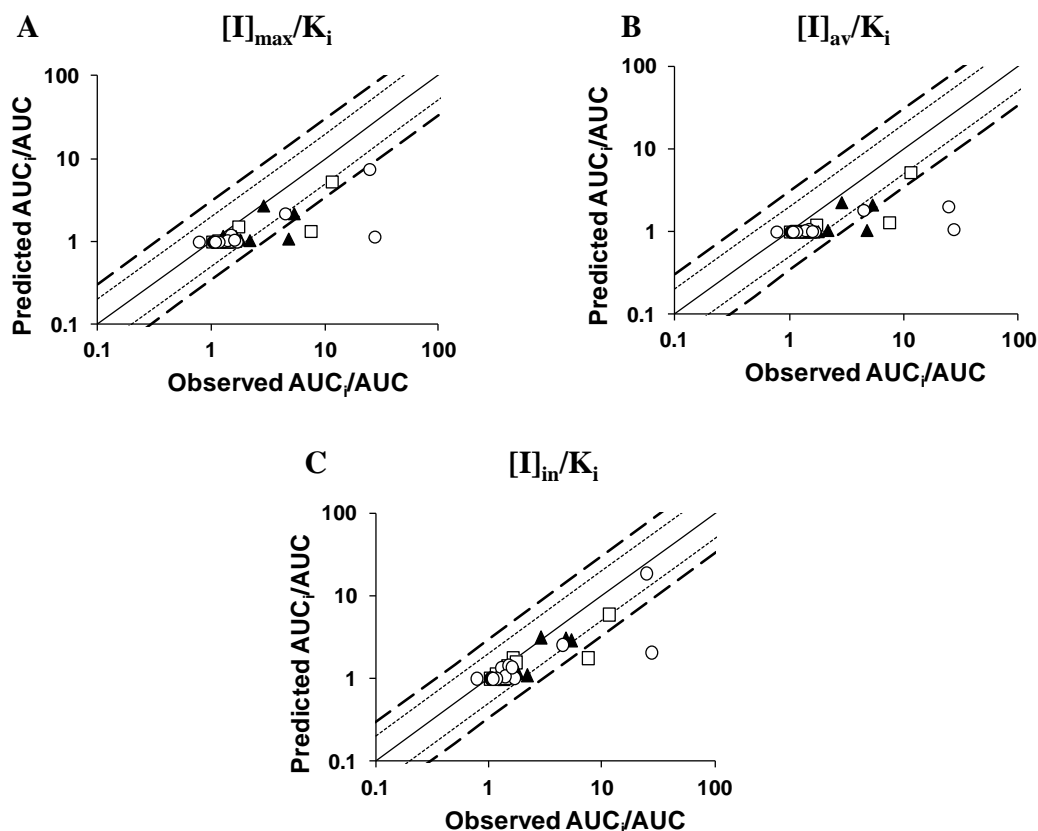


Figure II-2. Relationship between $[I]/K_i$ ratio vs. *in vivo* AUC_i/AUC for CYP2C8(●), CYP2C9(▲), CYP2D6(□) and CYP3A4(○).

$[I]_{\max}/K_i$ (A), $[I]_{\text{av}}/K_i$ (B) and $[I]_{\text{in}}/K_i$ (C) were used for the prediction of DDIs using HHSS. Solid line represents line of unity. The area between the dotted lines represents an area within 2-fold error. The area between the dashed lines represents an area within 3-fold error.

Table II-3 Prediction accuracy for CYP2C8, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4 using the static model

	HHSS			rhCYPs		
	$[I]_{\text{av}}/K_i$	$[I]_{\max}/K_i$	$[I]_{\text{in}}/K_i$	$[I]_{\text{av,u}}/K_{i,u}$	$[I]_{\max,u}/K_{i,u}$	$[I]_{\text{in,u}}/K_{i,u}$
Over-predict	0	0	0	0	0	0
Under-predict	8	8	2	5	5	2
2-fold limit	24	24	30	27	27	30
% within 2-fold limit	75.0	75.0	93.8	84.4	84.4	93.8
AFE	1.8	1.6	1.4	1.7	1.5	1.3
RMSE	6.3	5.8	4.8	6.2	5.5	4.6

第4節 考察

In vitro 試験から算出された K_i 値と阻害剤濃度, $[I]$ を利用した static model は, DDI の予測に汎用されている (Davit et al., 1999; Ito et al., 2002; Tucker et al., 2001). しかしながら, 創薬段階の初期において $[I]$ の情報は限定的であり, ミクロソームを用いた阻害試験で $1 \mu\text{mol/L}$ 以下の IC_{50} 値であれば DDI を引き起こす可能性が高いという経験的なクライテリアが報告されている (Obach et al., 2005). そのような $[I]$ に依存しないクライテリアは探索段階の P450 阻害スクリーニングに有用であるが, 血漿タンパク結合が強い化合物については阻害剤の DDI リスクを過大評価する可能性がある.

実際, rhCYP から得られた K_i のカットオフ値として $1 \mu\text{mol/L}$ を設定した場合, propafenone, diphenhydramine, montelukast および zafirlukast が false-positives であった (Fig. II-1B). Propafenone および diphenhydramine は臨床で weak DDI を示すが, montelukast および zafirlukast は CYP2C8 によって代謝される薬物に影響を与えない (Jaakkola et al., 2006; Kim et al., 2007). この結果はミクロソームや rhCYPs を使った P450 阻害スクリーニングは, montelukast や zafirlukast など血漿タンパク結合が高い ($\geq 99\%$) 化合物 (Obach et al., 2008b; Walsky et al., 2005) について false-positive となることを示している. 従って, 単純な *in vitro* P450 阻害スクリーニングは, 化合物の最適化に誤った情報を与えたり, 有望な候補化合物の開発の機会損失につながる可能性がある.

rhCYP から得られた K_i 値では, DDI ポテンシャル評価のための適切なクライテリアを設定することが困難であった (Fig. II-1B). 一方, HHSS から得られた IC_{50} 値は $100 \mu\text{mol/L}$ を下回った場合, false-negative を出さずに DDI リスクがあるとみなすことが可能であった (Fig. II-1A). すなわち, 阻害剤の IC_{50} 値が $100 \mu\text{mol/L}$ 以上であれば, 臨床での DDI が弱いもしくは起こらないことが示唆

された。MontelukastおよびzafirlukastのCYP2C8基質に対するは非常に低いが、血漿タンパク結合が強いためHHSSにおけるIC₅₀値は100 μmol/L以上を示す。血漿タンパク結合への結合が弱い薬物にとって100 μmol/Lというカットオフ値は高いように見えるが、血漿タンパク結合が低く (<50%)CYP3A4への強い阻害作用を有するfluconazoleのIC₅₀値を <100 μmol/Lと、CYP3A4への阻害作用が弱いazithromycin, ranitidine, trimethoprimのIC₅₀値を>100 μmol/Lと評価した。これらの結果は、HHSSから算出したIC₅₀値のみで定量的なDDI予測は難しいが、創薬初期段階における化合物の優先順位付けには実践的かつ有用と考えられた。

肝ミクロソームおよびrhCYPsは、[I]を考慮したstatic modelを使ったDDI予測に汎用されている (Brown et al., 2006; Einolf, 2007; Grime and Riley, 2006; Ito et al., 2004). 同様に、HHSSについてもいくつか報告があるが (Lu et al., 2008; Lu et al., 2006; Mao et al., 2012; Mao et al., 2011b), 肝ミクロソームやrhCYPsと比較するとその予測精度はよく分かっていない。そこで本研究では、同じデータセットを用いてHHSSとrhCYPsについてDDIの予測精度を比較した (Table II-3). その結果、HHSSとrhCYPsの予測精度は同等であり、rhCYPsと同様にHHSSがDDIのリスク評価に使用可能であることが示唆された。一方、ヒト血漿に懸濁した肝細胞の方が、血漿非添加の凍結肝細胞よりも正確なDDI評価が可能であることが報告されている (Mao et al., 2012). この矛盾は、肝細胞への非特異的な結合が影響している可能性がある。Maoらの報告では、非結合型の血漿中濃度を[I]として使用しているが、血漿非添加の凍結肝細胞より算出されたIC₅₀は非特異的結合補正をしていない。一方、本研究ではrhCYPsからの予測においてK_i値と[I]の両方について結合補正をしている。非特異的な結合は、*in vitro*試験時の阻害評価に大きな影響を与えることが報告されており (Brown et al., 2006; Grime and Riley,

2006; Margolis and Obach, 2003; Tran et al., 2002), 正確なDDI予測には非特異的な結合による補正が必要と考えられる. rhCYPやマイクロソームを用いた場合, 正確なDDI評価には K_i 値の決定に加え, K_i 値と $[I]_{in}$ の両者について非結合型分率を算出する必要があり, DDI予測までの過程が非常に複雑である. 一方, HHSSは非結合型分率を測定する必要がないため, DDI予測において非常に実践的なツールであることが示唆された.

非結合型 $[I]_{in}$ とマイクロソーム試験から算出された K_i 値の組み合わせが, 最も臨床のDDIの程度を精度予測することが報告されている (Ito et al., 1998; McGinnity et al., 2008; Obach, 2005; Obach et al., 2006). 本研究もまた, rhCYPsから算出された K_i 値は, 非結合型の $[I]_{in}$ と組み合わせることで最も精度の高い予測結果が得られた (Table II-3). 同様に, HHSSを用いた場合も $[I]_{in}$ と組み合わせることで最も精度良く阻害剤併用時のAUCの上昇率を予測した (Table II-3, Fig. II-2C). 異なるデータセットを使用している他の研究機関から報告されている論文と直接比較することは難しいが, Maoらは $[I]_{av}$ を使った予測において warfarin-miconazoleのDDIを過小評価しているのに対し, $[I]_{in}$ を使うことでその予測精度が改善することが本研究により示された. 以上の結果から, static modelに基づくHHSSを使ったDDI予測において, $[I]_{in}$ は良いサロゲートになることが示唆された.

いくつかの薬物において小腸のCYP3Aが初回通過効果に寄与することは良く知られているが, 本研究では小腸の阻害を考慮していないにも関わらずDDIに対して高い予測精度が得られた (Table II-3, Fig. II-2C). また, 小腸のP450阻害を考慮した場合でもDDIの予測精度に大きな改善は認められなかった (data not shown). 小腸のCYP3A阻害をDDI予測に組み込んだ場合の精度向上は報告によって異なっており (Brown et al., 2006; Galetin et al., 2007; Kato et al., 2003; Obach et

al., 2006), CYP3A4の阻害剤における小腸DDIの寄与については更なる検討が必要である。加えて, 本研究では創薬段階でのHHSSの活用法に焦点を当てており, 阻害剤の血漿中濃度推移を考慮したような **dynamic model** を使用したアプローチは考慮していない。

結論として, HHSS において IC_{50} 値が $100 \mu\text{mol/L}$ より低ければ, DDI のリスクが高く, [I]についての情報がない創薬初期における候補化合物のスクリーニングに適用可能であることを示した。創薬の後期段階では, $[I]_{in}/K_i$ を組み入れた **static model** を使用することでより定量的な DDI を予測することが可能であると示唆された。非結合型分率の補正を必要としない HHSS は, 創薬段階の候補化合物選定における“go” および “no go” の判断に有用と考えられる。

第5節 小括

血清添加凍結肝細胞を用いた DDI 予測において $[I]_{in}$ が [I]の良いサロゲートであり, 本試験系はタンパク結合の影響を *in vitro* 試験に組み入れた DDI 予測法として有用であることが示唆された。本研究を通して, HHSS は DDI リスク評価として実践的なツールであることが示され, DDI リスクの低い候補化合物選定のための効率的なワークフローを提案した。

第 III 章 CYP3A の活性化の *in vitro* および *in vivo* 評価

第 1 節 緒言

CYP3A はヒトの P450 酵素で最も豊富な分子種であり、P450 を介した薬物代謝の約半数を占めている (Thummel and Wilkinson, 1998; Wienkers and Heath, 2005). CYP3A の誘導薬は併用した薬剤の治療効果を減弱させたり、代謝物を介した副作用を増強させることがある。P450 の誘導は、転写や翻訳の増加を介して酵素活性を増加させるため、一定の時間を要する (Pelkonen et al., 1998). 一方、活性化による代謝活性の増強は瞬時に起るため、誘導とは区別されている (Tang and Stearns, 2001). P450 の活性化は二つの異なる基質が、active サイトと effector サイトに結合することによって起こると考えられている (Hutzler and Tracy, 2002; Korzekwa et al., 1998; Niwa et al., 2008). CYP3A を介した代謝の活性化は、*in vitro* 試験において数多く報告されているものの (Hutzler and Tracy, 2002; Kerr et al., 1994; Maenpaa et al., 1998; Ngui et al., 2000; Schwab et al., 1988; Shou et al., 1994; Wang et al., 2000; Wiebel et al., 1971), その作用が *in vivo* でも起こるかについての報告は極めて少ない。ヒトにおいては、carbamazepine の定常状態における血漿中濃度が felbamate の CYP3A 活性化を介して減少することが報告されている (Egnell et al., 2003). また、efavirenz による midazolam 代謝の活性化が臨床試験で報告されている (Bayer et al., 2009).

Efavirenz は非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害薬の一種であり、HIV-1 感染への処置として他の抗レトロウイルス薬と併用される (Adkins and Noble, 1998). Efavirenz は CYP3A の誘導および阻害薬としてだけでなく (Hariparsad et al., 2004; von Moltke et al., 2001), 活性化薬としても作用することが知られており (Keubler et al., 2012), 臨床試験において efavirenz の単回経口投与後わずか一日で midazolam の血漿中濃度を減少させる (Bayer et al., 2009). この *in vivo* での

現象は、ヒト肝ミクロソームやヒト CYP3A 発現ミクロソームを用いた *in vitro* 試験によって支持されているが (Keubler et al., 2012), 動物試験から予測できるかどうかについては明らかになってない。

最近、肝ミクロソームおよび肝細胞において認められた CYP3A を介した midazolam の水酸化の活性化が、ラットの *in vivo* に外挿性があることが報告された (Blobaum et al., 2013). また、カニクイザルの CYP3A のアミノ酸配列および機能活性はヒトと近いことが報告されており (Igarashi et al., 1997; Iwasaki and Uno, 2009; Ogawa et al., 2013; Uno et al., 2007), カニクイザルが DDI の評価に使用されている (Kanazu et al., 2004; Ogasawara et al., 2007; Ogasawara et al., 2009; Ohtsuka et al., 2010; Prueksaritanont et al., 2006). Tang らは、カニクイザルにおいて CYP3A を介した diclofenac の代謝クリアランスが quinine の持続注入により促進されることを報告している (Tang et al., 1999). これまでのところ efavirenz の活性化について種差は明らかになっていないが、ラットやカニクイザルなどの動物モデルは、臨床試験で認められた efavirenz の CYP3A の活性化を反映する可能性がある。

本研究では、最初に efavirenz の CYP3A 基質に対する種差を明らかにするために、3 種類の CYP3A 基質を用いて肝ミクロソームにおける活性化の有無を評価した。次に、種差の結果を踏まえ、*in vivo* 実験により動物モデルが *in vitro* 試験や臨床試験の結果を反映できるかについて評価した。

第 2 節 実験材料と実験方法

III-2-i) 試薬

Nifedipine, testosterone, midazolam および diclofenac sodium は Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan) から購入した。Efavirenz は Waterstone

Technology. (Carmel, IN, USA)から購入した。Oxidized nifedipine は Oxford Biomedical Research (Oxford, MI, USA) から購入した。Alprenolol , 6 β -hydroxytestosterone, 1'-hydroxymidazolam および 4-hydroxymidazolam は Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA) から購入した。内部標準物質に使用した各種安定同位体は BD Biosciences™ (Bedford, MA)から購入した。 β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (β -NADP⁺) , glucose-6-phosphate および glucose-6-phosphate dehydrogenase は Oriental Yeast Co., Ltd. (Tokyo, Japan) から購入した。ヒト肝マイクロソーム (n = 200, mixed gender), カニクイザル肝マイクロソーム (n = 10, male), Sprague Dawley (SD) ラットマイクロソーム (n = 400, male)および バキュロウイルスを用いた昆虫細胞由来のヒト CYP3A4 および CYP3A5 発現系およびコントロールマイクロソームは BD Biosciences (Lenexa, KS, USA) から購入した。その他の試薬は HPLC 用試薬, 試薬特級またはそれに相当する試薬を使用した。

III-2-ii) 肝マイクロソームおよび CYP3A 発現系を用いた *in vitro* 試験

反応容量は 100 μ L で, 各試薬の反応液中の組成は, 1 pmol/mL CYP3A4, CYP3A5 発現系または 0.1 mg protein/mL 肝マイクロソーム, リン酸緩衝液 (pH 7.4, 50 mmol/L), NADPH 生成系として MgCl₂ (5 mmol/L), β -NADP⁺ (0.5 mmol/L), G-6-P (5 mmol/L) および G-6-PDH (1.5 unit/mL) とした。CYP3A4 および CYP3A5 発現系を用いた試験の総タンパク質濃度は, コントロールマイクロソームを使って終濃度 0.5 mg/mL に調製した。CYP3A 基質および efavirenz はそれぞれメタノールおよび DMSO に溶解させ, 終濃度が 1% (v/v)となるよう反応溶液に添加した。インキュベーションは 37°C で実施した。10 μ mol/L efavirenz の CYP3A 基質代謝に及ぼす影響を調べるため, nifedipine, midazolam および testosterone

を基質として添加したサンプルはそれぞれ 15, 10 および 15 min インキュベーションした。Nifedipine, midazolam および testosterone の濃度は 10, 2 および 40 $\mu\text{mol/L}$ とした。10 $\mu\text{mol/L}$ efavirenz, 存在下の midazolam 1'-hydroxylation の時間推移を評価するため, 30 min 間経時的に評価した。Efavirenz の濃度依存性を調べるため, midazolam を基質として添加したサンプルを 10 min インキュベーションした。Efavirenz の濃度は 0.5~50 $\mu\text{mol/L}$, midazolam の濃度は 2 $\mu\text{mol/L}$ とした。内部標準物質を含む等量のアセトニトリル (20 ng/mL alprenolol, 500 nmol/L 6 β -hydroxytestosterone- d_7 , 100 nmol/L 1'-hydroxymidazolam- $^{13}\text{C}_3$) の添加により反応を停止させた後, 1,500 g で 10 min 遠心分離した。上清中の代謝物濃度を LC/MS/MS で測定した。

III-2-iii)-a カニクイザルを用いた薬物動態試験

カニクイザルへの投与および血漿の採取は Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd で実施した。すべての動物計画は Institutional Animal Care and Use Committee で承認されており (Approval No. IACUC20130620TM), AAALAC International の承認を受けた Shin Nippon Biomedical Laboratories, Ltd., Drug Safety Research Laboratories の動物倫理規則に従って動物実験を行った。雄性のカニクイザル (6 years, 5.6 to 6.1 kg) は薬物投与前の一晩絶食した。ただし, 自由飲水とした。絶食条件は efavirenz 投与後 10 h 維持した。3 匹のカニクイザルを実験に使用し, ベースとなる CYP3A 活性の評価のため, 3 mg/kg で midazolam を経口投与した (day1)。14 日目, 3 mg/kg の midazolam 投与 1 時間前に 20 mg/kg の efavirenz を投与した。28 日目, 3 mg/kg の midazolam 投与 5 時間前に 20 mg/kg の efavirenz を投与した。Efavirenz および midazolam は 0.5% methylcellulose solution に懸濁した。血液はカニクイザルの大腿静脈より採取し

た.

III-2-iii)-b サンプルの前処理

血液は 1,710 g で 15 min 遠心することで血漿と分離し, 分析まで -80°C で保管した. 血漿サンプルは (30 μL), 90 μL の内部標準物質を含むアセトニトリル (100 ng/mL diclofenac, 100 nmol/L 1'-hydroxymidazolam- $^{13}\text{C}_3$) と混合し, 4,000g で 5 min 遠心分離した. 上清 10 μL を 90 μL の精製水で希釈後, LC/MS/MS で測定した.

III-2-iv) 代謝物濃度の測定

Oxidized nifedipine, β -hydroxytestosterone, 1'-hydroxymidazolam および 4-hydroxymidazolam は LC/MS/MS によって定量した. 高速液体クロマトグラフは Shimadzu series 20AD-VP (Shimadzu, Kyoto, Japan) を使用した. タンデム質量分析装置 (MS) は PE-Sciex API 5000 instrument (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) を使用した. データ解析には Analyst software version 1.6.2 (Applied Biosystem) を使用した. LC および MS の分析条件は以下の通りである.

カラム: Shim-pack XR-ODS (2.0 mm i.d. \times 30 mm, 2.2 μm ; Shimadzu, Tokyo, Japan)

移動相 A: 0.2% (v/v) formic acid in 0.01 mol/L ammonium formate (pH 3.0)

移動相 B: Acetonitrile

流速: 0.5 mL/min

カラム温度: 50°C

グラジエント条件 (移動相 B の%): 6β -hydroxytestosterone 15% (0–0.2 min), 15–21% (0.2–3.6 min), 21–90% (3.6–3.61 min), 90% (3.61–4.5 min), 90–15% (4.5–4.51 min), 15% (4.51–6.0 min); oxidized nifedipine および efavirenz 20% (0–2.6 min), 10% (0–0.2 min), 10–95% (0.2–0.4 min), 95% (0.4–2.0 min), 95–10%

(2.0–2.01 min), 10% (2.01–2.7 min); 1'-hydroxymidazolam および 4-hydroxymidazolam 20–90% (2.6–2.7 min), 90% (2.7–3.5 min), 20% (3.51–5.0 min). マススペクトロメトリー: 6 β -hydroxytestosterone, m/z 305.0→187.2; 6 β -hydroxytestosterone-*d*₇, m/z 312.2→276.4; 1'-hydroxymidazolam, m/z 341.9→324.0; 4-hydroxymidazolam, m/z 341.9→325.1; 1'-hydroxymidazolam-¹³C₃, m/z 345.0→171.2; oxidized nifedipine, m/z 345.3→283.9; alprenolol, m/z 250.3→116.3; efavirenz, m/z 314.1→244.0; alprenolol, m/z 250.3→116.3; diclofenac, m/z 293.8→249.9.

III-2-v) 薬物動態パラメータ解析

血漿中濃度曲線下面積 (AUC)は台形法によって算出し, 平均滞留時間 (MRT)はモーメント解析により算出した (Yamaoka et al., 1981).

III-2-vi) 統計解析

Midazolam および代謝物の AUC, midazolam/hydroxymidazolam の AUC 比の差は, 対応のある t 検定 (paired *t*-test)によって統計的に評価された.

第3節 結果

III -3-i) CYP3A を介した代謝に及ぼす efavirenz の影響

10 μ mol/L の efavirenz は, ヒトおよびカニクイザル肝ミクロソームにおける midazolam の 1'-水酸化活性をそれぞれ 442 および 348% 増加させたが, midazolam の 4-水酸化活性には影響しなかった (Fig. III-1). Midazolam の 1'-水酸化および midazolam の 4-水酸化のどちらの反応においても, ラット肝ミクロソームにおいて efavirenz による活性化は認められなかった. いずれの肝ミクロソームにおいても nifedipine および testosterone の酸化は, efavirenz によって活

性化しなかった。Efavirenz はラット肝ミクロソームにおいて nifedipine および testosterone の酸化を阻害する傾向が認められた。

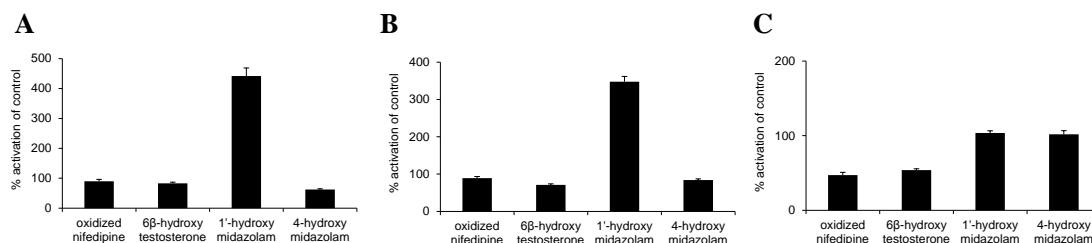


Figure III-1. The effect of efavirenz on the oxidation of nifedipine, testosterone and midazolam in human (A), monkey (B) and rat (C) microsomes.

Data points represent the mean + SD (n = 3).

III -3-ii) Efavirenz による CYP3A を介した midazolam 代謝の活性化

ヒトおよびカニクイザル肝ミクロソームにおける efavirenz の 1'-hydroxymidazolam の生成速度に与える影響を調べた (Fig. III-2). Efavirenz による midazolam の 1'-水酸化の活性化が、インキュベーション 30 min まで経時的認められた。また、ヒトおよびカニクイザル肝ミクロソームにおいて、efavirenz は、midazolam の 1'-水酸化を濃度依存的に活性化した。Efavirenz 濃度が 10 $\mu\text{mol/L}$ の時に midazolam の 1'-水酸化は最大値を示した (Fig. III-3).

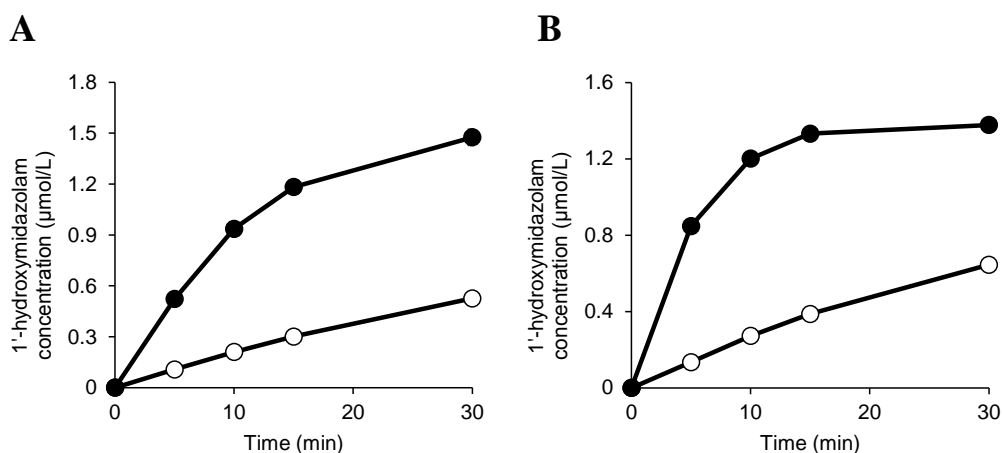


Figure III-2. Time course of 1'-hydroxymidazolam formation in human (A) and monkey (B) liver microsomes with (closed circle) or without (open circle) 10 $\mu\text{mol/L}$ efavirenz. Data points represent the mean \pm SD (n = 3).

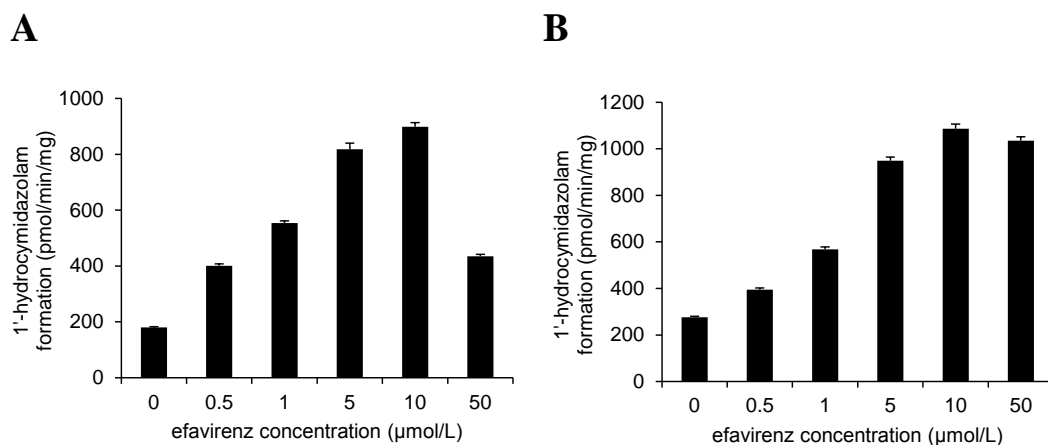


Figure III-3. Effect of efavirenz on midazolam 1'-hydroxylation in human (A) and monkey (B) liver microsomes.

Data points represent the mean + SD (n = 3).

III -3-iii) CYP3A4 および CYP3A5 発現系における活性化

ヒト肝ミクロソームで認められた活性化について、ヒト CYP3A4 および CYP3A5 発現ミクロソームを用いて評価した。両発現系ともに、efavirenz は濃度依存的に midazolam の 1'-水酸化を活性化した (Fig. III-4A)。CYP3A5 における midazolam の 1'-水酸化の活性化の程度が、CYP3A4 よりも高かった。一方、

efavirenz による midazolam の 4-水酸化に対する活性化は、両発現系ともに認められず (Fig. III-4B), CYP3A4 において efavirenz は濃度依存的に midazolam の 4-水酸化を阻害した。

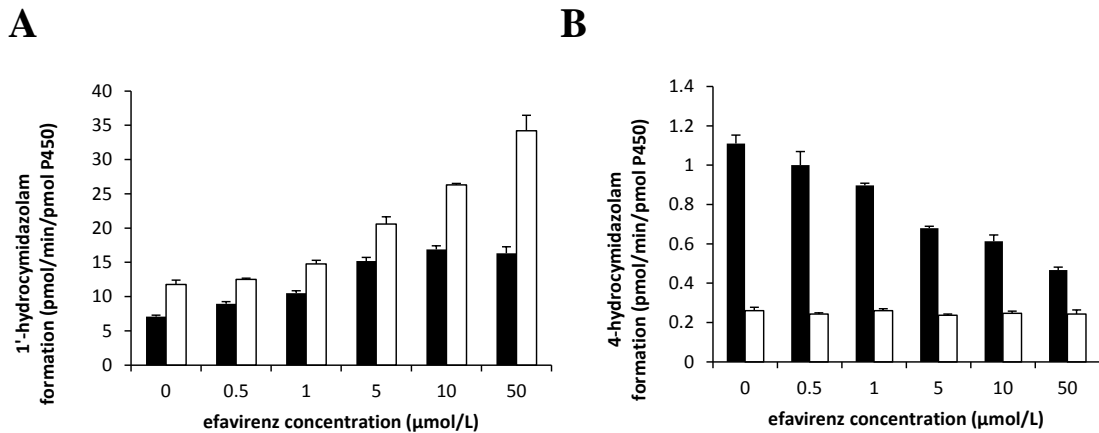


Figure III-4. Effect of efavirenz on midazolam 1'-hydroxylation (A) and 4-hydroxylation (B) in recombinant CYP3A4 (solid column) and CYP3A5 (open column).

Data points represent the mean + SD (n = 3).

III -3-iv) カニクイザルにおける midazolam の薬物動態に与える efavirenz の影響

Efavirenz を前処置したカニクイザルにおける midazolam およびその代謝物の薬物動態を評価した。1'-hydroxymidazolam の循環血漿中最大濃度 (C_{max}) および AUC 値は efavirenz の前処置により顕著に増加した。その効果は、midazolam を投与する 1 時間前より 5 時間前の方がより顕著であった。1'-hydroxymidazolam の C_{max} および AUC 値は、efavirenz の処置により 2 倍以上増加したのに対し、4-hydroxymidazolam の C_{max} および AUC 値は減少した (Table III-1, Fig. III-5)。Midazolam 自体の AUC 値は、efavirenz の処置により 20% 程度減少した。Midazolam/1'-hydroxymidazolam の AUC 比は midazolam を投与す

る 5 時間前の efavirenz 処置により, 0.85 から 0.30 に減少したが, midazolam/4-hydroxymidazolam の AUC 比に顕著な変化は認められなかった。Efavirenz の C_{max} および AUC 値は, それぞれ $8.40 \pm 0.31 \mu\text{mol/L}$ および $174.1 \pm 22.4 \mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ であった (Fig. III-6)。

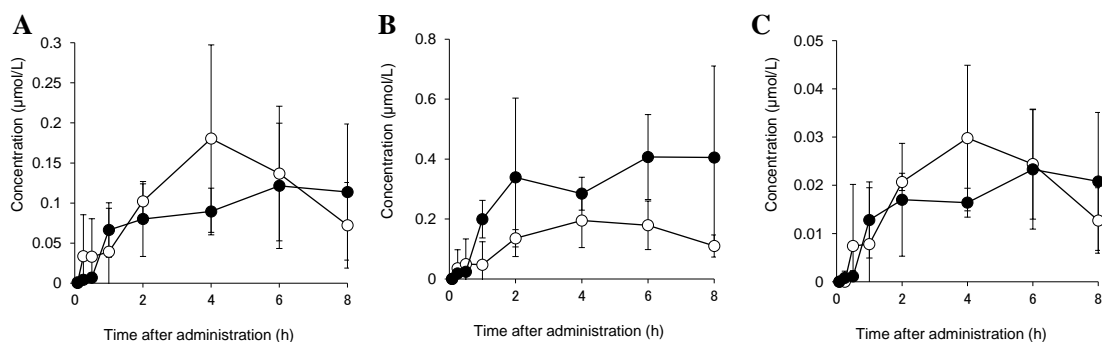


Figure III-5. Plasma concentrations of midazolam (A), 1'-hydroxymidazolam (B), and 4-hydroxymidazolam (C) after oral administration of midazolam and efavirenz in monkeys.

(○) No treatment, (●) pretreatment with efavirenz. Efavirenz was administered orally 5 h before oral dosing of midazolam. Each point represents the mean \pm SD (n = 3).

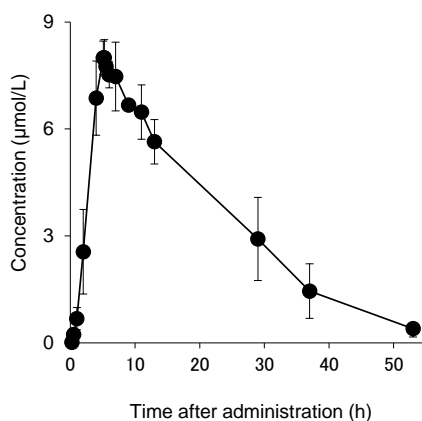


Figure III-6. Plasma concentrations of efavirenz after oral administration of midazolam and efavirenz in monkeys.

Efavirenz was administered orally 5 h before oral dosing of midazolam. Each point represents the mean \pm SD (n = 3).

Table III-1. Pharmacokinetic parameters of midazolam, 1'-hydroxymidazolam, and 4-hydroxymidazolam in monkeys after administration of midazolam

treatment group			midazolam	1'-hydroxy-midazolam	<u>MDZ</u> ^a 1'-OH	4-hydroxy-midazolam	<u>MDZ</u> ^b 4-OH
Given alone	C _{max}	(μmol/L)	0.188 ± 0.112	0.231 ± 0.064		0.033 ± 0.012	
	T _{max}	(h)	3.67 ± 2.52	4.00 ± 2.00		3.50 ± 2.78	
	AUC	(μmol·h/L)	0.909 ± 0.425	1.071 ± 0.131	0.85	0.153 ± 0.038	5.9
	MRT	(h)	4.24 ± 0.87	4.44 ± 0.78		4.27 ± 0.76	
1 h after a dose of efavirenz	C _{max}	(μmol/L)	0.140 ± 0.114	0.434 ± 0.140		0.023 ± 0.015	
	T _{max}	(h)	6.00 ± 2.00	7.33 ± 1.15		5.33 ± 1.15	
	AUC	(μmol·h/L)	0.692 ± 0.513	1.691 ± 0.688	0.41	0.107 ± 0.082	6.5
	MRT	(h)	4.99 ± 0.34	5.72 ± 0.40		5.39 ± 0.26	
5 h after a dose of efavirenz	C _{max}	(μmol/L)	0.156 ± 0.041	0.553 ± 0.156		0.029 ± 0.003	
	T _{max}	(h)	5.33 ± 3.06	5.33 ± 3.06		5.33 ± 3.06	
	AUC	(μmol·h/L)	0.709 ± 0.251	2.344 ± 0.416*	0.30*	0.130 ± 0.030*	5.5
	MRT	(h)	4.59 ± 0.96	4.69 ± 0.93		4.56 ± 0.96	

Mean ± SD (n=3).

^athe AUC ratio of midazolam/1'-hydroxymidazolam, ^bthe AUC ratio of midazolam/4-hydroxymidazolam

*Statistically significant difference from treatment given alone (P < 0.05).

第4節 考察

Efavirenz による midazolam 代謝の活性化が報告されているが (Keubler et al., 2012), 他の CYP3A 基質代謝に対する影響は明らかになっていない. 本研究において efavirenz は, nifedipine および testosterone の酸化代謝を活性化しないことが明らかになった (Fig. III-1). また, efavirenz はヒト肝ミクロソームにおいて midazolam の 1'-水酸化を活性化するものの, midazolam の 4-水酸化は活性化しなかった (Fig. III-1). この結果は, 1'-hydroxymidazolam と 4-hydroxymidazolam が 2 つの異なる結合部位から生成するという知見を支持するものであり (Cameron et al., 2005; Khan et al., 2002), efavirenz による CYP3A の活性化は高い基質特異性を示すことを示唆した. Testosterone, nifedipine および midazolam を含む大半の CYP3A 基質の酸化代謝は典型的な誘導薬として知られている rifampin によって誘導されるため (Niemi et al., 2003), すべての CYP3A 基質に対する DDI を懸念する必要がある. 一方, CYP3A 活性化についてはその高い基質選択性を考慮すると, *in vitro* での活性化が *in vivo* で認められたとしても CYP3A の活性化によって引き起こされる DDI の CYP3A 基質全体に及ぼす影響は限定的である可能性がある.

CYP3A4 および CYP3A5 の基質特異性は重複しており, midazolam の代謝には CYP3A4 および CYP3A5 ともに関与していることが報告されている (Gorski et al., 1994). 本研究において efavirenz は, CYP3A4 および CYP3A5 発現系の両方で midazolam の 1'-水酸化を活性化した. α -naphthoflavone もまた両 CYP3A4 および CYP3A5 発現系において midazolam の 1'-水酸化を活性化するが, testosterone は CYP3A5 発現系においてのみ midazolam の 1'-水酸化を活性化することが報告されている (Emoto and Iwasaki, 2006). 加えて, sorafenib および sunitinib は CYP3A5 発現系において midazolam の 1'-水酸化を活性化するが,

CYP3A4 発現系においては阻害する (Sugiyama et al., 2011). これらを総合的に考えると, midazolam の 1'-水酸化の活性化に対する基質選択性は CYP3A4 と CYP3A5 とで部分的に一致する場合はあるものの, 異なるものと考えられた.

最近, ヒトおよびラット肝ミクロソームにおいて VU0448187 が midazolam の 1'-水酸化を活性化し, ラットを用いた *in vivo* 試験においても同様に midazolam の 1'-水酸化を活性化することが報告された (Blobaum et al., 2013). 一方, 本研究において efavirenz は, ラット肝ミクロソームでの midazolam の 1'-水酸化を活性化しなかった (Fig. III-1). 従って, ラットは活性化の *in vivo* 評価モデルとして汎用的に使用することは難しいと考えられた. 実際, ヒトとラットの薬物代謝には大きな種差があることが報告されている (Ishigami et al., 2001; Komura and Iwaki, 2008; Kuperman et al., 2001; Lu and Li, 2001; Nakamura et al., 1999). Ishigami *et al.*らは, CYP3A4 の阻害剤である itraconazole と CYP3A4 基質である simvastatin は臨床で相互作用を起こすが, ラットにおいて itraconazole は simvastatin の血漿中濃度推移に影響を与えないことを報告した. 代謝の活性化の種差について言及すると, α -naphthoflavone および diazepam はヒト肝ミクロソームにおいて quinine 3-水酸化を活性化するが, その反応はラットの肝ミクロソームでは起らないことが報告されている (Zhao and Ishizaki, 1997).

複数の研究機関で, CYP3A を介した阻害および誘導による臨床の DDI を予測するまたはそのメカニズムを理解する上でサルが使用されている (Kanazu et al., 2004; Ogasawara et al., 2007; Ogasawara et al., 2009; Ohtsuka et al., 2010; Prueksaritanont et al., 2006). ヒトとサルの間には, 代謝クリアランスおよび阻害の選択性などの種差が報告されているが (Bogaards et al., 2000; Emoto et al., 2013; Sharer et al., 1995), 活性化の種差についてはこれまでのところ明らかにな

っていない。本研究において、ヒト肝ミクロソームで認められた efavirenz の濃度依存的な CYP3A の活性化は、カニクイザル肝ミクロソームにおいても同様に認められた (Fig. III-3)。カニクイザルの CYP3A8 および CYP3A5 はヒトの CYP3A4 および CYP3A5 とアミノ酸のシークエンスで 91-93% 一致するが (Iwasaki and Uno, 2009; Uno et al., 2007), ラットの CYP3A1 とヒトの CYP3A4 では cDNA のシークエンスで 78%, アミノ酸のシークエンスで 73% 程度の一致であることが報告されている (Igarashi et al., 1997)。このラットとヒトの低い相同性が肝ミクロソームにおける活性化の種差に起因していると考えられた。また、ヒトとカニクイザルの高い相同性を考慮すると、カニクイザルは CYP3A 基質の血漿中濃度推移に及ぼす CYP3A 活性化の影響を観察する上で良いモデル動物になる可能性が示された。

ヒトに 400 mg/man で efavirenz を投与した際、midazolam 代謝の活性化が認められている (Bayer et al., 2009)。その際の efavirenz の C_{max} および AUC 値はそれぞれ 1.9 ~ 2.0 $\mu\text{mol/L}$ および 52 ~ 83 $\mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ と報告されている (Oswald et al., 2012; Schwab et al., 1988)。本研究において、カニクイザルに 20 mg/kg で投与した際の efavirenz の C_{max} および AUC 値はそれぞれ 8.4 $\mu\text{mol/L}$ および 174 $\mu\text{mol}\cdot\text{h/L}$ であり (Fig. III-6), CYP3A の活性化を引き起こすのに十分な efavirenz の血漿中濃度が認められた。

カニクイザルにおいて midazolam/1'-hydroxymidazolam の AUC 比は、efavirenz の前投与により 0.85 から 0.30 に減少する一方、midazolam/4-hydroxymidazolam の AUC 比に影響を与えなかった (Table III-1)。この結果は、*in vitro* のデータと一致しており、臨床で認められた midazolam/1'-hydroxymidazolam の AUC 比の減少とも同等であった (Bayer et al., 2009)。しかしながら、1'-水酸化は midazolam の主代謝経路にもかかわらず

(Heizmann and Ziegler, 1981), midazolam の AUC 変化が期待したよりも小さかった。血漿中の 1'-hydroxymidazolam 濃度の増加の原因の一端としては、1'-hydroxymidazolam の efavirenz による代謝阻害が考えられた。

1'-hydroxymidazolam の血漿中濃度は、代謝物の生成と消失のバランスによって左右される。1'-hydroxymidazolam は CYP3A によって生成された後、UDP-グルクロン酸転移酵素 (UGT)によってグルクロン酸抱合される。ヒトにおいては、UGT1A4, UGT2B4 および UGT2B7 が 1'-hydroxymidazolam のグルクロン酸抱合に関与していると報告されている (Seo et al., 2010; Zhu et al., 2008)。一方、efavirenz は UGT1A4 および UGT2B7 の基質に対して阻害作用を有するため (Belanger et al., 2009; Ji et al., 2012), efavirenz による UGTs の阻害が 1'-hydroxymidazolam の AUC 増加の一部に起因している可能性がある。従って、P450 に対する活性化の DDI リスクを評価する上で、*in vitro* 実験のみでリスク評価するのではなく、*in vitro* 実験で認められた活性化が *in vivo* を反映するかについて注意深く確認していく必要がある。

カニクイザルにおける midazolam の肝クリアランスは肝血流に近い (Prueksaritanont et al., 2006), midazolam を静脈内投与した際は efavirenz の CYP3A 活性化の影響を観察することは難しい。実際、rifampicin を前処置した際、midazolam の経口投与では midazolam の AUC が変化するのに対し、静脈内投与した場合は AUC の変化は認められなかった (Prueksaritanont et al., 2006)。また、midazolam を静脈内投与した場合、CYP3A の阻害剤の影響を受けないことが報告されている (Kanazu et al., 2004; Ogasawara et al., 2007)。従って、midazolam のような高クリアランス化合物は、*in vivo* における活性化の影響を評価するツール化合物としては適当ではない場合があり、小腸と肝臓の DDI の寄与を分けて検討する際にはより適切な CYP3A 基質を選択する必要がある。

結論として、本研究は efavirenz による midazolam の 1'-水酸化の活性化に顕著な種差があることを明らかにした。加えて、efavirenz による CYP3A の活性化に高い基質特異性があることが明らかになった。カニクイザルの試験において midazolam/1'-hydroxymidazolam の AUC 比は臨床試験と同様に顕著な増加が認められたが、efavirenz による midazolam の AUC 減少は 20%程度であり、*in vitro* の試験ほど顕著な変化は認められなかった。従って、臨床での知見が十分でない P450 活性化に対する DDI リスクを評価する際は、*in vitro* の知見のみから判断するのではなく、*in vitro* 試験においてヒトを反映するような動物種を見出した後、動物を用いて実際の *in vivo* での作用を確認し、総合的にリスク評価することが重要であると考えられた。

第 5 節 小括

本章では、肝ミクロソームを用いた *in vitro* 試験により CYP3A の活性化には顕著な種差および高い基質特異性があることを明らかにした。カニクイザルを用いた *in vivo* 試験により、efavirenz は midazolam/1'-hydroxymidazolam の AUC 比を顕著に増加すること、efavirenz による midazolam の AUC 減少は 20%程度であることを示した。臨床の知見が少ない P450 の活性化を介した DDI リスクを評価する上では、*in vitro* 試験のみでのリスク評価が難しい。従って、*in vitro* 試験で認められた活性化が、*in vivo* でどの程度認められるかを確認していく必要があると考えられた。

総括

P450 は、生体内の様々な代謝に関与するヘムタンパク質であり、代謝部位における薬物間相互作用の大半が P450 を介している。この P450 を介した DDI には、酵素阻害によって併用基質濃度を上昇させる場合や酵素の活性化および誘導によって併用基質濃度を減少させる場合がある。薬効の減弱や副作用の増強の程度によっては併用を制限されるのみならず mibefradil, terfenadine, cisapride, cerivastatin, astemizole などのように市場から姿を消すことになる。従って、創薬段階において P450 に対する阻害、誘導および活性化のリスクが小さい化合物を選択することは極めて重要である。本研究では、酵素阻害と活性化に着目し、創薬プロセスにおける DDI リスクを評価することを目的とした。

P450 を介した酵素阻害について近年改定された FDA のドラフトガイダンスや EMA のドラフトガイドラインは、肝ミクロソームなど *in vitro* 試験から算出された K_i と阻害剤の血漿中濃度の比を用いて臨床相互作用試験実施の有無を判断するよう記載されている。しかしながら、両機関の基準はタンパク結合の考慮という点で大きく異なっている。本研究では両基準の比較から、それぞれのリスク評価の妥当性について検討した。また、基準の違いの原因となっている血漿および肝ミクロソームタンパク結合に着目し、タンパク結合の影響を *in vitro* 試験に組み入れた P450 阻害試験の予測精度を検証した。酵素活性化については、臨床報告が少なく、その重要性についてはまだ不明な点が多い。そこで、創薬プロセスにおける P450 活性化のリスク評価のため、基質特異性および種差を明らかにすることにより動物を用いた *in vivo* 試験の実践的な利用法について検討した。

第 I 章では、2010 年に公開された EMA のガイドラインにおける P450 を介した薬物間相互作用(DDI)のリスク評価法を検証し、FDA のドラフトガイダンス

スとの比較検討を実施した。EMA は DDI に対するリスク評価の際、非結合型分率を考慮するよう言及している。そこで 35 の臨床相互作用試験の結果について、実測した K_i および $f_{u,mic}$ に基づきレトロスペクティブに EMA の DDI 評価法を検証した。EMA のカットオフ値を使用した場合、薬物併用時の血漿中濃度下面積 (AUC) の増加が 2 倍より大きい DDI を正しく評価することが示された。一方、薬物併用時の AUC が 2 倍以下である弱い DDI を過小評価することを明らかにした。EMA と FDA の DDI に対するリスク評価の違いは f_p と $f_{u,mic}$ の違いが起因しており、 $f_p/f_{u,mic}$ の比が 0.2 以外の化合物のリスク評価は異なることを示した。実際、FDA の評価法に従うと roxithromycin, quinidine, sertraline, sulphinpyrazone および fluvastatin については DDI リスクを有し、臨床で薬物間相互作用試験が要求されるが EMA の評価法ではそれらの DDI リスクを過小評価することを明らかにした。CYP3A の阻害剤に対する小腸の DDI を考慮した EMA のリスク評価は、臨床での顕著な相互作用を示さない化合物を過大評価することを示した。以上の結果から、EMA と FDA の実践的な違いを明らかにし、それらの DDI 評価法には改善の余地があることを示した。

第 II 章では、FDA ガイダンスと EMA ガイドラインの基準の違いの原因となっている血漿およびマイクロソームタンパク結合に着目し、その補正を必要としない血清添加凍結肝細胞を用いて、DDI のリスク評価を行った。最初に、リード化合物探索時の創薬初期段階のように [I] の情報がない場合の DDI ポテンシャルを定性的に評価するため、最適な IC_{50} のクライテリアを探索した。血清添加凍結肝細胞を用いた阻害試験において IC_{50} 値が $100 \mu\text{mol/L}$ より低ければ DDI のリスクが高く、[I] についての情報がない創薬初期における候補化合物のスクリーニングに適用可能であることを示した。次に、適切な [I] を決めることによって、 $[I]/K_i$ に基づく static model を使った定量的な DDI 予測法の最適化を

検討した。最大門脈血漿中濃度 ($[I]_{in}$)を指標とした static model を使用することで評価した阻害剤の 93.8%について、予測した AUC_i/AUC が実測の 2 倍以内であった。一方、循環血中の平均血漿中濃度 ($[I]_{av}$)や最大血漿中濃度 ($[I]_{max}$)を使用した場合、 AUC_i/AUC を過小評価した。血清添加凍結肝細胞を用いた DDI 予測において $[I]_{in}$ が $[I]$ の良いサロゲートであり、本試験系はタンパク結合の影響を *in vitro* 試験に組み入れた DDI 予測法として有用であることが示唆された。以上の結果から、血清添加凍結肝細胞は、創薬初期の定性的な評価から後期段階における定量的な DDI 予測まで幅広く適用できることが示された。

第 III 章では、臨床での知見が少なく、かつ種差や基質特異性が明らかになっていない CYP3A の活性化の DDI リスクを *in vitro* および *in vivo* 試験を用いて評価した。最初に、CYP3A 基質である midazolam, testosterone, nifedipine の酸化代謝における efavirenz の影響をラット、カニクイザルおよびヒト肝マイクロソームを用いて評価した。カニクイザルおよびヒト肝マイクロソームでは、efavirenz は濃度依存的に midazolam の 1'-水酸化を活性化したが、ラットでは活性化は認められず顕著な種差があることが明らかとなった。また、いずれの肝マイクロソームにおいても efavirenz は、midazolam の 4-水酸化や nifedipine および testosterone の酸化代謝を活性化しなかったことから、CYP3A 活性化において高い基質特異性があることが明らかになった。次に、*in vitro* で認められた顕著な活性化が *in vivo* にどの程度反映するかを明らかにするため、カニクイザルを用いた DDI 試験を実施した。その結果、efavirenz は midazolam/1'-hydroxymidazolam の AUC 比は顕著に増加すること、efavirenz による midazolam の AUC 減少は 20%程度であることを見出した。CYP3A の活性化に対するリスク評価は、*in vitro* でヒトを反映するような動物種を見出し、動物を用いて *in vivo* での作用を確認していくことで、総合的にリスク評価する必要があることが示唆された。

以上、本研究により EMA および FDA の基準に改善の余地があることが明らかとなり、AUC 増加が 2 倍より大きい DDI を評価する上では創薬プロセスに適用可能であることが示された。また、両基準の違いに起因するタンパク結合の影響を *in vitro* 試験に組み入れた DDI 予測法が、最大門脈血漿中濃度を考慮することでより定量的な DDI 予測に適用できることを明らかにした。十分な知見のない P450 の活性化については、肝ミクロソームを用いた試験により、CYP3A 活性化に顕著な種差および高い基質特異性があることを見出した。臨床情報が少ない CYP3A 活性化のリスク評価には *in vitro* 試験だけではなく、動物を用いた *in vivo* における DDI 試験を実施し総合的にリスク判断することで、DDI リスクの低い化合物選択が可能になると考えられた。これらの知見により、創薬段階における P450 阻害および活性化のより正確で実践的なリスク評価が可能となり、迅速な化合物の最適化や相互作用懸念の少ない安全な医薬品の創出に大きく貢献すると考えられた。

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。

Kosugi Y, Hirabayashi H, Igari T, Fujioka Y, Hara Y, Okuda T, and Moriwaki T. (2012) Evaluation of cytochrome P450-mediated drug-drug interactions based on the strategies recommended by regulatory authorities. *Xenobiotica* **42**:127-38.

Kosugi Y, Hirabayashi H, Igari T, Fujioka Y, Okuda T, and Moriwaki T. (2013) Risk assessment of drug-drug interactions using hepatocytes suspended in serum during the drug discovery process. *Xenobiotica* **44**:336-44.

Kosugi Y, and Takahashi J. (2015) Species differences and substrate specificity of CYP3A heteroactivation by efavirenz. *Xenobiotica* **45**:345-52.

謝辞

本論文は筆者が武田薬品工業株式会社薬物動態研究所において、薬物間相互作用に関する基盤研究の成果をまとめたものです。稿を終えるにあたり、本論文の主査として、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先生に謹んで深謝の意を表します。本論文の副査として、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先生および同大学生化学研究室教授伊東進先生に深謝の意を表します。

昭和薬科大学薬物動態学研究室教授山崎浩史先生には、論文作成にあたってご指導をいただくとともに、成果発表の機会を与えていただきました。謹んで深謝の意を表します。昭和薬科大学薬物動態学研究室講師清水万紀子先生並びに村山典恵先生には、論文作成および成果発表にあたって有益なご助言とご支援をいただき、ここに深謝の意を表します。

研究の機会を与えて頂くと共に終始多大なる御支援と御助言を頂きました武田薬品工業株式会社薬物動態研究所所長 朝日知博士, 薬物動態研究所リサーチマネジャー 森脇俊哉博士, 近藤孝博士, 薬物動態研究所主席研究員 平林英樹博士, 高橋順三修士, 並びに薬物安全性研究所リサーチマネジャー 奥田照明博士に心から感謝の意を表します。また, 本研究にご協力頂いた武田薬品工業株式会社薬物動態研究所 藤岡泰博士, 猪狩朋子修士並びに多くの皆様に深く感謝いたします。

最後に, 本研究に理解を示し, 遂行を支えてくれた家族に心より感謝します。

参考文献

- 千葉寛 (1995) チトクローム P450 を介した薬物相互作用. *ファルマシア* 31:992-996.
- Adkins JC, Noble S. (1998). Efavirenz. *Drugs* 56:1055-64; discussion 65-6.
- Ajayi FO, Sun H, Perry J. (2000). Adverse drug reactions: a review of relevant factors. *J Clin Pharmacol* 40:1093-101.
- Almond LM, Yang J, Jamei M, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. (2009). Towards a quantitative framework for the prediction of DDIs arising from cytochrome P450 induction. *Curr Drug Metab* 10:420-32.
- Andersson T, Lundborg P, Regardh CG. (1991). Lack of effect of omeprazole treatment on steady-state plasma levels of metoprolol. *Eur J Clin Pharmacol* 40:61-5.
- Bachmann KA, Lewis JD. (2005). Predicting inhibitory drug-drug interactions and evaluating drug interaction reports using inhibition constants. *Ann Pharmacother* 39:1064-72.
- Backman JT, Aranko K, Himberg JJ, Olkkola KT. (1994). A pharmacokinetic interaction between roxithromycin and midazolam. *Eur J Clin Pharmacol* 46:551-5.
- Backman JT, Wang JS, Wen X, Kivisto KT, Neuvonen PJ. (1999). Mibefradil but not isradipine substantially elevates the plasma concentrations of the CYP3A4 substrate triazolam. *Clin Pharmacol Ther* 66:401-7.
- Bailey DG, Freeman DJ, Melendez LJ, Kreeft JH, Edgar B, Carruthers SG. (1993). Quinidine interaction with nifedipine and felodipine: pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation. *Clin Pharmacol Ther* 53:354-9.

- Bayer J, Heinrich T, Burhenne J, Haefeli WE, Mikus G. (2009). Potential induction of CYP3A4 after a single-dose of efavirenz using midazolam pharmacokinetics as a marker. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 104:515.
- Belanger AS, Caron P, Harvey M, Zimmerman PA, Mehlotra RK, Guillemette C. (2009). Glucuronidation of the antiretroviral drug efavirenz by UGT2B7 and an in vitro investigation of drug-drug interaction with zidovudine. *Drug Metab Dispos* 37:1793-6.
- Bergstrom RF, Peyton AL, Lemberger L. (1992). Quantification and mechanism of the fluoxetine and tricyclic antidepressant interaction. *Clin Pharmacol Ther* 51:239-48.
- Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L and others. (2003). The conduct of in vitro and in vivo drug-drug interaction studies: a Pharmaceutical Research and Manufacturers of America (PhRMA) perspective. *Drug Metab Dispos* 31:815-32.
- Black DJ, Kunze KL, Wienkers LC, Gidal BE, Seaton TL, McDonnell ND, Evans JS, Bauwens JE, Trager WF. (1996). Warfarin-fluconazole. II. A metabolically based drug interaction: in vivo studies. *Drug Metab Dispos* 24:422-8.
- Blanchard N, Richert L, Coassolo P, Lave T. (2004). Qualitative and quantitative assessment of drug-drug interaction potential in man, based on K_i , IC_{50} and inhibitor concentration. *Curr Drug Metab* 5:147-56.
- Blobaum AL, Bridges TM, Byers FW, Turlington ML, Mattmann ME, Morrison RD, Mackie C, Lavreysen H, Bartolome JM, Macdonald GJ and others. (2013). Heterotropic activation of the midazolam hydroxylase activity of CYP3A by a positive allosteric modulator of mGlu5: in vitro to in vivo translation and

- potential impact on clinically relevant drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* 41:2066-75.
- Bogaards JJ, Bertrand M, Jackson P, Oudshoorn MJ, Weaver RJ, van Bladeren PJ, Walther B. (2000). Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man. *Xenobiotica* 30:1131-52.
- Bowles SK, Reeves RA, Cardozo L, Edwards DJ. (1993). Evaluation of the pharmacokinetic and pharmacodynamic interaction between quinidine and nifedipine. *J Clin Pharmacol* 33:727-31.
- Brown HS, Galetin A, Hallifax D, Houston JB. (2006). Prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data : factors affecting prototypic drug-drug interactions involving CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4. *Clin Pharmacokinet* 45:1035-50.
- Brown HS, Ito K, Galetin A, Houston JB. (2005). Prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data: impact of incorporating parallel pathways of drug elimination and inhibitor absorption rate constant. *Br J Clin Pharmacol* 60:508-18.
- Cameron MD, Wen B, Allen KE, Roberts AG, Schuman JT, Campbell AP, Kunze KL, Nelson SD. (2005). Cooperative binding of midazolam with testosterone and alpha-naphthoflavone within the CYP3A4 active site: a NMR T1 paramagnetic relaxation study. *Biochemistry* 44:14143-51.
- Cheng Y, Prusoff WH. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I₅₀) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmacol* 22:3099-108.

- Daneshmend TK, Roberts CJ. (1984). The effects of enzyme induction and enzyme inhibition on labetalol pharmacokinetics. *Br J Clin Pharmacol* 18:393-400.
- Davit B, Reynolds K, Yuan R, Ajayi F, Conner D, Fadiran E, Gillespie B, Sahajwalla C, Huang SM, Lesko LJ. (1999). FDA evaluations using in vitro metabolism to predict and interpret in vivo metabolic drug-drug interactions: impact on labeling. *J Clin Pharmacol* 39:899-910.
- DeVane CL, Liston HL, Markowitz JS. (2002). Clinical pharmacokinetics of sertraline. *Clin Pharmacokinet* 41:1247-66.
- Egnell AC, Houston B, Boyer S. (2003). In vivo CYP3A4 heteroactivation is a possible mechanism for the drug interaction between felbamate and carbamazepine. *J Pharmacol Exp Ther* 305:1251-62.
- Einolf HJ. (2007). Comparison of different approaches to predict metabolic drug-drug interactions. *Xenobiotica* 37:1257-94.
- Einolf HJ, Chen L, Fahmi OA, Gibson CR, Obach RS, Shebley M, Silva J, Sinz MW, Unadkat JD, Zhang L and others. (2014). Evaluation of various static and dynamic modeling methods to predict clinical CYP3A induction using in vitro CYP3A4 mRNA induction data. *Clin Pharmacol Ther* 95:179-88.
- Elwood RJ, Hildebrand PJ, Dundee JW, Collier PS. (1983). Ranitidine influences the uptake of oral midazolam. *Br J Clin Pharmacol* 15:743-5.
- Emoto C, Iwasaki K. (2006). Enzymatic characteristics of CYP3A5 and CYP3A4: a comparison of in vitro kinetic and drug-drug interaction patterns. *Xenobiotica* 36:219-33.
- Emoto C, Yoda N, Uno Y, Iwasaki K, Umehara K, Kashiyama E, Yamazaki H. (2013). Comparison of p450 enzymes between cynomolgus monkeys and humans:

- p450 identities, protein contents, kinetic parameters, and potential for inhibitory profiles. *Curr Drug Metab* 14:239-52.
- Fahmi OA, Boldt S, Kish M, Obach RS, Tremaine LM. (2008). Prediction of drug-drug interactions from in vitro induction data: application of the relative induction score approach using cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 36:1971-4.
- Fleishaker JC, Hulst LK. (1994). A pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of the combined administration of alprazolam and fluvoxamine. *Eur J Clin Pharmacol* 46:35-9.
- Foti RS, Wienkers LC, Wahlstrom JL. (2010). Application of cytochrome P450 drug interaction screening in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen* 13:145-58.
- Funck-Brentano C, Becquemont L, Kroemer HK, Buhl K, Knebel NG, Eichelbaum M, Jaillon P. (1994). Variable disposition kinetics and electrocardiographic effects of flecainide during repeated dosing in humans: contribution of genetic factors, dose-dependent clearance, and interaction with amiodarone. *Clin Pharmacol Ther* 55:256-69.
- Galetin A, Gertz M, Houston JB. (2010). Contribution of intestinal cytochrome p450-mediated metabolism to drug-drug inhibition and induction interactions. *Drug Metab Pharmacokinet* 25:28-47.
- Galetin A, Hinton LK, Burt H, Obach RS, Houston JB. (2007). Maximal inhibition of intestinal first-pass metabolism as a pragmatic indicator of intestinal contribution to the drug-drug interactions for CYP3A4 cleared drugs. *Curr Drug Metab* 8:685-93.

- Gillette JR, Pang KS. (1977). Theoretic aspects of pharmacokinetic drug interactions. *Clin Pharmacol Ther* 22:623-39.
- Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. (1994). Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A (CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* 47:1643-53.
- Gram LF, Hansen MG, Sindrup SH, Brosen K, Poulsen JH, Aaes-Jorgensen T, Overo KF. (1993). Citalopram: interaction studies with levomepromazine, imipramine, and lithium. *Ther Drug Monit* 15:18-24.
- Grime K, Riley RJ. (2006). The impact of in vitro binding on in vitro-in vivo extrapolations, projections of metabolic clearance and clinical drug-drug interactions. *Curr Drug Metab* 7:251-64.
- Guo H, Liu C, Li J, Zhang M, Hu M, Xu P, Liu L, Liu X. (2013). A mechanistic physiologically based pharmacokinetic-enzyme turnover model involving both intestine and liver to predict CYP3A induction-mediated drug-drug interactions. *J Pharm Sci* 102:2819-36.
- Gupta S, Banfield C, Kantesaria B, Flannery B, Herron J. (2004). Pharmacokinetics/pharmacodynamics of desloratadine and fluoxetine in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 44:1252-9.
- Hamelin BA, Bouayad A, Methot J, Jobin J, Desgagnes P, Poirier P, Allaire J, Dumesnil J, Turgeon J. (2000). Significant interaction between the nonprescription antihistamine diphenhydramine and the CYP2D6 substrate metoprolol in healthy men with high or low CYP2D6 activity. *Clin Pharmacol Ther* 67:466-77.
- Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. (2001). Goodman & Gilman's The

pharmacological

basis of therapeutics. 10th ed. New York: McGraw-Hill.

Hariparsad N, Nallani SC, Sane RS, Buckley DJ, Buckley AR, Desai PB. (2004).

Induction of CYP3A4 by efavirenz in primary human hepatocytes: comparison with rifampin and phenobarbital. *J Clin Pharmacol* 44:1273-81.

Heinig R, Adelman HG, Ahr G. (1999). The effect of ketoconazole on the pharmacokinetics, pharmacodynamics and safety of nisoldipine. *Eur J Clin Pharmacol* 55:57-60.

Heizmann P, Ziegler WH. (1981). Excretion and metabolism of ¹⁴C-midazolam in humans following oral dosing. *Arzneimittelforschung* 31:2220-3.

Henry D, Brent P, Whyte I, Mihaly G, Devenish-Meares S. (1987). Propranolol steady-state pharmacokinetics are unaltered by omeprazole. *Eur J Clin Pharmacol* 33:369-73.

Hermann DJ, Krol TF, Dukes GE, Hussey EK, Danis M, Han YH, Powell JR, Hak LJ. (1992). Comparison of verapamil, diltiazem, and labetalol on the bioavailability and metabolism of imipramine. *J Clin Pharmacol* 32:176-83.

Hewitt NJ, Lecluyse EL, Ferguson SS. (2007). Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: methods, mechanisms, recommendations, and in vitro-in vivo correlations. *Xenobiotica* 37:1196-224.

Hinton LK, Galetin A, Houston JB. (2008). Multiple inhibition mechanisms and prediction of drug-drug interactions: status of metabolism and transporter models as exemplified by gemfibrozil-drug interactions. *Pharm Res* 25:1063-74.

Hoglund P, Nilsson LG. (1989). Pharmacokinetics of diltiazem and its metabolites after

- repeated multiple-dose treatments in healthy volunteers. *Ther Drug Monit* 11:543-50.
- Huang YC, Colaizzi JL, Bierman RH, Woestenborghs R, Heykants J. (1986). Pharmacokinetics and dose proportionality of ketoconazole in normal volunteers. *Antimicrob Agents Chemother* 30:206-10.
- Hunt BA, Bottorff MB, Herring VL, Self TH, Lalonde RL. (1990). Effects of calcium channel blockers on the pharmacokinetics of propranolol stereoisomers. *Clin Pharmacol Ther* 47:584-91.
- Hutzler JM, Tracy TS. (2002). Atypical kinetic profiles in drug metabolism reactions. *Drug Metab Dispos* 30:355-62.
- Igarashi T, Sakuma T, Isogai M, Nagata R, Kamataki T. (1997). Marmoset liver cytochrome P450s: study for expression and molecular cloning of their cDNAs. *Arch Biochem Biophys* 339:85-91.
- Ishigami M, Kawabata K, Takasaki W, Ikeda T, Komai T, Ito K, Sugiyama Y. (2001). Drug interaction between simvastatin and itraconazole in male and female rats. *Drug Metab Dispos* 29:1068-72.
- Ito K, Brown HS, Houston JB. (2004). Database analyses for the prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data. *Br J Clin Pharmacol* 57:473-86.
- Ito K, Chiba K, Horikawa M, Ishigami M, Mizuno N, Aoki J, Gotoh Y, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Kato M and others. (2002). Which concentration of the inhibitor should be used to predict in vivo drug interactions from in vitro data? *AAPS PharmSci* 4:E25.
- Ito K, Hallifax D, Obach RS, Houston JB. (2005). Impact of parallel pathways of drug elimination and multiple cytochrome P450 involvement on drug-drug

- interactions: CYP2D6 paradigm. *Drug Metab Dispos* 33:837-44.
- Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y. (1998). Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev* 50:387-412.
- Iwasaki K, Uno Y. (2009). Cynomolgus monkey CYPs: a comparison with human CYPs. *Xenobiotica* 39:578-81.
- Jaakkola T, Backman JT, Neuvonen M, Niemi M, Neuvonen PJ. (2006). Montelukast and zafirlukast do not affect the pharmacokinetics of the CYP2C8 substrate pioglitazone. *Eur J Clin Pharmacol* 62:503-9.
- Ji HY, Lee H, Lim SR, Kim JH, Lee HS. (2012). Effect of efavirenz on UDP-glucuronosyltransferase 1A1, 1A4, 1A6, and 1A9 activities in human liver microsomes. *Molecules* 17:851-60.
- Kanazu T, Yamaguchi Y, Okamura N, Baba T, Koike M. (2004). Model for the drug-drug interaction responsible for CYP3A enzyme inhibition. I: evaluation of cynomolgus monkeys as surrogates for humans. *Xenobiotica* 34:391-402.
- Kang BC, Yang CQ, Cho HK, Suh OK, Shin WG. (2002). Influence of fluconazole on the pharmacokinetics of omeprazole in healthy volunteers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* 23:77-81.
- Karonen T, Filppula A, Laitila J, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. (2010). Gemfibrozil markedly increases the plasma concentrations of montelukast: a previously unrecognized role for CYP2C8 in the metabolism of montelukast. *Clin Pharmacol Ther* 88:223-30.
- Karonen T, Laitila J, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. (2012). Fluconazole but not the CYP3A4 inhibitor, itraconazole, increases zafirlukast plasma concentrations.

Eur J Clin Pharmacol 68:681-8.

Kato M, Chiba K, Hisaka A, Ishigami M, Kayama M, Mizuno N, Nagata Y, Takakuwa S, Tsukamoto Y, Ueda K and others. (2003). The intestinal first-pass metabolism of substrates of CYP3A4 and P-glycoprotein-quantitative analysis based on information from the literature. *Drug Metab Pharmacokinet* 18:365-72.

Kato M, Chiba K, Horikawa M, Sugiyama Y. (2005). The quantitative prediction of in vivo enzyme-induction caused by drug exposure from in vitro information on human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet* 20:236-43.

Kato M, Shitara Y, Sato H, Yoshisue K, Hirano M, Ikeda T, Sugiyama Y. (2008). The quantitative prediction of CYP-mediated drug interaction by physiologically based pharmacokinetic modeling. *Pharm Res* 25:1891-901.

Kees F, Holstege A, Ittner KP, Zimmermann M, Lock G, Scholmerich J, Grobecker H. (2000). Pharmacokinetic interaction between proton pump inhibitors and roxithromycin in volunteers. *Aliment Pharmacol Ther* 14:407-12.

Kerr BM, Thummel KE, Wurden CJ, Klein SM, Kroetz DL, Gonzalez FJ, Levy RH. (1994). Human liver carbamazepine metabolism. Role of CYP3A4 and CYP2C8 in 10,11-epoxide formation. *Biochem Pharmacol* 47:1969-79.

Keubler A, Weiss J, Haefeli WE, Mikus G, Burhenne J. (2012). Drug interaction of efavirenz and midazolam: efavirenz activates the CYP3A-mediated midazolam 1'-hydroxylation in vitro. *Drug Metab Dispos* 40:1178-82.

Khan KK, He YQ, Domanski TL, Halpert JR. (2002). Midazolam oxidation by cytochrome P450 3A4 and active-site mutants: an evaluation of multiple binding sites and of the metabolic pathway that leads to enzyme inactivation.

Mol Pharmacol 61:495-506.

Kim KA, Park PW, Kim KR, Park JY. (2007). Effect of multiple doses of montelukast on the pharmacokinetics of rosiglitazone, a CYP2C8 substrate, in humans. *Br J Clin Pharmacol* 63:339-45.

Kirch W, Spahn H, Kitteringham NR, Hutt HJ, Mutschler E, Ohnhaus EE. (1984). Interaction between the beta-adrenoceptor blockers metoprolol and atenolol with amitriptyline and their effects on oxidative liver metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 17 Suppl 1:65S-8S.

Komatsu K, Ito K, Nakajima Y, Kanamitsu S, Imaoka S, Funae Y, Green CE, Tyson CA, Shimada N, Sugiyama Y. (2000). Prediction of in vivo drug-drug interactions between tolbutamide and various sulfonamides in humans based on in vitro experiments. *Drug Metab Dispos* 28:475-81.

Komura H, Iwaki M. (2008). Species differences in in vitro and in vivo small intestinal metabolism of CYP3A substrates. *J Pharm Sci* 97:1775-800.

Korzekwa KR, Krishnamachary N, Shou M, Ogai A, Parise RA, Rettie AE, Gonzalez FJ, Tracy TS. (1998). Evaluation of atypical cytochrome P450 kinetics with two-substrate models: evidence that multiple substrates can simultaneously bind to cytochrome P450 active sites. *Biochemistry* 37:4137-47.

Kosugi Y, Hirabayashi H, Igari T, Fujioka Y, Hara Y, Okuda T, Moriwaki T. (2012). Evaluation of cytochrome P450-mediated drug-drug interactions based on the strategies recommended by regulatory authorities. *Xenobiotica* 42:127-38.

Kowey PR, Kirsten EB, Fu CH, Mason WD. (1989). Interaction between propranolol and propafenone in healthy volunteers. *J Clin Pharmacol* 29:512-7.

Krishnaiah YS, Satyanarayana S, Visweswaram D. (1994). Interaction between

- tolbutamide and ketoconazole in healthy subjects. *Br J Clin Pharmacol* 37:205-7.
- Kumar V, Wahlstrom JL, Rock DA, Warren CJ, Gorman LA, Tracy TS. (2006). CYP2C9 inhibition: impact of probe selection and pharmacogenetics on in vitro inhibition profiles. *Drug Metab Dispos* 34:1966-75.
- Kuperman AV, Kalgutkar AS, Marfat A, Chambers RJ, Liston TE. (2001). Pharmacokinetics and metabolism of a cysteinyl leukotriene-1 receptor antagonist from the heterocyclic chromanol series in rats: in vitro-in vivo correlation, gender-related differences, isoform identification, and comparison with metabolism in human hepatic tissue. *Drug Metab Dispos* 29:1403-9.
- Kurtz DL, Bergstrom RF, Goldberg MJ, Cerimele BJ. (1997). The effect of sertraline on the pharmacokinetics of desipramine and imipramine. *Clin Pharmacol Ther* 62:145-56.
- Kusama M, Maeda K, Chiba K, Aoyama A, Sugiyama Y. (2009). Prediction of the effects of genetic polymorphism on the pharmacokinetics of CYP2C9 substrates from in vitro data. *Pharm Res* 26:822-35.
- Kusumoto M, Ueno K, Tanaka K, Takeda K, Mashimo K, Kameda T, Fujimura Y, Shibakawa M. (1998). Lack of pharmacokinetic interaction between mexiletine and omeprazole. *Ann Pharmacother* 32:182-4.
- Lu C, Hatsis P, Berg C, Lee FW, Balani SK. (2008). Prediction of Pharmacokinetic Drug-Drug Interactions Using Human Hepatocyte Suspension in Plasma and Cytochrome P450 Phenotypic Data. II. In Vitro-in Vivo Correlation with Ketoconazole. *Drug Metabolism and Disposition* 36:1255-60.
- Lu C, Li AP. (2001). Species comparison in P450 induction: effects of dexamethasone,

- omeprazole, and rifampin on P450 isoforms 1A and 3A in primary cultured hepatocytes from man, Sprague-Dawley rat, minipig, and beagle dog. *Chem Biol Interact* 134:271-81.
- Lu C, Miwa GT, Prakash SR, Gan LS, Balani SK. (2006). A Novel Model for the Prediction of Drug-Drug Interactions in Humans Based on in Vitro Cytochrome P450 Phenotypic Data. *Drug Metabolism and Disposition* 35:79-85.
- Lu C, Miwa GT, Prakash SR, Gan LS, Balani SK. (2007). A novel model for the prediction of drug-drug interactions in humans based on in vitro cytochrome p450 phenotypic data. *Drug Metab Dispos* 35:79-85.
- Lumholtz B, Siersbaek-Nielsen K, Skovsted L, Kampmann J, Hansen JM. (1975). Sulfamethizole-induced inhibition of diphenhydantoin, tolbutamide, and warfarin metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 17:731-4.
- Lundahl J, Regardh CG, Edgar B, Johnsson G. (1995). Relationship between time of intake of grapefruit juice and its effect on pharmacokinetics and pharmacodynamics of felodipine in healthy subjects. *Eur J Clin Pharmacol* 49:61-7.
- Madsen JK, Jensen JD, Jensen LW, Pedersen EB. (1996). Pharmacokinetic interaction between cyclosporine and the dihydropyridine calcium antagonist felodipine. *Eur J Clin Pharmacol* 50:203-8.
- Maenpaa J, Hall SD, Ring BJ, Strom SC, Wrighton SA. (1998). Human cytochrome P450 3A (CYP3A) mediated midazolam metabolism: the effect of assay conditions and regioselective stimulation by alpha-naphthoflavone, terfenadine and testosterone. *Pharmacogenetics* 8:137-55.
- Mao J, Mohutsky M, Harrelson J, Wrighton S, Hall S. (2012). Predictions of

- CYP-Mediated Drug-Drug Interactions Using Cryopreserved Human Hepatocytes: Comparison of Plasma and Protein-Free Media Incubation Conditions. *Drug Metab Dispos*.
- Mao J, Mohutsky MA, Harrelson JP, Wrighton SA, Hall SD. (2011a). Prediction of CYP3A-mediated drug-drug interactions using human hepatocytes suspended in human plasma. *Drug Metab Dispos* 39:591-602.
- Mao J, Mohutsky MA, Harrelson JP, Wrighton SA, Hall SD. (2011b). Prediction of CYP3A Mediated Drug-Drug Interactions Using Human Hepatocytes Suspended in Human Plasma. *Drug Metabolism and Disposition*.
- Margolis JM, Obach RS. (2003). Impact of nonspecific binding to microsomes and phospholipid on the inhibition of cytochrome P4502D6: implications for relating in vitro inhibition data to in vivo drug interactions. *Drug Metab Dispos* 31:606-11.
- McGinnity DF. (2005). Prediction of Cyp2c9-Mediated Drug-Drug Interactions: A Comparison Using Data from Recombinant Enzymes and Human Hepatocytes. *Drug Metabolism and Disposition* 33:1700-7.
- McGinnity DF, Tucker J, Trigg S, Riley RJ. (2005). Prediction of CYP2C9-mediated drug-drug interactions: a comparison using data from recombinant enzymes and human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 33:1700-7.
- McGinnity DF, Waters NJ, Tucker J, Riley RJ. (2008). Integrated in Vitro Analysis for the in Vivo Prediction of Cytochrome P450-Mediated Drug-Drug Interactions. *Drug Metabolism and Disposition* 36:1126-34.
- Muirhead M, Bochner F, Somogyi A. (1988). Pharmacokinetic drug interactions between triamterene and ranitidine in humans: alterations in renal and hepatic

- clearances and gastrointestinal absorption. *J Pharmacol Exp Ther* 244:734-9.
- Nakamura A, Hirota T, Morino A, Imaoka S, Funae Y, Yamamoto Y, Tasaki T, Masuda M, Kazusaka A, Fujita S. (1999). Cytochrome P450 isoforms responsible for the N-deethylation and cyclohexane-hydroxylation of NS-21. *Xenobiotica* 29:243-52.
- Ngui JS, Tang W, Stearns RA, Shou M, Miller RR, Zhang Y, Lin JH, Baillie TA. (2000). Cytochrome P450 3A4-mediated interaction of diclofenac and quinidine. *Drug Metab Dispos* 28:1043-50.
- Niemi M, Backman JT, Fromm MF, Neuvonen PJ, Kivisto KT. (2003). Pharmacokinetic interactions with rifampicin : clinical relevance. *Clin Pharmacokinet* 42:819-50.
- Niemi M, Backman JT, Neuvonen PJ. (2004). Effects of trimethoprim and rifampin on the pharmacokinetics of the cytochrome P450 2C8 substrate rosiglitazone. *Clin Pharmacol Ther* 76:239-49.
- Niwa T, Murayama N, Yamazaki H. (2008). Heterotropic cooperativity in oxidation mediated by cytochrome p450. *Curr Drug Metab* 9:453-62.
- O'Reilly RA. (1982). Stereoselective interaction of sulfinpyrazone with racemic warfarin and its separated enantiomorphs in man. *Circulation* 65:202-7.
- O'Reilly RA, Goulart DA, Kunze KL, Neal J, Gibaldi M, Eddy AC, Trager WF. (1992). Mechanisms of the stereoselective interaction between miconazole and racemic warfarin in human subjects. *Clin Pharmacol Ther* 51:656-67.
- Obach RS. (2005). The Utility of in Vitro Cytochrome P450 Inhibition Data in the Prediction of Drug-Drug Interactions. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316:336-48.

- Obach RS, Lombardo F, Waters NJ. (2008a). Trend Analysis of a Database of Intravenous Pharmacokinetic Parameters in Humans for 670 Drug Compounds. *Drug Metabolism and Disposition* 36:1385-405.
- Obach RS, Lombardo F, Waters NJ. (2008b). Trend analysis of a database of intravenous pharmacokinetic parameters in humans for 670 drug compounds. *Drug Metab Dispos* 36:1385-405.
- Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Gaman EA, Houston JB, Tremaine LM. (2006). The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther* 316:336-48.
- Obach RS, Walsky RL, Venkatakrishnan K, Houston JB, Tremaine LM. (2005). In vitro cytochrome P450 inhibition data and the prediction of drug-drug interactions: qualitative relationships, quantitative predictions, and the rank-order approach. *Clin Pharmacol Ther* 78:582-92.
- Oda S, Fukami T, Yokoi T, Nakajima M. (2015). A comprehensive review of UDP-glucuronosyltransferase and esterases for drug development. *Drug Metab Pharmacokinet* 30:30-51.
- Ogasawara A, Kume T, Kazama E. (2007). Effect of oral ketoconazole on intestinal first-pass effect of midazolam and fexofenadine in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* 35:410-8.
- Ogasawara A, Utoh M, Nii K, Ueda A, Yoshikawa T, Kume T, Fukuzaki K. (2009). Effect of oral ketoconazole on oral and intravenous pharmacokinetics of simvastatin and its acid in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* 37:122-8.
- Ogawa K, Kato M, Houjo T, Ishigai M. (2013). A new approach to predicting human hepatic clearance of CYP3A4 substrates using monkey pharmacokinetic data.

- Xenobiotica 43:468-78.
- Ohtsuka T, Yoshikawa T, Kozakai K, Tsuneto Y, Uno Y, Utoh M, Yamazaki H, Kume T. (2010). Alprazolam as an in vivo probe for studying induction of CYP3A in cynomolgus monkeys. *Drug Metab Dispos* 38:1806-13.
- Oswald S, Meyer zu Schwabedissen HE, Nassif A, Modess C, Desta Z, Ogburn ET, Mostertz J, Keiser M, Jia J, Hubeny A and others. (2012). Impact of efavirenz on intestinal metabolism and transport: insights from an interaction study with ezetimibe in healthy volunteers. *Clin Pharmacol Ther* 91:506-13.
- Pelkonen O, Maenpaa J, Taavitsainen P, Rautio A, Raunio H. (1998). Inhibition and induction of human cytochrome P450 (CYP) enzymes. *Xenobiotica* 28:1203-53.
- Prueksaritanont T, Kuo Y, Tang C, Li C, Qiu Y, Lu B, Strong-Basalysa K, Richards K, Carr B, Lin JH. (2006). In vitro and in vivo CYP3A64 induction and inhibition studies in rhesus monkeys: a preclinical approach for CYP3A-mediated drug interaction studies. *Drug Metab Dispos* 34:1546-55.
- Rapeport WG, Muirhead DC, Williams SA, Cross M, Wesnes K. (1996). Absence of effect of sertraline on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of phenytoin. *J Clin Psychiatry* 57 Suppl 1:24-8.
- Rioux N, Batonga J, Colombo F, Masse J, Zouki C, Ribadeneira MD, Duan J, Bethell RC. (2013). A simplified approach to predict CYP3A-mediated drug-drug interactions at early drug discovery: validation with clinical data. *Xenobiotica* 43:592-7.
- Rostami-Hodjegan A, Tucker G. (2004). "In silico" simulations to assess the "in vivo" consequences of "in vitro" metabolic drug-drug interactions. *Drug Discovery*

- Today: Technologies 1:441-8.
- Sakamoto K, Ohashi K. (1995). *Jpn J Clin Pharmacol Ther* 26:159-60.
- Schwab GE, Raucy JL, Johnson EF. (1988). Modulation of rabbit and human hepatic cytochrome P-450-catalyzed steroid hydroxylations by alpha-naphthoflavone. *Mol Pharmacol* 33:493-9.
- Sennef C, Timmer CJ, Sitsen JMA. (2003). Mirtazapine in combination with amitriptyline: a drug-drug interaction study in healthy subjects. *Human Psychopharmacology: Clinical and Experimental* 18:91-101.
- Seo KA, Bae SK, Choi YK, Choi CS, Liu KH, Shin JG. (2010). Metabolism of 1'- and 4-hydroxymidazolam by glucuronide conjugation is largely mediated by UDP-glucuronosyltransferases 1A4, 2B4, and 2B7. *Drug Metab Dispos* 38:2007-13.
- Sharer JE, Shipley LA, Vandenbranden MR, Binkley SN, Wrighton SA. (1995). Comparisons of phase I and phase II in vitro hepatic enzyme activities of human, dog, rhesus monkey, and cynomolgus monkey. *Drug Metab Dispos* 23:1231-41.
- Shibata Y, Takahashi H, Chiba M, Ishii Y. (2008). A novel approach to the prediction of drug-drug interactions in humans based on the serum incubation method. *Drug Metab Pharmacokinet* 23:328-39.
- Shitara Y, Itoh T, Sato H, Li AP, Sugiyama Y. (2003). Inhibition of transporter-mediated hepatic uptake as a mechanism for drug-drug interaction between cerivastatin and cyclosporin A. *J Pharmacol Exp Ther* 304:610-6.
- Shoaf SE, Elizari MV, Wang Z, Sekar K, Grinfeld LR, Barbagelata NA, Lerman J, Bramer SL, Tronge J, Orlandi C. (2005). Tolvaptan administration does not

- affect steady state amiodarone concentrations in patients with cardiac arrhythmias. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 10:165-71.
- Shou M, Grogan J, Mancewicz JA, Krausz KW, Gonzalez FJ, Gelboin HV, Korzekwa KR. (1994). Activation of CYP3A4: evidence for the simultaneous binding of two substrates in a cytochrome P450 active site. *Biochemistry* 33:6450-5.
- Shou M, Hayashi M, Pan Y, Xu Y, Morrissey K, Xu L, Skiles GL. (2008). Modeling, prediction, and in vitro in vivo correlation of CYP3A4 induction. *Drug Metab Dispos* 36:2355-70.
- Smith SR, Kendall MJ, Lobo J, Beerah A, Jack DB, Wilkins MR. (1987). Ranitidine and cimetidine; drug interactions with single dose and steady-state nifedipine administration. *Br J Clin Pharmacol* 23:311-5.
- Sommers DK, Kovarik JM, Meyer EC, van Wyk M, Snyman JR, Blom M, Ott S, Grass P, Kutz K. (1993). Effects of diclofenac on isradipine pharmacokinetics and platelet aggregation in volunteers. *Eur J Clin Pharmacol* 44:391-3.
- Spina E, Pollicino AM, Avenoso A, Campo GM, Perucca E, Caputi AP. (1993). Effect of fluvoxamine on the pharmacokinetics of imipramine and desipramine in healthy subjects. *Ther Drug Monit* 15:243-6.
- Stass H, Nagelschmitz J, Moeller JG, Delesen H. (2004). Pharmacokinetics of moxifloxacin are not influenced by a 7-day pretreatment with 200 mg oral itraconazole given once a day in healthy subjects. *Int J Clin Pharmacol Ther* 42:23-9.
- Sugita O, Sawada Y, Sugiyama Y, Iga T, Hanano M. (1981). Prediction of drug-drug interaction from in vitro plasma protein binding and metabolism. A study of tolbutamide-sulfonamide interaction in rats. *Biochem Pharmacol* 30:3347-54.

- Sugiyama M, Fujita K, Murayama N, Akiyama Y, Yamazaki H, Sasaki Y. (2011). Sorafenib and sunitinib, two anticancer drugs, inhibit CYP3A4-mediated and activate CYP3A5-mediated midazolam 1'-hydroxylation. *Drug Metab Dispos* 39:757-62.
- Tachibana T, Kato M, Watanabe T, Mitsui T, Sugiyama Y. (2009). Method for predicting the risk of drug-drug interactions involving inhibition of intestinal CYP3A4 and P-glycoprotein. *Xenobiotica* 39:430-43.
- Takahashi H, Sato T, Shimoyama Y, Shioda N, Shimizu T, Kubo S, Tamura N, Tainaka H, Yasumori T, Echizen H. (1999). Potentiation of anticoagulant effect of warfarin caused by enantioselective metabolic inhibition by the uricosuric agent benzbromarone. *Clin Pharmacol Ther.* United States. p 569-81.
- Tang W, Stearns RA. (2001). Heterotropic cooperativity of cytochrome P450 3A4 and potential drug-drug interactions. *Curr Drug Metab* 2:185-98.
- Tang W, Stearns RA, Kwei GY, Iliff SA, Miller RR, Egan MA, Yu NX, Dean DC, Kumar S, Shou M and others. (1999). Interaction of diclofenac and quinidine in monkeys: stimulation of diclofenac metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 291:1068-74.
- Tateishi T, Nakashima H, Shitou T, Kumagai Y, Ohashi K, Hosoda S, Ebihara A. (1989). Effect of diltiazem on the pharmacokinetics of propranolol, metoprolol and atenolol. *Eur J Clin Pharmacol* 36:67-70.
- Terao T, Hisanaga E, Sai Y, Tamai I, Tsuji A. (1996). Active secretion of drugs from the small intestinal epithelium in rats by P-glycoprotein functioning as an absorption barrier. *J Pharm Pharmacol* 48:1083-9.
- Thummel KE, Wilkinson GR. (1998). In vitro and in vivo drug interactions involving

- human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38:389-430.
- Tornio A, Niemi M, Neuvonen PJ, Backman JT. (2008). Trimethoprim and the CYP2C8*3 allele have opposite effects on the pharmacokinetics of pioglitazone. *Drug Metab Dispos* 36:73-80.
- Tran TH, Von Moltke LL, Venkatakrishnan K, Granda BW, Gibbs MA, Obach RS, Harmatz JS, Greenblatt DJ. (2002). Microsomal protein concentration modifies the apparent inhibitory potency of CYP3A inhibitors. *Drug Metab Dispos* 30:1441-5.
- Transon C, Leemann T, Vogt N, Dayer P. (1995). In vivo inhibition profile of cytochrome P450TB (CYP2C9) by (+/-)-fluvastatin. *Clin Pharmacol Ther* 58:412-7.
- Tucker GT, Houston JB, Huang SM. (2001). Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential-toward a consensus. *Clin Pharmacol Ther* 70:103-14.
- Turgeon J, Pavlou HN, Wong W, Funck-Brentano C, Roden DM. (1990). Genetically determined steady-state interaction between encainide and quinidine in patients with arrhythmias. *J Pharmacol Exp Ther* 255:642-9.
- Turpeinen M, Korhonen LE, Tolonen A, Uusitalo J, Juvonen R, Raunio H, Pelkonen O. (2006). Cytochrome P450 (CYP) inhibition screening: comparison of three tests. *Eur J Pharm Sci* 29:130-8.
- Ueda N, Yoshimura R, Umene-Nakano W, Ikenouchi-Sugita A, Hori H, Hayashi K, Kodama Y, Nakamura J. (2009). Grapefruit juice alters plasma sertraline levels after single ingestion of sertraline in healthy volunteers. *World J Biol Psychiatry* 10:832-5.

- Uno Y, Hosaka S, Matsuno K, Nakamura C, Kito G, Kamataki T, Nagata R. (2007). Characterization of cynomolgus monkey cytochrome P450 (CYP) cDNAs: is CYP2C76 the only monkey-specific CYP gene responsible for species differences in drug metabolism? *Arch Biochem Biophys* 466:98-105.
- Varhe A, Olkkola KT, Neuvonen PJ. (1994). Oral triazolam is potentially hazardous to patients receiving systemic antimycotics ketoconazole or itraconazole. *Clin Pharmacol Ther* 56:601-7.
- Varhe A, Olkkola KT, Neuvonen PJ. (1996a). Effect of fluconazole dose on the extent of fluconazole-triazolam interaction. *Br J Clin Pharmacol* 42:465-70.
- Varhe A, Olkkola KT, Neuvonen PJ. (1996b). Fluconazole, but not terbinafine, enhances the effects of triazolam by inhibiting its metabolism. *Br J Clin Pharmacol* 41:319-23.
- Veronese ME, Miners JO, Randles D, Gregov D, Birkett DJ. (1990). Validation of the tolbutamide metabolic ratio for population screening with use of sulfaphenazole to produce model phenotypic poor metabolizers. *Clin Pharmacol Ther. United States.* p 403-11.
- von Moltke LL, Greenblatt DJ, Granda BW, Giancarlo GM, Duan SX, Daily JP, Harmatz JS, Shader RI. (2001). Inhibition of human cytochrome P450 isoforms by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *J Clin Pharmacol* 41:85-91.
- Wagner F, Kalusche D, Trenk D, Jahnchen E, Roskamm H. (1987). Drug interaction between propafenone and metoprolol. *Br J Clin Pharmacol* 24:213-20.
- Walsky RL, Gaman EA, Obach RS. (2005). Examination of 209 drugs for inhibition of cytochrome P450 2C8. *J Clin Pharmacol* 45:68-78.
- Wang RW, Newton DJ, Liu N, Atkins WM, Lu AY. (2000). Human cytochrome P-450

- 3A4: in vitro drug-drug interaction patterns are substrate-dependent. *Drug Metab Dispos* 28:360-6.
- Wiebel FJ, Leutz JC, Diamond L, Gelboin HV. (1971). Aryl hydrocarbon (benzo(a)pyrene) hydroxylase in microsomes from rat tissues: differential inhibition and stimulation by benzoflavones and organic solvents. *Arch Biochem Biophys* 144:78-86.
- Wienkers LC, Heath TG. (2005). Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nature Reviews Drug Discovery* 4:825-33.
- Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR, 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* 32:1201-8.
- Yamaoka K, Tanigawara Y, Nakagawa T, Uno T. (1981). A pharmacokinetic analysis program (multi) for microcomputer. *J Pharmacobiodyn* 4:879-85.
- Zhang ZY, Wong YN. (2005). Enzyme kinetics for clinically relevant CYP inhibition. *Curr Drug Metab* 6:241-57.
- Zhao XJ, Ishizaki T. (1997). The In vitro hepatic metabolism of quinine in mice, rats and dogs: comparison with human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 283:1168-76.
- Zhu B, Bush D, Doss GA, Vincent S, Franklin RB, Xu S. (2008). Characterization of 1'-hydroxymidazolam glucuronidation in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 36:331-8.
- Zimmermann T, Yeates RA, Laufen H, Scharpf F, Leitold M, Wildfeuer A. (1996). Influence of the antibiotics erythromycin and azithromycin on the

pharmacokinetics and pharmacodynamics of midazolam.

Arzneimittelforschung 46:213-7.