

약리 독성학 or 독성 약리학

AITOX

(www.darwinconsultings.com)

박영철 (독성학박사)
<detox35@hanmail.net>

<드리는 말씀>

이번 자료는 다음과 같이 3가지 질문에 대한 답을 얻을 수 있도록 내용이 디자인 되었습니다.

- Paracelsus의 약과 독은 용량이 결정한다. 이와 같은 관념은 우리에게 독성과 약리 기전에 대한 이해를 얼마나 왜곡했고 신약 개발의 노력에 악영향을 주지는 않았을까?
- 지난 20여년 동안 신약의 모달리티가 17개가 출현하였으며 그들에 대한 비교·판단이 잘 이루어질 수 있을 정도로 small molecule의 독성과 약리에 대해 우리는 어떻게 이해하고 있을까?
- Small molecule의 신약 개발 과정에서 응용 확장성을 위해 우리는 무엇을 이해하여야 하고 인허가 기관과의 인식 차이는 어떻게 극복할 것인가?

결과적으로 약리독성학 또는 독성약리학이라는 학문을 새롭게 다지는 기초 자료가 되길 바랍니다.

<약리독성학 or 독성약리학 이해를 위한 핵심 근거>

- 독성학의 핵심은 제1상반응의 cytochrome P450과 제2상반응의 glutathione에 대한 이해이며 다음의 2가지를 통해 근거가 제시되었습니다.
- ① Cytochrome P450을 통해 독성기전뿐만 아니라 항암제 약리에 대한 기본 원리
 - ② Glutathione은 독성대사체와 산화적 스트레스-유도 물질을 동시에 제거할 수 있는 유일한 물질이며 신경퇴행성질환(AD 및 ALS)의 예방 및 진행의 지연을 통해 신약 개발의 제1의 소재

<내용>

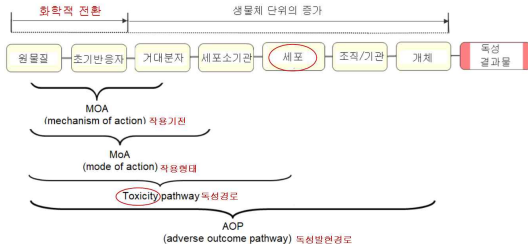
1. 독성학 개념과 현대 독성학
2. 위해성평가(Risk assessment)와 현대 3대 독성학
3. 규제독성학 측면에서 의도적 노출과 의도적 노출의 차이
4. 기전독성학
 - 1) 기전 독성학(Mechanistic toxicology) 개념
 - 2) Active drug와 prodrug의 이해와 중요성
 - 3) Active drug와 prodrug의 예시
 - 4) Active drug 예시
 - 5) Prodrug 예시: protonsil
5. 약물의 약리기전 및 독성기전을 위한 4대 거대분자와 주요 결합 반응
 - 1) 중요성과 의미
 - 2) 결합 종류에 따른 특성
6. 유기화학물질 독성기전의 Central dogma
 - 1) Central dogma 의미
 - 2) 독성과 유효성의 용량 교집합에 대한 의미:
 - 6-1. 직접작용 독성물질(direct-acting toxicants)
 - 6-2. 간접작용 독성물질(indirect-acting toxicants)
 - 6-2-1. Reactive metabolites: Carbon-centered radicals
 - 6-2-2. Reactive metabolites: Redox-active species (RAS)
 - 6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite
 - 6-3. 간접작용 독성물질(indirect-acting toxicants)의 요약
 - 6-4. 직접작용 독성물질 vs 간접작용 독성물질의 비교 분석
7. Biotransformation(생화학적 전환)
 - 1) 개념
 - 2) 제1상반응(Phase I reaction)의 핵심 효소 - Cytochrome P450 효소특성과 촉매 반응 사이클
 - 3) Cytochrome P450의 독성학적 및 임상학적 중요성
 - 4) Cytochrome P450을 이용한 항암치료 기법 개발
 8. 유기화학물질 독성기전의 central dogma - Phase II reaction
 - 1) 제2상반응(Phase II reaction)의 종류
 - 2) 제2상반응(Phase II reaction)의 특이적 예시
 - 3) Glutathione (GSH) 포함
 - 4) 신경퇴행성 질환에서의 Methionine 독성
 - 5) 신경퇴행성 질환 치료에서 Glutathione 중요성
 9. Biotransformation - Phase I & Phase II reaction 관련 효소의 공동 발현
 - 10 요약

1. 독성학 개념과 현대 독성학

1) 전통적인 독성학: 생물체 독성시험 → 생태 및 인체의 부정적인 영향 예측(prediction)

2) 현대 독성학: 기전, 기술, 규제 독성학등의 3대 독성학으로 구성

① 기전 독성학(Mechanistic toxicology) - 분자 및 세포 수준의 영향을 기반 개체 수준의 독성기전



1. 독성학 개념과 현대 독성학

2) 현대 독성학 - 3대 독성학으로 구성

② 기술독성학(Descriptive toxicology)

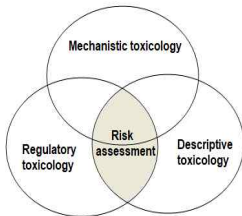
- 독성시험을 통해 화학물질의 정량 및 정성의 독성지표 확인
- 예시) NOAEL(최대무독성용량), 독성표적기관(toxicity target organ): 간독성, 심장독성 등

③ 규제독성학(Regulatory toxicology)

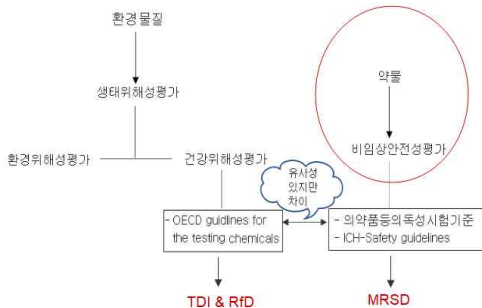
- 비발암물질 - 인체노출안전기준 (=HBGV; Health based guidance value)
- 발암물질 - 위험도(Risk level)

2. 위해성평가(Risk assessment)와 현대 3대 독성학

- 위해성평가: 인체노출안전기준 & 위해도 추정 과정
- 위해성관리: 추정된 위해성평가를 다양한 측면에서 검토 및 결정
- 현대 3대 독성학은 위해성평가의 핵심도구



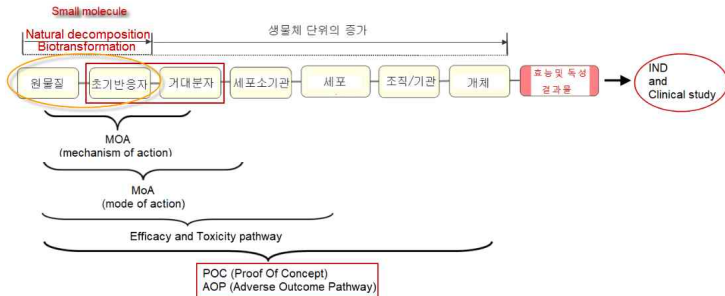
3. 규제독성학 측면에서 의도적 노출과 의도적 노출의 차이



4. 기전독성학

1) 기전 독성학(Mechanistic toxicology) 개념 - 분자 및 세포 수준의 영향을 기반 개체 수준의 독성기전

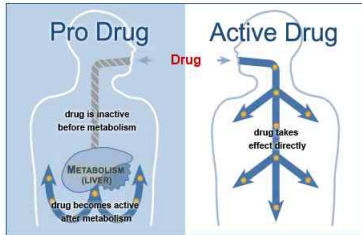
- (원물질 or 대사체) + 수용체 → **약리** vs (원물질 or 대사체) + 4대 거대분자 → **독성**



4. 기전독성학

2) Active drug와 prodrug의 이해와 중요성

- 독성이 약리기전으로 설명되며 약물의 종류와 기전에 대한 이해의 필요성
- Active drug: 원물질 자체의 **약리작용 분자단(Pharmacophore)**이 체내에서 약리작용하는 약물
- Prodrug: 대사 또는 biotransformation(생화학적 전환) 후 생긴 약리작용 분자단에 의해 약리작용, 즉 pharmacologically inactive medication의 prodrug으로 구분됨(Oyon, 2015).
- 대부분 약물은 활성약물 vs 전구약물은 약 5-7% (Rautio 등, 2008)



4. 기전독성학

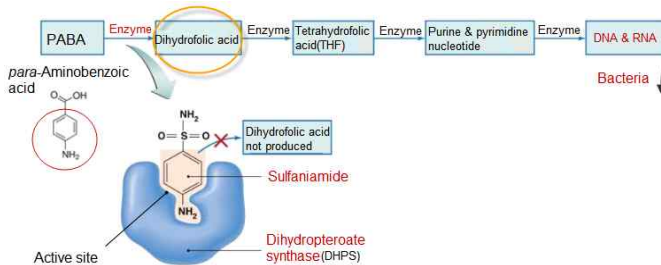
3) Active drug와 prodrug의 예시

ACTIVE DRUG	PRODRUG
Sulfanilamide	Protonsil
Dopamine	Levodopa
Ampicillin	Talampicillin
Oxazepam	Diazepam
Mercaptopurine	Azathioprine
Hydrocorticosone	Cortisone
Adrenaline	Dipiverfin
Predinsolone	Prednisone
Enalprilat	Enalpril
Phosphoramide mustard	Cyclophosphamide

4. 기전독성학

4) Active drug 예시

- Sulfanilamide (항균제로 사용되었지만 다른 것으로 대체되고 있음)



Inhibition of folic acid synthesis by sulfonamide

(Bauman, 2012)

4. 기전독성학

5) Prodrug 예시: protosil

- Protosil: Penicillin 발견 이전의 최초의 항생제

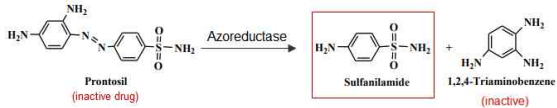


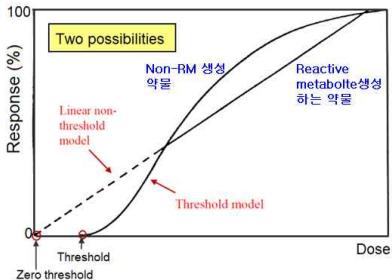
Fig. 1: Protosil metabolism in vivo

(Mohammed 등, 2017)

5. 약물의 약리기전 및 독성기전을 위한 4대 거대분자와 주요 결합 반응

1) 중요성과 의미

- ① 약물과 표적 분자와의 결합 형태인 (가역적 비공유결합) 또는 (비가역적 공유결합)에 따라 독성의 양상이 달라짐
- ② (가역적 비공유결합)에 의한 독성은 과잉용량에 기인하며 포화 및 가역적 반응이 특징.
- ③ (비가역적 공유결합)에 의한 독성은 단 하나의 물질로 발현되며 **threshold의 부존재**로 독성의 질적 및 양적 특성은 용량이 약과 독을 결정한다는 Paracelsus의 dogama와 배치됨.



<그림> 전형적 2종류의 용량-반응곡선(박영철, 2019)

- Zero - threshold 의 경우 약물은 **toxicity (risk) - benefit analysis** 기반으로 신약 개발이 필요함

5. 약물의 약리기전 및 독성기전을 위한 4대 거대분자와 주요 결합 반응

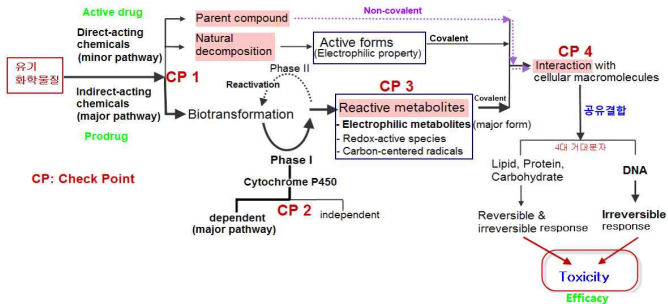
2) 결합 종류에 따른 특성

결합종류	특이성	결합 종류	결합의 특성 및 독성기전
• 비공유결합	표적 특이성(active drug & prodrug)	- 수소결합 - 이온 결합 - 반데발스 force - 소수성 상호작용	- 단백질인 막수용체, 세포내 수용체 및 이온채널 효소(ion channels enzyme) 등과 결합 동이며 가역적 결합에 비활성 2차 신호전달체계(2nd messenger)의 일시적 활성유도
• 공유결합	- Prodrug - 표적 비특이성	- 수소발체 (Hydrogen abstraction)	- CytochromeP450을 통한 수소발체를 통해 라디칼 생성 → Carbon-centered radical - Protein-protein, DNA-DNA, DNA- protein 등 cross link 형성 - Lipid radicals 생성: 지질과산화(lipid peroxidation) - DNA와 단백질 등의 strand break
		- 전자전달 반응 (Electron transfer reaction)	Redox active species가 전자의 수용체 및 공여자로 역할 - ROS 생성 및 fenton pathway를 통해 라디칼 생성 - 세포의 산화-환원 비율 등 세포내 환경변화
	표적비특이적(active drug) vs 표적 특이성의가능성 (Prodrug)	공유결합 (Covalent binding)	- DNA와 단백질 등과의 결합을 통해 adduct 형성을 통한 DNA, 단백질 손상 - Protein-protein, DNA-DNA, DNA- protein 등 cross link 형성 - 발암화 기전 - 비가역적 결합이며 표적 거대분자의 영구적으로 기능을 변형-① Active drug ② Prodrug: Electrophilic metabolite(procedure)

6. 유기화학물질 독성기전의 Central dogma

1) **Central dogma 의미:** 유기물질의 독성 유발에 대한 MOA(mechanism of action)이지만 약물의 유효성에 대한 MOA이기도 함. 이는 독성과 유효성의 용량 영역이 교집합을 의미함.

2) **독성과 유효성의 용량 교집합에 대한 의미:** 독성과 유효성의 명확한 경계를 기반으로 한 신약 개발의 접근은 바람직한 방법이 아님. 즉, toxicity(risk)-benefit을 기반으로 개발과 인허가 절차가 수행되어야 함.



(박영철, 2010)

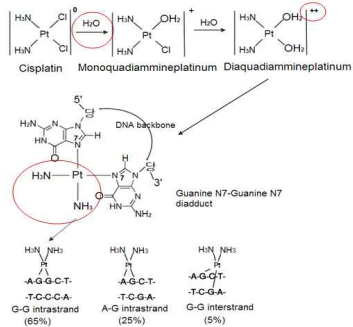
6-1. 직접작용독성물질(direct-acting toxicants)

1) 개념

- Direct-acting chemical: **효소의 촉매작용**이 없이 자연분해 친전자성(electrophilic)를 갖는 active compound(활성형 물질)

2) 예시

<예시-1> Cisplatin: 세포독성 1세대 항암제

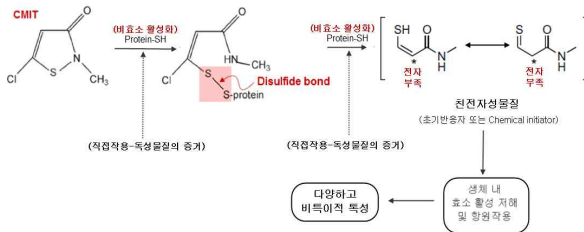


<그림> 가수분해에 의한 Cisplatin의 친전자성 전환 및 DNA 친핵성 부위와의 공유결합

(Martinho 등, 2019)

6-1. 직접작용독성물질(Direct-acting toxicants)

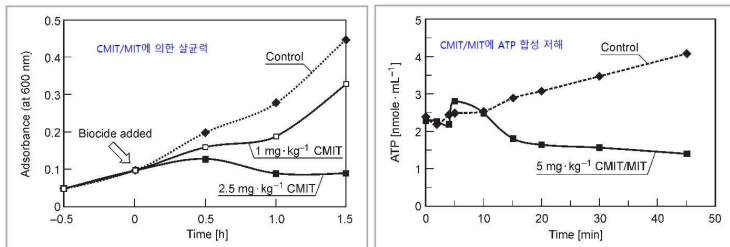
<예시-2> CMIT(chloromethylisothiazolinone) - 가슴기살균제 사건에서 사용된 살생물제



<그림> CMIT의 비효소적 활성화를 통해 친전자성 물질 발생기전(Mutschler 등, 2009; 박영철, 2019)

6-1. 직접작용독성물질(Direct-acting toxicants)

<예시-2> Biocide - (chloromethylisothiazolinone: CMIT)의 살생기전은 ATP 합성 저해



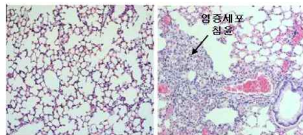
<그림> CMIT의 비효소적 활성화를 통해 독성을 유발하는 기전(Williams등, 2007)

6-1. 직접작용독성물질(Direct-acting toxicants)

<예시-2> CMIT (chloromethylisothiazolinone)은 중간 독성 차이가 없는 물질임. **미생물**뿐만 아니라 CMIT는 **동물** 그리고 **인체**에서도 확인이 되었음. 이와 같이 **직접작용독성물질**은 독성의 중간 차이가 없는 물질

<표> CMIT/MIT의 기도점적을 통한 수컷 마우스에서의 염증 중증도

Degree of lung inflammation	Male			
	0	Low dose	Middle dose	High dose
No significant	6	3	3	
Minimal		3	3	2
Mild				3(2)
Moderate				
Severe				
P-Value		>0.05	>0.05	<0.05



(A) 대조군

(B) CMIT/MIT

(김하영 등, 2017)

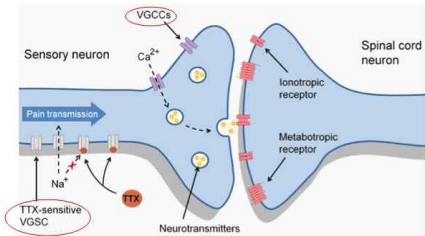
가습기살균제 사건의 인과관계 확인에서 2가지 문제점

- 역학적 결과를 독성학적 시험으로 확인했다는 측면
- 독성물질의 특성에 대한 이해가 부족했다는 점

6-1. 직접작용독성물질(Direct-acting toxicants)

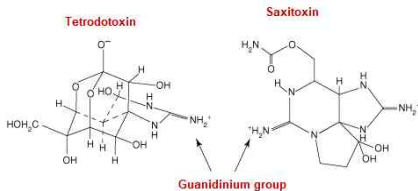
<예시-3: Toxin >

- 체내 유입 후 **가수분해** 및 주변 단백질과 상호작용으로 즉각적으로 활성화되어 **빠른 독성 유발**
- 예시물질: Gilvocarcin V, mitomycin C, formaldehyde, TCDD, methylisocyanate, HCN(시안화수소), **tetrodotoxin** 등
- 복어 독성의 Tetrodotoxin(TTX), 폐류 독성의 Saxitoxin와 brevetoxin, 화살촉 개구리 독성의 batrachotoxin: Voltage-gated sodium channels(VGSC) → 활동전위(action potentials)의 방해



VGSC: Voltage gated sodium channel. 전압-게이트 나트륨 채널)

(LookForDiagnosis, 2024)



<그림> Guanidinium group에 의한 채널 비활성 (Finch 등, 2018)

6-1. 직접작용독성물질(Direct-acting toxicants)

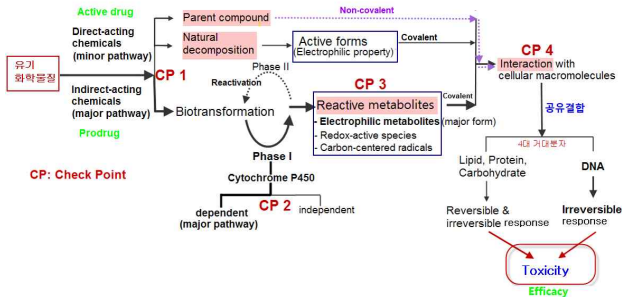
3) 직접작용독성물질 vs 간접작용독성물질의 비교 분석

항목	직접작용-독성물질	간접작용-독성물질
초기반응자로의 전환 방법	단백질 친핵성 부위와 상호작용등과 같은 자연분해	- 효소적 대사에 의한 생화학적 전환 ① Cytochrome P450 ② CYP 외의 기타 효소
초기반응자의 이름	친전자성전환체(electrophilics)	활성중간대사체 3종류: 친전자성대사체, 유기라디칼대사체, 산화-환원 순환대사체 등.
독성의 특성	- 급성 독성 - 물질에 따라 차이가 있지만, 반응성이 큰 물질은 첫 노출 부위부터 독성을 유발할 가능성 - 표적에 분포가 다른 CYP 활성화에 의존하지 않아 표적기관이 없는 비특이적 독성유발의 가능성 있음. - 효소 또는 단백질과 공유결합으로 자가항원(autoantigen) 전환하여 면역독성 유발	- 만성 독성 - 다양한 조직에서 다양한 cytochrome P450이 존재하는데 활성화를 유도하는 CYP가 어느 조직에 존재하느냐에 따라 표적독성을 유발할 가능성이 있음. - 활성중간대사체 3종류는 독성의 유발에 있어서 공통성 그리고 차이점도 있어 다양한 독성유발-DNA 손상, 단백질과 상호작용, 산화 스트레스 등.
생체 구성의 거대 분자와의 상호작용 방법	- DNA 염기의 친핵성 부분과 분리되지 않는 공유결합 - 단백질의 친핵성 부위인 -SH기와 공유결합	- DNA 및 단백질의 친핵성 부분과 분리되지 않는 공유결합 - 체내 무기질 등과 상호작용하여 산화 스트레스를 유발
종간 차이 및 이유	없음: 독성물질의 활성화와 단백질 친핵성 부위 및 pH 등에 의해 이루어지는데 모든 생물체가 이러한 조건은 다 가지고 있어 종간 차이가 없이 활성화	있음: 활성화를 유도하는 cytochrome P450이 생물종마다 차이가 있으며 생물종에서 동일 효소의 존재에 대한 유무에 따라 종간 차이 유무가 결정됨
원리가 응용된 독성시험	In vitro 유전독성시험 직접법: cytochrome P450을 포함한 랫드 간의 S9 분획이 없이 시험방법	In vitro 유전독성시험의 대사활성법: cytochrome P450이 포함된 S9 분획이 있는 시험방법
약물 및 유기물질의 특징 및 잠재성	- 급성독성을 유발하며 노출되는 부위부터 독성유발가능성이 있어 항암제 외의 약물의 개발은 쉽지 않음 - 초기반응자의 생성이 효소에 의한 것이 아니고 비효소적 빠른 전환에 의해. 이러한 빠른 전환의 특성으로 미생물의 살생제로 개발	항암제 및 저농도 장기간 노출에 의한 발암물질도
화학물질의 종류	Gilvocarcin V, cisplatin, mitomycin C, formaldehyde, tetrodotxin, TCDD, methylisocyanate, HCN 등	Polycyclic aromatic hydrocarbons, cyclophosphamide, dibrochloropropane 등 대부분의 유기성 외인성물질

6-2. 간접 작용독성물질(indirect-acting toxicants)

• Biotransformation(생화학적 전환)에 의한 3종류 **Reactive metabolite**(=intermediates, 활성중간대사체)

- ① Organic 또는 carbon-centered radicals(유기 및 탄소부위-라디칼)
- ② Redox-active species(산화-환원의 순환반응 대사체)
- ③ Electrophilic metabolites(친전자성 대사체)



<그림> 유기화학물질 독성기전의 central dogma(박영철, 2010)

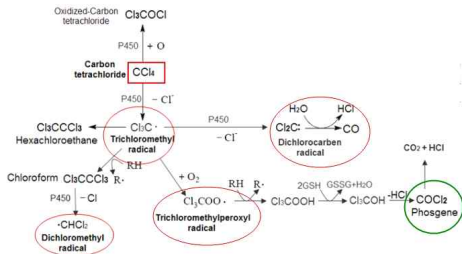
6-2-1. Reactive metabolites: Carbon-centered radicals

1) 개념

- Organic 또는 carbon-centered radicals(유기 및 탄소부위-라디칼): 전자의 추가나 발취에 의해 탄소의 최외각 궤도(orbital)에 하나 또는 더 이상의 비쌍 전자(unpaired electron)를 가진 대사체.

2) 예시

- CCl_4 (사염화탄소)



(박영철, 2010)

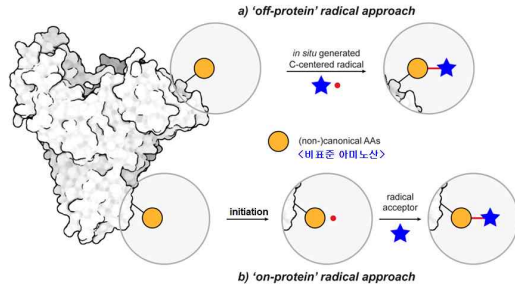
<그림> 사염화탄소의 biotransformation: 한 종류만 아니라 여러 종류 carbon-centered radicals과 더불어 가장 강력한 친전자성대사체인 **Phosgene**으로도 전환 - 독성의 불예측성과 비표적성 특성

6-2-1. Reactive metabolites: Carbon-centered radicals

3) 신약 개발을 위한 응용

<예시> Protein의 변연 후 수정(post-translational modifications) → 암호화된 단백질의 다양성 2-3배 확장

- 수정 유형은 크게 **화학기의 첨가(addition of chemical groups)**, 갈라짐(cleavage), 복잡한 분자의 첨가(addition of complex molecules), 분자 내 결합 형성(formation of intramolecular bonds) 등의 4 class로 200여 가지 유형
- Single electron carbon-centred **C•** species 이용 → **Site-specifically "edit" proteins**을 통해 활성, 단백질-단백질 상호작용, location
- Chemical biology 분야에서 시도되고 있는 번역 후 수정의 유형



(Chen 등, 2023)

Figure 1. (a) General scheme for "off-protein" radical approach.
(b) General scheme for "on-protein" radical protein modification.

6-2-2. Reactive metabolites: Redox-active species(RAS)

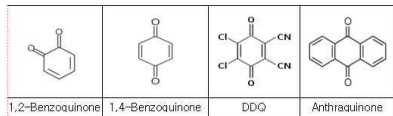
1) 개념

- Redox-active species(산화-환원의 순환반응 대사체):

- ① 산화-환원의 순환반응이 가능한 라디칼성 대사체로 DNA, 지질 및 단백질과 결합을 통해 독성을 유발
- ② Fenton pathway를 통해 발생하는 부산물에 의해 독성을 유발하는 간접적인 방법도 있음.

2) 구조

- Benzoquinone이라고 불리기도 하는 **quinone(퀴논)**이 모든 RAS의 기본구조임.
- <그림>에서처럼 benzoquinone는 방향족탄화수소에 있어서 2개의 $-CH=$ 가 2개의 $-C(=O)-$ 기로 전환되어 2개의 ketone($R_1(C=O)R_2$)을 가진 환상구조

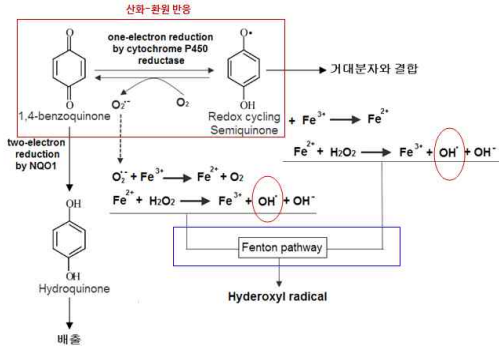


<그림> 여러 Quinone 화합물

(DDQ: 2,3-dicyano-5,6-dichloroparabenzquinone)

3) Redox-active species(산화-환원의 순환반응 대사체)의 독성기전

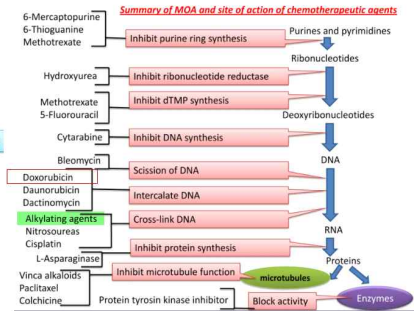
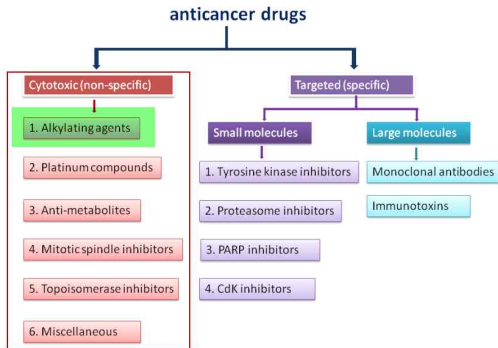
- ① 산화-환원의 순환반응, 그리고 ② Fenton pathway(라디칼이 철이온과 반응)를 통한 Oxidative stress-유도 및 독성



6-2-2. Reactive metabolites: Redox-active species(RAS)

4) 1세대 세포독성 항암제(cytotoxic anticancer drug)

- Small molecule 항암제는 세포독성(1세대) 및 표적(1세대) 항암제로 구분, 상당수 1세대 항암제가 RAS



6-2-2. Reactive metabolites: Redox-active species

5) Cytotoxic anticancer drug의 1세대 항암제 예시와 기전 - Doxorubicin

- ① 산화-환원의 순환반응 ② Fenton pathway를 통한 암세포 독성이지만 정상세포에게도 영향 → 특이성 부족

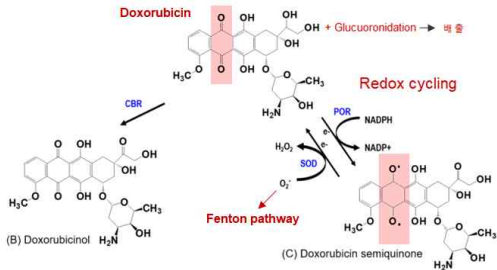


Figure 4. Metabolic pathway and related metabolic enzymes for the transformation of (A) DOX to (B) doxorubicinol and (C) doxorubicin semiquinone, major metabolites of DOX. CBR: carbonyl reductase; POR: cytochrome P450 oxidoreductase; SOD: superoxide dismutase. Arrows represent the metabolic conversion.

(Lee 등, 2023)

6) Doxorubicin를 이용한 최신 표적항암제

- 암세포 독성이지만 정상세포에게도 영향 → 특이성 부족
- 오늘날 항체-약물 복합체(antibody-drug conjugate) 또는 aptamer-drug conjugate
- Aptamers: 암세포 표적특이성을 가진 short single-stranded DNA or RNA molecules
- 이가(bivalent) 앵타머-DNA 운반체-Dox conjugate

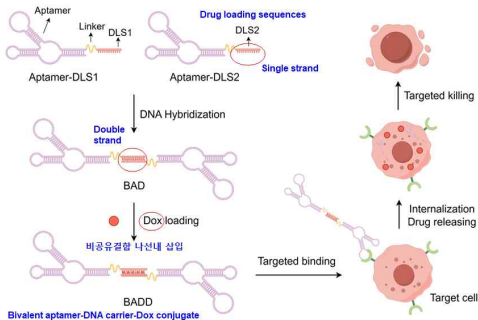
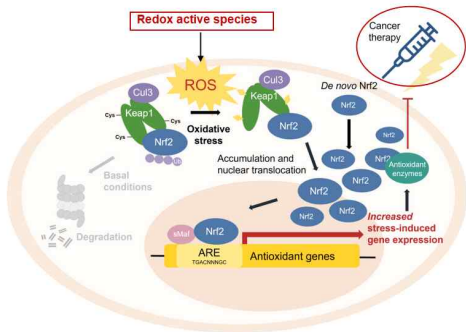


Figure 1. Schematic illustration of the design principle of the BADD for targeted killing of cancer cells.

(Zhang 등, 2024)

7) RAS의 Redox medicine 개발

- **Keap1/NRF2 pathway의 양면성:** NRF2 활성화는 암세포 생존에 도움, 반면에 활성화 부족은 염증 지속과 신경퇴행성질환의 유도(Kargbo, 2024)
- **산화적 스트레스 유도하는 RAS를 통한 KEAP1/NRF2 interaction 조절:** 항암 및 노화성 뇌질환 치료제 → Redox(산화-환원) 약물



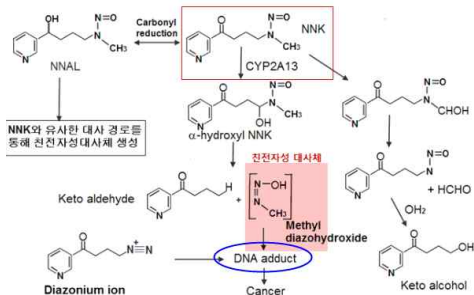
(Kargbo, 2024)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

1) 개념

- Electrophilic metabolites(친전자성 대사체): 친전자성 대사체이란 효소에 의한 대사 후 전자가 부족한 원자, 이온을 비롯하여 분자성 대사체. 특히 생체 내의 친핵성물질의 전자쌍과 높은 친화성으로 공유결합을 하는 대사체.
- Carbon-centered radicals의 차이점은 탄소 이외의 원자 또는 분자에서 최외각 비쌍전자

2) 예시: NNK(4-(*N*-Nitrosomethylamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone): Grade 1A 발암물질



(박영철, 2010)

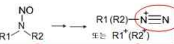
6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

3) Electrophilic metabolites의 분류

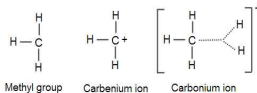
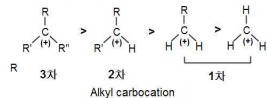
- Alkylating와 arylating agent의 친전자성대사체
- Electrophilic nitrogen을 지닌 친전자성대사체
- Carbonyl compound와 acylating agent
- Organophosphorous compounds

4) Alkylating와 arylating agent의 친전자성대사체

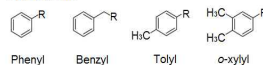
- **알킬화(alkylation):** 한 분자의 알킬기(R-CH₃)가 다른 분자로 이동하는 것 또는 지방족 포화탄화수소기를 부가하는 것
- **아릴기(aryl group):** 방향족 화합물에서 수소원자 하나를 제거하여 원자단(기능기 또는 치환기)을 부가하는 것)

원물질의 대분류	친전자성대사체의 화학적 구조에 따른 분류	구조식 (R은 H를 비롯한 alkyl 또는 arylalkyl 기)	독성유발 반응
Alkylating 및 arylating agents	Alkyl halides(할로겐알킬화합물)	$R-X(X = I, Br, Cl \text{ 과 } F)$	친핵성치환 (nucleophilic substitution)
	Epoxid(또는 oxiranes: alkene이나 방향족화합물 등 모두에서 생성 가능)	 	
	Alkyl nitrosamide 또는 Alkyl nitroamine (대부분 이들 물질은 alkyl diazonium ion이나 carbonium ion 등과 같은 경로를 통해 활성화 됨)	 	
	Dialkyl sulfates 또는 Alkyl alkanesulfonate	 	

A) Alkyl groups and carbocation



B) Aryl groups



A) 알킬기와 carbocation(탄소양이온화)

B) DNA염기의 방향족 탄화수소

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

4-1) Alkylating와 arylating agent의 친전자성대사체 예시

- 조울증 치료제 - 카르바마제핀(Carbamazepine)의 **Prodrug**
- VGSC(Voltage-gate sodium channel)의 slow inactivator - 활동전위 차단

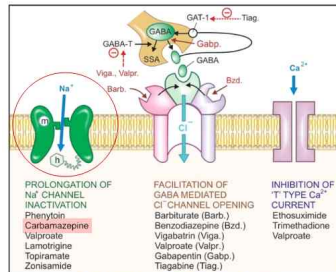
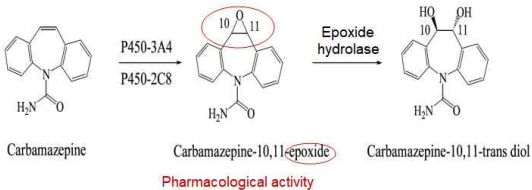


Fig. 30.2: Major mechanisms of anticonvulsant action
m: Activation gate; h: inactivation gate; GABA-T: GABA transaminase;
SSA: Succinic semialdehyde; GAT-1: GABA transporter

(Ambrósio 등, 2002)

FIGURE 2. Biotransformation of carbamazepine.(Eadie 등, 1991; Attia 2014)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

5) 그외 다양한 친전자성대사체 - 친전자성 질소, 카르보닐기, 아실기, 인산기

원물질의 대분류	친전자성대사체의 화학적 구조에 따른 분류	구조식 (R은 H를 비롯한 alkyl 또는 aralkyl 기)	독성유발 반응
Compound with electrophilic nitrogen	Aromatic amine(nitrorenium ion의 생성을 통해 활성화)		친핵성치환
Carbonyl compounds	Aldehydes, ketone	$\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{H}$ $\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}'$	carbinolamine 경로를 통한 Schiff base
Acylation agents	Organic acid anhydrides Organic acid halides Isocyanates Isothiocyanates	$\text{R}_1-\text{C}(=\text{O})-\text{O}-\text{C}(=\text{O})-\text{R}_2$ $\text{R}-\text{C}(=\text{O})-\text{X}$ (X = F, Cl, Br, I) $\text{O}=\text{C}=\text{N}-\text{R}$ $\text{S}=\text{C}=\text{N}-\text{R}$	친핵성치환 또는 첨가반응
Phosphorylating agents	Organo phosphorous compounds	$\text{R}_1-\text{O}-\text{P}(=\text{O})(\text{F})-\text{O}-\text{R}_2$ $\text{R}_1-\text{P}(=\text{O})(\text{S})-\text{O}(\text{S})-\text{X}$	친핵성치환

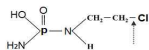
6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

5) 그외 다양한 친전자성대사체 - 친전자성 질소, 카르보닐기, 아실기, 인산기

5-1) 친전자성 질소의 예시 - Nitrogen mustard

- Nitrogen mustard: 친전자성 클로로에틸기가 DNA를 알킬화(<math>\text{R-CH}_2\text{Cl}>의 DNA와 비가역적 공유결합 과정)함으로써 핵산의 합성을 억제하는 성질을 가진 발암물질
- 친전자성 group 수에 따른 분류: Monofunctional(하나의 친전자성) alkylating agent VS Bifunctional(두개의 친전자성) alkylating agent

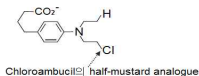
A) Monofunctional alkylating agents



Dechloroethyl phosphoamide mustard

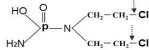


2-Chloroethylamine

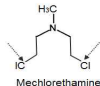


Chloroambucil의 half-mustard analogue

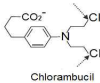
B) Bifunctional alkylating agents



Phosphoamide mustard



Mechlorethamine



Chlorambucil

<표> 친전자성 group 수에 따른 DNA 손상 유발 기전

Monofunctional (단 일 작 용)
alkylating agent

- 염기의 점돌연변이의 유전자 수준의 DNA 손상

Bifunctional(복수작용) alkylating agent

- 나선간(내) 삽입에 의한 염색체 수준의 DNA 손상
- 대부분의 항암제 개발과 관련하여 중요한 기전

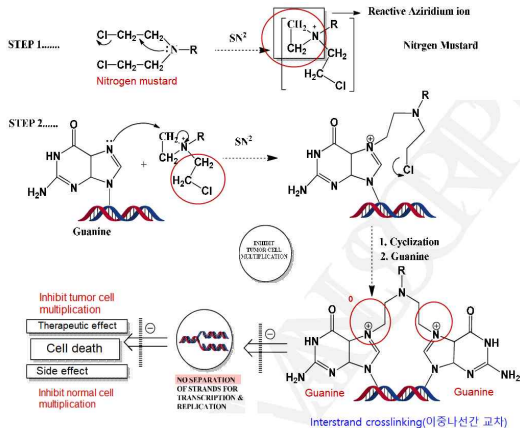
(박영철, 2010)

<그림> Nitrogen mustard의 활성기의 수 (박영철, 2010)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

5-2) 친전자성 질소의 예시 - Bifunctional(두개의 친전자성) alkylating agent

<예시> Nitrogen mustard의 ICL(Interstrand crosslinking; 이중나선간교차)



<그림> Nitrogen mustard의 Interstrand crosslinking (Singh 등, 2018)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

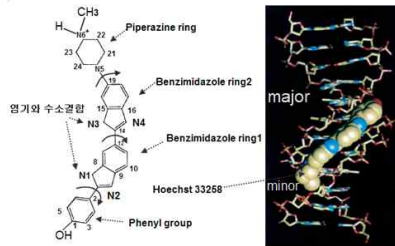
6) ICL(Interstrand crosslinking; 이중나선간교차)의 염기서열-특이적 유도

<표> ICL 종류에 따른 항암제 목록

ICL agent class	Chemical representatives	The sequence of ICL	ICL% of total adducts	Groove distortion
Psoralens	Psoralen	5'-T-A-3' 3'-A-T-5'	30-40	Minor
Mitomycin C	Mitomycin C	5'-CG-3' 3'-GC-5'	5-13	Minor
Platinum compounds	Cisplatin	5'-GC-3' 3'-CG-5'	5-8	Major
	Carboplatin		3-4	
	Transplatin	5'-G-3' 3'-C-5'	10-20	
Nitrogen mustard	Nitrogen mustard	5'-GNC-3' 3'-CNG-5'	1-5	Major
Nitrosoureas	BCNU	5'-G-3' 3'-C-5'	<8	Unknown
	CNU		2.5	

BCNU: bis-chloroethyl-nitrosourea, CNU: chloroethyl-nitrosourea.

(박영철, 2010)



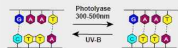
<그림> Hoechst의 구조와 minor groove-hoechst 33258 복합체 (Vega 등, 1994)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

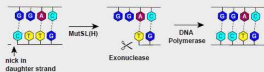
7) DNA 손상에 수복과 ICL에 대한 세포 반응의 특이성

- Clastogenic mutation → 나선간교차결합 (interstrand crosslink: ICL) → Double strand break(이중나선절단) → 염색체 절단

I. Direct reversal

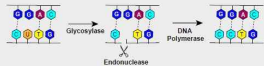


II. Mismatch Repair (MMR)



III. Repair of Single strand breaks (SSB)

a. Base excision repair (BER)



b. Nucleotide excision repair (NER)

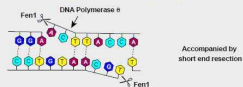


IV. Repair of Double strand breaks (DSB)

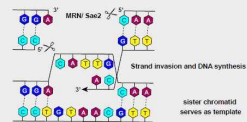
a. Non homologous end joining (NHEJ)



b. Microhomology-mediated end joining (MMEJ)



c. Homologous recombination (HR)

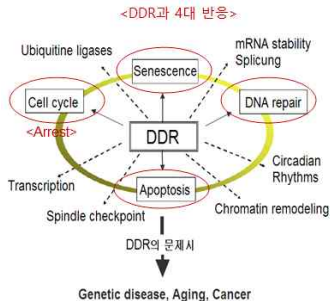


- DSB 수선 방법은 type of DSB 및 species (Proteintech, 2024)

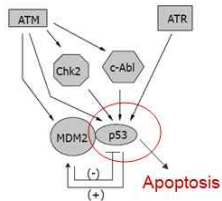
6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

8) ICL-유도와 DNA-damage response

- DSB(double strand break)의 세포 반응 → DNA-damage response(DDR, DNA-손상 반응)
- DDR 수행을 위한 2가지 Sensor(감지자: 탈인산화효소): ATM(ataxia-telangietasia, mutated)과 ATR(ATM and Rad3-related)
- 특히, ATM (ataxia-telangietasia, mutated) - DDB의 Master regulator



<그림> DDR과 4대 반응 (박영철 2019)



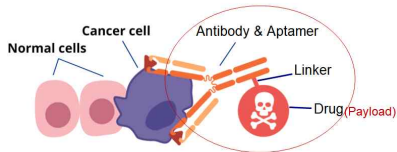
<그림> DNA 손상에 의한 ATM/ATR regulation의 기전

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

9) ICL의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체약물복합체)와 ApDC(apramer-drug conjugate)의 항암제 신약 개발 응용

9-1) 논리

- 1세대 항암제의 Target specificity과 Delivery 증대 → 효능와 안전성 증대에 집중이 신약개발의 흐름



<그림> 1세대 항암제 개발에 응용되는 ADC 및 ApDC 모식도

(EurekAlert, 2024)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

9-2) 2021년 최초의 ICL-유도 항암제 기반의 ADC(antibody-drug conjugate, 항체약물복합체)

Table 1 Overview of FDA-approved ADC drugs

company	generation	ADC drug (brand name)	target	isotype	antibody	linker	payload	average DAR	tumor types	approval date
Pfizer	First	Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg)	CD33	IgG4k	Gemtuzumab	hydrazone	Calicheamicin	2-3	AML	May 17, 2000 Sep 1, 2017
Seagen, Takeda	Second	Brentuximab Vedotin (Adcetris)	CD30	IgG1k	Brentuximab	mc-VC-PABC	MMAE	4	HL, ALCL	Aug 19, 2011
Genentech	Second	Trastuzumab Emtansine (Kadcyla)	HER2	IgG1k	Trastuzumab	SMCC	DM1	3.5	Breast cancer	Feb 22, 2013
Pfizer	Second	Inotuzumab Ozogamicin (Besponsa)	CD22	IgG4k	Inotuzumab	hydrazone	Calicheamicin	5-7	ALL	Jun 28, 2017 (EMA) Aug 17, 2017 (FDA)
AstraZeneca	Second	Moxetumomab Pasudotox (Lumoxiti)	CD22	IgG4k	Moxetumomab	mc-VC-PABC	PE38	1.8	HCL	Sep 13, 2018
Genentech	Third	Polatuzumab Vedotin (Polivy)	CD79b	IgG1k	Polatuzumab	mc-VC-PABC	MMAE	3.5	DLBCL	Jun 10, 2019
Astellas, Seagen	Third	Enfortumab Vedotin (Padcev)	Nectin-4	IgG1k	Enfortumab	mc-VC-PABC	MMAE	3.8	UC	Dec 18, 2019
AstraZeneca, Daiichi Sankyo	Third	Trastuzumab Deruxtecan (Enhertu)	HER2	IgG1k	Trastuzumab	tetrapeptide	DXD	7-8	Breast cancer	Dec 20, 2019
Gilead Sciences	Third	Sacituzumab Govitecan (Trodelvy)	TROP2	IgG1k	Sacituzumab	CL2A	SN-38	7.6	Breast cancer UC	Apr 22, 2020
RemeGen	Third	Disitamab Vedotin (Aidixi)	HER2	IgG1k	Disitamab	mc-VC-PABC	MMAE	4	GC UC	Jun 8, 2021 (NMPA)
ADC Therapeutics	Third	Loncastuximab Tesirine (Zynlonta)	CD19	IgG1k	Loncastuximab	mc-VC-PABC	PBD SG3199	2.3	DLBCL	Apr 23, 2021
Seagen	Third	Tisotumab Vedotin (Tivdak)	TF	IgG1k	Tisotumab	mc-VC-PABC	MMAE	4	Cervical cancer	Sep 20, 2021
ImmunoGen	Third	Mirvetuximab Soravtansine (Elahere)	FR α	IgG1k	Mirvetuximab	Sulfo-SPDB	DM4	3.3-5	Ovarian cancer	Nov 14, 2022

(Liu 등, 2024)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

9-3) 최초 ADC : 거대 B세포 림프종(Diffuse Large B-Cell Lymphoma, DLBCL)의 항암 ADC 구조

- (Zynlonta®): **Loncastuximab** + **SG3199**
- Loncastuximab는 림프종의 세포 표면 특이 항원단백질
- SG3199: 이중나선의 G-G cross-linking payload(**PBD dimer**)
- PBD dimer: guanine-alkylating pyrrolo benzodiazepine (PBD) analogue

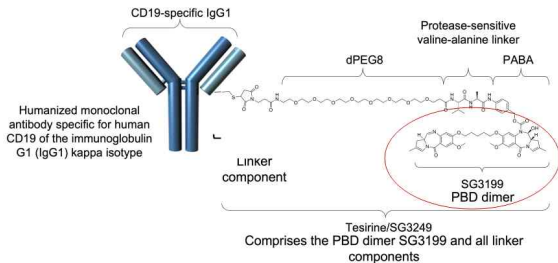
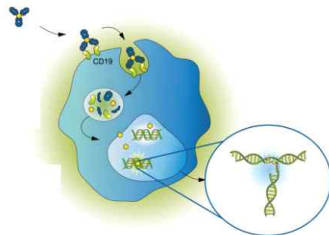


Figure 1. Structure of loncastuximab tesirine.

(FurqanLiu 등, 2022)

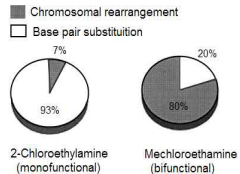
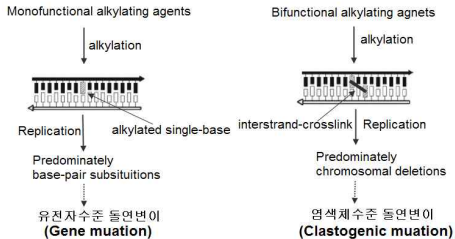


<그림> Zynlonta의 MOA

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

10) ICL의 발생 비율

- Monofunctional alkylating agent vs Bifunctional alkylating agent



<그림> 2-chlorethylamine와 mechlorethamine에 의한 DNA 손상의 비율
(Wijen 등, 2001)

<그림> 단일작용기성 및 복수작용기성 알킬화-유도물질의 DNA 손상의 특성
(Noll 등, 2006)

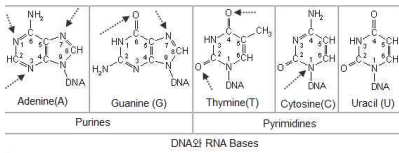
6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

11) Electrophilic metabolite의 친핵성 부위와의 공유결합을 위한 특성

- 약물의 표적: DNA(or RNA) vs 단백질(or 효소) -신약 개발을 위한 표적(target) 결정에 중요한 요소

11-1) DNA 및 단백질의 친핵성 부위(neucleophili site)

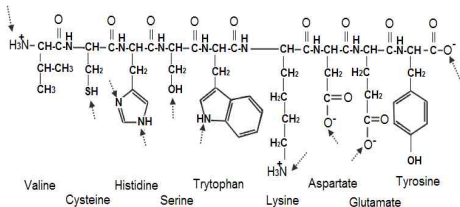
① DAN와 RNA의 가장 친핵성부위:염기의 환구조내의 질소는 대부분 친핵성이지만 친전자성대사체 대한 가장 높은 친화성을 지닌 염기의 부위(→)는 guanine의 N7, adenine의 N3 그리고 guanine의 O6순.



<그림> DAN와 RNA의 가장 친핵성부위 (박영철, 2010)

② 단백질 adduct를 형성하는 아미노산과 친핵성잔기:

이들은 pH 7 부근에서 양성자화 또는 비양성자화가 가장 잘 발생하는 친핵성부위(→)



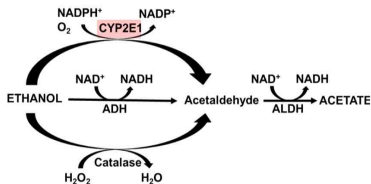
<그림> 친전자성대사체와 단백질 adduct를 형성하는 아미노산과 친핵성잔기

(Tornqvista 등, 2002)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

11) Electrophilic metabolite의 친핵성 부위와의 공유결합을 위한 특성

11-2) 예시: Acetaldehyde의 단백질의 친핵성 부위(nucleophilic site)



< 그림 > Ethanol metabolism - 3 routes
(Jiang 등, 2020)

(Rodríguez 등 2021)

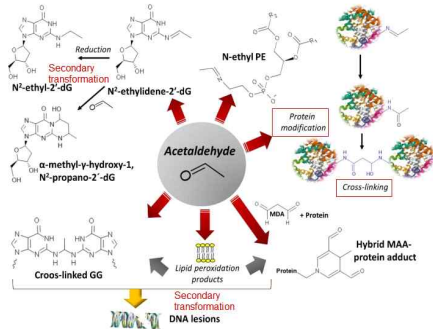


Figure 6. Protein, DNA, and phospholipid adducts are generated by the reaction of electrophilic acetaldehyde with nucleophilic groups. Additional secondary transformations may take place. dG, deoxyguanosine; GG, two contiguous deoxyguanosine on a DNA strand; MDA, malondialdehyde; MAA, malondialdehyde acetaldehyde; PE, phosphatidylethanolamine. The figure includes colored representations of a human nucleosome (Protein data bank code 3AFA). DNA figure: doi.org/10.5281/zenodo.4012404 [26, 62, 80, 82, 83, 85, 149, 229, 231].

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

11) Electrophilic metabolite의 친핵성 부위와의 공유결합을 위한 특성

11-3) Hard vs Soft electrophilic metabolite에 의해 DNA or Protein adduct 결정

<표> Hard 및 Soft Electrophiles과 Hard 및 Soft Nucleophiles의 종류와 특성

Electrophiles
<u>Hard:</u> Alkyl carbonium ions, Benzylic carbonium ions
<u>Soft:</u> Acrylamide, Acrolein, Acrylonitrile, Quinone
Nucleophiles
<u>Hard:</u> • Oxygen atoms of purine/pyrimidine bases in DNA • Endocyclic nitrogens of purine bases in DNA • Oxygen atoms of protein serine and threonine residues
<u>Soft:</u> • Protein thiol groups • Sulfhydryl groups of glutathione • Primary/secondary amino groups of protein lysine and histidine residues

근거: HSAB(hard and soft acids and bases) 이론

- "Hard"라는 개념은 작고 높은 전하밀도를 띠는 상태이며 극성화(친수성기가 잘 결합하는 특성)가 잘 되지 않은 화학물질에 적용
- "Soft"는 크고 낮은 전하밀도를 가지며 극성화가 잘 되는 화학물질에 적용되는 개념

(LoPachin 등, 2005)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

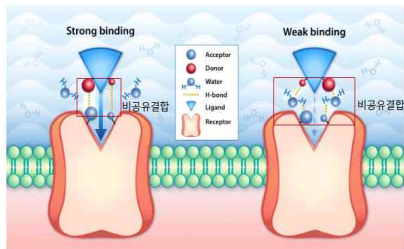
12-1) 약물의 표적

① ICL-생성 prodrug 형식의 ADC or ApDC은 hard electrophilic metabolite로 doxorubicin으로 이미 설명

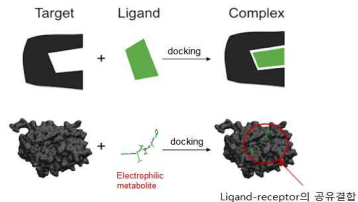
② Soft EM을 이용한 단백질-표적 항암제: 단백질 활성부위와 친전자성 대사체의 활성부위와 공유결합

→ 활성 저해 → 세포주기와 관련된 신호전달체계 억제

- 아래의 <그림>은 정상세포에서의 비공유 결합, 반면에 암세포에서는 비가역적 결합의 공유결합에 대한 비교



<그림> 정상세포에서 ligand와 receptor의 가역적 수소결합에 물분자 매개에 따른 결합의 강도 (Chen, 2016)



<그림> Electrophilic metabolite의 표적 단백질과의 비가역적 공유결합 (irreversible covalent bonding) 모식도 (Scigenis, 2015)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-2) 항암제의 특성 변화

- 지난 23년(2001년서 2023년) 동안 small molecule 항암제는 101개가 FDA 신약으로 등록: Inhibitor로서의 표적 항암제

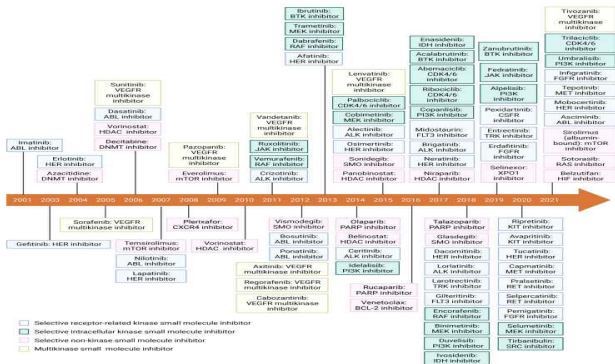


FIGURE 1 Timeline for the US FDA-approved small molecule inhibitors targeting the cancers. Figure created with BioRender.com

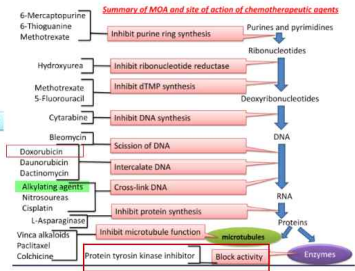
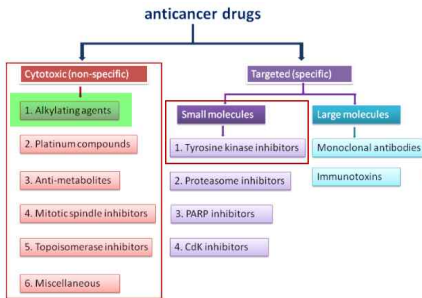
(<https://drughunter.com/category>: 2023; Liu 등, 2022)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-3) Soft EM을 이용한 단백질-표적 항암제의 예시

- 암세포의 대표적인 표적단백질: Receptor tyrosine kinase

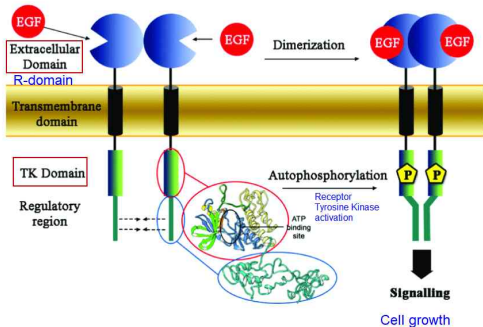


6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-4) Receptor tyrosine kinase inhibitor(RTKI: 수용체티로신)의 개발의 필요성

- EGFR(epidermal growth factor receptor, 표피성장인자): 19 아종과 55개 receptors - 3 domain
- 암세포의 경우 TK(tyrosine kinase) domain에 돌연변이 → RTK의 신호전달체계 활성화 → 따라서 RTKI 개발 필요성



(Minnelli 등, 2020)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-5) Receptor tyrosine kinase inhibitor(RTK: 수용체티로신저해제) - 개발의 변천사

- Fig2는 EGFR의 RTK 저해제의 화학적 특성 변화를 기반으로 제1세대-제2세대-제3세대로 구분한 것임
- Astrazeneca의 **Osimertinib**와 유한양행의 **Lasertinib** 공통적인 특성: RTK의 TK-domain에서 돌연변이가 발생한 T790M및T90M에 각각 선택적이면서 공유결합을 통한 비가역성이라는 점
- **특성: 돌연변이-특이적 공유결합 저해제**(Sattler 등, 2023)

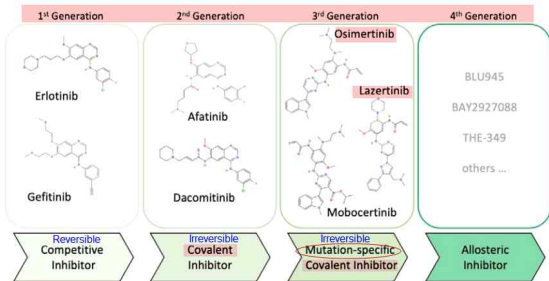


Figure 1. Evolution of EGFR tyrosine kinase inhibitors.

(Sattler 등, 2023)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-6) Receptor tyrosine kinase inhibitor(RTKI: 수용체티로신저해제) - Astrazeneca의 Osimertinib 약리기전
친전자성대사체(electrophilic metabolite)의 근거: M1 & M7의 일산화 반응 + M13의 glutathione 포합

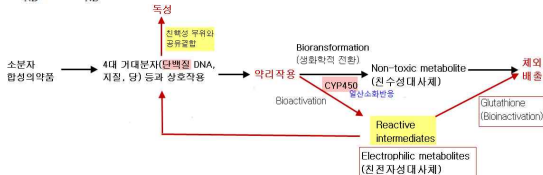
TABLE 4

Semiquantification by ultraviolet (UV) spectroscopy of osimertinib metabolites in mouse, rat, dog, and human hepatocytes

Peak ID	Proposed Structure	Proportion (%) of UV Chromatogram (320–330 nm) ^a			
		Mouse	Rat	Dog	Human
M1	Oxidation (+O)	<1	<1	1–10	<1
M2	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N)	ND	<1	<1	<1
AZ7550	Demethylation (-CH ₃)	1–10	1–10	1–10	1–10
M4	Oxidation (+O)	1–10	1–10	1–10	1–10
M5	Oxidation (+O ₂)	<1	<1	<1	ND
AZ5104	Demethylation (-CH ₃)	<1	<1	<1	<1
M7	Oxidation (+O)	ND	ND	<1	ND
M8	Cysteine-glycine adduct	ND	<1	ND	<1
M9	Demethylation (-CH ₃) + oxidation (+O)	1–10	<1	<1	ND
M10	Glutathione adduct	1–10	>10	1–10	<1
M11	Acetylation or deamination + glutathione	1–10	1–10	ND	ND
M12	Dealkylation (-C ₄ H ₉ N) + glutathione	1–10	ND		
M13	Oxidation (+O) + glutathione	1–10	1–10		
M14	Oxidation (+O) + sulfation	ND	ND		
M15	Glutathione adduct	<1	<1		
M16	Oxidation (+O) + glucuronidation	<1	<1		

^a% represents percentage of parent (osimertinib) UV response
ND, not detectable by mass spectrometry.

(Dickinson 등(2016))



(박영철, 2010)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-7) RTKI(수용체티로신저해제)의 Osimertinib와 gefitinib의 결합의 비교 약리기전

- Osimertinib의 친전자성대사체(electrophilic metabolite) + TK domain의 **mutant T790M에 비가역적 공유결합**
- Gefitinib의 가역적 비공유결합 - 암세포 비특이적으로 정상세포 영향으로 부작용

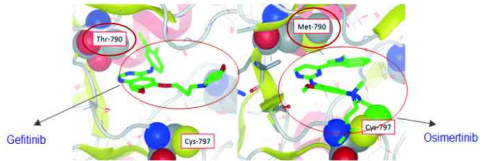


Fig. 1 X-ray crystal structure of gefitinib in wild-type EGFR showing close proximity of the compound with the threonine gatekeeper (left). Modelled structure of osimertinib in T790M mutant of EGFR showing close proximity with the methionine gatekeeper residue and also covalent bond to Cys-797 (right).

(Butterworth 등, 2017)

6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-8) RTK 저해제와의 병용요법

- 2가지 항체인 (① 면역관문-저해항체 또는 ② EGFR antibody) + RTK(receptor tyrosine kinase) small molecule inhibitor

① Immune checkpoint-based antibody

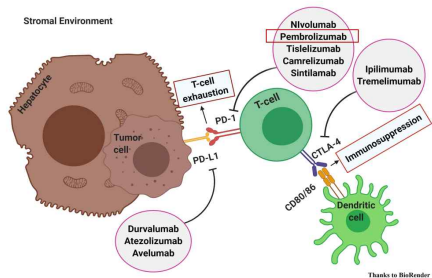
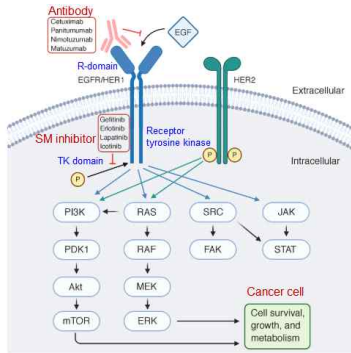


FIGURE 1 | Immune checkpoint inhibitors in hepatocellular carcinoma. PD-1 binding its ligand PD-L1 prevents TCR signaling, blocks T cell proliferation, and induces the exhaustion of T cells. CTLA-4 binds CD80/CD86 and blocks activation of the T cells. The inhibition of immune checkpoints avoids immune exhaustion, reduces Treg activity, and leads to the reactivation of the anticancer immune response.

(Donisi 등, 2021)

② EGFR(epidermal growth factor receptor) antibody



(Maron 등, 2020)

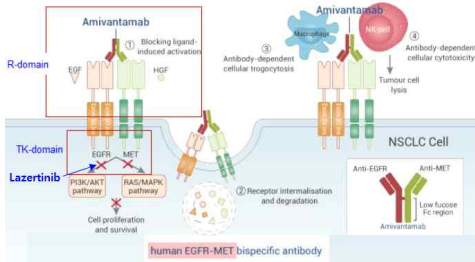
6-2-3. Reactive metabolites: Electrophilic metabolite

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-9) EGFR(epidermal growth factor receptor) antibody + RTKI(receptor tyrosine kinase inhibitor)의 병용요법 예시

- 이때 RTKI는 Soft electrophilic metabolite이라는 점을 증명

	적응증 및 monotherapy	병용요법의 RTKI	임상결과
유한양행	•비소세포폐암치료 •Amivantamab(EGFR mutation 및 MET에 대한 항체)	•Lazertinib	• FDA approval(2024)



(Gilman, 2023)

6-2-3. Reactive metabolites: **Electrophilic metabolite**

12) Prodrug 개발을 위한 Soft electrophilic metabolite의 응용성

12-10) Osimertinib와 Lazertinib의 QSAR(Quantitative Structure-Activity relationship, 정량적 구조-활성 관계)

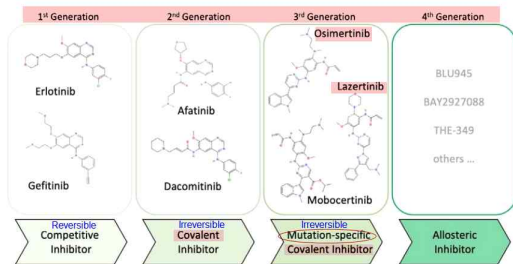
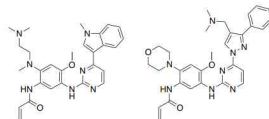


Figure 1. Evolution of EGFR tyrosine kinase inhibitors.

(Sattler 등, 2023)



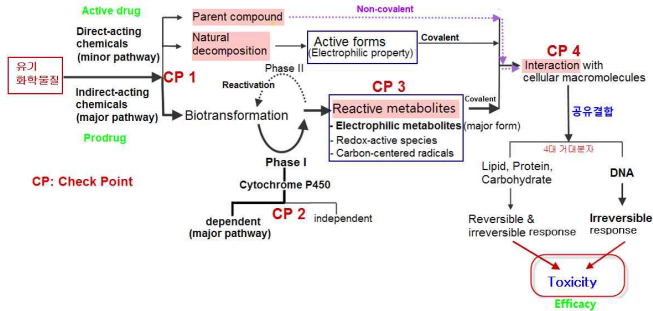
Osimertinib **Lazertinib**
Figure 1. Chemical Structures of third-generation EGFR inhibitors osimertinib and lazertinib.

	Osimertinib	Lazertinib
TK-domain의 돌연변이 특성	T790M mutant	T790M mutant
공유결합 부위	C797S	Cys797
Electrophilic metabolite	Soft	Soft
Cytochrome P450	CYP3A4	CYP3A4
결론	표적이 단백질일 경우에는 Soft electrophilic metabolite 로 전환되는 small molecule 선택	

6-3. 간접작용독성물질(indirect-acting toxicants)의 요약

• Reactive metabolite(=intermediates) <활성(중간)대사체>의 3종류로 구성

- ① Organic 또는 carbon-centered radicals(유기 및 탄소부위-라디칼)
- ② Redox-active species(산화-환원의 순환반응 대사체)
- ③ Electrophilic metabolites(친전자성 대사체)



<그림> 유기화학물질 독성기전의 central dogma(박영철, 2010)

6-4. 직접작용독성물질 vs 간접작용독성물질의 비교 분석

항목	직접작용-독성물질	간접작용-독성물질
초기반응자로의 전환 방법	단백질 친핵성 부위와 상호작용등과 같은 자연분해	- 효소적 대사에 의한 생화학적 전환 ① Cytochrome P450 ② CYP 외의 기타 효소
초기반응자의 이름	친전자성전환체(electrophilics)	활성중간대사체 3종류: 친전자성대사체, 유기라디칼대사체, 산화-환원 순환대사체 등.
독성의 특성	- 급성 독성 - 물질에 따라 차이가 있지만, 반응성이 큰 물질은 첫 노출 부위부터 독성을 유발할 가능성 - 표적에 분포가 다른 CYP 활성화에 의존하지 않아 표적기관이 없는 비특이적 독성유발의 가능성 있음. - 효소 또는 단백질과 공유결합으로 자가항원(autoantigen) 전환하여 면역독성 유발	- 만성 독성 - 다양한 조직에서 다양한 cytochrome P450이 존재하는데 활성화를 유도하는 CYP가 어느 조직에 존재하느냐에 따라 표적독성을 유발할 가능성이 있음. - 활성중간대사체 3종류는 독성의 유발에 있어서 공통성 그리고 차이점도 있어 다양한 독성유발-DNA 손상, 단백질과 상호작용, 산화 스트레스 등.
생체 구성의 거대 분자와의 상호작용 방법	- DNA 염기의 친핵성 부분과 분리되지 않는 공유결합 - 단백질의 친핵성 부위인 -SH기와 공유결합	- DNA 및 단백질의 친핵성 부분과 분리되지 않는 공유결합 - 체내 무기질 등과 상호작용하여 산화 스트레스를 유발
종간 차이 및 이유	없음: 독성물질의 활성화 단백질 친핵성 부위 및 pH 등에 의해 이루어지는데 모든 생물체가 이러한 조건은 다 가지고 있어 종간 차이가 없이 활성화	있음: 활성화를 유도하는 cytochrome P450이 생물종마다 차이가 있으며 생물종에서 동일 효소의 존재에 대한 유무에 따라 종간 차이 유무가 결정됨
원리가 응용된 독성시험	In vitro 유전독성시험 직접법: cytochrome P450을 포함한 랫드 간의 S9 분획이 없이 시험방법	In vitro 유전독성시험의 대사활성법: cytochrome P450이 포함된 S9 분획이 있는 시험방법
약물 및 유기물질의 특징 및 잠재성	- 급성독성을 유발하며 노출되는 부위부터 독성유발가능성이 있어 항암제 외의 약물로의 개발은 쉽지 않음 - 초기반응자의 생성이 효소에 의한 것이 아니고 비효소적 빠른 전환에 의해. 이러한 빠른 전환의 특성으로 미생물의 살생제로 개발	항암제 및 저농도 장기간 노출에 의한 발암물질도
화학물질의 종류	Gilvocarcin V, cisplatin, mitomycin C, formaldehyde, tetrodotoxin, TCDD, methylisocyanate, HCN 등	Polycyclic aromatic hydrocarbons, cyclophosphamide, dibrochloropropane 등 대부분의 유기성 외인성물질

7. Biotransformation(생화학적 전환)

1) 개념

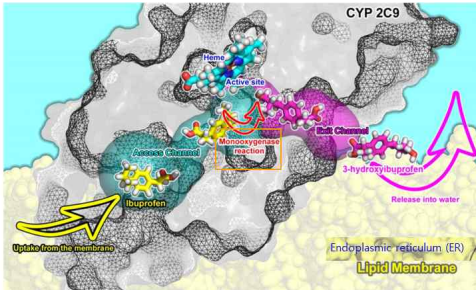
- Metabolism(대사) vs Biotransformation(생화학적 전환) = 영양물질 vs 외인성물질(xenobiotics)
- 외인성물질의 대사와 관련된 효소에 의해 화학물질의 친지질성 → 극성 vs 친전자성 → 친수성 등의 화학적 특성 변화
- Phase 1 + Phase 2 reaction로 구성



7. Biotransformation(생화학적 전환)

2) 제1상반응(Phase I reaction)의 핵심 효소 - **Cytochrome P450 효소** 특성과 촉매 반응 사이클

- ① 기질 채널(substrate channel)에 의한 **기질-특이성**
- ② 촉매 반응 결과로 **RH**에서 **ROH** 수산화
- ③ 촉매 반응 중 **Shunt way**를 통해 **ROS**(reactive oxygen species, 활성산소종) 생성



<그림> Model of the substrate(**ibuprofen**) access channel of CYP2C9

(Scott 등, 2016)

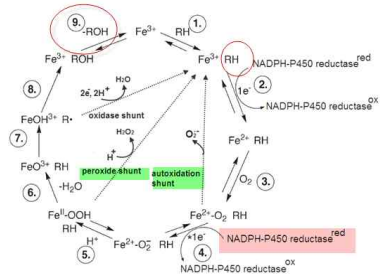


그림-14: 일반적인 P450의 촉매반응 사이클:

(박영철, 2010)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학적 및 임상학적 중요성

3-1) 비임상시험 및 임상시험의 종간(interspecies) 차이 - 극성대사체(비 reactive metabolite) 사례

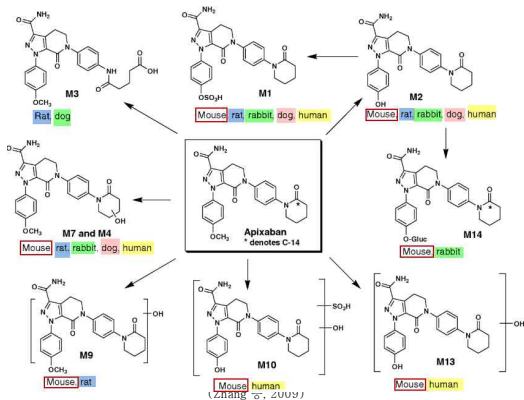
<그림> Apixaban(항응고제)의 대사체 종간 차이

Table 1. CYP enzymes of the major drug metabolizing CYPs family in man, mouse, rat, dog and monkey.

Family	Subfamily	Human	Mouse	Rat	Dog	Monkey
CYP1	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1	1B1	1B1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13	2A4, 2A5, 2A12, 2A22	2A1, 2A2, 2A3	2A13, 2A25	2A23, 2A24
	B	2B6, 2B7	2B9, 2B10	2B1, 2B2, 2B3	2B11	2B17
약물 대사 효소계	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C54, 2C55	2C6, 2C7*, 2C11*, 2C12*, 2C13*, 2C22, 2C23	2C21, 2C41	2C20, 2C43
	D	2D6, 2D7, 2D8	2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18	2D15	2D17**, 2D19**, 2D29**, 2D30**, 2D42**
3	E	2E1	2E1	2E1	2E1	2E1
	A	3A4*, 3A5, 3A7, 3A43	3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44	3A1/3A23, 3A2*, 3A9*, 3A18*, 3A62	3A12, 3A26	3A8

* gender difference ** strain specific

Martignoni, (2006)



7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학적 및 임상학적 중요성

3-2) 비임상시험 및 임상시험의 종간(interspecies) 차이-천자성대사체와 산화-환원 활성대사체 사례

- 항간질제의 Pheytin(=diphenyl hydantoin)의 대사 특성
→ 다양한 Reactive metabolites → 신약개발에 낮은 예측성과 다양한 독성

<그림> 인체에서 Pheytin(=DPH)의 대사과정

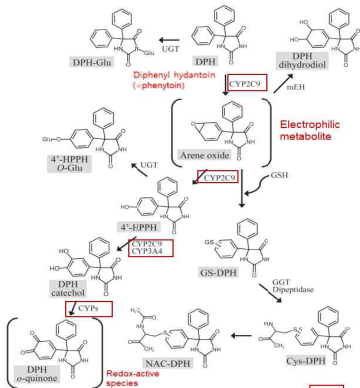


Fig. 1. Proposed major metabolic pathways of DPH in humans

Table 1. CYP enzymes of the major drug metabolizing CYPs family in man, mouse, rat, dog and monkey.

Family	Subfamily	Human	Mouse	Rat	Dog	Monkey
CYP1	A	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2	1A1, 1A2
	B	1B1	1B1	1B1	1B1	1B1
CYP2	A	2A6, 2A7, 2A13	2A4, 2A5, 2A12, 2A22	2A1, 2A2, 2A3	2A13, 2A25	2A23, 2A24
	B	2B6, 2B7	2B9, 2B10	2B1, 2B2, 2B3	2B11	2B17
약물 대사 효소 계	C	2C8, 2C9, 2C18, 2C19	2C29, 2C37, 2C38, 2C39, 2C40, 2C44, 2C50, 2C54, 2C55	2C6, 2C7*, 2C11*, 2C12*, 2C13*, 2C22, 2C23	2C21, 2C41	2C20, 2C43
	D	2D6, 2D7, 2D8	2D9, 2D10, 2D11, 2D12, 2D13, 2D22, 2D26, 2D34, 2D40	2D1, 2D2, 2D3, 2D4, 2D5, 2D18	2D15	2D17**, 2D19**, 2D29**, 2D30**, 2D42**
3	E	2E1	2E1	2E1	2E1	2E1
	A	3A4, 3A5, 3A7, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A43, 3A44	3A11, 3A13, 3A16, 3A25, 3A41, 3A44	3A1/3A23, 3A2*, 3A9*, 3A18*, 3A62	3A12, 3A26	3A8

* gender difference

** strain specific

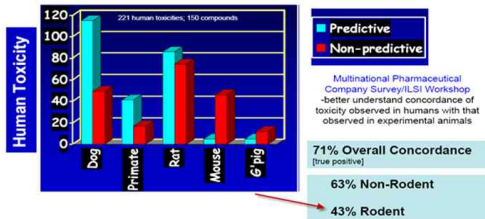
Martignoni, (2006)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학적 및 임상학적 중요성

3-3) 비임상시험 및 임상시험의 종간(interspecies) 차이 - 일치율(concordance rate)의 종간 차이

- 이와 같은 불일치율을 극복하기 위해 비임상독성시험에서 설치류 & 비설치류의 2종 이용
- 이는 cytochrome P450 아종의 종간 차이에 기인함



(Adami 등, 2010)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학적 및 임상학적 중요성

3-4) Intraspecies(종내)의 독성 차이: 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)

- 비임상 독성시험의 실험동물은 Inbreeding(동계교배) → 종내 동일한 독성반응
- 임상 및 일반 환자에서의 polymorphism → 독성반응의 종내 차이 → 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)

본질적 독성(Intrinsic toxicity)	개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)
- 약물 또는 외인성물질의 대사 과정인 생화학적 전환(biotransformation)능력 또는 수선(repair) 경로가 시험물질에 의한 포화 및 내성이 되지 않는 상황(오늘날 독성시험의 문제점)에서 개체의 부정적 반응을 의미 - 특정 용량에서 모든 개체의 개체군에 영향 - 용량-의존성 독성	- 감수성이 있는 개체에만 영향 - 노출 후 독성의 발생에 대한 예측 불가능 - 모호한 용량-의존성 영향 - 시장에서 철수 및 경고 문구 등을 결정하는 요인임

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학 및 임상학적 중요성

3-5) 대표적인 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity) 사례

- Drug-induced liver injury(DILI: 약물-유발 간 손상)의 2 종류

Intrinsic vs. Idiosyncratic DILI

• Intrinsic

- predictable
- dose-related
- similar in animals
- high incidence
- short latency (hrs)
- types
 - directly destructive
 - indirect, metabolic
 - Cholestatic
- Mortality high

• Idiosyncratic

- unpredictable
- Generally, not dose-related
- not seen in animals
- low incidence, rare
- variably longer latency
- types
 - immunoallergic
 - metabolic ("host")
- Mortality variable

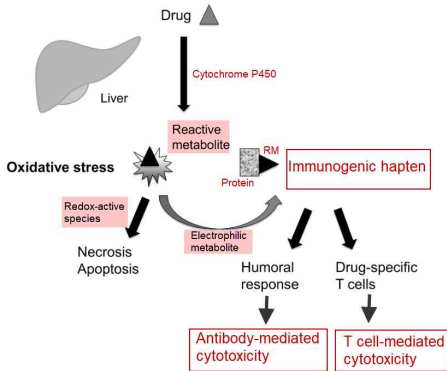
(Thread Reader App, 2021)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학 및 임상학적 중요성

3-6) Reactive metabolites + 단백질의 공유결합 → **합텐화(Haptenization)**

- 임상에서의 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity) 핵심 기전이며 **면역 반응의 차이**로 첫 복용 후 1-2개월 내에 발생



(Trepanier, 2013)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

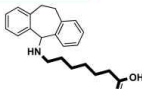
3) Cytochrome P450의 독성학적 및 임상학적 중요성

3-7) Reactive metabolites 생성에 의한 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)과 경고 또는 시장에서 철수된 약물

예시-1) Amineptine(프랑스 인허가 사용, 독일 미국에서 판매 중단: Wikipedia, 2024)

Table 1. Structural Alert and RM Analysis for Drugs Withdrawn Due to IADRs (idiosyncratic adverse drug reactions)

Drug	Indication	Phys. Chem.	M W	Log P	TPSA ^a (Å ²)	Reason for Withdrawal	Daily Dose ^b (mg)	Alerts	Reactive Metabolite Formation ^d
Amineptine (1)	Antidepressant	Acid	337	2.51	49.30	Hepatotoxicity DILI	200	Short to medium chain fatty acid	Yes ⁵⁶⁻⁵⁸



(Stepan 등, 2011)

이러한 여드름양발진(acneiform eruption)을 유발하는 약물은 다음과 같이 알려져 있습니다.

부신피질호르몬, 스테로이드,

국소칼시뉴린억제제 (아토피치료제) : 타크로리무스, 피메크로리무스 국소도포제 -> 프로토픽, 엘리델

테트라사이클린,

비타민B1, B6, B12, D2,

항경련제, 정신과약물 (아미넵틴amineptine, 리튬 lithium carbonate)

isoniazid, penicillamine, quinidine,

감기약, 거담제, 진정제 (요오드염, 브롬염)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

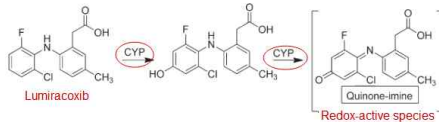
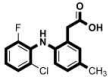
3) Cytochrome P450의 독성학적 및 임상학적 중요성

3-7) Reactive metabolites 생성에 의한 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)과 경고 또는 시장에서 철수된 약물

예시-2) Lumiracoxib(비스테로이드성 소염진통제)의 독성 기전

Table 1. Structural Alert and RM Analysis for Drugs Withdrawn Due to IADRs (idiosyncratic adverse drug reactions)

Drug	Indication	Phys. Chem.	M W	Log P	TPSA ^a (Å ²)	Reason for Withdrawal	Daily Dose ^b (mg)	Alerts	Reactive Metabolite Formation ^d
Lumiracoxib (9)	NSAID	Acid	293	4.65	49.30	Hepatotoxicity DILI	400	Arylacetic <i>p</i> -Alkylaniline acid,	Yes ^{49,50}



(Stepan 등, 2011)

<그림> Cytochrome P450에 의한 Lumiracoxib의 RM 중 Redox-active species 생성 과정

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학 및 임상학적 중요성

3-8) 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)의 개체 내외부 요인에 대한 실제적 예시

- Intrinsic factor(Cytochrome P450의 활성) vs Exogenous factor = 환경요인

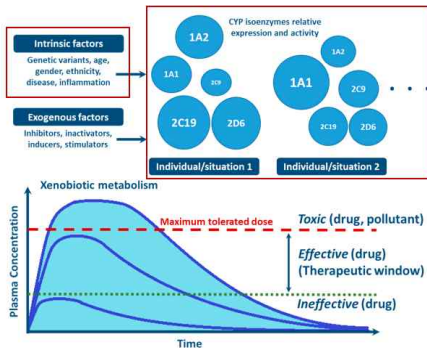


Figure 4. Factors influencing inter- and intra-individual variability in CYP activity and expression, and their impact on xenobiotic metabolism.

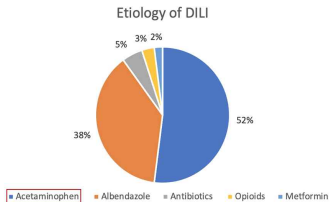
7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학 및 임상학적 중요성

3-8) 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)의 개체 내외부 요인에 대한 실제적 예시

① **개체내부의 요인(intrinsic factor):** Cytochrome P450 효소에 의한 Tyrenol-유도 간독성

- Tyenol 복용에 의한 DILI(약물-유발 간 손상) 발생율: 2.4 - 13.9/100,000 (명)
- 연령 1-17세 어린이 청소년 대상 6년 동안 발생한 급성간질환 환자 2533명 중 52%가 acetaminophen에 기인
- 가장 높은 발생율 연령: 13에서 17세 사이 청소년
- 다음의 원인 약물: Albendazole(회충 구충제)에 의한 38%



(Dijmărescu 등, 2022)

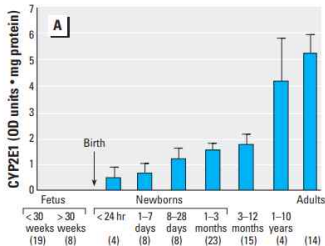


Figure 4. Age-related variations of CYP2E1 protein in the human liver.

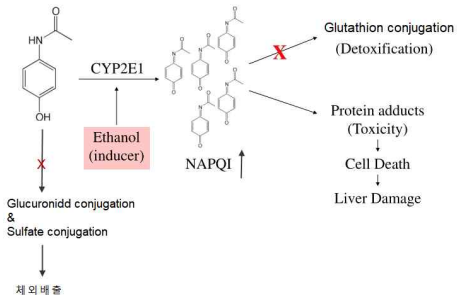
(Ginsberg 등, 2004)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학 및 임상학적 중요성

3-8) 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)의 개체 내외부 요인에 대한 실제적 예시

② **개체 외부 요인(Exogenous factor):** 에탄올-유도 CYP2E1에 의한 Acetaminophen 독성 기전



<아세트아미노펜에 의한 역학적 사고>

- 간이식의 2번째 주요 원인
- 연 56,000 환자가 응급실 이용
- 연 2600명이 입원
- 연 500명이 사망
- 이와 같은 원인의 50%가 술과 비의도적으로 만성적 과잉용량 (Agrawal 등, 2023)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학 및 임상학적 중요성

3-8) 개체-특이적 독성(Idiosyncratic toxicity)의 개체 외부 요인(Exogenous factor)

② 개체 외부 요인(Exogenous factor): 에탄올-유도 CYP2E1에 의한 Acetaminophen 독성 기전

Table 1. Factors influencing APAP-related hepatotoxicity.

Factors	Clinical implications
Dose and pattern of use	↑ APAP toxicity with acute, high doses
EtOH	↓ APAP toxicity with acute EtOH ingestion
	↑ APAP toxicity with chronic EtOH ingestion
Herbs and medications	↑ APAP toxicity with impedance of hepatic glucouronidation
Age and genetic factors	↑ APAP toxicity with advancing age and impaired glucouronidation
Nutritional status	↑ APAP toxicity in malnourished patients
Chronic liver disease	↑ APAP toxicity, especially in chronic EtOH abuse

(Yoon 등, 2016)

- (APAP toxicity with acute EtOH injection)의 근거 연구

- 음주에 의해 **N-acetylcysteine(GSH 전구체)** 처방을 받는 362명 환자 대상

- **Acute ethanol intake** is associated with a lower risk of hepatotoxicity after acetaminophen overdose.

- **This apparent protective effect cannot be explained solely** by lower exposure to acetaminophen in this group, nor differences in the interval between ingestion and initiation of treatment.

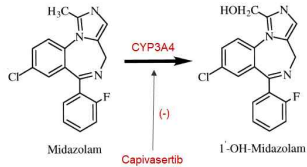
(Waring 등, 2008)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학 및 임상학적 중요성

3-9) CYP450에 의한 약물상호작용(Drug-Drug Interaction)

- 인체 말기 고형암에서 진정제이면서 CYP3A4의 기질인 **midazolam**와 **capivasertib**의 병용 투여에 의해 midazolam이 혈중농도가 **1.75배 증가**. 따라서 **capivasertib**은 CYP3A4 inhibitor(저해제) (Miller 등, 2024)



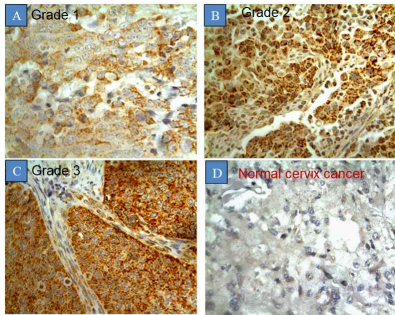
(Miller 등, 2024)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

3) Cytochrome P450의 독성학 및 임상학적 특징

3-10) CYP450 활성화와 Cancer

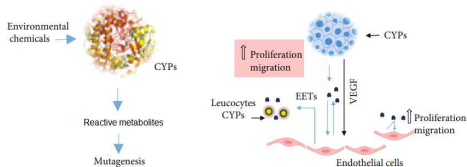
- Cervical cancer에서 grade가 증가될 수록 CYP1B1 효소의 비례적 증가
- CYP 발현은 암세포와의 cross-talk을 통해 전이를 유도



<그림> Cervical cancer의 등급에 따라 CYP1B1의 발현 차이
(Alshammari 등, 2021)

<그림> CYP450의 EET와의 Cross-talk을 통한 암세포 전이

- CYP2J2 + EET → cancer Proliferation 증가 → Endothelial cell adhesion molecule expression 감소 → 세포막에 leukocyte adhesion 감소



EET: epoxyeicosatrienoic acid, VEGF: vascular endothelial growth factor

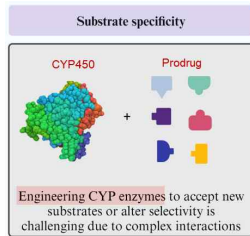
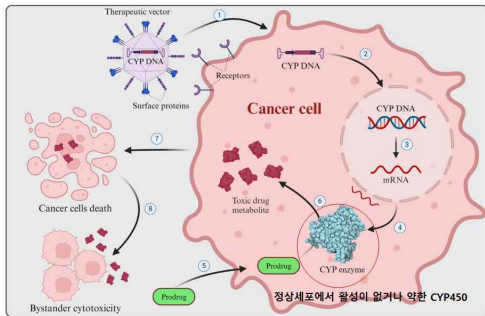
(Alzahrani 등, 2020)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

4) Cytochrome P450을 이용한 항암치료 기법 개발

① GDEPT(Gene-directed enzyme prodrug therapy): 항암치료 응용을 위해 cytochrome P450 디자인

- 기전: 암세포 표면에 결합하는 Virus vector + CYP DNA → 암세포에서 CYP 발현 → CYP에 의해 Reactive metabolite로 전환되는 Prodrug 투여 → 이웃 암세포 사멸



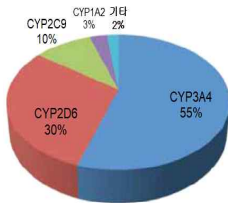
- <그림> 항암치료 응용을 위해 cytochrome P450 디자인 방법 - GDEPT (Carrera-Pacheco 등, 2024)

<그림> Prodrug에 특이적 cytochrome P450 제작

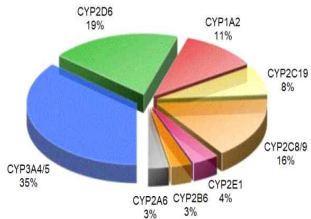
7. Biotransformation(생화학적 전환)

4) Cytochrome P450을 이용한 항암치료 기법 개발

② GDEPT(Gene-directed enzyme prodrug therapy)를 위한 최적의 CYP450 - 분포와 활성이 가장 낮은 CYP450



A) CYP 분포 비율



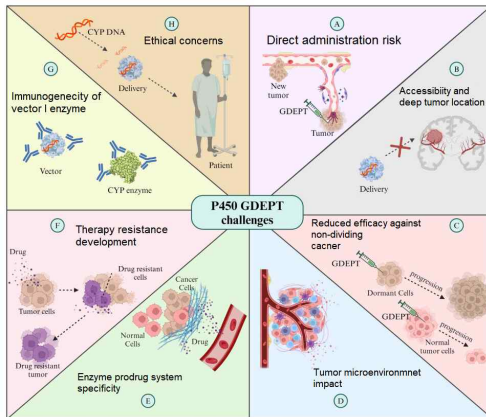
B) CYP의 약물대사 비율

(Zanger 등, 2013)

7. Biotransformation(생화학적 전환)

4) Cytochrome P450을 이용한 항암치료 기법 개발

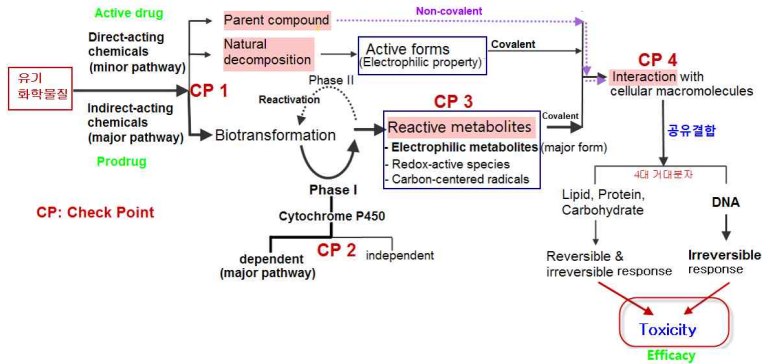
③ CYP gene의 GDEPT(Gene-directed enzyme prodrug therapy) 개발을 위한 향후 과제



(Carrera-Pacheco 등, 2024)

FIGURE 5. Challenges of CYP enzymes-GDEPT in cancer treatment. For further details refer to the text

8. 유기화학물질 독성기전의 central dogma - Phase II reaction



(박영철, 2010)

8. Biotransformation - Phase II reaction

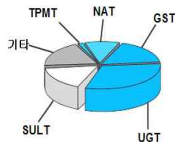
1) 제2상반응(Phase II reaction)의 종류

- 포합(conjugation) 반응이라고도 함
- 2 분류: 일반 포합 & Glutathione 포합

표-1. 포합반응 종류와 반응에 관여하는 효소

포합반응의 종류	포합물질 또는 내인성반응물질	포합물질의 전이효소 (효소위치)	대사체의 반응부위	기질의 분류	기질의 예
글루쿠론산포합 (Glucuronidation)	UDP-glucuronic acid	UDP-glucuronosyl transferase (microsome)	-OH -COOH -NH ₂ -NH -SH -CH	phenols alcohols carboxylic acids hydroxylamines sulfonamides	morphine acetaminophen diazepam digitoxin digoxin meprobamate
황산포합 (sulfate conjugation)	Phosphoadenosyl phosphosulfate	Sulfotransferase (cytosol)	aromatic -OH aromatic -NH ₂ alcohols	phenols alcohols aromatic amines	estrone 3-hydroxy coumarin acetaminophen methyldopa
아세틸화 (acetylation)	Acetyl-CoA	N-Acetyl transferase (cytosol)	aromatic -NH ₂ aliphatic -NH ₂ hydrazine -SO ₂ NH ₂	amines	sulfonamides isoniazid clonazepam procainamide histamine
메틸화 (methylation)	S-Adenosyl-methionine	transmethylase (cytosol)	aromatic -OH -NH ₂ -NH -SH	catecholamines phenols amines histamine	dopamine epinephrine histamine thiouracil pyridine
아미노산포합 (amino acid conjugation)	glycine glutamine	Amino acid acyl transferase (microsome)	aromatic-NH ₂ -COOH	aromatic amine carboxylic acids	
GSH 포합 (glutathione conjugation)	Glutathione	GSH-S-transferase (cytosolic, microsome)	epoxide organic halides	epoxides, nitro groups, hydroxylamines	ethyrcinic acid bromobenzene

Reactive metabolites



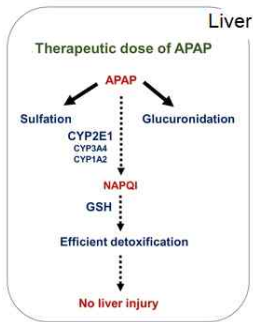
<그림> 제2상반응에 관여하는 효소의 활성 비율

(박영철, 2010)

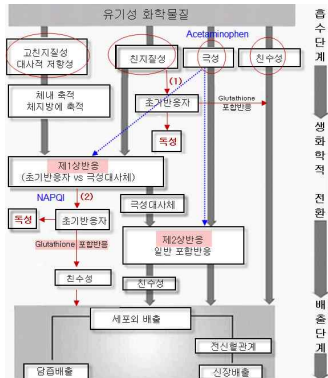
8. Biotransformation - Phase II reaction

2) 제2상반응(Phase II reaction)의 특이적 예시

- 일반적으로 제1상반응 → 제2상반응의 과정
- 아세트아미노펜은 제2상반응 우선 후 제1상반응과 2상반응 진행



(Begriche, 2023)



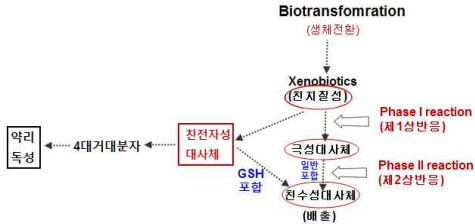
<그림> Acetaminophen의 흡수에서 제1반응과 제2반응 (박영철, 2019)

8. Biotransformation - Phase II reaction

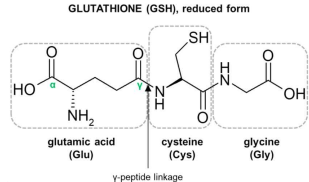
3) Glutathione(GSH) 포함

① Glutathione의 구성

- Gutathione - 3개의 아미노산으로 구성
- Electrophilic metabolite(친전자성대사체) 제거에 생체 내 유일한 물질



<그림> 극성대사체 vs 친전자성대사체에 따른 포함 경로
(박영철, 2010)



<그림> Glutathione의 구조 - 3개의 아미노산

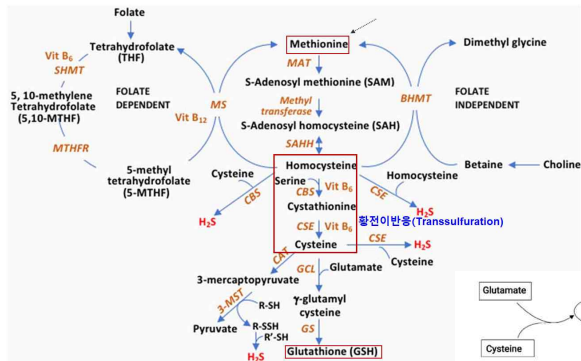
(박영철, 2010)

8. Biotransformation - Phase II reaction

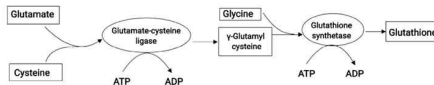
3) Glutathione 포함

② Glutathione(GSH)의 합성

- 간에서만 Glutathione 합성 - 간이 해독의 중심기관이 이유
- Methionine에서 **황전이반응(간세포에서만 존재)**을 거쳐 Cysteine 및 glutathione 합성 과정



<그림> Glutathione 합성 과정 (Paul, 2021)



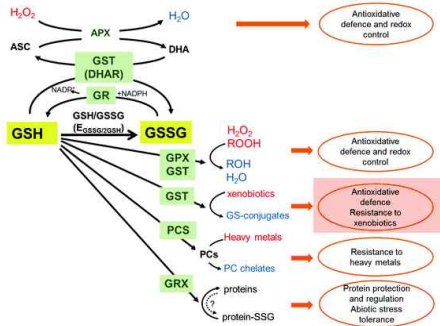
<그림> GSH의 ATP-의존성 합성 (Dwivedi 등, 2020)

8. Biotransformation - Phase II reaction

3) Glutathione(GSH) 포함

③ Glutathione의 다양한 기능

- 다양한 세포 생리학적 기능 수행: 세포의 redox 조절, 중금속 독성 방어, 외인성물질에 대한 방어, 단백질 손상 방어 및 조절, 비생물학적 스트레스에 대한 내성



(Csiszár, 등 2016)

③ Glutathione의 다양한 기능

Table 1. Physiological and metabolic functions of GSH.

Function	Role of GSH
Enhancement of immune system function	Protects against inflammatory pathologies Impaired immunological function caused by cysteine and glutathione deficiency is restored when supplemented with cysteine
Prevention of oxidative cell damage	Serves as an antioxidant
Prostaglandin synthesis	Inhibits prostaglandin synthesis at elevated levels
Transport of metals across membranes	Chelates reactive metals and facilitates their transport across cell membranes
Transfers metals between ligands	Forms coordinate-covalent adducts with several transition metals and transports them between ligands
Protein synthesis	Is involved in post-translational modification of proteins
DNA synthesis and repair	Efficient scavenging of OH• and secondary radicals; participates in rejoining of X-ray induced DNA strand breaks; activates T-cell proliferation; provides a source of cysteine moieties
Amino acid transport	Participates in amino acid permeation system; assists with transmembrane transport of amino acids by acting as a donor of g-glutamyl groups to amino acids, catalyzed by membrane-bound g-glutamyl transpeptidase
Enzyme activation	As a reducing agent, is important for activation of peptidyl-arginine deiminase; binds to microsomal prostaglandin E synthase type 2 (mPGES2), a heme group is attached to GSH via an iron-sulfur bond, and the resulting enzyme catalyzes degradation of PGH2
Metabolism of toxins and carcinogens	Detoxification of electrophilic xenobiotics and endogenous compounds after spontaneous or enzymatic (GSH-S-transferase) GSH conjugation; conjugation of 1,2-dibromoethane
Redox reactions	Neutralizes charges on ROS, RNS, and other reactive species
Source of cysteine	Serves as an extracellular source of cysteine
Metal Homeostasis	Reduction of Cr ⁶⁺

NMDAR responses, neuronal activity	Enhances NMDAR responses and neuronal activation by calcium or electrical signals, while its depletion or oxidation results in NMDAR hypofunction
Calcium signaling	Participates in calcium signaling (mM range), especially in Müller glia; can regulate GABA release with protective effects on the retinal neuron-glial circuit; modulates influx of Ca ²⁺ and oxidative toxicity through the TRPM2 channel in rat dorsal root ganglion neurons
Myelin maturation	Its deficit impairs maturation of myelin
Neuro-modulator, neurotransmitter	Has binding sites for a putative receptor, likely the glutamate receptor; can serve as a neuromodulator or neurotransmitter
Source of neuronal glutamate	Serves as a physiologic reservoir of neuronal glutamate
Neuronal differentiation	Induces neuronal differentiation in rat bone marrow stromal cells
Apoptosis	Intracellular levels decrease after activation of the mitochondrial death receptor, drug exposure, or oxidative stress
JAK1-STAT3 signaling	Reducing its intracellular pool enhances LIF-induced JAK1-STAT3 signaling
cAMP signaling	Upregulates cAMP signaling via G protein alpha 2
T-cell metabolism	Primes T cell metabolism for inflammation
Activates MAPK pathways	Reducing its intracellular pool activates mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathways

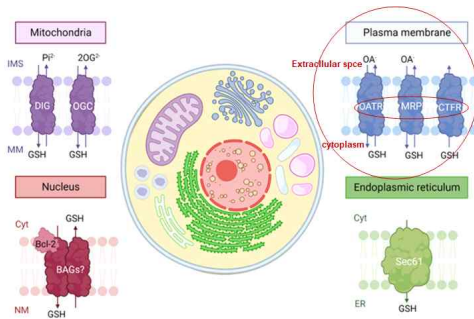
(Iskusnykh 등, 2022)

8. Biotransformation - Phase II reaction

3) Glutathione(GSH) 포함

④ Glutathione의 이동 (Cellular & Systemic Compartmentalization)

- 세포질에서 합성 → 수송단백질을 통해 세포소기관으로 이동
- Systemic Compartmentalization:** 간 외의 대부분의 기관으로 이동하지만 간에서 약 5- 10 mM 정도가 혈액에서 5-20 μ M 정도로 GSH가 분해되어 짧은 반감기
- GSH의 BBB(blood-brain barrier) 통과 및 합성에 대해서는 논란



(Vázquez-Meza 등, 2023)

Figure 2: Glutathione intracellular compartmentalization : Cyt (cytosol), MM (mitochondrial membrane), ES(extracellular membrane), ER(endoplasmic reticulum), NM (nucleus membrane), Pi (Porin), OA (organic anion),DIG (Dicarboxylate) and ODC (the oxoglutarate) transporters, BAG (Bcl2 - associated athanogene pores, Sec61 protein -conducting channel, **OATR(organic - anion - transporting polypeptide** , **MRP (the drug resistance - associated proteins)** , **CTRF(cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)**)

8. Biotransformation - Phase II reaction

3) Glutathione(GSH) 포함

⑤ Glutathione 농도와 질환과의 관계

- Low Plasma glutathione Con.(GSH/GSSG의 낮은 levels): 심혈관계 질환, Cancer, Type 2 당뇨, **Neurodegenerative Diseases**[Alzheimer's Disease (AD), Parkinson's Disease (PD), Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), Huntington's Disease (HD)].

Table 2. Activity of glutathione-related enzymes and content of glutathione in the blood and brain of patients with different brain diseases (5).

Disease/Disorder	Blood	Brain
Alzheimer's disease (AD)	Decreased GSH	Decreased GSH
	Decreased GSH/GSSG	Decreased GST
	Increased GSSG	-
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	Decreased Gpx activity	-
	Decreased GSH(erythrocytes)	Decreased GSH (motor cortex)
	-	Decreased GST (motor cortex)
Autism	Decreased GSH	Decreased GSH in (cerebellum and temporal cortex)
	Increased GSSG	Decreased Gpx activity
	Decreased Gpx activity (erythrocytes)	Decreased GST activity
	Decreased GST activity (erythrocytes)	Decreased GCL activity
	Decreased GSH/GSSG	Decreased GSH/GSSG (cerebellum and temporal cortex)

Disease/Disorder	Blood	Brain
Bipolar disorder	Decreased GSH	Decreased GSH (hippocampus and anterior cortex)
	Increased GSSG	-
	Decreased GSH/GSSG	-
Huntington's disease (HD)	Decreased GSH	-
Multiple sclerosis	Decreased GSH	Decreased GSH
Parkinson's disease (PD)	Decreased GSH	Decreased GSH
	-	Increased Gpx protein
	-	Increased GST protein
Schizophrenia	Decreased GSH	Decreased GSH
	Decreased GSH/GSSG	-
	Increased GSSG	-

(Iskusnykh 등, 2022)

8. Biotransformation – Phase II reaction

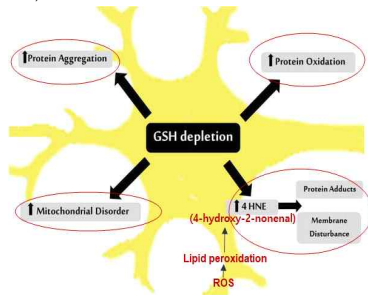
3) Glutathione(GSH) 포함

⑥ Glutathione과 신경퇴생성질환과의 관계

- 세대별 혈장 GSH/GSSG 감소에 의한 **Neurodegenerative Diseases**: Alzheimer's Disease (AD), Parkinson's Disease (PD), Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS), Huntington's Disease (HD) 등
- Table 3에서처럼 노령인에 있어서 GSH 및 GSH/GSSG의 감소
- **신경퇴행성질환 발생 이전에 뇌의 GSH depletion**(Moustapha, 2020; Aoyama, 2020)

Table 3. GSH, GSSG concentrations, GSH:GSSG ratio and EhGSH/GSSG at different stages of an individual's life.

Life Period	GSH	GSSG	GSH/GSSG	E _h GSH/GSSG	Refs.
Childhood	2.7 ± 0.17 mM	0.16 ± 0.02 mM	16.8	~200-220 mV	[153,154]
Maturity	2.8 ± 0.9 mM	0.14 ± 0.4 mM	20	~200-240 mV	[154,155]
Old age	2.2 ± 2.0 mM	0.15 ± 0.03 mM	14.7	~200-240 mV	[154,155]



(Moustapha, 2020)

8. Biotransformation - Phase II reaction

3) Glutathione(GSH) 포함

⑥ Glutathione과 신경퇴생성질환과의 관계

- **Glutathione의 중요성:** reactive metabolite를 제거하는 유일한 물질뿐만 아니라 거의 모든 ROS 및 RNS 제거하고 또한, 다양한 효소들이 관여하기 때문에 효소 활성도 함께 고려되어야 함.

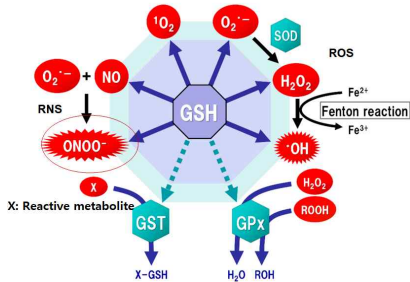


Figure 2. Function of glutathione (GSH) as an antioxidant (Aoyama, 2021)

8. Biotransformation - Phase II reaction

3) Glutathione(GSH) 포함

⑦ Glutathione의 치료제 응용에 있어서 문제점 - Glutathione의 BBB(blood brain barrier, 뇌혈관장벽) 통과 예시

- Fig 7: BBB 통과 후 혈과내피세포와 상호작용을 하는 성상세포(astrocyte)를 거쳐 신경세포(neuron)로 전달
- Figure 1: BBB를 통과하기도 하며 황전이반응이 있는 성상세포에서 합성 후 신경세포 및 희소돌기교세포(oligodendrocyte) 이동. 또는 Cysteine이 성상세포로부터 공급되어 각각의 세포에서 합성

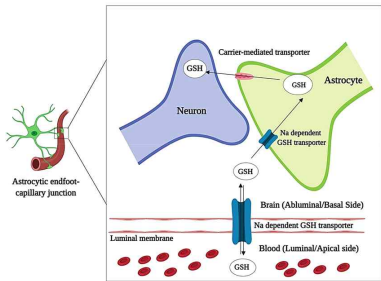


Fig. 7 GSH transport across the blood brain barrier (BBB)

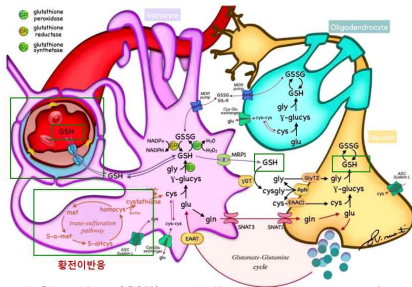
(Dwivedi $\frac{\text{द्वि}}{\text{द्वि}}$, 2020)

Figure 1. Glutathione (GSH) metabolism within the nervous tissue.

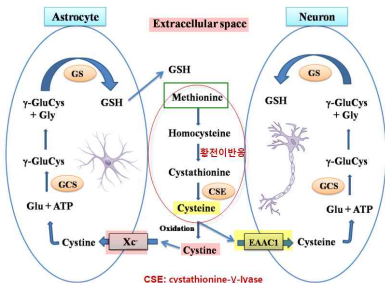
(Bottino $\frac{\pi}{8}$, 2021)

8. Biotransformation - Phase II reaction

3) Glutathione(GSH) 포함

⑦ Glutathione의 치료제 응용에 있어서 문제점 - Glutathione의 BBB(blood brain barrier, 뇌혈관장벽) 통과 예시

- GSH does not cross blood-brain-barrier and its systemic administration is not effective to increase the concentration in the brain as most of the GSH are metabolized in blood. (Haseena 등, 2022; Aoyama 등, 2021)
- 세포간 공간에 황전이반응 경로가 존재하고 여기서 합성된 cysteine은 신경세포 그리고 산화된 cysteine은 정상세포로 유입되어 GSH 합성
- 특히 cysteine과 cysteine의 유입되는 통로단백질의 발현 정도가 GSH 합성에 영향



• (Haseena 등, 2022; Aoyama 등, 2021)

- **Figure 1. GSH synthesis in astrocytes and neurons.**
The Transsulfuration pathway synthesizes homocysteine from the dietary amino acid methionine to produce cystathionine. Further, cystathionine-γ-lyase (CSE) converts cystathionine into cysteine in extracellular space to neurons and astrocytes. Neurons utilize extracellular cysteine for GSH synthesis, unlike astrocytes which uses the oxidized form cystine. Neurons use excitatory amino acid transporter (EAAC1) to take up cysteine, while a cystine/glutamate transporter (Xc-) mediates the transport of cystine in astrocytes. γ-Glutamylcysteine synthetase (GCS), rate limiting enzyme in GSH synthesis catalyzes the formation of γ-glutamylcysteine dipeptide utilizing ATP. γ-GluCys is then combined with glycine to form GSH by glutathione synthetase (GS) in both neurons and astrocytes. GSH formed in astrocytes is released into extracellular space where it is cleaved into individual amino acids by a set of enzymes.

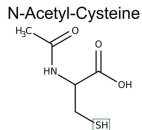
8. Biotransformation - Phase II reaction

3) Glutathione(GSH) 포함

⑧ 질환별 Glutathione 투여 임상시험 결과

- 병의 원인치료제(Disease-modifying drug)로써의 치매환자에 Glutathione을 구강, 비강 투여 뇌에서 농도 변화 없음
- 근위축성측색경화증 환자에서 근육 또는 피하 장기 투여 후 치료 및 병의 지연에 도움이 안됨

GSH 및 관련 물질	Alzheimer's and Parkinson's Disease	근위축성측색경화증(Amyotrophic Lateral Sclerosis, ALS)
Glutathione	● Intranasal GSH uptake → 45분 후 혈장 농도는 증가 ● No clinical trial was found to assess brain GSH levels in AD patients with the intervention of GSH.	● 6개월 600 mg dose GSH 근육 투여 → No significant difference between the treated ALS (Amyotrophic Lateral Sclerosis)
NAC(N-acetylcystein)	● Oral NAC (50 mg/kg/day) 6개월 투여 → insignificant Mini-Mental State Examination (MMSE) score ● Oral 28 days of 6000 mg NAC/day → 혈액 증가, 뇌에는 변화 없음	● A dose of 50 mg/kg/day 피하 주사 12개월 → No increased survival period or reduction in disease progression



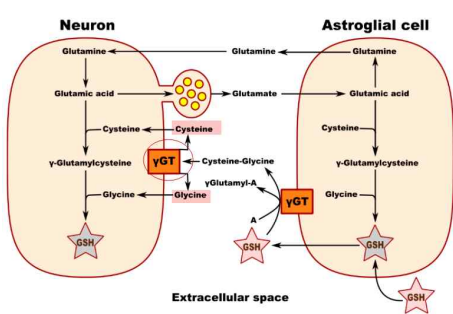
(Dwivedi 등, 2020)

8. Biotransformation - Phase II reaction

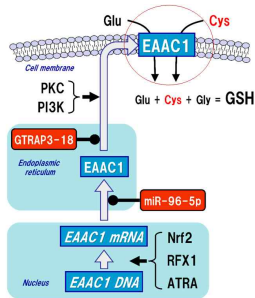
3) Glutathione(GSH) 포함

⑨ 뇌의 Glutathione 증가 및 촉진

1. GSH의 구성 AA인 cysteine를 생성하는 **γ -glutamyl transpeptidase(γ GT)**에 대한 이해와 활성화
2. Cystine 통로 단백질인 EAAC1(Excitatory amino acid carrier 1)의 **변역 후 조절인자**에 대한 이해 및 저해제 개발: GTRAP3-18(glutamate transporter-associated protein 3-18)과 miR-96-5p(EAAC1의 3'-UTR에 결합하는 micro RNA)



<그림> (γ GT)에 의한 GSH 분해에 의한 cysteine 농도 증가 (Iskusnykh 등, 2022)

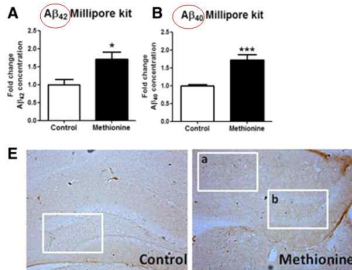


<그림> Cysteine의 통로단백질 EAAC1 단백질의 조절인자에 대한 저해 (Aoyama 등, 2021)

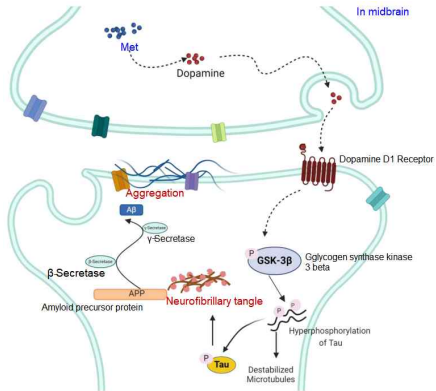
8. Biotransformation – Phase II reaction

4) 신경퇴행성질환에서의 Methionine 독성

- Methionine is a high risk factor for AD



<그림> Methionine 축적과 Beta-amyloid 생성
(Tapia-Rojas 등, 2015)



<그림> Methionine에 의한 Beta-amyloid 응집
(Wang 등, 2024)

8. Biotransformation - Phase II reaction

4) 신경퇴행성질환에서의 Methionine 독성

- Methionine-35의 산화에 의한 A β Peptide 생성과 응축

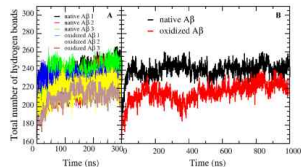
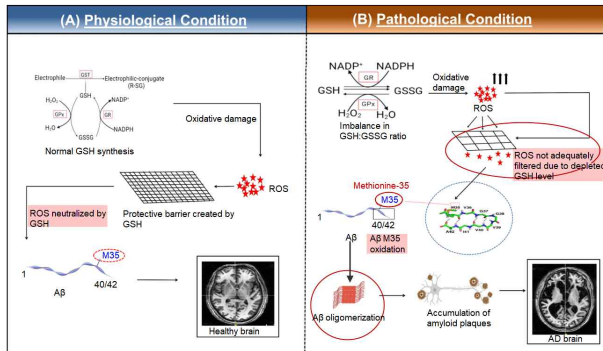


Figure 8. The total number of hydrogen bonds in the native protofibril (black) and the Met35-oxidized protofibrils (red) for the 300 ns (A) and 1 μ s (B) simulations.

<그림> Beta amyoid의 Methionine-35 산화 확인

(Maghsoodi 등, 2023)

<그림> Beta amyoid의 methionine-35 산화에 의한 amyloid plaques 형성 (Mandal 등, 2023)

8. Biotransformation - Phase II reaction

5) 신경퇴생성질환 치료에서 **Glutathione** 중요성

- **Glutathione의 중요성:** reactive metabolite를 제거하는 유일한 물질뿐만 아니라 거의 모든 ROS 및 RNS 제거하고 또한, 다양한 효소들이 관여하기 때문에 효소 활성도 함께 고려되어야 함.

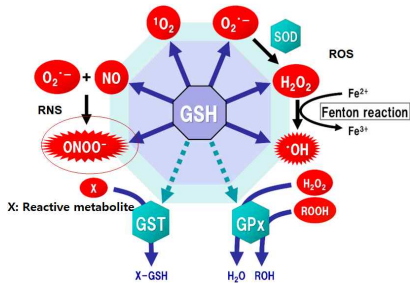
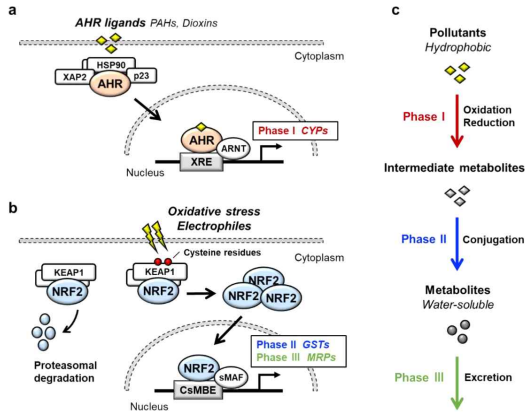


Figure 2. Function of glutathione (GSH) as an antioxidant (Aoyama, 2021)

9. Biotransformation - Phase I & Phase II reaction 관련 효소의 공동 발현



<제1상반응과 제2상반응의 효소 및 MRP의 공동 발현> 핵 수용체들인 AHR (aryl hydrocarbon receptor), pregnane X receptor (PXR), constitutive androstane receptor (CAR), ARNT (Ahr nuclear translocator) retinoid X receptor (RXR)와 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) 등이 활성화되어 제1상반응 및 제2상반응과 관련된 효소들이 유도된다. 또한 P450 효소의 활성화에 통해 생성된 친전자성물질(electrophilic compound)와 ROS 등에 대한 반응을 통해 제2상반응과 관련된 효소인 GST, UGT 등이 Nrf2-의존성 기전을 통해 유전자-공동발현조절 기전이 이루어진다. 특히 MRP(multidrug resistance protein) 역시 유전자 공동발현조절 기전에 의해 발현되어 약물내성의 원인이 된다. (박영철, 2010)

<그림> AhR-gene battery와 Nrf2-gene battery의 gene-coordinate regulation

(Edamitsu 등, 2022)

10. 결론

- 독성기전의 Cental dogma를 통해 Small molecule-기반 다양한 약물 모달리티의 개발에 있어서 약리기전으로 응용성

① Cytochrome P450을 통해 독성기전뿐만 아니라 항암제 약리에 대한 기본 원리

② Glutathione은 독성대사체와 산화적 스트레스-유도 물질을 동시에 제거할 수 있는 유일한 물질이며 신경퇴행성질환(AD 및 ALS)의 예방 및 진행의 지연을 통해 신약 개발의 제1의 소재

- 결론적으로 독성의 이해는 곧 약리에 대한 이해이며 Cental dogma와 glutathione을 통해 독성약리학 또는 약리약리학의 이해

