



저작자표시 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.
- 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#) 

약학석사 학위논문

MDCK cell에서 OAT1의 기능적 발현

- 인간과 Rat에서 그 기능의
종간 차이에 관한 근거 -

Functional Expression of OAT1 in MDCK cells:

Evidence of Species-differences in the Function between
the Human and Rat

2015 년 2 월

서울대학교 대학원
약학과 약제과학 전공
김 병 진

국문 초록

미국 식품의약국은 여러 약물수송체들(Drug transporters) 중 약물상호작용(Drug-drug interaction, DDI)에 큰 영향을 미치는 7가지 주요 약물수송체를 발표하고 신약개발 과정에서 후보물질과 이들 간의 상호작용을 반드시 평가하도록 권고하고 있다. 그 중 유기음이온 수송체인 OAT1은 다양한 상피세포의 basolateral membrane에 발현되는 단백질로 기질인 음이온성 물질의 세포막 투과를 매개하는 역할을 담당하고 있다. 특히 신장의 근위세뇨관에 주로 존재하여 신 배설에 중요한 역할을 하기 때문에 음이온성 약물(예, non-steroidal anti-inflammatory drug)의 조직분포 등 체내동태를 평가하기 위해서는 OAT1과 이들 간의 상호작용을 먼저 면밀히 검토할 필요가 있다. 따라서 본 실험에서는 OAT1과 관련된 잠재적인 약물상호작용을 평가하기 위해 in vitro screening system을 구축하였다. 또한 문헌보고에는 몇 종 약물에서 실험동물(예, Rat)의 OAT1과 사람의 OAT1에는 종간 차이가 존재한다고 보고되어 있을 뿐이고, 그 차이가 체내동태에 영향을 줄 정도로 큰 파급효과를 가지는지, 또 얼마나 많은 어떠한 약물들이 종간 OAT1 수송 특성의 차이를 보이는지 등에 대해서는 거의 연구되어 있지 않다. 따라서 임의의 19가지 빈용처방 약물들에 대한 DDI screening study를 통해 어떠한 약물들이 human과 rat에서 서로 다른 inhibitory potential을 보이는지 연구함으로써 체내동태예측 가능성을 평가하고자 하였다.

먼저 실험실에서 보유 중인 plasmid 상태의 human과 rat OAT1을 MDCK cell에 각각 transfection 시켰다. RT-PCR과 function test를 통해 OAT1의 안정적인 기능적인 발현을 확인한 후, 임의의 빈용처방 약물 19종에 대한 inhibition screening study를 진행하였다. 실험 후 cell 수의 차이는 BCA method를 사용하여 보정하였고, fitting 프로그램인 Winnonlin®을 사용하여 IC₅₀값을 측정하였다.

빈용처방 19가지 약물 중 17가지 약물이 OAT1과 상호작용을 보였으며, 특히 NSAIDs 몇 종과 cimetidine, methotrexate와 quinine은 human과 rat OAT1에서 서로 다른 inhibition 양상을 보였다. 또한 흥미롭게도 quinine, rifampicin과 theophylline은 anionic moiety가 없는 약물임에도 불구하고 OAT1과 상호작용을 나타내었다.

본 연구를 통해 human과 rat OAT1이 MDCK cell에 기능적으로 잘 발현되었음을 확인할 수 있었고 앞으로 OAT1의 DDI screening을 위한 in vitro system으로서도 적절함을 확인할 수 있었다. 따라서 신약개발의 초기단계에 후보물질들의 약물상호작용 평가에 유용하게 이용될 수 있을 것이라 기대된다. 또한 몇몇 약물에서 human과 rat OAT1에서 중간차이를 나타내는 것을 확인하였으며, 추후 연구를 통해 어떠한 약물들이 종차를 나타내는지 예측할 수 있다면 신약개발의 전 임상단계에서 실험동물을 통해 인간에서의 체내동태를 예측할 때 발생할 수 있는 오류를 줄이는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

주요어 : 약물수송체, OAT1, 약물상호작용, 종차, IC₅₀

학 번 : 2013-21575

목 차

국문초록	i
목 차	iii
표 목차	v
그림 목차	vi
1. Introduction	1
1.1. 약물수송체 (Drug transporter)	1
1.2. 약물상호작용 (Drug-drug interaction)	2
1.3. In-vitro screening system	3
1.4. Species-differences	3
2. Materials	6
3. Methods	8
3.1. Establishment of stable cell line	8
3.1.1. Mutagenesis	8
3.1.2. Transformation	10
3.1.3. Liquid culture & Miniprep	11
3.1.4. Transfection	11
3.1.5. RT PCR	13
3.1.6. Function test	14
3.2. Inhibition study	15

4. Results	17
4.1. Mutagenesis	17
4.2. RT PCR	17
4.3. Function test	18
4.4. Inhibition study	19
5. Conclusion & Discussion	30
Reference	33
Abstract	37

표 목 차

[표 1] OAT1의 대표적인 substrate와 inhibitor	2
[표 2] LB media 조성	7
[표 3] Cell culture media 조성	7
[표 4] Transport media 조성	8
[표 5] Mutagenesis mixture	9
[표 6] Mutagenesis 조건	10
[표 7] Reverse Transcription 조건	13
[표 8] PCR reaction mixture	13
[표 9] PCR 조건	14
[표 10] OAT1 function study	15
[표 11] Inhibition screening study에 사용된 19가지 약물들	16
[표 12] Probenecid의 human과 rat OAT1에 대한 IC50 측정값	20
[표 13] NSAIDs의 human과 rat OAT1에 대한 IC50 측정값	21

그림 목 차

[그림 1] 주요 장기에 분포하는 약물수송체	4
[그림 2] Human과 rat OAT1에서 kynurenic acid의 uptake	5
[그림 3] pcDNA5/FRT vector map	9
[그림 4] human OAT1의 1349번에서 관찰된 mutation	9
[그림 5] Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line	12
[그림 6] pOG44 vector map	12
[그림 7] Mutagenesis를 통한 reference sequence 완성	17
[그림 8] Human과 rat OAT1 stable cell line의 RT-PCR 결과	17
[그림 9] MDCK/FRT/hOAT1 와 rOAT1의 uptake study 결과	18
[그림 10] Diphenhydramine(A) 과 Isoniazid(B)에 대한 DDI screening 결과	19
[그림 11] Probenecid에 대한 DDI screening 결과	20
[그림 12] Ibuprofen(A), flurbiprofen(B), ketoprofen(C), diclofenac(D), piroxicam(E), flufenamic acid(F), naproxen(G), indomethacin(H), antipyrine(I)에 대한 DDI screening 결과	21
[그림 13] Cimetidine(A), methotrexate(B), quinine(C)에 대한 DDI screening 결과	26
[그림 14] Rifampicin(A), theophylline(B)에 대한 DDI screening 결과	28

1. Introduction

1.1. 약물수송체 (Drug transporter)

약물수송체는 인체 내 다양한 조직의 세포막에 존재하는 단백질로서 약물과 같은 외인성 및 내인성 물질의 흡수 (Absorption), 분포 (Distribution), 대사 (Metabolism), 배설 (Excretion)에 관여하여 약물의 체내동태에 중요한 영향을 미친다. [그림 1]에서와 같이 약물수송체는 혈액-뇌장벽(blood-brain barrier)의 내피세포와 장(intestine), 간(liver), 신장(kidney)의 상피세포 등에 다양하게 발현되어 약물의 안전성 (safety) 과 유효성 (efficacy) 측면에서 매우 중요하다. 따라서 최근 신약 개발 과정에서 이러한 transporter들이 약물들의 분포나 안전성에 미치는 영향에 대해 면밀히 확인하는 것이 필수적이게 되었다.

현재까지 인간에서 400가지 이상의 약물수송체들이 존재한다고 알려져 있으며 특성에 따라 두 개의 주요 superfamily인 ABC (ATP-binding cassette) transporter와 SLC (Solute carrier) transporter로 나뉜다.

1.1.1. OAT1 (Organic anion transporter 1; SLC22A6)

미국 식품의약국은 2007년 발행한 guidance에서 인체 내에서 주요하게 작용하는 수송체 7가지를 선정하여 신약 개발 단계에서 약물과 이들 transporter와의 상호작용을 자세히 관찰하도록 권고하였다. OAT1은 이 7가지 주요 수송체들 중 하나로서 solute carrier family에 속하며 인간의 SLC22A6 gene에 의해 발현된다.

분포하는 장기는 신장 (kidney), 뇌의 맥락총 (choroid plexus), 골격근 (skeletal muscle)과 태반 (placenta) 등이며 특히 신장의 근위세뇨관 상

피세포의 basolateral membrane에 주로 존재하여 dicarboxylate와 organic anion 간의 exchange를 통해 세포내로 여러 내인성 물질들을 uptake하여, 결과적으로 blood에서 urine으로 약물의 elimination에 관여한다. 따라서 특히 antivirals, H₂ blockers, diuretics, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, statins와 toxins 등 다양한 물질들의 renal clearance에 중요한 역할을 한다. 현재까지 알려진 OAT1의 주요 substrate와 inhibitor는 [표 1]과 같다.

[표 1] OAT1의 대표적인 substrate와 inhibitor

Substrate	Inhibitor
p-Aminohippurate(PAH), adefovir, zidovudine, ciprofloxacin, cephaloridin, NSAIDs, ochratoxin, pravastatin	Probenecid, novobiocin

1.2. 약물상호작용 (Drug-drug interaction)

일반적으로 약물을 복용할 경우 좀 더 좋은 치료효과를 기대하기 위해 또는 복합적인 질병을 치료하기 위해 다양한 약물들을 한 번에 같이 복용하는 경우가 많다. 이럴 경우 그들 간의 약물상호작용(Drug-drug interaction, DDI)에 의해 각각의 약물의 체내동태 양상에 큰 영향을 미칠 수 있다.

어떠한 transporter의 기질이 되는 약물이 같은 transporter를 경유하는 약물 또는 그 transporter의 inhibitor나 inducer로서 작용하는 물질과 병용투여 되었을 때, 그 약물의 흡수나 배설이 영향을 받을 수 있다. 이는 특히 methotrexate와 같이 좁은 therapeutic index를 가진 약물이나

transporter의 영향을 많이 받는 약물의 경우 큰 변화를 야기할 수 있으며, 독성이 있는 약물이 배설되지 못하고 혈액에 높은 농도로 남게 되면 때로는 치명적일 수도 있다.

이처럼 DDI의 중요성이 커짐에 따라 미국 FDA에서도 신약개발과정에서 약물과의 상호작용에 대한 연구가 필요한 주요 transporter 7가지를 선정하여 관련 연구를 진행하도록 권고하고 있다. 선정된 transporter에는 SLC transporter 5가지(OATP1B1, OATP1B3, OAT1, OAT3, OCT2)와 ABC transporter 2가지(MDR1, BCRP)가 있다.

1.3. In-vitro screening system

약물상호작용의 중요성이 점점 커짐에 따라 이를 평가할 수 있는 재현성 있고 표준화된 in-vitro screening system이 필요하게 되었다. in-vitro를 통한 in-vivo 예측을 이용하여 in-vivo study 이전에 불필요한 progress를 줄일 수 있으며, 따라서 약물개발의 초기단계에서 후보물질들의 screening에 중요한 역할을 함으로서 임상에서의 후보물질의 탈락비율을 줄여줄 것으로 기대된다. 본 연구에서는 앞서 언급한 7가지 주요 약물수송체들 중 하나인 OAT1에 대하여 human과 rat OAT1 각각의 영향을 예측할 수 있는 screening system을 구축하였다.

1.4. Species-differences

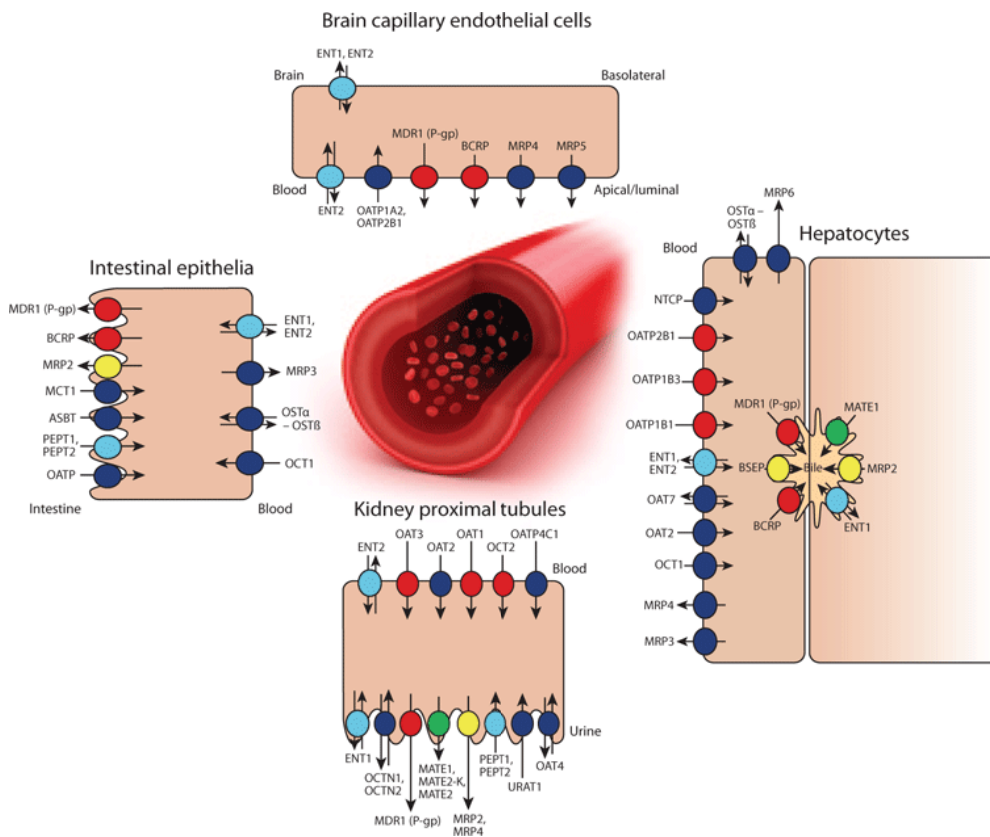
일반적으로 실험동물(예, rat)에서의 in vivo 자료를 통해 human에서의 약물의 동태를 예측하며 전임상과 임상연구가 진행이 되는데, 이때 실험동물과 인간이 가진 상이한 유전적 특성으로 인해 체내동태 양상이 서로 다르게 나타날 수 있다.

이미 OAT3 등 몇몇 transporter에서 종간차이를 보이는 약물들이 문헌

들에 의해 보고되고 있다 (Nozaki, Yoshitane, et al. 2007). 특히 OAT1의 경우 human과 rat OAT1은 아미노산 서열에서 88% 일치하며 이미 몇 약물이 각각의 종에서 서로 다른 상호작용을 보였다고 보고되었다 (Uwai., et al. 2013) [그림 2].

따라서 약물개발 단계에서 실험동물과 인간 간의 종간 차이를 아는 것이 중요하며 이를 예측할 수 있다면 실험동물에서 인간으로의 scale up 과정에서 발생할 수 있는 예측의 오류를 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

[그림 1] 주요 장기에 분포하는 약물수송체



[그림 2] Human과 rat OAT1에서 kynurenic acid의 uptake

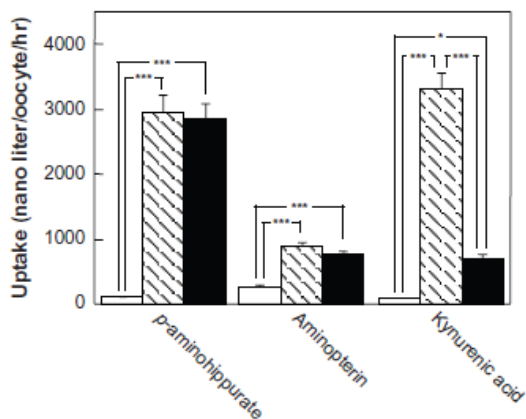


Figure 3. Uptake of *p*-aminohippurate, aminopterin and kynurenic acid by hOAT1 and rOAT1.

Notes: Oocytes injected with water (open column), hOAT1 cRNA (hatched column) or rOAT1 cRNA (closed column) were incubated with 221 nM [³H]*p*-aminohippurate, 28.5 nM [³H]aminopterin or 20 nM [³H]kynurenic acid for 1 hr. The uptake amounts of the radiolabeled compounds in each oocyte were determined and divided by their concentrations in uptake buffer. Each column represents the mean ± S.E.M. of 26 to 30 oocytes from 3 experiments. ****P* < 0.001, significantly different; **P* < 0.05, significantly different.

2. Materials

2-1. Drugs

p-Aminohippuric acid, methotrexate (TCI), ibuprofen, diclofenac, piroxicam, flufenamic acid, naproxen, indomethacin, antipyrine, probenecid, cimetidine, rifampicin, theophylline, pravastatin, diphenhydramine, isoniazid (Sigma), quinine (Lancaster), rosuvastatin (한국유나이티드제약), flurbiprofen, ketoprofen

2-2. Radioisotope (RI)

[³H]p-Aminohippuric acid (Perkinelmer)

2-3. Chemicals & Reagents

FuGENE® HD DNA transfection reagent (Promega)

Hygromycin (Invitrogen)

Ultima Gold LSC-cocktail (Packard bioscience)

Trypsin EDTA (Sigma)

Poly-L-Ornithine (Sigma)

Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline (Welgene)

0.2N NaOH (DAE JUNG)

2-4. Experimental kits

WelPrep Plasmid Miniprep Kit (Welgene)

RNeasy Mini Kit (Quiagen & Thermo scientific)

Primescript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara)

Ex taq polymerase (Takara)

QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Statagene)

2-5. Cells & Vectors

E.coli HST08 Premium Competent Cells (Takara)

MDCKII/FRT cell

pcDNA5/FRT vector (Invitrogen)

pOG44 vector (Invitrogen)

2-6. Experiment equipment

25T & 75T flask (Thermo scientific)

6 & 24 well plate (Corning)

15ml & 50ml conical tube (Corning Falcon)

2-7. Media

LB media : total 500mL

[표 2] LB media 조성

Materials	Mass	제조사
Tryptone	5 g	Beckton-Dickinson
NaCl	5 g	
Yeast extract	2.5 g	
Agarose (고체배지일 경우)	2.5 g	

Cell culture media : total 500mL

[표 3] Cell culture media 조성

Materials	Mass	제조사
DMEM	433 ml	Welgene
Fetal Bovine Serum	50 ml	
HEPES	5 ml	
Penicillin-streptomycin	5 ml	
Gentamicin	2 ml	Sigma
Non-essential amino acid	5 ml	

Transport media (TM) : total 1L

[표 4] Transport media 조성

Materials	Mass	제조사
Hank's Balanced Salts (HBSS)	9.7 g	
NaHCO ₃	0.35 g	Sigma
HEPES	2.38 g	
Glucose	1.95 g	

3. Methods

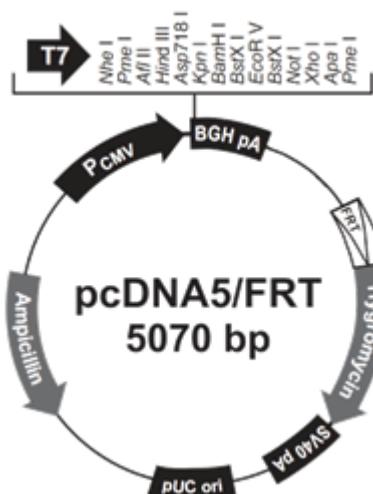
3.1. Establishment of stable cell line

먼저 실험실에서 보유중인 plasmid 상태의 human OAT1과 rat OAT1을 이용하여 stable cell line을 구축하였다.

3.1.1. Mutagenesis

본 실험실에서 보유중인 pcDNA5/FRT vector (그림 3) 에 ligation된 human OAT1의 sequencing을 통해서 mutation이 하나 발생한 것을 확인하였다. 1349번째 bp에서 thymine이 cytosine으로 치환되어 phenylalanine에서 leucine으로 amino acid change (그림 4) 가 일어나 mutagenesis를 진행하였다.

[그림 3] pcDNA5/FRT vector map



[그림 4] human OAT1의 1349번에서 관찰된 mutation

```

Query 1330 CCCACCCTCGCCACCTCTTC
                |||
Sbjct 488  CCCACCCTCGCCACCTCCTC
    
```

Stratagene 사의 QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit 를 이용하였으며 조건은 다음과 같다.

[표 5] Mutagenesis mixture

Materials	Volume
DDW	15 μ l
10x reaction buffer	2.5 μ l
dNTP mix	0.5 μ l
Quick solution reagent	1.5 μ l
Primer (forward, reverse)	2.5 μ l \times 2
Template DNA	0.5 μ l
total	25 μ l

사용한 primer는 아래와 같고 여기에 Pfu Ultra HF DNA polymerase 1 μ l를 첨가하고 tapping 하였다. PCR 반응 조건은 다음과 같다.

Used primer

Forward 5'- CCT CCG CCA CCT CTT CCT CTG CCT CTC -3'

Reverse 5'- GAG AGG CAG AGG AAG AGG TGG CGG AGG -3'

[표 6] Mutagenesis 조건

Temperature	Time	Cycles
95°C	1 min	-
95°C	50 sec	-
60°C	50 sec	18 cycles
68°C	8 min	-
68°C	7 min	-
4°C	∞	-

PCR 반응이 끝난 후 반응 mixture에 Dpn I restriction enzyme을 0.5 μ l 넣어 37°C에서 1시간 incubation하여 methylation된 template를 제거하였다.

3.1.2. Transformation

Mutagenesis를 통해 얻은 hOAT1이 ligation된 pcDNA5/FRT vector를 XL10-Gold ultracompetent cell 안으로 transformation하였다.

먼저 prechilled EP tube에 E.coli 22.5 μ l와 DNA 10 μ l을 섞은 후 ice에서 30분간 방치하였다. 42°C로 미리 가온한 수조에서 EP tube를 약 30초간 heat shock 한 후 다시 2분간 ice에서 cooling하였다.

항생제를 함유하지 않은 LB 배지를 400 μ l 가한 후 37°C shaking incubator에서 1시간가량 incubation하였다.

다음으로 미리 100 μ g/ml ampicillin이 첨가된 고체배지를 37°C

incubator에 준비하고 여기에 incubation이 끝난 mixture를 spreading한 후 37°C CO₂ incubator에서 overnight 배양하였다.

3.1.3. Liquid culture & Miniprep

다음으로 liquid culture와 miniprep을 통해 충분한 양의 plasmid를 얻는 과정을 진행하였다.

Transfection 후 다음날 확인한 colony를 ampicillin 2.5 μ l (100 μ g/ml)가 첨가된 액체배지 5 ml에 옮겨 overnight 배양한 후 WelPrep Plasmid Miniprep Kit를 이용하여 mutation이 없는 hOAT1 gene이 ligation된 vector를 고농도로 다량 확보할 수 있었다.

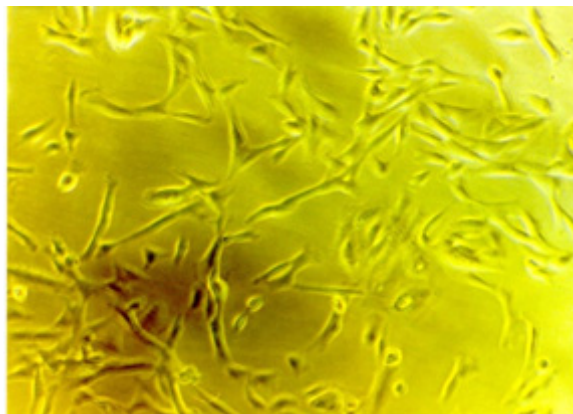
3.1.4. Transfection

실험에 사용한 cell line은 본 실험실에서 Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell (그림 5)의 chromosome에 FRT site를 삽입하여 만든 MDCKII/FRT cell line이며, 성장속도가 빠르고 monolayer를 잘 형성하며 자체적으로 발현되어 있는 transporter가 적다. pcDNA5/FRT vector에 삽입되어 있는 human과 rat OAT1을 Flp recombinase를 발현하는 pOG44 vector (그림 6)와 함께 Flp-In system을 사용하여 각각 MDCK/FRT cell에 transfection하였다. 사용한 시약은 Promega사의 FuGENE® HD DNA transfection reagent로 진행하였다.

먼저 12 well plate에 MDCKII/FRT cell을 5×10^5 cells/ml 의 농도로 seeding한 후, 37°C, 5% CO₂ incubator에서 하루 동안 70 ~ 90% confluence 하게 배양하였다. Transfection mixture는 well당 pcDNA5/FRT/hOAT1, pcDNA5/FRT/rOAT1과 pOG44의 비율을 1 : 9로 하여 각각 0.2 μ g 과 1.8 μ g 씩 넣어주었다. Reagent는 미리 실온에

꺼내어 준비하고 DNA와 3 : 1 의 비율로 reagent를 6 μ l 가한 후 나머지를 serum-free medium으로 채워 총 100 μ l의 transfection mixture를 제조하였다. Mixture를 실온에서 5 ~ 10분간 incubation 한 후 각 well당 100 μ l 씩 조심스럽게 분산하여 적하하였다. 37°C, 5% CO₂ incubator에서 24시간 ~ 48시간 배양 후 harvest 하여 25T flask 에 옮겼다. 24시간 후 cell이 안정적으로 부착된 후 selection marker가 첨가된 complete media로 바뀌서 배양했다. Selection marker 는 hygromycin 100 μ g/ml를 사용하였으며 2 ~ 3일에 한번 배지를 갈아주면서 약 3주간의 selection 과정을 거쳐 stable cell line을 얻었다.

[그림 5] Madin-Darby canine kidney (MDCK) cell line



[그림 6] pOG44 vector map



3.1.5. RT-PCR

MDCK II/FRT/hOAT1과 MDCK II/FRT/rOAT1에 대하여 RT-PCR을 진행하였다. 먼저 1×10^6 cells를 harvest한 후 RNeasy Mini Kit로 추출한 RNA를 template로 하여 Takara의 Primescript 1st strand cDNA Synthesis Kit를 사용하여 RT를 진행하였다.

[표 7] Reverse Transcription 조건

Materials	Volume
RNase free dH ₂ O	6
Oligo(dT) primer	1
dNTP	1
mRNA	2
65°C 5 min & ice incubation 1 min	
FDDW	4.5
5× buffer	4
RNase inhibitor	0.5
Reverse transcriptase	1
42°C 60 min & 95°C 5 min & 4°C ∞	

RT를 통해 얻은 cDNA를 template로 하여 PCR를 수행하였다. Ex taq polymerase를 사용하였으며 positive control로 house-keeping gene으로 알려진 canine GAPDH를 사용하였고 반응 조건은 [표 9]과 같다.

[표 8] PCR reaction mixture

Materials	Volume
RNase free dH ₂ O	14.15 μ l
10× Ex Taq buffer	2 μ l
dNTP	1.6 μ l
Template cDNA	1 μ l
Primers (forward/reverse)	0.5 μ l × 2
Taq polymerase	0.25 μ l
Total	20 μ l

[표 9] PCR 조건

Temperature	Time	Cycles
94°C	5 min	1
94°C	30 sec	
55°C	30 sec	30
72°C	1 min	
72°C	10 min	1
4°C	∞	

3.1.6. Function test

human과 rat OAT1에 대해 uptake study를 진행하였다. 24 well plate의 각 well을 poly-l-ornithine (Sigma) 을 20 μ l씩 떨어트려 코팅하였다. 다음으로 empty vector를 transfection 시킨 대조군 cell과 실험군 cell (MDCK/FRT/hOAT1 & MDCK/FRT/rOAT1)을 n=3으로 하여 seeding하고 80 ~ 90% confluent 할 때까지 약 48시간 배양하였다. 다음으로 각 well의 배지를 제거하고 37°C PBS를 well당 500 μ l 넣어 두 번 반복 washing하였다. 미리 37°C로 데워둔 transport media(TM)를 가하여 약 30분간 pre-incubation 시켰다. TM을 제거하고 미리 37°C로 데운 약물을 well당 200 μ l씩 가한 후 10분간 37°C에서 incubation하였다.

약물은 아래와 같이 준비하였다. OAT1의 대표적인 기질인 p-aminohippuric acid(PAH)는 문헌의 Km value와 Radioisotope의 specific activity를 고려하여 1 μ M 이 되도록 하였다. 여기에 분석을 위한 방사성동위원소 물질 [³H]p-Aminohippuric acid (Perkinelmer)를 준비한 기질물질 농도의 10%가 되도록 첨가하였다. [³H]PAH의 농도는 1m Ci/ml, specific activity는 3.45 Ci/mmol 이었다. Inhibitor로는 대표적인 저해제인 probenecid 500 μ M을 준비하였다.

[표 10] OAT1 function study

Cell type	약물	Volume
Mock cell	p-aminohippuric acid	
Mock cell	p-aminohippuric acid +probenecid	
MDCK/hOAT1 or MDCK/rOAT1	p-aminohippuric acid	200 μ l
MDCK/hOAT1 or MDCK/rOAT1	p-aminohippuric acid +probenecid	

Incubation이 끝나면 약물을 제거하고 well당 cold PBS 500 μ l로 3번 washing 하였다. 그 후 0.2N NaOH 를 well당 500 μ l씩 가하여 overnight 동안 상온에 방치하여 세포를 lysis시켰다. 다음 날 lysate 400 μ l에 1 mL의 Ultima Gold LSC-cocktail (Packard bioscience) 을 섞어서 LSC (Liquid Scintillation Counter) 로 분석하였다. 실험 후 well 당 cell 수의 차이는 BCA assay를 통해 보정하였다.

3.2. Inhibition study

Uptake study를 통해 human OAT1과 rat OAT1이 각각 기능적으로 발현된 cell line이 구축되었음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 다빈용처 방 약물 19가지를 임의로 선정하여 Inhibition screening study를 진행하여 약물간의 상호작용(DDI)을 평가하였다 (표 11). 기질은 PAH 2 μ M 를 사용하였으며, [³H]PAH 10%를 섞어서 LSC로 분석하였다. Compound의 농도는 용해도와 문헌을 고려하여 6 ~ 7가지를 정하여 n=3 으로 3.1.6 에서 기술한 바와 같은 방식으로 진행하였다. 실험 후 Protein quantification은 BCA assay를 이용해 보정하였고 inhibitor들의 IC₅₀값은 Winnonlin®을 사용하여 구하였다.

[표 11] Inhibition screening study에 사용된 19가지 약물들

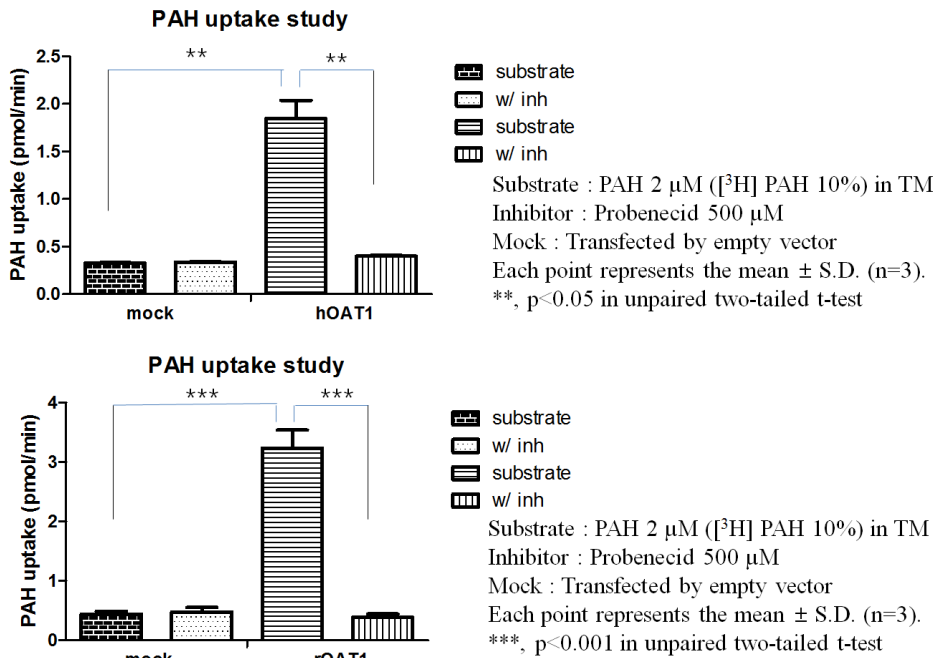
약물	농도 (μM)	약물	농도 (μM)
Ibuprofen	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Probenecid	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500
Flurbiprofen	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Cimetidine	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500
Ketoprofen	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Methotrexate	0.1, 1, 10, 100, 500, 1000
Diclofenac	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Rifampicin	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500
Piroxicam	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Theophylline	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500
Flufenamic acid	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Quinine	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500
Naproxen	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Rosuvastatin	0.1, 1, 10, 100, 500, 1000
Indomethacin	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Pravastatin	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500
Antipyrine	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500	Diphenhydramine	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500
		Isoniazid,	0.01, 0.1, 1, 10, 100, 500

4.3 Function test

Uptake study를 진행하여 본 연구에서 구축한 human과 rat OAT1 cell line을 기능적으로 평가해 보았다.

실험 결과 두 cell line 모두 OAT1이 발현된 cell에서 uptake amount가 유의하게 증가하는 것을 확인하였다. hOAT1의 경우 mock cell 대비 5.66 배, rOAT1의 경우 7.32 배 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한 inhibitor인 probenecid 500 μ M을 처리했을 때 uptake amount가 현저히 감소하였다 (그림 9).

[그림 9] MDCK/FRT/hOAT1 와 rOAT1의 uptake study 결과



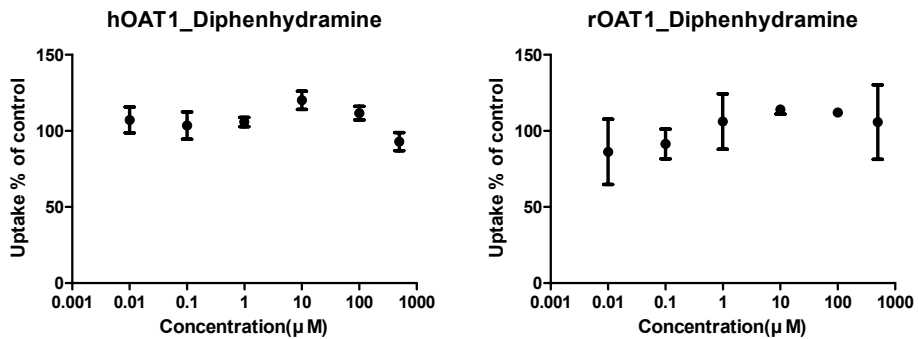
4.4 Inhibition study

본 연구에서 구축한 stable한 hOAT1/FRT/MDCK cell line과 rOAT1/FRT/MDCK cell line을 토대로 빈용처방약물 19종에 관한 inhibition screening study의 결과는 다음과 같다.

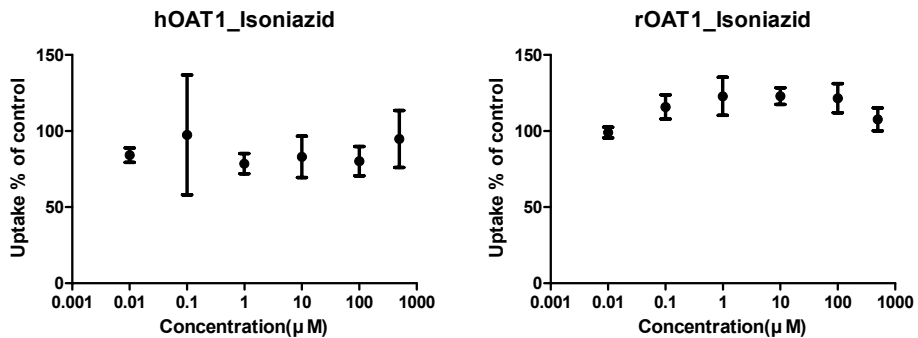
먼저 diphenhydramine과 isoniazid에서는 human과 rat OAT1 모두와 interaction을 보이지 않았다 (그림 10).

[그림 10] Diphenhydramine(A) 과 Isoniazid(B)에 대한 DDI screening 결과

(A)



(B)

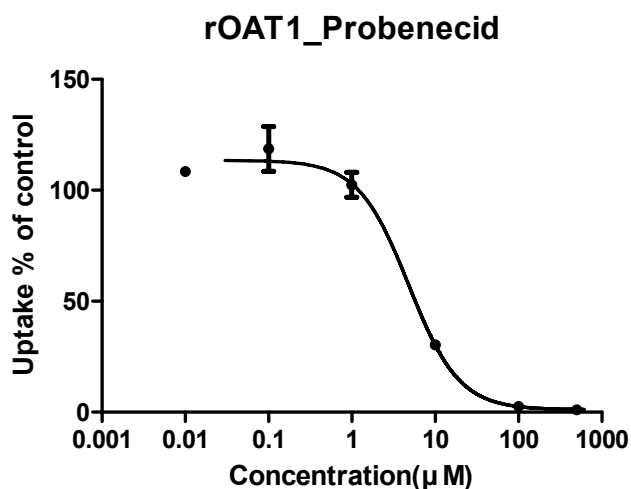
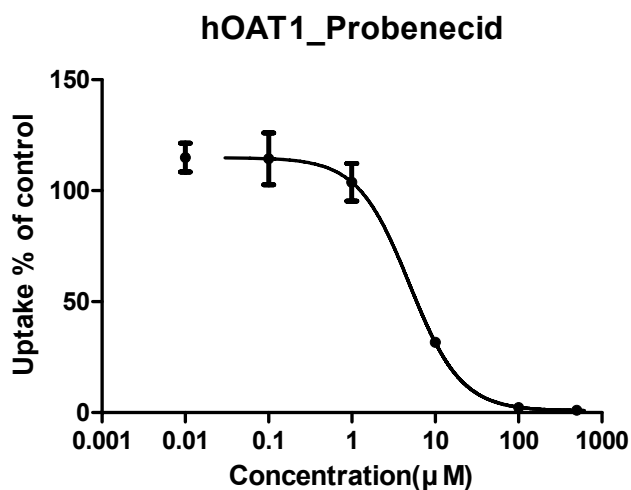


다음으로 OAT1의 대표적인 inhibitor로 알려진 probenecid의 결과이다.

[표 12] Probenecid의 human과 rat OAT1에 대한 IC₅₀ 측정값

IC ₅₀	Estimate (μ M)
human OAT1	4.91 \pm 0.03
rat OAT1	4.81 \pm 1.02

[그림 11] Probenecid에 대한 DDI screening 결과



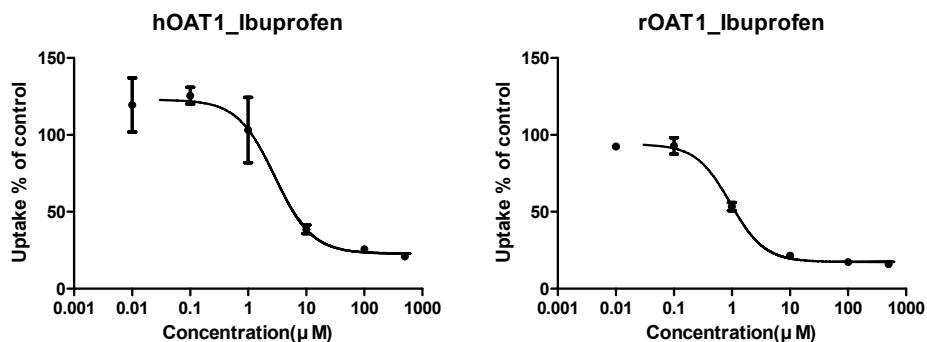
다음으로 NSAIDs 9종에 대한 결과이다.

[표 13] NSAIDs의 human과 rat OAT1에 대한 IC₅₀ 측정값

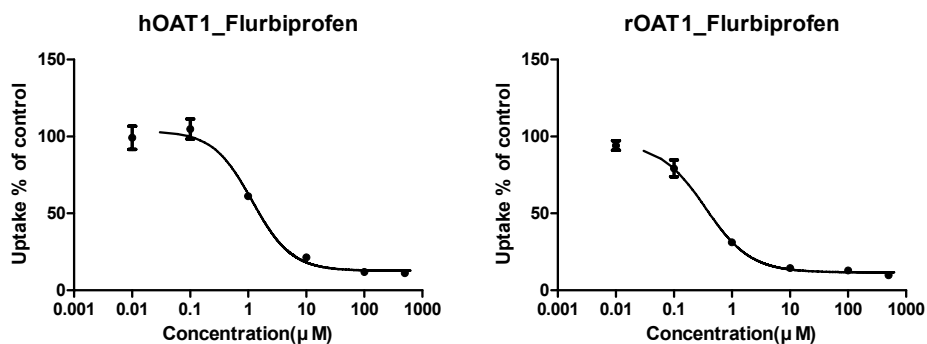
IC ₅₀	Ibuprofen	Flurbiprofen	Ketoprofen	Diclofenac	Flufenamic acid	Naproxen
hOAT1	2.88 ± 0.54	1.17 ± 0.26	0.779 ± 0.063	2.27 ± 0.71	0.323 ± 0.090	0.868 ± 0.228
rOAT1	0.936 ± 0.092	0.349 ± 0.038	0.838 ± 6.56	1.27 ± 0.040	0.371 ± 0.102	0.352 ± 0.032

[그림 12] Ibuprofen(A), flurbiprofen(B), ketoprofen(C), diclofenac(D), piroxicam(E), flufenamic acid(F), naproxen(G), indomethacin(H), antipyrine(I)에 대한 DDI screening 결과

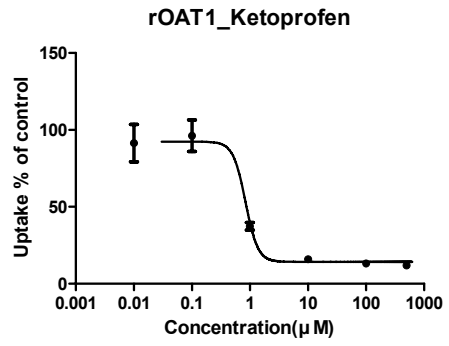
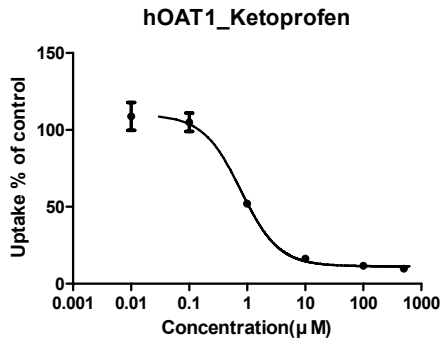
(A)



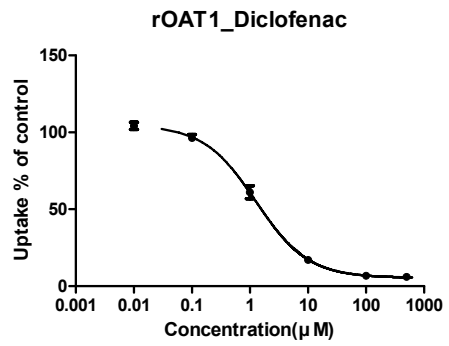
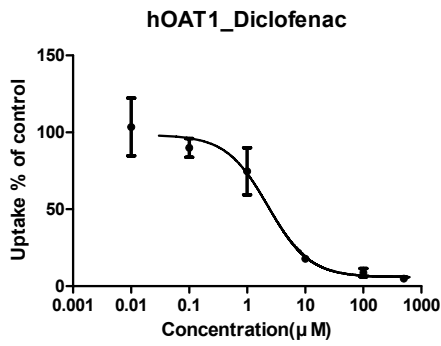
(B)



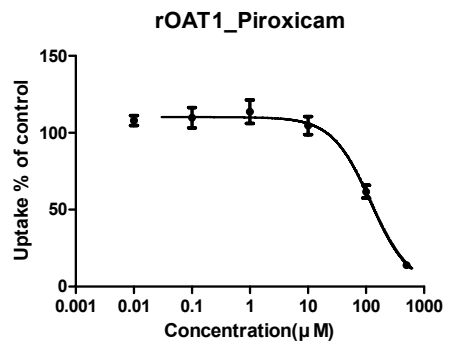
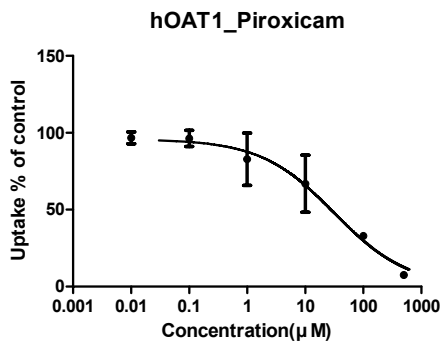
(C)



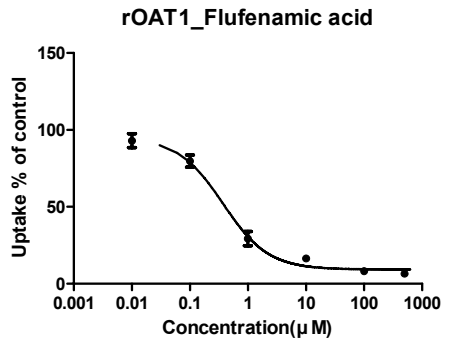
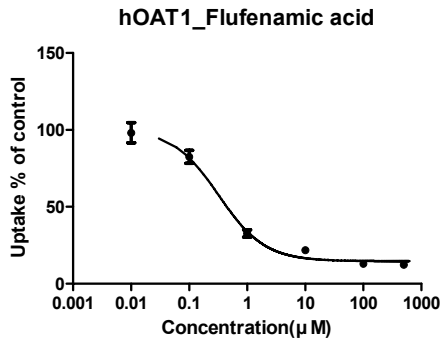
(D)



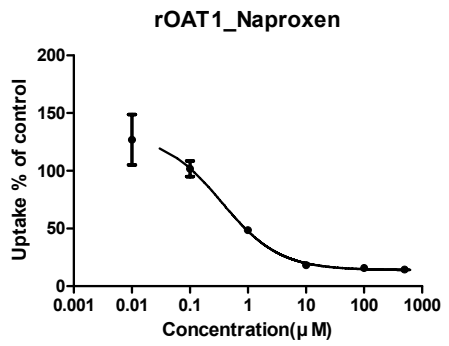
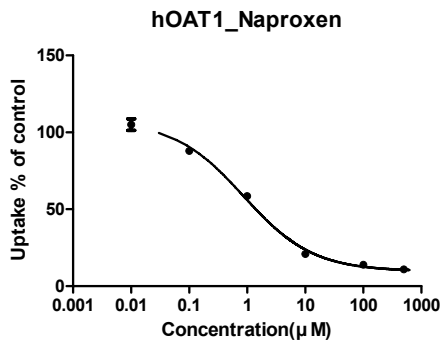
(E)



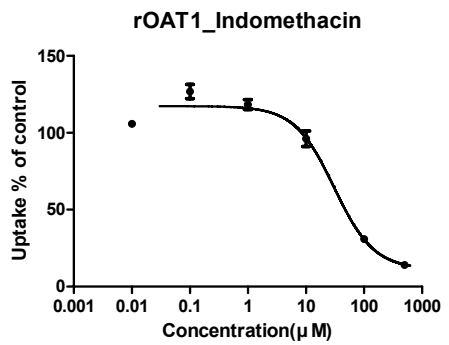
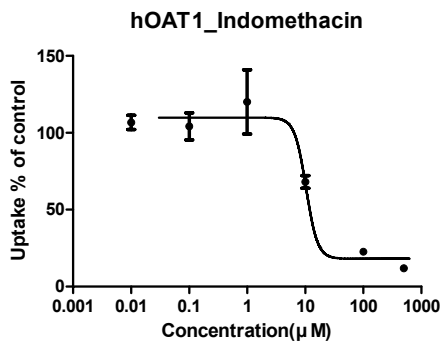
(F)



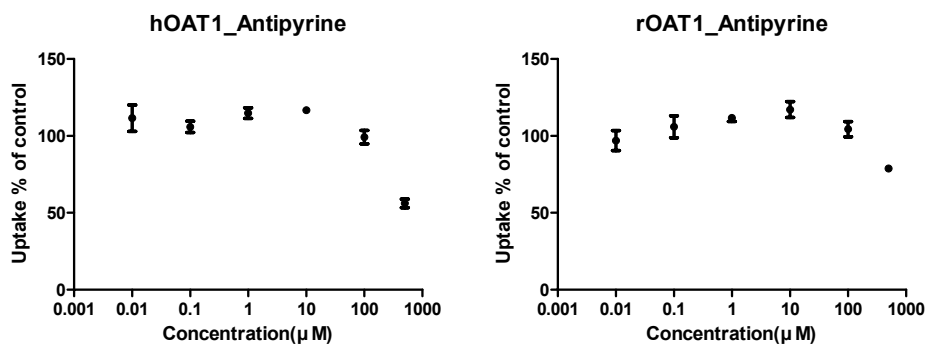
(G)



(H)



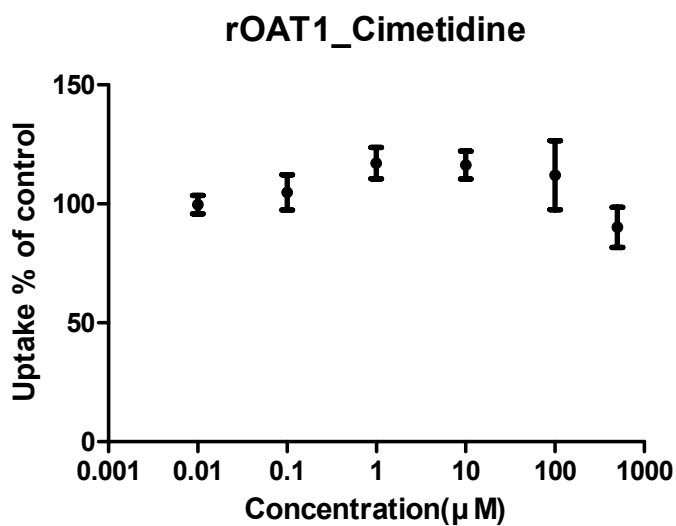
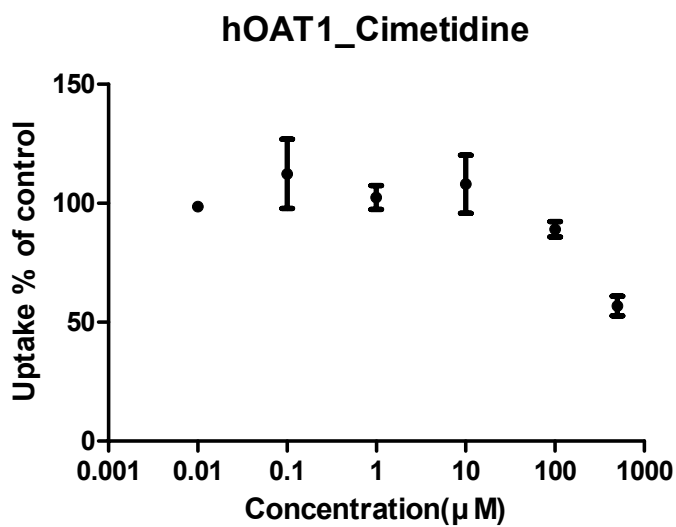
(I)



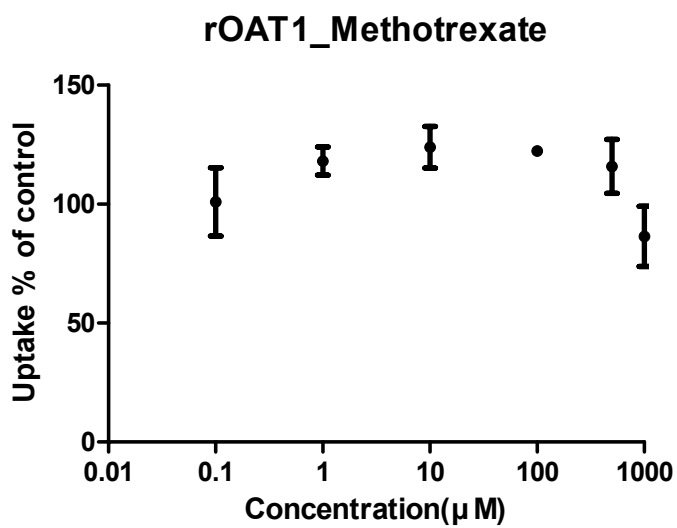
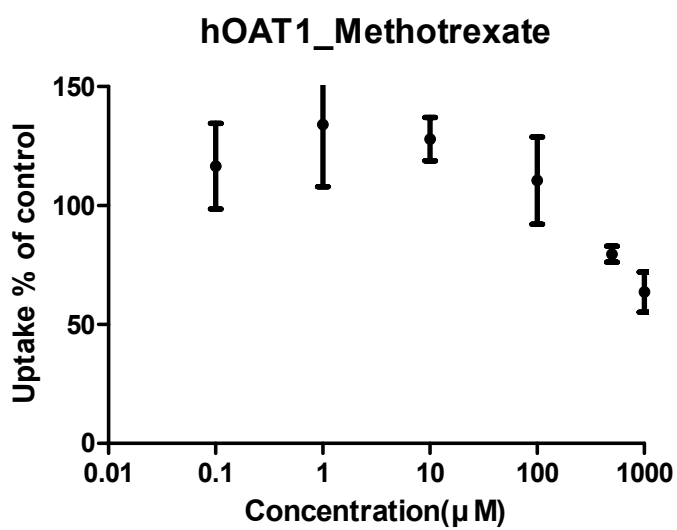
다음으로 cimetidine, methotrexate, quinine에 대한 결과이다. 이 세 약물은 human과 rat OAT1에서 서로 다른 inhibitory potential을 보였으며 특히 quinine의 경우 IC₅₀값에서 rat에서 비해 human에서 5배 가량 큰 값을 나타내었다.

[그림 13] Cimetidine(A), methotrexate(B), quinine(C)에 대한 DDI screening 결과

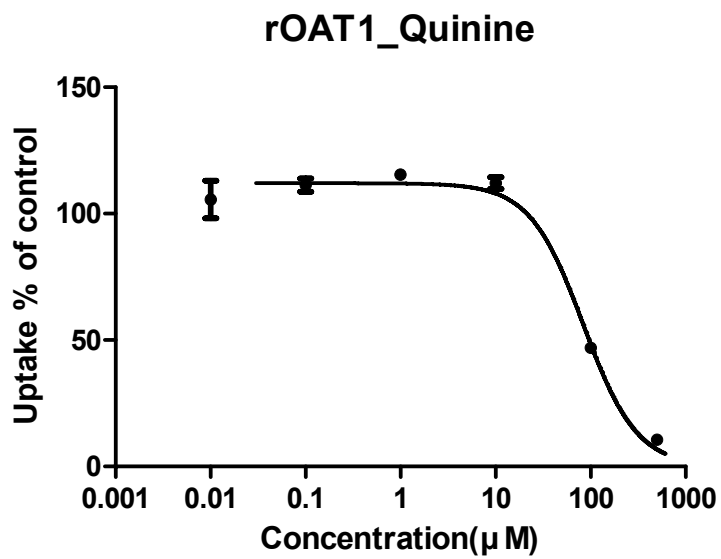
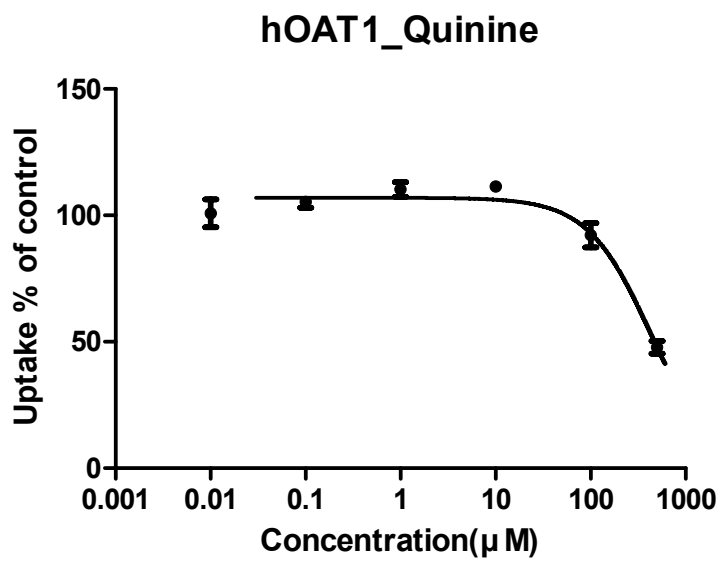
(A)



(B)

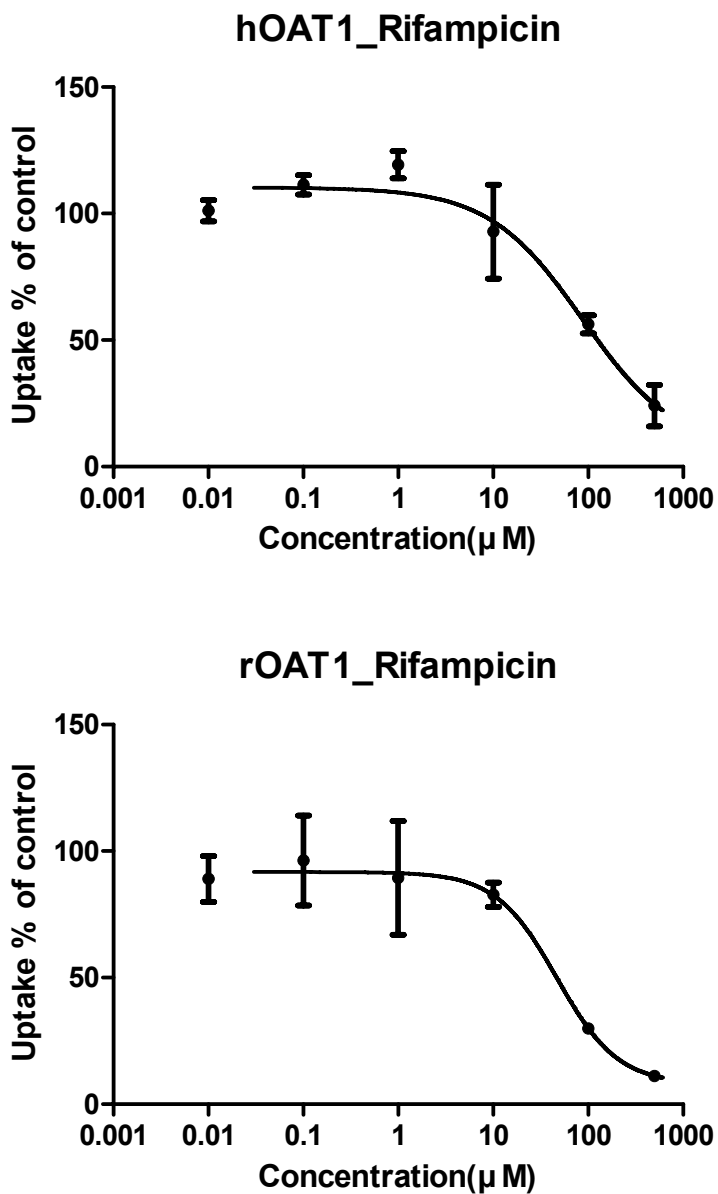


(C)

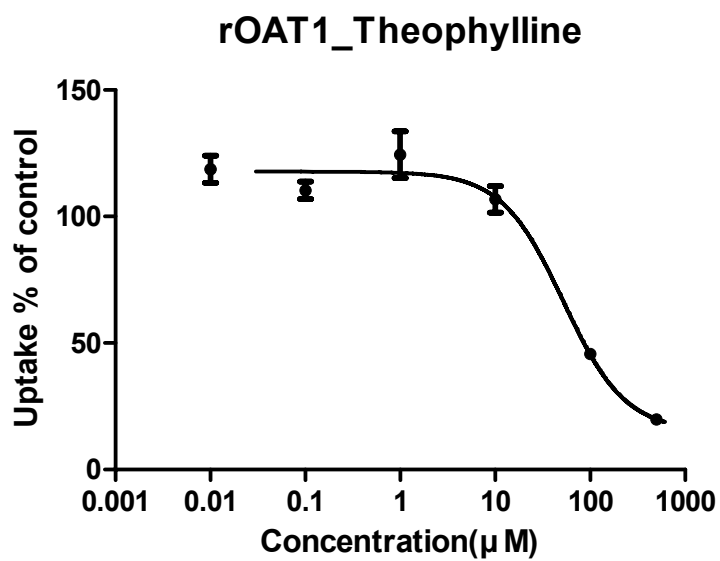
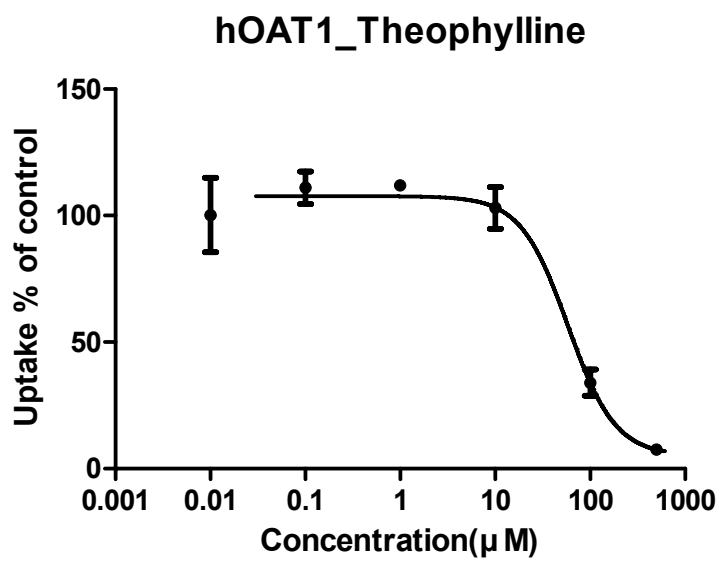


다음으로 rifampicin, theophylline에 대한 결과이다.

[그림 14] Rifampicin(A), theophylline(B)에 대한 DDI screening 결과 (A)



(B)



5. Conclusion & Discussion

본 연구에서는 미 FDA에서 발표한 7가지 주요 transporter 중 하나인 OAT1의 DDI screening study와 더불어 human과 rat OAT1에서 그 기능의 중간차이에 대해 연구하였다. 먼저 실험실에서 보유중인 plasmid 내의 human과 rat OAT1을 각각 MDCK/FRT cell에 transfection 시켰다. [그림 3]에서 보이듯 hygromycin 내성 vector에 각각의 transporter가 삽입되어 있기 때문에 hygromycin을 이용하여 3주간의 selection과정을 거쳐 stable한 cell line을 얻었다. Transfection 후 하루 정도 cell이 안정적으로 자란 후, selection을 진행하는 것이 더 효과적인 방법으로 생각된다. RT-PCR을 통해 mRNA 수준에서 transporter의 안정적 발현을 확인하였으며, 약물을 세포 내로 uptake하는 OAT1의 특성에 따라 uptake study를 진행하였다. Uptake study는 공vector가 transfection된 mock cell과의 uptake 양과 inhibitor 처리 군과의 uptake 양의 비교를 통해 진행하였고, 각각의 transporter의 기능적인 발현 역시 확인하였다. 실험 후 washing은 cold 약물과 cold PBS 모두 진행해 보았으나, 차이를 보이지 않아 이 후 실험은 모두 cold PBS로 진행하였다. 또한 실험 후 각 well당의 cell 수 차이는 BCA method를 사용하여 보정해주었다.

Inhibition study는 먼저 가장 널리 사용되는 OAT1의 inhibitor인 probenecid를 사용하여 진행하였는데, IC₅₀값의 문헌치와 비교를 통해 이 assay가 적합한지 알아보려 하였으며, 그 결과 여러 문헌치의 값과 비슷한 수준인 것으로 보아 본 실험에서 구축한 in vitro screening system을 이용한 IC₅₀값 측정이 적절한 assay임을 확인할 수 있었다 (HO., et al. 2000). 또한 NSAIDs의 inhibition screening study 결과에서 human

OAT1 같은 경우에도 문헌치와 IC₅₀값이 비슷한 수준으로 낮은 수치였으며, 이를 rat OAT1의 IC₅₀값과 비교하였을 때 ibuprofen과 flurbiprofen에서 IC₅₀값이 중간 3배 ~ 4배 가량 차이가 났으며, 나머지는 유의미한 차이를 보이지 않았다. 특히 cimetidine의 경우 이미 문헌에 알려진 바와 같이 human OAT1에서만 약한 inhibitor로서 작용하였으며 rat OAT1에서는 inhibition 효과를 보이지 않았다. 마찬가지로 methotrexate에서도 human OAT1에서 더 강한 inhibition potential을 나타내었다 (Tahara, Harunobu, et al. 2005). 또한 quinine의 경우 human에서 IC₅₀값 (422 ± 61.0 μM)이 rat에서보다 (83.8 ± 12.4 μM) 5배 이상 높게 나타났다. 중간 차이를 보인 약물에 대해서는 NSAID를 제외하고 2번 이상의 반복 실험을 하였다. 그 밖에 앞에서 보인 결과 외의 rosuvastatin과 pravastatin을 이용한 추가적인 실험에서는 human과 rat OAT1 간 유의미한 차이를 보이지 않았다.

또한 흥미롭게도 quinine, rifampicin과 theophylline은 이미 알려진 몇몇 antivirals와 더불어 anionic moiety가 없는 약물임에도 불구하고 유기음이온 수송체인 OAT1과 human과 rat 모두에서 interaction을 보였으며, anionic moiety 외의 또 다른 physicochemical property가 OAT1과의 interaction에 작용함을 시사하였다 (Wada, Saiko, et al. 2000).

Inhibition study 중 발생하는 well 당 cell 수의 차이는 BCA method를 사용하여 보정이 가능하지만, well 당 incubation time의 차이는 보정하는 것이 거의 불가능하므로 이를 유의하며 실험을 진행하는 것이 중요하다. 또한 washing 과정에서 cell이 떨어지지 않게 유의하며 진행하는 것도 재현성 있는 결과를 얻는데 중요하다.

본 실험을 통해 결론적으로 OAT1의 약물상호작용을 in vitro에서 평가할 수 있는 system을 구축할 수 있었고, 이를 통해 신약개발의 초기단계

에 후보물질들의 약물상호작용 평가에 유용하게 이용될 수 있을 것이라 기대된다. 또한 본 연구를 통해서 특정약물에서 실험동물과 인간 사이에 중간차이가 발생할 수 있음을 알 수 있었으며, 추후 연구를 통해 어떠한 약물들이 종차를 나타내는지 예측할 수 있다면 신약개발의 전 임상단계에서 실험동물을 통해 인간에서의 체내동태를 예측할 때 발생할 수 있는 오류를 줄이는데 큰 도움이 될 것으로 사료된다.

Reference

1. Giacomini, K. M., and S. M. Huang. "Transporters in drug development and clinical pharmacology." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 94.1 (2013): 3-9.
2. Giacomini, Kathleen M., et al. "Membrane transporters in drug development." *Nature reviews Drug discovery* 9.3 (2010): 215-236.
- Nozaki, Yoshitane, et al. "Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322.3 (2007): 1162-1170.
3. Uwai, Yuichi, Hiroaki Hara, and Kikuo Iwamoto. "Transport of Kynurenic Acid by Rat Organic Anion Transporters rOAT1 and rOAT3: species Difference between Human and Rat in OAT1." *International journal of tryptophan research: IJTR* 6 (2013): 1.
4. HO, EDMUND S., et al. "Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1." *Journal of the American Society of Nephrology* 11.3 (2000): 383-393.
5. Tahara, Harunobu, et al. "A species difference in the transport activities of H₂ receptor antagonists by rat and human renal organic anion and cation transporters." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315.1 (2005): 337-345.
6. Wada, Saiko, et al. "Rat multispecific organic anion transporter 1 (rOAT1) transports zidovudine, acyclovir, and other antiviral nucleoside analogs." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 294.3 (2000): 844-849.

7. Apiwattanakul, Nopporn, et al. "Transport Properties of Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs by Organic Anion Transporter 1 Expressed in *Xenopus laevis* Oocytes." *Molecular pharmacology* 55.5 (1999): 847-854.
8. HO, EDMUND S., et al. "Cytotoxicity of antiviral nucleotides adefovir and cidofovir is induced by the expression of human renal organic anion transporter 1." *Journal of the American Society of Nephrology* 11.3 (2000): 383-393.
9. Hong, Mei, Fanfan Zhou, and Guofeng You. "Critical amino acid residues in transmembrane domain 1 of the human organic anion transporter hOAT1." *Journal of Biological Chemistry* 279.30 (2004): 31478-31482.
10. Nozaki, Yoshitane, et al. "Characterization of the uptake of organic anion transporter (OAT) 1 and OAT3 substrates by human kidney slices." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321.1 (2007): 362-369.
11. Tahara, Harunobu, et al. "Molecular cloning and functional analyses of OAT1 and OAT3 from cynomolgus monkey kidney." *Pharmaceutical research* 22.4 (2005): 647-660.
12. Uwai, Yuichi, et al. "Functional characterization of the rat multispecific organic anion transporter OAT1 mediating basolateral uptake of anionic drugs in the kidney." *FEBS letters* 438.3 (1998): 321-324.
13. Takeda, Michio, et al. "Characterization of methotrexate transport and its drug interactions with human organic anion transporters." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 302.2 (2002): 666-671.

14. Mulato, Andrew S., Edmund S. Ho, and Tomas Cihlar. "Nonsteroidal anti-inflammatory drugs efficiently reduce the transport and cytotoxicity of adefovir mediated by the human renal organic anion transporter 1." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 295.1 (2000): 10-15.
15. Cihlar, Tomas, et al. "The antiviral nucleotide analogs cidofovir and adefovir are novel substrates for human and rat renal organic anion transporter 1." *Molecular pharmacology* 56.3 (1999): 570-580.
16. Windass, Amy S., et al. "The contribution of organic anion transporters OAT1 and OAT3 to the renal uptake of rosuvastatin." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322.3 (2007): 1221-1227.
17. Choi, Min Koo, et al. "Inhibitory effects of ketoconazole and rifampin on OAT1 and OATP1B1 transport activities: considerations on drug - drug interactions." *Biopharmaceutics & drug disposition* 32.3 (2011): 175-184.
18. Burckhardt, Birgitta C., et al. "Transport of cimetidine by flounder and human renal organic anion transporter 1." *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 284.3 (2003): F503-F509.
19. Sugawara, Mitsuru, et al. "Structure - affinity relationship in the interactions of human organic anion transporter 1 with caffeine, theophylline, theobromine and their metabolites." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes* 1714.2 (2005): 85-92.
21. Duan, Peng, et al. "Potent inhibitors of human organic anion transporters 1 and 3 from clinical drug libraries: discovery and molecular characterization." *Molecular pharmacology* 9.11 (2012): 3340-3346.

22. Nozaki, Yoshitane, et al. "Species difference in the inhibitory effect of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on the uptake of methotrexate by human kidney slices." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322.3 (2007): 1162-1170.
23. Tahara, Harunobu, et al. "Molecular cloning and functional analyses of OAT1 and OAT3 from cynomolgus monkey kidney." *Pharmaceutical research* 22.4 (2005): 647-660.

Abstract

Functional Expression of OAT1 in MDCK cells

Evidence of Species-differences in the
Function between the Human and Rat

Byung Jin, Kim

Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Objective. Organic anion transporter 1 (OAT1, SLC22A6) is one of the seven major transporters identified in the US Food and Drug Administration guidance for drug interaction study. Since OAT1 plays a crucial role in renal clearance of organic anionic drugs, its potential interaction needs to be ascertained. The purpose of this study is to express the transporter in MDCK cells for the intention of screening for the potential drug-drug interaction at the level of OAT1. In addition, since literature is not entirely clear on the possibility of species-difference in the function between the human OAT1 and rat

OAT1, the difference in the inhibitory potential was determined and compared for nineteen commonly prescribed drugs.

Methods. Human and rat OAT1, individually incorporated in pcDNA5/FRT vector, were previously cloned in this laboratory. The transporters were transfected to MDCK cells using FuGENE® transfection reagent and their expression confirmed by RT-PCR. The functional expression was then determined by comparing the uptake ability of p-aminohippuric acid (PAH), a standard substrate of the transporter, in the MDCK cell lines with that in the control cell line (i.e., mock-transfected cell). Protein amount was determined to correct for the cell number used in the function study. When necessary, inhibition studies were carried out to determine IC₅₀ of 19 potential inhibitors by nonlinear regression analysis.

Results. Amongst the 19 drugs studied, 17 drugs were interacted with human and rat OAT1 to a certain extent. In particular, the inhibitory potential (i.e., IC₅₀, apparent affinity of the drug to the transporter) for cimetidine, methotrexate and quinine were quite different between human and rat in terms of the function of OAT1. Furthermore, quinine, rifampicin and theophylline, compounds that do not contain anionic moiety, interacted with OAT1, suggesting that multi-specific nature of the transporter.

Conclusion. These observations suggest that OAT1 is functionally expressed in MDCK cells and the in vitro system can be readily used for the screening of OAT1 mediated drug-drug interaction. The species-difference for OAT1 between the human and rat may occur for certain drugs.

Keywords : OAT1, Drug-drug interaction, in vitro system,
Species-difference, IC₅₀

Student Number : 2013-21575