

## 암브록솔과 세티리진의 Cytochrome P450 저해 활성 평가

김봉희 · 류창선 · 장힘찬 · 이상윤 · 이지윤 · 채정우 · 권광일 · 김상겸<sup>#</sup>

충남대학교 약학대학

(Received April 4, 2013; Revised April 16, 2013; Accepted April 23, 2013)

### *In Vitro* Assessment of Cytochrome P450 Inhibition by Ambroxol and Cetirizine

Bong-Hee Kim, Chang Seon Ryu, Him Chan Jang, Sang Yoon Lee, Ji-Yoon Lee,  
Jung-Woo Chae, Kwang-Il Kwon and Sang Kyum Kim<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 305-763, Korea

**Abstract** – In the present study we evaluated drug-drug interaction potential of ambroxol and cetirizine mediated by inhibition of CYP isoforms including CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2D6, CYP2E1 and CYP3A4 using pooled human liver microsomes (HLMs). As measured by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, cetirizine and ambroxol inhibited significantly CYP2E1 but the maximal inhibition was approximately 36% at 10  $\mu$ M cetirizine and 28% at 3  $\mu$ M ambroxol. In addition, CYP2D6 activity was decreased to approximately 83% of control activity in pooled HLM incubated with 3  $\mu$ M ambroxol. Activities of CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C9, CYP2C19, and CYP3A4 were not significantly inhibited by cetirizine and ambroxol. Considering their maximal plasma concentration in human ( $C_{max}$  of cetirizine is approximately 0.67  $\mu$ M and  $C_{max}$  of ambroxol is 0.044  $\mu$ M), these two drugs have very low possibility in drug-drug interaction by CYP inhibition in clinical situations.

**Keywords** □ CYP 450, CYP inhibition, drug interaction, ambroxol, cetirizine

약물대사는 체내로 침입한 외인성 물질의 화학적 구조를 변형함으로써 화학물질의 체외배설을 촉진하는 생체방어체계로 항상성 유지를 위한 필수과정이다. 간은 약물대사의 중추로 위장관과 전신혈관계 사이에 위치하여 소화관으로 흡수된 외인성 물질을 대사시켜 전신혈관계로 유입되는 외인성 물질의 양을 감소시킨다. 현재 시판되는 대표적인 약물의 체외배설 경로는 크게 대사경유(약 70%), 대사과정이 없는 신장배설(약 25%), 그리고 담즙배설(약 5%)로 구분된다.<sup>1)</sup> 약물의 대사는 크게 화학물질에 관능기를 부여하는 일상반응(phase I reaction)과 화학물질의 수용성을 증가시키는 이상반응(phase II reaction)으로 구분된다. 최근 외인성 물질의 흡수를 phase 0 그리고 수송체에 의한 외인성 물질의 배설을 phase 3로 구분하기도 한다. 약물 대사의 주요 의미는 약물의 제거(elimination)와 대사활성화(metabolic activation)이다. 약물대사의 핵심적인 효소는 cytochrome P450(CYP)으로 다양한 isoform이 존재하고 광범위한 기질선택성과 중첩성과 외

인성 물질에 의한 발현 및 활성의 조절이 가능한 특성을 가지고 있다. 시판되고 있는 약물의 대사에서 CYP의 역할은 약 75%로, CYP는 약물배설에서 약 50% 이상을 담당한다. CYP isoform 중에서 CYP3A(40~50%), CYP2D6(15~20%), CYP2C9(20~25%), CYP2C19(10~15%)와 CYP1A2(5~10%)와 CYP2E1(5~10%)이 중추적인 역할을 수행한다.<sup>2)</sup>

CYP는 다양한 내인성 및 외인성 물질에 의해 발현과 활성이 조절된다.<sup>3,4)</sup> 특히 두 가지 이상의 약물이 병용투여 될 경우 CYP 저해와 유도는 임상약물치료에서 약물-약물 상호작용(drug-drug interaction, DDI)을 유발하는 대표기전이다.<sup>4)</sup> CYP의 유도는 동시에 복용하는 약물의 청소율 (clearance)을 증가시켜, 모약물이 약리학적 활성을 가지는 약물일 때 약효를 감소시킬 수 있다. 반대로, CYP의 저해는 약물의 혈액 농도를 증가시켜 약물의 독성을 일으킬 수 있다. 만성질환 환자의 증가에 따라 약물의 병용투여가 일상적으로 이루어지고 있으며, 2개 이상의 약물이 같은 CYP 효소에 의해 대사되는 현상이 일반적으로 이루어질 수 있다.

신약 개발 과정에서 약물 상호작용의 가능성을 최소화시키기 위한 다양한 노력이 진행 중이며 미국 식품의약품안전청(FDA)

<sup>#</sup>본 논문에 관한 문의는 저자에게로  
(전화) 042-821-5930 (팩스) 042-823-6566  
(E-mail) sangkim@cnu.ac.kr

의 *in vitro* draft guideline가 1997년에 발간되었다. 하지만, 과거에 개발된 대부분의 약물에 대한 CYP 억제 및 유도에 대한 연구는 매우 미진하다. 본 연구실에서는 미국 FDA draft guidance<sup>5)</sup>를 바탕으로 인간 간세포로부터 분리된 liver microsomes을 활용하여 8개 CYP isoform에 대한 억제효과를 LC-MS/MS로 분석하는 방법을 확립하였고<sup>6)</sup> 또한 대사에 의존적으로 이루어지는 CYP 저해의 기전을 분석하는 방법을 확립하였다.<sup>7)</sup> 현재까지 확립된 실험계를 바탕으로 한방 처방인 갈근탕<sup>8)</sup>과 쌍화탕<sup>9)</sup>의 CYP에 의한 약물 상호작용 가능성을 평가하여 보고하였다.

본 연구에서는 시장에 출시되어 장기간 높은 빈도로 사용되는 의약품 중에서 약물상호작용에 대한 연구가 미진한 약물을 선정하여 CYP의 억제효과를 평가하였다. 선정된 약물은 진해거담제인 ambroxol 그리고 항히스타민제인 cetirizine이며 이 약물들은 다른 약물과 병용가능성이 높다. Cetirizine은 가장 널리 사용되는 2세대 항히스타민제로 알러지성 비염과 결막염, 두드러기, 담마진 등의 알러지 증상의 경감 목적으로 사용된다. 벨기에 UCB group에 의해 개발되어 미국에서는 1995년 FDA 허가를 받은 후 현재는 일반 의약품으로 판매되고 있다. Ambroxol은 1970년대 후반 소개되어 현재까지 널리 쓰이고 있는 진해거담제로서 기관지염, 폐 감염 등의 질환에서 폐로부터 분비물 제거를 위한 목적으로 사용된다.

## 재료 및 실험 방법

### 시약

Ambroxol hydrochloride, cetirizine dihydrochloride, phenacetin, acetaminophen, coumarin, 7-hydroxycoumarin, bupropion, tolbutamide, 4-hydroxytolbutamide, dextromethorphan, dextrorphan, chlorzoxazone, 6-hydroxychlorzoxazone, testosterone, fluvoxamine, furafylline, ketoconazole, carbamazepine, 및 환원된  $\beta$ -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(NADPH)는 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)로부터 구입하였다. Hydroxybupropion, S-mephenytoin, 4'-hydroxymephenytoin, 1-hydroxymidazolam, 및 6 $\beta$ -hydroxytestosterone BD Gentest Co.(Woburn, MA)로부터 구입하였다. Midazolam은 부광약품(서울)로부터 구입하였다. Pooled human liver microsomes(BD UltraPool™ HLM 150, lot 38289)은 BD Gentest Co.(Woburn, MA)로부터 구입하였다. 모든 시약은 분석용 또는 HPLC용 등급을 사용하였다.

### CYP 직접 저해 평가

8×12 rack(1.2 ml; VWR, Emeryville, CA)에 8-well tube strips을 반응에 이용하였다. CYP 저해 평가법은 알려진 CYP 직접 저해제를 이용하여 IC<sub>50</sub> 값과 용량 반응 곡선을 작성하여 설정되었다.<sup>6)</sup> 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, and midazolam; B set: bupropion, tolbutamide, chlorzoxazone, and testosterone)에 의해 최종 부피 200  $\mu$ l로 구성되었다. 기질은 각각의 Michaelis-Menten constant(K<sub>m</sub>) 값에 맞게 다음과 같이 농도를 설정하였다: phenacetin 50  $\mu$ M, coumarin 5  $\mu$ M, bupropion 50  $\mu$ M, tolbutamide 100  $\mu$ M, S-mephenytoin 100  $\mu$ M, dextromethorphan 5  $\mu$ M, chlorzoxazone 50  $\mu$ M, midazolam 5  $\mu$ M, 및 testosterone 50  $\mu$ M. 기질 농도의 보고된 K<sub>m</sub>값을 토대로 설정하였다.<sup>6)</sup> 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°C에서 5분간의 pre-incubation 한 후에, 최종농도 1 mM NADPH를 가하여 반응을 시작하였다. 반응 용액은 10분간 37°C 진탕배양기를 이용하여 incubation 하였다. 200  $\mu$ l 부피의 ice-cold 반응 종결액(내부 표준물질로 50 nM carbamazepine을 포함한 acetonitrile)을 가하여 반응을 종결한다. 각 반응액을 4°C, 3,000 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.

### 분석 방법

미리 확립된 분석 조건을 이용하여<sup>7-9)</sup> 반응시킨 약물들을 Shimadzu LC-20A prominence UFLC(Shimadzu Corp. Tokyo, Japan)와 Turbo IonSpray™ source(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)가 장착된 API3200™ Q-trap LC-MS/MS(Applied Biosystems)로 구성된 분석 시스템을 이용하여 분석하였다. 샘플 10  $\mu$ l를 주입하여 0.7 ml/min의 유속으로 Atlantis C18 컬럼(5  $\mu$ m 4.6×150 mm; Waters)과 SecurityGuard™ 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. 설정된 장비의 조건은 다음과 같다: 이온 소스 온도, 600°C; nebulizing gas (NEB) flow, 50 l/min; auxiliary gas flow, 4.0 l/min; curtain gas (CUR) flow, 20 l/min; and collision gas(nitrogen) pressure, 3.4×10<sup>-5</sup> Torr. 초순도 질소 가스가 CUR, collisionally activated dissociation(CAD)와 NEB를 위해 사용되었다. MRM(multiple reaction monitoring) transitions, collision energies과 머무름시간은 각각 대사체과 내부 표준물질에 대해 측정되었다. 4중극자의 Q1과 Q3는 unit resolution으로 설정하였다. 샘플의 분석은

positive와 negative(6-hydroxychlorzoxazone) MRM mode를 이용하여 각각 형성된 대사체와 내부 표준물질의 peak 넓이를 통해 계산하였다. 분석의 dwell 시간은 각 채널 별로 0.08초로 설정하였다. 분석된 값들은 Analyst™ 소프트웨어(version 1.5.1, Applied Biosystems, Foster City, CA)를 통해 처리하였다. 정량선 작성을 위한 표준물질은(0.977~4000 nM) 내부 표준물질을 포함하는 상태로 ice-cold acetonitrile에 녹여 blank matrices에 미리 처리하여 분석하였다. 표준검량선은 linear least-squares regression에 따라 사용된 구간에서 직선형이 되도록 설정되었다( $r^2 > 0.999$ ).

자료 분석

저해제에 의한 CYP에 의한 활성은 대조군의 백분율로 환산하였다. 모든 결과는 평균±표준편차로 나타내었다. 선형 분석은

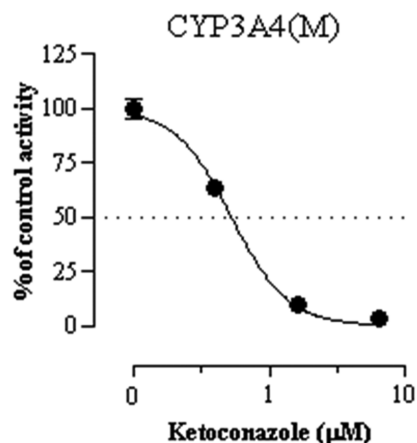


Fig. 1 – Effect of ketoconazole on activity of CYP3A4 (midazolam as a substrate) in pooled human liver microsomes. Each data point represents the mean±SD of two independent samples.

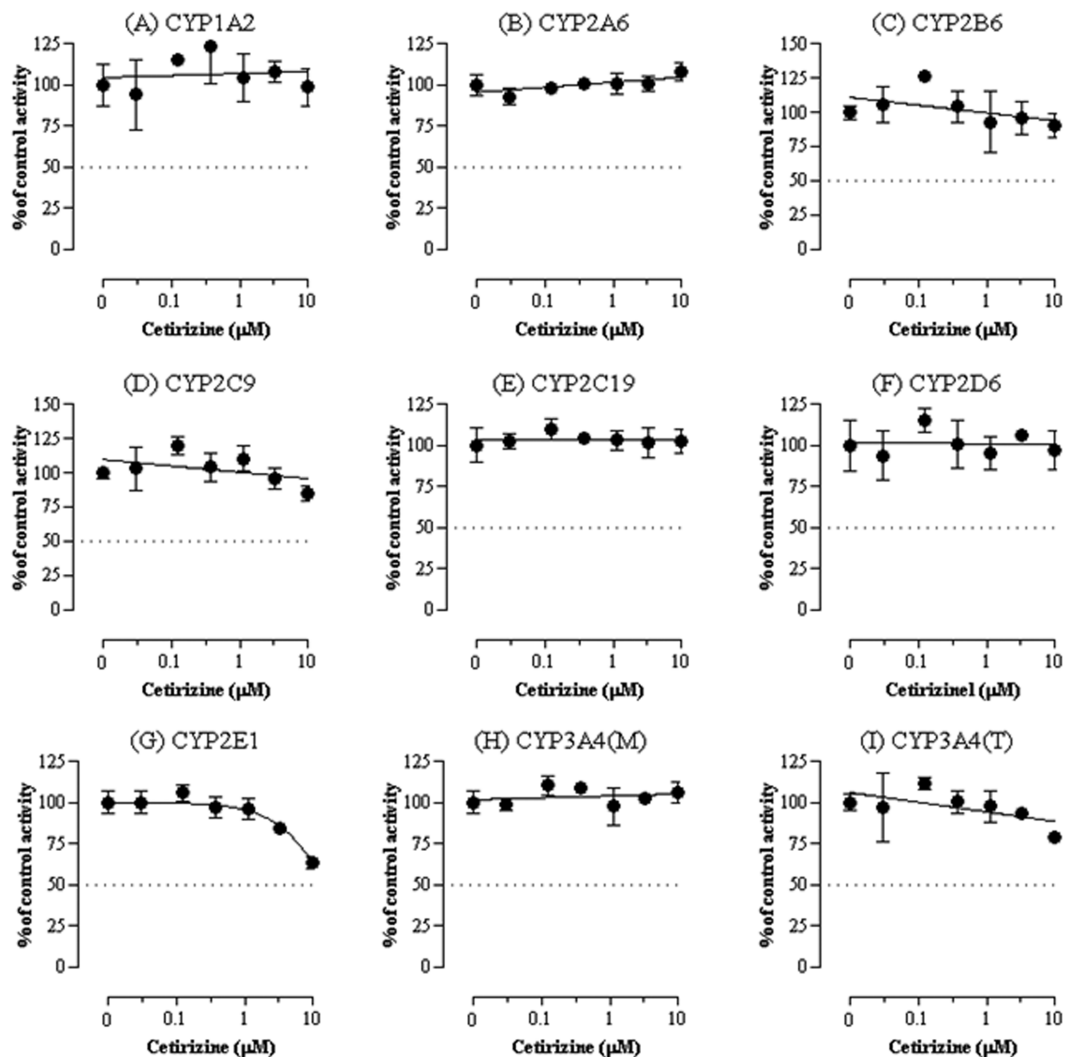


Fig. 2 – Effect of cetirizine on activities of CYP1A2 (A), CYP2A6 (B), CYP2B6 (C), CYP2C8 (D), CYP2C9 (E), CYP2C19 (F), CYP2D6 (G), CYP2E1 (H), CYP3A4 (midazolam as a substrate) (I), and CYP3A4 (testosterone as a substrate) (J) in pooled human liver microsomes. Each data point represents the mean±SD of three independent samples.

GraphPad Prism, version 5.0.(GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA)을 이용하였다.

### 실험결과 및 고찰

시험물질의 농도를 설정하기 위해 상용량에서 시험물질의 최대혈중 농도를 조사하였다. 인간에서 cetirizine 경구 10 mg 투여 시 혈중 최대 농도는  $0.67 \mu\text{M}$ ,<sup>10)</sup> 그리고 ambroxol 경구 30 mg 투여 시 혈중 최대 농도는  $44.4 \text{ nM}$ <sup>11)</sup>로 조사되었다. 시험물질의 농도는 최대혈중농도를 기준으로 공비 3으로 높은 농도와 낮은 농도를 3개 농도로 설정하여 총 7개의 농도에서 실험을 수행하였다.

양성대조군으로 사용한 ketoconazole은 CYP3A4에 의해 매개되는 midazolam hydroxylation의 활성을 현격하게 억제하였다(Fig.

1). 계산된  $\text{IC}_{50}$  값은  $0.526 \mu\text{M}$ 로  $1.6 \mu\text{M}$ 에서 약 85%의 활성이 저해되는 것을 확인 할 수 있었다.

Cetirizine은 8개 CYP isoform 중에서 CYP2E1에서만 약한 억제효과를(Fig. 2G) 나타내었다. Cetirizine은  $3.33 \mu\text{M}$ ( $p < 0.05$ )에서 16% 그리고  $10 \mu\text{M}$ (un-paired Student *t*-test,  $p < 0.01$ ) 농도에서 36% 저해를 보였으며 반면 나머지 isoform을 억제하지 않았다(Fig. 2).

Ambroxol은 CYP2E1를 최대 혈중농도의 약 22배인  $1 \mu\text{M}$ 에서 15%(un-paired Student *t*-test,  $p < 0.01$ ) 그리고  $3 \mu\text{M}$ 에서 약 28% 억제하였다(un-paired Student *t*-test,  $p < 0.001$ ). 또한 최대 혈중 농도의 약 67배인  $3 \mu\text{M}$ 에서 CYP2D6에 대해 약 17%의 억제를 보였다( $p < 0.05$ ). 반면 나머지 다른 isoform에 대해서는 억제효과를 보이지 않았다(Fig. 3).

CYP2E1은 환경 오염물질과 일부 내인성 물질의 대사에서 주

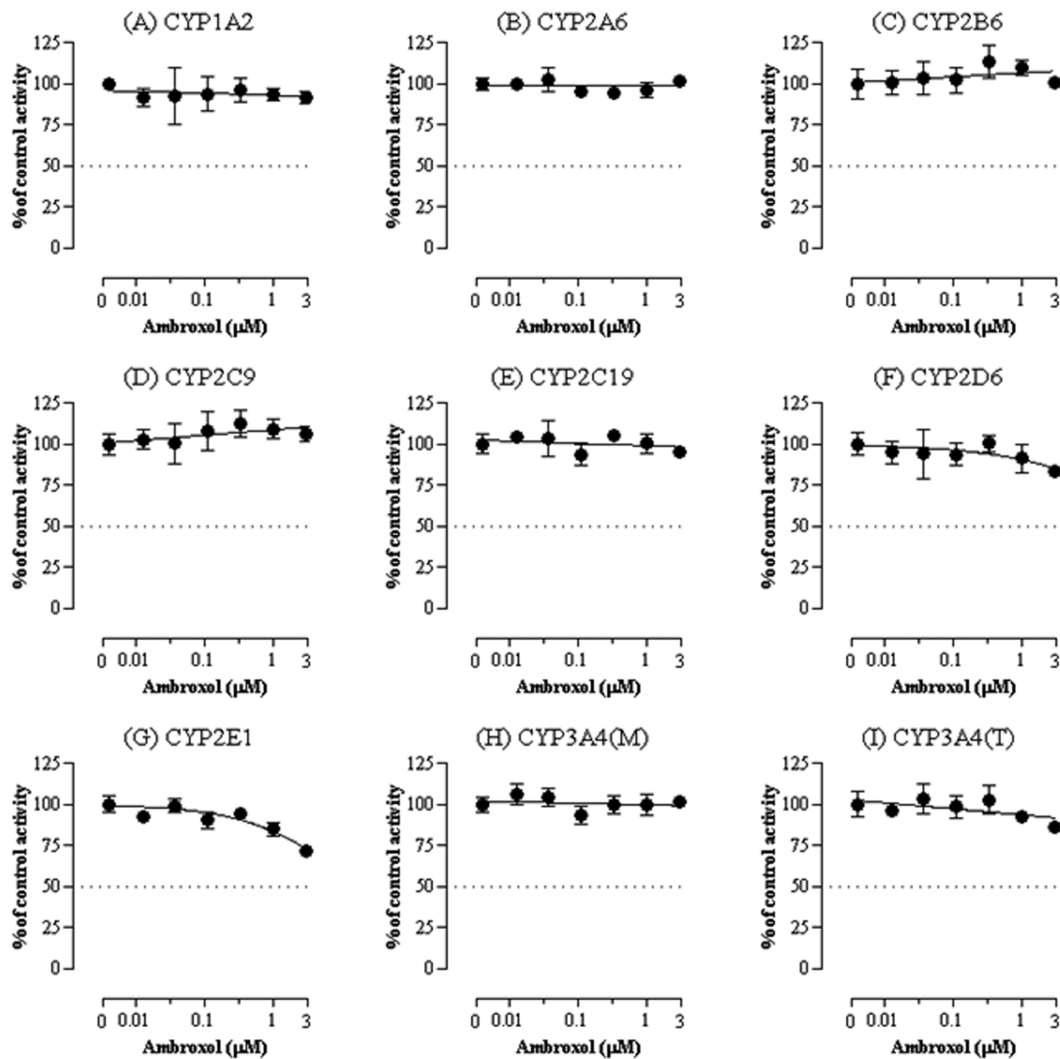


Fig. 3 – Effect of ambroxol on activities of CYP1A2 (A), CYP2A6 (B), CYP2B6 (C), CYP2C8 (D), CYP2C9 (E), CYP2C19 (F), CYP2D6 (G), CYP2E1 (H), CYP3A4 (midazolam as a substrate) (I), and CYP3A4 (testosterone as a substrate) (J) in pooled human liver microsomes. Each data point represents the mean  $\pm$  SD of three independent samples.

요한 역할을 한다. 에탄올, 아세트알데히드, 아세트아미노펜, 아크릴아마이드, 아닐린, 벤젠, 부탄올, 디메틸설폭사이드, 피라졸, 피리미딘, ethylene chloride, vinyl chloride 등이 CYP2E1의 기질이다. 이들 기질 중 일부는 대사에 의해 독성이 강한 대사체로 전환된다.<sup>12)</sup> CYP2E1은 또한 hydroxyeicosatetraenoic acids과 같은 내인성 물질의 대사에도 관여한다.<sup>13)</sup> 본 실험에서 cetirizine과 ambroxol의 CYP2E1에 대한 저해능은 상용량의 약 15배, 22배에 달하는 고농도에서만 약하게 일어나며 50% 이상의 강한 억제제를 보이지 않으므로 임상에서 이 isoform의 저해에 의한 약물 상호작용 가능성은 낮은 것으로 보인다. 마찬가지로 ambroxol에 의한 CYP2D6의 저해능은 상용량의 67배에 달하는 고농도에서만 약하게 일어나므로 약물상호작용 가능성은 낮은 것으로 보인다. 본 연구에서 평가된 두 가지 약물의 다른 CYP isoform에서 저해능은 나타나지 않았으며 이 결과는 이들 약물이 대사과정에서 CYP isoform의 억제를 통하여 약물 상호작용을 발생시킬 가능성은 매우 낮음을 시사한다.

## 결 론

인간 간에서 분리된 microsomes을 활용하여 8개의 CYP isoform에 대한 cetirizine과 ambroxol의 억제효과를 인간 간 microsomes과 LC-MS/MS를 이용하여 평가하였다. 실험결과 cetirizine과 ambroxol은 본 연구에 사용한 최대농도(임상에서 보고된 최대혈중농도의 각각 약 15배와 67배)에서 유의적인 CYP2E1의 저해가 관찰되었다. 또한 ambroxol은 최대농도인 3 µM에서만 CYP2D6의 약한 억제를 보였다. 반면 cetirizine과 ambroxol은 다른 CYP isoform에 대해 억제효과가 없었다. 이 결과는 cetirizine과 ambroxol의 혈중농도를 고려할 때 이들 의약품이 CYP의 억제를 통하여 약물상호작용을 발생시킬 가능성은 낮은 것으로 판단한다.

## 감사의 말씀

이 연구는 2011년 충남대학교 학술연구비에 의해 지원되었음.

## 참고문헌

1) Williams, J. A., Hyland, R., Jones, B. C., Smith, D. A., Hurst, S., Goosen, T. C., Peterkin, V., Koup, J. R. and Ball, S. E. : Drug-

drug interactions for UDP-glucuronosyltransferase substrates: a pharmacokinetic explanation for typically observed low exposure (AUC<sub>i</sub>/AUC) ratios. *Drug. Metab. Dispos.* **32**, 1201 (2004).

2) Guengerich, F. P. : Cytochrome p450 and chemical toxicology. *Chem. Res. Toxicol.* **21**, 70 (2008).

3) Kim, S. K. and Novak, R. F. : The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. *Pharmacol. Ther.* **11**, 88 (2007).

4) Guengerich, F. P. : Role of cytochrome P450 enzymes in drug-drug interactions. *Adv. Pharmacol.* **43**, 7 (1997).

5) U.S. Food and drug administration: Draft FDA Guidance for Industry, Drug Interaction Studies - Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations (2012).

6) Lee, K. S. and Kim, S. K. : Direct and metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition assays for evaluating drug-drug interactions. *J. Appl. Toxicol.* **33**, 100 (2013).

7) Lee, J. Y., Lee, S. Y., Oh, S. J., Lee, K. H., Jung, Y. S. and Kim, S. K. : Assessment of drug-drug interactions caused by metabolism-dependent cytochrome P450 inhibition. *Chem. Biol. Interact.* **198**, 49 (2012).

8) Lee, S. Y., Lee, J. Y., Kang, W., Kwon, K. I., Park, S. K., Oh, S. J., Ma, J. Y. and Kim, S. K. : Cytochrome P450-mediated herb-drug interaction potential of Galgeun-tang. *Food Chem. Toxicol.* **51**, 343 (2013).

9) Lee, S. Y., Lee, J. Y., Kang, W., Kwon, K. I., Oh, S. J., Ma, J. Y. and Kim, S. K. : *In vitro* and *in vivo* assessment of cytochrome P450-mediated herb-drug interaction of Ssang-hwa-tang *Food Chem.* **136**, 450 (2013).

10) Pfizer Labs : Insert paper of Zyrtec (cetirizine hydrochloride) (2006) [http://www.pfizer.com/files/products/uspi\\_zyrtec.pdf](http://www.pfizer.com/files/products/uspi_zyrtec.pdf).

11) Villacampa, J., Alcántar, F., Rodríguez, J. M., Morales, J. M., Herrera, J. and Rosete, R. : Pharmacokinetic properties of single-dose loratadine and ambroxol alone and combined in tablet formulations in healthy men. *Clin. Ther.* **25**, 2225 (2003).

12) Guengerich, F. P., Kim, D. H. and Iwasaki, M. : Role of human cytochrome P450 11E1 in the oxidation of many low molecular weight cancer suspects. *Chem. Res. Toxicol.* **4**, 168 (1991).

13) Laethem, R. M., Balazy, M., Falck, J. R., Laethem, C. L., Koop, D. R. : Formation of 19(S)-, 19(R)-, and 18(R)-hydroxyeicosatetraenoic acids by alcohol-inducible cytochrome P450 2E1. *J. Biol. Chem.* **268**, 12912 (1993).