

創薬における探索薬物動態スクリーニング (III)
—膜透過性及び CYP1A2 の阻害活性に対する *in silico* モデルの検討—

小村 弘,* 茂本友貴枝, 河原亥一郎, 松田健一,
阿野理恵子, 村山洋子, 森脇俊哉, 吉田長弘

High Throughput Screening of Pharmacokinetics and Metabolism in Drug Discovery (III)
—Investigation on *In silico* Model for Membrane Permeability and CYP1A2 Inhibition—

Hiroshi KOMURA,* Yukie SHIGEMOTO, Ichiro KAWAHARA, Kenichi MATSUDA,
Rieko ANO, Yoko MURAYAMA, Toshiya MORIWAKI, and Nagahiro H. YOSHIDA
Department of Research Pharmacokinetics, Research Center Kyoto, Bayer Yakuhin, Ltd.,
6-5-1-3 Kunimidai, Kizu-cho, Soraku-gun, Kyoto 619-0216, Japan

(Received May 14, 2004; Accepted October 6, 2004)

Pharmacokinetic and metabolic screening plays an important role in the optimization of a lead compound in drug discovery. Since those screening methods are time-consuming and labor intensive, *in silico* models would be effective to select compounds and guide derivatization prior to the screening. We investigated *in silico* models for permeability in Caco-2 cells, brain distribution and cytochrome P450 (CYP) inhibition using molecular weight, lipophilicity (clog $D_{7.4}$), polar surface area (PSA), and number of rotatable bonds (RB). A variety of test compounds was selected from different Caco-2 assay projects. The permeability determined exhibited a good correlation with a combination of PSA and clog $D_{7.4}$ rather than with PSA alone. In the brain distribution, PSA, in addition to lipophilicity, was one of the determinant parameters, and compounds were significantly distributed to the brain in rats with the decrease in the PSA value. When this approach was adapted to CYP1A2 inhibition in the fluorometric assay, the inhibitory potential for two plane core structures was successfully predicted by utilizing number of RB, PSA, and clog $D_{7.4}$. In particular, an increase in the number of RB weakened the inhibitory potential due to a loss of the plane structures. These results suggest that the PSA and RB are key parameters to design chemical structures in terms of the improvement of both membrane permeability in the brain and gastrointestinal and CYP1A2 inhibition, respectively.

Key words—*in silico*; Caco-2 permeability; cytochrome P450A2 inhibition; polar surface area; rotatable bond; drug discovery

緒 言

コンビナトリアルケミストリーの発展により化合物ライブラリーの数は百万を越え、週に何十万もの化合物が多く生物学的ターゲットに対してスクリーニングされている。これに伴い多くのリード化合物が見出されている。さらに開発候補品のデベロッパビリティにおいて動態代謝特性が重要な要因の1つであるとの認識が深まり、¹⁾優れた薬物動態プロファイルを伴った開発候補品を見出すため探索動態グループに対する要求が年々高まってきている。²⁾このような状況下において、溶解性、Caco-2

膜透過性及び代謝安定性試験などについてハイスループットスクリーニング (HTS) への取り組みが行われてきた。³⁻⁸⁾しかしながら、探索動態試験における HTS は時間と労力を必要とし、評価できる化合物の数は最大でも生物学的ターゲットに対する HTS の 1/100 から 1/10000 と限られている。

近年、合成化合物の体内動態特性を予測するための *in silico* モデルが検討されている。⁹⁻¹⁴⁾特に polar surface area (PSA), molecular weight (MW), 脂溶性 (log P) 及び hydrogen bonding (HB) の数などの種々のパラメータが用いられ、薬物の膜透過性又は経口吸収性の予測が試みられている。また GlaxoSmithKline のグループによって PSA に加えて rotatable bond (RB) の数が生体内利用率に影響

することが報告されており,¹⁵⁾ このように経口吸収性についていくつかのモデルが提唱されている。同様の *in silico* モデルは脳移行性についても検討されており,^{10,16,17)} 脳移行性の改善又は抑制を目的とした誘導体化において重要な予測ツールとなっている。しかしながら, Caco-2 の膜透過性と同様に, MW, PSA や log P さらには HB など種々のパラメータが用いられ, 多様なモデルが確立されている。この要因として試験化合物群の物性及び試験系の差が挙げられ, さらにエンドポイントとして使用するパラメータによりモデル及び相関式が変わってくるものと考えられる。

今回われわれの化合物の物性及び評価系に適した *in silico* モデルを確立するため, MW, pH 7.4 における脂溶性 ($\text{clog } D_{7.4}$), RB の数及び PSA の 4 つのパラメータを指標として Caco-2 単層膜透過性及び脳移行性について検討した。さらに cytochrome P4501A2 (CYP1A2) に対する阻害活性について適応を試み, 確立した *in silico* モデルから RB の数の増加すなわちフレキシブルな置換基の導入が CYP1A2 の阻害活性を低下させることを明らかにした。

実験方法

1. 試薬 用いた試薬はシグマアルドリッチ (Tokyo, Japan), 和光純薬工業 (Osaka, Japan) 又はナカライ (Kyoto, Japan) から購入した。3-cyano 7-ethoxycoumarin (CEC) はフナコシ (Tokyo, Japan) から, リコンビナント CYP1A2 (バキュロウイルス系) は第一化学薬品 (Tokyo, Japan) からそれぞれ購入した。

2. Caco-2 単層膜透過性試験 Caco-2 単層膜透過性試験は主に Biomek 2000 (Beckman Coulter, Tokyo, Japan) を用いて Komura らの方法³⁾により実施した。細胞を 6.44×10^4 cells/cm² の濃度にて 24 ウェルプレートに播種したのち, 37°C, 5% CO₂ の条件下で 14 日間培養した。試験化合物を最終濃度が 20 μM になるように DMSO 溶液 (最終濃度 0.5% 以下) にて apical 側へ添加した。なお, 脂溶性化合物の評価では, 0.1% gelucire 44/14 及び 4% bovine serum albumin をそれぞれ apical 側及び basolateral 側へ加えた。37°C にて一定時間インキュベーション後, basolateral 側の化合物濃度を

HPLC 法又は脱塩カラムを用いた LC/MS 法で測定した。その integrity は光学顕微鏡にて確認するとともに, Lucifer Yellow の透過係数により判断した ($< 5 \times 10^{-7}$ cm/s)。

3. CYP1A2 阻害試験 化合物の CYP1A2 阻害活性は基質として CEC を用いて Crepsi らの方法に準じて測定した。¹⁸⁾ 100 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4) に, 5 μM CEC, 2.5 pmol/ml CYP1A2 及び NADPH 生成系 (3.3 mM glucose-6-phosphate, 1.3 mM NADP⁺, 3.3 mM MgCl₂, 0.4 units/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase) を含むものを反応液とした。試験化合物は 50% から 70% アセトニトリル溶液に 2—5 mM の濃度で溶解させた。阻害曲線を得るため, 試験化合物を 96 ウェルプレート上で 3 分の 1 ずつ希釈し 8 濃度とした。37°C, 10 分間プレインキュベーション後, リコンビナント CYP1A2 及び NADPH 生成系を添加することにより反応を開始した。20 分間 37°C インキュベーション後, アセトニトリル : 0.1 M Tris (80/20, v/v) の添加により反応を停止した。CEC の代謝物である 3-cyano-7-hydroxycoumarin の蛍光をプレートリーダー Arvo SX FL (Perkin Elmer, Inc., Wellesley MA) で測定 (excitation: 420 nm, emission: 485 nm) し, 50% の阻害を与える濃度を IC₅₀ とした。

4. In vivo 動態試験 雄性 Wistar 系ラットを 7—10 週齢にて絶食下で実験に供した。試験化合物を polyethylene glycol 400 : ethanol (9 : 1, v/v) に 1 又は 2 mg/ml の濃度で溶解させ, エーテル麻酔下 1 mg/kg の用量で大腿静脈から投与した。10 分後麻酔下にて腹部大動脈から採血したのち, 大脳及び小脳を摘出して生理食塩液で洗浄した。なお血液はヘパリン処理を施したのち, 遠心分離により血漿を得た。脳に等張リン酸緩衝液 pH 7.4 を加えポリトロンホモジナイザーを用いて 20% ホモジネートを調製した。血漿中又は脳ホモジネート中の化合物を中性若しくはアルカリ条件下でエーテル又は酢酸エチルにより抽出後, HPLC 又は LC/MS を用いて Komura らの方法³⁾に従い分析定量した。血液-血漿間分配率である R_b 値は, 試験化合物を 0.5 又は 1 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で血液に添加し, 15 分間, 37°C にてインキュベーション後, 血漿中濃度を測定し算出した。以上の動物実験についてはバイエル薬品中央研究所動物倫理委員会の承認を受け実施した。

5. 血清タンパク及び組織結合試験 血清及び脳組織に対する結合試験は平衡透析法を用いて行った。血清又は20%脳ホモジネートに0.5–10 µg/mlの濃度になるように試験化合物を添加し、15分間、37°Cにてインキュベーションした。そのサンプルを、片側をクリップでとめた透析膜 Spectrum® (Spectrum Laboratories Inc., Rancho Dominguez, CA)に加え、反対側をとめたのち重量を測定した。等張リン酸緩衝液3 ml中で37°C、6時間インキュベーション後再度重量を測定し、血清又は20%脳ホモジネート中及び緩衝液中濃度を求めた。このとき20%ホモジネートで得られた非結合率を100%ホモジネートへ外挿した。

6. 脂溶性 (cLog D_{7.4}), PSA 及び相関係数の算出 cLogD_{7.4}についてはPallas (CompuDrug International, Inc. South San Francisco, CA)を、RBの数及びPSAについてはバイエル社内で構築した物理化学的パラメータ計算システムをそれぞれ用いて算出した。各薬物動態パラメータと物性パラメータの相関係数は、Statistica (stattsoftジャパン株式会社, Tokyo, Japan)を用いて検討した。

結果と考察

膜透過性が物理化学的特性と深く関連していることはよく知られている。そこでまずCaco-2単層膜における薬物の透過性について、MW, clog D_{7.4}, RBの数及びPSAを用いた*in silico*モデルを検討した。LipinskyらによりHBの数が経口吸収性の指標の1つとなることが報告されている。¹⁹⁾ まず

HBの数とstatic PSAの関係について検討したところ良好な相関性が得られたことからstatic PSAを用いることとした。なおstatic PSAがdynamic PSAと1対1の相関を示すことは確認した。³⁾ 多様な化学構造に適応できる相関関係を確立するため、カルシウム拮抗剤(ジヒドロピリジン誘導体)やβ-ブロッカーなどの市販薬を含め25の異なるシリーズの誘導体から77の化合物を選択評価した。Table 1に試験化合物の物性パラメータの平均値及びその最小値と最大値をまとめた。いずれのパラメータについても最小値と最大値の範囲が広く、試験化合物が幅広い物性を有することを示している。また、各パラメータ間での相関性を検討したところ、いずれの組み合わせにおいても相関性は乏しいことから、まず4つのパラメータを用いて膜透過性との重回帰分析を試みた。その結果clog D_{7.4}及びPSAと比較してMWとRBの数の寄与が小さいことから前者を用いて解析しEq. (1)を得た。そのときの実測値と予測値の関係をFig. 1に示した。

$$\text{Log } P_{\text{app}} = -0.0184 \text{ PSA} + 0.0788 \text{ clog } D_{7.4} - 3.97 \quad (1)$$

$$r = 0.850, n = 77$$

最近、PSAが経口吸収性及びCaco-2膜透過性の指標となることが報告されている。^{11,20)} われわれの結果はPSA並びに脂溶性が膜透過性に影響すること、すなわちPSAの減少に加えて脂溶性が高くなることにより膜透過性が亢進することを示している。事実われわれが実施したプロジェクトの中の1つにおいて、PSAが130Å²以下の化合物では

Table 1. Average and Range of Physicochemical Parameters of Compounds Used as Training Set

	Core structure	MW	clog D _{7.4}	Rotatable bond	PSA (Å ²)
Caco-2 permeability	25 ^{a)}	426 (225–727)	1.68 (–2.82–7.10)	6.9 (0–20)	100.1 (26.2–176.0)
BBB permeability	A	321 (269–358)	4.05 (0.11–6.48)	2.7 (1–6)	46.1 (20.4–71.1)
	B	420 (308–526)	4.36 (3.42–5.04)	6.8 (3–11)	82.1 (58.2–128)
	A+B	362 (269–526)	4.18 (0.11–6.48)	4.2 (1–11)	61.0 (20.4–128)
CYP1A2 inhibition	C	310 (295–410)	1.39 (–3.0–4.27)	2.5 (0–6)	86.3 (51.7–109.1)
	D	362 (270–555)	1.15 (–0.28–2.64)	3.2 (2–6)	74.8 (49.3–115.8)

a) 19 different core structures in in-house projects and marketed drugs. The values in the parentheses represent the range of parameters used.

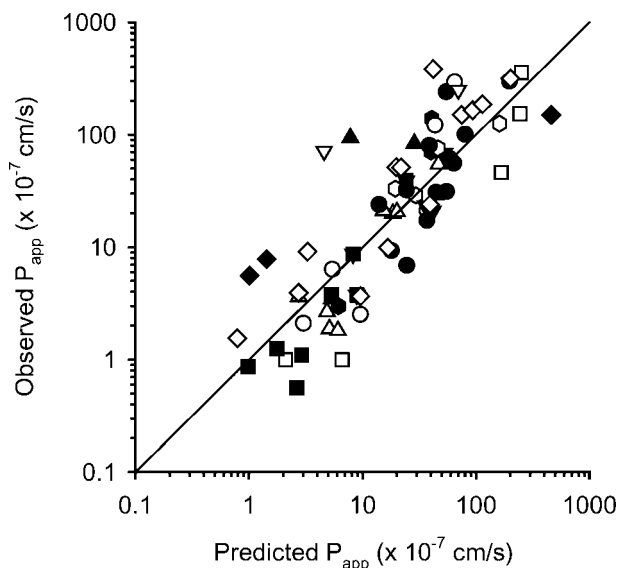


Fig. 1. Relationship between Observed and Predicted Permeability Based on QSAR Analysis

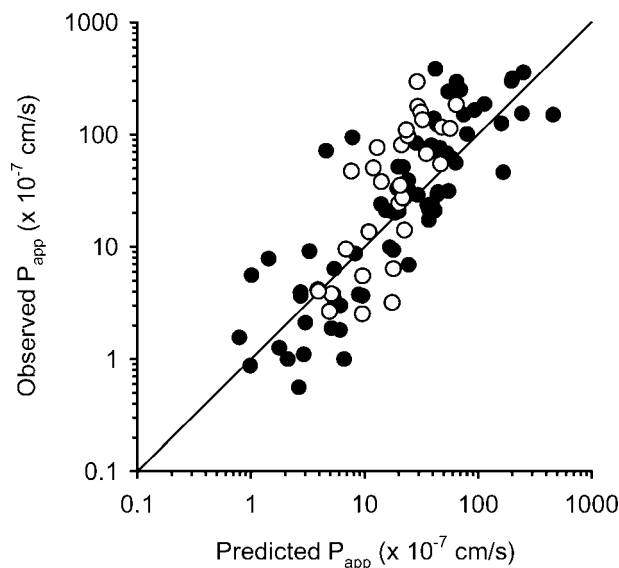


Fig. 2. Comparison of Permeability Observed and Predicted for Data Set

●: training set, ○: data set.

Caco-2 細胞での膜透過係数が脂溶性に依存していた。³⁾ 脂溶性化合物を通常の Caco-2 透過性試験法で評価した場合、apical 側での低い溶解性やフィルターへの吸着のため適切な値が得られないことが知られている。しかしわれわれが今回脂溶性化合物に対して採用した方法では、apical 側及び basolateral 側にそれぞれ 0.1% gelucire 44/14 及び 4% bovine serum albumin を加えていることから溶解性及び吸着性の影響を排除することが可能となり、その結果として膜透過性に対する脂溶性の影響が現れたのかもしれない。この式の有用性を検証するため、相関性の解析に使用した中の 2 つの母骨格及び 3 つの新規母骨格から新たに 30 化合物 (data set) を選択し評価した。Figure 2 に示すように、実測値と予測値はほぼ 1 対 1 の相関曲線の近くにプロットされ、本モデル式が新規誘導体に対しても有用であることが示された。

次に脳移行性に関する *in silico* モデルを検討するため、化合物の脳内濃度と血液中濃度との比 (K_p 値) と物性パラメータとの相関性について検討した。 K_p 値は静脈内投与 10 分後の濃度比から求めた。この濃度比が血液及び脳の AUC 比とほぼ一致することは確認した。なお脳内に残存する血液中の薬物量の補正は行わなかった。まず 2 つの母骨格 (A と B) について 4 つの物理化学的パラメータ間の相関性を検討した。Caco-2 膜透過性の化合物群と異なり、

PSA は RB の数及び MW に対して良好な相関性を示した。これは、Caco-2 膜透過性において多岐に渡る化合物群を用いて検討したのに対し、脳移行性では構造の多様性が限られているためであろう。そこで、 $\log D_{7.4}$ と PSA を用いて K_p 値に対して重回帰分析を実施し、Eq. (2) 及び Fig. 3 を得た。なお、両母骨格が異なった傾向を示すことから、母骨格 A 及び B について、それぞれ indicator I_1 及び I_2 を設定して 1 を代入することにより補正し、1 つの相関式を導いた。

$$\log K_p = -0.0155 \text{ PSA} + 0.241 \log D_{7.4} + 0.243 I_1 + 0.0539 I_2 - 0.635 \quad (2)$$

$$I_1 = 1; \text{ Core structure A}, I_2 = 1; \text{ Core structure B} \\ r = 0.727, n = 29$$

得られた相関係数は 0.73 と比較的低かったものの、PSA の増加に伴い K_p 値は低下し、脂溶性の上昇により K_p 値は高くなる傾向が得られた。脳移行性に対して、blood brain barrier (BBB) 透過性に加えて、脳組織結合性さらに Tanaka と Mizojiri が報告しているように血清タンパク結合性²¹⁾などの複数の因子が影響しているものと考えられる。そこで、母骨格 B について血液及び脳中の非結合型濃度比 ($C_{u, \text{brain}}/C_{u, \text{blood}}$) を用いて検討したところ、濃度比は PSA に対して良好な相関性を示した [Eq. (3) 及び Fig. 4]。

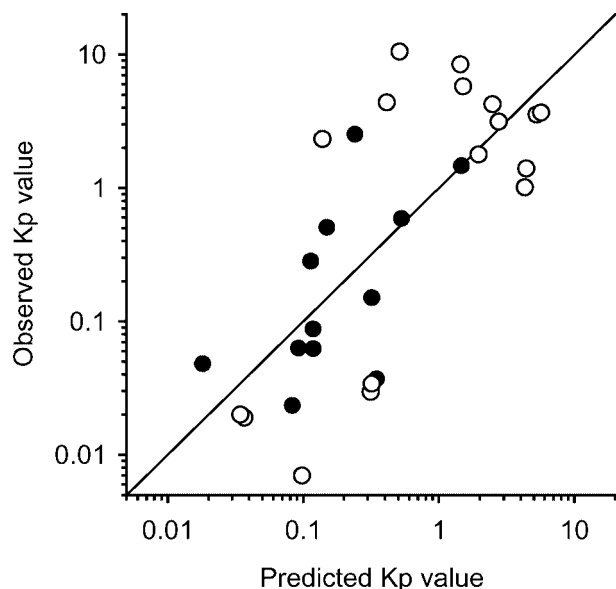


Fig. 3. Relationship between Observed K_p Values and Predicted K_p Values Based on QSAR Analysis
●: core structure A, ○: core structure B.

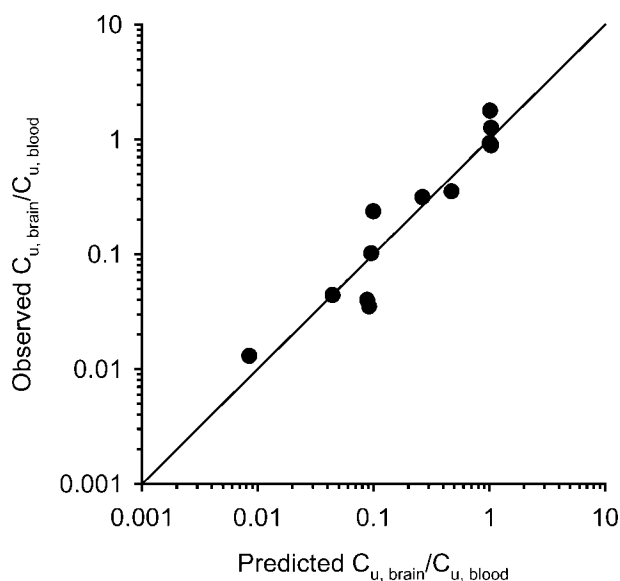


Fig. 4. Relationship between Observed $C_{u, \text{brain}}/C_{u, \text{blood}}$ and Predicted $C_{u, \text{brain}}/C_{u, \text{blood}}$ Based on QSAR Analysis

$$\text{Log}(C_{u, \text{brain}}/C_{u, \text{blood}}) = -0.0299 \text{ PSA} + 1.76 \quad (3)$$

$$r = 0.947, n = 12$$

したがって、非結合型濃度比の予測において PSA が重要なパラメータと考えられ、PSA の低下に伴い濃度比は増大した。Kelder らによっても類似した結果が報告されており、彼らは PSA が $60\text{--}70\text{\AA}^2$ へ減少することにより化合物の脳移行性が改善することを示している。²⁰⁾ われわれの結果におい

ても PSA が 67\AA^2 のときに 0.5 の非結合型濃度比が得られている。

CYP 阻害反応などの薬物相互作用はリード化合物の最適化における重要な項目の 1 つである。Kinase はいくつかの疾患において重要な役割を果たしており、kinase の阻害剤として同定されたりード化合物の多くは少なくともその一部に平面構造を持ち、さらに CYP1A2 に対する阻害作用を有するケースが認められた。これは CYP1A2 の基質が平面構造を取ること²²⁾と関連しているものと考えられる。したがって、構造展開において kinase と CYP1A2 に対する阻害活性を分離する必要があり、*in silico* モデルの確立は構造展開を考える上で極めて重要なツールとなる。われわれは立体的に大きな置換基を導入することにより阻害活性が低くなることに着目し、 $\text{clog } D_{7.4}$ 及び MW に加え PSA や RB の数などのパラメータを用いて CYP1A2 の阻害に対する *in silico* モデルを検討した。その結果、両母骨格 (C 及び D) において MW の寄与が低かったことから、残り 3 つのパラメータを用いて解析を行ったところ比較的良好な相関関係が得られた (Figs. 5 及び 6)。その際算出された Eqs. (4) 及び (5) を以下に示す。なお、母骨格 D において、pyridine 環に置換基が導入された場合と pyridine 環が bicyclic な誘導体に置換された場合では、それぞれ異なった傾向を示した。そこで、これら置換基の影響を補正し 1 つの式として評価するため、各ケースについて indicator I_1 及び I_2 を設定し解析を試みた。なお上記以外のケースについては I_1 及び I_2 に 0 を代入した。

$$\text{Log IC}_{50} = -0.196 \text{ clog } D_{7.4} + 0.234 \text{ RB} + 0.0273 \text{ PSA} - 1.87 \quad (4)$$

$$r = 0.881, n = 23$$

$$\text{Log IC}_{50} = -0.250 \text{ clog } D_{7.4} + 0.330 \text{ RB} - 0.0173 \text{ PSA} + 0.596 I_1 + 1.17 I_2 + 0.962 \quad (5)$$

$$r = 0.809, n = 43$$

$I_1 = 1$; derivatives with a moiety at pyridine ring,

$I_2 = 1$; bicyclic derivatives replaced from pyridine ring,

I_1 and $I_2 = 0$; others

Caco-2 膜透過性及び脳移行性で重要なパラメータであった PSA は両母骨格間で異なった影響を与えた。一方、両母骨格ともに $\text{clog } D_{7.4}$ の上昇は阻

害活性を高めたものの、RBの数の増加は阻害活性を減弱させた。これは脂溶性の上昇により酵素に対する親和性が高くなるため阻害活性が上昇し、フレキシブルな置換基の導入 (RBの数の増加) により構造の平面性が失われ阻害能力が低下したものと

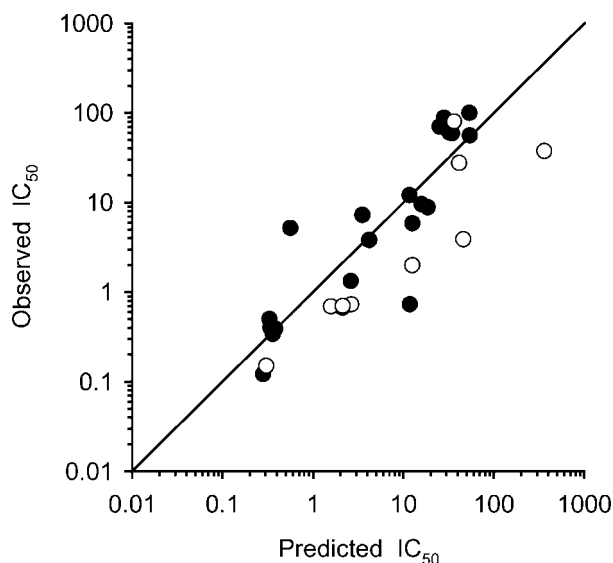


Fig. 5. Relationship between Observed IC_{50} and IC_{50} Predicted from QSAR Analysis for CYP1A2 Inhibition in Project C (Core Structure C)
●: training set, ○: data set.

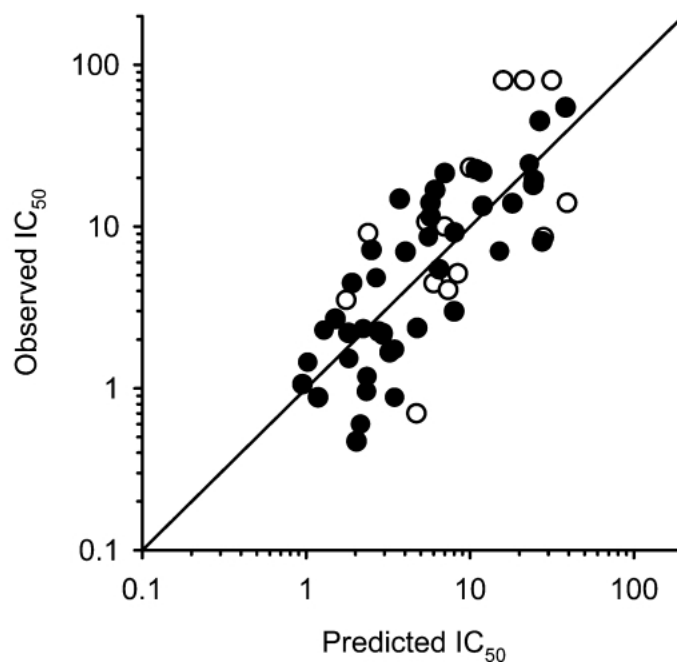
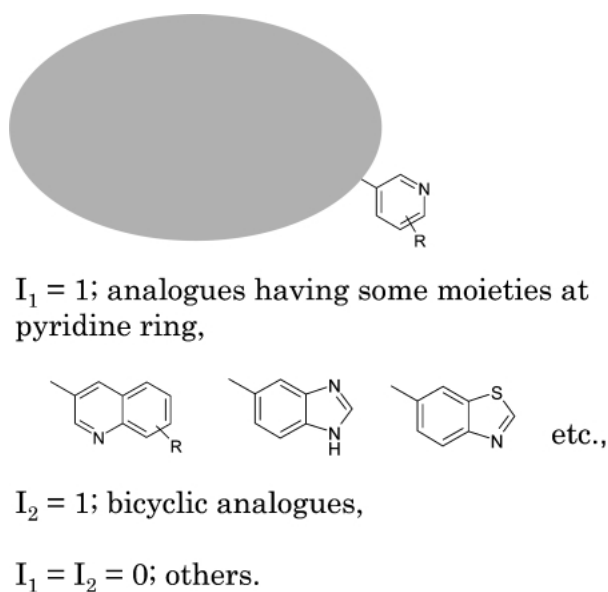


Fig. 6. Relationship between Observed IC_{50} and Predicted IC_{50} from QSAR Analysis for CYP1A2 Inhibition in Project D (Core Structure D)
●: training set, ○: data set.

判断された。そこでこの式の妥当性を検証するため、さらに各母骨格の誘導体 (data set) について予測値と実測値を求め Figs. 5 及び 6 にプロットしたところ、それらの値は 1 対 1 の相関曲線に近かった。このことは本モデルが CYP1A2 の阻害活性の低い誘導体をデザインする上で重要な指標となることを示唆するものである。ただ PSA の寄与が両母骨格間で異なっていたことに関して、その原因は現時点では不明であり、CYP の活性中心と化合物との 3 次元的な相互作用の検討が必要かもしれない。

経口吸収性、脳移行性及び CYP の阻害剤に対するニューラルネットワークや遺伝的アルゴリズムなどを用いた仮想スクリーニング系などが検討されており、ライブラリーを評価することが可能となりつつある。²³⁻²⁷⁾ しかしながら、創薬初期段階において合成の方向性を検討する際、デザインした化合物について煩雑な計算を計算化学の研究者に依頼する必要がある。一方、今回われわれが採用したパラメータは、化学構造情報から比較的簡単に得られるものである。算出された式から膜透過性さらに CYP1A2 に対する阻害を改善するための合成の方向性を、探索動態及び合成研究者のみならずプロジェクトチームに関わっている研究者が具体的にかつ

容易に理解することができる。さらに合成された化合物の実測値と予測値を比較することにより、*in silico* モデルに基づいた合成展開の妥当性を確認することができ、モデルの確立—検証—再構築のサイクルにより精度の高いモデルへ改善できるものと考えられる。最も重要なことは、これらのプロセスを通じて探索動態及び合成研究者が話し合い、お互いの信頼関係を築くことであり、プロジェクトチーム内で目標、戦略及び問題点を共有化し、リードの最適化に効率よく取り組むことが可能となるであろう。

REFERENCES

- 1) Hodgson J., *Nat. Biotechnol.*, **19**, 722–726 (2001).
- 2) Spalding D. J., Harker A. J., Bayliss M. K., *Drug Discov. Today*, **5**, S70–S76 (2000).
- 3) Komura H., Kawahara I., Shigemoto Y., Matsuda K., Ano R., Murayama Y., Moriwaki T., Yoshida N. H., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 121–130 (2005).
- 4) Komura H., Matsuda K., Shigemoto Y., Kawahara I., Ano R., Murayama Y., Moriwaki T., Yoshida N. H., *Yakugaku Zasshi*, **125**, 131–140 (2005).
- 5) Tarbit M. H., Berman J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2**, 411–416 (1998).
- 6) Roberts S. A., *Xenobiotica*, **31**, 557–589 (2001).
- 7) White R. E., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **40**, 133–157 (2000).
- 8) Watt A. P., Morrison I. I., Evans D. C., *Drug Discov. Today*, **5**, 17–24 (2000).
- 9) Darvas F., Keseru G., Papp A., Dormon G., Urge L., Krajcsi P., *Curr. Top. Med. Chem.*, **2**, 1287–1304 (2002).
- 10) Butina D., Segall M. D., Frankcombe K., *Drug Discov. Today*, **7**, S83–S88 (2002).
- 11) Grass G. M., Sinko P. J., *Drug Discov. Today*, **6**, S54–S60 (2001).
- 12) van De Waterbeemd H., Smith D. A., Beaumont K., Walker D. K., *J. Med. Chem.*, **44**, 1313–1333 (2001).
- 13) Tantishaiyakul V., *Pharmazie*, **56**, 407–411 (2001).
- 14) Curatolo W., *Pharm. Sci. Technol. Today*, **1**, 387–393 (1998).
- 15) Veber D. F., Johnson S. R., Cheng H. Y., Smith B. R., Ward K. W., Kopple K. D., *J. Med. Chem.*, **45**, 2615–2623 (2002).
- 16) Feng M. R., *Curr. Drug Metab.*, **3**, 647–657 (2002).
- 17) Clark D. E., *Drug Discov. Today*, **8**, 927–933 (2003).
- 18) Crespi C. L., Miller V. P., Penman B. W., *Anal. Biochem.*, **248**, 188–190 (1997).
- 19) Lipinsky C. A., Lomburdo F., Dominy B. W., Feeney P. J., *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **46**, 3–26 (2001).
- 20) Kelder J., Grootenhuis P. D., Bayada D. M., Delbressine L. P., Ploemen J. P., *Pharm. Res.*, **16**, 1514–1519 (1999).
- 21) Tanaka H., Mizojiri K., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **3**, 912–918 (1999).
- 22) Lewis D. F., Dickins M., *Drug Discov. Today*, **7**, 918–925 (2002).
- 23) Wanchana S., Yamashita F., Hashida M., *Pharm. Res.*, **20**, 1401–1408 (2003).
- 24) Yamashita F., Wanchana S., Hashida M., *J. Pharm. Sci.*, **90**, 2230–2239 (2002).
- 25) Wessel M. D., Jurs P. C., Tolan J. W., Muskal S. M., *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, **38**, 726–735 (1998).
- 26) Doniger S., Hofmann T., Yeh J., *J. Comput. Biol.*, **9**, 849–864 (2002).
- 27) Ekins S., Wrighton S. A., *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, **45**, 65–69 (2001).