



# Codexis 代謝産物 プラットフォーム

## 開発の経緯と新たな取り組み

医薬品は肝臓で代謝されるが、この代謝を担うのは主に酸化による変換と共役による変換である。代謝により生じる新しい化合物はその親化合物とは異なる毒性プロファイルや活性プロファイルを呈する可能性がある。ある推論によると、候補物質が医薬品として完成されない原因は多くの場合、親化合物ではなくその代謝産物にある<sup>1</sup>。近年、創薬の過程で医薬品の代謝産物の安全性試験を重視する傾向が強まっている<sup>2</sup>。こうした状況から、代謝産物の特性を調べるための標準的な枠組みがいくつか提唱されている<sup>3</sup>。ヒトシトクロムP450は現在市販されている医薬品のうち約90%の代謝に関与する酵素系であるが<sup>4</sup>、その収量は往々にして低い。そこで、この酵素を生産するための最善の方法が問題となる。

代謝産物の特定と合成とを支援する一連の製品、サービスを当社にて開発した。CODEXIS HUMAN CYTOCHROME BIOCATALYSTS酵素組換え型スクリーニングキット、CODEXIS MICROCYPスクリーニングプレートの両製品は、目的の化合物に関連する医薬品代謝産物やヒドロキシル化したリード化合物のスクリーニングを効率化するものである。ヒトシトクロム、MICROCYP両酵素の凍結乾燥粉末は、代謝産物やリード化合物を数マイクログラムから数グラムの単位で得ることを可能にする。代謝産物合成サービスは、代謝産物の合成と精製に関する当社の専門技術を利用したものである。このサービスで用いるのはHUMAN CYTOCHROME BIOCATALYSTS、MICROCYPの両酵素、当社が保有する微生物株の膨大なライブラリ、そして他社製のマイクロソームである。これまでに当社が合成した代謝産物としては、グルクロニド、グルタチオン誘導体、N-アセチル-システイン誘導体など各種の酸化物、脱アルキル化物、共役化合物が挙げられる。

## CODEXIS HUMAN CYTOCHROME BIOCATALYSTS (HCB)

代謝産物の生産を支援することを目的としたHUMAN CYTOCHROME BIOCATALYSTS (HCB) 組換え型酵素を当社にて開発した。HCBとは、ヒト由来レダクターゼドメインとともに大腸菌内にて高レベルで発現されるよう組み換えられたヒトシトクロムP450を指す。このHCBのセットを、目的の化合物に関連する代謝産物を短時間で特定するためのスクリーニングキットとして販売している。代謝産物を産生する機能を十分に備えた触媒系の構築に必要な成分は、補酵素やその再生系を含めてすべてこのスクリーニングキットに含まれている。なお、HCBは単品としても販売している。単品の製品形態は、代謝産物の合成に必要な成分をすべて備えた安定な凍結乾燥粉末である。顧客は水と、代謝させたい化合物とを添加するだけでよい。HCBの発現レベルの高さから、HCBを含む合成系のコストは他の発現済みシトクロムP450を含む系に比べ最小で25%にまで抑えられる。このことが、HCBを含む系による代謝産物の合成を実用的なものとしている。

## CODEXIS MICROCYP プラットフォーム

リード化合物の多角化やライブラリの拡大、その他創薬分野での応用を意図した水酸化物を生成するための酵素試薬の開発が有機合成化学の分野からバイオテクノロジーに対して要請されるようになってから20年の歳月が過ぎた。また、HCB酵素は構

造決定用材料の合成やごく一部の試験には便利であるが、代謝産物やリード化合物の大量生産においては実用的でないことが多い。この二つのニーズを同時に満たす回答がMICROCYPプラットフォームである。

MICROCYPは、進化により哺乳動物型代謝産物の産生能を獲得した微生物酵素 (BACILLUS MEGATERIUM由来シトクロムP450、別名BM3のバリエーション) を集積したものである<sup>5</sup>。BM3バリエーションは多種の基質に対して特異性を示し、宿主である微生物において高レベルで発現される。ヒトシトクロムP450の活性を基準とするとMICROCYPの産生能は最大で100倍に達する。生産コストは低く、そのため数グラム単位の代謝産物の生産においても費用対効果は高い (図2)。また、リード化合物の多角化に役立つ他種の変換も可能である (図3)。MICROCYPは2種類の製品形態で販売する。まずスクリーニングプレートは当社独自のBM3バリエーション86種類から構成され、そこに試薬とプロトコールとが付属する。必要と考えられるあらゆる試薬とプロトコールが備わっているため、目的の化合物を産生するBM3酵素を短時間で特定することができる。プレートの設計は、有機合成化学分野の一般的なラボや標準的なスクリーニング検査室での使用を想定したものとなっている。このプレートに加えて、水酸化物の大量生産に用いる単品としてのBM3バリエーションを凍結乾燥粉末という形態で販売している。

## CODEXIS MICROCYPプラットフォーム（続き）

MICROCYPプレートを用いて、ジェネリック薬2種類と先発医薬品1種類のスクリーニングを行なった。結果を図1に示す。MICROCYP酵素はどの医薬品に対しても非常に高い活性を示している。初期濃度の高い基質とも反応しており、単位量あたりの代謝産物の産生量が多い。このことから、数ミリグラムから数グラムの単位の代謝産物がMICROCYP酵素の利用によって得られたといえる。

MICROCYPプレートによる医薬品の代謝

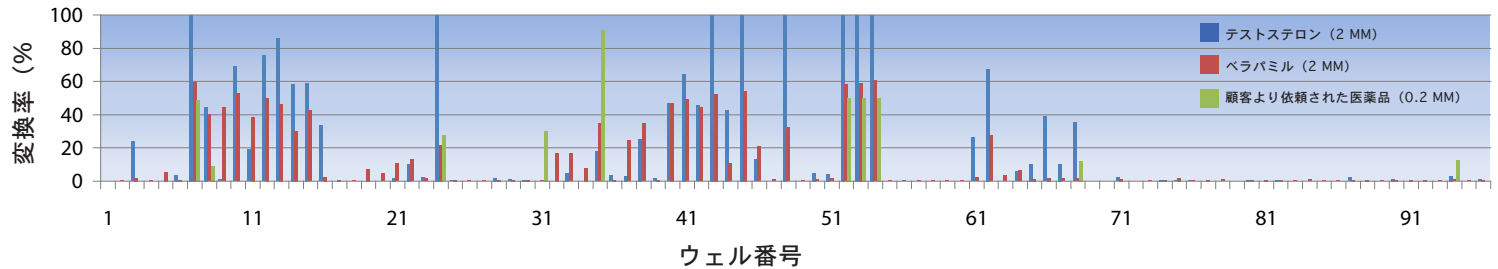


図1 MICROCYPスクリーニングプレートを用いてテストステロン、ペラパミル、その他先発医薬品1種類の各代謝産物を得た。縦軸は変換率（%）、横軸はウェル番号である。

## CODEXIS 代謝産物スクリーニング・合成サービス

顧客に材料が揃っていない場合は、当社の代謝産物合成グループ（CMSG）が代謝産物のスクリーニングと合成を代行する。

当社施設内に最先端の液体クロマトグラフィー・質量分析（LC-MS）システムと専門技術者のチームとを擁するCMSGは最適な代謝系を短時間で特定し、その代謝系を利用して顧客が求める代謝産物やリード化合物を合成する。CMSGが受注する業務の範囲は、この作業の一部であっても全体であってもよい。これまでに当社がその代謝産物として酸化物、共役化合物を合成した医薬品の種類は30種類以上、生産規模は数マイクログラムから数ミリグラムまでの範囲にわたる。

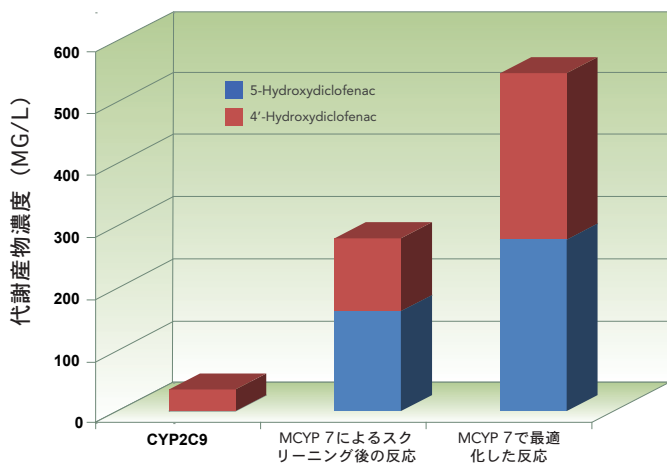


図2 MICROCYP酵素を用いてジクロフェナクの代謝物2種類をグラム単位で合成した（最適な反応系2.5 Lでの収量は約1 G）。

## 総括

代謝産物の合成やリード化合物のライブラリの拡大が容易になることはかつてなかった。当社が販売する組換え型ヒトシトクロムP450は使いやすい組成を採用し、またMICROCYPは非常に高い産生能を誇る。そのため、代謝産物合成の効率と費用対効果はこれまでになく高い。これらの新製品をもって当社は顧客が求めるキットやサービスを提供し、それにより顧客の創薬を支援する。

製品の販売とサービスの提供についてはJapanSales@codexis.comまで照会されたい。

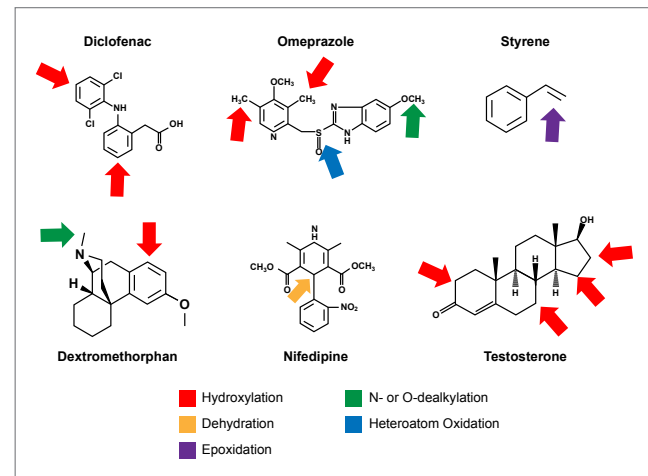


図3 シトクロムP450に関連する既知の反応にも、MICROCYP酵素に触媒されるものは多い。

## 参考文献

- C.K. Svensson. 2006. Commentary: Drug Hypersensitivity — Where Do We Stand? AAPS J. 8: E236-8.
- US-FDA. 2008. Safety Testing of Drug Metabolites. [www.fda.gov/cder/guidance/#Pharmacology/Toxicology](http://www.fda.gov/cder/guidance/#Pharmacology/Toxicology)
- L. Leclercq et al. 2009. Which human metabolites have we MIST? Retrospective analysis, practical aspects, and perspectives for metabolite identification and quantification in pharmaceutical development. Chem Res Toxicol 22: 280-93.
- T. Lynch et al. 2007. The effect of cytochrome P450 metabolism on drug response, interactions, and adverse effects. Am Fam Physician 76: 391-6.
- F.H. Arnold et al. 2006. Preparation of human metabolites of propranolol using laboratory-evolved bacterial cytochromes P450. Biotech Bioeng 93: 494-9.