약학회지 제 58 권 제 4 호 255~261 (2014)
Yakhak Hoeji Vol. 58, No. 4

藥學會誌

HepaRG 세포를 이용한 Bosentan 약물의 CYP450 효소활성 측정

한경문# · 정정아 · 신지순 · 차혜진 · 배영지 · 김현욱 · 김영훈 · 성원근 · 강호일
식품의약품안전평가원 약리연구과
(Received July 11, 2014; Revised July 30, 2014; Accepted August 4, 2014)

Measurement of CYP450 Enzymes Activity of Bosentan in HepaRG Cell

Kyoung-moon Han#, Jung-A Jung, Ji-soon Sin, Hye-jin Cha, Hyun-uk Kim, Young-ji Bae, Young-hoon Kim, Won-keun Seong and Hoil Kang
Pharmacological Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea

Abstract — Poly-pharmacy has been on the rise because of aging of population and chronic disease. Most of drug metabolism happens in the liver by CYP isozymes and the metabolism by CYP450 enzymes. The Cytochrome P450 (CYP) is a superfamily of enzymes that catalyzes the oxidations of many endogenous and exogenous compounds. Primary human Hepatocytes (HH) are considered as the gold standard model for *In vitro* drug interaction studies. However, there are several limitations (cost, limited life span) for using HH cells. HepaRG cells are being used as a possible alternative. HepaRG cells were cultured in William E medium containing the positive control inducers (1A2: 10, 25, 50 μM omeprazole, 2C9 and 2C19: 10 μM rifampin, 3A4: 10, 25, 50 μM rifampin) at 37°C, 5 % CO_2 in a humidified atmosphere. This study was to evaluate the induction of CYP isozymes (1A2, 2C9, 2C19 and 3A4) using LC-MS/MS. We evaluated the potential induction ability of Bosentan, as a drug of pulmonary artery hypertension, in HepaRG cells. For reference, dose of the Bosentan is determined to the basis of the C_{max} (835 mg/m*l*) value. The enzyme activity demonstrated that CYP2C9 and 3A4 were induced up to 20 times by Bosentan. Like as *In vivo*, the enzyme activity of CYP2C9 and CYP3A4 is significantly induced in a dose-dependent by Bosentan.

Keywords □ CYP450, HepaRG, LC-MS/MS, Bosentan

약물상호작용(Drug interaction)은 두 개 이상의 약물을 동시에 복용하면서 발생하는 결과로써, 하나의 약물에서 발생되는 약리효과가 증가하거나, 감소되는 결과를 초래하며, 안전한 약물투여를 위해서는 반드시 약물상호작용의 발생 위험도에 대해서 사전에 고려하여 약물요법을 실시해야 한다. 약물상호작용은 고령환자 또는 여러 가지 질환을 가진 환자와 같은 경우에, 질병의 치료를 위해서 복용하는 약물의 수가 증가할수록 발생할 위험이 커진다. 현대사회에는 의료기술의 발달로 인하여 각종 약물요법에 의해서 만성질환을 관리하여 생명을 연장하고 있기 때문에 한 환자가 사용하는 약물의 수가 증가하고 있어 약물상호작용 발생 가능성이 크다.[1-3)]

체내에서 약물의 대사는 일부 약물의 경우, 혈장, 폐, 장관에서 일어나기도 하지만 대부분의 약물은 간에서 주로 일어나며, 간에서의 약물대사는 크게 제I상 반응(Phase I reaction)과 제II상 반응(Phase II reaction)으로 나누어진다. 약물의 대사에 관여하는 인자 중에 CYP450 효소는 제I상 반응의 약 70~80%를 담당하여 다수의 내인성 및 외인성 약물의 대사과정에 관여하지만, 종 간, 개인 간의 약물의 흡수 · 대사 · 분포 · 배설 과정에 관련한 유전자의 다양성으로 인하여 약물의 동태학적 및 역학적 기전의 차이가 큰 것으로 알려져 있다.[4,5)]

최근까지 체내에 존재하는 CYP450 isozymes의 기능 규명에 관한 연구가 많이 진행되었으며, 이중의 대다수는 약물을 포함하는 생체이물과 스테로이드 또는 프로스타글란딘과 같은 내인성 물질의 대사에 관여하는 것으로 알려져 있다. 약물대사 관련 연구가 발전함에 따라, 이상반응을 유발하고 각 개인 간의 약물

#**Corresponding Author**
Kyoung-moon Han
Pharmacological Research Division, National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Ministry of Food and Drug Safety, Chungcheongbuk-do 363-700, Korea
Tel.: 043-719-5206 Fax.: 043-719-5200
E-mail: lovelyhkm@korea.kr

반응의 차이가 약물대사과정의 제I상 반응의 대부분을 차지하는 약물대사효소의 유전적 발현의 다형성에 기인함을 알게 되었다. 따라서 CYP450 효소의 유전적 다형성을 이해하는 것은 약물개발 과정에서의 약물평가에 기초가 된다고 할 수 있기에 신약개발 과정에서 초기 약물상호작용 연구를 진행할 때에는 어떤 CYP450 효소의 약물상호작용을 주로 평가할 것인가에 관한 결정이 매우 중요하다. 미국 FDA에서는 초기 약물상호작용 관련하여 CYP450 효소의 약물대사에 관여하는 중요도에 따라 최소 CYP1A2와 CYP3A4가 포함되도록 권고하고 있다.[6-10]

국제적으로 CYP450 효소에 의한 약물대사평가연구에 통용되는 연구방법은 각각의 CYP450 효소의 활성을 측정하는 방법이 널리 이용되고 있다. 효소활성측정법은 유도작용을 하거나 억제작용을 할 수 있는 약물로 처리된 세포로부터 주요 CYP450 효소에 특이적으로 반응하는 기질로 작용하는 약물을 처리하여 대사효소의 대사체를 정량하는 방법이다. LC-MS/MS을 이용하여 극미량의 대사체를 선택적으로 정량할 수 있기에, 이를 이용한 대사효소활성측정법이 널리 연구되고 이용되고 있다. 관상동맥질환치료제 및 고지혈증 치료제로 사용되는 아토르바스타틴(Atorvastatin), 프라바스타틴(Pravastatin), 심바스타틴(Simvastatin) 경우 사람일차간세포에서 LC-MS/MS를 이용해 enzyme activity를 측정한 결과 아토르바스타틴과 심바스타틴은 약물대사효소인 CYP1A2(substrate : Phenacetin, metabolite : Acetaminophen 152 → 110 m/z), CYP2B6(substrate : Bupropion, metabolite : HydroxyBupropion 256 → 238 m/z), CYP2C19 (substrate : S-Mephenytoin, metabolite : 4-Hydroxymephenytoin 235 → 150 m/z), CYP3A4는(substrate : Atorvastatin, metabolite : o-Hydroxyatorvastatin 575 → 440 m/z) 기질처리하여 얻은 약물대사체를 미량분석한 결과 FDA가이던스 기준인 fold induction이 2배 이상으로 결과가 측정되어 약물에 대한 대사효소의 유도능을 확인할 수 있었고, 프라바스타틴의 경우 fold induction이 2배 이하의 결과를 나타내어 약물에 대한 대사효소(CYP1A2, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4)의 유도능이 미미한한 것으로 평가되었다.

이번 실험은 시험관계 약물대사연구에서 사람일차간세포와 거의 동등한 수준의 활성을 나타내는 분화된 Human Hepatocellular carcinoma cell line인 HepaRG 세포주를 이용하여 시험약물의 약물대사 관련 유전자 및 단백질의 기초발현 수준을 평가하고, LC-MS/MS를 이용한 질량분석 방법으로 약물대사효소의 활성을 측정하였다. HepaRG 세포는 사람일차간세포와 비교하였을 때, 간 기능과 간 특이적 유전자의 발현 수준이 비슷하게 유지되고 있는 것으로 보고되고 있다.[11-16] 따라서 사람일차간세포와 유사하면서 가격이 저렴하고, 세포의 생명주기가 긴 HepaRG 세포를 이용하여 대사효소 활성 시험법을 확립하고, *In vitro*에서 약물상호작용 평가로 신약개발의 기간 단축 및 조기 약물상호작용 평가로 인하여 국내 의약산업 발전에 기여하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기

세포배양에 필요한 세포주(HepaRG), William's E Medium, no Phenol Red, GlutaMAX™, HepaRG™ Serum-free Induction Medium supplement, 5X, HepaRG™ General Purpose Medium supplement, 5X, Collagen, Coated Plate 24 well은 Gibco(Grand Island, USA)에서 구입하여 사용하였다. 유도약물인 Omeprazole, Rifampin은 Sigma-Aldrich(Louis. MO, USA)에서 Bosentan monohydrate은 ZACH에서 구입하여 사용하였고 기질인 Phenacetin, Tolbutamide는 Sigma-Aldrich(Louis. MO, USA)로부터 Testosterone과 Midazolam은 각각 ACROS (New Jersey, USA), BD(Becton, USA)에서 구입하였다. 또한 효소활성측정에 필요한 단백질 농도 측정은 SMART BCA protein assay kit(INTRON, 한국)를 이용하였다. 검량선 작성을 위한 표준물질인 S-Mephenytoin, 1-Hydroxymidazolam은 BD(Becton, USA)에 4-Acetamidopheonol, Diphenhydramide hydrochloride, 4-Hydroxytolbutamide은 Sigma-Aldrich(Louis. MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. LC-MS 분석에 필요한 용매 제조를 위한 Methanol, Acetonitrile, Formic acid는 Sigma-Aldrich(Louis. MO, USA)에서 구입하였다. 대사체 분석은 LC-MS/MS(Agilent 1260 Infinity LC system coupled triple quad 6460, Santa clara, USA)과 Accuity® BEH C18 column(2.1×100 mm, 1.7 μm, Agilent, Santa clara, USA)를 사용하였고, Quantitative analysis softeware(version B.06.00, Agilent, USA)를 사용하여 데이터를 분석하였다.

세포주 배양 및 약물처리

HepaRG 세포 배양은 General purpose supplement가 포함된 William's medium E 배지를 사용하고, 약물 유도시에는 Serum Free supplement가 포함된 William's medium E 배지를 사용한다. HepaRG 세포를 6×10^5의 세포수를 collagen-coated 24 well plate에 넣고 배양 24시간 후, 효소유도 약물을 48시간 동안 처리하였으며, 24시간마다 배지를 교환하였다. 48시간 후, 배지를 제거하고 500 μl의 PBS를 이용하여 세척한 뒤, 200 μl의 trypsin-EDTA를 각 well에 넣어 반응시켜 세포를 분리해낸다.

유도약물로 선정한 rifampin과 omeprazole은 DMSO를 이용하여 각 50 mM, 10 mM의 stock solution을 만들어 약물처리 전 배지에 희석하여 사용하였다.

효소활성 측정

약물처리 48시간 처리 후 배지를 제거하고 500 μl의 PBS를

Table I – Inducer and Substrate reaction mixture preparations

CYP isozyme	Substrate	Concentration	Incubation time	Induction	
				Inducer	Concentration
1A2	Phenacetin	100 μM	60 min	Omeprazole	25, 50, 100 μM
2C9	Tolbutamide	100 μM	120 min	Rifampin	10 μM
2C19	S-mephenytoin	200 μM	120 min		
3A4	Testosterone	200 μM	30 min		10, 25, 50 μM
	Midazolam	10 μM	30 min		

Table II – Ion transition of metabolite

CYP isozyme	Metabolite	Precursor ion	Product ion	Ionization mode	Fragmentor	Collision energy
1A2	4-acetamidophenol	151.94	109.94	ESI+	90	14
2C9	4-hydroxytolbutamide	287.05	170.93		91	26
2C19	4'-hydroxymephenytoin	235.03	150.00		102	14
3A4	6β-hydroxytestosteron	305.04	287.07		127	10
	1'-hydroxymidazolam	342.25	203.15		145	27
Internal standard	Diphenhydramine	256.06	166.96		80	6

이용하여 남아있는 배지를 세척한다. 그 후 각 CYP isoform에 해당하는 기질을 포함하는 배지를 각 well당 200 μl 넣어준 뒤 각각의 배양조건에 맞춰 이산화탄소 배양기에서 배양한다(Table I).

반응액(배지) 150 μl, stop solution(ACN+0.1% FA) 37.5 μl과 IS(Internal Standard, Diphenhydramine 50 ng/ml) 7.8 μl를 넣고 30초간 vortexing을 통해 섞어준 다음 12,000 rpm, 4°C, 5분간 원심분리한다. 상층액을 취해 LC-MS/MS로 분석한다. LC-MS/MS를 이용해 효소활성 측정을 위하여, CYP3A4의 기질인 testosterone 처리 후 얻은 대사체인 6-β-hydroxytestosterone은 305.04 m/z에서 transition되는 287.07 m/z로, 다른 CYP3A4의 기질인 midazolam을 처리 후 얻은 대사체인 1'-hydroxymidazolam은 342.24 m/z에서 transition되는 203.15 m/z로, CYP2C9의 기질인 tolbutamide의 처리 후 대사체인 4-hydroxytolbutamide는 287.05 m/z에서 transition되는 170.93 m/z로, CYP2C19의 기질인 S-mephenytoin의 대사체인 4'-hydroxymephenytoin은 235.03 m/z에서 transition되는 150.00 m/z로, CYP1A2의 기질인 phenacetin의 대사체인 4-acetamidophenol은 151.94 m/z에서 transition되는 109.94 m/z로 조건을 잡아, Xevo® TQ MS의 operating software인 MassLynx® manual tuning을 이용하여 MRM(multiple reaction monitoring)모드를 사용하였고(Table II), 자동 tuning 옵션인 Intellistart®를 이용하여 설정한 조건이

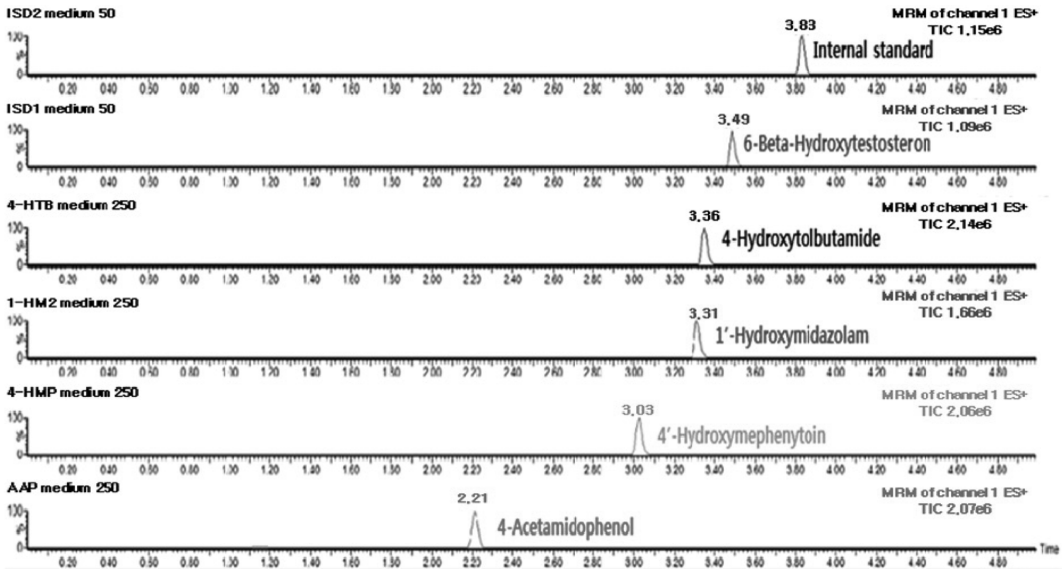

Fig. 1 – CYP isozyme metabolites of LC-MS/MS spectrum.

분석조건인 것을 확인한 후 분석을 진행하였다(Fig. 1).[17,18]

반응액을 취하고 남은 세포는 500 μl의 PBS를 이용하여 세척한 뒤, trypsin-EDTA를 사용하여 세포를 분리한 후, 분리해낸 세포를 12,000 rpm, 5분간 원심분리하여 얻은 세포 침전물에 100 μl의 pro-prep protein extraction solution을 첨가한 뒤 4°C에서 10분간 반응시킨 후 12,000 rpm, 4°C, 5분간 원심분리한다. 상층액을 취하여 SMART BCA kit를 이용하여 단백질을 정량하여 대사효소 활성도 측정값을 보정한다.

$$\text{CYP450 enzyme activity} = \frac{\text{Calculated Con } \mu\text{M} \times \text{Incubation volume } (\mu l)}{\text{mg protein/well} \times \text{Incubation time (min)}}$$

결과 및 고찰

표준유도약물의 LC-MS/MS를 이용한 Cytochrome P450 대사효소 분석법 확립

HepaRG 세포에 1A2 표준 유도약물인 omeprazole과 2C9, 2C19, 3A4 표준 유도약물인 rifampin을 권장농도로 48시간 처리하여 각 CYP450 효소군에 해당하는 대사체를 분석하였다.[4]

CYP1A2 효소군에 대해서는 omeprazole 50 μM 처리하였을 경우 9.6배로 가장 높은 유도능이 나타났고, CYP2C9는 10 μM에서 17배 증가하는 것으로 나타났다. 또 CYP2C19는 rifampin에 의해 fold induction이 4배 증가하였다. CYP3A4는 표준유도

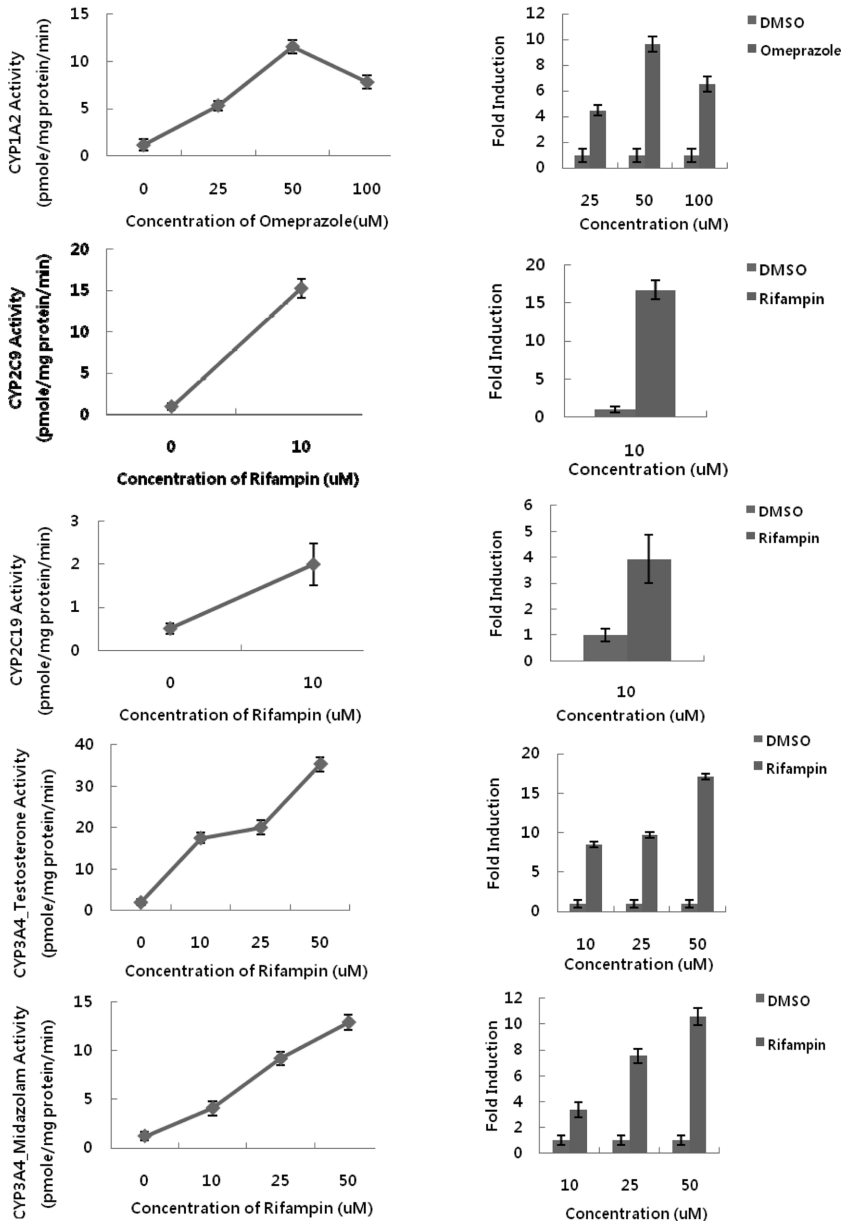

Fig. 2 – Cytochrome P450 enzyme activity in HepaRG cell for 48 hours induction.

약물인rifampin에 의해 농도의존적인 유도능을 보이고 있다(Fig. 2). FDA Guidance에 따르면 처리약물에 대한 특정 약물대사 효소가 2배 이상 증가하면 유도능이 있다고 기술하고 있다.[4)]

시험약물(Bosentan)의 LC-MS/MS를 이용한 Cytochrome P450 대사효소 분석

Cytochrome P450의 동질효소인 CYP2C9와 CYP3A4를 유도하나, *In vitro* 실험에 약물상호작용이 잘 알려지지 않은 약물인 Bosentan(폐동맥성 고혈압치료제)을 시험약물로 선정하였다. 선정된 약물의 세포에 대한 처리농도는 FDA guidance에서 권고한 내용에 따르면, 시험약물을 3가지 농도로 처리하며 적어도 한가지 농도는 평균 혈중 약물농도보다 많은 농도를 포함하도록 명시되어있다. 따라서, 본 연구에서도 시험약물의 최고혈중농도(C_{max})를 문헌조사를 통해 835 ng/ml임을 확인하고, 최고혈중농도의 1/10, 1, 10배를 시험약물 처리농도로 설정하였다.[19)] 선행연구를 통해 설정한 시험방법을 바탕으로 HepaRG 세포를 이용하여 진행하였다. Cell을 seeding하여 안정화된 HepaRG 세포에 시험약물을 83.5 ng/ml 835 ng/ml 8,350 ng/ml 농도로 48시간 처

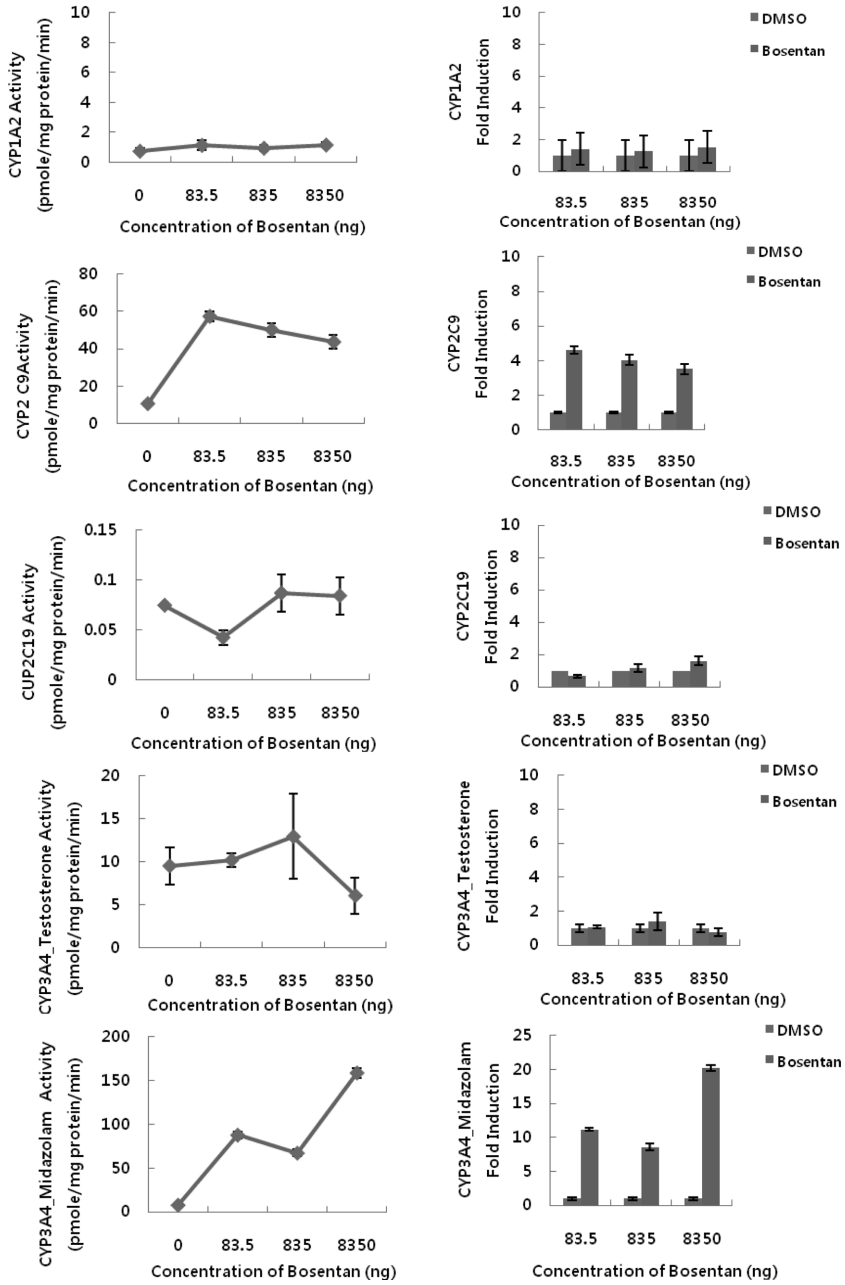

Fig. 3 – Cytochrome P450 enzyme activity treated Bosentan in HepaRG cell for 48 hours.

리하였으며, 24시간마다 약물 포함 배지를 교환하였다.

효소활성도를 측정한 결과, 모든 CYP450 효소군의 대사체의 검출이 가능하였다(Fig. 3). CYP2C9의 경우, 약물처리농도에 상관없이 비슷한 대조군 대비 약 4배의 유도능을 나타내었다. CYP3A4는 기질을 midazolam으로 처리하였을 때, 농도의존적으로 증가하는 양상을 보였다.

결 론

과학기술이 발달함에 따라, 이상반응을 유발하고 각 개인 간의 약물반응의 차이가 약물대사 과정의 제I상 반응의 대부분을 차지하는 약물대사효소의 유전적 발현의 다형성에 기인함을 확인하였으며, 따라서 CYP450 효소의 유전적 다형성을 이해하는 것은 약물개발 과정에서의 약물평가에 기초가 된다고 할 수 있다.[6] 또한 신약개발 과정에서 초기 약물상호작용 연구를 진행할 때에는 어떤 CYP450 효소의 약물상호작용을 주로 평가할 것인가에 관한 결정이 매우 중요하다. 미국 FDA guidance에서는 초기 약물상호작용 연구에서는 CYP450 효소의 약물대사에 관여하는 중요도에 따라 최소 CYP1A2와 CYP3A4가 포함되도록 권고하고 있다. LC-MS/MS를 이용한 enzyme activity 측정법은 *In vitro*에서 약물대사의 유도능을 확인하는 방법으로 현재 사용되고 있다.[4]

따라서 본 연구에서는 시험관계 약물대사 연구에서 많이 사용되는 사람일차간세포와 거의 동등한 수준의 활성을 나타내는 분화된 Human Hepatocellular carcinoma cell line인 HepaRG 세포주를 이용하여 CYP1A2와 CYP3A4 뿐 아니라 CYP2C9와 CYP2C19를 추가로 확인하였다. 또한, Bosentan에 의한 약물대사효소의 유도능을 확립하고자 하였다.

HepaRG 세포에 표준 유도약물인 omeprazole과 rifampin을 48시간 처리하고, LC-MS/MS를 이용하여 선정한 4종(CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP3A4)의 효소군에서 대사체의 유도능을 분석하였다. 그 결과, CYP1A2 효소군은 표준유도약물을 처리하였을 때, 9배 이상의 유도능을 나타내었다. 그리고 CYP2C9/19 2가지 CYP450 효소능에 대해서는 rifampin 10 μM을 48시간 약물을 처리하였을 때, 각 17배, 4배의 유도능을 나타내었으며, CYP3A4의 효소군에서는 약물 농도에 의존적으로 유도되는 양상을 나타내며, 모두 3배 이상의 효소능을 나타내었다.

HepaRG 세포를 이용하여, 폐동맥성 고혈압치료제로서, 약물상호작용이 알려지지 않은 Bosentan의 약물유도를 평가한 결과, Bosentan은 Cytochrome P450의 동질효소인 CYP2C9와 CYP3A4의 유도작용을 나타냄을 확인한 약물이다.[19]

LC-MS/MS를 이용한 효소활성도를 측정한 결과, 모든 CYP450 효소군의 대사체의 검출이 가능하였으나, 기존 문헌조사를 통해 알려진 바와 같이 CYP2C9와 CYP3A4를 유의적으로 유도함을 확인하였다. CYP2C9의 경우, 약물처리농도에 상관없이 비슷한 대조군 대비 약 4배의 유도능을 나타냈으며, CYP3A4는 기질을 midazolam으로 처리하였을 때, 농도의존적으로 증가하는 양상을 띄었다. 하지만 testosterone에 의해서는 증가하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 문헌에 따르면 기질에 따라 enzyme activity에 영향을 미칠 수 있다고 보고되고 있다.[20,21] 본 실험에서도 기질에 따라 enzyme activity의 다른 양상을 확인하였다. 따라서 본 문헌에서는 *In vitro* 실험에서 Bosentan에 의해 CYP2C9와 CYP3A4가 *In vivo* 실험에서와 같이 효소 활성도가 증가하는 것을 확인하였다.

감사의 말씀

본 연구는 2012년 식품의약품안전처 자체연구사업의 연구비(12181의안유659)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

1) Brandon, E. F., Raap, C. D., Meijerman, I., Beijnen, J. H. and Schellens, J. H. : An update on *in vitro* test methods in human hepatic drug biotransformation research: pros and cons. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **189**, 233 (2003).
2) McGinnity, D. F., Zhang, G., Kenny, J. R., Hamilton, G. A., Otmani, S., Stams, K. R., Haney, S., Brassil, P., Stresser, D. M. and Riley, R. J. : Evaluation of multiple *in vitro* systems for assessment of CYP3A4 induction in drug discovery: Human hepatocytes, pregnane X receptor reporter gene, and Fa2N-4 and HepaRG cells. *Drug. Metab. Dispos.* **37**, 1259 (2009).
3) Fahmi, O. A. and Ripp, S. L. : Evaluation of models for prediction drug-drug interactions due to induction. *Expert. Opin. Drug. Metab. Toxicol.* **6**, 1399 (2010).
4) Drug Interaction Studies - Study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations, guidance for industry, FDA, Silver Spring, 2-75 (2012).
5) Yuan, R., Madani, S., Wei, X. X., Reynolds, K. and Huang, S. M. : Evaluation of cytochrome P450 probe substrates commonly used by the pharmaceutical industry to study *in vitro* drug interactions. *Drug. Metab. Dispos.* **30**, 1311 (2002).
6) Balimane, P. V., Han, Y. H. and Chong, S. : Current industrial practices in assessing CYP450 enzyme induction: Preclinical and clinical. *AAPS J.* **10**, 391 (2008).
7) Hewitt, N. J., Lecluyse, E. L. and Ferguson, S. S. : Induction of hepatic cytochrome P450 enzymes: Methods, mechanisms, recommendations, and *in vitro-in vivo* correlations. *Xenobiotica.* **37**, 1196 (2007).
8) Rodriguez-Antona, C., Donato, M. T., Boobis, A., Edwards, R. J., Watts, P. S., Castell, J. V. and Gomez-Lechon, M. J. :

Cytochrome P450 expression in human hepatocytes and hepatoma cell lines: molecular mechanism that determine lower expression in cultured cells. *Xenobiotica.* **32**, 505 (2002).

9) Zhang, L., Zhang Y., Zhao, P. and Huang, S. M. : Prediction drug-drug interactions: An FDA perspective. *AAPS J.* **11**, 2 (2009).

10) Guideline on the investigation of drug interactions, European Medicines Agency, 4-38 (2010).

11) Antherieu, S., Chesne, C., Li, R., Camus, S., Lahoz, A., Picazo, L., Turpeinen, M., Tolonen, A., Uusitalo, J., Guguen-Guillouzo, C. and Guillouzo, A. : Stable expression, activity and inducibility of cytochromes P450 in differentiated HepaRG cells. *Drug. Metab. Dispos.* **38**, 516 (2010).

12) Guillouzo, A., Corlu, A., Aninat, C., Glaise, D., Morel, F. and Guguen-Guillouzo, C. : The human hepatoma HepaRG cells: A highly differentiated model for studies of liver metabolism and toxicity of xenobiotics. *Chem. Biol. Interact.* **168**, 66 (2007).

13) Lubberstedt, M., Muller-Vieira, U., Mayer, M., Biemel, K. M., Knospel, F., Knobeloch, D., Nussler, A. K., Gerlach, J. C. and Zeilinger, K. : HepaRG human hepatic cell line utililty as a surrogate for primary human Hepatocytes in drug metabolism assessment *in vitro*. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* **63**, 59 (2011).

14) Bowen, W. P., Carey, J. E., Miah, A., McMurray, H. F., Munday, P. W., James, R. S., Coleman, R. A. and Brown, A. M. : Measurement of cytochrome P450 gene induction in human hepatocytes using quantitative real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Drug. Metab. Dispos.* **28**, 781 (2000).

15) Kanebratt, K. P. and Andersson, T. B. : Evaluation of HepaRG cells as an *in vitro* model for human drug metabolism studies. *Drug. Metab. Dispos.* **36**, 1444 (2008).

16) Turpeinen, M., Tolonen, A., Chesne, C., Guillouzo, A., Uusitalo, J. and Pelkonen, O. : Functional expression, inhibition and induction of CYP enzymes in HepaRG cells. *Toxicol. In Vitro* **23**, 748 (2009).

17) Tolonen, A., Petsalo, A., Turpeinen, M., Uusitalo, J. and 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.* **42**, 960 (2007).

18) Li, X., Chen, X., Li, Q., Wang, L. and Zhong, D. : Validated method for rapid inhibition screening of six cytochrome P450 enzymes by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **852**, 128 (2007).

19) Wrishko, R. E., Dingemanse, J., Yu, A., Darstein, C., Phillips, D. L. and Mitchell, M. I. : Pharmacokinetic interaction between tadalafil and Bosentan in healthy male subjects. *J. Clin. Pharmacol.* **48**, 610 (2008).

20) Kenworthy, K. E., Bloomer, J. C., Clarke, S. E. and Houston, J. B. : CYP3A4 drug interactions: correlation of 10 *in vitro* probes substrates. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **48**, 716 (1999).

21) Fahmi, O. A., Kish, M., Boldt, S. and Obach, R. S. : Cytochrome P450 3A4 mRNA is a more reliable marker than CYP3A4 activity for detecting pregnane X receptor-activated induction of drug-metabolizing enzymes. *Drug. Metab. Dispos.* **38**, 1605 (2010).