

博士論文

カニクイザル シトクロム P450 2C  
分子種の基質認識性に関する  
網羅的解析研究

平成 27 年度

保坂 信哉



## 目次

序論 .....	- 1 -
第 I 章 主要カニクイザル CYP2C 分子種の基質認識性の全体像 .....	- 4 -
第 1 節 緒言 .....	- 4 -
第 2 節 実験材料および実験方法 .....	- 6 -
I-2-i 試薬 .....	- 6 -
I-2-ii 代謝反応 .....	- 7 -
I-2-iii 検量試料の調製 .....	- 8 -
I-2-iv 代謝反応後の基質濃度の測定 .....	- 8 -
I-2-v データ解析 .....	- 8 -
第 3 節 結果および考察 .....	- 10 -
I-3-i 基質消失アッセイ .....	- 10 -
第 4 節 結論 .....	- 12 -
第 II 章 カニクイザル CYP2C19 の基質認識性 .....	- 13 -
第 1 節 緒言 .....	- 13 -
第 2 節 実験材料および実験方法 .....	- 14 -
II-2-i 試薬 .....	- 14 -
II-2-ii 代謝反応 .....	- 14 -
II-2-iii 検量試料の調製 .....	- 14 -
II-2-iv 代謝反応後の基質濃度の測定 .....	- 14 -
II-2-v Loratadine の代謝物分析 .....	- 14 -
II-2-vi データ解析 .....	- 15 -
II-2-vii ドッキングシミュレーション .....	- 15 -
第 3 節 結果および考察 .....	- 16 -
II-3-i 基質消失アッセイ .....	- 16 -
II-3-ii Loratadine 代謝の固有クリアランス .....	- 18 -
II-3-iii Loratadine 代謝物の LC-MS/MS 分析 .....	- 20 -
II-3-iv ドッキングシミュレーション .....	- 22 -
第 4 節 結論 .....	- 24 -
第 III 章 カニクイザル CYP2C9 の基質認識性 .....	- 25 -
第 1 節 緒言 .....	- 25 -
第 2 節 実験材料および実験方法 .....	- 26 -
III-2-i 試薬 .....	- 26 -
III-2-ii 代謝反応 .....	- 26 -
III-2-iii 検量試料の調製 .....	- 26 -

III-2-iv	代謝反応後の基質濃度の測定	- 26 -
III-2-v	Efavirenz の代謝物分析	- 27 -
III-2-vi	データ解析	- 27 -
III-2-vii	ドッキングシミュレーション	- 27 -
第 3 節	結果および考察	- 28 -
III-3-i	基質消失アッセイ	- 28 -
III-3-ii	Efavirenz 代謝の固有クリアランス	- 30 -
III-3-iii	Efavirenz 代謝物の LC-MS/MS 分析	- 30 -
III-3-iv	8-Hydroxyefavirenz 生成反応の速度論的解析	- 32 -
III-3-v	ドッキングシミュレーション	- 33 -
第 4 節	結論	- 35 -
第 IV 章	カニクイザル CYP2C76 の基質認識性	- 36 -
第 1 節	緒言	- 36 -
第 2 節	実験材料および実験方法	- 37 -
IV-2-i	試薬	- 37 -
IV-2-ii	代謝反応	- 37 -
IV-2-iii	検量試料の調製	- 37 -
IV-2-iv	代謝反応後の基質濃度の測定	- 37 -
IV-2-v	Nifedipine および Bupropion の代謝物分析	- 37 -
IV-2-vi	データ解析	- 38 -
IV-2-vii	ドッキングシミュレーション	- 38 -
第 3 節	結果および考察	- 39 -
IV-3-i	基質消失アッセイ	- 39 -
IV-3-ii	Nifedipine および Bupropion 代謝の固有クリアランス	- 40 -
IV-3-iii	Nifedipine および Bupropion 代謝物の LC-MS/MS 分析	- 41 -
IV-3-iv	ドッキングシミュレーション	- 44 -
第 4 節	結論	- 47 -
第 V 章	カニクイザル CYP2C8 の基質認識性およびヒト CYP2C8 基質である化合物 A の ヒト初回投与量算出	- 48 -
第 1 節	緒言	- 48 -
第 2 節	実験材料および実験方法	- 51 -
V-2-i	試薬	- 51 -
V-2-ii	代謝反応	- 51 -
V-2-iii	検量試料の調製	- 51 -
V-2-iv	代謝反応後の基質濃度の測定	- 51 -
V-2-v	データ解析	- 51 -

第 3 節 結果および考察.....	- 52 -
V-3-i 市販 22 化合物の基質消失アッセイ .....	- 52 -
V-3-ii 化合物 A の基質消失アッセイ .....	- 55 -
第 4 節 結論.....	- 57 -
総括 .....	- 58 -
本論文内容の誌上発表 .....	- 61 -
謝辞 .....	- 62 -
参考文献.....	- 63 -

## 略号

CL <sub>int</sub>	intrinsic clearance
CYP	cytochrome P450
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EMA	European Medicines Agency
ESI	electrospray ionization
FDA	Food and Drug Administration
FIH	first in human
HPLC	high performance liquid chromatography
K <sub>m</sub>	Michaelis constant
K <sub>s</sub>	substrate inhibition constant
LC	liquid chromatography
M	mol/L
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	mass spectrometry
MS/MS	tandem mass spectrometry
NADP	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	nicotine adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
P450	cytochrome P450
PP	polypropylene
RAF	relative activity factor
[S]	substrate concentration
S/N	signal to noise
SRM	selected reaction monitoring

<i>t</i> -butyl	tertiary butyl
TIC	total ion chromatogram
$t_R$	retention time
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethane
U	unit
$U$ value	total interaction energy
$V_{\max}$	maximum velocity

## 序論

医薬品開発を行うに当たり、医薬品候補化合物のヒトでの薬効および毒性の予測のため、動物を用いた種々の非臨床試験の実施が規制上求められている。非臨床試験の歴史的背景を見ると、1961年、催奇形性が社会問題となったサリドマイド事件が発生したが、当時は医薬品の承認申請に必要な非臨床試験については何ら規制がなかった。サリドマイド事件を受け、1963年に初の非臨床試験ガイドラインである「胎児に及ぼす影響に関する毒性試験法ガイドライン」が通知され、以降現在に至るまで種々のガイドラインが制定されてきた。非臨床試験では一般的にげっ歯類としてラットおよびマウス、非げっ歯類としてイヌ、ウサギ、ブタおよびサル等が使用されているが、カニクイザルは他の実験動物に比べて進化的にヒトに近く、薬物の体内動態もヒトと類似しており、非臨床試験に汎用されている重要な動物種である。

P450はヒトにおける主要な薬物代謝酵素であり、臨床で使用されている薬の7割以上の代謝に寄与することが報告されている。その中でもCYP3AおよびCYP2C分子種(CYP2C9およびCYP2C19)は薬物代謝への寄与が大きいことが知られている(Williams et al., 2004)。したがって、進化的にヒトに近いカニクイザルにおいても、これらP450分子種の医薬品候補化合物の代謝への寄与は大きいと推察されるため、ヒトとカニクイザルの薬物代謝の種差を理解する上で重要と考えられる。CYP2C分子種に関しては、カニクイザルの肝臓においてもヒトと同様にCYP2C9およびCYP2C19の発現が確認されているが、それらに加えいずれのヒトP450とも対応関係の取れないCYP2C76が発現している(Uehara et al., 2011)。したがって、CYP2C76はヒトとカニクイザルの薬物代謝における種差の一因となる可能性が考えられるが、実際、ピタバスタチン(リバロ錠)の体内動態における種差がCYP2C76による代謝に起因することが明らかにされている(Uno et al., 2007; Yamada et al., 2003)。カニクイザルCYP2C分子種としては、上記以外にCYP2C8およびCYP2C18が同定されている(Komori et al., 1992; Uno et al., 2010)。両分子種はヒトにおいても同定されて

おり、ヒト CYP2C8 は Paclitaxel や Amodiaquine といった医薬品の主代謝酵素であることが報告されている (Rahman et al., 1994; Li et al., 2002)。一方、ヒト CYP2C18 は、肝臓でのタンパク質としての発現量は検出限界以下であり (Läpple et al., 2003)、代表的な基質はほとんど知られていない (Obach et al., 2001)。なお、カニクイザルにおいても CYP2C18 の発現量は低いと考えられている (Uno et al., 2010)。

カニクイザルとヒトの CYP2C 分子種のアミノ酸配列相同性を Table 1 に示す (Uno et al., 2011a)。カニクイザル CYP2C 分子種は対応するヒト CYP2C 分子種に対し 90% 以上の高いアミノ酸相同性を示すが、CYP2C76 は例外であり、その相同性はいずれのヒト CYP2C 分子種に対しても 70% 程度である。

以上のように、カニクイザル CYP2C 分子種による薬物代謝には複数の分子種が関与しているため複雑であると予想されるが、これまでにカニクイザル CYP2C 分子種の基質認識性に関する網羅的な検討は実施されていない。そこで、本研究ではヒト P450 の基質あるいは阻害剤を、カニクイザル CYP2C 分子種の大腸菌発現系と反応し代謝試験を実施することで、カニクイザル CYP2C 分子種の基質認識性を網羅的に解析した。なお、CYP2C18 の薬物代謝における寄与は小さいと考えられたため、本研究では評価を行わなかった。第 I 章では、カニクイザル CYP2C 分子種のうち薬物代謝の種差の理解に特に重要と考えられる CYP2C9、CYP2C19 および CYP2C76 の基質認識性の全体像を示した。第 II～V 章では個々のカニクイザル CYP2C 分子種に焦点を当て、第 II 章では CYP2C19、第 III 章では CYP2C9、第 IV 章では CYP2C76、そして第 V 章では CYP2C8 の基質認識性をそれぞれ明らかにした。

また、第 V 章では、本研究の医薬品開発への応用例として、ヒト CYP2C8 基質である化合物 A のヒト初回投与量算出についても示した。医薬品開発において被験薬を初めてヒトに投与する試験は First-in-Human (FIH) 試験と称される。FIH 試験を開始する時点で使用可能なデータは非臨床試験から得られたものに限られるが、実験動物とヒトの間には様々な種差が存在し得るため、ヒト初回投与量算出の際は十分な安全性マージンを考慮する必

要がある。本検討では、化合物 A の主代謝酵素をヒトとカニクイザルで比較し、薬物代謝の観点からの安全性マージンについて考察した。

本研究を通じ、カニクイザルを用いた非臨床試験のデータを精度よくヒトに外挿するため、カニクイザル CYP2C 分子種の基質特異性を網羅的に解析したので、以下に詳述する。

**Table 1. Amino acid identity between cynomolgus monkey and human P450 2Cs.**

	Human CYP2C8	Human CYP2C9	Human CYP2C18	Human CYP2C19
Monkey CYP2C8	92	78	77	79
Monkey CYP2C9	78	93	81	91
Monkey CYP2C18	77	81	96	81
Monkey CYP2C19	76	93	81	92
Monkey CYP2C76	70	71	72	72

“Monkey” means cynomolgus monkey.

## 第 I 章 主要カニクイザル CYP2C 分子種の基質認識性の全体像

### 第 1 節 緒言

Williams らは、アメリカ合衆国の処方薬トップ 200 の消失経路を調べた結果、約 75% が代謝により消失し、さらにその約 75% が P450 による代謝であったことを報告している (Williams et al., 2004). すなわち、P450 はヒトにおける主要な薬物代謝酵素である。ヒトにおいては、これまでに 50 種類を超える機能的な P450 分子種が同定され、その機能が明らかとなっている (Nelson et al., 2004). そのうち CYP1, CYP2 および CYP3 ファミリーは薬物代謝に重要であり、特に CYP3A 分子種 (CYP3A4 および CYP3A5) は P450 が関与する代謝反応に最も寄与している重要な薬物代謝酵素である。そして、CYP3A 分子種に次いで薬物代謝への寄与が大きいのが、CYP2C 分子種 (CYP2C9 および CYP2C19) である (Williams et al., 2004).

ヒトにおいては、これまでに CYP2C 分子種として CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 および CYP2C19 の 4 分子種が同定されている。肝臓における 4 分子種の発現量は P450 全体の約 20% を占め、そのうち CYP2C9 の含量が最も多い。さらに、これらの分子種はすべて 80% 以上のアミノ酸相同性を有し、基質認識性も重複していることから、CYP2C はヒトにおいて最も複雑なサブファミリーである (加藤・鎌滝, 2000; Goldstein and de Morais, 1994).

一方、カニクイザル CYP2C 分子種としてはこれまでに CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18, CYP2C19 および CYP2C76 の 5 分子種が同定されている。カニクイザルの CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18 および CYP2C19 は対応するヒト CYP2C 分子種に対し 90% 以上の高い相同性を示すが、CYP2C76 はヒトにオーソログが存在せず、いずれのヒト CYP2C 分子種に対してもアミノ酸レベルで 70% 程度の相同性しか示さない (Uno et al., 2011a).

カニクイザルにおいて、ヒトとの薬物代謝における種差を考える上で、ヒトで薬物代謝への寄与が大きい CYP2C9 および CYP2C19, 並びにヒトにオーソログが存在しない

CYP2C76 の基質認識性を明らかにすることは重要であると考えられた。そこで本研究では、市販の 89 化合物を上記のカニクイザル CYP2C 分子種と反応し代謝試験を実施することにより、その基質認識性を網羅的に評価したので、以下に詳述する。なお、本研究で評価した 89 化合物は、FDA あるいは EMA の薬物相互作用ガイダンスあるいはガイドライン (<http://www.fda.gov/cder/guidance/6695dft.htm>; [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/Scientific\\_guideline/2012/07/WC500129606.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2012/07/WC500129606.pdf)) に記載のあるヒト P450 の代表的な基質または阻害剤に、ヒト CYP2C 分子種の基質または阻害剤として文献報告 (Rendic, 2002) のある化合物を追加することにより選択した。なお、LC-MS による測定を考慮し、イオン化が不十分あるいは分子量が小さく十分な S/N 比が得られない化合物は評価対象外とした。

## 第 2 節 実験材料および実験方法

### I-2-i 試薬

基質として使用した 89 化合物 (Table I-1) は和光純薬工業株式会社, Sigma-Aldrich, Santa Cruz Biotechnology, コスモバイオ株式会社またはナカライテスク株式会社より購入した. カニクイザル CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C76 の組換えタンパク質は, Iwata らおよび Daigo らの手法 (Iwata et al., 1998; Daigo et al., 2002) に従い, 大腸菌を宿主とし発現させた後に精製したものを使用した. 他の全ての試薬は, 分析用グレードあるいは高純度品をメーカーより購入した.

**Table I-1. Eighty-nine compounds evaluated in this study**

Amiodarone	Erythromycin	Nifedipine	Simvastatin
Amitriptyline	7-Ethoxyresorufin	p-Nitrophenol	Sulfadiazine
Amlodipine	Fluconazole	Nootkatone	Sulfamethoxazole
Amodiaquine	Fluoxetine	Olanzapine	Sulfaphenazole
Amoxapine	Flurbiprofen	Omeprazole	Tacrine
Atorvastatin	Fluvastatin	Orphenadrine	Terfenadine
Azamulin	Fluvoxamine	Paclitaxel	Testosterone
Bufuralol	Furafylline	Phenacetin	Theophylline
Bupropion	Gemfibrozil	Phenylbutazone	Thiotepa
Caffeine	Ifosfamide	Pioglitazone	Ticlopidine
Chlormethiazole	Imipramine	Piroxicam	Tolbutamide
Chlorzoxazone	Irsogladine	Pitavastatin	Torseamide
Citalopram	Itraconazole	Pitavastatin lactone	Tranlycypromine
Clomipramine	Ketoconazole	Pravastatin	Triazolam
Clopidogrel	Lansoprazole	Proguanil	Trimethoprim
Clozapine	Loratadine	Propranolol	Troglitazone
Coumarin	Maprotiline	Quercetin	Troleandomycin
Cyclophosphamide	Methoxsalen	Quinidine	Tryptamine
Dapson	Miconazole	Ritonavir	Verapamil
Dextromethorphan	Midazolam	Rosiglitazone	Warfarin
Diazepam	Montelukast	Rosuvastatin	
Diclofenac	$\alpha$ -Naphthoflavone	Salbutamol	
Efavirenz	Nicardipine	Sertraline	

## I-2-ii 代謝反応

1.5 mL 容 PP チューブに 1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.4) 5  $\mu$ L (終濃度 50 mM), 基質の 100  $\mu$ M メタノール溶液 1  $\mu$ L (終濃度 1.0  $\mu$ M), カニクイザル CYP2C 分子種 (CYP2C9, CYP2C19 または CYP2C76) 発現系 2.5 pmol (終濃度 25 pmol/mL) および蒸留水 72.75  $\mu$ L を添加した. さらに, 5 mM  $\beta$ -NADP 水溶液 5  $\mu$ L, 50 mM グルコース 6 リン酸 2 ナトリウム水溶液 5  $\mu$ L, 100 U/mL グルコース 6 リン酸脱水素酵素水溶液 0.25  $\mu$ L および 500 mM

塩化マグネシウム水溶液 6  $\mu\text{L}$  を添加し、計 100  $\mu\text{L}$  とした。37°C で 0, 15 または 30 分間反応後、LC-MS/MS 測定用の内標準物質である 5 nM テルビナフィン (Positive モード) あるいは 300 nM メフェナム酸 (Negative モード) を含有した氷冷メタノール溶液 200  $\mu\text{L}$  を添加し、反応を停止した。21600 g, 4°C, 10 分間遠心分離後の上清を LC-MS/MS で分析した。なお、代謝反応は duplicate で行った。

#### I-2-iii 検量試料の調製

終濃度として 0, 0.01, 0.05, 0.1 および 1  $\mu\text{M}$  の基質溶液を I-2-ii 項に準じて調製した。ただし、カニクイザル CYP2C 分子種発現系および 100 U/mL グルコース 6 リン酸脱水素酵素水溶液の代わりに、TGE 緩衝液 (終濃度: 10 mM Tris-HCl, 20% グリセロール, 1 mM EDTA) および蒸留水をそれぞれ添加した。

#### I-2-iv 代謝反応後の基質濃度の測定

代謝反応後の基質濃度の測定は、株式会社資生堂の Nanospace SI-2 HPLC および Thermo Fisher Scientific の TSQ Quantum Ultra Triple-Quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS) を用いて実施した。カラムは CAPCELL CORE C18, 2.1 $\times$ 50 mm, 2.7  $\mu\text{m}$  (株式会社資生堂) を使用した。注入量は 5 (Positive モード) または 10 (Negative モード)  $\mu\text{L}$  とした。移動相は 0.1 vol% ギ酸水溶液 (A 液) と 0.1 vol% ギ酸メタノール溶液 (B 液) を使用し、グラジエント法により分析した。流速は 0.4 mL/min とした。グラジエントは、B 液を 2% で開始し、0.1 分で 100% まで上昇させた。1.6 分まで 100% で維持した後、1.7 分で 2% に戻し、4.2 分まで 2% で維持した。ESI 法によるイオン化後、SRM モードによりデータを取得し、得られたピークエリア比 (基質/内標準物質) を基に試料中の基質濃度を定量した。

#### I-2-v データ解析

検量試料の測定値より作成した検量線を用い、各試料中の基質濃度を定量した。反応時

間 0 分および 30 分の試料中に含まれる基質濃度から、30 分間反応後の基質残存率 (%) を算出した。さらに、100 から基質残存率 (%) を差し引くことで、30 分間の代謝反応による基質消失率 (%) を算出した。

### 第3節 結果および考察

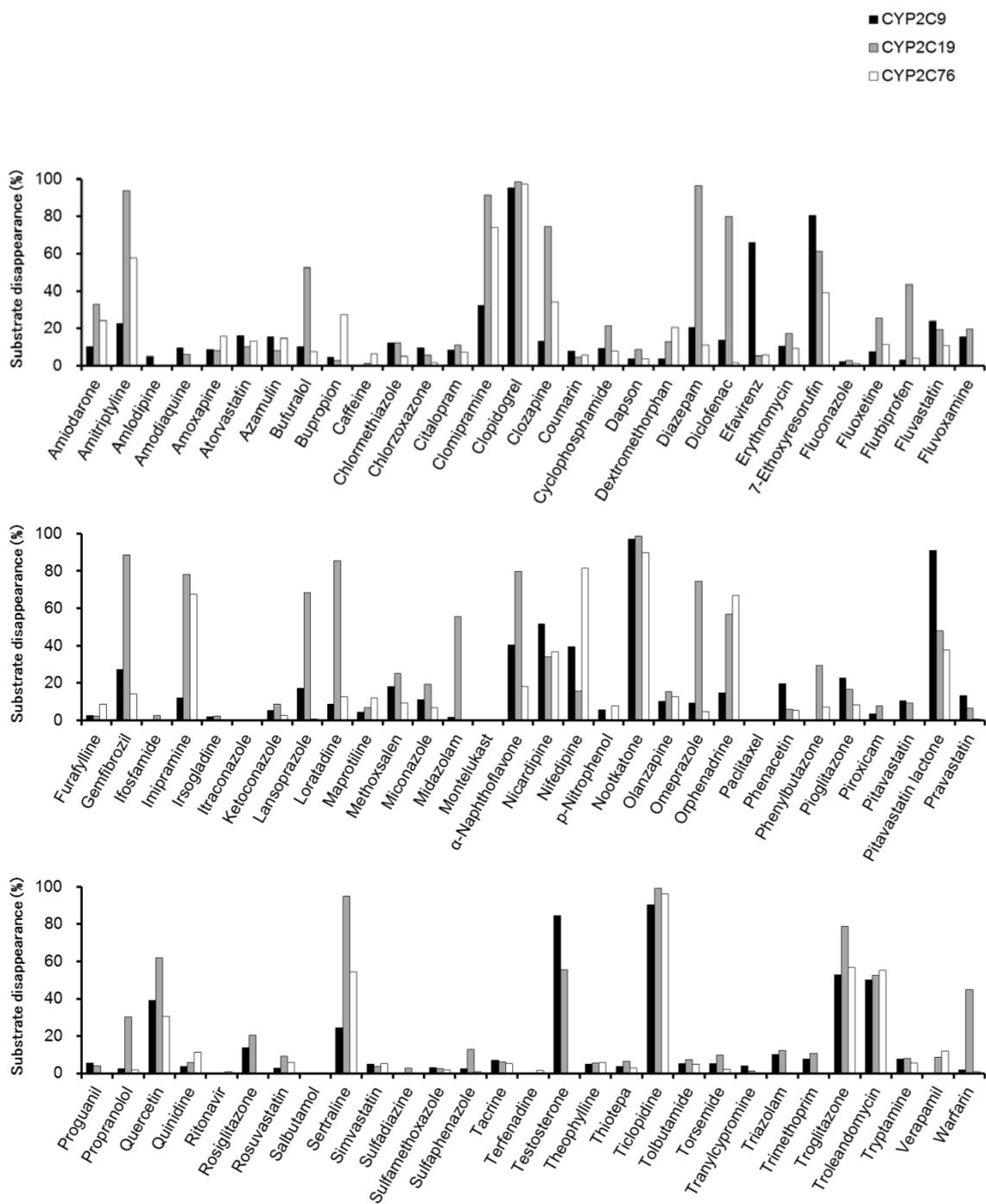
#### I-3-i 基質消失アッセイ

基質濃度 1.0  $\mu\text{M}$  および P450 濃度 25 pmol/mL の条件下で 30 分間代謝反応後の基質消失率を Figure I-1 に示した. 本基質消失率が 20% を超えた化合物を当該 P450 分子種の基質であると判定した. その結果, 基質となった化合物数はカニクイザル CYP2C19, CYP2C9 および CYP2C76 において, それぞれ 89 化合物中 34 化合物, 20 化合物および 19 化合物であった.

P450 による代謝反応はミカエリス・メンテン式に従うことから, 基質濃度が高ければ, 代謝速度は大きくなり, 反応をより捉えやすくなる. 本検討での基質濃度は 1.0  $\mu\text{M}$  であり, 化合物が持つ一般的な  $K_m$  値よりも十分に低い濃度であると考えられたため, 本反応系においては反応速度の小さい代謝反応については検出できない可能性が考えられた. 実際, 既報においてカニクイザル CYP2C9 は基質濃度 1 mM において Diclofenac を (Mitsuda et al., 2006), CYP2C76 は基質濃度 100  $\mu\text{M}$  および 20  $\mu\text{M}$  において Tolbutamide および Bufuralol をそれぞれ代謝することが報告されているが (Uno et al., 2006, 2011b), 本検討においてはこれらの化合物の代謝はほとんど進まなかった. これは, 試験間における基質濃度等の反応条件の差に起因するものであると考えられた. また, 上記を逆説的に捉えると, 本試験系で検出された基質は, 当該 P450 により速やかに代謝を受ける化合物であると考えられた.

ヒトにおいて, CYP2C 分子種は分子種間で相同性が高く, 基質特異性が重複していることが知られているが, 本検討より, カニクイザル CYP2C 分子種においても同様の傾向が認められた. すなわち Amitriptyline や Clomipramine のようにいずれの分子種においても代謝される化合物や, Amlodipine や Amoxapine のようにいずれの分子種においてもほとんど代謝を受けない化合物は比較的高頻度に認められたが, 単一の分子種でのみ代謝反応が進行した化合物はごく一部であった. 単一の分子種に高い選択性を示した代謝反応につい

ては、以降の章で詳述する。



**Figure I-1** Substrate disappearance of 89 compounds metabolized by recombinant cynomolgus monkey CYP2Cs. Substrates (1.0  $\mu$ M) were incubated with each recombinant P450 for 30 minutes.

#### 第4節 結論

本検討により、カニクイザル CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C76 の基質認識性の全体像を把握することができた。89 化合物中 34 化合物, 20 化合物および 19 化合物が, それぞれカニクイザル CYP2C19, CYP2C9 および CYP2C76 の基質であることが明らかとなった。続く第 II 章, 第 III 章および第 IV 章にて, それぞれのカニクイザル CYP2C 分子種の基質認識性について, より詳細な検討結果を記述する。

## 第 II 章 カニクイザル CYP2C19 の基質認識性

### 第 1 節 緒言

ヒトにおいて CYP2C19 は主要な薬物代謝酵素の一つであり, *S*-Mephenytoin, Imipramine, Omeprazole, Diazepam および Propranolol 等の薬物の代謝に関与することが知られている (加藤・鎌滝, 2000). カニクイザルの肝臓においても CYP2C19 の発現が確認されている. カニクイザル CYP2C19 はヒト CYP2C19 および CYP2C9 に高い相同性を示し, アミノ酸相同性はそれぞれ 92% および 93% である (Uno et al., 2011a). したがって, カニクイザル CYP2C19 はヒト CYP2C19 または CYP2C9 に類似した基質認識性を示すことが予想される. これまでに, カニクイザル CYP2C19 は Diclofenac, Flurbiprofen, Omeprazole および Warfarin といったヒト CYP2C 基質を代謝することが報告されている (Uno et al., 2011c, 2014; Hosoi et al., 2012). しかし, その基質認識性に関する網羅的な検討は行われていない.

そこで, 本研究では市販 89 化合物を用い, カニクイザル CYP2C19 の基質認識性を網羅的に解析し, ヒト CYP2C19 および CYP2C9 と比較した. さらに, 他のカニクイザル CYP2C 分子種 (CYP2C9 および CYP2C76) に比べ CYP2C19 に対し高い選択性を示し, かつこれまでカニクイザルにおいて代謝研究がされていない Loratadine について,  $CL_{int}$  値の算出および主代謝物の同定を行った.

## 第2節 実験材料および実験方法

### II-2-i 試薬

Loratadine は Sigma-Aldrich より購入した。ヒト CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4 の組換えタンパク質発現系は Corning より購入した。その他の試薬の入手先および調製方法は I-2-i 項に準じた。

### II-2-ii 代謝反応

代謝反応は基本的に I-2-ii 項に準じて実施した。ただし Loratadine の代謝物分析時は、基質の終濃度を 10.0  $\mu\text{M}$ , 反応時間を 60 分間とした。

### II-2-iii 検量試料の調製

I-2-iii 項に準じて実施した。

### II-2-iv 代謝反応後の基質濃度の測定

I-2-iv 項に準じて実施した。

### II-2-v Loratadine の代謝物分析

代謝物分析は、株式会社資生堂の Nanospace Nasca2 HPLC および Thermo Fisher Scientific の Q Exactive Plus hybrid quadrupole-Orbitrap mass spectrometer (LC-MS/MS) を用いて実施した。カラムは CAPCELL PAK C18 ACR, 2.1×150 mm, 5  $\mu\text{m}$  (株式会社資生堂) を使用した。注入量は 10  $\mu\text{L}$  とした。移動相は 0.1 vol% ギ酸水溶液 (A 液) と 0.1 vol% ギ酸メタノール溶液 (B 液) を使用し、グラジエント法により分析した。流速は 0.4 mL/min とした。グラジエントは、B 液を 2% で開始し、3.0 分まで維持した。3.0 分から 50.0 分にかけてリニアグラジエントで 100% に上昇させ、55.0 分まで 100% で維持した。55.1 分に 2% に戻し、

60.0 分まで 2%で維持した。ESI 法によるイオン化後，Full scan モードあるいは Data dependent MS<sup>2</sup> scan モードによりデータを取得し，代謝物分析を行った。

#### II-2-vi データ解析

30 分間の代謝反応による基質消失率 (%) の算出は I-2-v 項に準じて実施した。

CL<sub>int</sub> 値は以下の式により算出した。なお， $k$  は縦軸 (対数) に基質濃度，横軸に反応時間 (0, 15 および 30 分) をとり，直線回帰して作成したグラフの傾きとした。

$$CL_{int} (\text{mL/min per nmol P450}) = k (\text{/min}) \times (\text{mL incubation}) / \text{nmol P450}$$

#### II-2-vii ドッキングシミュレーション

カンクイザル CYP2C19 の一次配列をヒト CYP2C19 の結晶構造 (Protein Data Bank code 4GQS) と照らし合わせることで，カンクイザル CYP2C19 の 3 次元構造をモデリングした。

モデリングには Molecular Operating Environment ソフトウェア (version 2013.10, Computing Group) を使用した。ドッキングシミュレーションに先立ち，モデリングした 3 次元構造のエネルギーを CHARMM22 force field により最小化した。ドッキングシミュレーションには ASE Dock software (Ryoka Systems) を使用し， $U$  value およびヘムと代謝部位の距離を算出した。

### 第3節 結果および考察

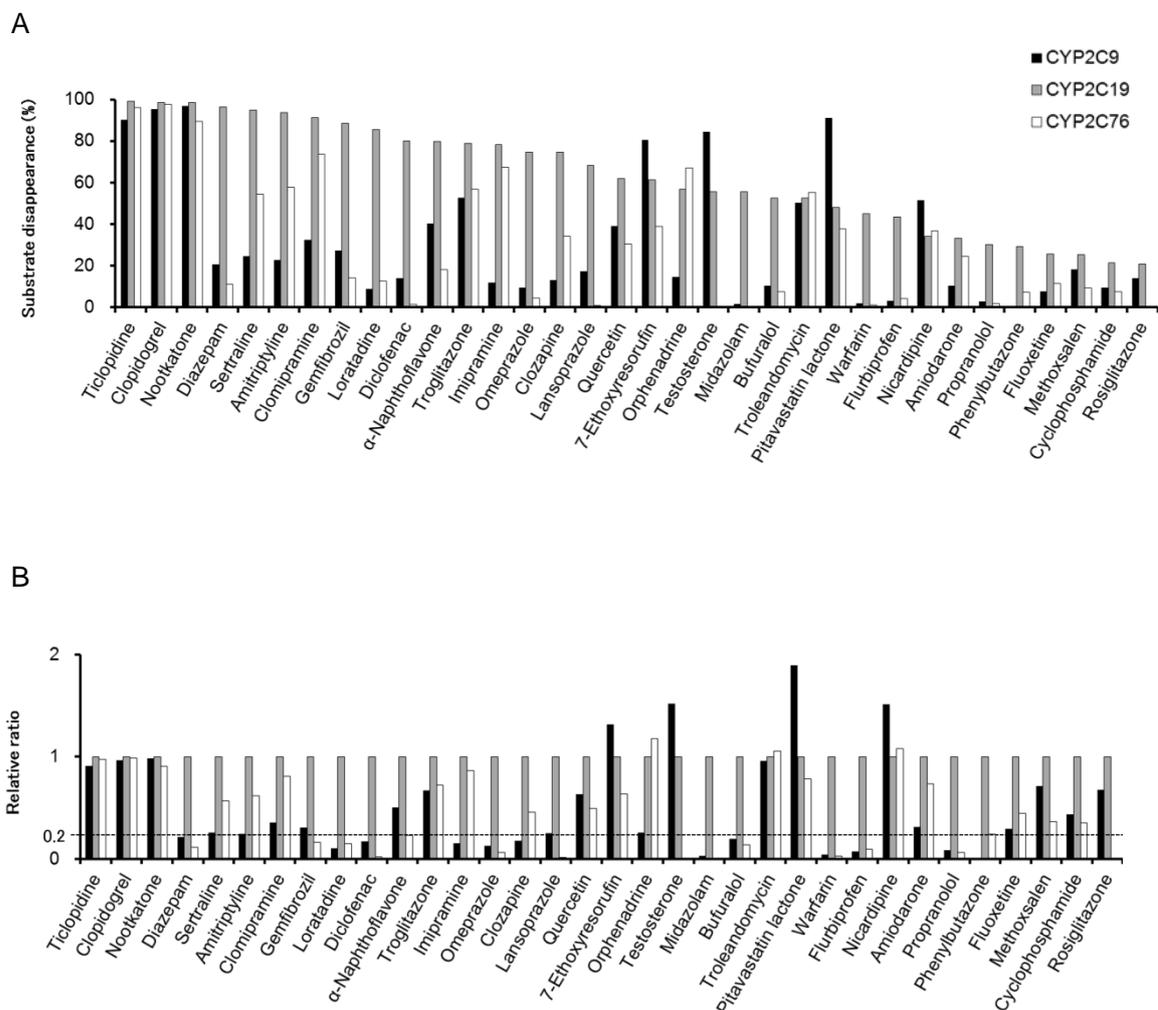
#### II-3-i 基質消失アッセイ

89化合物中34化合物において30分間代謝反応後の基質消失率は20%を超え、カニクイザル CYP2C19により速やかに代謝されることが示された (Figure II-1A)。これまでのヒト CYP2C 基質を用いた検討により、カニクイザル CYP2C19は Diclofenac, Flurbiprofen, Omeprazole および Warfarin といった薬物を代謝することが報告されている (Uno et al., 2011c, 2014; Hosoi et al., 2012)。本研究においても、これらの化合物はカニクイザル CYP2C19により速やかに代謝を受けた。興味深いことに、Diclofenac, Flurbiprofen および Warfarin はヒトでは CYP2C9 のマーカー基質であるが (Leemann et al., 1993; Lee et al., 2003; Rettie et al., 1992), カニクイザルでは CYP2C9 ではなく CYP2C19により主として代謝された。

多くのカニクイザル CYP2C19 基質は、同時に CYP2C9 あるいは CYP2C76によっても代謝を受けたが、Bufuralol, Diazepam, Diclofenac, Flurbiprofen, Loratadine, Midazolam, Omeprazole, Propranolol および Warfarin については、Figure II-1Bにおける Relative ratio が CYP2C9 および CYP2C76の双方において0.2より小さく、CYP2C19に対して高い選択性を示した。これらの9化合物うち Diazepam および Omeprazole は、ヒトにおいても主として CYP2C19により代謝されることが報告されている (Jung et al., 1997; Karam et al., 1997)。Bufuralol, Midazolam および Propranolol は、ヒトにおいてはそれぞれ主に CYP2D6, CYP3A4/5 および CYP2D6により代謝されるが、同時に CYP2C19の基質でもある (Mankowski, 1999; Emoto and Iwasaki, 2007; Ward et al., 1989)。Diclofenac, Flurbiprofen および Warfarin はヒトでは CYP2C9 のマーカー基質である (Leemann et al., 1993; Lee et al., 2003; Rettie et al., 1992)。Loratadine はヒト CYP2C19 の阻害剤である (Nicolas et al., 1999, Barecki et al., 2001)。以上より、カニクイザル CYP2C19に高い選択性を示した9化合物は

すべて、ヒト CYP2C19 または CYP2C9 の基質あるいは阻害剤として報告のある化合物であった。

Rendic (2002) および他の報告 (Lee et al., 2003; Emoto and Iwasaki, 2007; Nicolas et al., 1999, Barecki et al., 2001; Scott et al., 2013; Nishiya et al., 2009; Wen et al., 2001; Rastogi and Jana, 2014; Obach et al., 2005) によると、基質消失率が 20% を超えた 34 化合物のうち、19 化合物 (Amiodarone, Amitriptyline, Bufuralol, Clomipramine, Clopidogrel, Clozapine, Cyclophosphamide, Diazepam, Diclofenac, Imipramine, Lansoprazole, Loratadine, Midazolam, Omeprazole, Propranolol, Sertraline, Testosterone, Troglitazone および Warfarin) はヒト CYP2C19 の基質として知られている薬物であった。また、14 化合物 (Amitriptyline, Bufuralol, Clozapine, Diazepam, Diclofenac, Flurbiprofen, Lansoprazole, Omeprazole, Phenylbutazone, Rosiglitazone, Sertraline, Testosterone, Troglitazone および Warfarin) はヒト CYP2C9 の基質として知られている薬物であった。カニクイザル CYP2C19 がヒト CYP2C19 および CYP2C9 の双方に高いアミノ酸相同性 (92% および 93%) を示すことを考慮すると、上記の結果は妥当であると考えられた。さらに、34 化合物中 21 化合物 (Amiodarone, Amitriptyline, Clopidogrel, Clozapine, Diazepam, Fluoxetine, Gemfibrozil, Lansoprazole, Loratadine,  $\alpha$ -Naphthoflavone, Niacardipine, Nootkatone, Omeprazole, Orphenadrine, Phenylbutazone, Quercetin, Rosiglitazone, Sertraline, Ticlopidine, Troglitazone および Warfarin) はヒト CYP2C19 または CYP2C9 の阻害剤として報告のある化合物であった。カニクイザル CYP2C19 はヒト CYP2C19 および CYP2C9 に高いアミノ酸相同性を示すため、3 者の基質認識部位の類似性は高いと推測された。しかしながら、数% の僅かなアミノ酸配列の違いが P450 の 3 次元構造の違いに影響し、ヒトでは阻害剤となる化合物がカニクイザルでは基質となった可能性が考えられた。なお、ヒト CYP2C19 または CYP2C9 の基質および阻害剤として報告のない化合物は、34 化合物中 4 化合物 (7-Ethoxyresorufin, Methoxsalen, Pitavastatin lactone, および Troleandomycin) であった。以上より、カニクイザル CYP2C19 の基質認識性はヒト CYP2C19 または CYP2C9 に概ね類似すると考えられた。

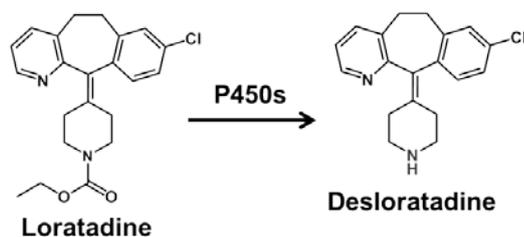


**Figure II-1. Substrate disappearance of compounds metabolized by recombinant cynomolgus monkey CYP2Cs.** Substrates (1.0  $\mu$ M) were incubated with each recombinant P450 for 30 minutes. The substrates whose disappearance by CYP2C19 exceeded 20% are shown. Substrate disappearance (A) and the ratio relative to CYP2C19 (B) are shown.

### II-3-ii Loratadine 代謝の固有クリアランス

Loratadine はヒト CYP2C19 の阻害剤であることが報告されている (Nicolas et al., 1999; Barecki et al., 2001; EMA guideline). また, Loratadine はヒト CYP2D6 および CYP3A4 の基質であり, 代謝を受け Desloratadine となる (Yumibe et al., 1996). 一方で, Desloratadine の生成にヒト CYP2C19 が関与するという報告もある (Ghosal et al., 2009)

(Figure II-2). Loratadine はカニクイザル CYP2C19 に高い選択性を示したが (Figure II-1B), カニクイザルにおける Loratadine 代謝に関する報告はこれまでにない. そこで, カニクイザル CYP2C 分子種およびヒト P450 分子種の Loratadine に対する代謝活性を評価した. その結果, カニクイザル CYP2C 分子種において Loratadine 代謝に対する活性は CYP2C19 で大きく,  $CL_{int}$  値は CYP2C9 または CYP2C76 の約 15~30 倍高かった. この値はヒト CYP2C19 または CYP2D6 と同程度であり, ヒト CYP3A4 の 5 倍程度であった (Table II-1). Ghosal ら (2009) は, 基質濃度 8 nM および 26  $\mu$ M において, ヒト CYP2C19 および CYP2D6 による Desloratadine 生成速度がヒト CYP3A4 よりも 3~10 倍速いことを報告している. 本研究における Loratadine 濃度は 1.0  $\mu$ M であることから, 得られた結果は既報と同等であることが示唆された.



**Figure II-2. Chemical structures of loratadine and its main metabolite desloratadine formed by human P450s (i.e., CYP2C19, CYP2D6 and CYP3A4).**

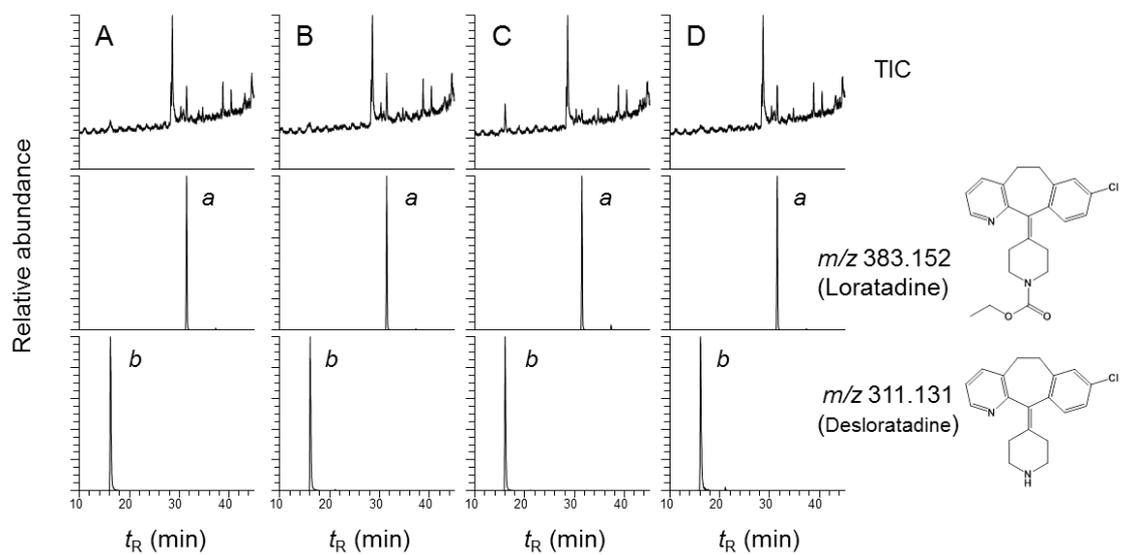
**Table II-1. Intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) values for loratadine**

P450	$CL_{int}$ (ml/min per nmol P450)
Monkey CYP2C9	0.11
Monkey CYP2C19	3.01
Monkey CYP2C76	0.20
Human CYP2C19	3.39
Human CYP2D6	4.83
Human CYP3A4	0.57

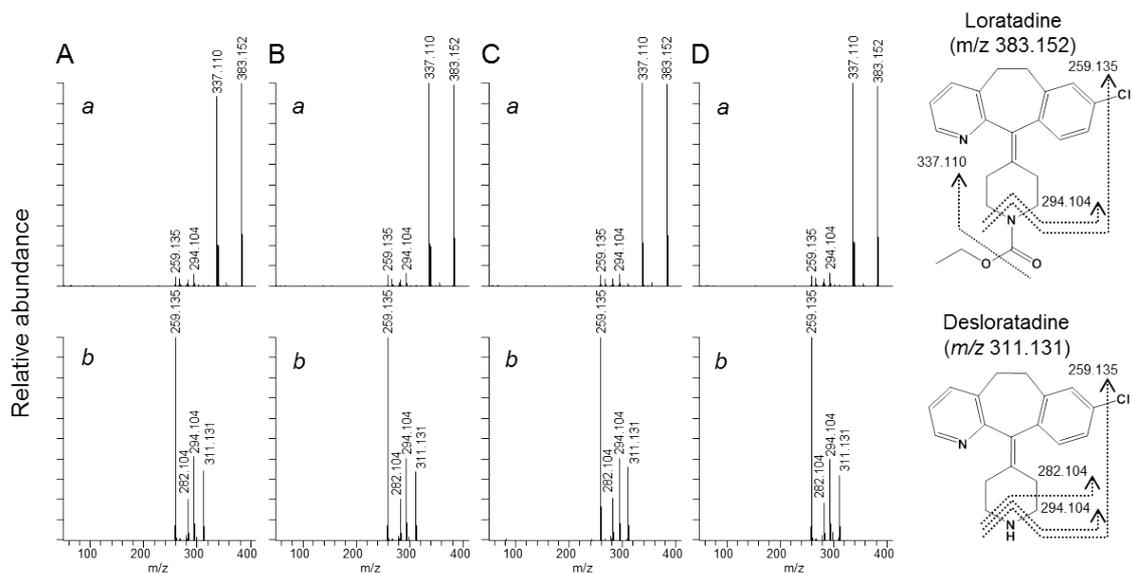
“Monkey” means cynomolgus monkey.

### II-3-iii Loratadine 代謝物の LC-MS/MS 分析

Loratadine はカニクイザル CYP2C19 並びにヒト CYP2C19, CYP2D6 および CYP3A4 により代謝されることが明らかとなったため, LC-MS/MS を用いた代謝物分析を行った. 主代謝物の保持時間 ( $t_R$ ) および MS/MS フラグメントがカニクイザル CYP2C19 とヒト P450 分子種で一致したことから, カニクイザル CYP2C19 においてもヒトにおける主代謝物である Desloratadine が生成することを確認した (Figure II-3, II-4).



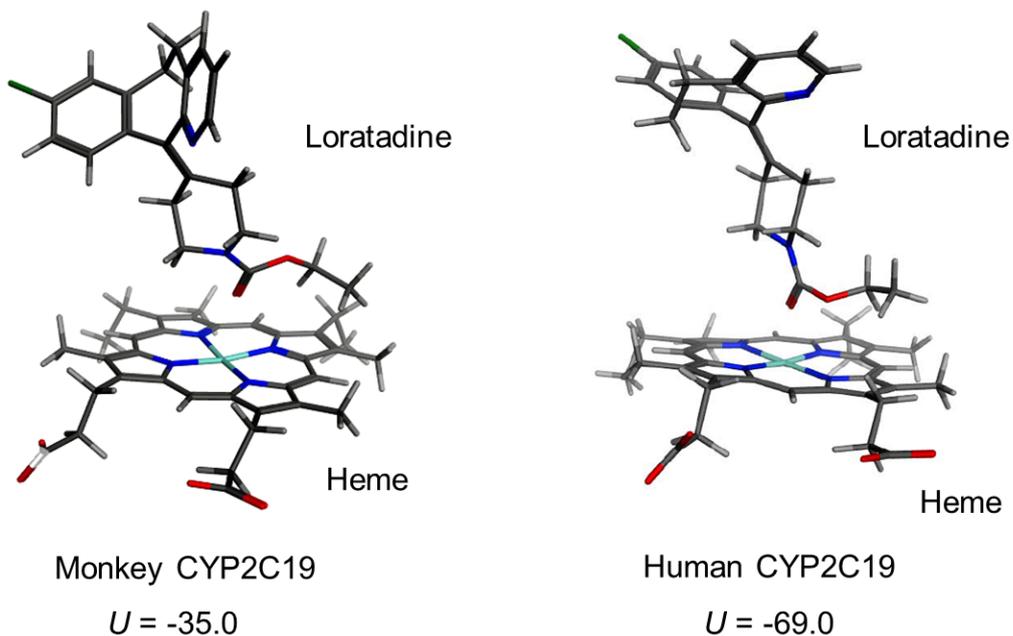
**Figure II-3. Chromatographic profiles of loratadine after incubation with recombinant cytomolgus monkey CYP2C19 (A), human CYP2C19 (B), human CYP2D6 (C), and human CYP3A4 (D).** Loratadine (10.0  $\mu\text{M}$ ) was incubated with each recombinant P450 for 60 min, and the reaction mixtures were analyzed by LC-MS/MS in positive full scan mode. Peak a, loratadine; and Peak b, desloratadine.



**Figure II-4.** The MS/MS spectra of loratadine (a) and desloratadine (b) formed by cynomolgus monkey CYP2C19 (A), human CYP2C19 (B), human CYP2D6 (C), and human CYP3A4 (D). Loratadine (10.0  $\mu$ M) was incubated with each recombinant P450 for 60 min. Processed samples were analyzed by data dependent MS<sup>2</sup> scanning mode; polarity: positive, normalized collision energy: 30 V, precursor ion:  $m/z$  383.152 (a), and  $m/z$  311.131 (b).

#### II-3-iv ドッキングシミュレーション

Loratadine とカニクイザル CYP2C19 およびヒト CYP2C19 のドッキングシミュレーションを行った。シミュレーションの結果、Desloratadine への代謝部位がヘムの中心を向き安定化しており、 $U$  value およびヘムと代謝部位である炭素原子の距離は、カニクイザル CYP2C19 ではそれぞれ-35.0 kcal/mol および 3.8 Å であり、ヒト CYP2C19 ではそれぞれ-69.0 kcal/mol および 3.2 Å であった (Figure II-5)。シミュレーション結果はカニクイザルにおいても Desloratadine が生成し得ることを示しており、LC-MS/MS を用いた代謝物分析結果を支持するものであった。



**Figure II-5. Docking simulation of the interaction of loratadine with modeled cynomolgus monkey (A) and human CYP2C19 (B).** Oxygen, nitrogen, and iron atoms are colored with red, blue, and light blue, respectively. The total interaction energies ( $U$  value) of loratadine with modeled cynomolgus monkey (A) and human CYP2C19 (B) were -35.0 kcal/mol and -69.0 kcal/mol, respectively. The distances between metabolism sites of loratadine to heme iron of cynomolgus monkey (A) and human CYP2C19 (B) were 3.8 Å and 3.2 Å, respectively.

#### 第4節 結論

本検討により、ヒト P450 分子種の基質および阻害剤 89 化合物に対するカニクイザル CYP2C19 の基質認識性を評価した結果、34 化合物がカニクイザル CYP2C19 の基質となることが示された。そのうち 30 化合物はヒト CYP2C19 あるいは CYP2C9 の基質または阻害剤として報告されている化合物であった。なお、ヒト CYP2C9 のマーカー基質である Diclofenac, Flurbiprofen および Warfarin は、カニクイザルでは CYP2C9 ではなく CYP2C19 により主として代謝された。Loratadine 代謝において、カニクイザル CYP2C19 はヒト CYP2C19 と同等の  $CL_{int}$  値を示し、またヒトにおける主代謝物である Desloratadine を生成した。以上より、カニクイザル CYP2C19 はヒト CYP2C19 および CYP2C9 に概ね類似した基質認識性を示すことが示唆された。なお、本検討で見出されたカニクイザル CYP2C19 により高い選択性をもって代謝された 9 化合物 (Bufuralol, Diazepam, Diclofenac, Flurbiprofen, Loratadine, Midazolam, Omeprazole, Propranolol および Warfarin) は、カニクイザル CYP2C19 のマーカー基質となる可能性が示唆された。

### 第 III 章 カニクイザル CYP2C9 の基質認識性

#### 第 1 節 緒言

ヒトにおいて CYP2C9 は主要な薬物代謝酵素の一つであり、Diclofenac, Flurbiprofen, Phenytoin, および Warfarin 等の薬物の代謝に関与することが知られている (加藤・鎌滝, 2000). カニクイザルの肝臓においても CYP2C9 の発現が確認されている. カニクイザル CYP2C9 はヒト CYP2C9 および CYP2C19 に高い相同性を示し, アミノ酸相同性はそれぞれ 93% および 91% である (Uno et al., 2011a). したがって, カニクイザル CYP2C9 はヒト CYP2C9 または CYP2C19 に類似した基質認識性を示すことが予想される. これまでに, カニクイザル CYP2C9 は Testosterone, *S*-Mephenytoin および Diclofenac といったヒト CYP2C 基質を代謝することが報告されている (Mitsuda et al., 2006; Uno et al. 2006). しかし, その基質認識性に関する網羅的な検討は行われていない.

そこで, 本研究では市販 89 化合物を用い, カニクイザル CYP2C9 の基質認識性を網羅的に解析し, ヒト CYP2C9 および CYP2C19 と比較した. また, 他のカニクイザル CYP2C 分子種 (CYP2C19 および CYP2C76) に比べ CYP2C9 に対し高い選択性を示した Efavirenz について,  $CL_{int}$  値の算出および主代謝物の同定を行った. さらに, Efavirenz の主代謝物である 8-Hydroxyefavirenz の生成反応について速度論的解析を行った.

## 第2節 実験材料および実験方法

### III-2-i 試薬

Efavirenz および 8-Hydroxyefavirenz はそれぞれ Sigma-Aldrich および Toronto Research Chemicals より購入した。カニクイザル CYP2B6 の組換えタンパク質は、Iwata らおよび Daigo らの手法 (Iwata et al., 1998; Daigo et al., 2002) に従い、大腸菌を宿主とし発現させた後に精製したものを使用した。ヒト CYP2B6 の組換えタンパク質発現系は Corning より購入した。カニクイザルおよびヒトの肝ミクロソームは BioreclamationIVT より購入した。その他の試薬の入手先および調製方法は I-2-i 項に準じた。

### III-2-ii 代謝反応

代謝反応は基本的に I-2-ii 項に準じて実施した。ただし、Efavirenz の代謝物分析時は、基質の終濃度を 1.0 または 10.0  $\mu\text{M}$ 、反応時間を 60 分間とした。また、8-Hydroxyefavirenz 生成反応の速度論的解析時は、基質の終濃度を 0.5, 2, 5, 20 および 50  $\mu\text{M}$  とし、タンパク質の終濃度をカニクイザル肝ミクロソームでは 0.1 mg/mL、カニクイザル CYP2C および CYP2B6 発現系では P450 の終濃度を 10 pmol/mL とした。なお、反応時間は 10 分間とした。

### III-2-iii 検量試料の調製

I-2-iii 項に準じて実施した。

### III-2-iv 代謝反応後の基質濃度の測定

I-2-iv 項に準じて実施した。

### III-2-v Efavirenz の代謝物分析

II-2-v 項に準じて実施した。

### III-2-vi データ解析

30 分間の代謝反応による基質消失率 (%) の算出は I-2-v 項に準じて実施した。CL<sub>int</sub> 値の算出は II-2-vi 項に準じて実施した。

8-Hydroxyefavirenz 生成反応の速度論的解析は、非線形回帰分析ソフト KaleidaGraph (Synergy Software) を用いて行った。なお、基質阻害が認められた場合の回帰式は、 $v = V_{\max} \cdot [S] / (K_m + [S] + [S]^2 / K_s)$  とした。ただし、 $K_s$  は基質阻害定数とした。

### III-2-vii ドッキングシミュレーション

カニクイザル CYP2C9 および CYP2B6 の一次配列を、ヒト CYP2C9 (Protein Data Bank code 1OG2) および CYP2B6 (Protein Data Bank code 4I91) の結晶構造と照らし合わせることで、カニクイザル CYP2C9 および CYP2B6 の 3 次元構造をモデリングした。以降の操作は II-2-vii 項に準じて実施した。

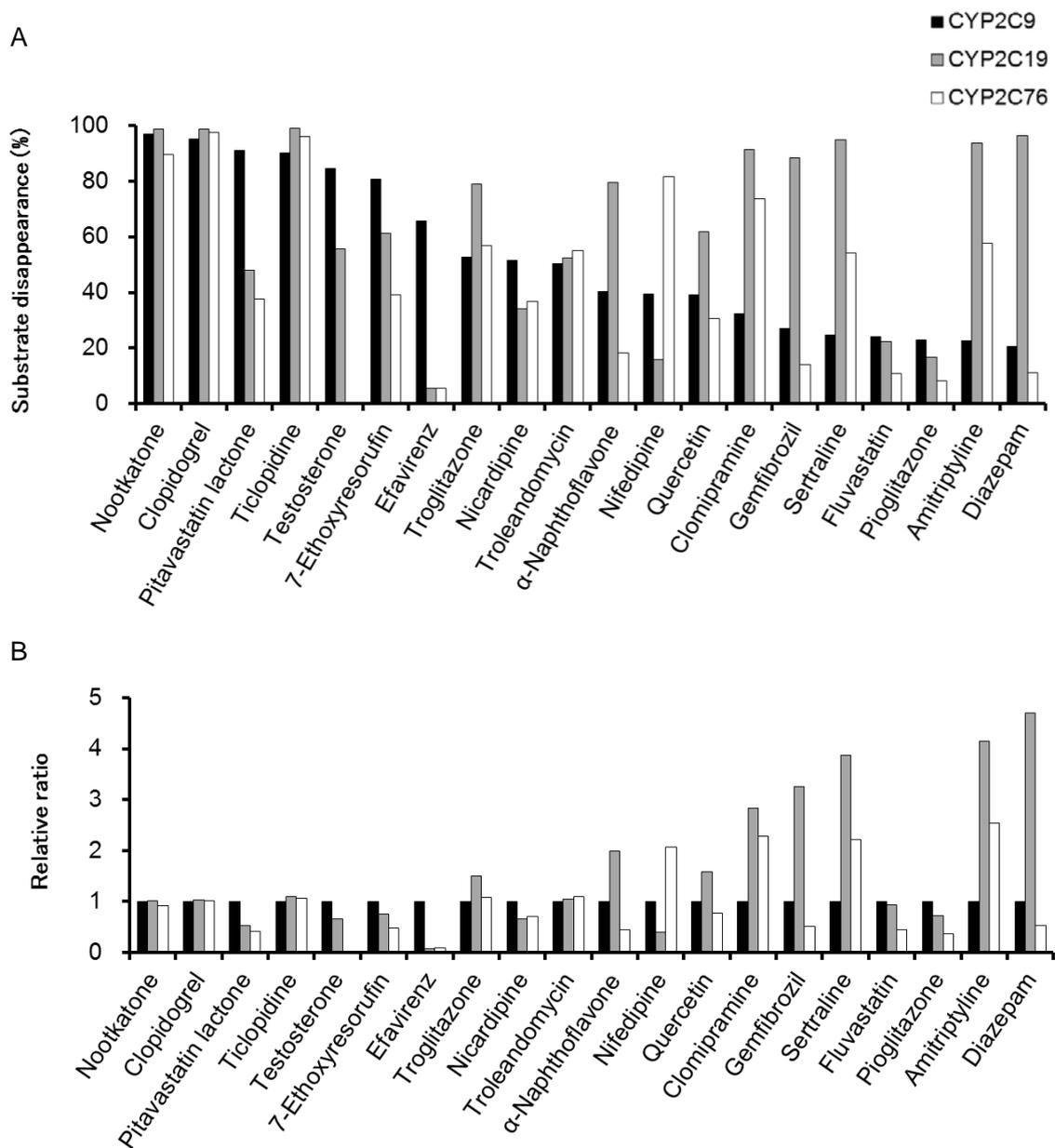
### 第3節 結果および考察

#### III-3-i 基質消失アッセイ

89化合物中20化合物において30分間代謝反応後の基質消失率は20%を超え、カニクイザル CYP2C9 により速やかに代謝されることが示された (Figure III-1A)。ほとんどのカニクイザル CYP2C9 基質は、同時に CYP2C19 あるいは CYP2C76 によっても代謝を受けたが、Efavirenz は CYP2C9 に対し高い選択性を示した (Figure III-1B)。

Rendic (2002) および他の報告 (Transon et al., 1995; Yamazaki et al., 2000; Wen et al., 2001; Obach et al., 2005; Nishiya et al., 2009; Scott et al., 2013; Xu and Desta, 2013; Rastogi and Jana, 2014) によると、基質消失率が20%を超えた20化合物のうち、6化合物 (Amitriptyline, Diazepam, Fluvastatin, Sertraline, Testosterone および Troglitazone) はヒト CYP2C9 の基質として知られている薬物であった。また、7化合物 (Amitriptyline, Clomipramine, Clopidogrel, Diazepam, Sertraline, Testosterone および Troglitazone) はヒト CYP2C19 の基質として知られている薬物であった。カニクイザル CYP2C9 はヒト CYP2C9 および CYP2C19 の双方に高いアミノ酸相同性 (93% および 91%) を示すことを考慮すると、上記の結果は妥当であると考えられた。さらに、20化合物中15化合物 (Amitriptyline, Clopidogrel, Diazepam, Efavirenz, Fluvastatin, Gemfibrozil,  $\alpha$ -Naphthoflavone, Nicardipine, Nifedipine, Nootkatone, Pioglitazone, Quercetin, Sertraline, Ticlopidine および Troglitazone) はヒト CYP2C9 または CYP2C19 の阻害剤として報告のある化合物であった。カニクイザル CYP2C9 はヒト CYP2C9 および CYP2C19 に高いアミノ酸相同性を示すため、3者の基質認識部位の類似性は高いと推測された。しかしながら、数%の僅かなアミノ酸配列の違いが P450 の3次元構造の違いに影響し、ヒトでは阻害剤となる化合物がカニクイザルでは基質となった可能性が考えられた。なお、ヒト CYP2C9 または CYP2C19 の基質および阻害剤として報告のない化合物は、20化合物中3化合物 (7-Ethoxyresorufin, Pitavastatin lactone および

Troleandomycin)であった。以上より、カニクイザル CYP2C9 の基質認識性はヒト CYP2C9 または CYP2C19 に概ね類似すると考えられた。



**Figure III-1. Substrate disappearance of compounds metabolized by recombinant cynomolgus monkey CYP2Cs.** Substrates (1.0 μM) were incubated with each recombinant P450 for 30 minutes. The substrates whose disappearance by CYP2C9 exceeded 20% are shown. Substrate disappearance (A) and the ratio relative to CYP2C9 (B) are shown.

### III-3-ii Efavirenz 代謝の固有クリアランス

Efavirenz はカニクイザル CYP2C9 に高い選択性を示したが、ヒトでは CYP2B6 のマーカー基質であるため (Ward et al., 2003; Bumpus et al., 2006), カニクイザルおよびヒト CYP2B6 の Efavirenz に対する代謝活性についても検討した。その結果, Efavirenz はカニクイザル CYP2B6 によってはほとんど代謝されず, その  $CL_{int}$  値はカニクイザル CYP2C9 の 1/10 程度であった。なお, ヒト CYP2B6 による Efavirenz 代謝の  $CL_{int}$  値はカニクイザル CYP2C9 と同程度であった (Table III-1)。

**Table III-1. Intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) values for efavirenz**

P450	$CL_{int}$ (ml/min per nmol P450)
Monkey CYP2C9	1.54
Monkey CYP2C19	<0.10
Monkey CYP2C76	0.14
Monkey CYP2B6	0.15
Human CYP2B6	1.86

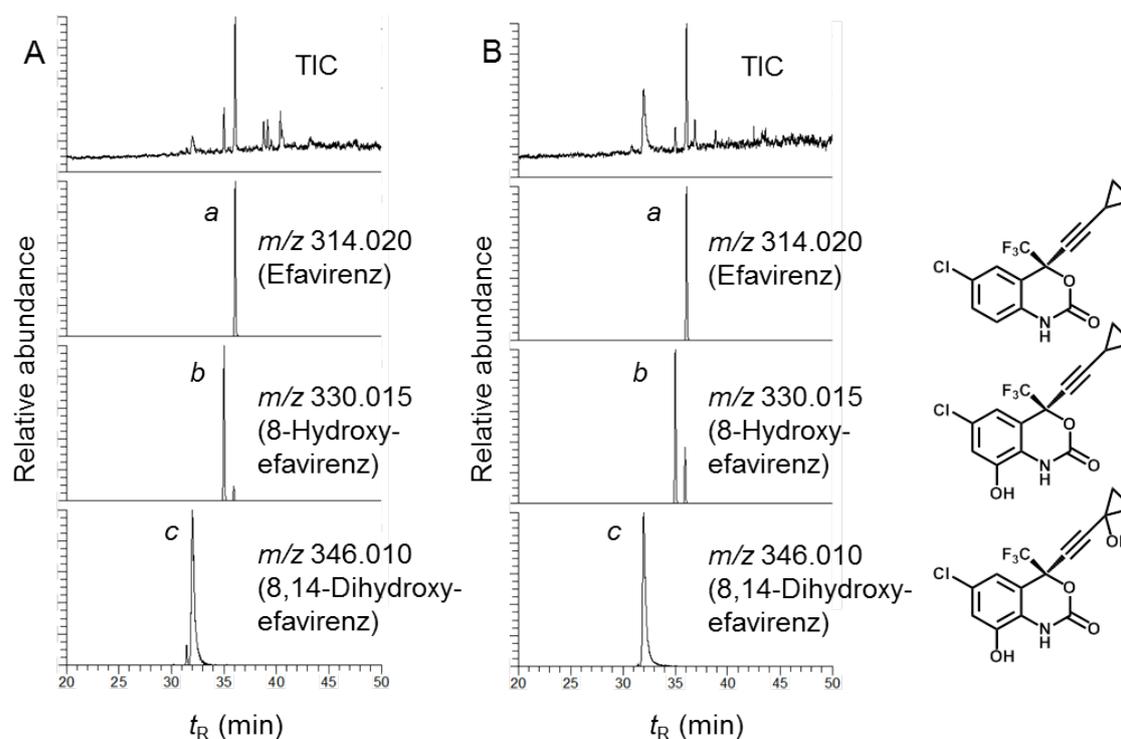
“Monkey” means cynomolgus monkey.

### III-3-iii Efavirenz 代謝物の LC-MS/MS 分析

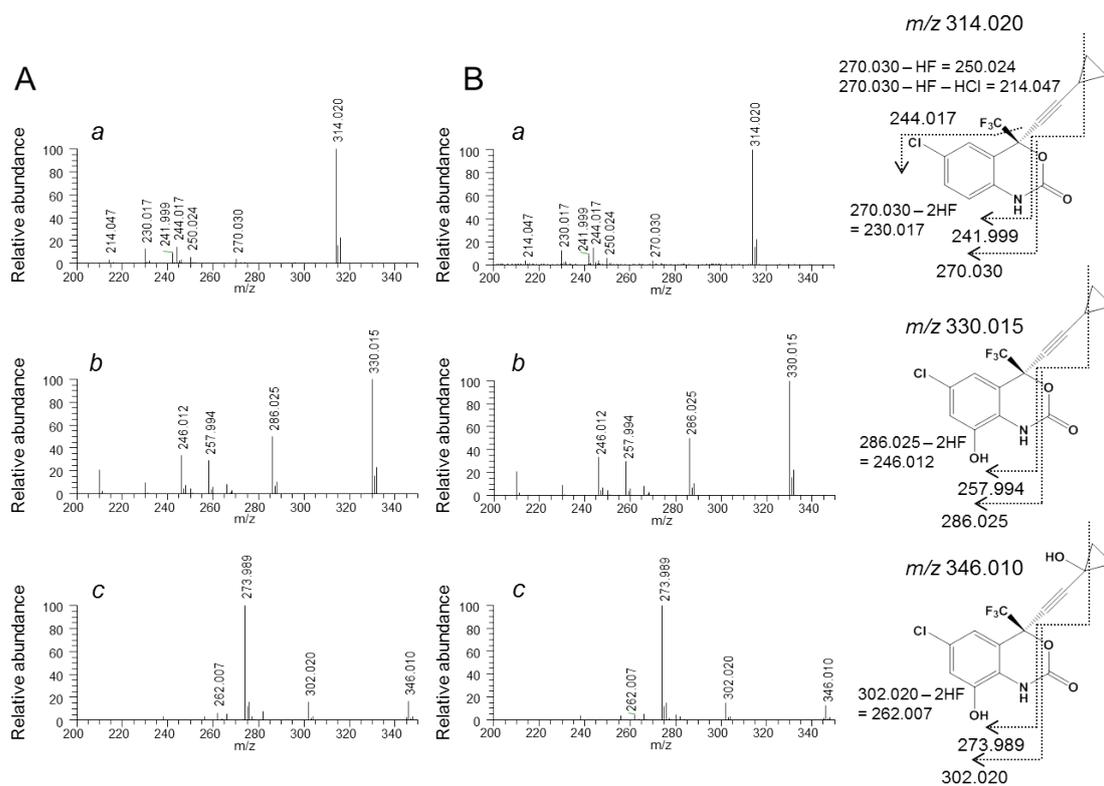
ヒトにおいて, Efavirenz は主として CYP2B6 により代謝され, 8-Hydroxyefavirenz および 8,14-Dihydroxyefavirenz が生成する (Ward et al., 2003; Bumpus et al., 2006)。一方, カニクイザルにおいて Efavirenz は CYP2C9 によって代謝を受けたことから, Efavirenz のカニクイザル CYP2C9 およびヒト CYP2B6 による代謝物を LC-MS/MS を用いて分析し, 両者を比較した。

主代謝物の保持時間 ( $t_R$ ) および MS/MS フラグメントがカニクイザル CYP2C9 とヒト CYP2B6 で一致したことから, カニクイザル CYP2C9 においてもヒトにおける主代謝物である 8-Hydroxyefavirenz および 8,14-Dihydroxyefavirenz が生成することが確認され

た (Figure III-2, III-3). なお, カニクイザルおよびヒトの肝マイクロソームを用いた同様の検討においても, 両者で同種の主代謝物が生成することを確認した (data not shown).



**Figure III-2. Chromatographic profiles of efavirenz after incubation with recombinant cynomolgus monkey CYP2C9 (A) and human CYP2B6 (B).** Efavirenz (1.0  $\mu$ M) was incubated with each recombinant P450 for 60 min, and the samples were analyzed by negative full scan mode. The mass chromatograms were obtained after background subtraction with control samples (reaction mixture not containing efavirenz). Peak a, efavirenz; peak b, 8-Hydroxyefavirenz; and peak c, 8,14-Dihydroxyefavirenz.



**Figure III-3. Estimated chemical structures by comparison of the MS/MS spectra of efavirenz (a) and its mono- (b) and di-oxidized (c) metabolites formed by cynomolgus monkey CYP2C9 (A) and human CYP2B6 (B).** Substrates (10.0  $\mu\text{M}$ ) were incubated for 60 min. Processed samples were analyzed by targeted MS<sup>2</sup> scanning mode; polarity: negative, normalized collision energy: 15 V. precursor ion:  $m/z$  314.020 (a),  $m/z$  330.015 (b),  $m/z$  346.010 (c).

#### III-3-iv 8-Hydroxyefavirenz 生成反応の速度論的解析

カニクイザルにおける 8-Hydroxyefavirenz 生成反応の速度論的解析を行った結果、肝ミクロソームおよび CYP2C9 発現系における見かけの  $K_m$  値はそれぞれ 2.5  $\mu\text{M}$  および 9.9  $\mu\text{M}$  であり、同程度であった。なお、カニクイザル肝ミクロソームでは 8-Hydroxyefavirenz 生成反応はミカエリス・メンテン型であったが、CYP2C9 発現系では基質阻害が認められ、見かけの  $K_s$  値は 3.3  $\mu\text{M}$  であった (Table III-2)。肝ミクロソームにおいて基質阻害が認められなかった理由は不明であるが、可能性の一つとして肝ミクロソーム中に存在する他の P450 分子種や薬物代謝酵素等の影響が考えられた。

**Table III-2. Kinetic parameters for efavirenz 8-oxidation**

Enzyme	Efavirenz 8-oxidation			
	$K_m$	$V_{max}$	$V_{max}/K_m$	$K_s$
Monkey liver microsomes	$2.5 \pm 0.3^a$	$0.23 \pm 0.01^b$	0.09	-
Monkey CYP2C9	$9.9 \pm 2.2^a$	$5.4 \pm 1.0^b$	0.54	$3.3 \pm 0.7^a$
Monkey CYP2C19	-	<0.05	-	-
Monkey CYP2C76	-	<0.05	-	-
Monkey CYP2B6	-	<0.05	-	-

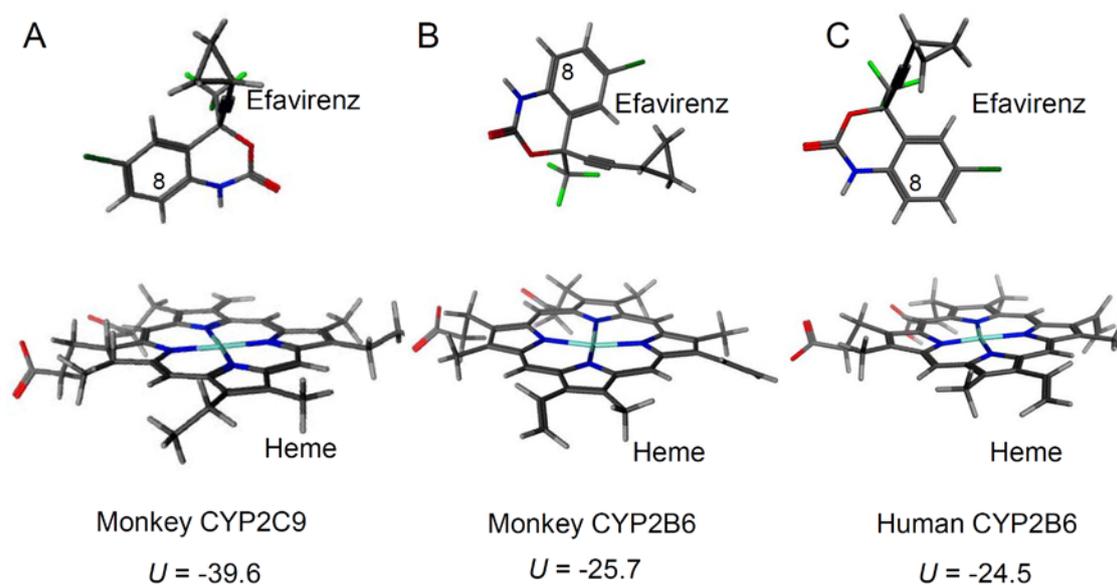
“Monkey” means cynomolgus monkey.

<sup>a</sup>  $\mu\text{M}$ , <sup>b</sup> nmol/min/nmol P450. Efavirenz (0.5, 2, 5, 20, and 50  $\mu\text{M}$ ) was incubated with cynomolgus monkey liver microsomes (0.1 mg/mL) or recombinant cynomolgus monkey CYP2C or CYP2B6 enzymes (10 pmol/mL) at 37°C for 10 min in the presence of an NADPH-generating system. 8-Hydroxyefavirenz formation was quantified by LC-MS/MS using mefenamic acid as internal standard and showed linearity between 0.1-0.5 mg protein/mL in cynomolgus monkey liver microsomes, 10-50 pmol P450 in cynomolgus monkey CYP2C9, and reaction time range of 10-20 min. Kinetic analysis was done using nonlinear regression analysis employing the Michaelis-Menten equation,  $v = V_{max} \cdot [S]/(K_m + [S])$ , or  $v = V_{max} \cdot [S]/(K_m + [S] + [S]^2/K_s)$  for substrate inhibition.

### III-3-v ドッキングシミュレーション

Efavirenz とカニクイザル CYP2C9 および CYP2B6, 並びにヒト CYP2B6 のドッキングシミュレーションを行った。シミュレーションの結果, カニクイザル CYP2C9 およびヒト CYP2B6 では Efavirenz の 8 位の炭素原子がヘムの中心を向き安定化しており,  $U$  value および 8 位の炭素原子とヘムの距離は, カニクイザル CYP2C9 ではそれぞれ-39.6 kcal/mol および 6.1 Å であり, ヒト CYP2B6 ではそれぞれ-24.5 kcal/mol および 6.9 Å であった (Figure III-4)。本シミュレーション結果は, カニクイザル CYP2C9 においても 8-Hydroxyefavirenz が生成し得ることを示しており, LC-MS/MS を用いた代謝物分析結果を支持するものであった。一方, カニクイザル CYP2B6 とのドッキングシミュレーションにおいては, Efavirenz の 8 位の炭素原子がヘムと反対の方向を向いて安定化しており,  $U$  value は-25.7

kcal/mol であった (Figure III-4). 本シミュレーション結果はカニクイザル CYP2B6 においては Efavirenz の代謝がほとんど進行しないことを支持するものであった。



**Figure III-4. Docking simulation of the interaction of efavirenz with modeled cynomolgus monkey CYP2C9 (A) and CYP2B6 (B) and human CYP2B6 (C) enzymes.** Oxygen, nitrogen, fluorine, and iron atoms are colored with red, blue, green, and light blue, respectively. The total interaction energies ( $U$  value) of efavirenz with modeled cynomolgus monkey CYP2C9 (A) and CYP2B6 (B), and human CYP2B6 (C) enzymes were -39.6 kcal/mol, -25.7 kcal/mol, and -24.5 kcal/mol, respectively. The distances between metabolism sites of efavirenz to heme iron of cynomolgus monkey CYP2C9 (A) and human CYP2B6 (C) were 6.1 Å and 6.9 Å, respectively.

#### 第4節 結論

本検討により，ヒト P450 分子種の基質および阻害剤 89 化合物に対するカニクイザル CYP2C9 の基質認識性を評価した結果，20 化合物がカニクイザル CYP2C9 の基質となることが示された．そのうち 17 化合物はヒト CYP2C9 あるいは CYP2C19 の基質または阻害剤として報告されている化合物であった．したがって，カニクイザル CYP2C9 はヒト CYP2C9 および CYP2C19 に概ね類似した基質認識性を示すことが示唆された．カニクイザル CYP2C9 の基質となった化合物のうち，Efavirenz の代謝はカニクイザル CYP2C9 に対し高い選択性を示した．Efavirenz はヒトでは主として CYP2B6 により代謝されるが，カニクイザル CYP2B6 によってはほとんど代謝を受けなかった．また，カニクイザル CYP2C9 とヒト CYP2B6 は同一の Efavirenz 代謝物（8-Hydroxyefavirenz および 8,14-Dihydroxyefavirenz）を生成することを確認した．さらに，Efavirenz はカニクイザル CYP2C9 のマーカー基質となる可能性が示唆された．

## 第 IV 章 カニクイザル CYP2C76 の基質認識性

### 第 1 節 緒言

ヒトにおいて、これまでに 50 種を超える P450 分子種が同定され、その機能が明らかになっているが (Nelson et al., 2004), カニクイザルにおいても 20 種を超える P450 分子種が同定されている (Uno et al., 2011a). ほとんどのカニクイザル P450 分子種のアミノ酸配列は、対応するヒト P450 分子種に対し 90%以上の相同性を示すが、CYP2C76 はヒトにオースログが存在せず、いずれのヒト CYP2C 分子種に対してもアミノ酸レベルで 70%程度の相同性しか示さない (Uno et al., 2011a).

CYP2C76 はカニクイザルの肝臓に発現しており、ヒト CYP2C 基質である Tolbutamide の 4 位水酸化反応や Testosterone の 2 $\alpha$ /16 $\alpha$  位水酸化反応を触媒する (Uno et al., 2006). また、CYP2C76 は 7-Ethoxyresorlfine や Bufuralol のようなヒト CYP2C 以外の基質の代謝にも関与する (Uno et al., 2011b). さらに、CYP2C76 は Pitavastatin の代謝においてヒトでは報告のない代謝物を生成する (Uno et al., 2007). これらの報告は、CYP2C76 がヒトとカニクイザルの薬物代謝における種差の一因となる可能性を示唆している. しかしながら、カニクイザル CYP2C76 の基質認識性に関する網羅的な検討はこれまでに実施されていない.

そこで、本研究では市販 89 化合物を用い、カニクイザル CYP2C76 の基質認識性を網羅的に解析した. また、他のカニクイザル CYP2C 分子種 (CYP2C9 および CYP2C19) に比べ CYP2C76 に対し比較的高い選択性を示した Nifedipine と Bupropion について、CL<sub>int</sub> 値の算出および代謝物検索を行った. さらに、Nifedipine および Bupropion とカニクイザル CYP2C76 のドッキングシミュレーションを行った.

## 第2節 実験材料および実験方法

### IV-2-i 試薬

Nifedipine および Bupropion は和光純薬工業株式会社より購入した。Pitavastatin lactone および Dehydronifedipine は Santa Cruz Biotechnology より購入した。カニクイザル CYP2B6 および CYP3A4 の組換えタンパク質は、Iwata らおよび Daigo らの手法 (Iwata et al., 1998; Daigo et al., 2002) に従い、大腸菌を宿主とし発現させた後に精製したものを使用した。その他の試薬の入手先および調製方法は I-2-i 項に準じた。

### IV-2-ii 代謝反応

代謝反応は基本的に I-2-ii 項に準じて実施した。ただし、Nifedipine および Bupropion 代謝物の MS/MS スペクトル分析時は、基質の終濃度を 20.0  $\mu\text{M}$  とした。

### IV-2-iii 検量試料の調製

I-2-iii 項に準じて実施した。

### IV-2-iv 代謝反応後の基質濃度の測定

I-2-iv 項に準じて実施した。

### IV-2-v Nifedipine および Bupropion の代謝物分析

代謝物分析は、株式会社資生堂の Nanospace SI-2 HPLC および Thermo Fisher Scientific の TSQ Quantum Ultra Triple-Quadrupole mass spectrometer (LC-MS/MS) を用いて実施した。カラムは CAPCELL PAK C18 ACR, 2.1 $\times$ 150 mm, 5  $\mu\text{m}$  (株式会社資生堂) を使用した。注入量は 2 $\sim$ 5  $\mu\text{L}$  とした。移動相およびグラジエント条件は、II-2-v 項に準じた。ESI 法によるイオン化後、Single MS scan モードあるいは Product ion scan モードによりデータを取得

し、代謝物分析を行った。

#### IV-2-vi データ解析

30 分間の代謝反応による基質消失率 (%) の算出は I-2-v 項に準じて実施した。CL<sub>int</sub> 値の算出は II-2-vi 項に準じて実施した。

#### IV-2-vii ドッキングシミュレーション

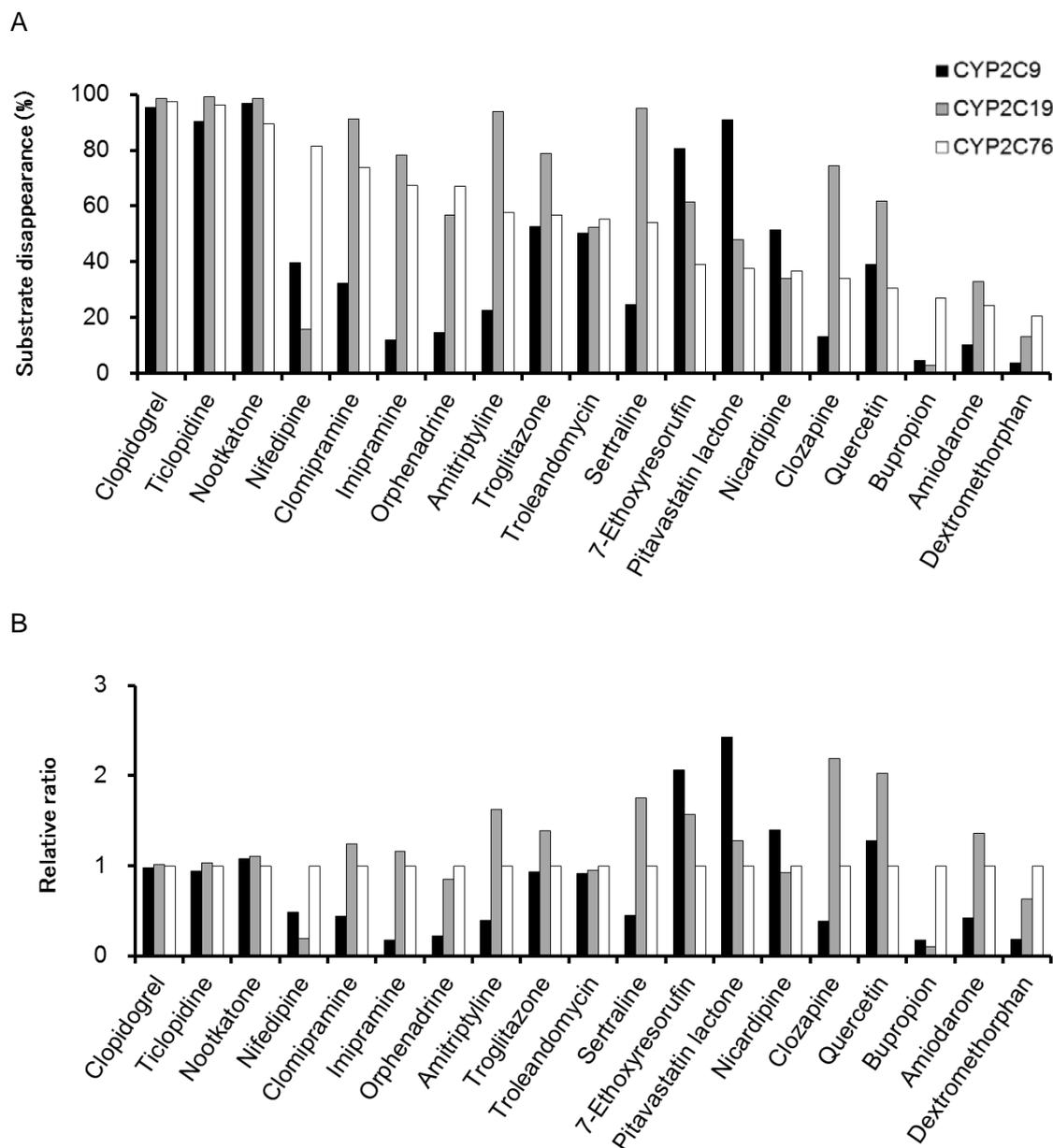
カニクイザル CYP2C76 の一次配列を、ヒト CYP2C9 (Protein Data Bank code 1R9O, Wester et al., 2004) の結晶構造と照らし合わせることで、カニクイザル CYP2C76 の 3 次元構造をモデリングした。以降の操作は II-2-vii 項に準じて実施した。

### 第3節 結果および考察

#### IV-3-i 基質消失アッセイ

カニクイザル CYP2C76 基質のポジティブコントロールである Pitavastatin lactone (Uno et al., 2007) を含む 89 化合物中 19 化合物において, 30 分間代謝反応後の基質消失率は 20% を超え, カニクイザル CYP2C76 により速やかに代謝されることが示された (Figure IV-1A). ほとんどのカニクイザル CYP2C76 基質は, 同時に CYP2C9 あるいは CYP2C19 によっても代謝を受けたが, Nifedipine および Bupropion は CYP2C76 に対し比較的高い選択性を示した (Figure IV-1B).

基質消失率が 20% を超えた 19 化合物の中には, ヒトにおいて CYP1A2 基質である 7-Ethoxyresorflinone, CYP2B6 基質である Bupropion, CYP2D6 基質である Dextromethorphan, CYP3A4/5 基質である Dextromethorphan および Nifedipine, CYP2B6 阻害剤である Sertraline, Clopidogrel および Ticlopidine, CYP2C8 阻害剤である Quercetin, CYP2C19 阻害剤である Ticlopidine および Nootkatone, CYP3A4/5 阻害剤である Troleandomycin が含まれていた. 比較的小さな構造の Nootkatone や, 比較的大きな構造の Troleandomycin を代謝したことから, カニクイザル CYP2C76 の基質認識性は広く, 様々な構造の化合物を代謝し得ることが示唆された.



**Figure IV-1. Substrate disappearance of compounds metabolized by recombinant cynomolgus monkey CYP2Cs.** Substrates (1.0  $\mu$ M) were incubated with each recombinant P450 for 30 minutes. The substrates whose disappearance by CYP2C76 exceeded 20% are shown. Substrate disappearance (A) and the ratio relative to CYP2C76 (B) are shown.

IV-3-ii Nifedipine および Bupropion 代謝の固有クリアランス

Nifedipine および Bupropion はヒトではそれぞれ CYP3A4 および CYP2B6 のマーカー基

質であるため (Guengerich et al., 1986; Hesse et al., 2000), カニクイザルの CYP3A4 および CYP2B6 のこれらの化合物に対する代謝活性についても検討した。Nifedipine のカニクイザル CYP3A4 による  $CL_{int}$  値は CYP2C76 と同程度であった。Bupropion のカニクイザル CYP2B6 による  $CL_{int}$  値は CYP2C76 に比べ小さかった。なお, CYP2C76 による代謝反応のポジティブコントロールである Pitavastatin lactone の  $CL_{int}$  値と比較し, Nifedipine の  $CL_{int}$  値は約 10 倍大きく, 一方, Bupropion の  $CL_{int}$  値は同程度であった (Table IV-1)。

**Table IV-1. Intrinsic clearance ( $CL_{int}$ ) values for CYP2C76 substrates to cynomolgus monkey P450s**

Compound	$CL_{int}$ (mL/min per nmol P450)				
	CYP2C9	CYP2C19	CYP2C76	CYP3A4	CYP2B6
Pitavastatin lactone <sup>a</sup>	3.36	0.85	0.43	ND	ND
Nifedipine	0.67	0.23	4.23	6.57	ND
Bupropion	<0.10	<0.10	0.47	ND	0.19

ND; not determined

a; Pitavastatin lactone was used as positive control because CYP2C76 is important for monkey-specific metabolism of pitavastatin lactone (Uno et al., 2007).

#### IV-3-iii Nifedipine および Bupropion 代謝物の LC-MS/MS 分析

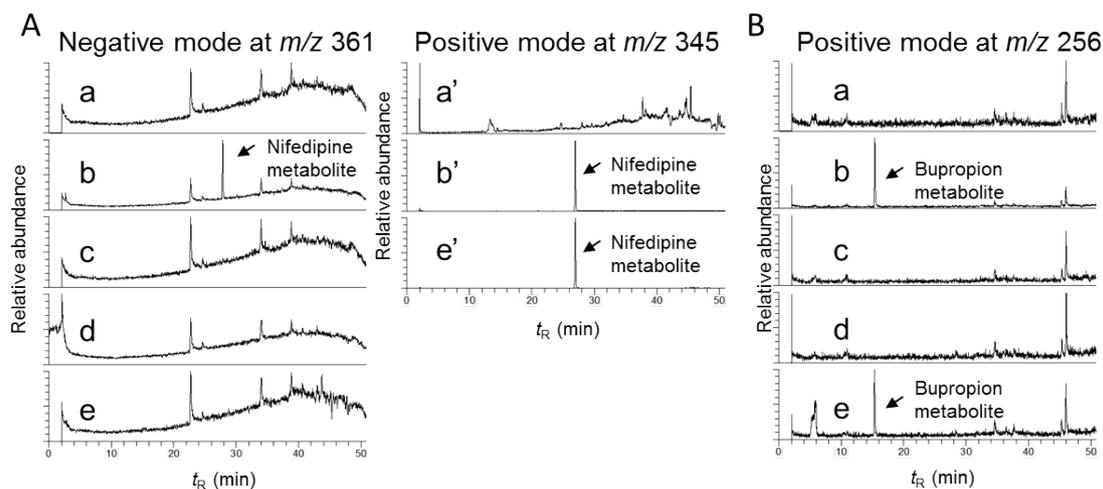
Nifedipine および Bupropion の代謝が CYP2C76 に対し比較的高い選択性を示したため, これらの化合物のカニクイザル P450 分子種による代謝物について調べた。Figure IV-2 に Nifedipine および Bupropion 代謝物の抽出イオンクロマトグラムを示した。Nifedipine においては,  $m/z$  361 に CYP2C76 特異的な  $[M - H]^-$  イオンが検出され, さらに  $m/z$  345 に CYP2C76 および CYP3A4 で  $[M + H]^+$  イオンが検出された。Bupropion においては,  $m/z$  256 に CYP2C76 および CYP2B6 で  $[M + H]^+$  イオンが検出された。Nifedipine および Bupropion において, それぞれ  $m/z$  361 および  $m/z$  256 に認められたイオンは, 親化合物より 16 Da 大きいことから,

親化合物に酸素原子が 1 つ付加した代謝物であると考えられた。また、Nifedipine において  $m/z$  345 に認められたイオンは、親化合物より 2 Da 小さいことから、Nifedipine の 1,4-ジヒドロピリジン環から水素原子が 2 つ脱離した代謝物であると考えられた。なお、 $m/z$  345 に認められた  $[M + H]^+$  イオンは、ヒトでの主代謝物である Dehydronifedipine に由来すると考えられたが、 $m/z$  361 に認められた  $[M - H]^-$  イオンはヒトで報告がなく、新規の代謝物であると考えられた。そこで、この新規代謝物の構造情報を取得するため、MS/MS スペクトルを取得した。

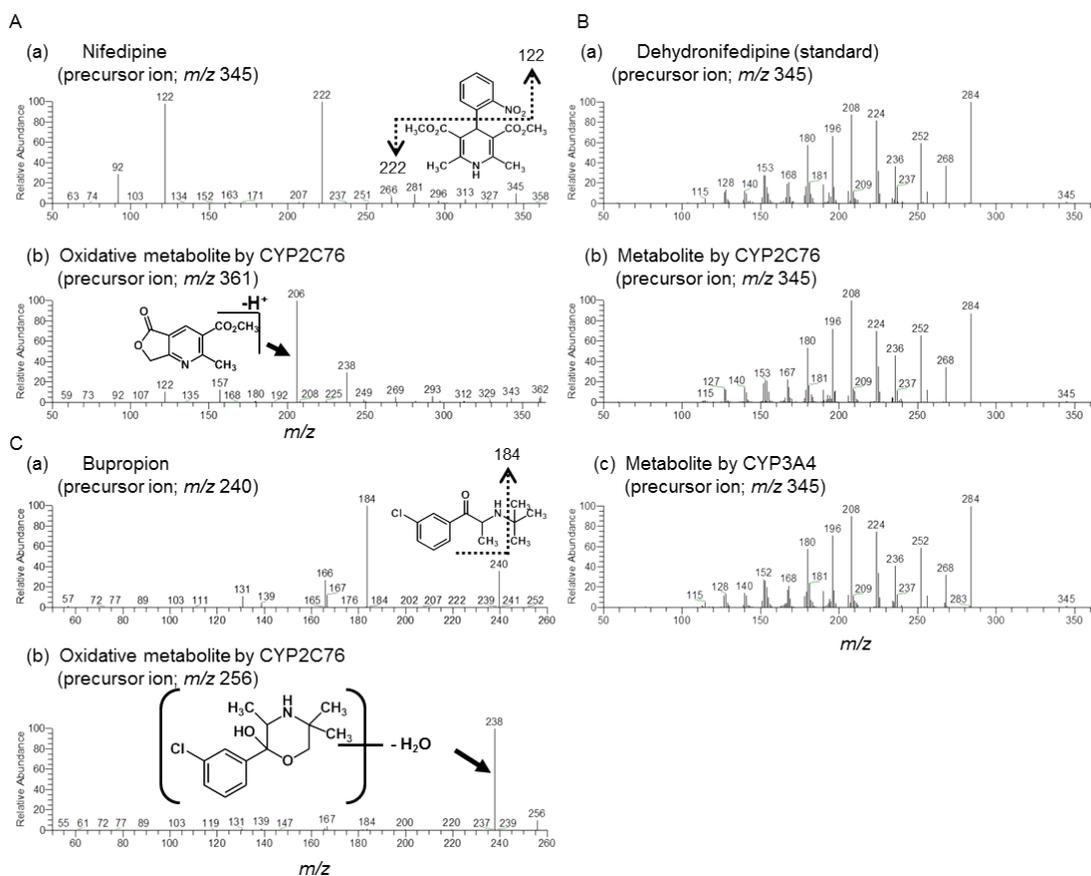
Nifedipine および新規代謝物において  $m/z$  122 にシグナルが認められたことから、両者ともその構造中にニトロベンゼン環を有すると考えられた (Figure IV-3A)。また、Nifedipine および新規代謝物において、それぞれ  $m/z$  222 および  $m/z$  238 にシグナルが認められたことから、ニトロベンゼン環以外の部位に酸素原子が付加された代謝物であると推定された。さらに、新規代謝物においてのみ  $m/z$  206 にシグナルが認められたが、これは Figure IV-3A (b) に示したフラグメントイオンに由来すると考えられた。以上より、この新規代謝物は Nifedipine の 1,4-ジヒドロピリジン環のメチル基の酸化代謝物であると推定された。なお、カニクイザル CYP2C76 および CYP3A4 によって生成した  $m/z$  345 のイオンについても同様に MS/MS スペクトルを取得し、Dehydronifedipine 標品と比較を行ったところ、両者は一致した (Figure IV-3B)。したがって、カニクイザルにおいても Dehydronifedipine が生成することを確認した。

同様に、Bupropion およびその代謝物についても MS/MS スペクトルを取得したところ、両者は異なるスペクトルパターンを示した (Figure IV-3C)。Bupropion のプロダクトイオンである  $m/z$  184 は、Bupropion の *t*-butyl 基が脱離して生じたイオンであると考えられた。Bupropion 代謝物のプロダクトイオンである  $m/z$  238 は、Bupropion 代謝物からの脱水 ( $-H_2O$ ) により生じたイオンであると考えられた。なお、CYP2C76 により生成された Bupropion 代謝物の MS/MS スペクトルは、既報のヒトおよびラット *in vivo* における Bupropion 代謝物の MS/MS スペクトルと一致したことから (Yeniceli et al., 2011)、カニクイザルにおいても

同一の代謝物が生成したと考えられた。



**Figure IV-2. Chromatographic profiles of nifedipine and bupropion after incubation with recombinant cynomolgus monkey P450s.** Substrates (1.0  $\mu$ M) were incubated with each recombinant cynomolgus monkey P450 for 0 (control) or 30 min, and the samples were analyzed by positive or negative single MS scan mode. (A) Nifedipine metabolites were analyzed by negative mode at  $m/z$  361 for (a) control, (b) CYP2C76, (c) CYP2C9, (d) CYP2C19, and (e) CYP3A4; and positive mode at  $m/z$  345 for (a') control, (b') CYP2C76, and (e') CYP3A4. (B) Bupropion metabolites were analyzed in positive mode at  $m/z$  256 for (a) control, (b) CYP2C76, (c) CYP2C9, (d) CYP2C19, and (e) CYP2B6.

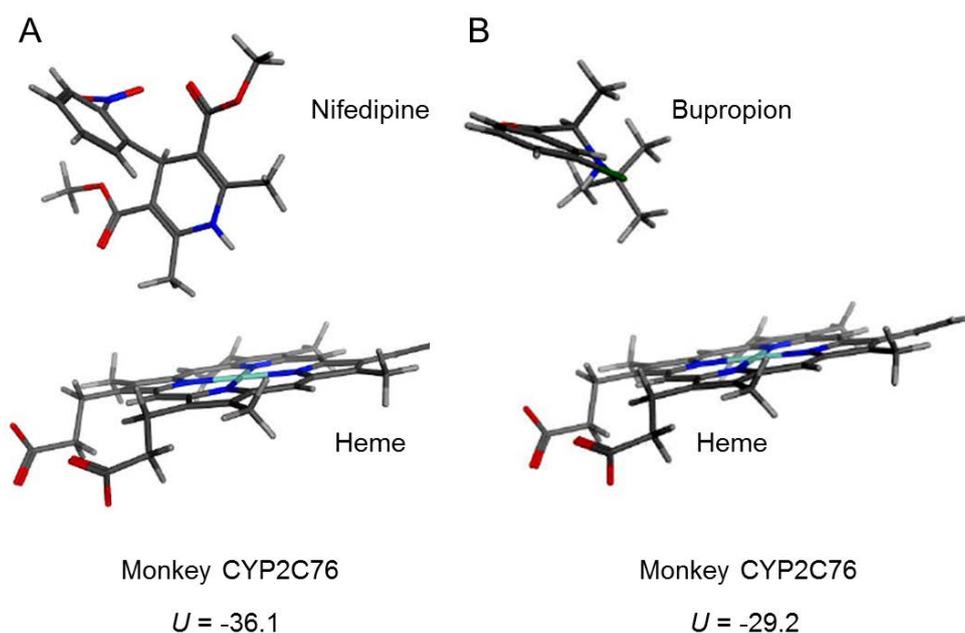


**Figure IV-3. Comparison of the MS/MS spectra of nifedipine or bupropion to those of their metabolites formed by cynomolgus monkey CYP2C76 or CYP3A4.** Substrates (20.0  $\mu$ M) were incubated with CYP2C76 for 30 min, and the samples were analyzed in positive or negative product ion scan mode. (A) Nifedipine and its oxidative metabolite were analyzed (scan mode: negative, scan range:  $m/z$  50-365, and collision energy: 15 V). (B) Dehydronifedipine and nifedipine metabolites were analyzed (scan mode: positive, scan range:  $m/z$  50-365, and collision energy: 45 V). (C) Bupropion and its oxidative metabolite were analyzed (scan mode: positive, scan range:  $m/z$  50-260, and collision energy: 15 V).

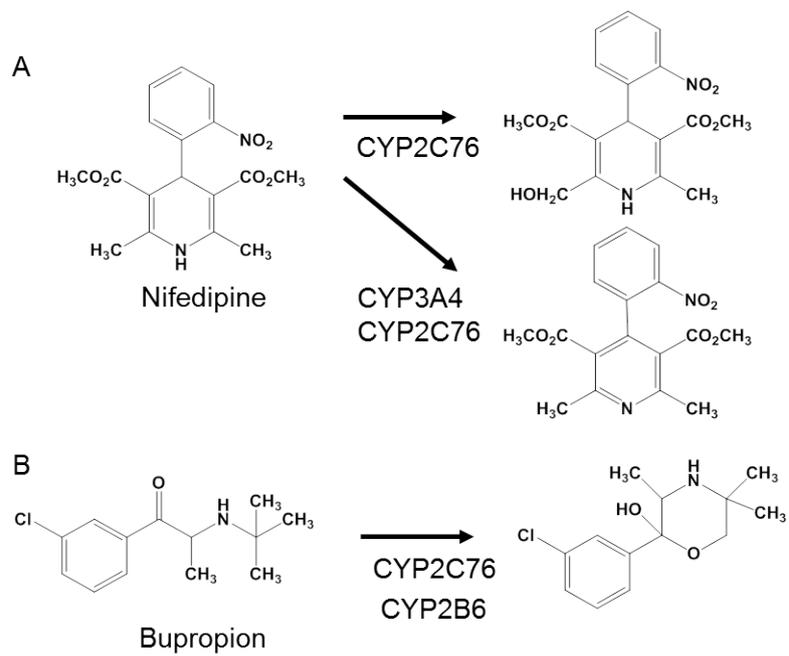
#### IV-3-iv ドッキングシミュレーション

Nifedipine および Bupropion とカニクイザル CYP2C76 のドッキングシミュレーションを行った。シミュレーションの結果、Nifedipine においては 1,4-ジヒドロピリジン環のメチル基の炭素原子がヘムの中心を向き安定化しており、 $U$  value および炭素原子とヘムの距

離はそれぞれ-36.1 kcal/mol および 4.6 Å であった (Figure IV-4A). したがって, ドッキングシミュレーションによる解析からも 1,4-ジヒドロピリジン環のメチル基が CYP2C76 による代謝部位となる可能性が示唆された. Bupropion においては *t*-butyl のメチル基の炭素原子がヘムの中心を向き安定化しており, *U* value および炭素原子とヘムの距離はそれぞれ-29.2 kcal/mol および 6.5 Å であった (Figure IV-4B). したがって, ドッキングシミュレーションによる解析からも本炭素原子が CYP2C76 による代謝部位となる可能性が示唆された. 以上, ドッキングシミュレーションと LC-MS/MS により得られた解析結果は一致した. 上述の解析結果から推定された Nifedipine および Bupropion のカニクイザル P450 分子種による代謝物の構造を Figure IV-5 に示した.



**Figure IV-4. Docking simulation of the interaction of nifedipine and bupropion with modeled CYP2C76 enzyme.** Oxygen, nitrogen, and iron atoms are colored with red, blue, and light blue, respectively. The total interaction energies (*U* value) of nifedipine (A) and bupropion (B) with modeled CYP2C76 enzyme were -36.1 kcal/mol and -29.2 kcal/mol, respectively. The distances between metabolism sites of nifedipine (A) and bupropion (B) to heme iron were 4.6 Å and 6.5 Å, respectively.



**Figure IV-5. Putative structure of nifedipine and bupropion metabolite formed by cynomolgus monkey P450s.**

#### 第4節 結論

本検討により，ヒト P450 分子種の基質および阻害剤 89 化合物に対するカニクイザル CYP2C76 の基質認識性を評価した結果，19 化合物がカニクイザル CYP2C76 の基質となることが示された．これらの化合物の中には，薬物相互作用に関する FDA ドラフトガイダンスおよびEMA ガイドラインに記載されている種々のヒト P450 分子種の基質または阻害剤が含まれており，CYP2C76 が様々な構造の化合物の代謝に関与することが示された．カニクイザル CYP2C76 の基質となった化合物のうち，Nifedipine および Bupropion はカニクイザル CYP2C76 に対し比較的高い選択性を示したが，Nifedipine の代謝において CYP2C76 はヒトでは報告のない新規の代謝物を生成した．以上，CYP2C76 の広い基質認識性および CYP2C76 によるカニクイザル特異的代謝物の生成例があることから，CYP2C76 は薬物代謝におけるヒトとカニクイザルの種差の一因となる可能性が示唆された．なお，この Nifedipine 代謝物は CYP2C76 以外のカニクイザル P450 分子種（CYP2C9，CYP2C19 および CYP3A4）では生成しなかったことから，本代謝反応は CYP2C76 のマーカー反応になる可能性が示唆された．

## 第 V 章 カニクイザル CYP2C8 の基質認識性およびヒト CYP2C8 基質である化合物 A のヒト初回投与量算出

### 第 1 節 緒言

ヒトにおいて薬物代謝に主として寄与する CYP2C 分子種は CYP2C9 および CYP2C19 であるが (Williams et al., 2004), Paclitaxel や Amodiaquine のように, ヒトにおいて主として CYP2C8 によって代謝される薬物も存在する (Rahman et al., 1994; Li et al., 2002). カニクイザルとヒトの薬物代謝における種差の観点から見ると, カニクイザルにおける主要な CYP2C 分子種は, ヒトにおいて薬物代謝における寄与が大きい CYP2C9 および CYP2C19, 並びにヒトにオーソログが存在しない CYP2C76 であると考えられたが, 上記より CYP2C8 の基質認識性評価も重要であると考えられた.

カニクイザルの肝臓においても CYP2C8 の mRNA 発現が確認されている. カニクイザル CYP2C8 はヒト CYP2C8 に高い相同性を示し, アミノ酸相同性は 92% であることから (Uno et al., 2011a), カニクイザル CYP2C8 はヒト CYP2C8 に類似した基質認識性を示すことが予想される. これまでに, カニクイザル CYP2C8 は Paclitaxel, Flurbiprofen, S-Mephenytoin および Tolbutamide といったヒト CYP2C 基質を代謝することが報告されている (Uno et al., 2007, 2011c). しかし, その基質認識性に関する網羅的な検討は行われていない. そこで, 本研究ではカニクイザル CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C76 の評価に使用した市販 89 化合物のうち, ヒト CYP2C8 の基質および阻害剤を中心とした 22 化合物を用いてカニクイザル CYP2C8 の基質認識性を網羅的に解析し, ヒト CYP2C8 と比較した.

さらに, ヒト CYP2C8 基質である化合物 A のヒト初回投与量算出のための検討を行った. 医薬品開発において被験薬を初めてヒトに投与する試験は First-in Human (FIH) 試験と称される. FIH 試験の多くは健常成人を対象としており, 治療的な恩恵はないため, 被験者の安全性の確保が最優先とされる. FIH 試験を開始する時点で使用可能なデータは非

臨床試験から得られたものに限られるが、非臨床試験は実験動物を対象としているため、ヒトにおける有害作用の予測には限界がある。実験動物とヒトの間には解剖学および生理学的な相違があり、薬物反応性の種特異性や薬物動態の種差が存在し得る。そのため、ヒトへの初回投与量の算出する際は、動物モデルにおける薬理作用、毒性所見および薬物動態を考慮しつつ、十分な安全性マージンをもって決定する必要がある（熊谷，2013；「医薬品開発におけるヒト初回投与試験の安全性を確保するためのガイダンス」（[http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/chiken/dl/120412\\_3.pdf](http://www.mhlw.go.jp/topics/bukyoku/isei/chiken/dl/120412_3.pdf)））。

ヒトへの初回投与量の算出方法としては、体重あたりの投与量で概略の致死量の 1/600 以下、最も感受性の高い動物における最大無毒性量の 1/60 以下、推定臨床用量の 1/10 以下、または最小有効量の 1/5 以下等が経験的に用いられてきた。一方、FDA のヒト初回投与量に関するガイダンス (<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/UCM078932.pdf>) では、動物における投与量を体表面積を基にヒトにおける投与量に換算することを推奨している。すなわち、動物種ごとに決められた体表面積による換算係数を用いて最大無毒性量のヒト等価用量を求め、さらにこれに適切と考えられる安全係数を乗じることで初回投与量を算出する。なお、安全係数は 1/10 が一つの目安となるが、一律のものではなく、その薬物が持つリスクによって決定されるべきものとされている。

開発中の医薬品候補化合物 A については、初回投与量の算出の根拠となる非臨床試験として、カニクイザルを用いた *in vivo* 試験から最大無毒性量が算出されていた。また、ヒトの凍結肝細胞、肝ミクロソームおよび P450 分子種発現系を用いた *in vitro* 試験から、化合物 A の  $CL_{int}$  値、生成する主代謝物および代謝に寄与する P450 分子種の情報が取得されていた。さらに、カニクイザルの凍結肝細胞を用いた *in vitro* 試験から、化合物 A の  $CL_{int}$  値および生成する主代謝物の情報が取得されており、ヒトとカニクイザルで化合物 A の  $CL_{int}$  値および生成する主代謝物は類似することが示されていた。医薬品開発において、一般的に主代謝酵素の確認はヒトにおいてのみ実施され、ガイドライン上も動物での主代謝酵素の確認は求められていない。しかしながら、今回はヒト初回投与量算出における安全

係数設定の根拠となるデータを得る目的で、カニクイザルにおいても主代謝酵素の確認を行った。

ヒトの肝ミクロソームおよび P450 分子種発現系を用いた *in vitro* 試験から、化合物 A の代謝に主として寄与する P450 分子種は CYP2C8 であり、一部は CYP3A4 によって代謝を受けることが知られていた (Figure V-1)。そこで、カニクイザルにおいても CYP2C 分子種 (CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C76) および CYP3A4 の発現系を用い、代謝に関与する P450 分子種を評価した。

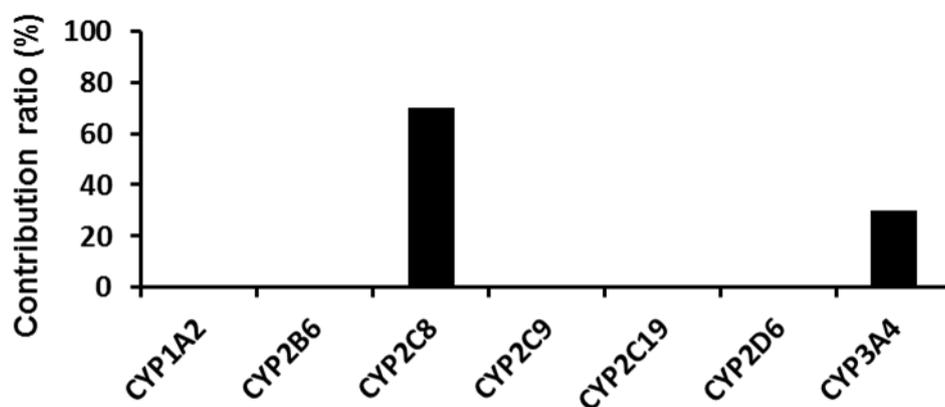


Figure V-1. Contribution ratio for the disappearance of compound A by human P450s.

## 第 2 節 実験材料および実験方法

### V-2-i 試薬

Amodiaquine および Quercetin は Sigma-Aldrich より購入した。Montelukast および Rosiglitazone は和光純薬工業株式会社より購入した。化合物 A は合成品を使用した。カニクイザル CYP2C8 の組換えタンパク質は, Iwata らおよび Daigo らの手法 (Iwata et al., 1998; Daigo et al., 2002) に従い, 大腸菌を宿主とし発現させた後に精製したものを使用した。その他の試薬の入手先および調製方法は I-2-i 項および IV-2-i 項に準じた。

### V-2-ii 代謝反応

I-2-ii 項に準じて実施した。

### V-2-iii 検量試料の調製

I-2-iii 項に準じて実施した。

### V-2-iv 代謝反応後の基質濃度の測定

I-2-iv 項に準じて実施した。

### V-2-v データ解析

I-2-v 項に準じて実施した。

### 第3節 結果および考察

#### V-3-i 市販 22 化合物の基質消失アッセイ

22化合物中5化合物において代謝活性は0.27 nmol/min per nmol P450を超え(すなわち, 30分間代謝反応後の基質消失率が20%を超え), カニクイザル CYP2C8により速やかに代謝されることが示された (Table V-1). ガイドライン上では, これらのうち Amodiaquine はヒト CYP2C8の基質であり, Montelukast および Quercetin はヒト CYP2C8の阻害剤であった. Rosiglitazone はヒト CYP2C8の基質および阻害剤の両方を満たす化合物であった. 一方, Loratadine はガイドライン上ではヒト CYP2C19の阻害剤であるが, その代謝活性は0.28 nmol/min per nmol P450(すなわち, 30分間代謝反応後の基質消失率が21.1%)であり, その値は本試験系の境界値付近であった. 以上より, カニクイザル CYP2C8の基質認識性はヒト CYP2C8に類似すると考えられた.

これまでのカニクイザル CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C76 を用いた基質消失アッセイにおいて, Amodiaquine および Montelukast はほとんど代謝を受けなかった (Figure V-2). したがって, これらの2化合物はカニクイザル CYP2C8のマーカー基質となる可能性が示唆された.

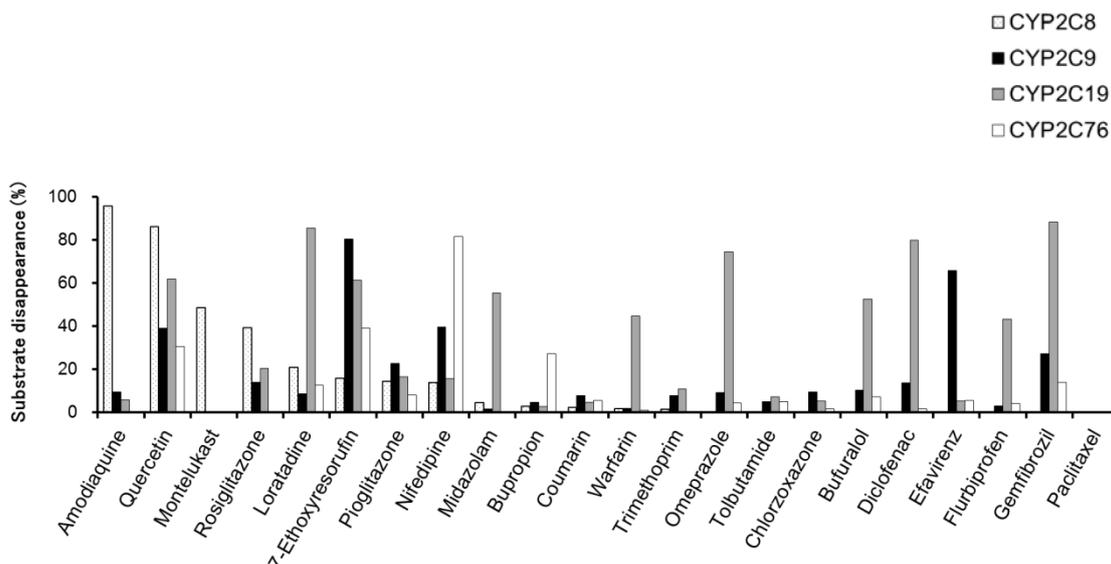
これまでの文献報告では, カニクイザル CYP2C8が Paclitaxel, Flurbiprofen, *S*-Mephenytoin および Tolbutamide といったヒト CYP2C 基質を代謝することが報告されていた (Uno et al., 2007, 2011c). Paclitaxel はヒト CYP2C8のマーカー基質であるが, Paclitaxel のカニクイザル CYP2C8による  $CL_{int}$  値はヒトの1/667であることが報告されている (Emoto et al., 2013). また, 既報では Paclitaxel の代謝反応時の基質濃度を 2.5~100  $\mu$ M に設定しており, 本研究での基質濃度の2.5~100倍である. これらの理由で, 本試験系では Paclitaxel の代謝が認められなかったと考えられた. Flurbiprofen および Tolbutamide の代謝が認められなかった理由も, 同様に基質濃度等の反応条件の違いに起因するものと考えられた. なお, *S*-Mephenytoin については, イオン化効率が低く LC-MS による測定が困難であったため,

本研究では評価対象としなかった。なお、Paclitaxel についてもカニクイザル CYP2C 分子種の中で CYP2C8 により選択的に代謝を受けることが報告されているが(Uno et al., 2011c), Amodiaquine および Montelukast に対するカニクイザル CYP2C8 の代謝活性の方が高いことから、両化合物はカニクイザル CYP2C8 のより良いマーカー基質となる可能性が示唆された。

**Table V-1. Rates of substrate disappearances mediated by recombinant cynomolgus monkey CYP2C8**

Compounds	Activity, nmol/min per nmol P450	Note
Amodiaquine	1.28	Human CYP2C8 substrate
Bufuralol	< 0.27	
Bupropion	< 0.27	
Chlorzoxazone	< 0.27	
Coumarin	< 0.27	
Diclofenac	< 0.27	
Efavirenz	< 0.27	
7-Ethoxyresorufin	< 0.27	
Flurbiprofen	< 0.27	
Gemfibrozil	< 0.27	
Loratadine	0.28	Human CYP2C19 inhibitor
Midazolam	< 0.27	
Montelukast	0.65	Human CYP2C8 inhibitor
Nifedipine	< 0.27	
Omeprazole	< 0.27	
Pioglitazone	< 0.27	
Quercetin	1.15	Human CYP2C8 inhibitor
Rosiglitazone	0.53	Human CYP2C8 substrate/inhibitor
Paclitaxel	< 0.27	
Tolbutamide	< 0.27	
Trimethoprim	< 0.27	
Warfarin	< 0.27	

Compounds (1.0  $\mu$ M) were incubated with recombinant cynomolgus monkey CYP2C8 at 37°C for 30 min.



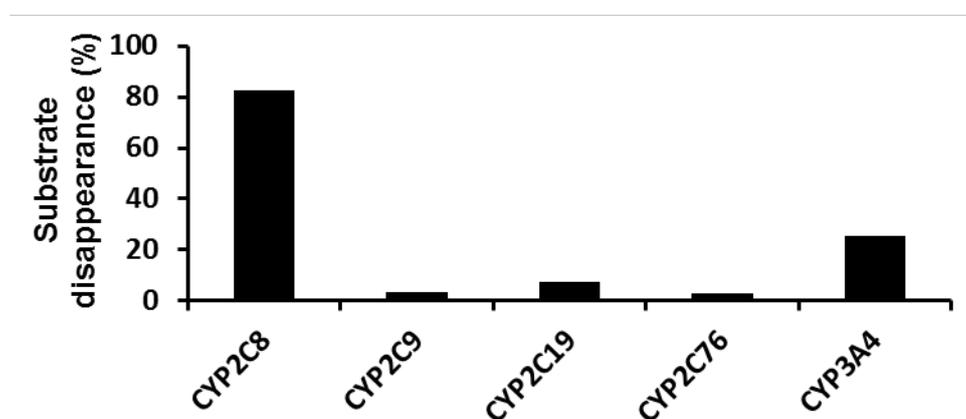
**Figure V-2. Substrate disappearance of compounds metabolized by recombinant cynomolgus monkey CYP2Cs.** Substrates (1.0  $\mu$ M) were incubated with each recombinant P450 for 30 minutes.

### V-3-ii 化合物 A の基質消失アッセイ

化合物 A の 30 分間代謝反応後の基質消失率は、カニクイザル CYP2C8 および CYP3A4 において、それぞれ 82.7% および 25.4% であった。カニクイザル CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C76 においては、いずれも数% 程度であった (Figure V-3)。したがって、カニクイザルとヒトで化合物 A の代謝に寄与する P450 分子種は類似していることが示唆された。

なお、ヒトにおける化合物 A の代謝への P450 分子種の寄与率は、RAF 法により算出された。RAF 法では、初めに各 P450 分子種に選択的な基質の代謝反応を利用して、各 P450 発現系と肝ミクロソームによる代謝速度の比を算出する。次にこの比を用いて、未知化合物の P450 発現系による代謝速度を、肝ミクロソームによる特定の P450 分子種を介した代謝速度に変換する。これにより、各 P450 分子種の肝臓での代謝全体に占める寄与率を算出することができる (Venkatakrisnan et al., 2000)。一方、カニクイザルにおいては各 P450 分子種に選択的な基質またはその代謝反応が確立されていないため、RAF 法を適用するこ

とができない。そのため、得られた基質消失率のデータは単一 P450 発現系のものであり、それぞれの P450 分子種の肝臓での発現量および活性の補正は行われていない点は注意が必要である。本研究にて第 II 章から第 V 章で実施した基質認識性の検討から、各カニクイザル CYP2C 分子種のマーカー基質または代謝反応の候補を見出すことができた。これらについて、今後、未検討のカニクイザル P450 分子種にて代謝試験を実施し、選択性を確認することができれば、カニクイザルからヒトへ薬物代謝および薬物動態を精度よく外挿する上で、極めて有用なツールとなることが期待された。



**Figure V-3. Substrate disappearance of compound A metabolized by recombinant cynomolgus monkey CYP2Cs and CYP3A4.** Substrates (1.0  $\mu$ M) were incubated with each recombinant P450 for 30 minutes.

#### 第4節 結論

ヒト CYP2C8 の基質および阻害剤を中心に、ヒト P450 分子種の基質および阻害剤 22 化合物に対するカニクイザル CYP2C8 の基質認識性を評価した結果、新たに Amodiaquine, Quercetin, Montelukast および Rosiglitazone の 4 化合物がカニクイザル CYP2C8 の基質であることが明らかとなった。これら 4 化合物はヒト CYP2C8 の基質または阻害剤として報告のある化合物であったことから、カニクイザル CYP2C8 はヒト CYP2C8 に類似した基質認識性を示すことが示唆された。なお、Amodiaquine および Montelukast はカニクイザル CYP2C 分子種のうち CYP2C8 に高い選択性を示したことから、これらはカニクイザル CYP2C8 のマーカー基質となる可能性が示唆された。

また、化合物 A について、通常実施されるヒトに加えカニクイザルにおいても主代謝酵素の同定を行った結果、化合物 A の代謝が両種で類似していることを明らかとした。*In vivo* における薬効および毒性の発現は、血中濃度および組織中濃度等の薬物動態に影響されるため、薬物代謝の種差はヒトでの毒性発現のリスクとなり得るが、上記の結果からヒト初回投与量の算出時に薬物代謝の観点からは安全係数を大きく取る必要はないことが示唆された。以上、本検討を実施することにより、ヒト初回投与量算出の根拠となるデータを取得した。

## 総括

医薬品開発における非臨床試験の主な目的は、医薬品候補化合物のヒトにおける薬効および毒性を予測することにある。非臨床試験において、進化的にヒトに近いという理由でカニクイザルが広く使用されているが、近年、薬物代謝において稀にヒトとカニクイザルの間で種差が認められることが明らかとなってきた。このような種差は、ヒトでの薬効および毒性の予測を困難にするため、医薬品開発において重要な問題である。P450 はヒトにおける主要な薬物代謝酵素であり、その中でも CYP3A4 および CYP2C 分子種の薬物代謝への関与が大きいことが報告されている。肝臓において発現している P450 の種類はカニクイザルとヒトで類似しているが、カニクイザルにはいずれのヒト P450 とも対応関係の取れない分子種である CYP2C76 が発現している。加えて、カニクイザル CYP2C 分子種による薬物代謝は、ヒトと同様に複数の分子種が関与しており複雑であることが予想されるが、その基質認識性に関する検討は未だ十分には行われていなかった。そこで本研究では、カニクイザル CYP2C 分子種のうち重要と考えられる CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C76 の基質認識性を網羅的に解析することを目的とした。

第 I 章では薬物代謝におけるカニクイザルとヒトの種差を理解する上で特に重要と考えられた、カニクイザル CYP2C9, CYP2C19 および CYP2C76 の基質認識性を網羅的に解析し、その全体像を明らかにした。検討の結果、89 化合物中 34 化合物、20 化合物および 19 化合物が、それぞれカニクイザル CYP2C19, CYP2C9 および CYP2C76 の基質であることが明らかとなった。

第 II 章ではカニクイザル CYP2C19 の基質認識性について詳細を示した。検討の結果、カニクイザル CYP2C19 はヒト CYP2C19 および CYP2C9 に概ね類似した基質認識性を示すことが示唆された。なお、ヒト CYP2C9 のマーカー基質である Diclofenac, Flurbiprofen および Warfarin は、カニクイザルでは CYP2C9 ではなく CYP2C19 により主として代謝されることが明らかとなった。また、本検討で見出されたカニクイザル CYP2C19 により高

い選択性をもって代謝された 9 化合物 (Bufuralol, Diazepam, Diclofenac, Flurbiprofen, Loratadine, Midazolam, Omeprazole, Propranolol および Warfarin) は, カニクイザル CYP2C19 のマーカー基質となる可能性が示唆された。

第 III 章ではカニクイザル CYP2C9 の基質認識性について詳細を示した。検討の結果, カニクイザル CYP2C9 は Efavirenz のような例外はあるものの, 概ねヒト CYP2C9 および CYP2C19 に類似した基質認識性を示すことが示唆された。また, Efavirenz はカニクイザル CYP2C9 のマーカー基質となる可能性が示唆された。

第 IV 章ではカニクイザル CYP2C76 の基質認識性について詳細を示した。検討の結果, カニクイザル CYP2C76 基質には, CYP2C 以外を含む種々のヒト P450 分子種の基質または阻害剤が含まれており, CYP2C76 が様々な構造の化合物の代謝に関与することが示唆された。また, カニクイザル CYP2C76 は Nifedipine の代謝において, ヒトでは報告のない新規の代謝物を生成した。以上より, カニクイザル CYP2C76 は薬物代謝におけるヒトとカニクイザルの種差の一因となる可能性が示唆された。さらに, この新規の Nifedipine 代謝物の生成反応はカニクイザル CYP2C76 のマーカー反応になる可能性が示唆された。

第 V 章ではカニクイザル CYP2C8 の基質認識性について詳細を示した。検討の結果, カニクイザル CYP2C8 はヒト CYP2C8 に類似した基質認識性を示すことが示唆された。また, Amodiaquine および Montelukast はカニクイザル CYP2C8 のマーカー基質となる可能性が示唆された。さらに, 第 V 章では本研究の医薬品開発への応用例として, 化合物 A のヒト初回投与量算出についても示した。化合物 A はヒトにおいて CYP2C8 基質であることが示されていたが, カニクイザルにおいても調べた範囲で化合物 A の代謝における CYP2C8 の寄与は大きく, 化合物 A の代謝は両種で類似していた。これより, ヒト初回投与量の算出時に, 薬物代謝の観点からは安全係数を大きく取る必要はないことが示唆された。

以上, 89 化合物を網羅的に評価することにより, カニクイザル CYP2C8, CYP2C9 および CYP2C19 の基質認識性は, Efavirenz のような例外はあるものの, 基本的には対応する

ヒト CYP2C 分子種に類似していることが明らかとなった。一方、ヒトにオーソログの存在しないカニクイザル CYP2C76 については、多様な化合物を代謝し、かつヒトで報告のない代謝物を生成したことから、薬物代謝の種差の一因となる可能性が示唆された。また、本研究を通じ、各カニクイザル CYP2C 分子種のマーカー基質またはその代謝反応の候補を見出すことができた。以上、本研究によりカニクイザル CYP2C 分子種の基質認識性を網羅的に明らかにした。本研究で得られた知見は、ヒト初回投与量算出の例のように、カニクイザルを用いて得た非臨床試験データをヒトへ外挿するために極めて有用であると考えられた。さらに、本研究で得られた知見は、カニクイザル P450 の肝臓における発現量および代謝速度等の定量的な情報と組み合わせることにより、ヒトでの薬物動態をより定量的に予測するためのツールとなることが期待される。非臨床試験データからヒトにおける血中濃度、さらには標的となる組織中濃度あるいは受容体周辺濃度を予測することができれば、薬効用量や投与間隔の推定が可能になると考えられる。本研究ではカニクイザル CYP2C 分子種に着目しその基質認識性を明らかにしたが、他の薬物代謝酵素あるいはトランスポーター等についても分子レベルの理解が深まれば、カニクイザルを用いて得られた非臨床試験の結果を精度よくヒトに外挿するための有用な情報となり、現在の創薬科学的手法に新たな知見を加えるものとなることが期待された。

## 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。

1. Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Uehara S, Shimizu M, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y, and Yamazaki H. Similar substrate specificity of cynomolgus monkey cytochrome P450 2C19 to reported human P450 2C counterpart enzymes by evaluation of 89 drug clearances. *Biopharm Drug Dispos*, **36**: 636–643.
2. Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Uehara S, Shimizu M, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y and Yamazaki H (2015) Comprehensive evaluation for substrate selectivity of cynomolgus monkey cytochrome P450 2C9, a new efavirenz oxidase. *Drug Metab Dispos* **43**: 1119–1122.
3. Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Shimizu M, Uehara S, Fujino H, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y and Yamazaki H (2015) Evaluation of 89 compounds for identification of substrates for cynomolgus monkey CYP2C76, a new bupropion/nifedipine oxidase. *Drug Metab Dispos* **43**:27-33.
4. Hosaka S, Murayama N, Satsukawa M, Uehara S, Shimizu M, Iwasaki K, Iwano S, Uno Y and Yamazaki H. Identification of putative substrates for cynomolgus monkey cytochrome P450 2C8 by substrate disappearance assays with 22 human P450 substrates and inhibitors. *Biopharm Drug Dispos*, in press.

## 謝辞

稿を終えるにあたり，本研究の遂行および本論文の作成に懇切なるご指導とご鞭撻を賜りました昭和薬科大学 薬物動態学研究室教授 山崎浩史博士に謹んで感謝の意を表します。

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 渡邊泰男博士に深甚なる謝意を表します。また，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 水谷顕洋博士および同生化学研究室教授 伊東進博士に深甚なる謝意を表します。

本研究を遂行するにあたり，数多くのご助言ならびにサポートを頂きました株式会社新日本科学薬物代謝分析センター 宇野泰広博士に厚く御礼申し上げます。また，本研究を遂行するにあたり，数多くのご助言ならびに論文の校閲を賜りました株式会社新日本科学薬物代謝分析センター 岩崎一秀博士に厚く御礼申し上げます。

昭和薬科大学 薬物動態研究室講師 村山典恵博士には，MOEによるドッキングシミュレーションにおける技術的なご支援をいただき，ここに謝意を表します。また，多くのご指導とご助言を賜りました昭和薬科大学 薬物動態学研究室特任助教 上原正太郎博士，同講師 清水万紀子博士および同研究員 岩野俊介博士に厚く御礼申し上げます。

本研究の機会を与えて頂きました科研製薬株式会社 新薬創生センター 薬物動態・安全性部 箕輪賢治部長および多くのご指導とご助言を賜りました同経営企画部 薩川正広博士に深謝の意を表します。

最後に，本研究の遂行を支えてくれた家族に心より感謝します。

## 参考文献

加藤隆一, 鎌滝哲也 (2000) 薬物代謝学 医療薬学・毒性学の基礎として 第2版.

熊谷雄治 (2013) First-in-Human 試験の実際 — 立案から施行まで. *医学のあゆみ* **244**:1217-1222.

Barecki ME, Casciano CN, Johnson WW and Clement RP (2001) In vitro characterization of the inhibition profile of loratadine, desloratadine, and 3-OH-desloratadine for five human cytochrome P-450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **29**:1173-1175.

Bumpus NN, Kent UM and Hollenberg PF (2006) Metabolism of efavirenz and 8-hydroxyefavirenz by P450 2B6 leads to inactivation by two distinct mechanisms. *J Pharmacol Exp Ther* **318**:345-351.

Daigo S, Takahashi Y, Fujieda M, Ariyoshi N, Yamazaki H, Koizumi W, Tanabe S, Saigenji K, Nagayama S, Ikeda K, Nishioka Y and Kamataki T (2002) A novel mutant allele of the CYP2A6 gene (CYP2A6\*11) found in a cancer patient who showed poor metabolic phenotype towards tegafur. *Pharmacogenetics* **12**:299-306.

Emoto C and Iwasaki K (2007) Relative roles of CYP2C19 and CYP3A4/5 in midazolam 1'-hydroxylation. *Xenobiotica* **37**:592-603.

Emoto C, Yoda N, Uno Y, Iwasaki K, Umehara K, Kashiwama E and 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**:239-252.

Ghosal A, Gupta S, Ramanathan R, Yuan Y, Lu X, Su AD, Alvarez N, Zbaida S, Chowdhury SK and Alton KB (2009) Metabolism of loratadine and further characterization of its in vitro metabolites. *Drug Metab Lett* **3**:162-170.

Goldstein JA and de Morais SM (1994) Biochemistry and molecular biology of the human CYP2C

subfamily. *Pharmacogenetics* **4**:285-299.

Guengerich FP, Martin MV, Beaune PH, Kremers P, Wolff T and Waxman DJ (1986)

Characterization of rat and human liver microsomal cytochrome P-450 forms involved in nifedipine oxidation, a prototype for genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. *J Biol Chem* **261**:5051-5060.

Hesse LM, Venkatakrishnan K, Court MH, von Moltke LL, Duan SX, Shader RI and Greenblatt DJ

(2000) CYP2B6 mediates the in vitro hydroxylation of bupropion: potential drug interactions with other antidepressants. *Drug Metab Dispos* **28**:1176-1183.

Hosoi Y, Uno Y, Murayama N, Fujino H, Shukuya M, Iwasaki K, Shimizu M, Utoh M and

Yamazaki H (2012) Monkey liver cytochrome P450 2C19 is involved in R- and S-warfarin 7-hydroxylation. *Biochem Pharmacol* **84**:1691-1695.

Iwata H, Fujita K, Kushida H, Suzuki A, Konno Y, Nakamura K, Fujino A and Kamataki T (1998)

High catalytic activity of human cytochrome P450 co-expressed with human NADPH-cytochrome P450 reductase in *Escherichia coli*. *Biochem Pharmacol* **55**:1315-1325.

Jung F, Richardson TH, Raucy JL and Johnson EF (1997) Diazepam metabolism by

cDNA-expressed human 2C P450s: identification of P4502C18 and P4502C19 as low K(M) diazepam N-demethylases. *Drug Metab Dispos* **25**:133-139.

Karam WG, Goldstein JA, Lasker JM and Ghanayem BI (1997) Human CYP2C19 is a major

omeprazole 5-hydroxylase, as demonstrated with recombinant cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos* **24**:1081-1087.

Komori M, Kikuchi O, Sakuma T, Funaki J, Kitada M and Kamataki T. (1992) Molecular cloning

of monkey liver cytochrome P-450 cDNAs: similarity of the primary sequences to human cytochromes P-450. *Biochim Biophys Act* **29**:141-146.

Läpple F, von Richter O, Fromm MF, Richter T, Thon KP, Wisser H, Griese EU, Eichelbaum M

and Kivistö KT (2003) Differential expression and function of CYP2C isoforms in human

intestine and liver. *Pharmacogenetics* **13**:565-575.

Lee CR, Pieper JA, Frye RF, Hinderliter AL, Blaisdell JA and Goldstein JA (2003) Tolbutamide, flurbiprofen, and losartan as probes of CYP2C9 activity in humans. *J Clin Pharmacol* **43**:84-91.

Leemann T, Transon C and Dayer P (1993) Cytochrome P450TB (CYP2C): a major monooxygenase catalyzing diclofenac 4'-hydroxylation in human liver. *Life Sci* **52**:29-34.

Li XQ, Björkman A, Andersson TB, Ridderström M and Masimirembwa CM (2002) Amodiaquine clearance and its metabolism to N-desethylamodiaquine is mediated by CYP2C8: a new high affinity and turnover enzyme-specific probe substrate. *J Pharmacol Exp Ther* **300**:399-407.

Mankowski DC (1999) The role of CYP2C19 in the metabolism of (+/-) bufuralol, the prototypic substrate of CYP2D6. *Drug Metab Dispos* **27**:1024-1028.

Mitsuda M, Iwasaki M and Asahi S (2006) Cynomolgus monkey cytochrome P450 2C43: cDNA cloning, heterologous expression, purification and characterization. *J Biochem* **139**:865-872.

Nelson DR, Zeldin DC, Hoffman SM, Maltais LJ, Wain HM and Nebert DW (2004) Comparison of cytochrome P450 (CYP) genes from the mouse and human genomes, including nomenclature recommendations for genes, pseudogenes and alternative-splice variants. *Pharmacogenetics* **14**:1-18.

Nicolas JM, Whomsley R, Collart P and Roba J (1999) In vitro inhibition of human liver drug metabolizing enzymes by second generation antihistamines. *Chem Biol Interact* **123**:63-79.

Nishiya Y, Hagihara K, Kurihara A, Okudaira N, Farid NA, Okazaki O and Ikeda T (2009) Comparison of mechanism-based inhibition of human cytochrome P450 2C19 by ticlopidine, clopidogrel, and prasugrel. *Xenobiotica* **39**:836-843.

Obach RS, Zhang QY, Dunbar D and Kaminsky LS (2001) Metabolic characterization of the major human small intestinal cytochrome p450s. *Drug Metab Dispos* **29**:347-52.

Obach RS, Cox LM and Tremaine LM (2005) Sertraline is metabolized by multiple cytochrome

P450 enzymes, monoamine oxidases, and glucuronyl transferases in human: an in vitro study.

*Drug Metab Dispos* **33**:262-270.

Rahman A, Korzekwa KR, Grogan J, Gonzalez FJ and Harris JW (1994) Selective biotransformation of taxol to 6 alpha-hydroxytaxol by human cytochrome P450 2C8. *Cancer Res* **54**:5543-5546.

Rastogi H and Jana S (2014) Evaluation of inhibitory effects of caffeic acid and quercetin on human liver cytochrome p450 activities. *Phytother Res* **28**:1873-1878.

Rendic S (2002) Summary of information on human CYP enzymes: human P450 metabolism data. *Drug Metab Rev* **34**:83-448.

Rettie AE, Korzekwa KR, Kunze KL, Lawrence RF, Eddy AC, Aoyama T, Gelboin HV, Gonzalez FJ and Trager WF (1992) Hydroxylation of warfarin by human cDNA-expressed cytochrome P-450: a role for P-4502C9 in the etiology of (S)-warfarin-drug interactions. *Chem Res Toxicol* **5**:54-59.

Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, Hulot JS, Mega JL, Roden DM, Klein TE, Sabatine MS, Johnson JA and Shuldiner AR (2013) Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther* **94**:317-323.

Transon C, Leemann T, Vogt N and Dayer P (1995) In vivo inhibition profile of cytochrome P450TB (CYP2C9) by (+/-)-fluvastatin. *Clin Pharmacol Ther* **58**:412-417.

Uehara S, Murayama N, Nakanishi Y, Zeldin DC, Yamazaki H and Uno Y (2011) Immunochemical detection of cytochrome P450 enzymes in liver microsomes of 27 cynomolgus monkeys. *J Pharmacol Exp Ther* **339**:654-661.

Uno Y, Fujino H, Kito G, Kamataki T and Nagata R (2006) CYP2C76, a novel cytochrome P450 in cynomolgus monkey, is a major CYP2C in liver, metabolizing tolbutamide and testosterone. *Mol Pharmacol* **70**:477-486.

- Uno Y, Kumano T, Kito G, Nagata R, Kamataki T and Fujino H (2007) CYP2C76-mediated species difference in drug metabolism: A comparison of pitavastatin metabolism between monkeys and humans. *Xenobiotica* **37**:30-43.
- Uno Y, Matsuno K, Nakamura C, Utoh M and Yamazaki H (2010) Identification and characterization of CYP2C18 in the cynomolgus macaque (*Macaca fascicularis*). *J Vet Med Sci* **72**:225-228.
- Uno Y, Iwasaki K, Yamazaki H and Nelson DR (2011a) Macaque cytochromes P450: nomenclature, transcript, gene, genomic structure, and function. *Drug Metab Rev* **43**:346-361.
- Uno Y, Matsuno K, Murayama N, Nakamura C and Yamazaki H (2011b) Metabolism of P450 probe substrates by cynomolgus monkey CYP2C76 *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **109**:315-318.
- Uno Y, Uehara S, Kohara S, Iwasaki K, Nagata R, Fukuzaki K, Utoh M, Murayama N and Yamazaki H (2011c) Newly identified CYP2C93 is a functional enzyme in rhesus monkey, but not in cynomolgus monkey. *PLoS One* **6**:e16923.
- Uno Y, Matsushita A, Shukuya M, Matsumoto Y, Murayama N and Yamazaki H (2014) CYP2C19 polymorphisms account for inter-individual variability of drug metabolism in cynomolgus macaques. *Biochem Pharmacol* **91**: 242-248.
- Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Court MH, Harmatz JS, Crespi CL and Greenblatt DJ (2000) Comparison between cytochrome P450 (CYP) content and relative activity approaches to scaling from cDNA-expressed CYPs to human liver microsomes: ratios of accessory proteins as sources of discrepancies between the approaches. *Drug Metab Dispos* **28**:1493-1504.
- Ward SA, Walle T, Walle UK, Wilkinson GR and Branch RA (1989) Propranolol's metabolism is determined by both mephenytoin and debrisoquin hydroxylase activities. *Clin Pharmacol Ther* **45**:72-79.
- Ward BA, Gorski JC, Jones DR, Hall SD, Flockhart DA and Desta Z (2003) The cytochrome P450

- 2B6 (CYP2B6) is the main catalyst of efavirenz primary and secondary metabolism: implication for HIV/AIDS therapy and utility of efavirenz as a substrate marker of CYP2B6 catalytic activity. *J Pharmacol Exp Ther* **306**:287-300.
- Wen X, Wang JS, Backman JT, Kivistö KT and Neuvonen PJ (2001) Gemfibrozil is a potent inhibitor of human cytochrome P450 2C9. *Drug Metab Dispos* **29**:1359-1361.
- Wester MR, Yano JK, Schoch GA, Yang C, Griffin KJ, Stout CD and Johnson EF (2004) The structure of human cytochrome P450 2C9 complexed with flurbiprofen at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem* **279**:35630-35637.
- Williams JA, Hyland R, Jones BC, Smith DA, Hurst S, Goosen TC, Peterkin V, Koup JR and Ball SE (2004) Drug-drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug Metab Dispos* **32**:1201-1208.
- Xu C and Desta Z (2013) In vitro analysis and quantitative prediction of efavirenz inhibition of eight cytochrome P450 (CYP) enzymes: major effects on CYPs 2B6, 2C8, 2C9 and 2C19. *Drug Metab Pharmacokinet* **28**:362-371.
- Yamada I, Fujino H, Shimada S and Kojima J (2003) Metabolic fate of pitavastatin, a new inhibitor of HMG-CoA reductase: similarities and difference in the metabolism of pitavastatin in monkeys and humans. *Xenobiotica* **33**:789-803.
- Yamazaki H, Suzuki M, Tane K, Shimada N, Nakajima M and Yokoi T (2000) In vitro inhibitory effects of troglitazone and its metabolites on drug oxidation activities of human cytochrome P450 enzymes: comparison with pioglitazone and rosiglitazone. *Xenobiotica* **30**:61-70.
- Yeniceli D, Sener E, Korkmaz OT, Doğrukol-Ak D and Tuncel N (2011) A simple and sensitive LC-ESI-MS (ion trap) method for the determination of bupropion and its major metabolite, hydroxybupropion in rat plasma and brain microdialysates. *Talanta* **84**:19-26.
- Yumibe N, Huie K, Chen KJ, Snow M, Clement RP and Cayen MN (1996) Identification of human

liver cytochrome P450 enzymes that metabolize the nonsedating antihistamine loratadine.

Formation of desloratadine by CYP3A4 and CYP2D6. *Biochem Pharmacol* **51**:165-172.