

## 사람 혈장에서 비발리루딘 농도 측정을 위한 분석 방법의 유효성 검증 및 약동학 시험에의 적용

<sup>1</sup>서울아산병원 임상약리학과, <sup>2</sup>울산대학교 의과대학, <sup>3</sup>서울아산병원 임상시험센터 임상약리실험실

김요한<sup>1,2</sup>, 박현정<sup>3</sup>, 최희연<sup>1,2</sup>, 임형석<sup>1,2</sup>, 배균섭<sup>1,2</sup>

=Abstract=

### Validation of LC-MS/MS Method for Determination of Bivalirudin in Human Plasma: Application to a Pharmacokinetic Study

Yo Han Kim MD<sup>1,2</sup>, Hyun Jeong Park<sup>3</sup>, Hee Youn Choi MD<sup>1,2</sup>,  
Hyeong-Seok Lim MD, PhD<sup>1,2</sup>, Kyun-Seop Bae, MD, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, Asan Medical Center, Seoul, Korea,

<sup>2</sup>University of Ulsan College of Medicine, <sup>3</sup>Clinical Trial Center, Asan Medical Center, Seoul, Korea

**Background:** Bivalirudin is a direct thrombin inhibitor for patients with unstable angina undergoing percutaneous coronary intervention.

**Methods:** A sensitive liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) method was developed and validated for the determination of bivalirudin, in human plasma using nafarelin as internal standard (IS). Chromatographic separation was performed using a Shiseido MG3 mm column (2.0 × 50 mm) with a gradient mobile phase consisting of water and acetonitrile containing 0.1 % formic acid at a flow rate of 0.4 mL/min, and total run time was within 5 min. Detection and quantification was performed by the mass spectrometer using a multiple reaction-monitoring mode at m/z 1091.0 → 650.3 for bivalirudin, and m/z 662.1 → 249.3 for IS.

**Results:** The assay was linear over a concentration range of 10 - 10000 ng/mL with a lower limit of quantification of 10 ng/mL in human plasma.

**Conclusion:** This method was successfully applied for pharmacokinetics study after intravenous administration of bivalirudin to healthy Korean male volunteers.

**Key words:** Bivalirudin, Liquid chromatography, Pharmacokinetics

---

본 연구는 씨트리(주)의 지원에 의하여 이루어졌음.

교신저자: 배균섭

소 속: 서울아산병원 임상약리학과/울산대학교 의과대학

주 소: 서울시 송파구 올림픽로 43길 서울아산병원 임상약리학과

전화번호: 02-3010-4611, 팩스: 02-3010-4623, E-mail: ksbae@amc.seoul.kr

접수일자: 2013. 11. 14. 수정일: 2013. 12. 17. 게재확정일: 2013. 12. 20.

## 서론

비발리루딘은 가역적으로 작용하는 직접 트롬빈 억제제(direct thrombin inhibitor)로 심장동맥 중재술시 혈액이 굳는 것을 막기 위하여 투여하는 항응고제로 사용되고 있다.<sup>1,2)</sup> FDA 및 EMEA로부터 각각, 2000년 및 2004년도에 승인을 받은 후, 제품명 안지오맥스(ANGIOMAX<sup>®</sup>) 및 안지옥스(ANGIOX<sup>®</sup>)로서 시판 중인 제품이나, 국내에서는 동일 성분 및 동일 제제로서 허가 받은 제품은 아직 없다.<sup>3,4)</sup>

다양한 문헌을 통해 비발리루딘의 약동학 및 약력학 특성이 알려져 있다. 비발리루딘의 소실 반감기는 1시간 이내이며, 투여한 양의 80 %는 세포 내에서 단백질 가수 분해되고, 남은 20 %는 신장으로 제거된다.<sup>5)</sup> 또한, 활성화부분트롬보플라스틴 시간(activated partial thromboplastin time, aPTT)이나 활성화 응고 시간(activated clotting time, ACT)을 약력학 파라미터로 하여, 투여용량과 약력학적 효과의 상관관계를 관찰한 임상시험에서 투여 용량과 항응고 효과 사이에 밀접한 상관관계가 있음이 보고된 바 있다.<sup>6,7)</sup>

기존에 사용 중인 헤파린의 경우, 간접 트롬빈 억제제로 응고된 혈액에 붙어있는 트롬빈(clot-bound thrombin)을 억제하지 못하는 점, 비전형적인 약동학/약력학 특성을 보인다는 점이 단점으로 지적되고 있다. 이에 반해, 비발리루딘의 경우 반감기가 짧고, 주된 제거 과정이 특정 장기에 의존하지 않는 점, 약동학/약력학 효과가 예측이 용이한 점, 트롬빈의 결합부위뿐 아니라 트롬빈의 항응고 효과를 나타내는 활성화 부위에 모두 결합하여 항응고 효과를 나타낸다는 점으로 인해 헤파린을 대체하는 역할을 할 것으로 기대된다.<sup>8-10)</sup>

비발리루딘 제제의 약동학 및 약력학 특성이 널리

알려진 것에 반해 비발리루딘 제제의 분석법과 관련하여서는 소수의 논문에서만 보고된 바 있다.<sup>11,12)</sup> 이에 본 논문에서는 혈장에서 LC/MS/MS를 이용하여 비발리루딘의 농도를 측정하기 위한 분석법을 확립하고, 이를 가지고 (주)씨트리에서 제조한 비발리루딘 제제의 약동학 특성을 확인하는데 적용하였다.

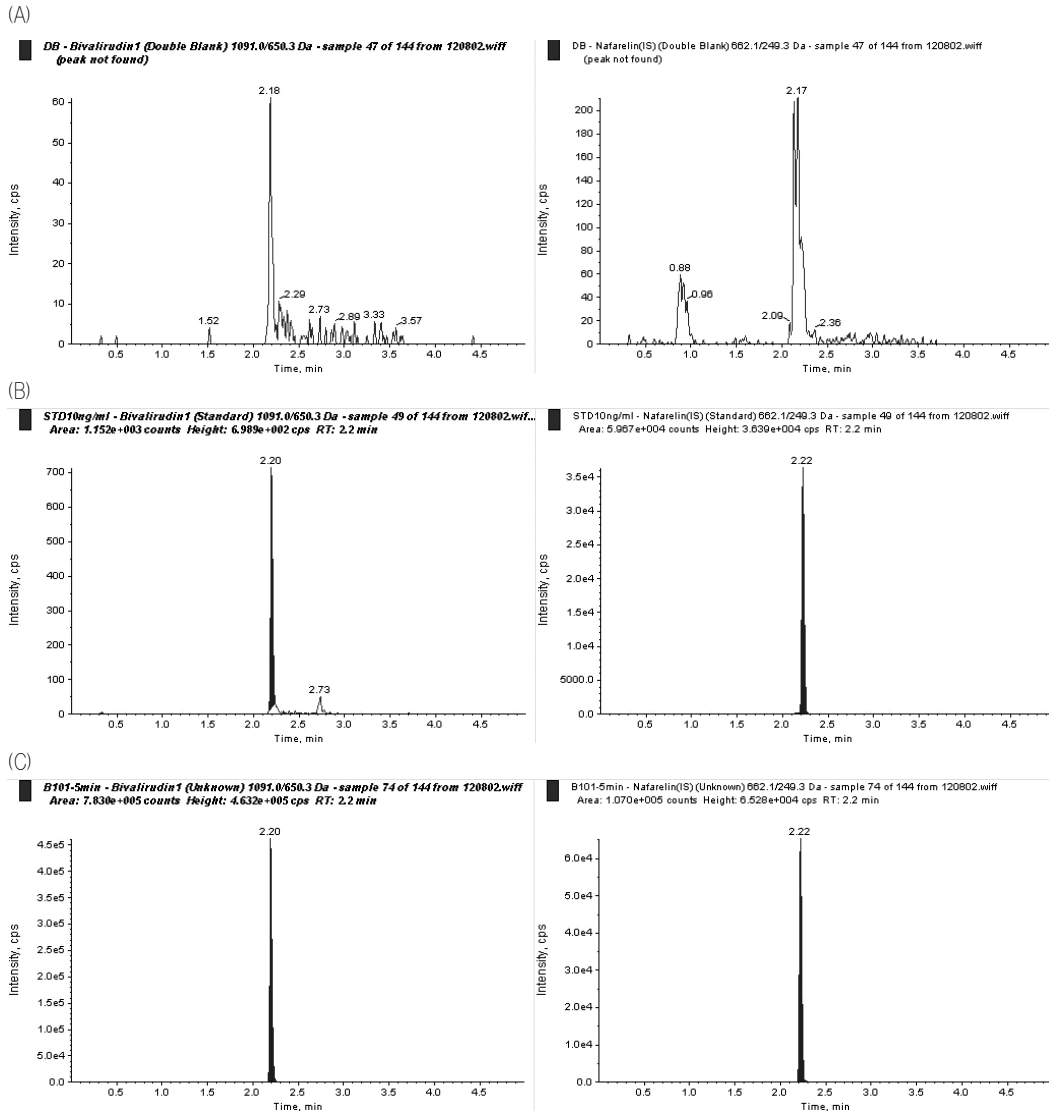
## 연구대상 및 방법

### 1. 시험약물 및 내부표준 물질

표준물질인 비발리루딘(88.84 %)은 의뢰사인 (주)씨트리에서 공급받았으며, 내부표준물질로 사용한 나파렐린(Nafarelin)은 Sigma-Aldrich사(MA, USA)에서 구입하였다. 용매로 사용된 메탄올(methanol)과 아세토니트릴(Acetonitrile)은 J.T.Baker (HPLC grade, USA)에서 구입하였다.

### 2. 분석 조건

시료의 분석에는 Agilent 1200 series liquid chromatograph/API 4000 mass spectrometer (Applied Biosystems, USA)를 사용하였고, 질량분석기의 이온화 방식에는 전기분무 이온화(electrospray ionization, ESI)의 양이온 모드를 사용하였다. HPLC 분석조건의 경우, 컬럼은 Shiseido MG3mm, 50 mm (length) × 2.0 mm (i.d.)를 사용하였으며, 이동상으로 물과 아세토니트릴을 그래디언트(gradient) 방법을 이용하여 분리하였고, 유속은 0.4 mL/min로 하였다. Mass Spectrometer 분석조건의 경우, multiple reaction monitoring (MRM) 모드에서 비발리루딘은 1091.0 → 650.3, 나파렐린은 662.1 → 249.3의 조건에서 검출하였다.



**Figure 1.** Chromatograms of (A) a human blank plasma sample; (B) a human plasma sample spiked with 10 ng/mL of bivalirudin and IS (nafarelin); (C) a subject's plasma sample at 5 min after intravenous bolus administration of bivalirudin 0.375 mg/kg.

### 3. 시료 전 처리 및 검량선 작성

비발리루딘 표준품을 메탄올에 녹여 농도가 비발리루딘으로서 1 mg/mL이 되도록 만들고, 이 용액을 순차적으로 희석하여 물과 메탄올

10:90(v/v)의 비율에 0.1 % formic acid를 첨가하여 표준액을 조제하였다. 표준검량선을 작성하기 위하여 공혈장 200 mL에 비발리루딘의 혈장 중 농도가 10, 50, 100, 500, 1000, 2000, 5000 및 10000 ng/mL의 농도가 되도록 첨가하였다. 각 시

험관에 비발리루딘의 내부표준물질인 나파렐린(1000 ng/ml) 20 mL와 아세트니트릴을 400 mL 가한 후 2분간 진탕한 후 원심분리하고 유기용매 상층을 500 mL 취해 1.5 mL 튜브에 옮긴 후 45 °C, 120분간 건조시켰다. 건조된 각 튜브에 물과 메탄올 90:10 (v/v)의 비율에 0.1 % formic acid 를 100 mL 가한 후 2분간 혼합하여 재용해 하였다. 원심분리하고 유기용매 상층액 5 mL를 LC/MS/MS에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준 물질의 피크 면적에 대한 비발리루딘 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다.

#### 4. 분석법 검증

검량선 작성용 표준시료 이외에 별도로 조제한 정도관리시료를 저농도(20 ng/mL), 중농도(5000 ng/mL), 고농도(8000 ng/mL)를 만들어 정확성 및 정밀성을 확인하였다. 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하고 5일간 실험을 반복 시행하여 일간 재현성을 구하였다.

#### 5. 약동학 시험

총 3개의 용량군(0.375 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1.5 mg/kg)으로 나누어 각 용량군별 6명의 건강자원을 대상으로 비발리루딘을 정맥내 일시 주사하였다. 채혈 시점은 기존 문헌을 참고로 하여 정맥내 주사 전(pre-dose), 주사 후(post-dose) 5, 10, 20, 40, 60, 90, 120, 180, 240, 300분에 채혈을 시행하였다.<sup>5)</sup> 각 시점마다 헤파린 튜브에 7 mL의 혈액을 채취하였고, 4 °C, 1800 g, 조건에서 8분동안 원심분리하여 상층 혈장을 분리하였다. 해당 검체는 -20 °C 이하에 냉동 보관 후 7일 이내에 -70 °C 이하 냉동고로 옮긴 후 농도 분석 시까지 보관하였다.

## 결 과

### 1. 특이성

시료 전 처리 과정에 기술한 대로 검체를 처리 하여 LC/MS/MS로 분석하였을 때 얻어진 크로마토그램은 Figure 1과 같았으며 비발리루딘의 피크의 머무름 시간은 약 2.20분이었고 내부표준물질인 나파렐린 피크의 머무름 시간은 약 2.22분이었다. 분석조건에서 비발리루딘과 내부표준물질인 나파렐린의 분리상태는 양호하였다.

### 2. 직선성, 정확성, 정밀성

비발리루딘 분석시  $1/x^2$ 에 대한 가중치로 단순 회귀분석 하였을 때 10 - 10000 ng/mL 범위에서 회귀계수는 0.9974에서 0.9990 사이의 양호한 직선성을 나타내었다.

정도관리시료의 일내 분석에서 bivalirudin의 정밀성은 10 ng/mL의 농도에서 7.03 %, 20 ng/mL에서 10.16 %, 5000 ng/mL에서 5.03 % 및 8000 ng/mL에서 4.76 %로 나타났다. 일내 분석에서 정확성은 각 농도에서 10.02 %, -0.48 %, 4.02 % 및 2.28 %로 나타났다(Table 1).

정도관리시료의 일간 분석에서 bivalirudin의 정밀성은 10 ng/mL의 농도에서 8.02 %, 20 ng/mL에서 5.78 %, 5000 ng/mL에서 5.13 % 및 8000 ng/mL에서 6.34 %로 나타났다. 일간 분석에서 정확성은 각 농도에서 9.46 %, 6.73 %, 5.90 % 및 4.69 %로 나타났다(Table 1).

### 3. 안정성

저농도(20 ng/mL), 고농도(8000 ng/mL)에 해당

**Table 1.** Intra- and inter-day precision and accuracy data for this assay of bivalirudin in human plasma (n=5)

	QC 10 ng/mL	QC 20 ng/mL	QC 5000 ng/mL	QC 8000 ng/mL
Intra-day				
Mean (ng/mL)	11.00	19.90	5201.08	8182.33
Precision (%)	7.03	10.16	5.03	4.76
Accuracy (RE*, %)	10.02	-0.48	4.02	2.28
Inter-day				
Mean (ng/mL)	10.95	21.35	5295.03	8375.37
Precision (%)	8.02	5.78	5.13	6.34
Accuracy (RE*, %)	9.46	6.73	5.90	4.69

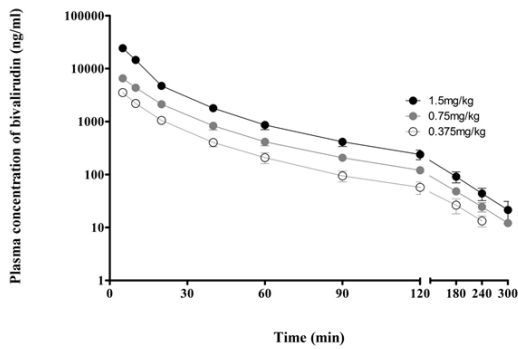
RE = 100% × (spiked concentration - mean calculated concentration) / spiked concentration.

**Table 2.** Stability of bivalirudin in human plasma

Storage conditions	QC 20 ng/mL	QC 8000 ng/mL
Short-term (room temperature for 24 h)	-12.37%	-13.01%
Long-term (-70 °C for 40 days)	-0.89%	-7.68%
Three Freeze/thaw cycles	3.66%	-9.07%
After extraction (stored in HPLC autosampler at 4 °C for 24 h)	-7.66%	0.37%

Data are presented as percent difference from baseline (%).

하는 시료를 모든 전처리 과정을 거친 다음, 상온에서의 안정성, 장기 안정성, 냉해동 안정성, 추출 후 안정성을 확인하였다. 그 결과, Table 2에서 알수 있듯이 실험을 수행한 모든 상황에서 안정함을 알 수 있었다.



**Figure 2.** Mean plasma concentration time curves of bivalirudin after single intravenous bolus injection. Data are expressed as mean ± SD (each group, n=6).

#### 4. 최저 정량 한계

최저정량한계는 정확성 및 정밀성이 ± 20 % 이내인 LLoQ의 농도로 결정하되 크로마토그램상에서 신호대 잡음비(S/N ratio)가 10 이상이거나 최저정량한계에서 분석물질의 반응이 공시료의 반응과 비교할 때 최소 5배 이상이어야 하는 조건을 만족하는 10 ng/mL를 최저정량한계로 결정하였다.

#### 5. 약동학 시험에의 적용

본 시험에서 개발된 분석법을 이용하여 측정하는 시간에 따른 혈장 농도 양상은 Figure 2와 같다. 채혈시점의 적절성을 확인하기 위해 WinNonlin® Version 6.1 (Pharsight Co., Mountain View, CA, USA)을 이용하여  $AUC \% \text{ Extrap} = (AUC_{\text{inf}} - AUC_{\text{last}}) / AUC_{\text{last}} \times 100$ 을 확인한 결과, 0.375 mg/kg, 0.75 mg/kg, 1.5 mg/kg 군에서 각각  $1.48 \pm 0.31$ ,  $0.72 \pm 0.17$ ,  $0.44 \pm 0.24$ 였다. 이상을 고려

해 볼 때, 본 농도 측정법의 최저 정량 한계(10 ng/mL) 및 채혈 시점은 약동학 시험에 적용하기에 적절한 것으로 생각된다.

### 고 찰

비발리루딘은 히루딘 구조를 토대로 한 단일 체인의 20개 아미노산 폴리펩타이드로서 합성 펩타이드 분자량은 2180 Da로 알려져 있다.<sup>13)</sup> 최근 들어 펩타이드 제제가 치료제로 개발되는 경우가 늘어남에 따라, 펩타이드 제제에 대한 분석법 개발의 중요성이 대두된 바 있다.<sup>14-16)</sup> 비발리루딘의 농도 분석법과 관련하여서는 몇몇 문헌에서 보고된 바가 있다. Farthing 등은 고체상 추출법 (solid-phase extraction, SPE)과 OPA (o-phthalaldehyde) 유도체화를 이용하여 3000 - 20000 ng/mL의 검량선 범위에서 분석법을 확립한 바 있다.<sup>12)</sup> Robson 등은 고체상 추출법을 적용한 분석법을 가지고 임상시험에 적용하였고, 당시의 검량선 범위는 500 - 25000 ng/mL였다.<sup>5)</sup> 그러나, 고체상 추출법을 사용한 분석법의 경우 비용 소모가 큰 점, 분석 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 이런 점을 보완하고자, Pan 등은 고체

상 추출법 대신 메탄올을 이용한 단백질 침전 (protein precipitation)을 이용하여 1.25 - 500 ng/mL의 검량선 범위에서 분석법을 확립하였고, 분석 실행 시간(run time)은 7분이었다.<sup>11)</sup>

본 시험에서는 아세토니트릴을 이용한 단백질 침전을 이용하여 10 - 10000 ng/mL의 검량선 범위에서 분석법을 확립하였고, 분석 실행 시간 (run time)은 5분이었다. 이는 Pan이 보고한 분석법과 비교하였을 때, 검체당 분석 실행 시간도 단축했을 뿐 아니라, 더 넓은 검량선 범위를 확보했다는 데 의의를 둘 수 있다.

넓은 검량선 범위를 확보함으로써 검체의 희석을 최소화하여 분석을 진행할 수 있었다. 실제 임상시험용의약품을 투여한 결과, 최고 용량군인 1.5 mg/kg 군에서는 검량선 범위의 상한인 10000 ng/mL를 넘어, 희석이 필요한 채혈 포인트가 일부 있었다. 희석이 필요한 채혈 포인트의 분석에 앞서 20 (QC1), 5000 (QC2), 50000 (Dilution 1/10) (QC3), 8000 (QC4) ng/mL과 같이 희석 QC (quality control) 시료를 포함하여 적합성을 확인하였고 앞서 기술된 방법으로 시료 전 처리 후 분석하였다. 그 결과, QC시료 중 67 %가 예상되는 이론값의 15 %이내여야 하는 조건을 모두

**Table 3.** Suitability of bivalirudin in human plasma

Analyte concentration (ng/mL)	Calculated concentration (ng/mL)	Accuracy (%)
20	18.82	94.08
	18.39	91.96
5000	4983.39	99.67
	4873.87	97.48
50000(Dilution 1/10)*	51346.64	102.69
	53721.03	107.44
8000	8205.98	102.57
	8663.37	108.29

QC samples of 50000 ng/mL were diluted 1:10 to prepare QC sample of 5000 ng/mL. Those diluted QC samples were used to analyze diluted samples of bivalirudin in case of the unexpected high concentration over 10000 ng/mL.

만족하였다(Table 3).<sup>17)</sup>

이를 종합하여 볼 때, 이미 분석법이 어느 정도 알려져 있다 하더라도 분석법의 개선을 통해 충분한 검량선 범위를 확보 후 약동학 시험에 적용하는 것이 중요함을 확인할 수 있다.

### 참고문헌

1. Gladwell TD. Bivalirudin: a direct thrombin inhibitor. *Clin Ther*, 2002;24(1):38-58.
2. Lincoff AM, Bittl JA, Harrington RA, Feit F, Kleiman NS, Jackman JD, Sarembock IJ, Cohen DJ, Spriggs D, Ebrahimi R, Keren G, Carr J, Cohen EA, Betriu A, Desmet W, Kereiakes DJ, Rutsch W, Wilcox RG, de Feyter PJ, Vahanian A, Topol EJ, Investigators R-. Bivalirudin and provisional glycoprotein IIb/IIIa blockade compared with heparin and planned glycoprotein IIb/IIIa blockade during percutaneous coronary intervention: REPLACE-2 randomized trial. *JAMA*, 2003;289(7):853-863.
3. EMEA. Scientific discussion for the approval of Bivalirudin [cited 2013 31 Oct]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/docs/en\\_GB/document\\_library/EPAR\\_-\\_Scientific\\_Discussion/human/000562/WC500025072.pdf](http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000562/WC500025072.pdf).
4. FDA. NDA 020873 Angiomax (Bivalirudin): Clinical Pharmacology Biopharmaceutics Review. Rockville, MD: Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration; 2003.
5. Robson R, White H, Aylward P, Frampton C. Bivalirudin pharmacokinetics and pharmacodynamics: effect of renal function, dose, and gender. *Clin Pharmacol Ther*, 2002;71(6):433-439.
6. Lidon RM, Theroux P, Juneau M, Adelman B, Maraganore J. Initial experience with a direct antithrombin, Hirulog, in unstable angina. Anticoagulant, antithrombotic, and clinical effects. *Circulation*, 1993;88(4 Pt 1):1495-1501.
7. Topol EJ, Bonan R, Jewitt D, Sigwart U, Kakkar VV, Rothman M, de Bono D, Ferguson J, Willerson JT, Strony J, et al. Use of a direct antithrombin, hirulog, in place of heparin during coronary angioplasty. *Circulation*, 1993;87(5):1622-1629.
8. Reed MD, Bell D. Clinical pharmacology of bivalirudin. *Pharmacotherapy*, 2002;22(6 Pt 2):105S-111S.
9. Anand SX, Viles-Gonzalez JF, Mahboobi SK, Heerdt PM. Bivalirudin utilization in cardiac surgery: shifting anticoagulation from indirect to direct thrombin inhibition. *Can J Anaesth*, 2011;58(3):296-311.
10. Shamma NW. Bivalirudin: pharmacology and clinical applications. *Cardiovasc Drug Rev*, 2005;23(4):345-360.
11. Pan G, Wang X, Huang Y, Gao X, Wang Y. Development and validation of a LC-MS/MS method for determination of bivalirudin in human plasma: Application to a clinical pharmacokinetic study. *J Pharm Biomed Anal*, 2010;52(1):105-109.
12. Farthing D, Larus T, Fakhry I, Gehr T, Prats J, Sica D. Liquid chromatography method for determination of bivalirudin in human plasma and urine using automated ortho-phthalaldehyde derivatization and fluorescence detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2004;802(2):355-359.
13. Maraganore JM, Bourdon P, Jablonski J, Ramachandran KL, Fenton JW, 2nd. Design and characterization of hirulogs: a novel class of bivalent peptide inhibitors of thrombin. *Biochemistry*, 1990;29(30):7095-7101.
14. Zhang X, Nieforth K, Lang JM, Rouzier-Panis R, Reynes J, Dorr A, Kolis S, Stiles MR, Kinchelov T, Patel IH. Pharmacokinetics of plasma enfuvirtide after subcutaneous administration to patients with human immunodeficiency virus: Inverse Gaussian density absorption and 2-compartment disposition. *Clin*

- Pharmacol Ther*, 2002;72(1):10-19.
15. Douglas SA. Human urotensin-II as a novel cardiovascular target: 'heart' of the matter or simply a fishy 'tail'? *Curr Opin Pharmacol*, 2003;3(2):159-167.
  16. John H, Walden M, Schafer S, Genz S, Forssmann WG. Analytical procedures for quantification of peptides in pharmaceutical research by liquid chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, 2004;378(4): 883-897.
  17. FDA. Bioanalytical Method Validation (Draft Guidance). Rockville, MD: Department of Health and Human Services, US Food and Drug Administration; 2013.