

# 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

과학기술부장관 귀하

본 보고서를 "신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태 연구"의 1단계 연구보고서로 제출합니다.

2002. 8.30

주관기관명: 한국과학기술연구원

주관연구책임자: 김동현 (생체대사연구센터)

연구원: 노동석, 명승운, 김연제, 김승기, 이재익, 김승모, 김은정, 신혜주, 이수용,  
김성욱, 김지연, 차수진, 민혜기, 이선영, 윤성호, 고미라

여 백

보고서 초록

과제관리번호		해당단계 연구기간	2000.6.14-200.6.13	단계 구분	1단계 / 총2단계
연구사업명	중 사업명	국가지정연구실사업			
	세부사업명				
연구과제명	중 과제명				
	세부(단위)과제명	신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태 연구			
연구책임자	김동현	해당단계 참여연구원수	총 : 16 명 내부 : 5 명 외부 : 11 명	해당단계 연구비	정부 657,202천원 기업: 천원 계: 657,202천원
연구기관명 및 소속부서명	한국과학기술연구원 생체대사연구센터		참여기업명		
국제공동연구	상대국명 :	상대국연구기관명 :			
위탁연구	연구기관명 :	연구책임자 :			
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자 이내)					보고서면 수
<p>-HPLC/MS/MS를 이용한 rapid In vitro metabolic stability 평가기술 개발: 다 약물 동시 분석과 data analysis 방법개발로 기존 평가 방법 보다 분석 시간을 10배 단축하였으며, single analysis에서 대사체 확인까지 기능하였음.</p> <p>-MS chromatogram에서 대사체 유추와 MS/MS tandem mass spectrum으로부터 대사 구조 유추 방법을 확립하여 20여 종 화합물에서 생성되는 대사체 구조 해석</p> <p>- In vitro Caco-2 세포 배양 조건과 permeability 평가 기반 확립 (HPLC/MS 방법을 이용한 rapid analysis) 기존의 20여개 화합물의 Papp 값을 구하고 physio-chemical property와의 관련성을 평가하였으며 PSA 값이 Caco-2 세포 permeability 정도와 상관성이 높음을 입증</p> <p>-Human P450 6종의 isozyme을 E. coli reductase와 동시 발현하여 이를 이용한 flavonoid들의 활성 억제의 selectivity를 규명하고 또한 대사에 관여하는 P450 동정 연구에 활용 기반을 구축</p> <p>-미량 약물의 분석을 위하여 GC/MS, HPLC/MS/MS, 그리고 switching HPLC 방법을 도입하여 정량이 어려운 steroid, 당화합물, 그리고 taxol등의 극미량 분석 방법을 개발 확립.</p> <p>- Radio-labeled compound를 이용하여 L-FMAU의 ADME 연구를 수행 기반을 확립하였으며, 전신 분포 규명을 위한 rat whole body autoradiography 방법을 확립하고 L-FMAU, telemsteine의 autoradiogram을 획득 조직분포를 규명하였음</p> <p>- HPLC/MS/MS, GC/MS등의 방법을 이용하여 eperisone과 DDB등의 in vivo metabolic profile을 규명하고 또한 대사체의 구조를 확인</p> <p>- 신규화합물의 대사 및 체내동태 특성을 in vitro에서 평가하는 체계를 구축하고, 전임상 ADME 연구 기반을 확립하였음</p>					
색인어 (각 5개 이상)	한 글	약물대사, 대사 안전성, 흡수도 평가, P450 억제, 미량 생체 분석			
	영 어	drug metabolism, metabolic stability, permeability, P450 inhibition, bioanalysis			

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 생체 기능조절 연구도 한층 활성화 될 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 신물질 개발의 bottleneck으로 남게된다.

- lead optimization의 핵심 기술은 대사 안전성과 흡수율의 평가 및 체내동태 예측, 그리고 독성발현 가능성의 진단이라 할 수 있다. 따라서 이러한 문제를 해결하

기 위하여 high throughput 개념의 대사 screening과 흡수 스크리닝 기술을 개발하고, 또한 computer simulation을 통한 virtual absorption/metabolic screening 기술 개발에 선진 제약회사와 연구소가 심혈을 기울이고 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 시작되었거나 시작될 예정이며, 또한 유전자의 최종산물인 대사체의 기능을 규명하는 metabolomics 연구도 시작되는 시점이며, 결과적으로 국내 신물질 개발은 보다 활발히 진행되리라 예측되며, 성공적인 신물질 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 screening 방법 개발 및 대사체 확인 기술 개발
- In vitro permeability 방법 개발 및 Chemoinformatics 도입을 통한 흡수율 예측 기법확립
- P450 발현 및 이를 이용한 P450 inhibition 규명 기술 확립
- Hypernated technique을 이용한 생체 시료에서의 약물 분석 기술 개발 (LC/MS/MS 의 응용)
- 약물의 대사 profiling 및 새로운 대사체 구조 규명 연구
- Radioisotope-labeled compound를 이용한 전임상 ADME 연구와 신약개발 지원

### IV. 연구개발결과

- **In vitro rapid metabolic stability screening 방법 개발 및 대사체 확인 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 20여 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

**In vitro permeability 방법 개발 및 Chemoinformatics 도입을 통한 흡수율 예측 기법확립**

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
  - PSA와의 상관성이 가장 높음
  - simulation을 통한 흡수율 예측 식의 도출과 실측값과의 상관성 분석
- P450 발현 및 이를 이용한 P450 inhibition 규명 기술 확립**
- Human P450 inhibition 스크리닝 기술 확립
- 각각 P450 isozyme 특이기질을 이용하여 활성 억제 방법 확립
  - 10여가지 Flavonoid 들에 의한 CYP1A1, CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, 그리고 CYP3A4 억제에 대한 선택성 규명
    - 황금에서 추출된 flavonoid들에 의한 CYP1A2 활성 억제와 기전 규명
    - DDB에 의한 CYP3A4 선택적 억제와 억제 기전 규명
- 4종의 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
- Radioisotope-labeled compound를 이용한 전임상 ADME 연구와 신약개발 지원**
- 동위원소를 이용한 전신생체 대사 및 대사체 tracing 기법 구축
- 전신 생체 분포 평가를 위한 whole body autoradiography 기술개발
  - radiotracer의 확산 방지를 위한 몸통전체의 동결 방법 개발.
  - Cryocut을 이용한 20  $\mu$ m두께의 전신 박편 시료 제조법 개발
  - whole body distribution 규명 ( $^{14}$ C-FMAU)
  - 투여 시간 경과에 따른 체내분포 변화를 경시적으로 추적
  - HPLC/radio-flow detector 시스템을 이용한 생체 시료에서의 대사체 추적 및 구조 규명 기술 확립
- $^{14}$ C-labeled compound를 이용한 흡수, 분포, 대사, 배설 profile 규명
  - L-FMAU의 rat에서의 대사 및 체내분포 특성을 규명
  - 혈장 중  $^{14}$ C-FMAU와 monophosphorylated metabolites를 확인

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

- **Hypernated technique**을 이용한 생체 시료에서의 약물 분석 기술 개발  
(LC/MS/MS 의 응용)

Column switching HPLC 를 이용한 분석방법 개발

1. glycoside aloesin 분석방법

· 용매추출, solid phase 추출이 불가능한 aloesin 함유 생체 시료를 direct injection 과 3-column switching 방법으로 분석 방법 개발

· 정량한계를 10배 증대

2. 추출이 난해한 taxol의 분석방법 개발

· Plasma를 전처리 없이 MF-Ph column에 주입 2-step column switching으로 taxol 분석

· 정량한계 5 ng/ml로 경구투여 제형 평가 가능

· GC/MS를 이용한 bucillamine, medroxyprogesterone 분석법 확립

- GC/MS를 이용한 분석방법 개발

1. tizanidine의 분석방법

· MSTFA 유도체 방법으로 tautomerization 반응 제어

· 검출한계: 0.2 ng/ml

· 체내 동태 평가에 적용

LC/MS/MS를 이용한 분석방법 개발

1. progesterone 의 분석방법

· Mutiple reaction monitoring 방법 선택성과 sensitivity 증대

· 검출한계: 0.05 ng/ml

· 체내 동태 평가에 적용

2. enalapril 과 대사체 enalaprilat의 동시 분석방법 개발

· 96-well type solid-phase extractor 와 LC/MS를 integration시킨 system 구축하여 신속분석방법 확립

· mass monitoring으로 검출 한계를 0.2 ng/ml 로 향상)

- 약물의 대사 profiling 및 새로운 대사체 구조 규명 연구

간염치료제로 사용되는 DDB의 인체 대사 규명

- human microsomes에서 5개의 대사체 생성 확인
- EI mass, LC/MS, NMR 분석을 통하여 각각의 대사체 구조 규명
- Demethylation과 O-demethylation이 major metabolic pathway이며 lactonization으로 대사체간의 조성이 바뀜

2. Eperisone의 in vitro와 in vivo 대사 규명

- In vitro에서 5개 in vivo의 경우 human에서 약20개의 대사체가 검출됨/ rat와 종차 확인
- LC/MS/MS를 이용하여 각대사체의 구조규명 (carbonyl reduction, side chain hydroxylation, piperidine ring hydroxylation)
- Caco-2세포에서도 대사가 일어나며 낮은 혈 중 농도는 빠른 대사속도, 그리고 간, 소장 초회통과효과임을 규

cyclofenyl의 대사 규명

- in vivo : human urine으로 배출되는 cyclofenil의 미량의 대사체들을 GC/MSD 와 HPLC-MS/MS를 사용하여 phase I 및 phase II 형태로 분석하는 기술 개발.

5. in vitro 대사 : fumagilline 계열의 약물의 in vitro incubation을 통하여 생성된 미량의 대사체 14개를 HPLC-MS/MS방법으로 구조규명

## 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 전임상 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

- 신물질 개발은 생명공학의 백미로서 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 전임상 ADME 연구와 임상에서의 ADME연구지원에 활용가능함
- 국가적으로 문제가 되고 있는 대체조제를 위한 생물학적 동등성 평가에 개발된 hypernated 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

여 백

## S U M M A R Y

Drug metabolism and pharmacokinetic properties of drug candidates are determinant factors in successful new drug development. During last 10 years, major cause of dropout of newly developed drugs in clinical stages are pharmacokinetic and metabolic issues. Therefore, selection and optimization of candidates in early drug discovery stage is prerequisite for successful drug development. The purpose of present study is to establish rapid metabolic/absorption screening method and 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 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. The metabolites were first characterized by nominal mass measurement of the corresponding protonated molecules. Subsequent multi-stage tandem spectrometry ( $MS^n$ ) on the ion trap instrument allowed characterization of structure of the detected metabolites. *N,O*-dealkylation and ring hydroxylation reaction were identified to be major metabolic reaction in piperazinylalkylisoxazole derivatives. 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. 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 goverened by PSA value and correlation coefficient between PSA and Caco-2 experimental value was over 0.7. The hypernated analytical technique is essential for pharamcokinetics study and tracing drug metabolites. HPLC/MS/MS product ion monitoring, column-switching HPLC, and gas chromatography/mass spectrometic selective ion monitoring methods were developed for sensitive analysis of drugs such as medroxyprogesterone acetate, taxol, and tizanidine. By using these technique detection limit could be lowered to subnano gram/ml level. 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.

## C O N T E N T S

Chapter 1: Rapid screening of metabolic screening and characterization of metabolites ·	19
Chapter 2: In vitro permeability in Caco-2 cell system .....	65
Chapter 3: Expression of human P450 enzymes and inhibition .....	89
Chapter 4: Development of new analytical techniques .....	109
Chapter 5: ADME using radio-labeled compounds and autoradiography .....	141
Chapter 6: Metabolism of eperisone and drugs. ....	163



여 백

## 목 차

제 1 장 신속 in vitro 대사 안전성 평가 및 대사체 구조 규명 .....	19
제 2 장 Caco-2 세포를 이용한 소장 흡수 연구 .....	65
제 3 장 Human P450 효소 발현 및 효소 억제 .....	89
제 4 장 새로운 분석 방법의 개발 및 응용 .....	109
제 5 장 방사성 동위원소를 이용한 대사 연구 .....	141
제 6 장 대사 profile 및 구조 분석 .....	163

여 백

## 제1장: 신속 *in vitro* 대사 안전성 평가 및 대사체 구조 규명

여 백

## 1. 서론

생리활성물질의 개발은 바이오텍연구 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 백만개의 화합물 정보은행에 저장된 물질에서 활성을 가지는 후보물질을 일차로 스크리닝하게 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.

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 많은 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 좀 더 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 1은 high-throughput 개념의 대사 스크리닝 기술의 개발을 위한 전략을 보여준다.

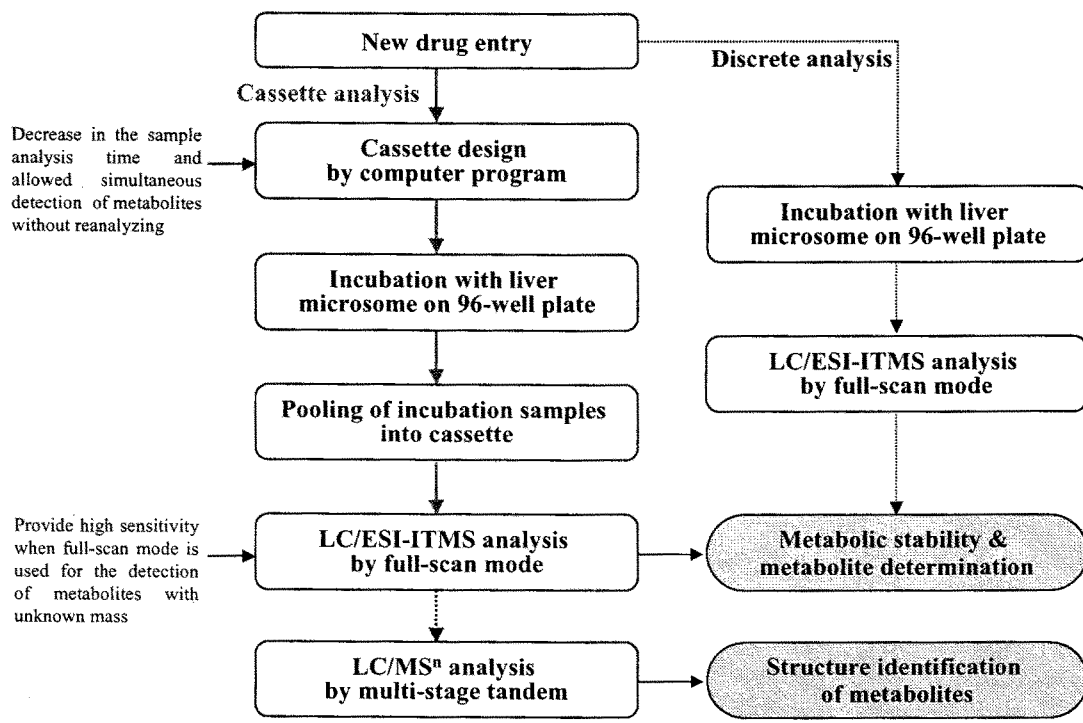
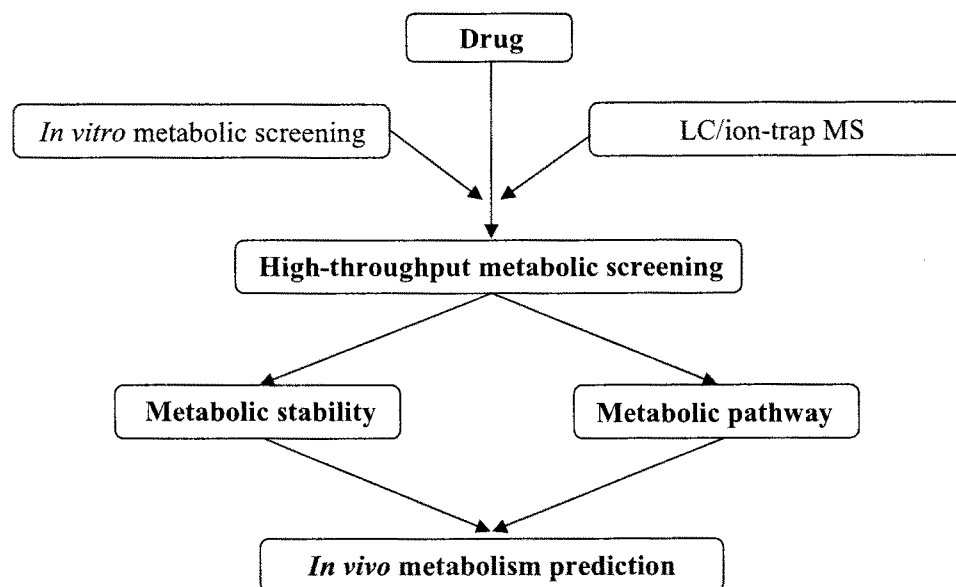


Figure 1. Strategy for high-throughput metabolic screening

High-throughput 개념의 대사 스크리닝 기술의 개발을 위하여 먼저 수행되어야 할 기본 과정은 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 단

순화를 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 각 약물들의 대사 경로를 제시하는 것이다. 이를 위하여 본 실험실에서는 multi-stage tandem mass spectrometry ( $MS^n$ ) 방법을 이용하여 생성된 대사체들의 정확한 구조를 결정하였다. 각 대사체들은  $MS^2$ 에서 생성된 product ion들을 확인하여 변화된 구조가 확인되었으며  $MS^2$ 를 통하여 구조 확인이 어려운 경우는  $MS^3$ 를 통하여 확인하였다.



**Figure 2.** A flowchart overview of high-throughput metabolic screening for a drug discovery

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 스크



리닝 기술을 개발하고 나아가 in vitro 대사 자료로부터 in vivo 대사를 예측할 수 있는 모델을 정립할 수 있는 기틀을 마련하고자 하였다 (figure 2).

## 2. 실험방법

### Human liver

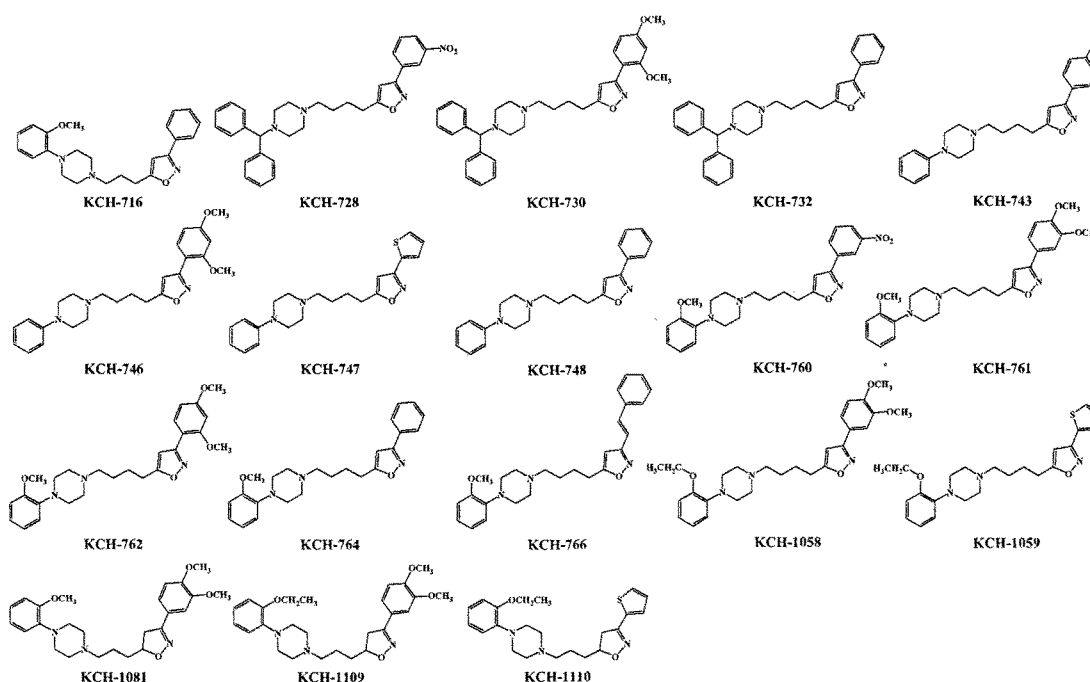
사람의 간 박편은 바이러스 감염 시험을 통과한 시료로서 Dr. F. P. Guengerich (Vanderbilt University, TN, USA)로부터 기증 받았으며  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 보관하였다.

### HBI 마이크로솜

Human Biologies Inc. (HBI) (Phoenix, AZ, USA)로부터 9종류의 human liver micrososome (HBI 2, HBI 3, HBI 5, HBI 7, HBI 9, HBI 10, HBI 11, HBI 12, HBI 13)을 구입하여  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 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 3은 본 연구에서 사용한 dopamine D3/D4 receptor antagonist들의 보여준다.



**Figure 3.** Structures of dopamine D3/D4 receptor antagonists

*Sample preparation*

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

*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 $\times$ 50 mm, 3.5 $\mu\text{m}$ )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 $^{\circ}\text{C}$ , 그리고 nebulizing pressure는 35 psi로 설정하였다.

### *Calculation of metabolic stability*

분석후 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 MS<sup>n</sup>*

위의 full-scan mode 분석으로부터 검출된 대사체들의 구조는 multi-stage tandem mass spectrometric (MS<sup>n</sup>) 방법을 이용하여 결정되었다. Collision gas로는 helium을 사용하였으며 parent drug 및 대사체들의 [M+H]<sup>+</sup> ion을 isolation하고 fragment amplitude를 조절하여 MS<sup>2</sup> spectrum을 얻었다. 대사체의 MS<sup>2</sup> spectrum에서 생성된 product ion들을 parent drug의 product ion들과 비교하여 생성된 대사체들의 정확한 구조를 결정하였다. MS<sup>2</sup>로부터 구조를 결정하기 어려운 대사체들은 MS<sup>3</sup> 와 MS<sup>4</sup>에 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 예측할수 있는 중요한 척도로서 신약 개발 초기 단계에서 이루어지고 있는 시험이다. 본 시험에서의 문제점은 수 많은 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. Table에서 보는 바와 같이 Coumarine-7-hydroxylation와 같은 CYP1A2, CYP2A6, CYP2D6, CYP3A4, CYP2E1 효소 substrate의 대사체를 정량 시 반응 volume이 0.1 ml까지 낮추어도 큰 문제가 없었으나 mephenytoin과 diclofenac등과 같은 P450효소 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 요인이된다. 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 96well 전체를 vortexing 하는방법, 그리고 shaker에서 5분간 vigorous shaking을 이용하는 방법을 비교하여 회수율을 HPLC로 분석하여 결과를 얻었다 (Table ). 96-well을 이용시 phase 분리도 plate 자체를 원심분리 하므로 시료전처리 시간이

짧아지게 된다. Liquid extraction 결과를 보면 5개의 test compound 모두 96-well을 사용하는방법이 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 compound 의 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, 시료당 분석시간 역시 48분으로 기존의 분석방법에 비하여 1/3-1/4를 단축하였다 (Table ). Fig 에는 서로다른 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 반응시 시간 경과에 따라 parent compound가 대사되어 감소하는 pattern 을 Fig 에 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. Effects of incubation volume on P450 activities in human live incrosomes.

Incubation Volume (ml)	Caffeine N3-demethylation (CYP2A2)	Coumarine 7-hydroxylation (CYP2A6)	S-Mephenytoin 4-hydroxylation (CYP2C8)	Diclofenac 4-hydroxylation (CYP2C18)	Dexhomethorphan O-demethylation (CYP2F6)	testosterone 6-hydroxylation (CYP3A4)	Chlorzoxazone 6-hydroxylation (CYP2E1)
0.1	80*	421	-	82	14.2	589	402
0.2	90	404	12.1	118	17.6	587	450
0.4	89	464	14.4	119	18.0	620	449
0.6	101	424	14.1	132	18.8	634	412
0.8	104	394	15.1	120	20.1	652	442
0.8	104	394	15.1	120	20.1	652	442
1.0	94	481	14.2	122	18.9	622	456

Each P450 activity was measured after 1 hr incubation with subshates and microsomes (1 mg/ml). Substrate concentrations were 1mM for caffeine, 0.4M for caffeine, 0.4 M for coumarine, 80 M for mephenytoin 5 M for diclofenac, 5 M for dextro methorphan, 40 M for tesosterone, and 20 M for chlvozoxazone.

\* Unit : pmol/min/mg protein

Table 2. Solvent extraction of drugs using various methods :

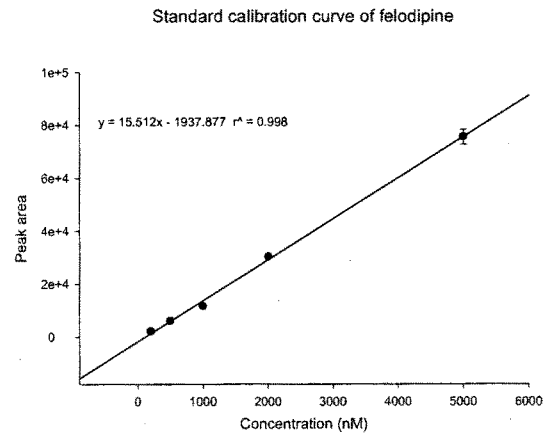
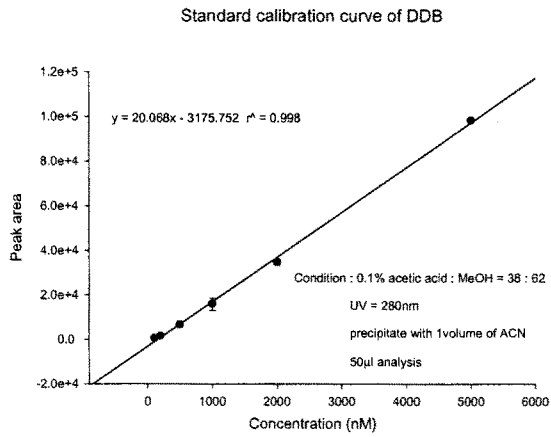
Drugs (g/ml)	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>			% Recovery			Ethyl acetate	
	conventional	96-well Vortex	96-well shaking	conventional	96-well vortex	96-well shaking	conventional	96-well shaking
HWY 250 Dj								
0.1	84 ± 4.3	65.1 ± 3.9	60.3 ± 5.7	54.1 ± 6.1	42.0 ± 1.2	38.2 ± 3.2		
1	78.1 ± 6.2	66.4 ± 5.2	57.4 ± 4.1	59.1 ± 5.1	40.4 ± 5.2	35.4 ± 2.1		
10	84.3 ± 4.1	64.5 ± 9.1	58.9 ± 6.3	62.1 ± 3.1	48.4 ± 2.7	43.1 ± 4.1		
Testosterone								
0.1	90.2 ± 3.2	89.2 ± 6.1	93.2 ± 2.1	52.1 ± 4.1	32.4 ± 6.2	41.2 ± 5.1		
1	95.2 ± 5.2	94.1 ± 4.1	91.3 ± 4.1	62.1 ± 3.7	52.9 ± 5.4	29.4 ± 3.1		
10	92.1 ± 4.1	94.4 ± 3.1	102.4 ± 3.2	48.2 ± 5.9	59.1 ± 4.7	40.1 ± 4.1		
felodipine								
0.1	69.1 ± 3.1	58.1 ± 4.5	71.4 ± 2.7	49.2 ± 5.9	59.1 ± 4.7	40.1 ± 4.1		
1	59.1 ± 6.1	62.4 ± 6.7	70.6 ± 5.9	54.1 ± 2.7	50.1 ± 5.2	49.1 ± 7.1		
10	65.4 ± 7.1	51.2 ± 4.9	63.1 ± 6.2	56.2 ± 7.1	50.1 ± 5.2	49.1 ± 7.1		
DDB								
0.1	72.9 ± 4.1	68.4 ± 3.2	59.1 ± 4.2	80.1 ± 4.2	84.2 ± 4.2	87.6 ± 3.1		
1	69.1 ± 6.2	62.4 ± 2.7	57.2 ± 3.1	72.4 ± 4.1	81.3 ± 2.1	99.1 ± 4.1		
10	60.1 ± 6.2	63.4 ± 3.1	62.1 ± 1.2	84.1 ± 3.1	88.3 ± 3.9	93.1 ± 1.1		
SKP-450								
0.1	71.2 ± 10.1	82.3 ± 4.2	88.3 ± 5.2	104.2 ± 3.2	95.4 ± 3.1	101. ± 1.0		
1	82.1 ± 5.2	86.2 ± 7.2	94.2 ± 3.2	97.3 ± 2.1	90.2 ± 2.1	98.2 ± 2.1		
10	77.3 ± 6.2	84.1 ± 3.2	89.2 ± 5.3	100.3 ± 1.1	92.1 ± 1.0	99.1 ± 3.1		

Conclusion : 96-well shaking method is suitable for sample pretreatment for rapid analysis

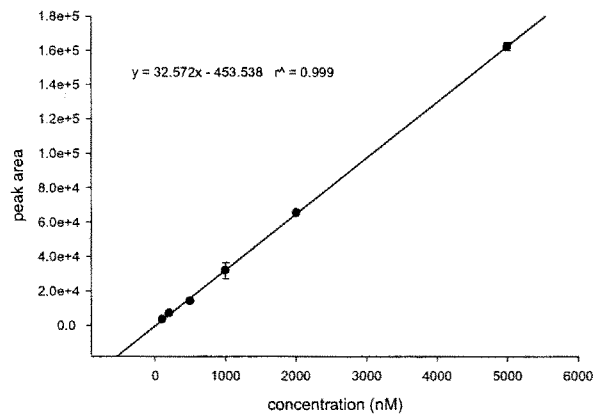


Table. 3. Comparison of analysis time between conventional method and 96-tube method

	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)	-		
분석시간	HWY250-Dj	15 min		
	DDB		6 min	
	YH1885		5 min	
	Amiodarone		8 min	
	Diclofenac	15 min	4 min	sample에 따라 차이가 있으나 분석시간은 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

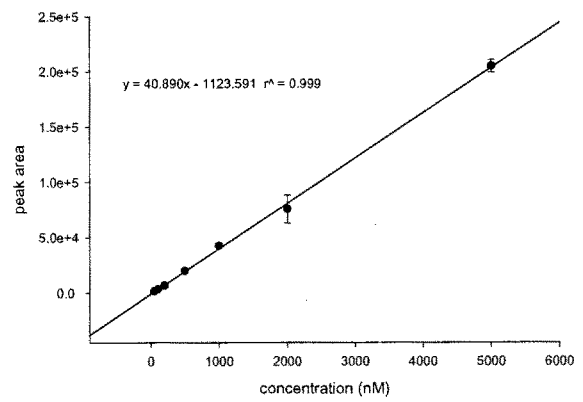


Fig. 2 Calibration curve generated by 96-tube method.

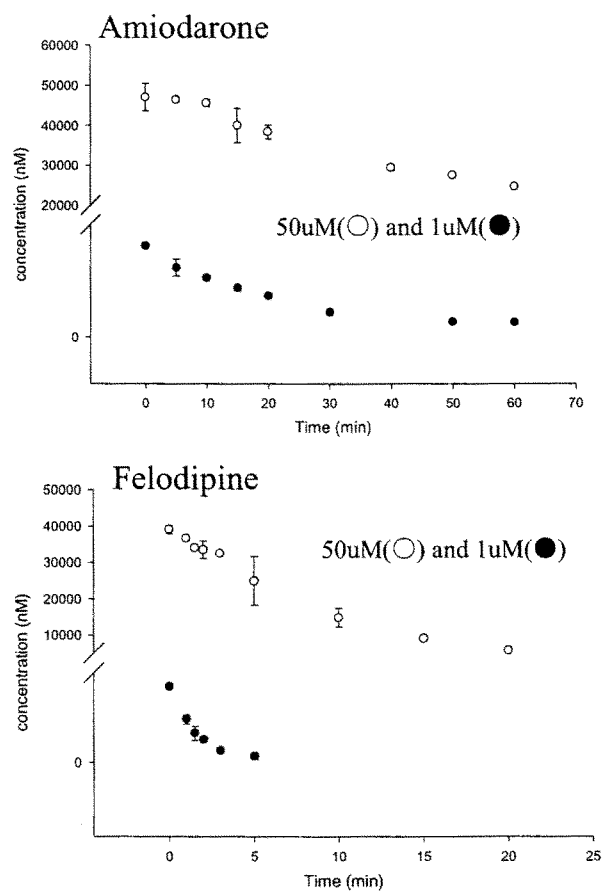


Fig 3. Time -dependent decrease of drugs during incubation with rat liver microsomes

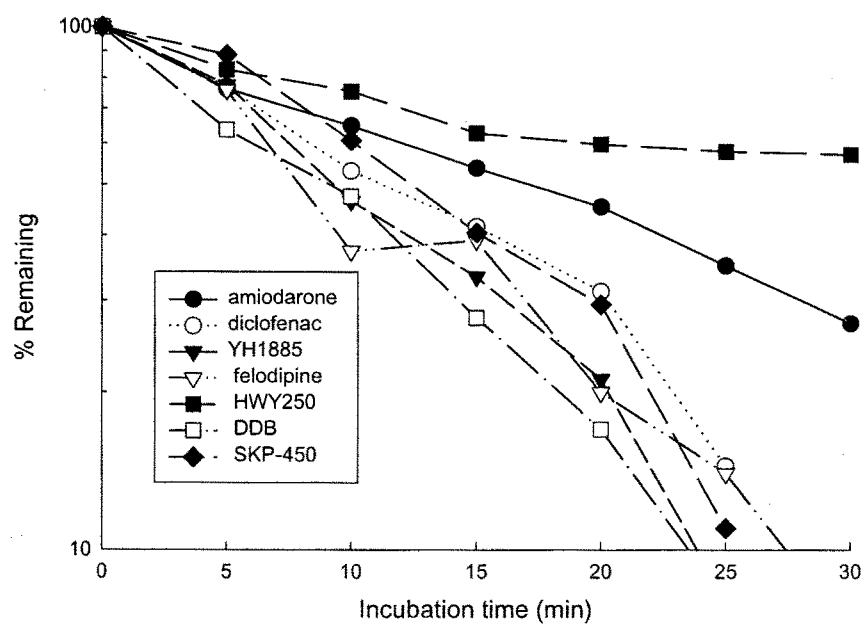


Fig. 4. In vitro metabolic stability of 7 different drugs after incubation with human liver microsomes.

### *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 cassette 안 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 4는 본 연구에서 사용한 17종의 dopamine D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> 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 보여지는 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 4에서 보여지는 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 1은 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.

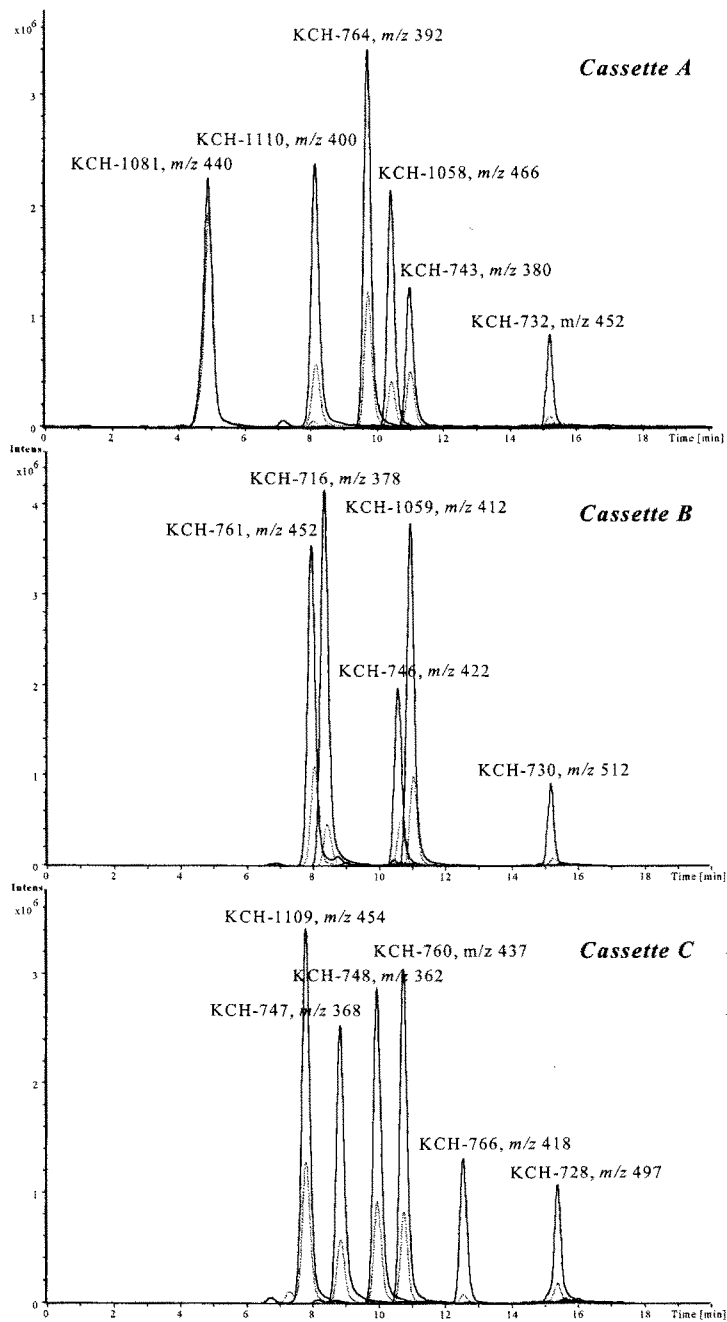


Figure 5. Mass chromatograms of 18 dopamine receptor antagonists in cassette A, B and C obtained from the cassette analyses of 0-min incubated (solid line) and 30-min incubated (dotted line)

Table 4. *In vitro* metabolic stability of D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> receptor antagonists, piperazinylalkylisoxazole derivatives and molecular ions of presumed metabolites generated in rat liver microsomes

Compound	Metabolic stability (%)	No. of metabolite	[M+H] <sup>+</sup> 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, 378, 286
KCH-760	26.9	4	437; 423, 453, 453, 331
KCH-761	32.2	6	452; 438, 438, 468, 468, 346, 424
KCH-764	37.6	5	392; 378, 408, 408, 286
KCH-766	26.9	7	418; 404, 434, 434, 434, 312, 436, 450
KCH-1058	19.6	10	466; 482, 482, 482, 452, 438, 438, 437, 424, 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, 470, 442, 440, 426, 334
KCH-1110	24.3	6	400; 416, 416, 372, 280, 432, 388

*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 5는 cassette analysis와 discrete analysis에 의한 각각의 metabolic stability 결과를 보여준다. 그림에서 보여지는 바와 같이 두 가지의 다른 방법에 의한 분석결과를 비교할 때 R<sup>2</sup>=0.88의 좋은 correlation을 나타내었으며 KCH-728, 1058 등 몇 개의 약물을 제외하고는 거의 동일한 결과를 보여 주었다.



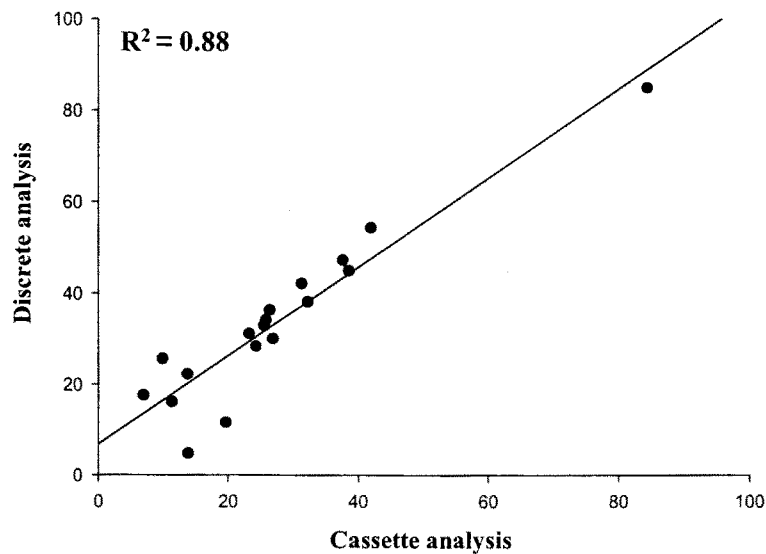


Figure 6. Comparison of in vitro metabolic stability results from cassette analysis and discrete analysis by LC/MS

또한 figure 6에서 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 7에서 보여지는 것과 같이 cassette으로 고안된 약물들을 cassette incubation 하여 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.

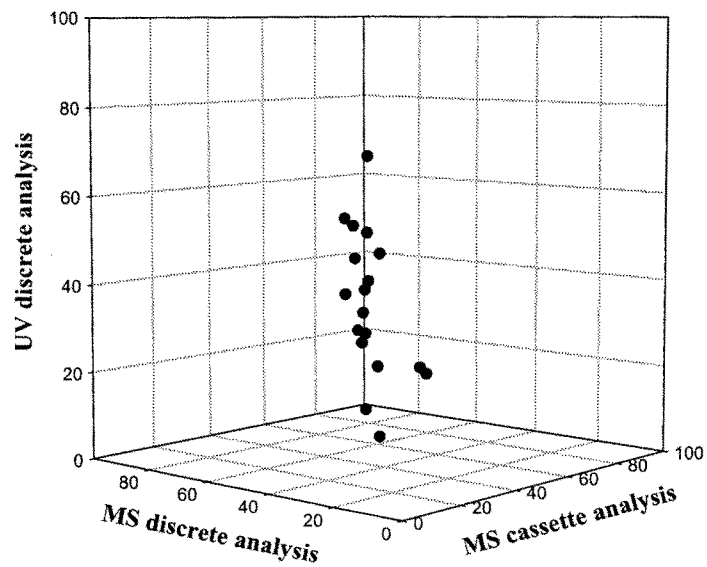


Figure 7. Comparison of in vitro metabolic stability results from MS cassette analysis and MS & UV discrete analysis

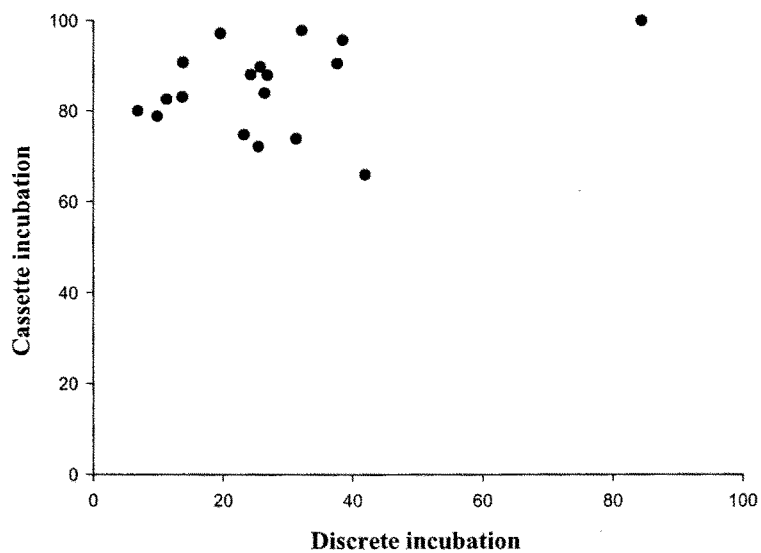


Figure 8. Comparison of in vitro metabolic stability results from cassette incubation and discrete incubation

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

본 연구에서는 metabolic stability와 Log P와의 상관관계를 조사하기 위하여 먼저,

Table 5. 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

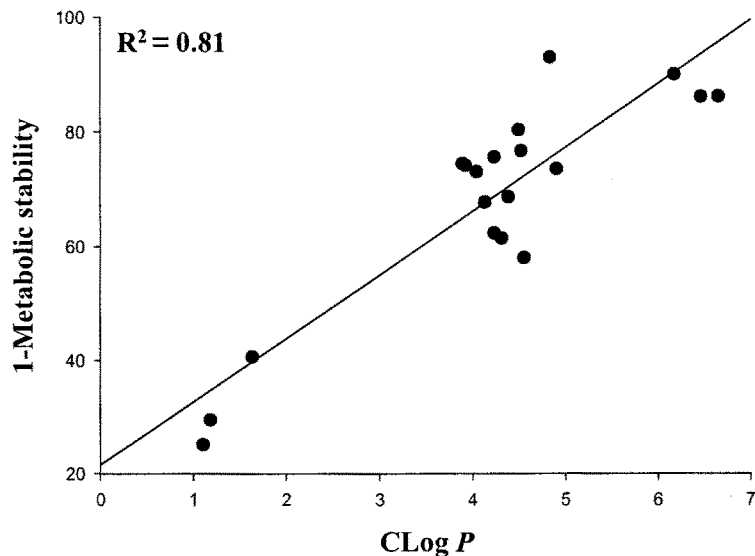


Figure 9. Relationship between in vitro metabolic stability and Log P

Sybyl 6.5 base (Tripos)의 CLog P 모듈을 이용하여 모든 약물들에 대하여 CLog P 값을 계산하였다 (table 2). Figure 8은 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 8로부터 알 수 있었다. 따라서 Log P는 metabolic stability에 영향을 미치는 중요한 인자임을 확인하였다.

Figure 8은 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 2). CLog P와 metabolic stability와의 관계 (Figure 8)에서 보여지는 상관성과는 대조적으로 figure 9에서 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 P

가 매우 중요한 인자임을 확인할 수 있었다.

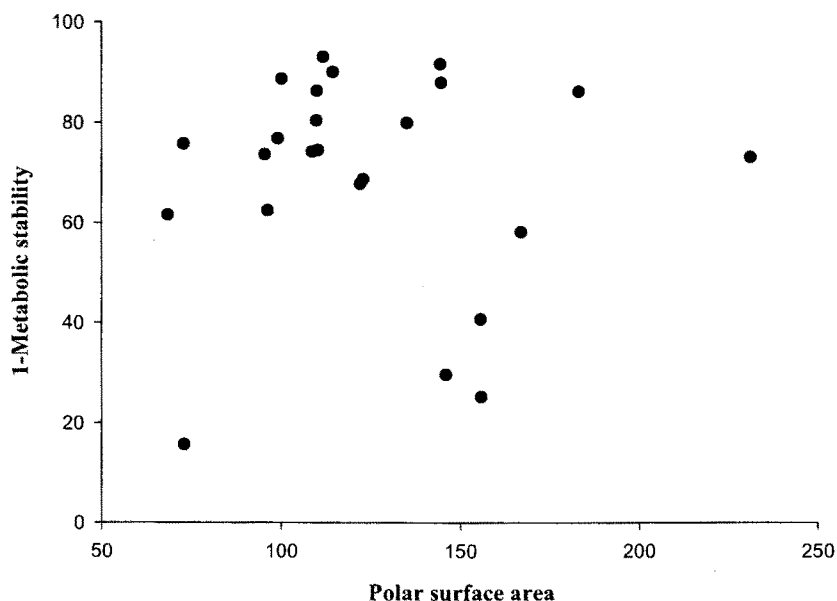


Figure 10. Relationship between in vitro metabolic stability and polar surface area

*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 간섭효과가 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 1에 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 있음

을 확인하였다.

Figure 10는 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 1에 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.

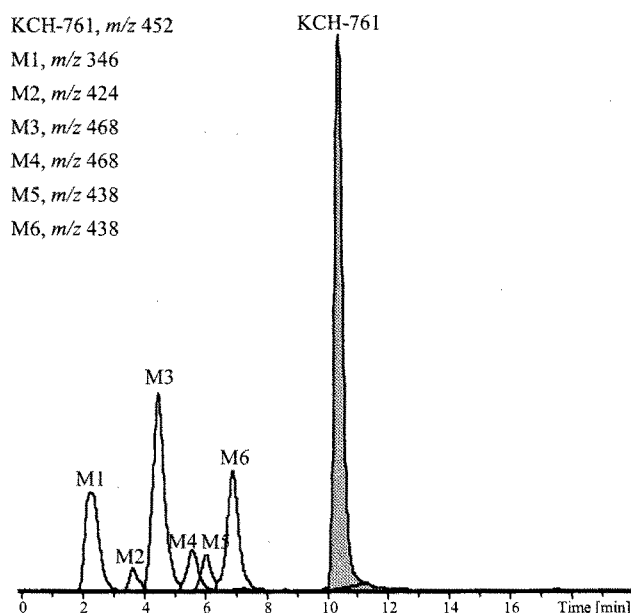


Figure 11. Reconstructed mass chromatograms of the metabolites of dopamine receptor antagonist KCH-761 after 30-min incubation with rat liver microsome

*LC/MS<sup>n</sup> 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 11은 figure 10에서 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  $m/z$  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  $MS^2$  fragmentation pattern과의 비교는 aromatic ring에 hydroxylation이 발생했음을 알 수 있었다. M5와 M6는 O-demethylation된 isobaric 대사체로 검출되었다. Chromatographic separation과 각 대사체들의  $MS^2$  spectrum은 isobaric 대사체의 구조를 정확히 확인할 수 있었다. 즉, parent의  $MS^2$  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 isoxazole 부분에서 demethylation이, 그리고 M6는 piperazine 부분에서 demethylation이 일어난 구조임을 확인할 수 있었다.

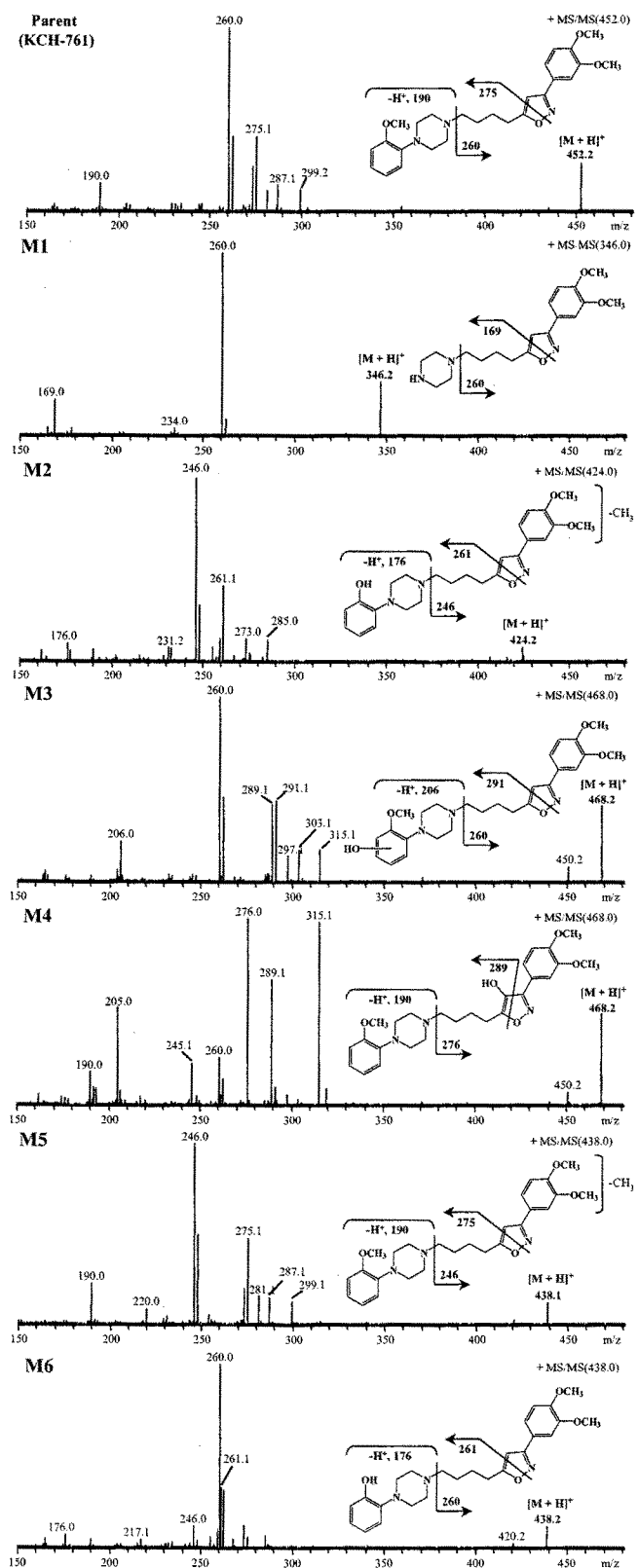


Figure 12. MS<sup>2</sup> spectra of parent KCH-761 and its metabolites



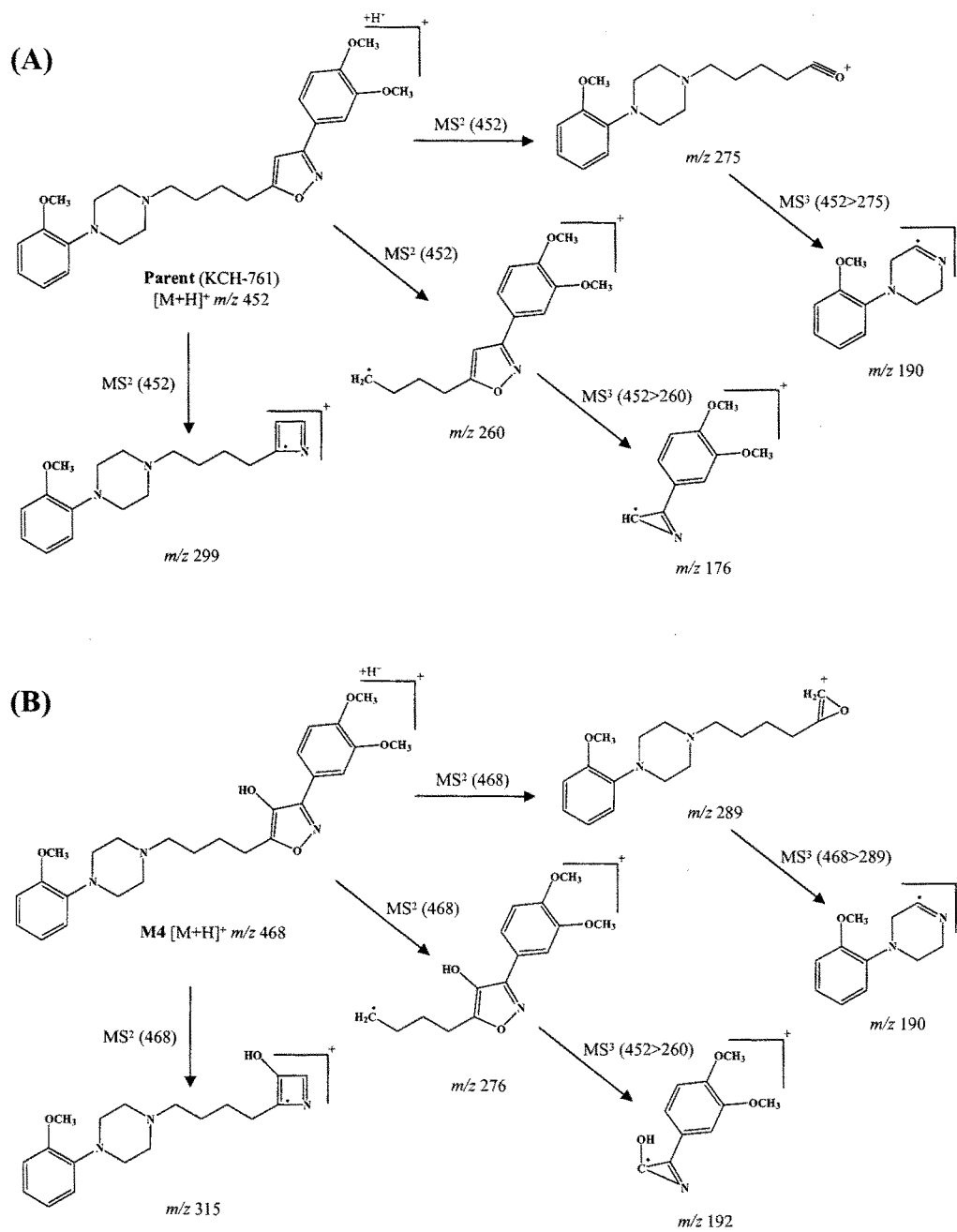


Figure 13. Proposed  $MS^2$  and  $MS^3$  mass fragmentation of (A) KCH-761 and (B) its monooxygenated metabolites M4

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

여 parent와 M4에 대한 MS<sup>3</sup>를 시도하였으며 결정된 mass fragmentation pattern을 figure 11에서 설명하였다. Figure 12 (A)에서 설명되어 있는 바와 같이 KCH-761은 MS<sup>2</sup> spectrum에서 *m/z* 299, *m/z* 275, *m/z* 260의 fragment ion들에 의하여 구조적 특징이 기술된다. 또한 parent의 452>275와 452>260의 MS<sup>3</sup> spectrum을 보면 452>275는 *m/z* 190이 452>260은 *m/z* 176이 특징적인 product ion으로서 검출된다. 반면, figure 12 (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 13는 이상과 같은 연구를 통하여 얻어진 KCH-761의 대사 경로를 보여주고 있다. 17개의 모든 dopamine D<sub>3</sub>/D<sub>4</sub> receptor antagonist들에 대하여 MS<sup>n</sup>을 수행함으로써 생성된 대사체들의 정확한 구조를 결정할 수 있었으며(별첨) 각 parent에 대하여 figure 12와 같은 대사 경로를 얻을 수 있었다.

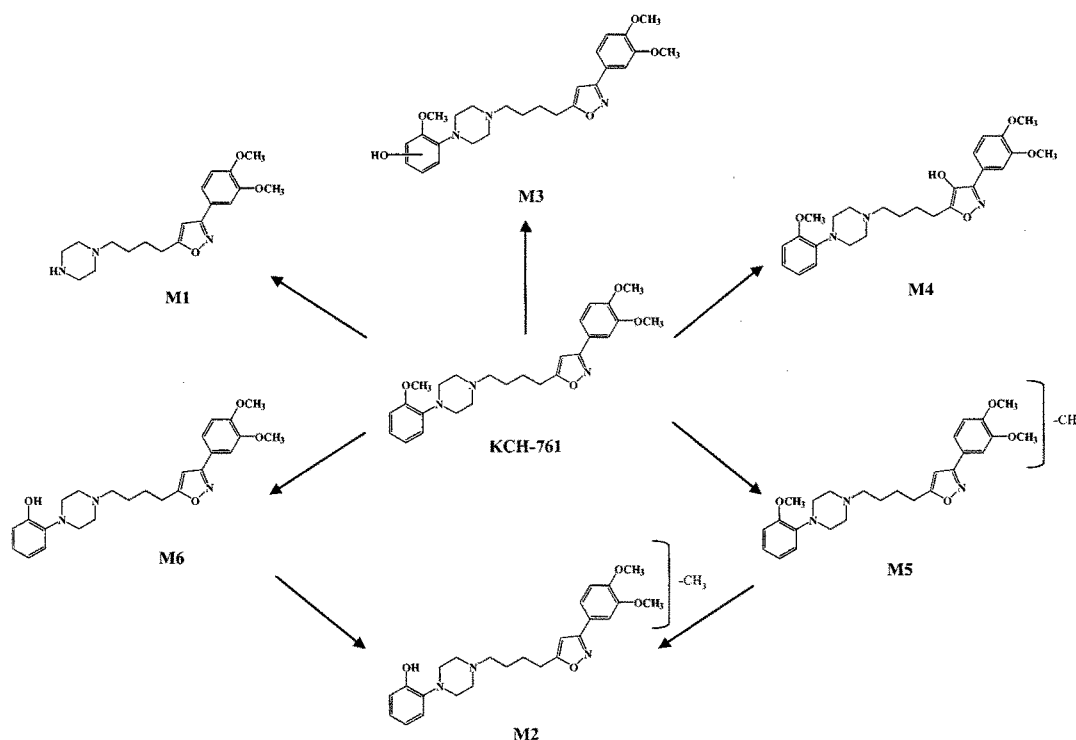
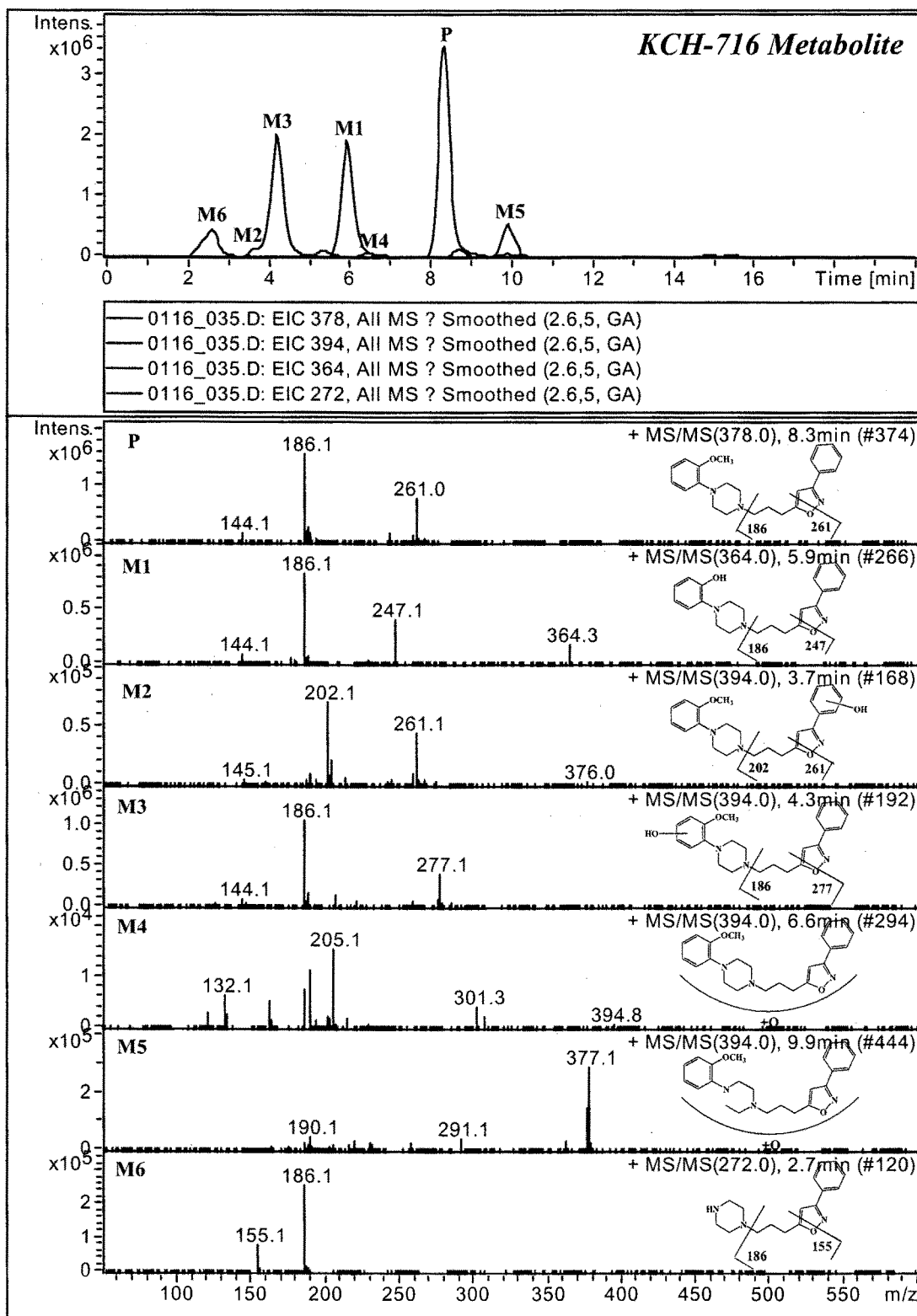
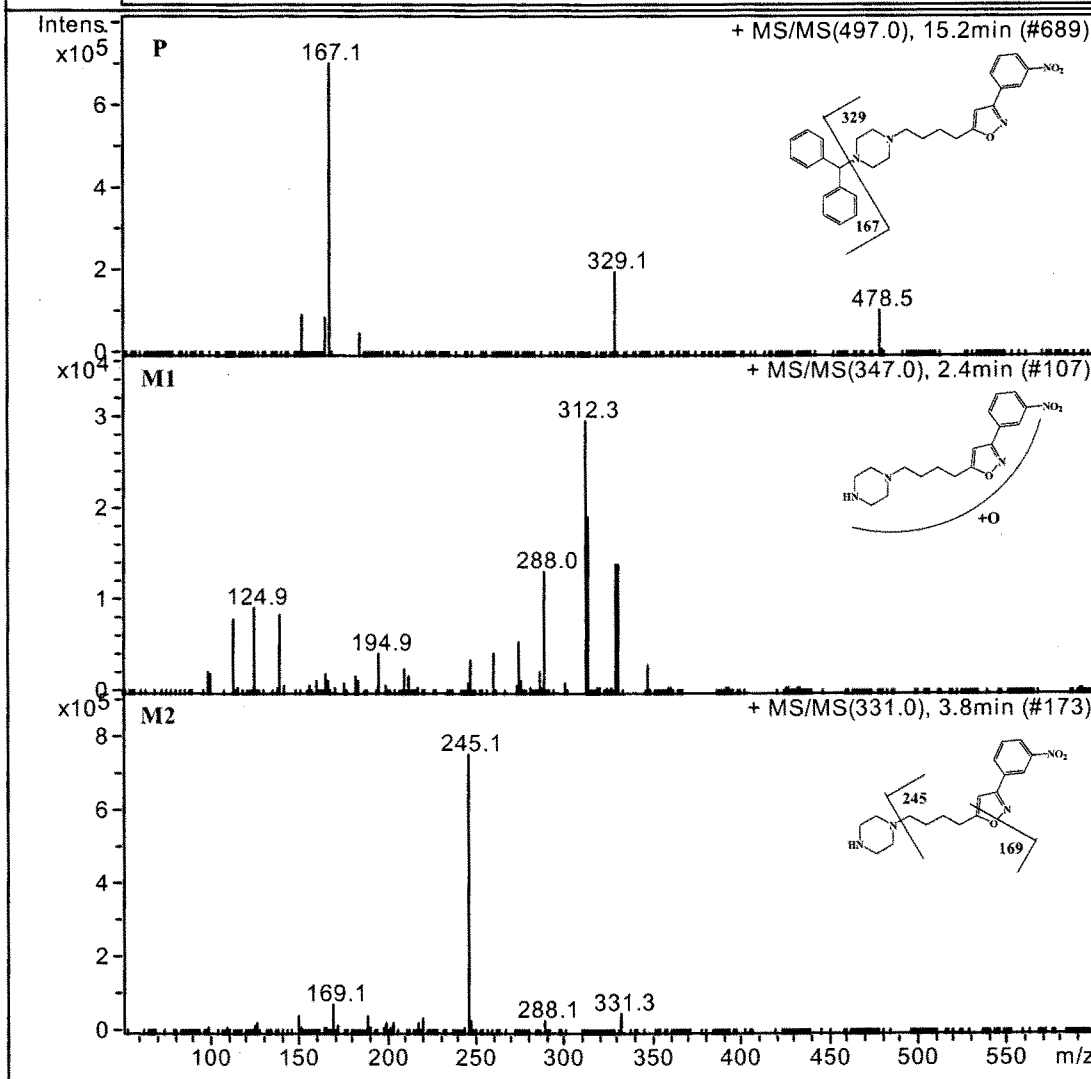
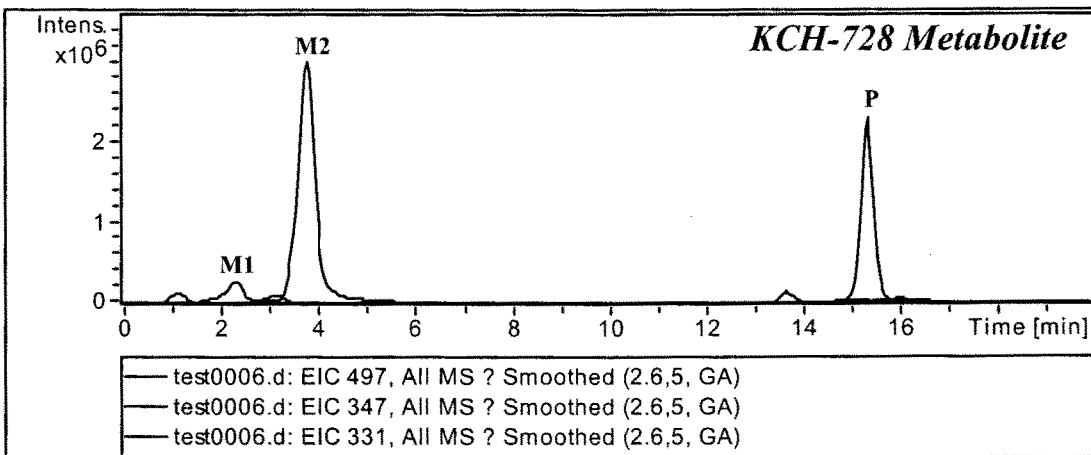


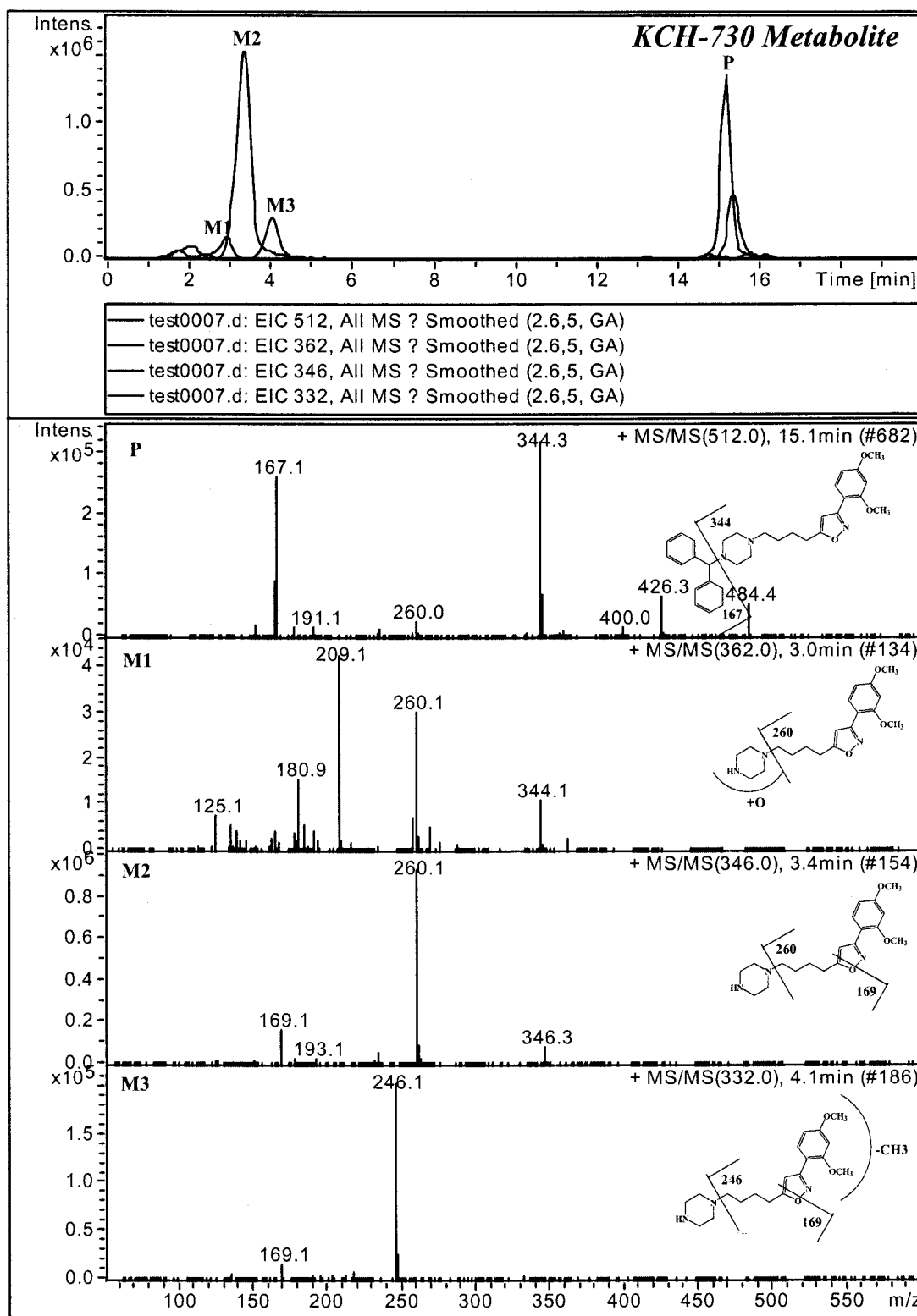
Figure 14. Postulated metabolic pathway of KCH-761 in rat liver microsomes

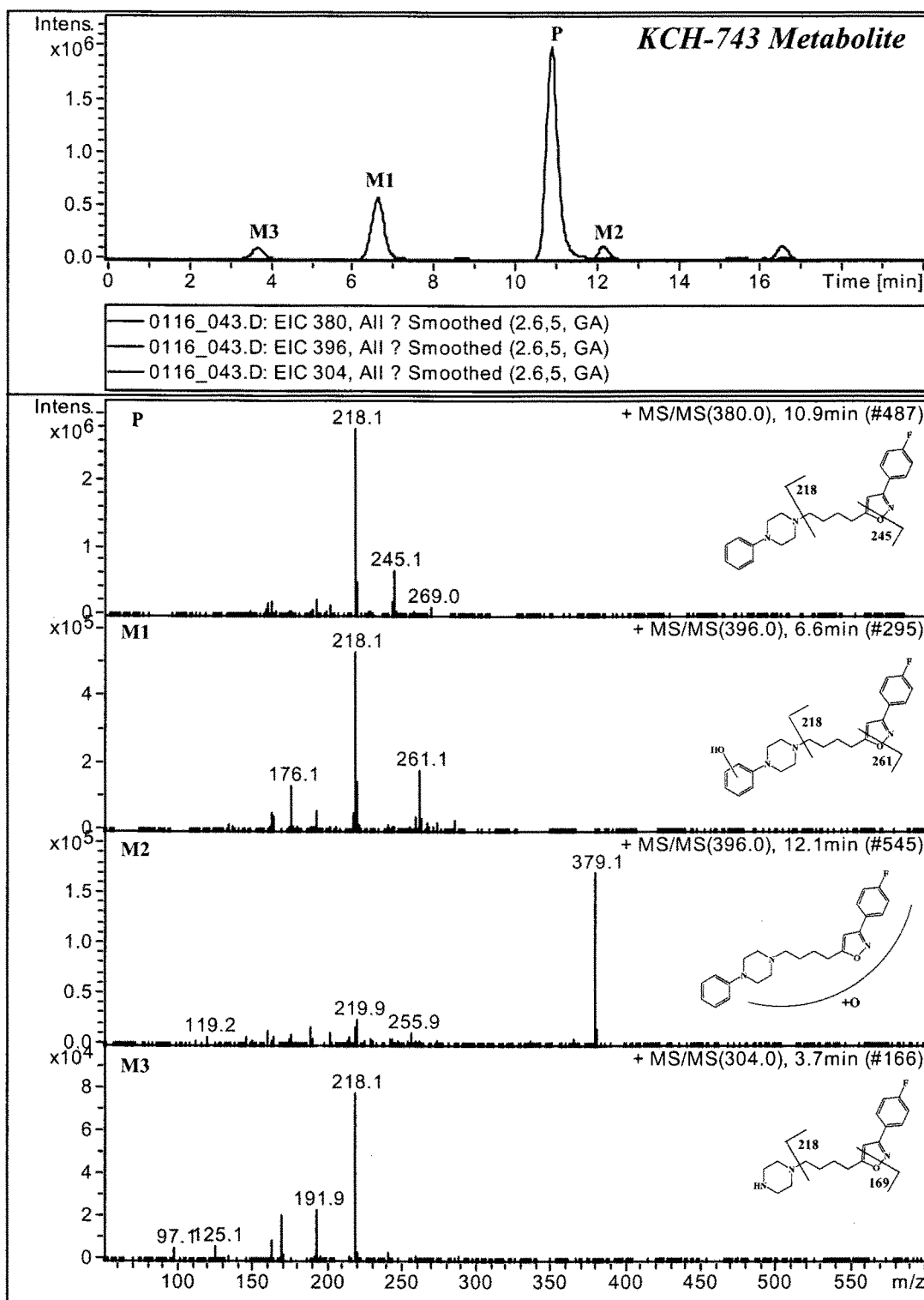
이상과 같이 본 연구에서 수행한 LC/ion-trap tandem MS 기술과 cassette analysis 그리고 in vitro 대사 모델이 병합된 high-throughput 개념의 대사 스크리닝 기술은 신속히 metabolic stability와 metabolic pathway를 제공할 수 있었으며 신약 후보물질들을 평가하는데 매우 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

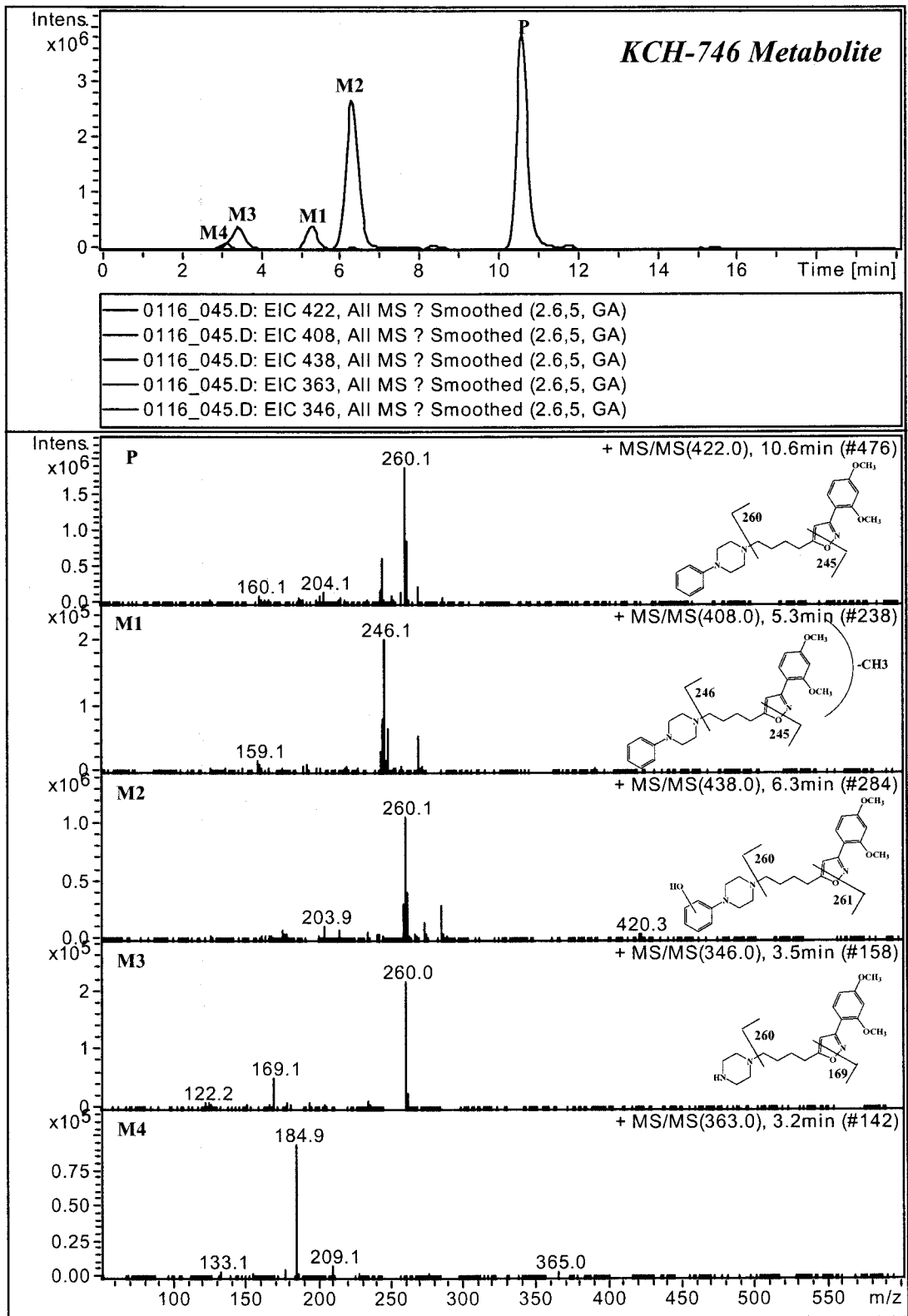
# 별첨 #



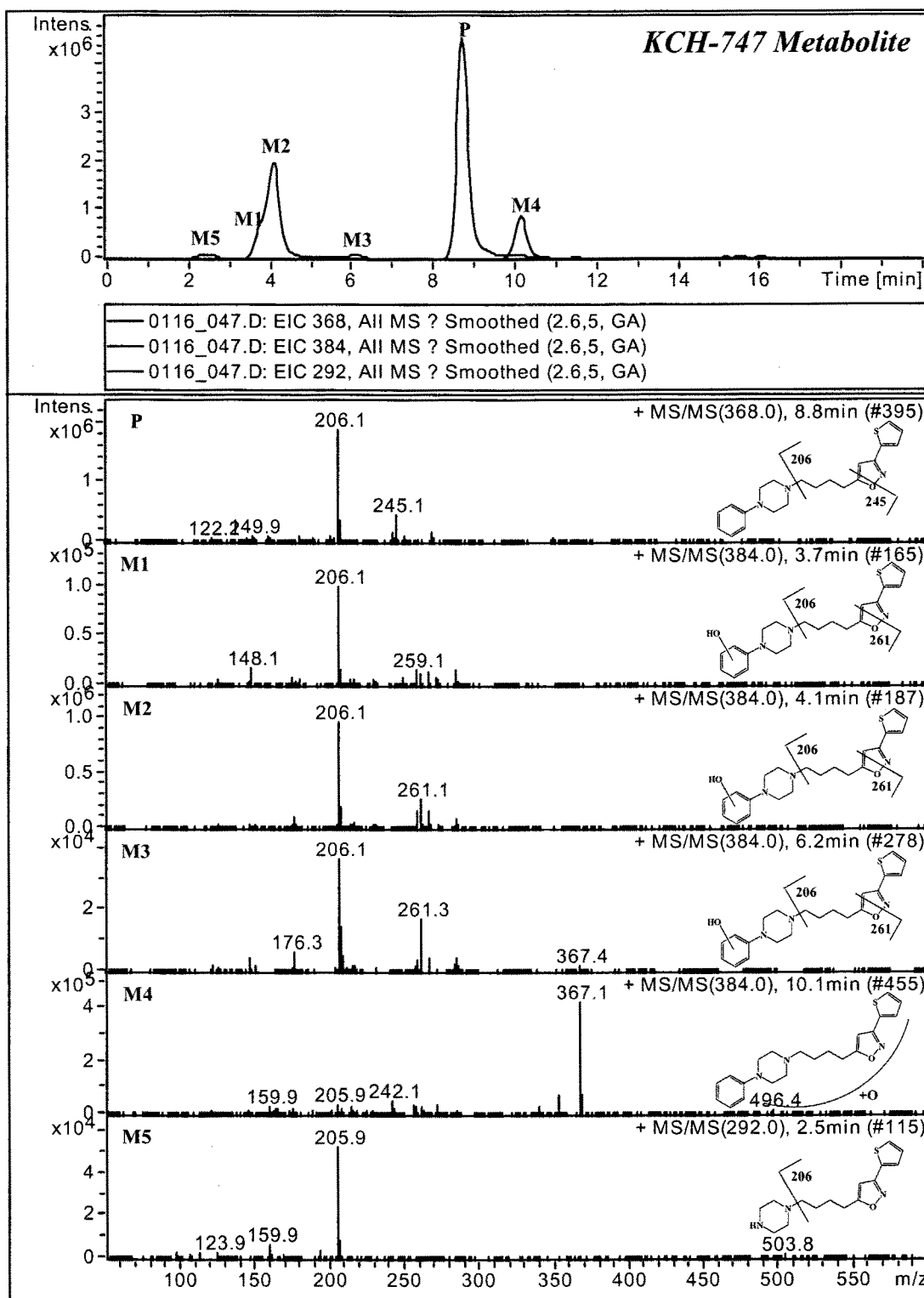


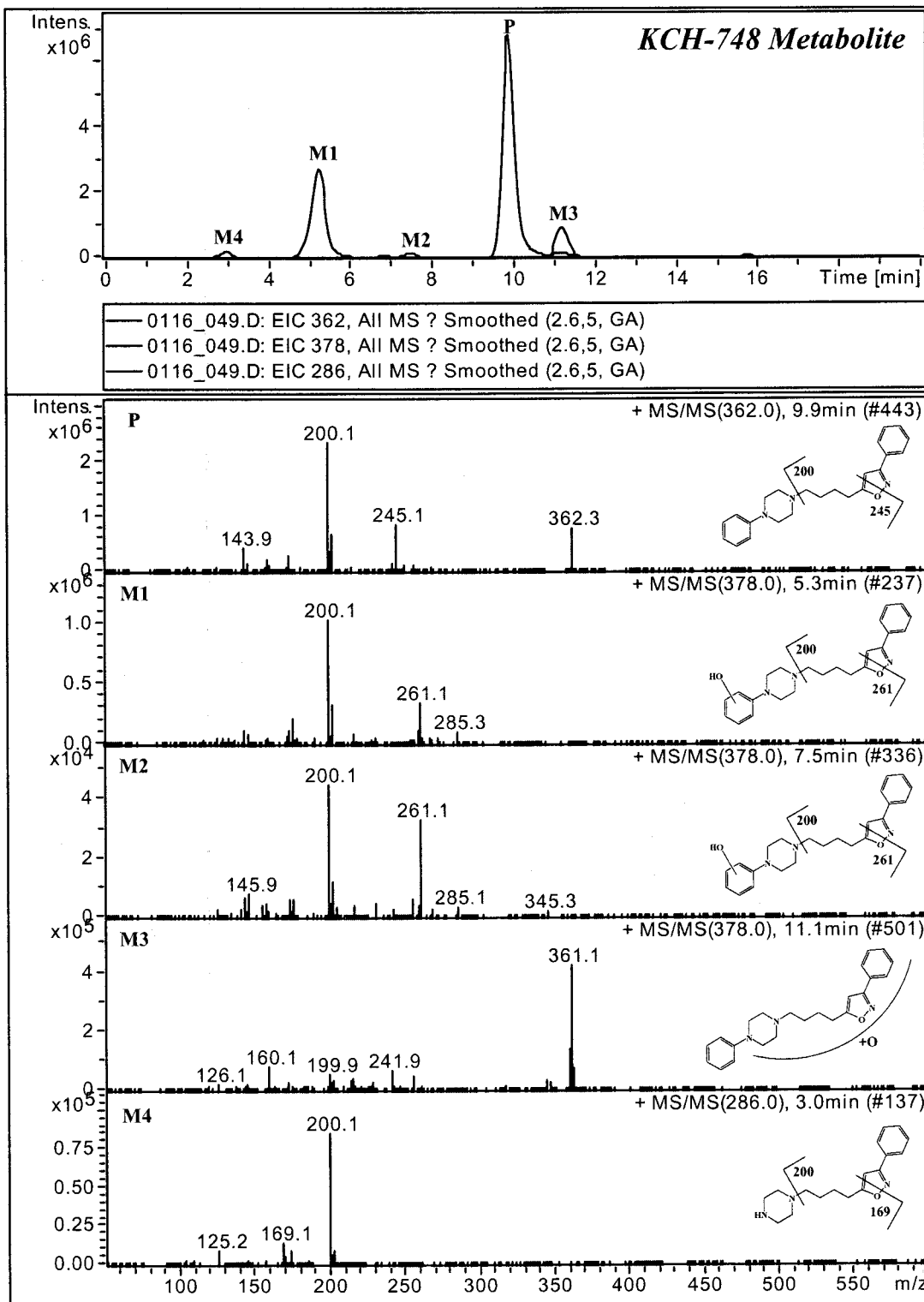


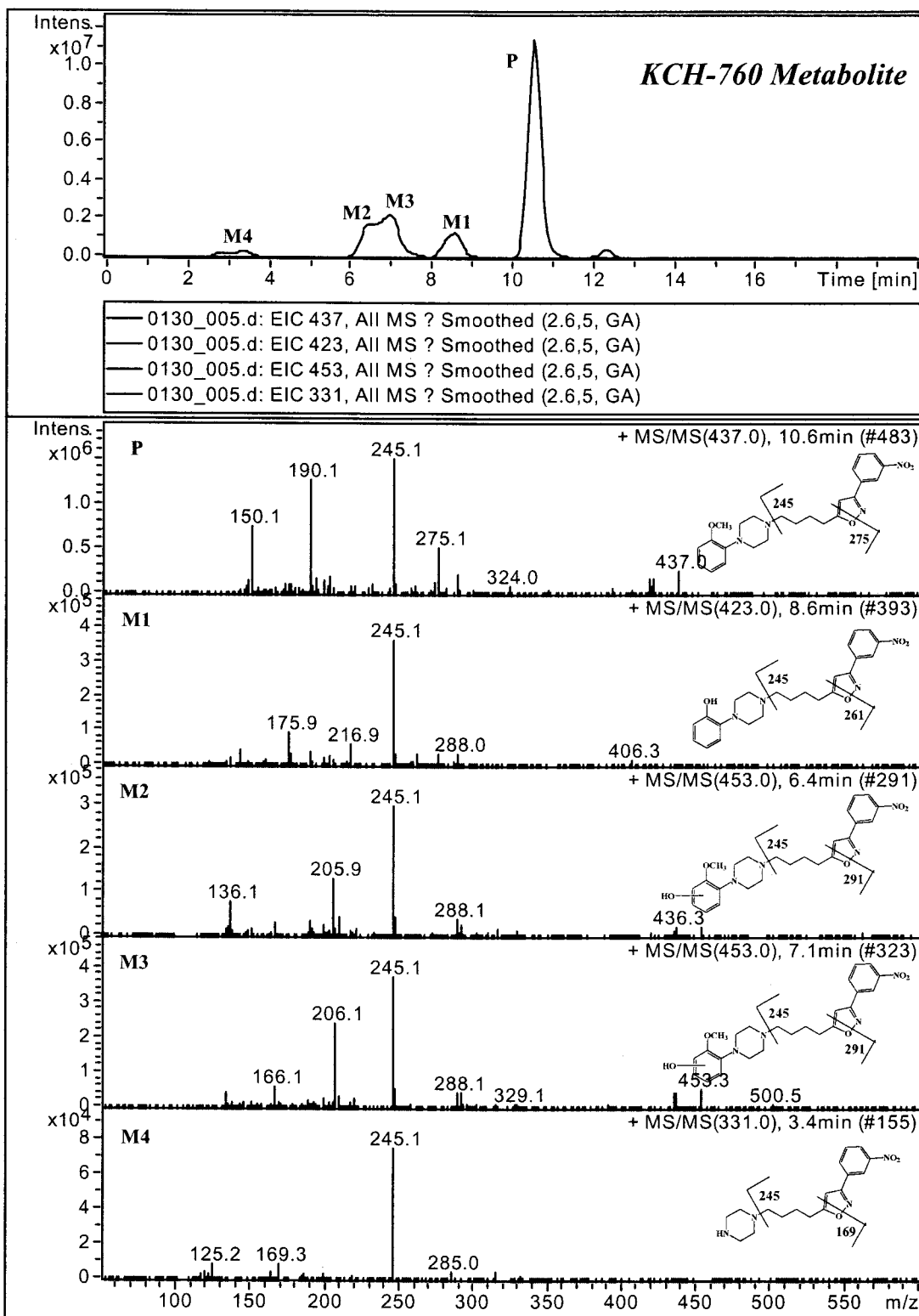


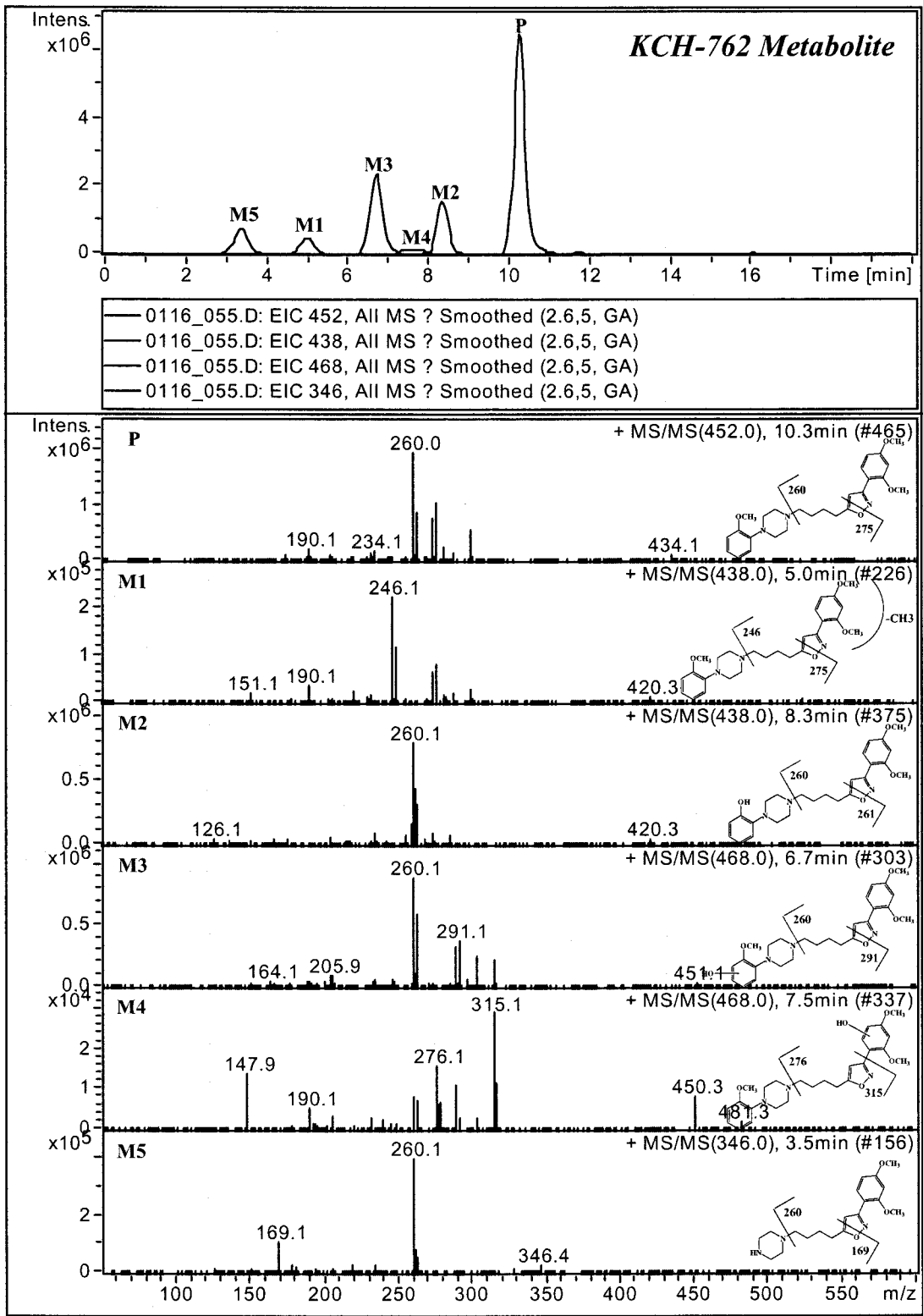


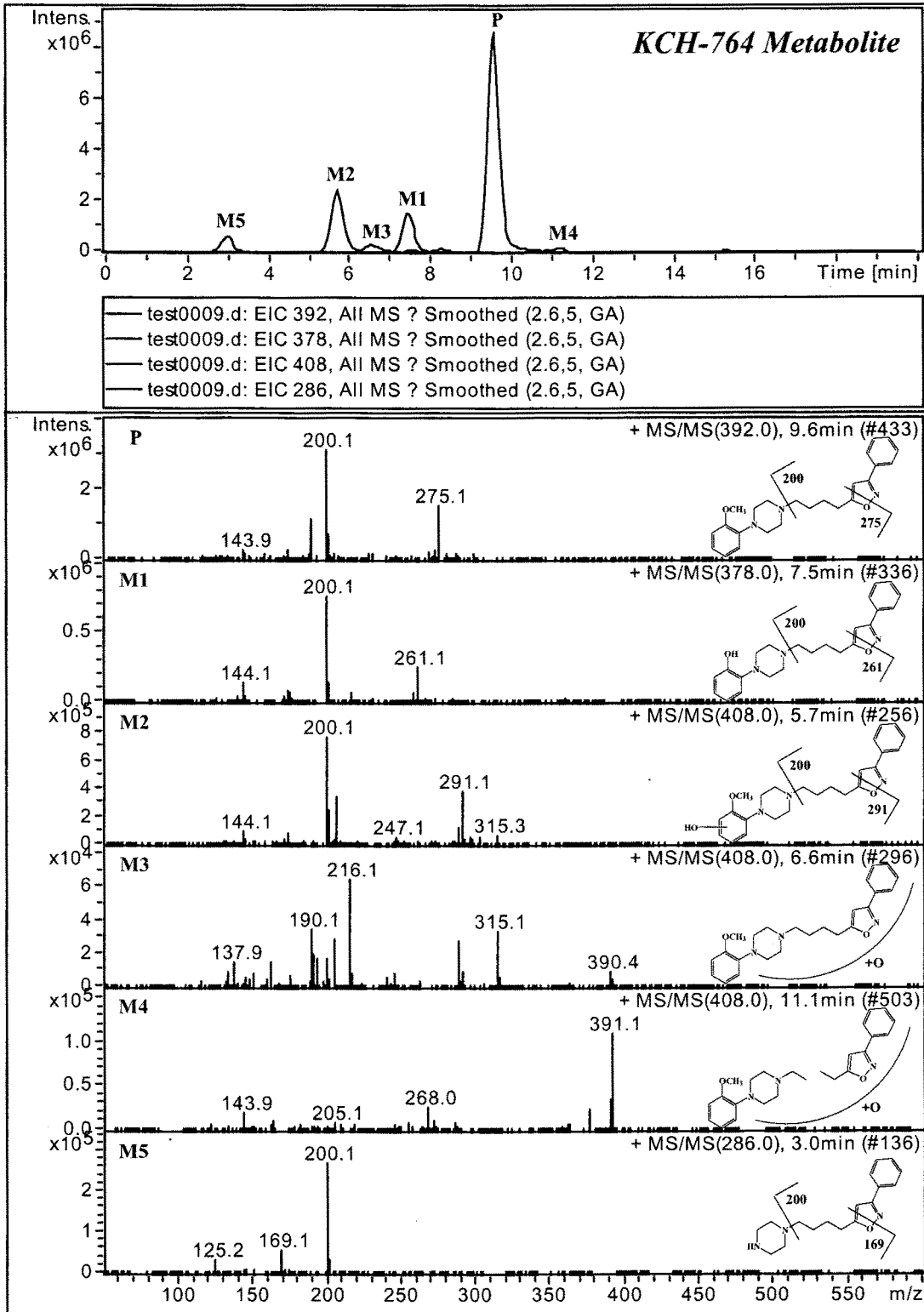


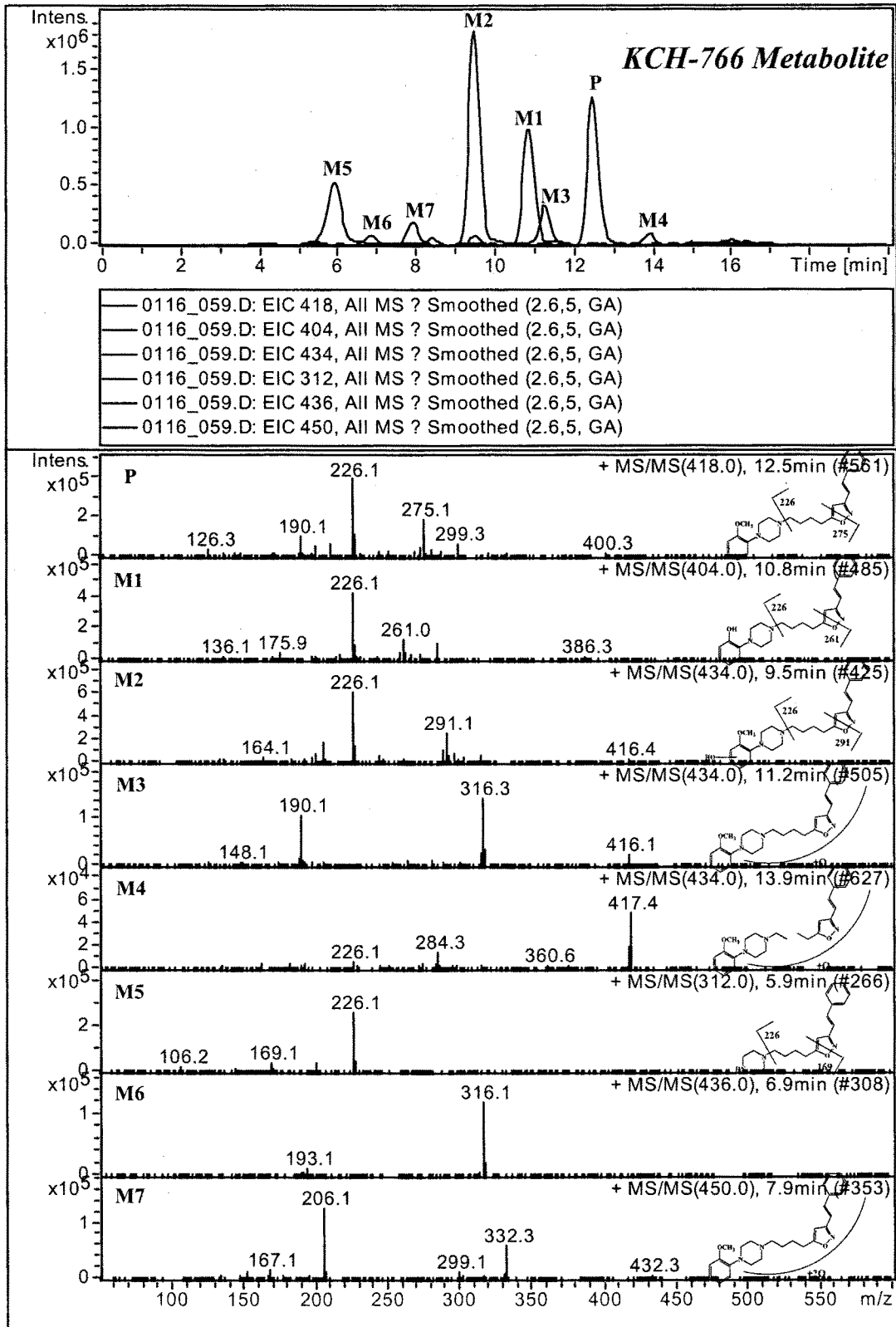


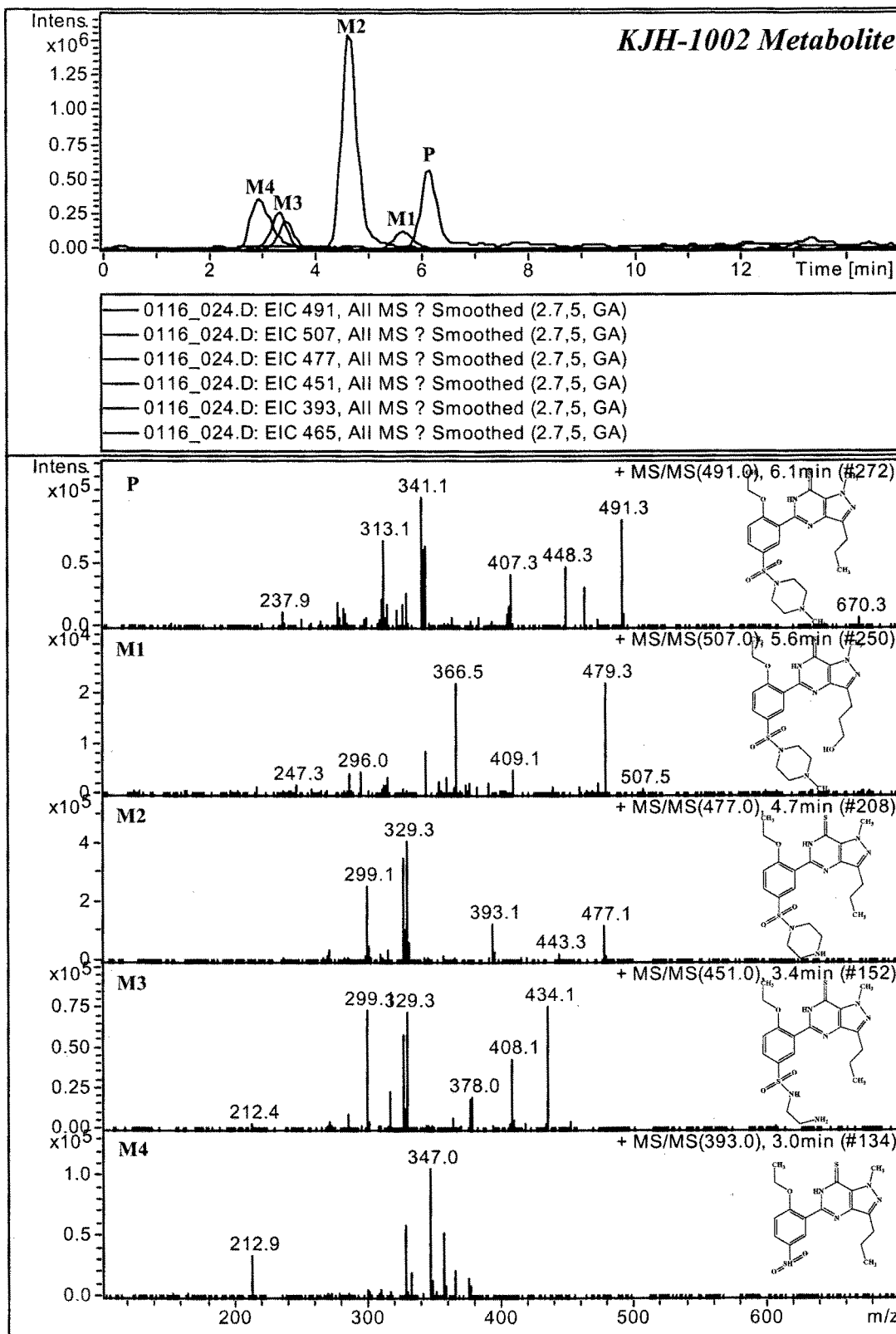












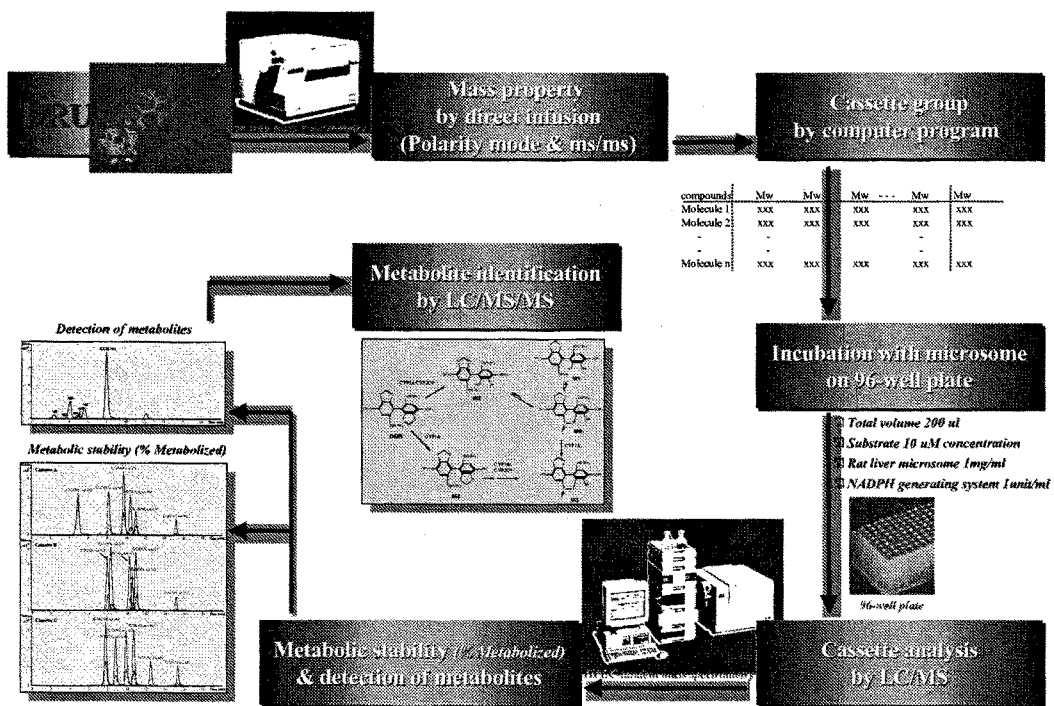


Fig. 15. Rational approach to characterize metabolic stability and structure of metabolites developed in the present study



여 백

## 제 2장: Caco-2 세포를 이용한 소장 흡수 연구

여 백

## 제 1절: 서론

제약 업계에 있어서 환자에게 투여하기 편리하고, 안전하게 복용하기 위한 경구 복용 약물을 개발하는 것은 매우 중요한 업무 중 하나다. 이런 약물을 개발하는 데 있어서 약물의 다양한 흡수경로 중 장 막을 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 line*으로 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 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. 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 장 막과 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  $1 \times 10^6$  cm/sec (I.J. Hidalgo, et al. 1989) 와  $6 \times 10^5$  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 사용

하고자 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 장 막에서 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 ClogP<sup>17</sup> is used) or > 4.15 (if MlogP<sup>18</sup> is used)

장 막을 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  $\beta$ -blocking agent의 transport를 이용한 expected model을 연구했던 연구자들은 분자의 수소결합력이 강력한 결정 요인이라는 연구 결과를 보고 한 바 있다. 여기서 말하는 수소결합력은 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 통용되기 보다 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 구성되

는데 여기서 좀더 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.

## 제 2절: 실험재료 및 방법

### 실험 재료

#### 1. Chemicals

KJH 계열 유도체, dopamine receptor antagonist 유도체, clomipramine, sulfaphenazole, ketoconazole, erythromycin, testosterone, quinidine, verapamil, vinblastine, atenolol, metoprolol (Sigma-aldrich corp)

#### 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.

### 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 cm<sup>2</sup>)의 apical chamber의 polycarbonate membrane에 5 x 10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup>로 seeding하였다. Transwell의 apical과 basolateral 부분에 각각 0.5 ml, 1.5 ml의 media를 채워 cell이 자리를 잡도록 약 4일간 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다 (Caco-2 cell의 특성 상 plate나 membrane에 attach하는데 오랜 시간이 소요된다). 4일간의 배양이후 apical membrane에 자리잡은 cell을 손상시키지 않도록 주의하면서 이들에 한

번씩 배지를 갈아가며 15일간 배양하였다.

## 2. Transport assay

### a. 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<sup>®</sup>-ERS voltohmmeter (Millipore corp)로 측정 할 수 있었다.  $5 \times 10^4$  cells/cm<sup>2</sup>을 apical monolayer에 seeding 하여 25일간 배양하면서 측정한 TEER과 mannitol 흡수율을 비교하여 실험 가능한 최적의 조건을 파악하였다. TEER의 단위는 voltohmmeter로 측정한 값을 surface area(cm<sup>2</sup>)로 나눈  $\Omega$ /cm<sup>2</sup>로 나타내었다.

### b. 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 0.5iCi/ml을 사용하였다. 이 모든 실험은 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 수행되었고, transwell을 shaking하진 않았다.



Table 1) Composition of transport assay buffer

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

c. transport assay

Transwell의 배지를 제거 한 후, HBSS로 transwell의 apical, basolateral 부분을 세 번 세척 후 transport assay buffer를 채워 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> 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 채취 시간은 특별한 경우를 제외하고 20, 40, 80분으로 하였다. ( KJH계열의 약물은 흡수율이 낮은 약물이니 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 monolayer 상태를 파악하기 위해 TEER을 측정하였다.

d. 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 table 2와 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 Caccell Pak C18 2.0 mm column을 사용하였다.

Table 2) KJH 계열 분석시 이동상의 조성

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) Dopamine receptor antagonist (KCH계열) 분석이 이동상의 조성

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

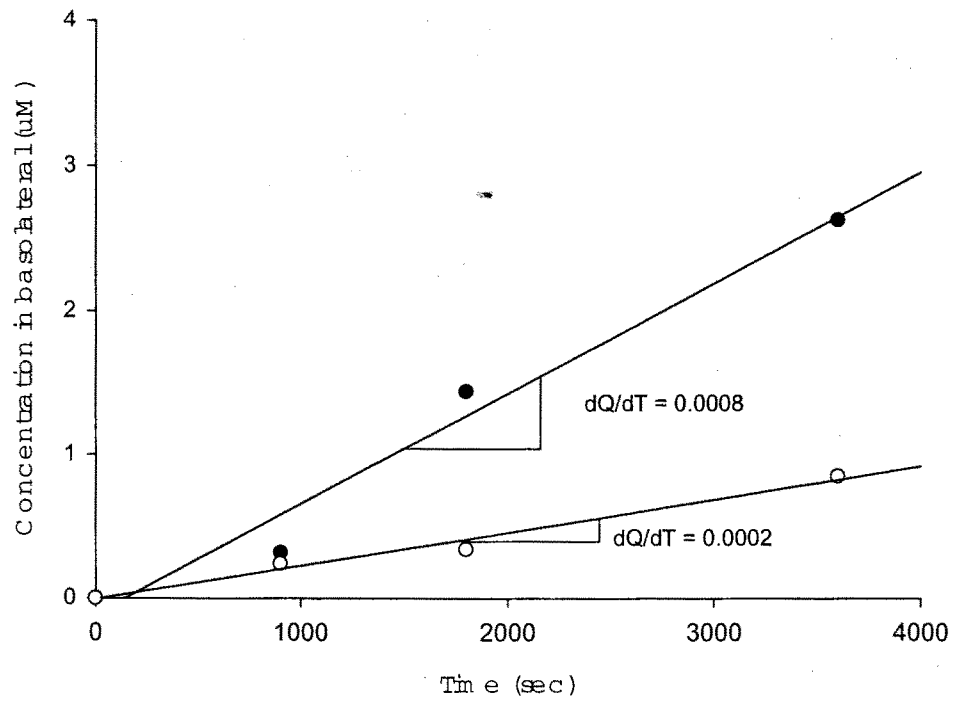
e. Papp (apparent permeability coefficient) calculation

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 (cm<sup>2</sup>)이고, C<sub>0</sub>는 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  $24 \times 10^{-6}$  cm/s의 Papp (cm/s)값을 갖는다.



KCH-761의 경우

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

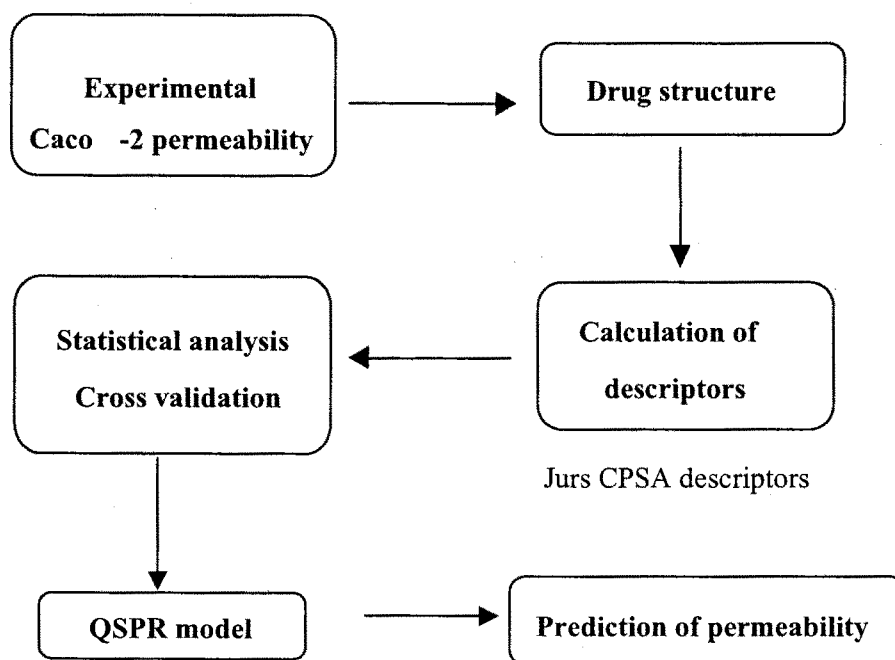
KCH-1058의 경우

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

Fig. 1. Papp 계산 과정의 예 ○ : 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)



$$P_{app} = 1.04 + (25.5 / (1 + CPSA / 110.2)^{14.5})$$

Fig. 2. PSA 유도과정

### 제 3절: 실험 결과 및 고찰

#### 1. 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  $0.3 \times 10^{-6}$  (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 시험에서는 Caco-2 세포를 18일 배양한 후 TEER 값을 측정하여 600 이상인 well 만으로 시험을 수행하였다.

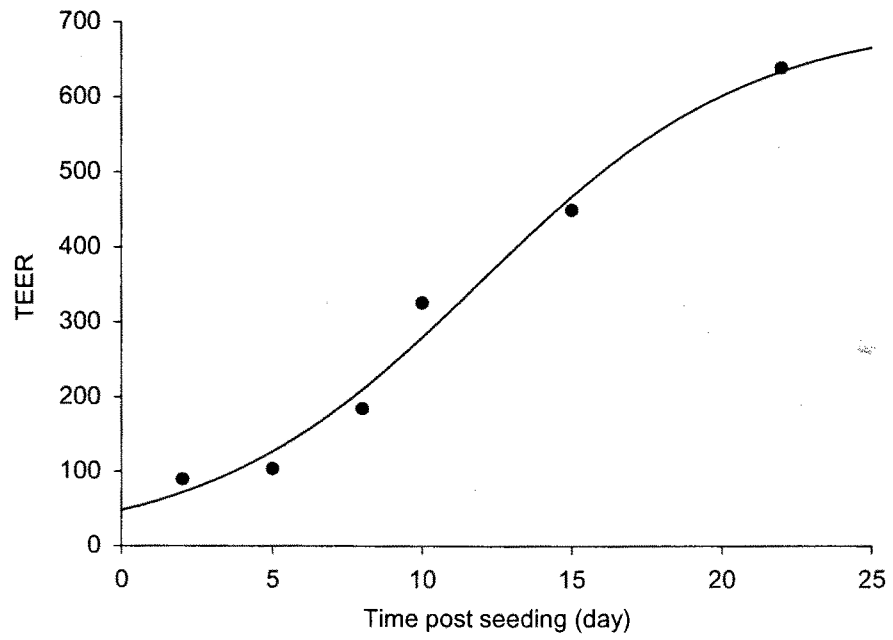


Fig. 3. 배양시간에 따른 Caco-2 cell monolayer에 TEER 측정값

### Mannitol permeability

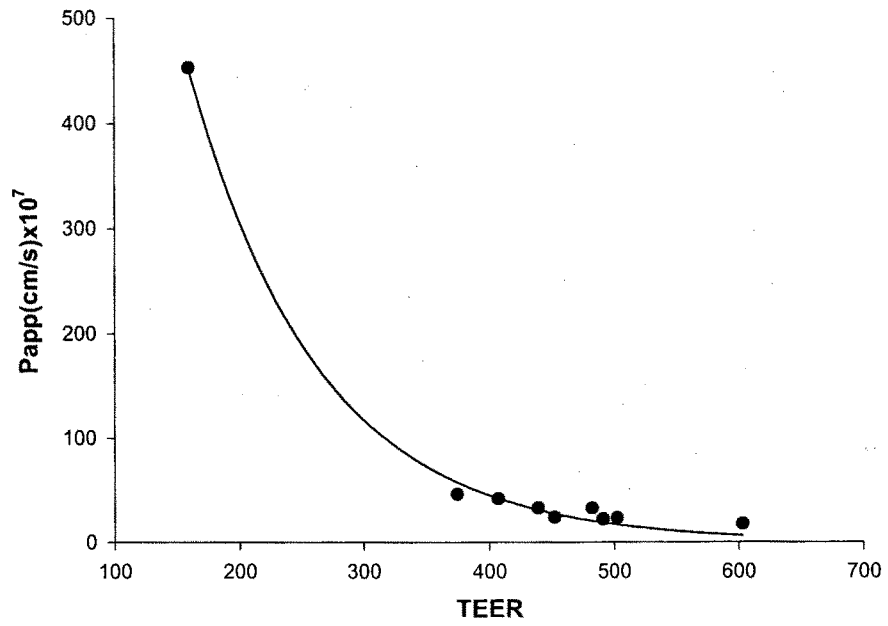


Fig. 4. TEER에 따른 [<sup>14</sup>C]-mannitol permeability

Table 4. Mannitol permeability

[ <sup>14</sup> C]-Mannitol (nCi)	Papp (cm/s) x 10 <sup>6</sup> Apical→basalateral
400	0.282
200	0.249
100	0.257
50	0.271



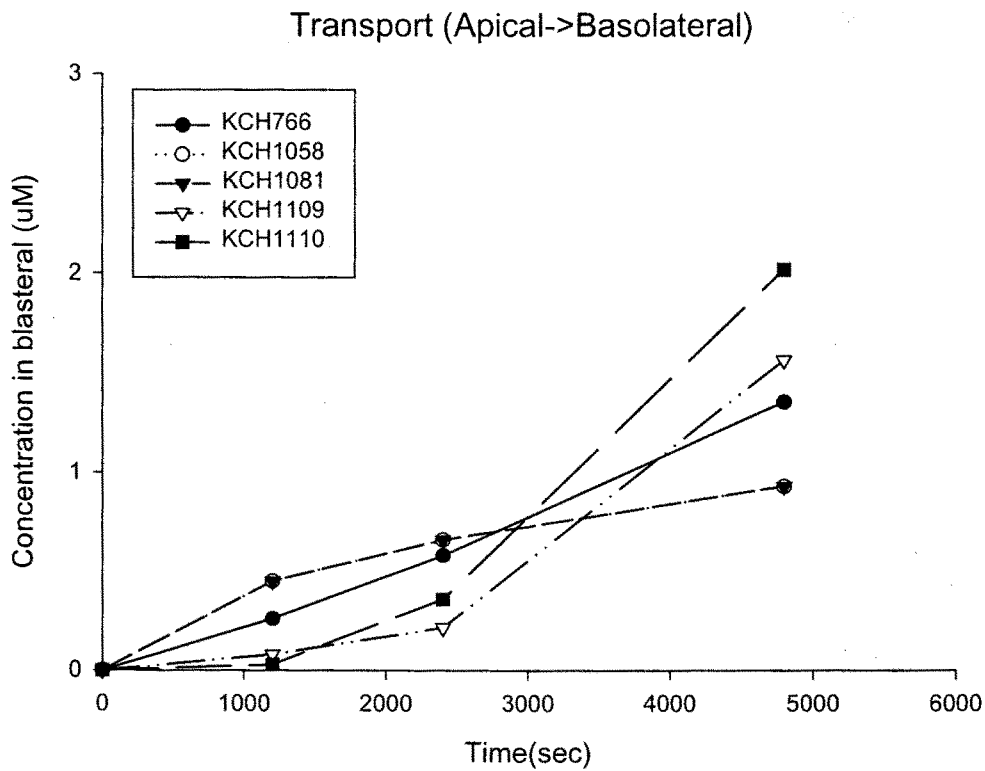


Fig. 5. Time-dependent transport of drugs in Caco-2 cells

## 2. Dopamine D3/D4 receptor antagonist 의 permeability

확립된 Caco-2 monolayer system으로 KJH계열, dopamine receptor antagonist 유도체들을 초기 농도 50 uM로 맞추어, transwell에 개별적으로 처리하여 각각의 Papp를 측정하였다 (Table 5). 본 연구의 목적 중의 일부인 rapid evaluation을 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 상관관계수가 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 배양시간 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 cm/sec x 10<sup>6</sup>으로 계산되었으며, 본 시험에 사용된 화합물의 대부분이 구조 유사체인 점을 감안시 구조 유사체 일지라도 세포 투과성에 많은 차이를 보여주었다. 일반적으로 Caco-2세포에서 Papp 값이 7이상일 경우 대부분 흡수가 일어나며, 생체이용률의 차이는 대사등의 요인에 의하여 나타난다고 알려져있다. 본 시험에서는 11개의 화합물이 이러한 기준이상의 Papp 값을 가지고 있었다 (Table 5).

약물 중에는 일차대사효소인 cytochrome P450에 의해 대사가 되거나 소장세포에 존재하는 multidrug resistance protein인 P-glycoprotein에 의해 역투과 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 실험전에 계산으로 흡수율 정도를 예측할수 있는지를 평가하기 위하여 partition coefficient, polar surface area (PSA), 그리고 total surface area (TSA)를 구하였다 (Table 6). PSA는 전체 표면적 (total surface area; TSA)에서 nonpolar surface area (NPSA)를 제하여 구해졌다. 계산된 physico-chemical parameter와 실험적으로 얻은 Caco-2세포에서의 Papp 값과의 연관성을 살펴보았다 (Fig. 6). 실제 실험군의 Papp값과 PSA값으로 얻어진 식을 도입하여 계산된 값은 약 50%의 약물에 대해 근사치의 값을 보였다 (Table 7). 또한 이를 통해 알 수 있던 것은 100이하의 PSA를 갖는 약물의 경우 140이상의 PSA를 갖는 약물 보다 강력한 흡수율을 보인다는 사실을 알 수 있었다. 더욱 다양하고, 많은 수의 test set을 통해 유도된 model일 경우 더욱 자세한 예측이 가능하리라 여겨진다. 결과적으로 QSAR model에서 산출된 Papp는

computational workstation을 통해 얻어진 PSA와 관련하여 실제 Caco-2 monolayer transport system내에서 약물 흡수와 관련된다는 사실을 알 수 있었다.

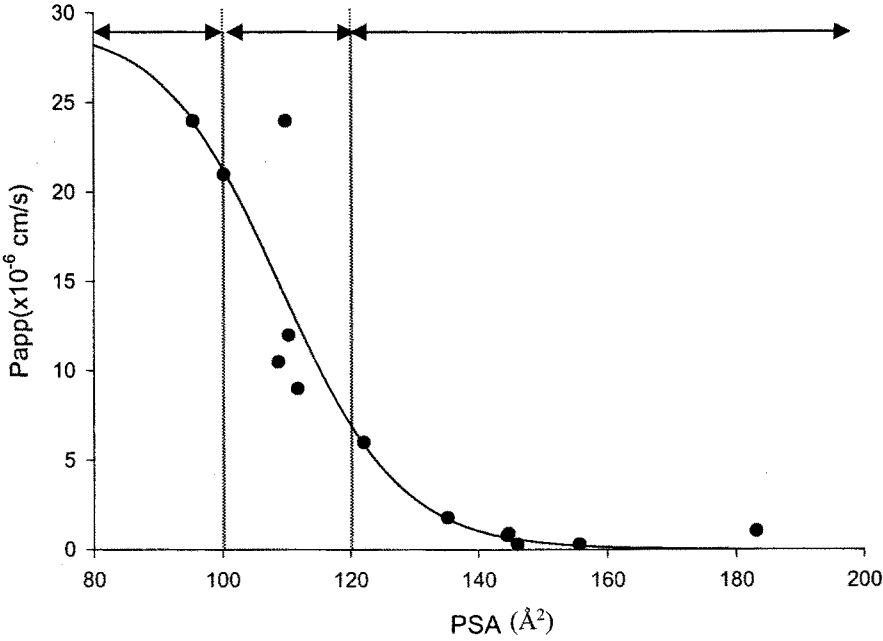


Fig. 6. Sigmoidal fit of single conformer PSA values to intestinal permeability data for compounds.

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

Compounds	Papp (cm/s) x 10 <sup>6</sup>
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) Polar Surface Area (PSA) of tested compounds

Compounds	[M+H] <sup>+</sup>	PSA (Å <sup>2</sup> )	NPSA (Å <sup>2</sup> )	TSA (Å <sup>2</sup> )
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

Table 6. Experimental Papp value and calculated Papp value for compounds

Compounds	PAS (Å <sup>2</sup> )	Experimetal Papp(x10 <sup>6</sup> cm/s)	Predicted Papp(x10 <sup>6</sup> 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

#### 제4절: 참고 문헌

- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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
- 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.
- 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
- 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

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. *S.t.p. Pharma Sci.* 5, 93-97

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

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

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

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

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

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

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

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

H. Ellens, P. E. Eddy. D.-P. Lee, P. Dougherty, A. Lago, J.-N. Xiang, J. D. Elliott, H.-Y.



Cheng, E. Ohstein, and P.L.Smith. (1997) In vitro permeability screening for identification of orally bioavailable endothelin receptor antagonists. *Adv. Drug Del. Rev.* 23:99-109

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

### 제 3장: Human P450 효소 발현 및 효소 억제

여 백

## 제1절: 연구의 필요성

Cytochrome P450 효소는 약물대사의 중추적인 역할을 하며 인체내로 유입되는 화합물의 약 95%정도가 cytochrome P450 효소에 의해 대사된다고 알려져있다. 따라서 약물이 인체내 대사 및 대사과정에서 일어나는 약물 상호간 작용을 규명하기 위하여서는 in vitro enzyme kinetics 연구와 어떤 P450효소가 대사에 관여하는지를 동정하는 것이 필요하다고 할 수 있다. Human P450에의한 약물의 대사 연구와 대사관여 P450 isozyme을 characterization하기 위하여서는 다량의 P450 protein이 필요하다. 본 과제에서는 human 조직의 획득이 난이한 관계로 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 대사 시험에 사용하였다.

## 제2절: 실험 재료 및 방법

### 1. 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 DH5 $\alpha$  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.

### 2. Membrane fraction 만들기

배양된 배양액을 회수하여 4°C 5000 xg에서 10분간 원심 분리하여 cell pellet을 취한다. Cell pellet의 무게를 측정하여 cell pellet 1g당 15ml 의 500mM sucrose와 0.5mM EDTA를 포함하는 0.1mM Tris-acetate buffer (pH 7.4)를 첨가하여 resuspend시켰다. Lysozyme은 cell g당 300 ug이 되도록 첨가하여 천천히 흔들어 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 6mM magnesium acetate, 20% glycerol, 0.1mM DTT가 포함된 100mM potassium phosphate buffer(pH 7.6)에서 resuspend한 후 -70°C에서 보관하였다. 준비된 spheroplast에 protease inhibitor인 1mM PMSE, 2uM Leupeptin, 0.04U/ml aprotinin, 1uM bestatin을 첨가하여 차갑게 유지하면서 sonication 한 후 4°C에서 10,000xg로 20분간 원심분리하여 얻은 상층액을 4°C에서 100,000 xg에서 90분간 초원심분리하여 membrane fraction을 얻어 250mM sucrose와 0.25mM EDTA가 포함된 50mM Tris-acetate (pH 7.6)에서 homogenization한 후 적당량을 분주하여 -70°C에서 보관하였다.

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 <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	100ml
	125.4g K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
0.5mM δ-ALA (ammonium levulunic acid)	per 1 L	1ml
	0.5M	
50 uM FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.2M	0.25ml
1mM MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	1M	1ml
2.5mM (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2.5M	1ml
Trace element	2.7g FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.25ml
	0.2g ZnCl <sub>2</sub> · 4H <sub>2</sub> O	
	0.2g CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	
	0.2g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O	
	0.1g CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	
	0.1g CuCl <sub>2</sub>	
	0.05g H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	
10ml coc.HCl/100ml DW		

### 3. P450 Assay

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

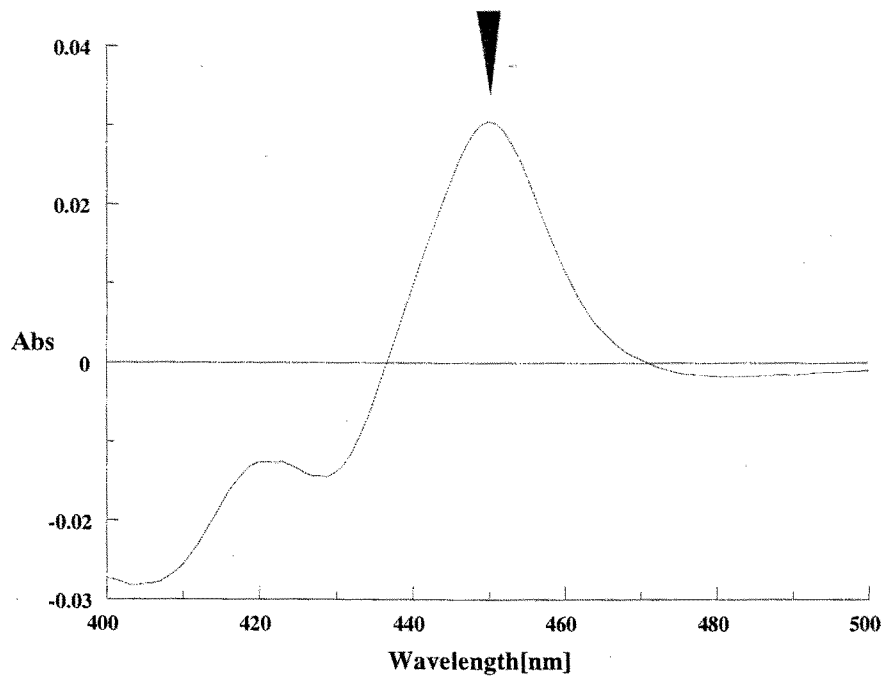


Fig. 1. Difference spectrum of Cytochrome P450 expressed in *E. coli*

#### 4. P450을 이용한 enzyme assay

각각의 isozyme이 발현된 membrane fraction을 이용하여 실험을 하였고, flavonoid compound 13가지를 이용해 억제 실험을 하였다. 모두 1uM의 flavonoid을 각각의 기질을 첨가하기전 preincubation time에 첨가하였다.

##### a. Testosterone 6 hydroxylation assay

50pmole P450 membrane fraction, 10mM glucose 6-phosphate, 0.65mM  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>, 1U/ml glucose 6-phosphate dehydrogenas, 0.3mM testosterone을 100mM potassium phosphate buffer (pH 7.4)에 첨가하여 만든 반응액(0.5ml)을 37°C shaking water bath에서 30분간 반응시켰다. CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1ml을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 반응이 정지된 반응액을 원심분리한 후 0.8ml을 취하여 질소가스를 이용하여 날린 후 methanol 100ul에 녹여서 10ul를 취하여 HPLC로 분석하였다.

60% methanol을 1ml/min의 유속으로 흘려주면서 254mM에서 peak를 검출하였다. Column은 YMC pack C18 (4.6 x 150mM, 5um)을 사용하였다. 생성된 hydroxy testosterone은 peak area로 작성한 calibration curve로부터 정량하였다.

##### b. Dextromethorphan O-Demethylation (CYP2D6)

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

20% acetonitrile을 포함하는 10mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 1ml/min의 유속으로 흘려주면서 excitation 290nm, emission 320nm에서 형광측정하였다. Column은 shiseido capcellpak C18 (4.5 x 250mM, 5um)을 사용하였다. 생성된 dextrophan은 peak area로 작성한 calibration curve로부터 정량하였다.

##### c. Diclofenac 4-hydroxylation (CYP2C9)

50pmole P450 membrane fraction, 10mM glucose 6-phosphate, 0.65mM  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>, 1U/ml glucose 6-phosphate dehydrogenas, 0.3mM testosterone을 100mM Tri-HCl (pH 7.4)



에 첨가하여 만든 반응액(0.5ml)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 30ul를 취하여 HPLC로 분석하였다. Column은 shiseido capcellpak C18 (4.5 x 250mm, 5um)을 사용하였다. 생성된 hydroxy diclofenac은 peak area로 작성한 calibration curve로부터 정량하였다. 분석에 이용된 이동상의 조성과 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

#### d. Ethoxyresorufin O-deethylation (CYP1A)

50pmole P450 membrane fraction, 10mM glucose 6-phosphate, 0.65mM  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>, 1U/ml glucose 6-phosphate dehydrogenas, 2.5uM ethoxyresorufin, 1mg/ml BSA를 100mM potassium phosphate bufferl (pH 7.4)에 첨가하여 만든 반응액(0.5ml)을 37°C shaking water bath에서 15분간 반응시켰다. 2ml의 HPLC grade methanol을 첨가하여 반응을 정지시켰고, 반응이 정지된 반응액을 20초간 vortexing하였다. 원심분리한 후 2ml을 취하여 형광측정계를 이용하여 excitation 550nm, emmision 585nm에서 형광도를 측정하였다. 생성된 resorufin은 각각의 형광도를 이용해 측정한 calibration curve를 이용해 정량하였다.

### 제3절: 실험 결과 및 고찰

#### 1. 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 약물체 대사 연구를 지원할 수 있는 기반을 확립하게 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 각 각 1L 당 88.4nmol, 67.5nmol, 258.4nmol, 68.1nmol, 46.6nmol, 51nmole이었다. P450의 발현은 CYP3A4가 가장 발현이 잘 되었다. P450의 발현정도가 다른 것은 P450 enzyme의 N-terminal sequenc 의 영향으로 추정되고 있는데 이 N-terminal 부분이 cell membrane에 binding 되는 것과 관계가 있기 때문으로 사료된다.

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

## 2. 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 200uM stock으로 DMSO에 녹여 준비했고, 대사 실험용 반응액의 전체 1% 이하의 DMSO를 이용하였다. 대사 억제 실험시 첨가되는 inhibitor는 원하는 반응에 대한 기질을 첨가하기 전 넣고 미리 5분간 incubation하였다. Testosterone은 CYP3A4에 특이적인 대사를 확인하는 표준 물질이다. 대사 억제 실험을 수행한 결과 시료 번호 50092와 50097를 1uM 처리하였을 때 다른 11가지에 비해 효과적인 억제 작용을 관찰할 수 있었다.

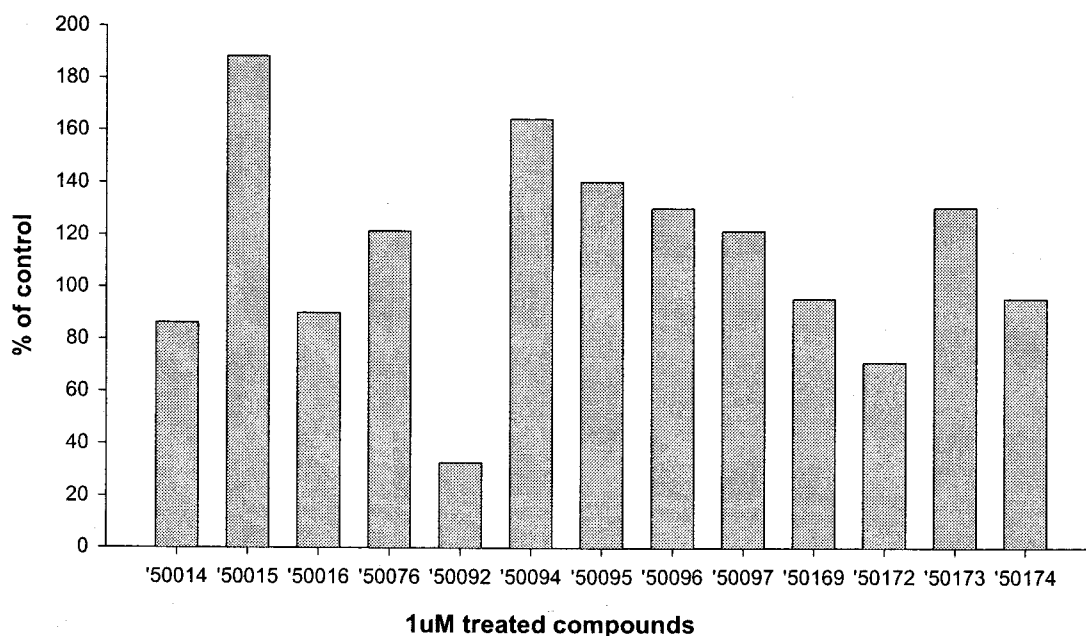


Fig. 2. Inhibition of testosterone metabolism with 500series

### 2) CYP2C9 대사 억제 실험

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

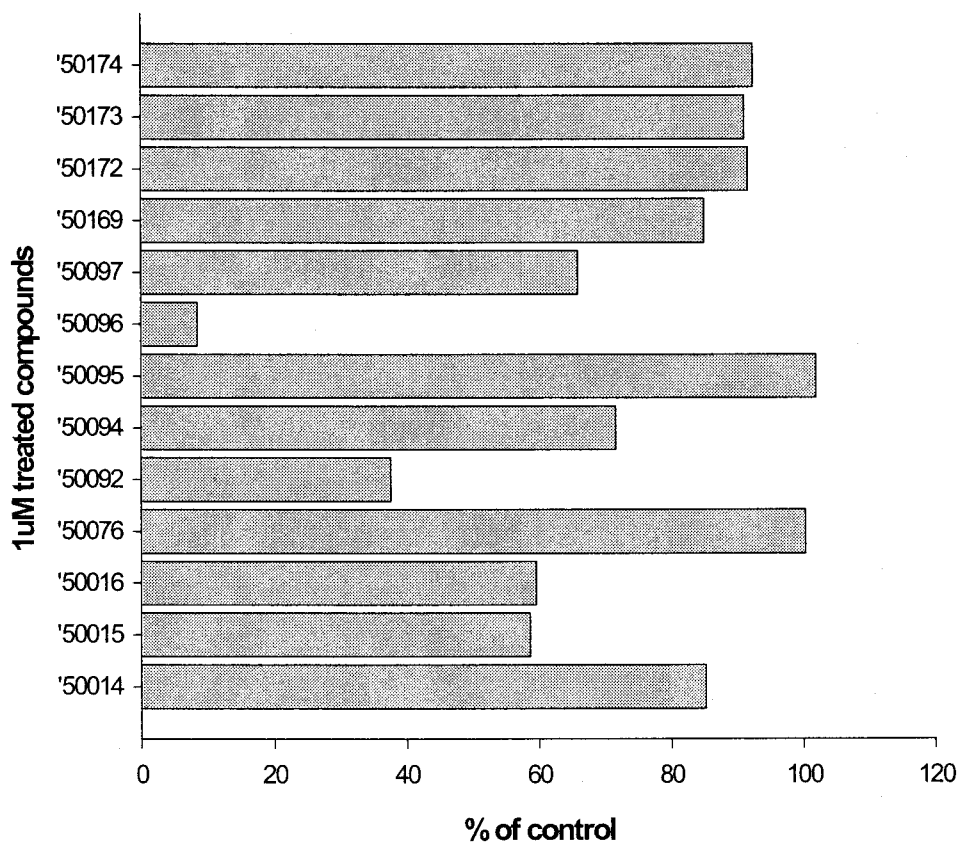


Fig. 3. Inhibition of diclofenac metabolism with 500series

c. 500series의 CYP1A1 대사 억제

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

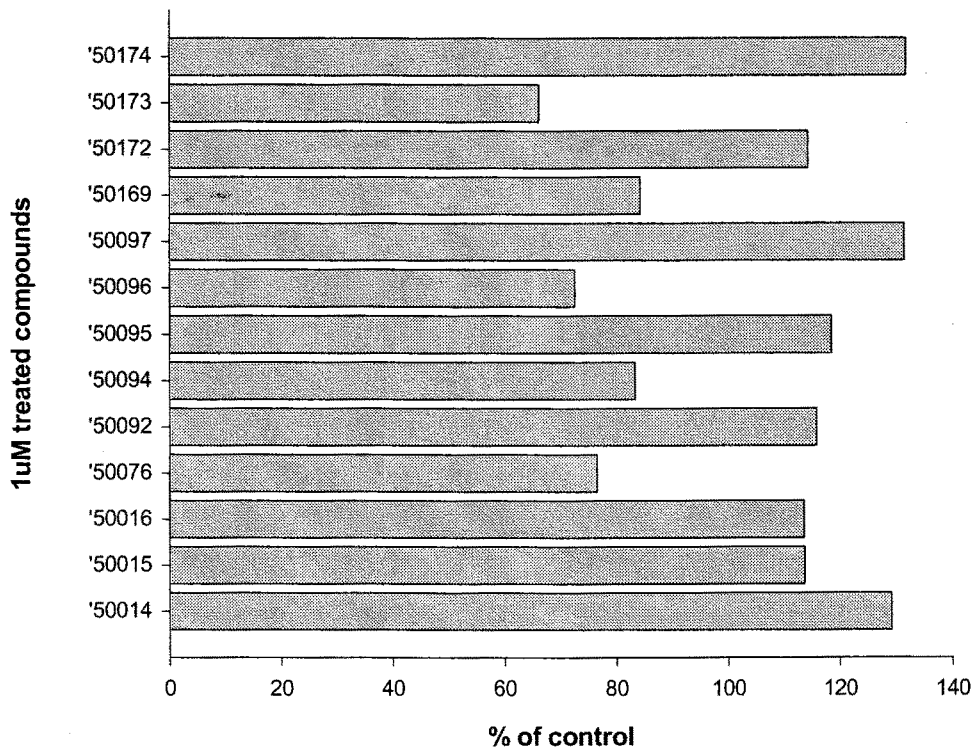


Fig. 4. Inhibition of ethoxyresorufin metabolism with 500series

#### d. CYP2D6 에 대한 억제 효과

Dextromethorphan이 CYP2D6에 의해 dextrophan으로 대사되는 대사능을 살펴보았다. 실험 결과 50174가 54%정도의 억제 효과를 보였다.

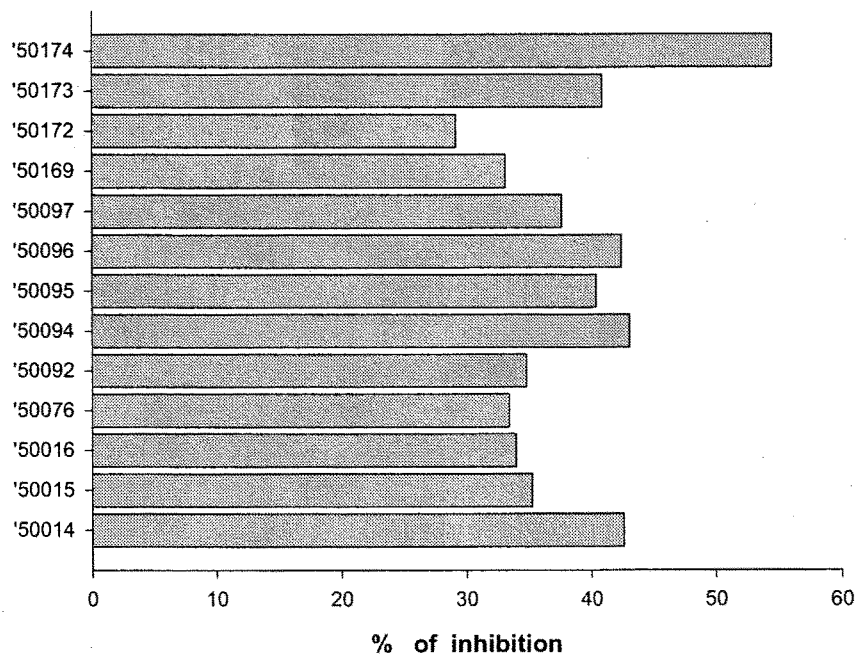


Fig. 5. Inhibition of CYP2D6 activity by natural flavonoids.

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.

#### 3. Human microsome과 expressed enzyme을 이용한 CYP3A4 억제 연구

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 활성억

제를 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 준바와 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 사람에 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 비가역적임을 알 수 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.

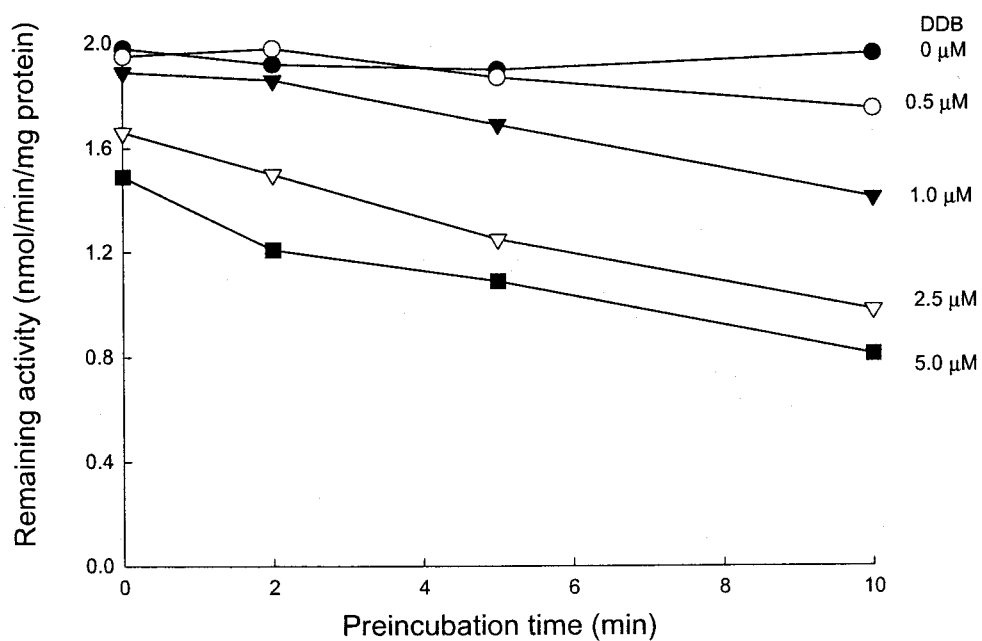


Fig. 6. DDB concentration and time dependency for inactivation of CYP3A4 as reported by testosterone 6-hydroxylation. DDB was incubated, at the concentrations shown, with human liver microsomes. At specified times aliquots of the incubation were diluted 20-fold and incubated for a further 30 min and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



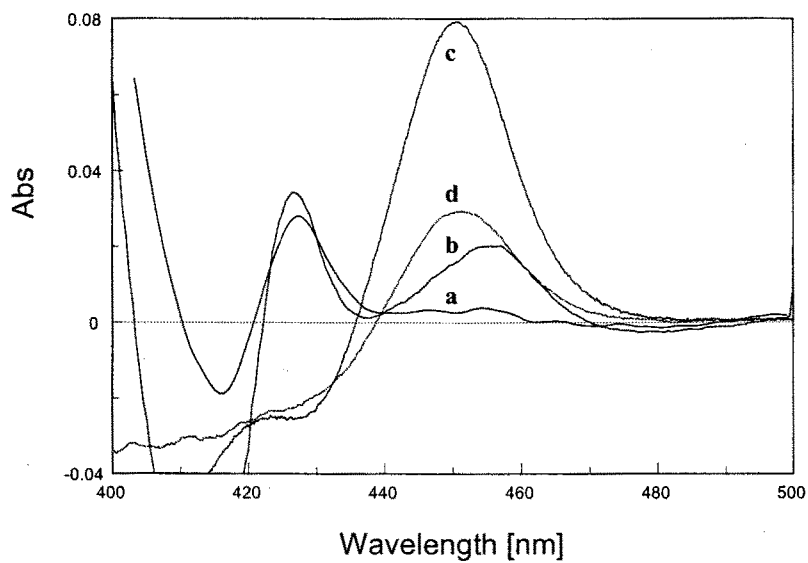


Fig. 7. Metabolite-P450 complex spectrum in PCN-treated rat liver microsomes. Spectrum (a) represents the baseline spectrum and spectrum (b) was recorded after a 5-min incubation with 100 mM DDB and 1 mM NADPH in PCN-treated art liver microsomes. Then the reduced CO-difference P450 spectrum (c) was recorded.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

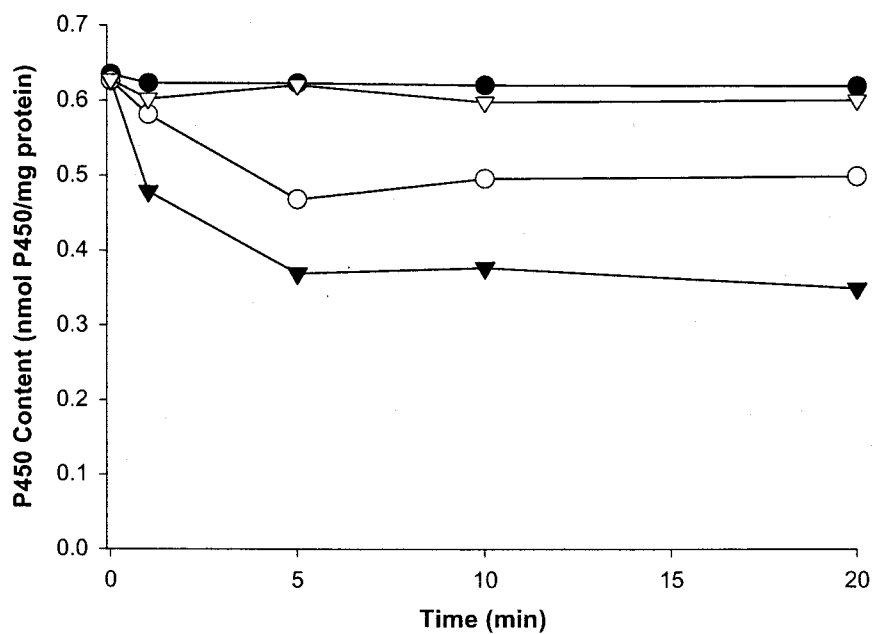


Fig. 8. Time-dependent loss of P450 content in human liver microsomes. Human liver microsomes (1mg protein/ml) were incubated in duplicate at 37°C. At the designated time points, the P450 concentrations were measured by reduced CO-difference P450 spectra. ●, microsome control; ▽, 25 mM DDB; ○, 1mM NADPH;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

**Table 3.** Recovery of testosterone 6 $\beta$ -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 $\mu$ 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 microsomes. Data represent the mean  $\pm$  S.D. of three different preparations.

DDB $\mu$ M	$\Delta A_{456-490}$ /mg protein		Complexed <sup>a</sup>		P450 Complexed	
	Rat	Human	Rat	Human	Rat	Human
			<i>nmol/mg</i>		<i>%</i>	
20	0.0027 $\pm$ 0.0003	— <sup>b</sup>	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

<sup>a</sup> Calculation based on an extinction coefficient of 75 mM cm<sup>-1</sup> for  $\Delta A_{456-490}$

<sup>b</sup> —, 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 <i>μM</i>	Enzyme Sources	
	PCN-Treated Rat	Human
0	0.735 (100) <sup>a</sup>	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)

<sup>a</sup>P450 content was calculated based on extinction coefficient of 91 nM cm<sup>-1</sup> for  $\Delta A_{456-490}$ .

여 백

## 제 4장 새로운 분석방법의 개발 및 응용

여 백

## 제1절: LC/MS/MS를 이용한 medroxyprogesterone의 분석

### 1. 서론

LC/electrospray multiple reaction monitoring 방법은 선택성이 우수할 뿐만 아니라 분석 감도 또한 타 방법에 비하여 우수하며, 또한 동시에 여러개의 물질 분석이 가능하므로 미량 물질 분석에 많이 사용되고 있다. 특히 호르몬제의 경우와 같이 투여 용량이 작을 경우에 혈 중 예상되는 농도가 subnanogram 수준에서 기존의 HPLC 방법이나 GC 방법으로는 분석이 불가능 한 경우가 다수 있다. 본 연구에서는 극미량으로 존재하는 약물의 분석 감도를 높이고 이를 이용하여 pharmacokinetics 연구를 수행할 수 있는 HPLC/ion trap mass spectrometry 방법을 medroxyprogesterone을 이용하여 개발하고자 하였다.

Medroxyprogesterone acetate (6 $\alpha$ -methyl-17 $\alpha$ -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.

MPA 투여 후 약효와 약동력학적 연구를 위하여 다양한 분석방법이 개발되어 있다. MPA는 경구 투여시 흡수율이 매우 낮으며, 또한 간에서 A ring 또는 side-chain hydroxylation 대 사 반응이 활발히 일어난다. 그러므로 혈장내의 MPA 농도는매우 낮으며 또한 약물농도에 있어서 개체간의 차이도 크게 나타난다. 현재까지 알려진 분석방법은 radioimmuno assay, gas chromatography/electron capture detection, HPLC, 그리고 gas chromatography/mass spectrometry 방법이 보고되어 있다. 하지만 어떠한 방법도 치료 용량을 투여 후 pharmacokinetics 연구에 필요한 정도의 분석 감도를 보여주고 있지 않아서 이러한 연구에 는 사용할 수가 없다.

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 liqiod extraction 후 HPLC를 통과하고 selective reaction monitoring 방법을 이용하여 MPA를 검출하고자 한다.

### 2. 실험 방법

#### A. 주요기기 및 장치

- 분석기기 : Agilent 1100 series LC/MSD



- Column : Phenyl column (1.5 × 150 mm, 5  $\mu$ m, Shiseido)
- 이 동 상 : 20 mM Ammonium formate(pH 4.0)/acetonitrile 혼합액  
(48/52,v/v)
- 유 속 : 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℃, 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.

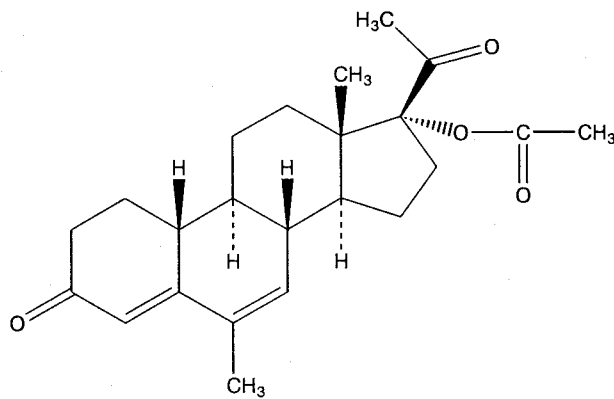
## C. 검량선 작성

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  $\mu$ 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 $\mu$ L of 0.5  $\mu$ g/mL) 씩을 첨가한 후, 다음의 검체 전처리법과 LC/MSD를 이용한 분석조건에 따라 분석하였다. 검량선은 내부표준물질의 피크면적에 대한 MPA의 피크면적비로 MPA의 농도에 대하여 작성하였다.

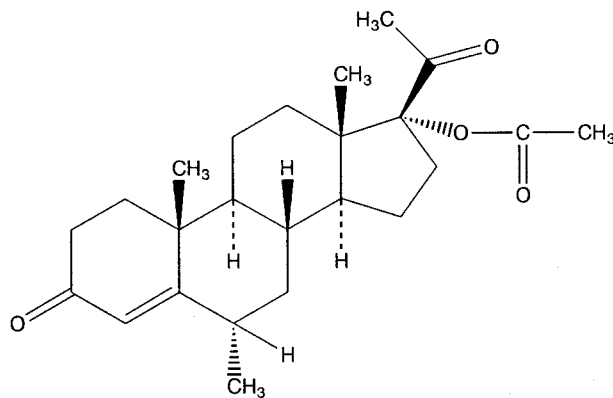
## D. 혈장 시료의 처리 및 혈 중 농도 계산

피험자로부터 각 시간대별로 채취하여 -20℃에 보관했던 혈장시료를 실온에 방치하여

녹인 다음, 검체 1.0 mL (혈장)에 내부표준물질 5 ng (10 $\mu$ L of 0.5  $\mu$ g/mL) 씩을 첨가한 후, 증류수 1.0 mL을 첨가하고 2 mL의 pentane으로 2회 추출하였다. 유기층을 취하여 질소기류 하에서 용매를 날려 건조시킨 다음, 50 $\mu$ L의 이동상에 녹여 그 중 20 $\mu$ L를 HPLC에 주입하였다. 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크면적에 대한 MPA의 피크면적비를 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 MPA의 농도를 구하였다.



Nomegestrol MW 370.5



Medroxyprogesterone MW 386

Fig. 1. Structure of megroxyprgesterone acetate and internal standard

### 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  $-COCH_3$  group이 떨어진  $m/z$  285의 fragment ion이 검출되었다 (Fig. 2).

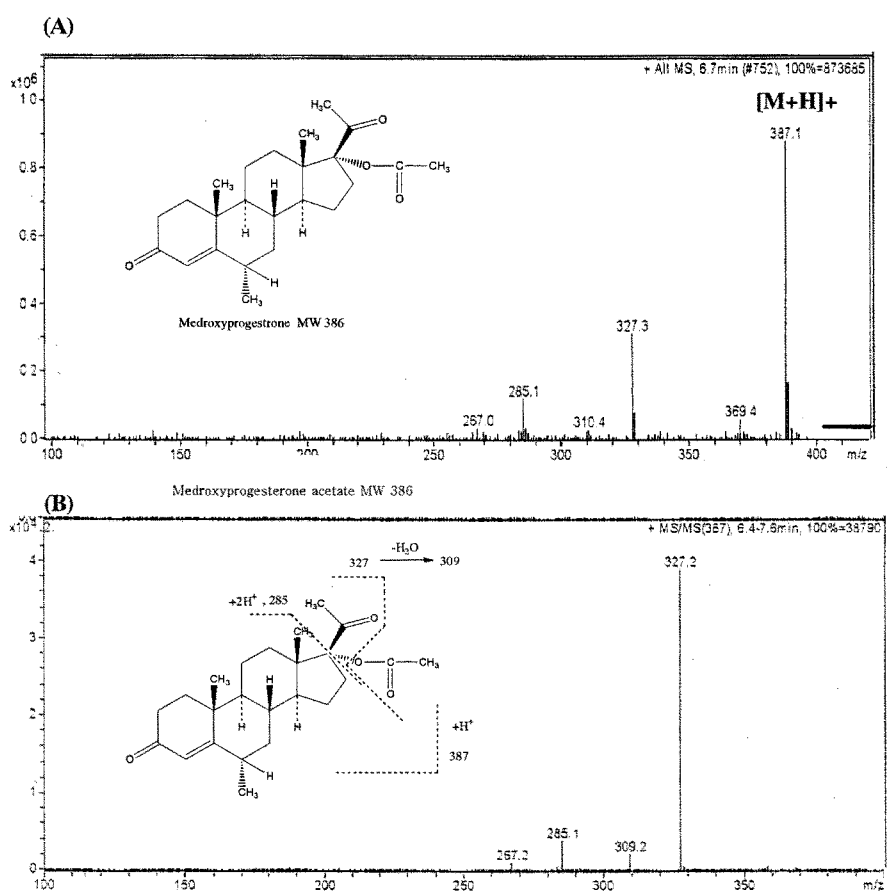


Fig. 2. Positive ion mass spectrum (A) and product ion mass spectrum (B) of medroxyprogesterone acetate

Internal standard로 사용한 nomegestrol 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  $-COCH_3$ 이 빠진  $m/z$  269의 fragment ion이 검출되었다 (Fig. 3).

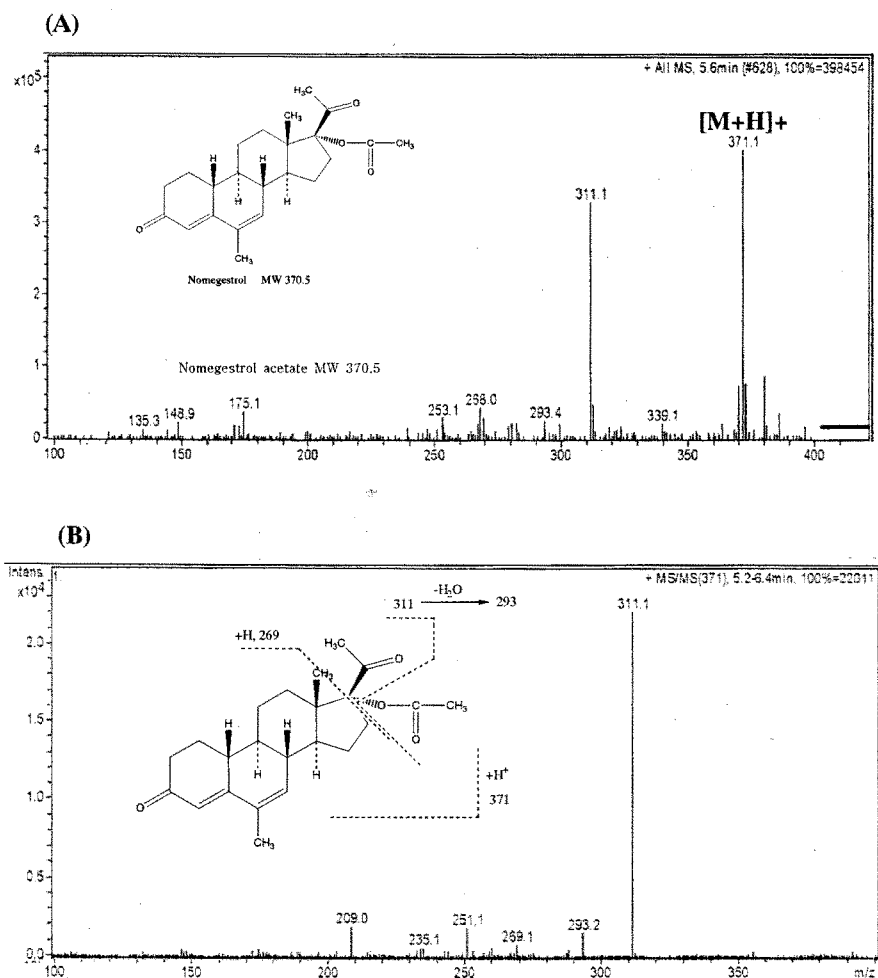


Fig. 3. Positive ion mass spectrum (A) and product ion mass spectrum (B) of nomegestrol acetate

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).

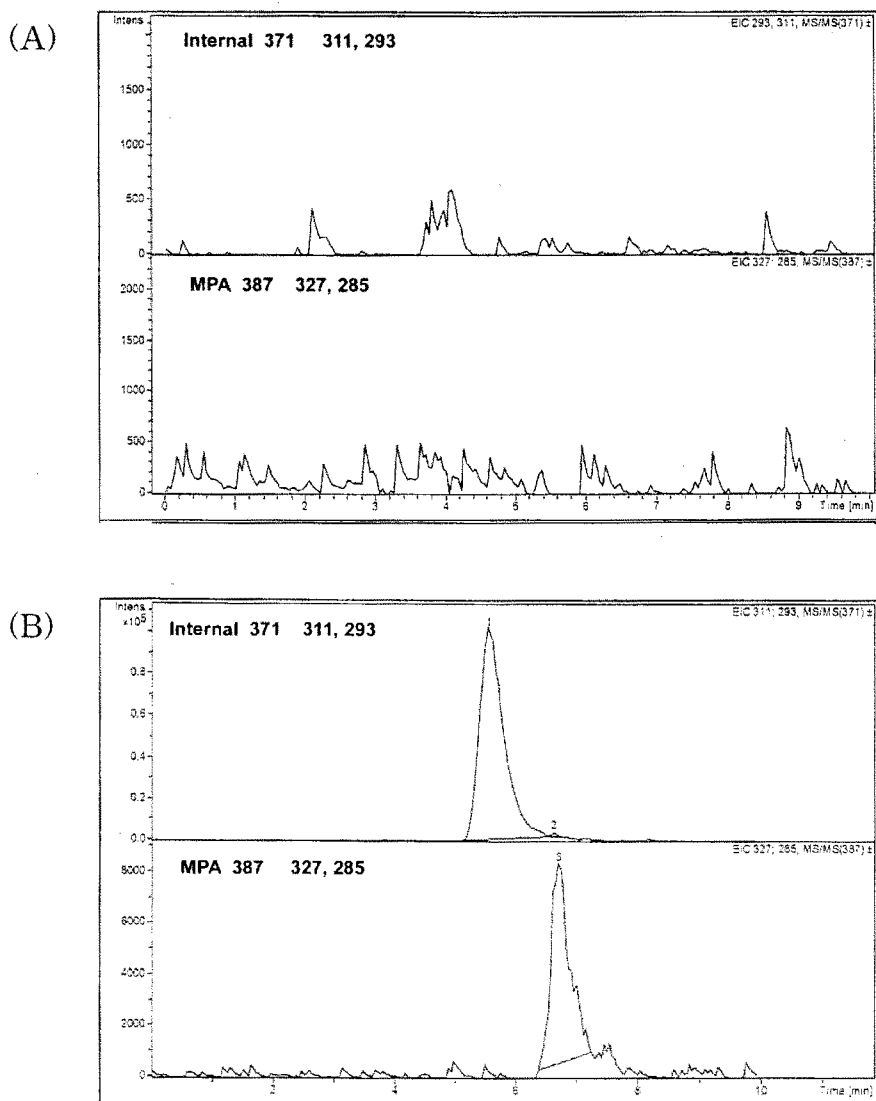


Fig. 4. Extracted ion chromatogram of an extract of blank human plasma (A) and human plasma spiked with 0.2 ng/mL medroxyprogesterone acetate (B).

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.

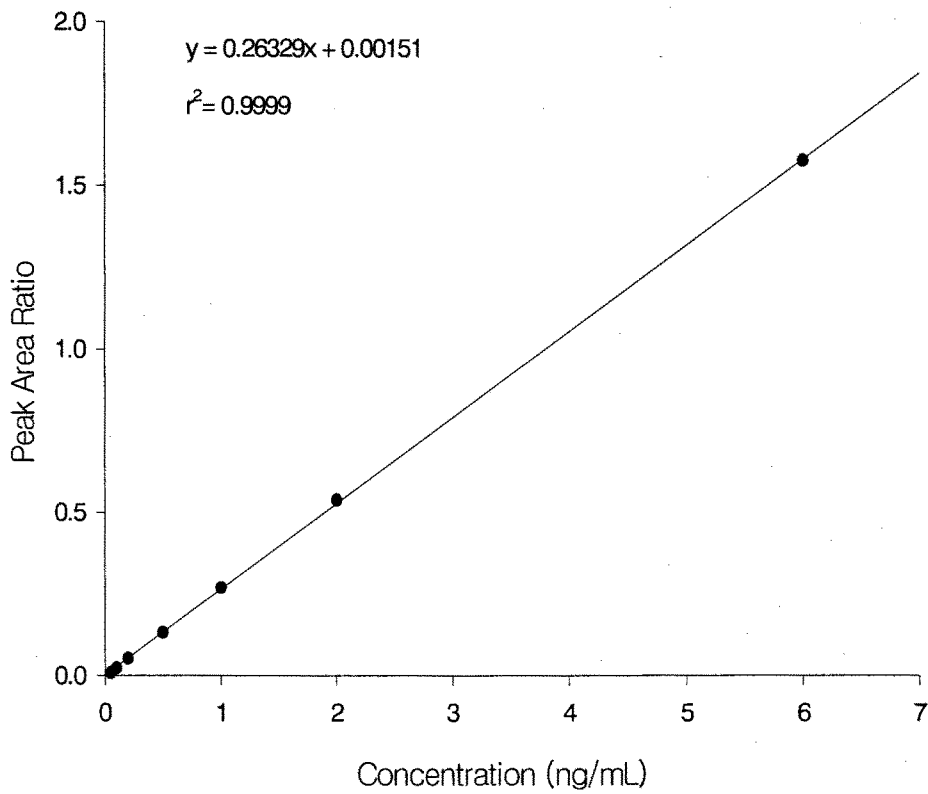


Fig. 5. Calibration curve of medroxyprogesterone acetate in human plasma

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

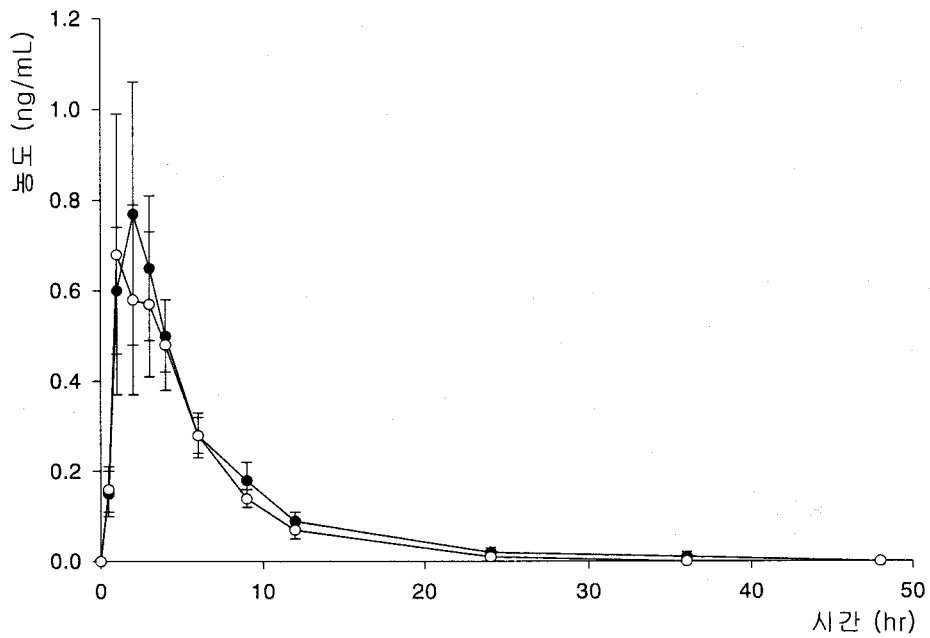


Fig. 6. 1군 (A) 및 2군 (B) 혈장 중 초산메드록시프로게스테론의 평균

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  $0.73 \pm 0.78$  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 6.10hr 로 계산되었다.



## 2절: HPLC/MS/MS 방법을 이용한 enalaprilat과 enalapril 정량

### 1. 서론

Enalapril은 angiotensin converting enzyme 저해제로서 고혈압 치료제로서 많이 사용되는 약물이다. Enalapril의 경우 proenzyme로서 체내에 유입되면 esterase에 의하여 효소저해에 필수적인 free carboxyl group이 생기게 되며 이 대사체인 enalaprilat이 활성을 갖게 된다. Enalaprilat의 경우 free carboxyl group을 함유하고 또한 극성이 높아 gas chromatography로서는 분석이 용이하지 않고 또한 chromophore가 작고, isomer로 존재하므로 체내동태 연구에 적용할수 있을 정도의 약물을 검출할수 있는 HPLC 분석이 용이하지 않다. 따라서 pharmacokinetics 연구에 radioimmunoassay를 많이 이용하고 있으나 이 경우 parent enalapril과 대사체인 enalaprilat을 구분할 수 가 없다. Enalapril은 peptide bond가 존재하고 비록 cis-configuration이 favorable configuration이지만 trans-isomer로도 존재한다. 특히 enalapril과 같이 proline이 있는 peptide bond는 찬 trans- interconversion 반응이 매우 용이하게 일어난다. Enalapril은 상온에서 conversion 반응시 relaxation time이 수분정도 되며 column에서 분리중에도 conversion 반응이 일어나므로 peak shape에 영향을 주며 또한 peak spilliting이 일어나기도 한다. 본 연구에서는 HPLC/MS/MS 방법을 이용하여 혈장내 enalapril과 enalaprilat을 동시 분석하는 방법을 개발하여 체내동태 연구에 적용하고자 하였다.

## 2. 실험방법

### HPLC 조건

전처리된 혈장 시료는 다음의 HPLC 조건에서 정량한다. 이를 위해 Agilent사의 LC/MSD Trap을 이용하고, 시료 주입에는 autosampler를, 컬럼은 Shiseido사의 C18 column(50 mm x 3.0 3 $\mu$ m)을, 데이터 처리장치로는 HP사의 chemstation을 사용한다. 이동상은 0.1% acetic acid와 methanol을 사용하며, 최초 용매 조성은 0.1% acetic acid 용액/acetonitrile (70:30, v/v)로 그리고 4분동안 methanol을 70%로 증가시키고 8분동안 peak를 모니터링한다. 유속은 0.5ml/min, column온도는 60 $^{\circ}$ C로 유지하고, 검출은 mass spectrometry를 이용한 multiple reaction monitoring 방법을 이용하여 정량한다. 즉 enalaprilat은 parent ion m/z 349의 product ion 206과 303을, enalapril은 parent ion m/z 377의 product ion 234와 303을, 그리고 ramipril은 parent ion m/z 417의 product ion 234와 343을 monitoring 한다.

### 검량선 작성

Enalaprilat과 enalapril 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 100 $\mu$ g/ml로 만든 후 냉장보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 blank 혈장(청)으로 희석하여 alprazolam의 혈장(청)중 농도가 각각 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100 ng/ml가 되도록 표준 혈장(청)시료를 만든다. 각각의 표준 혈장(청) 1ml에 내부표준물질로 ramipril (1000ng/ml) 20 $\mu$ l를 가한 후 흔들어 섞는다. 여기에 20 $\mu$ l의 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 가하고 vortexing한다. C18 Sep-pak cartridge를 10ml 메탄올로 활성화시키고 다시 0.1% acetic acid용액으로 washing한 후 혈장시료를 loading한다. Sep-pak을 2 ml의 0.1% acetic acid용액으로 washing한 다음 1ml의 메탄올로 elution한다. 메탄올층을 질소 기류하에서 증발·건조시킨 후 잔사에 메탄올 40 $\mu$ l를 첨가하여 60초간 vortexing한 다음, 이 최종 시료용액중 10 $\mu$ l를 취하여 HPLC에 주입한다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 면적에 대한 enalaprilat과 enalapril의 피크 면적의 비를 가지고 검량선을 작성한다.

재현성을 구하기 위해 검량선 작성 전, 하루에 실험을 4 번 시행하여 일내 재현성을 구하고 연속하여 3일간 실험을 행한다. 재현성을 확인한 다음, 검량선 작성을 한다.

검체 실험 중에는 검량선 작성 시료를 먼저 HPLC로 측정 후, 각 피험자간의 시료들 사이마다 enalaprilat 검량선 작성 시료 중 10 ng/ml QC시료를 삽입하여 로 측정하여 accuracy를 확인한다.

### 3. 결과 및 고찰

Enalaril과 enalaprilat을 동시 분석 방법을 확립하기 위하여 먼저 각 물질의 mass spectrum을 획득하였다. Fig에서 나타낸 바와 같이 enalapril은 protonated molecular ion이 m/z 377로 나타나며 fragment ion spectrum은 carboxyethyl group이 빠진 m/z 303, 그리고 proline moiety가 떨어진 m/z 234가 major fragment ion으로 나타났다. 대사체인 enalaprilat의 protonated molecular ion은 m/z 349, 그리고 fragment ion은 free carboxyl group이 떨어진 m/z 303과 proline moiety가 떨어진 m/z 206이 major fragment ion으로 나타났다. Internal standard로 사용하고자 하는 유사체인 ramipril은 protonated molecular ion m/z 417, 그리고 fragment ion으로는 마찬가지로 carboxyethyl group과 아미노산 analog group이 떨어진 분자량 각각 m/z 343과 234가 major fragment ion으로 나타났다.

따라서 본 시험에서는 HPLC/MS/MS product ion monitoring 방법에서 각각의 peak 검출을 위하여 enalapril은 m/z 303과 234, enalaprilat은 m/z 303과 206, 그리고 ramipril은 m/z 343과 234를 monitoring하였다.

서론에서도 언급하였듯이 enalapril의 경우 찬, trans- interconversion으로 인하여 peak spiliting이 관찰되었다. 이를 극복하기 위하여 C-N bond의 double nature을 줄이고 interconversion rate을 증가하여 single peak로 분석하기 위하여 pH와 column 온도를 변화하였다. Acidic 조건과 column temperature를 60oC로 하였을 경우 모든 peak가 single peak로서 검출되었으며 따라서 분석 조건으로는 0.1% acetic acid 용액을 용매로 사용하고 column 온도는 60oC로 고정하였다. 또한 본 연구에서 사용한 ion-trap mass spectrometer에서는 organic modifier로서 acetonitrile을 사용할 경우에는 enalapril과 ramipril 모두 2nd injection에서 memory effect로서 처음 injection한 양의 약 1-2%정도의 peak가 지속적으로 관찰되었다. 이러한 meemory 효과는 4-5회 blank

run을 하여도 정도의 차이는 있지만 지속적으로 관찰되어 정량에는 적용할 수 가 없었다. Organic modifier를 methanol로 변화시에는 이러한 memory 효과가 나타나지 않아 최종적으로 methanol gradient를 사용하였다. qtlfy 전처리는 Sep-pak을 이용한 solid phase extraction을 이용하였으며 본 방법으로 분석한 HPLC/MS/MS chromatogram을 Fig 에 나타내었다. 이러한 분석방법은 selectivity가 우수하였으며 정량한계는 enalapril 과 enalaprilat 각각 0.5ng/ml과 2.0 ng/ml로 설정하였으며 Fig에 나타낸바와 같이 직 선성 또한 우수하여 혈장내 enalapril과 enalaprilat 정량에 적용할 수 있다고 사료된다.

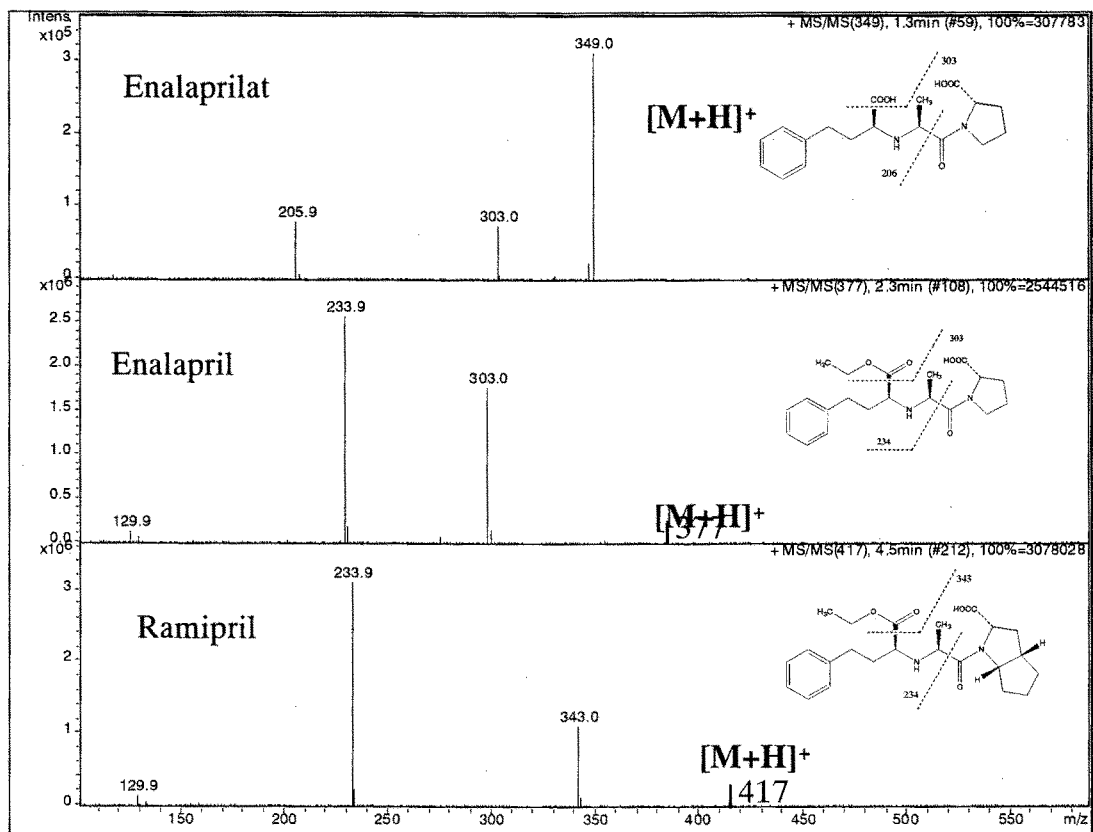


Fig. 7. MS/MS product ion mass spectra of enalapril (A), enalaprilat (B), and ramipril (C)

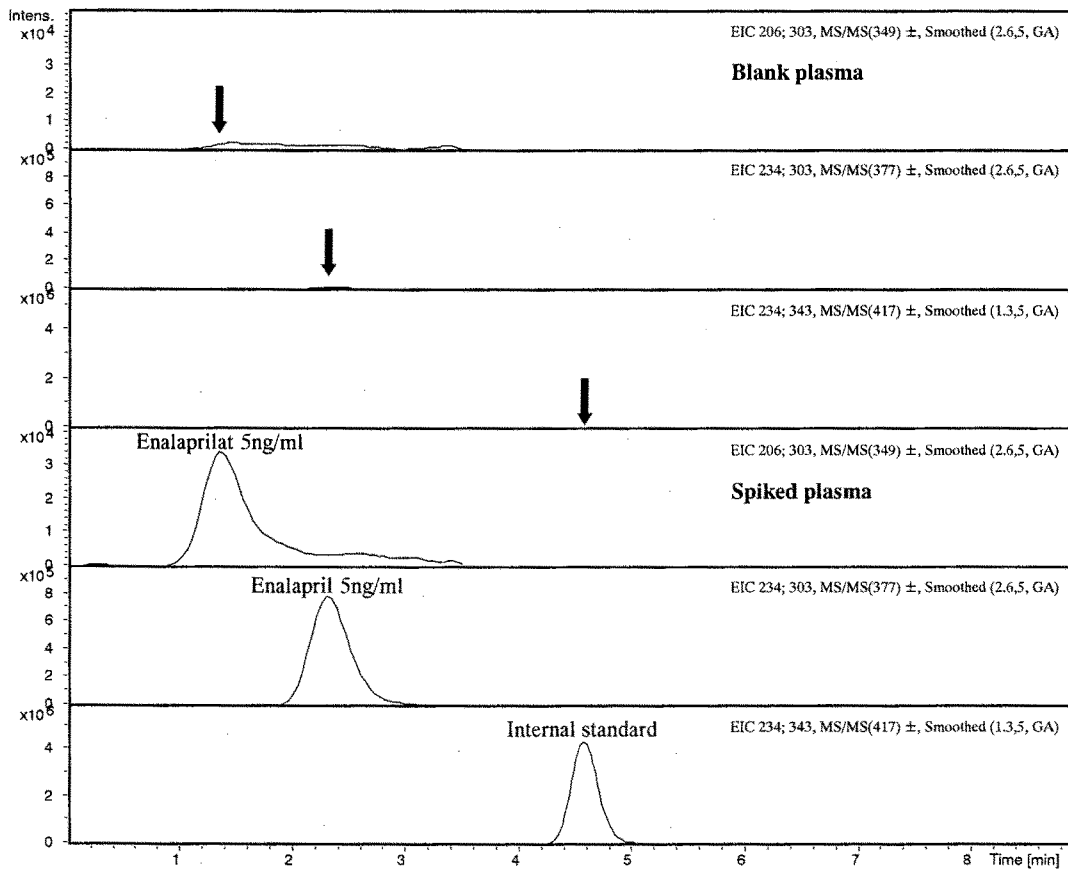


Fig. 8. MS/MS product ion chromatograms of blank plasma and plasma spiked with 5 ng/ml of enalapril and enalaprilat.

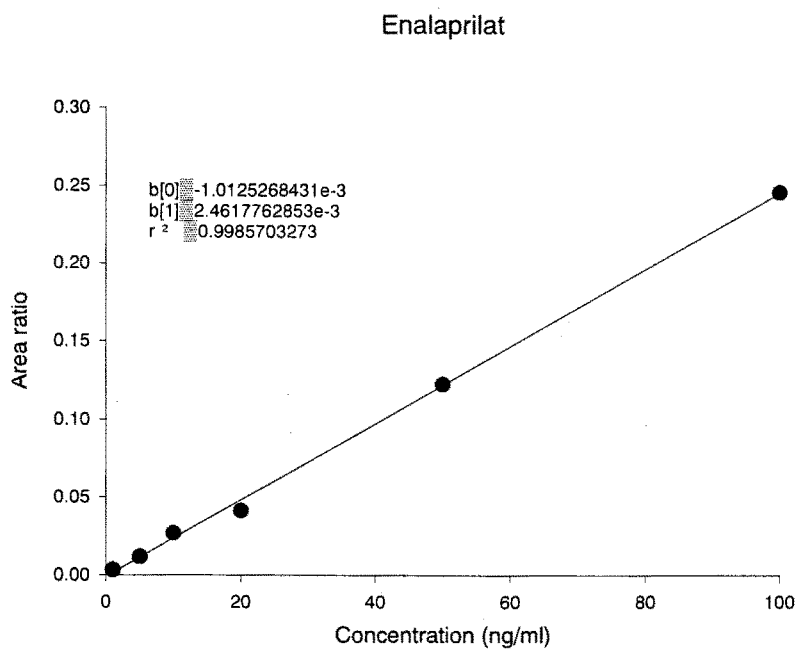
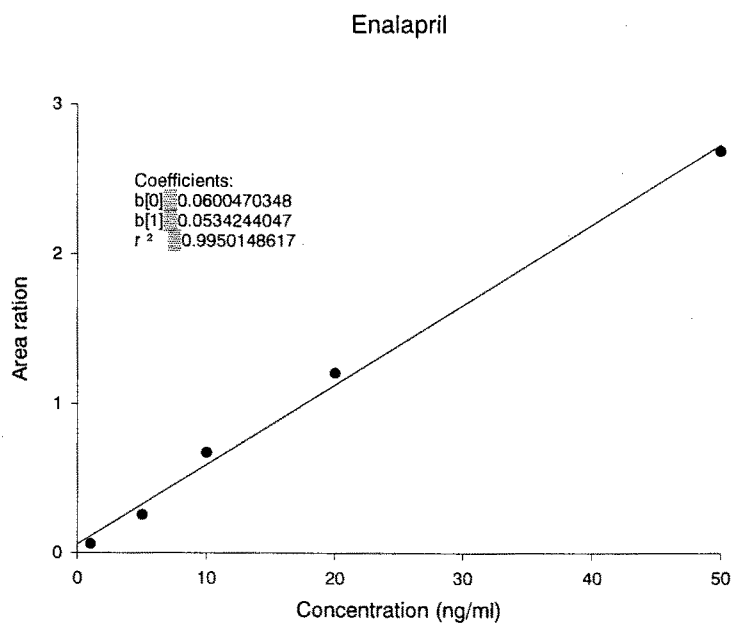


Fig. 9. Standard calibration curve of enalapril and enalaprilat.

### 제3절 GC/MS를 이용한 혈중 tizanidine 분석

#### 1. 서론

Gas chromatography/mass spectrometry를 이용한 분석방법은 여러 가지 분석방법 중에서도 특유의 resolving power와 높은 감도를 가지고 있어 volatile 화합물뿐만이 아니라 생체 시료에서의 약물 분석등에 광범위하게 사용되고 있다. 특히 mass selective detector에서 selective ion monitoring (SIM) 이용한 분석 방법은 분석 화합물 자체가 volatile하여야하고 ionization이 잘 되어야한다는 제한점이 있기는 하지만 높은 분석 감도와 뛰어난 selectivity로 인하여 생체 시료내에서 미량성분 분석에 유용하게 이용되고 있다. 본 연구에서는 HPLC로서는 미량 분석이 불가능한 tizanidine을 GC/MSD 방법을 이용한 분석법을 개발 하고자 하였다. Tizanidine (5-chloro-4-(2-imidazolylamino)-2,1,3-benzothiadiazole) 은 중추신경계에 작용하는 근 이완제로서 임상에서 최소한 baclofen이나 diazepam과 동등한 효과를 보여주는 약물을 보고되어 있다. Tizanidine은 경구 생체이용율이 낮으며 간에서 ring hydroxylation 반응등의 대사가 신속히 일어난다고 알려져 있다 따라서 혈 중 tizanidine 농도는 수 ng/ml도이며 생체내 pharmacokinetics 실험등을 위하여서는 감도가 높은 분석방법의 개발이 요구되고 있다. 현재까지 생체 시료에서의 분석은 주로 radioimmunoassay를 이용하여 수행되어 왔으며 다른 기기분석적인 방법은 보고되어 있지 않고 있다. Radioimmunoassay는 감도는 우수하나 항체의 cross-reactivity등으로 인하여 tizanidine과 대사체를 구분할 수 없으며 따라서 정확한 혈장 내 tizanidine 정량에는 그 사용이 제한적이다. Yizanidine은 cyclic guanidine moiety를 함유하고 있으며 따라서 두 개의 tautomer로 존재한다. 이러한 tautomers에 있어서 chromatographic 성질이 나쁘고 따라서 혈 장내 수 ng 수준의 약물 정량을 위하여서는 imidazole moiety의 nitrogen을 protection 시켜야 한다. 본 연구에서는 trimethylsilylation 후 GC-SIM-MS를 이용하여 혈장내 tizanidine을 분석하는 방법을 개발하고자 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 과정으로



2회 반복하여 유기층을 pool한 다음 magnesium sulfate를 넣어 수분을 제거하고 nitrogen 가스하에서 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 30°C/r 230°C까지 증가시켰으며, 이후에는 분당 15°C씩 300°C까지 증가시켰다. Transfer line의 온도는 290°C를 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 반응 시간에 관계없이 mono-TMS와 di-TMS 유도체가 혼합되어 생성되어 정량에 사용하기에 적절하지 않았다. 이에 반하여 MSTFA의 경우에는 70°C에서 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 Fig 11에 나타내었다. 모든

spectra에서 TMS 유도체는  $[M]^+$ ,  $[M-15]^+$ ,  $[M-35]^+$  그리고  $[M-184]^+$ 의 특징적인 fragment pattern을 보여주었다. 혈장의 background을 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  $^{13}C$ -NMR 결과는 table 2에 나타내었으며, 3.44-3.67 ppm의 multiplet ( $^1H$ -NMR)은 2개의 imidazole의 methylene group으로 assign되었다.  $^{13}C$ -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 ethylacetate로 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 보았으며 상관계수 0.999의 우수한 직선성을 보여주었으며, Intra-day variation과 inter-day variation은 table3에 나타내었다. RSD는 1.5에서 6.9%사이로, 그리고 정확도는 99.2%에서 110.3%로 본 방법을 이용하여 혈장내 tizanidine을 분석하기에는 합리적이라 사료된다.

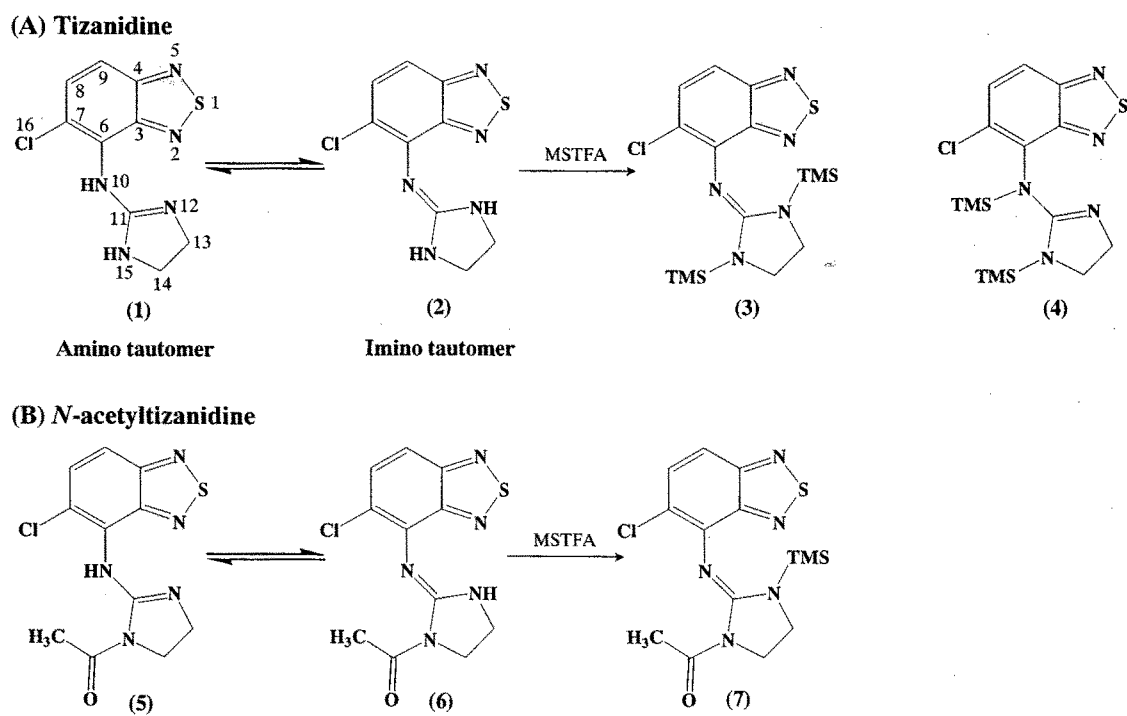


Fig. 10. Structures of (A) tizanidine and 12,15-di-TMS-tizanidine and (B) *N*-acetyltizanidine and its TMS derivatives.

Table 2 <sup>1</sup>H-NMR and <sup>13</sup>C-NMR data of *di*-TMS-tizanidine

Position	Chemical shift (ppm, )	
	<sup>1</sup> H-NMR	<sup>13</sup> 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 <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	0.003 (s, 18H)	0.09
3N-Si(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>		

Solent: CDCl<sub>3</sub>; s=singlet, d=doublet, m=multiplet

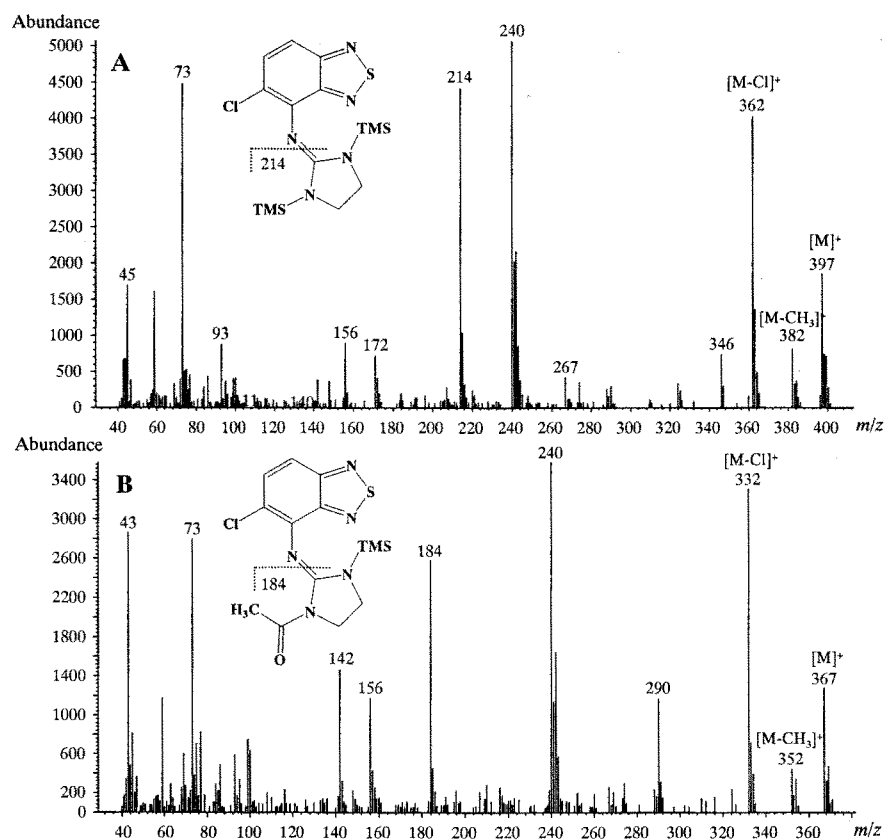


Fig. 11. Scan spectra of (A) 12,15-di-TMS-tizanidine and (B) 12-TMS-15-acetyltizanidine

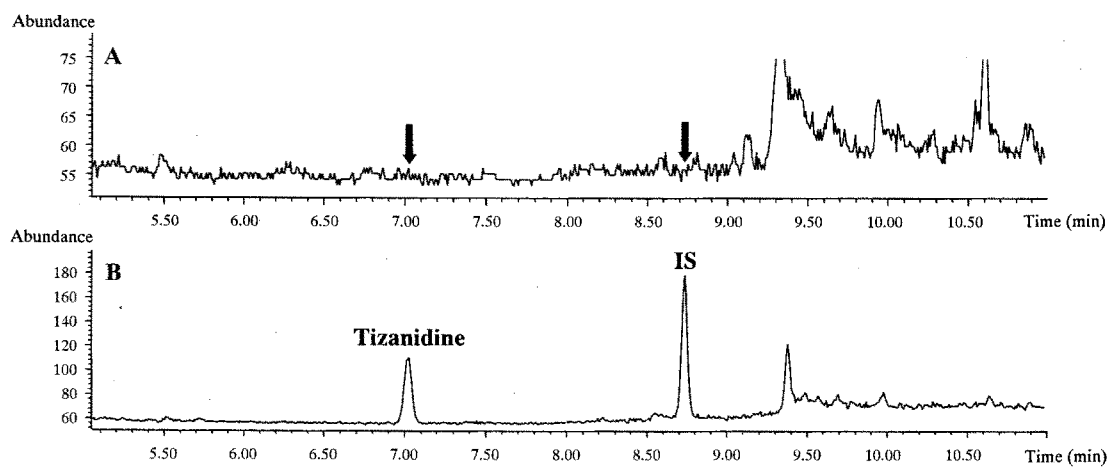


Fig. 12. Selected ion chromatograms of (A) blank human plasma and (B) plasma spiked with internal standard (10 ng/ml) and tizanidine (5 ng/ml). separated on Ultra-1 (17 m × 0.20 mm I.D., 0.25 m film thickness) column system. The oven temperature was held at 210°C for 1 min and programmed to 230°C at a rate of 3°C/min, then to 300°C at a rate of 15°C/min.

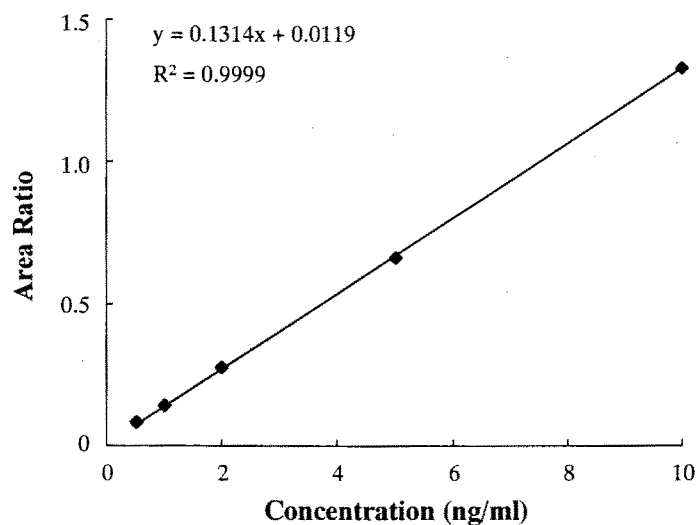


Fig. 13. Calibration curve for GC-SIM-MS quantitation of tizanidine in human plasma. Each standard was prepared in triplicate and injected.

Table 3 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

## 제4절. Column-switching HPLC를 이용한 taxol의 분석

### 1. 서론

항암제로 사용되고 있는 Taxol은 난용성과 낮은 생체이용율로 인하여 경구투여제로서는 사용되지 않고 정맥 주사제로 개발되어 시판되고 있다. 최근 중국에서는 경구흡수율을 획기적으로 증대한 capsule제제 (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 kinetic시험에서 얻어진 각각의 plasma 200  $\mu$ l에 internal standard로서 butyl-p-hydroxybenzoic acid (100  $\mu$ g/ml in acetonitrile) 10  $\mu$ l을 가하였다. tert-butylmethylether 1ml을 첨가하고 30초간 vortexing과정을 거쳐 시료를 추출하였다. 3000 rpm에서 5분간 원심분리로 유기층을 분리하고, 0.8 ml의 유기층을 취하여 질소 기류 하에서 건조시켰다. 잔사를 80  $\mu$ l의 60% acetonitrile에 녹이고 그 중 30  $\mu$ l를 HPLC에 injection하여 paclitaxel을 분석하였다. HPLC system (Shisheido 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 육방 valve, 그리고 Shisheido-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 나가도록하고, analytical column용출액은 UV detector를 통과도록 하였다. 전처리 column에서 internal standard는 4.1분에서 7.2분에

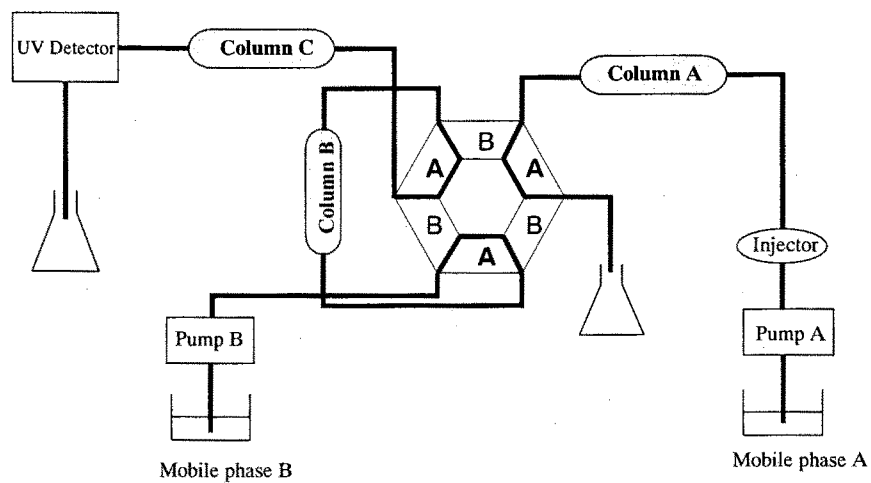


걸쳐, 그리고 paclitaxel은 6.4분에서 9.3분에 걸쳐 용출되므로 4.0분에서 switching valve를 B 위치로 변환하여 전처리 column 용출액이 concentration column으로 흐르도록 하여 시료를 농축하였다. 10분 경과시점에서 switching valve를 다시 A위치로 변환하여, flow를 농축 column에서 analytical column으로 바꾸고 227 nm에서 peak를 모니터링 하였다. 각 chromatogram은 Syscon software (Shiseido)를 이용하여 peak를 정량하였다.

### 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 phase가 동시에 존재하는 column으로서 단백질과 같은 친수성 생체 성분에 의한 방해물을 최소화시켜준다. 따라서 혈장을 전처리 과정을 거치지 않고 직접 column에 주입할 수 있다. 본 시험에서 사용한 column-switching의 diagram은 Fig. 14에 나타내었으며 1차 column에서 taxol이 분리되어 나오는 7분을 중심으로 shdcnrcolumn으로 peak를 농축시키고 1차 column에서 taxol peak가 모두 용출되는 시간에 flow를 2차 column으로 변화시켜 C18 2차 column에서 taxol이 분리되어 나오도록 하였다. 이와 같은 방법을 사용 시 taxol peak는 Fig 15에 나타낸 바와 같이 24.6분에 용출되었으며 taxol peak 근처에 방해 peak가 나타나지 않았다. 본 방법의 정량성을 검증하기 위하여 0.05에서 10 ug/ml 농도사이에 직선성을 검증하여 보아보았다. Fig. 16에서 보는바와 같이 taxol은 상기 농도 범위 내에서 0.999의 상관계수를 나타내어 이 농도범위 내에서 혈장중 taxol 정량에 적용할 수 있었다.

### Valve position A



### Valve position B

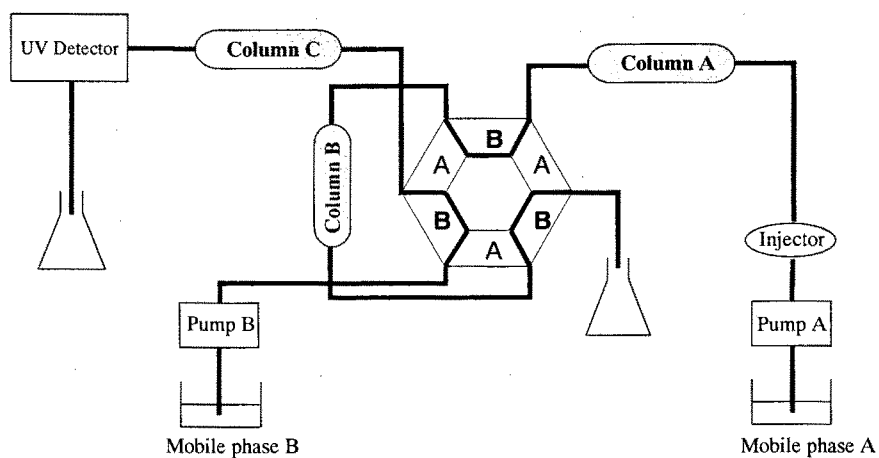


Fig. 14. Flow diagram of column switching HPLC used for quantitation of taxol

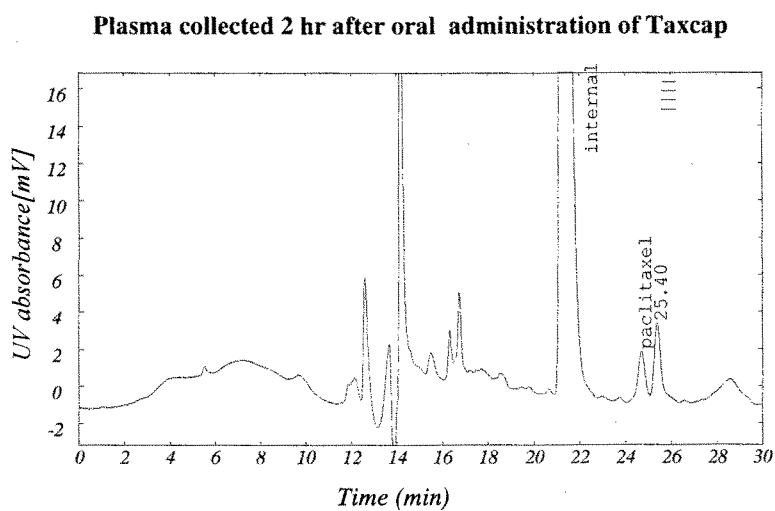
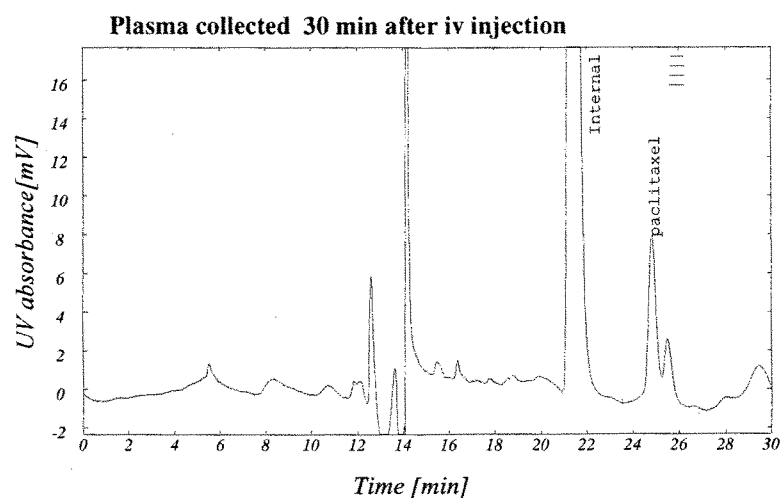


Fig. 15. HPLC chromatograms of blank plasma, plasma spiked with 0.3 ug/ml paclitaxel, plasma collected 30 min after single iv injection (2 mg/ml), and plasma collected 2hr after oral administration of Taxcap (20mg/ml)

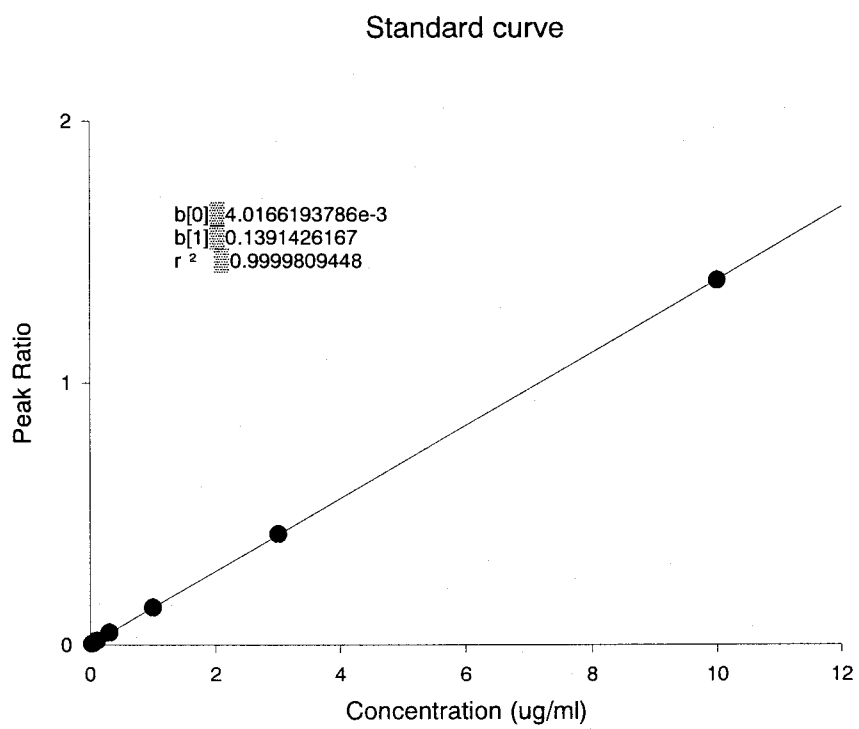


Fig. 16. Calibration of paclitaxol in rat plasma.

여 백

## 제5장: 방사성 동위원소를 이용한 대사 연구

여 백

## 제1절: 서론

신약 개발에서 방사성 동위원소를 이용한 ADME 연구는 radioisotope의 뛰어난 selectivity와 tracing의 용이성으로 대사 profile 및 체내 약물의 추적에 매우 요이한 관계로 임상 시험전에 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 개발하고자 하였다.

## 제2절 시험 방법

### 1. 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.

### 3. 투여 방법

시험 하루 전날 밤부터 시험동물을 절식시킨 후 다음날 아침에 랫드용 존대를 이용하여 강제 경구 투여하였다.

### 4. 시험액

$^{14}\text{C}$ -L-FMAU에 cold L-FMAU를 첨가하여 specific activity를 6.57 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$ 가 되도록 조정된 다음 생리식염수로 5 mg/ml의 농도가 되도록 시료를 제조하였다.

### 5. 방사능 측정법

노, 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 풍건 하였고, 간 등 중량이 큰 조직은 동량의 생리식염수를 첨가하여 균질화한 후 일부분을 취하여 combustion pad상에서 풍건하였다. 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.

## 6. 분포시험

랫드를 각 그룹 당 4마리씩 L-FMAU를 20 mg/kg 용량으로 단회 경구 투여한 후 2, 8, 그리고 24시간 경과시점에서 랫드를 ether로 마취시키고, cardiac puncture로 혈액을 채취하였다. 그 이후 즉시 복부를 개복하여 간 등의 각 조직을 적출하였다. 적출된 장기는 생리식염수로 세척 후 중량을 측정하였다. 각 조직내의 radioactivity를 측정하여 결과를 ng equivalent L-FMAU/g tissue로 나타내었다.

## 7. 대사 시험

L-FMAU의 대사체 분석은 HPLC-radiospectrometry를 이용하여 분석하였다. Urine과 bile의 경우 0.24  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{l}$ 의 HPLC buffer에 용해하여 그중 30  $\mu\text{l}$ 를 HPLC에 주입하였다. Column은 Ultrasphere C18 (4.6 x 25 cm, 5  $\mu\text{m}$ , Beckman)을 사용하였으며, 용매는 50 mM ammonium phosphate (pH 2.0) (Solvent A)과 acetonitrile (solvent B)를 이용하여 gradient 분석을 하였다. 먼저 100% 용매 A에서 시작하여 15분까지 용매 B를 20%로 그리고 30분까지 용매 B를 70%를 증가하였으며, 35분까지는 용매 B의 조성을 70%로 유지하였다. 이때 flow는 1.0 ml/min으로 하였으며 peak 검출은 261 nm에서 하였다. 이 조건하에서 L-FMAU는 18.1분에서 검출되었다. Radioactivity를 검출하기 위하여서 Radio-flow detector ( $\beta$ -Ram,

IN/US system)를 UV 검출기 뒤에 장착하였으며, solid cell (CaF, 100  $\mu$ l)을 이용하여 radioactivity를 모니터링하였으며 결과는 B2 processor (IN/US system)를 이용하여 분석하였다.

## 8. 배설시험

랫드를 각 그룹당 4마리씩 L-FMAU를 20 mg/kg 용량으로 단회 경구 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.

## 9. 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 놓힌 후 dry ice로 cooling 시킨 hexane bath에서 냉동시키고, solvent를 휘발시키기 위해 -20 $^{\circ}$ 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 $\mu$ m두께의 박편으로 잘라 냈다. 잘라낸 section은 -20 $^{\circ}$ C에서 3일간 건조시킨 후 상온에서 하루 방치했다가 BAS 2000 image analyzer를 이용하여 intensity를 정량하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. L-FMAU의 조직 분포 및 대사

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 조직내의 radioactivity를 측정하였으며, 그 결과는 Table 1에 나타내었다. 투여 2시간 후 조직 분포를 살펴보면 소화기관내에 많은 양이 존재하고있으며, 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 비교시 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.

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

#### 3. 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.2-4 에 나타내었다. Urine, plasma, 그리고 bile 모두에서 1개의 대사체 (M1)가 검출되었으며 상대적인 양은 Table 에 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.

#### 4. 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 생체이용률이 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.

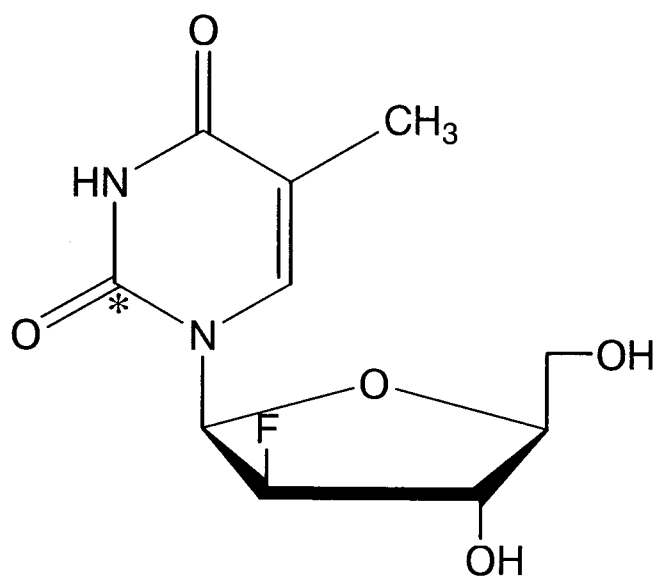


Fig 1. Structure of L-FMAU

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  $^{14}\text{C}$  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 <sup>14</sup>C 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.

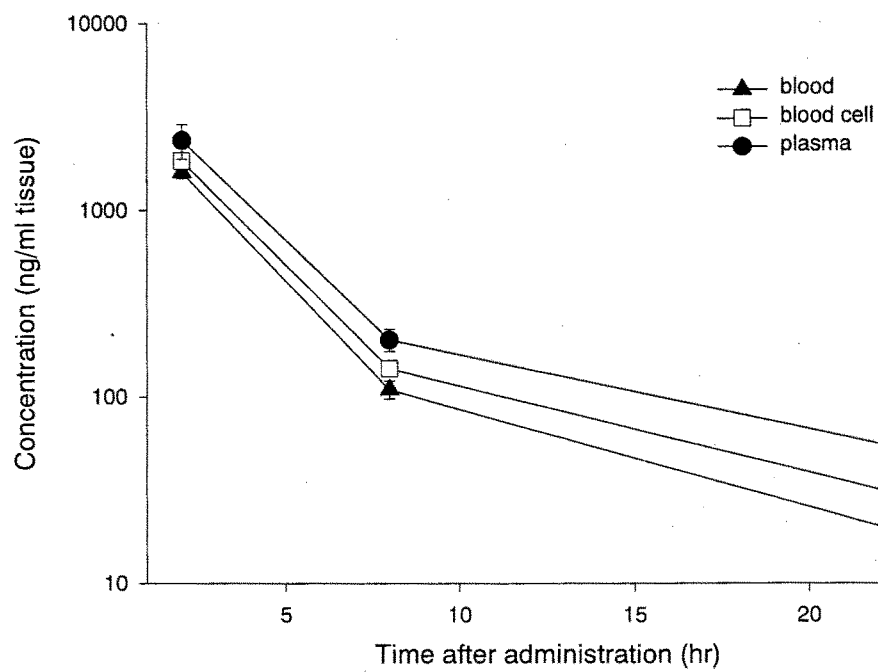


Figure 2. Distribution of radioactivity in blood after oral administration of 20mg/kg <sup>14</sup>C-L-FMAU to male rats.

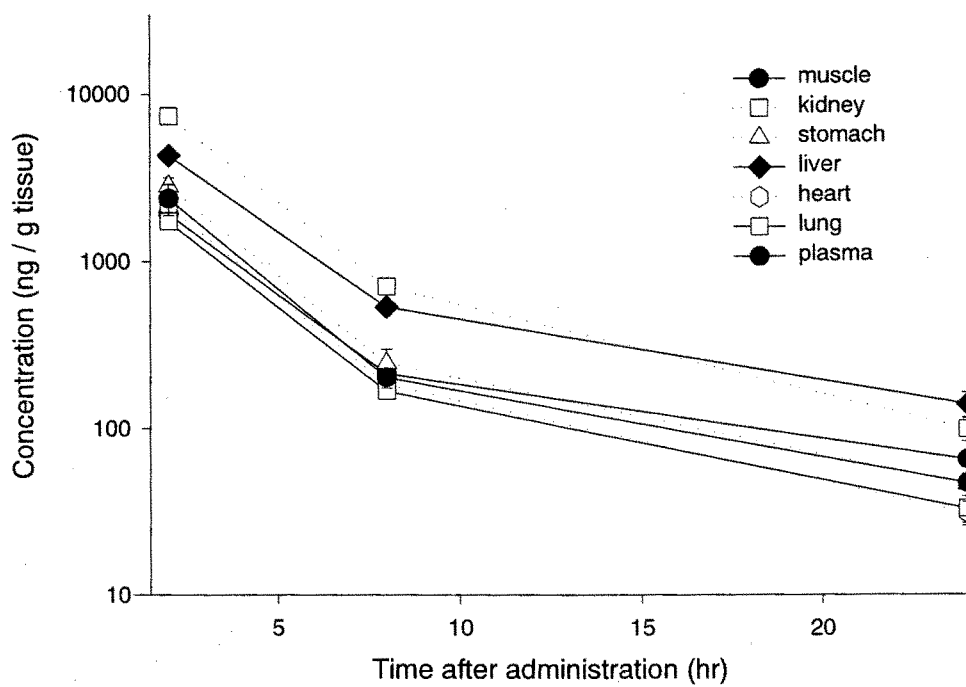


Figure 3. Organs and tissue distribution of radioactivity after oral administration of 20mg/kg <sup>14</sup>C-L-FMAU to male rats.

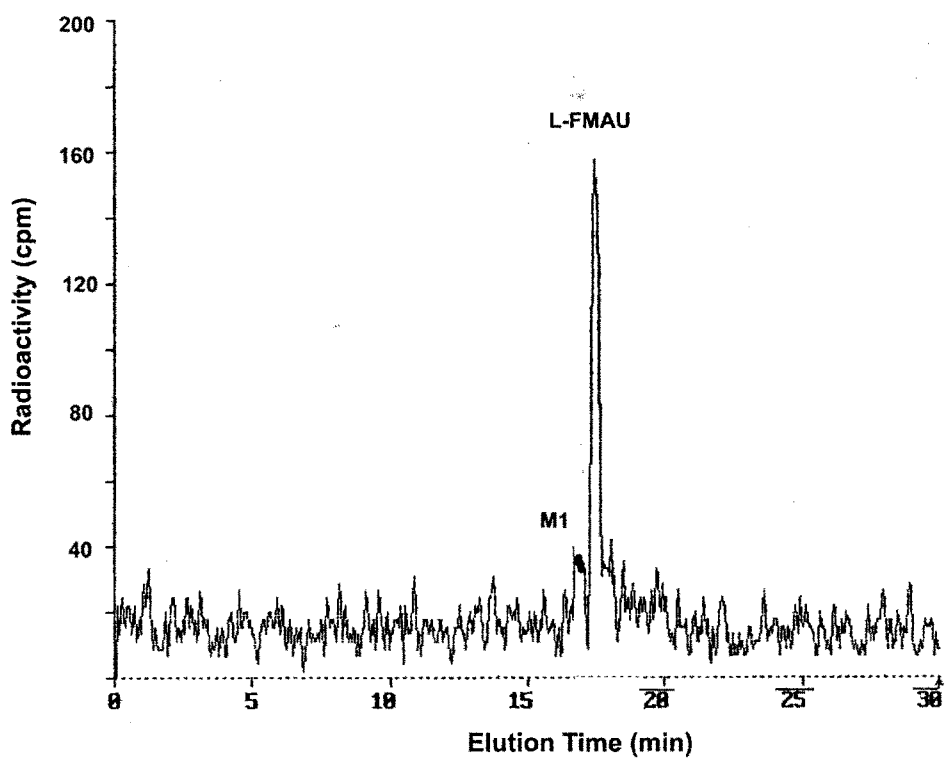


Figure 4. HPLC chromatogram of plasma obtained 2hr after oral administration of  $^{14}\text{C}$ -L-FMAU

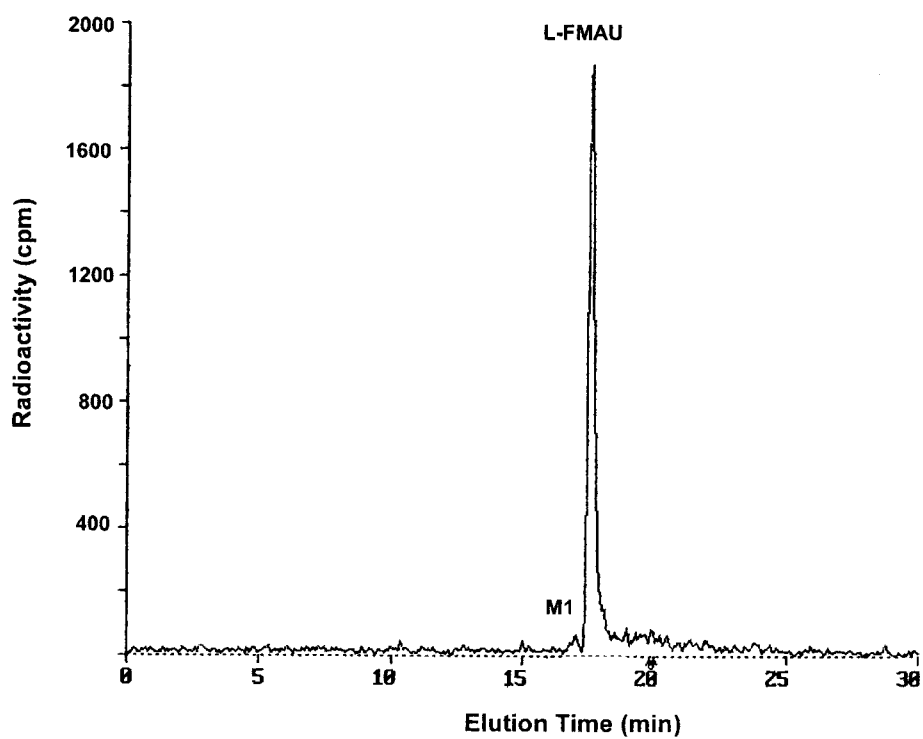


Figure 5. HPLC radiochromatogram of rat urinary L-FMAU and metabolite

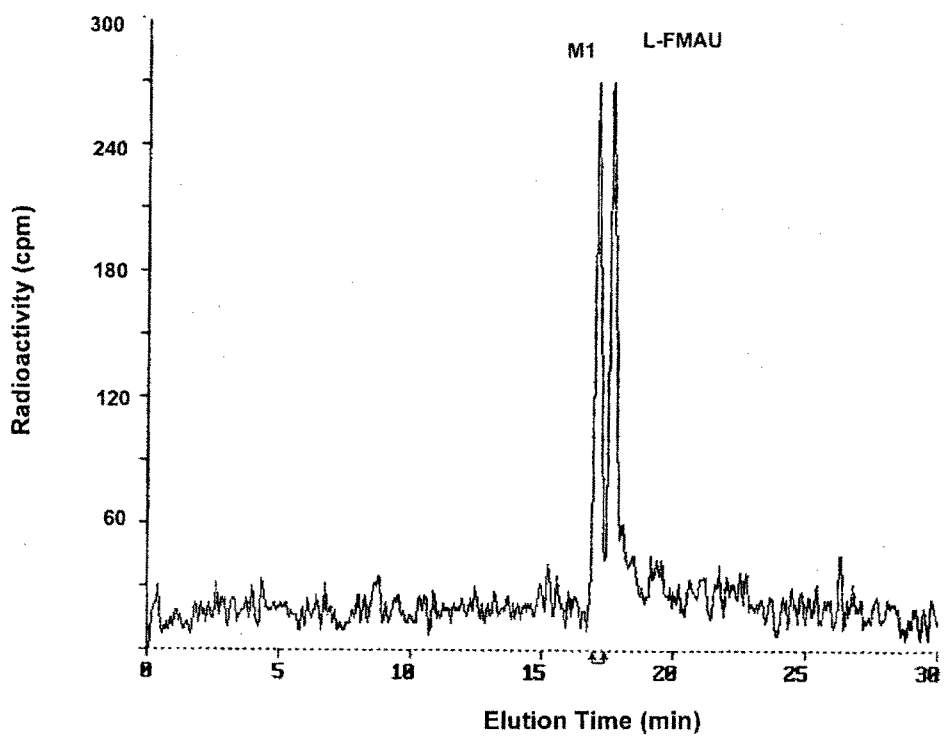


Figure 6. HPLC radiochromatogram of rat biliary L-FMAU and metabolite

## Wholebody autoradiography

Telmesteine의 체내 분포를 image로 보기 위하여  $^{14}\text{C}$ -telmesteine을 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  $\mu\text{m}$ 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 telmesteine의 조직 affinity가 낮다는 것을 의미한다. 조직 내에서의 분포는 highly perfused 기관인 간, 신장, 그리고 비장에서의 radioactivity가 상대적으로 높게 측정되었다 (table 5). 뇌와 eyeball에는 radioactivity가 거의 검출되지 않았으며 이는 뇌혈관 관문 transport는 거의 일어나지 않는다는 것을 시사한다. Wholebody autoradiography에서의 radioactivity 분포는 조직을 분리하여 radioactivity를 측정한 분포시험 결과와 일치함을 보여주고 있다.

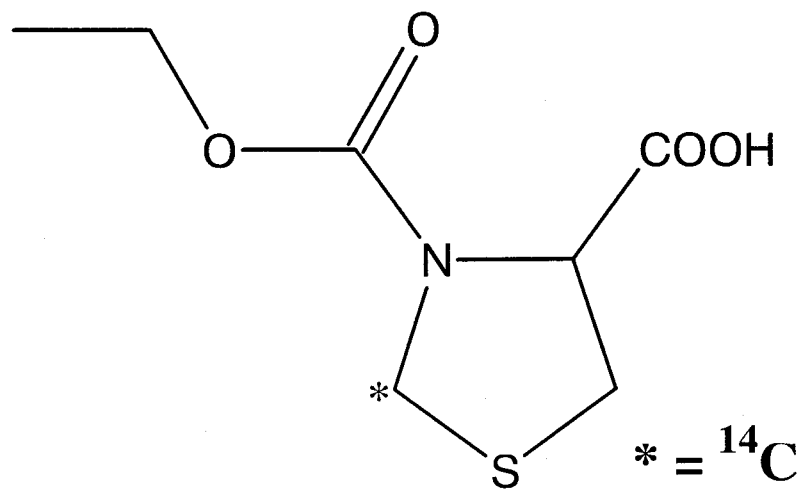


Fig. 7 Structure of telmesteine



**kidney line section**

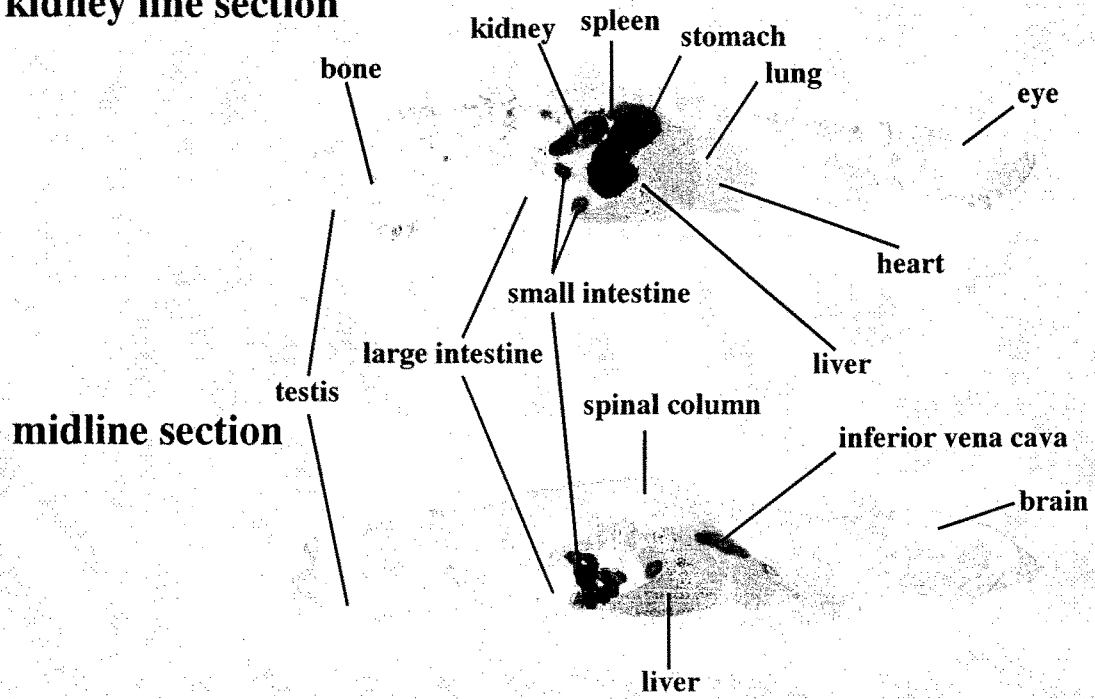


Fig. 8. Whole body autoradiography of rats after oral administration of  $^{14}\text{C}$ -telmestaine

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

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

여 백

## 제6장: 대사 profile 및 구조 분석

여 백

## 제1절: 서론

화학물질이 (drug, chemicals, toxicant food additive 등) 체내로 유입시 대사과정을 거쳐 체외로 배설되며 어떤 경우는 독성 대사체가 생성되기도 한다. 따라서 약물의 체내동태는 약효 발현 및 독성 규명을 위하여 대사에 관여하는 약물대사 효소 및 대사기전에 관한 연구가 절대적으로 필요하게 된다.

생체내에서의 약물대사 과정은 크게 2가지로 분류되며 산화반응을 통하여 polar 대사체로 대사시키는 phase I 반응과 이들 대사체를 체외로 배설시키기 용이하게 glutathione, sulfate, glucuronide 등과 conjugate를 형성하는 phase II 반응으로 대별된다. 그중에서도 phase I 반응은 주로 cytochrome P450(CYP)과 peroxidase가 주로 관여하는 독성물질 또는 약물을 inactivation 시키나 종종 metabolic activation을 통하여 활성 대사체가 생성되어 약효 또는 독성을 유발하기도 한다. Phase I 반응의 주요 역할을 하는 cytochrome P450은 주로 간에 존재하며 drug, pesticide, mutagen, toxicants, pollutant 그리고 natural product 등 많은 xenobiotics의 산화적 대사에 관여한다.(Guengerich, 1987; Wislocki et al., 1980) P450 enzyme의 catalytic mechanism, gene structure, regulation, 각 대사 반응에 있어서 개개의 P450의 역할등에 관하여 주로 실험동물을 이용하여 많이 연구되어 독성물질의 작용기전 및 신규의약품의 대사경로 연구 및 체내 약물대사에 관한 이해의 폭을 넓혀 왔다. 그러나 실험동물 model의 연구 결과를 인체의 약물 동태 및 risk assessment에 그대로 적용하는 데는 여러 문제점이 지적되고 있다.

그 이유로는 첫째, 설치류에 있어서 P450 enzyme의 sexual dimorphism을 들수 있으며 이는 인체에 있어서 성간의 pharmacokinetic difference가 거의 없는 사실에 비추어 상당한 제약점이 될 수 있다. (Giudicelli and Tillement, 1977)

둘째, 실험동물의 각 P450 enzyme이 유도되는 정도가 서로 상이하다는 점이다. 예로서, rat의 경우는 pregnolone-16 $\alpha$ -carbonitrile에 의해 P450 enzyme이 induction되나 rabbit의 경우 induction 정도가 다르다. (Nebert et al., 1981) 또한 매우 유사한 structural gene에 code 되어 있는 orthologous P450 enzyme들의 catalytic specificity도 아주 다르다. 예로서 mouse P1450과 rat의 P450 BNF- $\beta$ 는 sequence가 98% 정도 같으나 warfarin 6-, 또는 8-hydroxylation은 rat P450 BNF- $\beta$ 에 의해서만 일어난다. (Kaminsky et al., 1984) Human

P450(CYP 2C19)은 (S)-mephenytoin 4-hydroxylase로서 이미 sequence가 유사한 rat과 rabbit의 P450 enzyme과 비교하여 볼 때 catalytic activities에서 커다란 차이를 보여줌을 알 수 있다. (Umbenhauer et al., 1987) 이와같은 이유로서 인체에 있어서 약물대사를 보다 명확하게 이해하고 예측하기 위한 human P450 enzyme에 관한 연구가 그동안 biochemical technique와 molecular biology 기술의 발전과 human tissue sample의 획득이 가능함으로써 human P450 protein과 gene의 분리 및 biochemical 한 특성 그리고 catalytic activity에 관한 연구가 진행되어 왔다. 또한 임상시험에서 발견된 약물대사의 polymorphism이 P450 gene의 polymorphism (CYP 2D6, CYP 2C(mephenytoin))에서 기인되며 이들의 population frequency 연구를 통하여 예측될 수 있는 약물의 부작용 방지 및 적정투여 용량등 임상에 있어서도 많이 응용되고 있다. (Mahgoub et al., 1977; Idle, 1988)

신약개발의 측면에 있어서는 약물 대사 경로 및 대사체 구조 규명은 부적절한 pharamcokinetics 성질을 개선하고 독성이 낮은 안전한 약물의 설계를 위하여서 반드시 요구된다고 할 수 있다. 체내에서 어떠한 효소에 의하여 구조가 변하며 또한 대사체의 구조가 어떤지를 명확히 규명하고 이를 바탕으로 대사 속도의 조절과 필수적인 pharamcophore가 대사 효소에 의하여 변형되지 않도록 새로운 화합물의 설계가 가능하여 진다. 약물대사체 규명과 관련 대사효소의 확인은 기존의 시판 약물 또는 타 약물과 병용 투여 시 흔히 나타나는 약물 상호 작용을 예측할 수 있으며 따라서 약물상호작용에 의한 심각한 부작용을 사전에 방지하기 위하여서도 연구가 이루어져야 한다. 본 연구에서는 모델 약물로 근 이완제로 사용되고 있는 eperisone과 natural flavonoids를 선택하여 대사 경로 및 대사체의 구조를 규명하고자 하였다. Eperisone (4'-ethyl-2-methyl-3-piperidinopropiophenone hydrochloride)은 합성 근 이완제로서 경구 투여시 생체 이용율이 매우 낮은 (약 5%) 약물로 알려져 있다. In vitro permeability 시험에서 membrane 투과도는 높은 것으로 판명되어 이러한 낮은 생체 이용율은 대사 속도가 매우 높아 hepatic 또는 intestinal first-pass effect에 기인된다고 사료된다. 따라서 본 연구에서는 in vitro microsomal incubation 시 그리고 rat과 human에 경구로 투여 시 urinary metabolites의 구조를 규명하고 관여 효소를 확인함으로써 낮은 bioavailability 원인을 규명하고 타 약물과의 상호작용 가능성을 알아 보고자 하였다.

## 제2절: 실험 방법

### 1. Human liver microsome의 제조

Human liver slice는 모두 virus infection test를 통과한 시료로써 Dr. F.P. Guengerich(Vanderbilt Univ.)로부터 기증받았으며 -80°C에서 보관하였다.

Microsome은 Guengerich 등이 사용한 분획 원심 분리법을 이용하여 제조하여 -70°C에서 보관하였다. 단백질량은 Lowry의 방법으로 bovine serum albumin을 표준시료로써 사용하여 측정하였다.

### 3. *in vitro* metabolism 연구

Microsome 0.5mg과 0.1M potassium phosphate(pH7.4), 100uM eperisone의 혼합물을 37°C에서 3분간 preincubation시킨후 NADPH generating system(0.01M glucose 6-phosphate, 1unit glucose 6-phosphate dehydrogenase, 0.5mg/ml  $\beta$ -NADP<sup>+</sup>)을 첨가하여 전체 반응혼합물의 volume을 0.5ml로 하였고 37°C에서 2시간동안 배양하였다. 1N HCl 25 $\mu$ l를 첨가한 후 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1ml을 첨가하여 vortex한 후 3000rpm에서 10분간 원심분리한 후 0.8ml의 유기용매 층을 회수하고 나머지 반응물은 1ml의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 넣어 추출과정을 한번 더 반복한 후 유기층을 합하여 N<sub>2</sub> stream으로 건조하였다. 잔류물을 200 $\mu$ l의 methanol에 녹인 후 그중 20 $\mu$ l를 HPLC로 분석하였다.

### b) HPLC 분석

Agilent HPLC 1100 system을 사용하여 분석하였다.

Column은 Hydrosphere C18(2.0 x 150mm, S-5 $\mu$ m)를 이용하였고 eluent는 20mM ammonium formate buffer (pH4.0)(A)와 acetonitrile(B)이였으며 gradient를 사용하였다. 처음조건은 methanol 40%에서 시작하여 20분간 linear gradient로서 80%로 증가 하였으며 이 조성으로 5분간 더 분석하였다. 용출액은 230 nm에서 검출하였고 또한 mass spectrometer를 이용하여 mass monitoring을 수행하였다.



### 3. In vivo 대사

Eperisone을 50 mg/kg 용량으로 경구로 rat에게 투여하고 12시간동안 metabolic cage를 이용하여 urine과 feces를 수집하였다. 수집된 urine은 원심분리 후 직접 HPLC column에 증비하여 대사체를 규명하였고, feces는 methanol로 추출한 후 추출물을 HPLC로 분석하였다.

인체에서의 eperisone 대사를 규명하기 위하여 건강한 남성에게 5 mg의 eperisone을 경구로 복용시키고 6시간동안 urine을 collection하였다. 수집된 urine은 rat에서와 같은 조작을 통하여 대사체를 분석하였다.

### 4. 대사체 구조 규명

대사체의 구조 규명은 LC/MSD Trap (Agilent, Palo Alto, USA)를 이용하여 분석하였다. HPLC 용출액을 electrospray ionization interface로 흘려가게 하였으며 이때 nebulizing은 350°C nitrogen gas를 10 l/ml로 하여 주었다. Trap 조건은 CapEx voltage는 124 V로 scan은 50에서 2200 m/z로 하였으며 daughter ion spectrum은 helium gas를 이용하여 얻었다. 먼저 molecular ion을 monitoring하고 blank 시료와 비교 분석한 후 대사체 분자량을 얻고 다시 product ion mass spectrum을 얻어 구조 규명을 수행하였다.

### 제3절: 결과 및 고찰

Eperisone을 rat 또는 human liver microsome과 반응한 후 대사체 생성 유무를 HPLC/MS를 이용하여 분석하였다. In vitro incubation에서는 rat과 human microsome 모두에서 5-7 개의 대사체가 생성되었으며 metabolic rate는 20 ng eperisone/mg protein/min으로 상대적으로 신속히 일어나는 것으로 판명되었다. Rat liver microsome과 human liver microsome에서의 대사차이를 보여주고 있으며 rat의 경우 M12, M16, 그리고 M20가 major 대사체로 생성되었으며, human의 경우는 M12, M15, 그리고 M16이 major 대사체로 판명되었다. 두 종간의 정성적인 차이는 보여주지 않고 상대적인 대사 profile만 달라 종간의 차이는 보여 주지 않았다. 각각의 대사체의 구조를 규명하기 위하여 ESI mass spectrum을 얻고 분자량을 확인하였다. M12는 protonated molecular ion  $[M+H]^+$  m/z 278이었으며 fragment ion 은 m/z 260, 98로 나타났다. 분자량이 18 증가한 것은 carbonyl group이 reduction되어 분자량이 2증가하고 분자량 16증가는 hydroxylation 반응에 기인된 것으로 알수 있다. Hydroxylation 위치는 fragment ion m/z 98은 piperazine moiety에서 유래 되므로 piperazine moiety는 대사를 받지 않았으며 4'-ethyl bezyyl moiety에 있는 ethyl group의 terminal carbon hydroxylation반응이 일어난 것으로 추정된다. 이는 eperisone의 major 대사체가 side chain hydroxylation 반응이란 발표된 논문에 근거하여 추론된다. M15과 M16은 protonated molecular ion  $[M+H]^+$ 가 m/z 276으로 두 대사체 모두 hydroxylation 반응이 일어난 것으로 추정된다. M16은 eperisone의 side chain hydroxylation 반응이 일어나 4'-hydroxyethyl-2-methyl-3-piperidinopropiophenone hydrochloride로 변환된 대사체로 추정되며 합성 대사체와 HPLC retention time과 mass pattern과 비교하여 확인하였다. 합성된 hydroxy 대사체는 Dr. S. Omori (Chiba Univ.)로부터 제공받았다. M15은 동일한 hydroxylation 반응에 의하여 생성되며 rat microsome에서는 거의 검출되지 않았으며 human liver microsome과 반응시 나타난 대사체로 역시 side chain hydroxylation 반응이 일어나나 hydroxylation 위치는  $\alpha$ -carbon에 일어난 것으로 추정된다. 현재 정확한 hydroxylation 위치를 확인하기 위하여 대사체를 합성 중에 있다. M20는 protonated molecular ion  $[M+H]^+$ 가 262로서 분자량 261로 확인되었다 Eperisone에 비하여 mass unit가 2 증가하여 reduction 반응

이 일어난 것으로 추정되며 carbonyl group이 reduction 된 대사체임을 추정할 수 있다. In vitro microsomal incubation 시 대사에 관여하는 효소를 동정하기 위하여 chemical inhibitor와 purified P450 enzyme을 이용하여 시험을 하였다.

먼저 생성되는 eperisone 대사체가 cytochrome P450에 의하여 생성되는지를 알아보기 위하여 heme을 blocking하는 CO gas를 bubbling하거나 non-specific inhibitor인 SKF-525A를 처리한 후에 생성되는 대사체를 분석하였다. SKF-525A는 CO gas 모두 M12, M15, 그리고 M16의 생성을 억제하였으나 M20의 생성에는 큰 영향을 주지 않았다. 따라서 M12, M15, 그리고 M16은 P450-dependent reaction 이라고 결론을 내릴 수 있고 M20 즉 carbonyl reduction 반응은 P450-mediated reaction이 아닌 다른 효소반응이라 할 수 있다. Microsomal reduction 반응에 관여하는 11 beta hydroxysteroid reductase 의 역할을 규명하기 위하여 selective inhibitor인 18 b-glycirretinic acid를 처리한 결과 M15과 M16의 생성은 변하지 않았고 M12와 M20의 생성은 90%이상 억제를 하였다. 이는 eperisone의 carbonyl reduction은 11 beta hydroxysteroid reductase 에 의하여 일어나며 M12의 경우에는 carbonyl reduction 이후에 hydroxylation 반응이 일어나므로 두가지 억제제에 의하여 모두 영향을 받는다고 할 수 있다. M12, M15, 그리고 M16의 생성에 관여하는 cytochrome P450 효소 isozyme을 규명하기 위하여 각 isozyme selective inhibitor를 처리하여 대사체를 정량하였으며 또한 E. coli에 각 P450 isozyme을 발현시킨 membrane fraction을 이용하여 대사연구를 수행하였다. Table 에 나타낸 바와 같이 CYP3A 효소 억제제인 ketoconazole 처리시에는 M15 이, 그리고 CYP2D6 억제제인 quinidine을 처리하면 M16이 감소하였으며, M12와 M20 생성에는 각 selective 억제제가 영향을 주지 못하였다. cDNA expressed membrane fraction과 반응시 CYP1A1과 CYP1A2 효소에 의하여서는 M16 생성이 확인 되었으며, 따라서 효소에서는 detectable activity가 확인되지 못하였다. 위의 결과를 종합하여 보면 M15은 CYP3A효소, M16은 CYP1A효소와 CYP2D6, 그리고 M20 는 11 beta hydroxysteroid reductase 효소가 관여한다고 결론을 내릴수가 있다.

In vivo에서의 eperisone 대사를 규명하고자 eperisone을 20 mg/kg 용량으로 rat에 경구 투여하고 초기 12시간 동안 urine을 collection 하였다. 사람의 경우 건강한 성인 남성에게 5 mg의 eperisone을 경구로 복용시키고 6시간동안 urine을 collection하여 urine으로

배설된 eperisone의 대사체를 HPLC/MS/MS를 이용하여 규명하였다.

In Vivo로 eperisone을 투여하고 urine으로 배설되는 대사체를 HPLC로 분석하여 얻은 mass chromatogram은 fig 에 나타내었다. Eperisine 대사체는 대부분 urine으로 배설되었으며, parent eperisone은 검출되지 않고 모두 대사체로 배설되었다. rat과 human 사이의 species difference는 크게 보이지 않았으며 두 경우 모두 M5가 major 대사체로 확인되었다. M5는 ethyl side chain 의 terminal carbon이 hydroxylation 되고 carbonyl group이 reduction 된 대사체 (M12)의 glucuronide 대사체로 규명되었다. 또다른 major 대사체로는 ethyl side chain의 terminal carbon이 hydroxylation 된 M16의 glucuride 인 M7으로 나타났다. eperisone은 in vivo에서 대부분 carbonyl group의 reduction, side chain hydroxylation, side chain oxidation, 그리고 piperidine ring hydroxylation 반응이 major 반응으로 규명되었다. 결론적으로 eperisone은 체내로 유입되면 carbonyl reduction이 11 beta hydroxysteroid reductase에 의하여 일어나고 또한 cytochrome P450에 의하여 side chain oxidation 과 piperidine ring hydroxylation 반응이 빠른 속도로 일어나며 결과적으로 낮은 생체 이용률과 clearance가 큰 것으로 유추할 수 있다.

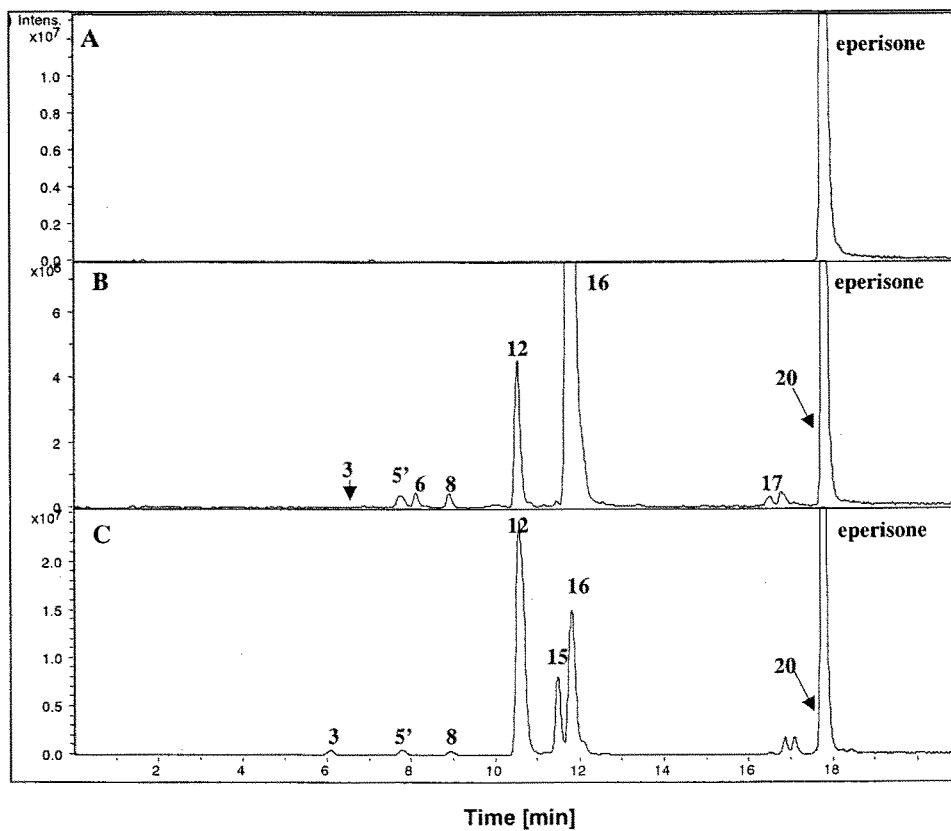


Fig. 1. Mass chromatogram of incubation mixtures after in vitro incubation of eperisone with rat (B) or human (C) liver microsomes.

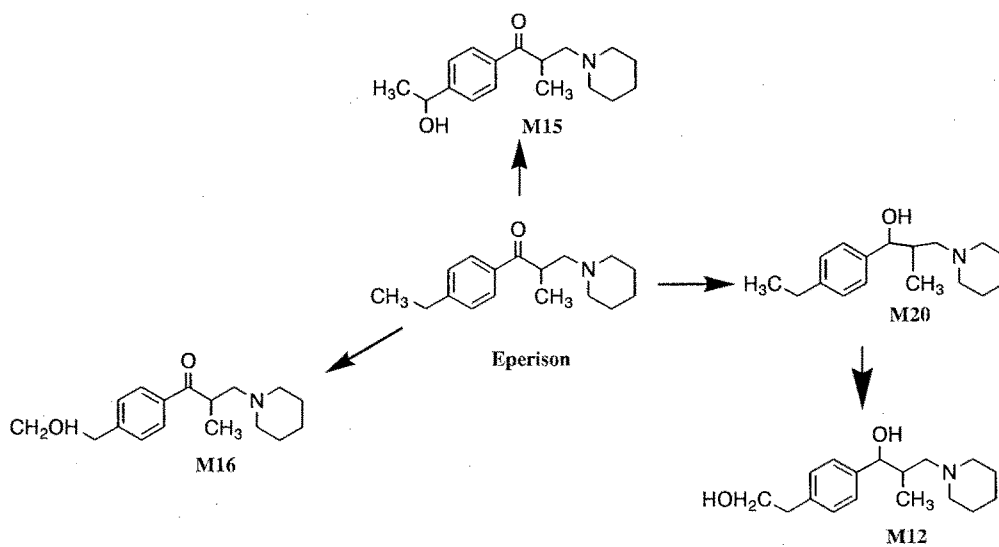


Fig. 2. Proposed in vitro metabolic pathway of eperisone in rats and human

Table1. Effects of selective inhibitors on the formation of eperisone metabolites in human liver microsome

<b>Inhibitors</b>	<b>Percentage of control activity</b>			
	<b>M12</b>	<b>M15</b>	<b>M16</b>	<b>M20</b>
<b>Furafylline (CYP1A2)</b>	<b>84.7</b>	<b>94.0</b>	<b>80.8</b>	<b>109.2</b>
<b>Sulfaphenazole (CYP2C9)</b>	<b>85.0</b>	<b>110.7</b>	<b>105.2</b>	<b>97.2</b>
<b>DEDTC (CYP2E1)</b>	<b>74.9</b>	<b>82.0</b>	<b>87.4</b>	<b>92.1</b>
<b>Quinidine (CYP2D6)</b>	<b>58.1</b>	<b>117.1</b>	<b>24.5</b>	<b>114.4</b>
<b>Ketoconazole (CYP3A4)</b>	<b>70.1</b>	<b>16.4</b>	<b>102.8</b>	<b>109.1</b>

Table 2.

**Effect of inhibitor of microsomal heme, P450 and 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase on eperisone metabolism in human liver microsome**

<b>Inhibitors</b>	<b>Percentage of control activity</b>			
	<b>M12</b>	<b>M15</b>	<b>M16</b>	<b>M20</b>
<b>CO (1bubble/s) (240sec)</b>	<b>26.8</b>	<b>44.3</b>	<b>54.8</b>	<b>95.3</b>
<b>SKF-525A (100uM)</b>	<b>27.2</b>	<b>32.3</b>	<b>34.4</b>	<b>87.1</b>
<b>18β-glycyrrhetic acid (2 uM)</b>	<b>0</b>	<b>95.3</b>	<b>94.9</b>	<b>11.9</b>



Effect of 18beta-glycyrrhetic acid on eperisone metabolism

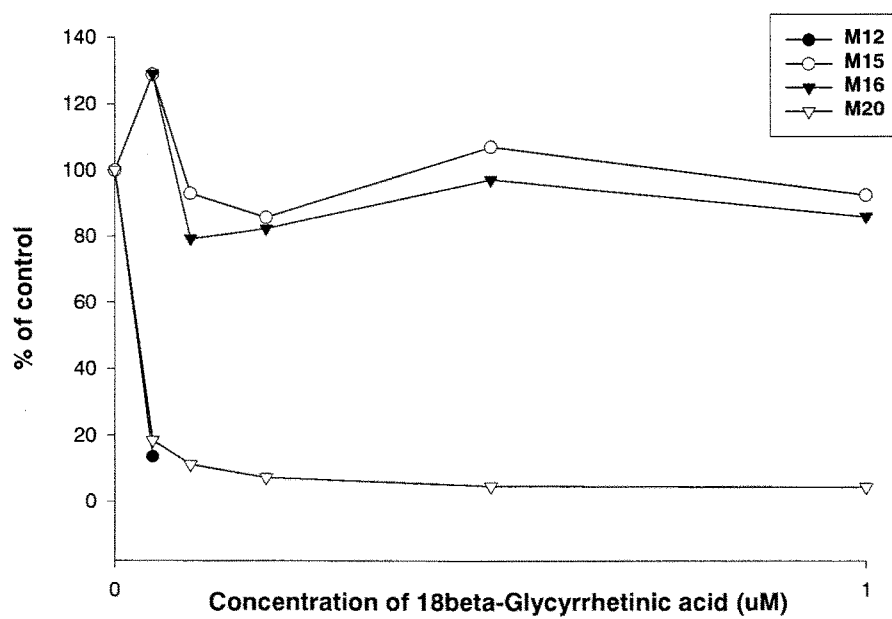
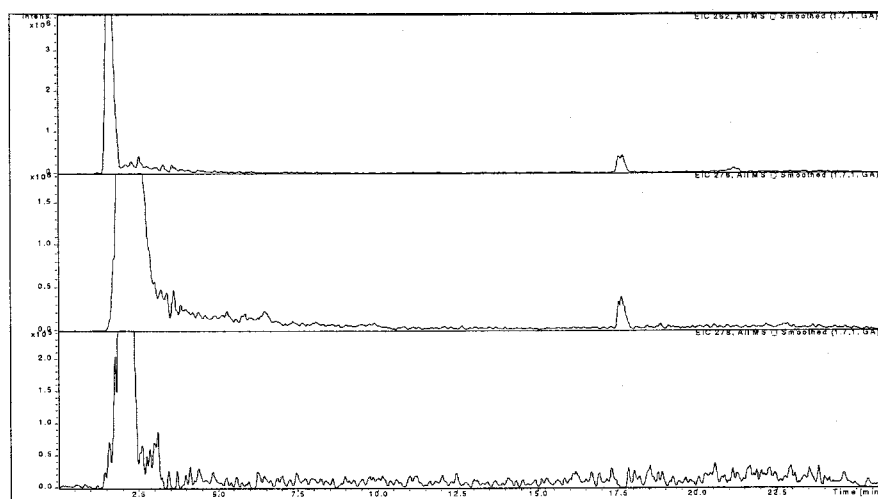


Fig. 3 Effects of 18 b-glycirretinic acid on the formation of eperisone metabolites in human liver microsoems.

(A)



(B)

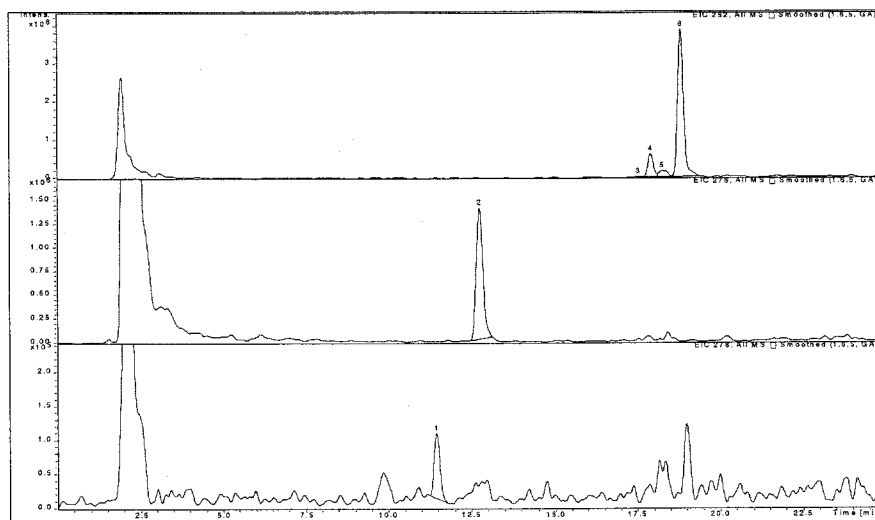


Fig. 4. HPLC mass chromatogram of caco-2 incubation media after 24 hr incubation of eperisone with Caco-2 cells: (A) incubation without cells and (B) incubation with cells.

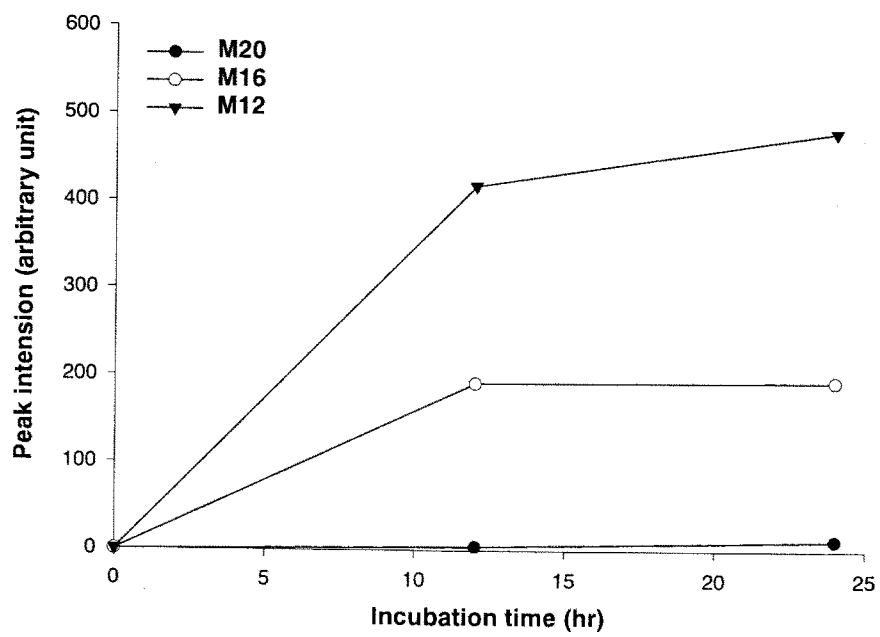


Fig. 5. Incubation time dependent formation of eperisone metabolites in Caco-2 cells.

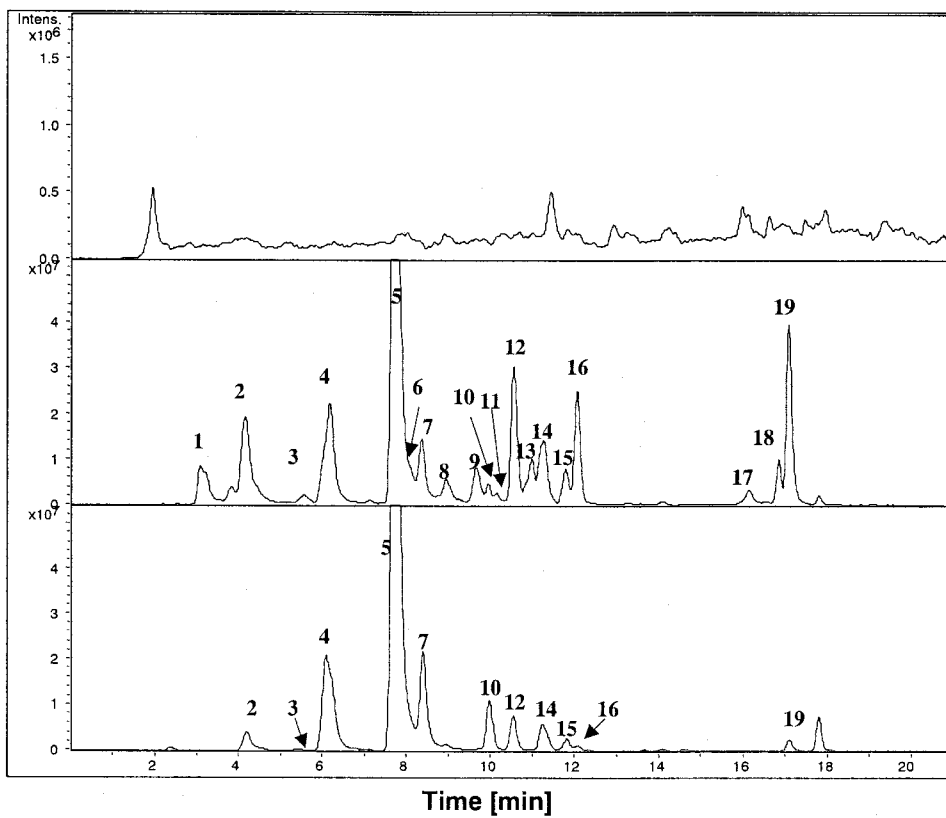


Fig. 6. Reconstructed mass chromatogram of rat and human urine after oral administration of eperisone.

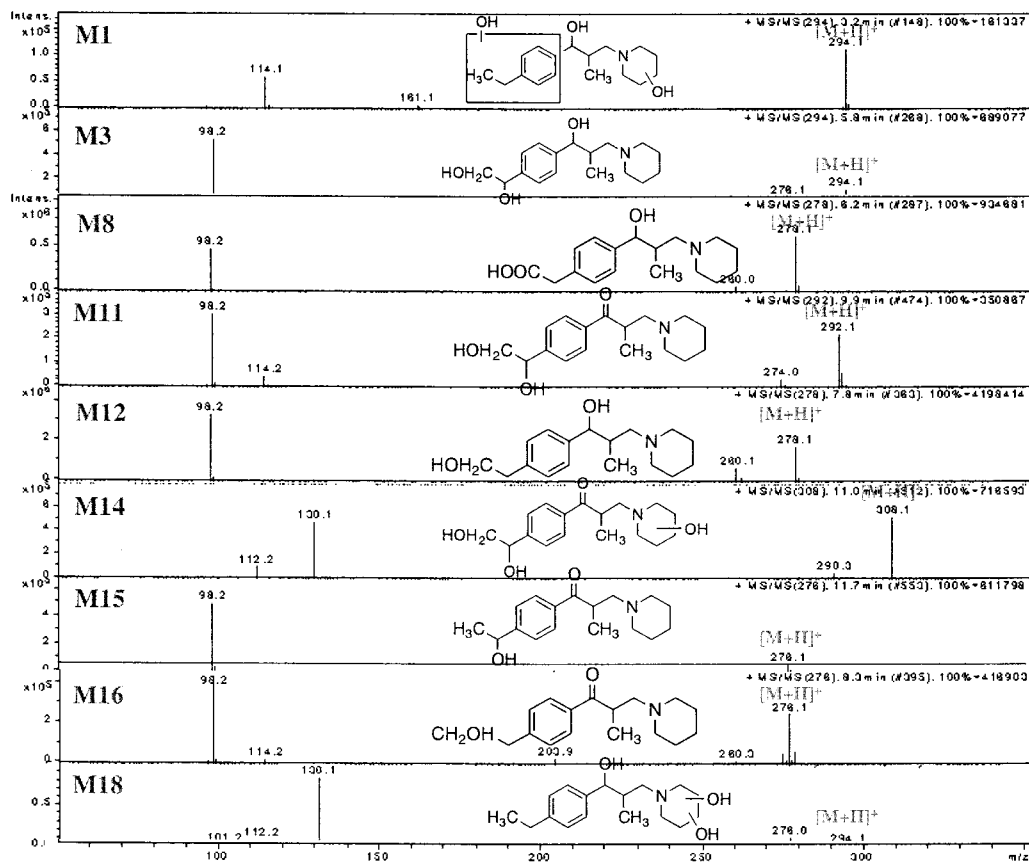


Fig. 7. product ion mass spectra of eperisone metabolites

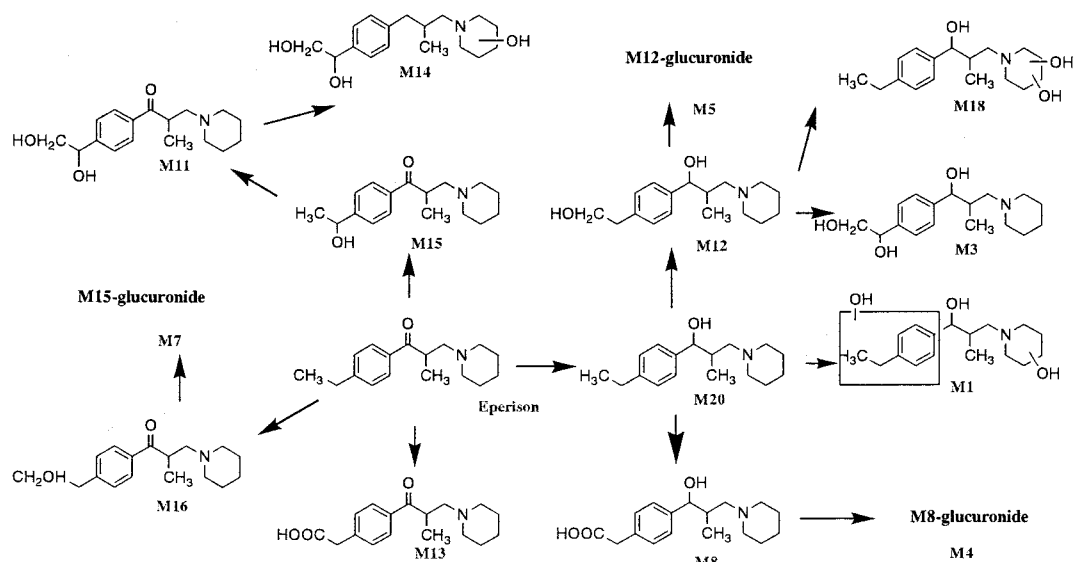


Fig. 8. Proposed in vivo metabolic pathway of eperisone in rats and human.

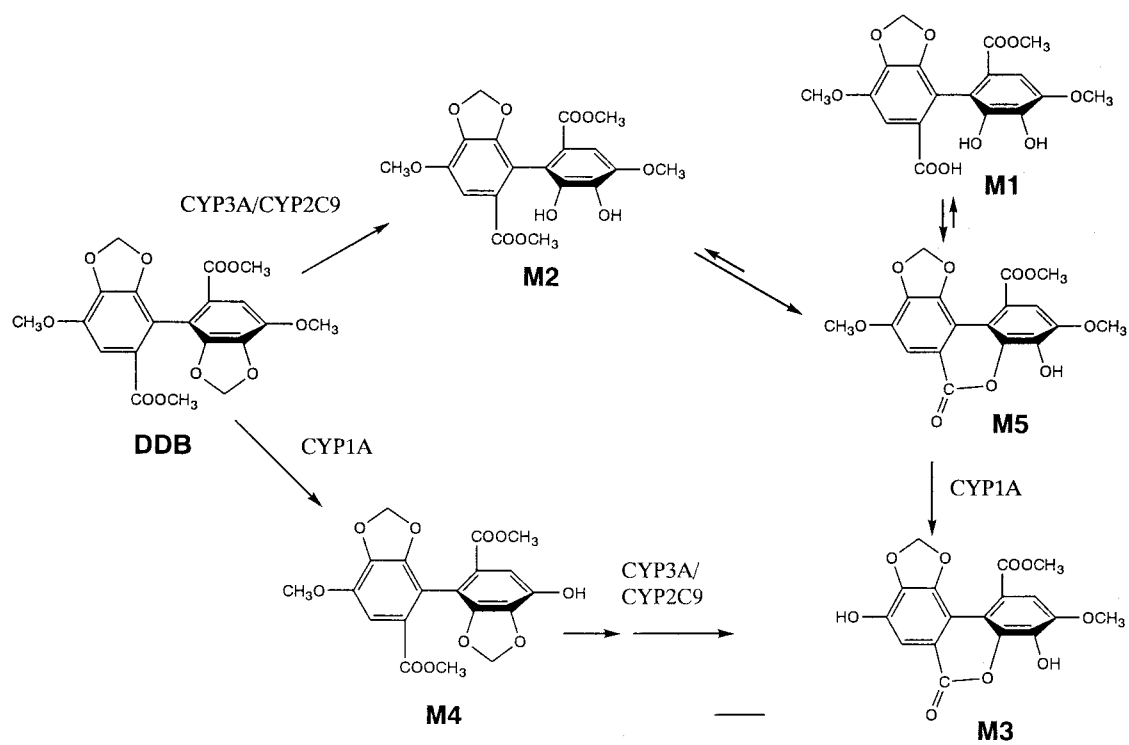


Fig. 9. Proposed metabolic pathway of DDB in human liver microsomes.

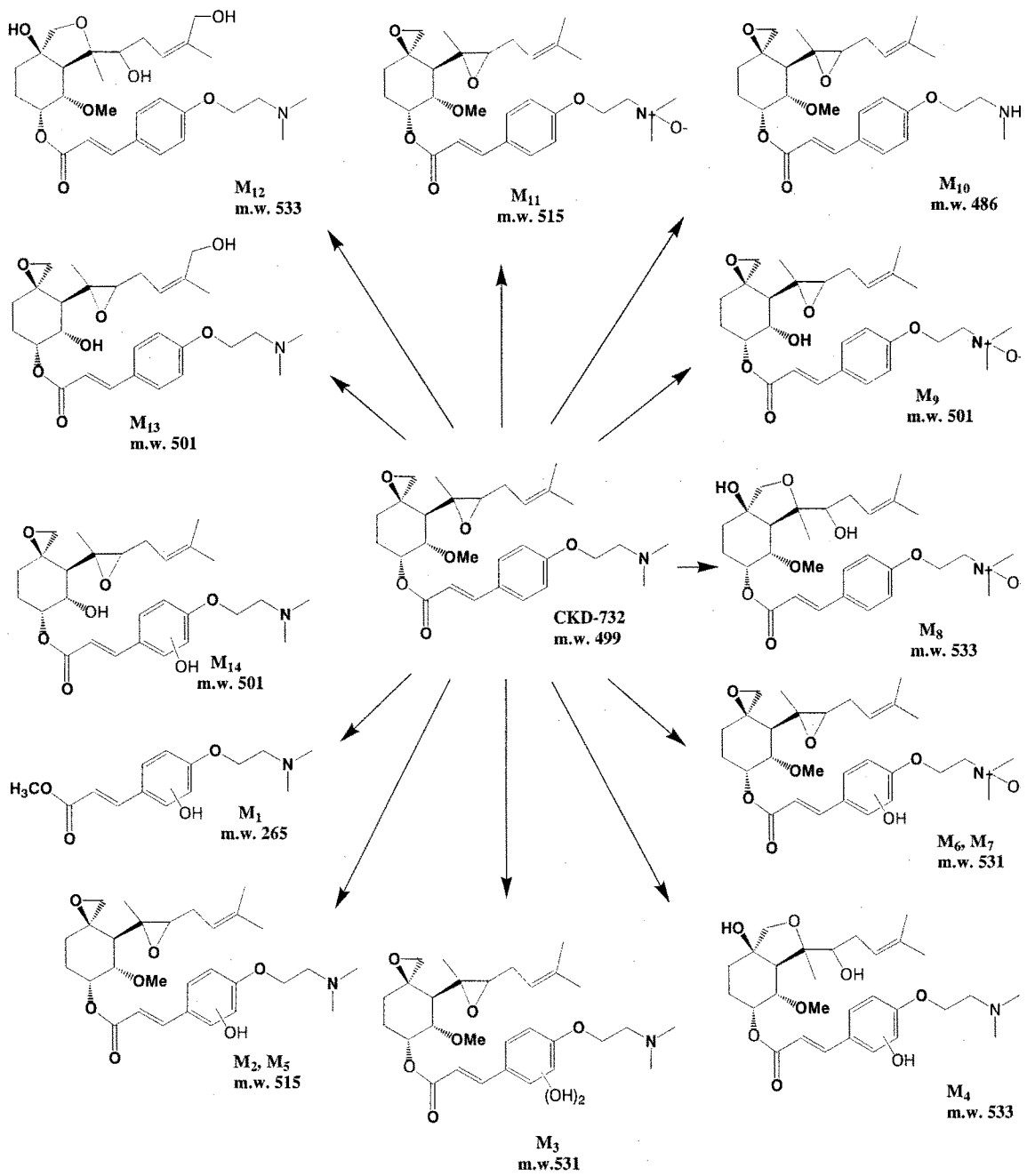


Fig. 10 Proposed in vitro metabolic pathways of CKD in rats.



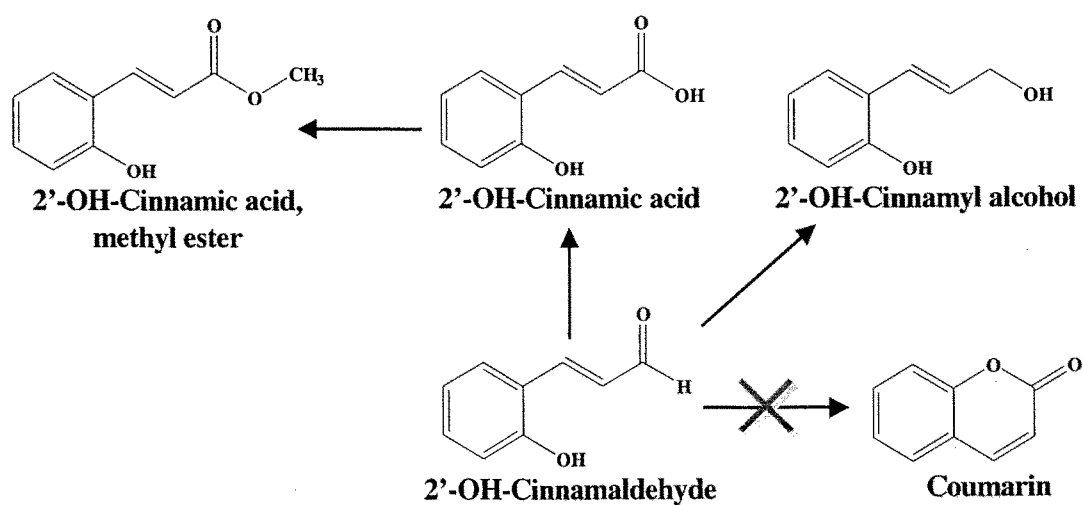


Fig. 11 Proposed in vivo metabolism of cinnamaldehyde in rats.

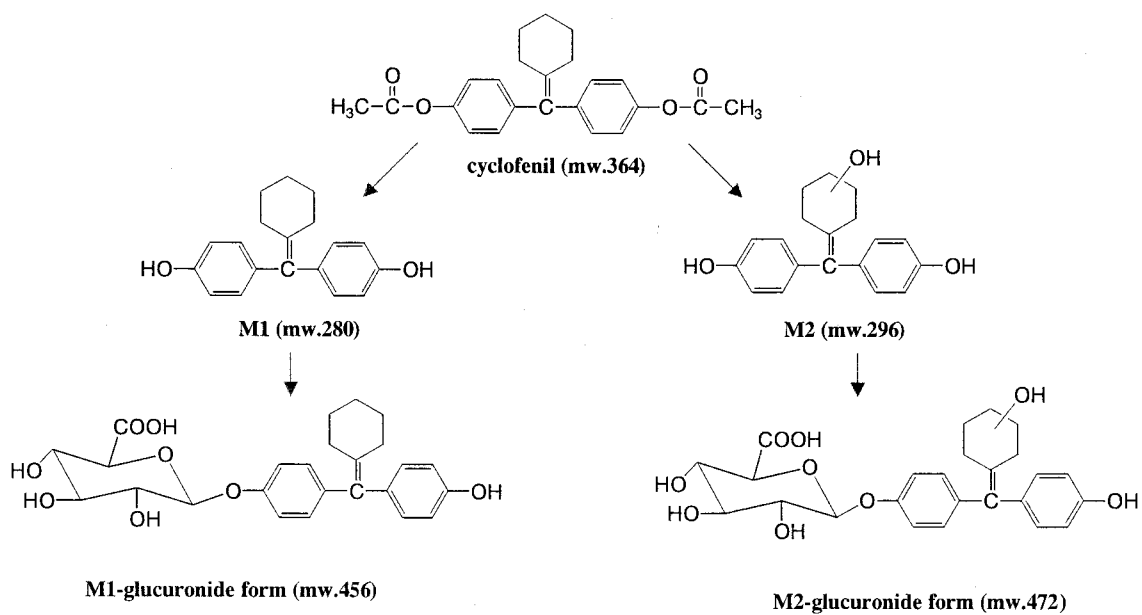


Fig. 12. Proposed metabolism of cyclofenil in human.

# 여 백

## 특정연구개발사업 연구결과 활용계획서

사업명	중사업명	국가지정연구실사업		
	세부사업명			
과제명	신물질 평가를 위한 약물대사 및 체내동태 연구			
연구기관	한국과학기술연구원	연구책임자	김 동 현	
총연구기간	2000년. 6월. 14일. ~ 2002년. 6월. 13일. ( 24개월)			
총 연구비 (단위 : 천원)	정부출연금	민간부담금	합계	
기술분야				
참여기업				
공동연구기관				
위탁연구기관				
연구결과활용 (해당항목에(√) 표시)	1. 기업화 ( )	2. 기술이전( )	3. 후속연구추진(●)	4. 타사업에 활용( )
	5. 선행 및 기 초연구( )	6. 기타목적활용 (교육연구)( )	7. 활용중단(미활용)( )	8. 기타( )

특정연구개발사업 처리규정 제 31조(연구개발결과의 보고) 제 2항에 의  
거 연구결과 활용계획서를 제출합니다.

첨부 : 1. 연구결과 활용계획서 1부.  
2. 기술요약서 1부

2002 년 9월 12일

연구책임자 : 김 동 현 (인)  
연구기관장 : 박 호 군 (직인)

과학기술부장관 귀하

# 여 백

[첨부1]

## 연구결과 활용계획서

1. 연구목표 및 내용

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 함. 이를 위하여 다음연구 내용으로 연구를 수행함

- 방사성 동위원소 표지물질 합성 기반 구축 및 이를 이용한 ADME연구 기술 개발
- 대사체 분석기술 및 고속 대사체 검정 기술 개발
- In vitro 대사분석을 통한 체내동태 예측 기술 개발

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 대사체 규명 및 mass spectrum 해석을 통한 대사체

구조 규명기술

- Cassette analysis를 이용한 rapid metabolic screening 기술
- Radio-labeled compound를 이용한 대사체 추적 및 whole body autoradiography 기술
- Cytochrome P450 expression 및 inhibition kinetics를 이용한 drug interaction 예측 기술

라. 발생품 및 시작품 내역

마. 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	○

학술지 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명	SCI게재여부
Chromatographia	Rapid and sensitive analysis of medroxyprogesterone acetate in human serum by gas chromatography-mass spectrometry	2001,	Vol. 54		미국	○
J. Toxicol. Environ. Health	Effects of flavonoids isolated from Scutellariae radix on cytochrome P450 activities in human liver microsomes	2002,	Vol 65		미국	○
Rapid Commun. Mass Spectro.	Mass spectrometric analysis of cyclofenil and its metabolites in human urine	2002,	Vol 16,		미국	○
계: 건수	8					

○ 학술회의 발표 실적(필요시 별지사용)

학술회의 명칭	제목	게재연월일	호	발행기관	국명
10th North American ISSX Meeting, Indianapolis,	Inhibition of microsomal testosterone 6 $\beta$ -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 추계 학술대회	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 춘계 학술대회,	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



학술회의 명칭	제목	계재연월일	호	발행 기관	국명
춘계 대한약학회, 충 북대학교,	Structure-transport relationship of drugs in Caco-2 monolayer system: through sildenafil derivatives and dopamine receptor antagonists	2002. 4			한국
춘계 대한약학회, 충북대학교,	Effect of TCDD on the expression of rat hepatic cytochrome P450 2A1: Assessment of the effect in vivo and in a hepatocyte culture system	2002. 4			한국
춘계 대한약학회, 충북대학교,	High throughput analysis of metabolic stability of dopamine receptor antagonists and identification of their metabolites by liquid chromatography/tandem mass spectrometry	2002. 4			한국
계: 10건					

### 3. 연구성과

#### 4. 기술이전 및 연구결과 활용계획

##### 가. 당해연도 활용계획

신약 개발을 수행중인 산업체의 ADME 연구 지원 (대우약품의 DDB\_S의 대사체 구조 규명, YH3945의 대사체 구조 규명)

##### 나. 활용방법

신규 과제 수행

##### 다. 차년도이후 활용계획

고속 대사 안전성 및 대사 크리닝 기술을 생리활성 물질 사업에 참여하는 기업에 전수

미량 생체시료 분석 기술을 생물학적 동등성 평가연구에 활용

### 5. 기대효과

향후 활용에 따른 기술적, 사회·경제적 파급효과(정량적 및 정성적으로 전문가입장에서 구체적으로 작성)

- 예상매출액(단위: 백만원), 수입대체효과((단위: 백만원), 수출증대효과(단위: 백만원), 원가절감(단위: 백만원,기존대비%), 에너지절감효과(단위: 백만원,기존대비%), 생산성 향상(단위: 백만원,기존대비%) 인력양성 또는 고용창출효과(단위: 명), 투자유치실적((단위: 백만원), 인프라구축 효과 등

## 6. 문제점 및 건의사항

[첨부2]

## 기술 요약서

■ 기술의 명칭

In vitro metabolic stability 평가 기술

대사체 구조 규명 기술

Caco-3 세포를 이용한 흡수율 평가 기술

동위원소 표지 물질을 이용한 ADME 평가 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	2000.6.14-2002.6.13			
총연구비	정부(657,202)천원    민간(            )천원    합계(657,202)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	고미라	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 평가
- (2) Chemical inhibitor, expressed P450을 이용한 대사에 관여하는 P450효소 동정
- (3) Caco-2 세포를 이용한 흡수율 평가
- (4) HPLC/MS/MS를 이용한 Cassette analysis

[용도 · 이용분야]

- (1) 신약 개발
- (2) generic 약물의 생물학적 동등성 평가
- (3)



■ 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 적응시킴
	③ 외국기술의 개선·개량단계 : 성능이나 기능을 개선시킴
	④ 신기술의 혁신·발명단계 : 국내 최초로 개발

■ 본 기술과 관련하여 추가로 확보되었거나 개발중인 기술