

(様式4)

学 位 論 文 概 要

平成 30 年 1 月 9 日

学位申請者

細木 淳 印

学位論文題目

ピペラジン環骨格を有する新規キナーゼ阻害剤のモノアミノオキシダーゼB及びアルデヒドオキシダーゼによる代謝

学位論文の要旨

本研究では、白血病治療薬候補物質として開発された新規キナーゼ阻害剤 KW-2449 が、生体外試験において高い有効性を示すにもかかわらず、臨床試験において十分な有効性を示せなかったこと背景にあるメカニズムを解明することと、それにより、類似薬剤の開発における問題の解決に資することを目的とした。その結果、以下に示すように、KW-2449 からオキソピペラジン型の代謝物 (M1) への比較的稀な代謝経路及び代謝酵素の阻害という、ピペラジン環を有する化合物群に共通して起こる可能性のあるメカニズムを見いだした。

第一に、KW-2449 から M1 への代謝には、代表的な薬物代謝酵素であるシトクローム P450 (CYP) は関与しておらず、KW-2449 がモノアミノオキシダーゼ B (MAO-B) によりイミニウム中間体へと代謝され、次いでこのイミニウム中間体がアルデヒドオキシダーゼ (AO) により M1 へと代謝されることを明らかにした。また、MAO-B 及び AO が代謝に関与した場合にヒトの全身クリアランスを予測する方法について、比較検討を行い、肝細胞の代謝データをサル *in vivo* データで補正することで、実用的精度で予測できることを実証した。

第二に、阻害パラメータの解析から、KW-2449 及び代謝物 M1 はいずれも、反復投与後の M1 濃度低下の原因ではないと考えられる結果を得た。次いで、KW-2449 のイミニウム中間体が AO を強力に不可逆阻害するとともに、内因性タンパクと共有結合することを明らかにした。

以上の結果から、KW-2449 が臨床試験において十分な薬効を示せなかった原因は、MAO-B 及び AO による協奏的代謝にあると推定した。すなわち、KW-2449 が速やかに M1 に代謝されたことで KW-2449 濃度が低下し、次いでイミニウム中間体による AO 阻害のため、薬理作用を有する M1 の濃度も低下して、キナーゼを十分阻害するのに必要な血中濃度を維持することができなかったと考えた。さらに本研究で明らかにしたイミニウム中間体によるタンパクとの共有結合は、臨床における毒性発現の危険性を有していたことを示唆した。

近年、本研究で明らかにした KW-2449 の代謝経路のように、通常の薬物代謝酵素である CYP 以外の薬物代謝酵素 (Non-CYP) である MAO や AO のような酵素で医薬品候補が代謝される事例の報告が増加している。KW-2449 の薬物動態上の問題を改善するため、本研究の前段部で明らかにした KW-2449 の代謝機構を根拠として、MAO-B 及び AO への代謝安定性を高めた後続化合物が合成された。この化合物は薬物動態プロファイル、タンパクとの共有結合量ともに、KW-2449 より改善していた。このことから、医薬品候補化合物が想定外の Non-CYP 代謝を受けた場合に

においても、その代謝経路や毒性懸念のある代謝中間体の物性を分析し、代謝安定性を高める戦略は、より優れた化合物を創出する上で有効であった。また、本研究の対象としたKW-2449が有するピペラジン環のようなN-ヘテロ環構造は、開発中の他の多くの医薬品にも導入されている構造である。本研究で実証した代謝中間体の物性検討方法やヒトの薬物動態予測方法は、今後の医薬品開発において、医薬品の安全性確保と有効性確保の両方の観点から有用であると考えられる。

東京工科大学

博士学位論文

ピペラジン環骨格を有する新規キナーゼ阻害剤の
モノアミンオキシダーゼ B 及び
アルデヒドオキシダーゼによる代謝

平成 30年 3月

細木 淳

目次

略語表	2
第1章 諸言	
第1節 医薬品開発における薬物代謝研究	4
第2節 医薬品開発における Non-CYP 代謝	6
第3節 新規チロシンキナーゼ阻害剤 KW-2449	9
第2章 Monoamine oxidase B 及び Aldehyde oxidase による KW-2449 の代謝	
第1節 研究の目的	12
第2節 実験材料及び方法	13
第3節 結果及び考察	20
第4節 結語	36
第3章 KW-2449 のイミニウムイオン中間体による Aldehyde oxidase 阻害	
第1節 研究の目的	39
第2節 実験材料及び方法	41
第3節 結果及び考察	48
第4節 結語	62
第4章 総括	66
第5章 参考文献	68

略語表

4-HQ: 4-hydroxyquinoline
5-FU: 5-fluoro uracil
ABHD10: α/β hydrolase domain containing 10
ADH: Alcohol dehydrogenase
ALDH: Aldehyde dehydrogenase
ALL: Acute lymphoblastic leukemia
AML: Acute myeloid leukemia
AO: Aldehyde oxidase
AUC: Area under the plasma drug concentration-time curve
CES: Carboxyesterase
CL: Clearance
CML: Chronic myelogenous leukemia
CYP: cytochrome P450
EDTA: ethylenediamine tetraacetic acid
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor
ESI: Electrospray ionization
F: Bioavailability
FDA: Food and Drug Administration
FLT3: FMS-like tyrosine kinase 3
FMO: Flavin-containing monooxygenase
G-6-P: Glucose-6-phosphate
GSH: Glutathione
IC₅₀: half maximal inhibitory concentration
IDA: Information dependent acquisition
IP: Imaging plate
I.S.: Internal Standard
ITD: Internal Tandem Dupli-cation
iv: intravenous
k_{deg}: Turnover rate of the enzyme
K_i: Inhibition constant
k_{inact}: Rate of enzyme inactivation
K_m: Michaelis constant
k_{obs}: Observed rate of enzyme inactivation
KW-2449: (E)-1-{4-[2-(1H-Indazol-3-yl)vinyl]benzoyl}piperazine

LC-MS/MS: Liquid Chromatography-tandem Mass spectrometry
MAO: Monoamine oxidase
MgCl₂: Magnesium chloride
MPTP: 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine
MRM: Multiple reaction monitoring
MS/MS: Tandem Mass spectrometry
NADPH: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NaCN: sodium cyanide
PBPK: physiologically based pharmacokinetic
PDGER: Platelet-derived growth factor receptor
po: oral
PXR: pregnane X receptor
R_B: Blood/plasma ratio
Q_H: Hepatic blood flow
SD: Sprague-Dawley
SDS: Sodium dodecyl sulfate
Tris: Tris(hydroxymethyl)aminomethane
VEGER: vascular endothelial growth factor receptor
V_{max}: Maximum velocity
XO: Xanthine oxidase

第1章 諸言

第1節 医薬品開発における薬物代謝研究

新たな医薬品の創製には、10年以上の期間と数百億円に及ぶ費用が必要であると言われており、2000年以降そのコストは年々上昇している^{1,2,3)}。また、その成功確率は初期の化合物合成段階から考えると1/30000以下である^{4,5)}。このような環境下、医薬品開発の成功確率を向上させることは、製薬企業のみならず、医療経済、公衆衛生の観点からも重要である。

1960年代から1990年代までに臨床第1相試験(Phase1)まで進んだ化合物の開発中止原因の39%は不適切な薬物動態であり、次いで有効性、安全性の問題であった(Figure 1)^{6,7)}。2000年代には、薬物動態を原因とする開発中止事象は減少し、有効性と安全性が主な中止原因であった。しかし、見かけ上薬効不足や毒性が発現した事例であっても、実際には不適切な薬物動態が原因であった事例もあると考えられ、医薬品開発において優れた薬物動態特性を持つ化合物を選抜することは依然として重要である^{8,9)}。

薬物動態研究の目的は、医薬品候補化合物が体内でどのような挙動を示すかを予測することであり、医薬品のADME(吸収、分布、代謝、排泄)が様々な手法で評価されている¹⁰⁾。上市されている医薬品の7割以上はなんらかの代謝を受けて、解毒・体外へ排泄されるため、代謝に関する評価は特に重要である¹¹⁾。また、薬物相互作用の多くは代謝酵素の阻害や誘導に関連したものであり^{12,13)}、安全性の観点からも薬物代謝の研究は重要であると考えられる¹⁴⁾。薬物相互作用による副作用の例として、古くはソリブジンが5-FUの代謝を阻害することで重篤な副作用が発生したソリブジン薬害事件や^{15,16)}、テオフィリンの代謝をニューキノロン系抗菌薬や選択的セロトニン受容体阻害薬が阻害することで起こるテオフィリン中毒が知られている^{17,18)}。

代謝を受ける医薬品の約80%はチトクロムP450(CYP)で代謝されるため^{12,19)}、医薬品開発の現場においては、CYP代謝に関する種々の評価方法が確立されている。肝ミクロソーム画分、S9画分やサイトゾル画分等を用いた*in vitro*の代謝安定性スクリーニング系や^{20,21,22)}、各CYP分子種の阻害を効率的に検出するためのプローブ基質等が精力的に開発されるとともに^{23,24)}、ロボット等を用いてこれら进行评估する自動化システムも開発されている^{25,26)}。代謝酵素の誘導に関しては、従来生細胞による評価が必要であることから、ヒト肝細胞が用いられていたが^{27,28)}、良質な肝細胞の入手や培養時の代謝活性変動など課題は多く、肝癌由来の不死化細胞株であるHepaRG細胞を用いた評価や²⁹⁾、CYPを誘導する核内受容体であるpregnane X receptor(PXR)を用いたレポーター遺伝子アッセイなども用いられてきている³⁰⁾。さらに、コンピューター科学の発展を受け、化合物の代謝安定性や代謝経路を予測する*in silico*システムの開発も試みられている^{31,32,33)}。

CYP代謝に関しては *in vitro* の結果を *in vivo* に外挿する方法論の開発も進んでおり、肝ミクロソームの代謝実験から、ヒトでの肝クリアランス・肝アベイラビリティを精度よく予測できることなどが報告されている³⁴⁾。また、近年は生理学的薬物動態モデル (physiologically based pharmacokinetic model、PBPK モデル) と呼ばれる多数の臓器コンパートメントにより、人体での薬物の挙動をシミュレーションする手法も活用されており^{35,36)}、PBPK モデルを内蔵したソフトウェア (Simcyp、Gastro plus) により、一部の臨床薬物相互作用を省略することも可能となりつつある^{37,38)}。

このように、CYP が関与する代謝に関しては、多様な評価方法が開発されると共に、基質特異性や誘導機構、遺伝子多型による活性変動などの知見が蓄積され、開発化合物候補品の選択や、臨床における薬物相互作用の回避、予測に役立てられている。近年、CYP 代謝を直接の原因として医薬品候補化合物が開発中止になる事例は減少している⁶⁾。

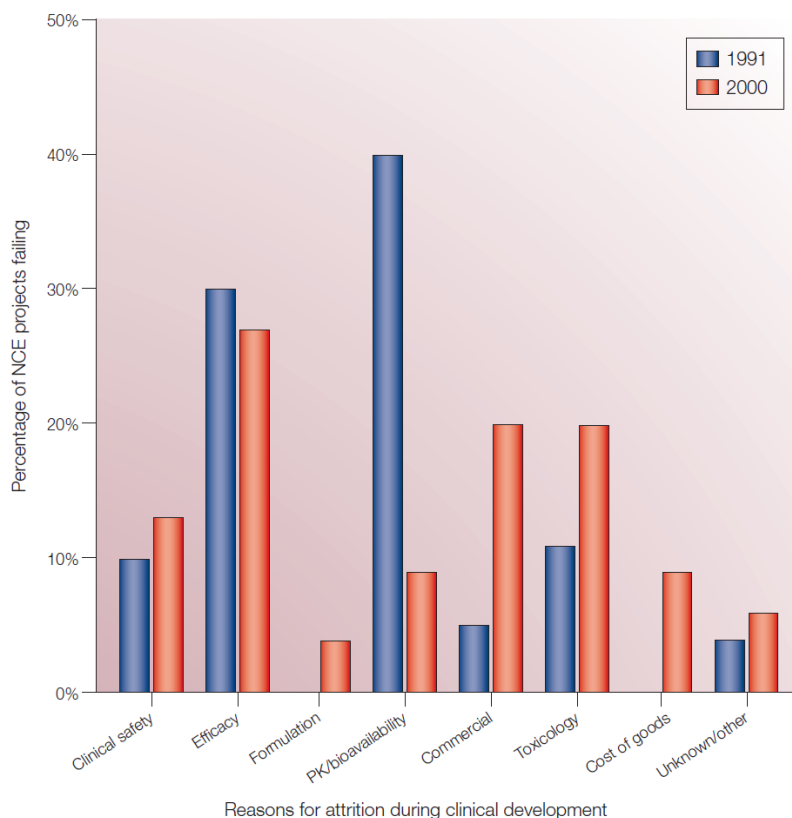


Figure 1 Reasons for attrition during clinical development⁶⁾

第2節 医薬品開発における Non-CYP 代謝

第1節で述べたように、CYPに関するスクリーニング法が進展したことにより、CYP代謝を原因とする医薬品の開発中止は著しく減少した。一方、CYPへの代謝安定性向上を指標に化合物を最適化した結果、開発後期になってからCYP以外の薬物代謝酵素（Non-CYP）で代謝される事例の報告が増加している^{39,40}。Non-CYP酵素はCYPとは異なり、肝臓以外の臓器にも発現していることが多く⁴¹、Non-CYP代謝に由来する高クリアランスにより、臨床開発が中止に追い込まれる事例も多く報告されている^{42,43,44}。

医薬品候補化合物がNon-CYP酵素により代謝される場合、ヒトの全身クリアランスの予測法や、薬物相互作用評価の方法論は十分確立しておらず、予測精度の高い*in vitro*評価系や動物モデルはほとんど存在していない。また、種差や遺伝子多型の情報がない場合も多く、適切な非臨床試験の動物種を選択し、ヒトでの個体差を予測することは困難である。代表的なNon-CYP薬物代謝酵素としてはFlavin-containing monooxygenase（FMO）、Monoamine oxidase（MAO）、Carboxylesterase（CES）、Alcohol dehydrogenase（ADH）、Aldehyde dehydrogenase（ALDH）、Aldehyde oxidase（AO）等が挙げられるが⁴¹、 α/β hydrolase domain containing 10（ABHD10）のように薬物代謝への関与が考えられていなかった酵素の寄与が見いだされるなど⁴⁵、薬物代謝におけるNon-CYP代謝酵素の知見は未だ十分ではない。

医薬品候補化合物がNon-CYPにより代謝されることが明らかとなった場合、その代謝経路を同定し、薬物相互作用の可能性やヒトでのクリアランスを予測することは、医薬品開発の成功確率を向上させる上で重要な課題であると考えられる。

反応性代謝物

Non-CYPが薬物代謝に関与する場合の別の問題点として、反応性代謝物の生成が挙げられる。医薬品はその代謝の過程で、化学的に不安定な代謝物に変換される場合があり、生体中のタンパク質と不可逆的に結合して免疫反応を惹起し、時として重篤な副作用を起こすことが示されている^{46,47}。これらは一般に特異体質性薬物毒性（Idiosyncratic toxicity）と呼ばれているが、発生頻度が低く、投与量等にも依存しないことから、予測することが非常に困難とされている。臨床試験や、上市後にこのような毒性が明らかとなった場合、市場撤退や開発中止を余儀なくされる場合もあり、糖尿病治療薬であるトログリタゾン⁴⁸は、重篤な肝毒性により、上市後に間もなく撤退している⁴⁸。

製薬企業では、このような重篤な毒性を可能な限り避けるため、創薬の初期段階から反応性代謝物のスクリーニングを実施しているが^{49,50}、CYP代謝を念頭に肝ミクロソーム画分などを用いて検討されていることが多く、Non-CYP代謝によって生成する反応性代謝物は見落とされてしまう可能性が考えられる。従って、Non-CYP代謝が認められた場合、毒性回避の観点から、反応性代謝物生成の有無についても検討をすることが重要である。

Monoamine oxidase (MAO)

MAO はフラビンアデニンジヌクレオチド (FAD) 含有の酵素であり、ヒトにおいては基質特異性、発現分布の異なる MAO-A、MAO-B が存在する^{51,52})。MAO は肝臓、腎臓、肺など全身の主要臓器に発現しており、細胞内では主にミトコンドリア画分に局在する。中枢神経系に発現している MAO はセロトニン、ノルアドレナリン、ドーパミンといった神経伝達物質の制御に重要であり⁵³)、MAO-B はパーキンソン病、鬱病、統合失調症といった精神・神経疾患の創薬標的としても有力であると考えられている^{54,55})。

薬物代謝酵素としては、アドレナリン受容体アゴニスト・アンタゴニスト (フェニレフリン、プロプラノロール等) やセロトニン受容体アゴニスト (スマトリプタン等) などを代謝することが知られている^{56,57,58})。MAO は医薬品代謝だけでなく食品に含まれるアミン代謝においても重要であり、MAO-B 阻害によりチーズ効果と呼ばれるチラミン中毒が生じるため、医薬品候補化合物が MAO を阻害する場合、薬物相互作用だけでなく、食品との安全性についても注意が必要である⁵⁹)。

また、CYP 同様、代謝の過程で反応性高いアルデヒドやイミニウムイオン型の反応性代謝物を生じる場合があるため、代謝物の反応性や毒性についても注意が必要である。MAO 代謝に起因した重篤な毒性として、1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) が MAO-B によりイミニウムイオンに代謝されることでパーキンソン病様の症状を惹起することが知られている^{60,61})。

Aldehyde oxidase (AO)

AO は細胞内のサイトゾル画分に存在するモリブデン含有酵素であり、ほとんどの哺乳類に存在し、Xanthine oxidase (XO) と共にキサンチン酸化酵素ファミリーに属している^{62,63})。AO は内因性のアルデヒドや N-ヘテロ環化合物の代謝を担当しているとされているが、その生理学的役割については十分明らかとなっていない。AO は薬物代謝酵素として注目されており、CYP 代謝等で生じる化学的に活性なアルデヒド等の解毒において重要と考えられている。AO によって代謝される医薬品の絶対数は多くないものの、ザレプロン、メタトレキセート、ファンシクロビルなどの酸化代謝やゾニサミドの還元代謝など重要な医薬品の代謝に寄与している^{64,65,66,67})。

近年、開発中の医薬品候補化合物が AO 代謝による低曝露、短半減期のために開発中止になるケースが増加してきている。リウマチ治療薬として開発中であった p38 マップキナーゼ阻害剤 RO1 やパーキンソン病治療薬として開発されていたアデノシン A1/2 拮抗薬 FK3453 が共に AO 代謝による低曝露のため開発中止となっている^{68,69})。これらの事例は、CYP を対象とする従来の代謝安定性試験では、Non-CYP 代謝の寄与を十分に評価できていないことを示唆している。

また、AO による代謝が非臨床試験の段階で判明した場合にも、ヒトでの AO 代謝の寄与を予測することは容易ではない。ヒト肝細胞や肝サイトゾル画分を用いた AO 代謝予測法がいくつかのグループで検討されているものの、いずれも実際のクリアランスを過少評価してしまったことが報告されている^{70,71,72}。AO の薬物代謝酵素としての重要性は増してきているが、その影響や薬物相互作用を予測する方法は十分確立していないのが現状である。

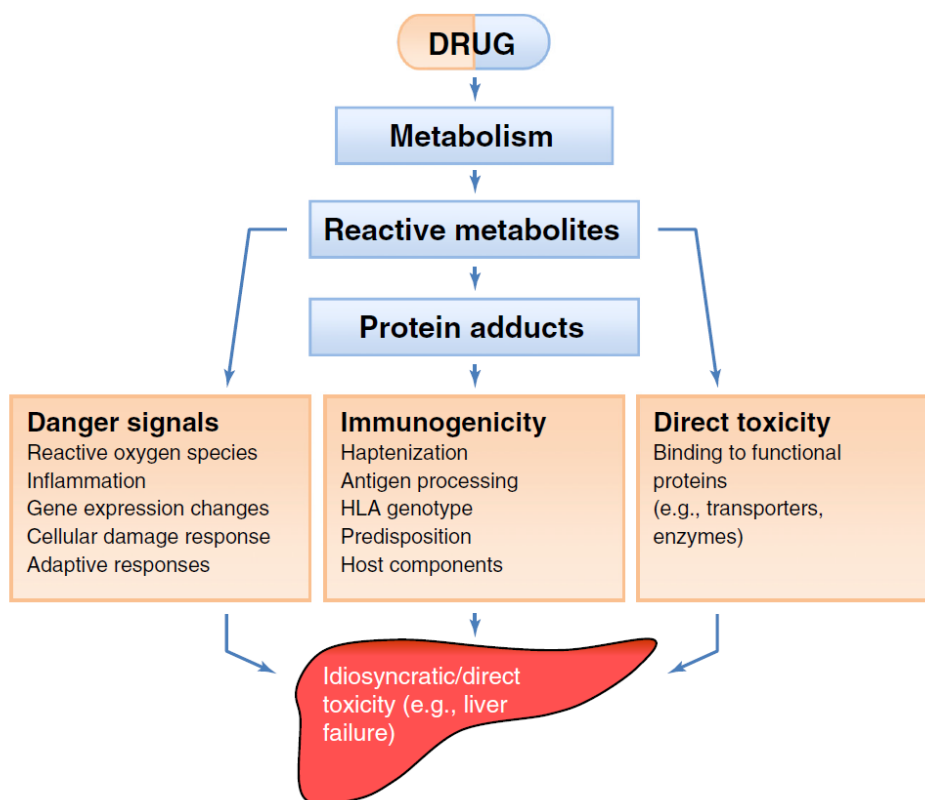


Figure 2 Putative mechanism of drug-induced idiosyncratic toxicity triggered by reactive metabolites⁷³.

第3節 新規チロシンキナーゼ阻害剤 KW-2449

分子標的薬：チロシンキナーゼ阻害剤開発の歴史

チロシンキナーゼの過剰発現及び活性化変異は、ある種の血液癌では頻繁に認められ、異常活性化したチロシンキナーゼ経路が、癌細胞の増殖や不死化に関与していると考えられている。慢性骨髄性白血病（CML）及び急性リンパ球白血病（ALL）の治療薬として 2001 年に初めて承認された Bcr-ABL、KIT チロシンキナーゼ阻害剤イマチニブの臨床的な成功により^{74,75)}、数多くのチロシンキナーゼ阻害剤が開発されており、これまでに上皮成長因子受容体（EGFR）阻害剤であるゲフィチニブ、エルロチニブなど多くのチロシンキナーゼ阻害剤が承認され、目覚ましい成果をあげている^{76,77)}。

FMS-like 受容体チロシンキナーゼ 3（FLT3）は class III receptor tyrosine kinase family に属し、急性骨髄性白血病（AML）で最も高頻度に変異が認められるチロシンキナーゼである。また、Internal Tandem Duplication（ITD）と呼ばれる FLT3 の恒常活性化変異は AML 患者の約 30%に見られ、同変異を有する患者では、血中の癌細胞数が多く予後が不良であることが知られている⁷⁸⁾。

消化管間質腫瘍及び進行性腎細胞癌を適用として承認されているスニチニブは血小板由来増殖因子受容体（PDGFR）、血管内皮増殖因子受容体（VEGFR）、FLT3 など多様なチロシンキナーゼを阻害する薬剤であり、AML を対象とした Phase1/2 試験において、血中 AML 芽球細胞の減少、骨髄芽球の減少、好中球数の増加などの効果を示したことが報告されている^{79,80)}。スニチニブは副作用の問題から AML での開発は継続されていないと見られているが、FLT3 阻害の有効性が示されたことを受けて、FLT3 阻害活性を持つ薬剤の研究開発が活発化している。既に肝臓癌、腎臓癌治療薬として承認されているソラフェニブをはじめとして、キザルチニブ（アステラス製薬）、ペキシダルチニブ（第一三共）などが、米国の Food and Drug Administration（FDA）から画期的治療薬に指定され開発されている^{81,82,83)}。

チロシンキナーゼ阻害剤 KW-2449 の創製

KW-2449 ((E)-1-{4-[2-(1H-Indazol-3-yl)vinyl]benzoyl}piperazine) は協和発酵キリンにおいて、FLT3 阻害剤として見いだされた FLT3、ABL、FGFR 及び Aurora キナーゼ阻害を主要な作用とする薬物である⁸⁴⁾。協和発酵キリンでの FLT3 阻害剤の探索は 2000 年に名古屋大学のグループが FLT3 キナーゼの点変異を発見したことをひとつの契機とし、2001 年にアカデミアとの共同研究として着手された^{85,86)}。当時の薬剤スクリーニングのクライテリアとしては、1) 点変異を含む FLT3 変異を有する細胞に対して強い増殖抑制活性を有すること、2) 吸収性が良好で経口投与可能であること、3) 比較的マイルドな毒性であること等を設定し、難治性の AML 患者に安全な新規薬剤を届けることを目標とした⁸⁶⁾。

当初 FLT3 阻害剤としてヒットしたリード化合物は肝ミクロソーム中で極めて不安定であったため、ヒト、マウス肝ミクロソームを用いたスクリーニングを行い、代謝的に安定な化合物

として KW-2449 が見いだされた。マウスやラットに経口投与した時の曝露も高く、ヒト、サル、ラットの血漿懸濁肝細胞を用いた評価でも概ね代謝的に安定であった。また、KW-2449 は野生型 FLT3 及び活性化変異 FLT3 (FLT3/ITD、FLT3/D835Y) を強く阻害し、これらを発現する白血病細胞株の増殖を *in vitro* で強く阻害した。さらに、FLT3/ITD 変異を有するヒト白血病細胞 (MOLM-13) を移植した担癌マウスにおいても著効を示したことから、臨床においても強力な抗腫瘍活性を発揮することが期待された⁸⁴⁾。

毒性や薬物動態を評価する非臨床試験を経て、2004 年に開発化合物として選定され、2005 年の年末に FDA に治験申請を行い、白血病患者を対象とした臨床試験を開始した。KW-2449 の第 1 相臨床試験 (Phase1) は AML、ALL、CML 患者を対象に実施され、試験期間中、KW-2449 は FLT3/ITD 変異を有する患者の約半数で 50%を超える一時的な抹消血中の AML 芽球細胞の減少を認めたものの、臨床的に意味のある抗腫瘍効果は確認されず、臨床試験は中止された⁸⁷⁾。

臨床試験において KW-2449 が十分な有効性を示せなかった原因として、ヒトでの薬物動態プロファイルが想定よりも悪く、薬効発現に必要な血中濃度を維持できなかったことが挙げられる。KW-2449 のヒトでの半減期は 3 時間程度と短く、ラットやマウスではほとんど認められなかったオキシペラジン型の代謝物 M1 への代謝が認められた。M1 は KW-2449 の 10 倍以上の高濃度で検出されたことから、M1 への代謝が KW-2449 濃度低下の一因と考えられた。また、M1 は FLT3 阻害活性を保持していることから、M1 が薬効へ寄与することも期待されたが、反復投与により M1 の曝露も顕著に減少した。

KW-2449 は前述の通り、ヒト肝ミクロソーム中で安定な化合物として選抜されたことから、M1 への代謝には Non-CYP 代謝酵素が関与していることが推測された。

そこで、本研究では KW-2449 が臨床試験において十分な有効性を示せなかったこと背景にあるメカニズムを解明し、それにより、類似薬物の開発における問題の解決に資することを目的とした。

第 2 章では、KW-2449 から M1 への代謝酵素を同定し、シアン化ナトリウムを用いたトラッピング法を用いて、代謝中間体としてイミニウムイオンが存在することを明らかにした。次いで、同定した代謝経路について、ヒトの薬物動態を簡便に予測する方法を比較検討した。また、短半減期の原因と考えられた代謝酵素に対する安定性を高めることで、後続化合物の薬物動態を改善できることを実証した。

第 3 章では、反復投与により M1 の曝露が低下した原因を解明するため、代謝酵素に対する KW-2449、M1 及びイミニウムイオン中間体の阻害能を検討した。また、2 章で存在が明らかとなったイミニウムイオン中間体のタンパクへの共有結合能についても毒性発現の点から評価を行い、イミニウムイオン中間体の酵素阻害能及びタンパク共有結合能について、新たな知見

を得た。

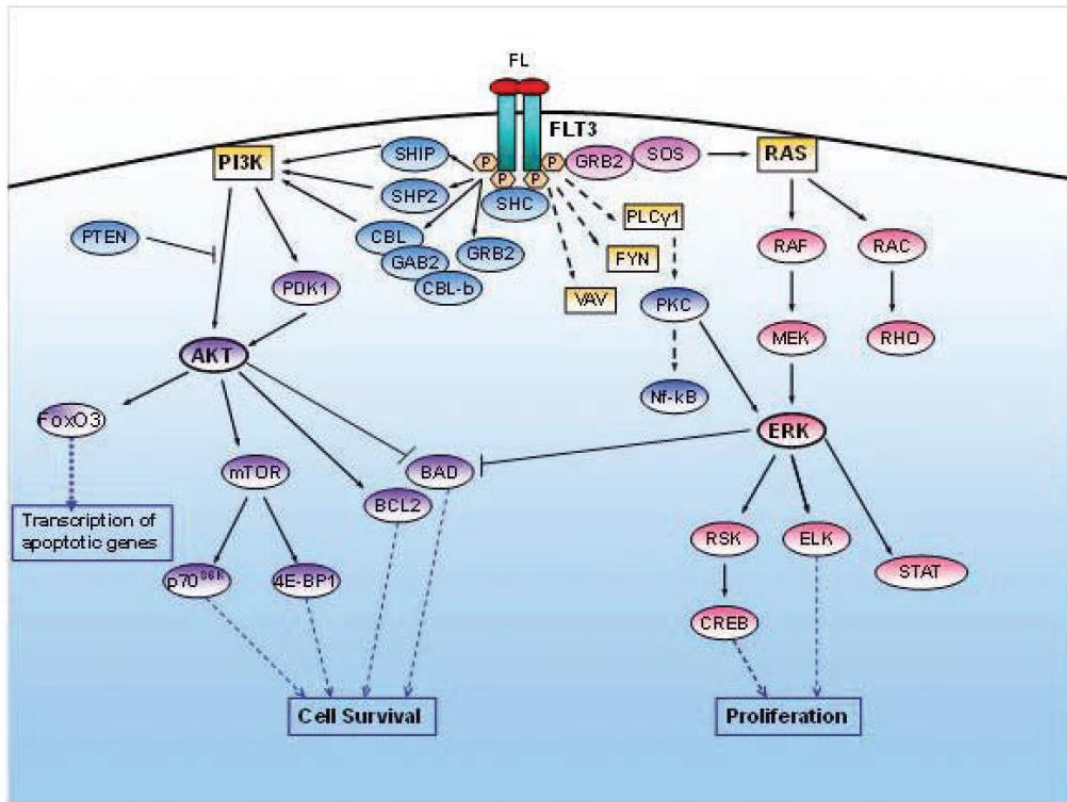


Figure 3 Signaling pathways activated by FLT3⁸⁸.

第2章 Monoamine oxidase B 及び Aldehyde oxidase による KW-2449 の代謝

第1節 研究の目的

医薬品の開発において、臨床試験に到達した候補化合物であっても有効性や薬物動態における問題が明らかとなり最終的に各国の規制当局による承認に至らない確率が高い。このため、製薬会社では、医薬品開発の成功確率向上を企図して、早期段階からヒトの薬物動態を予測するため、種々のスクリーニング法を開発し、候補化合物の選定に利用している。1960年代から1990年代における医薬品開発失敗の原因は、薬物動態に起因するものが最も多く、特に代謝酵素による急速な代謝は、しばしば薬物の生物学的利用率 (Bioavailability) や曝露を低下させ、臨床試験の失敗につながることから、医薬品の代謝安定性は極めて重要である。

KW-2449 はある種の血液癌で過剰発現及び活性化変異が認められるチロシンキナーゼである FLT3 の阻害を主薬効とする白血病治療薬として開発されていたものの、臨床試験において十分な FLT3 阻害活性を示すことができず、開発中止となった化合物である。臨床試験における KW-2449 の消失半減期は3時間前後と、想定よりも短く、FLT3 阻害に十分な濃度を維持することができなかった。臨床試験では、オキシペラジン型の代謝物である M1 が KW-2449 の10倍以上の高濃度で検出されたことから、M1 への代謝が KW-2449 の半減期が短かった要因である可能性が考えられた。

そこで、本章では、KW-2449 から M1 への代謝に関わる代謝酵素を特定し、その詳細な代謝経路を明らかにすることを目的とした。KW-2449 は CYP に対して安定な化合物として選抜されているため、特に Non-CYP 代謝酵素の寄与について検討した。また、Non-CYP 代謝については、*in vivo* のクリアランスを予測する方法が確立されていないことから、明らかとなった薬物代謝経路についてのヒトの薬物動態予測法予測法についても比較検討を行った。

第2節 実験材料及び方法

第1項 被験物質及び対照物質

KW-2449、代謝物標品（M1-M4）及び代謝安定性を向上させた後続化合物 Compound A は協和発酵キリンで合成したものをを用いた。¹⁴C-KW-2449 は Amersham Biosciences で合成したものをを用いた。

略称	化合物名
KW-2449	(E)-1-{4-[2-(1H-Indazol-3-yl)vinyl]benzoyl}piperazine
M1	(E)-1-{4-[2-(1H-Indazol-3-yl)vinyl]benzoyl}piperazine-3-one
M2	(E)-4-[2-(1H-indazol-3-yl)vinyl]benzoic acid
M3	(E)-N-(2-aminoethyl)-4-[2-(1H-indazol-3-yl)vinyl]benzamide
M4	E)-2-{4-[2-(1H-indazol-3-yl)vinyl]benzamido}acetic acid
Compound A	(E)-3-amino-1-{4-[2-(1H-Indazol-3-yl)vinyl]benzoyl}-pyrrolidine

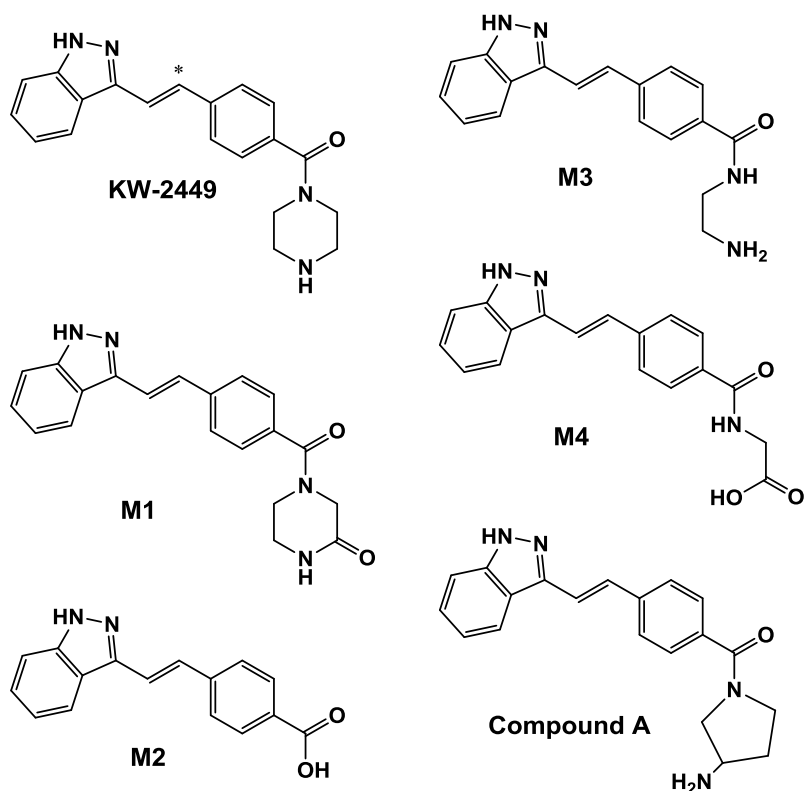


Figure 4 Chemical structures of KW-2449, its metabolites and successor compound A.

*: An asterisk represents the labeled position with ¹⁴C.

第2項 *In vivo* 薬物動態評価

すべての動物実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省⁸⁹⁾」及び各実施機関における動物実験委員会の基準に従って実施した。

KW-2449 をカニクイザルに静脈内（0.82 mg/kg）及び経口（100 mg/kg）投与し、投与後5分から48時間まで経時的に採血を行った。KW-2449 を雄性 Sprague-Dawley (SD) ラットに10 mg/kg 経口投与し、投与後3分から48時間まで経時的に採血を行った。サルにおける KW-2449 の代謝物プロファイルを分析するため、¹⁴C-KW-2449（8.04 MBq/kg）をカニクイザルに5 mg/kg 経口投与し、投与後30分に採血を行った。また、サルにおける KW-2449 の M1 への変換率を算出するため、M1 をサルに2 mg/kg 静脈内投与し、投与後5分から24時間まで経時的に採血を行った。後続化合物 Compound A の薬物動態を評価する目的で、Compound A をカニクイザルに1 mg/kg 静脈内投与し、投与後5分から24時間まで経時的に採血を行った。

第3項 凍結肝細胞を用いた代謝速度、代謝物プロファイルの検討

ヒト、カニクイザル、イヌ及びラットの凍結肝細胞（Tissue Transformation Technologies 社製又は In Vitro Technologies 社製）を 2×10^6 又は 4×10^6 cells/mL になるよう血漿で懸濁し、KW-2449 又は ¹⁴C-KW-2449 を添加して、37°C でインキュベートした。代謝速度を評価する場合、KW-2449 の濃度は20-2000 ng/mL とし、20分間インキュベーションした。代謝物プロファイルを評価する場合、¹⁴C-KW-2449 の濃度は5又は50 µmol/L とし、2-6時間インキュベーションした。氷冷したアセトニトリルを添加して反応を停止させ、遠心分離（約 20000 × g、4°C、5分間）した上清を検討に用いた。

第4項 肝ミクロソームを用いた *in vitro* 代謝

KW-2449（5 µmol/L）を100 µmol/L ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) 含有の phosphate buffer（100 mmol/L、pH 7.4）に溶解し、NADPH 生成系（0.8 mmol/L β-NADP⁺、8 mmol/L G-6-P、1 unit/mL G-6-P dehydrogenase and 6 mmol/L MgCl₂）存在下、37°C で3分間プレインキュベートした。ヒト、カニクイザル又はラット肝ミクロソーム（Sekisui Xenotech 社製）を0.5 mg/mL になるよう添加して37°C で1時間インキュベートした。氷冷したアセトニトリルを添加して反応を停止させ、遠心分離（約 5000 × g、4°C、5分間）した上清を検討に用いた。

また、イミニウムイオン型の代謝中間体を捕捉する場合、0.1 mmol/L になるようシアン化ナトリウム（NaCN、和光純薬工業社製）を添加した試料を調製した。

第5項 CYP発現系を用いた *in vitro* 代謝

酵素源として CYP 発現系 (CYP1A2、2A6、2C9、2C19、2D6、3A4、0.5 mg/mL、商品名 CYP Supersome、BD Biosciences 社製) を用い、0.1 mmol/L になるよう NaCN を添加して、4 項と同様に反応を行った。

第6項 S9画分、ミトコンドリア画分を用いた *in vitro* 代謝

KW-2449 (5 $\mu\text{mol/L}$) を 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 含有の phosphate buffer (100 mmol/L、pH 7.4) に溶解し、37°C で 3 分間プレインキュベートした。ヒト肝 S9 画分 (Sekisui Xenotech 社製)、肝ミトコンドリア画分 (Sekisui Xenotech 社製)、腎ミトコンドリア画分 (HAB 研究機構提供の組織より調製) 又は肺ミトコンドリア画分 (HAB 研究機構提供の組織より調製) を 0.5 mg/mL になるよう添加して 37°C で 1 時間インキュベートした。氷冷したアセトニトリルを添加して反応を停止させ、遠心分離 (約 5000 \times g、4°C、5 分間) した上清を検討に用いた。下表の濃度になるよう、各阻害剤、イミニウムイオン捕捉剤を添加した試料も調製した。

阻害剤	化合物名	メーカー	最終濃度
MAO-A 阻害剤	Clorgyline ⁹⁰⁾	MP Biomedicals	0.1 $\mu\text{mol/L}$
MAO-B 阻害剤	Pargyline ⁹⁰⁾	Sigma	10 $\mu\text{mol/L}$
XO 阻害剤	Alloprinol ⁹¹⁾	ナカライテスク	100 $\mu\text{mol/L}$
AO 阻害剤	Menadione ⁹¹⁾	ナカライテスク	50 $\mu\text{mol/L}$
	Anti-AO antibody	Thermo Fisher Scientific	20 $\mu\text{g/mL}$
イミニウムイオン捕捉剤	NaCN ⁹²⁾	和光純薬工業	0.1 mmol/L

MAO-A: monoamine oxidase A, MAO-B: monoamine oxidase B, XO: xanthine oxidase, AO: aldehyde oxidase
Anti-AO antibody を添加した場合、酵素源の濃度は 0.2 mg/mL とした。

第7項 MAO発現系を用いた *in vitro* 代謝

酵素源として MAO 発現系 (MAO-A、MAO-B、Negative control、0.02 mg/mL、商品名 MAO Supersome、BD Biosciences 社製) を用い、0.1 mmol/L になるよう NaCN を添加して、6 項と同様に反応を行った。

第8項 MAO 発現系+ヒト肝 cytosol 画分を用いた *in vitro* 代謝

KW-2449 (5 $\mu\text{mol/L}$) を 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 含有の phosphate buffer (100 mmol/L , pH 7.4) に溶解し、37°C で 3 分間プレインキュベートした。MAO 発現系 (0.02 mg/mL) 及びヒト肝 cytosol 画分 (0.5 mg/mL) の混合液を添加して 37°C で 1 時間インキュベートした。氷冷したアセトニトリルを添加して反応を停止させ、遠心分離 (約 5000 \times g, 4°C, 5 分間) した上清を検討に用いた。下表の濃度になるよう、各阻害剤を添加した試料も調製した。

阻害剤	化合物名	メーカー	最終濃度
MAO-A 阻害剤	Clorgyline	MP Biomedicals	0.1 $\mu\text{mol/L}$
MAO-B 阻害剤	Pargyline	Sigma	10 $\mu\text{mol/L}$
AO 阻害剤	Menadione	ナカライテスク	50 $\mu\text{mol/L}$
	Anti-AO antibody	Thermo Fisher Scientific	20 $\mu\text{g/mL}$

MAO-A: monoamine oxidase A, MAO-B: monoamine oxidase B, AO: aldehyde oxidase
Anti-AO antibody を添加した場合、ヒト肝 cytosol 画分の濃度は 0.2 mg/mL とした。

第9項 LC-MS/MS 分析

KW-2449、M1、CN 付加体 (CN adduct、イミニウムイオン型の代謝中間体が NaCN により捕捉されたもの) 及び Compound A の定量は LC-MS/MS を用いて行った。

代表的な LC 分析条件を以下に示す

Liquid chromatograph	: Agilent 1100 (Agilent Technologies)
Auto sampler	: HTC PAL (CTC Analytics)
Analytical column	: XTerra RP18, 3.5 μm , 2.1 mm i.d. \times 100 mm (Waters)
Guard column	: YMC AS12S05-0102CC (YMC)
Mobile phase	: (A) 10 mmol/L ammonium acetate - acetonitrile (95:5, v/v) (B) 10 mmol/L ammonium acetate - acetonitrile (5:95, v/v)
Gradient program	: Time (min) 0 10 10.1 12 12.1 18 Pump B (vol%) 18 46 100 100 18 18 (linear gradient)
Flow rate	: 200 $\mu\text{L/min}$
Column temperature	: Room temperature
Time program	: 0-6 min, 13-18 min, Switching valve position 1 (to waste line) 6-13 min, Switching valve position 2 (to MS/MS)

代表的な MS/MS 分析条件を以下に示す

Mass spectrometer : API 4000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX)
Ionization mode : Electrospray ionization (ESI), positive
Scan type : Multiple reaction monitoring (MRM)
Source temperature : 600°C
Monitoring ion : KW-2449, m/z 333/247 (Q1/Q3)
M1, m/z 347/247 (Q1/Q3)
CN adduct, m/z 358/247 (Q1/Q3)
Compound A, m/z 333/247 (Q1/Q3)
Internal Standard (I.S., methylated KW-2449), 347/261 (Q1/Q3)

代謝物プロファイル及び代謝物の構造解析を実施する際には、上記の条件を基に、Scan type を Information dependent acquisition (IDA)⁹³⁾、Precursor ion scan 又は Product ion scan モードに変更して解析を行った。

第 10 項 ¹⁴C-KW-2449 を用いた代謝物プロファイル分析

¹⁴C-KW-2449 を投与後のサル血漿試料、¹⁴C-KW-2449 を添加してインキュベーションした肝細胞試料は Deepwell Lumaplate-96 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences 社製) に分画し、各ウェルの放射能を TopCount NXT (PerkinElmer Life and Analytical Sciences 社製) で測定した。

代表的な分取条件を以下に示す

Liquid chromatograph : Agilent 1100 (Agilent Technologies)
Fraction collector : Gilson 222XL
Analytical column : L-column ODS, 3.5 µm, 1.5 mm i.d. × 150 mm (Chemicals Evaluation and Research Institute)
Mobile phase : (A) 10 mmol/L ammonium acetate
(B) acetonitrile
Gradient program : Time (min) 0 10 35 45 45.1 50 50.1
Pump B (vol%) 10 18 24 45 95 95 10
(linear gradient)
Flow rate : 300 µL/min
Column temperature : Room temperature

第 11 項 薬物動態パラメータの算出

カニクイザル及びラットに KW-2449 を静脈内又は経口投与した時の薬物動態パラメータは WinNonlin software (Pharsite 社製) を用いて算出した。

第 12 項 肝クリアランスの予測

肝細胞を用いた代謝実験の結果を用い、ヒト、カニクイザル及びラットの肝固有クリアランス (CL_{Hint}) を以下の式に従って予測した⁹⁴⁾。

$$CL_{Hint} \text{ (mL / min / kg body weight)} = \frac{k \cdot A \cdot B}{S}$$

k: KW-2449 の消失速度 (ng/cell/min)、A: 肝臓 1g あたりの肝細胞数 (cell/g liver)、B: 体重当たりの肝臓重量 (liver weight/body weight)、S: KW-2449 添加濃度 (ng/mL)

* インキュベーション中、KW-2449 濃度は一定と仮定した。

算出された肝固有クリアランスを well-stirred model を用いてヒト、カニクイザル及びラットの肝クリアランス (CL_H) を予測した⁹⁵⁾。

$$CL_H = \frac{Q_H \cdot CL_{Hint} / R_B}{Q_H + CL_{Hint} / R_B}$$

Q_H : 肝血流量 (ng/cell/min)、 R_B : 血球移行率 (血液/血漿濃度比)

各生理学的パラメータは以下の値を用いた。また、KW-2449 の血球移行率 (R_B) は 1.26 (ヒト)、1.45 (カニクイザル) 及び 2.76 (ラット) を用いた。

略号	生理学的パラメータ	ヒト	カニクイザル	ラット
A	肝細胞 1g あたりの肝細胞数 (cells/g liver) ⁹⁶⁾	120×10^6	120×10^6	120×10^6
B	体重当たりの肝臓重量 (肝臓重量/体重) ⁹⁷⁾	0.0257	0.03	0.04
-	肝臓重量 (kg) ⁹⁷⁾	1.8	0.15	0.01
-	体重 (kg) ⁹⁷⁾	70	5	0.25
Q_H	肝血流量 (L/h) ⁹⁷⁾	87	13.08	0.83

第 13 項 ヒト全身クリアランスの予測 (In Vitro to In Vivo Extrapolation)

12 項で算出されたヒト及びサル肝クリアランスとサルの *in vivo* クリアランス (全身クリアランス、 CL_{Total}) からヒトの全身クリアランスの予測を行った。臨床試験において、KW-2449

の消失には肝外代謝の寄与があることが示唆されたため、予測にあたっては、肝外代謝の予測法として既報がある以下の2法を比較した。

(A) *In vitro to in vivo normalization*⁹⁸⁾

サル全身クリアランス-肝クリアランスの比を用いてヒトの肝クリアランスを補正し、全身クリアランスを予測した。

$$CL_{\text{Total, Human}} = CL_{\text{H, Human}} \times \left(\frac{CL_{\text{Total, Monkey}}}{CL_{\text{H, Monkey}}} \right)$$

(B) *Allometric scaling for extrahepatic clearance*⁹⁹⁾

サル全身クリアランスと肝クリアランスの差から肝外クリアランス (CL Extrahepatic) を求め、アロメトリー法を用いてヒトの肝外クリアランスを予測した。体重のべき乗の指数にはヒトとサルの肝外血流量の比を用いた。

$$CL_{\text{Total, Human}} = CL_{\text{H, Human}} + CL_{\text{Extrahepatic, Monkey}} \times \left(\frac{BW_{\text{Human}}}{BW_{\text{Monkey}}} \right)^a$$

$$CL_{\text{Extrahepatic, Monkey}} = CL_{\text{Total, Monkey}} - CL_{\text{H, Monkey}}$$

a = (Cardiac output-Hepatic blood flow) in human / (Cardiac output-Hepatic blood flow) in monkey

CL_{Extrahepatic}: 肝外クリアランス、BW: Body weight

第3節 結果及び考察

第1項 カニクイザル及びラットにおける薬物動態

KW-2449 投与後のカニクイザル及びラットの血漿中薬物濃度推移を Figure 5 に示す。カニクイザルでは KW-2449 の経口及び静脈内投与後、1.26-3.48 時間の半減期で消失した。M1 の産生は投与直後から認められ、M1 の薬物濃度-時間曲線下面積 (AUC) は KW-2449 の AUC の 4-6 倍であった (Table 1)。また、M1 を静脈内投与した際の AUC 比から算出された KW-2449 から M1 への変換率は 28.3% であり、カニクイザルでは M1 への代謝が KW-2449 の主要な消失経路の一つであると考えられた。

一方、ラットでは M1 の産生は認められず、サルと比較して長い消失半減期を示したことから、KW-2449 の代謝には種差があり、M1 産生の有無が KW-2449 の半減期に影響している可能性が示唆された。

Table 1 Pharmacokinetic parameters of KW-2449 in human, cynomolgus monkey and rat.

Test Article	Species	Dose (mg/kg)/ Route	KW-2449			M1	
			AUC (ng·h/mL)	t _{1/2} (h)	CL ^{a)} (L/h/kg)	AUC (ng·h/mL)	t _{1/2} (h)
KW-2449	Human ^{b)}	1, po	821	2.93	3.70	8540	2.65
	Monkey	0.82, iv	108	1.26	5.77	632	3.29
		100, po	13600	3.48	-	52700	4.78
	Rat	10, iv	6140	6.22	0.59	-	-
M1	Monkey	2, iv	-	5330	-	5330	5.95

a) CL/F for po and CL for iv, converted as human body weight was 70kg, monkey body weight was 5 kg and rat body weight was 0.2 kg.

b) calculated using the data from clinical trial⁸⁷⁾

po: oral administration

iv: intravenous administration

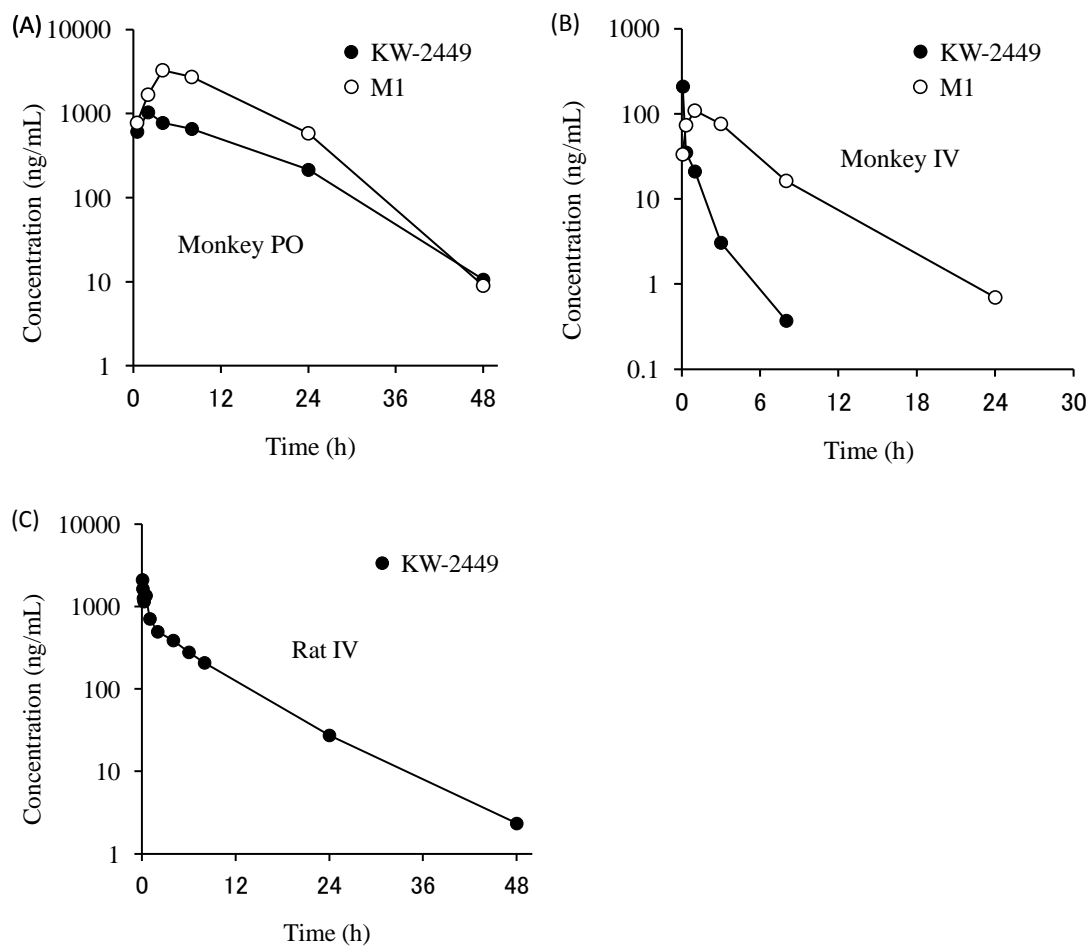


Figure 5 Plasma concentration-time profiles of KW-2449 and M1 in cynomolgus monkey after (A) 100 mg/kg of KW-2449 oral administration and (B) 0.82 mg/kg of KW-2449 intravenous administration, (C) Plasma concentration-time profiles of KW-2449 in rat after 10 mg/kg of KW-2449 intravenous administration.

第2項 代謝物構造解析

代謝物の構造解析は LC-MS/MS により、合成標品とマススペクトルを比較することで行った。KW-2449 (m/z 333) のプロダクトイオンスペクトル上には主に m/z 247 と 219 にフラグメントイオンが観測され、これらはそれぞれピペラジン環の脱離とベンゾイル基の開裂に由来するものと考えられた (Figure 6A)。M1 (m/z 347) のプロダクトイオンスペクトル上には多様なフラグメントイオンが観測された。 m/z 247 はピペラジン環の脱離、 m/z 290, 319 及び 219 はピペラジン環の開裂、 m/z 127 はベンゾイル基、 m/z 99 はオキソピペラジン環に由来するものと考えられた (Figure 6B)。M2-M4 についても同様に構造解析を実施した (Figure 7A, B, C)。代謝物構造解析の結果から KW-2449 の主な代謝部位は末端のピペラジン環部分であると推測された。

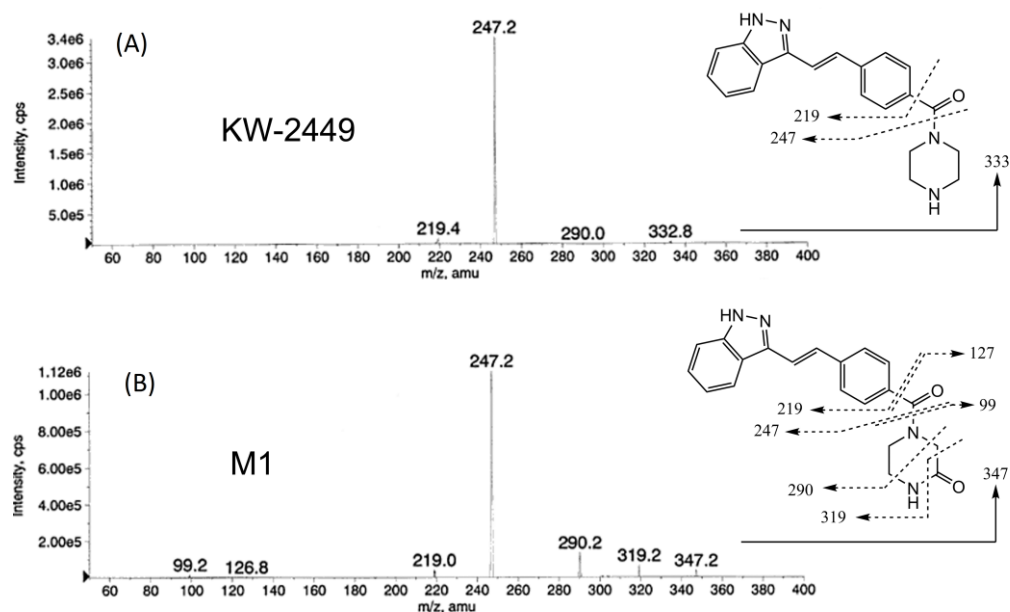


Figure 6 Mass spectrum of (A) KW-2449 and (B) M1.

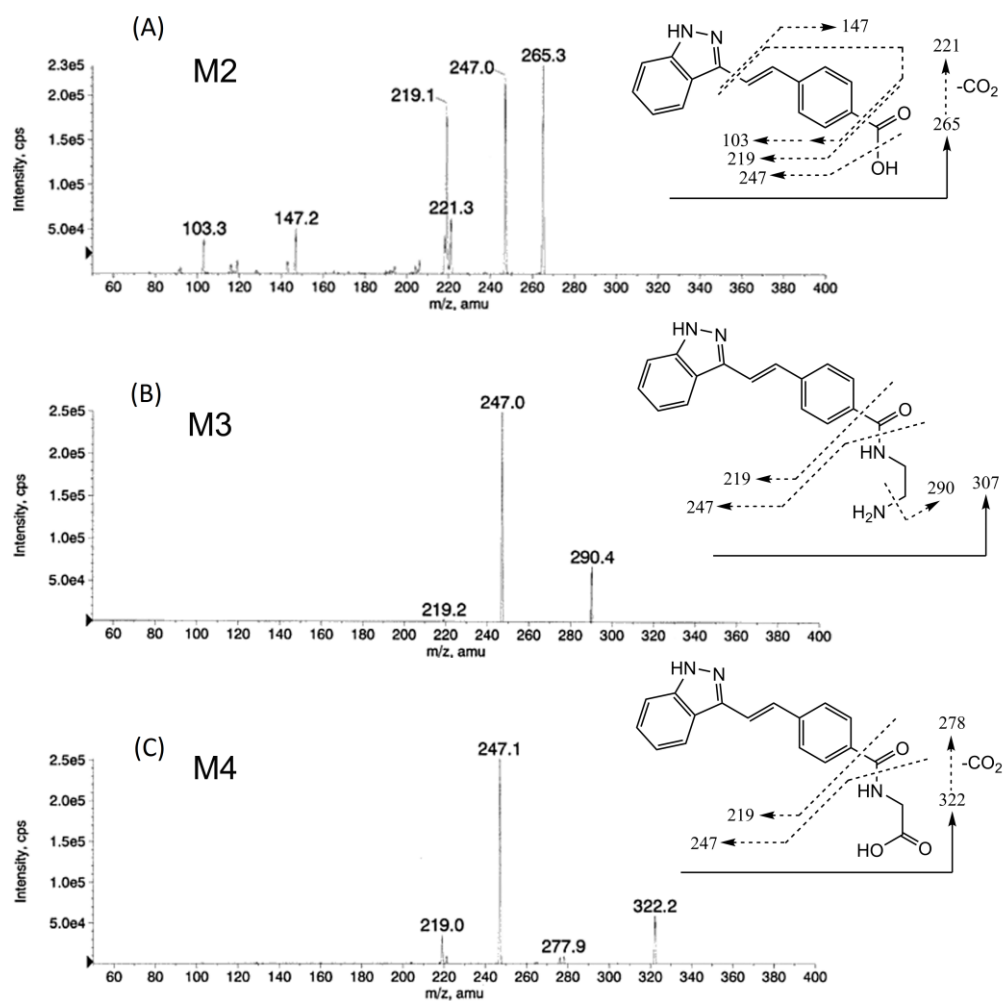


Figure 7 Mass spectrum of (A) M2, (B) M3 and (C) M4.

第3項 肝細胞中代謝物プロファイル

各動物種の肝細胞中代謝物プロファイルを LC-MS/MS を用いて評価した。ヒト及びカニクイザルでは M1 が主要な代謝物であり、イヌ及びラット肝細胞中では M1 の産生はほとんど認められなかった。ラット肝細胞中では水酸化体と思われる+16 Da 体が主な代謝物であったが、イヌ肝細胞ではほとんど代謝活性が認められなかった (Figure 8)。*In vivo* と同様 KW-2449 の代謝には種差が認められ、代謝プロファイルの観点からはサルが最もヒトに近いと考えられた。

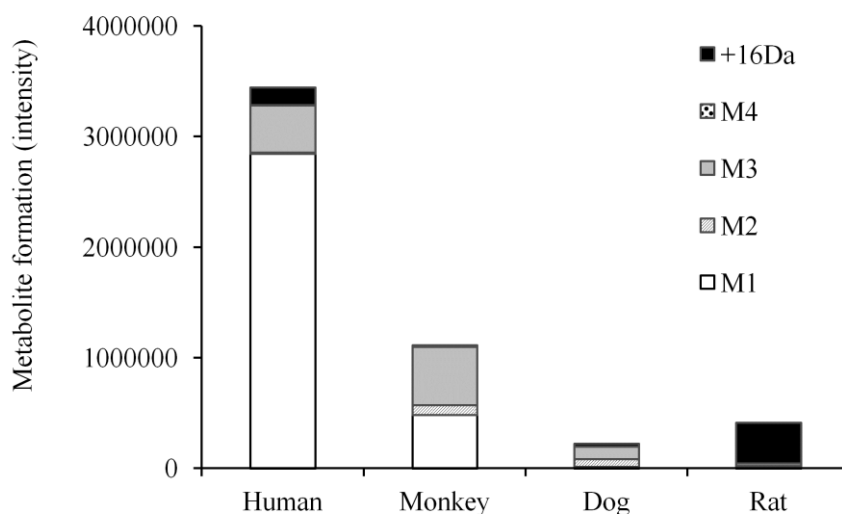


Figure 8 Metabolic profiles after incubation of KW-2449 with various species of hepatocytes.

* after 2h incubation with human and cynomolgus monkey hepatocytes and 6 h incubation with dog and rat hepatocytes.

第4項 ¹⁴C-KW-2449 を用いた代謝物プロファイル検討

代謝物プロファイルをより定量的に比較するため、¹⁴C-KW-2449 をヒト及びカニクイザルの肝細胞に添加して代謝物プロファイルを比較した。また、*in vivo* における代謝物プロファイルを確認するため、カニクイザルに ¹⁴C-KW-2449 を経口投与後の血漿中代謝物プロファイルを同様に評価した。ヒト、カニクイザルいずれの肝細胞中でも M1 が主要な代謝物であり、他の代謝物はわずかであった。また、サル血漿中でも M1 が主要な代謝物であり、肝細胞中の代謝物プロファイルは、*in vivo* の代謝物プロファイルをよく反映していると考えられた (Figure 9)。

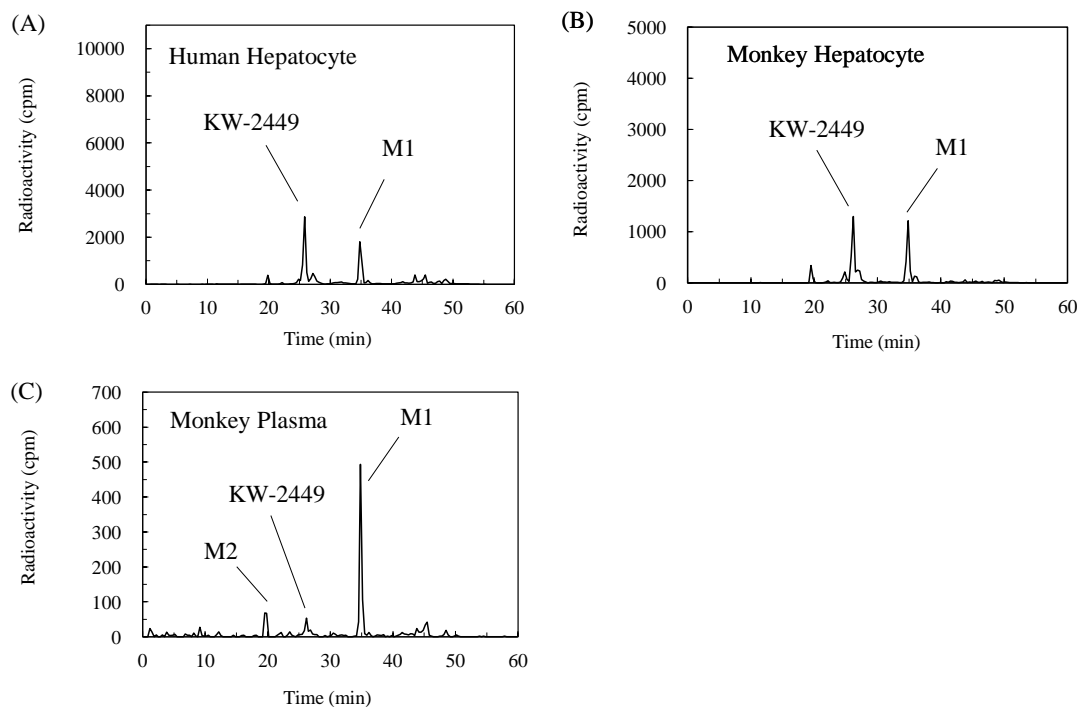


Figure 9 Radiochromatograms of ^{14}C -KW-2449 (A) after incubation in human hepatocytes, (B) after incubation in cynomolgus monkey hepatocytes, (C) after oral administration to cynomolgus monkey.

第5項 肝ミクロソーム、肝 S9 画分の M1 産生能

代表的な薬物代謝酵素である CYPs の M1 生成への寄与を評価するため、ヒト肝ミクロソーム及び肝 S9 画分（ミクロソーム画分+サイトゾル画分）を用い、NADPH 存在/非存在下で M1 の生成量を評価した。M1 産生は S9 画分中では認められたが、肝ミクロソーム中ではほとんど認められず、その活性は S9 画分の 1/10 程度であった。このことから、M1 産生にはサイトゾル画分含まれる薬物代謝酵素が関与していることが示唆された。また、M1 産生が NADPH に依存しなかったことから、M1 産生における CYPs の寄与は小さいものと推測された (Figure 10)。

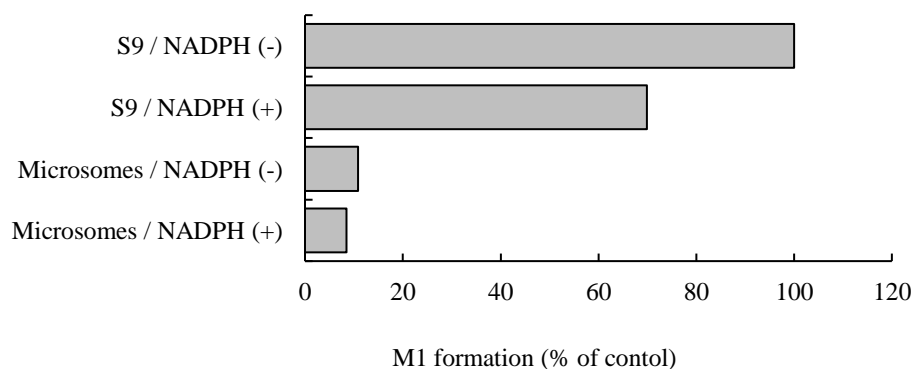


Figure 10 Formation of M1 after incubation of KW-2449 with human liver microsomes and human liver S9

第 6 項 Aldehyde oxidase 及び Monoamine oxidase の寄与の検討

サイトゾル画分に存在する薬物代謝酵素を調査したところ、Aldehyde oxidase (AO) が窒素を含むヘテロ環化合物をラクタム型の代謝物に変換する薬物代謝酵素の候補として考えられた。そこで、M1 産生における AO の寄与及び AO の isozyme である Xanthine oxidase (XO) の寄与を検討した。また、AO はラクタム型の代謝物を生じる際に炭素-窒素原子間の sp² 軌道を攻撃することから¹⁰⁰⁾、M1 産生に AO が寄与していた場合、KW-2449 は AO で代謝される前にイミニウムイオン (4 級アミン) 型の代謝物に代謝されることが予想された。そこで、CYPs と並んでイミニウムイオン型の代謝物を与えることが知られている Monoamine oxidase (MAO) の寄与も同時に検討した¹⁰¹⁾。

M1 産生は Clorgyline (MAO-A 阻害剤)、Allopurinol (MAO-B 阻害剤) 添加ではほとんど阻害されなかったが、Pargyline (MAO-B 阻害剤)、Menadione (AO 阻害剤) 添加した場合に顕著に阻害された (Figure 11)。抗 AO 抗体の効果は限定的であったが、抗体原液濃度が低かったため、十分な濃度を添加できなかったことが原因であると考えられた。また、イミニウムイオンの捕捉剤として NaCN を添加した場合、M1 の産生が完全に抑制され、代わりにピペラジン環部分にシアノ基が結合した CN 付加体が検出された (Figure 12)。このことから、M1 の産生には MAO-B 及び AO が関与していると共に、代謝の過程でイミニウムイオンを経ていることが強く示唆された。

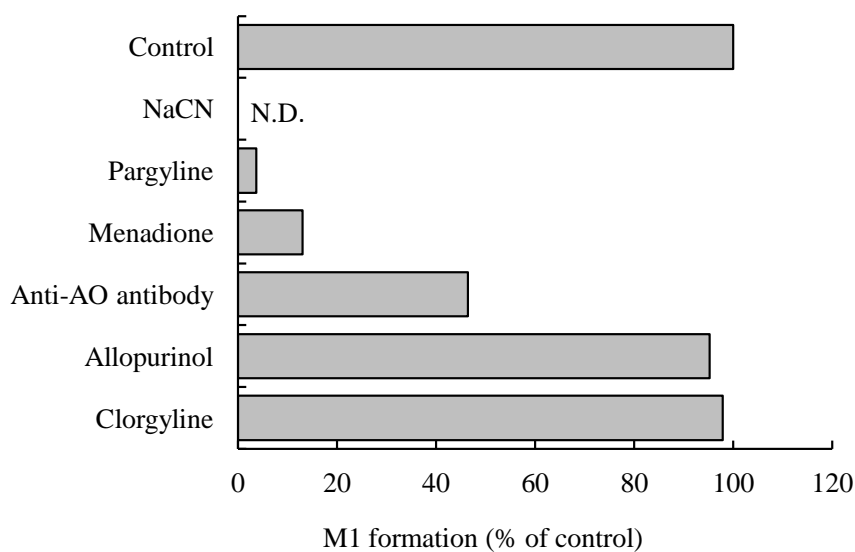


Figure 11 Effects of AO, XO and MAO inhibitors on the formation of M1 after incubation of KW-2449 in human liver S9

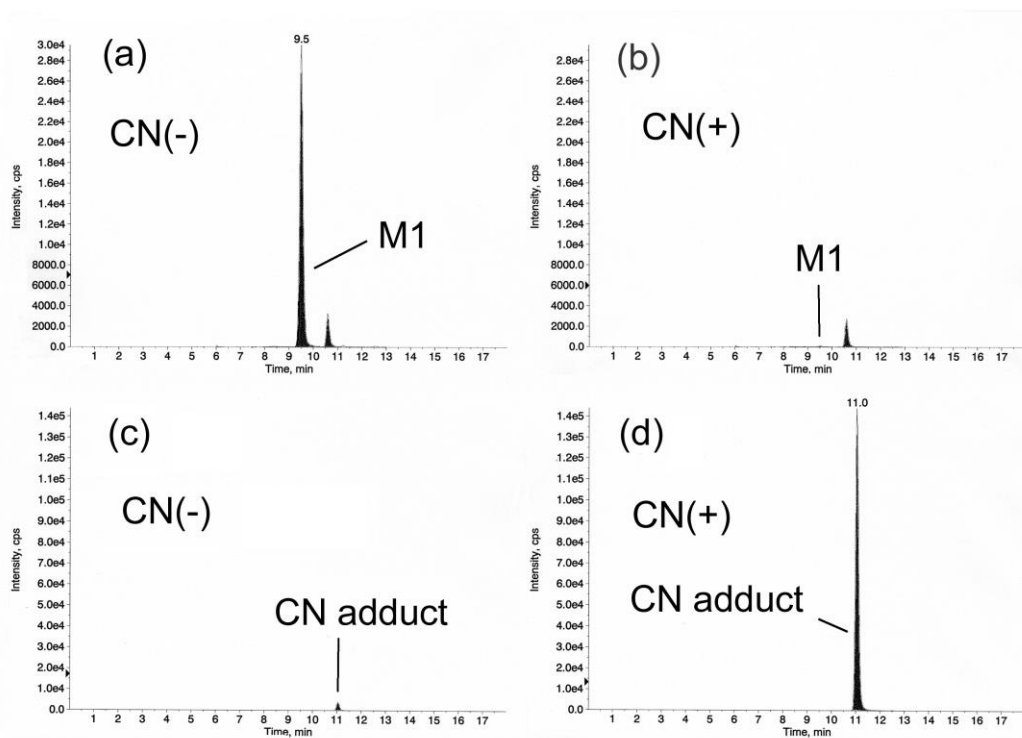


Figure 12 MRM chromatograms of M1 and CN adduct after incubation of KW-2449 in human liver S9. (a) Formation of M1 in the absence of NaCN, (b) formation of M1 in the presence of NaCN, (c) formation of CN adduct in the absence of NaCN, (d) formation of CN adduct in the presence of NaCN.

第7項 イミニウムイオン中間体産生能の種差及び CYPs の寄与

イミニウムイオン中間体産生能の種差を検討するため、MAO-B の酵素源としてヒト、カンクイザル、ラットの肝マイクロソームを用い、KW-2449 の CN 付加体の産生量を指標として比較を行った。また、CYP 3A4 や 2D6 はしばしばイミニウムイオン型の代謝物を産生することが知られているため、これら CYP 分子種の寄与もヒト CYP 発現系を用いて検討した^{102,103}。

ラット肝マイクロソームの CN 付加体の産生能はヒト、サル肝マイクロソームの 1/10 程度であり、ラットにおける CN 付加体の代謝能は低いことが示唆された。ラット肝臓の MAO-B 活性はヒトよりも低く、基質特異性も異なるとの報告があることから、この結果は一般的に知られている MAO-B の種差と一致しているものと考えられた^{104,105}。

また、ヒト CYP 発現系を用いた検討では、いずれの CYP 分子種でも CN 付加体の産生はほとんど認められなかった。このことから KW-2449 からイミニウムイオン代謝への CYPs の寄与はほとんどないものと考えられた (Figure 13)。

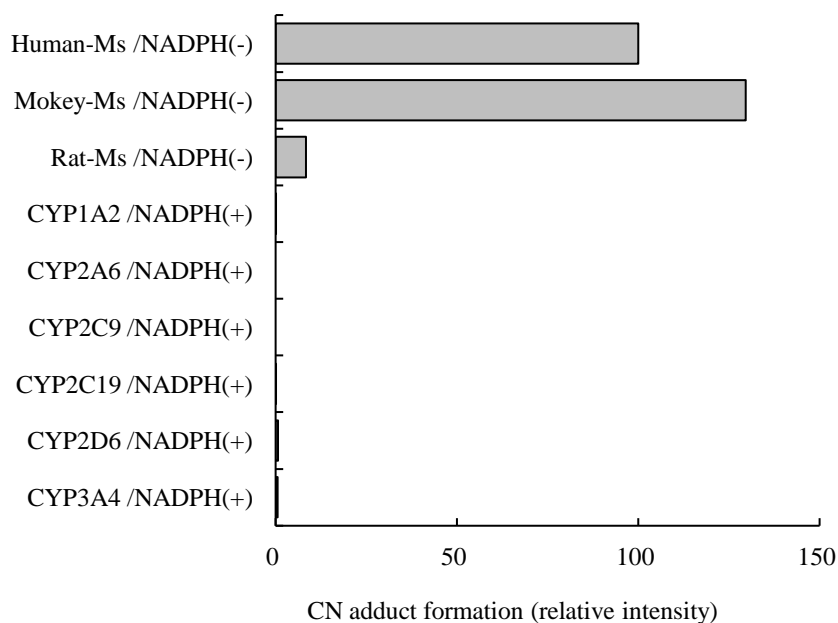


Figure 13 Formation of CN adduct in various species microsomes and recombinant human CYPs

MS: microsomes

第8項 ミトコンドリア画分におけるイミニウムイオン中間体産生能の比較

MAO は一般的にミトコンドリア膜上に発現していることが知られているため、ヒト肝 S9 画分とヒト肝、腎及び肺のミトコンドリア画分を用いて、イミニウムイオン中間体の産生能を KW-2449 の CN 付加体の産生量を指標として比較した。

肝、腎ミトコンドリア画分の CN 付加体産生能は肝 S9 画分の 2-3 倍高い一方で、肺ミトコンドリア画分の CN 付加体産生能は低かった (Figure 14)。この結果は MAO-B のタンパク及び mRNA の臓器毎の発現分布^{106,107,108,109}及び MAO-B 活性の細胞内分布¹¹⁰と一致しており、KW-2449 のイミニウムイオンへの代謝に MAO-B が寄与していることを支持するものと考えられた。

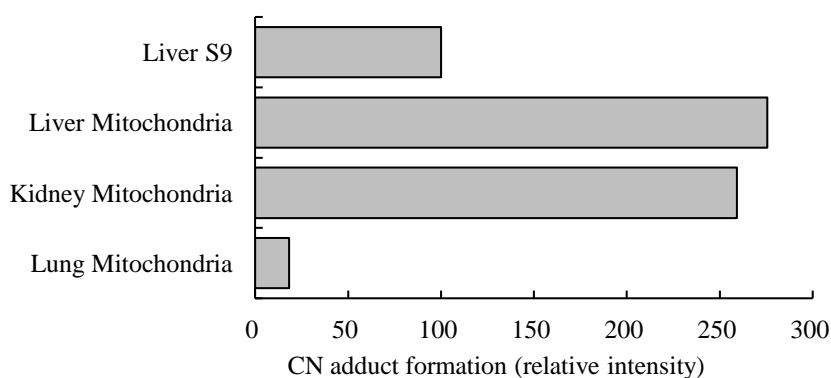


Figure 14 Formation of CN adduct in liver S9 and liver, kidney, lung mitochondria

第9項 イミニウムイオン中間体産生に対する MAO 及び AO 阻害剤の影響

KW-2449 を肝 S9 画分中で代謝させ、イミニウムイオン中間体産生に対する MAO 阻害剤、AO 阻害剤の影響を CN 付加体の産生量を指標として検討した。CN 付加体産生は抗 AO 抗体、Allopurinol (XO 阻害剤)、Clorgyline (MAO-A 阻害剤) では阻害されず、Pargyline (MAO-B 阻害剤) 添加した時に顕著に阻害された (Figure 15)。本結果も、KW-2449 のイミニウムイオンへの代謝に MAO-B が寄与していることを支持するものと考えられた。

Menadione (AO 阻害剤) 添加でも CN 付加体産生が約 60% 阻害されたが、抗 AO 抗体で全く阻害が認められておらず、MAO-B による Tyramine 代謝に対する Menadione の K_i 値は 27 $\mu\text{mol/L}$ と報告されていることから、Menadione の非特異的な酵素阻害により、MAO-B が阻害されたものと推測された^{111,112}。

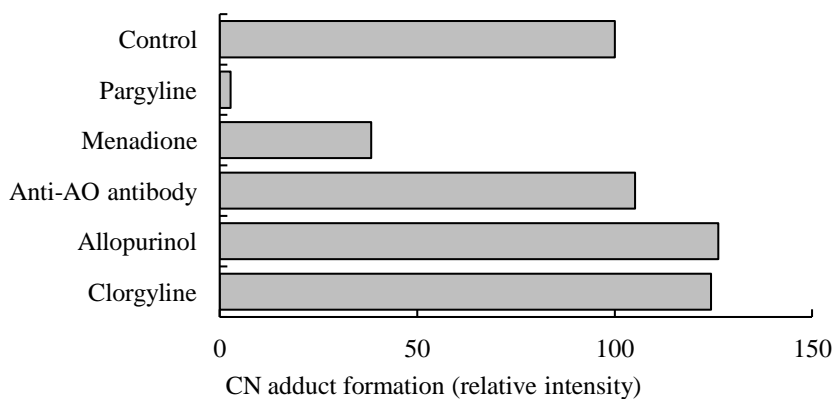


Figure 15 Effects of MAO and AO inhibitors on the formation of CN adduct

第 10 項 MAO 発現系を用いたイミニウムイオン中間体産生評価

イミニウムイオン中間体産生に寄与する MAO 分子種を特定するため、MAO 発現系中で KW-2449 をインキュベートし、イミニウムイオン中間体産生を CN 付加体の産生量を指標として検討した。CN 付加体は MAO-B 発現系のみで検出され、MAO-A 発現系、Negative Control (発現系母体の昆虫細胞由来のミクロソーム) では全く検出されなかった (Figure 16)。

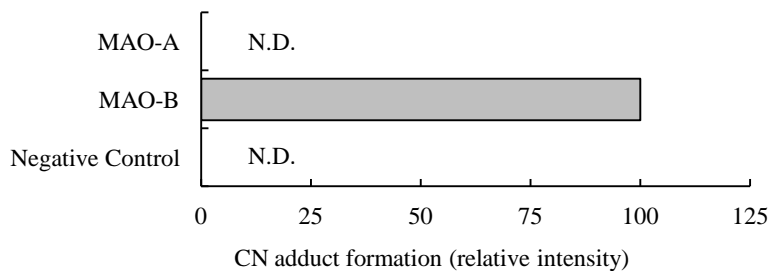


Figure 16 Formation of CN adduct in recombinant human MAO expression microsomes

第 11 項 MAO 発現系及びヒト肝サイトゾルを用いた M1 産生評価

第 10 項までの検討から、KW-2449 は MAO-B によりイミニウムイオン中間体に代謝され、次いで AO により M1 に酸化されると考えられた (Figure 17)。この代謝経路を確認するため、MAO 発現系及び AO の供給源としてヒト肝サイトゾル画分を混合し、M1 産生及び、MAO-B 阻害剤、AO 阻害剤の影響を評価した。

M1 産生は MAO-B 発現系とヒト肝サイトゾル画分を混合した場合に顕著に認められ、MAO-A 発現系とヒト肝サイトゾル画分を混合した場合の活性は MAO-B 発現系と比較して 1/5 以下であった。M1 産生は Pargyline (MAO-B 阻害剤)、Menadione (AO 阻害剤) を添加した場合に 90%以上阻害されが、抗 AO 抗体を添加した場合の阻害率は 60%程度であった (Figure 18)。

MAO-A 発現系とヒト肝サイトゾル画分を混合した際にも、わずかに M1 の産生が認められたが、サイトゾル画分にわずかに存在する MAO-B 活性によるものと考えられた。また、抗 AO 抗体の効果は限定的であったが、十分な濃度を添加できなかったことが原因であると考えられた。これらの結果から、KW-2449 が MAO-B 及び AO により協奏的に M1 に代謝されることが強く示唆された。

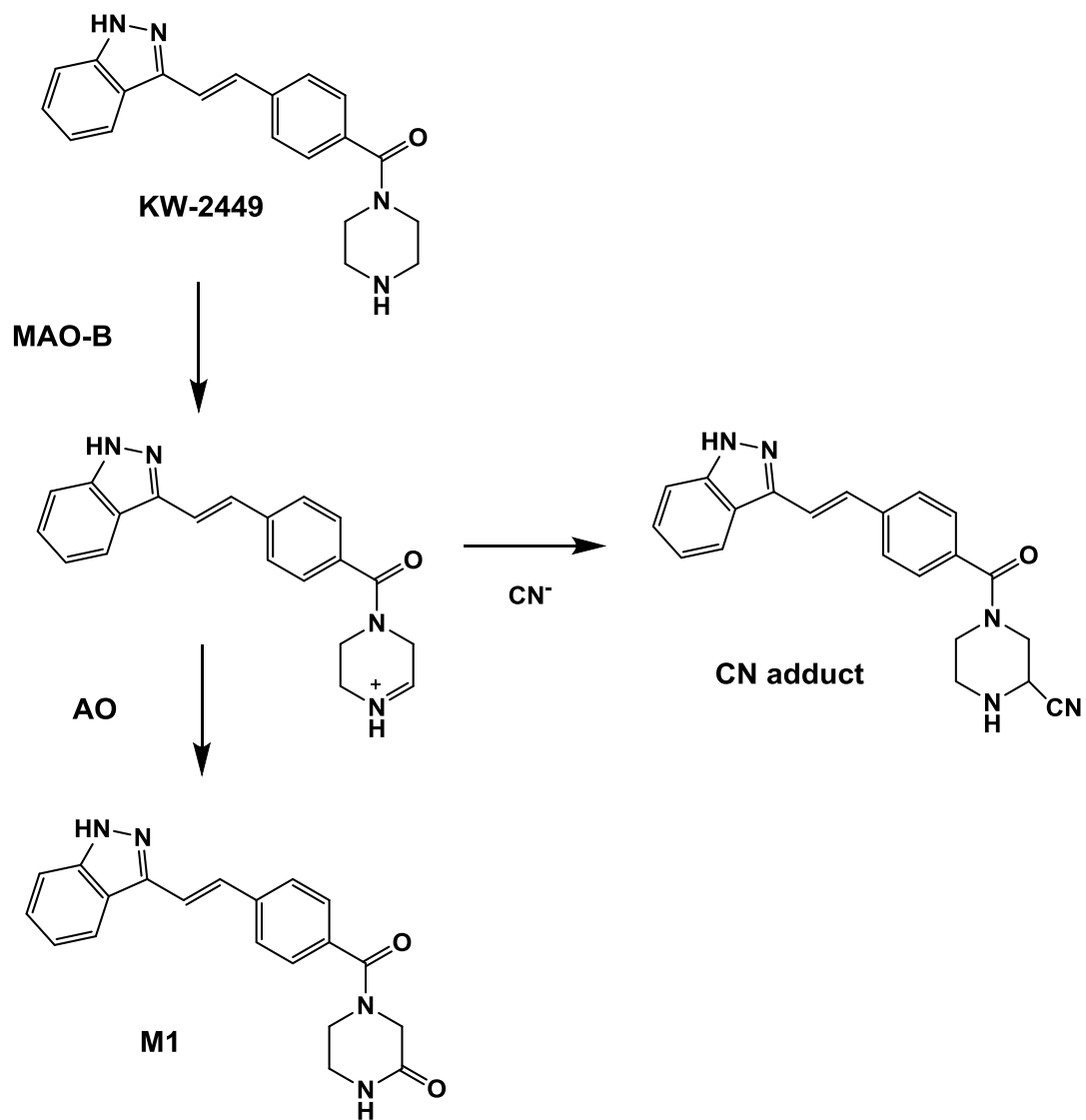
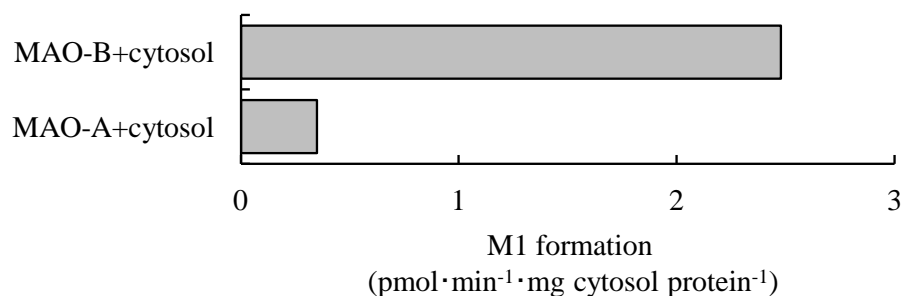


Figure 17 Proposed metabolic pathway from KW-2449 to M1

(A)



(B)

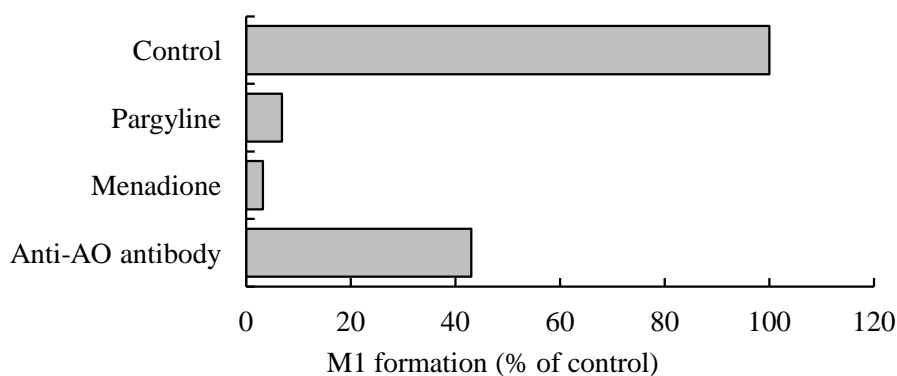


Figure 18 Formation of M1 in mixture of recombinant human MAO and human liver cytosol (A), Effects of inhibitors on M1 formation (B).

第 12 項 ヒトの全身クリアランスの予測

MAO-B は肝臓、腎臓、肺、骨格筋、血小板等、AO は肝臓、腎臓、肺、小腸等、多様な臓器に発現していることが知られていることから^{107,108,113)}、一般的に薬物が代謝される肝臓以外での代謝も KW-2449 の消失に寄与していることが考えられた。

そこで、*in vitro* の代謝実験及び動物実験の結果から、ヒトの全身クリアランスの予測を試みることにし、*in vivo* データにはヒトと KW-2449 の薬物動態プロファイルや代謝物プロファイルが近いカニクイザルを用いた。

肝細胞を用いた代謝実験から得られた *in vitro* の肝クリアランスはヒト (0.741 L/h/kg) とカニクイザル (0.687 L/h/kg) でほぼ同程度であった。肝細胞代謝データをサルでの *in vivo* で補正した予測されたヒトの全身クリアランスは 6.22 L/h/kg (*In vitro to in vivo normalization* 法)⁹⁸⁾、13.26 L/h/kg (Allometric scaling for extrahepatic clearance 法)⁹⁹⁾であった (Table 2)。臨床試験におけるヒトの見かけの全身クリアランスは 3.70 L/h/kg であり、*In vitro to in vivo normalization* 法

では概ね 2 倍以内の精度で予測することができた。Allometric scaling for extrahepatic clearance 法ではやや過大評価となったが 4 倍程度の精度で予測可能であった。

Table 2 Prediction of total body clearance of KW-2449 in human.

Species	<i>in vitro</i>		<i>in vivo</i>		
	CL _{H,int}	CL _H	Observed CL _{total}	Predicted CL _{total}	
	mL/min/kg	L/h/kg	L/h/kg	L/h/kg	L/h/kg
Rat	18.1	0.352	0.59		
Dog	NC	NC	-		
Monkey	22.5	0.687	5.77		
Human	38.6	0.741	3.70	6.22 ^{a)}	13.26 ^{b)}

a) calculated by *in vitro* to *in vivo* normalization

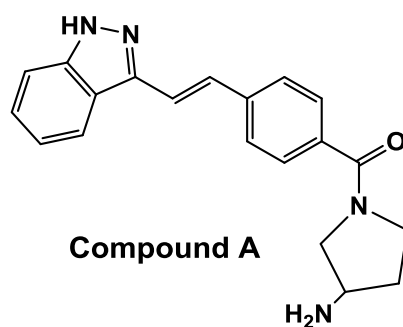
b) calculated by allometry scaling for extrahepatic clearance

NC: not calculated (Sufficient metabolic activity in dog hepatocytes was not detected).

第 13 項 後続化合物 Compound A の薬物動態評価

MAO-B 及び AO による代謝が KW-2449 の高クリアランスの原因であると推察されたため、MAO-B 及び AO に対する代謝安定性を高めた化合物の探索を行い、薬物代謝プロファイルの改善を検討した。Compound A は KW-2449 と同程度のキナーゼ阻害活性を持ちながら、MAO-B 及び AO による代謝に対して安定な化合物である。Compound A をカニクイザルに 1 mg/kg 静脈内投与後の血漿中薬物濃度推移を Figure 19 に示す。Compound A のカニクイザルにおける全身クリアランスは 0.47 L/h/kg であり、KW-2449 (5.77 L/h/kg) と比較して 1/10 以下に低下し、消失半減期は 8.51 時間と KW-2449 の消失半減期 1.26 時間と比較して長半減期を示した。この結果から、代謝酵素への安定性を高めることが、化合物の薬物動態プロファイルを改善する上で有効であることが示された。

(A)



(B)

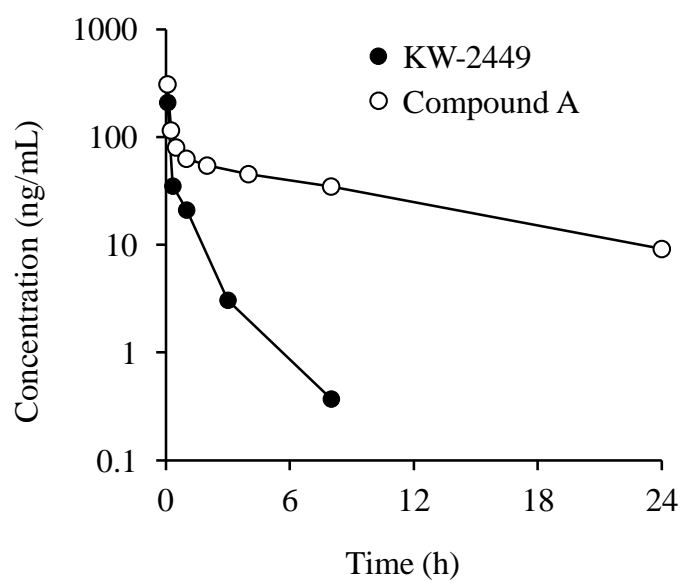


Figure 19 (A) Chemical structure of Compound A, (B) Plasma concentration-time profiles of KW-2449 and Compound A in cynomolgus monkey after 0.82 mg/kg of KW-2449 or 1 mg/kg of Compound A intravenous administration.

第4節 結語

本章では、KW-2449のピペラジン環がMAO-Bによってイミニウム中間体へと代謝され、次いでAOによりオキシピペラジン型の代謝物(M1)に変換されることを明らかにした。

本章の実験結果は以下のように要約される。

肝細胞を用いたKW-2449の代謝物プロファイル解析では、カニクイザルが最もヒトに近い代謝物プロファイルを示す動物種であり、ヒトとカニクイザルではM1が主代謝物であった。KW-2449の半減期はM1が産生されないラットでは比較的長かったものの、カニクイザルではヒトと同様に短半減期であり、M1への代謝が短半減期、低曝露の一因であると推測された。NaCNを用いた代謝中間体のトラップ法を用いて、M1への代謝中間体としてイミニウムイオンが存在していることを明らかにし、KW-2449がMAO-Bによってイミニウム中間体へと代謝され、さらに、イミニウムイオン中間体がAOによりM1に代謝されるというM1への代謝経路を同定した。AOのN-ヘテロ環化合物をラクタム型の代謝物に変換する活性には大きな種差があることが知られており、その活性は霊長類>>げっ歯類>イヌであることから、ラットやイヌでほとんどM1が産生されず、ヒト、カニクイザルでは主代謝物であった原因は、AO活性の種差がM1産生の種差の一因であると考えられた。

章の後半では、*in vitro*のデータをサルの*in vivo*データで補正することにより、ヒトにおけるKW-2449の全身クリアランス予測を試み、2-4倍の実用的精度で予測可能であることを示した。明らかにしたKW-2449の代謝機構を根拠としてMAO-B及びAOに対する代謝安定性を高めた後続化合物であるCompound AはKW-2449に比べ長い半減期を有しており、良好な薬物動態を示した。

MAO-B及びAOによるピペラジン環のオキシピペラジンへの協奏的代謝は、ピペラジン環の代謝機構としては、本研究で初めて同定した。ピペラジン環の代表的な代謝としてはN-脱アルキル化、水酸化、N-酸化、ラクタム化、ピペラジン環の開裂や開環などが知られており^{114,115}、ラクタム型に変換された代謝物はニューキノロン系抗菌薬のノルフロキサシンやエノキサシンなどで報告されていたものの、代謝酵素及び代謝経路は過去に報告されていなかった^{116,117}。これらピペラジン環がラクタム化された代謝物はKW-2449と同様の代謝機構により生成している可能性が考えられる。また、ピペラジン環は抗精神病薬であるブスピロン、ネファゾドン、抗菌薬であるレボフロキサシン、ケトコナゾール、性機能改善薬のシルデナフィル(バイアグラ)、抗癌剤のイマチニブをはじめ、数多くの医薬品に含まれる構造であり^{114,118}、本研究でピペラジン環からオキシピペラジンへの詳細な代謝経路を明らかにしたことは、今後、ピペラジン環を有する医薬品の代謝経路を検討する上で有用と考えられる。

また、MAO-B及びAOが協奏的に作用してラクタム型の代謝物を産生する代謝機構は、合成麻薬の一種であるMPTP(1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine)の代謝以外ではこれ

まで報告されていないが¹⁰¹⁾、*N*-ヘテロ環化合物からラクタム型の代謝物が生成するという報告例は多い¹¹⁵⁾。今回見いだした MAO-B 及び AO による協奏的な反応機構は、他の *N*-ヘテロ環代謝でも重要な代謝経路の一つである可能性が考えられる。

一般的に、代謝経路の途中で化学的に不安定な中間体が存在する場合、中間体を直接検出できることはほとんどないため、その構造推定や代謝酵素を同定することは難しい。本章では KW-2449 のイミニウムイオン中間体を検出するため、シアン化ナトリウムによるトラップ法を用い、シアン付加体の生成量を指標として代謝酵素の同定を行った。一般にエポキシドやキノンなどの求電子性の反応性代謝物の捕捉にはグルタチオン (GSH) が用いられるが、脂肪族アミンから生成するイミニウムイオンではシアノイオンのほうが反応性が高い。イミニウムイオンは MAO だけでなく CYP や FMO など他の薬物代謝酵素からも産生される場合もあることから¹¹⁹⁾、本トラップ法はイミニウムイオンが介在する場合の代謝経路の同定に有用であると考えられる。

Non-CYP は肝臓以外の臓器にも発現している場合が多く、Non-CYP で代謝される薬物の全身クリアランス (CL_{Total}) 予測法は未だ確立されていない。本章では MAO-B 及び AO が代謝に関与する場合のヒト全身クリアランスの予測を試みた。MAO は主に細胞内のミトコンドリア画分に、AO はサイトゾル画分に局在していることから、これらの寄与を総合的に検討するため、肝細胞での代謝試験から求めた肝クリアランス (CL_H) を用い、サル の CL_{Total} との比較によってヒトの CL_{Total} を予測した。*In vitro* to *in vivo* normalization 法では実測値の 2 倍、Allometric scaling for extrahepatic clearance 法では 4 倍と、ある程度実用的な精度で予測することが可能であった。肝サイトゾル画分や肝 S9 画分、凍結肝細胞を用いて AO で代謝される化合物の CL_{Total} を予測した先行研究では、実際の CL_{Total} を大幅に過少評価 (~1/11 程度) してしまうことが報告されていることから⁷¹⁾、本研究で用いた手法は、今後さらに多くの化合物で検証することが必要なものの、医薬品開発早期において簡便な Non-CYP 代謝の評価法となり得ると考えられる。

Non-CYP 代謝酵素の発現や活性は、細胞の保存状態や試料採取の過程で大きく変わってしまう事が多いことから、より精度の高い予測には、ヒトの新鮮肝細胞の使用やマウスの肝臓をヒトの肝臓に置き換えたキメラマウス (PXB マウス、Phoenix Bio) の使用が有用である可能性がある^{120,121)}。また、Non-CYP 酵素の各臓器での発現量やターンオーバーなどを反映させた PBPK モデルの確立も今後の検討課題である^{122,123)}。

ピペラジン環をはじめとする *N*-ヘテロ環構造は、医薬品開発の場において、しばしば候補化合物の水溶性や代謝安定性を向上させる目的で導入されている。また、これらの構造は多くの天然物にも含まれ、多様な生物活性をもつ Drug-Like な構造であるとみなされており、*N*-ヘテロ環を含む医薬品開発は今後も拡大するものと考えられる。本章で明らかにしたピペラジン

環の代謝経路検討手法や全身クリアランスの予測法は *N*-ヘテロ環構造を含む医薬品開発において有用であると考えられる。

第3章 KW-2449 のイミニウムイオン中間体による Aldehyde oxidase 阻害

第1節 研究の目的

第2章では KW-2449 が MAO-B によってイミニウムイオン中間体に代謝され、次いで AO によって M1 へと変換されることを明らかにした。

一方、M1 は KW-2449 の約 1/3 程度の FLT3 阻害活性を持つため、臨床試験においては、M1 の曝露も FLT3 阻害に寄与することが期待されていた。しかしながら、臨床試験において KW-2449 の血中濃度推移は反復投与（1日2回経投与）で変化しなかったものの、M1 の血中曝露は反復投与によって顕著に低下し、投与開始から約2週間後には初回投与時の約30%まで低下した⁸⁷⁾。M1 曝露の低下により、FLT3 阻害活性で補正した KW-2449 及び M1 の総濃度が低下し、十分な FLT3 阻害を維持できる時間が短縮したことも、KW-2449 が臨床試験において十分な有効性を示すことができなかつた一因であると考えられた（Figure 20）。

反復投与により M1 の濃度が低下したことから、M1 産生酵素である MAO-B 及び AO の阻害か M1 代謝酵素の誘導が原因として考えられた。M1 産生酵素である MAO 及び AO は薬物の代謝のみならず、広範な内因性物質を代謝することが知られており、MAO はセロトニン、ノルエピネフリン、ドーパミンといった神経伝達物質の代謝に関与し、AO は内因性のアルデヒド化合物や N-ヘテロ環化合物の代謝に関与している。そのため、MAO または AO が強く阻害された場合、予期せぬ薬物相互作用や毒性発現につながる可能性も懸念された。

本章では、まず KW-2449 の代謝物プロファイルがヒトと類似しているサルを用い、反復投与による M1 曝露の低下が酵素阻害であるか、酵素誘導であるかを検討した後、KW-2449 及び M1 の MAO-B、AO 阻害能や阻害形式を評価し、臨床試験で M1 曝露が低下した原因が代謝酵素阻害であるかを阻害パラメータから考察した。また、前章で明らかとなった KW-2449 のイミニウムイオン中間体のこれら代謝酵素への阻害作用も併せて評価した。さらに、イミニウムイオンは一般的に高い求電子反応性を有し、タンパクと共有結合することが知られていることから¹²⁴⁾、章の後半では KW-2449 のタンパクとの共有結合能についても評価した。

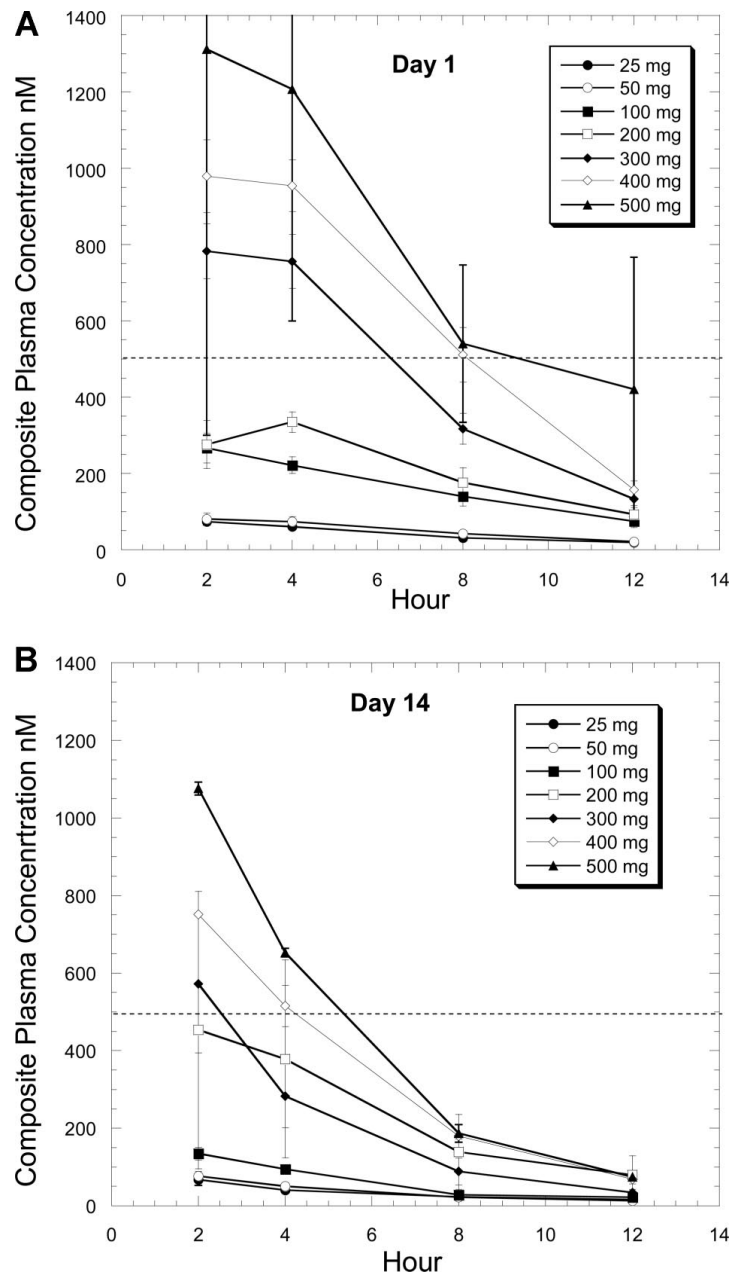


Figure 20 Total concentrations of KW-2449 and the metabolite M1 in plasma after multiple dosing of KW-2449 in Phase 1 trial⁸⁷).

M1 concentrations were divided by 3.6 to normalize the inhibitory activity on FLT3.

Dashed line at 500 nmol/L represents the estimated drug concentration at which FLT3 is inhibited by 80%.

第2節 実験材料及び方法

第1項 被験物質及び対照物質

KW-2449、M1 は協和発酵キリンで合成したものをを用いた。¹⁴C-KW-2449 は Amersham Biosciences で合成したものをを用いた。

第2項 動物実験

すべての動物実験は「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文部科学省）⁸⁹⁾」及び各実施機関における動物実験委員会の基準に従って実施した。

KW-2449 をカニクイザルに 10 mg/kg で 1 日 2 回経口投与（計 5 回）し、初回、3 回目、5 回目投与時の、投与前、投与後 2、4、8、24 時間後に採血を行った。

¹⁴C-KW-2449 (8.04 MBq/kg) をカニクイザルに 5 mg/kg 経口投与し、投与後 30 分から 48 時間まで経時的に採血を行った。

第3項 MAO 及び AO 活性測定

MAO の活性は kynuramine (MAO 基質、Sigma) を基質として、4-hydroxyquinoline (4-HQ、kynuramine 代謝物、和光純薬工業社製) の産生量を評価した¹²⁵⁾。AO の活性は phthalazine (AO 基質、和光純薬工業社製) を基質として phthalazone (phthalazine 代謝物、和光純薬工業社製) の産生量を評価した (Figure 21)¹²⁶⁾。

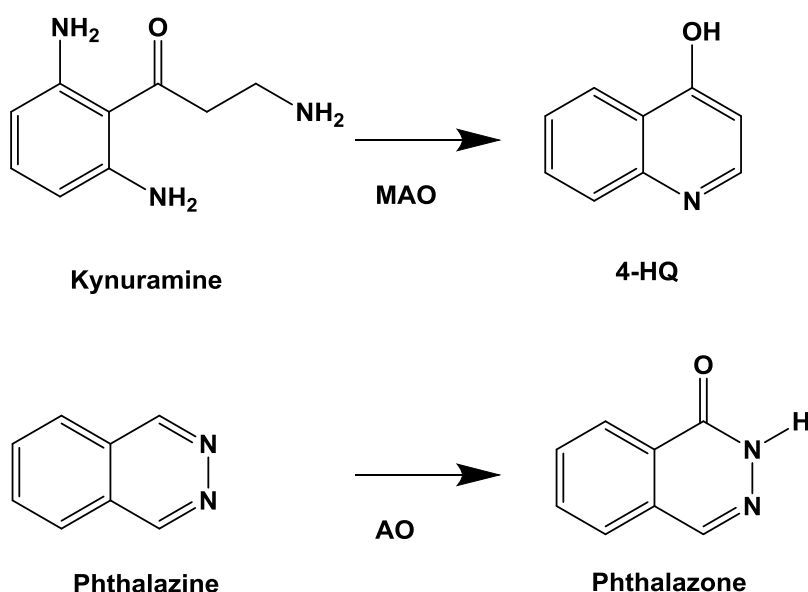


Figure 21 Reaction of kynuramine to 4-HQ and reaction of phthalazine to phthalazone

第4項 KW-2449 及び M1 による MAO 阻害活性評価

KW-2449 又は M1 並びに kynuramine を 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 含有の phosphate buffer (100 mmol/L 、pH 7.4) に溶解し、37°C で 3 分間プレインキュベートした。MAO 発現系 (MAO-A、MAO-B、BD Biosciences 社製) を添加し 37°C で 10 又は 20 分間反応させた。氷冷したアセトニトリルを添加して反応を停止させ、Ultrafree MC (日本ミリポア、0.2 μm) を用いて濾過 (約 5000 \times g、4°C、5 分間) した反応液を検討に用いた。各阻害剤と基質濃度の組み合わせは以下とした。

	タンパク濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	Kynuramine ($\mu\text{mol/L}$)	KW-2449 or M1 ($\mu\text{mol/L}$)
MAO-A 活性測定	0.02	40	0.5, 5, 50
MAO-B 活性測定	0.04	25	0.5, 5, 50

阻害様式及び阻害パラメータを算出する場合には以下の濃度を用いた

	タンパク濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	Kynuramine ($\mu\text{mol/L}$)	KW-2449 or M1 ($\mu\text{mol/L}$)
MAO-B 活性測定	0.04	10, 20, 40, 80, 200	2, 10, 50

第5項 KW-2449 及び M1 による AO 阻害活性評価

KW-2449 又は M1 (0.5, 5, 50 $\mu\text{mol/L}$) 並びに phthalazine (2 $\mu\text{mol/L}$) を 100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA 含有の phosphate buffer (50 mmol/L 、pH 7.8) に溶解し、37°C で 3 分間プレインキュベートした。ヒト肝サイトゾル画分 (0.2 mg protein/mL) を添加し 37°C で 10 分間反応させた。氷冷したアセトニトリルを添加して反応を停止させ、Ultrafree MC (日本ミリポア、0.2 μm) を用いて濾過 (約 5000 \times g、4°C、5 分間) した反応液を検討に用いた。

第6項 イミニウムイオン中間体による AO 阻害活性評価

ヒト肝サイトゾル画分 (0.5 mg protein/mL)、MAO-B 発現系 (0.1、0.25、0.5 mg protein/mL) 及び KW-2449 (2.5、5、10 $\mu\text{mol/L}$) を含む懸濁液 (50 $\text{mmol phosphate buffer}$ 、pH 7.8、100 $\mu\text{mol/L EDTA}$) を 37°C で 0-20 分間プレインキュベーションした。phthalazine (2 $\mu\text{mol/L}$) を添加し 37°C で 10 分間反応させた (Figure 22)。氷冷したアセトニトリルを添加して反応を停止させ、遠心分離 (約 15000 \times g、4°C、5 分間) した上清を検討に用いた。

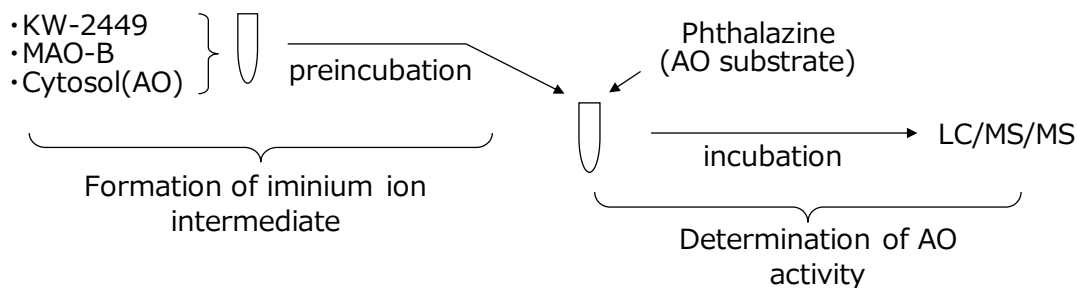


Figure 22 Assay procedure for inhibition of AO activity by the iminium ion metabolite produced from KW-2449. The iminium ion metabolite was produced from the incubation of KW-2449 and MAO-B in human liver cytosol (AO source) for 0-20 min and then phthalazine was added as a substrate for AO.

第6項 イミニウムイオン中間体による AO 不可逆阻害評価

ヒト肝サイトゾル画分 (0.5 mg protein/mL)、MAO-B 発現系 (0.5 mg protein/mL) 及び KW-2449 (5、10、20 $\mu\text{mol/L}$) を含む懸濁液 (50 mmol phosphate buffer、pH 7.8、100 $\mu\text{mol/L}$ EDTA) を 37°C で 0-30 分間プレインキュベーションした。プレインキュベーション後の反応液を 20 倍希釈し、phthalazine (20 $\mu\text{mol/L}$) を添加して 37°C で 10 分間反応させた (Figure 23)。氷冷したアセトニトリルを添加して反応を停止させ、遠心分離 (約 15000 \times g、4°C、5 分間) した上清を検討に用いた。ヒト肝サイトゾルと MAO-B 発現系及び KW-2449 を別々にインキュベーションしたサンプルをコントロールとして調製した (プレインキュベーション時にイミニウムイオン中間体と AO が共存しない条件)。

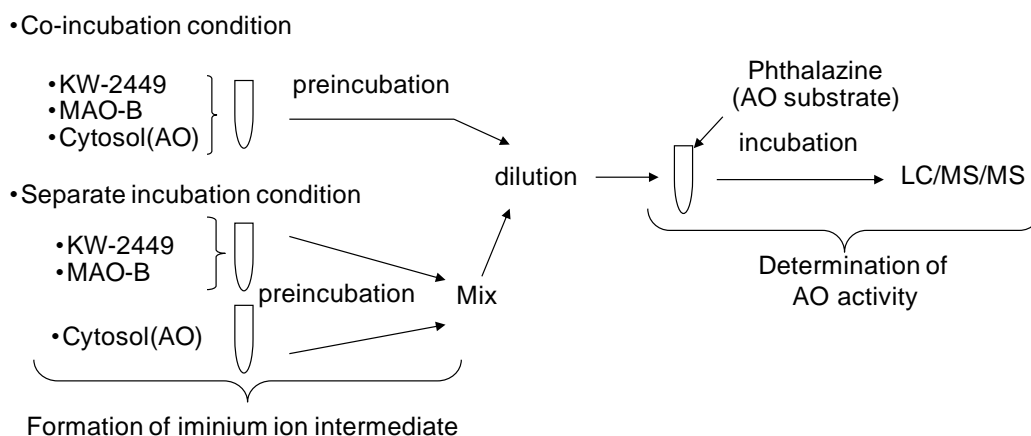


Figure 23 Assay procedure for the evaluation of irreversible inhibition of AO by the iminium ion metabolite produced from KW-2449. KW-2449 and MAO-B were preincubated with/without human liver cytosol. The preincubation mixture was diluted 20-fold before the determination of AO activity.

第7項 LC-MS/MS分析

KW-2449、M1 の定量は第2章と同様の条件で行った。

MAO 及び AO 活性測定での 4-HQ 及び phthalazone の定量は LC-MS/MS を用いて行った。

代表的な LC 分析条件を以下に示す

Liquid chromatograph	: Agilent 1100 (Agilent Technologies)
Auto sampler	: HTC PAL (CTC Analytics)
Analytical column	: XTerra RP18, 3.5 μ m, 2.1 mm i.d. \times 50 mm (Waters)
Guard column	: Symmetry C18, 3.5 μ m, 2.1 mm i.d. \times 10 mm (Waters)
Mobile phase	: (A) 0.1 vol% acetic acid (B) acetonitrile
Gradient program	: Time (min) 0 1 2 3 6 6.1 12.5 Pump B (vol%) 5 5 50 80 80 5 5 (linear gradient)
Flow rate	: Time (min) 0 7 7.1 11.5 11.6 12.5 (μ L/min) 200 200 300 300 200 200 (linear gradient)
Column temperature	: Room temperature
Time program	: 0-2 min, 7-12.5 min, Switching valve position 1 (to waste line) 2-7 min, Switching valve position 2 (to MS/MS)

代表的な MS/MS 分析条件を以下に示す

Mass spectrometer	: API 4000 (Applied Biosystems/MDS SCIEX)
Ionization mode	: Electrospray ionization (ESI), positive
Scan type	: Multiple reaction monitoring (MRM)
Source temperature	: 600°C
Collision energy	: 37 eV
Monitoring ion	: 4-HQ, m/z 146/91 (Q1/Q3) Phthalazone, m/z 147/90 (Q1/Q3)

4-HQ を定量する際には phthalazone を I.S.として添加し、phthalazone を定量する際には 4-HQ を I.S.として添加した。

第 8 項 ^{14}C -KW-2449 を用いた代謝物プロファイル分析

^{14}C -KW-2449 投与後のサル血漿試料の代謝物プロファイル分析は 2 章と同様に実施した。

第 9 項 MAO-B 阻害の速度論的解析

MAO-B による kynuramine 代謝の K_m 、 V_{max} 、KW-2449 及び M1 の MAO-B の阻害定数 (K_i) の初期値は Lineweaver-burk plot から算出した。求めた初期値を用いて、Dixon plot 上でフィッティングを行い、 K_m 、 V_{max} 及び K_i 値を決定した。フィッティングは WinNonlin Professional (Pharsight 社製) を用い、競合阻害を前提とした下記の式に従って実施した。フィッティングは 2 段階で行い、Simplex (Nelder-Mead) アルゴリズムを用いて算出されたパラメータを初期値として、再度 Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) アルゴリズムでフィッティングを行い各パラメータを求めた。

$$v = \frac{V_{max} \cdot [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

v: MAO-B 活性 (nmol/min/mg protein)、I: KW-2449 又は M1 添加濃度 ($\mu\text{mol/L}$)
S: kynuramine 添加濃度 ($\mu\text{mol/L}$)、 V_{max} : 最大反応速度 (nmol/min/mg protein)
 K_m : ミカエリス定数 ($\mu\text{mol/L}$)、 K_i : 阻害定数 ($\mu\text{mol/L}$)

第 10 項 AO 阻害の速度論的解析

AOX 残存活性を自然対数変換した値をプレインキュベーション時間に対してプロットし、各 KW-2449 濃度における見かけの酵素不活化速度定数 (k_{obs} ; min^{-1}) を算出した¹²⁷⁾。さらに KW-2449 濃度 ($[I]$; $\mu\text{mol/L}$) と $[I]/k_{obs}$ を以下の式を用いて直線回帰し、最大不活化速度定数 (k_{inact} 、 min^{-1}) 及び見かけの阻害定数 ($K_{i,app}$ 、 $\mu\text{mol/L}$) の初期値を算出した。

$$\frac{[I]}{k_{\text{obs}}} = \frac{[I]}{k_{\text{inact}}} + \frac{K_{i,\text{app}}}{k_{\text{inact}}}$$

k_{obs} : 見かけの酵素不活化速度定数 (min^{-1})、 k_{inact} : 最大不活化速度定数 (min^{-1})
 I: KW-2449 添加濃度 ($\mu\text{mol/L}$)、 $K_{i,\text{app}}$: 見かけの阻害定数 ($\mu\text{mol/L}$)

以降の解析には WinNonlin Professional を用い、以下の式に基づいて各パラメータを非線形最小二乗法で算出した。フィッティングは 2 段階で行い、Simplex (Nelder-Mead) アルゴリズムを用いて算出されたパラメータを初期値として、再度 Gauss-Newton (Levenberg and Hartley) アルゴリズムでフィッティングを行い各パラメータを求めた。

$$k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}} \cdot [I]}{K_{i,\text{app}} + [I]}$$

k_{obs} : 見かけの酵素不活化速度定数 (min^{-1})、 k_{inact} : 最大不活化速度定数 (min^{-1})
 I: KW-2449 添加濃度 ($\mu\text{mol/L}$)、 $K_{i,\text{app}}$: 見かけの阻害定数 ($\mu\text{mol/L}$)

第 11 項 ^{14}C -KW-2449 のタンパクへの不可逆結合

(1) サル血漿との反応

^{14}C -KW-2449 (50 $\mu\text{mol/L}$ 、107.5 MBq/L) をサル血漿に添加し、37°C で 3 分間プレインキュベーションした。MAO-B 発現系 (0.25 mg protein/mL) またはヒト肝ミクロソーム (1 mg protein/mL) を添加し、NADPH 生成系存在/非存在下で 37°C で 6 時間インキュベートした。

(2) ヒト血清アルブミンとの反応

^{14}C -KW-2449 (50 $\mu\text{mol/L}$) をヒト血清アルブミン溶液 (1 mg/mL) に添加し、37°C で 3 分間プレインキュベーションした。MAO-B 発現系 (0.25 mg protein/mL) または MAO-B Negative Control を添加し、37°C で 1 時間インキュベートした。下表の濃度になるよう、各阻害剤、イミニウムイオン捕捉剤を添加した試料も調製した。

阻害剤	化合物名	メーカー	最終濃度
MAO-B 阻害剤	Pargyline	Sigma	20 $\mu\text{mol/L}$
イミニウムイオン捕捉剤	NaCN	和光純薬工業	10 mmol/L

(3) ミクロソーム中での反応

^{14}C -KW-2449 (10 $\mu\text{mol/L}$) にヒト及びサル肝ミクロソームに添加し、NADPH 生成系存在/非存在下で 37°C で 1 時間インキュベートした。

(4) 肝細胞中での反応

^{14}C -KW-2449 (10 $\mu\text{mol/L}$) 及び ^{14}C -Compound A にヒト肝細胞懸濁液 (2×10^6 cells/mL) を添加し、 37°C で2時間インキュベートした。

第 12 項 結合放射能の定性分析

11 項で得られた試料に SDS 緩衝液 (0.125 mol/L Tris 緩衝液 (pH 6.8)、4 w/v% SDS、20 vol% glycerol、50 $\mu\text{g/mL}$ bromophenol blue) と 2-メルカプトエタノールを 1000 : 63 (v/v) の比で混合したものを等量添加し、 95°C で約 4 分間処理して泳動用試料とした。ポリアクリルアミドゲル (PAGEL NPU-7.5L、アトー社製) に試料をアプライし、泳動用緩衝液 (0.0316 mol/L Tris、0.1 w/v% SDS、0.192 mol/L glycine) 中、20 mA/枚の定電流で約 75 分間泳動した。電気泳動終了後のゲルを Coomassie brilliant blue R-250 (ナカライ社製) で染色後、乾燥させた。乾燥後のゲルを、imaging plate (IP、富士写真フィルム社製) と密着させ、シールドボックス (BAS SHB 2040、富士写真フィルム社製) 内で 4 日間以上露光させた。露光後の IP を IP reader (Bio-Imaging Analyzer IPR 2500、富士写真フィルム社製) で読み取り、放射能の測定を行った。

第 13 項 結合放射能の定量分析

10 項で得られた試料の一部に等量のアセトニトリルを添加して、定量分析用の試料とした。沈殿したタンパクペレットをメタノールとジエチルエーテルを 3:1 で混合した溶媒で 3 回洗浄した後、5 w/v% SDS 溶液中 $50\text{-}60^\circ\text{C}$ でインキュベーションしてペレットを溶解させた。再度メタノール/ジエチルエーテル混合液を添加してタンパクを沈殿させ、上記の洗浄過程を繰り返した^{128,129}。組織溶解剤 Solvable (PerkinElmer Life and Analytical Sciences 社製) を加え、 $50\text{-}60^\circ\text{C}$ で 6 時間以上インキュベーションして沈殿を完全に溶解させた。液体シンチレーションカクテル Hionic Fluor (PerkinElmer Life and Analytical Sciences 社製) を適量加え、液体シンチレーションアナライザー Tri-Carb 2700TR (PerkinElmer Life and Analytical Sciences 社製) で放射能を測定した。

第3節 結果及び考察

第1項 カニクイザルに KW-2449 を反復投与した時の KW-2449 及び M1 の血中濃度推移

カニクイザルに KW-2449 を 1 日 2 回、1 mg/kg の用量で経口投与した時の KW-2449 及び M1 の血漿中薬物濃度推移を Figure 24 に示す。KW-2449 の濃度推移は反復投与によりほとんど変化しなかった。一方、M1 は初回投与後には KW-2449 の 10 倍以上の濃度で検出されたが、3 回目投与後には 1/10 程度まで低下し、5 回目投与後にはさらに低下した。カニクイザルでもヒトと同様に M1 曝露の低下が認められ、M1 の産生酵素阻害か M1 の代謝酵素誘導が起きている可能性が高いと考えられた。一般に薬物代謝酵素の誘導には数日から数週間かかることが知られている^{130,131)}。カニクイザルにおける M1 濃度の低下は投与翌日に認められたことから、酵素誘導による M1 代謝の亢進の可能性は低いと考えられた。

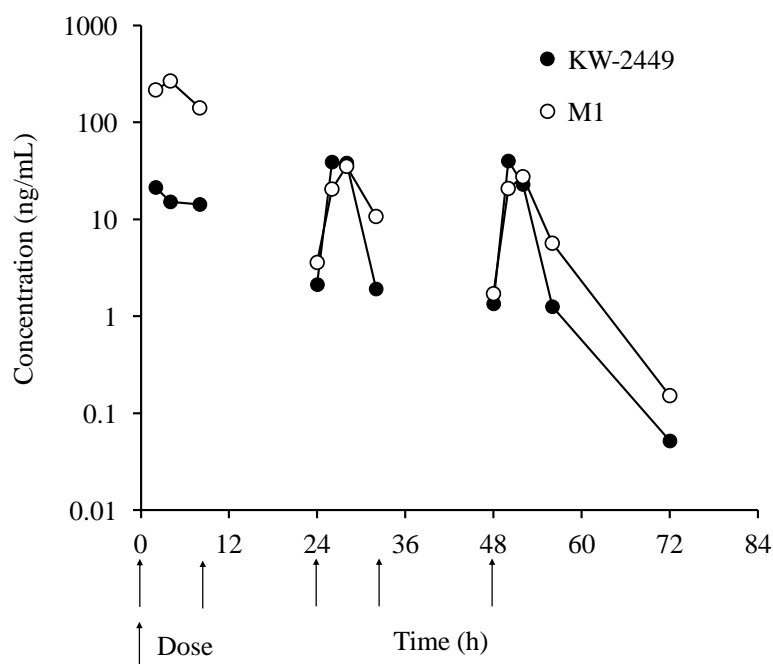


Figure 24 Plasma concentration-time profiles of KW-2449 and M1 after the repeated oral administrations of 1 mg/kg KW-2449 to cynomolgus monkeys at the time indicated by the arrows.

第2項 KW-2449 及び M1 による MAO-A、AO 阻害活性

KW-2449、M1 の MAO-A 及び AO 活性への影響を Figure 25 に示す。MAO-A 及び AO 活性は 50 $\mu\text{mol/L}$ の KW-2449 または M1 存在下でも、コントロールの 80% 以上であり、ほとんど阻害されなかった。臨床試験における初回投与後の KW-2449 及び M1 の最高濃度はそれぞれ、0.54 $\mu\text{mol/L}$ and 3.44 $\mu\text{mol/L}$ であることから、ヒトにおいて KW-2449 または M1 が直接 MAO-A、AO を阻害する可能性は低いと考えられた。MAO-A 及び AO に関しては、追加の速度論的解析は実施しなかった。

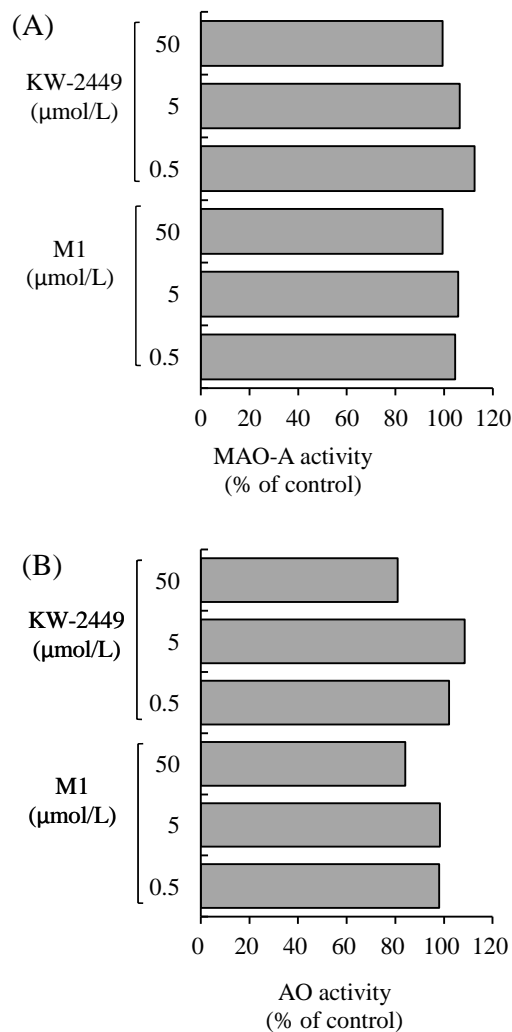


Figure 25 Effects of KW-2449 or M1 concentrations on the activities of MAO-A (A) and AO (B). Kynuramine and phthalazine and were used as substrates for MAO-A and AO, respectively.

第3項 KW-2449 及び M1 による MAO-B 阻害

KW-2449、M1 の MAO-B 活性への影響を Figure 23 に示す。MAO-B は KW-2449 及び M1 の濃度依存的に阻害され、50 $\mu\text{mol/L}$ では 50%以上阻害された (Figure 26A)。また、KW-2449 の MAO-B 阻害活性は反応時間には依存しなかった (Figure 26B)。このことから、KW-2449 が MAO-B に代謝される過程で自殺基質として作用し、MAO-B を不可逆的に阻害する可能性は低いと考えられた。基質 (kynuramine) 及び阻害剤濃度 (KW-2449 or M1) を変化させて検討した際の Lineweaver-burk plot の交点が Y 軸上であったことから、KW-2449 及び M1 はいずれも MAO-B を競合的に阻害すると考えられた (Figure 27)。Dixon plot から求めた阻害係数 (K_i) はそれぞれ 8.32 $\mu\text{mol/L}$ 、11.5 $\mu\text{mol/L}$ であった (Figure 28, Table 3)。

この K_i 値は臨床試験における初回投与後の KW-2449 及び M1 の最高濃度である 0.54 $\mu\text{mol/L}$ and 3.44 $\mu\text{mol/L}$ より低値であった。また、一般的に酵素阻害に寄与すると考えられているのは血漿タンパクに結合していないフリーの薬物濃度である¹³²⁾。KW-2449 及び M1 の血漿中フリー体分率は 0.1 前後であることから、実際の血漿中フリー体濃度は K_i 値の 1/10 以下であり、循環血中に存在する KW-2449 及び M1 が MAO-B を阻害する可能性は低いと考えられた。

一方、経口投与後の門脈中薬物濃度は循環血中の薬物濃度より高くなる場合があり、経口投与後の吸収過程において門脈中の KW-2449 濃度が K_i 値よりも高くなり、肝臓中の MAO-B が阻害された可能性は否定できない¹³³⁾。しかしながら、MAO-B は肝臓、腎臓、肺、骨格筋、血小板をはじめとした広範な臓器に発現している。さらに、第2章での全身クリアランスの予測検討から KW-2449 の代謝には肝外代謝の寄与が大きいことも示唆されている。このため、肝臓内の MAO-B 阻害により、KW-2449 及び M1 の薬物動態に影響が出る可能性は否定できないが、その可能性は限定的であると推測される。ヒト及びカニクイザルの反復投与試験では M1 の曝露は 1/10 程度まで低下していることから、MAO-B 阻害が M1 曝露低下の主因である可能性は低いと考えられた。

Table 3 Kinetic parameters for the effects of KW-2449 and KF90693 on MAO-B activities.

Compound	K_i ($\mu\text{mol/L}$)	K_m ($\mu\text{mol/L}$)	V_{max} (nmol/min/mg protein)
KW-2449	8.32	34.4	49.6
M1	11.5	29.1	39.8

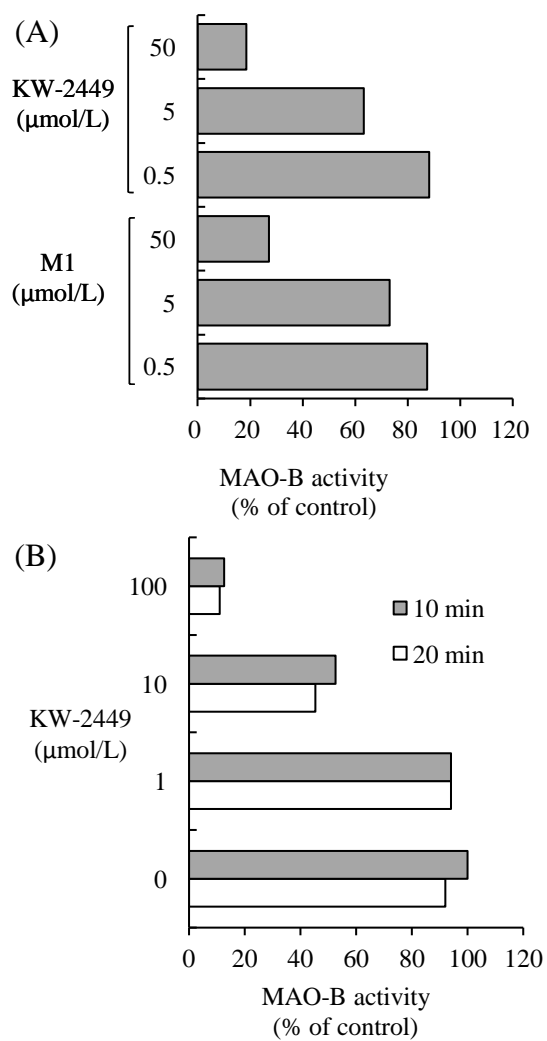


Figure 26 (A) Effects of KW-2449 or M1 concentrations on the activities of MAO-B.
 (B) Incubation time did not affect on the MAO-B activity at various concentrations of KW-2449.

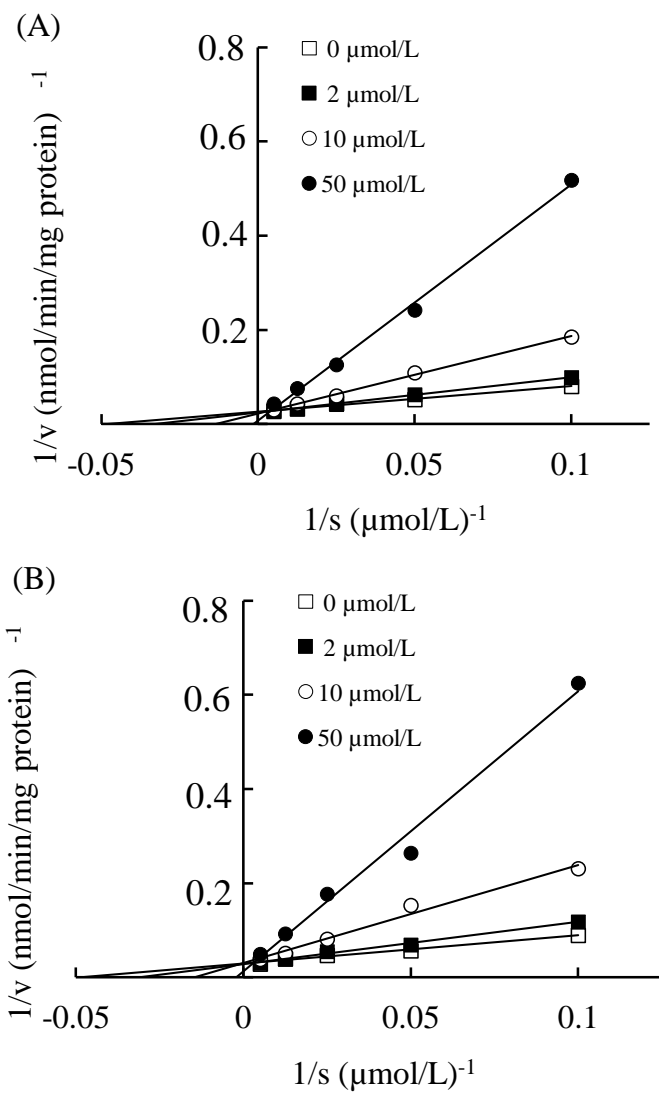


Figure 27 Lineweaver-burk plots for MAO-B activity against KW-2449 (A) or M1 (B).

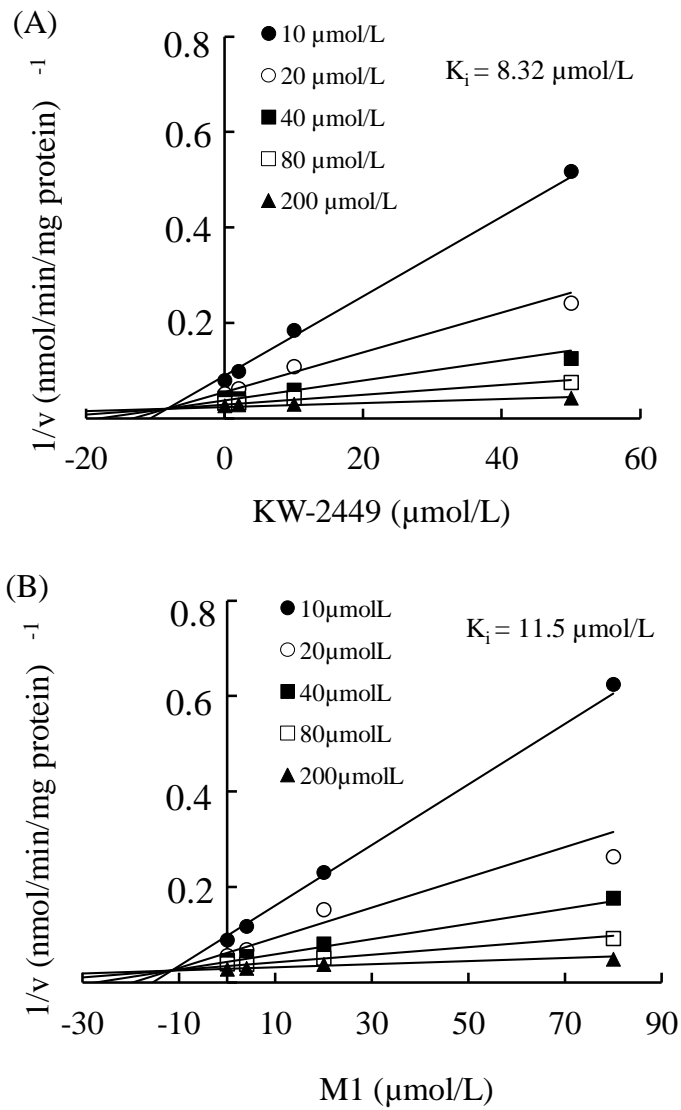


Figure 28 Dixon plots for MAO-B activity against KW-2449 (A) or M1 (B).

第4項 KW-2449 のイミニウム中間体による AO 阻害

第2章において存在を明らかにした KW-2449 のイミニウムイオン中間体による AO の阻害活性を検討するため、プレインキュベーション法を採用した¹³⁴⁾。ヒト肝サイトゾルを KW-2449 及び MAO-B 共存下でプレインキュベーションし、AO 活性の変化を検討した。AO 活性は、プレインキュベーション時間依存的に減少し、添加した KW-2449、MAO-B 濃度とも比例していた (Figure 29)。この結果より、KW-2449 の代謝中間体であるイミニウムイオン中間体が AO 活性を阻害することが示唆された。

プレインキュベーション法は不可逆阻害を検出する簡便な手法であり、医薬品開発では広く用いられているが、プレインキュベーション中に生成する代謝物が強い競合結合を有する場合、不可逆阻害と競合阻害を区別することが難しい。また、イミニウムイオン型の化合物はしばしば AO の基質となり、かつ競合阻害剤として働くことが知られている¹³⁵⁾。

そこで、イミニウムイオン中間体による AO 不可逆阻害と競合阻害の寄与を分離するため、プレインキュベーション+希釈法を採用した^{136,137)}。この方法では、プレインキュベーション時の KW-2449 及び MAO-B を高めることで不可逆阻害を最大化し、反応液を希釈した後に高濃度の基質存在下で AO 活性を測定することで競合阻害の影響を最小化することができる。本条件下でも AO 活性はプレインキュベーション時間依存的に低下した。一方、プレインキュベーション時に AO とイミニウムイオンが共存しないよう別々にインキュベーションした場合には AO 活性は阻害されなかったことから、イミニウムイオン中間体による AO 阻害は不可逆阻害であることが強く示唆された (Figure 30)。

見かけの不活化速度定数を KW-2449 濃度に対してプロットして得られた最大不活化速度定数 (k_{inact}) 及び見かけの阻害定数 ($K_{\text{i,app}}$) はそれぞれ 0.111 min^{-1} 及び $11.8 \text{ } \mu\text{mol/L}$ であった (Figure 31, Table 4)。これら阻害パラメータの値は furafylline (CYP1A2 に対する $K_{\text{i,app}}$: $23 \text{ } \mu\text{mol/L}$, k_{inact} : 0.87 min^{-1}) や erythromycin (CYP3A4 に対する $K_{\text{i,app}}$: $8.82 \text{ } \mu\text{mol/L}$, k_{inact} : 0.120 min^{-1}) 等、過去にヒトにおいて不可逆阻害を起こすことが報告されている化合物に匹敵する値であり^{138,139)}、KW-2449 は *in vivo* においても AO の不可逆阻害を起こす可能性が高いと考えられた。本項の最後に検討により明らかとなった KW-2449、M1 及びイミニウム中間体の代謝酵素阻害の概略図を Figure 32 に示す。

Table 4 Parameters for inhibition of AO activity by KW-2449 in the presence of MAO-B.

k_{inact} (min^{-1})	0.111
$K_{\text{i,app}}$ ($\mu\text{mol/L}$)	11.8

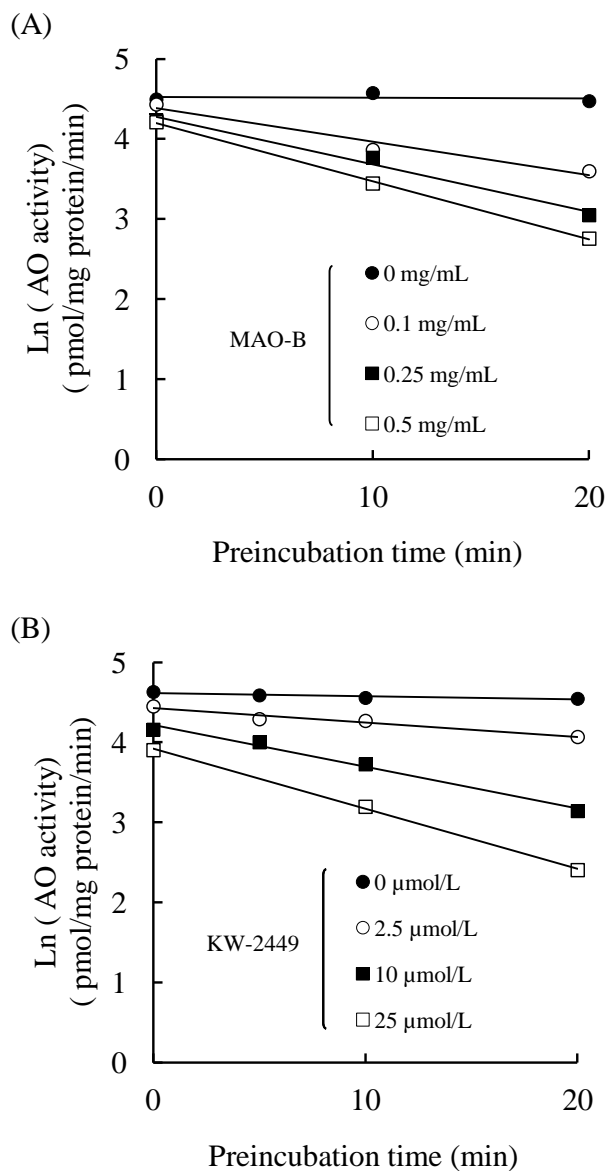


Figure 29 Inhibition of AO activity by the iminium ion metabolite produced from KW-2449. The iminium ion metabolite was produced from the incubation of KW-2449 and MAO-B in human liver cytosol (AO source) for 0-20 min and then phthalazine was added as a substrate for AO. (A) Effects of MAO-B Supersomes concentration in the presence of 10 $\mu\text{mol/L}$ of KW-2449. (B) Effects of KW-2449 concentration in the presence of 0.25 mg/mL of MAO-B Supersomes.

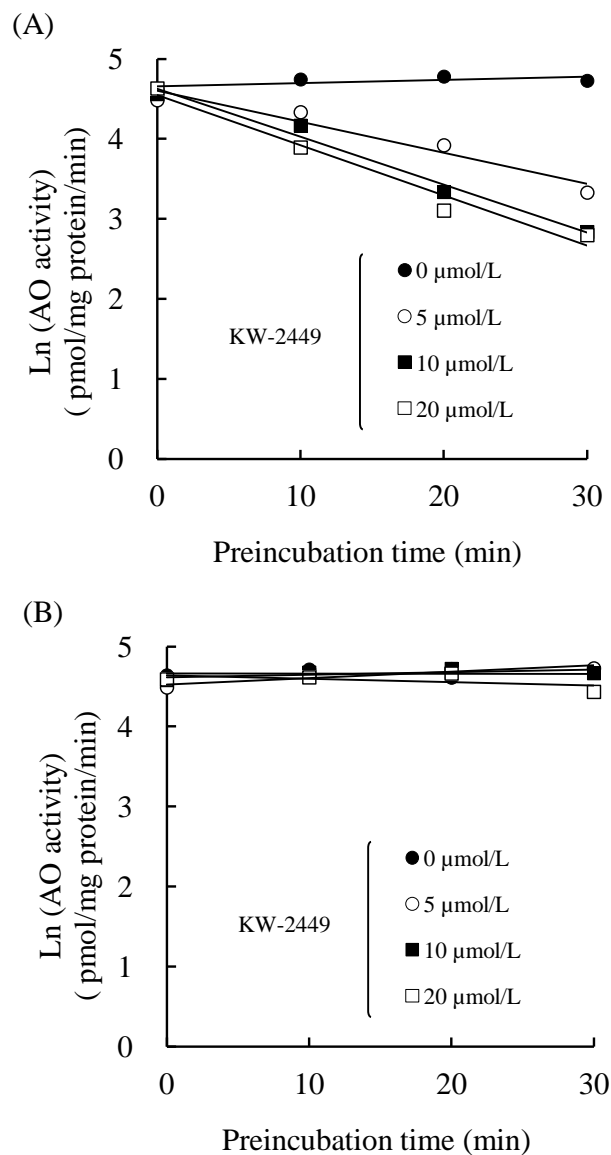


Figure 30 Evaluation of irreversible inhibition of AO by the iminium ion metabolite of KW-2449 catalyzed by MAO-B. (A) Co-incubation condition: KW-2449 and MAO-B Supersomes were preincubated with human liver cytosol. (B) Separate incubation condition: KW-2449 and MAO-B Supersomes were preincubated separately from human liver cytosol.

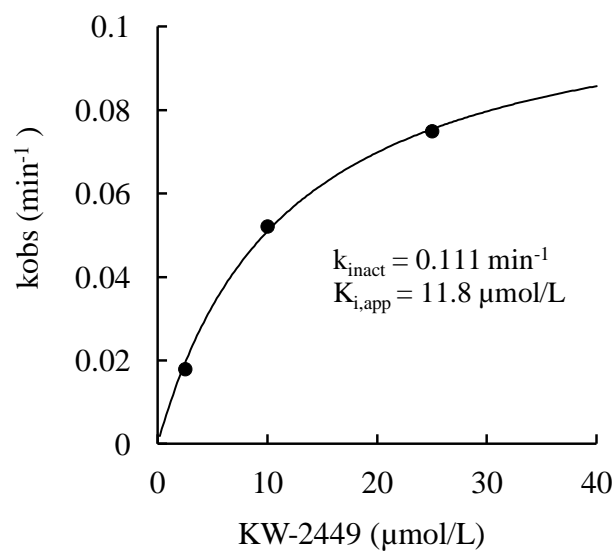


Figure 31 Plot of observed rate of enzyme inactivation against KW-2449 concentration.

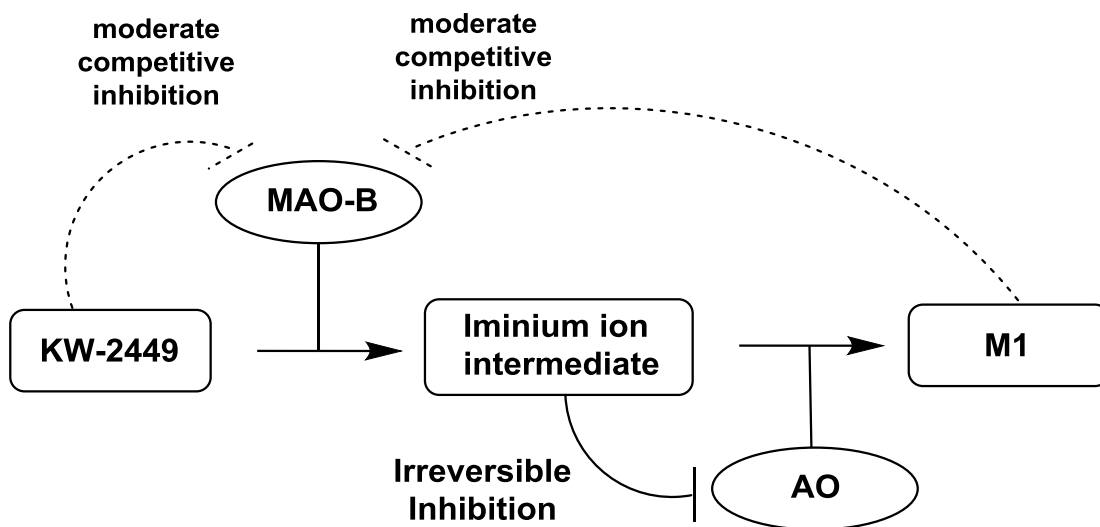


Figure 32 Metabolic pathway of KW-2449 and inhibitory effects of KW-2449, M1 and the iminium ion metabolite on their metabolizing enzymes.

第5項 KW-2449 のイミニウムイオン中間体によるタンパクへの不可逆結合

第4項で KW-2449 のイミニウムイオン中間体が AO を不可逆阻害したことから、イミニウムイオン中間体が AO 以外の内因性タンパクとも共有結合する可能性が考えられた。

サルに ^{14}C -KW-2449 を経口投与した際の血漿中代謝物プロファイル及び、血漿をアセトニトリルで除タンパクした時に、上清に回収された放射能の割合を Table 5 に示す。2章での検討同様、サル血漿中では M1 が主代謝物であったが、除タンパク上清へ回収される放射能の割合は時間依存的に低下し、投与後 30 分では 83.4% であったが、4 時間では 51.5% になり、24 時間以降は 10% 以下まで低下した。回収される放射能量の低下により、投与後 24 時間以降の代謝物プロファイルは解析できなかった。この結果から、投与後 24 時間では投与された放射能の大半が沈殿したタンパクペレット側に存在しており、KW-2449 が血漿タンパクと不可逆的に結合したことが示唆された。

^{14}C -KW-2449 を種々酵素源存在下、サル血漿と反応させた際の Radioluminograph を Figure 33A に示す。放射能はアルブミンを中心とする血漿タンパクの泳動位置に存在しており、MAO-B または肝ミクロソーム存在下で ^{14}C -KW-2449 がタンパクに不可逆結合したことが示唆された。アルブミンは本来の分子量よりやや低分子量側に泳動された。この明確な原因は特定できなかったものの ^{14}C -KW-2449 がアルブミンに結合したことにより、泳動プロファイルに変化が生じたためと推測された。また、結合放射能は NADPH の存在に依存しなかったことから不可逆結合への CYP の寄与はほとんどないものと推測された。

不可逆結合のメカニズムをより詳細に検討するため、ヒトアルブミンをターゲットタンパクとして MAO-B 存在下、pargyline (MAO-B 阻害剤)、NaCN (イミニウムイオン捕捉剤) を添加して、 ^{14}C -KW-2449 と反応させた。放射能は MAO-B 存在下でヒトアルブミンと強く結合したが、pargyline 及び NaCN 添加によりそれぞれ 7.6% 及び 0.1% まで減少した (Figure 33B、Table 6)。以上より、 ^{14}C -KW-2449 の血漿タンパクとの共有結合も、MAO-B により代謝されるイミニウムイオン中間体により引き起こされることが明らかとなった。

薬物によるタンパクとの共有結合は、薬物の免疫原性を亢進させ、Idiosyncratic な毒性 (特異体質性薬物毒性) 発現の原因になることが報告されている^{46,47)}。そこで、既報のスクリーニング法を用いて ^{14}C -KW-2449 の不可逆結合による毒性発現リスクを評価した¹⁴⁰⁾。算出された 1 時間あたりの肝ミクロソームへの ^{14}C -KW-2449 の不可逆結合量は 110-163 pmol/h/mg microsomal protein であり、Merck 社から報告されているカットオフ値である 50 pmol/h/mg microsomal protein を上回っていた。さらに、後続化合物 Compound A とのタンパクへの共有結合量を肝細胞を用いて比較したところ、 ^{14}C -Compound A の共有結合量は ^{14}C -KW-2449 の 1/4 以下であり、タンパクとの共有結合量の低下に関しても MAO-B 及び AO への代謝安定性を高めることが有効であると示唆された。

Table 5 Metabolite profiles of KW-2449 after oral administration of ¹⁴C-KW-2449 to cynomolgus monkeys

		Time (h)			
		0.5	4	24	168
Plasma concentration (ng eq./mL)		284.8	2064.9	640.0	177.5
% of radioactivity in the supernatant fraction after deproteinization ^{a)}		83.4	51.5	6.5	<2.5
Metabolite Profile (%) ^{b)}	KW-2449	7.33	1.80	NA	NA
	M1	42.22	34.39	NA	NA
	M2	8.75	15.63	NA	NA
	M3	ND	2.18	NA	NA
	M4	1.61	1.91	NA	NA
	Other Metabolites	8.44	8.62	NA	NA

a): Radioactivity in the supernatant fraction after deproteinization / Total radioactivity in plasma × 100

b): Metabolite profiles in the supernatant fraction

ND: not detected

NA: not applicable

Table 6 Irreversible binding of radioactivity to human serum albumin after incubation of ¹⁴C-KW-2449 with MAO-B Supersomes.

		Binding radioactivity	
		pmol/min/mg MAO-B protein	%
Human	Control	31.9	100
Serum	+ Pargyline	2.43	7.6
Albumin	+ NaCN	0.031	0.1

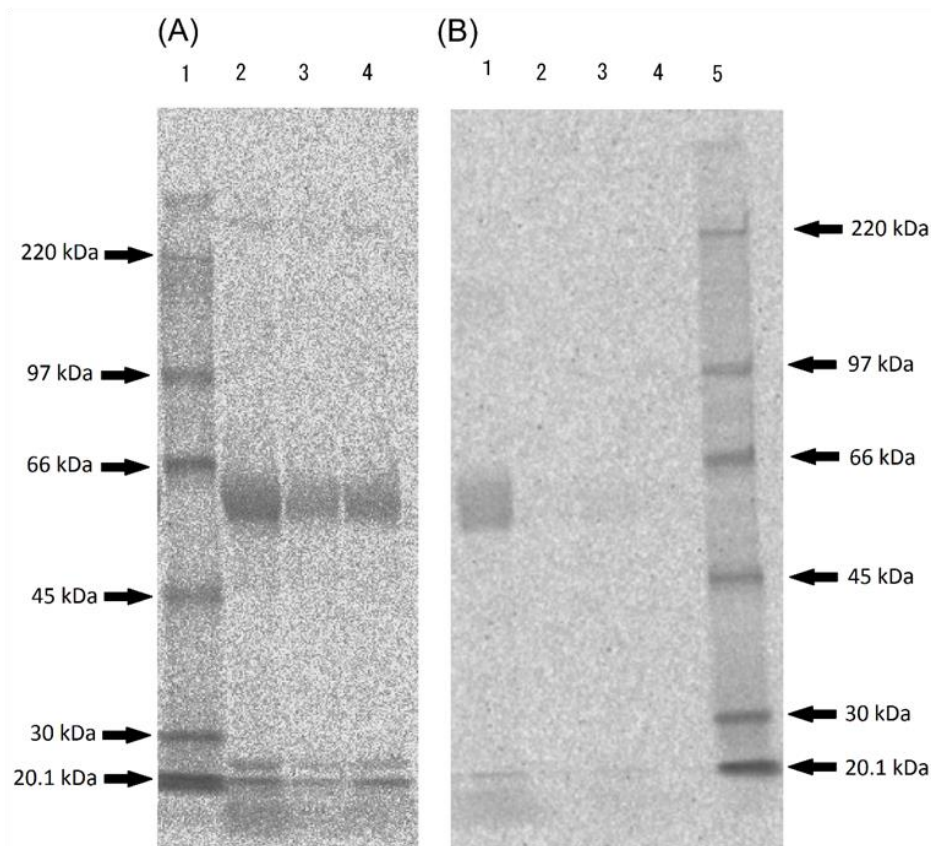


Figure 33 Radioluminograms of ^{14}C -KW-2449.

(A) ^{14}C -KW-2449 was incubated in cynomolgus monkey plasma with MAO-B Supersomes or human liver microsomes.

Lane 1: Molecular marker (220, 97, 66, 45, 30 and 20.1 kDa in descending order).

Lane 2: MAO-B Supersomes and human liver microsomes in the absence of NADPH.

Lane 3: Human liver microsomes in the presence of NADPH.

Lane 4: Human liver microsomes in the absence of NADPH.

(B) ^{14}C -KW-2449 was incubated in the mixture of human serum albumin and MAO-B Supersomes.

Lane 1: MAO-B Supersomes.

Lane 2: MAO-B Supersomes and pargyline (MAO-B inhibitor).

Lane 3: MAO-B Supersomes and NaCN (Iminium ion trapping reagent).

Lane 4: MAO-B Negative control.

Table 7 Irreversible binding of radioactivity to microsomal proteins after incubation of ¹⁴C-KW-2449 with liver microsomes.

Species	NADPH	Binding radioactivity (pmol eq./mg microsomal protein)
Human	+	110
	-	130
Monkey	+	163
	-	133

Table 8 Irreversible binding of radioactivity to human hepatocytes after incubation of ¹⁴C-KW-2449 or ¹⁴C-Compound A.

	% of Added radioactivity
KW-2449	2.3
Compound A	0.6

第4節 結語

本章では、MAO-Bにより産生されるKW-2449のイミニウムイオン中間体がAOを不可逆阻害し、同時に血中タンパクに不可逆結合を起こすことを明らかにした。

本章の実験結果は以下のように要約される。

ヒトと類似した代謝物プロファイルを持つカニクイザルにKW-2449を反復投与したところ、サルでもヒトと同様にM1濃度が顕著に低下した。サルにおけるM1濃度の低下は投与翌日には生じたことから、M1濃度低下の原因として、M1産生酵素(MAO-B及びAO)の阻害が推測された。KW-2449及びM1のこれら代謝酵素への阻害能を検討し、KW-2449及びM1がMAO-Bを競合阻害することを見いだしたが、その K_i 値は臨床におけるKW-2449及びM1濃度よりも十分低く、臨床においてMAO-B阻害が生じる可能性は低いと考えられた。次いでイミニウムイオン中間体の代謝酵素阻害能について検討し、イミニウムイオン中間体がAOを不可逆的に阻害することを見いだした。その阻害パラメータは臨床でCYPを不可逆的に阻害することが知られている他の阻害剤に匹敵する値であった。イミニウムイオン中間体がAOを不可逆阻害し、高い反応性を有していることが示唆されたため、章の後半では、毒性との関連が懸念されるタンパクへ共有結合能を評価した。サルに ^{14}C -KW-2449を経口投与したところ、放射能の除タンパク血漿上清への回収率は時間依存的に低下し、 ^{14}C -KW-2449由来の放射能が血漿中タンパクに共有結合していることが強く示唆された。MAO-B阻害剤及びイミニウムイオン捕捉剤による*in vitro*検討から、イミニウムイオン中間体がタンパクとの共有結合を起こしていることを明らかにした。

代謝酵素が不可逆的に阻害される場合は、可逆的阻害とは異なり、薬物が消失した後も長く影響が残るため、重篤な副作用を引き起こす危険性が高い。不可逆阻害の実際の影響は阻害剤の阻害パラメータに加えて阻害される酵素の分解速度定数(k_{deg} 、ターンオーバー)にも左右されるため定量的に判断することは難しいが、本研究で見いだされたAOの不可逆阻害パラメータについて、その影響を概算した。

各国の規制当局から発出されているガイドラインでは下記の式で算出されるR値が1.1又は1.25を超える場合には、薬物相互作用の懸念があるとして、臨床薬物相互作用試験の実施を検討するよう求められている^{141,142)}。信頼できるAOの k_{deg} 値は知られていないものの、CYP3A4で報告されている 0.00033 min^{-1} を使用した場合¹⁴³⁾、KW-2449のR値は15.7とカットオフ値の1.1又は1.25を大きく超えたことから、*in vivo*でもイミニウムイオン中間体がAOを阻害する可能性は高く、AOの不可逆阻害が臨床試験でM1の曝露が低下した主因であると考えられた。

$$R = \frac{k_{\text{obs}} + k_{\text{deg}}}{k_{\text{deg}}}, \quad k_{\text{obs}} = \frac{k_{\text{inact}} \cdot [I]}{K_i + [I]}$$

k_{obs} : 見かけの酵素不活化速度定数 (min^{-1})、 k_{inact} : 最大不活化速度定数 (min^{-1})

I : 臨床での KW-2449 の最高血中濃度 ($\mu\text{mol/L}$)、 K_i : 阻害定数 ($\mu\text{mol/L}$)、 k_{deg} : 酵素の分解速度定数 (min^{-1})

なお、本研究では、イミニウムイオン中間体を直接定量することはできなかったため、AO の不可逆阻害パラメータは添加した KW-2449 濃度を元に、見かけの阻害定数として算出した。試験系内のイミニウムイオン濃度は KW-2449 よりも低いと考えられるため、実際のイミニウムイオン中間体の阻害定数はさらに強いことが予想される。正確な阻害定数を見積もることは今後の課題であるが、KW-2449 のイミニウムイオン中間体は不安定であり、試験系内のイミニウムイオン濃度を制御することは困難であった。KW-2449 のシアン付加体を合成し、 Ag^+ イオンを添加することで人工的にイミニウムイオン中間体を発生させ、パラメータを算出できる可能性がある¹⁴⁴⁾。

近年、上市薬の AO 阻害活性が網羅的に評価され、ラロキシフェン ($\text{IC}_{50} = 2.9 \text{ nmol/L}$)、ペルフェナジン ($\text{IC}_{50} = 33 \text{ nmol/L}$)、チオリダジン ($\text{IC}_{50} = 160 \text{ nmol/L}$) などが強い AO 阻害活性を有することが報告されている¹²⁶⁾。しかしながら、臨床用量を考慮すると、これらの医薬品が臨床で AO 阻害を起こす可能性は低い。また、シメチジンを併用した場合にザレプロンの血中濃度が数十%増加することを除き、臨床で AO 阻害に起因する薬物相互作用は報告されていない^{145,146)}。このことから、KW-2449 は臨床用量付近において *in vivo* で強力な AO 阻害を起こす希少な化合物であると考えられた。今後、AO を介した薬物相互作用試験等の陽性対照物質として有効利用されることが期待される。

本章では、KW-2449 のイミニウムイオン中間体による AO 不可逆阻害を選択的に検出するため、プレインキュベーション法に加え希釈法を検討した。通常、代謝酵素の不可逆阻害能の検出にはプレインキュベーション法が用いられ、プレインキュベーションにより阻害が増強した場合、不可逆阻害ありと判定する。しかしながらこの方法では、代謝物が競合阻害活性を有していた場合、代謝物の影響を受けやすく、競合阻害と不可逆阻害の影響を区別しにくい場合がある。

競合阻害による阻害率は以下の式で表すことができる。また、AO による phthalazine 代謝の K_m 値は $2.6 \mu\text{mol/L}$ である¹²⁶⁾。ここで、本章で用いたプレインキュベーション法 ($[S] = 2 \mu\text{mol/L}$) と希釈法 ($[S] = 20 \mu\text{mol/L}$) の条件下、プレインキュベーション時のイミニウムイオンの濃度を $1 \mu\text{mol/L}$ と仮定して、50%阻害を起こす阻害剤の K_i を求めると、それぞれ $0.56 \mu\text{mol/L}$ 、 $0.0057 \mu\text{mol/L}$ と算出された。希釈法ではプレインキュベーション後の反応液を希釈すると共に過剰量の基質存在下で酵素活性を測定することで競合阻害の影響を 1/100 程度に低減しており、化合物の不可逆阻害能を選択的に検出する分析系として優れていると考えられた。

$$\text{Inhibition (\%)} = \frac{K_m \cdot [I]}{(K_m + [S]) \cdot K_i + K_m \cdot [I]}$$

K_m : ミカエリス定数 ($\mu\text{mol/L}$)、 S : 基質濃度 ($\mu\text{mol/L}$)、 I : 阻害剤濃度 ($\mu\text{mol/L}$)、 K_i : 阻害定数 ($\mu\text{mol/L}$)

本章の検討により、KW-2449 のイミニウムイオン中間体が高い反応性を有しており、AO の阻害のみならず、タンパクとの共有結合も引き起こすことが明らかとなった。近年、薬物とタンパクとの共有結合は *Idiosyncratic* な毒性を引き起こす原因の一つと考えられ、医薬品開発において注意が払われている。タンパク結合による毒性発現のメカニズムは十分明らかとなっていないが、内因性タンパク機能が阻害されることによる直接的な毒性や薬物が結合したことでタンパクの免疫原性が亢進し、アナフィラキシーを含む免疫反応を惹起することなどが考えられている。*Idiosyncratic* な毒性発現を非臨床試験から予測することは極めて困難であるが、過去に *Idiosyncratic* な毒性が認められた化合物を用いた評価から、毒性発現とタンパク結合量にはある程度相関があることが知られている。Merck 社は肝ミクロソームタンパクへの結合量 50 pmol/h/mg microsomal protein を毒性発現リスクの閾値として報告しており、KW-2449 の結合量はこの値を超えていた。また、KW-2449 が MAO-B で代謝されることを考慮すると、全身でのタンパクとの結合量はミクロソームでの検討よりもさらに増えることが予想された。

KW-2449 の臨床試験では、KW-2449 は良好な忍容性を示し、顕著な毒性は認められなかったものの、本章で検討したイミニウムイオン中間体とタンパクとの共有結合の結果から、*Idiosyncratic* な毒性発現のリスクを有していたことが示唆される。MAO-B への代謝安定性を向上させた Compound A では共有結合量が顕著に低下したことから、代謝安定性の向上が薬物動態の改善のみならず、安全性の観点からも有効であることが示された。

最後に本章の検討で明らかとなったイミニウムイオン中間体による作用の概略図を Figure 34 に示す。KW-2449 のイミニウムイオン中間体による AO 阻害は、薬理活性を保持した M1 の血中濃度低下を引き起こし、これにより FLT3 の阻害率が低下し、KW-2449 が臨床試験で有効性を示せなかった一因になったと考えられた。また、AO 阻害はイミニウムイオン中間体の M1 への変換率（解毒）も低下させ、タンパクへの共有結合を増加させたと考えられる。

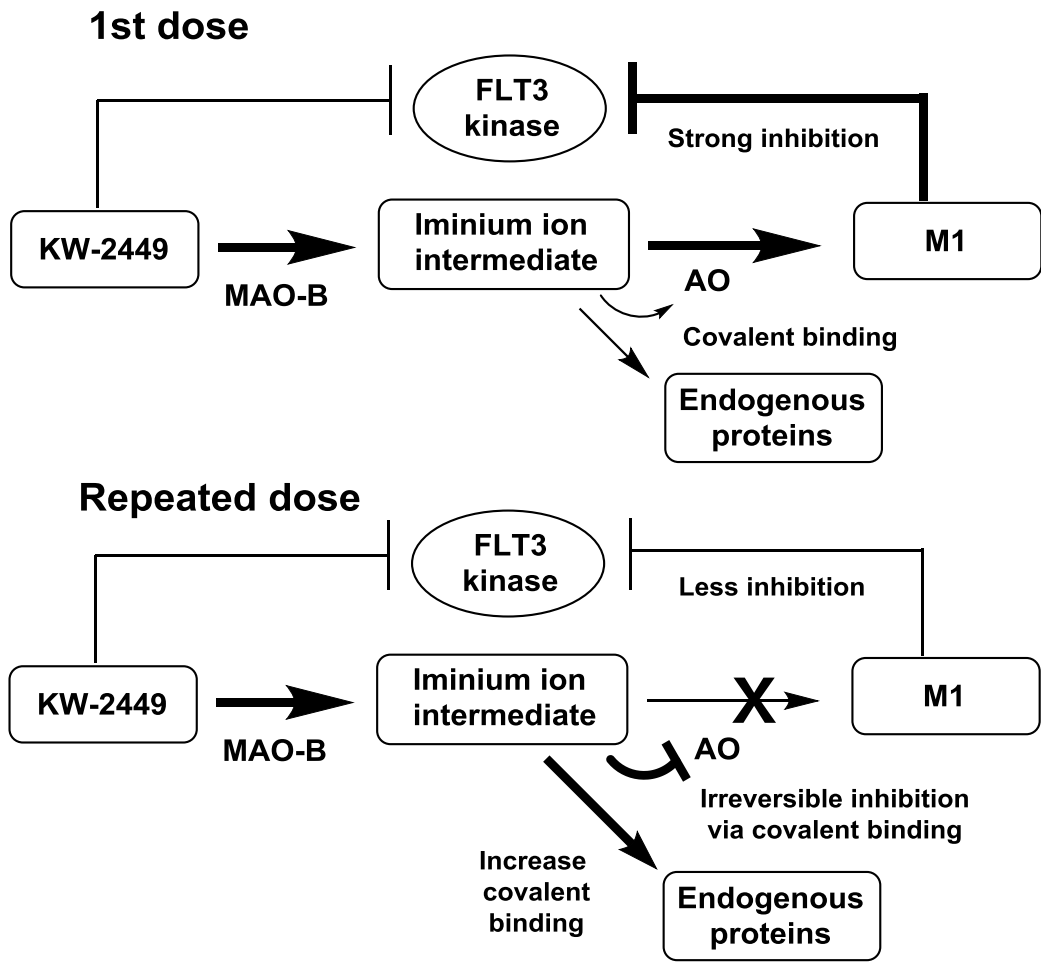


Figure 34 Overall influence of the iminium ion intermediate of KW-2449

第4章 総括

本研究では、白血病治療薬候補物質として開発されていた新規キナーゼ阻害剤 KW-2449 が臨床試験で十分な有効性を示せなかったことを受け、その要因であると推定された KW-2449 から M1 への代謝経路及び代謝酵素の阻害機構について解明した。また、研究の過程で明らかとなった Non-CYP 酵素による代謝は、CYP 代謝と異なり、種差や個体差の情報、その評価方法についての知見が十分定まっていないことから、ヒトの動態予測法や薬物相互作用予測法などの種々評価法の検討を行った。

第2章では KW-2449 が臨床試験で速やかに M1 に代謝され、血中濃度が低下した原因を解明するために、KW-2449 から M1 への代謝経路を検討した。KW-2449 が MAO-B によりイミニウムイオン中間体へと代謝され、次いでイミニウム中間体が AO により M1 へと代謝されるという MAO-B 及び AO による協奏的な代謝機構を同定した。ラットやイヌで M1 の産生が認められなかった原因は、AO の N-ヘテロ環化合物の代謝能の種差にあると考えられた。また、MAO-B 及び AO による肝臓外での代謝の寄与を評価するため、ヒトの薬物動態予測法を比較検討し、肝細胞の代謝データをサルでの *in vivo* データで補正することで、実用的精度で予測できることを実証した。

第3章では、薬理的に活性を有する M1 の曝露が、KW-2449 の反復投与により顕著に低下した原因を解明するため、KW-2449 から M1 への代謝酵素の阻害能を解析した。KW-2449 及び M1 は MAO-B の活性を競合阻害したが、その阻害活性は弱く、臨床で MAO-B 阻害は生じないと考えられた。一方、KW-2449 のイミニウム中間体は AO を不可逆的に阻害し、その阻害パラメータ解析から、臨床試験及びサルで M1 濃度が低下した原因であると推測された。イミニウムイオン中間体が AO を不可逆阻害したことから、イミニウムイオン中間体の化学的反応性についても検討し、イミニウムイオン中間体が内因性タンパクと共有結合することを明らかにした。

第2章、3章の結果から、KW-2449 が臨床試験において十分な薬効を示せなかった原因は、MAO-B 及び AO による協奏的な代謝にあると推定された。これはピペラジン環の代謝経路としては本研究で初めて明らかにした機構である。すなわち、KW-2449 が速やかに M1 に代謝されることで KW-2449 の濃度が低下し、次いでイミニウムイオン中間体による AO 阻害のため、薬理作用を保持している M1 の濃度も低下したと考えられた。また、イミニウムイオン中間体によるタンパクとの共有結合は、臨床試験において毒性発現の危険性を有していたと示唆された。

このように、CYP の代謝安定性を指標に化合物を選択する場合、Non-CYP 代謝を見落とすことがあり、薬物動態や安全性上の問題につながる可能性がある。KW-2449 で認められた薬物動態上の問題点を改善するため、後続化合物として、MAO-B 及び AO による代謝に対する安定性を高めた Compound A が合成された。その結果、Compound A は薬物動態プロファイル、タンパクとの共有結合量とも KW-2449 に比べて改善した。このことから、医薬品候補化合物

が Non-CYP 酵素による想定外の代謝を受けた場合においても、その代謝経路を特定し、代謝安定性を高めることは、より優れた化合物を創出する上で有効な戦略であることが示された。

近年、通常の代謝酵素である CYP 代謝を制御し回避するための医薬候補物質の開発方法論が進歩したが、その反面、候補物質が MAO や AO のような Non-CYP 代謝酵素により代謝を受けるといった事例の報告が増加している。また、これら酵素により産生された反応性中間体により、毒性が惹起されることも多い。本研究で検討したヒトの全身クリアランスの予測法や、反応性中間体のシアンによる補足法、反応性中間体による代謝酵素の不可逆阻害検討法などは、今後の医薬品研究において、Non-CYP 代謝や反応性中間体が介在する場合に、その影響を精査する有用な手法となり得ると期待される。

また、本研究で対象とした KW-2449 に含まれるピペラジン環をはじめとする *N*-ヘテロ環構造は、開発中の他の多くの医薬品にも含まれる構造であり、化合物の親水性向上等の目的で医薬品に導入されることも多い。本研究で明らかにした MAO-B 及び AO による協奏的代謝経路は、*N*-ヘテロ環化合物の代謝経路を検討する上で有用であると考えられる。本研究で得られた知見は、医薬品の安全性確保と有効性確保の両方の観点から、今後の医薬品開発において、さらに活用し得るものと期待される。

第 5 章 参考文献

1. DiMasi JA, Grabowski HG, Hansen RW. Innovation in the pharmaceutical industry: New estimates of R&D costs. *J Health Econ.* 2016 May;47:20-33. doi:10.1016/j.jhealeco.2016.01.012.
2. Adams CP, Brantner VV. Estimating the cost of new drug development: is it really 802 million dollars? *Health Aff (Millwood).* 2006 Mar-Apr;25(2):420-8.
3. DiMasi JA, Hansen RW, Grabowski HG. The price of innovation: new estimates of drug development costs. *J Health Econ.* 2003 Mar;22(2):151-85.
4. Paul SM, Mytelka DS, Dunwiddie CT, Persinger CC, Munos BH, Lindborg SR, Schacht AL. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat Rev Drug Discov.* 2010 Mar;9(3):203-14. doi: 10.1038/nrd3078
5. Pammolli F, Magazzini L, Riccaboni M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. *Nat Rev Drug Discov.* 2011 Jun;10(6):428-38. doi:10.1038/nrd3405
6. Frank R, Hargreaves R. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov.* 2003 Jul;2(7):566-80.
7. Kola I, Landis J. Can the pharmaceutical industry reduce attrition rates? *Nat Rev Drug Discov.* 2004 Aug;3(8):711-5. doi: 10.1038/nrd1470
8. Alavijeh MS, Palmer AM. The pivotal role of drug metabolism and pharmacokinetics in the discovery and development of new medicines. *IDrugs.* 2004 Aug;7(8):755-63.
9. Lin JH, Lu AY. Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development. *Pharmacol Rev.* 1997 Dec;49(4):403-49.
10. Eddershaw PJ, Beresford AP, Bayliss MK. ADME/PK as part of a rational approach to drug discovery. *Drug Discov Today.* 2000 Sep;5(9):409-414.
11. Wienkers LC, Heath TG. Predicting in vivo drug interactions from in vitro drug discovery data. *Nat Rev Drug Discov.* 2005 Oct;4(10):825-33.
12. 加藤隆一. 臨床薬物動態学 (改訂第 4 版). 南江堂; 2009.
13. Ito K, Iwatsubo T, Kanamitsu S, Ueda K, Suzuki H, Sugiyama Y. Prediction of pharmacokinetic alterations caused by drug-drug interactions: metabolic interaction in the liver. *Pharmacol Rev.* 1998 Sep;50(3):387-412.
14. Guengerich FP. Cytochrome P450s and other enzymes in drug metabolism and toxicity. *AAPS J.* 2006 Mar 10;8(1):E101-11.
15. Okuda H, Nishiyama T, Ogura K, Nagayama S, Ikeda K, Yamaguchi S, et al. Lethal drug interactions of sorivudine, a new antiviral drug, with oral 5-fluorouracil prodrugs. *Drug Metab Dispos.* 1997 May;25(5):270-3.
16. Diasio RB. Sorivudine and 5-fluorouracil; a clinically significant drug-drug interaction due to inhibition of dihydropyrimidine dehydrogenase. *Br J Clin Pharmacol.* 1998 Jul;46(1):1-4.

17. Tsokos M, Sperhake JP. Coma blisters in a case of fatal theophylline intoxication. *Am J Forensic Med Pathol.* 2002 Sep;23(3):292-4.
18. Goldberg MJ, Park GD, Berlinger WG. Treatment of theophylline intoxication. *J Allergy Clin Immunol.* 1986 Oct;78(4 Pt 2):811-7.
19. Zanger UM, Schwab M. Cytochrome P450 enzymes in drug metabolism: regulation of gene expression, enzyme activities, and impact of genetic variation. *Pharmacol Ther.* 2013 Apr;138(1):103-41. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.12.007
20. Ansedde JH, Thakker DR. High-throughput screening for stability and inhibitory activity of compounds toward cytochrome P450-mediated metabolism. *J Pharm Sci.* 2004 Feb;93(2):239-55.
21. White RE. High-throughput screening in drug metabolism and pharmacokinetic support of drug discovery. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2000;40:133-57.
22. Masimirembwa CM, Thompson R, Andersson TB. In vitro high throughput screening of compounds for favorable metabolic properties in drug discovery. *Comb Chem High Throughput Screen.* 2001 May;4(3):245-63.
23. He F, Bi HC, Xie ZY, Zuo Z, Li JK, Li X, et al. Rapid determination of six metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates in human liver microsome by liquid chromatography/mass spectrometry: application to high-throughput inhibition screening of terpenoids. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(5):635-43.
24. Tolonen A, Petsalo A, Turpeinen M, Uusitalo J, Pelkonen O. In vitro interaction cocktail assay for nine major cytochrome P450 enzymes with 13 probe reactions and a single LC/MSMS run: analytical validation and testing with monoclonal anti-CYP antibodies. *J Mass Spectrom.* 2007 Jul;42(7):960-6.
25. Moody GC, Griffin SJ, Mather AN, McGinnity DF, Riley RJ. Fully automated analysis of activities catalysed by the major human liver cytochrome P450 (CYP) enzymes: assessment of human CYP inhibition potential. *Xenobiotica.* 1999 Jan;29(1):53-75.
26. Yin H, Racha J, Li SY, Olejnik N, Satoh H, Moore D. Automated high throughput human CYP isoform activity assay using SPE-LC/MS method: application in CYP inhibition evaluation. *Xenobiotica.* 2000 Feb;30(2):141-54.
27. Bowen WP, Carey JE, Miah A, McMurray HF, Munday PW, James RS, et al. Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug Metab Dispos.* 2000 Jul;28(7):781-8.
28. Pérez G, Tabares B, Jover R, Gómez-Lechón MJ, Castell JV. Semi-automatic quantitative RT-PCR to measure CYP induction by drugs in human hepatocytes. *Toxicol In Vitro.* 2003 Oct-Dec;17(5-6):643-9.
29. Kanebratt KP, Andersson TB. HepaRG cells as an in vitro model for evaluation of cytochrome P450 induction in humans. *Drug Metab Dispos.* 2008 Jan;36(1):137-45.

30. Luo G, Cunningham M, Kim S, Burn T, Lin J, Sinz M, et al. Parkinson A, Christ D, Selling B, LeCluyse E, Gan LS. CYP3A4 induction by drugs: correlation between a pregnane X receptor reporter gene assay and CYP3A4 expression in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2002 Jul;30(7):795-804.
31. Lee PH, Cucurull-Sanchez L, Lu J, Du YJ. Development of in silico models for human liver microsomal stability. *J Comput Aided Mol Des.* 2007 Dec;21(12):665-73.
32. Fox T, Kriegl JM. Machine learning techniques for in silico modeling of drug metabolism. *Curr Top Med Chem.* 2006;6(15):1579-91.
33. Rostami-Hodjegan A, Tucker G. 'In silico' simulations to assess the 'in vivo' consequences of 'in vitro' metabolic drug-drug interactions. *Drug Discov Today Technol.* 2004 Dec;1(4):441-8. doi: 10.1016/j.ddtec.2004.10.002.
34. Chiba M, Ishii Y, Sugiyama Y. Prediction of hepatic clearance in human from in vitro data for successful drug development. *AAPS J.* 2009 Jun;11(2):262-76. doi: 10.1208/s12248-009-9103-6.
35. Zhao P, Zhang L, Grillo JA, Liu Q, Bullock JM, Moon YJ, et al. Applications of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation during regulatory review. *Clin Pharmacol Ther.* 2011 Feb;89(2):259-67. doi: 10.1038/clpt.2010.298.
36. Sager JE, Yu J, Ragueneau-Majlessi I, Isoherranen N. Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling and Simulation Approaches: A Systematic Review of Published Models, Applications, and Model Verification. *Drug Metab Dispos.* 2015 Nov;43(11):1823-37. doi: 10.1124/dmd.115.065920.
37. Wagner C, Zhao P, Pan Y, Hsu V, Grillo J, Huang SM, Sinha V. Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Modeling to Support Dose Selection: Report of an FDA Public Workshop on PBPK. *CPT Pharmacometrics Syst Pharmacol.* 2015 Apr;4(4):226-30. doi: 10.1002/psp4.33.
38. US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Center for Veterinary Medicine. Guidance for industry: Physiologically Based Pharmacokinetic Analyses - Format and Content. (2016)
39. Argikar UA, Potter PM, Hutzler JM, Marathe PH. Challenges and Opportunities with Non-CYP Enzymes Aldehyde Oxidase, Carboxylesterase, and UDP-Glucuronosyltransferase: Focus on Reaction Phenotyping and Prediction of Human Clearance. *AAPS J.* 2016 Nov;18(6):1391-1405.
40. Cerny MA. Prevalence of Non-Cytochrome P450-Mediated Metabolism in Food and Drug Administration-Approved Oral and Intravenous Drugs: 2006-2015. *Drug Metab Dispos.* 2016 Aug;44(8):1246-52. doi: 10.1124/dmd.116.070763.
41. Foti RS, Dalvie DK. Cytochrome P450 and Non-Cytochrome P450 Oxidative Metabolism: Contributions to the Pharmacokinetics, Safety, and Efficacy of Xenobiotics. *Drug Metab Dispos.* 2016 Aug;44(8):1229-45. doi:10.1124/dmd.116.071753.

42. Dittrich Ch, Greim G, Borner M, Weigang-Köhler K, Huisman H, Amelsberg A, et al. Phase I and pharmacokinetic study of BIBX 1382 BS, an epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitor, given in a continuous daily oral administration. *Eur J Cancer*. 2002 May;38(8):1072-80.
43. Diamond S, Boer J, Maduskuie TP Jr, Falahatpisheh N, Li Y, Yeleswaram S. Species-specific metabolism of SGX523 by aldehyde oxidase and the toxicological implications. *Drug Metab Dispos*. 2010 Aug;38(8):1277-85. doi:10.1124/dmd.110.032375.
44. Lolkema MP, Bohets HH, Arkenau HT, Lampo A, Barale E, de Jonge MJA, et al. The c-Met Tyrosine Kinase Inhibitor JNJ-38877605 Causes Renal Toxicity through Species-Specific Insoluble Metabolite Formation. *Clin Cancer Res*. 2015 May 15;21(10):2297-2304. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3258.
45. Iwamura A, Fukami T, Higuchi R, Nakajima M, Yokoi T. Human α/β hydrolase domain containing 10 (ABHD10) is responsible enzyme for deglucuronidation of mycophenolic acid acyl-glucuronide in liver. *J Biol Chem*. 2012 Mar 16;287(12):9240-9. doi: 10.1074/jbc.M111.271288
46. Kaplowitz N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. *Nat Rev Drug Discov*. 2005 Jun;4(6):489-99.
47. Walgren JL, Mitchell MD, Thompson DC. Role of metabolism in drug-induced idiosyncratic hepatotoxicity. *Crit Rev Toxicol*. 2005 Apr-May;35(4):325-61.
48. Jaeschke H. Troglitazone hepatotoxicity: are we getting closer to understanding idiosyncratic liver injury? *Toxicol Sci*. 2007 May;97(1):1-3.
49. Utrecht J. Screening for the potential of a drug candidate to cause idiosyncratic drug reactions. *Drug Discov Today*. 2003 Sep 15;8(18):832-7.
50. Stepan AF, Walker DP, Bauman J, Price DA, Baillie TA, Kalgutkar AS, et al. Structural alert/reactive metabolite concept as applied in medicinal chemistry to mitigate the risk of idiosyncratic drug toxicity: a perspective based on the critical examination of trends in the top 200 drugs marketed in the United States. *Chem Res Toxicol*. 2011 Sep 19;24(9):1345-410. doi: 10.1021/tx200168d
51. Shih JC, Chen K, Ridd MJ. Monoamine oxidase: from genes to behavior. *Annu Rev Neurosci*. 1999;22:197-217.
52. Benedetti MS. Biotransformation of xenobiotics by amine oxidases. *Fundam Clin Pharmacol*. 2001 Apr;15(2):75-84.
53. Youdim MB, Riederer P. Dopamine metabolism and neurotransmission in primate brain in relationship to monoamine oxidase A and B inhibition. *J Neural Transm Gen Sect*. 1993;91(2-3):181-95.
54. Binda C, Newton-Vinson P, Hubálek F, Edmondson DE, Mattevi A. Structure of human monoamine oxidase B, a drug target for the treatment of neurological disorders. *Nat Struct Biol*. 2002 Jan;9(1):22-6.

55. Youdim MB, Edmondson D, Tipton KF. The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Apr;7(4):295-309.
56. Raffel DM, Wieland DM. Influence of vesicular storage and monoamine oxidase activity on [¹¹C]phenylephrine kinetics: studies in isolated rat heart. *J Nucl Med.* 1999 Feb;40(2):323-30.
57. Imamura Y, Wu X, Noda A, Noda H. Side-chain metabolism of propranolol: involvement of monoamine oxidase and mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the metabolism of N-desisopropylpropranolol to naphthoxylactic acid in rat liver. *Life Sci.* 2002 Apr 19;70(22):2687-97.
58. Dixon CM, Park GR, Tarbit MH. Characterization of the enzyme responsible for the metabolism of sumatriptan in human liver. *Biochem Pharmacol.* 1994 Mar 29;47(7):1253-7.
59. Anderson MC, Hasan F, McCrodden JM, Tipton KF. Monoamine oxidase inhibitors and the cheese effect. *Neurochem Res.* 1993 Nov;18(11):1145-9.
60. Chiba K, Trevor A, Castagnoli N Jr. Metabolism of the neurotoxic tertiary amine, MPTP, by brain monoamine oxidase. *Biochem Biophys Res Commun.* 1984 Apr 30;120(2):574-8.
61. Heikkilä RE, Hess A, Duvoisin RC. Dopaminergic neurotoxicity of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine (MPTP) in the mouse: relationships between monoamine oxidase, MPTP metabolism and neurotoxicity. *Life Sci.* 1985 Jan 21;36(3):231-6.
62. Garattini E, Terao M. Increasing recognition of the importance of aldehyde oxidase in drug development and discovery. *Drug Metab Rev.* 2011 Aug;43(3):374-86. doi: 10.3109/03602532.2011.560606.
63. Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *J Med Chem.* 2010 Dec 23;53(24):8441-60. doi: 10.1021/jm100888d.
64. Renwick AB, Ball SE, Tredger JM, Price RJ, Walters DG, Kao J, et al. Inhibition of zaleplon metabolism by cimetidine in the human liver: in vitro studies with subcellular fractions and precision-cut liver slices. *Xenobiotica.* 2002 Oct;32(10):849-62.
65. Jordan CG, Rashidi MR, Laljee H, Clarke SE, Brown JE, Beedham C. Aldehyde oxidase-catalysed oxidation of methotrexate in the liver of guinea-pig, rabbit and man. *J Pharm Pharmacol.* 1999 Apr;51(4):411-8.
66. Clarke SE, Harrell AW, Chenery RJ. Role of aldehyde oxidase in the in vitro conversion of famciclovir to penciclovir in human liver. *Drug Metab Dispos.* 1995 Feb;23(2):251-4.
67. Sugihara K, Kitamura S, Tatsumi K. Involvement of mammalian liver cytosols and aldehyde oxidase in reductive metabolism of zonisamide. *Drug Metab Dispos.* 1996 Feb;24(2):199-202.
68. Zhang X, Liu HH, Weller P, Zheng M, Tao W, Wang J, et al. In silico and in vitro pharmacogenetics: aldehyde oxidase rapidly metabolizes a p38 kinase inhibitor. *Pharmacogenomics J.* 2011 Feb;11(1):15-24. doi:10.1038/tpj.2010.8.

69. Sanoh S, Nozaki K, Murai H, Terashita S, Teramura T, Ohta S. Prediction of human metabolism of FK3453 by aldehyde oxidase using chimeric mice transplanted with human or rat hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2012 Jan;40(1):76-82. doi:10.1124/dmd.111.041954.
70. Zientek M, Jiang Y, Youdim K, Obach RS. In vitro-in vivo correlation for intrinsic clearance for drugs metabolized by human aldehyde oxidase. *Drug Metab Dispos.* 2010 Aug;38(8):1322-7. doi: 10.1124/dmd.110.033555
71. Akabane T, Gerst N, Masters JN, Tamura K. A quantitative approach to hepatic clearance prediction of metabolism by aldehyde oxidase using custom pooled hepatocytes. *Xenobiotica.* 2012 Sep;42(9):863-71. doi:10.3109/00498254.2012.670736.
72. Hutzler JM, Yang YS, Albaugh D, Fullenwider CL, Schmenk J, Fisher MB. Characterization of aldehyde oxidase enzyme activity in cryopreserved human hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2012 Feb;40(2):267-75. doi:10.1124/dmd.111.042861
73. Brink A, Pähler A, Funk C, Schuler F, Schadt S. Minimizing the risk of chemically reactive metabolite formation of new drug candidates: implications for preclinical drug design. *Drug Discov Today.* 2017 May;22(5):751-756. doi:10.1016/j.drudis.2016.11.018.
74. Druker BJ, Guilhot F, O'Brien SG, Gathmann I, Kantarjian H, Gattermann N, et al. Five-year follow-up of patients receiving imatinib for chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2006 Dec 7;355(23):2408-17.
75. Heinrich MC, Corless CL, Blanke CD, Demetri GD, Joensuu H, Roberts PJ, et al. Molecular correlates of imatinib resistance in gastrointestinal stromal tumors. *J Clin Oncol.* 2006 Oct 10;24(29):4764-74.
76. Burotto M, Manasanch EE, Wilkerson J, Fojo T. Gefitinib and erlotinib in metastatic non-small cell lung cancer: a meta-analysis of toxicity and efficacy of randomized clinical trials. *Oncologist.* 2015 Apr;20(4):400-10. doi:10.1634/theoncologist.2014-0154.
77. Yazdi MH, Faramarzi MA, Nikfar S, Abdollahi M. A Comprehensive Review of Clinical Trials on EGFR Inhibitors Such as Cetuximab and Panitumumab as Monotherapy and in Combination for Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Avicenna J Med Biotechnol.* 2015 Oct-Dec;7(4):134-44.
78. Kiyoi H, Ohno R, Ueda R, Saito H, Naoe T. Mechanism of constitutive activation of FLT3 with internal tandem duplication in the juxtamembrane domain. *Oncogene.* 2002 Apr 11;21(16):2555-63.
79. Fiedler W, Krauter J, Götze K, Salih HR, Bokemeyer C, Spaeth A. A Phase I/II Study Combining Sunitinib with Standard Ara-C/Daunorubicin Chemotherapy In Patients 60 Years or Older with FLT3 Mutated AML. *Blood* 2010 116:3285
80. Fiedler W, Kayser S, Kebenko M, Janning M, Krauter J, Schittenhelm M, et al. A phase I/II study of sunitinib and intensive chemotherapy in patients over 60 years of age with acute myeloid leukaemia and activating FLT3 mutations. *Br J Haematol.* 2015 Jun;169(5):694-700. doi: 10.1111/bjh.13353.

81. Zhang W, Konopleva M, Shi YX, McQueen T, Harris D, Ling X, et al. Mutant FLT3: a direct target of sorafenib in acute myelogenous leukemia. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Feb 6;100(3):184-98. doi: 10.1093/jnci/djm328.
82. Wander SA, Levis MJ, Fathi AT. The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond. *Ther Adv Hematol.* 2014 Jun;5(3):65-77. doi: 10.1177/2040620714532123.
83. Grunwald MR, Levis MJ. FLT3 inhibitors for acute myeloid leukemia: a review of their efficacy and mechanisms of resistance. *Int J Hematol.* 2013 Jun;97(6):683-94. doi: 10.1007/s12185-013-1334-8
84. Shiotsu Y, Kiyoi H, Ishikawa Y, Tanizaki R, Shimizu M, Umehara H, et al. KW-2449, a novel multikinase inhibitor, suppresses the growth of leukemia cells with FLT3 mutations or T315I-mutated BCR/ABL translocation. *Blood.* 2009 Aug 20;114(8):1607-17. doi: 10.1182/blood-2009-01-199307
85. Yamamoto Y, Kiyoi H, Nakano Y, Suzuki R, Kodera Y, Miyawaki S, et al. Activating mutation of D835 within the activation loop of FLT3 in human hematologic malignancies. *Blood.* 2001 Apr 15;97(8):2434-9.
86. 塩津行正, 清井仁, 秋永士朗, 直江知樹, 新規白血病治療薬 FLT3/Aurora 阻害剤 KW-2449 の創生戦略と先行他剤との比較. *臨床血液.* 2008;49:8:641-49.
87. Pratz KW, Cortes J, Roboz GJ, Rao N, Arowojolu O, Stine A, et al. A pharmacodynamic study of the FLT3 inhibitor KW-2449 yields insight into the basis for clinical response. *Blood.* 2009 Apr 23;113(17):3938-46. doi: 10.1182/blood-2008-09-177030
88. Grafone T, Palmisano M, Nicci C, Storti S. An overview on the role of FLT3-tyrosine kinase receptor in acute myeloid leukemia: biology and treatment. *Oncol Rev.* 2012 Apr 17;6(1):e8. doi: 10.4081/oncol.2012.e8
89. 研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針, 文部科学省
90. Malorni W, Giammarioli AM, Matarrese P, Pietrangeli P, Agostinelli E, Ciaccio A, et al. Protection against apoptosis by monoamine oxidase A inhibitors. *FEBS Lett.* 1998 Apr 10;426(1):155-9.
91. Rashidi MR, Smith JA, Clarke SE, Beedham C. In vitro oxidation of famciclovir and 6-deoxypenciclovir by aldehyde oxidase from human, guinea pig, rabbit, and rat liver. *Drug Metab Dispos.* 1997 Jul;25(7):805-13.
92. Argoti D, Liang L, Conteh A, Chen L, Bershas D, Yu CP, et al. Cyanide trapping of iminium ion reactive intermediates followed by detection and structure identification using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Chem Res Toxicol.* 2005 Oct;18(10):1537-44.
93. Politi L, Morini L, Poletini A. A direct screening procedure for diuretics in human urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with information dependent acquisition. *Clin Chim Acta.* 2007 Nov-Dec;386(1-2):46-52.

94. Shibata Y, Takahashi H, Ishii Y. A convenient in vitro screening method for predicting in vivo drug metabolic clearance using isolated hepatocytes suspended in serum. *Drug Metab Dispos.* 2000 Dec;28(12):1518-23.
95. Wilkinson GR. Clearance approaches in pharmacology. *Pharmacol Rev.* 1987 Mar;39(1):1-47.
96. Iwatsubo T, Hirota N, Ooie T, Suzuki H, Shimada N, Chiba K, et al. Prediction of in vivo drug metabolism in the human liver from in vitro metabolism data. *Pharmacol Ther.* 1997;73(2):147-71.
97. Davies B, Morris T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. *Pharm Res.* 1993 Jul;10(7):1093-5.
98. Yamazaki S, Toth LN, Black ML, Duncan JN. Comparison of prediction methods for in vivo clearance of (S,S)-3-[3-(methylsulfonyl)phenyl]-1-propylpiperidine hydrochloride, a dopamine D2 receptor antagonist, in humans. *Drug Metab Dispos.* 2004 Apr;32(4):398-404.
99. Shibata Y, Chiba M. The role of extrahepatic metabolism in the pharmacokinetics of the targeted covalent inhibitors afatinib, ibrutinib, and neratinib. *Drug Metab Dispos.* 2015 Mar;43(3):375-84. doi: 10.1124/dmd.114.061424.
100. Alfaro JF, Jones JP. Studies on the mechanism of aldehyde oxidase and xanthine oxidase. *J Org Chem.* 2008 Dec 5;73(23):9469-72. doi: 10.1021/jo801053u.
101. Wu E, Shinka T, Caldera-Munoz P, Yoshizumi H, Trevor A, Castagnoli N Jr. Metabolic studies on the nigrostriatal toxin MPTP and its MAO B generated dihydropyridinium metabolite MPDP+. *Chem Res Toxicol.* 1988 May-Jun;1(3):186-94.
102. Kassahun K, Skordos K, McIntosh I, Slaughter D, Doss GA, Baillie TA, et al. Zafirlukast metabolism by cytochrome P450 3A4 produces an electrophilic alpha,beta-unsaturated iminium species that results in the selective mechanism-based inactivation of the enzyme. *Chem Res Toxicol.* 2005 Sep;18(9):1427-37.
103. Mašič LP. Role of cyclic tertiary amine bioactivation to reactive iminium species: structure toxicity relationship. *Curr Drug Metab.* 2011 Jan;12(1):35-50.
104. Inoue H, Castagnoli K, Van Der Schyf C, Mabic S, Igarashi K, Castagnoli N Jr. Species-dependent differences in monoamine oxidase A and B-catalyzed oxidation of various C4 substituted 1-methyl-4-phenyl-1,2,3, 6-tetrahydropyridinyl derivatives. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999 Nov;291(2):856-64.
105. Geha RM, Chen K, Shih JC. Phe(208) and Ile(199) in human monoamine oxidase A and B do not determine substrate and inhibitor specificities as in rat. *J Neurochem.* 2000 Sep;75(3):1304-9.
106. Fowler JS, Logan J, Shumay E, Alia-Klein N, Wang GJ, Volkow ND. Monoamine oxidase: radiotracer chemistry and human studies. *J Labelled Comp Radiopharm.* 2015 Mar;58(3):51-64. doi: 10.1002/jlcr.3247.
107. Fagerberg L, Hallström BM, Oksvold P, Kampf C, Djureinovic D, Odeberg J, et. al. Analysis of the human tissue-specific expression by genome-wide integration of transcriptomics and antibody-based proteomics. *Mol Cell Proteomics.* 2014 Feb;13(2):397-406. doi: 10.1074/mcp.M113.035600.

108. Duff MO, Olson S, Wei X, Garrett SC, Osman A, Bolisetty M, et al. Genome-wide identification of zero nucleotide recursive splicing in *Drosophila*. *Nature*. 2015 May 21;521(7552):376-9. doi: 10.1038/nature14475.
109. National Center for Biotechnology Information Database, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>
110. Iwasa T, Sano H, Sugiura A, Uchiyama N, Hara K, Okochi H, et al. An in vitro interethnic comparison of monoamine oxidase activities between Japanese and Caucasian livers using rizatriptan, a serotonin receptor 1B/1D agonist, as a model drug. *Br J Clin Pharmacol*. 2003 Nov;56(5):537-44.
111. Jan YH, Richardson JR, Baker AA, Mishin V, Heck DE, Laskin DL, Laskin JD. Vitamin K3 (menadione) redox cycling inhibits cytochrome P450-mediated metabolism and inhibits parathion intoxication. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2015 Oct 1;288(1):114-20. doi: 10.1016/j.taap.2015.07.023
112. Coelho Cerqueira E, Netz PA, Diniz C, Petry do Canto V, Follmer C. Molecular insights into human monoamine oxidase (MAO) inhibition by 1,4-naphthoquinone: evidences for menadione (vitamin K3) acting as a competitive and reversible inhibitor of MAO. *Bioorg Med Chem*. 2011 Dec 15;19(24):7416-24. doi: 10.1016/j.bmc.2011.10.049
113. Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human phase I metabolizing enzymes except for cytochrome P450 and phase II metabolizing enzymes. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2006 Oct;21(5):357-74.
114. Arbo MD, Bastos ML, Carmo HF. Piperazine compounds as drugs of abuse. *Drug Alcohol Depend*. 2012 May 1;122(3):174-85. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2011.10.007.
115. Bolleddula J, DeMent K, Driscoll JP, Worboys P, Brassil PJ, Bourdet DL. Biotransformation and bioactivation reactions of alicyclic amines in drug molecules. *Drug Metab Rev*. 2014 Aug;46(3):379-419. doi:10.3109/03602532.2014.924962
116. 医薬品インタビューフォーム「バクシダール錠 100 mg」, 第 14 版, 2016.
117. 医薬品インタビューフォーム「フルマーク錠 100 mg」, 第 10 版, 2010.
118. Meher CP, Rao AM, Omar M. Piperazine-pyrazine and their multiple biological activities. *Asian J Pharm Sci Res* 2013; 3(4):43-60.
119. Cashman JR, Park SB, Yang ZC, Wrighton SA, Jacob P 3rd, Benowitz NL. Metabolism of nicotine by human liver microsomes: stereoselective formation of trans-nicotine N'-oxide. *Chem Res Toxicol*. 1992 Sep-Oct;5(5):639-46.
120. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Ohshita H, et al. Prediction of in vivo hepatic clearance and half-life of drug candidates in human using chimeric mice with humanized liver. *Drug Metab Dispos*. 2012 Feb;40(2):322-8. doi: 10.1124/dmd.111.040923.
121. Sanoh S, Horiguchi A, Sugihara K, Kotake Y, Tayama Y, Uramaru N, et al. Predictability of metabolism of ibuprofen and naproxen using chimeric mice with human hepatocytes. *Drug Metab Dispos*. 2012 Dec;40(12):2267-72. doi: 10.1124/dmd.112.047555.

122. Galetin A. Rationalizing underprediction of drug clearance from enzyme and transporter kinetic data: from in vitro tools to mechanistic modeling. *Methods Mol Biol.* 2014;1113:255-88. doi: 10.1007/978-1-62703-758-7_13.
123. Hu ZY, Edginton AN, Laizure SC, Parker RB. Physiologically based pharmacokinetic modeling of impaired carboxylesterase-1 activity: effects on oseltamivir disposition. *Clin Pharmacokinet.* 2014 Sep;53(9):825-36. doi:10.1007/s40262-014-0160-3.
124. Ward DP, Trevor AJ, Kalir A, Adams JD, Baillie TA, Castagnoli N Jr. Metabolism of phencyclidine. The role of iminium ion formation in covalent binding to rabbit microsomal protein. *Drug Metab Dispos.* 1982 Nov-Dec;10(6):690-5.
125. Yan Z, Caldwell GW, Zhao B, Reitz AB. A high-throughput monoamine oxidase inhibition assay using liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2004;18(8):834-40.
126. Obach RS, Huynh P, Allen MC, Beedham C. Human liver aldehyde oxidase: inhibition by 239 drugs. *J Clin Pharmacol.* 2004 Jan;44(1):7-19.
127. Grimm SW, Einolf HJ, Hall SD, He K, Lim HK, Ling KH, 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.* 2009 Jul;37(7):1355-70. doi:10.1124/dmd.109.026716.
128. Wessel D, Flügge UI. A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem.* 1984 Apr;138(1):141-3.
129. Day SH, Mao A, White R, Schulz-Utermoehl T, Miller R, Beconi MG. A semi-automated method for measuring the potential for protein covalent binding in drug discovery. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2005 Sep-Oct;52(2):278-85.
130. Fuhr U. Induction of drug metabolising enzymes: pharmacokinetic and toxicological consequences in humans. *Clin Pharmacokinet.* 2000 Jun;38(6):493-504.
131. Yang J, Liao M, Shou M, Jamei M, Yeo KR, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Cytochrome p450 turnover: regulation of synthesis and degradation, methods for determining rates, and implications for the prediction of drug interactions. *Curr Drug Metab.* 2008 Jun;9(5):384-94.
132. Palleria C, Di Paolo A, Giofrè C, Caglioti C, Leuzzi G, Siniscalchi A, et al. Pharmacokinetic drug-drug interaction and their implication in clinical management. *J Res Med Sci.* 2013 Jul;18(7):601-10.
133. Tabata K, Yamaoka K, Fukuyama T, Nakagawa T. Evaluation of intestinal absorption into the portal system in enterohepatic circulation by measuring the difference in portal-venous blood concentrations of diclofenac. *Pharm Res.* 1995 Jun;12(6):880-3.
134. Zhou S, Yung Chan S, Cher Goh B, Chan E, Duan W, Huang M, et al. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 3A4 by therapeutic drugs. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44(3):279-304.

135. Brandänge S, Lindblom L. The enzyme "aldehyde oxidase" is an iminium oxidase. Reaction with nicotine delta 1'(5') iminium ion. *Biochem Biophys Res Commun*. 1979 Dec 14;91(3):991-6.
136. Grime KH, Bird J, Ferguson D, Riley RJ. Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 enzymes: an evaluation of early decision making in vitro approaches and drug-drug interaction prediction methods. *Eur J Pharm Sci*. 2009 Feb 15;36(2-3):175-91. doi: 10.1016/j.ejps.2008.10.002.
137. Piver B, Berthou F, Dreano Y, Lucas D. Inhibition of CYP3A, CYP1A and CYP2E1 activities by resveratrol and other non volatile red wine components. *Toxicol Lett*. 2001 Dec 15;125(1-3):83-91.
138. Chiba M, Nishime JA, Lin JH. Potent and selective inactivation of human liver microsomal cytochrome P-450 isoforms by L-754,394, an investigational human immune deficiency virus protease inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther*. 1995 Dec;275(3):1527-34.
139. Atkinson A, Kenny JR, Grime K. Automated assessment of time-dependent inhibition of human cytochrome P450 enzymes using liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis. *Drug Metab Dispos*. 2005 Nov;33(11):1637-47.
140. Evans DC, Watt AP, Nicoll-Griffith DA, Baillie TA. Drug-protein adducts: an industry perspective on minimizing the potential for drug bioactivation in drug discovery and development. *Chem Res Toxicol*. 2004 Jan;17(1):3-16.
141. 「医薬品開発と適正な情報提供のための薬物相互作用ガイドライン」, 厚生労働省 2014.
142. European Medicines Agency, Guideline on the Investigation of Drug Interactions, 2012.
143. Kanamitsu S, Ito K, Green CE, Tyson CA, Shimada N, Sugiyama Y. Prediction of in vivo interaction between triazolam and erythromycin based on in vitro studies using human liver microsomes and recombinant human CYP3A4. *Pharm Res*. 2000 Apr;17(4):419-26.
144. Enders D, Shilvock JP. Some recent applications of α -amino nitrile chemistry. *Chemical Society Reviews*, 2000;29(5); 359-373.
145. Dooley M, Plosker GL. Zaleplon: a review of its use in the treatment of insomnia. *Drugs*. 2000 Aug;60(2):413-45.
146. Renwick AB, Ball SE, Tredger JM, Price RJ, Walters DG, Kao J, Scatina JA, Lake BG. Inhibition of zaleplon metabolism by cimetidine in the human liver: in vitro studies with subcellular fractions and precision-cut liver slices. *Xenobiotica*. 2002 Oct;32(10):849-62.

謝 辞

本論文作成にあたり、終始多大なご指導とご鞭撻を賜りました東京工科大学応用生物学部・今村亨教授に謹んで感謝申し上げます。

本論文の審査にあたり、有益なご助言とご校閲と賜りました東京工科大学応用生物学部の杉山友康教授、正木仁教授、佐藤淳教授、藤沢章雄准教授に心より感謝いたします。また、東京工科大学応用生物学部元教授山本順寛先生には 1999 年に東京大学大学院工学系研究科にてご指導いただいて以来長きにわたりご指導、ご助言をいただきました。ここにあらためて感謝申し上げます。

さらに本研究の遂行において、的確なご助言と激励を頂きました横浜薬科大学薬学部の栞原隆教授に厚く御礼を申し上げます。

本研究の機会を与えてくださいました、協和発酵キリン株式会社の岡崎寛博士、神田知之博士ならびに田原晴信博士をはじめとする関係者各位、投稿論文の共著者各位に深く感謝致します。