creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

이학석사 학위논문

신규 급성 뇌손상 치료 선도물질 1H10의 *in vivo* 및 *in vitro* 약물동태 특성 연구

in vitro ADME profile and *in vivo* Pharmacokinetic Study of Novel Acute Brain Injury Agent

울 산 대 학 교 대 학 원
의 과 학 과
유 동 구

신규 급성 뇌손상 치료 선도물질 1H10의

in vivo 및 *in vitro* 약물동태 특성 연구

지 도 교 수 오 수 진, 임 형 석

이 논문을 이학석사 학위 논문으로 제출함

2022년 8월

울 산 대 학 교 대 학 원
의 과 학 과
유 동 구

유동구의 이학석사 학위 논문을 인준함

심사위원 오 수 진 (인)

심사위원 정 성 윤 (인)

심사위원 황 정 진 (인)

울 산 대 학 교 대 학 원

2022 년 8월

감사의 글

지난 2년 6개월 간의 학위과정 기간 동안 많은 분들의 도움으로 마무리하게 되었습니다. 이 글을 통해서 부족한 저를 위해 도움을 주신 모든 분들께 짧게나마 감사의 말씀을 드리고자 합니다.

항상 도움을 주시고 제가 나아갈 수 있도록 이끌어 주시며 지금의 결실을 맺을 수 있게 지도해주셨던 저의 지도교수님이신 오수진 교수님께 먼저 깊은 감사의 마음을 전합니다. 지금도 연구자로써 많이 부족하지만, 부족한 점이 많았던 저를 위해 많은 가르침을 주신 덕분에 논문을 작성하고 석사과정을 마칠 수 있었습니다. 또한 바쁘신 와중에도 논문에 관심을 가지고 논문 작성에 많은 도움을 주시고 조언을 해주신 이지윤 박사님께도 감사의 마음을 전합니다.

그리고 논문심사를 위해 바쁘신 중에도 귀중한 시간을 내어주시고 많이 부족했던 제게 아낌없는 조언과 따뜻한 격려를 해주신 정성윤 교수님과 황정진 교수님께도 감사의 인사를 드립니다.

마지막으로 변함없이 믿어주시고 지원해주신 부모님께도 감사한다는 말을 전하며, 부족한 저와 배움의 길을 함께하느라 고생한 실험실 선생님들, 힘들때마다 응원해주었던 친구들에게 감사의 마음을 전합니다.

이렇게 많은 분들의 도움으로 제가 석사 학위 과정을 졸업할 수 있었다고 생각합니다. 다시 한번 감사하다는 말씀을 드리며 제게 주셨던 도움을 밑거름 삼아 더욱더 성장하는 사람이 되도록 하겠습니다. 감사합니다.

초 록

전 세계적으로 인구의 노령화와 더불어 노인성 신경과적 질환들의 유병률이 높아 지고 있으나 근본적인 치료제가 존재하지 않아 신규 약물의 개발이 필요한 상황이다. AMPK의 과도한 활성은 신경 세포 사멸을 초래하는 것으로 알려졌다. 선행연구에서 AMPK 저해능 평가와 더불어 아연흥분, glutamate 흥분, 산화적 스트레스와 같은 다양한 신경 독성 평가 그리고 Rat MCAO(중대뇌동맥폐쇄) 모델을 이용한 효능 평가를 통해 우수한 효과를 보인 1H10이 선도물질로 발굴되었다. 본 연구에서는 선도물질 1H10의 체내동태 연구를 위해 *in vivo* rat pharmacokinetics 및 *in vitro* ADME (흡수, 분포, 대사, 배설) 평가를 수행하였다. Rat에 정맥 투여 시 1H10은 낮은 전신노출, 빠른 반감기 ($t_{1/2}$= 0.16 hr), 그리고 낮은 분포용적 (V_{ss}, 0.13 L/kg)의 특성을 나타내었다. 복강투여 시 빠른 흡수 (t_{max} = 5min)를 보여주었으며 생체이용률은 30.3%로 관찰되었다. 선도물질 1H10은 Caco-2 세포를 이용한 세포투과도 시험에서 낮은 P_{app} 값 (1.3 x 10^{-6} cm/sec)을 나타내어 장에서 비교적 낮은 흡수율을 보일 것으로 예상되었다. Human, dog, rat, mouse 모든 종에서 1H10은 높은 혈장 단백 결합율 (fu <0.1%) 과 낮은 대사안정성을 나타내었다. Liver microsomes을 이용한 대사안정성 시험에서 cytochrome P450 (CYP)-의존적인 반응(% remaining: human(52%) > mouse(33%), > dog(31%) > rat(25%)) 과 glucuronidation 반응 (% remaining: rat(45%) > dog(25%) > human(13%) > mouse(5%)) 모두에서 대사에 불안정한 특징을 나타내었다. 또한 1H10은 10uM 수준에서 CYP1A2, CYP2C8와 CYP3A4(T)

각각 16%, 37%, 30% 억제하는 것으로 관찰되었다. 이상의 결과는 비록 선도물질 1H10이 우수한 약효를 보였으나 낮은 흡수율과 높은 대사율, CYP 저해능을 지닌 물성을 가지고 있어 향후 lead optimization을 위한 추가 연구, 특히 약물대사의 구조적 특성 파악이 필요함을 시사한다.

목 차

초 록 i

표 목록 v

그림 목록 vi

연구 배경 1

재료 및 방법

1. 시약 및 실험재료 5
2. 실험동물 조건 및 투여방법 및 시약들 6
   2.1. 실험동물 6
   2.2. 목정맥채혈법 7
3. LC-MS/MS 장비 및 분석조건 7
4. *In vivo* pharmacokinetic studies 시험 10
   4.1. 시료 전처리 및 분석 10
   4.2. 데이터 분석 10
5. 용해도 시험 (Solubility test) 11
6. 투과도 시험 (Permeability test) 12
   6.1. Caco-2 세포 배양 및 투과도 시험 12
   6.2. 인공막 투과도 시험 (Parallel artificial membrane permeability assay) 14
7. 혈장 단백 결합 시험 (Protein binding assay) 15
8. 혈장 안정성 시험 (Plasma stability assay) 15
9. 대사 안정성 시험 (Microsomal stability assay) 16
10. CYP 저해 평가 (CYP inhibition assay) 16

10.1. CYP 저해 평가 시험법 16

10.2. 분석방법 17

결과 및 고찰

1. *In vivo* pharmacokinetic studies 시험 20

2. 용해도 시험 (Solubility test) 23

3. 투과도 시험 (Permeability test) 27

3.1. Caco-2 세포 투과도 27

3.2. 인공막 투과도 시험 (Parallel artificial membrane permeability assay) 29

4. 혈장 단백 결합 시험 (Protein binding assay) 31

5. 혈장 안전성 시험 (Plasma stability assay) 33

6. 대사안정성 시험 (Microsomal stability assay) 35

6.1. Phase Ⅰ 반응 35

6.2. Phase Ⅱ 반응 38

7. CYP 저해 평가 (CYP inhibition assay) 41

결 론 43

참고문헌 45

Abstract 52

표 목록

표 1. LC-MS/MS 분석 조건 9

표 2. CYP inhibition 평가를 위한 LC-MS/MS 분석 조건 19

표 3. 1H10의 정맥투여 및 복강투여를 통해 산출된 약동학 파라미터 22

표 4. 1H10의 용해도 24

표 5. 사람에서 maximum absorbable dose (MAD) 예측 26

표 6. 1H10의 Caco-2 cell monolayer에서의 투과도 28

표 7. 1H10의 인공막에서의 투과도 30

표 8. 1H10의 종별 혈장 단백 결합율 32

표 9. 간 마이크로솜에서 1H10의 Phase Ⅰ 반응의 안정성 평가 36

표 10. 간 마이크로솜에서 1H10의 Phase Ⅱ 반응의 안정성 평가 39

표 11. 1H10의 cytochrome P450 중 9종에 대사 효소에 대한 저해도 42

그림 목록

그림 1. 1H10의 정맥투여 및 복강투여 후 시간에 따른 혈중농도의 변화.....21

그림 2. 1H10의 0.1 M 인산완충액 [pH 6.5(A), pH 7.4(B)]에서 thermodynamic aqueous solubility (열역학적 수용성 용해도).....25

그림 3. 1H10의 0.1 M 인산완충액 [pH 7.4(A)] 및 혈장(B) 에서의 안정성 시험.....34

그림 4. 다양한 종에서 1H10의 Phase Ⅰ 반응의 안정성 평가.....37

그림 5. 다양한 종에서 1H10의 Phase Ⅱ 반응의 안정성 평가.....40

연구 배경

신약 개발 과정은 타겟 물질 선정, 선도물질 최적화, 후보물질 도출하는 탐색 (discovery) 단계와 전임상 및 임상 연구하는 개발 (development) 단계에서부터 최종 시판이 되기까지의 여러 단계가 있다. [1, 2] 탐색 단계에서는 약물의 활성 (activity)와 성질 (property)에 대한 최적화 연구를 진행하여 개발 단계에서의 성공 가능성을 높일 수 있도록 좋은 약물성 (drug-like property)를 지닌 후보물질을 도출하는데 중점을 두고 있다. [3, 4] 개발 단계에서는 탐색 단계에서 선정된 후보물질의 약효 및 독성 평가를 전임상 및 임상에서 실시한다. 이러한 신약 개발 과정에서는 약물이 시판되기까지 많은 시간과 비용이 필요할 뿐만 아니라 시장에서의 성공률도 상당히 낮다. [5, 6]

1990년대 초반 임상연구 과정에서 신약개발의 주요 실패 원인이 약물대사 (Drug metabolism) 및 약물동태 (Pharmacokinetics, PK)로 인한 것으로 알려진 이후 신약개발 초기단계부터 ADME (Absorption(흡수), Distribution(분포), Metabolism(대사), Excretion(배설)) 평가를 도입함으로써 신약개발의 성공률을 높이기 위해 지속적으로 진행되었으며, 현재 다국적 제약사를 중심으로 신약개발의 일반적인 흐름으로 자리잡고 있다. [7-9] 약물동태는 약물의 ADME를 연구하는 분야로 좋은 약동학적 특성을 보이는 후보물질을 선별하여 신규 화합물이 약물로서의 성공 가능성을 높이는데 많은 영향을 미친다. [10] 신약개발 초기단계에서 약물대사 및 약물동태학 (Drug metabolism and Pharmacokinetics, DMPK) 연구는 개발물질의 PK 특성을 파악하여 이를 구조적 변화를 통해 개선하여 선도물질을 최적화하고 후보물질을 도출하기 위해서이다.

[11, 12] 이 단계에서의 약물대사연구는 개발 중인 약물의 운명을 결정하는데 매우 중요한 역할을 담당한다. [13]

약물대사 (Drug metabolism, Biotransformation)는 외인성 물질이 체내로 들어오게 되면, 수용성을 증가시켜 체외배설이 용이하도록 전환시키는 과정이다. [14, 15] 이는 거의 모든 장기에서 일어날 수 있지만 주요 약물대사효소 발현이 높은 장기인 간에서 주로 일어난다. [16] 약물대사반응은 크게 1상 반응 (Phase Ⅰ reaction)과 2상 반응 (Phase Ⅱ reaction)로 나누어진다. Phase Ⅰ 반응은 분자에 관능기 (functional group)를 도입하여 물질의 극성을 증가시키는 반응이고 Phase Ⅱ 반응은 모화합물 (parent) 자체 또는 모화합물이 Phase Ⅰ 반응을 통해 생성된 대사체에 conjugation 반응하여 수용성을 증가시키는 반응이다. [17, 18] Phase Ⅰ 반응에 관여하는 주된 효소는 cytochrome P450 (CYP) enzyme으로 약물이나 생체이물에 대한 산화반응의 주요 역할을 담당한다. [19] 2002년 미국에서 많이 처방되는 TOP 200개 약물의 배설을 조사한 결과 약 75%가 약물대사경로를 통해 체외로 배설되고 신장 (약 20%) 및 담즙 (약 5%)으로 배출되었다. 약물대사가 약물 청소율 (clearance)에 있어 매우 중요한 경로임을 알 수 있다. [15, 20] 약물대사의 75%가 CYP에 의해 일어나며, 이는 시판되는 약물의 약 55%가 CYP에 의해 매개된다는 것을 의미한다. [21] 대사에서 CYP는 다양한 isoform 중 5가지 동종효소, CYP1A2, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6 및 CYP3A4가 중추적인 역할을 수행한다. [17] 신약개발 초기 스크리닝 단계에서 약물대사에 안정한 특히 CYP에 보다 안정한 물질을 찾고자 하고 microsomes을 이용한 대사 안정성 시험을 수행한다.

현대사회는 평균수명이 높아지면서 점차 고령화 사회로 진입하고 있다. 이로 인해 알츠하이머병, 파킨슨병, 뇌졸중 등의 퇴행성 질환 환자 및 사망자가 지속적으로 증가하는 상황이다. [22, 23] 치료제에 대한 수요가 증가하는 상황임에도 불구하고 근본적인 치료제가 존재하지 않아 신규 약물의 개발이 필요하다. 뇌졸중과 파킨스병 등의 퇴행성 뇌질환은 미토콘드리아 중심의 아연신경독성, 산화성 손상과 apoptosis, 라이소좀 기능 이상 등 세포 내 복잡한 작용 기전이 있다. [24-27] 아연은 산화성 손상을 감지하여 세포 내 다양한 신호기전을 활성화시키나 뇌손상이 발생하면 세포 내 아연이 급격히 증가되어 신경세포사가 유발된다. [28-32] 아연 항상성을 유지시키는 것이 세포 생존에 매우 중요하다. 1H10은 뇌졸중의 주요 원인인 아연 신경독성의 AMPK 활성을 저해하는 새로운 화합물로 뇌손상 과정에서 신경세포의 손상을 줄이고, 염증반응을 최소화하며 신경회로 재생을 촉진하여 뇌졸중을 치료하는 신종 뇌졸중 치료제로 다발성 경화증 및 뇌피질경색 모델에 탁월한 효과가 있다고 알려져 있다. [24, 33] 하지만 신약 개발에 있어서는 Pharmacodynamic factors와 Pharmacokinetic factors와의 균형이 중요하기 때문에 연구를 통한 1H10의 Pharmacokinetic factors의 결과를 더해 drug like property를 확인하여 신약으로서의 성공률을 높이고자 한다. [34]

본 연구에서는 1H10의 좋은 약효를 바탕으로 선도물질로 선정하여 선도물질 최적화를 위한 약물 대사 및 약동력학 연구를 수행하고자 한다. 우선 SD rat를 이용한 *in vivo*에서 1H10의 약동력학적 특성을 파악하고 이 *in vivo*의 결과를 토대로 1H10의 약물로서의 특성을 확인하기 위한 *in vitro* ADME 연구를

수행하고자 한다. 이를 통하여 신약개발과정에 있어서 약동력학의 특성을 개선시켜 체내 동태 최적화의 중요한 역할을 하기 위함이다.

재료 및 방법

1. 시약 및 실험재료

본 연구를 위한 1H10은 세종대학교 생명과학대학 김양희 교수로부터 제공받았다. Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH), uridine diphosphate glucuronic acid (UDPGA), saccharo-1,4-lactone, alamethicin, dimethylacetamide (DMAC), dimethylsulfoxide (DMSO, 99.7% purity), Tween 80, 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (HPBCD), fetal bovine serum (FBS), metoprolol, sodium bicarbonate, atenolol, ranitidine, verapamil, carbamazepine (CBZ), phenacetin, coumarin, bupropion, amodiaquine, tolbutamide, S-mepheytoin, testosterone, 4-methylumbelliferon (4-MUF), dextromethorphan는 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. Minimum essential medium (MEM), 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), Hank's balanced salt solution (HBSS), non-essential amino acid (NEAA), 0.25% trypsin-EDTA, penicillin-streptomycin solution, phosphate buffer saline (PBS)는 GIBCO (Waltham, Massachusetts, USA)에서 구입하였다. 랫드 경정맥 카테터 (rat jugular vein catheter)는 Braintree Scientific Inc. (MA, USA)에서 구입하였고, microtainer LH는 Becton Dickinson (Sunnyvale, CA, USA)에서 구입하였다. Caco-2 세포는 American Type Culture Collection (Rockville, Maryland, USA)에서 구입하였고, transwells™ (12 mm i.d., 3.0 μm pore size, Polycarbonate membrane insert, Sterile), Human liver microsomes, dog liver microsomes, rat liver microsomes, mouse liver

microsomes은 Corning (NY, USA)에서 구입하였고, pooled human plasma, pooled dog plasma, pooled rat plasma, pooled mouse plasma는 Innovative Research에서 구입하였다. RED device는 Thermo SCIENTIFIC (Waltham, MA, USA)에서 구입하였고, Millipore filter (Millex-HV PVDF, 내경 0.45 μm)는 Milipore (Burlington, Massachusetts, USA)에서 구입하였다. Midazolam은 충남대학교 약학대학 김상겸 교수로부터 양도받았다. Ketamine과 Rompun (xylazine)은 ㈜BKPharm (고양, 대한민국)에서 구입하였고, formic acid (98% purity)는 Honeywell (Charlotte, NC, USA)에서 구입하였다. 에탄올 (Ethanol, EtOH), 메탄올 (Methanol, MeOH), 아세토니트릴 (Acetonitrile, ACN)과 물 (water)은 HPLC grade로 J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA)에서 구입하였다. 1H10 및 내부표준품은 각각 최종 농도 10 mM로 칭량 후 DMSO로 용해하여 실험 전까지 -80°C에 보관하였다.

2. 실험동물 조건 및 투여방법 및 시약들

2.1 실험동물

본 동물실험의 연구대상은 8주령의 체중 250~280 g의 SD계 수컷 랫드로써 ㈜자바이오 (수원, 대한민국)에서 구입하였다. 실험동물운영위원회 (IACUC) 표준운영 가이드라인에 따라 실험하기 전까지 사육시설의 온도는 22 ± 2℃, 상대습도는 50 ± 10%, 조명시간은 12시간 (08:00~20:00)을 유지하였고 고형배합사료와 음수를 자유롭게 섭취시켜 1주일간 순화시킨 뒤에 실험에 사용하였다. 랫드는 서울아산병원의 동물실험윤리위원회 (승인번호: 2021-13-322)의 승인을 받아 동물실험

을 수행하였다.

2.2 목정맥채혈법 (Jugular vein blood collection)

1H10의 약물동태 동물실험을 수행하기 위해 랫드의 목정맥채혈법을 이용하여 연속적으로 채혈을 진행하였다. [35] 8주령의 체중 250g~280 g의 SD계 수컷 랫드에 ketamine (50 mg/kg)과 xylazine (6.7 mg/kg)을 복강에 투여하여 마취시킨 후, 경정맥에 catheter를 삽입하였다. 1H10은 정맥투여 (0.5 mg/kg) 및 복강투여 (1 mg/kg) 그룹으로 수행하고, DMAC/Tween 80/20% 2-hydroxypropyl-β-cyclodextrin (10%/10%/80%)로 용해 후 투여하였다. 정맥투여 후 0.083, 0.167, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 24시간, 복강투여 후 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 24시간에 랫드의 경정맥 카테터에서 혈액을 약 400 μL를 채혈하였다. 시간대별로 채혈한 혈액은 BD Microtainer PST™ (LH, BD, USA) 튜브에 모아 혈장 (plasma)을 분리하고, 분석하기 전까지 -20℃에서 보관하였다.

3. LC-MS/MS 장비 및 분석조건

약물동태시험 연구를 수행하기 위한 정량분석 장비는 LC (Agilent 1200 series HPLC system)-MS/MS (API 4000 QTRAP hybrid triple-linear ion trap mass spectrometry, Turbo V™ Ion spray)를 사용하였다. 1H10 및 내부표준물질의 MS 파라미터를 최적화하기 위해 각각 50% ACN으로 용액을 제조 후 MS 에 주입하고 positive 모드를 사용하였다. 얻어진 MS 파라미터와 LC를 연결 후 LC 조건을

최적화하였다 (표 1).

표 1. LC-MS/MS 분석 조건

LC	HPLC system	Agilent 1200 series equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment
	Column	XTerra MS C18 (2.1 x 50mm, 5 um, Waters)
	Mobile phase	Linear gradient from 95% A (0.1% Formic acid in water)/ 5% B (0.1% Formic acid in ACN) to 5% A/ 95% B
	Flow rate	0.4 mL/min
MS	MS system	4000 QTRAP LC/MS/MS system
	Ion source	Turbo V™ Ion Spray
	Polarity	Positive
	MRM	1H10 : m/z 336>174 (Ret. Time: 2.87 min)
		Carbamazepine (IS): m/z 237>194 (Ret. Time: 2.86 min)

4. *in vivo* pharmacokinetic studies 시험

4.1 시료 전처리 및 분석

본 연구에서는 재료 및 방법 섹션 2의 언급된 방법으로 랫드의 혈액 내 혈장을 사용하였으며, 혈장은 분석하기 전까지 -20℃에서 보관 후 단백 침전법 (protein precipitation) 을 이용하여 전처리를 수행하였다. [36] 각각의 혈장 시료를 50 μL씩 8-well tube strips로 옮긴 후 단백질 제거를 하기 위해 내부표준물질인 carbamazepine이 포함된 차가운 acetonitrile을 150 μL를 첨가하였다. 10분간 섞어주고, 실온에서 30분 동안 초음파 처리한다. 3400 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상등액 100 μL을 96-well plate (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 취하고 탈이온수 100 μL 첨가하였다. 재료 및 방법 섹션 3의 언급된 분석방법으로 1H10을 정량 분석하였다.

4.2 데이터 분석

약동력한 파라미터는 Kinetica™n 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific Inc., Woburn, MA, USA) 프로그램을 이용한 non-compartmental analysis에 의해 계산되었다. 혈중 최고 농도 C_{max}와 그때의 시간 T_{max}은 raw data에서 직접 얻었다. 0분에서 마지막 시간까지의 혈장 약물농도-시간 곡선 아래 면적 (area under curve, AUC), AUC_{0-t}는 linear trapezoidal rule에 의해 계산되었다. 무한대 시간까지의 추론된 면적 $AUC_{0-\infty}$은 다음의 방정식을 통해 계산되었다.

$$AUC_{0-\infty} = AUC_{0-t} + C_t/K_{el}$$

여기서 소실속도상수 (K_{el})은 log 농도 시간 곡선의 terminal phase에서 정량할 수

있는 마지막 3~4개 지점의 linear regression에 의해 결정된 elimination rate 상수이다. 반감기 ($t_{1/2}$)는 아래 식에 의해 계산되었고,

$$t_{1/2}, Z=0.693/K_{el}$$

클리어런스 (CL_{plasma})는 다음식으로 계산하였다.

$$CL_{plasma} = Dose/AUC_{0-\infty}$$

여기서 Dose와 AUC는 각각 정맥 투여 용량과 0분에서 무한대 시간까지의 곡선 아래 면적이다. 정상상태의 분포용적 (V_{ss})는

$$V_{ss}= CL_{plasma} \times AUMC_{0-\infty}/ AUC_{0-\infty}$$

위 식에 의해 계산되었다. 여기에서 AUMC는 혈장농도-시간곡선에서 첫 시간의 아래 면적부터 무한대 시간까지 추론된 값이다.

$$AUMC_{0-\infty} = AUMC_{0-t} + Ct/K_{el}^2 + Ct \cdot t_{last}/K_{el}$$

약물의 평균잔류시간 (Mean residence time, MRT)은 다음 식에 의해 계산되었다.

$$MRT = AUMC_{0-\infty}/AUC_{0-\infty}$$

생체이용률 (F)은 아래의 식 (수식 3)을 이용하여 계산하였다.

$$F = \frac{AUCPO/DosePO}{AUCIV/DoseIV} \times 100 \quad (3)$$

5. 용해도 시험 (Solubility test)

1H10을 1 mg씩 칭하여 0.1 M 인산완충액 (potassium phosphate buffer, pH 6.5) 및 0.1 M 인산완충액 (pH 7.4)를 사용하여 각각 0.5 mL로 용해한다. 각각 buffer 조건으로 실온에서 15분 동안 초음파 처리 후 vortexer 장비를 이용해 60분 동안 실온에서 용해시킨다. 용해된 물질은 원심분리 후 Miilipore (Millex-HV PVDF)

0.45 μm로 필터 후 150 μL를 96-well UV plate (Costar)에 옮겨 UV plate reader (INFINITE M200 PRO, TECAN)를 이용하여 230에서 280 nm의 파장까지 흡광도를 측정하였다.

6. 투과도 시험 (Permeability assay)

6.1 Caco-2 세포 배양 및 투과도 시험

Caco-2 cell은 약물흡수를 예측하는 *in vitro* model로 널리 사용되고 있다. 1H10의 투과도 및 efflux efficiency 시험을 수행하기 위해 Caco-2 세포를 사용하였다. Caco-2 세포는 polycarbonate membrane transwell™에서 ~21일 동안 배양하여 실험에 사용한다. [37, 38] Caco-2 세포의 배양에는 10% FBS, 1% NEAA, 100 U/mL penicillin, 100 μg/mL streptomycin이 포함된 MEM 이용하고 37℃의 95% 상대습도/95% air/5% CO_2 배양기에서 배양한다. 투과도를 측정하기 위해서는 transwells의 polycarbonate membrane 당 7.1 x 10^3 cells/cm^2가 되도록 세포를 넣어준 후 투과도 분석에 적절한 tight junction integrity를 가진 단층 (monolayer) 형태로 잘 자라도록 20~25일 배양하였다. 단층이 잘 형성되었는지는 21일 배양 후 EVOM Epithelial Tissue Voltohmmeter (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)와 STX2 "chopstick" electrode (World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA)를 이용해 Transepithelial electrical resistance (TEER) 값을 측정하여 단층 (400~800 Ω cm^2)의 여부를 확인하였다. 12-well plate를 준비하여 A (Apical)→B (Basolateral) 방향에 따른 투과도 실험인 경우, basolateral side에 데워진 1% DMSO가 포함된 HBSS buffer를 1.5 mL,

apical side에는 5 μM의 1H10을 0.4 mL 분주하고, B→A 방향일 때는 basolateral side에는 5 μM의 1H10을 1.5 mL, apical side에는 1% DMSO가 포함된 HBSS buffer를 0.4 mL 분주한다. 37℃에서 30 rpm으로 2시간 동안 반응시킨다. 반응 후 각각의 시료를 8-well tube strips (VWR, Emeryville, CA, USA)에 100 μL씩 분주하고, 내부표준물질인 carbamazepine이 포함된 차가운 acetonitrile을 200 μL를 첨가하여 반응 종결시킨다. 10분간 섞어주고, 실온에서 30분 동안 초음파 처리한다. 3400 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상등액 200 μL을 96-well plate (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)로 옮긴 후, 재료 및 방법 섹션 3의 언급된 분석방법으로 1H10을 정량 후 Caco-2 세포 투과도를 산출하였다. Reference 화합물 (Metoprolol, ranitidine, atenolol)도 동일한 방법으로 진행하였다. 투과도 계수 (apparent permeability coefficient, P_{app}, cm/s)는 아래와 같이 계산하였다. [39]

$$P_{app}\ (cm/s) = \frac{dQ/dt}{C0 \times A} \quad (1)$$

dQ/dt: Transport rate A→B

A: insert 표면적 (1.12 cm^2)

C0: donor의 초기 농도 (μM)

양방향 (bidirectional) caco-2 permeability assay는 시험물질의 A→B과 B→A 방향으로의 투과도를 측정하기 위해 수행 후 efflux ratio 즉, P_{app}(B-A) / P_{app}(A-

B)로 나타낼 수 있다. 회수율 (% recovery)은 투과도 데이터를 해석하는데 유용하게 사용된다.

$$\% \text{ Recovery} = \frac{\text{Total compound in donor and receiver at end of experiment (nmpl)}}{\text{Initial compound present (nmol)}} \times 100$$

6.2 인공막 투과도 (Parallel artificial membrane permeability assay, PAMPA) 시험

PAMPA는 수동확산 (passive diffusion)한 세포 내 투과를 측정하는 *in vitro* model로서 단순한 투과성만 측정한다. [40, 41] 1H10을 최종농도 5 μM 되도록 PBS buffer에 제조하였다. PAMPA plate의 donor 부분에 1H10을 300 μL 분주하고 receiver 부분에 가하고 PBS (인산완충생리식염수, pH 7.4) buffer를 200 μL 를 첨가한 후, 5시간 동안 상온에서 반응시켰다. 반응 후 각각의 시료를 8-well tube strips에 100 μL씩 분주하고, carbamazepine이 포함된 차가운 acetonitrile을 400 μL를 첨가하여 반응 종결시킨다. 10분간 섞어주고, 실온에서 30분 동안 초음파 처리한다. 3400 rpm, 4℃에서 20분간 원심분리하여 상등액 200 μL을 96-well plate로 옮긴 후, 재료 및 방법 섹션 3의 언급된 분석방법으로 1H10을 정량 후 인공막 투과도를 산출하였다. Reference 화합물 (Metoprolol, ranitidine, verapamil, carbamazepine)은 UV plate로 150 μL씩 옮겨 230~280 nm의 파장으로 microplate reader (INFINITE M200 PRO, TECAN)로 흡광도를 측정하였다.

7. 혈장 단백 결합 시험 (Protein binding assay)

1H10의 혈장단백과의 결합 정도를 확인하기 위해 혈장 (plasma)과 plasma protein binding을 평가하기 위한 가장 널리 알려진 방법인 RED (Rapid Equilibrium Dialysis) 방법을 이용한 평형투석법으로 측정하였다. [42] 한쪽 챔버에는 PBS (pH 7.4)을 가하고, membrane이 있는 다른 한쪽 챔버에는 1H10 (1 μM)이 가해진 혈장 (mouse, rat, dog, human plasma)을 넣었다. 37℃에서 80 rpm로 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후 챔버액을 취하여 전처리 과정을 거친 후 LC-MS/MS를 이용하여 정량분석하였다. 비결합형 약물 분율 (fraction unbound, fu)과 이를 통한 혈장 단백 결합율 (% plasma protein binding)은 다음 식으로 계산하였다(수식 2).

$$fu = \frac{C\ free}{C\ total} = \frac{C\ buffer,chamber}{C\ plasma,chamber} \quad (2)$$

$$\%\ plasma\ protein\ binding = (1-fu) \times 100\%$$

8. 혈장 안정성 시험 (plasma stability assay)

1H10의 생체 시료 내 안정성을 평가하기 위해 랫드와 사람의 혈액으로부터 얻은 혈장에 최종 농도 5 uM 농도로 1H10을 첨가하여 37℃에서 0, 1, 2, 4시간 동안 반응 시킨 후 1H10을 LC-MS/MS로 분석하였다..

9. 대사 안정성 시험 (Microsomal stability assay)

본 연구에서는 마우스, 랫드, 도그와 사람의 간 microsomes을 사용하여 대사 안정성을 평가하였다. Phase Ⅰ 반응으로 cofactor를 NADPH 사용하였고, Phase Ⅱ 반응으로 cofactor를 UDPGA를 사용하였다. 0.1 M 인산완충액 (potassium phosphate buffer, pH 7.4)에 마우스, 랫드, 도그와 사람의 간 microsomes (0.5 mg/mL)과 1H10(1 μM)을 가한 후 37℃에서 5분간 pre-incubation시키고 NADPH (1 mM)나 UDPGA (1 mM)를 첨가하여 반응을 시작하였다. 30분 반응 후 carbamazepine이 포함된 차가운 acetonitrile을 첨가하여 반응 종결시켰다. 시료를 혼합 및 원심분리 과정의 전처리 후, 재료 및 방법 섹션 3의 언급된 분석방법으로 분석 후 1H10에 대한 대사안정성을 평가하였다.

10. CYP 저해 평가 (CYP inhibition assay)

10.1 CYP 저해 평가 시험법

1H10의 CYP 약물대사효소에 의한 대사 저하를 평가하였다. 반응 용액은 최종 농도 1 mg/mL human microsomal protein, 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), 1 mM NADPH와 다양한 CYP isoform의 CYP isoform-specific 개별 기질의 혼합액 (A set: phenacetin, coumarin, S-mephenytoin, dextromethorphan, midazolam; B set: bupropion, tolbutamide, chlorzoxazone, testosterone)에 의해 최종 부피 200 μL로 구성되었다. 기질은 각각의 Michaelis-Menten constant (K_m) 값에 맞게 다음과 같이 농도를 설정하였다: phenacetin 50 μM, coumarin 5 μM, bupropion 50 μM, tolbutamide 100 μM, S-mephenytoin 100 μM, dextromethorphan 5 μM,

chlorzoxazone 50 μM, midazolam 5 μM, 및 testosterone 50 μM. 기질 농도의 보고된 K_m값을 토대로 설정하였다. [43, 44] 모든 실험에 사용된 기질은 acetonitrile에 녹여 계열 희석하였다. 반응에 사용된 기질에 포함된 acetonitrile의 조성은 최종 1.0% (A set) 및 0.5% (B set)이 되도록 설정하였다. 37℃에서 5분간의 pre-incubation 한 후에, 최종농도 1 mM NADPH를 가하여 반응을 시작하였다. 반응 용액은 10분간 37℃ 진탕배양기를 이용하여 반응시켰다. 200 μL 부피의 ice-cold 반응 종결액 (내부 표준물질로 40 nM carbamazepine을 포함한 acetonitrile)을 가하여 반응을 종결한다. 각 반응액을 4℃, 3400 rpm에서 20분간 원심분리한 다음, 각 샘플 반응액(A, B set)을 96 well에 1:1로 희석한다. CYP 저해의 양성대조군으로 CYP 3A4의 선택적인 저해제인 ketoconazole을 사용하여 동일한 조건으로 실험하였다.

10.2 분석방법

미리 확립된 분석 조건을 이용하여 반응시킨 약물들을 LC (Agilent 1200 series HPLC system)-MS/MS (API 4000 QTRAP hybrid triple-linear ion trap mass spectrometry, Turbo VTM Ion spray)로 구성된 분석 시스템으로 분석하였다. [45] 샘플 5 μL를 주입하여 0.4 mL/min의 유속으로 Atlantis dC18 컬럼 (2.1 x 50 mm, 3 um, Waters)과 SecuityGuardTM C18 (2.0×4.0 mm i.d., Phenomenex, Torrance, CA) 가드 컬럼을 이용하여 분리하였다. 이동상으로 0.1% formic acid가 각각 포함된 탈이온수 (이동상 A)와 acetonitrile (이동상 B)를 이용하였다. 두 이동상은 linear gradient를 이용하여 0.1분까지 100% A로 유지한 후 4분까지 50%로

증가시키고 0.1분간 유지하였다. 샘플의 분석은 positive MRM mode를 이용 (표 2)하여 각각 형성된 대사체와 내부 표준물질의 peak 넓이를 통해 계산하였다. 분석된 값들은 Analyst™ 소프트웨어 (version 1.5.2, Applied Biosystems, Foster City, CA)를 통해 처리하였다. 저해제에 의한 CYP에 의한 활성은 대조군의 백분율로 환산하였고 모든 결과는 평균±표준편차(Mean± SD)로 나타내었다.

표 2. CYP inhibition 평가를 위한 LC-MS/MS 분석 조건

LC	HPLC system	Agilent 1200 series equipped with on-line degasser, binary pump, thermostatted well-plate autosampler and column compartment
	Column	Waters Atlantis dC18 (2.1 x 50 mm, 3 um)
	Mobile phase	Linear gradient from 100% A (0.1% formic acid/99.9% water)/ 0% B (0.1% formic acid/99.9% acetonitrile) to 5% A/ 95% B
	Flow rate	0.4 ml/min
MS	Ion source	Turbo V™ Ion Spray
	Polarity	Positive
	MRM	Acetaminophen: m/z 152>110 (Ret. Time: 2.88 min)
		7-Hydroxycoumarin: m/z 163>107 (Ret. Time: 3.12 min)
		Hydroxybupropion : m/z 256>238 (Ret. Time: 2.99 min)
		N-desethylamodiaquine : m/z 328>283 (Ret. Time: 2.89 min)
		4-Hydroxytolbutamide : m/z 287>89 (Ret. Time: 3.19 min)
		4'-Hydroxymepheytoin : m/z 235>150 (Ret. Time: 3.08 min)
		Dextrorphan : m/z 258>157 (Ret. Time: 2.98 min)
		1-Hydroxymidazolam : m/z 342>324 (Ret. Time: 3.11 min)
		6β-Hydroxytestosterone : m/z 305>269 (Ret. Time: 3.28 min)
		Carbamazepine (IS): m/z 237>194 (Ret. Time: 3.42 min)

결과 및 고찰

1. *In vivo* PK

0.5 mg/kg 의 1H10 을 정맥 (5, 10, 15, 30 분, 1, 2, 4, 6, 8, 그리고 24 시간) 및 1 mg/kg 의 1H10 을 복강 (5, 15, 30 분, 1, 2, 4, 6, 8, 그리고 24 시간) 투여 후 채취한 혈액에서 혈장내의 1H10 을 정량하였다. 약동학적 지표는 1H10 의 혈중농도 곡선(그림 1)을 토대로 산출하였다. 정맥 투여 후 30 분까지만 검량한계 이상으로 검출되었고 이후에는 검출되지 않았다(그림 1). AUC 는 218 ng.hr/ml 로 높게 관찰되었고, 이로부터 구한 평균체류시간은 0.05hr 이었다. 클리어런스 (CL)는 2.50 Vhr/kg 로 낮은 클리어런스를 보였다. 반감기 (half-life, $t_{1/2}$)는 약 0.16 hr 로 매우 빠른 반감기를 보여주었다. Steady state 에서의 분포용적 (V_{ss})은 0.13 L/kg 으로 계산되었다(표 3). 복강투여 시, 투여 후 8 시간까지 혈중에서 검량한계 이상으로 나타났으며, 24 시간에서는 검출되지 않았다(그림 5). AUC 는 105 μg.hr/ml 로 관찰되었고, 이로부터 구한 평균 체류시간 (MRT)은 4.99 hr 으로 관측되었다. 체내 최고 혈중 농도 도달 시간 (T_{max})는 투여 후 5 분으로 매우 빠르게 흡수되는 것으로 관찰되었고, 체내 최고 혈중 농도 (C_{max})는 37.27 ng/ml 로 관찰되었다. 생체이용율 (Bioavailability, BA)는 30.28%로 moderate 한 수준을 보였다(표 3).

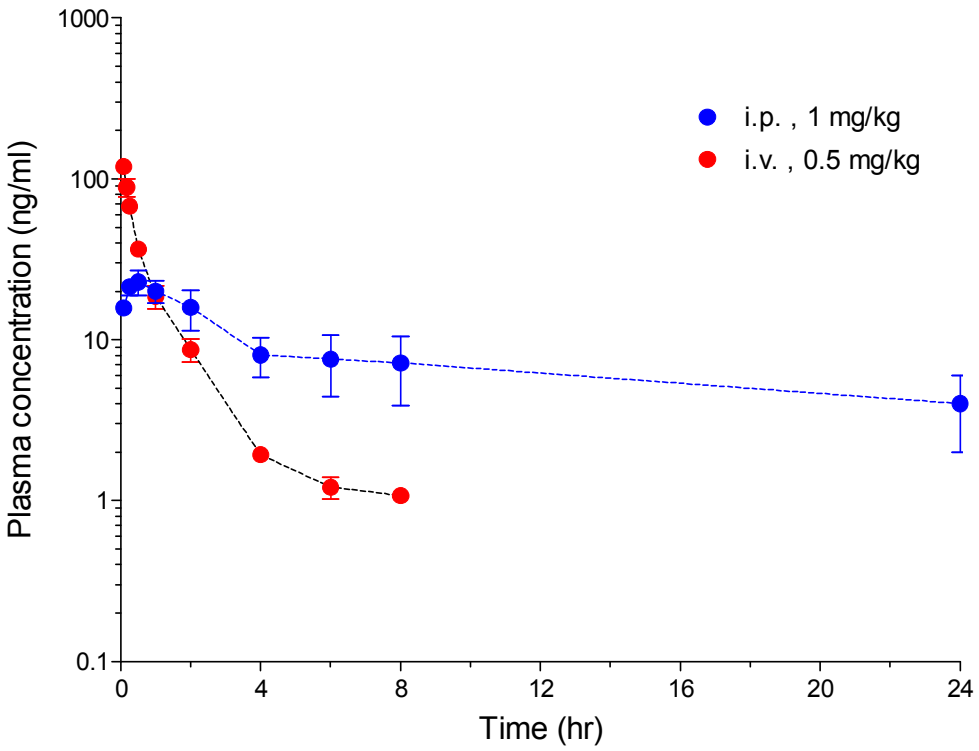


그림 1. 1H10의 정맥투여 및 복강투여 후 시간에 따른 혈중농도의 변화

표 3. Rat에서 1H10의 정맥투여 및 복강투여 후 산출된 약동학적 파라미터

PK Parameter		i.v.		i.p.	
		mean	SD	mean	SD
Dose	(mg/kg)	0.5		1	
t_{max}	(hr)	NA		0.08	0.00
C_{max}	(ng/mL)	NA		37.27	4.03
AUC_{last}	(ng.hr/mL)	218.12	95.97	105.89	11.73
AUC_{inf}	(ng.hr/mL)	220.34	95.38	133.46	11.67
CL	(L/hr/kg)	2.50	1.08	NA	
V_{ss}	(L/kg)	0.13	0.09	NA	
V_z	(L/kg)	0.61	0.38	NA	
$t_{1/2}$	(hr)	0.16	0.03	5.24	1.41
MRT_{inf}	(hr)	0.05	0.01	4.99	1.09
F	(%)	NA		30.28	2.65

Notes:

1. Pharmacokinetic parameters were obtained by non-compartmental analysis of the plasma concentration-time profiles using KineticaTM 4.4.1 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Woburn, MA, USA).

2. NA: not applicable

3. F was calculated using AUC_{inf}.

2. 용해도 시험 (Solubility test)

1H10의 용해도는 0.1 M 인산완충액 (potassium phosphate buffer) pH 6.5와 pH 7.4에서 각각 측정하였다(표 4 & 그림 2). 1H10은 전반적으로 물에 잘 녹는 용해도 결과로 보이지는 않았으며, 1H10의 2 mg/ml에 대한 용해도는 pH 6.5에서 2.56 ± 0.69 ug/mL 그리고 pH 7.4에서 4.72 ± 1.06 ug/mL로 pH 7.4에서 약 2배 정도 좋은 용해도를 보였고 pH에 따라 용해도에 차이가 있음을 확인하였다. 장의 pH(pH 6.5)를 고려해 볼 때, 1H10은 사람에서 maximum absorbable dose(MAD)는 5.18 mg으로 예상되었다(표 5).

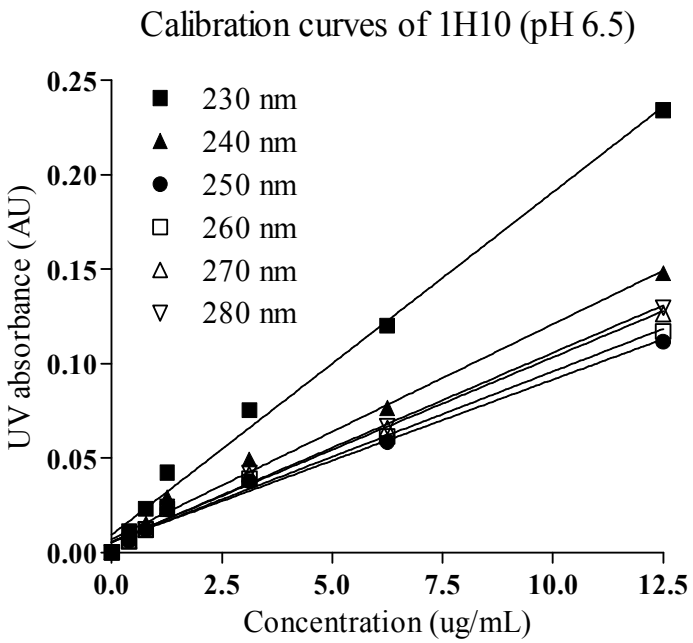
표 4. 1H10의 용해도

1H10	Solubility (ug/mL)	
	pH 6.5	pH 7.4
230 nm	2.77	4.55
240 nm	3.02	5.11
250 nm	3.35	6.25
260 nm	2.75	5.25
270 nm	1.95	3.91
280 nm	1.53	3.24
Mean ± SD	2.56 ± 0.69	4.72 ± 1.06

Lower limit of quantification (LLOQ): 0.39 ug/mL

*Solid samples (~1 mg) of test substances were placed in Whatman Syringeless filter device (PVDF membrane, 0.45 um pore size) and mixed with 0.5 mL of aqueous phosphate buffer (pH 6.5 and 7.4). The mixtures were sonicated for 15 min followed by 1 hr vortex mixing at room temperature. The equlibrated mixtures were then filtered and the filtrate was analyzed by multi-wavelength UV plate reader.

A.



B.

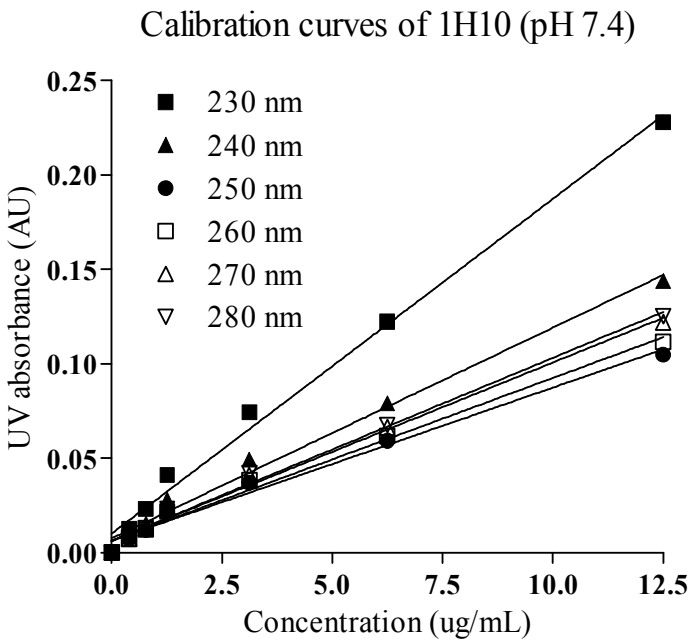


그림 2. 1H10의 0.1 M 인산완충액 [pH 6.5(A), pH 7.4(B)]에서 thermodynamic aqueous solubility (열역학적 수용성 용해도)

표 5. 사람에서 maximum absorbable dose (MAD) 예측

Compound	Solubility (ug/mL)	Ka (min^{-1})	SIWV (mL)	SITT (min)	**MAD (mg)**
1H10	2.56	0.03	250	270	**5.18**

MAD (maximum absorbable dose) = Solubility x Ka x SIWV x SITT

Solubility: thermodynamic solubility at pH 6.5

Ka: intestinal absorption rate constant

SIWV: small intestinal water volume (~250 mL)

SITT: small intestinal transit time (~270 min)

3. 투과도 시험

3.1. Caco-2 세포 투과도

1H10의 장에서의 투과도 (AP-to-BL)는 P_{app} 값은 1.3 x 10^{-6} cm/sec으로 계산되었다. 이는 낮은 투과도의 지표로 사용된 atenolol (0.4 x10^{-6} cm/sec) 과 ranitidine의 P_{app} 값 (1.2 x 10^{-6} cm/sec)와, 높은 투과도의 지표로 사용된 metoprolol의 P_{app} 값 (25.1 x 10^{-6} cm/sec) 범위 안에 값이지만, 낮은 투과도의 지표인 Ranitidine의 P_{app} 값과 비슷한 값을 보이므로, 1H10의 장에서의 투과도는 낮은 수준으로 판단되었다(표 6). Efflux ratio가 0.8로 수동확산 (passive diffusion)으로 추정된다. 회수율 (% recovery)이 상당히 낮으므로 이는 용해도가 좋지 않거나 시험과정 중에 플라스틱 실험제품과의 non-specific하게 결합하거나 Caco-2 세포에 의한 대사로 인하지 않았나 추정된다. Cell lysate에 1H10이 전혀 검출이 되지 않았으므로 cell monolayer에 시험물질이 축적되었을 가능성은 매우 낮다.

표 6. Caco-2 cell 에서의 1H10 의 투과도

Compound	Test conc. (μM)	Permeability [P_{app} x 10^{-6} (cm/sec)]					Recovery (%)				Comments
		A-to-B		B-to-A		Efflux ratio	A-to-B		B-to-A		
		mean	SD	mean	SD		mean	SD	mean	SD	
1H10	5	1.3	0.3	1.1	0.3	0.8	46.2	3.4	78.6	1.7	
Metoprolol	10	25.1	0.0				92.6	1.9			High permeability standard
Atenolol	20	0.4	0.06				92.6	1.5			Low permeability standard
Ranitidine	20	1.2	0.08				99.2	0.9			Low permeability standard

Notes:

1. P_{app} values were determined in A-to-B and B-to-A directions in HBSS supplemented with 10 mM HEPES (pH 7.4). Assays were conducted in triplicate.

2. Efflux ratio (ER) = P_{app} (B-to-A) / P_{app} (A-to-B)

3.2. 인공막 투과도(Parallel artificial membrane permeability assay, PAMPA) 시험

1H10의 permeability coefficients(Pe)는 0.68 ± 0.17로 실험에 같이 사용된 low permeability marker로 잘 알려진 ranitidine과 유사하였으며, 이는 좋은 않은 permeability coefficients (Pe) 값을 보여주었다. 이로써 1H10은 낮은 permeability를 갖는 약물로 판단되었다(표 7). 투과도가 15 nm/s 이상일 시 물질의 투과도가 좋다고 판단할 수 있는데, 1H10의 PAMPA를 이용한 투과도를 측정한 결과 0.68 nm/s로 낮은 투과도의 reference compound인 ranitidine (0.16 nm/s)와 유사한 수준의 투과도로 매우 낮은 측정값을 확인할 수 있었다.

표 7. 1H10의 인공막에서의 투과도

Compound	Test conc. (μM)	P_e (nm/s)	R (%)	Comments
Metoprolol	200	39.01 ± 16.20	1.13 ± 0.85	High
Ranitidine	200	0.16 ± 0.27	-1.16 ± 1.47	Low
Verapamil	200	122.16 ± 9.51	12.09 ± 0.27	High
Carbamazepine	200	221.35 ± 56.55	-3.98 ± 0.91	High
1H10	5	0.68 ± 0.17	49.47 ± 0.13	

Notes:

1. R : Mass Retention

2. Permeability < 15 nm/s → Low Permeability

> 15 nm/s → High Permeability

4. 혈장 단백 결합 시험

1H10의 혈장 단백 결합율을 측정하기 위하여 평형투석법으로 혈장 단백결합율을 확인한 결과, human과 rat에서의 unbound fraction은 0.008%, dog와 mouse는 unbound fraction은 0.004%로 낮은 F_{ub}을 보여, 1H10의 혈장 단백 결합율이 상당히 높은 것으로 확인하였다(표 8). 1H10은 Fb (%)가 human에서 99.9 ± 0.002, dog에서 100.0 ± 0.001, dog에서 99.9 ± 0.004, rat에서 99.8 ± 0.11, mouse에서 100.0 ± 0.002이었고 unbound fraction은 종차 없이 1% 이하였다. 따라서 1H10은 plasma protein binding이 높은 약물에 속하는 것으로 판단되었다.

표 8. 1H10의 혈장 단백 결합율

Compound	Species	F_{ub} (%)		F_b (%)		Recovery (%)	
		Mean ±SD	N	Mean ±SD	N	Mean ±SD	N
1H10	Human	0.008 ± 0.002	3	99.99± 0.002	3	97.79 ± 9.22	3
	Dog	0.004 ± 0.001	3	100.00 ± 0.001	3	85.50 ± 2.58	3
	Rat	0.008 ± 0.004	3	99.99± 0.004	3	93.15 ± 5.81	3
	Mouse	0.004 ± 0.002	3	100.00 ± 0.002	3	83.23 ± 2.56	3

Notes:

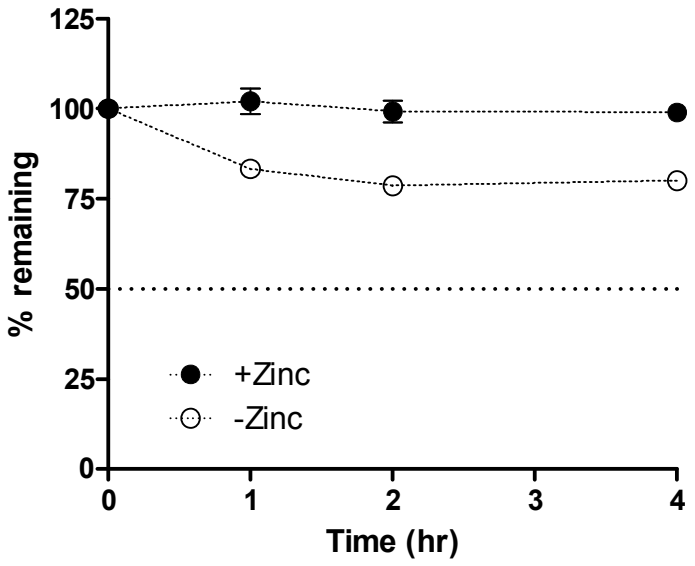
1. F_{ub} (%): fraction unboud (%)

2. Protein binding was determined by equilibrium dialysis using RED device. 1H10 (5 uM) in PBS was dialyzed for 4 hr at 37℃. Samples were analyzed by LC-MS/MS in positive MRM modes.

5. 혈장 안정성 시험

1H10의 완충용액에서 안정성을 확인하기 위하여 4시간까지 96% 이상의 안정성을 보였다(그림 3A). 시험물질의 혈장에서 안정성을 확인하기 위하여 human과 rat의 혈장에서 4시간 반응을 수행하였다. 그 결과 human과 rat plasma에서 4시간까지 80% 이상의 안정성을 보였다(그림 3B). 따라서 Plasma protein에 대해 종차 없이 1H10은 안정한 약물이라 보여진다.

A.



B.

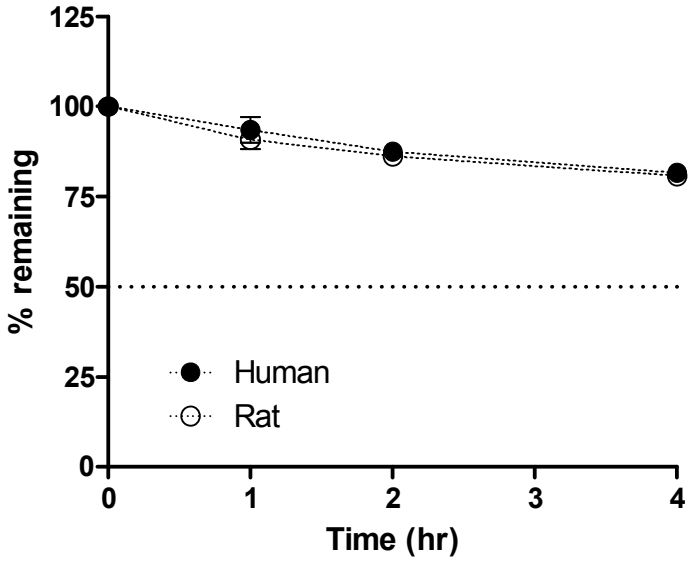


그림 3. 1H10의 0.1 M 인산완충액 [pH 7.4(A)] 및 혈장(B)에서의 안정성 시험

6. 대사안정성 시험

6.1 Phase Ⅰ 반응

다양한 종의 liver microsomes (Human, dog, rat, mouse)에서 Phase Ⅰ 반응의 cofactor인 NADPH에 의한 1H10의 대사 정도를 확인하였다. 반응시간 30분에 human은 약 48%, dog와 mouse는 약 65% 이상 그리고 rat은 약 75% 대사가 일어났다(표 9 & 그림 4). NADPH 부재 시 30분 반응 후에는 시험 종의 간 마이크로솜에서 91% 이상으로 안정하였다(표 9). Phase Ⅰ 대사반응의 시스템적으로 잘 구동되었는지 확인하기 위한 positive control인 buspirone을 사용하였다.

표 9. 간 마이크로솜에서 1H10의 Phase Ⅰ 반응의 대사안정성 평가

Liver microsomes	Cofactor	% remaining after 30 min incubation	
		1H10	Buspirone*
Human	+NADPH	51.86 ± 4.19	4.78 ± 0.80
	-NADPH	92.57 ± 2.53	95.29 ± 1.35
Dog	+NADPH	31.34 ± 0.93	6.93 ± 0.42
	-NADPH	91.90 ± 2.70	94.74 ± 2.26
Rat	+NADPH	25.11 ± 0.48	0.30 ± 0.25
	-NADPH	91.63 ± 3.91	96.87 ± 1.86
Mouse	+NADPH	32.87 ± 0.70	0.20 ± 0.18
	-NADPH	96.97 ± 2.27	94.52 ± 2.75

Notes:

1. Microsomal stability was determined in various species liver microsomes (0.5 mg protein/ml) at 37℃ for 30 min in the absence and presence of NADPH (1 mM) using 1 μM 1H10 (n=3).

2.* Positive control (n=3)

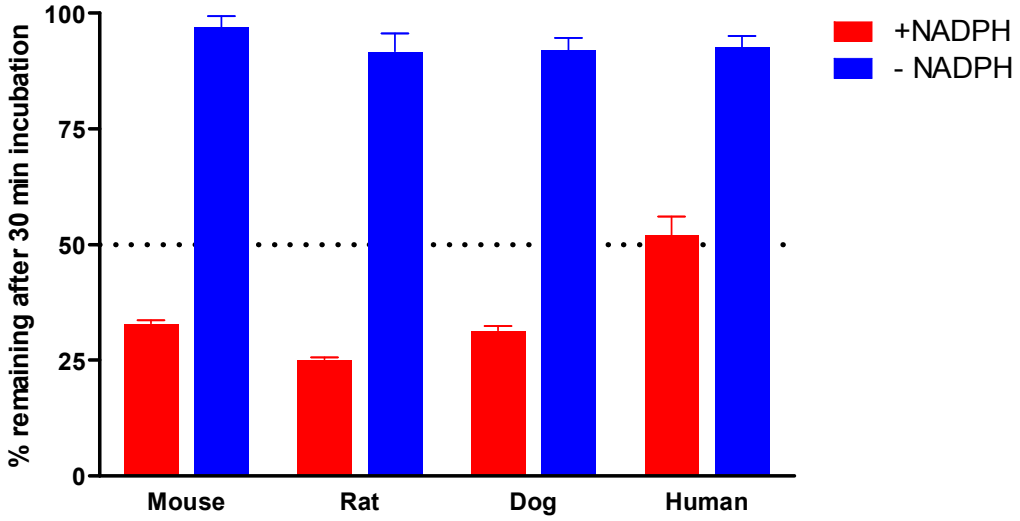


그림 4. 다양한 종에서 1H10의 Phase Ⅰ 반응의 안정성 평가

6.2 Phase Ⅱ 반응

다양한 종의 liver microsomes (Human, dog, rat, mouse)에서 Phase Ⅱ 반응의 cofactor인 UDPGA에 의한 1H10의 대사 정도를 확인하였다. 반응시간 30분에 human은 약 87%, dog는 75%, rat은 약 55% 그리고 mouse는 약 95% 이상 대사가 일어났다(표 10 & 그림 5). UDPGA 부재 시 30분 반응 후에는 시험 종의 간 마이크로솜에서 82% 이상으로 안정하였다(표 10). Phase Ⅱ 대사반응의 시스템적으로 잘 구동되었는지 확인하기 위한 positive control인 4-MUF을 사용하였다. UDPGA가 첨가된 반응에서는 전체적으로 1H10은 NADPH가 첨가된 반응보다는 대사 반응이 빠르게 일어났으며 특히 mouse liver microsomes에서 30분 incubation시 1H10의 남아있는 양은 5% 로 다른 종보다 대사 반응이 빠르게 일어났다. 결과적으로 1H10은 간에서의 대사 반응에 있어 CYP450 효소보다 UGT 효소에 의한 대사 반응에 불안정한 약물로 보여진다.

표 10. 간 마이크로솜에서 1H10의 Phase Ⅱ 반응의 대사안정성 평가

Liver microsomes	Cofactor	% remaining after 30 min incubation	
		1H10	4-MUF*
Mouse	+UDPGA	5.28 ± 0.32	0.00 ± 0.00
	-UDPGA	92.58 ± 1.80	93.03 ± 3.29
Rat	+UDPGA	45.19 ± 1.73	0.00 ± 0.00
	-UDPGA	92.65 ± 3.51	93.05 ± 0.55
Dog	+UDPGA	25.10 ± 0.87	0.00 ± 0.00
	-UDPGA	90.90 ± 0.95	92.28 ± 2.39
Human	+UDPGA	12.89 ± 0.69	0.00 ± 0.00
	-UDPGA	82.57 ± 2.85	93.32 ± 1.04

Notes:

1. Microsomal stability was determined in various species liver microsomes (0.5 mg protein/ml) at 37℃ for 30 min in the absence and presence of UDPGA (1 mM) using 1 μM 1H10 (n=3).

2.* Positive control (n=3)

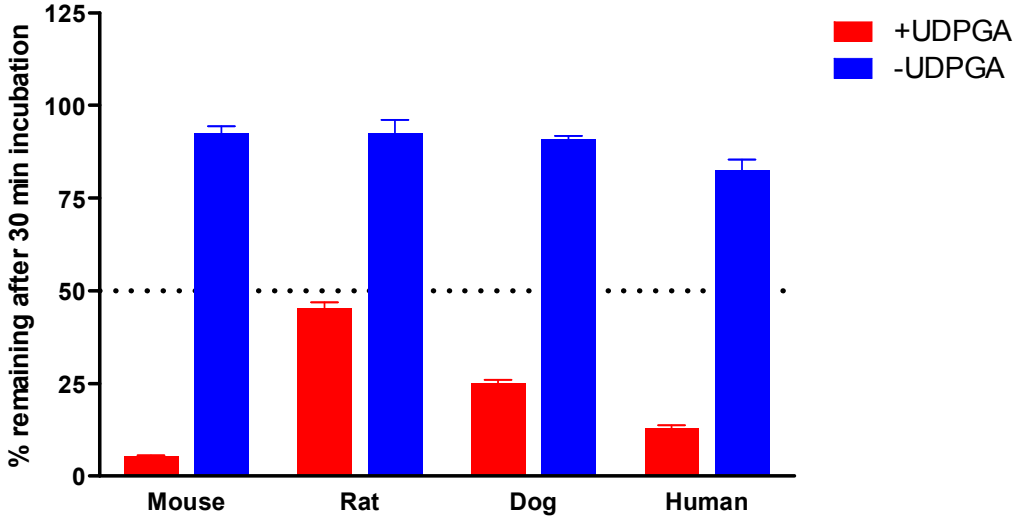


그림 5. 다양한 종에서 1H10의 Phase Ⅱ 반응의 안정성 평가

7. CYP inhibition

현재 약물대사에 많이 관여하고 있다고 알려져 있는 CYP isoform 8종 (CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP3A4(M), CYP3A4(T)) 에 대한 1H10의 약물상호작용 (drug-drug interaction, DDI)을 확인하기 위하여 CYP inhibition 시험을 수행하였다. 그 결과 CYP1A2에서 특이적으로 16% 억제가 일어났으며, CYP2C8와 CYP3A4(T)는 30% 이상 억제가 일어났다(표 11). 나머지 CYP isoform의 경우 중간이거나 억제가 적게 일어났다. CYP inhibition 시험 제대로 구동되었는지를 확인하기 위한 positive control은 CYP3A4 potent inhibitor인 ketoconazole을 사용하였다. 따라서 1H10의 drug-drug interaction potential은 CYP1A2를 제외하면 중간 혹은 낮은 약물로 판단되었다.

표 11. CYP isoform 8종에 대한 1H10의 CYP 저해 평가

% of Control	Control	1H10	Ketoconazole*
CYP1A2	100 ± 1.3	**16.0 ± 0.5**	101.7 ± 3.3
CYP2A6	100 ± 1.1	102.1 ± 1.2	102.4 ± 1.6
CYP2B6	100 ± 5.4	94.3 ± 7.2	96.4 ± 6.4
CYP2C8	100 ± 4.1	37.5 ± 0.9	99.1 ± 3.2
CYP2C9	100 ± 9.8	47.0 ± 5.4	101.4 ± 8.6
CYP2C19	100 ± 2.7	81.1 ± 1.9	96.6 ± 9.5
CYP2D6	100 ± 1.5	64.8 ± 2.4	101.3 ± 1.7
CYP3A4(M)	100 ± 2.6	101.4 ± 4.3	5.5 ± 0.3
CYP3A4(T)	100 ± 7.0	30.0 ± 0.7	4.0 ± 0.2

*Positive control (n=3)

결 론

신규 화합물이 신약개발과정을 통해 시판되기까지 많은 시간과 비용, 어려움이 존재한다. 따라서 본 연구에서 급성 뇌손상에 효과가 좋다고 알려진 1H10의 임상단계에서의 성공률을 높일 수 있는 후보물질로 선정하기 위해 선도물질 최적화단계를 위한 근거를 제공하고자 했다. 1H10의 약효를 약동학적 측면에서 확인해보고자 *In vivo* 및 *in vitro* 약물 동태 연구를 진행하였다. Rat를 이용하여 PK parameters를 산출하였고, 반감기가 5분정도로 매우 빨랐으며, 복강 투여 시 생체이용률이 30.28%로 경구투여시 더욱 낮은 수치의 생체이용률이 예상되어 경구용 제제로 부적합한 약동력학 특성을 보였다. 빠른 반감기와 낮은 생체이용률과 같이 좋지 않은 PK 특성들의 원인을 파악하기위 해서 추가적으로 용해도 시험, 투과도 시험, 혈장 단백 결합 시험, 혈장 안정성 시험, 대사안정성 시험, 저해평가 시험 총 6가지의 *in vitro* ADME assay를 진행하였다. 용해도 시험에서 pH 6.5에서 2.56 ug/ml pH 7.4에서는 4.7 2ug/ml으로 매우 낮은 수준을 보여 경구용 제제로 개발되기 위해서는 부형제의 선택이 중요할 것으로 생각된다. 낮은 생체이용률의 원인을 파악하기 위해서 PAMPA plate를 이용한 인공막 투과도 시험과 Caco-2 세포를 이용한 투과도 실험을 한 결과 두 실험 모두 낮은 reference compound인 Ranitidine과 유사한 수준으로 낮은 투과도를 보였다. RED device를 이용한 혈장 단백 결합 시험에서는 unbounded fraction이 종차없이 1% 이하로 대부분이 혈장 단백에 결합함으로써 약효를 나타낼 free form의 형태로는 거의 존재하지 않는 것을 확인할 수 있었다. Mouse, Rat, Dog, Human 각 종의 liver

microsome을 사용하고 cofactor로 Phase Ⅰ은 NADPH, Phase Ⅱ는 UDPGA를 사용한 대사안정성 시험에서는 Phase Ⅰ, Ⅱ 반응에 모두 불안정한 약물로 보인다. 혈장안정성시험에서는 Human과 Rat 혈장에서 4시간 반응시켰고, 4시간까지 80% 이상의 안정성을 보였다. 약물상호작용을 확인하기 위한 CYP 저해 평가시험에서도 많은 CYP isoform을 건드리면서 약물상호작용의 가능성이 매우 높을 것으로 보인다 이상의 결과로 1H10은 낮은 용해도와 투과도, 높은 혈장 단백 결합율로 급성 뇌손상 경구용 제제로는 적합하지 않은 약동력학 특성을 보여주었고, 약물상호작용까지 예상된다. 이러한 약동력학 특성의 파악을 통해 화학자들에게 제공함으로써 약동력학 특성을 개선시켜 선도물질인 1H10의 최적화에 중요한 역할을 하여 좋은 후보물질을 도출할 수 있을 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Deore, A., et al., *The Stages of Drug Discovery and Development Process.* Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development, 2019. **7**: p. 62-67.

2. Ator, M.A., J.P. Mallamo, and M. Williams, *Overview of drug discovery and development.* Curr Protoc Pharmacol, 2006. **Chapter 9**: p. Unit9.9.

3. Hughes, J.P., et al., *Principles of early drug discovery.* Br J Pharmacol, 2011. **162**(6): p. 1239-49.

4. Di, L., E.H. Kerns, and G.T. Carter, *Drug-like property concepts in pharmaceutical design.* Curr Pharm Des, 2009. **15**(19): p. 2184-94.

5. DiMasi, J.A., R.W. Hansen, and H.G. Grabowski, *The price of innovation: new estimates of drug development costs.* Journal of Health Economics, 2003. **22**(2): p. 151-185.

6. Dickson, M. and J.P. Gagnon, *The cost of new drug discovery and development.* Discov Med, 2004. **4**(22): p. 172-9.

7. Tuntland, T., et al., *Implementation of pharmacokinetic and pharmacodynamic strategies in early research phases of drug discovery*

and development at Novartis Institute of Biomedical Research. Front Pharmacol, 2014. **5**: p. 174.

8. Lin, J.H. and A.Y. Lu, *Role of pharmacokinetics and metabolism in drug discovery and development.* Pharmacol Rev, 1997. **49**(4): p. 403-49.

9. Meibohm, B. and H. Derendorf, *Pharmacokinetic/pharmacodynamic studies in drug product development.* J Pharm Sci, 2002. **91**(1): p. 18-31.

10. Bleicher, K.H., et al., *Hit and lead generation: beyond high-throughput screening.* Nat Rev Drug Discov, 2003. **2**(5): p. 369-78.

11. Lin, J.H., *The role of pharmacokinetics in drug discovery: finding drug candidates with the greatest potential for success.* Ernst Schering Res Found Workshop, 2002(37): p. 33-47.

12. Ruiz-Garcia, A., et al., *Pharmacokinetics in drug discovery.* J Pharm Sci, 2008. **97**(2): p. 654-90.

13. Alavijeh, M.S. and A.M. Palmer, *The pivotal role of drug metabolism and pharmacokinetics in the discovery and development of new medicines.* IDrugs, 2004. **7**(8): p. 755-63.

14. Almazroo, O.A., M.K. Miah, and R. Venkataramanan, *Drug Metabolism in the Liver.* Clin Liver Dis, 2017. **21**(1): p. 1-20.

15. Garza, A.Z., S.B. Park, and R. Kocz, *Drug Elimination*, in *StatPearls*. 2022, StatPearls Publishing Copyright © 2022, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).

16. Remmer, H., *The role of the liver in drug metabolism.* The American Journal of Medicine, 1970. **49**(5): p. 617-629.

17. Iyanagi, T., *Molecular Mechanism of Phase I and Phase II Drug-Metabolizing Enzymes: Implications for Detoxification*, in *International Review of Cytology*. 2007, Academic Press. p. 35-112.

18. Jancova, P., P. Anzenbacher, and E. Anzenbacherova, *PHASE II DRUG METABOLIZING ENZYMES.* Biomedical papers, 2010. **154**(2): p. 103-116.

19. Gibson, G.G. and P. Skett, *Introduction to drug metabolism*. 2013: Springer.

20. Zhao, M., et al., *Cytochrome P450 Enzymes and Drug Metabolism in Humans.* International journal of molecular sciences, 2021. **22**(23): p. 12808.

21. Esteves, F., J. Rueff, and M. Kranendonk, *The Central Role of Cytochrome P450 in Xenobiotic Metabolism-A Brief Review on a Fascinating Enzyme Family.* J Xenobiot, 2021. **11**(3): p. 94-114.

22. Wyss-Coray, T., *Ageing, neurodegeneration and brain rejuvenation.* Nature, 2016. **539**(7628): p. 180-186.

23. Hou, Y., et al., *Ageing as a risk factor for neurodegenerative disease.* Nat Rev Neurol, 2019. **15**(10): p. 565-581.

24. Choi, B.Y., et al., *A Novel Zinc Chelator, 1H10, Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Modulating Zinc Toxicity and AMPK Activation.* Int J Mol Sci, 2020. **21**(9).

25. Qi, Z. and K.J. Liu, *The interaction of zinc and the blood-brain barrier under physiological and ischemic conditions.* Toxicol Appl Pharmacol, 2019. **364**: p. 114-119.

26. Frederickson, C.J., J.Y. Koh, and A.I. Bush, *The neurobiology of zinc in health and disease.* Nat Rev Neurosci, 2005. **6**(6): p. 449-62.

27. Kim, Y.H., et al., *Zinc-induced cortical neuronal death with features of apoptosis and necrosis: mediation by free radicals.* Neuroscience, 1999. **89**(1): p. 175-82.

28. Krall, R.F., T. Tzounopoulos, and E. Aizenman, *The Function and Regulation of Zinc in the Brain.* Neuroscience, 2021. **457**: p. 235-258.

29. Portbury, S.D. and P.A. Adlard, *Zinc Signal in Brain Diseases.* Int J Mol Sci, 2017. **18**(12).

30. Kim, Y.H., J.W. Eom, and J.Y. Koh, *Mechanism of Zinc Excitotoxicity: A Focus on AMPK.* Front Neurosci, 2020. **14**: p. 577958.

31. Kim, J., et al., *AMPK activators: mechanisms of action and physiological activities.* Experimental & Molecular Medicine, 2016. **48**(4): p. e224-e224.

32. Hardie, D.G., F.A. Ross, and S.A. Hawley, *AMPK: a nutrient and energy sensor that maintains energy homeostasis.* Nature reviews. Molecular cell biology, 2012. **13**(4): p. 251-262.

33. Eom, J.W., et al., *Identifying New AMP-Activated Protein Kinase Inhibitors That Protect against Ischemic Brain Injury.* ACS Chem Neurosci, 2019. **10**(5): p. 2345-2354.

34. Derendorf, H. and B. Meibohm, *Modeling of pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) relationships: concepts and perspectives.* Pharm Res, 1999. **16**(2): p. 176-85.

35. Lu, W., et al., *Microsurgical Skills of Establishing Permanent Jugular Vein Cannulation in Rats for Serial Blood Sampling of Orally Administered Drug.* J Vis Exp, 2021(178).

36. Polson, C., et al., *Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid*

chromatography-tandem mass spectrometry. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2003. **785**(2): p. 263-75.

37. Lee, K. and D.R. Thakker, *Saturable transport of H2-antagonists ranitidine and famotidine across Caco-2 cell monolayers.* J Pharm Sci, 1999. **88**(7): p. 680-7.

38. van Breemen, R.B. and Y. Li, *Caco-2 cell permeability assays to measure drug absorption.* Expert Opin Drug Metab Toxicol, 2005. **1**(2): p. 175-85.

39. Artursson, P. and J. Karlsson, *Correlation between oral drug absorption in humans and apparent drug permeability coefficients in human intestinal epithelial (Caco-2) cells.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1991. **175**(3): p. 880-885.

40. Ottaviani, G., S. Martel, and P.A. Carrupt, *Parallel artificial membrane permeability assay: a new membrane for the fast prediction of passive human skin permeability.* J Med Chem, 2006. **49**(13): p. 3948-54.

41. Berben, P., et al., *Drug permeability profiling using cell-free permeation tools: Overview and applications.* Eur J Pharm Sci, 2018. **119**: p. 219-233.

42. Waters, N.J., et al., *Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding.* J Pharm Sci, 2008. **97**(10): p. 4586-95.

43. Chen, Z.H., et al., *An improved substrate cocktail for assessing direct inhibition and time-dependent inhibition of multiple cytochrome P450s.* Acta Pharmacol Sin, 2016. **37**(5): p. 708-18.

44. Spaggiari, D., et al., *A cocktail approach for assessing the in vitro activity of human cytochrome P450s: an overview of current methodologies.* J Pharm Biomed Anal, 2014. **101**: p. 221-37.

45. Otten, J.N., et al., *An in vitro, high throughput, seven CYP cocktail inhibition assay for the evaluation of new chemical entities using LC-MS/MS.* Drug Metab Lett, 2011. **5**(1): p. 17-24.

Abstract

With the aging of the population around the world, the prevalence of senile neurological diseases is increasing, but there is no fundamental treatment, so it is necessary to develop new drugs. Excessive activity of AMPK is known to cause neuronal apoptosis. In previous studies of AMPK inhibitory assessment, along with various neurotoxic assessments such as zinc excitation, glutamate excitation, oxidative stress, and efficacy assessment using Rat MCAO (middle cerebral artery occlusion) model, 1H10 was discovered as a lead compound. In this study, *in vivo* rat PK (pharmacokinetics) and *in vitro* ADME (absorption, distribution, metabolism, excretion) assays were performed for PK study of the lead compound 1H10. When 1H10 was injected intravenously to rat, it showed a low systemic exposure, fast half-life ($t_{1/2}$ = 0.16 hr), and low distribution volume (V_{ss} = 0.13 L/kg). Rapid absorption (t_{max} = 5min) was shown during intraperitoneal injection, and the bioavailability was observed to be 30.3%. The lead compound 1H10 was expected to show a relatively low absorption rate in the intestine as it showed a low apparent permeability (P_{app}) value (1.3 x 10^{-6} cm/sec) in the permeability test using Caco-2 cells. In Human, dog, rat, mouse, 1H10 showed high plasma protein binding (fu <0.1%) and low metabolic stability. In the microsomal stability assay using Liver microsomes, for cytochrome P450 (CYP)-dependent reactions, % remaining of 1H10 was human (52%) > mouse (33%), > dog (31%) > rat (25%) and for glucuronation

reactions, % remaining was rat (45%) > dog (25%) > mouse (13%). In addition, 1H10 was observed to inhibit 16%, 37%, and 30% of CYP1A2, CYP2C8 and CYP3A4(Testosterone) at 10uM concentration, respectively. The above results suggest that although the lead compound 1H10 shows excellent efficacy, it has a low absorption, high metabolic rate, and CYP inhibitory properties. Therefore, it is necessary to understand the structural characteristics of this lead compound for the future.