

キャピラリー電気泳動を用いるヒト α_1 -酸性糖タンパク質の薬物結合研究

黒田幸弘,* 澁川明正, 中川照眞

Drug Binding Analysis of Human α_1 -Acid Glycoprotein Using Capillary Electrophoresis

Yukihiro KURODA,* Akimasa SHIBUKAWA, and Terumichi NAKAGAWA

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyoto University, 46-29, Yoshidashimoadachi-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8501, Japan

(Received May 30, 2003)

Drug-plasma protein binding analysis is indispensable for drug development and clinical use. However, conventional methods for binding analyses were not suitable for small amounts of proteins because of large sample requirements. On the other hand, high-performance frontal analysis/capillary electrophoresis (HPFA/CE) consumes very small sample volumes, and is useful for ligand-binding study of small amounts of proteins. In this study, HPFA/CE was used in a drug-binding study of α_1 -acid glycoprotein (AGP) subtypes in which plasma concentrations change dynamically to elucidate the effects of structural variation on drug binding. Binding study on desialyated AGP revealed that (*S*)-enantiomer selectivity in propranolol-AGP binding was caused by sialic acid residues, while neither sialic acid nor galactose caused the enantioselectivity of verapamil binding to AGP. Biantennary glycans slightly suppressed disopyramide binding to AGP, whereas the glycans did not have any influence on propranolol and verapamil binding. Disopyramide and verapamil were selectively bound to the A variant rather than the F1S variant. The A variant showed larger enantioselective binding to disopyramide, but not to verapamil.

Key words— α_1 -acid glycoprotein; drug-protein binding; frontal analysis; capillary electrophoresis; glycan; genetic variant

1. はじめに

生体に投与された薬物は血液中に移行しアルブミンや α_1 -酸性糖タンパク質 (AGP) など複数のタンパク質とタンパク結合平衡状態で存在する。この時、非結合型薬物のみが血管壁を透過し組織に移行することからタンパク結合は薬理効果や副作用の発現、薬物体内動態に影響を与える。¹⁻³⁾ また、タンパク質自身がキラルな高分子であるので、光学活性な薬物のタンパク結合は異性体間で異なることが多い。⁴⁾ さらに AGP を始めとするいくつかの血漿タンパク質は感染症・炎症・外傷などの病態時に急性相反応を示し、血漿中濃度が約 1/2—5 倍と大きく変動するとともに、⁵⁾ 糖鎖構造やアミノ酸配列の異なる AGP isoform の分布が変化する。^{6,7)} それゆえ急性相反応中の血漿タンパク結合性が定常時のそれ

とは異なり、予期せぬ薬物体内動態や薬理効果、副作用をもたらす恐れがある。これまで医薬品の開発過程や臨床において全血漿や全アルブミン、全 AGP の結合解析が行われてきたが、特に AGP のような isoform の分布に大きな個体間変動・病態変動が見られるタンパクの場合、病態に応じた薬物投与計画を構築するためには全血漿や全 AGP の薬物結合解析のみでは十分ではなく、各 isoform の立体選択的薬物結合性を明らかにし薬物の血漿内分布を解明することが重要となる。

これまで血漿中非結合型薬物濃度の定量には主に限外ろ過法や平衡透析法が用いられてきた。これらの従来法は、薬物の膜への吸着や結合型薬物の漏れに伴い測定誤差が生じることや、平衡化に時間がかかる、高疎水性薬物への適用が困難、試料消費量が大きいと言う問題点がある。さらに限外ろ過膜に使用されている素材は合成セルロースなどのキラルな高分子であり、光学活性な薬物の膜吸着量が光学異性体間で異なることがある。一方、結合親和性評価法については上記従来法のほかに種々の分光学的手

京都大学大学院薬学研究科 (〒606-8501 京都市左京区吉田下阿達町 46-29)

e-mail: kurodada@pharm.kyoto-u.ac.jp

*本総説は平成 14 年度日本薬学会近畿支部奨励賞の受賞を記念して記述したものである。

法やカロリメトリーなどが用いられるが、一般的に生体実試料への適用が難しく試料消費量が大きいという問題点が付随する。本研究ターゲットである AGP isoform などはアルブミンなどと比べてごく少量しか存在していないので、これらの結合実験を行うには試料消費量の少ない方法に限られる。微量結合分析という点では最近表面プラズモン共鳴を利用したバイオセンサーがよく用いられるようになってきているが、血漿タンパク結合解析に利用するには感度が十分ではなく、またタンパクの固定化に伴う構造変化によって正しく測定できないことがある。以上に述べた状況を考慮すると、AGP isoform の薬物結合研究には試料消費量が少なく (100—300 nl 程度) 吸着による誤差の生じにくい高性能先端分析/キャピラリー電気泳動 (HPFA/CE) 法が有用であると思われる。ここでは AGP の糖鎖多様性やアミノ酸配列の異なる遺伝的 variant が立体選択

的な薬物—タンパク結合に与える影響を HPFA/CE 法を用いて調べた結果について述べるが、HPFA/CE 法の原理については他の文献⁸⁾に述べられているので割愛する。Figure 1 には本研究で用いた薬物の構造式を示す。いずれも AGP と選択的にタンパク結合することが知られている代表的な塩基性薬物である。

2. AGP 糖鎖が立体選択的薬物結合に与える影響

AGP は 183 残基から構成される 1 本のポリペプチド鎖と 5 つの複合型糖鎖から構成されており (Fig. 2), その糖含量は約 40% と高く、糖鎖末端のシアル酸のため分子全体としては強く負の電荷を帯びている (pI 約 3.3)。AGP の糖鎖は生理的条件下で次に挙げるようなマイクロな不均一性を示し,⁹⁾ 構造的に非常に多様である。(I) 糖鎖分枝程度が二本鎖、三本鎖又は四本鎖とばらついている。(II) 糖鎖

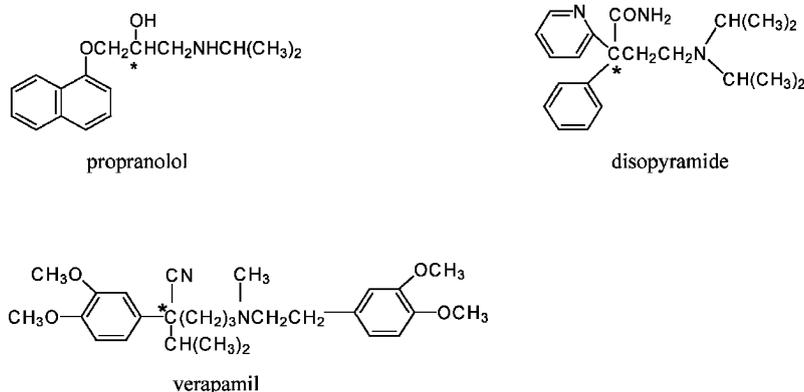


Fig. 1. Model Basic Drugs

pK_a values are 9.5 for propranolol, 10.2 for disopyramide, 9.0 for verapamil.

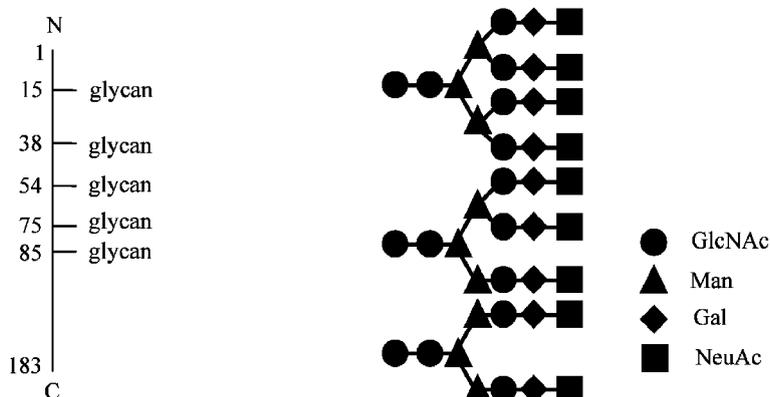


Fig. 2. AGP Glycan Structure

あたりのフコース残基数が0, 1又は2個である。(III) N-アセチラクトサミンの繰り返し構造によって伸長している糖鎖が含まれている。(IV) 末端シアル酸残基が欠失している糖鎖もある。(V) 5カ所ある糖鎖結合部位間で結合しうる分枝糖鎖が異なる。このように多様な糖鎖構造には何らかの生理的機能があると推測されており, その1つに炎症部位での白血球の組織浸潤の調節が挙げられるが, 多くの機能は未だ不明である。一方, AGPは主に塩基性薬物の血漿タンパク結合に深く関与することが知られているが, これらの糖鎖多様性を塩基性薬物のタンパク結合という観点から考えると, 2つの構造的特徴が目向けられる。1つは糖鎖末端のシアル酸である。AGPと相互作用することが知られている塩基性薬物は血漿中で正に帯電しており, 一方シアル酸は負に帯電しているので静電的相互作用により薬物結合に関与している可能性がある。もう1つは二本鎖糖鎖である。これまでの研究から二本鎖糖鎖を有するAGPはそれらをN末端側の3カ所の糖鎖結合部位(Asn15, Asn38, Asn54)にのみ付加し, C末端側の2カ所には存在していないことが明らかとなっている。¹⁰⁾ 一方, 修飾AGPを用いた競合的薬物結合実験からAGPの薬物結合サイトはペプチド1次配列上のN末端から1つ目と2つ目の糖鎖結合部位の間(21—31残基)にあると示唆されている。¹¹⁾ このことから二本鎖糖鎖を持つAGPはそれらを薬物結合部位に配列上近い位置に持っていることとなる。一方でシアル酸数や二本鎖糖鎖の割合は急性相反応時に変動する。本研究においてHPFA/CEを用いてAGPのシアル酸及び二本鎖糖鎖が立体選択的な薬物結合性に与える影響を調べた。

Figure 3には(S)-プロプラノロール単独溶液(a), (S)-プロプラノロール—市販AGP混合溶液(b), (S)-プロプラノロール—アシアロAGP混合溶液(c)を同一条件でHPFA/CE分析したときに得られたエレクトロフェログラムを示す。図に見られる台形状ピークはいずれも(S)-プロプラノロールのUV吸収を示すものであり, これらのピークの中にはAGPは含まれていない。先端分析法の原理の詳細は他に委ねるが, この台形状薬物ピークの高さが試料溶液中における非結合型薬物濃度を反映しており, 試料中にタンパク質が含まれない場合には薬物総濃度を反映することになる。Table 1には,

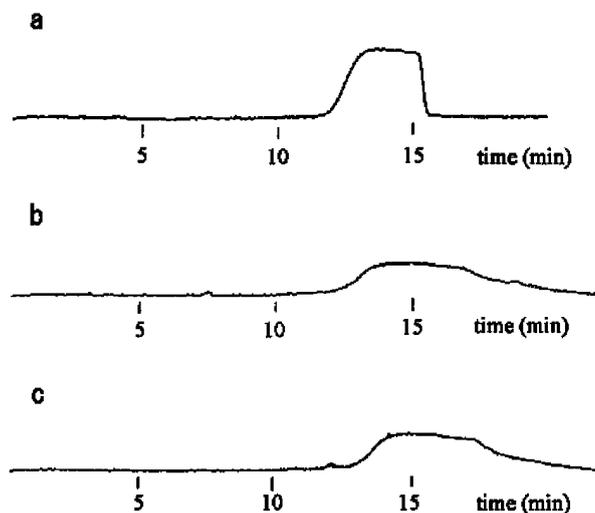


Fig. 3. HPFA/CE Profiles

(a) Propranolol standard solution (30 μM), (b) Propranolol (30 μM) and native AGP (40 μM) mixed solution, (c) Propranolol (30 μM) and asialo AGP (40 μM) mixed solution. Capillary of 42 cm total length (30 cm effective length) treated with linear polyacrylamide. Sodium phosphate buffer (pH 7.4, 66.7 mM). Voltage at +7 kV for electrophoresis. Hydrodynamic injection (suction) for 5 sec. Detection wavelength at 215 nm.

Table 1. Unbound Drug Concentrations (C_u) in Asialo or Asialo-Agalacto AGP Solution

	$C_u(R)$ (μM)	$C_u(S)$ (μM)	$C_u(R)/C_u(S)$
<i>Propranolol</i>			
native AGP	14.5 \pm 0.52	11.4 \pm 0.84	1.27
asialo AGP	14.8 \pm 0.19	14.6 \pm 0.43	1.01
<i>Verapamil</i>			
native AGP	13.1 \pm 0.25	17.2 \pm 0.19	1.31
asialo AGP	13.7 \pm 0.27	17.0 \pm 0.63	1.25
asialo-agalacto AGP	13.6 \pm 0.30	17.1 \pm 0.90	1.26

Mean \pm sd, $n=3$. Sample; propranolol enantiomer (30 μM) or verapamil racemate (50 μM) were added in AGP (40 μM or 50 μM) solution (pH 7.4, 66.7 mM sodium phosphate buffer).

N-アセチルノイラミニダーゼ及び β ガラクトシダーゼで処理したアシアロAGP又はアシアロ—アガラクトAGPの薬物混合溶液をHPFA/CE分析し, 得られた台形状ピークの高さから求められた非結合型薬物濃度をまとめた。プロプラノロールの場合, 市販AGP溶液中では(S)-体は(R)-体より非結合型濃度が低く, 強い結合性を示したが, アシアロ化することにより(R)-体の非結合型濃度には変化が見られない一方で, (S)-体の非結合型濃度は(R)-体のそれとほぼ同じレベルまで上昇した。こ

のことは AGP の糖鎖末端のシアル酸は (S)-プロプラノロールの結合に有利に働くが (R)-プロプラノロールの結合にはほとんど関与していないことを意味する。ところがベラパミルの場合、AGP をアシアロ化及びアシアローアガラクト化しても市販 AGP 溶液中の非結合型濃度と有意な差異は認められず、これらの糖はベラパミルの立体選択的結合に関与していなかった。

続いて Table 2 には二本鎖糖鎖の有無によって分離したそれぞれの AGP と塩基性薬物との混合溶液中の非結合型薬物濃度を同様に HPFA/CE 法により定量した結果を示す。UR-AGP は concanavalin A に対する親和性を持たず、このカラムを素通り

した二本鎖糖鎖を持たない AGP であり、R-AGP はこのカラムに保持された二本鎖糖鎖を持つ AGP である。プロプラノロール、ベラパミルともに、UR-AGP 溶液中・R-AGP 溶液中において非結合型薬物濃度に有意な差は見られず、立体選択的結合に二本鎖糖鎖の有無は関与していなかった。ところが、ジソピラミドの場合、二本鎖糖鎖を持つ R-AGP 溶液中の非結合型濃度は二本鎖糖鎖を持たない UR-AGP 溶液中のそれより小さくなった。また、光学異性体間の非結合型薬物濃度比は両 AGP 溶液中ではほぼ等しかった。このことは二本鎖糖鎖はジソピラミド-AGP 間の親和性に有利に作用しているが立体識別効果を示さないことを意味している。

3. AGP 遺伝的 Variant が立体選択的薬物結合に与える影響

一方、AGP は 3 つの遺伝子 (AGP-A, B, B' gene) でコードされており、そのうち、AGP-B gene と AGP-B' gene は同一である。¹²⁾ 以前は AGP-A 及び -B 遺伝子はアリルであると考えられていたが、その後の研究によりアリルではないことが明らかとなった。AGP-A gene と AGP-B/B' genes とではエクソン部分で 30 以上の塩基対が異なるため、ペプチド配列の異なる genetic variant が存在している。主な variant として、AGP-A gene に由来する F1 variant と S variant, 及び、AGP-B/B' gene に由来する A variant の 3 つが知られている¹³⁾ (Fig. 4)。さらに等電点電気泳動によりこれら以外のマイナーな variant が数多く見出されている。F1 variants と

Table 2. Unbound Drug Concentrations (C_u) in Unretained AGP (UR-AGP) or Retained (R-AGP) Solution

	$C_u(R)$ (μM)	$C_u(S)$ (μM)	$C_u(R)/C_u(S)$
<i>Propranolol</i>			
UR-AGP	15.8±0.43	12.9±0.35	1.22
R-AGP	15.5±0.29	12.8±0.46	1.22
<i>Verapamil</i>			
UR-AGP	14.0±0.41	18.1±0.32	0.773
R-AGP	14.0±0.45	17.8±0.28	0.787
<i>Disopyramide</i>			
UR-AGP	6.56±0.16	5.61±0.06	1.17
R-AGP	7.84±0.10	6.89±0.04	1.14

Mean±sd, $n=3$. Sample; propranolol, verapamil (30 μM) or disopyramide (15 μM) enantiomer were added in AGP (40 μM) solution (pH 7.4, 66.7 mM sodium phosphate buffer).

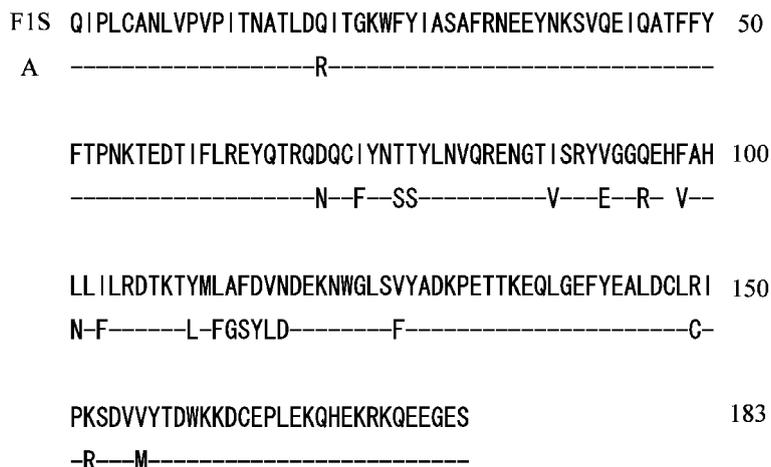


Fig. 4. Amino Acid Sequence of F1 and A Variant Deduced from Respective Genes
Bars indicate identical amino acid residues to those in F1 variant.

A variant では 183 残基中 22 残基のアミノ酸が異なることが遺伝子のクローニングで判明し、さらに single strand nucleotide polymorphism 法により、S variant の 20 位のは Gln ではなく Arg であること、F2 variant の 154 位は Val ではなく Met であることが明らかとなった。¹⁴⁾ しかしその他のマイナーな variant のアミノ酸配列は不明である。Hervé らは F1 や S variants に選択的に結合する薬物と A variant に選択的に結合する薬物とを報告するとともに、competitive molecular field analysis によって A variant の薬物結合ポケットの空間的配置を求めた。¹⁵⁾ これによると A variant と薬物は 2 ヲ所の疎水性相互作用部位と 1 ヲ所の静電相互作用部位の合計 3 点で相互作用し、ジソピラミドのように 2 つの芳香環が正電荷を持つ短鎖で架橋されているような薬物は A variant に選択的に結合する。これは以前に Kalitzan らが提唱した AGP 固定化カラム (variant に分離していない AGP を固定化したもの) 上の薬物結合ポケットの構造と類似するものであった。¹⁶⁾ しかしその後これらの説を支持する結果はまだ発表されておらず、また F1 や S variant を始めとする他の variant のポケットの構造は全く未知であり、これらの薬物結合の立体選択性については不明である。一方、ジソピラミドの不斉中心は 2 つの芳香環と 3 級アミンが結合している炭素原子であり、市販 AGP (全 variant の混合物) には (S)-ジソピラミドが (R)-体よりも強く結合することが既に知られている。もし Hervé らの説が正しいのであれば A variant には (S)-体が (R)-体よりも強く結合するはずである。なぜなら (S)-体より (R)-体が A variant に強く結合した場合、残りの F1 や S variant はジソピラミドに対する結合性が弱いため、これらが全体の立体選択性を逆転させるのは困難であると思われるからである。そこで AGP の A variant 及び F1, S variant の塩基性薬物に対する立体認識能を HPFA/CE により調べた。

AGP は銅イオンを固定化した immobilized metal affinity chromatography (IMAC) により、保持のない F1 variant や S variant を主に含む画分 (F1S variant) と保持される A variant を主に含む画分 (A variant) に分取した。両画分中の UR-R-AGP の比は約 48 : 54 で等しく、シアル酸量を電気泳動移動度から評価したところ両画分ともほぼ同一であ

Table 3. Unbound Drug Concentrations (C_u) in AGP Genetic Variant Solution

	$C_u(R)$ (μM)	$C_u(S)$ (μM)	$C_u(R)/C_u(S)$
<i>Verapamil</i>			
F1S variant	20.1 ± 0.21	22.4 ± 0.92	0.900
A variant	14.9 ± 0.70	17.9 ± 0.76	0.871
<i>Disopyramide</i>			
F1S variant	10.8 ± 0.03	10.1 ± 0.16	1.07
A variant	4.16 ± 0.11	1.76 ± 0.03	2.37

Mean ± sd, $n=3$. Sample; verapamil (30 μM) or disopyramide (15 μM) enantiomer were added in AGP (40 μM) solution (pH 7.4, 66.7 mM sodium phosphate buffer).

った。これらを精製後、各塩基性薬物光学異性体とともにバッファに溶解し、その中の非結合型薬物濃度を HPFA/CE により定量した。Table 3 にその結果を示す。ジソピラミドの場合 A variant 溶液中の方が F1S variant 溶液中よりも非結合型濃度が低く A variant に選択的に結合し、この結果は Hervé らの報告と一致する。一方、立体選択性については、結合性の強い A variant は大きな立体選択性を示したのに対し、結合性の弱い F1S variant はほとんど立体選択性を示さなかった。この結果は Hervé らの説を支持すると同時に、F1S variant の薬物結合ポケットは A variant のそれと異なる構造をとっていることを示唆している。一方で各 variant 中の UR-AGP と R-AGP の割合を調べたところ両者でほぼ等しい値が得られた (約 4 : 5)。また両 variant の電気泳動移動度はほぼ等しく (約 $-1.2 \times 10^{-4} \text{ cm}^2/\text{Vsec}$)、シアル酸数については両者でほぼ同等であると考えられる。さらに、F1S variants と A variant の蛍光スペクトル及び CD スペクトルを測定、比較したところ、両 variant 間で大きな違いは観測されなかった。一方、銅イオンを用いる IMAC では AGP のヒスチジン残基と銅イオンとの相互作用の違いに基づき分画される¹⁷⁾が、F1S variant と A variant では、ヒスチジン残基の数、及びそれらの 1 次配列上の位置は同じである¹²⁾にもかかわらず、銅イオンに異なる親和性を示したことから、variant ごとにペプチド部分のコンフォメーションが異なることが示唆された。この違いは、前述のように、蛍光スペクトル及び CD スペクトルでは確認できるほどの大きなものではないが、少なくともヒ

スチジン残基付近の立体構造に影響を及ぼすとともに, variant ごとに異なる薬物結合性を与えるものであると考えられる. また, ベラパミルの場合では, F1S variant より A variant に選択的に結合したが, その程度はジソピラミドの時ほどは大きくはなかった. ベラパミルも2つの芳香環が正電荷を持つ鎖によって結ばれた形をしているので, ジソピラミドと同様に A variant と選択的に結合したのではないかと推察される. しかし, ジソピラミドに比べて芳香環を結ぶ鎖が rigid でなく pK_a が低いことが, A variant 選択性がジソピラミドより小さい原因であるかもしれない. また立体選択性は両 variant とも市販 AGP のそれとほぼ同等の値を示し, IMAC での AGP variant 分離機構は AGP のベラパミルに対する立体認識に関与していないと示唆された.

次にこれらの AGP variant とジソピラミドの結合に対して溶液の pH が与える影響を調べた. 最近多く開発されるタンパク結合率の高い薬物の場合には非結合型濃度と体内動態の相関性が小さいことがある.¹⁸⁾ 可能性のある要因の1つに血漿バルク中の pH と細胞膜表面の微小環境下での pH が異なることがある. 後者の pH は酸性側に傾いているため薬物-タンパク結合平衡状態が解離側に移動し, その結果, 予想より多くの薬物が取り込まれたと考えることができる. Table 4 に各 pH の試料溶液中における非結合型 DP 濃度をまとめたものを, Fig. 5 には 1:1 の結合を仮定して得られた結合定数とそれらの比を示す. Figure 5(a) は各 genetic variant の薬物結合能の pH 依存性を示したものである. F1S variant の場合, pH が 7.4 から 6.0 に低下すると両異性体とも結合定数は減少したが, pH が 6.0 から

4.0 まで低下すると逆に増加した. 一方, A variant の場合, pH が 7.4 から 4.0 に低下すると両異性体とも結合定数は減少した. Figure 5(b) はジソピラミドの genetic variant 選択性を示した. pH が 7.4 や 6.0 では両異性体とも A variant とより強く結合したのに対し, pH 4.0 では逆に両異性体とも F1S variant とより強く結合した. すなわち, 生理的 pH と酸性側の pH とでは, ジソピラミドと結合するメインの genetic variant が異なることが判明した. Figure 5(c) は各 genetic variant の薬物立体認識能を示した. いずれの pH においても A variant の方が薬物立体認識能は大きい, その程度は pH により異なり, 特に pH 6.0 では両 genetic variant とも最も大きな立体認識能を示すことが判明した. また F1S variant, A variant とともに pH によらず (S)-DP とより強く結合することが判明した. これらの原因を探るべく次に各 pH において電気泳動移動度・蛍光スペクトル・CD スペクトルを測定した. 電気泳動移動度は pH 6 以下で急激に減少し, 蛍光スペクトルは pH 4 以下で急激に強度が増加したが, 両 genetic variant 間での大きな違いは見られなかった. 一方, CD スペクトルをもとに 2 次構造解析をした結果を Table 5 に示す. F1S variant の場合, pH が 7.4 から 4.0 へ低下するのに従って β -sheet 含量が減少したのに対し, A variant の場合は pH が 7.4 から 4.0 へ低下するのに伴って β -sheet 含量が増加した. すなわち F1S variant と A variant とでは, pH 低下に伴う β -sheet 含量の変化に違いが生じた. F1S variant では pH 4 において生じる構造変化がジソピラミドの結合に有利に働き, 一方で A variant の場合にはその効果がなく, 結果的に結合親和性の

Table 4. Unbound Drug Concentration (C_u) in DP-Genetic Variant Solutions

	C_u (μM)			
	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.4
<i>F1S variants</i>				
(R)-DP	10.4±0.393	12.1±0.113	12.6±0.132	9.38±0.156
(S)-DP	9.56±0.315	11.6±0.112	11.8±0.097	9.24±0.221
<i>A variant</i>				
(R)-DP	13.3±0.185	12.8±0.258	11.5±0.112	7.79±0.146
(S)-DP	12.2±0.100	9.46±0.248	6.81±0.268	5.70±0.313

Mean \pm SD, $n=3$. Sample; 15 μM (R)-or (S)-disopyramide (DP) were dissolved in 20 μM AGP genetic variant solution (66.7 mM sodium acetate/phosphate buffer).

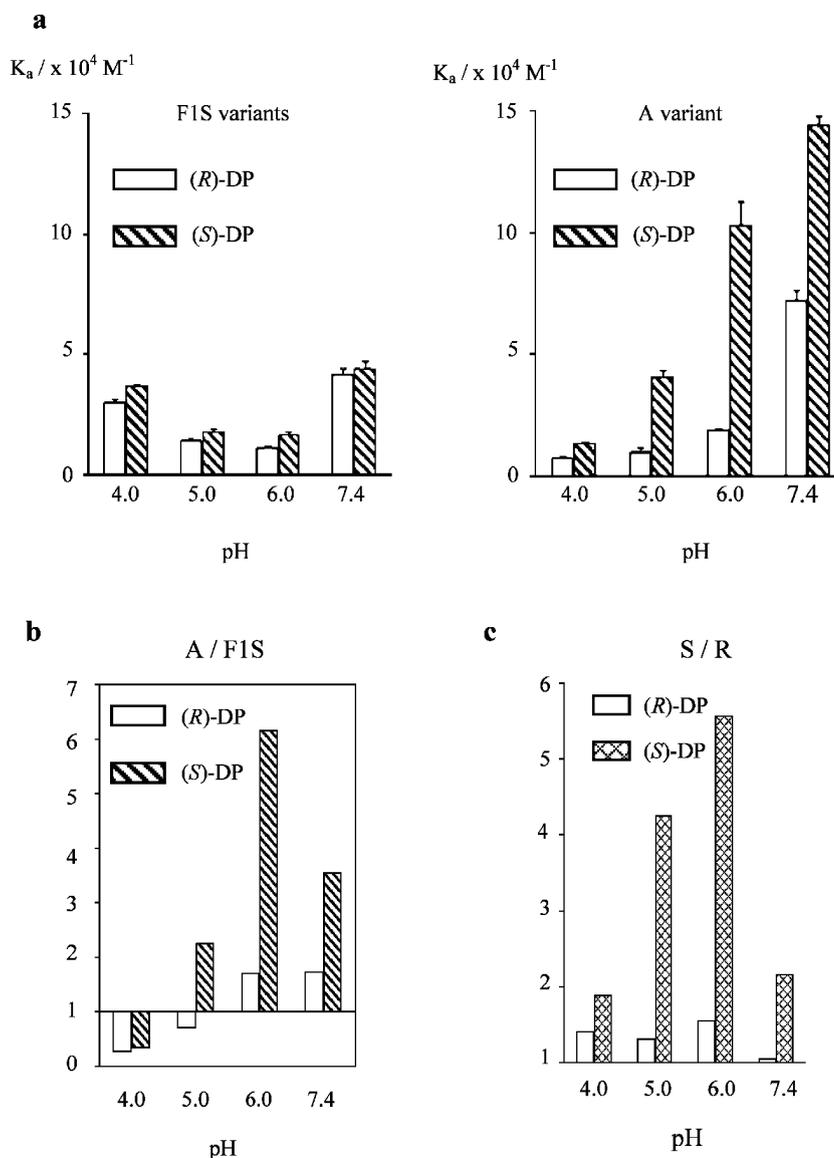


Fig. 5. Affinity Constants of Disopyramide Enantiomer—AGP Genetic Variant Binding and Their Ratios

(a) Binding constants between disopyramide enantiomer and AGP genetic variants, (b) Ratio of binding constants between FIS and A variant, (c) Enantiomeric ratio of binding constants. Affinity constants were calculated assuming 1 : 1 binding stoichiometry.

Table 5. Distribution in Secondary Structure of AGP Genetic Variants

	pH 4.0	pH 5.0	pH 6.0	pH 7.4
<i>FIS variants</i>				
α -helix	15.6%	14.2%	19.7%	14.8%
β -sheet	71.9%	81.3%	80.3%	85.2%
Other	12.5%	4.50%	0.00%	0.00%
<i>A variant</i>				
α -helix	21.9%	22.9%	29.8%	29.7%
β -sheet	73.5%	74.0%	64.2%	56.0%
Other	4.60%	3.10%	6.00%	14.3%

Sample concentration: 1 μ M. Temperature: 25°C. Wavelength: 200—250 nm.

Reference spectra: Yang J. T. *et al.*, *Methods in Enzymology*, **130**, 208—269 (1986).

逆転が生じたと考えられる。

4. おわりに

以上に述べたように、HPFA/CE法の試料消費量が少ないという特徴を生かすことにより、従来法では測定が困難であったAGP糖鎖の構造的特徴やAGPの遺伝的variantに着目した立体選択的薬物結合研究を迅速簡便に行うことが可能になった。本研究でキャピラリーに注入された薬物のモル数は数ピコモルであり、これは、従来の限外ろ過や平衡透析などの結合実験法より約2—3桁少ない試料量であった。このような特徴から本法は血漿タンパク結合が薬物動態に及ぼす影響を個体間変動・病態変動

に応じて詳細に検討する上で有用な結合実験法であると言える。

REFERENCES

- 1) Meyer M. C., Glutman D. E., *J. Pharm. Sci.*, **57**, 895–918 (1968).
- 2) Vallner J. J., *J. Pharm. Sci.*, **66**, 447–465 (1977).
- 3) Knong T. C., *Clin. Chem. Sci.*, **151**, 193–216 (1985).
- 4) Tucker G. T., Lennard M. S., *Pharmacol. Ther.*, **45**, 309–329 (1989).
- 5) Schmid K., Nimberg R. B., Kimura A., Yamaguchi H., Binette J. P., *Biochem. Biophys. Acta*, **492**, 291–302 (1977).
- 6) Van Dijk W., Pos O., Van der Stelt M. E., Moshage H. J., Yap S. H., Dente L., Baumann P., Eap C. B., *Biochem. J.*, **276**, 343–347 (1991).
- 7) Hervé F., Duché J. C., Jaurand M. C., *J. Chromatogr.*, **B715**, 111–123 (1998).
- 8) Ohara T., Shibukawa A., Nakagawa T., *Anal. Chem.*, **67**, 3520–3525 (1995).
- 9) Van Dijk W., Havenaar E. C., Brinkman – Van Der Linden E. C. M., *Glycoconj. J.*, **12**, 227–233 (1995).
- 10) Treuheit M. J., Costello C. E., Halsall H. B., *Biochem. J.*, **283**, 105–112 (1992).
- 11) Kute T., Westphal U., *Biochim. Biophys. Acta*, **420**, 195–213 (1976).
- 12) Dente L., Pizza M. G., Metspalu A., Cortese R., *EMBO J.*, **6**, 2289–2296 (1987).
- 13) Eap C. B., Cuendet C., Baumann P., *Hum. Genet.*, **80**, 183–185 (1988).
- 14) Yuasa I., Umetsu K., Vogt U., Nakamura H., Namba E., Tamaki N., Irizawa Y., *Hum. Genet.*, **99**, 393–398 (1997).
- 15) Hervé F., Caron G., Duché J. C., Gaillard P., Rahman N. A., Kakoulidou A. T., Carrupt P. A., d’Athis P., Tillement J. P., Testa B., *Mol. Pharmacol.*, **54**, 129–138 (1998).
- 16) Kaliszan R., Nasal A., Turowski M., *J. Chromatogr. A*, **722**, 25–32 (1996).
- 17) Hervé F., Duché J. P., Barré J., Millot M. C., Tillement J. P., *J. Chromatogr.*, **577**, 43–59 (1992).
- 18) Ueda K., Yamaoka K., Rosas M. E. R., Shibukawa A., Nakagawa T., *Drug Metabol. Disp.*, **25**, 281–286 (1997).