creative commons
COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

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

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

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

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

Disclaimer

dCollection

약학박사학위논문

SK3530 의 PDE5 저해효과 및 체내동태에 관한 연구

PDE5 inhibitory Activity and Pharmacokinetic Study of SK3530

2012 년 8 월

서울대학교 대학원

약학과 생약·분석약학 전공

김 태 곤

SK3530 의 PDE5 저해효과 및 체내동태에 관한 연구

PDE5 Inhibitory Activity and Pharmacokinetic Study of SK3530

지도교수 박 정 일

이 논문을 약학박사 학위논문으로 제출함

2012년 8월

서울대학교 대학원 약학과

생약•분석약학 전공

김 태 곤

김태곤의 약학박사 학위논문을 인준함

2012 년 8 월

위 원 장 권 성 원 (인)

부위원장 한 상 범 (인)

위 원 유 혜 현 (인)

위 원 이 주 영 (인)

위 원 박 정 일 (인)

국문초록

발기부전 (Male erectile dysfunction)은 의학적인 질병 중의 하나이며, 심리적, 외과적인 원인과 약물에 의한 부작용이 그 원인으로 알려져 있다. 미국 Pfizer사의 비아그라는 협심증 치료제로 개발이 시작되었으나 발기 유발 효과가 있다는 것이 발견되어 경구용 발기부전 치료제로 개발되었다. 현재까지의 연구결과 복용량이 증가하면 치료효과도 증가하나 이에 비례하여 부작용 역시 증가하였다. 따라서, 이러한 문제점이 개선된 새로운 PDE5 (Phosphodiesterase 5) 저해제 개발이 요구되었고, SK케미칼에서는 경구용 발기부전증 치료제 신약개발을 시작하여 이러한 단점을 극복한 최종후보물질 SK3530을 확보하였다.

SK3530은 PDE isozyme을 통한 *in vitro* 실험, 개 음경 해면체 내압에 미치는 영향 평가를 통한 약효실험을 통하여 비아그라보다 효능은 크고 부작용은 보다 작다는 결과를 보여주었다. SK3530을 경구투여후 미변환체인 parent drug을 LC/MS/MS로 분석한 결과, 위장관으로부터 흡수되어 투여 1.2-1.7시간에 최대혈중농도를 보여주었으며, 반감기는 약 1.7-1.8시간으로 나타났다. AUC와 Cmax는 10-40 mg/kg 용량에서 투여 용량에 비례하나 용량증가에 비하여 높은 비율로 증가하였으며, 이는 대사 효소의 saturation에 기인되었다고 사료된다. 생체 이용률은 24-43%로 계산되었다.

SK3530을 경구 투여 후 1시간과 4시간 시점에서의 조직 분포는 유사하였으며, 소화, 배설기관을 제외한 다른 조직에서는 tissue/plasma 비가 0.5-2.6 정도로 조직에 분포하였다. *In vitro* 단백 결합은 rat과 human plasma

모두의 경우에서 98% 이상으로 나타났으며, *in vivo* 단백 결합도 투여 1시간에서 24시간 시점에서 모두 98% 이상을 보여주어, SK3530은 혈장 단백과 결합율이 높다는 것을 보여주었다.

SK3530을 0.5에서 10 mg/kg 용량으로 7일간 연속 투여 후 약물대사 효소계인 cytochrome P450 총량 그리고 각 isozyme의 발현량을 측정한 결과 SK3530은 cytochrome P450 효소계의 유도는 유발하지 않았다. Human liver microsome을 이용한 억제 시험에서는 SK3530이 CYP3A4 효소와 CYP2C9 효소활성을 억제하나 therapeutic 농도에서의 약물 상호작용 유발 가능성은 낮은 결과를 보여주었다.

SK3530은 체내로 유입되면 매우 빠른 속도로 대사된다. 이는 혈중 parent drug의 농도가 total radioactivity에 비하여 10-20% 정도이었으며, 또한 bile과 feces에서 검출되는 SK3530의 양은 각각 0.4%와 4.6%로 대부분 대사체로 배설됨을 보여주었다. *In vitro* human 과 rat microsome에서의 metabolic profile은 매우 유사하였으며, phase I metabolite profile은 rat의 경우 *in vitro*와 *in vivo* 사이에도 유사하게 나타났다. SK3530을 경구 투여 일주일 후까지 urine 및 feces에서 회수된 radioactivity 양은 약 92.3% 정도였으며 배설량의 90% 이상이 feces에서 회수되었다. SK3530에 대한 전임상 연구 및 임상 1상 연구를 통해 약물의 안전성을 입증하였으며, 사람에서 200 mg까지 용량의존적인 약물의 혈중노출도를 확인하였다.

결론적으로 SK3530는 기존의 sildenafil 및 PDE5 저해제들과는 달리 부작용은 없으면서 약효가 10배 이상 개선된 효과를 보였고, 경구 투여 시 체내로 신속히 흡수되어 생체이용률은 23-43%로 측정되었다. 또한 약물대사

효소계에 미치는 영향도 미미하여 병용 투여 약물과의 상호작용도 미미할 것으로 예측되었다. 이는 SK3530이 기존의 PDE5 저해제들의 문제점을 개선할 수 있는 새로운 PDE5 저해제로 개발될 가능성을 보여주고 있다.

주요어: SK3550, mirodenafil, SK3541, SK3544, PDE5, Corpus cavernosum, LC/MS/MS, Validation, Intravenous, Oral, Administration, Dose-dependent pharmacokinetics, Hepatic first-pass effects, Rats, Protein binding, Cytochrome P450, Inducers, Inhibitors, CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6, CYP1A2, Nitroglycerin

학번: 2004-30584

목 차

국문초록 ····· i

목차 ····· iv

List of Tables ····· ix

List of Figures ····· xi

List of Abbreviations ····· xiii

I. 서 론 ····· 1

1. 발기부전의 원인 ····· 2

2. Phosphodiesterases 효소 ····· 3

3. 발기부전 치료제의 작용기전 ····· 6

4. Phosphodiesterases와 선택성 ····· 7

5. 발기부전 치료제 종류 ····· 7

5.1. 발매 중인 PDE5 저해제 ····· 8

5.2. PDE5 저해작용에 대한 선택성 ····· 9

5.3. 약물별 주의사항 및 약동학적 특징 ····· 13

II. 실험재료 및 방법 ····· 15

1. 실험재료 ····· 15

1.1. 시험약 ····· 15

1.2. 실험동물 ····· 15

1.3. 기기 및 시약 ····· 15

2. PDE 저해효과 측정 ····· 18

3. 개 음경해면체 내압에 미치는 영향 평가 ····· 18

4. 생체시료 분석법 validation ····· 20
4.1. 표준용액 및 내부표준용액의 조제 ····· 20
4.2. 전처리 방법 및 분석조건 ····· 20
4.3. 특이성 및 직선성 ····· 21
4.4. 정밀성 및 정확성 ····· 21
4.5. 최저정량한계 ····· 22
4.6. 희석의 영향 ····· 22
4.7. 실온 및 냉해동 안정성 ····· 22
5. 생체이용률 평가 ····· 24
5.1. 정맥투여 PK ····· 24
5.2. 경구투여 PK ····· 24
6. 조직분포 연구 ····· 25
6.1. 조직분포 ····· 25
6.2. 단백 결합 ····· 25
7. 대사안정성 연구 ····· 25
7.1. 랫드 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성 ····· 25
7.2. 사람 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성 ····· 26
7.3. 사람 microsome에서 SK3530의 대사 isozyme 규명 ····· 26
8. Cytochrome P450 연구 ····· 27
8.1. Cytochrome P450 효소에 미치는 영향 ····· 27
8.2. Human liver microsomes에서 CYP효소 활성 억제 ····· 28
9. 대사체 연구 ····· 30

10. 배설 연구 ····· 31
11. SK3530의 독성시험 연구 ····· 32
11.1. 랫드 단회투여 급성독성시험 ····· 32
11.2. 마우스 단회투여 급성독성시험 ····· 32
11.3. 랫드 4주 반복투여 독성시험 ····· 32
11.4. 비글견 4주 반복투여 독성시험 ····· 32
11.5. 유전독성시험 ····· 33
11.6. 안전약리시험 ····· 33
12. SK3530의 임상 PK 연구 ····· 34
12.1. 일회 경구투여 후의 약물의 체내동태 평가 ····· 34
12.2. 반복 경구투여 후의 약물의 체내동태 평가 ····· 34
III. 결과 및 고찰 ····· 36
1. PDE5 저해효과 ····· 37
2. 개 음경해면체 내압에 미치는 영향 평가 ····· 38
3. 생체시료 분석법 validation ····· 41
3.1. 특이성 및 직선성 ····· 41
3.2. 정밀성 및 정확성 ····· 41
3.3. 최저정량한계 ····· 41
3.4. 희석의 영향 ····· 41
3.5. 실온 및 냉해동 안정성 ····· 42
4. 생체이용률 평가 ····· 45
4.1. 정맥투여 PK ····· 45

4.2. 경구투여 PK ····· 47
5. 조직분포 연구 ····· 52
5.1. 조직분포 ····· 52
5.2. 단백 결합 ····· 54
6. 대사안정성 연구 ····· 55
6.1. 랫드 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성 ····· 55
6.2. 사람 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성 ····· 57
6.3. 사람 microsome에서 SK3530의 대사 isozyme 규명 ····· 58
7. Cytochrome P450 연구 ····· 59
7.1. Cytochrome P450 효소에 미치는 영향 ····· 59
7.2. Human liver microsomes에서 CYP효소 활성 억제 ····· 61
8. 대사체 연구 ····· 63
9. 배설 연구 ····· 65
10. SK3530의 독성시험 연구 ····· 67
10.1. 랫드 단회투여 급성독성시험 ····· 67
10.2. 마우스 단회투여 급성독성시험 ····· 67
10.3. 랫드 4주 반복투여 독성시험 ····· 68
10.4. 비글견 4주 반복투여 독성시험 ····· 68
10.5. 유전독성시험 ····· 69
10.6. 일반약리시험 ····· 69
11. SK3530의 임상 PK 연구 ····· 71
11.1. 일회 경구투여 후의 약물의 체내동태 평가 ····· 71

12.2. 반복 경구투여 후의 약물의 체내동태 평가 ····· 73

IV. 결론 ····· 75

V. 참고문헌 ····· 79

Abstract ····· 91

List of Tables

Table 1. Characterization, tissue distribution of phosphodiesterases ····· 4

Table 2. Physiological function of phosphodiesterases ····· 5

Table 3. Selectivity of sildenafil on each phosphodiesterases isozymes ····· 10

Table 4. Relative selectivity profiles of PDE5 inhibitors ····· 12

Table 5. Comparison of PK parameters of three PDE5 inhibitors ····· 14

Table 6. CYP isozyme specific substrates and their concentrations used in the inhibition experiments ····· 29

Table 7. Inhibitory effect of SK3530 on PDE isozyme ····· 37

Table 8. Pharmacokinetic parameters of SK3530 after single i.v. injection of SK3530 at a dose of 5 mg/kg to rats ····· 45

Table 9. Pharmacokinetic parameters of SK3530 after single oral administration of SK3530 ····· 45

Table 10. *In vitro* protein binding of SK3530 in human and rat plasma ····· 54

Table 11. Metabolic stability of SK3530 and sildenafil in rat liver microsomes ····· 55

Table 12. Metabolic stability of SK3530 and sildenafil in human liver microsomes · 57

Table 13. The formation rates of SK3541 from SK3530 in human cDNA-expressed CYPs ····· 58

Table 14. Total P450 amount of SK3530 treated male rat liver microsome ····· 60

Table 15. Effects of CYP isozyme selective inhibitors on the activities of CYP marker activities in pooled human liver microsomes ····· 62

Table 16. Effects of the SK3530 on CYP isozyme specific marker activities in pooled human liver microsomes ····· 62

Table 17. Summary of the Pharmacokinetic Parameters of SK3530 Following Single Oral Doses ····· 72

Table 18. Summary of the Pharmacokinetic Parameters of SK3530 Following Multiple Oral Doses ····· 74

List of Figures

Figure 1. Structure of sildenafil ····· 1

Figure 2. Molecular mechanism of PDE5 inhibitors ····· 6

Figure 3. Commercial PDE5 inhibitors ····· 8

Figure 4. Chemical structure of SK3530 ····· 36

Figure 5. The effect of SK3530 on ICP increase induced by electrical stimulation at 1, 2, 4, 8, and 16 Hz frequencies in anesthetized dogs ····· 39

Figure 6. The effect of SK3530 on ICP increase induced by electrical stimulation at 4 Hz frequency in anesthetized dogs ····· 40

Figure 7. Multiple reaction monitoring chromatograms of (A) blank rat plasma, and (B) plasma spiked with SK3530 (500 ng/ml), (C) sample plasma, and internal standard (100 ng/ml) ····· 43

Figure 8. Calibration curve of SK3530 in rat plasma generated by using LC/MS/MS 44

Figure 9. Plasma concentration of total radioactivity and SK3530 after i.v. injection of SK3530 at a dose of 5 mg/kg to rats ····· 46

Figure 10. Plasma concentration of total radioactivity and parent SK3530 after oral administration of SK3530 at a dose of 10 mg/kg to rats ····· 49

Figure 11. Plasma concentration of total radioactivity and parent SK3530 after oral administration of SK3530 at a dose of 20 mg/kg to rats ····· 50

Figure 12. Plasma concentration of total radioactivity and parent SK3530 after oral administration of SK3530 at a dose of 40 mg/kg to rats ····· 51

Figure 13. Time-dependent decrease of total radioactivity in organs and tissues after oral administration of SK3530 at a dose of 40 mg/kg to male rats ····· 53

Figure 14. Metabolic stability of SK3530 and sildenafil in rat liver microsomes ····· 56

Figure 15. Western blot analysis of CYP isozymes in rat liver microsomes ····· 60

Figure 16. Representative radiochromatograms obtained from rat and human liver microsomal incubations of SK3530 ····· 64

Figure 17. Biliary excretion of the radioactivity after oral administration of 40 mg ^{14}C-SK3530/kg to rats ····· 66

List of Abbreviations

ANOVA	: Analysis of Variance
AUC	: Area Under the Curve
$CaCl_2$	: Calcium chloride
cAMP	: cyclic Adenosine Monophosphate
cGMP	: cyclic Guanosine Monophosphate
CD	: Circular Dichroism
CL	: Clearance
Cmax	: Maximum plama concentration
CV	: Coefficient of Variation
CYP	: Cytochrome P450
DMSO	: Dimethyl sulfoxide
ED_{50}	: 50% Effective dose
ESI	: Electrospray Ionization
EtOH	: Ethanol
GC	: Guanylyl Cyclase
HPLC	: High Performance Liquid Chromatography
IC_{50}	: 50% inhibitory concentration
ICP	: Intracavernous Pressure
IS	: Internal Standard
KCl	: Potassium chloride
LC-MS/MS	: Liquid Chromatography-Mass Chromatography

LLE : Liquid Liquid Extraction

LLOQ : Low limit of quantification

MeOH : Methanol

$MgCl_2$: magnesium chloride

MED : Minimal Effective Dose

MLD : Minimum Lethal Dose

MRM : Multiple Reaction Monitoring

MRT : Mean Residence Time

NaCl : Sodium chloride

NO : Nitric Oxide

NOAEL : No Observed Adverse Effect Level

PDE : Phosphodiesterase

PEG : Polyethylene Glycol

PK : Pharmacokinetic

PVDF : Polyvinylidene Fluoride

QC : Quality Control

RE : Relative Error

RT : Retention time

SD : Sprague Dawley

S/N : Signal to Noise ratio

T1/2 : Elimination Half life

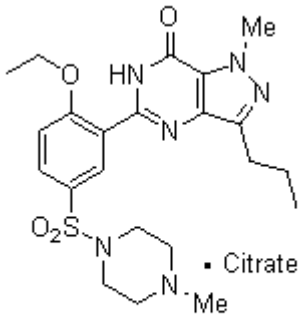
UV : Ultraviolet absorption

Vd : Volume of Distribution

I. 서 론

발기부전 (Male erectile dysfunction)은 의학적인 질병 중의 하나이며, 무작위 조사방법에 의한 보고서에 의하면 40-70대 남성들의 50% 이상이 발기부전을 갖고 있는 것으로 보고되어 있다 (Feldman *et al*., 1994).

비아그라 (sildenafil citrate)는 PDE5 저해제로서 경구용 발기부전 치료제로 개발된 최초의 약물이다 (Fig. 1, Moreland *et al*., 1999). 또한, vardenafil, tadalafil 등 추가적인 PDE5 저해제들이 개발되어 시장에 나오고 있다 (Eardley *et al*., 1997).



Sildenafil (Viagra)

Figure 1. Structure of sildenafil

미국 Pfizer사의 비아그라는 원래 협심증 치료제로 개발이 시작되었으나 발기 유발 효과가 있다는 것이 발견되어 경구용 발기부전증 치료제로 개발이 된 것이다. 비아그라는 그 작용기전이 잘 입증되어 있으며, 성적 자극이 있으

면 발기가 유발되는 매우 생리적인 약물이다. 현재까지의 연구결과 복용량이 증가하면 치료효과도 증가하나 이에 비례하여 부작용 역시 증가하는 것을 보였다. 100 mg의 비아그라를 복용한 경우 환자들의 10-20%가 두통, 안면홍조, 소화불량, 근육통, 시각장애 등을 경험한 것으로 알려져 있다. 이러한 부작용은 비아그라가 해면체 평활근내의 PDE5 뿐만아니라 타 조직의 PDE (PDE1, PDE3, 그리고 PDE6) 역시 저해함으로써 생기는 것으로 생각된다 (Beavo *et al.*, 1995).

지금까지의 결과를 고려할 때 비아그라를 포함한 PDE5 저해제들이 다른 기전의 약물들보다 여러면에서 비교우위를 보이고 있으나, 부작용과 약효 발현시간에 있어서의 지연성이 약물의 사용을 제한하는 요소가 되고 있으므로 이러한 문제점이 개선된 새로운 PDE5 저해제가 개발되어야 할 것이다. SK케미칼에서는 경구용 발기부전증 치료제 신약개발을 시작하여 이러한 단점을 극복한 최종후보물질 SK3530을 확보하였다.

이 논문에서는 새로운 PDE5 저해제인 SK3530에 대한 PDE5 저해효과, 발기부전 치료효과, 약동학 연구, 그리고 독성 연구 등을 다루고자 한다.

1. 발기부전의 원인

발기부전의 원인은 내피조직의 기능 저하, pelvic surgery, spinal injury, 심리학적인 조건, 그리고 약물에 의한 부작용 등으로 알려져 있다 (Chew *et al.*, 2000). 임상적으로는 심리학적인 측면과 의학적인 측면이 복합하여 일어나는 현상이며, 이 중 의학적인 측면의 원인이 발기부전의 대부분을 차지하고 있다. 의학적으로는 심혈관계 질환, 고혈압, 당뇨병, 그리고 ischaemic heart disease가

주로 관련되어 있다. 병원에 입원한 심혈관계 환자들 중 64%는 발기부전의 경험이 있었고, bypass surgery를 수행한 남성환자들 중 57%가 발기부전의 경험이 있다는 연구결과가 이를 뒷받침하고 있다 (Feldman *et al*., 1994).

2. Phosphodiesterases 효소

Phosphodiesterases 효소 (PDE)는 cGMP를 5’ nucleoside monophosphate로 전환시키는 기능을 가지고 있다. 현재까지 phosphodiesterase superfamily는 cDNA 서열에 따라 11종이 분류되었으며 (PDE1-11), 각각의 기전과 다양한 약리작용이 밝혀져 있다 (Beavo *et al*., 1995; Juilfs *et al*., 1999; Soderling *et al*., 2000; Fawcett *et al*., 2000). 포유류 조직에서는 11개의 PDE 효소들이 완벽히 규명되었으며, PDE1에서 PDE6까지는 그들의 조직분포와 기능에 대해 수년간 연구가 진행되어 왔다. 최근에는 PDE7에서 PDE11에 대한 조직분포와 작용기전에 대한 특성들이 밝혀지고 있다 (Corbin *et al*., 1999; Baxendale *et al*., 2001). 각각의 PDE 효소들에 대한 조직별 분포와 다양한 생리학적 기능들은 Table 1과 2에 요약하였다 (Francis *et al*., 2001; Beavo *et al*., 1995).

Table 1. Characterization, tissue distribution of phosphodiesterases

PDEs	Substrate	Tissue Localization
1	cGMP > cAMP	Brain, heart, kidney, liver, skeletal muscle, vascular and visceral smooth muscle
2	cAMP and cGMP	Adrenal cortex, brain, corpus cavernosum, heart, kidney, liver, visceral smooth muscle, and skeletal muscle
3	cAMP > cGMP	Corpus cavernosum, heart, platelets, vascular and visceral smooth muscle, liver, kidney, adipose tissue
4	cAMP	Kidney, lung, mast cells, brain, heart, skeletal muscle, vascular and visceral smooth muscle, thyroid, testis, neural tissue
5	cGMP	Corpus cavernosum, platelets, vascular and visceral smooth muscle
6	cGMP	Retina Visual transduction
7	cAMP	Skeletal muscle, heart, lymphocytes
8	cAMP	Widely distributed. Most abundant in testes, ovaries, small intestine, colon
9	cGMP	Widely distributed. Most abundant in spleen, small intestine, brain
10	cAMP and cGMP	Putamen and caudate nucleus, testes, thyroid
11	cAMP and cGMP	Corpus cavernosum, penile vasculature, vascular smooth muscle, testes, pituitary, liver, kidney, skeletal muscle

cAMP = cyclic adenosine monophosphate

cGMP = cyclic guanosine monophosphate

Table 2. Physiological function of phosphodiesterases

PDEs	Physiological function
PDE1:	Vascular smooth muscle proliferation, gustation, olfaction
PDE2:	Olfaction, adrenocorticosteroid production
PDE3:	Cardiac contractility, insulin secretion, lipolysis, liver glucose Production
PDE4:	Inflammation, smooth muscle tone, depression, thyroid secretion, reproductive physiology
PDE5:	Penile erection, smooth muscle tone, platelet aggregation
PDE6:	Visual transduction
PDE7:	T-cell activation, skeletal muscle metabolism
PDE8:	T-cell activation
PDE10:	Dopamine signaling

3. 발기부전 치료제의 작용기전

사람 해면체 조직에서 발기부전 치료제의 작용기전은 다음과 같다. Cavernous 신경에서 유리된 NO (Nitric Oxide)는 Guanylyl cyclase를 활성화시켜 GTP를 cGMP로 전환시켜 줌으로써 해면체 조직에서 cGMP 수준을 높게 유지시킨다. cGMP는 PKG 효소를 통해 Ca^{2+} 이온을 낮게 하여 평활근 세포의 이완을 일으키게 되며, 이로 인해 해면체 조직에서는 발기 (erection)이 나타나게 된다 (Fig. 2).

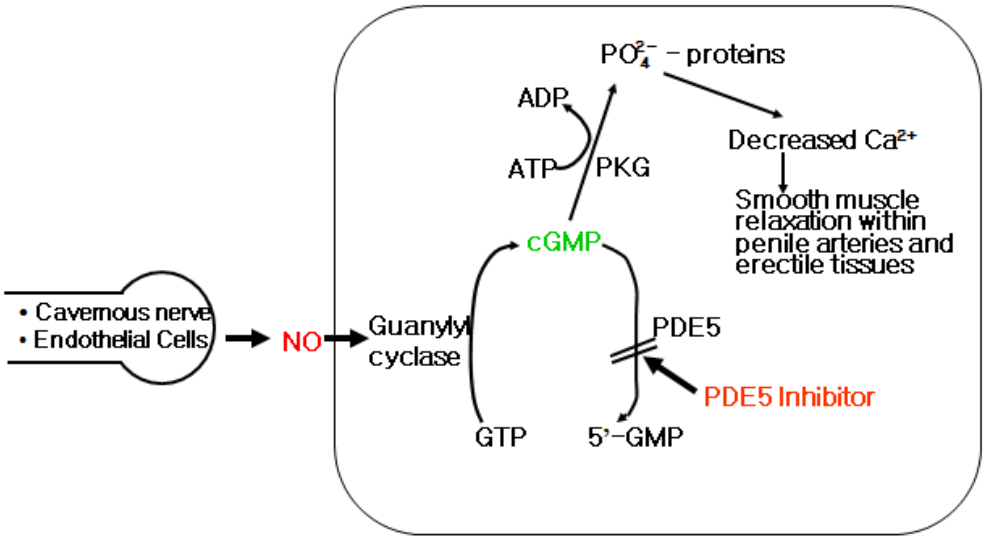


Figure 2. Molecular mechanism of PDE5 inhibitors

하지만, 발기부전 환자의 경우 cGMP를 5'-GMP로 다시 전환시켜 주는 PDE5 효소의 작용이 강해 cGMP가 정상적인 발기를 일으키기에 충분하지 못한 수준이 됨으로써 발기부전이 생기게 된다. 따라서, PDE5가 발기부전 치료제의 타겟이 되는 것은 명확하며, 이에 대해 저해제 개발이 시도되고 있는 것이다 (Stoclet *et al*., 1995).

4. Phosphodiesterases와 선택성

현재 비아그라는 우수한 약효 및 간편한 복용성에 힘입어 기록적인 판매고를 올리고 있다. 그러나 비아그라는 약물 복용시 심장장애, 두통, 안면홍조, 소화불량, 근육통, 시각장애 (망막기능 이상) 등의 부작용이 나타나고 있고, nitrate 계열의 약물을 사용하고 있는 심장질환 환자들이 비아그라와 병용시 사망한 예도 보고되었다. 비아그라와 같은 PDE5 저해제들은 위에서 언급한 다양한 PDE isozyme들에 대해서도 작용할 수 있으며, PDE1은 두통, PDE3는 심장관련 부작용, 안구의 망막에 존재하는 PDE6는 일시적인 시각 장애와 관련이 있다. 따라서, 이들 isozyme들에 대해서 충분한 선택성을 보이지 않을 경우 부작용들이 나타나는 것으로 예상하고 있다. 한편 PDE5 저해제가 아닌 apomorphine은 비교적 경미한 비기질성 발기부전증 환자에게만 유효하고 오심, 구토, 하품, 혼절등의 부작용을 나타내고 있다. 따라서 PDE isozyme들에 대하여 보다 높은 선택성을 보여 부작용이 경미한 새로운 경구용 발기 부전증 치료제인 PDE5 저해제의 개발이 요구되고 있는 상황이다.

5. 발기부전 치료제 종류

5.1. 발매 중인 PDE5 저해제

발기부전증은 질병 자체가 터부시되어 오다가 현대에 와서 스트레스 등에 의한 환자의 증가와 함께 그 중요성이 부각되었다. 발기부전증의 치료 방법으로는 진공장치, 혈관수술, 음경보형물수술, 음경해면체내 자가주사요법 등이 사용되어 왔으나 최근에는 효과가 크고 간편하게 경구로 복용할 수있는 발기부전증 치료제들이 개발되고 있다. 발기기전에 관여하고있는 phosphodiesterase type 5 (PDE5) 효소의 작용을 선택적으로 저해하여 해면체의 평활근 세포를 이완시켜 발기를 유발시키는 Pfizer사의 비아그라가 대표적인 경구용 발기부전증 치료제로 발매되었고, 레비트라와 시알리스도 발매를 시작하였다. 시상하부의 dopamine D2 수용체에 작용하여 발기부전증을 치료하는 Taketa-Abbott사의 중추성 apomorphine 설하정도 시판되기 시작하였다.

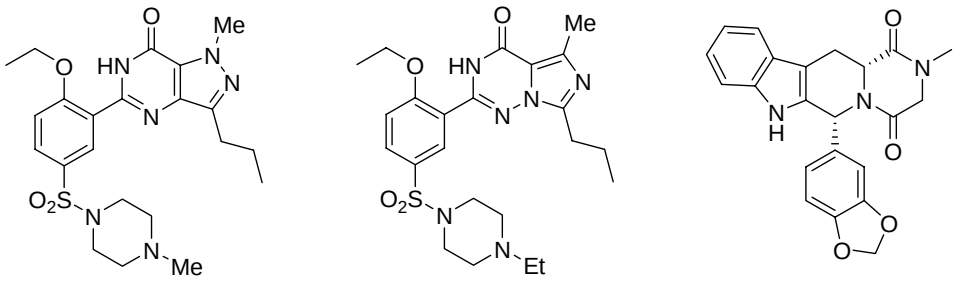


Figure 3. Commercial PDE5 inhibitors

Bayer사의 PDE5 저해제 vardenafil을 26주동안 736명의 환자에 투여한 임상결과에 따르면 복용그룹의 85%가 발기부전에 효과를 나타냈으며, 위약 복용그룹에서는 28%만이 기능개선을 경험한 것으로 나타났다. Vardenafil 10 mg을 복용한 남성들은 80%가 반응을 나타냈고, 5 mg을 복용할 경우엔 65%가 반응을 나타냈다. Vardenafil은 특히 당뇨병성 발기부전에 효과적이라고 한다.

Lilly/ICOS사의 Cialis는 약효가 24시간 지속되며 비아그라나 레비트라로 약효를 기대하기 어려운 발기부전증 환자에게도 발기개선효과 (20 mg, 64%)가 있는 것으로 나타났다.

Abbott사의 Uprima는 apomorphin을 주성분으로 하는 경구용 발기 부전 치료제로서 성욕을 담당하는 중추신경에 직접 작용하여 발기와 관련된 뇌신경전달물질인 dopamine 분비를 촉진시켜 발기를 유발하기 때문에 순환기에 거의 무리를 주지 않아 협심증이나 심장마비와 같은 치명적인 심혈관계 부작용이 없는 것이 특징이며, 설하정이어서 15-20분만에 효과가 나타나지만 혼절등의 심한 부작용이 문제가 되고 있다.

5.2. PDE5 저해작용에 대한 선택성

비아그라의 경우 351명의 비기질성 발기부전증 환자들에게 50 mg을 4주간 투여한 결과, 위약군에서는 38%의 환자에서 효과를 나타낸 반면 투약군에서는 88%의 환자에게서 발기 향상이 관찰되었다. 또한 416명의 여러 가지 원인의 질환을 가진 발기부전증 환자들을 대상으로 한 임상연구에서는 100 mg의 비아그라를 복용 후 78.5%의 환자에서 성기능 향상이 확인되어 위약군에서의 29%에 비해 뚜렷한 치료효과를 보였다. 하지만, 현재까지의 연구결과를 보면

복용량이 증가하면 치료효과도 증가하나 이에 비례하여 부작용 역시 증가하는 것을 보였다. 100 mg의 비아그라를 복용한 경우 환자들의 10-20%가 두통, 안면홍조, 소화불량, 근육통, 시각장애 등을 경험한 것으로 알려져있다. 이러한 부작용은 비아그라가 해면체 평활근내의 PDE5 뿐만아니라 타 조직의 PDE 역시 저해함으로써 생기는 것으로 생각된다. 지금까지의 연구결과에 의하면 여러 PDE isozyme에 대한 비아그라의 IC_{50} 값은 Table 3와 같다.

Table 3. Selectivity of sildenafil on each phosphodiesterases isozymes

PDE isozymes	Sources	IC50 (μ M)
PDE1	Human cardiac ventricle	0.29
PDE2	Human corpus cavernosum	30
PDE3	Human corpus cavernosum	17
PDE4	Human skeletal muscle	7.3
PDE5	Human corpus cavernosum	0.0039
PDE6	Bovine retina	0.038

위에서 알수 있듯이 망막에 존재하는 PDE6에 대한 비아그라의 IC_{50} 값은 해면체 PDE5에 대한 IC_{50} 값에 비하여 10배 차이밖에 없어 시각장애 부작용을 초래하는 것으로 생각된다.

Tadalafil 및 vardenafil에 대한 선택성 profile을 고찰해 보면, tadalafil에 있어 시각적인 부작용이 다른 약물에 비해 낮게 발생하는 것은 PDE6에 대한 IC_{50}

값이 매우 높기 때문인 것으로 설명된다. 반면, sildenafil과 vardenafil은 PDE11에 대한 선택성이 tadalafil에 비해 매우 높은 것으로 나타났다. Tadalafil의 경우 임상적인 농도 구간에서 사람 재조합 PDE11A1에 대한 활성이 매우 높은 것으로 나타나 이에 대한 부작용 (정자형성 감소 등)을 초래할 가능성이 클 것으로 예상된다. 대표적인 약물별 선택성 profile을 Table 4에 요약하였다.

Table 4. Relative selectivity profiles of PDE5 inhibitors

Family/gene	Sildenafil	Vardenafil	Tadalafil
PDE1a	290	630	20 000
PDE1b	1 100	5 000	21 000
PDE1c	110	460	11 000
PDE2a	19 000	72 000	49 000
PDE3a	12 000	7 700	38 000
PDE3b	17 000	15 000	18 000
PDE4a	6 000	46 000	30 000
PDE4b	5 800	33 000	22 000
PDE4c	5 200	34 000	23 000
PDE4d	3 600	16 000	13 000
PDE5	1	1	1
PDE6	6.8	2.9	780
PDE7a	22 000	200 000	47 000
PDE8a	19 000	310 000	30 000
PDE9a	540	3 600	19 000
PDE10a	3 100	12 000	9 000
PDE11a	1 500	640	14

5.3. 약물별 주의사항 및 약동학적 특징

각 약물별 특징을 대표적으로 설명하면, sildenafil과 vardenafil은 음경강직도, tadalafil은 작용시간, udenafil은 이들 약제의 중간정도, 그리고 SK3530은 부작용 빈도 측면에서 장점을 가진다. 약동력학 (pharmacokinetic)과 부작용은 다소 차이가 있다. 모든 약물은 주로 간대사에 의해 이뤄지므로 간기능 장애나 cytochrome P450에 영향을 미칠 수 있는 약물과 병용투여 시 약물용량의 조절이 필요하다. 약물부작용은 대부분 안면홍조, 코막힘, 두통 등과 같은 말초성 혈관확장에 의해 발생하며 모든 약물에서 비슷한 발생률을 보인다. Tadalafil은 아직까지 그 발생기전을 정확히 모르지만 tadalafil을 복용한 경우 요통이 간혹 발생할 수 있다고 알려져 있다. 그 외 vardenafil은 복용 후 심전도상 경한 QT interval 지연을 보이는 경우가 있다.

유기질산염 (organic nitrate) 제제를 복용하고 있는 환자들은 PDE5 억제제 사용이 금기시된다. 하지만, sildenafil 복용 후 24시간, tadalafil 복용 후 48시간이 경과하면 유기질산염 제제의 투여가 가능하다. 알파차단제를 투여 중인 전립선 비대증 환자에서는 약 6시간의 간격을 두고 PDE5 억제제를 투여하는 것이 안전한 것으로 알려져 있다.

대표적인 PDE5 저해제에 대한 약동학적 profile은 Table 5와 같으며, 대부분의 약물이 투여후 1-2시간 정도에 최고혈중농도를 나타내나, tadalafil의 경우 반감기가 17.5시간으로 매우 길어 작용기간에 있어 큰 특장점을 보여주고 있다. 단백결합률은 대부분의 약물이 90%이상의 높은 수치를 나타내고 있고, 알코올과의 약물상호작용은 없는 것으로 나타났다.

Table 5. Comparison of PK parameters of three PDE5 inhibitors

Parameter	Vardenafil (20 mg)	Sildenafil (100 mg)	Tadalafil (20 mg)
T_{max} (min)	40	60	120
$T_{1/2}$ (hrs)	3.9	3.7	17.5
C_{max} (ng/mL)	209	560	378
AUC (ng.hr/mL)	74.5	1685	8066
Protein binding(%)	96	94	NA
Alcohol interaction	No	No	No

II. 실험 재료 및 방법

1. 실험재료

1.1. 시험약

SK3530은 SK Chemical에서 공급받았으며, ^{14}C-labeled SK3530은 Korea Radiochemicals Center (수원, Korea)로부터 공급받아 사용하였다. HPLC-radiochromatography로 분석한 결과 radioactivity purity는 98%이상이었다.

1.2. 실험동물

Sprague-Dawley계 랫드 (SPF, 250-270 g)는 대한실험동물센터로부터 구입하였으며 동물 사육실에서 1주일간의 순화기간을 거친 뒤 실험에 사용하였다. 동물 사육실은 온도 25±2℃, 상대습도 55±10%, 그리고 12시간 간격의 light/dark cycle의 상태를 유지하였다. 모든 시험은 특별히 명시되어있지 않은 한 각 그룹 당 4-5마리를 한 군으로 하여 시험을 수행하였다.

1.3. 기기 및 시약

· Acetone (Sigma-Aldrich, USA)

· Acetonitrile (J. T. Baker, USA)

· Analytical Balance (Sartorius, Germany)

· Balance: XP205 (METTLER TOLEDO, Greifensee, Switzerland)

· Carboxymethylcellulose (CMC, Sigma, USA)

· Centrifugal evaporator: RVC 2-25 (Martin Christ, Germany)

· Centrifuge: 3-16K (SIGMA, Germany)

· Centrifuge (Hanil, Korea)

· Desmethyl sildenafil (SK Chemicals, Korea)

· Desmethyl SK3530 (SK Chemicals, Korea)

· Dispenser: Repetman (Gilson, France)

· Ether (SkySoltech, SK Chemicals, Korea)

· Formic acid (KANTO, Japan)

· Glucose 6-phosphate (Sigma-Aldrich, USA)

· Glucose 6-phosphate dehydrogenase (Sigma-Aldrich, USA)

· HPLC (Nanospace SI-2 series, Shiseido, Japan)

· HPLC Solvents (Fisher Scientific, Korea)

· Human cDNA-expressed CYPs (BD Biosciences, USA)

· Human P-glycoprotein membranes (BD Biosciences, USA)

· Human liver microsomes (BD Biosciences, USA)

· LC/MS/MS (API4000, AB Sciex, USA)

· LC columns

ACQUITY UPLC® BEH C18, 1.7 μm, 2.1 X 100 mm (Waters Corporation, USA)

YMC J'Sphere ODS-H80, 150 mm × 4.6 mm i.d., 4 μm (YMC, Japan)

· Methanol (J. T. Baker, USA)

· Micropipette: Pipetman (Gilson, France)

· NADP (Sigma-Aldrich, USA)

· Phosphate Buffered Saline (PBS pH 7.4, Sigma, USA)

·

· Rat male liver microsomes (BD Biosciences, USA)

· Sample concentrator (Genevac, UK)

· Sildenafil (SK Chemicals, Korea)

· SK3530 (SK Chemicals, Korea)

· Sodium Chloride (Wako, Japan).

· Sodium Hydroxide (Wako, Japan)

· Sodium nitroprusside (Sigma-Aldrich, USA)

· Speed Vac Concentrator (Genevac, UK)

· Tween 80 (Sigma-Aldrich, USA)

· Ultrasonic bath (Branson 5200, USA)

· UV spectrometer (Beckman DU 650 spectrophotometer, USA)

· Vortex mixer (Thermolyne, USA)

· Water purification system (AquaMAX, Korea)

2. PDE 저해효과 측정

경구용 발기부전증 치료제로 개발한 최종후보물질 SK3530의 PDE5에 대한 저해작용을 측정하기 위하여 토끼 혈소판 또는 사람의 음경 해면체 조직에서 PDE5를 음이온 교환 수지를 이용하여 분리, 정제하여 얻었다. 같은 방법으로 토끼 혈소판 또는 사람의 음경 해면체 조직에서 PDE3, 소의 retina에서 PDE6를 분리하였다. 분리된 PDE에 대한 신약후보물질들의 저해도는 PDE [^{3}H] cGMP 또는 cAMP SPA enzyme assay kit를 이용하여 측정하였다.

3. 개 음경해면체 내압에 미치는 영향 평가

체중 23-30 kg의 수컷 mongrel dog 5마리를 대상으로 SK3530이 개 음경해면체의 내압에 미치는 영향을 평가하였다. 먼저 sodium pentobarbital을 brachial vein에 정맥주사하여 마취를 유도하였고, 기관삽관후 ventilator SIMV mode로 호흡을 유지하였다. 동맥혈 가스분석을 매 2시간마다 시행하였으며 호흡수를 일정하게 유지되도록 하였다. 체온은 37-38℃로 유지하였고, angiocatheter를 통해 좌측 femoral artery의 혈압을 측정하여 PowerLab polygraph (AD instruments, Australia)로 기록하였다.

음경해면체내압 (intracavernous pressure: ICP)은 양측 음경해면체 (corpus cavernosum)에 needle을 삽입하고 pressure transducer와 연결하여 PowerLab polygraph에 기록하였다. 발기유발은 pelvic plexus를 10-15 V, 2 msec pulse width, 1분간 자극으로 setting된 Grass electrical stimulator를 1, 2, 4, 8, 16 Hz로 변화시키면서 자극하였다. Plateau에 이른 음경해면체내압을 평균 혈압과의 percent로 표시하여 발기정도를 비교하였다.

동물당 2-4회의 control frequency-response curve를 작성하였고, 이후 시험약물을 1, 3, 10, 30, 100 μg/kg의 농도로 정맥 투여 10분 후, 각 Hz당 frequency-response curve 작성하였다. 한 농도의 약물 test 후, 다음 농도로 진행하기 전 30분의 wash-out period를 가졌다.

4. 생체시료 분석법 validation

4.1. 표준용액 및 내부표준용액의 조제

보관용 표준용액은 SK3530 standard를 methanol에 녹여 100 μg/mL의 농도로 조제하였다. 보관용 표준용액을 methanol로 희석하여 각각 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 5, 10 및 20 μg/mL의 농도로 상용 표준용액을 조제하였다. 내부표준용액은 보관용 내부표준용액을 methanol로 희석하여 10 μg/mL의 농도로 조제하였다. 표준용액과 내부표준용액은 조제 후 냉장, 차광보관 하였다.

검량선 작성을 위한 표준용액은 랫드 공혈장과 각각의 상용표준용액을 9:1 비율로 혼합하여, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 및 2000 ng/mL의 농도로 조제하였다.

4.2. 전처리 방법 및 분석조건

혈장 100 μL에 50 mM NaOH 용액 100 μL를 가하고 700 μL의 ethyl acetate로 추출하였다. 유기용매를 N_2 gas 하에서 건조시킨 후 잔사를 HPLC buffer에 녹여 분석하였다. 분석 조건은 HPLC system은 이동상으로 5 mM ammonium formate (pH 6.0) (buffer A)와 90% AcCN in buffer A (buffer B)을 80% isocratic (B)으로 사용하였다. 분석컬럼은 CAPCELLPAK Phenyl (1.5×150 mm, 5 μm)을 사용하여 유속을 0.15 mL/min으로 3.5 min 동안 분석하였다.

Peak 검출은 triple-quadrupole mass spectrometry를 이용하여 MS/MS MRM (multiple reaction monitoring)방법으로 검출하고, ionization은 turbo ion spray를 이용한 electrospray ionization (ESI), nebulizing gas와 turbo gas, 그리고 curtain gas는 nitrogen gas를 사용하였으며, 각각 30, 75, 그리고 40으로 설정하였다. Nebulizer

의 온도는 400℃로 설정하였다. MRM mode를 이용한 SK3530과 sildenafil (IS)의 검출은 4 collision gas (nitrogen gas)와 150 ms dwell time으로 분석하였으며, 각각의 protonated molecular ion은 m/z 532과 475이며, collision energy를 65와 67로 하여 생성된 product ion은 m/z 99와 58을 monitoring 하였다.

4.3. 특이성 및 직선성

특이성은 랫드 공혈장과 랫드 공혈장에 내부표준물질을 첨가한 시료, 그리고 정량한계 농도의 표준시료에 내부표준물질을 첨가한 시료를 분석하고, 랫드 공혈장 중 내인성 물질의 간섭을 확인하였다. 분석대상 성분이 용리되는 구간에 내인성 물질이 존재할 경우, peak intensity는 최저정량한계농도의 peak 대비 20% 이하에서 평가하였다.

직선성은 최저정량한계 (LLOQ, Low limit of quantification)를 포함한, 최소 6가지 농도의 검량선에서 측정농도와 이론농도 (Theoretical concentration) 사이의 상대오차 ±15% 이내에서 적합한 것으로 평가하였다 (LLOQ=±20%).

4.4. 정밀성 및 정확성

정밀성 (Precision)은 QC 시료 3배치 (6회/배치)를 3일간 반복 분석한 다음, 각 농도수준에서 측정된 결과를 변동계수 (CV, Coefficient of variation)로 표현하였다. 분석 배치내 (intra-batch), 분석 배치간 (inter-batch) 정밀성은 변동계수 15% 미만일 때 적합한 것으로 평가하였다.

CV (%) = Standard deviation of concentration/Mean of concentration × 100

정확성(Accuracy)은 QC 시료 3배치 (6회/배치)를 3일간 반복 분석한 다음, 각 농도수준에서 측정된 결과를 상대오차 (RE, Relative error)로 표현하였다. 분석 배치내 (intra-batch), 분석 배치간 (inter-batch) 정확성은 상대오차 ±15% 이내일 때 적합한 것으로 평가하였다.

RE (%) = (Calculated Conc.-Nominal Conc.)/Nominal Conc.×100

4.5. 최저정량한계

검량선용 표준시료 최저 농도의 신호대 잡음비 (Signal to Noise ratio)가 10 이상, 정밀성 (CV) 20% 미만, 정확성 (RE) ±20% 이내일 때 적합한 것으로 평가하였다.

4.6. 희석의 영향

10 μg/mL의 혈장시료를 조제하고, 공혈장으로 10 배 희석 (1 μg/mL)한 후 6회 반복 분석하고, 정밀성 15% 미만, 정확성 ±15% 이내에서 희석의 영향을 평가하였다.

4.7. 실온 및 냉해동 안정성

실온 안정성은 QC 시료 (n=3)를 실온에서 4시간 방치한 후 분석하고, 상대오차 ±15% 이내에서 평가하였다.

냉해동 안정성은 QC 시료 (n=3)를 3회 냉해동 조작을 반복한 후

분석하고, 상대오차 ±15% 이내에서 평가하였다.

5. 생체이용률 평가

5.1. 정맥투여 PK

시험약인 SK3530을 50% PEG로 10 mg/mL의 농도가 되도록 시료를 제조하였다. 각 군은 4마리의 랫드로 이루어졌고 5 mg/kg로 SK3530을 투여한 다음 투여 후 1, 5, 10, 30분, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10시간에 혈액을 취하여 혈장을 얻었다.

SK3530의 혈중농도를 계산하기 위한 표준 검량선을 작성하기 위하여 랫드 공혈장 100 μL에 SK3530을 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 그리고 2000 ng/mL의 농도가 되도록 첨가하고 각각에 내부표준물질 sildenafil을 최종농도 100 ng/mL이 되도록 첨가하였다. LLE 방법을 통해 약물층을 추출한뒤 유기용매를 N_2 gas 하에서 건조시킨 후 잔사를 HPLC buffer에 녹여 분석하였다. 분석 조건은 이동상으로 5 mM ammonium formate (pH 6.0) (buffer A)와 90% AcCN in buffer A (buffer B)을 80% isocratioc (B)으로 사용하였다. 분석컬럼은 CAPCELLPAK Phenyl (1.5×150 mm, 5 μm)을 사용하였다.

5.2. 경구투여 PK

경구투여의 경우 각 군은 5-6마리의 랫드로 구성하였고 시험당일 SK3530을 10, 20, 40 mg/kg로 랫드용 존대를 이용하여 강제 경구 투여하였으며 투여 후 10, 20, 30분, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12시간 경과 시점에서 대퇴동맥으로부터 0.3 mL의 혈액을 취한 후 원심 분리하여 혈장을 얻었다.

SK3530의 혈중농도를 측정하기 위한 전처리법은 정맥투여와 동일한 방법으로 실시하였으며, 약물농도 분석은 LC-MS/MS를 사용하였다. Total radioactivity 측정은 liquid scintillation counter를 사용하였다.

6. 조직분포 연구

6.1. 조직 분포

랫드를 각 그룹 당 6마리씩 SK3530을 40 mg/kg 용량으로 단회 경구 투여한 후 1, 4, 그리고 24시간 경과시점에서 랫드를 ether로 마취시키고, cardiac puncture로 혈액을 채취하였다. 그 이후 즉시 복부를 개복하여 간 등의 각 조직을 적출하였다. 적출된 장기는 생리식염수로 세척 후 중량을 측정하였다. 혈장을 제외한 조직은 일주일간 풍건하고 완전히 건조되면 sample oxidizer로 연소시켜 유리되는 $^{14}CO2$를 Carbosorb 10 mL에 trapping하고 여기에 다시 scintillation cocktail 10 mL을 첨가한 후 ß-counter를 이용하여 radioactivity를 측정하였다.

6.2. 단백 결합

Blank human plasma와 랫드 plasma 0.5 mL에 SK3530을 각각 1, 5, 50, 100 μM이 되도록 가한 다음 37℃에서 10분간 incubation하고 amicon (MW cutoff 30,000)으로 14,000 rpm 에서 30분간 원심 분리하여 protein free fraction 과 protein binding fraction에 있는 약물농도를 측정하였다. Protein free fraction 과 binding fraction의 약물농도를 얻은 후 두 값의 합을 총 합으로 잡고 protein free fraction을 제하여 단백결합율 (%)을 계산하였다.

7. 대사안정성 연구

7.1. 랫드 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성

대사 안정성을 측정하기 위한 반응액은 총 1.0 mL이며 SK3530 또는 sildenafil (10 μM), 랫드 간 microsome (1 mg protein), 0.05 M 인산염 완충액 (pH 7.4), NADPH 생성계 (5 mM glucose 6-phosphate, 1 mM NADP+, 1.0 U glucose 6-phosphate dehydrogenase)를 포함하였다.

시험물질을 랫드 간 microsome과 NADPH 생성계를 가한 후 37℃에서 반응하면서, 일정시간 5, 10, 20, 40, 60분에 반응액의 일부 (100 μL)를 취해 acetonitrile 100 μL를 가해 반응을 정지시킨 후 원심분리하고 상등액을 취하여 남아 있는 SK3530 또는 sildenafil의 양을 LC-MS/MS로 분석하였다. Control 값 (100%)은 시험물질을 80℃에서 10분간 불활성화 시킨 간 microsome과 NADPH 생성계를 가한 후 37℃에서 60분간 반응한 액으로 하였다.

7.2. 사람 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성

시험물질을 사람 간 microsome과 NADPH 생성계를 가한 후 37℃에서 반응하면서, 일정시간 5, 10, 20, 40, 60분에 반응액의 일부 (100 μL)를 취해 acetonitrile 100 μL를 가해 반응을 정지시킨 후 원심분리하고 상등액을 취하여 남아 있는 SK3530 또는 sildenafil의 양을 LC-MS/MS로 분석하였다. 기타 반응조건 및 계산식은 랫드 대사 안정성 시험과 동일하게 하였다.

7.3. 사람 microsome에서 SK3530의 대사 isozyme 규명

SK3530의 대사에 관여하는 CYP isozyme을 확인하기 위해, 반응액은 SK3530 표준용액 2 μL, NADPH generating system (5 mM glucose-6-phosphate, 1 mM NADP, G-6-P dehydrogenase 1 unit) 40 μL, 60 mM $MgCl_2$ 10 μL, 50 mM potassium

phosphate buffer (pH 7.4) 144 (L, human c-DNA expressed CYP1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4 isozymes 4 pmol을 가해 최종부피 200 μL가 되도록 조제하였다.

반응액을 37℃에서 15분간 반응시킨후 반응액에 methylene chloride 1000 μL를 첨가하여 반응을 중지시키고, 내부표준물질 (sildenafil 10 μg/mL) 20 μL를 첨가하였다. 13,000 rpm에서 5분간 원심 분리하여 유기용매층 850 μL를 취한 후 vacuum concentrator로 증발 건고하였다. 건고물을 이동상 50 μL에 용해하고, 10 μL를 LC/MS/MS에 주입하여 분석하여 SK3541과 내부표준물질의 피이크 면적비로부터 SK3541의 농도를 구하고, SK3541의 생성율 (pmol/pmol CYP/min)을 구하였다.

8. Cytochrome P450 연구

8.1. Cytochrome P450 효소에 미치는 영향

수컷의 Sprague-Dawley (SD)계 랫드에 SK3530을 0.5, 2.0, 그리고 10.0 mg/kg 용량으로 매일 1회 7일간 경구로 투여하였다. 7일간 약물 처리한 각각의 군을 8일째에 diethyl ether로 마취시킨 후 복부를 절개하여 간 문맥을 노출시킨 다음 간 문맥을 통하여 30 mL의 0.15% KCl로 간을 perfusion하였다.

마이크로좀 분리는 이미 보고된 분획 원심 분리 방법으로 분리하였다 (Guengerich FP, 1989). 간의 중량을 측정한 후 3배 분량의 buffer A (0.1 M Tris-acetate (pH 7.4), 0.1 M KCl, 1 mM EDTA (pH 8.0), 20 μM BHT)를 첨가하여 세절한 후 ultra turrax T25를 이용하여 균질화하였다. 이 균질액을 10,000 g (Sovall rotor 34: 9150 rpm)에서 20분간 원심 분리하여 상층액인 S9 fraction을 얻었다. 이 상

층액을 100,000 g (Kotran TFT70: 38,000 rpm)에서 60분간 초원심 분리하여 마이크로좀 pellet을 얻었다. 상층액을 버리고 buffer B (0.1 M potassium phosphate (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0), 20 μM BHT)를 첨가하여 glass homogenizer로 균질화한 후 다시 한번 100,000 g에서 60 분간 초원심 분리하였다. 얻은 pellet은 buffer C (10 mM Tris acetate (pH 7.4), 1 mM EDTA (pH 8.0), 20 % (w/v) glycerol)를 가하여 glass homogenizer로 균질화 하였고 -70℃에 보관하였다.

CYP isozyme의 발현량을 측정하기 위해 SDS polyacrylamide Gel 전기영동 (SDS-PAGE) 방법으로 Western blotting을 실시하였다. SDS-PAGE는 Laemmli의 방법 (Laemmli, 1970)으로 전기 영동하였다. 시료는 단백질을 변성시키기 위해 SDS gel loading buffer (50 mM Tris-Cl (pH 6.8), 100 mM DTT, 2% SDS, 0.1% bromophenolblue, 10% glycerol)를 첨가하고 100℃에서 10 분간 가열하였다. 전기영동 buffer (pH 8.8)는 25 mM Tris base, 250 mM glycine과 0.1% SDS를 함유하였다. 전기영동 후 gel을 polyvinylidene fluoride (PVDF) filter에 옮긴 후 Western blotting을 하였다.

8.2. Human liver microsomes에서 CYP효소 활성 억제

반응 incubation은 pooled human liver microsome (1 mg/mL), 7종의 substrate mixture, 그리고 SK3530을 0.1 M potassium phosphate (pH 7.4)에 첨가하고, 37℃에서 3분간 preincubation하였다. 이때 사용한 P450 isozyme specific substrate는 Table 6에 나타내었으며 농도는 Km 부근의 농도를 사용하였다. 반응 혼합물에 NADPH generating system (10 mM glucose-6-phosphate, 0.67 mM β-NADP+, 1 unit NADPH dehydrogenase)을 첨가하여 반응을 시작하였으며 이때 반응혼합물의

volume은 0.2 mL로 하였다. 반응 혼합물에서의 유기 용매의 농도는 0.5% (v/v)를 초과하지 않았다. 30분간 반응 후 동량의 0.1% acetic acid를 첨가하여 반응을 종료하였다.

Table 6. CYP isozyme specific substrates and their concentrations used in the inhibition experiments

P450 isozyme	marker substrate	concentration
CYP1A2	Phenacetin	40 μM
CYP2A6	Coumarin	2.5 μM
CYP2C8	Paclitaxel	10 μM
CYP2C9	Diclofenac	10 μM
CYP2C19	(±)-Mephenytoin	160 μM
CYP2D6	Dextromethorphan	5 μM
CYP3A4	Midazolam	2.5 μM

9. 대사체 연구

Microsome 0.5 mg과 0.1 M potassium phosphate (pH 7.4), 50 uM SK3530의 혼합물을 37℃에서 3분간 preincubation시킨후 NADPH generating system (0.01 M glucose 6-phosphate, 1 unit glucose 6-phosphate dehydrogenase, 0.5 mg/ml β-NADP+)을 첨가하여 전체 반응혼합물의 volume을 0.5 mL로 하였고 37℃에서 2시간동안 배양하였다. 반응은 acetonitrile (one-volume)을 첨가하여 정지시켰으며 3,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 분석에 사용하였다.

Mass spectrometry 조건으로는 ionization은 API-electrospray ionization방법을 이용하였으며 polarity mode는 positive mode 그리고 compound stability는 60%를 사용하였다. Nebulizing gas로는 nitrogen gas를 35 psi로 nebulizing하였으며, drying gas는 8 L/min로 그리고 dry temp.는 350℃를 사용하였다.

10. 배설 연구

4 마리의 rats에 SK3530을 40 mg/kg 용량으로 단회 경구 투여한 후 metabolic cage에 각각 1 마리씩 넣은 다음 배설되는 urine과 feces를 7일간 채집하였다. Urine과 feces의 무게를 측정한 후 urine은 바로 scintillation cocktail과 섞어 radioactivity를 측정하였으며, feces는 증류수를 첨가하여 균질화 한 후 일정량을 취하여 풍건하고 sample oxidizer로 연소시킨 후 radioactivity를 측정하였다.

담즙 배설연구를 위해 male 랫드를 각 그룹 당 4마리씩 pentobarbital로 마취시킨 다음 common bile duct에 PE10 tube를 삽관하여 고정하였다. 마취에서 깨어난 후 시험약을 40 mg/kg로 경구투여하고 0-12시간까지 1시간 간격으로 그리고 12-24시간까지 담즙을 채취하였다. 채취한 담즙 50 μL를 취하여 scintillation cocktail 5 mL와 섞은 후 radioactivity를 counting 한 후, 절대 투여량에 대한 담즙으로의 배설을 백분율(%)로 계산하였다.

11. SK3530의 독성시험 연구

11.1. 랫드 단회투여 급성독성시험

암수 랫드에 일회 경구 또는 정맥투여 후 사망율을 측정하여 최소치사량을 추정하고 14일간 체중의 변화, 생체 증상의 변화를 관찰하였다. 투여용량은 500, 1000, 2000 mg/kg로 설정하였으며, 사망동물은 부검하여 SK3530의 표적기관을 확인하였다.

11.2. 마우스 단회투여 급성독성시험

암수 마우스에에 일회 경구 또는 정맥투여 후 사망율을 측정하여 최소치사량을 추정하고 14일간 체중의 변화, 생체 증상의 변화를 관찰하였다. 투여용량은 500, 1000, 2000 mg/kg로 설정하였으며, 사망동물은 부검하여 SK3530의 표적기관을 확인하였다.

11.3. 랫드 4주 반복투여 독성시험

랫드에 1일 1회, 28일간 경구투여 독성시험을 실시하였으며, 용량은 10, 50, 200 mg/kg로 설정하였다. 약물투여후 사망, 생체증상, 체중, 사료섭취, 물섭취, 기관무게, 육안병리, 조직병리의 관찰, 검안, 혈액검사, 임상화학, 뇨분석을 수행하여 SK3530의 NOAEL 용량을 결정하였으며, 14일간의 휴약기 동안 독성의 가역성을 관찰하였다.

11.4. 비글견 4주 반복투여 독성시험

비글견에 1일 1회, 28일간 경구투여 독성시험을 실시하였으며, 용량은 5,

10, 20 mg/kg로 설정하였다. 약물투여후 사망, 생체증상, 체중, 사료섭취, 물섭취, 기관무게, 육안병리, 조직병리, 심전도, 혈액검사, 혈액화학, 뇨화학, 현미경상 뇨검사, 검안을 수행하여 SK3530의 NOAEL 용량을 결정하였으며, 14일간의 휴약기 동안 독성의 가역성을 관찰하였다.

11.5. 유전독성시험

복귀돌연변이시험은 5종의 균주 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, E. coli WP2 uvrA)에 대해 중복 AMES 한천배지법을 사용한 세균실험을 통해 복귀변이 집락 수를 계수하여 SK3530의 잠재적 돌연변이 유발성을 평가하였으며, 염색체 이상시험은 Chinese hamster 유래 폐선 유아세포의 세포분열을 중기에서 정지시킨 후 슬라이드를 만들어 절단, 재배열, 고복상체, 다배수체등과 같은 구조적, 숫적 염색체 이상을 관찰하여 SK3530의 잠재적 돌연변이 유발성을 평가하였다. 소핵시험은 마우스에 SK3530을 최고용량 1,400 mg/kg로 경구투여 후 대퇴골의 골수를 채취하여 도말표본을 만든 후 소핵화된 미성숙한 다염성의 적혈구수를 측정하여 SK3530의 유전독성 잠재성을 평가하였다.

11.6. 안전약리시험

11.6.1. 비글견에서 심혈관 및 호흡기에 미치는 영향 관찰 시험

마취시킨 비글견에 SK3530을 경구투여 후 1~2주 정도 간격을 두고 우측 대퇴동맥 에서 혈압을, tachometer를 사용하여 심박수를, Millar Micro-Tip catheter를 삽입하여 좌심실의 +dP/dtmax와 수축기압을 측정하고, 혈류량은 좌측 대퇴동맥에서 Doppler flowmeter로, electrocardiogram은 7P4H Grass ECG-amplifier를 사

용하여 측정해서 SK3530이 순환기 및 호흡기에 미치는 영향을 평가하였다.

11.6.2. Irwin 선별법

랫드에 SK3530을 투여한 후 시간별로 민첩성, 운동성 등의 행동 및 생리적 상태를 대조군과 비교하여 정도별로 점수를 매겨 관찰하였다. 또한 직장의 온도 및 자발적 운동성을 측정하였다.

11.6.3. 랫드에서의 호흡률 및 일호흡량 시험

수컷 랫드에 SK3530을 용량별로 경구투여 후 자유롭게 움직일 수 있는 chamber에 넣고 표준유속으로 순환하는 air가 chamber안을 지나도록 한 뒤 이 chamber를 컴퓨터에 연결하여 호흡률 및 일회 호흡량을 측정하였다.

12. SK3530의 임상 PK 연구

12.1. 일회 경구투여 후의 약물의 체내동태 평가

정상 성인 남성 16명을 대상으로 여러 용량 (25, 50, 100, 200, 400 mg)의 SK3530을 약 1주 간격으로 일회 경구투여한 후 각 시간대별로 혈액과 뇨를 채취하여 약물의 흡수, 대사, 분포 및 배설상의 특성을 파악하였다.

12.2. 반복 경구투여 후의 약물의 체내동태 평가

정상 성인 남성 36명을 대상으로 여러 용량 (75, 150, 200 mg)의 SK3530을 7일간 반복 경구투여한 후 각 시간대별로 혈액과 뇨를 채취하여 약물의 흡수, 대사, 분포 및 배설상의 특성을 일회 경구투여시의 결과와 비교하여 약물의

체내 축적 여부를 파악하였다.

III. 결과 및 고찰

발기부전치료제로 개발한 SK3530의 구조식은 다음과 같다.

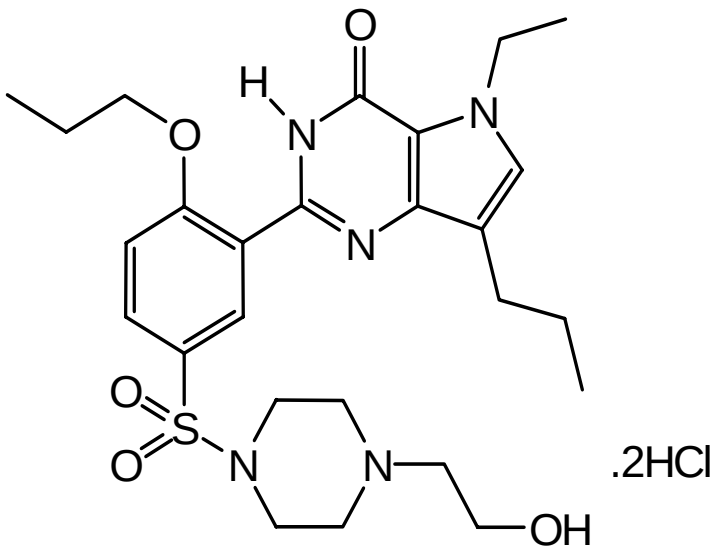


Figure 4. Chemical structure of SK3530

1. PDE5 저해효과 (enzyme assay)

경구용 발기부전증 치료제로 개발한 최종후보물질 SK3530의 PDE5에 대한 저해작용을 측정하기 위하여 토끼 혈소판 또는 사람의 음경 해면체 조직에서 PDE5를 분리하여 약물의 저해효과를 측정하였다. 같은 방법으로 토끼 혈소판 또는 사람의 음경 해면체 조직에서 PDE3, 소의 retina에서 PDE6를 분리한후 후보물질인 SK3530의 저해효과를 측정하였다. 시험약물별로 IC_{50}를 계산한 결과를 Table 7에 요약하였다.

Table 7. Inhibitory effect of SK3530 on PDE isozyme

Compound	IC_{50} (μM)				
	PDE1	PDE3	PDE5	PDE6	PDE11
SK 3530	16.4 (48,500)[a]	86.5 (256,000)	0.000338	0.0102 (30)	3.75 (11,095)
Sildenafil	0.281 (80)	16.2 (4,630)	0.0035	0.037 (11)	2.73 (780)
Tadalafil	>30 (>4,450)	>100 (>14,800)	0.00674	1.26 (187)	0.037 (5)
Vardenafil	0.070 (500)	>1.0 (>7,140)	0.00014	0.0035 (25)	0.162 (1,162)

[a] Selectivity ratio = IC_{50} for other PDEs/IC_{50} for PDE5

2. 개 음경해면체 내압에 미치는 영향 평가

체중 23-30 kg의 수컷 mongrel dog 5마리를 대상으로 SK3530이 개 음경해면체의 내압에 미치는 영향을 평가하였다. 동물당 2-4회의 control frequency-response curve를 작성하였고, 이후 시험약물을 1, 3, 10, 30, 100 μg/kg의 농도로 정맥 투여 10분 후, 각 Hz당 frequency-response curve 작성하였다 (Fig. 5).

대조약물인 sildenafil은 4 Hz 전기자극시 100 μg/kg 미만의 농도에서는 통계적으로 유의한 차를 보이지 않았다 ($P<0.05$). 반면 SK3530은 4 Hz 전기자극시 10, 100 μg/kg에서 모두 통계적으로 유의한 차를 보여, SK3530이 sildenafil에 비해 10배 정도 효능이 높은 것으로 판단된다 (Fig. 6).

Fig. 5. The effect of SK3530 on ICP increase induced by electrical stimulation at 1, 2, 4, 8, and 16 Hz frequencies in anesthetized dogs (n=4)

Fig. 6. The effect of SK3530 on ICP increase induced by electrical stimulation at 4 Hz frequency in anesthetized dogs (n=4). * $p<0.05$ versus control using Mann-Whitney Rank Test.

3. 생체시료 분석법 validation

3.1. 특이성 및 직선성

랫드 혈장 중 표준물질과 내부표준물질의 피크 위치에 영향을 줄만한 내인성 물질은 확인되지 않았다 (Fig. 7). 검량선 각 배치의 상관계수 (r)는 3가지 배치에서 모두 0.999 이상이었다. 검량선 최저 농도의 상대오차는 -4.9~-0.5% 였고, 검량선 최저 농도를 제외한 나머지 농도의 상대오차 범위는 -8.8~5.9% 였다 (Fig. 8).

3.2. 정밀성 및 정확성

QC 시료 (20, 200 및 1600 ng/ml)의 배치내 변동계수는 2.0~4.1% 였고, 배치간 변동계수는 3.1~8.0% 였다. 또한 QC 시료의 배치내 상대오차는 0.1~9.1% 였고, 배치간 상대오차는 6.0~10.4% 였다.

3.3. 최저정량한계

검량선 최저농도 (5 ng/ml)의 신호대 잡음비 (S/N ratio)는 126.3 이었고, 배치내 변동계수와 상대오차는 각각 6.1% 및 -7.7%, 배치간 변동계수와 상대오차는 9.7% 및 4.3%였다.

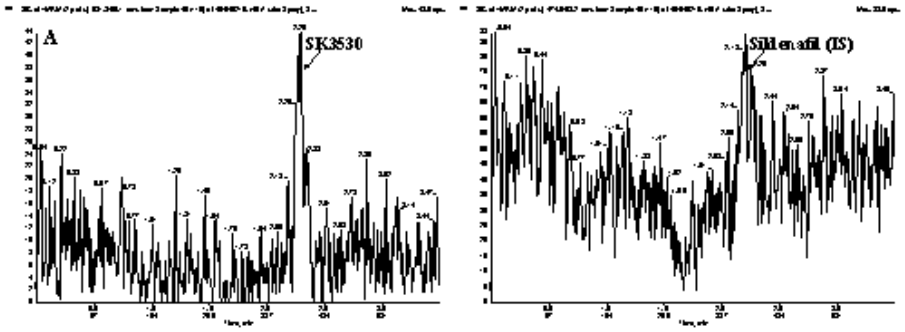
3.4. 희석의 영향

검량선 농도범위를 초과하는 표준시료 (10 μg/ml)를 랫드 공혈장으로 10배 희석한 표준시료(1 μg/ml)의 변동계수는 2.4%, 상대오차는 4.2%였다.

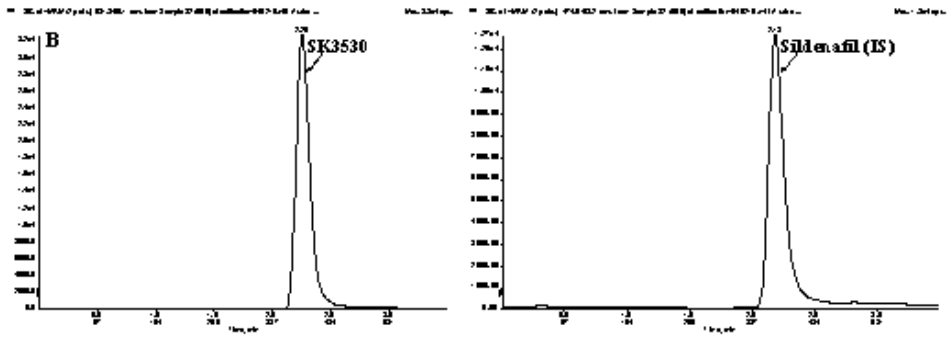
3.5. 실온 및 냉해동 안정성

QC 시료를 실온에서 4 시간 방치한 상대오차는 0.3~12.2% 이내였으며, QC 시료를 3 회 냉해동한 상대오차는 8.9~13.7% 이내였다.

(A) blank rat plasma



(B) plasma spiked with SK3530 (500 ng/ml)



(C) sample plasma

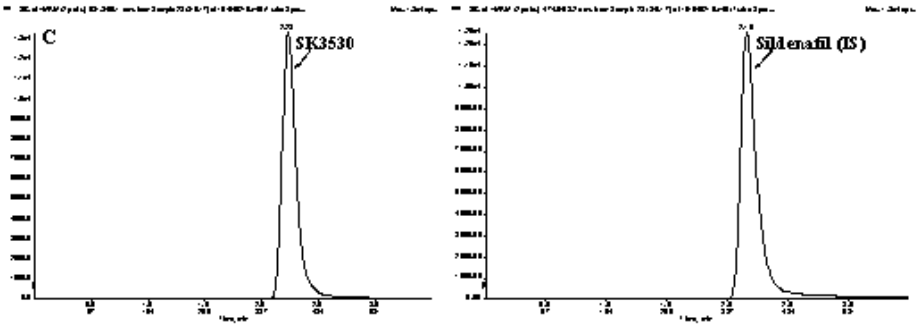


Fig. 7. Multiple reaction monitoring chromatograms of (A) blank rat plasma, and (B) plasma spiked with SK3530 (500 ng/ml), (C) sample plasma, and internal standard (100 ng/ml)

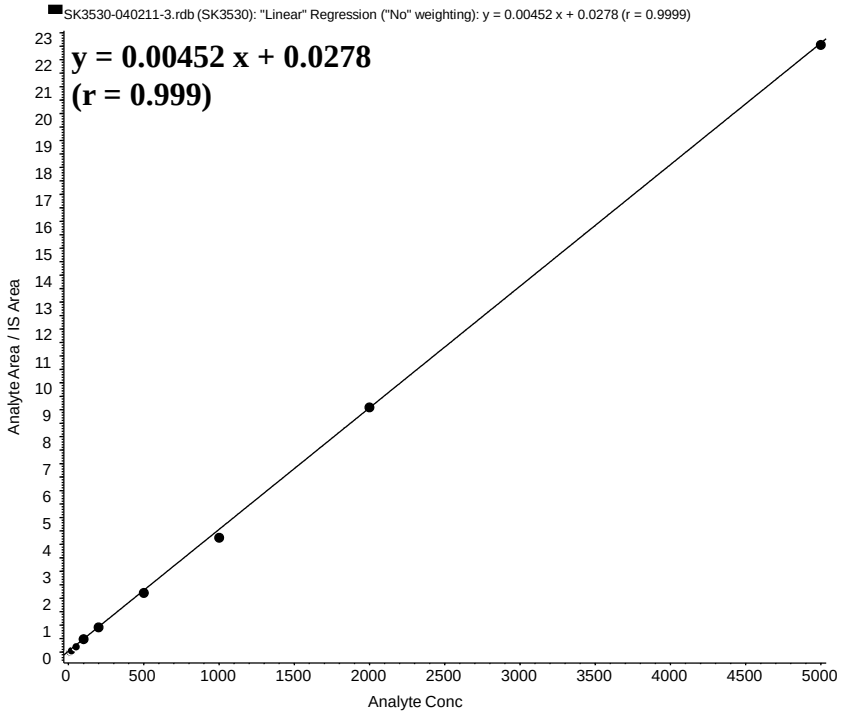


Fig. 8. Calibration curve of SK3530 in rat plasma generated by using LC/MS/MS

4. 생체이용률 평가

4.1. 정맥투여 PK

SK3530을 5 mg/kg 용량으로 정맥투여 후 혈중농도는 LC/MS/MS를 이용하여 분석하였다. 혈장내 SK3530은 532 > 99, 그리고 내부 표준물질인 sildenafil은 475 > 58 transition을 이용한 MRM 방법으로 정량하였다. SK3530의 pharmacokinetic parameter는 Table 8에 나타내었다.

SK3530은 정맥 투여 후 매우 짧은 distributional phase를 거쳐 신속히 혈중에서 소실되었으며 terminal pahse 반감기는 0.37시간으로 매우 짧았으며, 혈중 클리어런스는 102.6 mL/min/kg로 계산되었다. SK3530은 평균 혈중 농도를 비교시 total radioactivity의 농도에 비하여 현저히 낮은 농도를 보여 주었으며 total AUC에 비해 약 17% 정도로 나타나 정맥으로 투여된 SK3530은 대사에 의하여 소실됨을 보여주었다 (Fig. 9).

Table 8. Pharmacokinetic parameters of SK3530 after single i.v. injection of SK3530 at a dose of 5 mg/kg to rats

Parameter	SK3530
AUC (ng . hr/mL)	816.9±116.0
$T_{\alpha 1/2}$ (hr)	0.01±0.01
$T_{\beta 1/2}$ (hr)	0.37±0.10
Cl (mL/min/kg)	102.6±14.7
MRT (hr)	0.48±0.05
Vdss (L/kg)	3.15±0.66

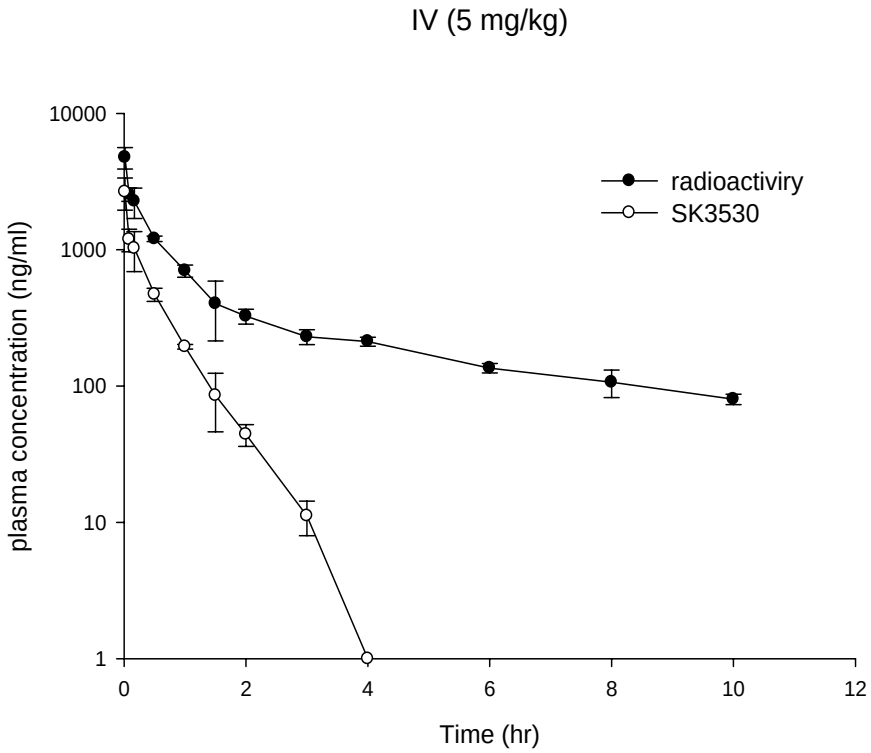


Fig. 9. Plasma concentration of total radioactivity and SK3530 after i.v. injection of SK3530 at a dose of 5 mg/kg to rats

4.2. 경구투여 PK

SK3530을 10, 20, 그리고 40 mg/kg 용량으로 경구 투여한 후 LC/MS/MS로 정량하여 얻은 pharmacokinetic paramenter는 Table 9에 나타내었다. 최대혈중 농도를 나타내는 시간은 1.2-1.7시간으로 나타났으며 이때 최고 혈중 농도는 10, 20, 그리고 40 mg/kg 용량에서 각각 220, 390, 그리고 756 ng/ml로 농도 의존적으로 증가함을 보여주었다. AUC 값은 용량이 증가에 따라 용량 비율보다 더 높게 증가함을 보여주었으며, 이는 고용량에서 대사 saturation에 의한 것으로 추정된다. 전신 클리어런스를 살펴보면 10 mg/kg 용량에서는 407 ml/min/kg로 매우 높은 클리어러스를 보이다가 용량이 증가 할수록 감소하여 40 mg/kg 용량에서는 235 ml/min/kg로 현저히 감소하였다. 평균 머무름 시간도 용량이 증가함에 따라 1.8시간에서 3.0시간으로 증가함을 보여주고 있다. 정맥 주사시 계산된 AUC를 이용하여 SK3530의 생체이용율을 계산하여보면 10 mg/kg, 20 mg/kg, 그리고 40 mg/kg 용량에서 각각 24.1%, 30.1, 그리고 43.4%로 계산되었다.

Table 9. Pharmacokinetic parameters of SK3530 after single oral administration of SK3530

	10 mg/kg	20 mg/kg	40 mg/kg
AUC (ng . hr/mL)	393.0±114.7	982.0±257.8	2835.9±443.5
Tmax (hr)	1.2±0.3	1.5±0.5	1.7±0.3
Cmax (ng/mL)	220.5±65.9	390.1±90.2	756.6±137.1
$T\lambda_{1/2}$ (hr)	1.8±1.0	1.7±0.6	1.7±0.5
Cl/F (mL/min/kg)	407.6±107.8	355.9±108.8	235.4±33.2
MRT (hr)	1.8±0.7	2.3±0.4	3.0±0.3
Vd/F (L/kg)	62.0±31.6	51.9±17.4	36.6±15.5
Bioavailability (%)	24.1	30.1	43.4

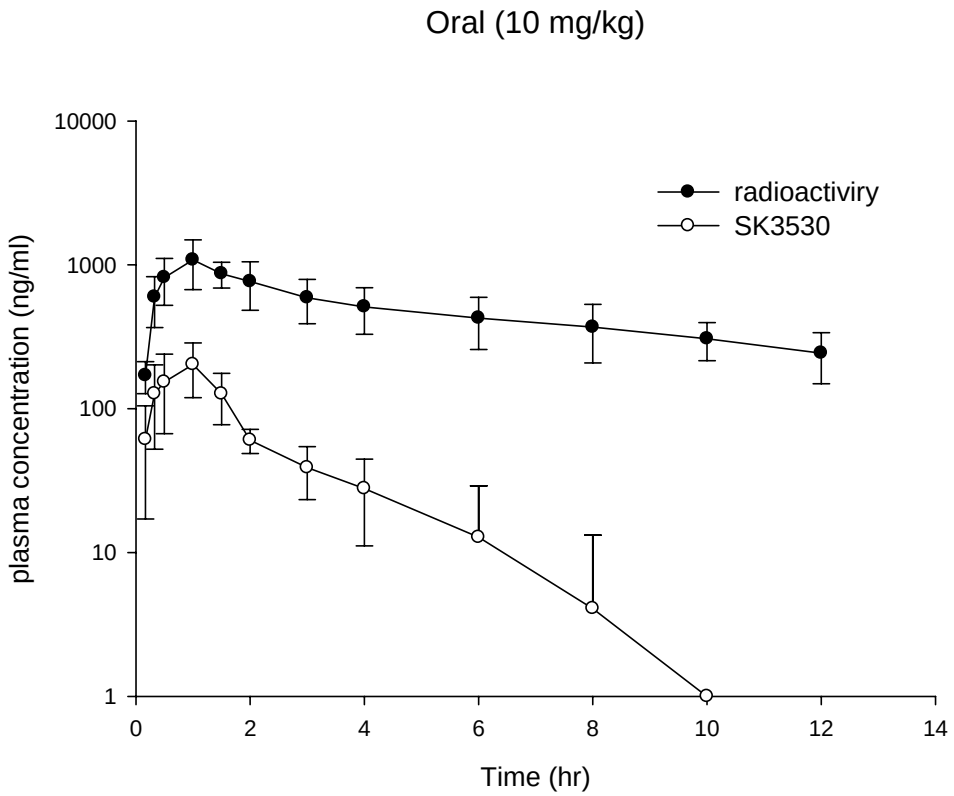


Fig. 10. Plasma concentration of total radioactivity and parent SK3530 after oral administration of SK3530 at a dose of 10 mg/kg to rats

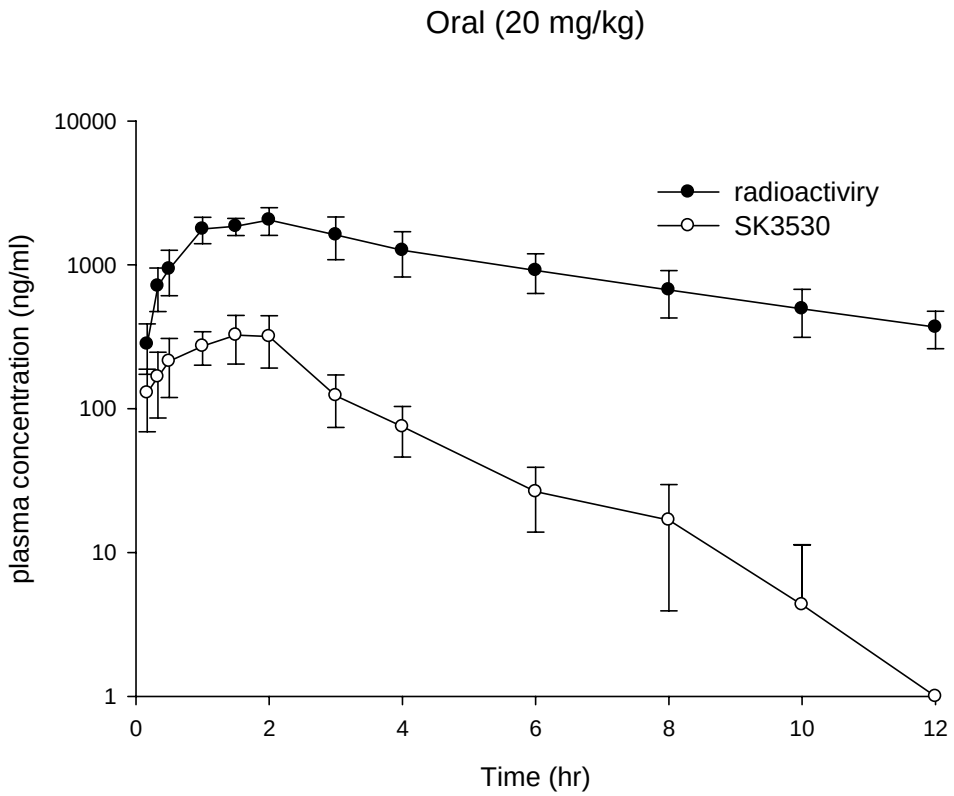


Fig. 11. Plasma concentration of total radioactivity and parent SK3530 after oral administration of SK3530 at a dose of 20 mg/kg to rats

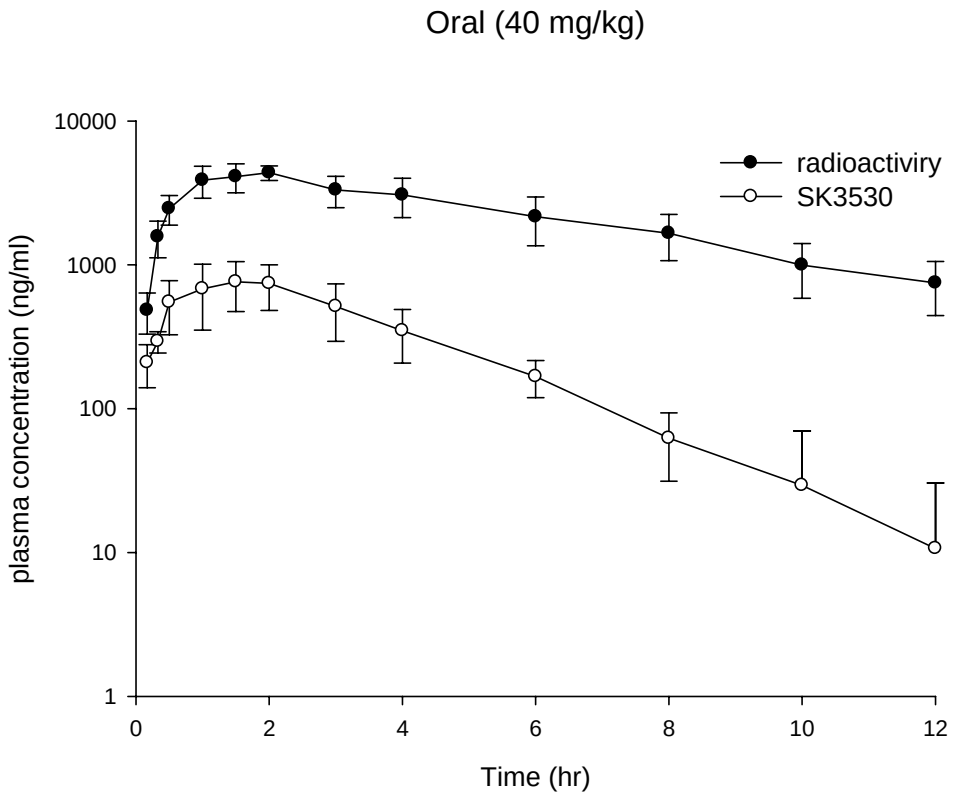


Fig. 12. Plasma concentration of total radioactivity and parent SK3530 after oral administration of SK3530 at a dose of 40 mg/kg to rats

5. 조직분포 연구

5.1. 조직 분포

SK3530을 각 그룹 당 6-7마리씩 나눠 40 mg/kg 용량으로 경구 투여하였으며, 투여 후 1시간, 4시간, 그리고 24시간 시점에서의 혈장내 농도와 조직내의 농도를 측정하였으며, 그 결과는 Fig. 13에 나타내었다. 투여 1시간 후 조직 분포를 살펴보면 혈류량이 많은 liver, heart, kidney, lung, spleen, 그리고 adrenal의 약물 농도는 혈장내 농도보다 높았으며 특히 대사 및 배설 기관인 liver의 경우 tissue/plasma 비가 14.2로 나타났다.

투여 4시간 경과 시점에서의 조직분포는 투여 1시간 시점과 비교하여 혈장 농도와 조직내에서의 농도 변화는 미미한 감소를 보여주고 있다. Stomach과 intestine에서의 약물 농도는 투여 1시간 시점과 비교하여 그 양이 1/3-1/4로 감소하여 대부분의 약물이 체내로 이행되었음을 보여주고 있으며, 주 대사기관인 liver에서의 농도도 약 30%정도 감소하였다.

투여 24시간 경과 시점에서의 조직분포를 살펴보면 대부분의 조직에서의 약물 농도는 혈장 내 약물 농도와 유사하게 나타났다. 투여 24시간 경과 시점에서 대장 내 약물 농도는 매우 높으며 이 시점까지 배설이 진행되고 있음을 보여주었다.

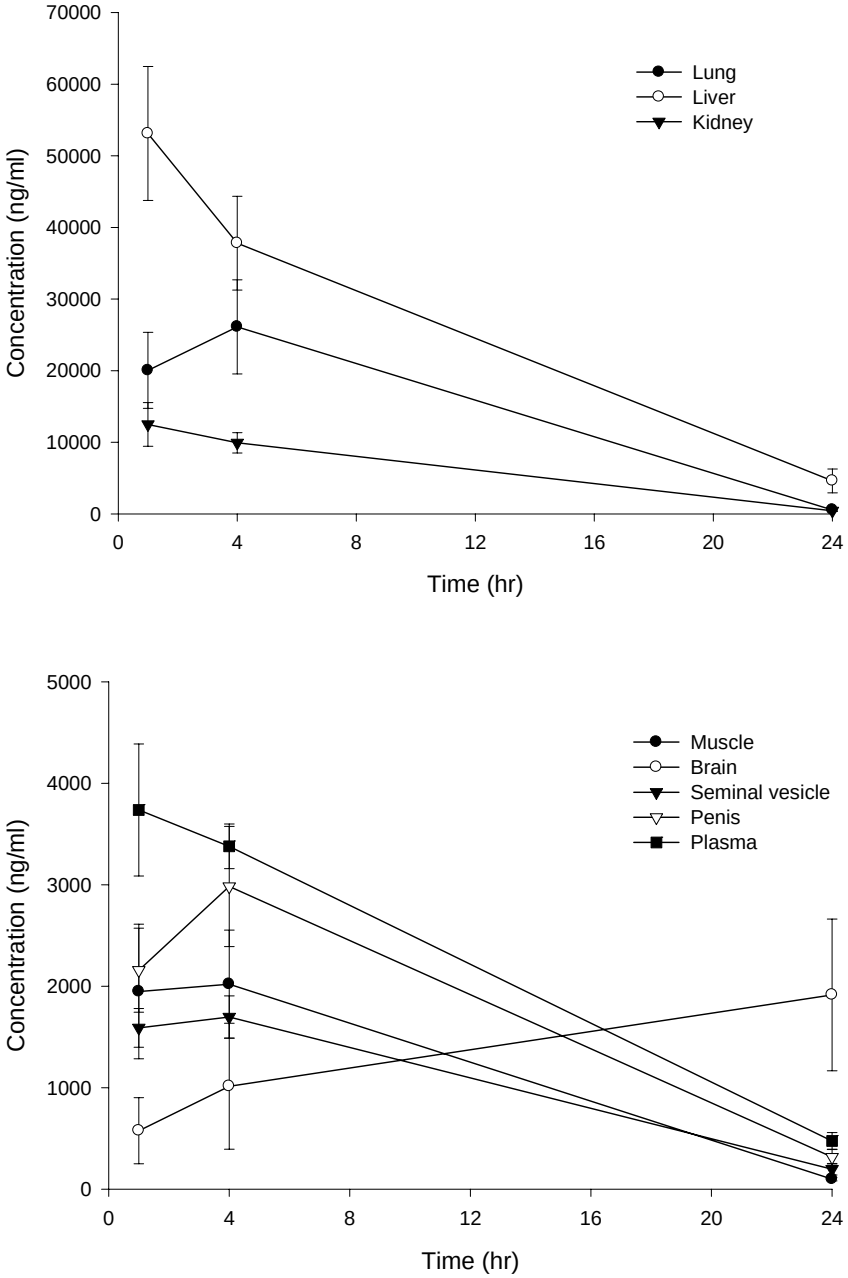


Fig. 13. Time-dependent decrease of total radioactivity in organs and tissues after oral administration of SK3530 at a dose of 40 mg/kg to male rats

5.2. 단백 결합

랫드와 human plasma를 이용한 *in vitro* 단백결합 시험은 SK3530을 1-100 μM 농도로 처리 후 ultrafiltration 방법을 이용하여 측정하였다. SK3530의 혈장 단백 결합율은 랫드와 human plasma에서 모두 97.5% 이상으로 혈장 단백에 대한 affinity가 상당히 높은 것으로 나타났으며 종간 차이는 보이지 않았다 (Table 10). 또한, 약물 농도에 따른 단백 결합율의 차이는 보여주지 않았다.

Table 10. *In vitro* protein binding of SK3530 in human and rat plasma

Concentration (μM)	% of binding [a]	
	human	rat
1	99.0 ± 0.5	98.0 ± 0.7
5	99.1 ± 0.1	98.3 ± 0.2
50	98.8 ± 0.1	98.0 ± 0.0
100	98.4 ± 0.3	97.5 ± 0.1

[a] Each data represents the mean±SE

6. 대사안정성 연구

6.1. 랫드 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성

랫드 간 microsomes에서 SK3530의 대사안정성이 sildenafil보다 우수하였다 (Table 11). 랫드 간 microsomes에서 SK3530의 대사 (60분 반응 후 43% 남음)는 sildenafil (60분 반응후 거의 남아있지 않음)의 대사보다 적게 일어났고, sildenfail은 랫드 간 microsomes에서 SK3530에 비하여 대사를 많이 받음을 확인하였다. 이는 랫드에 sildenafil과 SK3530을 경구 투여후 얻은 각 약물의 혈중농도의 결과와 일치한다.

Table 11. Metabolic stability of SK3530 and sildenafil in rat liver microsomes

Incubation time (min)	% of drug remained after incubation of drug in rat liver microsomes with NADPH	
	SK3530	sildenafil
0	100.0	100.0
5	77.3	65.5
10	63.3	43.2
20	53.8	15.6
40	47.8	1.9
60	43.4	0.6

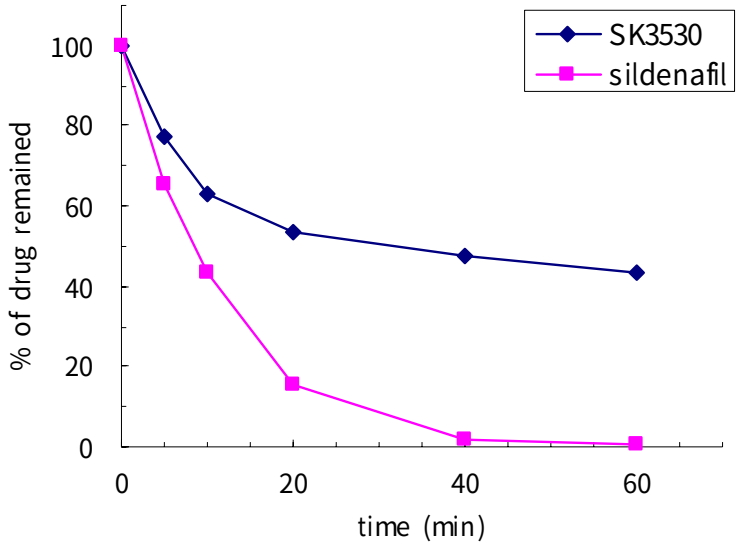


Fig. 14. Metabolic stability of SK3530 and sildenafil in rat liver microsomes. Each drug (10 μM) was incubated with rat liver microsomes (1 mg/ml) in the presence of NADPH at 37℃.

6.2. 사람 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성

사람 간 microsomes에서 SK3530의 대사 안정성은 sildenafil과 비슷하였다 (Table 12). 사람 간 microsomes에서의 SK3530의 대사율은 60분 반응 후 43.5%가 남았다.

Table 12. Metabolic stability of SK3530 and sildenafil in human liver microsomes.

Incubation time (min)	% of drug remained after incubation of drug in human liver microsomes with NADPH	
	SK3530	sildenafil
0	100.0	100.0
5	68.3	87.5
10	59.4	72.9
20	51.6	63.6
40	49.3	57.9
60	43.5	54.8

6.3. 사람 microsome에서 SK3530의 대사 isozyme 규명

사람 cDNA-expressed CYPs 1A1, 1A2, 2A6, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4에서 SK3530 2 및 80 μM의 SK3541로의 대사를 측정한 결과는 Table 13에 나타내었다. SK3530이 SK3541로 대사되는데 CYP3A4와 CYP3A5가 주로 관여하고, CYP2C8과 2D6는 약간 관여하는 것으로 보인다.

Table 13. The formation rates of SK3541 from SK3530 in human cDNA-expressed CYPs

Human CYPs	Metabolite formation (pmol/pmol CYP/min)	
	2 μM	80 μM
CYP1A1	N.D.	0.12
CYP1A2	N.D.	0.15
CYP2A6	N.D.	0.13
CYP2B6	N.D.	0.15
CYP2C8	0.032	0.45
CYP2C9	N.D.	0.14
CYP2C19	N.D.	0.35
CYP2D6	0.039	2.43
CYP3A4	1.21	21.8
CYP3A5	1.46	-

N.D.: not detected (<0.025 pmol/pmol CYP/min)

7. Cytochrome P450 연구

7.1. Cytochrome P450 효소에 미치는 영향

SK3530이 약물 대사에 관여하는 cytochrome P450 효소에 미치는 영향을 규명하기 위하여 총 cytochrome P450 양과 각 isozyme에 대한 단백질 발현 정도를 측정하였다. SK3530을 일주일간 투여한 후 간을 적출하고 마이크로좀을 제조하여 cytochrome P450 양을 측정하였다. SK3530은 투여 용량 모두에서 대조군에 비하여 통계적 유의성 있는 변화가 관찰되지 않았다 (Table 14).

SK3530이 CYP isozyme 발현에 미치는 영향을 검증하기 위하여, CYP 각 isozyme에 specific한 항체를 이용하여 SK3530을 처리한 microsome에서의 단백질의 발현 정도를 측정하였다. Fig. 15에서 나타낸 바와 같이 SK3530은 1주일간 경구 투여 시 최고 투여 용량에서까지 CYP1A1/2, CYP3A1/2, CYP2B1/2, CYP2C, CYP2E1, 그리고 CYP4A1 isozyme의 발현 양에 유의성 있는 변화를 보여주지 않았다.

이러한 결과로 볼 때, SK3530은 cytochrome P450 효소 단백질 발현에 어떠한 영향도 미치지 않는다는 것을 시사한다.

Table 14. Total P450 amount of SK3530 treated male rat liver microsome

	total P450 (nmol/mg protein)
control	0.47 ± 0.14
SK3530 0.5 mg/kg	0.45 ± 0.09
SK3530 2 mg/kg	0.40 ± 0.06
SK3530 10 mg/kg	0.41 ± 0.16

* SK3530 was orally administered for 7 consecutive days.

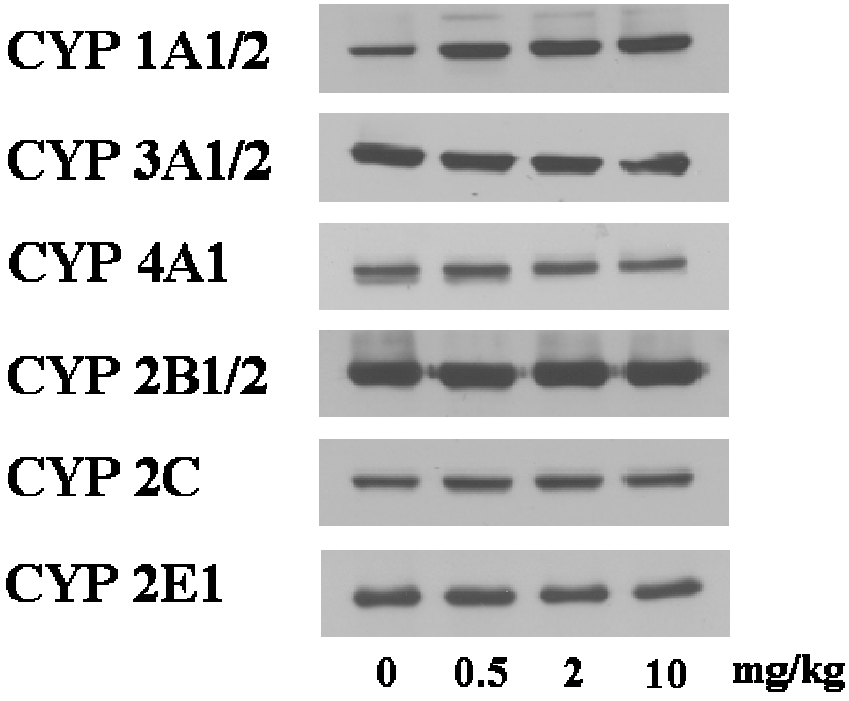


Fig. 15. Western blot analysis of CYP isozymes in rat liver microsomes

7.2. Human liver microsomes에서 CYP효소 활성 억제

SK3530이 *in vitro* human CYP 효소 활성에 미치는 영향을 검증하기 위하여 human liver microsome에 SK3530을 처리한 후 각 CYP isozyme에 특이적으로 대사되는 marker substrate의 활성을 측정하였다. CYP isozyme specific substrate는 잘 알려진 isozyme specific substrate를 사용하였으며, 각각의 대사체는 LC/MS/MS를 이용하여 정량하였다. 본 시험에 사용된 방법의 적정성을 검증하기 위하여, 잘 알려진 selective inhibitor를 처리하여 특정 효소만 선택적으로 억제되는지를 분석하였다. 사용한 selective inhibitor는 CYP1A2 억제제 furafylline, CYP2C9 억제제 sulfaphenazole, CYP2D6 억제제 quinidine, 그리고 CYP3A4 억제제인 ketoconazole을 각각 처리하여 분석하였으며, 그 결과를 Table 15에 나타내었다.

SK3530을 0.1에서 30 μM 농도로 처리한 후 7가지 isozyme 활성을 측정하여 대조군의 활성과 비교하여 저해효과를 검증하였다. Table 16에 나타낸바와 같이 SK3530은 CYP3A4와 CYP2C9 활성을 고농도에서 일부 억제하는 것으로 판명되었으며 나머지 CYP 효소에 대하여서는 IC_{50} 값이 30 μM 이상으로 추정되어 억제 효과가 없다고 판단된다. CYP3A4와 CYP2C9의 활성 억제는 *in vivo* 에서 일부 약물상호작용 가능성을 보여주나 동물 PK 시험을 바탕으로 한 임상시험시 최고 혈중농도를 추정하였을 때 (2-3 μM) 임상적 치료농도구간에서 병용약물과 상호작용할 가능성은 희박하다고 판단된다.

Table 15. Effects of CYP isozyme selective inhibitors on the activities of CYP marker activities in pooled human liver microsomes

Inhibitor (μM)	Activities of CYP isozyme (% of control)					
	CYP1A2	CYP2A6	CYP3A4	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6
Furafylline	16.4	79.4	114.0	122.8	87.6	86.6
Ketoconazole	68.8	84.4	3.5	52.0	64.0	80.3
Quinidine	80.7	49.4	71.6	71.1	82.3	0.6
Sulfaphenazole	77.1	75.4	86.3	105.7	2.9	86.4

Table 16. Effects of the SK3530 on CYP isozyme specific marker activities in pooled human liver microsomes

SK3530 (μM)	Activities of CYP isozyme (% of control)					
	CYP1A2	CYP2A6	CYP3A4	CYP2C8	CYP2C9	CYP2D6
0.1	95.2	86.7	101.4	101.7	93.1	96.3
0.3	104.6	105.1	97.8	88.4	107.8	96.7
1.0	106.9	110.0	98.3	104.0	90.2	103.9
3.0	106.2	106.7	88.9	83.8	116.3	111.0
10	85.5	79.8	48.9	97.9	69.2	83.3
30	91.6	92.4	39.7	91.8	52.0	67.9

8. 대사체 연구

Liver microsome을 이용한 *in vitro* 시험에서 SK3530은 NADPH generating system 존재하에서 human과 랫드 microsome 모두에서 10여개의 대사체로 대사되었다 (Fig. 16). 랫드와 human microsome에서의 metabolic profile은 유사하게 나타났으며 두 실험에서 모두 N-dealkylated 대사체인 M14가 major 대사체(SK3541)로 검출되었다. M13과 M16은 랫드 microsome에서만 검출되었으며, human microsome에서는 나타나지 않았다.

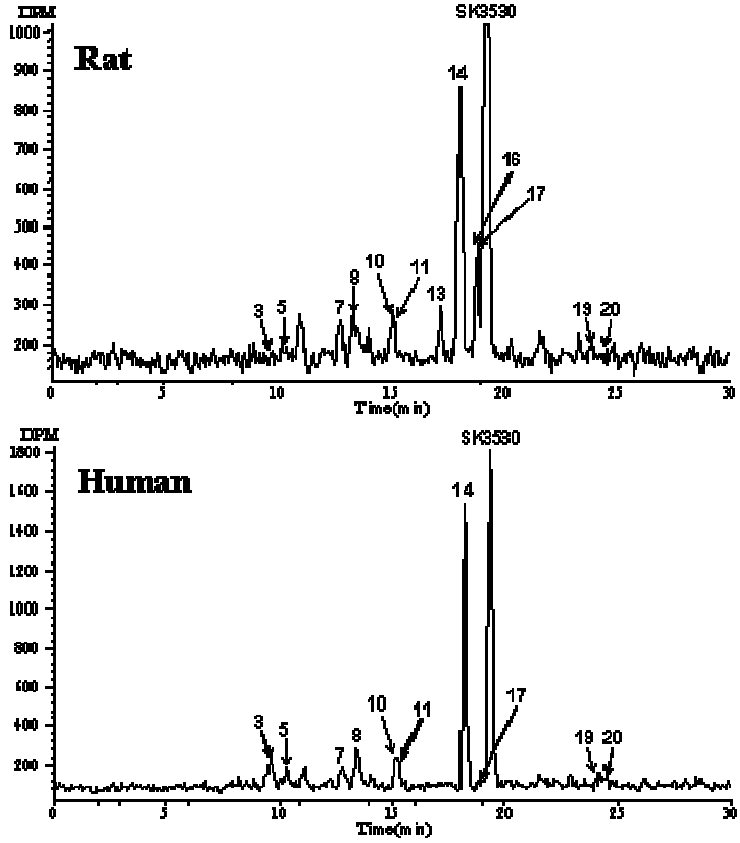


Fig. 16. Representative radiochromatograms obtained from rat and human liver microsomal incubations of SK3530

9. 배설 연구

SK3530을 40 mg/kg 용량으로 경구 투여하고 urine 및 feces로 배설되는 radioactivity를 일주일간 측정하였다. 랫드에서 약물 투여 일주일까지 urine과 bile로 배설된 총 radioactivity는 약 92.3%가 회수되었으며 따라서 투여 약물은 대부분 이 두 경로를 통하여 배설됨을 보여주었다. 각 배설 경로로 배설되는 radioactivity양을 보면 urine으로 약 1.1%, 그리고 feces로 약 91.3%가 배설되었고 대부분의 약물은 투여 2일 이내에 신속히 배설됨을 보여 주었다.

담즙으로의 배설을 측정하기 위하여 SK3530을 40 mg/kg 용량으로 경구 투여하고 초기 12시간 동안은 담즙을 매 시간별로 담즙을 채취하여 radioactivity를 측정하였다. 담즙으로 분비되는 radioactivity는 투여 1시간이내에서 최고 배설속도를 보여주었으며 이후 배설 속도는 조금씩 감소하며 투여 24시간 시점까지 총 투여량의 38.8%가 담즙내로 배설되었다 (Fig. 17). Feces 내의 radioactivity를 분석한 결과에서도 parent SK3530은 총 radioactivity의 약 4.6%만을 나타내 SK3530은 체내로 흡수된 대부분의 약물이 담즙으로 배설됨을 보여주었다.

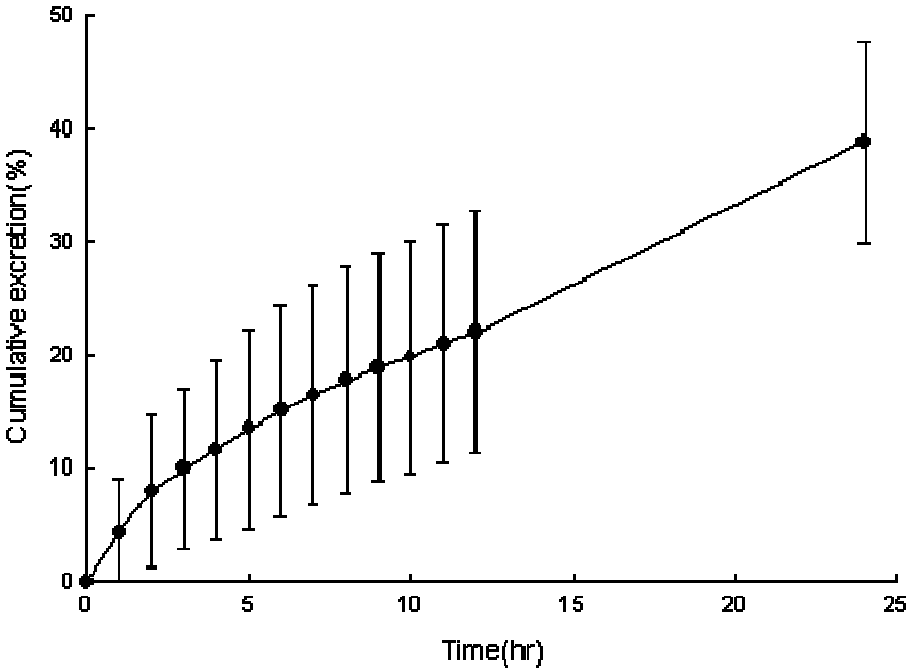


Fig. 17. Biliary excretion of the radioactivity after oral administration of 40 mg ^{14}C-SK3530/kg to rats.

10. SK3530의 독성시험 연구

10.1. 랫드 단회투여 급성독성시험

SK3530에 대하여 Sprague-Dawley (SD) 계통 암수 랫드에 단회 경구 투여하여 급성 독성 시험을 실시하였다. 시험물질을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 용량으로, 군당 10 마리 (암수 각 5 마리)에 단회 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 14일간 관찰하여 부형제대조군과 비교하였으며 그 결과 실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다. 체중변화 관찰 결과, 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 부검소견 관찰 결과 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, SK3530을 Sprague-Dawley (SD) 계통의 암수 랫드에 단회 경구 투여하였을 때, 본 시험물질의 최소치사량 (MLD: Minimum Lethal Dose)은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

10.2. 마우스 단회투여 급성독성시험

SK3530에 대하여 암수 마우스에 단회 경구 투여하여 급성 독성 시험을 실시하였다. 시험물질을 500, 1,000 및 2,000 mg/kg의 용량으로, 군당 10 마리 (암수 각 5 마리)에 단회 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중 및 부검소견을 14일간 관찰하여 부형제대조군과 비교하였으며 그 결과 실험기간 중 사망동물은 관찰되지 않았다. 체중변화 관찰 결과, 유의한 변화는 관찰되지 않았으며, 부검소견 관찰 결과 육안적 이상소견은 관찰되지 않았다.

이상의 결과로 보아, SK3530을 암수 마우스에 단회 경구 투여하였을 때, 본 시험물질의 최소치사량 (MLD: Minimum Lethal Dose)은 암수 모두 2,000 mg/kg을 상회하는 것으로 판단된다.

10.3. 랫드 4주 반복투여 독성시험

본 시험은 SK3530을 Sprague-Dawley 계통의 랫드에 4 주간 반복 경구 투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하며, 2 주간의 회복기간을 두어 회복성을 알아보고자 수행하였다. 시험물질을 10, 50 및 200 mg/kg/day의 용량으로 군당 암수 각각 10 마리 (회복군은 15 마리)에 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리학적인 소견을 관찰한 결과 실험기간 동안 시험물질의 투여와 관련된 일반증상의 이상이나 사망동물은 없었다. 육안적인 부검소견 및 조직병리학적 검사결과, 시험물질의 투여와 관련된 이상소견은 없었다. 하지만 50 mg/kg 이상 시험군에서 간중량 증가 및 간세포 비대가 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, SK3530을 Sprague-Dawley (SD) 계통의 암수 랫드에 4 주간 반복 경구 투여하였을 때, 본 시험 조건하에서 본 시험물질의 무독성량 (NOAEL)은 암수 모두 10 mg/kg/day로 판단하였다.

10.4. 비글견 4주 반복투여 독성시험

본 시험은 SK3530을 비글견에 4 주간 반복 경구 투여하였을 때 나타나는 독성을 조사하며, 2 주간의 회복기간을 두어 회복성을 알아보고자 수행하였다. 시험물질을 5, 10 및 20 mg/kg/day의 용량으로 투여한 후 사망률, 일반증상, 체중변화, 사료 및 물 섭취량, 안검사, 요검사, 혈액학 및 혈액생화학적 검사, 장기중량, 부검소견 및 조직병리학적인 소견을 관찰한 결과 실험기간 동안 시험물질의 투여와 관련된 일반증상의 이상이나 사망동물은 없었다. 육안적인 부

검소견 및 조직병리학적 검사결과, 시험물질의 투여와 관련된 이상소견은 없었다.

따라서, SK3530을 비글견에 4 주간 반복 경구 투여하였을 때, 본 시험 조건하에서 본 시험물질의 무독성량 (NOAEL)은 20 mg/kg/day로 판단하였다.

10.5. 유전독성시험

5종의 균주 (TA98, TA100, TA1535, TA1537, E. coli WP2 uvrA)에 대한 복귀돌연변이시험 결과, S-9 존재 여부에 상관없이 5,000 μg/plate까지 돌연변이를 일으키지 않았으며, human lymphocyte를 이용한 염색체 시험에서는 S-9 존재 여부에 상관없이 세포독성을 나타내는 농도까지 염색체이상 일으키지 않았다. 소핵시험에서는 1,400 mg/kg/day까지 랫드의 골수 다염성적혈구의 소핵화를 유도하지 않았다.

10.6. 일반약리시험

10.6.1. 중추신경계에 미치는 영향

최고 용량 225 mg/kg에서 pentobarbital sodium에 의한 수면유도 시간을 연장하였으나, 자발운동에 미치는 영향은 없었다. Acetic acid로 유발한 writhing 진통작용 및 hot-plate로 유발한 licking 진통작용에 미치는 영향은 없었다. 항경련작용과 motor coordination에 미치는 영향은 없었다.

10.6.2. 소화기계에 미치는 영향

장내 이동에 미치는 영향은 없었으나, 25, 75 mg/kg에서 뇨량이 감소하고

225 mg/kg에서 뇨 배설이 없음을 확인하였다. 이는 SK3530의 약효인 지속적 발기가 원인인 것으로 판단된다.

10.6.3. 자율신경계에 미치는 영향

기니픽 적출회장 평활근 수축이완에 미치는 영향을 평가하였으며 (10^{-7}, 10^{-6}, 10^{-5} mol/L), 실험 결과 SK3530과 관련된 직접적 수축, 이완작용은 나타내지 않았으나 histamine 및 $BaCl_2$에 의해 유발된 수축은 10^{-5} mol/L에서 수축을 일으켰다.

10.6.4. 심혈관 및 호흡기에 미치는 영향

마취시킨 비글견에 SK3530을 경구투여 후 1~2주 정도 간격을 두고 순환기 및 호흡기에 미치는 영향을 평가한 결과, 어떠한 영향도 일으키지 않았다.

10.6.5. Irwin 선별법

랫드에 SK3530을 투여한 후 시간별로 민첩성, 운동성 등의 행동 및 생리적 상태를 대조군과 비교한 결과, 랫드의 행동 및 생리에 어떠한 변화도 일으키지 않았다.

11. SK3530의 임상 PK 연구

11.1. 일회 경구투여 후의 약물의 체내동태 평가

정상 성인 남성 16명을 대상으로 여러 용량 (25, 50, 100, 200, 400 mg)의 SK3530을 약 1주 간격으로 일회 경구투여한 결과, 단회 경구투여시 400 mg까지 안전하였으나 400 mg에서 부작용 발현 빈도 및 강도 증가하였다. 따라서 단회 경구투여시 사용 가능 최대 용량은 200 mg으로 예상되었다. 시간대별로 혈액과 뇨를 채취하여 약물의 체내동태를 살펴보았으며, Table 17과 같은 PK profile을 보여주었다.

Table 17. Summary of the Pharmacokinetic Parameters of SK3530 Following Single Oral Doses

	Dose of SK3530				
Parameter	25 mg (N=6)	50 mg (N=6)	100 mg (N=6)	200 mg (N=6)	400 mg (N=6)
$AUC_{(0-tz)}$ (ng.h/mL)	121 (70.5)	264 (80.3)	959 (28.3)	1925 (63.6)	4807 (37.4)
$AUC_{(0-\infty)}$ (ng.h/mL)	NC	674 (167)	1140 (31.3)	1941 (67.0)	5349 (35.6)
Cmax (ng/mL)	74.3 (80.5)	177 (52.2)	481 (36.1)	701 (42.0)	1761 (60.6)
Tmax (h)	0.500	0.500	0.500	1.00	0.508
$T_{1/2}$ (h)	NC	2.79	1.57	1.03	1.95
CL/F (mL/min)	NC	1236 (167)	1463 (31.3)	1717 (67.0)	1246 (35.6)

Geometric mean (CV%) data are presented

N = Number of subjects studied

NC = Not calculated

11.2. 반복 경구투여 후의 약물의 체내동태 평가

정상 성인 남성 36명을 대상으로 여러 용량 (75, 150, 200 mg)의 SK3530을 7일간 반복 경구투여한 결과, 200 mg까지 안전하였으나 부작용 발현 빈도 및 강도는 증가하는 경향을 보여주었다. 따라서 7일 연속 경구투여시 사용 가능 최대 용량은 150 mg으로 예상되었다. 또한 비아그라와 레비트라에서 나타난 색각 식별 장애는 관찰되지 않았다. 시간대별로 혈액과 뇨를 채취하여 약물의 체내동태를 살펴보았으며, Table 18과 같은 PK profile을 보여주었고, 반복투여에 의한 체내 축적성을 보여주지 않았다.

Table 18. Summary of the Pharmacokinetic Parameters of SK3530 Following Multiple Oral Doses

Parameter	Dose of SK3530					
	75 mg		150 mg		200 mg	
	Day 1 (N=6)	Day 7 (N=6)	Day 1 (N=6)	Day 7 (N=6)	Day 1 (N=6)	Day 7 (N=6)
$AUC_{(0-\tau)}$ (ng.h/mL)	616 (15.3)	525 (46.6)	2552 (40.5)	2315 (54.9)	2603 (21.2)	1986 (42.6)
$AUC_{(0-\infty)}$ (ng.h/mL)	616 (15.3)	NC	2553 (40.5)	NC	2604 (21.2)	NC
Cmax (ng/mL)	217 (50.9)	234 (68.0)	1108 (38.3)	991 (49.9)	1062 (37.9)	872 (27.4)
Tmax (h)	0.500	0.767	0.533	1.00	0.500	0.500
$T_{1/2}$ (h)	1.57	1.39	1.25	1.17	1.35	1.24
CL/F (mL/min)	2029 (15.3)	2381 (46.6)	979 (40.5)	1080 (54.9)	1280 (21.2)	1679 (42.6)

Geometric mean (CV%) data are presented

N= Number of subjects studied

NC = Not calculated

IV. 결론

최근 허가되어 시판되고 있는 PDE5 저해제들이 다른 기전의 약물들보다 여러면에서 비교우위를 보이고 있으나, 부작용과 약효 발현시간에 있어서의 지연성이 약물의 사용을 제한하는 요소가 되고 있다. SK케미칼에서는 이러한 단점을 극복한 SK3530을 개발하였으며, 약리학, 약동학, 그리고 독성 연구를 통해 기존약물보다 유효성 및 유용성은 증가하였으며, 안전성은 우수함을 입증하였다.

SK3530은 PDE isozyme을 통한 *in vitro* 실험, 개 음경 해면체 내압에 미치는 영향 평가를 통한 약효실험을 통하여 비아그라보다 효능은 크고 부작용은 보다 작다는 결과를 보여주었다. SK3530을 이용하여 흡수, 분포, 대사, 및 배설에 관한 시험을 수행하였으며, SK3530은 경구투여시 위장관으로부터 신속히 흡수되어 투여후 1.2-1.7시간에 최대혈중농도를 보여주었고, 반감기는 약 1.7-1.8시간으로 나타났다. AUC와 Cmax는 10-40 mg/kg 용량에서 투여 용량에 비례하나 용량증가에 비하여 높은 비율로 증가하였으며, 이는 대사 효소의 saturation에 기인되었다고 사료된다. 경구투여시 생체 이용율은 약 24-43% 정도로 계산되었다.

SK3530을 경구 투여 후 1시간과 4시간 시점에서의 조직 분포는 유사하였으며, GI tract을 제외한 대부분의 조직에서는 tissue/plasma 비가 0.5-2.6 정도로 분포하였다. 뇌에서의 머무름 시간은 상대적으로 길었다. 투여 4시간에서 24시간 까지 조직에서의 약물농도의 감소 양상은 혈장 농도 감소 양상과 유사하였다. 단백 결합은 랫드와 human plasma 모두 98% 이상으로

나타나 SK3530이나 대사체 모두 혈장 단백과 결합율이 높다는 것을 알 수 있었다.

SK3530을 0.5에서 10 mg/kg 용량으로 7일간 연속 투여 후 약물대사 효소계인 cytochrome P450 총량 그리고 각 isozyme의 양을 측정한 결과 SK3530은 cytochrome P450 효소계의 유도는 유발하지 않았다. Human liver microsome을 이용한 억제 시험에서는 SK3530이 CYP3A4 효소와 CYP2C9 효소활성을 억제하나 CYP2C9의 경우 IC50 값이 약 30 μM, 그리고 CYP3A4 효소의 경우 IC50 값이 약 10 μM 로서 therapeutic 농도에서의 약물 상호작용 유발 가능성은 낮다고 할 수 있다.

랫드 간 microsome에서 SK3530의 대사 안정성은 sildenafil보다 우수하지만, SK3530은 체내로 유입되면 빠른 속도로 대사되는 특징을 가진다. 사람 간 microsome에서 SK3530이 대사체인 SK3541로 전환되는데에 관여하는 CYP 효소를 규명하였다. 사람 간 microsome에서 SK3530의 대사와 CYP activity와의 상관관계를 규명한 결과, SK3541의 생성율은 CYP3A4 marker인 testosterone 6β-hydroxylase 활성과 유의성있는 상관관계를 나타내었다. Human cDNA expressed CYP microsome에서 SK3530의 대사를 스크리닝한 결과, SK3530이 SK3541로의 대사되는데에 CYP3A4와 CYP3A5가 주로 관여함을 확인하였다. 혈중 parent drug의 농도와 total radioactivity를 비교한 결과 SK3530은 전체 농도에 비하여 10-20% 정도이었으며, 또한 bile과 feces에서 검출되는 SK3530의 양은 각각 0.4%와 4.6%로 대부분 대사체로 배설됨을 보여주었다. *In vitro* human 과 랫드 microsome에서의 metabolic profile은 매우 유사하였다. SK3530을 경구 투여 일주일 후까지 urine 및 feces에서 회수된 radioactivity 양은 약

92.3%정도였으며 배설량의 90% 이상이 feces에서 회수된 결과, SK3530은 담즙을 통한 fecal excretion이 주요 배설 경로라 할 수 있다.

SK3530에 대한 안전성을 평가하기 위해 단회투여 독성시험 및 반복투여 독성시험을 수행하였으며, 시험물질의 최소치사량은 2,000 mg/kg를 상회하였고 시험물질의 무독성량 (NOAEL)은 암수 랫드에서 10 mg/kg/day, 비글견에서는 20 mg/kg로 판단하였다. 약물의 유효혈중농도와 NOAEL 용량에서의 약물의 노노출도 감안하였을 때 SK3530의 안전역은 50배를 상회할 것으로 예상되었다. SK3530의 유전적 변이의 잠재성을 평가하기 위해 복귀돌연변이 시험, 염색체 이상 시험, 소핵시험을 수행하였고, 시험결과 모두 음성으로 나와 유전독성의 가능성은 없는 것으로 판단되었다. 일반약리시험에서도 중추신경계, 소화기계, 자율신경계, 심혈관 및 호흡기계에 미치는 영향이 없어 SK3530은 임상적으로 매우 안전한 약물임을 확인하였다.

정상 성인 남성 16명을 대상으로 한 단회투여 임상 1상 PK 연구에서는 사용 가능 최대 용량인 200 mg까지 약물의 체내동태를 살펴볼 때, AUC, Cmax 모두 용량의존적으로 증가하여 용량조절이 매우 용이한 약물로 판단하였다. Tmax는 0.5-1.0시간으로 측정되어 SK3530은 사람에서 매우 신속히 흡수되어 약효를 발현할 것으로 예상되었다. 7일간 반복투여 시에도 200 mg 용량까지 약물의 축적성은 나타나지 않았으며, 투여 1-2일후 향정상태 (steady state)에 도달함을 확인할 수 있었다.

결론적으로 SK3530는 기존의 sildenafil 및 PDE5 저해제들과는 달리

부작용은 없으면서 약효가 10배 이상 개선된 효과를 보였고, 경구 투여 시 체내로 신속히 흡수되어 생체이용율은 23-43%로 측정되었다. 또한 약물대사 효소계에 미치는 영향도 미미하여 병용 투여 약물과의 상호작용도 미미할 것으로 예측되었다. 이는 SK3530이 기존의 PDE5 저해제들의 문제점을 개선할 수 있는 새로운 PDE5 저해제로 개발될 가능성을 보여주고 있다.

V. 참고문헌

Aversa, A., Bruzziches, R., Pili, M., Spera, G. Phosphodiesterase 5 inhibitors in the treatment of erectile dysfunction. Curr. Pharm. Res. 2006, 12, 3467−3484.

Boudinot, F.D., Jusko, W.J. Fluid shifts and other factors affecting plasma protein binding of prednisolone by equilibrium dialysis. J. Pharm. Sci. 1984, 73, 774–780.

Broderick, G.A. P.o. pharmacotherapy and the contemporary evaluation and management of erectile dysfunction. Rev. Urol. 2003, 5, S9-S20.

Chiou, W.L. Critical evaluation of potential error in pharmacokinetic studies using the linear trapezoidal rule method for the calculation of the area under the plasma level–time curve. J. Pharmacokinet. Biopharm. 1978, 6, 539–546.

Chiou, WL. Potential pitfalls in the conventional pharmacokinetic studies: effects of the initial mixing of drug in blood and the pulmonary first-pass elimination. J. Pharmacokinet. Biopharm. 1979, 7, 527–536.

Choi, Y.H., Lee, M.G. Effect of enzyme inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of metformin in rats: involvement of CYP2C11, 2D1 and 3A1/2 for the metabolism of metformin. Br. J. Pharmacol. 2006, 149, 424−430.

Choi, Y.H., Kim, S.G., Lee, M.G. Dose-independent pharmacokinetics metformin in rats: hepatic and gastrointestinal first-pass effects. J. Pharm. Sci. 2006, 95, 2543–2552.

Choi, Y.H., Lee, Y.S., Bae, S.H., Kim, T.K., Im, G.-J., Lee, M.G. Effects of hepatic CYP inducers and inhibitors on mirodenafil pharmacokinetics, a new erectogenic, in rats: Involvement of CYP1A1/2, 2B1/2, 2D1, and 3A1/2 for the metabolism of mirodenafil. Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea 2007, p405.

Davies, B., Morris, T. Physiological parameters in laboratory animals and humans. Pharm. Res. 1993, 1091-95

Lee, M.G., Chiou, W.L. Valuation of potential causes for the incomplete bioavailability of furosemide: gastric first-pass metabolism. J. Pharmacokinet. Biopharm. 1983, 11, 623–640.

Lee, H.-J., Chiou, W.L. Erythrocytes as barriers for drug elimination in the isolated rat liver. I. Doxorubicin. Pharm. Res. 1989, 6, 833–839.

Lee, H.-J., Chiou, W.L. Erythrocytes as barriers for drug elimination in the isolated rat liver. II. Propranolol. Pharm. Res. 1989, 6, 840–843.

Lee, M.G., Chen, M.-L., Huang, S.-M., Chiou, W.L. Pharmacokinetics of drugs in blood I. Unusual distribution of gentamicin. Biopharm. Drug Dispos. 1981, 2, 89–97.

Lee, D.Y., Kim, J.Y., Kim, Y.C., Kwon, J.W., Kim, W.B., Lee, M.G. Dose-independent pharmacokinetics of torasemide after intravenous and oral administration to rats. Biopharm. Drug Dispos. 2005, 26, 173-182.

Lee, J., Yoo, H.H., Rhim, K.J., Sohn, D.-R., Kim, D.-H. Metabolism and excretion of 5-ethyl-2-{5-[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-sulfonyl]-2-propoxy- phenyl}-7-propyl-3,5-dihydropyrrolo[3,2-d]-pyrimidin-4-one (mirodenafil) in rats. Rapid Commun. Mass Spectrum 2007, 21, 1139–1149.

Lincoln, T.M. CyClic GMP and phosphodiesterase 5 inhibitor therapies: what's on the horizon? Mol. Pharmacol. 2004, 66, 776–784.

Litterst, C.L., Mimnaugh, E.G., Regan, R.L., Gram, T.E. Comparison of in vitro drug metabolism by lung, liver, and kidney of several common laboratory species. Drug Metab. Dispos. 1975, 3, 259–265.

Chew K K, Earle C M, Stuckey B G A, Jamrozik K, Keogh E J. Erectile dysfunction in general medical practice: Prevalence and clinical correlates. Int J Impot Res 2000, 12, 41-45.

Zusman R M. Cardiovascular data on sildenafil citrate: Introduction. Am J Cardiol 1999,

83(5A), 1C-2C.

Feldman H, Goldstein I, Hatzichristou D G, Krane R J, McKinlay J B. Impotence and its medical and psychosocial correlates: Results of the Massachusetts Male Aging Study. J Urology 1994, 151(1), 54-61.

Saenz de Tejada I, Anglin G, Knight J R, Emmick J T. Effects of tadalafil on erectile dysfunction in men with diabetes. Diabetes Care 2002, 25, 2159-2164.

Beavo, J. A. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases: Functional Implications of Multiple Isoforms. Physiol. Rev. 1995, 75, 725-748.

Juilfs, D. M.; Soderling, S.; Burns, F.; Beavo, J. A. Cyclic GMP as Substrate and Regulator of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases (PDEs). Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol. 1999, 135, 67-104.

Soderling, S. H.; Beavo, J. A. Regulation of cAMP and cGMP Signaling: New Phosphodiesterases and New Functions. Curr. Opin. Cell Biol. 2000, 12, 174-179.

Fawcett, L.; Baxendale, R.; Stacey, P.; McGrouther, C.; Harrow, I.; Soderling, S.; Hetman, J.; Beavo, J. A.; Phillips, S. C. Molecular Cloning and Characterization of a Distinct Human Phosphodiesterase Gene Family: PDE11A. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2000, 97, 3702-3707.

Corbin JD, and Francis SH. Cyclic GMP phosphodiesterase-5: target of sildenafil. J Biol Chem. 1999, 274, 13729–13732.

Baxendale RW, Smith EJ, Stanley M. Selectivity of sildenafil citrate and other phosphodiesterase type 5 (PDE5) inhibitors against human phosphodiesterase types 7-11. J Clin Pharmacol 2001, 41, 1015.

Francis SH, Turko IV, and Corbin JD. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: relating structure and function. Prog Nucleic Acid Res Mol Biol 2001, 65, 1–52.

Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. Physiol Rev 1995, 75, 725–748.

Wallis RM, Corbin JD, Francis SH. Tissue distribution of phosphodiesterase families and the effects of sildenafil on tissue cyclic nucleotides, platelet function, and the contractile responses of trabeculae carneae and aortic rings in vitro. Am J Cardiol 1999, 83(suppl 5A), 3C–12C.

Czarniecki, M.; Ahn, H.-S.; Sybertz, E. J. Inhibitors of Types I and V Phosphodiesterase: Elevation of cGMP as a Therapeutic Strategy. Annu. Rep. Med. Chem. 1996, 31, 61-70.

Stoclet, J.-C.; Keravis, T.; Komas, N.; Lugnier, C. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases as Therapeutic Targets in Cardiovascular Diseases. Exp. Opin. Invest. Drugs 1995, 4, 1081-1100.

Rajfer, J.; Aronson, W. J.; Bush, P. A.; Dorey, F. J.; Ignarro, L. J. Nitric Oxide as a Mediator of Relaxation of the Corpus Cavernosum in Response to Nonadrenergic, Noncholinergic Neurotransmission. N. Engl. J. Med. 1992, 326, 90-94.

Yoo, H.H., Kim, N.S., Im, G.J., Kim, D.H. Pharmacokinetics and Tissue Distribution of a Novel PDE5 Inhibitor. Acta Pharmacol. Sin. 2007, 28(8), 1247-1253

Lee, J., Yoo, H.H., Rhim, K.J., Sohn, D.R., Kim, D.H. Metabolism and Excretion of 5-ethyl-2-{5-[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-sulfonyl]-2-propoxyphenyl}-7-propyp-3,5-dihydropyrrolo[3,2-d]-pyrimidin-4-one (SK3530) in rats. Rapid Communications in Mass Spectrometry 2007, 21, 1139-1149

Arlotto, M.P., Sonderfan, A.J., Klaassen, C.D., Pakinson, A. Studies on the pregnenolone-16 alpha-carbonitrile-inducible form of rat liver microsomal cytochrome P-450 and UDP-glucuronosyl transferase. Biochem. Pharmacol. 1987, 36, 3859−3866.

Aversa, A., Bruzziches, R., Pili, M., Spera, G. Phosphodiesterase 5 inhibitors in the treatment of erectile dysfunction. Curr. Pharm. Res. 2006, 12, 3467−3484.

Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. Anal. Biochem. 1976, 72, 248–254.

Broderick, G.A. Oral pharmacotherapy and the contemporary evaluation and management of erectile dysfunction. Rev. Urol. 2003, 5, S9-S20.

Chiou, W.L. Critical evaluation of the potential error in pharmacokinetic studies using the linear trapezoidal rule method for the calculation of the area under the plasma level–time curve. J. Pharmacokinet. Biopharm. 1978, 6, 539−546.

Cho, M.K., Kim, Y.G., Lee, M.G., Kim, S.G. Suppression of rat hepatic cytochrome P450s by protein–calorie malnutrition: complete or partial restoration by cysteine or methionine supplementation. Arch. Biochem. Biophys. 1999, 372, 150–158.

Choi, Y.H., Lee, M.G. Effect of enzyme inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of metformin in rats: involvement of CYP2C11, 2D1 and 3A1/2 for the metabolism of metformin. Br. J. Pharmacol. 2006, 149, 424−430.

Choi, Y.M., Kim, S.H., Lee, M.G. Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatment on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of furosemide in rats. J. Pharm. Sci. 1991, 80, 638−642.

Choi, Y.H., Lee, I., Lee, M.G. Effects of water deprivation on the pharmacokinetics of metformin in rats. Biopharm. Drug Dispos. 2007, 28, 373−383.

Conney, A.H. Environmental factors influencing drug metabolism. In: La du, B.N., Mandel, H.G., Way, E.L. (Ed.), Fundamentals of Drug Metabolism and Drug Disposiotion, Williams & Wilkins Company, Baltimore. 1971, p269.

Correia, M.A. Appendix B. Rat and human liver cytochrome P450. Substrate and inhibitor specificities and functional markers. In: Oritz de Montellano P.R. (Ed.), Cytochrome P450. Structure, Mechamisn, and Biochemistry, 2nd ed. Masson Publishing USA, Inc., Plenum Press, New York, 1995, p 607−630.

Gibaldi, M., Perrier, D. Pharmacokinetics, 2nd ed. Marcel–Dekker, New York. 1982

Kim, E.J., Lee, A.K., Kim, S.H., Kim, S.G., Lee, M.G. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous azosemide in mutant Nagase analbuminemic rats. Drug Metab. Dispos. 2003, 31, 194–201.

Kim, Y.C., Lee, A.K., Lee, J.H., Lee, I., Lee, D.C., Kim, S.H., Kim, S.G., Lee, M.G. Pharmacokinetics of theophylline in diabetes mellitus rat: induction of CYP1A2 and CYP2E1 on 1,3-dimethyluric acid formation. Eur. J. Pharm. Sci. 2005, 114–123.

Lee, D.Y., Shin, H.S., Bae, S.K., Lee, M.G. Effects of enzyme inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous omeprazole in rats. Biopharm. Drug Dispos. 2006, 27, 209−218.

Lee, J., Yoo, H.H., Rhim, K.J., Sohn, D.-R., Kim, D.-H. Metabolism and excretion of 5-ethyl-2-{5-[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-sulfonyl]-2-propoxyphenyl}-7-propyl-3,5-dihydropyrrolo[3,2-d]-pyrimidin-4-one (mirodenafil) in rats. Rapid Commun. Mass Spectrum. 2007, 21, 1139–1149.

Lincoln, T.M. Cyclic GMP and phosphodiesterase 5 inhibitor therapies: what's on the horizon Mol. Pharmacol. 2004, 66, 776–784.

Moon, Y.J., Lee, A.K., Chung, H.C., Kim, E.J., Kim, S.H., Lee, D.C., Lee, I., Kim, S.G., Lee, M.G. Effects of acute renal failure on the pharmacokinetics of chlorzoxazone in rats. Drug Metab. Dispos. 2003, 31, 776–784.

Murray, M., Fiala-Beer, E., Sutton, D. Upregulation of cytochromes P450 2B in rat liver by orphenadrine. Br. J. Pharmacol. 2003, 139, 787−796.

Blount MA, Beasley A, Zoraghi R. Binding of tritiated sildenafil, tadalafil, or vardenafil to the phosphodiesterase-5 catalytic site displays potency, specificity, heterogeneity, and cGMP stimulation. Mol Pharmacol 2004, 66, 144–52.

Sáenz de Tejada I, Angulo Frutos J, Gadau M, Florio V. Comparative selectivity profiles

of tadalafil, sildenafil, and vardenafil using an in vitro phosphodiesterase activity assay. Int J Impot Res 2002, 14 (Suppl. 4), S20.

Fawcett L, Baxendale R, Stacey P. Molecular cloning and characterization of a distinct human phosphodiesterase gene family: PDE11A. Proc Natl Acad Sci USA 2000, 97, 3702–7.

Hellstrom WJ, Overstreet JW, Yu A. Tadalafil has no detrimental effect on human spermatogenesis or reproductive hormones. J Urol 2003, 170, 887–91

Sung B-J, Hwang KY, Jeon YH. Structure of the catalytic domain of human phosphodiesterase 5 with bound drug molecules. Nature 2003, 425, 98–102.

Corbin JD, Beasley A, Blount MA, Francis SH. Vardenafil: structural basis for higher potency over sildenafil in inhibiting cGMP-specific phosphodiesterase-5 (PDE5). Neurochem Int 2004, 45, 859–63.

Bischoff E, Niewoehner U, Hanig U, et al. The inhibitory selectivity of vardenafil on bovine and human recombinant phosphodiesterase enzymes. Int J Impotence Res 2001, 13(Suppl 4), S41.

Saenz de Tejada I, Angulo J, Cuevas P. The phosphodiesterase inhibitory selectivity and the in vitro and in vivo potency of the new PDE5 inhibitor vardenafil. Int J Impotence Res 2001, 13, 282–90.

Gbekor E, Bethell S, Fawcett L, et al. Phosphodiesterase 5 inhibitor profiles against all human phosphodiesterase families: Implications for use as pharmacological tools. J Urol 2002, 167, p246.

Bischoff E, Mondritzki T, Niewoehner U. Vardenafil improved erections in rabbits longer than expected from half-life. Int J Impotence Res 2002, 14 Suppl 4, S42.

Porst H, Rosen R, Padma-Nathan H. The efficacy and tolerability of vardenafil, a new, oral selective phosphodiesterase type 5 inhibitor, in patients with erectile dysfunction: the

first at-home clinical trial. Int J Impotence Res 2001, 13, 192–9.

Hellstrom WJG, Gittelman M, Karling G, et al. Vardenafil for treatment of men with erectile dysfunction: Efficacy and safety in a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. J Andrology 2002, 23, 763–71.

Goldstein I, Young JM, Fischer J, et al. Vardenafil, a new phosphodiesterase type 5 inhibitor, in the treatment of erectile dysfunction in men with diabetes. Diabetes Care 2003, 26, 1–7.

Porst H, Padma-Nathan H, Giuliano F. Efficacy of Tadalafil for the treatment of erectile dysfunction at 24 and 36 hours after dosing: A randomized controlled trial. Urology 2003, 62, 121–5.

Corbin JD, Francis SH. Pharmacology of phosphodiesterase 5 inhibitors. IJCP 2002, 56(6), 453–9.

Feldman, H. A.; Goldstein, I.; Hatzichristou, D. G.; Krane, R. J.; McKinlay, J. B. J. Urol. 1994, 151, 54.

Moreland, R. B.; Goldstein, I.; Kim, N. N.; Traish, A. Trends Endocrinol. Metab. 1999, 10, 97.

Eardley, I. Exp. Opin. Invest. Drugs 1997, 6, 1803.

Beavo, J. A. Physiol. Rev. 1995, 75, 725.

Review of Time Onset and Duration of Clinical Efficacy of Phosphodiesterase Type 5 Inhibitors in Treatment of Erectile Dysfunction. Urology 2006, 68, 689–696.

Reporters and Participants of the First Latin American Erectile Dysfunction Consensus: Anatomy and physiology of erection: pathophysiology of erectile dysfunction. Int J Impot Res 2003, 15, S5–S8.

Reporters and Participants of the First Latin American Erectile Dysfunction Consensus: Psychogenic erectile dysfunction and ejaculation disorders. Int J Impot Res, 2003, 15, S16–S21.

Dale, D. J.; Dunn, P. J.; Golightly, C.; Hughes, M. L.; Levett, P. C.; Pearce, A. K.; Searle, P. M.; Ward, G.; Wood, A. S. Org. Process Res. DeV. 2000, 4, 17-22.

Dunn, P. J.; Galvin, S.; Hettenbach, K. Green Chemistry 2004, 6, 43-48.

Haning, H.; Niewohner, U.; Schenke, T.; Es-Sayed, M.; Schmidt, G.; Lampe, T.; Bischoff, E. Bioorg. Med. Chem. Lett. 2002, 12, 865-868.

Isabel, C.; Latham, D. W. S.; Hartley, D.; Oxford, A. W.; Scopes, D. I. C. J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1980, 1, 1139-1146.

Garigipati, R. S. Tetrahedron Lett. 1990, 31, 1969-1972.

Levin, J. I.; Turos, E.; Weinreb, S. M. Synth. Commun. 1982, 12(13), 989-993.

Terrett, N. K.; Bell, A. S.; Brown, D.; Ellis, P. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 1819-1824.

Dale, D. J.; Dunn, P. J.; Golightly, C.; Hughes, M. L.; Levett, P. C.; Pearce, A. K.; Searle, P. M.; Ward, G.; Wood, A. S. Org. Process Res. DeV. 2000, 4, 17-22.

Saxena, A. K.; Padam, C. J.; Anand, N.; Dua, R. R. J. Med. Chem. 1973, 16, 560-564.

Madrigal, A.; Grande, M.; Avendano, C. J. Org. Chem. 1998, 63, 2724-2727.

Sorbera, L. A.; Martin, L.; Leeson, P. A.; Castaner, J. Drugs Future 2001, 26(1), 15-19.

Daugan, A.; Grondin, P.; Ruault, C.; Le Monnier de Gouville, A.-C.; Coste, H.; Kirilovsky, J.; Hyafil, F.; Labaudiniere, R. J. Med. Chem. 2003, 46, 4525-4532.

Wilson, S. R.; Wilson, B. W.; Shoemaker, K. R.; Wooldridge, K. R. H.; Hodgson, D. J. J.

Am. Chem. Soc. 1982, 104, 259.

Moreland, R. B.; Goldstein, I.; Kim, N. N.; Traish, A. Trends Endocrinol. Metab. 1999, 10, 97.

Martel, A. M.; Graul, A.; Rabasseda, X.; Castaner, R. Drugs Future 1997, 22, 138.

Terrett, N. K.; Bell, A. S.; Brown, D.; Ellis, P. Bioorg. Med. Chem. Lett. 1996, 6, 1819.

Boolell, M.; Allen, M. J.; Ballard, S. A.; Gepi-Attee, S.; Muirhead, G. J.; Naylor, A. M.; Osterloh, I. H.; Gingell, C. Int. J. Urol. Res. 1996, 8, 47.

Murphy, R.; Kung, H. F.; Kung, M.; Billings, J. J. Med. Chem. 1990, 33, 171.

Stanetty, P.; Koller, H.; Purstinger, G. Monatsche. Chem. 1990, 121, 883.

Hidaka, H.; Asano, T. Biochim. Biophys. Acta. 1976, 429, 485.

Ballard, S. A.; Gingell, C. J.; Tang, K.; Turner, L. A.; Price, M. E.; Naylor, A. M. J. Urol. 1998, 159, 2164.

Lue, T. F. Erectile dysfunction. N. Engl. J. Med. 2000, 324, 1802–1813.

Ogiso, T., Iwaki, M., Tanaka, H., Kobayashi, E., Tanino, T., Sawada, A., Uno, S. Pharmacokinetic drug interactions between ampiroxicam and sulfaphenazole in rats. Biol. Pharm. Bull. 1999, 22, 196−199.

Ross, P.H., Ciosk, B.G., Kallweit, P., Kauczinski, D., Hanstein, W.G. Formation of ligand and metabolite complexes as a means for selective quantitation of cytochrome P450 isozymes. Biochem. Pharmacol. 1993, 45, 2239−2250.

Ryan, D.E., Ramanathan, L., Iida, S., Thomas, P.E. Characterization of a major form of rat hepatic microsomal cytochrome P-450 induced by isoniazid. J. Biol. Chem. 1985, 260, 6385−6393.

Shim, H.J., Lee, E.J., Kim, S.H., Kim, S.H., You, M., Kwon, J.W., Kim, W.B., Lee, M.G. Factors influencing the protein binding of a new phosphodiesterase V inhibitor, DA-8159, using an equilibrium dialysis technique. Biopharm. Drug Dispos. 2000, 21, 285−291.

Shin, B.S., Hu, S.K., Kim, J., Oh, J.G., Youn, W.-N., Lee, B., Um, K.A., Kim, D.-K., Lee, J.Y., Yoo, S.D. Development of LC/MS/MS assay of the determination of 5-ethyl-2-{5-[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-sulfonyl]-2-propoxyphenyl}-7-propyl-3,5-dihydropyrrolo[3,2-d]pyrimidin-4-one (mirodenafil) in human plasma: application to a clinical pharmacokinetic study. J. Pharm. Biomed. Anal. 2007.

Sinclair, J.F., Szakacs, J.G., Wood, S.G., Kostrubsky, V.E., Jeffery, E.H., Wrighton, S.A., Bement, W.J., Wright, D., Sinclair, P.R. Acetaminophen hepatotoxicity precipitated by short-term treatment of rats with ethanol and isopentanol: protection by triacetyloleandomycin. Biochem. Pharmacol. 2000, 59, 445−454.

Mitruka, B.M., Rawnsley, H.M. Clinical Biomedical and Hematological Reference Values in Normal Experimental Animals and Normal Humans, second ed. Masson Publishing USA Inc. 1981

Murakami, T., Nakanishi, M., Yoshimori, T., Okamura, N., Norikura, R., Mizojiri, K. Separate assessment of intestinal and hepatic first-pass effects using a rat model with double cannulation of the portal and jugular veins. Drug Metab. Pharmacokinet. 2003, 18, 242–260.

Øie, S., Guentert, T.W. Comparison of equilibrium time in dialysis experiments using spiked plasma or spiked buffer. J. Pharm. Sci. 1982, 71, 127–128.

Shim, H.J., Lee, E.J., Kim, S.H., Kim, S.H., You, M., Kwon, J.W., Kim, W.B., Lee, M.G. Factors influencing the protein binding of a new phosphodiesterase V inhibitor, DA-8159, using an equilibrium dialysis technique. Biopharm. Drug Dispos. 2000, 21, 285–291.

Shin, B.S., Hu, S.K., Kim, J., Oh, J.G., Youn, W.-N., Lee, B., Um, K.A., Kim, D.-K., Lee, J.Y., Yoo, S.D. Development of LC/MS/MS assay of the determination of 5-ethyl-2-{5-

[4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-sulfonyl]-2-propoxyphenyl}-7-propyl-3,5-dihydropyrrolo[3,2-d]pyrimidin-4-one (mirodenafil) in human plasma: application to a Clinical pharmacokinetic study. J. Pharm. Biomed. Anal. 2000.

Yoo, H.-H., Kim, N.-S., Im, G..-J., Kim, D.-H. Pharmacokinetics and tissue distribution of a novel PDE5 inhibitor, SK-3530, in rats. Acta Pharmacol. Sin. 2007, 28, 1247−1253.

Yu, S.Y., Bae, S.K., Kim, E.J., Kim, Y.G., Kim, S.O., Lee, D.H., Lim, H., Lee, M.G. Dose-independent pharmacokinetics of a new reversible proton pump inhibitor, KR-60436, after i.v. and p.o. administration to rats: gastrointestinal first-pass effect. J. Pharm. Sci. 2003, 92, 1592−1603.

Tomkins, D.M., Otton, S.V., Joharchi, N., Li, N.-Y., Balster, R.F., Tyndale, R.F., Sellers, E.M. Effects of cytochrome P450 2D1 inhibition on hydrocodone metabolism and its behavioral consequences in rats. J. Pharmacol. Exp. Ther. 1997, 280, 1374−1382.

Williams, J.F., Lowitt, S., Szentivanyi, A. Effect of phenobarbital and 3-methylcholanthrene pretreatment on the plasma half-life and urinary excretion profile of theophylline and its metabolites in rats. Biochem. Pharmacol. 1979, 28, 2935−2940.

Wrighton, S.A., Maurel, P., Schuetz, E.G., Watkins, P.B., Young, B., Guzelian, P.S. Identification of the cytochrome P-450 induced by macrolide antibiotics in rat livers as the glucodorticoid responsive cytochrome P450. Biochemistry 1985, 24, 2171−2178.

Yang, K.H., Jung, Y.S., Lee, D.Y., Lee, J.H., Kim, Y.C., Lee, M.G. Time-dependent effects of Klebsiella pnemoniae endotoxin (KPLPS) on the pharmacokinetics of theophylline in rats: Return of the parameters in 96-hour KPLPS rats to the control levels. Presented in Annual Convention of the Pharmaceutical Society of Korea, Seoul Educational Cultural Cneter, Seoul, South Korea 2007, p419.

Abstract

Male erectile dysfunction (MED) is a common and important medical problem, and the causes of ED include psychogenic, physical, and medication side effects. Viagra (Pfizer) was originally developed as a therapy for angina, but it was also found to be effective to MED. Therefore Viagra was developed as a oral drug for MED. According to the research, the efficacy of Viagra increased with the dosage level, but the side effect also increased simultaneously. Therefore, it was required to develop a new PDE5 inhibitor, and SK Chemicals came up with a new PDE5 inhibitor, SK3530.

SK3530 showed more potent efficacy and decreased side effect compared to Viagra through *in vitro* PDE enzyme assay and *in vivo* animal study. In oral pharmacokinetic study, SK3530 was absorbed at gastrointestinal tract and showed Tmax as 1.2-1.7 hour, elimination half life as 1.7-1.8 hours. AUC and Cmax of SK3530 was dose proportional within a dose of 10-40 mg/kg. The absolute oral bioavailabity of SK3530 was calculated as 24-43%.

SK3530 didn't affect the cytochrome P450 system in terms of the amount of cytochrome P450, the activity of P450 reductase, and the expression of cytochrome P450 when administrated as a dosage of from 0.5 to 10 mg/kg for 7 days. In CYP inhibition assay using human liver microsome, SK3530 could inhibit the activity of CYP3A4 and CYP2C9 isozyme above the clinical therapeutic range. So, it was concluded that SK3530 has little possibility to have drug-drug interaction within the clinical therapeutic concentration.

SK3530 was rapidly metabolized and the exposure of parent dug was about 10-20%

compared to total radioactivity. The amount of SK3530 detected in bile and feces was 0.4% and 4.6% respectively. By conducting the preclinical and phase I clinical study, we made sure that SK3530 have a wide safety margin and showed a dose proportional PK profile up to dose of 200 mg.

Conclusively, SK3530 showed a 10-fold more potent efficacy and decreased side effect compared to sildenafil and other PDE5 inhibitors. SK3530 was rapidly absorbed with a oral bioavailability as 23-43%. SK3530 was predicted to have littile possibility to show drug-drug interaction because of minimal effect on cytochrome P450. These results indicated that SK3530 will be a new drug for PDE5 inhibitor which overcome the problem showed in other PDE5 inhibitors.

Key words: SK3550, mirodenafil, SK3541, SK3544, PDE5, Corpus cavernosum, LC/MS/MS, Validation, Intravenous, Oral, Administration, Dose-dependent pharmacokinetics, Hepatic first-pass effects, Rats, Protein binding, Cytochrome P450, Inducers, Inhibitors, CYP3A4, CYP3A5, CYP2D6, CYP1A2, Nitroglycerin

Student Number: 2004-30584