

보안과제(), 일반과제() / 공개(), 비공개()

최종평가 면제 신청여부(X)

임상연구인프라조성사업 제3차년도 최종보고서

HI 14C3321

**마이크로도징과 생리학적 기반
약동학 및 혼합효과
모델을 사용한 혁신 약물상호작용
임상시험기술 개발**

최종보고서

2017. 1. 18.

**주관연구기관 / 가톨릭대학교 산학협력단
세부연구기관 / 가톨릭대학교
충남대학교
한국과학기술원**

**보 건 복 지 부
한국보건산업진흥원**

제 출 문

보건복지부 장관 귀하

본 보고서를 “마이크로도징과 생리학적 기반 약동학 및 혼합효과 모델을 사용한 혁신 약물상호작용 임상시험기술 개발” (총연구개발기간 : 2014. 11. 01. ~ 2017. 03. 31.) 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 01. 18.



주관연구기관명 : 가톨릭대학교 산학협력단 전신수 (직인)

세부연구기관명 : 가톨릭대학교 산학협력단

충남대학교 산학협력단

한국과학기술원

주관연구책임자 : 임동석 (인)

1세부연구책임자 : 임동석

2세부연구책임자 : SHIN YOUNG GEUN

3세부연구책임자 : 송종한

보고서 요약서

과제번호	HI14C3321	해당 단계 연 구 기 간	2014.11.01.~ 2017.03.31	단 계 구 분	단계 없음			
연 구 사 업 명	중사업명	임상연구인프라조성사업						
	세부 사업명	국가임상시험사업						
연 구 과 제 명	대과제명	첨단융복합 임상시험 기술개발						
	세부 과제명	마이크로도징과 생리학적기반 약동학 및 혼합효과 모델을 사용한 혁신 약물상호작용 임상시험기술 개발						
연 구 책 임 자	임동석	해당단계 참여 연구원 수	총: 21 명 내부: 20 명 외부: 1 명	해당단계 연 구 개 발 비	정부: 500,000 천원 계: 500,000 천원			
		총 연구기간 참여 연구원 수	총: 65 명 내부: 61 명 외부: 4 명	총 연구개발비	정부: 1,350,000 천원 계: 1,350,000 천원			
연구기관명 및 소속부서명	가톨릭대학교 산학협력단 충남대학교 산학협력단 한국과학기술연구원			참여기업명: 해당사항 없음				
국제공동연구	상대국명: 해당사항 없음:			상대국 연구기관명: 해당사항 없음				
위탁 연구	연구기관명: 해당사항 없음			연구책임자: 해당사항 없음				
대상자에게 위해가 적은 마이크로도징 임상시험 수행 결과를 비 구획분석, 혼합효과 모델링, 생리학기반 모델링 등을 통하여 약 물-약물 상호작용의 유무와 정도를 예측 가능함을 보였음				보고서 면수				
				300				

국문 요약문

<p style="text-align: center;">연구의 목표 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 가속질량분석기를 사용한 마이크로도징 및 생리학적기반 약동학 모델을 사용하여 핵심 글로벌 임상시험 중 하나인 합성신약의 약물-약물 상호작용 임상 시험 기간과 비용을 획기적으로 단축하는 첨단 융복합 임상 및 분석 핵심기술을 개발함을 목표로 함 ▶ 1차년도 ~2차년도: 약물-약물 상호작용 임상시험 중 약물대사 억제/유도 예측 혁신 기술 개발 <ul style="list-style-type: none"> • 기존의 알려져 있는 CYP450 억제제/유도제 (inhibitor/inducer) 또는 P-glycoprotein 억제제/유도제 (inhibitor/inducer)를 선정함. • CYP450s 또는 P-glycoprotein 대표기질 물질들 (예: midazolam, tolbutamide, caffeine, fexofenadine)은 14C-표지를 한 후, 극미량 혼합물을 상기 CYP460 억제제 또는 P-glycoprotein 억제 물질과 함께 대상 피험자에 동시에 마이크로도징 투여하고 일정기간 채혈함. • 기존의 CYP450 억제제 및 P-glycoprotein 억제제에 의한 14C-표지된 대표 기질 물질의 약물농도 변화를 초고감도 가속 질량분석기를 사용하여 분석하고 약동학적 파라미터 변화를 평가하여 약물대사 억제 정도를 평가함. • 생리학적 기반 약동학 모델을 지원하는 <i>in silico</i> program (예: GastroPlus)을 사용하여 상기 대표기질 물질들의 <i>in silico</i> 모델을 확립하고, 이를 기존의 CYP450억제제 또는 P-glycoprotein 억제제와 함께 static drug-drug interaction 및 dynamic drug-drug interaction을 US FDA DDI guidance 또는 EMA DDI guideline와 함께 체계적으로 평가함. ▶ 3차년도: 임상시험 수행 및 결과 분석 <ul style="list-style-type: none"> • microdosing compound를 이용한 임상시험을 수행함 • 각 세부별로 혈액 중 약물 농도를 분석하고 결과를 공유함 • 약동학 비구획 분석 및 혼합효과 모델링을 통하여 DDI 모델 제시하고 <i>in silico model</i>과 비교함
<p style="text-align: center;">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ■ 기존의 약물 상호작용 임상 시험은 phase 1a SAD 과정에서 도입할 수도 없고, 따로 phase 1b에서 해당 CYP450 대사효소 및 P-glycoprotein 마다 따로 임상 시험을 하여야 하는 아주 고비용적이며 저효율적인 시험방법임. 아울러 시험에 참여 하는 건강한 피험자에게는 의료적 차원에서 볼때 아무런 혜택을 주지 못하며, 오히려 약물-약물 상호작용이 나타날 경우 건강 한 피험자의 안전을 위협할 수도 있음. ■ 마이크로도징과 생리학적 기반 약동학 모델을 사용한 혁신 임상시험기법은 저렴한 비용으로 신약개발 중인 신약의 여러 가지 대사효소 및 transporter에 대한 억제/유도 여부를 한꺼번에 관찰할 수 있다는 큰 장점이 있음. 따라서 약물-약물 상호작용에 관여한 임상 시험 비용과 기간을 획기적으로 단축 가능함. ■ 아울러 victim으로 사용하는 대사 효소 대표기질 물질들을 초극미량인 마이크로도징 레벨에서 사용하므로, 만약 약물-약물 상호작용이 일어나더라도 시험에 참여하는 건강한 피험자에게는 전혀 해가 없는 아주 안전한 혁신 임상시험

	법임. ■ 이 방법이 상용화된다면, 한국 제약사들의 글로벌 신약개발 기간과 비용, 특히 phase 1b의 기간과 비용을 획기적으로 단축할 수 있음.				
중심어 (5개 이내)	약물상호작용	마이크로도징	혼합효과모델	생리학적 기반 약동학 모델	가속질량분석기

영문 요약문

< SUMMARY >

Purpose& Contents	<p>■ The aims of this projects were to reduce clinical trial period and cost evaluating drug-drug interaction in new drug development process using AMS, microdosing and PBPK modeling methods.</p> <p>► 1st ~ 2nd year: A innovative technology development for inhibition/induction prediction of metabolism in DDI</p> <ul style="list-style-type: none">• A previously known CYP450 inhibitor or P-glycoprotein inhibitor was selected.• After tagging ¹⁴C to representative substrates of CYP450s or P-gp (eg, caffeine, omeprazole), the microdosing hot compound with inhibitor or inducer were administered to enrolled subjects in clinical trials, and get blood samples for analysis.• The blood samples from microdosing clinical trials were analyzed using LC-MS. After then the magnitude of DDI was assessed between microdose and regular dose study.• Using a <i>in silico</i> software (ex) GastroPlus) supporting PBPK modeling, a <i>in silico</i> model for previous representative compound was established. And the model was evaluated systematically static drug-drug interaction and dynamic drug-drug interaction with conventional CYP450 inhibitor/inducer or P-glycoprotein inhibitor/inducer by US FDA DDI guidance or EMA DDI guideline. <p>► 3rd year</p> <ul style="list-style-type: none">• DDI Clinical trials using microdosing compound was executed.• Drug concentration was analyzed in each part, and the results was shared.• DDI model through Pharmacokinetics Non-compartmental analysis and mixed effect modeling was suggested, and compared to the PBPK model of <i>in silico</i> program.
-------------------	---

Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ■ Conventional drug interaction clinical trials are very costly and low-efficiency studies, which cannot be applied in the phase 1a SAD process and requires separate trials for metabolism evaluation of the CYP450 and P-glycoproteins in phase 1b. In addition, there is no medical benefit to healthy subjects participating in the trial, and rather the drug-drug interactions may threaten the safety of healthy subjects. ■ Innovation clinical trials using microdosing and PBPK models have the great advantage of being able to simultaneously observe inhibition / induction of various metabolic enzymes and transporters in a new drug development at low cost. Thus, the costs and duration of clinical trials involved in drug-drug interactions can be drastically reduced. ■ In addition, metabolic enzyme representative substrates as victims are used at ultra-microdosing levels, making them a highly safe and innovative clinical trials that is harmless to healthy subjects participating in the trial even if drug-drug interactions occur. ■ If this method is commercialized, Korean pharmaceutical companies can cut down on the duration and cost of drug development process, especially phase 1b. 				
Keywords	drug-drug interaction (DDI)	microdosing	Mixed effects modeling	PBPK modeling	AMS

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	7
2. 국내외 기술개발 현황	10
3. 연구수행 내용 및 결과	13
4. 목표달성을 및 관련분야에의 기여도	200
5. 연구결과의 활용계획 등	204
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	207
7. 연구개발성과의 보안등급	207
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비현황	207
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	208
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	208
11. 기타사항	208
12. 참고문헌	209

<별첨1> 자체평가의견서

<별첨2> 실적 증빙자료

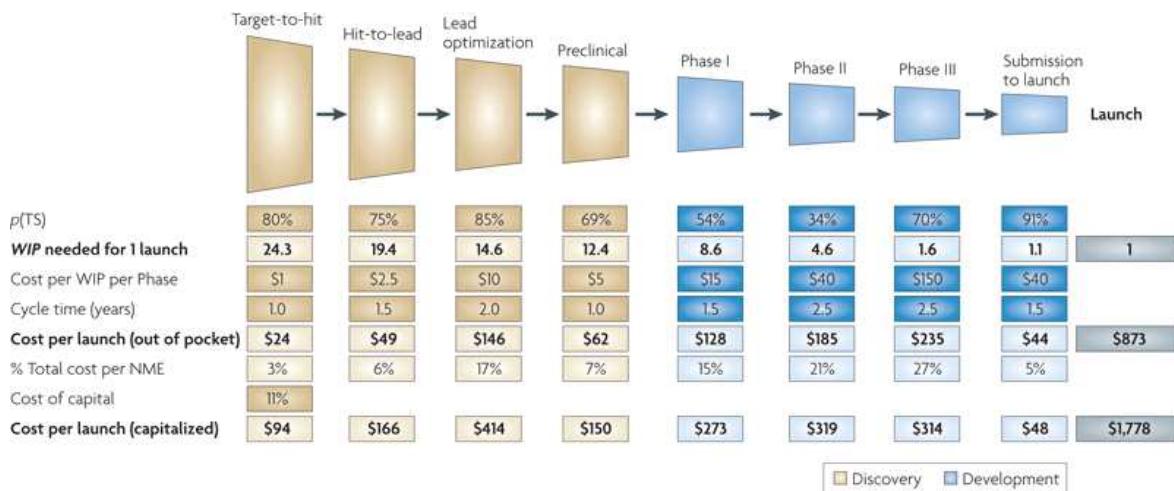
1. 연구개발과제의 개요

1-1. 연구개발 목표

- 가속질량분석기를 사용한 마이크로도징 및 생리학적 기반 약동학 모델을 사용하여 핵심 글로벌 임상시험 중 하나인 합성신약의 약물-약물 상호작용 임상시험 기간과 비용을 획기적으로 단축하는 첨단 융복합 임상 및 분석 핵심기술을 개발함을 목표로 함

1-2. 연구개발의 필요성

- 기존의 임상시험은 고비용 장기간을 요구하는 저효율적인 시험임
- 신약 검색 및 개발과정에서 임상시험이 차지하는 비율은 절반이 넘으며, 그 기간도 보통 8년 이상 소요되는 고비용 저효율적임
 - 따라서 신약개발에 있어서 비용과 시간을 획기적으로 줄이고 임상시험에서의 성공률을 더욱 높이기 위한 획기적인 전략의 도입이 시급함



Nature Reviews | Drug Discovery

그림 1. R&D model yielding costs to successfully discover and develop a single new molecular entity. How to improve R&D productivity: the pharmaceutical industry's grand challenge, Steven M. Paul, Daniel S. Mytelka, Christopher T. Dunwiddie, Charles C. Persinger, Bernard H. Munos, Stacy R. Lindborg & Aaron L. Schacht, Nature Reviews Drug Discovery 9, 203–214 (March 2010)

- 최근 14C-나노표지물질과 가속질량분석기를 사용한 혁신 바이오신약 임상시험법이 각광을 받고 있으며, 특히 신약 후보물질 단계에서 인간의 약동학적 예측이 어려울 때 마이크로도징 기법을 사용하여 적은 비용으로 효율적으로 임상 결과를 예측해 낼 수 있는 방법이 소개됨
- 14C-나노표지물질과 가속질량분석기를 사용한 혁신바이오신약 임상시료분석은 임상

시험분석 중 고난도의 기술을 요하는 고부가가치 핵심기술임.

- 이러한 고부가가치의 시험법의 수요는 나날이 증대. 2013년 미국 식약청에서 승인한 신약중 약 20%가 이러한 14C-나노표지물질과 가속질량분석기를 사용한 임상시험을 하였음
- 현재 전 세계적으로 4개의 회사만이 이러한 고부가가치 임상시료 분석을 위한 핵심기술을 상업적으로 활용
- 따라서 이와 관련 임상시험은 현재 모두 외국에서 수행되고 있거나 앞으로도 외국에서 수행될 것으로 예상되는 실정임
- 지금까지의 마이크로도징 또는 마이크로 트레이싱 임상 시험은 주로 absolute bioavailability, mass balance, metabolite profiling등의 연구에 주로 초점이 맞추어져 왔음
- 최근에는 약물-약물을 상호 작용에 대한 임상시험 가이드라인이 미국과 유럽 등지에서 소개됨에 따라 약물-약물을 상호작용을 빨리 예측하는 핵심 기술을 개발하는 것이 아주 중요하며, 특히 마이크로도징 기법을 활용한 융합기술 개발 또는 생리학적 기반의 약동학적 모델을 이용하는 것이 신약개발의 비용과 시간을 획기적으로 줄일 수 있는 좋은 방안이 될 것임
- 따라서 획기적인 글로벌 바이오 신약개발 임상비용절감 및 관련 신산업 핵심연구 고급인력 양성을 위한 측면에서 볼 때 마이크로도징 및 생리학적 기반 약동학 모델을 사용한 혁신 약물상호작용 임상시험기술 개발이 절실히 요구됨

1-3. 연구개발 범위

○ 1차년도 ~2차년도 연구개발 내용: 약물-약물 상호작용 임상시험 중 약물대사 억제 예측 혁신 기술 개발

- 기존의 알려져 있는 CYP450 억제제 (inhibitor) 또는 P-glycoprotein 억제제 (inhibitor) 선정함
- CYP450s 또는 P-glycoprotein 대표기질 물질들 (예: midazolam, tolbutamide, caffeine, fexofenadine)은 14C-표지를 한 후, 극미량 혼합물을 상기 CYP450 억제제 또는 P-glycoprotein 억제 물질과 함께 대상 대상자에 동시에 마이크로도징 투여하고 일정기간 채혈함
- 기존의 CYP450 억제제 및 P-glycoprotein 억제제에 의한 14C-표지된 대표기질 물질의 약물농도 변화를 초고감도 가속질량분석기를 사용하여 분석하고 약동학적 파라미터 변화를 평가하여 약물대사 억제 정도를 평가
- 생리학적 기반 약동학 모델을 지원하는 *in silico* program (예: GastroPlus)을 사용하여 상기 대표기질 물질들의 *in silico* 모델을 확립하고, 이를 기존의 CYP450억제제 또는 P-glycoprotein 억제제와 함께 static drug-drug interaction 및 dynamic drug-drug interaction을 US FDA DDI guidance 또는 EMA DDI guideline 체계적으로

평가함

○ 3차년도: 약물-약물 상호작용 임상시험 중 약물대사 유도 예측 혁신 기술 개발

- 기존의 알려져 있는 CYP450 유도제 (inducer) 또는 P-glycoprotein 유도제 (inducer) 선정함
- CYP450 유도제 또는 P-glycoprotein 유도제를 투여하기 전 CYP450/P-glycoprotein 대표 기질 물질 투여하여 약동학적 파라미터 관찰
- 일정기간 CYP450 유도제 또는 P-glycoprotein 유도제를 반복 투여한 후, CYP450/P-glycoprotein 대표 기질 물질들을 투여하여 약동학적 파라미터 관찰하고 이를 투여 전의 약동학적 파라미터와 비교하여 약물대사 유도 여부를 조사함
- 생리학적 기반 약동학 모델을 지원하는 *in silico* program (예: GastroPlus)을 사용하여 상기 대표기질 물질들의 *in silico* 모델을 확립하고, 이를 기존의 CYP450유도제 또는 P-glycoprotein 유도제와 함께 static drug-drug interaction 및 dynamic drug-drug interaction을 *in silico* program을 사용하여 US FDA DDI guidance 또는 EMA DDI guideline에 따라 체계적으로 평가함

2. 국내외 기술개발 현황

- 글로벌 임상 시험에서 ¹⁴C-표지물질과 가속질량분석기를 사용한 임상 시험법 개발은 외국에서는 2000년도 초부터 시작되었다가 2000년대 중반부터 본격적으로 상업적으로 활용됨
- 주로 사용된 분야는 마이크로도장을 통한 인간의 약동학적 파라미터를 통해, 전임상 후보 물질의 go/no-go decision making에 주로 활용됨
- 마이크로도징은 신약후보물질의 임상에서의 성공률을 예측하는 좋은 수단으로 미국과 유럽 등지의 바이오텍을 중심으로 널리 활용됨
- 마이크로 트레이싱을 이용한 임상 시험법은 주로 기존의 임상 2상에서 행해져온 mass balance, metabolite profiling을 대체하는 시험법으로 소개됨
- 마이크로 트레이싱을 이용한 mass balance study 및 metabolite profiling study는 특히 반감기가 아주 긴 약물 및 건강한 대상자에게서 시험할 수 없는 특수한 환자군, 또는 소아군에서 실험을 행해야 할 때 특히 유용한 방법으로 소개됨

Terminology for AMS-enabled A(D)ME studies.

Low 14C radioactivity ADME/PK studies

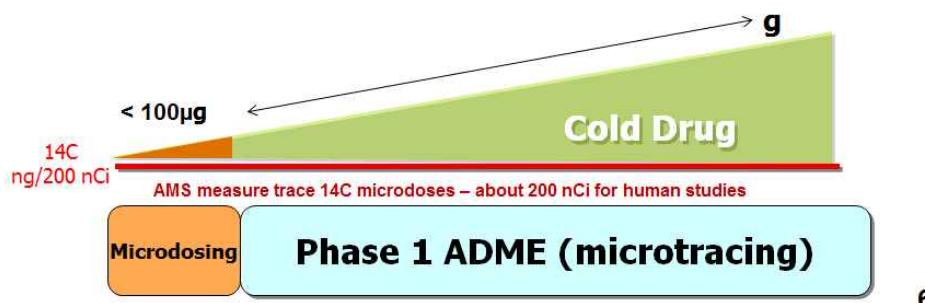
14C-microdosing

- Phase 0/Preclinical
- Bridges gap between Animal and Phase 1 Sub-pharmacologic dose
- Pharmacokinetic and metabolism information before standard Phase 1 testing

Phase I 14C-A(D)ME (microtracing)

- Phase I - III
- Use trace amount of 14C
- 100-fold reduction relative to traditional ADME studies
- Most useful when early - Phase 1

ADME level readouts with less intensive resources in and around Phase 1 testing



6

그림 2. 마이크로도징 및 마이크로 트레이싱 임상 시험 정의

Absolute Bioavailability시험에서 AMS방법과 일반적인 방법의 비교

일반적인 방법

- 약효농도에서의 IV dose (non-labeled된 약물 사용)
 - 난용성 물질인 경우 IV formulation이 거의 불가능하기도 함
- 엄격한 IV formulation 시험 필요
- Full 전임상 IV tox 시험 필요 (GLP, rodent and non-rodent)
- 기타 여러 가지 regulation 차원에서의 어려움으로 인해 일반적으로 수행하기 아주 어려움

AMS 방법

- 극미량의 ^{14}C label된 약물을 IV dose로 사용
- 따라서 formulation을 따로 개발할 필요가 거의 없음 (1-10 μg administered)
- 기존의 dose escalation phase 1 이상 시험에 손쉽게 삽입 가능
- 극미량의 ^{14}C label된 약물을 투여하기에 regulatory approval이 필요없음. (full 전임상 iv tox 시험 불필요)

그림 3. 마이크로 트레이싱을 사용한 Absolute BA 임상시험과 기존의 Absolute BA임상의 장단점 비교 예

- 효율적인 임상 신약개발에 있어서 생리학적 기반 약동학 (PBPK)를 사용한 약물-약물 상호 작용 예측 또한 최근 미국과 유럽 등지에서는 아주 활발히 진행됨
- 특히 US FDA와 EMA등은 생리학적 기반 약동학 (PBPK)을 사용한 *in silico* 모델링 방법으로 신약 물질의 약물-약물 상호작용을 예측하고 평가하는 것에 아주 호의적이며, 가이드라인에 도입하여 적극 홍보하고 있음
- 특히 US FDA는 pharmacometrics group에서 이를 적극적으로 지원을 하고 있으며, 최근 US FDA에서 약물-약물 상호작용과 관련하여 생리학적 기반 약동학 (PBPK) modeling을 사용한 예를 근거로 임상 시험을 면제해준 예가 다수 있으며, 점점 그 수가 증가하고 있는 추세임

TABLE 1: SUMMARY OF SUBMISSIONS USING PBPK (AUG2008 - AUG2009)

Submission Type (Method used)	Submission Content	Recommendation/remarks
EOP2 (PK-Sim)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is metabolized by multiple CYPs Simulated inhibition comparable to <i>in vivo</i> human study with itraconazole 200 mg QD Seek waiver of itraconazole 200 mg BID study 	Software not available at FDA
IND (SimCYP)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is a CYP2C9 inhibitor <i>in vitro</i> (K_i ~ 2) Drug has short $t_{1/2}$, and negative DDI with warfarin by simulations Seek waiver of <i>in vivo</i> warfarin DDI study 	Required <i>in vitro</i> DDI data with metabolites because metabolite shows comparable exposure and has longer $t_{1/2}$
IND (SimCYP)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is a CYP3A substrate <i>in vitro</i> Comparable ketoconazole inhibition between <i>in vivo</i> study and simulation Seek waiver of <i>in vivo</i> induction study with rifampin 	Waiver not granted
PMC (SimCYP)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is a substrate of multiple CYPs CYP contribution using microsomal enzyme kinetics data within PBPK software 	Agreed
PMC (SimCYP/Gastroplus)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is metabolized by multiple CYPs Simulation showed comparable results to <i>in vivo</i> human studies with ketoconazole and rifampin Support the absence of non-CYP 	Agreed
NDA (SimCYP)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is metabolized by multiple CYPs including CYP3A DDI with oral route of the drug available Simulation to show less degree of CYP3A inhibition after i.v. route of the drug 	Under review: CYP contribution was calculated using data from one pathway only
NDA (Sponsor's mechanistic model/ PK-Sim)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is metabolized by multiple CYPs and undergoes renal elimination Dedicated DDI and organ impairment data available a. Simulate CYP3A inhibition in renal impairment b. Simulate dosing in Pediatrics 	Study in renal impaired patients taking CYP3A/Pgp inhibitor needed; Enzyme inhibition and renal impairment may not be independent Under review: Pediatrics
NDA (SimCYP)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is a substrate with f_m_CYP3A4<0.2 Negative DDI after 200 mg ketoconazole QD <i>in vivo</i> and simulations Seek waiver of 400 mg ketoconazole QD study 	Agreed
Pre-IND (SimCYP)	<ul style="list-style-type: none"> Drug is a substrate of multiple CYPs CYP2C9 predominant, CL is much lower in PM Exclude CYP2C9 PM in first-in-man trial 	Agreed

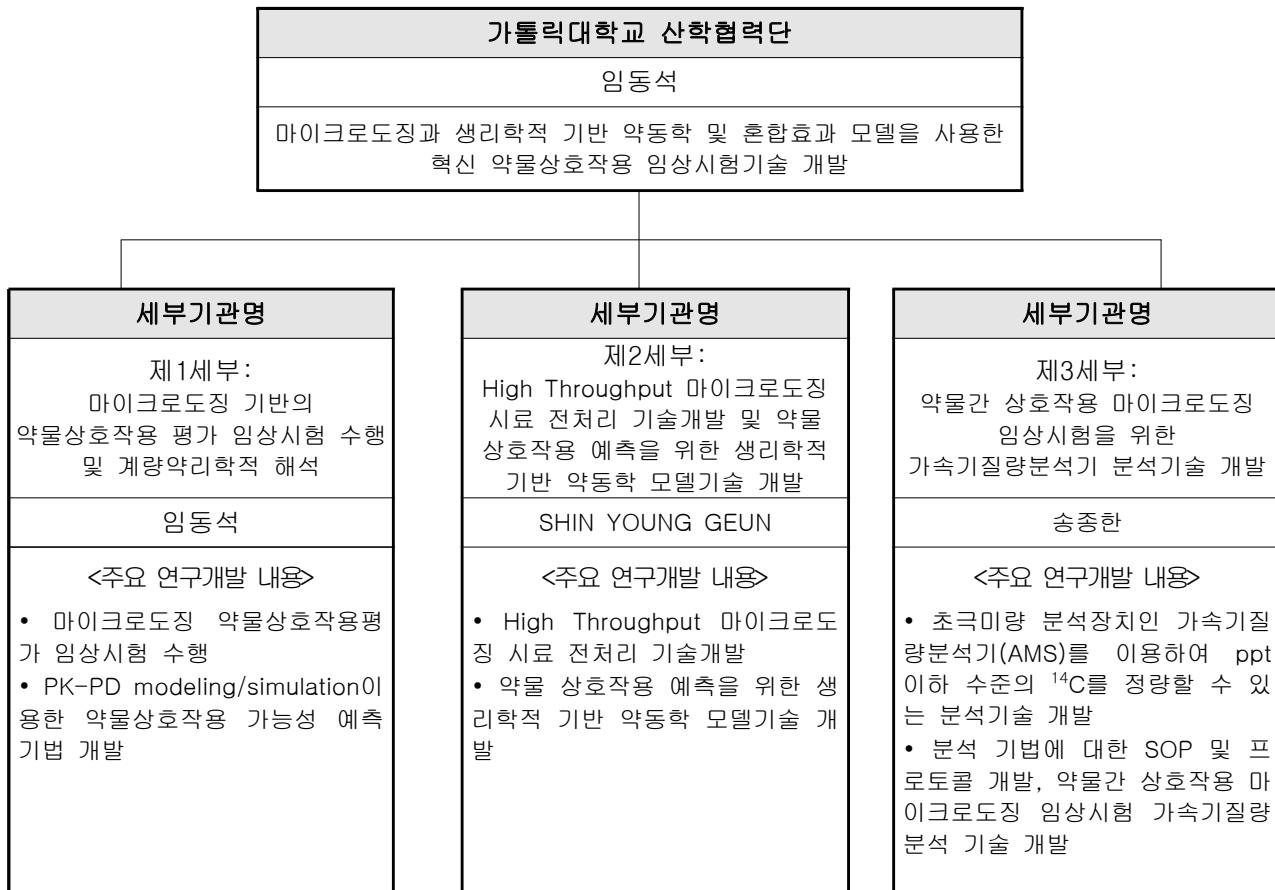
그림 4. US FDA가 자체적으로 실시한 PBPK modeling을 근거로 약물-약물 상호작용 임상시험을 면제 또는 재시험 요구 예

- 하지만 한국에서는 이와 같은 생리학적 기반 약동학 (PBPK)을 사용한 *in silico* 모델링 방법으로 신약 물질의 약물-약물 상호작용을 예측하고 평가하는 것은 아직 국내 산학관 어느 기관에서도 체계적으로 적용하지 못하고 있는 실정임

3. 연구수행 내용 및 결과

3-1. 연구개발 추진전략 및 일정

3-1-1. 과제 구성



3-1-2. 추진전략 및 방법

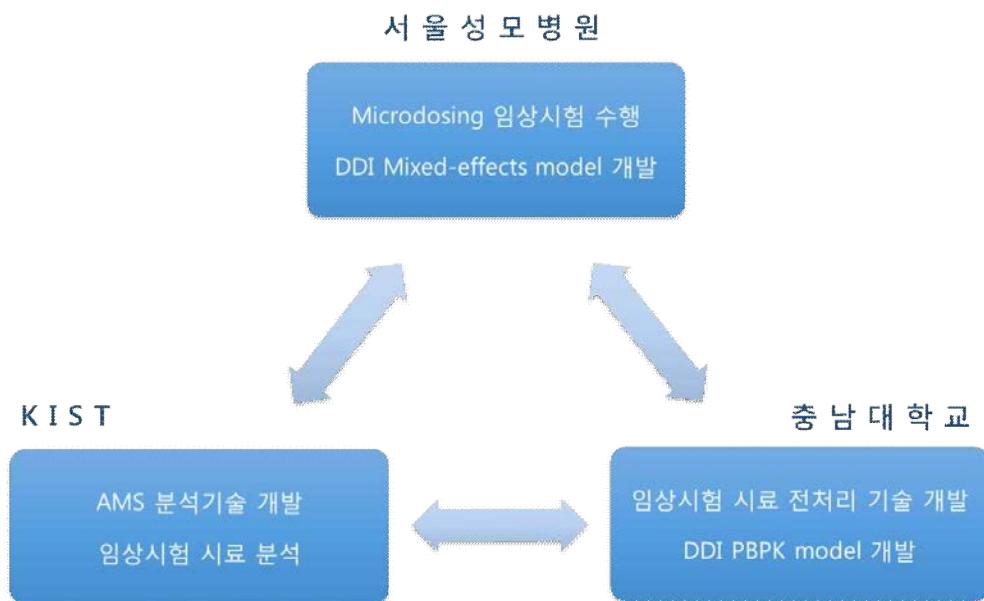


그림 6. 3개 세부의 유기적 관계 및 추진전략

□ 요약

- 본 과제의 목표는 마이크로도징 임상시험을 계획, 수행(1세부: 서울성모병원)하고, 검체를 처리(2세부: 충남대학교)한 후, 이를 가속기질량분석기술을 이용하여 약물 농도를 측정(3세부: 한국과학기술연구원)하여 마이크로도징 임상시험에 의한 약물상호작용(DDI; Drug-drug interaction)을 확인할 수 있는 기술을 개발하는데 있음
- 주관기관인 서울성모병원, 2세부 기관인 충남대학교, 3세부 기관인 한국과학기술연구원이 서로 긴밀히 협력하여 연구를 진행함
- 서울성모병원(1세부)에서는 마이크로도징 약물상호작용 임상시험을 계획하고 수행하여 시료를 확보함
- 충남대학교(2세부)에서는 마이크로도징 AMS 전처리 기술을 개발하고 얻어진 시료를 처리함
- 한국과학기술원(3세부)에서는 공혈장(blank plasma)을 이용하여 가속기질량분석법(AMS; Accelerator Mass Spectrometry)을 확립하고, 전처리된 시료를 이용하여 약물 농도를 측정함
- 측정된 약물 농도 데이터를 이용하여 서울성모병원에서는 계량약리학적으로 마이크로도징 약물상호작용 혼합효과모델을 구축하고, 약물상호작용 예측 기법 개발
- 측정된 약물 농도 데이터를 이용하여 충남대학교에서는 생리학적 기반 약동학 모델을 개발
- 이러한 연구를 통하여 약물상호작용을 예측을 위한 마이크로도징 가속기질량분석기술 확립

3-1-3. 연구개발 추진일정

구분	1년 차				2년 차				3년 차			
	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4	1/4	2/4	3/4	4/4
제 1 세 부	마이크로도징 DDI 임상시험 계획서 개발/IRB 심의											
	마이크로도징 DDI 방법론 확립											
	Substrate 2종에 대한 CYP inhibition 시험											
	알려져 있는 약물상호 작용과의 비교 평가											
	Substrate 2종에 대한 CYP induction 시험											
	계량약리학적 기법을 지속적으로 활용											
제 2 세 부	High Throughput 마이크로도징 시료 전처리 기술개발											
	약물-억제 상호작용 예측을 위한 생리학적 기반 약동학 모델기술 개발											
	약물-유도 상호작용 예측을 위한 생리학적 기반 약동학 모델기술 개발											
제 3 세 부	헬액(플라즈마)시료처 리 기술 개발											
	바이오 AMS용 프로그램 개발											
	가속기질량분석 기를 사용한 마이크로도징 분석기법확립											
	임상시료 분석											
	마이크로도징 관련 SOP, 프로토콜 완성											

3-2. 연구내용 및 결과

3-2-1. 총괄연구개발과제

총괄연구과제명	マイク로도징과 생리학적 기반 약동학 및 혼합효과 모델을 사용한 혁신 약물상호작용 임상시험기술 개발
총괄연구책임자	임동석 – 가톨릭대학교 산학협력단 – 임상약리학

가. 연구개발 내용 및 결과

목표

- 마이크로도징 기반의 약물상호작용 평가 방법론 확립
- 마이크로도징 기반의 약물상호작용 평가 임상시험 4건 수행
- PK-PD modeling & simulation을 이용한 약물상호작용 가능성 예측 기법 개발
- High Throughput 마이크로도징 시료 전처리 기술개발 및 약물 상호작용 예측을 위한 생리학적 기반 약동학 모델기술 개발을 통해 핵심 글로벌 임상시험 중 하나인 합성 신약의 약물-약물 상호작용 임상시험 기간과 비용을 획기적으로 단축하는 첨단 융복합 임상 및 분석 핵심기술을 개발함을 목표로 함.
- 초극미량 분석장치인 가속기질량분석기(AMS)를 이용하여 ppt 이하 수준의 14C를 정량할 수 있는 분석기술을 개발하고, 분석 기법에 대한 SOP 및 프로토콜을 완성하여 약물간 상호작용 마이크로도징 임상시험 가속기질량분석 기술 개발

연구 내용 및 결과

○ 1차 년도

- 마이크로도징을 위한 방사능 표지 의약품의 확보
- 각 약물상호작용에 대한 평가 임상시험 설계 및 수행
- 임상시험 계획 및 승인(IND, IRB) 획득
- 외국 AMS CRO의 시료 전처리 기법 도입을 통해 high throughput 마이크로 도징 시료 전처리법 확립
- 혈액(플라즈마)을 사용한 시료전처리 기술 확립 및 MC(Modern Carbon) 계산 프로그램 개발
- 약물간의 상호작용을 위한 임상시료인 플라즈마를 가속기질량분석하기 위한 플라즈마 시료의 전처리법을 확립
- 가속기질량분석 결과인 14C/12C의 비율로부터 14C-표지화합물의 농도를 단시간에 다량의 분석결과를 계산할 수 있는 프로그램 개발 12C의 비율로부터 14C-표지화합물의 농도를 단시간에 다량의 분석결과를 계산할 수 있는 프로그램 개발
- 생리학적 기반 약동학 모델을 지원하는 in silico program (예: GastroPlus)을 사용하여 임상에 사용될 대표기질 물질들의 in silico PBPK 모델을 확립하고, 이를 기존의 CYP450억제제 또는 P-glycoprotein 억제제와 함께 static drug-drug

interaction 및 dynamic drug-drug interaction을 US FDA DDI guidance 또는 EMA DDI guideline 체계적으로 평가함

○ 2차년도

- 14C hot compound에 대한 임상시험 계획 및 임상시험 승인 노력
- 마이크로도징 관련 가속기질량분석기의 분석방법 검증 및 임상시료 분석
- 가속기질량분석기를 사용하여 임상시료에 적용하기 위한 14C-표지 화합물 표준 시료 및 QC 시료를 제작하고 시료에 대한 측정범위 및 LLOQ, CV, Precision에 관한 분석기법 확립
- CYP450 또는 P-glycoprotein 대표기질을 14C-표지 한 후, 극미량 혼합물을 CYP450 또는 P-glycoprotein 억제 물질과 함께 대상 피험자에 동시에 마이크로 도징 투여 후 채혈한 시료의 대표기질 물질을 가속기질량분석기 분석

○ 3차년도

- 임상시험 승인 4건 (IND) 및 임상시험 수행(유도제2건, 저해제 2건)
- 약동학 분석 및 집단약동학 모델링 수행
- modeling & simulation 기법을 이용한 약물상호작용 분석법 확립
- 개발된 시료 전처리법을 사용하여 마이크로도징을 사용한 약물대사 유도 예측 임상시험 지원.
- 일정기간 CYP450 유도제 또는 P-glycoprotein 유도제를 반복 투여한 후, CYP450/P-glycoprotein 대표 기질 물질들을 투여하여 약동학적 파라미터 관찰하고 이를 투여전의 약동학적 파라미터와 비교하여 약물대사 유도 여부를 조사함.
- 생리학적 기반 약동학 모델을 지원하는 in silico program (예: GastroPlus)을 사용하여 상기 대표기질 물질들의 in silico 모델을 확립하고, 이를 기존의 CYP450유도제 또는 P-glycoprotein 유도제와 함께 static drug-drug interaction 및 dynamic drug-drug interaction을 in silico program을 사용하여 US FDA DDI guidance 또는 EMA DDI guideline에 따라 체계적으로 평가함.
- 가속기질량분석기를 사용하여 임상시료에 적용하기 위한 14C-표지 화합물 표준 시료 및 QC 시료를 제작하고 시료에 대한 측정범위 및 LLOQ, CV, Precision 확인
- CYP450 또는 P-glycoprotein 대표기질을 14C-표지 한 후, 극미량 혼합물을 각각 CYP450 또는 P-glycoprotein 억제 물질 또는 유도 물질을 함께 대상 피험자에 동시에 마이크로도징 투여 후 채혈한 시료의 대표기질 물질을 가속기질량분석기 분석
- 낮은 14C/12C의 값을 갖는 새로운 carrier의 개발 및 적용 등 마이크로도징 기법 심화연구

- 마이크로도징 가속기질량분석기법에 대한 SOP 및 프로토콜 정립

□ 연구 내용 및 결과

- 가속질량분석기를 이용한 약물농도 측정으로 약물간 상호작용을 예측하는 혼합효과모델을 개발하여 효율적으로 임상시험 수행이 가능함
- 극미량의 약물 투여로 임상시험 수행 시 대상자 안전에 기여
- 계량약리학적 PK-PD modeling & simulation 기법을 이용한 약물상호작용 분석법 확립으로 신약개발에 시간과 비용을 획기적으로 절감
- 본 연구개발에 의해 개발될 혁신 약물 상호작용 (drug-drug interaction, DDI) 평가법을 통해 적은 비용으로 보다 효율적인 약물 상호 작용 임상시험 수행 가능함.
- 이를 통해 한국 제약업계의 글로벌 신약개발에 필요한 비용과 시간을 획기적으로 단축 가능.
- 개발된 High throughput 마이크로도징 시료 전처리법은 특히 다른 임상시험센터 및 CRO에 인프라 기술이전 사업도 가능하고 이를 통한 기술료 수입도 기대 가능함.
- 초극미량의 방사성 동위원소를 측정할 수 있는 가속기질량분석기를 약물 간 상호작용 평가에 활용함으로써 신약개발에 소요되는 비용 및 시간을 획기적으로 줄일 수 있는 마이크로도징 기법을 국내에서 처음으로 확립함으로써 국내 바이오메디칼 관련기관에 가속기질량분석 서비스 제공
- 신약개발 연구를 하는 국내 제약회사에 가속기질량분석을 제공하여 신약개발 시간단축 및 비용 절감에 획기적으로 기여
- 가속기질량분석기를 이용한 마이크로도징 임상시험법을 확립함으로써 임상시료 분석을 외국에 의존하지 않고 국내에서도 분석이 가능하여 국내 신약개발기술의 향상 및 수입대체 효과를 가져 옴

3-2-2. 제 1세부과제

가. 요약서

과제명	마이크로도징 기반의 약물상호작용 평가 임상시험수행 및 계량약리학적 해석		
세부책임자	임동석	세부연구기관	서울성모병원
연구목표	<ul style="list-style-type: none">▶ 마이크로도징 기반의 약물상호작용 평가 방법론 확립▶ 마이크로도징 기반의 약물상호작용 평가 임상시험 4건 수행▶ PK-PD modeling & simulation을 이용한 약물상호작용 가능성 예측 기법 개발		
연구내용	<ul style="list-style-type: none">▶ 대상 약물상호작용의 선정 (예> ketoconazole 상용량 + simvastatin microdose)▶ 마이크로도징을 위한 방사능 표지 의약품의 확보▶ 각 약물상호작용에 대한 평가 임상시험 설계 및 수행▶ modeling & simulation 기법을 이용한 약물상호작용 분석법 확립		
연구개발에 따른 기대성과	<ul style="list-style-type: none">▶ 가속질량분석기를 이용한 약물농도 측정으로 약물간 상호작용을 예측하는 혼합효과 모델을 개발하여 효율적으로 임상시험 수행이 가능함▶ 극미량의 약물 투여로 임상시험 수행시 대상자 안전에 기여▶ 계량약리학적 PK-PD modeling & simulation 기법을 이용한 약물상호작용 분석법 확립으로 신약개발에 시간과 비용을 획기적으로 절감		

나. 연구 내용 및 결과

□ 1차 년도

○ 임상시험 계획 및 임상시험 관련 승인

- 2차 년도 임상시험 수행 예정인 2건의 임상시험

중 CYP1A2의 기질/저해제인

caffeine/ciprofloxacin과 CYP2C9 기질/저해제인

omeprazole/fluconazole의 약동학적 특성, 안전성,

기존 보고된 문헌 결과를 바탕으로 시험 디자인

검토 및 프로토콜 등 관련 문서 제작 완료

- CRO 선정 완료

- 분석기관 선정 완료

- IRB 승인 완료

- caffeine/ciprofloxacin: 2015년 6월 12일 서울성모병원 IRB 승인

- omeprazole/fluconazole: 2015년 6월 30일 서울성모병원 IRB 승인

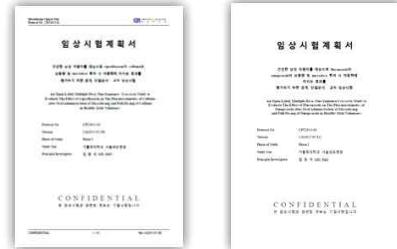


그림 7 임상시험계획서

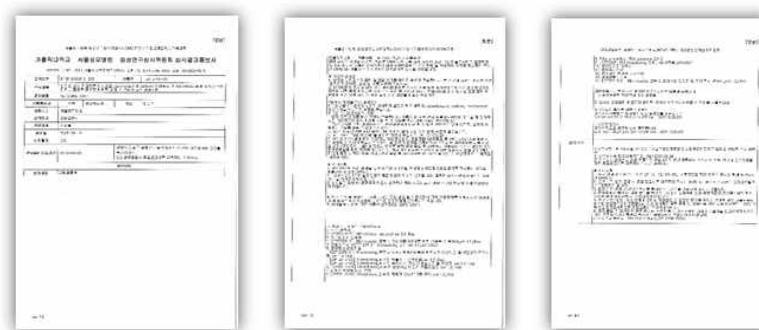


그림 8 IRB 승인서

- IND 승인: CYP1A2의 기질/저해제인 caffeine/ciprofloxacin과 CYP2C9 기질/저해제인 omeprazole/fluconazole의 임상시험이 비슷한 디자인이고 쟁점이 될 수 있는 부분이 14C-radio labelled microdosing administration으로 공통점이 있으므로 우선 caffeine/ciprofloxacin 임상시험의 IND를 먼저 신청함

「약사법」 제34조 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조, 「의약품 임상시험계획 승인에 관한 규정」(식약처고시)에 따라 다음의 자료를 제출하시기 바랍니다.

1. 동 규칙 제24조에 따라 임상시험계획 승인신청서 중 제조방법을 작성할 것
2. 동 규칙 제24조에 따라 별표 1의 의약품 제조 및 품질관리기준 및 별표4의2 임상시험용의약품 제조 및 품질관리기준에 맞게 제조되었음을 증명하는 서류 또는 자료를 제출할 것
3. 동 규정 제4조 제1항의 임상시험용의약품의 구조결정, 물리화학적 및 생물학적 성질에 관한 자료. 끝.



그림 9

식약처 보완 공문

- caffeine/ciprofloxacin: 2015년 7월 22일 식약처 IND 신청
- 보완: IND 신청한 임상시험에 대하여 식약처의 자료보완 요청

- 요청 사항은 다음과 같음
- Caffeien, 14C Caffeine의 사용기한, 제조원 정보, 원료의약품의 배합목적, 제조방법, 기준 및 시험법, CoA 재작성, 제조사 관련 GMP 관련 내용에 대하여 보완자료 제출에 관한 요청
- 보완 요청에 대한 설명과 그 대응

▶ Caffeine:

- 국내에서 caffeine의 품목허가는 유지되고 있으나 생산 허가가 취소된 품목으로 사실상 의약품으로서 caffeine을 구할 수 없음
- 미국에서 건강보조식품으로 판매되고 있는 Jet AlertTM (Bell pharmaceuticals Inc.)를 임상시험용의약품으로 이용할 계획이었으나, 회사측으로부터 물질관련 증명과 GMP grade의 certificate를 확보할 수 없으므로 불가하게 됨



그림 11 Jet AlertTM

- 커피, 차, 인스턴트 음료 등으로 매우 오랫동안 안전하게 섭취되고 있던 물질이고, 미국 내에서 건강식품으로 판매되고 있을 만큼 안전하다고 판단되는 물질이나, 식약처에서는 물질증명과 GMP certificate가 있지 않으면 임상시험 허가가 불가하다는 의견이었음
- 일본의 GMP grade인 마루이시제약에서 생산한 카페인수화물분말을 이용하는 것으로 계획을 변경함
- 소량 구매이므로 물질 관련 자료와 GMP 관련 자료는 제약사로부터 직접 제공받을 수는 없었고 인터넷을 통해 관련 자료를 확보함

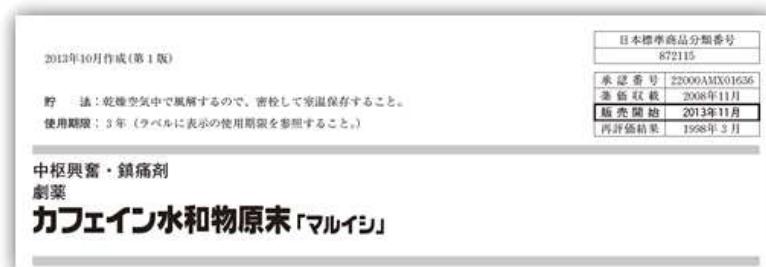


그림 12 마루이시제약의 카페인수화물



그림 13 마루이시제약의 카페인수화물의 물질관련 자료

그림 14 마루이시제약의 카페인수화물의 GMP certificate 관련 자료

▶ ^{14}C -Caffeine:

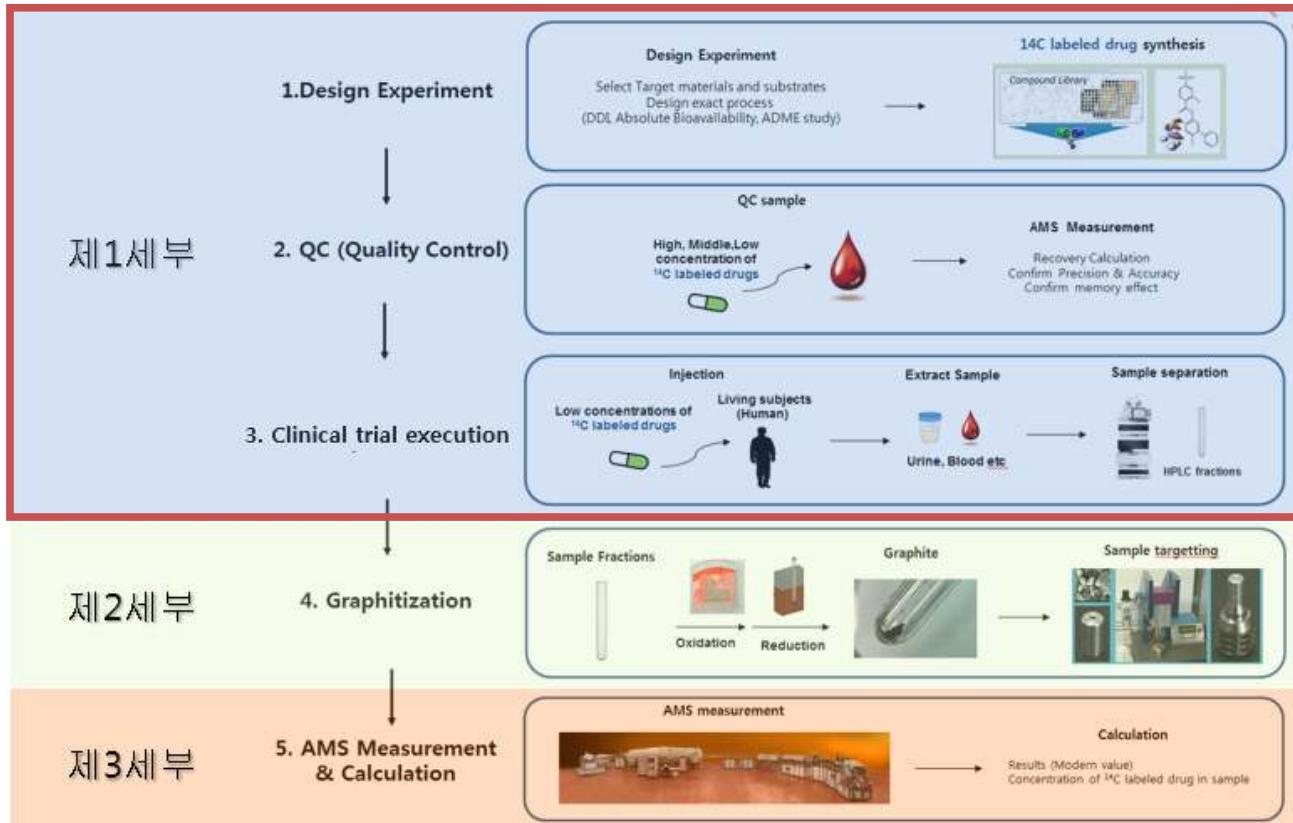
- 국내에 ^{14}C tagging 관련 회사 중 GMP certificate인 회사는 없음
- 그러나 식약처는 GMP grade 이거나 그에 준하는 자료를 요청함
- 기존 ^{14}C -caffeine 제조 회사에서 해외 제약사에서 시행하는 사람 대상 임상시험에 radio-labelled compound를 제공한 경험이 있는 회사로 변경하여 다시 제조하고 관련 서류를 구비함
- 현재 식약처에 자료를 제공하고 검토 중임



그림 14 ^{14}C caffeine 식약처 보완 관련 자료

□ 2차년도

□ 임상시험 디자인 및 1세부 역할



- 1세부에서 임상시험 4건에 대한 디자인과 승인 및 수행을 담당함
- 이때, 약동학에 영향을 주지 않을 정도로 적은 양(microdosing)의 ¹⁴C-compound와 상용량의 동일 약물을 투여하여 얻은 두 가지 혈장 약물 농도 데이터를 이용하여 모델링 수행

○ 약물상호작용 임상시험 디자인 근거

- FDA Guidance (Guidance for Industry, Drug interaction studies)에 따른 약물 상호작용 디자인
- ✓ CYP1A2 기질인 caffeine과 inhibitor인 ciprofloxacin, inducer인 omeprazole 임상시험 디자인 2건 수행
- ✓ CYP2C19의 기질인 omeprazole과 inhibitor인 fluconazole, inducer인 rifampicin 임상시험 디자인 2건 수행

- FDA guidance

The screenshot shows the FDA Guidance for Industry document. A red box highlights the section for CYP1A2, which lists substrates like alosetron, caffeine, duloxetine, melatonin, ramelteon, tacrine, and tizanidine. Another red box highlights the section for CYP2D6, which lists substrates like bupropion, clavulane, repaglinide, and celecoxib. A large red arrow points from the CYP1A2 section to the CYP2D6 section, indicating a comparison or relationship between the two enzymes.

U.S. Food and Drug Administration Protecting and Promoting Your Health		Sensitive substrates ⁽²⁾	Substrates with narrow therapeutic range ⁽³⁾	
Guidance for Indus	CYP1A2	Alosetron, caffeine, duloxetine, melatonin, ramelteon, tacrine, tizanidine	Theophylline, tizanidine	
Drug Interaction Studies — Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations <i>DRAFT GUIDANCE</i>	CYP Enzymes	Strong Inhibitors⁽²⁾ ≥ 5-fold increase in AUC or > 80% decrease in CL CYP1A2 Ciprofloxacin, enoxacin, fluvoxamine	Moderate inhibitors⁽³⁾ ≥ 2 but < 5-fold increase in AUC or 50-80% decrease in CL Methoxsalen, mexiletine, oral contraceptives, phenylpropanolamine, thiabendazole, vemurafenib, zileuton	Weak inhibitors⁽⁴⁾ ≥ 1.25 but < 2-fold increase in AUC or 20-50% decrease in CL Acyclovir, allopurinol, caffeine, cimetidine, Daidzein, ⁽⁵⁾ disulfiram, Echinacea ⁽⁵⁾ famotidine, norfloxacin, propafenone, propranolol, terbinafine, ticlopidine, verapamil

Table 5. Examples⁽¹⁾ of Sensitive In Vivo CYP Substrates and CYP Substrates with Narrow Therapeutic Range

CYP Enzymes	Sensitive substrates ⁽²⁾	Substrates with narrow therapeutic range ⁽³⁾
CYP1A2	Alosetron, caffeine, duloxetine, melatonin, ramelteon, tacrine, tizanidine	Theophylline, tizanidine
CYP2B6⁽⁴⁾	Bupropion, clavulane	
CYP2C8	Repaglinide ⁽⁵⁾	Paclitaxel
CYP2C9	Celecoxib	Warfarin, phenytoin
CYP2C19	Clobazam, lansoprazole, omeprazole, S-mephentyoin	S-mephentyoin
CYP3A⁽⁶⁾	Afentanil, aprepitant, budesonide, buspirone, conivaptan, darifenacin, darunavir, dasatinib, dronedarone, eletriptan, eperezine, everolimus, felodipine, indinavir, fluticasone, lopinavir, lovastatin, lurasidone, maraviroc, midazolam, nisoldipine, quetiapine, saquinavir, sildenafil, simvastatin, sirolimus, tolvaptan, tipranavir, triazolam, ticagrelor, vardenafil	Afentanil, astemizole, ⁽⁷⁾ cisapride, ⁽⁷⁾ cyclosporine, dihydroergotamine, ergotamine, fentanyl, pimozide, quinidine, sirolimus, tacrolimus, terfenadine ⁽⁷⁾
CYP2D6	Atomoxetine, desipramine, dextromethorphan, metoprolol, nebivolol, perphenazine, tolterodine, venlafaxine	Thioridazine, pimozide

그림 17 FDA guidence

○ IRB 및 IND 승인

- 2016년 6월 ~ 8월 IRB와 IND승인을 동시에 진행
- 아래 상세 설명

○ 임상시험용의약품 구매

- ^{14}C -compound 임상시험용 의약품
 - ✓ 제조사에서 제조완료
 - ✓ 서울성모병원 핵의학과 원내 제조시설로 배송
 - ✓ 원내 제조시설에서 대상자에게 투여하기 위하여 formulation 계획
- 상용량 임상시험용 의약품
 - ✓ 원내 계약이 완료되어 사용 가능한 의약품으로서
 - ✓ 원내 약제부의 약품관리 유닛에서 도매상을 통하여 구매
 - ✓ 연구용 의약품 구매 절차 (상용량의 경우)

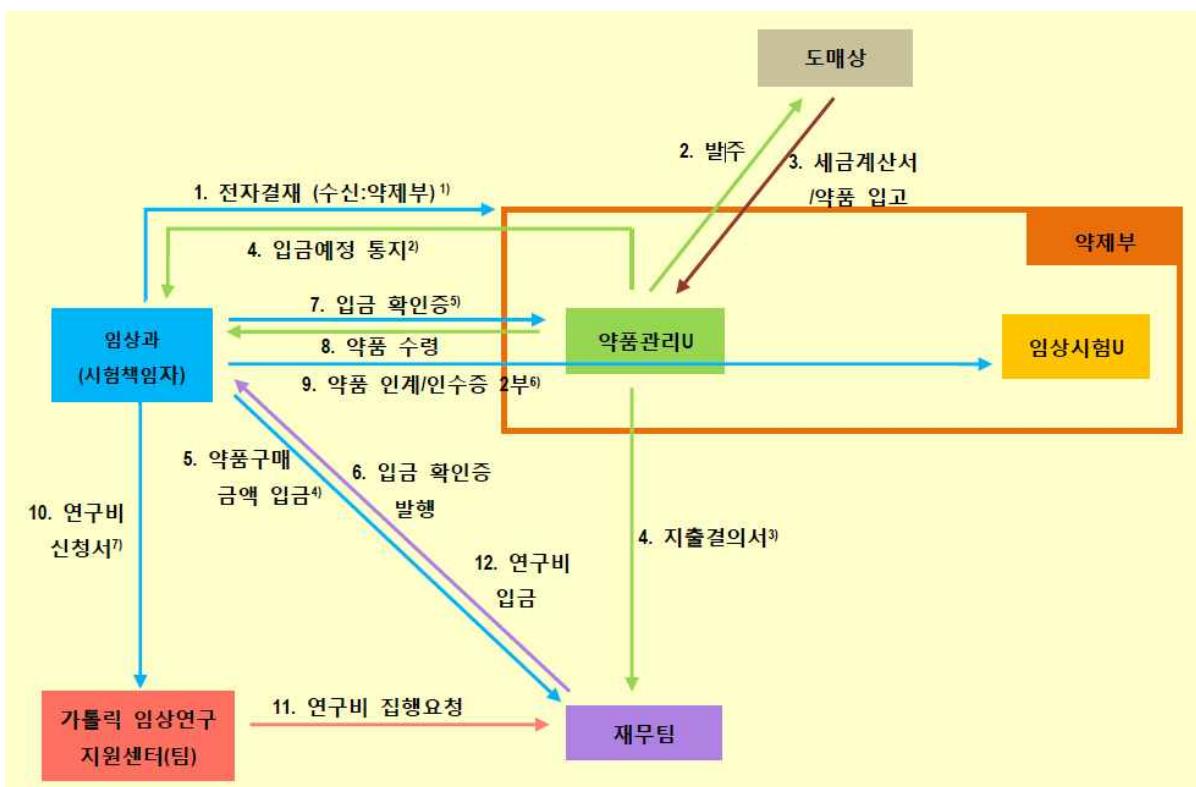


그림 18 약 구매 모식도

- ① 해당 연구의 시험책임자는 연구용 의약품 구입신청을 위한 전자결재를 올리며, 약제부 재무팀에서 공문을 접수한다.
- ② 약품관리U 담당자는 시험책임자에게 입금 예정 통보 시 ‘입금예정통지서 양식’

를 첨부한다.

- ③ 약품관리U 담당자는 재무팀으로 지출결의서 제출 시 세금계산서와 거래명세서를 함께 제출한다.
- ④ 시험책임자는 연구 의약품 구매 비용을 서울성모병원 재무팀 계좌로 입금한다.
- ⑤ 시험책임자는 재무팀에서 받은 입금확인증(사본)을 약품관리U으로 제출하고 구매 약품을 수령한다.
- ⑥ 시험책임자는 구매한 약품을 인수증 2부([별첨5] 인계자란에 시험책임자 서명함) 와 함께 임상시험약국으로 입고한다.
- ⑦ 시험책임자는 연구관리시스템(e-IRB)을 통하여 약품구매내역에 대한 연구비를 신청하며, 다음의 증빙자료를 첨부하여 임상연구지원센터(팀)에 제출한다.

○ 임상시험 수행

- 2016년 8월 ~ 9월
- 임상시험 4건을 동시에 수행
- Radio-labelled compound를 다루기 위한 연구자의 안전 교육 시행
 - ✓ 신규 교육은 2015년 6월 완료하였음
 - ✓ 방사성 작업 종사자 안전 정규 교육 : 2016년 6월 예정
 - ✓ 한국원자력안전재단 : 정규교육 3시간 예정
 - ✓ 한국원자력안전아카데미 : 정규교육 3시간 예정

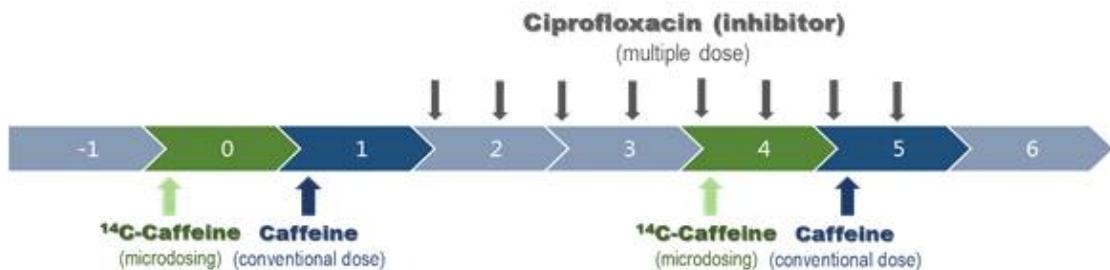
□ 임상시험 계획 및 비상 대책

○ 임상시험 4건 수행의 이유

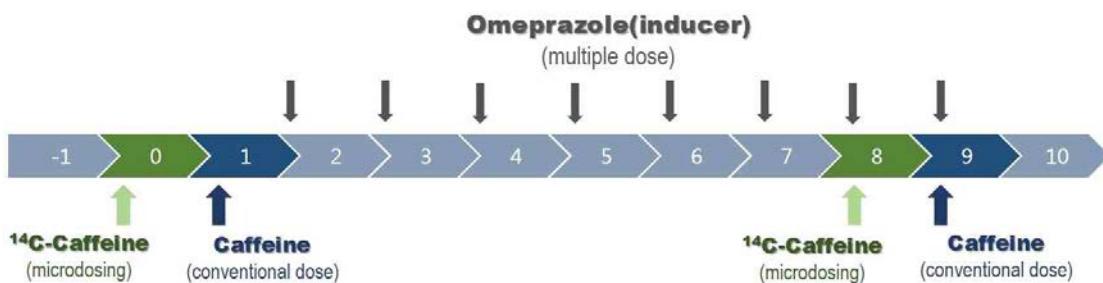
- 2차 년도 연구 성과 목표인 저해제 임상시험 2건 수행이 미달성 되었으나, 연구 과제의 최종 목표를 달성하기 위하여 3차 년도에 원래 계획 되었던 유도제 임상시험 2건과 함께 미시행 되었던 저해제 임상시험 2건을 포함하여 총 4건의 임상시험을 수행할 계획

○ 임상시험 계획 4건 내용

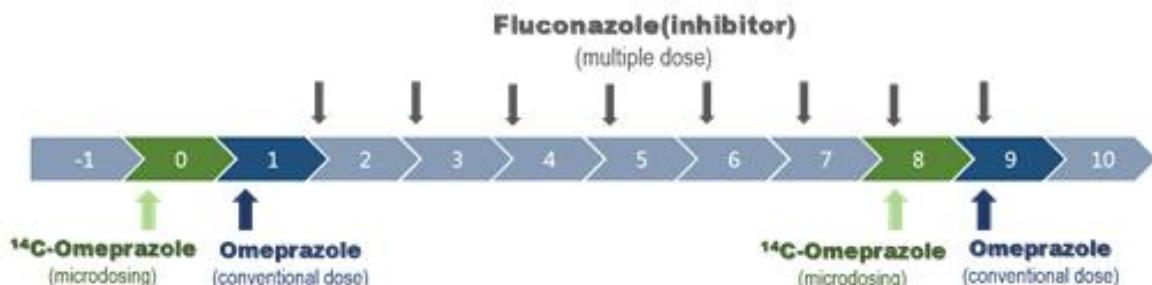
- CYP1A2 의 기질약물인 caffeine 과 저해제인 ciprofloxacin 병용투여시 나타날 수 있는 약물상호작용의 평가를 위한 임상시험 수행 - 1건



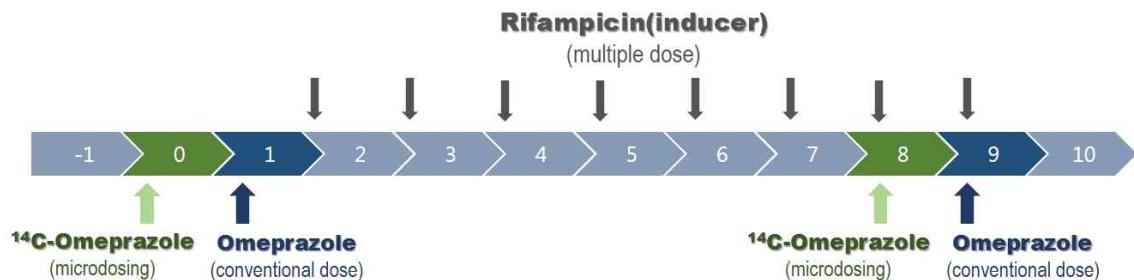
- CYP1A2 의 기질약물인 caffeine 과 유도제인 omeprazole 병용투여시 나타날 수 있는 약물상호작용의 평가를 위한 임상시험 수행 – 1건



- CYP2C19 의 기질약물인 omeprazole 와 저해제인 fluconazole 병용투여시 나타날 수 있는 약물상호작용의 평가를 위한 임상시험 수행 – 1건



- CYP2C19 의 기질약물인 omeprazole 와 유도제인 rifampicin 병용투여시 나타날 수 있는 약물상호작용의 평가를 위한 임상시험 수행 – 1건



- 대상 물질 유지 이유

- ✓ Caffeine은 일반의약품으로 판매되는 종합감기약, 진통제 등의 약물에 첨가되거나 음료 등에 첨가되어 널리 사용되고 있는 물질인 만큼 안전성이 확보되어 있다고 사료됨
- ✓ CYP1A2의 대표적인 기질 약물로서 약물상호작용을 평가하는 임상시험에서 적절하다고 판단됨
- ✓ Caffeine의 ¹⁴C-tagging compound가 이미 제조되어 있어, 변경 시 추가적인 비용 지출이 예상됨

○ 비상대책

- IND가 허가되지 않아 계획된 임상시험을 수행하지 못하는 경우, hot compound(¹⁴C-tagging compound)를 microdosing cold compound로 바꾸어 동일 디자인으로 임상시험을 수행함
- 이때 microdosing cold compound는 100 µg 으로 투약함
- 이를 위한 IRB 승인을 진행함

□ IND 계획

○ 추진 경과 및 현재 이슈

- 과제 2차 년도에 IND 시도 하였으나 반려되었고, 3차 년도에 4개의 임상시험에 대하여 IND 계획 중
- 이를 위하여 식약처 임상제도과와 대면회의 진행함
- 현재 이슈: ¹⁴C-compound를 이용한 임상시험의 IND의 세 가지 이슈
 - ✓ 사용량 caffeine의 CMC, GMP
 - ✓ ¹⁴C-compound의 CMC
 - ✓ ¹⁴C-compound의 GMP
- 기 승인 기관 밴치마킹 노력: 기 승인 기관의 대응 논리

- ✓ 원내 핵의학과 제조실에서 formulation하여 GMP 이슈 해결
- ✓ 용시조제 후 투약으로 drug product를 위하여 필요한 미생물한도시험 면제
- ✓ 방사성의약품이 아니고 시약 개념으로 접근
- ✓ 100 μ g 이하 투약하는 마이크로도징 스터디이며, 현재 임상시험계획서에서 투여량은 1~2 μ g로서 매우 소량이므로 안전성에 문제가 없다고 주장

○ 식약처 대면 면담 진행

- 2016년 4월 26일 식약처 임상제도과와 상기 이슈에 대하여 논의함
- 상용량 caffeine에 대하여 caffeine이 포함된 약물을 판매하는 제약사로부터 원말로서 caffeine과 이 물질에 대한 CoA를 제공 받을 것으로 권유함
- ^{14}C -compound에 대한 CMC, GMP는 사전 상담과 조율을 통하여 해결하도록 함

○ 추진 계획

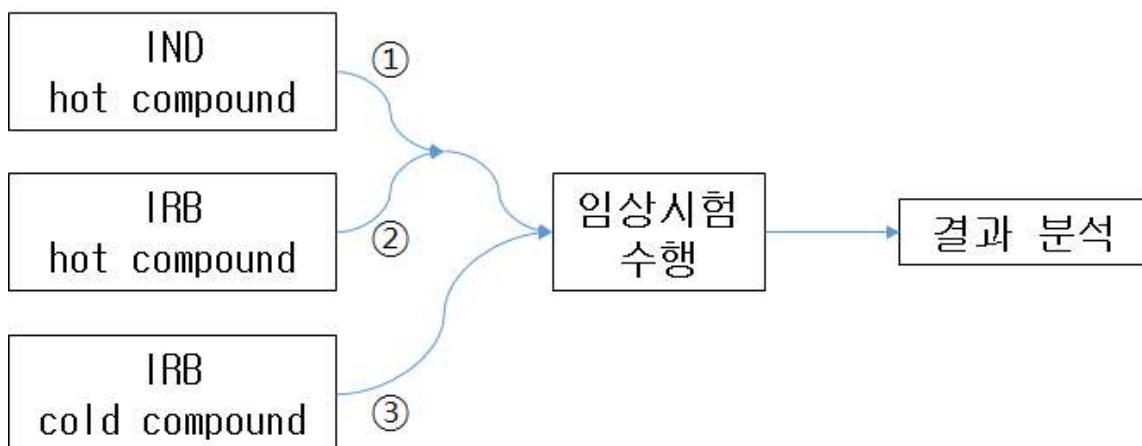


그림 23 임상시험 수행 scheme

- 임상시험 추진

- ✓ Hot compound에 대한 IRB, IND 및 cold compound에 대한 IRB를 3차년도 5월 ~ 7월에 동시에 진행
- ✓ IND가 승인되는 경우 ①, ②에 의하여 진행 후 8월~9월에 4건의 임상시험을 수행
- ✓ IND가 승인이 되지 않는 경우 ③에 의하여 hot compound를 배제하고 cold compound를 이용하여 8월~9월에 4건의 임상시험 수행

- 외부 전문가 활용 방안

- ✓ SCI-C RA 팀, 서울대 팀과 지속적으로 협력 계획

IRB 계획

- 4 건의 hot compound에 대한 임상시험과 4 건의 cold compound에 대한 임상시험에 대한 IRB 심의를 진행
- 기 승인 2건을 제외한 6건의 IRB 승인을 5월~6월에 동시 진행
- IND 승인 결과에 따라 4건의 임상시험을 진행 계획

임상시험 수행 계획

- 동종의 기질약물의 microdosing 및 full-dose (상용량)에서의 약물상호작용 임상시험을 동시에 수행하고 그 결과를 비교 평가 - ¹⁴C-표지화 물질 및 대상자 확보, 임상시험 수행 및 종료까지의 전 과정을 수행함
- 8월~9월 중 4개의 임상시험 동시 수행
 - 자원자에 한하여 스크리닝을 통하여 선정 기준을 만족하고, 제외 기준에 해당하지 않는 6명의 대상자를 선정하여 대상자 번호를 부여하고 임상시험을 수행

- 임상시험 일정 요약(예시)

시험일정	선별 검사	입원								PSV
		-1d	0d	1d	2d	3d	4d	5d	6d	
시험일자	28d~									13d~ 14d
자원자모집공고 및 선정	■									
동의서취득	■									
인구학적 정보/문진	■									
대상자번호부여 ¹⁾		■								
외래방문	■									■
의약품 투여 ²⁾ :			■				■			
¹⁴ C-caffeine 100μg			■				■			
의약품 투여 ²⁾ :				■				■		
caffeine 200mg				■				■		
의약품 투여 ²⁾ :					■	■	■	■	■	
ciprofloxacin 250mg					■	■	■	■	■	
약동학 채혈 ³⁾			■	■	■		■	■	■	
활력징후 및 신체검사 ⁴⁾	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
혈청 검사 ⁵⁾	■									
실험실적검사 ⁶⁾	■				■				■	
12-lead 심전도 ⁷⁾	■								■	
이상반응/병용약물 확인 ⁸⁾		■	■	■	■	■	■	■	■	
입원 ⁹⁾		■								
퇴원 ¹⁰⁾									■	

- 임상시험 방법(예시)

- ✓ 입원: -1d 저녁 7시경 임상시험센터에 입원함.
- ✓ 퇴원: 6d 오전 일정 마친 후 퇴원함
- ✓ ¹⁴C-caffeine 100 μ g: -1d, 3d 오후 10시부터 금식을 유지한 후 0d, 4d의 오전 9시경 공복상태에서 임상시험용의약품을 경구로 투여함
- ✓ Caffeine 200mg: 0d, 4d 오후 10시부터 금식을 유지한 후 1d, 5d의 오전 9시경 공복상태에서 임상시험용의약품을 경구로 투여함
- ✓ Ciprofloxacin 250mg: 2d부터 5d까지 오전 9시경, 오후 9시경, 1일 2회 임상시험 용의약품을 경구로 반복투여함
- ✓ 약동학 채혈: 0d, 4d의 임상시험용의약품 첫 투약 직전(0h), 투약 후 0.25, 0.50, 0.75, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 24.25, 24.50, 24.75, 25, 26, 28, 30, 32, 36, 48h (각21회, 총42회)
- ✓ 투여 시 주의사항: 시험책임자 또는 연구자가 직접 투여하며, 투여 후에는 구강 검사 등을 통하여 대상자가 이를 적절히 복용하였는지 확인함
- ✓ 대상자의 팔 또는 손등의 정맥부위에 catheter를 유지하고, 8mL씩을 채혈. (단, 투여 후 24시간은 15mL) 각 채혈 후에는 생리식염수 1mL를 catheter에 연결된 cap에 주입하여 혈액응고를 방지함. 투여 후 각 혈액 및 생리식염수 혼합액을 빼내어 버리고, 약 8mL (단, 24시간은 15mL)의 혈액을 채취. 혈액을 채취한 이후에는 다시 생리식염수 1mL를 catheter에 연결된 cap에 주입하여 혈액응고를 방지함. 사용하는 기구 및 수액 등은 완전 멸균된 1회용을 사용하여 감염을 방지

□ 계량약리학 분석을 통한 약물상호작용 예측 기법 개발

- PK/PD modeling & simulation 기법을 이용하여 약물상호작용 모델을 구축하여 약물과 대상자 간의 상호작용을 분석하고 시뮬레이션 시행함

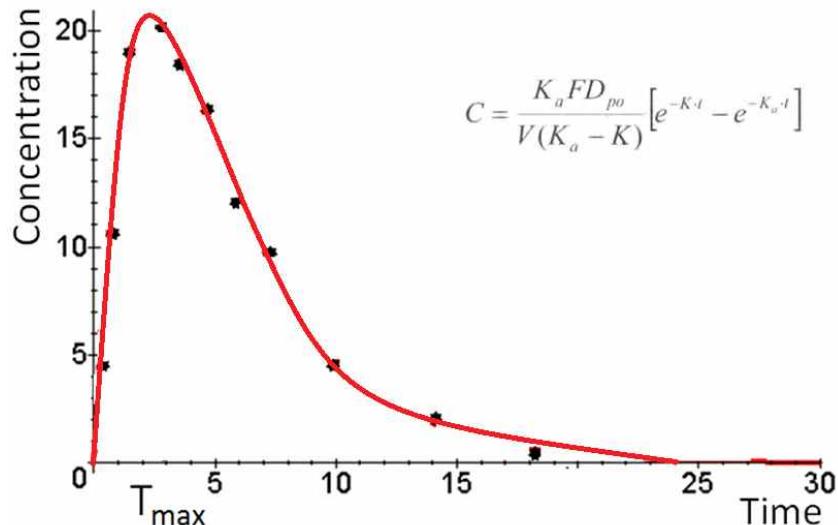


그림 24 혈관외 투여 시 약물의 시간-농도 곡선

- 약물상호작용 임상시험은 상호작용이 예상되는 약물들의 혈중 농도를 충분히 높여 서로간의 영향을 확인하는 임상시험이므로, 시험 대상자가 약물에 과다하게 노출되어 그 만큼 대상자의 안전에 문제가 발생할 소지가 있음
- 계획된 임상시험으로부터 얻어진 결과를 이용하여 계량약리학적인 방법으로 모델링하고, 이를 실제 해당 약물들에서, 사용량으로 시행한 결과와 비교하여 마이크로도징이 실제 약물상호작용을 어느 정도의 정량적인 비례관계를 갖는지 수치화하는 것을 시도함
- 마이크로도징 PKPD modeling & simulation이 가지고 있는 이러한 요소는 초기 임상시험의 위험성을 경감하고, 효율적인 초기 임상시험 설계를 가능케 하며, 대상자의 안전을 최대한 도모하며, 임상시험에 소요되는 비용을 획기적으로 절감할 수 있음

- 위의 4건의 임상시험 후 확보된 데이터를 계량약리학적 modeling & simulation 기법을 이용하여 약물상호작용 분석 및 예측
- 이미 알려진 약물상호작용과 비교 분석을 통해 약물상호작용 혼합효과 모델 (DDI mixed-effects model) 개발

- 혼합효과모형 분석 (Mixed-effect Modeling)

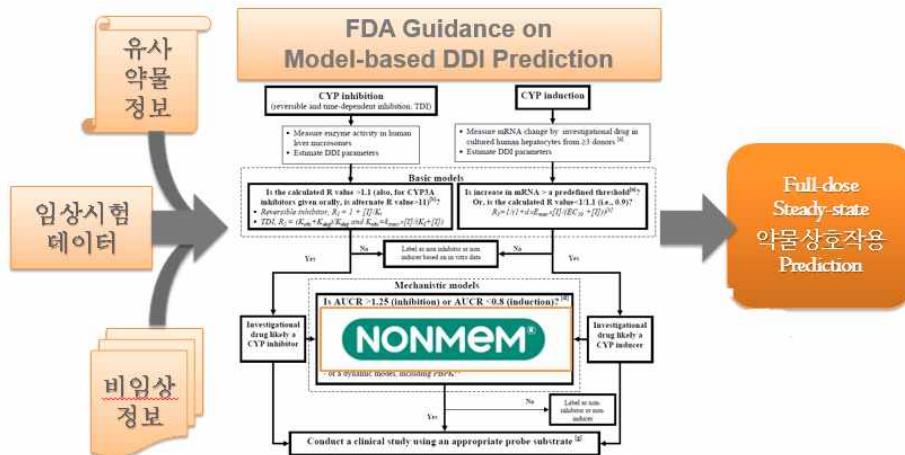


그림 25 혼합효과 모형 분석 모식도

□ 논문화 계획: 12월 submission, 과제 종료 이전 accept 완료

- 4개의 ^{14}C -compound를 이용한 임상시험으로부터 얻은 data를 분석하여 논문 작성
 - 12월까지 submission
 - 과제 종료 이전 accept 완료

□ 3차년도

○ 임상시험 추진 계획 및 수행 성과

- 성과 목표는 임상시험 4건 - 저해제 2건(caffeine-ciprofloxacin; 1A2 inhibitor, omeprazole-fluconazole; 2C19 inhibitor) 유도제 2건(caffeine-omeprazole; 1A2 inducer, omeprazole-rifampin; 2C19 inhibitor) - 임
- 임상시험 추진 계획
 - ✓ Hot compound에 대한 IRB, IND 및 cold compound에 대한 IRB를 3차년도 5월 ~ 7월에 동시에 진행
 - ✓ IND가 기한 내에 승인되는 경우 8월~9월에 4건의 임상시험을 수행
 - ✓ IND가 기한 내에 승인이 되지 않는 경우 hot compound를 배제하고 cold compound를 이용하여 8월~9월에 4건의 임상시험 수행 ([그림 참조](#))
- IND 승인이 지연됨에 따라 임상시험 수행 및 분석, 논문 작성을 위하여 cold compound로 임상시험을 진행하기로 함 (아래 상세)

○ IRB 승인

- 8개의 임상시험(Hot compound 4개 및 cold compound 4개)에 대하여 IRB 승인을 진행함
- 2016년 8월 4일 4개의 임상시험, 2016년 8월 9일 4개의 임상시험에 대하여 승인됨 (IRB 승인서 별첨 참조)

	임상시험	초기심의	결과	신속심의
Hot compound	¹⁴ C-caffeine, ciprofloxacin	2016.06	시정후승인	2016.08.09
	¹⁴ C-omeprazole, fluconazole	2016.06	시정후승인	2016.08.09
	¹⁴ C-caffeine, omeprazole	2016.06	시정후승인	2016.08.04
	¹⁴ C-omeprazole, rifampin	2016.06	시정후승인	2016.08.04
Cold compound	caffeine, ciprofloxacin	2016.06	시정후승인	2016.08.09
	omeprazole, fluconazole	2016.06	시정후승인	2016.08.09
	caffeine, omeprazole	2016.06	시정후승인	2016.08.04
	omeprazole, rifampin	2016.06	시정후승인	2016.08.04

그림 26 IRB 승인 현황

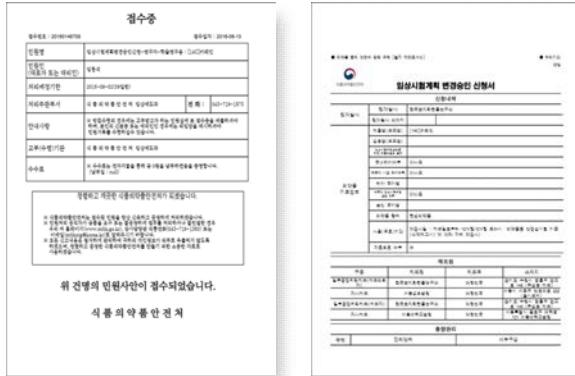
○ IND

- IND 신청:
 - ✓ IND 신청을 위한 사전 미팅: 2016년 4월, 5월 2차례 식약처에서 대면회의 형태로

미팅함

- ✓ IND를 위한 서류(CMC 등)에 대한 정보를 얻고 이를 적용하여 IND를 신청하기로 함
- ✓ Hot compound 4개의 임상시험에 대하여 2016년 6월 10일 신청

- IND 접수 및 신청 (그림, 별첨 참조)



- CMC 자료 작성 및 제출 (그림, 별첨 참조)

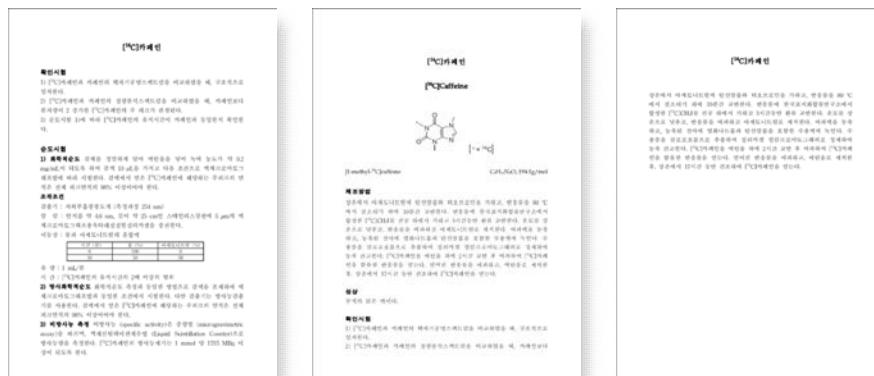
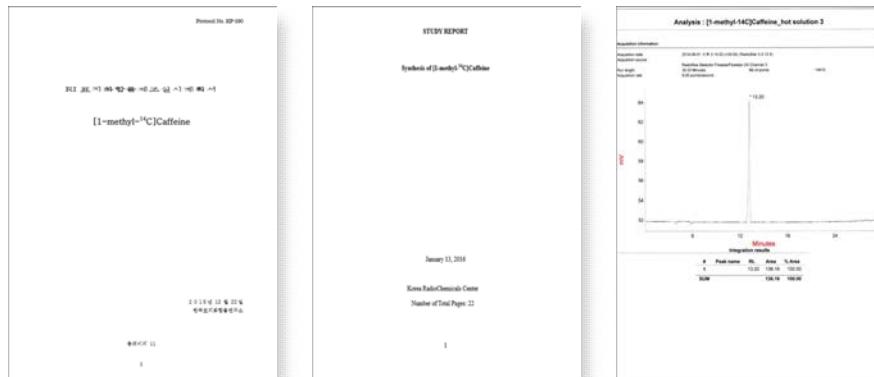


그림 28 ¹⁴C-Caffeine CMC 자료

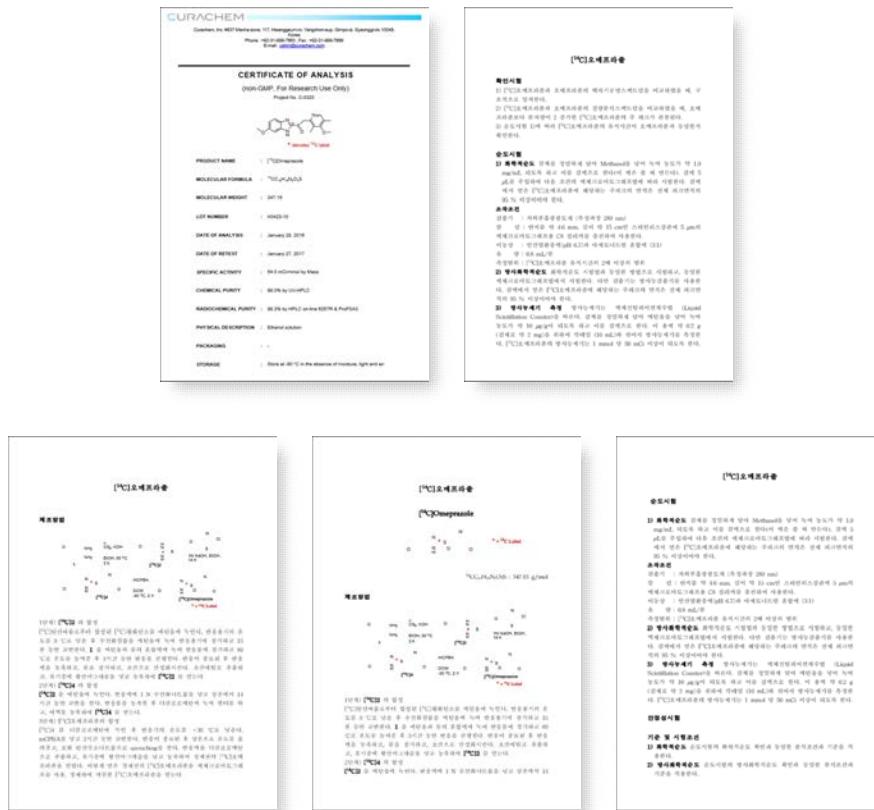


그림 29 ^{14}C -Omeprazole CMC 자료

- IND 승인:

✓ Hot compound 4개의 임상시험에 대하여 2016년 9월 2일 승인 (그림, 별첨 참조)

	임상시험	IND	결과	승인일
Hot Compound	^{14}C -caffeine, ciprofloxacin	2016.06	승인	2016.09.02
	^{14}C -omeprazole, fluconazole	2016.06	승인	2016.09.02
	^{14}C -caffeine, omeprazole	2016.06	승인	2016.09.02
	^{14}C -omeprazole, rifampin	2016.06	승인	2016.09.02

그림 30 IND 승인 현황



그림 31 IND 승인서 및 임상시험 승인 공문

○ 임상시험 수행 계획

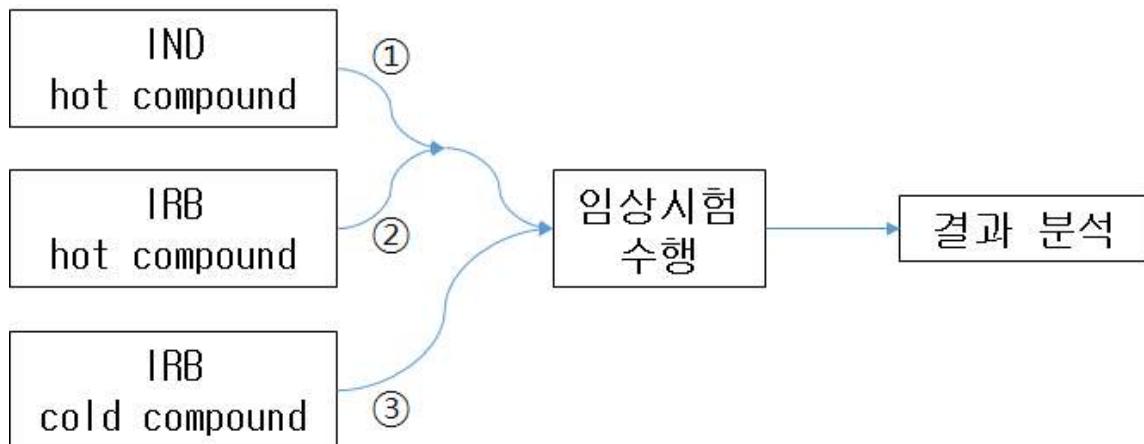


그림 32 임상시험 수행 계획

- 3차년도 계획 시 hot compound에 대한 IND 지연(①)에 대비하여 cold compound에 대한 임상시험을 동시에 준비함
- Hot compound 4건에 대한 IND는 2016년 09월 02일 승인됨(그림 40 참조)
- 그러나, 임상시험 후 농도 분석, 데이터 생성, 데이터 분석, 혼합효과모델링 및 논문 작성 등의 일정을 고려하여 먼저 IRB 승인(2016년 08월 04일, 09일; 그림 36 참조)을 획득한 cold compound 4 건의 임상시험을 수행함(③)

○ 계획서 번호와 임상시험용의약품

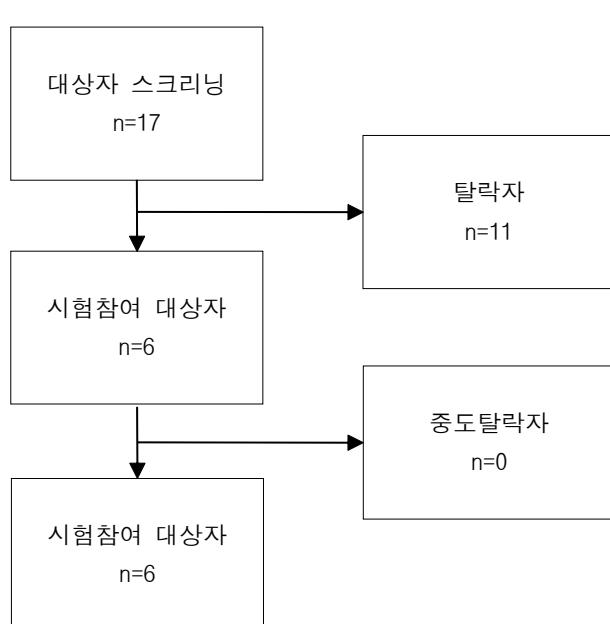
계획서 번호	DDI	임상시험용의약품
CPT2016-05	Inhibitor study	100 µg-caffeine, ciprofloxacin
CPT2016-06		100 µg-omeprazole, fluconazole
CPT2016-07	Inducer study	100 µg-caffeine, omeprazole
CPT2016-08		100 µg-omeprazole, rifampicin

그림 33 Cold compound 임상시험

- CPT2016-05

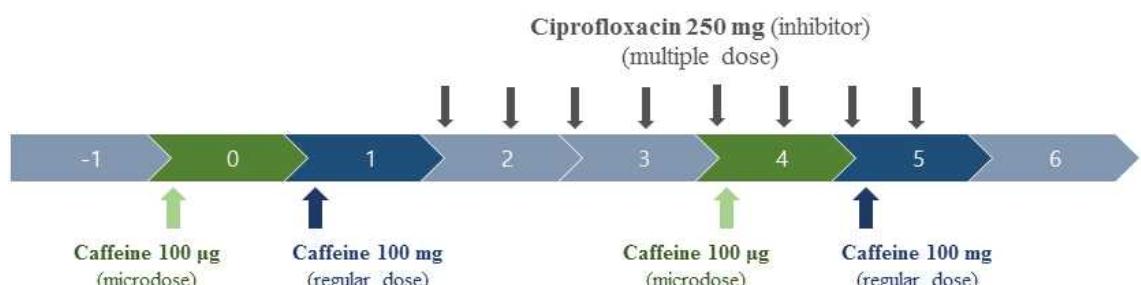
- ✓ 시험계획서 제목: 건강한 남성자원자를 대상으로 ciprofloxacinol caffeine의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서
 - 교차임상시험
- ✓ 임상시험용의약품
 - 시험약1: 씨프로바이정250 mg (ciprofloxacin 250mg), (주)종근당
 - 시험약2: 네오카프액2mL (Caffeine 20 mg), (주)한국팜비오
 - 시험약3: Caffeine 100 µg (네오카프액2mL), (주)한국팜비오

✓ 대상자 현황



✓ 임상시험 일정:

- IRB 승인: 2016년 08월 09일
- 개시모임: 2016년 09월 09일
- 임상시험 디자인

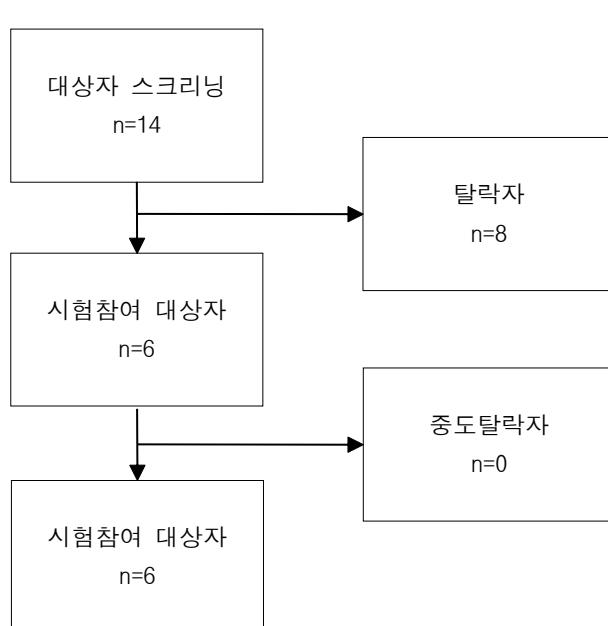


- 스크리닝: 2016/09/19
- 입원: 2016/09/23 ~ 09/30
- 투약
 - ▷ microdose: day0 (09/24), day4 (09/28)
 - ▷ regular dose: day1 (09/25), day5 (09/29)
 - ▷ inhibitor: day2 (09/26) ~ day5 (09/29)
- 약동학 채혈:
 - ▷ microdose: day0 (09/24), day4 (09/28)
 - ▷ regular dose: day1 (09/25), day5 (09/29)
- PSV(Post-study visit): 2016/10/07

- CPT2016-06

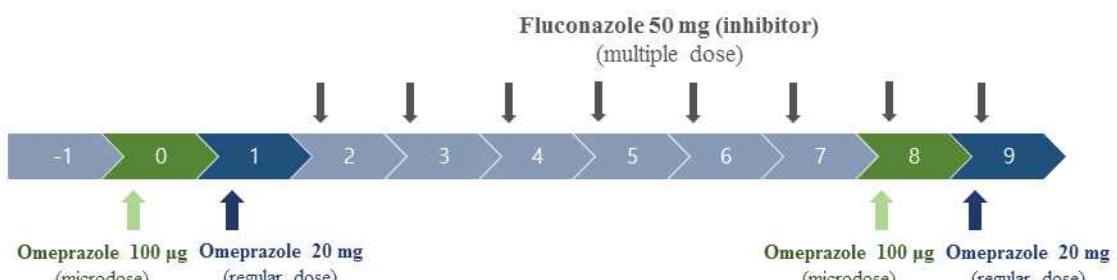
- ✓ 시험계획서 제목: 건강한 남성자원자를 대상으로 fluconazole와 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서
 - 교차임상시험
- ✓ 임상시험용의약품
 - 시험약1: 후코날캡슐50밀리그램(fluconazole cap 50 mg), (주)보령제약
 - 시험약2: 유한로섹캡슐(omeprazole cap 20 mg), (주)유한양행
 - 시험약3: Omeprazole 100 μg

✓ 대상자 현황



✓ 임상시험 일정:

- IRB 승인: 2016/08/09
- 개시모임: 2016/08/12
- 임상시험디자인

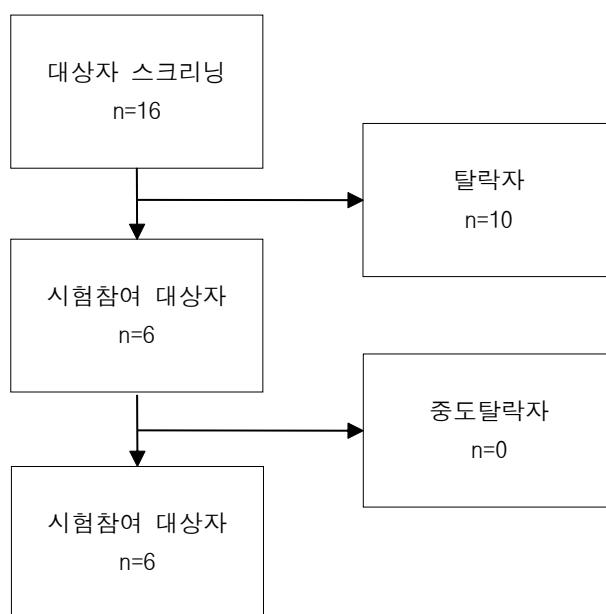


- 스크리닝: 2016/08/16

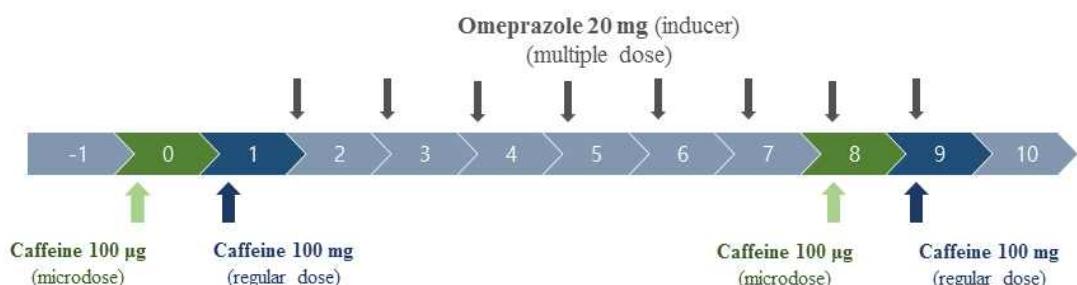
- 입원: 2016/08/25 ~ 08/28 (1기), 09/02 ~ 09/05 (2기)
- 외래: 2016/08/29 ~ 09/02
- 투약
 - ▷ microdose: day0 (08/26), day8 (09/03)
 - ▷ regular dose: day1 (08/27), day9 (09/04)
 - ▷ inhibitor: day2 (08/28) ~ day9 (09/04)
- 약동학 채혈:
 - ▷ microdose: day0 (08/26), day8 (09/03)
 - ▷ regular dose: day1 (08/27), day9 (09/04)
- PSV(Post-study visit): 2016/09/13

- CPT2016-07

- ✓ 시험계획서 제목: 건강한 남성자원자를 대상으로 omeprazole와 caffeine의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험
- ✓ 임상시험용의약품:
 - 시험약1: 유한로섹캡슐(omeprazole 20 mg), (주)유한양행
 - 시험약2: 네오카프액2mL (Caffeine 20 mg), (주)한국팜비오
 - 시험약3: Caffeine 100 µg (네오카프액2mL), (주)한국팜비오
- ✓ 대상자 현황



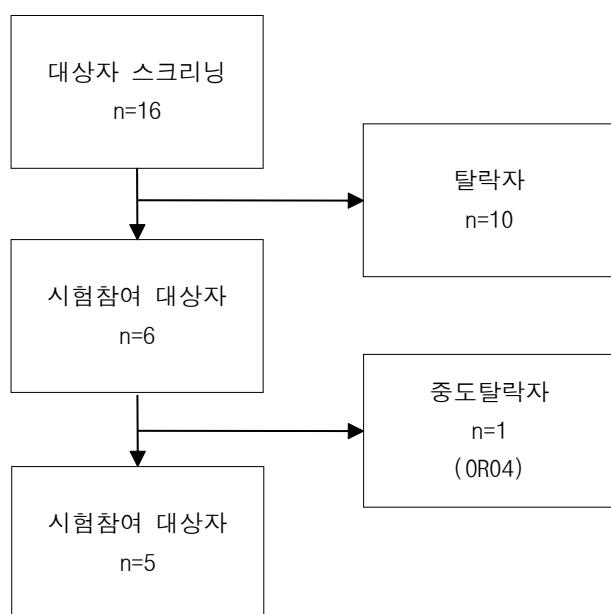
- ✓ 임상시험 일정:
 - IRB 승인: 2016년 08월 04일
 - 개시모임: 2016년 08월 12일
 - 임상시험디자인



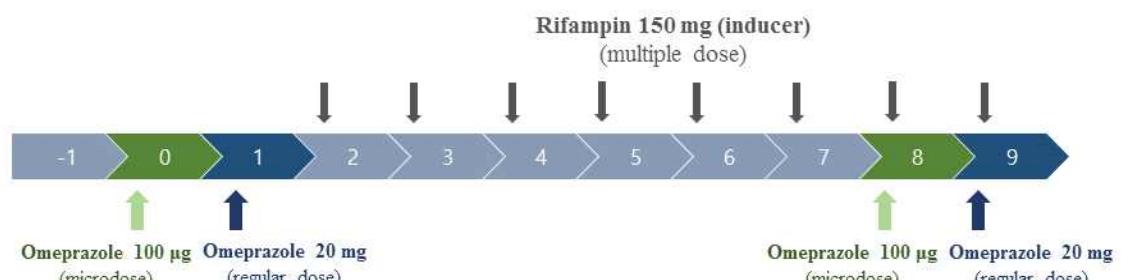
- 스크리닝: 2016/08/17
- 입원: 2016/08/25 ~ 08/28 (1기), 09/02 ~ 09/05 (2기)
- 외래: 2016/08/29 ~ 09/02
- 투약
 - ▷ microdose: day0 (08/26), day8 (09/03)
 - ▷ regular dose: day1 (08/27), day9 (09/04)
 - ▷ inducer: day2 (08/28) ~ day9 (09/04)
- 약동학 채혈:
 - ▷ microdose: day0 (08/26), day8 (09/03)
 - ▷ regular dose: day1 (08/27), day9 (09/04)
- PSV(Post-study visit): 2016/09/13

- CPT2016-08

- ✓ 시험계획서 제목: 건강한 남성자원자를 대상으로 rifampinol omeprazole의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험
- ✓ 임상시험용의약품:
 - 시험약1: 리팜핀캡슐150밀리그램(rifampin cap 150mg), 유한양행
 - 시험약2: 유한로섹캡슐(omeprazole cap 20 mg), (주)유한양행
 - 시험약3: Omeprazole 100 μg
- ✓ 대상자 현황



- ✓ 임상시험 일정:
 - IRB 승인: 2016년 08월 04일
 - 개시모임: 2016년 08월 12일
 - 임상시험디자인



- 스크리닝: 2016/08/18

- 입원: 2016/08/25 ~ 08/28 (1기), 09/02 ~ 09/05 (2기)
- 외래: 2016/08/29 ~ 09/02
- 투약
 - ▷ microdose: day0 (08/26), day8 (09/03)
 - ▷ regular dose: day1 (08/27), day9 (09/04)
 - ▷ inducer: day2 (08/28) ~ day9 (09/04)
- 약동학 채혈:
 - ▷ microdose: day0 (08/26), day8 (09/03)
 - ▷ regular dose: day1 (08/27), day9 (09/04)
- PSV(Post-study visit): 2016/09/13

○ Microdose 임상시험용의약품 (cold compound)

: 제조가이드라인 상세는 별첨 참조

- Caffeine 100 µg

✓ 조제 기본 정보

- 가) 시행 장소: 임상시험unit 내 무균조제실
- 나) 시행 내역: 임상시험용 의약품의 조제, 임상시험용 의약품 표시기재
- 다) 시행 이유: 임상시험용 의약품의 조제 시 발생할 수 있는 오염 등을 방지하고, 표시기재 시 발생되는 의료폐기물(needle)을 처리하기 용이하게 하고자 함.
- 라) 시행 관계 법령: 가이드라인 별첨1. 관계법령 참조

✓ 임상시험용의약품 라벨

- 1."임상시험용"
- 2. 네오카프액 20mg/ml (caffeine anhydrous 로 10mg/ml)
- 3. 제조번호 및 유효기간: 포장 기재사항 참조
- 4. 저장방법: 기밀용기, 실온보관
- 5. 임상시험 승인을 받은자: 서울시 서초구 반포대로222 서울성모병원
임상약리과 임동석
- 6. 임상시험 외의 목적으로는 사용할 수 없음

✓ 조제 절차

- 가) 임상약리과 연구자와 투약 일정을 확인한다.
- 나) 해당 IP 투약 전날, 투약 대상자 명단(랜덤번호만 수집)을 확보한다.
- 다) 임상시험용 의약품 처방을 감사하여, 조제 할IP의 수량을 확인한다.
- 라) 투약 예정1시간 전 IP에 대한 재구성을 실시한다. 재구성 방법 및 각 의약품의 조제법은[가이드라인 별첨2. 임상시험용 의약품 조제]를 따른다.
- 마) 재구성된 IP는 원내 제작 라벨을 부착하여 불출한다. 원내 제작라벨은 다음과 같은 내용을 포함한다.
 - 프로토콜 번호
 - 랜덤번호
 - 불출날짜
- 바) 재구성 된IP는 연구자에게 불출하고, 투약 된IP는 약국으로 반납 받는다.

- Omeprazole 100 µg

✓ 조제 기본 정보

- 마) 시행 장소: 임상시험unit 내 무균조제실
- 바) 시행 내역: 임상시험용 의약품의 조제, 임상시험용 의약품 표시기재
- 사) 시행 이유: 임상시험용 의약품의 조제 시 발생할 수 있는 오염 등을 방지하고, 표시기재 시 발생되는 의료폐기물(needle)을 처리하기 용이하게 하고자 함.
- 아) 시행 관계 법령: 가이드라인 별첨1. 관계법령 참조

✓ 임상시험용의약품 라벨

1. "임상시험용"
2. Omeprazole 20mg/cap
3. 제조번호 및 유효기간: 포장 기재사항 참조
4. 저장방법: 기밀용기, 실온보관
5. 임상시험 승인을 받은자: 서울시 서초구 반포대로222 서울성모병원
임상약리과 임동석
6. 임상시험 외의 목적으로는 사용할 수 없음

✓ 조제 절차

- 사) 임상약리과 연구자와 투약 일정을 확인한다.
- 아) 해당 IP 투약 전날, 투약 대상자 명단(랜덤번호만 수집)을 확보한다.
- 자) 임상시험용 의약품 처방을 감사하여, 조제 할 IP의 수량을 확인한다.
- 차) 투약 예정1시간 전 IP에 대한 재구성을 실시한다. 재구성 방법 및 각 의약품의 조제법은[가이드라인 별첨2. 임상시험용 의약품 조제]를 따른다.
- 카) 재구성된 IP는 원내 제작 라벨을 부착하여 불출한다. 원내 제작라벨은 다음과 같은 내용을 포함한다.
 - 프로토콜 번호
 - 랜덤번호
 - 불출날짜
- 타) 재구성 된 IP는 연구자에게 불출하고, 투약 된 IP는 약국으로 반납 받는다.

- 임상시험별 임상시험용의약품 라벨

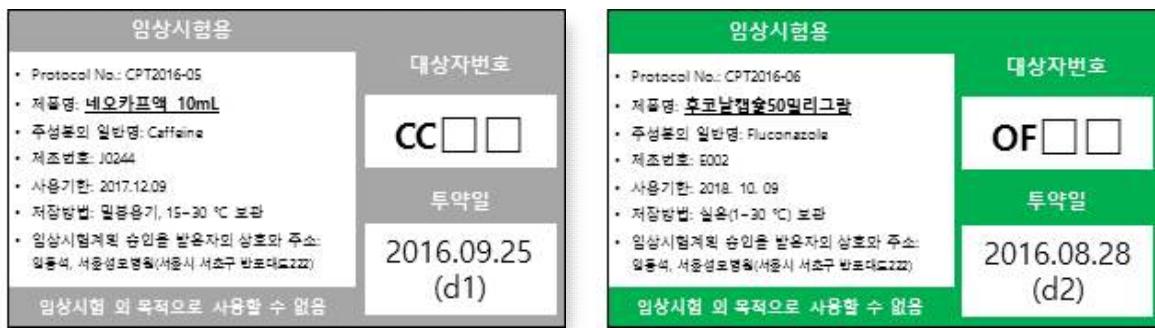


그림 42 CPT2016-05

그림 43 CPT2016-06

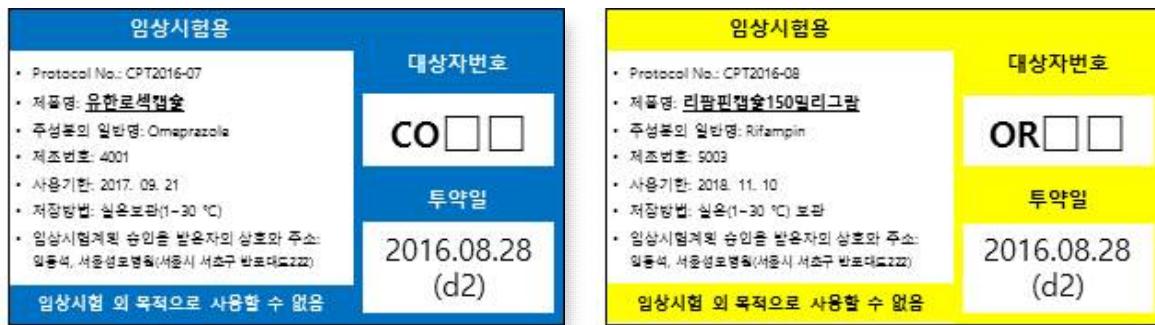


그림 44 CPT2016-07

그림 45 CPT2016-08

○ 약물농도 분석

- 임상시험 완료 후 발생한 혈액 검체를 각 세부에 전달함(검체인수서 별첨 참조)

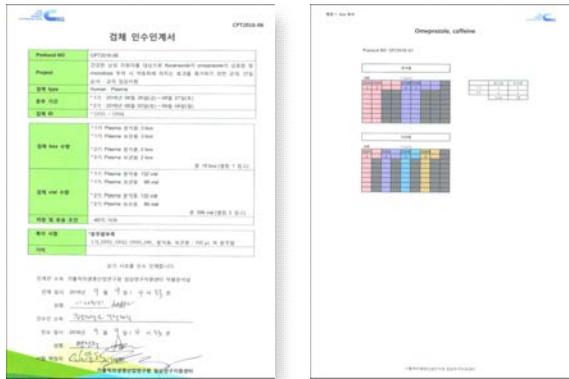


그림 46 검체인수서

- Regular dose caffeine and omeprazole
 - ✓ 3세부 KIST에서 분석
 - ✓ 분석 과정에 관한 내용은 3세부 보고서 참조
 - ✓ 각 분석에 대하여 동일 분석 protocol을 공유하여 분석
- Microdose caffeine and omeprazole

- ✓ 2세부 충남대에서 분석
 - ✓ 분석 과정에 관한 내용은 3세부 보고서 참조
 - ✓ 각 분석에 대하여 동일 분석 protocol을 공유하여 분석

SOP-2016003 -					
Small molecule Tier assay bioanalytical procedure -					
1. Assay Calibration (LLOQ 0.01ng/ml, targeting separation & normalization method)					
Stock solutions					
1. To the powder vial (0.1 mg in a vials), make a 5 mg/ml stock solution in DMso (-) 100 µl of Calixene					
2. Make a 100 µg/ml solution in 1 ml.吸取 the stock solution in DMso Calixene					
3. Please dilute 100 µl into 1 ml. 吸取 100 µl of the stock into 1 ml.移液头,稀释柱层					
A. Please dilute 100 µl into 1 ml. 移液头					
B. Transfer 100 µl of 100 µg/ml solution to 1 ml. 移液头 tube (2 dilutions)					
4. Please make serial dilutions from 100 µg/ml standard by 10 fold serially.					
A. Please dilute by 10 using 100 µl of 100 µg/ml standard (10 dilutions)					
B. Please dilute by 10 again. High to low by transferring 10 µl.					
STD & QC spiking solution (mg/ml)					
STD	Date issued	Sample / Standard	Conc. (µg/ml)	Conc. (ng/ml)	Conc. (ng/ml)
1	2016-01-05	Calixene	100.000	100.000	100.000
2	2016-01-05	Calixene	10.000	10.000	10.000
3	2016-01-05	Calixene	1.000	1.000	1.000
4	2016-01-05	Calixene	0.100	0.100	0.100
5	2016-01-05	Calixene	0.010	0.010	0.010
6	2016-01-05	Calixene	0.001	0.001	0.001
7	2016-01-05	Calixene	0.0001	0.0001	0.0001
8	2016-01-05	Calixene	0.00001	0.00001	0.00001
9	2016-01-05	Calixene	0.000001	0.000001	0.000001
10	2016-01-05	Calixene	0.0000001	0.0000001	0.0000001
QC	Date issued	Sample / Standard	Conc. (µg/ml)	Conc. (ng/ml)	Conc. (ng/ml)
1	2016-01-05	Calixene	100.000	100.000	100.000
2	2016-01-05	Calixene	10.000	10.000	10.000
3	2016-01-05	Calixene	1.000	1.000	1.000
4	2016-01-05	Calixene	0.100	0.100	0.100
5	2016-01-05	Calixene	0.010	0.010	0.010
6	2016-01-05	Calixene	0.001	0.001	0.001
7	2016-01-05	Calixene	0.0001	0.0001	0.0001
8	2016-01-05	Calixene	0.00001	0.00001	0.00001
9	2016-01-05	Calixene	0.000001	0.000001	0.000001
10	2016-01-05	Calixene	0.0000001	0.0000001	0.0000001
Internal standard (IS) solution:-					
IS: 0.01 mg/ml 100 µl of DMSO (in DMso) + 100 µl of NAc. Add to pre-wetted tips.					
7. Mix the materials for 10 sec in plastic bags.					
Final dilution of plasma					
Final name	Final dilution	Final volume	(µl)	Final volume	(µl)
100	1:100	1	100	100	100
50	1:50	1	50	50	50
25	1:25	1	25	25	25
10	1:10	1	10	10	10
5	1:5	1	5	5	5
2	1:2	1	2	2	2
1	1:1	1	1	1	1
0.5	1:0.5	1	0.5	0.5	0.5
0.2	1:0.2	1	0.2	0.2	0.2
0.1	1:0.1	1	0.1	0.1	0.1
0.05	1:0.05	1	0.05	0.05	0.05
0.02	1:0.02	1	0.02	0.02	0.02
0.01	1:0.01	1	0.01	0.01	0.01
0.005	1:0.005	1	0.005	0.005	0.005
0.002	1:0.002	1	0.002	0.002	0.002
0.001	1:0.001	1	0.001	0.001	0.001
0.0005	1:0.0005	1	0.0005	0.0005	0.0005
0.0002	1:0.0002	1	0.0002	0.0002	0.0002
0.0001	1:0.0001	1	0.0001	0.0001	0.0001
0.00005	1:0.00005	1	0.00005	0.00005	0.00005
0.00002	1:0.00002	1	0.00002	0.00002	0.00002
0.00001	1:0.00001	1	0.00001	0.00001	0.00001
0.000005	1:0.000005	1	0.000005	0.000005	0.000005
0.000002	1:0.000002	1	0.000002	0.000002	0.000002
0.000001	1:0.000001	1	0.000001	0.000001	0.000001
0.0000005	1:0.0000005	1	0.0000005	0.0000005	0.0000005
0.0000002	1:0.0000002	1	0.0000002	0.0000002	0.0000002
0.0000001	1:0.0000001	1	0.0000001	0.0000001	0.0000001
0.00000005	1:0.00000005	1	0.00000005	0.00000005	0.00000005
0.00000002	1:0.00000002	1	0.00000002	0.00000002	0.00000002
0.00000001	1:0.00000001	1	0.00000001	0.00000001	0.00000001
0.000000005	1:0.000000005	1	0.000000005	0.000000005	0.000000005
0.000000002	1:0.000000002	1	0.000000002	0.000000002	0.000000002
0.000000001	1:0.000000001	1	0.000000001	0.000000001	0.000000001
0.0000000005	1:0.0000000005	1	0.0000000005	0.0000000005	0.0000000005
0.0000000002	1:0.0000000002	1	0.0000000002	0.0000000002	0.0000000002
0.0000000001	1:0.0000000001	1	0.0000000001	0.0000000001	0.0000000001
0.00000000005	1:0.00000000005	1	0.00000000005	0.00000000005	0.00000000005
0.00000000002	1:0.00000000002	1	0.00000000002	0.00000000002	0.00000000002
0.00000000001	1:0.00000000001	1	0.00000000001	0.00000000001	0.00000000001
0.000000000005	1:0.000000000005	1	0.000000000005	0.000000000005	0.000000000005
0.000000000002	1:0.000000000002	1	0.000000000002	0.000000000002	0.000000000002
0.000000000001	1:0.000000000001	1	0.000000000001	0.000000000001	0.000000000001
0.0000000000005	1:0.0000000000005	1	0.0000000000005	0.0000000000005	0.0000000000005
0.0000000000002	1:0.0000000000002	1	0.0000000000002	0.0000000000002	0.0000000000002
0.0000000000001	1:0.0000000000001	1	0.0000000000001	0.0000000000001	0.0000000000001
0.00000000000005	1:0.00000000000005	1	0.00000000000005	0.00000000000005	0.00000000000005
0.00000000000002	1:0.00000000000002	1	0.00000000000002	0.00000000000002	0.00000000000002
0.00000000000001	1:0.00000000000001	1	0.00000000000001	0.00000000000001	0.00000000000001
0.000000000000005	1:0.000000000000005	1	0.000000000000005	0.000000000000005	0.000000000000005
0.000000000000002	1:0.000000000000002	1	0.000000000000002	0.000000000000002	0.000000000000002
0.000000000000001	1:0.000000000000001	1	0.000000000000001	0.000000000000001	0.000000000000001
0.0000000000000005	1:0.0000000000000005	1	0.0000000000000005	0.0000000000000005	0.0000000000000005
0.0000000000000002	1:0.0000000000000002	1	0.0000000000000002	0.0000000000000002	0.0000000000000002
0.0000000000000001	1:0.0000000000000001	1	0.0000000000000001	0.0000000000000001	0.0000000000000001
0.00000000000000005	1:0.00000000000000005	1	0.00000000000000005	0.00000000000000005	0.00000000000000005
0.00000000000000002	1:0.00000000000000002	1	0.00000000000000002	0.00000000000000002	0.00000000000000002
0.00000000000000001	1:0.00000000000000001	1	0.00000000000000001	0.00000000000000001	0.00000000000000001
0.000000000000000005	1:0.000000000000000005	1	0.000000000000000005	0.000000000000000005	0.000000000000000005
0.000000000000000002	1:0.000000000000000002	1	0.000000000000000002	0.000000000000000002	0.000000000000000002
0.000000000000000001	1:0.000000000000000001	1	0.000000000000000001	0.000000000000000001	0.000000000000000001
0.0000000000000000005	1:0.0000000000000000005	1	0.0000000000000000005	0.0000000000000000005	0.0000000000000000005
0.0000000000000000002	1:0.0000000000000000002	1	0.0000000000000000002	0.0000000000000000002	0.0000000000000000002
0.0000000000000000001	1:0.0000000000000000001	1	0.0000000000000000001	0.0000000000000000001	0.0000000000000000001
0.00000000000000000005	1:0.00000000000000000005	1	0.00000000000000000005	0.00000000000000000005	0.00000000000000000005
0.00000000000000000002	1:0.00000000000000000002	1	0.00000000000000000002	0.00000000000000000002	0.00000000000000000002
0.00000000000000000001	1:0.00000000000000000001	1	0.00000000000000000001	0.00000000000000000001	0.00000000000000000001
0.000000000000000000005	1:0.000000000000000000005	1	0.000000000000000000005	0.000000000000000000005	0.000000000000000000005
0.000000000000000000002	1:0.000000000000000000002	1	0.000000000000000000002	0.000000000000000000002	0.000000000000000000002
0.000000000000000000001	1:0.000000000000000000001	1	0.000000000000000000001	0.000000000000000000001	0.000000000000000000001
0.0000000000000000000005	1:0.0000000000000000000005	1	0.0000000000000000000005	0.0000000000000000000005	0.0000000000000000000005
0.0000000000000000000002	1:0.0000000000000000000002	1	0.0000000000000000000002	0.0000000000000000000002	0.0000000000000000000002
0.0000000000000000000001	1:0.0000000000000000000001	1	0.0000000000000000000001	0.0000000000000000000001	0.0000000000000000000001
0.00000000000000000000005	1:0.00000000000000000000005	1	0.00000000000000000000005	0.00000000000000000000005	0.00000000000000000000005
0.00000000000000000000002	1:0.00000000000000000000002	1	0.00000000000000000000002	0.00000000000000000000002	0.00000000000000000000002
0.00000000000000000000001	1:0.00000000000000000000001	1	0.00000000000000000000001	0.00000000000000000000001	0.00000000000000000000001
0.000000000000000000000005	1:0.000000000000000000000005	1	0.000000000000000000000005	0.000000000000000000000005	0.000000000000000000000005
0.000000000000000000000002	1:0.000000000000000000000002	1	0.000000000000000000000002	0.000000000000000000000002	0.000000000000000000000002
0.000000000000000000000001	1:0.000000000000000000000001	1	0.000000000000000000000001	0.000000000000000000000001	0.000000000000000000000001
0.0000000000000000000000005	1:0.0000000000000000000000005	1	0.0000000000000000000000005	0.0000000000000000000000005	0.0000000000000000000000005
0.0000000000000000000000002	1:0.0000000000000000000000002	1	0.0000000000000000000000002	0.0000000000000000000000002	0.0000000000000000000000002
0.0000000000000000000000001	1:0.0000000000000000000000001	1	0.0000000000000000000000001	0.0000000000000000000000001	0.0000000000000000000000001
0.00000000000000000000000005	1:0.00000000000000000000000005	1	0.00000000000000000000000005	0.00000000000000000000000005	0.00000000000000000000000005
0.00000000000000000000000002	1:0.00000000000000000000000002	1			

그림 47 Caffeine 분석 protocol

(SOP-2016002) -		Internal standard (IS) solution:																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Small molecule Tier assay bioanalytical procedure -		IS is made from Long-term aliquots of vanguard in ISHED. Handler 3 Long-term aliquots to ACN to prepare IS in 100 nL vials.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
1. Viscosity measurement by reconstitution method		1. Mix the reagent in vial (2-2 mL in a 4 mL vial), make a 1 mg/mL stock solution in ISHED (100 µL).																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
Stock solutions:		2. Dissolve a stock solution of 0.1 mg/mL from the above stock in ISHED (approximately 1 mL).																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
1. To make 100 µL of 0.01 mg/mL stock solution, dilute 10 µL of stock into 990 µL of HPLC-grade water.		3. Place 100 µL of stock into a 1.5 mL Eppendorf tube. Add 100 µL of HPLC-grade water to the tube.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
2. Vortex briefly to mix. Let stand for 10 minutes at room temperature.		4. Place 100 µL of stock into a 1.5 mL Eppendorf tube. Add 100 µL of HPLC-grade water to the tube.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
3. Vortex briefly to mix. Let stand for 10 minutes at room temperature.		5. Place 100 µL of stock into a 1.5 mL Eppendorf tube. Add 100 µL of HPLC-grade water to the tube.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
4. Vortex briefly to mix. Let stand for 10 minutes at room temperature.		6. Place 100 µL of stock into a 1.5 mL Eppendorf tube. Add 100 µL of HPLC-grade water to the tube.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
5. Vortex briefly to mix. Let stand for 10 minutes at room temperature.		7. Mix the reagents for final IS solution and make sure to invert 4 times in the bottom.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
6. Vortex briefly to mix. Let stand for 10 minutes at room temperature.		8. Add 100 µL of ISHED in ISHED to minimize the influence of initial LC condition.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
7. Vortex briefly to mix. Let stand for 10 minutes at room temperature.		9. If necessary, centrifuge the solution to make sure no precipitate appears.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
STD B: QC spiking solution (mg/mL)		10. Handler 3 the IS vials.																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																							
<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> <th>9</th> <th>10</th> <th>11</th> <th>12</th> <th>13</th> <th>14</th> <th>15</th> <th>16</th> <th>17</th> <th>18</th> <th>19</th> <th>20</th> <th>21</th> <th>22</th> <th>23</th> <th>24</th> <th>25</th> <th>26</th> <th>27</th> <th>28</th> <th>29</th> <th>30</th> <th>31</th> <th>32</th> <th>33</th> <th>34</th> <th>35</th> <th>36</th> <th>37</th> <th>38</th> <th>39</th> <th>40</th> <th>41</th> <th>42</th> <th>43</th> <th>44</th> <th>45</th> <th>46</th> <th>47</th> <th>48</th> <th>49</th> <th>50</th> <th>51</th> <th>52</th> <th>53</th> <th>54</th> <th>55</th> <th>56</th> <th>57</th> <th>58</th> <th>59</th> <th>60</th> <th>61</th> <th>62</th> <th>63</th> <th>64</th> <th>65</th> <th>66</th> <th>67</th> <th>68</th> <th>69</th> <th>70</th> <th>71</th> <th>72</th> <th>73</th> <th>74</th> <th>75</th> <th>76</th> <th>77</th> <th>78</th> <th>79</th> <th>80</th> <th>81</th> <th>82</th> <th>83</th> <th>84</th> <th>85</th> <th>86</th> <th>87</th> <th>88</th> <th>89</th> <th>90</th> <th>91</th> <th>92</th> <th>93</th> <th>94</th> <th>95</th> <th>96</th> <th>97</th> <th>98</th> <th>99</th> <th>100</th> <th>101</th> <th>102</th> <th>103</th> <th>104</th> <th>105</th> <th>106</th> <th>107</th> <th>108</th> <th>109</th> <th>110</th> <th>111</th> <th>112</th> <th>113</th> <th>114</th> <th>115</th> <th>116</th> <th>117</th> <th>118</th> <th>119</th> <th>120</th> <th>121</th> <th>122</th> <th>123</th> <th>124</th> <th>125</th> <th>126</th> <th>127</th> <th>128</th> <th>129</th> <th>130</th> <th>131</th> <th>132</th> <th>133</th> <th>134</th> <th>135</th> <th>136</th> <th>137</th> <th>138</th> <th>139</th> <th>140</th> <th>141</th> <th>142</th> <th>143</th> <th>144</th> <th>145</th> <th>146</th> <th>147</th> <th>148</th> <th>149</th> <th>150</th> <th>151</th> <th>152</th> <th>153</th> <th>154</th> <th>155</th> <th>156</th> <th>157</th> <th>158</th> <th>159</th> <th>160</th> <th>161</th> <th>162</th> <th>163</th> <th>164</th> <th>165</th> <th>166</th> <th>167</th> <th>168</th> <th>169</th> <th>170</th> <th>171</th> <th>172</th> <th>173</th> <th>174</th> <th>175</th> <th>176</th> <th>177</th> <th>178</th> <th>179</th> <th>180</th> <th>181</th> <th>182</th> <th>183</th> <th>184</th> <th>185</th> <th>186</th> <th>187</th> <th>188</th> <th>189</th> <th>190</th> <th>191</th> <th>192</th> <th>193</th> <th>194</th> <th>195</th> <th>196</th> <th>197</th> <th>198</th> <th>199</th> <th>200</th> <th>201</th> <th>202</th> <th>203</th> <th>204</th> <th>205</th> <th>206</th> <th>207</th> <th>208</th> <th>209</th> <th>210</th> <th>211</th> <th>212</th> <th>213</th> <th>214</th> <th>215</th> <th>216</th> <th>217</th> <th>218</th> <th>219</th> <th>220</th> <th>221</th> <th>222</th> <th>223</th> <th>224</th> <th>225</th> <th>226</th> <th>227</th> <th>228</th> <th>229</th> <th>230</th> <th>231</th> <th>232</th> <th>233</th> <th>234</th> <th>235</th> <th>236</th> <th>237</th> <th>238</th> <th>239</th> <th>240</th> <th>241</th> <th>242</th> <th>243</th> <th>244</th> <th>245</th> <th>246</th> <th>247</th> <th>248</th> <th>249</th> <th>250</th> <th>251</th> <th>252</th> <th>253</th> <th>254</th> <th>255</th> <th>256</th> <th>257</th> <th>258</th> <th>259</th> <th>260</th> <th>261</th> <th>262</th> <th>263</th> <th>264</th> <th>265</th> <th>266</th> <th>267</th> <th>268</th> <th>269</th> <th>270</th> <th>271</th> <th>272</th> <th>273</th> <th>274</th> <th>275</th> <th>276</th> <th>277</th> <th>278</th> <th>279</th> <th>280</th> <th>281</th> <th>282</th> <th>283</th> <th>284</th> <th>285</th> <th>286</th> <th>287</th> <th>288</th> <th>289</th> <th>290</th> <th>291</th> <th>292</th> <th>293</th> <th>294</th> <th>295</th> <th>296</th> <th>297</th> <th>298</th> <th>299</th> <th>300</th> <th>301</th> <th>302</th> <th>303</th> <th>304</th> <th>305</th> <th>306</th> <th>307</th> <th>308</th> <th>309</th> <th>310</th> <th>311</th> <th>312</th> <th>313</th> <th>314</th> <th>315</th> <th>316</th> <th>317</th> <th>318</th> <th>319</th> <th>320</th> <th>321</th> <th>322</th> <th>323</th> <th>324</th> <th>325</th> <th>326</th> <th>327</th> <th>328</th> <th>329</th> <th>330</th> <th>331</th> <th>332</th> <th>333</th> <th>334</th> <th>335</th> <th>336</th> <th>337</th> <th>338</th> <th>339</th> <th>340</th> <th>341</th> <th>342</th> <th>343</th> <th>344</th> <th>345</th> <th>346</th> <th>347</th> <th>348</th> <th>349</th> <th>350</th> <th>351</th> <th>352</th> <th>353</th> <th>354</th> <th>355</th> <th>356</th> <th>357</th> <th>358</th> <th>359</th> <th>360</th> <th>361</th> <th>362</th> <th>363</th> <th>364</th> <th>365</th> <th>366</th> <th>367</th> <th>368</th> <th>369</th> <th>370</th> <th>371</th> <th>372</th> <th>373</th> <th>374</th> <th>375</th> <th>376</th> <th>377</th> <th>378</th> <th>379</th> <th>380</th> <th>381</th> <th>382</th> <th>383</th> <th>384</th> <th>385</th> <th>386</th> <th>387</th> <th>388</th> <th>389</th> <th>390</th> <th>391</th> <th>392</th> <th>393</th> <th>394</th> <th>395</th> <th>396</th> <th>397</th> <th>398</th> <th>399</th> <th>400</th> <th>401</th> <th>402</th> <th>403</th> <th>404</th> <th>405</th> <th>406</th> <th>407</th> <th>408</th> <th>409</th> <th>410</th> <th>411</th> <th>412</th> <th>413</th> <th>414</th> <th>415</th> <th>416</th> <th>417</th> <th>418</th> <th>419</th> <th>420</th> <th>421</th> <th>422</th> <th>423</th> <th>424</th> <th>425</th> <th>426</th> <th>427</th> <th>428</th> <th>429</th> <th>430</th> <th>431</th> <th>432</th> <th>433</th> <th>434</th> <th>435</th> <th>436</th> <th>437</th> <th>438</th> <th>439</th> <th>440</th> <th>441</th> <th>442</th> <th>443</th> <th>444</th> <th>445</th> <th>446</th> <th>447</th> <th>448</th> <th>449</th> <th>450</th> <th>451</th> <th>452</th> <th>453</th> <th>454</th> <th>455</th> <th>456</th> <th>457</th> <th>458</th> <th>459</th> <th>460</th> <th>461</th> <th>462</th> <th>463</th> <th>464</th> <th>465</th> <th>466</th> <th>467</th> <th>468</th> <th>469</th> <th>470</th> <th>471</th> <th>472</th> <th>473</th> <th>474</th> <th>475</th> <th>476</th> <th>477</th> <th>478</th> <th>479</th> <th>480</th> <th>481</th> <th>482</th> <th>483</th> <th>484</th> <th>485</th> <th>486</th> <th>487</th> <th>488</th> <th>489</th> <th>490</th> <th>491</th> <th>492</th> <th>493</th> <th>494</th> <th>495</th> <th>496</th> <th>497</th> <th>498</th> <th>499</th> <th>500</th> <th>501</th> <th>502</th> <th>503</th> <th>504</th> <th>505</th> <th>506</th> <th>507</th> <th>508</th> <th>509</th> <th>510</th> <th>511</th> <th>512</th> <th>513</th> <th>514</th> <th>515</th> <th>516</th> <th>517</th> <th>518</th> <th>519</th> <th>520</th> <th>521</th> <th>522</th> <th>523</th> <th>524</th> <th>525</th> <th>526</th> <th>527</th> <th>528</th> <th>529</th> <th>530</th> <th>531</th> <th>532</th> <th>533</th> <th>534</th> <th>535</th> <th>536</th> <th>537</th> <th>538</th> <th>539</th> <th>540</th> <th>541</th> <th>542</th> <th>543</th> <th>544</th> <th>545</th> <th>546</th> <th>547</th> <th>548</th> <th>549</th> <th>550</th> <th>551</th> <th>552</th> <th>553</th> <th>554</th> <th>555</th> <th>556</th> <th>557</th> <th>558</th> <th>559</th> <th>560</th> <th>561</th> <th>562</th> <th>563</th> <th>564</th> <th>565</th> <th>566</th> <th>567</th> <th>568</th> <th>569</th> <th>570</th> <th>571</th> <th>572</th> <th>573</th> <th>574</th> <th>575</th> <th>576</th> <th>577</th> <th>578</th> <th>579</th> <th>580</th> <th>581</th> <th>582</th> <th>583</th> <th>584</th> <th>585</th> <th>586</th> <th>587</th> <th>588</th> <th>589</th> <th>590</th> <th>591</th> <th>592</th> <th>593</th> <th>594</th> <th>595</th> <th>596</th> <th>597</th> <th>598</th> <th>599</th> <th>600</th> <th>601</th> <th>602</th> <th>603</th> <th>604</th> <th>605</th> <th>606</th> <th>607</th> <th>608</th> <th>609</th> <th>610</th> <th>611</th> <th>612</th> <th>613</th> <th>614</th> <th>615</th> <th>616</th> <th>617</th> <th>618</th> <th>619</th> <th>620</th> <th>621</th> <th>622</th> <th>623</th> <th>624</th> <th>625</th> <th>626</th> <th>627</th> <th>628</th> <th>629</th> <th>630</th> <th>631</th> <th>632</th> <th>633</th> <th>634</th> <th>635</th> <th>636</th> <th>637</th> <th>638</th> <th>639</th> <th>640</th> <th>641</th> <th>642</th> <th>643</th> <th>644</th> <th>645</th> <th>646</th> <th>647</th> <th>648</th> <th>649</th> <th>650</th> <th>651</th> <th>652</th> <th>653</th> <th>654</th> <th>655</th> <th>656</th> <th>657</th> <th>658</th> <th>659</th> <th>660</th> <th>661</th> <th>662</th> <th>663</th> <th>664</th> <th>665</th> <th>666</th> <th>667</th> <th>668</th> <th>669</th> <th>670</th> <th>671</th> <th>672</th> <th>673</th> <th>674</th> <th>675</th> <th>676</th> <th>677</th> <th>678</th> <th>679</th> <th>680</th> <th>681</th> <th>682</th> <th>683</th> <th>684</th> <th>685</th> <th>686</th> <th>687</th> <th>688</th> <th>689</th> <th>690</th> <th>691</th> <th>692</th> <th>693</th> <th>694</th> <th>695</th> <th>696</th> <th>697</th> <th>698</th> <th>699</th> <th>700</th> <th>701</th> <th>702</th> <th>703</th> <th>704</th> <th>705</th> <th>706</th> <th>707</th> <th>708</th> <th>709</th> <th>710</th> <th>711</th> <th>712</th> <th>713</th> <th>714</th> <th>715</th> <th>716</th> <th>717</th> <th>718</th> <th>719</th> <th>720</th> <th>721</th> <th>722</th> <th>723</th> <th>724</th> <th>725</th> <th>726</th> <th>727</th> <th>728</th> <th>729</th> <th>730</th> <th>731</th> <th>732</th> <th>733</th> <th>734</th> <th>735</th> <th>736</th> <th>737</th> <th>738</th> <th>739</th> <th>740</th> <th>741</th> <th>742</th> <th>743</th> <th>744</th> <th>745</th> <th>746</th> <th>747</th> <th>748</th> <th>749</th> <th>750</th> <th>751</th> <th>752</th> <th>753</th> <th>754</th> <th>755</th> <th>756</th> <th>757</th> <th>758</th> <th>759</th> <th>760</th> <th>761</th> <th>762</th> <th>763</th> <th>764</th> <th>765</th> <th>766</th> <th>767</th> <th>768</th> <th>769</th> <th>770</th> <th>771</th> <th>772</th> <th>773</th> <th>774</th> <th>775</th> <th>776</th> <th>777</th> <th>778</th> <th>779</th> <th>780</th> <th>781</th> <th>782</th> <th>783</th> <th>784</th> <th>785</th> <th>786</th> <th>787</th> <th>788</th> <th>789</th> <th>790</th> <th>791</th> <th>792</th> <th>793</th> <th>794</th> <th>795</th> <th>796</th> <th>797</th> <th>798</th> <th>799</th> <th>800</th> <th>801</th> <th>802</th> <th>803</th> <th>804</th> <th>805</th> <th>806</th> <th>807</th> <th>808</th> <th>809</th> <th>810</th> <th>811</th> <th>812</th> <th>813</th> <th>814</th> <th>815</th> <th>816</th> <th>817</th> <th>818</th> <th>819</th> <th>820</th> <th>821</th> <th>822</th> <th>823</th> <th>824</th> <th>825</th> <th>826</th> <th>827</th> <th>828</th> <th>829</th> <th>830</th> <th>831</th> <th>832</th> <th>833</th> <th>834</th> <th>835</th> <th>836</th> <th>837</th> <th>838</th> <th>839</th> <th>840</th> <th>841</th> <th>842</th> <th>843</th> <th>844</th> <th>845</th> <th>846</th> <th>847</th> <th>848</th> <th>849</th> <th>850</th> <th>851</th> <th>852</th> <th>853</th> <th>854</th> <th>855</th> <th>856</th> <th>857</th> <th>858</th> <th>859</th> <th>860</th> <th>861</th> <th>862</th> <th>863</th> <th>864</th> <th>865</th> <th>866</th> <th>867</th> <th>868</th> <th>869</th> <th>870</th> <th>871</th> <th>872</th> <th>873</th> <th>874</th> <th>875</th> <th>876</th> <th>877</th> <th>878</th> <th>879</th> <th>880</th> <th>881</th> <th>882</th> <th>883</th> <th>884</th> <th>885</th> <th>886</th> <th>887</th> <th>888</th> <th>889</th> <th>890</th> <th>891</th> <th>892</th> <th>893</th> <th>894</th> <th>895</th> <th>896</th> <th>897</th> <th>898</th> <th>899</th> <th>900</th> <th>901</th> <th>902</th> <th>903</th> <th>904</th> <th>905</th> <th>906</th> <th>907</th> <th>908</th> <th>909</th> <th>910</th> <th>911</th> <th>912</th> <th>913</th> <th>914</th> <th>915</th> <th>916</th> <th>917</th> <th>918</th> <th>919</th> <th>920</th> <th>921</th> <th>922</th> <th>923</th> <th>924</th> <th>925</th> <th>926</th> <th>927</th> <th>928</th> <th>929</th> <th>930</th> <th>931</th> <th>932</th> <th>933</th> <th>934</th> <th>935</th> <th>936</th> <th>937</th> <th>938</th> <th>939</th> <th>940</th> <th>941</th> <th>942</th> <th>943</th> <th>944</th> <th>945</th> <th>946</th> <th>947</th> <th>948</th> <th>949</th> <th>950</th> <th>951</th> <th>952</th> <th>953</th> <th>954</th> <th>955</th> <th>956</th> <th>957</th> <th>958</th> <th>959</th> <th>960</th> <th>961</th> <th>962</th> <th>963</th> <th>964</th> <th>965</th> <th>966</th> <th>967</th> <th>968</th> <th>969</th> <th>970</th> <th>971</th> <th>972</th> <th>973</th> <th>974</th> <th>975</th> <th>976</th> <th>977</th> <th>978</th> <th>979</th> <th>980</th> <th>981</th> <th>982</th> <th>983</th> <th>984</th> <th>985</th> <th>986</th> <th>987</th> <th>988</th> <th>989</th> <th>990</th> <th>991</th> <th>992</th> <th>993</th> <th>994</th> <th>995</th> <th>996</th> <th>997</th> <th>998</th> <th>999</th> <th>1000</th> </tr> </thead></table>		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	

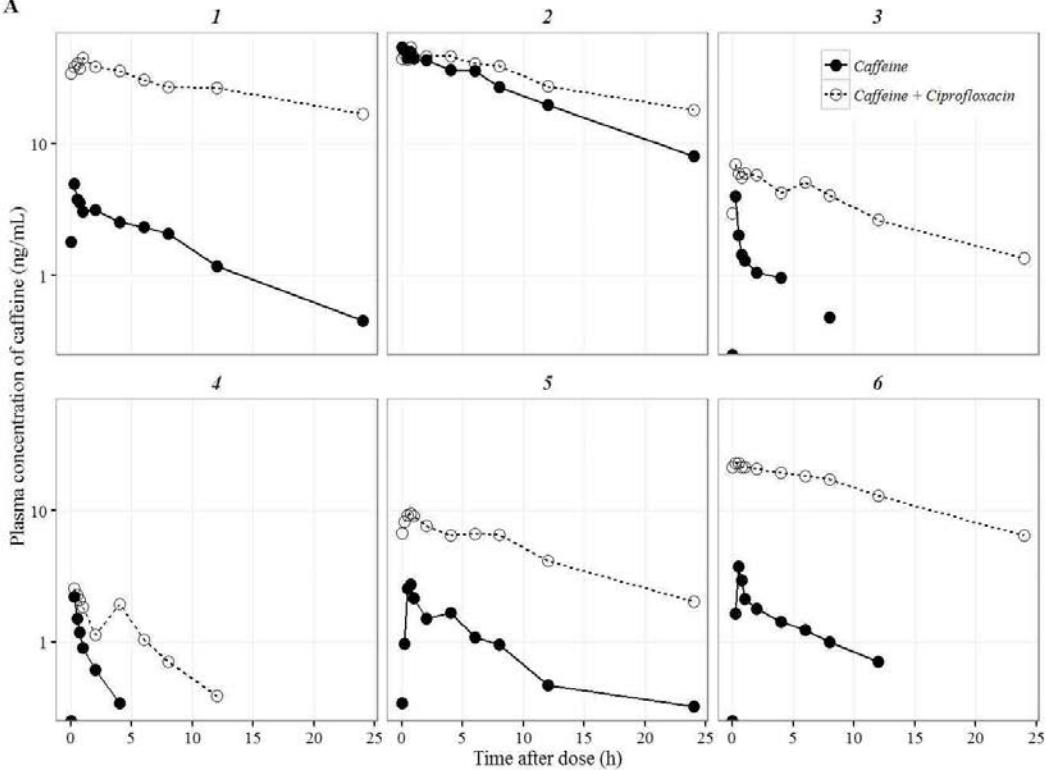
그림 48 Omeprazole 분석 protocol

○ 약물 농도 데이터 분석 - 데이터 탐색 및 비구획 분석

- CPT2016-05 (substrates: caffeine, inhibitor: ciprofloxacin)

✓ Individual plot

A



B

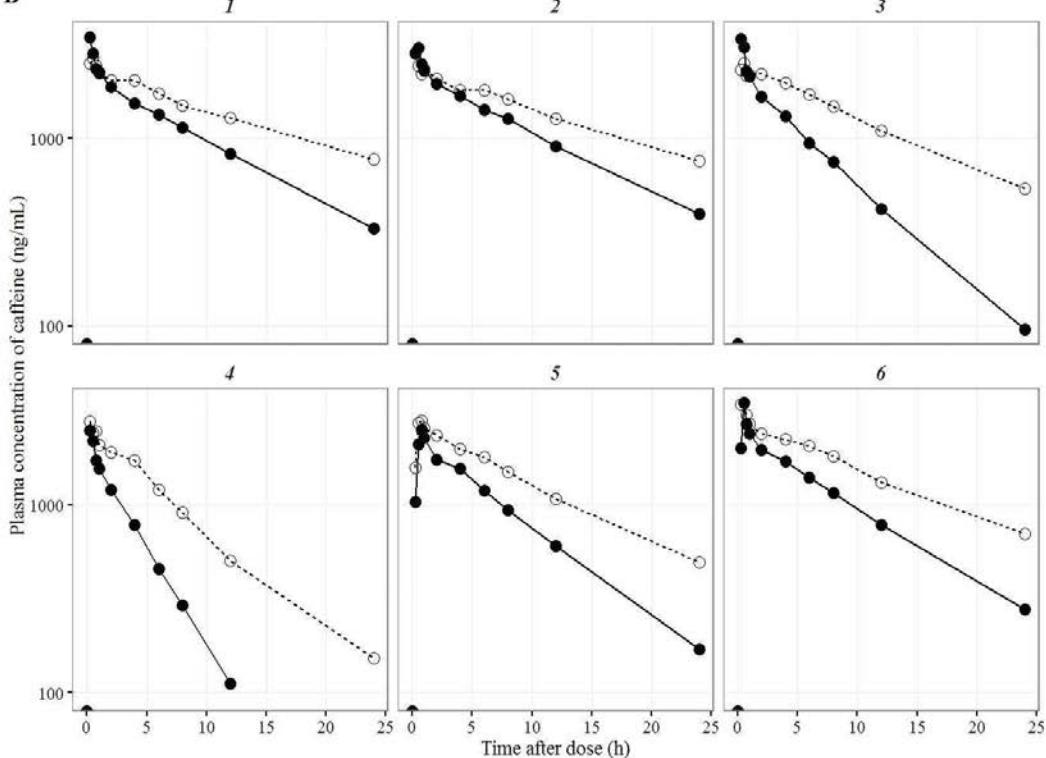


그림 49 Individual plot of caffeine with/without ciprofloxacin

A) microdose B) regular dose

✓ Mean,SD plot

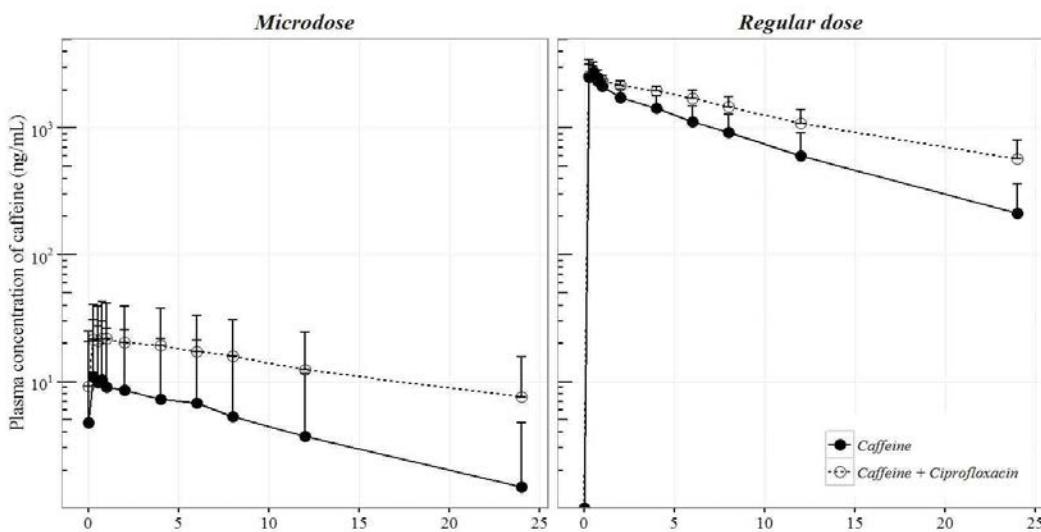


그림 50 Mean and SD plot of caffeine wih/without ciprofloxacin

✓ Non-compartmental analysis (NCA)

표 13 PK parameters (mean \pm standard deviation) of the caffeine inhibition study

Dose	Parameters	Caffeine	Caffeine + Ciprofloxacin
Microdose	C_{max} (ng/mL)	12.12 ± 21.0	23.74 ± 21.77
	T_{max} (h)	0.25 (0.00-0.75) ^a	0.50 (0.25-1.00) ^a
	AUC_t (ng•h/mL)	109.22 ± 226.60	326.77 ± 317.39
	Dose-normalized AUC_t^b	1902.2	3267.7
	AUC_{inf} (ng•h/mL)	130.81 ± 269.11	498.37 ± 520.12
	<i>Half-life</i> (h)	6.68 ± 2.64	11.85 ± 5.03
Regular dose	C_{max} (ng/mL)	3058.33 ± 460.24	2846.67 ± 336.14
	T_{max} (h)	0.38 (0.25-0.75) ^a	0.5 (0.25-0.75) ^a
	AUC_t (ng•h/mL)	19766.18 ± 6721.82	30605.42 ± 5819.06
	Dose-normalized AUC_t^b	197.66	306.05
	AUC_{inf} (ng•h/mL)	$22366.15 \pm 8508.81.00$	41120.89 ± 11497.68
	<i>Half-life</i> (h)	6.84 ± 2.46	11.55 ± 3.82
F_{rel}^c		9.62	10.68

Notes:^amedian (minimum-maximum); ^bThe values were based on 1mg caffeine; ^crelative bioavailability $F_{rel}=Dose-normalized AUC_{t(microdose)}/Dose-normalized AUC_{t(regular dose)}$

Abbreviations: AUC_{inf} , area under the plasma concentration-time curve from zero extrapolated to infinite time; AUC_t , area under the plasma concentration-time curve from zero until last measurable concentration; C_{max} , maximum plasma concentration

✓ 결과

- Microdose study 중 대부분의 대상자의 0시간 채혈 검체에서 caffeine이 관찰되었음
- Microdose study의 individual plot에서 inhibitor인 ciprofloxacin 병용투여시 AUC 증가를 보였으나, Cmax의 증가는 1, 5, 6번 대상자에서 현저한 증가를 보였으나, 이는 0시간 caffeine의 영향으로 판단됨
- Regular dose study에서는 병용투여시 단독투여에 비하여 Cmax는 현저하게 커지지는 않았으나 AUC는 증가하였고 이는 ciprofloxacin에 의한 CYP2C19의 억제에 의하여 대사가 영향을 받은 결과로 판단됨
- Mean plot에서는 병용투여시 이는 microdose study 보다 regular dose study에서 청소율의 변화가 더 잘 관찰되었음
- Microdose study에서 0시간에 관찰되는 caffeine의 농도 등으로 인하여 microdose study와 regular dose study에서 DDI 정도를 비교하여 결과를 도출하기는 어려울 것으로 판단됨

- CPT2016-06 (substrates: caffeine, inducer: omeprazole)

✓ Individual plot

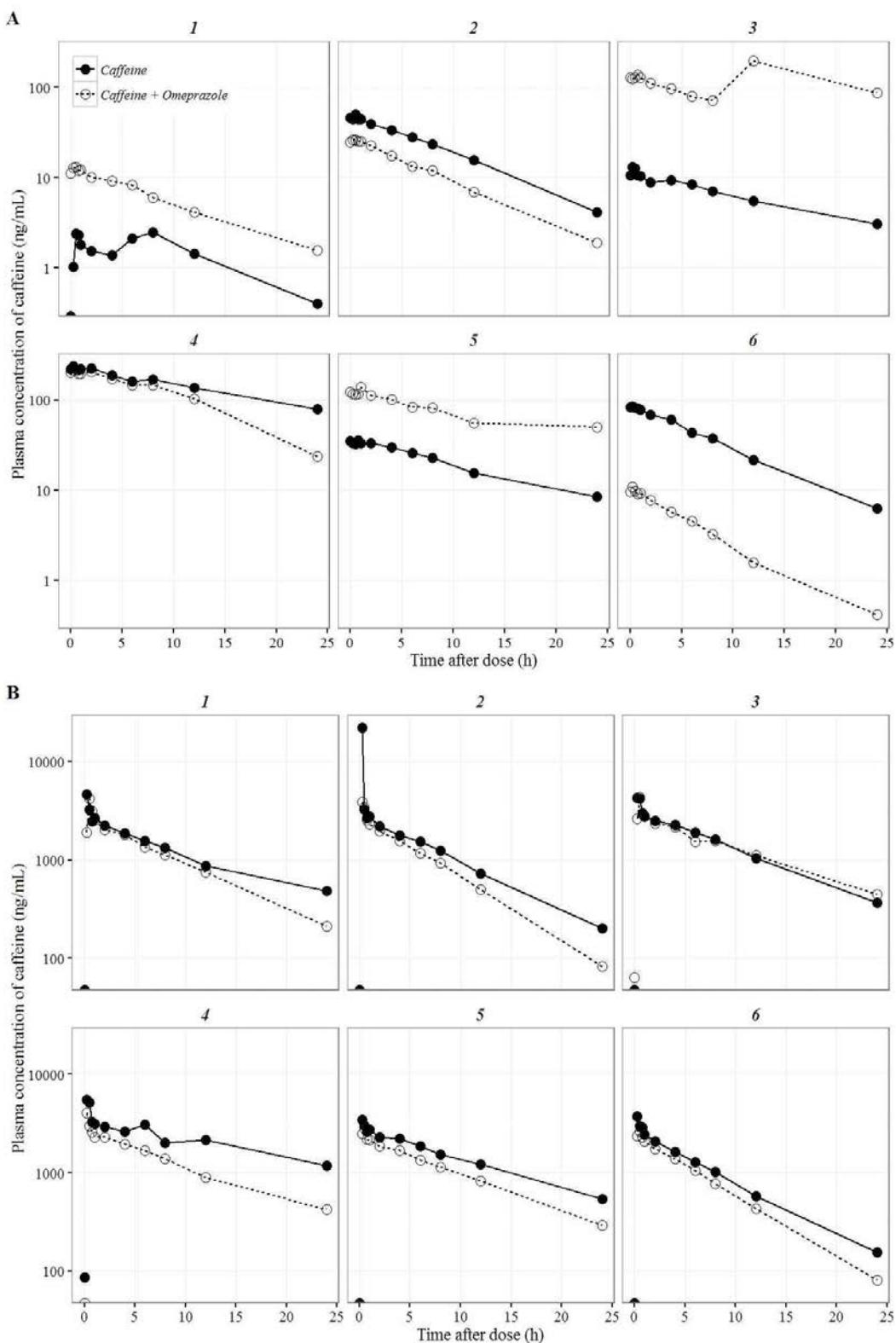


그림 51 Individual plot of caffeine with/without omeprazole.

A) microdose B) regular dose

✓ Mean, SD plot

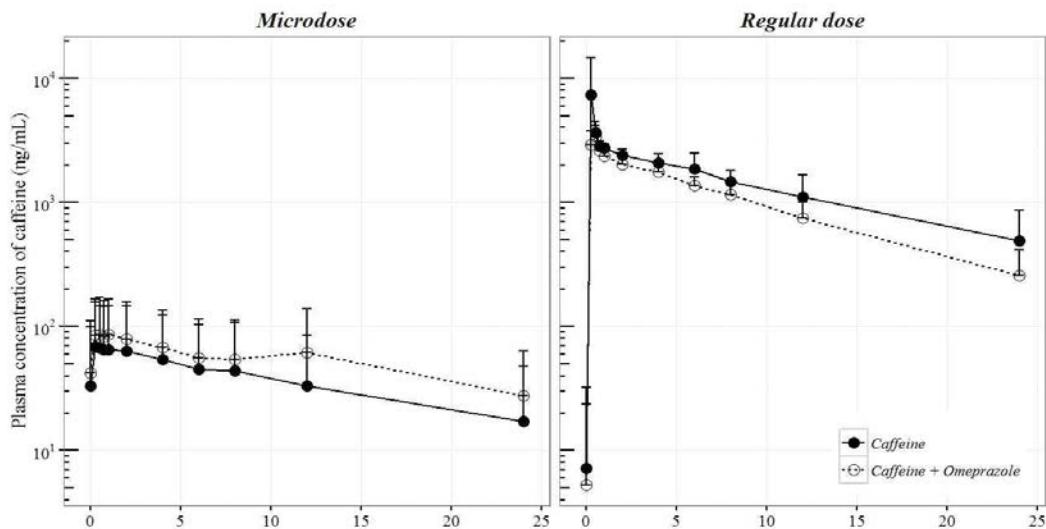


그림 52 Mean and SD plot of caffeine with/without omeprazole

✓ Non-compartmental analysis (NCA)

표 14 PK parameters (mean \pm standard deviation) of the induction study

Dose	Parameters	Caffeine	Caffeine + Omeprazole
Microdose	C_{max} (ng/mL)	70.73 ± 86.81	101.54 ± 1.29
	T_{max} (h)	0.38 (0.25–8) ^a	0.5 (0.25–12) ^a
	AUC_t (ng•h/mL)	889.56 ± 1288.96	1313.35 ± 1350.62
	Dose-normalized AUC_t ^b	8895.6	13133.5
	AUC_{inf} (ng•h/mL)	1458.29 ± 2082.64	1289.64 ± 1551.27
Regular dose	$Half-life$ (h)	10.40 ± 3.95	8.87 ± 5.68
	C_{max} (ng/mL)	7305.02 ± 7308.53	3667.70 ± 749.36
	T_{max} (h)	0.25 (0.25–0.25) ^a	0.5 (0.25–0.5) ^a
	AUC_t (ng•h/mL)	32735.07 ± 10051.55	23998.84 ± 5360.99
	Dose-normalized AUC_t ^b	327.35	239.99
	AUC_{inf} (ng•h/mL)	41084.69 ± 19826.16	26932.35 ± 7562.53
	$Half-life$ (h)	9.33 ± 3.95	6.99 ± 1.93
	F_{rel} ^c	27.17	54.73

Notes:^amedian (minimum-maximum); ^bThe values were based on 1mg caffeine; ^crelative bioavailability $F_{rel} = Dose-normalized AUC_{t(microdose)}/Dose-normalized AUC_{t(regular dose)}$

Abbreviations: AUC_{inf} , area under the plasma concentration-time curve from zero extrapolated to infinite time; AUC_t , area under the plasma concentration-time curve from zero until last measurable concentration; C_{max} , maximum plasma concentration

✓ 결과

- Microdose study 중 대부분의 대상자의 0시간 채혈 검체에서 caffeine이 관찰되었음
- 1, 3, 5번 대상자의 individual plot에서 omeprazole 병용투여시 더 높은 농도를 보였음
- Mean plot에서 regular dose study에서 병용투여시 청소율이 약간 감소하는 양상을 보였으나, microdose study에서는 변화를 보이지 않았고, 농도는 오히려 증가였음
- 잘 제어된 임상시험과 정확한 약동학 profile 획득을 위하여 대상자 교육을 철저히 하였음에도 불구하고, 이러한 현상이 나타난 이유로 i) caffeine이 이를 함유하고 있다고 알려진 커피, 콜라, 녹차 등 외에 다른 음료, 음식에도 포함될 수 있으며, 이의 조절이 어려운 점, ii) microdosing study의 특징상 투여량이 100 µg으로 매우 적으므로 혈중에 아주 작은 양의 caffeine도 약물농도 측정에 영향을 줄 수 있는 점, iii) caffeine이 반감기가 통상적으로 3~5시간으로 알려져 있고, 이를 고려하여 임상시험을 디자인 하였으나, 개인별로 청소율의 차이가 있을 수 있는 점 등이 그 이유로 논의되었음
- Microdose study에서 0시간에 관찰되는 caffeine의 농도 등으로 인하여 microdose study와 regular dose study에서 DDI 정도를 비교하여 결과를 도출하기는 어려울 것으로 판단되어 이러한 한계로 인하여 microdose와 regular dose에서의 약물상호작용 비교는 omeprazole study에서 진행하기로 함

- CPT2016-07 (substrates: omeprazole, inhibitor: fluconazole)

✓ individual plot

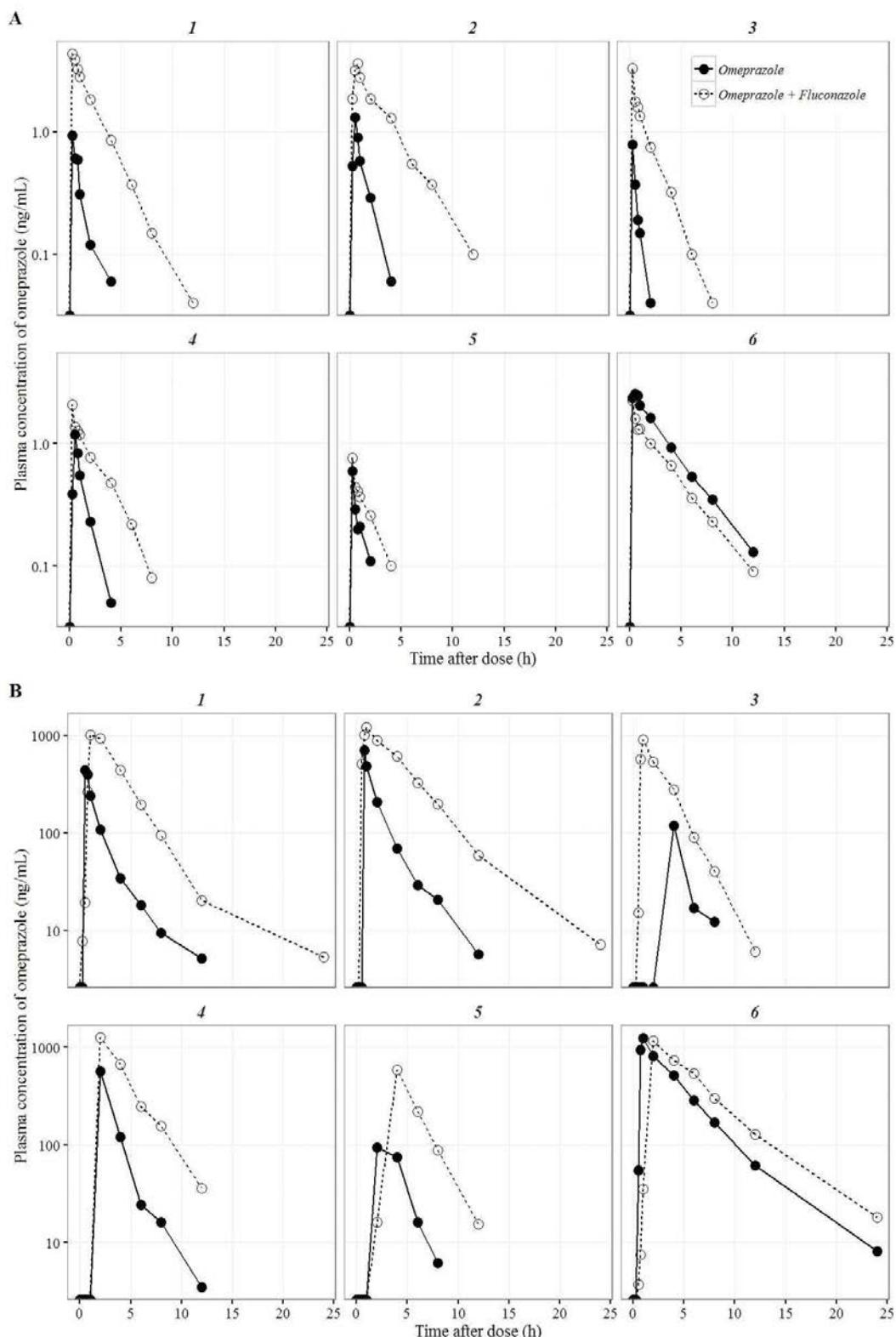


그림 53 Individual plot of omeprazole with/without fluconazole.

A) microdose B) regular dose

✓ Mean, SD plot

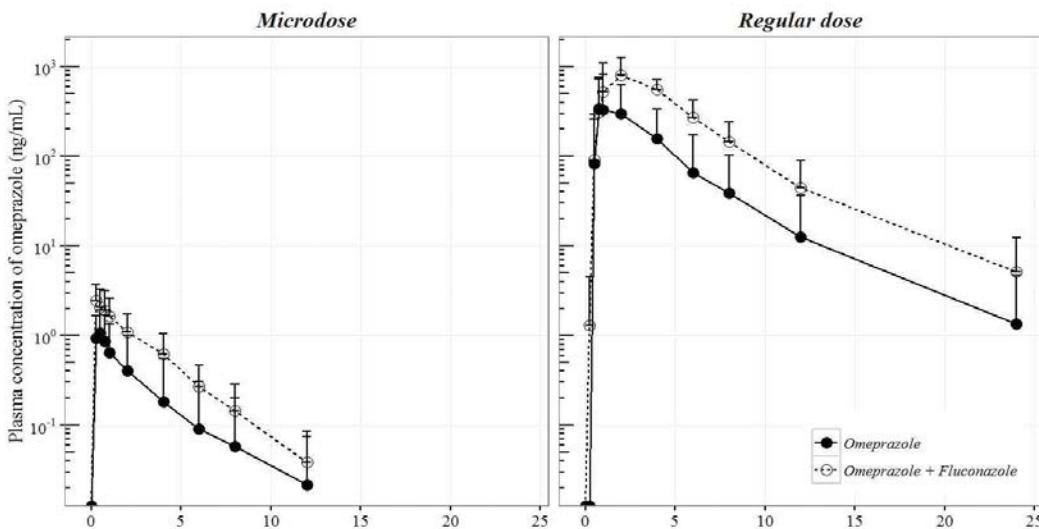


그림 54 Mean and SD plot of omeprazole with/without fluconazole

✓ Non-compartmental analysis (NCA)

표 15 PK parameters (mean \pm standard deviation) of the inhibition study

Dose	Parameters	Omeprazole	Omeprazole + Fluconazole
Microdose	C_{max} (ng/mL)	1.23 \pm 0.70	2.74 \pm 1.29
	T_{max} (h)	0.38 (0.25–0.5) ^a	0.25 (0.25–0.75) ^a
	AUC_t (ng•h/mL)	2.43 \pm 3.65	6.48 \pm 3.98
	Dose-normalized AUC_t ^b	24.3	64.8
	AUC_{inf} (ng•h/mL)	2.59 \pm 3.82	6.70 \pm 4.00
	$Half-life$ (h)	1.21 \pm 0.78	1.93 \pm 0.62
Regular dose	C_{max} (ng/mL)	528.49 \pm 426.85	1016.94 \pm 249.96
	T_{max} (h)	1.5 (0.5–4) ^a	1.5 (1–4) ^a
	AUC_t (ng•h/mL)	1403.70 \pm 1743.91	4027.94 \pm 1705.59
	Dose-normalized AUC_t ^b	70.19	201.40
	AUC_{inf} (ng•h/mL)	1647.75 \pm 1863.00	4097.78 \pm 1730.87
	$Half-life$ (h)	2.40 \pm 0.93	2.53 \pm 1.01
F_{rel} ^c		0.35	0.32

Notes:^amedian (minimum-maximum); ^bThe values were based on 1mg caffeine; ^crelative bioavailability $F_{rel} = \text{Dose-normalized } AUC_{t(\text{microdose})}/\text{Dose-normalized } AUC_{t(\text{regular dose})}$

Abbreviations: AUC_{inf} , area under the plasma concentration-time curve from zero extrapolated to infinite time; AUC_t , area under the plasma concentration-time curve from zero until last measurable concentration; C_{max} , maximum plasma concentration

✓ 결과

- 대상자 6명 중 5명에서 fluconazole과 병용투여의 경우 Cmax와 AUC가 microdose, regular dose study 모두에서 증가하였음
- Camx, AUC의 증가가 없는 1명의 대상자는 (6번 대상자) CYP2C19에 대하여 poor metabolizer로 의심됨
- Mean plot에서 omeprazole의 농도가 fluconazole에 의하여 AUC, Cmax가 증가한 것으로 보이나, 반감기에 변화가 없는 것으로 볼때, 이는 omeprazole의 고변동성, 적은 대상자 수에 기인한 것으로 판단되고, individual plot에서 반감기가 증가한 양상을 확인할 수 있음

- CPT2016-08 (substrates: omeprazole, inhibitor: rifampin)

✓ individual plot

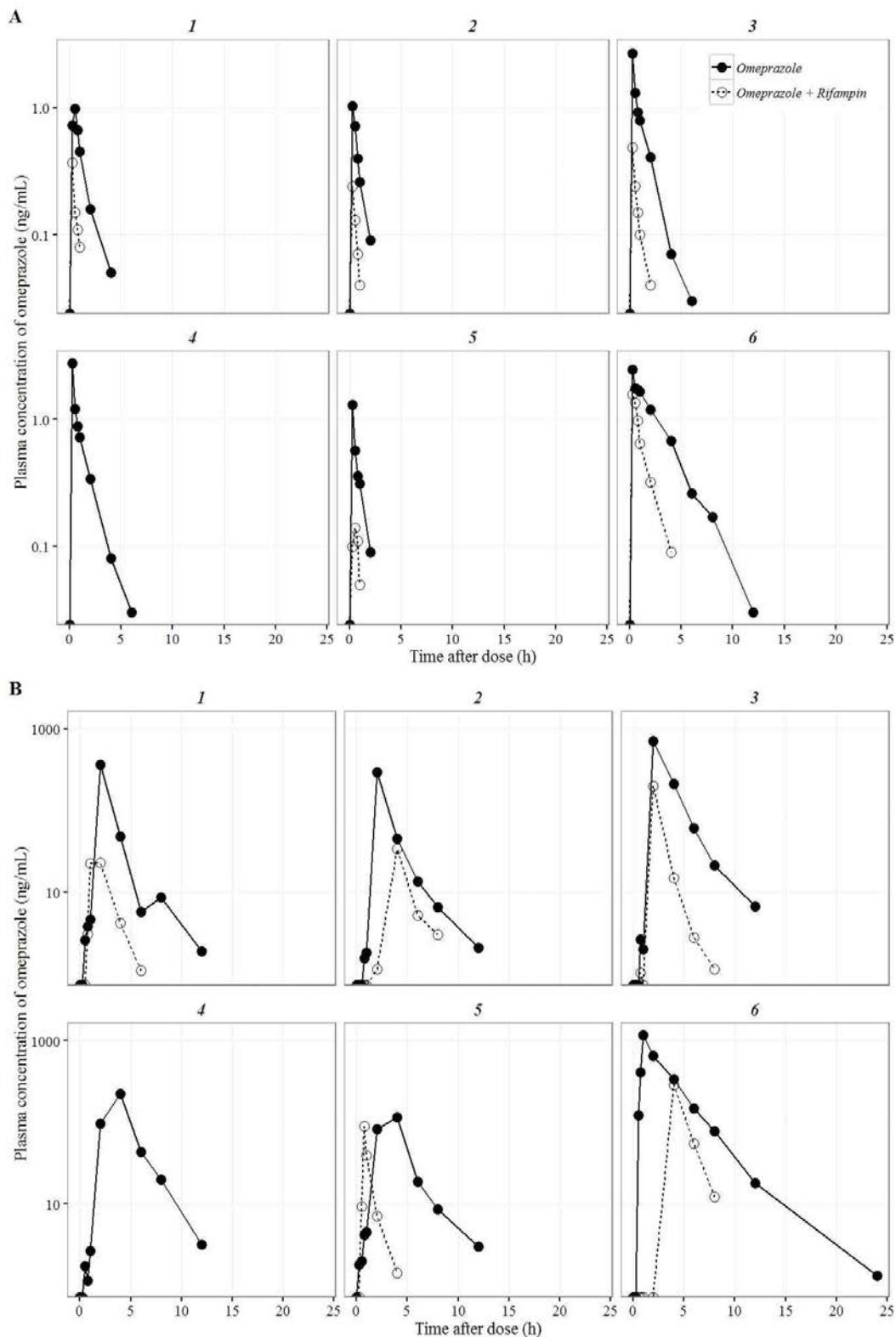


그림 55 Individual plot of omeprazole with/without rifampin

A) microdose B) regular dose

✓ Mean,SD plot

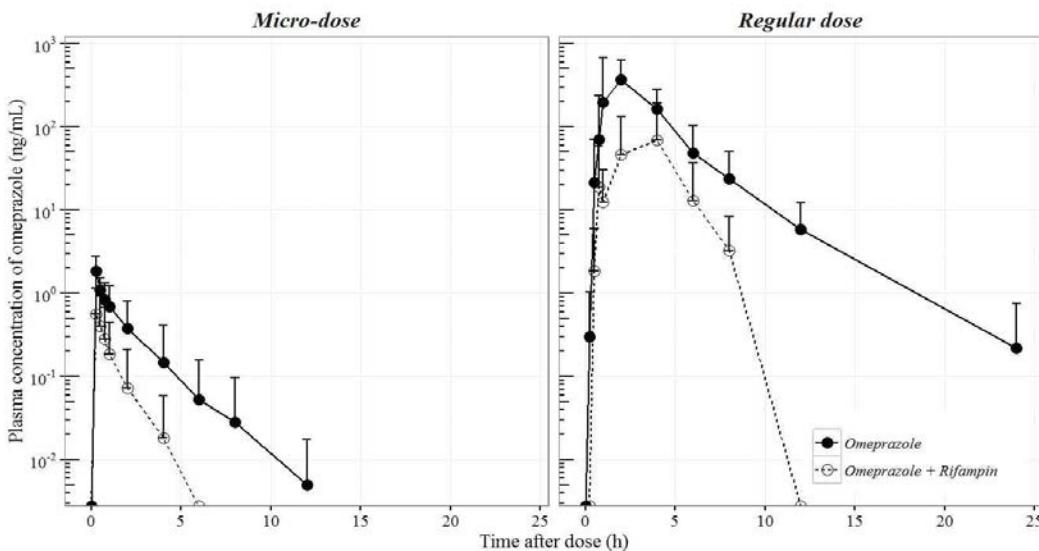


그림 56 Mean and SD plot of omeprazole with/without rifampin

✓ Non-compartmental analysis (NCA)

표 16 PK parameters (mean \pm standard deviation) of the induction study

Dose	Parameters	Omeprazole	Omeprazole + Rifampin
Microdose	C_{max} (ng/mL)	1.88 \pm 0.85	0.56 \pm 0.58
	T_{max} (h)	0.25 (0.25–0.5) ^a	0.25 (0.25–0.5) ^a
	AUC_t (ng•h/mL)	2.39 \pm 2.27	0.53 \pm 0.80
	Dose-normalized AUC_t ^b	23.9	5.3
	AUC_{inf} (ng•h/mL)	2.46 \pm 2.28	0.70 \pm 0.93
	Half-life (h)	1.01 \pm 0.50	0.65 \pm 0.32
Regular dose	C_{max} (ng/mL)	480.81 \pm 393.83	127.48 \pm 114.64
	T_{max} (h)	2 (1–4) ^a	2 (0.75–4) ^a
	AUC_t (ng•h/mL)	1228.31 \pm 1072.06	248.73 \pm 278.96
	Dose-normalized AUC_t ^b	61.42	12.44
	AUC_{inf} (ng•h/mL)	1239.19 \pm 1072.14	195.80 \pm 62.80
	Half-life (h)	2.12 \pm 0.38	0.30 \pm 0.65
F_{rel} ^c		0.39	0.43

Notes:^amedian (minimum–maximum); ^bThe values were based on 1mg caffeine; ^crelative bioavailability $F_{rel} = \text{Dose-normalized } AUC_{t(\text{microdose})}/\text{Dose-normalized } AUC_{t(\text{regular dose})}$

Abbreviations: AUC_{inf} , area under the plasma concentration–time curve from zero extrapolated to infinite time; AUC_t , area under the plasma concentration–time curve from zero until last measurable concentration; C_{max} , maximum plasma concentration

✓ 결과

- 6명 중 1명이 중도탈락하였고 5명의 대상자에서 rifampin과 병용투여의 경우 Cmax와 AUC가 microdose, regular dose study 모두에서 감소하였음
- Individual plot뿐 아니라 mean plot에서도 단독투여에 비하여 병용투여시 Cmax, AUC가 감소하고, 또한 반감기가 감소하는 것이 관찰되었음
- 이는 rifampin에 의한 CYP1A2가 유도되어 나타나는 현상으로 판단됨

□ 결과의 의의

- ✓ Caffeine 임상시험의 경우 예상보다 baseline caffeine 농도가 높게 관찰되어 regular dose, microdose study에서 DDI 정도를 판단하기 어려운 상황으로 판단되어, omeprazole을 이용한 inhibition study, induction study에 국한하여 연구를 진행하기로 하고, caffeine은 baseline correction을 진행한 후 혼합효과 모델링을 추가적으로 진행하기로 함
- ✓ Omeprazole inhibition study, induction study 각각에서 Cmax, AUC의 GMR(geometric mean ratio)로 판단한 DDI 정도는 microdose study와 regular dose study 간에 통계적으로 유의한 차이가 없었음 (표 20, 그림 58 참조)

표 17 GMR of omeprazole C_{max} and AUC_t in the inhibition and induction studies

Treatment	Parameters	Dose	Omeprazole Alone ^a	With Perpetrator ^a	GMR ^b	Paired <i>t</i> -test ^c (<i>p</i> -value)
			(day 0 or 1)	(day 8 or 9)		
Inhibition	C_{max} (ng/mL)	Microdose	1.1	2.39	2.171	0.4593
		Regular dose	367.44	986.1	2.683	
	AUC_t (ng•h/mL)	Microdose	1.27	5.14	4.065	0.5143
		Regular dose	854.9	3702.38	4.331	
Induction	C_{max} (ng/mL)	Microdose	1.71	0.4	0.232	0.9615
		Regular dose	364.46	87.78	0.229	
	AUC_t (ng•h/mL)	Microdose	1.74	0.25	0.146	0.8040
		Regular dose	944.97	148.41	0.157	

Notes: Notes:^aGeometric mean; ^bGeometricmeanratio=Withperpetrator/Omeprazolealone;^cPaired*t*-test comparing GMR of PK parameters in microdose and regular dose conditions.

Abbreviations: AUC_t , area under the plasma concentration-time curve from zero until last measurable concentration; C_{max} , maximum plasma concentration

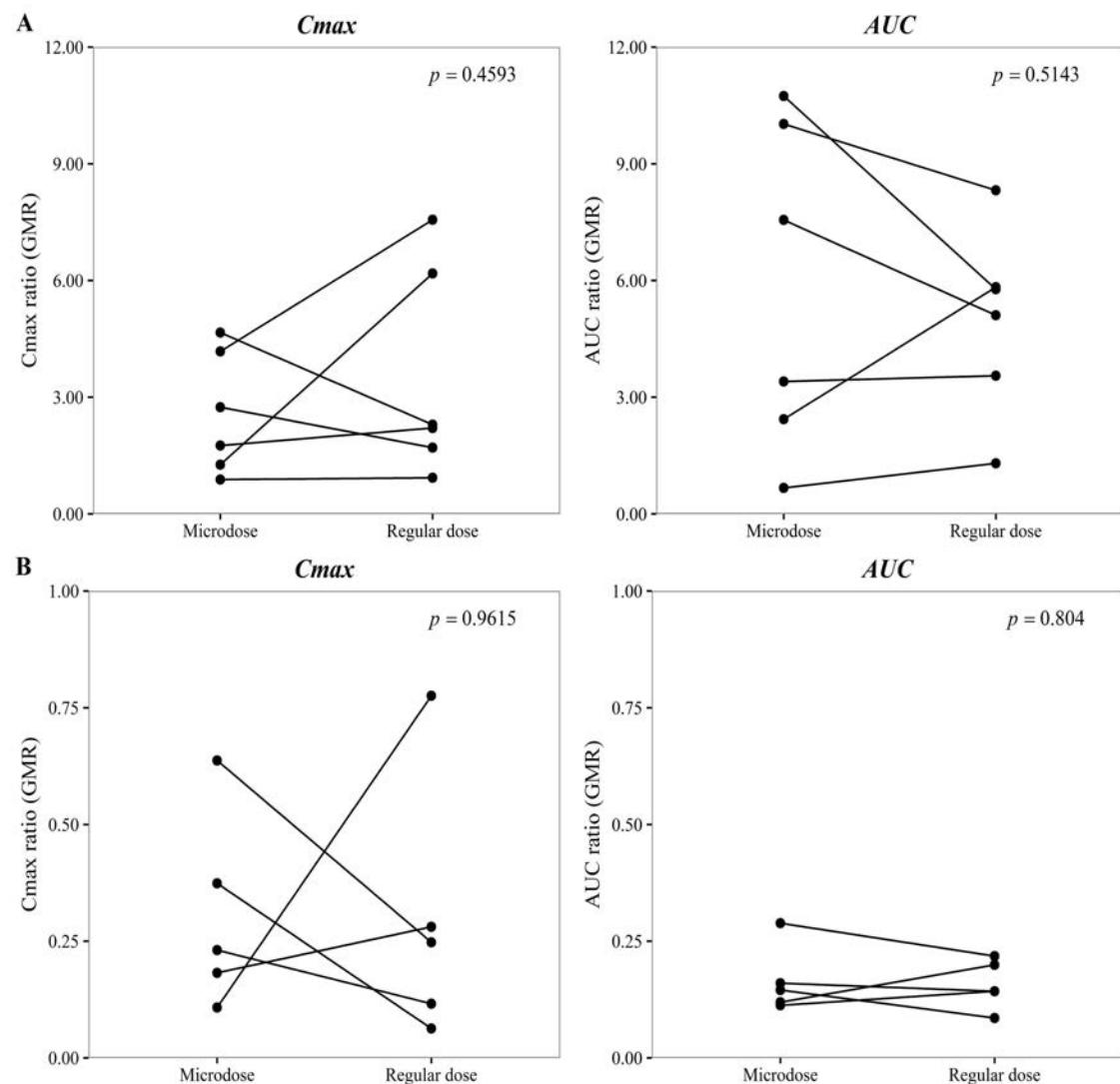


그림 57 Omeprazole PK parameter ratios (GMR) of DDI
Inhibition study with fluconazole (A); induction study with rifampin (B)
Paired *t*-test comparing GMR of PK parameters in microdose and regular dose
conditions.

○ 혈중 약물 농도 데이터 분석 - 혼합효과모델링

- 본 단계 수행을 위한 data exploration 단계에서 caffeine의 induction, inhibitions study에 대하여 data에 한계가 있음이 확인되어, omeprazole data에 대하여 용량별, DDI 별로 분리하여 각각 modeling하기로 함
- 이후 induction, inhibitions study data를 모두 이용하여 modeling 하여 DDI 유무, DDI 정도를 modeling을 통하여 확인하고자 함

- Regular dose, 1st order absorption, 1-compartment model

- ✓ Omeprazole의 기본 model을 확인하고 dose간의 차이와 DDI 정도를 확인하기 위하여 기본 model로 1st order absorption, 1-compartment model로 적합하였음

표 18 OFV and PK parameters for model 208

Control file	OFV	Theta1	Theta2	Theta3	Theta4	Eta1	Eta2	Eta3
		CL (L/hr)	V (L)	KA (hr^{-1})	LAG(hr)	CL	V	KA
208	890.911	27	58.9	1.04	0.23	0.614	0.452	0.663

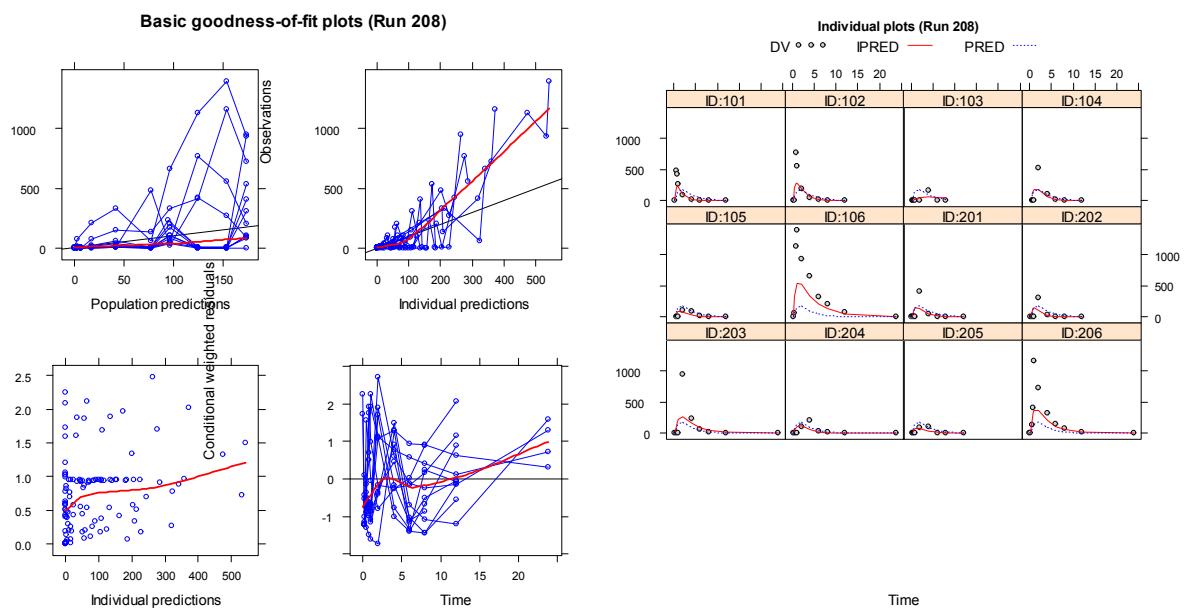


그림 58 GOF and individual plots for model 108

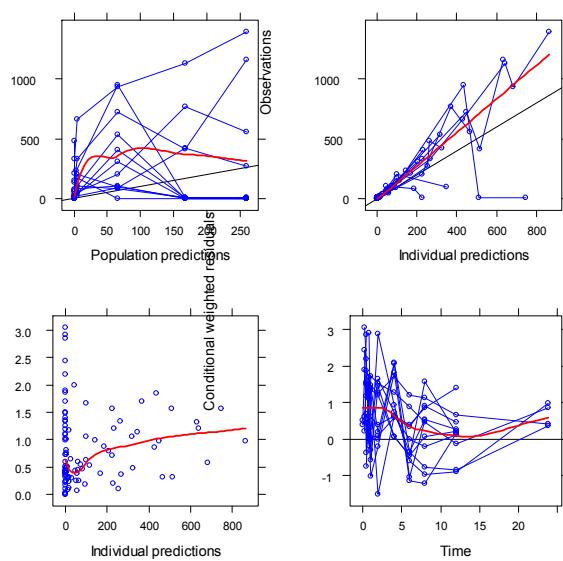
- Regular dose, zero-order absorption, 1-compartment model

- ✓ 흡수기의 PK profile의 양상과 문헌 조사에 의하여 zero-order absorption model 을 적용함

표 19 OFV and PK parameters for model 315

Control file	OFV	Theta1	Theta2	Theta3	Theta4	Eta1	Eta2	Eta3	Eta4
		CL (L/hr)	V (L)	D1 (hr)	ALAG(hr)	CL	V	D1	ALAG
315	715.471	75	54.7	0.393	0.544	1.13	0.434	0.0158	0.646

Basic goodness-of-fit plots (Run 315)



Individual plots (Run 315)

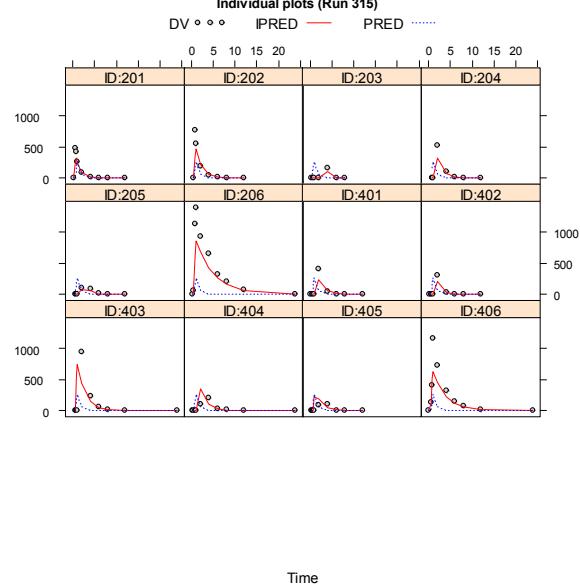


그림 59 GOF and individual plots for model 315

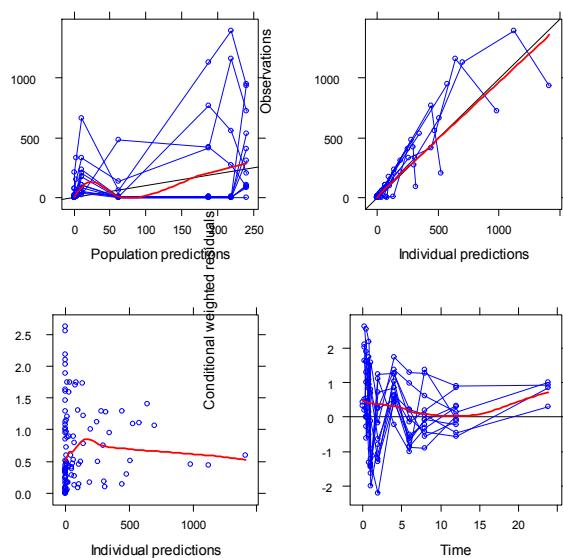
- Regular dose, zero-order absorption, 2-compartment model

- ✓ 이전 model의 goodness of fit plot에서 CWRES가 terminal phase에서 under-prediction 소견을 보이므로 구조 모델에 2-compartment model을 적용함
- ✓ 그러나 model의 개선이 뚜렷하지 않음
- ✓ 문현값 등을 고려하여 zero-order absorption, 2-compartment model을 적용하기로 함

표 20 OFV and PK parameters for model 409

Control file	OFV	Theta1	Theta2	Theta3	Theta4	Theta5	Theta6	Eta1	Eta2	Eta5	Eta6
		CL (L/hr)	VC (L)	VP (L)	Q(L/hr)	D1 (hr)	ALAG (hr)	CL	V	D1	ALAG
409	746.98	38.8	7.55	7.05	5.51	2.02	0.445	0.931	0.4	0.113	0.324

Basic goodness-of-fit plots (Run 409)



Individual plots (Run 409)

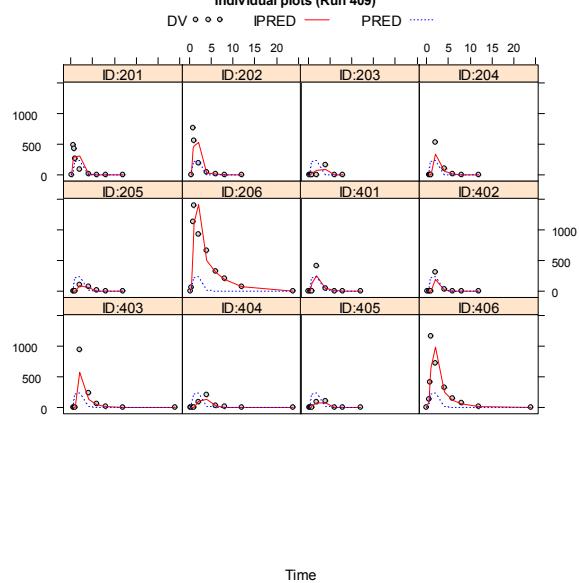


그림 60 GOF and individual plots for model 409

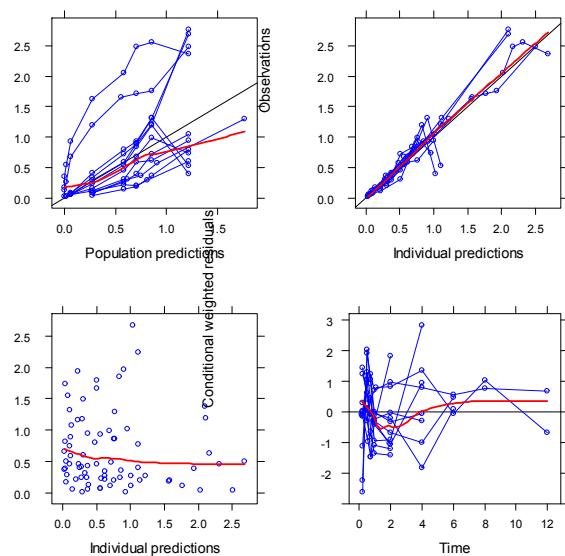
- Micro dose, zero-order absorption, 2-compartment model

✓ Regular dose model을 기본으로 microdose model을 적합함

표 21 OFV and PK parameters for model 303

Control file	OFV	Theta1	Theta2	Theta3	Theta4	Theta5	Theta6	Eta1	Eta2
		CL (L/hr)	VC (L)	VP (L)	Q(L/hr)	D1 (hr)	ALAG (hr)	CL	V
303	-366.5	37.5	4.84	25.7	47.9	0.00103	0.445	0.452	0.933

Basic goodness-of-fit plots (Run 303)



Individual plots (Run 303)

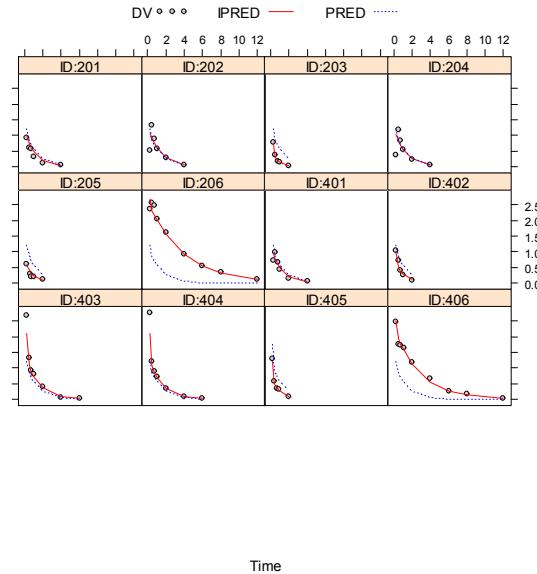


그림 61 GOF and individual plots for model 303

- Omeprazole regular dose, zero-order absorption, 2-compartment model

- ✓ 지금까지 진행된 기본 model(zero-order absorption, 2-compartment model)로 omeprazole data를 적합시킴
- ✓ Individual plot은 어느 정도 예측하나 goodness of fit plot에서 적합이 어려움을 확인함
- ✓ Data 양의 절대 부족으로 population modeling을 진행하기에 어려움이 있음을 확인함

표 22 OFV and PK parameters for model 3214

Control file	OFV	Theta1	Theta2	Theta3	Theta4	Theta5	Theta6	Eta1
		CL (L/hr)	VC (L)	VP (L)	Q(L/hr)	D1 (hr)	ALAG (hr)	CL
3214	305.848	47.8	0.0172	28.8	29.6	0.00998	0.0101	0.526

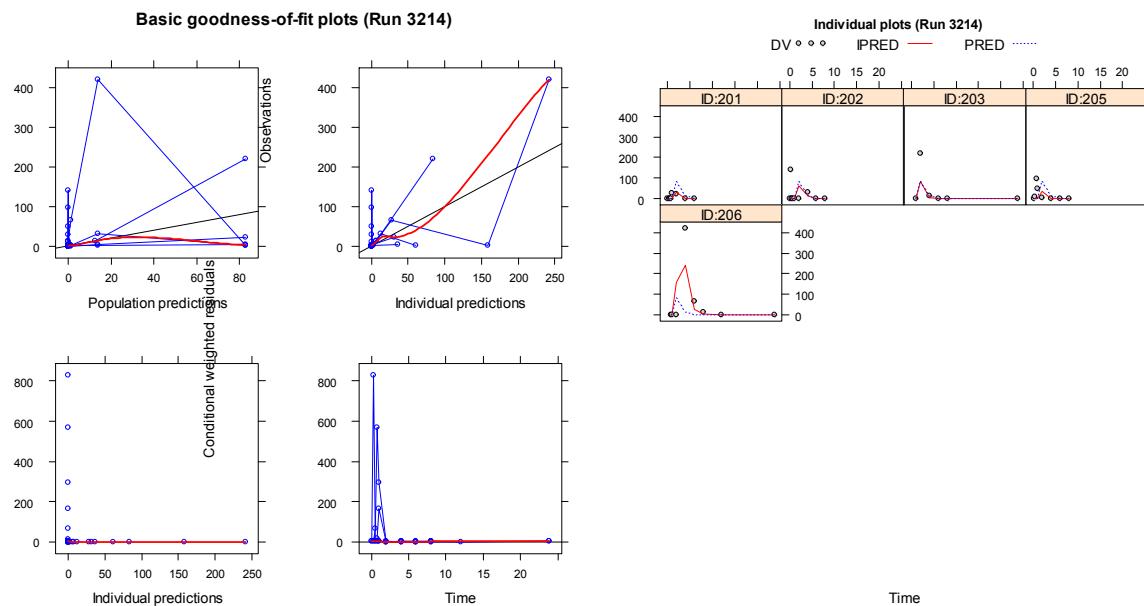


그림 62 GOF and individual plots for model 3214

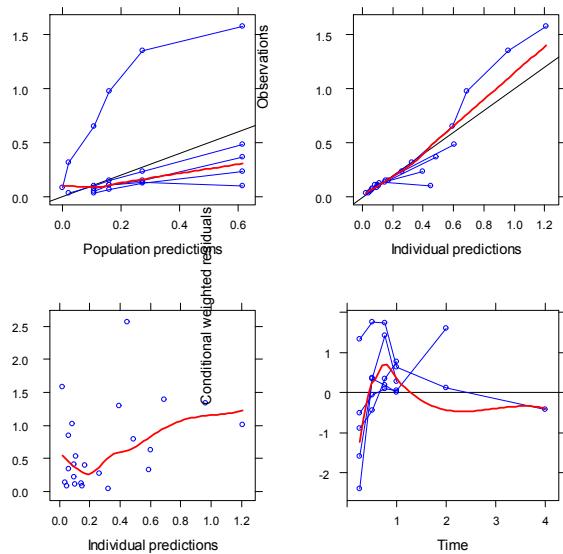
- Omeprazole microdose dose, zero-order absorption, 2-compartment model

- ✓ 지금까지 진행된 기본 model(zero-order absorption, 2-compartment model)로 omeprazole data를 적합시킴
- ✓ Omeprazole microdose는 solution 형태로 투약하였으므로, 흡수에 대한 lag-time 을 제외하고 parameter를 추정함
- ✓ 현재의 모델로 추정한 parameter가 적절치 않은 것으로 판단되는데, 이는 구조모델의 문제라기보다는 data의 양이 절대적으로 부족하기 때문에 발생하는 현상으로 판단됨

표 23 OFV and PK parameters for model 3214

Control file	OFV	Theta1	Theta2	Theta3	Theta4	Theta5	Eta1
		CL (L/hr)	VC (L)	VP (L)	Q(L/hr)	D1 (hr)	CL
3102	-131.735	220	1	68	205	0.494	0.571

Basic goodness-of-fit plots (Run 3102)



Individual plots (Run 3102)

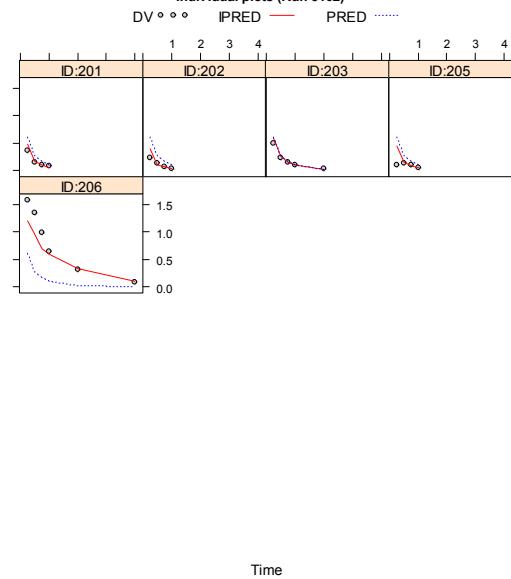


그림 63 GOF and individual plots for model 3102

문제점

- ✓ 지금까지 진행된 기본 model(zero-order absorption, 2-compartment model)로 micro dose, regular dose omeprazole data 전체를 modeling 하였으나, data의 양의 절대적인 부족에 비하여 추정하는 parameter가 많아 더 이상 진행이 어려울 것으로 판단하고, 최종 모델을 선정하지는 못함
- ✓ Regular dose study의 경우 기존의 문헌과 마찬가지로 zero-order absorption, 2-compartment model이 잘 적합하였음
- ✓ 그에 비하여 Microdose study의 경우 데이터의 variability가 심할뿐 아니라 정보의 양도 부족하고, 일반적으로 투여되는 형태인 정제 혹은 캡슐이 아닌 solution으로 투여하였으므로, regular dose에서 선택된 model이 잘 적합하지 않았음
- ✓ Regular dose study에서 선택된 기본 모델과 microdose study의 적합을 위한 model이 동일하지 않다면, 전체 data를 모두 적합하는 한 model 내에서 직접 비교가 어려울 것으로 판단하였음

○ 결론

- 비구획분석시 microdose study와 regular dose study 사이에 DDI 정도는 통계적으로 차이가 없었음
- 이 사실로 microdose study가 DDI의 판단할 근거가 될 수 있다고 확정할 수 있으나, 신약 개발 과정 중 비임상 단계에서 임상 단계로 진행하는 도중의 탐색적 연구로서 DDI 유무를 판단하는 근거로서는 어느 정도 역할을 할 수 있을 것으로 판단됨
- 추가적인 연구를 통하여 DDI에서 microdose study의 가능성을 넓힐 수 있을 것으로 판단됨
- 혼합효과모델링은 dose 별 modeling은 진행하였으나 data의 부족으로 전체 data에는 적합하지 못하였음
- 향후 hot compound를 이용한 AMS 임상시험으로 좀 더 정교한 약물농도를 확보한다면 추가적인 연구가 가능할 것임

3-2-3. 제 2세부과제

가. 요약서

과제명	High Throughput 마이크로도징 시료 전처리 기술개발 및 약물 상호작용 예측을 위한 생리학적 기반 약동학 모델기술 개발		
세부책임자	SHIN YOUNG GEUN	세부연구기관	충남대학교
연구목표	High Throughput 마이크로도징 시료 전처리 기술개발 및 약물 상호작용 예측을 위한 생리학적 기반 약동학 모델기술 개발을 통해 핵심 글로벌 임상시험 중 하나인 합성신약의 약물-약물 상호작용 임상시험 기간과 비용을 획기적으로 단축하는 첨단 융복합 임상 및 분석 핵심기술을 개발함을 목표로 함.		
연구내용	<p>1차년도~2차년도: High Throughput 마이크로도징 시료 전처리 기술 개발 및 생리학적 기반 약동학 기법을 사용한 약물대사 억제 예측 혁신 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 외국 AMS CRO의 시료 전처리 기법 도입을 통해 high throughput 마이크로 도징 시료 전처리법 확립 (1차년도) - 생리학적 기반 약동학 모델을 지원하는 in silico program (예: GastroPlus)을 사용하여 임상에 사용될 대표기질 물질들의 in silico PBPK 모델을 확립하고, 이를 기준의 CYP450 억제제 또는 P-glycoprotein 억제제와 함께 static drug-drug interaction 및 dynamic drug-drug interaction을 US FDA DDI guidance 또는 EMA DDI guideline 체계적으로 평가함 (2차년도). <p>3차년도: 약물-약물 상호작용 임상시험 중 약물대사 유도 예측 혁신 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 개발된 시료 전처리법을 사용하여 마이크로도징을 사용한 약물대사 유도 예측 임상시험 지원. - 일정기간 CYP450 유도제 또는 P-glycoprotein 유도제를 반복 투여한 후, CYP450/P-glycoprotein 대표 기질 물질들을 투여하여 약동학적 파라미터 관찰하고 이를 투여전의 약동학적 파라미터와 비교하여 약물대사 유도 여부를 조사함. - 생리학적 기반 약동학 모델을 지원하는 in silico program (예: GastroPlus)을 사용하여 상기 대표기질 물질들의 in silico 모델을 확립하고, 이를 기준의 CYP450유도제 또는 P-glycoprotein 유도제와 함께 static drug-drug interaction 및 dynamic drug-drug interaction을 in silico program을 사용하여 US FDA DDI guidance 또는 EMA DDI guideline 에 따라 체계적으로 평가함. 		
연구개발에 따른 기대성과	<ul style="list-style-type: none"> - 본 연구개발에 의해 개발될 혁신 약물 상호작용 (drug-drug interaction, DDI) 평가법을 통해 적은 비용으로 보다 효율적인 약물 상호 작용 임상시험 수행 가능함. - 이를 통해 한국 제약업계의 글로벌 신약개발에 필요한 비용과 시간을 획기적으로 단축 가능. - 개발된 High throughput 마이크로도징 시료 전처리법은 특히 다른 임상시험센터 및 CRO에 인프라 기술이전 사업도 가능하고 이를 통한 기술료 수입도 기대 가능함. 		

나. 연구 내용 및 결과

- CYP 1A2 에 대한 대표기질 물질인 caffeine을 14C-표지화시킴.

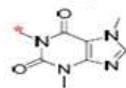
CURACHEM

Curachem, Inc. #837 Mecha-zone, 117, Hwanggeum-ro, Yangchon-eup, Gimpo-si, Gyeonggi-do 415-843,
Korea
Phone : +82-31-999-7663 ; Fax : +82-31-999-7669
E-mail : yekim@curachem.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

(non-GMP, For Research Use Only)

Project No. C-0306



* denotes ^{14}C label

PRODUCT NAME : [1-methyl- ^{14}C]Caffeine

MOLECULAR FORMULA : $^{14}\text{C}_7\text{H}_{10}\text{N}_4\text{O}_2$

MOLECULAR WEIGHT : 195.79 (at this specific activity)

LOT NUMBER : K0406-01

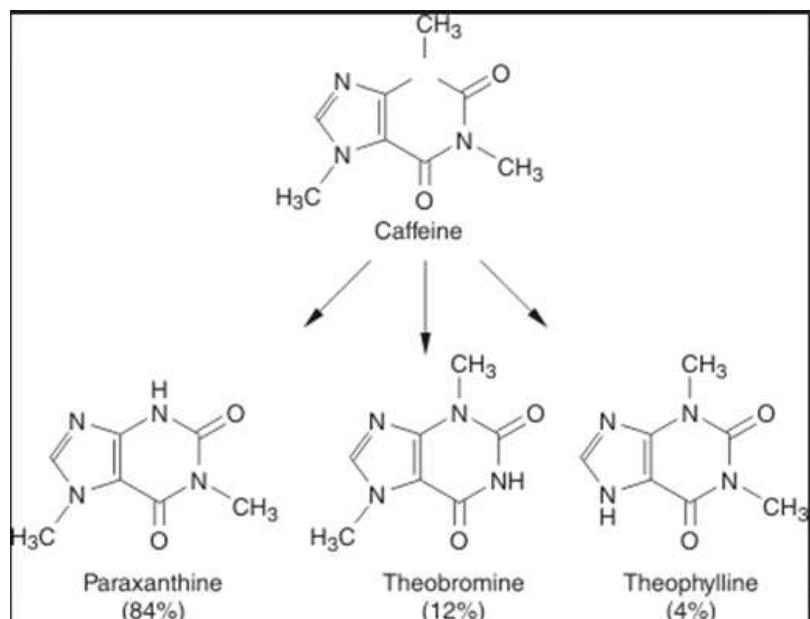
DATE OF ANALYSIS : July 07, 2015

DATE OF RETEST : July 06, 2017

SPECIFIC ACTIVITY : 50 mCi/mmol

∴ Caffeine에 14C 표지화 완료.

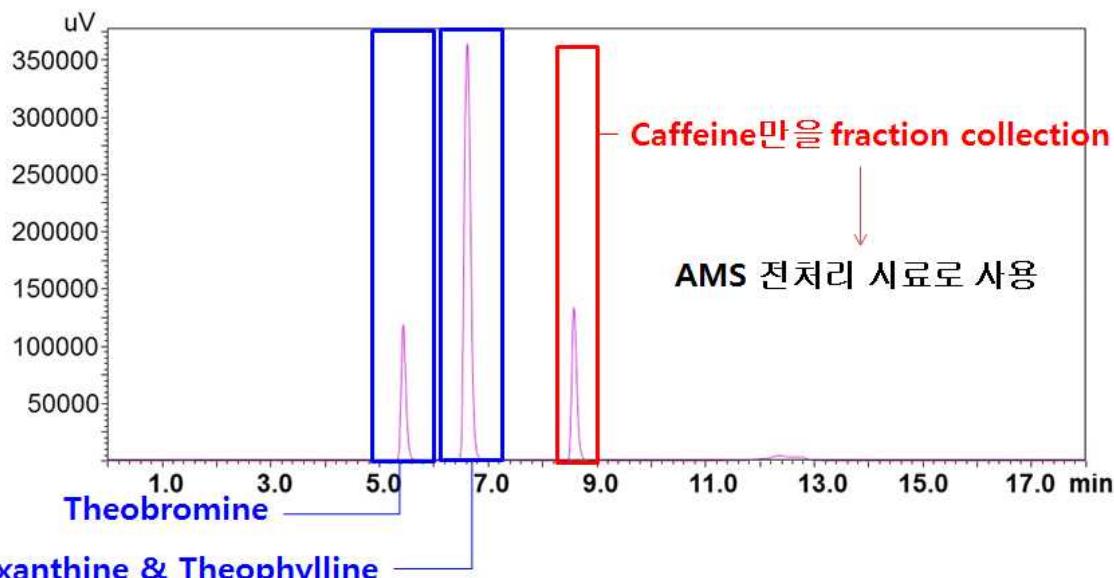
- 극미량의 14C-표지화 물질을 CYP 1A2 억제제인 ciprofloxacin과 함께 대상 피험자에 마이크로 도징 투여 후 일정기간 채혈한 샘플 중 caffeine의 모체 약물만을 분획 채취하는 방법 확립.



∴ Caffeine의 모체 약물만을 분리하기 위한 대사체 검색 완료.

LC-UV condition (Caffeine)	
Column	Phenomenex, Synergi 4um, Hydro-RP 2x50 mm
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	10 uL
Wave length	272 nm
Mobile phase A	DW containing 0.1% formic acid
Mobile phase B	ACN containing 0.1% formic acid
Gradient	
Time (min)	Mobile phase B %
0	0
0.5	0
12	20
12.5	20
12.6	80
14.1	80
14.2	0
16.3	0

∴ Caffeine의 모체 약물만을 분리하기 위한 LC-UV 조건 확립 완료.



∴ Caffeine의 모체 약물만을 분리하기 위한 분리 방법 확립 완료.

- CYP 2C19에 대한 대표기질 물질인 omeprazole을 ^{14}C -표지화시킴.

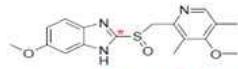
CURACHEM

Curachem, Inc. #837 Mecha-zone, 117, Hwangeum-ro, Yangchon-eup, Gimpo-si, Gyeonggi-do 415-843,
Korea
Phone : +82-31-999-7663, Fax : +82-31-999-7669
E-mail : ykim@curachem.com

CERTIFICATE OF ANALYSIS

(non-GMP, For Research Use Only)

Project No. C-0320

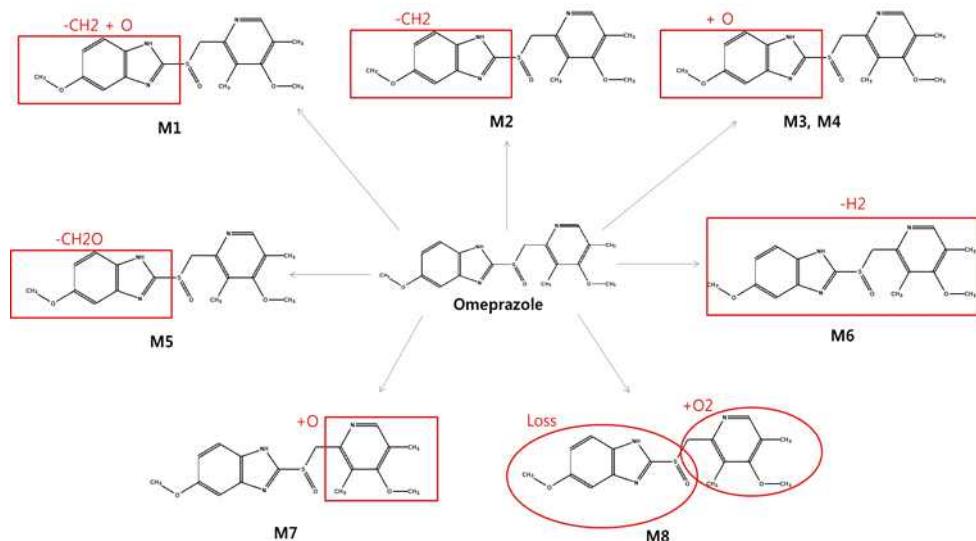


* denotes ¹⁴C label

PRODUCT NAME	:	[¹⁴ C]Omeprazole
MOLECULAR FORMULA	:	¹⁴ CC ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₃ S
MOLECULAR WEIGHT	:	347.15
LOT NUMBER	:	K0423-10
DATE OF ANALYSIS	:	October 06, 2015
DATE OF RETEST	:	October 05, 2016
SPECIFIC ACTIVITY	:	54.0 mCi/mmol by Mass

∴ Omeprazole에 ¹⁴C 표지화 완료.

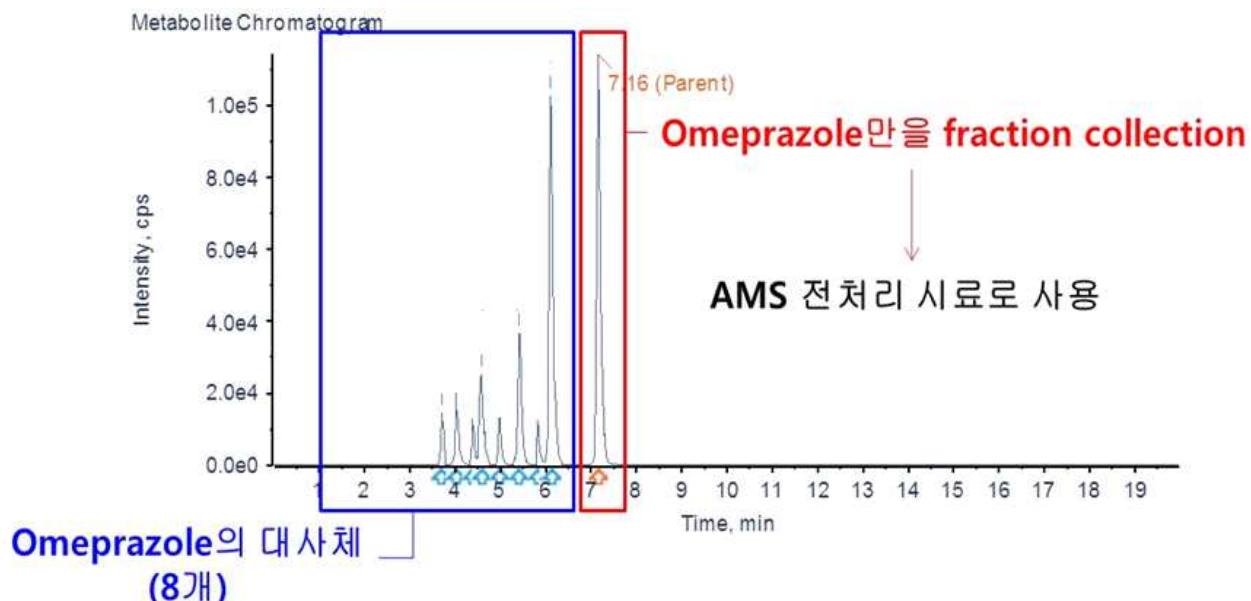
- 극미량의 ¹⁴C-표지화 물질을 CYP 2C19 억제제인 fluconazole과 함께 대상 피험자에 마이크로 도징 투여 후 일정기간 채혈한 샘플 중 omeprazole의 모체 약물만을 분획 채취하는 방법 확립.



∴ Omeprazole의 모체 약물만을 분리하기 위한 대사체 검색 완료.

LC-UV condition (Omeprazole)	
Column	Phenomenex, Synergi 4um, Hydro-RP 2x50 mm
Flow rate	0.5 mL/min
Injection volume	10 μ L
Wave length	302 nm
Mobile phase A	DW containing 0.1% formic acid
Mobile phase B	ACN containing 0.1% formic acid
Gradient	
Time (min)	Mobile phase B %
0	0
0.5	0
13	23
13.5	23
13.6	80
15.1	80
15.2	0
18	0

∴ Omeprazole의 모체 약물만을 분리하기 위한 LC-UV 조건 확립 완료.



∴ Omeprazole의 모체 약물만을 분리하기 위한 분리 방법 확립 완료.

- 피험자의 혈장에 존재하는 극미량의 caffeine과 omeprazole을 정량할 수 있는 혈장 전처리 법 및 분석 방법 확립

① Caffeine

1) 시료 전처리

Caffeine 표준품을 이용하여 1.0 mg/mL 농도의 stock solution을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 제조 후 이로부터 0.1 mg/mL 농도의 sub-stock solution을 제조. 제조한 sub-stock solution 으로부터 연속 희석하여 혈장에서의 최종농도가 0.102, 0.305, 0.914, 2.74, 8.23, 24.69, 74.07, 222.22, 666.66 ng/mL 농도가 되도록 검량선 곡선 제조를 위한 9 개 농도의 표준용액을 제조. 또한, 따로 제조한 0.1mg/mL 농도의 sub-stock solution을 이용하여 혈장에서의 최종농도가 1.5ng/mL (low), 16.53 ng/mL (medium), 181.82 ng/mL (high) 이 되도록 3가지 농도의 quality control (QC) 용액을 제조. 내부표준용액 제조를 위하여 동위 원소가 표지된 D9-caffeine을 이용하여 50 ng/mL 농도가 되도록 acetonitrile (ACN)에 녹여 제조.

	Final [Plasma] uL			
	Blank plasma (uL)	STD or QC (uL)	Make up (DMSO)	Final volume (uL)
STD	200	4		204
QC	200	4		204
BL/IS	200		4	204
BL/BL	200		4	204
Study sample	Sample 200		4	204

사람 공혈장 200 uL에 대하여 제조된 표준용액 및 QC용액 또는 DMSO를 4uL씩 가하여 최종 부피가 204 uL가 되도록 함.

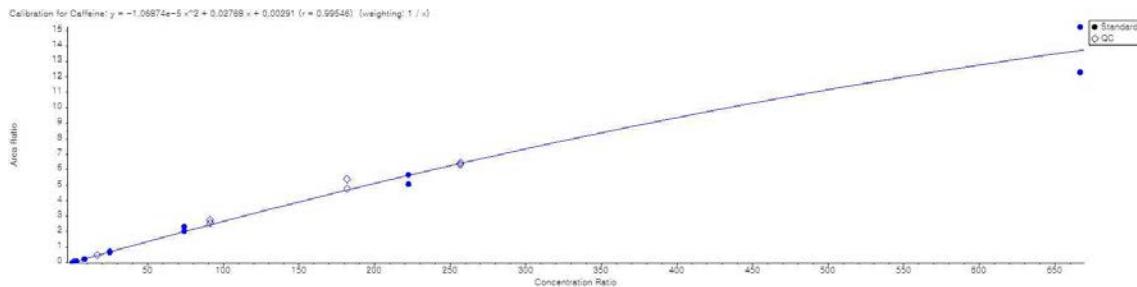
만들어진 각 용액에 대하여 1 mL에 해당되는 내부 표준품을 가하여 재단백을 진행 후 원심 분리를 통해 상층액 1 mL만을 다른 용기에 옮김. 상층액이 담긴 용기에 대하여 증발 건조를 4시간 이상 진행하여 용액이 모두 기화되도록 함. 증발 건조가 완료되면 33.3%의 ACN이 포함된 증류수를 70 uL 가하여 용기의 기벽에 붙은 caffeine을 추출함. 추출된 caffeine 용액에 대하여 다시 원심분리를 진행하고 상층액 60 uL만을 분석 바이알에 옮긴 후 이 중 10uL를 액체크로마토그래피-질량분석기 (LC-MS)를 통해 분석을 진행.

2) LC-QTOF-MS 분석조건

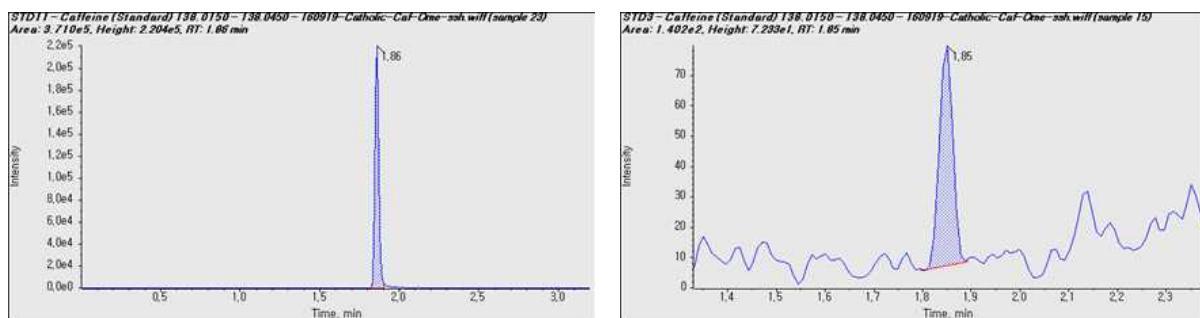
LC 조건	
컬럼	phenomenex, synergis-Hydro-RP, 2x50 mm
유속	0.8mL/min
투여량	10uL
이동상 용매A	Distilled water containing 0.1% formic acid
이동상 용매B	Acetonitrile containing 0.1% formic acid
LC-gradient time (min)	이동상 용매 B (%)
0	0
0.5	0
1.5	25
1.6	25
1.61	90
2.00	90
2.10	0
3.20	0
TOF-MS 조건	
온도	500°C
gas	30(curtain gas), 50(ion source gas)
voltage	5500V

3) 검량선 및 peak 크로마토그램

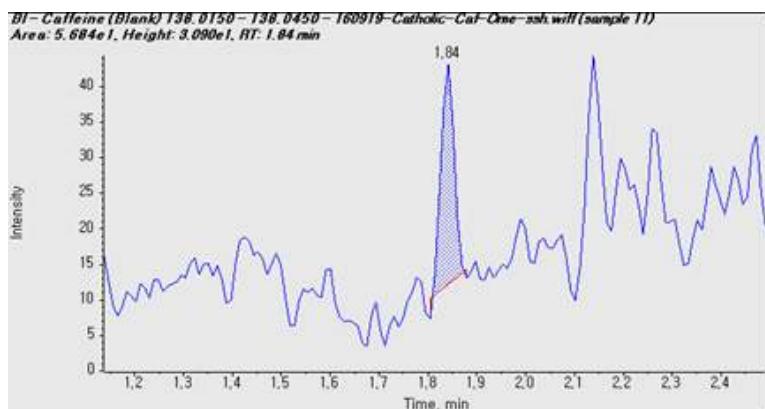
- 검량선



- LLOQ, ULOQ



- blank



② Omeprazole

Omeprazole 표준품을 이용하여 1.0 mg/mL 농도의 stock solution을 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 제조 후 이로부터 0.1 mg/mL 농도의 sub-stock solution을 제조. 제조한 sub-stock solution 으로부터 연속 희석하여 혈장에서의 최종농도가 0.034, 0.102, 0.305, 0.91, 2.74, 8.23, 24.69, 74.07, 222.22 ng/mL 농도가 되도록 검량선 곡선 제조를 위한 9개 농도의 표준용액을 제조. 또한, 따로 제조한 0.1mg/mL 농도의 sub-stock solution을 이용하여 혈장에서의 최종농도가 0.501 ng/mL (low), 5.509 ng/mL (medium), 60.606 ng/mL (high) 이 되도록 3가지 농도의 quality control (QC) 용액을 제조한다. 내부표준용액 제조를 위하여 verapamil을 이용하여 10 ng/mL 농도가 되도록 acetonitrile (ACN)에 녹여 제조.

사람 공혈장 200 uL에 대하여 제조된 표준용액 및 QC용액 또는 DMSO를 4uL씩 가하여 최

종 부피가 204 uL가 되도록 함.

	Final [Plasma] uL plasma			
	Blank plasma (uL)	STD or QC (uL)	Make up (DMSO)	Final volume (uL)
STD	200	4		204
QC	200	4		204
BL/IS	200		4	204
BL/BL	200		4	204
Study sample	Sample 200		4	204

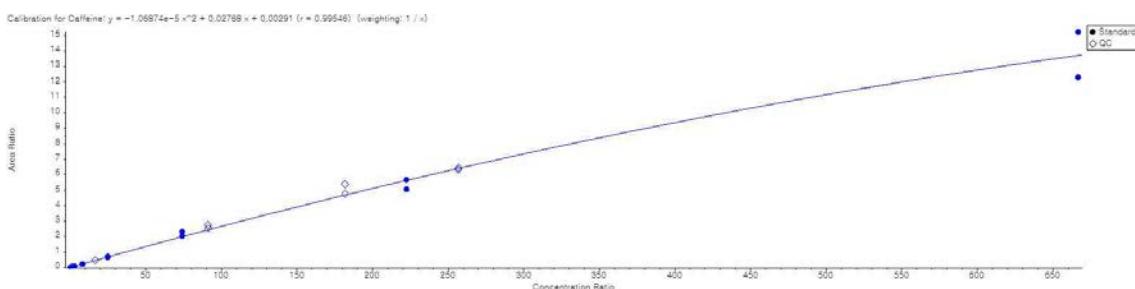
만들어진 각 용액에 대하여 1 mL에 해당되는 내부 표준품을 가하여 재단백을 진행 후 원심분리를 통해 상층액 1 mL만을 다른 용기에 옮김. 상층액이 담긴 용기에 대하여 증발 건조를 4시간 이상 진행하여 용액이 모두 기화되도록 함. 증발 건조가 완료되면 33.3%의 ACN이 포함된 증류수를 70 uL 가하여 용기의 기벽에 붙은 caffeine을 추출함. 추출된 caffeine 용액에 대하여 다시 원심분리를 진행하고 상층액 60 uL만을 분석 바이알에 옮긴 후 이 중 10uL를 액체크로마토그래피-질량분석기 (LC-MS)를 통해 분석을 진행.

2) LC-QTOF-MS 분석조건

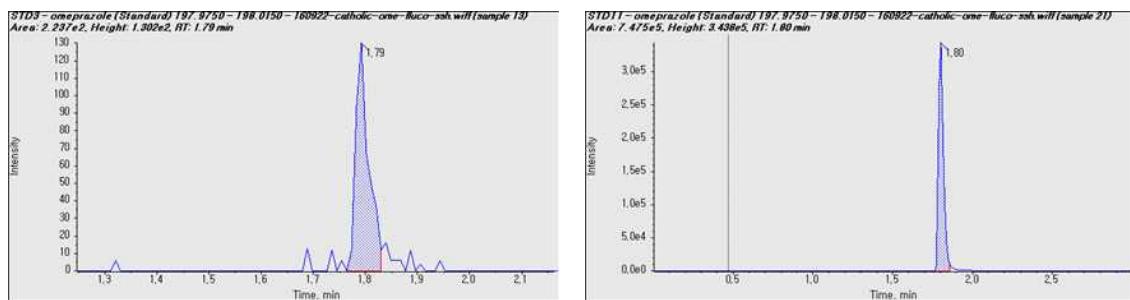
LC 조건	
컬럼	Phenomenex Phenyl-Hexyl column, 2.1 x 50mm (2.6 um)
유속	0.4 ml/min
투여량	10uL
이동상 용매A	Distilled water containing 0.1% formic acid
이동상 용매B	Acetonitrile containing 0.1% formic acid
LC-gradient	
time (min)	이동상 용매 B (%)
0	10
0.5	10
1.2	10
1.8	
1.85	90
3.00	90
TOF-MS 조건	
온도	500°C
gas	30(curtain gas), 50(ion source gas)
voltage	5500V

3) 검량선 및 peak 크로마토그램

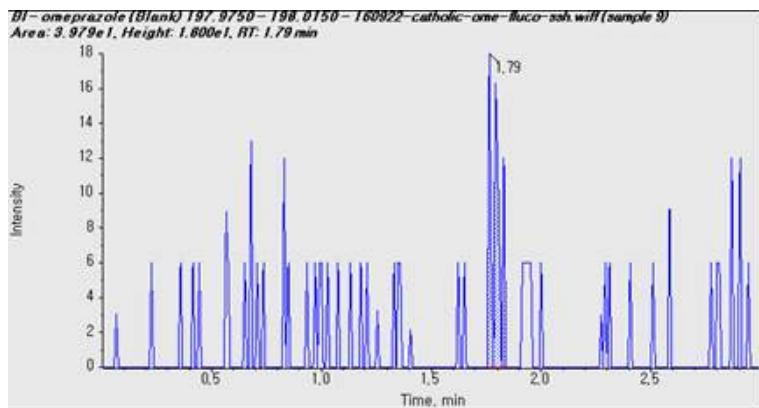
- 검량선



- LLOQ, ULOQ



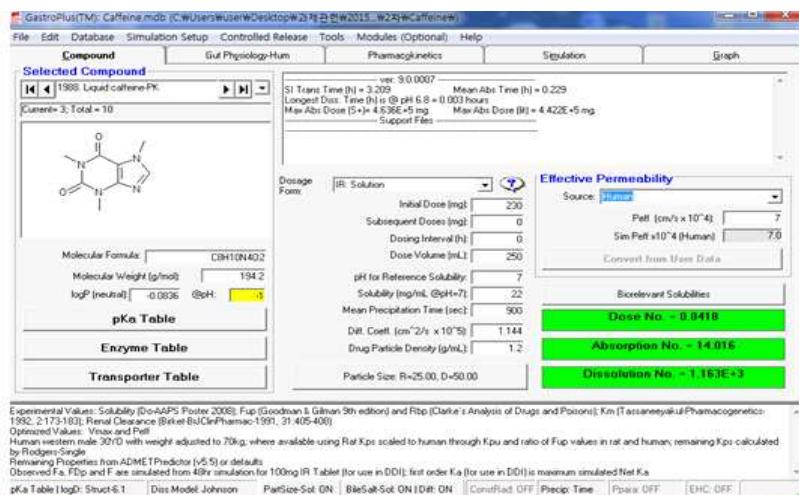
- blank



○ 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 기질 caffeine의 약동학 예측기술 탐색 완료

- 대상 논문-1 : 4-Quinolones inhibit biotransformation of caffeine, 1988

임상대상	12 healthy male volunteers (age 20-40 years, Germany)
약물 용량	230mg, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (230mg, PO, Liquid)

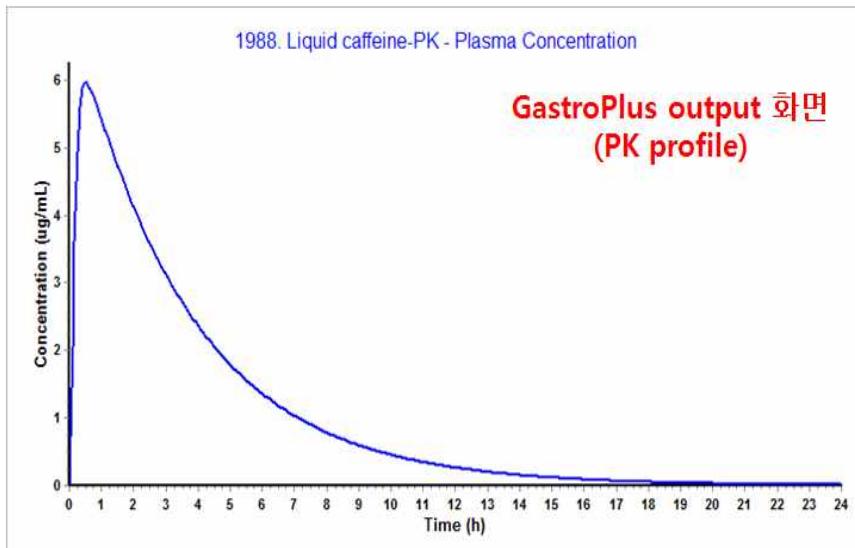


Table 3. Mean (SD) kinetic parameters of Caffeine alone and during treatment with quinolone antibiotics ($n=12$; Wilcoxon matched pairs sign rank test)

CIP	Drug	Caffeine alone				$p < 0.05$
		$t_{1/2}$ (h)	AUC (mg·h ⁻¹)	C_{max} (mg/L)	t_{last} (h)	
CIP 1	None	3.4 (1.2)	21.4 (9.2)	3.6 (1.5)	1.00 (0.50)	NS
		3.94 (0.60)	4.21 (0.59)	NS	NS	
CIP 2	None	3.4 (0.9)	22.4 (7.5)	3.9 (1.0)	1.04 (0.75)	$p < 0.05$
		4.49 (1.29)	4.88 (0.81)	NS	NS	
CIP 3	None	3.4 (1.0)	20.4 (6.8)	4.3 (1.2)	0.90 (0.40)	$p < 0.01$
		3.91 (1.06)	4.57 (0.74)	NS	NS	

* $t_{1/2}$ (h), AUC (mg·h⁻¹) dose-normalized, t_{last} (h), C_{max} (mg/L)

논문 값과의 비교

- C_{max} ratio (simulation value/experimental value)

$$= 6.0/4.1 = 1.5$$

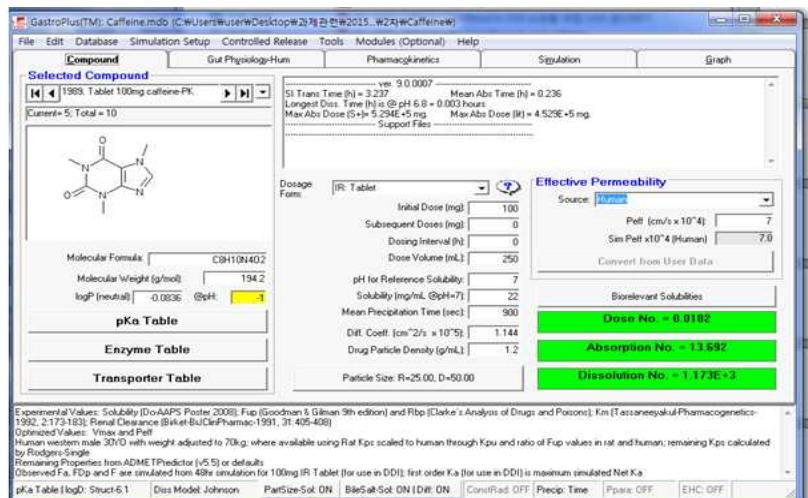
- AUC ratio (simulation value/experimental value)

$$= 24.6/21.4 = 1.1$$

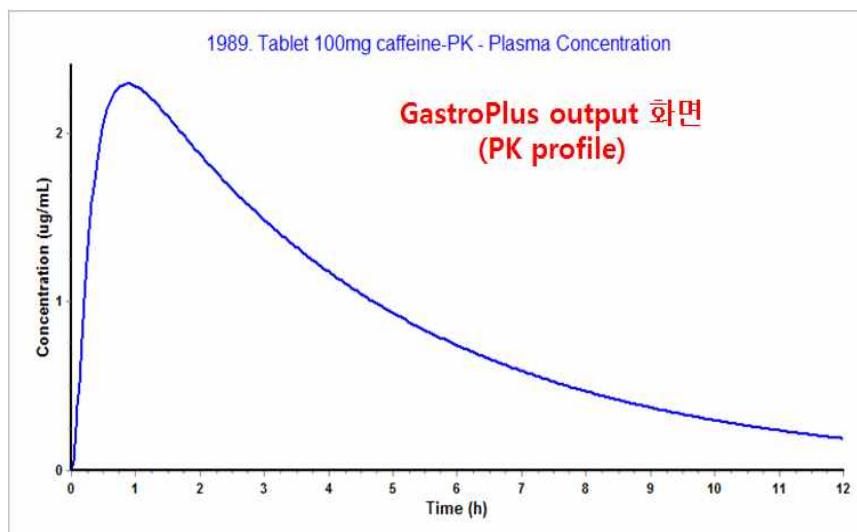
Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-2 : Interaction between Oral Ciprofloxacin and Caffeine in Normal Volunteers, 1989

임상대상	Age 26.7 ± 1.6 years, 76.3 ± 8.6kg, USA
약물 용량	100mg tablet, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (100mg, PO, Tablet)



Paper: 1989. Interaction between Oral Ciprofloxacin and Caffeine in Normal Volunteers

TABLE 1. Pharmacokinetic parameters for caffeine before and after three doses of ciprofloxacin (750 mg every 12 h)

Parameter*	Mean \pm SD		<i>P</i>
	Before ciprofloxacin	After ciprofloxacin	
<i>C</i> _{max} (ug/ml)	2.1 \pm 0.5	2.3 \pm 0.4	15 \pm 37 NS ^c
<i>T</i> _{max} (h)	1.2 \pm 0.4	1.4 \pm 0.6	25 \pm 66 NS
<i>k</i> _{el} (h ⁻¹)	0.139 \pm 0.026	0.095 \pm 0.037	-32 \pm 23 0.0003
<i>t</i> _{1/2} (h)	5.2 \pm 1.2	8.2 \pm 2.5	61 \pm 47 0.004
<i>V</i> (liters/kg)	0.67 \pm 0.19	0.62 \pm 0.16	-2 \pm 26 NS
<i>AUC_{0-∞}</i> (ug · h/ml)	16.3 \pm 6.6	25.9 \pm 7.8	67 \pm 36 <0.001
TBC (ml/min per 1.73 m ²)	106 \pm 41.6	58.2 \pm 28.8	-38 \pm 12 <0.001

* *C*_{max}, Maximum concentration of drug in serum; *T*_{max}, time to maximum concentration of drug in serum; *V*, volume of distribution; TBC, total body clearance.

^a Calculated as the mean percent change from data for individual subjects (see text).

^c NS, Not statistically significant (*P* > 0.05).

논문 간과의 비교

- Cmax ratio (simulation

$$\text{value/experimental value}) = 2.3/2.1 = 1.1$$

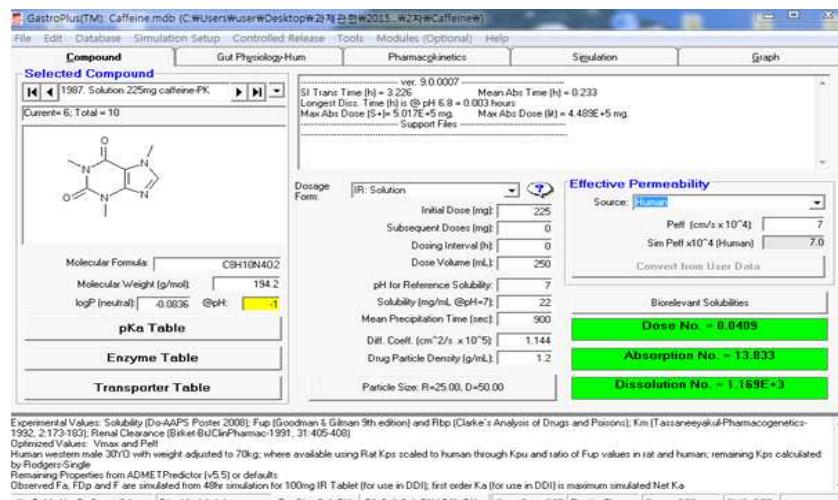
- AUC ratio (simulation value/experimental

$$\text{value}) = 11.9/16.3 = 0.73$$

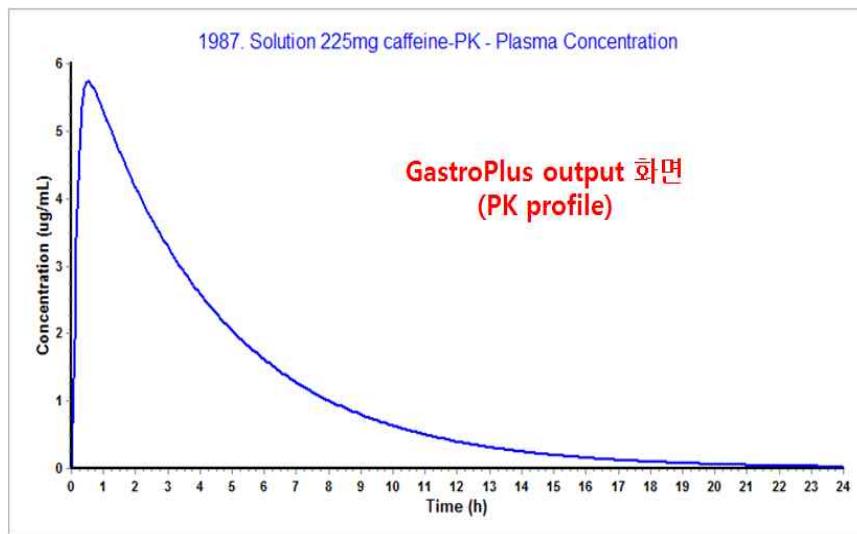
Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-3 : Interaction between quinolone and caffeine, 1987

임상대상	12 healthy male volunteers (age 24-39 years, 65-100kg, Germany)
약물 용량	220-230mg solution, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (225mg, PO, Solution)



Ciprofloxacin	
Cmax(mg/L)	4.49 ± 1.29
Tmax(h)	0.71 ± 0.26
T1/2(h)	3.4 ± 0.9
Vd(L/kg)	0.64 ± 0.11
AUC(mg*h/L)	22.4 ± 7.5
CL(L/h/kg)	0.139 ± 0.045

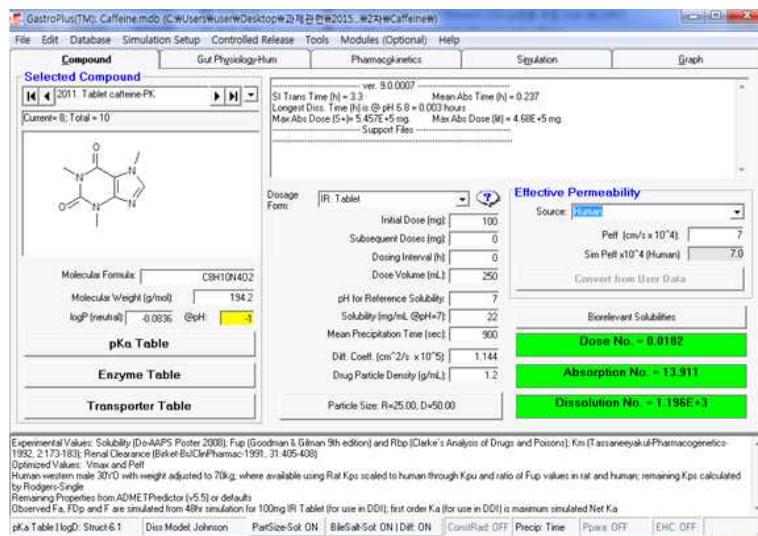
논문 값과의 비교

- Cmax ratio (simulation value/experimental value) = 5.7/4.5 = 1.3
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 27.1/22.4 = 1.2

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-4 : Pharmacokinetics of caffeine in plasma and saliva and the influence of caffeine abstinence on CYP1A2 metrics, 2011

임상대상	30 healthy male volunteers (age 18-50 years, Australia)
약물 용량	100mg tablet, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (100mg, PO, Tablet)

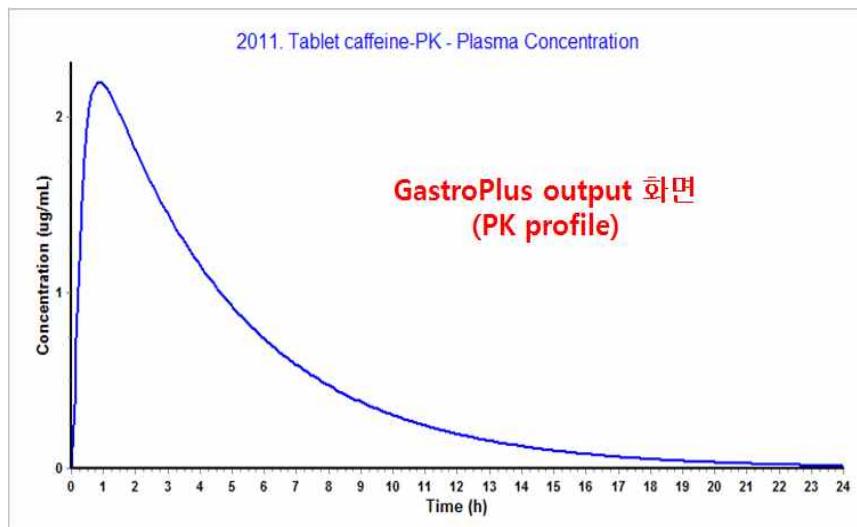


Table 1 Pharmacokinetic parameters of caffeine and paraxanthine in saliva and plasma (based on 24-h caffeine abstinence)

Pharmacokinetic parameter	Caffeine	Paraxanthine
Saliva		
$AUC_{0-\infty}$ (mg h/l)	12.0 ± 5.2	NC
AUC_{0-24} (mg h/l)	10.9 ± 3.9	7.4 ± 1.5
CL/F (ml/h/kg)	120.8 ± 36.6	NC
$t_{1/2}$ (h)	5.3 ± 1.8	NC
T_{max} (h)	0.5 ± 0	8 ± 0
C_{max} (ug/ml)	1.5 ± 0.7	0.4 ± 0.1
Plasma		
$AUC_{0-\infty}$ (mg h/l)	15.5 ± 6.3	NC
AUC_{0-24} (mg h/l)	14.1 ± 5.0	9.7 ± 2.4
CL/F (ml/h/kg)	95.0 ± 32.1	NC
$t_{1/2}$ (h)	5.5 ± 1.9	NC
T_{max} (h)	1 ± 0	6 ± 0
C_{max} (ug/ml)	1.5 ± 0.5	0.5 ± 0.1

Values are mean ± SD. NC, not calculated. AUC_{0-24} , area under the concentration-time curve from 0 to 24 h; $AUC_{0-\infty}$, area under the concentration-time curve from 0 to infinity; C_{max} , maximum concentration; CL/F , apparent clearance; $t_{1/2}$, half-life; T_{max} , time to C_{max} .

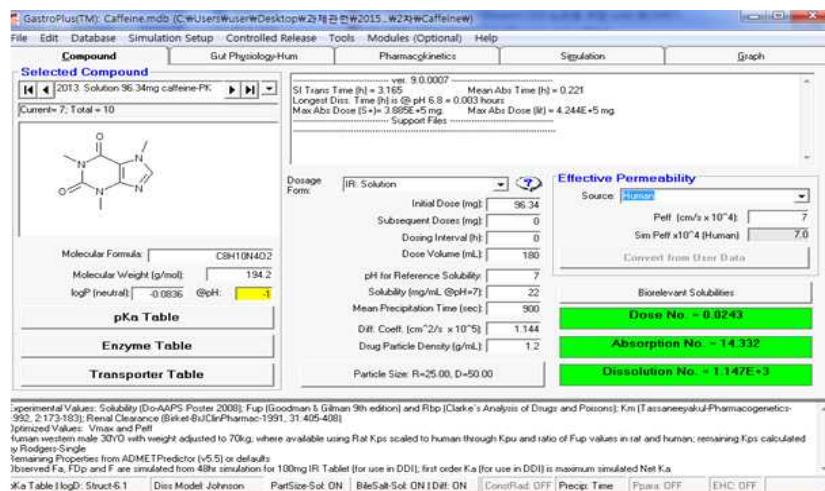
논문 값과의 비교

- Cmax ratio (simulation value/experimental value) = 2.2/1.5 = 1.3
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 11.7/15.5 = 1.2

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-5 : Pharmacokinetics of caffeine following a single administration of coffee enema versus oral coffee consumption in healthy male subjects, 2013

임상대상	11 healthy male volunteers (age 18-25 years, Thailand)
약물 용량	96.34mg solution, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (96.34mg, PO, Solution)

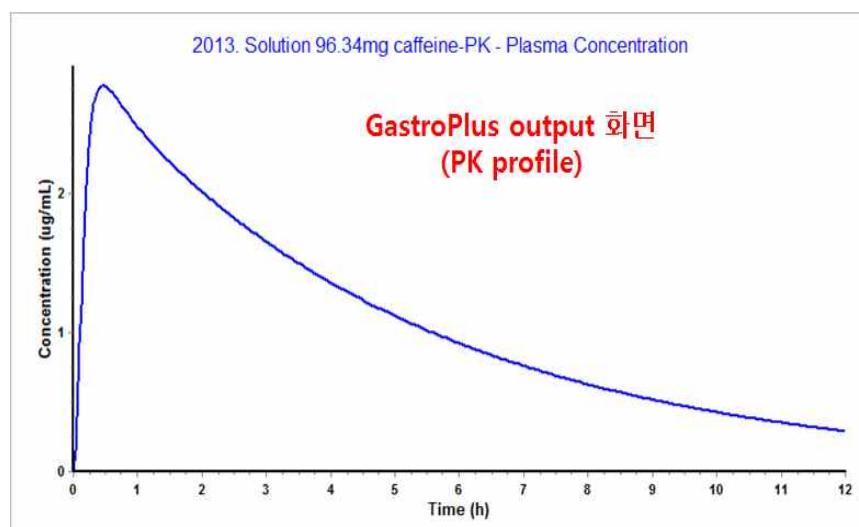


TABLE I: Pharmacokinetic parameters of caffeine following a single administration of the coffee enema or the oral coffee consumption ($n=11$)

Parameters	Coffee procedure		Mean difference	Standard error difference	95% confidence interval of the difference		P value ^a
	Coffee enema	Oral coffee consumption			Lower	Upper	
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.77 ± 0.14	2.47 ± 0.39	-1.70	0.12	-1.96	-1.44	<0.001
AUC_{0-12} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	3.69 ± 0.95	13.05 ± 2.06	-9.36	0.71	-10.83	-7.89	<0.001
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	4.73 ± 1.74	16.31 ± 3.89	-11.59	1.28	-14.27	-8.84	<0.001
T_{max} (h)	0.30 ± 0.12	0.44 ± 0.11	-0.14	0.05	-0.24	-0.02	0.02
$t_{1/2}$ (h)	4.68 ± 1.36	4.87 ± 1.39	-0.19	0.59	-1.41	1.04	0.76

Data represents mean ± SD. Abbreviations: C_{max} , maximum plasma caffeine concentrations, AUC_{0-12} , area under the concentration-time curve from administration to 12 hours, $AUC_{0-\infty}$, area under the concentration-time curve from administration and extrapolation to infinity, T_{max} , time to reach maximum plasma concentration, and $t_{1/2}$, half-life. *Statistical analysis using paired Student's t -test.

논문 값과의 비교

- Cmax ratio (simulation)

$$\text{value/experimental value}) = 2.8/2.5 = 1.1$$

- AUC ratio (simulation)

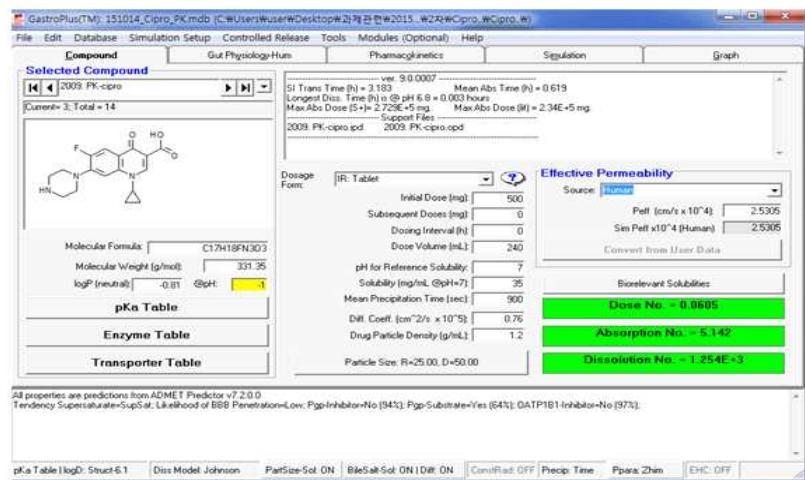
$$\text{value/experimental value}) = 13.4/13.1 = 1$$

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 perpetrator인 ciprofloxacin의 약동학 예측기술 탐색 완료

- 대상 논문-1 : BIOAVAILABILITY OF CIPROFLOXACIN TABLETS IN HUMANS AND ITS CORRELATION WITH THE DISSOLUTION RATES, 2009

임상대상	14 healthy male volunteers (age 18-37 years, 40-87kg, Pakistan)
약물 용량	500mg tablet, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (500mg, PO, Tablet)

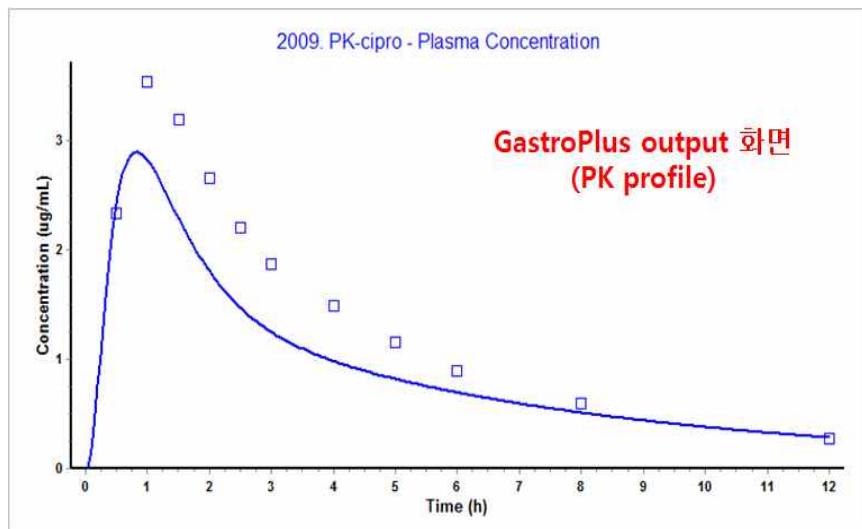


Table 5: Table showing the values of C_{max} , AUC_{0-t} and K_a of different brands

C_{max}	AUC_{0-t}	K_a
3.8	15.4	1.75
3.95	16.56	1.83
3.51	19.67	1.42
1.61	5.48	3.19
4.95	15.4	7.25
1.61	5.3	4.77
4.54	16.7	4.35
4.68	16.3	11.36

논문 값과의 비교

- C_{max} ratio (simulation)

$$\text{value/experimental value} = 2.9/3.6 = 0.8$$

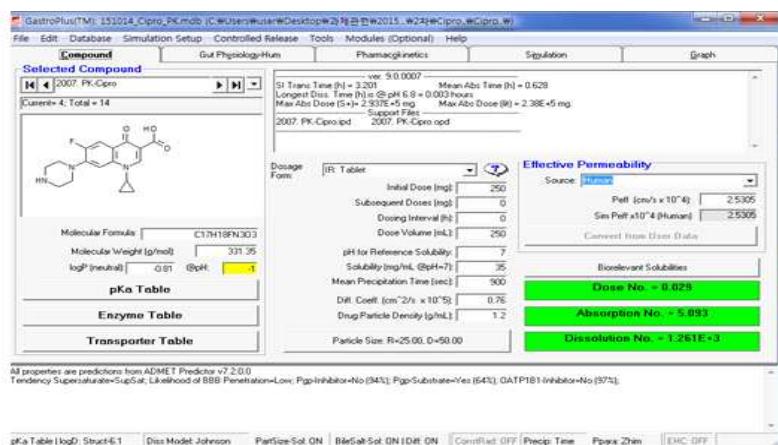
- AUC ratio (simulation)

$$\text{value/experimental value} = 11.2/13.9 = 0.8$$

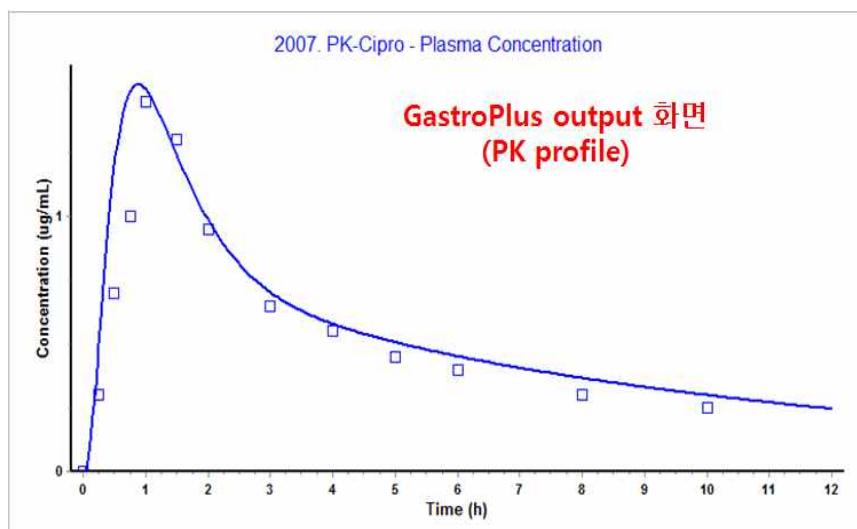
Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-2 : Bioequivalence and Pharmacokinetic Study of Two Oral Formulations of Ciprofloxacin Tablets in Healthy Male Volunteers, 2007

임상대상	24 healthy male volunteers (age 24-27 years, 64-75kg, Bangladesh)
약물 용량	250mg tablet, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (250mg, PO, Tablet)



Reference Formulation, Ciproxin 250-mg Tablet						
Geometric mean						
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	1.49	1.47	1.46	0.03	2.34	1.41
t_{max} (hr)	1.18	1.00	1.20	0.27	22.82	1.50
$AUC_{0-\infty}$ ($\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}$)	5.79	5.51	5.79	0.67	11.54	6.98
AUC_{0-t} ($\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}$)	6.88	6.48	6.92	0.92	13.34	8.49
$t_{1/2}$ (hr)	4.49	4.42	4.52	0.67	14.73	5.62
α	0.95	0.96	0.95	0.06	14.00	0.18
$AU/MC_{0-\infty}$ ($\text{hr}^2 \cdot \mu\text{g/mL}$)	23.76	22.54	23.89	2.96	12.46	21.69
AU/MC_{0-t} ($\text{hr}^2 \cdot \mu\text{g/mL}$)	42.62	39.29	43.79	12.36	28.24	65.47
MRT (hr)	6.34	6.06	6.38	0.79	12.34	7.71
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$	0.21	0.22	0.21	0.02	11.36	0.23

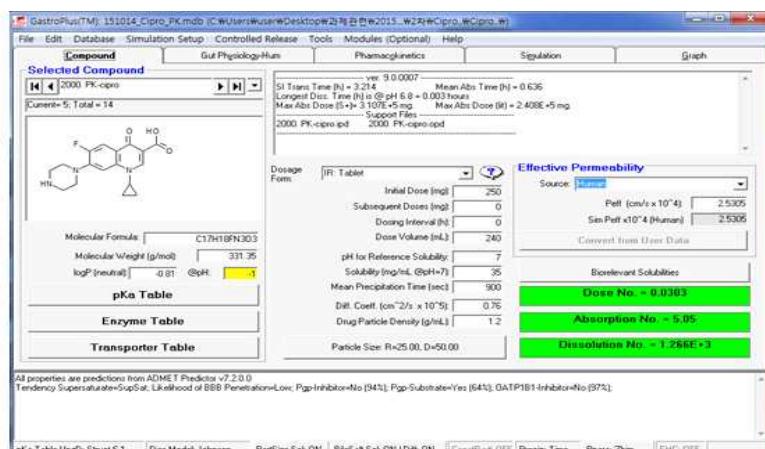
Test Formulation						
Geometric mean						
C_{max} ($\mu\text{g/mL}$)	1.49	1.49	1.49	0.09	5.66	1.60
t_{max} (hr)	1.18	1.20	1.00	0.27	22.82	1.50
$AUC_{0-\infty}$ ($\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}$)	5.81	5.82	5.73	0.38	11.55	6.39
AUC_{0-t} ($\text{hr} \cdot \mu\text{g/mL}$)	6.81	6.06	6.67	0.93	13.61	8.48
$t_{1/2}$ (hr)	4.85	4.96	4.33	1.19	24.03	6.46
α (hr ⁻¹)	0.14	0.15	0.16	0.03	22.26	0.18
$AU/MC_{0-\infty}$ ($\text{hr}^2 \cdot \mu\text{g/mL}$)	28.96	22.59	23.29	2.17	7.76	64.25
AU/MC_{0-t} ($\text{hr}^2 \cdot \mu\text{g/mL}$)	41.09	34.14	36.13	16.13	39.69	65.49
MRT (hr)	6.75	6.09	6.06	1.52	22.28	8.63
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$	0.22	0.22	0.22	0.00	15.00	0.26

C_{max} =peak plasma concentration; t_{max} =time to reach peak serum concentration; $AUC_{0-\infty}$ =area under the serum concentration-time curve; AUC_{0-t} =area under the serum concentration-time curve extrapolated to infinity; $t_{1/2}$ =elimination half-life; K_{el} =elimination rate constant; $AU/MC_{0-\infty}$ =area under the first moment versus time curve from $t=0$ to ∞ ; AU/MC_{0-t} =area under the first moment versus time curve from $t=0$ to t ; MRT = mean resident time; SD=standard deviation; CV=coefficient of variation

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-3 : Comparative Pharmacokinetics of Ciprofloxacin, Gatifloxacin, Grepaflloxacin, Levofloxacin, Trovafloxacin, and Moxifloxacin after Single Oral Administration in Healthy Volunteers, 2000

임상대상	12 healthy volunteers (age 21-35 years, 67.4 ± 10.6 kg, Germany)
약물 용량	250mg tablet, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (250mg, PO, Tablet)

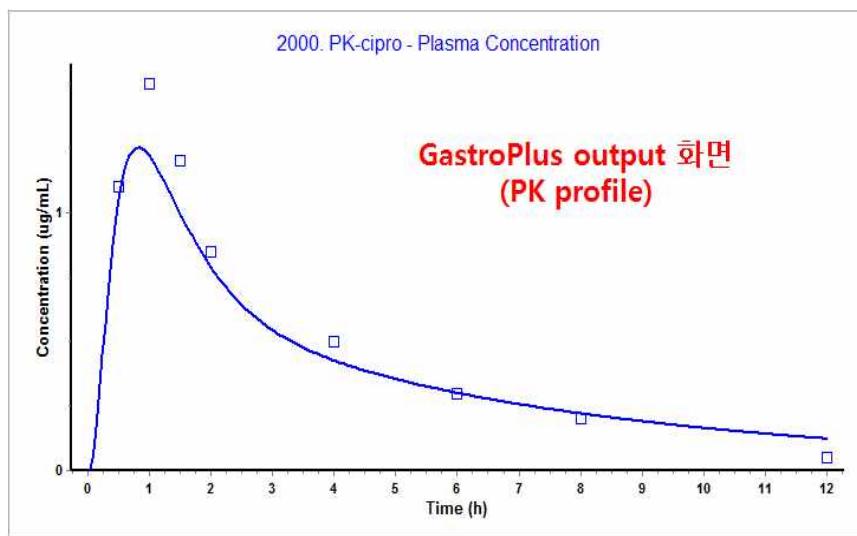


TABLE I. Pharmacokinetic parameters for six fluoroquinolones tested in 12 volunteers each^a

Drug (mg)	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}/70 \text{ kg}$)	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{ml}/70 \text{ kg}$, dose normalized)	T_{max} (h)	$T_{1/2}$ (h)	Half-life (h)	MRT (h)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}/70 \text{ kg}$)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}/70 \text{ kg}$, dose normalized)	Total urinary recovery (% of dose)	Renal clearance ($\text{ml}/\text{min}/1.73 \text{ m}^2$)	V_{ss} (liters/ 70 kg)
Ciprofloxacin (250)	1.5 ± 0.43	1.2 ± 0.34	0.78 ± 0.33	0.27 ± 0.17	5.37 ± 0.82	5.8 ± 0.94	5.75 ± 1.25	4.6 ± 1.0	40.8 ± 7.48	266 ± 40.6	231 ± 61.8
Gatifloxacin (400)	3.42 ± 0.74*	1.71 ± 0.37	1.49 ± 0.65	0.21 ± 0.19	6.52 ± 0.87	9.28 ± 1.12*	30 ± 3.8*	15 ± 1.9*	76.9 ± 5.6	153 ± 21	110 ± 20
Grepafloxacin (600)	1.98 ± 0.52*	0.66 ± 0.17	2.77 ± 1.11	0.34 ± 0.06	12.12 ± 3.92*	14.15 ± 2.67*	23.5 ± 4.73*	7.85 ± 1.58*	9.34 ± 2.91	35.2 ± 6.9	306 ± 54.3
Levofloxacin (500)	6.21 ± 1.34*	2.48 ± 0.53*	0.8 ± 0.38	0.33 ± 0.15	6.95 ± 0.81	8.65 ± 0.8**	44.8 ± 4.4*	17.9 ± 1.76*	75.9 ± 11.6	124 ± 19.1	88 ± 9.92
Moxifloxacin (400)	4.34 ± 1.61*	2.17 ± 0.81*	1.02 ± 0.72	0.18 ± 0.16	9.15 ± 1.62*	12.5 ± 2.03*	39.3 ± 5.35*	19.7 ± 2.67*	19.9 ± 4.55	30.5 ± 6.18	122 ± 19.6
Trovafloxacin (200)	2.09 ± 0.58	2.09 ± 0.58*	0.95 ± 0.61	0.12 ± 0.16	10.3 ± 3.4*	13.2 ± 5.37*	19.5 ± 3.1*	19.5 ± 3.1*	9.27 ± 2.47	14.2 ± 3.5	129 ± 58

* Drugs were given orally. Data were determined by HPLC for original doses and for normalized doses (200 mg) and are reported as means and standard deviations. P values for results that were statistically significant compared to those for ciprofloxacin were <0.01 (*) and <0.05 (**).

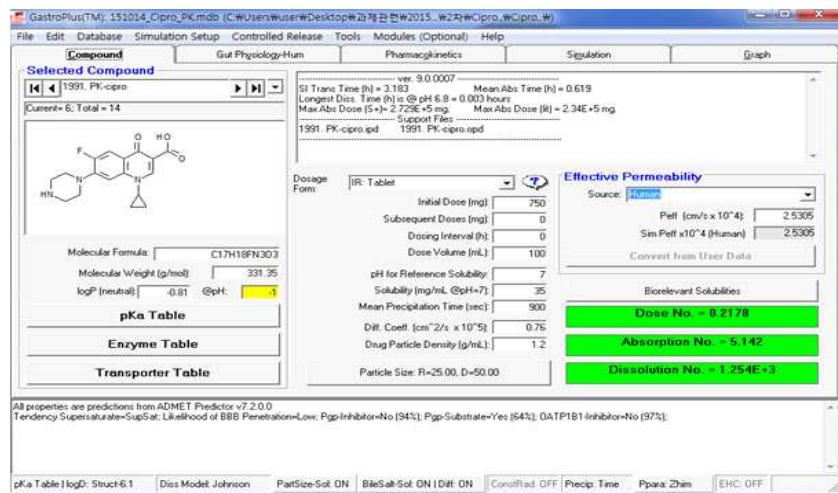
논문 값과의 비교

- C_{max} ratio (simulation value/experimental value) = 1.3/1.5 = 0.9
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 4.9/5.8 = 0.8

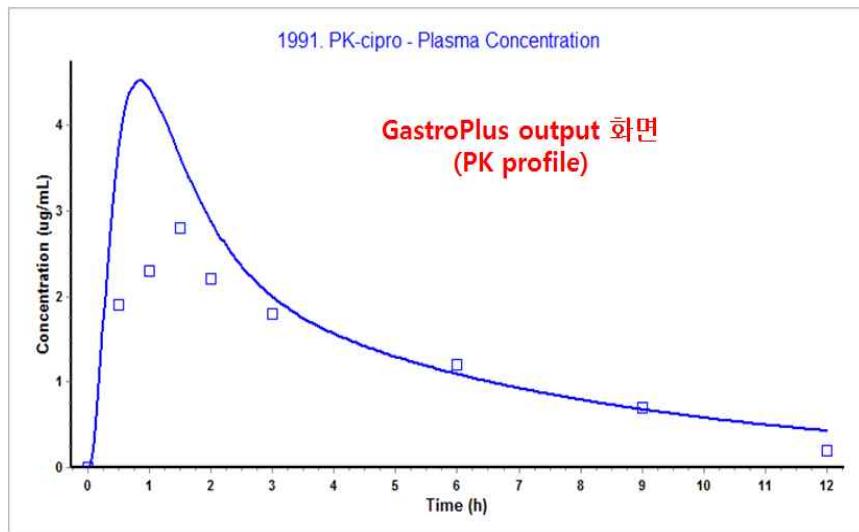
Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-4 : In Vitro and In Vivo Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Human Neutrophils, 1991

임상대상	8 healthy male volunteers (age 23-37 years, 46-82 kg, France)
약물 용량	750mg tablet, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (750mg, PO, Tablet)



Paper: 1991. In Vitro and In Vivo Ciprofloxacin Pharmacokinetics in Human Neutrophils

TABLE 1. Pharmacokinetic parameters of ciprofloxacin*

C_{\max} (mg/liter)	Concn (mg/liter) at:		T_{\max} (h)	$AUC_{0-\infty}$ (mg · h · liter $^{-1}$)	MRT (h)	$t_{1/2}$ (h)
	12 h	24 h				
Serum	2.7 \pm 0.46	0.21 \pm 0.2	0.03 \pm 0.07	1.5	15 \pm 6.3	5.74 \pm 1.6
PMNs	10.0 \pm 5.2	1.19 \pm 0.58	0.61 \pm 0.31	1.5	56 \pm 19.8	10 \pm 3
P_e	0.003	0.001	0.001		0.001	0.02
R^e	3.70	5.66	20.3	1	3.7	1.7
						1.6

* Values are means for eight volunteers who received 750 mg of ciprofloxacin orally. $t_{1/2}$, elimination half-life; abbreviations of the other pharmacokinetic parameters are defined in the text.

e Statistically significant for $P < 0.05$.

e R, PMN/plasma ratio.

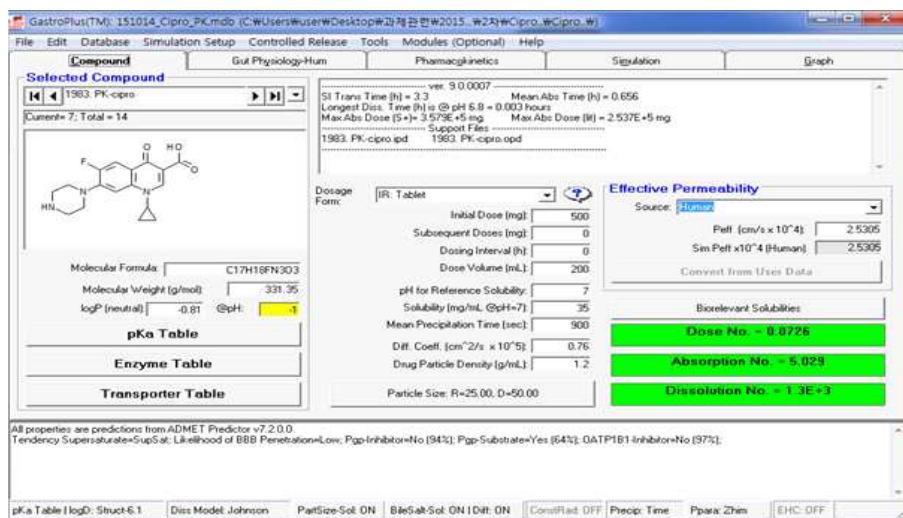
논문 값과의 비교

- C_{\max} ratio (simulation value/experimental value) = 4.5/2.7 = 1.7
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 20.4/15 = 1.4

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-5 : Pharmacokinetics and Tissue Penetration of Ciprofloxacin, 1983

임상대상	6 healthy male volunteers (age 23-41 years, 49-83 kg, UK)
약물 용량	500mg tablet, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (500mg, PO, Tablet)

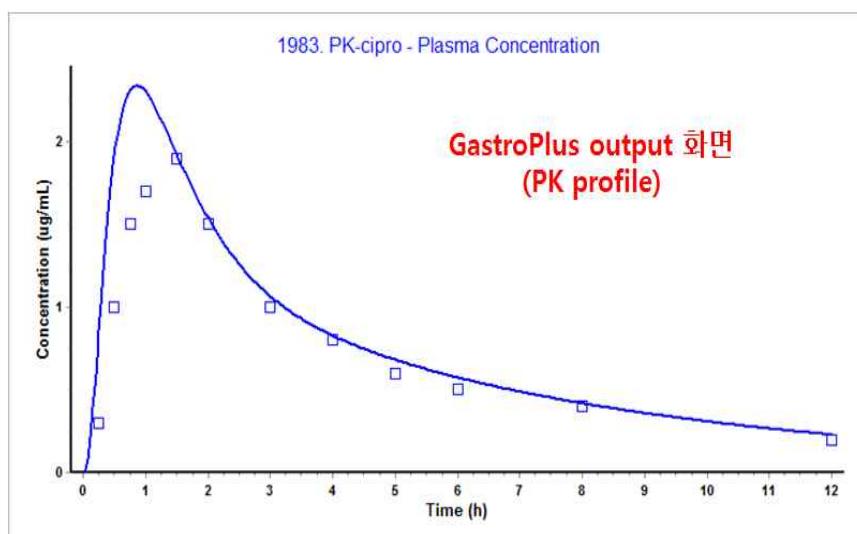


TABLE 2. Pharmacokinetics of ciprofloxacin

Parameter	Value \pm SD
Serum	
T_{max} (h)	1.25 \pm 0.5
C_{max} (μ g/ml)	2.3 \pm 0.7
$t_{1/2\alpha}$ (h)	3.9 \pm 0.8
K_{ep} (h^{-1})	0.18 \pm 0.035
$AUC_{0-\infty}$ (μ g · h/ml)	9.9 \pm 2.43
K_a (h^{-1})	2.7 \pm 1.22
Blister fluid	
T_{max} (h)	2.6 \pm 0.97
C_{max} (μ g/ml)	1.4 \pm 0.36
$t_{1/2\alpha}$ (h)	5.6 \pm 2.4
$AUC_{0-\infty}$ (μ g · h/ml)	11.6 \pm 4.1
Urinary recovery	
24-h excretion (% of dose)	30.6 \pm 9.8

^a Abbreviations: T_{max} , time at which the maximum concentration (C_{max}) in serum or tissue fluid is achieved; $t_{1/2\alpha}$, terminal elimination half-life in the serum and blister fluid; K_{ep} , overall elimination constant; $AUC_{0-\infty}$, area under the serum (or blister fluid) concentration-time curve; K_a , absorption rate constant.

논문 값과의 비교

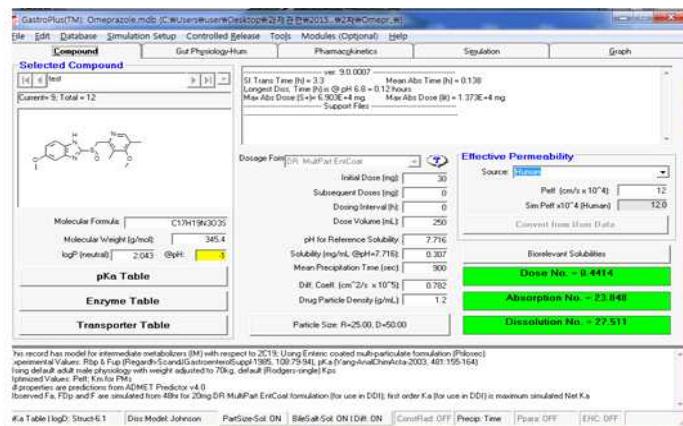
- Cmax ratio (simulation value/experimental value)
 $= 2.3/2.3 = 1$
- AUC ratio (simulation value/experimental value)
 $= 10.8/9.9 = 1.1$

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

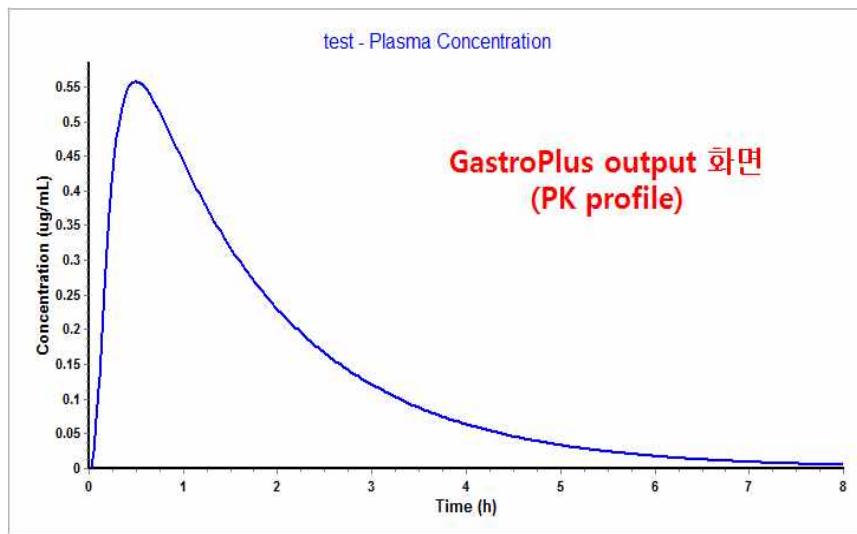
○ 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 기질 omeprazole의 약동학 예측기술 탐색 완료

- 대상 논문-1 : Oral Pharmacokinetics of Omeprazole, 1984

임상대상	6 healthy male volunteers (age 19-34 years, UK)
약물 용량	30mg, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (30mg, PO, Enteric coated multi-particulate)



Subject	30 mg		60 mg			
	t_{max} Dose 1	t_{max} Dose 7	C_{max} Dose 1	C_{max} Dose 7	AUC Dose 1	AUC Dose 7
1	1.0	1.5	223	239	338	496
2	1.5	4.5	690	610	937	1287
3	1.0	5.0	632	1000	1620	2830
4	3.0	2.0	305	489	748	1820
5	1.0	3.5	1160	1260	2270	3550
6	6.0	1.0	338	675	781	2130
				mean 558 ug/L	mean 1115.67 ug*h/L	

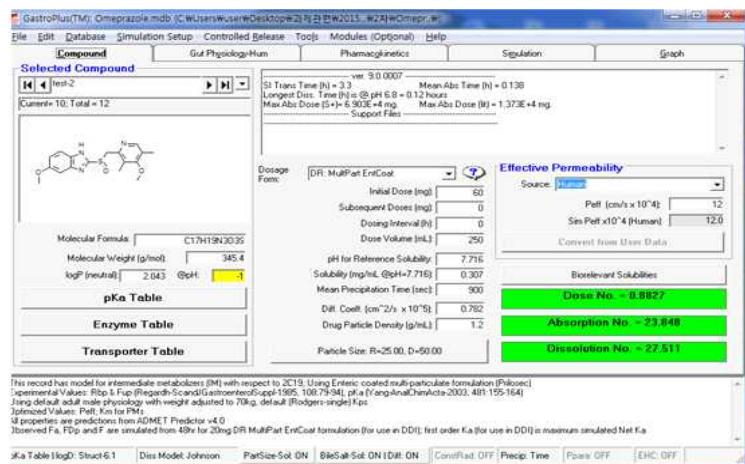
논문 값과의 비교

- C_{max} ratio (simulation value/experimental value) = $0.6/0.6 = 1$
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = $1.1/1.1 = 1$

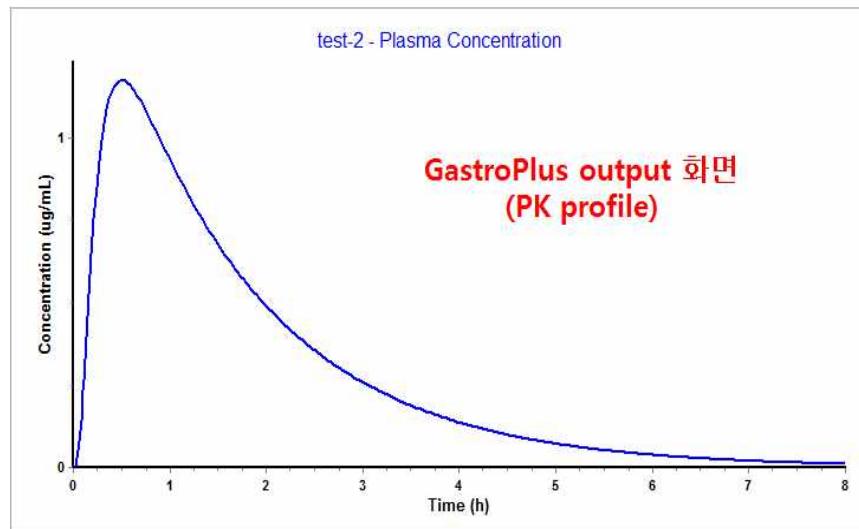
Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-2 : Oral Pharmacokinetics of Omeprazole, 1984

임상대상	6 healthy male volunteers (age 19-34 years, UK)
약물 용량	60mg, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (60mg, PO, Enteric coated multi-particulate)



Subject	60 mg		mean c _{max} 666.17 ug/L		mean AUC 3046.67 ug*h/L	
	t _{max}	C _{max}	Dose 1	Dose 7	Dose 1	Dose 7
7	1.0	2.0	660	1710	2040	6610
8	1.0	7.0	2070	1860	3120	5410
9	5.0	1.0	3830	2270	5000	7070
10	4.5	5.5	893	1310	2380	3230
11	1.0	0.5	954	2110	1380	5700
12	2.5	2.5	1270	3180	4440	7850

mean 1666.17 ug/L mean 3046.67 ug*h/L

논문 값과의 비교

- C_{max} ratio (simulation value/experimental value) = 1.2/1.7 = 0.7

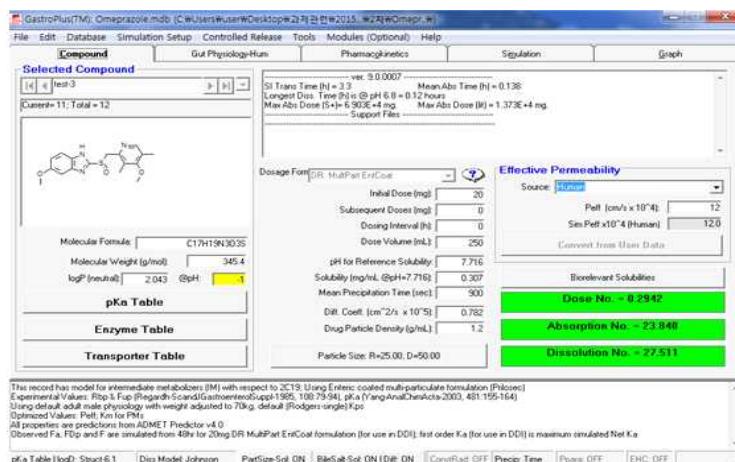
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 2.3/3.1 = 0.7

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-3 : Comparative pharmacokinetic analysis with two omeprazole formulation

"Proceptin" and "Losec" in healthy subjects, 2014

임상대상	14 healthy male volunteers (age 20-28 years, Bangladesh)
약물 용량	20mg capsule, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (20mg, PO, Enteric coated multi-particulate)

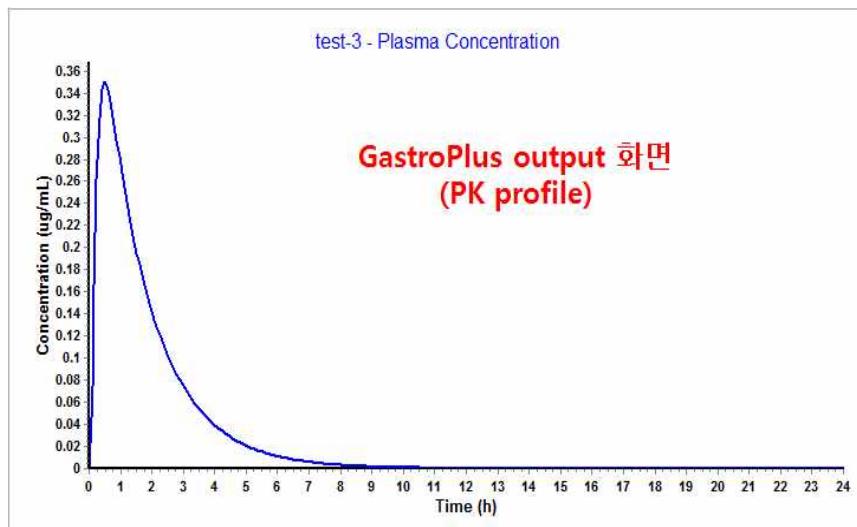


Table 1: Plasma pharmacokinetic parameters of all the volunteers for test and reference formulations

Pharmacokinetic Parameters	Reference formulation				
	Mean \pm SD ^a	Geometric Mean	CV (%) ^b	Max	Min
C_{max} (ng/ml)	345.28 \pm 42.38	335.46	25.35	378.43	197.54
t_{max} (h)	2.28 \pm 0.16	2.19	34.56	2.56	1.9
AUC_{0-t} (h · ng/ml)	710.01 \pm 92.51	702.56	43.46	805.58	596.93
$AUC_{0-\infty}$ (h · ng/ml)	648.21 \pm 65.31	635.23	38.54	942.51	605.74
MRt(h)	4.25 \pm 0.342	4.04	23.45	4.83	3.88
$AUMC_{0-t}$ (h ² ng/ml)	174.51 \pm 0.04	170.56	35.33	187.44	130.02
$AUMC_{0-\infty}$ (h ² ng/ml)	195.28 \pm 0.06	189.47	32.67	257.46	134.53
K_{el}	0.269 \pm 0.04	0.226	25.46	0.299	0.185
$t_{1/2}$ (h)	2.57 \pm 0.53	2.35	26.34	2.99	2.25
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$	0.407 \pm 0.03	0.387	35.77	0.463	0.346
Test formulation					
C_{max} (ng/ml)	316.23 \pm 102.12	310.48	28.46	369.63	185.04
t_{max} (h)	2.28 \pm 0.16	2.19	34.54	2.56	1.9
AUC_{0-t} (h · ng/ml)	771.13 \pm 102.35	761.42	42.76	825.82	584.19
$AUC_{0-\infty}$ (h · ng/ml)	803.56 \pm 45.73	897.49	41.35	942.51	605.25
MRt(h)	4.38 \pm 0.16	4.24	36.66	5.12	3.57
$AUMC_{0-t}$ (h ² ng/ml)	192.56 \pm 0.02	185.38	40.32	237.65	140.58
$AUMC_{0-\infty}$ (h ² ng/ml)	215.25 \pm 0.13	205.56	43.57	266.49	154.66
K_{el}	0.269 \pm 0.08	0.235	29.57	0.332	0.164
$t_{1/2}$ (h)	2.39 \pm 0.79	2.14	34.43	3.24	2.16
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$	0.350 \pm 0.21	0.281	37.66	0.384	0.314

^aSD=Standard Deviation; ^bCV=Coefficient of Variance**논문 값과의 비교****- Cmax ratio (simulation**

$$\text{value/experimental value}) = 0.4/0.3$$

$$= 1.3$$

- AUC ratio (simulation

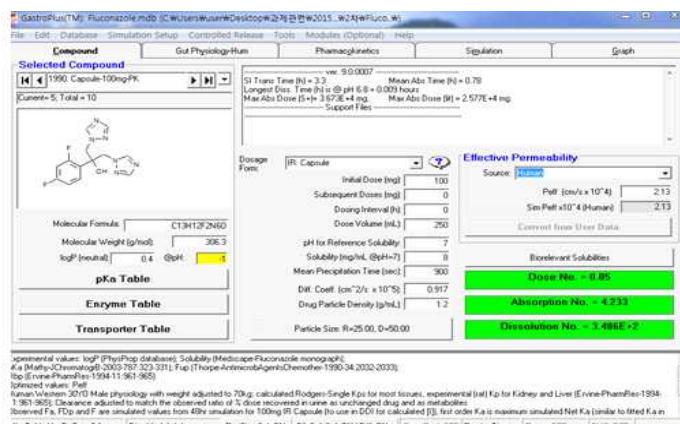
$$\text{value/experimental value}) 0.7/0.7 =$$

$$1$$

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.**○ 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 perpetrator인 fluconazole의 약동학 예측기술 탐색 완료**

- 대상 논문-1 : Effect of Oral Antacid Administration on the Pharmacokinetics of Oral Fluconazole, 1990

임상대상	7 healthy male volunteers (age 21-29 years, France)
약물 용량	100mg capsule, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus

**GastroPlus input 화면 (100mg, PO, Capsule)**

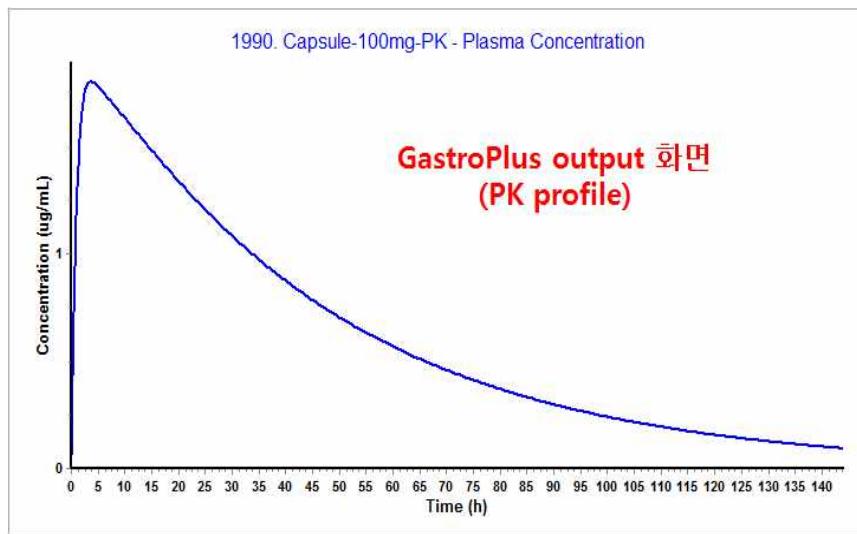


TABLE 1. Pharmacokinetic parameters for fluconazole with and without an antacid^a

Regimen	C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	T_{max} (h)	$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{mL}$) ^b	k_{el} (h ⁻¹)
Fluconazole without antacid	1.70 ± 0.26 (1.41–2.16)	4.29 ± 2.59 (2–12)	93.00 ± 13.82 (74–115)	0.01957 ± 0.0025 (0.0175–0.0258)
Fluconazole with antacid	1.71 ± 0.22 (1.38–2.12)	5.14 ± 1.88 (2–8)	92.43 ± 14.57 (75–116)	0.01964 ± 0.0027 (0.0153–0.0254)

^a Values are expressed as means ± standard deviations. Differences between parameters were not statistically significant (see text). Ranges for individual subjects are shown in parentheses ($n = 14$).

^b The maximum contributions due to extrapolation from 144 h to infinity were 8.2 and 9.0% for fluconazole without and with the antacid, respectively.

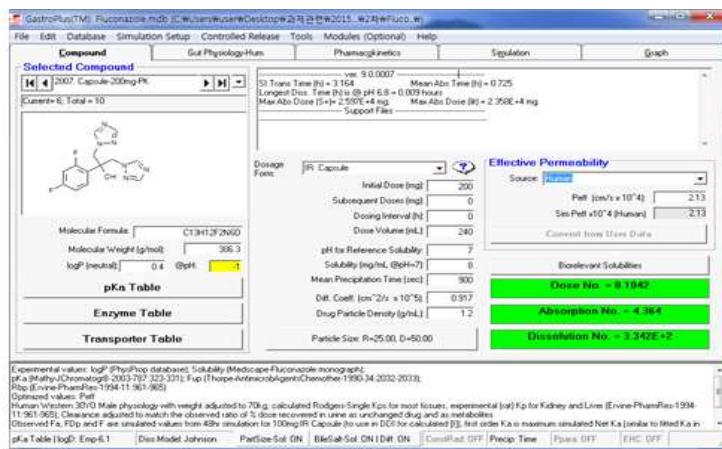
논문 값과의 비교

- C_{max} ratio (simulation value/experimental value) = 1.8/1.7 = 1.1
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 93.1/93.0 = 1.0

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-2 : Bioequivalence Evaluation of Two Fluconazole Capsule Formulations in Healthy Thai Volunteers, 2007

임상대상	10 healthy male volunteers (age 18-45 years, Thailand)
약물 용량	200mg capsule, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (200mg, PO, Capsule)

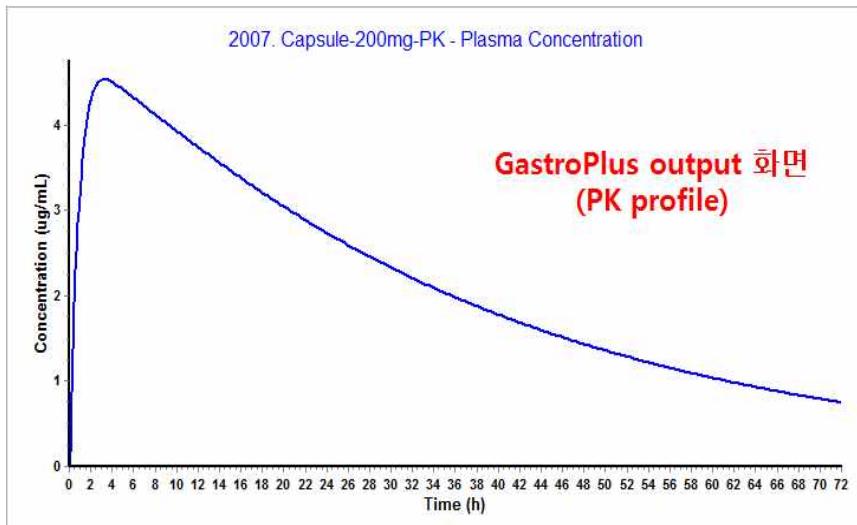


Table 1 Mean (\pm SD) pharmacokinetic parameters ($n = 20$) of fluconazole after test and reference administration

Parameter	Fluzoral (Test)	Diflucan (Reference)
C_{max} ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	3.98 ± 0.65	4.01 ± 0.39
AUC_{0-t} ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	125.62 ± 16.01	123.87 ± 14.66
$AUC_{0-\infty}$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h}/\text{mL}$)	161.09 ± 27.64	156.48 ± 25.94
T_{max} (h)	2.00 ± 0.83	2.53 ± 0.97
$t_{1/2}$ (h)	32.41 ± 7.20	30.90 ± 5.93
λ_z ($\times 10^{-2} \text{ h}^{-1}$)	2.24 ± 0.49	2.32 ± 0.44

논문 값과의 비교

- Cmax ratio (simulation)

$$\text{value/experimental value} = 4.5/4.0 \\ = 1.1$$

- AUC ratio (simulation)

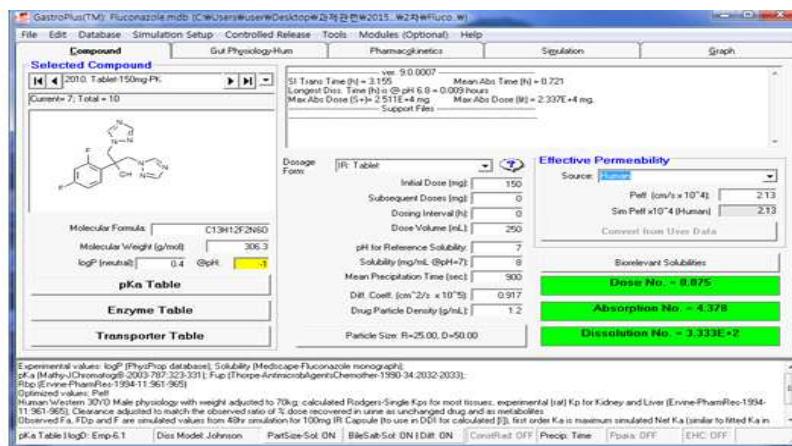
$$\text{value/experimental value} \\ 159.8/161.1 = 1$$

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

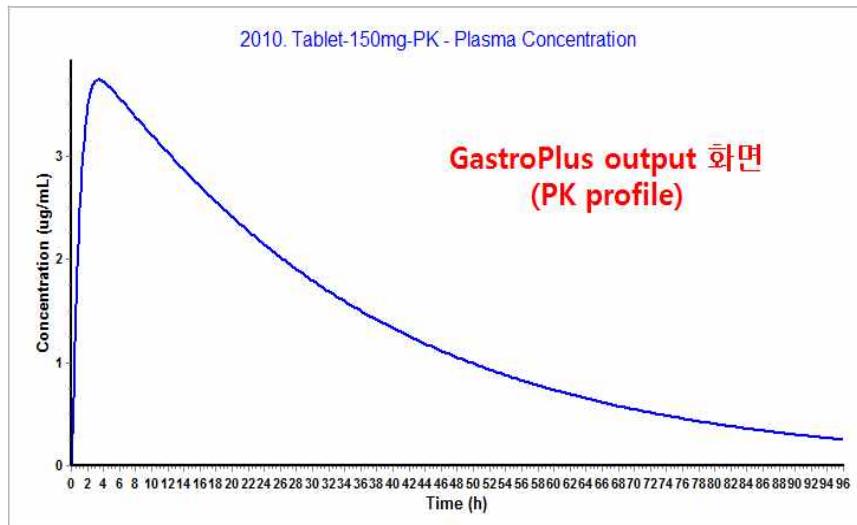
- 대상 논문-3 : Bioequivalence of Two Oral Fluconazole Formulations in Healthy

Subjects: a Single Dose, Open-Label, Randomized, Two-Period Crossover Study, 2010

임상대상	24 healthy male volunteers (age 18-55 years, Mexico)
약물 용량	150mg capsule, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (150mg, PO, Capsule)



Pharmacokinetic parameter	Reference Drug A (DIFLUCAN®)				Test Drug B (DIFUSEL®)			
	Mean	Standard Deviation	CV %	n	Mean	Standard Deviation	CV %	n
C _{max} (μg/mL)	4.38	0.83	19.07	25	4.44	0.79	17.90	24
AUC _{0-t} (h·μg/mL)	154.67	26.10	16.88	25	152.21	28.89	18.98	24
AUC _{0-∞} (h·μg/mL)	174.33	31.10	17.84	25	175.13	48.98	27.97	24
T _{max} (h)	2.70	1.15	42.77	25	2.59	1.03	39.93	24

AUC_{0-t} = AUC from time 0 (baseline) to 96 hours; AUC_{0-∞} = AUC from baseline to infinity.

Table 1: Pharmacokinetic parameters of 2 oral formulations of fluconazole after a single dose of 150 mg. Values are mean and SD.

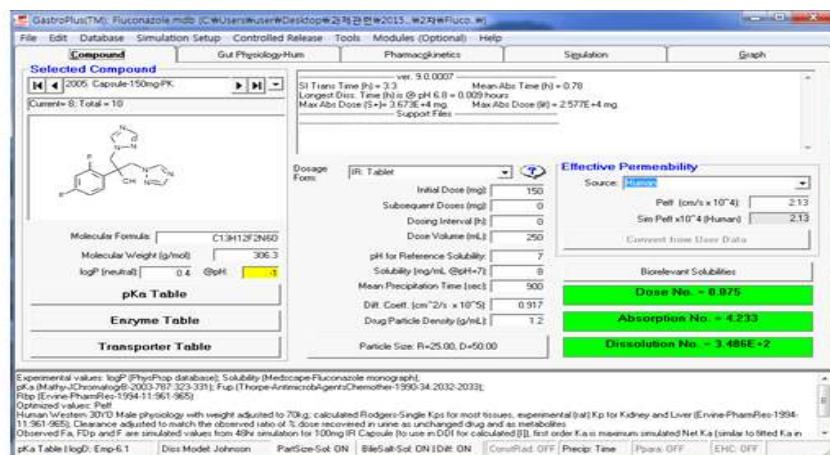
논문 간과의 비교

- C_{max} ratio (simulation value/experimental value) = 3.7/4.4 = 0.8
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 132.7/152.2 = 0.9

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 대상 논문-4 : Bioequivalence Evaluation of Two Formulations of Fluconazole 150mg Capsule in Healthy Arab Men, 2005

임상대상	28 healthy volunteers (age 19-45 years, 50-79 kg, Brazil)
약물 용량	150mg capsule, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (150mg, PO, Capsule)

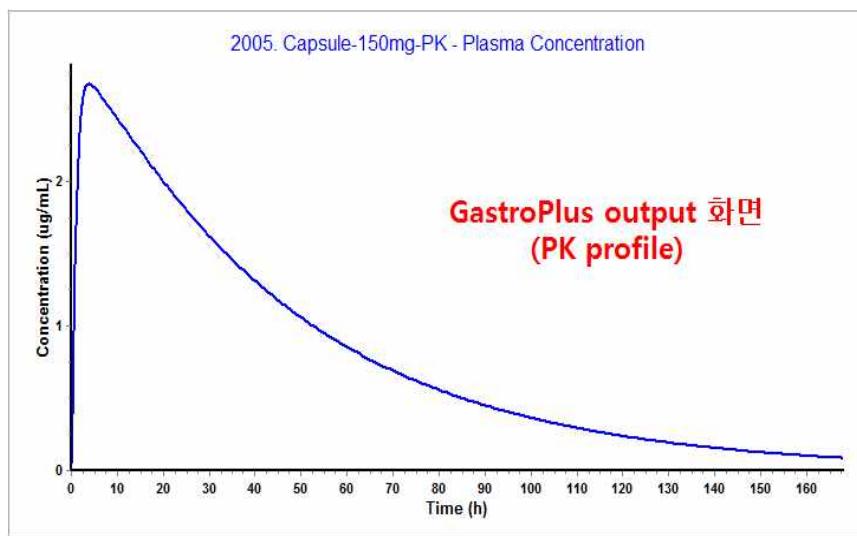


Table 1. Pharmacokinetic parameters and bioequivalence tests of Fluconazole™ capsule compared with Diflucan® capsule ($n=26$)

	Mean \pm SD		CV (%) ^a		<i>t</i> -test ^c		
	Fluconazole™	Diflucan®	Intrasubject	Intersubject	CI (%) ^b	Lower	Upper
$AUC_{0-\infty}$ (ug.h/mD)	149.5 \pm 29.5	151.4 \pm 25.8	5.95	18.00	95.48-101.04	12.424	14.600
AUC_{0-t} (ug.h/mD)	163.6 \pm 29.9	164.9 \pm 26.5	5.19	16.77	96.38-101.25	14.660	16.361
C_{max} (ug/mD)	3.2 \pm 0.5	3.2 \pm 0.6	7.99	13.74	94.62-102.07	15.312	16.926
K_{el} (h ⁻¹)	0.019 \pm 0.003	0.019 \pm 0.003	7.02	12.74			
$t_{1/2}$ (h)	36.8 \pm 5.7	36.6 \pm 5.4	7.02	12.74			
$C_{max}/AUC_{0-\infty}$ (h ⁻¹)	0.020 \pm 0.003	0.020 \pm 0.003	10.01	11.57			
$AUC_{0-\infty}/AUC_{0-\infty}$	0.91 \pm 0.03	0.92 \pm 0.02	1.62	1.42			
T_{max} (h)	2.6 \pm 2.0	2.7 \pm 1.6					

^aCV, coefficient of variation calculated from ANOVA tables of log-transformed data as follows: Intrasubject CV = 100 \times (MSResidual)^{0.5}.

Intersubject CV = 100 \times ((MSSubject/Sep) - MSResidual)/2^b^d [8].

^bCI, confidence interval: the antilog of the confidence limits on the mean difference of log transformed data (In Fluconazole™-In Diflucan®).

^cCalculated test statistics of the lower and upper limits using Schuirmann's two one-sided *t*-test. Critical *t* value is 1.2701 (df 24).

논문 간과의 비교

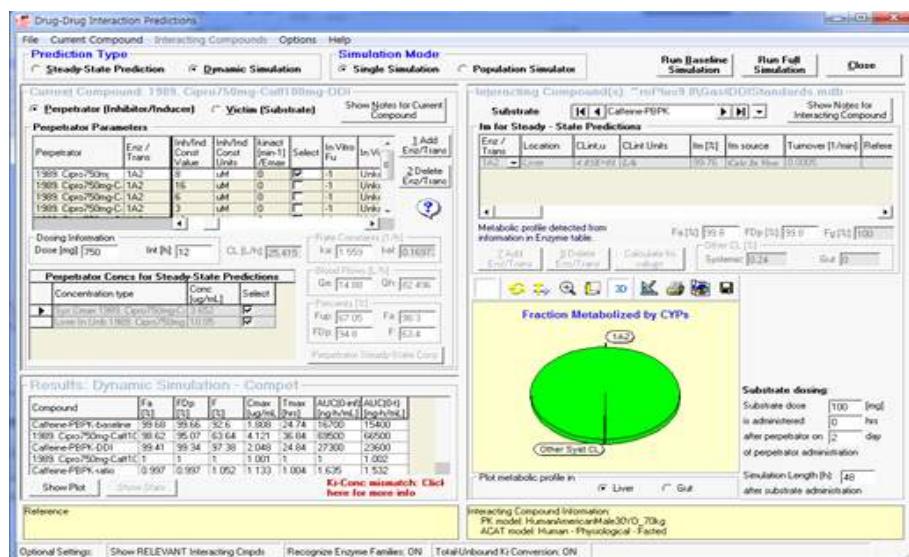
- Cmax ratio (simulation value/experimental value) = 2.7/3.2 = 0.8
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 135.7/149.5 = 0.9

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

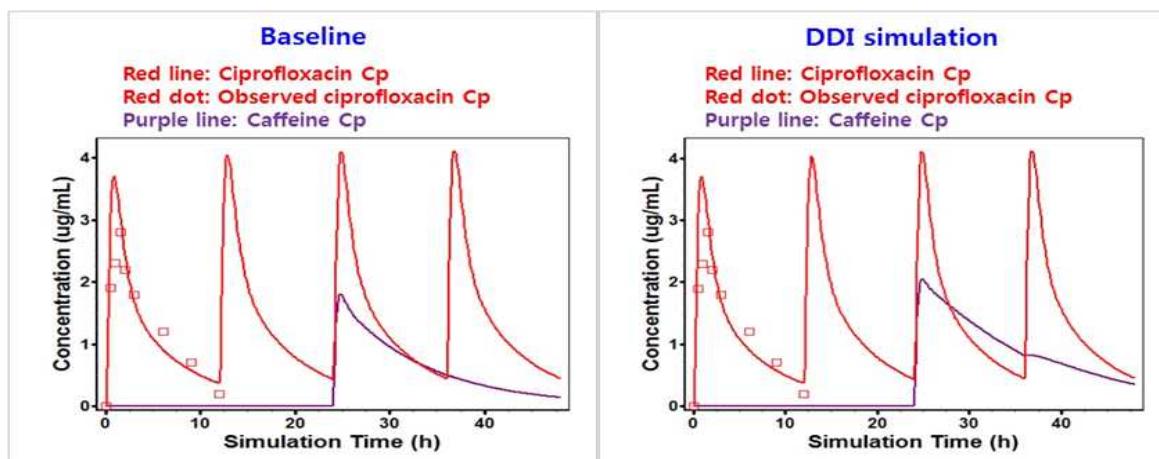
○ 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 caffeine과 ciprofloxacin의 약동학적 상호작용 예측 완료 - 기존 논문과 예측 비교

- 대상 논문 : Interaction between oral ciprofloxacin and caffeine in normal volunteers, 1989

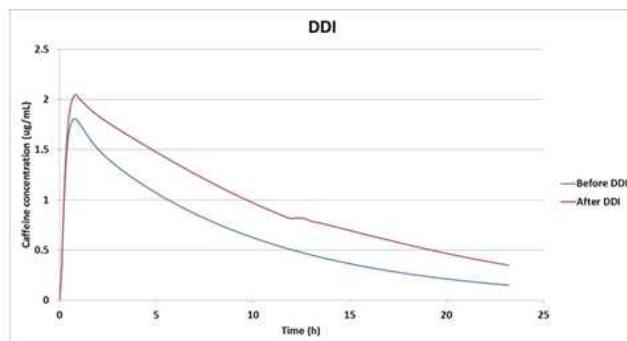
임상대상	10 healthy male volunteers (age 26.7 ± 1.6 years, 76.3 ± 8.6 kg, USA)
Caffeine 용량	100mg tablet, oral
Ciprofloxacin 용량	750mg tablet, oral, 12시간마다, 2일
DDI model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면



GastroPlus output 화면 (PK profile)



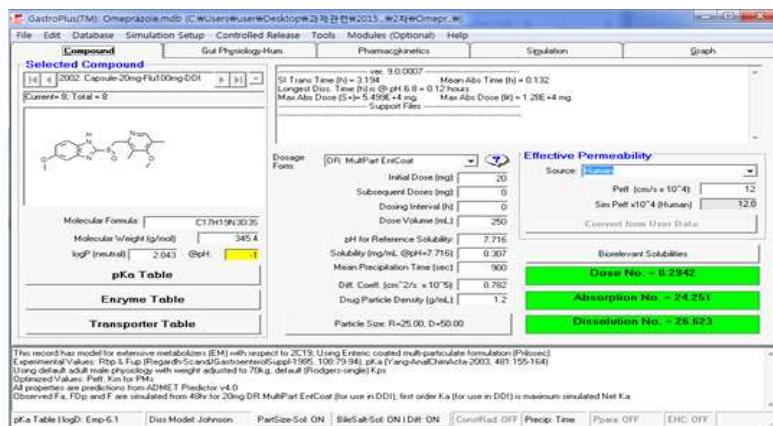
Observed value Vs. Predicted value		
	Cmax ratio (simulation value/experimental value)	AUC ratio (simulation value/experimental value)
Before ciprofloxacin	1.8/2.1 = 0.9	15.4/16.3 = 0.9
After ciprofloxacin	2.0/2.3 = 0.9	23.6/25.9 = 0.9

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

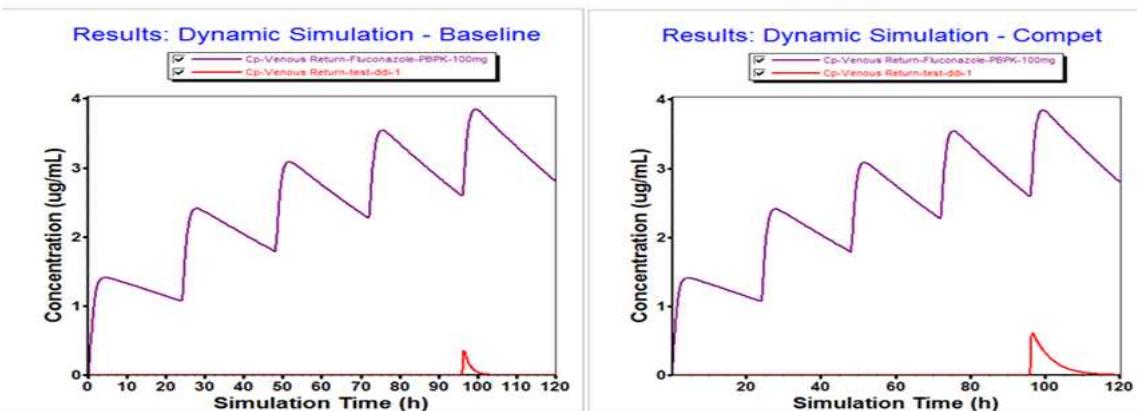
- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 omeprazole과 fluconazole의 약동학적 상호작용 예측 완료 - 기존 논문과 예측 비교

- 대상 논문 : Influence of Fluconazole on the Pharmacokinetics of Omeprazole in Healthy Volunteers, 2002

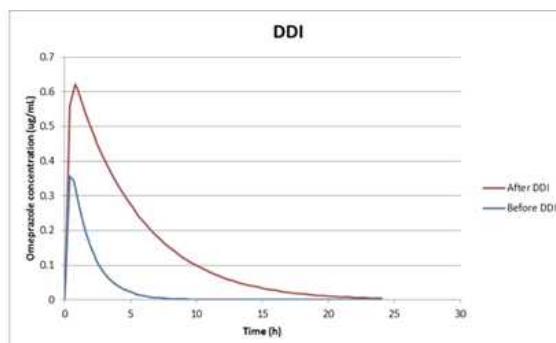
임상대상	18 healthy male volunteers (age 22-28 years, 56-78 kg, Korea)
Omeprazole 용량	20mg capsule, oral
Fluconazole 용량	100mg capsule, oral, 24시간마다, 5일
DDI model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면



GastroPlus output 화면 (PK profile)



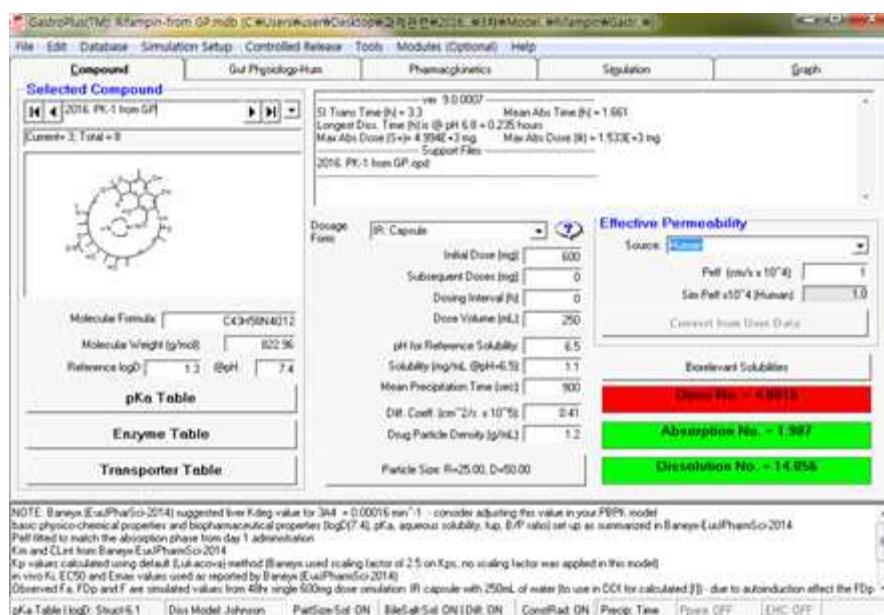
Observed value Vs. Predicted value		
	Cmax ratio (simulation value/experimental value)	AUC ratio (simulation value/experimental value)
Before ciprofloxacin	0.4/0.5 = 0.8	725.1/746 = 1.0
After ciprofloxacin	0.6/0.7 = 0.9	3442.4/3090 = 1.1

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

○ 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 perpetrator인 rifampin의 약동학 예측기술 탐색 완료

- 대상 논문-1 : Pharmacokinetics of rifampin under fasting conditions, with food, and with antacids, 2016

Prediction condition	
임상대상	14 healthy male & female volunteers (mean age 39.1±7.4 years, USA)
약물 용량	600mg, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (600mg, PO, capsule)

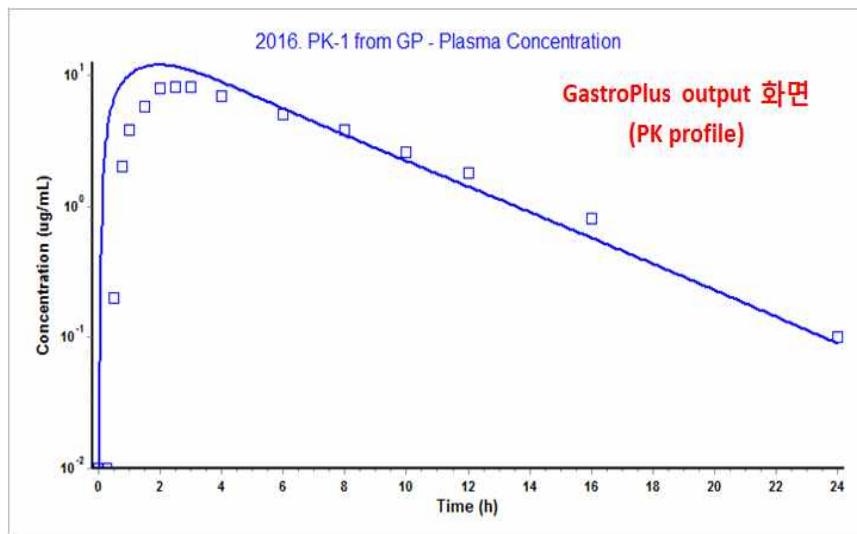


Table 1—The Absorption Characteristics for RIF for 14 Subjects Across the Four Treatments

Group	C _{max} , µg/mL		T _{max} , h		AUC _{0-∞*} (µg · h/mL)		AUC _{0-∞} (µg · h/mL)	
	Mean	%CV	Mean	%CV	Mean	%CV	Mean	%CV
Fast 1	10.54	30	2.43	55	54.69	24	57.15	23
Fast 2	11.32	27	2.18	66	57.09	29	58.98	27

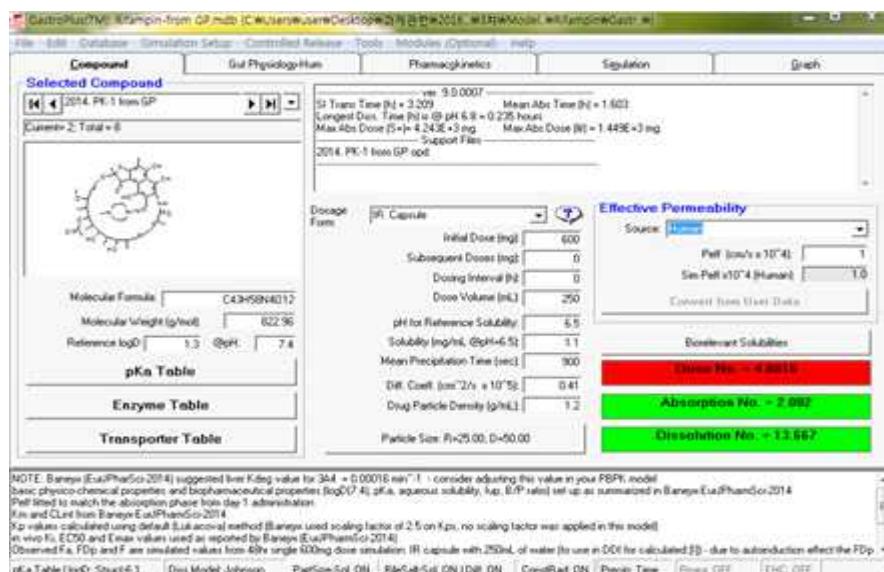
논문 값과의 비교

- C_{max} ratio (simulation value/experimental value) = 11.95/10.93 = 1.09
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 76.69/55.89 = 1.37

– 대상 논문-2 : Pharmacokinetics of rifampicin in mexican patients with tuberculosis and healthy volunteers, 2014

–

Prediction condition	
임상대상	24 healthy male & female volunteers (mean age 31.04±12 years, Mexico)
약물 용량	600mg, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (600mg, PO, capsule)

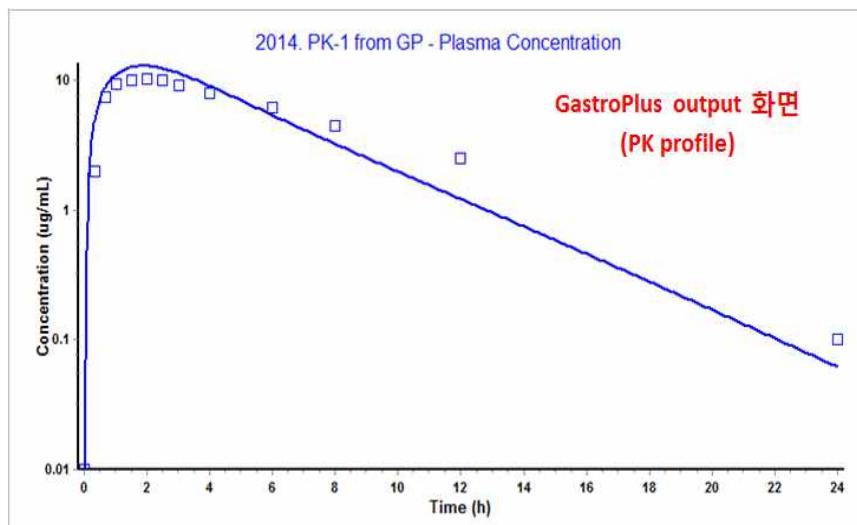


Table 3 Pharmacokinetic parameters obtained by non-compartmental approach and one-compartment open model

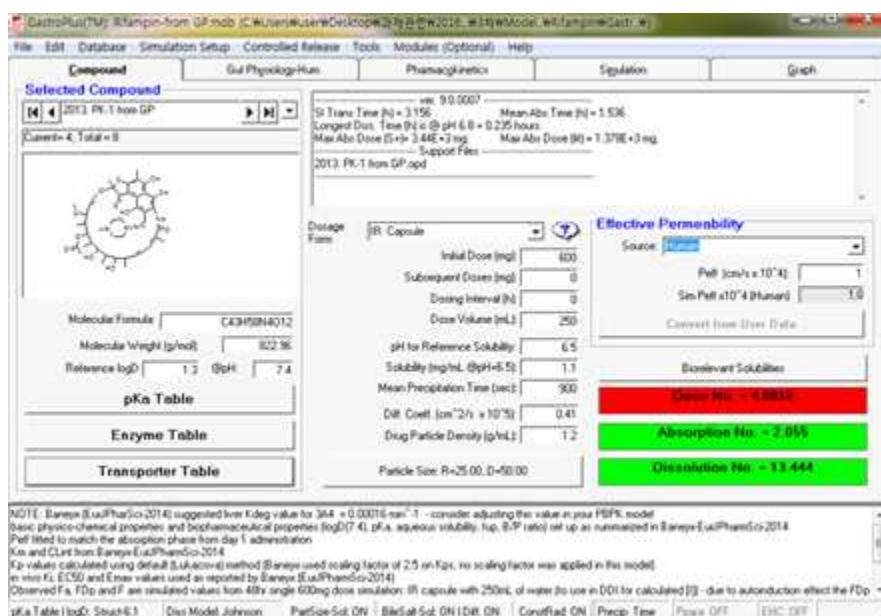
	TB patient	Healthy volunteers
Non-compartmental model		
T _{max} (h) ^a	1.62 (0.66–4.0)	1.83 (1.0–3.0)
C _{max} (mg/l) ^a	11.62 (7.01–19.9)	11.90 (6.4–18.9)
AUC _{0–24h} (mg·h/l) ^a	72.76 (41.1–202.3)	90.25 (37.4–135.4)
AUC _{0–...} (mg·h/l) ^a	76.25 (40.20–218.5)	93.60 (40.4–136.5)

논문 간과의 비교

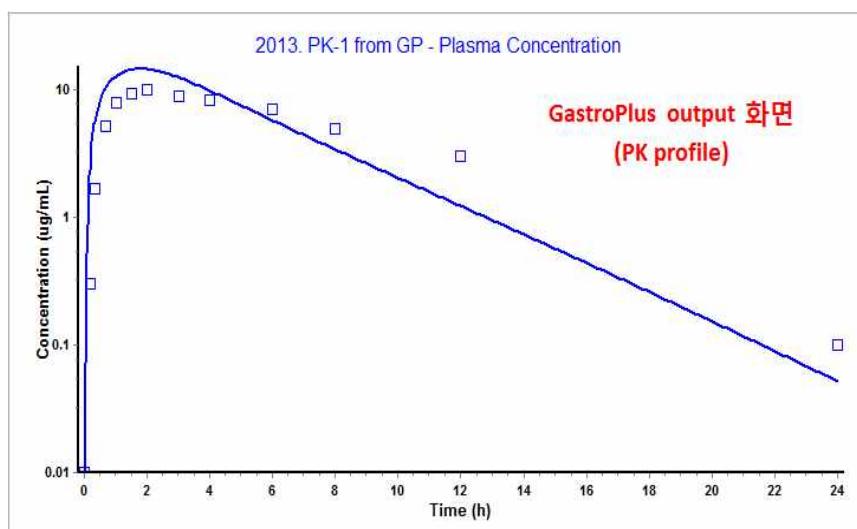
- Cmax ratio (simulation value/experimental value) = 13.01/11.90 = 1.09
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 77.24/90.25 = 0.86
- 대상 논문-3 : Oral Bioavailability of Rifampicin, Isoniazid, Ethambutol, and Pyrazinamide

in a 4-Drug Fixed-Dose Combination Compared With the Separate Formulations in Healthy Chinese Male Volunteers, 2013

Prediction condition	
임상대상	18 healthy male volunteers (mean age 36.4 ± 10.6 years, China)
약물 용량	600mg, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (600mg, PO, capsule)



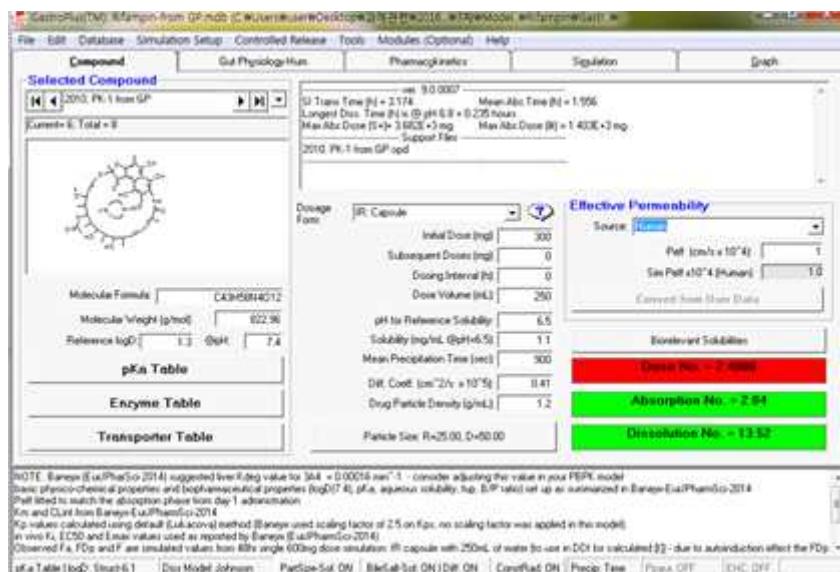
Rifampicin

Parameter	Combined	Separate
$AUC_{0-24}, \mu\text{gh}/\text{mL}$	91.4 (30.8)	95.2 (29.2)
$AUC_{0-\infty}, \mu\text{gh}/\text{mL}$	93.3 (31.3)	99.5 (29.5)
$C_{\max}, \mu\text{g}/\text{mL}$	11.4 (3.4)	12.4 (3.2)
$T_{\max}, \text{median (range)}, \text{h}$	1.50 (0.67–4.00)	1.75 (0.67–6.00)
$t_{1/2}, \text{h}$	3.7 (1.3)	4.5 (2.5)

논문 값과의 비교

- C_{\max} ratio (simulation value/experimental value) = $14.62/12.4 = 1.18$
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = $83.74/95.2 = 0.88$
- 대상 논문-4 : A Bioequivalence Comparison of Two Formulations of Rifampicin (300–vs 150–mg Capsules): An Open–Label, Randomized, Two–Treatment, Two–Way Crossover Study in Healthy Volunteers, 2010

Prediction condition	
임상대상	14 healthy male & female volunteers (age 20–28 years, Malaysia)
약물 용량	300mg, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (300mg, PO, capsule)

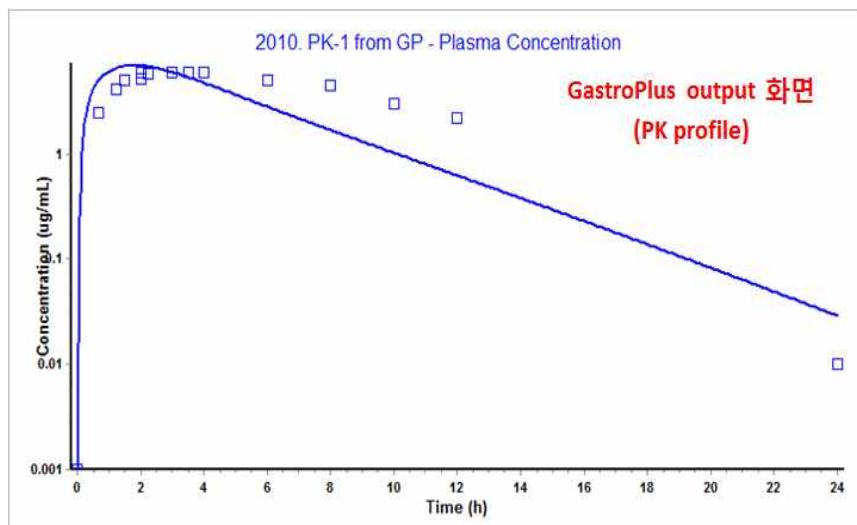


Table II. Mean (SD) pharmacokinetic parameters for rifampicin after administration of the 2 formulations to 14 subjects in the present study compared with data from an earlier study.

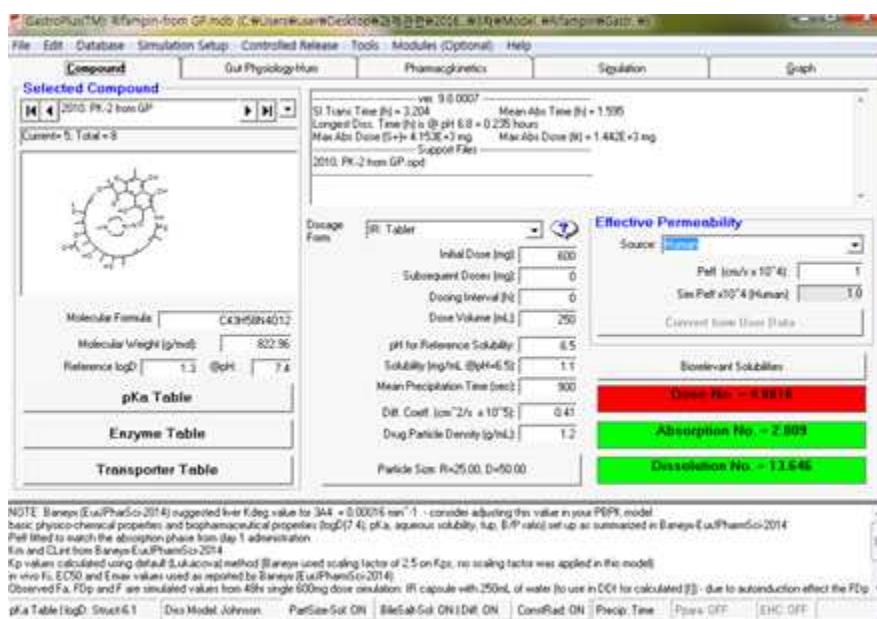
Parameter	Present Study		Agrawal et al ²⁰	
	Test [#] Formulation	Reference [†] Formulation	450-mg Combined Formulation	450-mg Separate Formulation
C_{max} , $\mu\text{g}/\text{mL}$	7.20 (2.19)	7.65 (2.51)	4.06 (1.11)	4.29 (1.53)
T_{max} , h	1.32 (0.40)	1.71 (0.61)	1.46 (0.66)	1.54 (0.66)
AUC_{0-24} , $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$	37.12 (15.52)	38.92 (13.50)	21.67 (8.82)	23.10 (9.71)
$AUC_{0-\infty}$, $\mu\text{g}/\text{mL} \cdot \text{h}$	39.69 (15.81)	42.24 (13.89)	22.09 (9.04)	23.70 (10.22)
k_e , h^{-1}	0.22 (0.04)	0.22 (0.04)	0.20 (0.08)	0.22 (0.08)
$t_{1/2}$, h	3.24 (0.59)	3.28 (0.59)	3.89 (1.43)	3.66 (1.30)

논문 값과의 비교

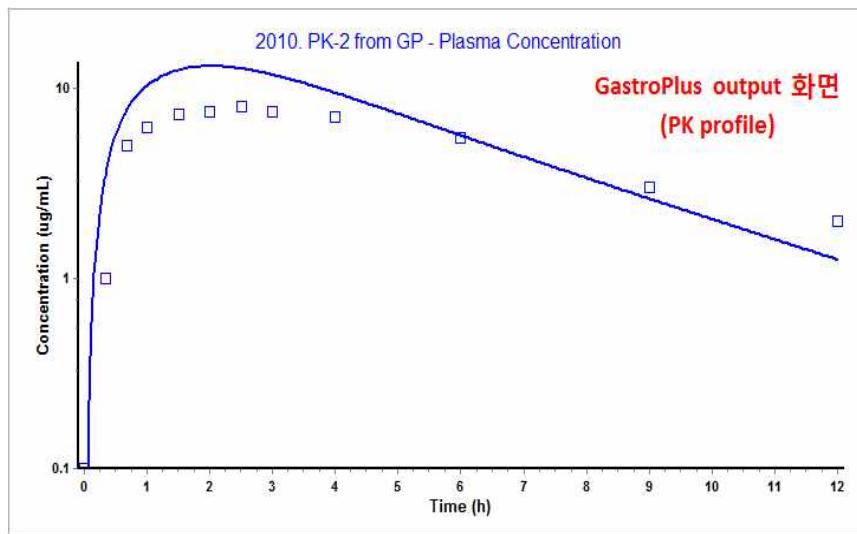
- Cmax ratio (simulation value/experimental value) = 6.95/7.20 = 0.97
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = 40.69/37.12 = 1.10

- 대상 논문-5 : Relative bioavailability of rifampicin in a three-drug fixed-dose combination formulation, 2010
-

Prediction condition	
임상대상	18 healthy male & female volunteers (mean age 23±2 years, Mexico)
약물 용량	600mg, oral
PK model for prediction	PBPK model made by CNU using GastroPlus



GastroPlus input 화면 (600mg, PO, capsule)

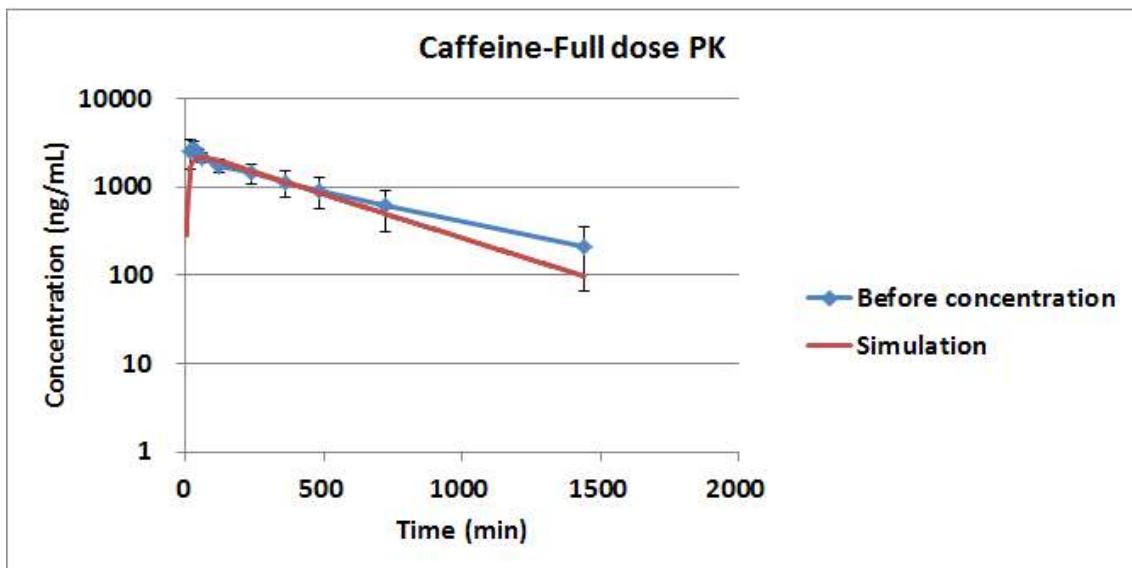


Pharmacokinetic parameter	Reference formulation		
	Mean \pm SD	CV, %	Range
λ, h^{-1}	0.21 ± 0.07	36.31	0.09–0.42
$t_{1/2(\lambda)}, h$	3.67 ± 1.32	36.08	1.63–7.42
T_{max}, h	2.07 ± 1.11	53.60	0.66–4.00
$C_{max}, \mu\text{g}/\text{ml}$	9.95 ± 2.66	26.79	5.41–14.75
Early exposure, $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$	10.09^*		1.88–24.47
$AUC_{0-12h}, \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$	58.03 ± 16.1	27.75	36.44–82.31
$AUC_{0-\infty}, \mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$	68.43 ± 22.39	32.72	41.61–109.4
$C_{max}/AUC_{0-\infty}, \mu\text{g}/\text{ml}/\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$	0.15 ± 0.04	26.52	0.09–0.22

논문 값과의 비교

- C_{max} ratio (simulation value/experimental value) = $12.99/9.95 = 1.31$
- AUC ratio (simulation value/experimental value) = $72.58/58.03 = 1.25$

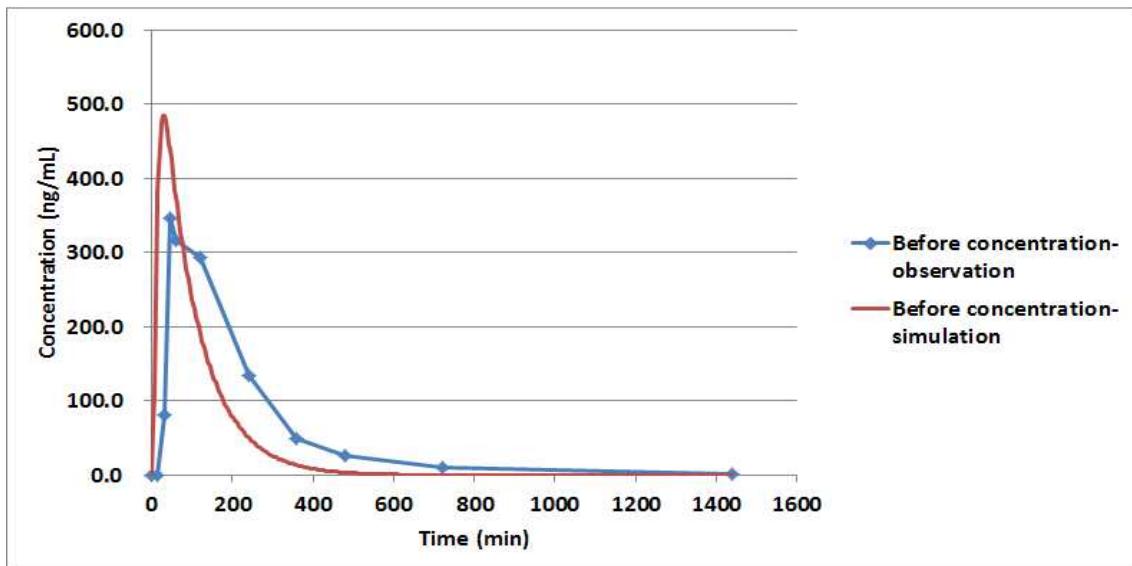
- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 기질 caffeine의 실제 임상 약동학 예측 – full dose PK (Dose: 100mg)



- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax ratio (simulation value/experimental value) = $2173.9/2783.0 = 0.78$
 - AUC ratio (simulation value/experimental value) = $17460/19890 = 0.88$

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

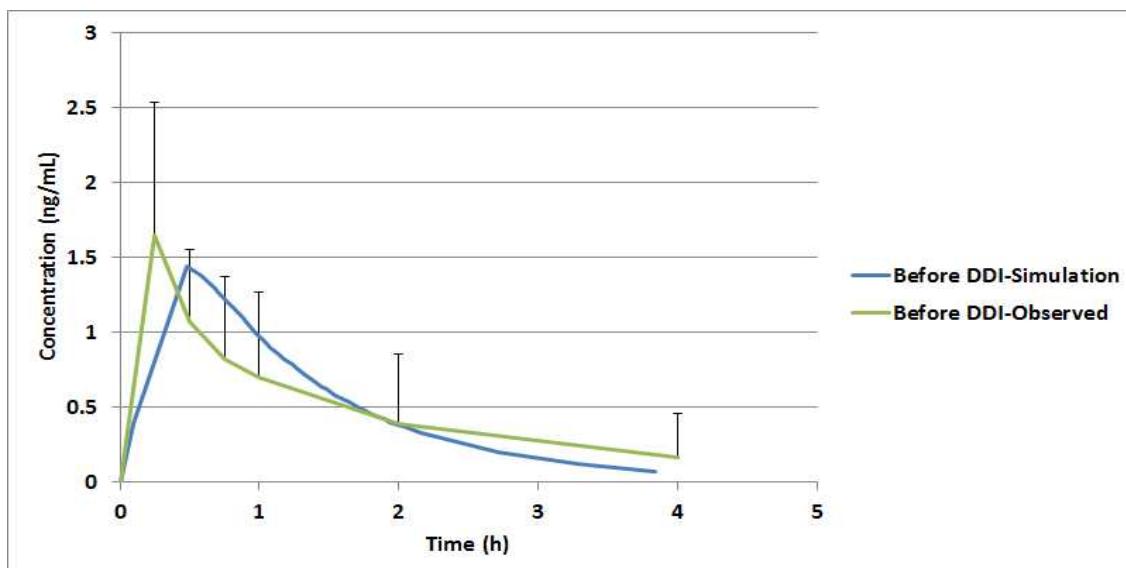
- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 기질 omeprazole의 실제 임상 약동학 예측 - full dose PK (Dose: 20mg)



- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax ratio (simulation value/experimental value) = $484.3/347.5 = 1.38$
 - AUC ratio (simulation value/experimental value) = $943.83/1272.7 = 0.73$

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

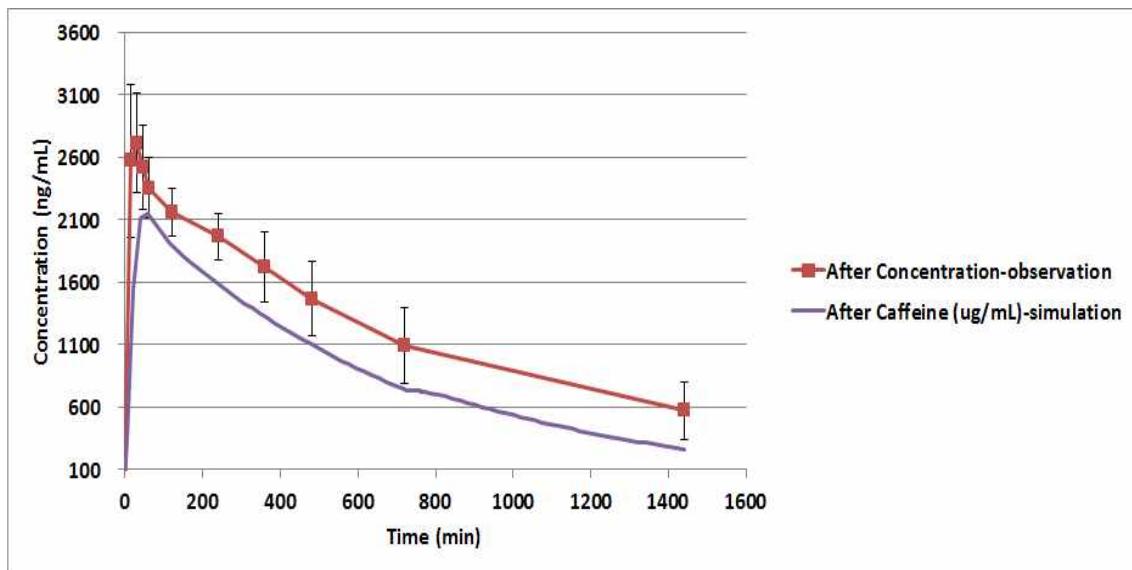
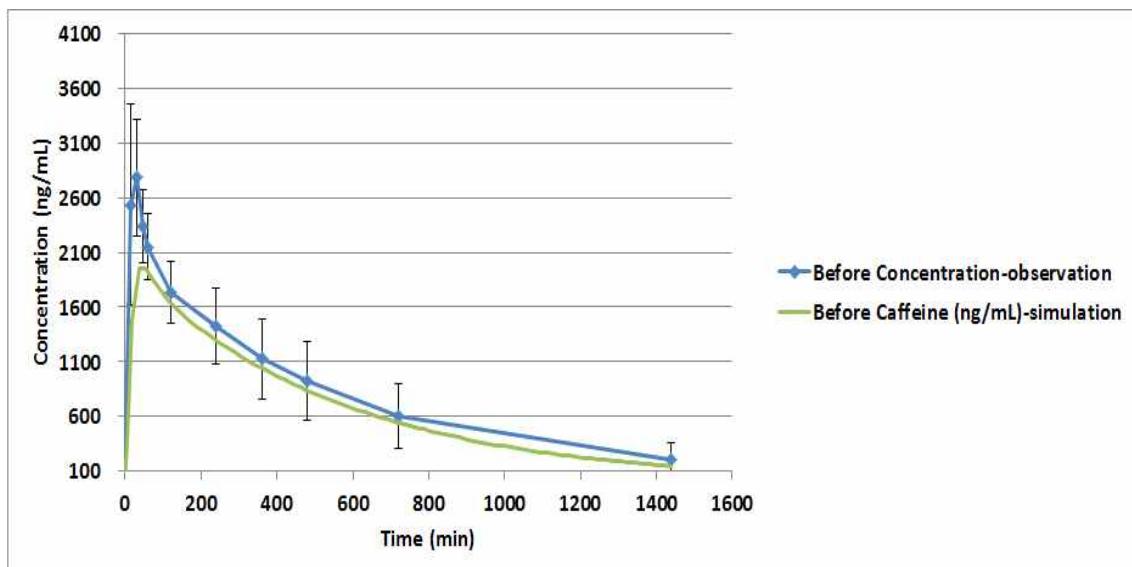
- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 기질 omeprazole의 실제 임상 약동학 예측 - microdose PK (Dose: 100ug)



- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax ratio (simulation value/experimental value) = $1.45/1.65 = 0.88$
 - AUC ratio (simulation value/experimental value) = $2148/2071 = 1.04$

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

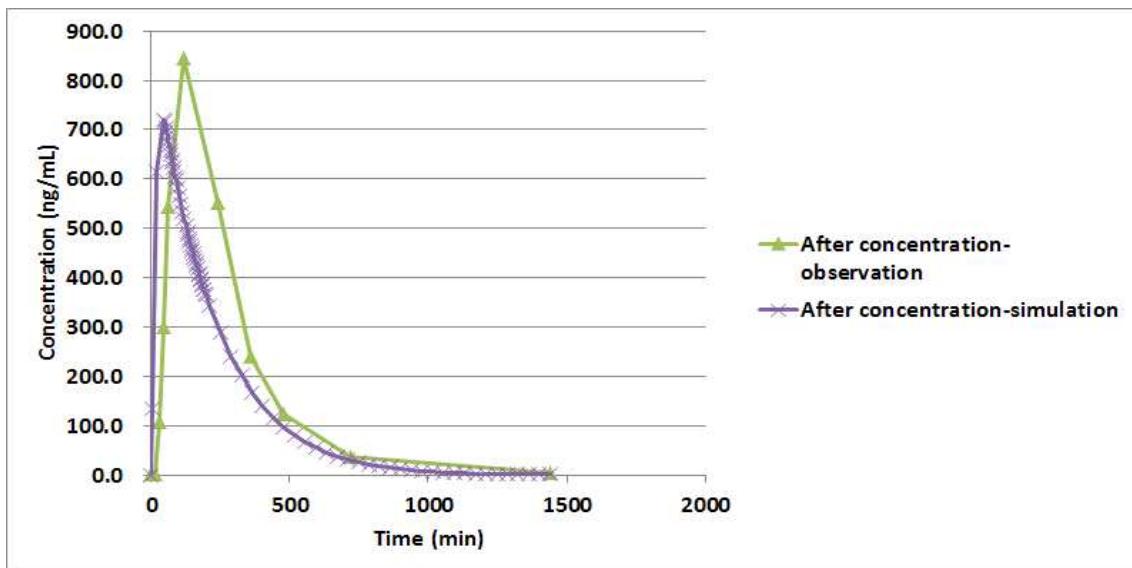
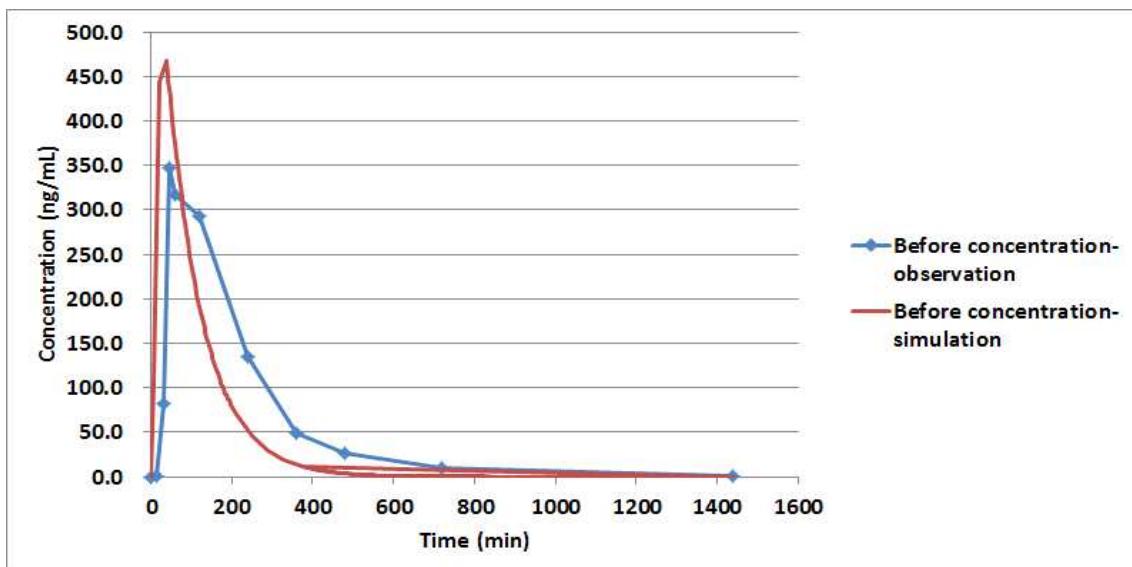
- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 caffeine과 ciprofloxacin의 약동학적 상호작용 예측 완료 - full dose DDI (Dose: 100mg)



- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax change ratio (observed data) = 1.03
 - Cmax change ratio (predicted data) = 0.92
 - AUC change ratio (observed data) = 0.65
 - AUC change ratio (predicted data) = 0.77

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

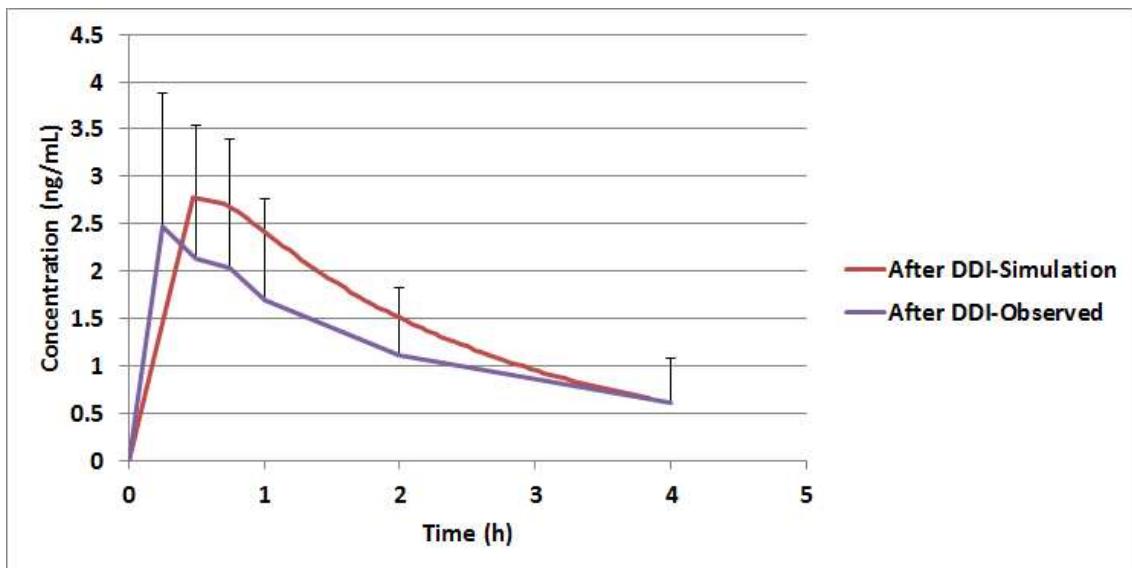
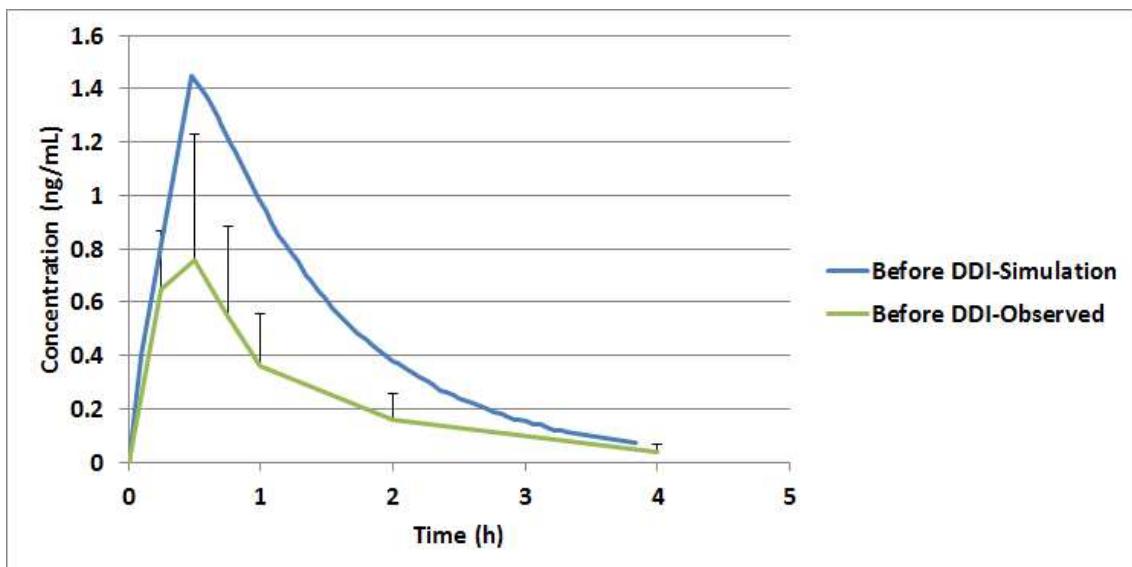
- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 omeprazole과 fluconazole의 약동학적 상호작용 예측 완료 – full dose DDI (Dose: 20mg)



- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax change ratio (observed data) = 0.41
 - Cmax change ratio (predicted data) = 0.66
 - AUC change ratio (observed data) = 0.32
 - AUC change ratio (predicted data) = 0.31

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

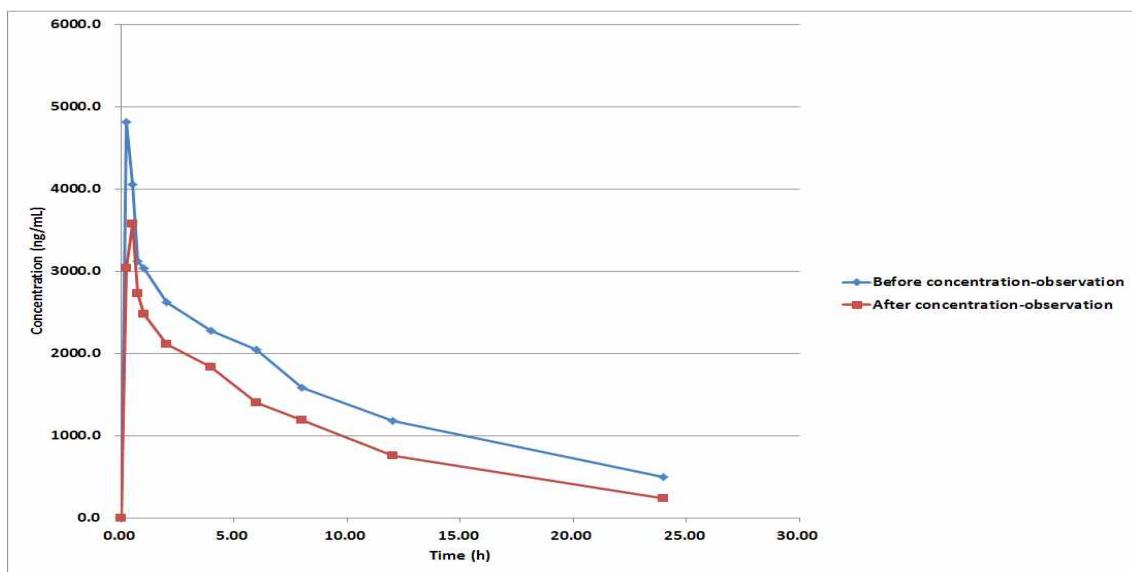
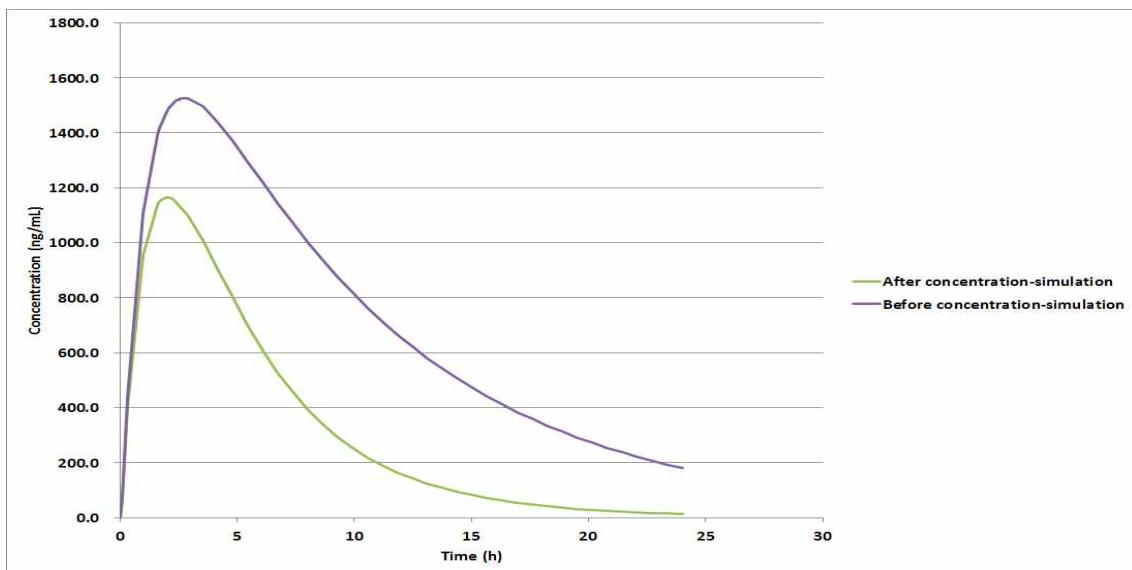
- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 omeprazole과 fluconazole의 약동학적 상호작용 예측 완료 – microdose DDI (Dose: 100ug)



- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax change ratio (observed data) = 0.31
 - Cmax change ratio (predicted data) = 0.52
 - AUC change ratio (observed data) = 0.20
 - AUC change ratio (predicted data) = 0.29

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 caffeine과 omeprazole의 약동학적 상호작용 예측 완료 - full dose DDI (Dose: 100mg)

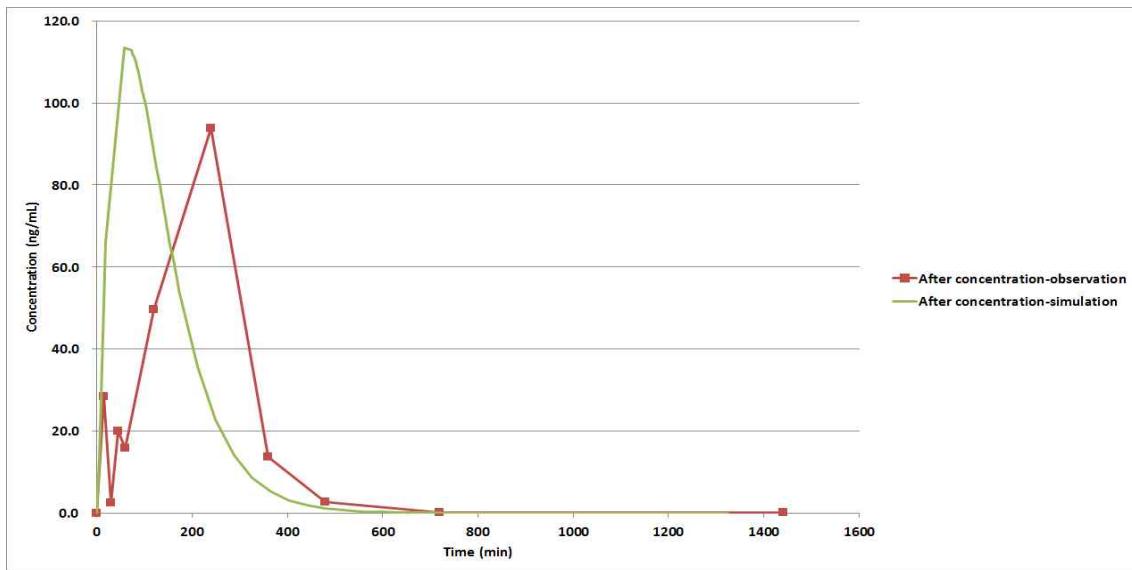
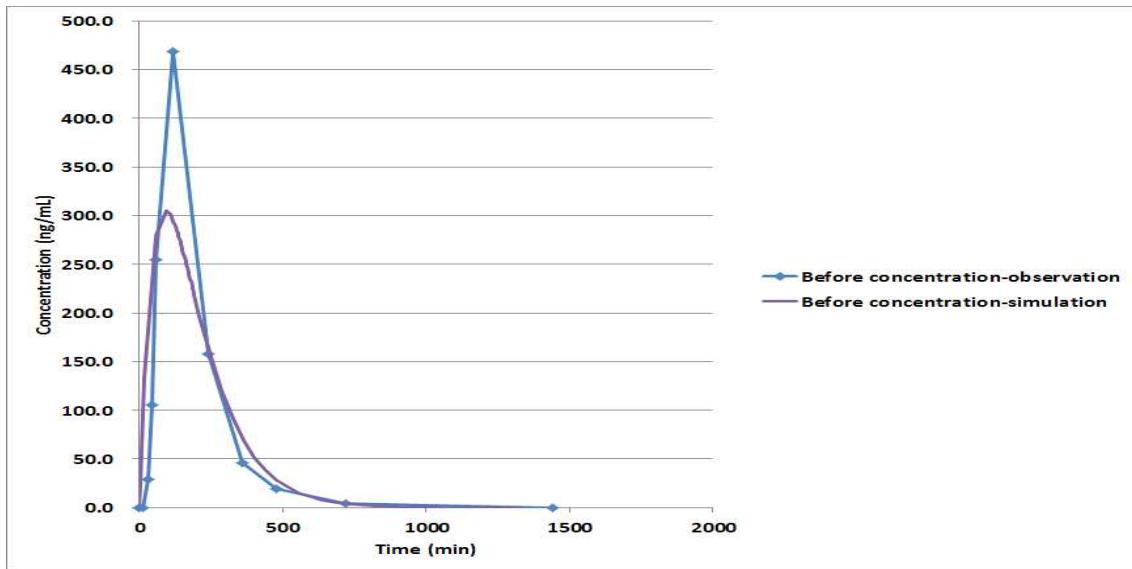


- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax change ratio (observed data) = 1.35
 - Cmax change ratio (predicted data) = 1.32
 - AUC change ratio (observed data) = 1.41
 - AUC change ratio (predicted data) = 2.17

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

※ Cmax와 AUC의 관측값과 예측값이 다른 이유 추정: 실제 관측값이 너무 높게 나온 것이라 추정됨. 현재 농도가 caffeine-ciprofloxacin의 DDI 임상의 caffeine 농도보다 2배 이상 높게 관측됨. 또한 이전에 진행되었었던 여러 caffeine 임상실험들과 비교시 농도가 역시 2배 이상 높게 관측됨. 개인차 등의 원인으로 인한 현상으로 추정됨.

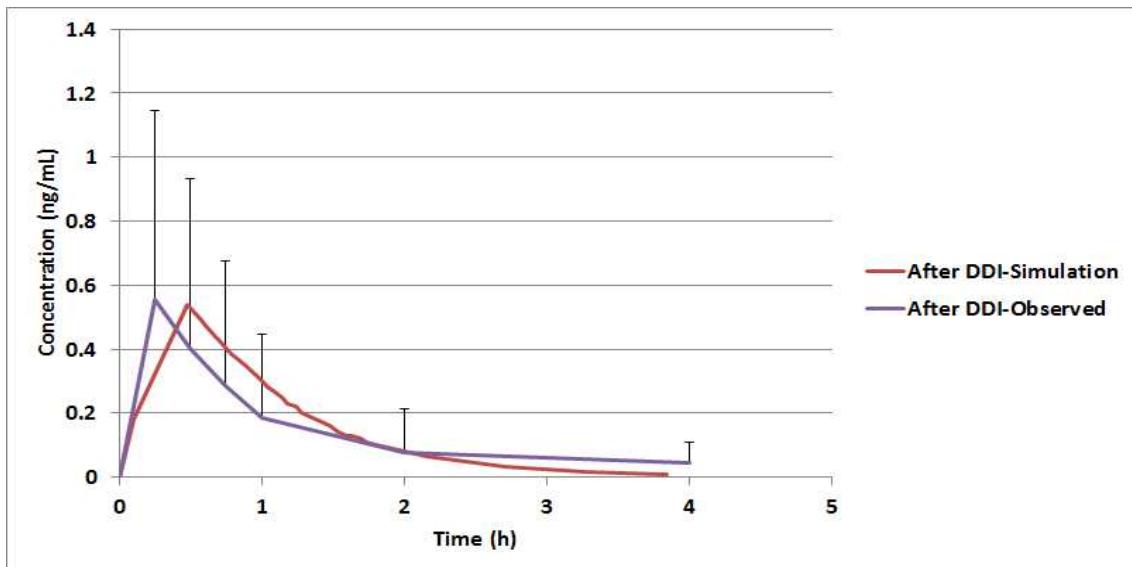
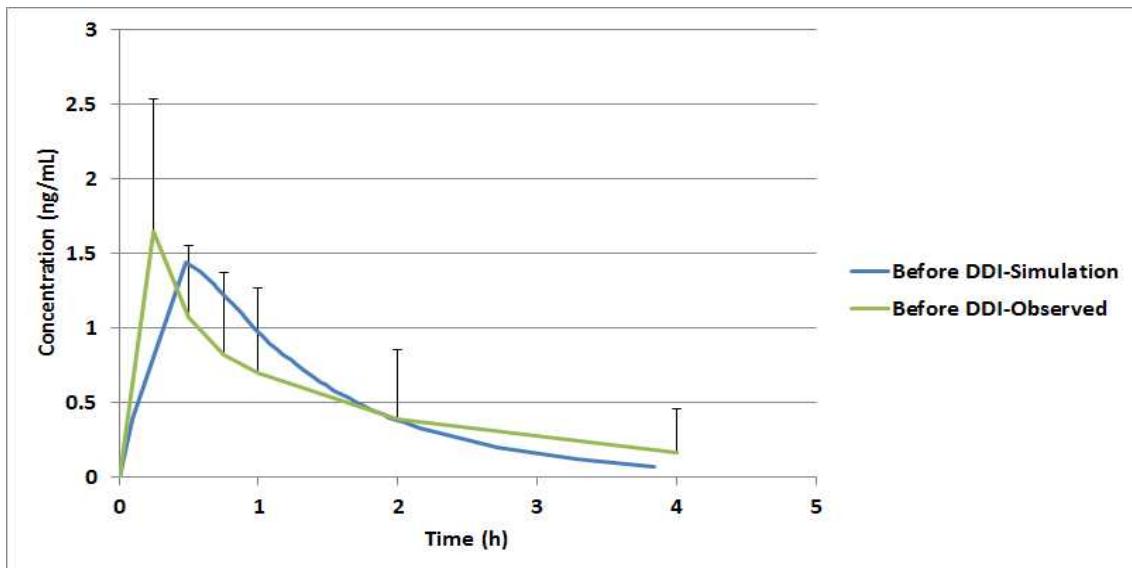
- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 omeprazole과 rifampin의 약동학적 상호작용 예측
완료 - full dose DDI (Dose: 100mg)



- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax change ratio (observed data) = 5.00
 - Cmax change ratio (predicted data) = 2.70
 - AUC change ratio (observed data) = 4.00
 - AUC change ratio (predicted data) = 4.17

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- 생리학적 기반 약동학 모델을 이용한 omeprazole과 rifampin의 약동학적 상호작용 예측
완료 - micro dose DDI (Dose: 100ug)



- Observed value Vs. Predicted value
 - Cmax change ratio (observed data) = 2.94
 - Cmax change ratio (predicted data) = 2.63
 - AUC change ratio (observed data) = 3.45
 - AUC change ratio (predicted data) = 3.45

Simulation value와 experimental value 비교 시 모두 2배 이하 범위 내에 있음.

- Full dose와 micro-dose의 DDI 효과 비교

DDI	Dose type	Cmax change ratio	AUC change ratio
		Observed	Observed
Induction (Ome-Flu)	Full dose	2.43	3.13
	Microdose	3.26	5.02
Inhibition (Ome-Rif)	Full dose	0.2	0.25
	Microdose	0.34	0.29

Micro-dose DDI를 통해 full dose DDI를 예측 가능함

- in silico PBPK modeling 결과와 실제 임상결과 예측에 대한 결과

PK	Dose type	Cmax			AUC		
		Observed	Predicted	Ratio simulated/observed	Observed	Predicted	Ratio simulated/observed
Caffeine*	Full dose	2783	2173.9	0.78	19890	17460	0.88
Omeprazole	Full dose	347.5	484.3	1.39	1272.7	943.83	0.74
Omeprazole	Microdose	1.65	1.45	0.88	2071.00	2148.00	1.04

Caffeine*: high level endogenous caffeine에 의해 caffeine의 micro-dose 결과는 제외함.

DDI	Dose type	Cmax change ratio		AUC change ratio	
		Observed	Predicted	Observed	Predicted
Induction (Caf-Cip)	Full dose	1.03	0.92	0.65	0.77
Induction (Ome-Flu)	Full dose	0.41	0.66	0.32	0.31
	Micro-dose	0.31	0.52	0.20	0.29
Inhibition (Caf-Ome)	Full dose	1.35	1.32	1.41	2.17
Inhibition (Ome-Rif)	Full dose	5.00	2.70	4.00	4.17
	Micro-dose	2.94	2.63	3.45	3.45

in silico PBPK modeling을 이용하여 실제 임상의 PK 및 DDI를 예측 가능함

3-2-4. 제 3세부과제

가. 요약서

과제명	약물 간 상호작용 마이크로도징 임상시험을 위한 가속기질량분석기 분석기술 개발		
세부책임자	송종한	세부연구기관	한국과학기술연구원
연구목표	<p>초극미량 분석장치인 가속기질량분석기(AMS)를 이용하여 ppt 이하 수준의 ^{14}C를 정량할 수 있는 분석기술을 개발하고, 분석 기법에 대한 SOP 및 프로토콜을 완성하여 약물간 상호작용 마이크로도징 임상시험 가속기질량분석 기술 개발</p>		
연구내용	<p>1차년도 : 헬액(플라즈마)을 사용한 시료전처리 기술 확립 및 MC(Modern Carbon) 계산 프로그램 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> - 약물간의 상호작용을 위한 임상시료인 플라즈마를 가속기질량분석하기 위한 플라즈마 시료의 전처리법을 확립 - 가속기질량분석 결과인 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$의 비율로부터 ^{14}C-표지화합물의 농도를 단시간에 다양한 분석결과를 계산할 수 있는 프로그램 개발 <p>2차년도: 마이크로도징 관련 가속기질량분석기의 분석방법 검증 및 임상시료 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> - 가속기질량분석기를 사용하여 임상시료에 적용하기 위한 ^{14}C-표지 화합물 표준 시료 및 QC 시료를 제작하고 시료에 대한 측정범위 및 LLOQ, CV, Precision에 관한 분석기법 확립 - CYP450또는 P-glycoprotein 대표기질을 ^{14}C-표지 한 후, 극미량 혼합물을 CYP450 또는 P-glycoprotein 억제 물질과 함께 대상 피험자에 동시에 마이크로도징 투여 후 채혈한 시료의 대표기질 물질을 가속기질량분석기 분석 <p>3차년도: 가속기질량분석기를 사용한 임상시료의 분석기법 심화 및 마이크로도징 분석방법 정립</p> <ul style="list-style-type: none"> - 가속기질량분석기를 사용하여 임상시료에 적용하기 위한 ^{14}C-표지 화합물 표준 시료 및 QC 시료를 제작하고 시료에 대한 측정범위 및 LLOQ, CV, Precision 확인 - CYP450또는 P-glycoprotein 대표기질을 ^{14}C-표지 한 후, 극미량 혼합물을 각각 CYP450 또는 P-glycoprotein 억제 물질 또는 유도 물질을 함께 대상 피험자에 동시에 마이크로도징 투여 후 채혈한 시료의 대표기질 물질을 가속기질량분석기 분석 - 낮은 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$의 값을 갖는 새로운 carrier의 개발 및 적용 등 마이크로도징 기법 심화연구 - 마이크로도징 가속기질량분석기법에 대한 SOP 및 프로토콜 정립 		
연구개발에 따른 기대성과	<ul style="list-style-type: none"> - 초극미량의 방사성 동위원소를 측정할 수 있는 기속기질량분석기를 약물 간 상호작용 평가에 활용함으로써 신약개발에 소요되는 비용 및 시간을 획기적으로 줄일 수 있는 마이크로도징 기법을 국내에서 처음으로 확립함으로써 국내 바이오메디칼 관련기관에 가속기질량분석 서비스 제공 - 신약개발 연구를 하는 국내 제약회사에 가속기질량분석을 제공하여 신약개발 시간단축 및 비용 절감에 획기적으로 기여 - 기속기질량분석기를 이용한 마이크로도징 임상시험법을 확립함으로써 임상시료 분석을 외국에 의존하지 않고 국내에서도 분석이 가능하여 국내 신약개발기술의 향상 및 수입대체 효과를 가져 옴 		

나. 연구 내용 및 결과

1.1 차년도 연구 내용 및 결과

1.1 약물간의 상호작용을 위한 임상시료인 플라즈마를 가속기질량분석하기 위한 플라즈마 시료의 전처리 법을 확립

1.1.1 연구 배경 및 목적

- 신약을 개발하기 위하여 임상시험을 실시하여 약동력학(Pharmacokinetic)에 대한 정보를 확인해야 한다. 약동력학에 대한 정보는 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설(ADME, ad.....) 과정에 대한 정보이다. 임상시험을 수행하여 약물을 투여하고 시간에 따른 약물의 농도를 확인하는 과정을 통해 약물에 대한 약동력학 정보를 확인 할 수 있다. 약물의 농도를 확인하기 위하여 일반적으로 질량 분석기를 사용하는데 본 연구에서는 극미량의 ^{14}C 표지 약물과 가속기 질량 분석기 (AMS)를 이용하여 약동력학 정보를 확인하고자 한다. ^{14}C 표지 약물과 가속기 질량 분석기를 이용하여 약동력학 정보를 확인하는 과정은 그림1에서 확인 할 수 있다. ^{14}C 표지 약물을 이용한 임상시험부터 전처리 과정을 통해 시료를 변형하고, 최종 AMS 결과로부터 약동력학 정보를 얻을 수 있다.

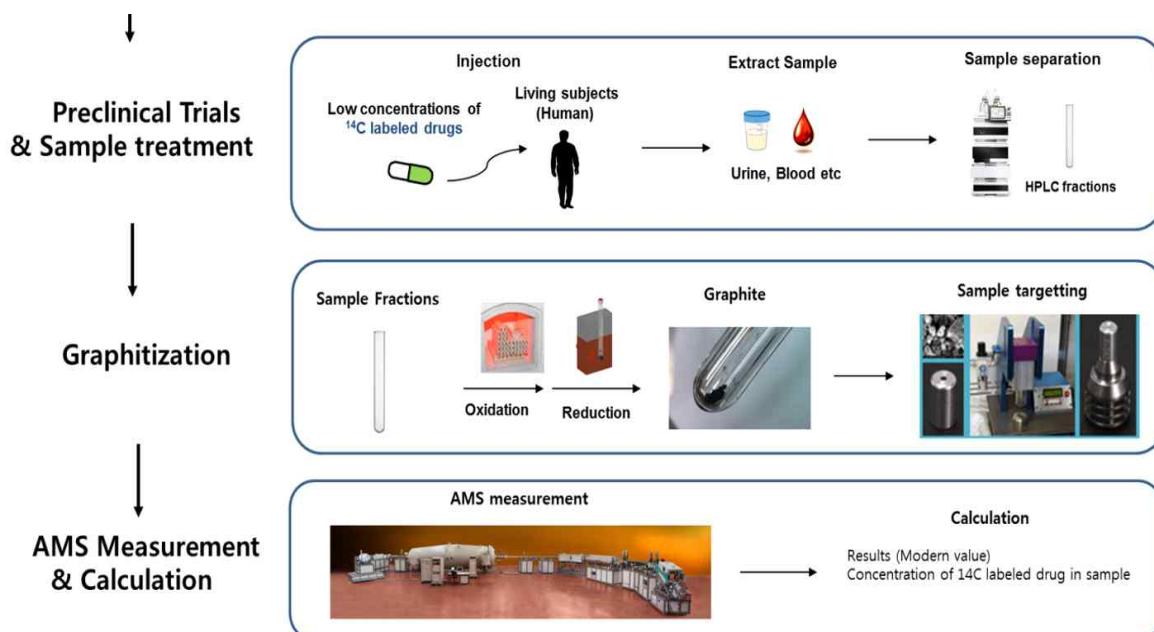


그림 191. ^{14}C 표지 약물과 AMS를 이용한 약동력학 정보 확인 과정

- 약동력학 정보를 얻기 위해서 임상시험을 수행하는 경우 투여 경과 후 시간 포인트와 피험자의 수에 따라 임상시료의 개수가 정해진다. 일반적으로 임상시료의 개수의 양이 상당히 많기 때문에 가속기질량분석법(AMS)으로 약동력학 정보를 구할 경우 시료를 처리

하여 결과를 얻기까지 많은 시간이 필요하다. 일반적으로 AMS를 측정하기 위해서는 임상 시료로부터 전처리과정을 진행하여 흡연을 만드는 과정이 필요하기 때문이다. 임상시료로부터 원하는 약물만을 분리한 후 이 약물을 산화, 환원시키는 과정을 진행하여 AMS를 측정할 수 있다. 일반적으로 이 과정이 시료 하나당 3일이 소요된다. 하지만 시료를 동시에 여러 개 처리할 수 있기 때문에 처리할 수 있는 용량 내에서 시료의 개수에 상관없이 3일이 소요된다. 따라서 본 연구 기관에서는 기존 전처리 과정에서 사용하고 있는 산화-환원반응을 거쳐 시료를 흡연화 할 수 있는 방법을 보완하여 30개/1day 이상 전처리 할 수 있는 시스템을 구축하고자 하였다.

- 일반적으로 ^{14}C 표지약물과 AMS를 이용하여 혈장 내에 있는 ^{14}C 의 총량 또는 혈장 내에 있는 ^{14}C 표지 약물이나 ^{14}C 표지 대사체의 농도를 확인 할 수 있다. 임상시험 피험자에게 AMS를 이용하여 분리한 혈장 내에 있는 ^{14}C 의 총량, ^{14}C 표지 약물 또는 대사체의 농도를 확인하기 위하여 각각의 전처리 방법이 다르다. 임상시험에서는 혈장 시료로부터 ^{14}C 표지 약물 또는 대사체를 분리하여 그 농도를 확인해야 한다. 혈장내의 ^{14}C 표지 약물 또는 대사체의 농도를 확인하기 위해서는 HPLC로 표지 약물 또는 대사체를 혈장으로부터 분리 한 후 그 분획을 받아 이를 전처리할 필요가 있다. 1차 년도에는 혈장 내에 있는 ^{14}C 의 총량, ^{14}C 표지 약물을 도입한 혈장내에 있는 ^{14}C 의 총량을 확인하여 혈장을 전처리 하는 방법을 확립하고자 한다. 전처리 후 AMS 결과에서 혈장 내에 포함된 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 비율을 확인하여 그 결과값을 예상한 MC값과 비교하여 확인하고자 한다. MC는 Modern carbon의 약자이며 현재 대기에 포함된 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 비율을 말하는데, 그 비율이 약 1.17×10^{-12} 이다.
- 따라서 본 연구에서는 향후 대량의 임상 시료를 처리 할 수 있도록 생의학 시료를 전용 전처리 실험실을 구축하고자 한다. 그리고 전처리 과정에서의 효율을 높일 수 있도록 실험 방법의 최적화를 진행하고, 임상시료로 처리해야 할 혈장 전처리법을 확립하고자 한다.

1.1.2 연구 내용

1.1.2.1 생의학 시료 처리용 실험실 구축



그림 2. 생의학 시료 전처리 전용 실험실

- ^{14}C 을 이용한 임상 시험 시료 또는 생의학 시료처리를 위하여 생의학 시료 전처리 전용 실험실을 구축하였다. 현재 KIST에서는 가속기 연구동에 탄소 연대 측정을 위한 전처리 전용 실험실이 구축되어 있다. ^{14}C 을 이용한 임상 시료 또는 생의학 시료를 전처리 하기 위한 실험실은 연대 측정을 위한 전처리 전용 실험실, AMS 측정하는 공간과 확실하게 분리되어 있어야 한다. 생의학 시료의 경우 ^{14}C 표지 약물을 임의로 도입한 후에 얻어진 생체시료 내에 있는 ^{14}C 표지 물질의 농도를 확인하기 때문에 1 MC 값보다 높은 결과를 얻을 수 있다. 하지만 연대측정 시료의 경우 방사성 탄소의 반감기를 이용하기 때문에 1 MC를 기준으로 하여 낮은 결과 값을 얻는다. 즉, 1 MC값보다 훨씬 높은 결과를 가지는 생의학 시료나 또는 그 시료를 전처리 하는 과정에서 1 MC 보다 낮은 연대 측정 시료의 결과 값에 영향을 줄 수 있다. AMS를 측정하는 공간 역시 생의학 시료 전처리 전용 실험실과 분리되어 있어야 하는데, 이 역시 높은 MC값을 가지는 생의학 시료가 측정 준비

또는 측정 과정에서 AMS 결과에 직접적으로 영향을 줄 수 있기 때문이다. 따라서 생의학 시료 처리를 위한 생의학 전용 전처리 실험실은 확실하게 분리되어 구축되어야 한다. 현재 생의학 시료 전용 전처리실험실은 L2연구동 L2335호실에 분리되어 구축되어 있다. 또한 생의학시료 전용 전처리실의 위치가 AMS와 탄소연대측정용 전처리실이 구축되어 있는 가속기연구동과 직선거리로 500 m이상 떨어져 있다.

- 그림 2에서 볼 수 있듯이 생의학 시료 전용 전처리 실험실에는 생의학 시료 전처리 실험 과정에 필요한 필수 장비를 포함하여 그 밖의 다양한 장비를 보유하고 있다. 따라서 실험실 내부에서 모든 관련 실험, 전처리가 가능하도록 하였다. 그리고 생의학 시료 전처리 전용 실험실은 실험 과정을 토대로 동선을 확인하여 장비를 배치하였다. 생의학 시료의 경우 HPLC 분획 과정, 건조과정, 산화 과정, 환원 과정, 표적 과정 등 여러 과정을 거쳐 AMS 측정을 위한 시료를 제작할 수 있다. 따라서 그림 2에서 볼 수 있듯 일련의 과정을 진행할 때 동선을 고려하여 효율적인 전처리가 진행될 수 있도록 하였다.



그림 193. 생의학 시료 전처리 순서

- 생의학 시료 전처리 전용 실험실은 생의학 시료 전처리과정(그림3)를 고려하여 실험 장비를 설치 및 배치하였다(그림4). 생의학 시료 전처리 과정에 대하여 간단하게 설명하면 다음과 같다. HPLC는 특정 표지 물질 또는 대사체등을 컬럼을 이용해 시료를 분리 한 후 자동으로 분획 시료를 받기위하여 설치하였다. 특정 물질의 확인 또는 농도 분석을 위하여 질량 분석기를 (HPLC에) 연결 하였다. 분획 과정을 진행한 분획 시료의 경우 용리액에 있는 용매가 탄소를 포함할 수 있기 때문에 이를 제거하는 과정이 필요하다. 용매자체 내에서 포함되어 있는 탄소는 AMS 실험 결과에 영향을 줄 수 있기 때문에 반드

시 제거하여야 한다. 따라서 분획한 시료를 처리하기 쉽도록 HPLC 옆에 진공농축기 (Speed vacuum concentrator)를 설치하였고, 이를 이용하여 시료에 포함된 용매를 제거 한다. 분획과정 후에 시료 내에 산화제로 쓰일 CuO와 Carbon carrier인 Tributyrin을 첨가하기 위한 시료 전처리 공간을 확보하였다. 맞은편에 석영관 밀봉 및 이산화탄소 포집 용 진공라인을 설치하여 진공하에서 석영관을 밀봉 할 수 있도록 하였다. 진공 밀봉된 석영관을 900 ($^{\circ}\text{C}$)에서 산화시킬 수 있도록 밀봉 공간 옆에 전기로를 설치하였다. 산화 과정으로부터 생성된 이산화탄소 와 물을 환원용 튜브로 끌기기 위하여 석영관 밀봉 및 이산화탄소 포집용 진공라인을 사용할 수 있다. 이후 520도로 설정된 환원 전용 전기로를 이용하여 환원 과정을 진행한다. 생성된 흑연이 포함된 철가루를 압착하여 AMS 타겟을 만들 수 있는 장비 및 시스템을 환원 과정 맞은편에 구축하였다. 압착을 위한 시스템은 공간상의 문제가 있고, 다른 과정에 비하여 독립적으로 진행할 수 있다고 판단하여 위치를 선정하였다.

- 이외에도 다른 많은 장비들이 설치되어 있다. 다양한 생의학 시료를 전처리 하기 위하여 시료 내에 존재하는 탄소의 비율 또는 양을 확인 할 수 있는 EA (Elemental Analyzer)를 설치하였다. 향후 EA는 시료를 산화 시킬 수 있기 때문에 시료로부터 산화된 CO₂를 포집하고 이로부터 수소와 함께 반응 시켜 흑연화 과정을 진행할 수 있는 반자동 흑연화 시스템을 함께 구축하였다. 실험 시에 사용되는 도구들을 세척하기 용이하도록 소니케이터를 설치하였고, 세척과정 후 건조를 위하여 오븐을 설치하였다. 또한 실험에 필요한 3 차 증류수를 만들 수 있는 시스템을 구축하였다. 그밖에도 토치에 필요한 프로판, 산소 가스등 실험 시 필요한 가스들을 안전하게 보관할 수 있도록 실험실 외에 따로 비치된 철제보관함을 이용하여 구축하였다.
- 향 후 구축된 생의학 시료 전처리 전용 실험실을 관리하고 효율적으로 사용할 수 있도록 전처리 전용 실험실의 유지 및 관리에 대한 프로토콜 또는 SOP를 구축하고자 한다. 또한 실험 장비에 대한 사용 요령, 유지 및 보수 등을 포함하는 프로토콜 및 SOP를 함께 구축할 예정이다.

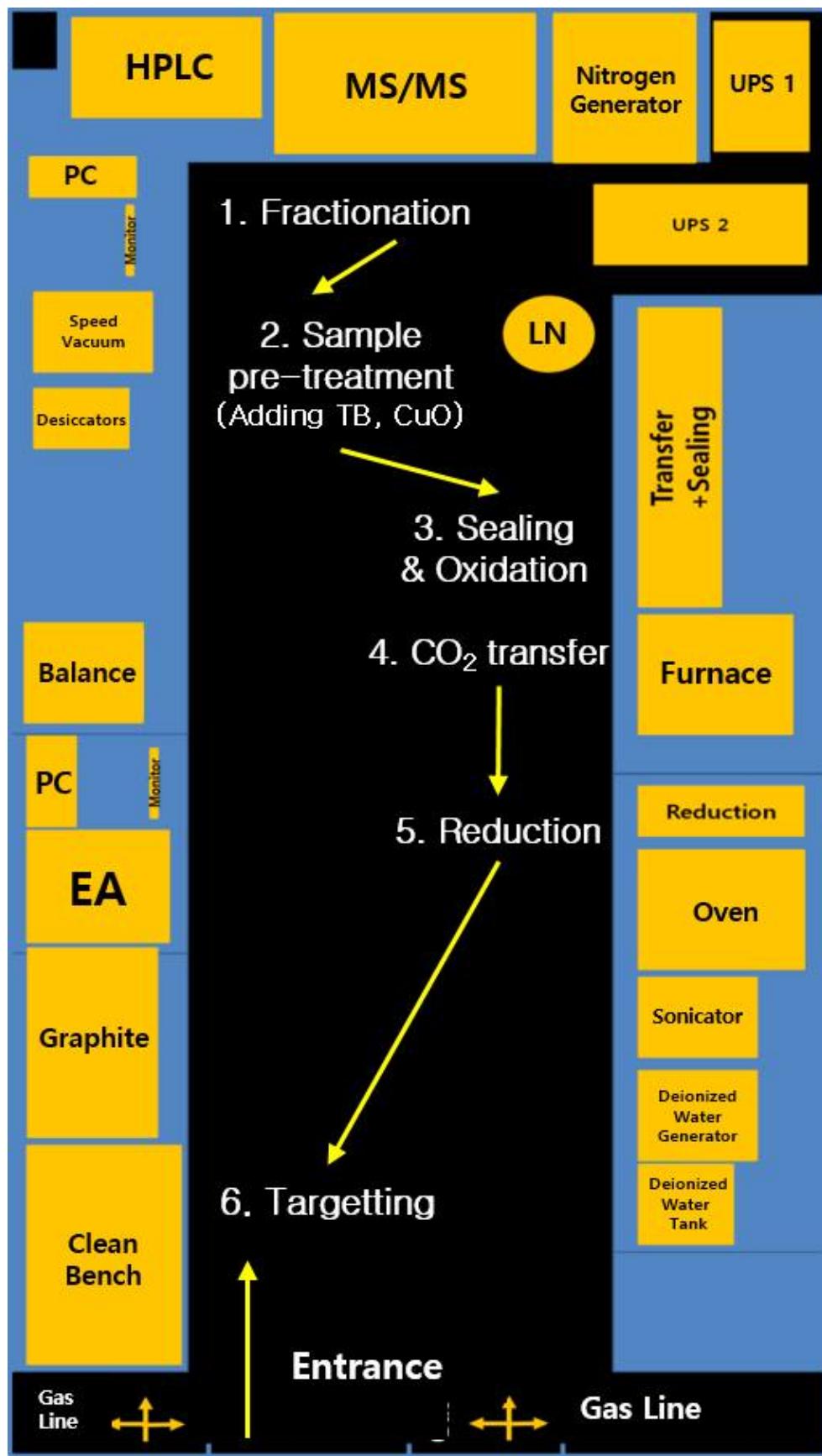


그림 194. 생의학 시료 전처리 전용 실험실 배치 및 동선

1.1.2.2 전처리 과정의 최적화과정

- 그림 5는 기존에 사용 했었던 시료용 석영관 밀봉 및 이산화탄소 포집용 진공라인으로 진공 시스템을 개선을 통하여 시료처리 시간을 1/5 정도로 획기적으로 줄일 수 있도록 개선하였다. 시스템 내에서 진공 시스템은 로터리 펌프와 터보 펌프를 이용하였고 낮은 진공도 (10 mtorr)를 유지하기 위하여 2개의 펌프를 순차적으로 이용할 수 있도록 자동화된 진공시스템을 구축하였다. 50 mtorr 이상의 진공도에서는 로터리 펌프만이 동작하고, 이하의 진공도에서는 터보펌프를 작동시켜 진공도를 더 낮게 유지할 수 있도록 하였다. 이 시스템을 자동화하기 위하여 공압 밸브를 사용한 시스템을 구성하였고, 진공센서를 함께 사용하여 진공라인의 진공도를 측정 할 수 있도록 하였다. 이 시스템을 사용하여 전처리 시간을 단축시킬 수 있었고, 모두 자동화 되어 있어 매우 편리하게 사용가능하다. 특히 이산화탄소 포집용 진공라인을 이용할 때, 진공이 10 mtorr 이하로 유지된 이후에 이산화탄소 이동 및 포집과정이 진행되는데 시간이 5분 이상 소요되던 것을 이 시스템을 이용하여 1분 이내로 줄일 수 있었다. 시료 한 개로부터 이산화탄소 이동 및 포집과정에 걸리는 시간을 단축함으로써 시간당 처리할 수 있는 시료의 개수가 많아졌다.



그림 5. 시료용 석영관 밀봉 및 이산화탄소 포집용 진공라인

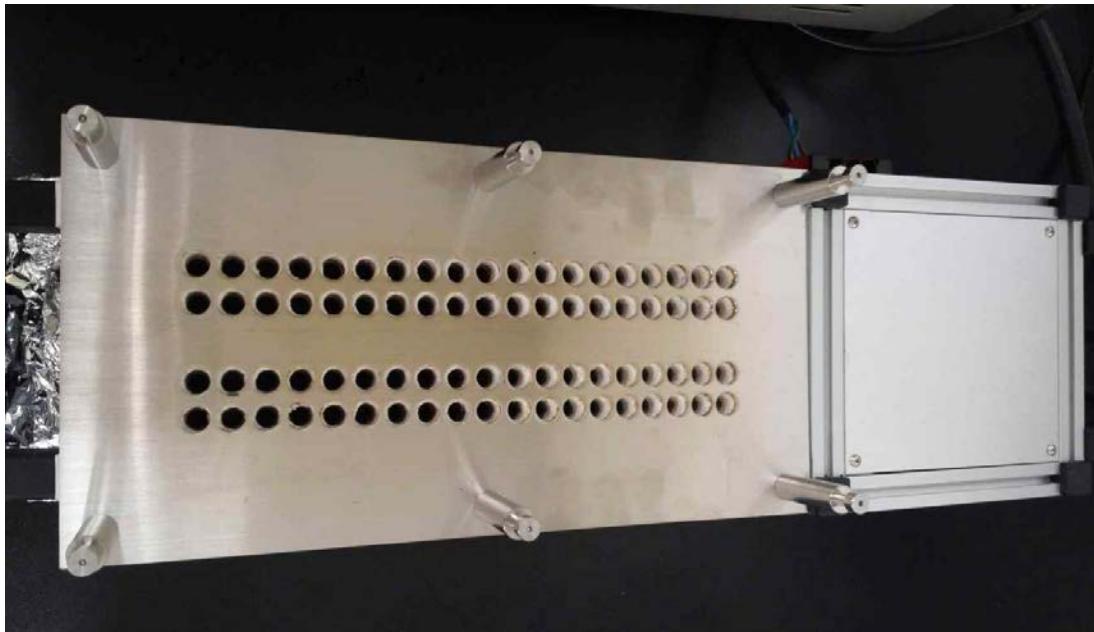


그림 6. 환원용 전기로 (76개 가능)

- 그림6는 환원용 전기로로 다양한 시료를 동시에 환원과정을 진행 할 수 있는 전기로를 제작하였다. 구리 블록을 이용한 전기로이며, 동시에 76개의 시료를 처리할 수 있다. . 현재 열원의 온도를 높여 구리블록이 온도를 올릴 수 있고, 온도 컨트롤러를 사용하여 특정 온도 (520°C)를 유지, 조절할 수 있도록 하였다. 반응 시간을 조절할 수 있는 시스템도 포함되어 있기 때문에 수월하게 환원과정을 진행할 수 있다. 그리고 사전에 실험을 통하여 환원용 전기로의 온도 분포가 일정함을 확인 하여 반응 위치에 따른 문제점을 배제할 수 있었다. 환원용 전기로를 사용하는 과정에서 내부에 열을 전달하는 구리블록이 산화되면서 산화구리가 형성되는 경우가 있다. 환원로 내부에서 산화구리가 형성되면 환원튜브를 넣기 힘들어지므로 이를 개선 보완할 필요가 있다. 또한 환원튜브를 밀폐시키기 위하여 사용되는 플라스틱 마개가 있는데 이 마개가 환원튜브내의 압력이 높아져 튀어나오지 않도록 환원 튜브의 높이에 맞춰 덮개를 설치할 필요가 있다. 현재 덮개는 열팽창에 의하여 덮여지지 않는다는 단점이 있어 이를 개선 보완한 새로운 환원용 전기로를 구축하고자 한다.
- 일반적으로 1개의 시료를 전처리하는데 3일의 시간이 소요되며 여러 개의 시료를 처리하더라도 소요되는 시간은 동일하다. 각 과정에서 1개의 시료를 처리하는 시간을 단축 할 수 있다면 시료를 처리할 수 있는 개수가 많아질 수 있다. 현재 전처리 할 수 있는 시스템은 30개/1day 수준이며, 향후 각 과정에서 문제점을 확인하고 최적화를 진행하거나 처리 용량을 늘려 하루 처리량이 30개 이상 수준으로 높이고자 한다.

1.1.2.3 혈장 시료 전처리방법 확립



그림 197. 혈장 시료 전처리 과정

- 혈장시료를 전처리 하기 위하여 사전에 EA를 이용하여 1mg의 탄소를 포함하는 혈장의 양을 확인하고자 하였다. EA를 이용하여 혈장 내에는 4%의 탄소가 혈장 내에 있음을 확인하였다. 그림 7은 혈장시료 속에 있는 탄소 원을 추출하여 가속기질량분석법으로 ^{14}C 의 량을 측정하는 과정의 모습이다. 전처리 방법을 자세하게 설명하면 다음과 같다. 1 mg이상의 탄소를 만들어주기 위하여 25 μl 의 혈장을 시료용 석영관에 넣고 혈장 내에 포함된 물을 진공농축기를 이용하여 제거한다. 건조된 혈장에 산화제로 사용할 CuO를 300 mg 정도이상 넣고 시료용 석영관을 밀봉용 석영관 내에 넣어준다. 이후 10 mtorr 이하의 진공상태에서 토치를 이용하여 밀봉한다. 밀봉한 석영관을 산화용 전기로에 순서대로 넣어주고 (매거진을 이용하여 밀봉용 석영관의 순서가 바뀌지 않도록 한다.) 900 °C도에서 3시간 이상 산화를 진행한다. 산화과정 후 밀봉된 석영관 내에 생성된 CO_2 와 H_2O 등을 이산화탄소 포집용 진공라인을 이용하여 환원용 튜브에 옮겨준다. 이산화탄소의 이동 및 포집 과정이 끝난 환원용 튜브를 환원용 전기로에 옮겨 넣어준 후 520도°C에서 5시간 반 동안 환원과정을 진행한다. 환원 과정후 생성된 특연이 포함된 철가루를 타겟팅 시스템을 이용하여 타겟하여 AMS 시료를 만든다.
- 그림 8에서 보는 바와 같이 가톨릭 의대에서 제공 받은 공혈장(control plasma)을 사용하여 설명된 전처리 과정을 통해 가속기 질량분석용 특연을 만들 수 있는 전처리 기술을 확립하였다. 표 1은 그 결과를 표현 한 것으로 5개의 시료를 측정한 결과 1.020 fMC의 값을 얻었으며 표준 편차는 0.009965 로서 일반적으로 생의학 시료의 가속기질량분석법 허용오차 0.1 MC ~ 100 MC 보다 훨씬 작은 오차를 보이고 있어 신뢰성 있는 가속기



그림 8. 혈장(왼쪽)으로부터 탄소(오른쪽)를 만듬

질량분석을 하기에 충분한 값이라고 할 수 있다.

Control plasma	MC(Modern Carbon)	Avg (SD)
sample - 1	1.017	1.020 (\pm 0.009965)
sample - 2	1.011	
sample - 3	1.024	
sample - 4	1.014	
sample - 5	1.036	

표 1. 공혈장의 AMS 측정 결과

- 추가적인 실험으로 표준시료 (공혈장 + ^{14}C Glucose)내의 ^{14}C 의 총량을 측정(TRA 측정)하고자 하였다. 혈장 내에 알고 있는 MC값을 가지도록 뚫혀진 ^{14}C 표지 물질(낮은 radio activity)을 spiking 하고 이를 전처리 하여 AMS를 측정한 결과와 예측하고 있는 값으로부터 정밀도 및 정확도를 확인하였다. ^{14}C 표지 물질을 뚫히는 과정은 예상되는 MC값을 가지기 위한 radio activity를 계산하여 원액에서부터 증류수 또는 공혈장 등을 이용하여 뚫

한다. 이 과정에서 radio active한 물질을 다루기 때문에 RI 실험실(Radio isotope 전용 실험실)에서 과정을 진행할 수 있다. 사전에 방사선 종사자 교육이 선행되어야 RI 실험실 출입이 가능하다는 점을 주의해야 한다. 방사성 물질을 다뤄야 하기 때문에 매우 주의해야 하는 과정이다. 둑히는 과정을 진행하여 최대한 둑혀 규정치 이하 값을 가진다고 판단하였을 때 외부 반입이 가능하다. 규정치는 ^{14}C 의 경우 $10^4 \text{ bq}/\text{ml}$ 로 처리해야 방사성물질이 아니라고 판단할 수 있다. 외부로 반입될 시에는 조금 더 엄격한 규정을 따라야 한다.

- 세개의 다른 MC값을 가지는 시료를 만들기 위하여 ^{14}C 표지 Glucose를 둑혔고, 각 3개의 시료를 제작하였다. 표 2에서 확인 할 수 있듯이 정밀도 및 정확도가 $\pm 15\%$ 이내에 포함되어 있음을 확인하였다. 따라서 공혈장 뿐만 아니라 ^{14}C 표지 물질을 spiking 한 혈장으로부터 얻은 결과 역시 신뢰할 수 있음을 확인하였다.

Sample	Meas. Value (MC)	Average (SD)	Prec. (CV %)	Exp. Value (MC)	Acc. (%)
Lo - 1	0.247	0.243 (± 0.0164)	6.73	0.213	114
Lo - 2	0.257				
Lo - 3	0.225				
Md - 1	21.7	22.0 (± 0.306)	1.39	21.3	103
Md - 2	21.9				
Md - 3	22.3				
Hi - 1	63.8	64.6 (± 1.09)	1.69	63.9	101
Hi - 2	65.9				
Hi - 3	64.3				

표 2. 표준시료 (공혈장 + ^{14}C Glucose)내의 ^{14}C 의 총량

- AMS를 위한 전처리, AMS 측정과정이 문제없이 정확한지 확인하기 위하여 IAEA에서 제공하는 기준시료를 사용하였다. IAEA에서 제공하는 C3 (Cellulose)와 C8 (Oxalic acid)는 MC 값과 $\delta^{13}\text{C}$ 값 (향후 결과 보정을 위해 필요한 값)을 가지는 기준 시료이다. C3, C8을 전처리 한 후 이로부터 AMS를 측정하였을 때 기준 값과의 비교를 통해 전처리, 측정과정의 이상이 없음을 확인하고자 하였다. 표3의 결과로부터 AMS 측정이 잘 이루어지고 있고 AMS 결과로부터 데이터 신뢰성이 매우 좋음을 알 수 있다.

	Meas. Value		IAEA	
	MC	delta 13C	MC	delta 13C
C3 (cellulose)	1.286	-20.17	1.294	-24.91
C8 (Ox)	0.1519	-12.78	0.1503	-18.31

표 3. IAEA 기준 시료 측정

1.1.3 결론

- AMS측정, 탄소연대측정에 영향을 주지 않는 생의학 시료 전처리 전용 실험실을 구축할 수 있었다. 또한 생의학 시료 전처리 전용 실험실 내에 설치된 장비는 전처리 과정을 토대로 동선을 생각하여 배치하였다. 생의학 시료 전처리를 위하여 필요한 대부분의 장비는 갖추었으므로 실험실 내에서 모든 실험이 수행될 수 있도록 하였다.
- 임상시료로 얻게 될 혈장을 사전에 전처리 하였고, 시료의 결과를 확인한 결과 혈장을 전처리하는 방법을 확립할 수 있었다.

1.2 바이오 AMS용 프로그램 개발

1.2.1 연구 배경 및 목적

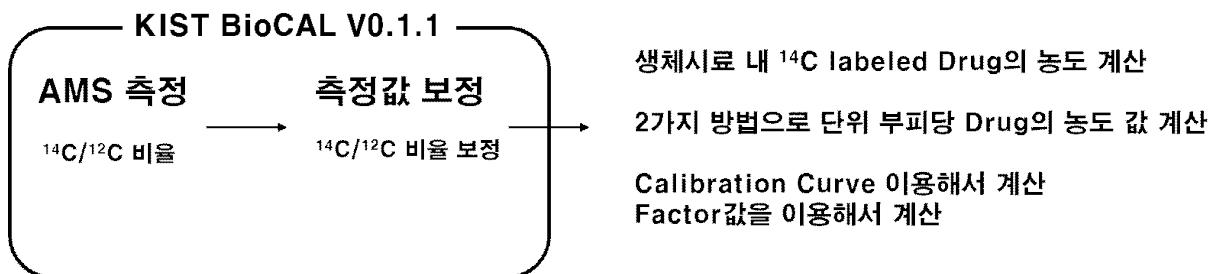


그림 199. KIST BioCAL V0.1.1을 이용한 측정값 보정 및 농도 계산과정

- 그림 9은 KIST BioCAL V0.1.1을 이용한 측정값 보정 및 농도 계산과정을 보여주는 그림이다. 기본적인 계산 과정을 진행하기 위하여 KIST BioCAL V0.1.1을 이용하여 AMS 측정 결과로부터 측정값을 보정하였다. 앞서 언급한 것처럼 질량수가 다른 탄소가 다르게 화학 반응에 참여 할 수 있기 때문에 이를 보정해줄 필요가 있다. KIST BioCal V0.1.0 프로그램을 개발하여 최종 MC(modern carbon) 값을 얻을 수 있도록 하였다. 또한 KIST BioCal V0.1.0 프로그램은 MC 값으로 부터 사용자에 맞도록 다양한 약물의 단위(dpm/sample, dpm/mL, ng/mL, pg/mL, pg/mL/mg)로 계산 할 수 있도록 프로그램화하여 사용자가 별도의 계산 없이 농도의 결과 값을 제공 받을 수 있도록 하였다(일반적으로 해외 Bio-AMS서비스 회사의 경우 결과 값으로 MC값으로 제공).
- 동위 원소 분별 효과는 대사과정, 시료의 화학적 처리과정, 측정 과정에서 동위원소의 비율 변화를 말한다. 즉, 질량수가 14, 13, 12인 탄소가 동일한 원자번호를 가지기 때문에 동일한 화학적 성질을 가진다고 알고 있으나 실제로는 질량수가 다르기 때문에 대사과정 등 여러 과정에서 반응하는 정도가 차이가 있다. 이를 보정해주기 위하여 알고 시료의 ¹³C/¹²C로부터 얻을 수 있는 값을 일치시켜 놓아서 시료가 거쳐 온 화학반응에 의해 생긴 동위 원소 분별 효과를 한꺼번에 보정 가능하다. PDB (PeeDee Belemnite, 화석) 가 보정해 주기 위한 기준이 되는데 현재 PDB 시료는 거의 소실되었으므로 PDB에 대해 아주 정확하게 $\delta^{13}\text{C}$ 값이 측정된 2차 표준시료로 Oxalic acid II를 사용하고 있다. $\delta^{13}\text{C}$ 은 ¹³C/¹²C값의 표준시료(PDB)에 대한 변이 정도를 나타내는 값이라고 할 수 있다. $\delta^{13}\text{C}_{\text{PDB}}$ 는 0 permil이며, $\delta^{13}\text{C}_{\text{OxII}}$ 의 값은 -17.8 permil이다. 그림 10에서와 같이 시료와 Oxalic acid II의 ¹³C/¹²C값으로부터 $\delta^{13}\text{C}$ 값을 구하고 이를 토대로 시료의 ¹⁴C/¹²C값을 보정한다.

Oxalic acid 표로 부터
PDB의 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 값을 계산

$$(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{PDB} = \frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{Oxu}}{1 + \left(\frac{-17.8}{1000}\right)}$$

$$\delta^{13}\text{C} = \left[\frac{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{sample}}{(^{13}\text{C}/^{12}\text{C})_{PDB}} - 1 \right] \times 1000$$

얻어진 $\delta^{13}\text{C}$ 값으로 부터 측정된 샘플의 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 보정

$$(^{14}\text{C}/^{12}\text{C})_{corr} = (^{14}\text{C}/^{12}\text{C})_{measure} \left[1 - \frac{2(25 + \delta^{13}\text{C})}{1000} \right]$$

최종 보정 값

그림 200. PDB를 이용한 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 결과 값 보정

- 보정된 측정값으로부터 혈장에 포함된 ^{14}C 표지 약물의 농도를 계산할 수 있다. HPLC 분회 시료와 같이 시료 속에 탄소의 량이 매우 적은 경우 ^{14}C 가 없는 (~ 0.2 MC) 캐리어 (Tributyrin) 1 μL 정도를 시료에 넣어주어 탄소 공급원으로 사용하여 식 (1)은 다음과 같이 표현 가능하다.

$$R_{meas} = \frac{^{14}\text{C}_{drug} + ^{14}\text{C}_{Carrier}}{C_{carrier}} \quad (1)$$

$$\frac{^{14}\text{C}_{drug}}{C_{carrier}} = (R_{meas} - R_{carrier}) \quad (2)$$

따라서 시료 속에 들어있는 ^{14}C 의 량은 식 (3)와 같이 표현 가능하다.

$$^{14}\text{C}_{drug} \left(\frac{fCi}{V_{inj}} \right) = (R_{meas} - R_{carrier}) MC \times \frac{6.108 fCi/mgC}{1 MC} \times C_{carrier} \quad (3)$$

식 (3)에서 R_{meas} 와 $R_{carrier}$ 는 시료와 캐리어의 AMS 측정 값이며, $C_{carrier}$ 는 사용한 캐리어에 포함된 탄소의 량으로써 1.23 mg이다. 일반적으로 HPLC를 사용하여 시료를 분획할 경우 일정한 량(부피)의 시료를 취하여 주입하기 때문에 식 (3)의 단위는 HPLC에 주입한 시료의 량(V_{inj})속에 포함된 ^{14}C 의 방사선량(fCi) 즉 fCi/V_{inj} 가 된다. 단위를 단위 부피(mL)로 환산하기 위하여 식 (3)의 결과 값에 주입인자(injection factor), F_{inj} 값을 고려하여 HPLC에 주입한 부피를 처음 사용한 혈장의 부피(V_{plasma})로 환산하고, 다시 단위 부피(mL) 속에 들어있는 ^{14}C 의 농도로 환산하여야 한다.

$$^{14}C_{drug} \left(\frac{fCi}{ml} \right) = ^{14}C_{drug} \left(\frac{fCi}{V_{inj}} \right) \times F_{inj} \times \frac{1}{V_{plasma}} \times \frac{1000 \mu L}{1 ml} \quad (4)$$

식 (4)의 F_{inj} 를 구하기 위하여 HPLC 전처리 과정에서의 용액의 들고남을 확인 하여야 하며 구하는 방법은 다음과 같다. 주입인자, F_{inj} 는 HPLC에 주입한 시료 ($20 \mu L$) 속에 존재하는 ^{14}C 의 량으로부터 처음 사용한 혈장($300 \mu L$)속에 존재하는 ^{14}C 의 량을 구하기 위한 인자로서 처리과정에서 비율로 감소된 것이 아니기 때문에 비율로 계산해서는 안되고 각 과정을 고려하여 주입인자, F_{inj} 를 구해야 한다.

처리과정	기호	사용량(μL)	총량(μL)
Initial plasma volume	V_{plasma}	300	300
Cold volume	V_{cold}	100	400
ACN volume	V_{ACN}	900	1300
Supernatant volume	V_{spt}	800	800
Dry	-	-	0
Reconstitution volume	V_{rc}	100	100
Injection volume	V_{inj}	20	20

표 4. 시료로부터 주입인자 F_{inj} 를 구하기 위한 계산

$$F_{inj} = \frac{V_{plasma} + V_{cold} + V_{ACN}}{V_{sp}} \times \frac{V_{rc}}{V_{inj}}$$

$$F_{inj} = \frac{300 \mu L + 100 \mu L + 900 \mu L}{800 \mu L} \times \frac{100 \mu L}{20 \mu L} = 8.125$$

그림 11. F_{inj} 를 구하기 위한 계산 과정 및 결과

최종적으로 식 (4)에 비방사능과 회수율(recovery(%))을 적용하여 단위부피 속에 들어있는 ^{14}C 의 량으로부터 약물의 농도를 계산할 수 있다.

$$conc.of drug \left(\frac{pg}{ml} \right) = ^{14}C_{drug} \left(\frac{fCi}{ml} \right) \times \frac{1}{SA} \times \frac{100}{Recovery} \quad (5)$$

위의 계산과정에서 구할 수 있었던 수식을 이용하여 단위 부피 혈장에 포함된 약물의 양, 농도를 확인 할 수 있다. 약물마다 비방사능(Specific Activity)이 다르고, Recovery 값이 다르다. 업그레이드 한 KIST BioCAL을 이용하여 측정한 MC 값으로부터 비방사능과 Recovery 값을 설정해서 넣으면 혈장 내에 약물의 농도를 계산할 수 있다. 그림과 같이 농도 계산이 가능할 수 있도록 두 값을 넣어주면 농도 값까지 계산을 진행할 수 있다.

1.2.2 연구 내용



1 - 메모장	
파일(F)	편집(E)
서식(O)	보기(V)
도움말(H)	
Isotope 1	: C14 Detector
Isotope 2	: C13 Detector
Isotope 3	: C12 Detector
Measurement time 1	: 9.7500e-003
Measurement time 2	: 1.0000e-004
Measurement time 3	: 1.0000e-004
Wait time 1	: 4.0000e-004
Delay time 1	: 2.5000e-007
Delay time 2	: 2.5000e-007
Delay time 3	: 2.5000e-007
Gate Delay	: 5.0000e-007
Rise time	: 10.
C14 duty	: 8.74439e-001
C13 duty	: 8.36681e-003
C12 duty	: 8.36681e-003
Charge state	: 2.
[RESULTS]	
Measurement time	: 543.0
Run time	: 567
C14 counts	: 50666
Detector counts	: 51113
C14 counts/sec	: 107.30
C14 statistical error %	: 0.444
C13 pulses	: 12959280
C13 charge	: 1.29593e-006
C12 pulses	: 12615167
C12 charge	: 1.26152e-004
C14 # C13 ratio	: 1.28491e-010
C14 # C12 ratio	: 1.31996e-012
C13 # C12 ratio	: 1.02728e-002
C14 # C13 rel std dev	: 1.32665e-002
C13 # C12 rel std dev	: 1.92978e-002
C14 # C12 rel std dev	: 9.86667e-005
【BLOCK DATA】	
B1 Iso1#Isot1s Iso2#Isot2s Iso3#Isot3s Iso1#Iso2 Iso2#Iso3 TargetCur Flags DetData Iso2Pis Iso3Pis	
1 2801 7.2915e-008 7.0857e-006 1.32700e-010 1.38410e-012 1.02500e-002 0.58 00 2859 728955 728973	
2 2821 7.3101e-008 7.1150e-006 1.25272e-010 1.30300e-012 1.02434e-002 0.57 00 2849 731014 711497	
3 2771 7.2915e-008 7.0975e-006 1.24599e-010 1.28313e-012 1.02734e-002 0.57 00 2803 729149 709746	
4 2726 7.2164e-008 7.0549e-006 1.23656e-010 1.22132e-012 1.02724e-002 0.57 00 2761 724544 705426	
5 2701 7.2116e-008 7.0454e-006 1.23720e-010 1.22174e-012 1.02714e-002 0.57 00 2761 724544 705427	
6 2649 7.2013e-008 7.0107e-006 1.23977e-010 1.33510e-012 1.02718e-002 0.58 00 2875 720125 701072	
7 2787 7.1879e-008 6.9997e-006 1.27423e-010 1.30895e-012 1.02716e-002 0.58 00 2814 718794 699790	
8 2807 7.1721e-008 6.9837e-006 1.29600e-010 1.32095e-012 1.02713e-002 0.58 00 2839 717213 698366	
9 2855 7.1711e-008 6.9813e-006 1.29130e-010 1.32095e-012 1.02712e-002 0.58 00 2884 717115 698126	
10 2695 7.1711e-008 6.9813e-006 1.31304e-010 1.34297e-012 1.02713e-002 0.58 00 2884 717115 698126	
11 2795 7.1749e-008 6.9847e-006 1.28072e-010 1.31516e-012 1.02724e-002 0.58 00 2817 717493 698466	
12 2817 7.1779e-008 6.9873e-006 1.28072e-010 1.32499e-012 1.02723e-002 0.58 00 2837 717779 698731	
13 2829 7.1779e-008 6.9873e-006 1.28072e-010 1.32499e-012 1.02723e-002 0.58 00 2837 717779 698731	
14 2786 7.1734e-008 6.9827e-006 1.28100e-010 1.31539e-012 1.02731e-002 0.58 00 2822 717338 698229	
15 2777 7.1613e-008 6.9710e-006 1.28100e-010 1.30354e-012 1.02730e-002 0.58 00 2791 716128 697096	
16 2732 7.1574e-008 6.9670e-006 1.25448e-010 1.28876e-012 1.02733e-002 0.58 00 2852 715737 696956	
17 2665 7.1532e-008 6.9577e-006 1.25136e-010 1.27348e-012 1.02734e-002 0.58 00 2883 715324 695772	
18 2801 7.1645e-008 6.9736e-006 1.28468e-010 1.32000e-012 1.02731e-002 0.59 00 2833 716443 697359	

Raw data (text file)

Raw data 주요 내용

그림 12. AMS 측정 결과 (raw data)와 주요내용

- 가속기질량분석법으로 시료를 측정할 경우 ^{14}C , ^{13}C , 그리고 ^{12}C 의 값이 주어진다. 이 세 가지 동위원소의 량으로부터 정확한 MC 값을 얻어야하기 때문에 결과 값의 ^{14}C 및 ^{13}C 의 보정 과정이 필요하다. 이러한 보정 과정은 미국표준연구원에서 판매하고 있는 Ox-II(Oxalic Acid, CRM 4990-C)를 전처리하여 얻는 결과를 이용한다. 그림 12에서 확인할 수 있듯이 Raw data를 얻을 수 있고, 얻어진 Raw data의 주요 내용을 살펴보면 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 또는 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 등 Isotope들의 비율 값을 결과로 얻을 수 있다. 얻어진 비율의 값은 Raw data의 아래쪽에 보이는 하나의 블록으로부터 얻을 수 있는 측정 결과 값들을 평균한 값이다. 블록이라고 하는 것은 한 개의 시료를 여러 번에 걸쳐 나눠찍는 것을 의미한다. 블록 하나를 측정하기 위하여 걸리는 시간동안에 Isotope의 개수를 세고, 그로부터 Isotope의 비율로 결과를 얻을 수 있다.
- 앞서 언급한 바와 같이 Raw data로부터 블록 하나하나마다 얻을 수 있는 결과물들을 평균하여야 한다. 평균하여 얻은 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 또는 $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 등의 값으로부터 Oxalic acid II를 이용한 보정을 진행한다. 즉, 우리가 보정한 결과를 얻기 위해서는 각 시료의 Raw data에 나타난 블록마다의 결과를 평균하여 얻고, 적절한 수식에 평균한 값들을 정리하여 얻는다. 처리해야 할 데이터 수가 많으면 평균하는 과정, 적절한 수식을 써서 평균값을 대입하여 계산하는데 오랜 시간이 걸린다. 따라서 프로그램을 만들어 단시간에 평균, 대입과정을 진행하도록 하였다. 프로그램은 부록에 첨부하였다.

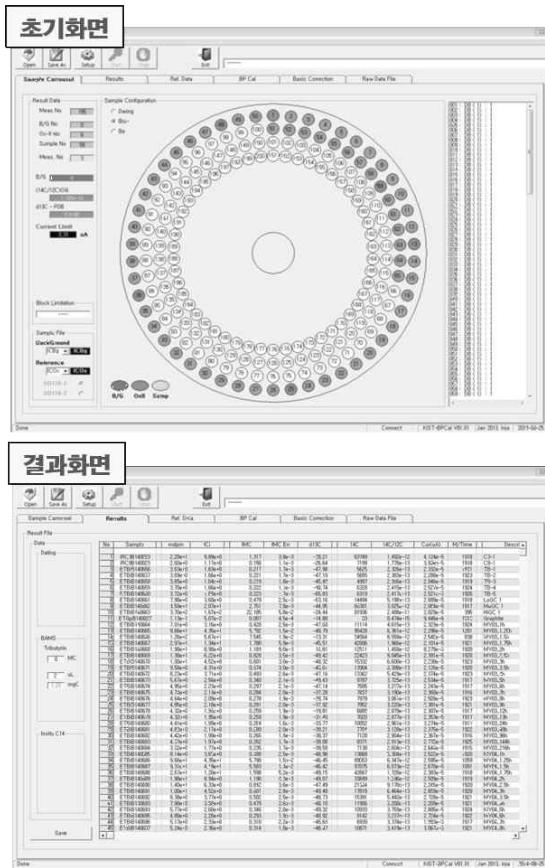


그림 13.AMS raw data를 사용하여 MC(modern carbon)을 계산할 수 있는 프로그램
(KIST BioCal V0.1.0)

- 그림 13은 KIST BioCal V0.1.0 프로그램의 초기 및 결과 화면 그리고 스펙에 대한 자료를 정리하였다. 프로그램의 화면을 보면 초기화면에 생의학적 전용 AMS 측정시 시료위치가 표현되어 있다. 초기화면에서는 시료의 분리 (보정용 시료인지, IAEA의 기준시료, 측정하고자 하는 시료등)하는 것을 색이 다른 원으로 표시해 놓았다. 또한 결과 값에서 평균값에 비해 많이 차이가 나는 경우, 그 경우를 배제하고 측정할 수 있도록 프로그램을 작성하였다. 결과 화면에서는 값을 평균 또는 수식을 써서 계산하는 과정에 필요한 값을 Raw data로부터 불러온 것을 정리하여 나타난 것을 확인 할 수 있다. 측정한 Raw data로부터 필요한 평균값 또는 수식에 의해 필요한 값을 계산한다. $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 비율, $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ 비율, MC 값, MC값의 표준편차 등 시료 측정을 통해 최종적으로 얻고자 하는 결과를 동시에 확인할 수 있다.
- 프로그램을 사용하기 전 엑셀을 이용하여 AMS 결과를 일일이 넣어주고, 그 넣어준 값을 수식에 넣어서 결과를 얻을 수 있었는데 60개 모든 시료에 대하여 MC까지 3시간 이상 소요되었다. 그리고 경우에 따라서 블록 내에서 결과가 잘못 나오는 경우에 대해서도 이를 인식하지 못하고 MC값까지 계산하기도 하였고, 보정을 위하여 Oxalic acid를 사용하는 경우 결과 값이 잘못 대입되어 시료 전체의 결과 값이 잘못 계산되기도 하였다. 즉, 결과 값에 대하여 분석자가 모든 데이터를 확인하기 쉽지 않기 때문에 오류가 생길 가능성을 배제할 수 없었다. 하지만 프로그램을 사용하게 되면서 실제 60개 시료의 결과는 1분 수초이내로 계산될 수 있었고, 그 결과 값이 잘못 나온 경우에 대해서도 문제가 된 부분이 명시가 되어 쉽게 오류를 찾을 수 있었

Language :

- Visual Basic 6.0

Function :

- Extracting data from raw data
- Adjustment through the calculation process

- Calibration function from $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ to MC with Ox-II (NIST standard sample)

- Result data format :

1. Modern value (MC)
2. dpm/sample
3. fCi/sample

Capability :

- 12000 data (200 cells × 20 blocks × 3 times)

↓
fraction factor
specific activity (진행중)

Concentration of Drug (mg/mL)

다.

- 현재 MC값으로 전환하는 과정에 대해서 프로그램이 완성되었고, 일부 내용에 대하여 수정 중에 있다. 향후 ^{14}C 표지 물질에 대한 비방사능(Specific activity)등의 정보를 제공하여 혈장 또는 생체시료내 ^{14}C 표지 물질의 농도 값으로 계산할 수 있도록 프로그램을 업그레이드 할 예정이다.

1.2.3 결론

- AMS 측정으로부터 얻을 수 있는 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 결과로 부터 Oxalic acid II를 이용한 보정이 필요하다. 이 보정 과정은 정확한 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 값을 얻기 위한 과정이고, 이 과정으로부터 수식을 이용하여 시료의 MC값을 계산할 수 있다.
- 구한 MC값으로부터 ^{14}C 표지 약물 또는 물질의 비방사능, 그 밖의 전처리 과정에서의 Factor(용액을 취하는 양, 건조 후 넣어주는 용매의 양 등)를 이용한다면 혈장 또는 생체 시료내에 있는 ^{14}C 표지 약물 또는 물질의 농도를 확인 할 수 있다.
- 본 연구팀에서는 앞선 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 결과물로부터 MC값으로 보정, 변환하고 이로부터 농도값으로 변환하는 프로그램을 개발하고자 하였다. 현재 프로그램을 이용하여 MC값을 계산하는 과정을 수행할 수 있으며 기존의 방법보다 수월하고 빨리 결과를 확인할 수 있다. 데이터가 12000개로 되더라도 결과 값을 얻기까지 짧은 시간내에 결과를 확인 할 수 있다.

2.2 차년도 연구 내용 및 결과

2.1 임상시료의 가속기질량분석 측정을 위한 분석방법 기술 개발

2.1.1 연구 배경 및 목적

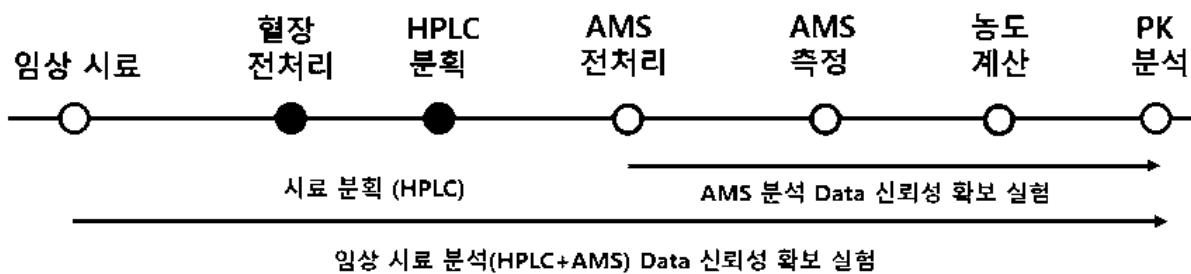


그림 14. 가속기 질량분석법의 신뢰성 확보를 위한 실험 디자인

- 임상시료의 가속기질량분석 측정을 위한 분석방법 기술 개발을 위하여 신뢰성 확보를 위한 연구가 선행되었다. 신뢰성 확보를 위한 과정은 그림 1과 같이 AMS 분석 Data 신뢰성 확보와 임상시료 분석 Data 신뢰성 확보로 총 2단계로 나누어 진행되었다. (그림 14)

2.1.2 연구 내용

2.1.2.1 AMS 분석 Data 신뢰성 확보를 위한 실험

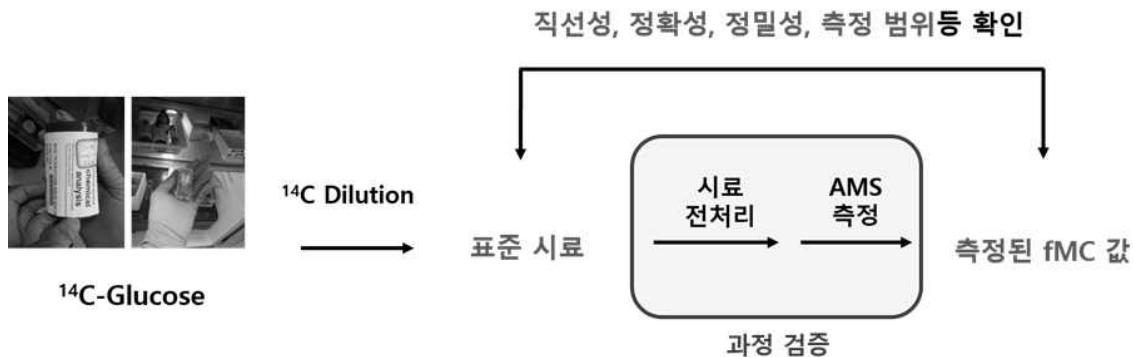


그림 205. AMS 분석 Data 신뢰성 확보를 위한 실험 계획

- AMS 분석 Data 신뢰성 확보라 함은 시료 분획 이후 AMS 전처리 과정을 검증하는 단계이다. 그림 15에서 나타난 바와 같이 ¹⁴C Glucose를 이용하여 알고 있는 MC(Modern Carbon) 값을 가지는 표준시료를 준비하였다. ¹⁴C Glucose를 이용하는 이유는 Glucose

가 물에 용해성이 좋아 증류수를 이용하여 순차적으로 끓혔을 때 값의 오차가 적을 것이라고 판단하였기 때문이다. 끓혀진 ^{14}C Glucose 시료들을 AMS 전처리 과정을 진행했을 때 측정 결과로 나온 MC 값과 비교하여 선형성(Linearity), 정확성(Precision), 정밀성(Accuracy), 측정 영역(Dynamic range)을 확인하는 과정이다. 이 단계를 통해 AMS 전처리 과정 및 AMS 측정에 이상이 없음을 확인할 수 있다.

- AMS 측정 Data의 신뢰성 확보를 위한 실험을 진행하기 위하여 시료는 측정된 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 값을 보정하기 위한 NIST SRM 4990C (Oxalic acid II) 6개, 개, AMS 측정이 정확한지 확인하기 위한 IAEA 표준 시료 2종류(C3, C8) 3개 씩, 높은 MC 값을 가지는 LLNL 표준시료 2종류(LLNL100, LLNL12) 각 1개씩, 낮은 영역에서부터 높은 영역까지 서로 다른 MC 값을 가지는 검정곡선용 표준 시료 농도 별로 (0.2, 1, 10, 40, 70, 100, 200, 250 MC) 6개씩, 검정곡선을 한번 더 확인 하기 위한 QC 시료 3종류를 준비하였고 이를 전처리하여 AMS 측정을 준비하였다.
- ^{14}C Glucose를 증류수로 순차적으로 끓히는 방법은 다음과 같다. 그림16와 같이 상업적으로 구매 가능한 ^{14}C Glucose (7.4Mboq, 200 μCi)를 준비하고, 이를 순차적으로 끓힌다. 원하는 MC 값을 얻기 위하여 필요한 ^{14}C Glucose의 radio activity를 확인한다. 보통 각 시료튜브에 들어가 있는 ^{14}C Glucose의 양이 매우 적기 때문에 시료를 제작하기 위해서 Tributyrin을 처리하여야한다. Tributyrin 2 μl 에 포함된 탄소량을 고려하여 ^{14}C Glucose의 Radio activity를 계산하고, 계산된 Radio activity를 가질 수 있도록 끓힌 시료를 증류수로 순차적으로 끓힌다. 이때 사용되는 Stock solution (일반적으로 원액 ^{14}C solution을 1/10 수준 또는 1/100 수준으로 끓힌 용액)이나 충분히 끓힌 solution의 Radio activity를 LSC (liquid scintillation counter)를 이용하여 측정하는 과정이 필요하다. ^{14}C Glucose 원액의 농도를 확인하여 예측은 가능하지만 실제 값은 아니기 때문에 LSC측정이 필요하다.



그림 206. ^{14}C Glucose 용액

- ^{14}C Glucose를 증류수를 이용하여 순차적으로 끓혀서 표준시료 (알고 있는 MC값을 가지는 시료)를 준비하였다. 이후 끓혀진 ^{14}C Glucose 시료들을 진공 농축기를 이용하여 건조시킨 후 충분한 양의 탄소가 형성될 수 있도록 Tributyrin (TB, Carbon Carrier)을 넣어 주었다. Tributyrin 첨가 후 산화제로 CuO를 넣어주고 석영관을 진공라인을 이용하여 밀봉한 후 900도에서 3시간 반응시켜 산화과정을 진행하였다. 생성된 CO_2 를 Reduction tube에 끓겨주고, 전기로에서 환원과정을 진행하여 흑연을 생성하였다. AMS 측정을 통해 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 비율을 얻고, 이로부터 1년차에 구축해놓은 프로그램을 이용해 MC값으로 변환하였다.

기준시료		측정 결과값 (MC)	기준 값 (MC)
IAEA	C3	1.297	1.294
	C8	0.150	0.150
LLNL	Ox-12M	12.13	12.00
	OX-102M	99.57	102.0

표 5. IAEA 및 LLNL 기준 시료 측정 결과 및 기준 값

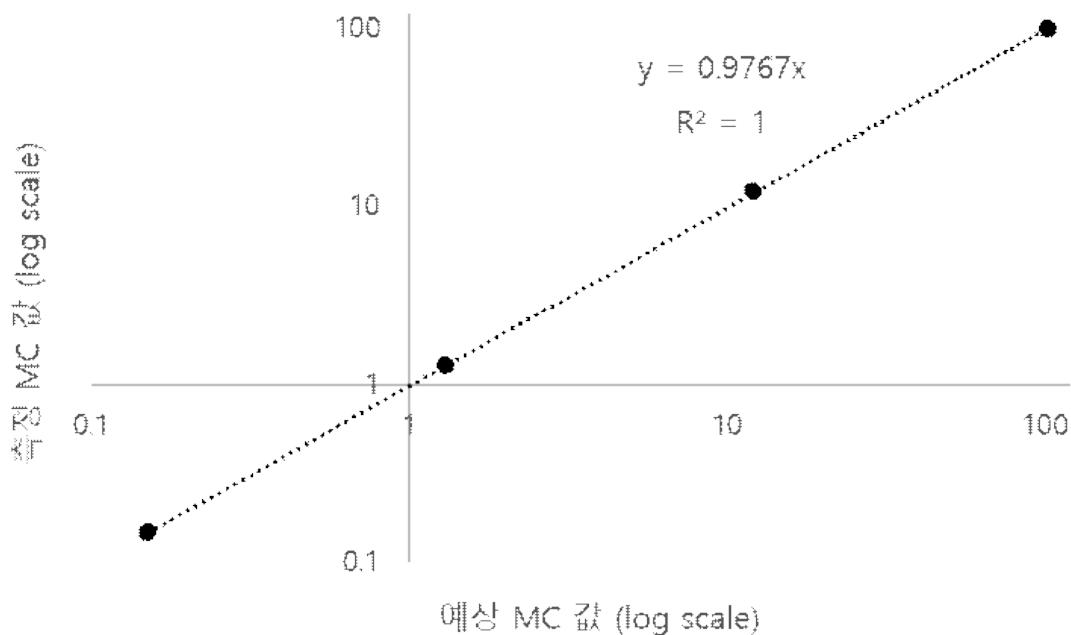


그림 207. IAEA 및 LLNL 기준 시료 측정 결과

- 기준시료의 예상된 MC값과 전처리과정 후 시료의 측정된 MC값을 비교하기 위해 우선 AMS 측정이 정확하게 진행되었는지 여부를 판단하고자 하였다. AMS 측정이 정확한지 확인하기 위해서 기준시료를 전처리 및 AMS 측정을 진행하였다. 기준 시료라고 함은 IAEA에서 제공하는 MC값이 알려져 있는 기준 물질 C3, C8의 2종류와 함께 LLNL (Lawrence Livermore National Laboratory)에서 준비된 Ox-12M, Ox-102M의 2종류 포함 총 4종류의 기준시료를 전처리 및 측정하였다. 측정한 결과는 표 5와 그림17과 같다. 기준 되는 값과 비교했을 때 MC값에서 차이가 나지 않음을 확인하였다. 이 결과로부터 AMS 측정과정에는 문제가 없음을 확인 할 수 있었다.
- 표준시료는 ^{14}C Glucose를 사용하여 만든(알고 있는 MC값을 가지는) 시료로 0.2, 1, 10, 40, 70, 100, 200, 250 MC의 6종류, 각 3개의 시료와 함께 QC(Quality Control)시료를 준비했다. 전처리과정을 거쳐 AMS 측정 결과는 표 6과 그림 18와 같다. R^2 값이 0.9998로 나타남을 확인하여 직선성을 나타내는 상관계수 R^2 값이 0.999이상이므로 직선성 지닌다고 할 수 있다. 정밀도(Precision)를 나타내는 CV 값이 측정 MC 범위에서 모두 5% 이하로 나타나고, 정확성(Accuracy)을 나타내는 값 역시 10% 이내로 측정 결과 값을 가진다. 따라서 두 값 모두 모든 영역에서 10% 이내로 나타나므로 정확도와 정밀도가 확보됨을 확인 할 수 있었다. 측정 영역을 확인하기 위하여 200 MC, 250 MC값도 측정하였고 확인 결과 알고 있던 MC값과 근접한 결과를 얻을 수 있었다. 다만, 높은 MC값을 가지는 시료의 경우 Carry over가 발생할 수 있기 때문에 측정 후 Cleaning 과정(다른 낮은 이 충분히 진행되고 다음 시료를 측정하는 것이 필요하였다. 따라서 측정영역이 0.1 MC에서 250 MC이 가능함을 확인할 수 있었다.

시료	Precision(CV)	Accuracy
STD 1	2.6 %	92.7 %
STD 2	3.3 %	93.1 %
STD 3	3.1 %	93.6 %
STD 4	2.8 %	96.9 %
STD 5	0.4 %	94.7 %
STD 6	1.3 %	97.2 %
STD 7	2.4 %	92.3 %
STD 8	3.6 %	91.4 %
STD 9	0.6 %	94.0 %
LoQC	1.5 %	93.8 %
MeQC	2.7 %	95.0 %
HiQC	1.8 %	95.0 %

표 6. 표준시료 및 QC 시료 측정 결과 정밀도 및 정확도

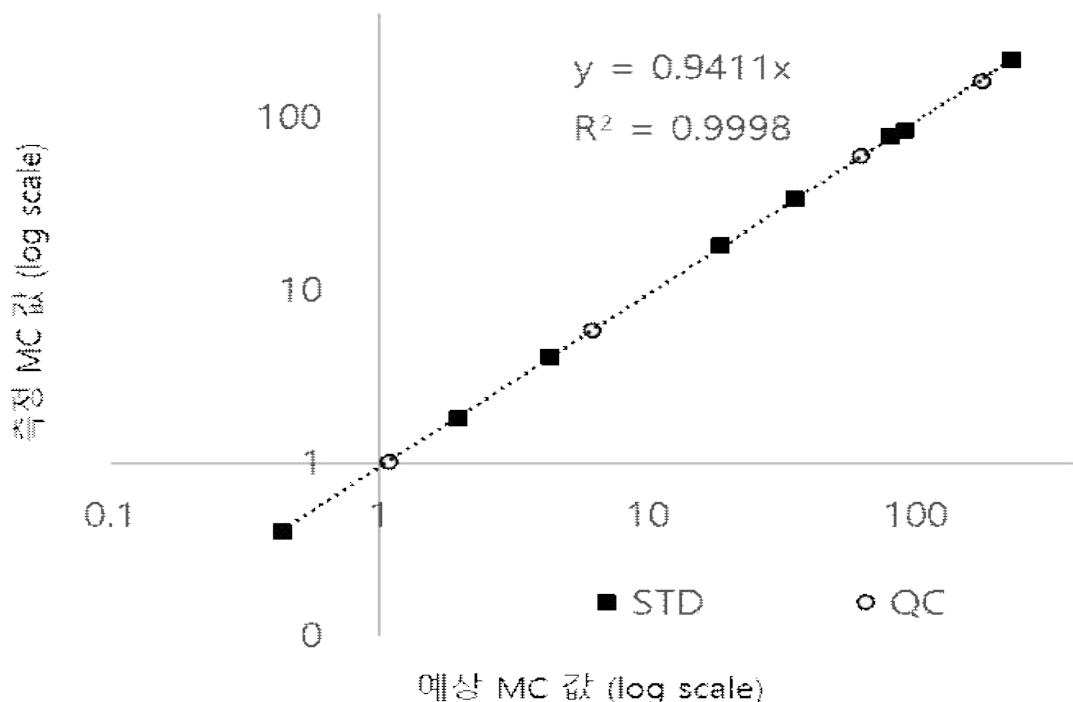


그림 208. 표준시료 및 QC 시료 측정 결과

2.1.2.2 임상시료 분석 Data 신뢰성 확보

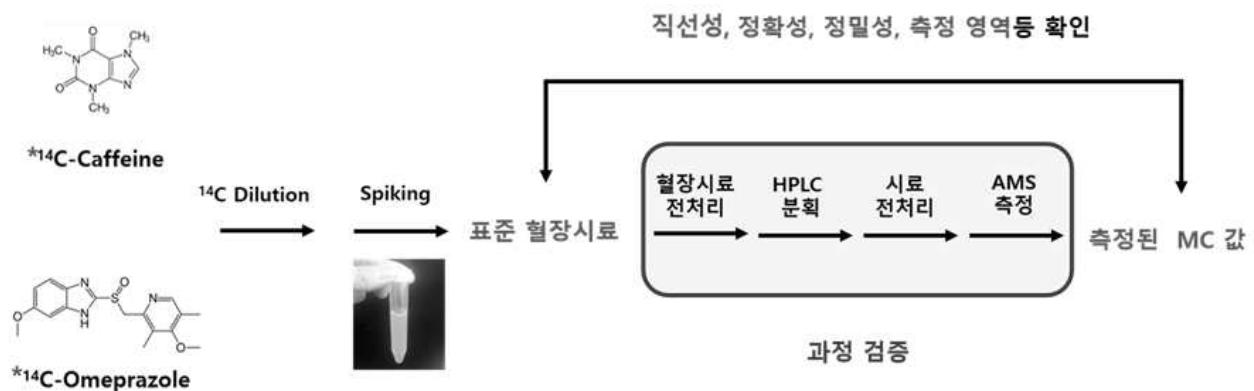


그림 209. 임상시료 분석 Data 신뢰성 확보를 위한 실험 디자인

- 임상시료 분석 Data 신뢰성 확보는 ¹⁴C 표지 약물을 이용하여 알고 있는 MC값을 가지는 시료를 준비하고 제단백, HPLC 분획과정, AMS 전처리 과정을 모두 진행하여 얻은 측정 MC값을 비교하는 과정이다. 이 과정에서의 선형성, 정확성, 정밀성을 확보하였을 때 약물의 농도 확인을 위한 실험 과정들을 신뢰할 수 있으며, 최종적으로 임상시료의 분석을 위한 신뢰성이 확보될 수 있다.

- 앞선 AMS data 신뢰성 확보를 통해 시료전처리 과정 및 AMS 측정과정에서는 이상이 없음을 확인하였다. 임상시료 분석을 진행하기 전 그림 19와 같이 제단백등의 혈장시료 전처리 과정, HPLC 분획, 시료 전처리, AMS 측정 과정을 모두 진행하였을 때, 표준 혈장 시료(알고있는 MC값을 가지는 혈장 시료)를 사용하여 예상 MC값과 측정 MC값의 직선성, 정확성, 정밀성을 확인하고자 하는 과정이다.
- ^{14}C Caffeine의 경우, 표준 혈장시료 제작부터 전처리과정을 거쳐 AMS 측정까지 완료하여 임상시료인 플라즈마속에 있는 Caffeine을 HPLC를 사용하여 분획하고 AMS를 측정할 수 있도록 완료하였고, 측정결과로부터 얻은 시료 속에 포함된 ^{14}C 의 양으로부터 쉽게 플라즈마 속에 있는 ^{14}C Caffeine 양을 계산 할 수 있도록 하였다. ^{14}C Omeprazole의 경우 역시 임상시료의 AMS 분석이 가능하도록 하였다.

2.1.2.2.1 ^{14}C Caffeine 분석을 위한 임상시료 분석 Data 신뢰성 확보 실험

- 표준 혈장시료를 만들기 위하여 ^{14}C Caffeine을 3차 종류수를 이용해 끓히는 과정을 진행하였다. 끓히는 과정은 기존에 익숙한 농도 끓히는 방법과는 다르고, 높은 Radio Activity를 끓히는 과정이기 때문에 주의를 요한다. 끓히는 과정이 진행되었다면 표준 혈장시료 (알고 있는 MC값을 가지는 혈장시료)를 만들기 위해 적절한 양의 끓혀진 ^{14}C Caffeine 용액을 혈장에 Spiking 한다. 이후 혈장을 이용해서 순차적으로 끓히는 과정을 진행한다. 표준 혈장시료가 준비되었다면 혈장시료 전처리 과정으로 제단백 과정을 진행한다. 제단백 과정은 혈장 내에 포함된 ^{14}C 약물 또는 대사체를 제외한 나머지 단백질을 제거해주기 위한 과정이다. 제단백 과정 진행 후 HPLC를 이용하여 약물과 대사체가 분명하게 분획되는지 확인하는 과정이 필요하다. 그림 6에서 HPLC를 이용하여 Caffeine과 주된 대사체의 명확하게 분획되었음을 확인 할 수 있다. HPLC 분획과정에서 Retention time을 확인하기 위한 본 과정은 Cold Caffeine(^{14}C 표지되지 않은 Caffeine, 상업적으로 구매가능한 연구용 Caffeine)을 이용하여 실험을 진행하였다. Cold Caffeine과 Caffeine의 대사체를 섞은 후 HPLC 분리를 진행하였고, Caffeine이 분획될 수 있음을 확인하였다.

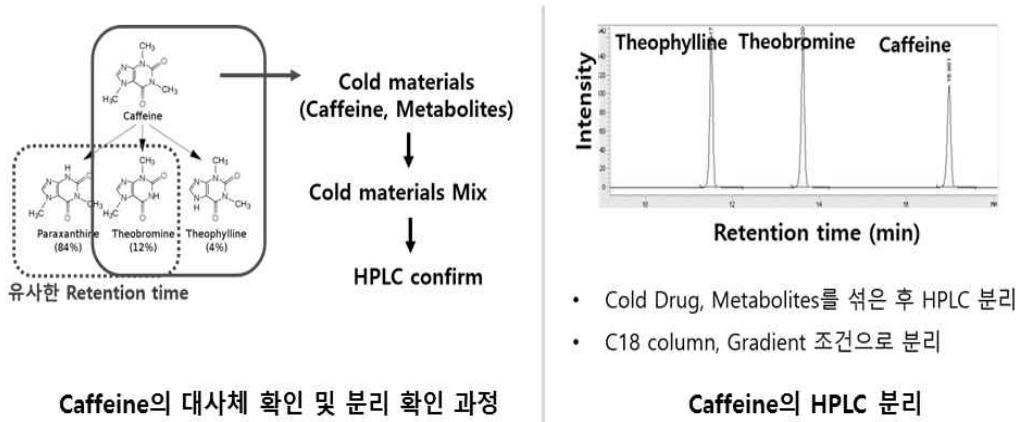


그림 210. Caffeine과 대사체의 HPLC 분획과정 및 결과

- HPLC 분획 이후 시료전처리 방법에 따라 산화, 환원과정을 거쳐 흑연을 제작한다. 1년 차에 구축하였던 BioAMS 전처리 실험실과 프로그램을 이용하여 그림 20과같이 HPLC 분획 과정부터 AMS측정, 결과처리 과정을 진행하고자 하였다. 1년차를 통해 구축해놓은 일일 처리량이 50개이고, 산화를 위한 장비나 환원과정, Transfer 과정을 위한 장비 확충이 있다면 그 이상 처리할 수 있도록 준비되어있다. ^{14}C Caffeine 표준 혈장 시료는 현재 전처리과정을 모두 진행하였고, AMS 측정하기 위해 대기하고 있다.

2.1.2.2.2 ^{14}C Omeprazole 분석을 위한 임상시료 분석 Data 신뢰성 확보 실험

- ^{14}C Omeprazole 표준 혈장시료를 제작하기 전, HPLC 분획과정을 위한 조건을 확인하고자 하였다. Caffeine과 마찬가지로 Cold Omeprazole을 이용하여 HPLC분획 과정을 진행하였고, 그 결과는 그림 21과 같다. 그림 21의 HPLC-DAD 크로마토그램 결과에서 볼 수 있듯이 Omeprazole의 Peak을 확인하였을 때, Omeprazole이라고 추정되는 물질 이 외에 알려지지 않은 물질이 검출됨을 확인할 수 있었다. 따라서 이를 좀 더 분명하게 확인하고자 HPLC MS/MS를 이용하여 Omeprazole을 확인한 결과 Retention time이 11분에서 나오는 Peak이 약물임을 확인하였고, Retention time 이후에 DAD 신호에서 얻은 결과는 불순물으로 판단하였다. Omeprazole은 상업적으로 구매가능한 대사체가 없기 때문에 이를 확인하고자 충남대 약학대학교와 협의 중이며, 대사체와 약물의 분획을 다시 확인할 필요가 있다.

(3) 결론

- ^{14}C Glucose 표준시료를 이용하여 직선성, 정확성, 정밀성, 측정영역 확인 할 수 있었다. 따라서 AMS 전처리과정 및 측정 과정에서 이상이 없음을 확인 할 수 있고, 이를 토대로 임상시험 시료 역시 처리할 수 있음을 확인 하였다.

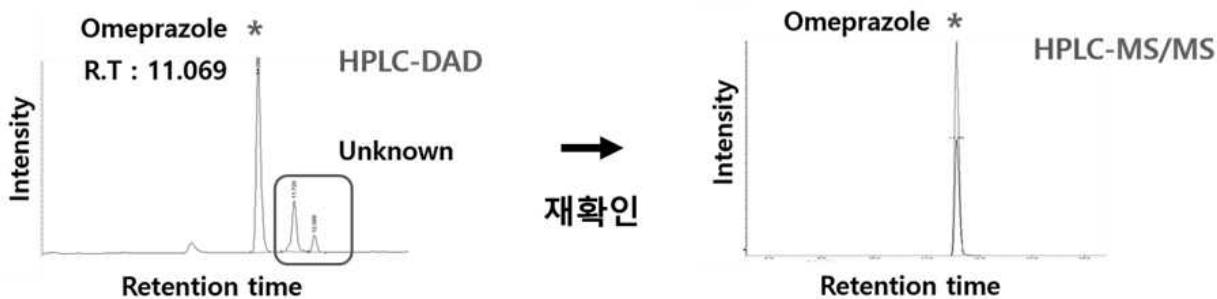


그림 211. Omeprazole의 HPLC 분획을 위한 DAD 및 MS/MS 분석

- 기준시료 (IAEA, NIST, LLNL)를 이용한 Data 신뢰성 확보할 수 있었다. 향후 지속적으로 기준시료를 전처리하고 이를 측정함으로써 Data의 신뢰도를 유지, 향상시킬 수 있을 것이다.
- 실제 ^{14}C 표지 물질(^{14}C Caffeine)을 사용하여 이를 처리하기 위한 전반적인 과정을 수행하여 향후 임상시험 시료 전처리 과정을 수월하게 수행할 수 있을 것이다.

2.2 억제물질에 의한 대사물질의 임상시험 분석

2.2.1 연구 배경 및 목적

임상시험을 위한 약물의 Activity에 대한 투여량 및 노출량 계산

- 안전하고 정확한 임상시험을 진행하기 위해 약물의 Activity에 대한 투여량과 노출량을 계산하였다. 일반적으로 수백 nCi의 ^{14}C 표지 화합물을 체내에 투여하지만, 본 연구에서는 약물의 반감기를 고려하여 500 nCi로 설정하였다. 따라서 500 nCi에 해당하는 ^{14}C Caffeine과 ^{14}C Omeprazole의 투여량과 노출량을 확인하였다. 투여량은 ^{14}C 표지 약물의 COA로부터 Specific Activity와 분자량을 확인하여 계산하였고, 노출량은 각 약물의 반감기를 고려하여 계산하였다.

2.2.2 연구 내용

① ^{14}C Caffeine의 투여량 및 노출량 계산

- ^{14}C Caffeine의 투여량을 계산 과정 및 결과는 그림과 같다. $1.95\mu\text{g}$ 의 아주 극미량 ^{14}C Caffeine을 도입하게 되면 이 물질이 체내에서 노출되는 량이 흉부엑스레이 1회 촬영시의 1/2000에 해당하는 매우 작은량이 노출된다. 따라서 매우 안전하게 임상시험이 진행될 수 있음을 확인하였다. (그림 22)

^{14}C Caffeine 500nCi 투여량 계산

COA Data

Molecular weight : 195.79 g/mol

Specific activity : 50 mCi/mmol

$$= \text{Molecular weight} / \text{Specific activity}$$

$$= \frac{195.79 \text{ g/mol}}{50 \text{ mCi/mmol}} = 3.92 \text{ g/Ci}$$

- 500nCi에 대한 무게 계산

$$= 3.92 \text{ ng/nCi} \times 500 \text{ nCi} = 1.95 \mu\text{g}$$

^{14}C Caffeine 500nCi 노출량 계산

Caffeine : 반감기 4hr, 평균수명 360 min

$$\begin{aligned} \text{Exposure} (^{14}\text{C}) &= \frac{8.3fJ \times 6 \text{ hr} \times 60 \text{ min/hr} \times 500 \text{ nCi} \times 2200 \text{ dpm/nCi}}{70 \text{ kg}} \\ &= 0.0469 \mu\text{Sv} = 46.9 \text{ nSv} \end{aligned}$$

흉부 엑스레이 촬영 시 1회 0.1mSv = 100000 nSv → 1/2000

유럽 비행기 여행 1회 0.7mSv = 70000 nSv → 1/1500

그림 212. ^{14}C Caffeine 500nCi의 투여량 및 노출량 계산 과정 및 결과

② ^{14}C Omeprazole의 투여량 및 노출량 계산

- ^{14}C Omeprazole의 투여량을 계산 과정 및 결과는 그림 10와 같으며 3.22μg의 극미량이 체내에 도입되고 이에 따른 노출량을 계산하면 흉부 X-선 촬영의 6000분의 일 정도로 매우 낮은 노출량을 보인다. 따라서 Omeprazole 매우 안전하게 임상시험을 진행할 수 있음을 확인 하였다. (그림 23)

^{14}C Omeprazole 500nCi 투여량 계산

COA Data

Molecular weight : 347.15 g/mol

Specific activity : 54 mCi/mmol

- Activity 당 무게(g/Ci) 계산

$$= \text{Molecular weight} / \text{Specific activity}$$

$$= \frac{347.15 \text{ g/mol}}{54 \text{ mCi/mmol}} = 6.43 \text{ g/Ci}$$

- 500nCi에 대한 무게 계산

$$= 6.43 \text{ ng/nCi} \times 500 \text{ nCi} = 3.22 \mu\text{g}$$

^{14}C Omeprazole 500nCi 노출량 계산

Omeprazole : 반감기 1 ~ 1.2 hr, 평균수명 120 min

$$\begin{aligned} \text{Exposure} (^{14}\text{C}) &= \frac{8.3fJ \times 2 \text{ hr} \times 60 \text{ min/hr} \times 500 \text{ nCi} \times 2200 \text{ dpm/nCi}}{70 \text{ kg}} \\ &= 0.0157 \mu\text{Sv} = 15.7 \text{ nSv} \end{aligned}$$

흉부 엑스레이 촬영 시 1회 0.1mSv = 100000 nSv → 1/6000

유럽 비행기 여행 1회 0.7mSv = 70000 nSv → 1/4500

그림 213. ^{14}C Omeprazole 500nCi의 투여량 및 노출량 계산 과정 및 결과

2.2.3 결론

- 실제 임상시험을 수행할 시 도입할 ^{14}C 표지 약물의 양을 계산할 수 있었고, 이를 토대로 ^{14}C 표지 약물에 의해 발생할 수 있는 피폭량도 계산할 수 있었다. 향후 진행될 임상시험, 비임상시험 또는 그 밖의 생의학적 실험에서 ^{14}C 표지 물질의 양, 피폭량등을 판단할 수 있어 ^{14}C 를 활용한 안전한 실험, 효과적인 실험 수행이 가능할 것이다.

- 마이크로도징 실험 시 안전한 실험이 가능함을 확인 할 수 있었다. 실제 피폭량이 매우 낮고, 실제 도입되는 약물의 양도 매우 극미량이므로 이를 다양한 생의학적 연구분야에서 활용 가능할 것이다.

3.3 차년도 연구 내용 및 결과

3.1 측정심화기술 개발

3.1.1 연구 배경 및 목적

- 가속기질량분석법(accelerator mass spectrometry, AMS)은 연대측정, 환경학, 지질학, 생의학 또는 환경과학 분야에서 초 극미량의 방사성 원소(주로 ^{14}C)를 검출 할 수 있는 분석법이다. 이 중 생의학 분야에서는 혈액, 대·소변, 조직, 장기 등의 생체유래성분과 생체유래성분에서 분리한 특정 물질(화합물, 약물 등)이 원시료로 사용된다. 원시료는 대부분 탄소를 포함하고 있으며 가속기질량분석법용 측정 시료로 만들 경우 ^{14}C 와 ^{12}C 의 비율($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$)을 5×10^{-16} 까지 측정할 수 있으므로 다양한 연구 분야로의 응용이 가능하다.
- 가속기질량분석법은 검출기의 특성상 매우 적은 양의 방사성 동위원소를 검출할 수 있으나 측정 시간 동안 탄소 이온빔을 안정적으로 생성하여야 하므로, 가속기질량분석법으로 시료를 측정하기 위해서는 약 1 mg의 탄소가 포함되어 있어야 한다. 생체유래성분의 경우 각 성분의 탄소 함유량(%)이 기준 문헌에 의해 보고되어 있으며(표 7), 유기원소분석기(organic elemental analyzer) 등을 통하여 시료 내 탄소 함유량을 측정할 수도 있다.

생체유래성분	탄소 함유량 (%)	부피 또는 질량
혈장	4	25 μL
적혈구	17	5 μL
혈액	10	10 μL
소변	0.3–1.5	200 μL
대변	10	10 mg
장기	15	7 mg
세포	22	5 mg
지방	64	1.5 mg
단백질	28	4 mg
DNA	29	4 mg
근육	11	8 mg
날숨	1	80 mg

표 7. 생의학 분야에 사용되는 가속기질량분석법용 원시료의 탄소 함유량

- 이를 바탕으로 1 mg의 탄소를 얻을 수 있도록 원시료의 양을 계산한 후 가속기질량분석법 용 시료를 제작한다. 그러나 생체유래성분에 포함된 특정 물질만을 분리하는 경우와 같이 탄소의 양이 매우 적은 시료에는 외부로부터 탄소를 일정량 첨가해주어야 하는데, 이 때 탄소원으로 시료에 첨가하는 물질을 캐리어라고 한다. 캐리어가 가진 ^{14}C 는 원시료에 포함되어 있지 않은 동위원소 배경 준위(isotopic background level)이므로 측정 결과로부터 해당 값을 제외해야 한다.

$$RA_{\text{samp}}(fMC) = RA_{\text{meas}} - RA_{\text{car}} \quad \dots \dots \quad (1)$$

- 원시료의 ^{12}C 는 캐리어의 ^{12}C 에 비해 무시할 수 있을 정도로 적으므로 가속기질량분석법 용 시료의 전체 ^{12}C 의 양은 캐리어의 ^{12}C 와 동일하다. 따라서 가속기질량분석법으로 시료를 측정한 결과(RA_{meas})에서 캐리어의 측정 결과(RA_{car})를 빼면 캐리어의 ^{12}C 에 대한 원시료의 ^{14}C 의 비율 (RA_{samp})을 얻을 수 있다. 위의 계산 방법을 통해 캐리어는 동위원소의 비율 ($^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$)을 측정하는 가속기질량분석법의 측정 한계를 결정하는 중요한 물질임을 알 수 있다.
- 가속기질량분석법에서 탄소 캐리어는 현재 트라이부티린(tributyrin)을 주로 사용하고 있다. 트라이부티린은 상대적으로 탄소 함유량이 높으면서도 ^{14}C 의 양이 적고, 독성과 질소 함유량 또한 적기 때문에 세계적으로 가장 많이 사용되는 캐리어이다. 그러나 트라이부티린의 ^{14}C 함량은 대기 중의 방사성탄소 농도의 22%에 해당(0.22 MC)하여 0.22 MC 이하 농도의 시료에 대해 정량하기 어렵고, 제조회사마다 ^{14}C 함량의 편차가 큰 편으로 배경 준위를 일정하게 유지하기 어렵다. 또한 트라이부티린은 독특한 냄새가 나고 상온에서 액체로 존재하기 때문에 휘발 가능성 (증기압 1.3×10^{-3} mmHg in the ambient atmosphere, 25 °C)이 있으며, 약 1 mg 탄소에 해당하는 트라이부티린의 양은 2 uL (1.23 mgC) 미만으로 매우 적은 부피이기 때문에 실험적으로 다루기 어렵다. 이를 해결하기 위해 메탄올과 같은 유기 용매에 트라이부티린을 희석 후 더 많은 부피를 취하는 방법을 사용하면 마이크로피펫에 의한 오차를 줄일 수 있으나 유기 용매의 점도가 낮아 희석액을 정확한 부피만큼 취한 즉시 옮겨야 하는 등 다루기 까다롭고, 옮긴 후에는 희석 용매를 제거하는 건조 과정을 거쳐야 한다는 단점이 있다. 최근에는 마이크로모세관을 이용하여 일정 부피의 트라이부티린을 취하는 방식을 사용하나 마이크로모세관의 오염 관리가 어렵다는 단점이 있다.
- 캐리어로서 사용할 물질은 다음과 같은 조건을 만족해야 한다. 우선 1) 캐리어 내 ^{14}C 의 양이 적어야 하고 포함된 ^{14}C 가 균일하게 분포하고 있어야 하며 2) 장기간 보관 시 휘발성이 없는 등 물리화학적으로 안정해야 하고 3) 실험적으로 다루기 간편하여 전처리 시간을 최소화할 수 있어야 하며 4) 일정량을 반복적으로 취할 수 있어야 한다. 본 연구에서는 트라이부티린이 가지고 있는 한계점을 극복하고 위의 조건을 만족하는 새로운 캐리어를 탐색하고 도출해내고자 하였다.

3.1.2 연구 내용

3.1.2.1 캐리어로 사용 가능한 후보 물질탐색



그림 24. 캐리어로 사용 가능한 여러 가지 형태의 물질. 왼쪽 위에서 오른쪽 순서대로 박편(flake), 과립(granule), 분진(powder), 액상(liquid), 필름(film), 시트(sheet). 박편은 벤조산, 과립과 분진, 시트는 흑연, 액상은 액체 파라핀, 필름은 파라필름

- 캐리어는 상온에서 그림 24와 같이 다양한 물리적 형태를 가질 수 있다. 캐리어 후보 물질의 상은 크게 액체와 고체로 나눌 수 있고 고체는 다시 가루 형태와 종이 형태로 나눌 수 있다. 액체의 경우 ^{14}C 가 고르게 분포하며 보관이 쉽고 피펫이나 마이크로모세관을 이용하여 일정량을 반복적으로 취하기 쉽다. 그러나 실험적으로 적은 부피는 반복적으로 취하기 어렵고 증발 및 휘발 가능성이 있기 때문에 시료를 제작하는 과정에서 진공 등에 의해 캐리어가 소실될 수 있는 단점이 있다. 또 마이크로모세관을 사용하는 과정에서 캐리어의 점성 등에 따라 전처리 시간이 길어질 수 있다.
- 한편 고체의 경우 휘발성이 없어 안정하고 보관이 쉬운 편이나 가루 형태인 박편(flake)과 과립(granule), 분진(powder)의 경우 액체에 비해 일정량을 반복적으로 취하기 어렵다. 이러한 이유로 흑연 과립과 흑연 분진, 벤조산 박편 등은 캐리어 후보 물질에서 제외되었다. 종이 형태인 필름(film)과 시트(sheet)는 천공 등의 방법을 통해 반복적으로 캐리어를 생성할 수 있다. 이 중 파라필름은 ^{14}C 함량은 낮지만 신축성이 있어서 일정량을 반복적으로 취하기 어려워 캐리어 후보 물질에서 제외하였다. 결과적으로 액상인 액체 파라핀, 트라이부티린, 고체상 시트인 흑연 시트 등이 캐리어로서 적합한 물리화학적 상태를 가지는 것을 알 수 있다.

3.1.2.2 후보 물질의 가속기질량분석법용 시료로 전처리 및 결과

- 가속기질량분석법의 시료 전처리 방법을 간략하게 요약하면 다음과 같다. 액상 물질인 트라이부티린과 액체 파라핀은 마이크로모세관을 이용하여 2 μL 를 취하여 시료용 석영관에 넣었고 고체 박편인 벤조산은 1 mgC0이 되도록 정밀 저울을 이용하여 질량을 측정한 후 시료용 석영관에 넣었다. 흑연 시트는 사무용 편치로 천공하여 직경 6 mm의 원형 조각을 얻은 것을 시료용 석영관에 넣었다. 이후 산화 구리(II) 약 300 mg를 첨가하고 각 시료용 석영관을 산화용 석영관에 넣었다. 산화용 석영관은 5 mtorr 이하 진공에서 프로판-산소 불꽃을 이용하여 밀봉한 후 전기로 내의 매거진에 넣고 900°C에서 3시간 반응하였다. 산화용 석영관 내에 생성된 이산화탄소는 10 mtorr 이하 진공에서 액체 질소를 이용하여 아연과 철 분말이 든 환원용 유리관에 옮기고 530°C에서 5시간 30분 간 반응하였다. 철 촉매 표면에 생성된 흑연을 알루미늄 표적 훌더에 넣고 구리 압축핀과 공압 프레스를 이용하여 5 MPa로 6초 간 압축한 후 0.6 mL 튜브에 넣어 가속기질량분석기 측정 전까지 상온에서 보관하였다. 가속기질량분석법으로 측정하여 표 8과 같은 결과를 얻었다.

후보 물질	fMC	14C/12C	d13C
트라이부티린 1	0.212	2.39E-13	-36.7
트라이부티린 2	0.230	2.61E-13	-35.1
트라이부티린 3	0.229	2.60E-13	-35.4
트라이부티린 4	0.218	6.57E-13	-38
트라이부티린 5	0.221	6.66E-13	-38
트라이부티린 6	0.220	6.62E-13	-38
흑연 시트 1	0.007	8.22E-15	-28.5
흑연 시트 2	0.006	7.39E-15	-31.8
흑연 시트 3	0.007	8.48E-15	-34.1
흑연 시트 4	0.007	7.85E-15	-26
흑연 시트 5	0.010	1.12E-14	-32.1
흑연 시트 6	0.008	9.80E-15	-32.8
액체 파라핀 1	0.008	9.09E-15	-33.3
액체 파라핀 2	0.006	8.40E-15	-35.3
액체 파라핀 3	0.006	7.31E-15	-21.5
액체 파라핀 4	0.006	7.23E-15	-37.9
액체 파라핀 5	0.008	8.75E-15	-35.5
벤조산 1	0.017	1.89E-14	-32.7
벤조산 2	0.302	3.42E-13	-35.8
벤조산 3	0.016	1.85E-14	-32.6

표 8. 캐리어 후보 물질에 대한 가속기질량분석법 측정 결과

- 각 후보 물질의 fMC 측정 결과에 대하여 평균값과 표준 편차를 구하여 표 9와 같이 나타내었다. 흑연 시트와 액체 파라핀에 포함된 ^{14}C 의 양은 트라이부티린보다 1/30 수준으로 적고 ^{14}C 가 비교적 고르게 분포하고 있어, 캐리어로 사용하기에 적절한 동위원소 배경 준위를 가지고 있다고 할 수 있다.

후보 물질	fMC	표준 편차	반복 수
트라이부티린	0.2217	0.0068	6
흑연 시트	0.0075	0.0014	6
액체 파라핀	0.0068	0.0011	5
벤조산	0.1116	0.165	3

표 9. 캐리어 후보 물질의 동위원소 배경 준위

3.1.2.3 일정량의 캐리어를 반복 도입 실험

- 액체 캐리어인 트라이부티린과 액체 파라핀은 그림 25와 같이 2 μL 마이크로모세관으로 캐리어를 취한 후의 질량과 마이크로모세관의 질량의 차이를 정밀 저울로 측정하여 순수한 캐리어 2 μL 만의 양을 구하였다. 흑연 시트는 편치로 천공하여 원형의 흑연 시트 조각을 얻은 후 정밀 저울을 이용하여 무게를 정확히 측정하고 평균값과 편차를 구하였다. 표 10는 반복해서 얻은 캐리어 후보 물질의 평균 질량과 표준 편차를 나타낸 것이다. 흑연 시트 조각의 경우 질량의 편차가 0.006, 0.008로 매우 적어 실험적으로 사용하기 좋은 것을 알 수 있다.

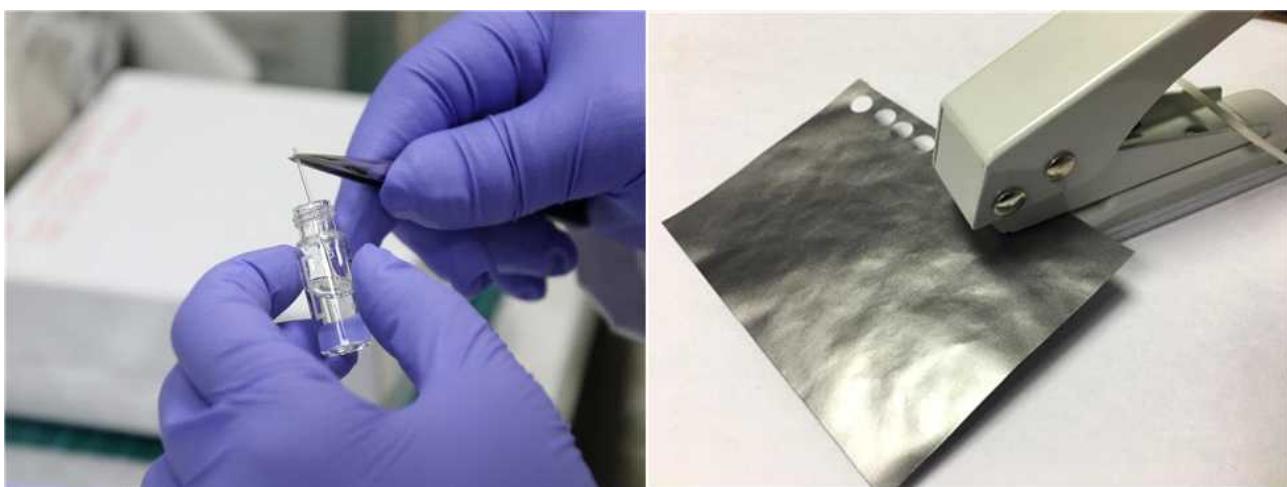


그림 25. 액체 캐리어를 마이크로모세관으로 취하는 방법(좌)과 흑연 시트를 편치로 천공하여 흑연 시트 조각을 얻는 방법(우)

후보 물질	fMC	표준 편차	반복 수
흑연 시트 A (두께 0.025 mm, 직경 6 mm)	1.313	0.006	30
흑연 시트 B (두께 0.040 mm 직경 6 mm)	1.985	0.008	30
액체 파라핀 (2 uL)	1.707	0.025	10
트라이부티린 (2 uL)	2.150	0.078	10

표 10. 반복해서 얻은 캐리어 후보 물질의 평균 질량과 표준 편차

- 그림 26은 반복해서 얻은 캐리어 후보 물질의 개별적인 질량을 그래프로 도식화하여 비교하였다.

3.1.3 결론

- 현재 가속기질량분석법에서 사용하고 있는 캐리어의 한계점을 극복하기 위해 본 연구를 진행하였으며 그 결과 후보 물질로부터 새로운 캐리어를 도출하였다.
- 흑연 시트는 트라이부티린이 가지고 있는 동위원소 배경 준위인 0.22 MC 보다 약 1/30 정도 낮은 동위원소 배경 준위를 가지고 있어 기존에 측정 가능한 정도보다 낮은 준위의 ^{14}C 를 포함한 생의학 분야 시료를 측정할 수 있게 되었다. 특히 혈중 약물 농도나 표적 물질의 체내 분포를 장기간 추적하는 것이 가능해지므로 흑연 시트는 약물동력학적 연구에 유리한 캐리어로 사용할 수 있다.
- 흑연 시트의 경우 상온에서 고체이고 휘발성이 없으므로 안정하며 장기간 보관이 가능하다는 장점이 있으며, 편치를 이용하여 필요한 양의 캐리어를 단시간에 다량으로 생성하기 때문에 다른 후보 물질에 비해 시료의 전처리 시간을 획기적으로 절약할 수 있다. 이 때 정밀한 편치를 사용하여 생성된 흑연 조각의 무게의 표준 편차가 매우 작아 가속기질량분석법에서 측정 오차를 줄일 수 있다는 장점이 있다.
- 본 연구 결과는 기존의 캐리어가 가지고 있는 한계를 극복하고 장점을 극대화한 흑연 시트 캐리어를 제시함으로써 생의학 분야에서의 가속기질량분석법을 활용한 시료전처리법의 발전 및 효율성 제고에 기여하였다.

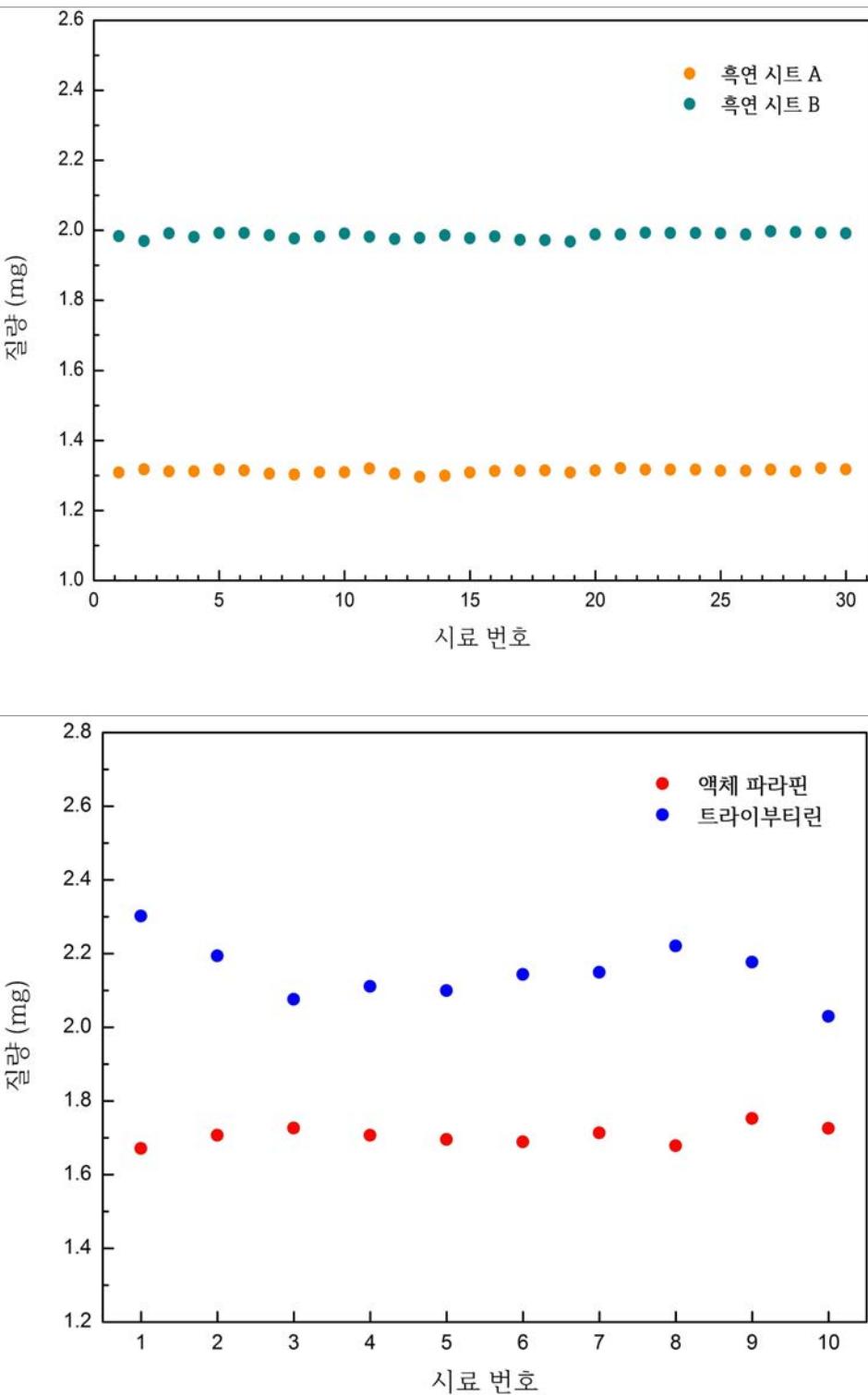


그림 26. 고체 캐리어(흑연 시트)의 개별 질량(상)과 액체 캐리어(액체 파라핀, 트라이부티린)의 개별 질량(하)

3.2 Full dose Caffeine 임상시료 측정

3.2.1 연구 배경 및 목적

- ¹⁴C Caffeine과 AMS를 이용하여 약물 간 상호작용을 확인하는 연구를 진행하고 이를 Full dose Caffeine의 약물간 상호작용 결과와 비교하고자 하였다. Microdose의 경우 약효를 나타내는 dose의 1/100 또는 100 ug이하의 양을 체내에 투여하는 것을 말하는데, 매우 낮은 극미량의 약물을 사용하기 때문에 안전한 임상시험성이 가능하다고 알려져 있다. 특히 임상 초기에 사람에게 처음 투여되는 신약의 경우 Phase 0 연구에서 마이크로도징 연구를 많이 진행하고 있다. 임상 초기에 약물에 관한 많은 정보를 얻을 수 있으며, 매우 안전하게 임상실험을 진행할 수 있다는 점에서 많은 국외 제약 회사들이 활용하고 있다.
- 마이크로도징 연구에서는 약효를 나타낼 수 있는 양을 도정하는 경우를 예측할 수 있을지에 대한 의문은 유효하다. 매우 극미량의 약물을 체내에 도입하기 때문에 극미량 약물의 약동력학 정보는 약효를 나타낼 수 있는 양을 투여하여 얻을 수 있는 약동력학 정보는 다를 수 있다. 일반적으로 약 70%이상의 약물이 Microdosing 연구 결과로부터 Full dose 연구 결과를 예측할 수 있다고 알려졌으나 약물의 Class에 의존적이다(종류에 따라 다르다).
- 본 연구에서 ¹⁴C Caffeine과 AMS를 이용하는 마이크로도징 연구를 계획했으나 연구계획이 변경되어 Caffeine을 체내에 마이크로도징한 후에 혈장에서의 매우 낮은 농도의 Caffeine을 감도가 매우 좋은 HPLC-MS/MS로 확인하고자 하였다. 이로부터 타 기관과 협의하여 Full dose의 Caffeine의 약물 간 상호작용을 확인하기 위한 임상시료의 농도 분석을 진행하고자 하였다. 본 연구기관에서 확인한 Full dose의 결과로부터 충남대학교 약학대학에서 확인하고자 한 마이크로도즈 Caffeine에 의한 약물 간 상호작용에 의한 결과를 비교하고자 하였다.

3.2.2 연구 방법

- 마이크로도즈한 Caffeine과 Full dose한 Caffeine의 임상시료 결과를 확인하기 위하여 마이크로도즈한 Caffeine 임상시료는 충남대 약학대학에서 분석을 진행하였고, full dose한 Caffeine의 임상시료 결과는 KIST에서 분석을 진행하였다. Full dose한 Caffeine에 대한 시료는 다음과 같다. 가톨릭 의대에서 진행한 CPT2016-07 프로토콜 (임상시료 중 Inducer인 Omeprazole이 사전에 처리된 경우에 대하여 full dose Caffeine의 약물 간 상호작용 확인)과 CPT-2016-05 프로토콜 (임상시료 중 Inhibitor인 Ciprofloxacin이 사전에 처리된 경우에 대한 Full dose caffeine의 약물 간 상호 작용 확인)을 따르는 시료의 농도를 확인하고자 하였다. Full dose Caffeine의 농도를 확인하기 위한 분석 방법은 아래와 같다.

3.2.2.1 표준용액 제조

- Caffeine stock solution (1.0 mg/ml)를 만들기 위하여 caffeine 1 mg를 DMSO 1 ml에 녹여 만들었으며, working solution (0.1 mg/ml)은 stock solution으로부터 10배 희석하여 제조하였다. 보정곡선을 만들기 위해서 working solution에서부터 3배씩 희석하여, 11개의 농도 (0.56, 1.69, 5.08, 15.2, 45.7, 137.2, 411.5, 1234.6, 3709.7, 1111.11, 33333.3 ng/ml)로 만들어 사용하였다.

3.2.2.2 내부표준용액 제조

- Caffeine d₉ stock solution (1.0 mg/ml)를 만들기 위하여 caffeine 1 mg를 DMSO 1 ml에 녹여 만들었으며, working solution (0.1 mg/ml)은 stock solution으로부터 10배 희석하여 제조하였다. 제조 된 working solution 10 ul를 ACN 20 ml 첨가하여 농도가 50 ng/ml 되도록 만들어 사용하였다.

3.2.2.3 전처리 방법

- 혈장 50 ul를 취하여 1.5 ml eppendorf tube에 옮긴 후, DMSO 10 ul와 50 ng/ml caffeine d₉이 포함 된 ACN 500 ul를 넣어준다. 시료가 들어있는 1.5 ml Eppendorf tube를 5 분간 voltex 과정을 진행한 후, 4 °C에서 13,000 rpm으로 10분간 centrifuge를 진행한다. 상층액 500 ul를 새로운 1.5 ml eppendorf tube에 옮긴 후 진공농축기를 이용하여 2시간 동안 건조 한다. 건조 된 1.5 ml eppendorf tube에 20% ACN 용액 70 ul 넣고 2분간 voltex를 진행 한 후 60 ul 취한 후 2 ml HPLC vial 옮긴 후 HPLC-MS/MS 분석한다.

3.2.2.4 분석기기

- Caffeine를 분석하기 위해서 HPLC는 agilent (USA)사의 1200 Infinity 사용하였다.

caffeine의 분리를 위한 컬럼은 Phenomenex Synergi Hydro-RP column, 2.1 x 50mm (3 um)를 사용하였다.

- HPLC 분리를 위한 이동상 A는 0.1% formic acid DW이며, 이동상 B 0.1% formic acid ACN으로 만들었다. 초기 이동상 조건은 1% 이동상 B이며, 3분까지 35% 이동상 B로 증가 시키고, 3.2분까지 35%로 이동상 B를 유지시킨다. 3.25분부터 90% 이동상 B로 증가시키며, 3.4분 까지 90% 이동상 B를 유지한다. 3.5분에 1% 이동상 B로 감소시킨 후 6분 까지 유지하였다.
- 질량분석기 사용은 AB sciex사 (USA)의 API 3200 triple quadrupole Mass spectrometry (MS/MS)를 이용하였으며, 이온화 방법은 electrospray ionization (ESI) 방식을 사용하였다. caffeine과 caffeine-d₉를 분석하기 위해 multiple reaction monitoring (MRM)을 사용하였으며, 각 성분의 정량 분석을 위한 product ion 및 collision energy (CE)는 표준 용액을 질량분석기에 직접 주입하여 선정하였다. Precursor/product ion은 caffeine의 경우 m/z 195/138이며, caffeine-d₉은 m/z 204.1/144.1이다. caffeine 및 caffeine d₉에 대한 data 처리는 AB Sciex사의 프로그램인 Analyst 1.1 software를 사용하였다.

3.2.3 연구 내용

3.2.3.1 CPT2016-07 caffeine과 omeprazole

3.2.3.1.1 Caffeine+Omeprazole 1기 calibration curve 작성

- Calibration curve 작성은 제조한 표준용액 (STD 1~12)을 이용하였다. 혈장 50 μ l에 표준용액을 각각 10 μ l씩 spike하여 전처리 한 후 다음과 같은 결과를 얻었다. (그림 28)

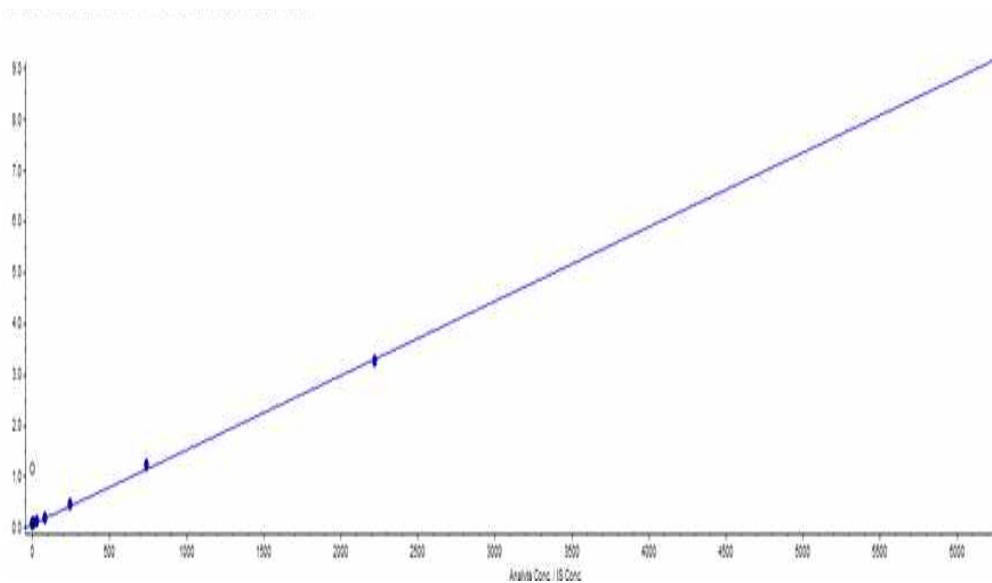


그림 217. Caffeine + Omeprazole 1기 calibration curve

Calibration number	ng/ml	STD/ISTD ratio
blk	0	0
1	0.11	NQ
2	0.34	NQ
3	1.02	NQ
4	3.05	NQ
5	9.14	0.028
6	27.43	0.050
7	82.30	0.138
8	246.91	0.401
9	740.74	1.178
10	2222.22	3.218
11	6666.67	8.919

표 11.Caffeine + Omeprazole 1기 calibration curve를 위한 표준 용액의 결과

3.2.3.1.2 Caffeine+Omeprazole 2기 calibration curve 작성

- 보정곡선 작성은 제조한 표준용액 (STD 1~12)을 이용하였다. 혈장 50 uI에 표준용액을 각각 10 uI 첨가하여 전처리 한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

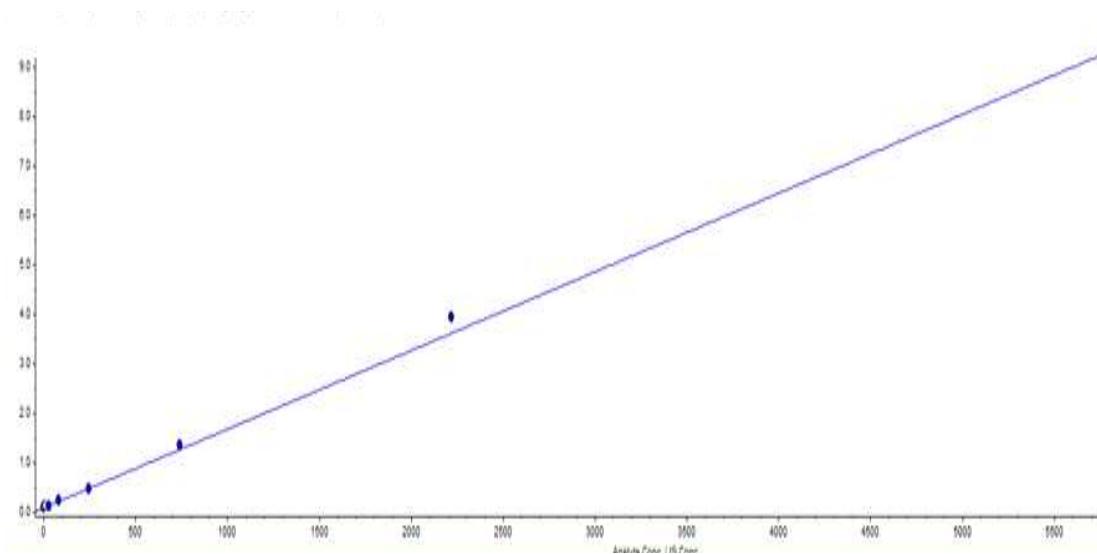


그림 218.Caffeine+Omeprazole 2gi calibration curve

Calibration number	ng/ml	STD/ ISTD ratio
blk	0	0
1	0.11	NQ
2	0.34	NQ
3	1.02	NQ
4	3.05	NQ
5	9.14	0.035
6	27.43	0.061
7	82.30	0.145
8	246.91	0.396
9	740.74	1.295
10	2222.22	3.532
11	6666.67	9.971

표 12.Caffeine+Omeprazole 2기 보정곡선을 위한 표준 용액의 MS/MS 결과

3.2.3.1.3 CO01

- Caffeine에 대한 1기 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 4683 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 30분, 4214 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Omeprazole)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기가 10% 감소하였다.

CO01		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Omeprazole (ng/ml)
0	0	0
15	4683	1902
30	3266	4214
45	2481	3134
60	2663	2540
120	2235	2026
240	1867	1816
360	1561	1357
480	1330	1129
720	874	756
1440	489	213

표13. CO01의 Omeprazole에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

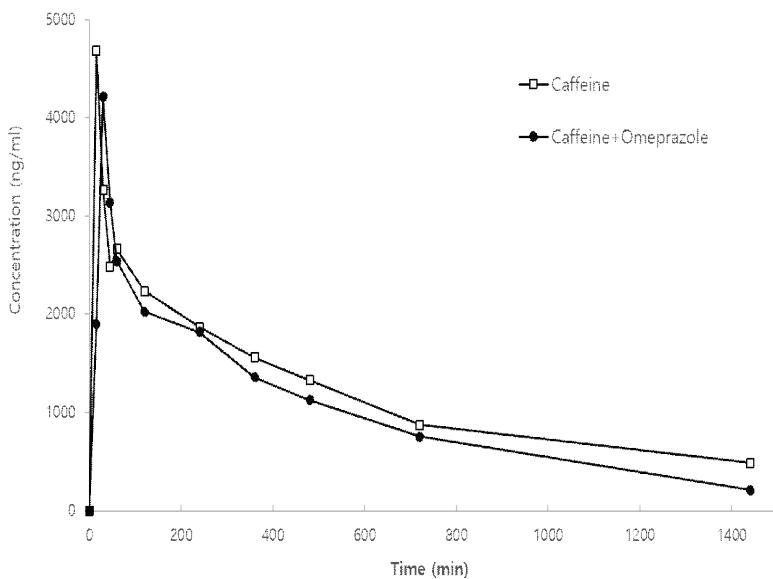


그림 219. CO01의 Caffeine PK와 Omeprazole에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.1.4 CO02

- Caffeine에 대한 1기 (caffeine) 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 22148 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기 (caffeine+Omeprazole)에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 15분, 3869 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Omeprazole)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기가 82.5% 감소하였다.

CO02		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Omeprazole (ng/ml)
0	20	0
15	22148	3869
30	3244	3396
45	2694	2569
60	2750	2320
120	2209	1951
240	1795	1563
360	1545	1172
480	1257	928
720	735	501
1440	201	83

표14. CO02의 Omeprazole에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

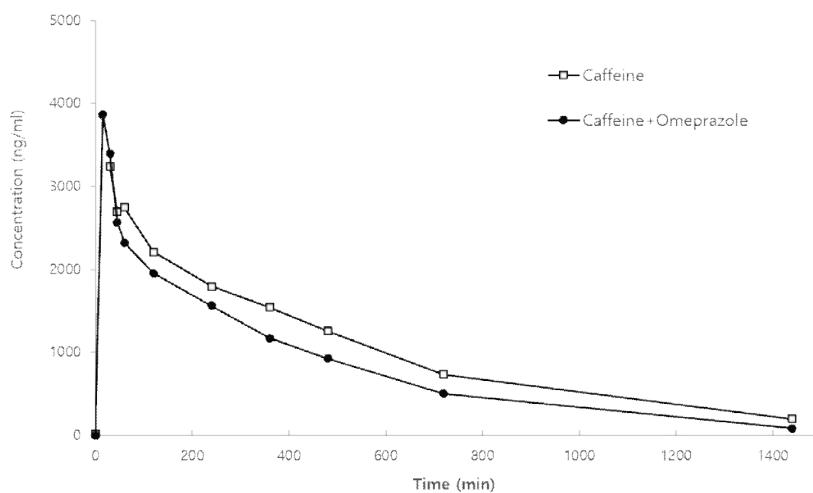


그림 220. CO02의 Caffeine PK와 Omeprazole에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.1.5 CO03

- caffeine에 대한 1기 (caffeine) 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 4325 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기 (caffeine+Omeprazole)에 대한 결과는 Tmax 와 Cmax가 30분, 4388 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Omeprazole)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기가 1.5% 증가하였다.

CO03		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Omeprazole (ng/ml)
0	0	63
15	4325	2656
30	4245	4388
45	2989	2908
60	2775	2810
120	2517	2336
240	2288	2161
360	1909	1540
480	1614	1573
720	1052	1105
1440	367	445

표 15. CO03의 Omeprazole에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

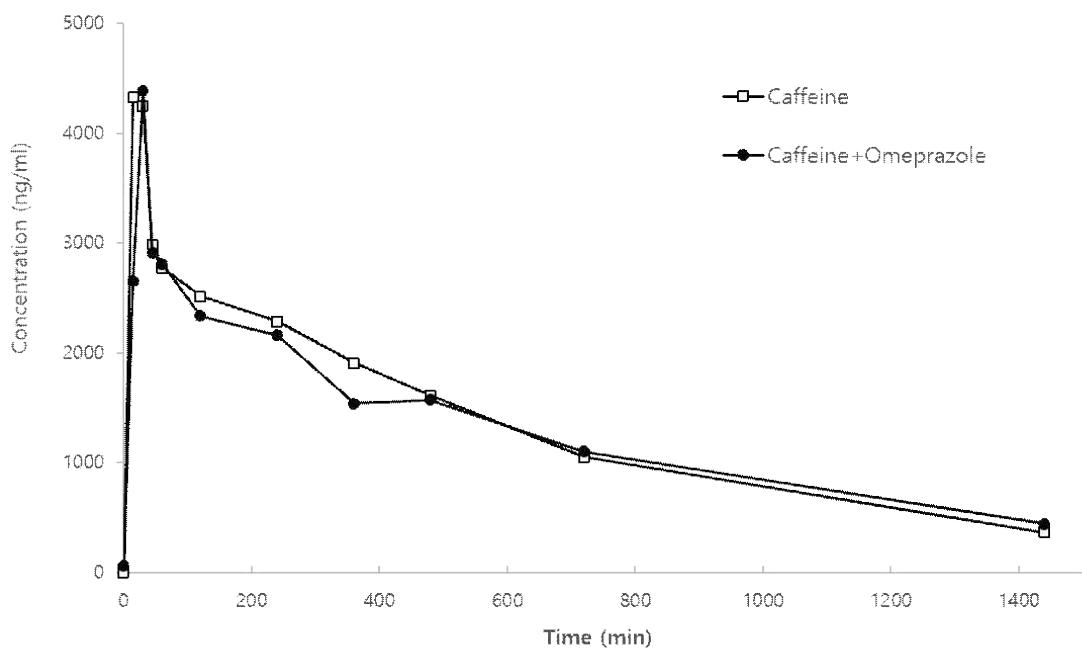


그림 221. CO03의 Caffeine PK와 Omeprazole에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.1.6 CO04

- caffeine에 대한 1기 (caffeine) 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 5511 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기 (caffeine+Omeprazole)에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 15분, 4077 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Omeprazole)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 26% 감소하였다.

CO04		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Omeprazole (ng/ml)
0	87	16
15	5511	4077
30	5171	2962
45	3294	2586
60	3118	2312
120	2945	2277
240	2629	1957
360	3057	1681
480	2002	1387
720	2133	889
1440	1184	420

표 16. CO04의 Omeprazole에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

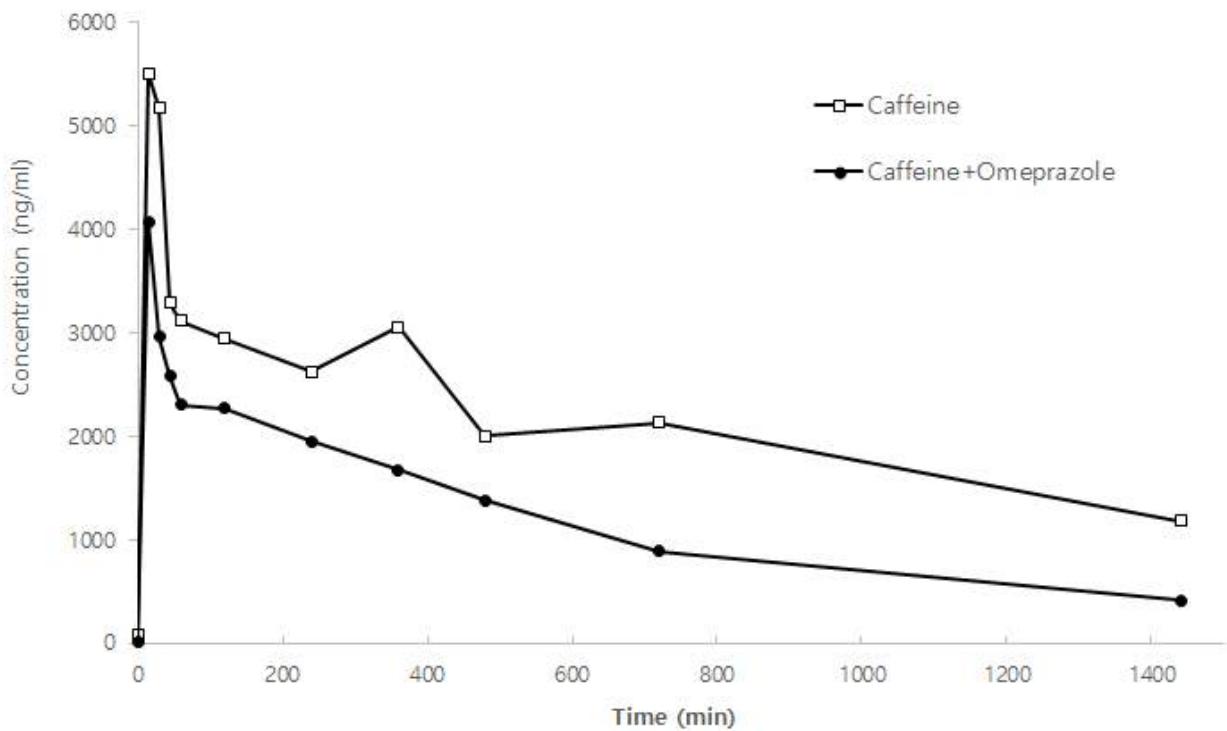


그림 222. CO04의 Caffeine PK와 Omeprazole에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.1.7 CO05

- caffeine에 대한 1기 (caffeine) 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 3436 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기 (caffeine+Omeprazole)에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 30분, 2830 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Omeprazole)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 17.6% 감소하였다.

CO05		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Omeprazole (ng/ml)
0	0	0
15	3436	2488
30	3037	2830
45	2602	2178
60	2750	2141
120	2307	1851
240	2227	1690
360	1868	1341
480	1534	1143
720	1224	823
1440	543	290

표 17. CO05의 Omeprazole에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

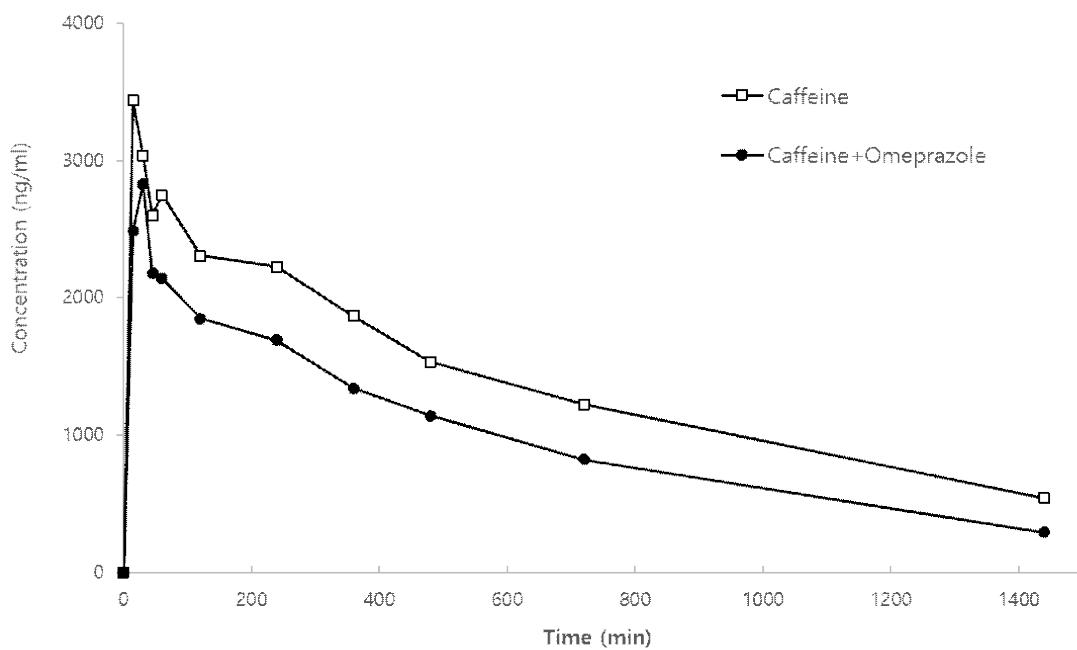


그림 223. CO05의 Caffeine PK와 Omeprazole에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.1.8 CO06

- caffeine에 대한 1기 (caffeine) 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 3726.6 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기 (caffeine+Omeprazole)에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 30분, 2627.8 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Omeprazole)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 29.5% 감소하였다.

CO06		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Omeprazole (ng/ml)
0	0	0
15	3727	2386
30	2986	2628
45	2894	2296
60	2451	2083
120	2075	1741
240	1621	1392
360	1276	1046
480	1022	772
720	578	431
1440	155	81

표 18. CO06의 Omeprazole에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

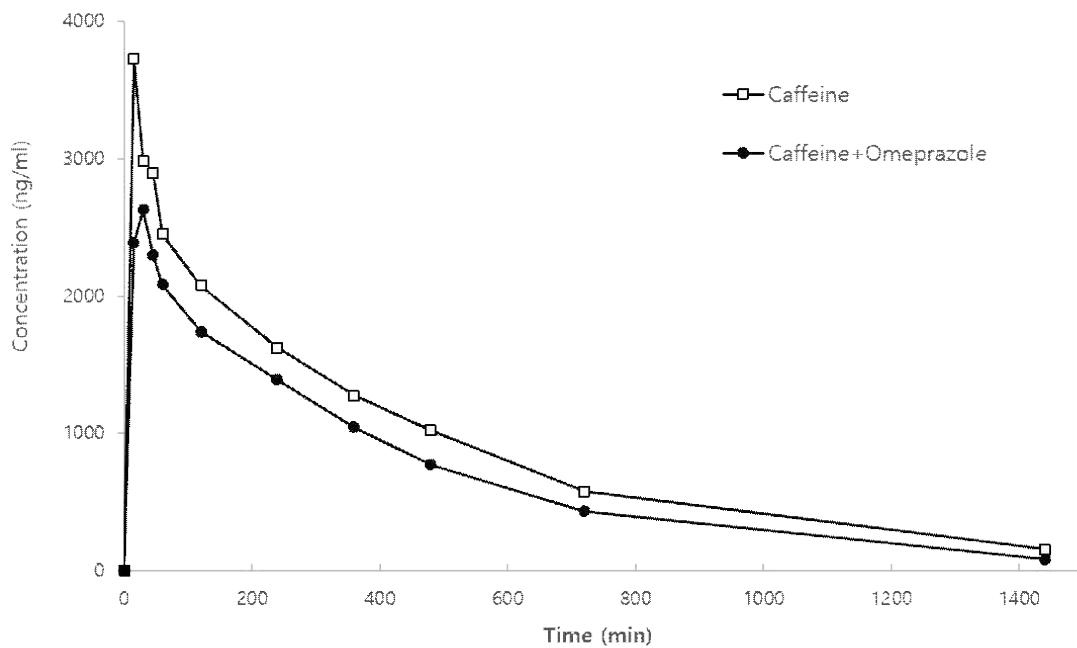


그림 224. CO06의 Caffeine PK와 Omeprazole에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.1.9 CO01~CO06

- caffeine에 대한 1기 (caffeine) 전체에 대한 평균 Cmax는 7305 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기 (caffeine+Omeprazole)에 전체에 대한 평균 Cmax는 3403 ng/ml로 나타났다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Omeprazole)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 53.4% 감소하였다.

CC01-06				
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	S.D	Caffeine + Omeprazole (ng/ml)	S.D
0	18	35	13	25
15	4336	819	2897	873
30	3658	871	3403	742
45	2826	296	2612	361
60	2751	216	2368	269
120	2381	312	2031	235
240	2071	375	1763	276
360	1870	627	1356	232
480	1460	338	1155	292
720	1099	555	751	251
1440	490	373	255	159

표 19. CC01-06의 Ciprofloxacin에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

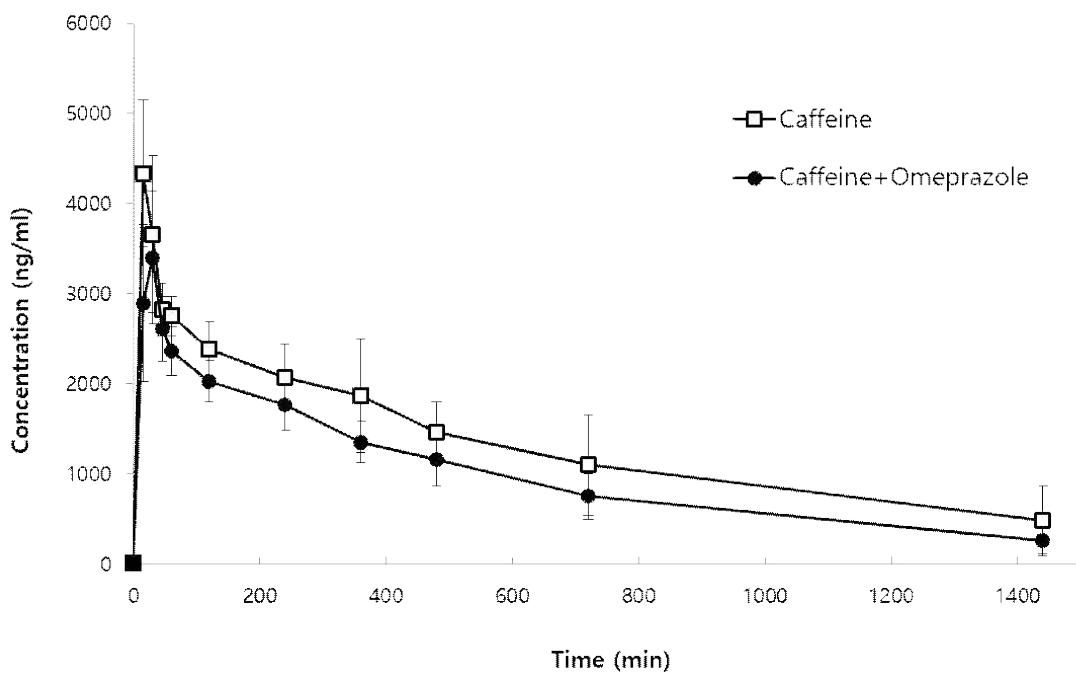


그림 225. CO01-06의 Caffeine PK와 Omeprazole에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.2 CPT2016-05 caffeine과 ciprofloxacin

3.2.3.2.1 Caffeine+Ciprofloxacin 1기 calibration curve 작성

- Calibration curve 작성은 제조한 표준용액 (STD 1~12)을 이용하였다. 혈장 50 uI에 표준용액을 각각 10uI씩 spike하여 전처리 한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

Calibration number	ng/ml	STD/ISTD ratio
blk	0	0
1	0.11	NQ
2	0.34	NQ
3	1.02	NQ
4	3.05	NQ
5	9.14	0.03
6	27.43	0.05
7	82.30	0.13
8	246.91	0.41
9	740.74	1.09
10	2222.22	3.08
11	6666.67	8.26

표 20. Caffeine+Ciprofloxacin 1기 calibration curve를 위한 표준 용액의 결과

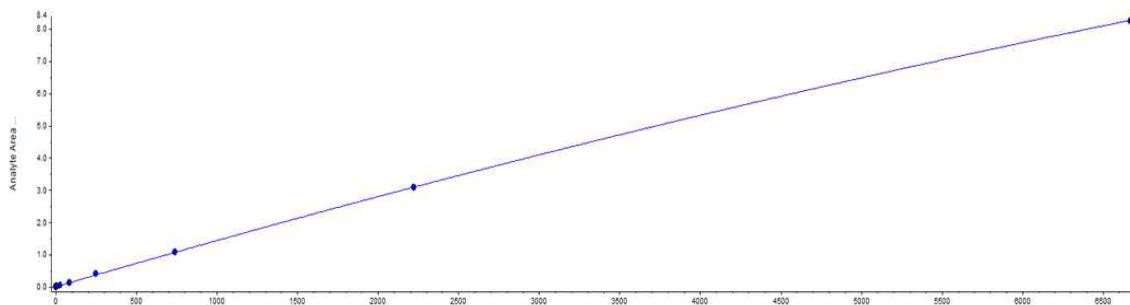


그림 226. Caffeine+Ciprofloxacin 1기 calibration curve

3.2.3.2.2 Caffeine+Ciprofloxacin 2기 calibration curve 작성

- Calibration curve 작성은 제조한 표준용액 (STD 1~12)을 이용하였다. 혈장 50 ul에 표준용액을 각각 10ul씩 spike하여 전처리한 후 다음과 같은 결과를 얻었다.

Calibration number	ng/ml	STD/ISTD ratio
blk	0	0
1	0.11	NQ
2	0.34	NQ
3	1.02	NQ
4	3.05	NQ
5	9.14	0.04
6	27.43	0.06
7	82.30	0.14
8	246.91	0.38
9	740.74	1.10
10	2222.22	3.09
11	6666.67	8.08

표 21. Caffeine+Ciprofloxacin 2기 calibration curve를 위한 표준 용액의 결과

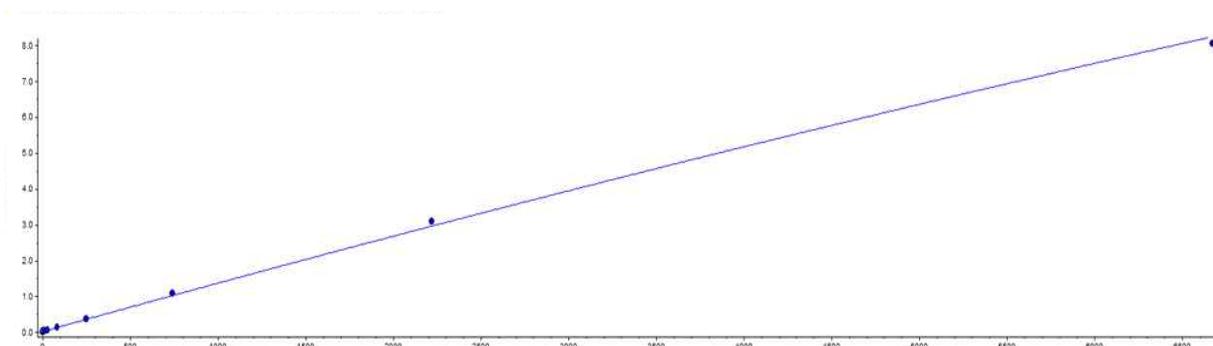


그림 227. Caffeine+Ciprofloxacin 2기 calibration curve

3.2.3.2.3 CC01

- caffeine에 대한 1기 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 3460 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 30분, 2670 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Ciprofloxacin)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 29.6% 증가하였다.

CC01		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Ciprofloxacin (ng/ml)
0	0	0
15	3727	2386
30	2986	2628
45	2894	2296
60	2451	2083
120	2075	1741
240	1621	1392
360	1276	1046
480	1022	772
720	578	431
1440	155	81

표 22. CC01의 Ciprofloxacin에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

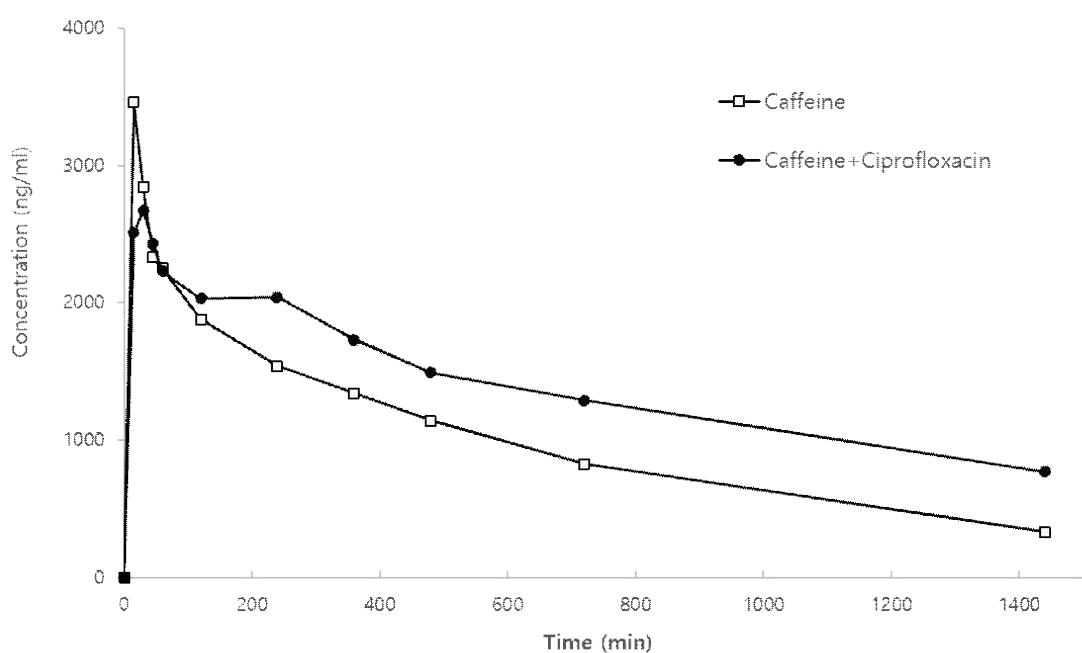


그림 228. CC01의 Caffeine PK와 Ciprofloxacin에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.2.4 CC02

- caffeine에 대한 1기 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 30분, 3020 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 15분, 2820 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Ciprofloxacin)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 7.1% 증가하였다.

CC02		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Ciprofloxacin (ng/ml)
0	9	4
15	2850	2820
30	3020	2440
45	2480	2200
60	2290	2340
120	1950	2070
240	1680	1800
360	1420	1800
480	1270	1610
720	903	1270
1440	394	757

표 23. CC02의 Ciprofloxacin에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

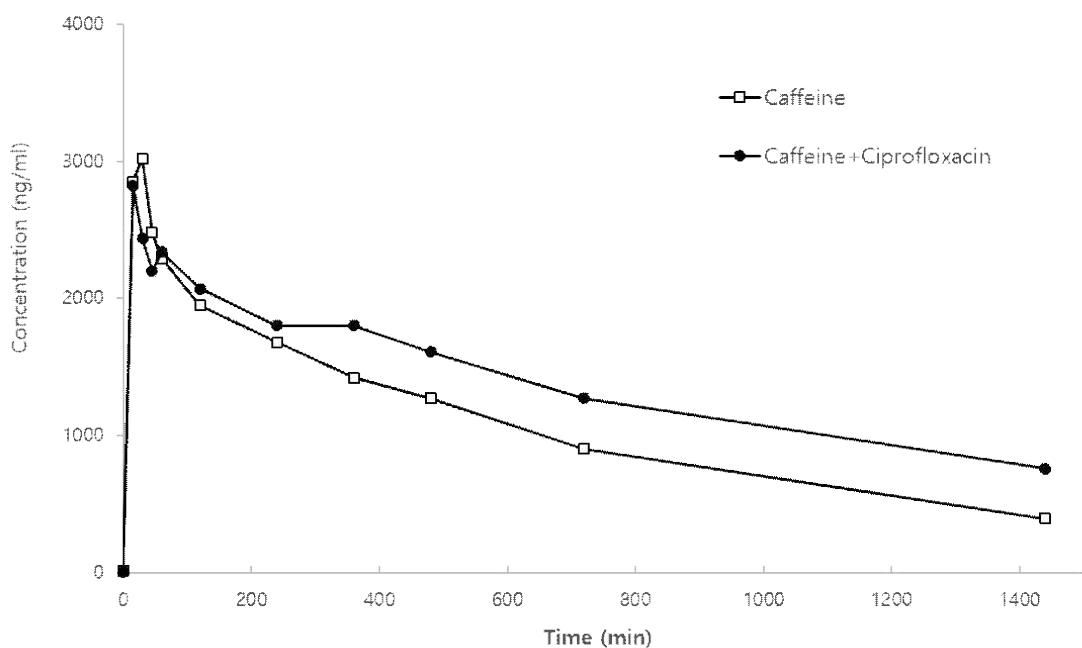


그림 229. CC02의 Caffeine PK와 Ciprofloxacin에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.2.5 CC03

- caffeine에 대한 1기 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 3370 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 30분, 2510 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Ciprofloxacin)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 34.3% 증가하였다.

CC03		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Ciprofloxacin (ng/ml)
0	0	0
15	3370	2320
30	3050	2510
45	2280	2170
60	2130	2190
120	1660	2210
240	1310	1980
360	944	1720
480	752	1480
720	420	1100
1440	96	542

표 24. CC03의 Ciprofloxacin에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

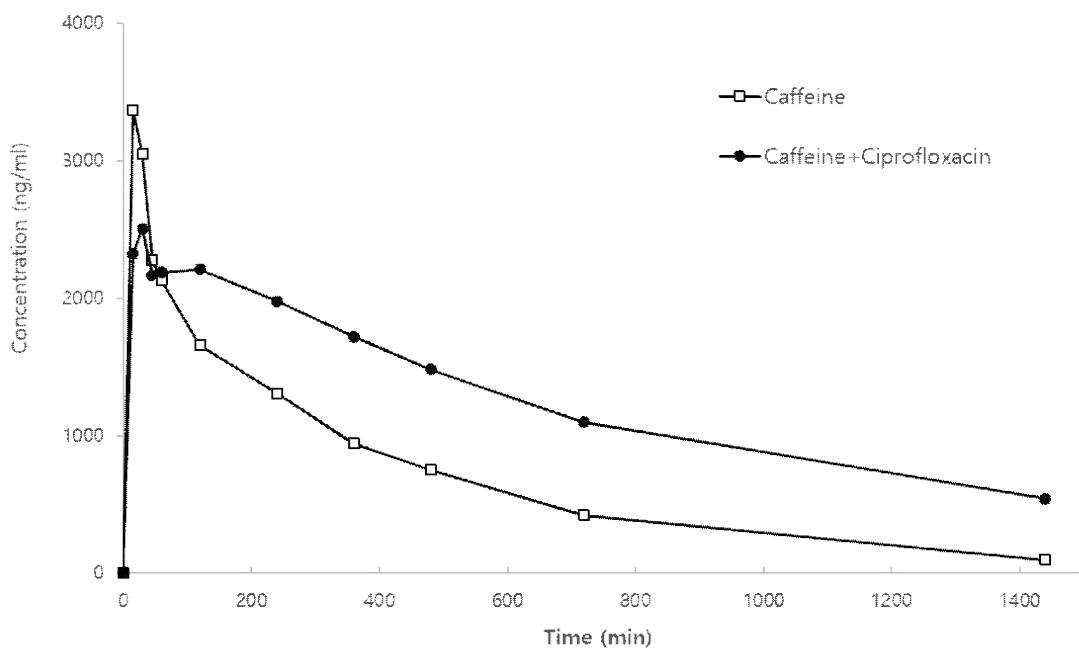


그림 230. CC03의 Caffeine PK와 Ciprofloxacin에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.2.6 CC04

- caffeine에 대한 1기 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 15분, 2490 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 15분, 2780 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Ciprofloxacin)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 0.4% 감소하였다.

CC04		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Ciprofloxacin (ng/ml)
0	0	0
15	2490	2780
30	2190	2430
45	1730	2480
60	1560	2080
120	1210	1910
240	784	1730
360	458	1210
480	293	910
720	112	508
1440	8	152

표 25. CC04의 Ciprofloxacin에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

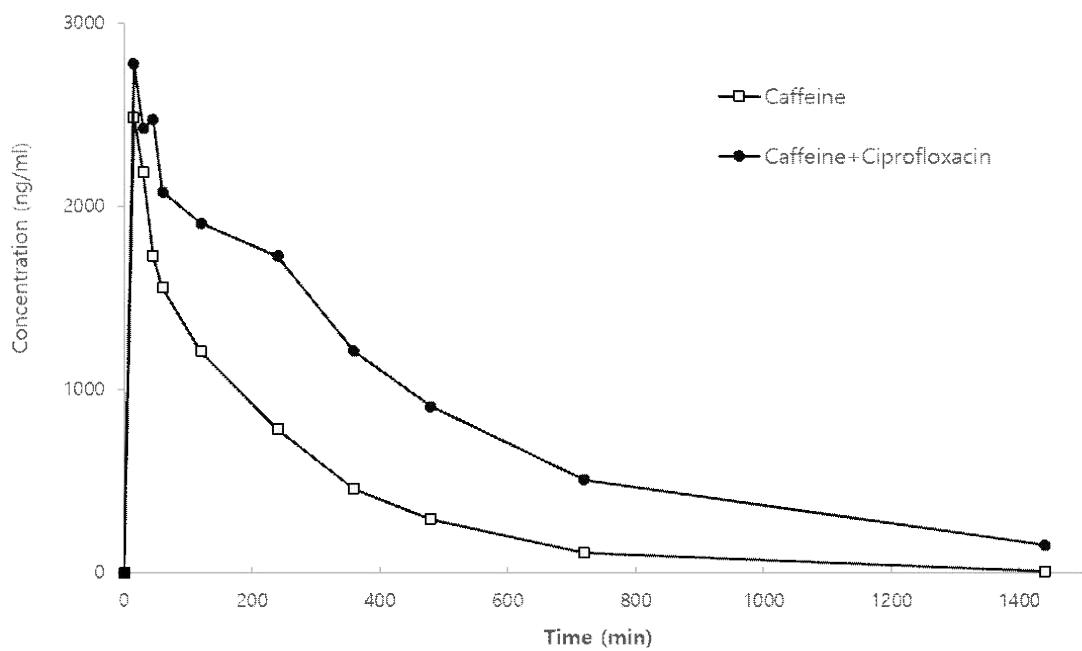


그림 231. CC04의 Caffeine PK와 Ciprofloxacin에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.2.7 CC05

- caffeine에 대한 1기 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 45분, 2520 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 45분, 2810 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Ciprofloxacin)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 11.5% 증가하였다.

CC05		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Ciprofloxacin (ng/ml)
0	0	0
15	1040	1580
30	2110	2730
45	2520	2810
60	2280	2570
120	1740	2340
240	1560	1990
360	1190	1790
480	935	1500
720	604	1080
1440	171	496

표 26. CC05의 Ciprofloxacin에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

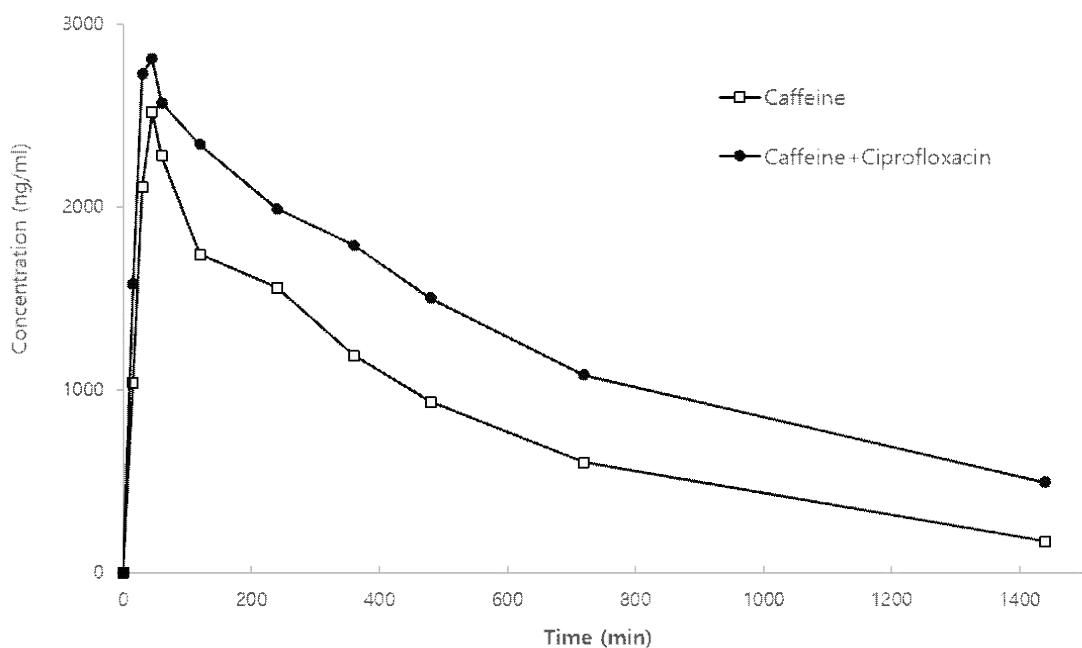


그림 232. CC05의 Caffeine PK와 Ciprofloxacin에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.2.8 CC06

- caffeine에 대한 1기 분석결과 caffeine의 Tmax와 Cmax는 각각 30분, 3490 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기에 대한 결과는 Tmax와 Cmax가 30분, 3490 ng/ml를 나타내었다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Ciprofloxacin)의 Cmax를 비교하였을 때 1기와 2기가 같은 결과가 나타났다.

CC06		
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	Caffeine+Ciprofloxacin (ng/ml)
0	0	0
15	2000	3420
30	3490	3490
45	2710	3020
60	2390	2710
120	1970	2390
240	1710	2240
360	1400	2060
480	1160	1820
720	781	1320
1440	277	703

표 27. CC06의 Ciprofloxacin에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

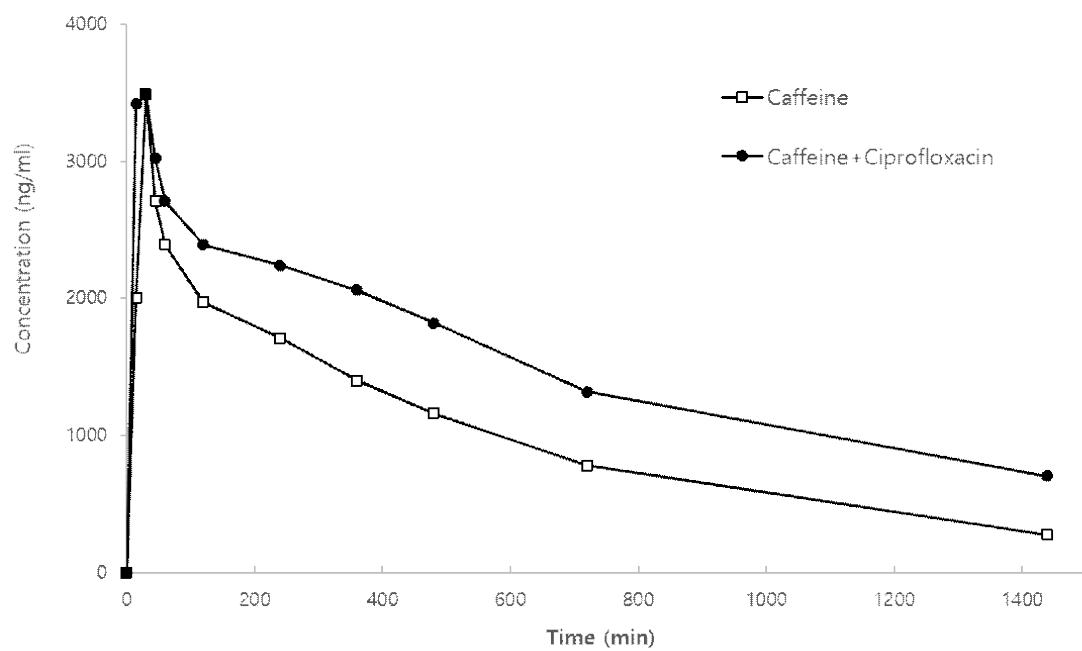


그림 233. CC06의 Caffeine PK와 Ciprofloxacin에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.2.3.2.9 CC01-CC06

- caffeine에 대한 1기 (caffeine) 전체에 대한 평균 Cmax는 2783 ng/ml의 농도를 나타났으며, Caffeine 2기 (caffeine+Omeprazole)에 전체에 대한 평균 Cmax는 2712 ng/ml로 나타났다. 1기 (Caffeine)와 2기 (Caffeine+Ciprofloxacin)의 Cmax를 비교하였을 때 1기에 비해 2기는 2.6% 감소하였다.

CC01-06				
Time (min)	Caffeine (ng/ml)	S.D	Caffeine +Ciprofloxacin (ng/ml)	S.D
0	1	4	1	1
15	2535	914	2572	559
30	2783	536	2712	366
45	2342	336	2518	308
60	2150	301	2353	220
120	1735	284	2158	171
240	1431	347	1963	166
360	1125	372	1718	254
480	925	361	1468	276
720	608	299	1095	278
1440	213	147	570	214

표 28. CC01-06의 Ciprofloxacin에 의한 Caffeine의 시간에 따른 농도 변화

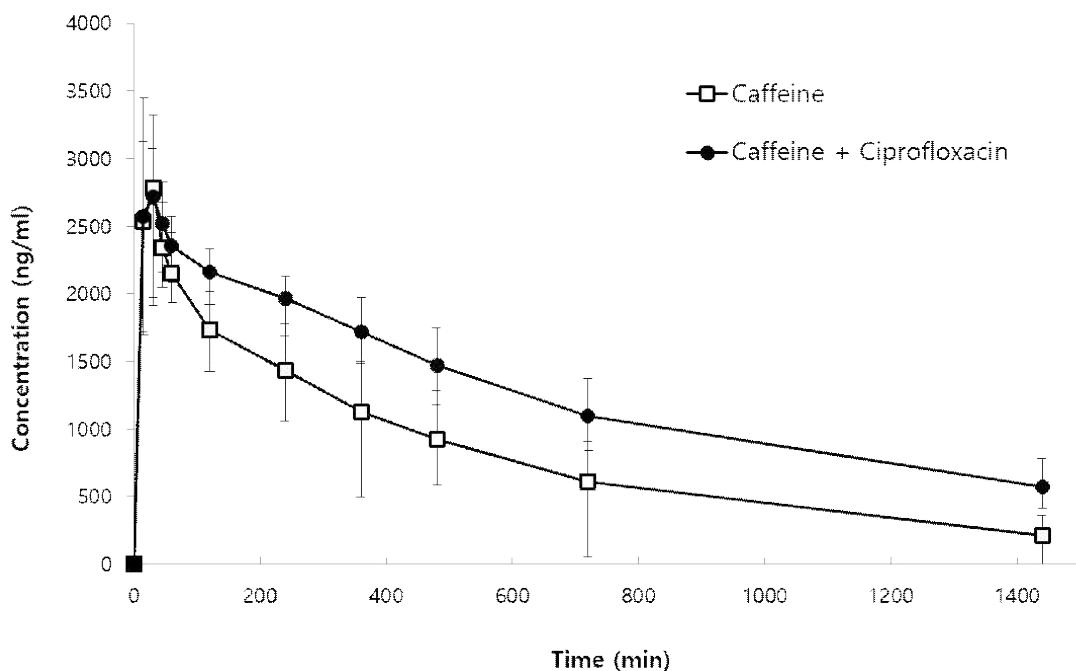


그림 234. CC01-06의 Caffeine PK와 Ciprofloxacin에 의하여 변화한 Caffeine의 PK

3.3 전처리 과정 및 AMS 측정을 위한 프로토콜 및 SOP 작성

3.3.1 연구배경 및 목적



그림 235. 전처리 과정 및 AMS 측정을 위한 프로토콜 및 SOP 작성

- 프로토콜 및 표준작업지침서 (Standard Operating Procedures, SOP)은 자료의 신뢰성을 확보하기 위하여 특정업무를 표준화된 방법에 따라 일관되게 실시할 목적으로 해당 절차 및 수행 방법 등을 상세하게 기술한 문서를 말한다. 따라서 상세하게 기술된 프로토콜 및 표준작업지침서를 토대로 업무를 수행하였을 때 어느 누구라도 동일한 결과를 얻을 수 있어야 한다.
- 프로토콜 및 표준작업지침서를 작성하는 이유는 각 업무에서의 프로토콜 및 표준작업지침서를 작성하고 이를 수행하는 과정은 특정 업무의 과정 또는 결과의 신뢰성 및 효율성을 높이기 위한 과정이다. 본 연구의 경우 AMS 시료를 제작 또는 AMS 측정하는 과정이 매우 복잡한 과정이며, 그 모든 과정이 정확하게 수행되어야만 AMS의 결과를 얻고, 이를 해석할 수 있기 때문에 프로토콜 및 표준작업지침서를 작성하고 이를 준수하여 연구과정 및 결과의 신뢰성, 효율성을 확보하고자 하였다.(그림 45)
- 이전에 수행된 연구 및 실험에 대해서는 프로토콜 및 SOP이 명확하게 작성되지 않아 업무를 수행하는 사람마다 과정에서 차이가 있었다. 특히 전처리 과정의 각 단계는 시간 소모가 많고 복잡한 과정이기 때문에 각 단계마다 상세하게 기술될 필요가 있었다. 각 단계 역시 최적화된 방법을 확인하고 이를 프로토콜 및 SOP에 설명할 필요가 있었다. 프로토콜 및 SOP 작성자를 통해 각 단계의 최적화된 조건을 확인하는 과정이 포함되어 있기 때문에 전처리 과정의 효율 향상을 기대할 수 있다.
- 본 연구에 있어서 AMS 전처리 과정 및 AMS 측정과정에 관한 프로토콜 및 SOPs를 작성하였다. 각각의 과정에 대한 프로토콜 및 SOPs는 좀 더 세부적으로 나눌 수 있다. 크게

두 과정으로 나눈 이유는 각 과정이 필요로 하는 기술이 다르기 때문이고 조금 더 효율적으로 결과를 얻기 위함이다. 전처리의 경우는 HPLC 분리등 화학에 관한 지식이 반드시 필요한 과정이고, 측정의 경우는 물리학적, 수학적 지식이 필요한 과정이다.

3.3.2 연구 내용

- SOP에는 표준작업지침서에 관한 표준작업지침서, 표준작업지침서 양식, 조직도 및 역할, 교육, 시료 접수 및 보관, 표준 시료 전처리, 바이오 시료 전처리에 대한 내용을 포함하고 있다. 또한 AMS 측정에 관한 SOP에는 안전 및 보안, 장비 설비 유지보수, AMS 측정, 표준시료 취급에 대한 SOP를 포함하고 있다. 각 SOP에 대한 내용을 간략하게 확인 할 수 있는 각 SOP의 첫장을 첨부하였으며, 간략하게 정리하면 아래와 같다.
- 표준작업지침서의 제정, SOP의 번호와 서식의 체계, SOP의 양식 구성 서식, SOP의 배포, SOP의 원본 관리 및 배포, SOP 정기 점검 및 변경에 관한 내용을 포함하고 있다. 표준 작업 지침서 양식은 작성한 SOP를 위한 양식을 포함하고 있다. 양식을 비롯하여 작성한 SOP에 대한 개요를 정리하고 있다. 조직도 및 역할에 대한 SOP에는 Bio AMS 전처리 및 AMS 측정을 위한 팀의 조직 구성 및 업무를 명확하기 위하여 작성되었다. 팀의 구성원의 역할 설정 및 조직도를 포함하고 있다. 교육에 관한 SOP는 BioAMS 팀원들의 교육 과정, 내용, 방법을 포함하고 있다. 교육 과정을 통해 전처리를 비롯한 Bio AMS 연구과정에 대한 이해도, 전처리 효율을 목적으로 작성하였다. 시료 접수 및 보관에 대한 SOPs는 외부 기관에서부터 제공되는 흙연화 과정이 수행된 시료를 접수 받고 이를 보관하는 과정을 서술하였다. 외부 기관에서 제공하는 흙연화가 진행된 시료의 이동과정에 따른 이상 유무, 시료 개수 확인, 시료 상태 확인 등을 진행하며 시료의 보관 및 저장에 관련된 내용을 수행하도록 서술되었다. 표준 시료 전처리에 관한 내용의 경우 AMS 측정을 위하여 반드시 포함되어야 하는 Oxalic acid II를 비롯하여 시료 측정 과정에서 이상이 없음을 확인하기 위한 표준시료 (C3, C8)를 전처리하는 과정을 포함하고 있다.
- AMS 측정에 관한 SOPs에는 안전 및 보안, 장비 설비 유지보수, AMS 측정, 표준시료 취급에 대한 SOP를 포함하고 있다. 특히 AMS 측정을 위한 프로토콜 및 SOP의 작성위하여 흙연화 과정이 진행된 시료를 AMS에 시료를 Loading하는 과정에서부터 측정과정에서 Beam 효율을 높이기 위한 튜닝과정, 시료의 측정 방법 및 측정값으로부터 결과 확인 과정을 포함하고 있다. 장비 설비 유지 보수에 대한 SOPs의 경우 신뢰성이 확보된 AMS 측정 및 결과를 얻기 위하여 측정 전, 후 확인 사항 및 보수 사항 등에 대하여 자세하게 기록하였다.

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology
STANDARD OPERATING PROCEDURES

표준작업지침서에 관한 표준작업지침서
SOPs for Standard Operation Procedures

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
GER-SOP-001	01		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

GER-SOP-001 1 of 8 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 236. 표준작업지침서에 관한 SOP

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology
STANDARD OPERATING PROCEDURES

조직도 및 역할
Organization and Responsibility

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
GER-SOP-001	B1		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

GER-SOP-001 1 of 7 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 237. 조직도 및 역할에 관한 SOP

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology
STANDARD OPERATING PROCEDURES

전처리실 관리
Samples Preparation Lab. Management

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
GER-SOP-006	01		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

GER-SOP-006 1 of 9 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 238. 전처리실 관리에 관한 SOP

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology
STANDARD OPERATING PROCEDURES

교육

Training Team Members

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
GER-SOP-D04	01		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

GER-SOP-D04 1 of 8 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 239. 교육에 관한 SOP

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology
STANDARD OPERATING PROCEDURES

KIST 흑연화 기기
KIST Graphite System

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
JNS-SOP-003	01		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

JNS-SOP-003 1 of 8 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 240. KIST 흑연화 기기에 관한 SOP

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology

STANDARD OPERATING PROCEDURES

시료 접수 및 보관
Sample Registration

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
REG-SOP-001	v1		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

REG-SOP-001 1 of 8 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 241. 시료 접수 및 보관에 관한 SOP

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology
STANDARD OPERATING PROCEDURES

바이오 시료 전처리
Bio Samples Preparation

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
SAM-SOP-003	01		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

SAM-SOP-003 1 of 12 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 242. 바이오 시료 전처리에 관한 SOP

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology
STANDARD OPERATING PROCEDURES

표준시료 전처리
Reference Samples Preparation

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
SAM-SOP-002	01		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

SAM-SOP-002 1 of 8 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 243. 표준 시료 전처리에 관한 SOP

KIST 한국과학기술연구원
Korea Institute of Science and Technology
STANDARD OPERATING PROCEDURES

표준작업지침서 양식
Format of Standard Operating Procedure

Document No.	Version No.	Effective Date	Review Date
GER-SOP-002	01		

BioAMS TEAM

한국과학기술연구원

특성분석센터

GER-SOP-002 1 of 6 BioAMS Team Accelerator Lab. KIST

그림 244. 표준작업지침서 양식에 관한 SOP

3.3.3 결론

- 프로토콜 및 SOP 작성 후 업무의 소요 시간 단축이 가능하여 시료전처리 과정의 효율을 높일 수 있었다. 특히 시료 전처리 과정에 대하여 각 과정에서 효율을 높이기 위하여 최적화된 조건을 확인하였고 이를 프로토콜 및 SOP작성하여 수행하였을 때 전처리 과정에서의 소요시간을 단축할 수 있었다. 탄소 캐리어를 넣는 과정에서 정확도를 높이기 위하여 기존 메탄올 솔루션을 만들어 처리하던 과정을 마이크로 캐필러리를 이용하여 처리하던 과정으로 교체하였다. 마이크로 캐필러리를 이용하여 처리하는 과정이 메탄올을 제거하는 과정을 배제할 수 있기 때문에 시간적으로 효율적이며 정확한 결과값을 가짐을 확인 하였다. 포 트랜스퍼 하는 과정에서 진공을 유지해야 하는데 그 과정에서 필요한 진공도를 최적화 시켜 소모시간을 2분이상 소요되던 것을 30초 이내로 단축하였다. 그 결과 트랜스퍼 과정에서 소모되는 시간을 줄일 수 있었고 하루에 처리할 수 있는 시료의 수를 늘릴 수 있었다. 이처럼 각 전처리 단계에서 상세하게 각 과정을 확인, 최적화시켜 전처리 효율 향상을 확인할 수 있었다.
- 현재 외부로부터 처리할 수 있는 시료에 대하여 SOP를 작성 완료 후 발행하였으며 이로부터 수정보완이 필요한 것들에 대해서는 지속적으로 개선하고 있다. 본 SOP를 이용하여 외부로부터 처리할 수 있는 시료의 검증 과정이 가능하기 때문에 AMS 전처리 및 측정의 신뢰도 향상에 크게 기여함을 확인 하였다. 향후 필요한 SOP에 대해서는 수정, 작성은 진행하여 지속적인 신뢰도 향상을 목표로 하고 있다.

3-3. 정량적 연구성과

3-3-1. 연차별 연구성과

구분		1차년도		2차년도		3차년도		계	
		목표치	달성	목표치	달성	목표치	달성	목표치	달성
국외논문 게재	SCI					3		3	
	비SCI								
	계					3		3	
국내논문 게재	SCI						1		1
	비SCI								
	계						1		1
특허출원	국내								
	국외								
	계								
특허등록	국내								
	국외								
	계								
인력양성	학사								
	석사								
	박사								
	계								
사업화	상품출시								
	기술이전								
	공정개발								
제품개발	시제품개발								
비임상시험 실시									
임상시험 실시 (IND승인)	의약 품	1상		2	0	2	4	4	4
		2상							
		3상							
	의료기기								
진료지침개발									
신의료기술개발									
성과홍보									
포상 및 수상실적									
국제협력기반	MOU체결								
	수요조사								
	계								
경제사회 파급효과	산업지원								
	고용창출								
기타									

3-3-2. 고유성과 달성도

□ 고유성과지표 정의

구분	지표해설	목표치	달성도	합계
AMS 분석 기술 개발(단위:건)	가속기질량분석기를 사용한 마이크로도징 분석 기법 확립	2	100%	2
AMS 시료 전처리 기술 개발(단위:건)	High throughput 마이크로도징 약물 시료 전 처리 기술 개발 탐색적 연구	2	100%	2
DDI 규명 방법론(단위:건)	개발 기법의 유용성에 대한 결과 비교 분석하여 DDI 규명 방법론 확립	2	100%	2
PBPK 모델링을 이용한 약물 대사 예측 기술 개발(단위:건)	GastroPlus를 사용하여 drug metabolic enzyme inducer 약물에 대한 PBPK modeling을 확립하고 이 물질과 대표적 약물 효소 기질 물질들의 약물-약물 상호작용을 static DDI 및 dynamic DDI 모델링을 통해 평가	2	100%	2
약물상호작용 예측 기법 개발(단위:건)	계량약리학 분석을 통한 약물상호작용 예측 기법 개발	2	50%	1
혈액(플라즈마)시료처리 기술 개발(단위:개)	임상시료를 대비한 플라즈마 시료의 처리기술 개발 (시료처리능력: 30개/day)	30	100%	30

3-5. 연구개발비 집행실적

3-5-1. 총괄현황

(단위 : 천원)

항목	비목		금액		1년차			2년차			3년차			비고		
					계획 금액	사용액	잔액	계획 금액	사용액	잔액	계획 금액	사용액	잔액			
직접비	인건비	내부인건비	미지급		92,700	92,700	0	109,440	109,440	0	119,520	25,200	94,320			
			지급	현금	45,000	45,000		30,000	30,000		30,000	20,000	10,000			
		외부인건비	미지급													
			지급	현금	6,480	6,480	0	24,000	22,250	1,750	45,120	24,284.05	20,835.95			
	학생인건비	현금		23,050	23,050	0	53,080	53,080	0	71,320	67,120	4,200				
		소계		74,530	74,530	0	107,080	105,330	1,750	146,440	111,404.05	35,035.95				
	연구장비·재료비	현금		183,996.87	183,993.87	3	95,865.4	95,845.4	20	121,506.56	76,541.56	44,965				
		현물														
	연구활동비			5,524.93	5,133.93	391	168,917	14,685	153,378	113,790	68,205.5	45,584.5				
	연구과제추진비			15,153.2	14,840.2	313	12,843.6	12,789.6	909	9,693.44	2,604.44	7,089				
	연구수당			14,376	14,376	0	13,000	13,000	0	8,000		8,000				
	위탁연구개발비															
	소계			219,051	218,344	707	330,626	176,320	154,307	292,990	175,851.5	117,138.5				
간접비	인력지원비			7,187	7,187		4,791	4,791		4,584						
	연구지원비			47,884	47,884	0	96,604	96,604	0	95,127						
	성과활용지원비			1,348	1,348		898	898		859						
	소계															
연구개발비 총액				350,000	214,293	707	500,000	343,943	156,057	500,000	353,434.55	146,565.45				

3-5-2. 제 1세부기관

(단위:천원)

항 목	비 목		금 액		1년 차			2년 차			3년 차			비 고
					계 획 금 액	사 용 액	잔 액	계 획 금 액	사 용 액	잔 액	계 획 금 액	사 용 액	잔 액	
직 접 비	인 건 비	내부 인 건 비	미지급		35,800	35,800	0	84,240	84,240	0	94,320	0	94,320	
			지급	현금										
				현물										
		외부 인 건 비	미지급											
			지급	현금	6,480	6,480	0	24,000	22,250	1,750	45,120	24,284.05	20,835.95	
	학 생 인 건 비	현금									7,200	4,500	2,700	
		소 계			6,480	6,480		24,000	22,250	1,750	52,320	28,784.05	23,535.95	
		연구 장비 · 재료비	현금		18,952	18,952					28,000	9,097	18,903	
			현물											
		연구활동비			3,952	3,952		163,917	10,109	152,954	112,290	68,105.5	44,184.5	
간 접 비	연구과제추진비				7,780	7,780		4,762	4,761	856				
	연구수당				1,376	1,376								
	위탁연구개발비													
	소 계				32,060	32,060		168,679	14,870	153,810	140,290	77,202.5	63,087.5	
	연구개발비 총액				50,000	50,000		250,000	94,440	155,560	250,000	163,376.55	86,623.45	

3-5-3. 제 2세부기관

(단위 : 천원)

항 목	비 목	금 액	1년 차			2년 차			3년 차			비 고
			계 획 금 액	사 용 액	잔 액	계 획 금 액	사 용 액	잔 액	계 획 금 액	사 용 액	잔 액	
직 접 비	인 건 비	내부 인건비	미지급	10,550	10,550	0	25,200	25,200	0	25,200	25,200	0
		지급	현금									
			현물									
		외부 인건비	미지급									
		지급	현금									
			현물									
	학 生 인 건 비	현금	17,950	17,950	0	43,080	43,080	0	54,120	54,120	0	
	소 계		17,950	17,950	0	43,080	43,080	0	54,120	54,120	0	
	연구 장비 · 재료비	현금	105,103.87	105,103.87	0	71,338.4	71,338.4	0	66,330.56	66,330.56	0	
		현물										
간 접 비	연구활동비		72.93	72.93	0							
	연구과제추진비		1373.2	1373.2	0	581.6	581.6	0	693.44	693.44	0	
	연구수당		3,000	3,000	0	5,000	5,000	0				
	위탁연구개발비											
	소 계		109,550	109,550	0	76,920	76,920	0	67,024	67,024	0	
	인력지원비											
	연구지원비		22,500	22,500	0	30,000	30,000	0	28,856	28,856	0	
연구개발비 총액	성과활용지원비											
	소계											
연구개발비 총액			150,000	150,000	0	150,000	150,000	0	150,000	150,000	0	

3-5-4. 제 3세부기관

(단위 : 천원)

항 목	비 목	금 액	1년 차			2년 차			3년 차			비 고
			계 획 금 액	사 용 액	잔 액	계 획 금 액	사 용 액	잔 액	계 획 금 액	사 용 액	잔 액	
직 접 비	인 건 비	내부 인건비	미지급									
		지급	현금	45,000	45,000		30,000	30,000		30,000	20,000	10,000
			현물									
		외부 인건비	미지급									
		지급	현금									
			현물									
	학 生 인 건 비	현금	5,100	5,100		10,000	10,000		10,000	8,500	1,500	
	소 계		50,100	50,100		40,000	40,000		40,000	28,500	11,500	
	연구 장비 · 재료비	현금	59,941	59,938	3	24,527	24,507	20	27,176	1,114	26,062	
		현물										
간 접 비	연구활동비		1,500	1,109	391	5,000	4,576	424	1,500	100	1,400	
	연구과제추진비		6,000	5,687	313	7,500	7,447	53	9,000	1,911	7,089	
	연구수당		10,000	10,000		8,000	8,000		8,000		8,000	
	위탁연구개발비											
	소 계		77,441	76,734	707	85,027	84,530	497	85,676	31,625	54,051	
	인력지원비		7,187	7,187		4,791	4,791		4,584			
	연구지원비		13,924	13,924		9,284	9,284		8,881			
성과 활용 지원비	성과 활용 지원비		1,348	1,348		898	898		859			
	소 계		22,459	22,459		14,973	14,973		14,324	8433	5,891	
	연구개발비 총액		150,000	14,293	707	100,000	99,503	497	100,000	40,058	59,942	

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

4-1. 목표달성도

년도	구분	목표	연구개발 수행내용	가중치 (%)	평가기준	성과실적	자체평가 (%)
1년차 ('14년)	제1세부 과제	◦ 임상시험 계획서 개발 / IRB 심의	◦ 임상시험 계획서 작성 완료	80	◦ IRB승인건수	◦ 0건 (3월 예정)	50
		◦ DDI 규명 방법론 확립	◦ 최적의 임상시험 설계 완료	20	◦ 임상시험설계	◦ 2건	100
		계		100			75
	제2세부 과제	◦ High throughput 마이크로도장 약물 시료 전처리 기술 개발 탐색적 연구	◦ 가속질량분석기 분석을 위한 high throughput 시료 graphitization 전처리법 확립	50	◦ 가속질량분석기 분석을 위한 전처리시험법 protocol 1종 이상 확립 유무	◦ 달성완료	100
		◦ 생리학적 기반 약동학 사용한 약물 대사 억제능 예측 기술 탐색	◦ GastroPlus를 사용하여 대표적 약물효소 기질 물질들의 PBPK modeling 확립	50	◦ 최소 3종이상의 대표적 약물효소기질물질들의 PBPK modeling 확보유무	◦ 달성완료	100
		계		100			100
	제3세부 과제	◦ 혈액(플라즈마) 시료 처리 기술 개발	◦ 임상시료를 대비한 플라즈마 시료의 처리기술개발	50	◦ 시료 처리능력 (30개/day)	◦ 30개/day 시료 처리 능력확보	100
		◦ 바이오 AMS 용 프로그램 개발	◦ $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 의 비율로부터 MC 계산 데이터 처리능력 (12000 data)◦ ^{14}C -표지화합물의 농도 계산	50	◦ data 처리능력 (12000 data/회)	◦ bio AMS 처리 프로그램 개발완료◦ pg/mL 농도계산 가능	90
		계		100			95

년도	구분	목표	연구개발 수행내용	가중치 (%)	평가기준	성과실적	자체평가 (%)
2년차 ('15년)	제1세부 과제	◦ 임상시험 2건 수행	◦ Substrate cocktail을 이용한 CYP inhibition 시험 ◦ 동종의 substrate에 대한 full dose 임상시험	80	◦ 임상시험 수행 (건)	◦ 0건	50
		◦ 계량약리학 분석을 통한 약물 상호작용 예측 기법 개발	◦ Microdosing 임상시험 결과와 full-dose 임상시험 결과에 대한 약물상호작용과의 비교 평가	20	◦ 예측 기법 개발 (건)	◦ 0건	0
		계		100			25
제2세부 과제		◦ 마이크로 도징 약물 대사 억제능 예측 기술 개발	◦ 대표적인 약물효소 기질과 약물대사 억제 물질을 이용한 마이크로 도징 임상시험 예측기술 개발	30	◦ 대표적인 약물효소 기질과 약물대사 억제 물질을 이용한 마이크로 도징 임상시험 예측기술 개발	◦ 2건, 달성완료	100
		◦ 생리학적 기반 약동학 모델을 사용한 약물 대사 억제능 예측 기술 개발	◦ 기존의 나와 있는 문헌 자료와 GastroPlus를 사용하여 perpetrator 약물에 대한 PBPK model을 확립하고, 이 물질과 대표적 약물효소 기질 물질들의 약물-약물 상호작용을 in silico DDI 모델링을 통해 평가	70	◦ 기존의 나와 있는 문헌 자료와 GastroPlus를 사용하여 perpetrator 약물에 대한 PBPK model을 확립하고, 이 물질과 대표적 약물효소 기질 물질들의 약물-약물 상호작용을 in silico DDI 모델링을 통해 평가	◦ 2건, 달성완료	100
		계		100			100
제3세부 과제		◦ 가속기질량분석기를 사용한 마이크로도정 분석 기법 확립	• Linearity (R^2) : > 0.999 • CV : < ± 15% (at 80MC) • 측정범위 : 0.1MC – 100MC • LLOQ : < 0.1MC	50	• Linearity (R^2) : > 0.999 • CV : < ± 10% (모든 측정값) • 측정범위 : 0.1MC – 100MC	• R^2 값 : 0.9998 • CV : < ± 10% (모든 측정값) • 측정범위 : 0.1MC – 250MC	90
		◦ 임상시료 분석	억제 물질에 의한 대표기질의 TRA 및 모체의 농도 측정	50	• > 200 개	-	-
		계		100%			45

년도	구분	목표	연구개발 수행내용	가중치 (%)	평가기준	성과실적	자체평가 (%)
3년차 (‘16년)	제1세부 과제	◦ 임상시험 4건 수행	◦ substrate 2종에 대한 CYP induction 시험 2건과 inhibition 시험 2건 수행	80	◦ 임상시험 수행 (건)	◦ 4건	100
		◦ 계량약리학 분석을 통한 약물 상호 작용 예측 기법 적용	◦ 계량약리학적 기법을 지속적으로 활용	20	◦ 예측 기법 개발 (건)	◦ 2건	80
		계		100			90
	제2세부 과제	◦ 마이크로 도징 약물 대사 유도능 예측 기술 개발	◦ 대표적인 약물효소 기질과 약물대사 유도 물질을 이용한 마이크로 도징 임상시험 예측기술 개발	30	◦ 대표적인 약물효소 기질과 약물대사 유도 물질을 이용한 마이크로 도징 임상시험 예측기술 개발	◦ 2건, 달성완료	100
		◦ 생리학적 기반 약동학 모델을 사용한 약물 대사 유도능 예측 기술 개발	◦ 기존의 나와 있는 문헌 자료와 GastroPlus를 사용하여 perpetrator 약물에 대한 PBPK model을 확립하고, 이 물질과 대표적 약물효소 기질 물질들의 약물-약물 상호작용을 in silico DDI 모델링을 통해 평가	70	◦ 기존의 나와 있는 문헌 자료와 GastroPlus를 사용하여 perpetrator 약물에 대한 PBPK model을 확립하고, 이 물질과 대표적 약물효소 기질 물질들의 약물-약물 상호작용을 in silico DDI 모델링을 통해 평가	◦ 2건, 달성완료	100
		계		100			100
	제3세부 과제	• 측정심화기술 개발	• 낮은 농도의 약물을 측정하기 위하여 새로운 Carrier 개발	20	• < 0.01 MC	• < 0.01 MC 시료 확보 • 새로운 Carrier 이용한 시료 제작완료	100
		• 임상시료 심화 분석	• ¹⁴ C 표지 대사체 분석 및 대사체 프로파일링 기법 확립	50	• 대사체 분석 시료 > 200 개 • 대사체 프로파일링 시료 > 200 개	• Full dose Caffeine 임상시험 시료 분석	-
		• 마이크로도징 기법 완성	• 가속기질량분석기를 사용한 마이크로도징 기법에 대한 SOP 및 프로토콜 완성 자료	30	• SOP 및 프로토콜 문서화	• SOP 및 프로토콜 작성 완료	100
		계		100			75

4-2. 관련분야 기여도

- 14C hot compound를 이용한 임상시험의 디자인과 수행을 위한 노력으로 다른 연구자들의 추가 임상시험에 대한 자료를 확보함
- 임상시험 진행을 위하여 관계 기관(식약처 등)과의 다양한 논의와 의견 교환으로 신기술을 이용한 임상시험에 대한 정보를 축적함
- Microdosing 임상시험을 통하여 PK profile을 확인하고 데이터를 분석함으로써 대상자에게 위험을 최소화하고 윤리적이고 안전한 임상시험의 가능성을 확인함
- 비임상시험 뿐 아니라 사람 대상 임상시험에서의 microdosing 임상시험을 통하여 기술을 축적하고 적용 범위의 확대 가능성 확인함
- 각 국은 현재 신뢰성 있는 microdosing을 이용한 DDI 평가기법 확보를 위해 노력하고 있음 - 이는 이러한 기술을 통해 robust한 DDI 근거자료를 확보할 수 있다는 rationale이 확보되었다는 방증이며, 우리나라가 본 과제를 통해 이러한 시도의 선도적 역할을 할 수 있음
- 전문가 집단 간 융합 연구 플랫폼 구축으로 인한 연구의 질 향상
- 국내에서 현재 수행되고 있거나, 향후 수행될 생의학적 AMS의 활용 연구를 위한 전처리 기술 확보 완료
- 외국의 유수 기관에서 수행되고 있는 생의학적 AMS 연구수준에 근접한 연구 수행 가능
- 본 연구의 참여 경험 및 결과를 토대로 향후 국내 또는 글로벌 신약 개발 분야에서 AMS 활용 가능
- 신약개발 뿐만 아니라 다양한 생의학적 연구 분야에서 AMS 활용 증대

5. 연구결과의 활용계획

- 본 과제에서 연구된 범위를 넘어 다양한 약물상호작용 상황에 적용함으로써 해당 기술에 대한 경험 및 지식을 축적함
- 후속 연구 기획을 통해, 보다 많은 약물에 대해 본 연구에서 시도된 방법론을 적용해 볼 수 있음
- Microdose 투여 시와 최고용량-항정상태 투여 시의 correlation이 관계를 밝혔기에 고전적 형태의 약물상호작용시험 없이도, 본 기술을 통해 약물상호작용 평가가 가능한 약물 계열을 확인하여 적용 가능
- 식약처의 가이드라인은 임상시험 허가 및 신약 허가 등에 있어 중요한 지표로 활용되고 있어, 특정 약물 개발 시 microdose 기반의 약물상호작용 시험을 통해, 고전적인 full-dose, steady-state 시험을 보완 또는 대체할 수 있음을 기술하여 국내 신약 개발 경쟁력을 강화하고자 함
- Microdose 약물상호작용 평가 결과를 license-out 근거 자료로 활용 가능
- 전임상 개발 중인 후보 신약에 대해 본 기술 적용 가능성 여부를 적극적으로 탐색
- 생의학적 AMS를 활용하기 위한 전처리 기술을 변형 및 개발하여 AMS의 활용을 늘릴 필요가 있음
- AMS과 14C 표지 약물을 활용하여 약물간 상호작용 뿐만 아니라 다양한 임상시험 단계에서 다각적으로 적용할 필요가 있음
- 14C 표지약물 뿐만 아니라 14C 표지 천연물등 다양한 생의학적 분자(단백질등)을 활용한 생의학적 연구에 다양하게 적용될 수 있음
- 비구획분석시 microdose study와 regular dose study 사이에 DDI 정도는 통계적으로 차이가 없었음. 이러한 분석이 microdose study가 DDI의 판단할 근거가 될 수 있다고 확정할 수 없으나, 신약 개발 과정 중 비임상 단계에서 임상 단계로 진행하는 도중의 탐색적 연구로서 DDI 유무를 판단하는 근거로서는 어느 정도 역할을 할 수 있을 것으로 판단됨
- 추가적인 연구를 통하여 DDI에서 microdose study의 가능성을 넓힐 수 있을 것으로 판단됨
- Microdose 임상시험에서도 약물 상호작용을 어느 정도 확인할 수 있었으며, 현재 신약개발과정에서 수행되고 있는 약물상호작용 임상시험을 완전히 대체할 수는 없겠으나, 약물상호작용의 유무 정도는 판단할 수 있는 근거가 될 수 있을 것으로 판단됨
- 본 과제에서 원래 계획되었던 14C compound와 AMS를 이용한 사람 대상의 임상시험이 추가적으로 필요하며, 이를 바탕으로 수행한 혼합효과모델링과 본 과제에서 수행한 분석과의 비교도 필요할 것으로 사료됨

5-1. 종료 후 연구실적 계획

구분		연구종료 후 3년 이내	
국외논문 계재	SCI		2
	비SCI		
	계		2
국내논문 계재	SCI		
	비SCI		
	계		
특허출원 특허등록	국내		
	국외		
	계		
인력양성	국내		
	국외		
	계		
	학사		
사업화	석사		
	박사		
	계		
제품개발	상품출시		
	기술이전		
	공정개발		
제품개발		시제품개발	
비임상시험실시			
임상시험 실시 (IND승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
국제협력기반	MOU체결		
	수요조사		
	계		
경제사회 파급효과	산업지원		
	고용창출		
기타			

5-2. 종료 후 고유성과지표별 계획

구분	종료 후 3년내 목표치
AMS 분석 기술 개발(단위:건)	1
AMS 시료 전처리 기술 개발(단위:건)	1
DDI 규명 방법론(단위:건)	1
PBPK 모델링을 이용한 약물 대사 예측 기술 개발(단위:건)	2
약물상호작용 예측 기법 개발(단위:건)	2
헐액(플라즈마)시료처리 기술 개발(단위:개)	50

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

- 전세계적으로 신약개발을 위하여 14C 표지 약물과 함께 AMS를 다양한 임상시험 단계에서 활용하고 있음 (여러개의 14C 표지 약물을 이용하여 동시에 여러개의 약물 간 상호작용확인, 대사체프로파일링, 절대생체이용률 확인 등에 활용)
- 14C 표지 약물뿐만 아니라 다양한 14C 표지 물질과 AMS를 활용하여 연구를 수행하고 있음 (ADC (Antibody Drug Conjugate)분야, 천연물, 세포 등)

7. 연구개발성과의 보안등급

- 일반과제

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록한 연구시설·장비 현황

- 해당 사항 없음

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

- 실험 중 가운, 장갑, 마스크 및 보호경 착용
- 시약이 손에 묻었을 시 바로 씻을 수 있도록 실험테이블 옆 싱크대 배치
- 시약이 눈에 묻었을 시 바로 씻을 수 있도록 실험테이블 옆 눈 세척기 배치
- 동물관리가 필요로 되므로 학내 동물 관리기관 보유

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문 /특허 /기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	Prediction of pharmacokinetics and drug-drug interaction potential using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach: A case study of caffeine and ciprofloxacin	충남 대학교 KIST	제1 저자, 교신 저자	The Korean Journal of Physiology and Pharmacology	1.378	2017.1.21	단독사사	SCI(E)

11. 기타사항

- 없음

12. 참고문헌

- FDA. U. Guidance for Industry: Drug Interaction Studies-Study Design, Data Analysis, Implications for Dosing, and Labeling Recommendations. . 2012.
- Harrison A, Gardner I, Hay T, et al. Case studies addressing human pharmacokinetic uncertainty using a combination of pharmacokinetic simulation and alternative first in human paradigms. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems.* 2012;42(1):57-74.
- Maeda K, Sugiyama Y. Novel strategies for microdose studies using non-radiolabeled compounds. *Adv Drug Deliv Rev.* 2011;63(7):532-538.
- Lappin G, Noveck R, Burt T. Microdosing and drug development: past, present and future. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2013;9(7):817-834.
- Burt T, Yoshida K, Lappin G, et al. Microdosing and Other Phase 0 Clinical Trials: Facilitating Translation in Drug Development. *Clin Transl Sci.* 2016;9(2):74-88.
- FDA U. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers-Exploratory IND Studies. *US Department of Health and Human Services* www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM078933.pdf. 2006.
- Fujita K, Yoshino E, Kawara K, et al. A clinical pharmacokinetic microdosing study of docetaxel with Japanese patients with cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology.* 2015;76(4):793-801.
- Croft M, Keely B, Morris I, Tann L, Lappin G. Predicting drug candidate victims of drug-drug interactions, using microdosing. *Clinical pharmacokinetics.* 2012;51(4):237-246.
- Halama B, Hohmann N, Burhenne J, Weiss J, Mikus G, Haefeli WE. A nanogram dose of the CYP3A probe substrate midazolam to evaluate drug interactions. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 2013;93(6):564-571.
- Kang BC, Yang CQ, Cho HK, Suh OK, Shin WG. Influence of fluconazole on the pharmacokinetics of omeprazole in healthy volunteers. *Biopharmaceutics & drug disposition.* 2002;23(2):77-81.
- Ieiri I, Kubota T, Urae A, et al. Pharmacokinetics of omeprazole (a substrate of CYP2C19) and comparison with two mutant alleles, C gamma P2C19m1 in exon 5 and C gamma P2C19m2 in exon 4, in Japanese subjects. *Clinical pharmacology and therapeutics.* 1996;59(6):647-653.
- Ridtitid W, Wongnawa M, Mahatthanatrakul W, Punyo J, Sunphanich M. Rifampin markedly decreases plasma concentrations of praziquantel in healthy volunteers. *Clinical Pharmacology & Therapeutics.* 2002;72(5):505-513.
- Savers S. Guidance for Industry, Investigators, and Reviewers: Exploratory IND Studies. *Biotechnology Law Report.* 2006;25(2):167-174.
- Frerichs VA, Zaranek C, Haas CE. Analysis of omeprazole, midazolam and hydroxy-metabolites in plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B.* 2005;824(1):71-80.
- Vittal S, Ganneboina R, Layek B, et al. Highly sensitive method for the determination of

omeprazole in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry: application to a clinical pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*. 2009;23(4):390–396.

- Narasimhan NI, Dorer DJ, Davis J, Turner CD, Sonnichsen D. Evaluation of the effect of multiple doses of rifampin on the pharmacokinetics and safety of ponatinib in healthy subjects. *Clinical Pharmacology in Drug Development*. 2015;4(5):354–360.
- Hassan-Alin M, Andersson T, Niazi M, Röhss K. A pharmacokinetic study comparing single and repeated oral doses of 20 mg and 40 mg omeprazole and its two optical isomers, S-omeprazole (esomeprazole) and R-omeprazole, in healthy subjects. *European journal of clinical pharmacology*. 2005;60(11):779–784.
- Wu F, Gaohua L, Zhao P, et al. Predicting nonlinear pharmacokinetics of omeprazole enantiomers and racemic drug using physiologically based pharmacokinetic modeling and simulation: application to predict drug/genetic interactions. *Pharmaceutical research*. 2014;31(8):1919–1929.
- Furuta T, Shirai N, Sugimoto M, Nakamura A, Hishida A, Ishizaki T. Influence of CYP2C19 pharmacogenetic polymorphism on proton pump inhibitor-based therapies. *Drug metabolism and pharmacokinetics*. 2005;20(3):153–167.

[별첨4]

실적 증빙자료

성과유형	첨부자료 예시	첨부여부	해당세부
연구논문	논문 사본	✓	2세부
임상시험실시 (IRB 승인)	IRB 승인서	✓	1세부
임상시험실시 (IND 승인)	IND 승인서	✓	1세부
임상시험	Microdosing omeprazole preperation SOP	✓	1세부
임상시험	Microdosing caffeine preperation SOP	✓	1세부
임상시험	14C comound clinical trial을 위한 방사선 안전 관리 위원회 의견서	✓	1세부
임상시험	CMC of Caffeine	✓	1세부
임상시험	CMC of Omeprazole	✓	1세부
임상시험	검체인수인계서	✓	1세부
임상시험	표지화합물제조실시계획서	✓	1세부
임상시험	Caffeine CoA	✓	1세부
임상시험	Synthesis Study Report	✓	1세부
임상시험	14C-Caffeine Stability test	✓	1세부

□ 연구논문

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/BISCI)	게재일
1	2017. Prediction of pharmacokinetics and drug-drug interaction potential using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach: A case study of caffeine and ciprofloxacin,Min-Ho Park et al., Korean J Physiol Pharmacol, 21 (1), 국내, SCI(E)급	The Korean Journal of Physiology and Pharmacology	Min-Ho Park	21	Korea	대한생리학회, 대한약리학회 공동 발행	SCI(E)	2017.1 .21

No	증빙 자료
1	첨부 참조

임상시험실시 (IND 승인)

No	발생년도	임상시험단계 구분	제품명	임상시험의 제목	승인(허가)번호	승인(인증)기관	연구내용
1	2016년	1상 (0상)	¹⁴ C-caffeine	건강한 남성 자원자를 대상으로 ciprofloxacin이 caffeine의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험	31006	식약처	약물상호작용 평가
2	2016년	1상 (0상)	¹⁴ C-omeprazole	건강한 남성 자원자를 대상으로 fluconazole이 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험	31007	식약처	약물상호작용 평가
3	2016년	1상 (0상)	¹⁴ C-caffeine	건강한 남성 자원자를 대상으로 omeprazole이 caffeine의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험	31006	식약처	약물상호작용 평가
4	2016년	1상 (0상)	¹⁴ C-omeprazole	건강한 남성 자원자를 대상으로 rifampin이 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험	31007	식약처	약물상호작용 평가
5	2016년	1상 (0상)	100 μg-caffeine	건강한 남성 자원자를 대상으로 ciprofloxacin이 caffeine의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험	KIRB-00601_12-005	서울성모병원 IRB	약물상호작용 평가
6	2016년	1상 (0상)	100 μg-omeprazole	건강한 남성 자원자를 대상으로 fluconazole이 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험	KIRB-00601_5-003	서울성모병원 IRB	약물상호작용 평가
7	2016년	1상 (0상)	100 μg-caffeine	건강한 남성 자원자를 대상으로 omeprazole이 caffeine의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험	KIRB-00601_12-002	서울성모병원 IRB	약물상호작용 평가
8	2016년	1상 (0상)	100 μg-omeprazole	건강한 남성 자원자를 대상으로 rifampin이 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서•교차 임상시험	KIRB-00601_5-002	서울성모병원 IRB	약물상호작용 평가

No	증빙 자료
1	IND 승인서와 IRB 승인서 별첨함

그 외 실적

- 임상시험 승인 및 수행 과정에서 발생하고 축적한 자료를 첨부함

[첨부]논문

Korean J Physiol Pharmacol 2017;x(x):1-9
<https://doi.org/10.4196/kjpp.2017.x.x.1>



Original Article

Prediction of pharmacokinetics and drug-drug interaction potential using physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling approach: A case study of caffeine and ciprofloxacin

Min-Ho Park¹, Seok-Ho Shin¹, Jin-Ju Byeon¹, Gwan-Ho Lee², Byung-Yong Yu³, and Young G. Shin^{1,*}

¹College of Pharmacy, Chungnam National University, Daejeon 34134, ²Department of Chemistry and Research Institute for Basic Sciences, Kyung Hee University, Seoul 02453, ³Advanced Analysis Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 02792, Korea

ARTICLE INFO

Received October 5, 2016
Revised November 7, 2016

Accepted November 14, 2016

*Correspondence

Young G. Shin
E-mail: yshin@cnu.ac.kr

Key Words

Caffeine
Ciprofloxacin
Drug-drug interaction
Physiologically based pharmacokinetics (PBPK)

ABSTRACT Over the last decade, physiologically based pharmacokinetics (PBPK) application has been extended significantly not only to predicting preclinical/human PK but also to evaluating the drug-drug interaction (DDI) liability at the drug discovery or development stage. Herein, we describe a case study to illustrate the use of PBPK approach in predicting human PK as well as DDI using *in silico*, *in vivo* and *in vitro* derived parameters. This case was composed of five steps such as: simulation, verification, understanding of parameter sensitivity, optimization of the parameter and final evaluation. Caffeine and ciprofloxacin were used as tool compounds to demonstrate the “fit for purpose” application of PBPK modeling and simulation for this study. Compared to caffeine, the PBPK modeling for ciprofloxacin was challenging due to several factors including solubility, permeability, clearance and tissue distribution etc. Therefore, intensive parameter sensitivity analysis (PSA) was conducted to optimize the PBPK model for ciprofloxacin. Overall, the increase in C_{max} of caffeine by ciprofloxacin was not significant. However, the increase in AUC was observed and was proportional to the administered dose of ciprofloxacin. The predicted DDI and PK results were comparable to observed clinical data published in the literatures. This approach would be helpful in identifying potential key factors that could lead to significant impact on PBPK modeling and simulation for challenging compounds.

INTRODUCTION

Understanding absorption, distribution, metabolism, excretion (ADME) as well as pharmacokinetics (PK) is critical in drug discovery and development. This approach typically begins early in the drug discovery phase, when hit compounds are available. As the project moves forward to the lead optimization phase, ADME/PK contributes significantly in rank-ordering compounds for further testing, aids in the dose selection in nonclinical *in vivo* pharmacology studies, establishes structure-activity relationships (SAR) for structural modifications to improve the

physicochemical and ADME properties and eventually supports candidate selection [1]. Once a candidate is selected, human PK prediction can also be conducted to estimate the dose-dependent drug exposure and its anticipated pharmacological response as well as the potential toxicological effects or even the potential drug-drug interactions.

Drug-drug interactions (DDIs) have led to contraindications, withdrawal from the market and non-approval of drugs by regulatory agencies [2]. Therefore, prediction for a potential risk of DDIs between the candidate drug and the co-administered drugs would be very important within the pharmaceutical



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License, which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
Copyright © Korean J Physiol Pharmacol, pISSN 1226-4512, eISSN 2093-3827

Author contributions: M.H.P., S.H.S. and J.J.B. performed the modeling and simulation. G.H.L., B.Y.Y. and Y.G.S. supervised and coordinated the study. M.H.P. wrote the manuscript.

in recent years. As a recommended practice, the verification of an appropriate PBPK model with the parameter sensitivity analysis as well as *in vivo* data could provide the increased confidence in DDI simulation outcome. This approach could be particularly useful in identifying potential key factors that could lead to significant impact on the extent of human exposure and DDI. This case study suggested that *in silico* derived parameters could be useful and acceptable for PK prediction if carefully applied. This study also suggested that the optimization module such as PSA could be helpful for optimizing important parameters for the prediction of human exposure and DDI simulation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by a grant of Korea Health Industry Development Institute (grant number: HI14C3321).

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Hosea NA, Jones HM. Predicting pharmacokinetic profiles using *in silico* derived parameters. *Mol Pharm*. 2013;10:1207-1215.
- Krayenbühl JC, Vozeh S, Kondo-Oestreicher M, Dayer P. Drug-drug interactions of new active substances: mibepradil example. *Eur J Clin Pharmacol*. 1999;55:559-565.
- Bjornsson TD, Callaghan JT, Einolf HJ, Fischer V, Gan L, Grimm S, Kao J, King SP, Miwa G, Ni L, Kumar G, McLeod J, Obach SR, Roberts S, Roe A, Shah A, Snikeris F, Sullivan JT, Tweedie D, Vega JM, Walsh J, Wrighton SA; Pharmaceutical Research and Manufacturers of America Drug Metabolism/Clinical Pharmacology Technical Working Groups. The conduct of *in vitro* and *in vivo* drug-drug interaction studies: a PhRMA perspective. *J Clin Pharmacol*. 2003; 43:443-469.
- Einolf HJ. Comparison of different approaches to predict metabolic drug-drug interactions. *Xenobiotica*. 2007;37:1257-1294.
- Almond LM, Yang J, Jamei M, Tucker GT, Rostami-Hodjegan A. Towards a quantitative framework for the prediction of DDIs arising from cytochrome P450 induction. *Curr Drug Metab*. 2009;10:420-432.
- Kato M, Chiba K, Horikawa M, Sugiyama Y. The quantitative prediction of *in vivo* enzyme-induction caused by drug exposure from *in vitro* information on human hepatocytes. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2005;20:236-243.
- Ripp SL, Mills JB, Fahmi OA, Trevenna KA, Liras JL, Maurer TS, de Morais SM. Use of immortalized human hepatocytes to predict the magnitude of clinical drug-drug interactions caused by CYP3A4 induction. *Drug Metab Dispos*. 2006;34:1742-1748.
- Shou M, Hayashi M, Pan Y, Xu Y, Morrissey K, Xu L, Skiles GL. Modeling, prediction, and *in vitro* *in vivo* correlation of CYP3A4 induction. *Drug Metab Dispos*. 2008;36:2355-2370.
- Fahmi OA, Maurer TS, Kish M, Cardenas E, Boldt S, Nettleton D. A combined model for predicting CYP3A4 clinical net drug-drug interaction based on CYP3A4 inhibition, inactivation, and induction determined *in vitro*. *Drug Metab Dispos*. 2008;36:1698-1708.
- Kozawa M, Honma M, Suzuki H. Quantitative prediction of *in vivo* profiles of CYP3A4 induction in humans from *in vitro* results with a reporter gene assay. *Drug Metab Dispos*. 2009;37:1234-1241.
- Guo H, Liu C, Li J, Zhang M, Hu M, Xu P, Liu L, Liu X. A mechanistic physiologically based pharmacokinetic-enzyme turnover model involving both intestine and liver to predict CYP3A induction-mediated drug-drug interactions. *J Pharm Sci*. 2013;102:2819-2836.
- Baneyx G, Fukushima Y, Parrott N. Use of physiologically based pharmacokinetic modeling for assessment of drug-drug interactions. *Future Med Chem*. 2012;4:681-693.
- Zhao P, Zhang L, Grillo JA, Liu Q, Bullock JM, Moon YJ, Song P, Brar SS, Madabushi R, Wu TC, Booth BP, Rahman NA, Reynolds KS, Gil Berglund E, Lesko LJ, Huang SM. Applications of physiologically based pharmacokinetic (PBPK) modeling and simulation during regulatory review. *Clin Pharmacol Ther*. 2011;89: 259-267.
- Chen Y, Jin JY, Mukadam S, Malhi V, Kenny JR. Application of IVIVE and PBPK modeling in prospective prediction of clinical pharmacokinetics: strategy and approach during the drug discovery phase with four case studies. *Biopharm Drug Dispos*. 2012;33:85-98.
- Jones HM, Dickins M, Youdim K, Gosset JR, Atkins NJ, Hay TL, Gurrell IK, Logan YR, Bungay PJ, Jones BC, Gardner IB. Application of PBPK modelling in drug discovery and development at Pfizer. *Xenobiotica*. 2012;42:94-106.
- Yamazaki S, Skaptason J, Romero D, Vekich S, Jones HM, Tan W, Wilner KD, Koudriakova T. Prediction of oral pharmacokinetics of cMet kinase inhibitors in humans: physiologically based pharmacokinetic model versus traditional one-compartment model. *Drug Metab Dispos*. 2011;39:383-393.
- Bungay PJ, Tweedy S, Howe DC, Gibson KR, Jones HM, Mount NM. Preclinical and clinical pharmacokinetics of PF-02413873, a nonsteroidal progesterone receptor antagonist. *Drug Metab Dispos*. 2011;39:1396-1405.
- Jones HM, Gardner IB, Watson KJ. Modelling and PBPK simulation in drug discovery. *AAPS J*. 2009;11:155-166.
- Yu LX, Amidon GL. A compartmental absorption and transit model for estimating oral drug absorption. *Int J Pharm*. 1999;186:119-125.
- Sawada Y, Hanano M, Sugiyama Y, Harashima H, Iga T. Prediction of the volumes of distribution of basic drugs in humans based on data from animals. *J Pharmacokinet Biopharm*. 1984;12:587-596.
- Poulin P, Theil FP. A priori prediction of tissue:plasma partition coefficients of drugs to facilitate the use of physiologically-based pharmacokinetic models in drug discovery. *J Pharm Sci*. 2000;89:16-35.
- Heikkilä AT, Baneyx G, Caruso A, Parrott N. Application of PBPK modeling to predict human intestinal metabolism of CYP3A substrates - an evaluation and case study using GastroPlus. *Eur J Pharm Sci*. 2012;47:375-386.
- Zhang T, Heimbach T, Lin W, Zhang J, He H. Prospective pre-

[첨부] IRB 승인서

[사본]

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8196~8206 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00601_12-004	시행일	2016-08-09		
연구제목	건강한 남성 자원자를 대상으로 ciprofloxacin0.1 caffeine의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 ?교차 임상시험				
과제번호	KC16MNSE0565				
시험책임자	소속	임상약리과	이름 임동석		
지원기관	서울성모병원				
심의대상	보완답변서				
연구대상	의약품				
심의일	2016-08-09				
심의결과	승인				
연구승인유효기간	2017-08-08	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 드립니다. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.			
심의내역					
심의내용	보완답변서				

ver 5.1

20160809

[첨부] IRB 승인서

[사본]

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8196~8206 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00601_5-005	시행일	2016-08-04		
연구제목	건강한 남성 자원자를 대상으로 omeprazole와 caffeine의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 ? 교차 임상시험				
과제번호	KC16MNSE0591				
시험책임자	소속	임상약리과	이름		
지원기관	서울성모병원				
심의대상	보완답변서				
연구대상	의약품				
심의일	2016-08-04				
심의결과	승인				
연구승인유효기간	2017-08-03	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 드립니다. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.			
심의내역					
심의내용	보완답변서				

ver 5.1

20160804

[첨부] IRB 승인서

[사본]

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8196~8206 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00601_12-003	시행일	2016-08-09		
연구제목	건강한 남성 자원자를 대상으로 fluconazole와 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 ? 교차 임상시험				
과제번호	KC16MASE0566				
시험책임자	소속	임상약리과	이름 임동석		
지원기관	서울성모병원				
심의대상	보완답변서				
연구대상	의약품				
심의일	2016-08-09				
심의결과	승인				
연구승인유효기간	2017-08-08	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 득하십시오. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.			
심의내역					
심의내용	보완답변서				

ver 5.1

20160809

[첨부] IRB 승인서

[사본]

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8196~8206 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00601_5-004	시행일	2016-08-04		
연구제목	건강한 남성 자원자를 대상으로 rifampin이 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 ? 교차 임상시험				
과제번호	KC16MNSE0592				
시험책임자	소속	임상약리과	이름		
지원기관	서울성모병원				
심의대상	보완답변서				
연구대상	의약품				
심의일	2016-08-04				
심의결과	승인				
연구승인유효기간	2017-08-03	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 드립니다. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.			
심의내역					
심의내용	보완답변서				

ver 5.1

20160804

[첨부] IRB 승인서

[사본]

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8196~8206 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00601_12-005	시행일	2016-08-09		
연구제목	건강한 남성 자원자를 대상으로 ciprofloxacin0.1 caffeine의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 ? 교차 임상시험				
과제번호	KC16MNSE0564				
시험책임자	소속	임상약리과	이름		
지원기관	서울성모병원				
심의대상	보완답변서				
연구대상	의약품				
심의일	2016-08-09				
심의결과	승인				
연구승인유효기간	2017-08-08	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 드립니다. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.			
심의내역					
심의내용	<p>보완답변서</p> <p>보완지적사항 : - 기본사항 : ► <심사결과> 시정 후 승인 관련 규정을 근거로 검토한 결과 본 IRB에서는 다음 지적 사항에 대한 보완이 필요하다고 결정하였습니다. 따라서 다음의 보완요청사항에 대해 e-IRB에서 “보완답변서”를 작성하여 서류로 제출하여 주시기 바랍니다. 제출된 보완답변서는 신속심사로 심사를 예정입니다.</p> <p>► 보완요청 사항: [계획서] 연구목적이 계획서 내의 목적보다는 마이트로도징 기법에 대한 유효성 평가의 측면'이 두드러지는 것으로 논의되었습니다. 본 임상시험의 정확한 연구의 목적에 대하여 질의하기로 하였으니 계획서 내의 목적과 비교하여 답변하여 주시기 바랍니다.</p> <p>[동의서] 1) 2p 1. 임상시험의 배경 및 목적: 비교적 세 줄 정도로 간단하게만 계획서내에 있는 그대로 목적이 기재되어 있을 확인하였습니다. 본 임상시험의 특성상 건강한 성인 남성 자원자에게 동의서를 받으므로 본 연구의 배경과 목적을 명확하게 이해할 수 있는 설명이 추가로 기술되어 임상시험에 대하여 정확한 알림과 이해를 바탕으로 진행되는 것이 옳다고 논의되었습니다. 주가 기술을 요청하기로 하였으니 수정하여 주십시오.(CYP1A2 의 단어 경우 무엇인지 설명이 필요함) 2) 12p 8. 대상자 준수사항: 2) 지원신청 한 날로부터~금지합니다. 에서 바른비탈류 등의 대사효소 유도 및 억제 의약품이 구체적으로 무엇인지 설명이 필요하니 수정하여 주십시오. 3) 14p 14. 임상시험에 참여시 발생되는 제반 비용: 세전 최대 95만원이라는 문구에서 세전, 최대 단어를 삭제하여 주십시오.(세전은 필요 없는 단어이며 최대는 유인책이 될 수 있음)</p>				

ver 5.1

20160809

[첨부] IRB 승인서

[사본]

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8196~8206 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00601_5-003	시행일	2016-08-04		
연구제목	건강한 남성 자원자를 대상으로 omeprazole와 caffeine의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 ? 교차 임상시험				
과제번호	KC16MNSE0593				
시험책임자	소속	임상약리과	이름		
지원기관	서울성모병원				
심의대상	보완답변서				
연구대상	의약품				
심의일	2016-08-04				
심의결과	승인				
연구승인유효기간	2017-08-03	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 드립니다. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.			
심의내역					
심의내용	보완답변서				

ver 5.1

20160804

[첨부] IRB 승인서

[사본]

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8196~8206 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00601_12-002	시행일	2016-08-09		
연구제목	건강한 남성 자원자를 대상으로 fluconazole와 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 ? 교차 임상시험				
과제번호	KC16MNSE0568				
시험책임자	소속	임상약리과	이름 임동석		
지원기관	서울성모병원				
심의대상	보완답변서				
연구대상	의약품				
심의일	2016-08-09				
심의결과	승인				
연구승인유효기간	2017-08-08	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 득하십시오. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.			
심의내역					
심의내용	보완답변서				

ver 5.1

20160809

[첨부] IRB 승인서

[사본]

서울성모병원 임상연구심사위원회(KCMC IRB) / 기관생명윤리심의위원회

가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구심사위원회 심사결과통보서

우편번호 : (137 - 701) 서울시 서초구 반포대로222 전화 : 02-2258-8196~8206 전송 : 02-2258-8210

문서번호	KIRB-00601_5-002	시행일	2016-08-04		
연구제목	건강한 남성 자원자를 대상으로 rifampin이 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 ? 교차 임상시험				
과제번호	KC16MNSE0594				
시험책임자	소속	임상약리과	이름		
지원기관	서울성모병원				
심의대상	보완답변서				
연구대상	의약품				
심의일	2016-08-04				
심의결과	승인				
연구승인유효기간	2017-08-03	연구의 지속을 위해 연구승인기간 만료 전에 지속심사의 승인을 드립니다. 임상연구종료시 종료보고서를 제출하여 주십시오.			
심의내역					
심의내용	보완답변서				

ver 5.1

20160804

[첨부] IND 승인서

		문서확인번호 : OIC7-EFVS-KILV-JOJB
제 31006 호		
임상시험계획 승인서		
신청인	성명	임동석
	명칭	서울성모병원임상약리과
	소재지	서울특별시 서초구 반포대로 222 서울성모병원 임상약리과
임상시험의 제목	별첨	
임상시험의 단계	0상	
제품명(코드명)	[14C]카페인	
성분명(코드명)		
원료약품 및 그 분량	기 승인사항과 동일	
제형 및 성상	기 승인사항과 동일	
	기 승인사항과 동일	
제조방법	기 승인사항과 동일	
저장방법 및 사용(유효)기간	기 승인사항과 동일	
	기 승인사항과 동일	
기준 및 시험방법	기 승인사항과 동일	
제조원	기 승인사항과 동일	
붙 임 : 임상시험계획서 「약사법」 제34조제1항 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조제4항에 따라 위와 같이 승인합니다.		
2016년 09월 02일		
		
 ※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 홈페이지(http://ezdrug.mfds.go.kr)의 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.		

[첨부] IND 승인서

		문서확인번호 : IBUJ-AJGK-HXF4-NTHK
제 31007 호		
임상시험계획 승인서		
신청인	성명	임동석
	명칭	서울성모병원임상의과
	소재지	서울특별시 서초구 반포대로 222 서울성모병원 임상의과
임상시험의 제목	별첨	
임상시험의 단계	0상	
제품명(코드명)	[14C]오메프리졸	
성분명(코드명)		
원료약품 및 그 분량	기 승인사항과 동일	
제형 및 성상	기 승인사항과 동일	
	기 승인사항과 동일	
제조방법	기 승인사항과 동일	
저장방법 및 사용(유효)기간	기 승인사항과 동일	
	기 승인사항과 동일	
기준 및 시험방법	기 승인사항과 동일	
제조원	기 승인사항과 동일	
불 입 : 임상시험계획서 「약사법」 제34조제1항 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조제4항에 따라 위와 같이 승인합니다.		
2016년 09월 02일		
<p>※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 홈페이지(http://ezdrug.mfds.go.kr)의 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.</p>		

[첨부] IND 승인서

		문서확인번호 : IBUJ-AJGK-HXF4-NTHK
제 31007 호		
임상시험계획 승인서		
신청인	성명	임동석
	명칭	서울성모병원임상의과
	소재지	서울특별시 서초구 반포대로 222 서울성모병원 임상의과
임상시험의 제목	별첨	
임상시험의 단계	0상	
제품명(코드명)	[14C]오메프리졸	
성분명(코드명)		
원료약품 및 그 분량	기 승인사항과 동일	
제형 및 성상	기 승인사항과 동일	
	기 승인사항과 동일	
제조방법	기 승인사항과 동일	
저장방법 및 사용(유효)기간	기 승인사항과 동일	
	기 승인사항과 동일	
기준 및 시험방법	기 승인사항과 동일	
제조원	기 승인사항과 동일	
불 일 : 임상시험계획서 「약사법」 제34조제1항 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조제4항에 따라 위와 같이 승인합니다.		
2016년 09월 02일		
<p>※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 홈페이지(http://ezdrug.mfds.go.kr)의 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.</p>		

[첨부] IND 승인서

		문서확인번호 : SUIM-BX0E-4KOR-HY00
제 31006 호		
임상시험계획 승인서		
신청인	성명	임동석
	명칭	서울성모병원임상약리과
	소재지	서울특별시 서초구 반포대로 222 서울성모병원 임상약리과
임상시험의 제목	별첨	
임상시험의 단계	0상	
제품명(코드명)	[14C]카페인	
성분명(코드명)		
원료약품 및 그 분량	별첨	
제형 및 성상	별첨	
제조방법	별첨	
저장방법 및 사용(유효)기간	별첨 별첨	
기준 및 시험방법	별첨	
제조원	별첨	
붙 임 : 임상시험계획서 「약사법」 제34조제1항 및 「의약품 등의 안전에 관한 규칙」 제24조제4항에 따라 위와 같이 승인합니다.		
2016년 9월 2일		
식품의약품안전처장		
 ※ 본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며, 홈페이지(http://ezdrug.mfds.go.kr)의 발급번호를 통하여 위변조 여부를 확인할 수 있습니다. 또한, 문서하단의 바코드로도 진위확인(스캐너용 문서확인프로그램)을 하실 수 있습니다.		

[첨부] Microdosing omeprazole preparation SOP

Omeprazole 100mcg/10ml/syr 조제를 위한 SOP

작성일 : 2016.06.21 유소현

1 연구 기본 정보

가) 연구 제목 및 시험디자인

	과제번호	KC16MNSE0568	연구코드	PT16CPT6F	
제 목	건강한 남성 자원자를 대상으로 fluconazole이 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여 시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 • 교차 임상시험				
디자인	<p>The diagram illustrates the study timeline. Fluconazole is administered daily from day -1 to 10. Omeprazole is administered at day 0 (labeled 'microdosing') and day 8 (labeled 'conventional dose').</p>				

나) 시험책임자 : 서울성모병원 임상약리과 임동석

2 조제 기본 정보

- 가) 시행 장소 : 임상시험 unit 내 무균조제실
- 나) 시행 내역 : 임상시험용 의약품의 조제, 임상시험용 의약품 표시기재
- 다) 시행 이유 : 임상시험용 의약품의 조제 시 발생할 수 있는 오염 등을 방지하고, 표시기재 시 발생되는 의료폐기물(needle)을 처리하기 용이하게 하고자 함.
- 라) 시행 관계 법령 : [별첨 1 관계법령] 참조

3 조제 규모

가) 총 대상자 수 :

① Omeprazole 100mcg/10ml/syr : 시험당 8명(6명+여유분 2명)

나) 대상자 당 투약 횟수 : 0d, 8d 또는 0d, 4d, 대상자당 총 2회 복용

CTP2016_06	[0 d] Omeprazole 100mcg/10ml/syr qd	[8 d] Omeprazole 100mcg/10ml/syr qd
------------	---	---

다) 조제 횟수: 안정성 미확보로 각 투약일정마다 용시조제

4 조제를 위한 원료 의약품 입고

- 가) PI로부터 해당 IP를 인수증 2부와 함께 입고 본다. 인수증에는 아래와 같은 내용이 포함되도록 한다.

- ① 약물명, 입고 총 수량, 유효기간
- ② 인계자(PI) 이름, 서명, 인계 날짜
- ③ 인수자 이름, 서명, 인수 날짜
- 나) 입고 시 인수증의 내용과 실물이 일치하는지 확인 후, 원본 2부에 서명하여 1부는 임상시험 약국에, 1부는 PI가 보관한다.
- 다) IP 입고 시 아래와 같은 내용의 임상시험용 의약품 라벨이 부착되었는지 확인한다.

① Omeprazole 20mg/cap

1. 임상시험용"
2. Omeprazole 20mg/cap
3. 제조번호 및 유효기간 : 포장 기재사항 참조
4. 저장방법 : 기밀용기, 실온보관
5. 임상시험 승인을 받은자 : 서울시 서초구 반포대로 222 서울성모병원
임상약리과 임동석
6. 임상시험 외의 목적으로는 사용할 수 없음

5 조제 절차

- 가) 임상약리과 연구자와 투약 일정을 확인한다.
- 나) 해당 IP 투약 전날, 투약 대상자 명단(랜덤번호만 수집)을 확보한다.
- 다) 임상시험용 의약품 처방을 감사하여, 조제 할 IP의 수량을 확인한다.
- 라) 투약 예정 1시간 전 IP에 대한 재구성을 실시한다. 재구성 방법 및 각 의약품의 조제법은 [별첨2. 임상시험용 의약품 조제]를 따른다.
- 마) 재구성된 IP는 원내 제작 라벨을 부착하여 불출한다. 원내 제작라벨은 다음과 같은 내용을 포함한다.
 - ① 프로토콜 번호
 - ② 랜덤 번호
 - ③ 불출날짜
- 바) 재구성 된 IP는 연구자에게 불출하고, 투약 된 IP는 약국으로 반납 받는다.

[별첨 1. 관계 법령]

- 관련 법령 규정상 조제-재구성으로 규정되어지며, 이에 따라 조제 가이드라인을 원내에서 작성하고 관련 문서를 보관하도록 함

조제:

일정한 처방에 따라서 두 가지 이상의 의약품을 배합하거나, 한가지 의약품을 그대로 일정한 분량으로 나누어서 특정한 용법에 따라 특정인의 특정된 질병을 치료하거나 예방하는 등의 목적으로 사용하도록 약제를 만드는 것 (약사법 제 2조 제 11호)

임상시험용 의약품 제조 (의약품등의 안전에 관한 규칙_별표 11 임상시험용 의약품 제조)

1. 원칙

사. 임상시험용의약품의 전체 또는 일부 제조나 분할(dividing up), 포장(packaging) 또는 표시(presentation) 같은 다양한 공정은 승인대상에 포함되나, 재구성(reconstitution)은 해당하지 않는다. 다만, 재구성은 임상시험계획서 및 관련 문서에 규정되어 있어야 하며, 임상시험을 실시하는 임상시험실시기관(이하 "실시기관"이라 한다)에서 이용 가능하여야 한다. 참고로 재구성은 유효성분을 포함한 몇 가지 성분을 혼합하여 임상시험용의약품을 제조하는 것은 아니며, 다음과 같은 간단한 조작(simple process)을 의미한다. 임상시험용의약품은 재구성 전에 반드시 존재하여야 하며, 투여 전에 가능한 한 신속히 실시되어야 한다.

- 1) 대상자에게 제품을 투여하기 위한 임상시험용의약품의 용해 또는 분산
- 2) 또는 임상시험용의약품을 투여하기 위한 수단(vehicle)으로 사용되는 물질(substances)과 임상시험용의약품을 희석 또는 혼합

[별첨 2. 임상시험용 의약품 조제]

임상시험용 의약품 조제- Omeprazole 액 100mcg/10ml

품명	Omeprazole 액 100mcg/10ml/syr	제형	맑은 액제	포장단위	10ml/syr															
제조년월일	2016.08.26	실제조량	8 syr	유효기간	조제당일															
지시제조량	8 syr	손실량	0	약품코드	XD-CPT6F_OM															
조제법	1. 조제자는 latex glove 를 착용한다. 2. 조제자는 Omeprazole cap 20mg 1cap 을 준비한다. 3. 조제자는 빈 물약병(20ml)에 Sodium Bicarbonate 8.4% 1 Ample 을 사용하여 10ml 을 준비한다. 4. 조제자는 Omeprazole cap 20mg 1cap 을 열어 Sodium Bicarbonate 8.4% 10ml 에 흔합하고 흔들어 잘 섞이도록 한다. (희석 후 오메프라졸 농도 2mg/ml) 5. 조제자는 빈 물약병에 Sodium Bicarbonate 8.4% 5 Ample 을 사용하여 99.5ml 을 준비한다. 6. 조제자는 멀균 1회용 주사기로 Omeprazole 2mg/ml 용액 0.5ml 을 취하여 99.5ml 의 Sodium Bicarbonate 8.4% 에 흔합한다 (희석 후 Omeprazole 농도 10mcg/ml) 7. Omeprazole 주입액을 부드럽게 흔들어 잘 섞이도록 한다. 8. 멀균 1회용 주사기로 해당용액을 10ml 취한다.																			
효능	CYP1A 대사 효소의 기질로 사용 (mcg 단위로 처방, 1일 1회 100mcg 복용)																			
비고	Omeprazole 2mg/ml 제제의 안정성은 실온 7일 조제법 5.6.7.8은 안정성 확보가 되지 않아 용시조제																			
참고문헌	1. Quercia RA, Fan C, Liu X, Chow MSS. Stability of Omeprazole in an Extemporaneously Prepared Oral Liquid. Am J Health-Syst Pharm. 1997; 54(Aug): 1833-1836. 2. DiGiacinto JL, Griener JC, Ten Eick AP. Stability of Suspension Formulations of Lansoprazole and Omeprazole Stored in Amber-Colored Plastic Oral Syringes. Ann Pharm. 2000; (34): 600-605.																			
조제자	유소현	감사자	이정선																	
원료	<table border="1"> <thead> <tr> <th>원료코드</th><th>원료명</th><th>원료규격</th><th>총 원료량</th><th>확인자</th></tr> </thead> <tbody> <tr> <td>XD-CPT6F_O</td><td>Omeprazole cap</td><td>20mg/C</td><td>1 C</td><td>유소현</td></tr> <tr> <td>D8.4NBPJ</td><td>Sodium Bicarbonate inj.8.4%</td><td>20ml/A</td><td>6 A</td><td>유소현</td></tr> </tbody> </table>					원료코드	원료명	원료규격	총 원료량	확인자	XD-CPT6F_O	Omeprazole cap	20mg/C	1 C	유소현	D8.4NBPJ	Sodium Bicarbonate inj.8.4%	20ml/A	6 A	유소현
원료코드	원료명	원료규격	총 원료량	확인자																
XD-CPT6F_O	Omeprazole cap	20mg/C	1 C	유소현																
D8.4NBPJ	Sodium Bicarbonate inj.8.4%	20ml/A	6 A	유소현																

임상시험용 의약품 조제- Omeprazole 액 100mcg/10ml

품명	Omeprazole 액 100mcg/10ml/syr	제형	맑은 액제	포장단위	10ml/syr
제조년월일	2016.09.03	실제조량	8 syr	유효기간	조제당일
지시제조량	8 syr	손실량	0	약품코드	XD-CPT6F_OM
조제법	1. 조제자는 latex glove 를 착용한다. 2. 조제자는 Omeprazole cap 20mg 1cap 을 준비한다. 3. 조제자는 빈 물약병(20ml)에 Sodium Bicarbonate 8.4% 1 Ample 을 사용하여 10ml 을 준비한다. 4. 조제자는 Omeprazole cap 20mg 1cap 을 열어 Sodium Bicarbonate 8.4% 10ml 에 혼합하고 흔들어 잘 섞이도록 한다. (희석 후 오메프라졸 농도 2mg/ml) 5. 조제자는 빈 물약병에 Sodium Bicarbonate 8.4% 5 Ample 을 사용하여 99.5ml 을 준비한다. 6. 조제자는 멀균 1회용 주사기로 Omeprazole 2mg/ml 용액 0.5ml 을 취하여 99.5ml 의 Sodium Bicarbonate 8.4% 에 혼합한다 (희석 후 Omeprazole 농도 10mcg/ml) 7. Omeprazole 주입액을 부드럽게 흔들어 잘 섞이도록 한다. 8. 멀균 1회용 주사기로 해당용액을 10ml 취한다.				
효능	CYP1A 대사 효소의 기질로 사용 (mcg 단위로 처방, 1일 1회 100mcg 복용)				
비고	Omeprazole 2mg/ml 제제의 안정성은 실온 7일 조제법 5.6.7.8은 안정성 확보가 되지 않아 용시조제				
참고문헌	1. Quercia RA, Fan C, Liu X, Chow MSS. Stability of Omeprazole in an Extemporaneously Prepared Oral Liquid. Am J Health-Syst Pharm. 1997; 54(Aug): 1833-1836. 2. DiGiacinto JL, Griener JC, Ten Eick AP. Stability of Suspension Formulations of Lansoprazole and Omeprazole Stored in Amber-Colored Plastic Oral Syringes. Ann Pharm. 2000; (34): 600-605.				
조제자	유소현	감사자	위원주		
원료					
원료코드	원료명	원료규격	총 원료량	확인자	
XD-CPT6F_O	Omeprazole cap	20mg/C	1 C	유소현	
D8.4NBPJ	Sodium Bicarbonate inj.8.4%	20ml/A	6 A	유소현	

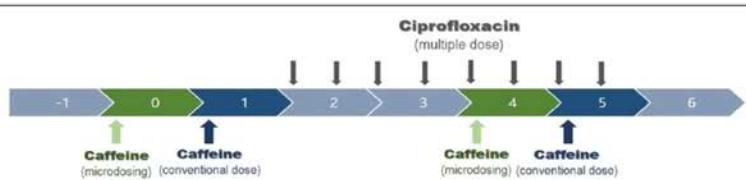
[첨부] Microdosing caffeine preparation SOP

Caffeine anhydrous 조제를 위한 SOP

작성일 : 2016.06.21 유소현

1 연구 기본 정보

가) 연구 제목 및 시험디자인

	과제번호	KC16MNSE0564	연구코드	PT16CPT05C
제 목	건강한 남성 자원자를 대상으로 ciprofloxacin이 caffeine의 상용량 및 microdose 투여 시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서 • 교차 임상시험			
디자인				

나) 시험책임자 : 서울성모병원 임상약리과 임동석

2 조제 기본 정보

가) 시행 장소 : 임상시험 unit 내 무균조제실

나) 시행 내역 : 임상시험용 의약품의 조제, 임상시험용 의약품 표시기재

다) 시행 이유 : 임상시험용 의약품의 조제 시 발생할 수 있는 오염 등을 방지하고, 표시기재 시 발생되는 의료폐기물(needle)을 처리하기 용이하게 하고자 함.

라) 시행 관계 법령 : [별첨 1 관계법령] 참조

3 조제 규모

가) 총 대상자 수 :

나) Caffeine anhydrous 100mcg/ea : 시험당 8명(6명+여유분 2명), 1

다) 대상자 당 투약 횟수 : 0d, 4d, 대상자당 총 2회 복용

CTP2016_05	[0 d] 카페인 100mcg qd	[4 d] 카페인 100mcg qd
------------	--------------------------	--------------------------

라) 조제 횟수: 안정성 미확보로 각 투약일정 마다 용시조제

4 조제를 위한 원료 의약품 입고

가) PI로부터 해당 IP를 인수증 2부와 함께 입고 본다. 인수증에는 아래와 같은 내용이 포함되도록 한다.

- ① 약물명, 입고 총 수량, 유효기간
- ② 인계자(PI) 이름, 서명, 인계 날짜

- ③ 인수자 이름, 서명, 인수 날짜
- 나) 입고 시 인수증의 내용과 실물이 일치하는지 확인 후, 원본 2부에 서명하여 1부는 임상시험 약국에, 1부는 PI가 보관한다.
- 다) IP 입고 시 아래와 같은 내용의 임상시험용 의약품 라벨이 부착되었는지 확인한다.
- ① 네오카프액
1. "임상시험용"
 2. 네오카프액 20mg/ml (**caffeine anhydrous** 로 10mg/ml)
 3. 제조번호 및 유효기간 : 포장 기재사항 참조
 4. 저장방법 : 기밀용기, 실온보관
 5. 임상시험 승인을 받은자 : 서울시 서초구 반포대로 222 서울성모병원
임상약리과 임동석
 6. 임상시험 외의 목적으로는 사용할 수 없음

5 조제 절차

- 가) 임상약리과 연구자와 투약 일정을 확인한다.
- 나) 해당 IP 투약 전날, 투약 대상자 명단(랜덤번호만 수집)을 확보한다.
- 다) 임상시험용 의약품 처방을 감사하여, 조제 할 IP의 수량을 확인한다.
- 라) 투약 예정 1시간 전 IP에 대한 재구성을 실시한다. 재구성 방법 및 각 의약품의 조제법은 [별첨2. 임상시험용 의약품 조제]를 따른다.
- 마) 재구성된 IP는 원내 제작 라벨을 부착하여 불출한다. 원내 제작라벨은 다음과 같은 내용을 포함한다.
- ① 프로토콜 번호
② 랜덤번호
③ 불출날짜
- 바) 재구성 된 IP는 연구자에게 불출하고, 투약 된 IP는 약국으로 반납 받는다.

[별첨 1. 관계 법령]

1. 관련 법령 규정상 조제-재구성으로 규정되어지며, 이에 따라 조제 가이드라인을 원내에서 작성하고 관련 문서를 보관하도록 함

조제:

일정한 처방에 따라서 두 가지 이상의 의약품을 배합하거나, 한가지 의약품을 그대로 일정한 분량으로 나누어서 특정한 용법에 따라 특정인의 특정된 질병을 치료하거나 예방하는 등의 목적으로 사용하도록 약제를 만드는 것 (약사법 제 2조 제 11호)

임상시험용 의약품 제조 (의약품등의 안전에 관한 규칙_별표 11 임상시험용 의약품 제조)

1. 원칙

사. 임상시험용의약품의 전체 또는 일부 제조나 분할(dividing up), 포장(packaging) 또는 표시(presentation) 같은 다양한 공정은 승인대상에 포함되나, 재구성(reconstitution)은 해당하지 않는다. 다만, 재구성은 임상시험계획서 및 관련 문서에 규정되어 있어야 하며, 임상시험을 실시하는 임상시험실시기관(이하 "실시기관"이라 한다)에서 이용 가능하여야 한다. 참고로 재구성은 유효성분을 포함한 몇 가지 성분을 혼합하여 임상시험용의약품을 제조하는 것은 아니며, 다음과 같은 간단한 조작(simple process)을 의미한다. 임상시험용의약품은 재구성 전에 반드시 존재하여야 하며, 투여 전에 가능한 한 신속히 실시되어야 한다.

- 1) 대상자에게 제품을 투여하기 위한 임상시험용의약품의 용해 또는 분산
- 2) 또는 임상시험용의약품을 투여하기 위한 수단(vehicle)으로 사용되는 물질(substances)과 임상시험용의약품을 회석 또는 혼합

[별첨 2. 임상시험용 의약품 조제]

1. 임상시험용 의약품 조제- Caffeine anhydrous 액 100mcg/10ml

품명	Caffeine anhydrous 100mcg/10ml	제형	맑은 액제	포장단위	10ml/syr
제조년월일	2016.09.24	실제조량	8 syr	유효기간	조제 당일
지시제조량	8 syr	손실량	0	약품코드	XD-CPTSC_CM
조제법	1. 조제자는 latex glove 를 착용한다. 2. 조제자는 네오파프액 20mg/ml(caffeine anhydrous) 로서 10mg/ml 1 Vial을 준비한다. 3. 조제자는 멸균 종류수 100ml 1병을 준비한다. 4. 멸균 종류수 1병에서 멸균 1회용 주사기로 1ml를 떨어내고, 다른 멸균 1회용 주사기로 네오파프액 1ml를 취하여 멸균 종류수 병에 주입한다. (희석 후 Caffeine anhydrous 농도 100mcg/ml) 5. Caffeine anhydrous 가 주입된 멸균 종류수 병을 부드럽게 흔들어 잘 섞이도록 한다. 6. 멸균 1회용 주사기로 해당 용액을 10ml 취한다. 7. 조제자는 새로운 멸균 종류수 100ml 1병을 준비한다. 8. 멸균 종류수 1병에서 멸균 1회용 주사기로 10ml를 떨어내고, 6번에서 취한 10ml를 멸균 종류수 병에 주입한다. (희석 후 Caffeine anhydrous 농도 10mcg/ml) 9. 멸균 1회용 주사기로 해당 용액을 10ml 취한다.				
효능	CYP1A 대사 효소의 기질로 사용 (mcg 단위로 처방, 1일 1회 100mcg 복용)				
비고	해당 농도의 제제는 안정성 정보 확보가 되지 않아 용시조제				
조제자	유소현	감사자			
원료					
원료코드	원료명	원료규격	총 원료량	확인자	
DCAFFS1	네오파프액	Caffeine anhydrous 10mg/1ml/V	1 V	유소현	
DDIST1-A	멸균증류수	100ml/BT	2 BT	유소현	

[첨부] ^{14}C comound clinical trial을 위한 방사선 안전관리 위원회 의견서

방사선 안전관리위원회 의견서

1. 개요

가톨릭대학교 서울성모병원 임상약리과에서 임상연구 시행을 위해 가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구 심사위원회에 심사를 요청한 “건강한 남성 지원자를 대상으로 시프로플록사신(Ciprofloxacin)이 카페인(Caffeine)의 상용량 및 마이크로도징(microdose) 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서·교차 임상시험”에 사용되는 방사성 동위원소가 연구 대상자에게 미치는 안전성에 대해 가톨릭대학교 서울성모병원 방사선 안전관리 위원회의 검토 의견에 대해 하기와 같이 기술합니다.

2. 방사선 핵종 및 방사선량

방사선 동위원소인 ^{14}C 투여 시 체내 노출되는 방사능 량은 ^{14}C -카페인 (^{14}C -cafffeine)의 투여량, 봉괴 시 발생하는 에너지 양, 노출 시간, 투약 대상자의 체적(체중) 등에 의하여 결정됩니다.

본 임상시험에서 이용되는 분석방법을 위하여 필요한 적정 방사선량은 평균 500 nCi (나노케리), 최대 1000 nCi로 설정되었고, ^{14}C -cafffeine 액상 500 nCi를 2회 투여하는 것으로 계획하였습니다. ^{14}C 는 caffeine에 결합한 형태로 존재하므로, caffeine의 생물학적 반감기가 3~4시간인 것을 고려하면, 6번의 반감기가 지난 시간인 투약 후 24시간에 약 98.4%가 체내에서 제거됩니다. ^{14}C 의 봉괴 시 발생되는 평균 에너지의 양이 8.3 fJ/decay 이므로 이를 바탕으로 문헌¹에서 제시한 방법에 따라 체중 70kg인 사람에게 최대 노출 정도(1000nCi)와 최대 노출 시간(24hr)을 가정한 방사선량은 **0.38μSV** (마이크로시버트), 즉 **0.00038mSV**입니다. 이는 연간허용선량의 0.00038배, 자연방사선량의 0.000158배, 흉부 X-ray 1회 촬영의 0.0038배에 해당하는 양입니다.

3. 방사성 동위원소 의약품의 보관

방사성 동위원소 의약품의 보관은 가톨릭대학교 서울성모병원 핵의학과의 방사선 안전관리자의 감독 하에 지정된 방사성 동위원소 의약품 보관 구역에서 보관을 하고, 보관 시 이용되는 보관 용기는 방사선 차폐를 위한 표준 규격을 준수하여 제작된 용기를 이용하며, 투약을 위한 불출 시 지정된 방호장비를 이용하여 불필요한 방사선 노출을 최소화 하도록 합니다.

4. 방사성 동위원소 의약품의 투약

본 방사성 동위원소 의약품의 투약은 가톨릭대학교 서울성모병원 핵의학과의 방사선 안전관리자의 감독 하에 지정된 장소에서 시행될 예정이며, 약품의 이동과 투약은 모두 방사성 동위원소 안전관리 법정교육을 받은 지정된 연구자들에 의해 시행될 예정입니다.

5. 결론

이상과 같은 사실을 검토한 결과, 가톨릭대학교 서울성모병원 임상연구 심사위원회에서 심사 중인 “건강한 남성 지원자를 대상으로 시프로플록사신(Ciprofloxacin)이 카페인(Caffeine)의 상용량 및 마이크로도징(microdose) 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일순서·교차 임상시험”에 사용되는 방사성 동위원소의 복용으로 인한 임상시험 대상자의 안전성에 미치는 영향은 최소한에 그칠 것으로 판단됩니다.

참고문헌

1. Kim SH, Kelly PB, Clifford AJ. Calculating radiation exposures during use of 14C-Labeled nutrients, food components, and biopharmaceuticals to quantify metabolic behavior in humans. *J Agric Food Chem.* 2010;58:4632-4637. doi:10.1021/jf100113c.

가톨릭대학교 서울성모병원 핵의학과 방사선 안전관리자/
가톨릭대학교 서울성모병원 방사선 안전관리 위원회 위원장

성명 서명

가톨릭대학교 서울성모병원 방사선 안전관리 위원회 위원

성명 서명

가톨릭대학교 서울성모병원 방사선 안전관리 위원회 위원

성명 서명

가톨릭대학교 서울성모병원 병원장

성명 서명

[첨부] CMC of Caffeine

[¹⁴C]카페인

상온에서 아세토니트릴에 탄산칼륨과 태오브로민을 가하고, 반응물을 80 °C에서 질소대기 하에 30분간 교반한다. 반응물에 한국표지화합물연구소에서 합성한 [¹⁴C]CH₃I를 진공 하에서 가하고 3시간동안 환류 교반한다. 온도를 상온으로 낮추고, 반응물을 여과하고 아세토니트릴로 세척한다. 여과액을 농축하고, 농축된 잔사에 염화나트륨과 탄산칼륨을 포함한 수용액에 녹인다. 수용층을 클로로포름으로 추출하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피로 정제하여 농축 건고한다. [¹⁴C]카페인을 에탄올 하에 2시간 교반 후 여과하여 [¹⁴C]카페인을 함유한 반응물을 얻는다. 얻어진 반응물을 여과하고, 에탄올로 세척한 후, 상온에서 17시간 동안 건조하여 [¹⁴C]카페인을 얻는다.

[첨부] CMC of Caffeine

[¹⁴C]카페인

확인시험

- 1) [¹⁴C]카페인과 카페인의 핵자기공명스펙트럼을 비교하였을 때, 구조적으로 일치한다.
- 2) [¹⁴C]카페인과 카페인의 질량분석스펙트럼을 비교하였을 때, 카페인보다 분자량이 2 증가한 [¹⁴C]카페인의 주 피크가 관찰된다.
- 3) 순도시험 1)에 따라 [¹⁴C]카페인의 유지시간이 카페인과 동일한지 확인한다.

순도시험

- 1) 화학적순도 검체를 정말하게 달아 에탄올을 넣어 녹여 농도가 약 0.2 mg/mL이 되도록 하여 검액 10 μL을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]카페인에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 98% 이상이어야 한다.

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 254 nm)

칼럼 : 안지름 약 4.6 nm, 길이 약 25 cm인 스테인리스강판에 5 μm의 액체크로마토그래프용옥타데실실릴실리카겔을 충전한다.

이동상 : 물과 아세토니트릴의 혼합액

시간 (분)	물 (%)	아세토니트릴 (%)
0	100	0
30	50	50

유량 : 1 mL/분

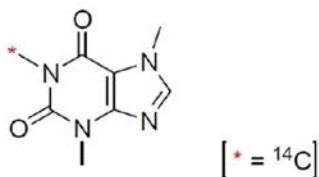
시간 : [¹⁴C]카페인의 유지시간의 2배 이상의 범위

- 2) 방사화학적순도 화학적순도 측정과 동일한 방법으로 검액을 조제하여 액체크로마토그래프법과 동일한 조건에서 시험한다. 다만 검출기는 방사능검출기를 사용한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]카페인에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 98% 이상이어야 한다.
- 3) 비방사능 측정 비방사능 (specific activity)은 중량법 (microgravimetric assay)을 따르며, 액체신틸레이션계수법 (Liquid Scintillation Counter)으로 방사능량을 측정한다. [¹⁴C]카페인의 방사능세기는 1 mmol 당 1715 MBq 이상이 되도록 한다.

[첨부] CMC of Caffeine

[¹⁴C]카페인

[¹⁴C]Caffeine



[1-methyl-¹⁴C]caffeine

C₈H₁₀N₄O₂:194.1g/mol

제조방법

상온에서 아세토니트릴에 탄산칼륨과 테오브로민을 가하고, 반응물을 80 °C에서 질소대기 하에 30분간 교반한다. 반응물을 한국표지화합물연구소에서 합성한 [¹⁴C]CH₃I를 진공 하에서 가하고 3시간동안 환류 교반한다. 온도를 상온으로 낮추고, 반응물을 여과하고 아세토니트릴로 세척한다. 여과액을 농축하고, 농축된 잔사에 염화나트륨과 탄산칼륨을 포함한 수용액에 녹인다. 수용층을 클로로포름으로 추출하여 실리카겔 컬럼크로마토그래피로 정제하여 농축 건고한다. [¹⁴C]카페인을 에탄올 하에 2시간 교반 후, 여과하여 [¹⁴C]카페인을 함유한 반응물을 얻는다. 얻어진 반응물을 여과하고, 에탄올로 세척한 후, 상온에서 17시간 동안 건조하여 [¹⁴C]카페인을 얻는다.

성상

무색의 맑은 액이다.

확인시험

- 1) [¹⁴C]카페인과 카페인의 핵자기공명스펙트럼을 비교하였을 때, 구조적으로 일치한다.
- 2) [¹⁴C]카페인과 카페인의 질량분석스펙트럼을 비교하였을 때, 카페인보다

[첨부] CMC of Caffeine

분자량이 2 증가한 [¹⁴C]카페인의 주 피크가 관찰된다.

- 3) 순도시험 1)에 따라 [¹⁴C]카페인의 유지시간이 카페인과 동일한지 확인한다.

순도시험

- 1) 화학적순도 검체를 정말하게 달아 에탄올을 넣어 녹여 농도가 약 0.2 mg/mL이 되도록 하여 검액 10 μL을 가지고 다음 조건으로 액체크로마토그래프법에 따라 시험한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]카페인에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 98% 이상이어야 한다.

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 254 nm)

칼럼 : 안지를 약 4.6 nm, 길이 약 25 cm인 스테인리스강판에 5 μm의 액체크로마토그래프용옥타데실실리카겔을 충전한다.

이동상 : 물과 아세토니트릴의 혼합액

시간 (분)	물 (%)	아세토니트릴 (%)
0	100	0
30	50	50

유량 : 1 mL/분

시간 : [¹⁴C]카페인의 유지시간의 2배 이상의 범위

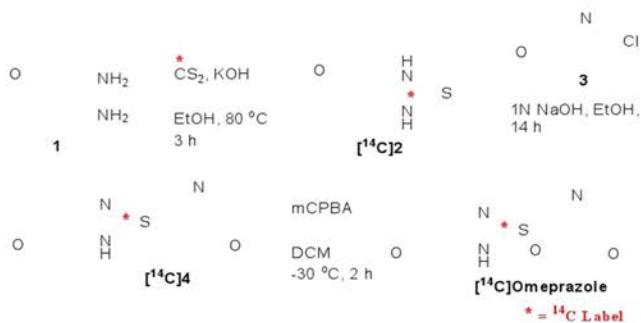
- 2) 방사화학적순도 화학적순도 측정과 동일한 방법으로 검액을 조제하여 액체크로마토그래프법과 동일한 조건에서 시험한다. 다만 검출기는 방사능검출기를 사용한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]카페인에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 98% 이상이어야 한다.

- 3) 비방사능 측정 비방사능 (specific activity)은 중량법 (microgravimetric assay)을 따르며, 액체신틸레이션계수법 (Liquid Scintillation Counter)으로 방사능량을 측정한다. [¹⁴C]카페인의 방사능세기는 1 mmol 당 1715 MBq 이상이 되도록 한다.

[첨부] CMC of Omeprazole

[¹⁴C]오메프라졸

제조방법



1단계) $[^{14}\text{C}]2$ 의 합성

$[^{14}\text{C}]$ 탄산바륨로부터 합성된 $[^{14}\text{C}]$ 황화탄소를 에탄올에 녹인다. 반응용기의 온도를 $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 낮춘 후 수산화칼륨을 에탄올에 녹여 반응용기에 첨가하고 15분 동안 교반한다. 1 을 에탄올과 물의 혼합액에 녹여 반응물에 첨가하고 $80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 로 온도를 높여준 후 3시간 동안 반응을 진행한다. 반응이 종료된 후 반응액을 농축하고, 물을 첨가하고, 초산으로 산성화시킨다. 초산에틸로 추출하고, 유기층에 황산마그네슘을 넣고 농축하여 $[^{14}\text{C}]2$ 를 얻는다.

2단계) $[^{14}\text{C}]4$ 의 합성

$[^{14}\text{C}]2$ 를 에탄올에 녹인다. 반응액에 1 N 수산화나트륨을 넣고 상온에서 14시간 동안 교반을 한다. 반응물을 농축한 후 디클로로메탄에 녹여 필터를 하고, 여액을 농축하여 $[^{14}\text{C}]4$ 를 얻는다.

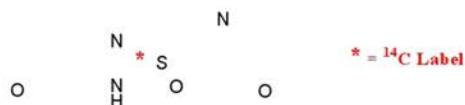
3단계) $[^{14}\text{C}]$ 오메프라졸의 합성

$[^{14}\text{C}]4$ 를 디클로로메탄에 녹인 후 반응기의 온도를 -30°C 로 낮춘다. mCPBA를 넣고 2시간 동안 교반한다. 반응이 종료된 후 상온으로 온도를 올려주고, 포화 탄산수소나트륨으로 quenching을 한다. 반응액을 디클로로메탄으로 추출하고, 유기층에 황산마그네슘을 넣고 농축하여 정제전의 $[^{14}\text{C}]$ 오메프라졸을 얻었다. 이렇게 얻은 정제전의 $[^{14}\text{C}]$ 오메프라졸을 액체크로마토그래프를 사용, 정제하여 깨끗한 $[^{14}\text{C}]$ 오메프라졸을 얻는다.

[첨부] CMC of Omeprazole

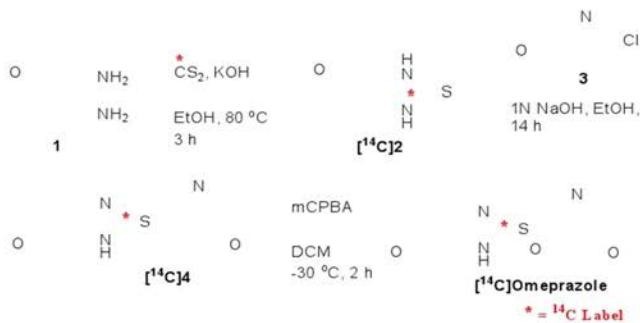
[¹⁴C]오메프라졸

[¹⁴C]Omeprazole



¹⁴CC₁₆H₁₉N₃O₃S : 347.15 g/mol

제조방법



1단계) [¹⁴C]2 의 합성

[¹⁴C]탄산바륨로부터 합성된 [¹⁴C]황화탄소를 에탄올에 녹인다. 반응용기의 온도를 0 °C로 낮춘 후 수산화칼륨을 에탄올에 녹여 반응용기에 첨가하고 15분 동안 교반한다. 1 을 에탄올과 물의 혼합액에 녹여 반응물에 첨가하고 80 °C로 온도를 높여준 후 3시간 동안 반응을 진행한다. 반응이 종료된 후 반응액을 농축하고, 물을 첨가하고, 초산으로 산성화시킨다. 초산에틸로 추출하고, 유기층에 황산마그네슘을 넣고 농축하여 [¹⁴C]2 를 얻는다.

2단계) [¹⁴C]4 의 합성

[¹⁴C]2 를 에탄올에 녹인다. 반응액에 1 N 수산화나트륨을 넣고 상온에서 14

[첨부] CMC of Omeprazole

시간 동안 교반을 한다. 반응물을 농축한 후 디클로로메탄에 녹여 필터를 하 고, 여액을 농축하여 [¹⁴C]4를 얻는다.

3단계) [¹⁴C]오메프라졸의 합성

[¹⁴C]4를 디클로로메탄에 녹인 후 반응기의 온도를 -30 °C로 낮춘다. mCPBA를 넣고 2시간 동안 교반한다. 반응이 종료된 후 상온으로 온도를 올 려주고, 포화 탄산수소나트륨으로 quenching을 한다. 반응액을 디클로로메탄 으로 추출하고, 유기층에 황산마그네슘을 넣고 농축하여 정제전의 [¹⁴C]오메 프라졸을 얻었다. 이렇게 얻은 정제전의 [¹⁴C]오메프라졸을 액체크로마토그래 페를 사용, 정제하여 깨끗한 [¹⁴C]오메프라졸을 얻는다.

성상

무색의 맑은 액이다.

확인시험

- 1) [¹⁴C]오메프라졸과 오메프라졸의 핵자기공명스펙트럼을 비교하였을 때, 구조적으로 일치한다.
- 2) [¹⁴C]오메프라졸과 오메프라졸의 질량분석스펙트럼을 비교하였을 때, 오메 프라졸보다 분자량이 2 증가한 [¹⁴C]오메프라졸의 주 피크가 관찰된다.
- 3) 순도시험 1)에 따라 [¹⁴C]오메프라졸의 유지시간이 오메프라졸과 동일한지 확인한다.

순도시험

- 1) 화학적순도 검체를 정밀하게 닦아 Methanol을 넣어 녹여 농도가 약 1.0 mg/mL 되도록 하고 이를 검액으로 한다(이 액은 쓸 때 만든다). 검액 5 μL를 주입하여 다음 조건의 액체크로마토그래프법에 따라 시험한다. 검액 에서 얻은 [¹⁴C]오메프라졸에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 95 % 이상이어야 한다.

조작조건

검출기 : 자외부흡광광도계 (측정파장 280 nm)

칼럼 : 안지를 약 4.6 mm, 길이 약 15 cm인 스테인리스강관에 5 μm의 액체크로마토그래프용 C8 실리카를 충진하여 사용한다.

이동상 : 인산염환충액(pH 6.7)과 아세토니트릴 혼합액 (3:1)

유량 : 0.8 mL/분

측정범위 : [¹⁴C]오메프라졸 유지시간의 2배 이상의 범위

[첨부] CMC of Omeprazole

[¹⁴C]오메프라졸

확인시험

- 1) [¹⁴C]오메프라졸과 오메프라졸의 핵자기공명스펙트럼을 비교하였을 때, 구조적으로 일치한다.
- 2) [¹⁴C]오메프라졸과 오메프라졸의 질량분석스펙트럼을 비교하였을 때, 오메프라졸보다 분자량이 2 증가한 [¹⁴C]오메프라졸의 주 피크가 관찰된다.
- 3) 순도시험 1)에 따라 [¹⁴C]오메프라졸의 유지시간이 오메프라졸과 동일한지 확인한다.

순도시험

- 1) 화학적순도 검체를 정밀하게 달아 Methanol을 넣어 녹여 농도가 약 1.0 mg/mL 되도록 하고 이를 검액으로 한다(이 액은 쓸 때 만든다). 검액 5 μL를 주입하여 다음 조건의 액체크로마토그래프법에 따라 시험한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]오메프라졸에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 95 % 이상이어야 한다.

조작조건

검출기 : 자외부흡광도계 (측정파장 280 nm)

칼럼 : 안지를 약 4.6 mm, 길이 약 15 cm인 스테인리스강관에 5 μm의 액체크로마토그래프용 C8 실리카를 충진하여 사용한다.

이동상 : 인산염환충액(pH 6.7)과 아세토니트릴 혼합액 (3:1)

유량 : 0.8 mL/분

측정범위 : [¹⁴C]오메프라졸 유지시간의 2배 이상의 범위

- 2) 방사화학적순도 화학적순도 시험법과 동일한 방법으로 시험하고, 동일한 액체크로마토그래프법에서 시험한다. 다만 검출기는 방사능검출기를 사용한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]오메프라졸에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 95 % 이상이어야 한다.

- 3) 방사능세기 측정 방사능세기는 액체신틸레이션계수법 (Liquid Scintillation Counter)을 따른다. 검체를 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 녹여 농도가 약 10 μg/g이 되도록 하고 이를 검액으로 한다. 이 용액 약 0.2 g (검체로 약 2 mg)을 취하여 칵테일 (10 mL)와 섞어서 방사능세기를 측정한다. [¹⁴C]오메프라졸의 방사능세기는 1 mmol 당 50 mCi 이상이 되도록 한다.

[첨부] CMC of Omeprazole

- 2) 방사화학적순도 화학적순도 시험법과 동일한 방법으로 시험하고, 동일한 액체크로마토그래프법에서 시험한다. 다만 검출기는 방사능검출기를 사용한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]오메프라졸에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 95 % 이상이어야 한다.
- 3) 방사능세기 측정 방사능세기는 액체신틸레이션계수법 (Liquid Scintillation Counter)을 따른다. 검체를 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 녹여 농도가 약 10 µg/g이 되도록 하고 이를 검액으로 한다. 이 용액 약 0.2 g (검체로 약 2 mg)을 취하여 칵테일 (10 mL)와 섞어서 방사능세기를 측정한다. [¹⁴C]오메프라졸의 방사능세기는 1 mmol 당 50 mCi 이상이 되도록 한다.

[첨부] CMC of Omeprazole

[¹⁴C]오메프라졸

순도시험

1) 화학적순도 검체를 정밀하게 달아 Methanol을 넣어 녹여 농도가 약 1.0 mg/mL 되도록 하고 이를 검액으로 한다(이 액은 쓸 때 만든다). 검액 5 μ L를 주입하여 다음 조건의 액체크로마토그래프법에 따라 시험한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]오메프라졸에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 95 % 이상이어야 한다.

조작조건

검출기 : 자외부흡광도계 (측정파장 280 nm)

칼럼 : 안지를 약 4.6 mm, 길이 약 15 cm인 스테인리스강관에 5 μ m의 액체크로마토그래프용 C8 실리카를 충전하여 사용한다.

이동상 : 인산염환충액(pH 6.7)과 아세토니트릴 혼합액 (3:1)

유량 : 0.8 mL/분

측정범위 : [¹⁴C]오메프라졸 유지시간의 2배 이상의 범위

2) 방사화학적순도 화학적순도 시험법과 동일한 방법으로 시험하고, 동일한 액체크로마토그래프법에서 시험한다. 다만 검출기는 방사능검출기를 사용한다. 검액에서 얻은 [¹⁴C]오메프라졸에 해당하는 주피크의 면적은 전체 피크면적의 95 % 이상이어야 한다.

3) 방사능세기 측정 방사능세기는 액체신틸레이션계수법 (Liquid Scintillation Counter)을 따른다. 검체를 정밀하게 달아 메탄올을 넣어 녹여 농도가 약 10 μ g/g이 되도록 하고 이를 검액으로 한다. 이 용액 약 0.2 g (검체로 약 2 mg)을 취하여 칵테일 (10 mL)와 섞어서 방사능세기를 측정한다. [¹⁴C]오메프라졸의 방사능세기는 1 mmol 당 50 mCi 이상이 되도록 한다.

안정성시험

기준 및 시험조건

1) 화학적순도 순도시험의 화학적순도 확인과 동일한 분석조건과 기준을 적용한다.

2) 방사화학적순도 순도시험의 방사화학적순도 확인과 동일한 분석조건과 기준을 적용한다.

[첨부] CMC of Omeprazole

3) 보관조건 에탄올 용액상태 (0.2 mg/mL)로 영하 20°C에 보관

결과

	화학적순도 (%)	방사화학적 순도 (%)
1주 후	97.8	97.7
2주 후	97.5	97.4
3주 후	97.5	97.2
4주 후	97.4	97.0

4주간의 안정성 시험결과 기준에 적합하므로, 제조 후 임상시험 투약 기간 까지 4주를 넘기지 않도록 한다.

[첨부] 검체인수인계서

	
CPT2016-05	
검체 인수인계서	
Protocol NO	CPT2016-05
Project	건강한 남성 자원자를 대상으로 ciprofloxacin이 caffeine의 상용량 및 microdose 투여 시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일 순서 · 교차 임상시험
검체 type	Human Plasma
분주 기간	* 1기 : 2016년 09월 24일(토) ~ 09월 25일(일) * 2기 : 2016년 09월 28일(수) ~ 09월 29일(목)
검체 ID	* CC01 ~ CC06
검체 box 수량	* 1기 Plasma 분석용: 3 box * 1기 Plasma 보관용: 2 box * 2기 Plasma 분석용: 3 box * 2기 Plasma 보관용: 2 box 총 10 box (별첨 1 참고)
검체 vial 수량	* 1기 Plasma 분석용: 132 vial * 1기 Plasma 보관용: 66 vial * 2기 Plasma 분석용: 132 vial * 2기 Plasma 보관용: 66 vial 총 396 vial (별첨 2 참고)
저장 및 운송 조건	: -60°C 이하
특이 사항	
기타	

상기 시료를 인수 인계합니다.

인계인 소속: 가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터 약물분석실

인계 일시: 2016년 10 월 14 일 10 시 23 분
성명: 13767 (서명)

인수인 소속: 충남대학교 약학대학

인수 일시: 2016년 10 월 14 일 10 시 23 분
성명: 신석호 (서명)

시험 책임자: 010-9514-3700 (서명)

가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터

별첨 1. box 배치



Ciprofloxacin, caffeine

Protocol NO: CPT2016-05

	분석용	보관용
121	3	2
221	3	2
total		10

가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터

별첨 2. 검체 info



Ciprofloxacin, caffeine

Protocol: CPT2016-05

* Period 1

Random NO: CC01 ~ CC06

PK time	CC01	CC02	CC03	CC04	CC05	CC06
0D_Predose						
0.25 h						
0.5 h						
0.75 h						
1 h						
2 h						
4 h						
6 h						
8 h						
12 h						
24 h						

총 11 point

Period	Type	Plasma	Vial 수
1	분석용	6명 * 11 point * 2 vial	132
	보관용	6명 * 11 point * 1 vial	66

* Period 2

Random NO: CC01 ~ CC06

PK time	CC01	CC02	CC03	CC04	CC05	CC06
4D_Predose						
0.25 h						
0.5 h						
0.75 h						
1 h						
2 h						
4 h						
6 h						
8 h						
12 h						
24 h						

총 11 point

Period	Type	Plasma	Vial 수
2	분석용	6명 * 11 point * 2 vial	132
	보관용	6명 * 11 point * 1 vial	66

첨부: 검체인수인계서_2

	CPT2016-06
검체 인수인계서	
Protocol NO	CPT2016-06
Project	건강한 남성 자원자를 대상으로 flucanazole와 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여 시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일 순서 · 교차 임상시험
검체 type	Human Plasma
분주 기간	* 1기 : 2016년 08월 26일(금) ~ 08월 27일(토) * 2기 : 2016년 09월 03일(토) ~ 09월 04일(일)
검체 ID	* OF01 ~ OF06
검체 box 수량	* 1기 Plasma 분석용: 3 box * 1기 Plasma 보관용: 3 box * 2기 Plasma 분석용: 2 box * 2기 Plasma 보관용: 2 box 총 10 box (별첨 1 참고)
검체 vial 수량	* 1기 Plasma 분석용: 132 vial * 1기 Plasma 보관용: 66 vial * 2기 Plasma 분석용: 132 vial * 2기 Plasma 보관용: 66 vial 총 396 vial (별첨 2 참고)
저장 및 운송 조건	: -60°C 이하
특이 사항	*분주량부족 1기_OF01, OF02, OF03_24h_ 분석용, 보관용 : 700 μL 씩 분주됨
기타	

상기 시료를 인수 인계합니다.

인계인 소속: 가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터 약물분석실

인계 일시: 2016년 9 월 9 일 / 4 시 53 분
 성명: 이재우 (서명)

인수인 소속: 충남대학교 약학대학
 인수 일시: 2016년 9 월 9 일 / 4 시 53 분
 성명: 변진자 (서명)

시험 책임자: 이종근 (서명)

가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터

별첨 1. box 배치



Fluconazole, omeprazole

Protocol NO: CPT2016-06

	분석용	보관용
1기	3	2
2기	3	2
	total	10

가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터

별첨 2. 검체 info



Fluconazole, omeprazole

Protocol: CPT2016-06

* Period 1

Random NO: OF01 ~ OF06

PK time	OF01	OF02	OF03	OF04	OF05	OF06
0D_Predose						
0.25 h						
0.5 h						
0.75 h						
1 h						
2 h						
4 h						
6 h						
8 h						
12 h						
24 h						

총 11 point

Period	Type	Plasma	Vial 수
1	분석용	6명 * 11 point * 2 vial	132
	보관용	6명 * 11 point * 1 vial	66

* Period 2

Random NO: OF01 ~ OF06

PK time	OF01	OF02	OF03	OF04	OF05	OF06
0D_Predose						
0.25 h						
0.5 h						
0.75 h						
1 h						
2 h						
4 h						
6 h						
8 h						
12 h						
24 h						

총 11 point

Period	Type	Plasma	Vial 수
2	분석용	6명 * 11 point * 2 vial	132
	보관용	6명 * 11 point * 1 vial	66

기독교의료생명산업연구원 임상연구지원센터



CPT2016-07

검체 인수인계서

Protocol NO	CPT2016-07
Project	건강한 남성 자원자를 대상으로 omeprazole와 caffeine의 상용량 및 microdose 투여 시 악동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일 순서 · 교차 임상시험
검체 type	Human Plasma
분주 기간	* 1기 : 2016년 08월 26일(금) ~ 08월 27일(토) * 2기 : 2016년 09월 03일(토) ~ 09월 04일(일)
검체 ID	* CO01 ~ CO06
검체 box 수량	* 1기 Plasma 분석용: 3 box * 1기 Plasma 보관용: 3 box * 2기 Plasma 분석용: 2 box * 2기 Plasma 보관용: 2 box 총 10 box (별첨 1 참고)
검체 vial 수량	* 1기 Plasma 분석용: 132 vial * 1기 Plasma 보관용: 66 vial * 2기 Plasma 분석용: 132 vial * 2기 Plasma 보관용: 66 vial 총 396 vial (별첨 2 참고)
저장 및 운송 조건	: -60°C 이하
특이 사항	
기타	

상기 시료를 인수 인계합니다.

인계인 소속: 가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터 약물분석실

인계 일시: 2016년 9 월 9 일 / 4 시 53 분

성명: 이대희 (서명)

인수인 소속: 충남대학교 약학대학

인수 일시: 2016년 9 월 9 일 / 4 시 53 분

성명: 변진자 (서명)

시험 책임자: 김도현 (서명)

가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터

별첨 1. box 배치



Omeprazole, caffeine

Protocol NO: CPT2016-07

분석용

6명		11point			
C001	C001	C002	C002		
↓	↓		↓	↓	

	분석용	보관용
1기	3	2
2기	3	2
total	10	

보관용

6명		11point			
C001	C001	C002	C003	C004	
↓		↓	↓	↓	

가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터

별첨 2. 검체 info



Omeprazole, caffeine

Protocol: CPT2016-07

* Period 1

Random NO: CO01 ~ CO06

PK time	CO01	CO02	CO03	CO04	CO05	CO06
0D_Predose						
0.25 h						
0.5 h						
0.75 h						
1 h						
2 h						
4 h						
6 h						
8 h						
12 h						
24 h						

총 11 point

Period	Type	Plasma	Vial 수
1	분석용	6명 * 11 point * 2 vial	132
	보관용	6명 * 11 point * 1 vial	66

* Period 2

Random NO: CO01 ~ CO06

PK time	CO01	CO02	CO03	CO04	CO05	CO06
8D_Predose						
0.25 h						
0.5 h						
0.75 h						
1 h						
2 h						
4 h						
6 h						
8 h						
12 h						
24 h						

총 11 point

Period	Type	Plasma	Vial 수
2	분석용	6명 * 11 point * 2 vial	132
	보관용	6명 * 11 point * 1 vial	66

기획·의생명산업연구원 임상연구지원센터



CPT2016-08

검체 인수인계서

Protocol NO	CPT2016-08
Project	건강한 남성 자원자를 대상으로 rifampin이 omeprazole의 상용량 및 microdose 투여 시 약동학에 미치는 효과를 평가하기 위한 공개, 단일 순서 · 교차 임상시험
검체 type	Human Plasma
분주 기간	* 1기 : 2016년 08월 26일(금) ~ 08월 27일(토) * 2기 : 2016년 09월 03일(토) ~ 09월 04일(일)
검체 ID	* OR01 ~ OR06
검체 box 수량	* 1기 Plasma 분석용: 3 box * 1기 Plasma 보관용: 3 box * 2기 Plasma 분석용: 2 box * 2기 Plasma 보관용: 2 box 총 10 box (별첨 1 참고)
검체 vial 수량	* 1기 Plasma 분석용: 132 vial * 1기 Plasma 보관용: 66 vial * 2기 Plasma 분석용: 110 vial * 2기 Plasma 보관용: 55 vial 총 363 vial (별첨 2 참고)
저장 및 운송 조건	: -60°C 이하
특이 사항	* 중도탈락 : OR04_2기_Predose
기타	

상기 시료를 인수 인계합니다.

인계인 소속: 가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터 약물분석실

인계 일시: 2016년 9월 9일 14시 53분

성명: 이민재 (서명)

인수인 소속: 중앙대병원 약학대학

인수 일시: 2016년 9월 9일 14시 53분

성명: 변진희 (서명)

시험 책임자: 이정숙 (서명)

가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터

별첨 1. box 배치



Rifampin, omeprazole

Protocol NO: CPT2016-08

	분식용	보관용
17)	3	2
22)	3	2
	total	10

가톨릭의생명산업연구원 임상연구지원센터

별첨 2. 검체 info



Rifampin, omeprazole

Protocol: CPT2016-08

* Period 1

Random NO: OR01 ~ OR06

PK time	OR01	OR02	OR03	OR04	OR05	OR06
0D_Predose						
0.25 h						
0.5 h						
0.75 h						
1 h						
2 h						
4 h						
6 h						
8 h						
12 h						
24 h						

총 11 point

Period	Type	Plasma		Vial 수
		분석용	보관용	
1		6명 * 11 point * 2 vial		132
		6명 * 11 point * 1 vial		66

* Period 2

Random NO: OR01 ~ OR06

PK time	OR01	OR02	OR03	OR04	OR05	OR06
8D_Predose			증			
0.25 h			도			
0.5 h			탈			
0.75 h			탁			
1 h						
2 h						
4 h						
6 h						
8 h						
12 h						
24 h						

총 11 point

Period	Type	Plasma		Vial 수
		분석용	보관용	
2		5명 * 11 point * 2 vial		110
		5명 * 11 point * 1 vial		55

[첨부] Caffeine 표지화합물제조실시계획서

Protocol No. KP·590

RI 표지화합물제조실시계획서

[1-methyl-¹⁴C]Caffeine

2015년 12 월 22 일
한국표지화합물연구소

총페이지 11

Protocol No. KP-590

제조번호 : KP590
제조화합물이름 : [1-methyl-¹⁴C]Caffeine
제조위탁자 : 카톨릭대학교 산학협력단
제조위탁책임자 : 임동석
제조위탁담당자 : 박갑진
제조위탁표지화합물품질관리자 : 김성훈
제조실시자 : 한국표지화합물연구소
경기도 수원시 영통구 광교로 147(이의동)
경기바이오센터 12 층
제조실시시설 : 한국표지화합물연구소
경기도 수원시 영통구 광교로 147(이의동)
경기바이오센터 12 층
TEL : 031-888-6503 FAX : 031-888-6513
[¹⁴C]표지화합물관리책임자 : 한국표지화합물연구소 신현일
[¹⁴C]표지화합물품질관리책임자 : 한국표지화합물연구소 강진미
[¹⁴C]표지화합물제조관리책임자 : 한국표지화합물연구소 손명건
제조기간 : 제조개시일 2015년 12月 24日
제조종료일 2015年 12月 31日
보고서제출일 2016年 1月 22日

Protocol No. KP-590

제조계획서작성과 승인

제조계획서 작성

[¹⁴C]표지화합물 제조관리책임자 : 한국표지화합물연구소 손명건



2015년 12월 22일

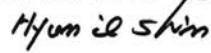
[¹⁴C]표지화합물 품질관리책임자 : 한국표지화합물연구소 강진미



2015년 12월 22일

제조계획서 승인

[¹⁴C]표지화합물 관리책임자 : 한국표지화합물연구소 심현일



2015년 12월 22일

제조위탁자 : 카톨릭대학교 산학협력단
제조위탁책임자 : 임동식

2015년 12월 22일

Protocol No. KP-590

목 차

RI 표지화합물제조설시계획서.....	1
1. 목적	5
2. 제조 사양.....	5
(1) 명칭	5
(2) 구조식	5
(3) 규격	5
(4) 비방사능	5
(5) 제조량	5
(6) 농도	5
(7) 용기	5
(8) 보관 조건	5
(9) 사용기한	6
(10) 반응구조식	6
(11) 원료 및 시약등.....	6
(12) 제조공정	6
(13) 제조 flow	7
(14) 용기자재 :	8
(15) 라벨	8
(16) [1-methyl- ¹⁴ C]Caffeine 의 제조시험과 시험방법	9
(17) 설비세정방법／세정확인.....	10
(18) 제조위생	10
(19) 제조환경	10
(20) 제조. 시험검사시의 주의 사항.....	10
(21) 출하처와 출하량.....	10
3. 필요로 하는 문서	10
4. 폐기물의 처리, 작업자의 실험복 교환, 시설의 청소	11
5. 이상시의 대응.....	11
6. 첨부자료.....	11

Protocol No. KP-590

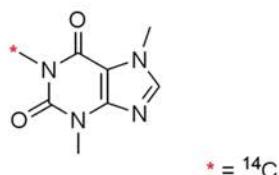
1. 목적

사람을 대상으로 하는 Microdosing 용 RI 표지화합물 [1-methyl-¹⁴C]Caffeine 의 제조를 목적으로 한다.

2. 제조 사양

(1) 명칭: [1-methyl-¹⁴C]Caffeine

(2) 구조식 :



(3) 규격

Test	Specification
Description	Reported Result
Purity	Radiochemical: ≥98%, Chemical: ≥98%
Optical purity	-
Identification	¹ H-NMR, MS, HPLC (UV, radioactivity)

(4) 비방사능 (Specific activity) : > 1,850 MBq/mmol

(5) 제조량 : 37 MBq

(6) 농도 : ~10 µCi/mL in ethaanol

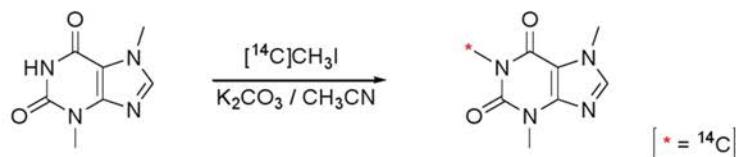
(7) 용기 : 암갈색 vial

(8) 보관 조건: 차광, 냉동보존 (-70°C±10°C)

Protocol No. KP-590

(9) 사용기한 : 안정성시험결과에 기초해서 설정

(10) 반응구조식



(11) 원료 및 시약등

성분	사용 Lot	仕込 み處 方	규격	메이커	사용목 적
[¹⁴ C]CH ₃ I		*	-	한국표지화합물 연구소	제조원료
Theobromine	MKBQ1887V	**	98.5%	Aldrich	시약***
Acetonitrile	SHBG3880V	**	Anhydrous	Aldrich	용제***
Potassium carbonate	MKBW3789V	**	99.99%	Aldrich	시약***
Sodium chloride	2015J1094	**	99.5%	JUNSEI	시약***
Chloroform	2015D2039	**	99%	JUNSEI	용제***
Water	4128-03	**	HPLC grade	J.T.Baker	용제***
Silica gel 1160	1002W	**	40 - 60 μm	Watchers	정제***
Ethyl acetate	2015K2024	**	99.5%	JUNSEI	용제***
Ethanol	SHBG2953V	**	Anhydrous	Aldrich	용제***

*: 한국표지화합물연구소에서 합성한 [¹⁴C]CH₃I 를 제조에 사용한다.

**: 시약,용매등의 사용량은 [¹⁴C]CH₃I 를 사용하는 양에 기초하여 산출하여 결정.

***: 조달은 한국표지화합물연구소에서 담당한다. (새로 구입하여 사용함)

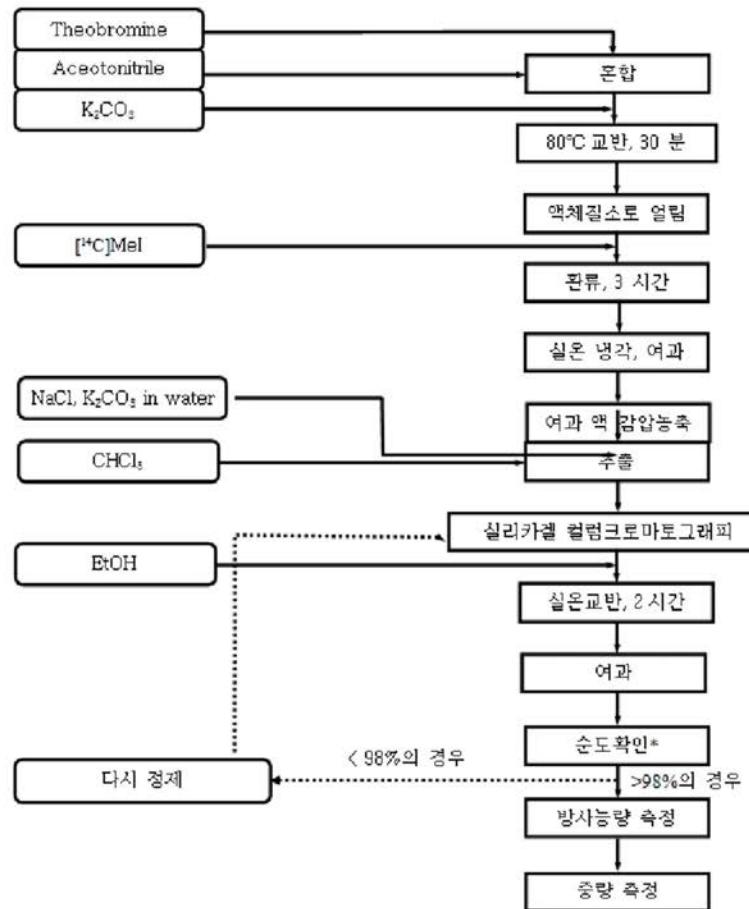
(12) 제조공정

Acetonitrile에 K₂CO₃ 와 theobromine을 가하고 80°C에서 질소대기 하에서 30분간 교반한다. 반응물에 한국표지화합물연구소에서 합성한 [¹⁴C]CH₃I 를 진공 하에서 가하고 3시간 동안 환류 교반한다. 온도를 상온으로 낮추고, 여과하여 여과 액을 농축한다. 농축된 잔사에 NaCl 와 K₂CO₃ 의 수용액을 가하고 chloroform 으로 추출하여 실리카겔 철립 크로마토그래피로 정제하여 농축 건고한다. 건고물을 ethanol 하에 2시간 교반 후 여과하여 [1-methyl-¹⁴C]Caffeine 을 얻는다.

용리 용매의 혼합 비율은 적절히 조정하여 사용한다.

Protocol No. KP-590

(13) 제조 flow



Protocol No. KP-590

* HPLC 분석의 결과가 98% 미만인 경우 그 결과를 위탁자에게 보고하고 양 기관의 협력하여 정제를 결정하고 분해물을 제거한다.

(14) 용기자재 :

한국표지화합물연구소에서 조달하고 적절히 품질을 확인하고 사용한다.

자재	규격	메이커	사용목적
Media bottle	250 mL	-	직접용기
외부용기	180 mm × 95 mm	-	차광포장

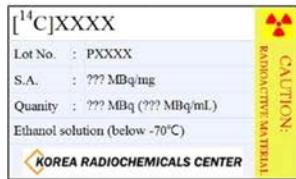
제조한 [1-methyl-¹⁴C]Caffeine 의 발송이 필요한 경우는 외부 용기를 dry ice 가 들어 있는 플라스틱 운반 용기에 넣어 한국표지화합물연구소가 운송한다.

(15) 라벨

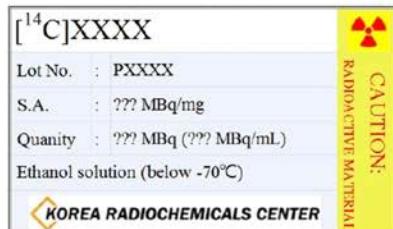
제품에는 별도 카톨릭대학교 의과대학 약리학교실에서 지시한 사항을 기재한 라벨을 작성해서 붙이고 차광, 냉동보관의 위해서 포장한다. 차광용 알루미늄이나 운송용 용기에도 라벨을 붙인다.

라벨 기재사항

① 제품 (Vial) 용



② 외부용기



Protocol No. KP-590

(16) [1-methyl- ^{14}C]Caffeine의 제조시험과 시험방법
제품의 순도, 구조, 비방사능을 시험하고 사양을 만족하는지 확인한다.
각 시험의 조작은 갈색용기를 사용해서 시행한다. 다만 제조한 용액은 알루미늄 호일로
용기를 싸고 차광 보존한다.

- 화학적 순도와 방사화학적 순도: $\geq 98\%$

HPLC 분석조건

* : 초순수를 사용한다.

** : HPLC 을 acetonitrile 를 사용한다.

Protocol No. KP·590

- 구조 : Proton 핵자기공명 스펙트럼과 질량스펙트럼으로 확인한다.

- 비방사능 : 중량법

(17) 설비세정방법 / 세정확인

표지화합물이 직접 접촉하는 용기 (glass, spatula 등)은 다른 화합물이 잔류하지 않는 새로 구입한 것을 사용한다. 사용 후 용기는 재 사용하지 않는다.

(18) 제조위생

- 실험복, 보호구는 한국표지화합물연구소의 규정을 따른다. 다른 화합물을 취급할 때는 실험복, 보호구를 바꾸는 등 작업자에 기인하는 오염을 방지한다.
- 화합물 등으로 오염된 물건 등을 통상 폐기물과 구별해서 모으고 한국표지화합물연구소의 처리 방법에 따라 처리한다.

(19) 제조환경

- 교차 오염을 방지하기 위해 전회에 사용한 잔류물이 없는 세정한 후드내에서 사용한다.
- 적절히 온도 관리가 되는 실험실에서 제조, 시험을 한다.

(20) 제조, 시험검사시의 주의 사항

MSDS 를 참조하고 제조, 시험종사자의 안전을 확보한 후에 작업을 시행한다. 그리고 만약 [1-methyl-¹⁴C]Caffeine 에 접촉을 했을 때는 채빨리 세정하고 오염을 제거한다.

(21) 출하처와 출하량

카톨릭대학교 의과대학 약리학교실에 송부하고 그 내용의 확인을 받는다. 출하가 필요한 시에는 출하를 지시하는 [제품출하보고서]를 수령한 후 제품을 출하한다. 출하량을 카톨릭대학교 의과대학 약리학교실의 지시를 따른다.

3. 필요로 하는 문서

- 표지화합물 GMP 3 인의 지명, 그리고 제조부문, 품질부문의 규정하는 조직도
- 표지화합물제조실시계획서 (명칭는 임의)
- 원료, 자료, 제품의 규격, 시험방법, 시험기록서, 시험성적서
- 제품의 출하를 승인하는 문서
- 사용설비, 기기의 점검, 교정이력
- 제조 담당자, 시험담당자의 교육훈련기록

Protocol No. KP-590

- (7) 시설의 도면 (실험실의 평면)
- (8) 일탈관리, 변경관리에 대한 수순서

또 출하를 하는 경우는 이하의 문서를 작성하고 복사본을 표지화합물에 첨부한다.

- ① GMP declaration
- ② TSE statement
- ③ Certificate of analysis
- ④ Caffeine 의 MSDS
- ⑤ 수령서 (송부처의 수령자의 확인)

그 외 통상 수출, 수입, 통관에 필요한 문서

4. 폐기물의 처리, 작업자의 실험복 교환, 시설의 청소

- (1) 본 제조의 과정에서 발생한 방사성 및 비방사능폐기물을 한국표지화합물연구소의 규정에 따라 적절히 폐기한다.
- (2) [1-methyl-¹⁴C]Caffeine 를 제조할 때는 제조에 필요한 깨끗한 실험복을 사용하고 본 제조에 사용하는 실험복과 타 제품을 제조할 때 사용하는 실험복은 명확히 구분한다.
- (3) [1-methyl-¹⁴C]Caffeine 의 제조에 사용하는 시설은 사용 개시 전에 충분히 청소를 실시하고 제조를 실시한다.

5. 이상시의 대응

본 계획서에 기재하지 않은 예상할 수 없는 사태가 발생하시는 빨리 제조위탁자에게 보고한 후 한국표지화합물연구소가 정한 소정의 방법에 따라 적절히 조치를 취한다.

6. 첨부자료

- ① GMP 조직도

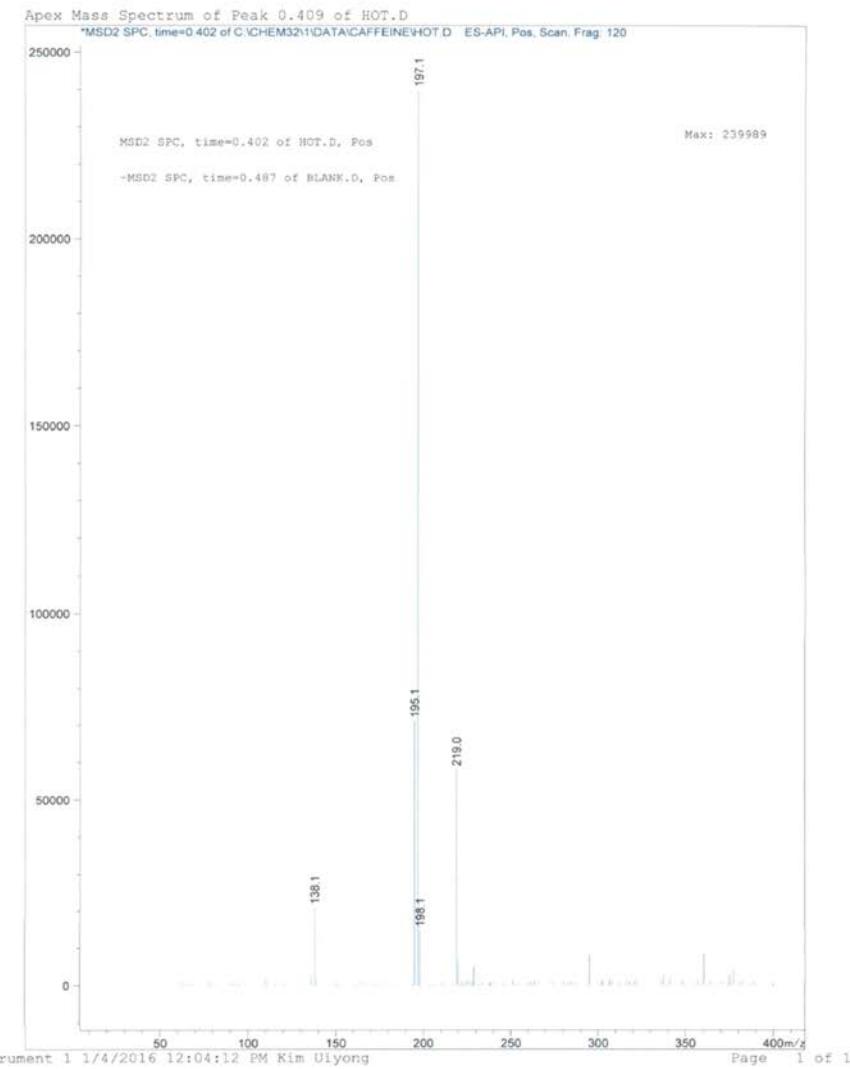
이상

[첨부] Caffeine CoA

Certificate of Analysis



Figure 9. LC/MS Spectrum of [1-methyl-¹⁴C]Caffeine



Korea RadioChemicals Center

12th Floor Gyeong Gi Bio-Center (Jui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

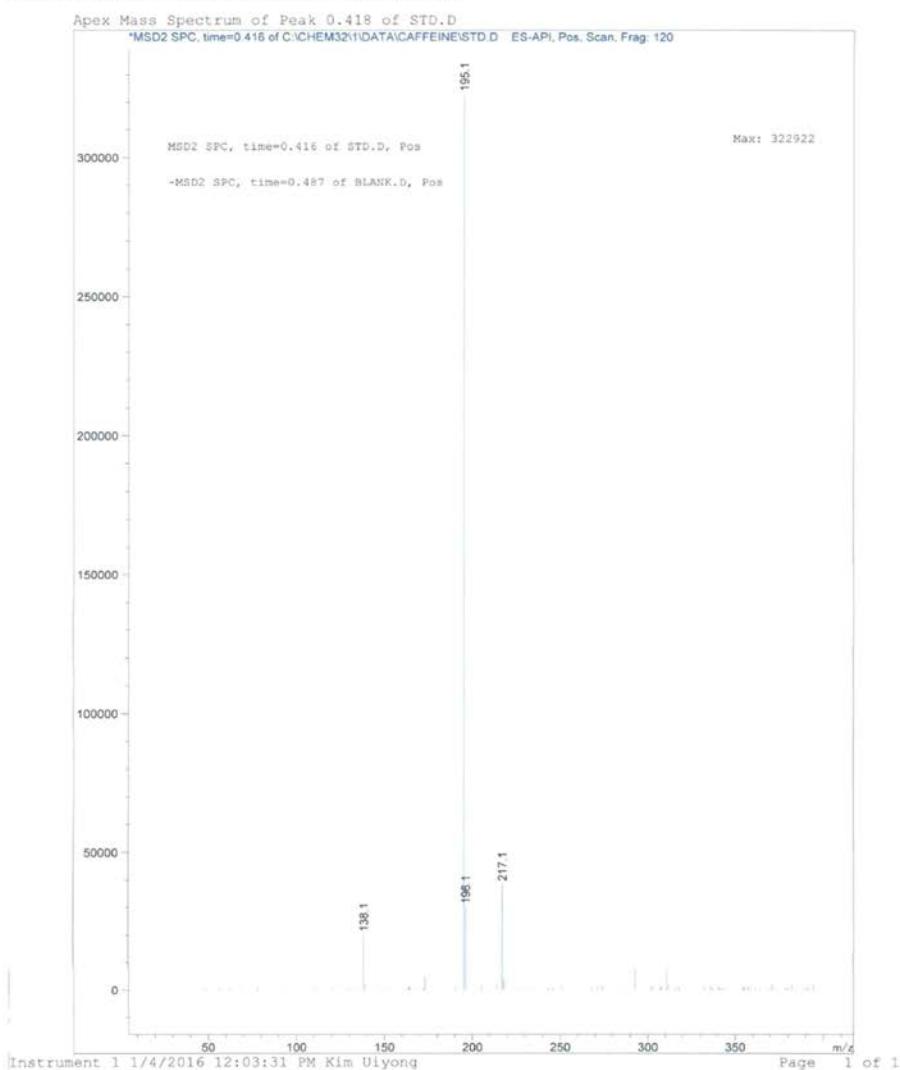
CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



Figure 8. LC/MS Spectrum of Reference Caffeine



Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

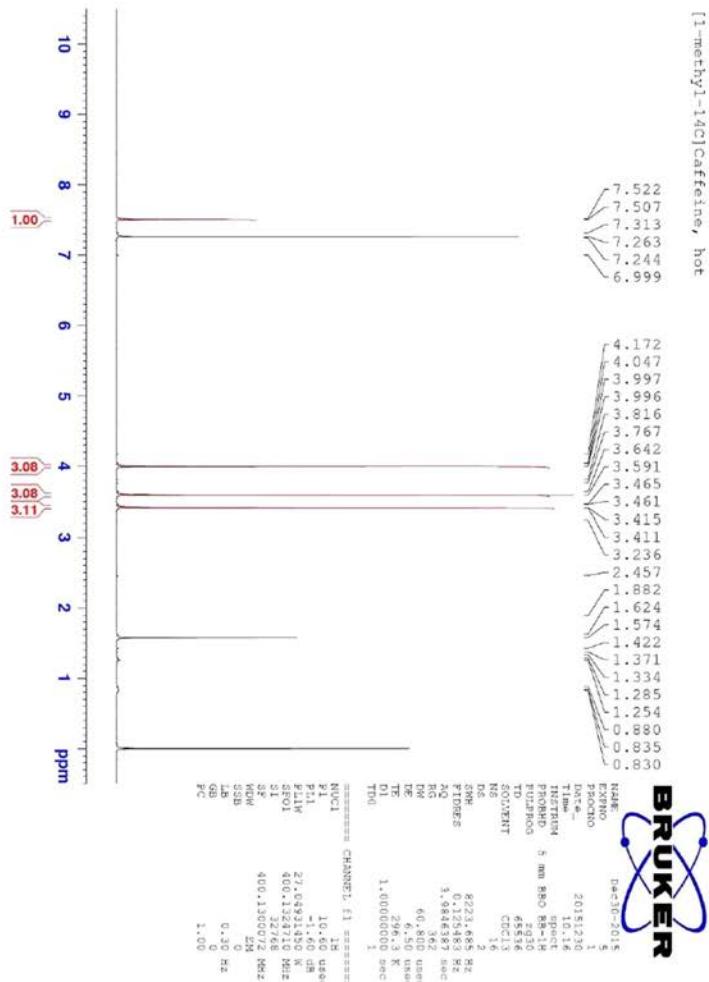
CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



Figure 7. ^1H NMR Spectrum of [1-methyl- ^{14}C]Caffeine



Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270, Republic of Korea.

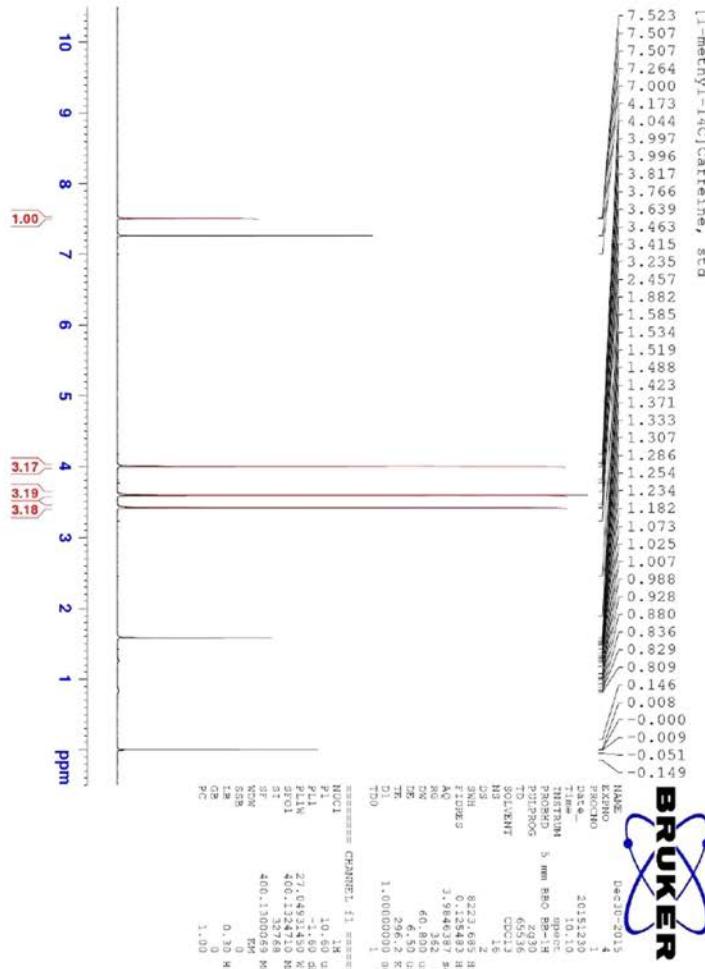
CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



Figure 6. ^1H NMR Spectrum of Reference Caffeine



Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

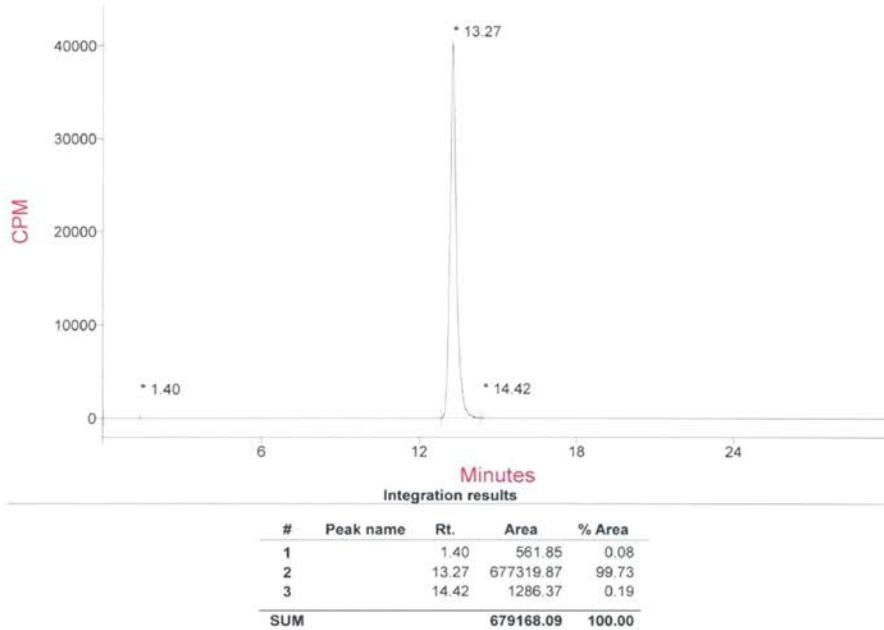
CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



Figure 5. ^{14}C Chromatogram of [1-methyl- ^{14}C]Caffeine



Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

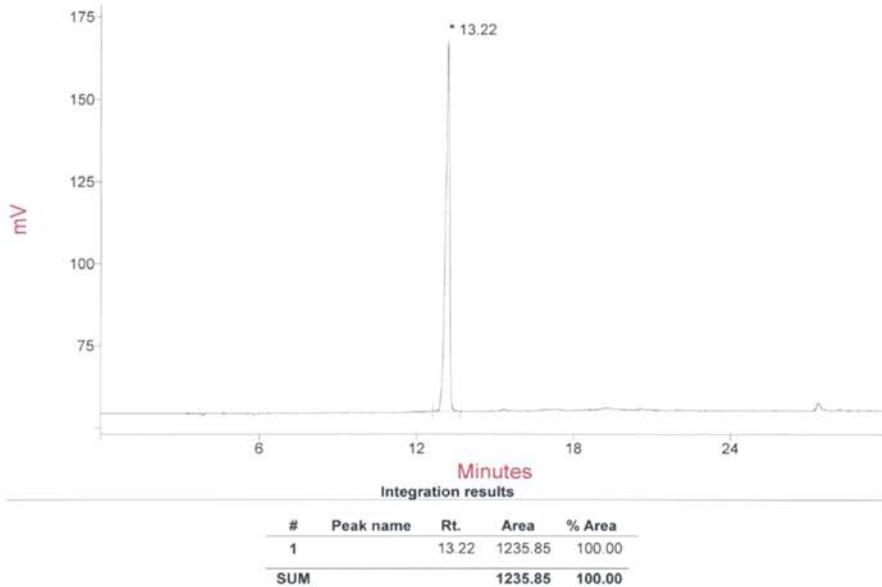
CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



Figure 4. UV Chromatogram of [1-methyl-¹⁴C]Caffeine



Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

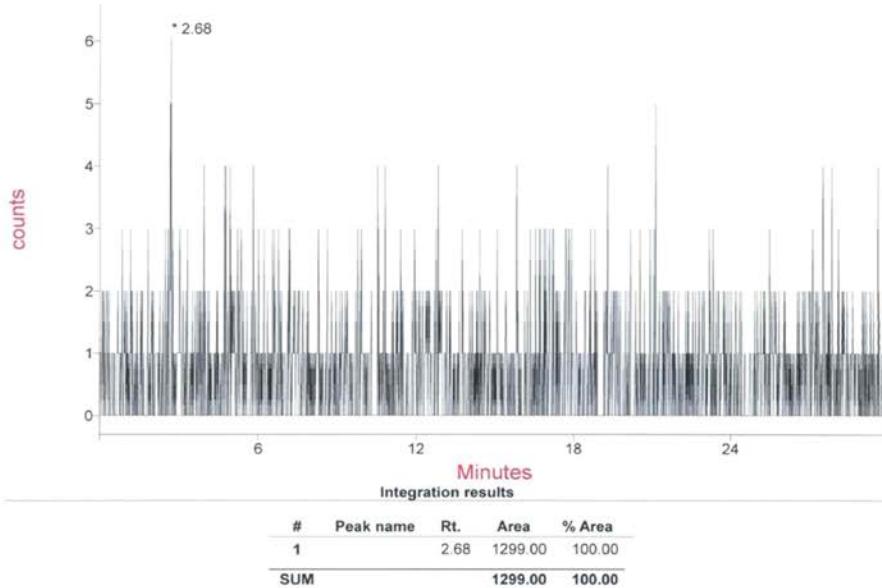
CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



Figure 3. ^{14}C Chromatogram of Reference Caffeine



Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

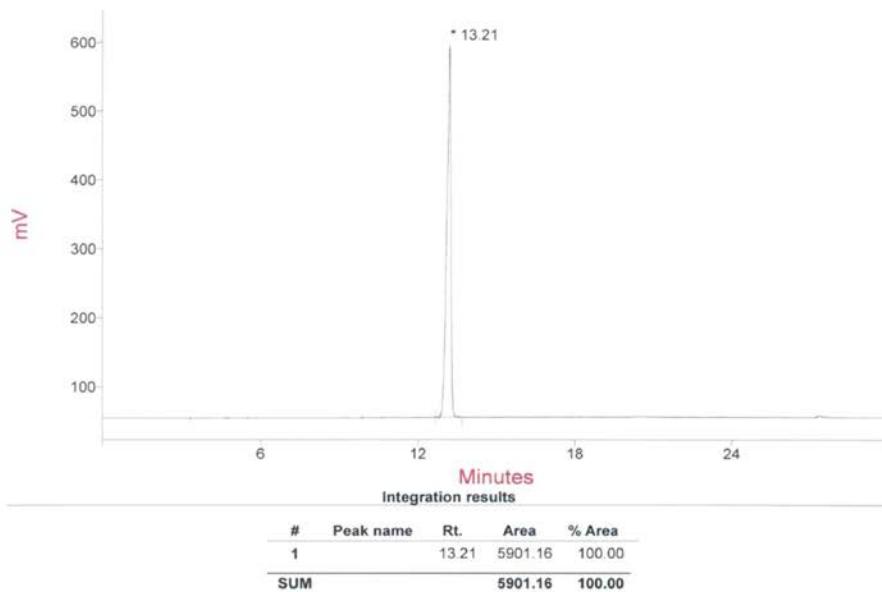
CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



Figure 2. UV Chromatogram of Reference Caffeine



Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

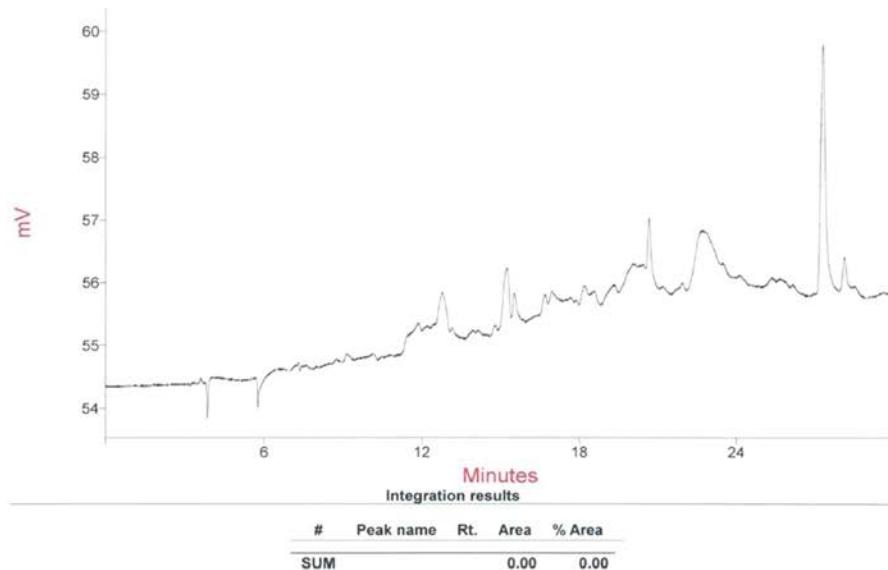
CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



Figure 1. UV Chromatogram of Reference Blank (Ethanol)



Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



LC/MS Method Sheet

LC/MS Condition

[Analytical Condition]

Drying Gas Flow : 8.0 L/min

Drying Gas Temperature : 350 °C

Nebulizer Pressure : 35 psig

Capillary Voltage : 3000 V

Ionization Mode : ESI

Polarity : Positive

Fragmentor Voltage : 120 V

[Equipment and System]

Agilent 6120 Quadrupole LC/MS (Serial No. SG14284105)

Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



NMR Method Sheet

NMR Condition

[Analytical Condition]

Solvent : Chloroform-*d* (Aldrich Lot No. MKBW2477V)

Internal reference : TMS (0.03%)

Temperature : Ambient

[Equipment and System]

Avance II 400 (BRUKER BIOSPIN AG UltraShield) 400MHz

Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



HPLC Method Sheet

HPLC Condition

[Analytical Condition]

KRCC Analytical Reference : KA-093

Column : Gemini-NX C18, 5 μm, 4.6 mm I.D. × 250 mm L
(Serial No. H15-194043 Phenomenex)

Mobil phase :
A: Water
B: Acetonitrile

Solvent Gradient :
Time (min) 0 30
B conc. (%) 0 50

Flow Rate : 1.0 mL/min

RI Detector-Cocktail Flow Rate : 3.0 mL/min

Column Temperature : 30 °C

UV Wavelength : 254 nm

VWD Attenuation : 2000 mAU

Injection Volume of All Samples : 10 μL

Analysis Time : 30 Min

Dissolving Solution : Ethanol

[Equipment and System]

Agilent 1100 Series HPLC system

Degasser: G1322A (Serial No. JPAAJ81624)

Quat Pump: G1311A (Serial No. DE11113596)

ALS: G1329B (Serial No. DEABE01532) Agilent 1260 Infinity

TCC: G1316A (Serial No. DE11119680)

VWD: G1314A (Serial No. JP92112783)

Berthold Radioactivity Monitor LB513 (Serial No. 1175)

Berthold Scintillator Pump: LB5035-3 (Serial No. AAL131400004)

Measuring Cell: Berthold Z-500-4 (Serial No. 6091)

RI Detector-Cocktail: Flo-Scint-II, Perkin Elmer (Lot No. 82-15261)

Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,

Republic of Korea.

CoA Version 1.1

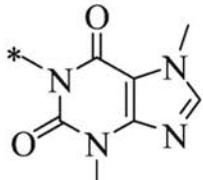
www.krcc.co.kr

Certificate of Analysis



[1-methyl-¹⁴C]Caffeine

Structure, *: ¹⁴C



Project Code :	KP590
KRCC Batch Number :	P1345
Molecular Formula :	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂
Molecular Weight :	194.19
Physical Form :	Ethanol Solution
Recommended Storage Condition :	Below -70°C
Analysis Date :	December 30, 2015

HPLC Analysis

HPLC Condition : Gemini-NX C18, 5 μm, 4.6 mm I.D. × 250 mm L
Chemical Purity : 100%
Radiochemical Purity : 99.73%

NMR Spectroscopic Analysis : Material compatible with proposed structure.

Specific Activity : 8.83 MBq/mg

Total Activity : 37.8 MBq in ethanol 100 mL

January 11, 2016

Byung Do Lee

Prepared by

January 11, 2016

Hyun Il Shin Ph.D.

Approved by

Korea RadioChemicals Center

12th Floor GyeongGi Bio-Center (Iui-dong)147, Gwanggyo-ro, Yeongtong-gu, Suwon-si, Gyeonggi-do, 443-270,
Republic of Korea.

CoA Version 1.1

www.krcc.co.kr

[첨부] Caffeine Study Report

STUDY REPORT

Synthesis of [1-methyl-¹⁴C]Caffeine

January 13, 2016

Korea RadioChemicals Center

Number of Total Pages: 22

Study Number : KP590
Product Number : P1345
Study Title : Synthesis of [1-methyl-¹⁴C]Caffeine
Sponsor : Gap Jin Park
The Catholic University of Korea
Seoul St. Mary's Hospital
222, Banpo-daero, Seocho-gu, Seoul 06591,
Korea
Testing Facility : Korea RadioChemicals Center (KRCC)
12th Floor Gyeonggi Bio-Center, 147
Gwanggyo-ro (Iui-dong), Yeongtong-gu, Suwon,
Gyeonggi-do 16229, Korea
Quality Administrator : Hyun Il Shin, Ph. D.
Manufacturing Control Manager : Myung Gun Son
Manufacturing Supervisor : Eun Jin Seo
Manufacturing Specialist : Yong Wan Seo
Storage Manager for RI : Do Kyung Ryu
Quality Control Manager : Jin Mi Kang
QC Operator : Byung Do Lee
QC Operator : Ui Yong Kim
Study Period : Date Study Initiated December 22, 2015
Date Synthesis Completed December 30, 2015
Date Study Completed January 13, 2016

This study report was prepared based on the results from the study conducted in our facility.

Myung Gun Son
Manufacturing Control Manager

January 13, 2016

X Son Myung-gum

Jin Mi Kang
Quality Control Manager

January 13, 2016

X Kang Jin-mi

Hyun Il Shin, Ph. D.
Quality Administrator

January 13, 2016

X Hyun ilshin

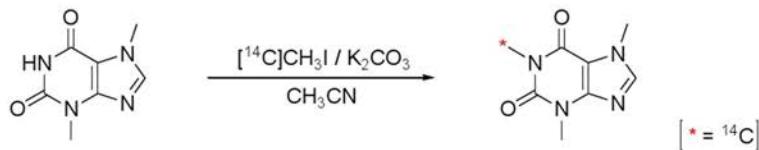
Table of Contents

	Page
1. Objective	5
2. Reaction Scheme	5
3. Material	5
3.1 Labeled Compound	5
4. Synthesis Procedure	5
4.1 Synthesis of [1-methyl- ¹⁴ C]Caffeine	5
5. Specific Radioactivity	6
6. Radiochemical Purity	6
7. Identification of compounds.....	6
8. Packages	7
9. Storage Condition.....	7
10. Appendix (COA and Reagents & Instruments List).....	7

1. Objective

[1-methyl-¹⁴C]Caffeine was synthesized according to the scheme shown below and the result is reported.

2. Reaction Scheme



3. Material

3.1 Labeled Compound

$[^{14}\text{C}]\text{CH}_3\text{I}$ as a labeled raw material was synthesized at KRCC.

4. Synthesis Procedure

4.1 Synthesis of [1-methyl-¹⁴C]Caffeine

To a suspension of theobromine (64.8 mg, 360 μmol) in acetonitrile (3.0 mL) was added potassium carbonate (54.4 mg, 394 μmol) at room temperature and the mixture was stirred at 80°C for 30 min and cooled to room temperature. To the mixture was added [¹⁴C]iodomethane (46.0 mg) through manifold and the mixture was refluxed for 3 h and cooled to room temperature. The mixture was filtered and washed with acetonitrile (10 mL). The filtrate was concentrated and the residue was dissolved in an aqueous solution [potassium carbonate (13.7 mg) and sodium chloride (110 mg) in water (25 mL)]. The aqueous layer was extracted with chloroform (25 mL \times 3) and the combined organic layers were concentrated. The residue was purified by column chromatography [Silica gel, ethyl acetate] to give crude [1-methyl-¹⁴C]Caffeine (184.8 MBq). To the crude [1-methyl-¹⁴C]Caffeine (185 MBq) was added ethanol (750 μL) and the mixture was stirred at room temperature for 2 h. The resulting solid was filtered, washed with ethanol (100 μL), and dried *in vacuo* at room temperature for 17 h to give [1-methyl-¹⁴C]Caffeine (101 MBq, 11.4 mg, 58.7 μmol).

5. Specific Radioactivity

The specific radioactivity of [1-methyl-¹⁴C]Caffeine (Lot No. P1345) was 8.83 MBq/mg as determined by microgravimetric assay.

6. Radiochemical Purity

The radiochemical purity of [1-methyl-¹⁴C]caffeine (Lot No. P1345) was 99.7 % as determined by radioisotope detection HPLC (radio-HPLC) under the following conditions.

Radio-HPLC Analytical Conditions

Column	:	Gemini-NX C18, 5 μm, 4.6 mm I.D. × 250 mm L
Mobile phase	:	A) Water B) Acetonitrile
Gradient	:	Time (min) 0 30 B conc. (%) 0 50
Flow rate	:	1.0 mL/min
Column temp.	:	30°C
Detection	:	UV 254 nm and Radioactivity
Analysis time	:	30 min

7. Identification of compounds

[1-methyl-¹⁴C]Caffeine (Lot No. P1345) and unlabeled caffeine were analyzed by Mass spectrometer (MS) and Fourier Transform proton nuclear magnetic resonance spectroscopy (¹H-NMR) under the conditions shown below.

[1-methyl-¹⁴C]Caffeine (Lot No. P1345) was confirmed by comparing with the spectrum of the unlabeled caffeine

MS Analytical Conditions

Instrument	:	6120 Quadrupole LC/MS (Agilent)
Drying Gas Flow	:	8.0 L/min
Drying Gas Temperature	:	350°C
Nebulizer Pressure	:	35 psig
Capillary Voltage	:	3000 V
Ionization Mode	:	ESI
Polarity	:	Positive
Fragmentor Voltage	:	120 V

NMR Analytical Conditions

Instrument : Avance II 400 (BRUKER BIOSPIN AG UltraShield)
Resolution : 400 MHz
Temperature : Ambient
Solvent : Chloroform-*d* (Aldrich)
Internal reference : Tetramethylsilane (0.03%)

8. Packages

[1-methyl-¹⁴C]Caffeine (Lot No. P1345): Ethanol solution (378 kBq/mL)
Total 101 MBq : 37.8 MBq × 1, 63.6 MBq × 1

9. Storage Condition

[1-methyl-¹⁴C]Caffeine (Lot No. P1345) packed in screw-caped bottles filled with nitrogen gas was stored below -70°C ± 10°C protected from light.

10. Appendix (COA and Reagents & Instruments List)

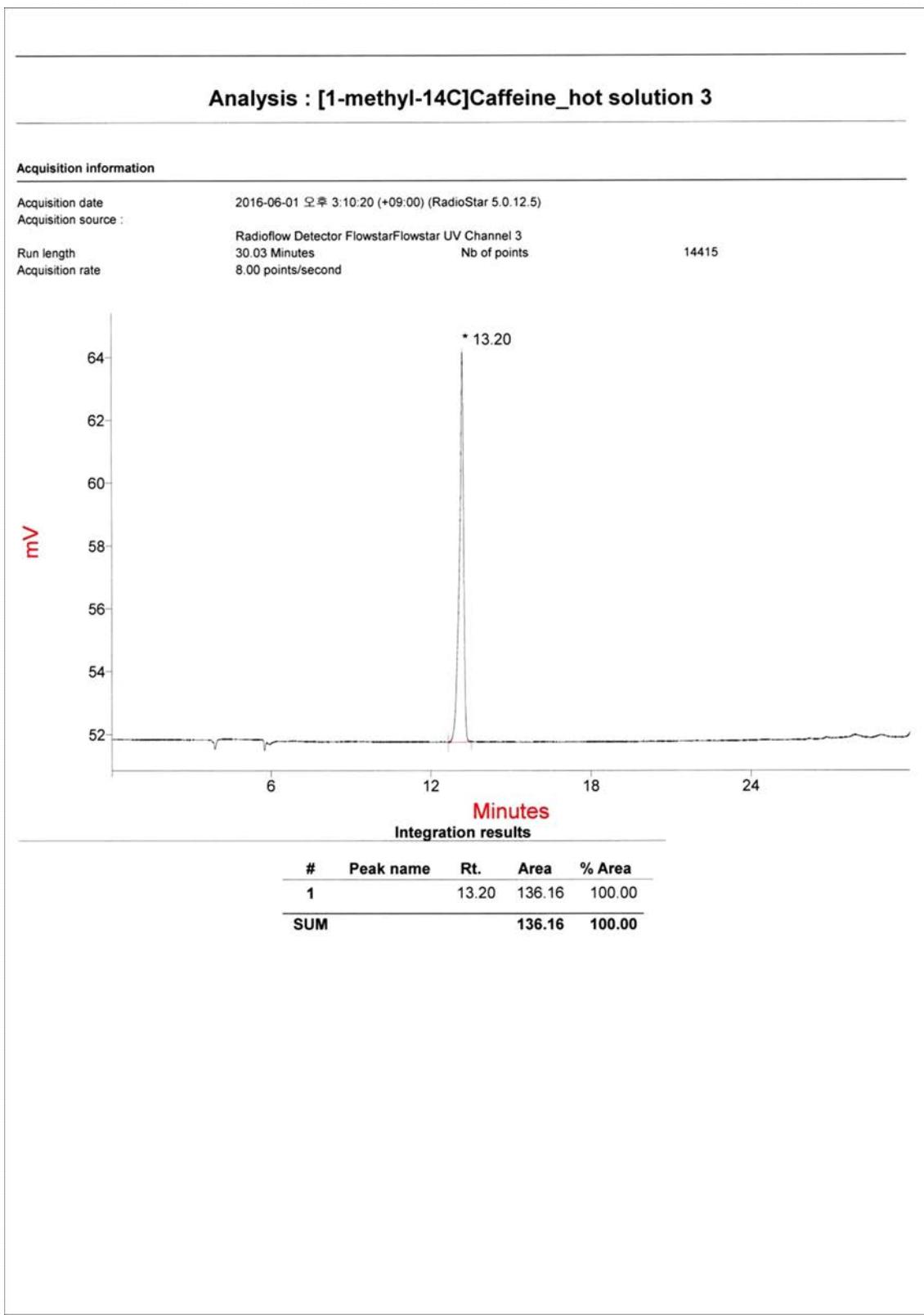
Korea Radio Chemicals Center Co., Ltd.

[1-methyl-¹⁴C]Caffeine**2. Instruments and Apparatuses**

	Equipment	Manufacture	Model	Serial No.	Intended Purpose	Calibration, Maintenance Records or Specification
	Degasser	Agilent	1100 series HPLC system	JPAAJ81624	Purity Analysis	Yes
	QuaPump	Agilent	1100 series HPLC system	DE11113596	Purity Analysis	Yes
	ALS	Agilent	1260 series HPLC system	DEABE01532	Purity Analysis	Yes
	TCC	Agilent	1100 series HPLC system	DE11119680	Purity Analysis	Yes
	VWD	Agilent	1100 series HPLC system	JP92112783	Purity Analysis	Yes
HPLC	Radioactivity Monitor	Berthold	LB513	1175	Purity Analysis	Yes
	Scintillator Pump	Berthold	LB5035-3	AAL131400004	Purity Analysis	Yes
	Measuring Cell	Berthold	Z-500-4	6091		
	HPLC Column (1)	Phenomenex	Gemini-NX C18, 5 μm, 4.6 mm I.D. × 250 mm L'	H15-194043	Purity Analysis	No
	RI Detector-Cocktail	Perkin Elmer	FLO-SCINT II	82-15261	Purity Analysis	No
	Degasser	Agilent	1200 series HPLC system	JP93572375	Mass Analysis	Yes
	Qua Pump	Agilent	1200 series HPLC system	DE62972172	Mass Analysis	Yes
	ALS	Agilent	1260 series HPLC system	DEABE01499	Mass Analysis	Yes
LC/MS	TCC	Agilent	1200 series HPLC system	DE90377573	Mass Analysis	Yes
	VWD	Agilent	1200 series HPLC system	DE60561344	Mass Analysis	Yes
	Quadrupole LC/MS	Agilent	6120 series	SG14284105	Mass Analysis	Yes
LC/MS	Nitrogen Generator	GAS	PEAK	N118LA	A14-08-074	Mass Analysis
Balance	Micro Balance	METTLER TOLEDO	AB204-S	1120021238	Specific Radioactivity Determination	Yes
Balance	Micro Balance	METTLER TOLEDO	GB3002	1118023871	Specific Radioactivity Determination	Yes
LSC	Liquid Scintillation Counter	Perkin Elmer	Tri-Carb 2910 TR	DG11107033	Counting of Radioactivity	Yes

Instruments and apparatuses in this table are used in Korea RadioChemicals Center.

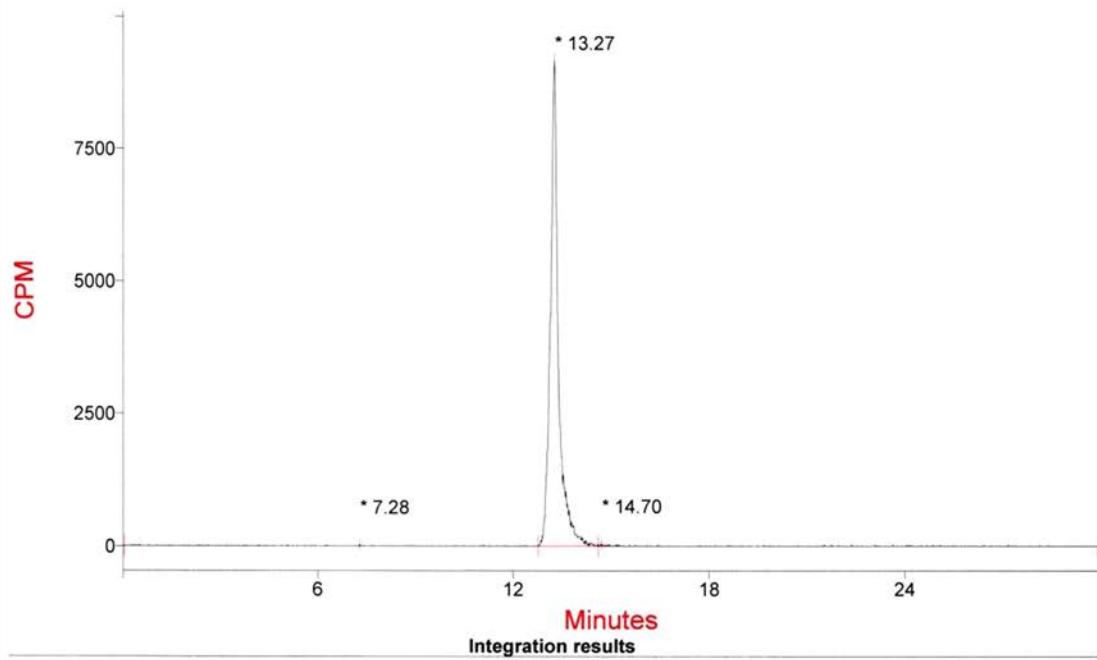
[첨부] Caffeine Stability test



Analysis : [1-methyl-14C]Caffeine_hot solution 3

Acquisition information

Acquisition date 2016-06-01 오후 3:10:20 (+09:00) (RadioStar 5.0.12.5)
Acquisition source : Radioflow Detector FlowstarFlowstar Channel 1
Run length 30.00 Minutes Nb of points 1801
Acquisition rate 1.00 points/second



Integration results

#	Peak name	Rt.	Area	% Area
1		7.28	603.53	0.38
2		13.27	156733.83	98.87
3		14.70	1189.73	0.75
SUM			158527.08	100.00

주 의

1. 이 보고서는 보건복지부에서 시행한 임상연구인프라조성사업(임상시험글로벌선도센터)의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 보건복지부에서 시행한 임상연구인프라조성사업(임상시험글로벌선도센터)의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.