

신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태 연구

A Study on Drug Metabolism and Pharmacokinetics for the
Evaluation of New Drug Candidates

연구기관
한국과학기술연구원

과 학 기 술 부

제 출 문

과학기술부 장관 귀하

본 보고서를 “신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태연구”과제의 보고서로 제출합니다.

2004 . 6.

주관연구기관명 : 한국과학기술연구원

주관연구책임자 : 김 동 현

연 구 원 : 노동석, 명승운, 김연제,
김승기, 이재익, 이수용
김승모, 김은정, 신혜주,
손정현, 민혜기, 이미진
이은영, 나숙희, 김성옥,
김남선, 이정화, 윤성호, 고미라
차수진, 윤성호

여 백

보고서 초록

과제관리번호	M1-0204-00-0167	해당단계 연구기간	2000.6-2004. 6	단계 구분	(2단계) / (총2단계)
연구사업명	중 사업명	국가지정연구실사업			
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명				
	단위과제명	신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태 연구			
연구책임자	김 동 현	해당단계 참여연구원수	총 : 15 명 내부 : 5 명 외부 : 10 명	해당단계 연구비	정부: 660,000 천원 기업: 천원 계: 660,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술연구원 생체대사연구센터		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위 탁 연 구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서 면수
<p>신물질 개발의 초기단계인 lead selection과 optimization에서 최적의 대사 및 체내동태 특성을 평가할 수 있는 기술을 개발하고자 하였으며 다음과 같은 결과를 얻었음</p> <ul style="list-style-type: none"> -HPLC/MS/MS를 이용한 rapid in vitro metabolic stability 평가기술 개발: 다 약물 동시 분석 과 data analysis 방법개발로 기존 평가 방법 보다 분석 시간을 10배 단축하였으며, single analysis에서 대사체 확인과 MS/MS spectrum으로 구조 유추가 가능한 방법을 확립 -Metabolic profile과 구조분석: Product ion mass spec., NMR, stable isotope labeling등 대사체의 구조를 규명하기 위한 다양한 approach 방법을 확립하였으며 pyronardidne등 10여종 약물의 대사 profile 규명 - Radio-labeled compound를 이용하여 LADME 연구를 수행 기반을 확립하였으며, 전신 분포 규명을 위한 rat whole body autoradiography 방법을 확립하고 L_FMAU, telemsteine의 autoradiogram을 획득 조직분포를 규명. -미량 약물의 분석을 위하여 GC/MS, HPLC/MS/MS, 그리고 switching HPLC 방법을 도입하여 정량이 어려운 steroid, 당화합물, 그리고 tizanidinel등의 극미량 분석 방법을 개발 확립하여 실제 PK 연구에 적용 - In vitro Caco-2 permeability 평가 방법의 확립과 물리화학적 특성에 따른 Papp 값의 변화, 그리고 흡수율의 상관성을 규명하였으며, 뇌질환치료제의 BBB 투과성 평가를 위한 체-culture system을 개발하여 평가하고자 함 -Human P450 8종의 isozyme을 E. coli에 reductase와 동시 발현하여 이를 이용한 flavonoid들의 활성 억제 selectivity를 규명하고 체내에서 약물 상호작용 평가를 위하여 cassette analysis를 이용한 CYP 효소 억제 정도를 동시 평가하는 방법을 개발 - Early stage에서 in vitro 결과를 이용하여 human PK를 예측하는 방법을 개발 중이며, 또한 urinary 대사체의 분석과 결과의 통계분석을 이용한 독성예측 평가방법을 개발하여 적용성을 평가중에 있음. 					
색 인 어 (각 5개 이상)	한 글	대사안전성, 흡수율 평가, 대사체 구조, 체내동태, 대사효소			
	영 어	metabolic stability, permeability, metabolite, pharmacokinetics, CYP			

여 백

요 약 문

I. 제 목:

신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구 개발의 목표

합성, 천연물질로부터 창출되는 신약후보물질로부터 신의약품을 개발하기 위하여 생리활성 스크리닝, 안전성 평가와 더불어 대사 및 체내동태의 규명으로 신물질의 생체내 활성 평가가 필수적으로 요구된다. 본 연구에서는 대사 및 체내동태를 신속하게 규명하는 기술과 동위원소 표지물질 합성과 이를 응용하는 기술 및 체계를 확립하여 국내 신물질 개발에 활용하는 것을 최종목표로 한다. 또한 확립된 기술을 국내 제약기업에 전수 보급하여 신물질 개발의 국가 경쟁력 강화에 기여하고자 함.

2. 연구 개발의 필요성

- 생리활성물질의 개발은 바이오텍연구 분야의 핵심을 이루고 있으며, 최근 인간 유전자 해독이 완료되고 protein의 기능 규명이 급속히 진행됨에 따라 질환 기전규명과 약물 target의 동정으로 생체기능조절물질 연구가 확대될 전망이다.

- 일단 drug target으로 알려진 단백질의 구조가 밝혀지면 virtual screening으로 수백만 개의 화합물 정보은행에 저장된 물질에서 활성을 가지는 후보물질을 일차로 스크리닝하는 생물 정보 기술이 급격하게 발전되고 있다. Virtual screening으로 selection된 물질이나 조합화학을 이용하여 합성된 물질이 high throughput screening을 거치더라도 활성을 가지는 후보물질의 수는 수백 수천 개가 될 수 있으며 따라서 이러한 물질들 중 실제 in vivo 활성을 가질 것으로 예측되는 물질을 selection하는 lead optimization이 신 물질 개발의 bottleneck으로 남게 된다.

- lead optimization의 핵심 기술은 임상시험 전에 인체에서 대사 안전성과 흡수율의 평가 및 체내동태 예측, 그리고 독성발현 가능성의 진단이라 할 수 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위하여 high throughput 개념의 대사 screening과 흡수 스크리닝 기술을 개발하고, 또한 computer simulation을 통한 virtual absorption/metabolic screening 기술 개발에 선진 제약회사와 연구소가 심혈을 기울

이고 있다.

- 전임상 과정에서 약효와 안전성이 충분히 검증된 신약 후보물질도 임상시험에서 성공할 확률은 10%이내이며 임상에서 탈락하는 약 30%정도의 신약후보물질이 부적절한 체내동태 및 대사에 기인된다는 사실은 lead selection과 lead optimization에서 흡수, 대사에 관한 올바른 평가가 신물질의 성공적인 개발에 핵심요소가 됨을 입증한다.

- 국내에서도 1999년 유전체학, 2001년도에 생리기능조절물질연구, 그리고 2002년도에는 단백질체학 (proteomics)에 관한 프론티어 연구개발프로그램이 시작되었으며, 또한 유전자의 최종산물인 대사체의 기능을 규명하는 metabolomics 연구도 2004년부터 시작될 예정이며, 결과적으로 국내 신 물질 개발은 보다 활발히 진행되리라 예측되며, 성공적인 신 물질 개발을 위하여서 필수 platform technology로서 대사와 체내동태를 평가하는 기술은 기반성과 핵심성을 가지고 있다고 할 수 있다.

III. 연구개발의 내용 및 범위

- In vitro rapid metabolic stability 평가방법 및 대사체 구조분석 기술 개발
- 약물의 대사 profiling 및 새로운 대사체 구조 규명 연구
- Radioisotope-labeled compound를 이용한 전임상 ADME 연구
- Hypernated technique을 이용한 생체 시료에서의 약물 분석 기술 개발
- P450 발현 및 이를 이용한 P450 inhibition 규명과 대사관여 CYP typing 기술 확립
- In vitro 흡수평가 및 BBB 투과성 평가 기술 개발과 물리 화학적 성질과의 연관성 규명
- 체내동태 예측 및 whole 대사체 분석을 이용한 독성예측 기술 개발

IV. 연구개발결과

- In vitro rapid metabolic stability 평가방법 및 대사체 구조분석 기술 개발
- LC/UV 방법을 이용한 10가지 약물의 대사 안전성 평가
(농도에 따라 대사속도가 상이함: Physiological setting 농도에서의 대사 안전성 평가를 위하여서는 감도가 높은 분석방법이 요구됨)

- 분석 감도가 우수한 LC/MS를 이용한 30여 종 약물의 대사 안전성 평가
- MS/MS product ion spectrum analysis를 이용한 대사체 구조 규명기술 확립 (20여종 신규 개발 약물의 대사체 구조 규명)
- Cassette analysis 방법 개발
 - compound를 grouping 하는 프로그램 개발
 - One-in-one 접근 방법으로 대사 안전성 평가 시간 단축은 한계가 있음
 - 동시반응 동시 분석 방법의 적용: 개별 반응/개별 분석과 차이가 큼
 - 개별 반응 동시분석 방법: 개별반응/개별 분석과 상관성이 높음을 확인 ($r=0.876$)
- Physico-chemical property에 따른 대사 안전성 평가 (구조 유사체를 이용)
 - Polar surface area 와 상관성 없음
 - lipophilicity와 상관성이 일부 규명
 - Electronegativity와 대사 hot spot과의 특별한 상관성이 없음

Metabolic profiling 과 대사체의 구조 규명

1. 말라리아 치료제로 개발되는 pyronaridine의 in vivo 및 in vitro 대사

- human microsomes과 in vivo에서 20개의 대사체 profile 획득
- EI mass, LC/MS/MS 분석을 통하여 각각의 대사체 구조 규명
- Quinone metabolite 확인과 fragmentation mechanism 규명, 독성과의 상관성 예측

2. Radiolabeled compound를 이용한 대사연구

2-1 Thiourea carbon을 labeling한 farnesyl transferase inhibitor의 대사 연구

- Radioactivity와 mass를 동시에 monitoring하는 방법을 확립하여 21개 대사체 추적
- LC/MS/MS와 TOCSY NMR을 이용하여 대사체 구조규명
- 특이적인 cyclic metabolites의 구조확인 및 생성 mechanism 제시
- Glucuronide 대사체의 product ion mass spectrum상에서 특이 fragmentation 규명

2-2 Nucleotide analogue인 PDE5저해제의 대사

- Radioisotope tracing으로 20개의 대사체 확인 및 각 조직에서의 metabolic profile 규명.
- Product ion mass spectrum을 이용하여 대사체의 구조를 규명

- In vivo 투여시 특이적으로 sulfate conjugate가 생성됨을 확인

3. 신규 PDE 5억제제 KJH series 화합물의 대사

- sildenafil의 oxygen이 sulfur로 치환된 유도체 화합물의 대사를 human liver microsome을 이용하여 규명
- 이 화합물의 low energy CID 조건에서 특이적인 mass fragmentation이 일어남 (long range methyl migration): 이현상은 ion-neutral complex가 intermediate로 생성되어 일어나는 mechanism 규명 (accurate mass 와 exchangeable proton을 deuterium으로 치환하여 규명)
- Hydroxylation, dealkylated 대사체 구조 확인

4. Deuterium labeled 화합물을 이용한 대사 연구

- Biphenyl 화합물로 간염치료제로 개발되는 DDB-S는 두개의 methylenedioxy와 methoxy group이 있어 대사체 구조 규명이 불가 이를 구분하기위하여 한쪽만 deuterium으로 치환하여 대사연구
- Human 대사와 rat 대사 profile 규명과 대사체 구조 분석

5. Artesunate의 대사

- 말라리아 치료제로 사용되는 artesunate 대사 연구를 ion trap mass spec.을 이용하여 규명 mass spec. 얻기가 어려운 화합물임
- Metabolic pathway를 규명

6. 기타 DDB, fumagilline, cyclofenyl의 metabolic pathway 규명

Radioisotope-labeled compound를 이용한 전임상 ADME 연구

1. 동위원소를 이용한 전신생체 대사 및 대사체 tracing 기법 구축

2. 전신 생체 분포 평가를 위한 whole body autoradiography 기술개발

- radiotracer의 확산 방지를 위한 몸통전체의 동결 방법 개발.
- Cryocut을 이용한 20 μ m두께의 전신 박편 시료 제조법 개발
- whole body distribution 규명 (14C-FMAU), YH3945

- 투여 시간 경과에 따른 체내분포 변화를 경시적으로 추적

3 HPLC/radio-flow detector 시스템을 이용한 생체 시료에서의 대사체 추적 및 구조 규명 기술 확립

- ¹⁴C-labeled compound를 이용한 흡수, 분포, 대사, 배설 profile 규명
- L-FMAU의 rat에서의 대사 및 체내분포 특성을 규명

4 혈장 중 ¹⁴C-FMAU와 monophosphorylated metabolites를 확인

- Carboxy thiazolidine carboxylic acid (CBCA)의 ADME 연구- 경구흡수율, 조직분포, high metabolic stability, isotope tracing과 LC/MS/MS를 이용한 in vivo 대사체 구조 규명

Hypermatd technique을 이용한 생체 시료에서의 약물 분석 기술 개발

1. Column switching HPLC 를 이용한 분석방법 개발

- glycoside aloesin 분석방법
 - 용매추출, solid phase 추출이 불가능한 aloesin 함유 생체 시료를 direct injection 과 3-column switching 방법으로 분석 방법 개발
- 추출이 난해한 taxol의 분석방법 개발
 - Plasma를 전처리 없이 MF-Ph column에 주입 2-step column switching으로 taxol 분석
- natural 화합물인 loganin과 sweroside분석

2. GC/MS를 이용한 tizanidine, buccillamine, medroxyprogesterone 분석법 확립

- tizanidine의 분석방법
 - MSTFA 유도체 방법으로 tautomerization 반응 제어
 - 체내 동태 평가에 적용

3. LC/MS/MS를 이용한 분석방법 개발

- progesterone 의 분석방법
- enalapril 과 대사체 enalaprilat의 동시 분석방법 개발
 - 96-well type solid-phase extractor 와 LC/MS를 integration시킨 system

구축하여 신속분석방법 확립

- Glimepride /banidipine의 분석방법 개발

P450 발현 및 이를 이용한 P450 inhibition 규명 기술 확립

- Human P450 의 E. coli에서의 발현
- 7 종의 P450 isozyme 활성 억제 동시 평가 기술 개발
 - LC/MS를 이용한 isozyme 선택적인 대사체 동시 모니터링 방법 확립
 - cassette incubation시에도 각 isozyme 활성의 변화 미미/ isozyme 선택적인 억제제 사용시 해당 활성만 억제
- 대사에 관여하는 CYP효소 검정 방법 확립
 - Chemical inhibition과 expressed CYP를 이용하여 동위효소 동정방법 확립
 - Eperisone, pyronaridine의 대사관여 효소 규명
- Prenyl flavonoid의 CYP효소저해 기작 규명

흡수율 평가기술의 개발 및 적용

1. Caco-2 cell을 이용한 in vitro 흡수 모델 정립
 - human colonic Caco-2 세포 배양 및 transport 평가 의 표준 protocol 작성
 - 세포 배양시간과 permeability 상관관계
 - TEER 값과 permeability 관계
 - P-glycoprotein 역할 평가
 - 정립된 모델을 이용한 30여종 약물의 흡수율 평가
 - nucleotide 계열, KJH 계열, 등 물리 화학적 성질이 다른 30여 종의 permeability 평가 (Papp 값의 산출)
 - 약물의 physico-chemical property 획득 시스템 구축 (polar surface area, lipophilicity, H-bond)
 - 흡수율과 상기 parameter와의 상관성 분석
2. P-glycoprotein 조절물질의 screening
 - Rhodamine assay를 이용한 falvonoid에서의 억제제 탐색
3. HUVEC와 C6 glial cell의 co-culture를 이용한 BBB투과성 평가 방법의 개발
 - Co-culture system 확립

- sucrose를 이용한 permeability 평가

In vivo PK prediction 및 metabolite 분석을 이용한 독성 예측

1. In vitro 결과와 PBPK를 이용한 체내동태 예측
 - 정맥주사 후 조직과 혈중의 경시적 약물 농도 변화를 simulation
2. LC-MS profiling과 패턴 분석을 이용한 간 독성 예측방법 개발
 - Urine 대사체의 분석과 이를 data set로 converting
 - LDA와 SIMCA 분석을 이용하여 독성 기전에 따른 결과의 pattern 인식 방법 개발

V. 연구개발결과의 활용계획

1. 활용계획

- 본 연구에서 개발된 대사안전성 및 흡수율 평가 기술은 일차적으로 대량으로 나오는 신약 후보물질의 lead selection 과 lead optimization에 활용.
- 개발이 확정된 약물의 IND filing을 위한 전 임상 ADME 연구에 활용하여 임상 시험을 촉진.
- 임상시험 단계에서 human specific 대사체의 추적 및 구조 규명에 활용
- 약물의 inhibition kinetics를 이용하여 약물 상호작용을 규명하여 임상적 부작용 방지에 활용
- 생체 시료에서의 극미량 성분분석을 generic drug의 생물학적 동등성 평가에 활용.

2. 활용가능성

- 새로운 치료제 개발은 생명공학연구 분야의 궁극적인 목표로서 연구개발이 지속적으로 확대되고 있으며 새로운 패러다임의 신물질 개발환경에서 성공적인 신약 개발을 위하여서는 대사와 pharmacokinetics 연구가 필수적이며, 또한 lead selection과 lead optimization의 key technology 이므로 본 기술의 활용이 필수적임.
- 취약한 전 임상 ADME 연구와 임상에서의 ADME연구지원에 활용 가능함
- 국가적으로 문제가 되고 있는 대체조제를 위한 생물학적 동등성 평가에 개발된 hypermated 분석기술의 활용이 가능함
- 체내에서 지속성이 높고 독성이 적은 새로운 약물 설계에 사용
- 유해물질의 독성발현 기전 규명에 활용하여 질병예방에 활용가능

확립된 미량유해물질 분석기술을 관련기관에 교육 및 전수하여 보건위생관련 연구에 활용가능

S U M M A R Y

Desirable metabolic and pharmacokinetic properties of drug candidates are required to be approved as new drugs. During last 10 years, major cause of dropout of newly developed drugs in clinical stages are pharmacokinetic and metabolic issues. Therefore, the selection and optimization of candidates in early stage of drug discovery stage is prerequisite for successful drug development. The purpose of present study was to establish rapid metabolic/absorption screening system for the selection and optimization of hit and/or lead compounds. Secondly, development of systemic approach to elucidate the structure of metabolites was aimed to identify the metabolic hot-spot. Third purpose was to construct the base for applying radiolabeling to preclinical ADME study.

In vitro metabolic stability of dopamine D3/D4 receptor antagonists and identification of their metabolites by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with ion trap mass spectrometry (ITMS) were done in rat and human liver microsomes. The compounds were divided into three cassette groups for rapid quantitative analysis of multiple drugs and simultaneous detection of their metabolites. The samples from incubation with rat liver microsomes were pooled into the designed cassette groups and analyzed by HPLC/electrospray (ESI) ITMS in full-scan mode. The metabolic stability of the drugs was determined by comparing their signals after incubation for 0 and 30 min, respectively. The metabolic stability of examined dopamine receptor antagonists was in the range of 9.9-84.4%. In addition, present cassette analysis allowed simultaneous detection of metabolites formed during the same incubation without having to reanalyze the samples. These results suggested that present approach is useful for rapid evaluation of metabolic stability and structural characterization of metabolites within a short period in new drug discovery. Metabolic profiles and characterization of structure of metabolites are important to understand the fate of the compounds and to optimize the structures. Several approaches were developed: 1) product ion mass spectrometry coupled with NMR spectroscopy, 2) tracing with radiolabeled compounds, and 3) application of stable isotope labeling to differentiate the isobaric metabolites. By using these methods, metabolic profiles of more than 10 compounds were characterized including pyronaridine and DDB derivatives. Determination of trace amounts of drugs or metabolites in biological species is also very important. For the development of more sensitive and selective

analytical method for the analysis of drugs, column-switching HPLC couple with UV detection, LC/MS/MS method, and GC/MS method have been developed and their application has been described. By using these techniques detection limit could be lowered to subnano gram/ml level. The culture condition of Caco-2 cells was established and apply this system to evaluate in vitro permeability study. After 17 day culture, TEER value of monolayered cells could reach to over $600 \Omega/\text{cm}^2$ and mannitol permeability was reduced down to $0.25\Omega/\text{cm}^2$. In vitro permeability of D3/D4 receptor antagonists was evaluated using this system. The permeability of these compounds varied depending on the structure and permeability coefficient was between 0.9 and 24.0. For the rapid evaluation of permeability, cassette analysis of mixtures was done using HPLC/MS/MS spectrometry. The permeability coefficients of compounds obtained by cassette analysis was well correlated with those obtained by single individual analysis. The permeability depends on physio-chemical properties of compounds. Polar surface area (PSA) and Log P value were calculated and simulated with experimental results. The permeability of chemicals was mostly governed by PSA value and correlation coefficient between PSA and Caco-2 experimental value was over 0.7. We also successfully apply radio-labeling to ADME experiment and whole body autoradiographic technique was developed. In conclusion, the methods and techniques required for lead selection and optimization in drug discovery process and preclinical ADME evaluation. Finally the prediction of in vivo plasma concentration of drugs using PBPK model has been developed. Also, the analysis of total urinary metabolites and principal component analysis of the data was extremely useful to predict the hepatic toxicities of the chemicals. The application of the above-described methods to new drug development will facilitate the development process and increase the success rate.

C O N T E N T S

Chapter 1: Screening of in vitro metabolic stability and application of cassette analysis-----	19
Chapter 2: Characterization of metabolic profiles of drugs and structure of the metabolites-----	47
Chapter 3: ADME using radio-labeled compounds and the autoradiography-----	121
Chapter 4: Development of new analytical techniques-----	143
Chapter 5: Expression of human P450 enzymes and development of CYP inhibition-----	197
Chapter 6: Establishment of Caco-2 permability and BBB permeability-----	229
Chapter 7: Prediction of in vivo drug profile and hepatotoxicity-----	273

여 백

목 차

제 1 장 신속 in vitro 대사 안전성 평가 및 대사체 구조 규명-----	19
제 2 장 개발 약물의 대사 profiling 및 구조분석 연구-----	47
제 3 장 방사성 동위원소를 이용한 ADME 및 autoradiography-----	121
제 4 장 새로운 분석 방법의 개발 및 응용 -----	143
제 5 장 약물 상호작용 평가를 위한 human CYP450 효소발현 및 in vitro inhibition 평가방법 개발 -----	197
제 6 장 소장 과 BBB 투과성 평가의 개발 및 응용 -----	229
제 7 장 In vitro 결과를 이용한 PK 예측 및 대사체분석을 이용한 독성 예측 -----	273

여 백

제 1 장 신속 in vitro 대사 안전성 평가 및 대사체 구조 규명

1. 서론

생리활성물질의 개발은 바이오텍 연구 분야의 핵심을 이루고 있으며, 최근 인간 유전자 해독이 완료되고 protein의 기능 규명이 급속히 진행됨에 따라 생체 기능조절 연구도 한층 활성화 될 전망이다. 일단 drug target으로 알려진 단백질의 구조가 밝혀지면 virtual screening으로 수 백 만개의 화합물 정보 은행에 저장된 물질에서 활성을 가지는 후보물질을 일차로 스크리닝 하게 된다. 그러나 virtual screening으로 선택된 물질을 high throughput screening으로 in vitro screening을 거치더라도 활성을 가지는 후보물질의 수는 수백 수천 개가 될 수 있으며 따라서 이러한 물질들 중 실제 in vivo 활성을 가질 것으로 예측되는 물질을 선택하는 lead optimization이 신물질 개발의 bottleneck으로 남게 된다. Lead optimization의 핵심 기술은 대사 안전성과 흡수율의 평가 및 체내동태 예측, 그리고 독성발현 가능성의 진단이라 할 수 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하기 위하여 high throughput 개념의 대사 screening과 흡수 screening 기술을 개발하는 것은 매우 중요한 일이라 할 수 있다.

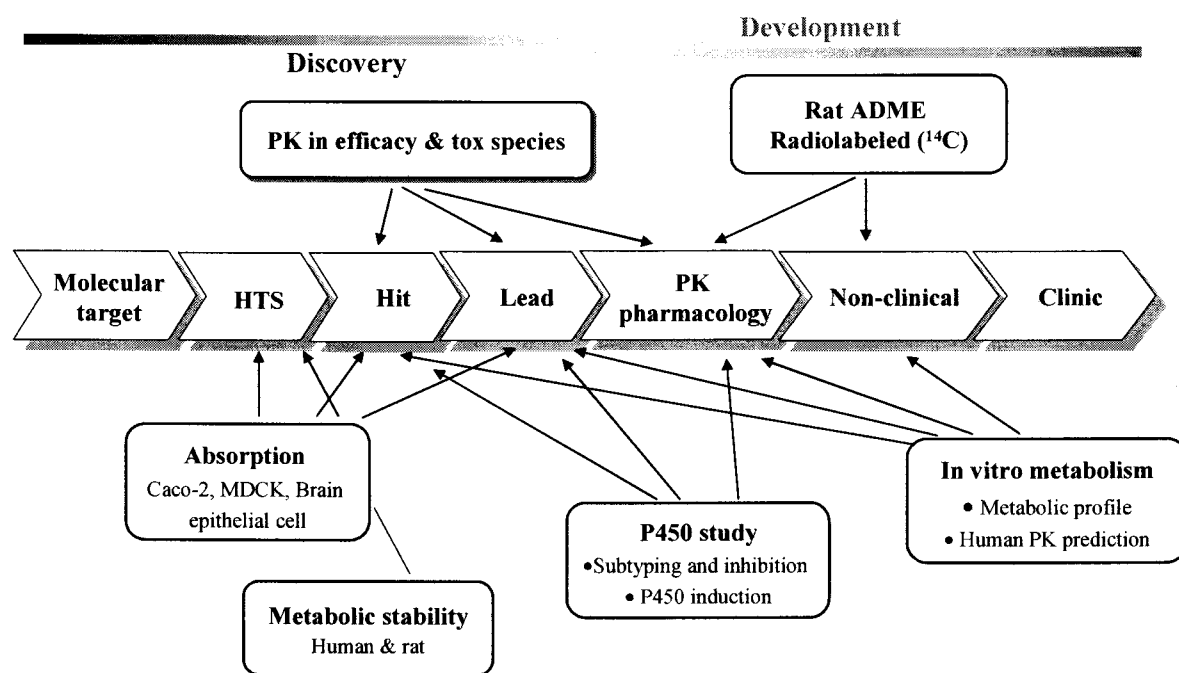


Figure 1. Strategy for drug evaluation in drug discovery and development stage

최근, high throughput 개념의 분석기술 개발과 더불어 약물대사에 관한 연구는 신약 개발의 많은 분야에서 중요한 연구의 분야로 점차 인식되어지고 있다. 현재, 대사에 관련된 다양한 지표들 가운데 대사 안전성과 대사 경로는 lead drug 후보물질들을 선택하는데 매우 중요한 지표로 정의되고 있다. 이러한 흐름에 맞추어 약물의 in vivo 대사과정을 신속한 in vitro 대사 모델을 통하여 예측하고자 하는 많

은 연구가 진행되어지고 있으며 이러한 약물들의 *in vitro* 대사에 대한 자료들은 많은 신약개발 분야에 있어서 *lead drug* 후보물질들을 선택하는데 가장 신속하고 적절한 방법으로 사용되어지고 있다. 또한 약물의 대사 경로는 생성된 대사체들에 의한 예기치 못한 약물 독성이나 대사에 의한 약물의 변형 부위를 확인함으로써 좀더 나은 생리활성을 가지는 약물의 고안에 관한 중요한 정보를 제공하고 있다. 따라서 이러한 약물 대사에 관련한 연구와 더불어 대사 안전성과 대사 경로를 신속, 정확하게 평가할 수 있는 *high-throughput* 개념의 분석기술의 개발은 신약개발의 분야에서 매우 중요한 과제라 할 수 있다.

Tandem mass spectrometry와 병합된 liquid chromatography의 발전은 이러한 신약개발에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며 현재 LC/MS/MS 기술은 다양한 약물 및 약물 유래 미지 대사체들의 정량 및 정성 분석에 널리 사용되고 있다. 이중 LC/ion-trap MS는 quadrupole MS에 비하여 scan mode에서도 감도가 매우 우수하여 대사 안전성 평가와 미지의 대사체 구조 결정에 매우 유용하게 사용되고 있다.

따라서 본 연구에서는 LC/ion-trap tandem MS 기술과 *in vitro* 대사 모델을 이용하여 *high-throughput* 개념의 대사 스크리닝 기술을 개발하고자 하였다. Figure 2는 *high-throughput* 개념의 대사 스크리닝 기술의 개발을 위한 전략을 보여준다.

High-throughput 개념의 대사 스크리닝 기술의 개발을 위하여 먼저 수행되어야 할 기본 과제는 *in vitro* incubation 단순화를 통한 시료의 대량 처리와 생성된 분석시료의 최소화를 통한 분석시간의 단축이다. 본 연구실에서는 이를 위하여 96-well plate와 12-channel multi-pipet를 이용, 한번에 96개의 시료를 동시에 incubation하고 precipitation을 이용하여 대량의 시료를 한번에 처리할 수 있도록 하였으며 또한 computer program을 이용한 cassette group을 고안하여 분석 시료의 수와 실제 분석시간을 단축시키고자 하였다. 이렇게 시료 전처리의 단순화를 통하여 얻어진 각각의 cassette 시료는 LC/ion-trap MS의 full-scan mode에서 분석되었으며 한번의 분석을 통하여 cassette안 모든 약물들의 대사 안전성에 관한 정량 정보를 얻을 수 있었다. 또한 현 기술은 시료의 재분석 없이 cassette안의 예측되는 대사체들의 nominal mass를 확인함으로써 cassette안에 포함되어 있는 모든 약물들의 대사체들을 신속히 확인할 수 있었다.

그 다음으로 고려되어야 할 중요한 과제는 이렇게 검출된 대사체들의 정확한 구조를 확인하여

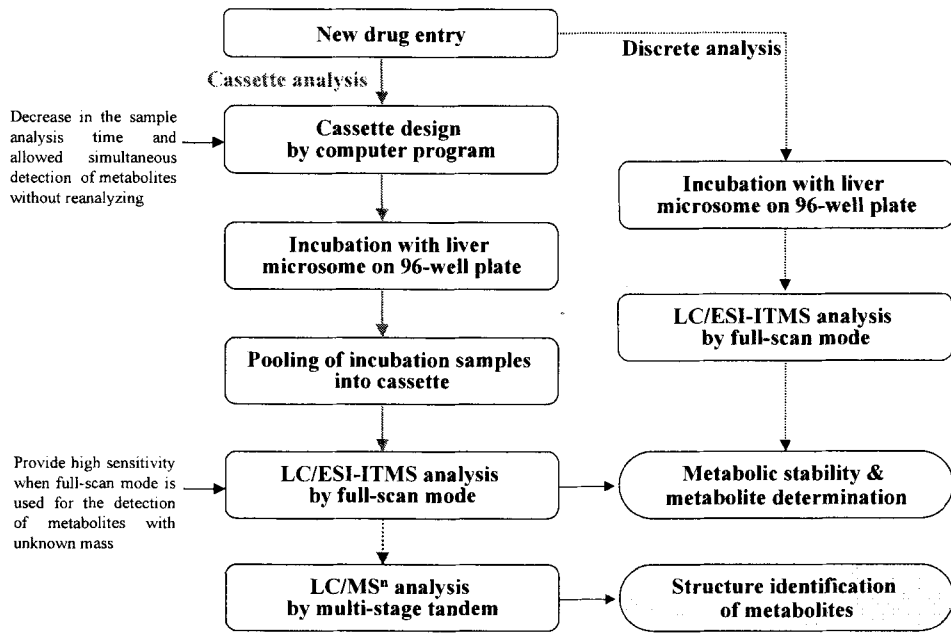


Figure 2. Strategy for high-throughput metabolic screening

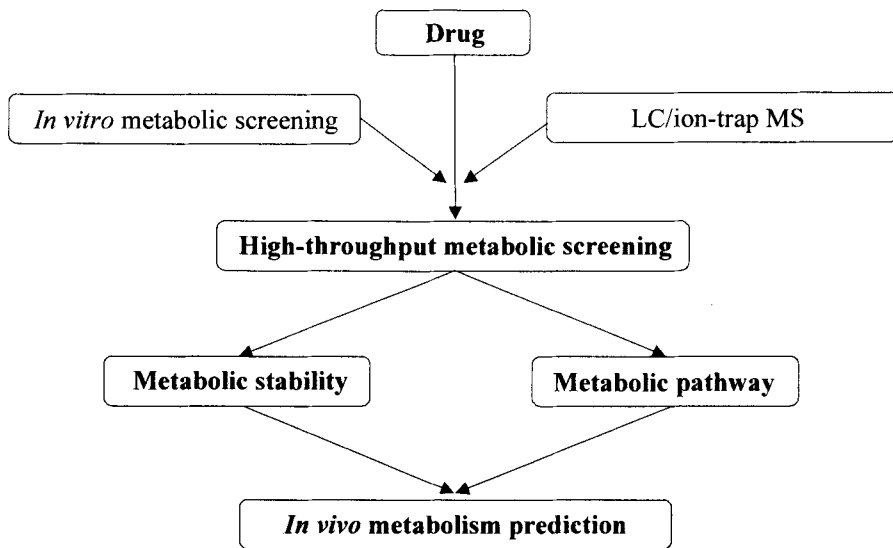


Figure 3. A flowchart overview of high-throughput metabolic screening for a drug discovery

각 약물들의 대사 경로를 제시하는 것이다. 이를 위하여 본 실험실에서는 multi-stage tandem mass spectrometry (MSⁿ) 방법을 이용하여 생성된 대사체들의 정확한 구조를 결정하였다. 각 대사체들은 MS²에서 생성된 product ion들을 확인하여 변화된 구조가 확인되었으며 MS²를 통하여 구조 확인이 어려운

경우는 MS³를 통하여 확인하였다.

이상과 같이 본 연구에서는 cassette 분석, LC/ion-trap tandem MS 기술, 그리고 in vitro 대사 모델을 이용하여 신약개발지원 시스템 구축을 위한 high-throughput 개념의 대사 스크리닝 기술을 개발하고 나아가 in vitro 대사 자료로부터 in vivo 대사를 예측할 수 있는 모델을 정립할 수 있는 기틀을 마련하고자 하였다 (Figure 3).

2. 실험방법

Human liver

사람의 간 박편은 바이러스 감염 시험을 통과한 시료로서 Dr. F. P. Guengerich (Vanderbilt University, TN, USA)로부터 기증 받았으며 -70°C에서 보관하였다.

HBI 마이크로솜

Human Biologies Inc. (HBI) (Phoenix, AZ, USA)로부터 9종류의 human liver microsome (HBI 2, HBI 3, HBI 5, HBI 7, HBI 9, HBI 10, HBI 11, HBI 12, HBI 13)을 구입하여 -70°C에서 보관하였다. 간 기증자에 관한 정보와 각 마이크로솜의 CYP450 content 그리고 CYP450 isozyme의 활성은 HBI사로부터 제공되었다.

Cassette group design

본 연구에서는 분석시간의 단축을 통한 다량의 시료 처리를 위하여 cassette group을 고안하여 분석을 수행하였다. Cassette group은 각 화합물들의 분자량, 상대적인 머무름 시간 그리고 예상되는 대사체들의 분자량에 기초한 algorithm을 이용하여 고안되었다. Figure 4는 본 연구에서 사용한 dopamine D3/D4 receptor antagonist들의 보여준다.

Sample preparation

각각의 화합물들을 DMSO에 녹여 1 mM stock 용액으로 제조한다. 다량의 시료를 동시에 incubation 하기 위하여 96-well type plate를 사용하며 여기에 12-channel pipet을 이용하여 증류수 144 μ l, 1.0 M potassium phosphate (pH 7.4) buffer 20 μ l, 표준물 용액 2.0 μ l와 NADPH generating system 30 μ l를 넣어 preincubation한 뒤 rat liver microsome (1mg/ml)를 넣어 0, 30, 60 분간 incubation하였다. 이 반응액에 acetonitrile 200 μ l를 넣어 반응을 정지시켰으며 교반 후 원심 분리시켜 상등액 50 μ l를 고안된 각각의 cassette 안으로 pool시켜 10 μ l를 LC/MSD에 주입하여 full-scan mode로 분석하였다.

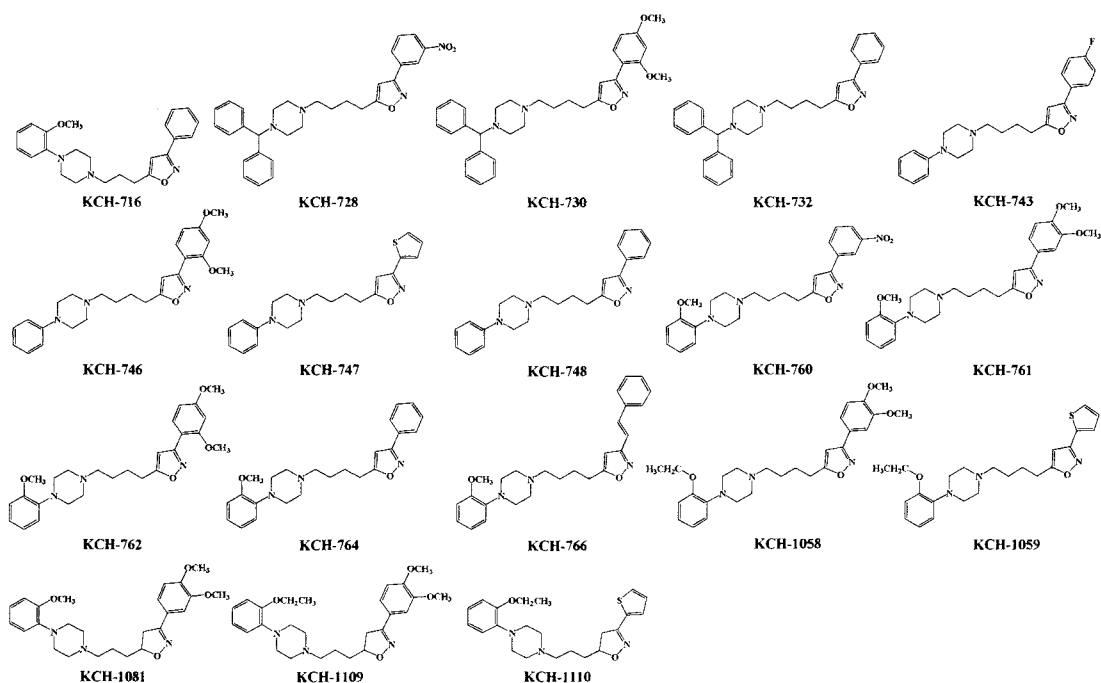


Figure 4. Structures of dopamine D3/D4 receptor antagonists

Liquid chromatography and mass spectrometry

Cassette group의 효과적인 분석 수행을 위하여 사용한 HPLC system은 Agilent 1100 series를 사용하였으며 mass spectrometry는 electrospray ionization과 ion trap이 장착된 tandem MS system을 사용하였다. Column은 Xterra C18 (2.1×50 mm, 3.5um)을 사용하였으며 이동상으로는 20 mM ammonium formate (pH 4.0) [A]과 acetonitrile [B]를 사용하여 gradient system에서 분석하였으며 조건은 다음과 같다.

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (ml/min)
0.0	75	25	0.20
8.0	60	40	0.20
10.0	60	40	0.20
10.1	75	25	0.20

각 화합물들의 metabolic stability를 측정하기 위한 mass spectrometry 조건으로는 ionization은 API-electrospray ionization방법을 이용하였으며 polarity mode는 positive mode 그리고 compound stability는 60%를 사용하였다. Nebulizing gas로는 nitrogen gas를 8 L/min의 속도로 nebulization하였으며 dry temp.는 350°C, 그리고 nebulizing pressure는 35 psi로 설정하였다.

Calculation of metabolic stability

분석 후 각 화합물들에 대한 metabolic stability는 0와 30분 incubation된 시료에서 parent 약물의 signal을 비교하는 아래 공식 (1)에 의하여 계산되었다.

$$\text{Metabolic stability} = (A_{30\text{-min}}/A_{0\text{-min}}) \times 100 \quad \text{공식 (1)}$$

여기서 $A_{0\text{-min}}$ 와 $A_{30\text{-min}}$ 는 각각 0와 30분 incubation된 시료에서 검출된 parent drug의 peak area를 나타낸다.

Structural identification of metabolites by MSⁿ

위의 full-scan mode 분석으로부터 검출된 대사체들의 구조는 multi-stage tandem mass spectrometric (MSⁿ) 방법을 이용하여 결정되었다. Collision gas로는 helium을 사용하였으며 parent drug 및 대사체들의 [M+H]⁺ ion을 isolation하고 fragment amplitude를 조절하여 MS² spectrum을 얻었다. 대사체의 MS² spectrum에서 생성된 product ion들을 parent drug의 product ion들과 비교하여 생성된 대사체들의 정확한 구조를 결정하였다. MS²로부터 구조를 결정하기 어려운 대사체들은 MS³ 와 MS⁴에 의하여 결정하였다.

3. 실험결과

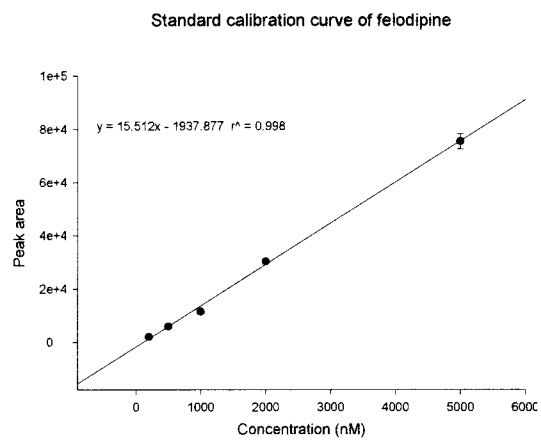
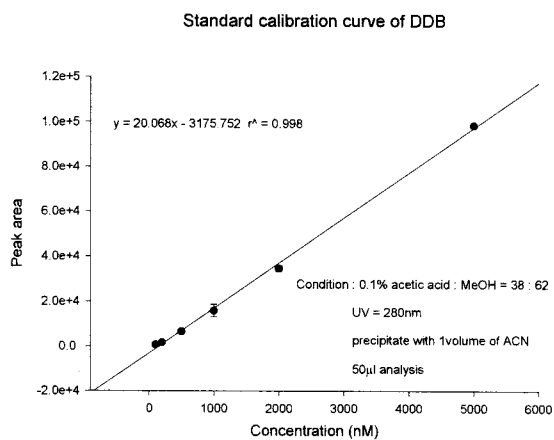
Single individual 분석에 의한 metabolic stability 평가

Metabolic stability는 약물이 체내에 유입되었을 경우 대사 효소에 의하여 어느 정도 속도로 대사되는지를 평가하는 척도로서 생체 반감기와 클리어런스를 예측할 수 있는 중요한 척도로서 신약 개발 초기 단계에서 이루어지고 있는 시험이다. 본 시험에서의 문제점은 수많은 후보물질의 평가를 짧은 시간에 수행하여야 하며 또한 human microsome 과 같은 고가의 시료를 사용하여야 하므로 결과의 평가에 방해받지 않으며 가능한 miniaturization이 요구된다. 일반적으로 분석의 편의를 위하여 약물의 농도를 실제 physiological 농도보다 높은 농도를 이용하나 이 경우 대사에 관여하는 효소가 달라질 수 있으므로 in vivo에서의 약물 대사 속도를 정확히 예측하기 어렵다. 따라서 in vitro 시험에서 가능하면 physiological concentration 에 근접하거나 Km value 근처 농도를 사용하는 것이 요구된다. 본 연구에서는 먼저 single incubation에서의 대사 안전성 평가를 일정시간에 많은 시료를 분석 평가하기 위하여 화합물 10 uM 농도에서 microsome과 반응 시 분석이 가능한 반응 volume을 최소화 하고 또한 반응 후 간편하고 심플한 검체 전처리 방법을 개발하고자 하였다. 먼저 micro-HPLC/UV system에서 분석을 이용하여 반응의 miniaturization 이 가능한지를 알아보았다. 반응 volume을 0.1 ml에서부터 1.0 ml까지 변화하여 반응을 시킨후 각 isozyme specific substrate의 대사체를 정량하였다. Coumarine-7-hydroxylation과 같은 CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP3A4, CYP2E1 효소 substrate의 대사체를 정량 시 반응 volume이 0.1 ml까지 낮추어도 큰 문제가 없었으나 mephenytoin과 diclofenac등과

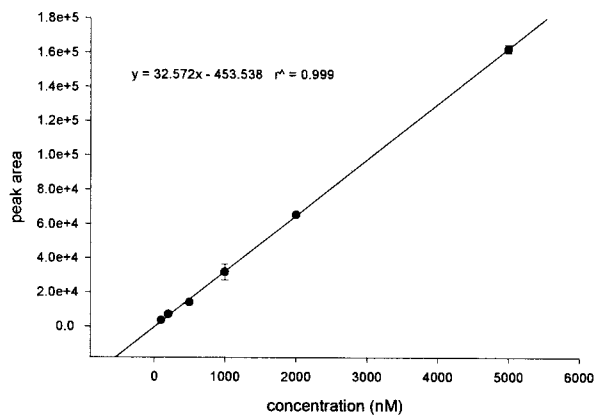
같은 P450 효소 substrate의 경우 0.1 ml의 반응 volume에서는 정량이 불가능하였다. 따라서 본 실험의 최소 반응 volume은 0.2 ml로 하였다. 반응 후 시료 전처리 과정의 단순화 또한 rapid screening을 위하여 필수적인 요인이 된다. 본 시험에서는 96 well type plate를 이용하여 효소반응을 수행하고 이들 시료의 전처리 과정을 plate 채로 수행하는 방법에 관한 연구를 수행하였다. Felodipine등 5개의 test 약물을 서로 다른 농도에서 고전적인 liquid extraction 방법과 96-well 전체를 vortexing 하는 방법, 그리고 shaker에서 5분간 vigorous shaking을 이용하는 방법을 비교하여 회수율을 HPLC로 분석하여 결과를 얻었다 (Table 1). 96-well을 이용 시 phase 분리도 plate 자체를 원심분리 하므로 시료전처리 시간이 짧아지게 된다. Liquid extraction 결과를 보면 5개의 test compound 모두 96-well을 사용하는 방법이 conventional extraction 방법에 비하여 회수율이 조금씩은 낮았지만 metabolic stability 평가를 위한 분석에는 적합한 것으로 판명되었다. 따라서 향후 실험에서는 96-well shaking 방법을 이용하여 분석하고자 하였다. 이러한 방법을 사용하여 10개의 test compound의 in vitro metabolic stability를 평가하고자 하였다. 분석방법을 단순화 하기 위하여 short C18 (2.0 x 50 mm, 3 um) column을 이용하여 5분간 10% acetonitrile에서 90% acetonitrile까지 급격한 gradient를 주는 방법을 도입하였으며 이러한 방법이 10개의 test compound 정량에 큰 무리가 없었으며, 시료 당 분석시간 역시 4-8분으로 기존의 분석방법에 비하여 1/3-1/4를 단축하였다 (Table 1). Figure 6에는 서로 다른 약물의 농도에 따른 in vitro metabolic rate를 나타내었으며 1 uM과 50 uM의 경우 대사되어 parent compound가 감소하는 속도에 큰 차이가 있음을 보여주고 있으며, 따라서 가능하면 낮은 농도에서의 metabolic stability가 in vivo 결과 예측에 필요함을 보여주고 있다. Test compound를 5 uM에서 rat liver microsome와 반응 시 시간 경과에 따라 parent compound가 대사되어 감소하는 pattern을 Figure 7에 나타내었다. Test compound 중 HWY-250 (반감기 34.7분) 이 대사 안정성이 가장 우수하고 DDB (반감기 8.4분)의 in vitro 대사 속도가 가장 빠른 것으로 판명되었다. In vivo 반감기와 클리어런스와의 상관성에 대한 보다 상세한 연구가 수행되어야 in vitro 연구의 유용성이 판명되리라 사료된다.

Table 1. Comparison of analysis time between conventional method and 96-tube method

	conventional method	96-tube use method		
extraction	vortex mix-30sec/each sample(4개 한번에 가능)	vortex mix-5sec/8 sample (for protein precipitation)	conventional method 의 경우 이 2단계 2회 반복	
centrifuge	10min	10min		
solvent evaporation	사용하는 solvent의 종류에 따라 소요시간이 다름. (12개/1 time about 15-20min 소요)	-		
분석 시간	HWY250-Dj	15 min		
	DDB			
	YH1885		5 min	sample에 따라 차이가 있으나
	Amiodarone		8 min	분석시간은
	Diclofenac	15 min	4 min	1/3-1/4로 단축
	Testosterone	12 min	4 min	
	SKP450		4 min	
	felodipine	16 min	5 min	



calibration of HWY-250



calibration of YH1885

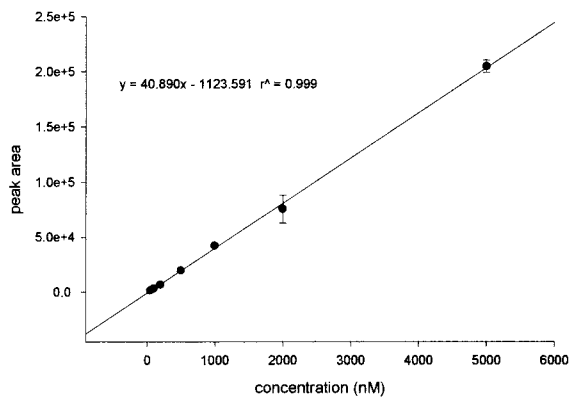


Figure 5 Calibration curve generated by 96-tube method.

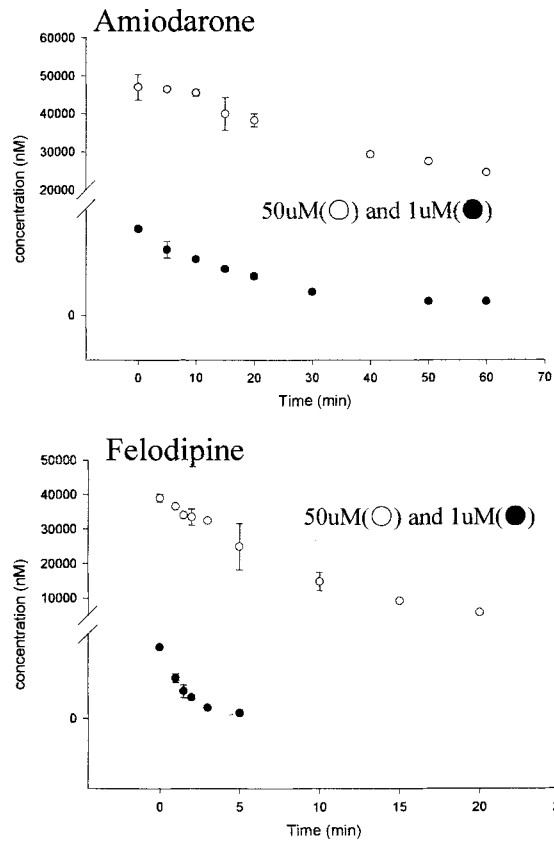


Figure 6. Time -dependent decrease of drugs during incubation with rat liver microsomes.

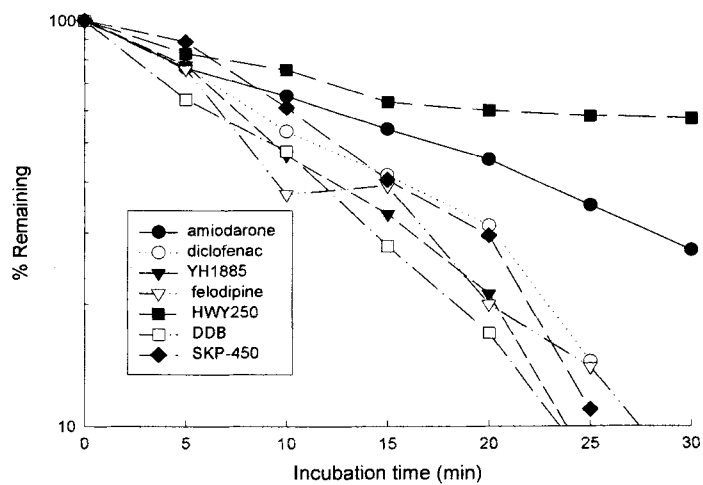


Figure 7. In vitro metabolic stability of 7 different drugs after incubation with human liver microsomes.

Cassette 분석에 의한 metabolic stability의 결정

High-throughput 개념의 대사 스크리닝 기술의 개발을 위하여 먼저 수행되어야 할 기본 과제들 중 in vitro incubation 단순화를 통한 시료의 대량 처리 기술은 96-well plate를 이용, 한번에 96개의 시료를 동시에 incubation하고 precipitation을 이용하여 대량의 시료를 한번에 처리할 수 있도록 고안함으로써 본 연구에서 목표하는 결과를 충분히 이룩할 수 있었다. 또한, 이렇게 단순화된 시료 전처리에 의하여 생성된 대량의 시료들은 cassette 분석 기술에 의하여 분석시료의 최소화와 분석시간의 단축을 이룩할 수 있었다. 본 연구에서 사용한 cassette들은 parent drug의 분자량, 상대적인 머무름 시간 및 예상되는 대사체들의 분자량을 고려하여 본 실험실에서 고안된 cassette program을 이용하여 semi-automatic하게 설계되었으며 96-well plate 위에서 독립적으로 microsomal incubation된 시료들은 이렇게 고안된 각각의 cassette안으로 pool되어 분석되었다. 총 34개의 독립적인 시료들 (0, 30-min)은 6개의 cassette 시료로 감소되었으며 결과적으로 분석시간에 있어서 6배의 감소를 가져올 수 있었다.

본 연구에서 사용한 ion trap mass spectrometry (ITMS)는 기존의 quadrupole MS에 비하여 full-scan mode와 selected ion mode에서의 감도가 동일하여 대사체와 같이 미지의 화합물들의 검출하는데 매우 유용하며 현재 가장 널리 사용되어지고 있다. 생성된 각각의 cassette 시료들은 LC/ion-trap MS의 full-scan mode에서 분석되었으며 한번의 분석을 통하여 cassette안 모든 약물들의 대사 안전성에 관한 정량 정보를 얻을 수 있었다. 또한 현 기술은 시료의 재분석 없이 cassette안의 예측되는 대사체들의 nominal mass를 확인함으로써 cassette안에 포함되어 있는 모든 약물들의 대사체들을 신속히 확인할 수 있었다. 따라서 본 실험실에서 고안된 LC/ITMS를 사용한 cassette analysis는 metabolic stability와 metabolic pathway를 연구하는데 최적의 방법으로 사료된다.

Figure 8은 본 연구에서 사용한 17종의 dopamine D₃/D₄ receptor antagonist들의 0와 30분 incubation된 cassette A, B, C의 full-scan LC/MS 분석으로부터 얻어진 extracted ion mass chromatogram을 보여 준다. Solid line과 dotted line은 각각 0와 30-min incubation된 시료의 약물들을 보여 준다. 그림에서 보여 지는 바와 같이 0-min (solid line)과 30-min (dotted line)의 비교는 각 약물들의 metabolic stability를 신속하게 확인하는데 매우 유용하였다. 각 약물의 metabolic stability를 얻는데 있어서 ITMS의 extracted ion chromatogram (EIC) mode의 사용은 cassette안에 모든 약물들의 완전한 chromatographic separation을 필요로 하지 않는다. 하지만 본 연구에서 사용한 HPLC의 simple한 gradient 프로그램은 Figure 8에서 보여 지는 바와 같이 cassette B의 KCH-761과 716 그리고 KCH-746과 1059를 제외한 거의 모든 약물들에 대하여 baseline 분리를 이룩할 수 있었다. 이 결과는 내부 불순물들에 의한 간섭효과를 최소화 할 수 있었으며 cassette안의 다양한 대사체들의 동시 검출을 수행하는데 매우 효과적인 결과를 보여 주었다. Table 2는 cassette 분석을 통하여 얻어진 모든 약물들의 in vitro metabolic stability 결과를 보여준다.

연구된 17종의 dopamine receptor antagonist들은 9.9 ~ 84.4%의 metabolic stability 결과를 보여 주었다. 이중 KCH-1081은 84.4%의 가장 좋은 metabolic stability 결과를 보여 주었으며 KCH-743, 748, 761, 764, 1109도 30% 이상의 좋은 결과를 나타냈다. 반면, KCH-716, 728, 730, 732, 1058은 15%이하의 낮은 대사 안전성을 보여주었다. 이와 같이 본 연구의 simple한 metabolic stability에 관한 결과는 KCH-1081, 743, 748, 761, 764, 1109이 metabolic stability라는 관점에서 판단될 때 dopamine receptor antagonist의 후보물질로서 적합하다는 것을 보여 주었다.

Method validation of cassette analysis and cassette incubation

LC/MS cassette analysis에 의한 metabolic stability 결과는 동일 시료의 LC/MS discrete analysis에 의하여 검증되었다. Figure 9는 cassette analysis와 discrete analysis에 의한 각각의 metabolic stability 결과를 보여준다. 그림에서 보여지는 바와 같이 두 가지의 다른 방법에 의한 분석결과를 비교할 때 $R^2=0.88$ 의 좋은 correlation을 나타내었으며 KCH-728, 1058 등 몇 개의 약물을 제외하고는 거의 동일한 결과를 보여 주었다.

또한 Figure 10에서 보여지는 바와 같이 LC/UV discrete analysis에 의한 결과와 비교하였을 때도 역시 동일한 결과를 보이고 있다. 이는 ITMS와 cassette에 의한 결과가 정량성에 있어 높은 신뢰도를 가진다는 것을 나타낸다. 따라서 본 연구에서 수행한 ITMS에 의한 cassette analysis는 metabolic stability의 신속한 결정에 매우 정확하고 유용한 방법임이 확인할 수 있었다.

그러나 Figure 11에서 보여지는 것과 같이 cassette으로 고안된 약물들을 cassette incubation하여 분석하였을 경우 독립적으로 incubation하여 cassette analysis한 결과와 전혀 다른 결과를 나타내었다. 이는 각 약물들의 metabolic interaction에 기인한 결과로 추정되며 방법적인 면에서 유효하지 못함을 알 수 있었다.

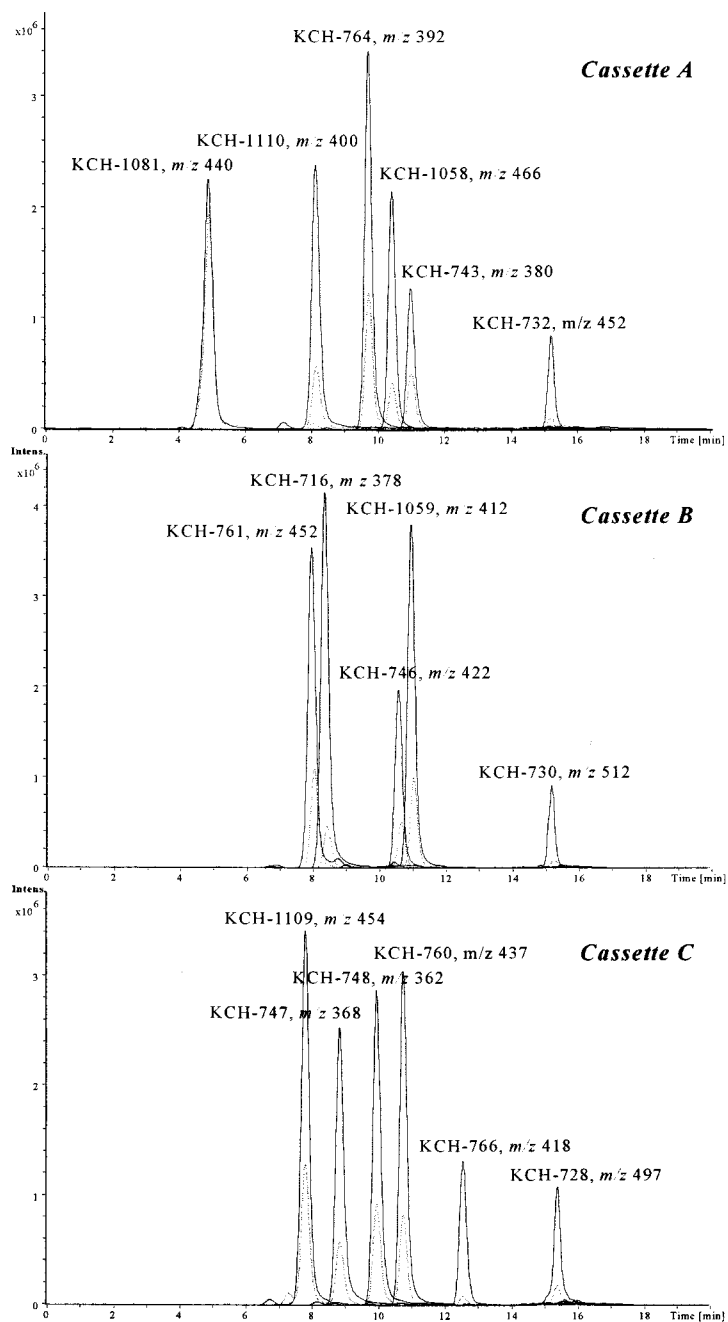


Figure 8. Mass chromatograms of 18 dopamine receptor antagonists in cassette A, B and C obtained from the cassette analyses of 0-min incubated (solid line) and 30-min incubated (dotted line)

Table 2. *In vitro* metabolic stability of D₃/D₄ receptor antagonists, piperazinylalkylisoxazole derivatives and molecular ions of presumed metabolites generated in rat liver microsomes

Compound	Metabolic stability (%)	No. of metabolite	[M+H] ⁺ ions (parent; metabolites)
KCH-716	11.3	6	378; 364, 394, 394, 394, 272
KCH-728	13.8	2	497; 347, 331
KCH-730	9.9	3	512; 362, 346, 332
KCH-732	13.7	1	452; 286
KCH-743	41.9	3	380; 396, 396, 304
KCH-746	25.5	4	422; 408, 438, 346, 363
KCH-747	23.2	5	368; 384, 384, 384, 292
KCH-748	31.3	5	362; 378, 378, 286
KCH-760	26.9	4	437; 423, 453, 331
KCH-761	32.2	6	452; 438, 438, 468, 346, 424
KCH-764	37.6	5	392; 378, 408, 408, 286
KCH-766	26.9	7	418; 404, 434, 434, 312, 436, 450
KCH-1058	19.6	10	466; 482, 482, 452, 438, 438, 437, 424, 332
KCH-1059	26.4	5	412; 384, 428, 428, 292
KCH-1081	84.4	5	440; 456, 456, 426, 426
KCH-1109	38.5	6	454; 470, 442, 440, 426, 334
KCH-1110	24.3	6	400; 416, 372, 280, 432, 388

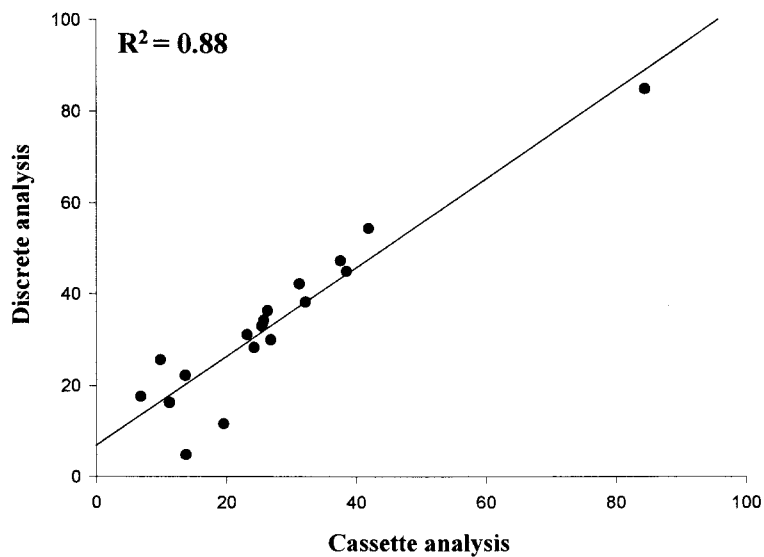


Figure 9. Comparison of in vitro metabolic stability results from cassette analysis and discrete analysis by LC/MS

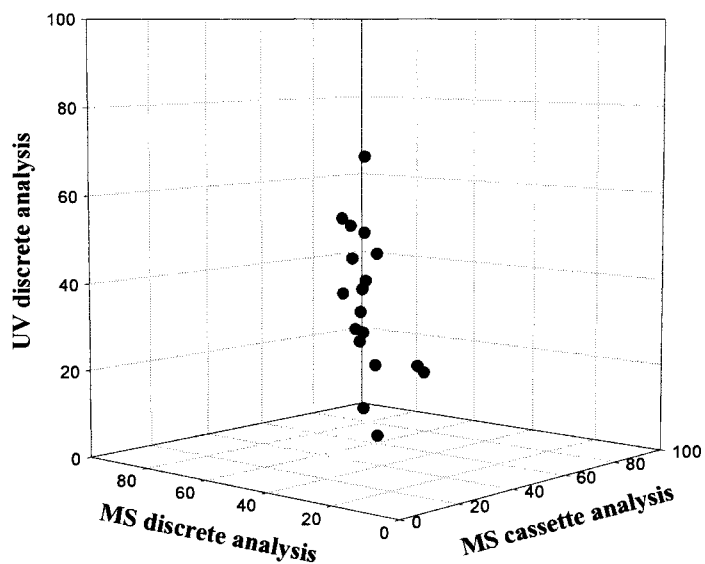


Figure 10. Comparison of in vitro metabolic stability results from MS cassette analysis and MS & UV discrete analysis

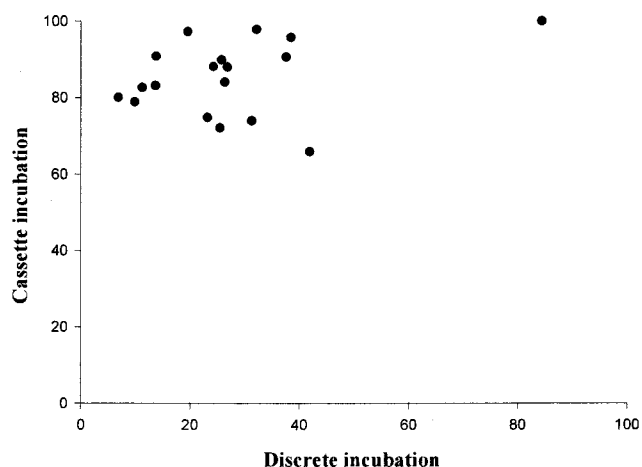


Figure 11. Comparison of in vitro metabolic stability results from cassette incubation and discrete incubation

Effect of physico-chemical properties on metabolic stability of structurally similar compound

본 연구에서는 metabolic stability와 Log P와의 상관관계를 조사하기 위하여 먼저, Sybyl 6.5 base (Tripos)의 CLog P 모듈을 이용하여 모든 약물들에 대하여 CLog P 값을 계산하였다 (Table 3). Figure 12는 cassette analysis로부터 얻어진 각 약물들의 metabolic stability 결과와 CLog P 결과의 상관관계를 나타내었다. 두 결과는 $R^2=0.81$ 의 좋은 correlation을 나타내었으며 CLog P 값이 클수록 대사가 많이 일어나는 결과를 Figure 12로부터 알 수 있었다. 따라서 Log P는 metabolic stability에 영향을 미치는 중요한 인자임을 확인하였다.

Figure 13은 조사된 metabolic stability와 약물의 polar surface area와의 상관관계를 보여주고 있다. 각 약물들은 MM2와 MOPAC에 의하여 structure modeling 되었으며 polar surface area (PSA)는 Sybyl 6.5 base (Tripos)의 charged partial surface area (CPSA) 모듈의 partial negative surface area (PNSA-1)에 의하여 계산되었다 (Table 3). CLog P와 metabolic stability와의 관계 (Figure 12)에서 보여지는 상관성과는 대조적으로 Figure 13에서 보여지는 바와 같이 metabolic stability와 PSA 사이에는 아무런 상관성을 보이지 않았다. 즉, metabolic stability는 각 약물들의 PSA에 의하여 영향을 받지 않는다는 결론을 얻을 수 있었다. 따라서 본 연구에서 수행한 metabolic stability와 약물들의 physico-chemical properties들과의 상관관계는, 약물 permeability에 있어서 PSA가 매우 중요한 인자임에 비하여 metabolic stability는 CLog P가 매우 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

Table 3. Physico-chemical properties of 17 dopamine receptor antagonists

Compound	CLog P*	Polar surface area*
KCH-716	3.70	100.2
KCH-728	6.46	183.1
KCH-730	6.17	114.4
KCH-732	6.65	110.0
KCH-743	4.55	167.0
KCH-746	3.89	110.3
KCH-747	4.52	99.1
KCH-748	4.38	122.8
KCH-760	4.04	231.3
KCH-761	4.13	122.0
KCH-764	4.23	96.2
KCH-766	4.83	111.7
KCH-1058	4.49	109.8
KCH-1059	4.90	95.4
KCH-1081	3.99	73.0
KCH-1109	4.31	68.4
KCH-1110	4.23	72.8

* Log *P* was calculated by CLOG P module of SYBYL 6.5 base, PSA was calculated by CPSA module of SYBYL 6.5 base; PSA (polar surface area, partial negative surface area) was defined as the area occupied by nitrogen and oxygen atoms plus the area of the hydrogen atoms attached to these heteroatoms

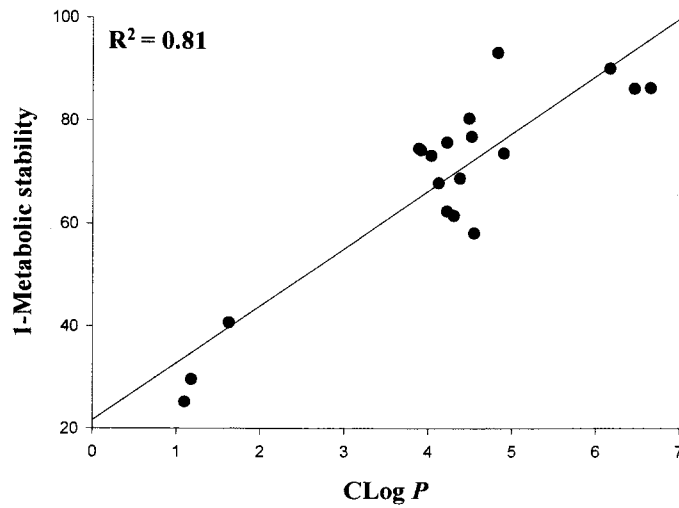


Figure 12. Relationship between in vitro metabolic stability and Log P

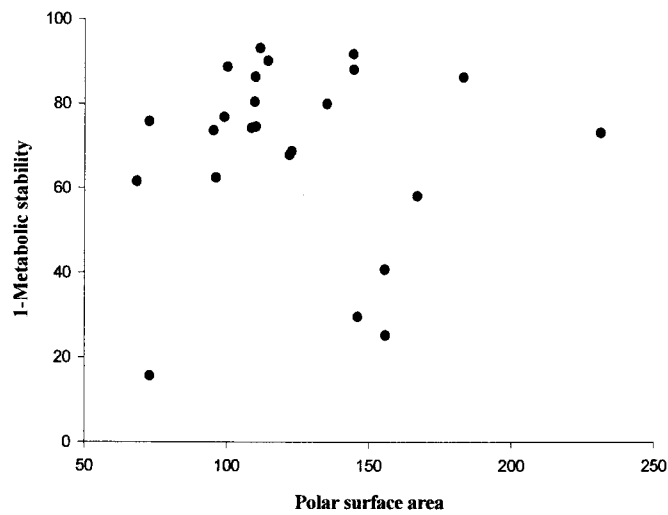


Figure 13. Relationship between in vitro metabolic stability and polar surface area

Simultaneous detection of metabolites by full-scan cassette analysis

Full-scan LC/ITMS에 의한 cassette analysis로부터 얻어진 scan mass spectra는 각 시료들의 독립적인 재분석 없이도 생성된 대사체들을 동시에 검출할 수 있었다. 따라서 full-scan에 의한 cassette analysis는 신속한 metabolic stability의 결정과 대사체들의 검출에 매우 유용함이 확인되었다. 대사체들은 30-min incubation 시료에서 예상되는 $[M+H]^+$ ion들의 mass peak를 확인하여 검출하였으며 0-min incubation 시료에서 검출되지 않는 것을 확인하여 시료 전처리 동안의 다른 불순물들에 의한 간섭효과

가 아님을 확인하였다. 또한 본 실험에서 사용한 simple한 HPLC gradient 시스템은 figure 10에서 보이는 바와 같이 대부분의 대사체들의 chromatographic separation을 가능하게 하였다. 이는 특히 isobaric 대사체들의 검출에 매우 유용하게 사용될 수 있었다. 각 약물들의 실제 검출된 대사체들의 수와 $[M+H]^+$ ion들을 Table 2에 열거하였다. 생성된 대사체들의 수는 1 ~ 10개의 다양한 범위를 보였으나 실제 대부분의 약물들은 4 ~ 6개의 대사체들을 생성시켰다. 대부분의 약물이 몇 가지의 다른 대사 경로를 보였으며 주로 *N,O*-dealkylation과 ring hydroxylation이 주 대사 경로를 이루고 있음을 확인하였다.

Figure 14는 조사된 여러 약물들 중 KCH-761과 생성된 대사체들의 reconstructed mass chromatogram을 보여 주고 있다. $[M+H]^+$ m/z 346, m/z 424, m/z 468 그리고 m/z 438에서 총 6개의 대사체가 검출되었으며 이중 m/z 468, m/z 438은 서로 다른 두 개의 isobaric 대사체가 존재함을 chromatographic separation을 통하여 확인할 수 있었다. 즉, M3와 M4는 monooxygenated $[M+O+H]^+$ isobaric 대사체를, 그리고 M5와 M6는 demethylated $[M-CH_2+H]^+$ isobaric 대사체를 나타낸다. KCH-761 이외의 다른 약물들에서도 monooxygenated 대사체와 demethylated 대사체가 각 약물의 주 대사 경로를 이루었으며 KCH-761에서와 마찬가지로 2 ~ 4개의 isobaric 대사체들이 검출되었다. Table 2에 열거된 바와 같이 조사된 모든 약물들에 대하여 예상되는 대사체들에 대한 nominal mass의 확인을 통하여 대사체들이 검출되었으며 이렇게 검출된 대사체들은 multi-stage tandem mass spectrometry (MS^n) 기술에 의하여 정확한 구조가 결정되었다.

LC/MSⁿ for structure confirmation of metabolites

Cassette analysis에 의하여 동시 검출된 각 약물들의 대사체들의 정확한 구조는 ion trap multi-stage tandem mass spectrometry (MS^n) 기술에 의하여 확인되었다. 각 대사체들 구조는 대사체의 product ion spectrum를 parent 약물의 product ion의 mass pattern과 비교하는 방법에 의하여 쉽게 결정될 수 있었으며 MS^2 로 결정하기 어려운 경우는 MS^3 의 product ion들에 의하여 결정되었다. Figure 15는 Figure 14에서 검출된 KCH-761의 6개 대사체들과 parent에 대한 MS^2 spectra를 보여주고 있다. 먼저, MS^2 spectrum에서 KCH-761은 m/z 299, m/z 275, m/z 260 그리고 m/z 190의 fragment ion들에 의하여 구조적 특징이 기술된다. 또한 이와 같은 mass fragment pattern이 대사체들의 MS^2 spectrum에서도 관찰되었다. 대사체 M1은 parent와 비교시, m/z 260이 그대로 유지되며 parent의 m/z 275가 m/z 169로 변화됨을 알 수 있다. 이로부터 M1은 parent의 piperazine 부분으로부터 $[-C_6H_4-OCH_3]$ 가 떨어져 나간 구조임을 알 수 있었다. M2는 parent의 m/z 275, m/z 260 그리고

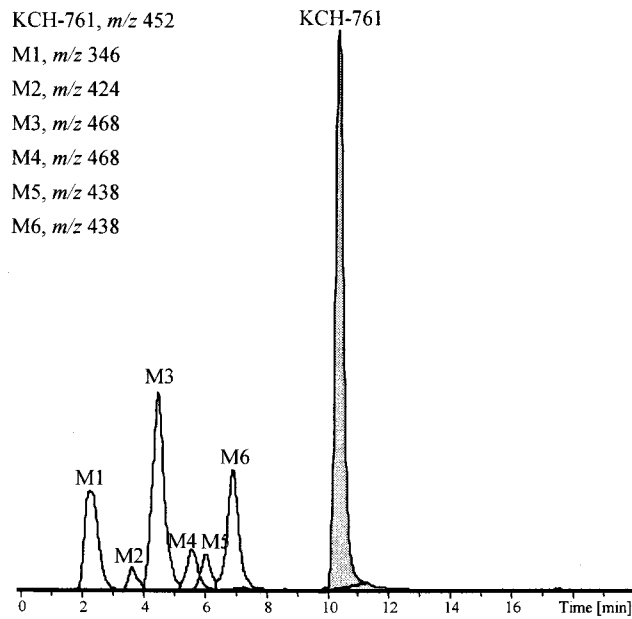


Figure 14. Reconstructed mass chromatograms of the metabolites of dopamine receptor antagonist KCH-761 after 30-min incubation with rat liver microsome

m/z 190이 m/z 261, m/z 246 그리고 m/z 176으로 변화된 것을 확인할 수 있다. 이 결과는 M2가 parent의 piperazine 부분과 isoxazole부분으로부터 각각 하나씩의 O-demethylation이 일어난 구조임을 확인할 수 있었다. 그러나 isoxazole부분의 두 methoxy group으로부터 어느 쪽에 demethylation이 발생하였는지는 확인될 수 없었다. M3는 parent의 m/z 275와 m/z 190이 m/z 291과 m/z 206으로 변하고 m/z 260이 그대로 유지된 것을 확인할 수 있다. 이러한 mass fragment pattern은 parent의 aromatic ring을 포함한 piperazine 부분에 hydroxylation이 발생한 구조임을 알 수 있었다. 또한 구조적으로 유사한 KCH 약물들의 MS² fragmentation pattern과의 비교는 aromatic ring에 hydroxylation이 발생했음을 알 수 있었다. M5와 M6는 O-demethylation된 isobaric 대사체로 검출되었다. Chromatographic separation과 각 대사체들의 MS² spectrum은 isobaric 대사체의 구조를 정확히 확인할 수 있었다. 즉, parent의 MS² spectrum과 비교할 때 M5는 m/z 275와 m/z 190이 그대로 유지되며 m/z 260이 m/z 246으로 변화되었고, 반면 M6는 m/z 260이 그대로 유지되며 m/z 275와 m/z 190이 m/z 261와 m/z 176으로 변화된 것을 확인할 수 있다. 이로부터 M5는 isoxazole부분에서 demethylation이, 그리고 M6는 piperazine 부분에서 demethylation이 일어난 구조임을 확인할 수 있었다.

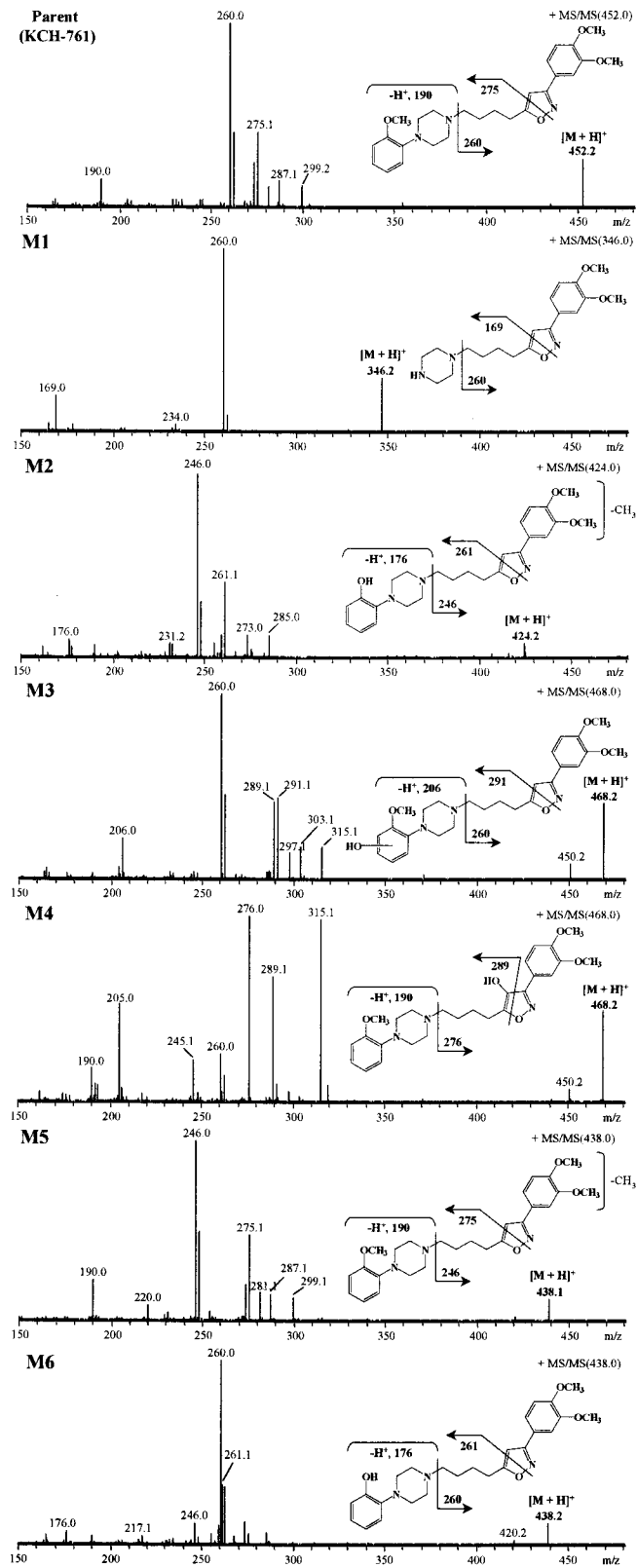


Figure 15. MS² spectra of parent KCH-761 and its metabolites

M4는 parent와는 약간 다른 mass pattern을 보이고 있다. M4의 정확한 구조 결정을 위하여 parent와

M4에 대한 MS³를 시도하였으며 결정된 mass fragmentation pattern을 figure 11에서 설명하였다. Figure 16 (A)에서 설명되어 있는 바와 같이 KCH-761은 MS² spectrum에서 m/z 299, m/z 275, m/z 260의 fragment ion들에 의하여 구조적 특징이 기술된다. 또한 parent의 452>275와 452>260의 MS³ spectrum을 보면 452>275는 m/z 190이 452>260은 m/z 176이 특징적인 product ion으로서 검출된다. 반면, figure 16 (B)에서 보여지는 바와 같이 M4는 KCH-761의 product ion들과 비교하여 볼 때 m/z 299과 m/z 176이 +16 증가된 m/z 315과 m/z 192를 보이고 있으며 m/z 276과 m/z 190이 그대로 유지가 됨을 볼 수 있다. 이는 isoxazole의 ring안에 hydroxylation이 일어났음을 증명한다.

Figure 17은 이상과 같은 연구를 통하여 얻어진 KCH-761의 대사 경로를 보여주고 있다. 17개의 모든 dopamine D₃/D₄ receptor antagonist들에 대하여 MSⁿ을 수행함으로써 생성된 대사체들의 정확한 구조를 결정할 수 있었다.

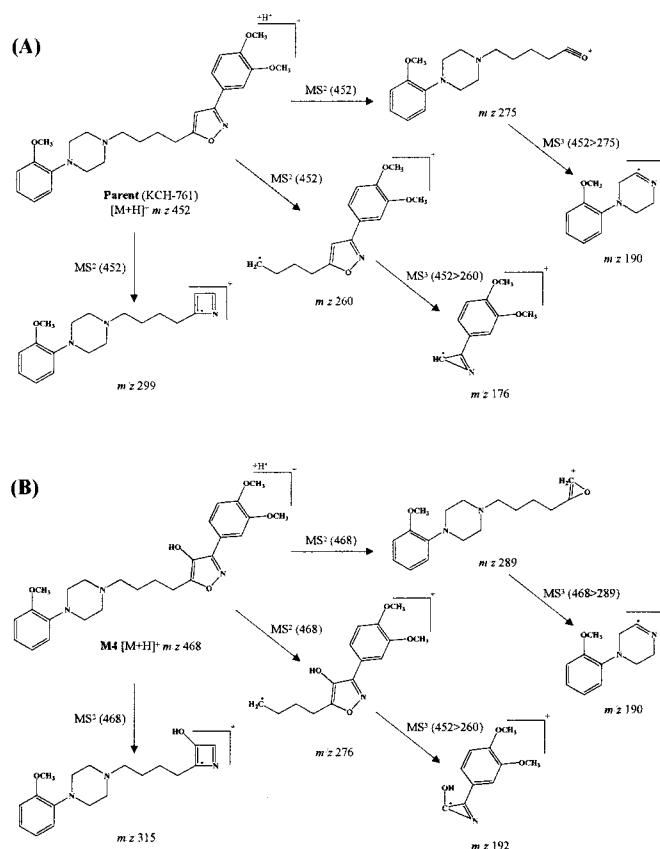


Figure 16. Proposed MS² and MS³ mass fragmentation of (A) KCH-761 and (B) its monoxygenated metabolites M4

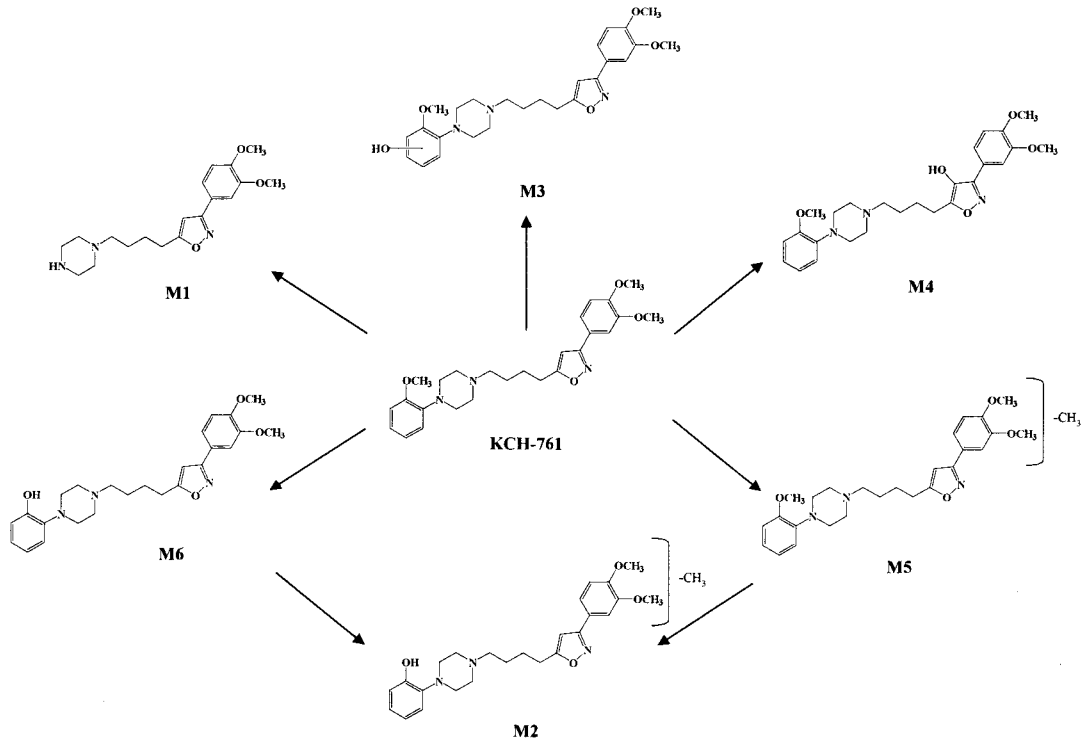


Figure 17. Postulated metabolic pathway of KCH-761 in rat liver microsomes

Metabolic stability of various drug candidates

본 연구에서 개발된 신속 대사 스크리닝 방법은 현재 약물 개발 단계 (Drug discovery stage)에 있는 다양한 종류의 약물 후보물질들의 스크리닝을 위하여 적용되었다. Figure 18은 human microsome을 이용한 일부 약물들의 metabolic stability를 보이고 있다. 각 약물들은 본 연구에서 개발된 신속 대사 스크리닝 방법을 이용하여 성공적으로 평가될 수 있었다. Reference drug으로서 felodipine이 사용되어 실험 방법의 신뢰도를 확인하였다. 얻어진 각각의 대사 안전성은 개발단계에 있는 약물들의 스크리닝에 많은 정보를 제공하였으며 다음 단계로 진행할 drug candidate들의 선정에 중요한 정보를 제공하였다. 또한 Figure 19과 20은 구조와 대사 안전성의 예측을 위하여 Log P 또는 molecular volume과의 상관 관계를 보였다. 상관성 분석을 위한 표현인자는 다음과 같았다.

Log P: $\sum n_i a_i$ (n_i : the number of atoms of type i , a_i : the atomic logP contribution)

Molecular volume: space 0.75 Å에서 계산된 화합물의 van der Waals 부피

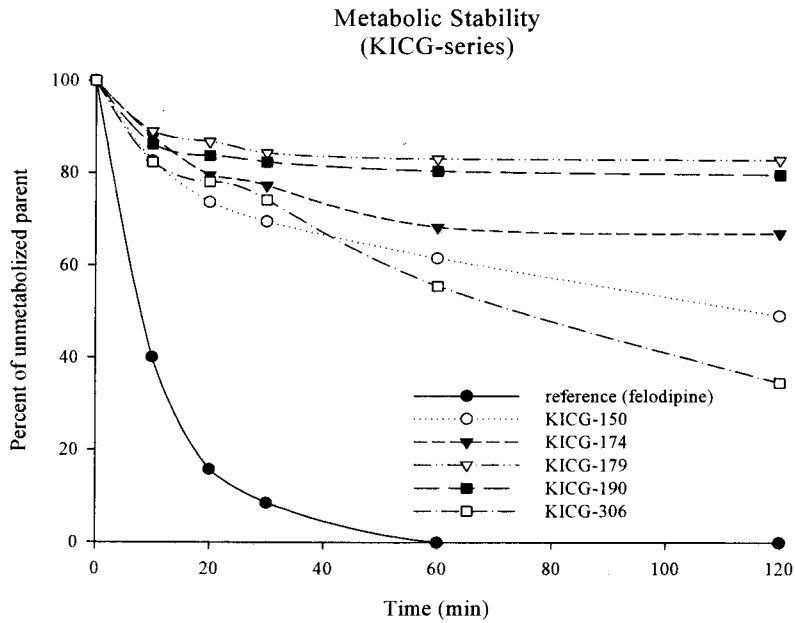
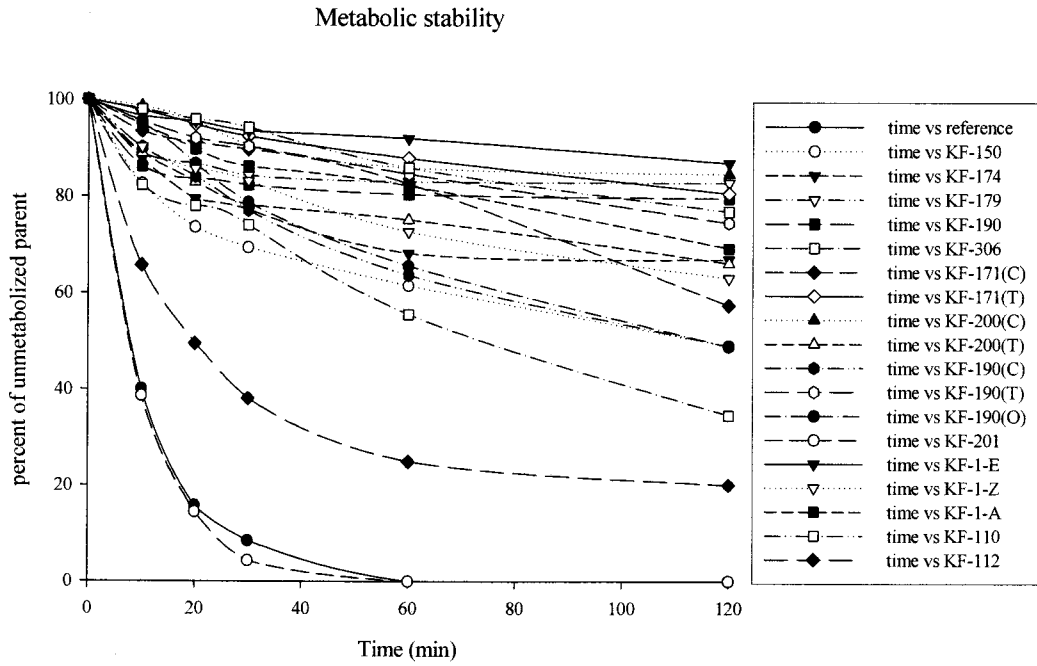


Figure 18. Metabolic stability of various drug candidates

일반적으로 Log P 값이 약 5 이상일 때 높은 대사 안전성을 보였으며 molecular volume이 약 400 \AA^3 이상일 때 대사 안전성이 높았다. 표현 인자와의 상관성 분석을 통하여 대사 안전성에 분자의 volume과 소수성이 중요 인자임을 확인할 수 있었다.

이상과 같이 본 연구에서 수행한 LC/ion-trap tandem MS 기술과 cassette analysis 그리고 in vitro 대사 모델이 병합된 high-throughput 개념의 대사 스크리닝 기술은 신속히 metabolic stability와 metabolic pathway를 제공할 수 있었다. 본 연구에서 개발 적용된 신속 대사 스크리닝 방법은 신약 개발의 초기 단계에서 신약 후보물질들을 평가하는데 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

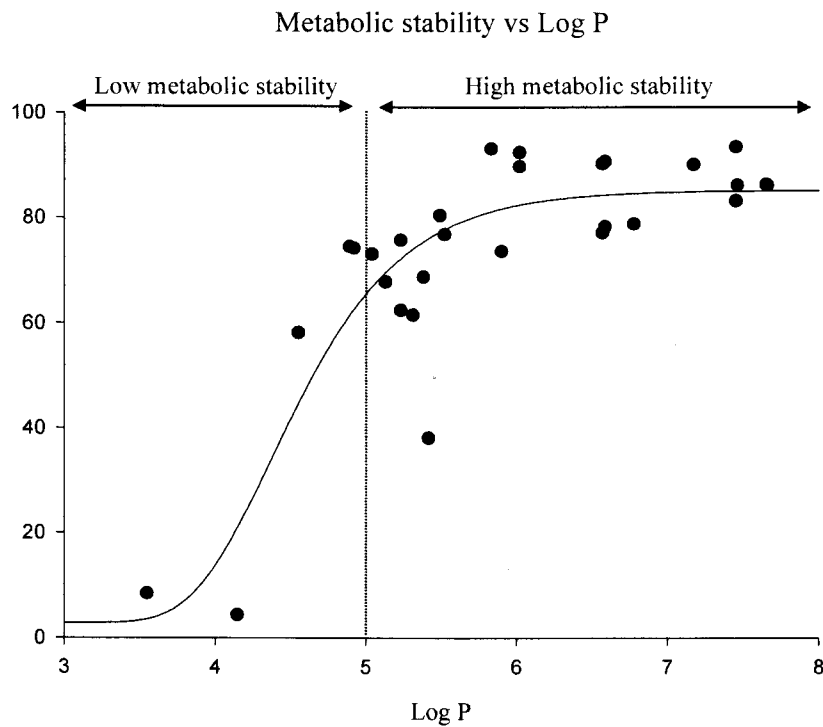


Figure 19. Relationship between metabolic stability and Log P

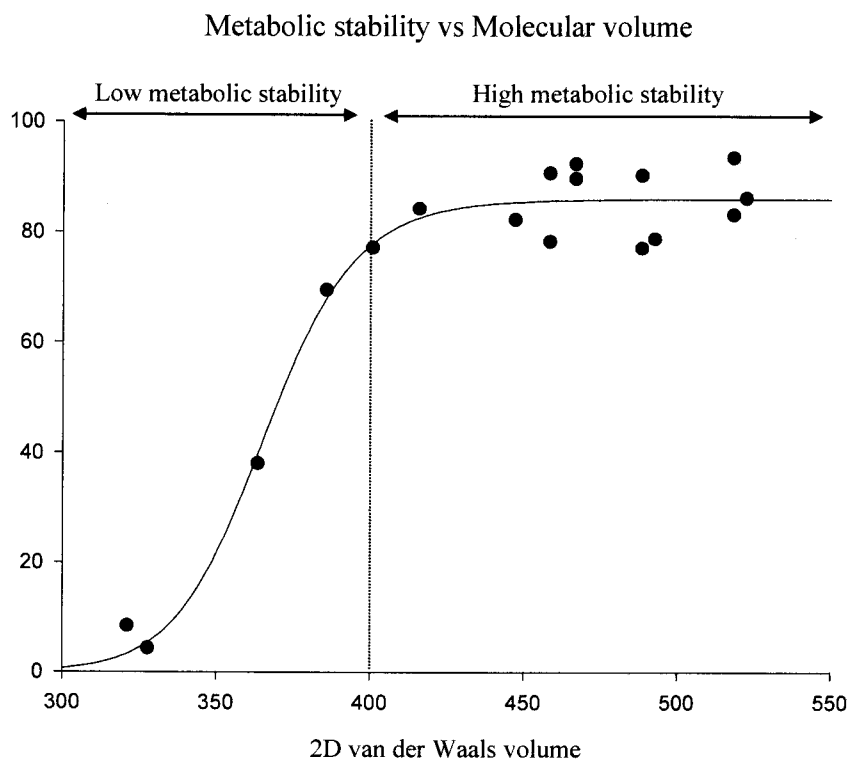


Figure 20. Relationship between metabolic stability and molecular volume

여 백

제 2 장 개발약물의 대사 profiling 및 구조분석 연구

약물대사 (Drug metabolism)에 관한 연구는 신약 개발 (Drug discovery and development)의 많은 분야에서 중요한 연구의 분야로 점차 인식되어지고 있다. 약물의 대사는 체내로부터 약물의 급격한 배출이나 관여 효소의 저해 또는 유도, 그리고 독성 등과 같은 예기치 못한 결과들을 가져올 수 있다. 따라서 약물의 대사 경로를 정확하게 이해하는 것은 매우 중요하며, 생성된 대사체들에 의한 약물 독성이나 대사에 의한 약물의 변형 부위를 확인하는 것은 좀 더 나은 생리활성을 가지는 약물의 고안에 관한 중요한 정보를 제공할 수 있다. 이렇게 약물의 대사경로를 신속, 정확하게 평가하는 것은 신약개발의 분야에서 매우 중요한 과제라 할 수 있다.

Tandem mass spectrometry (MS/MS)와 병합된 liquid chromatography (LC)의 발전은 이러한 신약 개발에 있어서 매우 중요한 역할을 하고 있으며 현재 LC-MS/MS 기술은 다양한 약물 및 약물 유래 미지 대사체들의 정량 및 정성 분석에 널리 사용되고 있다. 특히 ion-trap MS는 quadrupole MS에 비하여 scan mode에서 감도가 매우 우수하여 약물대사와 관련한 미지의 대사체들의 구조 결정에 매우 유용하게 사용되고 있다. 또한 대사체들의 구조 결정은 multi-stage tandem mass spectrometry (MS^n) 방법을 이용한 MS^2 에서 생성된 product ion spectrum들의 해석을 통하여 수행된다. 따라서 ion-trap과 같은 low-energy collision induced dissociation하에서 생성된 product ion spectrum들의 정확한 해석은 약물 대사에 있어 매우 중요한 과제라 할 수 있다.

본 연구에서는 discovery, preclinical 그리고 clinical 단계에 있는 약물들의 대사 경로를 규명하기 위하여 약물들의 mass fragmentation mechanism을 규명하고 이를 바탕으로 미지 대사체들의 각 product ion spectrum들을 해석하여 각 약물의 in vitro 및 in vivo 대사 경로를 규명하였다. 얻어진 대사 경로에 대한 정보는 약물의 평가에 매우 중요한 정보를 제공하였다.

제 1 절 말라리아 치료제, pyronaridine의 *in vitro*와 *in vivo* 대사

1. 서론

Pyronaridine은 1970년대 초에 Zheng 등에 의하여 합성된 말라리아 치료제이다. Pyronaridine은 chloroquine보다 독성이 적으며 chloroquine-sensitive와 resistant parasite들에 대하여 높은 활성을 보인다. 또한 haemoglobin degradation에 영향을 미치며 현재는 artesunate와 병행한 임상실험이 진행 중이다. 그러나 pyronaridine의 이러한 약물학적 중요성에도 불구하고 pyronaridine의 대사 경로에 대한 연구는 전혀 진행되어 있지 않다. 따라서 본 연구에서는 liquid chromatography-ion trap mass spectrometry (LC-MS/MS)를 이용하여 pyronaridine의 *in vitro*와 *in vivo* 대사 경로를 규명하고자 한다. Pyronaridine의 대사 경로를 규명하기 위하여 pyronaridine과 pyronaridine quinoneimine 대사체의 low energy-CID 하에서의 mass fragmentation mechanism을 규명하고 이를 바탕으로 생성된 대사체들의 각 구조들을 결정하여 pyronaridine의 대사 경로를 규명한다.

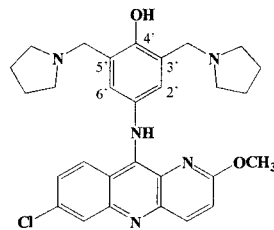


Figure 1. Structure of pyronaridine

2. 실험방법

Microsomal incubation

반응액은 전체 200 μ l의 potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5)내에 0.2 mg microsome, 100 μ M pyronaridine 그리고 NADPH-generating system (0.1 M glucose-6-phosphate, 10 mg/ml β -NADP⁺ 그리고 1 unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase)로 구성되었으며 반응은 NADPH-generating system의 첨가에 의하여 시작되었다. 37°C에서 2 시간동안 incubation 한 후 200 μ l의 acetonitrile을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 시료를 vortex 하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분석하였다.

Animal experiment

Male Sprague-Dawley rat에 50 mg/kg로 pyronaridine을 복강 주사 한 뒤 metabolic cage에 넣어 urine과 feces를 수집하였다. Urine과 feces는 0 - 12 그리고 12 -24 시간 간격으로 수집되었으며 분석하기 전까지 -20°C에서 보관되었다.

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry

HPLC system은 Agilent 1100 series를 사용하였으며 mass spectrometry는 electrospray ionization source와 ion trap analyzer가 장착된 tandem MS system을 사용하였다. Column은 YMC hydrosphere C₁₈ (2.0 × 150 mm, 5µm)을 사용하였으며 이동상으로는 0.2% acetic acid [A]와 acetonitrile [B]를 사용하였다. Flow rate은 0.2 ml/min이었으며 gradient 조건은 4% [B]에서 30% [B]로 linear하게 23 분 동안 변화시켰다. Mass spectrometry의 nebulizing과 drying gas는 nitrogen을 각각 35 psi와 8 l/min에서 사용하였으며 drying temperature는 350°C였다. Positive ion mode에서 수행되었으며 collision gas로서 helium이 사용되었다. Fragmentation을 위한 resonant excitation amplitude는 0.85 - 1.00 eV를 사용하였으며 isolation을 위한 selected mass width는 1 Da을 사용하였다.

3. 실험결과

In vitro 와 *in vivo* 대사 프로파일

Figure 2 (A)는 pyronaridine을 rat liver microsome과 incubation 한 후 얻어진 대표적인 extracted ion chromatogram을 보이고 있다. Rat liver microsome과의 incubation은 11개의 대사체를 생성하였으며 그들의 [M+H]⁺는 *m/z* 550, 516, 548, 502, 546, 532, 530 그리고 562에서 관찰되었다. 반면, human liver microsome과의 incubation은 9개의 대사체를 생성하였으며 그들의 [M+H]⁺는 *m/z* 550, 516, 478, 532, 530, 546 그리고 562에서 관찰되었다 (Figure 2 (B)). M1, M3, M10, M11, M12 그리고 M20은 human과 rat 모두에서 관찰되었고, M4, M5, M6, M8 그리고 M9는 rat에서만, 그리고 M7, M18 그리고 M21은 human에서만 관찰되었다.

Rat에 50 mg/kg로 pyronaridine을 복강 주사 한 후 urine과 feces이 수거되었고 분석되었다. Pyronaridine은 3개의 glucuronide conjugate된 대사체를 포함, 총 14개의 대사체들로 다양하게

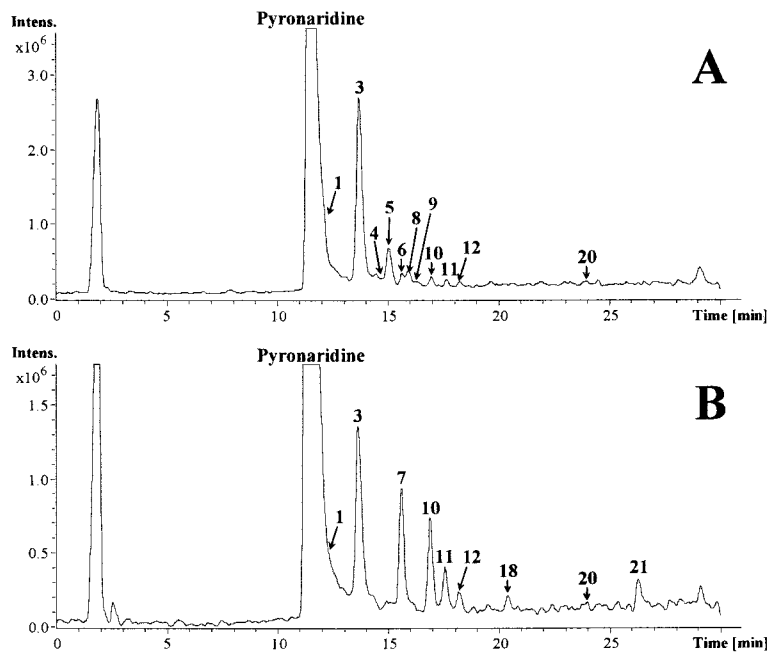


Figure 2. Extracted ion chromatograms of pyronaridine incubated with rat liver microsomes (A) and human microsomes (B).

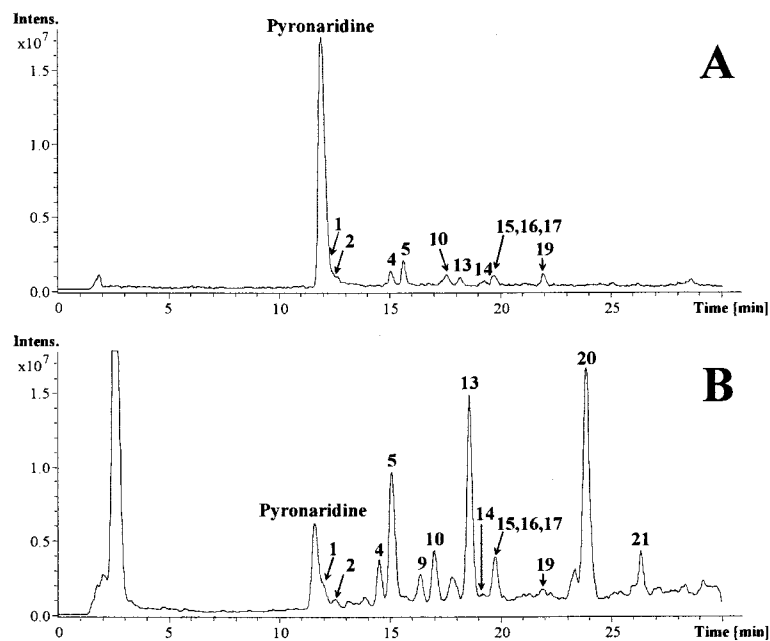


Figure 3. Extracted ion chromatograms of urine (A) and fecal extracts (B) collected for the first 24 hrs after an intraperitoneal injection of pyronaridine to rats (50 mg/kg).

Table 1. Chromatographic and mass spectrometric data of pyronaridine and its metabolites

Metabolites	Retention time (min)	[M+H] ⁺	MS ² (m/z)	MS ³ (m/z) ^a
Pyronaridine	11.6	518	447*	376, 378
M1	11.9	550	479, 447*	376, 378
M2	12.5	694	518, 447, 376	
M3	13.6	516	447*	376, 378
M4	14.5	548	477*	376, 378
M5	15.0	548	530, 477*	459, 376, 378
M6	15.5	502	433*	362, 364
M7	15.6	478	461*	376, 378
M8	15.9	546	477*	459, 376, 378
M9	16.3	548	461*	376, 378
M10	17.0	532	461*	376, 378
M11	17.5	550	479, 447*	376, 378
M12	18.2	530	461*	376, 378
M13	18.6	724	548, 530, 477, 459	-
M14	19.2	534	463*, 433	362, 364
M15	19.6	516	445*, 433	362, 364
M16	19.7	534	463*, 433	362, 364
M17	19.7	708	532, 461, 376	-
M18	20.4	546	528, 461*	376, 378
M19	21.9	518	447*	362, 364
M20	23.8	562	461*, 477*	376, 378
M21	25.3	546	461*	376, 378

* Major product ion of MS²

^a Product ions of MS² major ion (*)

대사 되었다. Urine과 fecal extracts의 대표적인 extracted ion chromatograms을 Figure 3에서 보인다. 그들의 MH^+ 는 m/z 550, 694, 548, 532, 724, 534, 516, 708, 518, 562 그리고 546에서 관찰되었다. Pyronaridine은 urine으로 주로 배설된 반면 대사체들은 feces에서 많이 검출되었다. 각 대사체들의 protonated molecular ions과 주 product ions 그리고 HPLC retention time들을 Table 1에 요약하였다.

Protonated (deuterated) pyronaridine과 metabolite 3 (quinoneimine)의 CID

Amodiquine과 같이 aminoquinoline 부위를 가지고 있는 mannich base antimalarial agent들은 cytochrome P450 (CYP) enzyme에 의하여 화학적으로 reactive한 quinoneimine으로 쉽게 대사되며 이 quinoneimine 대사체가 독성을 유발하는 것으로 알려져 있다. 본 실험에서 mannich base agent인 pyronaridine의 in vitro microsomal incubation은 주 대사체로서 quinoneimine (M3)을 형성하였다. Protonated pyronaridine (m/z 518), d_3 -pyronaridine (m/z 521) 그리고 protonated M3 (quinoneimine, m/z 516)의 MS^2 와 MS^3 spectra를 Figure 4에서 보이고 있다. Protonated (d_3) pyronaridine과 protonated M3의 MS^2 는 m/z 447 (449 for d_3 -pyronaridine)에서 주 product ion을 생성하였으며 m/z 447 (449) ion의 MS^3 는 m/z 376 (377)과 378 (380)에서 주 product ion을 보였다. 이와 같이 M3는 pyronaridine에 비하여 분자량에 2 amu의 감소를 보이지만 그 product ion들은 pyronaridine과 동일한 ion들을 보였다.

Figure 5는 mass fragmentation mechanism을 보이고 있다. Ion trap의 low-energy CID하에서 pyronaridine은 pyrrolidine의 nitrogen에 protonation이 된 후 charge site-initiated heterolytic cleavage에 의하여 분해된다. 즉 C-N bond의 cleavage는 m/z 447에 even electron cation (EE^+)와 71 Da의 neutral fragment를 생성한다. 그리고 pathway A에서 보여지는 것과 같이 이 cation은 charge site migration을 경험하게 된다. 반면 quinoneimine 대사체인 M3는 그 구조 내에 carbonyl group (π system)을 가지고 있으며 그로 인하여 pathway B를 통하여 분해된다. 결국 v -Hydrogen이 carbonyl group으로 transfer되고 sterically favorable한 six-membered-ring transition state를 이루게 된다. 이어서 중간체는 resonance stabilized cation을 형성하기 위하여 1,7-sigmatropic shift를 경험하게 되면 결과적으로 69 Da의 neutral loss를 통하여 pyronaridine과 같은 m/z 447에 product ion을 형성하게 된다. m/z 447의 product ion은 MS^3 에서 m/z 376 (neutral loss of 71 Da)과 m/z 378 (neutral loss of 69 Da)에 cation들을 형성하게 된다.

Figure 5에서 부과 설명된 것처럼 d_3 -pyronaridine (m/z 521)의 MS^2 는 제시된 pyronaridine의 fragmentation mechanism을 더욱 강력히 뒷받침한다. MS^2 단계에서 A-pathway (71 Da loss)인지

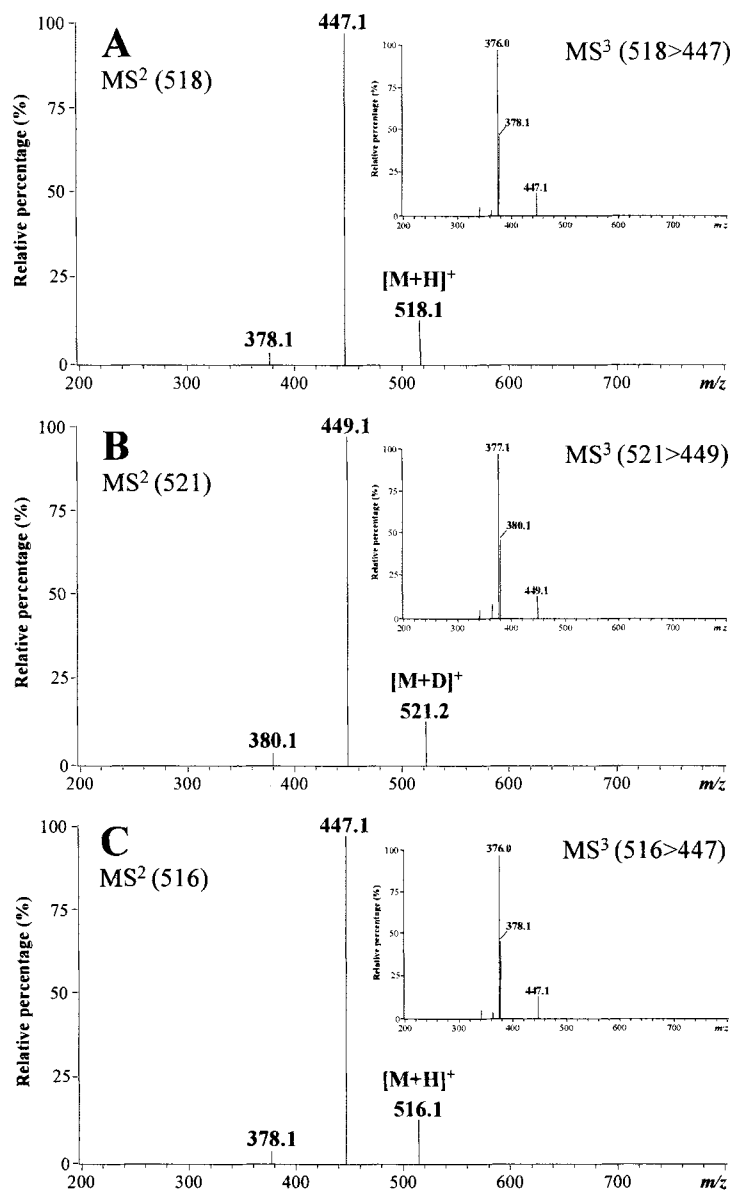


Figure 4. MS² and MS³ spectra of the protonated pyronaridine (*m/z* 518) (A), *d*3-pyronaridine (*m/z* 521) (B) and the protonated M3 (*m/z* 516, pyronaridine quinoneimine) (C) under low-energy CID in an ion trap.

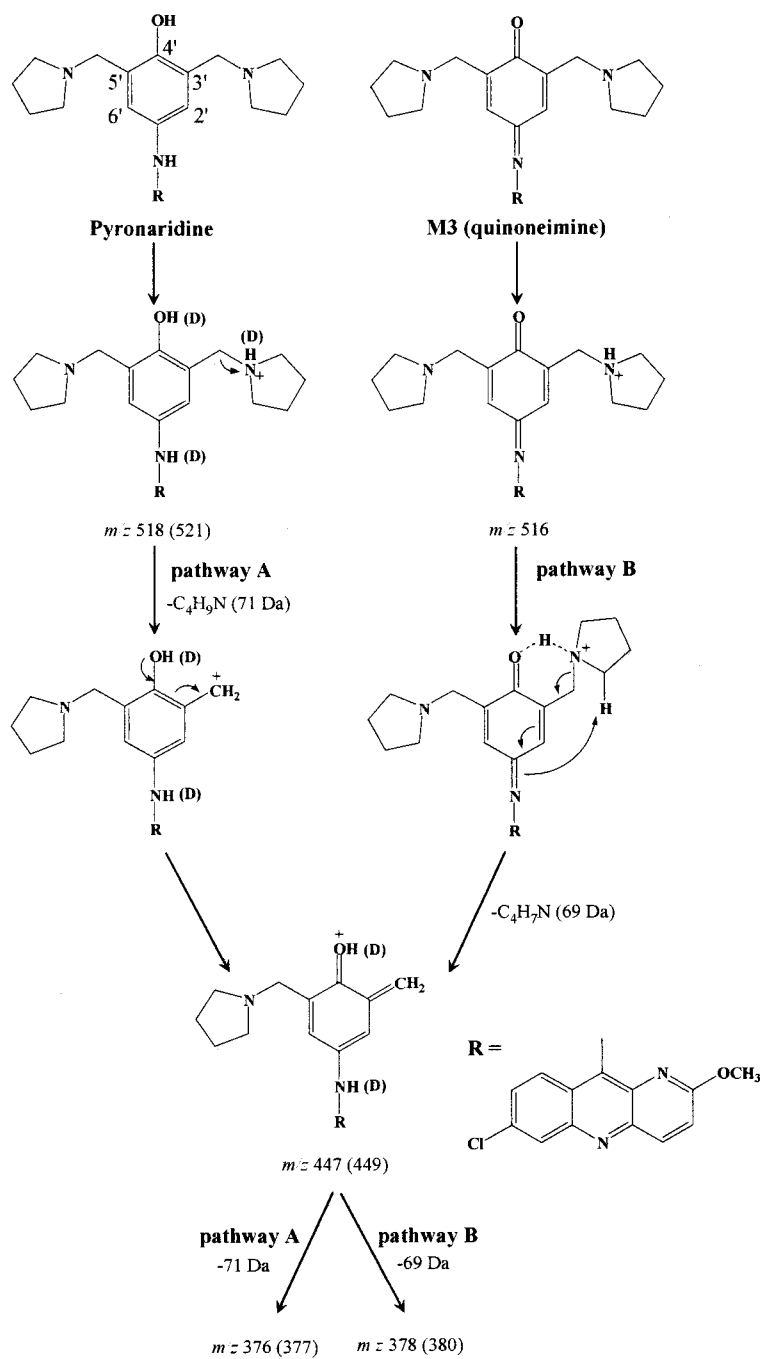


Figure 5. Proposed fragmentation mechanism, and structures of the product ions, observed in MS^2 and MS^3 of the protonated pyronaridine and protonated M3. The data in parentheses are those observed in MS/MS of deuterated d_3 -pyronaridine.

B-pathway (69 Da loss)인지를 아는 것은 생성된 대사체들의 기본 골격을 결정하는데 매우 중요한 정보를 제시한다.

대사체들의 구조 결정

Pyrrolidine을 포함한 화합물들은 nitrogen에 인접한 carbon에 hydroxylation을 경유하여 쉽게 carbonylation 된다. 이처럼 in vitro와 in vivo system에서 carbonylation된 다양한 대사체들의 형성은 pyronaridine 대사의 특징이었다. M10은 분자량에 14 amu의 증가를 나타냈으며 MS²는 m/z 461에서 product ion을 형성하였다 (Figure 6 and Table 1). 또한 m/z 461의 MS³는 m/z 376과 378에서 ion을 생성하였다. 이것은 두개의 pyrrolidine 부위 중 한곳에 carbonylation이 발생했음을 지적한다. 두 pyrrolidine 부위의 basicity를 고려할 때 carbonylated pyrrolidine보다 non-modified pyrrolidine에 우선적으로 protonation이 발생한다. 결국 C-N bond의 cleavage는 m/z 461에 cation을 형성하게 되며 이 cation은 MS³에서 m/z 376과 85 Da (71 + 14 Da)의 neutral 분자로 분해된다. MS²에서 m/z 461에 특징적인 fragment ion은 M7, M9, M12, M18, M20 그리고 M21에서 관찰되었다. 또한 MS³에서 m/z 376과 378에 ion들은 대사체들에서 benzo[b]-1,5-naphthyridines 부위가 변형되지 않았음을 지적한다. M12는 M10에 비하여 2 amu의 분자량 감소를 보이며 이는 M12가 M10의 quinoneimine 대사체임을 지적한다. M7은 m/z 478에서 protonated molecular ion을 보였으며 pyronaridine으로부터 40 amu의 분자량 감소와 M10과 동일한 product ion spectra를 보였다. 이는 pyrrolidine들 중 하나가 ring cleavage를 통하여 amine으로 변화되었음을 지적한다. 유사하게 M9, M20 그리고 M21은 각각 M10의 hydroxyl, hydroxyl lactam 그리고 lactam 대사체들로 그 구조를 밝힐 수 있었다.

M19는 pyronaridine과 동일한 분자량과 m/z 447의 MS² ion을 갖는다. 그러나 m/z 447의 MS³는 m/z 362에서 product ion을 생성하였다. 이는 benzo[b]-1,5-naphthyridines에서 demethylation이 발생했음을 지적한다. 덧붙여 m/z 447 ion은 pyrrolidine이 lactam으로 전환되었음을 지적한다. Non-modified pyrrolidine의 nitrogen에 protonation 후 C-N bond의 cleavage는 m/z 447의 cation과 71 Da의 neutral fragment를 형성하고 이 m/z 447의 cation은 MS³에서 m/z 362에 cation과 85 Da (71 +14 da)의 neutral molecule로 분해된다. M6, M14, M15 그리고 M16은 MS³에서 m/z 362와 364에 fragment ion들을 보인다. 두 isobaric 대사체인 M14와 M16은 MS²에서 m/z 463에 fragment ion을 보였으며 이는 O-demethyl과 hydroxyl lactam 구조임을 나타낸다. M15는 m/z 516에서 protonated molecular ion을 그리고 m/z 445에서 MS² product ion을 보였다. 이 대사체는 O-demethyl lactam 유도체로 판명되었다.

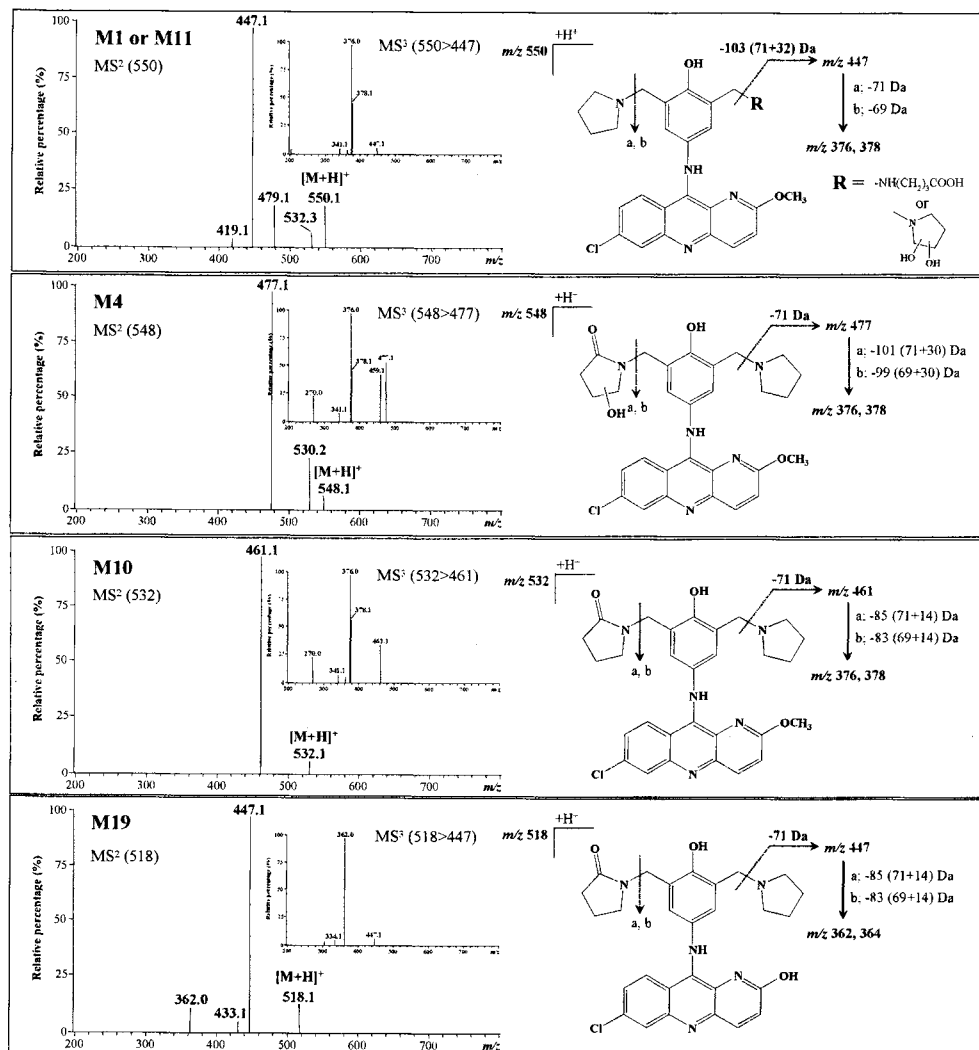


Figure 6. MS² and MS³ spectra and fragmentations of protonated M1 (11), M4, M10 and M19 (m/z 550, 548, 532 and 518) under low-energy CID in an ion trap.

M4는 pyronaridine에 비하여 30 Da의 분자량 증가를 보였으며 MS²에서 m/z 477, MS³에서 m/z 376과 378에 ion들을 보였다. 이것은 두개의 pyrrolidine 중 한쪽에서 30 Da의 증가가 발생했음을 보이며 hydroxyl lactam 구조로 밝혀졌다. M8은 M4의 quinoneimine 대사체이며 M5는 M4의 isobaric 대사체였다.

4. 고찰

Amodiaquine과 같은 4-aminoquinoline antimalarial 약물들은 prophylactic administration동안에 환자들에게서 agranulocytosis나 hepatotoxicity를 유발함으로써 약물 개발 (development) 단계에서 탈락하거나 제한적인 임상 적용을 받았다. 이러한 독성들은 reactive한 quinoneimine 대사체들에 의하여 유발되는 것으로 추정되고 있다. Aminoquinoline을 갖고 있는 mannich base antimalaria 약물들은 myeloperoxidase나 cytochrome P450 (CYP) enzyme들에 의하여 화학적으로 활성이 큰 quinoneimine으로 대사되는 것으로 보고되어져 있다. 이 quinoneimine은 그 구조 내에 C5' 위치에 glutathione (GSH)와 쉽게 conjugation 될 수 있으며 bile로 제거된다. 그러므로 quinoneimine 대사체의 형성과 결과하는 GSH conjugation은 mannich base 약물 연구의 주 관심사이다.

본 실험에서 pyronaridine의 quinoneimine 대사체는 rat과 human liver microsome 모두에서 확인되었으며 이 quinoneimine 대사체 M3는 in vitro에서 주 대사체로 확인되었다. 기존에 C5' substituted bis-mannich agents에서 quinoneimine 대사체는 보고되어 있지 않다. Pyronaridine 또는 cycloquine이 peroxidase의 존재하에서 neutrophil에 cellular glutathione을 감소시킨다 할지라도 pyronaridine이나 cycloquine이 horse radish peroxidase, H₂O₂ 그리고 glutathione과 배양 되었을 때 어떠한 quinoneimine 대사체나 glutathione conjugate된 대사체들도 확인되지 않았다. 하지만 pyronaridine의 oxidation을 위한 계산된 enthalpy 값은 amodiaquine의 값보다 낮으며 이는 pyronaridine이 quinoneimine 대사체들로 대사 될 수 있음을 강하게 지적한다. Hepatic cytochrome P450 enzyme에 의한 quinoneimine 대사체로 전환은 amodiaquine의 경우 많이 보고되어져 왔으며 이들 결과는 pyronaridine이 C5' 위치가 block되어져 있다는 사실에도 불구하고 electrophilic quinoneimine 대사체들로 전환될 수 있음을 강력히 지지한다.

Quinoneimine 대사체들은 C5' 위치에 glutathione과 conjugation되거나 또는 cellular defense mechanism에 의하여 낮추어질 수 있다. 우리의 in vivo 실험에서 pyronaridine의 quinoneimine 대사체들과 그들의 GSH conjugate 대사체들은 urine과 feces 모두에서 검출되지 않았다. Tebuquine을 제외한 몇몇의 C5' substituted bis-mannich agent에 대하여 어떠한 GSH conjugate 대사체들도 bile에서 검출되지 않았음이 보고되어 있다. Quinoneimine 대사체들의 conjugation은 steric constraint나 electronic effect (C5' 위치의 치환에 의한 lipophilicity와 basicity 모두의 증가)를 통하여 block 될 것으로 추정된다. 결국

Pyronaridine의 quinoneimine 대사체들은 reduction에 의하여 detoxification 되는 것으로 사료된다. 이들 결과는 pyronaridine이 quinoneimine 대사체들로 대사 될 수 있으나 bile로 배설되기 전에 쉽게 reduction되어 detoxification 된다는 것을 시사한다.

Pyrrolidine ring의 nitrogen에 인접한 carbon에 hydroxylation은 lactam 형성으로 진행된다. 이들 반응들은 nicotine, cyproheptadine, tremorine 그리고 prolitan 등의 대사에서 잘 설명되어져 있다. Pyronaridine은 C3'과 C5'에 pyrrolidine을 각각 가지고 있으며 다양한 lactam 대사체들이 in vitro와 in vivo 모두에서 확인되었다. Lactam 대사체들은 iminium ion 또는 carbinolamine으로부터 형성될 수 있다. Iminium ion들은 aldehyde oxidase에 의하여 lactam으로 전환 될 수 있으며 또한 이 ion은 자발적인 hydrolysis에 의하여 carbinolamine으로도 전환 될 수 있다. 더욱이 불안정한 carbinolamine 중간체의 ring opening으로부터 형성되는 amino aldehyde 중간체들은 M1 또는 M11 (Figure 7)과 같은 amino acid 대사체들을 형성할 수 있다. M1과 M11의 구조가 mass spectra에 의하여 정확히 분별되기는 어렵다 할지라도 M1은 HPLC의 retention time에 준하여 carboxypropyl 대사체로 판명되었다. M1의 N-dealkylation은 M7의 형성을 가져 왔다.

결론적으로 Pyronaridine은 다음 세 가지의 대사 경로를 통하여 대사되었다. 1) aminoquinoline의 quinoneimine으로 전환, 2) pyrrolidine ring에 hydroxylation과 carbonylation, 3) O-demethylation. Quinoneimine 대사체들은 in vitro 상에서만 검출되었으며 이것은 다른 대사 반응이 quinoneimine의 형성보다 우선적으로 진행되며 quinoneimine 대사체들이 body에서 쉽게 reduction된다는 것을 암시한다. 또한 rat과 human microsome 사이에 상당한 species 차이를 보였다. O-demethylated 대사체들은 rat에서만 검출되었으며 반면 amino 대사체 M7은 human에서만 검출되었다.

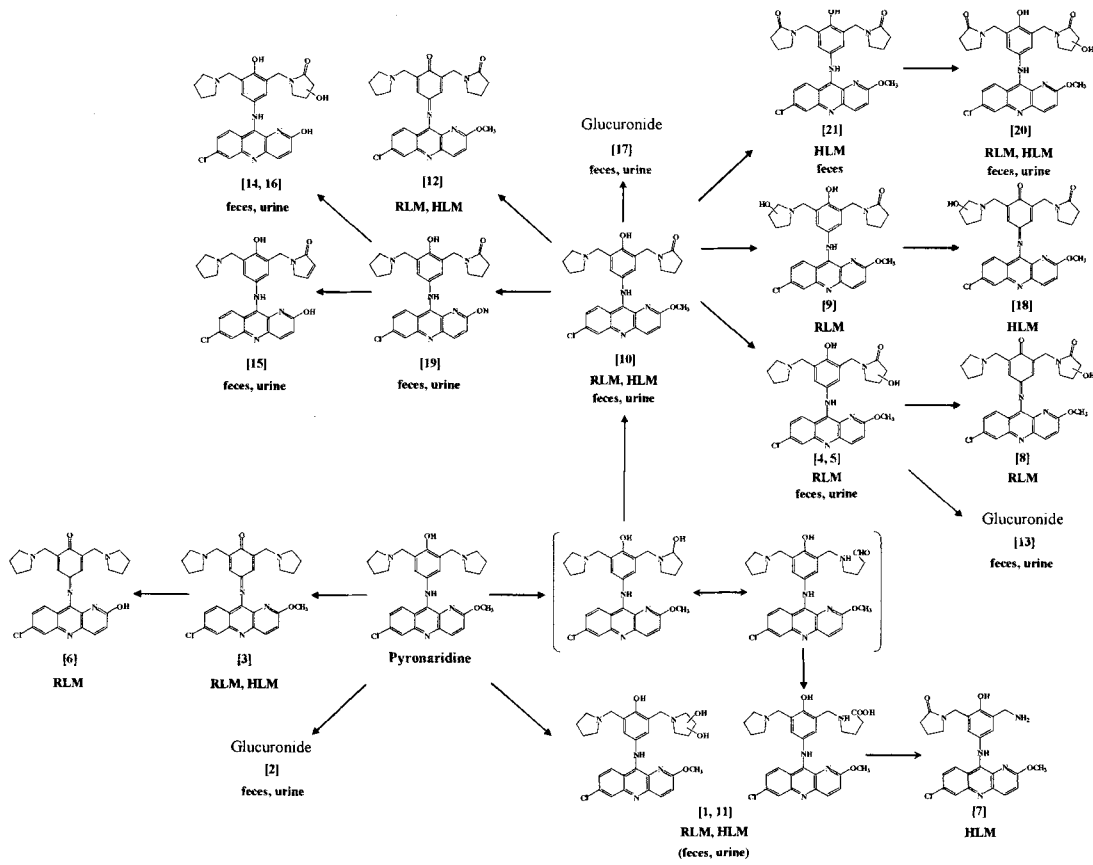


Figure 7. Postulated metabolic pathways of pyronaridine. RLM: rat liver microsomes, HLM: human liver microsomes

제 2 절 Radio-labeled compound를 이용한 대사 연구

2-1. 신규 항암제의 대사

1. 서론

YH3945 (1-[3-[3-(4-cyano-benzyl)-3H-imidazole-4-yl]-propyl]-3-(6-methoxy-pyridin-3-yl)-1-(2-trifluoromethyl-benzyl)-thiourea)는 farnesyl-protein transferase의 selective하고 potent한 저해제이며 cancer의 치료를 목적으로 개발되고 있는 약물이다. 본 연구에서는 전임상 (preclinical) 단계에 있는 YH3945의 대사 평가를 위하여 ^{14}C -labeled YH3945를 이용하여 rat에서 in vivo와 in vitro 대사를 수행하였다.

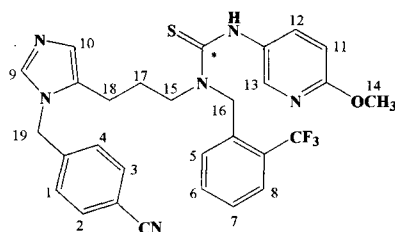


Figure 1. Chemical structure of YH3945. *, indicates the position of ^{14}C -labeled carbon.

^{14}C -labeled 화합물을 이용한 전임상 단계의 대사 연구를 위하여 본 연구에서는 multiple-detectors (diode array detector-radioactivity flow detector-tandem mass spectrometry)가 장착된 분석 system을 사용하여 시료의 single injection에 다양한 정보를 얻을 수 있는 체계화된 system을 구축하였으며 또한 mass spectra에 의하여 구조 해석이 어려운 대사체들에 대하여 1H- 와 TOCSY NMR을 수행하여 대사체들의 정확한 구조 확인을 수행하였다.

2. 실험방법

Excretion

Rat들에게 ^{14}C -labeled YH3945를 25 mg/kg로 정맥 투여한 뒤 metabolic cage에 넣어 두고 urine과 feces를 0-12, 12-24, 24-48, 48-72, 72-96, 96-120, 120-144 그리고 144-168 시간 간격으로 수거하였다. Biliary excretion을 위하여 bile duct cannulation된 rat들에 ^{14}C -labeled YH3945를 25 mg/kg로 정맥 투여한 뒤 처음 10 시간 동안은 1 시간 간격으로 그리고 나서 10-24 시간에 시료를 수거하였다. 여기서 얻어진 feces, urine 그리고 bile은 대사 연구를 위하여 사용되었다.

Metabolism study

In vitro 대사를 위하여 반응액은 전체 200 ul의 potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5)내에 1.0 mg/ml microsome, 50 uM ^{14}C -YH3945 그리고 NADPH-generating system (0.1 M glucose-6-phosphate, 10 mg/ml β -NADP⁺ 그리고 1 unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase)로 구성되었으며 반응은 NADPH-generating system의 첨가에 의하여 시작되었다. 37°C에서 2 시간동안 incubation 한 후 200 ul의 acetonitrile을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 시료를 vortex 하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분석하였다. Bile, urine, feces 그리고 plasma 시료들은 Sep-pak C₁₈ solid-phase extraction을 이용하여 cleanup 되었으며 methanol eluate들을 농축하여 분석하였다.

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry

HPLC system은 diode array detector (Agilent), β -RAM radioactivity flow detector (IN/US Corporation)과 LC/MSD ion-trap mass spectrometry가 장착된 Agilent 1100 series를 사용하였다. Column은 Capcell-Pak C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μ m)을 사용하였으며 이동상으로는 20 mM ammoniumformate (pH 4.0) [A]와 acetonitrile [B]를 사용하였다. Flow rate은 1.0 ml/min이었으며 gradient 조건은 20% [B]에서 50% [B]로 linear하게 25 분 동안 변화시킨 후 다시 80%로 5 분동안 변화시켰다. 전체 column eluent는 diode array detector로 직접 이동되었으며 그리고 나서 1/10 splitter를 거쳐 9/10은 β -RAM radioactivity flow detector로 그리고 나머지 1/10은 mass spectrometry로 이동되었다. Mass spectrometry의 nebulizing과 drying gas는 nitrogen을 각각 30 psi와 8 l/min에서 사용하였으며 drying temperature는 350°C였다. Positive ion mode에서 수행되었으며 collision gas로서 helium이 사용되었다. Fragmentation을 위한 resonant excitation amplitude는 0.85 - 1.00 eV를 사용하였으며 isolation을 위한 selected mass width는 1 Da을 사용하였다.

NMR spectrometry

대사체들의 구조 결정을 위한 1H와 TOCSY NMR은 Bruker AMX 600 spectrometer에서 얻어졌으며 대사체들은 0.5 ml의 CD₃OD에 용해시켜 수행하였다.

3. 실험결과

YH3945의 배설

¹⁴C-labeled YH3945의 single intravenous injection 후 urine과 feces에서 radioactivity의 배설을 Table 1에서 보이고 있다. 약물 투여 후 24 시간 동안 urine과 feces에서 전체 radioactivity의 회수는 각각 11%와 48%였다. 7일 동안 회수된 전체 radioactivity는 74%이며 feces에서 62%, 그리고 urine에서 12%였다. 또한 24 시간동안 bile로 배설된 radioactivity는 복용된 양의 총 22%가 배설되었다.

YH3945의 대사 프로파일

Rat에서 YH3945의 in vitro 대사는 rat liver microsome과의 incubation을 통하여 수행되었다. NADPH-generating system (NGS)하에서 YH3945는 11개의 대사체들로 대사되었으며 M17은 주 대사체였다 (Figure 2). YH3945는 NGS의 부재하에서는 대사되지 않았으며 이는 YH3945가 cytochrome P450 enzyme에 의하여 대사되었음을 강력히 시사한다.

¹⁴C-YH3945의 i.v. 투여 후 얻어진 plasma, feces, urine 그리고 bile의 대표적인 radiochromatogram들을 Figure 2에서 보이고 있다. YH3945는 7개의 glucuronide conjugate를 포함한 총 21개의 대사체들로 대사되었으며 대사체들의 상대량 (relative percentage)을 Table 2에서 보이고 있다. M17은 in vitro에서와 마찬가지로 plasma에서도 주 대사체 (50.1% of total radioactivity)로 판명되었다. 그러나 feces, bile 그리고 urine에서는 매우 적은 양으로만 검출되었다. 이는 M17이 다음 대사 경로의 진행을 위한 중요한 대사체임을 시사한다.

YH3945 대사체들의 구조 결정

각 대사체들의 구조는 mass spectra와 1H-와 TOCSY NMR에 의하여 결정되었으며 Table 3에 각 대사체들의 retention time, protonated molecular ion 그리고 product ion들을 요약하였다.

YH3945. YH3945의 protonated molecular ion은 m/z 565에서 관찰되었으며 m/z 441과 399에서 product ion들을 보였다. Figure 3에서 설명된 것처럼 m/z 399에 product ion은 methoxy pyridine thiourea 부위의 heterolytic cleavage에 의하여 생성되었으며 1H NMR data는 Table 4에 요약되었다.

Table 1. Excretion of radioactivity in the urine and feces after single intravenous injection of ¹⁴C-YH3945 to rats at a dose 25 mg/kg (n=4)

Time	% Dose		
	Urine	Feces	Total
0-12 h	9.86 ± 0.47*	3.33 ± 3.55	13.19 ± 3.55
12-24 h	1.33 ± 0.15	44.49 ± 6.48	45.83 ± 6.36
24-48 h	0.48 ± 0.06	12.47 ± 3.00	12.95 ± 3.04
48-72 h	0.13 ± 0.03	1.48 ± 0.78	1.60 ± 0.81
72-96 h	0.09 ± 0.01	0.29 ± 0.04	0.38 ± 0.04
96-120 h	0.06 ± 0.01	0.18 ± 0.06	0.23 ± 0.07
120-144 h	0.06 ± 0.01	0.08 ± 0.01	0.14 ± 0.02
144-168 h	0.04 ± 0.01	0.06 ± 0.00	0.10 ± 0.01
Total	12.04 ± 0.47	62.39 ± 1.20	74.43 ± 1.27

* Each value represents the relative percentage to total radioactivity administered.

Table 2. Relative percentage of YH3945 metabolites detected in plasma, urine, bile and feces after single intravenous injection of 14C-YH3945

Metabolites	Relative percentage (%)			
	Bile	Feces	Urine	Plasma
M1	-	14.97	-	-
M2	TR ^a	-	-	-
M3	ND ^b	ND	-	ND
M4	27.19	-	-	TR
M5	1.14	-	-	-
M6	TR	TR	0.54	-
M7	-	9.31	4.51	-
M8	8.05	-	-	TR
M9	-	6.7	7.46	TR
M10	-	-	9.11	-
M11	10.88	-	-	TR
M12	-	17.91	3.48	TR
M13	-	7.97	TR	TR
M14	-	2.54	TR	TR
M15	3.34	-	-	-
M16	11.79	8.13	2.55	TR
M17	TR	TR	0.94	50.14
M18	12.70 ^c	-	-	-
M19		3.27	-	1.71
M20		TR	-	TR
M21	6.83 ^c	TR	-	TR
YH3945	2.44	TR	-	14.84

Each data was generated based on radioactivity

^a Trace

^b Not detected (M3 does not include 14C)

^c No resolution

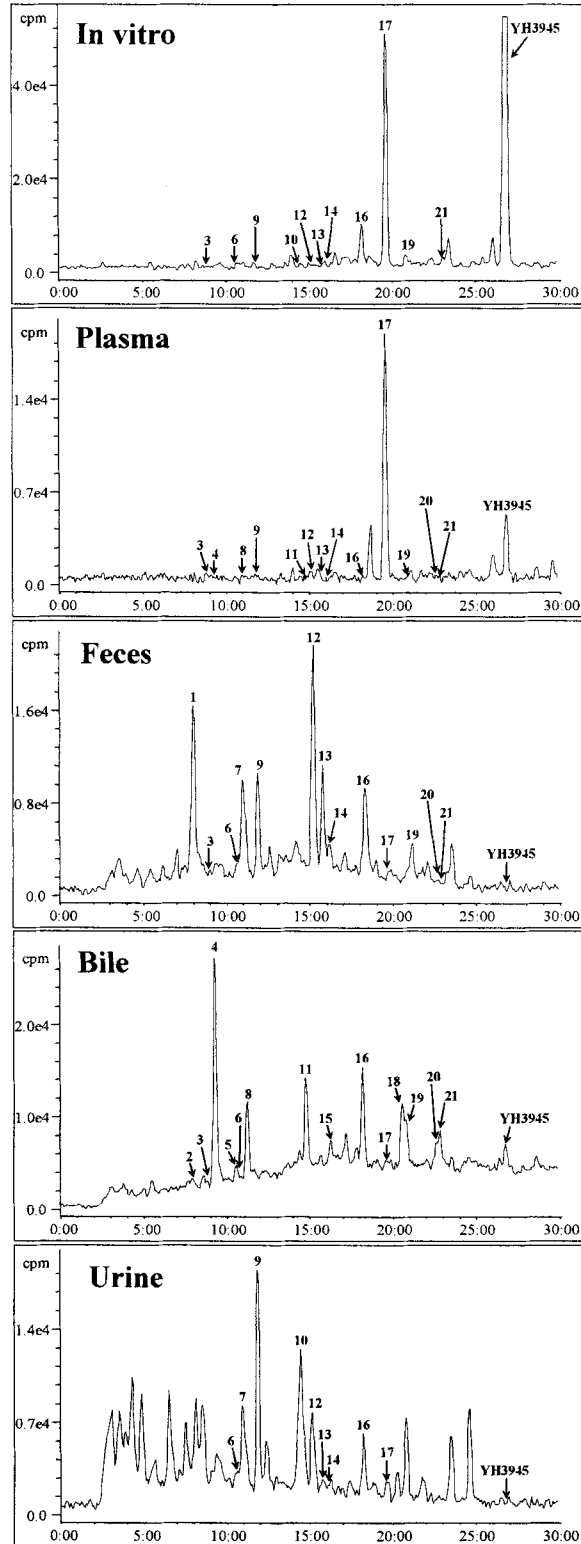


Figure 2. Representative radiochromatograms of rat microsomal incubation mixtures and plasma, feces, bile and urine from rats after i.v. administration of ^{14}C -YH3945

Metabolite M5, M9, M11, M13 and M17. M17의 protonated molecular ion과 product ion은 각각 m/z

450과 284에서 관찰되었다. m/z 450에 ion은 imidazole에 cyanobenzyl group이 YH3945로부터 제거되었음을 지적하며 m/z 284에 ion은 methoxypyridinyl thioamine 부위의 손실에 의하여 형성되었다 (Figure 4). 그러므로 M17은 N-debenzylated 대사체이다. M9와 M13은 MS2 spectra에서 M17과 같이 m/z 284에서 product ion을 생성하였다. M9의 protonated molecular ion (m/z 436)은 M17에서 14 amu의 감소를 지적하며 이는 M9가 M17로부터 O-demethylated 대사체임을 시사한다. M13은 M17로부터 16 amu의 증가를 보이며 이는 M17의 hydroxylated 대사체임을 지적한다. M5와 M11은 각각 M9와 M13의 glucuronide conjugate 대사체로 확인되었다. 이들 대사체는 176 Da (glucuronide)의 neutral 손실을 보였으며 M9와 M13과 동일한 product ion spectra를 보였다. 이들의 구조는 β -glucuronidase와의 처리에 의해 더욱 정확히 확인될 수 있었다.

Metabolite M1, M7, M10 and M12. M1과 M7은 M9의 mono-oxygenated isobaric 대사체들이다. 그들은 m/z 452 (436 + 16 Da)에서 protonated molecular ion을 보였으며 m/z 300에서 MS² product ion을 동일하게 보였다. 그러나 m/z 300의 MS³는 서로 다른 product ion들을 생성했다. 즉, M1과 M7은 각기 m/z 109와 95에서 product ion들을 보였다. m/z 109에 ion은 C15와 인접한 nitrogen 사이의 cleavage에 의해 생성되며, 반면 m/z 95에 ion은 alkyl chain hydroxyltion에 의한 C15와 C17 사이의 cleavage에 의해 생성된다. M10과 M12도 역시 m/z 300에서 product ion을 보였으며 그들의 protonated molecular ion은 m/z 466에서 검출되었다. 이것은 YH3945로부터 imidazole에 cyanobenzyl 기의 제거 후 hydroxylation이 trifluoromethylbenzyl 부위에 발생했음을 지적한다. 이들 hydroxylation은 Table 4에서 보여진 것처럼 1H NMR에 의해 다시 한번 확인될 수 있었다.

Metabolite M3. M3는 14C-labeled thiourea 부위의 손실로 인하여 radiochromatogram에서는 관찰되지 않았으며 protonated molecular ion은 m/z 399에서 관찰되었다. M3의 product ion들은 m/z 339, 283 그리고 224에서 관찰되었다. m/z 339에 ion은 3HF의 제거에 의하여 형성되었으며 m/z 283은 imidazole과 benzyl group 사이에 heterolytic cleavage에 의한 odd electron cation의 형성에 의해 생성되었다. m/z 224는 C15와 인접한 nitrogen 사이의 cleavage에 의한 even electron cation의 형성에 의하여 생성된다.

Metabolite M6. M6의 protonated molecular ion은 m/z 466에서 그리고 product ion들은 m/z 448, 358, 340, 300, 282 그리고 167에서 관찰되었다. m/z 358 ion은 thiourea로부터 imidazole 부위의 제거에 의하여 생성되었으며 m/z 167은 m/z 358로부터 thiourea의 cleavage에 의해 형성되었다. 또한 m/z 300 ion은 methoxy pyridine thiourea 부위의 cleavage에 의해 생성된다. m/z 448, 340 그리고 282는 m/z 466, 358 그리고 300에 ion들로부터 H₂O의 손실에 의해 생성되었다.

Metabolite M16, M18, M19 and M20. M16은 O-demethylated 대사체로 확인되었다. Protonated molecular ion은 m/z 551 (565 -14 Da)에서 그리고 product ion들은 m/z 441과 399에서 관찰되었으며 이는 methoxypyridine에 O-demethylation이 발생했음을 지적한다. M19와 M20은 mono-oxygenated

isobaric 대사체들이다. 그들은 m/z 581 (565 + 16 Da)에서 protonated molecular ion을 보였으며 M19와 M20의 각각에 대하여 각기 m/z 415와 399에서 product ion들을 생성하였다. M20의 m/z 399에 product ion은 hydroxylation이 pyridine ring에 발생했음을 지적하며 M19의 m/z 415 ion은 methoxypyridine 부위가 변형되지 않았음을 지적한다. 더욱이 m/z 224와 241의 MS^3 ion들은 M19의 hydroxylation이 trifluoromethylbenzyl ring에 발생했음을 보여준다. M18은 M20의 glucuronide conjugate 대사체로서 확인되었다.

Metabolite M2 and M4. M2와 M4는 m/z 642에서 동일한 protonated molecular ion을 보였으며 β -glucuronidase 처리 시 각기 M10과 M12로 전환되었다. Trifluoromethylbenzyl group에 hydroxylation이 발생한 M10과 M12는 m/z 466에서 protonated molecular ion을 그리고 m/z 300에서 product ion을 생성하였다. 일반적으로 glucuronide conjugate 대사체들은 glucuronide 부위의 neutral loss가 발생하기 때문에 MS^2 product ion과 그들의 free form의 protonated molecular ion은 같다. 그러나 예상 밖으로 M2와 M4의 MS^2 는 m/z 476에 product ion을 형성했다. 즉 예상되어지는 것보다 10 amu가 더 높은 ion을 형성했다. Glucuronide bond가 일반적으로 잘 쪼개어진다고 할지라도 현재 보여지는 구조는 thiourea 부위가 우선적으로 쪼개졌으며 결국 glucuronide 부위를 소유하고 있는 m/z 476에 ion을 형성하게 된다. M4의 구조는 1H와 TOCSY NMR data에 의하여 더욱 정확하게 확인되었다. 이처럼 glucuronide 부위의 neutral loss보다 우선한 다른 부위의 neutral loss는 glucuronide conjugate 대사체들에 대하여 발생하기 어려운 것 잘 보고되어 있지 않은 매우 독특한 결과이다.

Metabolite M8, M14, M15 and M21. M8은 m/z 610에서 protonated molecular ion이 관찰되었으며 m/z 434에서 176 Da의 neutral loss를 가지고 product ion이 검출되었다. Figure 6에서 보여지는 것처럼 δ 3.0 - 4.0 사이에서 glucuronide의 anomeric proton들은 M8이 glucuronide conjugate라는 것을 시사한다. 또한 β -glucuronidase 처리 시에 M14로 전환되었다. 1H NMR은 δ 5.74 (C16)의 signal이 2H에서 1H로 감소하였음을 보이며 또한 C13 위치에 proton이 사라졌음을 보인다. 이것은 대사 과정 중 C16과 C13 사이에 cyclization이 발생했음을 의미한다. M8의 구조는 mass spectrum의 해석에 의하여 다시 확인되었다. m/z 434 ion의 MS^3 는 m/z 326, 275 그리고 232에 product ion들을 형성하였다. m/z 326 ion은 ring system의 두 bond cleavage를 통한 EE+의

Table 3. Chromatographic and mass spectral data for metabolites of YH3945 isolated and characterized from rats

Metabolites	Retention time (min)	[M+H] ⁺	Fragment ions in MS ²	Fragment ions (MS ³) of major fragment ion in MS ²
1	8.0	452	300	109
2	8.1	642	476*, 300	300
3	8.9	399	283, 240, 224	-
4	9.3	642	476*, 300	300
5	10.4	612	436*	284
6	10.6	466	448, 358, 340, 300, 282, 167	-
7	11.0	452	300	95
8	11.1	610	434*	326, 275, 232
9	11.5	436	284	-
10	14.2	466	300	-
11	14.5	642	466*, 284	284
12	15.1	466	300	-
13	15.5	466	284	-
14	16.1	434	326, 275, 232	-
15	16.2	725	549*, 252	441, 390, 232
16	18.2	551	399	-
17	19.5	450	284	-
18	20.4	757	581*, 399	399
19	20.5	581	415*, 283, 241	241, 224, 175
20	22.3	581	399	-
21	22.4	549	441, 390, 232	-
YH3945	26.5	565	441, 399	-

* Major fragment ion

Table 4. ¹H NMR assignment for YH3945, M4 (M12-glucuronide), and M8 (M14-glucuronide)

Atom number	Chemical shift, d (ppm)		
	YH3945	M4	M8
1, 4	7.21, d, 2H	-	-
2, 3	7.68, d, 2H	-	-
5	7.38, d, 1H		7.38, d, 1H
6	7.63, t, 1H	7.38, d, 3H	7.55, t, 1H
7	7.46, t, 1H		7.44, d, 1H
8	7.73, d, 1H		7.73, d, 1H
9	7.71, s, 1H	7.56, s, 1H	7.56, s, 1H
10	6.82, s, 1H	6.74, s, 1H	6.78, s, 1H
11	6.77, d, 1H	6.78, d, 1H	6.85, d, 1H
12	7.60, dd, 1H	7.68, dd, 1H	7.69, d, 1H
13	7.92, d, 1H	8.00, d, 1H	-
14	3.90, s, 3H	3.91, s, 3H	-
15	3.67, t, 2H	3.62, t, 2H	3.57, t, 2H
16	5.24, s, 2H	5.25, d, 2H	5.74, d, 1H
17	1.97, m, 2H	2.00, m, 2H	2.05, m, 2H
18	2.46, t, 2H	2.59, t, 2H	2.66, t, 2H
19	5.30, s, 2H	-	-

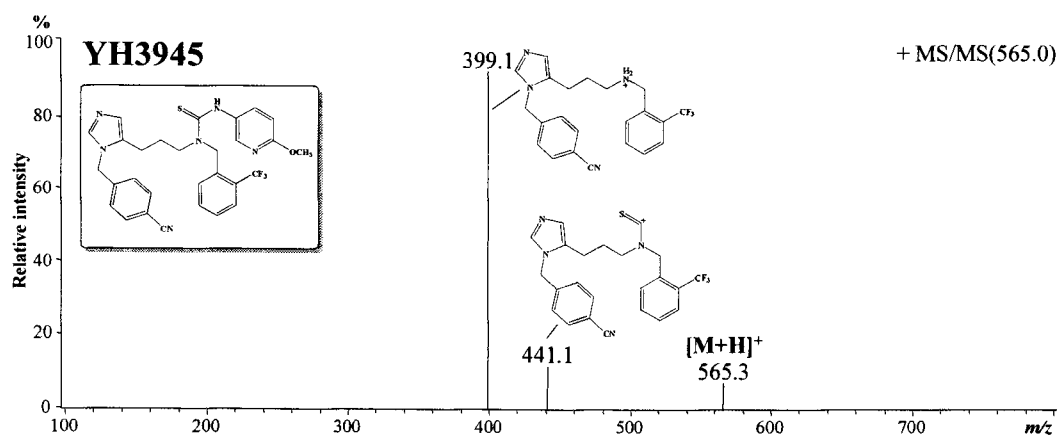


Figure 3. MS/MS spectrum of YH3945

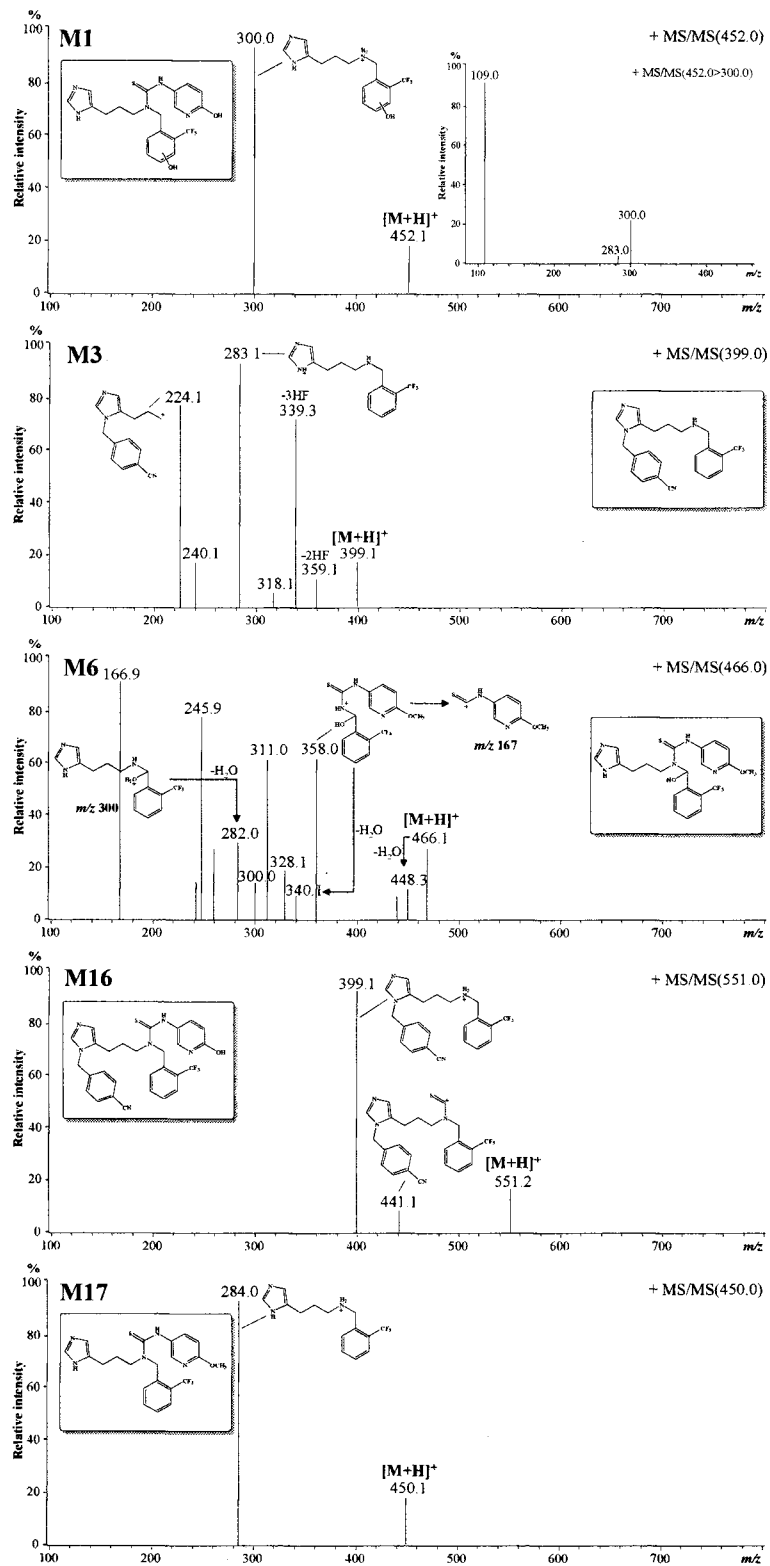


Figure 4. MS/MS spectra of representative N-debenzylated, O-demethylated and hydroxylated metabolites M1, M3, M6, M16 and M17.

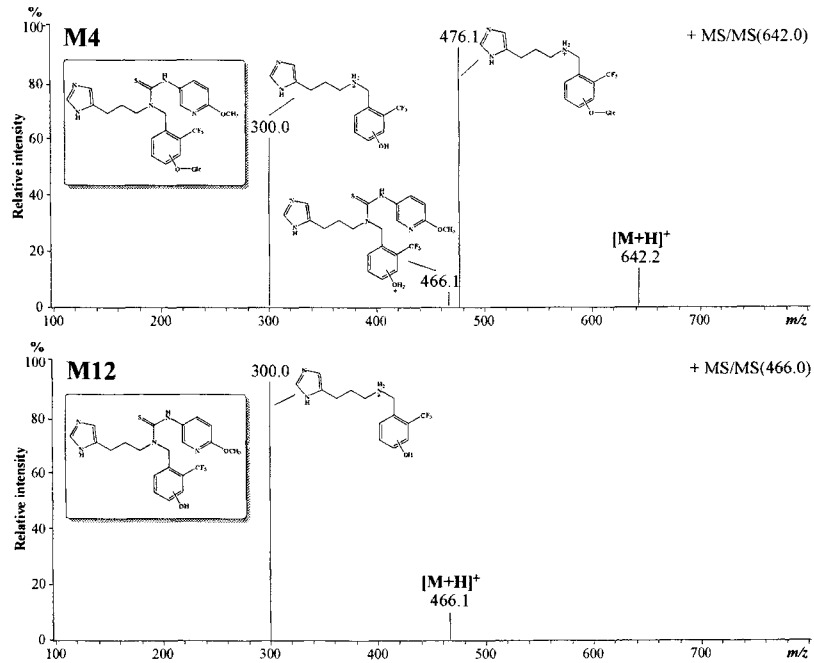


Figure 5. MS/MS spectra of M4 and its glucuronide conjugate (M12)

형성에 의하여 생성되었다. 그러나 m/z 275와 232는 OE+의 형성에 의하여 형성되었다. Cyclic 대사체 M14의 형성에 대한 작용기작을 Figure 7에서 설명하였다. M15 역시 비슷한 fragmentation pattern을 보이며 M8과 비교할 때 cyanobenzyl group을 소유한 구조이다.

4. 고찰

Rat에서 YH3945의 fate을 이해하기 위해 in vitro와 in vivo 대사가 조사되었다. HPLC/UV, radioactivity, ESI/MS 그리고 NMR을 이용하여 생성된 대사체들을 확인할 수 있었다. YH3945의 배설에 관한 실험은 YH3945가 bile로 배설되기 전 광범위하게 대사됨을 지적하였다.

Rat에서 확인된 YH3945 대사체들은 다음과 같은 3가지의 주 대사 반응에 의하여 생성되었다. 1) imidazole ring에 N-debenzylation, 2) ring hydroxylation 그리고 3) methoxypyridine group의 O-demethylation. YH3945의 특징적인 mass fragmentation은 대사 부위를 정확히 assign하는데 매우 중요하였다. YH3945는 MS2에서 m/z 399의 특징적인 product ion을 형성하였으며 대부분의 대사체들 역시 유사한 mass fragmentation pattern (m/z 399, 300, 284 그리고 415)을 보였다. 따라서 cyclic 대사체를 제외한 대부분의 대사체들은 이 fragmentation pattern에 기초하여 그 구조를 밝힐 수 있었다.

한 분자내에서 methoxypyridine에 demethylation과 C16 위치에 hydroxylation이 동시에 발생한다면

cyclic 대사체들이 non-enzymatically 생성되는 것으로 추정된다. Figure 7에서 설명된 것과 같이 methoxypyridine에 demethylation과 C16 위치에 hydroxylation은 분자의 화학적 안정성을 파괴하고 결국 cyclic 대사체의 형성을 이끈다. M6로부터 demethylation은 pyridine의 aromatic system을 파괴하고 pyridinol을 pyridinone으로 전환시키며 [A] C13의 반응성을 증가시킨다. 그리고 나서, C16에 dehydration이 진행되고 [B] cyclic 반응은 reactive한 C13의 공격에 의하여 진행된다. 이렇게 만들어진 cyclic 구조 [C]는 rearomatization과정에 의하여 다시 안정화 된다.

결론적으로 본 연구는 YH3945가 배설되기 전에 앞에서 언급된 바와 같이 주 3개의 경로를 통하여 대사된다는 것을 보였다. 또한 M17은 다음 대사를 진행하는데 주 대사체이며 다양한 대사체들로 더욱 대사되었다. Cyclic 대사체의 형성은 새로운 발견이었다. 이들 결과들에 기초하여 Figure 8은 in vitro 및 in vivo 대사 경로를 보였다. Urinary 와 biliary 대사체들의 확인은 YH3945의 in vivo 대사 운명과 disposition을 이해하는데 매우 중요한 정보를 제공한다.

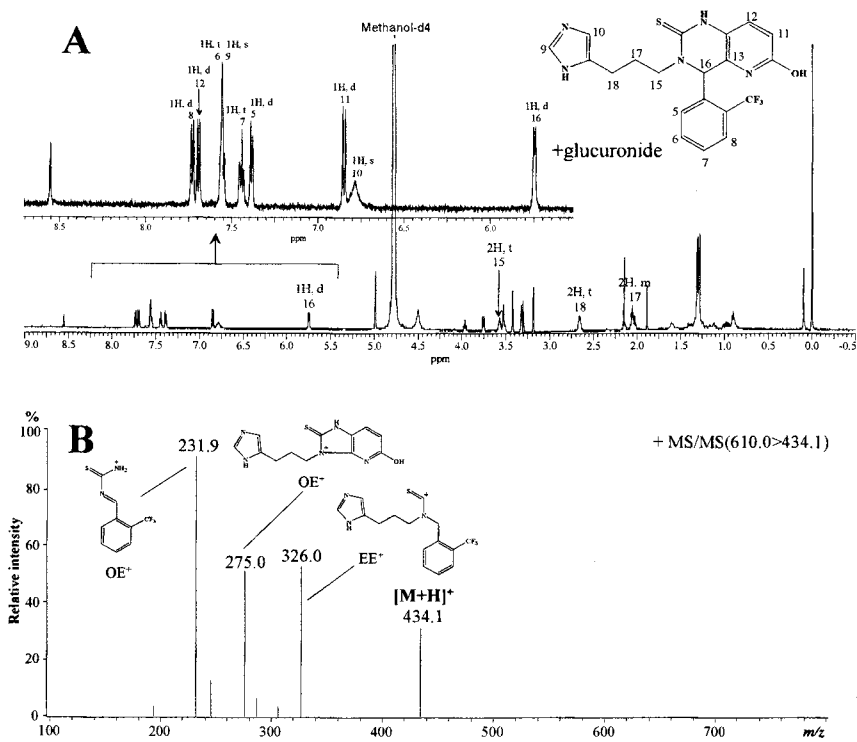


Figure 6. ¹H NMR (A) and MS³ spectrum of product ion at m/z 434 in the MS² scan (B) of cyclic metabolite M8

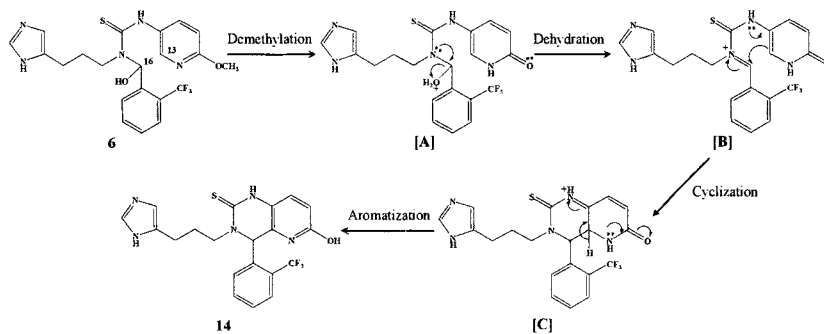


Figure 7. Proposed mechanism for non-enzymatic formation of cyclic metabolite M14.

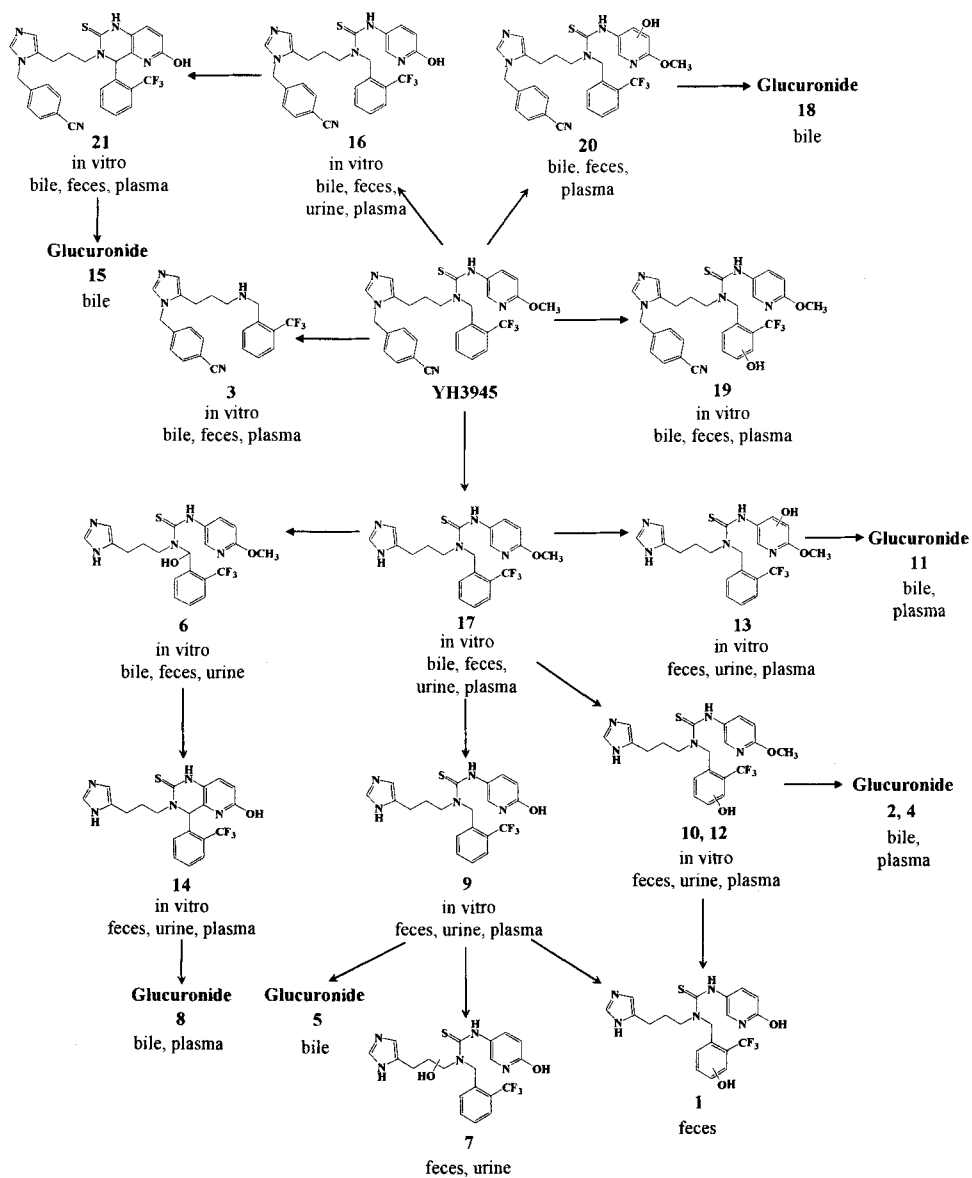


Figure 8. Postulated metabolic pathways of YH3945 in rats

2-2. 신규 PDE 5 저해제의 대사 연구

1. 서론

PDE 5 저해제이며 현재 전임상 (preclinical) 단계가 진행 중인 물질을 모델 화합물로 이용하여 연구를 수행하였다. 본 연구에서는 전임상 단계에 있는 SK3530의 대사 평가를 위하여 ^{14}C -labeled SK3530을 이용하여 rat에서 in vitro와 in vivo 대사를 수행하였다. ^{14}C -labeled 화합물을 이용한 전임상 단계의 대사 연구를 위하여 본 연구에서는 multiple-detectors (DAD-radioflow-MS)가 장착된 분석 system을 이용하였다.

2. 실험방법

Metabolism study

Rat and human liver microsomal incubations을 위하여 SK3530 (50 μM final concentration)은 1.0 mg의 microsome을 가지고 37°C에서 2시간동안 NADPH-generating system과 함께 incubation되었다. 반응은 acetonitrile (one-volume)을 첨가하여 정지시켰으며 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분석에 사용하였다.

In vivo metabolism 연구에 사용한 feces와 urine 시료는 excretion 시험에서 얻어진 0-24 hr 시료들을 pool하여 이용하였으며 bile 시료는 biliary excretion 시험에서 얻어진 0-6 hr 시료들을 pool하여 사용하였다. Plasma 시료는 distribution 시험에서 얻어진 1 hr과 4 hr 시료들을 pool하여 사용하였으며 liver 시료는 distribution 시험에서 얻어진 4 hr 시료들을 pool하여 사용하였다. Feces 시료는 동량의 Dw를 첨가하여 균질화시킨 뒤 다시 동량의 acetonitrile을 첨가하여 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 농축시켰다.

Sample preparation

Feces, urine, bile 그리고 plasma 시료들은 C18 cartridge를 이용한 SPE법에 의하여 전처리 하였다. 1ml methanol로 cartridge를 활성화시키고 Dw 1ml로 equilibrium시켰다. 각 시료를 loading한 후 Dw 3ml로 washing하고 1ml methanol로 용출하였다. 이 용액은 질소하에서 농축되었고 initial buffer에 녹여 분석을 수행하였다.

Liquid chromatography-mass spectrometry

HPLC system은 diode array detector와 electrospray ionization/ion trap analyzer가 장착된 tandem

MS system 그리고 β -Ram radioactivity flow detector가 장착된 Agilent 1100 series를 사용하였다. Column은 Capcelpack C18 (4.6×250 mm, 5 μ m)을 사용하였으며 DAD 다음에 1/10 splitter를 장착하여 1/10은 MS system으로 나머지 9/10은 β -Ram detector로 이동시켰다. 이동상으로는 20 mM ammonium formate (pH 4.0) [A]과 90% acetonitrile [B]를 사용하여 gradient system에서 분석하였다. Mass spectrometry 조건으로는 ionization은 API-electrospray ionization방법을 이용하였으며 polarity mode는 positive mode 그리고 compound stability는 60%를 사용하였다. Nebulizing gas로는 nitrogen gas를 35 psi로 nebulizing하였으며, drying gas는 8 L/min로 그리고 dry temp.는 350°C를 사용하였다. Full-scan mode 분석으로부터 검출된 대사체들의 구조는 multi-stage tandem mass spectrometric (MSⁿ) 방법을 이용하여 결정되었다. Collision gas로는 helium을 사용하였으며 parent drug 및 대사체들의 [M+H]⁺ ion을 isolation하고 fragment amplitude를 조절하여 MS² spectrum을 얻었다. Cut-off는 precursor ion의 27%를 사용하였다. 대사체의 MS² spectrum에서 생성된 product ion들을 parent drug의 product ion들과 비교하여 생성된 대사체들의 정확한 구조를 결정하였다. MS²로부터 구조를 결정하기 어려운 대사체들은 MS³ 와 MS⁴에 의하여 결정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

In vitro and in vivo metabolic profiles of SK3530

Rat microsome과의 incubation은 총 12개의 대사체로 대사되었으며 human microsome은 rat microsome에서 검출된 M13과 M16을 제외한 총 10개의 대사체로 대사되었다. 대사체 M14는 rat과 human 모두에서 major 대사체로 확인되었다.

반면 in vivo에서 SK3530은 in vitro에서 검출되었던 M13을 제외한 총 19개의 대사체로 대사됨을 확인하였으며 M1, 2, 4, 6, 9, 12, 15 그리고 18은 in vitro에서는 검출되지 않았던 대사체들이었다. Feces와 bile에서는 특이적으로 M18이 major 대사체로 확인되었으며 total dose radioactivity에 대한 그들의 relative percentage는 각각 64.9와 73.0%였다. Table 1은 검출된 대사체들의 retention time과 그들의 protonated molecular ion 그리고 MS² ion들을 보인다. Table 2는 검출된 각 대사체들의 relative percentage를 total dose에 대하여 계산한 결과를 각 시료별로 정리하여 보인다.

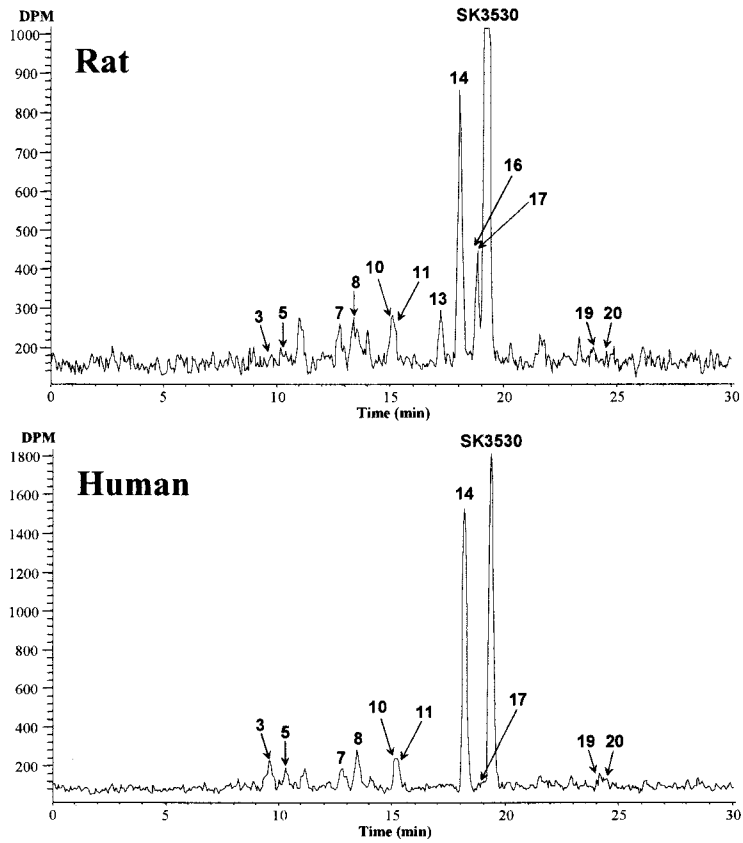


Figure 1. Representative radiochromatograms obtained from rat and human liver microsomal incubations of SK3530.

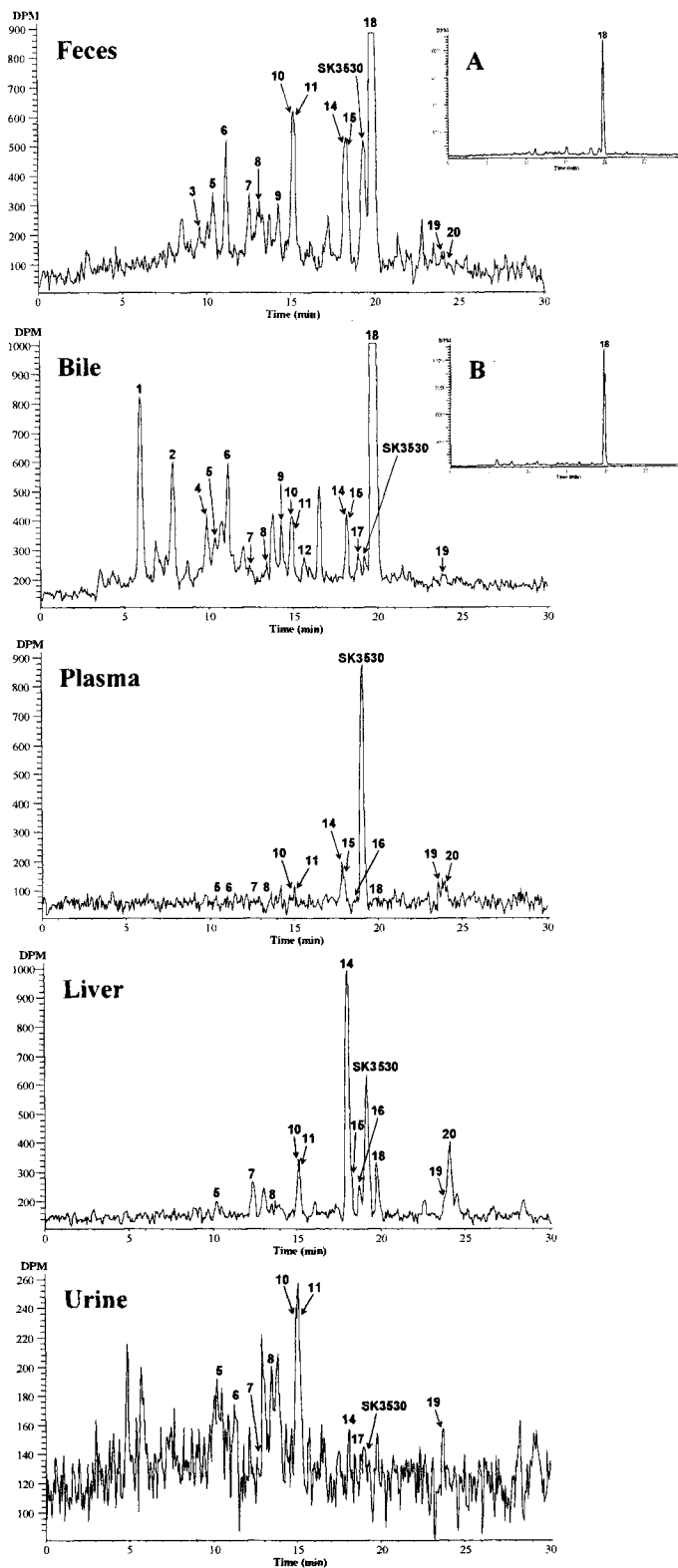


Figure 2. Representative radiochromatograms obtained from fecal, urinary, biliary, plasma and liver extracts.

Table 1. Chromatographic and mass spectrometric data of SK3530 and its metabolites

Metabolites	Retention time (min)	[M+H] ⁺	MS ² (m/z)
SK3530	19.0	532	514, 488, 404, 340, 338, 312, 296, 268
1	5.7	724	548* (530, 512, 420, 312)**
2	7.4	666	490* (472, 432, 378, 360, 312, 296, 268)**
3	9.5	548	530, 512, 486, 402, 310, 294
4	9.7	478	460, 404, 312, 296, 268
5	10.2	548	530, 512, 486, 402
6	11.1	628	548* (530, 512, 486, 402)**
7	12.5	404	362, 344, 339, 297, 268
8	13.5	548	530, 504, 420, 362, 312, 296, 268
9	14.2	628	548* (530, 504, 420, 312, 296)**
10	15.0	462	445, 419, 404, 388, 360, 338, 340, 312, 296, 269
11	15.1	506	488, 462, 445, 419, 404, 340, 312, 296
12	15.4	708	532* (514, 488, 404, 340, 338, 312, 296, 268)**
13	17.2	548	530, 504, 420, 328, 312
14	18.0	488	446, 404, 360, 338, 312, 296, 269
15	18.1	546	500, 488, 404, 360, 338, 312, 296
16	18.6	490	472, 432, 378, 360, 312, 296, 268
17	18.8	548	530, 504, 488, 404, 362, 296
18	19.7	612	532* (514, 488, 404, 340, 338, 312, 296, 268)**
19	23.7	419	377, 360, 338, 312, 296, 268
20	24.0	502	485, 460, 404, 362, 312, 296, 268, 235

* Major product ion of MS²

** Product ions of MS² major ion (*)

대사체들의 구조 결정

대사체들의 구조는 product ion spectra에 근거하여 결정되었다. SK3530 (m/z 532)의 product ion spectrum은 m/z 514, 488, 404, 362, 312 그리고 296에서 주요 ion들을 생산하였다. Figure 3은 SK3530의 spectrum과 fragmentation을 보여준다.

m/z 514는 piperazine ring의 $-CH_2CH_2OH$ 로부터 H_2O 의 손실에 의하여 그리고 m/z 488은 C_2H_4O 의 제거에 의하여 생성되었다. m/z 404는 sulfone oxygen의 protonation 후 S-N cleavage에 의하여 생산된다. 404 ion으로부터 C_3H_6 (from $-OCH_2CH_2CH_3$)의 제거는 m/z 362를 생산한다. Phenyl ring에 ipso-protonation은 m/z 338과 340에 ion을 생산하며 m/z 338은 C_3H_6 (from $-OCH_2CH_2CH_3$)의 제거에 의하여 296으로 그리고 340은 C_2H_4 (from $-NCH_2CH_3$)의 제거에 의하여 312로 분해된다.

Figure 4와 5는 각 대사체들의 product ion spectra와 fragmentation들을 보여주고 있다. SK3530의 product ion들로부터 변화된 각 대사체들의 product ion들은 대사체들의 구조를 결정할 수 있었다.

M3 (5), 8, 13 and 17: M3과 5는 동일한 spectrum을 보이고 있으며 pyrazolopyrimidine의 propyl부분에 hydroxylation된 구조임을 m/z 402, 310 그리고 294로부터 확인할 수 있었다. M13은 phenyl ring에 hydroxylation이 그리고 M17은 piperazine ring에 hydroxylation된 구조임을 m/z 420, 328, 312 (M13) 그리고 m/z 404, 312, 296 (M17)로부터 확인하였다. 반면 M8은 hydroxylation 대사체이나 hydroxylation의 정확한 위치를 해석할 수 없었다.

M4, 10, 11 and 14: M14는 parent에 비하여 분자량이 44 Da (C_2H_4O) 감소하였으나 product ion들은 parent ion들과 동일하였다. 이것은 piperazine ring에 dealkylation에 의하여 설명되며 M14는 SK3530의 N-dealkylated 대사체이다. M10과 11은 각각 M14와 SK3530으로부터 N,N-deethylenation된 대사체들이다. 특히 이들의 m/z 296, 312 그리고 404 product ion들은 sulfone group의 윗 부분이 그대로 유지되고 있음을 증명한다. 또한 각각의 분자량은 M10과 11이 piperazine에 deethylenation된 구조임을 증명한다. M4는 M10의 hydroxylation된 대사체이다. hydroxylation된 위치는 product ion m/z 296, 312 그리고 404에 의하여 modified piperazine에 발생되었음을 확인할 수 있다.

M7, 15, 19 and 20: M19는 M10으로부터 N-dealkylation된 대사체이다. m/z 296, 312 그리고 404에 product ion은 piperazine 부위가 변화되었음을 알 수 있으며 또한 product ion에서 17 Da ($-NH_3$)의 감소와 분자량은 M19의 구조를 증명한다. M7은 M19에서 아미노기가 떨어진 구조의 대사체이다. M20은 M14 (m/z 488)로부터 14 Da이 증가된 분자량을 갖고 있다. 또한 m/z 296, 312 그리고 404에 product ion들을 갖고 있는 것으로 보아 14 Da의 증가는 piperazine ring에서 발생하였음을 알 수 있으며 이는 carbonylation을 의미한다. 즉 m20은 M14로부터 piperazine에 carbonylation된 대사체이다. M15는 parent에서 14 Da 증가된 분자량을 갖고 있으며 product ion들은 14 Da의 증가가 piperazine에 연결된 chain에서 발생했음을 알 수 있다. 결국 M15는 acid로 전환된 대사체이다.

M1, 2, 6, 9, 12 and 18: M1, 2, 6, 9, 12 그리고 18은 conjugated 대사체들이다. M1, 2 그리고 12는 각각 M13, 16 그리고 SK3530의 glucuronide conjugated된 대사체들임을 176 da의 neutral loss와 그들의 free form과 동일한 product ion들로부터 확인할 수 있었다. M6, 9 그리고 18은 각각 M3(5), 8 그리고 SK3530의 sulfate conjugated 대사체들이었다. 이들은 80 da의 neutral loss를 보였으며 free form의 product ion들과 동일한 ion들을 보였다.

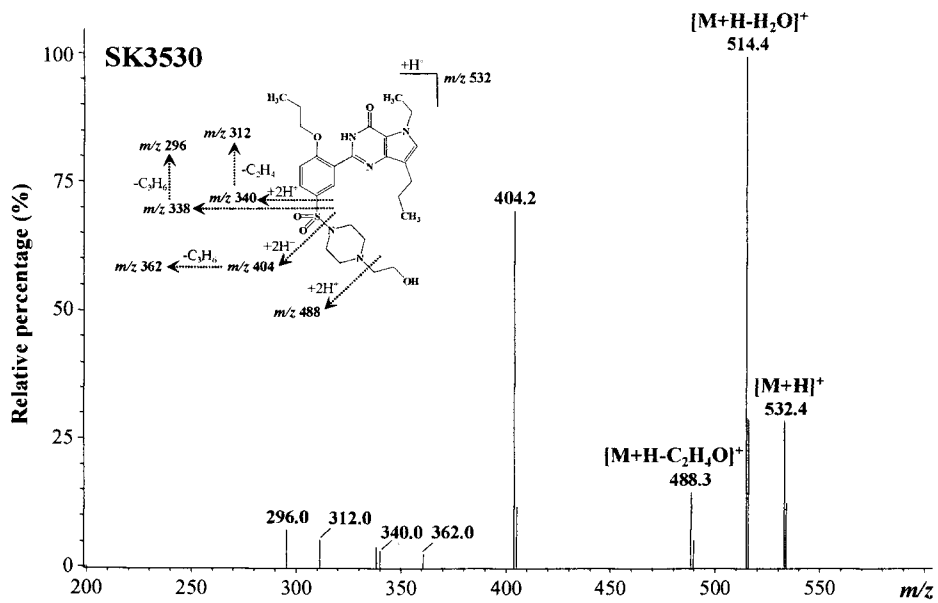


Figure 3. Product ion mass spectrum and fragmentation of SK3530

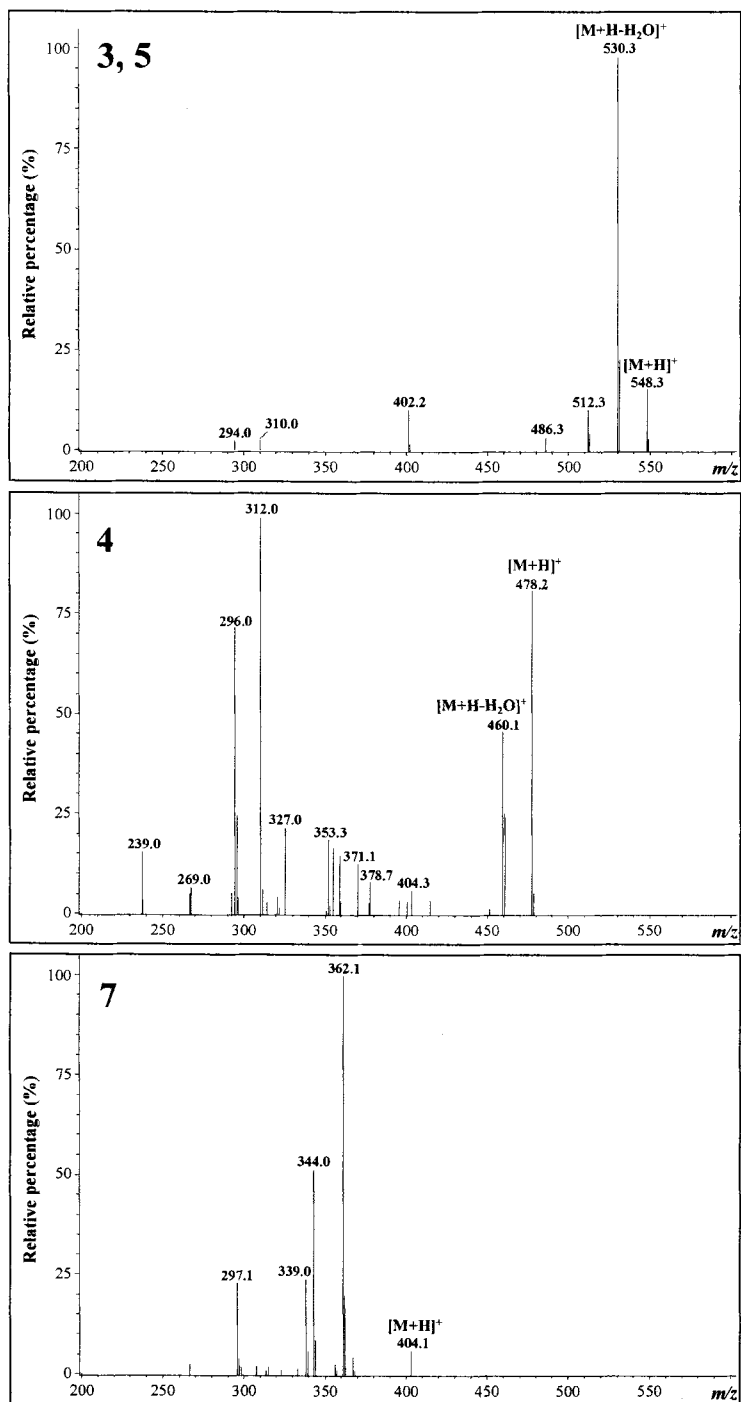


Figure 4. Product ion spectra of metabolites of SK3530

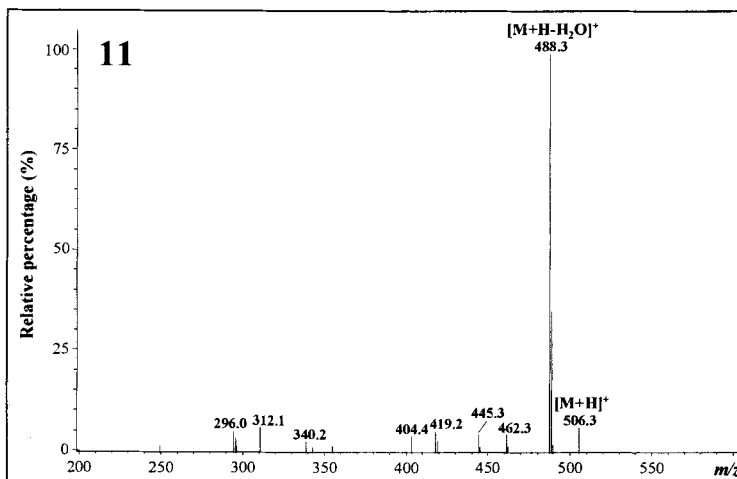
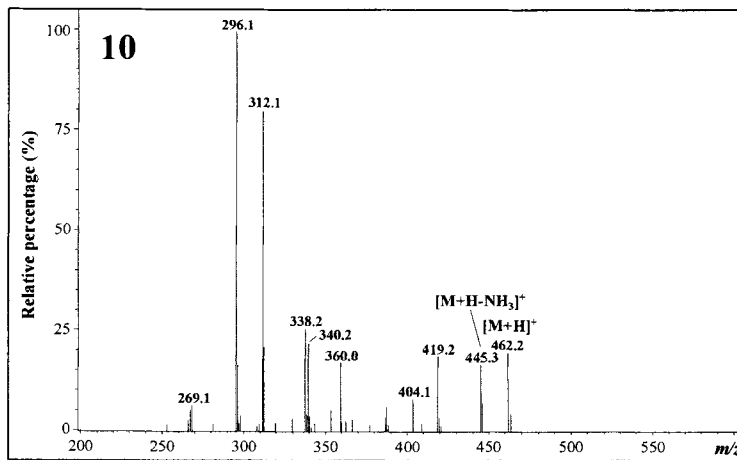
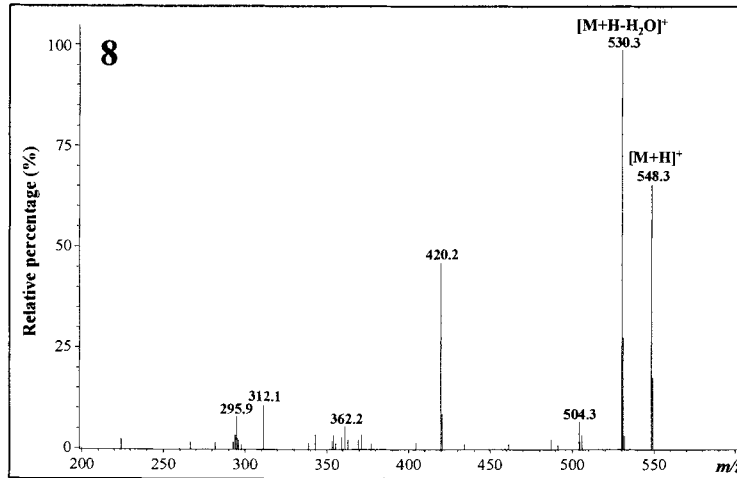


Figure 4. continued

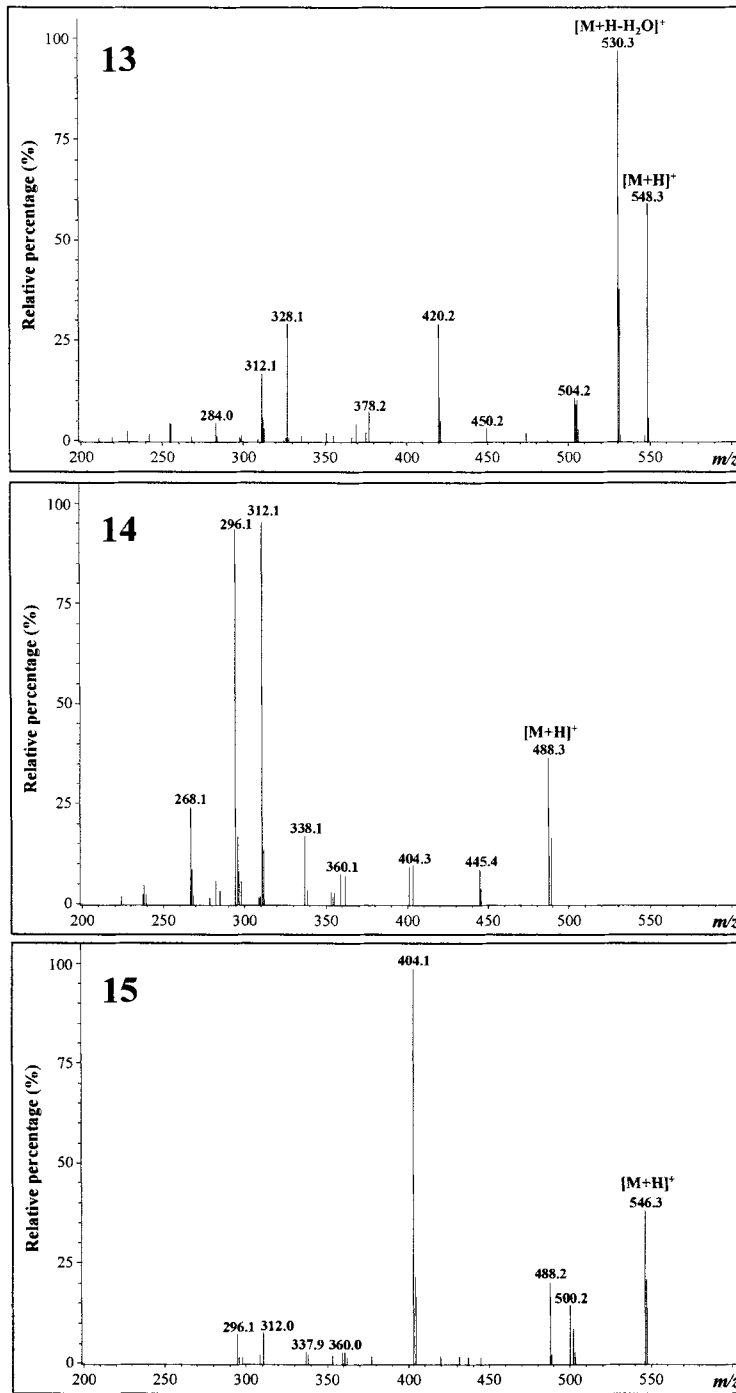


Figure 4. continued

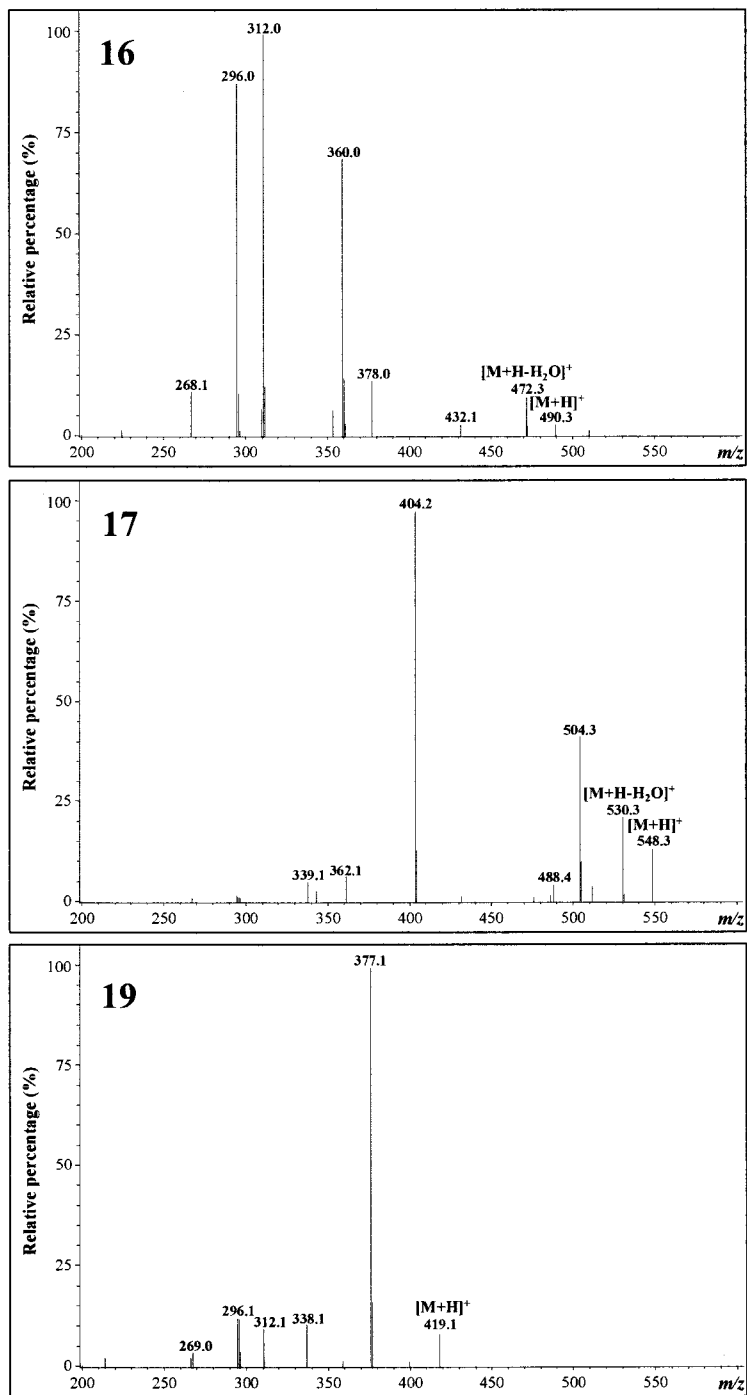


Figure 4. continued

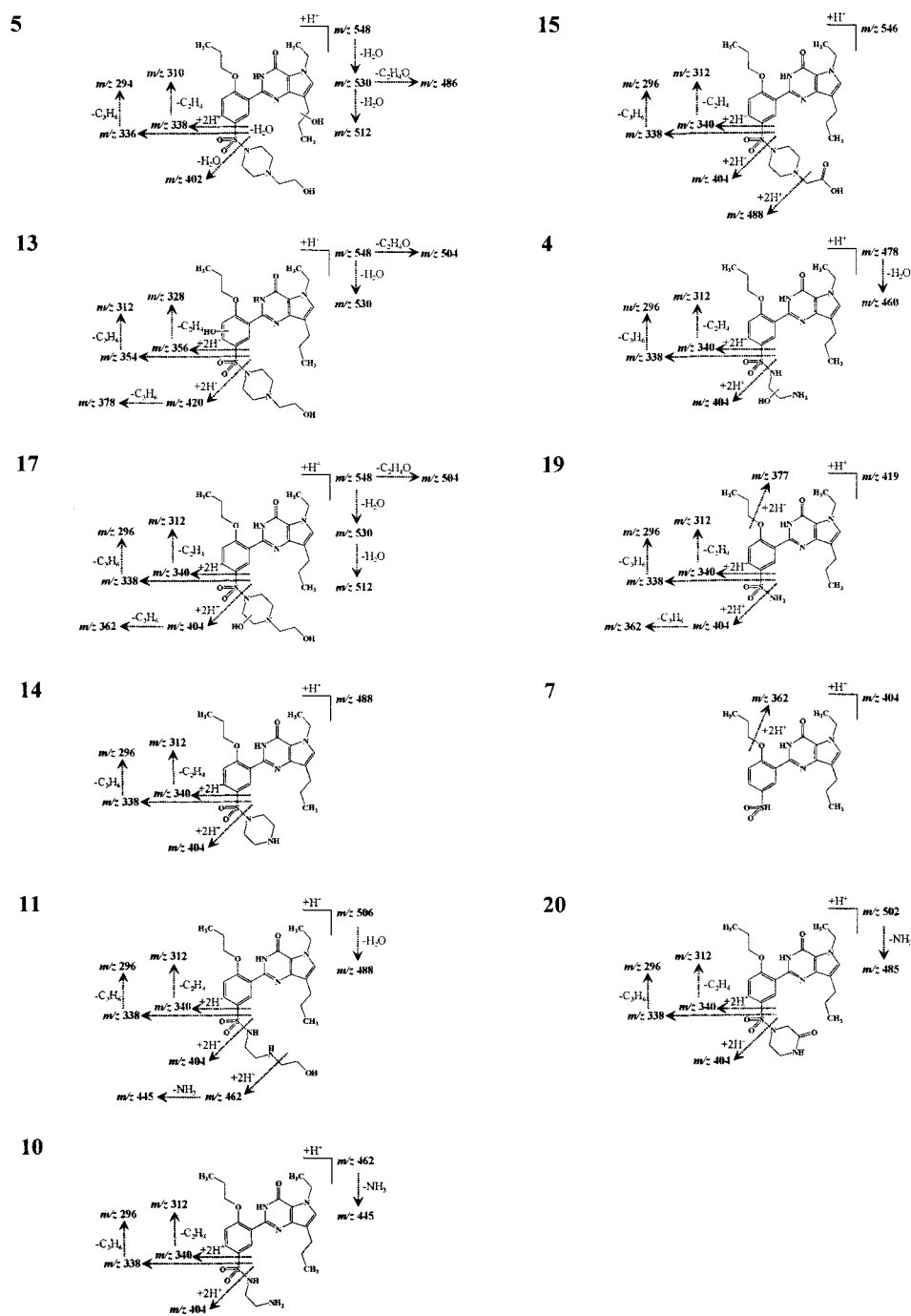


Figure 5. Fragmentations of metabolites

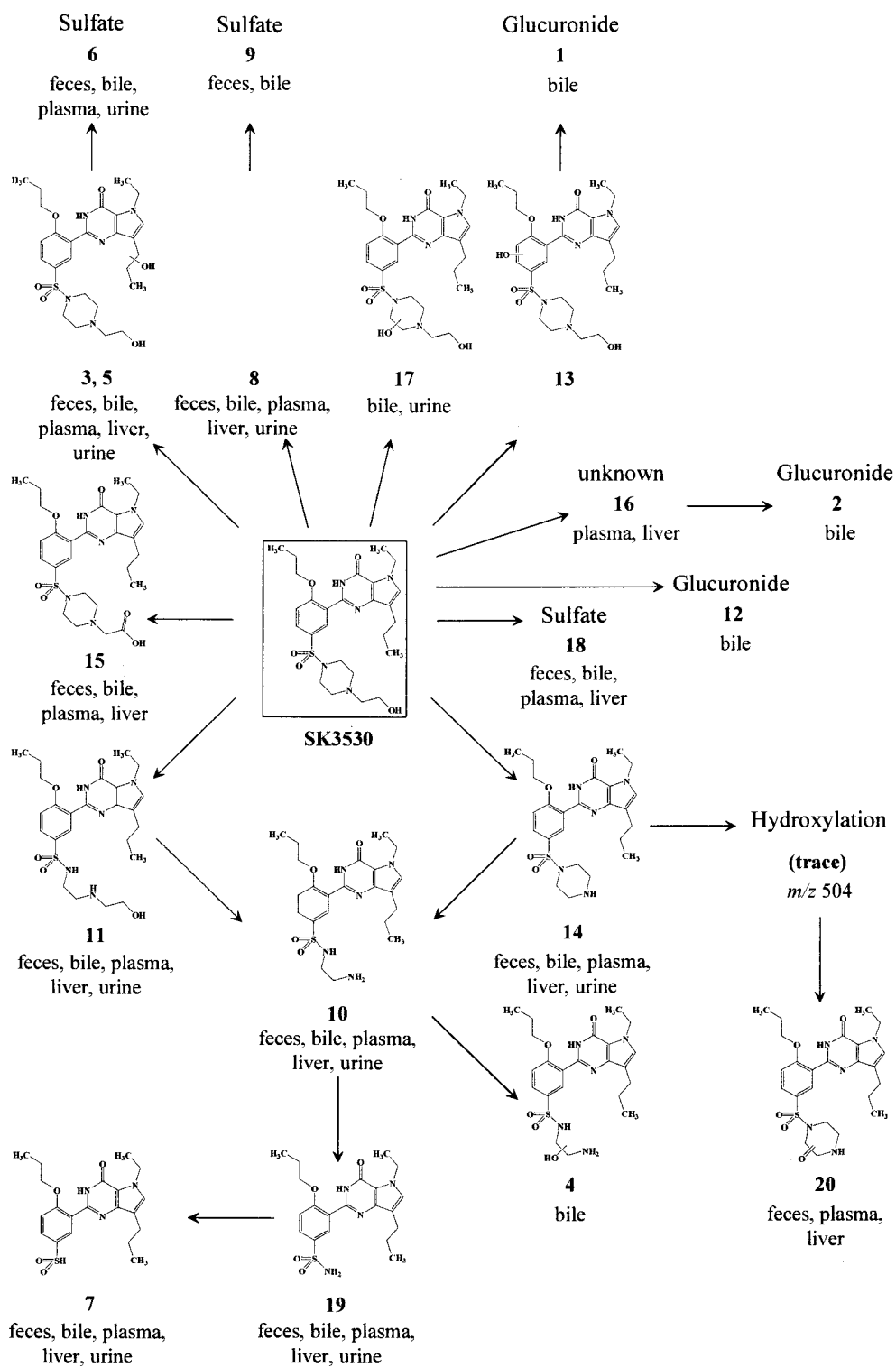


Figure 6. Postulated metabolic pathways of SK3530

제 3 절 새로운 PDE 5 저해제 KJH들의 *in vitro* 대사

1. 서론

KJH 유도체들은 기존에 보고된 sildenafil과 비교할 때 pyrazolopyrimidine의 oxygen 대신에 sulfur atom이 치환된 새로운 PDE 5 저해제이며 sildenafil의 여러 가지 보고된 결점을 보완하기 위하여 개발된 새로운 유도체들이다. 본 연구에서는 KJH들의 mass fragmentation mechanism을 규명하고 이를 바탕으로 *in vitro* 대사를 규명하였다.

2. 실험방법

Microsomal incubation

반응액은 전체 200 μ l의 potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5)내에 0.2 mg microsome, 10 μ M KJH 그리고 NADPH-generating system (0.1 M glucose-6-phosphate, 10 mg/ml β -NADP⁺ 그리고 1 unit/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase)로 구성되었으며 반응은 NADPH-generating system의 첨가에 의하여 시작되었다. 37°C에서 2 시간동안 incubation 한 후 200 μ l의 acetonitrile을 첨가하여 반응을 정지시켰다. 시료를 vortex 하고 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분석하였다.

Liquid chromatography/tandem mass spectrometry

HPLC system은 Agilent 1100 series를 사용하였으며 mass spectrometry는 electrospray ionization source와 ion trap analyzer가 장착된 tandem MS system을 사용하였다. Column은 YMC hydrosphere C₁₈ (2.0 \times 150 mm, 5 μ m)을 사용하였으며 이동상으로는 20 mM ammonium formate (pH 4.0) [A]와 acetonitrile [B]를 사용하였다. Flow rate은 0.2 ml/min이었으며 gradient 조건은 15% [B]에서 70% [B]로 linear하게 15 분 동안 변화시켰다. Mass spectrometry의 nebulizing과 drying gas는 nitrogen을 각각 35 psi와 8 l/min에서 사용하였으며 drying temperature는 350°C였다. Positive ion mode에서 수행되었으며 collision gas로서 helium이 사용되었다. Fragmentation을 위한 resonant excitation amplitude는 0.85 - 1.00 eV를 사용하였으며 isolation을 위한 selected mass width는 1 Da을 사용하였다.

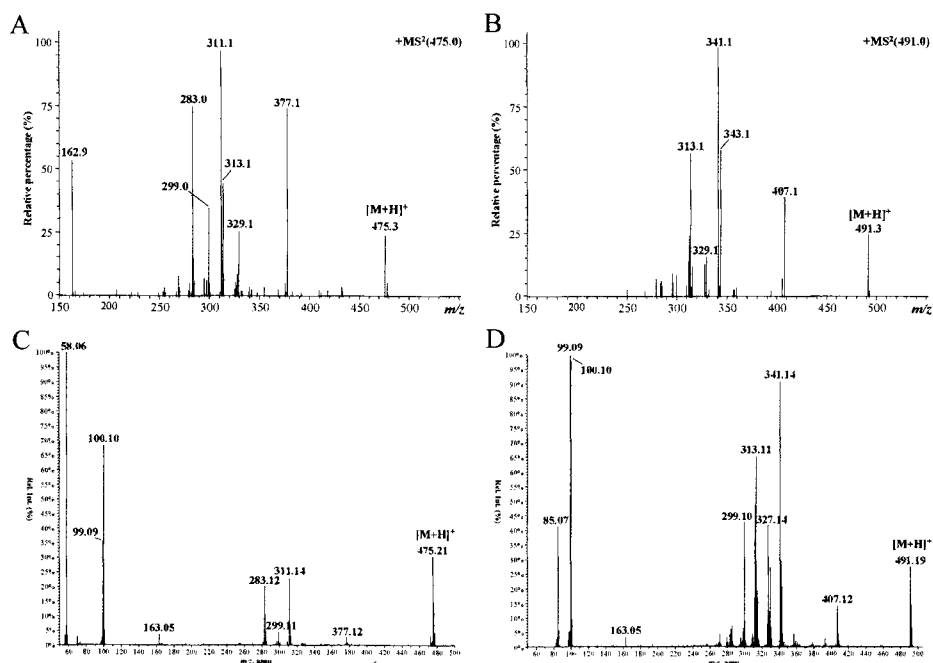
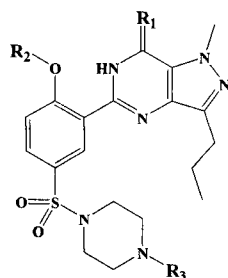


Figure 1. MS/MS spectra of sildenafil (A and C) and compound 1 (B and D). Spectra A and B were obtained from an ion trap mass spectrometry (cut-off: 27% of the precursor ion) and spectra C and D were obtained from a triple-quadrupole mass spectrometry.



	R₁	R₂	R₃	[M+H]⁺	A (m/z)	B (m/z)	C (m/z)
Sildenafil	O	CH ₂ CH ₃	CH ₃	475	377	313	311
Compound 1	S	CH ₂ CH ₃	CH ₃	491	407	343	341
Compound 2	S	CH ₂ CH ₃	H	477	393	329	327
Compound 3	S	CH ₂ CH ₃	CH ₂ CH ₃	505	421	357	355
Compound 4	S	CH ₃	CH ₃	477	393	329	327
Compound 5	S	CH ₃	CH ₂ CH ₃	491	407	343	341

Figure 2. Structures, protonated molecular ions and concerned product ions of sildenafil and compound 1-5. A, B and C (m/z) is the product ions of compound 1-5 corresponding to the ions at m/z 377 (A), 313 (B) and 311 (C) of sildenafil.

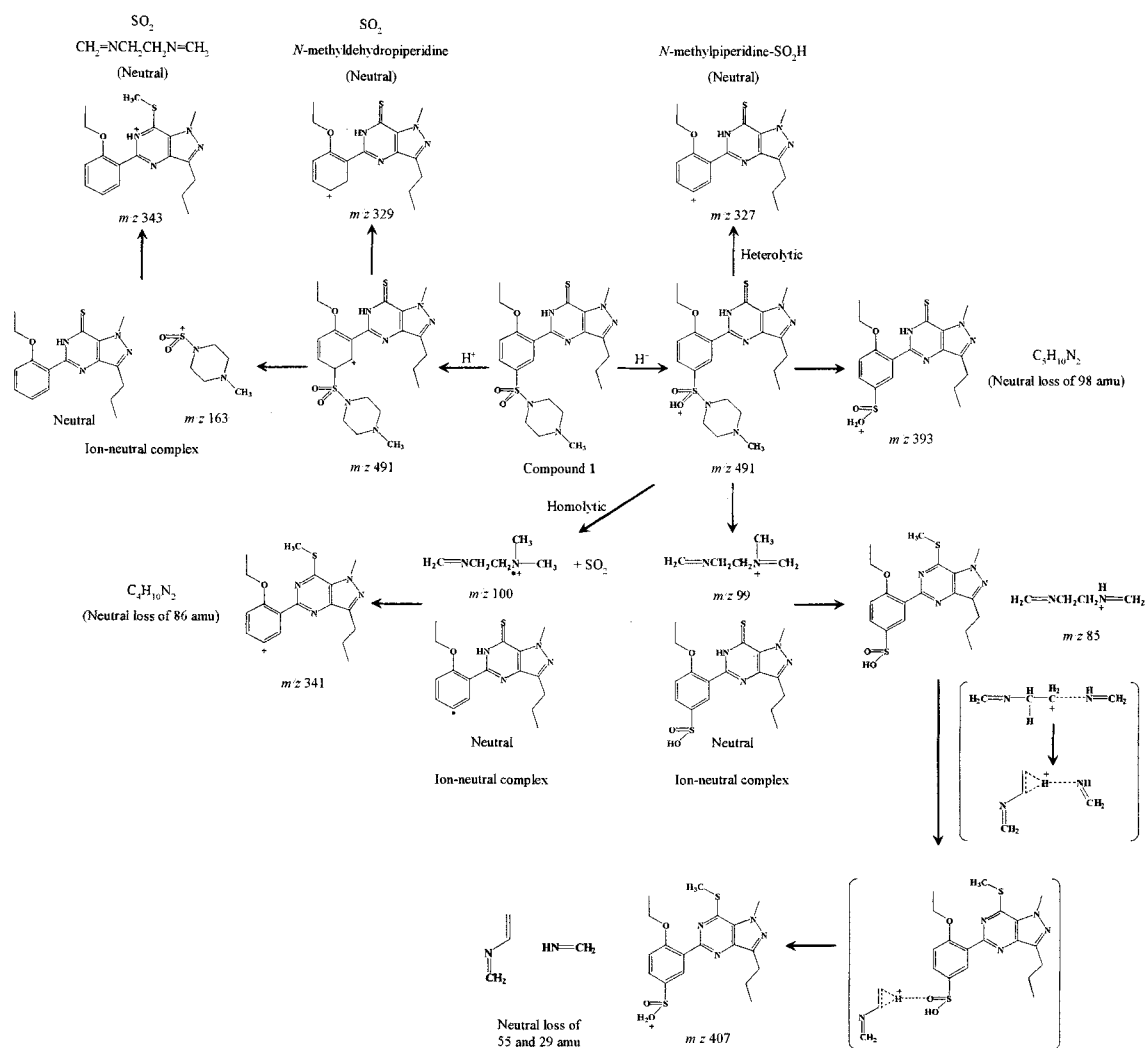


Figure 3. Proposed mechanism for the formation of product ions at m/z 407, 341 and 343 of the protonated 1.

산되었다. 그러므로 공간적 근접성을 고려할 때 protonated 1의 긴 거리를 가로지르는 rearrangement는 그들이 공유 결합으로 연결되어 있다면 사실상 불가능하다. 결과적으로 protonated 1의 rearrangement에는 ion-neutral complex가 중요한 역할을 하는 것으로 판단된다. 일부 compound들에 대하여 ion-neutral complex를 경유한 rearrangement들이 보고되어 있다. 이러한 특징적인 alkyl group migration은 단지 sildenafil thiono analogue들 (compound 1-5)에서만 관찰되었으며 sildenafil에서는 관찰되지 않았다. 이는 alkyl group transfer가 pyrazolopyrimidine에 새로 치환된 sulfur atom의 강한 nucleophilicity로 인하여 발생하고 있다는 것을 강력히 지적한다.

m/z 407, 343 그리고 341 ion들의 형성에 대한 mechanism이 Figure 3에서 설명된다. Sulfonyl oxygen에 protonation된 protonated 1 (m/z 491)은 piperazine α -proton의 sulfonyl oxygen으로 transfer가 관계한 기작에 의해 m/z 393에 even electron cation (EE+)와 98 amu의 neutral molecule로 분해되거나 또는 S-N bond의 heterolytic cleavage에 의해 neutral sulfuric acid와 $\text{CH}_2=\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)=\text{CH}_2^+$ ion으로 분해된다. 후자의 두 fragment들은 ion-neutral complex를 형성하고 이 complex 내에서 cationic substrate (m/z 99)와 thione-containing neutral nucleophile 사이에 methyl transfer가 발생한다. 이것은 406 amu의 neutral과 m/z 85에 $\text{CH}_2=\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{NH}=\text{CH}_2^+$ ion을 생성한다. m/z 85 ion은 다음 단계의 분해과정을 거치며 이 과정 동안, m/z 85 ion의 carbon에 연결된 active proton이 406 amu의 neutral로 전이된다. 결국 이 과정을 통하여 m/z 407의 EE+가 형성된다. Quadrupole time-of-flight mass spectrometry에 의하여 측정된 이 ion의 accurate mass는 m/z 407.1206에서 관찰되었으며 이것은 이론적으로 계산된 mass (407.1206, $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}_2$)와 -0.03 ppm의 error를 가지고 일치하였다.

Sulfonyl oxygen에 protonation된 protonated 1 (m/z 491)은 S-C_{Ar} bond의 heterolytic cleavage에 의해 m/z 327에 EE+와 neutral N-methylpiperazine-SO₂H으로 분해된다. 덧붙여 homolytic cleavage는 protonated 1을 radical neutral과 m/z 100에 odd electron cation $\text{CH}_2=\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_2^+$ ion (OE+)로 분해한다. 이 OE+와 neutral은 complex를 형성하고 m/z 341 ion을 형성한다. 이 cation에 대한 accurate mass는 341.1449에서 측정되었으며 계산된 mass (341.1430, $\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$)와 5.39 ppm의 error를 가지고 일치한다.

Compound 1의 benzene ring에 ipso protonation은 다른 분해 경로를 거치게 된다. 즉 ipso protonated 1은 m/z 329에 EE+와 neutral N-methyldehydropiperazine 과 SO₂로 분해될 수 있다. 또한 S-C_{Ar} bond의 heterolytic cleavage에 의해 m/z 163에 N-methylpiperazine-SO₂⁺와 neutral로 분해될 수 있다. 후자의 분해는 역시 ion-neutral complex를 형성하고 methyl group을 전이시켜 m/z 343에 ion을 생성한다. 이 cation의 accurate mass는 343.1568에서 측정되었으며 계산된 mass (343.1587, $\text{C}_{18}\text{H}_{23}\text{N}_4\text{O}_3\text{S}$)와 -5.56 ppm의 error를 가지고 일치하였다.

H/D exchange 실험에 의한 d_2 -1 (m/z 493)의 MS/MS spectra는 m/z 408, 345 그리고 341에서 ion들을

생성하였으며 이결과는 제시된 fragmentation/rearrangement mechanism과 잘 일치한다.

KJH의 *in vitro* 대사

Rat liver microsome을 이용하여 KJH의 *in vitro* 대사 연구가 수행되었다. Figure 4는 compound 1에 의하여 생성된 5개의 대사체들과 각 product ion mass spectra를 보이고 있다. 각 대사체들의 protonated molecular ion들은 m/z 451 (M1), 465 (M2), 477 (M3), 507 (M4) 그리고 493 (M5)에서 관찰되었다. 또한 그들의 product ion들은 특징적인 ion들을 형성하여 구조 결정에 유용하게 사용되었다. M1 (m/z 451)은 *N*-demethylated, *N,N*-deethylenated 대사체였으며 M2는 *N,N*-deethylenated 대사체였다. M3는 *N*-demethylated 대사체, M4는 hydroxylated 대사체였다. M5는 M4의 *N*-demethylated 대사체였다. KJH는 기존에 보고된 sildenafil과 유사한 대사 경로 (Figure 5)를 보였으며 이 결과는 KJH들의 약으로서의 개발에 많은 정보와 도움을 제공할 것이다.

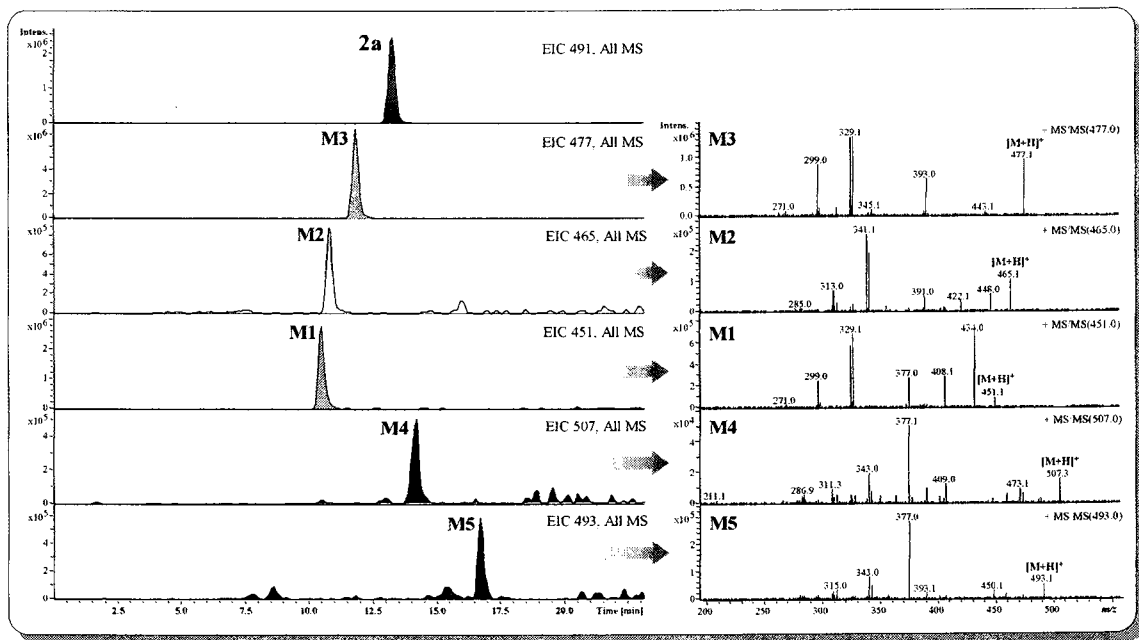


Figure 4. Extracted ion chromatograms and MS² spectra of compound 1 (2a) and its metabolites after 30-min incubation with rat liver microsomes.

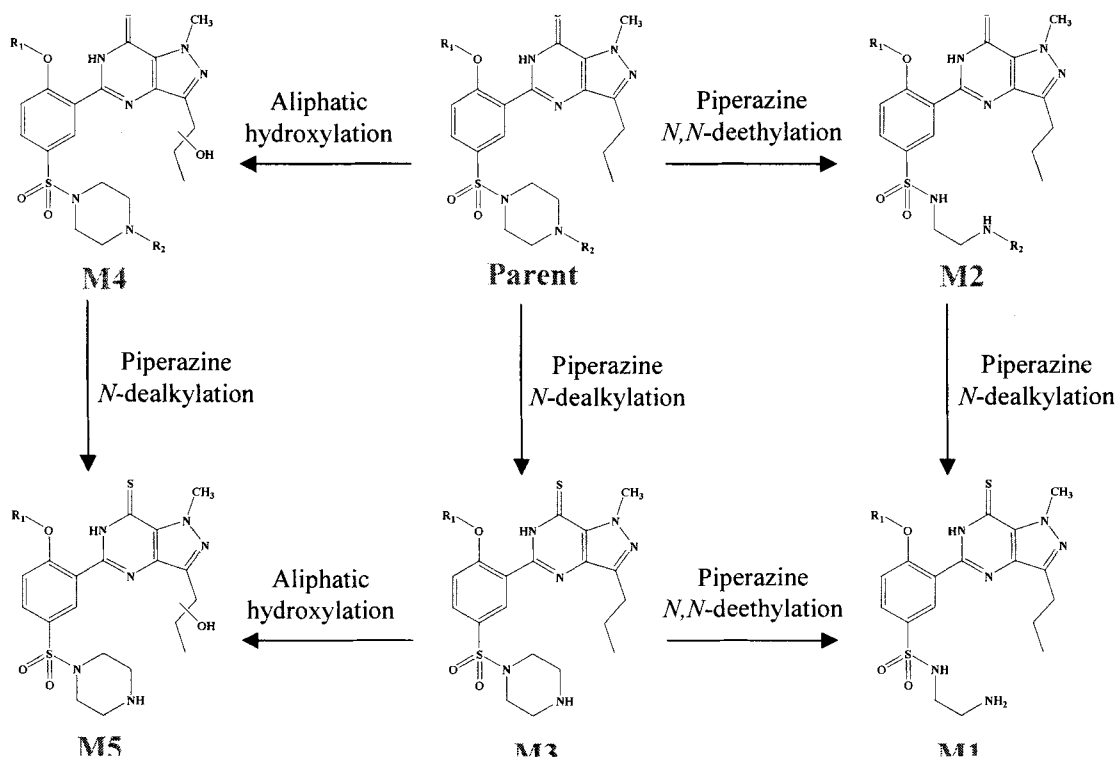


Figure 5. Postulated metabolic pathways of new analogues in rat microsomes

제 4 절 Deuterium labeled compound를 이용한 대사 연구

1. 서론

*Fructus Schizandrae sinensis Baill*은 중국의 전통적인 약재로 tonic과 sedative에 사용되어 왔으나, 1970대에 이르러 chronic viral hepatitis 환자의 serum glutamic-pyruvic transaminase (SGPT)의 level을 낮추는데 효과가 있다고 것이 밝혀졌다.

DDB-S는 두개의 carboxylic group을 포함한 매우 symmetrical bi-phenyl compound로, unique한 stereo-chemical 특징을 가지고 있다. 때문에 metabolism study시 mass spectrometry로 구조를 밝히는데 동일한 mass pattern을 가지는 metabolite가 검출되어 mass spectrum 상으로 구분이 될 수가 없었다. 따라서 보다 명확한 대사체 구조 규명을 위하여는 두개의 functional group을 구별하여야 하였으며 이를 위하여 한쪽 methoxy group과 ethylenedioxy moiety의 hydrogen을 deuterium으로 선택적으로 치환하여 대사 연구를 수행하였다.

2. 실험방법

Materials

DDB-S은 부산대 약학대로부터 제공받았으며, 그 외에 시약은 특급시약을 사용하였다. HPLC-grade water는 Milli-Q purification system (Millipore, Bedford, MA, USA)을 통하여 제조하여 사용하였고, high-purity nitrogen (99.999%)은 신양산소 (Seoul, Korea)에서 공급 받았다.

In vitro microsomal incubation

다양한 CYP450 isozyme에 의한 DDB-S의 영향을 알아보기 위하여 microsomal incubation을 하였다. DDB-S의 standard stock solution은 10 mM (DMSO)로 제조하였고, 이 후에 1 mM (DMSO)로 희석하여 working standard solution으로 사용하였다. Incubation mixtures에는 1.0 mg liver microsomes, 20 μ M substrate, 그리고 NADPH-generating system (0.1 M glucose-6-phosphate, 10 mg/ml -NADP⁺, 1 U/ml glucose-6-phosphate dehydrogenase)이 total volume 200 μ l potassium phosphate buffer (0.1 M, pH 7.5)로 구성되어있다. 반응의 시작은 NADPH-generating system을 넣고 37°C water bath에서 반응을 지속하였다. 반응의 정지는 400 μ l의 acetonitrile을 첨가하였다. Vortex후에 3000 rpm에서 10 min간 원심 분리하고, 상등액을 N₂ gas하에서 건조시켜 50 μ l의 CH₃CN/20 mM ammonium formate (pH 4.0) (1:9)으로 녹여 최종적으로 3 μ l을 HPLC에 주입하였다.

In vivo metabolic study

200 - 250 g 수컷 Sprague-Dawley rat은 대한실험동물 (Taejeon, Korea)로부터 구입하였고, 실내온도 (23±2°C)와 습도 (55±10%)가 조절되는 곳에서 12시간간격으로 낮과 밤을 조절하며 먹이를 주고 사육하였다. 실험 이틀 전에 PE-10 tube로 femoral vein에 cannulation하고 tube를 목뒤에 고정한다. 약물 투여 6시간전에 절식을 시키고 metabolic study와 excretion study를 수행하였다. DDB-S 또는 DDB-S-d₅를 일회 50 mg/kg 투여하고 6, 12, 24 시간 간격으로 urine과 feces를 채취하였다. 채취한 sample은 -20°C에 보관하였다.

10명의 건강한 자원자를 대상으로 일회 60 mg의 DDB-S를 투여하고 24시간동안 urine을 채취하여 metabolic study를 위와 동일하게 수행하였다.

Sample Preparations

2 ml의 isoprophylalcohol을 1 ml의 urine에 첨가하고 상등액을 N₂ gas하에서 건조시킨다. 잔사에 50 µl의 CH₃CN/20 mM ammonium formate (pH 4.0) (1:9)을 넣고, 이중 3 µl를 LC-MS/MS을 통하여 분석하였다. Feces는 두 배 부피의 증류수와 methanol을 첨가하고 균질화시킨 후 상등액을 농축하여 HPLC system에 주입하였다.

Liquid chromatography-mass spectrometry

HPLC system은 HP 1100 series을 사용하였다. 분석 컬럼은 Hydrosphere C₁₈ (2.0 × 150 mm, 5 µm, YMC, Kyoto, Japan)을 사용하였고, 컬럼온도는 40°C를 유지하였다. 이동상은 (A) 20 mM ammonium formate (pH 4.0)와 (B) 100% acetonitrile을 사용하였다. Gradient program은 유속 0.25 mL/min에서 초기 5% (B)에서 25분간 40% (B)로 조절하였다.

Mass spectrometry와 tandem mass spectrometry analyses는 LC/MSD ion-trap mass spectrometer를 사용하였으며, nitrogen을 nebulizing gas (35 psi)와 drying gas (8 L/min)로 사용하였고, 온도는 350°C를 유지하였다. Mass spectrometer는 positive ion mode에서 작동하였으며, helium을 collision gas로 사용하였다. Ion의 fragmentation은 0.85 V의 resonant excitation amplitude으로 2 Da의 selected mass window로 관찰하였다.

DDB-S-d₅의 합성

DDB-S-d₅의 합성은 Figure 1에 나타난 바와 같이 진행하였다.

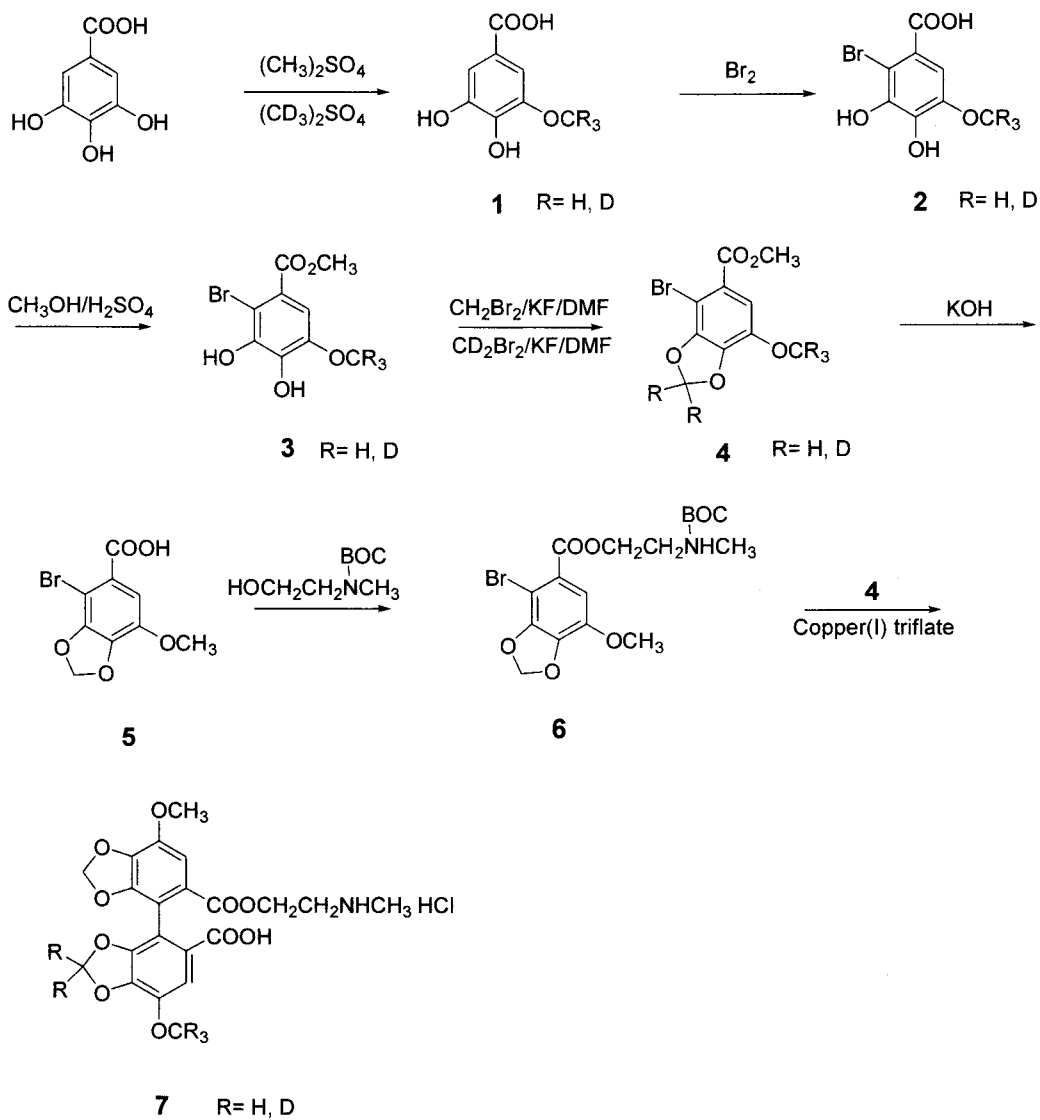


Figure 1. Procedure of synthesis of DDB-S-d₅.

3. 결과 및 고찰

DDB-S의 약효, 안전성 평가의 일환으로 rat과 human에서의 대사 profile과 대사체 구조 규명을 HPLC/MS/MS를 이용하여 규명하였다. Figure 2는 DDB-S와 DDB-S- d_5 의 chemical structure를 보이고 있다. DDB-S의 대칭적인 구조적 특징으로 인한 대사체 확인의 어려움을 극복하기 위하여 본 연구에서는 한쪽의 methoxy group과 methylene group의 proton들을 deuterium들로 치환하여 대사체 확인에 유용하게 사용하였다. Figure 3은 DDB-S와 DDB-S- d_5 의 ion-trap에 low-energy CID 하에서의 product ion spectrum들을 보여 주고 있다. DDB-S의 protonated molecular ion은 m/z 448에서 관찰되었으며 이 cation은 m/z 430 과 329에서 주 product ion을 생성하였다. m/z 430 ion은 protonated molecular ion으로부터 H₂O의 loss에 의하여 생성되었으며 m/z 329는 aromatic carbon과 CO bond 사이의 cleavage에 의하여 생성되었다. 반면, DDB-S- d_5 의 protonated molecular ion은 m/z 453 (448 + 5 amu)에서 관찰되었으며 product ion들은 m/z 435와 334에서 관찰되었다. 이 product ion들의 fragmentation은 DDB-S와 동일하게 설명될 수 있었다.

DDB-S는 rat, dog 그리고 human liver microsome을 이용한 in vitro incubation 시 대사가 되지 않았으며, rat liver microsome에서만 M6가 소량 생성되어 대사안전성이 높았다. DDB-S를 rat에 정맥 주시 후에는 urine으로 80%이상, 그리고 feces로 약 10%가 배설되었으며 urine과 feces 에서 모두 12개의 metabolite가 검출되었다 (Figure 4). Urine과 feces로 배설된 DDB-S는 약 96%가 parent compound로 검출되었으며 대사체는 전체 배설량의 약 4%정도로 추정되었다. Figure 5는 생성된 대표적인 DDB-S 대사체들의 product ion spectra를 보이고 있다. 덧붙여 구조 결정에 도움을 주기 위하여 DDB-S- d_5 에 의하여 생성된 대사체들의 product ion spectra를 함께 보이고 있다. Fragmentation mechanism은 DDB-S와 거의 동일하여 이에 기초하여 대사체들의 구조가 확인되었으며 더욱 자세한 구조는 DDB-S- d_5 대사체들의 spectra를 비교하여 결정되었다. DDB-S의 주요 대사 경로는 methylenedioxy group의 demethylation, methoxy group의 O-demethylation, methylaminiethyl group의 N-demethylation, 그리고 glucuronidation이었다 (Figure 6). Human의 경우 plasma에서는 parent DDB-S만 검출되었으며, urine으로 배설된 DDB-S는 rat와 유사하게 약 96%가 parent compound로 그리고 약4%가 대사체로 배설되었으며 8개의 대사체가 검출되었다. Human과 rat을 비교 시 대사 정도는 유사하였으나 metabolic profile에서는 큰 차이를 보여주었다. Rat에서는 methylenedioxy group의 demethylation된 M6 가 major 대사체로 검출되었으나, human에서는 parent DDB-S의 glucuronide conjugate가 86%이상으로 major metabolite로 검출되었다. 결론적으로 DDB-S는 자체의 hydrophilicity로 인하여 대사 안전성이 매우 높으며 대부분이 parent compound 형태로 urine으로 신속히 배설이 일어나며, 약 4-5%정도가 demethylation, N-, O-demethylation, 그리고 glucuronidation 반응을 통하여 대사체로 변환되며, rat에서는 demethylation 그리고 human에서는 glucuronidation이 major 대사반응으로 판명되었다.

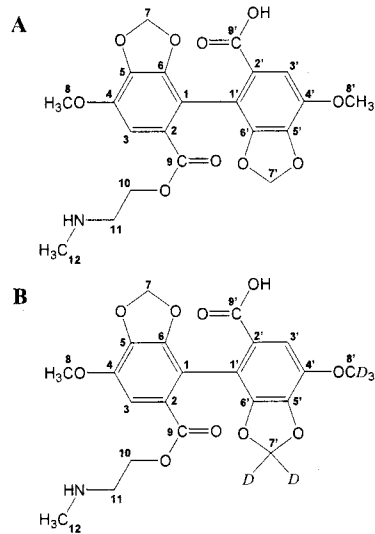


Figure 2. Chemical structures of DDB-S (A) and DDB-S-d₅ (B).

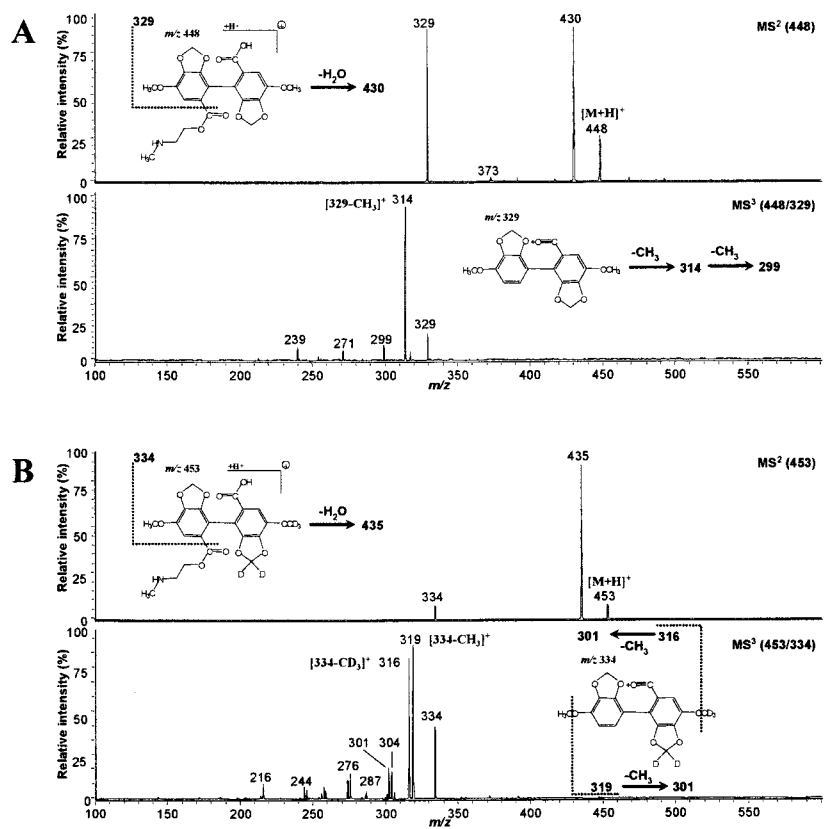


Figure 3. MS/MS spectra of DDB-S (A) and DDB-S-d₅ (B).

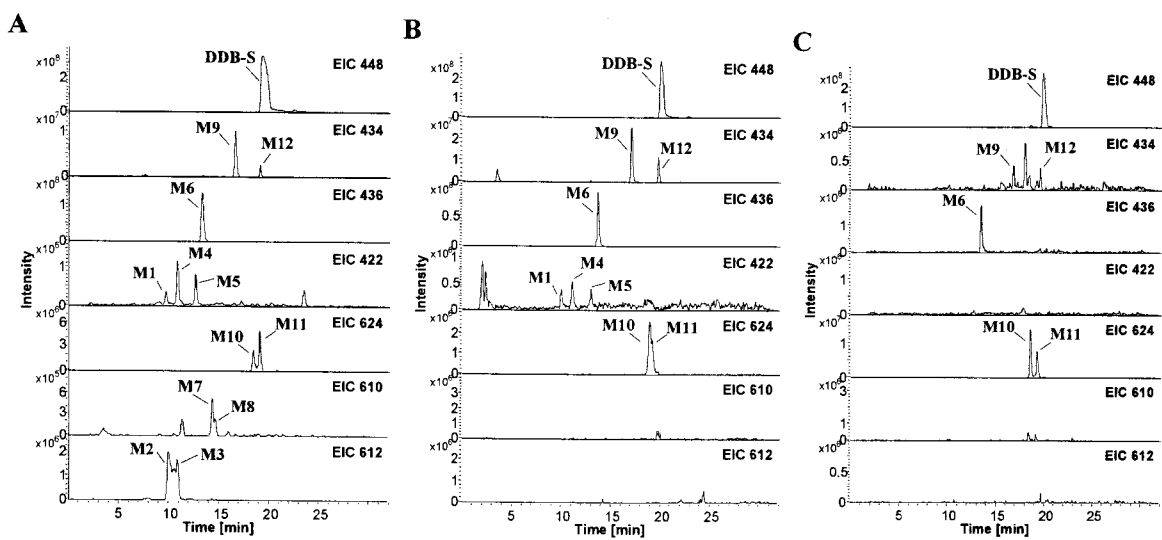


Figure 4. Representative extracted ion chromatograms of rat urine (A), rat feces (B), and human urine (C).

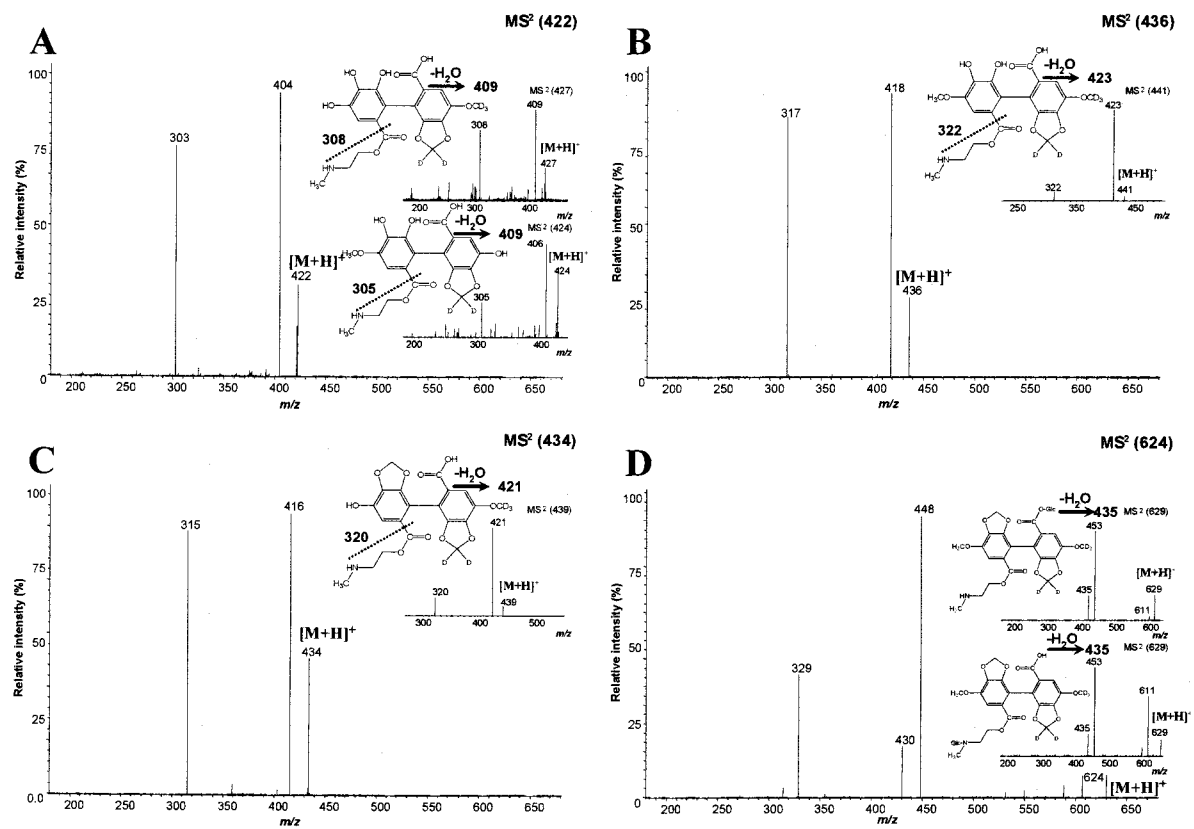


Figure 5. MS/MS spectra of representative metabolites. Small spectra obtained from DDB-S-*d*₅ metabolites.

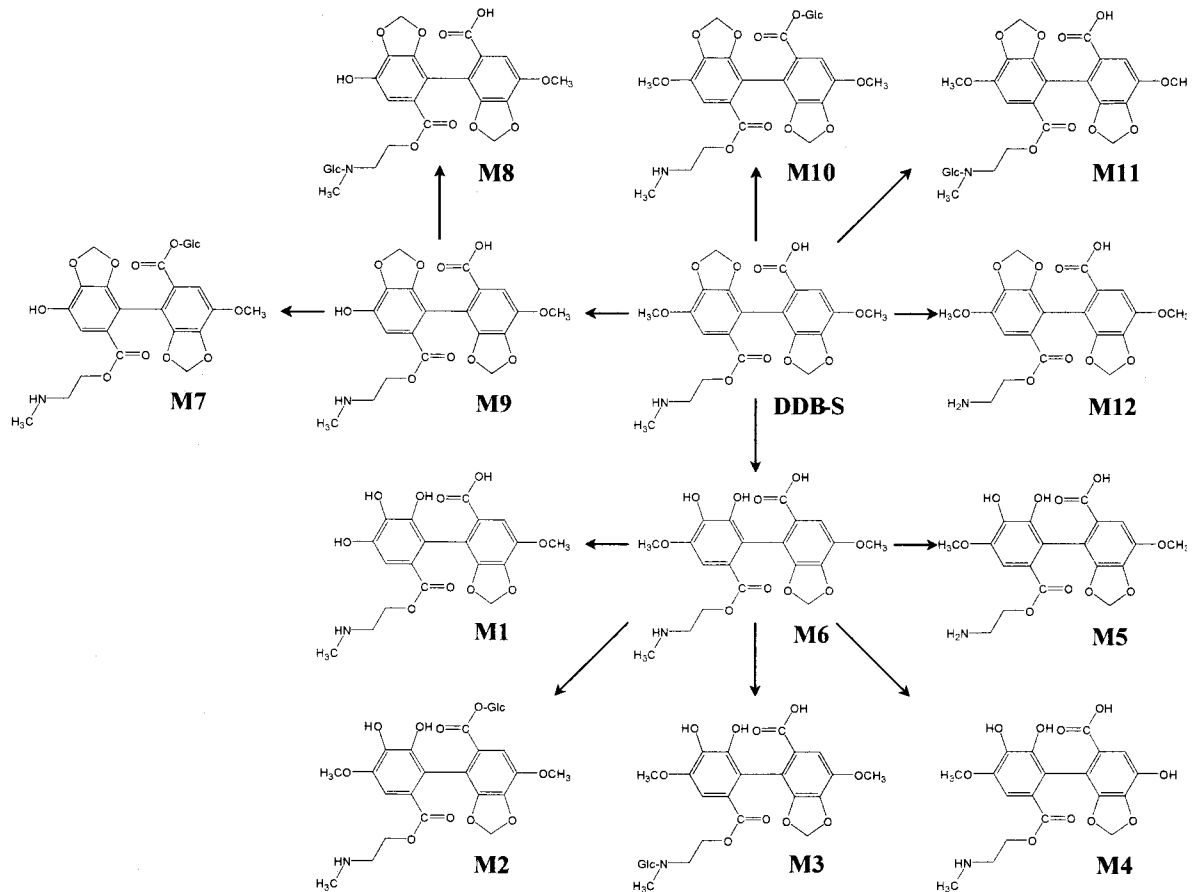
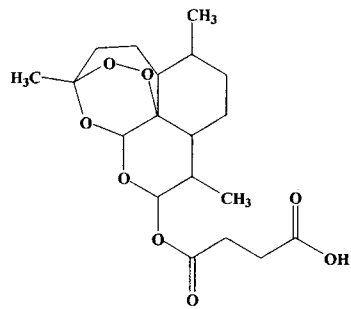


Figure 6. Proposed metabolic pathway of DDB-S.

제 5 절 말라리아 치료제 artesunate의 대사

1. 서론

Artesunate는 천연물 유래 화합물로서 말라리아 치료 효과가 보고되어 있으며, pyronaridine과 더불어 복합제로서 항 말라리아제로서 개발되고 있는 약물이다. 본 연구에서는 artesunate의 체내에서의 약리 작용과 안전성 검증의 일환으로서 rat에서 대사 경로와 대사체의 구조를 규명하고자 하였다.



Artesunate (Mw 384)

Figure 1. Structure of artesunate

2. 실험방법

Rat liver microsome의 제조

Rat의 간을 생리식염수로 perfusion 하여 피를 제거한 후 절취하였다. 절취된 간은 작은 조각으로 하고 3volume의 0.1M K-phosphate buffer를 첨가하여 Guengerich 등이 사용한 분획 원심 분리법을 이용하여 microsome을 제조하여 -70℃에서 보관하였다. 단백질량은 Lowry의 방법으로 bovine serum albumin을 표준시료로써 사용하여 측정하였다.

Plasma stability

Rat plasma 500ul에 artesunate를 10, 50, 100 uM이 되도록 첨가한 후 37℃에서 0, 5, 10, 20, 30, 60 그리고 120분간 incubation하였다. 각 시간별 시료에 acetonitrile을 1-volume 첨가한 뒤 13000 rpm에서 10분간 원심분리 하고 이중 상등액을 LC/MS로 분석하였다.

Metabolic stability

중류수 144 μl , 1.0 M potassium phosphate (pH 7.4) buffer 20 μl , 표준물 용액 2.0 μl (10 mM stock soln.)와 NADPH generating system 30 μl 를 넣어 preincubation한 뒤 rat liver microsome (1mg/ml)를 넣어 0, 10, 20, 30, 60 그리고 120 분간 incubation하였다. 이 반응액에 acetonitrile 200 μl 를 넣어 반응을 정지시켰으며 교반 후 원심 분리시켜 상등액을 LC/MS로 분석하였다.

In vitro metabolism with rat liver microsomes

Microsome 0.2mg과 0.1M potassium phosphate(pH7.4), 1 mM artesunate 또는 pyronaridin의 혼합물을 37°C에서 3분간 preincubation시킨후 NADPH generating system(0.01M glucose 6-phosphate, 1unit glucose 6-phosphate dehydrogenase, 0.5mg/ml β -NADP⁺)을 첨가하여 전체 반응혼합물의 volume을 0.2ml로 하였고 37°C에서 2시간동안 배양하였다. 반응은 2 volume의 acetonitrile을 첨가하여 종료하였으며 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 HPLC로 분석하였다.

Liquid chromatography/mass spectrometry

HPLC system은 Agilent 1100 series를 사용하였으며 mass spectrometry는 electrospray ionization과 ion trap이 장착된 tandem MS system을 사용하였다. Column은 YMC C18 (2.0×150 mm, 5 μm , for pyronaridine)과 Capcell-pak C18 (1.0×150 mm, 5 μm , for artesunate)을 사용하였으며 이동상으로는 0.1% acetic acid [A]과 acetonitrile [B]를 사용하여 분석하였으며 조건은 다음과 같다.

■ Artesunate

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (ml/min)
0.0	75	25	0.05
1.0	65	35	0.05
2.0	65	35	0.05
28.0	15	85	0.05
28.1	75	25	0.05

Mass spectrometry 조건은 다음과 같다.

Artesunate	
Ion source	ESI
Nebulizing gas (N ₂)	5 L/min
Dry gas (N ₂)	18 psi
Dry temperature	325°C
Polarity mode	negative or positive
Collision gas	He
Analyzer	ion trap

Full-scan mode 분석으로부터 검출된 대사체들의 구조는 multi-stage tandem mass spectrometric (MSⁿ) 방법을 이용하여 결정되었다. Collision gas로는 helium을 사용하였으며 parent drug 및 대사체들의 parent ion을 isolation하고 fragment amplitude를 조절하여 MS² spectrum을 얻었다. 대사체의 MS² spectrum에서 생성된 product ion들을 parent drug의 product ion들과 비교하여 생성된 대사체들의 정확한 구조를 결정하였다. MS²로부터 구조를 결정하기 어려운 대사체들은 MS³ 와 MS⁴에 의하여 결정하였다.

3. 실험결과 및 고찰

Artesunate (Arte)는 chromophore가 없으므로 mass monitoring으로 대사체를 추적하였다. Arte의 구조적 특징으로 인하여 positive ion mode에서는 molecular ion이 검출되지 않고 NH₄ adduct인 m/z 402로 보였으며 fragment ion으로는 m/z 284 (MH - succinate), 267 (MH - succinate - CH₃OH), 221 (MH -succinate - CH₃OH - C₂H₅OH)의 fragment pattern을 보여주었다. Negative ion mode에서는 molecular ion [M-H]⁻ 인 m/z 383이 보여주었으며 production ion spectrum에서는 m/z 365 (-H₂O)와 347 (- 2H₂O)을 보여주었다 (Fig. 3). Major 대사체로 추정되는 a-dihydroartemisinin (a-DHA)와 β-dihydroartemisinin (β-DHA)의 mass spectrum은 Arte와 동일한 양상을 보여주었다. Negative ion mode에서는 molecular ion [M-H]⁻이 m/z 283, 그리고 fragment ion은 m/z 265 [M-H-H₂O]와 221, 203, 그리고 179를 보여주었다 (Fig 4, Fig 5). 따라서 대사체 추적은 negative ion mode를 이용하였다. Arte를 rat liver microsome과 반응 후 얻어진 extracted ion chromatogram은 Fig 2에 나타내었다. Arte는 NADPH-generating system을 첨가직후 분석 시에는 어떤 대사체도 나타나지 않았으며, NADPH-generating system없이 2시간 반응시에는 a-DHA, β-DHA, 그리고 M1이 검출되었다. 따라서 이들 대사체는 cytochrome P450가 아닌 esterase에 의해서 생성된다고 할 수 있다. M1의 MS/MS

spectrum에서는 DHA와 유사한 fragment pattern을 보여주었으나 (Fig 6) HPLC chromatogram 상에서 retention time이 a-DHA에 비하여 약3분 정도 차이가 나며 이와 유사한 화합물의 대사를 참조하면 M1은 dihydroartemisinin furano acetate로 추정된다. 보다 명확한 구조는 positive ion mode mass spectrum을 해석하여할 것으로 사료된다. NADPH-generating system을 가하고 2시간 반응 시에는 DHA에서 2 mass unit가 증가된 분자량 286인 m/z 285 [M2], 그리고 DHA 30 mass unit가 증가된 분자량 314인 m/z 313을 가진 peak가 4개 [M3, M4, M5, M6]가 검출되었다. M2의 경우 MS/MS spectrum에서 fragment ion m/z 267 과 m/z 223을 보여주어 DHA와 비교 시 fragment ion도 2 mass unit가 증가됨을 알 수 있다 (Fig. 7). 따라서 M2는 peroxy bridge가 diol로 변환된 구조로 추정된다. M3와 M6는 모두 DHA로부터 mass unit이 30증가된 isobaric metabolites로 모두 methyl group중 하나가 oxidation되어 corboxylic acid로 변환된 대사체로 추정 된다 (Fig. 8, Fig. 9). Negative mode MS/MS spectrum만으로는 major fragment ion이 모두 물 분자가 빠져 생성되는 fragment ion으로 구조를 추론하기가 용이하지 않으며 따라서 positive ion mode에서의 fragment pattern을 얻어야지만 정확한 구조를 유추할 수 있다고 사료된다. In vitro rat liver microsomes 또는 plasma와 incubation시는 a-DHA, β -DHA, 그리고 M1이 cytochrome P450 효소가 아닌 esterase에 의하여 생성되고 M1의 경우 rearrangement가 일어난 대사체라 추론된다. M2에서 M6는 cytochrome P450에 의하여 생성되는 대사체로서 liver microsomal incubation에서만 검출이 되었으며 in vitro metabolic pathway는 Fig. 12에 제안하였다.

Arte가 plasma 또는 microsomal incubation시 대사되는 반감기는 농도 비의존성이므로 plasma에서는 약 2시간, 그리고 liver microsomes에서는 약 1시간 정도로 microsomes에서의 대사속도가 약 2배정도로 계산되었다 (Fig. 10, Fig. 11)

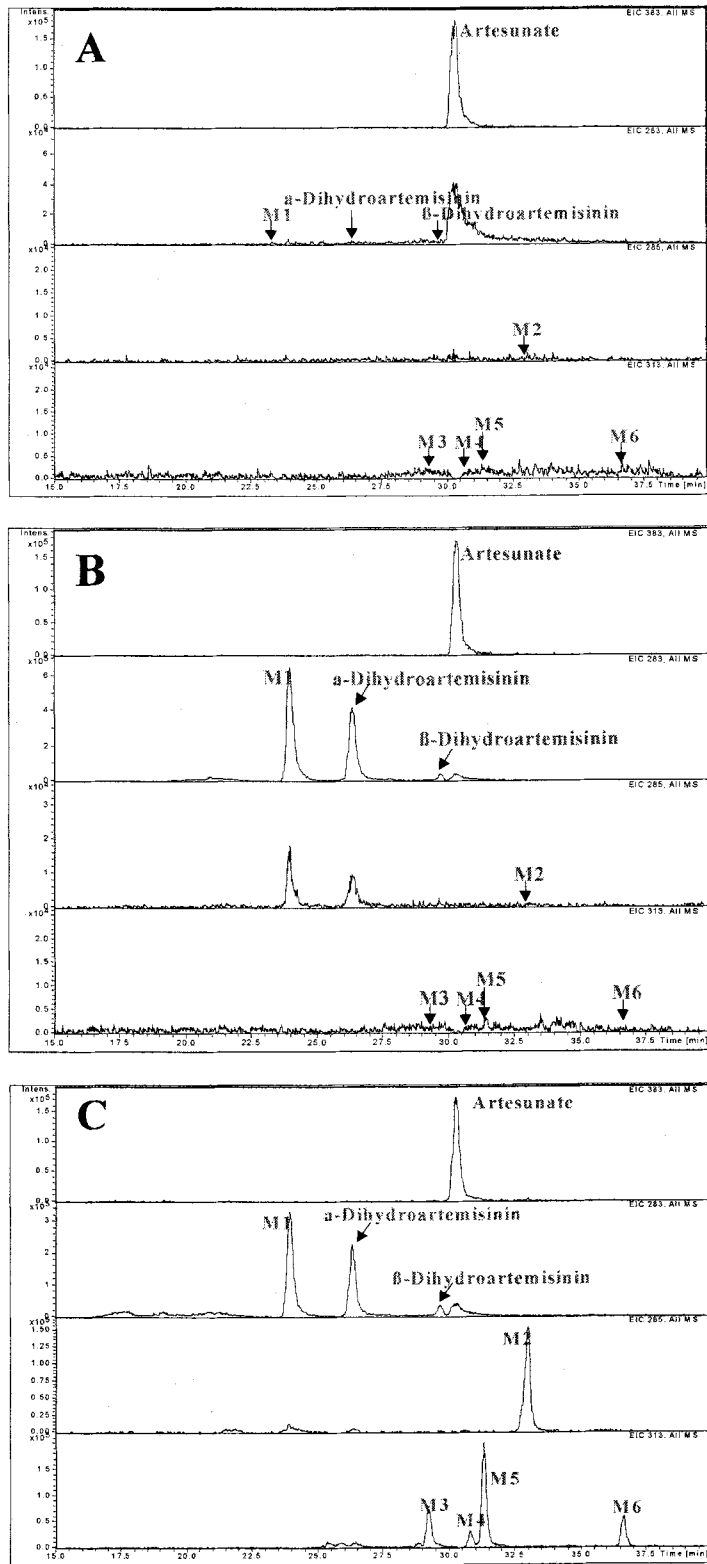


Figure 2. HPLC/extracted ion chromatograms of rat microsomal incubation mixtures of artesunate at 0 hr incubation (A), 2 hr incubation without NADPH, and 2 hr incubation with NADPH.

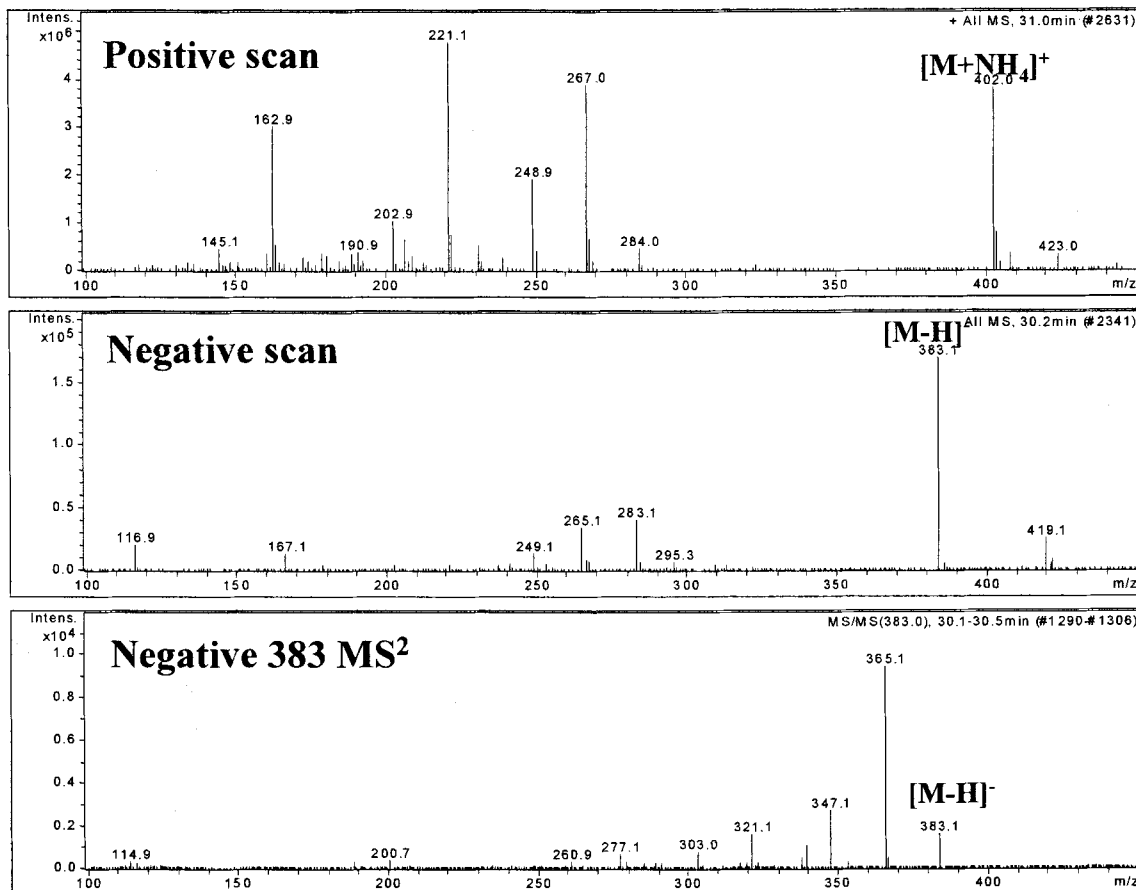


Figure 3. ESI Mass and product ion mass spectra of artesunate

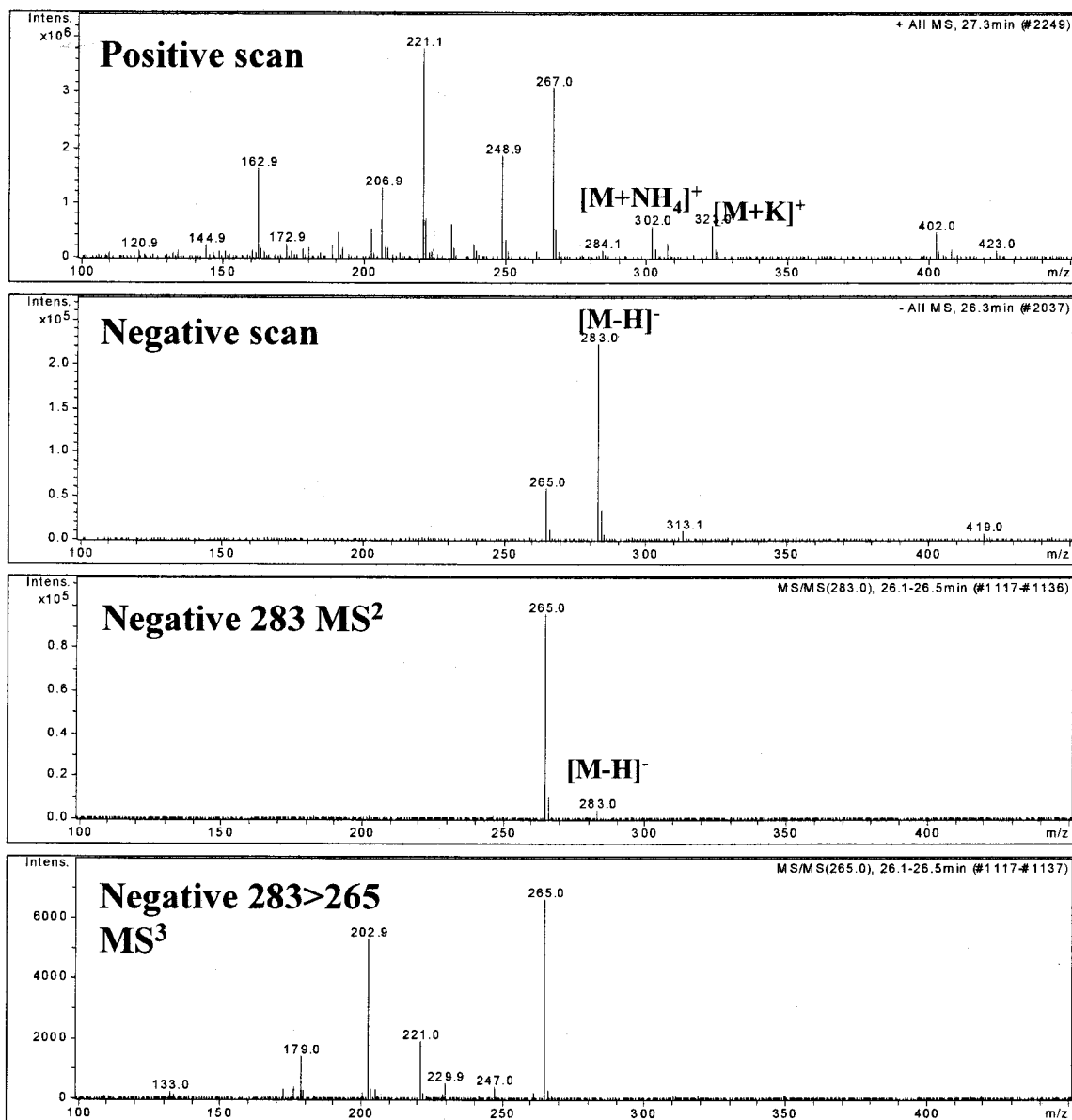


Figure 4. ESI Mass and product ion mass spectra of α -dihydroartemisinin.

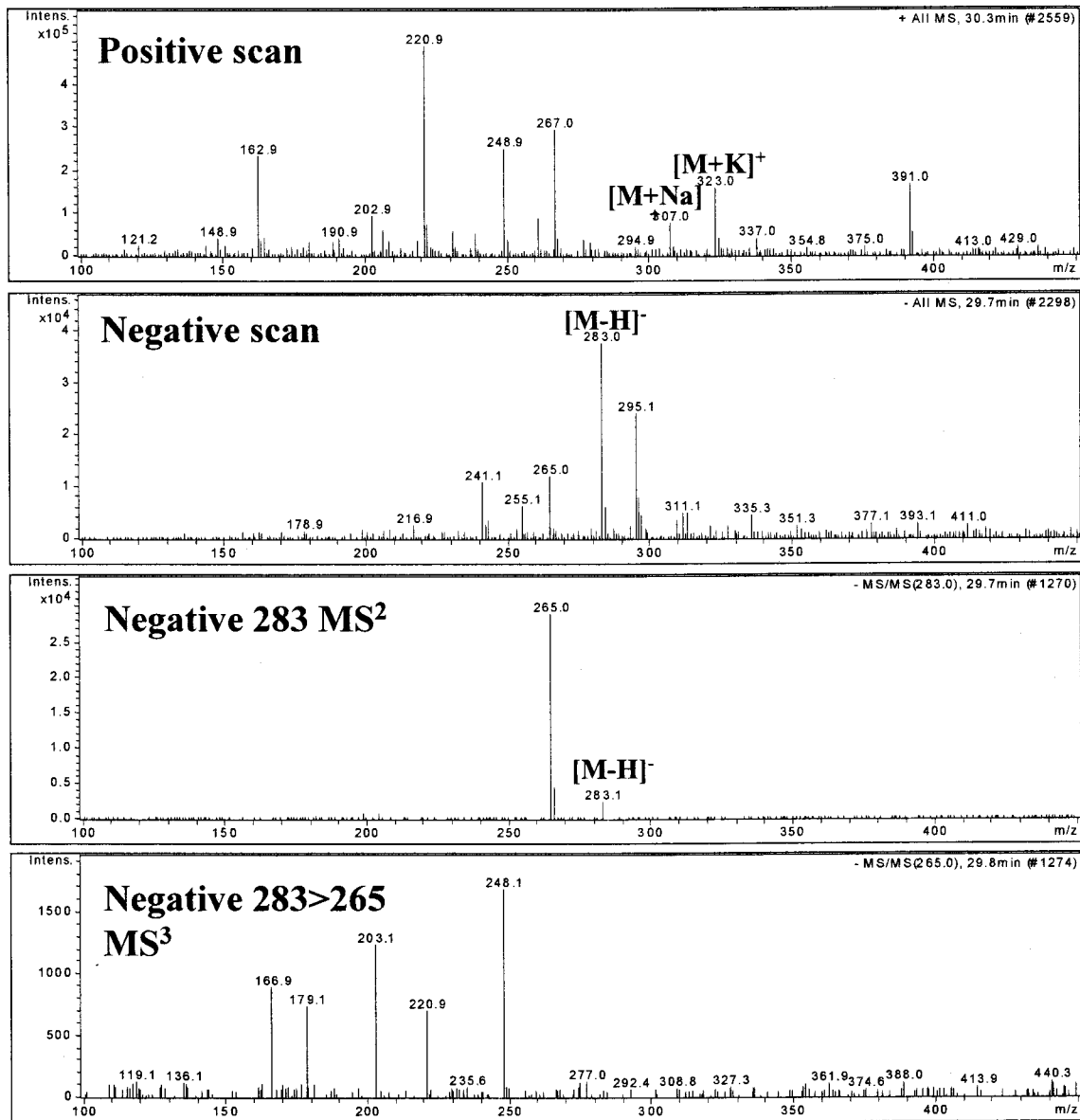


Figure 5. ESI Mass and product ion mass spectra of β -dihydroartemisinin.

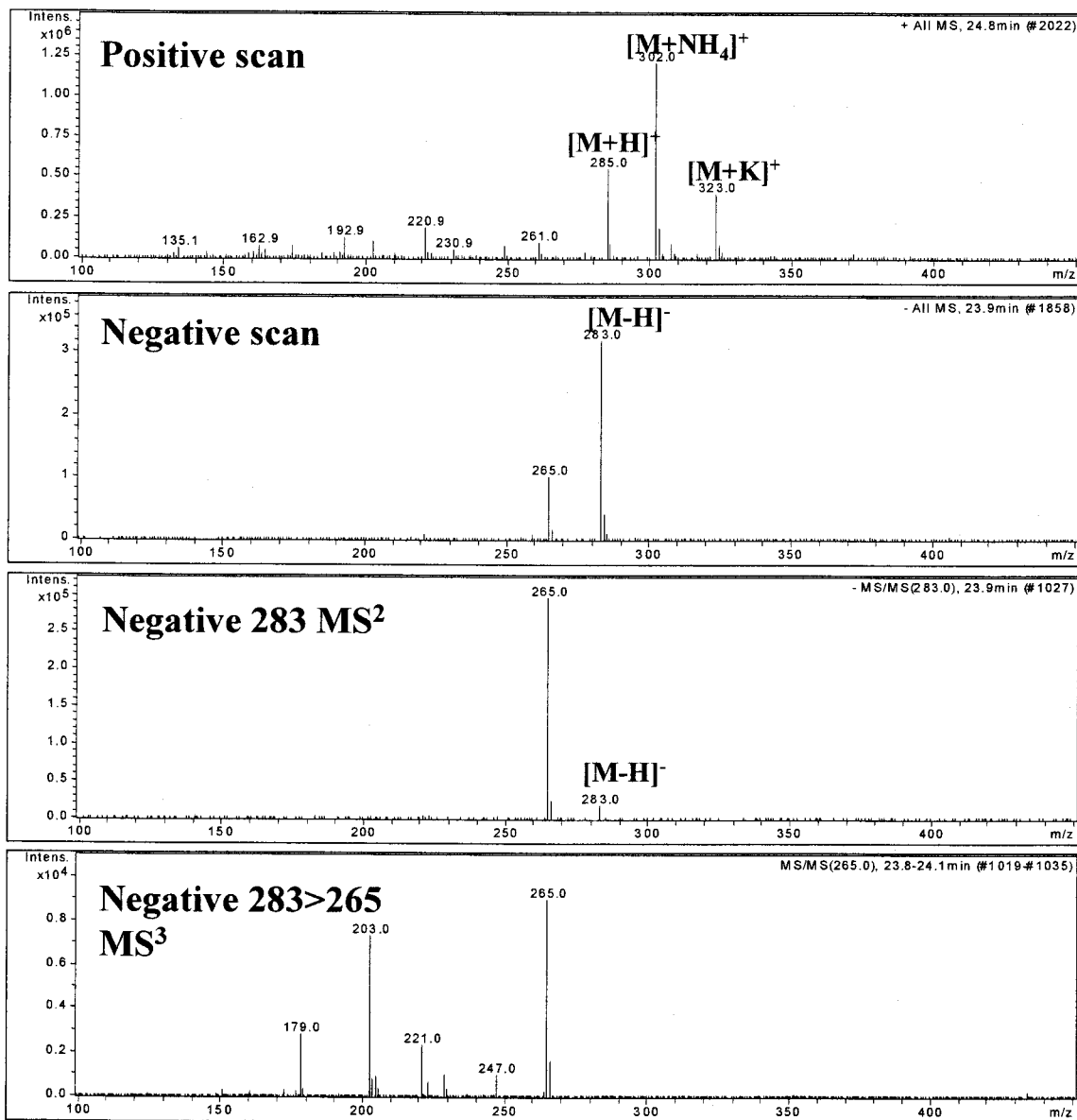


Figure 6. ESI Mass and product ion mass spectra of M1

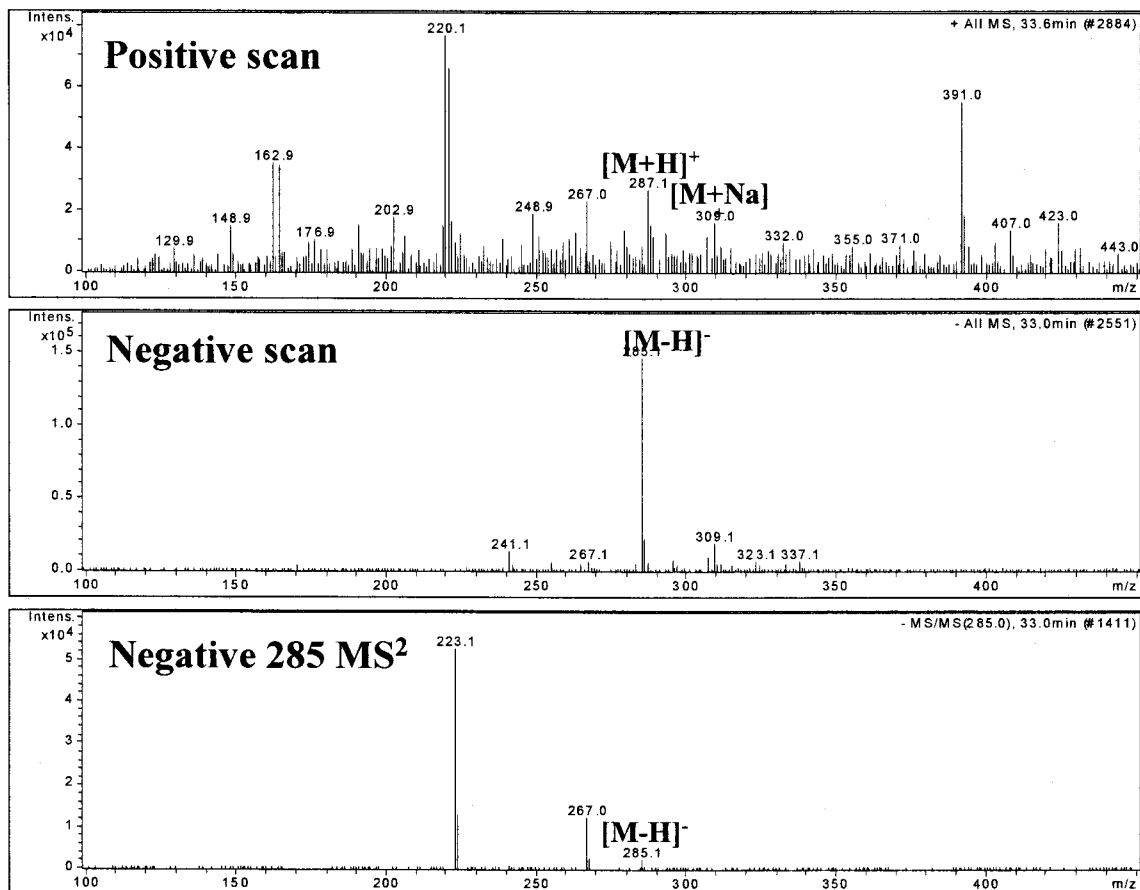
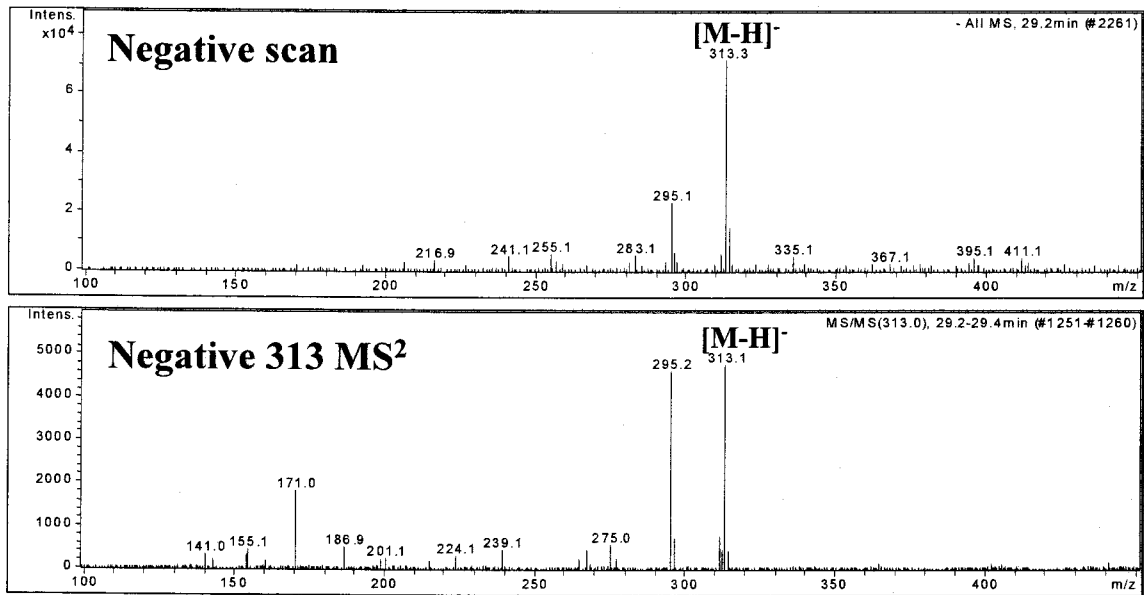


Figure 7. ESI Mass and product ion mass spectra of M2

M3



M4

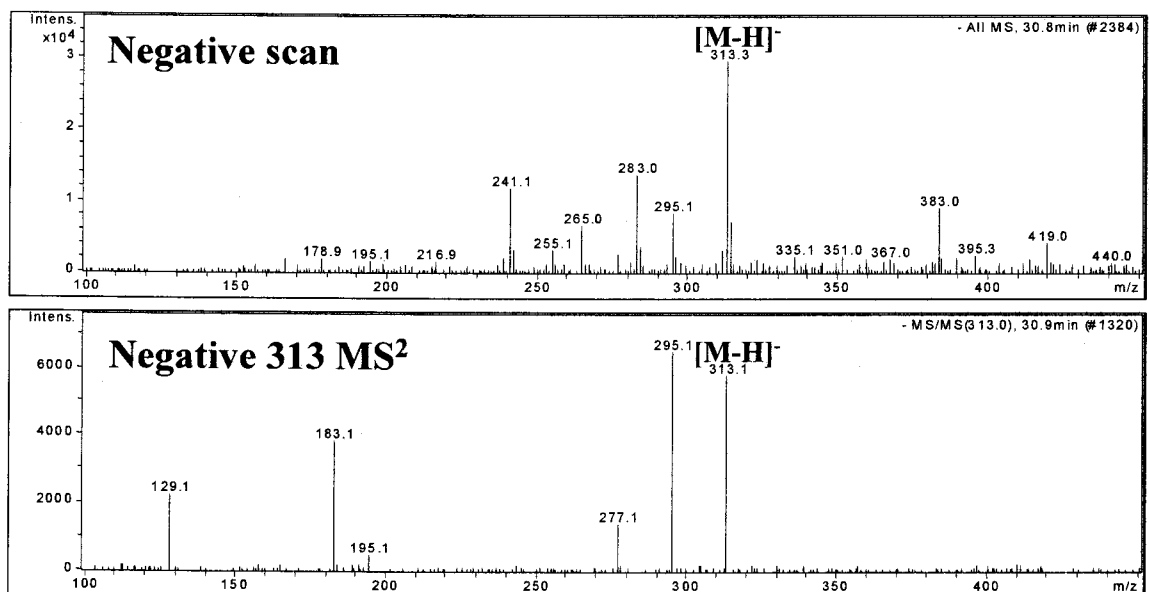
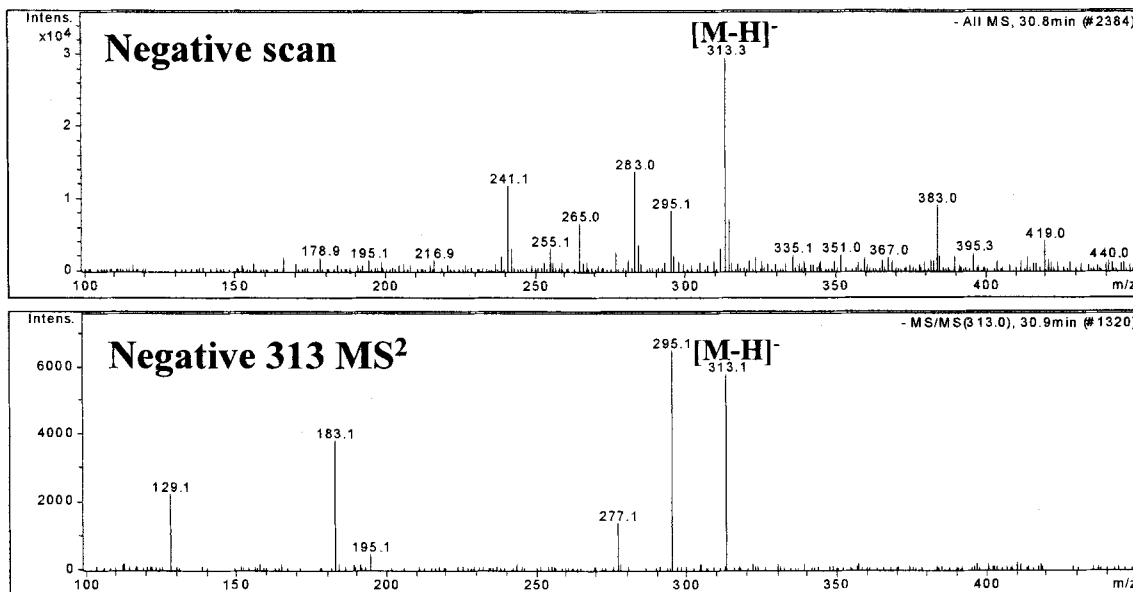


Figure 8. ESI Mass and product ion mass spectra of M3 and M4

M5



M6

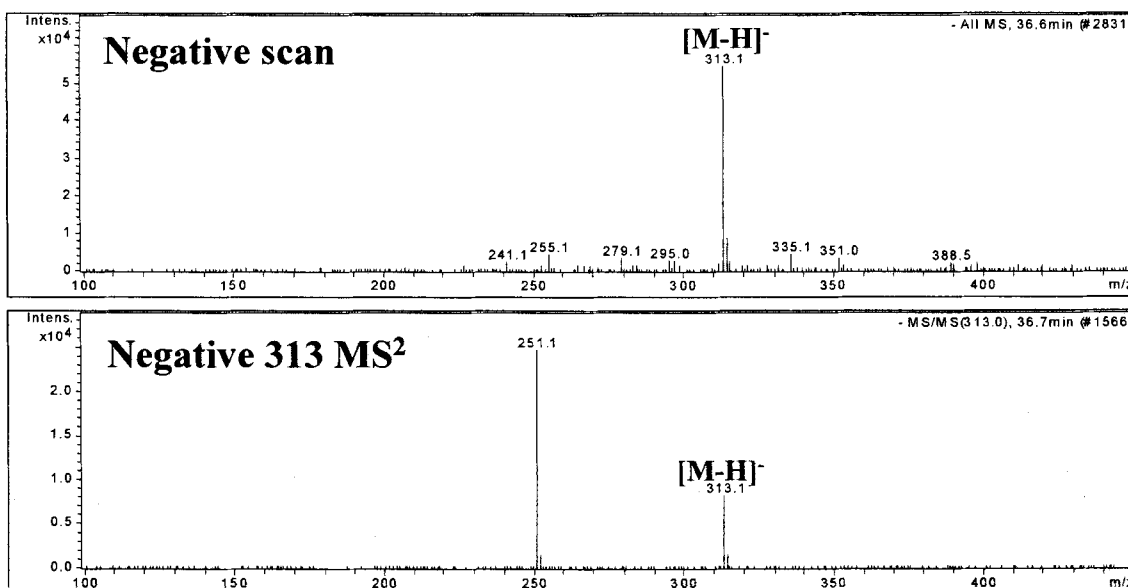


Figure 9. ESI Mass and product ion mass spectra of M5 and M6

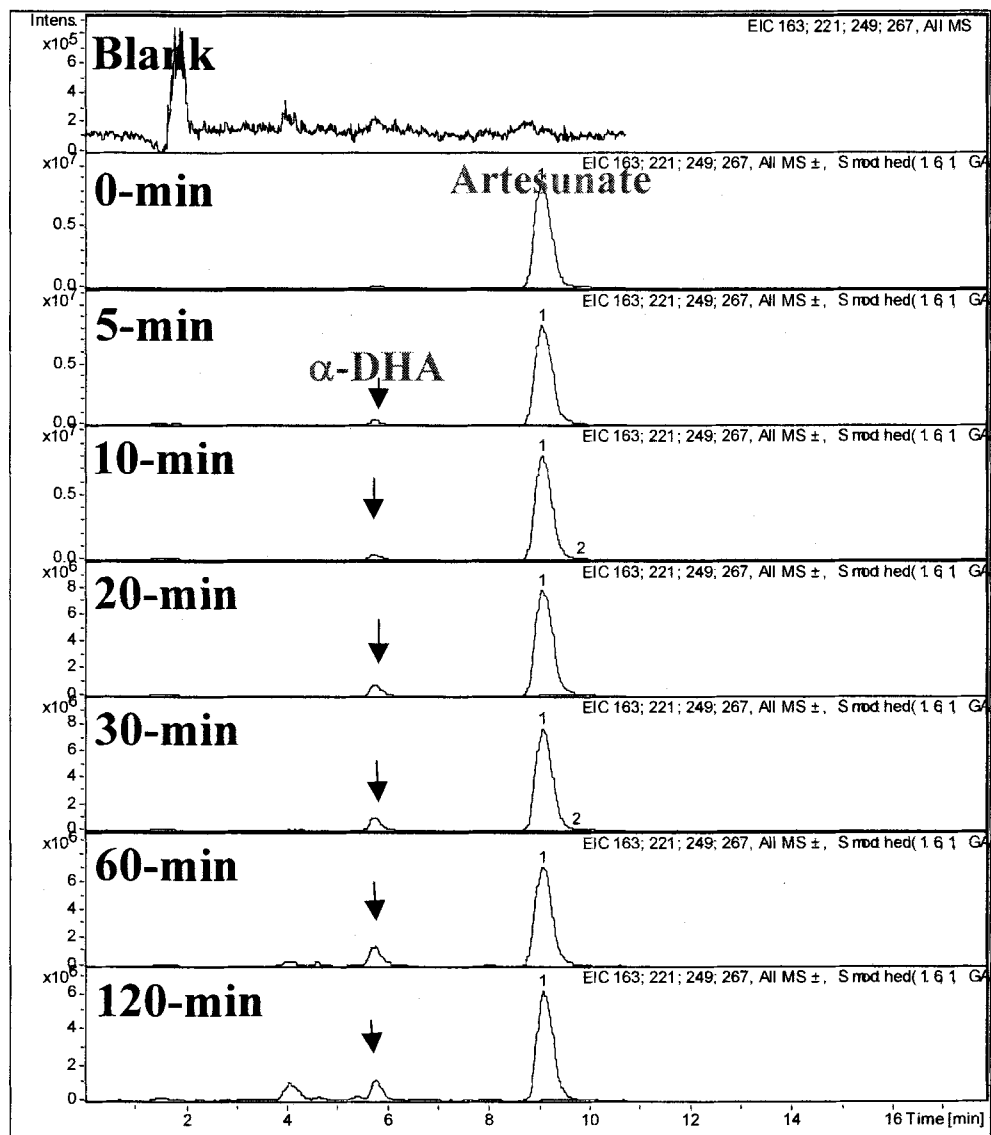


Figure 10. Incubation time dependent formation of α - and β - dihydroartemisinin in rat liver microsomes

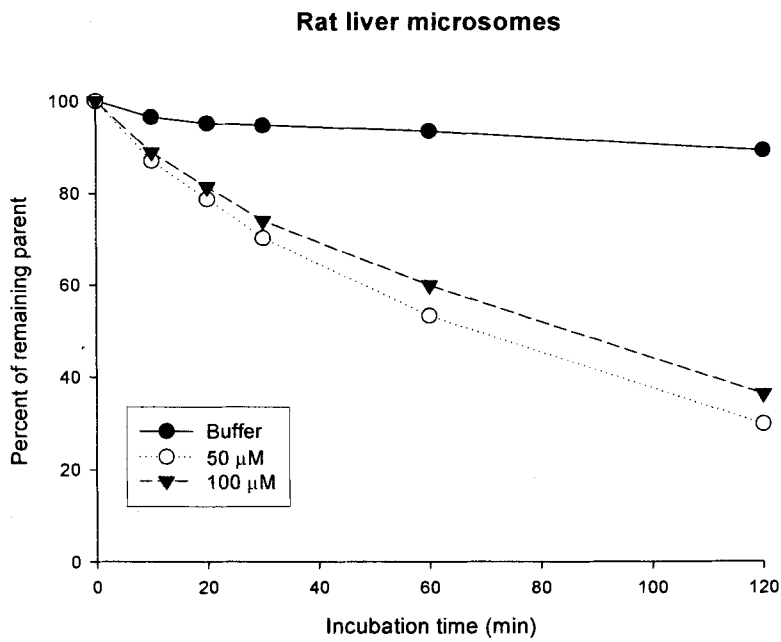
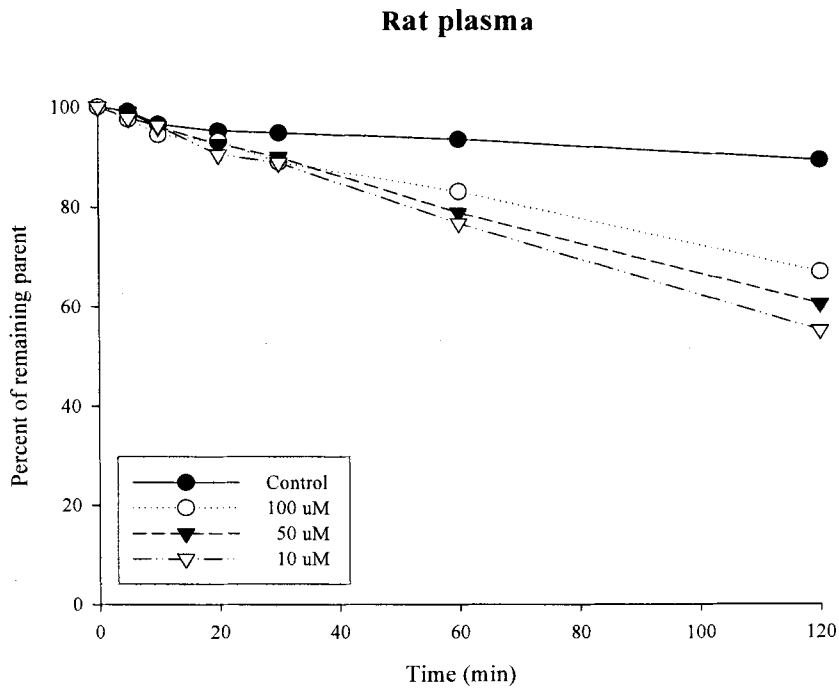


Figure 11. Time dependent disappearance of artesunate in rat plasam and liver microsomes.

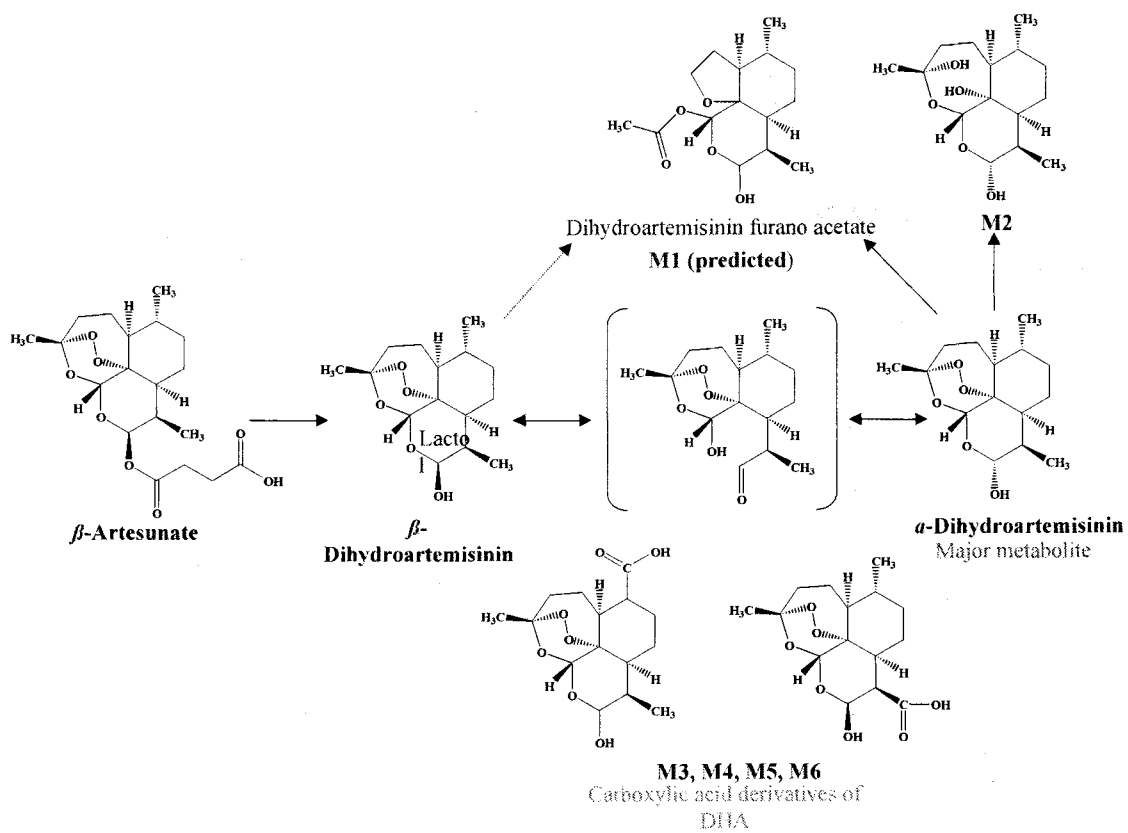


Figure 12. Proposed in vitro metabolic pathways of artesunate in rat liver microsomes.

제 6 절 DDB 와 cyclofenil의 metabolic pathway 규명

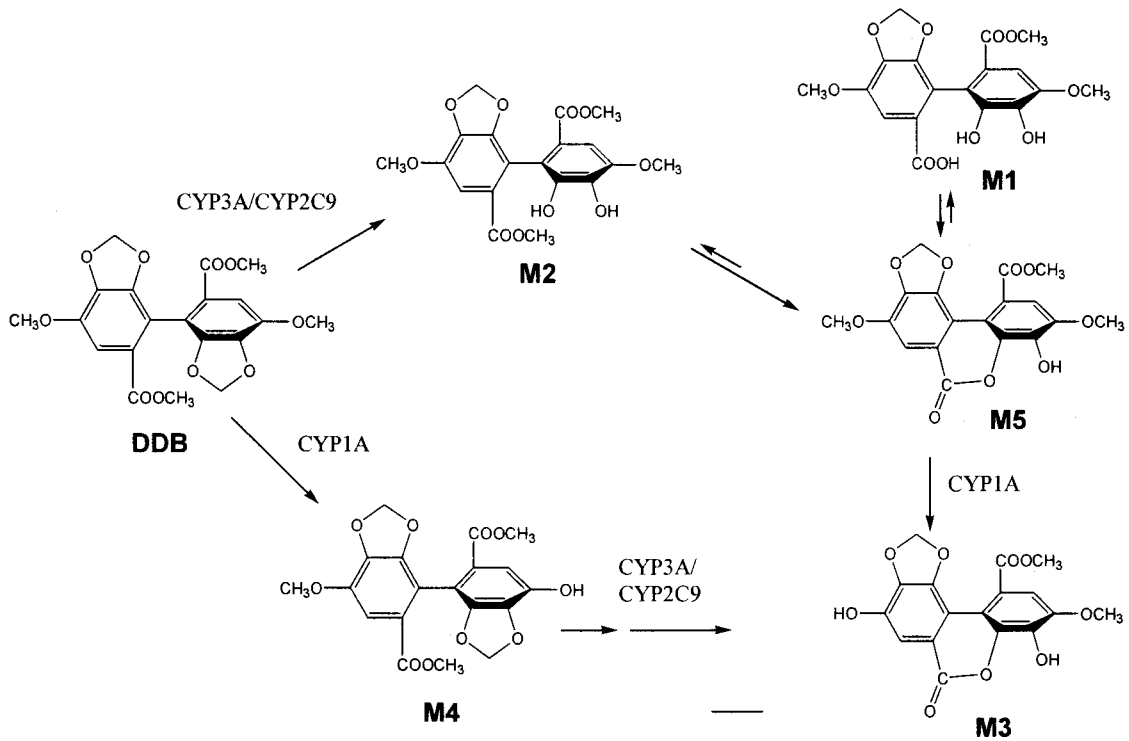


Figure 1. Proposed metabolic pathway of DDB in human liver microsomes.

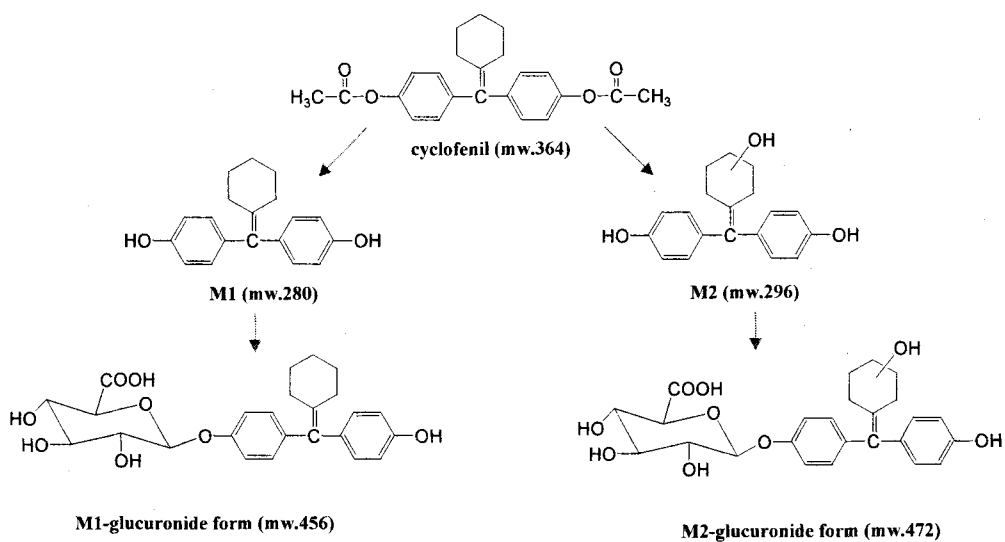


Figure 2. Proposed metabolism of cyclofenil in human.

여 백

제 3 장 방사성 동위원소를 이용한 ADME 및 autoradiography

1. 서론

신약 개발에서 방사성 동위원소를 이용한 ADME (absorption, distribution, metabolism and excretion) 연구는 radioisotope의 뛰어난 selectivity와 tracing의 용이성으로 대사 profile 및 체내 약물의 추적에 매우 용이하며 임상 시험 전에 개발 약물의 정확한 대사 및 체내동태 규명에 필수적이라 할 수 있다. 특히 IND filing시에는 동위원소를 이용한 ADME 자료를 요구하고 있으며, whole body autoradiography는 체내에 약물이 분포하는 정도를 명확하게 보여줄 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 신약 개발 후보물질을 동위원소로 labeling하고 이를 이용하여 rat에서 흡수, 분포, 대사, 그리고 배설에 대한 연구를 수행하였으며, 전신 분포를 규명하기 위하여 whole body autoradiography 방법을 개발하였다.

2. 실험방법

실험 동물

Male Sprague-Dawley rat (SPF, 220-240g)는 대한실험동물센터로부터 구입하였으며 KIST 동물 사육실에서 1주일간의 순화기간을 거친 뒤 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 온도 25±2℃, 상대습도 55-10%, 그리고 12시간 간격의 light/dark cycle의 상태를 유지하였다.

방사능 측정법

뇨, 담즙, 그리고 혈장 시료는 전처리 과정 없이 일정액을 취하여 10 ml의 scintillation cocktail (Ultima gold, Packard)를 첨가하고 상온에서 overnight 방치한 후 liquid scintillation counter (Tri-Carb, Packard)로 방사능을 측정하였다. 조직 및 혈액의 경우, adrenal과 같이 중량이 작은 조직은 전체를 분쇄하였고, 간 등 중량이 큰 조직은 동량의 생리식염수를 첨가하여 균질화한 후 일부분을 취하여 combustion pad상에서 분쇄하였다. 조직이 완전히 건조된 후 combustion cone을 sample oxidizer (Tri-Carb model 307, Packard)로 연소시켰다. 이때 발생하는 $^{14}\text{CO}_2$ 를 Carbosorb로 흡착한 후 Permafluor V scintillation fluid와 혼합한 후 radioactivity를 liquid scintillation counter (Tri-Carb, Packard)로 방사능을 측정하였다.

분포시험

랫드를 각 그룹 당 4마리씩 약물을 투여한 후 2, 8, 그리고 24시간 경과시점에서 랫드를 ether로 마취시키고, cardiac puncture로 혈액을 채취하였다. 그 이후 즉시 복부를 개방하여 간 등의 각 조직을 적출하였다. 적출된 장기는 생리식염수로 세척 후 중량을 측정하였다. 각 조직 내의 radioactivity를 측정하

여 결과를 ng equivalent drug/g tissue로 나타내었다.

대사 시험

대사체 분석은 HPLC-radiospectrometry (combined with ion trap mass spectrometry)를 이용하여 분석하였다. Urine과 bile의 경우 0.24 μm filter를 이용하여 filtration한 후 증류수와 1:1로 희석하여 분석을 하였다. 혈장의 경우 혈장 1 ml을 activated Sep-pak C18을 통과하고 resin을 0.1N HCl 용액 1ml로 세척한 후 1 ml의 메탄올로 시료를 elution하였다. 이 용액을 질소 기류 하에서 건조한 후 50 μl 의 HPLC buffer에 용해하여 그중 30 μl 를 HPLC에 주입하였다. Column은 Capcel-pak C18 (4.6 x 25 cm, 5 μm)을 사용하였다.

배설시험

랫드를 각 그룹당 4마리씩 약물 투여한 후 metabolic cage에 각각 1마리씩 넣은 다음 24시간동안 urine과 feces를 채집하였다. Urine과 feces의 무게를 측정 후 urine은 바로 scintillation 과 섞고 radioactivity를 counting하였으며, feces는 3vol의 증류수를 첨가하여 균질화한 후 일정량을 취하여 풍건하고 sample oxidizer로 radioactivity를 측정하였다.

Wholebody autoradiography

시험 하루전날 rat을 저녁부터 절식시킨 후, 시험당일 약물을 투여하고 혈중 최고 농도를 보이는 시간인 30분에 rat을 ether를 이용하여 sacrifice 시켰다. 꼬리를 cutting하고 미리 만들어진 CMC frame에 rat을 눕힌 후 dry ice로 cooling 시킨 hexane bath에서 냉동시키고, solvent를 휘발시키기 위해 -20 $^{\circ}\text{C}$ freezer에서 overnight 방치했다. 다음날 2.5% CMC solution 에 rat을 넣어서 hexane bath에서 급속냉동 시켰다. CMC 와 같이 얼려진 rat을 cryopolycut(Leica)에 setting 한 후 brain-kidney section 과 spinal cord section을 20 μm 두께의 박편으로 잘라 냈다. 잘라낸 section은 -20 $^{\circ}\text{C}$ 에서 3일간 건조시킨 후 상온에서 하루 방치했다가 BAS 2000 image analyzer를 이용하여 intensity를 정량하였다..

3. 실험결과 및 고찰

L-FMAU의 조직 분포

L-FMAU를 각 그룹 당 4마리씩 3그룹으로 하여 20 mg/kg 용량으로 경구 투여하였으며, 최대혈중농도를 나타내는 2시간, 반감기를 고려하여 투여 후 8시간, 그리고 투여 후 24시간 시점에서의 혈 중 radioactivity 농도와 조직 내의 radioactivity를 측정하였으며, 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 투여 2시간 후 조직 분포를 살펴보면 소화기관내에 많은 양이 존재하고 있으며, 혈장농도보다 조직농도가 높은 high affinity tissue는 신장과 간으로서 혈장농도에 대한 비율이 각각 3.10과 1.81로 나타났다. 신장에 높은 농도로 존재하는 것은 신장이 L-FMAU의 주요배설기관인 사실에 기인되며, L-FMAU의 target organ인 간도 affinity가 높은 것으로 판명되었다. 이밖에 뇌를 제외한 대부분의 조직도 tissue/plasma ratio가 0.7에서 1.37로 비교적 균일하게 분포되는 것으로 판명되었다. 뇌 조직에서의 ratio는 0.09로서 L-FMAU는 blood brain barrier를 통과하지 못하는 것으로 추정된다. 투여 8시간 경과시점에서는 대장과 방광에서의 radioactivity가 높게 나타났으며, 이는 두 기관을 통한 배설이 진행 중임을 시사한다. 신장과 간에서의 radioactivity가 타 조직에 비하여 상대적으로 높은 농도를 유지하였으나 투여 2시간 시점과 비교 시 약 80-90% 정도 농도감소를 나타내었다. 타 조직과 혈장 중 radioactivity역시 비슷한 비율로 감소함을 보여 주었다. 투여 24시간 시점에서도 대부분의 조직에서의 radioactivity 농도가 22-140 ng equivalent L-FMAU/g tissue를 유지하였으며, 표적장기인 간에서의 농도가 상대적으로 높은 것으로 판명되었다. 대장과 방광에서의 radioactivity가 높게 측정된 사실은 24시간 시점에서도 배설이 진행되고 있음을 시사한다. 투여 2시간부터 각 조직내의 radioactivity는 mono-exponential mode로 감소하며 대부분의 조직에서의 소실속도가 유사한 것으로 판명되었다.

혈액 중 radioactivity 분포는 혈구보다 혈장에 약 1.5배정도 높게 측정되었으며 이는 혈구세포에 대한 affinity가 낮다는 것을 시사한다.

L-FMAU의 대사

대사체 분석은 혈장의 경우 solid-phase extraction 후 HPLC eluting buffer에 녹여서 분석하였으며, urine과 bile의 경우 증류수로 1:1희석 후 바로 HPLC에 주입하였으며, radio-flow detector를 이용하여 peak를 검출하였다. 혈장, urine, 그리고 bile을 분석한 HPLC-radiochromatogram은 Fig.2-4에 나타내었다. Urine, plasma, 그리고 bile 모두에서 1개의 대사체 (M1)가 검출되었으며 상대적인량은 Table에 나타내었다. Urine으로 배설된 radioactivity의 95%정도가 대사되지 않은 parent L-FMAU, 그리고 약 5%정도가 머무름 시간 16.4분에 나타나는 대사체로 판명되었다. 혈장 내 radioactivity는 M1위치에 background activity보다 약간 높은 radioactivity를 보였으나 정량은 불가능한 것으로 사료되며 대부분 parent L-FMAU로 검출되었다. Bile의 경우는 M1과 L-FMAU가 거의 비슷한 양으로 존재하여 M1이

49% 그리고 L-FMAU가 51%로 측정되었다. L-FMAU의 배설은 대부분 urine으로 일어나며 bile로는 극히 일부 (5%이내)만 배설되는 점으로 미루어 L-FMAU는 95%이상이 대사되지 않고 parent 형태로 배설되며 따라서 metabolic stability는 매우 높다고 사료된다.

L-FMAU의 배설

L-FMAU를 경구투여 후 24시간동안 urine과 feces로 배설되는 radioactivity를 측정한 결과는 Table 3.에 나타내었다. 투여 후 24시간 동안 urine으로는 총 투여 량의 약 47%, 그리고 feces로는 약 40%정도가 배설되는 것으로 판명되었다. 따라서 투여 24시간 이내에 대부분이(87%) 배설되며, feces에서 검출된 radioactivity는 흡수되지 않은 약물에 기인된다고 사료된다. 이는 경구투여 후 8시간까지 담즙으로 배설되는 총 radioactivity는 약 2.6%로 매우 소량만이 배설 (Table 4.)된 결과가 본 가설을 지지한다고 할 수 있다. 체내로 흡수된 약물이 대부분 urine으로 배설된다고 가정하면 urine으로 약 55%정도가 배설되므로 생체이용율이 약 55%라고 가정할 수 있으며, 이는 L-FMAU의 oral bioavailability가 약 60% 정도라는 기존에 발표된 결과 (Wright J. D. et al., 1996)와 일치한다고 할 수 있다. 따라서 L-FMAU의 major excretion route는 urine으로 투여 24시간 이내에 대부분이 배설된다고 할 수 있다.

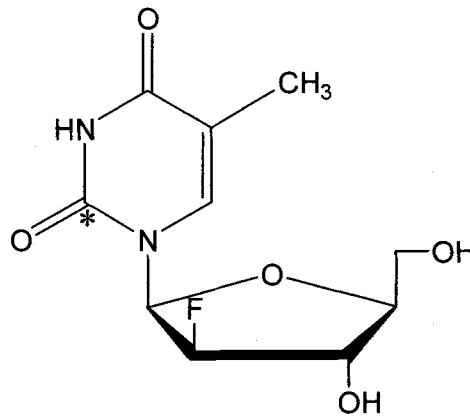


Figure 1. Structure of ¹⁴C-labeled L-FMAU, *, indicates isotope labeled position

Table 1. Distribution of L-FMAU in organs or tissues after oral administration to male rats at a dose of 20mg/kg.

Organ or tissues	ng equivalent to L-FMAU/g or ml tissue		
	2hr	8hr	24hr
Thyroid	8787±997	406±119	124±22
Seminal vesicle	1533±145	391±135	129±50
Bladder	190380±68632	5224±1284	187±36
Testis	2938±197	279±54	35±5
Muscle	1933±191	214±15	65±5
Small intestine	11193±2702	775±300	127±35
Large intestine	21307±9100	16917±1325	1192±236
Kidney	7396±619	712±73	99±16
Adrenal	3262±561	696±395	50±8
Spleen	2676±73	365±85	80±9
Stomach	2830±335	247±52	46±7
Liver	4314±312	537±18	140±24
Heart	2152±184	184±30	31±5
Lung	1741±146	168±14	33±6
Thymus	1821±216	167±28	45±10
Brain	218±18	73±4	22±2
Blood cell	1608±130	110±12	16±2
Blood	1845±176	142±12	26±4
Plasma	2385±502	203±28	47±11

* Each data represents the mean±SE.

Table 2. In vivo rat plasma protein binding of ¹⁴C L-FMAU after oral administration at a dose of

20mg/kg.

Time after administration (hr)	ng equivalent L-FMAU/ml		
	plasma	protein free plasma	% of binding
2	2385±251	2272±241	4.8±1.1
8	203±14	157±10	22.3±1.1
24	47±6	37±4	20.7±3.0

* Each data represents the mean±SE.

Table 3. Distribution of radioactivity in biological samples after a single oral administration of L-FMAU

Sample	Relative percentage of radioactivity	
	L-FMAU	metabolite
plasma	100	-
urine	95.3	4.7
bile	50.9	49.1

* Each data represents the mean±SE.

Table 4. Excretion of radioactivity into urine and feces after oral administration of 20mg/kg ¹⁴C L-FMAU to male rats.

Time (hr)	% of radioactivity excreted		
	urine	feces	total
0-24hr	46.57±1.63	40.26±2.22	86.83±3.72

* Each value represents the relative percentage to total radioactivity administered.

** Each data represents the mean±SE.

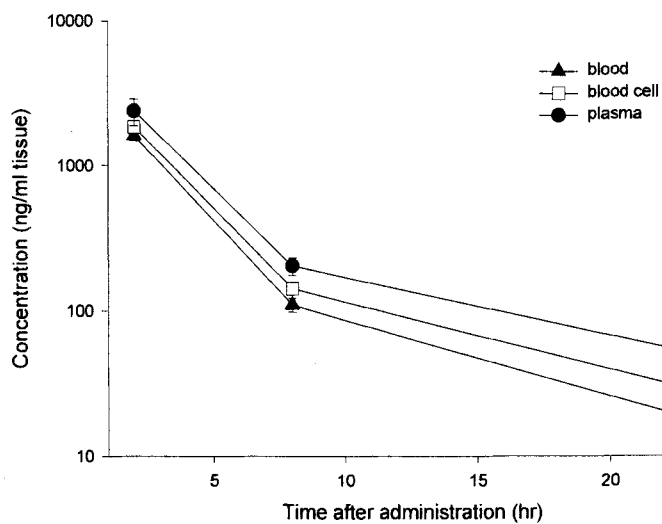


Figure 2. Distribution of radioactivity in blood after oral administration of 20mg/kg ¹⁴C-L-FMAU to male rats.

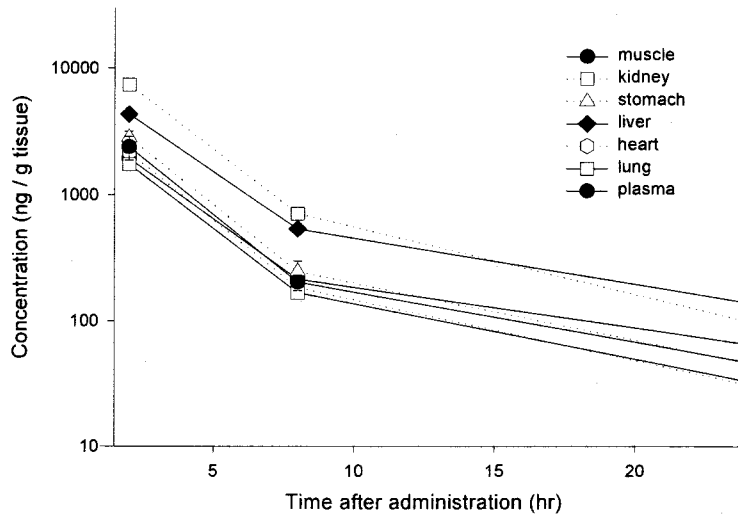


Figure 3. Organs and tissue distribution of radioactivity after oral administration of 20mg/kg ¹⁴C-L-FMAU to male rats.

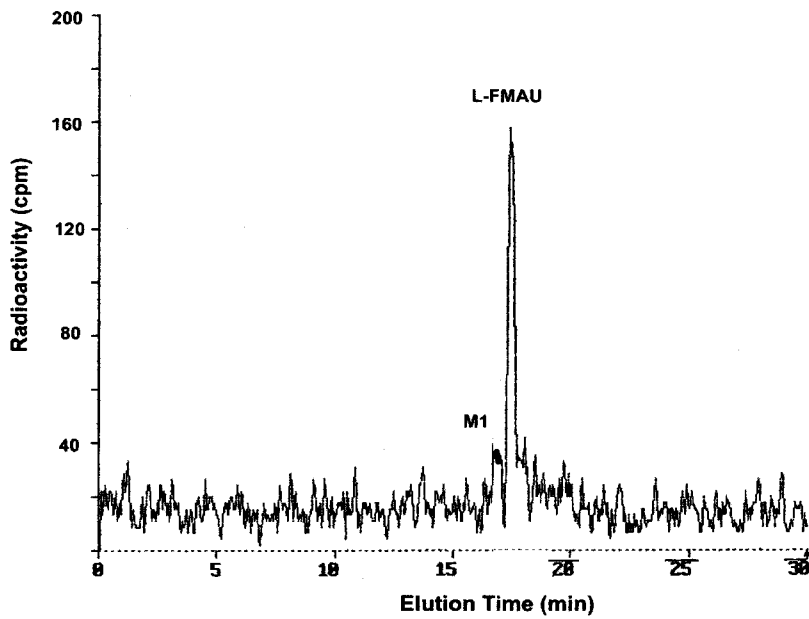


Figure 4. HPLC chromatogram of plasma obtained 2hr after oral administration of ¹⁴C-L-FMAU

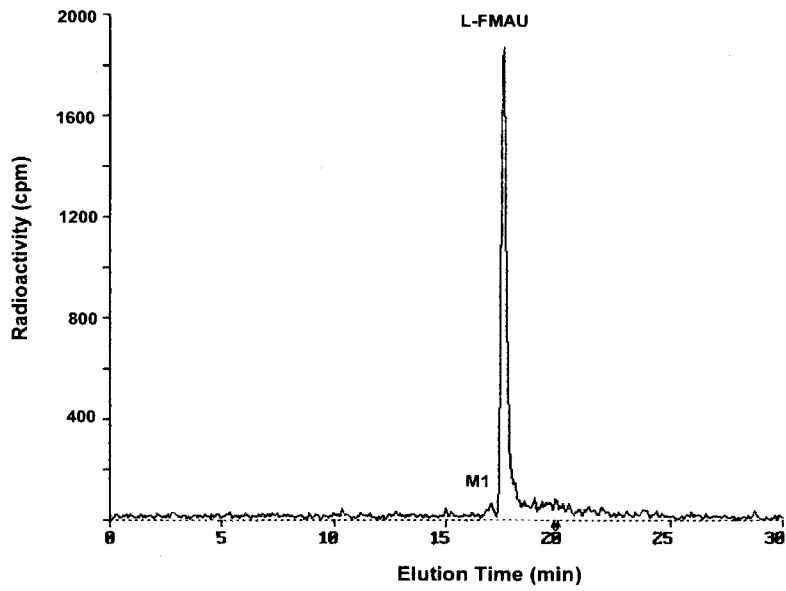


Figure 5. HPLC radiochromatogram of rat urinary L-FMAU and metabolite

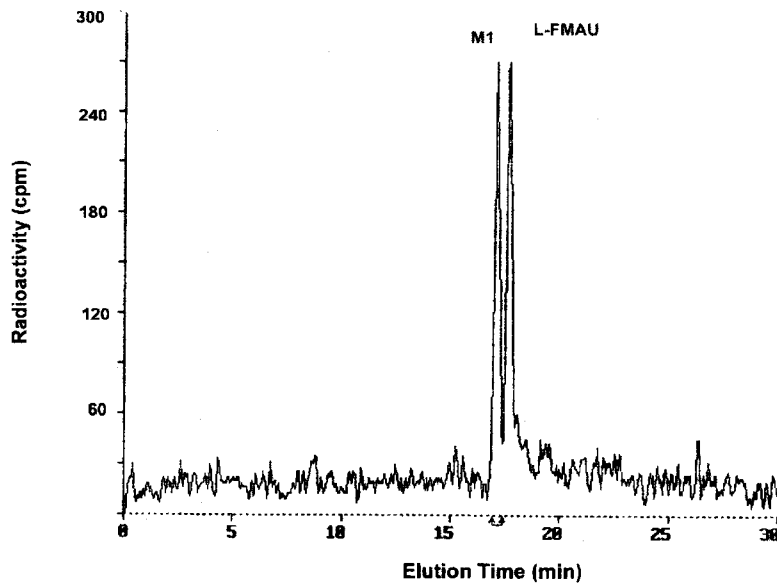


Figure 6. HPLC radiochromatogram of rat biliary L-FMAU and metabolite

Telmesteine of Wholebody autoradiography

Telmestaine의 체내 분포를 image로 보기 위하여 ^{14}C -telmestaine을 20 mg/kg 용량으로 투여 30분 후 ether로 마취치사 시킨 후 급속 냉동을 하고 kidney 부위가 보이는 부위와 정 중간을 나타내는 부위를 선택하여 두께 20 μm 의 조직 박편을 제조하여 autoradiography를 얻었으며 Fig. 8.에 나타내었다. Radioactivity 분포는 투여 30분 경에 흡수되지 않은 약물이 위와 소장 내에 고농도로 존재하며 모든 조직내의 농도가 혈액중 농도보다 낮았으며, 이는 telmestaine의 조직 affinity가 낮다는 것을 의미한다. 조직 내에서의 분포는 highly perfused 기관인 간, 신장, 그리고 비장에서 radioactivity가 상대적으로 높게 측정되었다 (table 5). 뇌와 eyeball에는 radioactivity가 거의 검출되지 않았으며 이는 뇌혈관 관문 transport는 거의 일어나지 않음을 시사한다. Wholebody autoradiography에서의 radioactivity 분포는 조직을 분리하여 radioactivity를 측정 한 분포시험 결과와 일치함을 보여주고 있다.

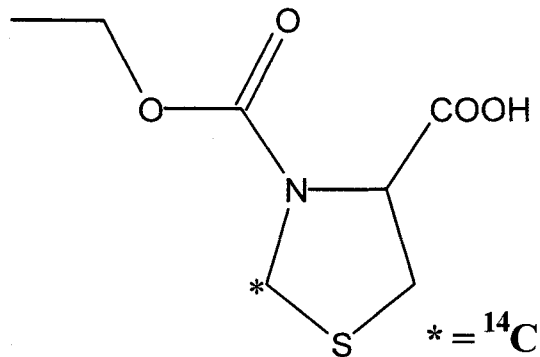


Figure 7. Structure of telmestaine

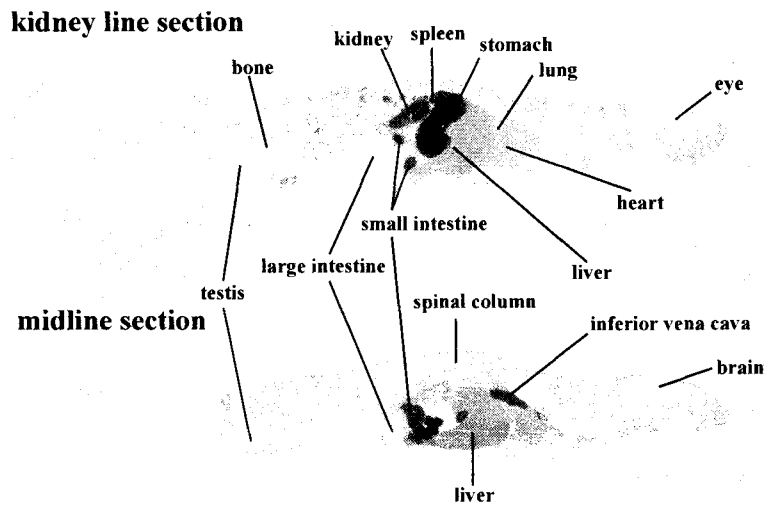


Figure 8. Whole body autoradiography of rats after oral administration of ¹⁴C-telmesteine.

Table 5. Distribution of radioactivity (PSL-BG/S) in various organs and tissues after oral administration of telmesteine (20mg/kg) to male rat.

		(PSL-BG)/S
		30min after administration
kidney line section	stomach	613.1
	heart	11.6
	liver	18.8
	kidney	74.7
	testis	3.8
	lung	4.5
	small intestine	125.3
	eye	0.2
	spleen	80.2
	large intestine	0.8
midline section	brain	1.0
	spinal column	4.1
	liver	22.8
	inferior vena cava	168.6
	small intestine	486.9
	lung	6.7

¹⁴C-YH3945를 각 그룹 당 4마리씩 암컷과 수컷으로 나눠 25 mg/kg 용량으로 경구 투여하였으며, 투여 후 3시간과 24시간 시점에서의 혈 중 radioactivity 농도와 조직 내의 radioactivity를 측정하였다. 그 결과는 Table 6과 Table 7 에 나타내었다. 투여 3시간 후 조직 분포를 살펴보면 위, 소장 등 소화기관에 많은 양이 존재하며, 이는 흡수가 왕성하게 일어나는 시점과 일치한다. 조직분포의 경우 tissue/plasma 비가 대부분 1이상으로 tissue affinity가 높은 약물로 사료된다. Highly perfused organ인 간, 허파, 신장의 경우 tissue/plasma 비가 수컷의 경우 각각 15.4, 2.7, 그리고 3.9였으며 암컷의 경우 10.3, 4.2, 그리고 2.9로 나타났으며 타 조직의 경우에도 tissue/plasma 비가 대부분 1이상으로 판명되었다. 뇌의 경우 조직농도가 혈장에 비하여 암컷의 경우 24%이상, 수컷의 경우 32% 이상으로 나타나 YH3945는 뇌혈관 관문을 통과 할 수 있는 약물로 추정된다. 투여 24시간 경과시점에서의 조직 농도를 살펴보면 암수 모두 위장, 특히 대장에서의 농도가 상대적으로 높아 흡수가 완전히 종결되지 않고 진행 중임을 시사한다. 이 밖의 타 기관에서의 조직농도는 상당량 감소하여 최대혈장농도를 나타내는 3시간 시점에 비하여 수컷의 경우 약 15% 내외정도의 그리고 암컷의 경우 10% 정도의 조직농도를 보여주고 있으나, highly perfused organ인 간, 허파, 신장의 경우 tissue/plasma 비가 수컷의 경우 각각 7.2, 1.0, 그리고 1.7이였으며 암컷의 경우 4.7, 0.9, 그리고 1.4로 상당히 높게 나타났다. 약물의 조직분포에 있어서도 암, 수간의 성차를 보여주었으며, 혈장농도와 유사하게 조직 중 약물농도도 암컷이 수컷에 비하여 약 100%정도 높게 관찰되었다.

YH3945의 wholebody autoradiography

YH3945의 체내 분포를 image로 보기 위하여 ¹⁴C-YH3945를 25 mg/kg 용량으로 투여 3시간과 24시간 후 ether로 마취치사 시킨 후 급속 냉동을 하고 kidney 부위가 보이는 부위와 정 중간을 나타내는 부위를 선택하여 두께 30 μm의 조직 박편을 제조하여 autoradiography를 얻었으며 Figure 9와 10에 나타내었다. 투여 3시간 후의 radioactivity 분포는 흡수되지 않은 약물이 위와 소장 내에 고농도로 존재하며 대부분 조직 내의 농도가 혈액 중 농도보다 높았으며, 이는 YH3945의 조직 affinity가 높다는 것을 의미한다. 조직 내에서의 분포는 highly perfused 기관인 간, 신장, 그리고 비장에서의 radioactivity가 상대적으로 높게 측정되었다 (table 8). eyeball에는 radioactivity가 거의 검출되지 않았으나 brain에서는 radioactivity가 검출되어 이는 뇌혈관 관문 transport가 일부 일어난다는 것을 시사한다. 투여 24시간 후 radioactivity는 흡수가 진행 중인 약물이 위와 소장 및 대장에 고농도로 존재하는 것을 볼 수 있으며, 특히 대장에서 고농도로 존재하는 것으로 보아 흡수 및 배설이 진행되고 있으며, feces 가 배설의 주요 경로라는 excretion test 결과와 일치한다고 할 수 있다. 24시간 ARG sample에서도 조직 내에서의 분포는 highly perfused 기관인 간, 신장, 그리고 비장에서의 radioactivity가 상대적으로 높게 측정되었다. (table 9) Wholebody autoradiography에서의 radioactivity 분포는 조직을 분리하여 radioactivity를 측정

한 분포시험 결과와 거의 일치함을 보여주고 있다.

YH3945의 배설

Balance study

YH3945의 배설을 규명하기 위하여 ^{14}C -YH3945를 25 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 urine 및 feces로 배설되는 radioactivity를 7일 동안 monitoring하였으며 결과는 urine으로의 배설은 table 10에, 그리고 feces로 배설은 table 11에 나타내었다. YH3945는 경구 투여 후 일주일 동안 암 수 모두 62-65% 정도가 urine 및 feces에서 검출되었다. 총 배설량은 암수간의 성 차를 보여주지는 않았다. 배설 경로를 살펴보면 암 수 모두 배설량의 60%정도가 feces에서 검출되었으며 urine에서는 5% 내외의 양만이 검출되었다. 이는 경구로 투여된 YH3945의 완전히 흡수가 되지 않았으며 흡수된 약물의 일부가 urine으로 배설되며, 따라서 fecal excretion이 주요 배설 경로임을 시사한다. 이는 경구 투여 시 생체 이용율이 65%정도 된다는 pharmacokinetic 결과와 일치한다고 할 수 있다.

배설 kinetics를 살펴보면 수컷의 경우 투여 후 12시간 이내에 약 30%가, 그리고 24시간 이내에 약 53%가 배설되었으며 암컷의 경우 투여 12시간 이내에 약 24%가, 그리고 투여 24시간 이내에 약 45%가 배설되어 암컷의 배설속도가 수컷에 비하여 약간 느린 것으로 나타났다 (Figure 11). 이는 혈중 농도 반감기가 암컷이 수컷에 비하여 상대적으로 길고 혈 중 농도가 높은 결과와 일치한다고 할 수 있다.

담즙으로의 배설

담즙으로의 배설을 측정하기 위하여 common bile duct를 cannulation 한 후 ^{14}C -YH3945를 25 mg/kg 용량으로 경구 투여하고 처음 10시간 동안은 담즙을 매 시간별로 담즙을 채취하여 radioactivity를 측정하고 대사체의 metabolic profile을 HPLC/radio chromatography를 이용하여 분석하였다. 본 실험에서는 담즙 분비속도가 정상치인 1 ml/hr 가까운 분비를 하는 쥐만을 선택하여 시험을 수행하였다. 매 시간당 배설되는 radioactivity의 양은 table 12에 나타내었으며 cumulative excretion은 Figure 12에 나타내었다. 담즙으로 분비되는 총 radioactivity양은 투여 24시간까지 male의 경우 약간씩의 증가하는 양상을 보였으며, female의 경우 투여 24시간까지 약간씩의 증가와 감소의 변화를 보이면서 배설되는 양상을 보였다. 투여 24시간까지 배설되는 양은 수컷의 경우 약 22% 그리고 암컷의 경우 약 19%정도가 배설되어 urine에 비하여 상당량이 담즙으로 배설되며 따라서 YH3945의 담즙 배설은 major 배설 경로임을 시사한다.

Table 6. Distribution of ^{14}C -YH3945 in organs and tissues after oral administration to male rats.

		male-3 hr
organ		mean \pm S.E.
thyroid		1.512 \pm 0.650
muscle		0.980 \pm 0.312
adrenal		3.527 \pm 0.983
bladder		3.615 \pm 0.194
thymus		0.828 \pm 0.301
small intestine		23.191 \pm 9.163
large intestine		18.587 \pm 4.255
brain		0.320 \pm 0.059
spleen		1.474 \pm 0.533
seminal vesicle		1.397 \pm 0.520
heart		1.305 \pm 0.495
stomach		31.954 \pm 4.940
liver		15.273 \pm 2.442
lung		2.644 \pm 0.870
kidney		3.896 \pm 0.870
testis		0.532 \pm 0.092
whole blood		0.533 \pm 0.166
plasma		0.991 \pm 0.265
blood cell		0.397 \pm 0.061
		male-24 hr
organ		mean \pm S.E.
thyroid		0.296 \pm 0.030
muscle		0.068 \pm 0.006
adrenal		0.715 \pm 0.128
bladder		0.307 \pm 0.062
thymus		0.219 \pm 0.018
small intestine		1.146 \pm 0.193
large intestine		2.467 \pm 0.760
brain		0.071 \pm 0.007
spleen		0.272 \pm 0.020
seminal vesicle		0.153 \pm 0.018
heart		0.180 \pm 0.022
stomach		0.657 \pm 0.279
liver		3.027 \pm 0.061
lung		0.421 \pm 0.083
kidney		0.792 \pm 0.065
testis		0.215 \pm 0.022
whole blood		0.246 \pm 0.055
plasma		0.423 \pm 0.029
blood cell		0.177 \pm 0.016

* Rats were dosed orally with 25mg/kg (45.45uCi/kg) of ¹⁴C-labeled YH3945. The mean weight of the animals were 249 g (range 239-261 g) for 3hr and 236 g (235-271 g) for 24hr.

Table 7. Distribution of ¹⁴C-YH3945 in organs and tissues after oral administration to female rats.

organ	female-3 hr mean ± S.E.
thyroid	4.954 ± 2.637
muscle	1.570 ± 0.293
adrenal	12.164 ± 1.852
bladder	2.904 ± 0.512
ovary	3.573 ± 0.821
uterus	1.944 ± 0.509
thymus	3.427 ± 0.600
small intestine	25.052 ± 5.855
large intestine	15.781 ± 2.715
brain	0.571 ± 0.071
spleen	7.049 ± 1.078
heart	4.059 ± 0.711
stomach	44.884 ± 12.386
liver	24.942 ± 3.083
lung	10.028 ± 1.611
kidney	6.880 ± 0.866
whole blood	1.199 ± 0.213
plasma	2.410 ± 0.376
blood cell	0.589 ± 0.072
organ	female-24 hr mean ± S.E.
thyroid	1.581 ± 0.665
muscle	0.209 ± 0.019
adrenal	0.360 ± 0.060
bladder	0.256 ± 0.012
ovary	0.410 ± 0.091
uterus	0.093 ± 0.014
thymus	0.191 ± 0.022
small intestine	0.669 ± 0.065
large intestine	2.059 ± 0.470
brain	0.077 ± 0.005
spleen	0.388 ± 0.028
heart	0.242 ± 0.025
stomach	0.442 ± 0.062
liver	2.123 ± 0.156
lung	0.408 ± 0.065
kidney	0.646 ± 0.072
whole blood	0.218 ± 0.022
plasma	0.448 ± 0.026
blood cell	0.241 ± 0.056

* Rats were dosed orally with 25mg/kg (45.45uCi/kg) of ¹⁴C-labeled YH3945. The mean weight of the animals were 220 g (range 195-225 g) for 3hr and 229 g (220-237.5 g) for 24hr.

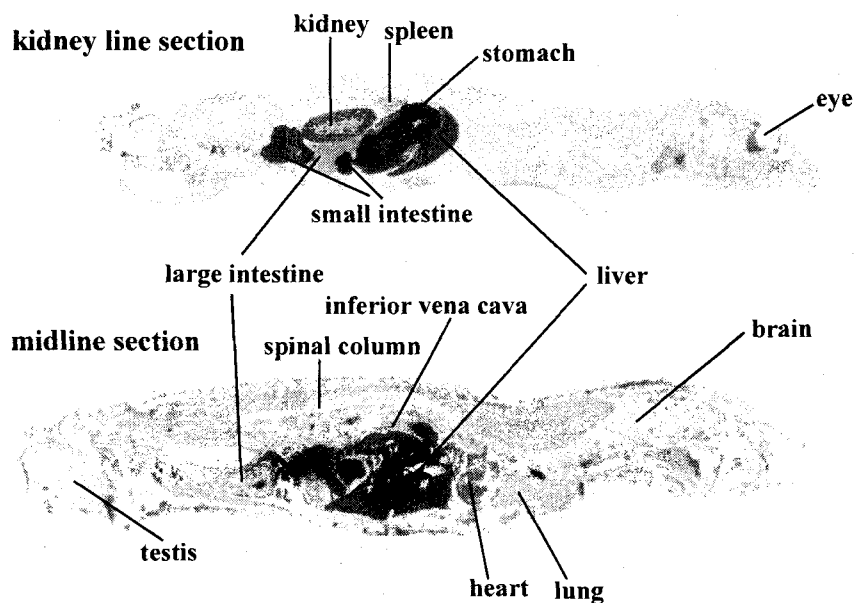


Figure 9. Wholebody autoradiography of rat slice 3hrs after oral administration of ^{14}C -YH3945

Table 8. Distribution of radioactivity (PSL-BG/S) in various organs and tissues after oral administration of YH3945 (25mg/kg) to male rat.

		(PSL-BG)/S
		3hr after administration
kidney line section	brain	4.79
	kidney	24.28
	stomach	170.71
	liver	96.43
	small intestine	416.29
	eye	0.81
	spleen	20.44
midline section	brain	4.75
	spinal column	7.47
	liver	143.76
	inferior vena cava	7.47
	small intestine	547.61
	lung	19.38
	heart	11.31
testis	3.93	

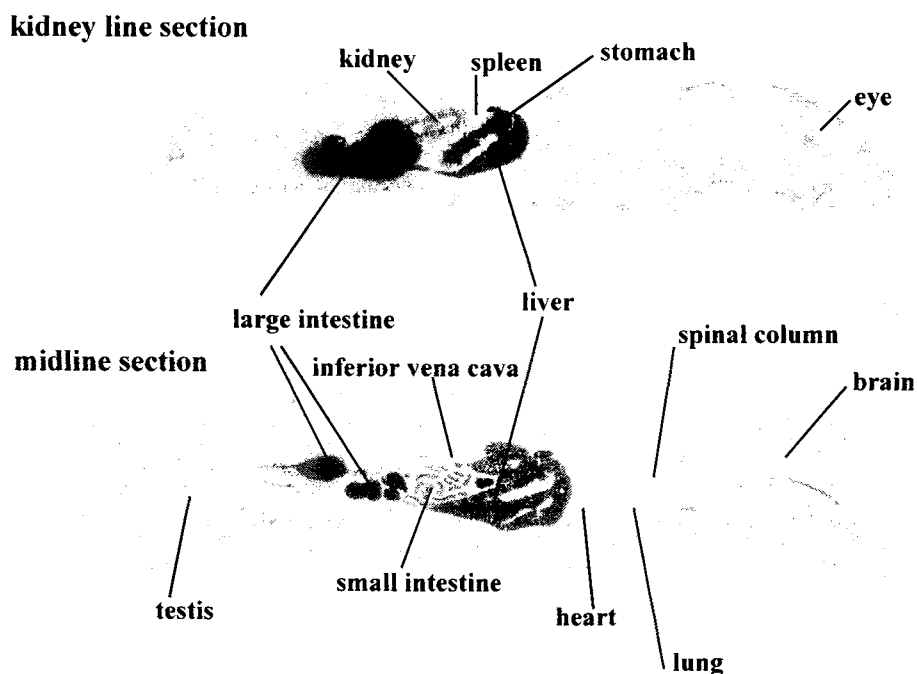


Figure 10. Wholebody autoradiography of rat slice 24hrs after oral administration of ¹⁴C-YH3945

Table 9. Distribution of radioactivity (PSL-BG/S) in various organs and tissues after oral administration of YH3945 (25mg/kg) to male rat.

		(PSL-BG)/S
		24hr after administration
kidney line section	kidney	7.62
	stomach	62.86
	liver	24.19
	large intestine	2298.25
	eye	3.42
	spleen	3.57
midline section	brain	1.55
	spinal column	1.76
	liver	10.41
	inferior vena cava	2.96
	small intestine	5.36
	lung	2.60
	large intestine	2041.86
	heart	1.86
testis	1.91	

Table 10. Urinary excretion of YH3945

Sex	Days	Mean \pm S.D.
Male	0.5	4.92 \pm 1.06
	1	0.69 \pm 0.15
	2	0.35 \pm 0.18
	3	0.16 \pm 0.02
	4	0.10 \pm 0.03
	5	0.06 \pm 0.02
	6	0.05 \pm 0.01
	7	0.04 \pm 0.00
	Total	6.33 \pm 1.15
Female	0.5	1.86 \pm 0.28
	1	0.60 \pm 0.34
	2	0.26 \pm 0.05
	3	0.10 \pm 0.03
	4	0.07 \pm 0.04
	5	0.05 \pm 0.01
	6	0.03 \pm 0.01
	7	0.03 \pm 0.01
	Total	3.00 \pm 0.22

* Rats were dosed orally with 25mg/kg (45.45uCi/kg) of ^{14}C -labeled YH3945. The mean weight of the animals were 235 g (range 230-239 g) for male rats and 215 g (205-222 g) for female rats.

Table 11. Fecal excretion of YH3945

Sex	Days	Mean \pm S.D.
Male	0.5	26.52 \pm 14.76
	1	22.47 \pm 11.70
	2	8.40 \pm 7.84
	3	0.58 \pm 0.18
	4	0.29 \pm 0.16
	5	0.28 \pm 0.34
	6	0.08 \pm 0.03
	7	0.12 \pm 0.09
	Total	58.75 \pm 22.49
Female	0.5	22.25 \pm 15.53
	1	20.64 \pm 15.07
	2	12.57 \pm 3.71
	3	3.78 \pm 4.72
	4	0.27 \pm 0.23
	5	0.06 \pm 0.05
	6	0.04 \pm 0.03
	7	0.02 \pm 0.01
	Total	59.63 \pm 6.50

* Rats were dosed orally with 25mg/kg (45.45uCi/kg) of ^{14}C -labeled YH3945. The mean weight of the animals were 235 g (range 230-239 g) for male rats and 215 g (205-222 g) for female rats.

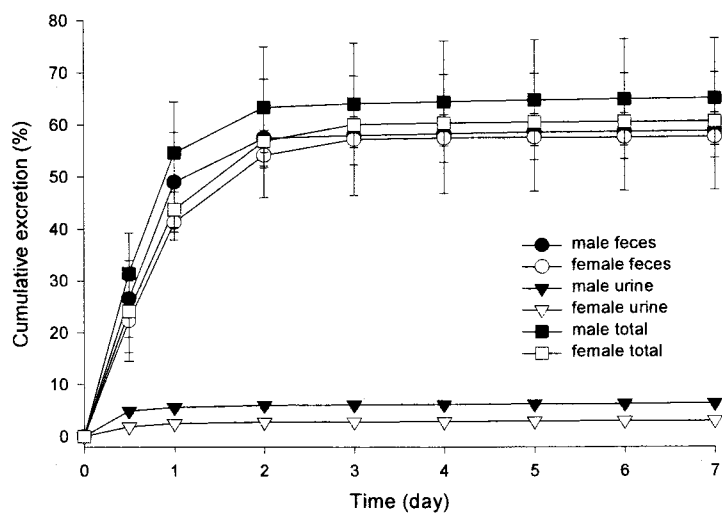


Figure 11. Cumulative urinary and fecal excretion of the radioactivity after oral administration of 25mg ¹⁴C-YH3945/kg to rats.

Table 12. Biliary excretion of YH3945

Sex	hrs	Mean ± S.E.
Male	1	0.06 ± 0.01
	2	0.15 ± 0.01
	3	0.47 ± 0.02
	4	0.57 ± 0.03
	5	0.73 ± 0.02
	6	0.87 ± 0.03
	7	1.78 ± 0.05
	8	1.48 ± 0.09
	9	1.47 ± 0.15
	10	1.94 ± 0.03
	24	12.56 ± 0.48
	Total	22.06 ± 0.52
Female	1	0.82 ± 0.02
	2	1.46 ± 0.05
	3	1.30 ± 0.06
	4	1.08 ± 0.05
	5	1.62 ± 0.07
	6	0.99 ± 0.04
	7	1.14 ± 0.03
	8	1.01 ± 0.10
	9	1.16 ± 0.07
	10	1.29 ± 0.08
	24	6.75 ± 0.18
	Total	18.62 ± 0.22

* Rats were dosed orally with 25mg/kg (45.45uCi/kg) of ¹⁴C-labeled YH3945. The mean weight of the animals were 230 g (range 225-239 g) for male rats and 212 g (205-220 g) for female rats.

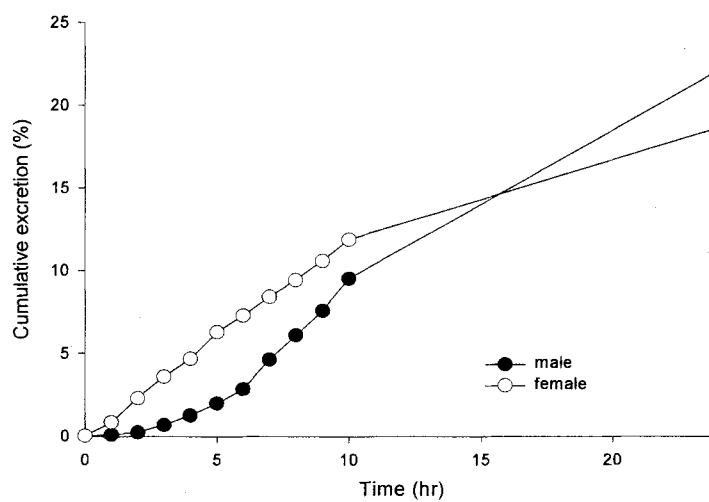


Figure 12. Biliary excretion of the radioactivity after oral administration of 25mg ^{14}C -YH3945/kg to rats

여 백

제 4 장 새로운 분석방법의 개발 및 응용

신약 개발 (Drug discovery and development)의 많은 분야에서 다양한 biological fluids 내에 존재하는 약물들의 신속한 분석 및 정량은 약물의 pharmacokinetics 성질을 이해하는데 매우 중요하게 평가되고 있다. 전임상 또는 임상 단계에 있는 약물들의 pharmacokinetics 성질이나 생물학적인 동등성을 평가하기 위하여는 다량의 시료 분석이 요구되며 따라서 매우 신속하고 sensitive한 분석방법이 필수적이다.

Tandem mass spectrometry (MS/MS)와 병합된 liquid chromatography (LC)의 발전은 약물의 신속 정확한 분석 및 정량에 매우 중요한 역할을 하고 있으며 현재 LC-MS/MS 기술은 다양한 약물들의 정량 분석에 널리 사용되고 있다. 특히 triple-quadrupole analyzer가 장착된 MS는 multiple reaction monitoring (MRM) mode의 사용에 의하여 매우 우수한 sensitivity와 selectivity를 보이고 있다. 따라서 분석시간의 단축과 endogenous peak 간섭을 최소화하며 다량의 시료를 매우 효과적으로 분석 가능하도록 하였다.

본 연구에서는 다양한 biological fluids에 존재하는 여러 가지 약물들의 신속 정확한 분석을 위하여 LC-MS/MS, column switching chromatography, GC-MS-SIM 그리고 ion-pairing LC-MS/MS 등의 새로운 분석방법들을 개발하고 이 분석법을 실제 임상 시료에 적용하였다. 얻어진 분석결과는 약물의 pharmacokinetics 또는 생물학적인 동등성의 평가에 매우 중요한 정보를 제공하였다.

제 1 절 Column-switching liquid chromatography를 이용한 glycoside 류 분석

- Loganin과 sweroside의 분석 -

1. 서론

Loganin과 sweroside는 각각 iridoid glycoside와 secoiridoid glucoside류에 속하며, 다양한 식물체에 널리 분포하고 있다. 이들은 hypotensive, sedative, antipyretic, 그리고 anti-tussive activity등의 생리활성을 가지는 물질로서, *Lonicera japonica*로부터 추출한 herbal extract (loganin과 sweroside)는 anti-inflammatory와 analgesic activity를 보이는 것으로 나타났다.

기존의 loganin과 sweroside에 대한 검출방법은 NMR과 mass spectrometry를 이용한 방법이 있었으나, 두 물질의 낮은 mass property와 biological fluid에서의 낮은 추출효율, 그리고 두 물질의 peak 간섭에 의하여 동시분석의 어려움과 높은 검출한계를 가졌었다. 이에 본 연구에서는 loganin과 sweroside에 대한 pharmacokinetic과 metabolism 연구를 위하여 biological fluid에서의 두 물질의 새로운 검출방법개발하고 plasma kinetics study를 수행하고자 하였다.

2. 실험방법

(1) 실험재료

Loganin은 Carl Roth (Karlsruhe, Germany)에서 구입하였고, sweroside는 *L. japonica*로부터 water extraction하고, reverse phase preparative HPLC로 정제하여 사용하였다. Methanol과 acetonitrile (HPLC grade)는 J.T. Baker (Mallinckrodt-Baker, Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였고, 이외 모든 chemical은 특급시약을 사용하였다.

(2) Standard solution and spiked samples

Loganin과 sweroside를 deionized water에 1 mg/ml에 되도록 stock solution을 만들고 -20°C에 보관하였으며, 이후에 deionized water로 희석하여 working solution을 만들어 사용하였다. Spiked plasma sample은 blank rat plasma에 loganin과 sweroside의 최종농도가 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 µg/ml이 되도록 working solution을 첨가하였다.

(3) Plasma collection

실험 이틀 전에 Sprague-Dawley rat (male)의 femoral artery와 vein에 각각 PE-50과 PE-10 tube를 cannulate한다. 수술한 rat에 single dose로 loganin과 sweroside를 각각 20 mg/kg로 IV injection 한 후, 0, 1, 5, 10, 15, 30, 90, 120, 180, 300분 간격으로 sample을 heparine 처리하여 채취하였다.

(4) Instrumentation

HPLC system은 Shisheido HPLC system (Nanospace, Shisheido, Tokyo, Japan)을 사용하였고, column은 Capcell Pak MF Ph-1 (150 mm × 4.6 mm, 5 μm, Shisheido)을 A column으로, Capcell Pak C18 UG120 (35 mm × 2.0 mm, 5 μm, Shisheido)를 B column으로, Hydrosphere C18 HS-3C2 (150 mm × 2.0 mm, 5 μm, YMC)를 C column으로 사용하였다. Column oven 온도는 30℃를 유지하였으며, 250 nm에서 정량적으로 두 물질을 검출하였다. 이동상은 10 mM sodium phosphate (pH 6.86) (buffer A)와 90% acetonitrile (buffer B)을 사용하고, autosampler는 4℃로 유지하였다.

(5) Chromatographic conditions

Column-switching HPLC system의 모식도는 Figure 1과 같으며 sample 분석은 다음과 같은 순서로 진행되었다.

① Step 1

Plasma sample (200 μl)를 PVDF syringe filter (13 mm, 0.2 μm, Millipore, Bedford, MA, USA)로 filtering한 후, 이 중 50 μl의 sample을 HPLC system에 injection 하였다. 이때 column-switching valve 1과 2의 위치는 position A이다. Protein과 다른 분석 방해물은 100% buffer A를 flow-rate 1 ml/min으로 흘려 세척해낸다.

② Step 2

1.8 min이 경과한 후에 valve 1을 position B로 변환하고, 100% buffer A를 flow-rate 0.5 ml/min으로 흘려, column A에서 column B로 농축시킨다.

③ Step 3

3.1 min에 valve 1을 position A로, valve 2를 position B로 교환하여, back-flush로 column B로부터 column C로 linear gradient로, 유속 0.2 ml/min으로 분석한다.

(6) Calibration and calculations

혈장에서 loganin과 sweroside의 calibration curve는 standard plasma의 nominal concentration에 대한 peak area로 계산하였다.

(7) Recovery, coefficient of variation, and accuracy

Recovery는 동량의 standard solution을 HPLC system에 injection하여 plasma sample과 peak area를 비교하여 결정하였다. Intra-day coefficient of variation (CV)과 accuracy는 6개의 서로 다른 spiked plasma sample을 분석하여 얻었으며, inter-day CV와 accuracy는 6일동안 반복하여 계산하였다.

3. 실험결과 및 고찰

Biological fluid에서의 loganin과 sweroside의 분석은 LPE와 SPE에서 모두 낮은 recovery를 보였다. 이에 plasma를 직접 HPLC system에 injection하는 column-switching 방법을 개발하였다. Loganin과 sweroside는 각각 19.4 min과 20.2 min에 검출되었으며, plasma의 endogenous compounds와의 peak 간섭 없이 분석되었다 (Figure 2). Spiked rat plasma에서의 loganin과 sweroside의 standard calibration curves는 0.05 - 40.0 µg/ml에서 직선성을 보였으며, correlation coefficient는 0.999 이상이었다. Calibration curve의 equation은 loganin과 sweroside 각각, $y=157112x-2487$, $y=175537x-1896$ 이다. Intra-day, inter-day variations은 Table 1에 나타냈으며, intra-day coefficient of variation은 8.1%이상이고, accuracy는 94.7에서 113.5%였다. Inter-day CV는 10.9%를 넘지 않았으며, accuracy는 95.0에서 113.1%였다.

개발된 방법을 통하여 rat plasma sample을 분석한 결과 (Figure 3), loganin과 sweroside의 AUC는 각각, 4707 ± 1404 , 5265 ± 1402 µg · h/ml이었고, 반감기는 0.285 ± 0.152 와 0.279 ± 0.117 이었다.

결론적으로 plasma 시료에서 loganin과 sweroside를 동시에 보다 selective하고 sensitive한 column-switching HPLC 방법을 개발하였고, 이 방법은 정확하고 재현성있는 방법으로 판명되었다.

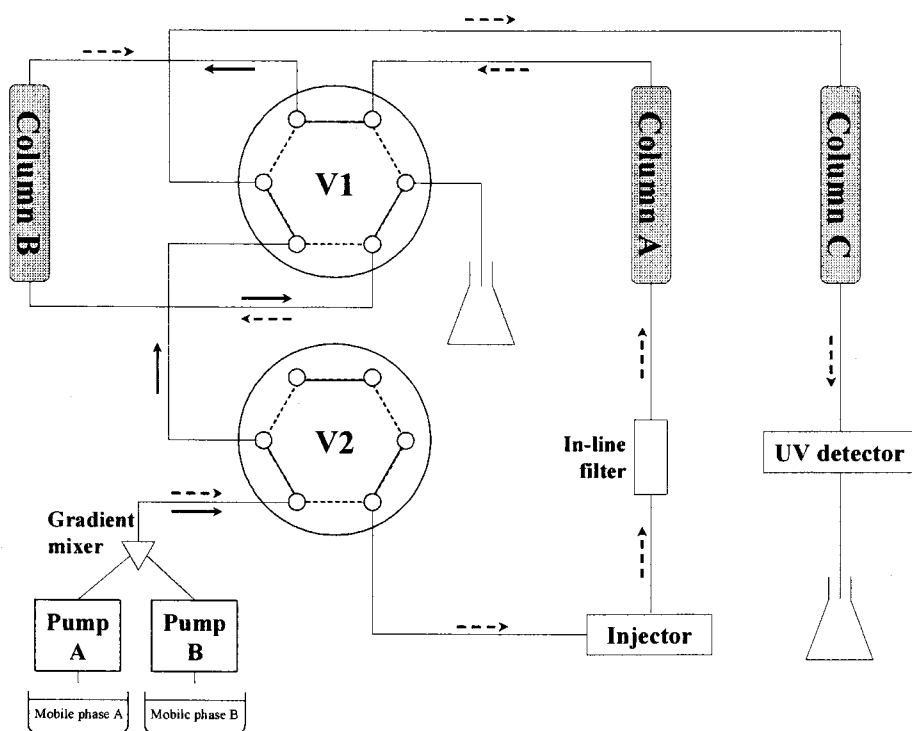


Figure 1. Schematic diagram of the column-switching HPLC system. The arrows indicate the direction of the flow depending on the valve position: dashed line, position A; bold line, position B.

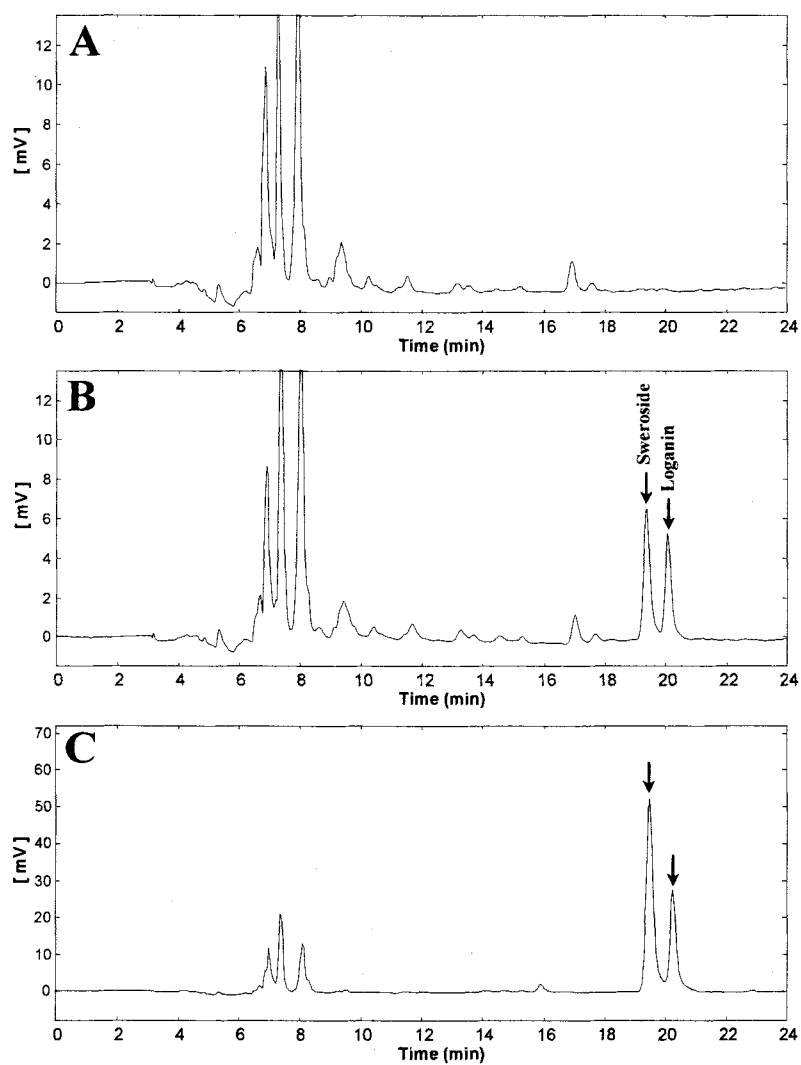


Figure 2. HPLC chromatograms of blank rat plasma (A), rat plasma spiked with loganin and sweroside (0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (B), and plasma collected 30 min after single IV injection of loganin and sweroside at a dose of 20 mg/kg, respectively, to rats (C).

Table 1. Intra-day and inter-day coefficient of variation and accuracy for determination of loganin and sweroside in rat plasma (n=6).

Theoretical concentration (µg/ml)	Intra-day			Inter-day		
	Concentration found (µg/ml)	CV	Accuracy	Concentration found (µg/ml)	CV	Accuracy
Loganin						
0.05	0.057 ± 0.001	1.9	113.5	0.053 ± 0.002	3.7	105.8
0.2	0.210 ± 0.011	5.2	105.2	0.213 ± 0.023	10.9	106.7
1.0	0.947 ± 0.063	6.6	94.7	1.085 ± 0.116	10.6	108.5
5.0	5.555 ± 0.059	1.1	111.1	5.652 ± 0.381	6.7	113.1
20	19.817 ± 0.556	2.8	99.1	18.998 ± 1.092	5.7	95
40	41.663 ± 1.969	4.7	104.2	38.797 ± 1.769	4.6	97
Sweroside						
0.05	0.054 ± 0.002	3.5	108.6	0.054 ± 0.003	5.6	107.4
0.2	0.212 ± 0.016	7.4	106	0.211 ± 0.014	6.6	105.7
1.0	0.984 ± 0.069	7	98.4	1.076 ± 0.072	6.7	107.6
5.0	4.817 ± 0.391	8.1	96.4	5.574 ± 0.314	5.6	111.5
20	20.368 ± 0.284	1.4	101.8	21.268 ± 1.158	5.5	106.3
40	40.832 ± 2.194	5.4	102.1	39.814 ± 2.012	5.1	99.5

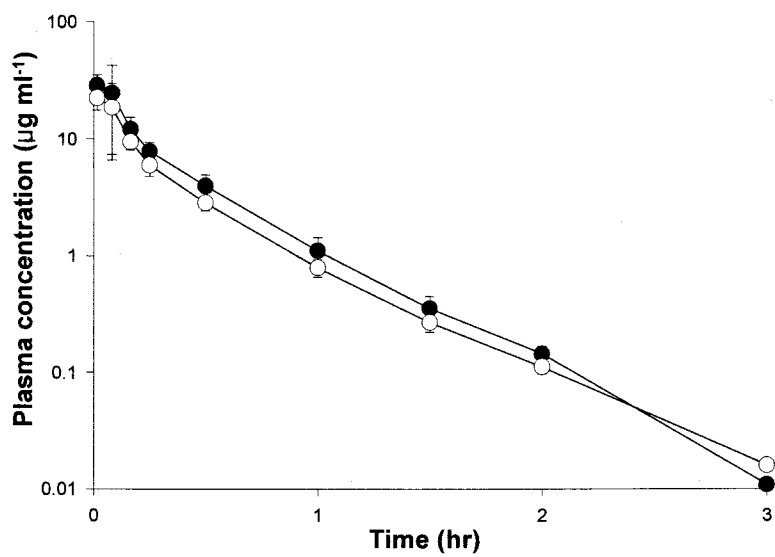


Figure 3. Mean plasma concentrations of loganin (○) and sweroside (●) after single IV injection at a dose of 20 mg/kg, respectively, to rats (n=4).

- Taxol의 분석 -

1. 서론

항암제로 사용되고 있는 Taxol은 난용성과 낮은 생체 이용율로 인하여 경구투여제로서는 사용되지 않고 정맥 주사제로 개발되어 시판되고 있다. 최근 중국에서는 경구흡수율을 획기적으로 증대한 capsule 제제 (Taxcap)를 개발하였다고 보고하였으며, 이는 낮은 흡수율을 보이는 타 약제에도 적용할 수 있는 가능성이 있다고 사료된다. 따라서 본 시험에서는 Taxcap의 상대 생체 이용율을 검증하고 개발가능성을 타진하고자 하였다.

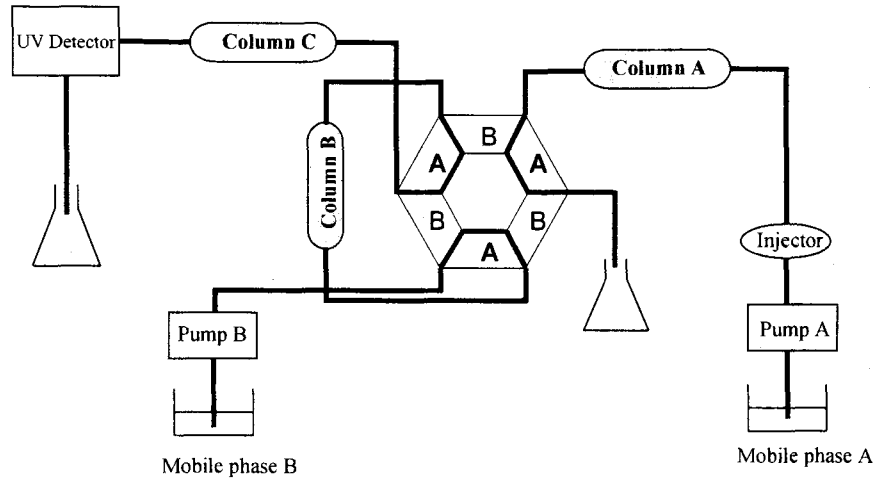
2. 실험방법

Blood kinetic 시험에서 얻어진 각각의 plasma 200 μ l에 internal standard로서 butyl-p-hydroxybenzoic acid (100 μ g/ml in acetonitrile) 10 μ l을 가하였다. tert-butylmethylether 1ml을 첨가하고 30초간 vortexing 과정을 거쳐 시료를 추출하였다. 3000 rpm에서 5분간 원심분리로 유기층을 분리하고, 0.8 ml의 유기층을 취하여 질소 기류 하에서 건조시켰다. 잔사를 80 μ l의 60% acetonitrile에 녹이고 그 중 30 μ l를 HPLC에 injection하여 paclitaxel을 분석하였다. HPLC system (Shiseido NANOSPACE, Semimicro column HPLC)은 SI-1/2001 pump, SI-1/2002 UV-VIS detector, SI-1/2004 column 항온조, SI-1/2003 Autosampler, SI-1/2009 탈기장치, SI-1/2011, 2012 고압 절환 욕방 valve, 그리고 Shiseido-MicroChrom software로 구성되었다. 전처리 컬럼으로는 CAPCELLPAK MF Ph-1 cartridge (4.6x 20 mm), 중간 농축 컬럼으로는 CAPCELLPAK C18 UG120 (2.0x35 mm), 그리고 분석 컬럼으로는 CAPCELLPAK C18 UG120 (2.0x250 mm) 컬럼을 사용하였다. 이동상은 0.1% phosphoric acid (pH=6.86) buffer (pump A)와 50% acetonitrile (pump B)을 사용하였고 컬럼의 온도는 30°C로 유지하였다. 혈장내 paclitaxel은 Fig. 1에 기술한 바와 같이 column switching 방법을 이용하여 분석하였다. 이동상은 전처리 column의 경우 0.1% phosphoric acid/acetonitrile 용액(84/16, v/v)을 0.5 ml/min으로 흘려주었고, analytical column은 phosphoric acid/acetonitrile (v/v)용액을 0.1 ml/min으로 흘려 주었다. 먼저 switching valve를 A위치로 하여 전처리 column 용출액은 waste로 나가도록 하고, analytical column 용출액은 UV detector를 통과하도록 하였다. 전처리 column에서 internal standard는 4.1분에서 7.2분에 걸쳐, 그리고 paclitaxel은 6.4분에서 9.3분에 걸쳐 용출되므로 4.0분에서 switching valve를 B위치로 변환하여 전처리 column 용출액이 concentration column으로 흐르도록 하여 시료를 농축하였다. 10분 경과시점에서 switching valve를 다시 A위치로 변환하여, flow를 농축 column에서 analytical column으로 바꾸고 227 nm에서 peak를 모니터링 하였다. 각 chromatogram은 Syscon software (Shiseido)를 이용하여 peak를 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

Column-switching 방법은 약물의 특성상 추출이 난이한 약물을 서로 다른 column을 조합하여 사용함으로써 생체시료에서 분석이 가능한 방법으로 알려져 있다. 본 방법에서도 switching valve를 사용하여 1차 column으로는 MF phenyl cartridge를 사용하고 2차 column으로는 C18 column을 사용하여 혈장내의 taxol을 분석 정량하고자 하였다. Capcell pak MF column은 polymer coating되어있는 silica bead에 hydrophilic phase와 hydrophobic phase 가 동시에 존재하는 column으로서 단백질과 같은 친수성 생체 성분에 의한 방해가 최소화 시켜준다. 따라서 혈장을 전처리 과정을 거치지 않고 직접 column에 주입할 수 있다. 본 시험에서 사용한 column-switching의 diagram은 Figure 1에 나타내었으며 1차 column에서 taxol이 분리되어 나오는 7분을 중심으로 shdcnrcolumn으로 peak를 농축시키고 1차 column에서 taxol peak가 모두 용출되는 시간에 flow를 2차 column으로 변화 시켜 C18 2차 column에서 taxol이 분리되어 나오도록 하였다. 이와 같은 방법을 사용 시 taxol peak는 Figure 2에 나타낸 바와 같이 24.6분에 용출되었으며 taxol peak 근처에 방해 peak가 나타나지 않았다. 본 방법의 정량성을 검증하기 위하여 0.05에서 10 ug/ml 농도사이에서 직선성을 검증하여 보아보았다. Figure 3에서 보는바와 같이 taxol은 상기 농도 범위 내에서 0.999의 상관계수를 나타내어 이 농도범위 내에서 혈장 중 taxol 정량에 적용할 수 있었다.

Valve position A



Valve position B

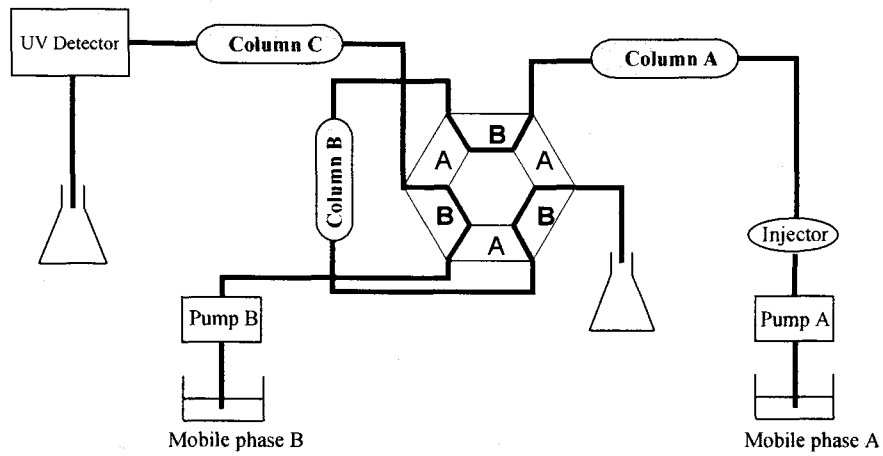


Figure 1. Flow diagram of column switching HPLC used for quantitation of taxol

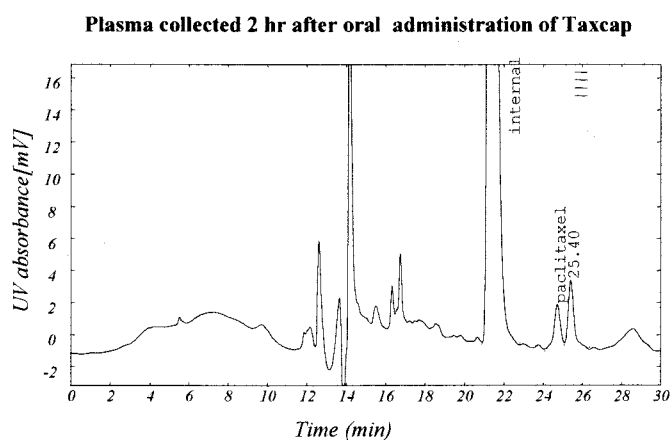
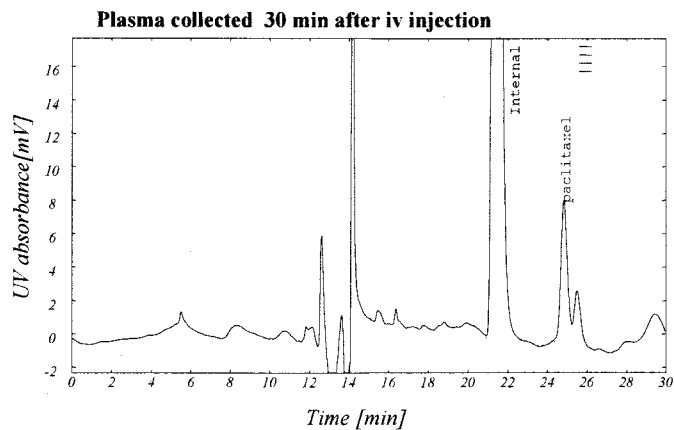


Figure 2. HPLC chromatograms of blank plasma, plasma spiked with 0.3 ug/ml paclitaxel, plasma collected 30 min after single iv injection (2 mg/ml), and plasma collected 2hr after oral administration of Taxcap (20mg/ml)

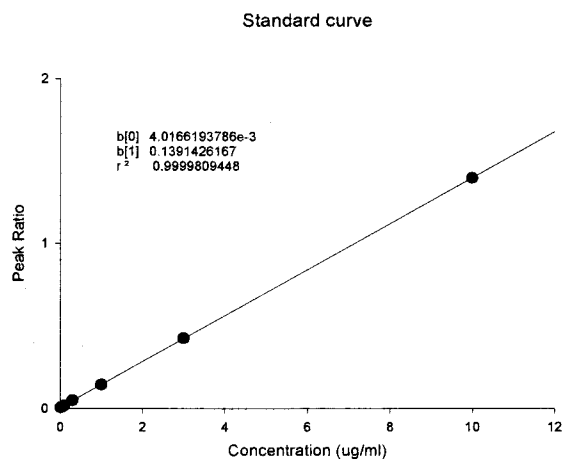


Figure 3. Calibration of paclitaxol in rat plasma.

제 2 절 Liquid chromatography-tandem mass spectrometry를 이용한 분석 방법의 개발

- Enalapril과 enalaprilat의 동시 분석 -

1. 서론

Enalapril (L-proline, 1-[N-(ethoxycarbonyl)-3-phenylpropyl]-L-alanyl-(S)) maleate는 renovascular hypertension과 heart failure에 효과적인 약물이다. Enalapril은 hepatic 대사를 통해 enalaprilat으로 대사되며 이 enalaprilat은 therapeutic action을 위한 active 대사체이다. 따라서 enalapril과 그 active 대사체인 enalaprilat의 동시 분석은 pharmacokinetic 연구를 위하여 매우 중요하다. 본 연구에서는 혈장 중 enalapril과 enalaprilat의 농도를 HPLC-MS/MS를 사용하여 측정하였다.

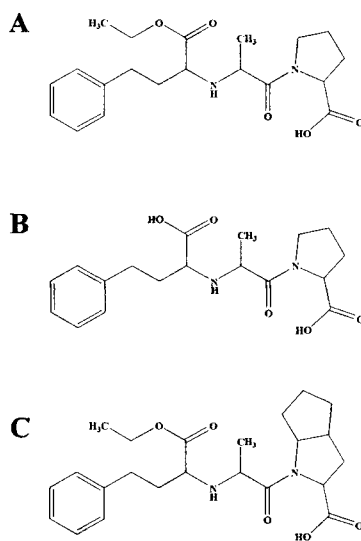


Figure 1. Structures of (A) enalapril, (B) enalaprilat (an active metabolite), and ramipril (internal standard)

2. 실험방법

(1) 주요기기 및 장치

· 분석기기 : Shimadzu HPLC systems LC-10A series (Kyoto, Japan)와 Applied Biosystems MDS

SCIEX, API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry (Concorde, Canada)

· Column : Hydrosphere C₁₈ HS-3C0-3 (50 × 2.0 mmI.D., S-3 μm, 12 nm, YMC, Kyoto, Japan)

· 이동상 : 10 mM ammonium formate (pH 4.0) (buffer A)와 90% methanol (buffer B)을 table 1과 같은 gradient program으로 사용하였다.

· 유속 : 0.2 mL/min, gradient.

Table 1. Gradient condition.

Time (min)	%B
0	22
2.2	90
3.0	90
3.01	22
5.5	stop

(2) 분석기기 조건

전처리된 혈장시료는 다음의 LC-MS/MS 조건에서 정량하였다.

Peak 검출은 triple-quadrupole mass spectrometry를 이용하여 MS/MS MRM (multiple reaction monitoring) 방법으로 검출하고, ionization은 turbo ion spray를 이용한 electrospray ionization (ESI)을 하며, nebulizing gas와 turbo gas, 그리고 curtain gas는 nitrogen gas를 사용하였으며, 각각 35, 80, 그리고 40 (임의단위)으로 설정하였다. Nebulizer의 온도는 450°C로 설정하였다.

MRM mode를 이용한 enalapril과 enalaprilat 그리고 ramipril (IS)의 검출은 4 (임의단위) collision gas (nitrogen gas)와 150 ms dwell time으로 분석하였으며, 각각의 protonated molecular ion은 m/z 377과 349 그리고 417이며, collision energy를 27과 29로 하여 생성된 product ion은 m/z 234, 206 그리고 234을 monitoring 하였다.

(3) 검량선 작성

Enalapril과 enalaprilat 그리고 internal standard인 ramipril을 각각 10 mg을 정확히 측정하여 1 mL의 DMSO에 녹여 10 mg/mL의 농도를 만들고, 10배 serial dilution으로 100, 10, 1, 0.1 그리고 0.01 μg/mL의 working standard 용액을 MeOH로 조제하였다.

표준 검량선을 작성하기 위하여 human blank 혈장 0.5 mL에 enalapril이 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10, 20, 50, 100, 200, 그리고 300 ng/mL의 농도가 되도록 첨가하고 각각에 내부표준물질 ramipril을 최종농도

50 ng/mL (5 μ L of 5 μ g/mL) 씩을 첨가한 후, 다음의 검체 전처리법과 LC-MS-MS를 이용한 분석조건에 따라 분석하였다.

검량선은 내부표준물질의 peak 면적에 대한 enalapril의 peak 면적비로 enalapril의 농도에 대하여 작성하였다.

(4) 혈장 시료의 처리

피험자로부터 각 시간대별로 채취하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관했던 혈장시료를 실온에 방치하여 녹인 다음, 검체 0.5 mL (혈장)에 내부표준물질 ramipril을 최종농도 50 ng/mL (5 μ L of 5 μ g/mL) 씩을 첨가한 후, 20 μ L의 phosphoric acid (H₃PO₄)를 첨가하고, 96-well type OASIS HLB extraction cartridge으로 통해서 다음과 같이 추출하였다.

OASIS cartridge를 1 mL의 methanol로 precondition시키고, 1 mL의 0.1% acetic acid로 equilibration한다. 시료를 load하고, 3 mL의 0.1% acetic acid로 washing한 후, enalapril과 ramipril을 1 mL의 methanol로 elution하고, nitrogen gas하에서 evaporation 하였다. 최종적으로 100 μ L의 20% acetonitrile로 녹여 그 중 3 μ L를 HPLC에 주입하였다.

(5) 혈중농도계산

얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 enalapril 과 enalaprilat의 피크면적비를 각각 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 enalapril과 enalaprilat의 농도를 구하였다.

3. 실험결과 및 고찰

(1) 분석조건의 검증

① 특이성 ; n=3

혈장 중 enalapril과 enalaprilat을 분석하기 위하여 turbo ion spray ionization과 triple-quadrupole LC-MS-MS를 이용하여 분석하였다.

Enalapril과 enalaprilat은 positive ion mode에서 protonated molecular ion m/z 377과 349에서 검출되었으며, MS/MS product ion spectrum에서는 proline moiety가 떨어진 m/z 234와 206이 주요 fragment ion으로 검출되었다. Internal standard로 사용한 ramipril은 분자량이 416으로 positive ion mode에서 molecular ion m/z 417이 검출되었으며, MS/MS product ion spectrum에서는 역시 m/z 234가 주요 fragment ion으로 검출되었다. (Figure 2).

따라서 peak 검출은 MRM mode로, enalapril의 molecular ion m/z 234를, 그리고 internal standard는 molecular ion m/z 234를 monitoring하였다.

C₁₈ column을 이용하여 분석한 HPLC 조건에서의 internal standard와 enalapril 그리고 enalaprilat은 각각의 머무름시간 4.3분과 4.0분 그리고 3.2분 부근에서 검출되었고, 위에서 기술한 검출조건에서 타 물질에 의한 방해 peak는 전혀 나타나지 않았으며, 우수한 selectivity를 나타내었다 (Figure 3).

② 직선성 ; n=3

Enalapril을 0.2 ng/mL에서 300 ng/mL까지 spike한 후 분석하여 표준검량선을 3회 작성하여 평균값으로 작성한 결과 (Peak ratio) = 0.0128 (concentration) + 0.00123의 직선성으로 표시되었으며, linear regression 시 $r^2=0.999$ 로서 우수한 직선성을 나타내었다. 본 검량선을 작성 시 6명의 시료를 처리할 때마다 새로이 검량선을 작성하여 이의 평균값과 표준편차를 이용하여 검량선을 작성하였으며, 이때 1.0 ng/mL에서 300 ng/mL의 농도에서 coefficient of variation은 1.85%에서 14.68%이었으므로 본 분석법은 1.0 ng/mL에서 300 ng/mL 범위에서 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

③ 정밀성, 정확성 및 감도 (정량한계)

본 분석방법의 정밀성, 정확성, 그리고 정량한계를 설정하기 위하여 inter-day, intra-day variation을 검증하였다. Enalapril을 1.0, 5.0, 20, 100, 그리고 300 ng/mL의 농도로 시료를 제조하여 validation 결과를 Table 2에 나타내었다.

Intra-day variation의 경우 coefficient of variation은 1.0 ng/mL에서 300 ng/mL의 농도에서 10.7%이하였으며 정확도는 이론적인 값에 비하여 88.8%에서 100.2%로 계산되었다. Inter-day variation의 경우 coefficient of variation은 1.8%에서 14.7%이었으며, 정확도는 97.5%에서 110.4%로 계산되었다. 따라서 본 시험의 분석 농도범위가 ng 수준임을 감안시 정량한계는 1.0 ng/mL로 설정할 수 있었다. 혈장중 enalapril에 대한 본 LC-MS-MS 분석법은 1.0 ng/mL에서 300 ng/mL 범위에서 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

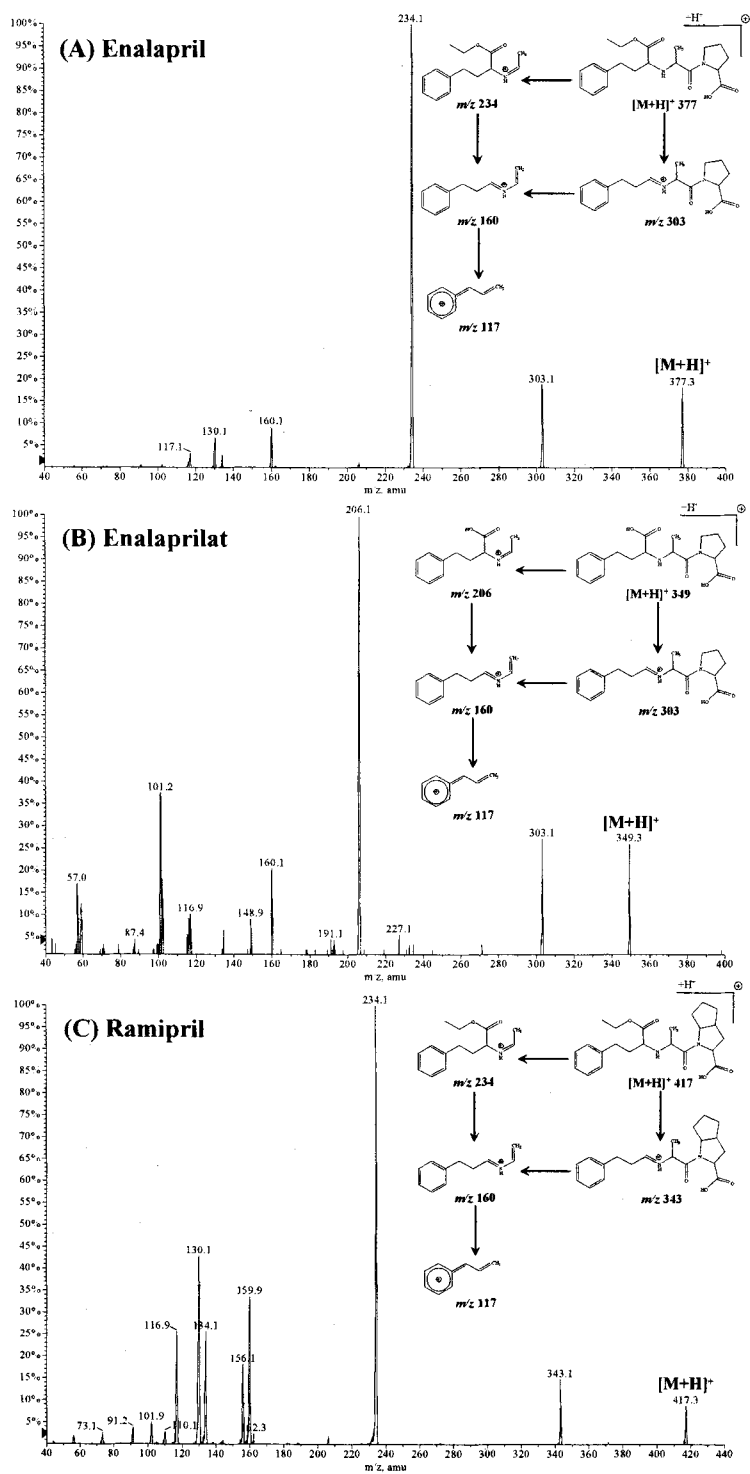


Figure 2. Product ion mass spectra of (A) enalapril, (B) enalaprilat, and (C) ramipril (IS) with each protonated molecule $[M+H]^+$ as precursor ion.

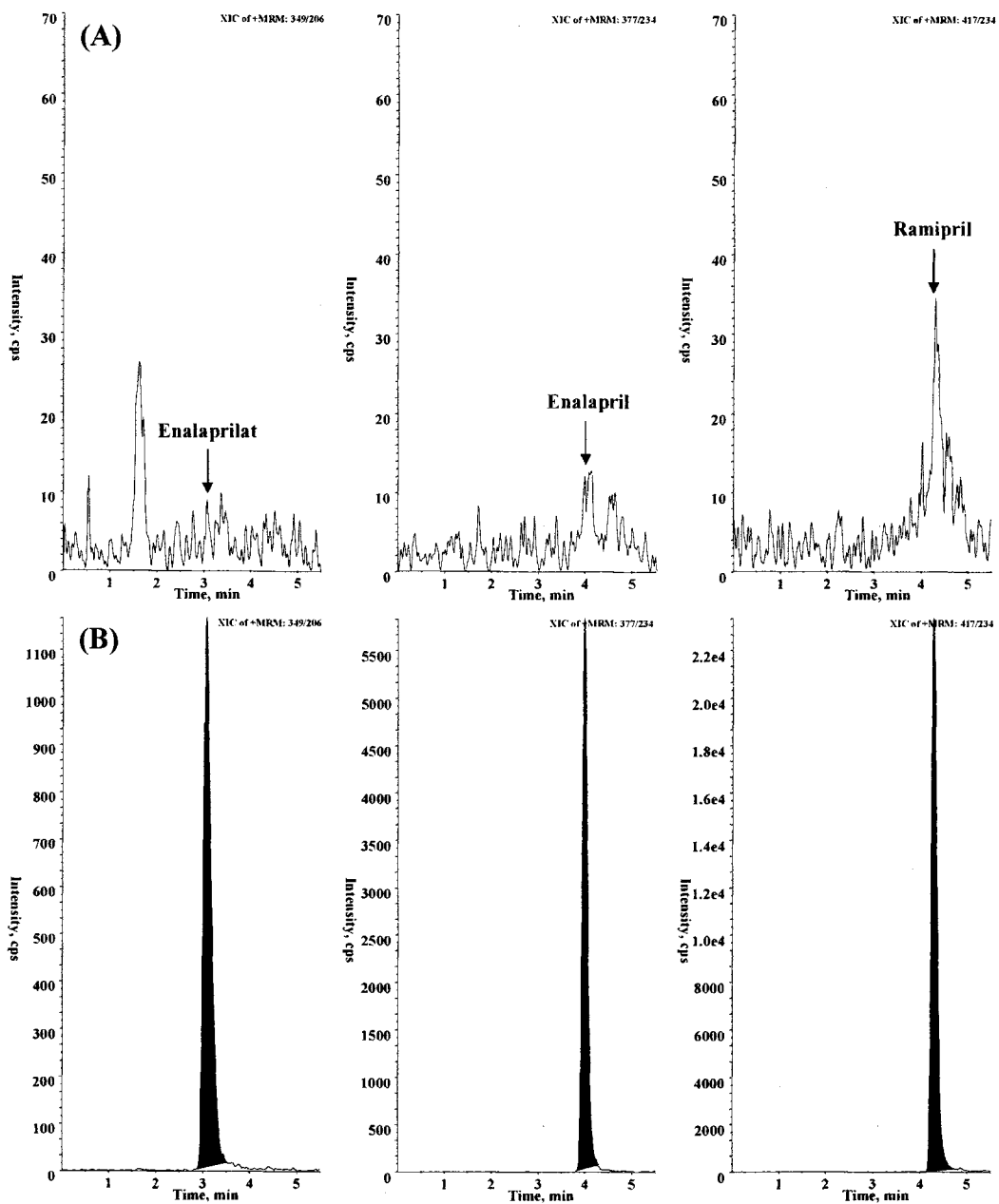


Figure 3. Multiple reaction monitoring chromatogram of (A) blank human plasma, (B) plasma spiked with enalapril, and internal standard (50 ng/ml), and (C) plasma from a volunteer 1.0 hr after an oral administration of 20 mg enalapril.

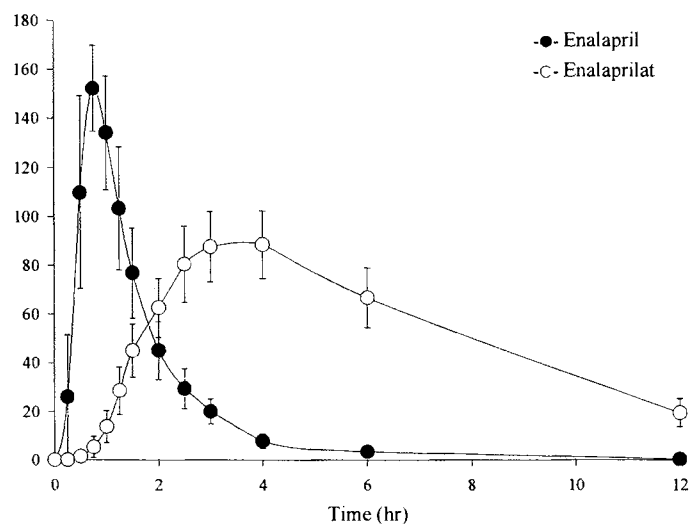


Figure 4. Mean plasma concentration-time profile of enalapril and enalaprilat after oral dose of 20 mg enalapril maleate to 12 healthy volunteers. Each point represents the mean \pm SD.

Table 2. Intra-day and inter-day coefficient of variation and accuracy for determination of enalapril and enalaprilat in human plasma (n=5)

Theoretical concentration (ng/ml)	Intra-day			Inter-day		
	Concentration found (ng/ml)	% RSD	Accuracy (%)	Concentration found (ng/ml)	% RSD	Accuracy (%)
Enalaprilat						
1	1.038 \pm 0.16	15.4	103.8	1.047 \pm 0.10	9.1	104.7
2	1.859 \pm 0.20	10.9	93	1.875 \pm 0.27	14.4	93.7
5	4.707 \pm 0.46	9.7	94.1	4.819 \pm 0.57	11.7	96.4
20	18.530 \pm 1.34	7.2	92.7	18.372 \pm 1.71	9.3	91.9
50	49.605 \pm 2.66	5.4	99.2	49.884 \pm 4.39	8.8	99.8
100	99.279 \pm 5.54	5.6	99.3	98.581 \pm 4.91	5	98.6
Enalapril						
0.2	0.185 \pm 0.02	8.2	92.4	0.190 \pm 0.02	8.4	95
0.5	0.446 \pm 0.02	3.6	89.2	0.469 \pm 0.03	5.4	93.9
1	1.048 \pm 0.13	12.7	104.8	1.048 \pm 0.14	13.3	104.8
2	1.857 \pm 0.17	8.9	92.9	1.971 \pm 0.22	11.3	98.5
5	4.926 \pm 0.45	9.1	98.5	5.073 \pm 0.38	7.6	101.5
20	20.085 \pm 2.23	11.1	100.4	20.070 \pm 2.22	11.1	100.3
50	50.256 \pm 4.87	9.7	100.5	50.597 \pm 6.35	12.5	101.2
100	105.016 \pm 5.10	4.9	105	103.775 \pm 5.23	5	103.8
200	205.171 \pm 3.61	1.8	102.6	203.155 \pm 5.49	2.7	101.6

- Oxiracetam의 정량 -

1. 서론

Oxiracetam (4-hydroxy-2-oxo-1-pyrrolidine acetamide)은 nootropic agent로, 다양한 cognitive disorders에 사용되고, 학습과 기억작용 개선에도 효과가 있는 것으로 밝혀졌다. Biological fluid에서의 oxiracetam의 분석은 normal-phase liquid chromatography를 통한 UV detection과 reversed-phase liquid chromatography를 통한 유도체화된 fluorescence detection, 그리고 column-switching high-performance liquid chromatography등이 알려져 있다. 하지만 oxiracetam은 210 nm의 낮은 wavelength에서 검출이 되고, 때문에 pharmacokinetic study에 적용하기에는 selectivity와 sensitivity에서 문제점이 많다. 또한 fluorescence 유도체화는 pretreatment step이 있어, 이러한 점을 개선하고 biological fluid에서 selectivity와 sensitivity를 갖춘 새로운 방법을 개발하고자 하였다.

2. 실험방법

(1) 실험재료

Oxiracetam reference standard와 internal standard (IS) piracetam은 Sigma Chemicals (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. Human plasma은 Korea Blood Bank Corp. (Seoul, Korea)에서 구입하였다. Methanol과 acetonitrile은 Fisher Scientific (Fair Lawn, NJ, USA)로부터, 이외 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

(2) Standard solution

Oxiracetam과 piracetam의 standard stock solution은 methanol에 1 mg/ml이 되도록 제조하였고, 이 후 methanol로 희석하여 working solution을 제조하였다. Spiked plasma sample은 blank plasma에 oxiracetam의 최종농도가 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 40.0 µg/ml이 되도록 working solution에서 spike하였다.

(3) Sample extraction

200 µl의 plasma sample에 IS (10 µg/ml) 20 µl를 spike하고, 400 µl의 acetonitrile 첨가한다. 30초간 vortex한 후 13,000 rpm에서 5분간 원심분리 한다. 상등액을 질소가스에서 TurboVap evaporator (Zymark, Hopkinton, MA, USA)을 사용하여 evaporation한다. 100 µl의 0.1% acetic acid로 reconstitution하고, 4 µl를 LC-MS/MS system에 injection한다.

(4) Reversed-phased liquid chromatography-mass spectrometry

HPLC system은 LC-10ADvp binary pump system과 SIL-10ADvp autosampler, CTO-10ASvp oven (Shimadzu, Kyoto, Japan)으로 구성되어 있으며, analytical column으로는 C₁₈ column (Atlantis™ dC₁₈, 50 × 3.0 mm I.D., 3 μm, Waters, Mass, USA)을 사용하였다. Mobile phases는 0.1% acetic acid (A)와 100% methanol (B)을 사용하였으며, flow rate은 0.3 ml/min으로 사용하였다. LC separation system은 Table 1과 같다.

Table 1. LC condition

Time (min)	%B
0	0
1	0
1.5	20
2	80
3	80
3.01	0
4.5	stop

API2000 triple-quadrupole mass spectrometry (Applied Biosystems SCIEX, Concord, Canada)는 Turbo Ion Spray source가 장착되어 있으며, electrospray ionization (ESI) 방식으로 positive mode에서 nitrogen gas를 nebulizing과 turbo spray, curtain gas로 각각 40, 80, 40 (arbitrary values)으로 최적화하였다. Nebulizer temperature는 425°C이며, mass spectrometer의 Q1과 Q3의 resolution은 각각 low와 unit으로 설정하였다. Multiple reaction monitoring (MRM) mode를 사용하며 nitrogen gas를 collision gas (4 arbitrary value)로 사용하고, dwell time은 150 msec로 설정하여서, oxiracetam과 piracetam의 protonated molecular ion은 각각 m/z 159과 m/z 143이며 생성된 product ion은 m/z 114와 m/z 126이다. Collision energy은 19 and 13eV으로 oxiracetam과 piracetam을 설정하였다.

(5) Calibration and validation

Human plasma에서 oxiracetam의 calibration curve는 standard spiked plasma samples의 농도와 peak area를 least-square linear regression (no weighting)으로 계산하였다. Calibration curves는 모두 8 point로 구성되었으며, triplicate로 실험하였다. Intra-day coefficient of variation (CV)과 accuracy는 5 set의 서로 다른 plasma sample을 분석하여 계산하였다. Inter-day는 5일동안 실시하였다.

(6) Human pharmacokinetic study

20세에서 28세의 건강한 남성 자원자들을 대상으로 본 연구를 실시하였다. Oxiracetam tablet (800 mg) 을 200 ml water와 함께 구강 투여하였으며 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 hr 간격으로 혈액을 채취하였다. Plasma는 원심분리를 통하여 분리하였으며 -20°C에 보관하였다. Pharmacokinetic parameters는 standard non-compartmental methods를 사용하여 결정하였다. Plasma AUC는 WinNonlin (version 3.1, Scientific Consulting, KY, USA)을 통하여 trapezoidal method로 계산하였다.

3. 실험결과 및 고찰

(1) Sample preparation and analysis

Pharmacokinetic study는 많은 양의 sample을 분석하여야 하기 때문에 sample의 빠른 전처리 및 분석이 필요하다. Oxiracetam은 매우 polar한 물질로 small molecular mass를 가지고 있어 chromophoric property에 적합하지 않다. Reverse-phase column에서 pH modifier를 첨가함으로써 손쉽게 polar compounds를 retain시킨다. 하지만 oxiracetam은 retain이 되지 않으며 chromatographic property도 매우 안 좋은 것으로 나타났다. Atlantis dC18 column은 polar compound를 손쉽게 분석할 목적으로 개발된 column으로 reverse-phase column에서 oxiracetam의 문제점을 보완해 주었다. 새로운 분석조건에서 oxiracetam은 성공적으로 1.3 min에 retain되었으며 훌륭한 peak shape을 보였다.

Oxiracetam과 piracetam의 product ion mass spectra와 postulated fragmentation patterns은 Figure 1에 나타났다. Protonated oxiracetam (m/z 159)과 piracetam (m/z 143)에서 NH_3 (17 amu)을 잃어 생성된 fragment ion은 각각 m/z 142와 126이었다. Fragment ion m/z 142와 126에서부터 CO (28 amu)를 잃어 m/z 114와 98을 얻었으며, 이 ion들을 MRM mode에서 최적화하였다. Oxiracetam은 m/z 114를 piracetam은 m/z 126을 선택적으로 monitoring 하였다.

이 방법의 specificity와 selectivity는 human blank plasma와 비교하여 oxiracetam과 piracetam의 retention time에 간섭이 없음을 알 수 있었다 (Figure 2A). Figure 2B는 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ oxiracetam과 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ internal standard를 spike한 plasma sample의 MRM chromatograms을 보여주고 있다.

(2) Method validation

Oxiracetam의 spiked human plasma의 standard calibration curve는 0.05 to 40.0 mg/ml의 구간에서 linear하였으며 correlation coefficient는 0.999이상이었다. Intra- and inter-day variation은 Table 2에 나타났다. Intra-day CV는 2.2 - 8.3%이내였으며 accuracy 범위는 92.5 - 106.4%였다. Inter-day CV는 2.8 - 5.6%, accuracy는 93.6 - 103.8%였다. Freeze/thaw stability와 24 hr temperature stability 역시 3%이내였다. 이 조건하에서 0.2-ml의 plasma sample에서 0.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 lower limit of quantitation (LLOQ)을 갖

는다. 또한 이 농도에서 CV와 accuracy는 15%이내이므로, pharmacokinetic study를 수행하는데 적합한 조건을 만족한다.

(3) Pharmacokinetic investigation in healthy volunteers

24명의 건강한 자원자들을 대상으로 oxiracetam 800 mg tablet을 경구 투여하였다. Mean plasma concentration-time curve는 Figure 3에 나타내었다. Oxiracetam의 AUC는 $110 \pm 28 \mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{ml}$ 이고 average Cmax는 $21.6 \mu\text{g}/\text{ml}$.

(4) 결론

Human plasma에서 정량적으로 손쉽게 oxiracetam을 검출할 수 있는 새로운 method을 확립하였다. 이 method는 sensitivity, accuracy와 precision에서 pharmacokinetic study에 필요한 조건을 만족시켰으며, 결과적으로 oxiracetam의 therapeutic monitoring을 성공적으로 수행하였다.

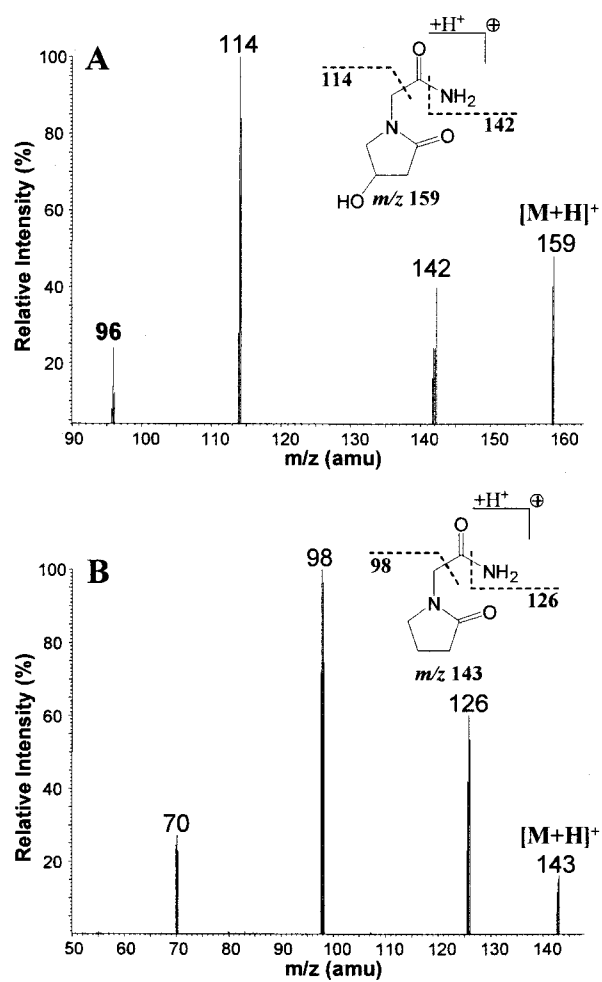


Figure 1. Product ion mass spectra of $[M+H]^+$ ions of (A) oxiracetam and (B) piracetam (IS)

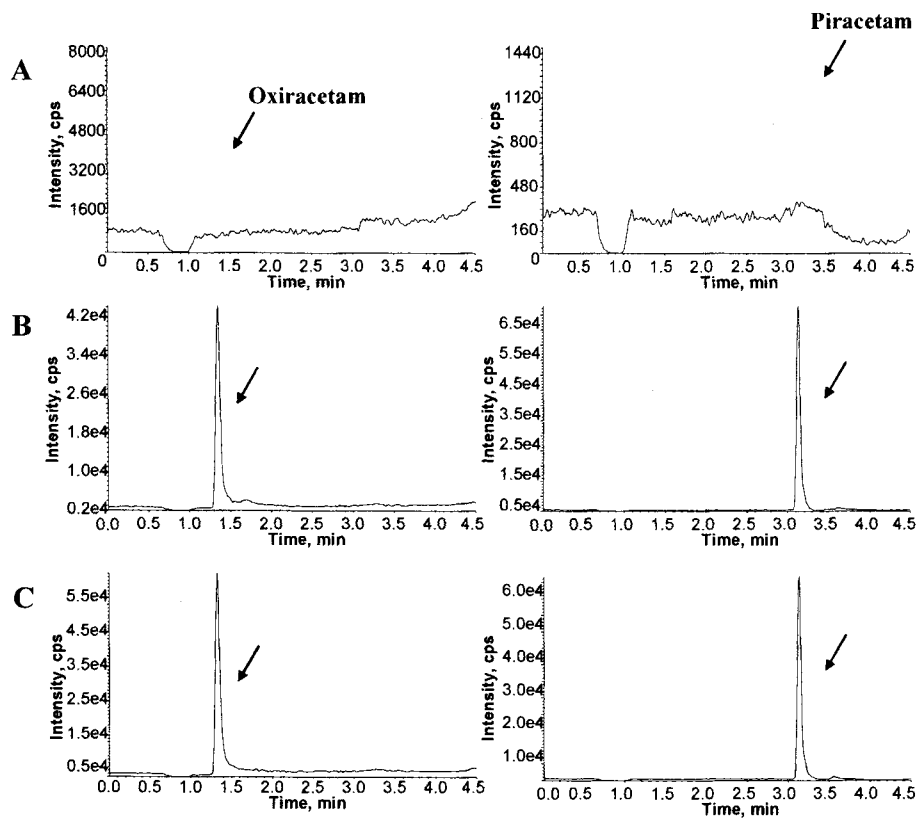


Figure 2. LC-MS/MS chromatograms of (A) blank human plasma, (B) plasma spiked with oxiracetam (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and internal standard (1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and (C) plasma collected 2.0 hr after single oral administration of oxiracetam tablet (800 mg).

Table 2. Intra-day and inter-day coefficient of variation and accuracy for determination of oxiracetam in human plasma (n=5)

Theoretical concentration (µg/ml)	Intra-day			Inter-day		
	Concentration found (µg/ml)	CV	Accuracy	Concentration found (µg/ml)	CV	Accuracy
0.2	0.19 ± 0.02	8.3	92.5	0.2 ± 0.01	3.8	98.2
0.5	0.5 ± 0.03	5.3	99.9	0.47 ± 0.02	4.4	93.6
1	1.06 ± 0.06	6.1	106.3	0.99 ± 0.06	5.6	99
2	2.13 ± 0.08	3.8	106.4	2.01 ± 0.11	5.5	100.3
5	5.07 ± 0.11	2.2	101.3	4.82 ± 0.13	2.8	96.3
10	11.1 ± 0.3	2.3	110.5	10.4 ± 0.4	3.6	103.8
20	20.7 ± 0.6	2.9	103.7	19.4 ± 0.6	3.3	96.9
40	39.7 ± 1	2.5	99.4	38.1 ± 1.6	4.2	95.4

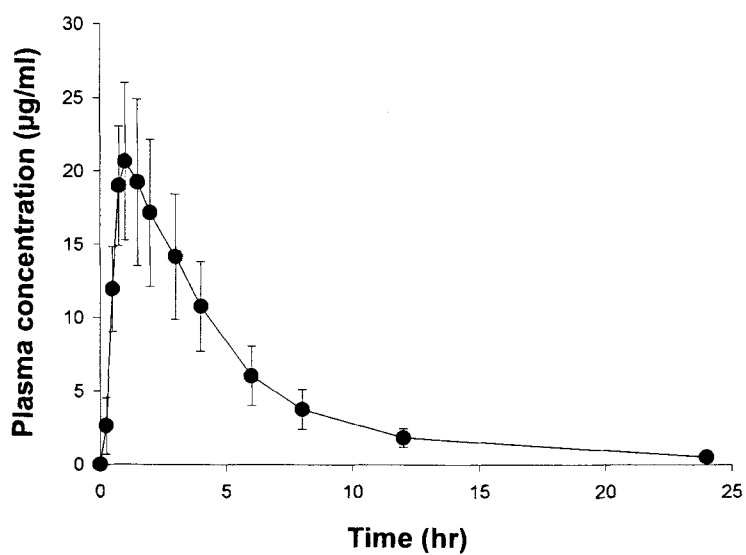


Figure 3. Mean plasma concentrations of oxiracetam after oral administration of oxiracetam tablet (800 mg) to 24 healthy volunteers. Each point represents the mean \pm SD.

- Lisinopril의 정량 -

1. 서론

본 연구에서는 human plasma 내에 존재하는 lisinopril 의 분석 방법을 LC/triple quadrupole mass spectrometry를 이용하여 개발하고자 하였다.

2. 실험방법

(1) 분석대상

사람혈장 중 lisinopril의 함량은 이미 보고된 lisinopril의 분석법에 관한 참고 문헌 (A. Taskalofe등)을 참고하여 검체를 처리한 후 LC-MS/MS를 이용하여 혈장 중 lisinopril의 농도를 정량 분석하였다.

(2) 주요기기 및 장치

HPLC: Shimadzu HPLC systems LC-10A series (Kyoto, Japan)

MS spectrometer: Applied Biosystems MDS SCIEX, API2000 triple-quadrupole mass spectrometry (Concord, Canada)

Column : Hydrosphere C18 (50 × 2.0 mmI.D., S-3 μm, 12 nm, YMC, Kyoto, Japan)

(3) 검량선 작성을 위한 표준용액 및 시료 조제

Lisinopril과 internal standard인 enalapril을 각각 1 mg을 정확히 측정하여 1 mL의 methanol에 녹여 1 mg/mL의 농도를 만들고, 10배 serial dilution으로 100, 10, 1, 0.1 그리고 0.01 μg/mL의 working standard 용액을 DW로 조제하였다.

표준 검량선을 작성하기 위하여 human blank 혈장 1 mL에 lisinopril이 2.0, 5.0, 10, 20, 50, 100, 200, 그리고 300 ng/mL의 농도가 되도록 첨가하고 각각에 내부표준물질 enalapril을 최종농도 10 ng/mL (10 μL of 1 μg/mL) 씩을 첨가한 후, 다음의 검체 전처리법과 LC-MS/MS를 이용한 분석조건에 따라 분석하였다.

검량선은 내부표준물질의 peak 면적에 대한 lisinopril의 peak 면적비로 lisinopril의 농도에 대하여 작성하였다.

(4) 혈장 시료의 전처리

Lisinopril을 농도별로 1 mL의 혈장 시료에 첨가한 후, 내부표준물질 enalapril을 최종농도 10 ng/mL (10 μL of 1 μg/mL) 씩을 첨가한 후, 50 μL의 phosphoric acid (H₃PO₄)를 첨가하고, 96-well type

OASIS HLB extraction cartridge으로 통해서 다음과 같이 추출하였다.

OASIS cartridge를 1 ml 의 methanol로 precondition시키고, 1 ml의 0.1% acetic acid로 equilibration한다. 시료를 load하고, 3 ml의 0.1% acetic acid로 washing한 후, lisinopril과 enalapril을 1 ml의 methanol로 elution하고, nitrogen gas하에서 evaporation 하였다. 최종적으로 50 µL의 10 mM formic acid로 녹여 그 중 5 µL를 HPLC에 주입하였다.

(5) 분석기기 조건 및 시료 분석

전처리된 혈장시료는 다음의 LC-MS/MS 조건에서 정량하였다.

HPLC system은 이동상으로 10 mM formic acid (pH 2.5) (buffer A)와 90% methanol (buffer B)을 Table 1과 같은 gradient program으로 사용하였다. 유속을 0.2 mL/min으로 사용하였다.

Peak 검출은 triple-quadrupole mass spectrometry를 이용하여 MS/MS MRM (multiple reaction monitoring)방법으로 검출하고, ionization은 turbo ion spray를 이용한 electrospray ionization (ESI)을 하며, nebulizing gas와 turbo gas, 그리고 curtain gas는 nitrogen gas를 사용하였으며, 각각 35, 75, 그리고 40 (임의단위)으로 설정하였다. Nebulizer의 온도는 400°C로 설정하였다.

MRM mode를 이용한 lisinopril과 enalapril (IS)의 검출은 4 (임의단위) collision gas (nitrogen gas)와 150 ms dwell time으로 분석하였으며, 각각의 protonated molecular ion은 m/z 406과 377이며, collision energy를 47과 27로 하여 생성된 product ion은 m/z 246과 234을 monitoring 하였다.

Table 1. Gradient condition.

Time (min)	%B
0	5
2.5	90
3.0	90
3.01	5
5.5	stop

(6) 분석조건의 검증 (Validation 방법)

재현성을 구하기 위해 검량선 작성 전 2, 5, 20, 100, 300 ng/ml 5가지 농도의 시료를 사용하여 intra-day 시험에서는 각 농도당 5개의 시료를 분석하여 일내 재현성을 구하고, inter-day 시험에서는 각 농도당 1개의 시료를 매일 4일간 실험을 행하였다. 재현성을 확인한 다음 검량선 작성을 하였다.

Intra-batch validation의 정밀도 (precision)는 동일 날짜에 분석한 sample에서 관찰한 농도의 coefficient

of variation (C.V. %)으로 나타내었다. Intra-batch의 정확도 (accuracy)는 각 sample에서 관찰된 농도의 평균값과 이론적 수치를 비교하였다.

Inter-day validation의 정밀도와 정확도 역시 동일한 방법으로 계산하였다.

Calibration standard의 back-calculated concentration은 검량선 작성용 시료를 분석한 결과를 lisinopril의 농도와 내부표준물질에 대한 lisinopril peak 면적비를 linear regression하여 얻은 검량선을 이용하여 얻은 직선식으로부터 구하였다.

Inter-day 분석에서 control matrix로 사용하는 human plasma blank의 chromatogram에서 시험물질의 retention time 근처에 간접 peak (interfering peak)가 존재하는지를 확인하였다.

(7) Validation acceptance criteria

Human plasma에서 lisinopril의 농도 분석 방법에 대한 validation acceptance criteria를 다음에 나타내었다.

① 정확도 및 정밀도

정확도 및 정밀도는 정량 가능한 최소농도 (lower limit of quantification: LLOQ)인 2 ng/ml를 제외한 sample에서 $\pm 15\%$ 를 초과하지 않으며, 2 ng/ml에서는 $\pm 20\%$ 까지 허용한다.

② Calibration function

8개의 calibration standard point중에서 분석적인 이유로 2개까지 제외할 수 있다. 모든 back-calculated concentration의 평균값의 $\pm 15\%$ 를 초과하지 않으며, LLOQ에서는 $\pm 20\%$ 까지 허용한다.

Calibration line의 선형성 (linearity)을 나타내는 determination coefficient (r^2)는 0.98 이상이어야 한다.

③ Sensitivity

Sensitivity는 intra-day에서 정확도 및 정밀도가 $\pm 20\%$ 이내인 LLOQ의 농도로 결정한다.

④ Specificity

분석을 실행한 모든 inter-day 시료에서 blank plasma에서 나오는 peak가 LLOQ의 50%를 초과하는 경우가 한번 이상 나오면 이 분석 방법은 specificity가 적합하지 않은 방법이다.

3. 실험결과 및 고찰

(1) 특이성

혈장 중 lisinopril을 분석하기 위하여 turbo ion spray ionization과 triple-quadrupole LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다.

Lisinopril은 분자량이 405로 positive ion mode에서 molecular ion m/z 406이 검출되었으며, MS/MS product ion spectrum에서는 m/z 246이 주요 fragment ion으로 검출되었다. Internal standard로 사용한 enalapril은 분자량이 376으로 positive ion mode에서 molecular ion m/z 377이 검출되었으며, MS/MS product ion spectrum에서는 m/z 234가 주요 fragment ion으로 검출되었다. (Figure 1).

따라서 peak 검출은 MRM mode로, lisinopril의 molecular ion m/z 406을, 그리고 internal standard는 molecular ion m/z 377을 monitoring하였다.

C18 column을 이용하여 분석한 HPLC 조건에서의 internal standard와 lisinopril은 각각의 머무름 시간 2.4분과 3.5분 부근에서 검출되었고, 위에서 기술한 검출조건에서 타 물질에 의한 방해 peak는 전혀 나타나지 않았으며, 우수한 selectivity를 나타내었다 (Figure 2).

(2) 직선성

Lisinopril을 2 ng/mL에서 300 ng/mL까지 spike한 후 분석하여 표준검량선을 작성한 결과 (Peak ratio) = 0.0325 (concentration) + 0.00999의 직선성으로 표시되었으며, linear regression 시 $r^2=0.999$ 로서 우수한 직선성을 나타내었으며 작성된 검량선은 Figure 3에 나타내었다.

(3) 정밀성, 정확성 및 감도 (정량한계)

본 분석방법의 정밀성, 정확성, 그리고 정량한계를 설정하기 위하여 inter-day, intra-day variation을 검증하였다. Lisinopril을 2.0, 5.0, 20, 100, 그리고 300 ng/mL의 농도로 시료를 제조하여 validation 결과를 Table 2에 나타내었다.

Intra-day variation의 경우 coefficient of variation은 2.0 ng/mL에서 300 ng/mL의 농도에서 10.9%이하였으며 정확도는 이론적인 값에 비하여 98.5%에서 104.3%로 계산되었다. Inter-day variation의 경우 coefficient of variation은 3.5%에서 10.9%이었으며, 정확도는 99.7%에서 110.5%로 계산되었다. 본 분석방법에서 최저 농도인 2 ng/ml 농도에서 S/N ratio가 10 이상, 정밀성이 15% 이하, 그리고 정확성도 90% 이상으로 2.0 ng/ml을 정량한계로 설정할 수 있다. 따라서 본 방법은 lisinopril의 혈장내 농도가 2.0 ng/mL에서 300 ng/mL 범위에서 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 분석법 검증에 대한 기준을 만족 하였다.

(4) 결론

Human plasma에서 정량적으로 손쉽게 lisinopril을 검출할 수 있는 새로운 method을 확립하였다. 이

method는 sensitivity, accuracy와 precision에서 pharmacokinetic study에 필요한 조건을 만족시켰으며 결과적으로 lisinopril의 therapeutic monitoring을 성공적으로 수행하였다.

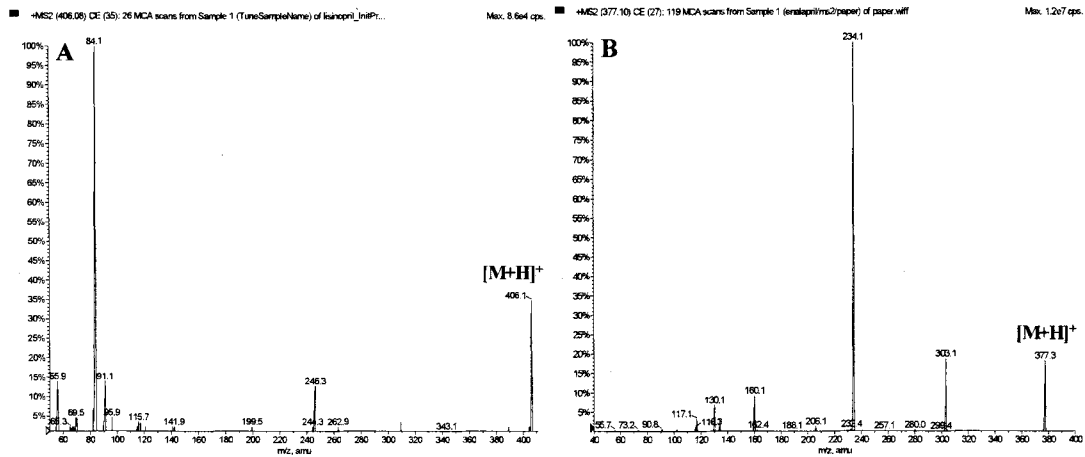


Figure 1. Product ion mass spectra of (A) lisinopril, and (B) enalapril (IS) with each protonated molecule [M+H]⁺ as precursor ion.

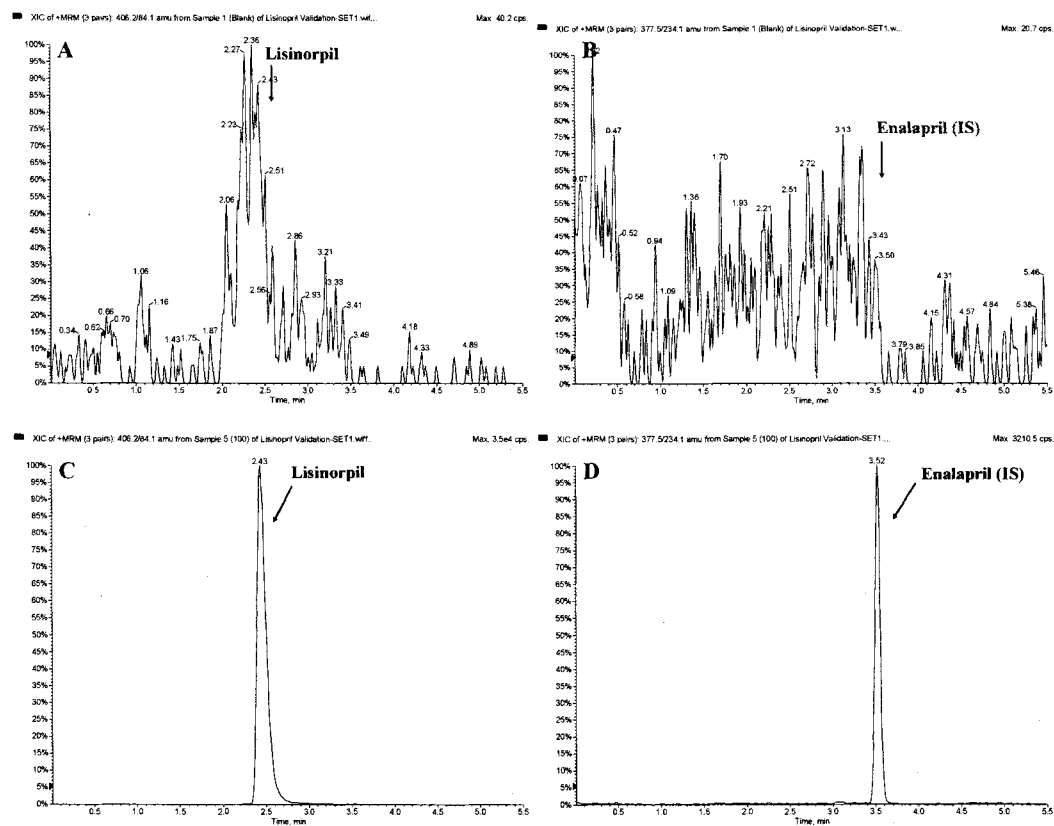


Figure 2. Multiple reaction monitoring chromatogram of (A) blank human plasma, and (B) plasma spiked with lisinopril (100 ng/ml), and internal standard (10 ng/ml).

- Gliclazide의 검출 -

1. 서론

Gliclazide (1-(3-azabicyclo [3.3.0] oct-3-yl)-3-p-tolylsulphonylurea)는 oral hypoglycemic drug으로, type II diabetes에 효과적인 약물이다. Pharmacokinetic study를 위한 대량 시료분석을 보다 빠르고 정확한 수행하기 위하여 새로운 분석방법이 필요성이 부각되었다. 이에 간단하면서 매우 정확한 분석방법을 LC-MS/MS triple quadrupole mass spectrometry를 통하여 개발하고자 하였다.

2. 실험방법

검체처리와 분석은 다음의 조건에 따라서 LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry)를 이용하여 수행하고 특이성, 직선성, 정확성, 정밀성, 감도 등에 대한 validation을 완료한 후 검체 분석에 응용한다.

(1) HPLC 조건

전처리된 혈장 시료는 다음의 LC-MS/MS 조건에서 정량한다. 이를 위해 Shimadzu HPLC systems LC-10A series (Kyoto, Japan)와 Applied Biosystems/MDS SCIEX, API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry (Concord, Canada)을 이용하고, column은 Hydrosphere C18 HS-3C0-3 (50 × 2.0 mm I.D., S-3 μm, 12 nm, YMC, Kyoto, Japan)을, 데이터 처리장치로는 Sciex사의 Analyst를 사용한다. 이동상은 (A) 5 mM ammonium formate (pH 6.0)와 (B) 90% acetonitrile (5 mM ammonium formate, pH 6.0)을 사용하며, isocratic flow B:70%로 분석한다. 유속은 0.20 ml/min, peak 검출은 triple-quadrupole mass spectrometry를 이용하여 MS/MS MRM (multiple reaction monitoring)방법으로 검출한다.

(2) Mass 조건

Ionization은 turbo ion spray를 이용한 electrospray ionization (ESI)을 하며, nebulizing gas와 turbo gas, 그리고 curtain gas는 nitrogen gas를 사용하였으며, 각각 30, 75, 그리고 40 (임의단위)으로 설정하였다. Nebulizer의 온도는 400℃로 설정하였다.

MRM mode를 이용한 gliclazide와 glibenclamide (IS)의 검출은 4 (임의단위) collision gas (nitrogen gas)와 150 ms dwell time으로 분석하였으며, 각각의 protonated molecular ion은 m/z 324와 493이며, collision energy를 27과 51로 하여 생성된 product ion은 m/z 127과 169를 monitoring 하였다.

(3) 검량선 작성

Gliclazide 표준품을 DMSO에 녹여 농도를 1000 µg/ml로 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 blank 혈장으로 희석하여 gliclazide의 혈장 중 농도가 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10 (µg/ml) 농도가 되도록 혈장 시료를 만든다. 각각의 표준 혈장 500 µl에 내부표준물질로 glibenclamide (250 µg/ml) 10 µl를 가한 후 흔들어 섞는다. 여기에 1 ml의 acetonitrile를 가하고 30초 동안 vortexing한 후 3,000g로 10 분간 원심 분리시킨다. 원심분리 후 상등액을 취하여 그 중 1 µl를 HPLC에 주입한다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적비에 대한 gliclazide의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성한다.

(4) 혈장 시료의 처리

피험자로부터 복용이후 C, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 24, 36시간에 각 6 mL의 혈액을 채취하여 즉시 3000 rpm 에서 원심분리하고 분리된 혈장은 -70 에 냉동보관한다. 보관했던 혈장 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 2 분간 진탕한 다음, 이 혈장 0.5 ml를 취하여 시험관에 옮기고 여기에 내부표준물질 glibenclamide (250 µg/ml) 10 µl를 가한 후 검량선 작성방법과 동일한 방법으로 전처리한 후 HPLC에 주입한다.

(5) 혈중농도계산

얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적비에 대한 gliclazide의 피크 면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 gliclazide의 농도를 구한다.

3. 실험결과 및 고찰

(1) 특이성

혈장 중 gliclazide을 분석하기 위하여 turbo ion spray ionization과 triple-quadrupole LC-MS/MS를 이용하여 분석하였다.

Gliclazide은 분자량이 323이며 positive ion mode에서 molecular ion m/z 324가 검출되었으며, MS/MS product ion spectrum에서는 m/z 127이 주요 fragment ion으로 검출되었다. Internal standard로 사용한 glibenclamide은 분자량이 493으로 positive ion mode에서 molecular ion m/z 494가 검출되었으며, MS/MS product ion spectrum에서는 m/z 169가 주요 fragment ion으로 검출되었다. (Figure 1).

따라서 peak 검출은 MRM mode로, gliclazide은 molecular ion에서 유래되는 major fragment ion (m/z 324 → 127), 그리고 internal standard는 fragment ion (m/z 494 → 169)을 monitoring하였다.

C18 column을 이용하여 분석한 HPLC 조건에서의 internal standard와 gliclazide은 각각의 머무름 시간 1.6분과 1.7분 부근에서 검출되었고, 위에서 기술한 검출조건에서 타 물질에 의한 방해 peak는 전혀 나타나지 않았으며, 우수한 selectivity를 나타내었다 (Figure 3).

(2) 직선성

Gliclazide을 0.1 µg/mL에서 10.0 µg/mL까지 spike한 후 분석하여 표준검량선을 작성한 결과 (Peak ratio) = 0.38 (concentration) + 0.0492의 직선성으로 표시되었으며, linear regression 시 $r^2=0.999$ 로서 우수한 직선성을 나타내었으며 작성된 검량선은 Figure 2에 나타내었다.

(3) 정밀성, 정확성 및 감도 (정량한계)

본 분석방법의 정밀성, 정확성, 그리고 정량한계를 설정하기 위하여 inter-day, intra-day variation을 검증하였다. Gliclazide을 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0 µg/mL의 농도로 시료를 제조하여 validation 결과를 Table 1에 나타내었다.

Intra-day variation의 경우 coefficient of variation은 0.1 µg/mL에서 10.0 µg/mL의 농도에서 5.0%이하였으며 정확도는 이론적인 값에 비하여 98.0%에서 103.1%로 계산되었다. Inter-day variation의 경우 coefficient of variation은 1.4%에서 3.2%이었으며, 정확도는 99.6%에서 106.6%로 계산되었다. 본 분석방법에서 최저 농도인 0.1 µg/ml 농도에서 S/N ratio가 10 이상, 정밀성이 15% 이하, 그리고 정확성도 90%이상으로 0.1 µg/ml을 정량한계로 설정할 수 있다. 따라서 본 방법은 gliclazide의 혈장 내 농도가 0.1 µg/mL에서 10.0 µg/mL 범위에서 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 분석법 검증에 대한 기준을 만족 하였다.

(4) 결론

Human plasma에서 정량적으로 손쉽게 gliclazide을 검출할 수 있는 새로운 method을 확립하였다. 이 method는 sensitivity, accuracy와 precision에서 pharmacokinetic study에 필요한 조건을 만족시켰으며, 결과적으로 gliclazide의 therapeutic monitoring을 성공적으로 수행하였다.

(A) Gliclazide mass spectrum

(B) Glibenclamide mass spectrum

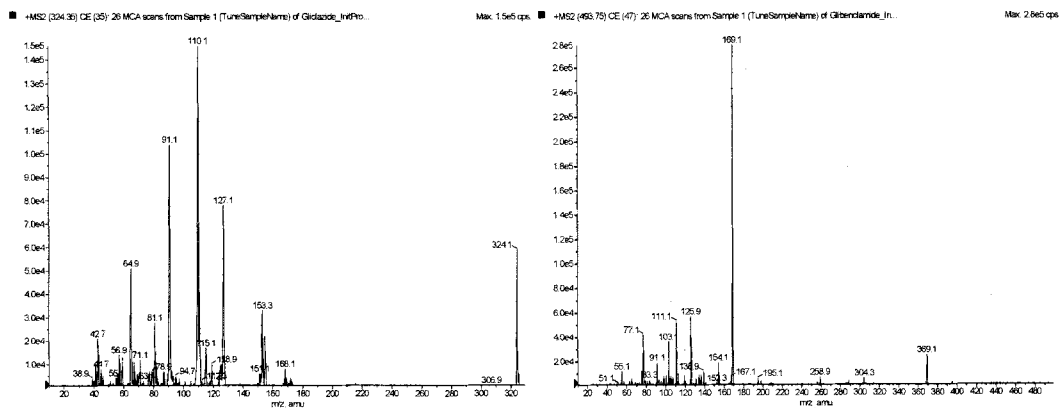


Figure 1. Product ion mass spectra of (A) gliclazide, and (B) glibenclamide (IS) with each protonated molecule $[M+H]^+$ as a precursor ion.

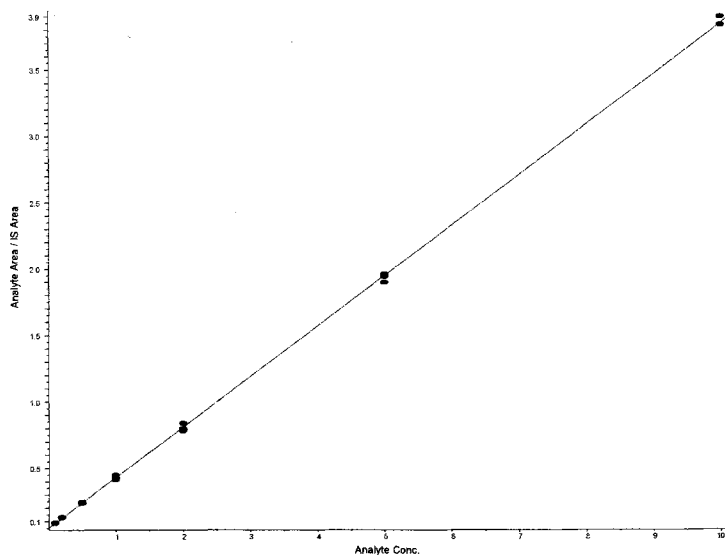


Figure 2. Calibration curve of gliclazide in human plasma.

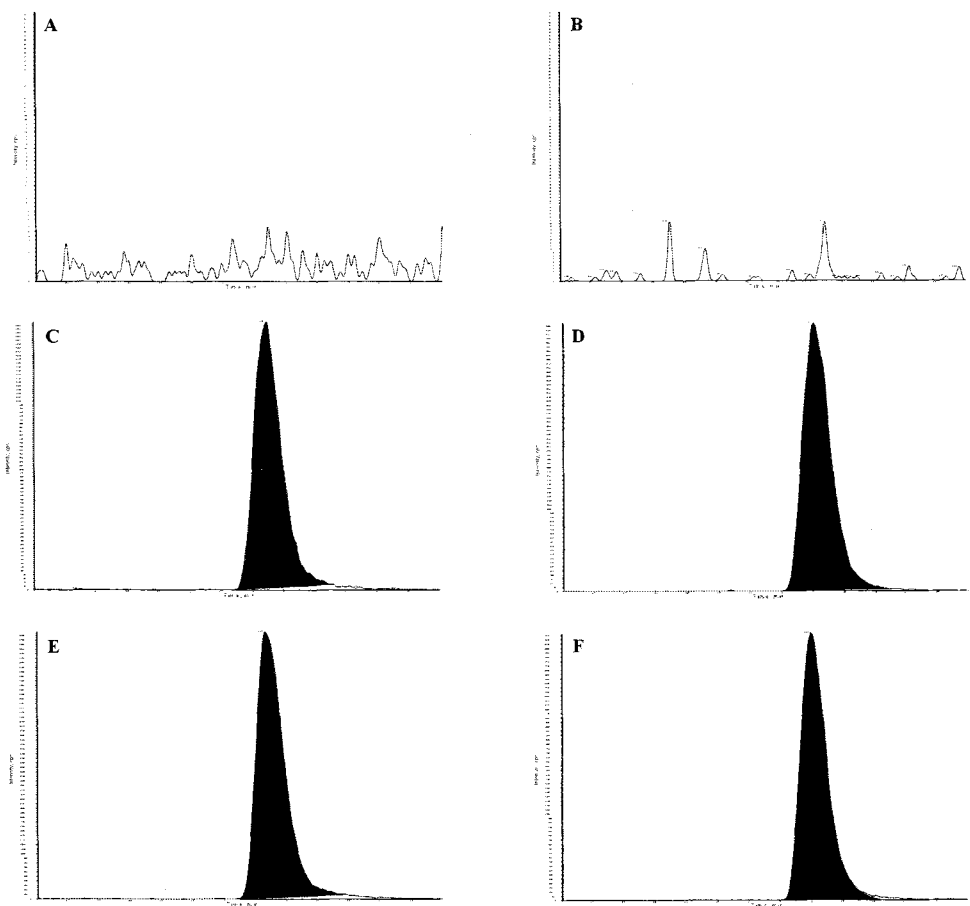


Figure 3. HPLC chromatogram of blank human plasma (A: gliclazide, B: glibenclamide), human plasma spiked with gliclazide (C, 1.0 µg/ml) and glibenclamide (D, 5.0 µg/ml), and plasma collected 3 hour after injection (E: gliclazide, F: glibenclamide)

Table 1. Intra-day and inter-day coefficient of variation and accuracy for determination of gliclazide in human plasma (n= 5)

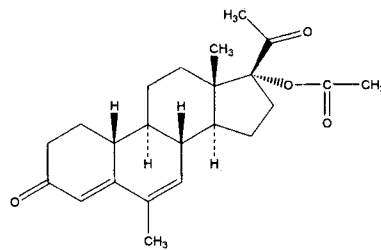
Theoretical concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Concentration found ($\mu\text{g/ml}$)	CV (%)	Accuracy (%)
Intra-day			
0.1	0.098 ± 0.005	5.0	98.0
0.2	0.206 ± 0.006	2.8	103.1
0.5	0.492 ± 0.012	2.4	98.3
1	0.993 ± 0.035	3.6	99.3
2	1.994 ± 0.056	2.8	99.7
5	4.990 ± 0.095	1.9	99.8
10	10.234 ± 0.238	2.3	102.3
Inter-day			
0.1	0.107 ± 0.003	3.2	106.6
0.2	0.206 ± 0.004	2.2	102.9
0.5	0.498 ± 0.010	2.1	99.6
1	1.030 ± 0.017	1.7	103.0
2	2.040 ± 0.040	2.0	102.0
5	5.104 ± 0.071	1.4	102.1
10	10.500 ± 0.235	2.2	105.3

- Medroxyprogesterone의 정량 -

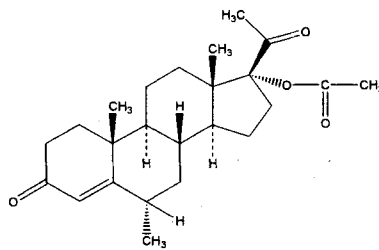
1. 서론

Medroxyprogesterone acetate (6a-methyl-17a-acetoxypregesterone; MPA)은 progesterone의 유도체로서 합성 스테로이드 호르몬제이다. MPA는 강력한 경구용 progestage으로 입증되었으며 경구용 피임제로서 그리고 dysfunctional uterine bleeding, secondary amenorrhoea, 및 endometriosis 치료제로서 사용되고 있다. MPA는 또한 자궁내막암과 유방암등 호르몬 유발성 암 치료 보조제로도 광범위하게 사용되고 있다.

본 연구에서는 혈장 내 subnano gram 수준의 MPA를 분석하기 위하여 HPLC/ion trap mass spectrometry를 이용한 분석방법을 개발하고자 하였다. 이 방법은 인체 혈장으로부터 MPA를 single liqid extraction 후 HPLC를 통과하고 selective reaction monitoring 방법을 이용하여 MPA를 검출하고자 한다.



Norgestrel MW 370.5



Medroxyprogesterone MW 386

Figure 1. Structure of medroxyprgesterone acetate and internal standard

2. 실험 방법

A. 주요기기 및 장치

- 분석기기 : Agilent 1100 series LC/MSD
- Column : Phenyl column (1.5 × 150 mm, 5 μ m, Shiseido)
- 이동상 : 20 mM Ammonium formate(pH 4.0)/acetonitrile 혼합액 (48/52,v/v)
- 유속 : 0.15 mL/min, isocratic

B. 분석기기 조건

전처리된 혈장시료는 다음의 LC/MSD 조건에서 정량하였다.

Peak 검출은 ion trap mass spectrometry를 이용하여 MS/MS SRM방법으로 검출하고, Ionization은 API-electrospray ionization을 하며, nebulizing gas로는 nitrogen gas를 8 L/min의 속도로 nebulizing 하며, 온도는 350°C, 그리고 nebulizing pressure는 35 psi로 설정하였다.

Medroxyprogesterone acetate는 1차 MS에서 molecular ion m/z 387을 isolation하고 fragment energy를 1.2 V로, helium gas를 이용하여 fragmentation한 후 생성되는 product ion m/z 327과 285를 monitoring 하였다. Internal standard (Nomegestrol acetate)는 1차 MS에서 molecular ion m/z 371을 isolation하고, fragment energy를 1.2 V로 helium gas를 이용하여 fragmentation한 후 생성되는 product ion m/z 311과 293을 monitoring 하였다.

C. 검량선 작성

Medroxyprogesterone acetate와 internal standard인 nomegestrol acetate 각각 10 mg을 정확히 칭량하여 10 mL의 MeOH에 녹여 1 mg/mL의 농도를 만들고, 10배 serial dilution으로 100, 10, 1, 0.1 그리고 0.01 μ g/mL의 working standard 용액을 조제하였다. 표준 검량선을 작성하기 위하여 human blank 혈장 1.0 mL에 medroxyprogesterone acetate가 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 그리고 6 ng/mL의 농도가 되도록 첨가하고 각각에 internal standard 5 ng (10 μ L of 0.5 μ g/mL) 씩을 첨가한 후, 다음의 검체 전처리법과 LC/MSD를 이용한 분석조건에 따라 분석하였다. 검량선은 내부표준물질의 피크면적에 대한 MPA의 피크면적비로 MPA의 농도에 대하여 작성하였다.

D. 혈장 시료의 처리 및 혈 중 농도 계산

피험자로부터 각 시간대별로 채취하여 -20°C에 보관했던 혈장시료를 실온에 방치하여 녹인 다음, 검체 1.0 mL (혈장)에 내부표준물질 5 ng (10 μ L of 0.5 μ g/mL) 씩을 첨가한 후, 증류수 1.0 mL을

첨가하고 2 mL의 pentane으로 2회 추출하였다. 유기층을 취하여 질소기류 하에서 용매를 날려 건조시킨 다음, 50 μ L의 이동상에 녹여 그 중 20 μ L를 HPLC에 주입하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 MPA의 피크면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 MPA의 농도를 구하였다.

3. 시험결과

A. 분석조건의 검증

혈장 중 초산 medroxyprogesterone을 분석하기 위하여 electrospray ionization과 Ion-trap LC/MS/MS를 이용하여 분석하였다.

초산 medroxyprogesterone은 분자량이 386으로 positive ion mode에서 molecular ion m/z 387이 검출되었으며, MS/MS product ion spectrum에서는 acetate group이 떨어진 m/z 327이 주요 fragment ion으로 검출되었으며, 여기에서 물이 빠진 m/z 309, 그리고 -COCH₃ group이 떨어진 m/z 285의 fragment ion이 검출되었다 (Fig. 2).

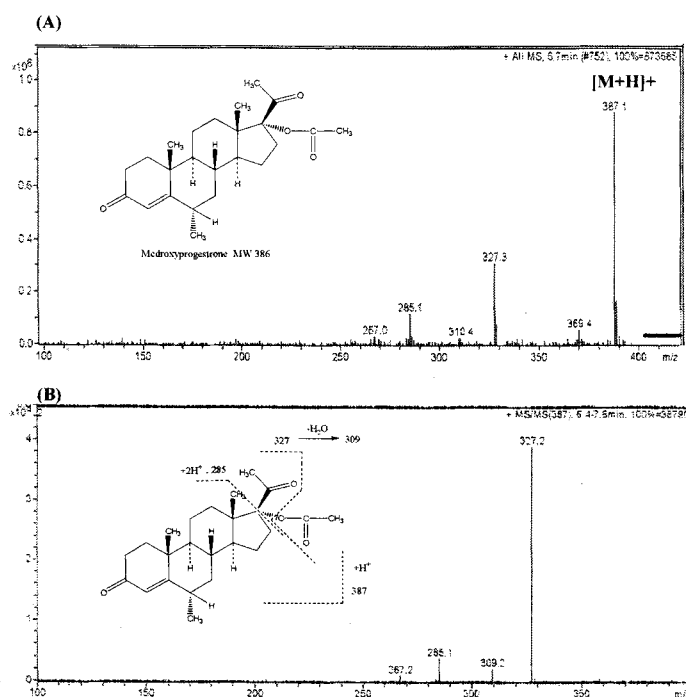


Figure 2. Positive ion mass spectrum (A) and product ion mass spectrum (B) of medroxyprogesterone acetate

Internal standard로 사용한 norgestrol acetate의 경우 분자량 370으로 positive ion mode에서 molecular ion이 m/z 371에서 검출되었으며, MS/MS product ion spectrum에서는 acetate group이 떨어진 m/z 311이 major fragment ion으로, 그리고 여기에서 물이 빠진 m/z 293, 그리고 -COCH₃이

빠진 m/z 269의 fragment ion이 검출되었다 (Fig. 3).

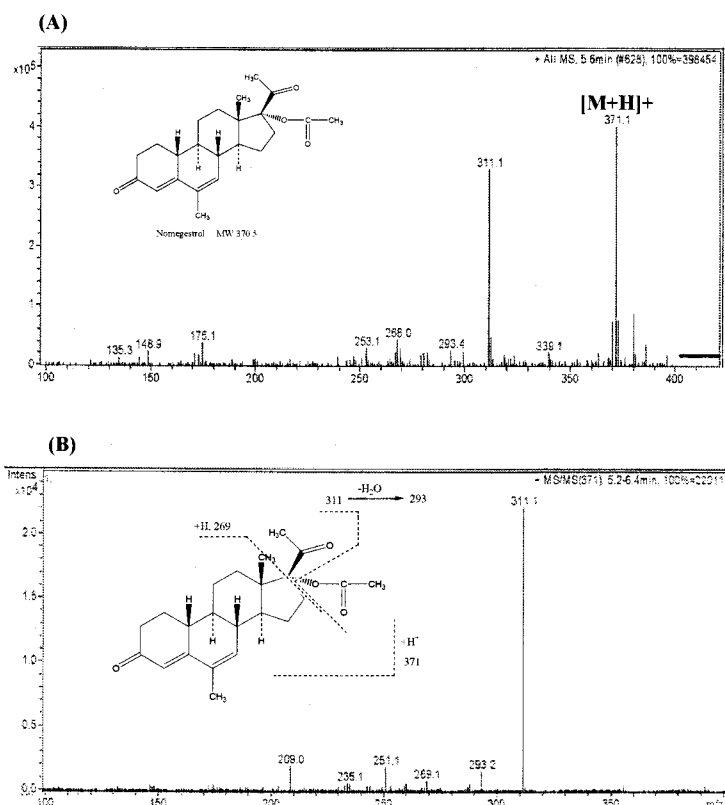


Figure 3. Positive ion mass spectrum (A) and product ion mass spectrum (B) of nomegestrol acetate

따라서 peak 검출은 MS/MS product ion monitoring으로, 초산 medroxyprogesterone의 molecular ion m/z 387을 isolation한 후 product ion m/z 327과 285를, 그리고 internal standard는 molecular ion m/z 371을 isolation하고 product ion m/z 311과 293을 monitoring하였다.

Phenyl column을 이용하여 분석한 HPLC 조건에서의 internal standard와 초산 medroxyprogesterone은 각각의 머무름시간 5.6분과 6.7분 부근에서 검출되었고, 위에서 기술한 검출조건에서 타 물질에 의한 방해 peak는 전혀 나타나지 않았으며 우수한 selectivity를 나타내었다 (Fig. 4).

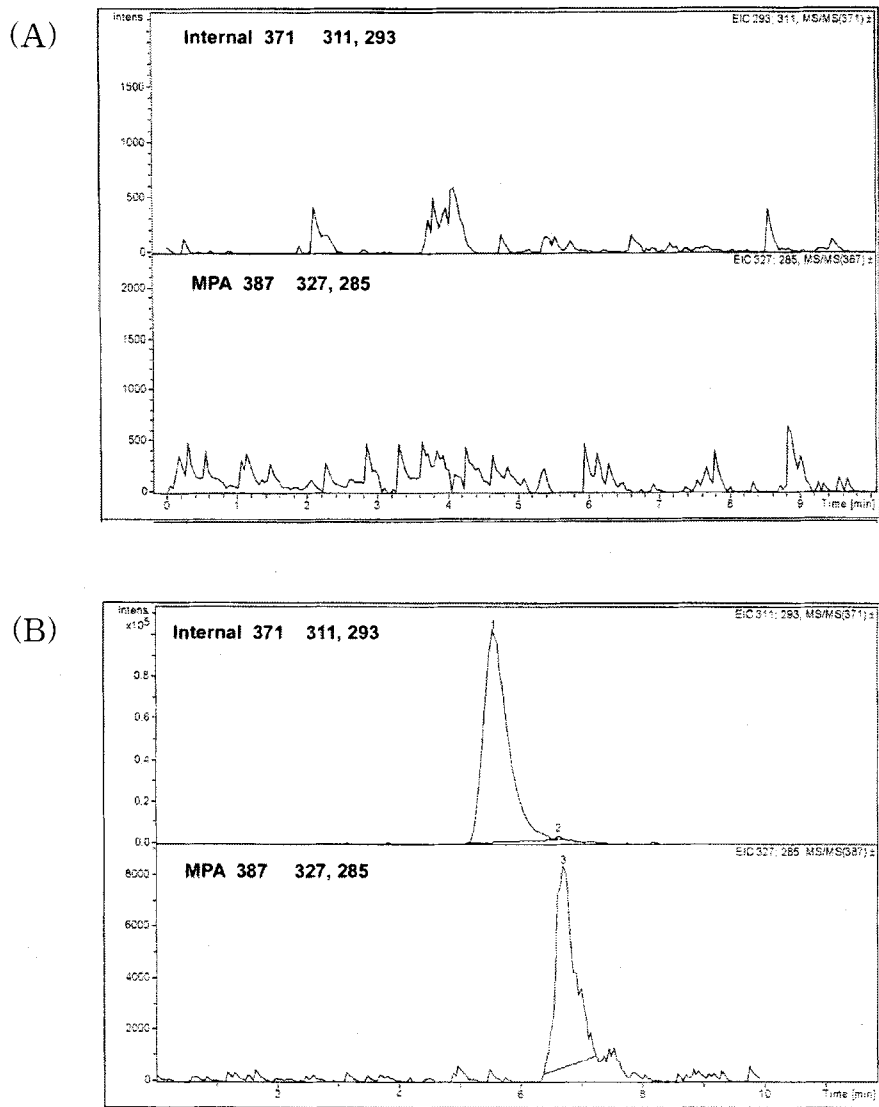


Figure 4. Extracted ion chromatogram of an extract of blank human plasma (A) and human plasma spiked with 0.2 ng/mL medroxyprogesterone acetate (B).

초산 medroxyprogesterone을 0.05 ng/mL에서 6.0 ng/mL까지 spike한 후 분석하여 표준검량선을 작성한 결과 (Peak ratio) = 0.26329 (concentration) + 0.00151의 직선성으로 표시되었으며, linear regression 시 $r^2=0.9999$ 로서 우수한 직선성을 나타내었다(Fig. 5). 본 검량선은 3회 시험을 실시하여 평균값에 의해 작성하였다.

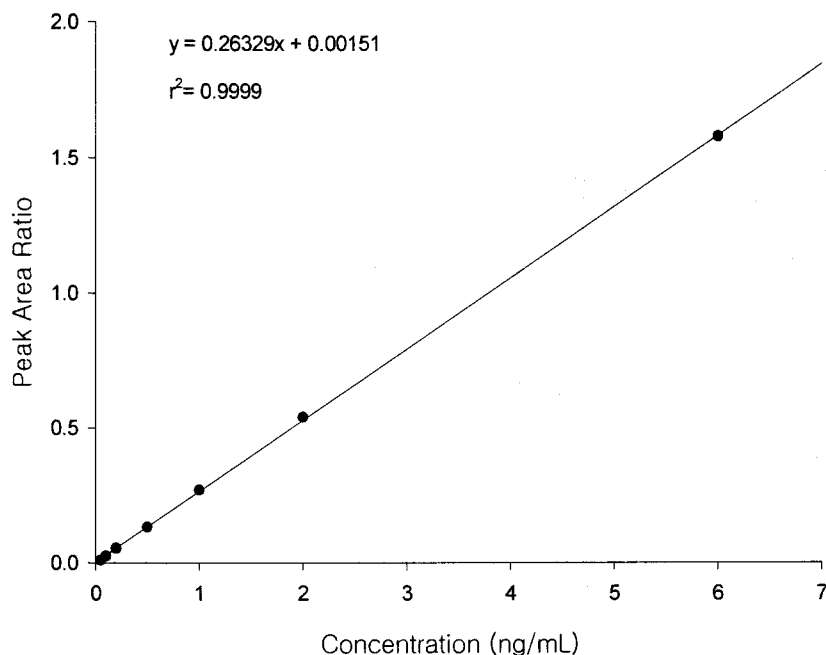


Figure 5. Calibration curve of medroxyprogesterone acetate in human plasma

본 분석방법의 정밀성, 정확성, 그리고 정량한계를 설정하기 위하여 inter-day, intra-day variation을 검증하였다. 초산 메드록시프로게스테론을 0.05, 0.2, 1.0, 그리고 6.0 ng/mL의 농도로 시료를 제조하여 validation 결과를 Table 3에 나타내었다.

Intra-day variation의 경우 coefficient of variation은 모든 농도에서 10%이하였으며 정확도는 0.05 ng/mL에서 6.0 ng/mL 모든 농도에서 이론적인 값에 비하여 95.3%에서 101.3%로 계산되었다. Inter-day variation의 경우 coefficient of variation은 26.10%에서 8.58%이었으며, 정확도는 95.6%에서 100.1%로 계산되었다. 따라서 본 시험의 분석 농도범위가 pg 수준임을 감안시 정량한계는 0.05 ng/mL로 설정할 수 있었다. 혈장중 초산메드록시프로게스테론에 대한 본 LC/MSD 분석법은 0.05 ng/mL에서 6.0 ng/mL 범위에서 인체에 대한 생체이용률 시험에 이용될 수 있는 충분한 감도, 특이성, 직선성, 정확성 및 정밀성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Intra-day and inter-day coefficient of variation and accuracy for determination of medroxyprogesterone acetate in human plasma (n=3)

Theoretical concentration (ng/mL)	Intra-day			Inter-day		
	concentration found (ng/mL)	CV %	accuracy %	concentration found (ng/mL)	CV %	accuracy %
0.05	0.048±0.003	7.08	95.3	0.050±0.013	26.10	100.1
0.2	0.192±0.014	7.27	95.9	0.196±0.037	19.06	98.0
1.0	1.013±0.075	7.39	101.3	0.968±0.138	14.22	96.8
6.0	6.062±0.113	1.87	101.0	5.736±0.492	8.58	95.6

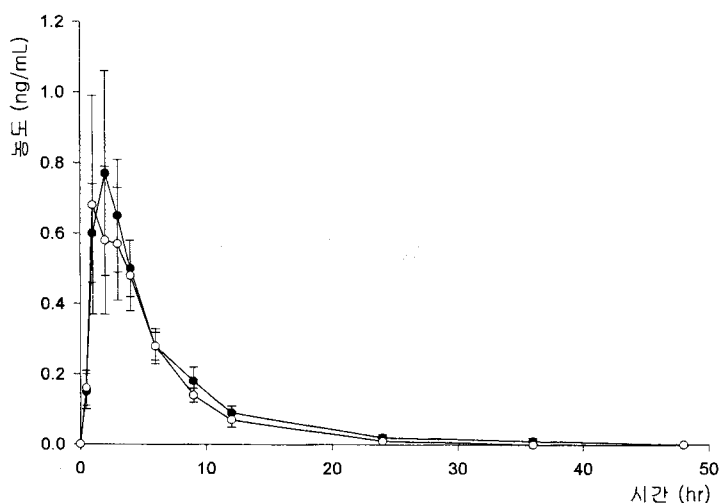


Figure 6. 1군 (A) 및 2군 (B) 혈장 중 초산메드록시프로게스테론의 평균 농도 추이 (Mean±S.E., n=9)

-●- 대조약 (프로베라정 5 mg, 파마시아&업존(주))

-○- 시험약 (메노포제정 5 mg, 삼일제약(주))

MPA 5 mg을 건강한 성인에게 투여 후 혈장내 MPA를 상기에 기술된 방법으로 분석한 결과는 Fig 6에 나타내었다. MPA는 투여 3시간에 최고 혈중 농도 0.73 ± 0.78 ng/ml을 보여 주었으며 반감기는 4.94 hr로 계산되었다. AUC는 5.07 ng.hr/ml, Cl/F는 946 L/hr, 그리고 MRC (mid retention time)은 6.10hr로 계산되었다.

제 3 절 Gas chromatography-mass spectrometry를 이용한 분석 방법의 개발

- Tizanidine의 분석 -

1. 서론

Tizanidine (5-chloro-4-(2-imidazolin-2-ylamino)-2,1,3-benzothiadiazole) 은 중추신경계에 작용하는 근이완제로서 임상에서 최소한 baclofen이나 diazepam과 동등한 효과를 보여주는 약무를 보고되어 있다. Tizanidine은 경구 생체 이용율이 낮으며 간에서 ring hydroxylation 반응 등의 대사가 신속히 일어난다고 알려져 있다 따라서 혈 중 tizanidine 농도는 수 ng/ml도이며 생체 내 pharmacokinetics 실험 등을 위하여서는 감도가 높은 분석방법의 개발이 요구되고 있다. Gas chromatography/mass spectrometry를 이용한 분석방법은 여러 가지 분석방법 중에서도 특유의 resolving power와 높은 감도를 가지고 있어 volatile 화합물뿐만이 아니라 생체 시료에서의 약물 분석 등에 광범위하게 사용되고 있다. 특히 mass selective detector에서 selective ion monitoring (SIM) 이용한 분석 방법은 분석 화합물 자체가 volatile 하여야하고 ionization이 잘 되어야한다는 제한점이 있기는 하지만 높은 분석 감도와 뛰어난 selectivity로 인하여 생체 시료 내에서 미량성분 분석에 유용하게 이용되고 있다. 본 연구에서는 HPLC로서는 미량분석이 불가능한 tizanidine을 GC/MSD 방법을 이용한 분석법을 개발 하고자 하였다.

2. 실험 방법

A. 시료 전처리 및 유도체화

Human plasma 1 ml을 1.0M sodium carbonate 용액으로 pH를 10.5로 조정하였다. 여기에 2 ml의 ethylacetate를 첨가하고 vortex과정을 거친 후 유기층을 취하였다. 동일한 과정을 2회 반복하여 유기층을 pool한 다음 magnesium sulfate를 넣어 수분을 제거하고 nitrogen 가스 하에서 건조시켰다. 유도체화 반응은 MSTFA (20 ul)를 dried residue에 첨가하고 70°C에서 2시간 반응시켜 반응을 진행하였으며, 그 중 2 ul를 GC/MS system에 주입하였다.

B. Gas-chromatography-mass spectrometry

Hewlett-Packard Model 5890 series II gas chromatography와 HP5972 mass spectrometer를 이용하였다. 시료 2 ul를 Ultra-1 capillary column (17 m x 0.20 mm id, 0.33 um film thickness)에 10:1 split mode로 주입하였으며 injector port 온도는 280°C를 유지하였다. Oven temperature는 210°C에서 1분간

머무르고 분당 30CT/r 230oC까지 증가시켰으며, 이후에는 분당 15oC씩 300oC까지 증가시켰다. Transfer line의 온도는 290oC를 유지하였다. Tizanidine과 internal standard의 SIM monitoring은 150 ms dwell time에서 m/z 397, 362, 그리고 214 (tizanidine) 그리고 m/z 367, 332, 184 (internal standard)를 선택하여 monitoring 하였다.

3. 결과 및 고찰

Tizanidine은 cyclic guanidien moiety에 2개의 active hydrogen을 가지고 있다. 이러한 active hydrogen과 tautomerization에 의하여 chromatographic separation이 좋지 않고 resolution 또한 낮았다. 따라서 chromatographic 성질을 개선하기 위하여 tizanidine을 유도체화하여 안정화하는 시도를 하였다. MTBSTFA와의 반응은 tert-butyldimethylsilyl group가 tizanidine의 경우 너무 커서 반응이 완전히 진행되지 못하였으며, BSTFA와의 반응은 반응시간에 관계없이 mono-TMS와 di-TMS 유도체가 혼합되어 생성되어 정량에 사용하기에 적절하지 않았다. 이에 반하여 MSTFA의 경우에는 70℃에서 2시간 반응 후 반응이 완전히 진행되었으며 반응산물도 di-TMS 유도체만 생성되어 chromatography에서 단일 peak로 나타나 정량에 사용하기에 적절하였다. 상기 반응 조건에서 2개의 TMS는 imidazole ring에 도입되는 것으로 mass spectroscopy와 NMR을 이용하여 확인하였다. 유도체화 반응 중 internal standard인 N-acetyltizanidine이 tizanidine으로 변환되는 반응은 일어나지 않았다. Tizanidine과 N-acetyl tiznidine의 TMS 유도체 mass spectrum은 Figure 2에 나타내었다. 모든 spectra에서 TMS 유도체는 $[M]^+$, $[M-15]^+$, $[M-35]^+$ 그리고 $[M-184]^+$ 의 특징적인 fragment pattern을 보여주었다. 혈장의 background를 고려하여 tizanidene은 m/z 397,362, 그리고 214를 내부표준물질인 N-acetyltizanidine은 m/z 367, 332, 그리고 184 ion을 선택하여 monitoring하였다. 유도체화 후 생성되는 di-TMS는 ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 결과는 table 1에 나타내었으며, 3.44-3.67 ppm의 multiplet (¹H-NMR)은 2개의 imidazole의 methylene group으로 assign되었다. ¹³C-NMR에서 0.09 ppm은 2개의 TMS group이고, 46.58 ppm은 imidazole group의 C-4',5'으로 assign 하였다. 이러한 결과는 di-TMS tizanidine의 구조는 aminotautomer 4번이 아닌 imino tautomer 3번의 구조를 갖는다는 것을 시사한다. TMS는 imidazole ring의 2개 nitrogen을 protection 하여 결과적으로 tautomerization을 저해하여 구조를 안정화 시킨다고 할수 있다. 혈장으로부터 tizanidine을 추출하기 위하여 여러 가지 유기용매를 사용하여 보았으며, 염기조건에서 ethylacetate로 추출시 tizanidine의 농도에 상관없이 높은 회수율 (>95%)을 보여주었다. 따라서 본 시험에서는 ethyleacetate로 추출하는 방법을 사용하였다. 본 분석방법의 선택성과 특이성은 4개의 서로 다른 human plasma를 이용하여 비교분석함으로써 확인하였다. drug-free plasma에서는 tizanidine과 내부표준물질 부근에 어떠한 방해 피크도 보여주지 않았다.

본 분석방법을 이용하여 0.5 ng/ml 농도에서부터 10.0 ng/ml 농도까지 표준 검량곡선을 작성하여 보았

으며 상관계수 0.999의 우수한 직선성을 보여주었으며, Intra-day variation과 inter-day variation은 table 2 에 나타내었다. RSD는 1.5에서 6.9%사이로, 그리고 정확도는 99.2%에서 110.3%로 본 방법을 이용하여 혈장내 tizanidine을 분석하기에는 합리적이라 사료된다.

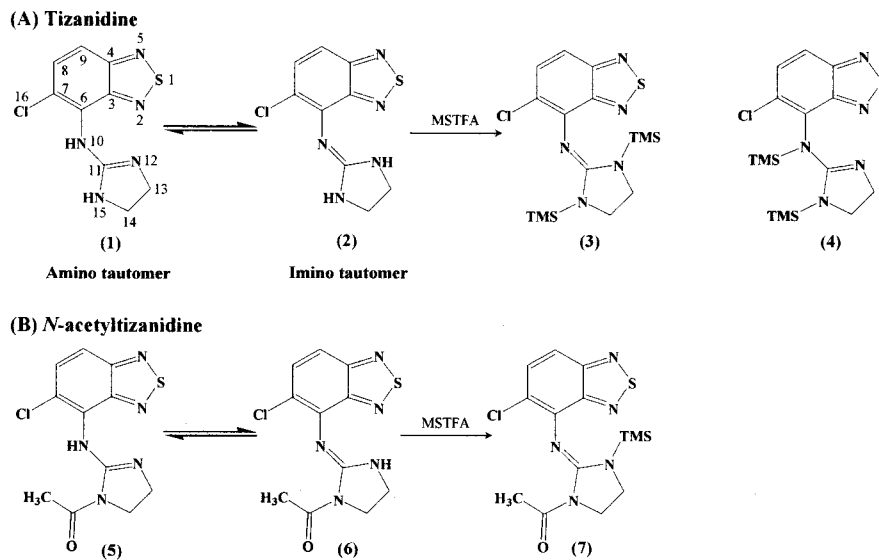


Figure 1. Structures of (A) tizanidine and 12,15-di-TMS-tizanidine and (B) *N*-acetyltizanidine and its TMS derivatives.

Table 1 ¹H-NMR and ¹³C-NMR data of *di*-TMS-tizanidine

Position	Chemical shift (ppm,)	
	¹ H-NMR	¹³ C-NMR
4		120.73
5		155.62
6	7.52 (d, <i>J</i> = 9.16 Hz, 1H)	133.38
7	7.26 (d, <i>J</i> = 9.15 Hz, 1H)	109.63
8		151.56
9		164.18
2		141.64
4, 5	3.44 3.67 (m, 4H)	46.58
1N-Si(CH ₃) ₃	0.003 (s, 18H)	0.09
3N-Si(CH ₃) ₃		

Solvent: CDCl₃; s=singlet, d=doublet, m=multiplet

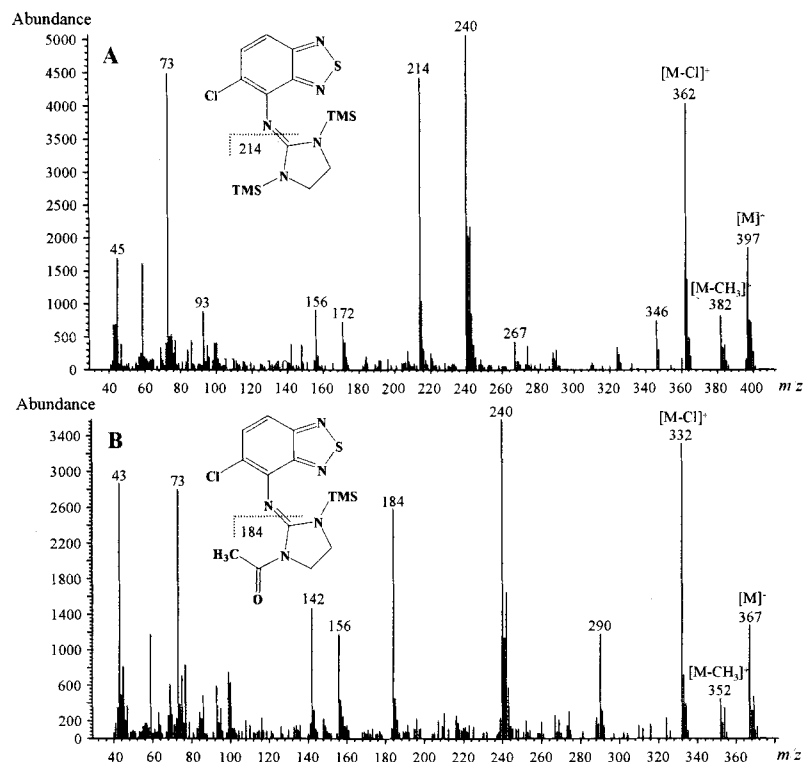


Figure 2. Scan spectra of (A) 12,15-di-TMS-tizanidine and (B) 12-TMS-15-acetyltizanidine.

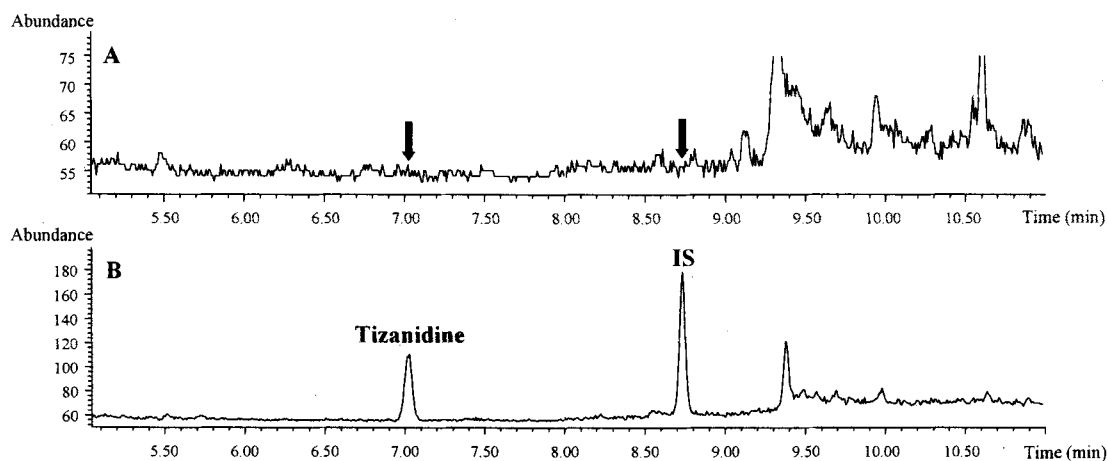


Figure 3. Selected ion chromatograms of (A) blank human plasma and (B) plasma spiked with internal standard (10 ng/ml) and tizanidine (5 ng/ml). separated on Ultra-1 (17 m × 0.20 mm I.D., 0.25 m film thickness) column system. The oven temperature was held at 210°C for 1 min and programmed to 230°C at a rate of 3°C/min, then to 300°C at a rate of 15°C/min.

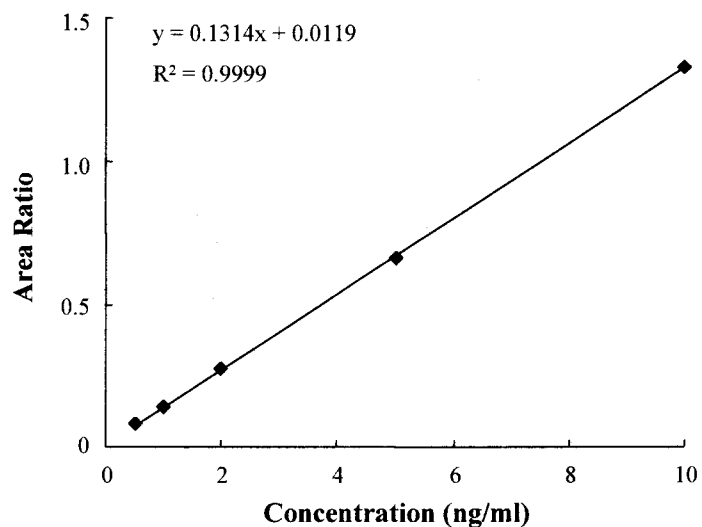


Figure 4. Calibration curve for GC-SIM-MS quantitation of tizanidine in human plasma. Each standard was prepared in triplicate and injected.

Table 2 Intra-day and inter-day coefficient of variation and accuracy for determination of tizanidine in human plasma (n = 5)

Theoretical concentration (ng/ml)	Intra-day			Inter-day		
	Concentration found (ng/ml)	% RSD	Accuracy (%)	Concentration found (ng/ml)	% RSD	Accuracy (%)
0.5	0.552±0.03	5.1	110.5	0.551±0.02	3.7	110.3
2.0	1.984±0.14	6.9	99.2	2.126±0.03	1.5	106.3
10.0	10.012±0.28	2.8	100.1	10.309±0.19	1.9	103.1

여 백

제 5 장 약물 상호 작용 평가를 위한 Human P450 효소 발현 및
in vitro inhibition 평가 방법의 개발

제 1 절 P450 발현 및 inhibition 연구

1. 서론

Cytochrome P450 효소는 간, 신장, 부신, 중추신경 등 폭넓은 장기에 존재하며 이들 세포내의 미토콘드리아에 존재하여 약물이나 독물을 해독, 대사하고 콜레스테롤 및 스테로이드 호르몬의 생합성에 관여한다. 특히 P450 효소는 약물대사의 중추적인 역할을 하며 인체 내로 유입되는 화합물의 약 95%정도가 cytochrome P450 효소에 의해 대사된다고 알려져 있다. 따라서 약물의 인체 내 대사 및 대사과정에서 일어나는 약물 상호간 작용을 규명하기 위하여서는 *in vitro* enzyme kinetics 연구와 어떤 P450 효소가 대사에 관여하는지를 동정하는 것이 필요하다고 할 수 있다. Human P450에 의한 약물의 대사 연구와 대사관련 P450 isozyme을 characterization하기 위하여서는 다량의 P450 protein이 필요하다. 그러나 human 조직의 획득이 난이한 관계로 본 과제에서는 bacteria에 human P450 gene을 발현시켜 recombinant protein을 얻어 대사연구에 이용하고자 하였다. 즉 human P450s gene이 cloning되어있는 pCW vector를 얻어 E. coli에서 expression시켰으며 column을 이용하여 정제하였다. Human P450중 CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6, 그리고 CYP2E1을 expression시켰으며, cell membrane을 sodium cholate를 이용하여 solubilization하였고 이를 DEAE sepharose column에서 flow recovery fraction을 CM sepharose fast flow column, hydroxyapatite column을 이용하여 각각 isozyme을 약 100-200 nmol 정제하였다. 이렇게 정제된 P450효소를 phospholipid와 reconstitution하여 대사시험에 사용하였다.

위와 같이 P450을 정제한 후 모델 약물로 flavonoid를 이용하여 P450 inhibition 영향을 알아보고, 간 기능 개선제인 DDB의 대사에 대한 CYP3A4 관련성을 규명하였다.

2. 실험 재료 및 방법

가. Human cytochrome P450을 포함하는 plasmid의 E.coli에서의 발현

Human P450 isozyme 의 cDNA를 포함하는 pCW vector(pCW/1A1, pCW/1A2, pCW/2E1, pCW/3A4, pCW/2C9, pCW 2D6)는 Dr. Dong으로부터 얻었다. 이 vector를 E. coli DH5a competent cell에 transformation시켰다. 형질 전환된 E.coli cell은 LB/amp agar plate에서 선택적으로 발현한 colony를 취하여 LB/amp media에 subculture (37°C shaking incubator, overnight culture) 하였다. Subculture된 media를 1:100으로 modified TB media (Table 1)에 희석하여 1mM IPTG를 동시에 처리하여 30°C , shaking incubator에서 약 30시간을 배양하였다.

나. Membrane fraction 만들기

배양된 배양액을 회수하여 4°C 5000 xg에서 10분간 원심 분리하여 cell pellet을 취한다. Cell pellet

의 무게를 측정하여 cell pellet 1g당 15 ml 의 500 mM sucrose와 0.5 mM EDTA를 포함하는 0.1 mM Tris-acetate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 resuspend시켰다. Lysozyme은 cell g당 300 ug이 되도록 첨가하여 천천히 흔들며 주면서 섞어주었고 이렇게 cell을 포함하는 현탁액을 미리 준비해둔 4°C distilled water를 첨가하여 얼음에 박아 현탁액 전체가 얼음에 둘러지도록 하여 30분간 그대로 둔다. 4에서 10,000 xg로 원심분리하여 얻은 spheroplast를 6 mM magnesium acetate, 20% glycerol, 0.1 mM DTT가 포함된 100 mM potassium phosphate buffer(pH 7.6)에서 resuspend한 후 -70°C에서 보관하였다. 준비된 spheroplast에 protease inhibitor인 1 mM PMSF, 2 uM Leupeptin, 0.04U/ml aprotinin, 1 uM bestatin을 첨가하여 차갑게 유지하면서 sonication 한 후 4°C에서 10,000 xg로 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 4°C에서 100,000 xg에서 90분간 초원심분리하여 membrane fraction을 얻어 250 mM sucrose와 0.25 mM EDTA가 포함된 50 mM Tris-acetate (pH 7.6)에서 homogenization한 후 적당량을 분주하여 -70°C에서 보관하였다.

다. P450 Assay

획득된 recombinant P450의 membrane fraction내의 P450 enzyme을 Omuro와 Sato의 방법으로 측정하였다. 1 mM EDTA, 20% glycerol, 0.5% sodium cholate, 0.4% Emulgen 913을 첨가하는 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 5 mM α -naphthoflavone을 L당 6 ml을 첨가하여 만든 P450 assay buffer를 이용했다. P450 assay buffer에 membrane fraction을 30배로 희석한 후 UV 400에서 500 사이에서 scanning하여 baseline을 잡는다. 여기에 sodium dithionate를 적당량 첨가해 충분히 섞은 후 다시 scanning한다 (Figure 1). 450에서의 높은 peak와 490에서의 낮은 peak를 이용해 계산하여 P450량을 측정하였다.

Table 1. Chemical composition of modified TB media

Components	Composition	Volume
TB	24g yeast extract	per 1L
	12g bactotryptone	
	2g bactopectone	
	4ml glycerol	
100mg/L Ampicilline	100mg/ml	1ml
1mM Tahiamine	1M	1ml
Potassium phosphate	23.1g KH ₂ PO ₄	100ml
	125.4g K ₂ HPO ₄ per 1 L	
0.5mM δ-ALA (ammonium levulunic acid)	0.5M	1ml
50 uM FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.2M	0.25ml
1mM MgCl ₂ · 6H ₂ O	1M	1ml
2.5mM (NH ₄) ₂ SO ₄	2.5M	1ml
Trace element	2.7g FeCl ₃ · 6H ₂ O	0.25ml
	0.2g ZnCl ₂ · 4H ₂ O	
	0.2g CoCl ₂ · 6H ₂ O	
	0.2g Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	
	0.1g CaCl ₂ · 2H ₂ O	
	0.1g CuCl ₂	
	0.05g H ₃ BO ₃	
10ml coc.HCl/100ml DW		

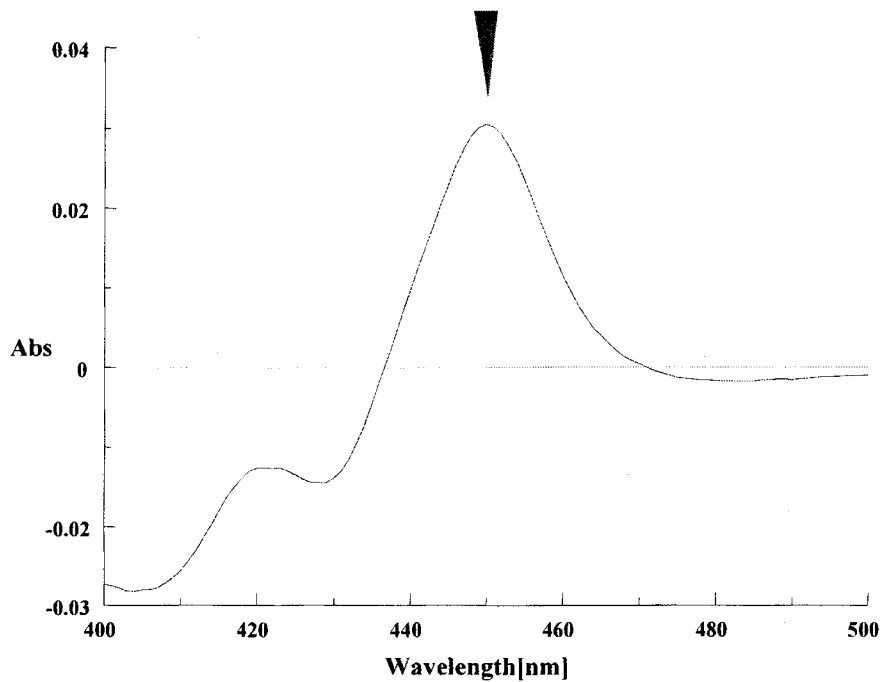


Figure 1. Difference spectrum of Cytochrome P450 expressed in *E. coli*

라. P450을 이용한 enzyme assay

각각의 isozyme이 발현된 membrane fraction을 이용하여 실험을 하였고, flavonoid compound 13가지를 이용해 억제 실험을 하였다. 모두 1 μM 의 flavonoid를 각각의 기질을 첨가하기 전 preincubation time에 첨가하였다.

(1) Testosterone 6 hydroxylation assay

50 pmole P450 membrane fraction, 10 mM glucose 6-phosphate, 0.65 mM $\beta\text{-NADP}^+$, 1U/ml glucose 6-phosphate dehydrogenase, 0.3 mM testosterone을 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 첨가하여 만든 반응액 (0.5 ml)을 37°C shaking water bath에서 30분간 반응시켰다. CH_2Cl_2 1ml을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 반응이 정지된 반응액을 원심분리한 후 0.8 ml을 취하여 질소가스를 이용하여 날린 후 methanol 100ul에 녹여서 10 ul를 취하여 HPLC로 분석하였다. 60% methanol을 1 ml/min의 유속으로 흘려주면서 254 mM에서 peak를 검출하였다. Column은 YMC pack C18 (4.6 x 150 mM, 5um)을 사용하였다. 생성된 hydroxy testosterone은 peak area로 작성한 calibration curve로부터 정량하였다.

(2) Dextromethorphan O-Demethylation (CYP2D6)

20 pmole P450 membrane fraction, 10 mM glucose 6-phosphate, 0.65 mM β -NADP⁺, 1U/ml glucose 6-phosphate dehydrogenase, 250 mM dextromethorphan을 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 첨가하여 만든 반응액 (0.2 ml)을 37°C shaking water bath에서 30분간 반응시켰다. 50 ul acetonitrile을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 반응이 정지된 반응액을 원심분리한 후 200 ul를 취하여 20 ul를 취하여 HPLC로 분석하였다.

20% acetonitrile을 포함하는 10 mM NH₄H₂PO₄를 1 ml/min의 유속으로 흘려주면서 excitation 290 nm, emission 320 nm에서 형광 측정하였다. Column은 shiseido capcellpak C18 (4.5 x 250 mm, 5um)을 사용하였다. 생성된 dextrophan은 peak area로 작성한 calibration curve로부터 정량하였다.

(3) Diclofenac 4-hydroxylation (CYP2C9)

50 pmole P450 membrane fraction, 10 mM glucose 6-phosphate, 0.65 mM β -NADP⁺, 1U/ml glucose 6-phosphate dehydrogenase, 0.3 mM testosterone을 100 mM Tri-HCl (pH 7.4)에 첨가하여 만든 반응액 (0.5 ml)을 37°C shaking water bath에서 1시간 반응시켰다. 50ul의 6% glacial acetic acid를 포함하는 acetonitrile을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 반응이 정지된 반응액을 30초간 vortexing하였다. 원심분리한 후 30 ul를 취하여 HPLC로 분석하였다. Column은 shiseido capcellpak C18 (4.5 x 250 mm, 5um)을 사용하였다. 생성된 hydroxy diclofenac은 peak area로 작성한 calibration curve로부터 정량하였다. 분석에 이용된 이동상의 조성파 시간당 조건은 다음과 같다.

Solvent A: 30% ACN-70% Water in 0.187ml/L 60% perchloric acid

Solvent B: Metanol

Time	Solvent A	Solvent B
0	70	30
15	0	100
16	0	100
20	70	30
25	70	30

(4) Ethoxyresorufin O-deethylation (CYP1A)

50 pmole P450 membrane fraction, 10 mM glucose 6-phosphate, 0.65 mM β -NADP⁺, 1U/ml

glucose 6-phosphate dehydrogenase, 2.5 uM ethoxyresorufin, 1 mg/ml BSA를 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 첨가하여 만든 반응액 (0.5 ml)을 37°C shaking water bath에서 15분간 반응시켰다. 2 ml의 HPLC grade methanol을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 반응이 정지된 반응액을 20초간 vortexing하였다. 원심분리한 후 2 ml을 취하여 형광 측정계를 이용하여 excitation 550 nm, emission 585 nm에서 형광도를 측정하였다. 생성된 resorufin은 각각의 형광도를 이용해 측정된 calibration curve를 이용해 정량하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

가. Recombinant Human Cytochrome P450 발현

분자 생물학적인 기술의 발전으로 human liver P450 단백질과 유전자를 분리하게 되었고 그 특성에 대한 정보를 얻게 되었으며 특히 recombinant DNA technique에 의해 보관이나 metabolic capacity에서 안정성을 갖춘 human P450 enzyme의 다량 제조가 가능하게 됨으로써 in vitro 약물 대사 연구가 더욱 용이하게 되었다.

본 연구에서는 약물 대사 연구를 지원할 수 있는 기반을 확립하기 위하여 P450 family의 대표적인 isozyme인 CYP1A1, CYP1A2, CYP3A4, CYP2D6, CYP2C9, CYP2E1을 선택하여 E. coli에서 발현시켰다. 실험방법에서 나타난 바와 같은 방법으로 발현시켰고 이 방법으로 얻은 recombinant P450량은 각각 1L 당 88.4 nmol, 67.5 nmol, 258.4 nmol, 68.1 nmol, 46.6 nmol, 51 nmole이었다. P450의 발현은 CYP3A4가 가장 발현이 잘 되었다. P450의 발현정도가 다른 것은 P450 enzyme의 N-terminal sequence의 영향으로 추정되고 있는데 이 N-terminal 부분이 cell membrane에 binding 되는 것과 관계가 있기 때문으로 사료된다.

나. Flavonoid를 이용한 P450 대사 inhibition 영향

500시리즈의 약물은 각각의 구조가 다른 13가지의 flavonoid로 구성되어 있다. 이들이 P450 isozyme의 대사능력에 미치는 영향을 살펴보기 위해 다음과 같은 실험을 수행하였다.

(1) CYP3A4에 대한 영향

준비한 13가지의 flavonoid compounds를 이용하여 inhibition 실험을 하였다. 각각은 200 uM stock으로 DMSO에 녹여 준비했고, 대사 실험용 반응액의 전체 1% 이하의 DMSO를 이용하였다. 대사 억제 실험 시 첨가되는 inhibitor는 원하는 반응에 대한 기질을 첨가하기 전 넣고 미리 5분간 incubation하였다. Testosterone은 CYP3A4에 특이적인 대사를 확인하는 표준물질이다. 대사 억제 실험을 수행한 결과

시료 번호 50092와 50097를 1 uM 처리하였을 때 다른 11가지에 비해 효과적인 억제 작용을 관찰할 수 있었다.

(2) CYP2C9 대사 억제 실험

Diclofenac을 기질로 하는 대사 실험을 수행하였다. 1 uM의 500series를 처리하여 표준 반응액의 대사를 100%로 하였을 때의 상대적인 % 값을 구하여 억제 정도를 살폈다. 시료 번호 50092가 79%이상의 억제를 함으로 가장 효과적인 것으로 나타났다.

(3) 500series의 CYP1A1 대사 억제

Ethoxyresorufin을 demethylation시키는 반응으로 CYP1A1의 대사 능을 보았고, 500시리즈를 1 uM 처리하여 저하되는 대사능을 관찰한 결과 figure 4에서 나타낸 바와 같이 시료 번호 50173이 30%이상의 억제 효과를 나타냈다.

(4) CYP2D6 에 대한 억제 효과

Dextromethorphan이 CYP2D6에 의해 dextrophan으로 대사되는 대사능을 살펴보았다. 실험 결과 50174가 54%정도의 억제 효과를 보였다. 500시리즈의 약물을 이용해 재조합 발현된 P450 효소의 반응을 기본적으로 살펴보고, 이들이 각각의 isozyme에 미치는 억제 영향을 살핀 결과 50173의 경우 CYP1A1에, 50172의 경우 CYP2C9과 CYP2D6에, CYP3A4의 경우 50092와 50096에 의해 가장 강하게 대사가 억제됨을 알 수 있었다.

다. Human microsome과 expressed enzyme을 이용한 CYP3A4 억제 기전 규명

Cytochrome P450 효소의 억제는 타 병용 투여 약물의 대사에 영향을 미치고 궁극적으로는 병용투여 약물의 pharmacokinetics를 변화시켜 약물의 부작용을 유발한다. 특히 CYP3A4는 체내로 유입되는 약물의 50%이상을 대사하는 major P450효소로서 약물의 CYP3A4 활성억제를 규명하는 것이 약물상호작용을 이해하는 관점에서 매우 중요하다. 본 연구에서는 CYP3A4에 의하여 대사되며 또한 CYP3A를 선택적으로 억제하는 DDB의 억제 기전에 대한 연구를 수행하였다. DDB를 NADPH 존재 하에서 human microsome과 반응 후 반응산물을 1/20로 희석 효소원으로 사용하여 CYP3A4 활성인 testosterone 6b-hydroxylation 활성을 측정된 결과 Fig 6. 에 보여 준비와 같이 DDB의 반응 시간에 따라 활성을 억제하였다. 이는 DDB가 CYP3A4를 비가역적으로 불활성화 시킨다는 것을 시사한다. 본 실험실에서 규명한 DDB의 대사는 methylenedioxy moiety의 demethylenation이 주요 대사 경로이며 따라서 carbene intermediate가 생성됨을 알 수 있다. carbene intermediate는 P450의 heme과 단단히 결합하는 quasi irreversible complex를 형성한다는 사실은 여러 사람에게 의하여 보고되어 있다. DDB에 의한 CYP3A4활성 억제가 비 가역적임을 규명하기 위하여 microsome과 DDB를 반응 후 18시간 동안 dialysis를 하여 남아있는 DDB를 완전히 제거한 후 testosterone 6b-hydroxylation 활성을 측정하여 보았다.

Table 에서 보여준 바와 같이 CYP3A4 활성은 dialysis 후에도 일부만이 회복되는 사실로 미루어 DDB에 의한 활성억제는 비가역점임을 알수 있었다. P450과 troleandomycin과 같은 quasi-irreversible complex를 형성하는 화합물을 처리하면 생성되는 MI complex의 UV spectrum상의 최대 흡광도가 456 nm에서 나타나며 이를 이용하여 MI complex형성과 양을 측정한다. DDB를 NADPH 존재 하에서 반응하면 Fig 7에서 보는바와 같이 456 nm에서 최대 흡광도를 나타내는 UV spectrum을 보여주고 있으며, NADPH가 없는 경우에는 이러한 spectrum을 보여주지 않았다 이러한 결과는 DDB가 대사과정에서 생성되는 carbene intermediate가 heme과 결합하여 complex를 형성함을 시사한다. Complex 형성 정도는 DDB를 처리 시 rat의 경우 total P450양 32%, 그리고 human의 경우는 12.6% 가 complex를 형성하였다 (Table 4). MI complex를 형성한다는 사실을 입증하기 위한 또 다른 방법으로 DDB를 처리한 후 P450 양을 정량하였다. DDB를 NADPH 존재 하에서 반응 시 P450양은 시간 의존적으로 감소함을 보여주었다. NADPH나 DDB만 넣어 반응 시에는 P450 양의 감소를 가져오지 않았다. 이러한 결과는 DDB가 CYP3A4에 의해 대사되면서 생성되는 intermediate가 P450과 complex를 형성하여 비 가역적으로 활성을 억제하며 DDB와 병용 투여되는 약물 중 CYP3A4에 의하여 대사되는 약물은 상호작용이 일어날 수 있음을 시사한다.

Table 2. Expression of recombinant P450 isozyme in E. coli DH5a

Isozyme	nmol P450/L medium
recP450 1A1	88.44
recP450 1A2	67.50
recP450 3A4	258.36
recP450 2C9	46.60
recP450 2D6	68.12
recP450 2E1	51.00

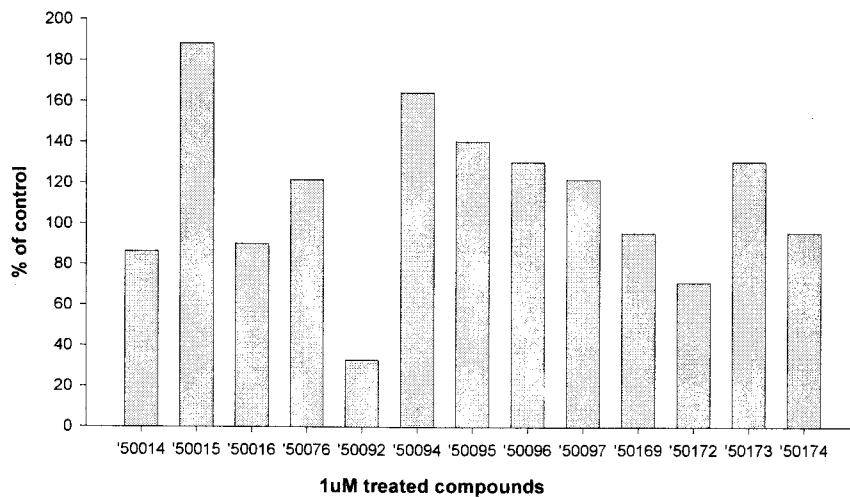


Figure 2. Inhibition of testosterone metabolism with 500series

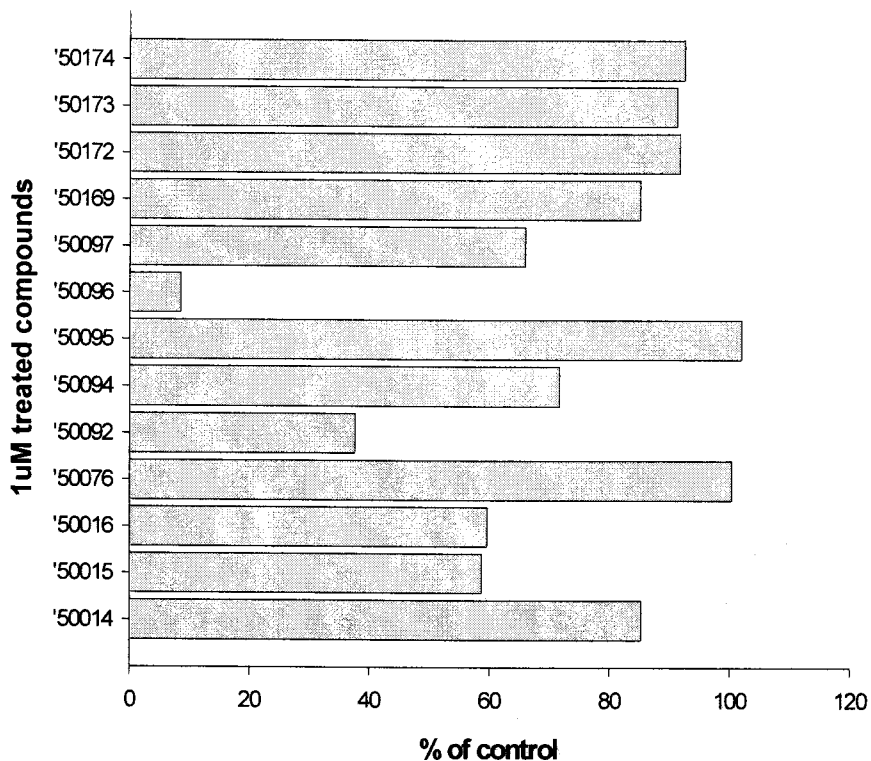


Figure 3. Inhibition of diclofenac metabolism with 500series

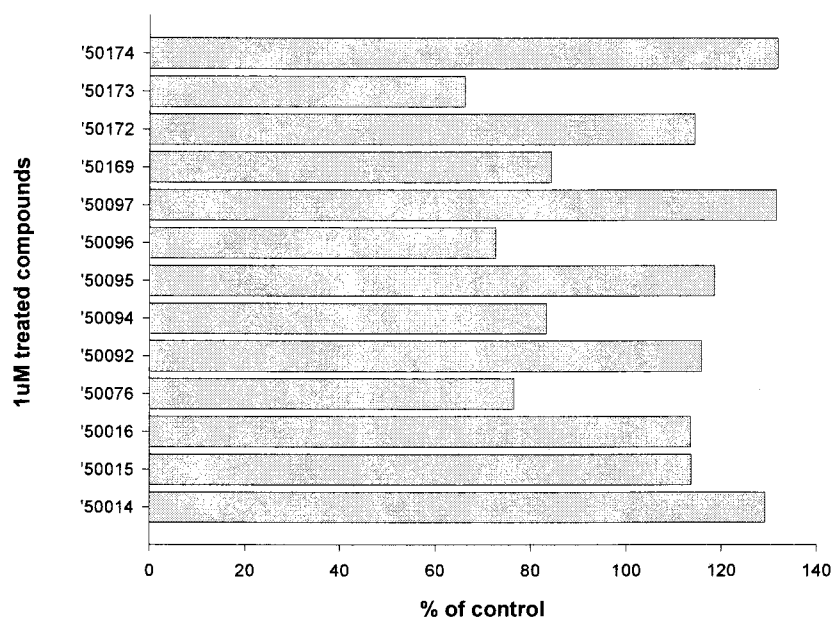


Figure 4. Inhibition of ethoxyresorufin metabolism with 500series

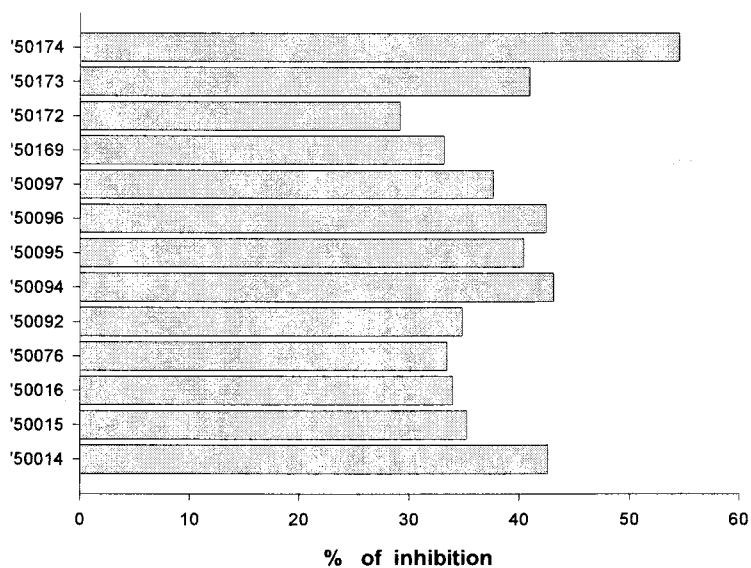


Figure 5. Inhibition of CYP2D6 activity by natural flavonoids.

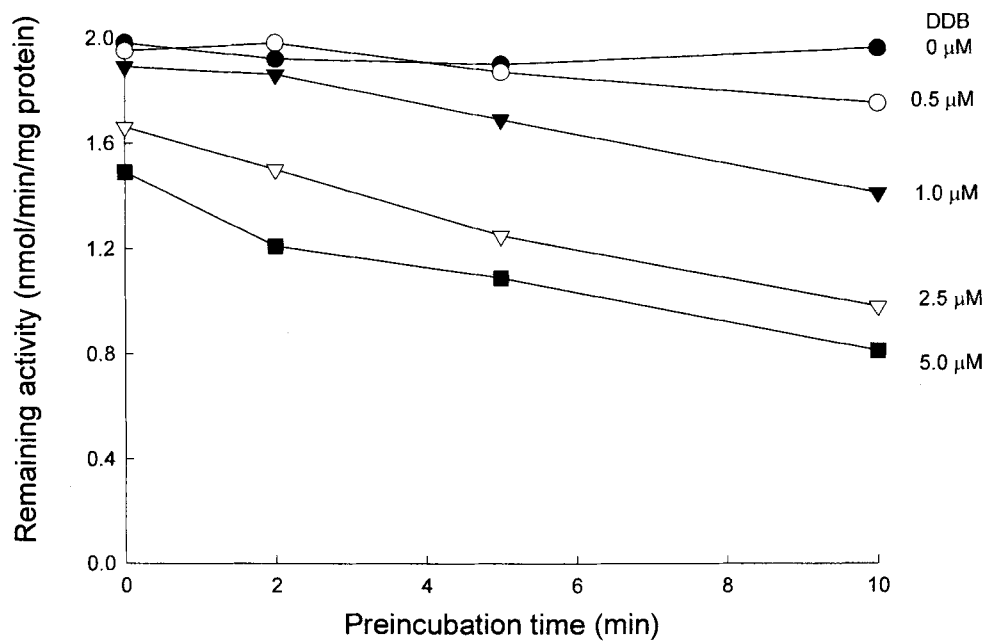


Figure 6. DDB concentration and time dependency for inactivation of CYP3A4 as reported by testosterone 6-hydroxylation. DDB was incubated, at the concentrations shown, with human liver microsomes. At specified times aliquots of the incubation were diluted 20-fold and incubated for a further 30 min and assayed for residual CYP3A4 Activity using testosterone 6-hydroxylation as a CYP3A4 specific reporter assay.

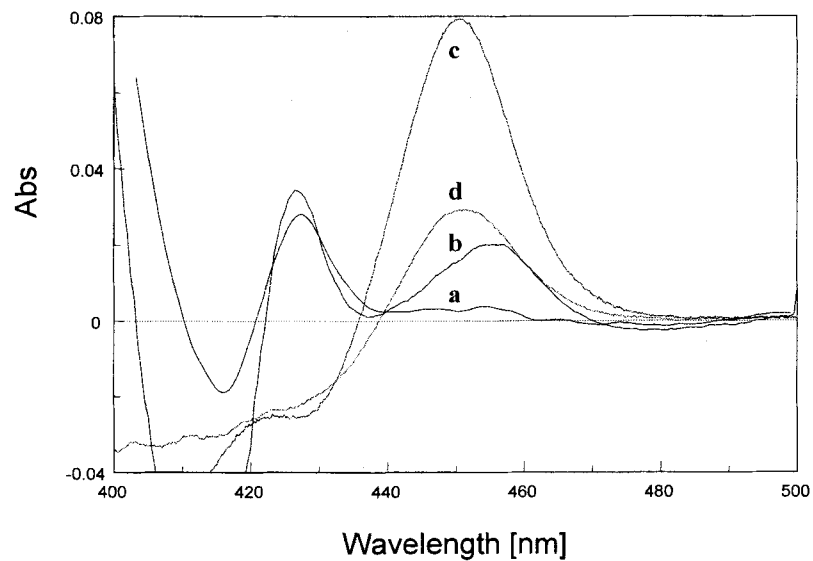


Figure 7. Metabolite-P450 complex spectrum in PCN-treated rat liver microsomes. Spectrum (a) represents the baseline spectrum and spectrum (b) was recorded after a 5-min incubation with 100 mM DDB and 1 mM NADPH in PCN-treated art liver microsomes. Then the reduced CO-difference P450 spectrum (c) was recorded. Spectrum (d) represents the reduced CO-difference P450 spectrum obtained before incubation with DDB.

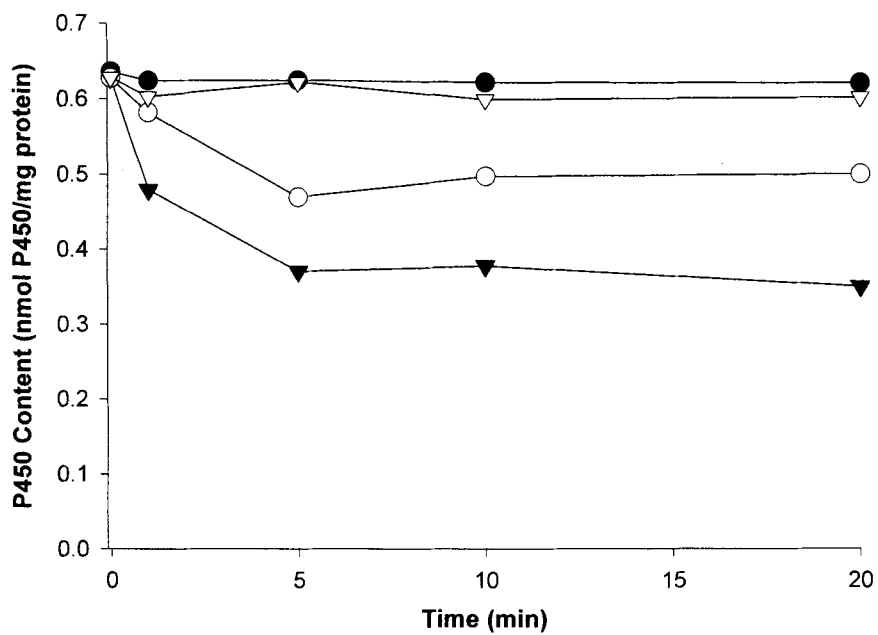


Figure 8. Time-dependent loss of P450 content in human liver microsomes. Human liver microsomes (1mg protein/ml) were incubated in duplicate at 37°C. At the designated time points, the P450 concentrations were measured by reduced CO-difference P450 spectra. ●, microsome control; ▽, 25 mM DDB; ○, 1mM NADPH; ▼, 25 mM DDB + NADPH.

Table 3. Recovery of testosterone 6 β -hydroxylase activity after an 18-h dialysis following a 20-min preincubation with DDB and NADPH in human liver microsomes

The uninhibited rates of the reaction in column 1, 2 and 3 were 0.53, 0.47, and 0.52 nmol/min/mg of protein, respectively. each value represents the mean \pm S.D. of three determinations.

DDB μ M	% of Control Activity Remaining		
	+NADPH -Dialysis	+NADPH -Dialysis	+NADPH -Dialysis
0	100	100	100
0.25	67.6 \pm 8.7	90.1 \pm 9.0	94.2 \pm 3.9
0.5	47.2 \pm 8.3	83.0 \pm 6.9	101.0 \pm 14.1
1	40.9 \pm 5.0	61.2 \pm 8.0	89.3 \pm 6.0
5	14.8 \pm 1.0	23.4 \pm 1.6	87.3 \pm 10.5

Table 4. Metabolite-450 complex formation by DDB in PCN-treated rat and liver microsome

Data represent the mean \pm S.D. of three different preparations.

DDB	$\Delta A_{456-490}$ /mg protein		Complexed ^a		P450 Complexed	
	Rat	Human	Rat	Human	Rat	Human
μ M			<i>nmol/mg</i>		<i>%</i>	
20	0.0027 \pm 0.0003	— ^b	0.036 \pm 0.004		5.0 \pm 0.6	
50	0.0109 \pm 0.0016	—	0.1373 \pm 0.0207		19.0 \pm 2.9	
100	0.0178 \pm 0.0018	0.0058 \pm 0.0012	0.2378 \pm 0.0237	0.0773 \pm 0.0207	32.8 \pm 3.9	12.6 \pm 1.7

^a Calculation based on an extinction coefficient of 75 mM cm⁻¹ for $\Delta A_{456-490}$

^b —, not detected.

Table 5. Changes in P450 content after incubation of DDB with PCN-treated rat and human liver microsomes in the presence of NADPH

Data in parenthesis means percent of control. Each value represents mean of two separate determinations.

DDB	Enzyme Sources	
	PCN-Treated Rat	Human
μM	nmol P450/mg protein	
0	0.735 (100) ^a	0.616 (100)
10	0.606 (82.4)	0.446 (72.4)
25	0.461 (62.7)	0.357 (58.1)
50	0.421 (57.3)	0.269 (43.1)

^aP450 content was calculated based on extinction coefficient of 91 nM cm^{-1} for $\Delta A_{456-490}$.

제 2 절 Human CYP isozyme의 억제 동시 평가 방법의 개발 및 응용

1. 서론

Isozyme selective 기질을 이용하여 human CYP isozyme (CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 그리고 CYP2D6)들의 억제 동시 평가방법을 개발하고자 하였다. 또한 개발된 방법을 새로운 PDE 5 저해제로 현재 전임상 단계에 있는 SK3530 약물에 적용하여 SK3530의 microsome에서 약물의 대사와 비독성화에 중요한 역할을 하는 P450 system의 저해정도를 알아보고자 하였다.

2. 실험방법

(1) 실험 재료

Enzyme source (rat liver microsome, 1 mg/ml of protein), P450 isozyme substrate (phenacetin (1A2), coumarin (2A6), paclitaxel (2C8), diclofenac (2C9), dextromethorphan (2D6), midazolam (3A4)), NGS (NADP, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase)

(2) 주요기기 및 장치

HPLC : Shimadzu HPLC systems LC-10A series (Kyoto, Japan)

MS spectrometer : Applied Biosystems MDS SCIEX, API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry (Concord, Canada)

Column : CAPCELL PAK C8 (2.0 mm I.D. × 35 mm, 5 μm, Shiseido, Tokyo, Japan)

(3) 표준용액 및 시료조제

100 mM potassium phosphate buffer와 rat liver microsome (1 mg/ml), 그리고 substrate mixture (Table 1) 를 혼합하여 37°C에서 5분간 prewarm한다. NGS (G6P, 1 ml; NADP⁺, 0.5 ml; and G6P dehydrogenase, 2.25 μl) 30 μl를 첨가하여 반응을 시작한다. 30 min간 37°C shaking water bath에서 incubation한다.

Table 1. CYP isozyme specific substrates and their concentrations used in the inhibition experiments. Precursor and product ions used for monitoring the metabolites generated by CYP isozymes.

P450 isozyme	Substrate		Metabolite	
	substrate	final conc. (μ M)	metabolite	selected ion (m/z)
CYP1A2	Phenacetin	40	Acetamidophenol	152/110
CYP2A6	Coumarin	2.5	7-hydroxycoumarin	163/107
CYP2C8	Paclitaxel	10	6 α -hydroxypaclitaxel	870/286
CYP2C9	Diclofenac	10	4'-hydroxydiclofenac	312/230
CYP2D6	Dextromethorphan	5	dextrorphan	258/157
CYP3A4	Midazolam	2.5	1'-hydroxymidazolam	342/324

(4) 시료의 전처리

37°C shaking water bath에서 30 min간 incubation 한 후, 0.1% acetic acid 400 μ l를 넣어 반응을 정지시키고, internal standard (16 μ M terfenadine)를 5 μ l씩 첨가한다. 96-well type OASIS HLB extraction cartridge으로 통해서 다음과 같이 추출하였다.

OASIS cartridge를 1 ml 의 methanol로 precondition시키고, 1 ml의 0.1% acetic acid로 equilibration한다. 시료를 load하고, 3 ml의 0.1% acetic acid로 washing한 후, 1 ml의 methanol로 elution한다. Elution된 시료를 nitrogen gas하에서 evaporation 하고, 최종적으로 40 μ l의 reconstitution buffer (90% ACN in 10 mM ammonium formate (pH 4.0)/ 10 mM ammonium formate (pH 4.0), 15/85)로 녹여 그 중 10 μ l를 HPLC에 주입하였다.

(5) 분석기기 조건 및 시료 분석

전처리된 시료는 다음의 LC-MS/MS 조건에서 분석하였다.

HPLC system은 이동상으로 10 mM ammonium formate (pH 4.0) (buffer A)와 90% ACN in 10 mM ammonium formate (pH 4.0) (buffer B)을 Table 2.과 같은 gradient program으로 사용하였다. 유속을 0.25 mL/min으로 사용하였다.

Peak 검출은 triple-quadrupole mass spectrometry를 이용하여 MS/MS MRM (multiple reaction monitoring)방법으로 검출하고, ionization은 turbo ion spray를 이용한 electrospray ionization (ESI)을 하며, nebulizing gas와 turbo gas, 그리고 curtain gas는 nitrogen gas를 사용하였으며, 각각 40, 80, 그리고 40 (임의단위)으로 설정하였다. Nebulizer의 온도는 450°C로 설정하였다.

MRM mode를 이용한 metabolites 및 internal standard의 검출은 4 (임의단위) collision gas (nitrogen gas)와 50 msec dwell time으로 분석하였으며, 각각의 related ion은 Table #.과 같으며, internal standard (terfenadine)은 protonated molecular ion은 m/z 472이며, 생성된 product ion은 m/z 436을 monitoring 하였다.

Table 2. LC gradient program

Time (min)	%B
0	5
3.0	90
4.0	90
4.01	5
6.0	stop

(6) 분석조건의 검증

각각의 P450 isozyme에 대한 specific chemical inhibitor를 이용하여 isozyme을 억제하고 이를 통해 metabolite의 생성 저해 정도를 알아보았다. CYP1A2의 저해제는 furafylline (10 μ M), CYP2C9의 저해제는 sulfaphenazole (100 μ M), CYP2D6의 저해제는 quinidine (50 μ M), 그리고 CYP3A4의 저해제로는 ketoconazole (5 μ M)을 처리하여 분석조건의 검증을 시행하였다.

3. 실험결과 및 고찰

CYP1A2, CYP2A6, CYP2C8, CYP2C9, CYP3A4 그리고 CYP2D6에 해당하는 각 selective substrate의 cocktail incubation과 대사체들의 동시 분석 방법을 LC-MS/MS를 이용하여 확립하였다. Figure 1은 7종의 CYP isozyme들의 활성을 평가하기 위하여 동시 분석된 MRM chromatogram들을 보여 준다. 서로 다른 isozyme에 대한 간섭과 각각 분석 시 유의성 있는 차이가 없었으며 selective inhibitor 처리 시 그 CYP 효소만이 억제됨을 확인 하였다.

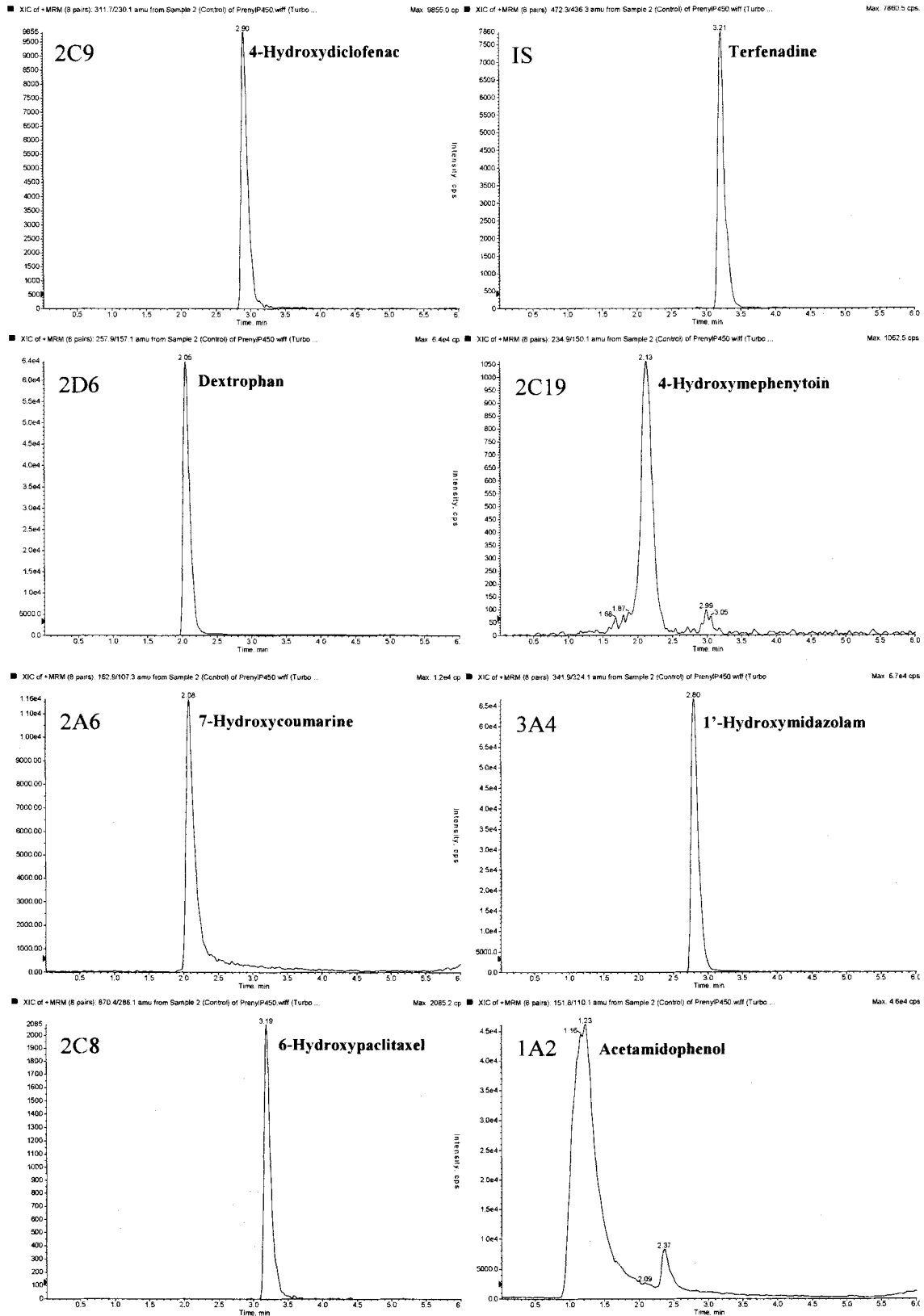


Figure 1. MRM chromatograms for the simultaneous determination of 7 CYP isozyme activities

SK3530의 CYP450 system 저해

SK3530을 0.1, 0.3, 1, 3, 10, 그리고 30 μM 의 농도로 처리한 후 6가지의 isozyme 활성을 측정하여 대조군의 활성과 비교하여 inhibition potential을 검증하였다. Table 4에 나타난 바와 같이 SK3530은 CYP3A4, CYP2C9, 그리고 CYP2D6의 활성을 억제하는 것으로 판명되었으나 그 억제정도는 최고 농도인 30 μM 에서 32.1에서 60.3으로 potential은 낮다고 할 수 있다. 그 밖의 다른 CYP isozyme 활성에도 특이적인 억제효과가 없다고 결론 내릴 수 있다. IC_{50} 가 10 μM 이상일 경우에는 CYP 효소 억제로 인한 약물상호 작용 가능성은 매우 낮다고 알려져 있으며, 따라서 SK3530은 metabolic interaction을 유발할 가능성이 낮다고 결론을 내릴 수 있다.

Table 3. Effects of CYP isozyme selective inhibitors on the activities of CYP marker activities in pooled human liver microsomes.

Inhibitor (μM)	Activities of CYP isozyme (% of control)					
	CYP1A2	CYP2A6	CYP3A4	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6
Furafylline	16.4	79.4	114.0	122.8	87.6	86.6
Ketoconazole	68.8	84.4	3.5	32.0	34.0	80.3
Quinidine	80.7	49.4	71.6	71.1	82.3	0.6
Sulfaphenazole	77.1	75.4	86.3	105.7	2.9	86.4

Each data represents mean of duplicate experiments

Table 4. Effects of the SK3530 on CYP isozyme specific marker activities in pooled human liver microsomes.

SK3530 (μM)	Activities of CYP isozyme (% of control)					
	CYP1A2	CYP2A6	CYP3A4	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6
0.1	95.2	86.7	101.4	101.7	93.1	96.3
0.3	104.6	105.1	97.8	88.4	107.8	96.7
1.0	106.9	110.0	98.3	104.0	90.2	103.9
3.0	106.2	106.7	88.9	83.8	116.3	111.0
10	85.5	79.8	48.9	97.9	69.2	83.3
30	91.6	92.4	39.7	91.8	52.0	67.9

Each data presents mean of duplicate experiments.

제 3 절 Pyronaridine 대사에 관여하는 P450 isozyme 규명

1. 서론

Pyronaridine은 1970년대 초에 Zheng 등에 의하여 합성된 말라리아 치료제이다. Pyronaridine은 chloroquine보다 독성이 적으며 chloroquine-sensitive와 resistant parasite들에 대하여 높은 활성을 보인다. 또한 haemoglobin degradation에 영향을 미치며 현재는 artesunate와 병행한 임상실험이 진행 중이다. Pyronaridine의 in vitro 및 in vivo 대사가 본 실험실에서 이미 규명되었다 (Figure 1). 본 연구에서는 밝혀진 pyronaridine의 대사에 관여하는 cytochrome P450 isozyme을 규명하고자 하였다. 대사에 관여하는 P450 isozyme의 규명을 위하여 specific P450 cDNA-transfected human B lymphoblastoid cell microsome과의 incubation, chemical inhibition 그리고 immunoinhibition이 수행되었다.

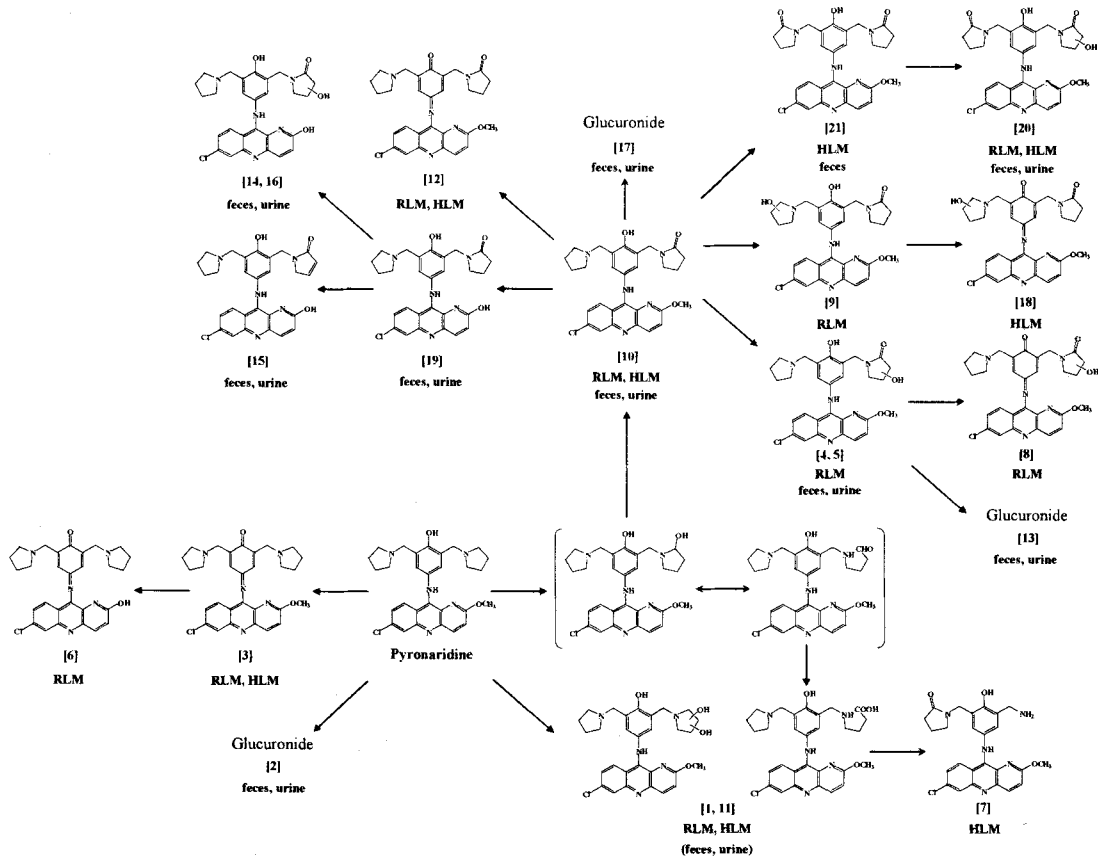


Figure 1. Postulated metabolic pathways of pyronaridine. RLM: rat liver microsomes, HLM: human liver microsomes

2. 실험방법

P450 isoform 과의 Incubation

Specific P450 cDNA-transfected human B lymphoblastoid cell microsome으로는 1A2, 2D6, 2C9 그리고 3A4 가 사용되었으며 NADPH-generating system 하에서 incubation하고 분석되었다.

Chemical inhibition

Chemical inhibition을 위하여 사용된 chemical inhibitor들은 ketoconazole (3A4), furafylline (1A2), Sulfaphenazole (2C9), quinidine (2D6) 그리고 EDTC (2E1)이 사용되었으며 inhibitor의 농도로는 1 - 100 uM이 사용되었다.

Immunoinhibition

Immunoinhibition을 위하여 anti 3A4, 1A2 그리고 2C9 IgG가 사용되었으며 NADPH-generating system 하에서 incubation하고 분석되었다.

3. 실험결과

Expressed isozyme들과의 incubation시 M3는 1A2, 2C9, 2D6 그리고 3A4 모두에서 검출되었다. 그러나 다른 대사체들은 단지 3A4에서만 검출되었다 (Figure 2). 특히 pyronaridine의 대사에서는 M1, M3, M10 그리고 M11이 다음 단계의 대사체들로 넘어가는 경로의 중요한 대사체 이었으며 따라서 본 연구에서는 이 4개의 대사체에 관여하는 isozyme을 규명하였다. Purified isozyme들과의 incubation은 이 4개의 주요 대사체들의 형성에 3A4가 관여하는 것으로 밝혀졌으며 M3의 대사에는 여러 효소들이 관여하는 것으로 보여 졌다.

Purified isozyme과의 incubation으로부터 나온 결과를 chemical inhibition을 통하여 다시 한번 확인하였다. chemical inhibition에 대한 결과를 Table 1에 나타내었다. Ketoconazole에 의해 3A4의 저해시 특히 10 uM의 농도로 저해 시 pyronaridine은 대사체들을 거의 형성하지 못했다. 주요 대사체들 M1, M3, M10 그리고 M11의 생성이 저해되므로 다음 단계의 대사체들 역시 생성이 억제되는 것을 확인 할 수 있었다. 그 밖의 효소 저해 (1A2, 2C9, 2D6 그리고 2E1)에 의하여는 고 농도에서만 약간의 생성 억제를 확인 할 수 있었다. 따라서 두 결과는 pyronaridine의 주요 대사체들 가운데 M1, M10 그리고 M11의 형성에 3A4가 관여함을 보였다. Chemical inhibition의 결과에서도 마찬가지로 M3는 특정 효소의 저해에 의하여 특이적인 생성 억제 효과를 보이지 않았다.

Immunoinhibition 실험에 의하여 M1, M3, M10 그리고 M11의 관여 효소를 확인하였다 (Figure 3). Pyronaridine 대사의 주요 경로에 있는 대사체 M1, M10 그리고 M11은 anti 3A4 antibody의 첨가에 의하여 생성이 억제 되었다. 이는 M1, M10 그리고 M11의 형성에 3A4가 관여한다는 것을 시사하며 이들의 생성 억제는 다음 단계의 대사체들의 형성을 억제하였다. 그러나 M3의 형성에 대하여 purified 효소,

chemical inhibition 그리고 immunoinhibition은 특정 효소가 관여하지 않고 multiple 효소가 관여됨을 보였다. 이는 aminoquinoline이 quinoneimine으로 전환됨에 있어 다양한 효소들이 관여 할 수 있다는 것을 시사했다.

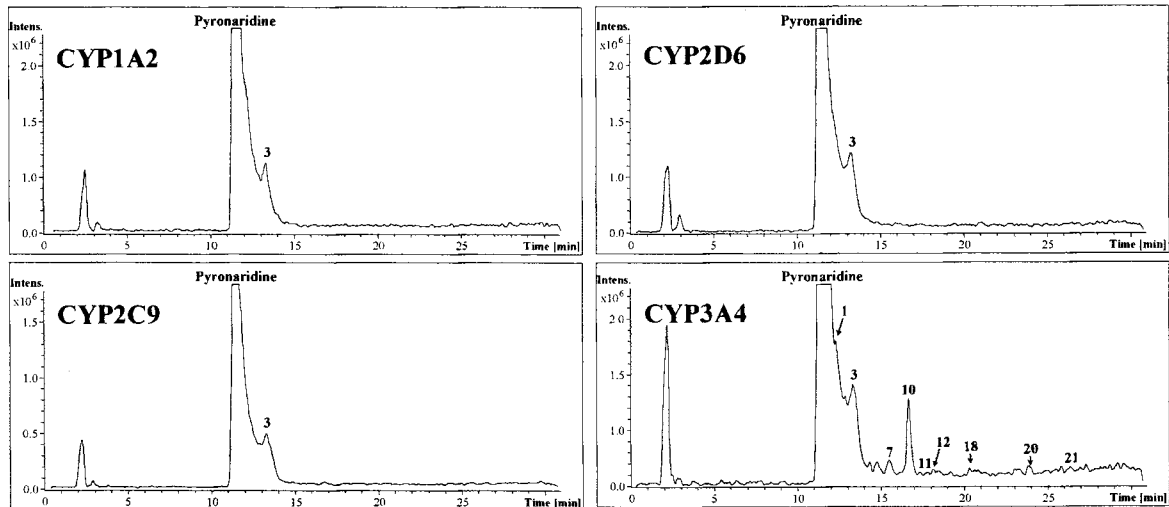


Figure 2. Metabolism of pyronaridine by Specific P450 cDNA-transfected human B lymphoblastoid cell microsomes (1A2, 2C9, 2D6 and 3A4)

Table 1. Effect of P450 isoform inhibitors on the metabolism of pyronaridine in human liver microsomes

Inhibitor	Inhibitor concentration (uM)	Percentage of control activity								
		1	3	7	10	11	12	18	20	21
Ketoconazole (3A4)	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	1	13.4	101.8	22.6	44.1	13.6	36.3	31.6	0	33.6
	10	0	60.1	2.4	13.5	0	9.3	0	0	0
Furafylline (1A2)	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	10	77.2	67.1	103.9	108.9	105.6	107.2	145.2	67.2	141.9
	50	76.6	66.1	88.7	96.6	104.5	99	118.8	56.7	120.7
Sulfaphenazole (2C9)	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	10	90.3	67.8	101.3	123.8	107.3	110.3	123.1	64.1	142
	100	82	50.1	66.5	101.2	78.4	88.5	87.5	20.7	102.2
Quinidine (2D6)	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	10	78	69.2	57.3	100.8	92	95.3	95.4	39.9	95.4
	50	32.6	57.3	22.3	83.6	54.5	69	36.6	15.2	58.7
EDTC (2E1)	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100
	10	95.1	68.6	93.6	111.6	99	111.5	111.7	65.8	122.9
	50	93.1	55	65.9	104.8	78.9	94.1	71.8	45.8	93.8

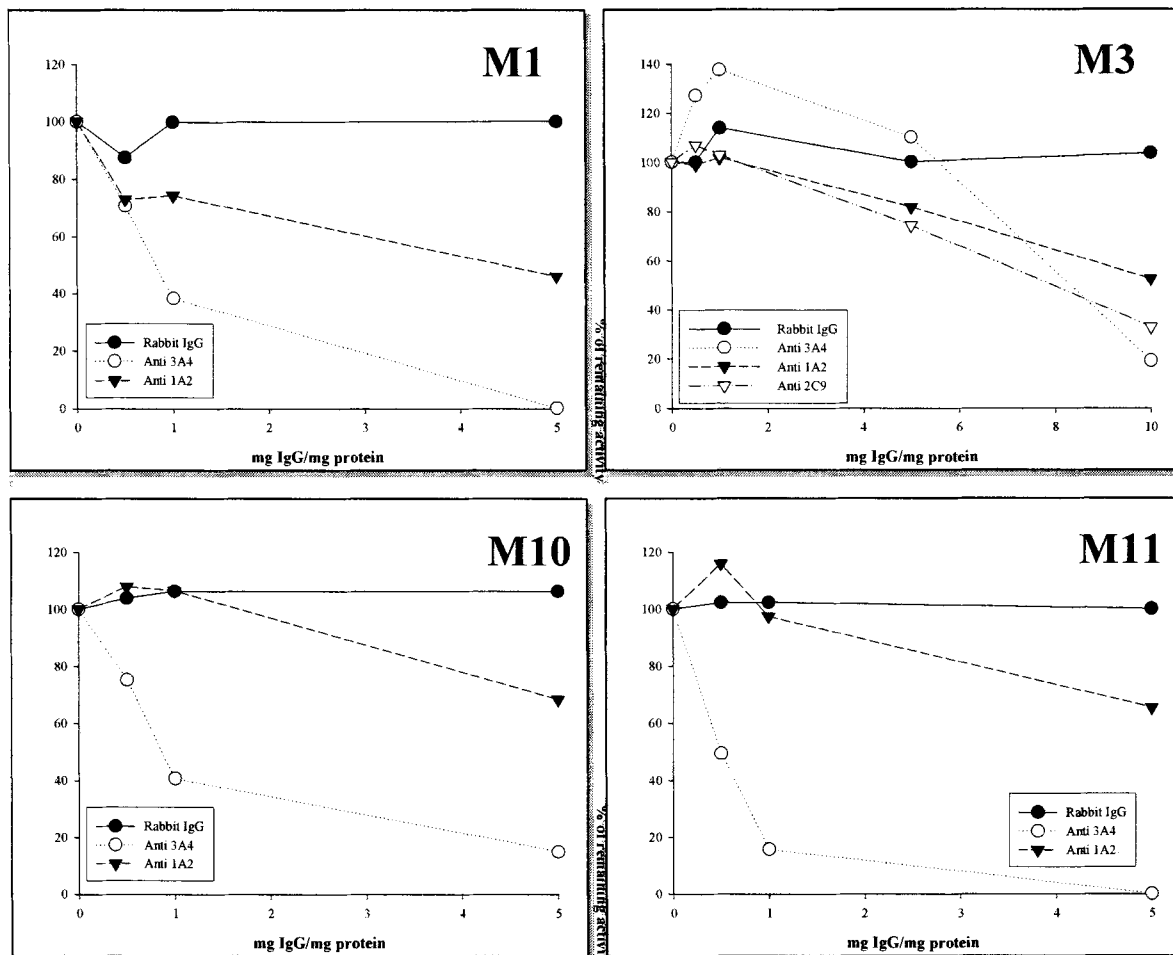


Figure 3. Effect of anti P450 antibody on the formation of metabolite 1, 3, 10 and 11 in human liver microsomes

제 4 절 Prenylated flavonoid의 대사 및 P450 효소 저해 기작 규명

1. 서론

Prenylated flavonoid는 cytochrome P450 효소에 의하여 대사되며 특히 prenyl group이 대사에 주로 관여한다. 이들 prenylated flavonoid들은 Figure 1에서 보여지는 바와 같이 prenyl group이 epoxide를 형성한 뒤 인접한 hydroxyl group에 의하여 공격받아 five- 또는 six-membered ring으로 변환되는 것으로 알려져 있다. 본 연구에서는 prenylated flavonoid들의 in vitro 대사를 human liver microsome에서 규명하고 P450 효소의 저해 기작을 규명하고자 하였다. Prenylated flavonoid의 효소 저해 기작이 reversible 인지 covalent 결합으로 인한 irreversible 기작인지를 규명하였다.

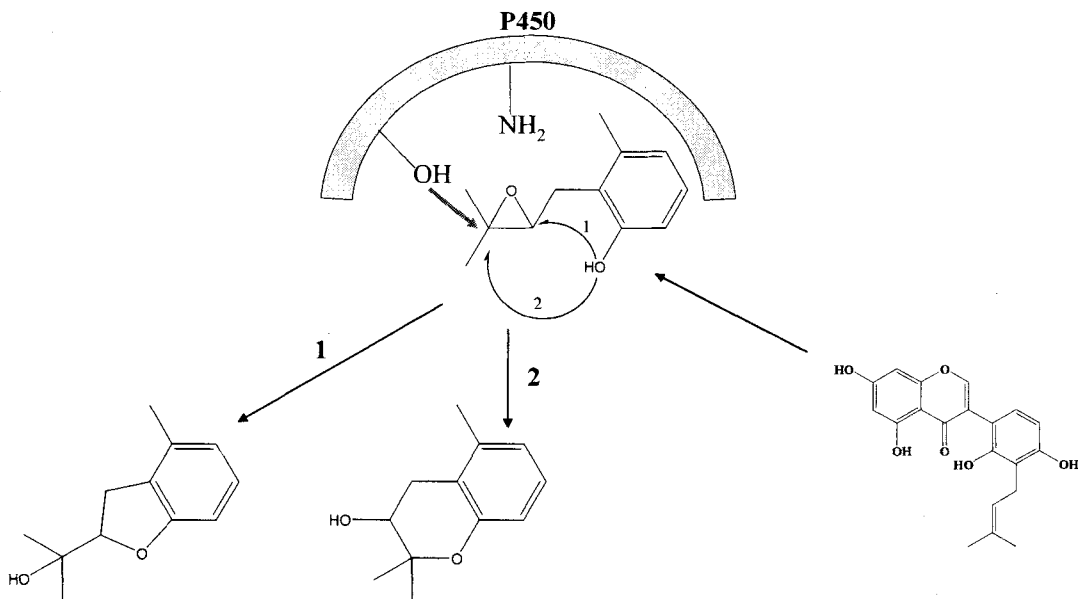


Figure 1. Metabolism and inhibition of prenylated flavonoids

2. 실험방법

각 prenylated flavonoid들은 in vitro 대사를 위하여 human liver microsome과 NADPH-generating system 하에서 incubation 되었으며 관여 효소의 확인을 위하여 purified P450 isozyme들과 역시 incubation 되었다. 생성된 대사체들은 ion-trap mass spectrometry의 negative ion mode에 의하여 얻어진 product ion spectra의 해석에 의하여 확인되었다.

Prenylated flavonoid들의 P450 inhibition은 본 연구에서 개발된 whole microsome을 이용한 cassette inhibition 방법에 의하여 수행되었으며 저해 기작 규명을 위하여 P450 효소의 불활성화 시험을 수행하

였다.

3. 실험결과 및 고찰

총 11 종의 prenylated flavonoid들의 in vitro 대사 프로파일이 human liver microsomes을 이용하여 얻어졌다. Figure 2는 KYS-50174의 rat, human 그리고 purified isozyme으로부터 얻어진 representative extracted ion chromatogram들을 보이고 있다. Prenylated flavonoid들의 in vitro 대사 프로파일을 확인한 결과 대부분이 16 amu 증가된 대사체들로 대사됨을 확인할 수 있었다.

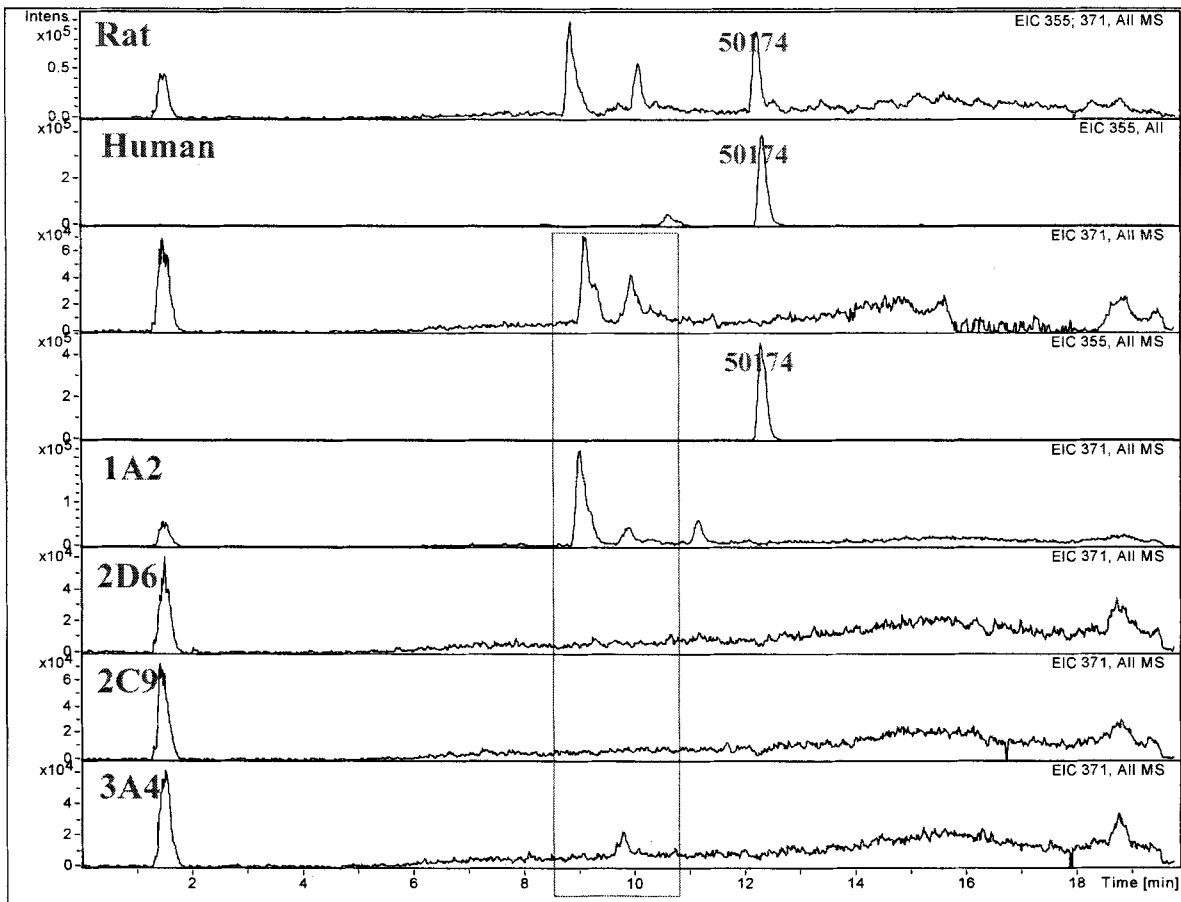


Figure 2. In vitro metabolism of prenylated flavonoid in human liver microsomes and purified P450 isozymes

Figure 3은 KYS-50172의 mass fragmentation mechanism을 보이고 있다. Deprotonation 후 retro-diels-alder reaction과 CO, CO2 그리고 CH3등의 loss가 특징적으로 관찰되었다. 각 parent와 대사체들의 mass fragmentation을 비교 해석한 결과 prenyl group을 포함한 product ion들 만이 16 amu 증가됨을 알 수 있었으며 이는 중간체로서 epoxide를 거친 뒤 dihydropyrano와 dihydrofurano ring으로 대부분 대사됨을 지적하였다 (Figure 4).

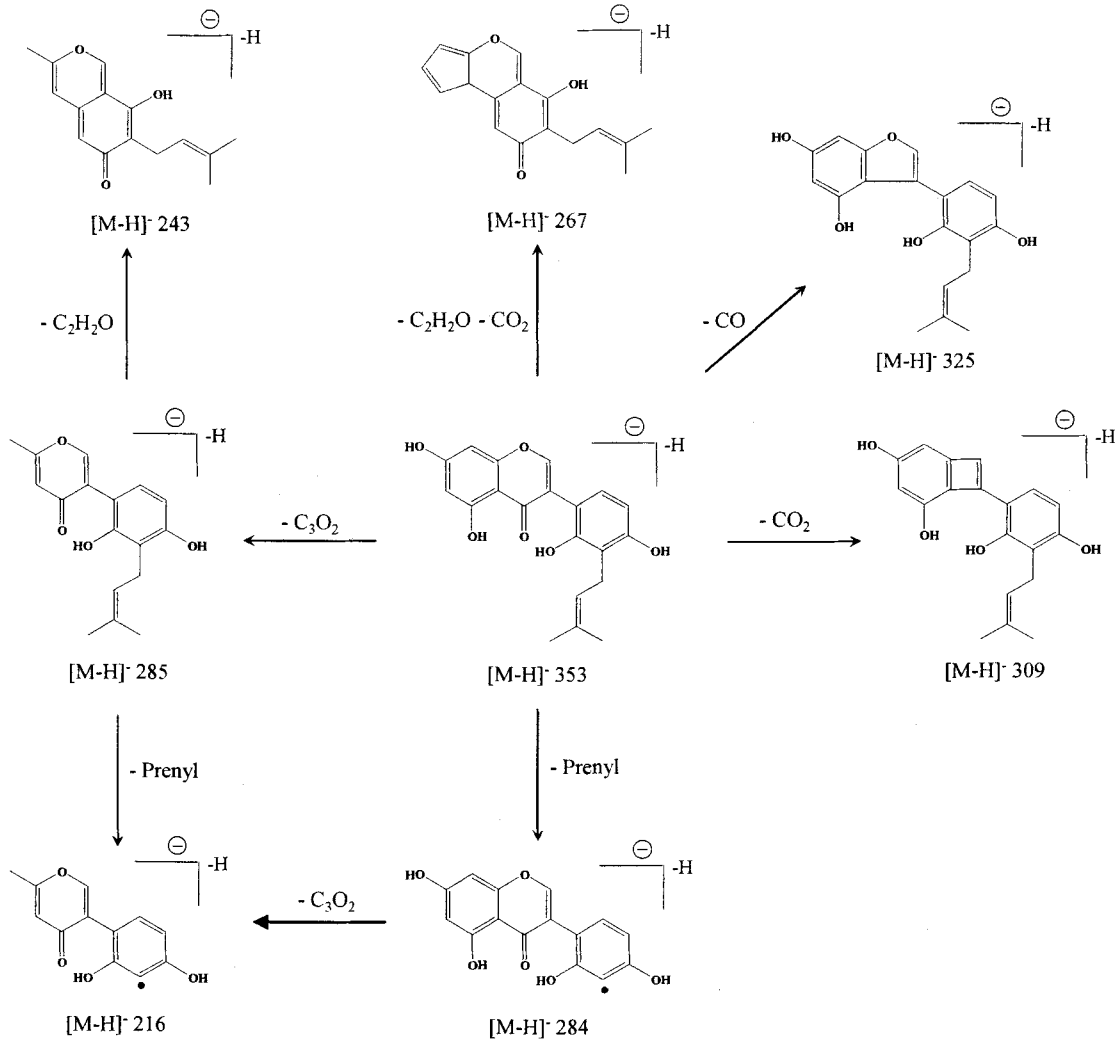


Figure 3. Proposed mass fragmentation pattern of prenylated flavonoid KYS-50172

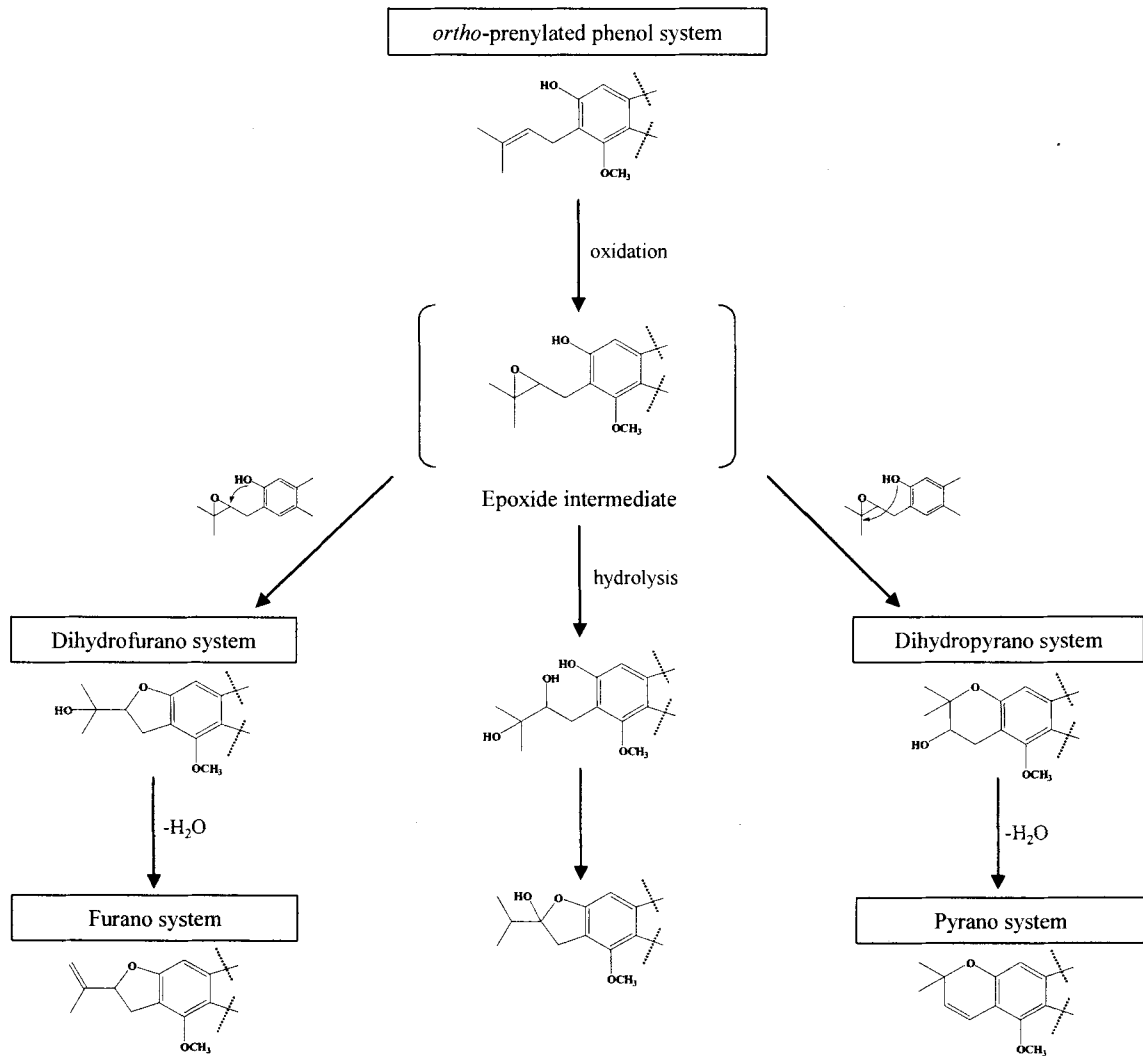


Figure 4. Proposed major metabolic pathways of prenylated flavonoid

Purified 1A2, 2C9, 2D6 그리고 3A4 효소를 이용하여 관여 효소를 확인한 결과 주로 1A2가 대사에 관여함을 확인 할 수 있었다. Figure 5는 wholebody human microsome을 이용한 효소 저해 (1 uM) 실험 결과를 보이고 있으며 실험 결과 KYS-50095가 1A2에 대하여 약 85% 정도의 저해 효과를 보이는 것으로 확인되었다. KYS-50095의 1A2 효소에 대한 저해 작용 기작을 규명하기 위하여 P450의 불활성화 실험이 수행되었다. 결과는 KYS-50095의 중간체로 형성되는 epoxide가 효소와 공유결합을 형성하여 효소 파괴에 의한 irreversible 저해 기전이 아닌 reversible 억제 기전임이 확인되었다 (Figure 6).

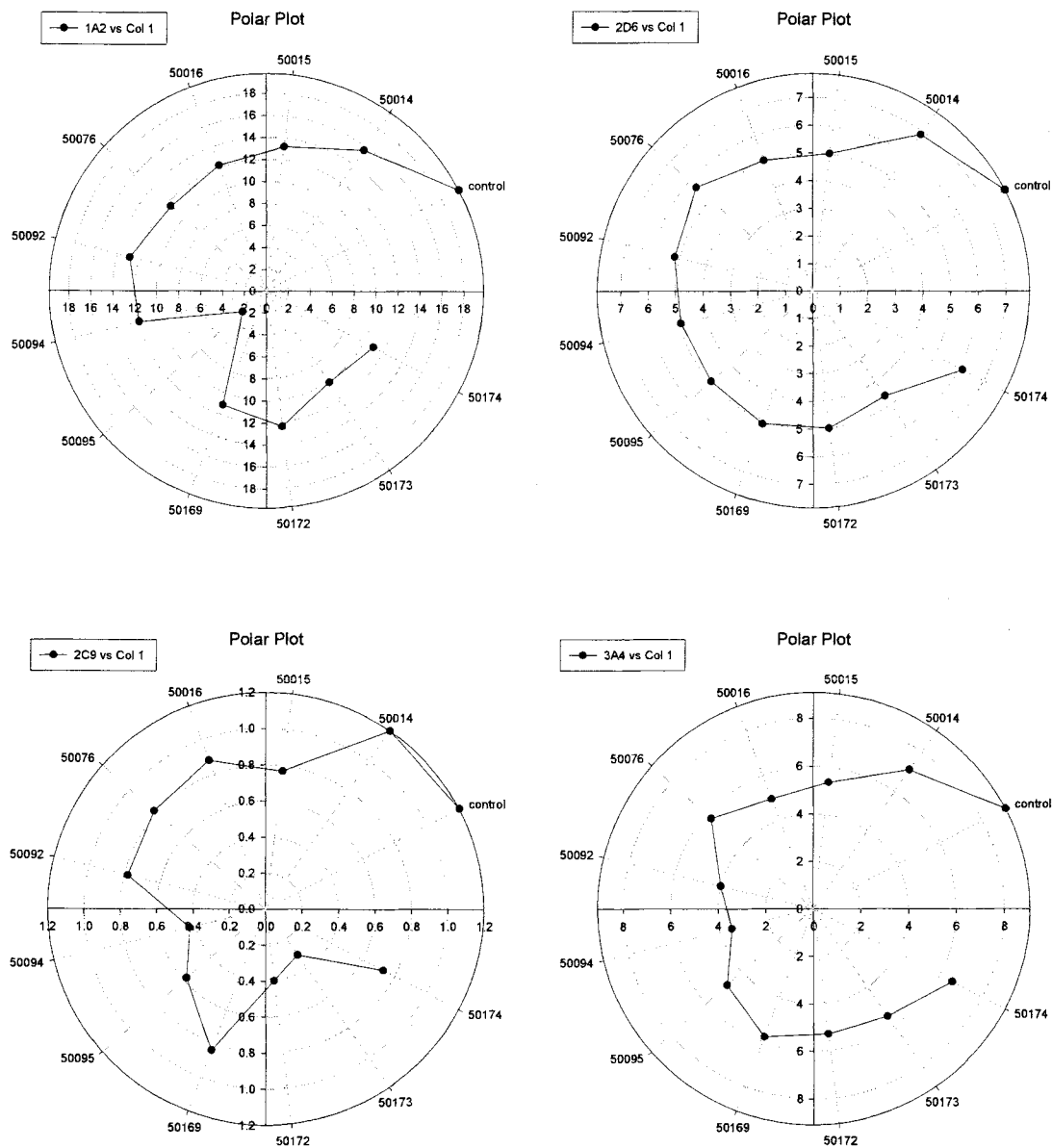


Figure 5. Inhibition of prenylated flavonoids for 1A2, 2D6, 2C9 and 3A4 enzymes (1 μ M)

Inactivation of P450 (1A2)
(KYS-50095)

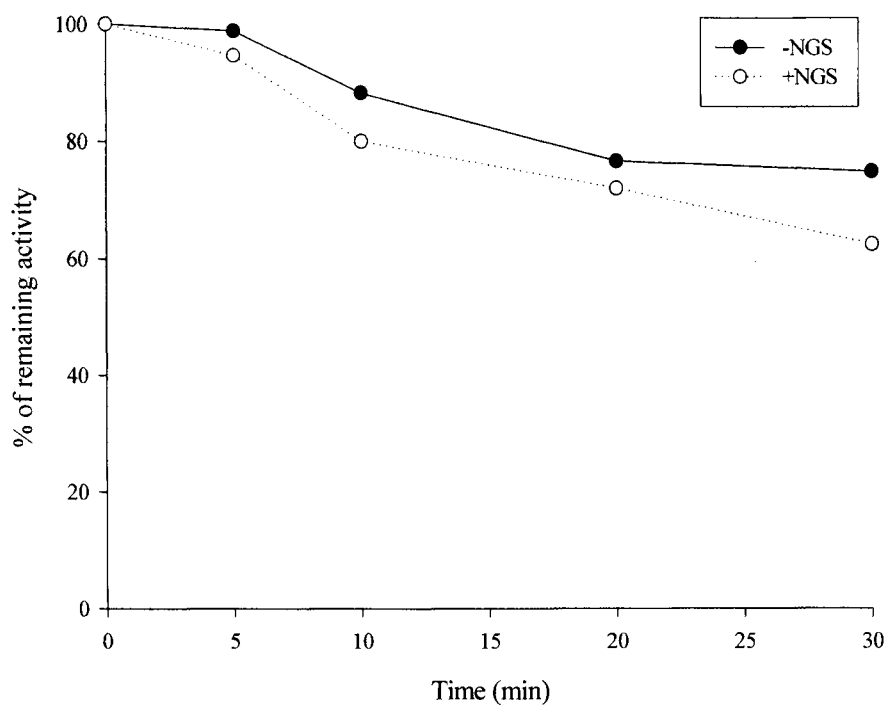


Figure 6. Inactivation for P450 (1A2) of prenylated flavonoid KYS-50095 (1uM)

제 6 장 소장과 BBB투과성 평가 방법의 개발 및 응용

제 1 절 Caco-2 세포를 이용한 소장 흡수 연구

1. 서론

제약 업계에 있어서 환자에게 투여하기 편리하고, 안전하게 복용하기 위한 경구 복용 약물을 개발하는 것은 매우 중요한 업무 중 하나이다. 이런 약물을 개발하는 데 있어서 약물의 다양한 흡수경로 중 장막을 통한 약물의 투과성은 경구 복용 약물로서 사용될 수 있는 가장 중요한 요인이라 할 수 있으며, 실제 인체 내에서 약물 흡수를 예측하고자 하는 목적으로 이미 *in vivo*, *in vitro*에서 다양한 약물 흡수 실험이 개발되고 있다. 최근 몇 년간 intestinal epithelial cell line으로 Caco-2 cell 이나 HT29 cell을 이용한 연구가 급증하였고, 현재는 Fogh (J.Fogh et. al. 1977)등에 의해서 분리된 human colon carcinoma cell인 Caco-2 cell을 주로 이용한 연구가 주목을 받고 있다. 이러한 연구의 목적은 drug이 장막을 통해 흡수 될 수 있는 경로, 즉 active transport이나 passive transport이나를 탐색하여, drug이 active transport를 통해 이동한 약물의 경우 개별적인 흡수 경로를 보인 연구 결과도 발표 되었고 (Burton, P.S et al. 1993, Karlsson, J. et al 1993, Takanaga, H. et al 1994), 특히 Caco-2 cell을 통해 연구된 대부분의 active transport는 depeptide carrier (Matsumoto, S-I et al 1994, Dantzig, A. H 1994)나 P-glycoprotein (Hunter, J. et al 1993, Phung-Ba, V. et al 1995)을 통한 경로임이 발표되었다. Drug이 passive transport된다면 실제 *in vivo*에서 흡수를 예측 할 수 있다는 연구도 발표된 바 있다 (Artursson, P. et al 1991, Rubas, W. et al 1995, Wils, P. et al 1994). Caco-2 cell이 분리된 후 이러한 실험을 가능하게 한 것은 실제 장막과 같이 형성되도록, 즉 enterocyte 의 differentiation 과 apical surface에 brush-border와 tight junction을 확립하기 위한 배양 조건에 대한 연구가 수행되었기 때문이며, 이러한 Caco-2 cell monolayer를 이용한 실험은 비교적 쉽고, 빠르게, 또한 소량의 drug을 이용해 약물 흡수를 screening할 수 있다는 장점이 있다. 그리하여 Caco-2 monolayer system을 이용한 연구는 급격히 증가한 제약적 가능성을 가진 수많은 후보 물질들에 흡수율을 측정하기 위한 빠른 검색 방법으로 이용되고 있다. 일반적으로 사람이 흡수하는 최소치와 최대치를 Caco-2 cell monolayer를 이용해 얻은 결과와 비교해 보면 약 1×10^6 cm/sec (I.J. Hidalgo, et al. 1989) 와 6×10^5 cm/sec (W. Rubas, et al. 1993)정도라고 알려지고 있으나 각 각의 연구 결과는 monolayer가 배양된 조건에 따라 다를 수 있다. 또한 Permeability 연구와 함께 molecule의 물리 화학적 특성을 종합하여 예측하는 system을 개발하여 약물 개발에 소요되는 시간과 경비를 좀 더 유용하게 사용하고자 하는 연구도 급격히 증가하고 있다. 약물을 개발하는데 있어서 정확히 표적에 전달되어 사용되어야 함은 물론 최적의 ADME (absorption, distribution, metabolism, and excretion)를 예측하는 것은 어느 것 하나도 소홀히 할 수 없는 부분으로, 개발 중인 약물이 위 조건에 만족되지 못한다면 약물 개발 초기 단계에서 그만 두는 것으로 시간이나

비용의 절감효과를 얻을 수 있는 것이다. 또한 약물의 물리 화학적 가치를 살려 장막에서 흡수가 유리한 물질을 디자인하고, 흡수를 예측 가능하게 하는 computational method들을 개발하는 연구 (Navia. M. A et al 1996, Chan. O.H. et al 1996)도 진행되었는데, 다른 연구자들이 이러한 약물전달 개념에 쉽게 접근할 수 있는 법칙으로 rule-of-5를 제시한다. 이 rule-of-5는 분자 구조에 있어 흡수율을 예측하는데 기본적인 접근 이론으로 알려지고 있다. 어떤 물질이 rule-of-5중 두 가지 이상의 조건을 만족하면 매우 저조한 흡수율이 예상 된다고 한다.

- 분자량 > 500
- Number of hydrogen bond donors > 5 (a donor being any O-H or N-H group)
- Number of hydrogen acceptors > 10 (an acceptor being any O or N including those in donor groups)
- Calculated log P > 5.0 (if ClogP¹⁷ is used) or > 4.15 (if MlogP¹⁸ is used)

장막을 통한 약물 흡수 경로의 대부분이 passive diffusion (transcellular absorption, paracellular absorption)으로 막을 통과하려는 분자의 물리화학적 특성에 의존하며, 여기에 포함되는 두 가지 큰 요인으로 수소 결합력과 물질의 크기를 들 수 있다 (H. van de Waterbeemd et al. 1996). Peptide나 β -blocking agent의 transport를 이용한 expected model을 연구했던 연구자들은 분자의 수소 결합력이 강력한 결정 요인이라는 연구 결과를 보고 한 바 있다. 여기서 말하는 수소 결합력은 분자의 표면적 가운데 극성을 띠는 부분으로, 산소나 질소, 수소 원자가 산소나 질소 원자에 결합해 형성된 van der Waals surface로 정의되고, 이 부분을 polar surface area (PSA)라 칭한다. 분자의 PSA를 구하는 방법은 특정한 하나의 방법으로 통용되기보다 다양하게 변형된 산출 방법들이 연구 분야의 특성에 따라 다수의 연구자들에 의해 발표되고 있다. Caco-2 cell monolayer를 이용한 약물 흡수 검색 방법은 Caco-2 cell monolayer를 이용한 실험과 그 실험을 통해 얻어진 시료를 분석하는 두 단계로 구성되는데 여기서 좀 더 신속한 검색을 위해 시료 분석을 좀 더 효율적으로 하는 많은 방법들이 또한 제시되고 있다. Monolayer를 통한 약물 실험은 약물간의 interaction을 피하기 위해 각각의 chamber에 하나 하나의 약물을 처리 할 수밖에 없지만, 분석 기계의 발전으로 시료의 분석은 여러 가지의 약물을 한번에 검색 할 수 있기 때문이다. 이렇게 다양하게 시도되고 있는 장 내의 약물 흡수 실험에 관련한 다양한 목적과 방법 가운데 본 연구에서는 신물질의 디자인 및 합성 후 대장 내 흡수를 예측하기 위한 in vitro 흡수 모델을 정립하고자 장내 세포인 Caco-2 cell을 이용한 monolayer system을 확립하여 transport 실험의 표준 protocol을 작성하였고, 이를 통해 dopamine receptor antagonist 유도체 (KCH계열), KJH 계열 등 physicochemical character가 다른 약 30여 가지의 물질의 흡수율을 측정하였다. 또한 실험을 수행하여

얻은 결과와 PSA와의 관계를 통해 좀 더 신속한 약물흡수가 예측 가능할 것인가에 대해 고찰해보았다.

2. 실험재료 및 방법

가. 실험 재료

(1) chemicals

KJH 계열 유도체, dopamine receptor antagonist 유도체, clomipramine, sulfaphenazole, ketoconazole, erythromycin, testosterone, quinidine, verapamil, vinblastine, atenolol, metoprolol (Sigma-aldrich corp), GSK 3 beta 억제제, HDAC 억제제, PPAR alpha, gamma antagonist

(2) Culture medium

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), L-glutamine, Fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL) Hank's balanced salt solution (HBSS), trypsin, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA), HEPES (Sigma-aldrich), transwell (Corning Costar Corp),

(3) 분석 기기

사용한 분석 기기로는 micro LC (Nanospace, Shiseido), LC/MSD (Agilent 110series, LC/MSD Trap)가 있으며, KCH 계열 유도체들은 X Terra™ MS C18 (2.1 x 50 mm, 3.5um) column을 사용하였고, KJH 계열 유도체와 sildenafil은 YMC HPLC Column, hydrosphere C18 (150 x 2.0 mm) column을 이용해 분석하였다. 또한 HPLC (Shimadzu, kyoto, Japan)와 Applied Biosystems API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry를 연결하여 분석하였다. GSK 3 beta 억제제, PPAR alpha, gamma antagonist는 YMC hydrosphere C18 (150 x 2.0 mm) column을 이용해 분석하였고, HDAC 억제제는 CAPCELL PAK C18 (2.0*150 mm, 5 μ m) column 으로 분석하였다.

나. 실험 방법

(1) 세포 배양

Human intestinal colon cancer cell인 Caco-2 cell을 10% FBS를 포함하는 DMEM에 배양하였다. 배양중인 cell이 flask에 80%-90% 밀집도로 자라면, cell count를 하여 12 transwell (pore size 0.4 um, insert growth area 1 cm²)의 apical chamber의 polycarbonate membrane에 5 x 10⁴cells/cm²로 seeding 하였다. Transwell의 apical과 basolateral 부분에 각각 0.5 ml, 1.5 ml의 media를 채워 cell이 자리를 잡도록 약 4일간 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다 (Caco-2 cell의 특성 상 plate나 membrane에 attach하는데 오랜 시간이 소요된다.). 4일간의 배양이후 apical membrane에 자리잡은 cell을 손상시키지

않도록 주의하면서 이틀에 한번씩 배지를 갈아가며 15일간 배양하였다.

(2) Transport assay

(가) Monolayer에 대한 검증

Transepithelial electrical resistance (TEER)을 측정하고, 저흡수 지표물질인 mannitol을 이용해 transport 실험을 선행하였다. TEER은 epithelial cell monolayer의 resistance를 측정하여 monolayer의 상태와 cell confluence 가늠하게 하는 factor로 이용되며 Millicell[®]-ERS voltohmmeter (Millipore corp)로 측정 할 수 있었다. 5×10^4 cells/cm²을 apical monolayer에 seeding 하여 25일간 배양하면서 측정한 TEER과 mannitol 흡수율을 비교하여 실험 가능한 최적의 조건을 파악하였다. TEER의 단위는 voltohmmeter로 측정한 값을 surface area(cm²)로 나눈 Ω /cm²로 나타내었다.

(나) 약물준비

모든 약물은 최종농도 10mM로 맞추어 DMSO에 녹였고, 이를 0.5%로 transport assay buffer (Table 1)에 녹여서 50uM로 만들어 실험을 수행하였다. Mannitol을 이용한 transport 실험은 예비 실험을 통해 얻은 값으로, 농도 0.5 μ Ci/ml을 사용하였다. 이 모든 실험은 5% CO₂ incubator에서 수행되었고, transwell을 shaking하진 않았다.

Table 1. Composition of transport assay buffer

Component		Concentration (g/L)
Hank's balanced salt solution (Mg ⁺⁺ ,Ca ⁺⁺ free)	KCl	4
	KH ₂ PO ₄	0.6
	NaCl	80
	Na ₂ HPO ₄	0.475
	glucose	10
	Sodium bicarbonate	0.35
	L-glutamine	0.286
	HEPES	5.95

(다) transport assay

Transwell의 배지를 제거 한 후, HBSS로 transwell의 apical, basolateral 부분을 세 번 세척 후 transport assay buffer를 채워 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 30분간 incubation하였고, incubation이 끝난 후 TEER를 측정하였다. TEER 측정은 모두 두 번으로 흡수율 실험 시작 전과 끝난 후 측정하였다. 여기서 변화된 TEER은 백분율로 환산하여 Caco-2 cell monolayer에 손상된 정도로, 약물이 monolayer에 미치는 cytotoxicity로 간주하였다. Cell monolayer를 이용한 drug permeability 실험은 apical-to-basolateral 이나 basolateral-to-apical의 두 방향으로 실험을 수행할 수 있다. 약물을 처리할 부분을 donor라 하고 약물이 전달 될 곳을 receptor라고 하고, 약물이 처리될 곳(donor)을 정하여 donor에는 약물을, receptor에는 transport assay buffer를 정확한 부피로 처리하였다. 본 실험에서 사용된 transwell의 경우 apical 부분에 0.5ml, basolateral 부분에 1.5ml을 처리하였다. 처리한 약물에 대한 시료 채취시간은 특별한 경우를 제외하고 20, 40, 80분으로 하였다. (KJH계열의 약물은 흡수율이 낮은 약물이라 시료 채취시간 간격을 보통의 실험보다 늘려서 1, 2, 4시간을 시료 채취시간으로 결정하였다.) 최초 약물을 처리하고 20분이 경과 한 후 receptor chamber에서 50ul의 시료를 정확히 취하였고, 그 receptor chamber에 새로운 transport assay buffer를 50ul 첨가하였다. 40, 80분 경과 후에도 이와 같은 방법으로 모두 세 번의 시료 채취를 수행하였다. 시료 채취가 끝난 후 다시 한번 cell monolayer상태를 파악하기 위해 TEER을 측정하였다.

(라) 시료 분석

[14C]-mannitol을 비롯한 방사선 지표 물질의 분석은 liquid scintillation counter (Packard Instrument)를 이용하였다. 각각의 분석용 시료 50ul는 5ml의 scintillation cocktail solution에 첨가하여 충분히 섞은 후 측정하였다. 일반적인 원소로 구성된 약물의 경우 HPLC를 이용해 분석하였다. 특히 LC/MSD를 이용한 분석은 동일한 분석 조건에서 분석되는 여러 가지의 시료를 한번에 분석 할 수 있는 장점이 있었다. 분석시료는 solvent A는 acetonitrile을 solvent B는 20mM ammonium formate (pH 4.0)을 이용하였다. 이동상의 조성과 처리 방법은 table2와 table 3에 나타내었다. LC (Agilent, 110series)와 LC/MSD Trap (Agilent)를 연결하여 Bruker Daltonics software를 이용하여 MSD trap을 control하고 data analysis를 하였다. KJH 계열은 Hydrosphere C18 150 x 2.0 mm column을 사용하였고, dopamine receptor antagonist 계열은 Capcell Pak C18 2.0 mm column을 사용하였다. 또한 HPLC (Shimadzu, kyoto, Japan)와 Applied Biosystems API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry를 연결하여 분석하였다. GSK 3 beta 억제제, PPAR alpha, gamma antagonist,는 YMC hydrosphere C18 (150 x 2.0 mm) column을 이용해 분석하였고, HDAC 억제제는 CAPCELL PAK C18 (2.0*150 mm, 5 μ m) column 으로 분석하였다.

Table 2. Mobile phase condition for analysis of KJH analogue

Time(min)	Flow (ml/min)	%A	%B
0.00	0.3	25	75
10.00	0.3	60	40
12.00	0.3	60	40
12.10	0.3	25	75

Table 3. Mobile phase condition for analysis of Dopamine receptor antagonist (KCH analogue)

Time(min)	Flow(ml/min)	%A	%B
Initial	0.2	25	75
8.00	0.2	40	60
10.00	0.2	40	60
10.10	0.2	70	30
12.00	0.2	70	30
12.10	0.2	25	75

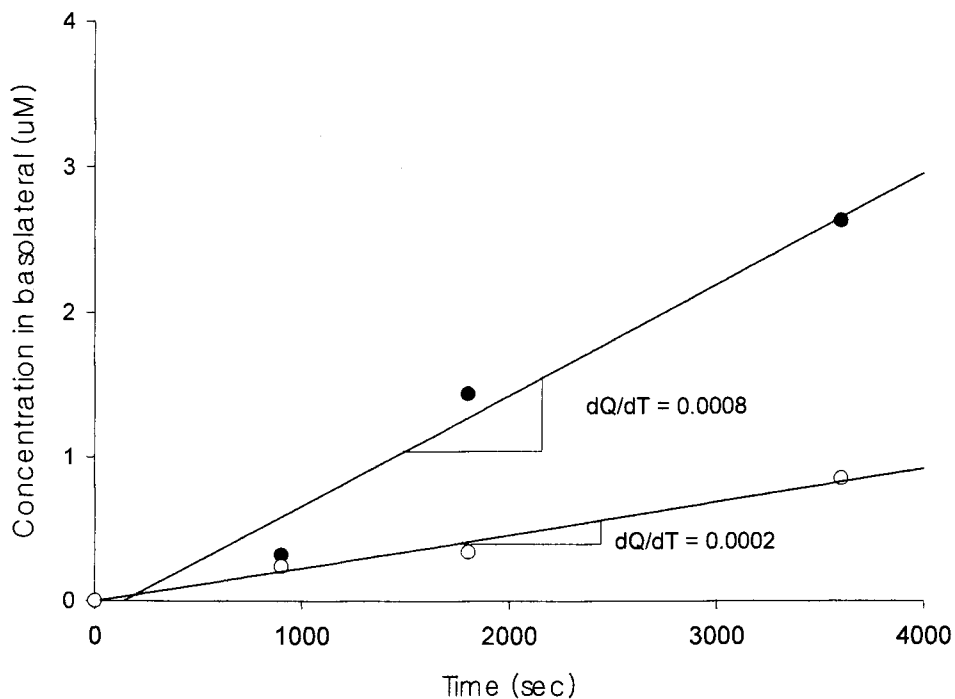
(마) Papp (apparent permeability coefficient) calculation

본 실험에서 이 실험값은 10^{-6} cm/sec로 맞추어 표기하였고 Papp를 구하기 위한 식은 다음과 같다.

$$P_{app} = (V/AC_0) \cdot (\Delta Q/\Delta t)$$

$\Delta Q/\Delta t$ 는 steady-state flux (uM/s)이고, V는 receptor chamber의 부피(ml)이고, A는 insert membrane의 apical membrane area (cm²)이고, C₀는 처리하는 약물의 초기농도 (uM)이다.

50ul씩 채취한 시료의 절대 농도를 구하여 전체 부피에 해당하는 절대 농도로 환산 한 후 몰농도로 맞추었다. 이렇게 맞추어진 농도를 이용해 시간에 대한 농도의 증가량을 구하였다. RI labeling된 chemical의 경우엔, 위 식에서 사용 된 농도 단위 인 'uM'대신 'cpm/ml'을 이용하였다. Figure 1은 실제 실험에 사용했던 약물의 시간당 증가율을 구한 것이다. Receptor chamber의 시료를 분석 해 얻은 전체의 uM 농도와 시간으로 얻어진 이 일차식 그래프와 그 식의 기울기를 이용해 Papp를 구하는 방법을 함께 나타내었다. 처리된 약물의 초기 농도는 50uM이고, receptor chamber의 부피가 1.5ml일 때 closed circle로 표시된 약물은 figure 1의 아래에 계산을 통해 24×10^{-6} cm/s의 Papp (cm/s)값을 갖는다.



KCH-761

$$P_{app} = (1.5/50 \cdot 1)(0.0008) = 24 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

KCH-1058

$$P_{app} = (1.5/50 \cdot 1)(0.0002) = 6 \times 10^{-6} \text{ cm/s}$$

Figure. 1. Example for calculation of P_{app} ○ : KCH-1058 ●: KCH-761

(3) Polar surface area

Chemical의 구조로 mopac을 통해 최소 에너지 상태의 구조를 예측하고, Jurs CPSA descriptors를 이용해 PNSA (partial negative surface area)를 얻었다 (Figure 2).

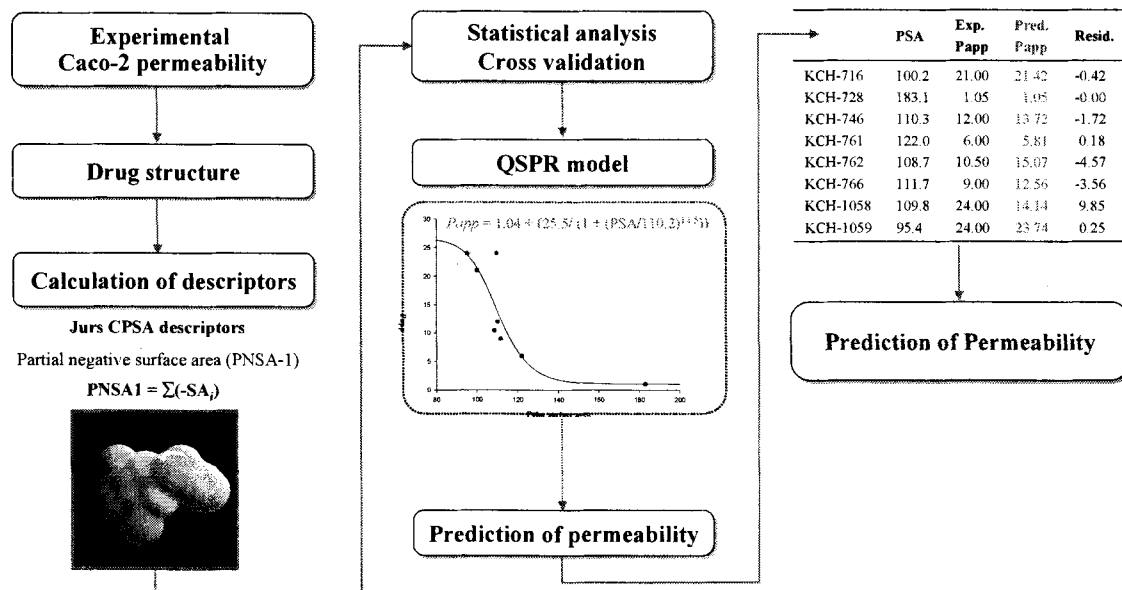


Figure 2. Strategy for prediction of permeability by polar surface area (Partial negative surface area: PNSA-1)

3. 실험 결과 및 고찰

가. 표준 Caco-2 monolayer system 정립

In vitro permeability 실험을 수행하기 위해 선정한 Caco-2 cell은 brush border를 형성하고 apical membrane 상에서 장시간 배양할 때 tight junction으로 장 막과 유사하게 배양된다. 실험 방법과 같이 transwell의 apical membrane에 적당량의 cell을 seeding하여 약 17일간 배양하여 monolayer로 배양하였고, 이렇게 배양한 monolayer를 이용한 실험의 최적의 조건을 마련하기 위해 우선 mannitol permeability와 TEER값을 측정하여 비교하였다 (Fig. 2,3). 측정 결과 TEER 값은 22일간의 배양기간 동안 꾸준히 증가했고, TEER값이 증가함에 따라 mannitol permeability는 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다. 여기서 TEER은 앞에서도 언급했듯이 cell monolayer의 상태를 파악할 수 있는 요소이고, cell 간의 tight junction의 긴장상태를 파악할 수 있는 요소이다. J. Gao등도 이 실험에서 (Gao, J. 2001) 장 막 흡수율 실험이 가능한 monolayer의 mannitol permeability는 0.3×10^{-6} (cm/sec)이하라 하였고, 이 외의 다른 연구자들도 이 정도의 permeability를 기본 조건으로 하고 있다. 본 연구에서 확립한 monolayer는 18일 이상 배양한 때 네 가지의 초기 mannitol 농도에서 모두 실험 가능한 수치로 측정되었고(Table 4) 이 때 TEER은 600이상이었다. TEER이 400이상으로 측정될 때 mannitol의 permeability가 급격히 줄지만 600이상이어야 실험이 가능한 최적 상태라 할 수 있었다(Fig. 4). 따라서 향후 permeability 시험에

서는 Caco-2 세포를 18일 배양한 후 TEER 값을 측정하여 600 이상인 well 만으로 시험을 수행하였다.

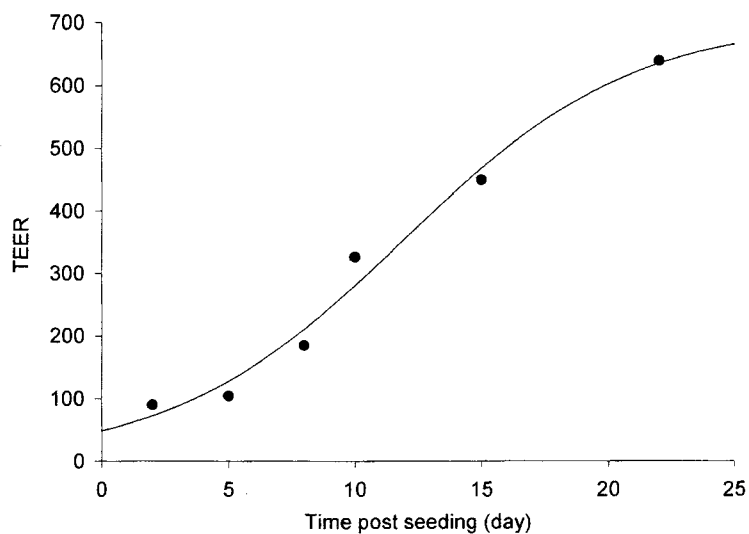


Figure 3. TEER measurement of incubation-dependent Caco-2 cell monolayer

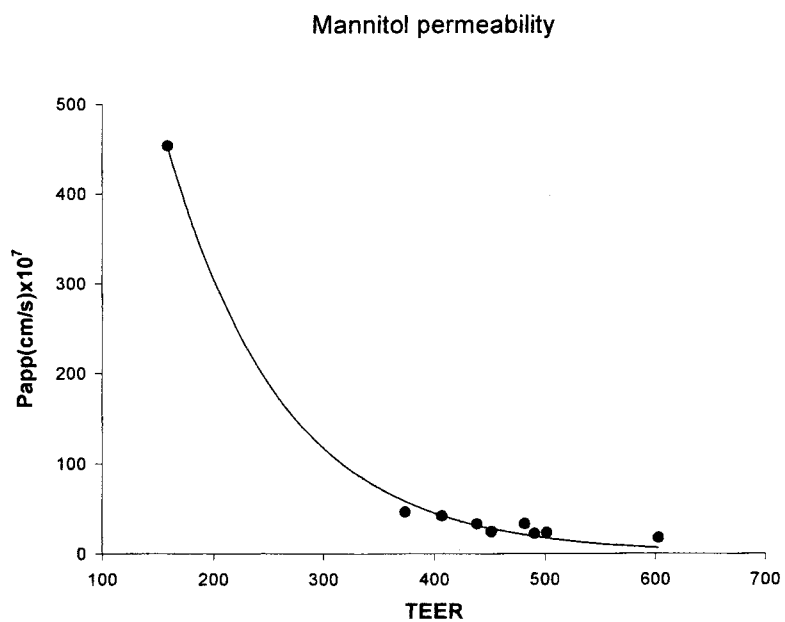


Figure 4. [¹⁴C]-mannitol permeability by TEER value

Table 4. Mannitol permeability

[¹⁴ C]-Mannitol (nCi)	Papp (cm/s) × 10 ⁶ Apical→basolateral
400	0.282
200	0.249
100	0.257
50	0.271

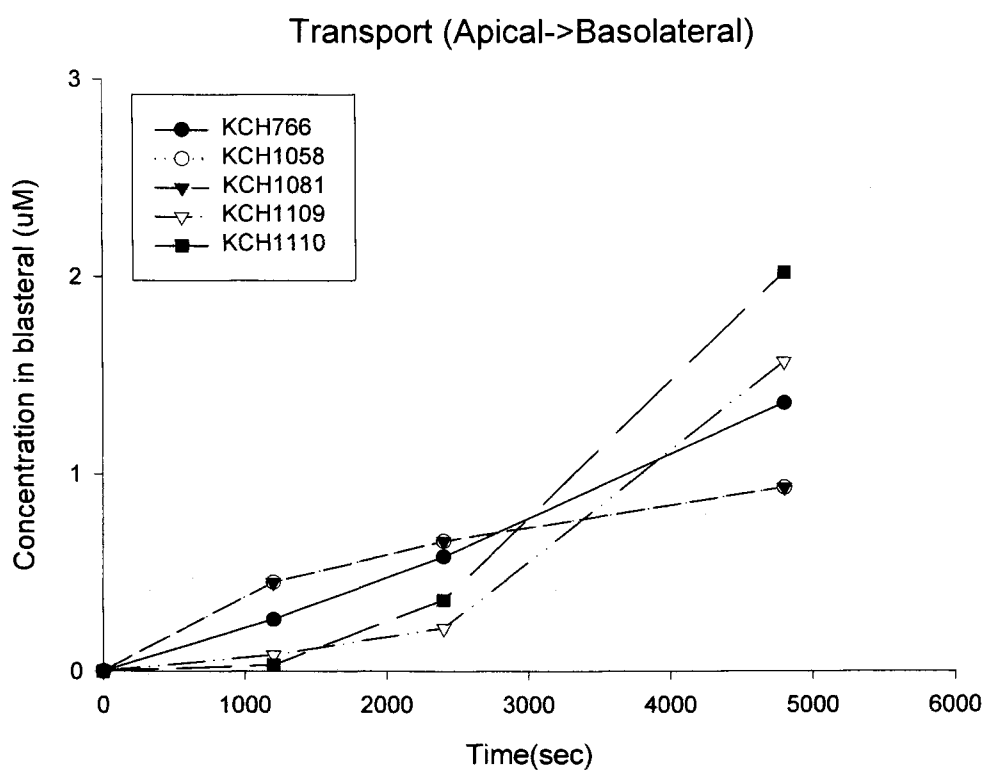


Figure. 5. Time-dependent transport of drugs in Caco-2 cells

나. Dopamine D3/D4 receptor antagonist 의 permeability

확립된 Caco-2 monolayer system으로 KJH계열, dopamine receptor antagonist 유도체들을 초기 농도 50 μM 로 맞추어, transwell에 개별적으로 처리하여 각각의 Papp를 측정하였다 (Table 5). 본 연구의 목적 중의 일부인 rapid aevaluation을 위한 분석 시간의 단축을 위하여 HPLC/MS/MS를 이용하여 single individual analysis 와 더불어 각 시간대별로 채취된 배지를 pool 하여 mass monitoring을 하는 cassette analysis 분석 방법도 병행하여 수행하였다. 먼저 rapid analysis를 위한 cassette analysis 방법으로 얻은 Papp 값과 single individual analysis를 통하여 얻은 Papp 값을 비교한 결과 상관 계수가 0.9이상이었으며 따라서 시료의 분석시간을 절감하기 위하여서는 유사한 화합물의 경우 cassette analysis 방법을 적용할 수 있음을 보여주었고 본 시험에서도 cassette 분석방법을 이용하였다. Dopamine receptor antagonist들은 Caco-2에서 배양

시간 1시간 30분까지 시간에 따라 apical side에서 basolateral side로 transport 되었으며 (Fig. 5) Papp 값도 1시간 30분 까지 transport 되는 pattern의 기울기로 구하였다. 시험에 사용된 21개의 화합물의 Caco-2 세포 permeability coefficient는 0.2에서 24 $\text{cm}^2/\text{sec} \times 10^6$ 으로 계산되었으며, 본 시험에 사용된 화합물의 대부분이 구조 유사체인 점을 감안 시 구조 유사체 일지라도 세포 투과성에 많은 차이를 보여주었다. 일반적으로 Caco-2세포에서 Papp 값이 7이상일 경우 대부분 흡수가 일어나며, 생체이용율의 차이는 대사 등의 요인에 의하여 나타난다고 알려져 있다. 본 시험에서는 11개의 화합물이 이러한 기준 이상의 Papp 값을 가지고 있었다 (Table 5). 본 연구에서 개발된 흡수율 평가 방법은 Table 6에서 보듯이 바와 같이 약 50 여종의 다양한 약물 후보물질들에 적용되었다. 결과는 다양한 약물 후보 물질들에 대하여 성공적으로 흡수율을 제공하였으며 이 결과는 KCH, KJH와 더불어 흡수율 예측과 평가를 위한 모델의 설립에 사용되었다.

약물 중에는 일차대사효소인 cytochrome P450에 의해 대사가 되거나 소장세포에 존재하는 multidrug resistance protein인 P-glycoprotein에 의해 역 투과 되어 실제 흡수되는 약물의 양은, chemical이 갖는 cytochrome P450에 의한 대사 정도와 P-glycoprotein의 substrate로 이용되는 정도에 따라 달라지는 경우도 있다. Passive transport되는 drug의 장내 흡수는 drug이 는 physicochemical character에 따라 영향을 받는다. 특히 Caco-2 cell line의 경우 brush border는 형성하지만 실제 human intestine에 비해 매우 낮은 cytochrome P450 enzyme을 발현하기 때문에, Caco-2 monolayer system의 경우 chemical의 solubility가 흡수율에 결정적인 영향을 끼칠 것이라는 것이 일반적인 견해다. 본 연구에서는 어떤 physicochemical property가 약물의 흡수에 결정적인 역할을 하는지를 규명하고 실험 전에 계산으로 흡수율 정도를 예측할 수 있는지를 평가하기 위하여 partition coefficient (Log P), polar surface area (PSA), 그리고 total surface area (TSA)를 구하였다. Table 7은 일부 화합물들에 대하여 계산된 polar surface area를 보여주고 있다. 표현인자의 계산은 다음과 같다.

Log P: $\sum n_i a_i$ (n_i : the number of atoms of type i , a_i : the atomic logP contribution)

Polar surface area: Jurs descriptor (PNSA-1: Partial negative surface area)

계산된 physico-chemical parameter와 실험적으로 얻은 Caco-2세포에서의 Papp 값과의 연관성을 살펴 보았다. Figure 6은 상관성 분석을 위한 표현인자 Log P와 Papp와의 상관관계를 보이고 있다. Log P와 Papp와의 관계는 sigmoidal plotting에 의하여 상당한 연관성을 보였으며 Log P 값이 약 4 이하일 때 좋은 흡수율을 보였다. 반면 Log P 값이 5 이상일 때는 낮은 흡수율을 보이는 상관관계를 나타냈다. Figure 7은 화합물들의 polar surface area와 Papp와의 상관관계를 보이고 있다. PSA가 약 100 이하일 때 좋은 흡수율을 보였으며 100-120 사이에서는 다소 유동적인 결과를 보였다. 그러나 PSA가 약 120 이상일 때는 일반적으로 낮은 흡수율을 보였다.

실제 실험군의 Papp값과 PSA값으로 얻어진 식을 도입하여 흡수율을 예측한 결과의 일부를 Table 8에서 보이고 있다. 결과는 상당한 일치성을 보였으며 더욱 다양하고, 많은 수의 test set을 통해 유도된 model 일 경우 더욱 자세한 예측이 가능하리라 여겨진다. 결과적으로 QSAR model에서 산출된 Papp는 computational workstation을 통해 얻어진 PSA와 연관하여 실제 Caco-2 monolayer transport system내에서 약물 흡수와 관련된다는 사실을 알 수 있었다.

Table 5. Papp values of test compound in Caco-2 cell system.

Compounds	Papp (cm/s) $\times 10^{-6}$
KCH-716	21.00
KCH-728	1.05
KCH-730	3.00
KCH-732	2.4
KCH-743	6.0
KCH-746	12.0
KCH-747	6.0
KCH-748	18.0
KCH-760	2.4
KCH-761	6.0
KCH-762	10.50
KCH-764	16.50
KCH-766	9.0
KCH-1058	24.0
KCH-1059	24.0
KCH-1081	12.0
KCH-1109	9.0
KCH-1110	10.5
KKJ-1002	0.9
KJH-1043	0.2
KJH-1045	0.2
KJH-1047	0.38
KJH-1061	0.3

Table 6. Papp values of test compound in Caco-2 cell system.

Compounds	처리농도 (uM)	Papp (cm/s) × 10 ⁶
1	50	2.3
2	50	2.1
3	50	2.1
4	50	3.1
5	10	2.5
6	50	5.7
7	50	5.2
8	50	9.0
9	50	6.0
10	50	4.6
11	50	7.6
12	50	6.7
13	50	4.9
14	50	7.5
15	20	5.4
16	50	9.0
17	50	9.8
18	50	10.0
19	50	8.4
20	50	6.9
21	50	9.5
22	50	9.0
23	50	9.6
24	50	10.5
25	50	12.0
26	50	11.7
27	50	8.9
28	50	6.6
29	50	11.9
30	50	6.4
31	50	5.4
32	50	3.4
33	50	6.5
34	50	2.9
35	10	3.8
36	50	6.4
37	10	2.9
38	50	3.8
39	50	8.6
40	50	5.5
41	20	2.1
42	10	6.6
43	50	1.5
44	20	2.1
45	50	2.4
46	50	4.4

Each date represent mean of duplicate experiment

Table 7. Polar Surface Area (PSA) of tested compounds

Compounds	[M+H] ⁺	PSA (Å ²)	NPSA (Å ²)	TSA (Å ²)
KCH-716	378	100.2	622.3	722.5
KCH-728	497	183.1	672.5	865.6
KCH-730	512	114.4	798.7	913.1
KCH-732	452	110.0	725.1	835.1
KCH-743	380	167.0	584.2	751.1
KCH-746	422	110.3	722.0	832.3
KCH-747	368	99.1	601.1	700.2
KCH-748	362	122.8	631.1	753.9
KCH-760	437	231.3	631.9	863.1
KCH-761	452	122.0	740.7	862.7
KCH-762	452	108.7	748.3	857.1
KCH-764	392	96.2	635.4	731.6
KCH-766	437	111.7	687.5	799.2
KCH-1058	466	109.8	738.3	848.1
KCH-1059	412	95.4	658.2	753.5
KCH-1081	440	73.0	723.6	796.6
KCH-1109	454	68.4	742.4	810.9
KCH-1110	400	72.8	670.5	743.3
sildenafil	475	135.1	657.8	792.9
KJH-1002	491	144.6	656.4	801.0
KJH-1043	521	155.8	686.7	742.5
KJH-1045	505	144.4	679.0	833.4
KJH-1047	535	155.6	716.6	872.2
KJH-1061	477	146.0	638.4	784.4

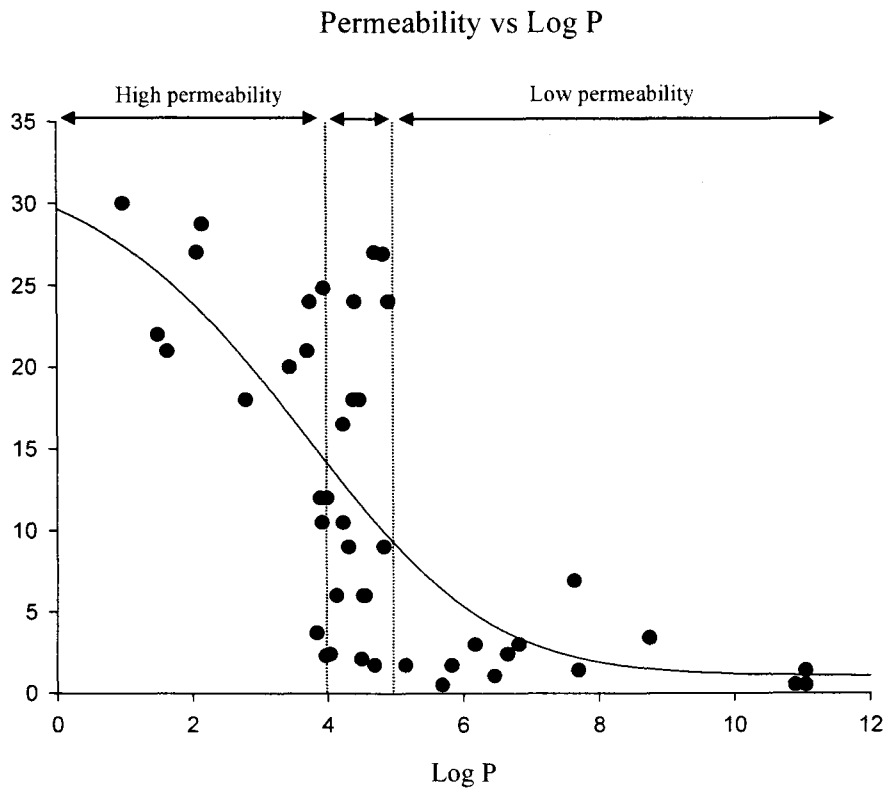


Figure 6. Relationship between in Caco-2 permeability and Log P

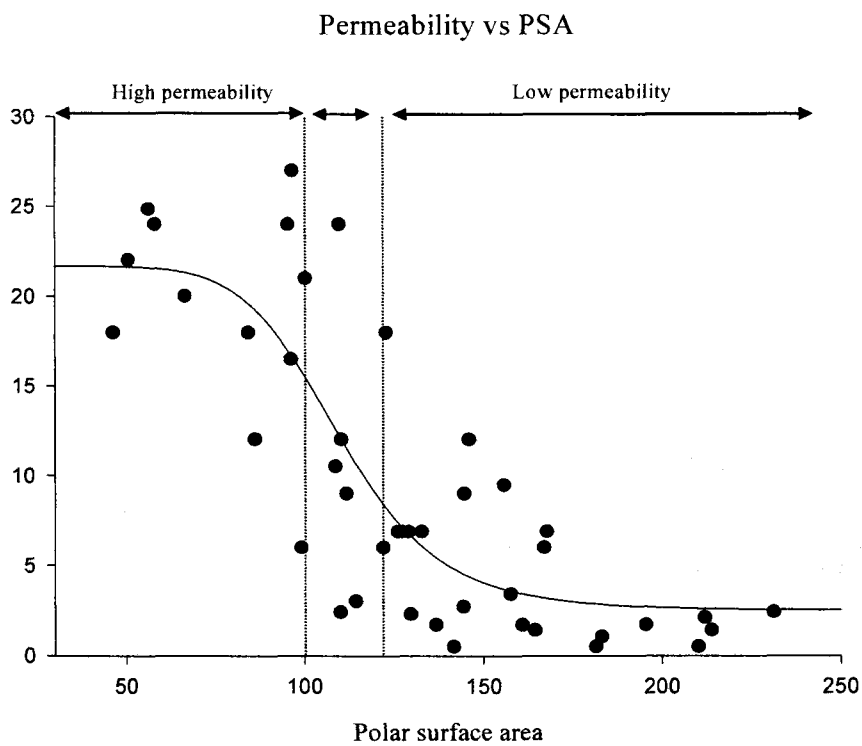


Figure 7. Relationship between Caco-2 permeability and polar surface area

Table 8. Experimental Papp value and calculated Papp value for compounds

Compounds	PAS (Å ²)	Experimetal Papp(x10 ⁻⁶ cm/s)	Predicted Papp(x10 ⁻⁶ cm/s)	Residual
KCH-716	100.2	21.0	21.42	-0.42
KCH-728	183.1	1.05	1.06	-0.01
KCH-746	110.3	12.00	13.73	-1.73
KCH-761	122.0	6.00	5.81	0.19
KCH-762	108.7	10.50	15.07	-4.57
KCH-766	111.7	9.00	12.57	-3.57
KCH-1058	109.8	24.00	14.15	9.85
KCH-1059	95.4	24.00	23.75	0.25
silenafile	135.1	1.80	1.71	0.09
KJH-1002	144.6	0.90	0.85	0.05
KJH-1045	144.4	0.80	0.89	-0.69
KJH-1047	155.6	0.30	0.55	-0.25
KJH-1061	146.0	0.30	0.79	-0.49

4. 참고 문헌

1. I.J. Hidalgo, R.J. Raub, and R.T. Borchardt. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* 96:736-749
2. J. Fogh, J.M. Fogh, and T. Orfeo, (1977) 127 Cultured human colon cell lines producing tumors in nude mice, *J. Natl. Acad. Sci. USA.* 59:221-226
3. Burton, P.S., Conradi, R. A., Hilgers, A. R. and Ho, N. F. H(1993) Evidence for a polarized efflux system for peptides in the apical membrane of Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190, 760-766
4. Karlsson, J., Kuo, S.-M., Ziemniak, J. and Artursson, P.(1993) Transport of celiprolol across human intestinal epithelial Caco-2 cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1009-1016
5. Takanaga, H., Tamai, I. and Tsuji, A.I (1994) pJ-dependent and carrier-mediated transport of salicylic acid across Caco-2 cells. *J. Pharm. Pharmacol.* 46, 567-570
6. Matsumoto, S.-I., Saito, H. and Inui, K.-I. (1994) Transcellular transport of oral cephalosporins in human intestinal epithelial cells, Caco-2: Interaction with dipeptide transport systems in apical and basolateral membranes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 270, 498-504
7. Dantzig, A. H., Hoskins, J., Tabas, L. B., Bright, S., Shepard, R. L., Jenkins, I.L., Duckworth, D.C., Sportsman, J.R., Mackenson, D., Rocstech Jr., P.R. and Skatrud, P.L. (1994) Association of intestinal peptide transport with a protein related to the cadherin superfamily. *Science* 264, 430-433
8. Hunter, J., Jepson, M.A., Tsuruo, T., Simmons, N.L. and Hirst, B.H. (1993) Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 268, 14991-14997.
9. Phung-Ba, B., Warnery, A., Scherman, D. and Wils, P. (1995) Interaction of pristinamycin IA with P-glycoprotein in human intestinal epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 288, 187-192
10. Artursson, P. and Karlsson, J. (1991) Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175, 880-885
11. Rubas, W., Villagran, J., Cromwell, M., McLeod, A., Wassener, J. and Mrsny, R. (1995) Correlation of solute flux across Caco-2 monolayers and colonic tissue in vitro. *St.p. Pharma Sci.* 5, 93-97
12. Wils, P., Warnery, A., Phung-Ba, V. and Scherman, D. (1994) Differentiated intestinal epithelial

cell lines as in vitro models for predicting the intestinal absorption of drugs. *Cell Biol. Toxicol.* 10, 393-397

13. W. Rubas, N. Jezyk, and G. M. Brass. (1993) Comparison of the permeability characteristics of a human colonic epithelial (Caco-2) cell line to colon of rabbit, monkey, and dog intestine and human drug absorption. *Pharm. Res.* 10:113-118

14. Navia. M. A.; Cahturvedi, P. R. (1996) Design principle for orally bioavailable drugs. *Drug. Discov. Today.* 1, 179-189

15. Chan. O.H.; Stewart. B. H. (1996) Physicochemical and drugdiscovery considerations for oral drug bioavailavility, *Drug, Discov. Today.* 1, 461-473

16. C.A.Lipinski, F.Lombardo, B. W. Dominy, and P. J. Feeney. (1997) Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Del. Rev.* 23:3-25

17. B. H. Stewart, O.H. CHan, N. Fezyk, and D. Fleisher. (1997) Discrimination between drug candidates using models for evaluation of intestinal absorption. *Adv. Drug Del. Rev.* 23:27-45

18. H. van de Waterbeend, G. Camerish, G. Folkers, and O. A. Raevsky. (1996) Estimation of Caco-2 cell permeability using calculated molecular descriptors. *Quant. Struct- Act. Relat.* 15:480-490

19. C.P.Lee, R.L. A. de Vrueth, and P.L. Smith. (1997) Selection of drug development candidates based on in vitro permeability measurements. *Adv. Drug Del. Rev.* 23:47-62

20. H. Ellens, P. E. Eddy. D.-P. Lee, P. Dougherty, A. Lago, J.-N. Xiang, J. D. Elliott, H.-Y. Cheng, E. Ohistein, and P.L.Smith. (1997) In vitro permeability screening for identification of orally bioavailable endothelin receptor antagonists.*Adv. Drug Del. Rev.* 23:99-109

21. J. Gao, O. Murase, R. L. Schowen, J. Aube, and R. T. Borchardt, A. (2001) Functional Assay for Qunatitation of the Apparent Affinities of Ligands of P-glycoprotein in Caco-2 cells, *Pharmaceu, Res.* 18:171-176

제 2 절 P-glycoprotein modulator 의 screening 방법 개발

1. 서론

약물 흡수를 예측하고자 하는 목적으로 in vivo, in vitro에서 다양한 약물 흡수 실험이 개발 진행되고 있다. 이러한 연구의 목적은 drug이 장 막을 통해 흡수 될 수 있는 경로, 즉 active transport이나 passive transport이나를 탐색하여, drug이 active transport를 통해 이동한 약물의 경우 개별적인 흡수 경로를 보인 연구 결과도 발표 되었고 (Burton, P.S et al. 1993, Karlsson, J. et al 1993, Takanaga, H. et al 1994), 특히 Caco-2 cell을 통해 연구된 대부분의 active transport는 depeptide carrier (Matsumoto, S.-I et al 194, Dantzig, A. H 1994)나 P-glycoprotein (Hunter, J. et al 1993, Phung-Ba, V. et al 1995)을 통한 경로임이 발표되었다. 앞에서 우리는 Caco-2 cell을 이용하여 소장 흡수율을 측정, 평가하는 system을 확립시킨 바 있다. 이 시스템을 이용하여 한 단계 더 나아가 흡수 경로 중 한가지인 P-glycoprotein-mediate transport에 관한 연구를 하였다. P-glycoprotein (P-gp)은 임상적으로 중요한 여러 가지 많은 약물들의 흡수, 분포, 배설 등에 영향을 준다. P-gp 는 ATP-dependent multi-drug efflux transporter로서 170 kDa의 막 단백질이며, 사람에게는 MDR1 gene이 발현되어 있다. P-gp 는 인체 여러 가지 조직에 분포하고 있는데 간(liver), 신장(kidney), Gastrointestinal tract(GI tract), 혈관뇌장벽(blood-brain barrier) 등에 주로 위치한다. 암세포에서는 다약제내성 (Multiple Drug Resistance)을 나타낸다. 약물 흡수에 있어서 P-gp 가 중요한 이유는 인체 내에서 efflux pump로 작용하기 때문이다. 어떠한 약물이 몸속으로 들어왔을 때 우리 몸은 drug을 생체의물질(xenobiotics)로 받아들이므로 신속히 방어기작에 나선다. 그 중 P-gp 도 drug을 제거 하려는 작용을 하여 drug을 몸 밖으로 계속 efflux 시키게 되므로 그 만큼 약물의 흡수가 떨어지게 되는 것이다. 그러므로 이런 P-gp를 매개로 하는 약물의 경우 verapamil 과 같이 잘 알려진 P-gp 억제제 (inhibitor) 와 함께 투여 하게 되면 P-gp efflux 작용이 억제되게 되어 결과적으로 target drug의 흡수율이 증가하게 되는 것이다. 이번 연구의 주된 목적은 caco-2 cell에 있어서 여러 가지 천연물(natural products) 중 P-gp modulator를 screening 하여 그 중 P-gp 에 억제적 영향(inhibitory effect)을 주는 천연물을 찾아내는 것이다. 우리는 크게 두 단계로 실험을 하게 되는데, 먼저 53개의 천연물을 가지고 screening을 하는 방법을 개발 확립한 후, 그 다음으로 Caco-2 cell monolayer에서 transport studies를 통해 흡수 와 배설을 동시에 측정함으로써 결과적으로 약물의 흡수를 평가하게 된다. 먼저 많은 수의 약물을 screening하는데 있어서는 P-gp substrate로 잘 알려진 Rhodamine-123(RH-123)을 이용하여 이를 test compounds를 함께 처리 하였을 때 cell 내로 RH-123 얼마나 축적이 되는지를 통해 P-gp 의 억제제로서의 영향을 알 수 있게 된다. 결과는 positive control 로 쓰이는 Nifedipine (100%) 에 대한 % inhibition 으로 나타낸다. [Dirtmar Schwab et al.

2003] 이렇게 해서 screening 한 compound 중 억제제로의 영향이 크게 나타난 Diosmin, Deoxyschizandrin, α -Naphthoflavone을 가지고 그다음 실험을 진행하여 나갔다. 앞의 두 물질은 각각 냉이, 오미자의 주성분이고 주로 이물질을 중심으로 실험하였다. 이어서 Caco-2 cell monolayer을 이루어 transport 실험을 하였는데 막의 apical에서 basolateral 부분으로의 투과를 흡수(absorption)로, basolateral에서 apical부분으로의 투과를 배설(excretion)로 정립하고 그 차이와 Papp를 비교하였다. 여기서는 P-gp substrate에 Digoxin을, positive control 로는 P-gp 억제제로 잘알려진 Verapamil을 사용하여 실험하였다.

2. 실험재료

가. Chemicals

Table 1. Natural products list

5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavone	Ginsenoside Rb2	Octopamine
Aloin	Ginsenoside Rc	Paeoniflorin
α -Naphthoflavone	Ginsenoside Rd	Paeonol
Apigenin	Ginsenoside Re	Puerarin
Astragaloside	Ginsenoside Rg1	Quercetin
Caffeic acid	Glycyrrhizin	Rhein
(\pm)-Catechin	Hesperetin	Rutaecarpine
Chrysin	Hesperidin	Rutin
Deoxyschizandrin	Honokiol	Salidroside
Diosmin	Icariin	Silibinin
EGCG	Isorhamnetin	Silybin
Emodin	Kaempferol	Synephrine
Esculin	Luteolin	(\pm)Taxifolin
Evodiae	Magnolol	Tetrahydropalmatine
Ferulic acid	Morin	Theobromine
Fisetin	Myricetin	Theophylline
Galangin	(\pm)-Naringenin	Tyramine
Ginsenoside Rb1	Naringin	

Vinblastine, Rhodamine-123, Nicardipine, Digoxin, Verapamil.(Sigma)

나. Culture medium

Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), L-glutamine, Fetal bovine serum (FBS) (Gibco BRL) Hank's balanced salt solution (HBSS), trypsin, ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA),

HEPES (Sigma-aldrich), BIOCOAT poly-D-lysin-coated 96-well black/clear plates (BD, Franklin Lakes, NJ), transwell (Corning Costar Corp)

다. 분석 기기

형광을 띠는 Rh-123 같은 경우에는 Florescence multiwell plate reader (excitation 450 nm, emission 530 nm)로 측정하였다. 그 외 compound 에 사용한 분석 기기로는 HPLC (Shimadzu, kyoto, Japan)와 Applied Biosystems API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry를 연결하여 분석하였다. Column 은 CAPCELL PAK C18 (2.0*150 mm, 5 μ m)을 사용하였다.

3. 실험 방법

가. 세포 배양

먼저 RH-123 screenig assay를 위해서 Human intestinal colon cacer cell 인 Caco-2 cell을 10 % FBS를 포함하는 DMEM media 에 약 4~5일간 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다. 한번의 계대를 거친 후 20 nM vincristine을 처리하여 다시 배양한다. vincristine을 처리하는 이유는 실험에 있어서 P-gp 발현의 variability를 줄이고 sensitivity를 증가 시키기 위해서이다. 배양중인 cell 이 flask 에 80-90% 밀집도로 자라면, 2-3번 pre-warmed PBS로 washing 하여 vincristine을 완전히 제거시킨다. 그다음 cell을 count 하여 BIOCOAT poly-D-lysin-coated 96-well black/clear plates 에 200 ul 씩 골고루 분주하고 (30000 cells/well) 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 약 4-5 일간 배양한다.

Transport assay를 하기 위해서는 동일한 방법으로 Caco-2 cell을 10% FBS를 포함하는 DMEM에 배양한 후 cell이 flask에 80%-90% 밀집도로 자라면, cell count를 하여 12 transwell (pore size 0.4 μ m, insert growth area 1 cm²)의 apical chamber의 polycarbonate membrane에 5 x 10⁴cells/cm²로 seeding 하였다. Transwell의 apical과 basolateral 부분에 각각 0.5 ml, 1.5 ml의 media를 채워 cell이 자리를 잡도록 약 4일간 37°C, 5 % CO₂ incubator에서 배양하였다 (Caco-2 cell의 특성 상 plate나 membrane에 attach하는데 오랜 시간이 소요된다.). 4일간의 배양이후 apical membrane에 자리잡은 cell을 손상시키지 않도록 주의하면서 이틀에 한번씩 배지를 갈아가며 15-20일간 배양하였다.

나. Rhodamine-123 screening assay

준비된 Caco-2 cell을 pre-warmed 된 PBS 로 2번 washing 후 5% FBS 가 포함된 DMEM으로 바꾸어 준다. 모든 약물은 최종농도 10mM로 맞추어 DMSO에 녹였고, 50 μ M로 media녹여서 준비하였다. test 약물들을 well 에 처리하고 37°C, 5 % CO₂ 에서 15 분간 pre-incubaion 시킨다. 그런 다음 최종농도가

1ug/ml (2.6 uM) 되도록 RH-123을 처리한다. 4 시간 후 ice-cold PBS 로 2번 washing 하고 RH-123 의 양을 측정한다. Florescence multiwell plate reader를 사용하여 450 nm의 excitation wavelength, 530 nm emission wavelength 로 scan 한다. 결과는 % of inhibition으로 나타내며, P-gp 의 positive control 인 Nicardipine 을 100 % inhibition 이라고 보고 계산한다.

다. Transport assay

(1) Monolayer에 대한 검증

Transepithelial electrical resistance (TEER)을 측정하고, 저흡수 지표물질인 Atenolo과 고흡수 지표물질 인 Metoprolo을 이용해 transport 실험을 선행하였다. TEER은 epithelial cell monolayer의 resistance를 측정하여 monolayer의 상태와 cell confluence 가늠하게 하는 factor로 이용되며 Millicell[®]-ERS voltohmmeter (Millipore corp)로 측정 할 수 있었다. 5×10^4 cells/cm²을 apical monolayer에 seeding 하여 20일간 배양하면서 측정한 TEER과 지표물질의 흡수율을 비교하여 실험 가능한 최적의 조건을 파악하였다. TEER의 단위는 voltohmmeter로 측정한 값을 surface area(cm²)로 나눈 Ω /cm²로 나타내었다.

(2) 약물준비

모든 약물은 최종농도 10 mM로 맞추어 DMSO에 녹였고, 이를 0.5%로 transport assay buffer 에 녹여서 50uM로 만들어 실험을 수행하였다. 이 모든 실험은 5% CO₂ incubator에서 수행되었고, transwell 을 shaking하진 않았다. P-gp substrate 로 Digoxin을 사용하였고, P-gp 억제제로 잘 알려진 Varapamil 을 사용하여 비교하였다.

(3) transport assay

준비된 Transwell의 배지를 제거 한 후, pre-warm HBSS로 transwell의 apical, basolateral 부분을 세 번 세척 후 transport assay buffer를 채워 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 20분간 incubation하였고, incubation이 끝난 후 TEER를 측정하였다. TEER 측정은 모두 두 번으로 흡수율 실험 시작 전과 끝난 후 측정하였다. 여기서 변화된 TEER은 백분율로 환산하여 Caco-2 cell monolayer에 손상된 정도로, 약 물이 monolayer에 미치는 cytotoxicity로 간주하였다. Cell monolayer를 이용한 drug permeability 실험 은 apical-to-basolateral(흡수) 이나 basolateral-to-apical(배설)의 두 방향으로 실험을 수행할 수 있다. 약 물을 처리할 부분을 donor라 하고 약물이 전달 될 곳을 receptor라고 하고, 약물이 처리될 곳(donor)을 정하여 donor에는 약물을, receptor에는 transport assay buffer를 정확한 부피로 처리하였다. 먼저 test 약물인 Diosmin과 Deoxyshizandrin을 처리하고 15분간 37 °C, 5 % CO₂ 에서 pre-incubation 시켰다. 그 런 다음 P-gp substrate인 Digoxin을 최종농도 50 uM 로 처리하고 가볍게 shaking 한다. 본 실험에서

사용된 transwell의 경우 apical 부분에 0.5ml, basolateral 부분에 1.5ml을 처리하였다. apical-to-basolateral (흡수)의 경우 apical 부분에 약물을 0.5ml, basolateral 부분에 1.5 ml의 HBSS를 채워주게 되고, basolateral-to-apical (배설)는 그 반대이다. 처리한 약물에 대한 시료 채취시간은 특별한 경우를 제외하고 20, 40, 60, 90분으로 하였다. 최초 약물을 처리하고 20분이 경과 한 후 receptor chamber에서 50 ul의 시료를 정확히 취하였고, 그 receptor chamber에 새로운 transport assay buffer를 50ul 첨가하였다. 40, 60, 90분 경과 후에도 이와 같은 방법으로 모두 세 번의 시료 채취를 수행하였다. 시료 채취가 끝난 후 다시 한번 cell monolayer상태를 파악하기 위해 TEER을 측정하였다.

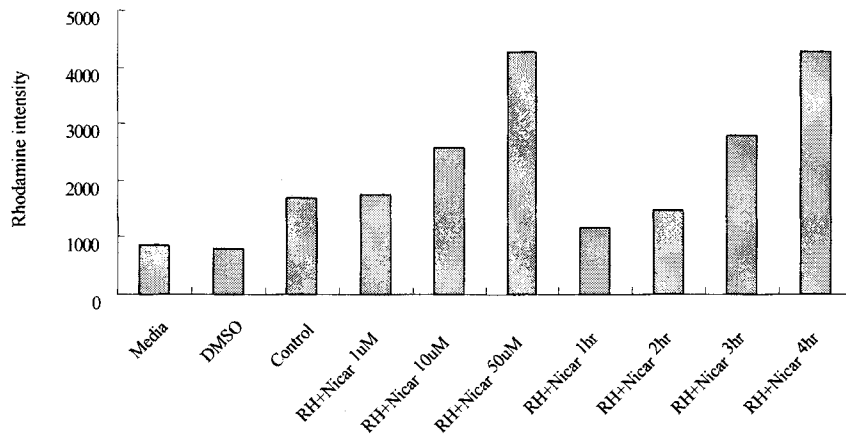
(4) 시료 분석

약물의 경우 HPLC를 이용해 분석하였다. 특히 LC/MS를 이용한 분석은 동일한 분석 조건에서 분석되는 여러 가지의 시료를 한번에 분석할 수 있는 장점이 있었다. 분석시료는 분석시료는 solvent (A) 5 mM ammonium formate (pH 6.0), solvent (B) 90 % acetonitrile in 5 mM ammonium formate (pH 6.0)의 mobile phase 를 이용하였다. Column 은 CAPCELL PAK C18 (2.0×150 mm, 5 μ m)을 사용하였고, 0.2 ml/min 의 유속으로 흘렸으며, oven 은 40 °C를 유지하였다. LC (Shimadzu, kyoto, Japan)와 Applied Biosystems API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry를 연결하여 분석하였다. 분석 후 Analyst 1.3 software를 이용하여 data analysis를 하였다.

4. 실험 결과 및 고찰

가. P-gp modulator screening system (Rhodamine-123 assay) 정립

본 연구에서 P-gp modulator를 신속히 screening 하기 위한 방법 중의 한가지인 Rhodamine-123 assay를 정립하였다. 이는 P-gp substrate 이자 지질친화성을 가지어 막을 잘 투과하는 model drug으로 알려진 Rhodamine-123을 사용하므로써 test compound 에 대한 P-gp inhibitory effect를 적을 시료를 가지고 간단히 screening 할 수 있다는 장점을 가진다. 먼저 이런 시스템의 유효성을 위해 시험을 해보았다. 우리가 사용하는 media나 chemical 들이 형광을 측정하는데 특정한 영향의 주는지의 여부를 보았고, test compound를 처리하지 않은 control 에 비하여 Positive control 인 Nicardipine 이 농도나 incubation 시간에 따라 어떻게 반응하는지를 시험해 보았다. 그 결과 nicardipine 은 50 uM이 적정 농도임을 알 수 있었고, 논문에서와 마찬가지로 incubation 시간은 4 시간이 적당함을 알 수 있었고 이런 조건으로 시스템을 정립할 수 있었다. [Dirtmar Schwab et al. 2003] (Figure 1.) 53개의 천연물을 가지고 RH-123 assay를 시행한 결과 20개의 물질이 P-gp에 억제적 영향을 보였고 여러 번의 실험을 통하여 그중 nicardipine 에 비교하였을 때 50% 이상의 억제적 영향을 보인 Diosmin, Deoxyschzandrin, α -Naphthoflavone 을 선택하여 중점적으로 실험해 나갔다. (Table 2, Figure 2.) 세 물질의 농도에 따른 변화를 실험한 결과에서도 농도 증가에 따라 억제적 영향이 증가함으로써 농도에 의존적임을 알 수 있었다. (Table 3, Figure 3)



* RH : Rhodamine-123, Nicar : Nicardipine

Figure 1. Rhodamine assay system test

Table 2. Inhibitory effect of P-gp in RH-123 screening assay

Compound	RH-123 assay	
	Caco-2 % inhibition	
Aloin		5.3
α -Naphthoflavone		64.9
Caffeic acid		2.0
Deoxyschizandrin		55.8
Diosmin		72.9
EGCG		4.3
Gensenoside Rb2		5.5
Gensenoside Rc		5.3
Gensenoside Rd		4.5
Gensenoside Re		0.8
Kaempferol		14.0
Nicardipine		100.0
Paeoniflorin		4.2
Paeonol		4.8
Puerarin		5.7
Rutaecarpine		15.5
Salidroside		3.3
Synephrine		9.4
Tetrahydropalmatine		15.3
Theophylline		3.5

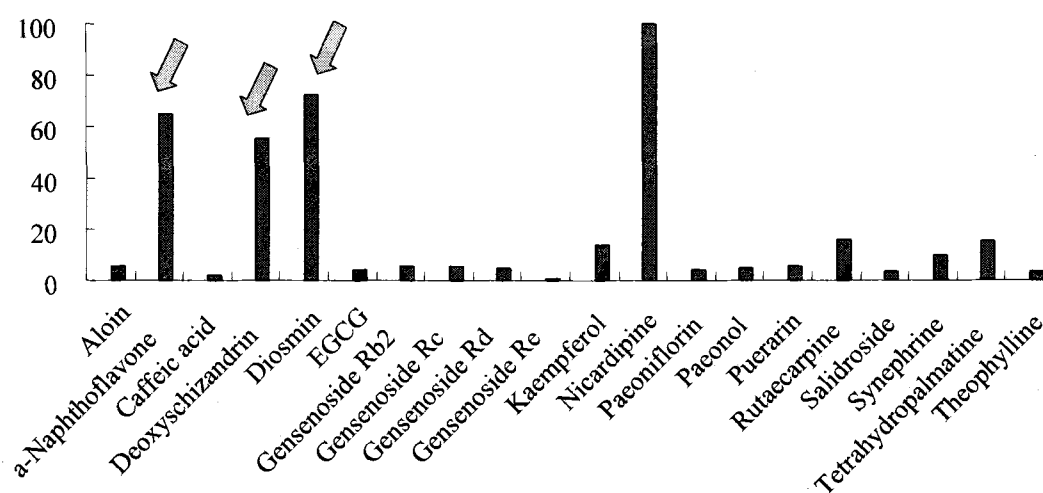


Figure 2. Inhibitory effect of P-gp in RH-123 screening assay

Table 3. Concentration-dependent inhibition of rhodamine-123 accumulation in Caco-2 cells by natural products.

Conc. (uM)	Diosmin	α -naphthoflavone	Deoxyschizandrin
10	6.6 \pm 0.3	15.6 \pm 3.0	5.9 \pm 0.6
20	20.5 \pm 2.0	26.1 \pm 1.7	19.5 \pm 1.4
50	75.0 \pm 5.1	47.3 \pm 3.5	45.9 \pm 4.0
100	107.8 \pm 2.4	62.6 \pm 1.5	63.4 \pm 2.7

Each date represent mean of triplicate experiment

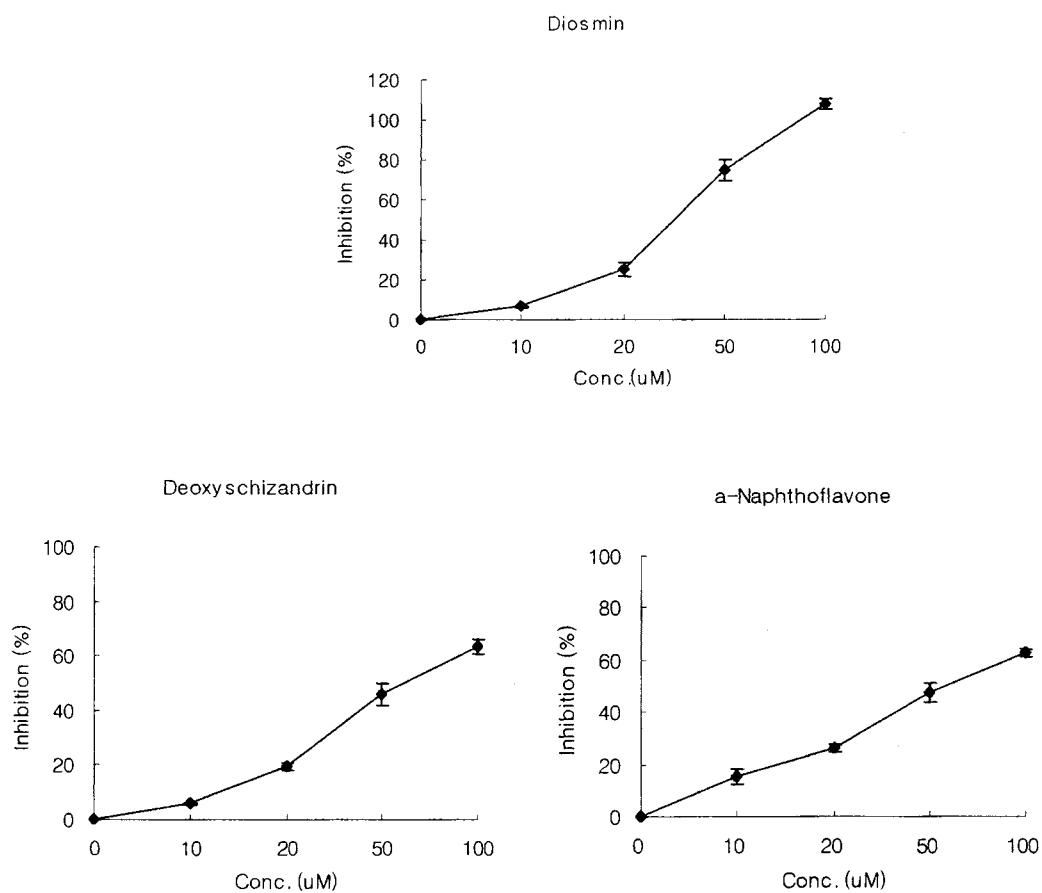


Figure 3. Concentration-dependent inhibition of rhodamine-123 accumulation in Caco-2 cells by natural products.

나. Transport assay in Caco-2 monolayer

이처럼 RH-123으로 screening 한 53개영 천연물 중에 Diosmin, Deoxyschzandrin, α -Naphthoflavone 세 가지 물질을 바탕으로 좀더 자세한 결과를 얻기 위하여 다음 실험인 transcellular transport studies를 시험해 보았다. 이 실험에서는 정확한 LC/MS 정량을 통하여 Papp value를 얻어야 하므로 P-gp substrate로 잘 알려진 Digoxin를 통하여 실험하였다.[Shuzhong Zhang et al. 2003] Caco-2 cell에서는 brush border를 형성하고 장시간 배양할 때 tight junction를 잘 막과 유사하게 자란다. Caco-2 cell monolayer 막의 apical에서 basolateral 부분으로의 투과를 흡수(absorption, A-to-B)로, basolateral에서 apical부분으로의 투과를 배설(excretion, B-to-A)로 정립하고 그 차이와 Papp를 비교하였다. Positive control로는 P-gp 억제제로 잘 알려진 Verapamil을 사용하여 실험하였다. test compound를 처리하지 않은 control과 함께 처리한 well을 비교하여 각각의 Papp value를 구하고 그 값을 가지고 A-to-B와 B-to-A에 관한 값은 Efflux ratio(A-to-B/B-to-A ratio)로 나타내었다. 흡수를 보면 P-gp efflux pump의 작용을 억제되어 control에 비하여 test compound를 함께 처리한 군이 흡수가 증가됨을 알 수 있고, 마찬가지로 배설에서도 control에 비하여 test compound를 함께 처리한 군이 배설이 감소 되어 전체적으로 digoxin의 총 흡수량을 증가시켜줌을 알 수 있다.(Figure 4.) Efflux ratio(A-to-B/B-to-A ratio)는 control ratio 5.1과 비교할 때, Diosmin, Deoxyschzandrin, α -Naphthoflavone, Verapamil은 각각 2.0, 2.4, 2.4, 1.9 ratio를 얻었다. (Table 4.) 결론적으로, 우리는 이번 실험의 결과로 Diosmin, Deoxyschzandrin, α -Naphthoflavone은 Caco-2 cell에서의 P-gp-mediated efflux를 억제 시킴을 알 수 있다.

Table 4. Effects of test compounds on the absorption and excretion of Digoxin in Caco-2 cells.

Compound	A-to-B/B-to-A ratio
Control	5.1
with diosmin	2.0
with α -naphthoflavone	2.4
with deoxyshizandrin	2.4
with verapamil	1.9

Each date represent mean of duplicate experiment

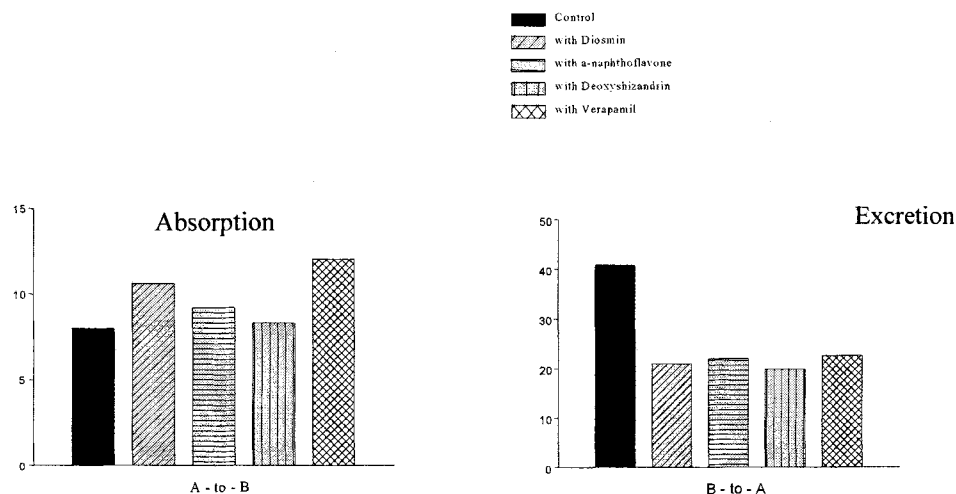


Figure 4. Effects of test compounds on the absorption and excretion of Digoxin in Caco-2 cells.

5. 참고 문헌

1. Dietmar Schwab, ; Holger Fischer, (2003) Comparison of in Vitro P-Glycoprotein Screening Assays. *J. Med. Chem.* 46, 1716-1725
2. Michael D. Perloff ; Elke stormer, (2003) Rapid Assessment of P-Glycoprotein inhibition and induction in vitro. *Pharm. Res.* 20(8), 1177-1183
3. Matthew D. Troutman, ; Dhiren R. Thakker, (2003) Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells. *Pharm. Res.* 20(8), 1192-1199
4. Jianguo Xu, ; Mei Lin Go, (2003) Modulation of Digoxin Transport across Caco2 cell monolayer by citrus fruit juices. *Pharm. Res.* 20(2), 169-176
5. Karlsson, J., Kuo, S.-M., Ziemniak, J. and Artursson, P.(1993) Transport of celiprolol across human intestinal epithelial Caco-2 cells: mediation of secretion by multiple transporters including P-glycoprotein. *Br. J. Pharmacol.* 110, 1009-1016
6. Hunter, J., Jepson, M.A., Tsuruo, T., Simmons, N.L. and Hirst, B.H. (1993) Functional expression of P-glycoprotein in apical membranes of human intestinal Caco-2 cells. *J. Biol. Chem.* 268, 14991-14997.
7. Shuzhong Ahang and Marilyn E. Morris, (2003) Effect of the Flavonoids Biochanin A and Silymarin on the P-Glycoprotein-Mediated Transport of digoxin and vinblastine in human intestinal Caco-2 cells. *Pharmaceutical Research* 20(8) 1184-1191
8. Sanna Tolle-Sander, Jarkko Rautio. (2003) Midazolam exhibits characteristics of a highly permeable P-glycoprotein substrate. *Pharmaceutical Research* 20(5) 757-764
9. Joseph W. Polli, Stephen A. Wring. (2001) Rational use of in Vitro P-glycoprotein assays on drug discovery. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics(JPET)* 299, 620-628

10. Yu-yuan Chiu, Kazutaka Higaki. (2003) Human jejunal permeability of Cyclosporin A;influence of surfactants on P-glycoprotein efflux in Caco-2 cells. *Pharmaceutical Research* 20(5) 749-756
11. Matthew D. Troutman and Dhiren R. Thakker (2003) Novel experimental parameter to quantify the modulation of absorptive and secretory transport of compounds by P-glycoprotein in cell culture models of intestinal epithelium. (2003) *Pharmaceutical Research* 20(8) 1210-1224
12. Matthew D. Troutman and Dhiren R. Thakker (2003) Rhodamine 123 requires carrier-mediated influx for its activity as a P-glycoprotein substrate in Caco-2 cells. *Pharmaceutical Research* 20(8), 1192-1199
13. Michael D. Perloff, Elke Stormer, Lisa L. von Moltke. (2003) Rapid assessment of P-glycoprotein inhibition and induction in vitro. *Pharmaceutical Research* 20(8), 1177-1183
14. Matthew D. Troutman and Dhiren R. Thakker (2003) Efflux ratio cannot assess P-glycoprotein-mediated attenuation of absorptive transport;Asymmetric effect of P-glycoprotein on absorptive and secretory transport across Caco-2 cell monolayers. *Pharmaceutical Research* 20(8), 1200-1209
15. M. Verschraagen, C.H.W.KOKS, J.H.M Schellens and J.H. Beijnen. (1999) P-glycoprotein system as a determinant of drug interactions;The case of Digoxin-Verapamil. *Pharmaceutical Research* 40(4), 301-306
16. J. Gao, O.Murase,, J. Aube, and R.T. Borchardt (2001) A functional assay for quantitation of the apparent affinities of ligands of P-glycoprotein in caco-2 cells. *Pharm. Res.* 18, 171-176
17. R. L. Juliano and V. Ling. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. *Biochim. Biophys. Acta* 455; 152-162
18. D. M. Brdshaw and R. J. Arceci. (1998) Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. *J. Clin. Oncol.* 16, 3674-3690
19. M. P. Di Marco, D. J. Edwards (2002) The effect of grapefruit juice and seville orange juice on the pharmacokinetics of dextromethorphan :the role of gut CYP3A and P-glycoprotein. *Life Sci.* 71, 1149-1160
20. U. A. German. (1996) P-glycoprotein -a mediated drug transport;A unifying mechanism to explain the interaction between digoxin and quinidine. *Circulation* 99, 552-557

제 3 절 Co-culture system을 이용한 *In vitro* BBB 투과성 평가 기술 개발

1. 서론

CNS-표적 약물들 중 98% 이상의 약들이 BBB에 의한 낮은 흡수율 때문에 중간 발전단계에 멈추어 있다. 이것이 현재 제약 산업에 있어서 주된 문제로 나타나고 있다. [Pardridge, W.M 2001, 2002] 이에 최근 지난 몇 십년간 과학자들은 *in vivo* BBB 흡수율을 측정할 수 있는 *in vitro* model을 찾아왔다. 여러 가지 *In vitro* culture system 들이 진행되어져 왔고, 다양한 Cell line을 이용하여 시도되어져 왔다. 두 가지 종류의 cell 을 co-culture 하기 위해서는 *In vivo*에서의 BBB 형성 구조와 그 역할에 대해 알 필요가 있다. 실제 *In vivo*에서 BBB 를 살펴 본다면, 신경조직에는 특정한 물질들이 혈관으로부터 들어가는 것을 막는 일종의 장벽 (barrier)이 존재하게 된다. 이러한 기능적인 장벽을 바로 혈관뇌장벽 (blood-brain barrier, BBB, 뇌혈관관문)이라고 하는 것이다. 예를 들어 트라이판 블루 (trypan blue)를 정맥 내에 주사한 후 관찰하면 이 염료는 다른 모든 세포사이공간에 나타나지만, 중추신경계(CNS)에만 나타나지 않는다. 이처럼 여러 종류의 약물과 대사물질이 이런 뇌혈관장벽을 투과하지 못한다. 혈관뇌장벽 (BBB)은 신경조직에 있는 모세혈관이 다른 조직에 비해 혈관 투과성이 낮기 때문에 형성된 구조이다. 뇌혈관장벽을 이루는 주된 구조는 모세혈관 내피세포 (capillary endothelial cell)에 있는 폐쇄연접 (tight junction, 폐쇄띠, zonula occludens)으로 생각된다. 이 폐쇄연접으로 인해 혈관 투과성이 더욱 낮아지게 된다. 이 장벽은 건강한 사람에게에는 좋지만 항암제 같은 약이 뇌로 전달되지 못하도록 막아서 질병의 치료에 어려움을 주고 있다. 이런 어려움의 원인으로 P-Glycoprotein (P-gp)의 작용을 들 수 있다. 약제학적 관점에서 본다면 P-gp는 BBB에서 가장 중요한 전달운반체 (transporter)이다. 왜냐하면 뇌에서 혈관으로 약물이 들어갈 때 P-gp 는 efflux transport 로의 작용으로 뇌 안으로의 약물의 축적을 저해하기 때문이다. [Tsuji, A. et al. 1992, Schinkel, A.H. et al. 1994, Kusahara, H. et al 1997] 우리는 *In vitro* BBB co-culture model을 만들어 *In vivo* BBB 와 유사한 조건을 이루도록 하여 효과적인 흡수율 예측을 하고자 하였다. Co-culture를 위한 cell line에는 먼저 Grail cell에는 C6 cell과 endothelial cell에는 Human umbilical vein endothelial cell 인 HUVEC cell을 사용하여 monolayer를 형성시켰다. (Figure 1.) Cell 간의 tight junction 은 Transepithelial electrical resistance (TEER) value의 측정을 통해 알 수 있다. TEER value는 endothelial cell monolayer의 resistance를 측정하여 막의 상태와 cell confluence 가 능하게 하는 factor로 이용되며 Millicell[®]-ERS voltohmmeter (Millipore corp)로 측정 할 수 있었다. Co-culture model에서 paracellular marker인 sucrose 와 transcellular marker 인 propranolol 을 이용해 transport 실험을 선행하였다.

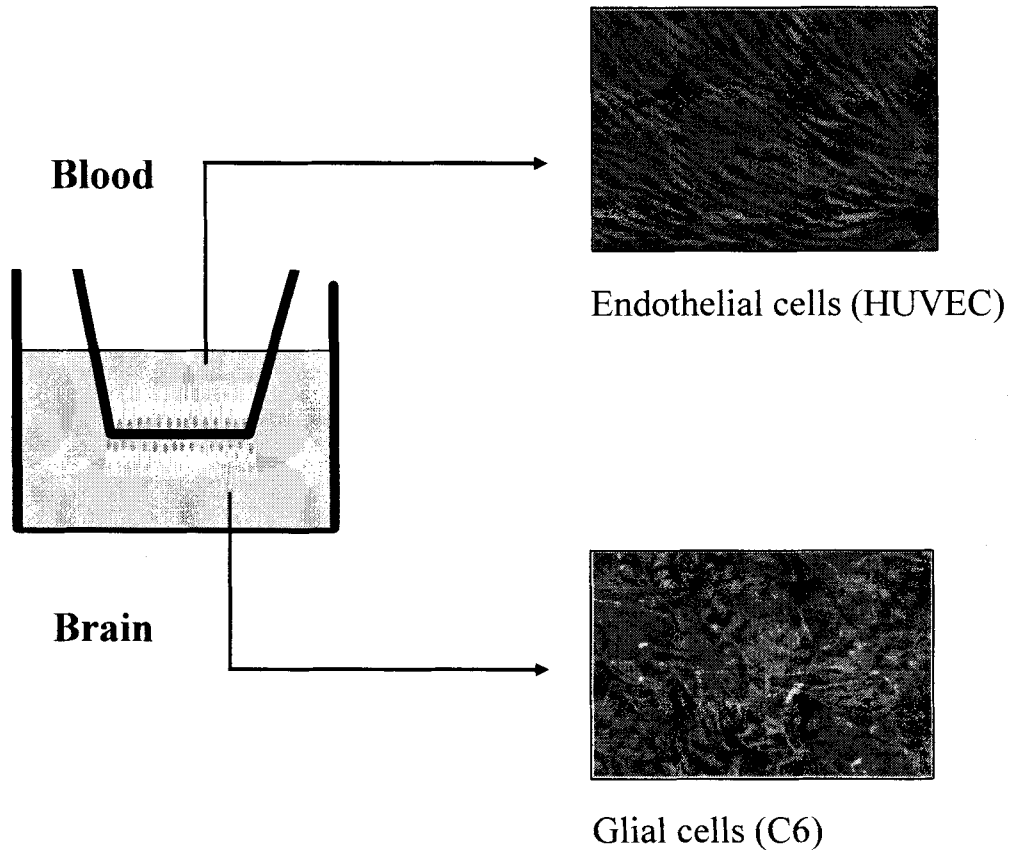


Figure 1. *In vitro* model of Blood-brain barrier

2. 실험재료 및 방법

가. 실험재료

(1). Chemicals

[¹⁴C]sucrose, [³H]propranolol (Amersham international plc.), Rhodamine-123, Naringenin, Hesperatin

(2). Culture medium

Ham's F12 medium, L-glutamine, sodium bicarbonate, Endothelial cell growth supplement (ECGS) Fetal bovine serum (FBS), Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), HEPES (Sigma-aldrich), Bovine serum albumin (BSA), CellagenTM filter discs (ICN Biomedical)

(3). 분석기기

사용한 분석 기기로는 HPLC (Shimadzu, kyoto, Japan)와 Applied Biosystems API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry를 연결하여 분석하였다. Column 은 CAPCELL PAK C18 (2.0×150 mm, 5 μ m)을 사용하였다. 방사선 지표 물질 (RI labled)의 분석은 liquid scintillation counter (Packard Instrument)를 이용하였다.

나. 실험방법

(1). 세포배양

Cell line은 ATCC 에서 분양 받아 배양 하였다. Grail cell 인 C6 cell과 Human umbilical vein endothelial cell 인 HUVEC cell을 10% FBS를 포함하는 Ham's F12 medium에 배양한다. 배양중인 cell 이 flask에 80-90 % 밀집도로 자라면, 먼저 C6 cell을 harvest 하여 cellagen discs를 뒤집어 그 아래면에 5×10^4 cells/cm² 로 seeding 한다. 약 5 hr 후 discs를 원상태로 돌린다. 다시 24 hr 후 apical 안쪽면에 HUVEC cell을 5×10^4 cells/cm² seeding 한다. Transwell 의 apical 과 basolateral 부분에 각각 0.25 ml, 1.0 ml 의 media를 채워 cell 이 자리 잡도록 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 co-culture 하였다.(Figure 2.) Apical membrane의 위쪽과 아래쪽에 자리 잡은 cell을 손상시키지 않도록 주의하면서 이틀에 한번씩 배지를 갈아가며 약 7일간 배양하였다. 배양하는 중간 중간에 cell 상태의 확인을 위하여 TEER value를 주기적으로 측정한다.

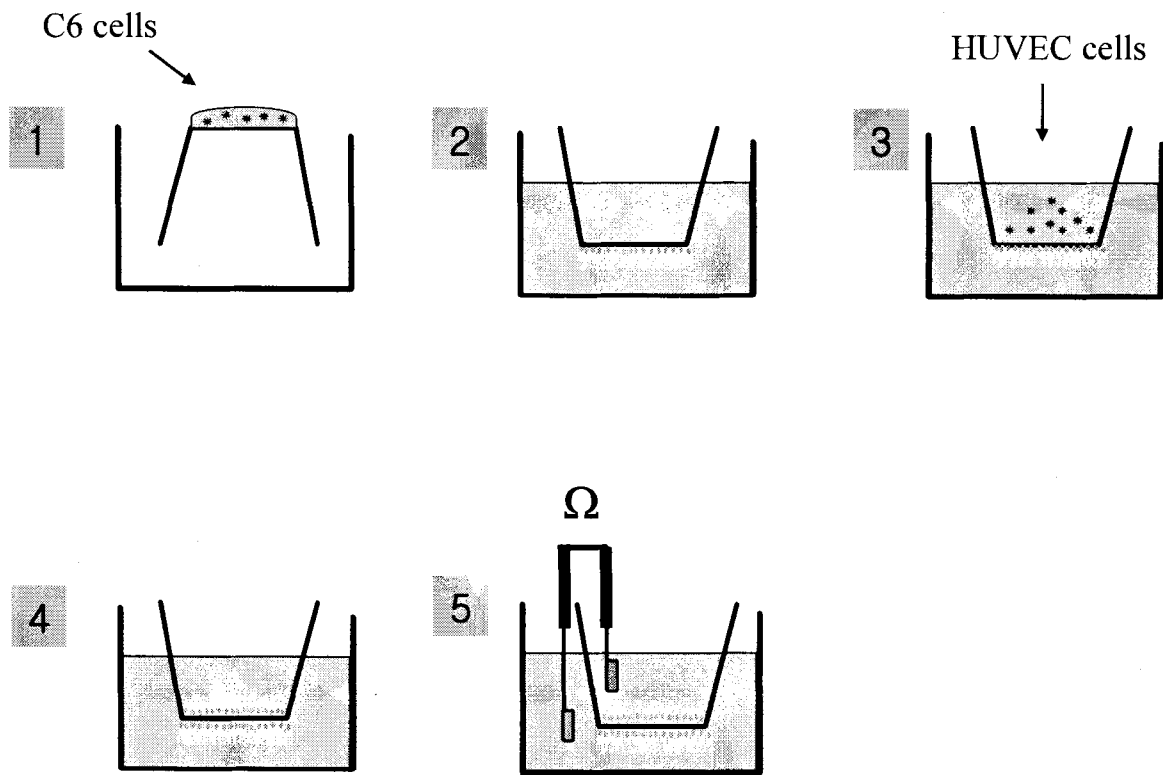


Figure 2. Step of *In vitro* Blood-brain barrier model

(2). Transport assay

① Monolayer에 대한 검증

Transepithelial electrical resistance (TEER)을 측정하고, paracellular marker인 sucrose 와 transcellular marker 인 propranolol 을 이용해 transport 실험을 진행하였다. TEER은 epithelial cell monolayer의 resistance를 측정하여 monolayer의 상태와 cell confluence 가늠하게 하는 factor로 이용되며 Millicell[®]-ERS voltohmmeter (Millipore corp)로 측정 할 수 있었다. 5×10^4 cells/cm²을 apical monolayer에 seeding 하여 7일간 배양하면서 측정한 TEER과 sucrose, propranolol의 흡수율을 비교하여 실험 가능한 최적의 조건을 파악하였다. TEER의 단위는 voltohmmeter로 측정한 값을 surface area(cm²)로 나눈 Ω /cm²로 나타내었다.

② 약물준비

모든 약물은 최종농도 10 mM로 맞추어 DMSO에 녹였고, 이를 0.5%이내의 organic 이 되도록 transport assay buffer (Table 1)에 녹여서 50 μ M로 만들어 실험을 수행하였다. Rhodamine-123은 20

uM로 만들어 수행하였다. Sucrose 와 propranolol 을 이용한 transport 실험은 예비 실험을 통해 얻은 값으로, 농도 0.02 Ci/ml을 사용하였다. 이 모든 실험은 5% CO₂ incubator에서 수행되었고, transwell을 shaking하진 않았다.

Table 1. Composition of transport assay buffer

Component		Concentration
Dulbecco's modified Eagle medium	Na ⁺ pyruvate	110 mg/L
	HEPES	25 mM
	L-glutamine	286 mg/L
	Glucose	4,500 mg/L
	Sodium bicarbonate	350 mg/L
	HEPES	25 mM
	BSA *	0.1 %

* BSA included to stabilize membrane and tight junction

③ Transport assay

Transwell의 배지를 조심스럽게 제거 한 후, transport assay buffer 로 transwell의 apical, basolateral 부분을 transport assay buffer로 세 번 세척 후 transport assay buffer를 채워 37 °C, 5 % CO₂ incubator에서 20분간 incubation하였고, incubation이 끝난 후 TEER를 측정하였다. TEER 측정은 모두 두 번으로 흡수를 실험 시작 전과 끝난 후 측정하였다. 여기서 변화된 TEER은 백분율로 환산하여 BBB monolayer에 손상된 정도로, 약물이 monolayer에 미치는 cytotoxicity로 간주하였다. 약물을 처리할 부분을 donor라 하고 약물이 전달 될 곳을 receptor라고 하고, 약물이 처리될 곳(donor)을 정하여 donor에는 약물을, receptor에는 transport assay buffer를 정확한 부피로 처리하였다. 본 실험에서 사용된 transwell의 경우 apical 부분에 0.25 ml, basolateral 부분에 1.0 ml을 처리하였다. 처리한 약물에 대한 시료 채취 시간은 특별한 경우를 제외하고 20, 40, 60분으로 하였다. 최초 약물을 처리하고 20분이 경과 한 후

receptor chamber에서 50 ul의 시료를 정확히 취하였고, 그 receptor chamber에 새로운 transport assay buffer를 50 ul 첨가하였다. 40, 60분 경과 후에도 이와 같은 방법으로 모두 세 번의 시료 채취를 수행하였다. 시료 채취가 끝난 후 다시 한번 cell monolayer 상태를 파악하기 위해 TEER value를 측정하였다.

④ 시료 분석

[¹⁴C] sucrose, [³H] propranolol 방사선 지표 물질(RI labled)의 분석은 liquid scintillation counter (Packard Instrument)를 이용하였다. 각각의 분석용 시료 50 ul는 5 ml의 scintillation cocktail solution에 첨가하여 충분히 섞은 후 측정하였다. 형광을 띠는 Rhodamine-123 은 Florescence multiwell plate reader (excitation 450 nm, emission 530 nm)로 측정하였다. 일반적인 원소로 구성된 약물의 경우 HPLC 를 이용해 분석하였다. 특히 LC/MS를 이용한 분석은 동일한 분석 조건에서 분석되는 여러 가지의 시료를 한번에 분석 할 수 있는 장점이 있었다. Flavonoids 계열인 naringenin 과 hesperetin 의 분석시료는 solvent (A) 5 mM ammonium formate (pH 6.0), solvent (B) 90 % acetonitrile in 5 mM ammonium formate (pH 6.0)의 mobile phase 를 이용하였다. Column 은 CAPCELL PAK C18 (2.0*150 mm, 5 μ m)을 사용하였고, 0.2 ml/min 의 유속으로 흘렸으며, oven 은 40 $^{\circ}$ C를 유지하였다. LC (Shimadzu, kyoto, Japan)와 Applied Biosystems API 2000 triple-quadrupole mass spectrometry를 연결하여 분석하였다. 분석 후 Analyst 1.3 software를 이용하여 data analysis를 하였다.

⑤ Papp (apparent permeability coefficient) calculation

본 실험에서 이 실험값은 10⁻⁵ cm/sec 로 맞추어 표기하였고 Papp를 구하기 위한 식은 다음과 같다.

$$P_{app} = (V/AC_0) \cdot (\Delta Q/\Delta t)$$

$\Delta Q/\Delta t$ 는 steady-state flux (uM/sec)이고, V는 receptor chamber의 부피 (ml)이고, A는 insert membrane의 apical membrane area (cm²)이고, C₀는 처리하는 약물의 초기농도 (uM)이다.

50 ul씩 채취한 시료의 절대 농도를 구하여 전체 부피에 해당하는 절대 농도로 환산 한 후 몰농도로 맞추었다. 이렇게 맞추어진 농도를 이용해 시간에 대한 농도의 증가량을 구하였다. RI labeling된 chemical의 경우엔, 위 식에서 사용 된 농도 단위 인 'uM'대신 'cpm/ml'을 이용하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

가. 표준 BBB co-culture system 정립

In vitro permeability 실험을 수행하기 위해 선정된 C6 와 HUVEC cell은 membrane 상에서 장시간 배

양할 때 tight junction을 이루어 실제 BBB와 유사하게 배양된다. 실험 방법과 같이 transwell의 apical membrane 아래쪽과 그 안쪽면에 적당량의 cell 을 seeding하여 약 7일간 co-culture 하였고, 이렇게 배양한 system을 이용한 실험의 최적의 조건을 마련하기 위해 우선 TEER값을 측정하여 비교하였다 (Figure 3) . 측정 결과 TEER 값은 7일간의 배양기간 동안 꾸준히 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 관찰 결과 TEER 값이 100이 넘는 well 의 상태를 가질 때가 실험하기에 가장 적정함을 알 수 있었다. 여기서 TEER은 앞서도 언급했듯이 cell 의 상태를 파악할 수 있는 요소이고, cell 간의 tight junction 의 긴장상태를 파악할 수 있는 요소이므로 정확히 측정하는 것이 필요하다. BBB 흡수를 실험이 가능한 paracellular marker 인 [¹⁴C] sucrose permeability는 $1.4 \times 10^{-5} - 4.2 \times 10^{-5}$ (cm/sec) 이하라 하였고 [Eddy et al., 1997], 이 외의 다른 연구자들도 이 정도의 permeability를 기본 조건으로 하고 있다. Transcellular marker 인 [³H] propranolol은 [¹⁴C] sucrose permeability에 비해 $2.8 \times 10^{-5} - 5.0 \times 10^{-5}$ (cm/sec)의 더 높은 값을 가진다.(Table 2.) 시간에 따른 Papp value를 본 결과 60min (3600sec)부터는 그 값이 떨어지기 시작하므로 60 min 까지의 data를 사용하였다. (Figure 4.) 이 두 가지 compound 의 Papp 값을 항시 측정하여 확인함으로써 system을 정확히 확인할 수 있다. Test compound인 Rhodamine-123은 2.9×10^{-5} (cm/sec) 의 Papp 값을 가진다. Rhodamine-123은 형광을 띠는 약물로써 실험할 때 강한 빛에 노출되지 않도록 유의 하면서 신속히 실험하여야 한다. 실험이 끝난 직후 형광용 black plate 에 분주하여 형광도를 측정한다. 또한 Flavonoids 계열의 compound 인 Naringenin과 Hesperetin 은 각각 2.9×10^{-5} (cm/sec), 2.7×10^{-5} (cm/sec)의 결과를 보인다.(Table 3.) 본 시험에서는 C6 와 HUVEC cell을 co-culture 하여 7일 배양한 후 TEER 값을 측정하여 100 이상인 well 만으로 시험을 수행하였다.

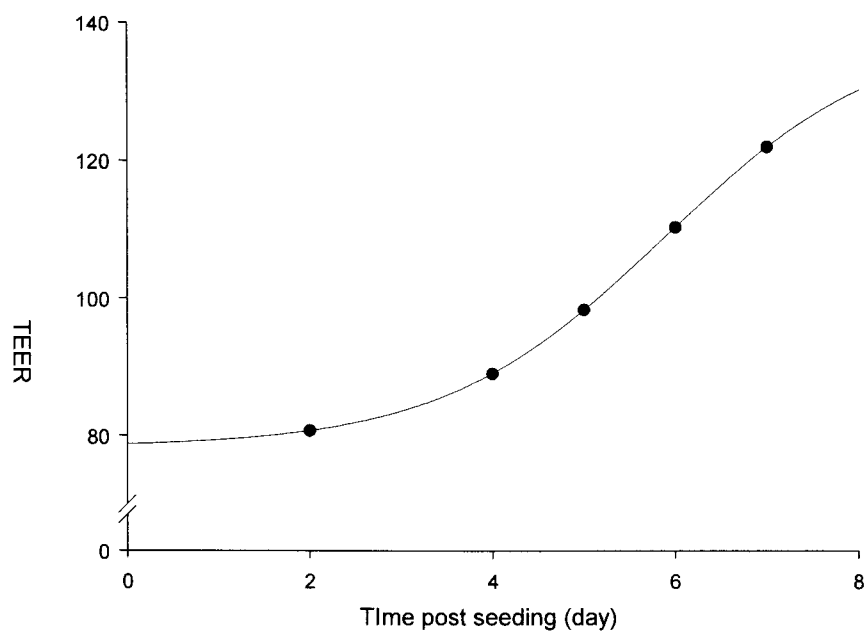


Figure 3. TEER of co-culture system by incubation time

Table 2. Papp values of control compounds in BBB co-culture system.

Compound	Papp ($\times 10^5$ cm/sec)	% drop in the TEER for 60 min
[14 C] sucrose	2.5 ± 0.4	<20
[3 H] propranolol	3.2 ± 0.1	<20

Each date represent mean of triplicate experiment

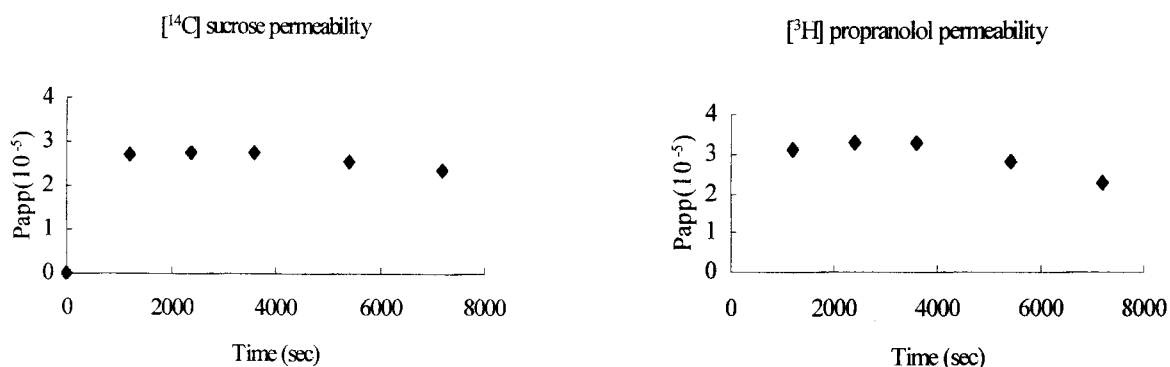


Figure 4. Trend of Papp by incubation time in BBB co-culture system

Table 3. Papp values of test compounds in BBB co-culture system.

Compound	Papp (x 10 ⁵ cm/sec)	% drop in the TEER for 60 min
Rhodamine-123	2.9	<20
Naringenin	2.9	<20
Hesperetin	2.7	<20

Each date represent mean of duplicate experiment

Minimum concentration of calibration : 0.1 uM

4. 참고 문헌

1. Kuresh A. Yyoudim, Michael S. Dobbie. (2003) Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *Journal of Neurochemistry* 85, 180-192
2. Yadollah Omid, Lee Campbell, Jalil Barar. (2003) Evaluation of the immortalised mouse brain capillary endothelial cell line, b.End3, as an in vitro blood-brain barrier model for drug uptake and transport studies. *Brain Research* 990, 95-112
3. Valentina V. Jeliaskova-Mecheva, Dennis J. Bobilya. (2003) A porcine astrocyte/endothelial cell co-culture model of the blood-brain barrier. *Brain Research Protocols* 12, 91-98
4. Ken-ichi Hosoya, Sumio Ohtsuki, Tetsuya Teraski. (2002) Recent advances in the brain-to-blood efflux transport across the blood-brain barrier. *International Journal of Pharmaceutics* 248, 15-29
5. Pieter Jaap Gaillard, Levina Helena Voorwinden, Jette Lyngholm Nielsen, Alexei Ivanov. (2001) Establishment and functional characterization of an in vitro model of the blood-brain barrier, comprising a co-culture of brain capillary endothelial cells and astrocytes. *European Journal of Pharmaceutical sciences*. 12, 215-222
6. A. Schiramacher, S. Winrwes, S. Fischer, J. Goeke, H.-J. Galla. (2000) Electromagnetic Fields (1.8 GHz) increase the permeability to Sucrose of the blood-brain barrier In Vitro. *Bioelectromagnetics* 21:338-345
7. Hartwig Wolburg, Jochen Neuhaus, Uwe Kniessel, Bodo Kraub. (1994) Modulation of tight junction structure in blood-brain barrier endothelial cells. *Journal of Cell Science* 107, 1347-1357
8. Stephen P. Letrent, Joseph W. Polli, Joan E. Humphreys, Gary M. Pollack (1999) P-Glycoprotein-Mediated Transport of Morphine in Brain Capillary Endothelial Cells. *Biochemical Pharmacology* 58, 951-957
9. Chetan S. Karyekar, Alessio Fasano, Sangeeta Raje. (2003) Zonula Occludens Toxin Increases the permeability of molecular weight markers and chemotherapeutic agents across the bovine brain microvessel endothelial cells. *Journal of Pharmaceutical* 92(2), 414-423
10. KA-YUN NG, CHEONG-WEON CHO, (2004) Effect of heat preconditioning on the uptake and permeability of R123 in brain microvessel endothelial cells during mild heat treatment. *Journal of Pharmaceutical* 93(4), 896-907
11. Li Di, Edward H. Kerns, Kristi Fan, Oliver J. McConnell, Guy T. Carter (2003) High throughput artificial membrane permeability assay for blood-brain barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38, 223-232

12. C.L. Gentry, R.D. Egleton, T. Gillespie, T.J. Abbruscato. (1999) The effect of halogenation on blood- brain barrier permeability of a novel peptide drug. *Peptides* 20 (1999) 1229-1238
13. Baranczyk-Kuzma A, Audus KL, Borchardt RT. (1986) Catecholaminemetabolizing enzymes of bovine brain microvessel endothelial cell monolayers. *J Neurochem.* 46:1956-60.
14. Broadwell RD, Ennis SR, Rarey KE, Betz AL, Goldstein GW. (1989) Brain microvessel endothelial cells in tissue culture: a model for study of blood-brain barrier permeability. *Ann Neurol* 14:396-402.
15. Asmundstad T. A., Morland J. and Paulsen R. E. (1995) Distribution of morphine-6-gluuronide and morphine across the blood- brain barrier in awake, freely moving rats investigated by in vivo microdialysis sampling. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 275, 435-441
16. Avdeef A. (2001) Physiochemical profiling (solubility, permeability and charge state). *Curr. Top. Med. Chem.* 1, 277-351
17. N. Joan Abbott. (2002) Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J. Anat.* 200, 629-638
18. Kathe A. Stanness, John F. Neumaier. (1999) A new model of the blood-brain barrier; co-culture of neuronal, endothelial and glial cells under dynamic conditions. *NeuroReport* 10, 3725-3731
19. R.D. Hurst and I.B. Fritz. (1996) Properties of an immortalised vascular endothelial/glioma cell co-culture model of the blood-brain barrier. *Journal of cellular Physiology* 167, 81-88
20. Roger D. Hurst, John B. Clark (1999) Butyric acid mediated induction of enhanced transendothelial resistance in an in vitro model blood-brain barrier system. *Neurochemistry International* 35, 261-267

여 백

제 7 장 In vitro 결과를 이용한 PK 예측 및 대사체
분석을 이용한 독성 예측 방법 연구

제 1 절 : *In vitro* data와 PBPK model을 이용한 체내동태 예측법 개발

1. 서론

신약의 발견과 개발 초기단계에서 가장 가능성있는 약물을 선택하기 위해, *in silico* 혹은 *in vitro* data를 이용하여 신약 후보 물질의 약물동력학적인 (PK:pharmacokinetic: PK) 거동을 예측하기 위한 연구에 많은 관심이 기울여지고 있다. 신약 개발 단계시 전임상 단계에서의 체내 거동에 관한 정보는 임상시험 design에 매우 중요하며 또한 후보 물질 선정의 중요한 criteria가 된다. 상당수의 신약후보물질의 실패 이유가 약물동력학적 원인인 것을 보면, 임상단계에서 약물동력학적인 요인으로 인하여 제외될 가능성이 있는 화합물들을 전임상과정에서 미리 고려할 수 있는 스크리닝 과정이 필수적이라고 할 수 있다¹. 이러한 실패를 줄이기 위해, 신약개발의 초기단계에서 ADME (Absorption, distribution, metabolism and excretion) 연구가 pharmacological tests와 함께 진행되어야 하며, 이러한 접근은 적합한 PK properties를 갖는 화합물만을 미리 선택하여 개발하고자 하는 목적이다. 이러한 연구를 위하여 제약 회사들은 초기단계에서 신속하게 PK properties에 관한 정보를 제공할 수 있는 고효율 (High throughput)의 *in vitro* methods를 사용하고 있으며, 이러한 *in vitro* 정보를 기초로 하여 체내 동태를 예측하고자 하는 시도들이 많이 진행되고 있다. 그 중에서도 생리학적 약물속도론 모델 (Physiologically based pharmacokinetic models: PBPK model)을 이용한 예측 모델은 혈액내의 약물 농도 뿐만 아니라 조직에서의 약물농도까지 예측가능하다는 장점을 지닌다^{2,3}. PBPK model에서는 주요 조직 장기에서의 혈류량, 혈액과 조직내 농도, *in vivo* P_{tp} (drug concentration of tissue:plasma ratio)를 이용하여 시간 변화에 따른 조직과 장기 사이의 약물의 이동을 설명하고자 하며, 이에 따른 수학적 모델을 개발함으로써 이를 이용하여 다양한 병태 생리학적 변화에 따른 분포 동태를 예측하거나 또는 한 동물 종에서 다른 동물 종이나 사람에서의 동태를 예측할 수 있다⁴.

본 연구에서는 모델을 수립함에 있어 생리학적인 기본 파라미터는 문헌자료를 이용하였으며, PBPK 모델의 기본구조는 Poulin의 모형을 따라 작성하였다⁵. 본 모델은 조직 분포에 대한 *in vitro* data로 lipophilicity ($\log P$, pK_a)와 plasma protein binding data를 이용하여 *in vivo* P_{tp} (drug concentration of tissue: plasma ratio)를 추정한 후 각 조직의 혈류와 부피를 이용하여 각 조직내의 분포정도를 예측하고 동시에 *in vitro* metabolic data로 hepatocyte나 microsome에서의 intrinsic clearance를 사용하여 hepatic metabolism을 예측한 후 PBPK model에 따라 작성된 약물 분포의 물질 수지에 대한 미분 방정식을 수치 적분하여 약물의 각 조직에서의 체내 동태를 예측하고자 하였다.

PBPK 모델은 rat (250g)와 man (70 kg)에 대하여 수립하였으며 실제의 *in vivo* 실험 data와 비교하여 적합성을 판단하였다. hepatic clearance의 예측법으로 protein binding을 고려한 경우와 고려하지 않은 경우를 비교하였으며, 약물의 acidity에 따른 prediction 차이도 관측하고자 하였다.

본 연구에서는 *in vitro* 실험 데이터와 PBPK 모델을 이용하여 체내 대사 및 약물 동태를 예측할 수 있는 기초 모델을 확립함으로써 신약개발 단계에서의 비용을 줄이고 그 효율성을 높이고자 하였다.

2. 실험방법

가. PBPK 모델의 구성

PBPK model의 framework는 figure 1 과 같이 구성하였다. 일반적인 구성요소인 12 compartments (blood, adipose, bone, brain, gut, heart, liver, lung, kidney, muscle, skin and spleen)을 사용하였으며, 약물의 clearance site로는 liver만을 가정하였다. 투여경로는 정맥투여 (intravenous)만을 고려하였다.

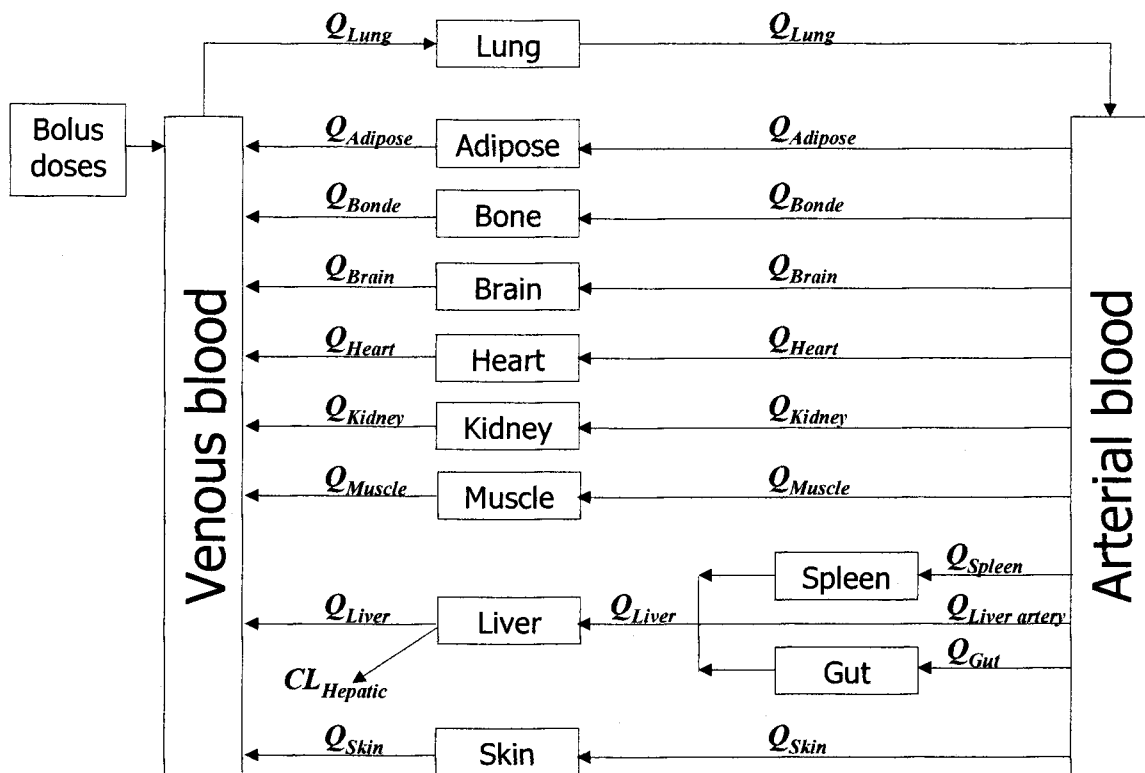


Figure 1. Conceptual representation of the PBPK model framework.

수학적인 모델은 simulation program인 ModelMaker 3.04 (Cherwell Scientific Inc. Oxford)를 사용하여 작성하였으며, Runge-Kutta-Gill method를 사용하여 수치적분하여 각 조직내의 농도를 simulation 하였다. Schematic diagram은 figure 2에 표현하였다.

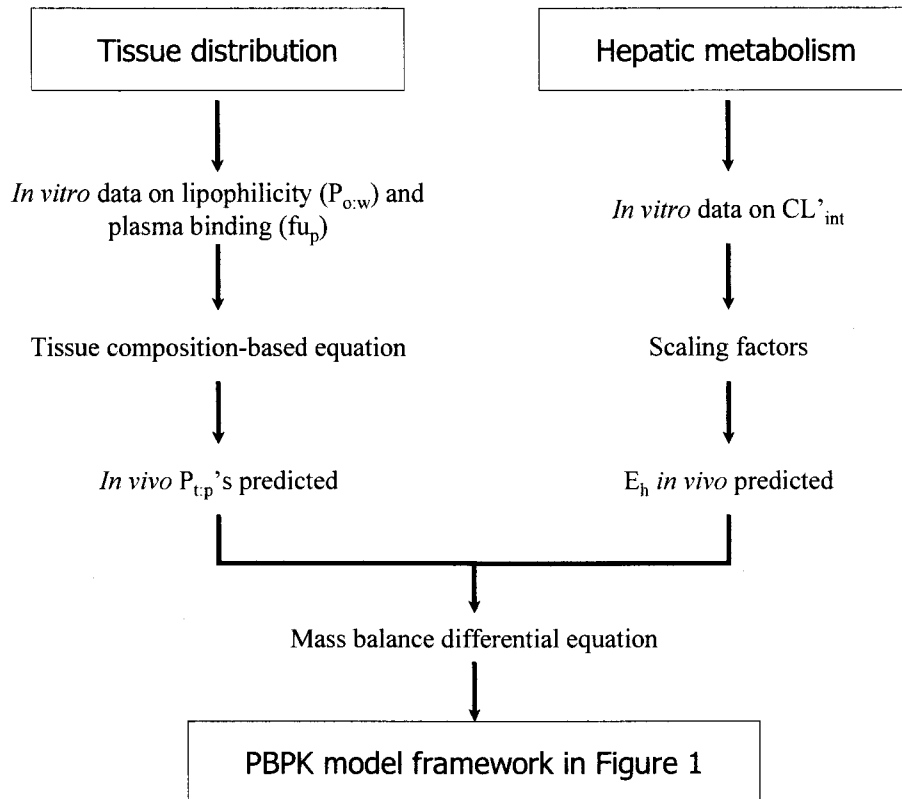


Figure 2. Schematic representation of the procedures used for developing PBPK models

Figure 1을 기초로 하여 수립한 mass balance equation은 아래와 같은 가정하에 연립미분방정식으로 표현하였다.

1. 약물은 혈류에 의해서만 조직으로 운반되며, 조직간의 직접적인 물질 교환은 없다.
2. 모세관 혈류 중과 조직 중 약물의 교환속도는 혈류에 비해서 매우 빠르고, 순간적으로 농도평형에 도달한다.
3. 비결합형 약물만이 모세관 및 세포막을 투과하며 능동수송은 없는 것으로 가정한다.

Mass balance differential equation

* For non-eliminating tissue:

$$dC_t/dt = Q_t * (C_{ab} - C_{vbt})/V_t \quad C_{vbt} = C_t / (P_{t,p}/B:P)$$

* For eliminating tissue (hepatic):

$$dC_h/dt = [(Q_h - Q_g - Q_{sl}) * C_{ab} + (Q_g * C_{vbg} + Q_{sl} * C_{vbsl} - Q_h * C_{vhh})] / V_h - [((Q_h - Q_g - Q_{sl}) * C_{ab} + (Q_g * C_{vbg} + Q_{sl} * C_{vbsl})) * E_h] / V_h$$

* For lung :

$$dC_l/dt = Q_c * (C_{vb} - C_{vbl}) / V_l$$

* For arterial blood:

$$dC_{ab}/dt = Q_c * (C_{vbl} - C_{ab}) / V_{ab}$$

* For mixed venous blood and plasma

$$dC_{vb}/dt = \sum(Q_t * C_{vbt} - Q_c * C_{vb}) / V_{vb} \quad C_{vp} = C_{vb} / B:P$$

Parameters	Subscribes				
Q: blood flow	C: concentration	t: tissue	h: liver	g: gut	
V: volume	E: extraction ratio	sl: spleen	l: lung	c: cardiac output	
P _{tp} : tissue:plasma ratio		ab: arterial blood	vb: mixed venous blood		
B:P: blood:plasma ratio		vbt: venous blood leaving tissue			
dC/dt: concentration of drug per unit of time	vp: mixed venous plasma				

나. Species-specific parameter의 입력 (tissue distribution data)

평균 생리학적 data (즉, 혈류와 조직부피)는 문헌상의 자료를 기초로 하여 사용하였으며, rat 와 man에 대하여 rat은 250g, man은 70 kg을 기준으로 사용하였다. (Table 1,2)⁶.

in vivo Pt:p는 homogenous한 약물의 distribution이 passive diffusion에 의하여만 일어난다고 가정하고, 각각의 조직과 plasma를 lipids와 water, protein으로 구성된 혼합물로 간주하여 약물의 분포과정이 lipid와 water 사이의 drug partitioning (nonspecific binding)과 plasma와 tissue 사이에 존재하는 protein에 대한 reversible binding에 의하여 진행된다고 가정하였다. 식 (1)과 (2)에 의하여 각 조직의 *in vivo* Pt:p를 예측하였으며, 각 조직의 조직 조성분율은 Table 1,2에 나타내었다⁶.

Table 1. Species-specific input parameters used in Rat PBPK models

Physiological Data	Tissue Composition Data
--------------------	-------------------------

Tissues	Blood Flow Rates (Q _i)	Volumes (V _i)	Water (V _w)	Neutral Lipids (V _{nl})	Phospholipids (V _{ph})
	[fraction of cardiac output in L/min]	[fraction of total body volume]	[fraction of wet tissue weight]	[fraction of wet tissue weight]	[fraction of wet tissue weight]
Adipose	0.07	0.076	0.12	0.853	0.002
Bone	0.122	0.04148	0.446	0.0273	0.0027
Brain	0.02	0.0057	0.788	0.0392	0.0533
Gut	0.131	0.027	0.749	0.0292	0.0138
Heart	0.049	0.0033	0.779	0.014	0.0118
Kidney	0.141	0.0073	0.771	0.123	0.0284
Liver	0.175	0.0366	0.705	0.0138	0.0303
Lung	- ^a	0.005	0.79	0.0219	0.014
Muscle	0.278	0.404	0.756	0.01	0.009
Skin	0.058	0.19	0.651	0.0239	0.018
Spleen	0.02	0.002	0.771	0.0077	0.0136
Arterial blood	-	0.0272	0.96	0.00147	0.00083
Venous blood	-	0.0544	0.96	0.00147	0.00083

^a Total cardiac output in L/min was calculated with an allometric equation $(0.235 \cdot \text{body weight}^{0.75})^7$

Table 2. Species-specific input parameters used in Human PBPK models

Tissues	Physiological Data		Tissue Composition Data		
	Blood Flow Rates (Q _i)	Volumes (V _i)	Water (V _w)	Neutral Lipids (V _{nl})	Phospholipids (V _{ph})
	[fraction of cardiac output in L/min]	[fraction of total body volume]	[fraction of wet tissue weight]	[fraction of wet tissue weight]	[fraction of wet tissue weight]
Adipose	0.05	0.11957	0.18	0.79	0.002
Bone	0.05	0.085629	0.439	0.074	0.0011
Brain	0.12	0.02	0.77	0.051	0.0565
Gut	0.17	0.0171	0.718	0.0487	0.0163
Heart	0.04	0.0047	0.758	0.0115	0.0166
Kidney	0.19	0.0044	0.783	0.0207	0.0162
Liver	0.25	0.026	0.751	0.0348	0.0252
Lung	- ^a	0.0076	0.811	0.003	0.009
Muscle	0.17	0.4	0.76	0.0238	0.0072
Skin	0.05	0.0371	0.718	0.0284	0.0111
Spleen	0.02	0.0026	0.788	0.0201	0.0198
Arterial blood	-	0.0257	0.945	0.0035	0.00225
Venous blood	-	0.0514	0.945	0.0035	0.00225

^a Based on cardiac output in humans of 6.5 L/min

Tissue composition-based equation	
$P_{t:p \text{ non-adipose}} = \frac{[P_{o:w} \times (V_{nlt} + 0.3 V_{plt})] + [1 \times (V_{wt} + 0.7 V_{plt})]}{[P_{o:w} \times (V_{nlp} + 0.3 V_{php})] + [1 \times (V_{wt} + 0.7 V_{php})]} \times \frac{fu_p}{fu_t} \quad (1)$	
$P_{t:p \text{ adipose}} = \frac{[D_{vo:w}^* \times (V_{nlt} + 0.3 V_{plt})] + [1 \times (V_{wt} + 0.7 V_{plt})]}{[D_{vo:w}^* \times (V_{nlp} + 0.3 V_{php})] + [1 \times (V_{wt} + 0.7 V_{php})]} \times \frac{fu_p}{1} \quad (2)$	
$fu_t = \frac{1}{1 + (1 - fu_p)/fu_p^* 0.5} \quad (3)$	
<p>fu=unbound fraction</p> <p>$P_{o,w}$=n-octanol-buffer partition coefficient (PC) of the non-ionized species at pH 4.0</p> <p>$D_{vo,w}^*$=olive oil:buffer PC of both the non-ionized and ionized species at pH 4.0</p>	

다. Drug-specific parameter의 입력 (hepatic metabolism data)

Hepatic extraction ratio(E_h)는 hepatocytes나 microsome을 사용하여 계산된 문헌상의 CL'_{int} 를 사용하여 구하였으며, well-stirred liver model을 가정하였다⁸. microsome이나 hepatocytes를 사용하여 얻어진 *in vitro* CL'_{int} 를 가지고 45 mg microsome/g liver, 109×10^6 cells/g liver와 liver weight, body weight를 곱한 scaling factor를 곱하여 *in vivo* CL_{int} 를 계산하였다. *in vivo* CL_{int} 예측시 plasma protein binding을 고려하지 않은 모델 (4)와 binding한 model (5)에 대하여 예측결과를 비교하였다.

$$in \text{ vivo } CL_{int} = \frac{Q_h \times CL'_{int}}{CL'_{int} + Q_h} \quad (4)$$

$$in \text{ vivo } CL_{int} = \frac{Q_h \times fu_p \cdot CL'_{int}}{fu_p \cdot CL'_{int} + Q_h} \quad (5)$$

사용된 drug-specific input data는 Table 3.에 표현하였다.

Table 3. Drug-specific input data^{6,8-2}

Rat					
	logP	pKa	fu _p	B:P	CL'int (ml/min/kg)
Clozapine	3.6	83	0.26	1.0	21.8
Diazepam	2.99	3.5	0.14	1.04	82.8
Epiroprim	2.89	6.96	0.1	1.0	10.3
Propranolol	3.2	9.5	0.23	0.8	997
Human					
	logP	pKa	fu _p	B:P	CL'int (ml/min/kg)
Base					
Diltiazem	2.84	7.7	0.22	1.0	8.7
diphenylhydramine	3.27	9.0	0.22	0.65	2.1
epiroprim	2.89	6.96	0.11	1.0	1.7
propafenone	3.37	9.86	0.04	1.0	166
propranolol	3.2	9.5	0.23	0.8	66
verapamil	3.79	8.49	0.12	0.85	122
Neutral					
Alprazolam	2.99	-	0.32	0.78	1.6
Diazepam	2.99	3.5	0.02	0.58	2.3
midazolam	2.95	5.82	0.02	0.05	160
Acid					
Diclofenac	3.03	3.99	0.005	0.55	189
Ibuprofen	3.68	4.31	0.01	0.55	8.8

라. PBPK model Simulation

수립된 PBPK models에 의한 simulation data와 *in vivo* 실험을 통하여 얻은 데이터를 비교하였다. 각각의 약물에 대한 *in vivo* 실험 데이터는 문헌 데이터를 사용하였으며, diazepam과 propranol의 경우는 tissue distribution을 비교하고 나머지 약물은 plasma concentration을 비교하였다. 두 결과의 비교시 0.5-2.0% 사이이면 두 결과가 잘 적합 (fitting)한다고 판단하였다. PK parameter는 WinNonlin program을 이용하여 nonlinear fitting을 하여 구하였으며, 각각의 약물에 대하여 AUC, CL, Vss를 비교하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. Rat에 대한 PBPK model을 이용한 plasma concentration simulation

4종의 약물에 대하여 rat에 대한 PBPK model에 의한 simulation을 실행하였다. (Figure 3). *in vivo* CL 계산시 protein binding을 고려하여 예측한 데이터와 고려하지 않은 데이터를 비교하여 rat PBPK model에 적합한 CL 예측법을 선택하고자 하였다. 4가지 약물 모두에 대하여 protein binding을 고려하지 않은 방법이 actual data를 더 잘 예측하는 것으로 나타났으며, protein binding을 고려한 경우 overestimating 하는 경향을 나타내었다. 특히, protein binding이 큰 diazepam ($f_u=0.14$)과 epiroprim ($f_u=0.10$)의 경우는 actual data와의 차이가 더 큰 것으로 나타났다. 이 결과는 lipophilic basic drug의 경우 protein binding을 고려한 경우의 actual data에 대한 predicted clearance의 적합성이 감소된다는 문헌의 결과와 일치하는 경향을 보였다⁸. 두 방법에 의하여 예측된 plasma concentration을 가지고 PK parameters를 구한 후 actual 농도의 PK parameter와 비교하였을 때도 protein binding을 고려하지 않은 경우는 simulation data와 actual data가 2 배 이하로 잘 예측되는 것으로 나타났으나 protein binding을 고려한 경우는 상대적으로 적합성이 감소함을 확인할 수 있었다 (Table 3).

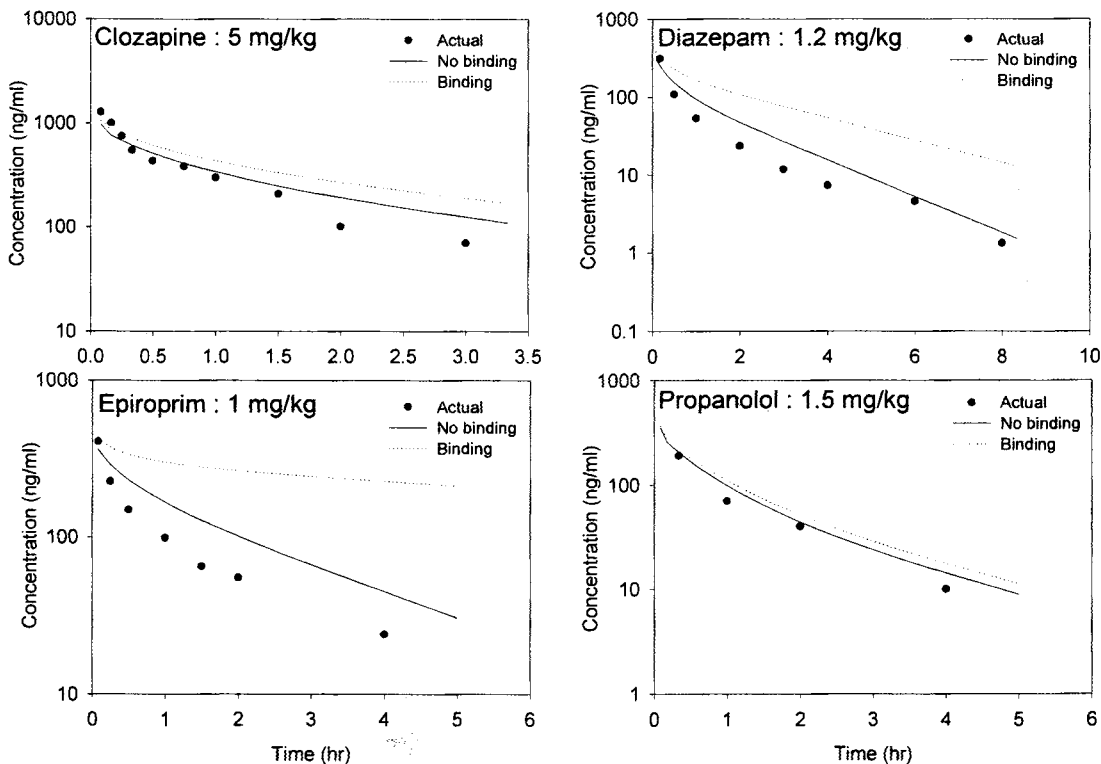


Figure 3. Comparison of PBPK model simulations (lines) with experimental data determined *in vivo*

(circles) on concentration-time profiles of plasma following an intravenous bolus administration of clozapine, diazepam, epiroprim and propranolol to male rats. The mean experimental data on concentration-time profiles were taken from the literature¹³⁻¹⁶.

Table 3. PK parameters and ratios of predicted plasma concentration data and actual data in rats

	AUC (ng.min/ml)					Cl (ml/min/kg)					Vss (L/kg)				
	Actual		No binding		binding	Actual		No binding		binding	Actual		No binding		binding
	value	value	ratio	value	ratio	value	value	ratio	value	ratio	value	value	ratio	value	ratio
Clozapine ¹³	44102	43389	1.0	51900	1.2	84	80	1.0	61	0.7	5.4	6.0	1.1	5.4	1.0
Diazepam ¹⁴	15800	20059	1.3	40119	2.5	75	59	0.8	28	0.4	5.0	5.2	1.0	4.4	0.9
Epiroprim ¹⁵	21032	31668	1.5	67354	3.2	42	27	0.6	5	0.1	4.2	3.3	0.8	2.9	0.7
Propranolol ¹⁶	16530	18787	1.1	20868	1.3	86	74	0.9	66	0.8	5.9	5.7	1.0	5.5	0.9

나. Rat에 대한 PBPK model을 이용한 tissue distribution simulation

Plasma concentraion의 예측 결과에 따라 protein binding을 고려하지 않은 rat PBPK model을 가지고 약물의 조직내의 분포가 얼마나 예측되는지를 확인하고자 하였다. 1.5 mg/kg의 propranolol과 1.2 mg/kg의 diazepam을 male rat (250g)의 정맥내 투여한 결과의 simulation data와 *in vivo* 실험 데이터를 figure 4와 5에 나타내었다. 각 시간에서의 예측결과를 *in vivo* 실험 결과로 나눈 후 조직에 따라 평균을 내어 0.5-2.0 이내에 들어가는 지를 확인하였다 (Table 5). Propranolol의 경우 plasma, heart, kidney, muscle의 경우는 actual 농도와 simulation 농도의 차이가 2배 이하에서 잘 예측이 되었으나 lung의 경우는 actual 농도에 비하여 낮게 예측되었다. 이는 propranolol과 같은 cationic-amphiphilic drug의 경우 *in vivo* conditions에서 lung으로의 accumulation이 현저히 증가한다는 것에 기인하리라 사료된다¹⁷. Diazepam의 경우는 7 tissue (adipose, heart, kidney, liver, lung, muscle, skin)과 plasma의 경우는 actual 농도와 simulation 농도의 차이가 2배 이하에서 잘 예측이 되었으나 brain과 gut의 경우는 actual 농도에 비하여 높게 예측되었다. *in vivo* condition에서 diazepam과 같은 benzodiazepin류는 blood-brain barrier의 낮은 투과성으로 인하여 brain으로의 uptake가 낮다고 보고되어 있는데 비하여, 본 모델에서는 rapid diffusion을 가정한데에 brain에서의 actual 농도와 simulation 농도의 차이가 기인한다고 사료된다¹⁸.

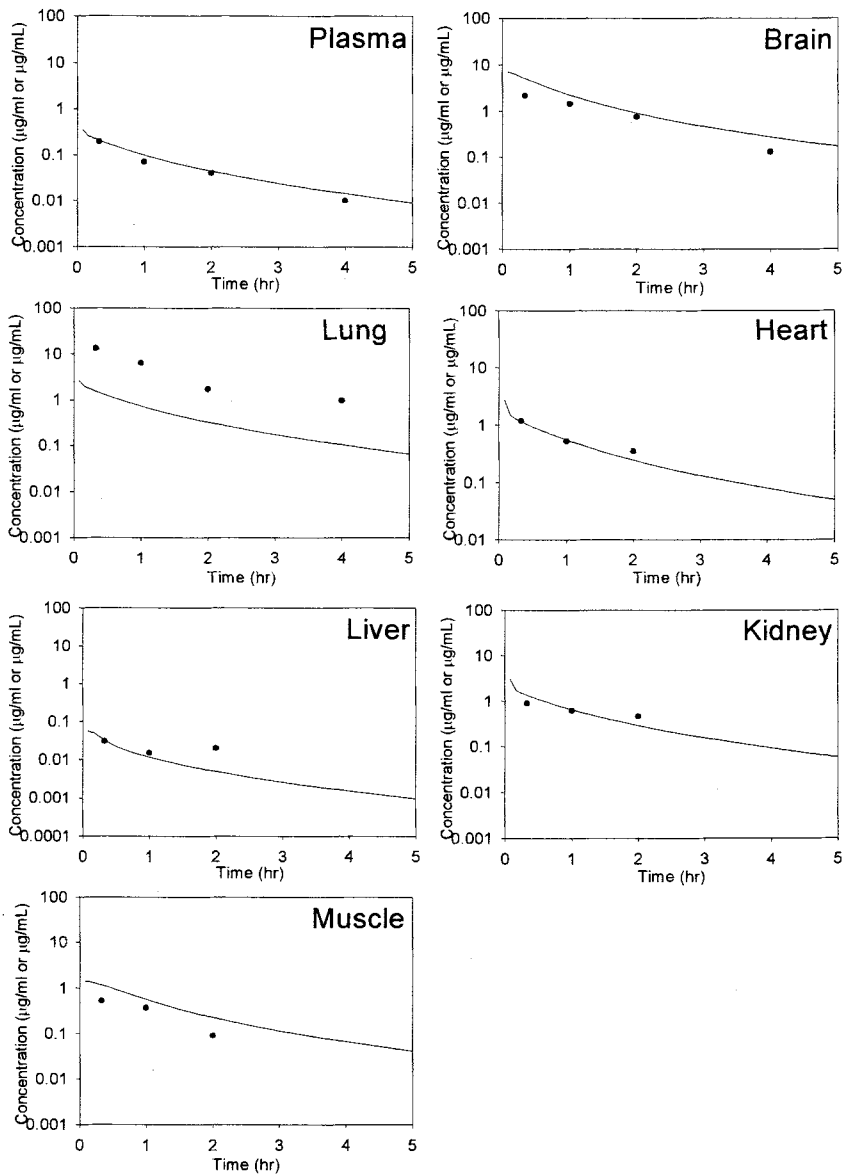


Figure 4. Comparison of PBPK model simulations (lines) with experimental data determined *in vivo* (circles) on concentration-time profiles of plasma, brain, heart, kidney, liver, lung and muscle following an intravenous bolus administration of 1.5 mg/kg of propranolol to male rats. The mean experimental data on concentration-time profiles of the racemic mixture were taken from the literature¹⁴.

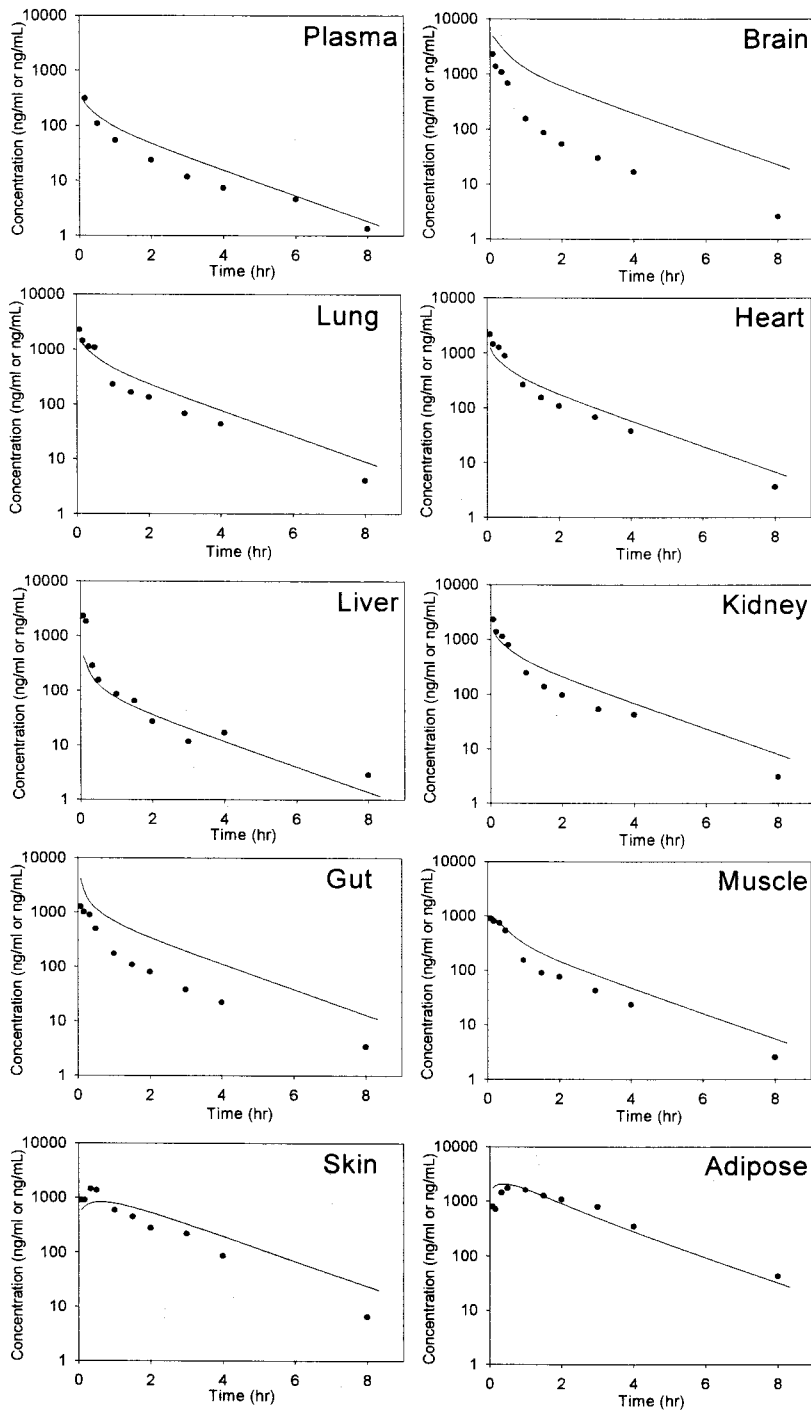


Figure 5. Comparison of PBPK model simulations (lines) with experimental data determined *in vivo* (circles) on concentration-time profiles of plasma, adipose, brain, gut, heart, kidney, liver, lung, muscle and skin following an intravenous bolus administration of 1.2 mg/kg of diazepam to male rats. The mean experimental data on concentration-time profiles were taken from the literature ¹⁶.

Table 5. Ratios of predicted tissue distribution data and actual data

tissues	propranolol	diazepam
---------	-------------	----------

plasma	1.3	1.6
Brain	1.8	7.2
lung	0.13	1.5
Heart	0.9	1.2
Liver	0.7	0.8
Kidney	1.1	1.6
Gut	-	3.7
Muscle	2.0	1.7
Skin	-	1.5
Adipose	-	1.3

다. Human에 대한 PBPK model을 이용한 plasma concentration simulation

6종의 basic drugs과 3종의 neutral drug, 2 종의 acidic drug에 대하여 human에 대한 PBPK model에 의한 simulation을 실행하여 약물의 acidity에 따라 본 PBPK model이 actual concentration을 잘 예측하는지를 알아보고자 하였다. (Figure 6,7). Basic drug의 경우는 protein binding을 고려하지 않고 농도를 예측하였을 때 어느 정도 actual plasma concentration을 예측하는 것으로 보이지만 neutral drugs이나 acidic drug의 경우는 actual data와 simulation data 사이에 큰 차이를 보이는 것으로 나타났다. Basic drug의 경우 protein binding을 고려하지 않은 경우의 예측력이 더 높은 것은 rat PBPK model의 경우와 일치하며, neutral drug이나 acidic drug의 경우 예측력이 떨어지는 것은 human microsome이나 hepatocytes를 사용한 *in vitro* system이 *in vivo* hepatic clearance를 잘 예측해내지 못하는 것에 기인한다고 사료된다⁸ (Table 6). basic drug에서도 diphenylhydramine의 경우는 *in vitro* CL의 예측값이 actual value보다 4배 이상 작은 값이 모델에 적용되어 simulation data의 경우도 actual value에 비하여 overestimate 되어 나타나는 것을 확인할 수 있었다.

Table 6. Average fold errors of predicted clearance to actual clearance⁸

	Basic compounds (n=6)	Neutral and acidic compounds (n=5)
No binding Considered	1.3	22.6
Binding Considered	4.1	2.7

$$\text{average fold error} = 10^{\left| \frac{\sum \log\left(\frac{\text{predicted}}{\text{actual}}\right)}{N} \right|}$$

각각의 방법에 의하여 예측된 plasma concentration을 가지고 PK parameters를 구한 후 actual 농도의 PK parameter와 비교하였을 때 protein binding을 고려하지 않은 basic drug의 경우는 diphenylhydramine을 제외하고는 simulation data와 actual data가 2 배 이하로 잘 예측되는 것으로 나타났으나 protein binding을 고려한 경우는 상대적으로 예측력이 감소함을 확인할 수 있었으며, acidic drug과 neutral drug의 경우 protein binding을 고려한 경우가 protein binding을 고려하지 않은 경우보다 plasma 내의 drug concentration이 높게 나오는 경향으로 인하여 PK parameter의 예측력이 상대적으로 높아지는 것처럼 보이거나, actual value와는 차이가 크게 나타남을 확인할 수 있었다. (Table 7).

라. Human에 대한 PBPK model을 이용한 tissue distribution simulation

Simulation data가 actual plasma concentration을 잘 예측하던 약물인 diltiazem과 verapamil에 대하여 human PBPK model을 가지고 약물의 조직내의 분포를 예측하여 보았다. 20 mg의 diltiazem과 25 mg의 verapamil을 human (70 kg)의 정맥내 투여한 경우의 다양한 compartment에서의 시간에 따른 약물의 농도 변화를 simulation하였다 (Figure. 8).

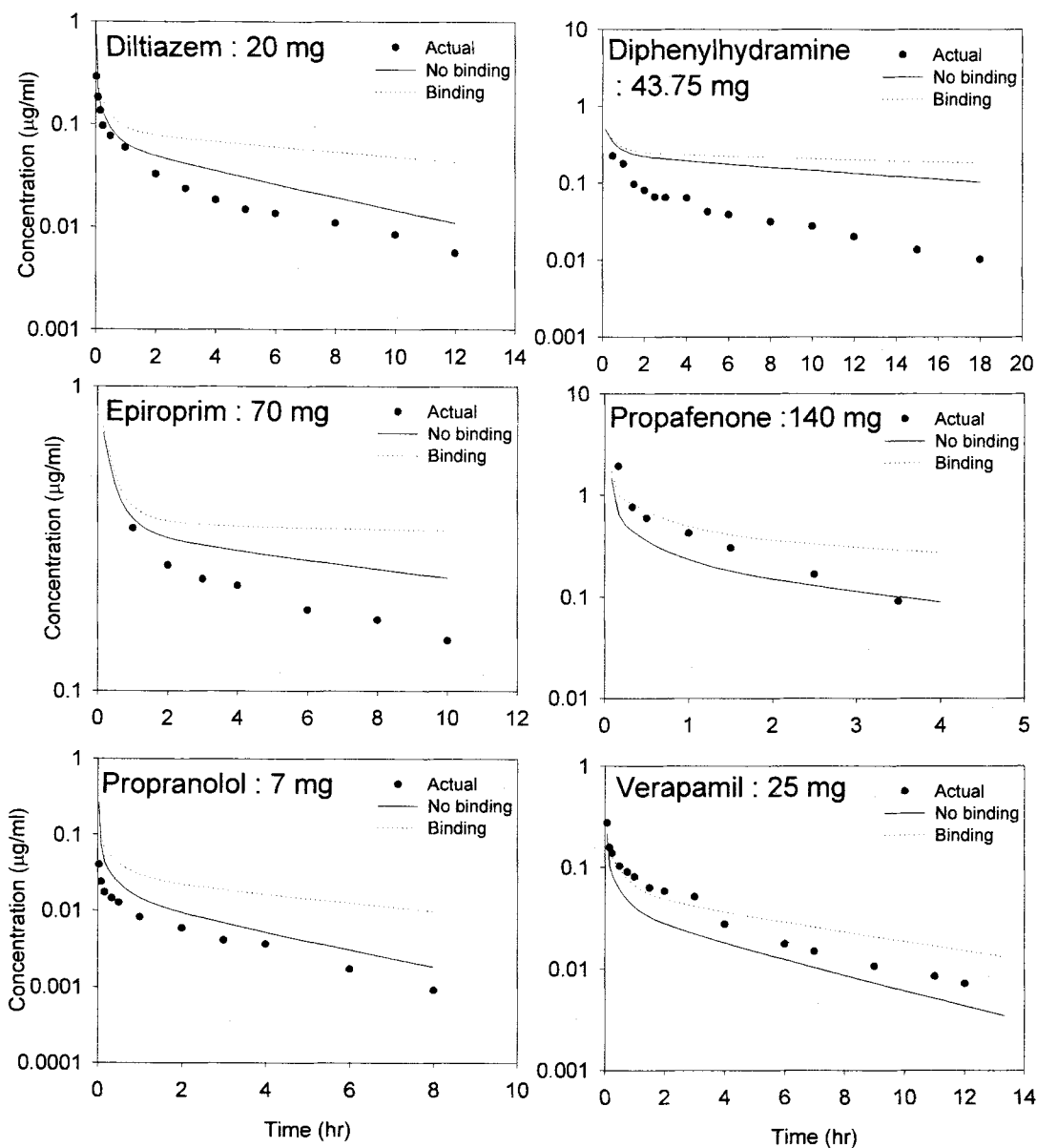


Figure 6. Comparison of PBPK model simulations (lines) with experimental data determined *in vivo* (circles) on concentration-time profiles of plasma following an intravenous bolus administration of 6 basic drugs to humans. The mean experimental data on concentration-time profiles were taken from the literature^{15,19-23}.

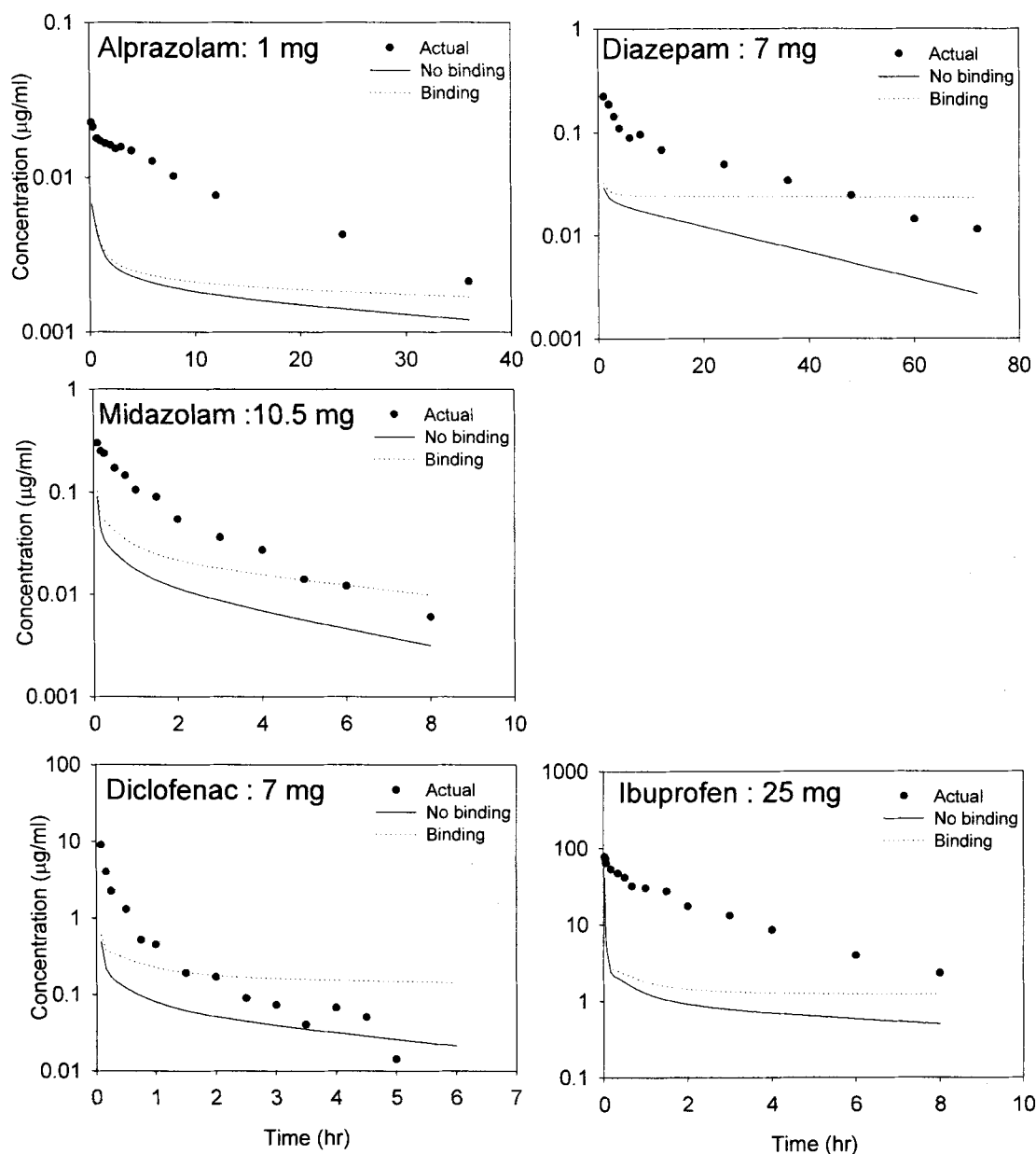
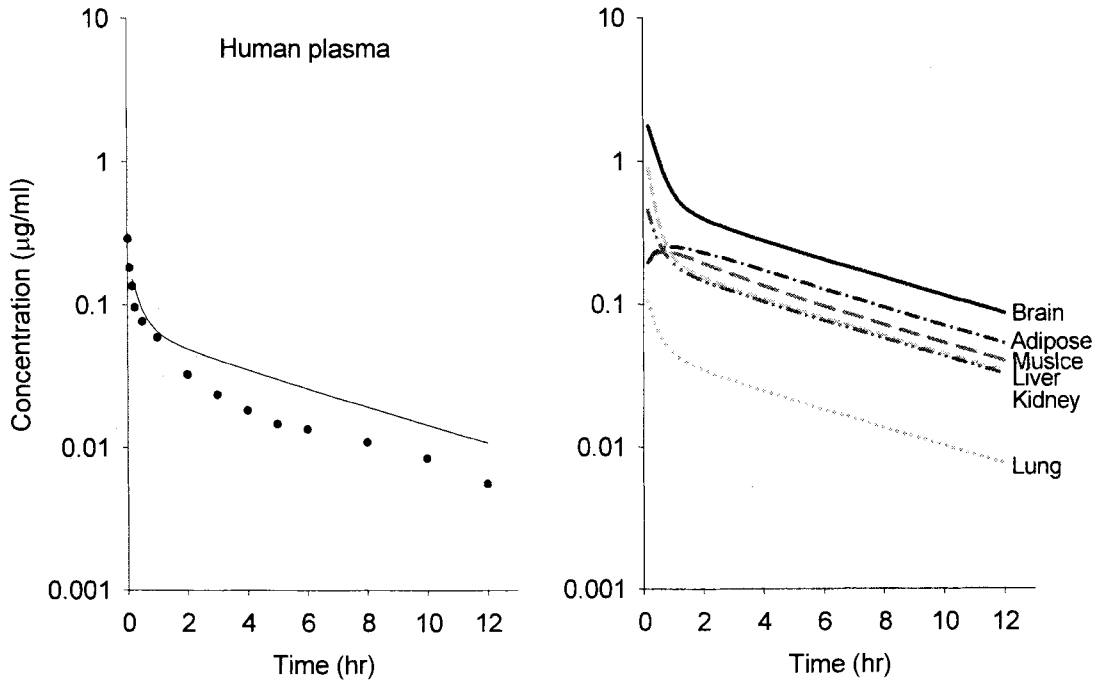


Figure 7. Comparison of PBPK model simulations (lines) with experimental data determined *in vivo* (circles) on concentration-time profiles of plasma following an intravenous bolus administration of 3 neutral and 2 acidic drugs to humans. The mean experimental data on concentration-time profiles were taken from the literature^{14,24-27}.

Table 7. PK parameters and ratios of predicted plasma concentration data and actual data in humans

	AUC ($\mu\text{g}\cdot\text{min}/\text{ml}$)					Cl ($\text{ml}/\text{min}/\text{kg}$)					Vss (L/kg)				
	Actual		No binding			Binding		Actual			No binding		Binding		
	value	value	ratio	value	ratio	value	value	ratio	value	ratio	value	value	ratio	value	ratio
Basic															
Diltiazem ¹⁹	17.3	27.8	1.6	50.9	2.9	13.8	9.1	0.7	3.4	0.2	4.7	2.8	0.6	2.6	0.6
Diphenylhydramine ²⁰	49.9	180.0	3.6	239.1	4.8	11.4	2.0	0.2	0.7	0.1	4.5	2.5	0.6	2.4	0.5
Epiroprim ¹⁵	135.0	174.3	1.3	213.5	1.6	3.8	1.8	0.5	0.4	0.1	3.2	2.9	0.9	2.7	0.9
Propafenone ²¹	102.2	48.6	0.5	102.3	1.0	18.0	31.4	1.7	11.3	0.6	1.2	4.3	3.6	2.7	2.2
Propranolol ²²	2.3	5.2	2.2	10.7	4.6	40.0	18.1	0.5	7.1	0.2	6.6	2.4	0.4	2.2	0.3
Verapamil ²³	24.6	14.7	0.6	27.1	1.1	13.5	22.3	1.7	10.4	0.8	3.2	5.6	1.8	4.6	1.4
Neutral															
Alprazolam ²⁴	15.8	3.8	0.2	4.6	0.3	0.8	2.0	2.5	1.2	1.5	0.8	5.5	7.1	5.3	6.8
Diazepam ¹⁴	202.6	40.9	0.2	103.9	0.5	0.4	2.2	4.8	0.1	0.1	0.8	4.3	5.6	4.1	5.4
Midazolam ²⁵	24.2	5.3	0.2	9.8	0.4	6.0	24.5	4.1	11.0	1.8	0.7	5.1	7.0	4.0	5.6
Acidic															
Diclofenac ²⁶	194.3	22.0	0.1	60.6	0.3	3.7	26.2	7.2	5.1	1.4	0.1	4.3	39.3	2.7	24.6
Ibuprofen ²⁷	6787.6	488.9	0.1	766.9	0.1	0.8	7.8	9.8	2.4	3.1	0.1	3.3	28.2	3.1	26.1

Diltiazem



Verapamil

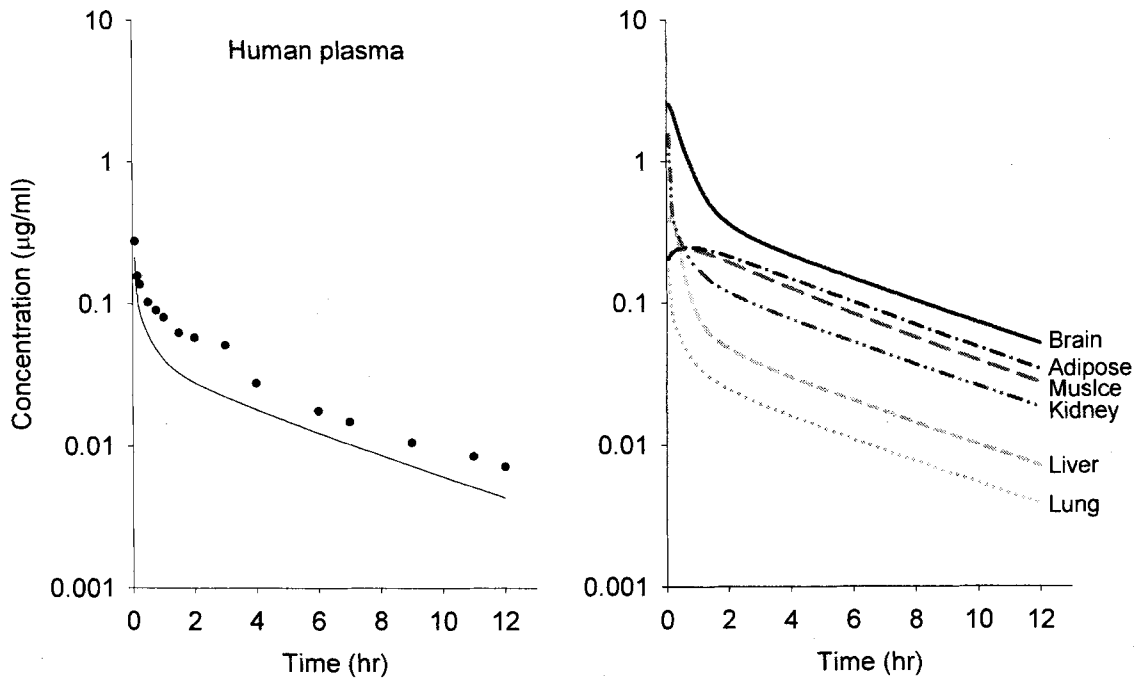


Figure 8. Simulated distribution in man of an intravenous injection of diltiazem (20 mg) and verapamil (25 mg) in various compartment over time.

본 연구에서는 약물에 따른 *in vitro* data와 종 (species)에 따른 tissue distribution data를 PBPK model

에 적용하여 약물의 체내동태를 예측할 수 있는 기초 모델로의 이용가능성을 보고자 하였다. 실험결과 simulation data와 actual data를 비교시 대부분의 basic drug에 대해서는 2배 이하의 좋은 적합성을 보였으나 acidic drug이나 neutral drug의 경우는 simulation data가 actual data를 잘 반영하지 못하는 것으로 확인되었다. Rat PBPK model을 이용하여 plasma concentration의 예측력이 높은 약물에 대하여 tissue distribution data를 simulation data와 actual data를 비교한 경우 대부분의 조직에서 두 데이터의 높은 적합성을 볼 수 있었고, 따라서, 이를 human에 확장하여 2 basic drug에 대해 tissue distribution에 대한 simulation을 수행할 수 있었다. 이상과 같이 본 연구에서 수행한 PK prediction 기술은 *in vivo* 실험전에 신약후보물질을 선택하고 optimization 하는데 활용할 수 있을 것이며, 약물의 human tissue distribution을 연구하는데도 활용될 수 있으리라 사료된다.

4. 참고문헌

1. Prentis RA, Lis Y, Walker SR. 1988. Pharmaceutical innovation by the seven UK-owned pharmaceutical companies (1964-1985). *Br J Clin Pharmacol* 25:387-396.
2. Dedrick RL, Bischoff KB. 1969. Pharmacokinetics in applications of the artificial kidney. *Chem Eng Progr Symp Ser* 64:32-44.
3. Krishnan K, Andersen ME. 2001. Physiologically based pharmacokinetic modeling in toxicology. In: Hayes W, ed.; *Principle and methods of toxicology*, 4th ed. Philadelphia, PA: Taylor&Francis, pp.193-241.
4. 심창구, 1994. 약물체내속도론: 서울대학교 출판부, 1994 p194-203
5. Poulin P, Theil FP. 2002. Prediction of pharmacokinetics prior to *in vivo* studies. II. Generic physiologically based pharmacokinetic models of drug disposition. *J Pharm Sci* 91:1358-1370.
6. Poulin P, Theil FP. 2002. Prediction of pharmacokinetics prior to *in vivo* studies. I. Mechanismbased prediction of volume of distribution. *J Pharm Sci* 91:129-156.
7. Clausen J, Bickel MH. 1993. Prediction of drug distribution in distribution dialysis and *in vivo* from binding to tissues and blood. *J Pharm Sci* 82:345-349.
8. Obach RS. 1999. Prediction of human clearance of twenty-nine drugs from hepatic microsomal intrinsic clearance data: An examination of *in vitro* half-life approach and non-specific binding to microsomes. *Drug Metab Dispos* 27:1350-1359.
9. Theil FP, Guentert TW, Haddad S, Poulin P, 2003. Utility of PBPK models to drug development and

rational drug discovery candidate selection. Toxicology Letters 138: 29-49

10. Turner JV, Maddalena DJ, Cutler DJ, 2004. PK parameter prediction from drug structure using artificial neural networks. Int. J. Pharmaceutics. 270: 209-219
11. Austin RP, Barton P, Cockroft SL, Wenlock MC, Riley RJ, 2002, The influence of nonspecific microsomal binding on apparent intrinsic clearance, and its prediction from physicochemical properties. Drug Metab Disposition 30 : 1497-1503
12. Zhao YH, Le J, Abraham MH, Hersey A, Eddershaw PJ, Luscombe CN, Boutina D, Beck G, Sherborne B, Cooper I, Platts JA, 2001, Evaluation of Human Intestinal Absorption Data and Subsequent Derivation of a Quantitative Structure Activity Relationship (QSAR) with the Abraham Descriptors, 90: 749-784
13. Sun L, Lau CE, 2000, Intravenous and oral clozapine pharmacokinetics, pharmacodynamics, and concentration-effect relation: acute tolerance. Eur J Pharmacol 398: 225-238
14. Igari Y, Sugiyama Y, Sawada Y, Iga T, Hanano M. 1983. Prediction of diazepam disposition in the rat and man by a physiologically based pharmacokinetic model. J Pharmacokinet Biopharm 11:577-593.
15. Luttringer O, Theil FP, Poulin P, Schmitt-Hoffmann AH, Guntert TW, Lave T, 2003, PBPK modeling of disposition of epiroprim in Humans 92: 1990-2007
16. Schneck DW, Pritchard F, Hayes AH. 1977. Studies on the uptake and binding of propranolol by rat tissues. J Pharmacol Exp Ther 203:621-629.
17. Ishizaki J, Yokogawa K, Nakashima E, Ohkuma S, Ichimura F. 1998. Uptake of basic drugs into rat lung granule fraction *in vitro*. Biol Pharm Bull 21:858-861 .
18. Arendt RM, Greenblatt DJ, Liebisch DC, Luu MD, Paul SM. 1987. Determinants of benzodiazepines brain uptake: Lipophilicity versus binding affinity. Psychopharmacology 93:72-76.
19. Mark S, Smith MD, Chacko P, Verghese MS, David G, Shand MB, Edwrad LC, Pritchett MD, 1983, Pharmacokinetic and pharmacodynamic effects of diltiazem, Am J Cardiol 51: 1369-1374
20. Blyden GT, Greenblatt DJ, Scavone JM, Shader RI, 1986, Pharmacokinetics of diphenhydramine and a demethylated metabolite following intravenous and oral administration. J Clin Pharmacol 26 : 529-533
21. Puigdemont A, Guitart R, Mora F, Arboix M, 1991, Prediction of the disposition of propafenone in humans and dogs from pharmacokinetic parameters in other animal species. J Pharm Sci 80 : 1106-1109
22. Fagan TC, Walle T, Walle UK, Conradi EC, Harmon G, Gaffney TE, 1982, Early kinetics of intravenous propranolol, Br J Clin Pharmacol 13: 571-574
23. Eichelbaum M, Mikus G, Vogelgesang B, 1984, Pharmacokinetics of (+)-, (-)- and (±)-verapamil after intravenous administration. Br J Clin Pharmacol 17 : 453-458

24. Smith RS, Kroboth PD, Vanderlugt JT, Philips JP, Jushi RP, 1984, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of alprazolam after oral and IV administration, *Psychopharmacology*, 84 : 452-456
25. Heiamann P, Eckert M, Ziegler WH, 1983, Pharmacokinetics and bioavailability of midazolam in man, *Br J Clin Pharmacol* 16 : 43S-49S
26. Willis JV, Kendall MJ, Flinn RM, Thornhill DP, Welling PG, 1979, The pharmacokinetics of diclofenac sodium following intravenous and oral administration, *Eur J Clin Pharmacol*, 16 : 405-410
27. Martin W, Koselowske G, Toberich H, Kerkmann TH, Mangold B, Augustin J, 1990, Pharmacokinetics and absolute bioavailability of ibuprofen after oral administration of ibuprofen lysine in man, *Pharmac Drug Disposition* 11: 265-278

제 2절 : LC-MS profiling과 패턴인식분석을 이용한 간독성 예측법 개발

1. 서론

신약 개발 연구에 있어서 초기 선도물질(lead compound)로부터 신약으로 개발되어 시장으로 판매되기까지 많은 비용과 시간이 소모된다. 전임상과정에서 좋은 효과를 보인 신약후보물질이라할지라도 약물동력학적인 요인과 독성관련으로 요인으로 실패할 가능성이 높으며 따라서, 다양한 생리활성 물질들 중에 신약으로서 적합한 후보물질을 약물동력학적인 요인과 독성관련 요인으로 개발이 취소될 가능성이 있는지 미리 스크리닝한 후, 이들을 대상으로 신약개발연구를 해 나간다면 향후 신약개발의 실패할 가능성을 줄여나갈 수 있고, 이를 통해 신약개발 기간을 단축하고 그 개발 비용을 줄일 수 있는 이점을 지니고 있다. 따라서, 신약의 독성을 스크리닝하기 위한 새로운 방법에 대한 요구가 늘어가고 있다.

독성물질은 복잡한 대사 상호작용에 영향을 끼쳐, 체액 내에 존재하는 많은 성분들의 농도에 현저한 변화를 일으키게 한다. 그러나, 이러한 변이는 단순한 data 처리로는 인식하기가 쉽지 않으며 독성물질에 기인한 생체 내의 metabolic profile의 변화와 그 상관관계를 연구하기 위해서는 Systematic approaches가 필요하다.

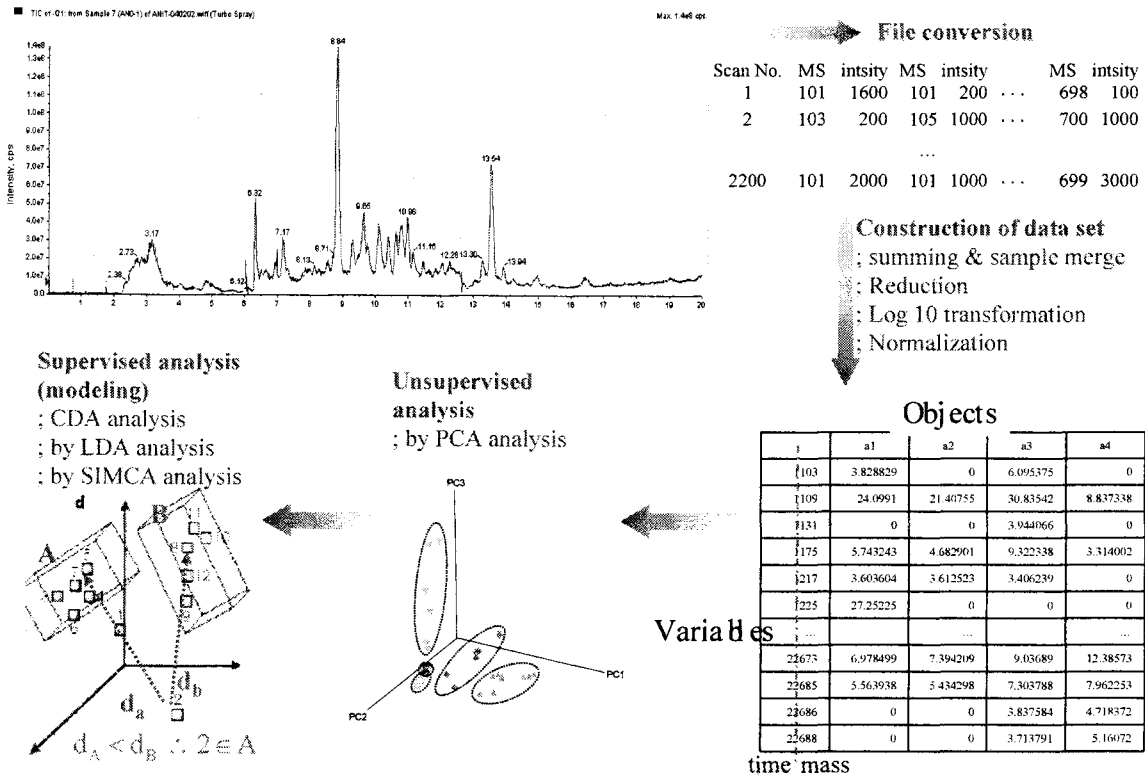
'Metabonomics'란 서로 다른 생리적 상태에서 metabolic profiles을 확인하는 분석기술과 이를 다시 체내의 생리적 상태와 연관지어 해석하고 생리적 변화의 원인을 규명하는 총체적 분야의 연구로 약물의 발견 및 개발 과정시 생체내 독성 실험단계에서 매우 유용하다^{1,2}. 일단 잘 알려진 독성작용을 갖는 모델 성분들의 범위에서 metabonomic 실험들을 수행하고 기기적으로 분석된 스펙트럼을 통계학적 모델들을 사용하여 처리된 데이터베이스를 수집한다면 약물후보물질의 독성을 예측하는데 적용할 수 있을 것이다^{3,5}.

최근 이러한 metabonomics를 이용한 database화 작업의 일환으로 NMR과 여러 가지 패턴인식분석법을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있으며, NMR 이외의 다른 분석기기를 이용한 연구도 시도되고 있다⁶⁻¹⁰. LC/MS는 다양한 약물 및 내인성물질의 정량 및 정성 분석에 많이 이용되고 있으며, 생체 시료로부터 대사과정의 해석에 필요한 다변량 자료를 제공할 수 있는 분석기기이다¹¹⁻¹². 이러한 spectrometer (MS나 NMR 등)로 분석된 자료는 sample당 수만개의 point로 구성되며, 이를 해석하기 위해서는 컴퓨터를 이용한 다양한 패턴인식분석을 필요로 하게 된다¹³⁻¹⁴. 따라서 본 연구에서는 LC/MS 기술과 적절한 통계학적 기법들을 이용하여 약물에 의해 유도된 간독성을 예측할 수 있는 기술을 개발하고자 하였다¹⁵⁻¹⁹.

본 연구실에서는 독성 mechanism이 다른 4 가지 hepatotoxin에 metabonomics 기술을 적용하여 간독성의 예측이 가능한 모델의 수립이 가능한 지에 대하여 연구하고자 하였다. 다양한 다변량 분석법을 LC/MS로 분석된 데이터에 적용하여 독성물질의 투여에 따른 metabolic profile의 시간에 따른 변이와 독성물질에 따른 변이에 관한 데이터의 구조를 해석하고자 하였으며, vehicle effects를 제거하기 위해

다변량 분석전에 modified z transformation을 이용한 normalization을 수행하여 수립된 독성 모델의 예측력을 수행전과 비교하고자 하였다²⁰. 적용된 주성분 분석 (principal component analysis: PCA)에 의하여 model hepatotoxin인 ANIT의 투여시의 metabolic trajectory의 변화를 2D plot으로 visualizaion하여 독성발현의 시간에 따른 경과와 회복정도를 확인할 수 있었으며, hepatotoxin의 종류에 따른 metabolic profile의 변화에 의한 군집을 확인할 수 있었다. hepatotoxin에 대한 모델을 수립하기 위하여 선형판별 분석 (linear discriminant analysis : LDA)과 SIMCA-RD (soft independent modeling of class analogy with residual distrnace)법을 적용한 하여 모델의 예측력을 보고자 하였다.

이상과 같이 본 연구에서는 LC/MS 분석 기술, 그리고 다양한 패턴인식 분석을 이용하여 신약개발시의 독성 평가를 위한 metabonomics 기술을 개발하고 나아가 독성을 예측할 수 있는 모델을 정립할 수 있는 기틀을 마련하고자 하였다



2. 실험방법

가. 실험동물

Sprague-Dawley계 rat (SPF, 250-270g)는 대한실험동물센터로부터 구입하였으며 KIST 동물 사육실에

서 1주일간의 순화기간을 거친 뒤 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 온도 25±2℃, 상대습도 55-10%, 그리고 12시간 간격의 light/dark cycle의 상태를 유지하였다. 아래와 같이 각각의 rat에 10 ml/kg의 용량으로 1회 경구투여한 후 ANIT의 경우는 8 일동안 (pre dose, 8 hr, 24 hr, 32 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr, 120 hr, 144 hr, 168 hr postdose), 나머지 hepatotoxin은 투여 후 32-48 시간동안 소변을 수집하였다. 각 투여군의 control group으로는 carrier vehicles만을 rat에 투여하여 동일기간동안 소변을 수집하였다. 수집된 소변은 분석전까지 -20℃에서 보관하였다. 소변 시료의 회석정도차이를 제거하기 위하여 소변 내 creatinine의 농도가 1 mM이 되도록 회석하여 회석된 소변 시료를 LC/MS로 분석하였다.

Model hepatotoxin	Toxicity mechanism ²¹	Vehicle	Dose
ANIT	Bile duct damage	Corn oil	100 mg/kg
CCl4	Fatty liver	Corn oil	800 mg/kg
Acetaminophen	Hepatocyte death	50% PEG	700 mg/kg
Diclofenac	Immune response	Saline	20 mg/kg

나. Liquid chromatography - mass spectrometry

사용한 HPLC system은 Shimadzu LC system을 사용하였으며 조건으로는 ionization은 API-electrospray ionization방법을 이용하였으며 polarity mode는 negative mode를 사용하였다. Column은 Capcell Pak C18 (250 µm × 2.0 mm I.D., 5 µm, Shiseido, Japan)을 사용하였으며 이동상으로는 5 mM ammonium formate (pH 4.0) [A]과 90% acetonitrile in 5 mM ammonium formate (pH 4.0)[B]를 사용하여 gradient system에서 분석하였으며 조건은 다음과 같고 분석시간은 20 min이었다.

Time (min)	A (%)	B (%)	Flow rate (ml/min)
0.0	100	0	0.20
8.0	65	35	0.20
17.0	5	95	0.20
17.1	100	0	0.20

Mass spectrometer의 nebulizing gas, turbo gas, curtain gas는 nitrogen gas를 사용하고, 각각 30, 75, 그리고 40 (임의단위)으로 설정하였으며 nebulizer의 온도는 420℃로 설정하였다. Q1 full scan mode를 이용하여 m/z 100-700에 대하여 분석하였다.

다. Dataset의 구성

일단 LC-MS에 의하여 얻어진 chromatogram은 통계적 처리에 적합한 data set의 형태로 전환시키기 위하여 분석된 chromatogram을 모든 scan spectra를 포함하는 text file로 conversion 시킨 후 SAS

program을 사용하여 noise로 추정되는 intensity 30000이하는 삭제한 후 얻어진 총 100 points의 mass spectra를 summing하여 한 개체의 LC/MS spectra로 표현하였다. 투여한 약물의 대사체가 존재하는 경우는 그에 해당하는 fraction을 제거한 후 한 개체당 약 2000개의 peaks (변수)를 얻었다. 각 개체의 spectra를 merge하여 original dataset으로 사용하였다. 높은 값의 변수와 noise structure의 이분산성의 영향을 줄이고자 log 10 transformation을 수행하였으며, 변환된 dataset을 사용하여 modified ZST를 수행하여 dataset을 normalize하였다. Modified z score는 각 그룹의 control groups의 평균과 표준편차를 이용하여 계산하였다. log 변환된 dataset과 log 변환 후 normalized된 dataset을 original dataset과 normalized dataset으로 사용하여 다변량분석에 이용하였다.

라. 패턴인식분석

다변량분석은 SAS와 SIMCA-P software를 사용하여 수행하였다. 비계통적인 분석인 주성분 분석을 수행하여 LC/MS 데이터를 기초로 각 시료군의 특성과 dataset 사이의 관계를 확인하여 dataset 내의 내재적인 패턴이나 군집의 존재를 확인하고자 하였으며, 일단 그룹 내의 내재적인 차이가 확인된 후, 시료군에 대한 사전지식을 토대로 분류법칙을 수립하는 계통적 분석을 수행하였다. 계통적 분석으로는 정준판별분석 (CDA), 선형판별분석 (LDA), SIMCA-RD 등을 사용하였으며, leaving-one out method를 이용한 cross validation을 사용하여 각 분석법의 modeling power를 보고자 하였다.

3. 실험결과 및 고찰

가. 독성물질 투여 후 시간에 따른 urinary metabolic profile의 변화

독성발현의 시간에 따른 변화를 보기 위하여 rats에 ANIT를 투여한 후 7일 동안의 소변 시료를 수집하여 그 metabolic profile을 분석하였다. 각 time point에서의 LC/MS spectra series를 통하여 시간에 따른 소변 시료내의 내인성 물질의 현저한 변화를 확인할 수 있었다. (Figure 2). ANIT 투여 후 24 시간이 지나면서 hippuric acid의 양이 현저히 줄어들면서 투여후 24-72 시간 동안 bile acids의 분비가 현저하게 나타났다. ANIT를 투여한 쥐의 소변내의 bile acids는 taurocholic acid isomers ($m/z=514$), glycocholic acid ($m/z=464$), cholic acid ($m/z=407$), tetrahydroxycholanoyl-taurine isomers ($m/z=512$)와 glycomonohydroxycholic acid isomers ($m/z=530$)이며 구조는 LC/MS/MS 분석과 bile acid standards를 spiking하여 확인하였다. 소변 시료의 metabolic profiling은 predose 상태로 회복되지는 않지만 투여 후 7일 경과시의 spectra는 control group의 같은 기간동안의 spectra와 비교시 매우 유사함을 확인할 수 있었다.

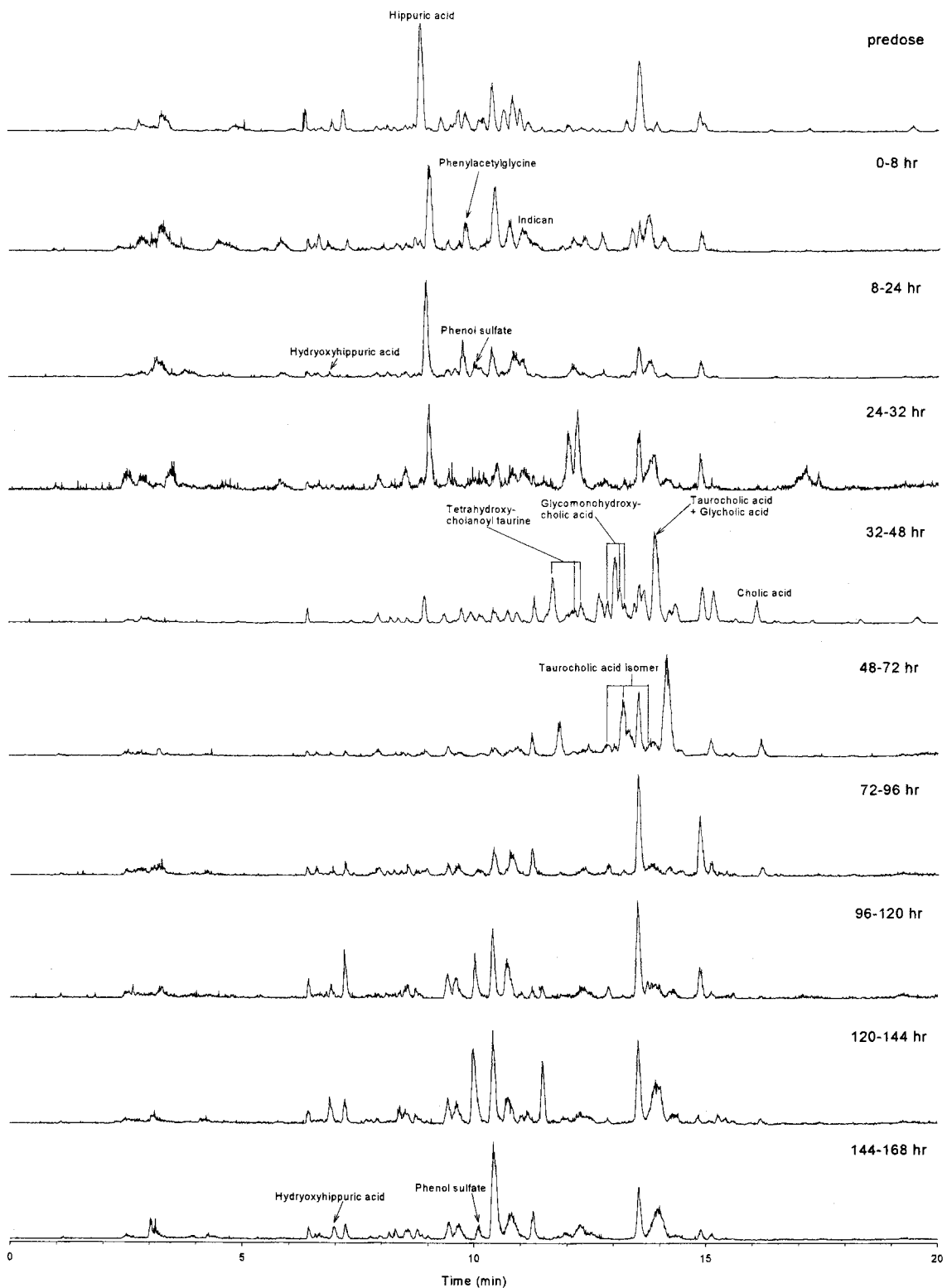


Figure 2. Series of LC-MS spectra of urine samples obtained predose and various time points up to 168 h (as indicated) following the administration of ANIT (100 mg/kg) to rats.

주성분 분석을 original dataset (before normalization)에 수행하여 PC1 과 PC2 space로 표현하였다. 각 time

point의 평균 위치로 표시한 PCA metabolic trajectory plots에서 Control group은 0-8 hr 시간에서 predose origin과 가장 멀리 떨어져 있다가 시간이 지날 수록 metabolic profile의 변화가 사라져 안정되는 시점인 144-168 hr를 대표하는 점으로 모이게 되며 ANIT treated group은 predose origin에서 출발하여 0-8 hr 시간에서 그 차이가 커졌다가 32-48 h point에서 가장 큰 차이를 보인 후 점점 144-168 hr 지점으로 가까워지게 된다. PCA 분석의 패턴인식은 ANIT treatment가 metabolic profile에 32-48 hr 기간에서 가장 크게 영향을 주는 것을 알려주며, 또한 metabolic profile이 predose origin으로 회귀하지는 않지만 시간이 경과할수록 control group으로 가까워짐을 보여주어 7일째에는 회복됨을 보여주고 있다. (Figure 3-A). ANIT-treated group 나타나는 0-8 hr에서 metabolic profile의 변화는 control group에서도 나타나는 것으로 판단하건데 corn oil에 의한 것으로 생각되며, 따라서, 소변시료에서 toxin에 의하여 특이적으로 나타나는 변화를 감지하고자 한다면 vehicle 효과를 고려해야 할 것이다. 본 실험에서는 이러한 vehicle effects와 각 개체의 spectrum에서 나타나는 개인차를 제거하기 위하여 modified ZST 방법을 이용하여 dataset을 normalization하여 사용하였다. normalized dataset에 PCA를 적용하였을 때 control sample의 mean point는 normalization의 결과로 한 점으로 모이게 되고 ANIT group의 metabolic trajectory도 32-48 hr에서 origin과 가장 크게 떨어져 있다가 시간이 지날 수록 predose origin으로 가까워지는 것을 확인할 수 있었으며 이로부터 predose 상태에서 투여후 24시간이 경과할 때까지는 ANIT의 투여가 소변 시료내의 metabolite에 별다른 영향을 끼치지 않다가 24시간이 지난 후부터 차이를 보이기 시작하여 32-48hr에서 최고조에 이르렀다가 48시간이 지난 후부터 회복되기 시작하여 144-168hr의 경우는 predose 상태로 회복됨을 확인할 수 있었다. original dataset에서와 달리 normalization data를 이용한 PCA 분석은 다른 effects를 배제한 ANIT 처리만에 의한 시간에 따른 metabolic profile의 변화를 볼 수 있도록 할 수 있었다. (Figure 3-B).

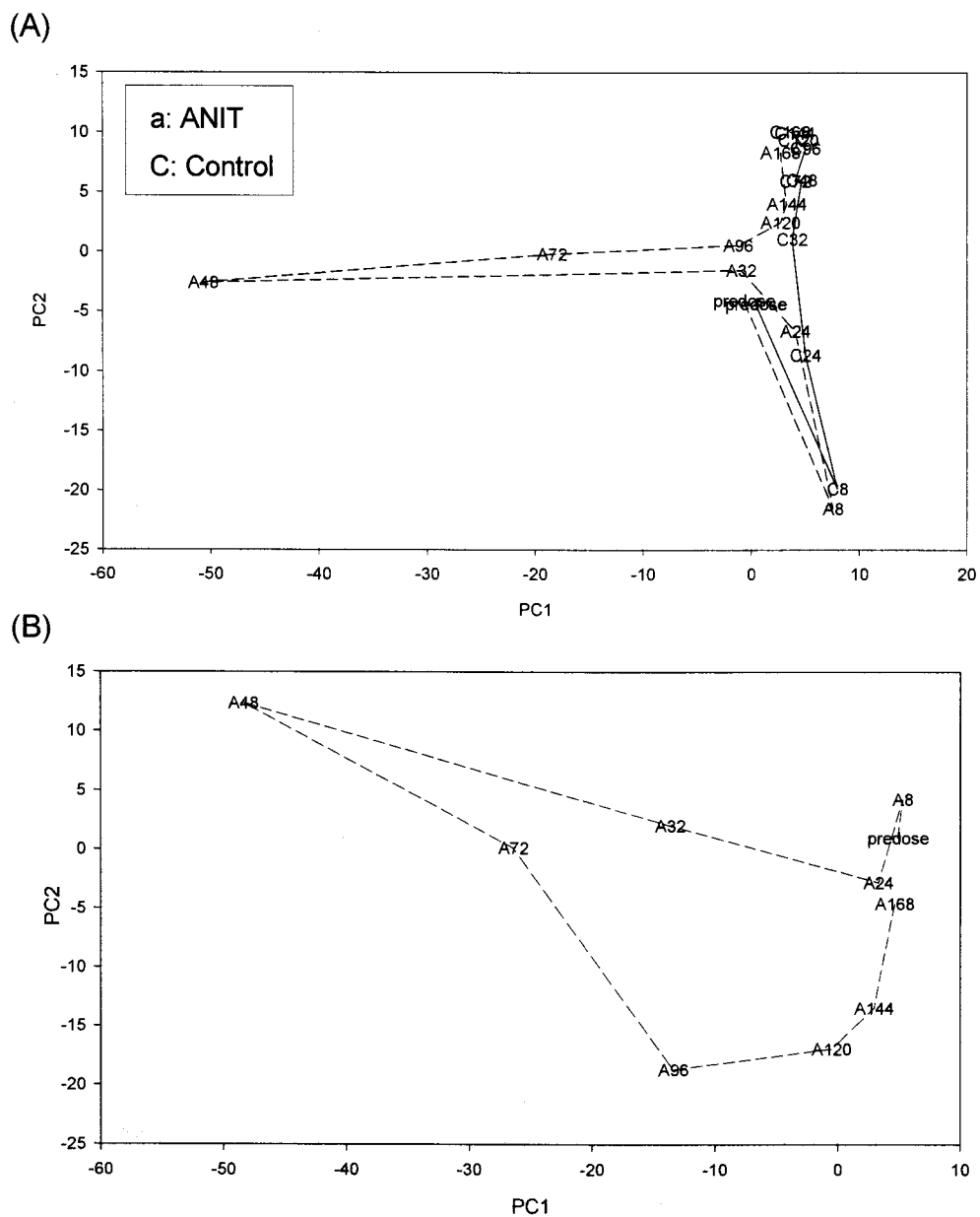


Figure 3. PC maps of urine spectra from rats treated with ANIT (100 mg/kg). Mean value of each time points were plotted. (A) Original dataset and (B) normalized dataset

나. Model hepatotoxin에 따른 urinary metabolic profile의 변화

ANIT treatment에 의하여 가장 큰 차이를 보인 시간이 32-48 hr 동안이었으므로, 각 hepatotoxin에 의한 metabolic profile의 변화를 보기 위한 실험에서는 32-48 hr 시료만을 이용하여 그 효과를 분석하였다. ANIT 투여 후 32-48 hr 동안의 소변시료의 LC/MS spectra는 내인성 대사물의 큰 변화를 보이며, 대부분의 주요 대사물의 농도가 감소하는 것으로 관찰된다. LC/MS 분석전에 소변 시료의 농도를 조절하기 위하여 1 mM creatinine의 농도를 가지도록 소변을 희석하여 분석하게 되는데 ANIT의 경우는 ANIT의 투여가 hypercreatininuria를 일으켜 소변내의 creatinine의 농도가 높아지게 되므로 나머지 대사물의 농도가 control에 비하여 상대적으로 더 낮게 관찰되는 것으로 추측된다²². 가장 큰 변화는 m/z 162, 194 (hydroxyhippuric acid), 218, 236, 268이 85% 이상 감소되고, bile acids가 검출되며, m/z 167과 269는 특이적으로 400% 이상 증가되는 것으로 나타났다. (Table 1). CCl_4 의 경우는 m/z 339가 현저히 증가하며 (control에 비하여 약 19배), m/z 178 (hippuric acid)와 278이 증가하고 m/z 160, 207, 212, 273이 대조군에 비하여 70% 이상 감소하였다. Acetaminophen 처리군에서는 acetaminophen의 대사체인 acetaminophen glucuronide와 acetaminophen sulfate가 대량으로 검출되어 dataset 구성단계에서 배제시킨 후 dataset을 구성하였다. 내인성 물질 중에서는 m/z 207이 control group (50% PEG only treated group)에 비하여 증가하였으며, hippuric acid m/z 273도 감소하는 것으로 나타났다. Diclofenac 처리 군에서는 control group과 비교하여 별다른 차이를 발견할 수 없었다. control vehicles 사이에서는 LC/MS spectra 상으로으로는 차이점이 발견되지 않았다 (Figure. 4).

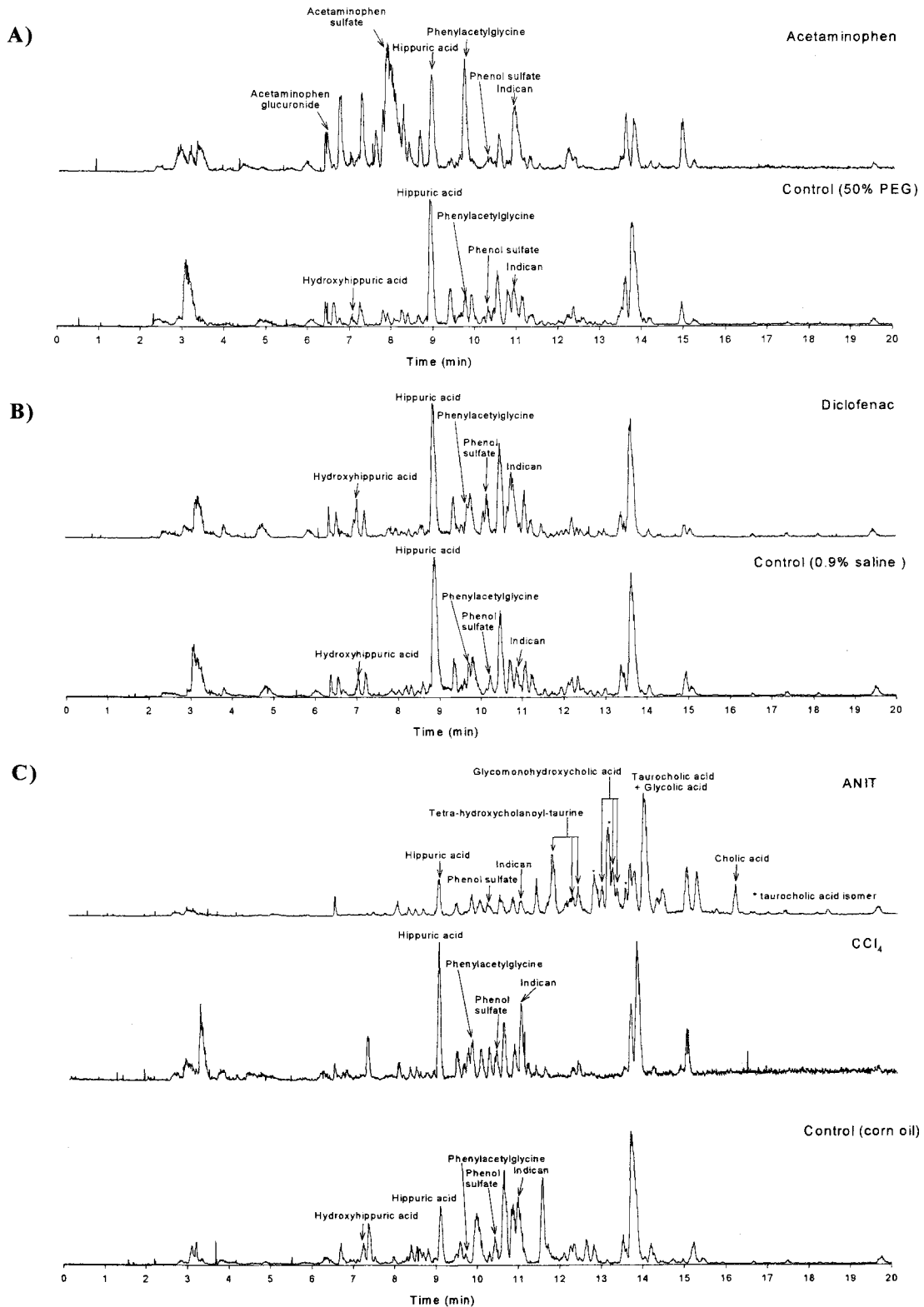


Figure 4. LC-MS spectra of urine 32-48 h post-administration of hepatotoxin and each vehicle: (A) acetaminophen, (B) diclofenac and (C) ANIT and CCl₄.

Table 1. Relative changes in major endogenous metabolite concentrations between hepatotoxin-treated groups and each control group.

<i>m/z</i>	RT (min)	AC	DI	CCl4	ANIT
160	10.4			74% ↓	68 % ↓
162	11.1			45% ↓	85 % ↓
167	6.4		34% ↓		869 % ↑
178	9.0	43% ↓		330% ↑	
189	9.8			59% ↓	66 % ↓
194	7.0			61% ↓	91 % ↓
201	13.6				73 % ↓
207	6.7	545% ↑		71% ↓	81 % ↓
212	10.9		40% ↑	71% ↓	81 % ↓
218	7.2				92 % ↓
222	10.3			43% ↓	75 % ↓
223	6.5				76 % ↓
231	14.9			62% ↓	75 % ↓
236	12.1				90 % ↓
242	10.1				67 % ↓
245	13.5			55% ↓	
268	13.9				89 % ↓
269	14.9				400 % ↑
273	9.5	27% ↓		73% ↓	61 % ↓
295	9.3			29% ↓	62 % ↓
339	8.7			1870% ↑	
343	13.3				75 % ↑
407	16.1				S
464	14.0				S
512*	13.1				S
514*	13.8				S
530*	13.4				S

* the largest peak of isomers.

** Specific in ANIT-treated group

Relative percentages were calculated in metabolites which had statistically significant differences for the relevant control group ($p < 0.05$).

네가지 hepatotoxin에 대한 original dataset에 PCA 분석을 적용한 결과 첫 번째 3 PCs를 사용한 PC score

plot에서 ANIT, CCl₄, acetaminophen의 경우는 분리된 군집을 형성하지만 diclofenac의 경우는 50% PEG를 처리한 diclofenac의 control group과 분리되지 않았으며, control group에 있어서 처리한 vehicle에 따라 PC3의 값이 뚜렷한 차이를 보이며 3 군집으로 분리되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 LC/MS를 사용한 metabonomic study에 있어서 처리한 vehicle이 metabonomic profile에 영향을 끼침을 의미한다. Diclofenac 처리군에 있어서는 original dataset을 이용한 PCA 분석에 있어 첫 번째 3 PCs에 의해서는 metabolic variations의 결과를 확인할 수 없었다. (Figure 5-A). 따라서, vehicle effects를 제거하기 위하여 modified ZST를 수행한 normalized dataset에 주성분을 실시한 결과 생성된 PC score plots에서는 original dataset에 비하여 group classification이 증가됨을 확인할 수 있었으며, diclofenac의 경우도 control group과 하나의 개체만이 겹치면서 거의 분리가 됨을 알 수 있었다 (Figure. 5-B).

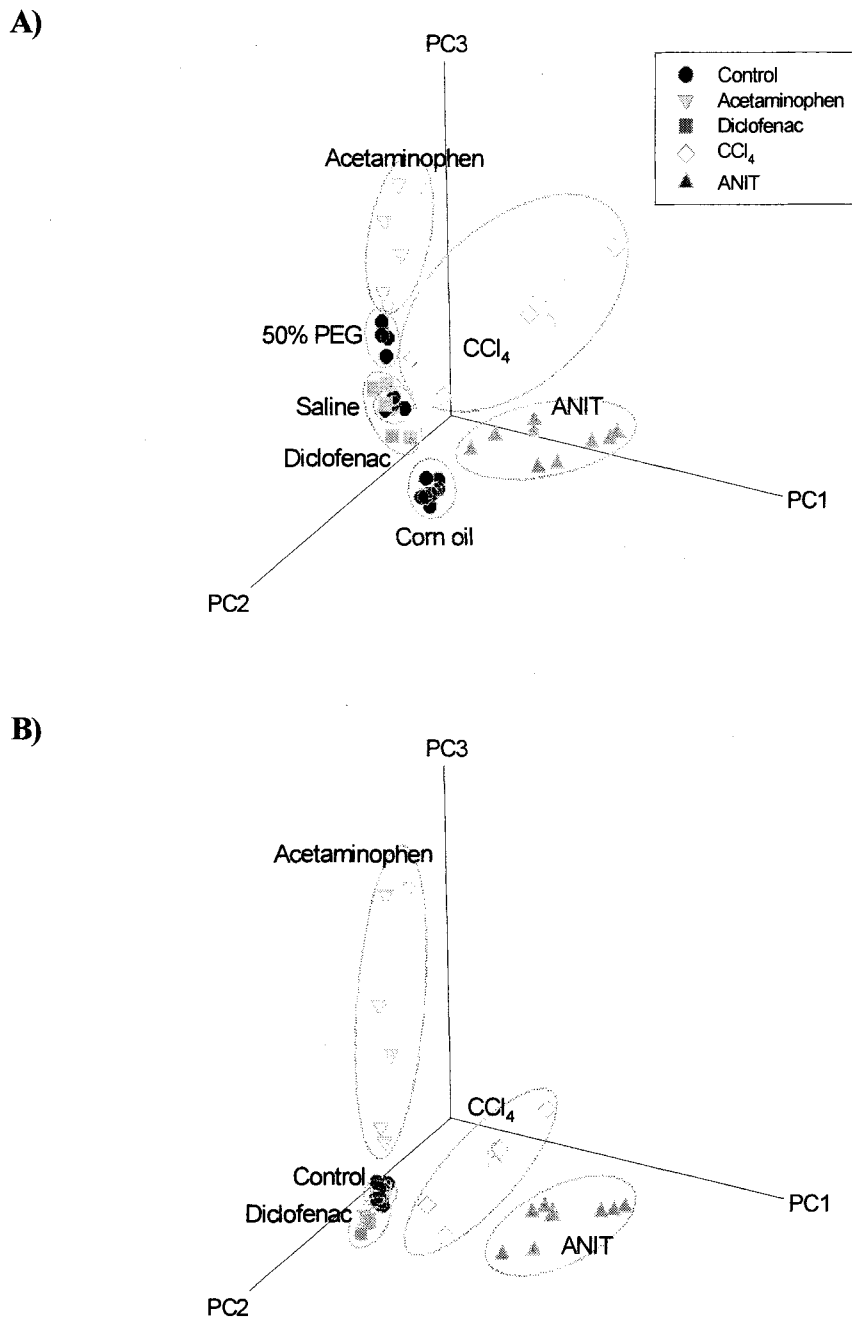


Figure 5. Plots of the first 3 PCs of 32-48 hr urines for acetaminophen (▼), diclofenac (■), CCl₄ (◇), ANIT (▲) and each control vehicles (●) A) Original dataset and (B) normalized dataset.

판별 분석의 경우는 dataset의 총분산의 90% 이상을 설명할 수 있도록 dataset의 정보를 축약한 23개의 주성

분을 사용하여 수행하였다. original dataset에 정준판별분석을 수행한 후 얻어진 정준그래프에는 5 classes의 분리를 볼 수 있었으나, 99.7% 신뢰도의 수준으로 그려넣은 ellipsoidal circle은 control group과 acetaminophen group이 overlap되어 나타났으며, 3 control 개체가 group과 2 acetaminophen 개체가 두 그룹 모두에 속하는 것으로 나타났다. (Figure 6-A) 이는 서로 다른 vehicle effect를 보이는 control group을 하나의 그룹으로 묶으면서 판별함수의 판별력의 신뢰도가 감소된 것으로 추측된다. CDA를 normalized data로부터 얻은 PC set에 적용하였을 때는 이러한 vehicle effect가 없어지면서 5 classes가 각자 뚜렷이 분리된 군집으로 나타나는 것을 볼 수 있었으며, ellipsoidal circle의 경우도 모두 분리되어 나타났다 (Figure 6-B).

집단을 구분할 수 있는 모델을 설정하고, 그 설정된 규칙에 의하여 새로운 관측치가 특정 집단에 할당되는지를 확인하기 위하여 4 가지 hepatotoxin에 대하여 선형판별분석(LDA) 과 SIMCA-RD를 적용하였다. 수립된 model의 판별력은 leaving-one-out method를 이용하여 나타내었다. original dataset을 이용하여 SIMCA-RD를 수행한 경우에는 acetaminophen과 diclofenac에 대한 판별력이 거의 없는 것으로 나타났는데, 이 결과는 주 성분 그래프의 결과와 CDA의 결과와 일치한다고 볼 수 있다. PC plots에서의 control group은 넓은 지역에 걸쳐 분포되어 있으며, toxin-treated group과 명확히 분리되지 않으며, 또한, diclofenac group의 경우에는 완전히 control group 내에 존재하는 것으로 나타난다. 이러한 original dataset의 특성상 판별함수의 판별력이 CDA와 마찬가지로 control group과 가까운 그룹들에 대하여서는 감소하는 것으로 추측된다. 이에 비하여 normalized data의 결과는 original dataset에 비하여 그 예측력이 크게 증가되었으며, 특히 SIMCA-RD의 경우는 적용한 48 개체 중 오직 한 개체만이 오분류되는 것으로 나타나 그 모델의 예측력이 매우 뛰어남을 확인할 수 있었다. (Table 2)

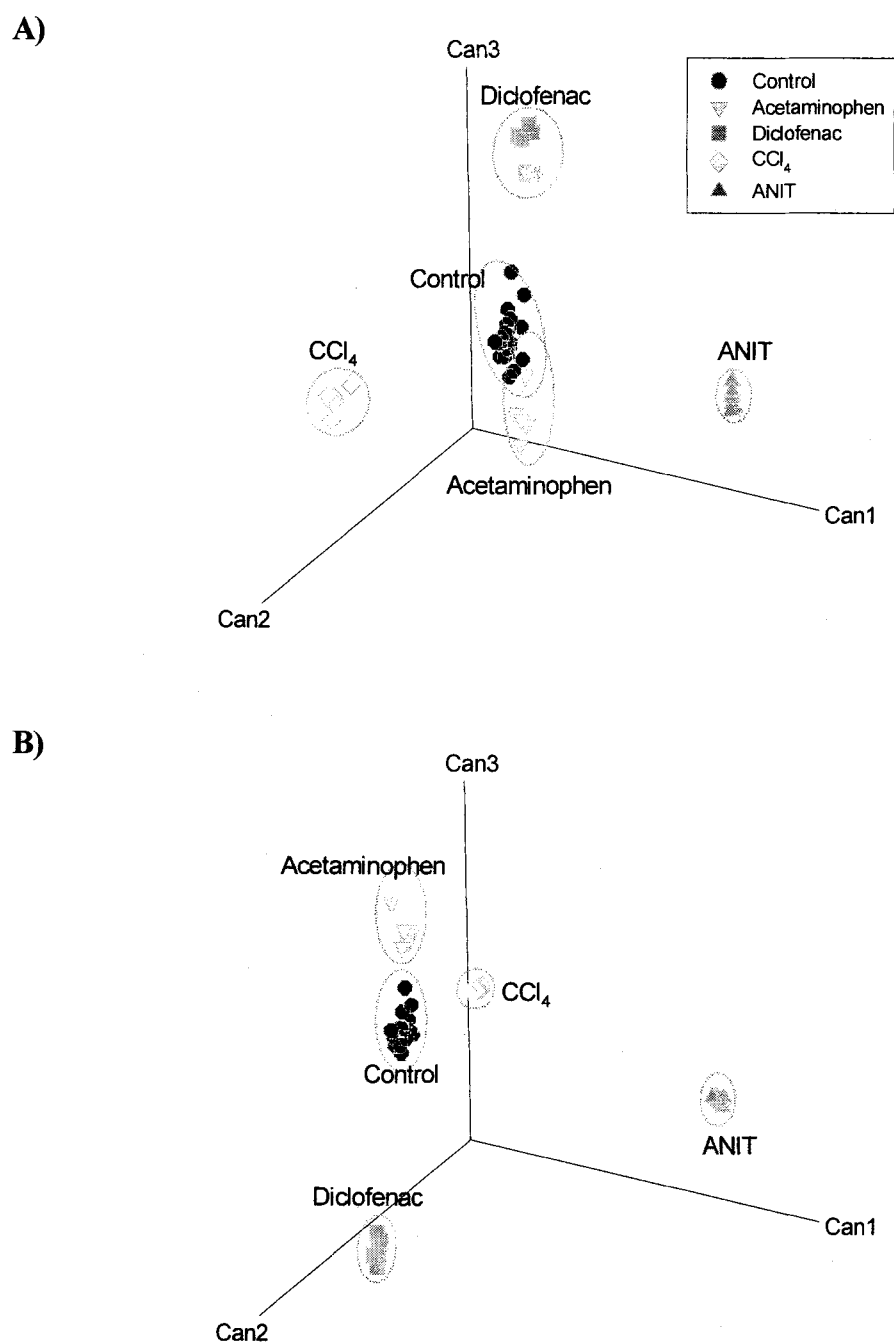


Figure 6. Plots of the first 3 canonical functions of 32-48 hr urines for acetaminophen (▼), diclofenac (■), CCl₄ (◆), ANIT (▲) and each control vehicles (●) A) Original dataset and (B) normalized dataset. Ellipse showed 3 SD (ca. 99.7 %) boundary from the center of each groups.

Table 2. Results of LDA and SIMCA-RD analysis

	Original dataset		Normalized dataset	
	LDA	SIMCA-RD	LDA	SIMCA-RD
Acetaminophen	5/6	3/6	4/6	6/6
Diclofenac	6/6	1/6	6/6	6/6
CCl4	3/6	6/6	4/6	5/6
ANIT	7/9	9/9	9/9	9/9
Control	21/21	21/21	21/21	21/21
Total (%)	82.2	73.3	86.7	96.7

Predictability of constructed models = number of correct classification / total number

LDA: Linear discriminant analysis

SIMCA-RD: Soft independent modeling of class analogy with residual distances.

이상과 같이 본 연구에서 수행한 LC/MS기술과 다변량기술을 이용한 metabonomics 개념의 간독성 예측 기술은 독성물질 자체들의 metabolic profiles의 변화에 대한 정보를 제공할 수 있으며, 지속적인 실험을 통해 여러 가지 독성 모델 등을 확립하여 신약후보물질의 독성 기작을 규명하는데 활용할 수 있을 것이라 사료된다.

4. 참고문헌

1. Nicholson, J. K. Connelly J., Lindon, J. C. and Homes, E. (2002) Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. *Nat. Rev.* 1, 153-161
2. Kenney, B. and Shockcor, J. P. (2003) Complementary NMR and LC-MS technologies for metabonomic studies. *Pharmagenomics* Nov(1), 56-63
3. Lindon, J. C., Homes, E. and Nicholson, J. K. (2003) So what's the deal with metabonomics? *Anal. Chem.* A-Pages 75(17), 385A-391A
4. Robertson, D. G., Reily, M. D., Sigler, R. E., Wells, D. F., Paterson, D. A., Braden, T. K. (2000) Metabonomics: Evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid *in vivo* screening of liver and kidney toxicants. *Toxicol. Sci.* 57, 326-337.
5. Beckwith-Hall, B. M., Nicholson, J. K., Nicholls, A. W., Foxall, P. J., Lindon, J. C., Connor, S. C., Abdi, M.,

- Connelly, J. and Holmes, E. (1998) Nuclear magnetic resonance spectroscopic and principal component analysis investigations into biochemical effects of three hepatotoxins. *Chem. Res. Toxicol.* 11, 260-272
6. Water, N. J., Homes, E., Williams, A., Watfield, C. J., Farrant, D. and Nicholson, J. K. (2001) NMR and Pattern Recognition Studies on the Time-Related Metabolic Effects of α -Naphthylisothiocyanate on Liver, Urine, and Plasma in the Rat: An Integrative Metabonomic Approach. *Chem. Res. Toxicol.* 14, 1401-1412
7. Mortishire-Smith, R. J., Skiles, G. L., Lawrence, J. W., Spence, S., Nicholls, A. W., Johnson, B. A. and Nicholson, J. K. (2004) Use of Metabonomics to Identify Impaired Fatty Acid Metabolism as the Mechanism of a Drug-Induced Toxicity. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 165-173
8. Williams, R. E., Williams, R. E., Jacobsen, M. and Lock, E. A. (2003) ^1H NMR Pattern Recognition and ^{31}P NMR Studies with D-Serine in Rat Urine and Kidney, Time- and Dose-Related Metabolic Effects. 16, 1207 - 1216
9. Lindon, J. C., Nicholson, J. K., Holmes, E. and Everett, J. R. (2000) Metabonomics: metabolic processes studied by NMR spectroscopy of biofluids. *Concepts Magn. Reson.* 12, 289-320.
10. Gavaghan, C. L., Holmes, E., Lenz, E., Wilson, I. D. and Nicholson, J. K. (2000) An NMR-based metabonomic approach to investigate the biochemical consequences of genetic strain differences; application to the C57BL/10J and Alpk:ApfCD mouse. *FEBS Lett.* 484, 169-174.
11. Plumb, R. S., Stumpf, C. L., Gorenstein, M. V., Castro-Perez, J. M., Dear, G. J., Anthony, M., Sweatman, B. C., Connor, S. C. and Haselden, J. N. (2003) Metabonomics: the use of electrospray mass spectrometry coupled to reverse-phase liquid chromatography shows potential for the screening of rat urine in drug development. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17, 2541-2549
12. Plumb, R. S., Granger, J., Stumpf, C., Wilson, I. D., Evans, J. A. and Lenz, E. M. (2003) Metabonomic analysis of mouse urine by liquid-chromatography-time of flight mass spectrometry (LC/TOFMS): detection of strain, diurnal and gender differences. *Analyst* 128, 819-823
13. Rhodes, G., Miller, M. and McConnell, M. L. (1981) Novotny M. Metabolic abnormalities associated with diabetes mellitus, as investigated by gas chromatography and pattern-recognition analysis of profiles of volatile metabolites. *Clin. Chem.* 27, 580-585.
14. Jellum, E., Harboe, M., Bjune, G., Wold, S. (1991) Interpreting complicated chromatographic patterns. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 9, 663-669.
15. Lindon, J. C., Homes, E. and Nicholson, J. (2001) Pattern recognition methods and applications in biomedical magnetic resonance. *Prog. Nucl. Magnetic Res.* 39, 1-40
16. Azmi, J., Griffin, J. L., Antti, H., Shore, R. F., Johnson, E., Nicholson, J. K. and Homes E. (2002) Metabolic

- trajectory characterization of xenobiotics-induced hepatotoxin lesions using statistical batch processing of NMR data. *Analyst*. 127, 271-276.
17. Tate, A. R., Damment, S. J. P and Lindon, J. C. (2001) Investigation of the metabolite variation in control rat urine using ^1H NMR spectroscopy, *Anal. Biochem.* 291,17-26
 18. Brindle, J. T., Nicholson, J. K., Schofield, P. M., Grainger, D. J. and Homes, E. (2003) Application of chemometrics to ^1H NMR spectroscopic data to investigation a relationship between human serum metabolic profiles and hypertension. *Analyst* 128, 32-36
 19. Homes, E and Antti, H. (2002) Chemometric contributions to the evolution of metabonomics: mathematical solutions to characterising and interpreting complex biological NMR spectra. *Analyst*, 127, 1549-1557
 20. Beckwith-Hall, B. M., Holmes, E., Lindon, J. C., Gounarides, J., Vickers, A., Shapiro, M., and Nicholson, J. K. (2002) NMR-Based Metabonomic Studies on the Biochemical Effects of Commonly Used Drug Carrier Vehicles in the Rat. *Chem. Res. Toxicol.* 15,1136-1141
 21. Moslen, M. T., (1996) Toxic response of liver. In Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons. Fifth Ed. (Kassen, C. D., Amdur, M. O. and Doull, J. D. Eds.) pp403-415, MCGRAW-Hill, New York.
 22. Clayton, T. A., Lindon, J. C., Everett, J. R., Charuel, Cl., Hanton, G., Le Net, J-L., Provost, J-P. and Nicholson, J. M. (2003) An hypothesis for ad mechanism underlying hepatotoxin-induced hypercreatinuria. *Arch. Toxicol.* 77, 208-207.

특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	선도, 중점		
	세부사업명	국가지정연구실사업		
과제명	신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태 연구			
연구기관	한국과학기술연구원	연구책임자	김 동 현	
총연구기간	2000년. 6월. 14일. ~ 2004년. 6월. 13일. (48개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
	660,000	0	660,000	
기술분야				
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ()	2. 기술이전()	3. 후속연구추진(●)	4. 타사업에 활용()
	5. 선행 및 기초연구()	6. 기타목적활용(교육연구)()	7. 활용중단(미활용)()	8. 기타()

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

- 첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.
2. 기술요약서 1부

2004년 6월 20일

연구책임자 : 김 동 현 (인)
연구기관장 : 김 유 승 (직인)

과학기술부장관 귀하

여 백

[첨부1]

연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

합성, 천연물질로부터 창출되는 신약후보물질로부터 신의약품을 개발하기 위하여 생리활성스 크리닝, 안전성 평가와 더불어 대사 및 체내동태의 규명으로 신물질의 생체 내 활성 평가가 필수적으로 요구된다. 본 연구에서는 신물질 개발 초기단계에서 lead selection과 lead optimization에 핵심기술인 대사 및 체내동태를 신속하게 규명하는 기술개발과, 전임상 ADME 연구 체계를 확립을 최종목표로 서술한 내용을 연구하자고 하였다.

- 방사성 동위원소 표지물질 합성 기반 구축 및 이를 이용한 ADME연구 기술 개발
- 대사체 분석기술 및 고속 대사체 검정 기술 개발
- hypernated technique을 이용한 약물 분석방법의 개발
- In vitro human absorption과 BBB 투과성 평가 기술 개발 및 응용
- In vivo 체내동태 예측 방법의 정립 및 독성예측
- 대사효소 활성 유도 및 억제 신속 스크리닝 방법 개발 및 약물 상호작용예측

2. 연구수행결과 현황(연구종료시점까지)

가. 특허(실용신안) 등 자료목록

발명명칭	특허공고번호 출원(등록)번호	공고일자 출원(등록)일자	발명자 (출원인)	출원국	비고

나. 프로그램 등록목록

프로그램 명칭	등록번호	등록일자	개발자	비고
HP/GC/MSD에서의 홍분제약물의DB화 및 자동검출 프로그램	2002-01-12-507	2002.01.26	명승운	
HP/GC/MSD에서의 베타차단제 약물의TMS및TFA유도체의DB화 및 자동 검출 프로그램	2002-01-12-508	2002.01.26	명승운	
HP/GC/MSD에서의 티로프라미드의 자동 탐색 및 정량 프로그램	2002-01-12-509	2002.01.26	명승운	
HP/GC/MSD를 이용한 시료의 자동 농도계산 프로그램	2002-01-12-1998	2002. 3. 26	김동현	
HP/GC/MSD를 이용한 시료의 자동 integration 프로그램	2002-01-12-1890	2002. 3. 26	김동현	

다. 노하우 내역

- HPLC/MS/MS를 이용한 대사 안정성 평가 및 mass spectrum 해석을 통한 대사체 구조 규명
- Hypernated technique를 이용한 생체 시료에서의 미량 약물 및 대사체 분석
- In vitro intestine 및 BBB 투과성 평가
- Cassette analysis를 이용한 rapid metabolic screening 과 PK 평가
- Radio-labeled compound를 이용한 대사체 추적 및 whole body autoradiography
- Cytochrome P450 expression 및 inhibition kinetics를 이용한 drug interaction 예측
- 내인성 물질 분석을 이용한 독성 및 활성 평가

라. 발생품 및 시작품 내역

바. 논문게재 및 발표 실적

○ 논문게재 실적(필요시 별지사용)

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재여부
Rapid Commun. Mass Spec.,	Characterization of amiodarone metabolites and impurities using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry	2000.	Vol 14		미국	○
J. Chromatogr. B	Column-switching high performance chromatographic assay for determination of aloesin in rat plasma and with ultraviolet absorbance detection	2001,	Vol754		네델란드	○
Drug Metab. Dispo.	Metabolism of DDB by human liver microsomal cytochrome P450: Probable involvement of CYP3A and CYP1A2	2001. 9	Vol 2		미국	○
Rapid Commun. Mass Spec.,	Quantitative determination of medroxyprogesterone acetate in human plasma by high performance liquid chromatography/ion-trap mass spectrometry	2001, 9	Vol 15		미국	○
Drug Metab. Dispo.	Characterization of the selectivity and mechanism of human cytochrome P-450 inhibition by dimethyl-4,4-dimethoxy-5,6,5,6-dimethylenedioxybiphenyl-2,2-dicarboxylate	2001. 12	Vol 29		(ASP ET) 미국	○

Chromatographia	Rapid and sensitive analysis of medroxyprogesterone acetate in human serum by gas chromatography-mass spectrometry	2001, 12	Vol. 54		미국	○
J. Toxicol. Environ. Health	Effects of flavonoids isolated from Scutellariae radix on cytochrome P450 activities in human liver microsomes	2002, 3	Vol 65		미국	○
Rapid Commun. Mass Spectro.	Mass spectrometric analysis of cyclofenil and its metabolites in human urine	2002, 5	Vol 16,		미국	○
The Analyst	Quantitative determination of tizanidine in human plasma by gas chromatography-mass spectrometry	2002. 7	Vol 127		영국	○
Rapid Communi. Mass Spect	Determination of 4-hydroxy nonenal, in rat plasma by gas chromatography/mass spectrometry.	2002. 8	Voil 16		미국	○
Rapid Communi. Mass Spect	The identification in vitro metabolites of CKD-732 by liquid chromatography/tandem mass spectrometry	2002. 10	Vol 16		미국	○
Anal. Biochem	Rapid analysis of metabolic stability of dopamine receptor antagonists and detection of their metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry.	2003. 2	Vol 313		미국	○
Xenobiotica	Absorption, distribution, metabolism and excretion of carboxy thiazolidine carboxylic acid, an mucolitic agent, in rats	2003. 6	Vol 33		영국	○
Rapid Commun. Mass Spectro	Simultaneous quantitation of enalapril and enalaprilat in human plasma by 96-well solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectroscopy.	2003. 8	Vol 17		미국	○
Anal. Chim. Acta	Simultaneous quantitation of loganin and sweroside in plasma using column-switching high-performance liquid chromatography	2004. 2	Vol 503		영국	○
J. Mass Spectro	In vitro and in vivo metabolism of pyronaridine characterized by low-energy collision induced dissociation mass spectrometry with electrospray ionization.	2004 in press			미국	○

J. Pharma. Biomedical Analysis	Rapid quantitative analysis of oxiracetam in human plasma by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry	2004 in press			미국	○
J. Mass Spectro	Low-energy collision-induced dissociation of sildenafil thiono analogue: Gas-phase nucleophilic substitution through ion-neutral complexes between cationic substrate and thione-containing neutral nucleophile	2004 revision			미국	○
Rapid Commun. Mass Spectro.	Metabolism of 1-[3-[3-(4-Cyano-benzyl)-3H-imidazol-4-yl]-propyl]-3-(6-methoxy-pyridin-3-yl)-1-(2-trifluoromethyl-benzyl)-thiourea (YH3945), a novel anti-cancer drug, in rats using ¹⁴ C-labeled compound.	2004 in press			미국	○
계	19					

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
10th North American ISSX Meeting, Indianapolis,	Inhibition of microsomal testosterone 6b-hydroxylase activity by dimethyl-4,4-dimethoxy-5,6,5,6-dimethylenedioxyphenyl 2,2-dicarboxylate (DDB),	2000. 10.24-28			(미국)
49회 추계 약학회	In vitro inhibition of DDB toward CYP3A4: inhibitory patterns are substrate -dependent	2000. 10.19-20			(서울, 한국)
2000년 한국약제학회 추계학술대회	Metabolism OF dimethyl-4,4-dimethoxy-5,6, 5,6- dimethylenedioxyphenyl 2,2-dicarboxylate (DDB) and inhibition of cytochrome P450 activities in human liver microsomes.	2000.10.30			(서울, 한국)
2001년도 대한약학회 춘계학술대회,	Mass Spectrometric Study of cyclofenil and its metabolites in human urine.	2001. 4.			한국
Manfred Donike Workshop, Germany	Determination of cyclofenil and its metabolites in human urine	2002. 03.			독일

The Pittsburgh Conference, New Orleans, U.S.A.	Characterization of the metabolites and impurities for CKD-732 from <i>in vivo</i> and <i>in vitro</i> sample.	2002.. 03.			미국
춘계 대한약학회, 충북대학교,	Rapid analysis of tizanidine in human plasma by gas chromatography/mass spectrometry	2002. 4			한국
대한약학회 추계학술대회	In vivo metabolism of 2-methylaminoethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxybiphenyl-2'-carboxy-2-carboxylate (DDB-S) by LC/ESI tandem mass spectrometry,	2002. 10			오송 (한국)
대한약학회 추계학술대회	Simultaneous quantitation of enalapril and enalaprilat in human plasma by high-throughput solid phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry,	2002. 10			오송 (한국)
대한약학회 추계학술대회	Rapid analysis of metabolic stability and structure of metabolites in new drug development. Invited presentation.	2002. 10			오송 (한국)
한국약제학회 추계학술대회	Pharmacokinetics and disposition of carboxy thiazolidine carboxylic acid in rats using ¹⁴ C-labeled compound,	2002 11			서울
51st ASMS	In vitro metabolism and fragmentation mechanism of sildenafil derivatives by liquid chromatography/tandem mass spectrometry	2003. 6			Montreal, Canada
대한약학회 춘계 학술대회	In vivo metabolism of 2-methylaminoethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylenedioxy biphenyl-2'-carboxy-2-carboxylate (DDB-S) in rats using deuterium labeled compound	2003. 4			대구 한국
대한약학회 춘계 학술대회	Metabolism of YH3945, a Novel Anticancer Drug, in Rats using ¹⁴ C-Labeled Compound	2003. 4			대구 한국
12th North American ISSX Meeting	In vitro and in vivo metabolism of pyronaridine, an antimalarial drug, in rat	2003. 10			Providence, USA
대한약학회 추계 학술대회	Metabonomic studies on the time-related metabolic effects of α -naphthylisothiocyanate on urine in the rats by liquid chromatography-mass spectrometer	2003. 10			서울

대한약학회 춘계 학술대회	Inhibitory effect of natural products on the P-glycoprotein-mediated transport of Rhodamine-123 and Digoxin in human intestinal Caco-2 cell	2004. 4			대전 한국
대한약학회 춘계 학술대회	In vitro and in vivo metabolism of Eperisone hydrochloride (4'-ethyl-2-methyl-3-piperidinopropiophenone hydrochloride) in human,	2004. 4			대전 한국
대한약학회 춘계 학술대회	Metabolism of SK3530, a novel PDE 5 inhibitor, in rats using 14C-labeled compound	2004. 4			대전 한국

3. 연구성과

4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

가. 당해연도 활용계획

- 신약 개발을 수행중인 산업체의 ADME 연구 지원 (크리스탈 지노믹스 당뇨치료제, 항암제의 lead selection과 optimization을 위한 ADME 연구)
- 분석 전문 CRO인 랩프런티어의 생체 시료분석에 기술 지원
- 대사체학 연구에 확립된 방법을 적용

나. 활용방법

- 과제 수행
- 기술 지원

다. 차년도이후 활용계획

고속 대사 안전성 및 대사 스크리닝 기술을 생리활성 물질 사업에 참여하는 기업에 전수

미량 생체시료 분석 기술을 생물학적 동등성 평가와 신약 개발을 위한 PK 연구에 활용

4. 기대효과

향후 활용에 따른 기술적, 사회·경제적 파급효과(정량적 및 정성적으로 전문가입장에서 구체적으로 작성)

5. 문제점 및 건의사항(연구성과의 제고를 위한 제도·규정 및 연구관리 등의 개선점을 기재)

[첨부2]

기술 요약서

■ 기술의 명칭

In vitro metabolic stability 평가 및 대사체 구조 분석 기술
 Caco-2 세포를 이용한 흡수율 평가 및 BBB투과성 평가 기술
 동위원소 표지 물질을 이용한 ADME 평가 기술
 생체 시료에서의 극미량 약물 및 대사체 분석 기술
 CYP 억제 평가 및 in vitro 약물 상호작용 예측 기술

■ 기술을 도출한 과제현황

과제관리번호				
과제명	신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태 연구			
사업명	국가 지정 연구실 사업			
세부사업명				
연구기관	한국과학기술연구원	기관유형	정부출연 연구소	
참여기관(기업)				
총연구기간	2000.6.14-2004.6.13			
총연구비	정부(1,317,202)천원 민간()천원 합계(1,317,202)천원			
연구책임자 1	성명	김 동 현	주민번호	
	근무기관 부서	한국과학기술연구원 생체대사연구센터	E-mail	dhkim@kist.re.kr
	직위/직급	책임연구원	전화번호	958-5055
연구책임자 2	성명		주민번호	
	근무기관 부서		E-mail	
	직위/직급		전화번호	
실무연락책임자	성명	이민경	소속/부서	생체대사연구센터
	직위/직급	사무원	E-mail	mlko@kist.re.kr
	전화번호	958-5053	FAX	958-5059
	주소	(136-791)서울시 성북구 하월곡동 39-1		

■ 기술의 주요내용

[기술의 개요]

- 신약 탐색 및 개발 단계에서 최적의 *in vivo* 대사, 체내동태 성질을 갖는 약물의 선택 및 특성 변화에 필수적인 lead selection과 optimization 요소 기술
- Radio-labeled 화합물을 이용한 전임상 ADME 규명 기술

<기술적 특징>

- (1) Human microsome을 이용한 rapid 대사 안전성 평가
HPLC/MS/MS를 이용한 metabolic profile 및 대사체 구조 분석
- (2) Chemical inhibitor, expressed P450을 이용한 대사에 관여하는 P450효소 동정
- (3) Caco-2 세포를 이용한 흡수율 평가 및 Huvec 세포를 이용한 BBB 투과성 평가
- (4) HPLC/MS/MS를 이용한 Cassette analysis
- (5) 내인성 대사체 동시분석 및 간독성 예측 기술

[용도 · 이용분야]

- (1) 신약 개발
- (2) 약물 유전체 및 metabolomics 분야
- (3) generic 약물의 생물학적 동등성 평가

■ 기술의 개발단계 및 수준

[기술의 완성도]

	① 기초, 탐색연구단계 : 특정용도를 위해 필요한 신 지식을 얻거나 기술적 가능성을 탐색하는 단계
	② 응용연구단계 : 기술적 가능성의 실증, 잠재적 실용화 가능성의 입증 등 실험실적 확인 단계
●	③ 개발연구단계 : Prototype의 제작, Pilot Plant Test 등을 행하는 단계
	④ 기업화 준비단계 : 기업화에 필요한 양산화 기술 및 주변 기술까지도 확보하는 단계
	⑤ 상품화 완료단계

[기술의 수명주기] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

	① 기술개념 정립기 : 기술의 잠재적 가능성만 있는 단계
	② 기술실험기 : 기술개발에 성공했으나 아직 실용성, 경제성 등이 확실치 않은 단계
	③ 기술적용 시작기: 최초의 기술개발국에서만 활용되고 있는 단계
●	④ 기술적용 성장기: 기술개발국 및 일부 선진국에서 활용되고 있는단계
	⑤ 기술적용 성숙기: 선진국사이에서 활발한 기술이전이 일어나며, 기술의 표준화가 되어가는 단계
	⑥ 기술적용 쇠퇴기: 선진국에서 개도국으로 기술이전이 활발하게 일어나고, 선진국에서는 기술의 가치가 저하되나, 개도국에서는 아직 시장의 가치가 높은 기술

[기술발전 과정상의 기술수준] (1개씩 선택(√호 표시)하여 주십시오)

	① 외국기술의 모방단계 : 이미 외국에서 개발된 기술의 복제, reverse Eng.
●	② 외국기술의 소화·흡수단계 : 국내시장구조나 특성에 적합하게 적용시킴
	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술