

【原著・基礎】

Telithromycin のヒト血清（漿）蛋白および赤血球との結合に関する研究

山崎 浩子¹⁾・Lamy S²⁾・Ducelier C²⁾・Bonnat C²⁾・Lenfant B²⁾¹⁾アベンティスファーマ株式会社研究開発本部開発研究所薬物動態研究室*²⁾Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Aventis Pharma

In vitro における telithromycin (TEL) とヒト血清との蛋白結合率は、11.73 mg/L 以下の TEL 濃度において 60~70% であった。血清蛋白において結合定数は 2 つと推定された。主結合蛋白はアルブミンと α_1 -酸性糖蛋白であることが示唆され、リポ蛋白 (HDL, LDL, VLDL), γ -グロブリンおよび赤血球との結合は弱かった。一方、海外で実施された第 I 相反投与試験で得られた血漿検体を用いて、*in vivo* 蛋白結合率を遠心限外ろ過法にて検討した結果、血漿中 TEL 濃度 0.116~3.175 mg/L に対し、非結合形分率は 37.1~46.5% であり、*in vitro* での結果とほぼ同程度であった。また、海外で行われた特殊集団における検討のうち、健康高齢者および肝障害患者における蛋白結合率は健康成人と同程度であった。

Key words: telithromycin, 蛋白結合, 赤血球

Telithromycin (TEL) は、フランス、アベンティスファーマ社において合成された新規のケトライド系経口抗菌薬である。今回、*in vitro* および *in vivo* におけるヒト血清（漿）蛋白との結合試験を行ったので報告する。

I. 材料と方法

1. 被験物質

試験に使用した ³H-TEL および TEL はフランス、アベンティスファーマ社で合成された (Fig. 1)。³H-TEL の放射化学的純度は 95% 以上であり、比放射能は 1.31~1.46 TBq/mmol であった。非標識体は、純度 96% 以上のものを使用した。

2. 試薬

使用した試薬は、特級試薬を用いた。

放射能測定は、液体シンチレーションカウンター (Tricarb 1500, PACKARD または WALLC 1409) およびシンチレーションカクテル (Dynagel, J. T. BAKER) を用いて行った。

3. 試験方法

1) *In vitro* 結合試験

³H-TEL を用い、ヒト血清蛋白との *in vitro* 結合試験を平衡透析法で、ヒト赤血球との *in vitro* 結合を後述の方法で検討した。

使用した健康成人から得たプールしたヒト血清の蛋白濃度は 75.9 g/L でアルブミン (HSA): 598 μ mol/L, α_1 -酸性糖蛋白 (AAG): 16.9 μ mol/L, 遊離脂肪酸 (FFA): 142 μ mol/L であった。各蛋白分画として、ヒト血清アルブミン (HSA, Sigma A-1887, FFA/HSA (モル比)=0.04): 951 μ mol/L, α_1 -酸性糖蛋白 (AAG, Behring 730102, 純度 98%): 97.4 μ mol/L, リポ蛋白

(VLDL, LDL and HDL, 健康成人のヒト血清より Havel R J, et al.¹⁾の方法により超遠心で分離)、ヒト γ -グロブリン (GG, Sigma, Cohn's fraction II, 純度 99%): 68.9 μ mol/L を使用した。また、ヒト赤血球は健康成人血液より分離し、生理食塩水で 3 回洗浄後、グルコース緩衝食塩水 (GBS; 1/15 mol/L リン酸緩衝液 (pH 7.4) に NaCl: 50 mmol/L, MgCl₂: 1 mmol/L: Glucose: 5 mmol/L を添加) でヘマトクリット値が 0.20 になるように調整して使用した。

³H-TEL を非標識 TEL で希釈し、0.171~124 μ mol/

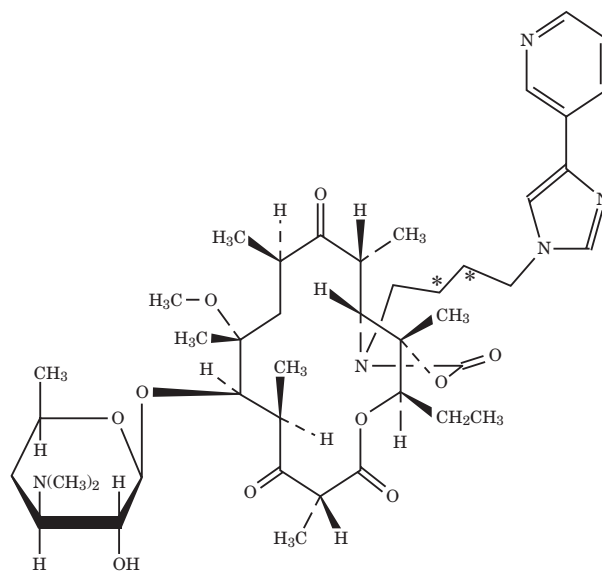


Fig. 1. Chemical structure of ³H-telithromycin.

*The radiolabeled position was indicated as.

Table 1. Binding parameters of telithromycin to human blood components

| Blood components | Percentage binding (%) | | Binding coefficient (NKa) | |
|------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| | maximum ^{a)} | maximum ^{b)} | 1 st site (NKa ₁) | 2 nd site (NKa ₂) |
| Serum | 70.32 ± 2.37 | 40.13 ± 1.73 | 1.79 ± 0.91 | 0.78 ± 0.49 |
| HAS | 49.21 ± 2.37 | 30.26 ± 1.40 | 0.88 ± 0.47 | — |
| AAG | 29.96 ± 3.79 | 11.76 ± 1.12 | 0.37 ± 0.13 | — |
| HDL | 36.39 ± 4.29 | 16.00 ± 2.49 | 0.45 ± 0.36 | — |
| LDL | 30.47 ± 4.72 | 11.46 ± 4.22 | 0.36 ± 0.07 | — |
| VLDL | 23.59 ± 3.65 | 12.04 ± 5.92 | 0.30 ± 0.07 | — |
| GG | 12.81 ± 1.72 | | 0.13 ± 0.01 | — |

^{a)}Percentage binding measured for the lowest concentration (0.068 to 0.112 mg/L) of telithromycin tested

^{b)}Percentage binding measured for the highest concentration (80.46 to 88.56 mg/L) of telithromycin tested

Lの被験液を調製した。平衡透析法は、半透膜 (Spectrapor 2, 排除分子量 12,000~14,000 dalton) を用い、2×0.2 mL のテフロンセル 20 個を装備した Dianorm[®] 装置で 37℃, 定速 (20 rpm) 攪拌下で試験した。平衡になった時点で各セルの ³H-TEL を液体シンチレーションカウンター (Tricarb 460 CD, PACKARD) で測定し、計算は、Urien の MicroPharm[®] ソフトウェア²⁾ を用い、結合率、結合定数および結合サイト数を求めた。

TEL の赤血球内への取り込みあるいは赤血球構成成分との結合は、赤血球—緩衝液系および赤血球—血漿系で 37℃, 30 分間インキュベートした後、37℃, 2,800 ×g で 10 分間遠心分離した。赤血球—緩衝液系の上清分より非結合形の TEL を測定し、赤血球—血漿系では TEL の赤血球結合に対する血漿蛋白の影響を調べた。

2) *In vivo* 結合試験

健康成人、高齢者、肝障害患者に TEL を単回あるいは反復投与した後、経時的に得た血漿を用い、限外ろ過法により蛋白結合率を求めた。

血漿試料 0.5 mL に ³H-TEL を添加し、そのうちの 0.2 mL をウルトラフリー MC 限外ろ過装置 (分画分子量; 30,000 ダルトン) を用い 37℃ で限外ろ過し、遠心分離後試料を得た。薬物濃度は血漿試料 (T) と限外ろ過後の試料 (F) を液体シンチレーション法により測定した。TEL の非結合形分率 (f_u) は次の式にしたがって計算した。

$$f_u (\%) = F/T \times 100$$

また、遊離体の薬物濃度 (C_u) は、別途 HPLC で定量した TEL の総血漿中濃度 (C_p) から次の式にしたがって計算した。

$$C_u = f_u (\%) \times C_p / 100$$

II. 結 果

1. ヒト血清蛋白および赤血球との *in vitro* 結合試験
ヒト血清蛋白との結合試験の結果を Table 1 に示した。ヒト血清蛋白に対する TEL の結合は中程度で、結合率は 1.25 μmol/L (1.02 mg/L) までの濃度では 70~71

Table 2. Binding of telithromycin to human plasma (*in vivo*)

| Subject number/day/time | Concentration (mg/L)* | Free form (%) |
|-------------------------|-----------------------|---------------|
| 34/J 1/1 hour | 1.449 | 41.2 |
| 35/J 1/1 hour | 1.716 | 44.5 |
| 13/J 1/1 hour | 1.936 | 46.4 |
| 15/J 1/1 hour | 1.853 | 38.0 |
| 16/J 1/1 hour | 1.607 | 45.9 |
| 34/J 1/2 hours | 1.727 | 40.0 |
| 35/J 1/2 hours | 1.495 | 46.5 |
| 15/J 1/2 hours | 3.175 | 40.2 |
| 16/J 1/2 hours | 1.358 | 44.4 |
| 15/J 1/3 hours | 2.429 | 37.2 |
| 15/J 1/4 hours | 1.879 | 38.1 |
| 34/J 1/6 hours | 0.631 | 39.5 |
| 35/J 1/6 hours | 0.384 | 42.3 |
| 13/J 1/6 hours | 0.343 | 42.4 |
| 16/J 1/6 hours | 0.678 | 39.8 |
| 34/J 1/8 hours | 0.354 | 39.9 |
| 35/J 1/8 hours | 0.200 | 44.5 |
| 13/J 1/8 hours | 0.149 | 41.2 |
| 15/J 1/8 hours | 0.706 | 37.1 |
| 16/J 1/12 hours | 0.116 | 45.8 |

*The concentration of telithromycin was determined by HPLC.

%, 14.45 μmol/L (11.73 mg/L) までは 61% 以上であったが、それ以降緩やかに減少して 108 μmol/L (87.7 mg/L) で 40% となった。また、2つの結合定数 NKa₁ および NKa₂ が推定され、それぞれ 1.79 および 0.78 であった。ヒトの血清蛋白画分との結合を詳細に検討した結果、検討に用いた TEL の濃度範囲 0.068~88.56 mg/L において、主結合蛋白は、アルブミン (HSA 30.26~49.21%), リポ蛋白 (HDL 16.00~36.39%), α₁-酸性糖蛋白 (AAG 11.76~29.96%), LDL (11.46~30.47

%), VLDL (12.04~23.59%) の順であり, γ -グロブリンとの結合は低かった (GG 12.81%)。また, 各分画における結合数は1つであり, 結合定数は, それぞれ 0.88 (HSA), 0.37 (AAG), 0.45 (HDL), 0.36 (LDL), 0.30 (VLDL) および 0.13 (GG) と HAS との結合がもっとも強かった。

緩衝液中の赤血球に対する TEL の結合は弱く, TEL 1 $\mu\text{mol/L}$ での結合率は約 35% で, 血漿の存在下でも結合の有意な減少はみられなかった。

2. ヒト血漿蛋白との *in vivo* 結合試験

海外で実施された第 I 相反復投与試験で得られた検体を用いて, *in vivo* 血漿蛋白結合率を遠心限外ろ過法にて検討した (Table 2)。血漿中 TEL 濃度 0.116~3.175 mg/L に対し, 非結合形分率は 37.1~46.5% であり, *in vitro* での結果と同様であった。

海外で行われた特殊集団における検討のうち, 健康高齢者と非高齢者における TEL の非結合形分率 (fu) は投与日数および投与後の時間にかかわらず, 約 40% 付近であり両被験者群で非常に近い値であった (Table 3)。

また, 肝障害患者および健康被験者に TEL を単回あるいは 1 日 1 回 7 日間反復投与後の fu を検討した (Tables 4, 5) 結果, 単回および反復投与後において, TEL の T_{max} および投与後 12 時間値 ($T_{12\text{h}}$) における fu は約 20~30% であり, 両被験者群で近い値であった。TEL の遊離体濃度 (Cu) は T_{max} では, 両被験者群でほぼ同じ値であったが, $T_{12\text{h}}$ では肝障害患者で健康被験者よりわずかに高い値を示す傾向がみられた。

III. 考 察

In vitro におけるマウス, ラット, イヌおよびヒトの血清蛋白との結合試験を約 0.1~110 mg/L の濃度範囲の ^3H -TEL を用い平衡透析法にて行った結果を比較したとき, マウスでは, 約 0.1~3 mg/L において他の動物に比べやや高い結合率 (最大値は約 90%) を示した³⁾ が, ヒトでは, 約 0.1~12 mg/L の濃度範囲で 61~70% であった。すべての動物種において, 高濃度で結合の飽和がみられた。また, ヒトにおいて結合パラメータの解析から結合サイトは 2 つ存在することが示され, 主結合蛋白はアルブミンと α_1 -酸性糖蛋白であることが示

Table 3. Mean unbound fraction (fu) and mean unbound concentration (Cu) of telithromycin in young and elderly subjects at T_{max} and $T_{12\text{h}}$

| Subject | Day | T_{max} | | $T_{12\text{h}}$ | |
|-----------------------|-------|------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| | | fu (%) | Cu (mg/L) | fu (%) | Cu (mg/L) |
| Young ^{a)} | 1 st | 40.93 \pm 0.89 | 0.803 \pm 0.090 | 39.95 \pm 0.78 | 0.0357 \pm 0.0032 |
| | 10 th | 42.16 \pm 0.88 | 0.78 \pm 0.15 | 42.16 \pm 0.77 | 0.0563 \pm 0.0046 |
| Elderly ^{b)} | 1 st | 39.5 \pm 1.4 | 1.17 \pm 0.12 | 40.00 \pm 0.95 | 0.071 \pm 0.012 |
| | 10 th | 41.23 \pm 0.86 | 1.47 \pm 0.15 | 40.3 \pm 1.1 | 0.137 \pm 0.018 |

^{a)} (mean \pm sem, n = 12)

^{b)} (mean \pm sem, n = 14)

Table 4. Mean unbound fraction (fu) and mean unbound concentration (Cu) of telithromycin in plasma samples after administration of a single oral dose of 800 mg in healthy volunteers and patients with hepatic impairment

| Subject | T_{max} | | $T_{12\text{h}}$ | |
|---------|------------------|-------------------|------------------|---------------------|
| | fu (%) | Cu (mg/L) | fu (%) | Cu (mg/L) |
| Healthy | 30.1 \pm 1.1 | 0.701 \pm 0.098 | 28.37 \pm 0.65 | 0.0394 \pm 0.0049 |
| Patient | 34.7 \pm 2.3 | 0.70 \pm 0.13 | 31.9 \pm 2.9 | 0.072 \pm 0.011 |

mean \pm sem, n = 12

Table 5. Mean unbound fraction (fu) and mean unbound concentration (Cu) of telithromycin in plasma samples after multiple oral administration of 800 mg once a day for 7 days to healthy volunteers and patients with hepatic impairment

| Subject | Day | T_{max} | | $T_{12\text{h}}$ | |
|---------|-------|------------------|-------------------|------------------------------|-----------------------------------|
| | | fu (%) | Cu (mg/L) | fu (%) | Cu (mg/L) |
| Healthy | 1 st | 21.3 \pm 1.0 | 0.367 \pm 0.034 | 20.4 \pm 1.4 | 0.0382 \pm 0.0061 |
| | 10 th | 21.4 \pm 1.2 | 0.404 \pm 0.036 | 19.6 \pm 1.2 ^{a)} | 0.0700 \pm 0.0080 ^{a)} |
| Patient | 1 st | 24.0 \pm 1.5 | 0.370 \pm 0.044 | 22.4 \pm 1.6 ^{a)} | 0.0489 \pm 0.0087 ^{a)} |
| | 7 th | 24.1 \pm 1.9 | 0.428 \pm 0.039 | 24.8 \pm 1.9 | 0.086 \pm 0.011 |

^{a)} n = 12 (insufficient plasma volume)

mean \pm sem, n = 13

峻された。ヒトの血清蛋白分画との結合を詳細に検討した結果、アルブミンの結合定数が0.88でもっとも強く、 α_1 -酸性糖蛋白およびリポ蛋白の結合定数は0.5以下で弱かった。アルブミンに対する結合率は、8.98 mg/Lまで42%以上であり、 α_1 -酸性糖蛋白に対しては0.07 mg/Lで30%、濃度の上昇にしたがい徐々に減少した。その他の蛋白、リポ蛋白および γ -グロブリンの結合特性から、TELの血清に対する結合においてわずかな役割しかないものと考えられる。緩衝液中の赤血球に対するTELの結合は弱く、TEL 1 μ mol/Lでの結合率は約35%で、血漿中においても結合は有意な減少を示さなかった。

健康成人にTELを投与したとき、投与後の時間にかかわらず、非結合形分率はほぼ一定の値を示した。このことは、TEL投与後、その多くが未変化体として血漿中に多く存在し、代謝物の割合が小さい⁴⁾ことに起因すると考えられる。また、健康高齢者および肝障害患者にTELを投与したとき、 T_{max} と投与後12時間における非

結合形分率は健康成人の値と同程度であった。

以上 *in vitro* および *in vivo* の結果から、TELの血清(漿)蛋白結合率は約55~70%と見積もられ、被験者の年齢、投与回数、投与時間、肝障害の有無による非結合形分率の変動はほとんどないと推察される。

文 献

- 1) Havel R J, Eder H A, Bragdon J M: The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J. Clin. Invest.* 34: 1345~1354, 1955
- 2) Urien S: MicroPharm, a software designed to analyse pharmacological data from kinetic, binding and tissue extraction experiments. *Bull. Cancer* 78: 654, 1991
- 3) 山崎浩子, Roeder V, Vicat P, et al.: Telithromycinのマウス, ラットおよびイヌにおける薬物動態学的研究. *日化療会誌* 51 (S-1): 182~199, 2003
- 4) 保田国伸, 石原浪砂, 鈴木比紅江, 他: Telithromycinの第I相臨床試験—単回投与および反復経口投与—. *日化療会誌* 51 (S-1): 210~223, 2003

Study of binding of telithromycin to human serum proteins

Hiroko Yamazaki¹⁾, Lamy S²⁾, Ducelie C²⁾,
Bonnat C²⁾ and Lenfant B²⁾

¹⁾Drug Metabolism & Pharmacokinetics, Lead Optimization, Drug Innovation & Approval Division, Aventis Pharma Ltd., 1-3-2, Minamidai, Kawagoe, Saitama, Japan

²⁾Department of Drug Metabolism and Pharmacokinetics, Aventis Pharma

In vitro human serum protein binding studies, telithromycin (TEL) was moderately bound to serum proteins. The percentage binding was 60~70% around C_{max} . Two binding coefficient (Nka) were estimated in all of tested serum, and these evidences suggest that albumin and α_1 -acid glycoprotein could be the main protein responsible for the binding of TEL. Binding of TEL to lipoprotein (HDL, LDL and VLDL), γ -globulin and isolated erythrocytes were weak. The samples from an overseas phase I repeated dose study were examined for the *in vivo* protein binding rate by a centrifugal ultrafiltration method. The rate of free form of TEL ranged from 37.1% to 46.5% at the plasma concentrations of TEL ranging from 0.116 to 3.175 mg/L, the results were similar to those obtained *in vitro*. Among the overseas studies conducted in special populations, additionally, the protein binding rates in the elderly and the patients with hepatic disorder were similar to those obtained in healthy adults.