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

약학석사 학위논문

Rat에서 ABN401의 장관 흡수에 관한 연구

Identification of the major determining foctor(s) governing the oral absorption of ABN401, an experimental anticancer agent, in rats

2019 년 2 월

서울대학교 대학원

약제학 약제과학 전공

여 정 민

Rat에서 ABN401의 장관 흡수에 관한 연구

지도교수 정 석 재

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함
2018 년 12 월

서울대학교 대학원
약학과 약제과학 전공
여 정 민

여정민의 약학석사 학위논문을 인준함
2018 년 12 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

c-MET은 수용체-타이로신 인산화 효소 (receptor-tyrosine kinase) 중의 하나로, ABN401은 c-MET에 대하여 특이적인 저해작용을 가진다. 폐암과 위암에 항암 효과를 가지는 것으로 기대하고 있으며 현재 임상 1상을 준비 중에 있다. 하지만 선행 연구를 통해 ABN401이 rat에서 oral bioavailability(BA)가 낮게 나타나는 것이 밝혀져 있고 따라서 본 연구에서는 이러한 ABN401의 낮은 흡수율에 영향을 미치는 여러 요인들을 살펴보고 특히 solubility, permeability 그리고 intestinal metabolism 측면에서 접근하고자 한다.

먼저 완전히 용해된 ABN401을 SD rat에 정맥 및 경구 투여하여 각각의 약물동태 파라미터를 구하였을 때, 0.5, 2, 4 mg/kg의 용량범위에서 선형 체내동태를 따르는 것으로 나타났다. 이 때 전신 클리어런스(CL)는 12.6~ 16.3 ml/min/kg, 전신 분포 용적(V_{ss})는 3.32~ 4.85 L/kg임을 알 수 있었다. 정맥 및 경구 투여 결과로 얻은 AUC_{inf}의 비로 계산한 BA는 22.4~ 24.5 %로 나타났으며 실험 용량에서 통계학적으로 유의미한 차이를 보이지 않았다.

ABN401의 인공 장액에서의 용해도는 0.00746 ± 0.000337 mg/ml로, 인공 위액에서보다 1000배 이상 더 낮게 나타났으며 *in vivo* 상에서 약물의 소장 내 석출 가능성에 대해 생각해 볼 수 있었다. 약물의 용해 및 석출 동태를 살펴보기 위해 *in vitro* dissolution-precipitation study를 수행하였고, 이를 통해 dissolution rate constant(k_{diss}), nucleation rate constant(k_{nuc}) 그리고 molecularity index(α)를 예측하였다.

Ussing chamber study를 통해 rat 소장에서의 ABN401의 permeability를 살펴본 결과, P_{app}가 10.5~ 11.3 cm/s × 10^{-6}로 비교적 permeable하였으며, 실험 용량 범위에서 용량 의존적 P_{app}가 관찰되지 않았다. 대표적인 MDR1 저해제인 verapamil을 ABN401과 함께 투여한 군에서는 ABN401의 투과도가 유의미하게 증가하는 것을 통해 rat MDR1과의 상

호작용을 간접적으로 확인할 수 있었다.

Rat intestine homogenates에서 ABN401의 metabolic stability를 평가하였을 때 CL_{int}은 0.0190 ml/min이며 이를 통해 계산한 F_g는 0.828이다. ABN401의 신장 배설이 1% 미만임이 밝혀져 있으므로 systemic CL가 곧 hepatic CL(i.e. non renal CL)이라고 가정하고 계산한 F_h는 0.817이다. 이를 통해 소장과 간에서의 대사는 ABN401의 낮은 흡수율에 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

Dissolution-precipitation model과 ADAM model을 적용하여 *in vivo* absorption model을 세우고 이전에 구한 P_{app}, k_{diss}, k_{nuc} 그리고 α를 대입하여 예측한 F_a는 0.537이다. BA는 F_a, F_g 그리고 F_h의 곱으로 나타낼 수 있고 본 연구를 통해 예측한 값으로 계산한 predicted BA는 36.3 %이다. 이는 observed BA의 약 1.6배로 추정치와 실측치가 크게 차이나지 않는 것으로부터 흡수율 예측에 사용된 model이 비교적 유효하다고 사료되었다.

ABN401의 흡수 과정을 전체적으로 봤을 때, intestine metabolism이나 hepatic first pass 과정은 major한 요인은 아닌 것으로 볼 수 있으며 가장 key step은 약물의 용해도를 개선하여 위장관을 통한 permeation의 기여도를 증가시키는 것이라고 할 수 있다. 약제학적 관점에서 이를 개선한다면 ABN401의 전체적인 흡수를 증가시킬 수 있고 약물의 활용성을 더 높일 수 있을 것이다.

주요어 : ABN401, oral bioavailability, $F_aF_gF_h$, 용해도, 석출
학 번 : 2017-29702

목 차

국문 초록 ····· i
1. Introduction ····· 1
2. Materials and Methods ····· 3
2.1 Chemicals ····· 3
2.2 Animals ····· 3
2.3 *In vivo* pharmacokinetics in rats ····· 3
2.4 Equilibrium solubility of ABN401 ····· 4
2.5 *In vitro* dissolution-precipitation study ····· 5
2.5.1 Disssolution-precipitation model ····· 5
2.6 Ussing chamber study ····· 7
2.7 Metabolic stability in rat intestinal homogenate ··· 8
2.8 Model to predict fraction absorbed ····· 9
2.9 Analytical condition for ABN401 ····· 11
3. Results ····· 12
3.1 *In vivo* pharmacokinetics of ABN401 in rats ····· 12
3.2 Equilibrium solubility of ABN401 ····· 15
3.3 *In vitro* dissolution-precipitation study ····· 16
3.4 Ussing chamber study ····· 18
3.5 Metabolic stability in rat intestinal homogenate ··· 20
3.6 Prediction of fraction absorbed ····· 22
4. Discussion and Conclusion ····· 25
5. References ····· 28
Abstract ····· 31

표 목 차

[표 1] ····· 13
[표 2] ····· 16
[표 3] ····· 18
[표 4] ····· 20

그 림 목 차

[그림 1] ····· 2
[그림 2] ····· 6
[그림 3] ····· 10
[그림 4] ····· 14
[그림 5] ····· 15
[그림 6] ····· 17
[그림 7] ····· 19
[그림 8] ····· 21
[그림 9] ····· 23
[그림 10] ····· 24

1. Introduction

Mesenchymal epithelial transition factor (c-MET)은 수용체-타이로신 인산화 효소 (receptor-tyrosine kinase) 의 일종으로 cell proliferation, migration, invation 그리고 angiogenesis 등의 여러 가지 주요 세포 기능에 관여한다. c-MET은 hepatocyte growth factor (HGF)-MET signaling을 촉진함으로써 cell signaling이 이루어지게 한다. 이러한 중요한 기능을 하는 c-MET이 최근 연구에 따르면 cancer biology에도 연관이 있다는 보고가 제기되고 있다. 위암, 폐암, 유방암, 대장암, 간암 등 여러 cancer biopsy sample에서 c-MET kinase의 과발현이 관찰되었으며 특히 약 30%의 폐암 환자에게서 이러한 과발현이 발견되었다. 이를 기반으로 현재 c-MET kinase를 억제하는 기전인 crizotinib이 non-small cell lung cancer의 치료제로 허가받아 환자들에게 투여되고 있다. 하지만 crizotinib은 11 nM의 IC_{50}를 가지고 c-MET kinase를 억제하는 동시에 anaplastic lymphona kinase (ALK) 및 Recepteur d'Origine Nantais (RON) 등 다른 tyrosine kinase도 저해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이로 인한 예기치 못한 부작용 및 내성 등의 문제로 인해 selective하게 c-MET을 저해하는 기전의 약물의 필요성이 제기되었다.

ABN401은 이러한 c-MET을 특이적으로 억제하는 기전으로 개발 중인 약물로 현재 전임상 단계의 마무리 단계에서 다음의 임상 1상을 준비하고 있다. 이 논문에서 자세한 약물의 약리학적, 구조적 정보를 제공하기는 어렵지만 기존 전임상 연구에 따르면 ABN401이 유의미하게 c-MET kinase를 억제하는 것으로 밝혀져 있다. 약물의 적응증으로는 폐암과 위암에 효과를 가지는 것으로 기대하고 있다.

하지만 본 연구실에서의 선행 연구에 따르면, SD rat에서 ABN401의 oral bioavailability(BA)가 낮게 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 먼저

oral BA에 대해 살펴보면 크게 세 가지 과정의 영향을 받는 것으로 생각할 수 있다(그림 1). 소장 lumen에서 대변으로 배설되지 않고 흡수되는 과정, 소장 세포에서 대사 되지 않고 혈류로 들어가는 과정 그리고 간에서 first pass effect를 받지 않는 과정 이렇게 세 가지 과정을 거치며 각각의 fraction의 곱으로 BA를 나타낼 수 있다.

따라서 본 연구에서는 ABN401의 낮은 흡수율에 영향을 미치는 여러 가지 요인들을 살펴보고 특히 solubility, permeability 그리고 intestinal metabolism 측면에서 접근하고자 하였다.

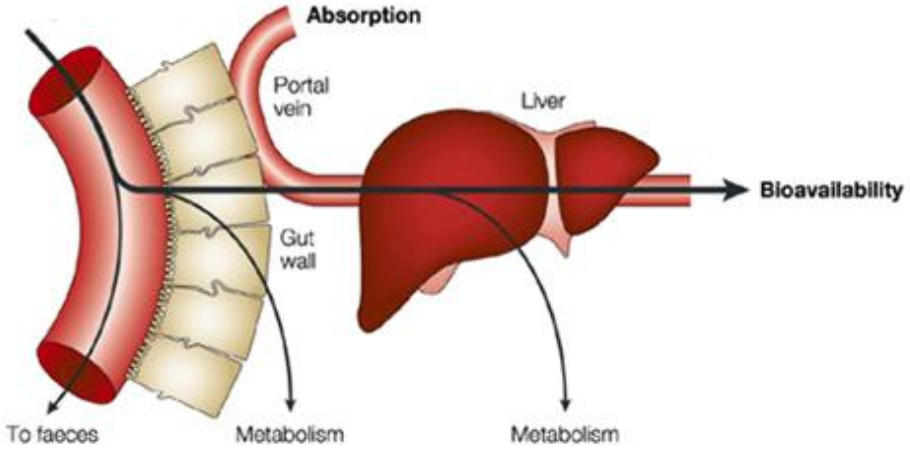


그림 1. Anatomical view of processes affecting bioavailability

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

ABN401은 에이비온 연구소 (서울, 대한민국)에서 제공받았다. Acetronitrile은 Fisher scientific (Waltham, MA, USA)로부터 구입하였으며, formic acid와 ammonium acetate는 Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

2.2 Animals

본 실험에는 230-270g 무게의 수컷 Sprague-Dawley rat을 사용하였으며, 오리엔트바이오(경기도, 대한민국)에서 구입하였다. 본 연구에서 진행된 동물 실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였다. *In vivo* dose ranging study에서는 50mg/kg tiletamine HCl/zolazepam HCl (Zoletil 50; Virbac Laboratories, France) and 10 mg/kg xylazine HCl (Rompun; Byer Korea, Korea)를 근육주사로 투여하여 마취하였다. Ussing chamber study에서는 diethyl ether(삼전순약공업)로 흡입 마취하였다.

2.3 *In vivo* pharmacokinetics in rats

하룻밤 동안 절식시킨 수컷 SD rat을 위의 Zoletil 50과 Rompun을 4:1 비율로 혼합하여 만든 마취제로 근육 주사하여 마취한 후 대퇴정맥과 동

맥을 polyethylene tube (PE50; Clay Adams, Parsippany, NJ, USA)로 cannulation하였다. 대퇴동맥에는 혈액 응고를 방지하기 위해 heparinized saline (20 IU/ml)을 채워주었다. 수술 후에는 3-4시간의 recovery time을 주고 실험을 진행하였다.

ABN401은 DMSO, PEG400, DDW (10%:45%:45%, v/v/v)의 조성으로 완전하게 녹인 후 투여하였다. 0.5, 2, 4 mg/kg의 용량으로 투여하였으며 4ml/kg로 정맥 투여, 5ml/kg로 경구 투여하였다. 혈액 샘플은 투여 후 0.083, 0.25, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16 그리고 24시간에 150μl 가량 채혈하였다. 혈액 샘플은 원심분리 후 50 μl의 혈장을 취해 분석까지 -20℃에 보관하였다.

2.4 Equilibrium solubility of ABN401

ABN401의 용해성을 평가하기 위해서 Fasted State Simulated Gastric Fluid (FassGF, 인공위액, pH 1.2), Fasted State Simulated Intestinal Fluid (FassIF, 인공장액, pH 6.8), HCl solution (pH 1.2) 그리고 deionized distilled water (DDW)에서의 equilibrium solubility를 측정하였다. FassGF 및 FassIF를 만들기 위해 필요한 powder는 Biorelevent (London, United Kingdom)에서 구입하였다. FassGF는 3 mg의 FassGF powder, 99.95 mg의 NaCl 그리고 0.48 ml의 2N HCl에 50ml 의 DDW를 넣어 제조하였고, FassIF는 89.5 mg의 FassIF powder, 69.6 mg의 NaOH, 111 mg의 Maleic acid 그리고 200.5 mg의 NaCl에 50 ml의 DDW를 넣어 제조하였다. HCl solution은 0.5 ml의 2N HCl에 20ml의 DDW를 넣어 pH 1.2의 용액으로 제조하였다. 실험은 n=4로 진행되었으며 각각의 media 0.5 ml에 약물의 석출이 육안으로 확인될 때 까지 ABN401을 첨가하였다. 그리고 25 ℃의 shaking incubator에서 24 시간

동안 혼합한 후 16,100 g로 5 분간 원심 분리하여 얻은 상층액에 용해된 약물의 농도를 측정하였다.

2.5 *In vitro* dissolution-precipitation study

ABN401의 precipitation rate을 *in vitro*에서 측정하기 위해 인공 장액을 이용하여 실험하였다. 약물을 다섯 가지의 농도로 DMSO에 완전히 녹이고 0.03 ml의 DMSO stock을 3 ml의 인공 장액에 첨가하여 과포화 상태에서 석출이 일어나도록 하였다. 실험 과정 전반에 걸쳐 50 rpm의 회전 속도를 유지하였으며, 실험 농도는 인공 장액에서의 equilibrium solubility의 10~ 50 배 range에서 다섯 가지 농도를 설정하였다. 실험은 n=3로 진행되었으며, DMSO stock을 인공 장액에 첨가한 후 0.5, 1, 2, 5, 10, 30, 60 분에 0.4 ml씩 샘플링 하였다. 각각의 샘플링 후에는 바로 filter 및 전처리 과정을 수행함으로써 샘플링 이후의 침전을 방지하고자 하였다.

2.5.1 Dissolution-precipitation model

기존의 Ruben Alvarez Sanchez et al.(2016)에서 사용된 dissolution-precipitation model을 적용하여 *in vitro* dissolution-precipitation study 결과를 해석하였다. 모델을 간략하게 설명하면 다음과 같다.

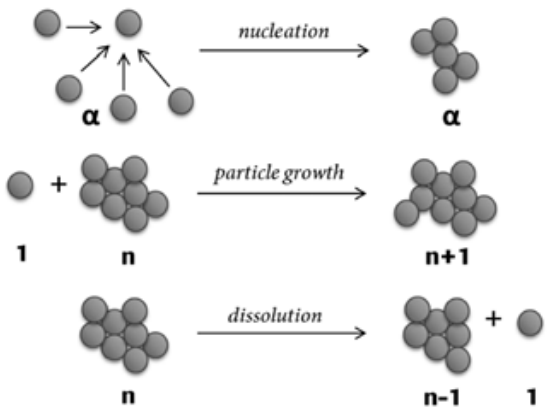


그림 2. A schematic drawing to illustrate the elementary molecular steps involved in the proposed dissolution-precipiation model

약물이 석출되고 용해되는 과정은 nucleation, particle growth, dissolution 과정의 결과로 나타난다 (그림 2). 용해되는 약물의 농도를 C_{dis}, 반응이 일어나는 부피를 V, dissolution rate constant를 k_{dis}, particle growth rate constant를 k_{growth}, nucleation rate constant를 k_{nuc}, 석출되는 약물의 양을 X_{pre} 그리고 nucleation이 일어나기 위해 필요한 분자의 평균 개수를 의미하는 α로 용해되는 약물의 변화량을 나타내면 equation (1)과 같다.

$$V \cdot \frac{dC_{dis}}{dt} = k_{dis} \cdot X_{pre} - k_{growth} \cdot X_{pre} \cdot C_{dis} - V \cdot k_{nuc} \cdot C_{dis}{}^{\alpha} \quad (1)$$

포화 농도의 평형 상태에서는 nucleation 과정이 무시되기 때문에 약물의 solubility인 C_{sol}은 equation (2)에서와 같이 k_{dis}와 k_{growth}의 비로 나타낼 수 있다.

$$C_{\mathrm{sol}} = \frac{k_{dis}}{k_{growth}} \quad (2)$$

2.6 Ussing chamber study

소장에서의 ABN401의 transport kinetic을 평가하기 위해 Ussing chamber study를 수행하였다. 마취시킨 SD rat의 ileum 부위를 절제하여 바로 O_2/CO_2 (95:5) 혼합 가스가 연결된 4 ℃의 transport media에 보관하였다. Peyer's patch를 피해 ileum segment를 2 cm씩 절단한 후 mesenteric border line을 따라 절단하여 luminal side가 바깥으로 드러나도록 하였다. 직사각형 모양의 평면으로 잘 펼쳐진 tissue 조각을 chamber의 6 개의 pin에 평평하게 고정시킨 후 serous membrane을 제거하였다. Donor chamber와 receiver chamber를 조립한 후 양쪽 chamber에 O_2/CO_2 (95:5) 혼합 가스를 연결하고, 37 ℃로 데워진 transport media를 이용하여 tissue membrane을 20 분간 pre-incubation 과정을 거쳐 안정화하였다. Pre-incubation이 끝난 후 양쪽 chamber의 media를 제거하고 receiver chamber에는 transport media를, donor chamber에는 1% DMSO로 녹인 ABN401을 함유한 transport media를 2 ml씩 넣었다. Incubation이 진행되는 동안 37 ℃로 유지하였으며, O_2/CO_2 (95:5) 혼합 가스를 계속 공급해주었다. 약물이 함유된 transport media를 처리한 후 30, 60, 90 그리고 120 분에 100 μl씩 샘플링 하였으며 이후 전처리 과정을 거쳐 약물의 농도를 분석하였다.

약물의 농도는 20, 50, 100 μM로 실험하였으며, 각각 n=7로 반복하여 진행하였다. 또한, p-glycoprotein (p-gp, MDR1)의 ABN401 수송에서의

영향을 살펴보기 위해 MDR1 억제제인 verapamil (500 μM)을 ABN401 (20 μM)과 함께 처리하여 n=4로 Ussing chamber study를 수행하였다.

ABN401의 위장관 투과도 (apparent permeability, P_{app})는 수송 속도 dQ/dt를 diffusion chamber의 표면적 A와 donor chamber에 처리한 ABN401의 초기 농도 C_0로 나누어 계산하였다 (equation 3).

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{A \times C_0} \tag{3}$$

2.7 Metabolic stability in rat intestinal homogenate

Rat intestinal homogenates에서의 ABN401의 대사 정도를 평가하기 위해 metabolic stability test를 진행하였다. Diethyl ether로 마취된 수컷 SD rat의 소장을 취하고 tissue의 2배 부피의 Dulbecco's phosphate-buffered saline (DPBS)를 넣어 homegenizer (Ultra Turrax model, T25, IKA Works, Inc, Cincinnati, OH)를 이용하여 rat intestinal homogenates를 준비하였다. ABN401은 DMSO에 녹여 0.5, 1.5, 5, 15, 50 mM이 되도록 하였고 rat intestinal homogenates 499 μL에 약물 stock 1 μL을 섞어 ABN401의 최종 농도가 1, 3, 10, 30, 100 μM이 되도록 하였다. 실험은 37 ℃ incubator에서 진행하였고 0, 15, 30, 60, 120 분에 50 μL씩 샘플링 하였다. 이후 샘플은 5 분간 vortex하고 4 ℃, 16100 g에서 5 분간 원심 분리 후 분리된 상층액을 전처리 과정을 거쳐 아래 2.9의 LC-MS/MS 방법으로 분석하였다.

Metabolic stability study를 통해 intrinsic clearance ($CL_{int,}$ ml/min)를

결정하고자 하였으며 equation (4)와 같이 계산하였다.

$$CL_{int} = \mathrm{k} \times \frac{tissue\ \ weight}{dilution\ \ factor} \tag{4}$$

여기서 k는 약물의 metabolic rate, tissue weight는 실험에 사용된 rat intestine tissue의 무게이다.

Intestinal availability (F_g)는 문헌을 참고하여 Q_{gut} model을 통해 예측하였다.

$$Q_{gut} = \frac{\mathrm{PS_{perm}} \cdot Q_{villi}}{\mathrm{PS_{perm}} + Q_{villi}} \tag{5}$$

$$F_g = \frac{\mathrm{Q_{gut}}}{Q_{gut} + f_{u,gut} \cdot CL_{u,int}} \tag{6}$$

여기서 Q_{villi}는 mucosal blood flow, $f_{u,gut}$은 소장에서의 unbound fraction을 의미하며 PS_{perm}은 소장에서의 effective permeability(P_{eff})에 surface area를 곱해 계산한 값이다.

2.8 Model to predict fraction absorbed (F_a)

위의 2.5.1에서 설명한 dissolution-precipitation model을 적용하여 *in vivo* intestinal absorption을 예측하고자 하였다. stomach에서 intestine까지 연동 운동에 따라 약물이 이행되는 과정을 모식도로 나타내면 다음과 같다(그림 3).

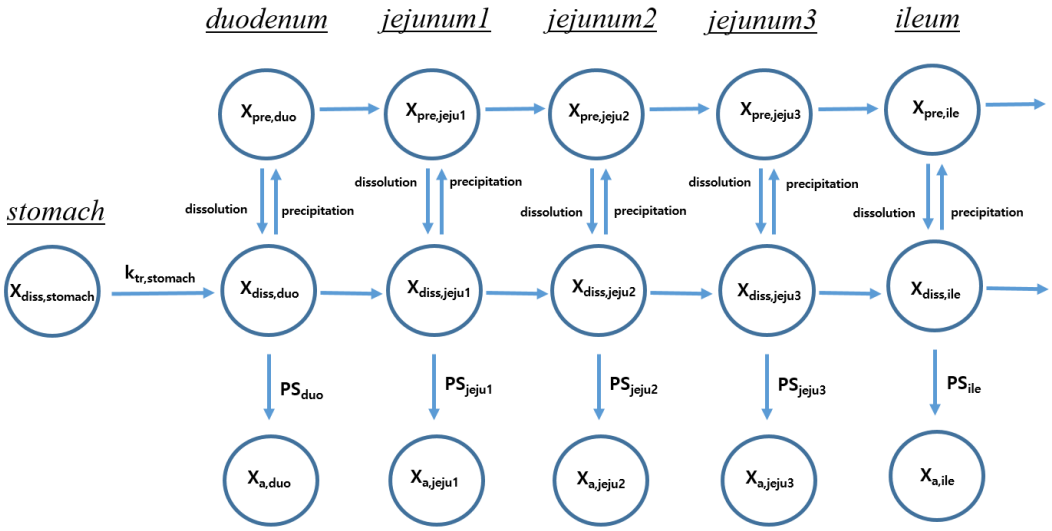


그림 3. Structure of the physiologically based model used for the prediction of *in vivo* absorption

이러한 model을 기반으로 stomach에서의 약물의 변화량(equation 7), 각 segment에서의 석출된 약물의 변화량(equation 8), 용해된 약물의 변화량(equation 9)을 아래의 수식으로 나타내었다.

$$\frac{dX_{dis,stomach}}{dt} = -k_{tr,\,stomach} \cdot X_{dis,\,stomach} \tag{7}$$

$$\frac{dX_{pre\,i}}{dt} = k_{tr,\,i-1} \cdot X_{pre,\,i-1} - k_{tr,\,i} \cdot X_{pre,\,i} - k_{dis,\,i} \cdot X_{pre,\,i} \cdot \left(1 - \frac{C_{dis\,i}}{C_{sol}}\right) + V_i \cdot k_{nuc} \cdot C_{dis,\,i}{}^{\alpha} \tag{8}$$

$$\frac{dX_{dis\,i}}{dt} = k_{tr,\,i-1} \cdot X_{dis,\,i-1} - k_{tr,\,i} \cdot X_{dis,\,i} + k_{dis,\,i} \cdot X_{pre,\,i} \cdot \left(1 - \frac{C_{dis\,i}}{C_{sol}}\right) - V_i \cdot k_{nuc} \cdot C_{dis,\,i}{}^{\alpha} - PS_i \cdot C_{dis,\,i} \tag{9}$$

여기서, 용해된 약물의 양을 $X_{dis,i}$ (i=1,2,3,4,5; 1=duodenum, 2= jejunum1, 3= jejunum2, 4= jejunum3, 5= ileum), 석출된 약물의 양을 $X_{pre,i}$, 흡수된 약물의 양을 $X_{a,i}$ 그리고 위장관의 transit rate을 $k_{tr,i}$로 나타냈습니다. Berkeley-Madonna software를 이용하여 시간에 따른 각 segment에서 흡수된 약물의 양을 예측할 수 있고 equation 10을 통해 F_a를 계산하였다.

$$F_a = \frac{X_{a,duo} + X_{a,jeju1} + X_{a,jeju2} + X_{a,jeju3} + X_{a,ile}}{Dose \cdot 0.25} \quad (10)$$

2.9 Analytical condition for ABN401

샘플 중의 ABN401 농도는 LC-MS/MS로 분석하였다. HPLC는 Waters e2695 module (Waters Corporation, Milford, MA, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Luna 3u CN 100A (50 × 2.0 mm, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)를 사용하였다. 이동상으로는 0.1% formic acid를 함유한 acetonitrile (이동상 A) 및 10 mM ammonium acetate buffer solution (이동상 B)를 사용하였다. 0~0.5 분 (A:5%, B:95%), 0.5~1.5 분 (A:30%, B:70%), 1.5~6 분 (A:5%, B:95%)의 gradient 분석 방법으로 진행하였으며, 이동상의 유속은 0.3 mL/min으로 유지하였다. Injection volume은 5 μl로 설정 하였다. HPLC에 연결된 MS/MS는 AB SCIEX API 3200 QTRAP triple quadrupole mass spectrometer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였다. Electrospray ionization은 positive ion mode에서 진행되었고, 그 때 ion spray voltage와 gas temperature는 각각 5500 V, 450 ℃로 유지되었다. ABN401은 MRM mode (m.w. 567.2 → 467.2)로 측정되었다.

3. Results

3.1 *In vivo* pharmacokinetics of ABN401 in rats

정맥 투여 및 경구 투여하여 얻은 ABN401의 시간에 따른 혈장 농도 추이를 그래프로 나타내고(그림 4) 이를 통해 얻은 pharmacokinetic parameters를 표 1.에 나타내었다. 먼저 정맥 투여 결과를 살펴보면, 0.5, 2, 4 mg/kg로 투여 결과 dose-normalized AUC_{inf}가 각각 1.23, 1.06 그리고 1.34 h·kg/L로 나타났다. Mean systemic clearance(CL)는 같은 dose range에서 각각 13.6, 16.3 그리고 12.6 ml/min/kg로 rat의 hepatic blood flow (i.e. 55.2 ml/min/kg)의 약 1/4 정도로 나타났다. Mean volume of distribution(V_d)은 3.32 ~ 4.85 L/kg로, rat의 total body water(i.e. 0.7 L/kg)의 4.8 ~ 6.9 배로 나타났다. Dose-normalized AUC_{inf}, CL, V_d 등 각각의 parameter에 대해 투여 용량 간 one-way ANOVA를 수행한 결과 유의미한 차이를 보이지 않았으며 이를 통해 0.5~ 4 mg/kg 용량 구간에서 ABN401이 선형적인 동태를 보이는 것으로 예측할 수 있었다.

다음 경구 투여 결과를 살펴보면, 0.5, 2, 4 mg/kg 용량으로 투여 결과 dose-normalized AUC_{inf}가 각각 0.294, 0.254 그리고 0.302 h·kg/L로 나타났으며 one-way ANOVA를 수행한 결과 용량 간에 유의미한 차이를 보이지 않았다. 정맥 투여 및 경구 투여 결과로 얻은 AUC_{inf}의 ratio를 통해 oral bioavailability를 계산한 결과 22.4 ~ 24.5 %로 나타났으며 이 또한 one-way ANOVA 결과 세 가지 용량에서 유의미한 차이를 보이지 않았다.

IV	0.5 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
$AUC_{infinite}$ (h·μg/mL)	0.616 ± 0.0616	2.07 ± 0.234	5.34 ± 0.647
Dose normalized $AUC_{infinite}$ (h·kg/L)	1.23 ± 0.123	1.04 ± 0.117	1.34 ± 0.162
V_{ss} (L/kg)	3.32 ± 0.690	3.39 ± 0.795	4.85 ± 0.161
CL (mL/min /kg)	13.6 ± 1.36	16.3 ± 1.80	12.6 ± 1.43

PO	0.5 mg/kg	2 mg/kg	4 mg/kg
$AUC_{infinite}$ (h·μg/mL)	0.147 ± 0.091	0.507 ± 0.392	1.20 ± 0.754
Dose normalized $AUC_{infinite}$ (h·kg/L)	0.294 ± 0.182	0.254 ± 0.196	0.30 ± 0.189
BA (%)	23.9	24.5	22.4

표 1. Pharmacokinetic parameters of ABN401 after intravenous(IV) and oral administration(PO) at the dose of 0.5, 2, 4 mg/kg in rats

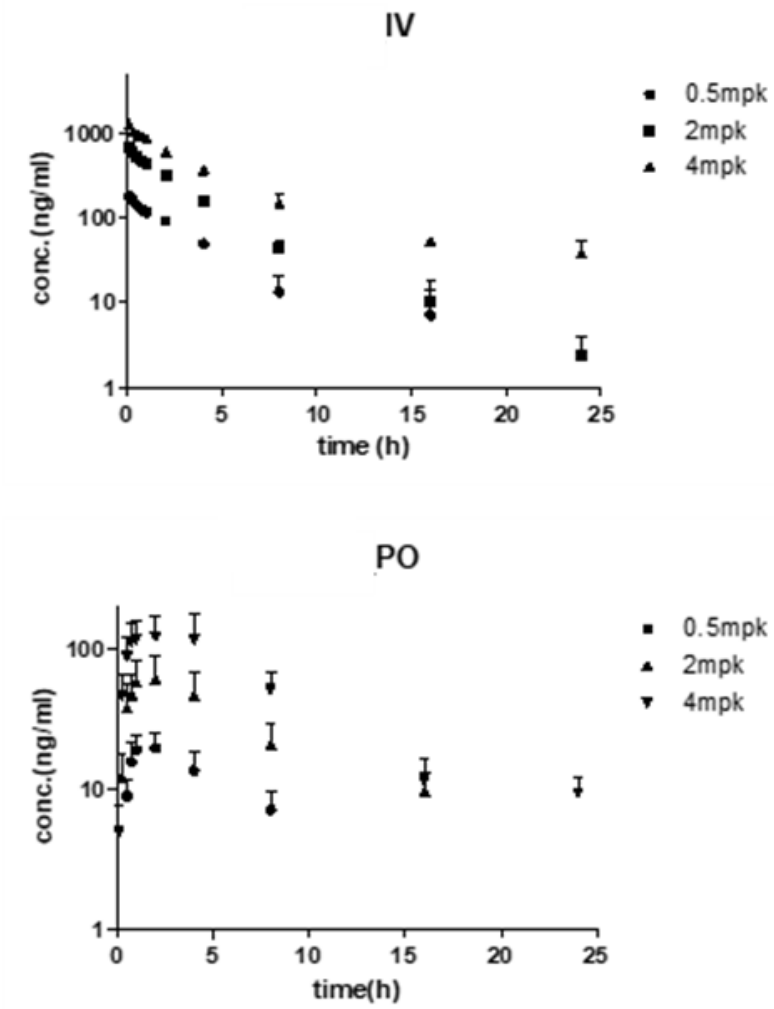


그림 4. Plasma concentration-time profils of ABN401 after intravenous(IV) and oral administration(PO) at the dose of 0.5, 2, 4 mg/kg in rats

3.2 Equilibrium solubility study

ABN401의 용해도를 알아보기 위해 여러 용액에서 ABN401의 equilibrium solubility를 측정하였다(그림 5). DDW, HCl solution, 인공 위액 (FassGF) 그리고 인공 장액 (FassIF)에서의 용해도는 각각 0.00799 ± 0.000140, 8.35 ± 0.887, 11.4 ± 0.404 그리고 0.00746 ± 0.000337 mg/ml로 나타났다. ABN401은 인공 장액(pH 6.8)에서보다 인공 위액 및 HCl solution(pH 1.2)에서 용해도가 훨씬 더 높게 나타났으며, 인공 장액에서의 용해도는 DDW에서의 용해도와 유의미한 차이를 보이지 않았다.

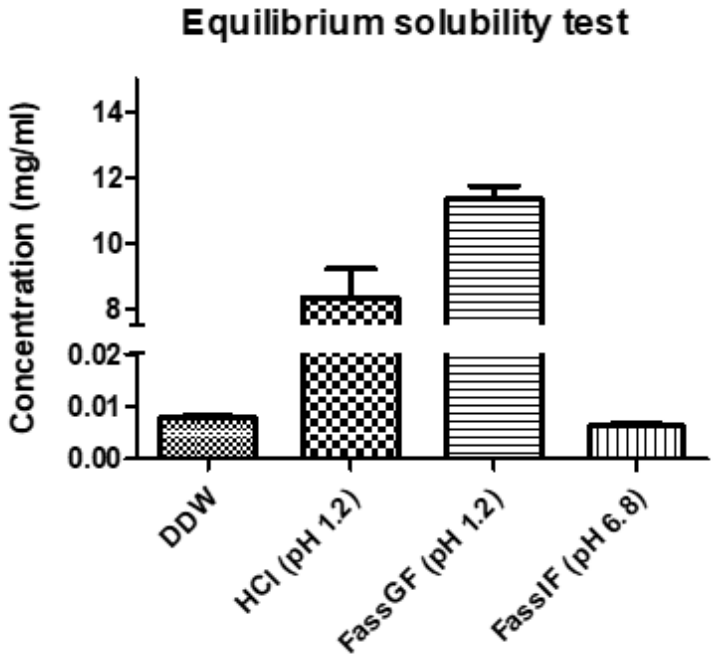


그림 5. The solubility of ABN401 in different vehicles.

3.3 *In vitro* dissolution-precipitation study

위의 2.5.1에서 설명한 model을 적용하여 *in vitro* dissolution - precipitation study 결과를 fitting하고 k_{diss}, k_{nuc}, α를 예측하였다. Data fitting에는 Berkeley-madonna software를 이용하였고 각각의 predicted parameter의 mean과 sd를 표 2.에 정리하였다. 그 중 대표로 0.2582 mg/ml로 실험한 n1 data fitting 결과를 그림 6.에 나타내었다. 침전이 본격적으로 이루어지기 전에 nucleation 과정이 이루어지는 latency time 이 약 2 분 정도로 나타났으며 그 후 침전이 이루어지다가 약 10 분에 equilibrium solubility에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 각각의 predicted parameter에 대해 one-way ANOVA를 수행한 결과 다섯 농도 간에 유의미한 차이를 보이지 않았으며 따라서 각 parameter의 전체의 mean 값을 이후 PBPK modeling에 적용하였다.

Initial conc. (mg/ml)	k_{diss} (min^{-1})	k_{nuc} ($min^{-1}\cdot(mg/ml)^{1-\alpha}$)	alpha
0.0861	0.446 ± 0.205	13.2 ± 1.92	2.32 ± 0.974
0.1721	0.380 ± 0.0453	11.0 ± 0.418	2.39 ± 1.06
0.2582	0.179 ± 0.117	11.9 ± 0.599	1.81 ± 1.08
0.3443	0.206 ± 0.0291	12.2 ± 0.429	0.550 ± 0.182
0.43	0.218 ± 0.0199	11.1 ± 0.431	1.40 ± 0.134

표 2. Identified parameters from equation 1 and 2 by fitting *in vitro* dissolution - precipitation study data

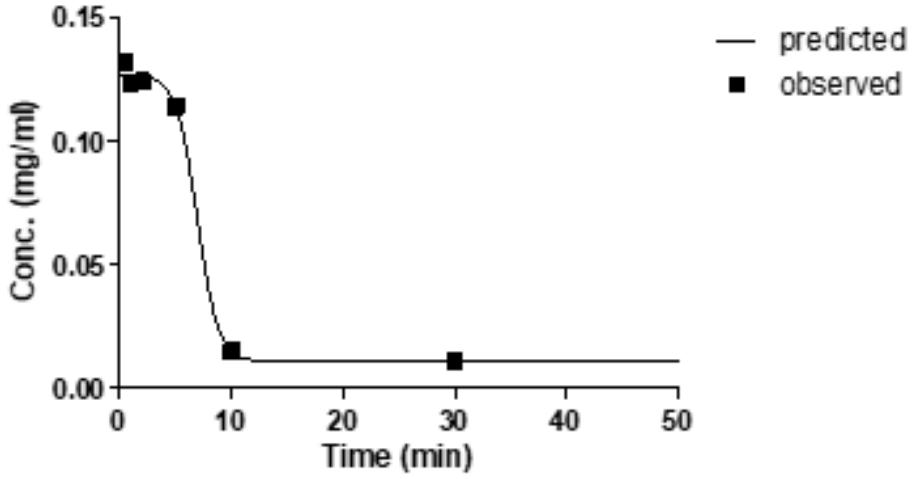


그림 6. Representative profile of dissolution - precipitation with observed and predicted data in initial concentration of 0.2582 mg/ml

3.4 Ussing chamber study

Rat intestine에서의 ABN401의 apparent permeability(P_{app})를 알아보기 위해 20, 50, 100 μM에서 Ussing chamber study를 수행하였다. 세 농도에서 P_{app}가 각각 11.3 ± 5.48, 10.5 ± 3.72 그리고 10.5 ± 2.64 cm/s × 10^{-6} 로 나타났으며(표 3, 그림 7), 실험 농도 범위에 대하여 rat intestinal P_{app}가 농도 의존성을 보이지 않았다. 하지만 대표적인 MDR1 저해제인 verapamil 500 μM을 20 μM의 ABN401과 함께 처리한 군에서는 ABN401의 투과도가 유의미하게 증가하였다($p<0.001$).

Concentration (μM)	P_{app} (cm/s x 10^{-6})	Recovery (%)
20	11.3 ± 5.48	103 ± 4.90
50	10.5 ± 3.72	99.1 ± 7.80
100	10.5 ± 2.64	89.7 ± 9.83
20 + verapamil 500 μM (n=4)	32.3 ± 5.22	137 ± 5.20

표 3. The apparent permeability(P_{app}) and recovery of ABN401 in Ussing chamber study

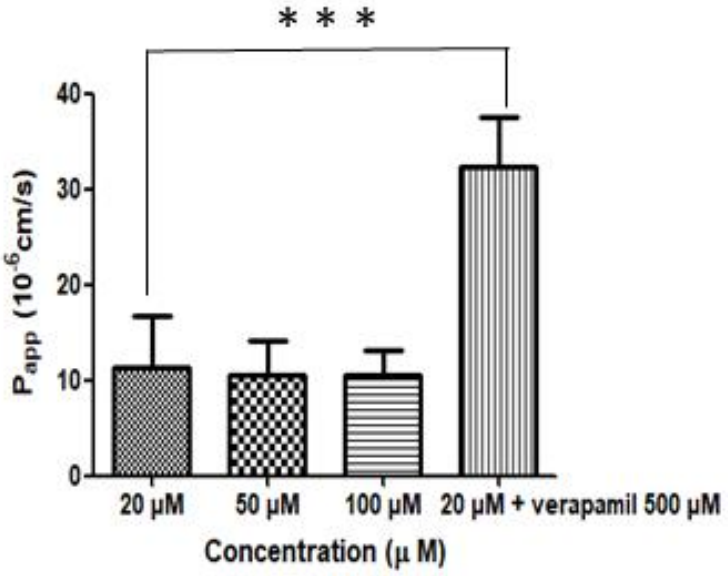


그림 7. P_{app} of ABN401 in 20, 50, 100 μM and 20 μM treated with 500 μM of verapamil

3.5 Metabolic stability in rat intestinal homogenate

Rat intestinal homogenate에서의 ABN401의 대사 정도를 평가하기 위해 1, 3, 10, 30, 100 μM 등 다섯 농도에서 metabolic stability test를 진행하였다(그림 8). 각 농도에서 얻은 metabolic rate constant (k)의 mean과 sd는 표 4.에 나타내었다. Rate constant에 대하여 one-way ANOVA 및 Tukey's multiple comparison test를 수행한 결과, 100 μM를 제외한 네 가지 농도에서 유의미한 차이를 보이지 않았고($p>0.05$), 이에 가장 저 농도인 1 μM에서 얻어진 rate constant를 F_g를 계산에 적용하였다. 위 2.7의 equation 4를 통해 계산한 CL_{int}은 0.0190 ml/min이며 Ussing chamber study를 통해 얻은 permeability, 그리고 문헌에 따른 Q_{villi} 및 intestine surface area 값을 이용하여 equation 5, 6에 따라 F_g를 계산한 결과 0.828임을 추정할 수 있었다.

(N=3, Mean ± SD)

Initial Conc. (μM)	k (min^{-1})
1	0.00186 ± 0.000378
3	0.00241 ± 0.000458
10	0.00176 ± 0.000451
30	0.00222 ± 0.000389
100	0.00113 ± 0.000679

표 4. The metabolic rate constant(k) of ABN401 in rat intestinal homogenates

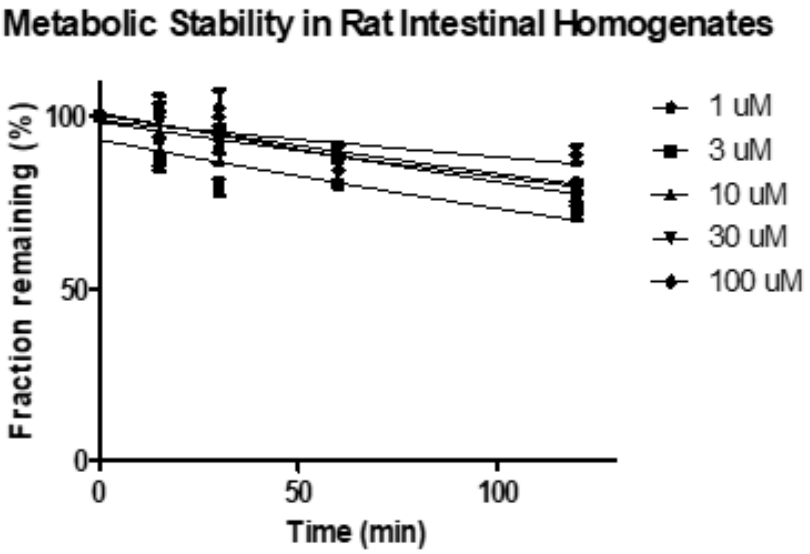
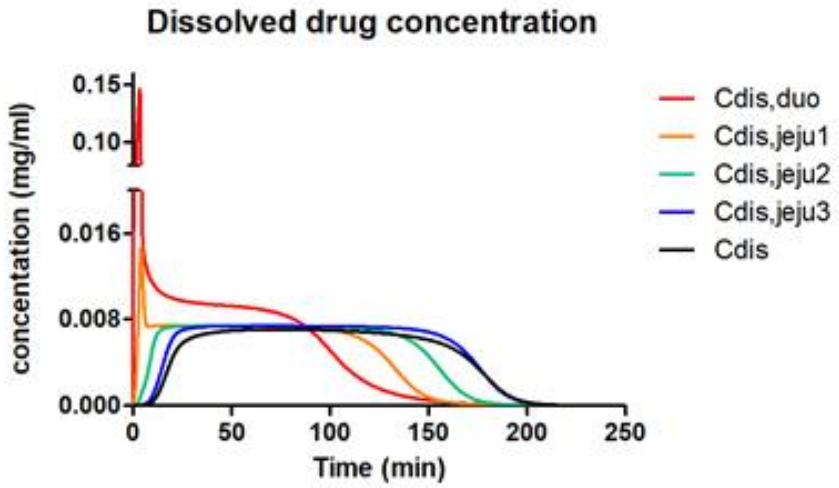


그림 8. The metabolic stability profile of ABN401 in rat intestinal homogenates

3.6 Prediction of fraction absorbed

위 2.8의 model을 이용하여 시간에 따른 각 segment 내 용해된 약물 및 석출된 약물의 농도를 그림 9.에 나타냈다. 용해된 약물 농도 추이를 살펴보면 앞쪽 segment인 duodenum과 jejunum 1에서 과포화에 도달한 ABN401이 석출되어 equilibrium solubility에 도달하는 것을 확인할 수 있으며, 그 이후 segment에서도 equilibruim solubility까지 용해가 일어나는 것을 알 수 있습니다.

결과적으로 각 segment에서 흡수된 ABN401의 양을 합하여 equation 10에 따라 시간에 따른 F_a를 나타낸 결과, F_a가 linear하게 증가하다가 0.537에 도달하였습니다(그림 10).



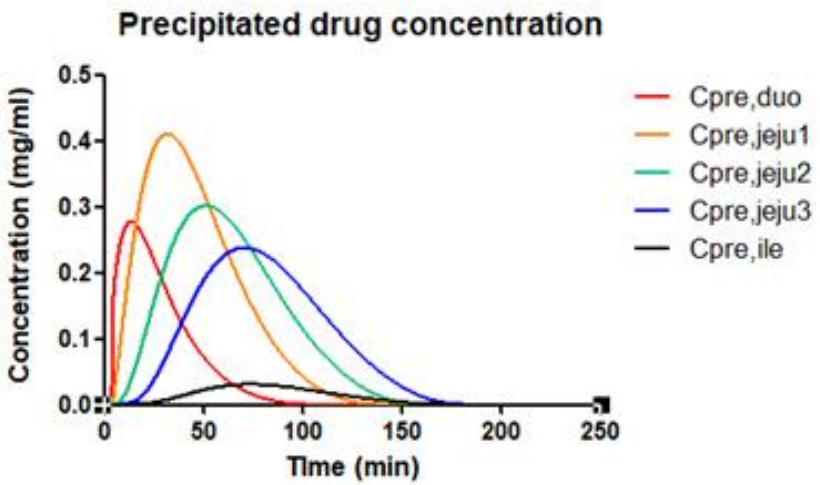


그림 9. Simulated concentration profile of dissolved and precipitated ABN401 in 5 segments of rat intestine obtained by *in vivo* absorption model

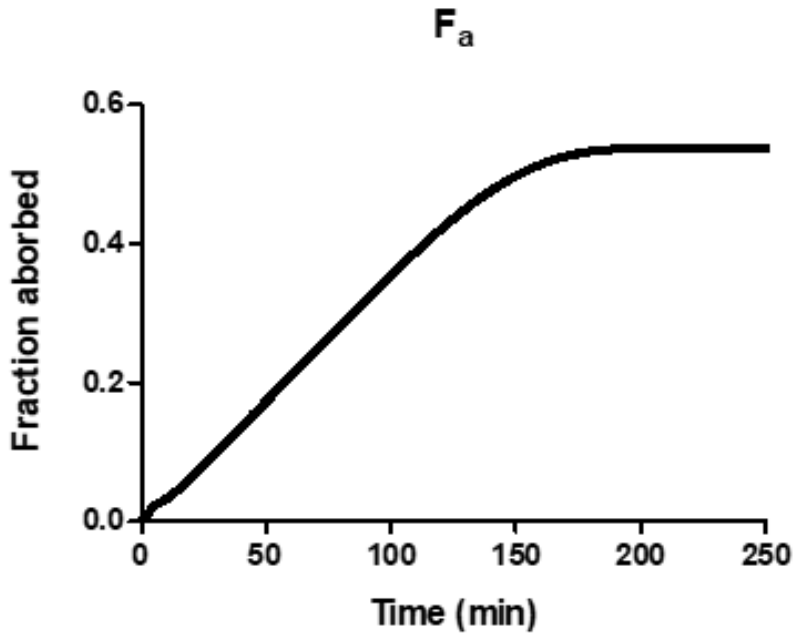


그림 10. Simulated profile of fraction absorbed(F_a) as a function of time in rat intestine obtained by *in vivo* absorption model

4. Discussion and Conclusion

경구 투여는 투여의 편리성 및 높은 복약순응도 등의 장점을 가지고 있어 일반적으로 선호되는 약물 투여 경로 중 하나이다. 따라서 oral bioavailability (BA)는 신약 개발 과정에서 중요한 고려 사항으로 작용한다. 약물이 낮은 oral BA를 보이는 원인으로는 약물의 solubilitiy, permeability, efflux mechanism 등이 있으며, 원인을 찾고 이를 극복하기 위한 전략을 구상하는 것은 신약 개발 과정에서 매우 중요한 부분이라고 할 수 있다.

현재 경구제제로서 ABN401은 임상 1상 시험을 준비 중인 selective c-Met 억제제로, 폐암과 위암 치료에 적응증을 가지는 것으로 개발 중인 약물이다. 하지만 rat에서 0.5, 2, 4 mg/kg의 용량으로 투여하여 실험한 결과, oral BA가 약 23%로 상당히 낮음을 확인했다. 이에, ABN401의 rat 소장에서의 흡수에 관여하는 요인들을 살펴보고 특히 F_a를 결정하는 요소라고 할 수 있는 solubility와 permeability 그리고 F_g를 결정하는 요소인 intestinal metabolism 측면에서 접근하고자 했다.

먼저 약물의 용해도를 살펴보기 위해 진행한 equilibrium solubility test 결과를 살펴보면 DDW에 대한 ABN401의 용해도는 약 8 μg/ml로 미국 약전 (USP)에 따라 'practically insoluble'에 해당한다. 인공 위액에서의 용해도는 높게 나타났으나 인공 장액에서는 용해도가 인공 위액에서보다 1000배 이상 더 낮게 나타나는 것을 통해, 위장에 녹아있는 ABN401이 소장으로 넘어가면서 석출이 일어났을 가능성에 대해 생각하게 되었다. 인공 장액에서 약물이 석출되는 과정의 kinetic을 좀 더 살펴보기 위해 *in vitro* dissolution-precipitation study를 수행하였고 이를 통해 k_{diss}, k_{nuc}, α 등의 parameter를 예측할 수 있었다. 다섯 농도에서 얻은 각각의

parameter에 대해 one way ANOVA를 수행한 결과, 유의미한 차이를 보이지 않았으며 따라서 전체의 mean value를 하나의 대표 parameter로 보고 이후 PBPK modeling에 이를 적용하였다.

ABN401의 rat 소장에서의 permeability를 알아보기 위해 수행한 Ussing chamber study 결과, P_{app}가 10.5~ 11.3 cm/s × 10^{-6} 로 비교적 permeable하였으며, 실험 용량 범위에서는 용량 의존적 P_{app}가 관찰되지 않았다. 대표적인 MDR1 저해제인 verapamil을 ABN401과 함께 투여한 군에서는 ABN401의 투과도가 유의미하게 증가하는 것을 통해 ABN401과 rat MDR1 사이에 상호작용이 존재한다는 것에 대한 간접적인 증거로 생각할 수 있었다.

Rat intestine에서 ABN401의 metabolic stability를 평가했을 때, 다섯 농도에서 얻은 rate constant에 대하여 one-way ANOVA를 수행한 결과 가장 높은 농도를 제외한 네 가지 농도에서 유의미한 차이를 보이지 않았다. 따라서 보수적으로 가장 낮은 농도에서 얻은 rate constant를 적용하여 equation 5 및 6에 따라 계산한 F_g는 0.828 이었다. 이를 통해 ABN401의 intestinal first pass가 0.2 정도로 크지 않으며 약물의 낮은 BA에 주된 영향을 미치는 인자는 아닌 것으로 생각할 수 있었다.

Oral BA에 영향을 미치는 또 다른 요인인 hepatic first pass를 알아보기 위해 *in vivo* dose-ranging study 결과를 통해 얻은 clearance(CL)를 이용하였다. 본 연구실의 선행 연구를 통해 ABN401의 신장 배설이 1% 미만으로 minor하다는 것이 밝혀져 있었기 때문에 *in vivo* 투여를 통해 얻은 systemic CL가 곧 hepatic CL (i.e. non renal CL)이라고 가정하고 F_h를 계산하였다. 그 결과 계산된 F_h는 0.817로, hepatic first pass가 0.2 정도로 크지 않으며 이 또한 ABN401의 낮은 흡수율에 주된 영향을 미치는 인자는 아닌 것으로 생각할 수 있었다.

지금까지의 결과를 이용하여, *in vivo* 흡수 모델로 많이 쓰이는 ADAM

model에 위 2.8의 dissolution-precipitation model을 적용하여 F_a를 예측하고자 하였다. Ussing chamber study를 통해 구한 permeability와 *in vitro* precipitation - dissolution study를 통해 예측한 k_{diss}, k_{nuc}, α를 modeling에 대입하였다. 이를 통해 얻은 각 segment에서 흡수된 ABN401의 양을 더해 F_a를 계산할 수 있고 그 결과 얻은 predicted F_a는 0.537이다. 따라서 gastrointestinal tract을 통한 ABN401의 흡수는 약 절반 정도임을 알 수 있었다.

BA는 F_a, F_g 그리고 F_h의 곱으로 나타나므로, 위의 결과들을 종합하여 각각의 predicted value를 곱하면, predicted BA는 36.3 %임을 알 수 있으며 이는 observed BA의 약 1.6 배이다. 추정치와 실측치가 크게 차이나지 않는 것으로부터 BA prediction에 사용된 model이 비교적 유효하다고 생각할 수 있다.

ABN401의 흡수 과정을 전체적으로 봤을 때, intestine metabolism이나 hepatic first pass 과정은 major한 요인은 아닌 것으로 볼 수 있으며 가장 key step은 약물의 용해도를 개선하여 위장관을 통한 permeation의 기여도를 증가시키는 것이라고 할 수 있다. 약제학적 관점에서 이를 개선한다면 ABN401의 전체적인 흡수를 증가시킬 수 있고 약물의 활용성을 더 높일 수 있을 것이다.

5. References

1. Gheradi, E., Birchmeier, W., Birchmeier, C., and Woude, GV., Targeting MET in cancer: rationale and progress. Nat. Rev. Cancer., 2012. 12(2):p.89-103
2. Organ, S. L., & Tsao, M. S. (2011). An overview of the c-MET signaling pathway. *Ther Adv Med Oncol, 3*(1 Suppl), S7-s19\
3. Cantley, L. G., & Cantley, L. C. (1995). Signal transduction by the hepatocyte growth factor receptor, c-met. Activation of the phosphatidylinositol 3-kinase. *J Am Soc Nephrol, 5*(11), 1872-1881.
4. Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmiecik, T. E., Vande Woude, G. F., & Aaronson, S. A. (1991). Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science, 251*(4995), 802-804.
5. Sierra, J. R., & Tsao, M.-S. (2011). c-MET as a potential therapeutic target and biomarker in cancer. *Ther Adv Med Oncol, 3*(1 Suppl), S21-S35.
6. Beau-Faller, M., Ruppert, A. M., Voegeli, A. C., Neuville, A., Meyer, N., Guerin, E., . . . Gaub, M. P. (2008). MET gene copy number in non-small cell lung cancer: molecular analysis in a targeted tyrosine kinase inhibitor naive cohort. *J Thorac Oncol, 3*(4), 331-339.
7. Chan, B. A., & Hughes, B. G. M. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational lung cancer research, 4*(1), 36-54.
8. Infante, J. R., Rugg, T., Gordon, M., Rooney, I., Rosen, L., Zeh, K., Ramanathan, R. K. (2013). Unexpected renal toxicity associated

with SGX523, a small molecule inhibitor of MET. *Invest New Drugs, 31*(2), 363-369.

9. Brown, R. P., Delp, M. D., Lindstedt, S. L., Rhomberg, L. R., & Beliles, R. P. (1997). Physiological parameter values for physiologically based pharmacokinetic models. *Toxicol Ind Health, 13*(4), 407-484.
10. Alanine, A., Nettekoven, M., Roberts, E., & Thomas, A. W. (2003). Lead generation enhancing the success of drug discovery by investing in the hit to lead process. *Comb Chem High Throughput Screen, 6*(1), 51-66.
11. van De Waterbeemd, H., Smith, D. A., Beaumont, K., & Walker, D. K. (2001). Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics. *J Med Chem, 44*(9), 1313-1333.
12. Gomez-Orellana, I. (2005). Strategies to improve oral drug bioavailability. *Expert Opin Drug Deliv, 2*(3), 419-433.
13. Jakubiak, P., Wagner, B., Grimm, H. P., Petrig-Schaffland, J., Schuler, F., & Alvarez-Sanchez, R. (2016). Development of a Unified Dissolution and Precipitation Model and Its Use for the Prediction of Oral Drug Absorption. *Mol Pharm, 13*(2), 586-598.
14. Yoon, I. S., Choi, M. K., Kim, J. S., Shim, C. K., Chung, S. J., & Kim, D. D. (2011). Pharmacokinetics and first-pass elimination of metoprolol in rats: contribution of intestinal first-pass extraction to low bioavailability of metoprolol. *Xenobiotica, 41*(3), 243-251.
15. Shin, B. S., Yoo, S. D., Kim, T. H., Bulitta, J. B., Landersdorfer, C. B., Shin, J. C. Shin, S. (2014). Quantitative determination of absorption and first-pass metabolism of apicidin, a potent histone deacetylase inhibitor. *Drug Metab Dispos, 42*(6), 974-982.
16. Obach, R. S. (1997). Nonspecific binding to microsomes: impact on

scale-up of in vitro intrinsic clearance to hepatic clearance as assessed through examination of warfarin, imipramine, and propranolol. *Drug Metab Dispos, 25*(12), 1359-1369.

17. McConnell, E. L., Basit, A. W., & Murdan, S. (2008). Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *J Pharm Pharmacol, 60*(1), 63-70.
18. Rowland, M., Peck, C., & Tucker, G. (2011). Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science. *Annu Rev Pharmacol Toxicol, 51*, 45-73.
19. Sugano, K.; Okazaki, A.; Sugimoto, S.; Tavornvipas, S.; Omura, A.; Mano, T. Solubility and dissolution profile assessment in drug discovery. Drug Metab. Pharmacokinet. 2007, 22 (4), 225－254.
20. Kambayashi, A., Yasuji, T., & Dressman, J. B. (2016). Prediction of the precipitation profiles of weak base drugs in the small intestine using a simplified transfer ("dumping") model coupled with in silico modeling and simulation approach. *Eur J Pharm Biopharm, 103*, 95-103.
21. Kambayashi, A., & Dressman, J. B. (2017). Forecasting gastrointestinal precipitation and oral pharmacokinetics of dantrolene in dogs using an in vitro precipitation testing coupled with in silico modeling and simulation. *Eur J Pharm Biopharm, 119*, 107-113.
22. Matsuda, Y., Konno, Y., Satsukawa, M., Kobayashi, T., Takimoto, Y., Morisaki, K., & Yamashita, S. (2012). Assessment of intestinal availability of various drugs in the oral absorption process using portal vein-cannulated rats. *Drug Metab Dispos, 40*(12), 2231-2238.

Abstract

Identification of the major factor(s) governing the oral absorption of ABN401, an experimental anticancer agent, in rats

Jungmin Yeo
Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy
The Graduate School
Seoul National University

c-MET is one of receptor tyrosine kinases and ABN401 has a specific inhibitory effect on c-MET. ABN401 is expected to have anticancer effect on lung cancer and stomach cancer, and is currently on the stage of preclinical studies. However, previous studies have shown that ABN401 has low oral bioavailability(BA) in rats. Therefore, the objective of this study is to determine major factors governing the oral absorption of ABN401 in rats especially in aspect of solubility, permeability and intestinal metabolism.

ABN401 was dissolved clearly in a dosing solution and administrated intravenously / orally to male Sprague-Dawley rats at the doses of 0.5, 2 and 4 mg/kg for the characterization of the systemic pharmacokinetics. The dose-normalized AUC_{inf} values for the compound were found to be linear in the dose range studied: The oral BA was found to be approximately 22.4 to 24.5%.

The solubility of ABN401 in simulated gastric fluid and intestinal fluis was determined and the solubility was found to be 11.4 and 0.00746 mg/ml, respectively. This results suggest that the precipitation of ABN401 may occur during the absorption process. To evaluate the impact of the precipitation/dissolution on the intestinal absorption of ABN401, *in vitro* precipitation study was carried out at ABN401 concentrations ranging from 0.0861 to 0.430 mg/ml in simulated intestinal fluid. The rate constant for the precipitation was estimated to be 0.209~ 0.606 min^{-1} depending on the initial concentration in simulated intestinal fluid. To characterize the kinetics of ABN401 transport in the rat intestinal epithelium, Ussing chamber study was carried out. The effective permeability ranged from 10.5 to 11.3 x 10^{-6}cm/s in 20, 50 or 100 μM of ABN401 in 1% DMSO transport media. In a group of ABN401 treated with verapamil, a representative MDR1 inhibitor, the permeability of ABN401 is significantly increased, suggesting that ABN401 might interact with rat MDR1. Metabolic stability of ABN401 in rat intestinal homogenate was measured to evaluate the contribution of metabolic elimination by rat intestine. The estimated intrinsic clearance was 0.0190 ml/min and accordingly, calculated F_g was 0.817. Since the urinary excretion was minor for ABN401 (i.e., less than 1% of the dose) in rats, F_h, as predicted from the systemic clearance, may be close to 0.817.

The *in vivo* absorption model is established and the fraction

absorbed(F_a) is predicted to be 0.537 using previously obtained parameters. The bioavailability calculated as the product of predicted F_a, F_g and F_h was 36.3% which is approximately 1.6 fold of the observed bioavailability.

keywords : ABN401, oral bioavailability, $F_aF_gF_h$, solubility
Student Number : 2017-29702