



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

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

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 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](#)

약학석사 학위논문

**Capillary Permeability Model을
반영한 Whole-body PBPK
Model의 구축에 관한 연구**

**Application of Capillary Permeability
Model in Whole-Body PBPK Model**

2015 년 2 월

서울대학교 대학원
약학과 약제과학 전공
정 유 성

Capillary Permeability Model을 반영한 Whole-body PBPK Model의 구축에 관한 연구

지도교수 정 석 재

이 논문을 약학석사 학위논문으로 제출함
2015 년 2 월

서울대학교 대학원
약학과 약제과학 전공
정 유 성

정유성의 석사학위논문을 인준함
2015 년 2 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국문초록

Whole-body physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model은 각 조직으로의 혈류속도(Q_t), 각 조직의 부피(V_t), 그리고 약물의 tissue-to-plasma concentration ratio(K_p)의 연립미분방정식만으로 조직 및 혈중의 약물 농도를 예측하는 이론체계를 말한다. 그런데, 이 이론 체계는 상당한 유용성을 가짐에도 불구하고 조직으로의 약물 이동 단계에서는 해당 이행의 율속 단계에 따라 perfusion rate-limited case 또는 permeability-limited case 중 하나를 실험적으로 정한 다음 적용해야 하는 단점이 있다. 따라서 이 연구의 목적은 위 두 limiting case를 한 개의 일관된 식으로 통합하여 whole-body PBPK model를 도출하는 것이다. Capillary permeability model과 유사한 방법으로 rate balance equation을 구축하여 얻어진 식을 통해, 기존의 whole-body PBPK model에서의 두 경우를 포괄하는 통합된 식을 유도할 수 있었고, 또한 이 식의 유용성을 높이기 위해 혈액과 조직 간 interface의 유효표면적을 평가하였다. Rat과 mouse의 9개의 주요 장기(간, 뇌, 신장, 심장, 폐, 비장, 장관, 근육, 지방) 및 carcass에 대한 유효표면적수치를 실험적으로 산출하고, 이 값을 써서 여러 약물의 in vivo plasma 및 tissue 농도의 추이를 예측하고 실측치와 비교하였다. 특히, 본 연구에서는 약물동태학 연구에서 model 약물로 널리 사용되고 있는 antipyrine을 model 약물로 선정하여 사용하였으며, PAMPA에서 측정한 permeability 값 및 Plasma / tissue의 약물의 free fraction 실측치를 적용하여 각 조직의 유효표면적 값을 계산할 수 있었다. 또한 이 이론을 적용하였을 때 일련의 in vitro physicochemical property 만을 가지고 기존 약물의 체내동태를

상당히 잘 계산해 낼 수 있음을 알았으며 따라서 본 이론체계는 상당한 실용적 가치를 가졌다고 할 수 있었다. 궁극적으로 본 연구를 통해 in vitro 실험만으로 약물의 in vivo tissue distribution를 예측하고 나아가 Human-PBPK 예측체계로 발전시킬 이론적 토대가 마련되었다할 것이다.

주요어 : physiologically-based pharmacokinetic modeling, simulation, surface area, human prediction

학 번 : 2012-23599

목 차

1. Introduction	1
2. Materials and Methods	3
2.1 Model structure	3
2.2 Estimation of surface area	5
2.3 Estimation of trapped volume	7
2.4 Integration plot analysis for allometry	8
2.5 Physiological input parameters	10
2.6 Compound specific input parameters	11
3. Results	12
4. Discussion	18
참고문헌	22
Abstract	29

표 목 차

[표 1]	10
[표 2]	11
[표 3]	12
[표 4]	12

그림 목 차

[그림 1]	3
[그림 2]	13
[그림 3]	14
[그림 4]	15
[그림 5]	16

1. Introduction

신약개발의 초기 단계에서, 수많은 신약 후보물질들은 그 중 가장 좋은 약물동태학적 특성을 가진 선도화합물을 도출해내기 위하여 흡수, 분포, 대사, 배설(ADME) 등과 관련된 파라미터들을 평가받게 된다. 특히, 그러한 신약 후보물질들의 물리화학적 특징들(physicochemical properties)과 체내의 생리학적 특징들(physiological parameters)을 수학적 모델에 적용하는 *in silico* whole body physiologically based pharmacokinetic (WBPBPK) modeling은 신약개발 과정에서 사람에서의 약물동태학적 프로파일을 정확하게 예측함으로써 신약개발 과정에서의 실패율을 줄이는데 중요한 기여를 하고 있다[1-2].

이러한 ADME 특성들 중, 약물 분포(distribution)의 특성은 분포 속도(rate)와 정도(extent)의 두 가지 측면으로 특징지어진다. Tissue to plasma concentration ratio(K_p)로도 잘 알려진 약물 분포의 extent를 예측하는 많은 mechanistic *in silico* 방법이 제시되어 왔고[3-7], 이들 중 어떤 방법이 좋은 예측을 제공하는 model로서 사용되는지에 관한 연구도 진행된 바 있다[8-9]. 그러나 약물의 조직분포의 속도론적 관점에서는, 대부분의 hydrophobic한 저분자 화합물들의 경우 보편적으로 perfusion rate-limited model이 가정되며, 반대로 hydrophilic한 고분자 화합물의 경우 permeability rate-limited model을 적용하기 위해 많은 양의 실험적 정보가 필요하게 된다[1,10-11]. 이러한 가정은 permeability rate-limited model을 따르는 많은 신약 후보물질들의 조직분포 속도에 대한 정확한 예측을 제공하지는 않는다[12].

이처럼, 약물이 혈중에서 조직으로 이동하는 단계에서는 해당 이행의 율속 단계에 따라 perfusion rate-limited case 또는 permeability-limited case 중 하나를 실험적으로 정한 다음 적용해야 하는 단점이 있다. 따라서 본 연구의 목적은 위 두 limiting case를 한 개의 일관된 식으로 통합한 whole-body PBPK model를 도출하는 것이다. 조직분포 kinetic을 설명하는 여러 가지 모델 중, capillary permeability model과 유사한 방법으로 mass balance equation을 구축하여 얻어진 식을 통해, 기존의

whole-body PBPK model에서의 두 경우를 포괄하는 통합된 식을 유도할 수 있었고, 또한 이 식의 유용성을 높이기 위해 약물동태학 연구에서 model 약물로 널리 사용되고 있는 antipyrine을 model 약물로 선정하여 혈액과 조직 간 interface의 유효표면적을 평가하였다. 즉, Mouse의 9개의 주요 장기(간, 뇌, 신장, 심장, 폐, 비장, 장관, 근육, 지방) 및 carcass에 대한 유효표면적수치를 실험적으로 산출하고, 이 값을 써서 여러 약물의 in vivo plasma 및 tissue 농도의 추이를 예측하고 실측치와 비교하였다. 또한 allometric scaling 방법을 이용해 mouse에서 산출된 유효표면적으로부터 rat에서의 유효 표면적을 산출할 수 있었다. 또한 이 이론을 적용하였을 때 일련의 in vitro physicochemical property 만을 가지고 기존 약물의 체내동태를 상당히 잘 계산해 낼 수 있는지를 평가하였다.

2. Materials and methods

2.1 Model structure

조직 분포에 관한 WBPBPk 모델로서 perfusion rate과 diffusion rate을 통합한 well stirred model이 제시된 바 있으나[13,53], permeability가 낮은 약물의 경우 vascular compartment 내에서 instantaneous equilibrium이 일어난다고 보기 어렵기 때문에 본 연구에서는 좀 더 physiological model인 capillary permeability model을 적용하였다(그림 1).

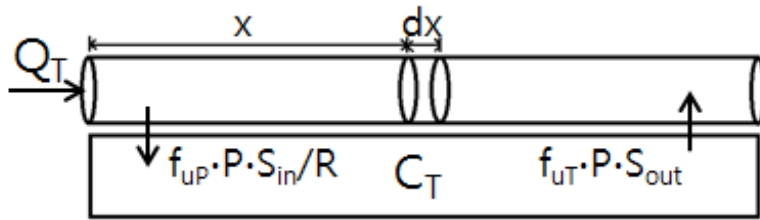


그림 1 capillary permeability model을 반영한 조직분포 모델,

위와 같은 그림에서 fractional distance x 에 대해 mass balance equation을 세우면 다음과 같다.

$$Q_T \cdot C(x + dx) = Q_T \cdot C(x) - P_{in} \cdot S \cdot f_{up} \cdot \frac{C(x)}{R} \cdot dx + P_{out} \cdot S \cdot f_{ut} \cdot C_T \cdot dx$$

$$Q_T \cdot \frac{dC(x)}{dx} = -P_{in} \cdot S \cdot f_{up} \cdot \frac{C(x)}{R} + P_{out} \cdot S \cdot f_{ut} \cdot C_T$$

여기서 f_{up} , f_{ut} 는 각각 약물의 혈장, 조직 중 unbound fraction을, P 는 약물이 혈액과 조직 사이에서 이행할 때의 투과도를, S 는 혈액과 조직 사이의 표면적을, Q_T 는 조직으로의 혈액이 공급되는 속도를, 그리고 R 은 약물의 blood to plasma concentration ratio를 의미한다.

이를 라플라스변환을 이용하여 정리하면 다음과 같은 식을 얻을 수 있다.

여기서 $x=1$ 을 대입하게 되면 다음과 같이 capillary 밖으로 빠져나오는 약물 농도 C_{out} 을 구할 수 있게 된다.

$$C(x) = C_{in} \cdot e^{-\frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{Q_T \cdot R} \cdot x} + \frac{C_T \cdot R}{K_p} (1 - e^{-\frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{Q_T \cdot R} \cdot x}) \quad (\because \frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{P_{out} \cdot S \cdot f_{ur}} = K_p)$$

$$\therefore C_{out} = C_{in} \cdot e^{-\frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{Q_T \cdot R}} + \frac{C_T \cdot R}{K_p} (1 - e^{-\frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{Q_T \cdot R}}) \quad (\because x = 1)$$

이를 조직 중 약물의 양이 변하는 미분방정식에 대입하여 정리하면 다음과 같은 식을 도출할 수 있다.

$$V_T \cdot \frac{dC_T}{dt} = Q_T \cdot (C_{in} - C_{out})$$

$$= Q_T \cdot (C_{in} - (C_{in} \cdot e^{-\frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{Q_T \cdot R}} + \frac{C_T \cdot R}{K_p} (1 - e^{-\frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{Q_T \cdot R}})))$$

$$V_T \frac{dC_T}{dt} = Q_T \cdot (1 - e^{-\frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{Q_T \cdot R}}) \cdot (C_{arterialblood} - \frac{C_T \cdot R}{K_p})$$

기존의 capillary permeability model을 설명하는 Kety-Renkin-Crone equation[14-17]에 f_{up} 의 영향을 고려한 연구가 선행된 바 있으며[18], 이 미분방정식은 여기에 R 항을 추가적으로 고려한 식이다. WBPBPK modeling에 각 조직으로의 약물 농도는 위의 식이 그대로 적용되었으며, 정맥혈, 동맥혈, 폐에는 다음과 같은 미분방정식을 적용하였다.

정맥혈 :

$$V_{VE} \frac{dC_{VE}}{dt} = \sum Q_{T,i} \cdot C_{out,i} - Q_{CA} C_{VE} + Dose\ rate$$

동맥혈 :

$$V_{AR} \frac{dC_{AR}}{dt} = Q_{CA} C_{out,LU} - Q_{CA} C_{AR}$$

$$\text{폐} : V_{LU} \frac{dC_{LU}}{dt} = Q_{CO} \cdot \left(1 - e^{-\frac{P_{in} \cdot S \cdot f_{up}}{Q_{CO} \cdot R}}\right) \cdot \left(C_{\text{venous blood}} - \frac{C_{LU} \cdot R}{K_p}\right)$$

또한, mouse body의 나머지 compartment인 carcass의 시간에 따른 농도는 다음과 같은 식으로부터 계산하여 PBPK modeling에 적용시켰다.

$$V_{Carcass} \cdot C_{Carcass}(T) = \text{Dose} - CL_{tot} \cdot AUC_0^T - \sum V_{t,i} \cdot C_{t,i}(T)$$

2.2 Estimation of surface area between the systemic circulation and tissues in rats and mice

Antipyrine은 pharmacokinetic study에서 model 약물로 널리 사용된 약물이다.[19-21] 본 연구에서는 특히 antipyrine의 tissue로의 distribution kinetic이 water의 그것과 비슷한 패턴을 보이고[22], 지금까지 DDI에 주로 관여한다고 알려진 주요 transporter에 대해 기질성이 보고된 바가 없기 때문에 antipyrine이 model약물로 사용되었다. 또한 antipyrine은 plasma free fraction, 즉 $f_{up}=1$ 인 좋은 모델 약물로서의 특징을 가지고 있다고 할 수 있겠다.

Animals

실험에는 4 주령의 수컷 ICR mouse, 7-8 주령의 수컷 SD rat가 사용되었으며, 오리엔트바이오(경기도, 대한민국)에서 구입하였다. 본 연구에서 진행된 동물 실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였다. 수컷의 SD rat는 50 mg/kg tiletamine HCl/zolazepam HCl (Zoletil 50[®]; Virbac Laboratories, France) and 10 mg/kg xylazine HCl (Rompun[®]; Byer Korea, Korea)를 근육주사로 투여하여 마취하였다. 마취 상태를 확인 후, 대퇴부 동맥(혈액 샘플링 목적)과 정맥(체액 보충 혹은 약물 투여 목적)에 heparinized saline(25 IU/mL)으로 채워진 polyethylene tube(PE 50; Clay Adams, Parsimony, NJ)를 삽관하였다.

Pharmacokinetic study of antipyrine in mice

하룻밤 동안 절식된 20-25 g ICR mouse에 8 mg/mL의 antipyrine을 함유한 normal saline 용액을 5 mL/kg의 부피로, 즉 40 mg/kg의 dose를 tail vein으로 bolus 투여하였다.

각 시간 군별(t = 20 s, 1, 2, 5, 15, 30, 60 min)로 3마리씩 정맥투여 후에, blood를 안와정맥총에서 채혈한 뒤(약 250 μ L) 경추탈골 후 9개 각 조직(간, 뇌, 신장, 심장, 폐, 비장, 소장, 근육, 지방)을 적출하였다. Blood sample은 4 $^{\circ}$ C, 13,200 rpm에서 10 분간 centrifuge된 후 상층액을 취하여 -20 $^{\circ}$ C에 보관하였다. 각 조직은 미리 칭량된 round bottom flask에서 칭량되었고, 전처리까지 -20 $^{\circ}$ C에 보관되었다.

Sample preparation and analysis

각 조직의 밀도는 1 g/mL로 가정하고, 각 조직의 무게에 4배에 해당하는 DPBS를 투여 후, homogenizer(Ultra Turrax model, T25, IKA Works)로 조직을 갈았다. 얻어진 tissue homogenate과 혈장 100 μ L는 190 μ L의 MeOH 과 10 μ L의 IS solution(dimethylaminoantipyrine, 40 μ g/mL in MeOH)을 섞은 뒤 vortex 후 4 $^{\circ}$ C, 13,200 rpm에서 10 분간 centrifuge시켰으며, 그 상층액을 HPLC-UV 기기(Waters e2695, 2489)로 분석하였다. 이동상은 water-acetonitrile(80:20, v:v)의 isocratic한 조건이었고, flow rate는 1 mL/min 이었다. 그 상층액 50 μ L는 역상 HPLC column(Kinetex XB-C18, 150 \times 4.6 mm, 5 μ m, phenomenex)으로 주입되었고, 그 eluent는 254 nm에서 측정되었다.

Data analysis

Antipyrine의 plasma and tissue concentration versus time profile을 이용하여, 각 조직으로의 분배계수인 K_p value를 다음과 같은 식을 이용해 계산하였다[38].

$$K_p = \frac{AUC_{inf,tissue}}{AUC_{inf,plasma}}$$

분수의 분자와 분모는 각각 tissue, plasma profile로부터 구한 밀면적을 의미한다. 또한 antipyrine의 plasma free fraction은 1로($f_{up} = 1$), B/P ratio는 0.93으로 적용하였다[21]. 또한 PAMPA로부터 구한 apparent permeability $P_{app} = 0.82 * 10^{-6}$ cm/s 로 적용하였다[30].

Antipyrine은 hepatic elimination capacity를 연구하는 데 model drug 으로 사용될 만큼 거의 대부분이 liver에서 대사되는 물질이다[20]. 그러나 통상적인 hepatic well stirred model로부터 구한 in vivo intrinsic clearance를 적용시킬 수 있으나[37], 간에서의 유효표면적을 산출하는데 불확실성을 줄이기 위해 동맥혈에서 약물의 소실이 일어나는 것을 나타내는 수식을 적용하였다.

각 조직별 유효 표면적은 위에서 기술된 미분방정식에 따라 antipyrine의 plasma and tissue concentration versus time profile에 simultaneously fitted 되었다. Data fitting에는 Winnonlin Professional 5.0.1[®]이 사용되었다. 각 조직별로 open loop model을 이용하여 initial estimate을 구하였으며 이를 data fitting에 적용하였다.

2.3 Estimation of trapped blood volume in tissue samples

Inulin의 volume of distribution은 vascular space와 extracellular fluid에 한정된다는 특징을 가진 물질로[23], 실험계에서 얼마 만큼의 blood가 trapped 되어있는지를 측정하기 위한 표지물질로 사용하였다. 3H-labeled inulin을 mouse와 rat에 0.1 mg/kg(for mice, 0.02 mg/mL soln, 5 mL/kg; for rats, 0.1 mg/mL soln, 1 mL/kg)로 투여하고 30초 후에 blood sampling을 진행한 뒤 그 직후 tissue sampling을 진행하였다.

Tissue homogenate(≈ 100 mg)는 2 mL의 완전히 soluene-350 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences, Waltham, MA)에 digest시킨 후(37°C incubation), quenching을 방지하기 위해 200 μ L의 hydrogen peroxide(35%, Junsei Chemical Co., Ltd.)를 반응시켰다. Scintillation cocktail로는 Ultima Gold(10 mL; PerkinElmer Life and Analytical

Sciences, Waltham, MA)가 사용되었으며, 이는 liquid scintillation counting program(Tri-Carb 3110TR Liquid Scintillation Analyzer, PerkinElmer)을 사용하여 분석되었다.

2.4 Integration plot analysis of theophylline for allometric scaling in mice and rats

Integration plot analysis for brain uptake of theophylline

Theophylline은 rat(마취에서 깨어난 후)과 mouse에서 모두 10 mg/kg 로 i.v. bolus 투여된 뒤 특정 시간(for rats, end time point $t_{last} = 30, 60, 75, 90$ s; for mice, $t = 30, 60$ s)이 지날 때까지 3회에 걸쳐 혈액 샘플링을 진행한 뒤 곧바로 9개의 장기를 적출하였다.

Integration plot analysis는 통상적으로 이용되는 다음과 같은 식을 이용하였다[24].

$$\frac{X_{Brain}(t)}{C_{Blood}(t)} = CL_{app} \frac{AUC_0^t}{C_{Blood}(t)} + V_{vascular}$$

Sample preparation and analysis

위에서와 마찬가지로, 각 조직의 밀도는 1 g/mL로 가정하고, 각 조직의 무게에 2배(for rats), 4배(for mice)에 해당하는 DPBS를 투여 후, homogenizer(Ultra Turrax model, T25, IKA Works)로 조직을 갈았다. 얻어진 tissue homogenate과 혈장 100 μ L는 400 μ L 의 MeOH과 섞은 뒤 vortex 후 4°C, 13,200 rpm에서 10 분간 centrifuge시켰으며, 그 상층액을 LC/MS/MS 기기(Agilent 6460 Triple quadrupole mass spectrometer with 1260/1290 LC system)로 분석하였다. autosampler의 온도는 4°C로 유지되었다. 이동상은 5 mM ammonium acetate in water-5 mM ammonium acetate in MeOH(20:80, v:v)의 isocratic한 조건이었고, flow rate는 0.3 mL/min 이었다. 그 상층액 3 μ L가 역상 HPLC column(Agilent Poroshell 120 SB-C18 2.7 μ m, 3.0×100 mm)으로 주입되었다. Electrospray ionization은 positive ion mode에서 진행되

었고, 그 때 Nebulizer의 N2 압력은 30 psi 로 진행되었고, 그 Gas flow 와 gas temperature는 각각 11 L/min, 300℃로 유지되었다. sheath gas temperature는 350℃, sheath flow rate는 11 L/min 이었다. Capillary와 nozzle의 voltage는 각각 4000 V, 1000 V로 적용되었다. Theophylline은 MRM mode(m.w. 181.2->124)로 측정되었다.

Allometric scaling of the effective surface area

유효표면적에 대한 interspecies allometry는 통상적으로 잘 알려져 있는 body volume(tissue volume)과의 다음과 같은 관계식으로 잘 알려져 있다[39].

$$S \propto V^{2/3}$$

위 식에 따르면 유효표면적은 장기의 volume이 커짐에 따라 같은 비례로 증가하는 것이 아니라 2/3제곱에 비례하여 증가하는 것을 알 수 있다. Mouse에서 구한 각 장기별 총 유효표면적을 위의 식에 따라 적용하여, rat의 장기별 유효표면적을 계산하였다.

이러한 관계를 study하기 위해, permeability가 매우 낮은 hydrophilic한 물질로 잘 알려진 theophylline을 이용하여 brain으로의 distributional clearance를 구하는 실험을 수행하였다. Rat과 mouse에 모두 theophylline을 10 mg/kg 만큼 I.V. bolus 투여하였고, 두 종 모두에서 ending time point까지 3회의 blood sampling을 거친 직후에 brain을 sampling하였다.

2.5 Physiological input parameters

Mice와 rat의 physiological parameter들은 표 1에 정리하였으며, 사용된 parameter 값들은 Simcyp® simulator[40] Version 14 Release 1(Simcyp Limited, Sheffield, UK)에서 사용되는 parameter들이다.

	Tissue volume(mL)		Blood flow(mL/min)	
	Mouse(20 g)	Rat(250 g)	Mouse(20 g)	Rat(250 g)
Liver	0.952	8.57	3.15	19.36
Brain	0.36	1.24	0.464	1.12
Kidney	0.272	2.19	1.9	11.6
Heart	0.096	1.05	0.799	3.2
Lung	0.12	1.24	14.01	80
Spleen	0.088	0.57	0.0995	0.88
Gut	2.048	6.19	1.74	8.08
Muscle	7.6	116.13	1.63	18.96
Adipose	1.504	16.66	0.981	4.72
Carcass	5.648	80.84	5.09	21.04
Venous blood	0.875	10.2		
Arterial blood	0.437	5.11		

표 1. Physiological parameters used for whole body PBPK modelling

2.6 Compound specific parameters

Tissue profile을 observe한 theophylline을 제외하고, rat model에 적용된 나머지 compound들에 대해서는 mechanistic한 *in silico* K_p 예측방법을 사용하였다[6,7]. 각 약물별로 사용된 compound specific input parameter들은 표 2에 나타내었다.

Rats	Type	pK _{a1} ^a	pK _{a2}	logP	fup	R	P _{app} (x 10 ⁻⁶ cm/s) ^m
Ketoprofen	monoprotic acid	4.45 ^b		3.12 ^c	0.011 ^f	1.1 ^f	0.043
Furosemide	diprotic acid	4.25	9.83	2.03 ^c	0.128 ^g	0.7 ^f	0.043
Sumatriptan	monoprotic base	9.54		0.93 ^d	0.83 ^h	1 ^k	0.013
Midazolam	monoprotic base	6.57		3.4 ^e	0.028 ^f	0.561 ^f	11
Ceftriaxone	monoprotic acid	7.57		-2.22 ^a	0.2 ⁱ	1 ^k	0.03 ⁿ
Theophylline					0.18 ^j	0.98 ^l	0.043

표 2 Compound specific parameters for PBPK modeling

^a따로 표기되어 있지 않는 한, 구조적으로 계산된 pK_a 값임 (chemicalize.org)

^b[41] ^c[42] ^d[43] ^e[44] ^f[45] ^g[46] ^h[47] ⁱ[48] ^j[49] ^kassumed ^l[50] ^m[30]

ⁿ[34]

3. Results

위의 방법에 따라 계산된 각 조직별 유효표면적은 mouse 와 rat 그리고 human에서 결정되었고 그 결과는 다음 표 3에 정리하였다.

	Estimated surface area(cm ² /gtissue)		
	Mouse	Rat	Human
Liver	1120000	538000	90600
Brain	165000	109000	10500
Kidney	1910000	953000	183000
Heart	514000	232000	34100
Lung	4350000	2000000	204000
Spleen	476000	255000	37400
Gut	395000	273000	47200
Muscle	94600	38100	6130
Adipose	4960	2230	230
Carcass	197000	81100	14100

표 3. Estimated surface area for application of capillary permeability model in WBPBPK modelling

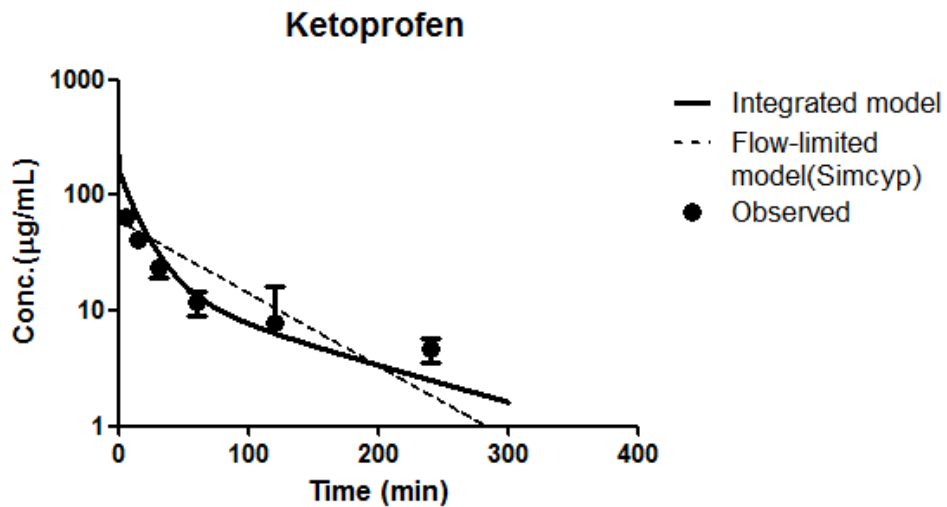
또한 mouse, rat에서 각각 tissue에서의 trapped volume 값은 다음 표 4와 같다.

	Trapped blood volume(μ L/g tissue \pm S.D.)	
	Mouse	Rat
Liver	301 \pm 61.3	105 \pm 26.4
Brain	59.3 \pm 12.0	17.6 \pm 1.36
Kidney	240 ^a	209 \pm 82.6
Heart	289 \pm 17.4	139 \pm 4.39
Lung	405 \pm 39.0	283 \pm 34.7
Spleen	151 \pm 29.2	43.0 \pm 20.9
Gut	189 \pm 19.4	107 \pm 17.2
Muscle	148 \pm 8.22	38.7 \pm 8.15
Adipose	59.3 \pm 19.6	30.9 \pm 6.26

표 4. Trapped blood volume

다음의 6개의 약물에 대하여 prediction을 진행해보았고, 각 약물에 대한 prediction versus observed data는 다음과 같다.

Ketoprofen(plasma)



Furosemide(plasma)

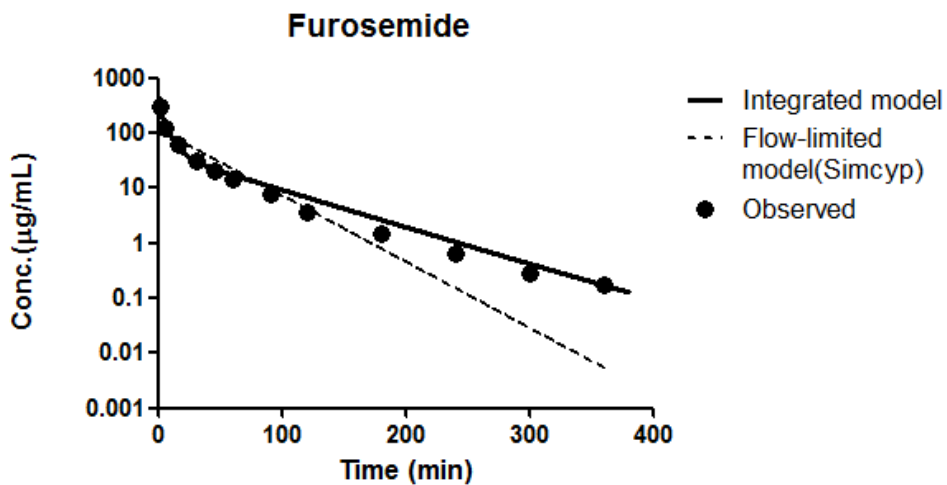
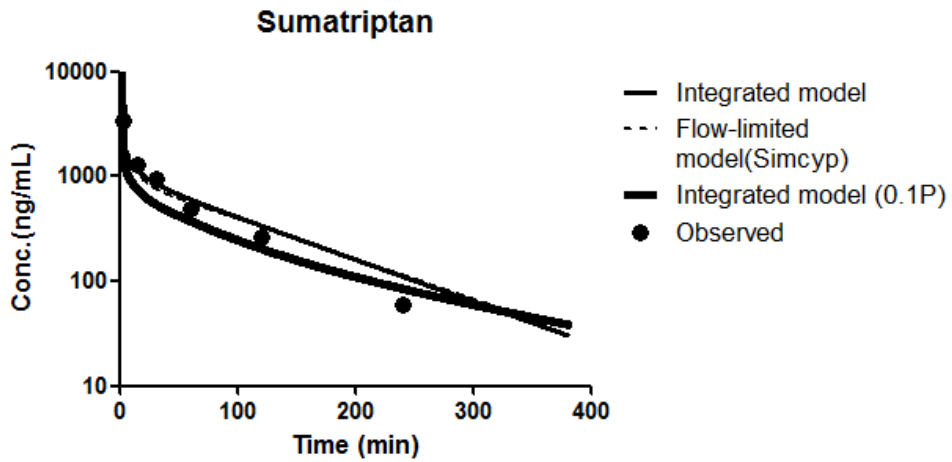


그림 2. Simulation versus observed data for ketoprofen and furosemide in rats

Sumatriptan(plasma)



Midazolam(plasma)

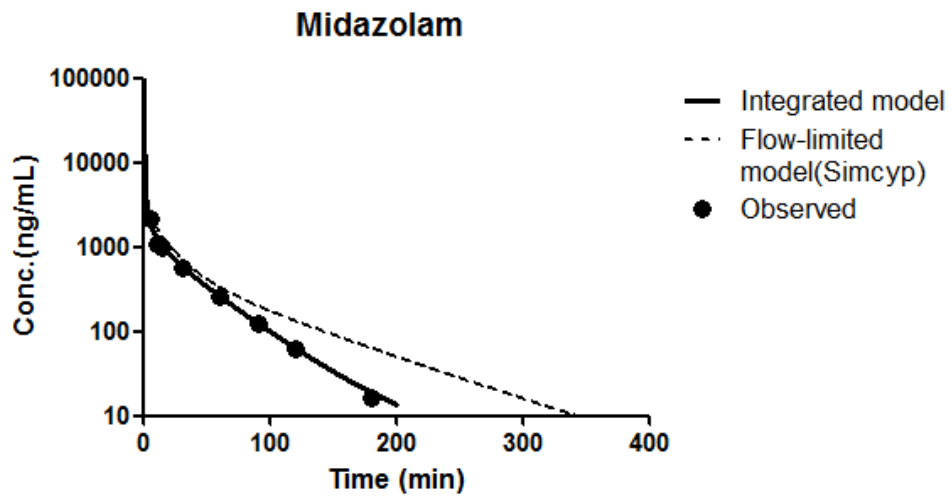


그림 3. Simulation versus observed data for sumatriptan and midazolam in rats

Ceftriaxone(plasma)

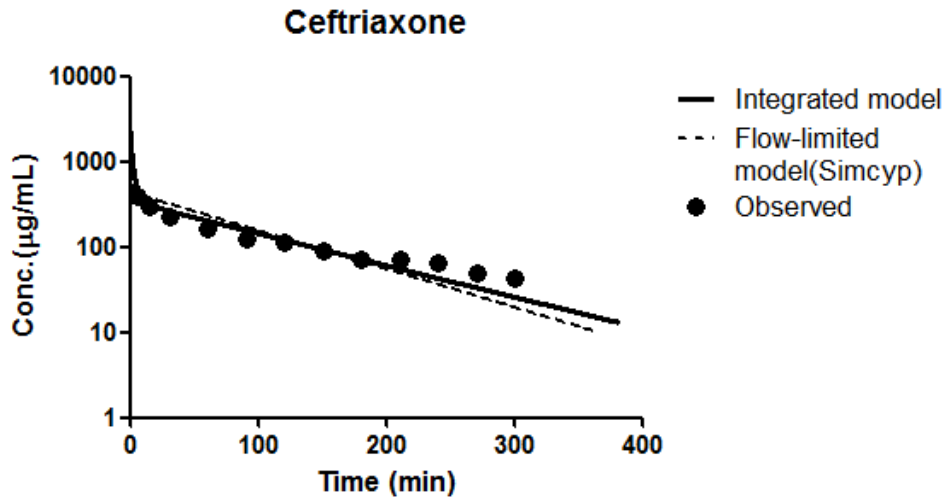
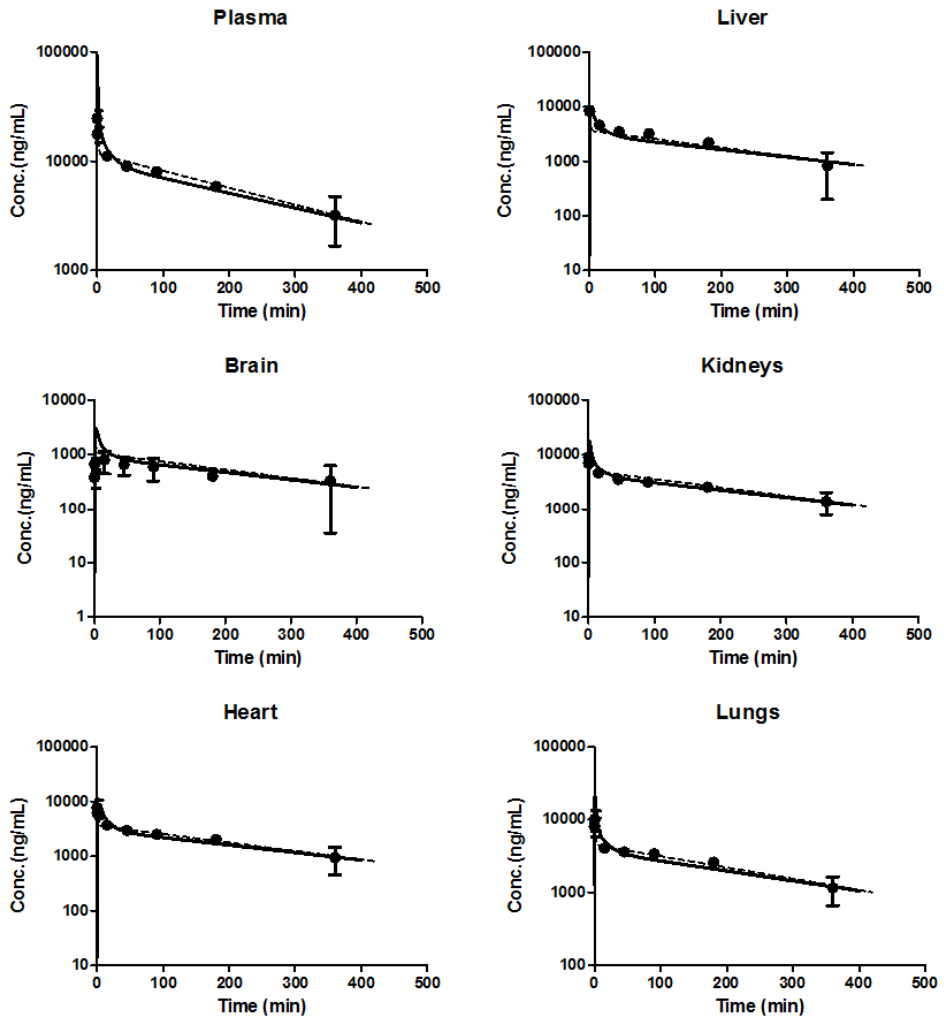


그림 4. Simulation versus observed data for ceftriaxone in rats

Theophylline



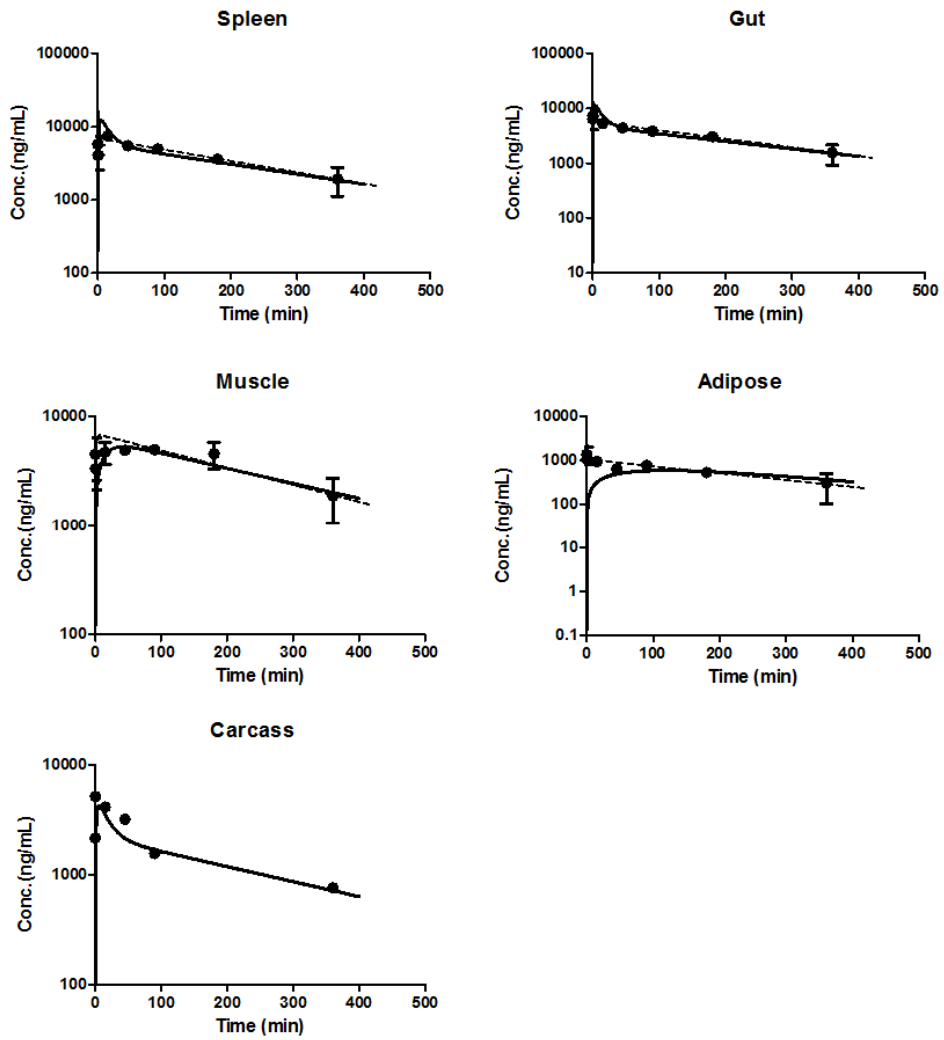


그림 5. 그림 3. Simulation versus observed data for theophylline in rats

4. Discussion

본 연구의 목적은 tissue distribution model에서 통상적으로 가정되는 perfusion rate-limited model과, 실험적으로 결정되어 적용되는 permeability rate-limited model을 통합하여, in vitro permeability assay 중 high throughput screening system으로 잘 알려진 PAMPA 를 이용해 예측하는 통합 모델을 구축하는 것이었다. 즉, PAMPA screening data를 이용하여, permeability가 높은 약물은 perfusion rate-limited model을, 반면에 permeability가 낮은 약물의 경우 permeability rate-limited model에 해당하는 속도를 계산해낼 수 있는 통합 모델을 제시하는 것이었다. 본 연구에서는, permeability가 낮은 약물의 경우 조직 내의 vascular compartement에서 약물이 instantaneous equilibrium 이 이루어지기 어렵기 때문에, well stirred model 대신 capillary permeability model을 사용하였으며, 이에 따른 Kety-Renkin-Crone의 수식을 좀더 변형, 발전시켜 PBPK modeling에 적용하였다. 특히 약물의 distribution kinetic에서 속도론이 중요한 이유는 약물이 transporter의 기질이 될 때에 혈중에서 조직으로 투과되는 그 속도를 in vitro 특성치로부터 계산해내는 것이 신약개발 과정에서 매우 유용하게 사용될 수 있을 것이기 때문이다.

이러한 조직 분포의 속도론적 측면이 중요하게 대두되기 이전에, 조직 별 유효표면적을 미리 구해낸 뒤 permeability를 예측하는 in vitro system을 이용해 조직의 interstitial space와 intracellular space사이에서 약물의 diffusional clearance를 이용하여 이를 PBPK modeling에 적용하는 것의 필요성에 관한 문제가 Edginton et al에 의해 제시된 바 있다 [25]. 본 연구에서는 이전에 지적된 바와 같이 유효표면적을 측정된 뒤, 이 값이 PBPK modeling에 적용되었을 때 어느 정도의 정확한 예측을 제공하는지에 대한 연구를 진행해 보았다.

Distribution kinetic이 물과 비슷하다고 알려져 있는 antipyrine을 model약물로 선정하게 되었다[22]. antipyrine은 plasma protein binding 이 거의 없어 distribution kinetic의 복잡성이 덜하고, 특히 transporter의

기질성이 거의 보고된 바가 없어 linear tissue distribution kinetic을 나타내는 특징 때문에, model 약물로 사용되었다.

약물의 Permeability를 측정하는 assay에는 Caco-2, MDCK cell permeability assay 등 cell line을 이용한 cell-based assay가 있으며 이는 신약개발과정에서 in vivo 흡수와 tissue로의 투과를 예측하는 데 유용하다[26-29]. 그러나 cell culture의 비용, cell culture에 드는 3주간의 시간, transporter의 존재와 세포 내에 존재하는 대사 효소 등에 의해 permeation process에 복잡성이 존재한다[30]. 이와 같은 한계에 따라, Kansy et al등 선행연구에서 PAMPA 라는 permeability assay가 개발되었다[31]. 이후, 약물의 absorption kinetic을 좀 더 정확하게 예측하기 위한 많은 종류의 PAMPA 실험법이 개발되었으나[32-36], 본 연구에서는 tissue distribution의 투과도를 예측하기 위해서 통상적으로 많이 사용되고 있는 PAMPA method와 그 측정치를 사용하였다[30,31]. Phospholipid의 단일막에 의한 PAMPA는 오직 passive diffusion에 의한 약물의 투과도를 측정할 수 있으며, 이에 따른 결과는 약물의 지용성 (lipophilicity), 이온화 상태(ionization state), 용해도(solubility) 등의 특징을 반영한 정보라고 할 수 있다. 물론, passive diffusion 이외에 active transport(influx, efflux 모두), paracellular route로의 약물 투과를 반영한 투과도를 측정할 수 있는 MDCK cell, Caco-2 permeability assay 등의 cell based assay를 적용하여 구한 유효 표면적을 다른 약물들에도 적용시킬 수 있겠으나, 본 연구에서는 in vivo 상에서 오직 passive diffusion에 의한 clearance를 구해내는 것이 목적이기 때문에 PAMPA의 유용성에 초점을 맞추었다.

PAMPA로부터 구한 permeability 수치가 약물이 조직으로 분포할 때의 투과도를 간접적으로 반영한 것일 수 있기 때문에, 측정한 유효표면적은 실제 조직에 분포해있는 모세혈관 주변에 퍼져있는 조직세포들의 표면적과는 상이할 수 있다. 미리 결정된 유효표면적 값에 in vitro permeability 수치를 대입하는 모델의 필요성에 대하여 언급된 바가 있으나[10], 보고된 바에 따르면 아직 이와 같이 full PBPK modeling을 위

한 조직별 유효표면적은 산출된 바가 없으며, in vitro permeability assay를 통해 diffusional clearance를 mechanistic하게 '예측'하는 첫 연구라는 데에서 의미가 큰 연구라고 볼 수 있다.

PAMPA permeability의 inter-laboratory, inter-assay variability를 측정하기 위해 sensitivity analysis를 진행하였다. 본 연구에서는 약물의 diffusional clearance에는 약물의 투과도뿐만 아니라, plasma protein binding(fup), B/P ratio 도 영향을 미치는 것을 반영하였다. 'fup*P/R' 항이 약물의 tissue distribution 속도를 결정짓는 항이라고 볼 수 있다. 이 항이 매우 작아지면 그 속도는 permeability rate-limited model을 따르게 되고, 이 항이 커지면 그 속도는 perfusion rate-limited model을 따르게 되는 것이다. Plasma protein binding이 커서 free fraction이 매우 낮은 약물의 경우, 측정값에 크게 영향을 받아 그에 따라 profile의 양상이 크게 바뀔 수도 있다.

또한, 이 'fup*P/R'항으로부터, tissue lumping에 대한 이론적 토대를 마련할 수 있을 것이다. 조직에서의 약물 양이 변하는 미분방정식에서 $(C_p - C_T/K_p)$ 항 앞에 있는 $Q_T * (1 - \exp(-PS * f_{up}/R * Q_T))$ 을 주목해보면, 궁극적으로 S over Q의 항이 같도록 계산되는 조직들에 한하여 tissue lumping이 가능하다는 것이다. 기존의 tissue lumping을 적용한 기존 논문들에서는 단순히 rapidly perfused organ과 slowly perfused organ으로 나누어서 그들의 blood flow에 의해 tissue lumping이 이루어진 데에 반해, 이와 같은 방법에 의하면 tissue lumping을 이용하면서도 수학적으로 타당한 약물동태학적 프로파일의 예측이 가능하게 된다는 것이다.

Minimal PBPK 는 physiological parameter와 약물의 ADME 특성치를 고려한 pharmacokinetic modeling이라고 할 수 있다[52]. Minimal PBPK modeling은 그러한 많은 유용성에도 불구하고, plasma concentration versus time profile이라는 observed data를 이용한 descriptive pharmacokinetic이라는 한계가 있다. 언급되었듯이, minimal PBPK modeling에서 fd term은 본 연구에서의 $1 - \exp(-PS * f_{up}/R * Q_T)$ 와 대응되며, parameter들을 plasma data로부터 fitting하는 것이 아니라 이러한

유효표면적을 이용하게 되면 in vitro assay로부터 구한 수치로 체내동태를 이론적으로 계산해낼 수 있게 되는 것이다.

PAMPA assay에서, 약물의 permeability 값은 약물이 물 층에서 lipid 층으로 partition되어 acceptor plate로 확산이 되는 것을 이용하는 것이므로, 그 특성이 반영되어있을 것이다. logP value와 PAMPA permeability간의 상관관계를 이용한다면 추후에는 약물의 구조적 특성을 이용하여 clogP를 이용해 조직으로의 distributional clearance를 계산해낼 수 있을 것이고 매우 유용할 것으로 생각된다.

약물의 동태학적 특성을 파악하는 과정은 신약개발과정에서 매우 중요하다. 조직으로의 투과도를 반영한 조직분포 모델은 약물동태를 in vitro 수치만으로 정확하게 예측할 수 있는 모델로서 유용할 것이다. 궁극적으로는 신약개발 과정에서 조직의 약물 약효 및 독성을 예측하는 데에 있어 기존의 모델보다 좋은 가이드라인을 제시해 줄 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1. Jones, Hannah M., Iain B. Gardner, and Kenny J. Watson.
"Modelling and PBPK simulation in drug discovery." *The AAPS journal* 11.1 (2009): 155-166.
2. Rowland, Malcolm, Carl Peck, and Geoffrey Tucker.
"Physiologically-based pharmacokinetics in drug development and regulatory science." *Annual review of pharmacology and toxicology* 51 (2011): 45-73.
3. Poulin, P., et al. (2001). "Prediction of adipose tissue: plasma partition coefficients for structurally unrelated drugs." *J Pharm Sci* **90**(4): 436-447.
4. Poulin, Patrick, and Frank Peter Theil. "A priori prediction of tissue: plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically based pharmacokinetic models in drug discovery." *Journal of pharmaceutical sciences* 89.1 (2000): 16-35.
5. Berezhkovskiy, Leonid M. "Volume of distribution at steady state for a linear pharmacokinetic system with peripheral elimination." *Journal of pharmaceutical sciences* 93.6 (2004): 1628-1640.
6. Rodgers, Trudy, David Leahy, and Malcolm Rowland.
"Physiologically based pharmacokinetic modeling 1: Predicting the tissue distribution of moderate to strong bases." *Journal of pharmaceutical sciences* 94.6 (2005): 1259-1276.
7. Rodgers, Trudy, and Malcolm Rowland. "Physiologically based pharmacokinetic modelling 2: predicting the tissue distribution of acids, very weak bases, neutrals and zwitterions." *Journal*

- of pharmaceutical sciences 95.6 (2006): 1238-1257.
8. Graham, Helen, et al. "Comparison of in vivo and in silico methods used for prediction of tissue: plasma partition coefficients in rat." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 64.3 (2012): 383-396.
 9. Zou, Peng, et al. "Prediction of volume of distribution at steady state in humans: comparison of different approaches." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 8.7 (2012): 855-872.
 10. Edginton, Andrea N., et al. "Whole body physiologically-based pharmacokinetic models: their use in clinical drug development." (2008): 1143-1152.
 11. Nestorov, Ivan. "Whole body pharmacokinetic models." *Clinical pharmacokinetics* 42.10 (2003): 883-908.
 12. De Buck, Stefan S., and Claire E. Mackie. "Physiologically based approaches towards the prediction of pharmacokinetics: in vitro-in vivo extrapolation." (2007): 865-878.
 13. Pilari, Sabine, and Wilhelm Huisinga. "Lumping of physiologically-based pharmacokinetic models and a mechanistic derivation of classical compartmental models." *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* 37.4 (2010): 365-405.
 14. Kety, Seymour S. "The theory and applications of the exchange of inert gas at the lungs and tissues." *Pharmacological Reviews* 3.1 (1951): 1-41.
 15. Renkin, Eugene M. "Effects of blood flow on diffusion kinetics in isolated, perfused hindlegs of cats; a double circulation hypothesis." *The American journal of physiology* 183.1 (1955): 125-136.
 16. Renkin, Eugene M. "Transport of potassium-42 from blood to

- tissue in isolated mammalian skeletal muscles." *Am J Physiol* 197.1205-1210 (1959): 297.
17. Crone, Christian. "The permeability of capillaries in various organs as determined by use of the 'indicator diffusion' method." *Acta physiologica scandinavica* 58.4 (1963): 292-305.
 18. Morgan, Denis J., and Jiu Li Huang. "Effect of plasma protein binding on kinetics of capillary uptake and efflux." *Pharmaceutical research* 10.2 (1993): 300-304.
 19. Stevenson, I. H. "Factors influencing antipyrine elimination." *British journal of clinical pharmacology* 4.3 (1977): 261-265.
 20. Poulsen, Henrik E., and Steffen Loft. "Antipyrine as a model drug to study hepatic drug-metabolizing capacity." *Journal of hepatology* 6.3 (1988): 374-382.
 21. Sahin, Selma, and Malcolm Rowland. "Effect of erythrocytes on the hepatic distribution kinetics of antipyrine." *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 29.1 (2004): 37-41.
 22. Soberman, Robert, et al. "The use of antipyrine in the measurement of total body water in man." *Journal of Biological Chemistry* 179.1 (1949): 31-42.
 23. Gaudino, Mario, and Marvin F. Levitt. "Inulin space as a measure of extracellular fluid." *Am. J. Physiol* 157.387 (1949): 19.
 24. Lee, Young-Joo, et al. "In vivo evaluation of P-glycoprotein function at the blood-brain barrier in nonhuman primates using [11C] verapamil." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 316.2 (2006): 647-653.
 25. Edginton, Andrea N., et al. "Whole body physiologically-based pharmacokinetic models: their use in clinical drug

- development." (2008): 1143-1152.
26. Di, Li, et al. "High throughput artificial membrane permeability assay for blood - brain barrier." *European journal of medicinal chemistry* 38.3 (2003): 223-232.
27. Artursson, Per, Katrin Palm, and Kristina Luthman. "Caco-2 monolayers in experimental and theoretical predictions of drug transport." *Advanced drug delivery reviews* 46.1 (2001): 27-43.
28. Hidalgo, Ismael J. "Assessing the absorption of new pharmaceuticals." *Current topics in medicinal chemistry* 1.5 (2001): 385-401.
29. Bohets, Hilde, et al. "Strategies for absorption screening in drug discovery and development." *Current topics in medicinal chemistry* 1.5 (2001): 367-383.
30. Kerns, Edward H., et al. "Combined application of parallel artificial membrane permeability assay and Caco 2 permeability assays in drug discovery." *Journal of pharmaceutical sciences* 93.6 (2004): 1440-1453.
31. Kansy, Manfred, Frank Senner, and Klaus Gubernator. "Physicochemical high throughput screening: parallel artificial membrane permeation assay in the description of passive absorption processes." *Journal of medicinal chemistry* 41.7 (1998): 1007-1010.
32. Avdeef, Alex, et al. "Drug absorption in vitro model: Filter-immobilized artificial membranes: 2. Studies of the permeability properties of lactones in *Piper methysticum* Forst." *European journal of pharmaceutical sciences* 14.4 (2001): 271-280.
33. Wohnsland, Frank, and Bernard Faller. "High-throughput permeability pH profile and high-throughput alkane/water log

- P with artificial membranes." *Journal of medicinal chemistry* 44.6 (2001): 923-930.
- 34.Sugano, Kiyohiko, et al. "Optimized conditions of bio-mimetic artificial membrane permeation assay." *International journal of pharmaceutics* 228.1 (2001): 181-188.
- 35.Avdeef, Alex, et al. "Caco-2 permeability of weakly basic drugs predicted with the Double-Sink PAMPA method." *European journal of pharmaceutical sciences* 24.4 (2005): 333-349.
- 36.Chen, Xiaoxi, et al. "A novel design of artificial membrane for improving the PAMPA model." *Pharmaceutical research* 25.7 (2008): 1511-1520.
- 37.Boxenbaum, Harold, and Joanne B. Fertig. "Scaling of antipyrine intrinsic clearance of unbound drug in 15 mammalian species." *European journal of drug metabolism and pharmacokinetics* 9.2 (1984): 177-183.
- 38.Sawada, Yasufumi, et al. "Prediction of the disposition of nine weakly acidic and six weakly basic drugs in humans from pharmacokinetic parameters in rats." *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 13.5 (1985): 477-492.
- 39.Schmidt-Nielsen, Knut. *Scaling: why is animal size so important?*. Cambridge University Press, 1984.
- 40.Jamei, Masoud, et al. "The Simcyp® population-based ADME simulator." (2009): 211-223.
- 41.Sangster, J. "LOGKOW databank." Sangster Research Laboratories, Montreal, Quebec, Canada (1994).
- 42.Sangster, J. "LOGKOW - A databank of evaluated octanol/water partition coefficients." Sangster Research Laboratories, Montreal, Canada (1993).
- 43.Adlard, Maxwell, et al. "Rapid estimation of octanol - water

- partition coefficients using deoxycholate micelles in capillary electrophoresis." *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 21 (1995): 2241-2243.
44. Gueorguieva, Ivelina, et al. "Development of a whole body physiologically based model to characterise the pharmacokinetics of benzodiazepines. 1: Estimation of rat tissue-plasma partition ratios." *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* 31.4 (2004): 269-298.
45. Berry, Loren M., Chao Li, and Zhiyang Zhao. "Species differences in distribution and prediction of human V_{ss} from preclinical data." *Drug Metabolism and Disposition* (2011): dmd-111.
46. Yang, Kyung H., et al. "Effects of cytochrome P450 inducers and inhibitors on the pharmacokinetics of intravenous furosemide in rats: involvement of CYP2C11, 2E1, 3A1 and 3A2 in furosemide metabolism." *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 61.1 (2009): 47-54.
47. Dixon, C. M., et al. "Disposition of sumatriptan in laboratory animals and humans." *Drug metabolism and disposition* 21.5 (1993): 761-769.
48. Kovar, Andreas, Teresa Dalla Costa, and Hartmut Derendorf. "Comparison of plasma and free tissue levels of ceftriaxone in rats by microdialysis." *Journal of pharmaceutical sciences* 86.1 (1997): 52-56.
49. Gao, Na, et al. "Pharmacokinetic changes of unbound theophylline are due to plasma protein binding displacement and CYP1A2 activity inhibition by baicalin in rats." *Journal of ethnopharmacology* 150.2 (2013): 477-484.
50. Gabrielsson, Johan L., Lennart K. Paalzow, and Lars Nordström. "A physiologically based pharmacokinetic model for

theophylline disposition in the pregnant and nonpregnant rat." *Journal of pharmacokinetics and biopharmaceutics* 12.2 (1984): 149-165.

52.Cao, Yanguang, and William J. Jusko. "Applications of minimal physiologically-based pharmacokinetic models." *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* 39.6 (2012): 711-723.

53.Watanabe, Takao, Hiroyuki Kusuhara, and Yuichi Sugiyama. "Application of physiologically based pharmacokinetic modeling and clearance concept to drugs showing transporter-mediated distribution and clearance in humans." *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* 37.6 (2010): 575-590.

Abstract

Application of Capillary Permeability Model in Whole-Body PBPK Model

Yooseong Jeong

Department of Pharmaceutics

The Graduate School

Seoul National University

Whole-body physiologically-based pharmacokinetic (PBPK) model is the theoretical system to predict plasma and tissue concentration versus time profile using differential equations with parameter values such as organ volume(V_t), organ perfusion rate(Q_t), and tissue-to-plasma water concentration ratio(K_p). Although this model has considerable usefulness, each tissue should be considered as following either a perfusion rate-limited model or a permeability rate-limited model after experimental determination. The objective of this study is to establish the whole-body PBPK model assuming capillary permeability, merging these two limiting model into an united

one. The united equation was derived with a mass balance equation using a similar method of the capillary permeability model, involving the two limiting case of the conventional whole body PBPK model. Surface area of the interface between the systemic circulation and 9 tissues(e.g. liver, brain, kidney, heart, lung, spleen, intestine, muscle, adipose and carcass) was estimated to enhance the utility of this equation. To estimate the surface area for each tissue, we used antipyrine which has been widely used as a model drug for pharmacokinetic study. It is shown that the application of capillary permeability model in whole body PBPK modeling can provide more accurate predictions of pharmacokinetic profiles than conventional models with in vitro physicochemical properties of drugs. This model can facilitate the process of drug development providing predictions of the accurate human PK properties.

Keywords : physiologically-based pharmacokinetic modeling, simulation, surface area, human prediction

학 번 : 2012-23599