약학회지 제 57 권 제 6 호 412~419 (2013)
Yakhak Hoeji Vol. 57, No. 6

가속질량분석기(Accelerator mass spectrometry, AMS)와 극미량 ^{14}C-동위원소를 이용한 혁신적 임상시험개발동향

조경희 · 이희주* · 최형식* · 이경률 · Stephen R. Dueker** · 신영근***,#
서울의과학연구소, *바이오코아, **Vitalea Science, ***충남대학교 약학대학
(Received October 15, 2013; Revised December 2, 2013; Accepted December 10, 2013)

Trends of Innovative Clinical Drug Development using AMS (Accelerator Mass Spectrometry) and ^{14}C-micro Tracer

Kyung Hee Cho, Hee Joo Lee*, Hyung Sik Choie*, Kyoung Ryul Lee, Stephen R. Dueker** and Young G. Shin***,#
Seoul Medical Science Institute/Seoul Clinical Laboratories, Seoul 140-863, Korea
**BioCore, Seoul 152-766, Korea*
***Eckert & Ziegler Vitalea Science, Davis, CA 95618, USA*
****College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea*

Abstract — Drug discovery and development processes are time consuming and costly endeavors. It has been reported that on average it takes 10 to 15 years and costs more than $ 1billion to bring a molecule from discovery to market. Compounds fail for various reasons but one of the significant reasons that accounts for failures in clinical trials is poor prediction/understanding of pharmacokinetics and drug metabolism in human. In an effort to improve the number of compounds that exhibit optimal absorption, distribution, metabolism, elimination (ADME), and pharmacokinetic properties in human, drug metabolism, pharmacokinetic scientists have been continually developing new technologies and compound screening strategies. Over the last few years, accelerator mass spectrometry (AMS) and its applications to preclinical/clinical pharmacokinetics and ADME studies have significantly increased, particularly for new chemical/biological entities that are difficult to support with conventional radiolabel studies. In this review, the application of AMS for micro-dosing, micro-tracer absolute bioavailability, mass balance and metabolite profiling studies will be discussed.

Keywords □ accelerator mass spectrometry, micro-dosing, absolute bioavailability, mass balance/metabolite profiling, ^{14}C-micro-tracer

일반적으로 신약개발은 초기 약품후보물질 선정에서부터 비임상 및 임상 시험을 거쳐 약효와 안전성이 확보되기까지 거의 10~15년 이상의 시간이 걸리며, 비용도 이제는 10억 달러까지 육박하는 고비용 사업이지만 한번 블록버스터 신약을 개발하게 되면 단기간에 높은 수익을 보장하는 고수익성 사업으로 알려져 있다.[1] 신약개발의 성공율은 초기 약품 후보물질부터 신약허가 마지막 단계까지 고려한다면 약 10,000개의 후보물질중 한개정도만이 성공하는 약 0.01%의 확률밖에 되지 않기에, 제약 업계에서는 시간과 비용을 효율적으로 사용하면서 신약개발의 성공율을 높일 수 있는 방법에 대해 많은 고민을 해왔다. 여전히 임상에서의 효능에 대한 검증의 어려움은 남아있지만, 새로운 "-omics" 기술의 발전은 새로운 타겟을 발굴하는데 많은 기여를 하였고, 따라서 이렇듯 새로운 기술발전에 따른 새로운 신약개발의 패러다임이 필요하게 되었다.

또한 글로벌 신약개발과정 중 가장 중요한 단계인 임상2상에서의 실패원인을 조사한 연구에 따르면, 약 70% 가까이 되는 실패이유가 약효의 부재와 예상하지 못한 독성이 차지한다고 보고되고 있다.[2] 즉, 동물모델을 사용한 전 임상단계에서는 약효와 안전성을 확보한 신약 후보물질이, 막상 임상시험 단계에 가서는 예상했던 약동학적 거동을 보이지 않아 충분한 약효농도에 이르지 못했거나 또는 예상하지 못한 독성을 나타냈기때문이다.[2]

예상하지 못한 독성은 다양한 이유가 있다. 전임상 동물모델

#**Corresponding Author**
Young G. Shin
College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
Tel.: 010-8277-0324 Fax.: 042-823-6566
E-mail: yshin@cnu.ac.kr

에서는 예측되지 않았던 대사체가 임상시험 과정에서 나타나서 이 새로운 대사체에 의한 독성이 영향을 미치는 경우도 종종 있으며, 또는 비록 전임상동물모델에서는 검출은 되었지만 상대적으로 인간에서 훨씬 고농도로 검출된 경우도 있다. 이와 같은 경우에는 이 대사체의 독성을 재평가 하기위해 여러가지 추가적인 실험을 해야 하며, 최악의 경우에는 대사체를 재합성하여 대사체의 독성시험을 따로 해야하는 경우도 생긴다.[3,4]

예상하지 못한 약효의 부재 역시 여러가지 이유가 있으나, 특히 전임상 실험동물에서 나타난 약동학적 지표를 토대로 allometry 방법 등으로 인간에서의 약동학적 지표를 예측한 결과가 실제와 틀려 임상시험에서 사용된 권장 투여량에서 충분히 원하는 만큼의 혈중농도가 나오지 않는 경우도 큰 이유를 차지 한다.

최근 신약개발에 대한 성공 예측율을 좀더 향상시키고자 여러가지 새로운 신약 개발 패러다임이 소개되었고, 특히 최근에 크게 각광받는 새로운 패러다임 중 하나는 극소량의 C^{14}-microtracer와 Accelerator Mass Spectrometry(AMS)를 사용한 micro-dosing 및 micro-tracing 임상시험들이다. 특히 micro-tracing 임상시험들은 기존의 micro-dosing 연구에서의 어려움이었던 therapeutic dose의 약동학적인 파리미터예측능을 완전히 해결하여 현재 대부분의 다국적 제약회사에서 표준적인 임상시험의 하나로 자리를 잡게 되었다.[5,6]

이러한 새로운 방법의 임상시험이 가능하게 된 것은 극소량의 ^{14}C micro-tracer 방사성 동위원소를 정량할수 있는AMS 기기가 실용화되었기 때문이며, AMS 기기의 감도는 atto(1×10^{-18}) mole 레벨이어서 기존의 Liquid Scintillation Counter(LSC)보다 감도가 백만배이상 좋고 ELISA 보다도 천배이상의 고감도를 보인다. 아울러 매우 적은 극소량의 방사성 동위원소 표지 화합물을 사용하기 때문에 거의 nonradioactive로 간주되어 기존의 방사성 동위원소 표지 화합물을 사용할때의 규정에 얽매이지 않고 사용할수 있다.[7] 본 총설에서는 AMS를 이용한 새로운 신약개발의 패러다임에 대해, 특히 임상시험을 중심으로 소개하고자 한다.

본 론

AMS란 무엇인가?

AMS는 1970년 후반 고고학이나 지질학에서 $^{14}C/^{12}C$의 비를 구하여 대상물체의 연대를 측정하는데 쓰였던 방법이다. 이 탄소연대측정 방법은 공기 중의 ^{14}N이 상층부의 대기에서 빛에 의해 ^{14}C로 변하고 $^{14}CO_2$가 되면, 살아있는 유기체가 호흡하면서 체내에 축적, 살아있는 중에는 체내의 ^{14}C 양이 대기중의 ^{14}C 양과 같아지다가, 죽게되면 더이상 받아들이지 않게 되어 ^{14}C의 양이 고정되어 버리는 것을 이용해, ^{14}C의 반감기(5730년)를 알면, 몇 만년후의 대기중의 ^{14}C 양과 이미 죽어 체내에 고정된 ^{14}C 의 양의 차를 비교 계산하여 그 유기체가 죽었을때의 연도를 약 5만년 정도까지 역으로 추적 가능하게 하는 방법이다.[8,9]

1980년 후반에 와서 Lawrence Livermore National Lab에서

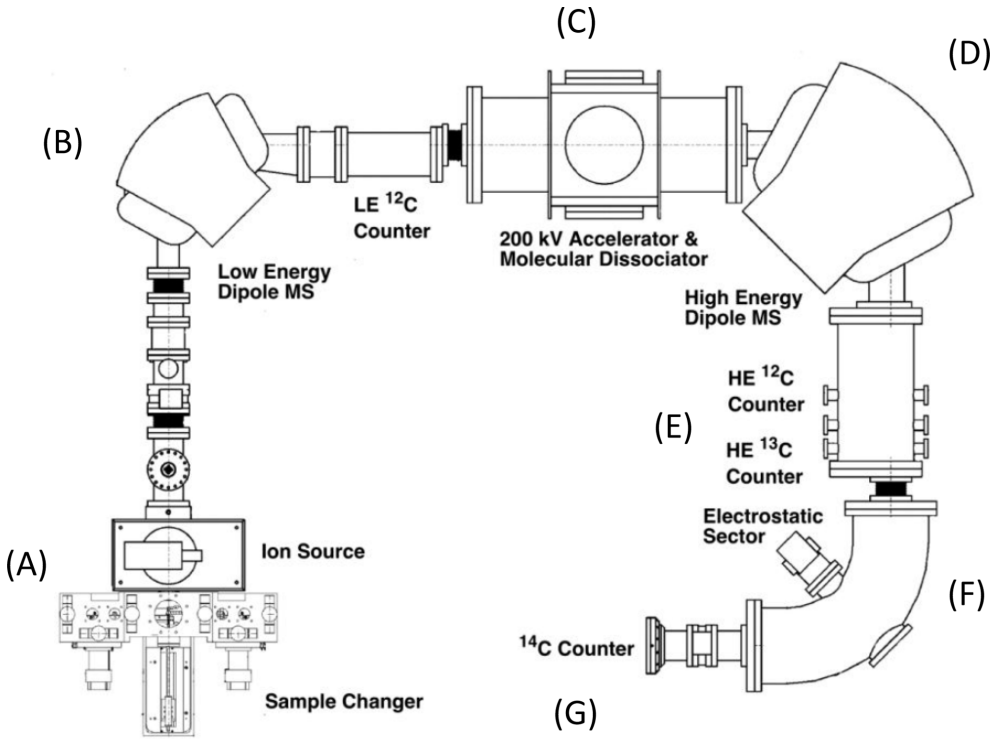

Fig. 1 – Scheme of Accelerator Mass Spectrometer with a 200 kV accelerator. Courtesy from Vitalea Science Inc.

는 AMS를 이용한 생체시료 분석을 처음 주도하여 인체의 대사체, 유전자 이상을 나타내는 거대분자를 형성하는 환경요인의 대사체 분석, 극미량의 농약성분 등의 연구에 이용하였다. 그 전까지는 이들의 대사체 및 분자작용 등을 분석하기에 너무 소량이라 어려움이 많았는데 AMS를 이용하여 정량가능하게 되었다.[8)]

AMS로 분석하기 위해 시료는 두 단계의 산화 환원 반응을 통해 graphite화 되어야 한다. 첫번째 과정에서는 900°C 정도의 온도에서 copper oxide 존재하에 모든 생체시료를 CO_2로 변하게 한다. 두번째 과정에서 CO_2는 500°C 정도의 온도에서 환원제인 titanium hydride와 zinc powder 그리고 cobalt 촉매 존재하에 graphite화 된다. CO_2 그 자체로 기기에 넣어 적용할수 있으나 일반적으로 graphite 하여 2 mg 정도의 시료를 조그만 cathode에 넣는다. 이 cathode를 기기의 ion source쪽에 위치한 시료분석 wheel에 넣어 분석한다.

AMS 기계의 도식도는 다음과 같다(Fig. 1). (A)는 graphite샘플을 장착하는 wheel 이 있는 caesium "sputter" ion source인데 여기서 caesium vapour에 의해 시료에서부터 형성된 negative ion들은 ion source보다 수천볼트 높은 상태를 유지하는 기기 안쪽으로 빨려들어간다. Negative ion들이 injection magnet(B)로 들어가면서 질량/이온 순서대로 분리되기 시작하고, 따라서 carbon 분석을 위해 ^{12}C, ^{13}C, ^{14}C를 구별할수 있게 한다. 이제 빠져나온 negative ion들이 약 200 kV의 accelerator(C)를 지나면서 고압의 전류차 및 accelerator 내부에 있는 collision cell들에 의해 negative charged ion들은 positive charged ion으로 변하게 된다. Positive charged ion들은 positive high terminal voltage에 반발하여 accelerator에서 빠져 나가게 되고, 빠져나온 ion들은 high energy dipole magnet(D)를 지나가면서 ^{12}C, ^{13}C, ^{14}C가 그들의 mass-to-charge ratio로 분리된다. ^{12}C 와^{13}C는 상대적으로 ^{14}C에 비해 풍부하며 faraday cups(E)에서 측정되고, ^{14}C는 electrostatic analyzer(F)에 의해 다시 re-focusing된 후 gas ionization detector(G)에서 측정된다.[8,9)]

신약검색 및 IND 단계에서 AMS의 응용

마이크로 도징(micro-dosing) – 마이크로도징은 최근에 신약개발에 있어서 고비용 저효율적인 생산성을 개선하기 위해 미국 식약청이 소개한 FDA 2004 critical initiative에 제안된 exploratory IND에 관련된 임상시험법 중 하나로 소개되었다.[11)] 전통적인 방법으로 신약후보물질들의 임상시험에 대한 승인(IND clearance)를 받기위해서는 적어도 두가지 비임상 동물종에서 여러가지 독성시험을 하여야 하며, 그 독성시험기간 역시 임상시험 기간에 맞춰서 진행되어야 한다.

아울러 임상에 사용될 시험물질 역시 철저한 기준에 맞추어 제조된 GMP lot을 사용하여 임상시험에 임해야 한다. 마이크로도징은 이러한 기존의 임상시험승인을 위해 요구되어온 여러가지 독성 패키지 실험들을 모두 행하지 않고, 사람에서의 독성을 예측할 수 있는 최소한의 독성자료만으로도 임상시험에 진입하는 것이 가능하다.[11)] 마이크로도징을 위해 US FDA가 일반적으로 요구하는 전임상 독성시험은 기본적인 *in vitro* 독성시험외에 한가지 설치류에서의 단회투여에 의한 독성 등 인간의 독성을 예측할수 있는 최소한의 전임상독성자료로서 이 자료를 제출하면 마이크로도징 조건하에서 임상시험이 가능하다. 또한 엄격한 GMP기준의 약물이 필요하지않으며 GMP에 준하는 순도의 약물로도 임상시험이 가능하다.

이와 같이 최소한의 독성 자료만을 요구하는 이유는 마이크로도징의 투여량이 아주 극미량이기에 가능한데, US FDA의 기준에 의하면 일반적으로 유효약효용량의 1% 이하이거나 또는 전체 투여량이 100 μg 이하 이면 가능하고, 특별히 가이드라인에 규정되어 있지는 않으나 일반적으로 임상1상 시험과 유사하게 4~6명의 건강한 피험자를 대상으로 수행한다.

이러한 마이크로도징은 특히 후보물질도출을 앞둔 신약검색단계에서 최종 후보물질 선정 및 투자결정을 내리는데 있어서도 특히 도움이 된다. 즉, 엄격한 신약검색 단계에서 약효와 물성이 좋은 후보물질을 3~4가지 정도 산출하였고, 이들의 간대사효소에서의 안정성, P450 효소에 대한 억제성, 단백결합, 타겟세포실험에서의 효능 및 전임상동물 모델에서의 PK/PD 등 모든 조건에서 서로 비슷하여 최종 후보물질로서의 우열을 가리기가 어려울 때, 이와 같은 마이크로도징을 통하여 극미량의 후보물질들을 사람에게 투여하여 그 약동학적인 파라미터를 빨리 알아봄으로서 여러 후보물질 중 임상에서 가장 우수한 결과를 낼 수 있는 물질을 선택할 수 있다.[12-16)]

마이크로 도징은 또한 후보물질중 인체에서의 약동학적인 파라미터를 여러가지 *in vitro* 시험 또는 *in vivo* 동물 시험을 통해서 예측하기가 어려운 상황에서 그 후보물질을 대한 연구의 지속 또는 중단 결정을 빨리 내려야 할때도 널리 이용될 수 있다. 실제로 신약검색단계에서는 *in vitro-in vivo* extrapolation 및 다양한 allometry scaling 방법을 사용하여 인간에서의 약동학적인 파라미터를 조기에 알아내고자 한다. 하지만 종종 이러한 전통적인 방법으로 부터 인간에서의 약동학적인 파라미터를 허용가능한 오차범위내에서(통상적으로 실측값이 예측값의 2배 이내의 오차이면 허용가능한 오차로 인식함) 예측하지 못하는 경우도 빈번하며, 다국적 제약회사들은 임상에서의 약동학 파라미터 예측율을 높이기 위해 많이 노력하고 있다. 궁극적으로 사람에서의 약동학적인 파라미터를 가장 잘 예측할 수 있는 모델은 바로 사람이며, 따라서 마이크로 도징은 이 개념에 충실히 따르는 실험전략이라고 할수 있다. 기타 마이크로도징이 도움을 줄수 있는 분야는 다음과 같다.[17)] 1. Prodrug의 active form drug으로 변함에 있어서 임상적인 약동학적인 이해가 필요한 경우 2. 특별한 질환을 앓고 있는 환자들을 대상으로 임상을 진행해야 할 경우

(예를 들면 신장질환 또는 간질환을 앓고 있는 환자에게 약효농도의 약물을 투여하는 것은 현실적으로 많은어려움이 따르나, 마이크로도징은 하면 그 부담을 크게 줄일 수 있음), 3. 라이센스 아웃 전략의 일환으로 좀더 빨리 임상데이터를 확보하려 할때 등이다.

마이크로도징을 수행하기가 어려울때는 다음과 같다.[17] 1. 약효농도에서 약물이 포화적인 약동학적 현상(saturated PK) 보일때, 2. 마이크로도즈 레벨에서도 약물의 solubility가 좋지 않을때, 3. Warfarin처럼 receptor에 high affinity 및 low-capacity binding을 보일때 등이 있다.

마이크로도징에 있어서 중요한 점은 극미량 투여시의 약물의 약동학적인 파라미터가 약효용량일때의 약물의 약동학적인 파라미터를 예측할수 있는냐 이다. 특히 이부분은 마이크로도징이 초기에 소개될 때부터 논란이 된 부분이며, 따라서 유럽에서는 여러회사들이 함께 마이크로도징의 약동학적 파라미터가 약효농도 투여시의 약동학적인 파라미터를 예측할수 있는지에 대해 몇몇의 약물을 선정하여 두번에 걸쳐서 CREAM(consortium for resourcing and evaluating AMS microdosing)과 EUMAPP (EU microdosing AMS partnership programme)이라는 큰 임상시험을 실시하였다.[17]

CREAM에서는 일부 약에 대해서는 마이크로도징이 약효농도에서의 약동학적인 지표를 오차범위내에서 예측가능하였으나 warfarin 등과 같은 경우에는 많이 차이를 보였다. EUMAPP에서는 6가지 약물을 따로 선정하여 그 결과를 비교하였고, 정맥투여시에는 비교적 잘 예측가능하였으나 경구투여시에는 그 예측율이 정맥투여와 비교시 다소 낮은 예측율을 보였다. 이러한 예측경향은 특히 약물의 BCS class 와도 관련이 있을수 있기에 실제 마이크로도징 시험을 계획전에 잘 고려하여야 할 것이다.

한국 식약청에서도 마이크로도징에 대한 기준안이 ICH M3(R2) 가이드라인을 참고로 하여 최종 마련되어 2012년에 공표되었고, 권고치인 마이크로도즈 레벨에서 최대 100 μg 단회투여 뿐만 아니라 총 5회 반복투여를 포함하여 전체투여량이 500 μg까지 허용하는 기준으로 설정되어 약동학(pharmacokinetics)적 평가뿐만 아니라, 바이오마커의 변화 관찰을 통한 약력학(pharmacodynamics)적인 평가도 어느정도 가능하게 구성되어 있다.[18]

신약개발 및 임상단계에서 AMS의 응용 (^{14}C-micro tracer 시험)

Absolute bioavailability – 임상시험에 진입하고 나면 일반적으로 해당 약물의 임상적인 약동학적 지표는 주로 최종 허가받을 임상 투여경로에서의 약동학적 지표를 허가기관에서는 요구하게 된다. 즉, 투여경로가 경구투여일경우, 많은 경우에 있어서 경구투여시의 약동학적 파라미터를 제출하게 되며, 정맥투여에 의한 약동학적 자료는 일부국가 외에는 특별히 요구하지 않는다. 하지만 최근들어 표적항암제 등 원하는 표적 단백질에 보다 선택적인 화합물이 많이 만들어지고, 이러다 보니 높은 단백결합 또는 비이성적인 log P 값, 특히 아주 나쁜 용해도값 등으로 인해, 인간에서의 약동학적 거동을 좀더 잘 이해하고자 정맥투여와 경구투여 둘 다의 약동적 지표를 요구하는 추세이다. 아울러 이 시험은 주로 cross-over에 의해 많이 실험을 진행하는데, 최근 들어 QD 또는 BID 투여를 기준으로 약물을 개발하기에 점점 임상후보 약물들의 반감기가 점점 길어지는 경향이 있으며, 최근에 허가를 받은 기저세포 암 치료제의 Erivedge(Vismodegib)는 저분자 합성신약임에도 불구하고 그 반감기가 12일 이상이 되는 현상도 발견되었다. 이와 같은 특이한 약동학적 파라미터를 제대로 이해하기 위해서는 정맥투여에에 의한 약동학적 파라미터를 구하는 것이 크게 도움이 되며, 따라서 점차 많은 신약허가기관들이 absolute bioavailability 자료를 요구하게 되었다.[19]

현실적으로 absolute bioavailability를 구하는데는 다음과 같은 큰 어려움이 있다. 첫째, 약효농도 또는 이에 근접한 약물농도에서 정맥주사를 하여 약동학적 지표를 구하여야 하는데, 이를 위해서는 약물이 일반적으로 사용되는 정맥주사용 formulation에 반드시 잘 용해되어야 한다. 하지만 앞서 언급한 바와 같이, 최근의 신약후보물질들, 특히 kinase를 타깃으로 하는 약물들은 그 lipophilicity가 높은 경우가 많기에 일반적인 정맥주사용 formulation에 제대로 녹지 않는 경우가 대부분이다. 따라서 기존의 absolute bioavailability 방법으로 정맥투여 데이타를 구하기가 아주 어려운데, 이를 극복하기 위해서는 유기용매를 좀더 첨가 하여 새로운 IV formulation을 개발하여야 하는데, 이와 같은 경우 그 새로운 IV formulation의 안전성이 문제가 될수 있다. 즉 새롭게 추가된 유기용매를 이용한 정맥주사시 약물의 부작용이 아니라 오히려 그 새로운 IV formulation의 부작용으로 용혈현상 등이 일어날 가능성도 있다. 아울러 해당 약물이 특정 pH에서만 좋은 용해도를 보인다면, 그 pH를 유지하기 위해 추가로 첨가된 산 또는 염기성 물질로 인해 또 다른 부작용이 나타날 수 있다. 따라서 미국 식약청에서는 이와 같이 새로운 IV formulation이 필요한 경우, 이 새로운 formulation에 대한 독성시험을 GLP하에서 두가지 동물종을 사용하여 다시 행할 것을 요구하며, 이를 통해 독성이 나타나지 않음을 규명하지 못하면, 해당 허가기관이 요구한 absolute bioavailability는 더이상 수행할 수 없게 된다.

또 반감기가 긴 약물인 경우에도 absolute bioavailability 시험은 큰 어려움을 겪게 되는데, 왜냐하면 대부분의 absolute bioavailability 시험이 주로 cross-over study design을 통해서 수행하기에, 반감기가 긴 약물일수록 그 wash out period가 길어져서 absolute bioavailability 결과에서 보다 많은변동성을 나타낼 가능성이 높다. AMS를 이용한 absolute bioavailability 시험은 이러한 문제점들을 크게 줄였다. 특히, ^{14}C-마이크로 트레이

서(micro-tracer)를 이용한 absolute bioavailability 시험으로 알려진 시험은 그 특이한 임상시험설계로 인해 최근에 더욱 각광을 받고있다. 이 방법은 일단 경구로 투여시 cold compound를 투여하고, 체내에서 약물의 혈중농도가 최대에 도달할 T_{max}인 1~2시간 후에 정맥주사로 극미량의 ^{14}C-마이크로 트레이서를 투여한다. 그런 다음 일정 시간마다 채혈을 하고, 그 채혈에서 분리된 혈장을 두가지 시료튜브로 나누어 보관하고 각각을 AMS로는 ^{14}C-labeled parent를, LC-MS/MS로는 cold parent compound를 분석하는 방법이다.

이 방법은 약효용량으로 경구 투여함으로 정확하게 약효용량 투여시의 약물농도를 구할수 있으며, 이때 정맥 투여된 ^{14}C-마이크로 트레이서를 추적함으로서 실제로 약효용량일 때의 정맥투여한 시험 때와 똑같은 효과를 볼 수 있다. 아울러 같은 시험자로부터 바로 경구투여용 시료와 정맥투여용 시료를 동시에 구하기에 cross-over study design이 필요없고, 따라서 intra-subject variation이 이론상으론 거의 없는 획기적인방법이다.

이러한 마이크로 트레이서를 이용한 absolute bioavailability의 study design예를 Fig. 2에 나타내었다.

Mass balance – 약물이 체내에 흡수되어 분포되는 일정시간이 지나고 나면, 체내의 여러 조직으로 분포되게 된다. 약물은 그 이후로 일정기간 동안 혈장단백 결합 및 조직결합의 비율에 따라 분포하다가 적절한 시간내에 체외로 원 화합물 그자체 또는 대사체의 형태로 뇨 또는 변으로 배설되게 된다.

이때 투약한 약물이 일정기간 후에 몸밖으로 얼마나 배설되었나를 조사하는 것은 신약허가기관들이 특히 중요하게 요구하는 자료인데, 이는 반복 투여시 해당 약물이 특정 조직에 축적된다면, 결국 독성을 유발할 가능성이 크기 때문이다.

전통적으로 mass balance study는 사람에게 실시하기 전에 여러가지 동물실험을 행하여 인체에 대한 안전성을 먼저 확보하여야 한다. ^{14}C labeled된 화합물을 합성한 후, 설치류 및 비설치류 한 종씩 각각 선정하여 투여하고, 그 투여후 뇨 또는 변으로 회수되는 회수율을 조사한다. 아울러 QWBA(quantitative whole body auto radiography)라는 시험을 GLP하에서 실시하여 투여된 ^{14}C labeled 물질이 어느 조직에 얼마만큼 분포되었는가를 조사하고, 아울러 그 방사능값을 dosimetry라는 방법을 통해 계산을 하여 인체에 투여 가능한 방사성물질의 양을 결정해야 한다. 이 과정을 통해서 허가기관으로부터 임상시험에 다음과 같은 mass balance study의 실시 여부를 승인받아야 한다.

이러한 과정은 굉장히 많은 시간과 비용이 소모되며, 막상 이 모든 시험들이 잘 끝나도 특정 조직에 대한 방사능의 축적으로 인해 인체에 투여가능한 방사능 물질의 양이 극히 제한 될 가능성도 있다. 일반적으로 LSC를 사용하여 mass balance 시험을 행

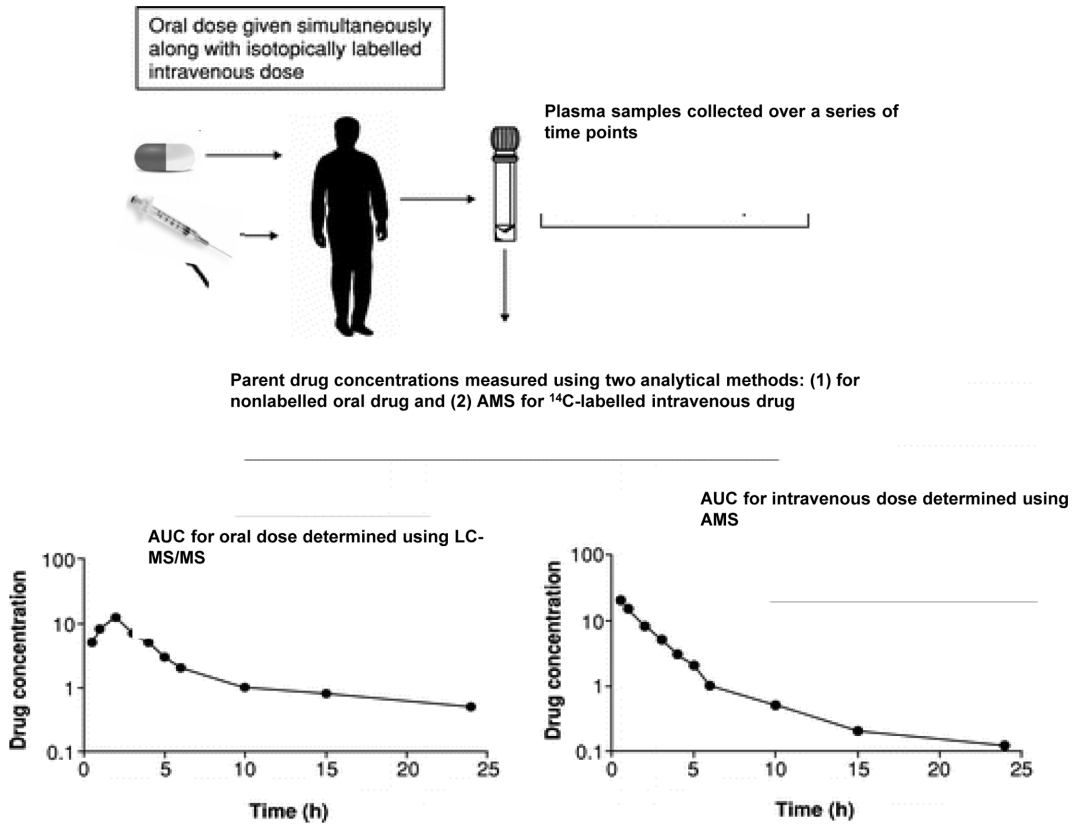

Fig. 2 – Typical absolute bioavailability study design. Courtesy from Vitalea Science Inc.

하기에 dosimetry에 의해 허가된 방사능물질의 투여량이 적으면 적을수록 차후에 약물 검출시 LSC의 검출감도 문제로 인해 큰 어려움을 겪게 된다.

AMS와 ^{14}C-마이크로 트레이서를 이용한 mass balance study는 이러한 기존의 mass balance study의 단점을 대부분 해결할 수 있다. 즉, 경구로 약효용량의 cold compound와 trace level의 ^{14}C-labeled compound를 동시에 투여한 후 일정한 시간마다 뇨와 변을 채취하는 것이다. 이 방법은 앞서 언급한 absolute bioavailability study design과 유사한 면이 있고, 특히 약효용량의 cold compound 를 투여하고 동시에 마이크로 트레이서로서 ^{14}C labeled compound 를 투여한다는 점에 있어서는 동일하다.

특히 이 방법에서 추가로 구할 수 있는 혈장 시료를 각각 LC-MS로 parent compound를, AMS로는 total ^{14}C 함량을 분석하면 해당 약물이 체내에서 일정시간후에 얼마만큼 metabolic burden이 있는지도 아주 손쉽게 계산 가능하다.

이 방법은 특히 반감기가 긴 화합물의 mass balance study에 크게 도움이 된다.[20] Obach *et al.* 의하면 반감기가 긴 약물일수록 mass balance에서 낮은 회수율을 보인다고 하며, 특히 반감기가 100시간 이상일 경우에는 거의 절반 이상 회수불가능하다고 한다.[21] 아울러 긴 반감기가 있는 약물은 그 만큼 체내에 존재하는 기간도 길어지기에 일반적인 mass balance 방법으로 고용량의 방사능을 투여하기가 거의 불가능하므로 AMS를 이용한 mass balance study는 더욱 효과적이다.

Metabolite profiling – 대사체 분석 및 프로파일링 연구는 신약개발에 있어서 아주 중요한부분을 차지 하고 있다. 특히 최근들어서 대사체로 인한 독성에 대한 우려가 갈수록 커지면서, 임상시험에서 대사체 연구에 대한 여러 토론이 있었고, 이에 따라 US FDA는 MIST(metabolite in safety testing) 이라는 가이던스를 소개하게 되었다.[3,4] 이후에 ICH M3에서 MIST의 단점을 좀더 보완한 내용을 포함하는 대사체 분석 및 프로파일링 기준이 소개되면서 임상시험에서의 대사체 분석연구는 보다 체계적으로 진행되게 되었다.

MIST와 ICH M3에서 우려하고 있는 부분은 전임상 독성시험에서 예측하지 못했던 대사체가 인간에게서 나타나는 것이며, 이로 인해 예측하지 못했던 독성이 인간에게서 발견되는 경우이다. 실질적으로 전임상독성연구에서 나타나지 않은 대사체가 사람에게만 나타날 확률은 그리 높지는 않지만, 다른 독성 종에 비해서 유독 인간에서만 고농도로 생성되는 경우는 종종 있다. 따라서 신약개발과정에서 이러한 인간 특이성 대사체를 가급적 빨리 발견하여 연구하는 것은 신약개발의 위험을 줄이는데 크게 기여할 수 있다. 기존의 대사체 프로파일링 연구는 일반적으로 mass balance study를 행한 후 남은 혈장시료, 또는 뇨, 변시료를 가지고 수행한다. 보통 인간에서의 mass balance study는 임상2상 중간 또는 거의 마지막 단계에서 주로 시행하고, 투여하는 방사능양이 보통 50~100 μCi이기에, 시료 중의 방사능양도 상당히 높은 편이며, 따라서 시료를 다룰 때도 여러 가지 방사선 취급 규정을 따라야 한다. 일반적으로 대사체 프로파일링을 제대로 하기위해선 방사선 지표물질이 함유된 신약후보물질들을 투여하여 실시하며, 임상2상 이후에 주로 시행된다.

문제는 이처럼 늦은 단계에서 실시한 대사체 프로파일링 연구에서 예상하지 못했던 인간 특이성 대사체가 발견되는 경우이다. 이 경우 그 대사체가 이전의 전임상 독성시험에서 충분히 생성되었는지를 조사해야하고, 만약 그렇지 않다면, 최악의 경우에는 그 대사체 만을 재합성하여 따로 전임상 독성시험을 GLP하에서 다시 실시하여야 한다. 만약 큰 독성이 나오지 않으면 다행이지만, 이 대사체로 인해 심각한 독성이 발견된다면 그 후보물질의 신약허가에 큰 장애가 될 것이다. 따라서 인간특이성 대사체 연구를 보다 빨리 시행하여 확인한다면 그 약물의 신약개발에 큰 도움이 된다.

인간의 대사체 프로파일링 정보를 좀더 빨리 알아내기 위해 최근에는 기존의 single dose escalation study 수행 중 한 cohort에 cold compound와 hot compound를 동시에 투여한 후 얻은 혈장으로 부터 대사체 연구를 수행하려는 시도가 소개되었다.[22-24] 이 방법은 기존의 임상 1상 에서부터 인간 대사체 정보를 보다 확실하게 구할수 있다는 것이 큰 장점이다. 아울러 AMS를 이용한 대사체 프로파일링연구는 기존의 timeline과 유사하게

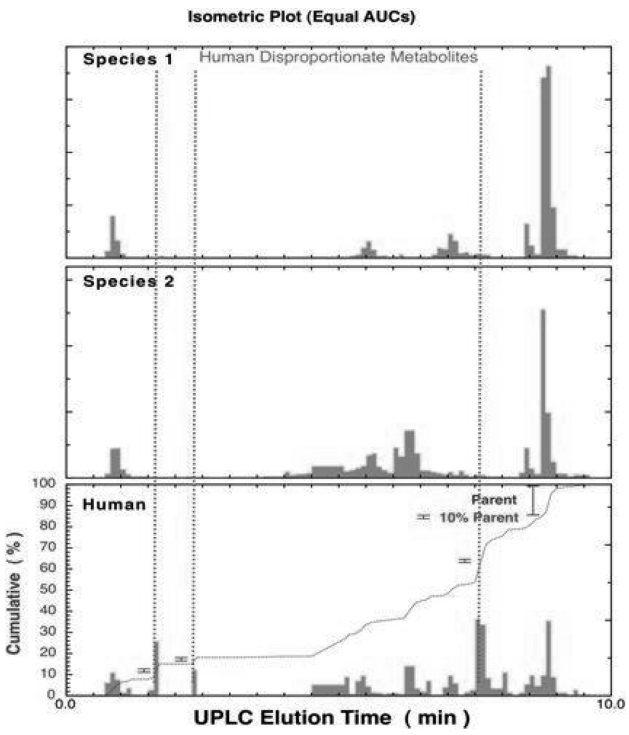

Fig. 3 – Comparison of metabolite profiling in human and two other species by AMS analysis. Courtesy from Vitalea Science Inc.

임상 2상에서도 수행가능하며, 기존의 대사체 프로파일링 연구와는 달리 극미량의 방사능 물질을 사용한 mass balance study 시료를 가지고 수행가능하기에 여러가지 방사선 취급규정으로부터 제외될수 있는 장점이 있다. Fig. 3에 AMS를 이용한 전형적인 대사체 프로파일링 예를 소개하였다.

단백질, 항체, 항체약물 중합체에의 AMS응용

단백질 또는 항체, 항체약물중합체 등과 같은 고분자 신약들은 우수한 타겟 선택성으로 인하여 최근에 크게 각광받고 있는 신약개발 플랫폼이다. 일반적으로 이러한 고분자 신약들은 그 물질의 특징상 저분자 합성신약과는 달리 간대사효소에 의한 metabolism 보다는 주로 catabolism에 의한 분해가 약물 소실의 주작용기전으로 알려져 있고, 뇨로의 배설도 극미량이기에, 단백질이나 항체 의약품에 대한 mass balance 연구나 metabolite profiling에 대한 연구가 크게 요구되지 않았다. 단백질 또는 항체들의 약동학적 연구를 위한 분석방법으로 주로 ELISA 방법이 널리 사용되었고 이를 위해 시간이 걸리더라도 해당 단백질 또는 항체를 선택적으로 인식가능한 anti-drug antibody를 먼저 개발하여 분석법을 확립한다. 분석법의 성공여부는 이 anti-drug antibody의 선택성에 많이 좌우되기에 단백질 또는 항체 약물개발 시 이 부분은 중요하다.

동물 PK 실험을 하려는 단백질이나 항체가 많지 않을 경우에는 각각의 단백질 또는 항체에 대한 anti-drug antibody를 만들면 되나, 물질 수가 많아지면 여러가지 어려움이 따르게 되고, 따라서 공통점인 signature portion을 인식하는 분석법을 개발하여 선택성을 최대한 높여야 하는 어려움이 있다. 최근에는 비교적 간단한 단백질인 ^{14}C-insulin을 사용하여 극미량의 ^{14}C-insulin을 토끼에 경구투여한 후, 그 혈장으로부터 구한 ^{14}C-insulin의 양을 AMS와 ELISA를 사용하여 비교 분석한 예도 있다.[25)]

또 다른 응용으로는 단백질 또는 항체에 간단한 유도체 반응에 의해 ^{14}C을 labeling시킨 후 극미량의 해당 물질을 동물에 투여하여 약동학적 파라미터를 기존의 ELISA와 비교한 예도 소개되었고, 또 다른 응용의 예로 PEG화된 단백질 약물의 태아로 약물의 전달여부를 알아보기 위해, 해당 PEG화 단백질에 ^{14}C을 라벨링한 후 그 약물을 임신한 guinea pig에 주입하여 태아로의 약물의 전달 여부를 조사한 예도 소개되었다.[26)]

항체약물중합체는 최근에 T-DM1이 미국 식약청의 허가를 받으면서 새로운 혁신 신약 플랫폼의 한 예로서 주목받고 있다. 항체약물중합체는 특히 선택성이 아주 높은 항체에 독성이 높은 약물을 링커라는 적절한 연결부분을 사용하여 연결하고, 생체내 원하는 타깃에 도달하면 독성이 높은 cytotoxic drug이 떨어져 나와서 약효를 발휘하게 된다. 따라서 링커의 체내 혈중 안정성이 아주 중요하고 목표지점에서는 잘 떨어져 나가야 하며, 떨어져 나간 독성물질의 함량 뿐만 아니라 대사체까지도 추적 조사하여야 한다. 기존의 방법은 주로 ^{3}H을 사용하여 그 대사 산물을 연구하였다. ^{3}H은 높은 specific activity 등으로 인하여 고분자물질의 분석연구에 사용되어 왔으나, 검출감도의 발달에 따라 이러한 항체약물중합체의 대사체 연구에도 AMS와 ^{14}C 마이크로 트레이서를 사용하면 대사체 추적이 가능할 것이다.

결 론

신약개발에 있어서 인간에게 적절한 용량으로 투여할 때 유효한 약효를 나타냄과 동시에 그 용량에서 독성이 나타나지 않아야 하며, 이를 위해 신약 검색단계에서는 인간에서의 해당 약물 또는 대사체의 약동학적 파라미터 예측 및 이를 통해 효능과 독성을 보다 빨리 예측하는 것이 무엇보다 중요하다.

인간에서의 약효와 독성을 예측하기 위해 여러 방법 중 인간이 결국 가장 좋은 모델이며, 비록 제한적으로 장단점이 있지만 마이크로 도징 같은 연구는 인간에서의 약동학적 파라미터를 예측하고 여러 후보물질 중에서 그 투자 우선순위를 정하는데 큰 도움이 될 것이다. 최근에 특히 널리 이용되고 있는 micro tracing study는 micro dosing의 단점을 크게 줄였고, 특히 absolute bioavailability, mass balance 등의 연구는 기존의 단점을 극복한 새로운 스터디 디자인으로 인정받고 있으며, 갈수록 기존의 연구 방식을 대체하고 있다. AMS를 이용한 연구는 신약개발의 위험도를 줄이는 데 크게 기여할 것이며 한국형 신약개발에 있어서도 많은 도움을 줄 것으로 기대된다.

감사의 말씀

본 연구는 충남대학교 의약품개발연구소의 학술조성연구비에 의해 지원되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1) Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R. and Schacht, A. L. : How to improve R&D productivity : the pharmaceutical industry's grand challenge. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 203 (2010).
2) Allison, M. : Reinventing clinical trials. *Nat. Biotechnol.* **30**, 41 (2012).
3) U.S. Food and drug administration : FDA MIST guidance, http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/ucm079266.pdf.
4) ICH M3 guidance, http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2009/09/WC500002720.pdf.
5) Bae, S. K. and Shon, J. : Microdosing studies using accelerated mass spectrometry as exploratory investigational new drug

trials. *Arch. Pharm. Res.* **34**, 1789 (2011).
6) Smith, D. A. : The debate is over : accerelator MS provides the route to better drug-development paradigms/protocols. *Bioanalysis* **3**, 391 (2011).
7) Garner, R. C. : Accelerator mass spectrometry in pharmaceutical research and development-a new ultrasensitive analytical method for isotope measurement. *Curr. Drug Metab.* **1**, 205 (2000).
8) Dueker, S. R., Vuong, L. T., Lohstroh, P. N., Giacomo, J. A. and Vogel, J. S. : Quantifying exploratory low dose compounds in humans with AMS. *Adv. Drug Del. Rev.* **63**, 518 (2011).
9) Schulze-Koenig, T., Dueker, S. R., Giacomo, J., Suter, M., Vogel, J. S. and Synal, H. : BioMICADAS : Compact next generation AMS system for pharmaceutical science. *Nuclear Instr. and Methods in Physics Res. sect B : Beam interactions with Materials and Atoms* **268**, 891 (2010).
10) Lappin, G. and Garner, R. C. : Current perspectives of 14C-isotope measurement in biomedical accelerator mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **378**, 356 (2004).
11) FDA 2004 critical path initiative, http://www.fda.gov/ScienceResearch/SpecialTopics/CriticalPathInitiative/ucm076689.htm.
12) Madan, A., O'Brien, Z., Wen, J., O'Brien, C., Farber, R. H., Beaton, G., Crowe, P., Oosterhuis, B., Garner, R. C., Lappin, G. and Bozigian, H. P. : A Pharmacokinetic evaluation of five H(1) antagonists after an oral and intravenous microdose to human subjects. *Br. J. Clin. Pharmacol.* **67**, 288 (2009).
13) Ings, R. M. J. : Microdosing : a valuable tool for accelerating drug development and the role of bioanalytical methods in meeting the challenge. *Bioanalysis* **1**, 1293 (2009).
14) Lappin, G., Wagner, C. C., Langer, O. and Van de Merbel, N. : New Ultrasensitive detection technologies and techniques for use in microdosing studies. *Bioanalysis* **1**, 357 (2009).
15) Lappin, G., Seymour, M., Young, G., Higton, D. and Hill, H. M. : An AMS method to determine analyte recovery from pharmacokinetic studies with concomitant extravascular and intravenous administration. *Bioanalysis* **3**, 407 (2011).
16) Lappin, G., Seymour, M., Young, G., Higton, D. and Hill, H. M. : AMS method validation for quantitation in pharmacokinetic studies with concomitant extravascular and intravenous administration. *Bioanalysis* **3**, 393 (2011).
17) Garner, R. C. : Practical experience of using human microdosing with AMS analysis to obtain early human drug metabolism and PK data. *Bioanalysis* **2**, 429 (2010).
18) 식품의약품 안전청 : 한국 식약청 마이크로도징 가이드 라인. "의약품의 임상시험 수행과 품목허가를 위한 비임상시험 가이드라인, 2012, 6".
19) Graham, R. A., Hop, C. E., Borin, M. T., Lum, B. L., Colburn, D., Chang, I., Shin, Y. G., Malhi, V., Low. J. A. and Dresser, M. J. : Single and multiple dose intravenous and oral pharmakinetics of the hedgehog pathway inhibitor vismodegib in healthy female subjects. *Br. J. Clin. Pharmocol.* **74**, 788 (2012).
20) Graham, R. A., Lum, B. L., Morrison, G., Chang, I., Jorga, K., Dean, B., Shin, Y. G., Yue, Q., Mulder, T., Malhi, V., Xie, M., Low, J. A. and Hop, C. E. : A single dose mass balance study of the Hedgehog pathway inhibitor vismodigib (GDC-0449) in human using accelerator mass spectrometry. *Drug Metab. Dispos*. **39**, 1460 (2011).
21) Roffey, S. J., Obach, R. S., Gedge, J. I. and Smith, D. A. : What is the objective of the mass balance study? A retrospective analysis of data in animal and human excretion studies employing radiolabeled drugs. *Drug Metab. Rev.* **39**, 17 (2007).
22) Lappin, G., Seymour, M., Gross, G., Jorgensen, M., Kall, M. and Kvaerno, L. : Meeting the MIST regulations: human metabolism in Phase I using AMS and a tiered bioanalytical approach. *Bioanalysis* **4**, 407 (2012).
23) Lappin, G. and Seymour, M. : Addressing metabolite safety during first-in-man studies using 14C-labeled drug and accelerator mass spectrometry. *Bioanalysis* **2**, 1315 (2010).
24) Lappin, G. and Stevens, L.: Biomedical accelerator mass spectrometry : recent applications in metabolism and pharmacokinetics. *Exp. Opin. Drug Metab.Toxicol.* **4**, 1021 (2008).
25) Salehpour, M., Ekblom, J., Sabetsky, V., Hakansson, K. and Possnert, G. : Accelerator mass spectrometry offers new opportunities for microdosing of peptide and protein pharmaceuticals. *Rap. Commun. Mass Spec.* **24**, 1481 (2010).
26) Dueker, S. R., Sivaraman, L., Wang, J., Wang, L., Fung, N., Maxwell, B., Bonnie, W., Christopher, L., Arnold, M. and McNerney, M. : Placental transfer of a pegylated adnectin in guinea pig (abstract #: 2783), presented poster (http://www.toxicology.org/AI/PUB/Tox/2012toxsup.pdf).