

Chlorpropamide 2-hydroxylation에 관여하는 Cytochrome P450 Isozyme의 규명 및 in vitro 약물 상호작용 평가

신동훈

고신대학교 의과대학 외과

Evaluation on Cytochrome P450 Isozymes Involved in Chlorpropamide 2-hydroxylation and in vitro Drug Interaction

Dong Hoon Shin

Department of surgery, Kosin University College of Medicine, Busan, Korea

Abstract

Background : Chlorpropamide is an oral hypoglycemic agent of sulfonylurea derivatives and has a similar chemical structure with tolbutamide. It is extensively metabolized and only 20% of dose is recovered in urine. 2-Hydroxychlorpropamide is the major metabolite found in human urine. The plasma concentration and clearance of chlorpropamide have an wide inter individual variation up to 30 folds. The polymorphism of cytochrome P450(CYP) isozymes responsible for catalyzing the chlorpropamide 2-hydroxylation is expected to cause this pharmacokinetic variation of chlorpropamide. However, there is no information on the CYP isozymes mediating the formation of this metabolite in human. Recently it was reported that chlorpropamide disposition was related with CYP2C9 genetic polymorphism as tolbutamide did, suggesting that chlorpropamide is expected to be a substrate of CYP2C9. **Objectives** : To characterize and identify the enzyme(s) mediating the formation of 2-hydroxychlorpropamide, a major metabolite of chlorpropamide, in vitro metabolic studies of and inhibitory effects of CYP specific inhibitors on the formation of 2-hydroxychlorpropamide were performed using human liver microsomes and cDNA expressed CYP isozymes. Additionally, it was evaluated whether chlorpropamide has the inhibitory potential on activity of CYP isozymes. **Methods** : To identify the CYP isozyme(s) involved in the chlorpropamide 2-hydroxylation, in vitro incubation studies including NADPH regenerating system in human liver microsomes and cDNA expressed CYP isozymes were conducted. Inhibition studies with CYP specific chemical inhibitors were carried out. The inhibitory effects of chlorpropamide on the activities of CYP isozymes probe reaction were also evaluated. Concentrations of 2-hydroxychlorpropamide and major metabolites of probe drugs were measured with HPLC using UV or fluorescence detectors. Kinetic parameters were calculated by fitting the data to enzyme models using WinNonlin[®] program. **Results** : The 2-hydroxylation of chlorpropamide was best fitted to one enzyme model from nonlinear regression and Eadie-Hofstee plot. The kinetic parameters, K_m and V_{max} in 3 human liver microsomes were $122.0 \pm 20.0 \mu M$ and $16.2 \pm 5.0 \text{ pmol/min/mg}$, respectively. Formation of 2-hydroxychlorpropamide was significantly inhibited by sulphaphenazole, but not by ketoconazole, S-mephenytoin, quinidine, and furaphyline. Both cDNA expressed CYP2C9 and CYP2C19 formed 2-hydroxychlorpropamide, and their K_m and V_{max} were 279.3 ± 41.9 and $663.0 \pm 152.12 \mu M$ and 64.6 ± 2.8 and $143.1 \pm 12.8 \text{ pmol/min/nmol CYP}$, respectively, intrinsic clearance was similar with that of cDNA expressed CYP2C9 (CYP2C19 : 0.224 vs CYP2C9 : $0.258 \text{ ml/min/pmol}$). Chlorpropamide inhibited the tolbutamide hydroxylation catalyzed by CYP2C9, but has no inhibitory effects on other CYP isozymes tested. **Conclusions** : CYP2C9 and CYP2C19 participate in chlorpropamide 2-hydroxylation in human liver in vitro, which is consistent with tolbutamide hydroxylase. However, the relative amount of CYP2C9 is much than CYP2C19 in human liver and the disposition of chlorpropamide was related with CYP2C9 genetic polymorphism not by CYP2C19 polymorphism in vivo. CYP2C9 is expected to be the major CYP isozyme catalyzing chlorpropamide 2-hydroxylation. Drug interactions are expected when chlorpropamide is coadministered with drugs which are metabolized mainly by CYP2C9.

Key words : Chlorpropamide, CYP2C9, CYP2C19, in vitro metabolism, genetic polymorphism

서론

많은 약물들에서 투여 후 약물치료반응이 개인차를 보이는 것이 사실이지만, 현실적으로 환자에게 처방 시에는 단순히 몸무게나, 간 기능 정도와 같은 몇몇 약동학적 및 약력학적 인자를 고려하여 약물 처방을 하는 것이 보통이다¹⁾.

그러나, 최근 약물 대사능에 대한 유전적다형성이 약동학적 개인차에서 크게 기여한다는 사실이 밝혀지면서, 개개의 약물 대사능을 결정짓는 특히 cytochrome P450 (이하 CYP) isozyme을 찾아내는 작업이 활발히 진행되고 있다. 특히, 신약의 경우에는 초기 개발 단계에서부터 in vitro 시험을 통한 CYP 효소군을 찾는 작업이 필수적이다.

Chlorpropamide은 경구혈당강하제로 제 II형 당뇨병의 치료에 널리 사용되는 sulfonylurea계 약물이다. 정확한 작용기전은 밝혀져 있지 않으나 췌장의 베타세포기능의 개선으로 내인성 인슐린의 합성과 분비를 자극하는 것이라 믿어지고 있으며²⁾, 34-46시간에 이르는 긴 반감기를 가지고 있고, 작용시간은 24-72시간으로 지속되어 하루 1회 용법으로 그 사용이 편리한 약물이다.^{3,4)}

Chlorpropamide는 간에서 주로 2-hydroxychlorpropamide로 대사 되는데, 하루 용량의 43-69%가 2-hydroxychlorpropamide 형태로 대사 되어 chlorpropamide의 주요 체내 대사산물이다.

이외에 chlorbenzenesulphonylurea, 3-hydroxychlorpropamide, P-chlorbenzenesulphonylurea 등의 대사체가 형성되기도 하지만 그 양은 많지 않다.^{5, 6)} 이들 대부분의 대사물질들은 소변을 통하여 배설되는데, 투여용량의 약 20%정도는 대사 되지 않은 형태로 소변에서 검출되며 그 배설량은 pH 등에 영향을 받는다.

Chlorpropamide을 정상 성인 혹은 당뇨병 환자에게 투여 시 혈장 chlorpropamide 농도의 개인차가 다양하게 나타나는 바, 특히 chlorpropamide의 혈장 청소율은 30배 이상까지 큰 차를 보이는 것으로 보고된 바 있다. 이런 개인차는 혈장농도와 혈장크레아틴 및 연령과는 상관관계가 없고, 다른 약물과 병용 시 더욱 심각해지는 것이 확인되었다.^{7,8)}

이러한 chlorpropamide의 약동학적 개인차는 큰 임상적 문제를 야기할 수 있는데, 그 예로 적정용량으로도

혈당강하 효과가 미진하게 나타나는 환자가 있는 반면, 몇몇 환자에서는 오히려 급성저혈당 증상과 같은 부작용이 발생할 수 있다. 그러므로 chlorpropamide의 체내 동태를 결정하는 요인들에 대한 구체적인 정보를 확보하고 이러한 이상반응 및 치료의 실패를 미연에 방지하는 것이 임상적으로 매우 중요하다.

chlorpropamide의 약동학적 개인차를 유발하는 원인으로는 대사효소의 유전적 다형성, 병태생리적 요인, 약물 상호작용 등 여러 요인이 있을 수 있겠지만, 이 약물의 대사를 담당하는 CYP 효소군의 유전적 다형성이 가장 큰 영향을 줄 것으로 기대된다. 그러므로 chlorpropamide 대사에 관여하는 특히 CYP 효소군의 유전적 다형성에 대한 정보가 있다면 이에 따라 chlorpropamide 적정 용량의 처방과 동시에 투여되는 타 약물과의 상호작용을 고려한 적정약물요법이 가능할 것이다. 따라서 먼저 약물대사를 담당하는 약물대사효소를 규명하고 이로부터 약물대사를 예측하는 것이 요구된다.

Sulfonylurea계 경구혈당강하제 초기 개발 약물로 대표되는 tolbutamide의 경우에는 CYP 주요 효소군인 CYP2C9에 의해서 주로 대사 되며, 그 효소의 활성도 평가의 지표약물(probe drug)로 오랫동안 사용되어 왔으며, 많은 연구들을 통하여 약동학적 개인차 유발에 있어서 CYP2C9의 유전적 다형성이 기여하고 있음이 비교적 잘 규명되어 있다.^{9,10)} 그러나 tolbutamide 이외의 sulfonylurea계 경구 혈당 강하제 특히, chlorpropamide 대사에 관련된 CYP 효소군에 대한 명확한 정보는 매우 부족한 실정이다.

Chlorpropamide의 대사, 특히 주요 대사물 생성과정인 Chlorpropamide 2-hydroxylation에 관여할 것으로 고려되는 CYP 효소군으로 먼저 CYP2C9의 기질약물들은 대부분 약산성을 띠며, 산화탄소로부터 약 7Å 떨어진 음이온 부위를 가지는 것으로 알려져 있는데^{11,12)}, Jones 등¹²⁾ 이 제안하였듯이 CYP2C9이 heteroatom hydrogen bond 공여 혹은 수혜물질을 가진 약물 대사에 주로 관여한다는 (putative active site 모델)점을 고려할 때, 이러한 화학구조를 가진 chlorpropamide의 대사에 CYP2C9이 관여할 가능성은 작지 않은 것으로 기대된다. 특히, Fig. 1에서와 같이 chlorpropamide는 CYP2C9의 대표적인 기질약물인 tolbutamide¹³⁻¹⁶⁾와 화학 구조가 매우 유사하며, sul-

fonyurea 측쇄 구조를 가지고 있어 인체에서의 chlorpropamide대사에 CYP2C9이 주로 관여할 것으로 기대된다.

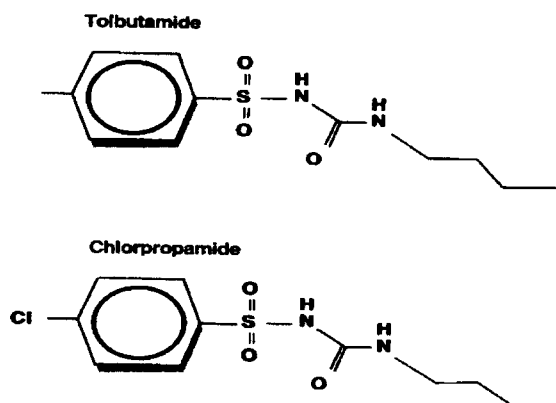


Fig. 1. Chemical structures of tolbutamide and chlorpropamide.

최근 CYP2C9 및 CYP2C19 유전형에 따라 나뉘어진 피험자군을 대상으로 시행된 chlorpropamide의 약동학 연구¹⁷⁾에서 chlorpropamide의 체내 약물동태가 CYP2C9 유전형에 의해서 영향을 받는다는 보고가 있었다.(Fig. 2 참조).

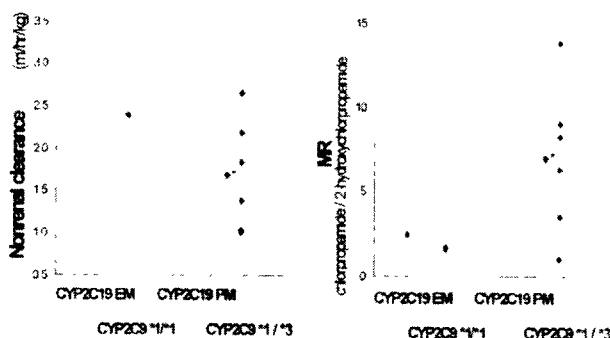


Fig. 2. Normal clearance and metabolic ratio after chlorpropamide 250 mg oral administration in healthy subjects whose genotypes of CYP2C9 and CYP2C19 have been determined¹⁸⁾(CYP2C19 EM ○, CYP2C19 PM □, CYP2C9*1/*1 ●, and CYP2C9*1/*3 ◆ : *p<0.05).

한편, CYP2C9의 원형기질 약물로 알려져 있는 tolbutamide에 대해서 인체간 마이크로솜 및 cDNA 발현 인체간 CYP 효소군을 이용한 몇몇 in vitro 연구¹⁸⁻²¹⁾에서 tolbutamide의 주요 대사물질인 4-hydroxytolbutamide 생성과정에 CYP2C9뿐만 아니라 CYP2C19도 동일한 내재성 청

소율(intrinsic clearance)을 가지고 이 대사과정에 관여하는 것으로 보고된 바 있어, 유사한 화학구조를 가지고 있는 chlorpropamide가 CYP2C19의 기질 약물이 될 가능성도 배제할 수 없는 것으로 사료된다.

그리고, chlorpropamide의 대사에 CYP2D6의 관련성도 고려되어야 할 것이다. Kallio 등²²⁾의 연구에 의하면 CYP2D6의 유전적 다형성으로 설명되어지는 debrisoquine 표현형 poor metabolizer(이하 PM)와 extensive metabolizer(이하 EM)간에 chlorpropamide의 혈장 약동학적 특성에 유의한 차이는 없었으나, 소변 내 chlorpropamide와 2-hydroxychlorpropamide로 추정되는 주요 산화 대사물간의 대사 비(metabolic ratio : MR)는 PM군에서 EM군보다 유의하게 더 높은 것으로 나타났다. 따라서, chlorpropamide 대사에 있어서 CYP2D6의 관련 여부 또한 확인할 필요가 있다.

Chlorpropamide 대사에 관여하는 CYP 동위 효소를 밝히는 것은 chlorpropamide의 약동학적 특성에 영향을 줄 수 있는 요인들을 예측하게 하며, 또한 치료에 있어 중요한 약물 상호작용의 연구에 중요한 정보를 제공하게 된다. Chlorpropamide의 대사에 CYP2C9이 주로 관여하는 것이 확인되었으므로 이미 잘 알려져 있는 CYP2C9 기질약물인 tolbutamide, phenytoin, S-warfarin 대사에 영향을 미치는 요인들과 비교함으로써 chlorpropamide 대사조절에 대한 기전을 예측할 수 있을 것이다.

CYP2C19의 경우 전체 인구집단에서 PM은 Caucasian에서는 2-5%의 낮은 빈도로 발견되고, 한국인, 중국인 및 일본인 등 동양인에서는 13-23%정도로 높은 빈도로 발견된다.²³⁻²⁵⁾ 그러므로 CYP2C19이 chlorpropamide대사에 관여함이 밝혀지면, CYP2C19 유전자에 결함이 있는 환자에서는 저혈당증 등의 부작용의 가능성을 고려하여 개별화된 약물요법의 적용이 가능하게 된다.

CYP 효소의 유전적 요소 외에도 같이 투여되는 약물들에 의해서도 CYP 효소들의 대사능이 영향을 받게 되는데, 효소가 유도되거나^{26,27)} 억제 될 수도 있다.²⁸⁾ 그러므로, 먼저 대사 담당효소에 대한 규명이 이루어진다면 이미 알려진 가능한 특정 효소군의 유도제 및 억제제들에 대한 정보로부터 chlorpropamide의 상호작용에 대한 예측도 가능하게 된다.

chlorpropamide는 제 II형 당뇨병 치료에 널리 사용되

는 약물로서 이 약물을 사용하는 당뇨병 환자들은 의외의 합병증 및 증상 치료를 위한 약물의 병용 가능성이 매우 커서, 약물상호작용 유발 가능성이 타 질환군의 치료 시에 비해서 크다고 할 수 있다. 그러므로, chlorpropamide에 특정 CYP 효소군 활성화에 대한 영향력 평가는 유발될 수 있는 약물 상호작용의 예측에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 사료된다.

살펴 본 바와 같이 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사의 특성 및 대사에 관여하는 CYP 효소군을 규명하고, 더불어 chlorpropamide의 CYP 효소군의 활성화에 대한 영향력을 조사하여 약물 상호작용 유발 가능성에 대한 평가를 해 볼 필요가 있다.

chlorpropamide는 제2형 당뇨병의 치료에 널리 사용되는 약물이나 그 대사 효소가 명확히 밝혀져 있지 않으므로 이를 규명하기 위하여, 인체 간 마이크로솜에서의 chlorpropamide의 주요 대사물인 2-hydroxychlorpropamide 형성에 대한 특성을 분석하고자 하였다. 또한, 다양한 CYP 효소군의 특이 활성 저해제(specific chemical inhibitor)를 이용하여 인체 간에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation 억제 정도를 평가하여 그 반응에 관련된 CYP 효소군을 검색하고자 하였다. 한편, cDNA 발현 인체간 CYP 효소군에서 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사 정도를 평가하여 그 반응에 활성을 나타내는 효소군을 검색하고자 하였으며, 인체 간에서 다양한 CYP 효소군의 표지약물들의 대사에 대한 chlorpropamide의 활성 저해능 평가를 통하여 chlorpropamide의 약물상호작용 유발능을 평가하고자 하였다.

이를 통하여 chlorpropamide 대사효소의 유전적 요소 등을 고려한 적정약물요법을 위한 자료를 제공하고자 하였다.

재료 및 방법

가. 인체 간 마이크로솜 및 cDNA 발현 인체 간 CYP 효소군

1. 인체 간 마이크로솜 추출

원발성이 아닌 전이에 기인한 간암 병소를 가진 환자 세 명의 간 절제 조직에서 병리 소견 상 특이사항이 관

찰되지 않은 부위를 사용하였다. 절제된 부위는 사용 전까지 -70°C 에서 보관하였으며, 마이크로솜 추출은 초 원심 분리법을 이용하였다. 우선 적당량의 간 조직을 homogenizer를 사용하여 균질화 시킨 뒤 완충액 A(Buffer A : KCl 11.48g, NaH_2PO_4 12.0g, EDTA 0.37g을 증류수 1L에 녹여서 pH 7.4로 보정)에 희석하였다. 이후 7800 RPM에서 2회 원심분리한 뒤 얻은 상층액을 고속원심분리기로 24,000 RPM으로 원심분리한 후 마이크로솜층을 침강시켜 얻었고, 이를 다시 완충액 B(Buffer B : $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.017g, NaH_2PO_4 12.00g, EDTA 0.37g을 증류수 1L에 녹여서 pH 7.4로 보정)에 희석하였다. 상기의 모든 과정들은 4°C 환경에서 이루어졌다. 추출된 마이크로솜층을 Bradford 방법을 이용한 단백질 정량법으로 농도를 확인하고 10mg/ml로 분주하여 사용 전까지 -70°C 에서 보관하였다.

2. cDNA 발현 인체 CYP 효소군

cDNA 발현 인체 CYP 효소군(cDNA expressed human CYP isozymes)은 인체 CYP cDNA를 Baculovirus의 유전자에 클로닝한 다음 이를 insect cell에 감염시킨 뒤 발현시켜 얻은 것으로, 본 실험에 사용한 효소군은 CYP1A2, CYP2C9, CYP3A4, CYP2D6 수퍼솜(supersomes)이었으며 모두 미국 Gentest사(Gentest, MA, USA)로부터 구입하였다.

나. 인체 간 마이크로솜에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사과정의 특성 규명

1. 간 마이크로솜에서의 배양 시험

간 마이크로솜 효소들에 의한 기질물질들의 대사 여부를 평가하기 위해 간 마이크로솜에서의 배양(incubation) 시험을 시행하였다. 우선적으로 기질약물(chlorpropamide)이 분주된 Eppendorf 튜브에 간 마이크로솜 25 μL (10mg/ml)와 phosphate buffer(KH_2PO_4 4.805g를 증류수 200ml에 첨가한 뒤 pH 7.4로 보정) 및 증류수를 적량 첨가하고 37°C 온수조에서 5분간 preincubation시켰다. 이후 반응이 진행될 수 있도록 하는 regeneration system (5mM NADP/20 mM glucose-6-phosphate/40 mM MgCl_2)을 50 μL 첨가함으로써 반응을 시작시켰다. 이때 반응액의 최종 부피는 250 μL 였고, 반응시키는 동안 지속적으로

일정하게 shaking시켰다. 정해진 반응시간 이후에 10% perchloric acid 100 μ l를 첨가하여 반응을 중단시키고 대사를 분석 때까지 반응샘플들을 4°C에 보관하였다.

2. Chlorpropamide 배양 시험

배양 시험에서 기질약물로서 chlorpropamide를 0~1000 μ M 농도로 사용하였다. 2시간의 반응시간 이후 샘플을 원심분리해서 얻은 반응 상층액에서 chlorpropamide의 주요 대사물인 2-hydroxychlorpropamide를 high performance liquid chromatography(이하 HPLC)로 정량하여 각각 기질약물농도에서의 2-hydroxychlorpropamide 생성에 대한 반응속도(velocity of reaction, V)를 구하였다. 개인별 간 내에 존재하는 특정 CYP 효소군의 다양성을 고려하여, 각기 다른 피험자로부터 추출한 3종류의 마이크로솜에서 같은 방법으로 진행하였으며, 모든 시험 샘플들은 같은 조건으로 한 쌍 씩 중복하여 최종 결과는 평균값을 사용하였다.

3. Chlorpropamide 2-hydroxylation 대사 특성 파악을 위한 효소학적 자료 분석

2-Hydroxychlorpropamide 형성에 대한 효소역학 경수(V_{max} , K_m)의 산출을 위해 약동학 분석 프로그램인 WinNonlin[®](Version 2.0, Scientific Consulting, Inc., Apex, NC, USA)을 이용하였다. 각 기질약물에 대한 반응속도를 Michaelis-Menten 모델의 one enzyme model(Eq.1)과 two enzyme model (Eq.2.)에 각각 적용시켜 비선형 최소자승 회귀분석법을 이용하여 산출하였다. 이때 최적 모델의 선정기준은 Akaike Information Criteria(AIC)수치를 비교하여 결정하였다. 더불어 결과들은 Eadie-Hofstee 플롯($V/[substrate]$ against V)에 적용하여 2-hydroxy 대사물 형성에 관여하는 효소모델(monophasic/biphasic enzyme model)결정에 참고하였다.

One enzyme model

$$V = \frac{V_{max} * [S]}{K_m + [S]} \quad \text{Eq. 1}$$

Two enzyme model

$$V = \frac{V_{max1} * [S]}{K_{m1} + [S]} + \frac{V_{max2} * [S]}{K_{m2} + [S]} \quad \text{Eq. 2}$$

다. 인체 간 마이크로솜에서의 특정 CYP 활성저해제를 이용한 chlorpropamide 2-hydroxylation 저해 평가

1. CYP 효소군 특이 활성저해제(specific CYP isozyme chemical inhibitor)

특정 CYP 효소군별 특이 활성저해제에 의한 chlorpropamide 대사의 저해효과를 평가하기 위해 각각의 CYP 효소군에 특이한 저해효능을 발휘하는 활성저해제를 준비하였다(furafyline ; CYP1A2, sulphaphenazole ; CYP2C9, quinidine ; CYP2D6, S-mephenytoin ; CYP2C19, ketconazole ; CYP3A4)²⁹⁻³²⁾

2. 저해 효과 평가

인체 간 마이크로솜에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation 반응의 K_m 값에 가까운 100 μ M까지 다양한 농도로 처리하고 regenerating system을 첨가한 후 반응을 시작시키고, 1시간 동안 배양을 진행하였다. 그외의 incubation 시험조건은 앞서 기술한 인체 간 마이크로솜에서의 반응시의 조건과 같았다. 이때 2-hydroxychlorpropamide의 생성 정도를 활성저해제가 첨가되지 않은 대조 샘플에서의 생성 정도와 비교 평가하여 각 특이 저해제에 의한 chlorpropamide 2-hydroxylation에 대한 억제 정도를 평가하였다.

라. cDNA 발현 인체 간 CYP 효소군에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사능 평가

1. 다양한 CYP 효소군에서의 chlorpropamide의 대사능 검색

다양한 cDNA 발현 인체 간 CYP 효소군에서의 chlorpropamide대사여부를 평가하기 위해 배양 시험을 시행하였다. 인체 CYP1A2, CYP2C9, CYP2D6, CYP2C19, CYP3A4 슈퍼솜 20pmol/Tlr을 사용하였으며 chlorpropamide 기질농도는 100 μ M이었다. 반응시간은 1시간이었으며 그 외의 incubation 시험조건은 인체 간 마이크로솜에서의 반응조건과 같았다.

2. CYP2C9 및 CYP2C19에서 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사 특성 평가

앞서 시행된 특정 효소군 별 대사 평가에서 2-hydroxychlorpropamide 생성능을 가지는 것으로 평가된 CYP2C9

과 CYP2C19 발현 효소군에서 다양한 chlorpropamide 기질농도와 반응을 통하여 2-hydroxychlorpropamide 생성에 대한 대사특성을 규명하고자 했다. Chlorpropamide 5 μ M에서 2000 μ M까지의 농도를 각각 CYP2C9와 CYP2C19 슈퍼솜 20pmol과 1시간 동안 반응시킨 후 2-hydroxychlorpropamide를 정량하여 각각 기질약물 농도에서의 반응속도를 계산하였다. CYP2C9 및 CYP2C19의 각 효소군별 역학적 경수(V_{max} , K_m)의 산출을 위해 약동학분석 프로그램인 WinNonlin[®] 을 이용하였다.

마. 특정 CYP 효소군에 대한 chlorpropamide의 활성 저해능 평가

1. CYP효소군 특이 표지 반응

특정 CYP 효소군 활성에 대한 chlorpropamide의 저해 작용에 기인한 약물상호작용 유발능을 관찰하기 위하여, CYP 효소군별 특이 활성 표지 반응에 해당하는 약물로 기질로 사용하여 chlorpropamide에 의한 대사 반응 억제 효과를 평가하였다. CYP 효소군에 특이적인 대사 반응 및 각 표지약물의 반응조건은 Table 1과 같았다.

2. Chlorpropamide에 의한 억제효과 평가

간 미크로솜효소에서 각 표지반응별 기질약물을 반응별 K_m 값을 고려해서 정해진 농도로 준비하고 미리 배양시킨 후, chlorpropamide를 0~100 μ M까지 다양한 농도로 처리하여 regenerating system을 첨가한 다음 반응을 시작하였다. CYP 효소군의 표지약물별로 반응조건에 따라 배양을 진행하였고, 그 외의 배양 시험조건은 인체 간 미크로솜에서의 반응조건과 같았다. 각각의 특이 대사물질의 생성정도를 평가하여 chlorpropamide에 의한 특정 CYP 효소군의 활성에 대한 저해 정도를 평가하였다.

바. 농도 분석

1. 2-Hydroxychlorpropamide 농도 분석

2-Hydroxychlorpropamide농도는 역상 HPLC방법을 이용하여 분석하였다. 이때 2-hydroxy-chlorpropamide를 정량하기 위해 필요한 표준물질을 구할 수 없었으므로 분석 chromatogram상에서의 2-hydroxy 대사물의 확인 작업이 요구되었다. 우선 인체에 chlorpropamide peak에 해당되지 않는 주요 대사물질 peak를 확인하였다.

이 peak에 해당되는 물질을 수집하여 LC/MS에 적용한 결과 분자구조가 2-hydroxychlorpropamide임을 확인하였다. (Fig.3)

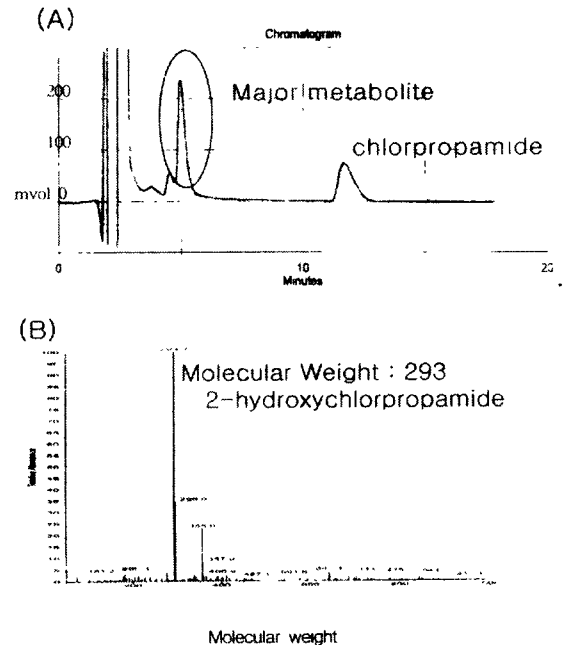


Fig. 3. HPLC chromatogram of chlorpropamide and its metabolite from human urine(A) and chromatogram of 2-hydroxychlorpropamide identified by LC/MS from human urine and in vitro microsomal incubation of chlorpropamide.

Table 1. The specific substrate reaction and reaction condition for each CYP isozyme^{14,33-36)}

CYP Isozymes	Specific reactions	Substrate/Concentration/Reaction time
CYP1A2	phenacetin <i>O</i> -deethylation	phenacetin / 25 μ M / 0.5 hour
CYP2C9	tolbutamide 4-hydroxylation	tolbutamide / 100 μ M / 1 hour
CYP2C19	S-mephenytoin 4-hydroxylation	S-mephenytoin / 50 μ M / 1 hour
CYP2D6	dextromethorphan <i>O</i> -demethylation	dextromethorphan / 50 μ M / 1 hour
CYP3A4	midazolam 1-hydroxylation	midazolam / 25 μ M / 0.5 hour

사용한 HPLC시스템은 Gilson 307 펌프, Gilson 118 UV 검출기, Rheodyne 7161 loop injector 및 Waters 사의 C8 ($5\mu\text{m}$ particle size, $12.5\text{cm} \times 4.6\text{mm}$) 칼럼으로 구성하였다. HPLC 이동상(mobile phase)은 증류수 : acetonitrile을 50 : 50(v:v)비로 만들었으며 pH는 85% phosphoric acid를 사용하여 pH 4.0으로 조절하였다.³⁷⁾ 칼럼 통과 유속은 $1.5\text{ml}/\text{min}$ 로 하였으며 UV 검출기를 이용한 검출 시 파장은 235nm 로 하였다. 시료의 전 처리는 반응이 끝나고 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 $50\mu\text{l}$ 을 취하여 HPLC column에 주입하였다. 표준 곡선을 위한 표준시료는 0.1, 0.25, 1, 2.5, 5 μM 로 준비하였다.

2. CYP 표지 약물의 주요 대사물질 농도 분석

Phenacetin을 기질약물로 사용했을 경우의 대사물질인 acetaminophen은 Merck사의 chromolith RP-189 칼럼($10 \times 4.6\text{mm}$)을 이용하여 분리하였고, 245mm 파장의 UV 검출기에서 정량분석하였다. 이때 chlorpropamide를 내부 표준물질로 사용하였으며, 이동상의 조성은 0.01% phosphoric acid : 25 mM KH_2PO_4 : CH_3CN 을 750 : 185 : 65 비로 하였다.

Tolbutamide을 기질약물로 사용했을 경우의 대사물질인 4-hydroxytolbutamide의 분석조건은 상기의 2-hydroxychlorpropamide 때와 동일하게 하였고, 이때 S-mephenytoin을 내부 표준물질로 사용하였다.

S-Mephenytoin을 기질약물로 사용했을 경우의 대사물질인 2-hydroxymephenytoin은 Merck사의 Lichrosorb RP-8 칼럼($3.9 \times 280\text{mm}$, $10\mu\text{m}$)을 이용하여 분리하였고, 225nm 파장의 UV 검출기에서 정량 분석하였다. 이때 carbamazepine을 내부 표준물질로 사용하였으며, 이동상의 조성은 1% acetic acid : acetonitrile(720 : 280)이었다.

Dextromethorphan을 기질약물로 사용했을 경우의 대사물질인 dextrophan은 Waters사의 $\mu\text{Bondapack C}_{18}$ 칼럼($3.9 \times 300\text{mm}$, $10\mu\text{m}$)을 이용하여 분리하였으며, fluorescence 검출기의 excitation - 200nm 와 emission - 304nm 의 파장에서 정량분석하였다. 이때 levallorphan을 내부 표준물질로 사용하였으며, 이동상의 조성은 10mM KH_2PO_4 : CH_3CN : MeOH (750:125:125)이었다.

Midazolam을 기질약물로 사용했을 경우의 대사물질인

1-hydroxymidazolam의 농도는 Waters사의 $\mu\text{Bondapack C}_{18}$ 칼럼을 이용하여 245mm 파장의 UV 검출기에서 분석하였다. 이때 ketoconazole을 내부 표준물질로 사용하였으며, 이동상의 조성은 0.4M acetate buffer(pH4.0) : methanol : acetonitrile(560 : 48 : 392)이었다.

모든 샘플들은 반응이 끝나고 10분간 원심 분리하여 얻은 상층액 일부를 취하여 HPLC 시스템에 직접 주입하였다.

연구결과

가. 인체 간 마이크로솜에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation

인체 간 마이크로솜에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사 평가에서 regenerating system이 없는 반응에서는 전혀 2-hydroxy 대사물이 형성되지 않았다. 3종류의 마이크로솜에서 chlorpropamide를 0~ $1000\mu\text{M}$ 의 다양한 농도로 배양한 결과에서 2-hydroxychlorpropamide의 생성은 Fig.4(A)에서와 같이 Michaelis-Menten kinetics에 잘 적용되었으며, two enzyme model 보다 one enzyme model에 더욱 잘 일치되는 것으로 판단되었다. 이때 K_m 은 $122.0 \pm 20.0\mu\text{M}$ 이었으며, v_{max} 는 $16.2 \pm 5.0\text{pmol}/\text{mg}/\text{min}$ 이었다.(Table 2) L-A 마이크로솜에서의 결과는 two enzyme model의 적용이 가능하지 않았다.

Table 2. Michaelis-Menten parameters estimated for the formation of 2 hydroxychlorpropamide from chlorpropamide (1~ $1000\mu\text{M}$) in 3 different human liver microsomes(L20, L21, and L23)

	L-20	L-21	L-23	Mean $\pm$ S.D
One enzyme model				
$K_m(\mu\text{M})$	78.16	125.40	140.02	122.0 ± 20.0
$V_{\text{max}}(\text{pmol}/\text{mg}/\text{min})$	13.19	21.67	14.60	16.2 ± 5.0
AIC*	58.56	16.16	2.52	
Two enzyme model				
K_{m1}/K_{m2}		41.82/190.19	115.95/175.57	
$V_{\text{max1}}/V_{\text{max2}}$		5.11/17.28	7.79/6.89	
AIC		17.23	6.69	

* The Akaike Information Criteria

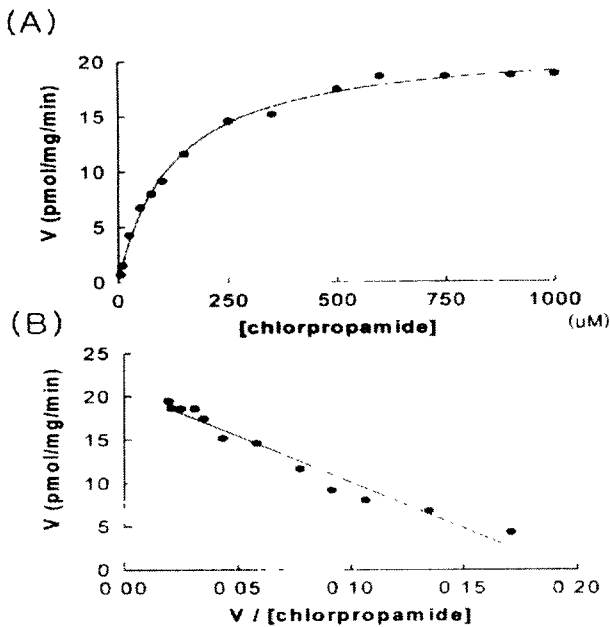


Fig. 4. Michaelis-Menten plots of the enzyme kinetics (A) and Eadie-Hofstee plots (B) for the formation of 2-hydroxychlorpropamide from the incubation of chlorpropamide in a human liver microsome (L-C). A range of chlorpropamide concentrations (1~1000 μ M) was used

한편, 상기 결과를 Eadie-Hofstee 플롯에 적용한 결과 인체간 미크로솜에서 chlorpropamide를 기질약물로 사용했을 때 2-hydroxychlorpropamide 형성은 단일효소모델 (monophasic enzyme model)에 잘 따르는 것으로 나타났다.(Fig. 4B).

나. CYP 효소군 특이 활성저해제에 의한 chlorpropamide 2-hydroxylation 억제능

인체 간 미크로솜에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation에 대한 CYP 효소군별 특이 저해제에 의한 억제능 평가의 결과는 Fig.5 와 같았다. 3종류의 미크로솜에서 일관되게 CYP2C9 특이 저해제 sulphaphenazole에 의해서 2-hydroxychlorpropamide의 생성이 강력하게 억제되었다. 저농도인 1 μ M이하의 농도에서부터 대조반응에 대해서 65%($\pm$ 10.5)이상 억제되었으며, 10 μ M 이상에서는 최대 100%에서 80%가량 chlorpropamide 2-hydroxylation을 강력하게 저해하였다. 외의 저해제에 의해서는 CYP3A4 특이 저해제인 ketoconazole의 고농도(25~50 μ M : 30~40%)에서 chlorpropamide 2-hydroxylation의 억제 양상이 관찰되었으나 sulphaphenazole과 비교할 때 억제

능이 크지 않았다. 그외의 CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 각효소군의 특이 저해제인 furafylline, S-mephenytoin, quinidine에 의해서는 2-hydroxychlorpropamide 생성의 억제 양상이 거의 관찰되지 않았다.(0~20%) .

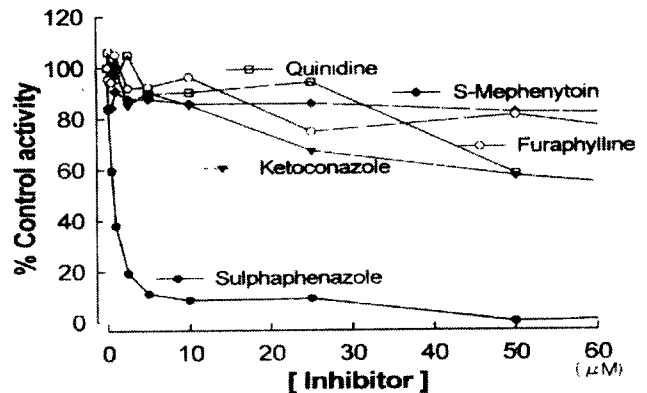


Fig. 5 Inhibitory effect of selective chemical inhibitors for CYP isozymes on chlorpropamide 2-hydroxylation in human liver microsome. Data shows the average value from 3 different human liver microsome (L-20, L-21 and L-23)

다. cDNA 발현 인체 간 CYP 효소군에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사능

5가지의 주요 cDNA 발현 인체 간 CYP 효소군에서 chlorpropamide를 기질약물로 배양시켰을 때 2-hydroxychlorpropamide의 생성 정도는 다양하게 나타났다. 동일한 조건에서 CYP2C9과 CYP2C19 효소군에서 2-hydroxychlorpropamide의 생성이 두드러졌으며, 이때 생성 속도는 각각 18.0과 20.1pmol/min/nmol CYP이었다. 반면 CYP3A4, CYP2D6, CYP1A2 효소군에서는 2-hydroxychlorpropamide 생성이 거의 없거나 미미한 수준이었다.(Fig. 6)

이어서 CYP2C9과 CYP2C19효소군에서 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사특성의 평가에서 5~2000 μ M의 다양한 농도의 chlorpropamide를 1시간동안 각 효소군으로 배양한 결과 2-hydroxychlorpropamide의 생성은 Fig. 7에서와 같았다. 동일한 조건으로 3회 시험을 실시했을 때 모두 Michaelis-Menten kinetics에 잘 따랐으며, 실시한 시험에서의 효소역학 경수 Km이 CYP2C9과 CYP2C19에서 각각 279.3 ± 41.9 과 663.0 ± 152.12 μ M이었으며, Vmax는 64.6 ± 2.8 과 143.1 ± 12.8 pmol/min/nmol CYP이었다. CYP2C9과 CYP2C19의 내재성 청소율은 각각

0.258과 0.224 ml/min/nmol CYP이었다(Table 3).

Table 3. Michaelis-Menten parameters estimated for formation of 2-hydroxychlorpropamide from chlorpropamide in cDNA expressed human CYP2C9 and CYP2C19 isozymes.

	K _m (μM)	V _{max} (pmol/mg/min)	CL _{int} * (ml/min/nmol CYP)
CYP2C9			
Mean±S.D	279.3±41.9	64.6±2.8	0.258
CYP2C19			
Mean±S.D	663.0±152.12	143.1±12.8	0.224

* Intrinsic clearance = V_{max}/K_m

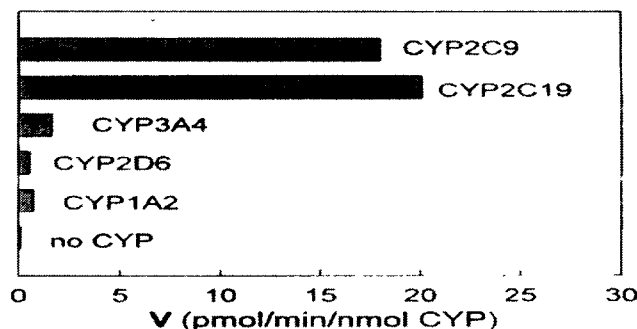


Fig. 6. Formation rate (V) of 2-hydroxychlorpropamide (pmol/min/nmol CYP) by cDNA expressed human CYP isozymes from incubation with chlorpropamide (100 μM). Data show mean value (n=2).

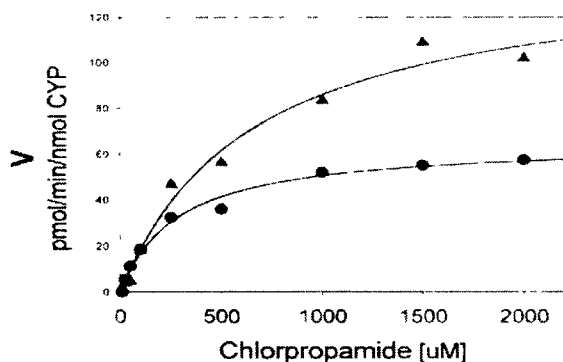


Fig. 7. Michaelis-Menten plots of the enzyme kinetics for the formation of 2-hydroxychlorpropamide from the incubation of chlorpropamide in cDNA expressed human CYP2C9(●) and CYP2C19(▲) isozymes. A range of chlorpropamide concentrations (5~2000 μM) was used.

라. 인체 간 마이크로솜에서의 CYP 효소군 활성화에 대한 chlorpropamide의 저해능 평가

인체 간 마이크로솜에서의 CYP 효소군 활성화에 대한 chlorpropamide의 저해능을 평가한 결과는 3종류의 마이크로솜에서 일관되게 CYP2C9 표지 반응인 tolbutamide 4-hydroxylation이 chlorpropamide의 저농도에서 부터 강력하게 저해되었다(Fig. 8).

CYP3A4에 특이한 midazolam 1-hydroxylation의 경우 고농도(> 50μM)의 chlorpropamide에서 억제능이 일부 관찰되었으나 tolbutamide 4-hydroxylation의 억제양상에 비교할 때 그 활성 저해 효과는 크지 않았다. CYP1A2, CYP2C19, CYP2D6 각 효소군의 특이 반응인 phenacetin 0-deethyltion, S-mephenytoin 4-hydroxylation, dextromethorphan 0-demethylation의 경우 chlorpropamide에 의한 활성 억제 양상이 거의 관찰되지 않았다.

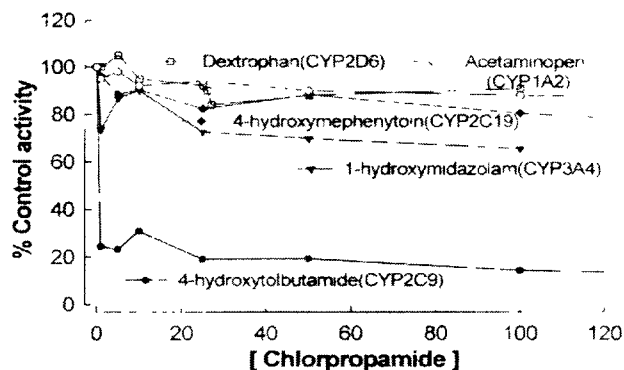


Fig. 8. Inhibitory effect of chlorpropamide on CYP isozymes in human liver microsomes. The reaction probe were phenacetin for CYP1A2, midazolam for CYP3A4, tolbutamide for CYP2C9, S-mephenytoin for CYP2C19, and dextromethorphan for CYP2D6. Data shows the average value from 3 different human liver microsomes.

고찰

Chlorpropamide와 구조적으로 상당히 유사한 tolbutamide는 CYP2C9의 기질 약물로 잘 알려져 있으며 그 유전적 다양성에 의해서 tolbutamide의 약동학적 다양성의 많은 부분을 설명할 수 있다고 알려져 있다.¹³⁻¹⁶⁾ 그러나 최근 몇몇 in vitro 인체간 마이크로솜 및 cDNA 발현 CYP 효소군을 가지고 실시한 연구에서 CYP2C9뿐만 아니라

CYP2C19도 tolbutamide 4-hydroxylation에 관여한다는 보고가 있어 왔다.¹⁸⁻²¹⁾

특히, 인체 간 마이크로솜에서 CYP2C9와 CYP2C19분획을 이용한 Lasker 등¹⁸⁾의 연구와 cDNA 발현 CYP2C9와 CYP2C19을 이용한 Venkatakrishnan 등¹⁹⁾의 연구에서는 CYP2C19이 tolbutamide 4-hydroxylation에 대하여 CYP2C9과 동등한 대사능을 가지고 있다고 보고하였다. 반면 Wester 등²⁰⁾이 시행한 CYP 특이 면역항체를 이용한 시험에서는 CYP2C19이 tolbutamide 대사의 4-hydroxy 대사물의 생성에 14-22%정도 관여할 것으로 추정하였다. CYP2C9과 CYP2C19이 모두 tolbutamide에 대해서 동등의 대사능력을 보유하고 있으나, 인체간에서는 tolbutamide의 대사에 대한 CYP2C19의 기여도가 상대적으로 낮으며, tolbutamide의 약동학적 개인간의 다양성에 CYP2C9의 유전적 다양성이 크게 관여하고 있는 것이 사실이다. 이런 현상의 근본적인 원인은 실제 인체간에서의 CYP2C9의 발현이 CYP2C19보다 훨씬 크다는 데 있다. Inoue 등³⁸⁾의 보고에 의하면 CYP2C9이 인체간 CYP 효소군에서 20%정도인 반면 CYP2C19은 0.8~1.4%에 지나지 않는다고 한다. 이러한 CYP2C9과 CYP2C19의 인체 간에서의 발현의 차이가 tolbutamide 4-hydroxylation 과정에 대한 기여도의 차이로 이어진 것으로 이해하고 있다.

Chlorpropamide 경우도 그 화학적 구조의 유사성을 고려할 때 tolbutamide에서와 같이 CYP2C9과 CYP2C19 효소군에 의해서 대사가 이루어지고 대사에 주로 관여하는 특정 효소군의 유전적 다양성에 의해서 약동학적 약력학적 다양성이 나타날 가능성이 충분히 있다고 할 수 있다.

본 연구에서 인체간 마이크로솜과 cDNA 발현 CYP 효소계를 사용한 in vitro 상의 시험결과에서 in vivo 인체 투여시와 동일하게 chlorpropamide 대사과정에서 2-hydroxychlorpropamide 생성이 주요 대사경로임을 확인할 수 있었다. 이 과정에는 CYP2C9 효소군이 주로 관여하며, 외에 CYP2C19도 chlorpropamide 2-hydroxylation에 대한 대사능을 가지고 있으나, 그 대사과정에 있어서 실제 인체에 chlorpropamide를 투여했을 경우에는 CYP2C9과 비교하여 그 기여도가 크지 않을 것으로 사료된다. 그 이유로는 첫째, chlorpropamide를 인체 간 마이크로솜에서

반응시켰을 때 2-hydroxychlorpropamide 생성에 대한 효소역학 동태가 두 종류의 효소군에 의해 대사되는 two enzyme model 보다 한가지 효소군에 의해서 결정되는 one enzyme model에서 더욱 잘 설명되어졌으며, Eadie-Hofstee 플롯에서도 monophasic enzyme model에 잘 적용되는 것으로 판단되어져, 인체 간 마이크로솜에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation 과정에는 한가지 종류의 효소군이 주로 관여하는 것으로 추정되어졌다. 두 번째로 각 CYP 효소군의 특이 활성 저해제에 의한 2-hydroxychlorpropamide 생성 억제 정도 평가에서는 CYP2C9 특이 활성 저해제인 sulphaphenazole에 의해서만 강력하게 억제되었다. 한편, CYP3A4 활성저해제인 ketoconazole을 비롯한 몇몇 활성저해제의 고농도(> 25 μ M)에서 chlorpropamide 2-hydroxylation에 대한 일부 저해효과가 관찰되었다. 그러나, 그 당시 농도가 각 저해제의 효소군별 특이 저해효과를 유발하는 농도 즉, 특이 저해 효과영역(window of selectivity)^{39,40)}을 넘어서서 비 특이적으로 일어난 저해 효과에 기인해서 발생된 것으로 사료된다.

반면 cDNA 발현 인체 간 CYP 효소군에서 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사능은 앞선 chlorpropamide in vitro 마이크로솜 실험과 in vivo 피험자 시험 결과와는 상이하게 관찰되었다. Tolbutamide 4-hydroxylation에 대한 마이크로솜 분획 및 cDNA 발현 효소군을 이용한 in vitro 대사능 시험¹⁸⁻²¹⁾에서와 유사하게 CYP2C9과 CYP2C19 두 효소군이 chlorpropamide 2-hydroxylation에 대한 대사능을 가지는 것으로 확인되었고, 2-hydroxychlorpropamide의 생성경로에 대한 CYP2C9과 CYP2C19의 Km은 각각 279.3 $\pm$ 41.9와 663.0 $\pm$ 152.1 μ M로 CYP2C9이 CYP2C19에 비하여 2배 이상 적은 반면, Vmax는 64.6 $\pm$ 2.8 과 143.1 $\pm$ 12.8 pmol/min/nmol CYP로 CYP2C19이 2배 가량 커서 결과적으로 유사한 내재성 청소율(CYP2C9 ; 1.258, CYP2C19; 0.224)을 나타내었다. 이는 Lasker 등¹⁸⁾의 tolbutamide 4-hydroxylation에 대한 인체 간 마이크로솜에서의 CYP2C9과 CYP2C19 분획이 가지는 효소역학 수치(CYP2C9 ; Km=178~407 μ M, Vmax=2.95~7.08 pmol/min/mg, CYP2C19; m=650 μ M, Vmax=3.71 pmol/min/min)의 경향과 상당히 유사하다. 이는 인체간에서의 각 효소군의 발현 비율을 생각지 않았을 때 chlorpropamide의 대사에

chlorpropamide의 대사에 CYP29 뿐만 아니라 CYP2C19도 중요하게 관여할 수 있음을 반영하는 것이다. 그러나, tolbutamide대사에서와 같이 CYP2C19의 인체간에서의 발현 비율은 CYP2C9의 1/20 정도에 지나지 않기 때문에 chlorpropamide 투여 시 약동학적인 개인간 변이에 단지 CYP2C9 유전적 다형성만이 주로 관여 할 것으로 추론된다. 이런 사실은 이번 실험결과에서 CYP2C19의 활성저해제로 사용한 S-mephenytion에 의한 chlorpropamide 2-hydroxylation에 대한 억제능 평가에서 저해제의 가장 고농도인 100 μ M에서도 0~20%정도 밖에 억제가 나타나지 않았으며, 반대로 chlorpropamide를 저해제로 사용했을 경우에도 S-mephenytion 4-hydroxylation에 대해 최대20% 이상 억제되지 않은 사실에서도 마이크로솜내의 CYP29과 CYP219 유전자형에 따라 분류된 피험자에서의 chlorpropamide 경구투여 약동학시험¹⁵⁾에서도 CYP2C9*1/*1 유전자형(wild type)군과 CYP*1/3 유전자형을 가지고 있는 군간에는 chlorpropamide의 혈 중 청소율과 대사비가 차이를 보이는 반면 CYP2C19에 대한 유전적 EM군과 PM군간에는 차이가 없는 것이 보고된 바 있다(Fig.2). 본 연구의 in vitro 시험은 in vivo상에서의 chlorpropamide의 약물동태의 다양성에 CYP2C9이 크게 기여한다는 사실을 뒷받침하는 것으로 사료된다.

CYP2C19의 경우 그 유전적 다양성에 있어 전체 인구 집단에서의 PM의 빈도가 Caucasian에서는 2-5%의 낮은 빈도로 발견되는데 반해서, 한국인, 중국인 및 일본인 등에서는 13-23%정도로 높은 빈도로 발견되고 A^{23,24,41)} CYP2C9 유전자의 결손빈도는 한국인에서 발견되는 변이유전형인 CYP2C9*3의 경우 1.13%⁴²⁾로 Caucasian의 3~8.5%와 비교할 때 상당히 낮은 빈도로 발견된다.^{43,44)} CYP2C9이 chlorpropamide 대사에 관여한다는 사실에서 CYP2C9 PM의 한국인에서의 낮은 발현 빈도를 고려하여, 이 약물을 사용할 때 CYP2C9 유전자에 결함이 있는 환자에서 chlorpropamide 상용량 사용 시 저혈당증 등의 부작용 발생의 가능성을 크게 줄일 수 있을 것으로 기대된다.

그러나, CYP29이 chlorpropamide의 대사에 미치는 기여도에 있어서 CYP2C9 PM 즉, 예로 CYP2C9*3/*3 유전형을 가진 피험자의 경우에는 CYP2C19 표현형이 상대적으로 부각되어 chlorpropamideml 약물동태에 영향력

을 미칠 가능성도 배제할 수 없다. 그러나 CYP 효소군의 개개의 발현 정도가 매우 크다는 것⁴⁵⁾을 고려할 때 이런 상대적인 기여도에 대한 명확한 예측은 불가능한 것으로 사료된다.

Kallio 등²²⁾의 연구에서는 CYP2D6의 PM과 EM간에서 소변내 chlorpropamide와 그의 산화대사물간의 대사비의 차이를 근거로 CYP2D6에 대한 chlorpropamide 대사관련 여부를 확인할 필요성을 제기했었다. 앞선 자원피험자에서 CYP2C9 및 CYP2C19 유전자형에 따른 chlorpropamide의 약동학적 차이 연구에서는 CYP2D6 유전자형에 대한 고려가 전혀 없어 그 사실에 대한 고찰이 불가능하였으나, 이번 in vitro 연구에서 CYP2D6의 특이 저해제인 quinidine에 의한 chlorpropamide 2-hydroxylation의 특이 억제능이 두드러지지 않는다는 사실과 cDNA 발현 CYP2D6에서는 거의 2-hydroxychlorpropamide 생성이 거의 되지 않는다는 사실에서 chlorpropamide의 대사에 있어서 CYP2D6의 관련 가능성은 상당히 적을 것으로 보인다.

이미 CYP2C9의 기질약물로 알려져 있는 tolbutamide와 이번 연구에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation에 CYP2C9이 주로 관여한다는 사실에서 상기약물들과 같은 sulfonylurea 측쇄구조를 가지고 있는 경구 혈당 강하제들의 주요대사과정에 또한 CYP2C9이 주로 관여할 것이라는 가능성을 생각해 볼 수 있다. 대사과정에 또한 CYP2C9이 주로 관여할 것이라는 가능성을 생각해 볼 수 있다. 실제로 CYP2C9*3 변이유전형을 가진 환자에 정상 유전형을 가진 환자에 비해 sulfonylurea 경구 혈당 강하제인 glipizide의 혈장 청소율이 5,6배 증가되었으며, 당시 혈당저하 효과의 증대로 전신위축, 심계항진, 발한 등의 저 혈당 증세의 유발에 대한 보고가 있었다³⁷⁾ 최근에 개발되어 널리 사용되고 있는 sulfonylurea계약물인 glipizide, gliclazide는 이런 대사과정에 관련된 효소군의 유전자형에 따른 약물동태의 다양성에 대한 정보의 필요성은 임상적으로 더욱 절실하다. 그러므로 본 연구의 chlorpropamide 대사과정에 대한 CYP2C9의 관련성 규명 연구가 앞으로 타 주요 sulfonylurea계 약물들의 대사과정에 대한 탐색 연구를 위한 기본적인 정보를 제공할 수 있을 것으로 기대된다.

Chlorpropamide에 의한 CYP 효소군별 특이 표지 약물

대사반응에 대한 영향력 평가에서는 CYP2C9의 표지반응인 tolbutamide 4-hydroxylation에 대해서는 chlorpropamide 1 μ M 농도에서부터 80%($\pm$ 5.5)이상의 강력한 저해능을 관찰할 수 있었으나, 그 외의 CYP 효소군의 표지반응에 대해서는 chlorpropamide의 250 μ M 농도까지에서 거의 저해효과가 없거나, midazolam 1-hydroxylation의 경우 100 μ M이상에서 최대 30% 정도의 억제능이 관찰될 뿐이었다. 이는 chlorpropamide를 실제 인체 투여시에 나타나는 혈장농도 범주가 $\sim$ 200 μ M($\approx$ 60 μ g/ml)라는 것을 고려할 때 chlorpropamide와 동시에 복용되는 약물이 CYP2C9의 기질약물일 경우 약물 상호작용이 유발될 수 있을 가능성을 제시한다 할 수 있다. 더불어 CYP2C9을 제외한 다른 CYP 효소군의 표지 약물반응에 대해서는 저해효과가 관찰되지 않아 임상적으로 CYP2C9 이외의 효소군에 의해서 대사 되는 약물의 약동학적 동태에는 영향이 없을 것으로 사료되나, 이런 in vitro 결과에 의한 추론은 실제 임상 환자군에서의 고찰이 뒷받침 되어야 할 것이다.

결론적으로 인체에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사과정에서 CYP2C9 주요하게 관여하며, chlorpropamide의 약물동태 결정에 그 유전적 다양성이 크게 기여할 것으로 사료된다. Chlorpropamide가 CYP 효소계와 관련하여 야기할 수 있는 약물상호작용 유발능에 대한 고찰은 임상상에서 경구 혈당 강하제에 의한 치명적인 이상 반응으로부터 CYP2C9의 유전적 결함이 있는 환자나 임상시험의 피험자들을 보호할 수 있는 과학적 근거를 제공할 수 있을 것으로 생각된다.

결 론

인체 투여 시 약물동태의 다양성이 큰 것으로 알려져 있는 chlorpropamide의 약동학적 개인차를 규명하기 위해, chlorpropamide의 대사에 관여하는 CYP 효소군을 파악하였다. 그 주요 대사체인 2-hydroxychlorpropamide 생성에 대해서 인체 간 마이크로솜과 다양한 cDNA 발현 CYP 효소군의 표지약물들의 대사에 대해서 chlorpropamide의 활성 억제능 평가는 통하여 chlorpropamide의 약물상호작용 유발능을 평가하고자 하였다.

2-Hydroxychlorpropamide의 생성은 one enzyme model에 잘 일치되었으며, 인체 간 마이크로솜에서의 chlorpropamide 2-hydroxylation은 CYP2C9 특이 저해제인 sulphaphenazole에 의해서 2-hydroxychlorpropamide 생성이 강력하게 억제되었다. 이런 사실들에서 chlorpropamide 2-hydroxylation 과정에 CYP2C9이 주요하게 관여할 것으로 보였다. 그러나, cDNA 인체 간 CYP2C9과 CYP2C19 효소군에서 2-hydroxychlorpropamide의 생성이 두드러지고 각각의 2-hydroxychlorpropamide 생성에 대한 내재성 청소율은 0.258와 0.224ml/min/nmol CYP으로 유사한 값을 보였다. 이렇게 in vitro cDNA 발현 인체 간 CYP 효소군의 연구에서는 chlorpropamide 2-hydroxylation 대사과정에 CYP2C19의 발현의 차이는 약물 대사능에 있어서 각 효소군의 기여도 차이로 이어지는 것으로 이해된다. 먼저의 정상 피험자에서의 임상시험과 이번 in vitro 연구의 결과로 인체에서 chlorpropamide 투여 시 그 약물동태 결정에 CYP2C9의 유전적 다형성이 크게 기여할 것으로 판단된다.

그리고, CYP 효소군 특이 표지반응에서 chlorpropamide에 대한 억제 평가에서 CYP2C9 특이 반응 tolbutamide 4-hydroxylation에 대해서만 강력한 억제 반응을 나타냄으로써 chlorpropamide가 CYP2C9 기질약물인 동시에 비슷한 대사경로를 가지는 약물과 동시에 투여되었을 때 대사과정에서 경쟁적 기질로 작용하여 약물 상호작용이 발생 할 수 있음을 지시하였다.

참고 문헌

1. Flockhart DA. Drug interactions and the cytochrome P450 system-the role of cytochrome P450 2C19 Clin pharmacokinetics 29(suppl 1) : 45-52, 1995
2. Diabinese(chlorpropamide) package insert. Pfizer Labs, New York, 1977
3. Sartor G, Melander A, Schersten B, Wahlin-Boll E. Comparative single-dose kinetics and effects of four sulfonylureas in healthy volunteers, Acta Med Scand 208: 301-307, 1980
4. Huupponen R, Lammintausta R : chlorpropamide bioavailability and pharmacokinetics. Int J Clin. Pharmacol Ther toxicol 19:331-333, 1981
5. Brotherton PM, Grievson P, McMartin C. A study metabolic fate of chlorpropamide in man. Clin. Pharmacol Ther 10:505-514, 1969

6. Taylor JA. Pharmacokinetics and biotransformation of chlorpropamide in man. *Clin Pharmacol Ther* 13:710-718, 1972
7. Bergman U, Christenson I, Jansson B, Wiholm B-E, Ostman. Wide variation in serum chlorpropamide concentration in outpatients. *Eur J Clin Pharmacol* 18:165-169, 1980
8. Huupponen R, Viikari J, Saarmaa H. Chlorpropamide and glibenclamide serum concentrations in hospitalized patients. *Ann Clin Res* 14:119-122, 1982
9. Eichelbaum M, Gross AS. The genetic polymorphism of debrisoquine/sparteine metabolism-clinical aspects. *Pharmacol Ther* 46:377-394, 1990
10. Daly AK, Choleston S, Gregory W, Idle JR. Metabolic polymorphisms. *Pharmacol Ther* 57:129-160, 1993
11. Mancy A, Broto P, Dijols S, Dansette PM, Mansuy D. The substrate binding site of human liver cytochrome P450 2C9: an approach using designed tienilic acid derivatives and molecular modeling. *Biochemistry* 34: 10365-10375, 1995
12. Jones BC, Hawksworth G, Home VA, et al. Putative active site model for cytochrome P450 2C9 (tolbutamide hydroxylase). *Drug Metab Dispos* 24: 260-266, 1996
13. Miners JO, Smith KJ, Robson RA, McManus ME, Veronese ME, Birkett DJ. Tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes. Kinetic characterisation and relationship to other cytochrome P-450 dependent xenobiotic oxidations. *Biochem Pharmacol* 37: 1137-1144, 1988
14. Relling MV, Aoyama T, Gonzalez FJ, Meyer UA, Tolbutamide and mephenytoin hydroxylation by human cytochrome P450s in the CYP2C subfamily. *J Pharmacol Exp Ther* 252: 442-447, 1990
15. Srivastava PK, Yun CH, Beaune PH, Ged C, Guengerich FP. Separation of human liver microsomal tolbutamide hydroxylase and (S)-mephenytoin 4-hydroxylase cytochrome P-450 enzymes. *Mol Pharmacol* 40:69-79, 1991
16. Veronese ME, Miners JO, Randles D, Gregov D, Birkett DJ. Validation of the tolbutamide metabolic ratio for population screening with use of sulphaphenazole to produce model phenotypic poor metaboliser. *Clin Pharmacol Ther* 47: 403-411, 1990
17. Yoon YR, Shon JH, Kim KA, Cha JJ, Shin SG, Shin JG. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of tolbutamide and chlorpropamide in relation to CYP2C9 and CYP2C19. *Clin Pharmacol Ther* 67:152, 2000
18. Lasker JM, Wester MR, Aramsombatdee E, Raucy JL. Characterization of CYP2C19 and CYP2C9 from human liver: respective roles in microsomal tolbutamide, S-mephenytoin, and omeprazole hydroxylation. *Arch Biochem Biophys* 353: 16-28, 1998
19. Venkatakrishnan K, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Relative quantities of catalytically active CYP2C9 and 2C19 in human liver microsomes: application of the relative activity factor approach. *J Pharm Sci* 87: 845-853, 1998
20. Wester MR, Lasker JM, Johnson EF, Raucy JL. CYP2C19 participates in tolbutamide hydroxylation by human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 28: 354-359, 2000
21. Richardson TH, Jung F, Griffin KJ, Wester M, Raucy JL, Kemper B, et al. A universal approach to the expression of human and rabbit cytochrome P450s of the 2C subfamily in *Escherichia coli*. *Arch Biochem Biophys* 323: 87-96, 1995
22. Kallio J, Huupponen R, Pyykko K. The relationship between debrisoquine oxidation phenotype and the pharmacokinetics of chlorpropamide. *Eur J Clin Pharmacol* 39:1990
23. Sohn DR, Kusaka M, Ishizaki R, Shin SG, Jang JJ, Shin JG, et al. Incidence of S-mephenytoin hydroxylation deficiency in a Korean population and the interphenotypic differences in diazepam pharmacokinetics. *Clin Pharmacol Ther* 52: 160-169, 1992
24. Bertilsson L. Geographical/interacial differences in polymorphic drug oxidation: current state of knowledge of cytochrome P450 (CYP) 2D6 and 2C19. *Clin Pharmacokinet* 29: 192-209, 1995
25. Nakamura K, Goto F, Ray WA, McAllister CB, Jacqz E, Wilkinson GR, et al. Interethnic differences in genetic polymorphism of debrisoquine and mephenytoin hydroxylation between Japanese and Caucasian populations. *Clin Pharmacol Ther* 38: 402-408, 1985
26. Morel F, Beaune PH, Ratanasavanh D, Flinois JP, Yang CS, Guengerich FP, et al. Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes. *Eur J Biochem* 191: 437-444, 1990
27. Chang TK, Yu L, Maurel P, Waxman DJ. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P-450 inducers and autoinduction by oxazaphosphorines. *Cancer Res* 57: 1946-1954, 1997
28. Caraco Y, Wilkinson GR, Wood AJ. Differences between white subjects and Chinese subjects in the in vivo inhibition of cytochrome P450s 2C19, 2D6, and 3A by omeprazole. *Clin Pharmacol Ther* 60: 396-404, 1996
29. Baldwin SJ, Bloomer JC, Smith GJ, Ayrton AD, Clarke SE, Chenery RJ. Ketoconazole and sulphaphenazole as the respective selective inhibitors of P4503A and 2C9. *Xenobiotica* 25: 261-270, 1995
30. Bourne M, Meunier V, Berger Y, Fabre G. Cytochrome P450 isozyme inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 321-332, 1996
31. Broly F, Libersa C, Lherm33itte M, Bechtel P, Dupuis B. Effect of quinidine on the dextromethorphan O-demethylase activity of microsomal fractions from human liver. *Br J Clin Pharmacol* 28: 29-36, 1989
32. Sesardic D, Boobis AR, Murray BP, Murray S, Segura J, de la Torre R, et al. Furfurylene is a potent and selective inhibitor of cytochrome P4501A2 in man. *Br J Clin Pharmacol* 29: 651-663, 1990
33. Tassaneeyakul W, Birkett DJ, Veronese ME, McManus ME, Tukey RH, Quattrochi LC, et al. Specificity of substrate and inhibitor probes for human cytochromes P450 1A1 and 1A2. *J Pharmacol Exp Ther* 265: 401-407, 1993

34. Rodrigues AD, Kukulka MJ, Surber BW, Thomas SB, Uchic JT, Rotert GA, et al. Measurement of liver microsomal cytochrome P450(CYP2D6) activity using [O-methyl-¹⁴C] dextromethorphan. *Anal Biochem* 219: 309-320, 1994
35. Gorski JC, Hall SD, Jones DR, VandenBranden M, Wrighton SA. Regioselective biotransformation of midazolam by members of the human cytochrome P450 3A(CYP3A) subfamily. *Biochem Pharmacol* 47: 1643-1653, 1994
36. Goldstein JA, Faletto MB, Romkes-sparks M, Sullivan T, Kitareewan S, Raucy JL, et al. Evidence that CYP2C19 is the major (S)-mephenytoin 4-hydroxylase in humans. *Biochemistry* 33: 1743-1752, 1994
37. Hill R. E., Crechiolo J. Determination of serum tolbutamide and chlorpropamide by high-performance liquid chromatography. *J Chromatography* 145:165-168, 1978
38. Inoue K, Yamazaki H, Imiya K, Akasaka S, Guengerich FP, Shimada T. Relationship between CYP2C9 and 2C19 enotypes and tolbutamide methylhydroxylation and S-mephenytoin 4-hydroxylation activities in livers of Japanese and Caucasian populations. *Pharmacogenetics* 7:103-113, 1997
39. Rodrigues AD. Use of in vitro human metabolism studies in drug development: An industrial perspective. *Biochem Pharmacol* 48: 2147-2156, 1994
40. Bourne M, Meunier V, Berger Y, Fabre G. Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *J Pharm Exp Ther* 277: 321-332, 1996
41. Daniel HI, Edeki TI. Genetic polymorphism of S-mephenytoin 4-hydroxylation. *Psychopharmacol Bull* 32:219-230, 1996
42. Yoon YR, Shon JH, Kim MK, Lim YC, Lee HR, Park JY, et al. Frequency of cytochrome P450 CYP2C9 mutant alleles in a Korean population. *Br J Clin Pharmacol* 51:277-280, 2001
43. Nasu K, Kubota T, Ishizaki T. Genetic analysis of CYP2C9 polymorphism in a Japanese population. *Br J Clin Pharmacol* 51:277-280, 2001
44. Sullivan-Klose TH, Ghanayem BI, Bell DA, Zhang ZY, Kaminsky LS, Shenfield GM, et al. The role of the CYP2C9-Leu359 allelic variant in the tolbutamide polymorphism. *Pharmacogenetics* 6:341-349, 1996
45. Shimada T, Yamazaki H, Mimura M, Inui Y, Guengerich FP. Interindividual variations in human liver cytochrome P-450 enzymes involved in the oxidation of drugs, carcinogens and toxic chemicals: studies with liver microsomes of 30 Japanese and 30 Caucasians. *J Pharmacol Exp Ther* 270: 414-423, 1994