건강한 한국인 자원자에서 테오브로민(Theobromine) 500mg 캡슐 반복 투여에 의한 안전성 및 약동학 평가에 관한 연구

서울대학교 의과대학 약리학교실 및 서울대학교병원 임상약리학과

김정원, 신광희, 이소정, 김태은, 오세을, 윤서현, 조주연, 유경상, 장인진, 신상구
=Abstract=

Safety and Pharmacokinetics of Theobromine after Multiple Adminstrations in Healthy Volunteers

Jung-Won Kim, Kwang-Hee Shin, SoJeong Yi, Tae-Eun Kim, MD,
Se-Ui Oh, Seo Hyun Yoon, PhD, Joo-Youn Cho, PhD,
Kyung-Sang Yu, MD, PhD, In-Jin Jang, MD, PhD, Sang-Goo Shin, MD, PhD

Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics,
Seoul National University College of Medicine and Hospital, Seoul, Republic of Korea

Background: Theobromine (3,7-dimethylxanthine) has various clinical properties including vasodilation, bronchodilation, and diuresis in humans. It is currently under clinical investigation for cough suppression. The aim of this study was to evaluate the safety and pharmacokinetic characteristics after multiple oral administrations of theobromine 500 mg capsules in healthy male volunteers.

Methods: A single-arm, multiple-dosing study was conducted in 12 healthy male volunteers. All subjects orally received the study drug every 12 hours for 7 days. Blood samples were collected up to 12 hours after first dosing and up to 48 hours after last dosing. Plasma concentrations of theobromine were analyzed using high-performance liquid chromatography. Safety assessments, including monitoring adverse events, laboratory tests, vital signs, ECGs, and physical examinations, were performed throughout the study.

Results: Pharmacokinetic steady-state was achieved before the last dosing. Median time to peak concentration at steady state ($T_{max,ss}$) was 1.8 hr. Mean terminal half-life was 13.4 hr, and mean peak-trough fluctuation was 47.5% at steady state. At steady state, mean peak concentration ($C_{max,ss}$) and area under the plasma concentration-time curve during a dosing interval ($AUC_{\tau,ss}$) was 22.0 $\mu\text{g/mL}$ (coefficient of variation, CV: 13.8%) and 213.9 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ (CV: 17.6%), respectively. Mean accumulation ratio ranged from 1.8 to 2.8 after multiple administrations. There were neither any serious adverse events nor remarkable findings regarding safety.

Conclusion: Theobromine capsules were safe and well-tolerated when administered twice daily at dose of 500 mg for 7 days. This study showed the relatively low inter-individual variation in terms of C_{max} and AUC, and moderate accumulation after multiple dosing. This study provided evidence for a twice-a-day dosing regimen of theobromine 500 mg capsules for treatment of chronic cough.

Key words: Theobromine capsule, Antitussives, Pharmacokinetics, Multiple administration, Cough

---

교신저자: 유경상

소 속: 서울대학교병원 의과대학 및 서울대학교병원 임상약리학과

주 소: 서울특별시 종로구 대학로 101 번지 서울대학교병원 임상시험센터 (110-744)

전화번호: (02) 2072-1920 Fax: (02)742-9252 E-mail: ksyu@snu.ac.kr

접수일자: 10. 02. 09 수정일: 10. 05. 27 게재확정일: 10. 06. 10

서 론

기침은 기도 내로 유해물질이 들어오는 것을 방지하고 폐와 기관지에 존재하는 유해물질을 제거하기 위한 정상적인 신체방어적 반사 작용으로, 상부기도를 비롯하여 인후두, 비강, 부비동, 외이도, 하부식도, 심낭, 흉막, 복부 장기 등에 분포되어 있는 기침 수용체가 자극되어 시작된다.¹⁾ 기침은 환자가 병원을 찾게 되는 가장 흔한 증상의 하나이며, 기간에 따라서 급성 기침(3주 이내), 아급성 기침(3주 ~ 8주 이내), 만성 기침(8주 이상)으로 구분한다. 급성 기침의 가장 흔한 원인은 감기로서 대개 3주 이내에 기침이 저절로 좋아지나, 만성 기침의 경우에는 기침의 원인이 되는 질환이 숨어 있으므로, 이에 대한 정확한 진단과 함께 치료가 필수적이다. 만성 기침의 가장 흔한 원인으로는 후비루증후군(postnasal drip syndrome, 41%), 기관지 천식(asthma, 21%), 위식도역류(gastro-esophageal reflux, 21%)가 있으며, 그 외에도 기관지 확장증과 혈압약(ACE 억제제) 등이 있다.¹⁻²⁾

만성 기침의 치료는 기침의 원인이 되는 질환을 치료하는 원인 치료법과 원인에 관계없이 기침을 억제하는 대증 치료법이 있다. 대증 치료법에

사용되는 진해제는 작용하는 부위에 따라, 말초 기침 수용체에 작용하는 진해제와 기침 중추에 작용하는 진해제로 구분된다. 기침 치료에 있어 연수의 기침 중추에 작용하여 역치를 증가시키는 진해제로 dextromethorphan, diphenhydramine 과 같은 비마약성 진해제와 codeine 과 같은 마약성 진해제가 기침 치료에 있어 가장 널리 쓰이고 있으나, 효능이 예측불가능하고, 종종 약물 중독에까지 이르게 하는 중추 및 말초 신경계에 대한 유해 반응을 일으키기도 한다.^{1,3-4)} 따라서 더 안전하고, 더 효과적인 진해제를 개발하기 위한 연구가 계속되어 왔다. 코코아와 초콜릿의 주성분인 theobromine (3,7-dimethyl-2,3,6,7-tetrahydro-1H-purine-2,6-dione, Figure 1) 은 guinea pig 에서 citric acid 에 의해 유발된 기침을 억제할 뿐 아니라 건강한 사람에서도 capsaicin 에 의해 유발된 기침을 효과적으로 억제하여,⁵⁻⁶⁾ 안전하고 효과적인 새로운 진해제로 개발 가능할 것으로 주목되었다. 최근 guinea-pig 와 사람의 미주신경에 대한 in vitro 연구 결과, 이 말초에서 감각 신경의 탈분극을 직접적으로 억제하는 것이 밝혀졌으며,⁵⁾ theobromine 을 주성분으로 비마약성 말초작용 기침약이 2008년 세계 최초로 국내에서 개발되었다.

Figure 1. The structure of theobromine

본 연구는 건강한 한국인 성인 남성을 대상으로 theobromine capsule 500 mg 을 1일 2회, 7일간 경구 반복투여 하여 theobromine 의 안전성 및 약동학적 특성을 파악하고자 하였다.

원회(Institutional Review Board, IRB) 의 승인을 얻은 후 시작되었고, 피험자의 권익과 안전을 우선으로 하는 헬싱키 선언과 KGCP (Korean Good Clinical Practice, 의약품임상시험관리기준) 규정에 따라 수행되었다.

연구 대상 및 방법

1. 연구대상

만 19세 이상 45세 이하 건강한 성인 남성 자원자 중 문진, 혈압, 심전도 검사, 혈액 및 요검사를 통해 적합하다고 판단된 12명을 대상으로 하였다. 자원자들은 모두 사전에 연구의 목적, 내용 등에 대하여 충분한 설명을 듣고 자의에 의하여 참여를 결정한 후, 동의서에 서명하였다.

본 연구는 서울대학교병원 의학연구윤리심의위

2. 연구방법

1) 연구설계

본 연구는 공개, 반복투여, 단일군 설계로 진행하였다. 피험자들은 임상시험용 의약품인 theobromine 500 mg (AG1321001) 1캡슐을 1일 오전부터 7일째 오전까지 12시간 간격으로 1일 2회, 총 13회 복용하였다. 시험약의 첫 번째와 마지막 투약은 약 12시간의 금식 후 공복상태에서 물 240 mL 와 함께 이루어졌고, 투약 후 4시간 동안 공복 상

Figure 2. Study design

One capsule of theobromine 500 mg was orally administered 13 times from day 1 to day 7 following the regimen of every 12 hours a day; On day 7, the drug was administered once in the morning. Blood samples for pharmacokinetics were drawn at the following intervals: 0 (pre-dose), 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 hours after the 1st dosing (Day 1), pre-dose on day 5 and day 6, and 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24, 48 hours after the last dosing (Day 7)

태를 유지하도록 하였다. 그 이외의 투약은 투약 2시간 전부터 1시간 후까지 금식하도록 하였다. 또한 입원기간 중에는 theobromine 의 흡수, 분포, 대사 및 배설에 영향을 줄 수 있는 카페인 함유 음료나 코코아 혹은 초콜릿의 섭취, 음주, 흡연 및 심한 운동을 금지시켰다.

안전성 및 내약성은 피험자의 자발적인 보고와 문진, 신체검사, 활력징후, 심전도 검사 및 임상시험실 검사를 통하여 확인하였다.

Theobromine 의 약동학적 특성을 평가하기 위하여 계획된 일정에 따라 채혈을 수행하였다. 첫 투약과 마지막 투약 직전 및 투약 후 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 24 시간에 각각 약 8 mL 의 혈액을 채취하였다. 이외에도 투약 5일째와 6일째 투약 직전 및 마지막 투약 후 48시간(9d 0h)에 채혈하였다(Figure 2). 채취한 혈액은 즉시 heparinized tube 에 담은 후 30분 이내에 원심분리하고, 혈장 시료를 보관용 tube 에 담아 농도 분석 시까지 -20℃ 에 냉동 보관하였다.

2) 혈장 중 theobromine 농도 측정

혈장 중 theobromine 의 농도는 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) 를 이용하여 reversed phase HPLC 법으로 측정하였다. Capcell Pak C18 (5 µm particle size, 4.6x150 mm) column을 사용하였고, 이동상으로는 methanol 과 0.05 M NaH_2PO_4 의 혼합액(1:5, v/v)을 사용하였다. UV 검출기를 사용하여 274 nm 의 파장에서 검출하였다.

Theobromine 표준품을 메탄올에 녹여 1 mg/mL 의 표준 원액을 만들어 냉장 보관하였다. 이 용액을 순차적으로 희석한 후 공혈장에 spiking 하여 theobromine 의 농도가 0.05-50 mg/mL 이 되도록 만든 표준 시료를 이용하여 검량선을 작성

하였다.

각 혈장 시료 0.5 mL 에 내부표준물질 (sulfa-methoxazole, 50 mg/mL) 50 µL 와 0.8 M perchloric acid 0.5 mL 를 가하여 혼합 및 원심분리한 후, 상층액 0.7 mL 를 취하여 유리 tube 에 넣고 4 M NaOH 54 µL 를 혼합하여 50 µL 를 HPLC 에 주입하였다.

얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 theobromine 의 피크 면적을 구하여 미리 작성한 검량선으로부터 혈장 중 theobromine 의 농도를 구하였다.

최소 정량한계농도는 0.05 mg/mL 이었고, 표준 검량선의 결정계수(r^2)는 0.989 이상이었다. Back-calculated concentration 의 정밀도(precision)는 모든 농도에서 11.8% 이하였고, 정확도(accuracy)는 96.2% ~ 105.1% 였다.

3) 약동학적 분석

약동학적 파라미터는 WinNonlin 5.2 (Pharsight Corporation, CA, USA)를 이용하여 비구획 방법(noncompartmental method)으로 산출하였고, 이때 채혈시각은 채혈이 수행된 실제 시간을 사용하였다. 초회투여와 반복투여 후의 최고 혈장농도($C_{\max}$, $C_{\max,ss}$)와 최고 혈장농도 도달시간($T_{\max}$, $T_{\max,ss}$),항정상태의 혈장 trough 농도라 할 수 있는 마지막 투여 후 12 시간 경과된 시점의 혈장농도($C_{\min,ss}$)는 관측된 값을 기술하였다. 투여간격 사이의 혈중농도-시간 곡선하면적(AUC_T) 및 측정가능한 마지막 채혈시점에서 무한대 시간까지 외삽하여 계산한 혈중농도-시간 곡선하면적(AUC_{inf})은 혈중농도-시간 곡선 그래프로부터 혈중 농도 상승 구간에서는 선형 사다리꼴 계산법(linear trapezoidal rule)으로, 혈중 농도 감소 구간에서는 대수 사다리꼴 계산법(logarithmic

trapezoidal rule)으로 계산하였다. AUC_{inf} 은 마지막 채혈시점까지의 혈중농도-시간 곡선하면적 (AUC_{last})에 마지막 채혈된 농도(C_{last})를 소실속도상수(λ_z)로 나눈 값을 더하여 산출하였다. 소실속도상수(λ_z)는 시간에 따른 혈중 농도의 log-linear plot 에서 T_{max} , 또는 $T_{max,ss}$ 이후 농도 중 정량한계 이상의 마지막 농도 측정치를 포함한 연속된 최소 3개의 점을 이용하여, 보정된 결정계수 (adjusted r^2)가 최대가 되도록 선형회귀하여 산출하였고, 이로부터 $\ln(2)/\lambda_z$ 계산하여 소실반감기 ($t_{1/2}$)를 구하였다. 또한 초회투여시와 반복투여시의 경구청소율(CL/F , CL_{ss}/F)과 겔보기분포용적 (V_z/F , $V_{z,ss}/F$)을 비롯하여 반복투여 후 도달된 항정상태의 평균 혈장 농도($C_{av,ss}$), 항정상태에서의 peak-trough fluctuation, 반복투여시의 축적률도 함께 산출하였다.

4) 통계 분석

SPSS 13.0 (SPSS Korea, Seoul, Korea)를 통계분석에 사용하였다. 약동학 파라미터는 평균, 표준편차, 변이계수 등의 기술통계학적 분석을 시행하였다.

초회투여시와 반복투여 후 도달된 항정상태에서의 약동학적 파라미터 비교시 비모수적 분석법 중 하나인 wilcoxon rank sum test 를 적용하였다.

연구 결과

본 연구는 스크리닝 검사 결과 본 연구에 적합한 12명의 자원자를 대상으로 진행되었다. 모든 피험자는 임상시험계획서에 따라 시험을 종료하였으며, 안전성 및 약동학적 평가 대상에 포함되었다. 본 연구에 참여한 피험자들의 평균 연령은

Table 1. Pharmacokinetic parameters of theobromine after single and multiple oral administrations of theobromine capsule 500 mg in 12 healthy Korean male volunteers

	Day 1	Day 7	p-value**
T_{max}^* (h)	2.0 [0.5 ~ 4.0]	1.8 [0.5 ~ 6.0]	0.898
$C_{max}^\dagger$ ($\mu\text{g/mL}$)	9.4 ± 1.5 (16.2%)	22.0 ± 3.0 (13.8%)	<0.001
$AUC^\ddagger$ ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	82.3 ± 9.6 (11.6%)	213.9 ± 37.7 (17.6%)	<0.001
AUC_{inf} ($\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$)	—	493.0 ± 140.5 (28.5%)	<0.001
$t_{1/2}$ (h)	13.0 ± 3.1 (23.8%)	13.4 ± 2.5 (18.9%)	0.569
$CL/F^\S$ (L/h)	2.8 ± 0.6 (23.1%)	2.4 ± 0.4 (17.9%)	<0.001
PTF (%)	—	47.5 ± 11.1 (23.4%)	—
$R^\P$	—	2.2 ± 0.3 (13.7%)	—

Results are presented as mean $\pm$ standard deviation (CV(%)).

* T_{max} are reported as Median [Min ~ Max]

† Day1 : C_{max} , Day7: $C_{max,ss}$

‡ Day 1 : $AUC_{0-\tau}$, Day 7 : $AUC_{\tau,ss}$

§ Apparent clearance, Day 1 : CL/F , Day 7: CL_{ss}/F

^{||} PTF(%) : Peak-trough fluctuation, calculated as $[(C_{max,ss}-C_{min,ss})/C_{av,ss}]\cdot 100$

¶ R : Accumulation ratio (index), calculated as $AUC_{\tau,ss} / AUC_{0-\tau}$

** Wilcoxon signed rank test

Figure 3. Mean theobromine plasma concentration-time profiles after single (Day 1) and twice-daily multiple administration (Day 7) of theobromine 500 capsules in 12 healthy male volunteers (A) linear scale, (B) log-linear scale. Bars represent standard deviations.

23.3 ± 2.0 세였으며, 평균 신장은 174.8 ± 7.0 cm, 평균 체중은 68.7 ± 9.0 kg 이었다.

Theobromine 500 mg1캡슐을 초회투여시(Day 1) 혈중농도는 0.5 ~ 4.0 시간 사이에 최고에 도달했고, 13.0 ± 3.1 시간의 소실 반감기를 보이며 감소했다. 평균 C_{max} 는 9.4 ± 1.5 µg/mL 였고, AUC_{0-12} 는 82.3 ± 9.6 µg·h/mL 였다. 항정상태(day 7) 에서는 0.5 ~ 6.0 시간 사이에 $C_{max,ss}$ 에 도달 후, 13.4 ± 2.5 시간의 소실 반감기를 나타내었다. 평균 C_{max} 는 22.0 ± 3.0 µg/mL, $AUC_{12,ss}$ 및 AUC_{inf} 는 각각 213.9 ± 37.7, 493.0 ± 140.5 µg·h/mL 로 초기투여시보다 증가하였다. 또한 % 변동율(fluctuation) 은 47.5 ± 11.1 이었고, 평균 축적율($AUC_{\tau,ss}$ (Day 7)/ $AUC_{0-\tau}$ (Day 1)) 은 2.2 이었다(Table 1, Figure 3).

연구기간 중 총 12명의 피험자 중 8명에서 총 11건의 유해사례가 발생하였다. 그 중 두통 3건과 어지러움 1건, 복통 2건의 유해사례에 대해서는 시험약과의 관련성을 배제하기 어렵다고 판단하였으며, 이들은 유사한 계열의 약물인 theophylline의 약품허가정보에 반영된 예측 가능한 유해사례

였다.⁷⁾ 모든 유해사례는 경증으로 나타났으며, 후유증 없이 자발적으로 소실되는 양상을 보였다. 기타 안전성 평가 항목인 활력징후, 심전도 검사, 임상실험실 검사 및 신체검진 결과 임상적으로 의미 있는 변화는 관찰되지 않았다.

고 찰

본 연구에서는 theobromine 500 mg 캡슐을 12명의 건강한 성인 남성에게 1일 2회, 7일간 반복 경구투여한 후 반복투여에 대한 안전성 및 내약성을 검토하고, theobromine의 약동학적 특성을 평가하고자 하였다. 임상시험 기간 내 발생한 모든 유해사례는 모두 경증에서 중등도로 예측 가능한 부작용이었으며, 특이사항은 발견되지 않았다. 관찰된 유해사례 양상과 안전성 평가 결과를 종합적으로 판단하였을 때, 투여된 용량범위(하루 총 1000 mg) 내에서 안전하고, 내약성이 우수하다고 판단되었다. 두통 및 어지러움 등 신경계통의 유해사례가 가장 흔하였으나, 이는 구조가 유사한 methylxanthine alkaloid 계열(cafeine, theophylline)

Figure 4. Methylxanthine alkaloids

(Theobromine is one of the methylxanthine alkaloids, including caffeine, paraxanthine, and theophylline. Methylxanthine alkaloids have similar structures and are connected by the metabolic pathway; paraxanthine, theophylline, and theobromine are derived from the metabolism of caffeine.)

Table 2. Geometric Mean ratios of Day 1 to steady-state (Day 7)

	Ratio [*]	90% CI [†]	
		Lower	Upper
$C_{max}^{\ddagger}$ (μg/mL)	2.34	2.14	2.56
$AUC^{\S}$ (μg·h/mL)	2.58	2.33	2.80

^{*} Geometric mean ratios of first dosing (Day 1) to last dosing (Day 7)

[†] 90% CI for geometric mean ratio, CI: Confidence interval

[‡] Day 1 : C_{max} , Day7 : $C_{max,ss}$

[§] Day 1 : $AUC_{0-\tau}$, Day 7 : $AUC_{\tau,ss}$

에서 공통적으로 흔하게 나타나는 부작용으로 methylxanthine alkaloid 구조에 의한 작용으로 사료된다(Figure 4).

대표적인 천연 methylxanthine 인 theobromine, caffeine, theophylline 은 구조가 유사함에도 불구하고, 효능의 강도나 작용 범위에 있어서 차이가

있다. Methylxanthine 계열의 약리 작용은 cyclic nucleotide phosphodiesterases (PDEs) 에 대한 비특이적 저해작용과 adenosine 수용체의 길항작용을 기본으로, xanthine 구조의 N1 위치에 치환기가 없거나 N7 위치에 치환기를 가지게 되면, 1,3-dialkylxanthine 에 비해 작용이 감소한다는 원칙을 따른다.⁸⁾ Theophylline 과 caffeine, theobromine 은 평활근을 이완시키는데, 특히 기관지 평활근에 대한 작용이 현저하며, 중추신경계 및 심근을 자극하고, 신장에도 작용하여 이뇨를 촉진한다.⁴⁾ Theobromine 의 경우 N7 위치에만 치환되어 있으므로 theophylline, caffeine 에 비해 낮은 효능을 가지며, PDE 저해작용과 adenosine 수용체 차단 측면에서 theophylline>caffeine>theobromine 의 순서를 보인다.⁸⁾

Theobromine 반복투여 후, 항정상태에서의 약동학적 특성은 흡수 및 소실 측면에서 초회투여시와 유사하였으나(T_{max} , $p=0.898$; $t_{1/2}$, $p=0.569$), C_{max} 및 AUC 는 항정상태 도달시 초회투여시에 비해 각각 234%, 258% 까지 증가하였다(Table 2). 항정상태에서의 평균 소실반감기가 13.4 시간이고, 1일 2회 반복투여 후 약물이 체내에 약 2.2 배 정도 축적되어 만성기침의 대증 치료법으로 theobromine 을 반복투여시 안정적인 기침 억제 효과를 나타낼 것으로 기대된다. 참고로 codeine 의 혈중 소실반감기는 2 ~ 4시간으로 theobromine 에 비해 짧다.⁸⁾ 또한 theobromine 은 C_{max} , $C_{max,ss}$, AUC_τ 및 AUC_{τ,ss} 의 변이계수는 11.6% ~ 17.6% 정도로 개체간 차이가 비교적 작은 특성을 보였다.

본 연구의 결과, theobromine 500 mg 캡슐을 1일 2회, 7일간 투여했을 때 안전성 및 내약성이 우수하다고 판단되며, 본 연구는 사람에서의 theobromine 반복투여 후 약동학적 특성을 밝히

고 theobromine capsule 제제에 대한 1일 2회 용법의 근거를 제시하였다는 점에서 의의를 가진다.

참 고 문 헌

1. Cho SH. Cough. *The Korean Journal of Medicine*, 2009;76(3):252-259.
2. Irwin RS, Curley FJ, French CL. Chronic cough. The spectrum and frequency of causes, key components of the diagnostic evaluation, and outcome of specific therapy. *Am Rev Respir Dis*, 1990;141(3):640-647.
3. Pavesi L, Subburaj S, Porter-Shaw K. Application and validation of a computerized cough acquisition system for objective monitoring of acute cough: a meta-analysis. *Chest*, 2001;120(4):1121-1128.
4. Resine T, and Pasternak, G. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 6th ed.; 1996.
5. Usmani OS, Belvisi MG, Patel HJ, Crispino N, Birrell MA, Korbonits M, Korbonits D, Barnes PJ. Theobromine inhibits sensory nerve activation and cough. *FASEB J*, 2005;19(2):231-233.
6. Dicpinigaitis PV. Currently available anti-tussives. *Pulm Pharmacol Ther*, 2009;22(2):148-151.
7. THOMSON. MICROMEDEX. Available at: http://ccis.snuh.org/hcs/librarian/ND_T/HCS/ND_PR/Main/CS/518271/DUPLICATIONSHIELDSDYNC/94D102/ND_PG/PRIH/ND_B/HCS/SBK/2/ND_P/Main/PFActionId/hcs.common.RetrieveDocumentCommon/DocId/0012/ContentSetId/31/SearchTerm/theophylline%20/SearchOption/BeginWith.
8. KORBONITS D, ARÁNYI P, JELINEK I, MIKUS E. *ANTITUSSIVE COMPOSITIONS*, WO/1998/042322, 1997.