

## 인체 간 microsome에서 pentoxifylline 대사체 M-1의 시험관내 대사

신 혜 순<sup>#</sup>

덕성여자대학교 약학대학

(Received September 6, 1999)

### *In vitro* Metabolism of Pentoxifylline Metabolite M-1 in Human Liver Microsomes

Hea Soon Shin<sup>#</sup>

College of Pharmacy, Duksung Women's University, Seoul 132-714, Korea

**Abstract** — The metabolism and pharmacokinetics of M-1, which is metabolite of pentoxifylline, have been studied in human liver microsomes. Biphasic kinetics was observed from the Eadie-Hofstee plot for the formation of both metabolites of M-1. For the kinetics of pentoxifylline, mean values of  $V_{max1}$  and  $V_{max2}$  were 1.648 and 5.622 nmol/min/mg protein, and the estimated values of  $K_{m1}$  and  $K_{m2}$  were 0.180 and 4.829 mM, respectively. For M-3, mean values of  $V_{max1}$  and  $V_{max2}$  were 0.062 and 0.491 nmol/min/mg protein, and estimated values of  $K_{m1}$  and  $K_{m2}$  were 0.025 and 1.216 mM. The formations of pentoxifylline and M-3 from M-1 were identified by using several selective inhibitors of cytochrome P450 isoforms at 0.05-5 mM concentration of M-1 in human liver microsomes. For the analysis of low (0.05 mM) concentration of M-1, where the affinity was expected as low, indicated that CYP1A2 and CYP3A4 were major P450 isoforms responsible for pentoxifylline and M-3 formation. CYP3A4 and CYP2A6 appeared to be P450 isoforms responsible for M-3 formation at high (5 mM) concentration of M-1.

**Keywords** □ Pentoxifylline, pharmacokinetics, cytochrome P450 isozymes.

간혈성 파행증의 치료제로 소개된 pentoxifylline은 조혈제로서,<sup>1,2)</sup> 당뇨병의 혈관성 합병증 치료효과나 tumor necrosis factor- $\alpha$  차단에 의한 알킬화제 (alkylating agent) 유형의 항종양 효과가 입증되고 AIDS 질환에 따른 신체 위축증에 유효하다는 보고가 발표되는 등 연구가 활발히 이루어져왔다.<sup>3-6)</sup> 그리고 1990년 초부터는 골수이식 수술 후 회복을 돕는 효과와 암치료시 투여되는 화학요법제로 인한, 체내 장기에 미치는 독성을 예방하는 효과로 인하여 많은 관심이 집중되었다.<sup>7-9)</sup> 이러한 pentoxifylline은 임상적으로 800~1600 mg/kg/day로까지 투여되는데, 과량투여시 위장관과 심혈관계나 중추신경계 등에 나타나는 부작용

용이나 cimetidine과 같은 다른 약물과의 상호작용 등이 문제점으로 지적된 바 있다.<sup>3,10)</sup> 한편 이 약물은 M-1(R형 및 S형)으로 산화 대사되며, 이 대사체들은 가역적인 반응에 의하여 다시 pentoxifylline을 형성하기도 한다.<sup>9)</sup> 본 연구에서는 상대적으로 효과가 훨씬 탁월한 R형에 국한하여 연구를 수행하였으며, 이하 M-1이라 함은 R형을 의미한다(Fig. 1).

Pentoxifylline에 관한 연구가 진행되는 동안 그 대사체인 M-1의 효과가 훨씬 탁월함이 발견되어, M-1은 CT-1501R 또는 lysofylline이라고도 알려졌으며 고용량 화학요법제의 투여로 인한 합병증 예방제로 보고되어 신약개발을 위한 연구들이 활발히 진행중에 있다.<sup>11-13)</sup> 이 화합물은 pentoxifylline의 강력한 활성형 대사체로서 장기이식 수술 후에 수반되는 전신성 염증반응의 치료나 골수이식 수술 후의 회복면에서는 pentoxifylline

<sup>#</sup> 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
(전화) 02-901-8498 (팩스) 02-901-8386

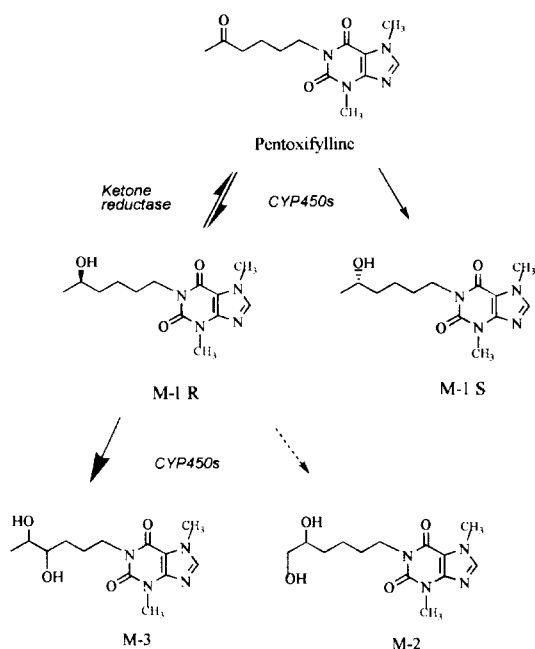


Fig. 1 - Metabolic pathway of pentoxifylline and M-1 in human liver microsomes.

보다 강한 효과를 보였다.<sup>14-16)</sup>

M-1은 lysophosphatidic acid에서 phosphatidic acid로 전환되는 반응을 관여하는 효소인 lysophosphatidic acid acyltransferase의 활성을 저해하여 항염 작용을 나타내는 것으로 알려져 있다. 그리고 이 약물은 hypoxia 상태에서도 tumor necrosis factor- $\alpha$ 와 interleukin-1 $\beta$  등을 동시에 차단함으로써 mRNA 생성의 억제제로 작용하는 항암효과도 관찰되었다. 또한 백혈구 응집을 억제하고 혈소판에는 영향을 미치지 않는 백혈병 치료효과도 보고되어 신약개발로의 중요성이 한층 증대되고 있다.<sup>12,14)</sup>

Lillibridge등의 보고에 의하면 pentoxifylline의 대사 과정에서는 M-1이 pentoxifylline의 주 대사체이며, M-1의 대사과정에서는 pentoxifylline이 M-1의 prodrug임과 동시에 internal diol형인 M-3로 대사되는 것으로 알려져 있다(Fig. 1).<sup>13,17)</sup> M-1으로부터 pentoxifylline 형성반응의 cytochrome P450 효소규명에 관하여는 Lee등이 보고하였는데, M-1에서 주로 전환되는 M-3 형성반응과의 상관성 등에 관하여는 연구되어지지 않았다.<sup>18)</sup>

따라서 본 연구에서는 간 microsome내에서 M-1이

pentoxifylline과 M-3로 전환되는 대사과정에 관한 약동력학적(pharmacokinetic) 연구로서 enzyme kinetic 특성을 파악하고 cytochrome P450 isozyme을 규명하여 체내 약물동태를 예측하고자 하였다. 이와 더불어 주어진 M-1 농도에서 pentoxifylline 형성반응과 M-3 형성반응 대사 비율이 어떻게 다른지도 함께 연구해 보고자 하였다. 또한, 주어진 M-1 농도에서 pentoxifylline과 M-3 형성반응에 관한 대사과정을 관여하는 cytochrome P450 isoform을 규명해 보고자 하였다.

### 실험방법

**시약 및 재료** - M-1 및 그외 대사체들은 Cell Therapeutics(Seattle, WA, USA)에서 기증받아서 사용하였고 pentoxifylline과 cytochrome P450 효소제해 실험에 사용되는 tolbutamide, diethyldithiocarbamate, sulfaphenazole, coumarin, quinidine, troleandomycin, orphenadrine, 1-aminobenzotriazole 및 배양실험에 조효소로 쓰이는 NADPH는 Sigma Chemical(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 대사체들의 농도분석을 위한 내부 표준물질(internal standard)로 사용한 7-(2'-chloroethyl)-theophylline은 ICN Pharmaceuticals(Costa Mesa, CA, USA)로부터 구입하였다. HPLC 분석용 용매들은 optima grade급으로서 Fisher Chemical(Santa Clara, CA, USA)에서 구입하여 사용하였고 그 외의 시약들도 실험용 일급을 사용하였다.

**간 microsome의 제조** - 미 Washington대의 human liver bank에서 35세이상 남성 간조직을 제공받아 재료로 이용하였다. 냉동된 간조직을 100 mM 인산염 완충액(pH 7.4)으로 균질화한 후 원심분리기에서 12,500 g로 25분간, 이어서 110,000 g로 1시간동안 원심분리하는 방법으로 cytosol과 microsome을 분리하였고 microsome pellet은 1 mM 농도의 EDTA를 혼합하여 제조한 100 mM의 인산염 완충액(pH 7.4)으로 현탁시켰다. 제조한 microsome은 1회 사용량으로 분리하여 -80°C로 보관하면서 사용하였다.<sup>19)</sup> Microsome 단백질의 정량은 Bradford 분석법에 따라<sup>20)</sup> bovine serum albumin을 표준물질로 사용하고 단백질의 염색 시약으로는 Bio-Rad(Oakland, CA, USA)제품을 이용하였다.

**Microsome의 배양** - M-1으로부터 pentoxifylline과 M-3를 형성하는 대사과정에 대하여 시간경과 또는 농도에 따른 대사속도와외의 선형관계를 얻기 위한 기본실험을 선행하여 최적의 배양실험 조건을 설정하였다. 기질로 설정한 M-1의 농도 범위는 0.05~5 mM이었고 microsome 단백질의 농도는 2 mg/ml이었으며 배양액의 총량은 0.5 ml로 정하였다. 인산염 완충액(pH 7.4)을 만들어서 사용하였고, 37°C로 고정시킨 진탕 배양기에서의 최적 전배양시간은 15초간이었다. 조효소로 작용하는 NADPH를 1 mM이 되도록 가함으로써 반응을 시작하였으며 최적의 배양시간은 10분간이었고 3N-TCA 50  $\mu$ l를 가함으로써 반응을 정지시켰다.

각 5종(UWHL-130, 135, 141, 142 및 144)의 간 시료에서 제조한 microsome과 0.05, 0.5 및 5 mM 농도의 M-1을 함께 배양하여, M-1에 대한 pentoxifylline과 M-3의 상대분율(relative fraction)을 측정하였다. 즉, pentoxifylline과 M-3의 대사체 형성속도의 합계에 대한 각 대사체의 형성속도를 계산하였다. 배양실험의 결과에서 상대적으로 대사체 형성속도가 미미한 대사체의 작은 수치는 무시하였다. 이와 같은 배양실험은 모두 3회씩 반복하여 수행하였다.

배양실험의 결과로부터, 용량 의존적인 비선형 약물 동태를 해석하기 위한 Michaelis-Menten 식을 이용하여 다음과 같이 표현하였다.

$$v = \frac{V_{max1} \cdot S}{K_{m1} + S} + \frac{V_{max2} \cdot S}{K_{m2} + S}$$

약동력학적 해석에 있어서 핵심적인 파라미터인 최대 약물대사 속도  $V_{max}$ 와 Michaelis-Menten 정수  $K_m$ 을 산출하기 위하여 Win-Nonlin 프로그램(Scientific Consulting, Apex, NC, USA)을 사용하였다.

**Cytochrome P450 효소저해** - 간 microsome내 M-1의 대사과정에서 pentoxifylline과 M-3의 형성반응에 관여하는 효소를 알아내기 위한 효소저해 실험에서는 cytochrome P450 효소들의 선택적 화학저해제(selective chemical inhibitor)를 투여하였다. 각 CYP450 효소에 선택적인 화학저해제들과 그 최적 농도를 열거하면 다음과 같다. CYP1A2에 선택적인 저해제인 furafylline은 30  $\mu$ M로,<sup>21)</sup> CYP2A6에 선택적인 저해제인 coumarin은 8  $\mu$ M로,<sup>22)</sup> CYP2B6/2C/3A에 선택적인 저해제인 orphenadrine은 300  $\mu$ M로,<sup>23)</sup> CYP2C8/9/10에 선택적인 저해제인 tolbutamide은

400  $\mu$ M로,<sup>22)</sup> CYP2C9에 선택적인 저해제인 sulfaphenazole은 10  $\mu$ M로,<sup>21)</sup> CYP2D6에 선택적인 저해제인 quinidine sulfate는 1  $\mu$ M로,<sup>21)</sup> CYP2E1에 선택적인 저해제인 diethylthiocarbamate는 100  $\mu$ M로,<sup>24)</sup> CYP3A4에 선택적인 저해제인 troleandomycin은 40  $\mu$ M로,<sup>25)</sup> CYP2C19에 선택적인 저해제인 (S)-mephenytoin은 200  $\mu$ M로,<sup>25)</sup> CYP450 효소전반에 저해작용을 미치는 1-aminobenzotriazole은 1 mM로<sup>26)</sup> 농도를 조절하여 실험에 사용하였다. Coumarin, sulfaphenazole, tolbutamide, quinidine, troleandomycin 및 1-aminobenzotriazole 등은 수용액으로 적합하지 않으므로 methanol에 용해시켜 사용하였다. 이 때 용매로 사용하였던 methanol은 55°C의 수조에 고정시키고 질소가스를 통하여 증발 농축시킨 후, microsome 배양시와 같은 실험방법으로 배양하여 cytochrome P450 효소저해 실험을 수행하였다. Furafylline, troleandomycin, diethylthiocarbamate, orphenadrine 및 1-aminobenzotriazole 등은 비가역적 저해제이므로 microsome과 NADPH와 함께 37°C에서 15분간 전배양시킨 후 M-1(0.05, 0.5, 5 mM)을 첨가하는 방법으로 저해반응을 시작하였다.

모든 배양실험은 3회씩 반복해서 실행하였으며 효소저해 실험결과는 저해제를 투여하지 않은 약물효과를 기준하여 이에 대한 저해제를 투여한 반응의 약물효과 비율로 나타내었다.

**대사체들의 농도 분석** - 간 microsome내 M-1의 대사에서 pentoxifylline과 M-3 형성반응의 농도분석을 위하여 HPLC를 사용하여 실험을 진행하였다. 먼저, 반응이 완료된 각 배양액에 methylene chloride를 6 ml 가하여 시료성분을 추출해 내었다. 내부 표준물질인 7-(2'-chloroethyl) theophylline은 100 mM 인산염 완충액(pH 7.4)에 용해시켜서 각 배양액에 5  $\mu$ g/ml로 가하고 대사체 농도분석의 기준으로 사용하였다.<sup>21)</sup> 배양액은 진탕기에서 10분간 혼합한 후 3,000g로 10분간 원심분리하였다. 배양액의 수층은 aspirator로 제거하고, 유층을 새로운 시험관에 옮긴 후에 55°C의 항온 수조에서 질소가스를 통하면서 증발 농축시켰다. 건조된 시료는 methanol 30  $\mu$ l와 25 mM 인산염 완충액(pH 3.0) 70  $\mu$ l를 가하여 용해시켰다. 이 실험단계에서 고농도의 단백질 침전이 생기는 경우에는 침전물이 들어있는 시험관을 12,000g로 5분간 원심분리한 후 완충액을 충전하였다. 재충진된 시료들은 HPLC

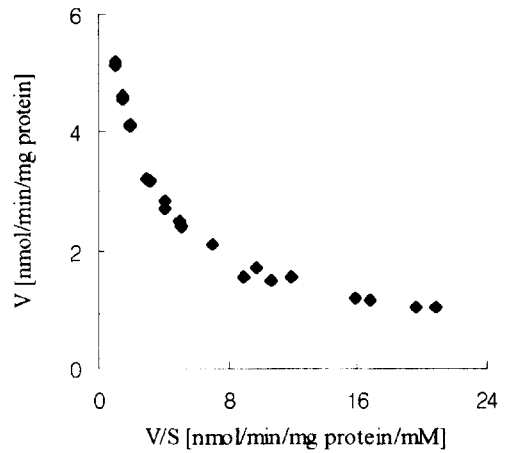
system에 25  $\mu$ 씩을 주입하였다. 이동상의 최적 조성으로는 완충액의 pH가 감소함에 따라 대사체의 형성 비율이 두드러지게 증가되는 결과를 보였기 때문에 pH 3.0으로 낮추고, methanol과 25 mM 인산염 완충액(0.25% acetate 혼합액)을 3대 7의 비율로 조절하였다.

HPLC의 기기조건으로서 이동상의 농도구배를 위하여 HP-1050(Hewlett-Packard Co.)를 사용하였고, Zorbax C<sub>8</sub> 5  $\mu$ M 4.6 $\times$ 250 mm 컬럼을 이용하였다. 이동상으로서 25 mM 인산염 완충액(0.25% acetate 혼합액)과 methanol을 혼합하여 사용하였으며, 대사체 성분의 피이크가 분리되는 시간에 따라 혼합비율을 조절하였다. 완충액과 methanol의 혼합비율을 0~10분 동안은 75대 25로, 10~20분 사이에는 70대 30으로, 20~25분에서는 65대 35로, 25-30분에는 60대 40의 비율로 점차 농도 구배를 조정하였다. 컬럼을 통과하는 유속은 0.9 ml/min으로 고정하였으며 UV spectrophotometer는 273 nm로 파장( $\lambda$ )을 고정시켰다. 피이크 검출시간은 M-3는 10.5분, pentoxifylline은 21.2분, M-1은 22.7분 그리고 내부 표준물질은 16.8분이었다. HPLC 분석에서 pentoxifylline과 M-3의 정량한계는 0.01  $\mu$ M과 0.02  $\mu$ M이었으며 대사체들의 농도계산은 내부 표준물질과의 피이크 면적비로부터 산출하였다.

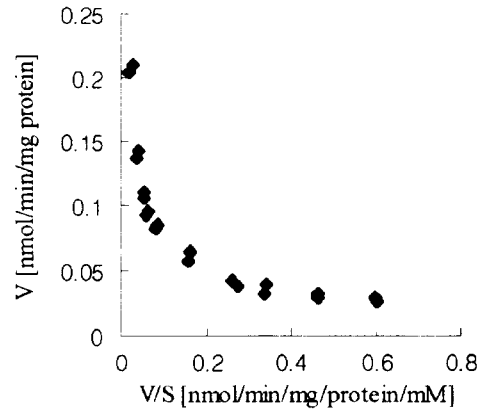
**실험결과**

M-1이 간 microsome내에서 pentoxifylline과 M-3로 전환되는 반응을 5종(UWHL-130, 135, 141, 142 및 144)의 인체 간 시료를 대상으로 측정해 보았으며, 측정결과의 대표적인 예로서 동일한 HL-130 시료에 대한 pentoxifylline과 M-3 형성반응의 결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 Eadie-Hofstee 그래프로 각각 나타내었다. Michaelis-Menten kinetic 형태로서  $K_m$ 이 작은 저농도 영역에서는 기울기가 급하고,  $K_m$ 이 큰 고농도 영역에서는 기울기가 완만한 biphasic curve 결과를 보였다.

약동력학적 동태를 조사하기 위해서 4종(UWHL-135, 141, 142 및 144)의 인체 간 시료에 대한 pentoxifylline과 M-3 형성반응의  $K_m$ 과  $V_{max}$ 를 Win-Nonlin 프로그램을 이용하여 산출하였다. Table I에 정리한 바와 같이 pentoxifylline과 M-3 형성반응에서 산출된 약동력학적 parameter들을 비교해 본 결과,



**Fig. 2** – Eadie-Hofstee plot of formation of pentoxifylline from M-1 in microsomes prepared from UWHL-130.



**Fig. 3** – Eadie-Hofstee plot of formation of M-3 from M-1 in microsomes prepared from UWHL-130.

$K_{m1}$ 은  $0.180 \pm 0.153$ (평균값  $\pm$  표준편차)과  $0.025 \pm 0.0017$  mM로 나타났고,  $K_{m2}$ 는  $4.829 \pm 2.956$ 과  $1.216 \pm 0.789$  mM로 나타났다.  $V_{max1}$ 은  $1.648 \pm 0.310$ 과  $0.062 \pm 0.058$  nmol/min/mg protein으로 나타났고,  $V_{max2}$ 의 평균값도  $5.622 \pm 1.552$ 와  $0.491 \pm 0.075$  nmol/min/mg protein으로 M-3로의 전환반응에서 산출된 파라미터들보다 pentoxifylline으로의 전환반응에서 산출된 파라미터들이 월등하게 큰 것으로 나타났다.  $V_{max}$ 에 대한  $K_m$ 의 비율로 나타내는  $Cl_{int1}$ (clearance<sub>intrinsic</sub>)의 평균값은 12.864와 3.266 nmol/min/mg protein으로 나타났고,  $Cl_{int2}$ 의 평균값은 5.945과 0.132 nmol/min/mg protein으로 나타났는데, 역시, M-3 형성반응에 비하여 pentoxifylline 형성반응이 각각 4배와 45

**Table I** – Michaelis-Menten parameters for pentoxifylline and M-3 formation from M-1 in human liver microsomes<sup>a)</sup>

Metabolite	HLM <sup>b)</sup>	V <sub>max1</sub>	V <sub>max2</sub>	K <sub>m1</sub>	K <sub>m2</sub>	Cl <sub>int1</sub>	Cl <sub>int2</sub>
		nmol/min/mg protein		mM		l/min/mg protein	
Pentoxifylline	HL-135	1.636	5.312	0.410	2.159	3.990	2.404
	HL-141	1.232	3.914	0.092	7.034	13.391	8.154
	HL-142	1.757	5.586	0.101	7.716	17.396	8.026
	HL-144	1.968	7.675	0.118	2.404	16.678	5.196
	Mean	1.648	5.622	0.180	4.829	12.864	5.945
	S.D.	0.310	1.552	0.153	2.956	6.167	2.727
M-3	HL-135	0.022	0.387	0.045	2.210	0.482	0.179
	HL-141	0.145	0.536	0.029	0.480	4.849	0.076
	HL-142	0.059	0.554	0.019	0.696	2.977	0.072
	HL-144	0.024	0.487	0.005	1.477	4.820	0.202
	Mean	0.062	0.491	0.025	1.216	3.266	0.132
	S.D.	0.058	0.075	0.017	0.789	2.054	0.068

<sup>a)</sup> Formation rate of M-3 and pentoxifylline were determined by incubations with different concentrations of M-1 (0.05–5 mM). The values of V<sub>max</sub> and K<sub>m</sub> were determined by the Win-Nonlin program.

<sup>b)</sup> Human liver microsome

**Table II** – Fraction of M-1 converted to pentoxifylline and M-3 in human liver microsomes<sup>a)</sup>

M-1 <sup>b)</sup> mM	HLM <sup>c)</sup>	V <sub>pent</sub> <sup>d)</sup>	V <sub>M-3</sub> <sup>e)</sup>	f <sub>m, pent</sub> <sup>f)</sup>	f <sub>m, M-3</sub> <sup>g)</sup>
		nmol/min/mg protein			
0.05	HL-130	1.039	0.030	0.972	0.028
	HL-135	0.140	0.021	0.868	0.131
	HL-141	0.486	0.114	0.809	0.191
	HL-142	0.573	0.023	0.962	0.038
	HL-144	0.536	0.038	0.934	0.066
	Mean	0.555	0.045	0.909	0.091
	S.D.	0.321	0.039		0.069
0.5	HL-130	2.458	0.048	0.981	0.019
	HL-135	0.925	0.105	0.898	0.101
	HL-141	1.689	0.154	0.916	0.083
	HL-142	2.170	0.040	0.982	0.018
	HL-144	2.157	0.108	0.952	0.047
	Mean	1.879	0.091	0.946	0.054
	S.D.	0.601	0.047		0.038
5	HL-130	5.504	0.143	0.975	0.025
	HL-135	3.658	0.421	0.897	0.103
	HL-141	4.118	0.272	0.938	0.062
	HL-142	4.697	0.126	0.974	0.026
	HL-144	5.927	0.346	0.945	0.054
	Mean	4.781	0.262	0.945	0.055
	S.D.	0.941	0.127		0.032

<sup>a)</sup> The relative fractions of conversion (f<sub>m</sub>) of M-1 to pentoxifylline and M-3 were determined in five human livers at 0.05, 0.5 and 5 mM M-1.

<sup>b)</sup> M-1 concentration

<sup>c)</sup> Human liver microsome

<sup>d)</sup> Pentoxifylline formation ratee M-3 formation rate

<sup>f)</sup> The relative fraction of conversion,  $f_{m, pent} = \frac{V_{pent}}{(V_{M-3} + V_{pent})}$

<sup>g)</sup> The relative fraction of conversion,  $f_{m, M-3} = \frac{V_{M-3}}{V_{M-3} + V_{pnt}}$

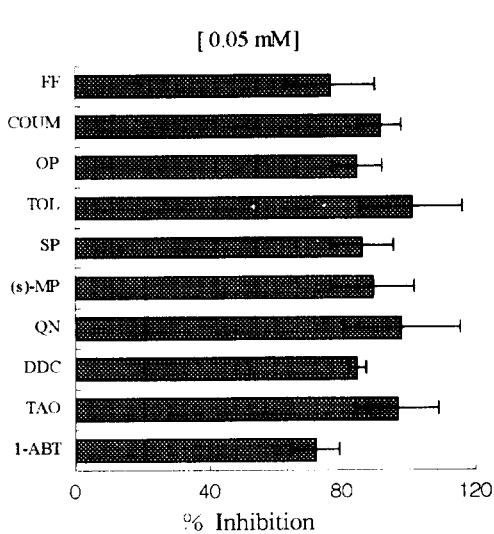
배인 것으로 나타났다.

상대 분율(relative fraction)측정은 기질인 M-1의 농도를  $K_m$ 이 작은 농도로서 0.05 mM와 중간영역의 농도로서 0.5 mM, 그리고  $K_m$ 이 큰 농도로서 5 mM을 선택하여 5종(UWHL-130, 135, 141, 142 및 144)의 인체 간시료를 대상으로 분석하였다. pentoxifylline과 M-3의 전체에 대한 각 대사체의 분율로 표시하여 Table II에 나타내었다. 0.05 mM의 M-1 농도에서는 각각의 평균 분율이 0.909와 0.091로, 0.5 mM의 M-1 농도에서는 각각의 평균 분율이 0.946과 0.054로, 5 mM의 M-1에서는 pentoxifylline과 M-3의 평균 분율이 0.945과 0.055로 나타났다. 이는 기질인 M-1이 대사되어 M-3로 전환되는 반응에 비하여 pentoxifylline으로 전환되는 반응이 0.05 mM에서는 10배, 0.5와 5 mM에서는 18배이상으로 대사정도가 상당한 차이로 커짐을 나타내었다.

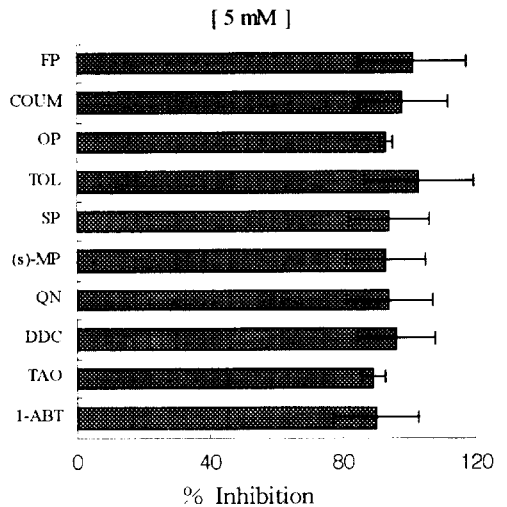
M-1이 pentoxifylline으로 전환되는 반응에 관여하는 효소를 확인하기 위하여, 간 microsome내 대사과정에 작용하는 선택적 화학저해제를 투여하여 배양실험을 수행함에 있어서, 3종(UWHL-141, 142, 및 144)의 인체 간 시료를 대상으로 0.05, 0.5 및 5 mM의 M-1

농도에서 실험 하였으며, 0.05와 5 mM에 대한 결과를 Fig. 4와 Fig. 5에 각각 나타내었다. Pentoxifylline으로의 전환반응은 0.05 mM 농도에서 furafylline과 DDC(diethyldithiocarbamate) 및 orphenadrine에 의해서 24.36±17.54, 16.47±3.84 및 16.59±9.25의 % inhibition을 나타내었다. 이 3종의 화학저해제들 중 furafylline과 orphenadrine을 함께 병용 투여한 경우에는 27.26±3.89의 % inhibition을 나타내어 furafylline를 단독으로 투여한 경우보다 저해효과가 뚜렷하게 상승되지 못하였으며 DDC와 orphenadrine를 함께 병용 투여한 경우의 평균 % inhibition은 16.83±8.73로서 미미한 저해효과를 보였다. 0.5와 5 mM 농도에서는 1-aminobenzotriazole의 % inhibition이 16이하로서 저해효과가 뚜렷하지 않았으며 1-aminobenzotriazole 외 9종의 선택적 화학저해제를 투여한 경우에서도 % inhibition이 10 이하로서 저해제의 영향이 뚜렷하게 관찰되지 않았다.

본 저자들의 이전 연구에 의하면 M-1에서 M-3로의 형성반응의 경우, 높은  $K_m$  농도로 설정된 5 mM에서는 10종의 저해제 중 troleandomycin, orphenadrine 및 coumarin 등 3종의 저해제가 뚜렷한 저해효과를



**Fig. 4** - Inhibition of pentoxifylline formation by CYP450 isozyme selective inhibitors in human liver microsomal incubation at 0.05 mM M-1. FP: furafylline, COUM: coumarin, OP: orphenadrin, TOL: tolbutamide, SP: sulfaphenazole, (s)-MP: (s)-mephenytoin, QN: quinidine, DDC: diethyl dithiocarbamate, TAO: troleandomycin, 1-ABT: 1-aminobenzotriazole



**Fig. 5** - Inhibition of pentoxifylline formation by CYP450 isozyme selective inhibitors in human liver microsomal incubation at 5 mM M-1. FP: furafylline, COUM: coumarin, OP: orphenadrin, TOL: tolbutamide, SP: sulfaphenazole, (s)-MP: (s)-mephenytoin, QN: quinidine, DDC: diethyl dithiocarbamate, TAO: troleandomycin, 1-ABT: 1-aminobenzotriazole

**Table III** – Inhibition of M-3 formation by troleandomycin and coumarin<sup>a)</sup>

HLM <sup>b)</sup>	% Inhibition <sup>c)</sup>	
	Troleandomycin	Coumarin
HL-130	32.02	35.88
HL-135	75.68	14.74
HL-141	53.14	17.85
HL-142	52.58	28.79
HL-144	82.18	48.11
Mean	59.12	29.07
S.D.	20.12	13.60

<sup>a)</sup> Inhibition of M-3 formation by 40  $\mu$ M troleandomycin and 8  $\mu$ M coumarin at 5 mM M-1.

<sup>b)</sup> Human liver microsome.

$$^c) \% \text{ inhibition} = \left(1 - \frac{\text{uninhibited activity}}{\text{control activity}}\right) \times 100$$

보였었다.<sup>27)</sup> 따라서 본 연구에서는 이들 3종의 화학저해제들을 단독 또는 병용 투여하면서 5종(UWHL-130, 135, 141, 142 및 144)의 간 microsome 효소저해 효과를 관찰하기 위한 추가실험을 수행하였다. 우선 troleandomycin과 coumarin의 효소저해 결과를 비교하여 Table III에 나타내었다. 40  $\mu$ M의 농도로 조제한 troleandomycin은 59.12 $\pm$ 20.12의 평균 % inhibition을 보였고, 8  $\mu$ M의 농도로 조제한 coumarin은 29.07 $\pm$ 13.60로서 troleandomycin보다 낮은 평균 % inhibition을 보였다. Troleandomycin과 orphenadrine을 함께 병용 투여한 경우의 평균 % inhibition은 47.64 $\pm$ 2.71, coumarin과 orphenadrine을 함께 병용 투여한 경우의 평균 % inhibition은 29.88 $\pm$ 5.42를 보였다(data are not shown). 즉, troleandomycin 또는 coumarin에 orphenadrine을 병용 투여한 경우에는 troleandomycin 또는 coumarin을 단독으로 투여한 경우보다 저해효과가 상승되지 못하였으므로, orphenadrine은 간 microsome CYP450 특정효소에 의한 상승적인 저해작용을 나타내지 못하는 것으로 판단하였다.

## 고 찰

본 연구에서는 인체 간 microsome에서 M-1로부터 pentoxifylline과 M-3로의 전환반응의 약동력학적 동태를 조사 비교하고, 이들의 대사과정에 관련된 CYP450 isozyme을 규명하고자 하였다. Lillibrige등도 본 연구에서와 같이 M-1이 pentoxifylline으로 전환되

는 것으로 보고하였는데, microsome에서는 biphasic 대사형태를, cytosol에서는 monophasic 대사형태를 보이므로 각각 서로 다른 효소가 관여하는 대사과정이라고 규명하였다.<sup>17)</sup> 이들은 M-1에서 M-3로의 대사과정에 대해서 0.1 mM이하의 농도에서는 M-1 농도의 증가에 따라서 M-3의 대사속도가 증가된다고만 하였을 뿐, 약동력학적 parameter  $V_{max}$ 와  $K_m$ 은 측정해내지 못하였다. 본 연구에서는 이전의 연구들에 의하여<sup>9,12,16)</sup> *in vitro* 실험이 가능한 M-1의 유효 혈중농도의 근사값이라고 판단되는 0.05 mM에서 약동력학적 parameter  $K_m$  및  $V_{max}$ 를 구해보았다. 본 연구에서의 모든 경우에 대하여 pentoxifylline 형성반응의  $K_m$ 과  $V_{max}$ 가 M-3 형성반응의  $K_m$ 과  $V_{max}$ 보다 크게 나타났는데, 이러한 결과는 기질인 M-1이, 대사체 M-3로 전환되는 반응보다는 pentoxifylline으로 전환되는 반응이 주반응임을 나타내는 것이다.

Lillibrige등에 의하면 0.001~0.005 mM의 M-1 농도에서는 pentoxifylline으로 전환되는 방향이 주반응이 아니라 pentoxifylline과 M-3의 형성반응이 각각 44%와 56%로서 서로 비슷한 비율로 나타난다고 하였다. 본 연구에서 0.05 mM 농도로 실험한 결과에서는 pentoxifylline 형성반응의 비율이 10배, 0.5와 5 mM에서는 18배이상으로 M-3 형성반응의 비율보다 현저하게 커짐을 나타내었다. 두 연구결과를 종합하여 고찰해 보면, 높은  $K_m$  농도로 갈수록 낮은  $K_m$  농도에 비하여 pentoxifylline과 M-3 비율의 차이가 커지는 것은 M-1에서 pentoxifylline으로 전환된 후, 생성된 pentoxifylline이 다시 가역반응으로서 모약물(mother drug)인 M-1으로 환원되어 진다는 사실을 뒷받침하는 것이다.<sup>2,17)</sup> 그러므로 M-1의 약동력학적 대사연구에서는 가역적인 전환반응인 pentoxifylline의 형성반응뿐 아니라, 대사체 M-3의 형성반응도 중요하게 고려되어야 할 것으로 사료된다.

실험결과에서 기술한 바와 같이 pentoxifylline과 M-3로의 전환반응은 모두 biphasic kinetic 형태로서  $K_m$ 이 작은 저농도 영역과  $K_m$ 이 큰 고농도 영역의 2가지 이상 다효소가 관여된 대사과정으로 밝혀졌다. 이에 간 microsome에 존재하는 CYP450 isoform 중 이들의 대사과정에 관여하는 특정 효소를 규명하였는데, 본 저자는 M-1에서 M-3로의 전환반응에 관하여 보고한 바 있다. 즉, cytochrome P450 isoform들에 대해 공통적으로 저해영향을 미치는 1-aminoben-

zotriazole이 100%로 저해하는 결과를 보였기 때문에 CYP450 효소가 이 반응에 전적으로 관여한다는 확신을 얻을 수 있었으며, 0.05 mM의 낮은  $K_m$  농도에서는 선택적 화학저해제 troleandomycin에 의해 저해된 CYP3A4가 주로 M-1에서 M-3로의 형성반응에 관여하는 것으로 판단되어졌다.<sup>27)</sup> 같은 농도에서 pentoxifylline으로의 전환반응은 선택적 화학저해제 furafylline에 의해서 저해된 CYP1A2가 주로 관여하는 것으로 본 연구의 결과로부터 추정할 수 있었다.

5 mM의 높은  $K_m$  농도에서는 Shin등의 보고에서와 같이<sup>27)</sup> M-3로의 전환반응은 간 microsome내 cytochrome P450 isoform 중에서, troleandomycin에 의해 저해된 CYP3A4가 친화성이 높은 효소이고 coumarin에 의해 저해된 CYP2A6는 그보다 친화성이 낮은 효소인 것으로 사료된다. 그런데 같은 농도에서 pentoxifylline으로의 전환반응에서는 0.05 mM 이상의 농도에서 특정하게 유의성있는 저해제의 영향이 관찰되지 않았으며, 1-aminobenzotriazole도 10% 정도의 미미한 저해효과를 보여서 간 microsome에 존재하는 CYP450 isozyme들이 전적으로 관여한다는 사실이 명확하게 관찰되지 않았다. 이는 pentoxifylline이 다시 가역적으로 대사체인 M-1으로 환원되고 또한 기타 다른 화합물(M-1 S 또는 M-6 등)로 복합적인 여러 대사과정을 거치기 때문인 것으로 추정된다.

이상의 M-1에 관한 약동력학적 연구를 종합하여 보면, pentoxifylline으로 전환되는 반응에 있어서는  $K_m$ 이 작은 0.05 mM의 M-1 농도에서만 CYP1A2가 관여하며, M-3로 전환되는 반응에 있어서는  $K_m$ 이 작은 0.05 mM의 M-1 농도에서 CYP3A4가 관여하는 이중적인 대사과정, 즉 저농도에서는 서로 다른 효소에 의한 전환반응으로 추정된다.  $K_m$ 이 큰 5 mM의 M-1 농도에서는 Shin등이 보고한<sup>27)</sup> 결과와 종합하여 보면, CYP3A4가 친화성이 강한 주효소로서 그리고 CYP2A6가 부효소로 관여하여 M-3가 형성되며, pentoxifylline이 형성되는 반응은 간 microsome 효소 및 기타 여러효소들에 의한 대사과정을 거치는 복합적인 것으로 사료된다. 이 대사과정에 대하여는 cytosol의 ketone reductase에 의한 pentoxifylline에서 M-1으로의 형성반응과 간 microsome의 pentoxifylline에서 M-3로의 형성반응 등에 관한 약동력학적 연구와 대사효소를 규명하는 연구가 계속적으로 요구된다고 하겠다.

## 감사의 말씀

본 연구의 일부는 '99학년도 덕성여자대학교 약학연구소 연구비 지원으로 이루어졌기에 감사드립니다. 그리고 주관심 연구과제 외에도 실험을 진행할 수 있도록 허락하여 주신 미 워싱턴대 약대의 J. T. Slattery 교수께 진심으로 감사드립니다.

## 문헌

- 1) Von, H. J., Bedebem, Hinze, G. and Sode, A.: Struktur der ausscheidung sprodukte des 3,7-dimethyl-1-(5-oxohexyl)-xanthines (BL 191) beim menschen. *Arzneimittelforschung* **22**, 1144 (1972).
- 2) Bryce, T. A., Chamberlain, J., Hillbeck, D. and Macdonald, C. M.: Metabolism and pharmacokinetics and <sup>14</sup>C pentoxifylline in healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* **39**, 512 (1989).
- 3) Campbell, R. K.: Clinical on pentoxifylline therapy for diabetes induced peripheral vascular disease. *Anal. Pharmacother.* **27**, 1099 (1989).
- 4) Ernst, E.: Pentoxifylline for intermittent claudication: a critical review. *Angiology* **45**, 339 (1994).
- 5) Landman, D., Sarai, A. and Sathe, S. S.: Use of pentoxifylline therapy for patients with AIDS-related wasting: pilot study. *Clinic. Infect. Dis.* **18**, 97 (1994).
- 6) Dezube, B. J.: Pentoxifylline for the treatment of infection with human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* **18**, 285 (1994).
- 7) Tournaye, H., Van, A. C., Steirteghem, A. and Devroey, P.: Pentoxifylline in idiopathic male-factor infertility: a review of its therapeutic efficacy after oral administration. *Human Reproduc.* **9**, 996 (1994).
- 8) Bianco, J. A., Appelbaum, F. R., Nemunaitis, J., Almgren, J., Andrews, F., Kettner, P., Shields, A. and Singer, J. W.: Phase I-II trial of pentoxifylline for the prevention of transplant related toxicities following bone marrow transplantation. *Blood* **78**, 1205 (1994).
- 9) Thompson, J. A., Bianco, J. A., Benyunes, M. C., Neubauer, M. A. and Slattery, J. T.: A Feber Phase Ib trial of pentoxifylline and ciprofloxacin in patients treated with interleukin-2 and lymphokine activated killer cell therapy for metastatic renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **54**, 3436 (1994).



- 10) Carrier, M., Pelletier, G., White, M., Bois, D., and Pelletier, C.: Effect of pentoxifylline on renal toxicity of cyclosporine: results of a clinical trial after heart transplantation. *J. Heart and Lung Trans.* **15**, 1179 (1996).
- 11) Rocci, M., Luke, D., and Saccr, C.: Pharmacokinetics of pentoxifylline during concomitant theophylline administration to Rats. *Pharmaceu. Res.* **4**, 433 (1987).
- 12) Abraham, E., Bursten, S., Shenkar, R., Allbee, J., Tuder, R., Woodson, P., Guidot, D. M., Rice, G., Singer, J. W., and Repine, J. E.: Phosphatidic acid signaling mediates lung cytokine expression and lung inflammatory injury after hemorrhage in mice. *J. Exp. Med.* **181**, 569 (1995).
- 13) Rice, G. C., Brown, P. A., Nelson, R. J., Bianco, J. A., Singer, J. W. and Bursten, S.: Protection from endotoxic shock in mice by pharmacologic inhibition of phosphatidic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 3857 (1994).
- 14) Waxman, K., Daughters, K. and Aswani, S.: Lisofylline decrease white cell adhesives and improves survival after experimental hemorrhagic shock. *Crit. Care. Med.* **24**, 1724 (1996).
- 15) Shulman, K. L., Stadler, W. M. and Vogelzang, N. J.: High-dose continuous intravenous infusion of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma: the university of chicago experience. *Urology* **47**, 194 (1996).
- 16) Clarke, E., Rice, G. C., Weeks, R. S., Jenkins, N., Nelson, R., Bianco, J. A. and Singer, J. W.: Lisofylline inhibits transforming growth factor release and enhances trilineage hematopoietics recovery after 5-fluorouracil treatment in mice. *Cancer Res.* **56**, 105 (1996).
- 17) Lillibridge, J. A., Kalthorn, T. F. and Slattery, J. T.: Metabolism of lisofylline and pentoxifylline in human liver microsomes and cytosol. *Drug. Metab. Dispos.* **24**, 1174 (1996).
- 18) Lee, S. and Slattery, J. T.: Cytochrome P450 isozymes involved in lisofylline metabolism to pentoxifylline in human liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* **25**, 1534 (1997).
- 19) Thummel, K. E., Lee, C. A., Kunze, K. L., Nelson, S. D. and Slattery, J. T.: Oxidation of acetaminophen to N-acetyl-benzoquinone by human CYP3A4. *Biochem. Pharmacol.* **45**, 1563 (1993).
- 20) Bradford, M. A.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248 (1976).
- 21) Mancinelli, A., Pace, S., Marzo, A. and Martelli, E. A.: Determination of pentoxifylline and its metabolites in human plasma by high performance liquid chromatography with solid-phase extraction. *J. Chromatography.* **575**, 101 (1992).
- 22) Newton, D. J., Wang, R. W. and Lu, A. Y. H.: Cytochrome P450 inhibitors. Evaluation of specificities in the in vitro metabolism of therapeutic agents by human liver microsomes. *Drug. Metab. Dispos.* **23**, 154 (1995).
- 23) Martine, B., Viviane, M., Yves, B. and Genrard, F.: Cytochrome P450 isoform inhibitors as a tool for the investigation of metabolic reactions catalyzed by human liver microsomes. *J. Pharm. Exp. Ther.* **277**, 321 (1996).
- 24) Ren, S., Yang, J. S., Kalthorn, T. F. and Slattery, J. T.: Oxidation of cyclophosphamide to 4-hydroxycyclophosphamide in human liver microsomes. *Cancer Res.* **57**, 4229 (1998).
- 25) Mitra, A. K., Tummel, K. E., Kalthorn, T. F., Kharasch, E. D., Unadkat, J. D. and Slattery, J. T.: Metabolism of dapsone to its hydroxylamine by CYP2E1 in vitro and in vivo. *Clinical Pharmacol. Ther.* **58**, 556 (1995).
- 26) Heyn, H., White, R. B. and Stevens, J. C.: Catalytic role of cytochrome P450 2B6 in the N-demethylation of S-mephenytoin. *Drug. Metab. Dispos.* **24**, 948 (1996).
- 27) Shin, H. and Slattery, J. T.: CYP3A4-mediated oxidation of lisofylline to lisofylline 4,5-diol in human liver microsomes. *J. Pharm. Sci.* **87**, 390 (1998).