



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](#)

의학박사 학위논문

약물 대사효소 및 수송체
유전형과 aspirin 병용투약이
clopidogrel 의 약동학/약력학에
미치는 영향을 평가하기 위한
건강자원자 대상 임상시험

2016 년 2 월

서울대학교 대학원

협동과정 임상약리학 전공

홍 경 섭

의학박사 학위논문

약물 대사효소 및 수송체
유전형과 aspirin 병용투약이
clopidogrel 의 약동학/약력학에
미치는 영향을 평가하기 위한
건강자원자 대상 임상시험

2016 년 2 월

서울대학교 대학원

협동과정 임상약리학 전공

홍 경 섭

초록

아스피린 복용에 따른 MDR1 유전자의 발현 증가로 인해 MDR1 의 기질 약물인 클로피도그렐의 흡수가 감소하였다는 보고가 있었고, 아스피린 병용 시 클로피도그렐의 효능 저하에 따른 치료 실패 가능성에 대한 우려가 있다. 본 연구에서는 전구 약물인 클로피도그렐의 대사에 관여하는 CYP2C19 유전형 및 MDR1 발현에 영향을 미치는 것으로 알려진 C3435T 유전형 별 남성 건강대상자 15 명을 모집한 후 8 주간 아스피린 복용 후 인체 십이지장 점막에서의 MDR1 발현 정도를 최초로 평가하였고, MDR1 발현과 클로피도그렐 및 H4 활성대사체의 약동학 및 약력학 간의 관련성을 평가하였다. 결과로서 아스피린 복용 후 C3435T CC/CT 유전형에서는 MDR1 발현이 증가한 반면 TT 군에서는 변화가 없거나 오히려 감소하였다. CC/CT 군 및 TT 군에서 공통적으로 아스피린 복용 전후에 클로피도그렐의 전신노출 정도에 유의한 차이는 없었다. 반면 H4 활성대사체의 경우 아스피린 투약 후 EM-CC/CT 군에서 통계적으로 유의하게 감소하였지만 *relative platelet inhibition* 으로 평가한 약력학 분석에서는 차이가 없었다. EM_TT 군 및 PM_CC/CT 군에서는 통계적으로 유의하지는 않았지만 H4 활성대사체가 증가하는 양상을 보였다. 결론적으로 아스피린 복용 후 MDR1 C3435T CC/CT 군에서 MDR1 발현이 증가하였음에도 불구하고 클로피도그렐 및 H4 활성대사체의 전신노출 정도는 감소하지 않았다. 아스피린과 클로피도그렐의 병용 투약은

EM_CC/CT, EM_TT 혹은 PM_CC/CT 군에서 효과적인 조합이라
생각된다.

.....

주요어 : 클로피도그렐, 아스피린, MDR1, CYP2C19

학 번 : 2011-30623

목차

초록.....	i
목차.....	iii
표목차.....	iv
그림목차.....	v
약어.....	vii
서론.....	1
방법론.....	4
결과.....	12
고찰.....	39
참고문헌.....	47
영문초록.....	50

표목차

Table 1. Disposition of Subject.....	10
Table 2. Comparison of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of clopidogrel after single oral administration of clopidogrel 300 mg in each period.....	13
Table 3. Study subject's demographics, genotypes and expression of CYP2C19 and MDR1 after the administration of aspirin for 8 weeks.....	20
Table 4. Comparison of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of clopidogrel by genotype of CYP2C19 after aspirin 300 and 600 mg administrations for 4 weeks successively.....	22
Table 5. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of clopidogrel by genotype of MDR1 C3435T after aspirin 300 and 600 mg administrations for 4 weeks successively.....	28
Table 6. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of clopidogrel by genotype of CYP2C19 and MDR1 C3435T after aspirin 300 and 600 mg administrations for 4 weeks successively.....	34

그림목차

Figure 1. Study design.....	11
Figure 2. Mean plasma concentration-time profiles of clopidogrel by period. Period 1, 2, and 3 denote baseline, 0-4 week, and 5-8 week after daily oral administration of aspirin at 300 mg and 600 mg, respectively. (Upper: Linear scale, Lower: Log-linear scale).....	15
Figure 3. Mean plasma concentration-time profiles of active metabolite (H4) of clopidogrel by period. Period 1, 2, and 3 denote baseline, 0-4 week, and 5-8 week after daily oral administration of aspirin at 300 mg and 600 mg, respectively. (Upper: Linear scale, Lower: Log-linear scale).....	16
Figure 4. Relative inhibition of platelet aggregation (% change from predose baseline in each period) with time after dose by period.....	18
Figure 5-1. AUC _{last} of clopidogrel parent with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 genotype.....	24
Figure 5-2. AUC _{last} of active metabolite (H4) for clopidogrel with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 genotype.....	25
Figure 5-3. Relative inhibition of platelet aggregation (% change from predose baseline in each period) with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 genotype.....	26
Figure 6-1. AUC _{last} of clopidogrel with time after the administration of clopidogrel in each period by MDR1 genotype.....	30

Figure 6-2. AUC_{last} of active metabolite (H4) for clopidogrel with time after the administration of clopidogrel in each period by MDR1 genotype.....31

Figure 6-3. Relative inhibition of platelet aggregation (% change from predose baseline in each period) with time after the administration of clopidogrel in each period by MDR1 genotype.....32

Figure 7-1. AUC_{last} of clopidogrel parent with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 and MDR1 genotype.....36

Figure 7-2. AUC_{last} of active metabolite (H4) for clopidogrel with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 and MDR1 genotype.....37

Figure 7-3. Relative inhibition of platelet aggregation (% change from predose baseline in each period) with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 and MDR1 genotype.....38

약어

MDR1: multidrug resistance protein 1

P-gp: permeability glycoprotein

EM: CYP2C19 extensive metabolizer

PM: CYP2C19 poor metabolizer

CC: CC subtype of MDR1 gene C3435T polymorphism

CT: CT subtype of MDR1 gene C3435T polymorphism

TT: TT subtype of MDR1 gene C3435T polymorphism

CC/CT: CC or CT subtype of MDR1 gene C3435T polymorphism

EM_CC/CT: CYP2C19 extensive metabolizer and CC/CT

EM_TT: CYP2C19 extensive metabolizer and TT

PM_CC/CT: CYP2C19 poor metabolizer and CC/CT

RPI: relative platelet inhibition

PK: pharmacokinetics

PD: pharmacodynamics

T_{\max} : time of maximum concentration

C_{\max} : maximum concentration

AUC: area under the concentration-time curve

서론

클로피도그렐 (clopidogrel)은 심근경색 혹은 뇌졸중을 앓은 환자에서 혈전증의 이차 예방을 위해 흔히 사용되는 약제이다. 아스피린 (aspirin)은 심근경색 혹은 뇌졸중을 앓은 환자에서 예방 효과가 잘 입증되어 있는 약제로서,¹ 항 혈전 효과를 높이기 위해 클로피도그렐과 아스피린의 병합 요법이 임상에서 흔히 사용되고 있다. 하지만, 이러한 이중 항 혈소판 치료법의 효능 및 안전성에 대하여는 여전히 논란의 여지가 있고,^{2,4} 치료 중에도 재발하는 환자에서는 클로피도그렐에 대한 낮은 반응성이 중요한 원인으로 알려져 있다.⁵

최대 30%의 환자에서는 클로피도그렐의 예방 효과가 명확하지 않은 것으로 알려져 있는데,⁶ 이는 클로피도그렐의 흡수 및 대사에 영향을 미치는 유전적 요인들에 의해서 약동학이 개인간 큰 편차를 보이는 점과 관련된 것으로 생각된다.⁷⁻¹³

약물수송체는 약동학에 영향을 미치는 요인으로서 상당한 개인차를 초래할 수 있는데, 클로피도그렐은 multidrug resistance protein 1 (MDR1) 혹은 permeability glycoprotein (P-gp)로 불리는 ATP-binding cassette transporter, subfamily B, member 1 (ABCB1)의 기질 약물이다. 장 상피세포에서 MDR1 발현에 따라 내강으로 약물이 배출되면 약물의 흡수가 감소하고 클로피도그렐의 효과를 저해할 수 있다.⁷ Jung 등은 인체 장 상피 세포주 (Caco-2)를 이용한 in vitro

실험 및 rat 에서 closed-loop model 을 이용한 in vivo 연구를 통해 아스피린에 의한 MDR1 발현 증가 및 아스피린 복용에 따른 클로피도그렐의 장 흡수율 감소를 보고한 바 있다.¹⁴

본 연구의 선행연구로서 Oh 등은 전구약물인 클로피도그렐의 체내 활성화에 중요한 영향을 미치는 cytochrome P450 (CYP) isoenzyme 인 CYP2C19 과 paraoxonase-1 (PON1) 유전형에 따라 동수로 모집한 18 명의 건강 대상자에서 아스피린 복용 후 MDR1 발현을 증가시키는 것으로 알려진 micro RNA (miR) 27a 및 451, 클로피도그렐 및 활성화대사체 H4 의 혈장 농도를 평가하였다.¹⁵ 4 주간 아스피린 100mg/일 복용 후 miR-27a 는 7.67 배로 유의하게 증가하였고, 클로피도그렐의 area under the concentration-time curve (AUC)는 통계적으로 유의하지는 않았지만 14% 감소한 반면 활성화대사체 H4 농도는 아스피린 투약 전후에 차이가 없었다.¹⁵ 하지만, 일일 아스피린 용량 100mg 은 동물실험에 사용된 용량에 비해 상당히 적은 용량이고, 아스피린 복용에 따른 인체 장 상피세포에서의 MDR1 발현 정도 변화를 직접적으로 평가하지 않았으며, MDR1 유전형에 따른 차이를 평가하지 못했다는 점에서 한계를 갖고 있다.

본 연구에서는 CYP2C19 및 MDR1 유전형 별로 건강대상자를 모집한 후 4 주간 300mg 및 이후 4 주간 600mg 의 아스피린을 1 일 1 회 투약 후 십이지장 점막 생검을 통해 장 상피세포에서의 MDR1 발현 정도와 클로피도그렐 및 H4 활성화 대사체의 혈장 내 농도에

대한 약동학 평가 및 relative platelet inhibition (RPI)을 활용한 약력학 평가를 수행함으로써 이중 항혈소판 치료를 받는 환자에서 아스피린과의 약물상호작용에 의한 클로피도그렐의 효능 저하 우려에 대한 기전을 규명하고 현재 통용되고 있는 이중 항혈소판치료법의 보완 필요성에 대한 임상약리학적 답을 찾는 것을 목표로 하였다.

방법론

1. 연구대상 및 시험 방법

본 연구는 건강한 성인 남성 자원자를 대상으로 수행되었으며, 연구의 목적, 내용 등에 대하여 충분히 설명을 듣고 자의에 의해 참여를 결정한 자원자들에 한하여 스크리닝 검사를 시행하였고, CYP2C19 및 MDR1 유전형에 따라 피험자를 본 임상시험에 등록하였다 (Table 1).

본 연구는 3 기로 구성되었다. 스크리닝을 통과한 피험자를 대상으로 클로피도그렐 투여 전 상부위장관 내시경을 통해 십이지장 생검을 시행하였다. 첫 번째 클로피도그렐 투약일 전날 모든 대상자는 서울대학교병원 임상시험센터에 입원하여 저녁 10 시 이후 식수를 제외하고 금식하였다. 투약일 오전 9 시경 공복상태에서 각 군의 피험자는 클로피도그렐 75 mg 을 투약하였다. 익일부터 1 일 1 회 용법으로 4 주간 아스피린 300 mg, 이후 4 주간 아스피린 600 mg 을 경구투여 하였다. 아스피린 300 mg 과 600 mg 의 마지막 투여 일에 클로피도그렐을 각각 1 회씩 투여하여 계획된 약동학/약력학 평가를 시행하였다 (Figure 1).

클로피도그렐과 활성대사체 (H4) 의 약동학 분석을 위한 채혈을 클로피도그렐 투약 후 24 시간 동안 정해진 시간에 17 회에 걸쳐 채혈을 진행하였다. 아울러, 클로피도그렐 투여 시 혈소판 응집능

평가를 위하여 클로피도그렐 투약 직전 및 투약 2 시간 후에 VerifyNow®를 시행하였다.

본 연구는 서울대학교병원 의학연구윤리심의위원회의 심의를 거쳐 승인을 받은 후 수행되었다.

2. 혈장 중 클로피도그렐 농도 측정

클로피도그렐과 활성대사체 (H4)의 약동학 분석을 위하여 투약 직전 및 투약 10, 20, 30, 40, 50 분 후, 1, 1.25, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 10, 12, 24 시간 후에 채혈을 시행하였으며, Ultra Performance Liquid Chromatography-tandem Mass Spectrometry (UPLC-MS/MS)를 활용하였고 특이도, 정확도, 정밀도 그리고 정량한계 등에 대한 타당성 검증을 완료한 후 검체를 분석하였다.

혈장 시료 400 μL 에 1% formic acid 100 μL , 내부표준물질 (클로피도그렐-d4, 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in 50% methanol) 30 μL 그리고 ethyl acetate 1.25 mL 를 가하였다. 1500 rpm 에서 10분간 잘 섞은 후 14,000 rpm 에서 10 분간 원심분리하고, 상층액 1 mL 를 튜브에 옮긴 후 40 분간 nitrogen concentrator 에서 휘발시켰다. 잔여물은 1:1(v/v) acetonitrile: water 로 재조합 후 2 μL 를 분석에 사용하였다. 20°C 에서 4 분간 Kinetex C8 (2.6 μm particle size, 2.1 \times 100 mm; Phenomenex, CA, USA)을 이용하여 분리하였고, mobile phase 는 0.1% formic acid in distilled water 와 0.1% formic acid in acetonitrile 로 구성되었다. Precursor to product ion transition 검출은 electro-spray ionization in the positive ion mode along with multiple reaction monitoring(MRM) 법을 활용하는 Xevo TQ (Waters, MA, USA)를 이용하였고 mass to charge ratio (m/z) 는 클로피도그렐의 경우

322.09 에서 154.96, H4 대사체의 경우 504.21 에서 155.02, 그리고 클로피도그렐-d4 대사체의 경우 326.09 에서 216.06 이었다. The calibration curves 는 클로피도그렐 0.02 – 10 ng/mL 및 H4 대사체 0.10 – 50 ng/mL 범위에서 직선 경향을 보였다.

3. 유전형 분석 - CYP2C19, MDR1

CYP2C19 유전형은 TaqMan Allelic Discrimination Assays on the AB 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하여 분석하였다. Genomic DNA 는 QIAamp DNA Blood Mini Kit 를 이용하여 채혈한 200 μ L 의 말초 혈액에서 추출하였다. 총 10 μ L 의 PCR reaction mixture 는 5 μ L 의 2X TaqMan Genotyping Master mix, 0.5 μ L 의 20 X Drug Metabolism Genotyping Assay Mix, 3.5 μ L 의 DNase-free water, 그리로 1 μ L 의 genomic DNA 로 구성되었다. CYP2C19 SNPs 중 한국인에서 매우 드문 유형을 제외하고 *2 G681A (rs 4244285), *3 G636A (rs4986893)에 대하여 Applied Biosystems 사의 TaqMan genotyping assays 키트를 이용하여 평가하였고 PCR 반응은 다음과 같이 수행하였다: initial denaturation at 95°C for 10 min, and 50 cycles on denaturation at 92°C for 15 seconds and anneal/extension at 60°C for 1 min. 대립형질의 구분 및 분석에는 7500 Real-Time PCR System software version 2.0.1/2.0.6 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)을 이용하였다. 혈액 중 MDR1 mRNA 발현 분석을 위하여 PAXgene TM RNA Kit (PreAnalytiX, Hombrechtikon, Switzerland)를 이용하여 RNA 를 추출하였다. Complementary DNA 는 QuantiTect Rev. Transcription Kit

(Qiagen, Hilden, Germany)를 활용하여 얻는 1 μg 의 total RNA 를 이용하여 합성하였다. PCR 은 10 μL 의 QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 6 μL 의 nuclease-free water, 2 μL 의 10X QuantiTect Primer assay for MDR1 gene (Qiagen) 및 2 μL 의 cDNA template 등 총 20 μL 로 수행되었고, 유전자 증폭은 아래 조건에서 CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad, CA, USA)를 이용하여 수행하였다: initial denaturation at 95°C for 15 minutes, and 40 cycles of denaturation for 15 seconds at 94°C, annealing for 30 seconds at 55°C, and elongation for 30 seconds at 70°C.

Internal control 로서 glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNA expression 을 사용하였다. 혈청 내 miR-27a and miR-16 정량을 위하여 miRN easy mini kit (Qiagen)를 이용하여 100 μL 의 혈청에서 RNA 를 추출하였다. 이 과정의 효율성을 검증하기 위하여 합성된 *Caenorhabditis elegans* (syn-cel-miR-39) microRNA 를 QIAzol Lysis Reagent (Qiagen)와 균질화시킨 후 분석하였다. Complementary DNA 는 miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen)을 이용하여 전처치하였다. PCR 은 10 μL 의 miScript SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen), 4 μL 의 nuclease-free water, 2 μL 의 10X miScript Primer assay, 2 μL 의 10X miScript Universal Primer 및 2 μL 의 cDNA template 등 20 μL 로 시행되었다. 유전자 증폭은 상기한 바와 같은 조건에서 CFX96™ Real-Time System 으로 수행하였고, miR-16 을 internal control 로 활용하였다.

4. 생검 조직에서의 mRNA / microRNA 정량

생체 검사를 통해 얻은 조직 검체는 조직의 고정과 안정화를 위하여 Qiagen 사의 Allprotect Tissue Reagent 에 넣은 후 분석하기 전까지 -20 °C에 보관하였다. 생검 조직에서의 total RNA 와 microRNA 추출에는 Qiagen 사의 AllprepDNA/RNA/Protein Mini Kit 와 RNeasy MinElute Cleanup Kit 를 사용하였다. mRNA 와 microRNA 에서 cDNA 를 합성하기 위한 역전사 반응에는 Qiagen 사의 QuantiTect Reverse Transcription Kit 와 miScript II RT Kit 를 각각 사용하였고, mRNA 정량을 위한 PCR 시료는 10 μ l의 2X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2 μ l의 10X QuantiTect Primer Assay, 6 μ l의 RNase-free water, 2 μ l의 template cDNA 를 넣어 제조하였다. Real-time PCR 은 Bio-Rad 사의 CFX 96 Real-Time System 을 사용하여 95 °C에서 15 분 간의 initial denaturation 과정을 거친 후 94 °C 15 초, 55 °C 30 초, 72 °C 30 초 과정을 45 번 반복 수행하였다. microRNA 정량을 위한 PCR 시료는 10 μ l의 2X miScript QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 2 μ l의 miScript Primer Assay, 2 μ l의 miScript Universal Primer, 4 μ l의 RNase-free water, 2 μ l의 template cDNA 를 넣어 제조하였다. Real-time PCR 은 Bio-Rad 사의 CFX 96 Real-Time System 을 사용하여 95 °C에서 15 분 간의 initial denaturation 과정을 거친 후 94 °C 15 초, 55 °C 30 초, 70 °C 30 초 과정을 45 번 반복 수행하였다.

5. 약동학 분석

약동학 분석은 각 피험자에 따라 실제 채혈시각을 사용하여 분석하였으며, 투약 직전 채혈의 경우 채혈 시각을 0 으로 설정하고 분석하였다. 혈중 농도가 T_{max} (time of maximum concentration) 이전의 정량한계 미만인 경우 0 으로 간주하였으며, T_{max} 이후 정량한계 미만인 경우 분석에 포함하지 않았다.

개별 피험자의 약동학 파라미터는 Phoenix[®] WinNonlin[®] software version 1.3 (Certara, St. Louis, MO, USA) 을 이용한 비구획 분석 방법으로 산출하였다. C_{max} 와 T_{max} 는 실제 측정된 값을 그대로 사용하였으며, AUC (area under the concentration-time curve)는 linear-up/log-down trapezoidal 방법을 사용하여 계산하였다. 소실계수 (elimination rate constant)는 로그 변환한 혈중 농도-시간 곡선에서 마지막 부분의 기울기 (terminal slope, λ_z)로부터 산출하였고, 반감기는 다음과 같이 산출하였다; $t_{1/2} = \ln 2 / \lambda_z$. AUC, C_{max} 및 T_{max} 에 대하여 SAS 프로그램을 이용하여 ANOVA (analysis of variance) 검정을 시행하였다.

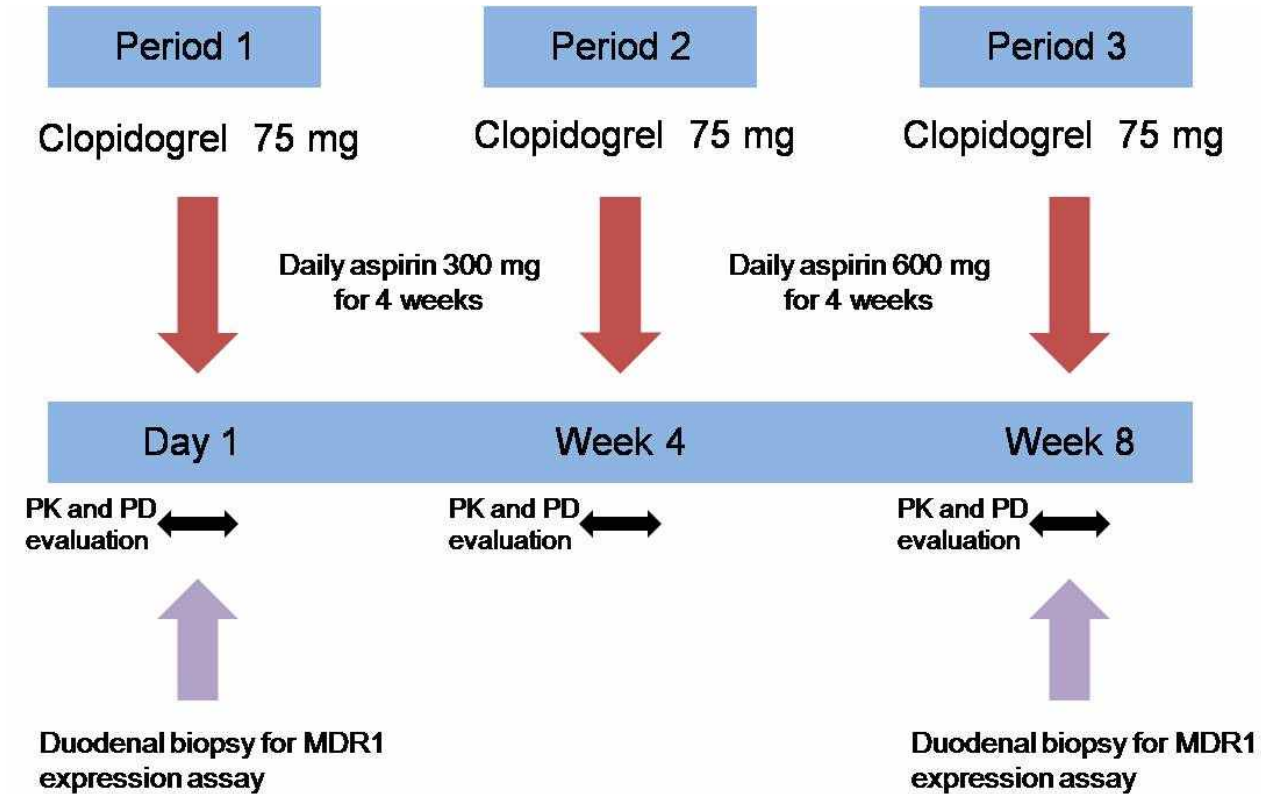
약력학 평가를 위하여 매 클로피도그렐 투약 전과 투약 2 시간 후에 VerifyNow[®]를 이용하여 혈소판 응집 억제능을 측정하여 기저치로부터의 변화량을 산출하여 유전형별로 비교하였다.

Table 1. Disposition of Subject.

	MDR1 C3435T	
	CC or CT	TT
CYP2C19 EM	6(5)*	6(4)*
CYP2C19 PM	6(6)*	6(0)*

* Initially planned number of subjects (actually enrolled number of subjects)

Figure 1. Study design.



결과

본 연구에 등록된 16 명의 피험자 중 동의를 철회한 1 명을 제외한 15 명을 대상으로 약동학 분석을 시행하였고, 유전형 분포는 Table 1 과 같다.

1. Effects of aspirin on clopidogrel pharmacokinetics

아스피린 300 mg 과 600 mg 을 각각 4 주간 투여한 후, 클로피도그렐과 활성대사체 (H4)의 약동학적 파라미터를 Table 2 에 요약하였으며, 평균 혈중 농도-시간의 양상은 Figure 2, 3 에 나타내었다.

아스피린 300 mg 과 600 mg 을 각각 4 주간 반복 투여 후, 클로피도그렐을 투여하였을 때 클로피도그렐의 T_{max} 의 중간값의 범위는 0.67-0.83 시간이었고, 평균 소실 반감기 (Half-life)는 7.7-8.8 시간으로 아스피린 투여와 무관하게 비교적 일정한 값을 가지는 것으로 나타났다. 아스피린 투약 전, 후로 측정된 C_{max} 는 각각 7.00, 7.10 및 6.90 ng/mL 이었고, AUC_{last} 는 13.31, 14.19 및 13.13 h*ng/mL 를 보임으로써, 아스피린 투약 전후로 클로피도그렐 전신노출도의 변화가 유의하지 않음을 확인할 수 있었다. 클로피도그렐 활성대사체의 전신노출도 아스피린 투약 전후에 유사한 것으로 나타났다.

Table 2. Comparison of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of clopidogrel after single oral administration of clopidogrel 300 mg in each period.

PK parameters		Period (n=15)			GMR ¹⁾ (90% CI), P-value	
		1	2	3	Period 2 / Period 1	Period 3 / Period 1
Clopi- dogrel	T _{max} (h)	0.83 (0.33- 1.25)	0.68 (0.50- 8.00)	0.67 (0.33- 2.00)		
	C _{max} (ng/mL)	7.00 ± 6.19	7.10 ± 4.76	6.90 ± 6.17	1.14 (0.93, 1.40), 0.438	0.93 (0.76, 1.14), 0.688
	AUC _{last} (h*ng/mL)	13.31 ± 8.18	14.19 ± 8.72	13.13 ± 9.63	1.07 (0.91, 1.25), 0.466	0.91 (0.78, 1.07), 0.898
	AUC _{inf} (h*ng/mL)	14.05 ± 8.24	15.18 ± 9.50	14.09 ± 9.94	1.06 (0.90, 1.23), 0.421	0.94 (0.80, 1.10), 0.975
	Half-life (h)	7.91 ± 2.70	7.74 ± 1.87	8.80 ± 7.15	1.00 (0.77, 1.29), 0.83	0.97 (0.75, 1.26), 0.866
H4	T _{max} (h)	0.67 (0.50- 1.00)	0.83 (0.50- 1.25)	0.67 (0.50- 1.25)		
	C _{max} (ng/mL)	84.09 ± 47.09	85.89 ± 90.85	90.85 ± 48.05	0.99 (0.83, 1.17), 0.845	1.11 (0.94, 1.32), 0.366
	AUC _{last} (h*ng/mL)	100.74 ± 51.50	97.13 ± 48.81	103.35 ± 49.21	0.98 (0.86, 1.11), 0.631	1.06 (0.94, 1.21), 0.753
	AUC _{inf} (h*ng/mL)	102.31 ± 52.15	98.33 ± 48.96	107.69 ± 54.93	0.98 (0.86, 1.11), 0.604	1.08 (0.95, 1.23), 0.597
	Half-life (h)	7.18 ± 9.36	5.72 ± 6.19	13.33 ± 18.98	0.93 (0.45, 1.90), 0.541	1.50 (0.73, 3.09), 0.323

Metabolic Ratio ²⁾	11.02 ± 8.80	9.46 ± 7.00	11.67 ± 8.21	0.91 (0.75, 1.13), 0.333	1.16 (0.95, 1.43), 0.665
Relative Platelet Inhibition ³⁾ (%)	27	29	35	-2 0.524	-8 0.069

C_{max} , AUC_{last} , AUC_{inf} , Half-life and metabolic ratio are presented as arithmetic mean ± standard deviation. Period 1, 2, and 3 denote baseline, four weeks after daily oral administration 300 mg and four weeks after daily oral administration 600 mg, respectively.

¹⁾ GMR; Geometric mean ratio

²⁾ Metabolic ratio: $AUC_{last, H4} / AUC_{last, clopidogrel}$

³⁾ Mean difference for inhibition of platelet aggregation

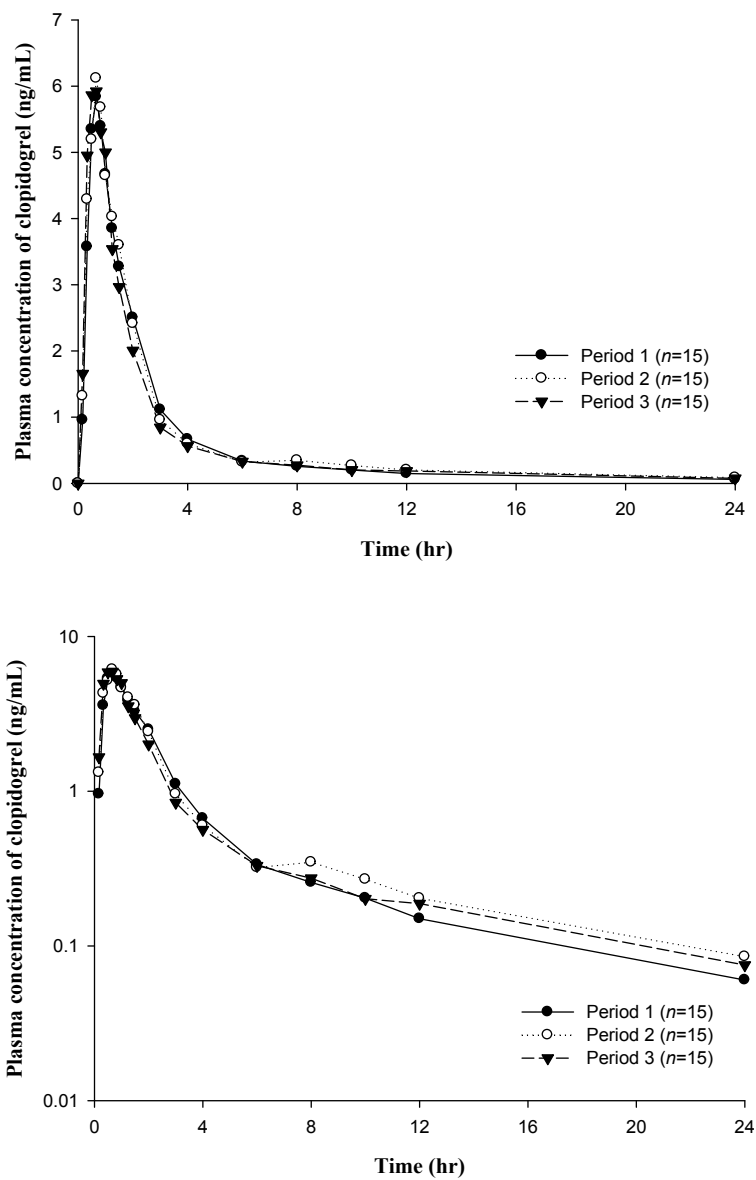


Figure 2. Mean plasma concentration-time profiles of clopidogrel by period. Period 1, 2, and 3 denote baseline, 0-4 week, and 5-8 week after daily oral administration of aspirin at 300 mg and 600 mg, respectively. (Upper: Linear scale, Lower: Log-linear scale).

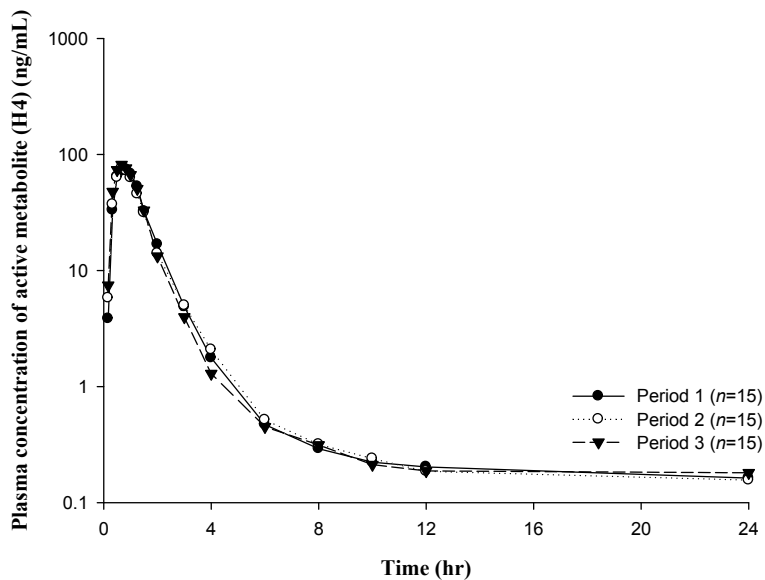
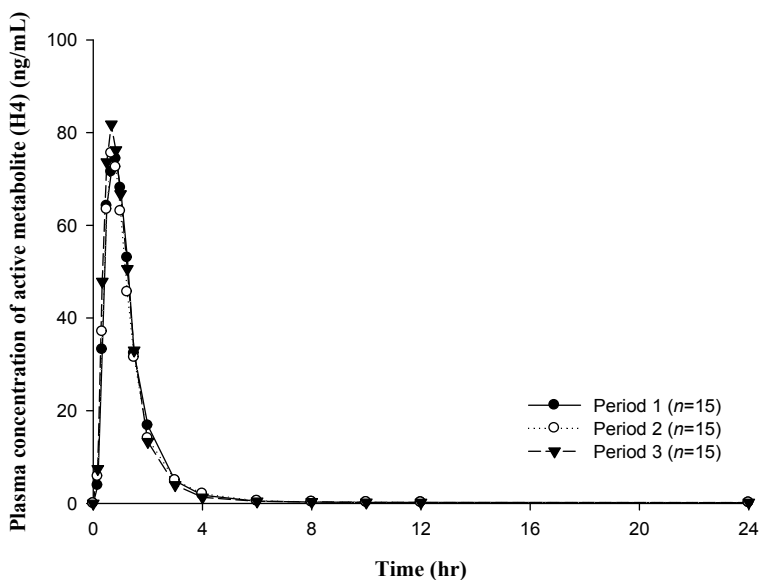


Figure 3. Mean plasma concentration-time profiles of active metabolite (H4) of clopidogrel by period. Period 1, 2, and 3 denote baseline, 0-4 week, and 5-8 week after daily oral administration of aspirin at 300 mg and 600 mg, respectively. (Upper: Linear scale, Lower: Log-linear scale).

2. Effects of aspirin on clopidogrel pharmacodynamics

아스피린 투약 후 클로피도그렐에 의한 혈소판응집능의 변화 여부를 통하여 약력학을 평가하였다. Relative platelet inhibition (RPI, %)은 아스피린 투약 전에 비하여 투약 후 증가하는 양상을 보였다. 아스피린 일일 용량 300-600 mg 을 8 주간 투여하였을 때 RPI 는 약 12% 증가하는 것으로 나타났으나 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Figure 4).

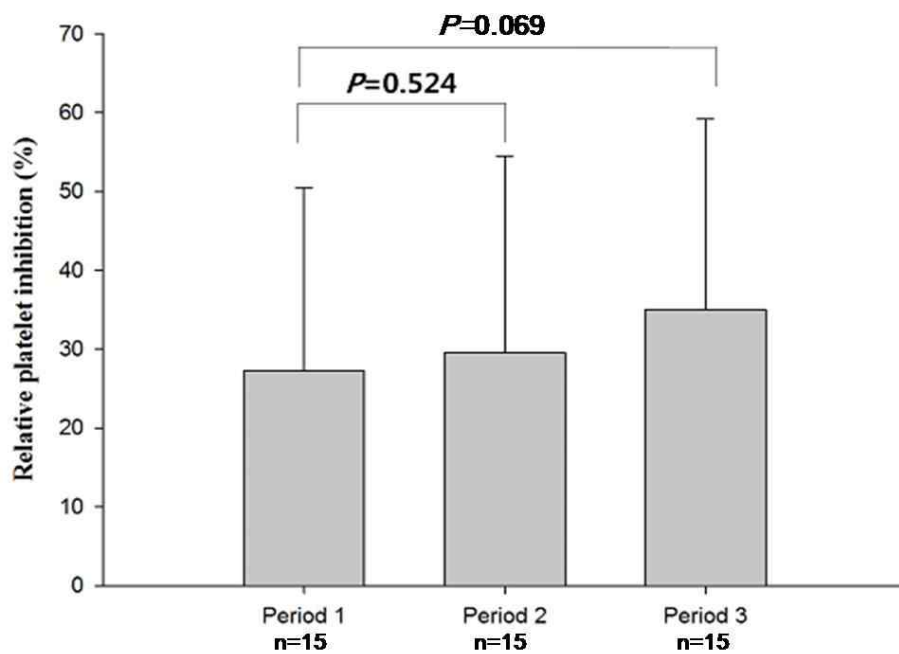


Figure 4. Relative inhibition of platelet aggregation (% change from predose baseline in each period) with time after dose by period.

3. Effects of aspirin on MDR1 expression

아스피린 반복 투여 전후 (1 기 predose 및 3 기 마지막 투여 후)에 시행한 십이지장 점막 생검 검체에서 약물 수송과 관련된 유전자의 발현을 real-time PCR 방법을 통하여 알아본 결과 MDR1 의 mRNA 발현은 MDR1 C3435T TT 군을 제외한 CC 혹은 CT 군에서 증가하는 경향이 확인되었다 (Table 3).

Table 3. Study subject's demographics, genotypes and expression of CYP2C19 and MDR1 after the administration of aspirin for 8 weeks.

ID	Age (yrs)	Height (cm)	Weight (kg)	CYP2C19 genotype	CYP2C19 expression				MDR1 C3435T genotype	MDR1 expression			
					Before	After	Change	%Change		Before	After	Change	%Change
1	31	180	75	EM	1.16	1.01	-0.15	-12.8	CT	0.45	0.78	0.32	71.0
2	27	178	67	PM	1.53	0.83	-0.70	-45.6	CT	0.83	0.54	-0.29	-34.9
3	38	180	74	EM	1.83	1.69	-0.13	-7.34	CT	0.69	0.81	0.11	16.1
5	23	175	79	EM	0.91	0.80	-0.11	-12.0	TT	0.54	0.55	0.01	2.43
6	23	163	65	EM	1.06	1.03	-0.04	-3.27	CT	0.53	0.78	0.25	47.1
7	26	170	69	EM	1.13	1.24	0.11	9.75	CT	0.57	0.89	0.32	55.6
8	27	168	59	EM	1.15	1.33	0.18	15.2	CC	0.78	1.11	0.32	41.5
9	27	178	69	PM	0.90	1.10	0.21	22.8	CC	1.05	0.93	-0.12	-11.6
10	32	181	70	PM	0.73	0.93	0.20	27.6	CT	0.42	0.53	0.11	25.5
11	24	174	65	EM	1.38	1.45	0.07	4.79	TT	2.38	1.81	-0.58	-24.2
12	27	182	75	PM	0.74	0.64	-0.10	-13.7	CT	0.86	0.73	-0.12	-14.3
13	29	168	63	PM	0.79	0.50	-0.29	-36.4	CT	0.62	1.04	0.42	67.9
14	29	173	62	PM	0.55	0.65	0.10	18.5	CC	0.71	0.95	0.24	34.1
15	24	178	65	EM	1.09	1.17	0.08	7.65	TT	0.83	0.58	-0.25	-30.6
16	27	176	72	EM	0.90	1.21	0.31	34.1	TT	0.48	0.66	0.18	37.4

4. Effects of CYP2C19 Genotypes on PK and PD of clopidogrel

알려진 바와 같이 클로피도그렐의 전신 노출도는 CYP2C19 extensive metabolizer(EM) 군이 poor metabolizer (PM)군 보다 낮은 반면, 활성대사체의 전신 노출도는 EM 군에서 약 2~3 배 가량 높은 것으로 확인되었다. 아스피린 300 mg 과 600 mg 반복 투여 후 PM 군 (n=6)에서 클로피도그렐의 전신 노출은 약 27% 정도 감소하는 반면, 활성대사체의 전신노출은 약 30% 정도 증가한 것으로 나타났으나 모두 통계적으로 유의하지는 않았다 (Table 4, Figure 5-1, Figure 5-2). 아스피린 반복 투여 후 RPI 값도 PM 군에서 증가하는 일관된 경향성을 보였지만 통계적으로 유의하지는 않았다 (Table 4, Figure 5-3).

Table 4. Comparison of pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of clopidogrel by genotype of CYP2C19 after aspirin 300 and 600 mg administrations for 4 weeks successively.

PK parameters		EM (n=9)			GMR (90% CI), <i>P</i> -value		PM (n=6)			GMR ¹⁾ (90% CI), <i>P</i> -value	
		1	2	3	Period 2 / Period 1	Period 3 / Period 1	1	2	3	Period 2 / Period 1	Period 3 / Period 1
Clopi dogrel	T _{max} (h)	0.83 (0.50- 1.25)	0.68 (0.50- 8.00)	0.67 (0.33- 2.00)	-	-	0.67 (0.33- 0.83)	0.75 (0.67- 1.50)	0.58 (0.33- 1.50)	-	-
	C _{max} (ng/mL)	6.10 ± 5.89	6.30 ± 5.23	6.60 ± 6.21	1.12 (0.86, 1.45)	1.01 (0.78, 1.31)	8.35 ± 6.92	8.31 ± 4.11	7.35 ± 6.67	1.18 (0.81, 1.71)	0.82 (0.57, 1.19)
	AUC _{last} (h*ng/mL)	10.73 ± 5.86	12.76 ± 7.61	12.63 ± 8.95	1.15 (0.93, 1.43)	1.06 (0.86, 1.32)	17.17 ± 10.12	16.34 ± 10.52	13.88 ± 11.41	0.95 (0.75, 1.19)	0.73 (0.58, 0.92)
	AUC _{inf} (h*ng/mL)	11.60 ± 5.87	13.94 ± 8.84	13.77 ± 9.29	1.13 (0.91, 1.41)	1.09 (0.88, 1.35)	17.72 ± 10.38	17.03 ± 10.99	14.58 ± 11.74	0.95 (0.77, 1.18)	0.75 (0.61, 0.93)
	Half-life (h)	8.95 ± 2.93	7.55 ± 2.03	9.95 ± 9.14	0.86 (0.56, 1.32)	0.90 (0.58, 1.38)	6.34 ± 1.34	8.02 ± 1.75	7.08 ± 1.87	1.26 (1.08, 1.47)	1.10 (0.94, 1.28)
H4	T _{max} (h)	0.67 (0.50- 1.00)	0.67 (0.50- 1.25)	0.67 (0.50- 1.00)	-	-	0.83 (0.50- 1.00)	0.83 (0.67- 1.25)	0.83 (0.67- 1.25)	-	-
	C _{max} (ng/mL)	115.97 ± 31.40	114.69 ± 45.74	116.78 ± 44.79	0.93 (0.75, 1.15)	0.95 (0.77, 1.18)	36.28 ± 7.68	42.68 ± 21.19	51.95 ± 15.11	1.09 (0.81, 1.46)	1.40 (1.05, 1.87)

AUC _{last} (h*ng/mL)	137.77 ± 27.26	127.93 ± 36.12	132.38 ± 41.48	0.91 (0.80, 1.04)	0.93 (0.82, 1.06)	45.19 ± 8.08	50.95 ± 17.79	59.81 ± 15.38	1.09 (0.86, 1.38)	1.30 (1.02, 1.65)
AUC _{inf} (h*ng/mL)	140.08 ± 26.55	129.37 ± 35.55	139.11 ± 48.47	0.91 (0.78, 1.05)	0.95 (0.82, 1.10)	45.65 ± 8.19	51.77 ± 18.83	60.56 ± 15.74	1.09 (0.85, 1.40)	1.30 (1.02, 1.66)
Half-life (h)	10.37 ± 10.90	7.48 ± 6.63	19.46 ± 22.28	0.85 (0.30, 2.40)	1.59 (0.57, 4.48)	2.40 ± 3.08	3.08 ± 4.77	4.14 ± 6.72	1.04 (0.33, 3.32)	1.38 (0.43, 4.39)
Relative Platelet Inhibition ²⁾ (%)	42	41	47	1 0.871	-5 0.331	5	12	16	-7 0.116	-11 0.125

C_{max}, AUC_{last}, AUC_{inf}, and Half-life are presented as arithmetic mean ± standard deviation. Period 1, 2, and 3 denote baseline, four weeks after daily oral administration 300 mg and four weeks after daily oral administration 600 mg, respectively.

¹⁾GMR; Geometric mean ratio

²⁾Mean difference for inhibition of platelet aggregation

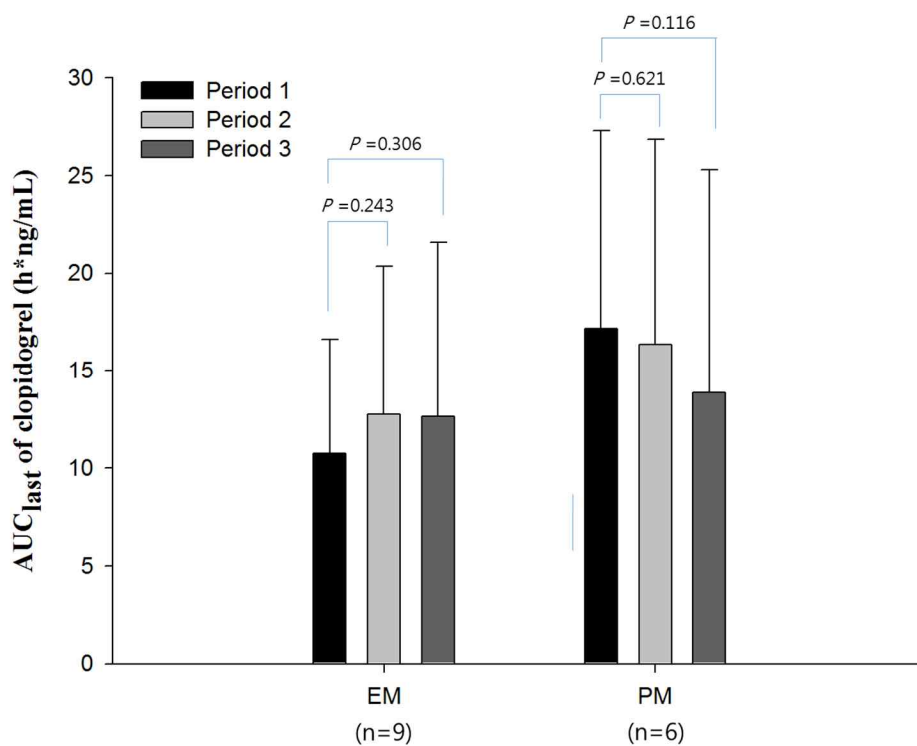


Figure 5-1. AUC_{last} of clopidogrel parent with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 genotype.

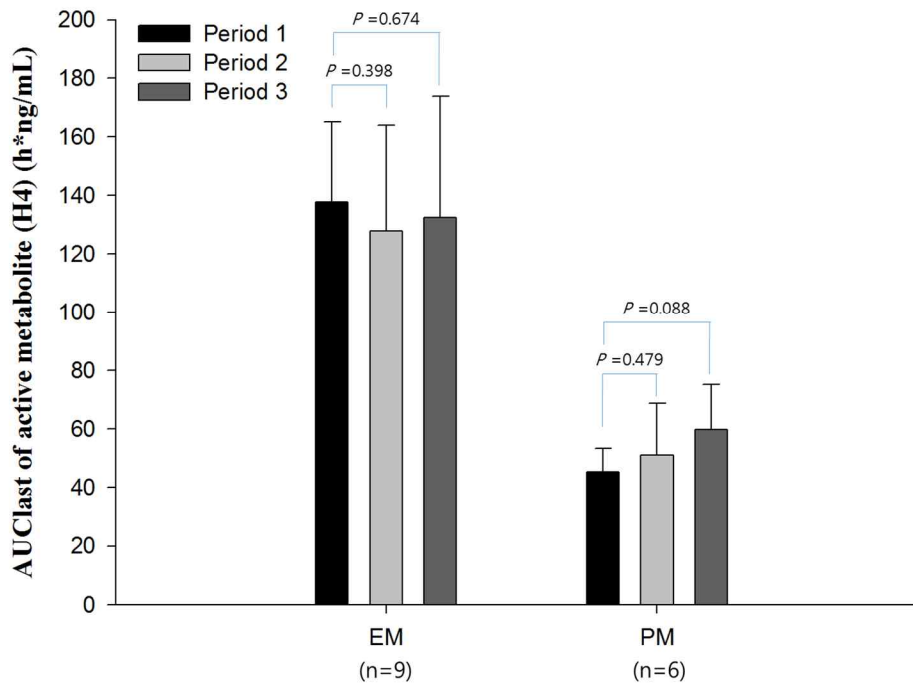


Figure 5-2. AUC_{last} of active metabolite (H4) for clopidogrel with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 genotype.

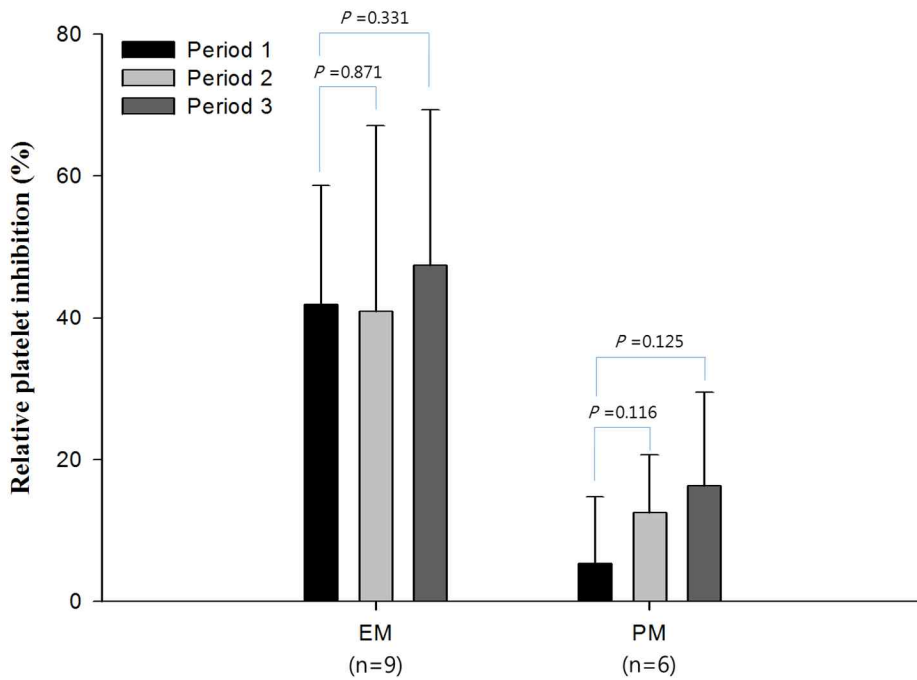


Figure 5-3. Relative inhibition of platelet aggregation (% change from predose baseline in each period) with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 genotype.

5. Effects of MDR1 Genotypes on PK and PD of clopidogrel

MDR1 C3435T 유전형에 따른 분석에서 아스피린 반복 투여 후 CC/CT 군 (n=11)은 MDR1 발현이 증가하였음에도 불구하고 클로피도그렐 및 활성대사체의 약동학 평가에서 뚜렷한 증감의 경향 없이 일정한 값을 보여주었다. 단, 클로피도그렐의 Tmax 값은 아스피린 투여 4 주 후에 기저값과 비교하여 2 배 이상으로 상승하였으나 8 주 후에는 기저값과 유사한 정도로 감소하였다 (Table 5).

TT 군 (n=4)은 아스피린 투여 전 약동학 평가에서 클로피도그렐의 전신 노출 정도에는 CC/CT 군과 큰 차이가 없었지만 활성대사체의 전신 노출 정도는 현저히 높았다. 아스피린 반복 투여 후 TT 군에서 클로피도그렐의 전신 노출 정도에는 변화가 없었지만 활성대사체는 증가하는 양상을 보였고, CC/CT 군과 비교하면 유의하게 높은 농도를 보였다 (Table 5, Figure 6-1, Figure 6-2). 약력학 평가에서 TT 군은 CC/CT 군에 비해 아스피린 투여 개시 전 기저 약력학 평가에서 클로피도그렐 투여 후 상대적으로 높은 RPI 값을 보여주었는데, 이는 활성대사체의 전신 노출 정도와 비례하는 것으로 생각된다. 아스피린 반복 투여 후 TT 군에서 RPI 값이 증가하는 경향성을 보여주었지만 통계적으로 유의한 차이는 없었다 (Table 5, Figure 6-3).

Table 5. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of clopidogrel by genotype of MDR1 C3435T after aspirin 300 and 600 mg administrations for 4 weeks successively.

PK parameters		CC/CT (n=11)			GMR ¹⁾ (90% CI)		TT (n=4)			GMR ¹⁾ (90% CI)	
		1	2	3	Period 2 / Period 1	Period 3 / Period 1	1	2	3	Period 2 / Period 1	Period 3 / Period 1
Clopidogrel	T _{max} (h)	0.75 (0.33-0.83)	1.54 (2.17-0.66)	0.83 (0.33-0.67)	-	-	0.83 (0.33-1.25)	0.83 (0.50-8.00)	0.67 (0.33-2.00)	-	-
	C _{max} (ng/mL)	6.12 ± 5.69	6.32 ± 3.94	5.96 ± 5.86	1.19 (0.92, 1.55)	0.89 (0.58, 1.16)	9.39 ± 7.77	9.27 ± 6.74	9.48 ± 7.16	1.01 (0.72, 1.41)	1.04 (0.74, 1.45)
	AUC _{last} (h*ng/mL)	12.97 ± 8.81	13.90 ± 8.99	12.48 ± 9.88	1.09 (0.88, 1.35)	0.89 (0.72, 1.10)	14.22 ± 7.21	14.99 ± 9.18	14.90 ± 10.06	1.00 (0.80, 1.25)	0.97 (0.78, 1.22)
	AUC _{inf} (h*ng/mL)	13.69 ± 8.92	15.01 ± 9.98	13.45 ± 9.97	1.09 (0.89, 1.33)	0.94 (0.76, 1.15)	15.01 ± 7.03	15.65 ± 9.42	15.84 ± 11.12	0.98 (0.76, 1.26)	0.95 (0.74, 1.23)
	Half-life (h)	7.18 ± 2.16	8.06 ± 1.82	9.37 ± 8.21	1.14 (0.83, 1.56)	1.09 (0.80, 1.49)	9.89 ± 3.35	6.86 ± 1.98	7.24 ± 3.04	0.70 (0.42, 1.16)	0.71 (0.43, 1.18)
H4	T _{max} (h)	0.67 (0.50-1.00)	0.67 (0.50-1.25)	0.67 (0.50-1.25)	-	-	0.67 (0.50-0.85)	0.83 (0.50-0.83)	0.58 (0.50-1.00)	-	-
	C _{max} (ng/mL)	68.94 ± 40.37	65.10 ± 38.66	69.45 ± 33.26	0.93 (0.76, 1.15)	1.07 (0.87, 1.32)	125.78 ± 41.90	143.05 ± 40.34	149.70 ± 28.12	1.15 (0.79, 1.68)	1.23 (0.84, 1.80)

AUC _{last} (h*ng/mL)	85.83 ± 50.46	74.67 ± 32.36	81.36 ± 32.92	0.93 (0.79, 1.09)	1.03 (0.88, 1.21)	141.74 ± 28.85	158.91 ± 26.27	163.82 ± 32.24	1.13 (0.93, 1.36)	1.16 (0.96, 1.40)
AUC _{inf} (h*ng/mL)	87.54 ± 51.49	75.95 ± 32.85	83.02 ± 34.05	0.93 (0.79, 1.09)	1.03 (0.88, 1.22)	142.93 ± 29.27	159.87 ± 26.53	175.52 ± 43.01	1.12 (0.88, 1.43)	1.22 (0.96, 1.55)
Half-life (h)	7.96 ± 10.78	6.57 ± 7.06	9.32 ± 11.83	1.00 (0.42,2. 36)	1.22 (0.51, 2.88)	5.04 ± 3.59	3.38 ± 1.56	24.38 ± 31.51	0.75 (0.15, 3.80)	2.70 (0.53, 13.62)
Relative Platelet Inhibition ²⁾ (%)	20	22	25	-2 0.648	-5 0.893	46	51	62	-5 0.625	-16 0.060

C_{max}, AUC_{last}, AUC_{inf}, and Half-life are presented as arithmetic mean ± standard deviation. T_{max} is presented as median (range). Period 1, 2, and 3 denote baseline, four weeks after daily oral administration 300 mg and four weeks after daily oral administration 600 mg, respectively.

1) GMR; Geometric mean ratio

2) Mean difference for inhibition of platelet aggregation

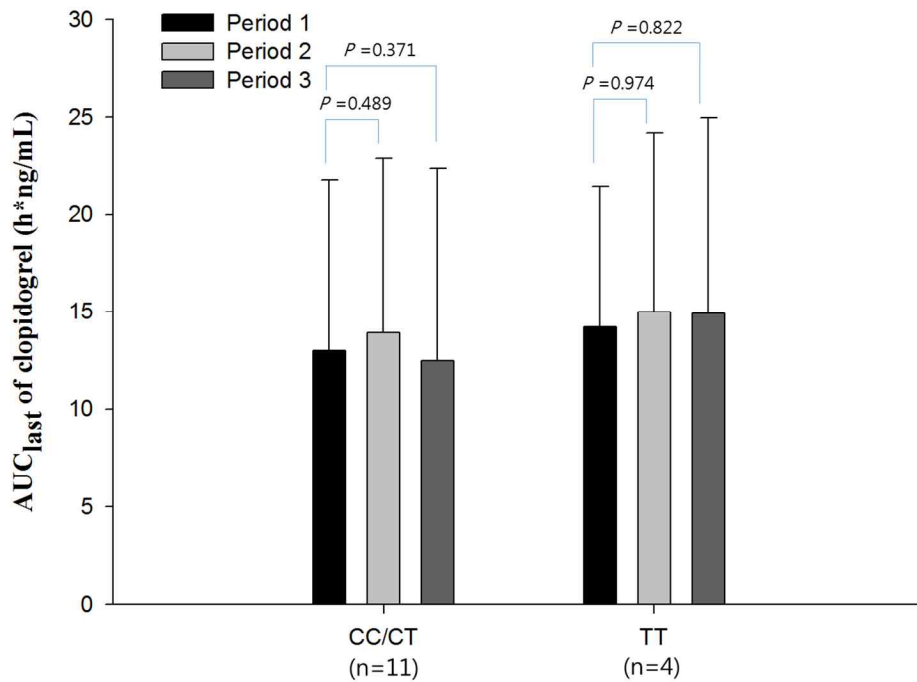


Figure 6-1. AUC_{last} of clopidogrel with time after the administration of clopidogrel in each period by MDR1 genotype.

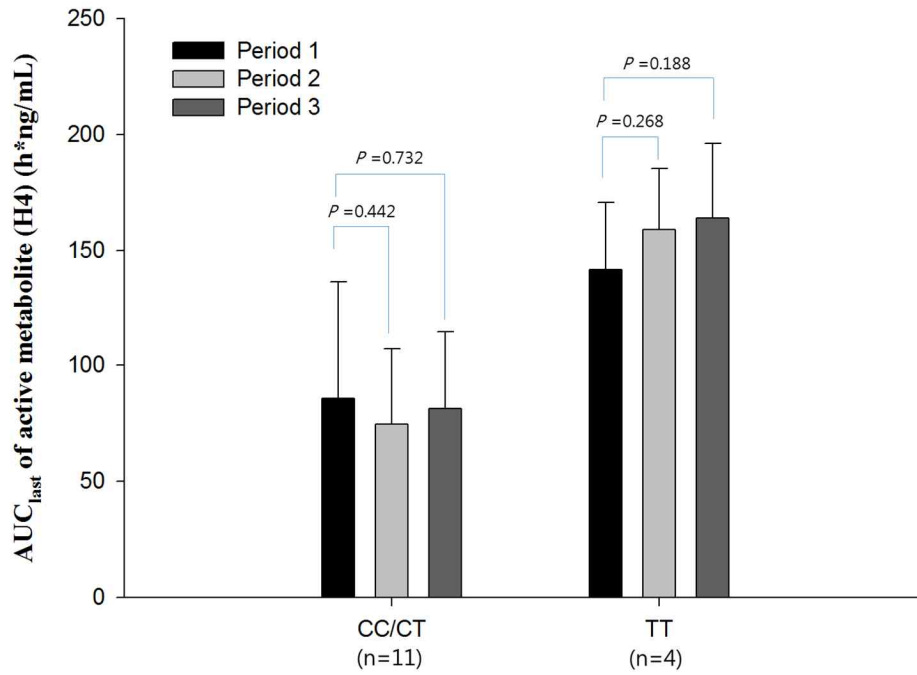


Figure 6-2. AUC_{last} of active metabolite (H4) for clopidogrel with time after the administration of clopidogrel in each period by MDR1 genotype.

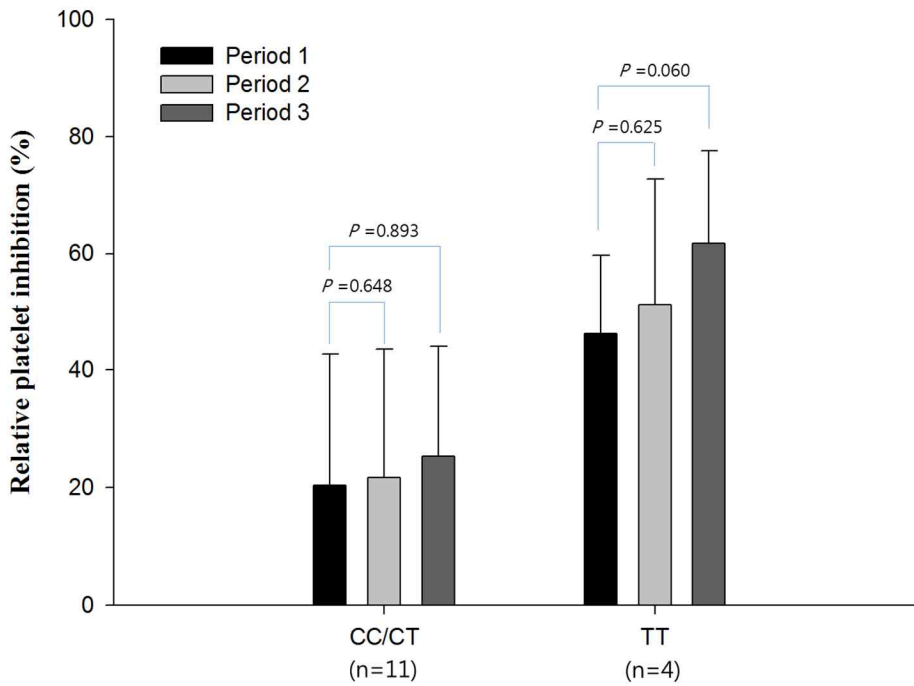


Figure 6-3. Relative inhibition of platelet aggregation (% change from predose baseline in each period) with time after the administration of clopidogrel in each period by MDR1 genotype.

6. Effects of CYP2C19 and MDR1 Genotypes on PK and PD of clopidogrel

CYP2C19 및 MDR1 C3435T 유전형 별 분석에서 CC/CT 군의 경우 아스피린 반복 투여 후 CYP2C19 EM 및 PM 군간에 다른 양상을 보였다. EM_CC/CT 군에서는 아스피린 투여 후 비록 통계적으로 유의하지는 않았지만 클로피도그렐의 전신 노출이 증가하였고 활성대사체는 통계적으로 유의하게 감소하였다. 하지만 이러한 변화는 아스피린 투여 4 주 후에 두드러졌고 8 주 후에는 그 차이가 감소하는 추세를 보였다. 반면 PM_CC/CT 군에서는 통계적으로 유의하지는 않았지만 지속적으로 클로피도그렐의 전신 노출이 감소하였고, 활성대사체는 증가하는 양상을 보였다 (Figure 7-1, Figure 7-2). 하지만 아스피린 반복 투여 후 RPI 값은 EM_CC/TT 군에서도 유의한 변화는 없었고, PM_CC/CT 군에서는 증가하는 양상을 보였다 (Figure 7-3).

Table 6. Pharmacokinetic and pharmacodynamic parameters of clopidogrel by genotype of CYP2C19 and MDR1 C3435T after aspirin 300 and 600 mg administrations for 4 weeks successively.

PK parameters		EM_CC/CT (n=5)			GMR ¹⁾ (90% CI), <i>P</i> -value		EM_TT (n=4)			GMR ¹⁾ (90% CI), <i>P</i> -value		PM_CC/CT (n=6)			GMR ¹⁾ (90% CI), <i>P</i> -value	
		1	2	3	Period 2 / Period 1	Period 3 / Period 1	1	2	3	Period 2 / Period 1	Period 3 / Period 1	1	2	3	Period 2 / Period 1	Period 3 / Period 1
Clopidogrel	T _{max} (h)	0.83 (0.50-1.25)	0.83 (0.50-8.00)	0.67 (0.50-2.00)	-	-	0.76 (0.50-1.00)	0.68 (0.50-1.50)	0.58 (0.33-0.67)	-	-	0.67 (0.33-0.83)	0.75 (0.67-1.50)	0.58 (0.33-1.50)	-	-
	C _{max} (ng/mL)	3.46 ± 2.16	3.93 ± 2.16	4.29 ± 4.87	1.21 (0.77, 1.89)	0.99 (0.63, 1.55)	9.39 ± 7.77	9.27 ± 6.74	9.48 ± 7.16	1.01 (0.72, 1.41)	1.04 (0.74, 1.45)	8.35 ± 6.92	8.31 ± 4.11	7.35 ± 6.67	1.18 (0.81, 1.71)	0.82 (0.57, 1.19)
	AUC _{1ast} (h*ng/mL)	7.94 ± 2.79	10.97 ± 6.62	10.80 ± 8.66	1.29 (0.87, 1.91)	1.14 (0.77, 1.68)	14.22 ± 7.21	14.99 ± 9.18	14.90 ± 10.06	1.00 (0.80, 1.25)	0.97 (0.78, 1.22)	17.17 ± 10.12	16.34 ± 10.52	13.88 ± 11.41	0.95 (0.75, 1.19)	0.73 (0.58, 0.92)
	AUC _{inf} (h*ng/mL)	8.86 ± 3.28	12.58 ± 9.19	12.11 ± 8.49	1.28 (0.88, 1.85)	1.22 (0.84, 1.76)	15.01 ± 7.03	15.65 ± 9.42	15.84 ± 11.12	0.98 (0.76, 1.26)	0.95 (0.74, 1.23)	17.72 ± 10.38	17.03 ± 10.99	14.58 ± 11.74	0.95 (0.77, 1.18)	0.75 (0.61, 0.93)
	Half-life (h)	8.19 ± 2.68	8.11 ± 2.10	12.12 ± 12.12	1.01 (0.49, 2.08)	1.08 (0.53, 2.22)	9.89 ± 3.35	6.86 ± 1.98	7.24 ± 3.04	0.7 (0.42, 1.16)	0.71 (0.43, 1.18)	6.34 ± 1.34	8.02 ± 1.75	7.08 ± 1.87	1.26 (1.08, 1.47)	1.1 (0.94, 1.28)

H4	T _{max} (h)	0.67 (0.52-1.00)	0.67 (0.50-1.25)	0.67 (0.50-0.67)	-	-	0.67 (0.50-0.85)	0.83 (0.50-0.83)	0.58 (0.50-1.00)	-	-	0.83 (0.50-1.00)	0.83 (0.67-1.25)	0.67 (0.67-1.25)	-	-
	C _{max} (ng/mL)	108.1 2 ± 21.95	92.01 ± 38.94	90.45 ± 38.33	0.78 (0.61, 0.99)	0.77 (0.61, 0.99)	125.7 8 ± 41.90	143.0 5 ± 40.34	149.7 0 ± 28.12	1.15 (0.79, 1.68)	1.23 (0.84, 1.80)	36.28 ± 7.68	42.68 ± 21.19	51.95 ± 15.11	1.09 (0.81, 1.46)	1.4 (1.05, 1.87)
	AUC ₁ ast (h*ng/ mL)	134.6 0 ± 28.88	103.1 4 ± 19.08	107.2 2 ± 29.69	0.77 (0.69, 0.86)	0.78 (0.70, 0.87)	141.7 4 ± 28.85	158.9 1 ± 26.27	163.8 2 ± 32.24	1.13 (0.93, 1.36)	1.16 (0.96, 1.40)	45.19 ± 8.08	50.95 ± 17.79	59.81 ± 15.38	1.09 (0.86, 1.38)	1.3 (1.02, 1.65)
	AUC _i nf (h*ng/ mL)	137.8 1 ± 27.44	104.9 7 ± 18.05	109.9 8 ± 30.39	0.76 (0.69, 0.85)	0.78 (0.71, 0.87)	142.9 3 ± 29.27	159.8 7 ± 26.53	175.5 2 ± 43.01	1.12 (0.88, 1.43)	1.22 (0.96, 1.55)	45.65 ± 8.19	51.77 ± 18.83	60.56 ± 15.74	1.09 (0.85, 1.40)	1.3 (1.02, 1.66)
	Half-life (h)	14.63 ± 13.29	10.77 ± 7.48	15.53 ± 14.32	0.94 (0.24, 3.77)	1.05 (0.26, 4.17)	5.04 ± 3.59	3.38 ± 1.56	24.38 ± 31.51	0.75 (0.19, 2.95)	2.7 (0.69, 10.56)	2.40 ± 3.08	3.08 ± 4.77	4.14 ± 6.72	1.04 (0.33, 3.32)	1.38 (0.43, 4.39)
Relative Platelet Inhibition ²⁾ (%)		38	32	36	6 0.374	2 0.733	46	51	61	-5 0.644	-11 0.097	5	12	16	-7 0.116	-11 0.125

C_{max}, AUC_{last}, AUC_{inf}, and Half-life are presented as arithmetic mean ± standard deviation. Period 1, 2, and 3 denote baseline, four weeks after daily oral administration 300 mg and four weeks after daily oral administration 600 mg, respectively.

¹⁾ GMR; Geometric mean ratio

²⁾ Mean difference for inhibition of platelet aggregation

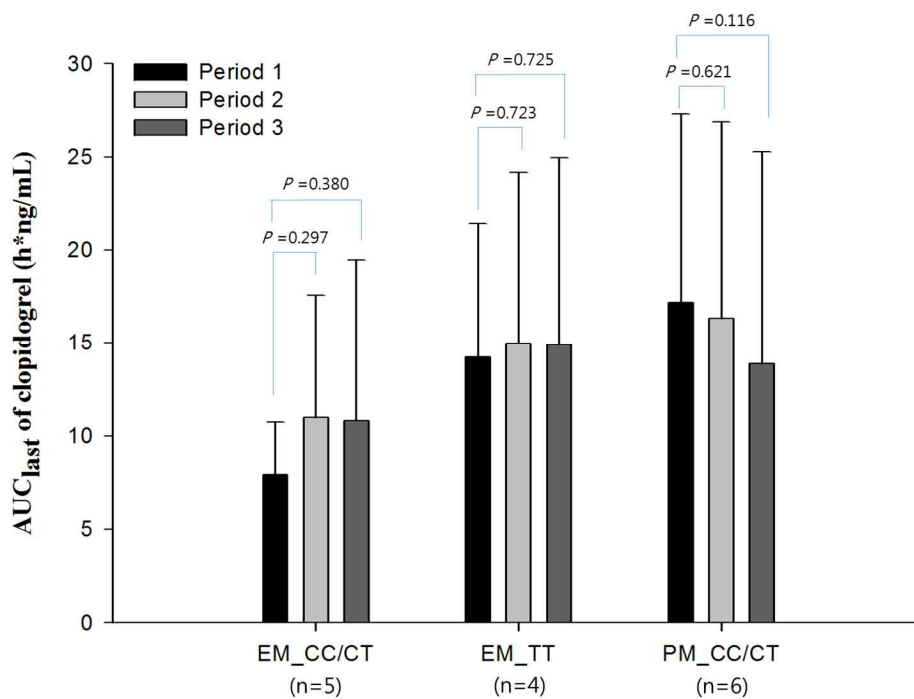


Figure 7-1. AUC_{last} of clopidogrel parent with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 and MDR1 genotype.

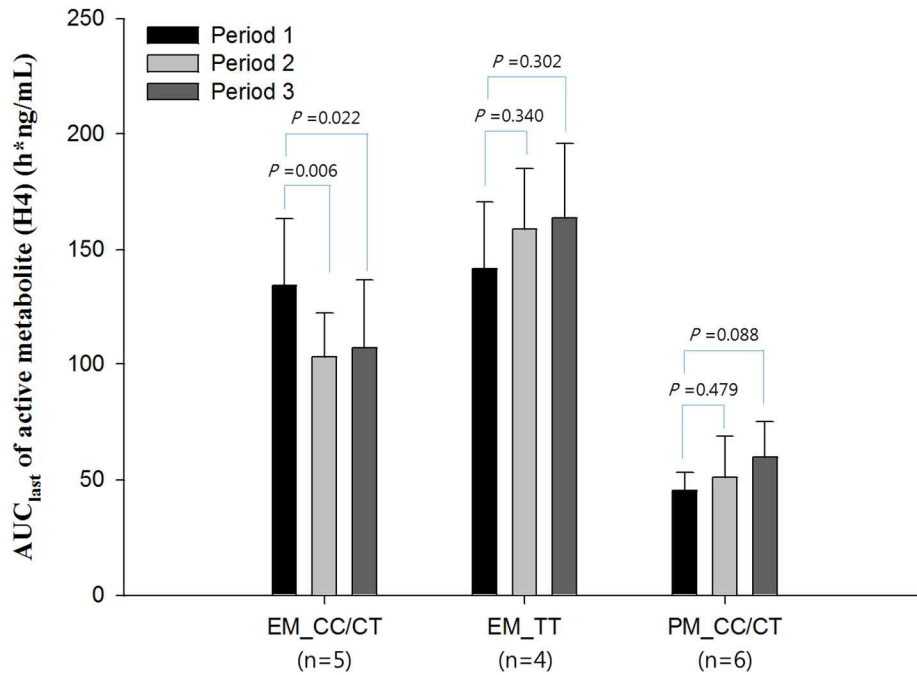


Figure 7-2. AUC_{last} of active metabolite (H4) for clopidogrel with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 and MDR1 genotype.

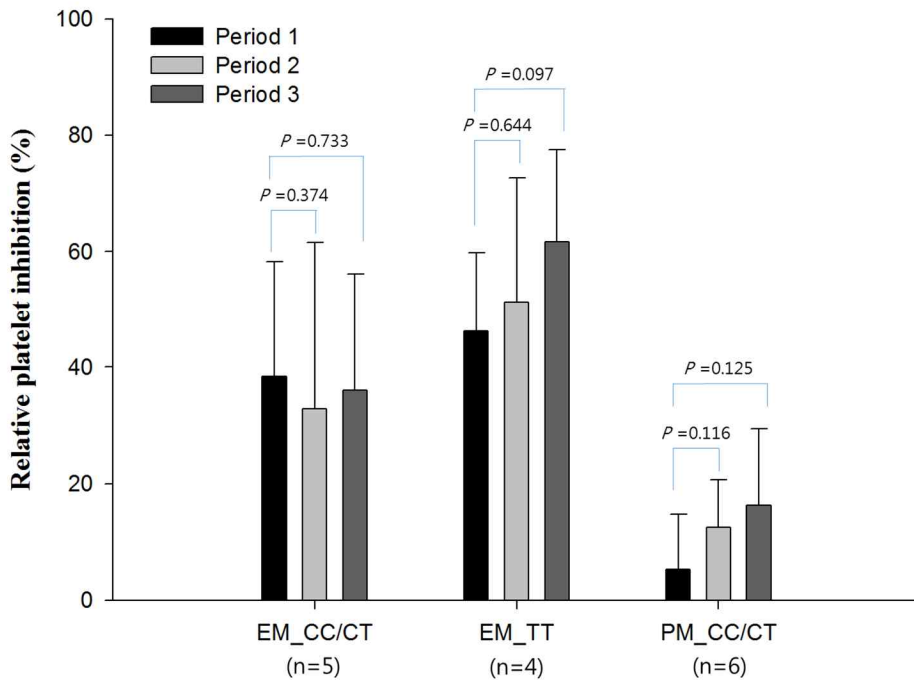


Figure 7-3. Relative inhibition of platelet aggregation (% change from predose baseline in each period) with time after administration of clopidogrel in each period by CYP2C19 and MDR1 genotype.

고찰

본 연구는 아스피린 반복 투여 후 인체 십이지장 점막에서의 MDR1 C3435T 유전형 별 발현 정도를 최초로 평가하고, MDR1 유전형이 클로피도그렐 및 H4 활성대사체의 약동학 및 약력학에 미치는 영향을 평가하는 것을 목표로 하였다. 결과적으로 이전 연구들에서 보고되었던,^{14,15} 아스피린 투약에 따른 클로피도그렐의 전신 노출 정도의 감소는 관찰되지 않았고, 활성대사체의 전신 노출 정도는 MDR1 C3435T 유전형에 따른 차이를 보였지만 전체적으로 아스피린 투약에 따른 시기별 차이는 관찰되지 않았다. 약력학 지표인 RPI 값은 아스피린 투여 후 다소 증가하는 양상을 보였지만 통계적으로 유의한 차이를 보이지는 않았다.

하지만 금번 연구 결과를 선행 연구결과와 상이한 것으로 보기는 어렵다. Oh 등이 보고한 연구에서는 아스피린 100 mg 을 2 주 및 4 주간 투약한 후 클로피도그렐의 약동학 및 약력학 분석을 수행한 반면, 금번 연구에서는 Jung 등이 동물실험에서 사용한 용량의 인체 용량에 해당되는 300 mg 및 600 mg 의 고용량 아스피린을 각 4 주간 투약하고 4 주 및 8 주째에 분석을 시행했다는 차이를 보인다. 이전 동물실험에서 아스피린에 의한 소장 점막에서의 MDR1 유도 효과가 아스피린의 용량에 의존적임이 보고된 바 있고, 금번 연구에서는 충분한 용량의 아스피린을 투여한 바 아스피린의 용량이 적어서 클로피도그렐의 전신 노출이 감소하지 않은 것으로 보기는 어렵다. 금번 연구에서는 십이지장 점막 생검을 통해 생체 내 MDR1 발현

정도를 정량적으로 평가하였고, C3435T CC/CT 군에서 MDR1 의 발현이 유의하게 증가하는 것을 확인하였음에도 불구하고 클로피도그렐의 농도 변화가 없었던 이유는 다음 두 가지로 설명될 수 있다. 첫째 아스피린에 의한 MDR1 발현 유도 효과가 일시적이고 4 주 이내에 정점에 도달하였을 가능성을 들 수 있다. Oh 등에 의한 선행 연구에서도 아스피린 병용에 따른 클로피도그렐의 전신 노출 정도의 감소는 4 주간의 병용 투여 완료 시점에 비해 2 주간 복용 후 평가하였을 때 그 감소 정도가 두드러지는 결과를 보였고,¹⁵ 금번 연구에서도 Table 5 에서 MDR1 발현이 증가한 CC/CT 군의 PK 분석 결과 클로피도그렐의 T_{max} 는 4 주째에 현저히 증가하였다가 8 주째에는 다시 감소하는 양상을 보였다는 점도 이런 가설을 잘 뒷받침하는 결과라 할 수 있다. 즉, 금번 연구에서는 아스피린에 의한 MDR1 유전자의 발현이 정점을 지난 이후 시점에서 약동학 및 약력학 분석이 수행되었고, 결과적으로 아스피린 병용에 의한 클로피도그렐의 흡수 감소 효과가 저평가되었을 가능성을 고려할 수 있다. 둘째는 금번 연구가 선행 연구에 비해 상대적으로 TT 군 피험자가 많이 포함되었을 가능성을 들 수 있다. Table 3 에서 TT 군의 경우 아스피린 반복 투여 후에도 MDR1 유도가 되지 않았고, 4 명 중 3 명에서는 MDR1 유전자의 발현 정도에 변화가 없거나 오히려 감소하는 결과를 보였으며, 결과적으로 활성대사체의 농도는 증가하였다. 따라서, TT 군 피험자의 비율이 높을수록 아스피린에 의한 클로피도그렐의 흡수 저해 효과가 저평가될 수 있다. 결국, Oh 등에 의한 선행 연구에서 아스피린 투여 후 클로피도그렐의 전신 노출 정도가 감소하고 활성대사체 및 RPI

값은 변함이 없었던 결과와 금번 연구에서 클로피도그렐의 전신 노출은 변함이 없었고 활성대사체 및 RPI 값이 증가하는 양상을 보인 것은 상반된 것이 아닌 일관된 경향성을 보여주는 결과로 해석할 수 있을 것이다.

본 연구에서는 흥미롭게도 아스피린 투여 후 MDR1 이 충분히 발현되었고 활성대사체의 전신 노출 정도가 감소 추세를 보인 CC/CT 군 전체 및 활성대사체의 전신 노출이 통계적으로 유의하게 감소했던 EM_CC/CT 군에서도 약력학 지표인 RPI 값은 감소하지 않았다는 점이다 (Figure 6-2, Figure 6-3, Figure 7-2, Figure 7-3). RPI 값은 클로피도그렐 활성대사체의 농도에 크게 좌우되는 양상을 보이는 바 (Table 4, Table 5), RPI 값이 감소하지 않은 현상은 아스피린 자체에 의한 효과라기 보다는 클로피도그렐 활성대사체의 생성과 관련된 것으로 해석하는 것이 타당할 것으로 생각된다. CYP2C19 등의 약물대사 효소는 간 외에 장 점막에서도 발현되는 것으로 알려져 있으므로 장 점막에서의 활성대사체의 생성 효과에 의할 가능성을 고려해볼 수 있다. 즉, MDR1 에 의해 장 내강 속으로 배출된 클로피도그렐이 장 점막에서 활성대사체로 서서히 바뀌게 됨으로써 클로피도그렐 복용 2 시간 후에 측정된 RPI 값의 상승에 기여하였을 수 있다. 정상인에서 식후 소장통과시간은 1-3 시간으로 알려져 있는데, 장 점막에서의 클로피도그렐 대사효과는 간 대사와 달리 소장통과시간에 걸쳐 서서히 나타나며, 전신 혈관계가 아닌 문맥 혈관계를 거쳐 흡수되므로, 간 대사에 비해서 말초혈액 혈청 내의 약물 농도에 미치는 영향이 상대적으로 적을 수밖에 없어서

통상적인 약동학 평가를 통해 민감하게 확인하기는 어려웠던 것으로 추론할 수 있다. 약물대사 효소의 발현 유도제 투약 전후에 간, 장 점막, 신장, 폐 등의 장기에서 발현 정도를 평가한 동물연구에서는 장 점막에서 대사효소의 초기 발현량은 간에 비해 단위 무게당 10%로 적었지만 경구 대사효소 유도제 복용 후에는 단위 무게당 발현량이 간과 동등하거나 9 배에 이르는 결과를 보고한 바 있다.¹⁶ 결과적으로 장 점막에서의 CYP2C19 대사작용은 MDR1 유도에 따른 클로피도그렐의 흡수 저해 효과를 상쇄시키는 매우 효율적인 체내 보상 기전으로 작용하는 것으로 추정되고, CYP2C19 PM 군에서도 일정 부분 역할을 할 것으로 추정된다. 금번 연구에서 대상자 수가 6 명으로 적었음에도 불구하고 PM_CC/CT 군에서 아스피린 복용 후 H4 활성대사체가 증가하는 경향성을 보여준 것은 상기 가설을 뒷받침하는 결과라 생각된다 (Figure 7-2). 장 점막에서의 활성대사체 생성이라는 가설을 증명하기 위해서는 숯과 같은 흡착제를 이용하여 장 내강 속으로 배출된 클로피도그렐을 제거한 후에 RPI 값의 변화를 확인하는 추가 검증 연구가 필요하다.

Simon 등은 급성심근경색증으로 진단받고 클로피도그렐을 복용하는 2208 명의 환자를 대상으로 한 1 년간의 추적 연구를 통해 MDR1 C3435T TT 및 CYP2C19 PM 군에서 심혈관계 사건의 재발 위험이 높았음을 보고하였다.¹⁷ 이후 Mega 등은 급성 관상동맥 증후군으로 진단된 후 경피적 관상동맥 시술을 시행 받고 클로피도그렐을 복용 중인 환자 1471 명을 대상으로 MDR1 및

CYP2C19 유전형 조합별로 심혈관계 사건 재발과의 관련성을 평가하였고, 15개월간 추적했을 때 심혈관계 사건의 발생률이 PM_TT 군에서 13.6%, EM_TT 군에서 12.6%, PM_CC/CT 군에서 11.5%, EM_CC/CT 군에서 6.3%임을 보고하였다.¹⁸ CYP2C19 PM 군에서 클로피도그렐 투약에 따른 치료 실패 위험이 높다는 것은 활성대사체의 생성 감소에 의한 것으로 그 기전을 쉽게 설명할 수 있지만, 아스피린 투약 후 네 명중 세 명에서는 MDR1 유전자의 발현 정도가 변함없거나 오히려 감소하는 양상을 보여준 TT 군에서 심혈관계 사건의 재발 위험이 높았다는 것은 기존의 약동학 및 약력학 연구 결과로는 여전히 그 기전을 설명하기 어렵다. 하지만, 본 연구의 결과에 근거하여 다음의 두 가지 요인으로 TT 군에서 심혈관계 사건의 재발 위험이 높음을 설명할 수 있다. 첫째는 CYP2C19 *2/*3 및 MDR1C3435T 유전형 간에 연관불평형 (linkage disequilibrium)이 존재할 가능성이 있다. 본 연구에 참여한 EM_TT 군 대상자 중 초기 MDR1 발현 정도가 현저히 높은 1인을 제외하였을 때 아스피린 투약 개시 전 기저 MDR1 발현 정도는 EM_CC/CT 군 (n=5) 과 EM_TT 군 (n=3)간에 차이가 없었지만 (Table 3), 기저 약동학 평가에서 EM_CC/CT 군은 EM_TT 군에 비해서 클로피도그렐 에서 H4 활성대사체로 대사된 비율이 높았다 (Figure 7-1, Figure 7-2). 이것은 EM_CC/CT 군에서의 CYP2C19 유전자의 기저 발현량이 TT 군에 비해 약 20% 많았던 것에 의한 결과로 설명할 수 있는데 (Table 3), 이는 CYP2C19 및 MDR1 C3435T 유전형 간에 통계적 연관성이 존재할 가능성을 시사하는 소견이라 할 수 있다. 둘째는 아스피린 복용에 따른

MDR1 유전자의 발현이 클로피도그렐의 흡수에 미치는 영향이 실제로는 미미하다는 점이다. Oh 등에 의한 선행 연구에서도 4 주간 아스피린 병용 후 클로피도그렐의 흡수 저해 효과는 2 주째 평가에서만 관찰되었으며 그 감소 폭도 14%로 통계적으로 유의하지는 않았다.¹⁵ 강력한 약물대사 효소 유도제로 알려져 있는 리팜피신을 2 주간 투약한 후 MDR1 의 대표적 기질 약물인 디곡신의 흡수 감소를 보고한 초기 연구에서는 십이지장 점막에서의 MDR1 발현이 3.5 배 증가하였고 디곡신의 전신노출 정도가 약 30% 감소하였음을 보고하였는데,¹⁹ 이 결과를 리팜피신 이외의 대사효소 유도제에 의해 MDR1 유전자의 발현이 증가하면 클로피도그렐 등 다른 기질 약물의 흡수를 심각하게 저해하는 것으로 확대 해석하는 것에는 상당한 주의가 필요하다. 본 연구에서는 충분한 용량의 아스피린을 투약하였음에도 불구하고 십이지장 점막에서 MDR1 발현 정도는 CC/CT 군에서 평균 27% 증가하는 데 그쳤고, 약동학 분석을 통해서는 클로피도그렐의 흡수가 감소하지 않음을 확인할 수 있었다. 오히려, 전술한 바와 같이 EM_CC/CT 군에서는 아스피린 병용 후 활성대사체의 농도가 유의하게 감소하였음에도 불구하고 RPI 값은 감소하지 않았고, 이 결과를 토대로 MDR1 의 작용으로 장 내강으로 배출된 클로피도그렐은 장 점막에서의 CYP2C19 대사 작용을 통해 RPI 값을 증가시키는 효과적인 보상 기전의 존재를 데이터에 근거하여 제안하였다는 점은 본 연구의 큰 소득이라 할 것이다. 하지만, Figure 7-2 에 제시된 아스피린 병용 후 클로피도그렐 1 회 투약에 따른 약력학 분석 결과만으로는 Mega 등이¹⁸ 보고한 CYP2C19 및 MDR1

유전형 별 심혈관계 사건 발생 위험을 모두 설명할 수는 없는데, 이 부분은 향후 유전형 별 클로피도그렐 반복 투여 연구를 통해 그 기전을 규명할 수 있을 것으로 기대된다.

본 연구의 장점은 아스피린 복용에 따른 소장점막에서의 MDR1 유도 효과를 십이지장 점막 생검을 통해 정량적으로 평가했고, CYP2C19 및 MDR1 C3435T 유전형 별 피험자 모집을 통해 아스피린 병용 시 클로피도그렐의 약동학 및 약력학 변화에 대한 심층적인 분석을 시행했다는 점을 들 수 있다. 약점으로는 첫째, 적은 N 수에 따른 통계 검정의 어려움을 들 수 있다. 약동학 및 약리학 측정값은 상당한 개인차이를 보일 수 밖에 없는데 적은 N 수로 인해 평균값에서 상당한 차이를 보이지만 대부분의 항목에서 통계적 유의성을 보이지 못했다는 점은 본 연구의 큰 제한점이라 할 수 있다. 둘째, 기존의 보고를 통해 심근경색증 후 심혈관계 사건의 재발 위험이 높은 고위험군으로 알려진 CYP2C19 PM 유전형 및 MDR1 C3435T TT 군에 모두 해당되는 대상자를 모집하지 못했다는 점을 들 수 있다.^{17,18} 서구인에서는 CYP2C19 *17 대립유전자의 빈도가 *2 및 *3 보다 높은 것으로 알려져 있지만 한국인에서는 CYP2C19 *17 대립유전자의 빈도가 1.5%로 *2 및 *3 에 비해 매우 드문 것으로 알려져 있어서 본 연구에서는 *17 을 제외하고 분석하였다.²⁰ 한국인에서 CYP2C19 PM 군의 비율은 서구인과 유사한 12.5-14%로 알려져 있고,^{20,21} MDR1 C3435T 유전형 중 TT 군의 비율도 서구인과 유사한 17.8%로 알려져 있다.²² 연구 기간의 제한 및 상대적으로 드문 유전형인 CYP2C19 PM 군 및 MDR1 C3435C TT 군에

동시에 해당되는 대상자를 한정된 수의 건강대상자 후보군 중에서 찾아내기가 어려웠던 것에 기인한 것으로 사료된다. 결과적으로 심혈관계 사건의 재발 위험이 가장 높은 고위험군에서 아스피린 병용이 클로피도그렐의 약동학 및 약력학에 미치는 영향을 직접 평가하지 못했다는 점은 본 연구의 상당한 제한점이라 할 수 있다.

결론적으로 아스피린 복용 후 MDR1 C3435T CC/CT 군에서 MDR1 발현이 증가하였음에도 불구하고 클로피도그렐 및 H4 활성대사체의 전신노출 정도는 감소하지 않았다. 오히려 MDR1 의 발현은 장 점막에서의 CYP2C19 대사를 통해 클로피도그렐의 효능을 강화시키는 역할을 하는 것으로 추정된다. 아스피린과 클로피도그렐의 병용 투약은 EM_CC/CT, EM_TT 혹은 PM_CC/CT 군에서 효과적인 조합이라 생각된다.

참고문헌

1. van Wijk I, Kappelle LJ, van Gijn J, et al. Long-term survival and vascular event risk after transient ischaemic attack or minor ischaemic stroke: a cohort study. *Lancet*. 2005;365:2098-2104.
2. Bhatt DL, Fox KA, Hacke W, et al. Clopidogrel and aspirin versus aspirin alone for the prevention of atherothrombotic events. *N Engl J Med*. 2006;354:1706-1717.
3. Usman MH, Notaro LA, Nagarakanti R, et al. Combination antiplatelet therapy for secondary stroke prevention: enhanced efficacy or double trouble? *Am J Cardiol*. 2009;103:1107-1112.
4. Squizzato A, Keller T, Romualdi E, Middeldorp S. Clopidogrel plus aspirin versus aspirin alone for preventing cardiovascular disease. *Cochrane Database Syst Rev*. 2011:CD005158.
5. Peace AJ, Tedesco AF, Foley DP, Dicker P, Berndt MC, Kenny D. Dual antiplatelet therapy unmasks distinct platelet reactivity in patients with coronary artery disease. *J Thromb Haemost*. 2008;6:2027-2034.
6. Gurbel PA, Bliden KP, Hiatt BL, O'Connor CM. Clopidogrel for coronary stenting: response variability, drug resistance, and the effect of pretreatment platelet reactivity. *Circulation*. 2003;107:2908-2913.
7. Taubert D, von Beckerath N, Grimberg G, et al. Impact of P-glycoprotein on clopidogrel absorption. *Clin Pharmacol Ther*. 2006;80:486-501.
8. Kim KA, Park PW, Hong SJ, Park JY. The effect of CYP2C19 polymorphism on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of clopidogrel: a possible mechanism for clopidogrel resistance. *Clin*

Pharmacol Ther. 2008;84:236-242.

9. Umemura K, Furuta T, Kondo K. The common gene variants of CYP2C19 affect pharmacokinetics and pharmacodynamics in an active metabolite of clopidogrel in healthy subjects. *J Thromb Haemost.* 2008;6:1439-1441.
10. Gong IY, Crown N, Suen CM, et al. Clarifying the importance of CYP2C19 and PON1 in the mechanism of clopidogrel bioactivation and in vivo antiplatelet response. *Eur Heart J.* 2012;33:2856-2464a.
11. Scott SA, Sangkuhl K, Stein CM, et al. Clinical Pharmacogenetics Implementation Consortium guidelines for CYP2C19 genotype and clopidogrel therapy: 2013 update. *Clin Pharmacol Ther.* 2013;94:317-323.
12. Bouman HJ, Schomig E, van Werkum JW, et al. Paraoxonase-1 is a major determinant of clopidogrel efficacy. *Nat Med.* 2011;17:110-116.
13. Ohmori T, Yano Y, Sakata A, et al. Lack of association between serum paraoxonase-1 activity and residual platelet aggregation during dual anti-platelet therapy. *Thromb Res.* 2012;129:e36-40.
14. Jung KH, Chu K, Lee ST, et al. Prolonged use of aspirin alters human and rat intestinal cells and thereby limits the absorption of clopidogrel. *Clin Pharmacol Ther.* 2011;90:612-619.
15. Oh J, Shin D, Lim KS, et al. Aspirin decreases systemic exposure to clopidogrel through modulation of P-glycoprotein but does not alter its antithrombotic activity. *Clin Pharmacol Ther.* 2014;95:608-616.
16. Lake BG, Hopkins R, Chakraborty J, Bridges JW, Parke DV. The influence of some hepatic enzyme inducers and inhibitors on extrahepatic drug metabolism. *Drug Metab Dispos.* 1973;1:342-349.
17. Simon T, Verstuyft C, Mary-Krause M, et al. Genetic determinants of

- response to clopidogrel and cardiovascular events. *N Engl J Med.* 2009;360:363-375.
18. Mega JL, Close SL, Wiviott SD, et al. Genetic variants in ABCB1 and CYP2C19 and cardiovascular outcomes after treatment with clopidogrel and prasugrel in the TRITON-TIMI 38 trial: a pharmacogenetic analysis. *Lancet.* 2010;376:1312-1319.
 19. Greiner B, Eichelbaum M, Fritz P, et al. The role of intestinal P-glycoprotein in the interaction of digoxin and rifampin. *J Clin Invest.* 1999;104:147-153.
 20. Kim KA, Song WK, Kim KR, Park JY. Assessment of CYP2C19 genetic polymorphisms in a Korean population using a simultaneous multiplex pyrosequencing method to simultaneously detect the CYP2C19*2, CYP2C19*3, and CYP2C19*17 alleles. *J Clin Pharm Ther.* 2010;35:697-703.
 21. Lee SS, Lee SJ, Gwak J, et al. Comparisons of CYP2C19 genetic polymorphisms between Korean and Vietnamese populations. *Ther Drug Monit.* 2007;29:455-459.
 22. Ryu HC, Kwon HY, Choi IK, Rhee DK. Analyses of single nucleotide polymorphisms and haplotype linkage of the human ABCB1 (MDR1) gene in Korean. *Arch Pharm Res.* 2006;29:1132-1139.

Abstract

Clinical trial to evaluate the influence of genotype of drug metabolizing enzyme or transporter and drug-drug interactions of aspirin co-administration on the pharmacokinetics / pharmacodynamics of clopidogrel in healthy volunteers

Kyoung Sup Hong, M.D.

Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics

The Graduate School

Seoul National University

Aspirin is known as an inducer of MDR1 gene that express an efflux pump protein in the small bowel epithelial cells. There was a report that the absorption of clopidogrel that is a substrate of MDR1 decreased after the administration of aspirin, and was a concern of treatment failure in patients who ingests clopidogrel and aspirin concomitantly. In the present study, we recruited 15 healthy male subjects according to CYP2C19 and MDR1 C3435T genotypes which had known to have an effect on the metabolism and absorption of clopidogrel as a pro-drug, and assessed quantitatively the expression of MDR1 in the duodenal mucosal cell after the administration of aspirin for 8 weeks in addition to pharmacokinetic and pharmacodynamic analyses of clopidogrel. As results, MDR1 expression increased in C3435T CC/CT group, but does not change or decreased in TT group. There was no significant change in systemic

exposure of clopidogrel in either CC/CT or TT group. H4 active metabolite significantly decreased in both CYP2C19 extensive metabolizers (EM) and CC/CT group (EM_CC/CT) after the administration of aspirin, but there was no change in relative platelet inhibition. Whereas, there showed a tendency of increase of H4 metabolite in either EM_TT or PM_CC/CT group, although statistically insignificant. In conclusion, there was no significant change in systemic exposure of both clopidogrel and H4 metabolite in CC/CT group as a whole in spite of the significant increase of MDR1 expression after the administration of aspirin. Dual antiplatelet therapy including clopidogrel and aspirin seems to be effect in EM_CC/CT, EM_TT or PM_CC/CT group.

.....

Keywords : clopidogrel, aspirin, MDR1, CYP2C19

Student Number : 2011-30623

