

정신분열병 환자에서 Clozapine과 그 대사물들의 혈장농도 및 *FMO3* 유전자 변이*

이 경 훈** · 김 철 응***†

Plasma Concentrations of Clozapine and its Metabolites and *FMO3* Variations in Korean Schizophrenic Patients *

Kyung-Hoon Lee, M.D., Ph.D., ** Chul Eung Kim, M.D., Ph.D.***†

ABSTRACT

Objective : The relationship between the total daily dose of clozapine given and the plasma concentrations of clozapine and its metabolites (*N*-desmethylclozapine and clozapine *N*-oxide) and the effect of Glu158Lys (wild-type : Glu, 'H' ; variant : Lys, 'h') and Glu308Gly (wild-type : Glu, 'D' ; variant : Lys, 'd') variation in *FMO3* gene on plasma concentrations of clozapine and its metabolites was studied in schizophrenic patients.

Methods : Trough plasma concentrations of clozapine and its metabolites were measured in 34 schizophrenic patients receiving clozapine. The genetic variation of 'h' and 'd' in *FMO3* were analyzed in 21 among 34 patients.

Results : A linear relationship between the total daily dose of clozapine given (mg/kg body weight per day) and the plasma concentrations (nM) of clozapine was revealed by regression analysis ($p < 0.001$) in the 23 patients receiving a constant daily dose of clozapine for 8 days. The plasma molar concentration ratios of clozapine *N*-oxide/clozapine in 8 subjects with 'hh' or 'Hh' alleles were not different from those in 6 subjects with 'HH' alleles and the plasma molar concentration ratios in 6 subjects with 'dd' or 'Dd' alleles were not different from those in 8 subjects with 'DD' alleles.

Conclusion : The effect of Glu158Lys and Glu308Gly variation in *FMO3* gene on clozapine metabolism could not be shown.

KEY WORDS : Clozapine · Clozapine *N*-oxide · Flavin-containing monooxygenase 3 (*FMO3*) · Genetic variation · Schizophrenia.

*본 논문의 일부는 2001년 신경정신의학 제40권 제1호 109쪽에서 116쪽까지에 발표되었음.

Some of data in this article are published in *J Korean Neuropsychiatr Assoc* 2001;40(1):109-116.

**본 논문은 1999년도 인하대학교 교내 연구비 지원(20565)을 받았음.

***성균관대학교 의과대학 분자세포생물학교실/삼성서울병원 임상의학연구소 임상시험센터

Department of Molecular Cell Biology, Sungkyunkwan University School of Medicine/Clinical Trial Center, Clinical Research Institute, Samsung Medical Center, Seoul, Korea

†인하대학교 의과대학 인하대병원 정신과학교실

Department of Psychiatry, College of Medicine, Inha University, Inha University Hospital, Incheon, Korea

†교신저자 : 김철응, 400-711 인천광역시 중구 신흥동 3가 7-206번지

전화) (032) 890-3475, 전송) (032) 890-3580 E-mail) kce320@inha.ac.kr

서 론

화학적 구조상 loxapine과 유사하면서 dibenzodiazepine 계열에 속하는 클로자핀(clozapine, 8-chloro-11-(4'-methyl)-piperazino-5-dibenzo(b,e)(1,4)-diazepine)은¹⁾ 정신분열병 환자의 양성 증상뿐만 아니라 감정둔마, 무감동, 흥미 결여 등의 음성 증상에도 효과적이다. 또한 추체외로 증상이나 지연성 운동장애를 거의 유발하지 않으며, 기존의 항정신병 약물에 거의 반응을 보이지 않던 환자들의 약 30%에서 효과적이 입증되어²⁾³⁾ 일부 국가에서 감독 하에 꾸준히 사용되어 왔고,⁴⁾ 1990년에는 미국 식품의약청(U.S. Food and Drug Administration)의 시판 허가를 받았다.⁵⁾ 클로자핀은 난치성 정신분열병 환자 외에 지연성 운동장애,⁶⁾ 정신분열양 정동장애,⁷⁾ 난치성 정동장애,⁸⁾ 그리고 최근에는 여러 신경학적 질환의 치료에 사용될 수 있는 가능성이 제시되었다.⁹⁾ 그러나 클로자핀은 치명적인 혈액학적 부작용인 무과립구증(agranulocytosis)의 발생률이 0.5~2%로¹⁰⁾¹¹⁾ 기존의 전형적 항정신병 약물에 비해 약 10~20배 정도로 매우 높으나,¹²⁾¹³⁾ 클로자핀을 중단하면 대개 시간이 지나면서 가역적으로 완전히 회복되는 것으로 알려져 있다.¹³⁾

클로자핀 부작용의 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았으나, 제시되고 있는 가설 중 하나는 클로자핀 또는 그 독성 대사물이 골수의 간세포(stem cell)에 직접적인 독성을 나타낸다는 것으로¹⁴⁾¹⁵⁾ 이런 독성 대사물이 축적되는 방향으로 클로자핀을 대사시키는 일부의 환자가 있다는 가정을 하고 있다.

사람 간장내 간세포(hepatocyte)의 내형질세망(endoplasmic reticulum)과 핵 및 사립체(mitochondria)에 존재하는 monooxygenase계에 의해 많은 약물과 화학물질 및 내인성 물질들이 산화된다. Arylamine의 N-산화대사를 담당하는 효소로 CYP와는 다른 flavoprotein이 존재한다는 것이 알려지면서 간장 미세소체에 다양한 산화효소가 존재함이 제시되었으며, 돼지의 간에서 처음 이 flavoprotein이 분리되어 'N-산화효소(N-oxidase)' 또는 '혼합기능 아민산화효소(mixed-function amine oxidase)' 등으로 명명되었다. 이후 이 'N-산화효소'가 아민(amine)계 물질뿐만 아니라, 질소, 황, 인 및 selenium 등을 이종원자(heteroatom)로 함유하는 친전자성(electrophilic) 물질인 sulfide 및 thiol 등의 대사에도 관여하고, 진핵세포생물에서는 단체(monomer) 하나당 1몰

(mole)의 FAD(flavin adenine dinucleotide)를 포함하고 있어 flavin-containing monooxygenase(FMO)로 불리게 되었다. Phenothiazine 등 항정신병약물과 아편유사(opioid) 진통제를 비롯하여 임상적으로 이용되는 많은 약물들이 FMO에 의해 모화합물(parent compound)보다 독성이 약한 수용성 수산화물로 대사된다.¹⁶⁾

약물의 산화대사에 대한 유전적 다형성(genetic polymorphism)은 종종 특이적인 cytochrome P450(CYP) 동위효소에서 발생하지만 이런 유전적 변이(variation)는 다른 약물대사효소에 대해서도 일어날 수 있어, 사람 FMO에 대해 보고되어 있는 유전적 다형성은¹⁷⁾ CYP 유전자에 비해 FMO 유전자 발현의 개체간 차이가 상대적으로 작지만,¹⁸⁾ 한 연구는 사람 간장 검체 내 FMO3의 양적 다양성이 약 10배에 이르며 이런 개체간 다양성이 FMO3에 의한 약물대사 다형성에 영향을 미침을 보고하였다.¹⁹⁾

Dolphin 등²⁰⁾은 FMO3 유전자 엑손(exon) 4의 153번째 코돈(codon)인 CCC 삼중자코드(triplet)가 CTC 삼중자코드로 치환된 염기 치환을 선천성 대사질환인 물고기향증후군(fish-odor syndrome, trimethylaminuria) 환자에서만 발견하고, 이 돌연변이에 의해 FMO3의 153번째 아미노산인 프롤린(proline)이 류신(leucine)으로 치환되면 야생형(wild-type) FMO3 효소의 쉬트(sheet) 구조가 2개의 작은 나선(helix) 구조를 지닌 다른 쉬트 구조로 변형되어 3차 아민에 대한 FMO3의 활성도가 저하되므로, 이 돌연변이가 물고기향증후군의 유전적 원인일 가능성을 제시하였다. Dolphin 등²⁰⁾이 물고기향증후군 환자에서 보고한 FMO3 유전자의 Pro153Leu 염기 치환 돌연변이뿐 아니라, 정상인에서도 흔한 돌연변이들이 FMO3 유전자에서 보고되어 있다. Brunelle 등²¹⁾이 보고한 엑손 4의 G472A 치환 돌연변이(Lys158)는, Hinf I 제한효소 작용부위에 존재하며 FMO3 효소의 아미노산 서열 중 158번의 글루탐산(glutamic acid)이 라이신(lysine)으로 치환된 것으로, 야생형 대립형질은 'H'로 돌연변이 대립형질은 'h'로 나타난다. 또한 A923G 치환 돌연변이(Gly308)는 Dra II 제한효소 부위에 위치하여 야생형인 Glu308의 GAGACCT 염기 서열이 GG-GACCT 염기 서열로 치환된 돌연변이로, FMO3 효소의 308번째 아미노산인 글루탐산을 글리신(glycine)으로 치환시키며, 야생형 대립형질은 'D'로 돌연변이 대립형질은 'd'로 나타난다.

시험관내(in vitro) 연구에서 클로자핀은 주로 CYP1A2

에 의해 촉매되는 탈메틸화(demethylation)에 의해 *N*-desmethyloclozapine (norclozapine)으로 대사되고, 주로 CYP3A4에 의해 촉매되지만 FMO3도 관여되는 *N*-산화(oxidation)에 의해 clozapine *N*-oxide로 대사됨이 보고되어 있어,²²⁻²⁴⁾ FMO3 유전자 변이가 사람에서 클로자핀의 생체내 *N*-산화(FMO3 활성도)에 미치는 영향에 대해 외국에서는 일부 보고되어 있으나,²⁵⁾ 정신분열병 환자에서 한국인 FMO3 유전자에 흔한 변이인 Lys158과 Gly308이²⁶⁾ 클로자핀의 생체내 *N*-산화에 미치는 효과에 대해서는 연구된 적이 없다.

따라서 클로자핀을 투여 받고 있는 정신분열병 환자에서, 클로자핀 및 그 대사물들의 혈장약물농도를 측정하고, 흔한 FMO3 유전자 변이인 Lys158과 Gly308에 대해 유전자형을 검색하여 FMO3 유전자 변이가 클로자핀의 생체내 대사에 미치는 영향을 연구하였다.

방 법

1. 연구대상

1999년 2월부터 1999년 12월까지 인하대병원 정신과 외래 또는 입원 환자 중 미국 정신장애의 진단 및 통계편람 제4판(Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorder, 4th edition, DSM-IV 진단 기준)²⁷⁾의 정신분열병 진단기준을 만족시키고 과거 정신병력을 조사하여 클로자핀 사용이 필요하다고 판단된 경우 환자 및 보호자에게 클로자핀의 부작용을 비롯한 장기간의 혈액 검사 필요성을 설명하고 동의하는 환자들을 대상으로 하였다. 클로자핀 사용 전의 통상적인 혈액 및 간 기능검사서 이상을 보이는 환자는 제외시켰다.

클로자핀(Clozaril®, Novartis Korea, Seoul, Korea)을 투여 받은 환자 중 클로자핀 및 그 대사물들의 혈장 농도를 한 번 이상 측정된 34명 중 8일 이상 고정 용량을 투여 받아 항정상태의 혈장농도를 유지하였던 환자 23명의 자료를 대상으로 하였으며, 이 중 2회 이상의 농도자료가 있는 환자는 5명이었다. 클로자핀 사용기간 내에 Clozaril Patient Monitoring Service(CPMS, Novartis Aktiengesellschaft, Basel, Switzerland) 기준에 의거하여 혈액검사를 시행하였고 중도 탈락된 환자는 그 이유를 명시하도록 하였다.

2. 클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도

다음 번 클로자핀 투약 직전(trough)의 혈액 10ml를

채혈하여 혈장을 분리한 다음, 클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도 측정시까지 -70°C 에 보관하였다.

15ml 원뿔원심분리관(conical centrifuge tube)에 혈장 1ml와 내부표준물질인 quinine($10\ \mu\text{g/ml}$, $25\ \mu\text{l}$) 및 ethyl acetate 7ml를 넣고 흔들어 섞은 다음 $3,000\times\text{g}$ 에서 10분간 원심분리하였으며, 원심분리후 ethyl acetate 층을 다른 시험관(tube)에 옮겨 0.01N HCl $150\ \mu\text{l}$ 를 넣어 2분간 vortex하고, $3,000\times\text{g}$ 에서 5분간 원심분리하여 원심분리된 산(acid) 층에서 $100\ \mu\text{l}$ 를 취해 고작위액체크로마토그래피(high-performance liquid chromatography, HPLC)에 주입하였다.²⁸⁾

HPLC 칼럼(column)은 Spherisorb C6(입자크기 $5\ \mu\text{m}$, 내부지름 \times 길이 : $4.6\times 250\text{mm}$; Waters Corporation, Milford, MA, USA)를 이용하였고, 이동상(mobile phase)으로는 0.9mM의 heptane sulfonic acid 및 30%의 acetonitrile을 함유한 0.06M KH_2PO_4 용액(pH 2.7)을 이용하였으며, 혈장내 클로자핀 및 그 대사물들(*N*-desmethyloclozapine과 clozapine *N*-oxide)의 농도를 자외선 검출기(ultraviolet detector)로 254nm에서 측정하였다.²⁸⁾

3. FMO3 유전자형 검색

1) 채혈 및 deoxyribonucleic acid(DNA) 추출

34명의 정신분열병 환자 중 유전자형 검색을 위한 채혈이 가능했던 21명의 위팔정맥으로부터 약 3ml의 혈액을 ethylenediamine tetraacetic acid(EDTA) 시험관에 채취하였다. 혈액을 $1,300\times\text{g}$ 에서 15분간 원심분리하여 채취한 백혈구연층(buffy coat) $500\ \mu\text{l}$ 를 새 시험관으로 옮겼다. 백혈구연층에 추출용액(10mM Tris-Cl(tris(hydroxymethyl)aminomethane-Cl), pH 8.0, 20mM NaCl, 4mM dithio-threitol(DTT)) $800\ \mu\text{l}$ 와 10% sodium dodecyl sulfate(SDS) $200\ \mu\text{l}$ 를 가한 후, 10~20초간 혼합한 다음 37°C 에서 10분간 배양(incubation)하였다. 배양한 용액에 $20\ \mu\text{l}$ 의 단백분해효소(proteinase) K 용액(20mg/ml)을 첨가하여 20초간 섞어 56°C 에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 용액을 상온에서 식혀 뚜껑이 있는 원심분리관으로 옮긴 다음, 동량의 phenol : chloroform : isoamyl alcohol(25 : 24 : 1) 혼합액을 첨가하고 뚜껑을 막은 후 조심스럽게 상온에서 10분간 수용액층과 유기용매층을 섞었다. 섞은 용액을 상온에서 $5,000\times\text{g}$ 로 15분간 원심분리하여 수용

액층과 유기용매층을 분리한 다음, 수용액층을 500 μ l씩 새 원심분리관으로 옮겨 4°C에 보관되어 있는 2.5배 용적(1.25ml)의 에탄올(ethanol)을 넣어 DNA가 침전됨을 확인하였다. 건조시켜 수분을 제거한 후 10분간 방치한 다음, 70% 에탄올 1ml를 첨가하여 13,000rpm(revolution per minute, 분당회전수)으로 4°C에서 10분간 원심분리하여 상층액을 버리고 상온에 10~20분간 방치함으로써 에탄올을 완전히 제거하였다. 얻어진 genomic DNA에 TE 완충용액(10mM Tris-Cl, pH 8.0, 1mM EDTA)을 100~200 μ l 첨가한 다음 DNA가 충분히 녹을 때까지 하루이상 4°C에 보관하였다가, 분광광도기로 DNA를 정량한 후 실험에 이용하였다.

2) Glu158Lys 및 Glu308Gly 변이의 검색

DNA를 분리한 정신분열병 환자 21명 개개인의 *FMO3* 유전자형을 한국인에서 흔한 변이인 Glu158Lys 및 Glu308Gly에 대해 검색하였다. 환자에서 분리한 genomic DNA를 이용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction : PCR)으로 증폭한 후 제한효소를 처리하여 변이 유무를 검색하였다.

(1) 중합효소연쇄반응

백혈구로부터 분리한 genomic DNA 검체 하나당 2개의 중합효소연쇄반응용 시험관을 준비하여 각 시험관에 0.5 μ g의 genomic DNA, 10 \times PCR 완충액(buffer) 5 μ l, 10mM deoxynucleotide triphosphate(dNTP) 4 μ l, Taq(*Thermus aquaticus*) 중합효소 1 unit을 넣고, Glu158Lys 및 Glu308Gly 변이를 검색하기 위해 각 변이에 대한 센스(sense) 및 안티센스(antisense) 길잡이(primer, 각각 10 μ M, 표 1)를 1 μ l씩 각 시험관에 넣어 혼합한 후, 무균 증류수를 첨가하여 총 50 μ l가 되게 한 다음 중합효소연쇄반응기로 증폭하였다. 중합효소연쇄반응은 94°C에서 1분간 DNA를 변성(denaturation)시킨 후, '변성 온도 94°C 1분, 길잡이 부착(annealing) 온도 53°C 1분, DNA 합성(extension) 온도 72°C 3분'을 30회 반복하였으며, 마지막 주기(cycle)에는 최종 DNA 합성

단계인 72°C를 10분간 실시하여 합성되어 가는 DNA의 3'-end쪽이 완전히 채워지도록(filling될 수 있도록) 하였다. 이 반응물을 0.8% 우무겔(agarose gel, SeaKem, FMC Bio Products, Rockland, ME, USA)에서 전기이동(electrophoresis)하여 중합효소연쇄반응 산물을 확인하였다.

(2) 제한효소 처리

중합효소연쇄반응으로 증폭한 산물을 3M sodium acetate와 에탄올을 이용하여 침전시킨 후, 20 μ l의 무균 증류수에 녹여 제한효소 반응에 이용하였다. 증폭산물을 2개의 시험관에 각각 10 μ l씩 나누어 특정 제한효소의 반응조건으로 처리하였다.

① Glu158Lys 변이

중합효소연쇄반응으로 증폭된 산물(615bp) 10 μ l에 *Hinf* I 제한효소반응용 완충액(buffer H) 2 μ l와 *Hinf* I 제한효소(TaKaRa Shuzo Company, Limited, Otsu, Shiga, Japan) 1 unit 및 무균 증류수 8 μ l를 첨가한 후 37°C에서 3시간동안 반응시켰다.

② Glu308Gly 변이

중합효소연쇄반응으로 증폭된 산물(408bp) 10 μ l에 *Dra* II 제한효소반응용 완충액(buffer L) 2 μ l와 *Dra* II 제한효소(TaKaRa Shuzo Company, Limited, Otsu, Shiga, Japan) 1 unit 및 무균 증류수 8 μ l를 첨가한 후 37°C에서 3시간동안 반응시켰다.

(3) 우무겔 전기이동

반응액을 2% 3 : 1 Nusieve GTG 우무겔(FMC Bio-Products, Rockland, ME, USA)에서 전기이동한 후 자외선 조명기(ultraviolet illuminator) 상에서 Glu158Lys 및 Glu308Gly 변이의 유무를 확인하였다. Lys158 변이 대립유전자를 야기하는 G472A 점돌연변이를 검출하기 위해 엑손 4의 중합효소연쇄반응 증폭 산물(615bp)을 *Hinf* I 제한효소로 처리하면, 야생형 산물(Glu158 : 'H')은 4개의 절편으로(217bp, 205bp, 127bp, 66bp) 잘리지만 Lys158 변이가 있으면 66bp의 띠(band)가

Table 1. Sequence of primers used in polymerase chain reaction (PCR) of human *FMO3* gene

Mutation	Primers	Location	Nucleotide sequences
Glu158Lys (Exon 4-5)	3420S (sense)	-42~-23	5'-GCTAGCATAGAAAAGAGGGA-3'
	3521A (antisense)	12~ 32	5'-CGAGAGTCACCCGAGTACCCG-3'
Glu308Gly (Exon 7)	3719S (sense)	-19~-1	5'-GTCTCTGTTTCCATACAG-3'
	3720A (antisense)	14~ 33	5'-CTTCGCAATCCATGAGCCTC-3'

전기이동상에서 나타나지 않아 3개의 절편으로(283bp, 205bp, 127bp) 잘린다. 이와 유사하게, Gly308 변이 대립유전자를 야기하는 A923G 점돌연변이를 검출하기 위해 엑손 7의 중합효소연쇄반응 증폭 산물(408bp)을 *Dra* II 제한효소로 처리하면, 야생형 산물(Glu308 : 'D')은 잘리지 않고 돌연변이가 있는 중합효소연쇄반응 산물(Gly308 : 'd')은 2개의 절편으로(293bp와 115bp) 잘려 408bp의 띠가 전기이동 상에서 나타나지 않는 것으로 점돌연변이의 유무를 확인하였다.²⁶⁾

4. 자료분석

클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도가 항정상태에 도달한 23명의 정신분열병 환자에서 다음 통계적인 상관(correlation)은 피어슨의 상관계수(Pearson's coefficient of correlation)를 산출하여 평가하였다 : 클로자핀 및 그 대사물들(*N*-desmethylclozapine, clozapine *N*-oxide)의 혈장농도와 단위체중당 일일용량 간의 상관, 단위체중당 일일용량으로 보정한 혈장농도와 연령 간의 상관, 단위체중당 일일용량으로 보정한 클로자핀 및 그 대사물들(*N*-desmethylclozapine, clozapine *N*-oxide)의 혈장농도 서로 간의 상관.

클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도가 항정상태에 도달한 23명의 정신분열병 환자 중 유전자를 분리하기 위한 채혈이 가능했던 14명에서, 혈장농도로부터 산출된 혈장 clozapine *N*-oxide/클로자핀의 개인별 몰농도 평균 비율인 클로자핀 *N*-산화대사능을, FMO3 유전자의 Lys 158 대립유전자에 대해 동형접합자(hh)이거나 이형접합자(Hh)인 8명과 Glu158 야생형 대립유전자에 대해 동형접합자(HH)인 6명에 대한 통계적인 차이를 Mann-Whitney U test로 검정하였고, FMO3 유전자의 Gly308 대립유전자에 대해 동형접합자(dd)이거나 이형접합자(Dd)인 6명과 Glu308 야생형 대립유전자에 대해 동형접합자(DD)인 8명에 대한 통계적인 차이도 Mann-Whitney

U test로 검정하였다.

또한 클로자핀을 투여받고 있는 정신분열병 환자 34명 중 유전자 분리를 위한 채혈이 가능했던 21명에서 한국인 FMO3 유전자에서 흔한 변이인 Lys158과 Gly308 변이에 대해 유전자형을 검색하였을 때, 본 연구에서의 야생형 Glu158과 변이형 Lys158 대립유전자에 대한 빈도 및 야생형 Glu308과 변이형 Gly308 대립유전자에 대한 빈도를 한국인 정상 자원자 210명에서 보고된²⁸⁾ Lys158과 Gly308 대립유전자 빈도와 피셔의 양측 정확검정(Fisher's two-sided exact test)으로 비교하였다.

통계적 분석은 SPSS 12.0(SPSS Korea, Korea) 과 SAS® 9.1(SAS Institute Inc., NC, USA) 소프트웨어를 사용하였다.

결 과

1. 연구대상의 임상적 특성

클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도가 항정상태에 도달한 23명의 정신분열병 환자의 연령은 17~48세로 30.7 ± 9.3(평균 ± 표준편차) 세이었고, 남자와 여자는 각각 16명과 7명이었다(표 2). 체중은 51~90(69.0 ± 12.1)kg 이었고, 클로자핀의 일일용량은 100~600(350.5 ± 188.5) mg이었으며, 단위체중당 일일용량(daily dose/body weight)은 0.50~9.23(5.06 ± 2.57) mg/kg/day이었다.

2. 항정상태 용량-혈장농도 관계 분석

클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도가 항정상태에 도달한 23명의 정신분열병 환자에서 총 43개씩의 혈장 클로자핀 및 그 대사물들의 농도자료가 수집되었으며, 클로자핀, *N*-desmethylclozapine, clozapine *N*-oxide의 혈장농도는 모두 단위체중당 일일용량에 선형적으로 비례하였다(클로자핀 : 피어슨의 상관계수(r)=0.770, $p <$

Table 2. Clinical characteristics of 23 schizophrenic patients (16 males and 7 females) whose plasma concentrations of clozapine and its metabolites attained the steady-state

	Mean	SD*	Range		
			Lower	Upper	Median
Age (years)	30.7	9.3	17	48	28
Body weight (kg)	68.1	10.8	51	90	65
Daily dose (mg/day)	373.3	173.1	100	600	400
Daily dose/Body weight (mg/kg/day)	5.38	2.34	1.16	9.23	6.35

* : Standard deviation

0.001 ; *N*-desmethylclozapine : $r=0.738$, $p<0.001$; clozapine *N*-oxide : $r=0.726$, $p<0.001$). 또한 단위체 중량 일일용량으로 보정한 클로자핀, *N*-desmethylclozapine, clozapine *N*-oxide의 혈장농도는 각각 221 ± 89 , 257 ± 110 , 55 ± 23 nM/mg/kg/day로, 모두 성별에 따라 유의한 차이를 보이지 않았으며 연령과도 유의한 상관관을 보이지 않았다.

3. 클로자핀 및 대사물들의 항정상태 혈장농도 상관

클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도가 항정상태에 도달한 23명의 정신분열병 환자에서 수집된 43개씩의 클로자핀과 *N*-desmethylclozapine 혈장농도(nM)는 밀접한 상관관을 보였으며($r=0.917$, $p<0.001$), 클로자핀과 clozapine *N*-oxide($r=0.789$, $p<0.001$) 및 *N*-desmethylclozapine과 clozapine *N*-oxide($r=0.751$, $p<0.001$)도 유의한 상관관을 나타내었다. 또한 클로자핀, *N*-des-

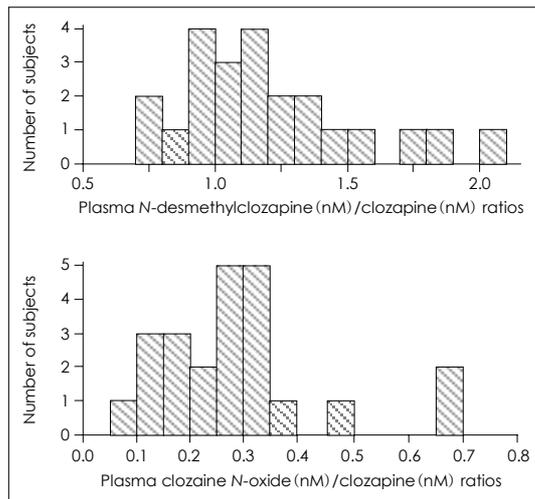


Fig 1. Distribution of steady-state plasma *N*-desmethylclozapine/clozapine molar concentration ratios (upper panel) and clozapine *N*-oxide/clozapine molar concentration ratios (lower panel) showing large interindividual variation of metabolism in 23 Korean schizophrenic patients whose plasma concentrations of clozapine and its metabolites attained the steady-state.

methylclozapine, clozapine *N*-oxide 각각의 혈장농도를 단위체중량 일일용량으로 보정한 후에도 클로자핀과 *N*-desmethylclozapine($r=0.834$, $p<0.001$), 클로자핀과 clozapine *N*-oxide($r=0.373$, $p=0.014$), *N*-desmethylclozapine과 clozapine *N*-oxide($r=0.302$, $p=0.049$)는 모두 통계적으로 유의한 상관관을 보였다.

4. 클로자핀 및 대사물들의 항정상태 혈장농도비 변화

클로자핀 및 그 대사물들의 항정상태 혈장농도를 2회 이상 측정된 5명의 환자들에서, 혈장 *N*-desmethylclozapine/clozapine 몰농도비(molar concentration ratio)의 전체(overall) 표준편차는 0.22이었으나 개체내(intraindividual) 표준편차를 평균한 값은 0.18이었고, 혈장 clozapine *N*-oxide/클로자핀 몰농도비의 전체 표준편차는 0.15이었으나 개체내 표준편차를 평균한 값은 0.09로 작았다. 항정상태 혈장농도를 반복하여 측정한 환자수는 적었지만, 환자들에서 이 비율들의 개체간 변이는 개체내 변이보다 더 커서 개체 내에서 비교적 일정하게 유지됨을 확인하여, 이 비율들을 개체 내 효소 활성도의 지표로 이용할 수 있음을 시사하였다.

클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도가 항정상태에 도달한 23명의 정신분열병 환자에서 혈장 *N*-desmethylclozapine/클로자핀의 몰농도비는 0.66~2.03(1.19 ± 0.30)으로 3.1배의 개체간 차이를 나타냈으며, 혈장 clozapine *N*-oxide/클로자핀의 몰농도비는 0.08~0.70(0.28 ± 0.15)으로 8.8배의 개체간 차이를 나타냈다(그림 1).

5. FMO3 유전자형 검색

클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도를 측정된 34명의 정신분열병 환자 중 유전자를 분리하기 위한 채혈이 가능했던 21명에서 검색한 *FMO3* 유전자 엑손(exon) 4의 *Hinf* I 부위에 존재하는 야생형(Glu158, 'H') 및 변이형(Lys158, 'h') 대립유전자와 엑손 7의 *Dra* II 부위에 존재하는 야생형(Glu308, 'D') 및 변이형(Gly158, 'd') 대립유전자에 대한 개개인의 *FMO3* 유전자형의 분

Table 3. *FMO3* variant allele frequencies and their distributions in the *FMO3* gene of 21 Korean schizophrenic patients

Genotypes	G472A(<i>Hinf</i> I)				A923G(<i>Dra</i> II)			
	HH	Hh	hh	Total	DD	Dd	dd	Total
Number of subjects	10	7	4	21	12	8	1	21
(%)	47.6	33.3	19.1	100	57.1	38.1	4.8	100

H : Glu158, h : Lys158, D : Glu308, d : Gly308

Table 4. In vivo human clozapine N-oxidation capacity(plasma molar concentration ratios of clozapine N-oxide/clozapine) related to FMO3 genotype patterns in 14 Korean schizo-phrenic patients

	HHDD (n=6)	HhDd (n=4)	hhDD (n=2)	hhDd (n=1)	hhdd (n=1)
Range	0.12–0.68	0.13–0.31	0.24–0.25		
Median	0.30	0.21	0.25		
Mean ± SD*	0.39 ± 0.23	0.21 ± 0.08	0.25 ± 0.01	0.26	0.26

H : Glu158, h : Lys158, D : Glu308, d : Gly308

* : Standard deviation

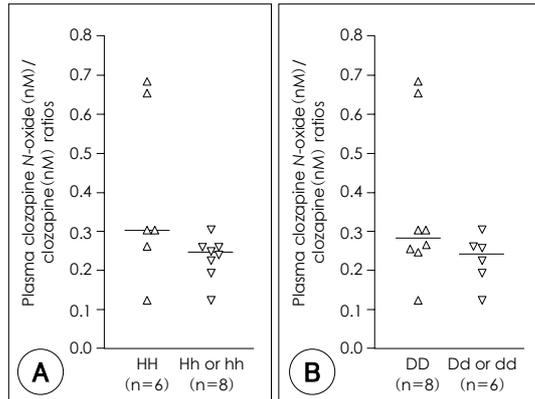


Fig. 2. Plasma molar concentration ratios of clozapine N-oxide/clozapine in 8 Korea schizophrenic patients with homozygous FMO3/Lys158 variant alleles ('hh') or heterozygous FMO3/Lys158 variant alleles ('Hh') were not different from those in 6 Korea schizophrenic patients with wild-type FMO3/Glu158 alleles ('HH') (A), Mann-Whitney U test, $p=0.121$), and the ratios in 6 Korea schizophrenic patients with homozygous FMO3/Gly308 variant alleles ('dd') or heterozygous FMO3/Gly308 variant alleles ('Dd') were not different from those in 8 Korea schizophrenic patients with wild-type FMO3/Glu308 alleles ('DD') (B), Mann-Whitney U test, $p=0.301$). Horizontal bars denote median values.

포를 표 3에 제시하였다. 엑손 4의 야생형('H')과 변이형('h') 대립유전자에 대한 빈도(frequency)는 각각 0.64와 0.36이었으며, 엑손 7의 야생형('D')과 변이형('d') 대립유전자에 대한 빈도는 각각 0.76과 0.24이었다.

6. FMO3 유전자형과 클로자핀 N-산화대사능 상관

클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도가 항정상태에 도달한 23명의 정신분열병 환자 중 14명에서 유전자를 분리하기 위한 채혈이 가능했으며, 이 14명 환자에서 혈장농도로부터 산출한 혈장 clozapine N-oxide/클로자핀의 개인별 몰농도 평균비율을 클로자핀 N-산화대사능의 지표로 이용하였다.

클로자핀 N-산화대사능은 Lys158 대립유전자에 대

해 동형접합자(hh)이거나 이형접합자(Hh)인 8명과 Glu158 야생형 대립유전자에 대해 동형접합자(HH)인 6명이 통계적으로 유의한 차이가 없었고($p=0.121$), Gly308 대립유전자에 대해 동형접합자(dd)이거나 이형접합자(Dd)인 6명은 Glu308 야생형 대립유전자에 대해 동형접합자(DD)인 8명과 통계적으로 유의한 차이가 없었다($p=0.301$, 표 4, 그림 2).

고 찰

클로자핀은 기존의 항정신병 약물과는 달리 장기적으로 투여하더라도 도파민계나 GABA(γ -aminobutyric acid)계의 초과민성을 유발하지 않고, 도파민 D₂ 수용체에 대한 차단 효과가 약한 반면에 D₁ 및 D₄ 수용체에 대한 차단 효과는 상대적으로 더 강하며, 도파민 D₂ 수용체 차단 효과에 비해 세로토닌(5-HT₂) 수용체 차단 효과의 상대적 비율이 높다.²⁹⁾³⁰⁾ 따라서 비정형적 항정신병 약물의 원형(prototype)으로 간주되고 있으나, 무과립구증이라는 심각한 약물유해작용 가능성 때문에 제한적으로 사용되고 있다.

본 연구에서는 우선 클로자핀을 투여받고 있는 환자에서 클로자핀과 그 대사물의 농도를 혈장에서 측정하고 클로자핀의 용량과 클로자핀 및 그 대사물들 혈장농도 사이의 상관을 규명하고자 하였다. 클로자핀 및 그 대사물들의 혈장농도가 항정상태에 도달한 정신분열병 환자 23명에서 클로자핀, N-desmethylozapine, clozapine N-oxide의 혈장농도는 단위체중당 일일용량에 선형적으로 비례하였으며 Haring 등³¹⁾의 보고와 유사한 결과를 나타내었다. Haring 등³¹⁾은 단위체중당 일일용량으로 보정한 클로자핀 혈장농도가 여성에서는 남성의 69.3%이고 연령이 많을수록 더 높다고 보고하였지만, 본 연구에서는 단위체중당 일일용량으로 보정한 클로자핀과 N-desmethylozapine 및 clozapine N-oxide의 혈장농도가 성별 및 연령에 따라 차이를 보이지 않았다. 현재

까지 성별에 따른 혈장 클로자핀 농도의 차이에 대한 연구는 규명되지 않았으며, 연령의 증가에 따른 혈장 클로자핀 농도의 증가는 고연령군에서 간장 대사효소 활성도의 감소에 기인할 것으로 추측하고 있으나,³²⁾ 본 연구에서의 연구 결과 단위체중당 일일용량으로 보정한 클로자핀의 혈장농도뿐 아니라 클로자핀의 대사물인 *N*-desmethylclozapine 및 clozapine *N*-oxide의 혈장농도도 연령에 따른 차이를 보이지 않았다. 연령 및 성별에 따른 클로자핀의 대사 차이에 대해서는 추후 연구가 더 필요할 것으로 판단된다.

또한 클로자핀의 항정상태 일일용량이 100~600mg인 이 연구에서 클로자핀의 최저 혈장농도(trough concentration)는 100~2,971nM이었으며, 단위체중당 일일용량으로 보정한 클로자핀의 최저 혈장농도는 27~443nM/mg/kg/day이었다(221±89). 따라서 클로자핀을 일일용량 100~500mg으로 경구투여하고 있는 환자에서 투약 후 약 12시간의 클로자핀 혈청농도가 184~1,836nM이었고 임상적인 반응과 연관된 클로자핀의 혈청농도가 612~1,224nM(체중당 일일용량으로 보정하면 153~306 nM/mg/kg)라는 기존의 보고들과 유사하였다.¹⁾³³⁻³⁵⁾

한편, 이 연구에서 항정상태 클로자핀의 혈장농도에 대한 *N*-desmethylclozapine의 혈장농도비는 1.19±0.30으로 기존 보고³⁵⁾에서의 평균값인 0.75~0.90에 비해 훨씬 큰 값을 나타냈으며, 클로자핀의 혈장농도에 대한 clozapine *N*-oxide의 혈장농도비는 0.28±0.15로 기존 보고³⁵⁾에서의 평균값인 0.10~0.35와 유사하였다.

시험관내 연구에서 클로자핀의 *N*-산화는 주로 CYP-3A4에 의해 촉매되지만 FMO3도 관여됨이 보고되어 있어,²²⁻²⁴⁾ 그림 1에 정신분열병 환자 23명의 항정상태 혈장 clozapine *N*-oxide/클로자핀 몰농도비를 빈도분포도로 나타냈을 때 Sachse 등²³⁾이 보고한 반최빈값(antimode)인 0.6이 넘는 환자가 2명 있었으며 이 연구에서 검색한 FMO3 유전자형에 대한 이들의 유전자형은 'HHDD'이었다. 그러나 클로자핀 및 그 대사물의 혈장농도가 항정상태에 도달한 23명의 정신분열병 환자 중 유전자를 분리하기 위한 채혈이 가능했던 14명에서 Lys158 및 Gly308 변이 대립유전자에 대한 유전자형은 Sachse 등²⁵⁾의 보고와 마찬가지로 클로자핀의 *N*-산화에 유의한 영향을 미치지 않았다.

한편 클로자핀을 투여 받고 있는 정신분열병 환자 34명 중 유전자 분리를 위한 채혈이 가능했던 21명에서 한

국인 FMO3 유전자에 가장 흔한 변이인 Lys158과 Gly308 변이에 대해 유전자형을 검색하였을 때, 야생형 Glu158과 변이형 Lys158 대립유전자에 대한 빈도는 각각 0.64와 0.36이었고 야생형 Glu308과 변이형 Gly308 대립유전자에 대한 빈도는 각각 0.76과 0.24이었다. 한국인 정신분열병 환자에서의 이 결과를 한국인 정상 자원자 210명을 대상으로 Lys158과 Gly308 변이 빈도를 보고한 결과²⁸⁾와 비교하였을 때, Gly308 대립유전자의 발현빈도는 정상인(0.16)과 유의한 차이가 없었으나(p=0.201) Lys158 대립유전자는 정상인(0.17)에 비해 그 빈도가 유의하게 높았다(p=0.005). 그러나 FMO3 유전자 변이와 정신분열병 연관성의 의미에 대해서는 더 많은 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, 이 연구에서 한국인 정신분열병 환자에서 항정상태 시 경구투여된 클로자핀의 용량과 클로자핀 및 그 대사물들의 혈장약물농도는 유의한 상관을 보였고 FMO3 유전자의 Lys158과 Gly308 변이는 클로자핀의 생체내 *N*-산화에 유의한 영향이 없었다.

중심 단어 : 클로자핀 · Clozapine *N*-oxide · Flavin-containing monooxygenase 3(FMO3) · 유전자 변이 · 정신분열병.

■ 감사의 글

Clozapine 농도 분석을 수행하신 안성완 선생님(연구 당시 소속 : 인하대학교 의과대학 약리학교실 ; 현재 소속 : 연세대학교 원주의과대학 약리학교실)께 진심으로 감사드립니다.

참고문헌

1. Baldessarini RJ, Frankenburg FR. Clozapine, a novel antipsychotic agent. N Eng J Med 1991;324:746-754.
2. Kane JM, Honigfeld G, Singer J, Meltzer H. Clozapine for the treatment-resistant schizophrenic. A double blind comparison with chlorpromazine. Arch Gen Psychiatry 1988;45:789-796.
3. Meltzer HY, Bastani B, Kwon KY, Ramirez LF, Burnett S, Sharpe J. A prospective study of clozapine in treatment-resistant schizophrenic patients. I. Preliminary report. Psychopharmacol (Berl) 1989;99 suppl:S68-S72.
4. Hippus H. The history of clozapine. Psychopharmacol (Berl) 1989;99 Suppl:S3-S5.
5. Alvir JM, Lieberman JA, Safferman AZ, Schwimmer JL,

- Schaaf JA. Clozapine-induced agranulocytosis. Incidence and risk factors in the United States. *N Eng J Med* 1993;329:162-167.
6. Tamminga CA, Thaker GK, Moran M, Kakigi T, Gao XM. Clozapine in tardive dyskinesia: observations from human and animal model studies. *J Clin Psychiatry* 1994; 55 Suppl B:102-106.
 7. McElroy SL, Dessain EC, Pope HG, Cole JO, Keck PE Jr, Frankenberg FR, et al. Clozapine in the treatment of psychotic mood disorders, schizoaffective disorder, and schizophrenia. *J Clin Psychiatry* 1991;52:411-414.
 8. Zarate CA Jr, Tohen M, Baldessarini RJ. Clozapine in severe mood disorder. *J Clin Psychiatry* 1995;56:411-417.
 9. Safferman AZ, Kane JM, Aronowitz JS, Gordon MF, Pollack S, Lieberman JA. The use of clozapine in neurologic disorders. *J Clin Psychiatry* 1994;55 Suppl B:98-101.
 10. Ansler HA, Teerenhovi L, Barth E, Harjula K, Vuopio P. Agranulocytosis in patients treated with clozapine. A study of the Finnish epidemic. *Acta Psychiatr Scand* 1977;56:241-248.
 11. Anderman B, Griffith RW. Clozapine-induced agranulocytosis: a situation report up to August 1976. *Eur J Clin Pharmacol* 1977;11:199-201.
 12. Krupp P, Barnes P. Leponex-associated granulocytopenia: a review of the situation. *Psychopharmacol (Berl)* 1989;99 Suppl:S118-S121.
 13. Krupp P, Barnes P. Clozapine-associated agranulocytosis: risk and aetiology. *Br J Psychiatry Suppl* 1992;17: 38-40.
 14. Gerson SL, Meltzer H. Mechanisms of clozapine-induced agranulocytosis. *Drug Saf* 1992;7 Suppl 1:17-25.
 15. Gerson SL, Arce C, Meltzer HY. *N*-Desmethylclozapine: a clozapine metabolite that suppresses haematopoiesis. *Br J Haematol* 1994;86:555-561.
 16. Sofer SS, Ziegler DM. Microsomal mixed-function amine oxidase. Oxidation products of piperazine-substituted phenothiazine drugs. *Drug Metab Dispos* 1978;6:232-239.
 17. Al-Waiz M, Ayesh R, Mitchell SC, Idle JR, Smith RL. A genetic polymorphism of the *N*-oxidation of trimethylamine in human. *Clin Pharmacol Ther* 1987;42:588-594.
 18. Phillips IR, Dolphin CT, Clair P, Hadley MR, Hutt AJ, McCombie RR, et al. The molecular biology of the flavin-containing monooxygenases of man. *Chem Biol Interact* 1995;96:17-32.
 19. Overby LH, Carver GC, Philpot RM. Quantitation and kinetic properties of hepatic microsomal and recombinant flavin-containing monooxygenases 3 and 5 from humans. *Chem Biol Interact* 1997;106:29-45.
 20. Dolphin CT, Janmohamed A, Smith RL, Shephard EA, Phillips IR. Missense mutation in flavin-containing monooxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nat Genet* 1997;17:491-494.
 21. Brunelle A, Bi YA, Lin J, Russell B, Luy L, Berkman C, et al. Characterization of two human flavin-containing monooxygenase (form 3) enzymes expressed in *Escherichia coli* as maltose binding protein fusions. *Drug Metab Dispos* 1997;25:1001-1007.
 22. Tugnait M, Hawes EM, McKay G, Rettie AE, Haining RL, Midha KK. *N*-Oxygenation of clozapine by flavin-containing monooxygenase. *Drug Metab Dispos* 1997;25: 524-527.
 23. Fang J, Coutts RT, McKenna KF, Baker GB. Elucidation of individual cytochrome P450 enzymes involved in the metabolism of clozapine. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 1998;358:592-599.
 24. Khan AY, Preskorn SH. Examining concentration-dependent toxicity of clozapine: role of therapeutic drug monitoring. *J Psychiatr Pract* 2005;11:289-301.
 25. Sachse C, Ruschen S, Dettling M, Sehley J, Bauer S, Müller-Oerlinghausen B, et al. Flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) polymorphism in a white population: allele frequencies, mutation linkage, and functional effects on clozapine and caffeine metabolism. *Clin Pharmacol Ther* 1999;66:431-438.
 26. Kang JH, Chung WG, Lee KH, Park CS, Kang JS, Shin IC, et al. Phenotypes of flavin-containing monooxygenase activity determined by ranitidine *N*-oxidation are positively correlated with genotypes of linked *FMO3* gene mutations in a Korean population. *Pharmacogenetics* 2000;10:67-78.
 27. American Psychiatric Association. DSM-IV: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders. 4th ed. Washington DC: American Psychiatric Association;1994. p.285-286.
 28. Volpicelli SA, Centorrino F, Puopolo PR, Kando J, Frankenburg FR, Baldessarini RJ, et al. Determination of clozapine, norclozapine, and clozapine *N*-oxide in serum by liquid chromatography. *Clin Chem* 1993; 39:1656-1659.
 29. Coward DM. General pharmacology of clozapine. *Br J Psychiatry Suppl* 1992;17:5-11.
 30. Richelson E. Neuroleptic affinities for human brain receptors and their use in predicting adverse effects. *J Clin Psychiatry* 1984;45:331-336.
 31. Haring C, Meise U, Humpel C, Saria A, Fleischhacker WW, Hinterhuber H. Dose-related plasma levels of clozapine: influence of smoking behaviour, sex and age. *Psychopharmacol (Berl)* 1989;99 Suppl:S38-S40.
 32. Platt D. Pharmacotherapie und Alter. *Triangel* 1986; 25:43-52. Cited from Haring C, Meise U, Humpel C, Saria A, Fleischhacker WW, Hinterhuber H. Dose-related plasma levels of clozapine: influence of smoking behaviour, sex and age. *Psychopharmacol (Berl)* 1989;99 Suppl: S38-S40.
 33. Choe MG, Lehr RG, Hsuan F, Honigfeld G, Smith HT, Borison R, et al. Multiple-dose pharmacokinetics of clozapine in patients. *Pharm Res* 1987;4:402-405.
 34. Perry PJ, Miller DD, Arndt SV, Cadoret RJ. Clozapine

and norclozapine plasma concentrations and clinical response of treatment-refractory schizophrenic patients. *Am J Psychiatry* 1991;148:231-235.

35. Jann MW, Grimsley SR, Gray EC, Chang WH. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of clozapine. *Clin Pharmacokinet* 1993;24:161-176.