

혈장 시료 풀링을 통한 신약 후보물질의 흡수율 고효율 검색기법의 평가

이인경 · 구효정* · 정석재 · 이민화 · 심창구[†]

서울대학교 약학대학, 가톨릭의대 의과학연구소
(2000년 5월 27일 접수)

Evaluation of a Sample-Pooling Technique in Estimating Bioavailability of a Compound for High-Throughput Lead Optimazation

In Kyong Yi, Hyo-Jeong Kuh*, Suk-Jae Chung, Min-Haw Lee, Chang-Koo Shim[†]

College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

*Catholic Research Institute of Medical Science, Catholic University, Seoul 137-701, Korea

(Received May 27, 2000)

ABSTRACT—Genomics is providing targets faster than we can validate them and combinatorial chemistry is providing new chemical entities faster than we can screen them. Historically, the drug discovery cascade has been established as a sequential process initiated with a potency screening against a selected biological target. In this sequential process, pharmacokinetics was often regarded as a low-throughput activity. Typically, limited pharmacokinetics studies would be conducted prior to acceptance of a compound for safety evaluation and, as a result, compounds often failed to reach a clinical testing due to unfavorable pharmacokinetic characteristics. A new paradigm in drug discovery has emerged in which the entire sample collection is rapidly screened using robotized high-throughput assays at the outset of the program. Higher-throughput pharmacokinetics (HTPK) is being achieved through introduction of new techniques, including automation for sample preparation and new experimental approaches. A number of *in vitro* and *in vivo* methods are being developed for the HTPK. *In vitro* studies, in which many cell lines are used to screen absorption and metabolism, are generally faster than *in vivo* screening, and, in this sense, *in vitro* screening is often considered as a real HTPK. Despite the elegance of the *in vitro* models, however, *in vivo* screenings are always essential for the final confirmation. Among these *in vivo* methods, cassette dosing technique, is believed the methods that is applicable in the screening of pharmacokinetics of many compounds at a time. The widespread use of liquid chromatography (LC) interfaced to mass spectrometry (MS) or tandem mass spectrometry (MS/MS) allowed the feasibility of the cassette dosing technique. Another approach to increase the throughput of *in vivo* screening of pharmacokinetics is to reduce the number of sample analysis. Two common approaches are used for this purpose. First, samples from identical study designs but that contain different drug candidate can be pooled to produce single set of samples, thus, reducing sample to be analyzed. Second, for a single test compound, serial plasma samples can be pooled to produce a single composite sample for analysis. In this review, we validated the issue whether the second method can be applied to practical screening of *in vivo* pharmacokinetics using data from seven of our previous bioequivalence studies. For a given drug, equally spaced serial plasma samples were pooled to achieve a “Pooled Concentration” for the drug. An area under the plasma drug concentration-time curve (AUC) was then calculated theoretically using the pooled concentration and the predicted AUC value was statistically compared with the traditionally calculated AUC value. The comparison revealed that the sample pooling method generated reasonably accurate AUC values when compared with those obtained by the traditional approach. It is especially noteworthy that the accuracy was obtained by the analysis of only one sample instead of analyses of a number of samples that necessitates a significant man-power and time. Thus, we propose the sample pooling method as an alternative to *in vivo* pharmacokinetic approach in the selection potential lead(s) from combinatorial libraries.

Keywords—Higher-throughput screening, HTPK, Sample pooling, AUC, Cassette dosing

Combinatorial chemistry (CC) 라는 새로운 합성기법에 의해 compound library의 규모가 매우 빠른 속도로 증가하

고 있다. 예컨대 1998년 Glaxo-Wellcome사에서 이 기법을 이용하여 4명의 화학자가 약 2500만개의 신물질을 합성할 수 있었다고 한다. 초기에는 이 기법은 주로 peptide나 oligonucleotide의 library를 얻는 데에 사용되었으나, 이제는 분자량이 매우 큰 물질을 합성하는 데에까지 활용되고 있

[†]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 02)880-7873, E-mail : shimck@plaza.snu.ac.kr

다.¹⁾ 최근 이러한 CC기법이 보편화 되어감에 따라, 즉 단시간내에 매우 다양한 여러 가지 화합물 library를 확보할 수 있게 됨에 따라, 새로운 의약품 개발 가능성도 그만큼 획기적으로 커졌다고 할 수 있다.

오늘날 신약개발에 가장 크게 기여할 것으로 기대되고 있는 분야는 genomics이다. Genomics의 발달로 많은 target이 발견되었는데, Poste에 의하면 genomics의 발달로 인해 1995년 이전에는 500개에 불과하던 biological target이 70000개 이상으로 증가되었다고 한다.²⁾ 신약개발에 있어서 library의 확보에 못지 않게 중요한 또 다른 단계는 많은 library를 검색하여 신약후보물질 (lead compound)를 도출하는 과정이다. 최근 CC기법에 의해 화합물을 합성하는 과정이 급속도로 빨라짐에 따라, 그 많은 물질들을 검색하는 단계가 신약개발의 속도를 결정하게끔 되었다. 현재 알려져 있는 물질의 약 절반이 약물로 사용될 가능성이 있는 물질이라고 할 경우, 약 10^7 개의 화합물이 검토의 대상이 된다. 물론 이것도 엄청나게 많은 숫자이지만, 몇몇 사람들에 의하면 'drug universe' (약물일 가능성이 있는 물질)의 개수는 무려 10^{62} 개에 이를 것이라고 한다. 그렇다면 현재까지는 가능성 있는 물질 개수의 약 10^{53} %만이 검토되어 있는 셈이다.³⁾ 따라서 CC기법에 의해 새로운 물질이 합성되는 속도가 가속되고 있는 세계적인 추세를 고려하면 우리나라도 머지 않아 기하학적인 규모의 combinatorial library를 확보하게 될 것이다. 이 많은 물질들을 기존의 low-throughput screening 방법으로 약효나 독성, 또는 체내동태 특성을 검색하기란 물리적으로 불가능하다. 따라서 사람들은 많은 물질들을 효율적으로 검색할 수 있는 방법을 생각하게 되었고, 그 결과 high-throughput screening (HTS) 기법이 탄생하게 되었다.

HTS란 말 그대로 단시간에 적은 비용을 들여서 보다 많은 물질을 검색하는 모든 방법을 일컫는다. 다시 말해 HTS는 sample preparation시간을 줄이기 위한 자동화, 적은 양의 물질을 사용하여 한꺼번에 많은 수의 물질을 검색할 수 있는 miniaturization, 그 밖에 *in vivo* 및 *in vitro*에서 흡수 동태나 효과를 고속으로 검색하는 모든 방법을 총칭한다. 한마디로 HTS는 시간, 비용면에서 경제적으로 많은 물질을 정보화하기 위한 기술이라고 말할 수 있다. 제약선진국에서 HTS가 시작된 것은 이미 오래 전 일이지만 그 동안 HTS는 주로 약효를 검색하는 방법으로 생각되어 왔다. 그러나 신약 개발 과정에 있어서 중요한 변수로 작용하는 것은 물질의 약효만은 아닐 것이다. 최근 물질의 체내동태특성 또한 신약개발에 중요한 변수라는 것이 알려지고 있는데, 예컨대 한 조사에 따르면 신약개발의 최종단계에서 약물을 drop 하는 요인의 40%가 바로 체내동태학적 특성이 불량하였기 때문이

라고 한다. 따라서 약물개발 초기단계에서 단시간에 PK parameter를 검색하는 방법이 많이 개발되게 되었다. 신속히 약효를 검색하는 방법을 HTSS (high-throughput screening system)라고 부르는 것과 유사하게, 신속히 체내동태를 검색하는 방법을 HTPK (high-throughput pharmacokinetic)⁴⁾라고 부른다.

in vitro HTS는 주로 HTSS를 위한 수단으로 사용되었다. 흡수모델로서 다양한 cell line을 이용하는 경우가 많은데, 가장 대표적인 세포주가 Caco-2 cell이다. Caco-2 cell은 소장 상피세포와 유사한 특성을 갖고 있기 때문에 소장흡수를 예측하기 위한 model로서 많이 사용된다.⁵⁾ Caco-2 cell이 사람의 대장암 유래 세포라는 것을 고려하여 대장으로의 약물 흡수를 예측하는 실험계로도 사용되고 있다.^{6,7)} Caco-2 cell은 배양하기 위해 3주라는 비교적 긴 시간이 걸린다는 단점이 있지만, 최근에는 3일 동안 배양한 후 assay에 이용할 수 있는 방법이 보고되었다.⁸⁾ 또 여러 가지 물질을 함께 apical막측에 가한 후 basal막측을투과한 약물의 농도를 측정함으로써, 이들 물질의 위장관 흡수 정도를 빠른 시간 내에 추정할 수 있었다. Taylor 등은 24가지의 약물을 이 실험계에 함께 투여하여 이 물질들의 장관흡수 가능성을 검토한 바 있다.⁹⁾ 만약에 combinatorial chemistry로 얻은 많은 물질에 대하여, Caco-2 cell 실험계를 써서 흡수 가능성이 높은 물질만 선별한 후, 다음 단계의 screening (약효, 독성 등)을 거치도록 한다면 신약개발에 걸리는 시간은 상당히 단축될 것이다. Caco-2 cell 이외에 개의 신장 상피 세포인 MDCK cell도 흡수를 예측하기 위한 *in vitro* HTS 수단으로 많이 사용된다. Rubas 등은 Caco-2 cell과 pituitary cell을 동시에 사용하는 실험을 구상하여 pituitary에 작용하는 약물의 흡수와 효과를 동시에 검색할 수 있는 방법을 제안하기도 하였다.¹⁰⁾

대사를 신속하게 예측하기 위한 *in vitro* metabolism screening 방법도 속속 개발되고 있다. 예컨대 실험 동물이나 사람의 간으로 microsome이나 short term culture로 얻은 isolated hepatocyte를 이용하여 간대사를 예측하는 방법 등이 개발되었다.¹¹⁾ 물론 *in vitro* 실험으로부터 *in vivo* 흡수나 대사를 예측하는 데에는 한계가 있겠지만 *in vivo* pharmacokinetics를 알아보기 전 단계의 screening으로서는 충분한 의미가 있을 것이다. *In vitro* screening을 거친 물질은 *in vivo* screening단계에 들어가게 된다. 그러나 *in vitro* 실험이 반드시 *in vivo* 실험결과와 일치한다고는 할 수 없다. 왜냐하면 *in vitro* 실험은 몇 가지 요인을 제어한 뒤 특정 단계에 대해서만 검토하는 실험 기법이기 때문이다. 그러나 실제의 약물의 흡수나 대사, 분포, 배설은 위장관 막 투과 이외

에도 혈류, 단백질결합, 효소활성, 배설 수송계의 활성 등 다양한 생리적인 요인에 의하여 결정되기 때문에, 아무리 좋은 *in vitro* 결과를 얻었다 하더라도 *in vivo* screening은 반드시 해야 한다. 그러나 *in vivo*에서 약물의 체내동태를 검색하는데에는 많은 시간과 인력, 노력이 소요되기 때문에, 이 *in vivo* 체내동태 검색속도를 높이기 위한 여러 가지 방법이 개발되고 있다. 대표적인 방법으로 cassette dosing 기법이 있다.¹²⁾

Cassette dosing은 “N in one dosing” 또는 “cocktail dosing”이라고도 하는데, 말 그대로 여러 가지 물질을 한꺼번에 동물에게, 마치 카세트틀을 꽂듯이 또는 카테일을 투여하듯 투여한 뒤 각 물질의 체내동태를 한꺼번에 조사하는 방법을 뜻한다. 보통은 10-20개의 물질을 한 cassette으로 하여, 한 물질의 농도가 10/n ng/ml (n은 한 cassette 내의 물질의 갯수) 정도가 되도록 조절하여 투여한다. 이 방법을 사용하면 screening 속도를 높일 수 있음은 물론, 사용하는 동물의 수를 줄일 수 있다. 그러나 cassette dosing을 통해서 얻은 체내동태 data를 믿을 수 없다 (즉, 1개씩 투여하여 얻은 데이터와 다른 결과를 보인다면) 이 기법은 아무런 의미가 없는 방법에 불과하다. 그러나 Frick 등은 12-22개 정도의 물질을 한 cassette으로 투여했을 때와 각 물질을 따로 투여했을 때 유사한 결과가 나온다는 것을 입증한 바 있다. 또한 이들은 90개의 물질을 한 마리의 rat에 함께 투여한 후, 그 물질들의 반감기를 한 물질씩 투여했을 때의 반감기와 비교하였더니 두 투여방법간에 반감기의 차이가 별로 없었다. 이로부터 cassette dosing 기법을 lead compound를 선택하기 위한 방법으로 사용할 수 있다는 믿음을 갖게 되었다.¹²⁾ 그리고 cassette dosing 기법을 통해 혈중 농도 profile뿐 아니라 brain penetration, urinary recovery도 예측 가능하다는 것을 알게 되었다.

그러나 cassette dosing 기법은 몇 가지 위험요인을 갖고 있다는 사실에 유의하여야 한다. 즉, 많은 약물을 함께 투여하기 때문에 흡수, 분포, 대사, 배설과정에서 약물간에 상호작용이 일어나기 쉽고, 여러 가지 약물들의 생리학적 작용이 축적되어 나타나기 쉽다. 이러한 문제점을 방지하기 위하여, 가능한 한 (혈중농도를 정량할 수 있는 한) 각 약물들을 저용량으로 투여하며, 또 이미 혈중 농도 profile을 잘 알고 있는 내부 표준물질을 함께 투여함으로써 추정 데이터의 신뢰성을 확인하기도 한다. 대사 단계의 상호작용이 특히 염려가 되는 경우라면, screening 하려는 물질과 같은 경로로 대사되는 물질을 내부 표준물질로 사용하면 좋을 것이다. 그러나 cassette dosing의 목적이 정확한 체내동태 data를 얻으려는 것이 아니고 수많은 물질 중 다른 물질보다 AUC가 수

십-수백 배 큰 물질을 찾으려는 것인 점을 고려하면, 상기한 약물간 상호 작용은 실제로는 큰 문제가 되지 않을 것이다. 또 CC기법에 의해 얻어지는 신물질의 양이 매우 소량인 점을 고려하면, cassette dosing은 몇 가지 단점이 있음에도 불구하고 많은 물질을 효율적으로 screening 하는 매우 좋은 방법이라고 할 수 있겠다.

이상에서 *in vitro* screening이나 cassette dosing 기법에 대하여 설명하였는데, 이러한 기법이 개발될 수 있었던 것은 혼합물 중에 들어 있는 매우 낮은 농도의 여러 물질을 분석할 수 있는 기술이 개발되었기 때문이다. 즉 1990년대 초에 개발된 LC-MS, LC-MS/MS, 또는 atmospheric pressure chemical ionization (API) 장치까지 붙은 LC-API/MS/MS 방법은 종래의 UV방법에 sensitivity와 selectivity가 현저히 향상된 방법이다.⁴⁾ Olah 등은 LC-API/MS 방법을 이용하여 1-1000 ng/ml 농도범위에 있는 12개의 약물을 동시에 detection 할 수 있었다. 이에 따라 그들은 2개의 다른 target에 작용하는 400개의 물질을 24주 동안에 분석해 낼 수 있었다.¹³⁾ 또 LC-API/MS/MS 방법은 MS/MS의 선택성이 높기 때문에 분석에 걸리는 시간이 대개 2-3분 정도 밖에 안 된다. 그 덕분에 하룻밤 정도 기계를 돌리면 약 150-200개의 시료를 분석할 수 있다고 한다.¹⁵⁾

한편 생체 시료 중 약물을 분석하는 과정 중에서 율속단계로 작용하고 있는 혈장 시료 처리 과정을 신속히 처리함으로써 체내동태 검색 속도를 높이려는 연구도 활발히 시도되고 있다. 지금까지 알려진 sample preparation 방법으로는 직접 주입하는 방법 (direct injection)과 matrix clean up 방법을 들 수 있다. 그러나 직접 주입하는 방법은 lipophilic한 물질에 한해 사용할 수 있기 때문에, 일반적으로는 matrix clean up 방법이 널리 활용되고 있다. Matrix clean up 방법으로는 liquid-liquid extraction (LLE), 수동 또는 로봇 자동화된 solid-phase extraction (SPE), 단백질침전법 등이 있다. 종래의 HPLC/UV 또는 GC 방법으로 분석하기 위해서는 약 200-1000 μ l의 혈장 (또는 혈청)이 필요하고, 경우에 따라서는 유도체화를 시켜야 하기 때문에 분석법을 개발하는데에만 1-3주 걸린다. 그러나 HPLC/API/MS/MS 방법이 개발됨에 따라 chromatography로는 분리가 불가능했던 물질들 (예: 동위원소들)을 혼합시료로부터 검출 또는 정량할 수 있게 되었다. 이는 MS/MS detector의 resolving power가 탁월하기 때문이다. 한편 시료의 처리 속도를 높이기 위하여, SPE (solid phase extraction) 과정을 자동화한 Gilson ASPEC XL이라는 로봇 장치 개발된 바 있다. 또 Spark-Holland사는 개발한 Propekt system이라는 자동화된 on-line solid-phase extraction (SPE) 시스템을 개발한 바 있는데

, 혈장 시료를 auto-sampler를 통해 이 시스템에 주입하면 시료중의 약물들은 Prospekt에 의해 추출된 후, 곧장 역상 HPLC 칼럼과 가열된 nebulizer interface를 거쳐 mass spectrometer로 들어가게 된다. McLoughlin 등은 Prospekt system과 연결되어 있는 API-MS 장치를 이용하여 beagle dog에 경구, 또는 정맥으로 투여된 10개의 약물의 혈중농도를 동시에 분석할 수 있었다.¹⁴⁾

한편 Zimmer 등은 turbulent-flow chromatography (TFC)와 MS/MS를 조합한 고속 분석법을 개발하였다.¹⁵⁾ TFC란 1997년에 미국의 Cohesive Technologies사의 Quinn과 Takrewski가 개발한 방법으로, 50 μm 의 구형 다공성 입자로 채운 특수한 칼럼에 crude혈장을 직접 주입하는 신속한 분석법이다. TFC에서는 시간이 많이 걸리는 시료의 clean-up 과정이 필요없다 대신에 90개의 혈장 시료가 들어 있는 96-well plate를 TFC/MS/MS기계로 5.25 시간에 분석할 수 있다 (시료 하나당 3.3분 걸리는 셈). 이 방법에서는 상기한 칼럼내에서 추출과 분석이 동시에 일어나기 때문에 분석에 걸리는 시간이 매우 짧아지는데, 예컨대 내경 1 mm짜리 칼럼에 4-6 ml/min의 속도로 이동상을 흘려 보낸다면, 총 분석에 걸리는 시간은 2분에 불과하다. 이 turbulent flow 조건 하에서는 단백질 같은 고분자에 99%이상 결합되어 있는 작은 약물 분자도 신속하고 효과적으로 분리할 수 있다. 따라서 100개의 sample을 분석하는 데 종래의 liquid-liquid extraction방법으로 8시간이 걸린 데 반해, TFC/MS/MS 방법으로는 1시간밖에 걸리지 않았다.¹⁵⁾

최근에는 HTS를 위하여 시료의 miniaturization과 분석의 automation을 동시에 추구하고 있다. 이 방법에서 key가 되는 기술은 정확 정밀한 microfluidics 기술 및 고감도 검출 기술이다. 이 방법으로 screening 속도가 획기적으로 빨라질 수 있기 때문에 이런 기술을 UHTS (ultra-high-throughput screening)라고 부르기도 한다.¹⁶⁾

자동화된 plate reader와 pipetter가 개발됨으로써 miniaturization이 가능해졌는데, miniaturization을 함으로써 크게 세 가지 이점이 있다. 첫째, 생화학적 reagent의 사용을 줄임으로써 screening에 사용되는 비용을 절감할 수 있다. 이 때, 사용하는 시료의 부피에 비례하여 비용이 줄어든다고 한다. screening 단계에서 reagent 구입에 드는 비용이 총비용의 3/4를 차지하는 것을 고려하면 상당히 비용이 절감될 것을 예상할 수 있다. 둘째, turn around time을 줄일 수 있다. 한 plate에 더 많은 sample을 담을 수 있으므로 sample간 거리를 줄일 수 있고 sample간 거리를 줄임으로써 screening에서 중요한 time factor인 sample transport 시간을 줄여서 sample하나를 분석하는 데 걸리는 시간이 그만큼 줄어든다.

마지막으로 miniaturization으로 분석하는 데 필요한 공간을 줄일 수 있다. 그 밖에도 적은 용량만을 사용하므로 radioactive한 물질의 사용을 줄일 수 있다는 이점도 있다.

실제로 Aurora Biosciences사에서는 3456개의 well (Nano Well™)을 장착한 UHTSS™라는 기계를 개발하고 있다(금년 중 개발될 것으로 예상됨). 이 기계에서는 검출 방법으로 FRET (fluorescence resonance energy transfer) assay 방법을 채택하고 있다. 한 해에 1.5개의 신약을 개발하는 회사는 약 40개의 HTS assay를 필요로 하며 50만개의 물질에 대하여 assay를 해야 한다.¹⁷⁾ 이것을 요즘 사용되고 있는 96-well plate나 384-well이 장착된 자동 분석기로 분석하려면 매우 많은 시간이 소요되겠지만, 3456개의 well (Nano-Well™)을 장착한 UHTSS™라는 기계를 사용하면 분석 시간을 대폭 단축할 수 있을 것이다. 이 방법으로 nanoliter scale의 분석도 가능할 것이다.

지금까지 소개한 것 외에도 HTS를 위해서는 분석해 낸 많은 data를 빨리 처리할 수 있는 software의 개발도 필요하다. 즉, HTS를 위해서는 biology, genomics, chemistry, detection technique, automation과 같이 여러 가지 학문과 기술의 접목도 필요하다. 선진국에서는 이미 많은 제약 회사와 연구실이 HTS에 직, 간접적으로 참여하고 있다. 본 논문에서는 HTS에 관한 수 많은 시도 중, *in vivo* 체내동태 (주로 AUC)를 pooled plasma sample로부터 추정하는 방법의 타당성에 대하여 검토한 결과 (즉 validation)를 보고하고자 한다. 이 방법은 Cox등¹⁹⁾이 제안한 방법이지만, 방법의 타당성에 대하여 다양한 약물을 써서 체계적으로 검증한 논문은 보고된 바 없다. 본 연구의 결과, 풀링한 혈장 시료 중의 약물 농도를 정량함으로써, 다양한 약물의 흡수(AUC)를 비교적 정확하게 예측할 수 있음을 알았다.

실험방법

이론적 배경

HTPK또는 pharmacokinetics (PK) screening이란 AUC나 clearance등 PK parameter중 하나를 빨리 구할 수 있는 screening방법을 뜻한다. Cox등¹⁹⁾은 rat에 test compound를 경구 투여한 후 1 시간 간격으로 6시간까지 같은 부피의 혈액을 sampling하였다. 그리고 취한 혈액을 모두 섞어 이 pooled sample중 물질농도를 정량하면 이 물질의 무한대 시간까지의 AUC를 추정할 수 있을 것이라고 생각하였다. AUC는 경구투여한 약물에 대한 매우 유용한 정보이므로 이 방법을 통해서 실제 AUC 값을 추정할 수 있다면 단시간에 potential lead compound를 찾을 수 있을 것이다. Pooled

sample 중 약물 농도로부터 이 약물의 AUC를 추정할 수 있다는 논리는 다음과 같다.

원래 AUC를 구하기 위해서는 여러 시간 간격으로 혈액을 취해 혈중 농도를 정량한 다음, 이를 써서 시간-혈중 약물농도 그래프를 그리고 이로부터 trapezoidal rule을 써서 계산한다. 즉,

$$AUC_i = \frac{1}{2} \Delta t (C_{i-1} + C_i) \quad (1)$$

$$[AUC]_0^{t-1} = \sum_{i=1}^n AUC_i \quad (2)$$

만일 같은 시간 간격으로 채혈했다면 마지막 sampling time까지의 AUC는 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$[AUC]_0^{t-1} = \Delta t \left(\frac{1}{2} C_0 + C_1 + C_2 + \dots + \frac{1}{2} C_n \right) \quad (3)$$

이 때 각 시간에 취한 sample의 부피를 각각 $V_1, V_2, V_3, \dots, V_n$ 이라 하자. 위의 식으로부터 V_2-V_{n-1} 은 같은 부피(V)만큼 취하고 V_1 과 V_n 은 그 반($V/2$)만 취하여 섞고, 그 섞은 sample중의 약물농도를 $C_{pool,ave}$ 라고 하면 AUC의 추정값, 즉 AUC_{est} 는 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$AUC_{est} = \Delta t (nC_{pool,ave}) \quad (4)$$

동시간 간격으로 같은 부피의 혈액을 취하여 pooling한 후 하나의 sample만을 분석하면 그 시간 동안의 평균농도를 알아낼 수 있다. 이 평균농도에 전체 시간을 곱하 Figure 1의 직사각형의 넓이가 된다. 1h에서 6h까지 일정 시간 간격의 sample의 농도를 측정하면 AUC의 실제값을 계산할 수 있다. 이렇게 얻은 AUC와 각 sample을 같은 부피씩 취

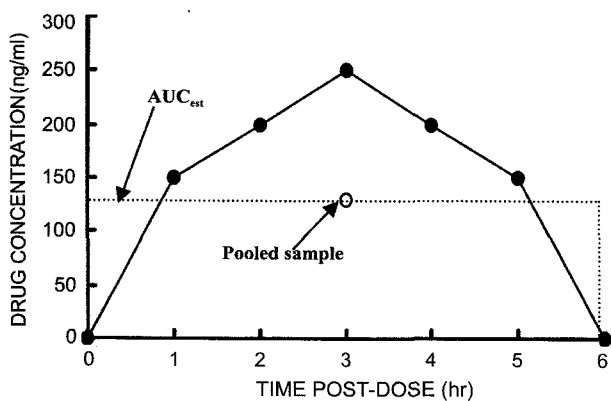


Figure 1—Illustration of the area under the curve (AUC) determination using a single pooled plasma measurement versus analysis of individual time points.

하여 섞은 후 그 농도를 측정하여 얻은 AUC추정값, 즉 Figure 1에서의 직사각형의 면적은 거의 같다. 따라서 이 방법으로 실제AUC에 근사하는 값을 얻을 수 있다.

만약 C_0 와 C_n 이 0이거나 아주 작아서 무시할 수 있다면, 처음과 마지막 시료도 다른 시료와 같은 부피(V)를 취하여 섞더라도, 실제값에 가까운 AUC_{est} 를 계산해낼 수 있을 것이다. 보통 경구투여한 약물의 경우 초기농도 (0h에서의 혈중농도)가 0이기 때문에 분석하지 않는다. 그러나 AUC를 계산하거나 여기서 소개한 방법대로 추정할 때는 초기 농도를 고려해 주어야 한다. 0h의 sample을 함께 pooling하지 않은 것을 보정하기 위해 Cox등은 다음과 같은 방법을 사용하였다. Figure 1에서 7 points의 평균농도를 $C_{pool,ave}$ 라고 하고, 6개의 sample을 pooling하여 측정한 값을 $C_{pool,obs}$ 라고 하면, 참된 평균농도 $C_{pool,ave}$ 은 $C_{pool,obs}$ 에 6/7을 곱해 주어야 얻어진다. sampling point가 n회일때는 $C_{pool,ave}$ 와 $C_{pool,obs}$ 의 관계는 다음과 같고 실제 측정된 값인 $C_{pool,obs}$ 로부터 AUC_{est} 는 식(6)과 같이 계산할 수 있다.

$$C_{pool,ave} = \frac{n-1}{n} C_{pool,obs} \quad (5)$$

$$AUC_{est} = \Delta t \times (n-1) C_{pool,obs} \quad (6)$$

3)식으로부터 처음과 마지막 sample은 1/2만 취하는 것이 실제값에 더 가깝다는 것을 알 수 있지만, 이 두 시료중의 약물 농도가 그다지 높지 않다면 같은 부피를 취한 경우에도 HTS에 큰 영향을 미치지 않을 것이다. 물론 이렇게 하면 AUC_{est} 은 실제값보다 약간 overestimate된다. 그러나 더 간단한 방법을 사용함으로써 screening속도를 더욱 가속화할 수 있고, 이 실험실에서 이 방법을 사용하여 200개의 물질의 AUC_{est} 를 비교하여 rank 해본 결과 실제의 AUC순으로 나열한 것과 큰 차이가 없었다고 한다. 그리고 실제 AUC와 그 추정값의 차이도 크지 않았다고 한다. 결과적으로 이 방법을 통해서 기존보다 4배나 빠른 속도로 어떤 물질의 AUC를 알아내는 데 성공했으며, standard curve도 더 좁은 범위에서 만들어도 충분하였다. 또 이 방법으로 AUC_{est} 를 계산할 수 있을 뿐 아니라 마지막 sample, 즉 6h의 sample 농도를 분석함으로써 그 물질의 반감기나 흡수도 예측할 수 있다고 제안하였다. 6h의 농도가 C_{pool} 과 유사하다면 그 물질은 C_{max} 에 도달하였고 혈중 소실반감기가 길 것이라는 점을 짐작할 수 있다. 반면에 6h에서의 농도가 C_{pool} 보다 작다면 경구투여시의 소실 반감기가 짧을 것임을, 6h의 농도가 C_{pool} 보다 아주 높다면 그 물질은 흡수가 매우 느리거나 소실반감기가 매우 길 것이라는 점을 짐작할 수 있다.

이처럼 간단한 방법으로 AUC를 추정할 수 있고 그 밖의 다른 정보도 얻을 수 있다면 이는 매우 유용한 *in vivo* HTS라고 할 수 있다. 본 연구에서는 기존의 생물학적 동등성 시험을 통해 갖고 있는 여러 약물의 혈중 농도 data를 분석하여 이 방법의 효용성을 검토해 보고자 하였다.

시간-혈중 농도 data

그 동안 실험실에서 했던 생물학적 동등성 실험의 결과를 이용하였다. 총 7가지의 약물을 사용하였는데, 당뇨병 치료제인 gliclazide²⁰⁾는 각 0.25, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 10, 24 h에서의 혈장 중 농도 데이터를 사용하였다. 간장약인 DDB²¹⁾는 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12 h에서의 혈장 중 농도 데이터를, ranitidine²²⁾은 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, 10, 12 h에서의 혈장 중 농도 데이터를, omeprazole은 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5, 8 h에서의 혈장중 약물농도 데이터를, prokinetic agent인 cisapride²³⁾는 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12, 24 h에서의 혈장중 약물농도 데이터를, nabumetone²⁴⁾은 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120 h에서의 혈장 중 약물농도 데이터를, loxoprofen²⁵⁾은 0.17, 0.33, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6 h에서의 혈장 중 약물농도 데이터를 사용하였다. 각 약물에 대해서 계산에 필요하지만 실측치가 없는 시점에서의 약물농도는 전후 시점에서의 약물농도로부터 외삽하여 구하였다. 이상의 데이터를 써서 7가지 약물에 대하여 각 사람에서의 AUC_{est}를 계산하였다[gliclazide (n=32명), DDB (n=28명), ranitidine (n=24명), omeprazole (n=33명), cisapride (n=24명), nabumetone (n=34명), loxoprofen (n=28명)].

AUC 추정값과 실제값의 계산

실제 AUC값 - 원 논문에서와 같이 trapezoidal rule을 사용하였다. 그리고 본 논문에서는 실제 AUC를 얼마나 반영하는지를 살펴보기 위해서 6시간까지의 실제 AUC인 AUC_{real,6}뿐 아니라 terminal phase까지의 AUC (AUC_{inf})도 계산하였다. AUC_{real,6}을 계산할 때는 원논문에서와 같이 6시간까지 1시간 간격으로 취한 sample에서 얻은 6개의 농도로부터 구했고, AUC_{inf}는 가지고 있는 모든 data로부터 계산했다.

$$AUC_{real,6} = \sum_{i=0}^{i=5} \frac{1}{2} \Delta t (C_i + C_{i-1}) \quad (8)$$

$$AUC_{inf} = AUC_{tlast} + \frac{C_{last}}{\lambda} \quad (9)$$

AUC추정값(AUC_{est}) - 원 논문에서와 같이 6시간까지 한

시간 간격으로 sampling했다고 가정하고 6시간까지의 AUC 추정값 AUC_{est}를 계산했다. 이 논문에서는 기존의 data로 Cox가 제안한 방법을 검토해 보려는 것이므로 sample을 실제로 섞을 수는 없었다. 각 시간마다 같은 부피의 혈액을 취해서 섞었다면 C_{pool}은 각 농도의 산술평균과 같게 나올 것이다. 따라서 각 시간에서 혈액의 농도인 C₁, C₂, C₃, C₄, C₅, C₆로부터 다음과 같은 방법으로 C_{pool}을 계산하였다.

$$C_{pool} = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_6}{6} \quad (10)$$

그리고 생물학적 동등성 시험에서 모든 약물은 모두 경구로 투여하였으므로, 0 h에서의 농도는 0일 것이다. 그러므로 실제 AUC와 좀 더 유사한 값을 얻기 위해 원 논문에서와 같이 6/7을 곱해주었다. 한 시간 간격으로 채혈한 상황을 가정하였으므로 Δt는 1이 되어, 결국 AUC_{est}는 다음과 같이 계산할 수 있다.

$$AUC_{est} = \frac{C_1 + C_2 + \dots + C_6}{7} \times \Delta t \times 6 \quad (11)$$

결 과

AUC_{est}와 AUC_{real,6}

6시간까지 1시간 간격으로 얻은 sample의 농도로부터 얻은 AUC_{est}와 AUC_{real,6}의 상관관계를 보면(Figure 2) 7개의 약물 모두에 대하여 AUC_{est}와 AUC_{real,6}은 매우 좋은 상관관계를 보이고 있다. 다시 말해 AUC_{est}가 큰 약물이 AUC_{real,6}도 컸다. 추세선의 기울기가 1인 것을 보아도 AUC_{est}만으로 AUC_{real,6}을 충분히 예측할 수 있음을 알 수 있다. 또 AUC_{real,6}과 CV를 비교해 보았더니 모두 10% 범위내에 있었다(데이터 안 보임). 이는 AUC_{est}와 AUC_{real,6}가 거의 차이가 없음을 말한다. 또한 loxoprofen을 제외한 모든 약물에서 AUC가 작은 값에 비해 AUC가 큰 data의 수가 적었고 매우 구분하기 쉬운 것을 확인할 수 있었다.

AUC_{est}와 AUC_{inf}

원 논문의 내용에 덧붙여 AUC_{est}가 AUC_{inf}를 얼마나 반영하는가를 알아보기 위해 AUC_{est}와 AUC_{inf}를 비교하였다(Figure 3). Figure 2보다는 분산된 모습을 보이지만 역시 AUC_{est}가 큰 경우에 AUC_{inf}도 크게 나타나는 경향을 확인할 수 있다. Figure 2에서와 같이 각 약물에 대해 AUC_{est}와 AUC_{inf}의 관계를 보이지는 않았지만 앞의 결과와 유사한 상관관계를 확인할 수 있었다. 또한 AUC_{inf}가 큰 상위 10% 정도의 data는 AUC_{est}도 거의 상위 10%내에 속해있었다.

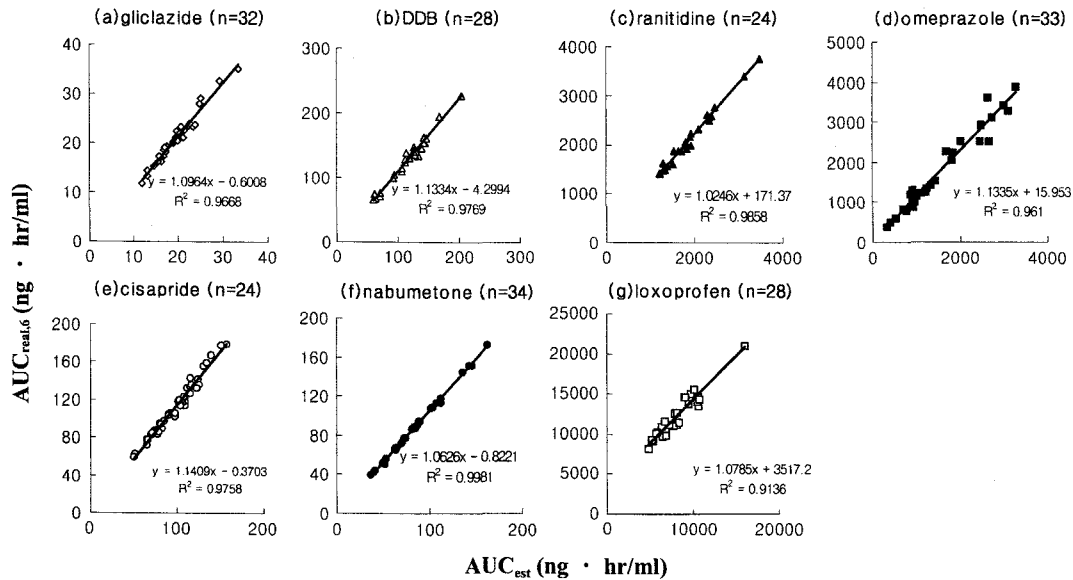


Figure 2—Correlation between AUC_{est} of each drug in each subject obtained from pooled plasma concentrations, and measured $AUC_{real,6}$ of each drug in each subject obtained from plasma concentrations at equally spaced time points until 6 h.

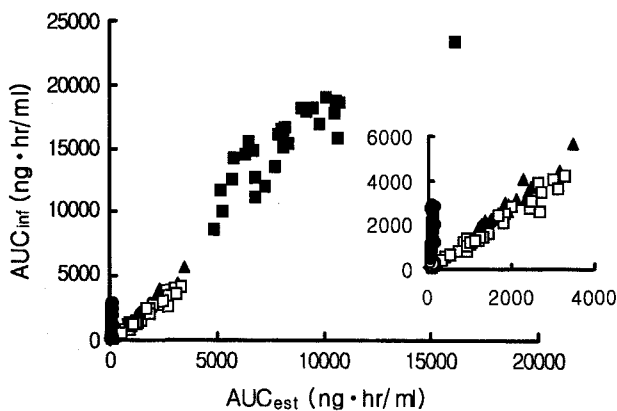


Figure 3—Comparison of estimated AUC_{est} of seven drugs in each subjects obtained from $C_{pool,obs}$ with measured AUC_{inf} obtained from plasma concentrations at individual time points. Key: \diamond ; gliclazide(n=32), \triangle ; DDB(n=28), \blacktriangle ; ranitidine(n=24), \square ; omeprazole(n=33), \circ ; cisapride(n=24), \bullet ; nabumetone(n=34), \blacksquare ; loxoprofen (n=28).

고찰

결과로부터 AUC_{est} 는 $AUC_{real,6}$ 과 AUC_{inf} 값을 상당히 반영하고 있으며, 이 방법이 HTPK로 응용될 수 있는 가능성을 확인했다. 더욱이 분석에 사용한 7가지 약물은 생리학적 작용이나 체혈시간, 약물동태가 다양한 약물들이었는데도 불구하고 모두 좋은 상관관계를 보인 사실로부터, 이 추정 방법은 매우 다양한 약물에 대하여 적용할 수 있을 가능성이 시사되었다

그러나 본 논문에서 AUC_{est} 를 계산한 방법에는 몇 가지

문제점이 있다. 우선 AUC_{est} 를 계산하는데 유일하게 사용된 값, C_{pool} 이 실제 측정된 값은 아니고 계산한 값이었다. 그러나 이 값은 같은 부피의 sample을 섞어 같은 detector로 측정했다면 유사하게 나왔을 것이다. 둘째, 6시간까지의 data만을 써서 추정하는 방법에 의문을 제기할 수 있다. 그러나 대부분의 약물은 6시간까지의 혈중 농도 값으로부터 추정한 AUC_{est} 와 AUC_{inf} 가 좋은 상관관계를 보였다. 그러나 nabumetone의 경우 큰 차이가 있었다 (Figure 3). 이는 nabumetone의 시간-농도 profile (데이터 안 보임)을 보면 금방 원인을 찾을 수 있다 Nabumetone은 T_{max} 가 6시간 이후에 나타나는 약물이다. 따라서 실제 생물학적 동등성 시험에서는 120 h까지 sampling하여 AUC_{inf} 를 구하였다. 즉 AUC_{est} 에 비해 AUC_{inf} 가 매우 커서 Figure 3에서 아주 급격한 경사를 보이는 것이다. 이런 물질의 AUC_{est} 를 다른 물질의 AUC_{est} 와 비교하여 어느 물질의 AUC_{inf} 크기를 추정하는 것은 매우 위험하다. 예를 들어 cisapride나 DDB는 nabumetone에 비해 AUC_{inf} 가 아주 작은 물질이다. 그러나 이들 약물의 AUC_{est} 가 오히려 크게 나타난 경우도 있다. 이 결과만으로 nabumetone과 같은 물질을 potential lead가 아니라고 잘못 판단할 위험성이 있음에 유의하여야 한다. 이런 단점을 해결하는 방법으로서 등시간 간격으로 혈액을 취하지 않고 sample pooling하여 AUC를 추정할 수도 있다.²⁶⁾ 이 경우에는 sampling 간격에 비례하는 부피만큼씩 취해서 pooling한 후 AUC_{est} 를 계산하므로 sampling time을 조절함으로써 AUC_{inf} 에 더 가까운 AUC_{est} 를 얻을 수 있다. 하지만 이 방법도 그 물질에 대한 사전정보가 없을 때는 sampling time

을 결정할 수 없다는 단점을 안고 있다. 만일 구조가 유사하고, 작용이 유사할 것으로 추정되는 물질들 간에서는 제한된 시간동안의 AUC_{est} 로도 충분히 PK profile을 예측할 수 있을 것으로 기대된다. 또 몇 가지 약물의 경우에는 AUC_{est} 와 AUC_{inf} 간에 뚜렷한 상관관계가 없는 듯이 보이지만 AUC 가 좋은 상위 10%정도의 물질을 선별해 내는 방법으로는 문제가 없을 것으로 생각된다.

결 론

이 논문에서는 *in vivo* PK screening의 속도를 높일 수 있는 방법으로서 일정 시간동안 취한 제한된 숫자의 sample을 모두 섞어 그 농도로부터 AUC 를 추정하는 방법을 소개하였다. 실제로 선진국의 제약회사에서는 combinatorial chemistry에 의해 합성된 많은 물질을 screening하기 위해서 sample pooling하는 방법을 많이 사용해 왔다. 또 제한된 개수의 시료를 pooling하여 전체 AUC 를 유추해 내는 방법도 생물학적 동등성 시험에 많이 응용되어 왔다.²⁷⁾ 결과에서 밝혔듯이 6시간까지의 추정값과 6시간까지의 실측 AUC 그리고 AUC_{inf} 는 좋은 상관관계를 보였다.

요컨대, 이 방법을 사용하여 약물개발단계에 필요한 중요한 PK parameter중 하나인 AUC_{inf} 를 추정해 낼 수 있다면 효과적인 것이다. 이 방법의 장점은 detection 하는 데 걸리는 시간을 줄일 수 있고, sample 수를 줄일 수 있음은 물론, 모두 섞어서 pool을 detection 하므로 적은 양의 sample만 있어도 가능하다. AUC_{est} 가 큰 몇 가지 물질에 대해서는 추가적으로 여러 단계의 screening을 거침으로써, 단 시간내에 적은 비용으로 효과적인 검색을 할 수 있을 것이다. 만약에 이 방법을 cassette dosing 기법과 함께 사용한다면 체내동태의 스크리닝 속도는 더욱 빨라질 것이다.

감사의 말씀

본 연구는 보건복지부의 보건의료기술연구개발사업 (HMP-99-D-07-0004) 연구비의 지원으로 수행되었으며 지원에 감사드립니다.

문 헌

- 1) W. Harrison, Changes in scale in automated pharmaceutical research, *Drug Discovery Today*, **3**, 343-379 (1998).
- 2) D. Hughes, Dizzying but scary: looking towards R&D in 2005, *Drug Discovery Today*, **4**, 393-395 (1999).
- 3) R. Rabana, How many leads from HTS?, *Drug Discovery Today*, **4**, 447-448 (1999).
- 4) A. P. Watt, D. Morrison and D. C. Evans, Approaches to higher-throughput pharmacokinetics (HTPK) in drug discovery, *Drug Discovery Today*, **5**, 17-40 (2000).
- 5) P. Artursson and K. Palm, Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport, *Adv. Drug Del. Rev.*, **22**, 67-48 (1996).
- 6) W. Rubas, M. E. M. Cromwell, Z. Shahrokh, J. Villagran, T.N. Nguyen, M. Wellton, T.H. Nguyen and R.J. Mersny, Flux measurement across Caco-2 monolayer may predict transport in human large intestinal tissue, *J. Pharm. Sci.*, **85**, 165-169 (1996).
- 7) W. Rubas and J. Vilagran, Correlation of solute flux across Caco-2 monolayers and colonic tissue *in vitro*, *S.T.P. Pharma. Sci.*, **5**, 93-97 (1995).
- 8) R. Bolger, High-throughput screening: new frontiers for the 21st century, *Drug Discovery Today*, **4**, 251-253 (1999).
- 9) E. W. Taylor and J. A. Gibbons, Intestinal absorption screening of mixtures from combinatorial libraries in the Caco-2 model, *Pharm. Res.*, **14**, 572-577 (1997).
- 10) W. Rubas, M. E. M. Cromwell, R. J. Mersny, G. Ingle, K. A. Elias, An integrated method to determine epithelial transport and bioactivity of oral drug candidates *in vitro*, *Pharm. Res.*, **13**, 23-26 (1996).
- 11) Th Lave, S. Dupin, C. Schmitt, B. Valles, G Ubeaud, R. C. Chou D. Jaeck and Ph Coassolo, The use of human hepatocytes to select compounds based on their expected hepatic extraction ratios in humans, *Pharm. Res.*, **14**, 152-155 (1997).
- 12) L. W. Frick, K. K. Adkison and K. J. Wells-Knecht, Cassette dosing: rapid *in vivo* assessment of pharmacokinetics, *Pharm. Sci. Tech. Today*, **1**, 12-18 (1998).
- 13) T. V. Olah, D. A. McLoughlin, J. D. Gilbert, The simultaneous determination of mixtures of drug candidates by liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry as an *in vivo* drug screening procedure, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **11**, 17-23 (1997).
- 14) D. A. McLoughlin, T. V. Olah and J. D. Gilbert, A direct technique for the simultaneous determination of 10 drug candidates in plasma by liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry interfaced to a Prospekt solid-phase extraction system, *J. Pharm. & Biomed. Anal.*, **15**, 1893-1901 (1997).
- 15) D. Zimmer, V. Pickard, W. Czembor and C. Muller, Comparison of turbulent-flow chromatography with automated solid-phase extraction used as plasma sample preparation techniques for liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **854**, 23-35 (1999).
- 16) L. Mere, T. Bennet and P. Coassin, Miniaturized FRET assays and microfluidics: key components for ultra high-throughput screening, *Drug Discovery Today*, **4**, 363-369 (1999).
- 17) R. W. Wallace, A little too much? Expense versus return in HTS miniaturation, *Drug Discovery Today*, **3**, 299 (1998).
- 18) J. J. Burbaum, Miniaturization technologies in HTS: how fast, how small, how soon?, *Drug Discovery Today*, **3**, 313-322 (1998).

- (1998).
- 19) K. A. Cox, K. Dunn-Meywell, W. A. Korfmacher, L. Broske, A. A. Nomeir, C. Lin, M. N. Cayen and W. H. Barr, Novel *in vivo* procedure for rapid pharmacokinetic screening of discovery compound in rats, *Drug Discovery Today*, **4**, 232-237 (1999).
- 20) S. S. Hong, S. H. Lee, Y. J. Lee, S. J. Chung, M. H. Lee and C. K. Shim, Accelerated oral absorption of gliclazide in human subjects from a soft gelatin capsule containing a PEG 400 suspension of gliclazide, *J. Cont. Rel.*, **51**, 185-192 (1998).
- 21) Y.R. Lee, C.K. Shim and S.J. Chung, Determination of dimethyl-4,4'-dimethoxy-5,6,5',6'-dimethylene dioxybiphenyl-2,2'-dicarboxylate in human serum by HPLC, *Anal. Letters*, **32**, 945-954 (1999).
- 22) C.K. Shim, J.S. Hong, C.K. Lee, I.S. Han and K.S. Choi, Bioequivalence study of ranitidine tablet, *Arch. Pharm. Res.*, **13**, 180-186 (1990).
- 23) K.H. Yun, S.J. Chung and C.K. Shim, Bioequivalence evaluation of cisapride formulation preceded by Dong Wha Pharmaceutical Co., *J. Applied Pharm.*, **7**, 59-65(1999).
- 24) Y.J. Lee, E.J. Jang, J.U. Lee, Y.H. Han, S.J. Chung, M.H. Lee and C.K. Shim, Bioequivalence study of nabumetone tablets in man., *Arch. Pharm. Res.*, **18**, 340-345 (1995).
- 25) I. W. Kim, T. G. Han, K. S. Kim, S. J. Chung, M. H. Lee and C. K. Shim, Bioequivalence of loxonin tablet (sodium loxoprofen anhydride 60mg), *J. Kor. Pharm. Sci.*, **28**, 185-191 (1998).
- 26) Y. G. Kim, The impacts of cassette dosing with multiple compound analyses using LC/MS/MS on drug discovery, *Recent trends in the development of DDS related technology*, 한국약제학회 제12회 과학의 달 기념 심포지움 요지집, pp. 39-47(2000).
- 27) A. Elbary, Agreement between pooled sample technique and trapezoidal rule in determining the bioequivalence of certain metronidazole tablets, *Bull. Fac. Pharm.*, **34**, 203-208 (1996).