

博士論文

創薬段階での **mechanism-based inhibition (MBI)**
による薬物間相互作用回避に向けた
スクリーニング系構築と
MBI 発現メカニズムの解析

渡邊 亜紀子

博士論文

創薬段階での **mechanism-based inhibition (MBI)**
による薬物間相互作用回避に向けた
スクリーニング系構築と
MBI 発現メカニズムの解析

渡邊 亜紀子

目次

| | |
|--------------------------------------------------------|-----------|
| 略語 | 3 |
| 序論 | 4 - 12 |
| 第 1 章 | |
| CYP3A に対する MBI スクリーニング系を用いた臨床での薬物間相互作用リスク評価系の構築 | |
| 要約 | 14 |
| 序論 | 15 - 17 |
| 結果 | 18 - 21 |
| 考察 | 22 - 26 |
| 図表 | 27 - 33 |
| 第 2 章 | |
| 社内で合成されたフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A に対する MBI 発現メカニズムの解析 | |
| 1. フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 に対する MBI 発現メカニズムの解析 | |
| 要約 | 35 |
| 序論 | 36 - 37 |
| 結果 | 38 - 43 |
| 考察 | 44 - 51 |
| 図表 | 52 - 66 |
| 2. フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 および CYP3A5 に対する MBI 発現メカニズムの違い | |
| 要約 | 68 |
| 序論 | 69 - 71 |
| 結果 | 72 - 75 |
| 考察 | 76 - 79 |
| 図表 | 80 - 85 |
| 結論および今後の展望 | 86 - 91 |
| 謝辞 | 92 |
| 実験方法 | 93 - 102 |
| 参考文献 | 103 - 114 |

略語

| | |
|--------------------------|-----------------------------------------|
| AUC | area under the concentration-time curve |
| CL | clearance |
| CYP | cytochrome P450 |
| DDI | drug-drug interaction |
| HLM | human liver microsomes |
| IC₅₀ | 50% inhibitory concentration |
| K_I | apparent inhibitory constant |
| k_{inact} | maximum inactivation rate constant |
| k_{obs} | observed inactivation rate constant |
| LC | liquid chromatography |
| <i>m/z</i> | mass-to-charge ratio |
| MBI | mechanism-based inhibition |
| MI | metabolite-intermediate |
| MS/MS | tandem mass spectrometry |
| PDB | Protein Data Bank |
| R_t | retention time |

序論

市販されている大部分の薬物の体内からの消失経路は、主にシトクロム P450 (cytochrome P450, CYP)を初めとする種々の薬物代謝酵素による代謝であり、代謝で消失する市販薬の 75%程度に CYP が関与することが報告されている¹。また、CYP の superfamily には多くの subfamily が存在し、薬物代謝に関わる subfamily としては、CYP3A を筆頭に CYP1A2, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 および CYP2E1 等が知られている。

薬物代謝酵素を介した薬物間相互作用(drug-drug interaction; DDI)の中でも、特に酵素阻害作用を介した DDI は、阻害薬が併用薬の代謝を阻害することで、その血中暴露を過剰に上昇させ、臨床で重篤な副作用を引き起こす可能性がある。実際に CYP に対する阻害作用を介した DDI により、臨床で重篤な副作用を引き起こした結果、市場撤退した薬物は複数存在する（表 1）^{1,2}。そのような薬物には mibefradil のような強力な CYP3A の阻害剤や、terfenadine, astemizole および cisapride などの CYP3A の基質（被相互作用薬）が含まれる。例えば、抗高血圧薬である mibefradil は、脂質改善薬である statin 系薬剤である atorvastatin と併用した際、atorvastatin の主な代謝酵素である CYP3A を阻害することによって atorvastatin の血中濃度曲線下面積（area under the concentration-time curve, AUC）を 3 倍程度上昇させ、statin 系薬剤の副作用である横紋筋融解症を発症させた³。

他に、表 2 に示すように、mibefradil は lovastatin や simvastatin のような statin 系薬剤や、cyclosporin や tacrolimus のように治療域の狭い薬剤との重篤な副作用が報告され、発売から約 1 年で米国市場撤退を余儀なくされている^{4,5}。また、抗ヒスタミン薬である terfenadine は、CYP3A の阻害剤である ketoconazole などのazole 系抗菌薬と併用されることにより、その血中濃度が上昇し、副作用である QT 延長を発症したことから、市場撤退に至っている^{6,7}。このように、DDI リスクを有する薬物は社会的にも大きな問題を引き起こす可能性があることから、薬物療法における患者の安全性を確保する上で、できるだけ DDI リスクを回避した薬物を創製することが望ましい。そのため、DDI リスクを適切に評価する方法論の開発が必要である。

CYP を代表する薬物代謝酵素の阻害作用は、そのメカニズムから主に直接阻害と mechanism-based inhibition (MBI) に分けられる^{8,9}。直接阻害は化合物自体が代謝酵素の活性部位を可逆的にブロックして阻害作用を示すため、化合物の血中／組織中濃度が低下すれば阻害作用も消失する。一方、MBI は図 1 に示すように、特に CYP において化合物が代謝されて生成される反応性中間体がアポ蛋白かヘムに共有結合するか(irreversible inhibition)、ヘム鉄に配位結合して metabolite-intermediate (MI) complex を形成し(quasi-irreversible inhibition)、酵素を不活化するものである⁸。この阻害様式では血中／組織中から薬物が消失後も酵

素が新しく合成されるまで阻害作用が持続するため作用が強力であり、特に開発候補化合物として回避すべき薬物特性である。先述した mibefradil もその一例である。他に上市されている薬物の中で MBI を引き起こすものとして、マクロライド系抗菌薬の erythromycin や clarithromycin、抗 HIV 薬の ritonavir や delavirdine、抗高血圧薬の verapamil, diltiazem や nicardipine、ステロイド薬の ethynylestradiol などが知られているが¹⁰⁻¹²、それらのほとんどは DDI により併用薬の血中濃度を上昇させることが報告されている（表 3）¹³⁻¹⁶。

医薬品の研究開発においては、各ステージにおいて適切な CYP 阻害による DDI リスク評価を実施している¹。創薬段階においては主に in vitro での CYP 阻害評価を実施し、化合物の新規合成、評価を繰り返し、CYP 阻害作用のない化合物の獲得を目指す。CYP 阻害作用が回避されないまま開発候補化合物となった場合には、前臨床段階において詳細な DDI リスクアセスメントを実施し、実際に臨床でどの程度 DDI が起こり得るかを見積もる必要がある。DDI の予測には in vitro 試験で算出した化合物の CYP 阻害作用に関するパラメータと推定臨床血中濃度が必要となる。それを元に臨床 DDI 試験実施の必要性の有無を判断し、必要と判断された場合には、主に臨床第 II 相試験での既存薬を複数併用していることが想定される患者への化合物投与前に DDI 試験を実施しておく必要がある。臨床 DDI 試験では、対象とする CYP 分子種の代表的な基質をプローブ基質

とし、開発候補化合物がこのプローブ基質の体内動態に影響を与えるかどうかを評価する。これで臨床での DDI が問題とならないことが確認できれば臨床試験の継続が可能となるが、臨床 DDI 試験を実施することで全体の臨床試験スケジュールの遅延につながる場合がある。もしくは臨床で重篤な DDI が確認された場合には開発が中止となる可能性もある。そのため、化合物の DDI リスクポテンシャルの有無は臨床開発の成功に大きな影響を与えうる。

そこで本研究では、CYP 阻害作用の中でも特に MBI に着目し、創薬段階から MBI による DDI リスクを回避した化合物の合成展開を推進することを目的として以下の研究に取り組んだ。

第 1 章では、創薬初期段階から活用可能な、CYP3A に対するハイスループットな MBI スクリーニング系を構築した。本スクリーニング系の臨床 DDI リスク評価系としての妥当性を検証するため、市販薬の評価を実施した。評価した MBI ポテンシャルと臨床血中濃度の関係を明示し、臨床での DDI リスクの情報に基づいて zone 分類した。

第 2 章第 1 節では、MBI スクリーニングで MBI positive となった化合物の MBI 回避の合成展開の方策への提言に向けて、CYP3A に対して MBI を示すフルオロキノロン系抗菌薬の MBI 発現メカニズムの解析を試みた。MBI 結合性評価から、一連の化合物は側鎖構造の違いにより CYP3A4 に対する結合性が異なることが

示された。また CYP3A4 での代謝物構造解析から、MBI の原因構造を同定し、側鎖のアミノ基の結合する環状構造の違いが irreversible および quasi-irreversible inhibition の違いを生じている可能性を示した。さらに、CYP3A4 のドッキングスタディから、ヘム鉄との結合部位付近への立体障害の導入により MI complex 形成が阻害されうることを示した。

第 2 章第 2 節では、フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 と CYP3A5 に対する MBI 発現の違いを評価した。CYP3A4 の irreversible inhibitor は CYP3A5 に対しても同様に irreversible inhibition を示すのに対し、CYP3A4 の quasi-irreversible inhibitor は CYP3A5 に対しては阻害作用を示さなかった。両分子種から生成される代謝物は同じであるにも関わらず、MI complex 形成に差が生じるのは、両分子種の基質結合ポケット構造の違いが起因している可能性を CYP3A5 のホモロジーモデルと CYP3A4 の結晶構造との重ね合わせにより示した。

本研究結果を創薬段階での MBI 回避の合成展開に活用することにより、MBI による DDI リスクを回避した開発候補化合物を早期に獲得できれば、臨床試験の短縮および成功確立の向上にもつながることが期待される。

表 1 CYP が関与する薬物間相互作用により市場撤退した薬剤の例

| 薬剤名 | 用途 | 安全性上の問題 | 撤退年 |
|--------------|----------|---------|------|
| Terfenadine | 抗ヒスタミン剤 | QT 延長 | 1998 |
| Mibefradil | 狭心症 | QT 延長 | 1998 |
| Bromfenac | NSAID | 毒性 | 1998 |
| Astemizole | 抗ヒスタミン剤 | QT 延長 | 1999 |
| Cisapride | 消化管運動改善剤 | QT 延長 | 2000 |
| Alosetron | 潰瘍性大腸炎 | 毒性 | 2000 |
| Cerivastatin | 高脂血症 | 横紋筋融解症 | 2001 |
| Nefadozone | 抗うつ薬 | QT 延長 | 2003 |

文献 1 から引用した。

表 2 Mibefradil との相互作用が報告されている薬剤

| | | |
|------------------|--------------|--------------|
| Amiodarone | Flecainide | Quinidine |
| Astemizole | Flutamide | Simvastatin |
| Bepiridil | Halofantrine | Tacrolimus |
| Cisapride | Ifosfamide | Tamoxifen |
| Cyclosporin | Imipramine | Terfenadine |
| Cyclophosphamide | Lovastatin | Thioridazine |
| Desipramine | Mexiletine | Vinblastine |
| Erythromycin | Pimozide | Vincristine |
| Etoposide | Propafenone | |

文献 5 から引用した。

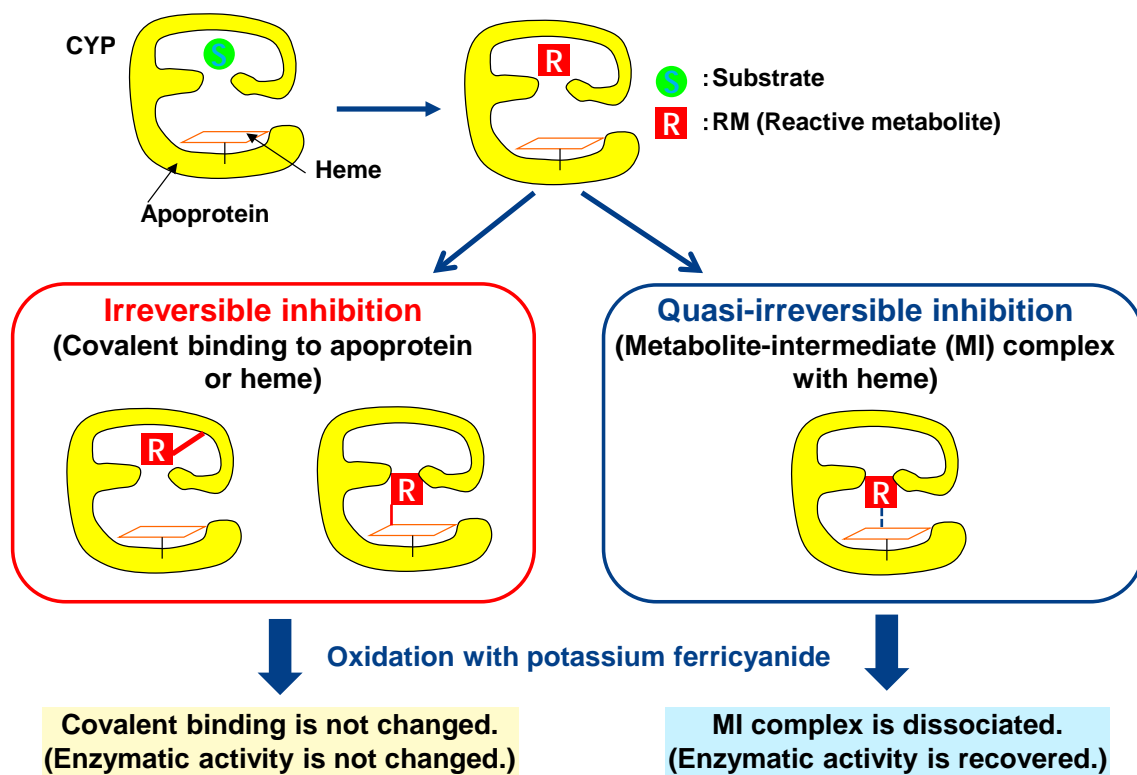


図 1. MBI 化合物による CYP 不活化メカニズム

表 3 CYP3A における MBI による薬物間相互作用の例

| Inhibitor | Substrate | AUC ratio | Ref. |
|------------------|-------------|-----------|------|
| Clarithromycin | Midazolam | 3.57-7.00 | 13 |
| | Triazolam | 3.65 | 13 |
| Erythromycin | Midazolam | 3.81-4.42 | 13 |
| | Triazolam | 2.06-3.65 | 13 |
| | Alprazolam | 2.47 | 13 |
| | Buspirone | 5.90 | 13 |
| | Cyclosporin | 2.15-2.22 | 13 |
| | Felodipine | 2.49 | 13 |
| | Simvastatin | 6.20 | 13 |
| Ritonavir | Alprazolam | 2.48 | 13 |
| Delavirdine | Amprenavir | 4.02 | 16 |
| Verapamil | Buspirone | 3.40 | 13 |
| | Midazolam | 2.92 | 13 |
| | Simvastatin | 4.60 | 13 |
| Diltiazem | Buspirone | 5.50 | 13 |
| | Lovastatin | 3.57 | 13 |
| | Midazolam | 3.75 | 13 |
| | Nifedipine | 2.22-3.11 | 13 |
| | Simvastatin | 4.82 | 13 |
| | Triazolam | 2.30-3.38 | 13 |
| Nicardipine | Propranolol | 1.47 | 15 |
| Ethinylestradiol | Midazolam | 1.21 | 14 |

第 1 章

CYP3A に対する MBI スクリーニング系を用いた 臨床での薬物間相互作用リスク評価系の構築

要約

CYP3A の MBI により引き起こされる DDI リスクを評価するため、ヒト肝ミクロソームでの CYP3A 代謝活性を指標とした MBI スクリーニング系を構築した。本スクリーニング系において 171 個の市販薬を評価し、その残存酵素活性(% remaining)と臨床での血液もしくは血漿中濃度、さらに臨床での DDI 情報から、171 個の市販薬を MBI による臨床での DDI 発現可能性に基づいて 4 つに分類した。この解析から、DDI の発現リスクは化合物自体の MBI の強さと臨床血中濃度に依存することが示された。% remaining が 80%以上では、臨床血中濃度によらず、臨床で DDI を発現した市販薬は存在しなかった (zone 1)。% remaining が 80%未満の市販薬はその臨床血中濃度によって DDI 発現リスクが異なり、それに基づいて zone 2-4 に分類した。本分類図は、創薬初期段階からの化合物の MBI による DDI リスク回避の合成展開のための指標として非常に有用と考えられた。また、MBI を引き起こす化合物の CYP3A への結合様式を確認するため、フェリシアン化カリウムを用いた MBI 結合性評価系を構築した。本評価系により、文献報告されている irreversible inhibitor と quasi-irreversible inhibitor を明確に区別することができた。化合物による MBI 結合性の情報は MBI 原因構造を解析する上で有用な情報となりうると考えられた。

序論

CYP はヒトにおける主要な薬物代謝酵素の一つである¹⁷。実際、代謝により消失する薬物の 75% 近くは CYP により代謝され、その CYP が関与する代謝のうち、半数は CYP3A が寄与していることが報告されている¹。そのため、CYP3A を阻害する薬物は、多くの CYP3A で代謝される併用薬の血中濃度に影響を与える可能性があるため、創薬段階から化合物の CYP3A に対する阻害作用は特に注意する必要がある。また MBI に関しては特に CYP3A が関与する報告例が多い^{11, 12}。このことから多くの製薬会社では創薬段階から CYP3A の MBI 評価を実施している¹⁸。MBI は化合物が代謝活性化された後、代謝酵素に結合してその活性を阻害する作用である。時間依存的に代謝活性化が進行し、その反応性中間体が代謝酵素に結合して酵素を阻害することから、in vitro においては、代謝酵素に対する化合物の反応時間依存的な阻害作用の増強によってその作用は確認される。つまり、preincubation 段階として化合物（阻害剤）と代謝酵素を一定時間反応させた後、incubation 段階として代謝酵素とその典型基質を反応させ、典型基質から生成される代謝物の濃度を LC/MS 等で測定することによって酵素活性を評価する。MBI 化合物である場合には、preincubation 時間依存的に酵素活性が低下する。主に図 2 に示すように、preincubation の有無での IC₅₀ 値の比較(IC₅₀ shift)や MBI に関するパラメータ (K_I および k_{inact}) の算出によって化合物の MBI

の程度を評価している^{2, 18, 19}。自動分注機を用いた自動化された IC₅₀ shift の評価系構築に関する報告例はあるが、その実際の創薬における活用法については十分に確立されているとはいえない状況だった^{20, 21}。

CYP3A の阻害評価系では、CYP3A の活性を確認するための典型基質として midazolam, testosterone, terfenadine および nifedipine などがよく用いられている²²。しかし、CYP3A は分子内に複数の結合サイトが存在すると考えられていることから、結合化合物の可逆的な CYP3A に対する阻害作用は、用いる基質によって異なる例が多数報告されている²³⁻²⁵。そのため、複数の基質を用いて阻害評価をすることが推奨されているが、MBI に関しては用いる基質による阻害結果への影響に関しては検討されていなかった。今回 CYP3A の阻害試験において使用例の多い midazolam, testosterone および nifedipine を用いて MBI 化合物の阻害作用を比較することとした。

MBI は化合物から代謝反応により生成された反応性中間体が CYP に結合することによって阻害作用を示すが、その反応性中間体の結合性によって irreversible inhibition と quasi-irreversible inhibition に分けられる (図 1)⁸。前者は反応性中間体が CYP のアポ蛋白もしくはヘムへ共有結合するものであるが、後者は反応性中間体が還元状態のヘム鉄と配位結合による metabolite-intermediate (MI) complex を形成するものである²⁶。In vitro において、MI complex はフェリシア

ン化カリウムによってヘム鉄を酸化することによって解離し、代謝酵素の活性は回復する^{27, 28}。このメカニズムを利用して **MBI** 化合物の両結合性を分離評価することが可能である。

そこで本研究においては、創薬段階での **CYP3A** に対する **MBI** による **DDI** のリスクアセスメント系を確立することを目的とし、自動分注機を用いたハイスループットのスクリーニング系を構築した。また用いる **CYP3A** の典型基質による **MBI** スクリーニングの結果を比較した。さらに **MBI** の結合性に関する評価系も構築し、**MBI** スクリーニング結果、**DDI** リスク、および **MBI** 結合性との関係について考察した。

結果

CYP3A の MBI スクリーニング系における基質依存性

ヒト肝ミクロソームを用いた MBI スクリーニング系において、CYP3A の典型基質である midazolam、nifedipine および testosterone に対する阻害作用を比較した。各典型基質に対する MBI 陽性の対照化合物である ethynylestradiol (50 μ M) および MBI 陰性の対象化合物である ketoconazole (100 nM) の MBI の指標である 30 min preincubation 後の残存酵素活性(% remaining)を比較した (表 4)。また、各典型基質に対する市販薬 24 化合物の % remaining を比較した (図 3)。さらに、各典型基質に対する代表的な MBI 化合物である erythromycin、clarithromycin および verapamil の K_I および k_{inact} 値を算出し、比較した (図 4 および表 5)。各阻害剤の % remaining 値、および K_I および k_{inact} 値は使用する基質によらず同程度の値が得られることが確認された。以後の評価系には基質として midazolam を使用することとした。

CYP3A の MBI によって引き起こされる DDI のリスク評価

MBI スクリーニング結果から、臨床で生じうる DDI のリスクを予測することが可能か評価するため、MBI を引き起こすことが報告されている化合物に加え、近年の市場での売り上げ情報等を元に収集した市販薬 171 化合物を本 MBI スク

リーニング系で評価した。化合物の評価濃度は最初 100 μ M に設定し、CYP3A への直接阻害作用が強い化合物は至適濃度に希釈して評価した。MBI スクリーニングでの % remaining の結果と臨床での血中もしくは血漿中濃度²⁹ との関係を図 5 に示した。さらに併用薬の AUC 上昇率 2 倍以上を significant DDI の基準^{30, 31}として、評価した化合物を併用薬の AUC の上昇率の情報^{13, 32}から、AUC 上昇率 2 倍以上 (moderate もしくは strong DDI)、2 倍未満 (weak DDI) および AUC 上昇率の情報なし (weak もしくは little DDI) の 3 つに分類し、図 5 中のポイントを色分けして表示した。図 5 中で、DDI リスクの低い化合物は主に 80% remaining 以上に存在した。そこで、この 80% remaining 以上の領域は臨床血中濃度によらず MBI による DDI が生じるリスクは低いとして zone 1 と設定した。80% remaining より下の化合物は臨床血中濃度および DDI リスクから 3 つに zone 分けした。図 5 中の ethynylestradiol のように MBI ポテンシャルを有していても臨床血中濃度が低いために DDI 発現の可能性が低い領域を zone 2、一方、diltiazem, verapamil, clarithromycin, mibefradil および nefazodone 等のように MBI による DDI が問題となっている化合物を多く含む領域を zone 3 と設定した。また、強い MBI ポテンシャルを有し、臨床血中濃度が高い市販薬は delavirdine 以外になく、この領域は市販薬としての素質が低いと考えられ、zone 4 と設定した。

MBI 結合性評価

MBI を引き起こす化合物の CYP3A への結合様式を確認するため、フェリシアン化カリウムを用いた MBI 結合性評価系を構築した。MBI スクリーニングによって MBI であると判定された化合物を本評価系で評価した（表 6）。Diltiazem, verapamil, nifedipine, amlodipine, erythromycin, clarithromycin および troleandomycin のそれぞれとヒト肝ミクロソーム中で 30 分間 preincubation した後低下した CYP3A の代謝活性（% of control）は、フェリシアン化カリウム処理により回復した。これらは quasi-irreversible inhibitor であると考えられた。これらの化合物の代謝中間体は CYP3A のヘム鉄と複合体（MI complex）を形成することが報告されている^{33, 34}。また、sertraline も quasi-irreversible inhibitor であることが示された。一方、clozapine, delavirdine, mibefradil および ethinylestradiol のそれぞれとヒト肝ミクロソーム中で 30 分間 preincubation した後低下した CYP3A の代謝活性は、フェリシアン化カリウムの処理によって回復しなかった。これらは irreversible inhibitor であると考えられた。これらの化合物の代謝中間体は細胞内やミクロソーム蛋白、もしくはヘムに共有結合することが報告されている³⁴。また、prazosin, bromocriptine, bepridil, bupivacaine および buprenorphine も irreversible inhibitor であることが示された。以上より、本評価系によって MBI

化合物の CYP3A への irreversible もしくは quasi-irreversible な結合が区別できることが示された。

考察

CYP3A の MBI による DDI リスクを評価するため、被験化合物を 1 濃度 30 分 preincubation した後の残存酵素活性(% remaining)を指標とした MBI スクリーニング系を構築し、市販薬を用いて評価系の妥当性を検証した。In vivo における DDI リスクは化合物の MBI ポテンシャルと血中濃度に依存するため、MBI による DDI リスクはこれら 2 つの要因を考慮して分類した (図 5)。MBI による DDI リスクが最も低いとされる zone 1 には in vivo で DDI を引き起こすことが知られている fluvoxamine, fluconazole および cimetidine が存在した。これらは CYP3A に対して MBI ではなく、強力な直接阻害作用を有している¹³。Ethinylestradiol は強力な MBI を示すが、血中濃度が 1 nM 以下と非常に低いため、in vivo での DDI は引き起こさない^{14, 35}。Diltiazem, verapamil, clarithromycin, erythromycin, mibefradil および nefazodone 等の化合物は MBI により in vivo での DDI を引き起こすことが報告されている^{11-13, 15}。Mibefradil および nefazodone はいずれも CYP3A4 を介した DDI のために市場から撤退している¹。Buprenorphine は、ベンゾジアゼピン系化合物と重篤な DDI を引き起こすことが知られている³⁶。多くのベンゾジアゼピン系化合物は CYP3A4 の基質である³⁷。Buprenorphine の CYP3A に対する直接阻害作用は弱く、その臨床血中濃度は K_i 値よりも十分低いため、DDI の原因は薬物動態的な要因ではなく、薬効の相乗効果によるものと

考えられていた^{38,39}。しかし、今回の結果から、buprenorphine は強力な MBI 化合物であることが示されたため、ベンゾジアゼピン系化合物との DDI の原因の一部には薬物動態的な要因も含まれるのではないかと示唆された。そのため、ethynylestradiol を含む領域を、MBI ポテンシャルを有していても臨床血中濃度が低いために DDI 発現の可能性が低いとして zone 2、diltiazem や buprenorphine を含み、MBI による DDI 発現の可能性が高い領域を zone 3 とした。

強い MBI ポテンシャルを有し、臨床血中濃度が高い市販薬は抗ウイルス薬の delavirdine のみだった。Delavirdine は HIV の治療に用いられ、その使用方法是例外的である。同じく抗ウイルス薬であり、CYP3A4 で代謝される amprenavir は、その血中濃度を維持するために CYP3A の強力な阻害剤である delavirdine と併用される¹⁶。通常、強力な MBI ポテンシャルを有し、薬効発現に高い血中濃度を必要とする化合物は市販薬となり得ないものと考えられ、この領域を zone 4 と設定した。

図 5 に示す相関図から、DDI リスクを回避した化合物を生み出すためには、化合物の MBI ポテンシャルを低減させるか、化合物の薬理活性を向上させることによって臨床血中濃度を低減させる必要があるといえる。この相関図は薬物の初期探索段階において MBI による DDI リスクを回避した化合物の合成展開の方針を考える上で非常に有用である。化合物の in vitro の薬理活性や類似薬の情

報等から、臨床血中濃度を見積もり、それと MBI スクリーニングの結果から、化合物の DDI リスクを評価することが可能である。それを元に、その化合物の DDI リスク回避のために有効な方策を示すことが可能になると考えられる。

MBI 評価系において、使用する CYP3A 基質の違いが MBI 評価結果に影響を与えるか検討した。通常、CYP3A に対する *in vitro* の阻害試験において、midazolam, testosterone, terfenadine, erythromycin または nifedipine 等が基質として使用される²²。CYP3A は複数の基質結合部位を有するため、*in vitro* の CYP3A 阻害試験で使用する基質によって被験化合物の阻害能が異なることが報告されている²³⁻²⁵。そのため、*in vivo* での DDI リスクの過小および過大評価を避けるため、*in vitro* の CYP3A 阻害試験では複数の基質を用いて評価することが推奨されている。しかし、CYP3A に対する MBI の評価結果が使用する基質に依存するかどうかは示されていない。そこで今回、midazolam, testosterone および nifedipine を基質とした際の MBI 評価結果を比較した。MBI スクリーニング系において、それぞれを基質とした際の市販薬 24 化合物の % remaining 結果は良く相関した (図 3)。また、それぞれの基質に対して代表的な MBI 化合物である erythromycin, clarithromycin および verapamil の K_I 値および k_{inact} 値を算出したところ、使用する基質によらず同程度の値が得られた (図 4 および表 5)。従って、これらの評価系で検出される化合物の MBI ポテンシャルは、評価系で使用する基質に依存しないと考え

られる。これらの結果から、本研究および今後の評価では *in vivo* での DDI に関する情報が豊富な midazolam を基質として用いることとした。MBI 化合物から生成される反応性中間体は、P450 のアポ蛋白やヘムに結合し、基質結合ポケットを占有して酵素を不活化させるため、他の化合物はこの不活化された酵素にアクセスできないと考えられる。そのため、用いる基質によって MBI の評価結果が変わらないという結果は妥当であると考えられる。

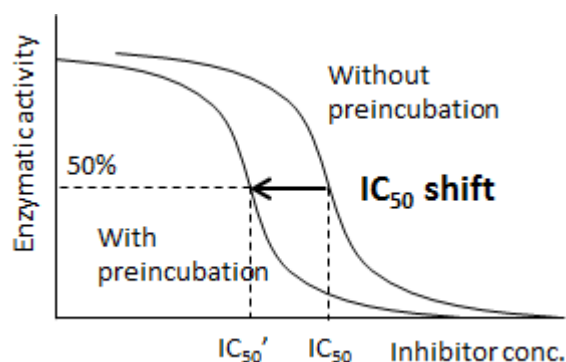
ミクロソームや細胞内の蛋白に共有結合する MBI 化合物は、DDI に加えて肝毒性を誘発する可能性があることが知られている^{34,40}。また、末端アセチレンを有する化合物は、その反応性代謝物が P450 のヘムを irreversible にアセチル化すること、求電子性反応性代謝物やラジカル種を生成する化合物は、P450 のアポ蛋白に共有結合することが知られている^{8,9}。一方、methylenedioxybenzene、alkylamine および hydrazine 等の化合物はヘム鉄と quasi-irreversible な MI complex を形成することが知られている^{8,9}。従って、MBI 化合物の結合性に関する情報は、肝毒性誘発の可能性や、MBI を引き起こす化学構造の推定に有用であると考えられる。そのため、MBI 化合物の CYP3A への結合様式を確認する評価系を構築した。本評価系は、quasi-irreversible な MI complex はフェリシアン化カリウムによるヘム鉄の酸化により解離して、P450 の酵素活性は回復するが、irreversible な結合により阻害された酵素活性は回復しないという作用を利用している^{27,28}。

MBI スクリーニング系において MBI positive と判定された化合物を MBI 結合性評価系で評価した (表 6)。肝ミクロソーム中で quasi-irreversible inhibitor であると報告されている diltiazem, verapamil または nicardipine 等を 30 分間 preincubation した後に低下した CYP3A の酵素活性は、フェリシアン化カリウムの添加により preincubation を実施しなかった場合と同程度まで回復した。一方、細胞内やミクロソームの蛋白に共有結合することが報告されている clozapin や delavirdine、また、P450 のへムに共有結合することが報告されている ethynylestradiol と 30 分間 preincubation して低下した CYP3A の酵素活性は、フェリシアン化カリウムの添加によって回復しなかった。Clozapin の MBI ポテンシャルは他の化合物と比べて強くないが、実際、MBI よりも特異体質性毒性 (idiosyncratic toxicity: IDT) を起こすことが報告されている⁴⁰。MBI 結合性の評価は DDI に加えて反応性代謝物の生体内のタンパク質等への共有結合によって引き起こされる薬物誘発性毒性のリスク評価としても有用であると考えられる。

以上より、本研究において、ハイスループットの MBI スクリーニング系を構築し、市販薬の評価から、MBI ポテンシャルと臨床血中濃度の関係を明示し、臨床での DDI リスクの情報に基づいて zone 分類した。また、MBI 結合性に関する評価系も構築した。これは、探索初期段階から臨床での DDI リスクを回避した合成展開を推進するのに非常に有用なツールとなった。

IC₅₀ shift 評価

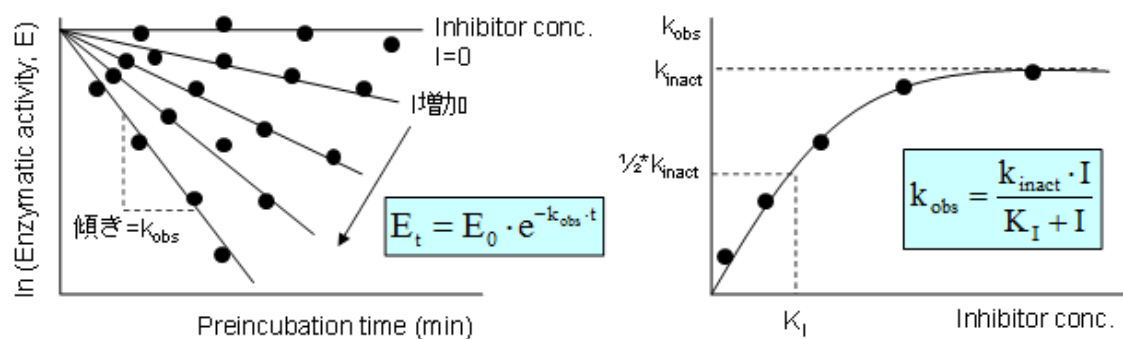
一定時間 preincubation した場合の阻害曲線の推移を評価



IC₅₀: 50% inhibitory concentration

MBI パラメータ (K_I および k_{inact} 評価)

阻害剤濃度および preincubation 時間を変化させたときの残存酵素活性を測定



E: Enzymatic activity

I: Inhibitor concentration

K_I: Apparent inhibitory constant

k_{inact}: Maximum inactivation rate constant

k_{obs}: Observed inactivation rate constant

図 2. In vitro での代表的な MBI 評価系

表 4. MBI スクリーニング系における各典型基質に対する MBI 陽性および陰性対照化合物の% remaining の日間変動

異なる 3 日間に得られた MBI 陽性対照化合物である ethynylestradiol (50 μ M)および陰性対照化合物である ketoconazole (100 nM)の残存酵素活性（% remaining）の平均値を比較した。

| % remaining | | | | | | |
|-------------|------------------|--------------|------------------|--------------|------------------|--------------|
| Substrate | Midazolam | | Nifedipine | | Testosterone | |
| Inhibitor | Ethynylestradiol | Ketoconazole | Ethynylestradiol | Ketoconazole | Ethynylestradiol | Ketoconazole |
| Days | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 | 3 |
| Mean | 33.7 | 108.0 | 35.7 | 112.3 | 46.9 | 101.8 |
| S.D. | 4.0 | 6.7 | 2.7 | 6.0 | 5.9 | 5.8 |
| C.V. (%) | 12.0 | 6.2 | 7.4 | 5.3 | 12.5 | 5.7 |

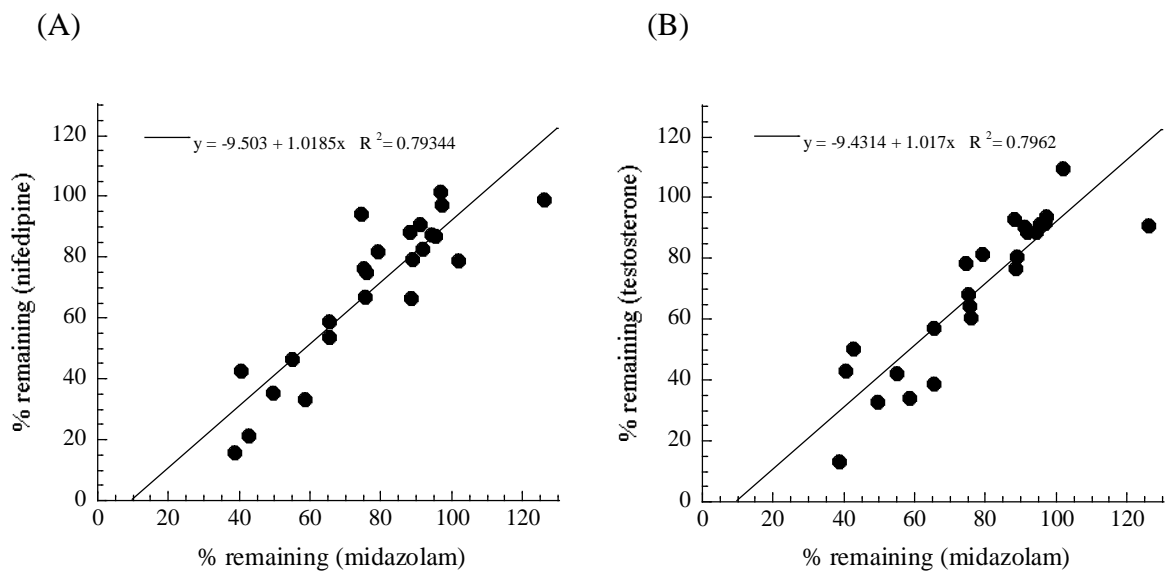


図 3. 各 CYP3A 基質に対する市販化合物での% remaining 比較

MBI スクリーニング系において、midazolam、nifedipine または testosterone を基質としたときの市販薬の残存酵素活性 (% remaining) を算出した。Midazolam もしくは nifedipine を基質としたときの % remaining の比較を A に、midazolam もしくは testosterone を基質としたときの % remaining の比較を B に示す。最小二乗法による線形近似を実線で示す。

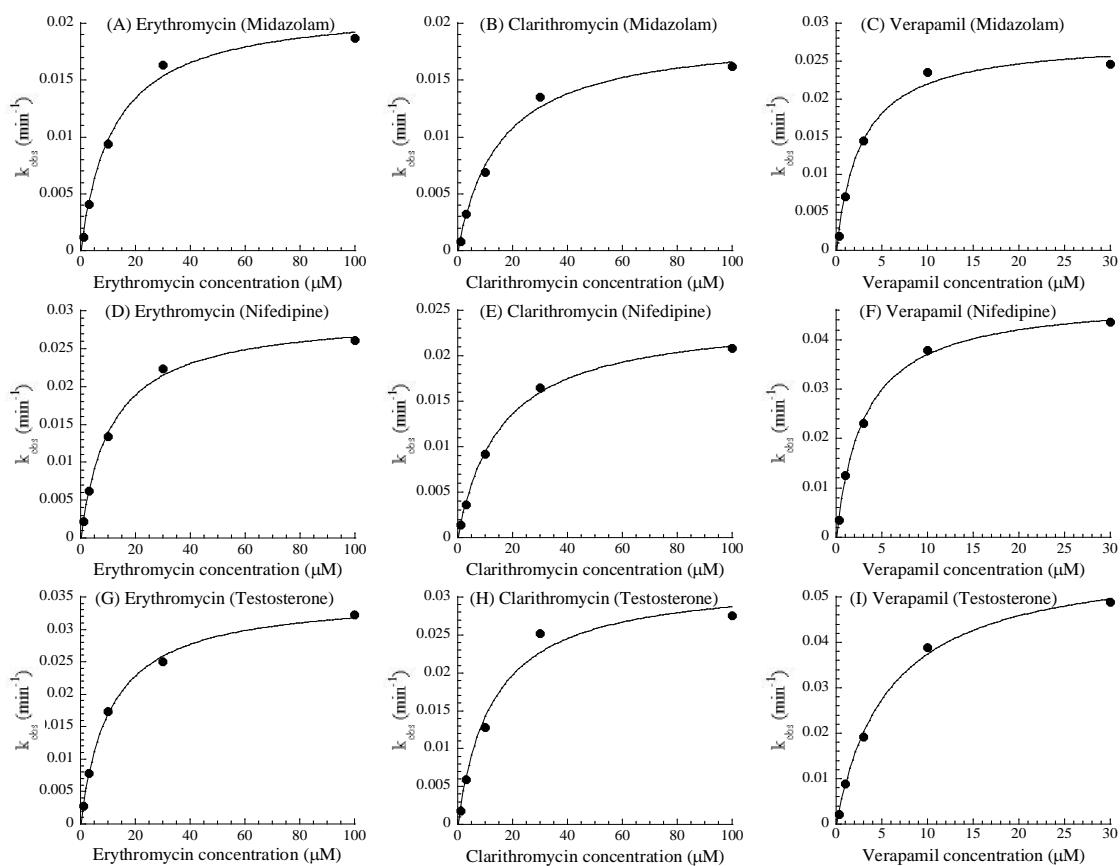


図 4. 各 CYP3A 基質 (midazolam, nifedipine および testosterone) に対する erythromycin, clarithromycin および verapamil による preincubation 時間および濃度依存的阻害

各阻害剤において、preincubation 時間 (0, 15 および 30 min) に対する代謝活性 (% of control) の自然対数をプロットしてその直線の傾き(k_{obs})を算出し、 k_{obs} を阻害剤濃度に対してプロットした。最小二乗法による式 4 への fitting line を実線で示す。

表 5. 各 CYP3A 基質に対する erythromycin, clarithromycin および verapamil

の K_I および k_{inact} 値

K_I および k_{inact} 値は図 4 に示す結果に基づいて算出された。

| Inhibitor | | Substrate | | |
|----------------|-----------------------------------|-----------|------------|--------------|
| | | Midazolam | Nifedipine | Testosterone |
| Erythromycin | K_I (μM) | 12.1 | 11.3 | 10.9 |
| | k_{inact} (min^{-1}) | 0.0215 | 0.0295 | 0.0352 |
| Clarithromycin | K_I (μM) | 15.5 | 15.9 | 12.9 |
| | k_{inact} (min^{-1}) | 0.0192 | 0.0244 | 0.0324 |
| Verapamil | K_I (μM) | 2.55 | 3.12 | 5.79 |
| | k_{inact} (min^{-1}) | 0.0277 | 0.0486 | 0.0591 |

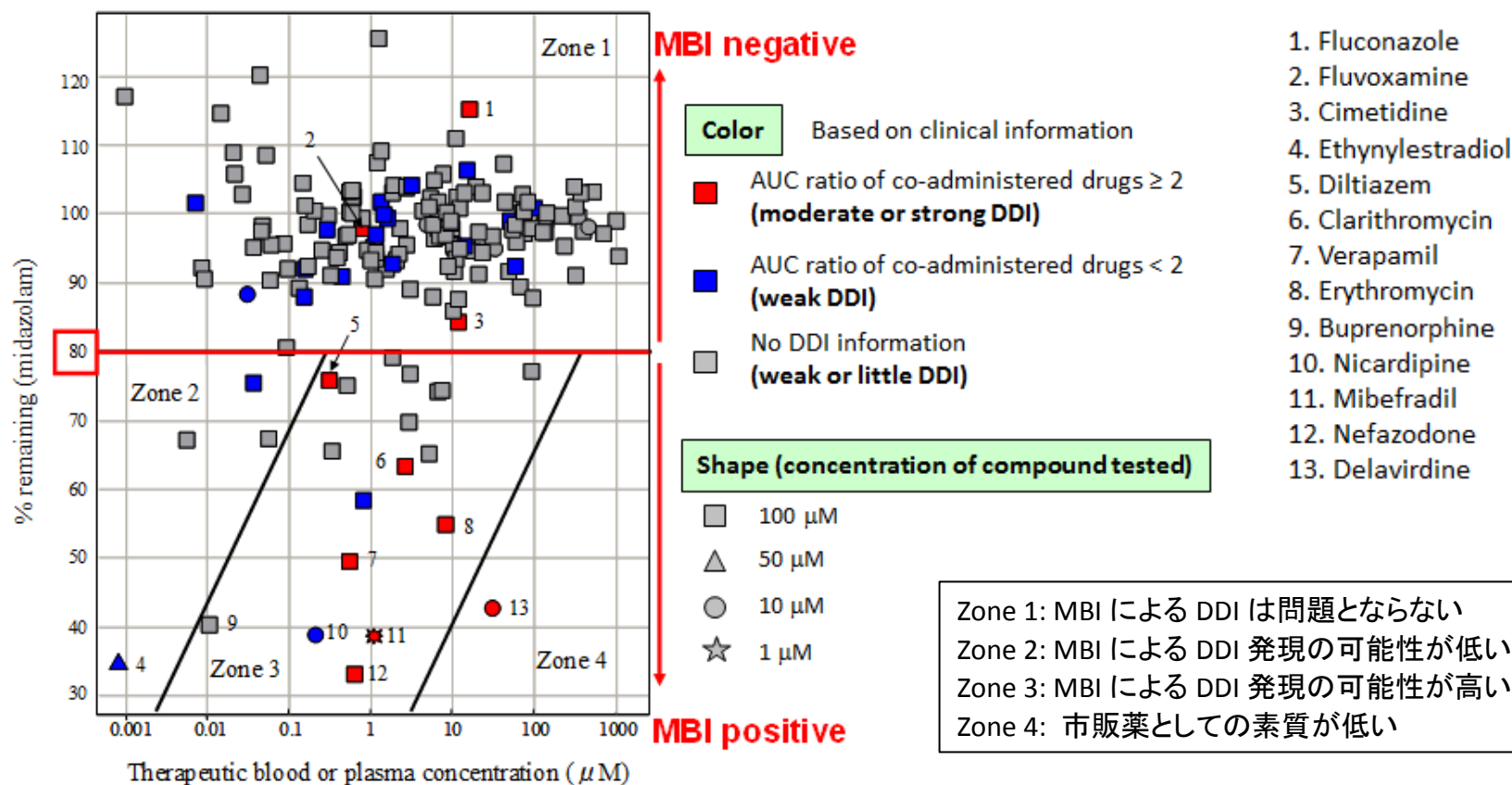


図5 市販薬での% remaining と臨床血中もしくは血漿中濃度の関係と臨床での DDI 発現可能性による分類

MBI スクリーニング系において、市販薬 171 化合物の残存酵素活性 (% remaining) を算出し、臨床血中もしくは血漿中濃度との関係を示した。各ポイントは併用薬の AUC 上昇率の情報に基づいて色分けし、DDI リスクに基づいて zone 分類した。

表 6. MBI 化合物の CYP3A に対する結合性評価の結果と文献情報のまとめ

| Inhibitor | Concentration (μ M) | % of control (0 min) | | % of control (30 min) | | Judgement | Reported Information |
|------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--------------------|----------------------------------------------------|
| | | -K ₃ Fe(CN) ₆ | +K ₃ Fe(CN) ₆ | -K ₃ Fe(CN) ₆ | +K ₃ Fe(CN) ₆ | | |
| Diltiazem | 100 | 85.7 | 92.5 | 62.3 | 90.7 | Quasi-irreversible | MI-complex |
| Verapamil | 10 | 71.5 | 80.1 | 41.2 | 70.1 | Quasi-irreversible | MI-complex |
| Nicardipine | 1 | 58.3 | 75.5 | 53.3 | 96.6 | Quasi-irreversible | MI-complex |
| Amlodipine | 100 | 68.0 | 72.1 | 49.3 | 73.2 | Quasi-irreversible | MI-complex |
| Erythromycin | 100 | 71.4 | 88.1 | 51.0 | 73.5 | Quasi-irreversible | MI-complex |
| Clarithromycin | 100 | 74.8 | 89.7 | 53.7 | 76.2 | Quasi-irreversible | MI-complex |
| Troleandomycin | 100 | 49.4 | 68.2 | 39.2 | 66.9 | Quasi-irreversible | MI-complex |
| Sertraline | 100 | 51.0 | 65.1 | 40.3 | 73.2 | Quasi-irreversible | |
| Clozapine | 100 | 76.5 | 76.4 | 62.6 | 66.3 | Irreversible | Covalent binding to cellular proteins and GSH |
| Delavirdine | 10 | 42.3 | 66.1 | 27.3 | 27.9 | Irreversible | Covalent binding to microsomal proteins |
| Mibefradil | 1 | 32.4 | 41.4 | 24.5 | 24.8 | Irreversible | Irreversible binding |
| Ethinylestradiol | 50 | 45.8 | 63.5 | 30.2 | 31.4 | Irreversible | Covalent binding to apoproteins and heme of CYP |
| Prazosin | 100 | 93.9 | 96.8 | 68.6 | 75.2 | Irreversible | |
| Bromocriptine | 1 | 70.4 | 87.7 | 63.2 | 65.5 | Irreversible | |
| Bepridil | 100 | 63.4 | 63.5 | 48.9 | 52.0 | Irreversible | |
| Bupivacaine | 100 | 88.1 | 93.0 | 57.6 | 66.3 | Irreversible | |
| Buprenorphine | 100 | 42.1 | 52.7 | 17.8 | 19.5 | Irreversible | |

第 2 章

社内で合成されたフルオロキノロン系抗菌薬の
CYP3A に対する **MBI** 発現メカニズムの解析

第 1 節

フルオロキノロン系抗菌薬の **CYP3A4** に対する **MBI**
発現メカニズムの解析

要約

社内のフルオロキノロン系抗菌薬(compound 1-10)の CYP3A4 に対する MBI 発現メカニズムを解析した。MBI 結合性評価から、評価した化合物の側鎖構造の違いにより CYP3A4 に対する結合性が異なることが示され、irreversible inhibitor (compound 1-5)と quasi-irreversible inhibitor (compound 6-9)とに分類された。

Quasi-irreversible inhibitor については CYP3A4 発現系との反応液の吸光度解析から、MI complex の形成が確認された。代謝物構造解析から、irreversible inhibitor からは側鎖のシクロプロパン環が開環した代謝物が検出された。このことから、開環反応の過程で生成した炭素ラジカルが CYP3A4 に対して irreversible に結合していると示唆された。一方、quasi-irreversible inhibitor からは側鎖のアミノ基が代謝されて生成したオキシム体が検出された。このことから、オキシム体生成過程の中間体であるニトロソ体が MI complex を形成していると示唆された。

Compound 8 のアミノ基の根元の炭素にメチル基を導入した compound 10 は CYP3A4 に対する阻害作用は示さず、MI complex の形成も確認されなかったが、代謝物としてオキシム体が検出された。CYP3A4 とのドッキングスタディから、アミノ基に隣接するメチル基はその立体障害によりヘム鉄とニトロソ基との MI complex 形成を阻害すると考えられた。

序論

社内で新規フルオロキノロン系抗菌薬として compound 1 および 8 が開発された^{41,42}。これらの化合物は *in vitro* での評価から、CYP3A に対して MBI ポテンシャルを有することが明らかとなった^{43,44}。MBI による DDI 発現のリスクを有する化合物の臨床試験を進めるには、臨床においてその化合物が阻害する薬物代謝酵素の典型基質との DDI 試験を必要とするが、その試験の実施前にヒトに化合物投与後の血漿サンプル中の薬物代謝酵素の内因性基質の変動を評価して DDI リスクを見積もることが試みられている。CYP3A に関しては、糖質コルチコイドである cortisol (F) が CYP3A により代謝をされて 6 β 水酸化体、6 β -hydroxycortisol (6 β -OHF) となり、両者は尿中へ排泄されることから、cortisol の見かけの 6 β 水酸化クリアランス（尿中 6 β -OHF 量を血漿中 cortisol の AUC で除したもの： $CL_{6\beta\text{-OHF}} = X_{6\beta\text{-OHF}}/AUC_F$ ）を化合物による CYP3A 活性変動の指標として用いることが提唱されている^{45,46}。実際、compound 1 の臨床第 I 相試験において、血漿中 cortisol および尿中 6 β -OHF 濃度を測定し、compound 1 を 1200 mg、15 日間投与後の $CL_{6\beta\text{-OHF}}$ を算出したところ、placebo 投与と比較して 27% 低下していることが示された⁴³。この低下は *in vitro* から算出した compound 1 の MBI パラメータより見積もられた肝臓中の活性型 CYP3A 量の低下率 25-53% とほぼ一致した。このことから、compound 1 は臨床の投与条件下で MBI による

CYP3A4 の活性低下を引き起こす可能性が示唆された。CYP3A は多くの薬物の代謝に関わる酵素であることから、compound 1 は CYP3A により代謝される多くの薬物との DDI を引き起こしうると考えられる。

Compound 1 および 8 は共通のキノロン骨格を有しており、6 位と 7 位の側鎖が異なっている（表 7）。Compound 8 の 7 位側鎖のアミノ基の根元の炭素原子にメチル基を導入した compound 10 では、薬理活性を維持したまま MBI を回避していることが示された^{44,47}。しかしこれらフルオロキノロン系抗菌薬の MBI 原因構造や、compound 10 に導入されたメチル基の MBI 陰性化における効果は不明だった。そこで本研究では、社内で合成された一連のフルオロキノロン系抗菌薬（表 7）を用いて、MBI 発現メカニズムの解析を行った。

結果

CYP3A に対する結合性

一連のフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A に対する結合性を評価するため、ヒト肝ミクロソームを用いて MBI 結合性評価を実施した (表 8)。ヒト肝ミクロソーム中でフルオロキノロン骨格の 7 位側鎖のピロリジン環にシクロプロピルアミンを有する化合物(compound 1-5)と 30 分間 preincubation 後に不活化された CYP3A の代謝活性は、フェリシアン化カリウム処理によって回復しなかった。このことから、これらの化合物は irreversible inhibitor であることが示された。一方、フルオロキノロン骨格の 7 位側鎖の環状構造に一級アミンを有する化合物(compound 6-9)では、30 分間 preincubation 後に低下した酵素活性はフェリシアン化カリウム処理によって回復した。このことから、これらの化合物は quasi-irreversible inhibitor であることが示された。Compound 10 では 30 分間 preincubation による酵素活性の低下は観察されなかった。

これらの化合物を用いて CYP3A4 発現系においても MBI 結合性を評価した (図 6)。Compound 6-9 と 30 分間 preincubation した後に低下した酵素活性は、フェリシアン化カリウムの添加によって、preincubation しなかった場合と同等程度まで回復した。一方、compound 1-5 では 30 分間の preincubation により低下した酵素活性は、フェリシアン化カリウム処理により compound 3-5 ではわずかな

活性上昇が観察されたが、十分な活性の回復は見られなかった。これにより CYP3A4 に対して compound 1-5 は irreversible inhibitor、compound 6-9 は quasi-irreversible inhibitor と明確に区別できた。また、CYP3A4 はこれらの化合物のヒト肝ミクロソームで観察された CYP3A に対する MBI に関与する分子種の一つであることが示された。このことから、以後の評価には CYP3A4 発現系を使用した。

CYP3A4 に対する MBI パラメータ(K_I および k_{inact})評価

CYP3A4 発現系において、irreversible inhibitor の代表化合物として compound 1、および quasi-irreversible inhibitor の代表化合物として compound 6 の K_I および k_{inact} 値を算出した (図 7)。これらのパラメータから両化合物は異なる阻害特性を有することが示され、compound 1 は lower affinity ($K_I = 395 \pm 47 \mu\text{M}$) および higher reactivity ($k_{inact} = 0.459 \pm 0.024 \text{ min}^{-1}$)、compound 6 は higher affinity ($K_I = 7.21 \pm 1.38 \mu\text{M}$) および lower reactivity ($k_{inact} = 0.190 \pm 0.009 \text{ min}^{-1}$) であった。

CYP3A4 での MI complex 形成確認のための吸光度評価

前項での評価より、quasi-irreversible inhibitor であることが示された化合物群が MI complex を形成しているかを確認するため、CYP3A4 発現系と各化合物を

含む反応液に NADPH-generating system を添加後の波長 455 nm と 490 nm 間の吸光度差を 20 分間測定し、その時間推移をプロットした (図 8)。CYP3A4 の quasi-irreversible inhibitor の代表化合物として compound 6 および 8 を、CYP3A4 に対して阻害を示さない化合物として compound 10 を用いた。Compound 6 および 8 では、その吸光度差は時間依存的に増加し、約 15 分後にプラトーに到達したが、compound 10 では吸光度差の増加は観察されなかった。

CYP3A4 発現系での irreversible inhibitor の代謝物構造解析

フルオロキノロン系抗菌薬の irreversible inhibition の発現メカニズムを検討するため、irreversible inhibitor の代表化合物として compound 1 の CYP3A4 発現系で incubation した後のサンプル中の代謝物の構造を LC-MS/MS で解析した。検出された代謝物のマスクロマトグラムを図 9A に、マススペクトルデータを表 9 に示す。Compound 1 からは、シクロプロピルアミン部分が酸化された 4 つの代謝物、cpd1-M1, cpd1-M2, cpd1-M3 および cpd1-M4 が検出された。各代謝物の推定構造および MS/MS スペクトルの帰属を図 9B に示す。Cpd1-M1 および cpd1-M2 に関しては、pyrrolidinyl cyclopropylamine 部分の水酸化であると考えられた。Cpd1-M3 に関しては、側鎖のシクロプロパン環が開環した hydroxyethyl carbonyl 体であると考えられた。Cpd1-M4 も同じくシクロプロピル環が開環して生成さ

れた dihydroisoxazole 体と考えられた。他の irreversible inhibitor である compound 2 および 5 でも同様に代謝物の構造解析を実施した（図 10 および図 11、および表 9）。Compound 1 と同じくシクロプロパン環が開環した代謝物が検出された。

CYP3A4 発現系での quasi-irreversible inhibitor の代謝物構造解析

フルオロキノロン系抗菌薬の quasi-irreversible inhibition の発現メカニズムを検討するため、quasi-irreversible inhibitor の代表化合物として compound 6 の CYP3A4 発現系で incubation した後のサンプル中の代謝物の構造を LC-MS/MS で解析した。検出された代謝物のマスキロマトグラムを図 12A に、マスマスペクトルデータを表 9 に示す。Compound 6 からは、amino azaspiro[4.4]nonan 部分が酸化された 5 つの代謝物、cpd6-M1, cpd6-M2, cpd6-M3, cpd6-M4 および cpd6-M5 が検出された。各代謝物の推定構造および MS/MS スペクトルの帰属を図 12B に示す。

Cpd6-M1 および cpd6-M2 に関しては、amino azaspiro[4.4]nonan 部分の水酸化でないと考えられた。Cpd6-M3 に関しては、一級アミンが酸化されて生成されたオキシム体と考えられた。Cpd6-M4 および cpd6-M5 はそれぞれ酸化的脱アミノ化により生成した水酸化体およびケト体であると考えられた。他の

quasi-irreversible inhibitor である compound 8 においても同様に代謝物の構造解析を実施した（図 13 および表 9）。Compound 6 と同じく、アミノ基が酸化されて

生成されたオキシム体(cpd8-M1)とニトロ体(cpd8-M3)が検出された。Compound 8 の一級アミンの根元の炭素にメチル基を導入し、CYP3A4 に対して阻害作用を示さなかった compound 10 においても同様に代謝物構造解析を実施した。検出された代謝物のマスキロマトグラムを図 14A に、マススペクトルデータを表 9 に示す。Compound 10 からは、amino azaspiro[2.4]heptan 部分が酸化された 4 つの代謝物、cpd10-M1, cpd10-M2, cpd10-M3 および cpd10-M4 が検出された。各代謝物の推定構造および MS/MS スペクトルの帰属を図 14B に示す。Compound 6 および 8 と同様に、アミン酸化が初発と考えられる代謝物、ヒドロキシルアミン体 (Cpd10-M2)、ニトロソ体(Cpd10-M1)およびニトロ体(Cpd10-M4)が検出された。Cpd10-M3 はニトロ体(cpd10-M4)の azaspiro[2.4]heptan 部分の酸化体と考えられた。以上より、compound 10 でも同様の代謝反応が進行していることが示された。

Compound 6 およびそのニトロソ体と CYP3A4 とのドッキングスタディ

Quasi-irreversible inhibitor のアミノ基の根元の炭素原子に導入されたメチル基の効果が CYP3A4 との結合に与える影響を検討するため、quasi-irreversible inhibitor の代表化合物である compound 6 とそのニトロソ体の CYP3A4 とのドッキングスタディを実施した。Compound 6 とそのニトロソ体に対して、それぞれ典型的な鉄配位様式を保つようなドッキングモデルを得た (図 15A および図

16A)。Compound 6 の場合、アミノ基の窒素原子とヘム鉄との距離は 2.25Å、角度 θ_1 (C-N-Fe)は 110.0°、ニトロソ体の場合は、ニトロソ体の窒素原子とヘム鉄との距離は 2.35Å、角度 θ_2 (C-N-Fe)は 130.0°であった。これらのドッキングモデルは特にヘム鉄周辺については確からしいと考えられ、以降の解析に利用することとした。これらのドッキングモデルにおいて、化合物のアミノ基およびニトロソ基の根元の炭素原子にメチル基を追加した(それぞれ図 15B および図 16B)。導入されたメチル基はいずれのモデルにおいてもヘム鉄と立体障害を起こすことが示された。

考察

本研究では、表 7 に示す共通のキノロン骨格を有する一連のフルオロキノロン系抗菌薬による CYP3A に対する MBI 発現メカニズムを明らかにすることを目的とした。まずこれらの化合物の結合様式を調べるため、ヒト肝ミクロソームを用いた MBI 結合性評価を実施した。Compound 1-9 は CYP3A に対して阻害作用を示し、そのうち compound 1-5 は irreversible inhibitor、compound 6-9 は quasi-irreversible inhibitor に分類された（表 8）。この分類はキノロン母核の 7 位側鎖構造によって異なり、compound 1-5 はピロリジン環上にシクロプロピルアミンを有し、compound 6-9 は一級アミンを有していた。Compound 8 のアミノ基の根元の炭素原子にメチル基を導入した compound 10 は CYP3A に対して阻害作用を示さなかった。また CYP3A4 発現系を用いた結合性評価においても上記と同様の結果が得られた（図 6）。このことから、ヒト肝ミクロソームで観察された一連のフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A に対する阻害には、CYP3A サブファミリーの主要な分子種である CYP3A4 が関与していることが示されたため、以後の MBI 発現メカニズムの詳細解析には CYP3A4 発現系を用いることとした。

CYP のヘム鉄と化合物との配位結合により形成される MI complex は 455 nm 付近に特徴的な Soret ピークを示すことから、MI complex を形成する化合物を CYP と反応させた際、時間依存的な MI complex 量の増加に伴って、455 nm と

490 nm の吸光度差が増加することが報告されている^{26, 27, 48}。このことを利用して quasi-irreversible inhibitor による CYP3A4 との MI complex 形成を確認した。Compound 6 および 8 では、CYP3A4 との反応において吸光度差の時間依存的な増加が観察されたが、compound 10 では観察されなかった（図 8）。また、この compound 6, 8 および 10 の吸光度差の値の大小は、図 6 に示される 30 min preincubation 後の CYP3A4 に対する阻害作用の強弱を反映していた。このことから、compound 6 および 8 に代表される quasi-irreversible inhibitor は CYP3A4 との MI complex を形成しており、compound 10 は MI complex を形成しないと考えられた。

薬物代謝の観点から、一連のフルオロキノロン系抗菌薬が CYP3A4 に対して irreversible および quasi-irreversible inhibition を起こすメカニズムを考察するため、両阻害様式の代表化合物の CYP3A4 により生成した代謝物の構造解析を行った。確認された代謝物を元に推定した compound 1 および 6 の代謝経路を図 17 に示す。Compound 1 からは特徴的な代謝物としてシクロプロパン環が開環して生成された hydroxyethyl carbonyl form の cpd1-M3 が検出された（図 9）。シクロプロピルアミンの代謝に関する文献情報^{49, 50} から、アミノ基の一電子酸化により N-カチオンラジカルが生成し、隣接する歪んだシクロプロピル環が開環したものと考えられた。その結果生成された C ラジカル中間体の水酸化およびイミンの

ケト体への加水分解を経て cpd1-M3 が生成されたと考えられた。この C ラジカル中間体が CYP3A4 に irreversible に結合するものと考えられた。また cpd1-M3 の前駆体であると考えられる hydroxylated imine intermediate から dihydroisoxazole form の cpd1-M4 が生成されたと考えられた。同様のシクロプロピルアミン部分の開環した代謝物は他の irreversible inhibitor の compound 2 および compound 5 からも検出された (図 10 および図 11)。

一方、compound 6 においては irreversible inhibitor とは異なり、環状構造が開環した代謝物は検出されなかった。Compound 6 からは特徴的な代謝物としてニトロソ体の生成を示唆するオキシム体の cpd6-M3 が検出された (図 12)。一般的に、ニトロソ体は不安定なため、より安定なオキシム体に変換されることが知られている⁵¹。Compound 6 はまず hydroxylamine form に酸化された後、ニトロソ体を生成し、これが CYP3A4 と MI complex を形成して quasi-irreversible inhibition を引き起こすと考えられた。他の quasi-irreversible inhibitor である compound 8 からはオキシム体とニトロ体が検出された (図 13)。これらもニトロソ体を経て生成されると考えられる。

代謝物構造解析の結果から、irreversible および quasi-irreversible inhibitor 共に側鎖のアミノ基の一電子酸化による N ラジカル生成を初発代謝とするものの、アミノ基の結合する環状構造の違いから、以後の反応が異なると考えられた。

Irreversible inhibitor のアミノ基が結合している三員環の歪みエネルギーは quasi-irreversible inhibitor の五員環よりも大きいため、N ラジカルが不安定であり、ラジカル反応によってシクロプロパン環が開環して C ラジカルが生成し、これが CYP3A4 のアポ蛋白に共有結合して irreversible inhibition を引き起こすと考えられる。一方、compound 6 では五員環の歪みが少なく N ラジカルが比較的安定なため、そのままアミン上で水酸化が起こり、ニトロソ体を生成して MI complex を生成するものと考えられる。つまり、両者のアミノ基の結合している環状構造の違いにより CYP3A4 による反応性代謝中間体の生成経路が異なるため、CYP3A4 に対する結合性が異なると示唆され、これは今回の他のフルオロキノロン系化合物にも当てはまるといえる。また、この両者の反応性の違いは k_{inact} の差に反映されていると考えられ、compound 1 の k_{inact} は $0.459 \pm 0.024 \text{ min}^{-1}$ であり、compound 6 の $0.190 \pm 0.009 \text{ min}^{-1}$ より大きく、より反応性が高いことが示されている。

Quasi-irreversible inhibitor の lapatinib では、ヒト肝ミクロソーム中で lapatinib をインキュベーションして MI complex を形成させた後、遠心して CYP に結合していない化合物を取り除いた後でフェリシアン化カリウム処理をすることで、処理しない場合と比較して、ヘム鉄から外れたニトロソ体とニトロソ体から生成されるオキシム体の量の増加が確認された⁵²。このことから、実際にニトロソ

体がへム鉄に結合していることが示唆されている。本研究においても同様に、compound 6 のニトロソ体が *quasi-irreversible inhibition* の原因構造であることを直接的に確認するため、compound 6 の CYP3A4 との反応液のフェリシアン化カリウム処理の有無での代謝物量を比較した。しかし、今回はフェリシアン化カリウム処理の有無で代謝物量の違いは検出されなかった(data not shown)。へム鉄に結合している代謝物の量に対して、蛋白への非特異的な結合が無視できないレベルであったため、フェリシアン化カリウム処理による差が検出できなかったのではないかと想定された。

CYP3A4 に対して阻害作用を示さない compound 10 では、アミノ基の根元の炭素原子に導入されたメチル基による立体障害のため、ニトロソ体生成の代謝反応が進行しないと想定していた。しかし、当初の予想に反し、compound 10 からアミノ基の酸化が初発と考えられる代謝物、hydroxylamine form の cpd10-M2、ニトロソ体の cpd10-M1、およびニトロ体の cpd10-M4 が検出され、compound 10 でも同様の代謝反応が進行していることが示された (図 14)。マスキロマトグラム上で compound 10 から生成される代謝物のピークエリアは compound 6 のものと同程度であり(data not shown)、CYP3A4 を阻害するのに十分な反応性代謝物が生成されていることが示唆された。そこで、compound 10 のメチル基は

CYP3A4 のヘム鉄との MI complex 形成を阻害しているのではないかと想定された。

Quasi-irreversible inhibitor のアミノ基に隣接するメチル基が CYP3A4 との結合に与える影響を検討するため、代表化合物として compound 6 とそのニトロソ体と CYP3A4 とのドッキングスタディを実施した。Compound 6 とそのニトロソ体に対して、それぞれ典型的な鉄配位様式を保つドッキングモデルを得た (図 15A および図 16A)。また、これらのドッキングモデルにおいて、化合物のアミノ基およびニトロソ基の根元の炭素のメチル基を追加した (図 15B および図 16B)。追加したメチル基はいずれのモデルにおいてもヘム鉄と重篤な立体障害を起こす可能性が示された。これにより、窒素原子と鉄の至適な配座が崩れると示唆された。

このアミノ基に隣接するメチル基による立体障害は、CYP3A4 の基質認識には影響しないものの、MI complex 形成に影響を与える原因を考察した。CYP の基質はアポ蛋白との水素結合や疎水性相互作用により代謝部位がヘム鉄に近づけられているが、MI complex は反応性代謝物とヘム鉄との強固な配位結合により形成されている。この配位結合は水素結合や疎水性相互作用に比べて結合力が強い。ミオグロビンのヘム鉄と NO との配位結合のエネルギーに関する報告では、結合エネルギーはヘム鉄と窒素原子間の距離に依存し、その距離が 1.8Å の

ときに結合エネルギーは最大となり、その状態から距離が少しでも変動すると結合エネルギーは大きく変動することが示されている⁵³。今回も同様に、メチル基による立体障害により窒素原子とヘム鉄の間の距離が変化することによって配位結合が崩れ、メチル基の付加された compound 10 では MI complex が形成できなかったと考えられる。一方、compound 10 でもアミノ基周辺の代謝反応は進行していることから、今回のヘム鉄と窒素原子間の距離の変動は基質認識には影響を与えず、ヘム鉄と化合物間の電子伝達は可能であると示唆された。

今回のフルオロキノロン系抗菌薬の quasi-irreversible inhibitor と同様に、アミノ基から生成されたニトロソ体が MI complex を形成する化合物群において、肝ミクロソームを用いて吸光度差の評価から MI complex 形成速度を比較した報告では、3 級アミン体である SKF525A および 1- α -acetylmethadol に比べて、それぞれ対応する 2 級アミン体である SKF8742A および nor-a- α -acetylmethadol のほうが MI complex 形成速度が大きいことが示された⁵⁴。このことから、ヘム鉄周辺への立体障害が少ないほうが MI complex が形成されやすいことが示唆される。

以上より、本研究において、一連のフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 に対する MBI の原因構造を同定し、側鎖のアミノ基の結合する環状構造の違いが irreversible および quasi-irreversible inhibition の違いを生じている可能性を示した。さらに、compound 8 から compound 10 へのメチル基の導入により MBI ポテンシ

ヤルが低減したのは、メチル基の立体障害により **MI complex** 形成が阻害されたためと示唆された。このことから、ヘム鉄に対して立体障害を生じうる置換基を導入することにより、**MI complex** 形成が阻害できると考えられ、この新たな知見は **MBI** 回避の合成展開に広く適用可能であるといえる。

表 7. 試験に使用したフルオロキノロン系抗菌薬の構造

キノロン骨格の 1 位～5 位の側鎖は全ての化合物で共通である。各化合物の 6 位～8 位の側鎖構造を以下に示す。

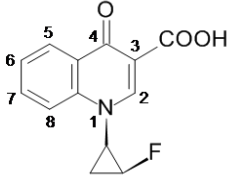
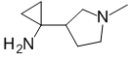
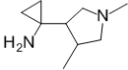
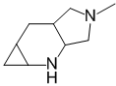
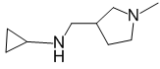
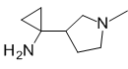

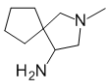
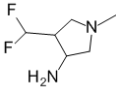
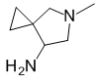
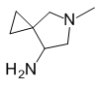
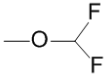
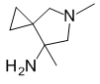
| Quinolone scaffold |  | | |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------|
| | Position | | |
| | C-6 | C-7 | C-8 |
| Compound 1 | —H |  | —O— |
| Compound 2 | —H |  | —O— |
| Compound 3 | —F |  | —O— |
| Compound 4 | —F |  | —O— |
| Compound 5 | —F |  |  |
| Compound 6 | —F |  | —O— |
| Compound 7 | —F |  | —O— |
| Compound 8 | —F |  | —O— |
| Compound 9 | —F |  |  |
| Compound 10 | —F |  | —O— |

表 8. フルオロキノロン系抗菌薬のヒト肝ミクロソームでの CYP3A に対する結合性評価

100 μ M の化合物存在下で 0 min または 30 min preincubation した後のフェリシア
ン化カリウム処理($K_3Fe(CN)_6$)の有無による代謝活性 (% of control) を以下に示
す。

| Compound | % of control (0 min) | | % of control (30 min) | | Judgement |
|-------------|----------------------|-----------------|-----------------------|-----------------|--------------------|
| | - $K_3Fe(CN)_6$ | + $K_3Fe(CN)_6$ | - $K_3Fe(CN)_6$ | + $K_3Fe(CN)_6$ | |
| Compound 1 | 99.3 | 101 | 75.1 | 75.5 | Irreversible |
| Compound 2 | 75.8 | 86.8 | 41.4 | 46.1 | Irreversible |
| Compound 3 | 91.1 | 92.1 | 60.6 | 65.6 | Irreversible |
| Compound 4 | 64.4 | 70.3 | 35.6 | 38.9 | Irreversible |
| Compound 5 | 77.0 | 83.0 | 54.6 | 57.9 | Irreversible |
| Compound 6 | 76.4 | 94.6 | 49.1 | 96.0 | Quasi-irreversible |
| Compound 7 | 94.2 | 98.9 | 71.3 | 90.8 | Quasi-irreversible |
| Compound 8 | 103 | 107 | 83.9 | 99.1 | Quasi-irreversible |
| Compound 9 | 92.9 | 101 | 72.1 | 102 | Quasi-irreversible |
| Compound 10 | 96.0 | 96.4 | 91.3 | 90.3 | No inhibition |

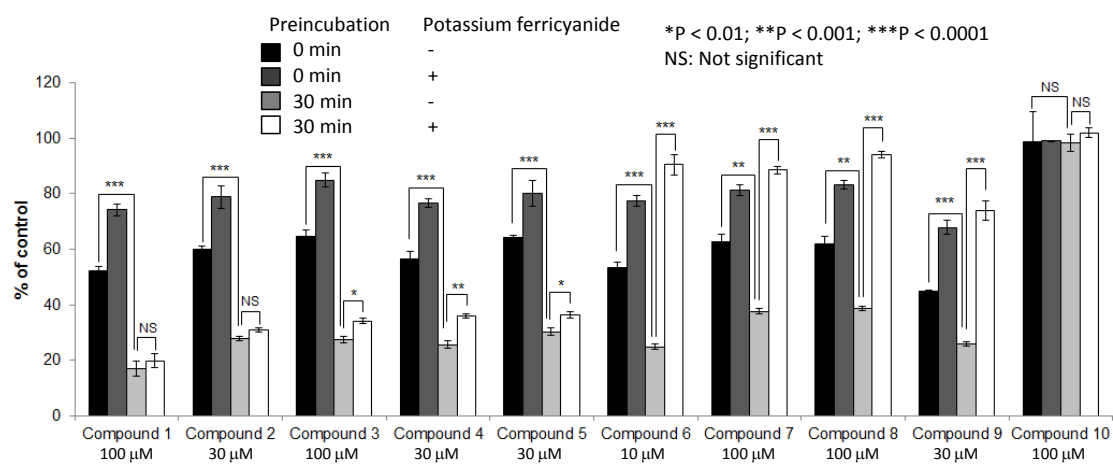


図 6. フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 発現系での MBI 結合性評価

各化合物存在下で 0 min または 30 min preincubation した後のフェリシアン化カリウム処理の有無による代謝活性 (% of control) を示す。それぞれの値は平均値 \pm SD (n=3) を示す。

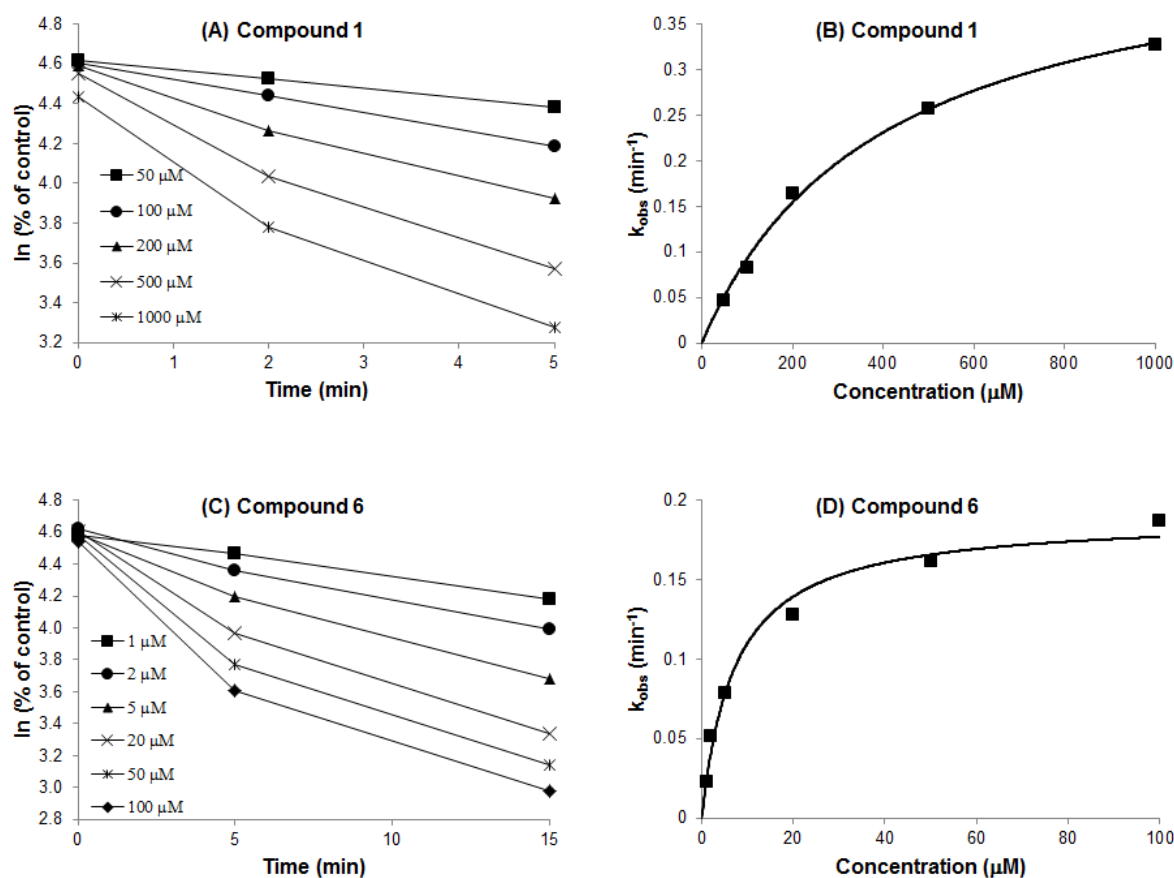


図 7. CYP3A4 発現系での compound 1 および 6 による preincubation 時間および濃度依存的阻害

各阻害剤において、各 preincubation 時間に対する代謝活性（% of control）の自然対数を各阻害剤濃度ごとにプロットし(A および C)、それぞれの直線の傾き (k_{obs})を算出し、 k_{obs} を阻害剤濃度に対してプロットした(B および D)。最小二乗法による式 4 への fitting line を実線で示す。

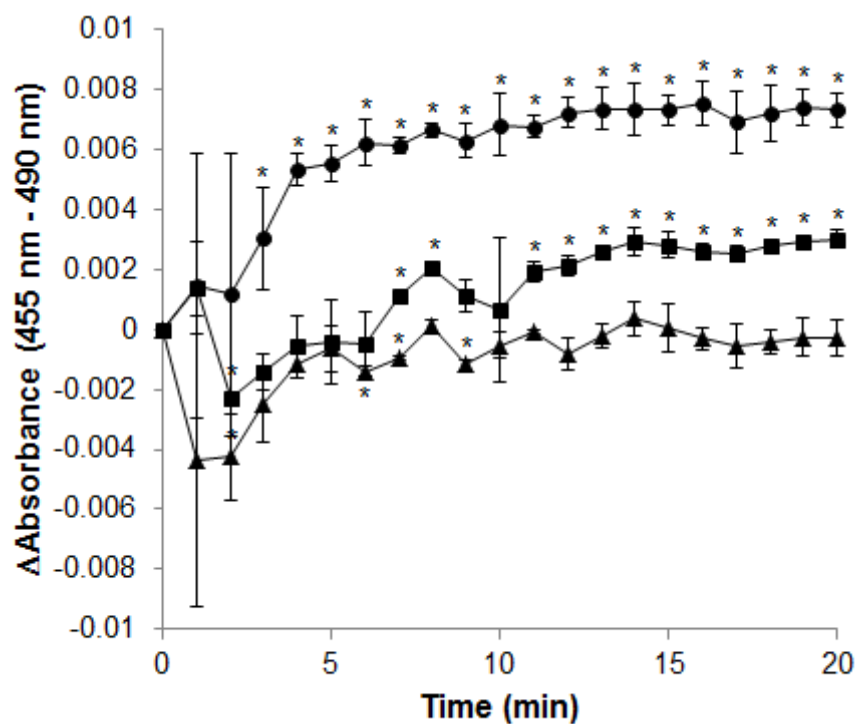


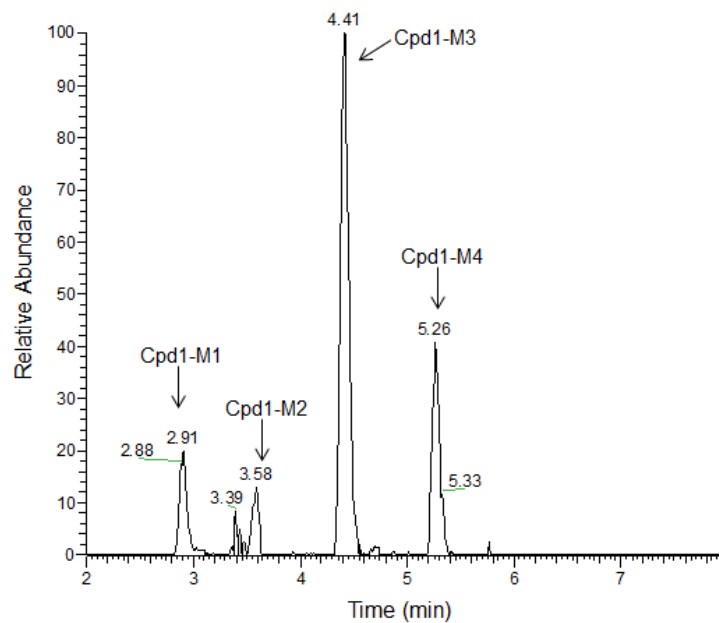
図 8. Compound 6, 8 および 10 での CYP3A4 の吸光度差評価

Compound 6 (●)、8 (■) または 10 (▲) を CYP3A4 発現系において

NADPH-generating system 添加後の波長 455 nm と 490 nm 間の吸光度差を 20 分間

測定した。それぞれの値は平均値 \pm SD (n=3)を示す。*p < 0.01

A



B

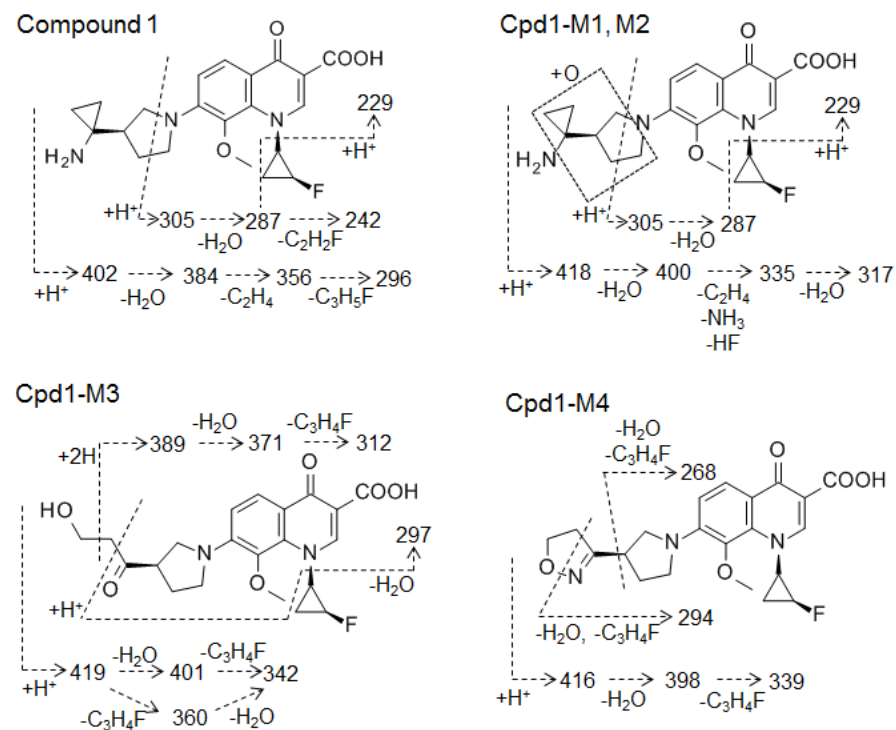


図 9. CYP3A4 発現系での compound 1 の代謝物のマスククロマトグラム(A)、および代謝物の推定構造と MS/MS スペクトルの帰属(B)

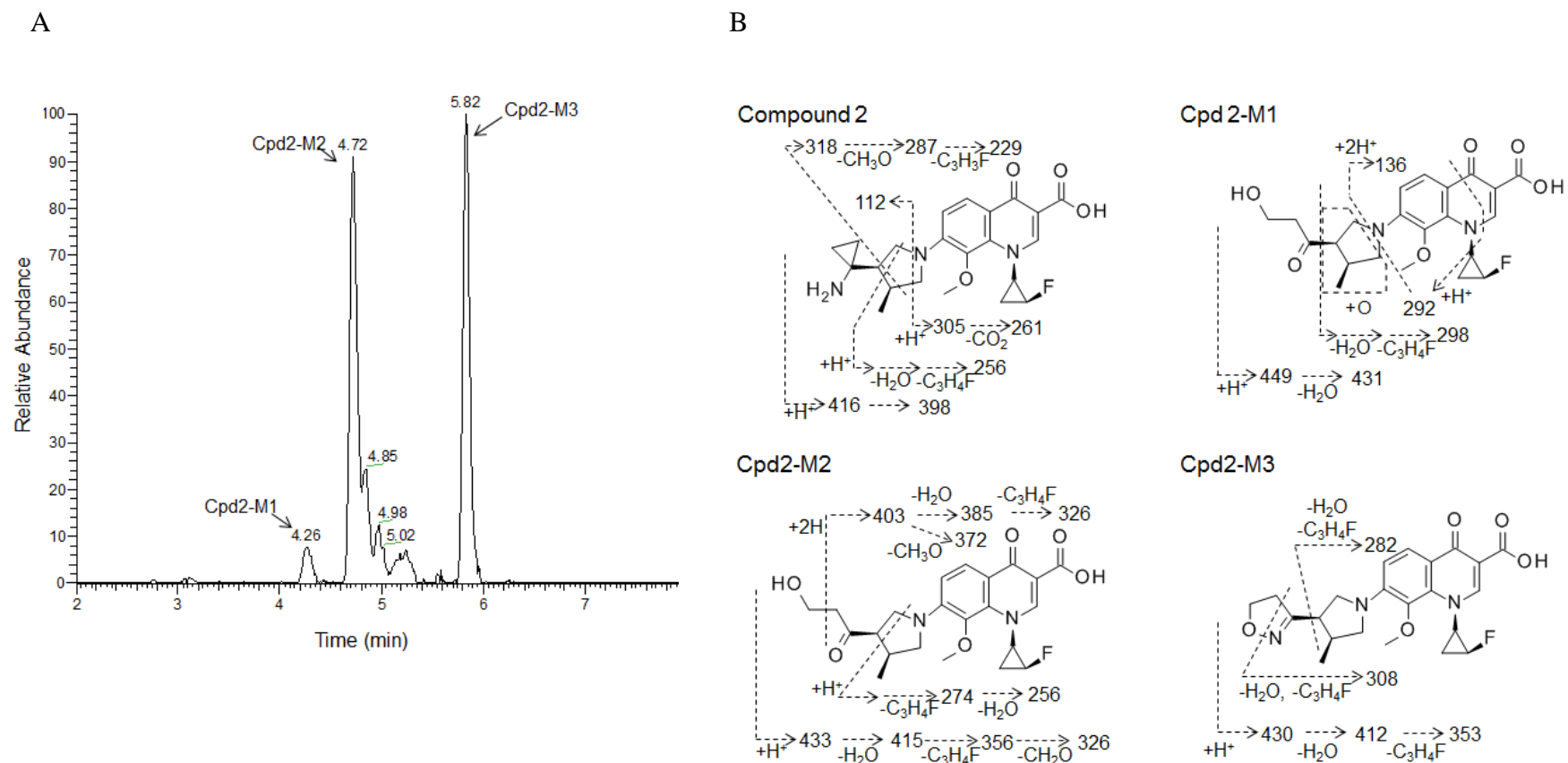
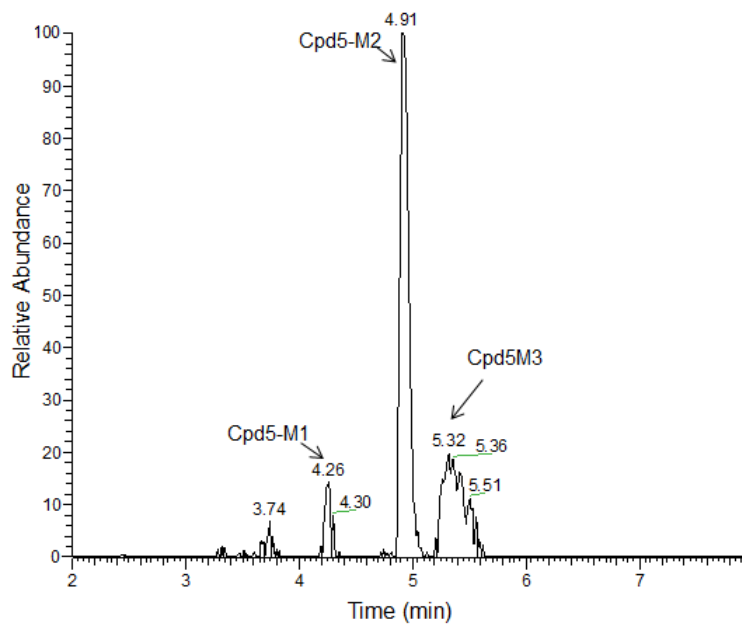


図 10. CYP3A4 発現系での compound 2 の代謝物のマスキロマトグラム(A)、および代謝物の推定構造と MS/MS スペクトルの帰属(B)

A



B

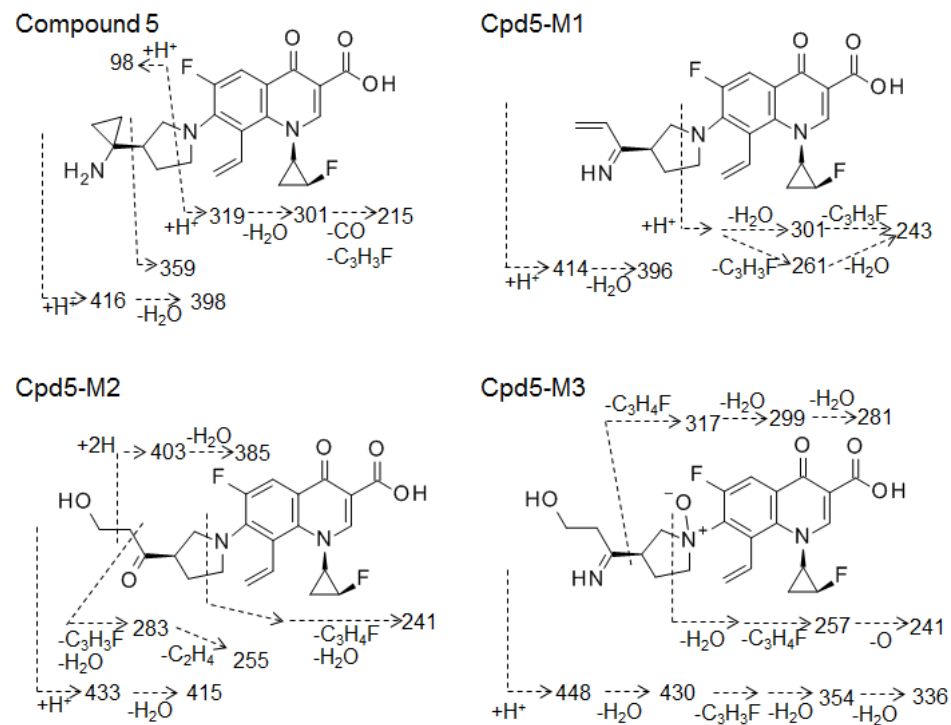


図 11. CYP3A4 発現系での compound 5 の代謝物のマスキロマトグラム(A)、および代謝物の推定構造と MS/MS スペクトルの帰属(B)

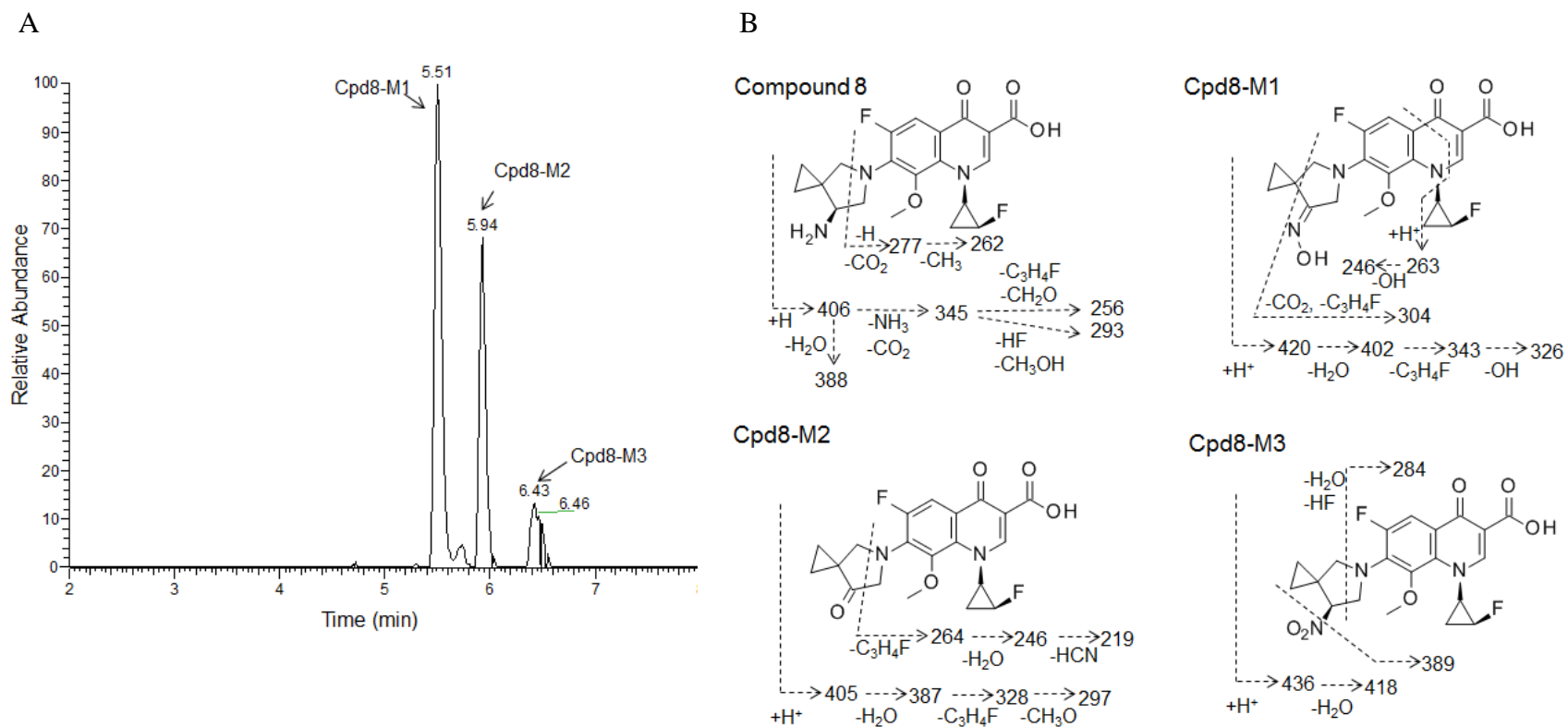
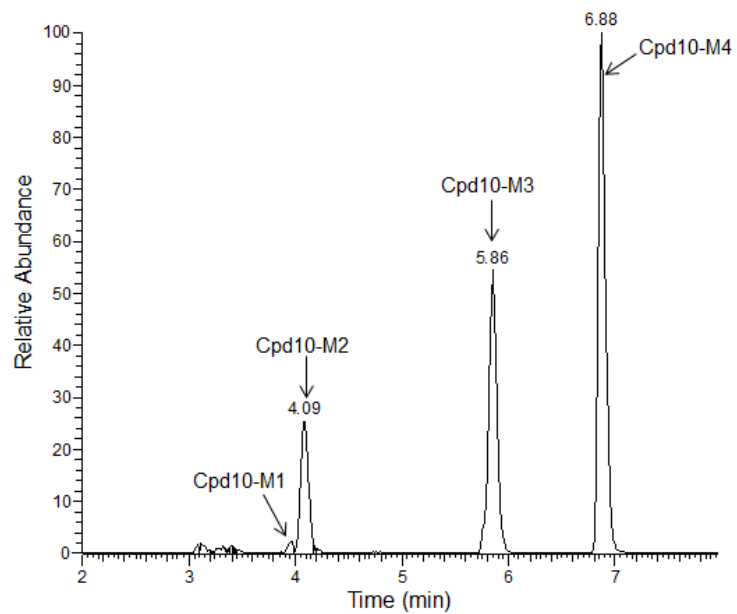


図 13. CYP3A4 発現系での compound 8 の代謝物のマスキロマトグラム(A)、および代謝物の推定構造と MS/MS スペクトルの帰属(B)

A



B

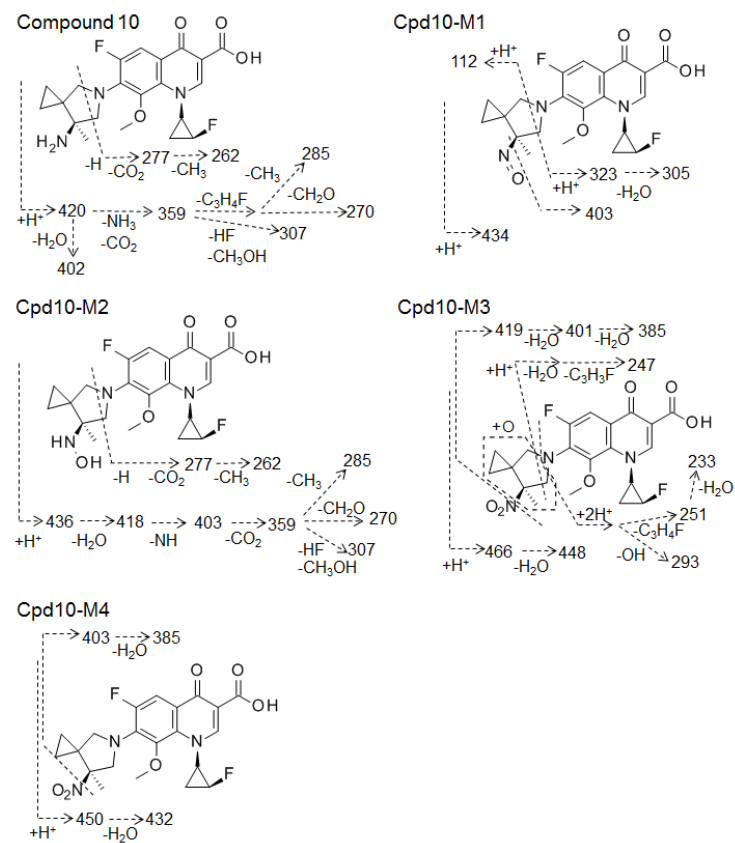


図 14. CYP3A4 発現系での compound 10 の代謝物のマスククロマトグラム(A)、および代謝物の推定構造と MS/MS スペクトルの帰属(B)

表 9. フルオロキノロン系抗菌薬の精密質量解析および H/D 交換測定からのマ

ススペクトルデータ

| | Composition | m/z [M + H] ⁺ | | | Comp. shift | m/z [M + D] ⁺ | Number of H/D |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------|--------------------------|-------------|------------|----------------|-----------------------------|------------------|
| | | Observed | Theoretical | Δ (ppm) | | | |
| Compound 1 | C ₂₁ H ₂₄ N ₃ O ₄ F | 402.1819 | 402.1824 | 1.18 | N.A. | 406.2068 | 3 |
| Cpd1-M1 | C ₂₁ H ₂₄ N ₃ O ₅ F | 418.1772 | 418.1773 | 0.14 | +O | 423.2079 | 4 |
| Cpd1-M2 | C ₂₁ H ₂₄ N ₃ O ₅ F | 418.1771 | 418.1773 | 0.52 | +O | 423.2065 | 4 |
| Cpd1-M3 | C ₂₁ H ₂₃ N ₂ O ₆ F | 419.1611 | 419.1613 | 0.45 | +2O-N-H | 422.1797 | 2 |
| Cpd1-M4 | C ₂₁ H ₂₂ N ₃ O ₅ F | 416.1615 | 416.1616 | 0.25 | +O-2H | 418.1734 | 1 |
| Compound 2 | C ₂₂ H ₂₇ N ₃ O ₄ F | 416.1972 | 416.198 | 1.86 | N.A. | 420.2227 | 3 |
| Cpd2-M1 | C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₇ F | 449.1718 | 449.1718 | 0.03 | +3O -NH | 453.1965 | 3 |
| Cpd2-M2 | C ₂₂ H ₂₆ N ₂ O ₆ F | 433.1768 | 433.1769 | 0.21 | +2O -NH | 436.1955 | 2 |
| Cpd2-M3 | C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₅ F | 430.1773 | 430.1773 | 0 | +O -2H | 432.1891 | 1 |
| Compound 5 | C ₂₂ H ₂₄ N ₃ O ₃ F ₂ | 416.1775 | 416.178 | 1.28 | N.A. | 420.2029 | 3 |
| Cpd5-M1 | C ₂₂ H ₂₂ N ₃ O ₃ F ₂ | 414.1622 | 414.1624 | 0.49 | -2H | 417.1809 | 2 |
| Cpd5-M2 | C ₂₂ H ₂₃ N ₂ O ₅ F ₂ | 433.1566 | 433.157 | 0.78 | +2O -NH | 436.1757 | 2 |
| Cpd5-M3 | C ₂₂ H ₂₄ N ₃ O ₅ F ₂ | 448.1678 | 448.1678 | 0.08 | +2O | 452.1929 | 3 |
| Compound 6 | C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₄ F ₂ | 434.1881 | 434.1886 | 1.03 | N.A. | 438.2133 | 3 |
| Cpd6-M1 | C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₅ F ₂ | 450.1834 | 450.1835 | 0.27 | +O | 455.2144 | 4 |
| Cpd6-M2 | C ₂₂ H ₂₅ N ₃ O ₅ F ₂ | 450.1833 | 450.1835 | 0.34 | +O | 455.2142 | 4 |
| Cpd6-M3 | C ₂₂ H ₂₃ N ₃ O ₅ F ₂ | 448.1677 | 448.1679 | 0.29 | +O-2H | 451.1863 | 2 |
| Cpd6-M4 | C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₅ F ₂ | 435.1729 | 435.1726 | 0.15 | +O-N-H | 438.1912 | 2 |
| Cpd6-M5 | C ₂₂ H ₂₂ N ₂ O ₅ F ₂ | 433.1569 | 433.157 | 0.22 | +O-N-3H | 435.1690 | 1 |
| Compound 8 | C ₂₀ H ₂₂ N ₃ O ₄ F ₂ | 406.1565 | 406.1573 | 1.88 | N.A. | 410.183 | 3 |
| Cpd8-M1 | C ₂₀ H ₂₀ N ₃ O ₅ F ₂ | 420.1364 | 420.1366 | 0.41 | +O -2H | 423.156 | 2 |
| Cpd8-M2 | C ₂₀ H ₁₉ N ₂ O ₅ F ₂ | 405.1256 | 405.1256 | 0.04 | +O -NH3 | 407.1388 | 1 |
| Cpd8-M3 | C ₂₀ H ₂₀ N ₃ O ₆ F ₂ | 436.1312 | 436.1315 | 0.63 | +2O -2H | 438.1449 | 1 |
| Compound 10 | C ₂₁ H ₂₄ N ₃ O ₄ F ₂ | 420.1723 | 420.1729 | 1.52 | N.A. | 424.1986 | 3 |
| Cpd10-M1 | C ₂₁ H ₂₂ N ₃ O ₅ F ₂ | 434.1514 | 434.1522 | 1.86 | +O -2H | 436.1653 | 1 |
| Cpd10-M2 | C ₂₁ H ₂₄ N ₃ O ₅ F ₂ | 436.1674 | 436.1678 | 1.14 | +O | 440.1935 | 3 |
| Cpd10-M3 | C ₂₁ H ₂₂ N ₃ O ₇ F ₂ | 466.1415 | 466.142 | 1.06 | +3O -2H | 469.1617 | 2 |
| Cpd10-M4 | C ₂₁ H ₂₂ N ₃ O ₆ F ₂ | 450.1470 | 450.1471 | 0.32 | +2O -2H | 452.1601 | 1 |

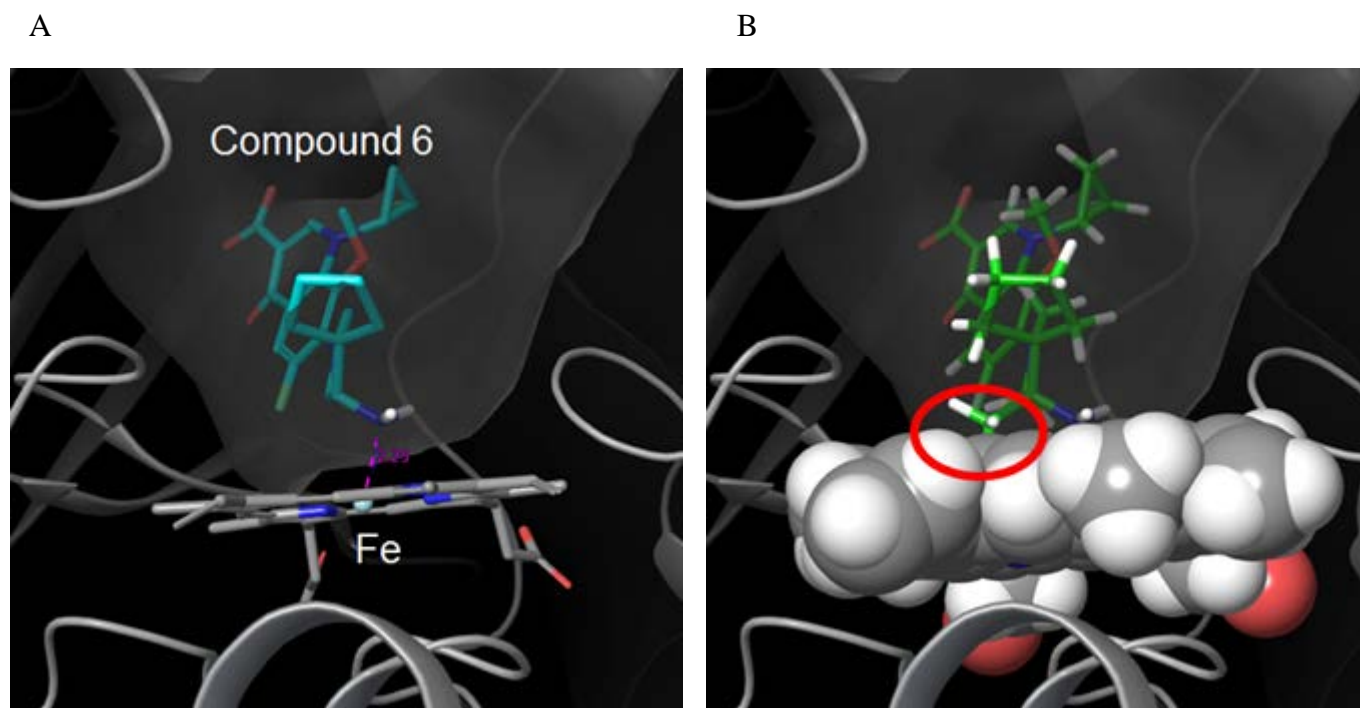


図 15. Compound 6 と CYP3A4 のドッキングモデル(A)およびそのドッキングモデルの compound 6 へのメチル基導入(B)

A では、CYP3A4 の構造は ribbon model と基質結合ポケットの分子表面図で、化合物とヘム鉄は tube model で表示。B では、ヘム鉄を space-filling model (van der Waals 半径) で表示。追加したメチル基 (赤丸) は、ヘム鉄と立体障害を起こしている。

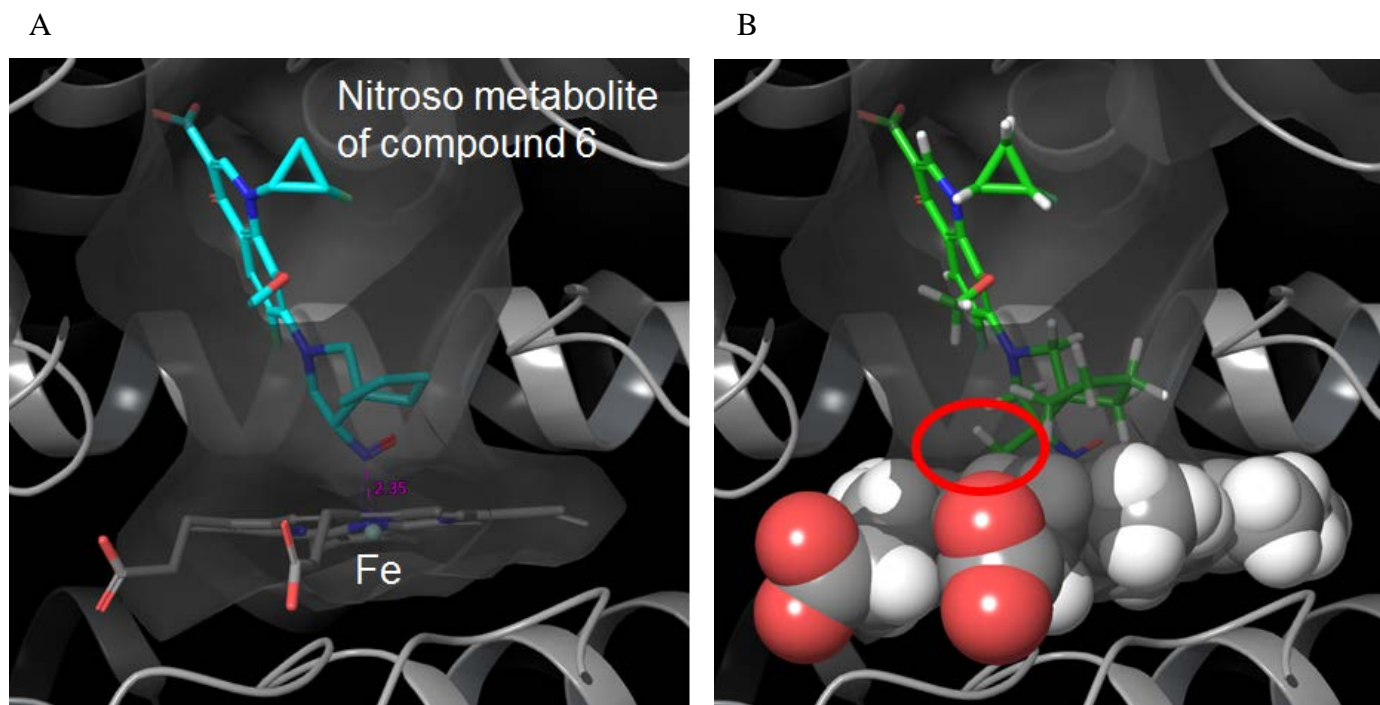


図 16. Compound 6 のニトロソ体と CYP3A4 のドッキングモデル(A)およびそのドッキングモデルの compound 6 のニトロソ体へのメチル基導入(B)

A では、CYP3A4 の構造は ribbon model と基質結合ポケットの分子表面図で、化合物とヘム鉄は tube model で表示。B では、ヘム鉄を space-filling model (van der Waals 半径) で表示。追加したメチル基 (赤丸) は、ヘム鉄と立体障害を起こしている。

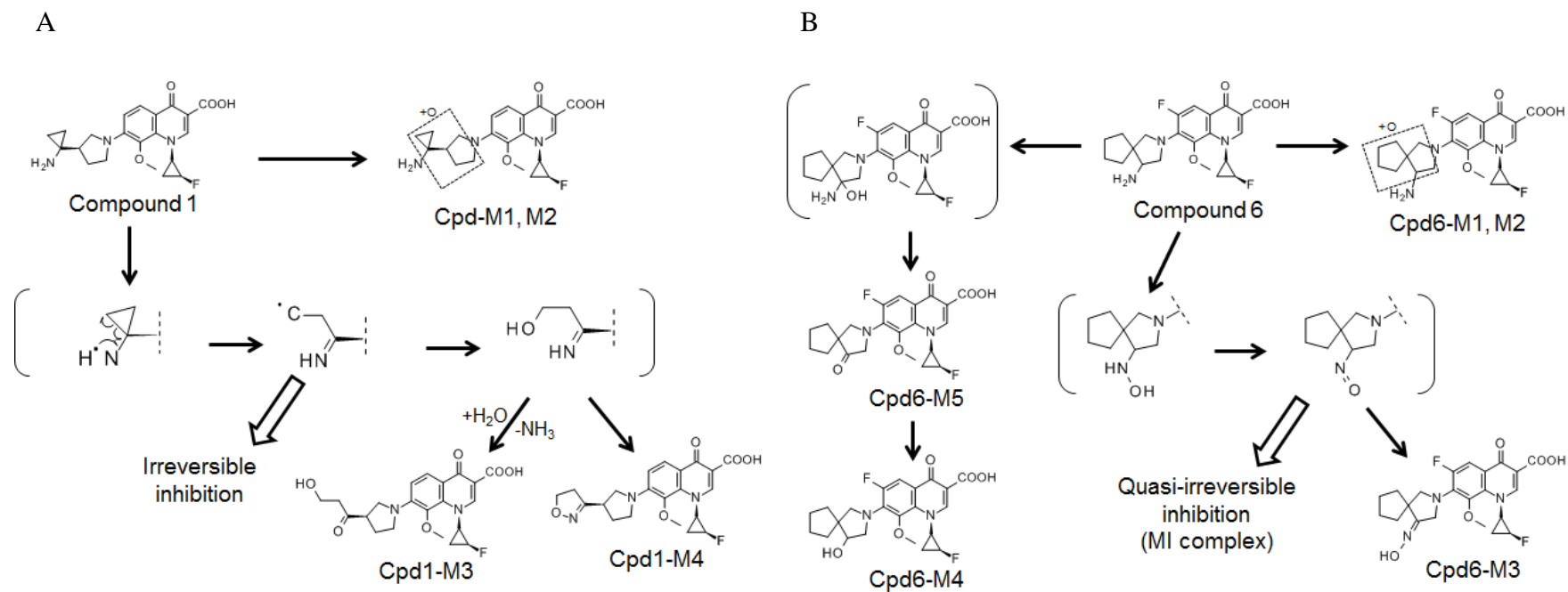


図 17. Compound 1 (A)および compound 6 (B)の CYP3A4 による推定代謝経路

第 2 章

社内で合成されたフルオロキノロン系抗菌薬の
CYP3A に対する **MBI** 発現メカニズムの解析

第 2 節

フルオロキノロン系抗菌薬の **CYP3A4** および
CYP3A5 に対する **MBI** 発現メカニズムの違い

要約

社内のフルオロキノロン系抗菌薬を用いた CYP3A4 に対する MBI 評価から、側鎖構造の違いにより irreversible inhibitor (compound 1-5) と quasi-irreversible inhibitor (compound 6-9) とに分類された。これらの化合物の CYP3A5 に対する MBI 評価を実施した。Compound 1-5 は CYP3A5 に対しても irreversible inhibition を示したが、compound 6-9 は CYP3A5 に対して阻害作用を示さず、MI complex の形成も確認されなかった。Compound 1 および 6 と CYP3A5 との反応液からは、CYP3A4 の場合と同様の代謝物が検出され、MBI を引き起こす反応性中間体の生成が示唆された。CYP3A5 のホモロジーモデリングから、CYP3A4 の基質結合ポケット内の compound 6 のニトロソ体周辺にある 4 つのアミノ酸が CYP3A5 の対応するアミノ酸残基と比べて bulky であり、特に CYP3A5 の Phe210 が立体障害を生じる可能性が示唆された。CYP3A5 の基質結合ポケット構造がニトロソ体とヘム鉄との配位結合を阻害することで quasi-irreversible inhibition を引き起こさなかったと考えられた。

序論

CYP3A サブファミリーの主要な isoform には CYP3A4 と CYP3A5 が存在し、両分子種のアミノ酸配列の相同性は 83% であり、基質特異性が類似していることが知られている^{55,56}。また、CYP3A5 には遺伝多型が存在し、midazolam や nifedipine のような CYP3A 基質の体内動態の個人間変動の要因となりうる⁵⁷。

このように両分子種は高いアミノ酸相同性を有するにも関わらず、それらの阻害剤、特に MBI 化合物による阻害作用は両分子種で異なる例が多数報告されており、一般的に CYP3A4 に比べて CYP3A5 に対する阻害作用が弱い例が多い⁵⁸。Raloxifene は CYP3A4 に対して irreversible な阻害作用を示すが、CYP3A5 は阻害しない。Raloxifene の反応性中間体は CYP3A4 のアポ蛋白に共有結合するが、この共有結合される CYP3A4 の 239 番目のアミノ酸の Cys を CYP3A5 と同じ Ser に変換した変異体では、irreversible inhibition が観察されなかった。このことから、両分子種の 239 番目のアミノ酸の違いが阻害作用の違いの原因と示唆された⁵⁹。Erythromycin, diltiazem, nicardipine, verapamil および lapatinib は quasi-irreversible inhibitor であり、CYP3A4 のヘム鉄と MI complex を形成することが知られているが、CYP3A5 とは MI complex の形成が観察されなかった⁶⁰⁻⁶²。Lapatinib では CYP3A4 により生成されるニトロソ体がヘム鉄と MI complex を形成すると考えられるが、ニトロソ体の前駆体である hydroxylamine 体と、ニトロ

ソ体を介して生成されるオキシム体の生成量が CYP3A4 に比べて CYP3A5 で大幅に低いことが示された⁶¹。このことから、lapatinib の両分子種に対する阻害作用の差異は、MI complex を形成するニトロソ体の生成能力の差に起因すると示唆された。このように、CYP3A4 と CYP3A5 に対する MBI 化合物の阻害作用の差異は、反応性中間体の生成能力の差によるものと示唆される例が多い。

本章第 1 節での社内のフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 に対する MBI 評価において、quasi-irreversible inhibitor である compound 6-9 はキノロン骨格の 7 位側鎖の環状構造にアミノ基を有し、このアミノ基が代謝を受けて生成されるニトロソ体がヘム鉄と MI complex を形成すると示唆されたが、このアミノ基の根元の炭素原子にメチル基を導入した compound 10 では MI complex が形成されなかった。このメチル基の立体障害は CYP3A4 による代謝反応には影響を与えないものの、ニトロソ体とヘム鉄との MI complex 形成に影響を与えると示唆された。ここで得られた知見から、MI complex の形成には窒素原子と鉄との距離が重要であり、至適な距離からずれると MI complex は形成されないと考えられた。このことから、CYP3A5 では基質結合ポケット構造の違いから、反応性中間体とヘム鉄が配位結合をするのに至適な配座を保てないため、MI complex を形成できない可能性も考えられる。

以上より、本研究では、フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A5 に対する MBI を評価し、CYP3A4 と CYP3A5 に対する MBI の差異を検討した。

結果

CYP3A5 に対する結合性

CYP3A5 の発現系を用いてフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A5 に対する結合性を評価した (図 18)。Compound 1-5 と 30 min preincubation 後、CYP3A5 の代謝活性は低下し、その低下した代謝活性はフェリシアン化カリウム処理によって回復しなかった。このことから、compound 1-5 は CYP3A5 に対して irreversible に結合していることが示された。これらの化合物の CYP3A4 と CYP3A5 に対して 30 min preincubation した後の残存酵素活性(% remaining)を比較した (表 10)。Compound 1-5 では、CYP3A5 での % remaining は CYP3A4 の場合と比較してほぼ同等か若干高い値であり、両分子種に対する阻害能は概ね同等であることが示された。一方、compound 6-10 と 30 min preincubation した後の CYP3A5 の代謝活性は変化が見られなかった。

CYP3A5 での MI complex 形成確認のための吸光度評価

CYP3A4 において MI complex 形成が確認された compound 6 および 8、MI complex 形成が見られなかった compound 10 を用いて CYP3A5 でも同様に、CYP3A5 発現系と各化合物を含む反応液に NADPH-generating system を添加後の波長 455 nm と 490 nm 間の吸光度差を 20 分間測定し、MI complex 形成の有無を

観察した (図 19)。いずれの化合物においても吸光度差の変化は観察されなかった。このことから、compound 6, 8 および 10 は CYP3A5 に対して MI complex を形成しないことが示された。

CYP3A4 発現系での compound 1 および 6 の代謝物構造解析

フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 と CYP3A5 での代謝プロファイルを比較するため、両分子種の irreversible inhibitor の代表化合物として compound 1 の CYP3A5 発現系で incubation した後のサンプル中の代謝物の構造を LC-MS/MS で解析した。検出された代謝物のマスキロマトグラムを図 20A に示す。Compound 1 からは、シクロプロピルアミン部分が酸化された 4 つの代謝物、cpd1-M1, cpd1-M2, cpd1-M3 および cpd1-M4 が検出され、CYP3A4 の場合と同じだった (図 9)。CYP3A4 に対して quasi-irreversible inhibition を示すものの、CYP3A5 に対しては阻害作用を示さない compound 6 においても同様に、CYP3A5 での代謝物構造解析を実施した。検出された代謝物のマスキロマトグラムを図 20B に示す。Compound 6 からは、amino azaspiro[4.4]nonan 部分が酸化された 5 つの代謝物、cpd6-M1, cpd6-M2, cpd6-M3, cpd6-M4 および cpd6-M5 が検出され、CYP3A4 の場合と同じだった (図 12)。Compound 6 は CYP3A5 に対しては阻害作用を示さな

いことから、CYP3A4 の quasi-irreversible inhibition の原因となる反応性中間体の生成が起こらないと予想していたが、予想に反する結果となった。

CYP3A5 のホモロジーモデリング

CYP3A5 の基質結合ポケットの構造を把握するため、CYP3A5 のホモロジーモデリングを実施した。CYP3A5 のホモロジーモデルは、CYP3A4 で構造決定されている範囲の 27-495 aa に対して構築した（図 21A）。鋳型構造である CYP3A4 との相同性が非常に高かったため（相同性 77%、類似性 84%）、精度の高いモデルが構築されたと考えられた。CYP3A5 のホモロジーモデルを本章第 1 節で得た compound 6 とそのニトロソ体と CYP3A4 のドッキングモデルで重ね合わせて両分子種のポケット構造を比較した（図 21B および C）。その結果、CYP3A5 の基質結合ポケット構成残基のうち、compound 6 周辺で 9 個の疎水性アミノ酸残基（Leu57, Leu79, Leu108, Leu120, Phe210, Ile224, Leu240, Val369, Ile371）が CYP3A4（Phe57, Gln79, Phe108, Ile120, Leu210, Thr224, Val240, Ile369, Met371）と異なることが示された。これらの両分子種で異なるアミノ酸残基のうち、CYP3A5 の 4 個のアミノ酸残基（Leu108, Leu120, Phe210, Leu240）が CYP3A4 の対応するアミノ酸残基と比べて bulky であり、特に CYP3A5 の Phe210 がニトロソ体と立体障害を生じている可能性が示唆された。そこで、compound 6 のニト

ロソ体と両分子種との MI complex 形成の違いについて、両分子種の 210 番目のアミノ酸に着目した。CYP3A4 の Leu210 の側鎖とニトロソ体の最も近い側鎖との距離は 4.63Å であるのに対し、CYP3A5 の Phe210 の側鎖とニトロソ体の最も近い側鎖との距離は 1.35Å であることが示された（図 22）。このことから、CYP3A5 では Phe210 によりニトロソ体の結合が妨げられる可能性が考えられた。

考察

本研究では、CYP3A4 において irreversible inhibitor (compound 1-5) と quasi-irreversible inhibitor (compound 6-9) に分類された一連のフルオロキノロン系抗菌薬による CYP3A4 と CYP3A5 に対する阻害作用の違いに着目した。まず、CYP3A5 の発現系を用いてこれらのフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A5 に対する阻害作用を評価し (図 18)、CYP3A4 と CYP3A5 との阻害能を比較した (表 10)。Compound 1-5 は CYP3A5 に対して CYP3A4 と同じく irreversible inhibition を示し、その阻害能は compound 1, 2 および 4 は両分子種で同程度、compound 3 および 5 は CYP3A4 と比べて CYP3A5 でやや弱い程度であった。一方、CYP3A4 に対して quasi-irreversible inhibition を示す compound 6-9 は、CYP3A4 に対して阻害を示すのに十分な濃度 (100 μ M) でも CYP3A5 に対して阻害作用を示さなかった。Compound 10 は両分子種に対して阻害作用を示さなかった。Compound 6, 8 および 10 では CYP3A5 と MI complex の形成も確認されなかった (図 19)。本化合物群においても、他の化合物の例^{58, 60-62} と同じく、CYP3A4 と CYP3A5 で quasi-irreversible inhibitor の阻害作用が明確に異なる結果となった。

本章第 1 節で評価したフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 での代謝プロファイルと比較するため、CYP3A5 の発現系での反応液の代謝物構造解析を実施した。Compound 1 において、CYP3A4 との反応液で検出された 4 個の代謝物はす

べて CYP3A5 でも検出された (図 20A)。CYP3A4 の場合と同様に、CYP3A5 においても cpd1-M3 の前駆体であるラジカル中間体がアポ蛋白に共有結合することで irreversible inhibition を引き起こすと考えられる。

Compound 6 においては、CYP3A5 では反応性中間体生成の代謝反応が進行しないため、quasi-irreversible inhibition を引き起こさないと予想していた。しかし予想に反し、CYP3A4 の場合と共通の 5 個の代謝物が検出され、ニトロソ体を介して生成されと考えられるオキシム体の cpd6-M3 も含まれていた (図 20B)。このことから、CYP3A5 はニトロソ体を生成するものの、ヘム鉄と MI complex は形成しない可能性が示唆された。CYP3A5 の LC-MS/MS クロマトグラムでの代謝物のピークエリアは CYP3A4 のものと概ね同程度であり (data not shown)、CYP3A5 でも MBI 結合性評価系で quasi-irreversible inhibition を示すのに十分なニトロソ体が生成されていると示唆されるが、両分子種のニトロソ体生成能の正確な比較には更なる定量的な評価が必要である。

MI complex の形成には、ニトロソ体はヘム鉄と至適な距離と角度を維持する必要がある⁵³。今回、フルオロキノロン系抗菌薬は CYP3A5 においてニトロソ体は生成されるものの MI complex を形成しない原因として、CYP3A5 の基質結合ポケット構造の違いにより MI complex が形成できないのではないかと考えた。この仮説を検証するため、CYP3A5 については結晶構造が明らかとされていない

ため、CYP3A4 の結晶構造を元に CYP3A5 のホモロジーモデルを作成した (図 21A)。このホモロジーモデルに対し、本章第 1 節において作成した compound 6 とそのニトロソ体と CYP3A4 とのドッキングモデルの重ね合わせを行った (図 21B および C)。その結果、CYP3A5 の基質結合ポケットで compound 6 のニトロソ体周辺のアミノ酸残基は CYP3A4 に比べて bulky であることが示された。このことは、各分子種の阻害剤の *in vitro* の阻害作用に関するパラメータを元に作成した CYP3A4 のファーマコフォアが CYP3A5 や CYP3A7 のものより大きいという報告と一致する⁶³。特に図 22 から、CYP3A5 の Phe210 が compound 6 のニトロソ体とヘム鉄との結合に対して立体障害を引き起こすと考えられた。この CYP3A4 と CYP3A5 の 210 番目のアミノ酸残基は、aflatoxin B1 の認識にも重要であることが報告されている⁶⁴。Aflatoxin B1 の代謝において、両分子種で位置選択性が異なることが示されており、CYP3A4 では主に 3 α 水酸化が進行し、CYP3A5 では *exo*-8,9 酸化が進行する。CYP3A4 の 210 番目のアミノ酸の Leu を CYP3A5 型の Phe にした変異体では、その位置選択性が CYP3A5 と同様となることが示された。Aflatoxin B1 と CYP3A4 の 206 番目の Asn との水素結合が 3 α 水酸化代謝に重要であることが示唆されているが、それが Phe の立体障害によって影響を受けると考えられた。

本研究において、フルオロキノロン系抗菌薬の compound 6-9 による CYP3A4 と CYP3A5 に対する quasi-irreversible inhibition の発現の違いに着目した。両分子種によるこれらの化合物のニトロソ体生成能はほぼ同等であるにも関わらず、MI complex 形成に差が生じるのは、両分子種の基質結合ポケット構造の違いが起因している可能性を CYP3A5 のホモロジーモデルと CYP3A4 の結晶構造との重ね合わせにより示した。一方 irreversible inhibitor である compound 1-5 による両分子種に対する阻害作用は同等だった。ラジカルによるアポ蛋白への共有結合は基質結合ポケットの構造の違いに依存しないが、ニトロソ体による MI complex の形成にはニトロソ体とヘム鉄との間が至適な距離と角度が保たれている必要があり、基質結合ポケット構造の違いが大きく影響するものと示唆された。本研究結果は、阻害剤による CYP3A4 と CYP3A5 に対する阻害作用、特に quasi-irreversible inhibition の違いについて新たな知見を得ることができた。

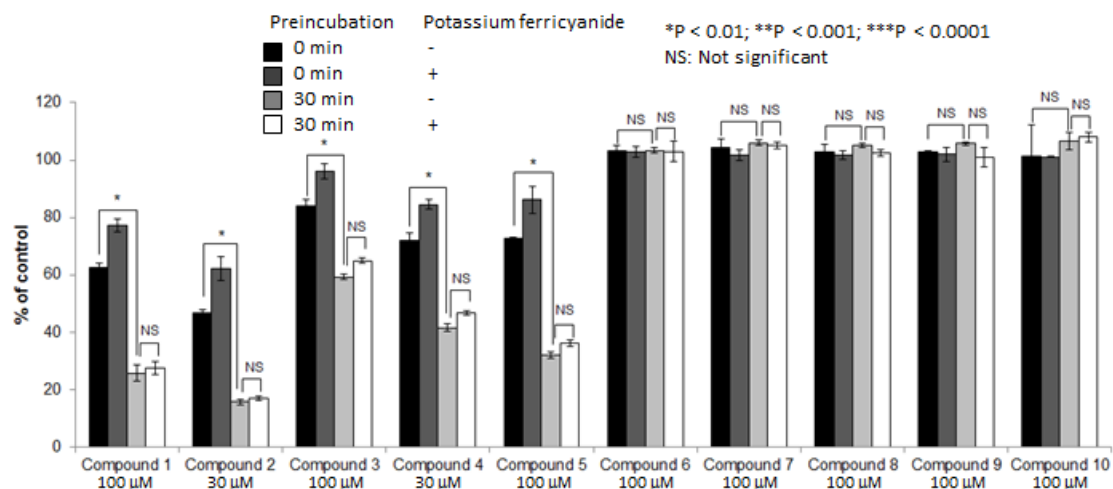


図 18. フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A5 発現系での MBI 結合性評価

各化合物存在下で 0 min または 30 min preincubation した後のフェリシアン化カリウム処理の有無による代謝活性 (% of control) を示す。それぞれの値は平均値 \pm SD (n=3)を示す。

表 10. フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 と CYP3A5 に対する阻害作用の比較

各化合物存在下で各分子種と 0 min preincubation 後の酵素活性に対する 30 min preincubation 後の酵素活性の比（いずれもフェリシアン化カリウム処理なし）を % remaining とした。CYP3A4 の値は図 5 の結果を、CYP3A5 の値は図 18 の結果から算出した。それぞれの値は平均値 \pm SD (n=3)を示す。

| | CYP3A4 | | CYP3A5 | |
|-------------|---------------|----------------|---------------|----------------|
| | Concentration | % remaining | Concentration | % remaining |
| Compound 1 | 100 μ M | 32.1 \pm 4.4 | 100 μ M | 41.3 \pm 1.4 |
| Compound 2 | 30 μ M | 46.4 \pm 1.9 | 30 μ M | 33.9 \pm 2.4 |
| Compound 3 | 100 μ M | 42.4 \pm 1.8 | 100 μ M | 70.5 \pm 2.1 |
| Compound 4 | 30 μ M | 45.3 \pm 2.1 | 30 μ M | 58.0 \pm 2.8 |
| Compound 5 | 30 μ M | 47.0 \pm 1.5 | 100 μ M | 44.3 \pm 2.5 |
| Compound 6 | 10 μ M | 46.4 \pm 1.5 | 100 μ M | 100 \pm 4 |
| Compound 7 | 100 μ M | 60.1 \pm 3.0 | 100 μ M | 101 \pm 1 |
| Compound 8 | 100 μ M | 62.2 \pm 2.1 | 100 μ M | 102 \pm 1 |
| Compound 9 | 30 μ M | 57.7 \pm 1.8 | 100 μ M | 103 \pm 3 |
| Compound 10 | 100 μ M | 101 \pm 13 | 100 μ M | 106 \pm 12 |

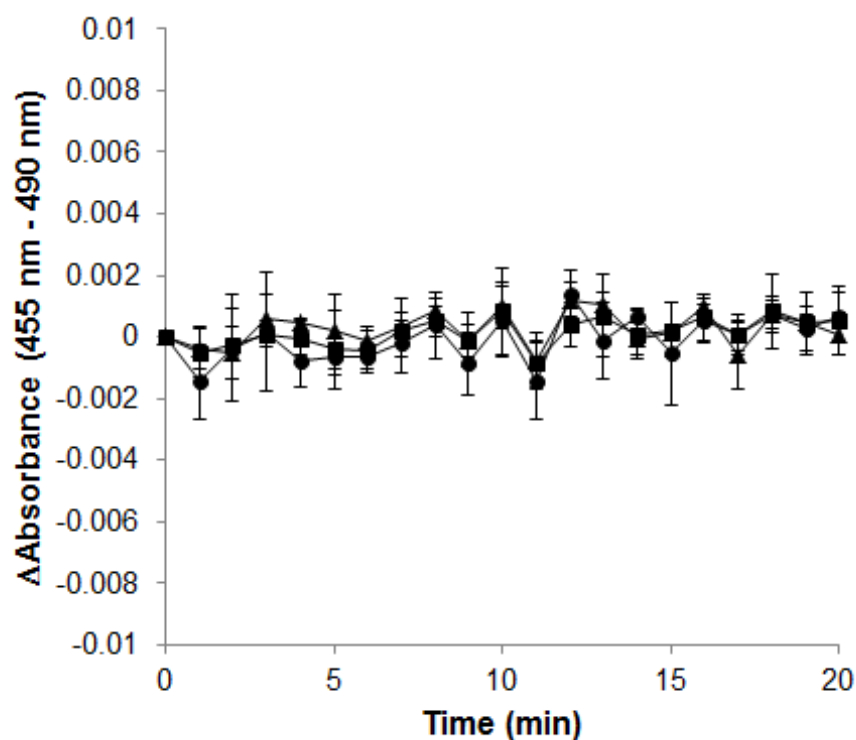


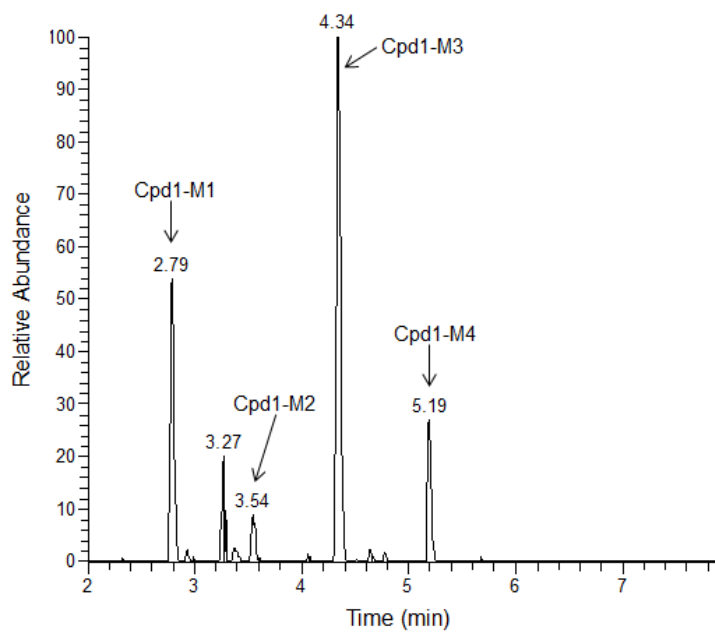
図 19. Compound 6, 8 および 10 での CYP3A5 の吸光度差評価

Compound 6 (●)、8 (■) または 10 (▲) を CYP3A5 発現系において

NADPH-generating system 添加後の波長 455 nm と 490 nm 間の吸光度差を 20 分間

測定した。それぞれの値は平均値 \pm SD (n=3)を示す。

A



B

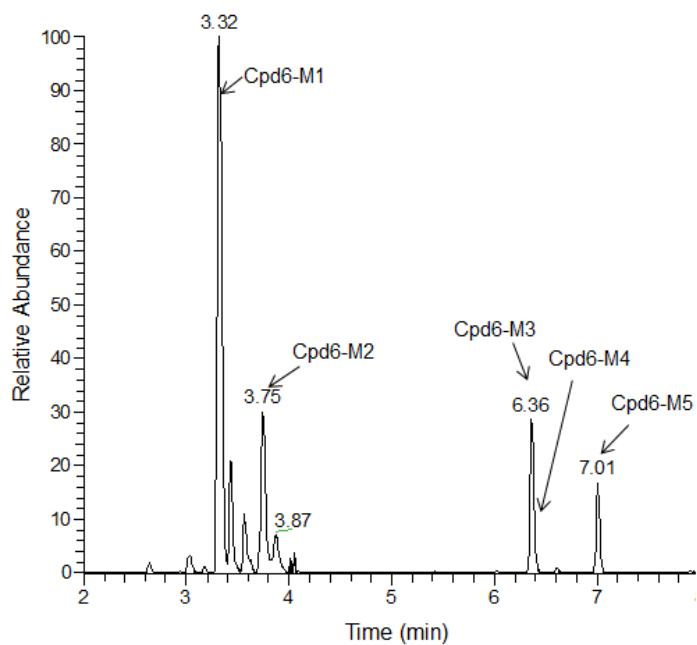


図 20. CYP3A5 発現系での compound 1 (A)および compound 6 (B)の代謝物のマ
スクロマトグラム

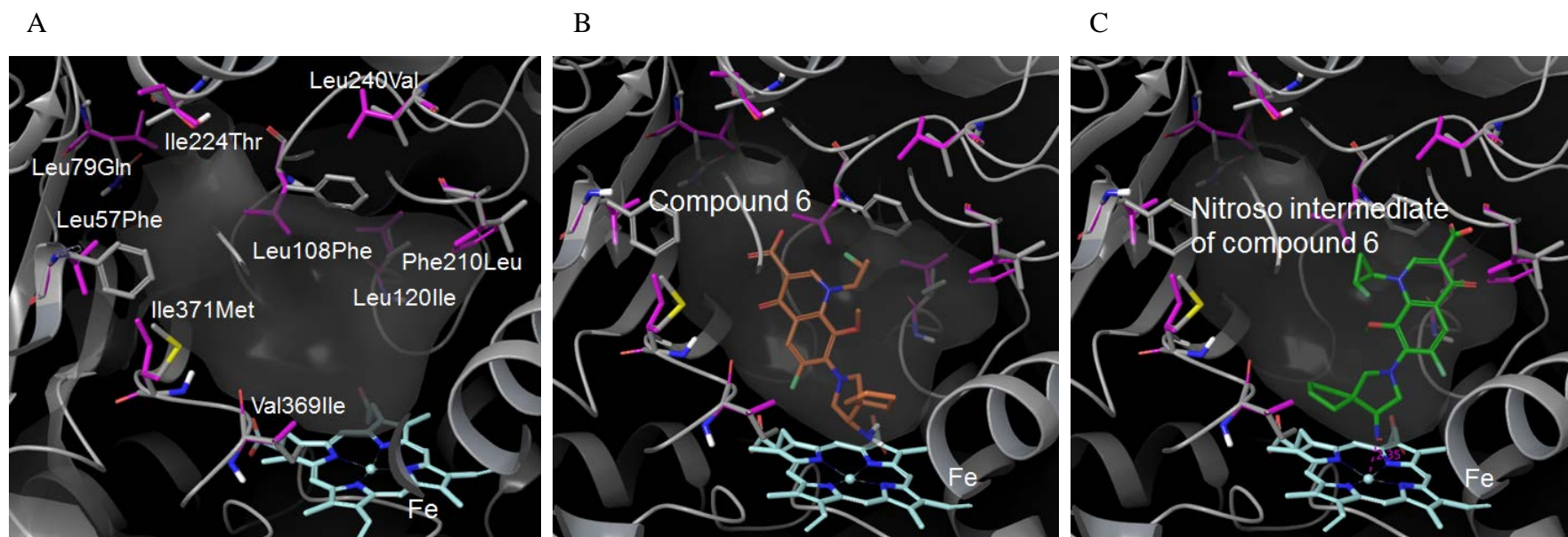


図 21. CYP3A5 のホモロジーモデル(A)と CYP3A5 のホモロジーモデルへの compound 6 (B)および compound 6 のニトロソ体 (C)と CYP3A4 のドッキングモデルの重ね合わせ

CYP3A5 のホモロジーモデル（ピンク色）に CYP3A4 の結晶構造（灰色）を重ね合わせた。CYP3A5 で CYP3A4 と異なる 9 個の疎水性アミノ酸とヘム鉄を tube model で表示した。CYP3A5 の構造を ribbon model とポケットの分子表面図で表示した。

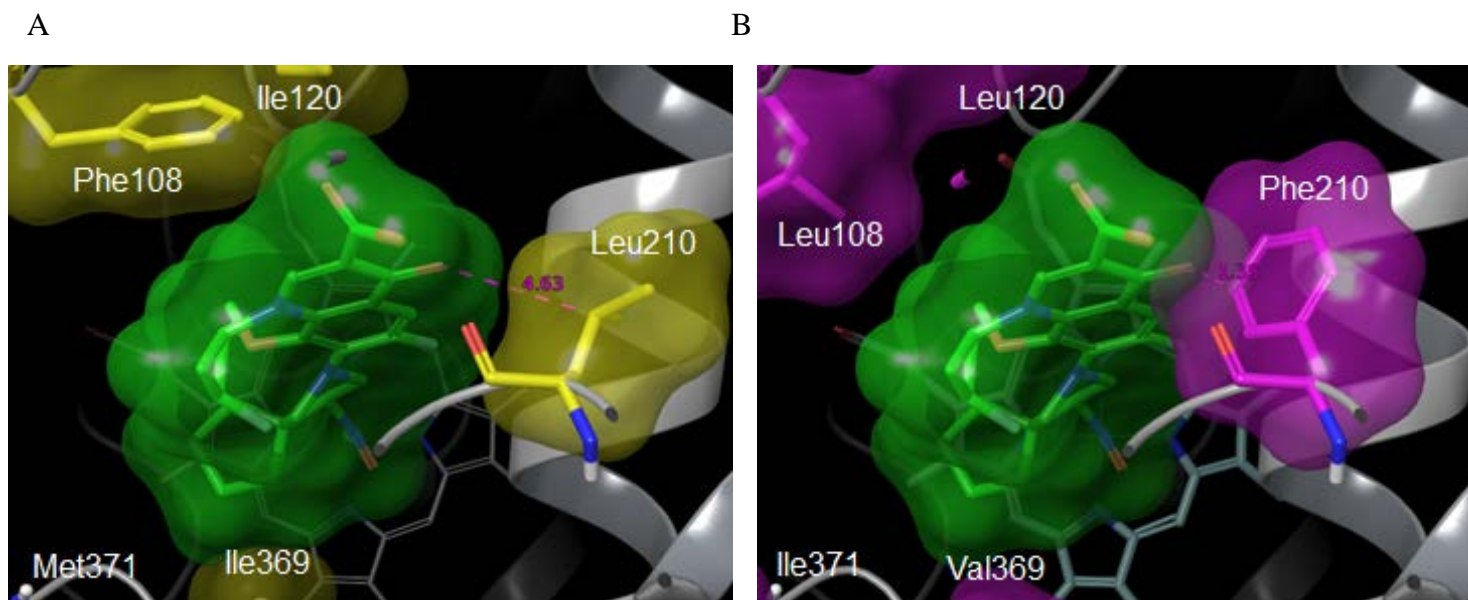


図 22. Compound 6 のニトロソ体の結合における CYP3A4 (A)および CYP3A5 (B)の 210 番目のアミノ酸残基の影響

Compound 6 のニトロソ体の分子表面を緑で示す。ニトロソ体周辺で CYP3A4 と CYP3A5 とで異なるアミノ酸残基をそれぞれ黄色およびピンク色で示す。

結論および今後の展望

本研究を通じて、CYP3A に対する MBI スクリーニング系の構築によって、創薬初期段階からの MBI による DDI リスクを回避した化合物の合成展開に貢献した。また、フルオロキノロン系抗菌薬の MBI 発現メカニズムに関する一連の解析から、MBI 原因構造推定に関する手法を示すことができた。さらに CYP3A4 と CYP3A5 の基質結合ポケット構造の違いが MI complex 形成に影響を与える可能性、また MI complex 形成はヘム鉄との結合部位付近への置換基導入による立体障害の付与により阻害されうることを示した。

第 1 章では、CYP3A に対するハイスループットの MBI スクリーニング系を構築し、市販薬の評価から、MBI ポテンシャルと臨床血中濃度の関係を明示し、臨床での DDI リスクの情報に基づいて zone 分類した。この図を元に 80% remaining 以上であれば、臨床血中濃度によらず MBI による DDI 発現のリスクは低いことから、80% remaining を本スクリーニング系の判定基準に設定し、80% remaining 以上であれば MBI negative、80% remaining 未満であれば MBI positive とした。創薬段階であっても、化合物の in vitro の薬理活性や先行品の情報などから目標臨床血中濃度を推定することは可能である。この目標臨床血中濃度と MBI スクリーニング結果から、この zone 分類図を元に DDI リスクを把握することが可能であり、本評価系は実際の創薬の現場で活用されている。また、MBI

結合性に関する評価系も構築した。この化合物の CYP に対する結合性に関する情報は、肝毒性発現リスクの把握や、MBI 原因構造の推定に有用である。

第 2 章第 1 節では、CYP3A に対して MBI を示すフルオロキノロン系抗菌薬の MBI 発現メカニズムの解析を行った。MBI 結合性評価から、一連の化合物は側鎖構造の違いにより CYP3A4 に対する結合性が異なることが示された。また CYP3A4 での代謝物構造解析から、MBI の原因構造を同定し、側鎖のアミノ基の結合する環状構造の違いが irreversible および quasi-irreversible inhibition の違いを生じている可能性を示した。さらに、CYP3A4 のドッキングスタディから、compound 8 から compound 10 へのメチル基の導入により MBI ポテンシャルが低減したのは、メチル基の立体障害により MI complex 形成が阻害されたためと推察した。この研究を通じ、ヘム鉄に対して立体障害を生じうる置換基を導入することにより、MI complex 形成が阻害できると考えられ、MBI 回避の合成展開に新たな知見を得ることができた。

第 2 章第 2 節では、フルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A4 と CYP3A5 に対する MBI 発現の違いを評価した。Compound 1-5 は両分子種に対して同等な irreversible inhibition を示すのに対し、CYP3A4 の quasi-irreversible inhibitor である compound 6-9 は CYP3A5 に対しては阻害作用を示さなかった。代謝物構造解析により、両分子種で生成される代謝物は同じであることを示した。両分子種

による compound 6-9 のニトロソ体生成能はほぼ同等であるにも関わらず、MI complex 形成に差が生じるのは、両分子種の基質結合ポケット構造の違いに起因している可能性を CYP3A5 のホモロジーモデルと CYP3A4 の結晶構造との重ね合わせにより示した。ラジカルによるアポ蛋白への共有結合は基質結合ポケットの構造の違いに依存しないが、ニトロソ体による MI complex の形成にはニトロソ体とヘム鉄との間が至適な距離と角度が保たれている必要があり、基質結合ポケット構造の違いが大きく影響するものと示唆された。本研究結果は、阻害剤による CYP3A4 と CYP3A5 に対する阻害作用、特に quasi-irreversible inhibition の違いについて新たな知見を得ることができた。

CYP ファミリーの中で CYP3A に次いで薬物代謝に重要な isoform には CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 等がある。社内ではこれらの分子種に対する MBI スクリーニング系も構築し、化合物の評価を実施している。しかし、文献情報や今までの市販薬や社内化合物で評価した経験から、これらの CYP3A 以外の分子種に対して直接阻害作用を有する化合物は多く存在するが、MBI を示す化合物は CYP3A に比べて圧倒的に少なく、CYP3A 以外の分子種で MBI が問題となることはほとんどない。そのため、社内でも創薬初期段階では MBI スクリーニング系は基本 CYP3A のみ実施し、必要に応じてその他の分子種の評価を追加している。この分子種による MBI 発現の違いの原因は不明であるが、フル

オロキノロン系抗菌薬の MBI 発現メカニズム解析の研究を通じて得られた知見から、CYP3A のサブファミリーの中でも特に CYP3A4 が MBI に至る反応性中間体を生成しやすい、もしくは生成された反応性中間体がヘム鉄と MI complex を形成するのに至適な距離を保ちやすい等の原因があるのではないかと考えられる。

本研究を通じて得られた知見は、創薬段階での効率的な MBI による DDI リスクを回避した化合物の獲得に貢献することが期待される。MBI スクリーニング系を活用することで、創薬初期段階から化合物の合成展開に合わせてタイムリーに評価をすることが可能である。また、MBI 結合性評価や代謝物構造解析を組み合わせることによって、MBI 原因構造の推定も可能となる。MBI 原因構造が推定されれば、直接的にその原因構造を変換するか、quasi-irreversible inhibitor の場合には、ドッキングスタディで化合物と CYP のヘム鉄の結合部位を確認し、結合部位付近への置換基導入による立体障害の付与で MBI を回避するといった方策を取ることができる。

今回のフルオロキノロン系抗菌薬の場合、第 2 章第 1 節の表 7 に示すキノロン母核と 3 位側鎖のカルボニル基は薬効発現に必須である⁶⁵。さらに末端に塩基性基であるアミノ基を導入することによってカルボニル基と双性イオンを形成し、脂溶性が向上して標的への親和性が向上し、抗菌効果を示す菌種が増える。

そのため、末端のアミノ基も薬効発現に必須である。今回用いた化合物群は、アミノ基を初発代謝として反応性中間体を生成し、**irreversible** もしくは **quasi-irreversible inhibition** を引き起こすことが示唆されたが、薬効発現のためにこのアミノ基を置換することはできない。今回の研究から、**compound 1** ではアミノ基の結合するシクロプロパン環の歪みのため、**N** ラジカルが不安定で環が開いて **C** ラジカルが生じると示唆された。このシクロプロパン環を変換することで **C** ラジカル生成を抑えることができる可能性が考えられるが、シクロプロパン環は肺炎球菌などのグラム陽性菌に対する抗菌活性に必須であり⁶⁶、この環を大きくすると薬効発現に至適な脂溶性から解離し、活性が低下する。

Quasi-irreversible inhibitor の **compound 8** では、**compound 10** のようにアミノ基の隣にメチル基を導入することにより **MBI** 回避が可能となった⁴⁴。また、一般的には、**CYP** は膜蛋白質であり、その基質結合部位が **lipophilic** であることから、脂溶性と **CYP** に対する阻害作用は相関することが知られており、脂溶性が増加すると **CYP** に対する阻害作用も増大する⁶⁷⁻⁶⁹。実際に脂溶性と **MBI** スクリーニングでの % **remaining** は相関する場合が多く、脂溶性低減も **MBI** 回避に有効であるが、同時に薬効も低下する場合があるので注意が必要である⁷⁰。

さらにこの創薬研究の充実により **DDI** リスクを回避した開発候補化合物を早期に獲得できれば、前臨床段階において詳細な **DDI** リスクアセスメントや臨床

段階での DDI 試験の必要がなくなり、臨床試験の短縮および成功確立の向上にもつながることが期待される。本研究がより安全で使いやすい薬物の研究開発に貢献することを期待する。

謝辞

本研究の推進にあたり、終始懇切なる御指導、御鞭撻を賜りました東京大学大学院薬学系研究科分子薬物動態学教室 教授 楠原 洋之 先生に深謝致します。

本研究の機会を与えてくださり、研究の推進に多大なるご支援を賜りました旧第一製薬株式会社 創剤代謝研究所 元所長 故 須藤 賢一 博士、公益財団法人木原記念横浜生命科学振興財団 岡崎 治 博士、第一三共株式会社薬物動態研究所 所長 安東 治 博士に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、直接の御指導、御助言を頂きました第一三共株式会社 臨床薬理部 奥平 典子 博士、第一三共株式会社 薬物動態研究所 井上 晋一 博士に深謝致します。

本研究を共に遂行していただいた第一三共株式会社薬物動態研究所 中村 晃一 氏、高草 英生 博士、第一三共 RD ノバーレ株式会社合成化学研究部 木村 貴子 氏をはじめとする共同研究者の皆様、討論に参加してくださいましたすべての皆様に深謝致します。

実験方法

第1章 CYP3A に対する MBI による DDI リスク評価系の構築

試薬

Midazolam maleate salt, testosterone, nifedipine, dextrorphan tartrate, 17 α -ethynylestradiol, ketoconazole, potassium ferricyanide および glucose-6-phosphate は Sigma (St. Louis, MO)より購入した。1'-Hydroxymidazolam, 6 β -hydroxytestosterone および oxidized nifedipine は Ultrafine (Manchester, UK)より購入した。0.5 M sodium phosphate buffer, MgCl₂•6H₂O および dimethyl sulfoxide (DMSO)はナカライテスク (Kyoto, Japan)より購入した。β-NADP⁺および glucose-6-phosphate dehydrogenase はオリエンタル酵母(Tokyo, Japan)より購入した。ヒト肝ミクロソーム(HLM)は XenoTech LLC (Lenexa, KS)より購入した。阻害剤として用いた市販薬はすべて試薬販売元より購入したものを使用した。他の試薬は市販の特級品、もしくは分析用を購入して用いた。

HLM での MBI スクリーニング系

本スクリーニング系は Beckman Biomek FX (Bekman Coulter Inc., Fullerton, CA)を用いて自動化した。以下の反応はアルミプレートで 37°C に温めた 96 穴平底プレート(Nalge Nunc, Fullerton, CA)上で以下の手順で行った。

1. 0.1 M sodium phosphate buffer および HLM (0.5 mg/mL for midazolam and nifedipine または 1 mg/mL for testosterone)含有 preincubation 溶液 160 μ L に阻害剤もしくはコントロール（阻害剤非含有）溶液(10% v/v DMSO) 20 μ L を添加した後、20 μ L の NADPH generating system（25 mM β -NADP⁺, 250 mM glucose-6-phosphate, 20 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase, 100 mM MgCl₂·6H₂O および 0.1 M sodium phosphate buffer 含有）を添加して反応を開始し、0 min および 30 min preincubation する。

2. 0 min および 30 min preincubation 後、1 液を 20 μ L 分取し、0.1 M sodium phosphate buffer および基質溶液(25 μ M midazolam, 200 μ M testosterone または 50 μ M nifedipine)含有 incubation 溶液 180 μ L に添加して 10 min incubation する。

3. 10 min incubation 後、2 液を 50 μ L 分取し、4°C に冷却したアルミプレート上の 96 穴丸底プレートに分注した 200 nM dextrorphan (internal standard)含有メタノール溶液 200 μ L に添加して反応を終了させる。

4. サンプルは遠心後、上清を Millipore MultiScreen (Millipore, Molsheim, France)によりフィルターろ過し、LC/MS を用いて 1'-hydroxymidazolam を定量する。

MBI パラメータ(K_I および k_{inact})評価系

上述の MBI スクリーニング系の preincubation 時間を 0, 15 および 30 min に、被験化合物濃度を 5 濃度とし、MBI スクリーニング系と同様の手順で実施した。

MBI 結合性評価系

以下の手順で行った。

1. 上述の MBI スクリーニング系の手順 1 と同様。
2. 0 min および 30 min preincubation 後、1 液を 50 μ L 分取し、0.1 M sodium phosphate buffer 中 2 mM potassium ferricyanide 含有および非含有溶液 50 μ L に添加して 10 min incubation する。
3. 10 min incubation 後、2 液を 40 μ L 分取し、上述の MBI スクリーニング系と同様の組成の incubation 溶液 160 μ L に添加して 10 min incubation する。以降の手順は上述の MBI スクリーニング系の手順 3 および 4 と同様。

データ解析

MBI スクリーニング系において、阻害剤存在下での 0 min および 30 min preincubation 後の代謝活性のコントロール（阻害剤非存在下）に対する比（% of control_(0 min)および% of control_(30 min)）は以下の式より求めた。

$$\% \text{ of control}_{(0min)} = \frac{v_{(0min,+inhibitor)}}{v_{(0min,-inhibitor)}} \times 100 \quad (\text{式 1})$$

$$\% \text{ of control}_{(30min)} = \frac{v_{(30min,+inhibitor)}}{v_{(30min,-inhibitor)}} \times 100 \quad (\text{式 2})$$

$V_{(0 \text{ or } 30 \text{ min, } \pm \text{inhibitor})}$ は阻害剤存在下(+)または非存在下(-)での 0 min または 30 min preincubation 後の代謝活性を示す。30 min preincubation 後の残存酵素活性(% remaining)は以下の式より求めた。

$$\% \text{ remaining} = \frac{\% \text{ of control}_{(30\text{min})}}{\% \text{ of control}_{(0\text{min})}} \times 100 \quad (\text{式 } 3)$$

MBI パラメータ (K_I および k_{inact}) の算出には、各阻害剤濃度ごとに preincubation 時間に対して % remaining の自然対数をプロットし、その直線の傾き (k_{obs}) を算出する。 k_{obs} と阻害剤濃度 (I) を以下の式に fitting させ、 K_I (見かけの阻害定数) および k_{inact} (最大不活化速度) を求める。

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}} \times I}{K_I + I} \quad (\text{式 } 4)$$

第 2 章

社内で合成されたフルオロキノロン系抗菌薬の CYP3A に対する MBI 発現メカニズムの解析

試薬

表 7 に示す本試験で使用したフルオロキノロン系抗菌薬はいずれも第一製薬株式会社（現第一三共株式会社）において合成された。Midazolam maleate salt は Sigma より購入した。1'-Hydroxymidazolam は Ultrafine より購入した。0.5 M potassium phosphate buffer, [$^{13}\text{C}_3$]hydroxymidazolam, NADPH Regenerating System Solution A および B、および recombinant human CYP3A4 および CYP3A5 Supersomes containing P450 reductase and cytochrome b5 は Corning (Woburn, MA) より購入した。フェリシアン化カリウムは関東化学株式会社（東京）より購入した。ヒト肝ミクロソーム(HLM)は XenoTech LLC より購入した。他の試薬は市販の特級品、もしくは分析用を購入して用いた。

Recombinant human CYP3A Supersomes を用いた MBI 結合性

以下の反応は 37°C 水浴中で 96 穴チューブを用いて以下の手順で行った。

1. 0.1 M potassium phosphate buffer, 10 pmol/mL recombinant CYP3A4 または CYP3A5 Supersomes、および被験化合物(10, 30 または 100 μM)もしくはコントロール（阻害剤非含有）溶液(final 1% v/v DMSO)からなる preincubation 溶

液を 270 μL ずつ分注し、30 μL の NADPH generating system (NADPH Regenerating System Solutions A および B を用いて調製) を添加して反応を開始し、0 min および 30 min preincubation する。

2. 0 min および 30 min preincubation 後、1 液を 50 μL 分取し、0.1 M potassium phosphate buffer 中 2 mM potassium ferricyanide 含有および非含有溶液 50 μL に添加して 10 min incubation する。

3. 10 min incubation 後、2 液を 40 μL 分取し、0.1 M potassium phosphate buffer および 25 μM midazolam (final 1% v/v acetonitrile) 含有の incubation 溶液 160 μL に添加して 10 min incubation する。

4. 10 min incubation 後、3 液を 100 μL 分取し、96 穴プレートに分注した 2 μM [$^{13}\text{C}_3$]hydroxymidazolam (internal standard) 含有アセトニトリル溶液 50 μL とメタノール 100 μL の混合液に添加して反応を終了させる。

5. サンプルは遠心後、上清を Waters Acquity UPLC および TQD system (Waters) からなる LC-MS/MS を用いて 1'-hydroxymidazolam を定量する。

MBI パラメータ(K_I および k_{inact})評価系

以下の反応は 37°C 水浴中で 96 穴チューブを用いて以下の手順で行った。

1. 0.1 M potassium phosphate buffer, 10 pmol/mL recombinant CYP3A4 または 1 CYP3A5 Supersomes、および被験化合物 (1 化合物あたり 5-6 濃度) もしくは

コントロール（阻害剤非含有）溶液(final 1% v/v DMSO)からなる preincubation 溶液を 180 μ L ずつ分注し、20 μ L の NADPH generating system を添加して反応を開始する。

2. 各時間（compound 1 では 0, 2, 5 min、compound 6 では 0, 5, 15min）

preincubation 後、1 液を 20 μ L 分取し、0.1 M potassium phosphate buffer および 25 μ M midazolam (final 1% v/v acetonitrile)含有の incubation 溶液 180 μ L に添加して 10 min incubation する。以降の手順は上述の Recombinant human CYP3A Supersomes を用いた MBI 結合性評価の手順 4 および 5 と同様。

データ解析

第 1 章のデータ解析と同様に行った。

MI complex 形成確認のための吸光度評価

96 穴プレートを用いて以下の手順で行った。

1. 0.1 M potassium phosphate buffer, 100 pmol/mL recombinant CYP3A4 または CYP3A5 Supersomes、および 50 μ M の被験化合物またはコントロール（被験化合物非含有）(final 1% v/v DMSO)からなる反応液を 180 μ L ずつ分注し、37°C で 5 min preincubation する。
2. 反応液に 20 μ L の NADPH generating system を添加して反応を開始し、VersaMax microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA)を用いて 37°C で

20 min, 455 nm と 490 nm の吸光度を測定する。この吸光度の結果から、455 nm と 490 nm の吸光度差を計算する。

Recombinant human CYP3A Supersomes での被験化合物の代謝物構造解析

以下の手順で行った。

1. 0.1 M potassium phosphate buffer および 100 pmol/mL recombinant human

CYP3A4 または CYP3A5 Supersomes を含む incubation 溶液 890 μ L に対し、被験化合物 (final 50 μ M in 1% v/v DMSO) 10 μ L を添加してそれを 450 μ L ずつ 2 つのチューブに分注し、以下のように 0 min および 30 min incubation サンプルを調製する。

0 min incubation サンプル : Acetonitrile を 500 μ L 添加後、NADPH generating system を 50 μ L 添加する。

30 min incubation サンプル : 5 min prewarm 後、NADPH generating system を 50 μ L 添加して 30 min incubation 後に acetonitrile を 500 μ L 添加する。

2. 両 incubation サンプルを 9000 g で 3 min 遠心し、上清を遠心エバポレーターで濃縮後、得られたサンプルは LTQ-Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA) および Acquity UPLC PDA system (Waters) からなる LC-MS/MS で分析する。

Compound 6 およびそのニトロソ体と **CYP3A4** とのドッキングスタディ

Compound 6 およびそのニトロソ体の CYP3A4 に対するドッキング作成には、それぞれ CYP3A4 の結晶構造の Protein Data Bank (PDB) code 2V0M⁷¹ および PDB code 4I4G⁷² を用いた。化合物の 2 次元構造を元に、Maestro の LigPrep module (version 3.5; Schrödinger, LLC, New York, NY)を用いて 3 次元化を行った。LigPrep 出力構造は、pH 7 でのイオン化状態を考慮した 3 次元構造であるが、compound 6 はアミン-NH₂ の lone pair が鉄に配位することが知られているため、手で形式電荷を 0 に編集した (-NH₃⁺⇒-NH₂に変更)。ドッキングは Maestro の Glide docking module (version 3.5; Schrödinger, LLC)を用いて行った。また、Glide ではアミン-NH₂ やニトロソ-N=O の窒素ローンペアを鉄の配位子として認識しなかったため、既知結晶構造情報からヘム鉄に配位している座標を検索し、ドッキング時の拘束条件に用いた。具体的には、CYP3A4 のヘムに既知結晶構造（アミンの場合は、Cambridge Structural Database code CICNEH⁷³、ニトロソ体の場合は PDB code 4M4A⁷⁴）を重ね合せた座標を準備しておき、既知結晶構造側の配位子（-C-NH₂、-C-N=O）の位置に compound 6 または compound 6 ニトロソ体の対応する化合物構造が RMSD 0.75Å 以下の位置に来るよう位置拘束をかけた条件でドッキングを実施した。それぞれのドッキングモデルに対し、該当する位置にメチル基を手動で付加することにより、メチル化体のドッキングモデルを構築した。

CYP3A5 のホモロジーモデリング

CYP3A5 のホモロジーモデリングは、鋳型構造を CYP3A4 結晶構造 (PDB code 4I4G) ⁷² として Maestro の Prime homology modeling module (version 4.1, Schrödinger,LLC)を用いて実施した。まず、CYP3A4 の結晶構造 4I4G のアミノ酸配列と CYP3A5 のアミノ酸配列(UniProt code P20815)のアラインメントを実施した。そのアラインメントをもとに、CYP3A4 結晶構造をコピーして CYP3A5 と異なるアミノ酸の側鎖を CYP3A5 のアミノ酸に変異させることで、CYP3A5 の初期モデルを得た。続いて、変異を導入した CYP3A5 のアミノ酸側鎖の構造精密化を Maestro の Prime protein refinement module (Schrödinger,LLC)を用いて実施した。

参考文献

1. Wienkers, L.C. & Heath, T.G. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov* **4**, 825-33 (2005).
2. Nettleton, D.O. & Einolf, H.J. Assessment of cytochrome p450 enzyme inhibition and inactivation in drug discovery and development. *Curr Top Med Chem* **11**, 382-403 (2011).
3. Jacobson, T.A. Comparative pharmacokinetic interaction profiles of pravastatin, simvastatin, and atorvastatin when coadministered with cytochrome P450 inhibitors. *Am J Cardiol* **94**, 1140-6 (2004).
4. Omar, M.A. & Wilson, J.P. FDA adverse event reports on statin-associated rhabdomyolysis. *Ann Pharmacother* **36**, 288-95 (2002).
5. Po, A.L. & Zhang, W.Y. What lessons can be learnt from withdrawal of mibefradil from the market? *Lancet* **351**, 1829-30 (1998).
6. Monahan, B.P. et al. Torsades de pointes occurring in association with terfenadine use. *JAMA* **264**, 2788-90 (1990).
7. von Moltke, L.L., Greenblatt, D.J., Duan, S.X., Harmatz, J.S. & Shader, R.I. In vitro prediction of the terfenadine-ketoconazole pharmacokinetic interaction. *J Clin Pharmacol* **34**, 1222-7 (1994).

8. Lin, J.H. & Lu, A.Y. Inhibition and induction of cytochrome P450 and the clinical implications. *Clin Pharmacokinet* **35**, 361-90 (1998).
9. Murray, M. Drug-mediated inactivation of cytochrome P450. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **24**, 465-70 (1997).
10. Fontana, E., Dansette, P.M. & Poli, S.M. Cytochrome p450 enzymes mechanism based inhibitors: common sub-structures and reactivity. *Curr Drug Metab* **6**, 413-54 (2005).
11. Zhou, S. et al. Therapeutic drugs that behave as mechanism-based inhibitors of cytochrome P450 3A4. *Curr Drug Metab* **5**, 415-42 (2004).
12. Zhou, S. et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet* **44**, 279-304 (2005).
13. Ito, K., Brown, H.S. & Houston, J.B. Database analyses for the prediction of in vivo drug-drug interactions from in vitro data. *Br J Clin Pharmacol* **57**, 473-86 (2004).
14. Palovaara, S. et al. Effect of an oral contraceptive preparation containing ethinylestradiol and gestodene on CYP3A4 activity as measured by midazolam 1'-hydroxylation. *Br J Clin Pharmacol* **50**, 333-7 (2000).

15. Schoors, D.F., Vercruysse, I., Musch, G., Massart, D.L. & Dupont, A.G.
Influence of nicardipine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of propranolol in healthy volunteers. *Br J Clin Pharmacol* **29**, 497-501 (1990).
16. Tran, J.Q., Petersen, C., Garrett, M., Hee, B. & Kerr, B.M. Pharmacokinetic interaction between amprenavir and delavirdine: evidence of induced clearance by amprenavir. *Clin Pharmacol Ther* **72**, 615-26 (2002).
17. Guengerich, F.P. Common and uncommon cytochrome P450 reactions related to metabolism and chemical toxicity. *Chem Res Toxicol* **14**, 611-50 (2001).
18. Grimm, S.W. et al. The conduct of in vitro studies to address time-dependent inhibition of drug-metabolizing enzymes: a perspective of the pharmaceutical research and manufacturers of America. *Drug Metab Dispos* **37**, 1355-70 (2009).
19. Obach, R.S., Walsky, R.L. & Venkatakrishnan, K. Mechanism-based inactivation of human cytochrome p450 enzymes and the prediction of drug-drug interactions. *Drug Metab Dispos* **35**, 246-55 (2007).
20. Atkinson, A., Kenny, J.R. & Grime, K. Automated assessment of time-dependent inhibition of human cytochrome P450 enzymes using liquid

- chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Drug Metab Dispos* **33**, 1637-47 (2005).
21. Lim, H.K. et al. Automated screening with confirmation of mechanism-based inactivation of CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, and CYP1A2 in pooled human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **33**, 1211-9 (2005).
 22. Yuan, R., Madani, S., Wei, X.X., Reynolds, K. & Huang, S.M. Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study in vitro drug interactions. *Drug Metab Dispos* **30**, 1311-9 (2002).
 23. Kenworthy, K.E., Bloomer, J.C., Clarke, S.E. & Houston, J.B. CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 in vitro probe substrates. *Br J Clin Pharmacol* **48**, 716-27 (1999).
 24. Stresser, D.M. et al. Substrate-dependent modulation of CYP3A4 catalytic activity: analysis of 27 test compounds with four fluorometric substrates. *Drug Metab Dispos* **28**, 1440-8 (2000).
 25. Wang, R.W., Newton, D.J., Liu, N., Atkins, W.M. & Lu, A.Y. Human cytochrome P-450 3A4: in vitro drug-drug interaction patterns are substrate-dependent. *Drug Metab Dispos* **28**, 360-6 (2000).

26. Ullrich, V. & Schnabel, K.H. Formation and binding of carbanions by cytochrome P-450 of liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **1**, 176-83 (1973).
27. Buening, M.K. & Franklin, M.R. SKF 525-A inhibition, induction, and 452-nm complex formation. *Drug Metab Dispos* **4**, 244-55 (1976).
28. Muakkassah, S.F., Bidlack, W.R. & Yang, W.C. Reversal of the effects of isoniazid on hepatic cytochrome P-450 by potassium ferricyanide. *Biochem Pharmacol* **31**, 249-51 (1982).
29. Schulz, M. & Schmoldt, A. Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics. *Pharmazie* **58**, 447-74 (2003).
30. Bachmann, K.A. & Lewis, J.D. Predicting inhibitory drug-drug interactions and evaluating drug interaction reports using inhibition constants. *Ann Pharmacother* **39**, 1064-72 (2005).
31. Tucker, G.T., Houston, J.B. & Huang, S.M. Optimizing drug development: strategies to assess drug metabolism/transporter interaction potential--toward a consensus. *Pharm Res* **18**, 1071-80 (2001).
32. Obach, R.S. et al. The utility of in vitro cytochrome P450 inhibition data in the prediction of drug-drug interactions. *J Pharmacol Exp Ther* **316**, 336-48 (2006).

33. Ma, B., Prueksaritanont, T. & Lin, J.H. Drug interactions with calcium channel blockers: possible involvement of metabolite-intermediate complexation with CYP3A. *Drug Metab Dispos* **28**, 125-30 (2000).
34. Zhou, S., Chan, E., Duan, W., Huang, M. & Chen, Y.Z. Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metab Rev* **37**, 41-213 (2005).
35. Kuhn, W., Humpel, M., Biere, H. & Gross, D. Influence of repeated oral doses of ethinylestradiol on the metabolic disposition of [¹³C₂]-ethinylestradiol in young women. *Eur J Clin Pharmacol* **50**, 231-5 (1996).
36. Saber-Tehrani, A.S., Bruce, R.D. & Altice, F.L. Pharmacokinetic drug interactions and adverse consequences between psychotropic medications and pharmacotherapy for the treatment of opioid dependence. *Am J Drug Alcohol Abuse* **37**, 1-11 (2011).
37. Thummel, K.E. & Wilkinson, G.R. In vitro and in vivo drug interactions involving human CYP3A. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **38**, 389-430 (1998).
38. Elkader, A. & Sproule, B. Buprenorphine: clinical pharmacokinetics in the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet* **44**, 661-80 (2005).

39. Ibrahim, R.B., Wilson, J.G., Thorsby, M.E. & Edwards, D.J. Effect of buprenorphine on CYP3A activity in rat and human liver microsomes. *Life Sci* **66**, 1293-8 (2000).
40. Walgren, J.L., Mitchell, M.D. & Thompson, D.C. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol* **35**, 325-61 (2005).
41. Fujikawa, K., Chiba, M., Tanaka, M. & Sato, K. In vitro antibacterial activity of DX-619, a novel des-fluoro(6) quinolone. *Antimicrob Agents Chemother* **49**, 3040-5 (2005).
42. Otani, T. et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of DK-507k, a novel fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3750-9 (2003).
43. Imamura, Y. et al. Effect of the fluoroquinolone antibacterial agent DX-619 on the apparent formation and renal clearances of 6beta-hydroxycortisol, an endogenous probe for CYP3A4 inhibition, in healthy subjects. *Pharm Res* **30**, 447-57 (2013).
44. Odagiri, T. et al. Design, synthesis, and biological evaluations of novel 7-[7-amino-7-methyl-5-azaspiro[2.4]heptan-5-yl]-8-methoxyquinolines with potent antibacterial activity against respiratory pathogens. *J Med Chem* **56**, 1974-83 (2013).

45. Furuta, T. et al. Evidence for the validity of cortisol 6 beta-hydroxylation clearance as a new index for in vivo cytochrome P450 3A phenotyping in humans. *Drug Metab Dispos* **31**, 1283-7 (2003).
46. Ushiyama, H., Echizen, H., Nachi, S. & Ohnishi, A. Dose-dependent inhibition of CYP3A activity by clarithromycin during *Helicobacter pylori* eradication therapy assessed by changes in plasma lansoprazole levels and partial cortisol clearance to 6beta-hydroxycortisol. *Clin Pharmacol Ther* **72**, 33-43 (2002).
47. Hoshino, K. et al. In vitro and in vivo antibacterial activities of DC-159a, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 65-76 (2008).
48. Franklin, M.R. Cytochrome P450 metabolic intermediate complexes from macrolide antibiotics and related compounds. *Methods Enzymol* **206**, 559-73 (1991).
49. Cerny, M.A. & Hanzlik, R.P. Cyclopropylamine inactivation of cytochromes P450: role of metabolic intermediate complexes. *Arch Biochem Biophys* **436**, 265-75 (2005).
50. Cerny, M.A. & Hanzlik, R.P. Cytochrome P450-catalyzed oxidation of N-benzyl-N-cyclopropylamine generates both cyclopropanone hydrate and

3-hydroxypropionaldehyde via hydrogen abstraction, not single electron transfer.

J Am Chem Soc **128**, 3346-54 (2006).

51. Mansuy, D., Gans, P., Chottard, J.C. & Bartoli, J.F. Nitrosoalkanes as Fe(II) ligands in the 455-nm-absorbing cytochrome P-450 complexes formed from nitroalkanes in reducing conditions. *Eur J Biochem* **76**, 607-15 (1977).
52. Barbara, J.E., Kazmi, F., Parkinson, A. & Buckley, D.B. Metabolism-dependent inhibition of CYP3A4 by lapatinib: evidence for formation of a metabolic intermediate complex with a nitroso/oxime metabolite formed via a nitron intermediate. *Drug Metab Dispos* **41**, 1012-22 (2013).
53. Negrier, M. et al. Role of heme iron coordination and protein structure in the dynamics and geminate rebinding of nitric oxide to the H93G myoglobin mutant: implications for nitric oxide sensors. *J Biol Chem* **281**, 10389-98 (2006).
54. Franklin, M.R. Enhanced rates of cytochrome P450 metabolic-intermediate complex formation from nonmacrolide amines in rifampicin-treated rabbit liver microsomes. *Drug Metab Dispos* **23**, 1379-82 (1995).
55. de Wildt, S.N., Kearns, G.L., Leeder, J.S. & van den Anker, J.N. Cytochrome P450 3A: ontogeny and drug disposition. *Clin Pharmacokinet* **37**, 485-505 (1999).

56. Niwa, T., Yasumura, M., Murayama, N. & Yamazaki, H. Comparison of catalytic properties of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by molecular docking simulation. *Drug Metab Lett* **8**, 43-50 (2014).
57. Lamba, J.K., Lin, Y.S., Schuetz, E.G. & Thummel, K.E. Genetic contribution to variable human CYP3A-mediated metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* **54**, 1271-94 (2002).
58. Niwa, T., Murayama, N., Emoto, C. & Yamazaki, H. Comparison of kinetic parameters for drug oxidation rates and substrate inhibition potential mediated by cytochrome P450 3A4 and 3A5. *Curr Drug Metab* **9**, 20-33 (2008).
59. Pearson, J.T. et al. Differential time-dependent inactivation of P450 3A4 and P450 3A5 by raloxifene: a key role for C239 in quenching reactive intermediates. *Chem Res Toxicol* **20**, 1778-86 (2007).
60. McConn, D.J., 2nd, Lin, Y.S., Allen, K., Kunze, K.L. & Thummel, K.E. Differences in the inhibition of cytochromes P450 3A4 and 3A5 by metabolite-inhibitor complex-forming drugs. *Drug Metab Dispos* **32**, 1083-91 (2004).
61. Takakusa, H. et al. Metabolic intermediate complex formation of human cytochrome P450 3A4 by lapatinib. *Drug Metab Dispos* **39**, 1022-30 (2011).

62. Wang, Y.H., Jones, D.R. & Hall, S.D. Differential mechanism-based inhibition of CYP3A4 and CYP3A5 by verapamil. *Drug Metab Dispos* **33**, 664-71 (2005).
63. Ekins, S., Stresser, D.M. & Williams, J.A. In vitro and pharmacophore insights into CYP3A enzymes. *Trends Pharmacol Sci* **24**, 161-6 (2003).
64. Wang, H. et al. Structure-function relationships of human liver cytochromes P450 3A: aflatoxin B1 metabolism as a probe. *Biochemistry* **37**, 12536-45 (1998).
65. Takahashi, H., Hayakawa, I. & Akimoto, T. [The history of the development and changes of quinolone antibacterial agents]. *Yakushigaku Zasshi* **38**, 161-79 (2003).
66. Takemura, M. & Hayakawa, I. Recent advances in the field of quinolones. *Farmaco* **56**, 37-40 (2001).
67. Gleeson, M.P. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *J Med Chem* **51**, 817-34 (2008).
68. Lewis, D.F. & Dickins, M. Baseline lipophilicity relationships in human cytochromes P450 associated with drug metabolism. *Drug Metab Rev* **35**, 1-18 (2003).

69. Waring, M.J. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opin Drug Discov* **5**, 235-48 (2010).
70. Hansch, C. & Dunn, W.J., 3rd. Linear relationships between lipophilic character and biological activity of drugs. *J Pharm Sci* **61**, 1-19 (1972).
71. Ekroos, M. & Sjogren, T. Structural basis for ligand promiscuity in cytochrome P450 3A4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 13682-7 (2006).
72. Sevrioukova, I.F. & Poulos, T.L. Understanding the mechanism of cytochrome P450 3A4: recent advances and remaining problems. *Dalton Trans* **42**, 3116-26 (2013).
73. Munro, O.Q., Madlala, P.S., Warby, R.A., Seda, T.B. & Hearne, G. Structural, Conformational, and Spectroscopic Studies of Primary Amine Complexes of Iron(II) Porphyrins. *Inorg Chem* **38**, 4724-4736 (1999).
74. Yi, J., Ye, G., Thomas, L.M. & Richter-Addo, G.B. Degradation of human hemoglobin by organic C-nitroso compounds. *Chem Commun (Camb)* **49**, 11179-81 (2013).