



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 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 human과 rat의
organic anion transporter 3
기능의 종간 차이 연구

Study of functional differences between
human and rat OAT3 (SLC22A8/slcl22a8)
in MDCK cells

2016 년 2 월

서울대학교 대학원
약학과 약제과학 전공
김 경 민

국문초록

약물 수송체 (Drug transporter)는 기질이 되는 약물의 흡수, 분포 및 배설 동태에 유의한 영향을 미칠 뿐만 아니라 약물-약물 상호작용 (DDI)에 중요한 역할을 한다는 것이 보고되면서 약물동태학적 특성 평가에서 그 중요성이 최근 지속적으로 강조되어 왔다. 이에 미국의 FDA는 2012년에 약물상호작용 연구에 대한 guidance를 제시했는데, organic anion transporter 3 (이하 OAT3)를 포함한 7가지 중요 transporter를 선정하여 신약개발과정에서 평가할 것을 요구했다. OAT3는 주로 신장의 근위세뇨관에 존재하며 음이온성 약물의 신배설에 영향을 주는데, 음이온성 약물의 체내 동태 예측 및 다른 약물들과의 병용 요법 시에 OAT3에 의한 상호작용이 면밀히 검토될 필요가 있다. 또한 transporter는 종간 차이가 존재한다고 보고되어 있는데, 이 차이가 큰 약물의 경우에 실험동물을 이용한 전임상 연구 결과가 실제 임상 연구 결과와 차이가 있어 예상치 못한 독성, 약물상호작용 등의 문제를 가져올 수 있다. 문헌 보고에서 OAT3의 종간 차이에 대해 언급은 있지만 어떤 약물이 해당하는지 정보가 부족하다. 따라서 본 연구에서는 OAT3의 약물상호작용에 대한 기여도를 in vitro 수준에서 평가할 수 있는 cell line을 구축하고, 구축한 human과 rat OAT3 expressing system을 이용해 OAT3의 종간 차이 정보를 제공하고자 하였다.

먼저 human과 rat form OAT3를 삽입한 vector를 MDCK/FRT cell에 transfection하였다. RT-PCR과 function test를 통해 OAT3가 안정적이고 기능적으로 발현됨을 확인하고, 모델 기질인 estrone-3-sulfate (이하 E3S)에 대한 Km, Vmax 값을 구하였다. 다양한 계열에 속한 22개 약물을 선정하여 구축한 OAT3 expressing system을 이용해 억제성 평가를 수행하고 human과 rat에서의 차이를 보았다. 22개 약물을 각 500 μ M로 하여 E3S 1 μ M와 동시에 처리했을 때 E3S의 수송을 억제하는 정도를 % uptake로 구하였다. 이 때 human과 rat에서 % uptake가 큰 차이를 보이는 약물에 대해 추가적으로 inhibitory experiment를 수행하여 농도에 따른 % uptake 곡선을

구하고 nonlinear regression analysis로 K_i 값을 구하였다.

RT-PCR과 function test를 통해 transfection된 cell이 안정적으로 human과 rat OAT3를 발현한다는 것을 확인하였고, hOAT3 / rOat3 expressing cell은 mock cell에 비해 E3S를 각각 4.59배, 6.64배 높은 수준으로 uptake하였다. 선정된 22개 약물 중, 5개 약물 (cephradine, diphenhydramine, furosemide, rifampicin, theophylline)이 human OAT3와 rat OAT3에서 기질 수송의 억제 수준에 차이를 보였다. 이 차이를 K_i 값으로 측정하였을 때, cephradine과 theophylline은 rOat3의 K_i 값이 hOAT3의 K_i 값보다 더 작았고 furosemide는 hOAT3의 K_i 값이 rOat3의 값보다 더 작았다. 특히 rifampicin은 hOAT3에서는 충분한 억제능을 보이지 않아 K_i 값을 구할 수 없었던 것에 비해 rOat3에서 그 값이 $12.9 \mu\text{M}$ 로 비교적 강한 억제능을 보였다. 한편 diphenhydramine은 본 연구에서 K_i 값을 구할 수 없었다.

본 연구에서는 human과 rat OAT3의 종간 차이가 있음을 동일한 cell system을 이용하여 약물의 기질 수송 억제능으로 확인하였고, 보고된 적 없던 5개 약물의 K_i 값을 구함으로써 그 차이를 수치적으로 비교했다는 것에서 의미가 있다. 향후 이 system을 이용한 더 많은 약물 screening을 통해 OAT3 종간 차이에 대한 기초적인 연구 database 확보가 가능할 것이다. 이는 약물 개발 과정에서 실험동물로부터 인간 체내 동태를 예측할 때, OAT3의 종간 차이에 의한 예상치 못한 문제 발생을 낮추는 데에 크게 기여할 수 있을 것으로 사료된다.

주요어 : 약물수송체, OAT3, estrone-3-sulfate, 약물상호작용, 종간 차이, K_i

학 번 : 2014-25279

목 차

국문초록	i
목차	iii
표 목차	v
그림 목차	vi
1. Introduction	1
1.1. Drug transporters	1
1.1.1. OAT3	1
1.2. Interspecies differences	2
1.3. In vitro screening system	3
2. Materials	4
3. Methods	7
3.1. Establishment of stable cell line	7
3.1.1. Cloning of rat OAT3	7
3.1.2. Transformation	10
3.1.3. Sequencing & Mutagenesis	10
3.1.4. Transfection of human and rat OAT3	12
3.2. Confirmation of expression / function of established cell system	13
3.2.1. RT-PCR	13
3.2.2. Function study	15
3.3. Calculation of Km and Vmax value of human and rat OAT3	16
3.4. Calculation of IC ₅₀ of known inhibitor	17
3.5. Rough inhibitory study of 22 drugs and differences between human and rat OAT3	17

3.6. Further study; Determination of K_i values for selected drugs	18
4. Results	20
4.1. Confirmation of expression / function of established cell system	20
4.2. Calculation of K_m and V_{max} value of human and rat OAT3	22
4.3. Calculation of IC_{50} of known inhibitor	24
4.4. Rough inhibitory study of 22 drugs and differences between human and rat OAT3	24
4.5. Further study; Determination of K_i values for 5 drugs	26
5. Discussion & Conclusion	30
참고문헌	33
Abstract	37

표 목 차

표 1. LB media 조성	4
표 2. Cell culture media 조성	5
표 3. transport media 조성	6
표 4. RT (step 1) reaction mixture	7
표 5. RT (step 2) reaction mixture	7
표 6. RT (step 2) 조건	8
표 7. Rat OAT3 cloning primer	9
표 8. PCR reaction mixture	9
표 9. PCR 조건	10
표 10. Mutagenesis primer	11
표 11. Mutagenesis mixture	11
표 12. Mutagenesis 조건	12
표 13. RT reaction mixture	14
표 14. RT 조건	14
표 15. Human OAT3 cloning primer	14
표 16. GAPDH RT primer	15
표 17. 선정한 22개 약물	18
표 18. Human과 rat OAT3 의 Km, Vmax 값	22
표 19. Probenecid의 IC ₅₀ (μ M)	24
표 20. 다섯 개 약물의 Ki 값 (μ M)	26

그림 목 차

그림 1. Map of pcDNA5/FRT vector	8
그림 2. hOAT3/rOat3 transfected cell RT-PCR 결과	20
그림 3. hOAT3/rOat3 expressing cell function study 결과	21
그림 4. hOAT3/rOat3 expressing cell의 기질 농도에 따른 수송속도 그래프	23
그림 5. Probenecid 농도에 따른 E3S의 % uptake	24
그림 6. 22개 약물들의 OAT3에 대한 rough screening	25
그림 7. Inhibitory experiment of cephadrine, diphenhydramine, and furosemide	27
그림 8. Inhibitory experiment of rifampicin and theophylline	28

1. Introduction

1.1. Drug transporters

약이 체내에서 작용하기까지 걸리는 시간, 작용 부위, 지속 시간은 그 약물의 흡수, 분포, 대사, 배설 (통칭 ADME) 특징에 따라 결정된다. 따라서 약물 개발 과정에서 그 약물의 ADME를 파악하는 것이 매우 중요하다. 이 때 ADME에 유의한 영향을 끼치는 약물 수송체(Drug transporter)의 연구 중요성은 최근에 지속적으로 강조되어 왔다.

Transporter는 brain, liver, kidney, intestine 등 다양한 site의 세포막에 발현되어 있는 단백질로서 기질을 세포 안팎으로 수송한다. 따라서 transporter의 기질이 되는 약물은 체내 동태에 영향을 받고, 이는 약물의 치료효과나 이상반응의 중요한 결정인자가 될 수 있다. 또한 약물-약물 상호작용 (DDI)에도 중요한 역할을 한다는 것이 많은 연구를 통해 밝혀지면서 transporter의 기질, 억제제, 유도제 등을 파악하는 것은 신약개발 초기단계에서 효율을 증대시킬 뿐만 아니라 약물상호작용의 평가에도 중요하다. 미국의 FDA는 2012년에 약물상호작용 연구에 대한 guidance를 제시했는데, 여기에는 신약개발과정에서 약물상호작용에 주요한 영향을 끼치는 7가지 transporter (P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1, and OAT3) 에 대한 평가를 요구하고 있다.

1.1.1. OAT3

OAT3(Organic anion transporter3)는 solute carrier family에 속하는 influx transporter로서 human에서 SLC22A8 gene에 의해 발현된다. 주로 신장의 근위세뇨관 상피세포에서 발현되며 basolateral

membrane에 존재하고 뇌의 choroid plexus에서는 apical membrane에 존재한다. OAT3는 유기음이온의 신배설에 중요한 역할을 할 뿐만 아니라 뇌척수액에서의 동태에도 영향을 주는 것으로 밝혀졌다. 많은 종류의 항생제, 항바이러스제, NSAIDs 약물이 OAT3의 기질로 알려져 있는데 이 계열의 약물들은 빈용처방되는 약물이므로 약물 개발 시에 후보물질의 OAT3에 대한 기질성 여부는 중요하게 고려되어야 한다.

1.2. Interspecies differences

약물 개발 과정에서 실험동물을 이용한 전임상 연구는 임상 시험을 수행하기 위해 반드시 선행되어야 한다. 실험동물(예, rat)로부터 얻은 약물 체내 동태 정보는 인간에서의 약물 동태를 예측하는데 이용되는데 이때 실제 양상이 예측한 것과 상이할 수 있다. 이는 약물 동태에 영향을 주는 대사효소나 약물 수송체의 기능이 유전자 서열 차이로 인해 종에 따라 기능이 다를 수 있기 때문이다. 실제로 OAT3를 포함한 여러 transporter에 대해 상호작용에서 종간차이를 보이는 약물들이 문헌에서 보고되고 있다. (Chu, Xiaoyan, Kelly Bleasby, and Raymond Evers., 2013)

OAT3는 RNA 서열에서는 human (NM_001184732.1)과 rat (NM_031332.1) 간에 83% 일치하며 아미노산 서열에서는 80% 일치한다. 임상에서 보고된 famotidine과 probenecid의 약물-약물 상호작용 (DDI)이 rat에서는 보이지 않은 것에 대해 OAT3의 종간 차이가 기여한다는 것이 보고된 바 있다. (Tahara, Harunobu, et al., 2005) 따라서 실험동물로부터 인간으로의 약물 체내 동태 예측 시에 OAT3의 종간 차이를 고려한다면, 발생할 수 있는 예측의 오류를 줄일 수 있을 것이다.

1.3. In vitro screening system

Transporter에 대한 기질성, 억제성과 이로 인한 약물 상호작용에 대한 평가는 중요하지만 임상단계에서 시행하기에는 위해성을 유발할 수 있을 뿐만 아니라 시간적, 경제적으로 비효율적이다. In vitro 수준에서 표준화된 transporter screening system은 in vitro-in vivo correlation을 통해 in vivo에서의 transporter 기여도에 대한 정보를 제공할 수 있고, 이는 전체 약물 개발과정의 효율을 증가시킬 수 있다. 따라서 본 연구에서는 OAT3를 발현하는 cell line을 만들어 in vitro screening system을 구축하였고, 이를 이용해 human과 rat type 간의 기능 차이를 연구해 OAT3 종차 정보를 제공하였다.

2. Materials

2.1. Establishment of OAT3 expressing cell line

2.1.1. Cloning

Rat kidney total RNA (실험실 보유)

Primestart 1st strand cDNA synthesis kit (Takara)

Ex Taq polymerase (Takara)

Restriction enzymes (Takara)

pcDNA5/FRT vector (Invitrogen)

E.coli HST08 competent cell (Takara)

Accuprep PCR Purification Kit (Bioneer)

QuickChange II XL site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent)

XL10-Gold ultracompetent cell (Agilent)

Weprep Plasmid miniprep Kit (Welgene)

DNA ligation Kit (Takara)

LB media (표 1)

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

표 1. LB media 조성

2.1.2. Transfection

MDCK/FRT cell (Madin-Darby Canine Kidney cell/flippase recognition target)

pOG44 (Invitrogen)

FuGENE® transfection reagent (Promega)

Hygromycin B in PBS 50mg/ml (Invitrogen)

12-well plate (Corning)

25T, 75T flask (Nunc)

Cell culture media (전체 500 ml, 표 2)

Material	Volume	제조사
DMEM/Low glucose	433 ml	
FBS	50 ml	Hyclone
Penicillin-streptomycin	5 ml	
HEPES	5 ml	
Gentamicin	2 ml	Welgene
Non-essential amino acid	5 ml	Sigma

표 2. Cell culture media 조성

2.1.3. RT-PCR

GeneJET RNA purification Kit (Thermo)

AccuPower RT-PCR PreMix Kit (Bioneer)

Ex Taq polymerase (Takara)

2.1.4. Function study

Estrone-3-sulfate, potassium salt (Sigma)

[³H] Estrone-3-sulfate, ammonium salt (PerkinElmer)

Probenecid (Sigma)

Poly-L-ornitine (Sigma)

0.1 N NaOH, DPBS (Welgene)

Ultima Gold LSC-cocktail (Packard bioscience)

Transport media (TM, 전체 1 L, 표 3)

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

표 3. Transport media 조성

2.2. Inhibitory experiment

Substrate: Estrone-3-sulfate, potassium salt (Sigma)

[³H] Estrone-3-sulfate, ammonium salt (PerkinElmer)

Probenecid (Sigma)

22 Drugs (Sigma)

Antipyrine, Buspirone, Cephadrine, Chlorothiazide, Cimetidine, Diclofenac, Diphenhydramine, Donepezil, Flufenamic acid, Flurbiprofen, Furosemide, Ibuprofen, Isoniazid, Methotrexate, Metoprolol, PAH, Penicillin G potassium salt, Quinine HCl, Rifampicin, Rosuvastatin, Theophylline, Uric acid

3. Methods

3.1. Establishment of stable cell line

3.1.1. Cloning of rat OAT3

Rat kidney total RNA를 template로 사용, cDNA synthesis kit (Takara)를 이용하여 Reverse transcription (RT)를 수행하였다. RT는 두 단계에 걸쳐 수행하였다. 표 4의 mixture를 65°C에서 5분 incubation 후 ice에서 1분 식혔다. 그 후 다음의 조건 (표 5, 표 6)에서 step 2를 수행하였다.

Materials	Volume
RNase free water	6 μ l
template RNA	2 μ l
dT Primer	1 μ l
dNTP	1 μ l
Total 10	

표 4. RT (step 1) reaction mixture

Materials	Volume
표 4의 total mixture	10 μ l
5x buffer	4 μ l
FDDW	4.5 μ l
RNase inhibitor	0.5 μ l
RTase	1 μ l
Total 20 μ l	

표 5. RT (step 2) reaction mixture

Reaction step	Temperature	Time
cDNA synthesis	42°C	60 min
RTase inactivation	95°C	5 min
Resting	4°C	유지

표 6. RT (step 2) 조건

RT 결과로 얻은 각각의 cDNA를 template로 하여 rat OAT3에 대한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. Cloning하고자 하는 유전자 정보는 NCBI database에서 얻었고 slc22a8 gene (rat OAT3 유전자)의 mRNA 서열 (NM_031332)을 참고하였다. CDS (r.124...1734)를 포함하는 PCR product를 얻을 수 있도록 적합한 조건을 갖는 primer를 design하고, target vector (그림 1)에 존재하는 restriction site를 붙여 코스모진텍사에 합성을 의뢰하였다. 다음은 primer와 PCR product에 대한 정보이다. (표 7, 밑줄 친 부분은 restriction site)

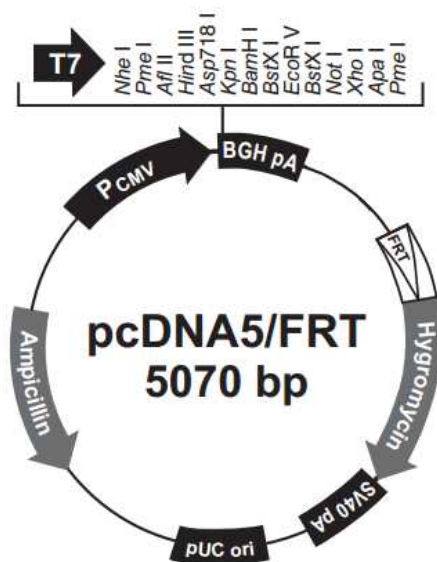


그림 1. Map of pcDNA5/FRT vector

Gene	Primer (5 '→3' 방향)		Product size
slc22a8 (rat OAT3)	sense (99...120)	AAA <u>GCT AGC (NheI)</u> GTT TTG GTT CAT CTT GCC TGG T	1748 bp
	antisense (1827...1846)	CCC <u>AAG CTT (HindIII)</u> CAC CTA GGG CTT TCC CCA AC	

표 7. Rat OAT3 cloning primer

위의 primer를 이용하여 다음 반응 조건 (표 8, 표 9)에서 PCR을 수행하였다. PCR에 사용된 중합효소는 Ex Taq polymerase이다. 얻은 rat OAT3 PCR product (1748 bp)와 pcDNA5/FRT (5070 bp)는 각각 restriction enzyme인 Hind III와 NheI로 37°C에서 1시간 double digestion하였다. 그 후 ligation mix Kit를 이용해 16°C에서 약 30분 incubation하여 rat OAT3 유전자를 pcDNA5/FRT vector로 ligation 하였다.

Materials	Volume
Template cDNA	1 μ l
primer (F / R)	2 / 2 μ l
dNTP	1.6 μ l
Ex Taq polymerase	0.2 ul
10x Ex Taq buffer	2 μ l
RNase free water	11.2 μ l
Total 20 μ l	

표 8. PCR reaction mixture

Step	Temperature	Time	Cycles
1	94℃	5 min	
2	94℃	30 sec	29회 반복 (2~4 step)
3	63℃	30 sec	
4	72℃	2 min	
5	72℃	10 min	
6	4℃	유지	

표 9. PCR 조건

3.1.2. Transformation

Cloning으로 얻은 각각의 vector를 고농도로 얻기 위해 HST 08 strain의 E.coli competent cell에 transformation하였다. DNA 10 μ l 와 E.coli 30 μ l를 섞은 mixture를 30분 ice incubation후, 42℃에서 45초간 heat shock하였다. 바로 ice에서 cooling하고 항생제를 넣지 않은 액체 LB 배지를 가한 후 37℃, 140 rpm shaking incubator에서 약 1시간 30분 incubation하였다. 그 후 mixture 일부만 덜어 ampicillin 100 μ g/ml 이 포함된 고체 LB 배지에 spreading하고 37℃ CO₂ incubator에서 overnight 배양하였다. 확인된 colony는 같은 농도의 ampicillin이 포함된 액체 LB 배지에서 overnight으로 증식시킨 후 plasmid miniprep kit를 이용해 rat OAT3 gene이 삽입된 pcDNA5/FRT vector를 고농도로 얻을 수 있었다.

3.1.3. Sequencing & Mutagenesis

Target vector에 rat OAT3 gene이 제대로 삽입됐는지 확인하기 위해 코스모진택사에 sequencing을 의뢰하였다. 의뢰 결과 r.1666c>a의 mutation이 존재하였다. 이는 아미노산을 바꾸는 mutation으로 확인되

어 mutagenesis kit를 이용해 mutagenesis를 수행하였다. Mutagenesis에 이용될 primer는 mutation 위치를 포함하며 길이, Tm 값, GC% 등의 조건이 mutagenesis에 적절하도록 다음과 같이 design 하였다. 다음 표에서 밑줄 친 위치가 mutation을 수정할 위치이다.

Primer (5' → 3' 방향)	
Forward	CTG GCA CAA GCA AGT <u>CCA</u> GAA AAC AAA GCA G
Reverse	CTG CTT TGT TTT <u>CTG</u> GAC TTG CTT GTG CCA G

표 10. Mutagenesis primer

위의 primer를 이용하여 다음의 조건 (표 11, 표 12) 하에서 mutagenesis를 수행하였다.

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 F	0.6 μ l
Primer R	0.6 μ l
Template DNA	0.5 μ l (10–100 ng/ μ l 기준)
Pfu Ultra HF DNA polymerase	0.5 μ l

표 11. Mutagenesis mixture

Step	Temperature	Time	Cycles
1	95°C	30 sec	
2	95°C	30 sec	
3	55°C	1 min	16회 반복
4	68°C	2 min (약 1 min/kb)	(2~4 step)
5	68°C	7 min	
6	4°C	유지	

표 12. Mutagenesis 조건

반응이 끝난 mixture에 Dpn I enzyme 1 μ l를 넣고 37°C에서 1시간 incubation하여 methylation된 template를 제거하였다. 이렇게 digestion까지 완료된 DNA는 XL10-Gold ultracompetent cell로 transformation하여 고농도로 얻은 후 DNA는 sequencing을 통해 mutation이 고쳐진 것을 확인하였다.

3.1.4. Transfection of human and rat OAT3

위의 3.1.3까지의 과정으로 cloning이 완료된 pcDNA5/FRT rat OAT3 (rOat3) vector와 연구실에서 기존에 보유하고 있던 pcDNA5/FRT human OAT3 (hOAT3) vector를 MDCK/FRT cell (Madin-Darby Canine Kidney cell/flippase recognition target)에 발현시키기 위하여 transfection을 수행하였다. 이 때 FRT (flippase recognition target) vector와 cell을 이용한 것은 삽입된 유전자가 FRT region에만 삽입되게 하여 안정적으로 발현되도록 하기 위함이다. Transfection에는 FuGENE® transfection reagent를 사용하였다. 12 well plate에서 MDCK/FRT cell을 24시간 동안 배양하여 70 ~ 90% confluency가 되도록 하였다. 모든 세포배양은 37°C, 5% CO₂ 조건으

로 유지되는 incubator에서 진행하였다. 반응액은 pOG44와 pcDNA5/FRT hOAT3 vector 또는 pcDNA5/FRT rOat3 vector를 질량 비율로서 9:1로 하여 총 2 μg 이 되도록 섞고 나머지를 serum-free media로 채워 총 100 μl 가 되도록 하였다. 여기에 FuGENE® transfection reagent를 6 μl 가하고 잘 섞어준 후 15분 동안 상온에서 incubation하였다. 이 때 pOG44는 MDCK/FRT cell의 chromosome에 있는 FRT site에 pcDNA5/FRT OAT3 vector가 결합되도록 하는 recombinase 효소를 발현하는 vector이다. 앞서 조제한 반응액 106 μl 를 seeding된 well의 플라스틱 벽면에 닿지 않게 조심하며 한 방울씩 떨어뜨렸다. 이후 incubator에서 24~48시간 동안 배양하고 이를 25T flask로 옮겨 다시 24시간 동안 배양하였다. 이 후엔 selection marker가 첨가된 media로 갈아주었다. selection marker로는 hygromycin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 사용하였다. 2~3주 동안 selection 후 stable cell line을 얻을 수 있었다.

3.2. Confirmation of expression / function of established cell system.

3.2.1. RT-PCR

Selection까지 하여 완성된 cell line이 human 과 rat form의 OAT3를 발현하는지를 mRNA존재 여부를 통해 확인해보았다. 먼저 1 ml의 cell을 harvest한 후 RNA purification kit로 세포 내 total RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 RT-PCR PreMix Kit로 reverse transcription하여 cDNA template를 얻었다. 반응 조건은 다음과 같다. (표 13, 표 14)

Materials	Volume
RNase free water	18 μ l
RNA (500 ng/ μ l)	2 μ l
Total 20 μ l	

표 13. RT reaction mixture

Reaction step	Temperature	Time
cDNA synthesis	42°C	60 min
RTase inactivation	95°C	5 min
Resting	4°C	유지

표 14. RT 조건

위 RT 결과로 얻은 cDNA를 template로 하고 cloning 때 사용한 primer를 이용하여 PCR을 수행하였다. hOAT3의 cloning에 사용되었던 primer는 표 15와 같다. House keeping gene인 canine-GAPDH를 positive control로 하여 비교하였다. GAPDH primer는 다음과 같고 (표 16), PCR 반응 조건은 cloning시와 같게 하였다.

Gene	size (bp)	primer (5' → 3' 방향)
hOAT3	2032	Forward CCCAAGCTTGCCGCCACCATG ACCTTCTCGGAGATCCTG
		Reverse CCGCTCGAGCGCTGTTTATTG AAACCTCCC

표 15. Human OAT3 cloning primer

Gene	size (bp)	primer (5' → 3' 방향)	
		sense	antisense
GAPDH	247	AACATCATCCCTGCTTCCAC	GACCACCTGCTCAGTGT

표 16. GAPDH RT primer

3.2.2. Function study

FDA에서 OAT3의 모델 기질로 제안한 estone-3-sulfate (E3S)의 세포내 uptake 수송능력을 시험하여 MDCK cell에서 발현된 human과 rat OAT3의 작동을 확인하였다. Transporter gene이 삽입되지 않은 empty vector로 transfection된 MDCK/FRT cell (mock cell)의 uptake 수송능력을 대조군으로서 비교하였다. 먼저 24 well plate에 poly-L-ornithine으로 coating을 하고, n=3으로 하여, 대조군과 실험군 cell 을 각 well 당 2.5×10^5 cells가 되도록 seeding 후 48시간동안 incubator에서 배양하였다.

방사성 물질인 [^3H] estrone-3-sulfate를 hot substrate로 하여 cold substrate (E3S)의 1% (hOAT3의 경우), 또는 3% (rOat3의 경우) 가 되게 하여 최종 E3S는 $1 \mu\text{M}$ 이 되게 하였다. OAT3의 잘 알려진 inhibitor인 probenecid 1 mM를 억제제로 사용하였다.

각 well에 담겨있는 배지를 제거하고 well 마다 DPBS 500 μl 로 3회 wash한 후 transport media를 500 μl 넣고 37°C에서 30분 동안 pre-incubation하였다. 이후 pre-incubation한 TM을 제거하고, 대조군과 실험군 cell에 TM에 녹여 농도를 맞춘 각 약물을 well 당 200 μl 넣었다. 37°C에서 10분 incubation 후 cold DPBS로 3회 washing하고, 0.1 N NaOH 500 μl 로 lysis하였다.

얻어진 lysate 500 μl 중 400 μl 를 ultima gold liquid scintillation fluid 1 ml 와 함께 vial에 각각 가하여 섞은 후 liquid scintillation counter를 이용하여 시료의 dpm 값을 측정하였다. dpm 값으로부터 환

산한 pmole을 BCA assay를 수행하여 구한 mg protein으로 보정하였다. 이 값을 수송 반응시간으로 나누어 mg protein당 수송속도 (pmol/mg protein/min)를 계산하였다.

3.3. Calculation of Km and Vmax value of human and rat OAT3

OAT3 expressing cell과 대조군인 mock cell에 기질 E3S를 8가지 농도 (0.5, 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200 μ M)로 n=3로 하여 각 well 당 200 μ l씩 처리하고 37°C에서 incubation하였다. 이 때 incubation time은 사전에 incubation time-수송속도 실험을 수행하여 수송속도가 plateau에 도달하기 전인 6분으로 하였다. Cold DPBS 500 μ l로 수송을 중단시킨 후 3회 wash하고 0.1 N NaOH 500 μ l로 lysis한다. 이 중 400 μ l의 lysate에 ultima gold liquid scintillation fluid 1 ml를 잘 섞은 후 liquid scintillation counter로 dpm을 측정하였다. 측정된 dpm 값으로부터 환산된 pmole 값은 BCA assay로 구한 mg protein으로 보정해주고, incubation time인 6분으로 나누어 mg protein 당 수송속도 (pmol/mg protein/min)를 계산하였다. Km, Vmax 값은 nonlinear regression analysis (WinNonlin)로 기질 농도에 대한 수송속도 곡선으로부터 계산되었다. 사용한 식은 다음과 같다. 식에서 a는 transporter를 매개하지 않고 기질이 세포 내로 수송되는 경로에 대한 상수이다.

$$\text{mock cell의 경우: } v = a \times [S]$$

$$\text{transfected cell의 경우: } v = \frac{V_{\max} \times K_m}{K_m + [S]}$$

[S]: 기질의 농도 (μ M)

v: 기질 수송 속도 (pmol/mg protein/min)

3.4. Calculation of IC₅₀ of known inhibitor

본 연구에서 확보한 OAT3 expressing cell을 이용해 이미 잘 알려진 OAT3의 inhibitor인 probenecid의 IC₅₀값을 구해보았다. 기질 E3S 1 μM를 6가지 농도(0.01, 0.1, 1, 10, 100, 1000 μM)의 probenecid와 함께 총 200 μl가 되게 하여 각 well 당 처리하였다. 각 농도마다 n=3로 하여 3.3.에서 기술한 방법으로 실시하였다. Inhibitor를 처리하지 않은 실험군을 control로 하고 이것의 평균 수송속도를 100%의 수송능력으로 가정하였을 때, inhibitor 농도에 따른 수송속도의 % of control값을 계산하여 plot하였다. x 축을 약물의 농도, y 축을 기질의 % uptake로 하여 sigmoidal curve를 그리고 다음의 식을 이용하여 IC₅₀값을 구하였다. IC₅₀값의 추정은 Winnonlin 프로그램을 이용하였다.

$$v = V_{\max} \times \left(1 - \frac{[I]}{[I] + IC_{50}}\right)$$

3.5. Rough inhibitory study of 22 drugs and differences between human and rat OAT3

다양한 계열에 속하는 22개 약물을 선정하여 human과 rat OAT3에서 기질 수송 억제능을 평가하였다. Rough screening을 위해 선정한 22개 약물은 OAT3의 기질로 알려진 NSAIDs, 이노제, 항생제, statin 계열에 속하는 약물들과 OAT3와의 상호작용이 보고되지 않은 약물들을 포함하고 있다. (표 17) 각 약물 농도 500 μM를 기질 E3S 1 μM와 같이 총 200 μl를 hOAT3 / rOat3 expressing cell에 n=2로 처리하고 37°C에서 10분 incubation하였다. 3.2.2.에서 기술한 방법으로 각 약물을 처리했을 때 기질의 수송속도 pmol/mg protein/min를 구하였다.

약물을 처리하지 않은 실험군을 control로 하여 이것의 수송속도를 100%로 하고, 각 약물을 처리했을 때의 수송속도의 % of control 값을 계산하였다.

Class	Drugs
Antibiotics	Cephadrine, Penicillin G, Isoniazid, Rifampicin
Antimalarial drug	Quinine
Beta-blocker	Metoprolol
Bronchodilator	Theophylline
CNS drugs	Buspirone, Donepezil, Diphenhydramine
Cytostatics	Methotrexate
Diuretics	Chlorothiazide, Furosemide
H2 antagonists	Cimetidine
NSAIDs	Antipyrine, Diclofenac, Flufenamic acid, Flurbiprofen, Ibuprofen
Others	Uric acid, PAH(para-aminohippuric acid)
Statins	Rosuvastatin

표 17. 선정된 22개 약물

3.6. Further study; Determination of K_i values for selected drugs

3.5.에서 OAT3의 human과 rat form에서 % uptake에 약 두 배 또는 그 이상의 차이를 보인 약물에 대해 추가적인 inhibitory experiment를 수행하였다. 각 약물은 6가지 농도 (0.01, 0.1, 1, 10,

100, 500~1000 μ M)로 하여 E3S 1 μ M와 같이 처리하여 3.4.에서 기술한 방법으로 수행하여 IC₅₀값을 구하였다. 구한 IC₅₀ 값으로 다음 식을 이용해 Ki 값을 구하였다.

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{[S]}{K_m}}$$

Human OAT3에 대해서는 duplicate로 1~3회 수행하였3회 수행한 경우에 한하여 SD값을 구하였고, rat OAT3에 대해서는 duplicate로 1회 수행하여 SD값을 구하지 못해 명시하지 않았다.

4. Result

4.1. Confirmation of expression / function of established cell system

Cloning하여 얻은 rOat3가 삽입된 pcDNA5/FRT vector와 기존에 연구실에서 보유하고 있던 human OAT3가 삽입된 pcDNA5/FRT vector는 각각 MDCK/FRT cell에 transfection되었다. 각 transfected cell에서의 RNA 발현을 RT-PCR로 확인한 결과, hOAT3에 해당하는 2000 bp보다 조금 더 큰 크기의 band가 hOAT3 transfected cell에서 확인되고, rOat3에 해당하는 약 1750 bp 크기의 band가 rOat3 transfected cell에서 확인되었다. 한편 대조군인 mock cell에서는 OAT3에 해당하는 band가 확인되지 않았다. 따라서 각각 transfected cell 이 human 또는 rat OAT3를 발현한다는 것을 RNA 수준에서 확인하였다. (그림 2)

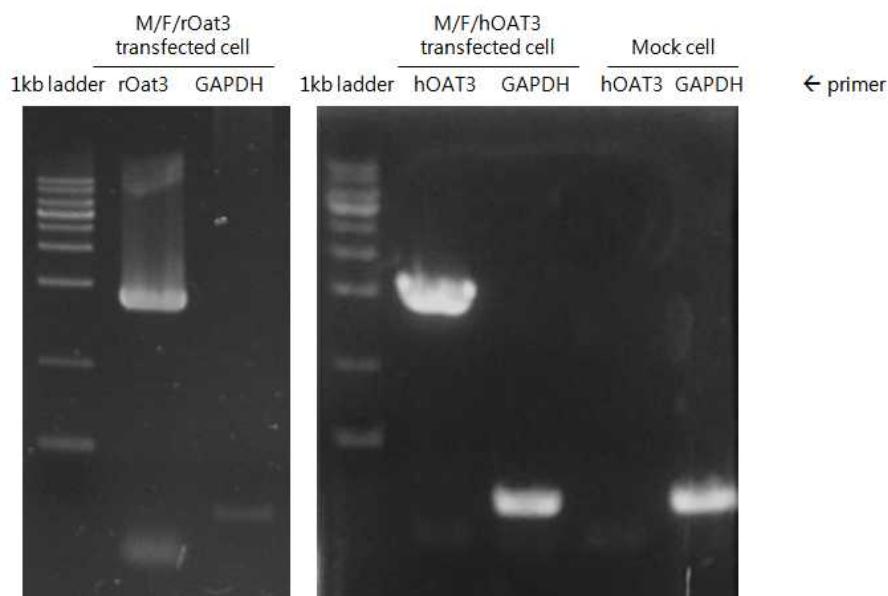


그림 2. hOAT3 / rOat3 transfected cell RT-PCR 결과

발현된 transporter의 기능적 평가를 위해 수행한 function study에
 서, 두 cell line 모두 대조군인 mock cell에 대비하여 모델 기질을 유
 의하게 높은 수준으로 uptake하였다.(그림 3) 모델 기질인 E3S 1 μ M
 를 처리하였을 때, mock cell에 비해 human OAT3 expressing cell은
 약 4.59배, rat OAT3 expressing cell은 약 6.64배로 높은 수준의 기
 질 수송을 보였으며, 이 때 대조군과의 t-test 결과 p값이 두 경우 모두
 0.001보다 작았다. 또한 기질과 함께 OAT3의 대표적 억제제인
 probenecid 1 mM를 같이 처리했을 때, hOAT3와 rOat3 expressing
 cell에서의 기질 uptake가 현저히 감소하여 대조군과 비슷한 수준을 보
 였다. 이는 두 cell line에서 보인 높은 수준의 기질 수송이 발현시킨
 OAT3에 의한 것임을 의미한다. 따라서 RNA 발현뿐만 아니라 function
 test를 통해 그 기능을 확인함으로써 안정적으로 human과 rat OAT3를
 발현하고 기능을 하는 cell line을 확보하였다.

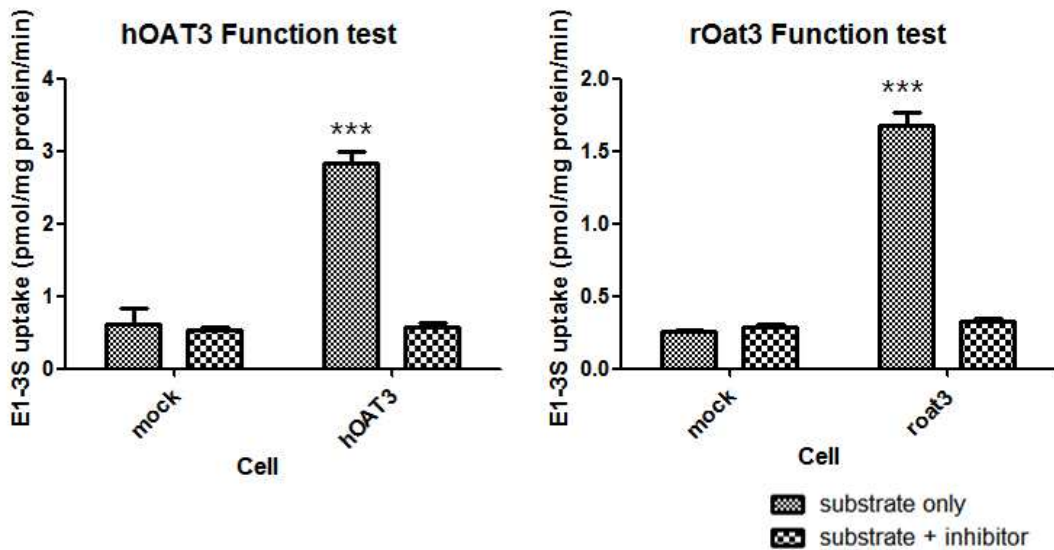


그림 3. hOAT3 / rOat3 expressing cell function study 결과

4.2. Calculation of Km and Vmax value of human and rat OAT3

완성된 stable cell line을 이용해 human과 rat OAT3의 모델기질 E3S에 대한 Km과 Vmax 값을 구하기 위해 기질 농도에 따른 기질수송 속도를 측정하였다. (그림 4) Nonlinear regression analysis (WinNonlin)을 이용해서 human과 rat OAT3에 대해 각각 구한 parameter들의 값은 표 18과 같다.

Parameters	human OAT3	rat OAT3
Km (μM)	7.45 ± 0.709	14.7 ± 4.13
Vmax (pmol/mg protein/min)	39.5 ± 1.78	7.91 ± 1.24

표 18. Human과 rat OAT3 의 Km, Vmax 값

OAT3의 모델 기질 E3S에 대한 Km 값은 human type에서는 $7.45 \pm 0.709 \mu\text{M}$, rat type에서는 $14.7 \pm 4.13 \mu\text{M}$ 이었다. Inhibition study 시에 기질농도에 따른 수송속도가 직선성을 갖는 구간에서 수행해야 하므로 $1 \mu\text{M}$ 을 기질 농도로 설정하였다.

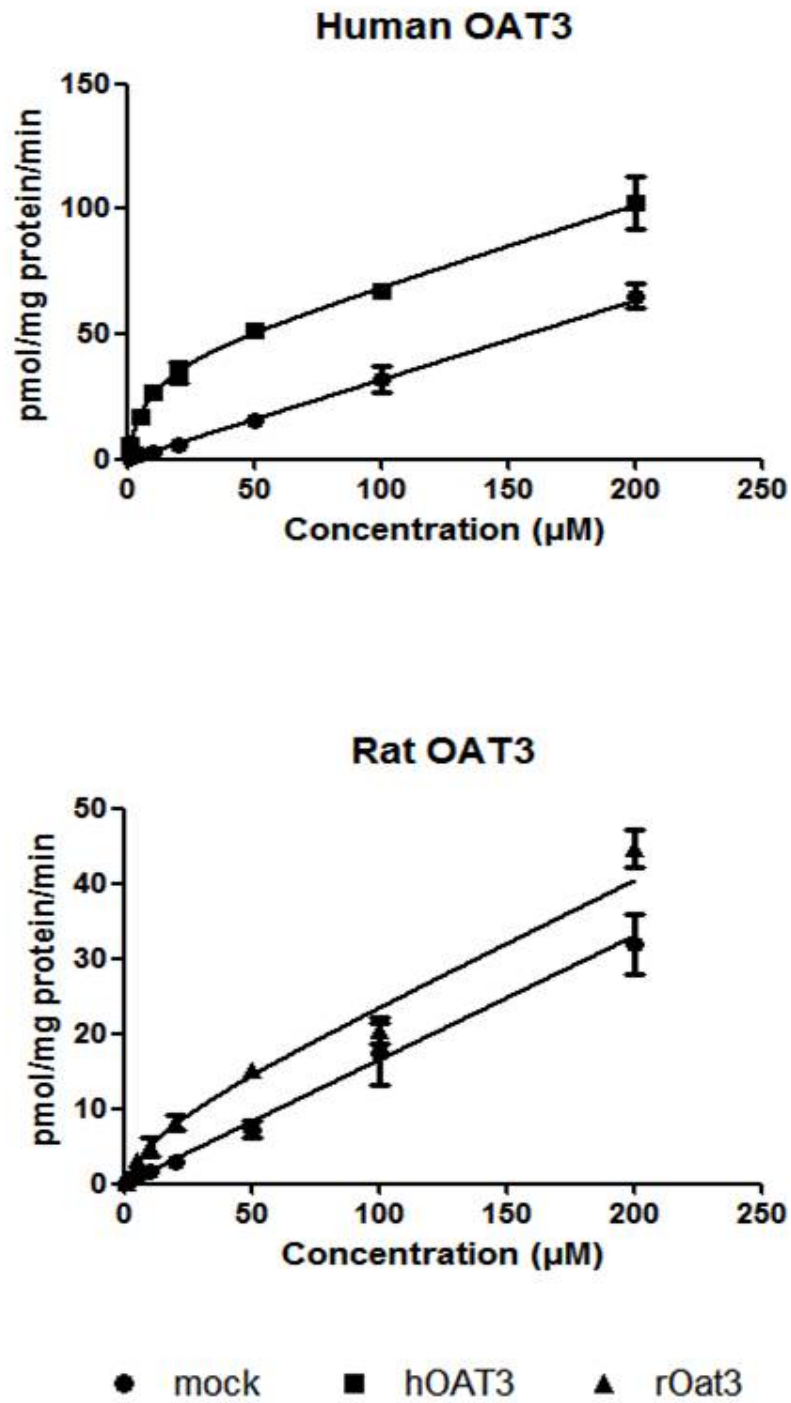


그림 4. hOAT3 / rOat3 expressing cell의 기질 농도에 따른 수송 속도 그래프

4.3. Calculation of IC₅₀ of known inhibitor

각 hOAT3 cell과 rOat3 expressing cell을 이용하여 OAT3의 잘 알려진 억제제인 probenecid의 IC₅₀값을 구하였다. (그림 5, 표 19)

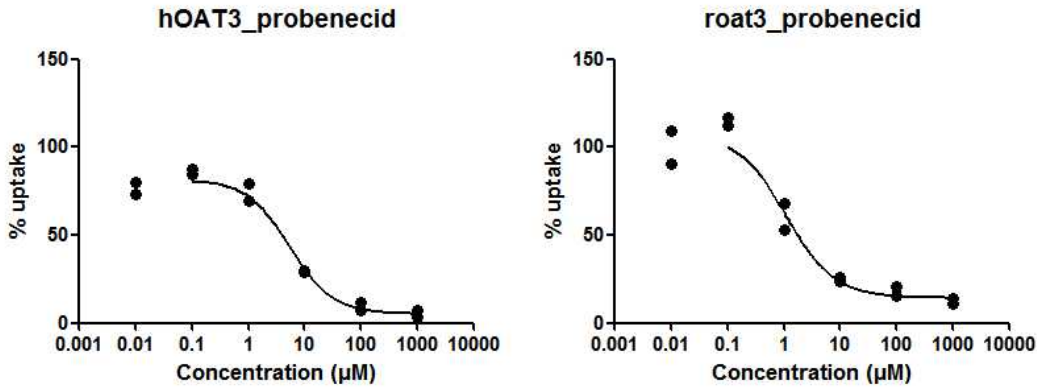


그림 5. Probenecid 농도에 따른 E3S의 % uptake

Drug	human OAT3	rat OAT3
Probenecid	5.08 ± 1.32	1.06 ± 0.375

표 19. Probenecid의 IC₅₀ (µM)

위의 구해진 IC₅₀값은 이전의 문헌에서 보고된 probenecid의 OAT3에 대한 IC₅₀값 (hOAT3 경우 4.93 ± 1.37 µM, rOat3의 경우 6.03 ± 0.27 µM, Khamdang, Suparat, et al., 2004)과 근접하였다.

4.4. Rough inhibitory study of 22 drugs and differences between human and rat OAT3

본 연구에서 구축한 OAT3 발현 MDCK cell을 이용하여 human과 rat type의 중간 차이를 약물들의 억제능으로 판단하기 위해 선정된 22

개 약물들 (Antipyrine, buspirone, cephradine, chlorothiazide, cimetidine, diclofenac, diphenhydramine, donepezil, flufenamic acid, flurbiprofen, furosemide, ibuprofen, isoniazid, methotrexate, metoprolol, PAH, penicillin G potassium salt, quinine HCl, rifampicin, rosuvastatin, theophylline, uric acid) 에 대해 rough screening을 수행하였다. (그림 6) 다음 22개 약물 각 500 μ M과 E3S 1 μ M를 동시에 처리했을 때의 기질 uptake를 기질만 처리했을 때의 uptake에 대비하여 % uptake로 나타내었다. % uptake 값이 작을 수록 억제능이 큰 것을 의미한다.

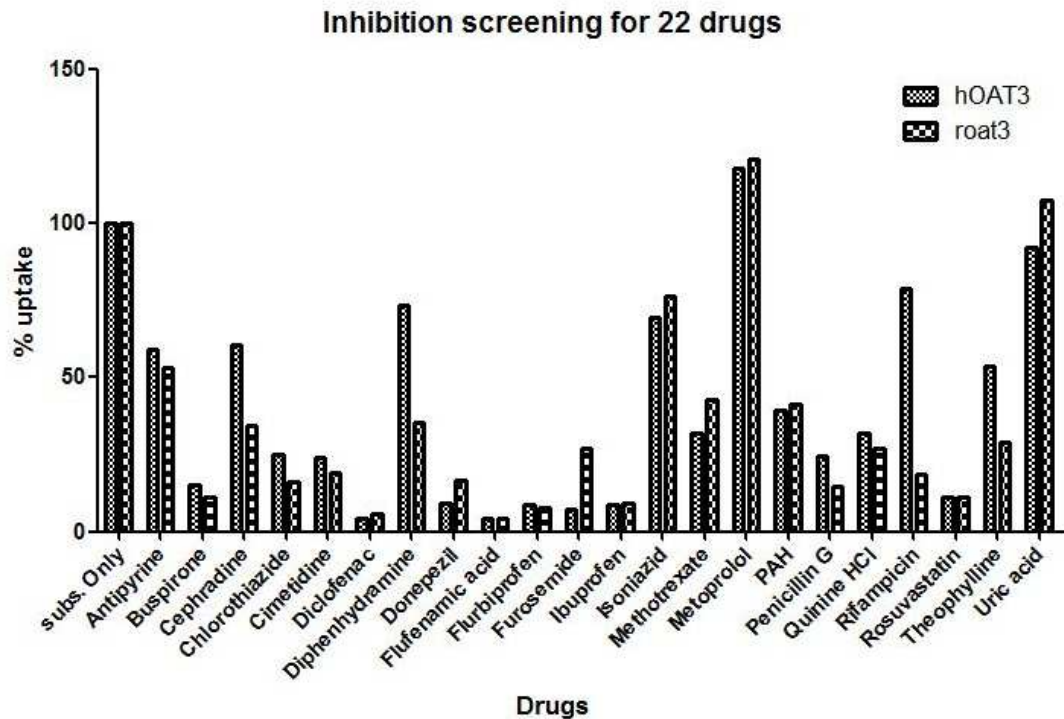


그림 6. 22개 약물들의 OAT3에 대한 rough screening

다양한 약물들이 서로 다른 수준으로 기질의 수송을 억제했다. 이 때 5개 약물 (cephradine, diphenhydramine, furosemide, rifampicin, theophylline)의 억제능이 human과 rat에서 약 두 배 또는 그 이상의

차이를 보였다. 이는 human OAT3와 rat OAT3 의 중간차이에 의한 것으로 생각된다. Cephadrine, diphenhydramine, rifampicin, theophylline은 모두 rOat3에서 % uptake가 더 낮았고 rifampicin이 약 4.2 배로 hOAT3와 가장 큰 값 차이를 보였다. (hOAT3에서 78.9%, rOat3에서 18.8%) Furosemide는 다른 네 약물과는 반대로 hOAT3에서 % uptake가 더 낮았으며 약 3.65 배의 값 차이가 있었다. (hOAT3에서 7.40%, rOat3에서 27.0%)

4.5. Further study; Determination of K_i values for 5 drugs

차이를 보인 5개 약물에 대해 inhibitory experiment를 수행하여 K_i 값을 계산하였다. (그림 7, 그림 8, 표 20)

Drug	human OAT3	rat OAT3
Cephadrine	128 ± 17.8	37.9
Diphenhydramine	–	–
Furosemide	1.76 ± 1.22	3.42
Rifampicin	–	12.9
Theophylline	205 ± 28.0	8.93

표 20. 다섯 개 약물의 K_i 값 (μM)

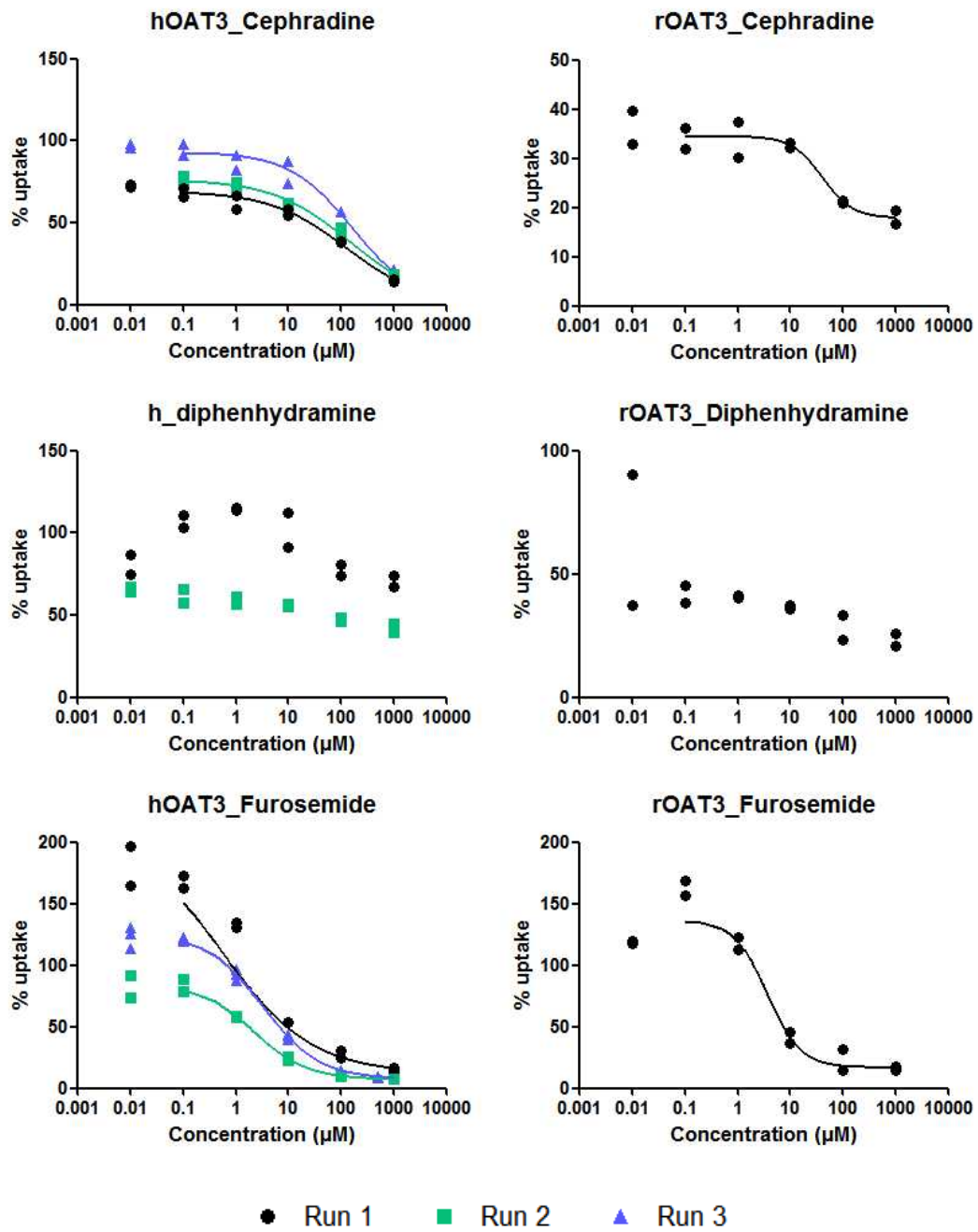


그림 7. Inhibitory experiment of cephradine, diphenhydramine, and furosemide

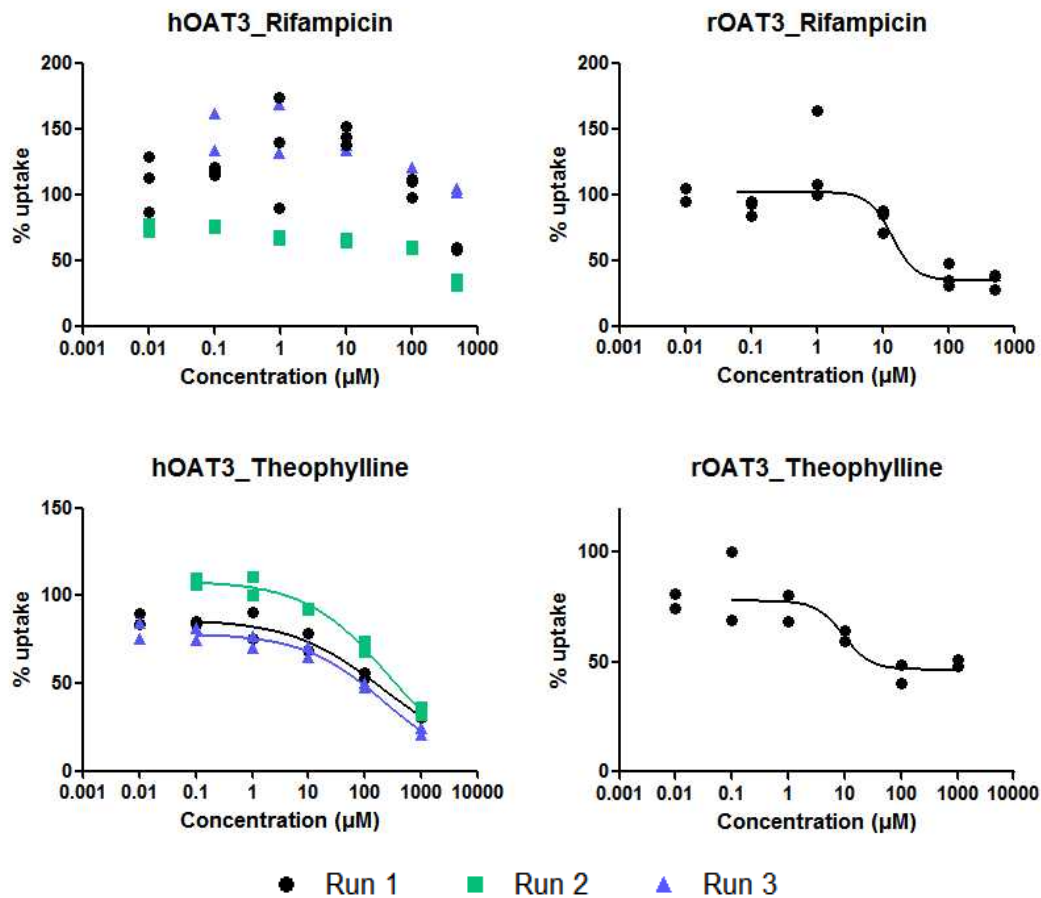


그림 8. Inhibitory experiment of rifampicin and theophylline

Diphenhydramine은 human과 rat OAT3 모두에서 sigmoid curve를 보이지 않아 nonlinear regression analysis로 K_i 값을 계산할 수 없었다. Diphenhydramine 농도가 높을수록 % uptake가 감소하는 경향은 hOAT3와 rOat3에서 유사하였다. 단, 최고 농도 1000 μM 에서 % uptake 값이 hOAT3에서 $56.3 \pm 16.6\%$, rOat3에서 $23.3 \pm 3.59\%$ 로, 약 두 배 차이 났는데 이는 rough screening 결과 (그림 6)와 유사했다. Cephadrine, theophylline은 rOAT3의 K_i 값이 hOAT3보다 작았다. 특히 rifampicin은 hOAT3에서는 농도에 따른 % uptake의 감소가 뚜렷하게 나타나지 않아 K_i 값을 구할 수 없었던 것에 비해, rOat3에서는 12.9 μM 으로 비교적 낮은 K_i 값을 보였다. 한편 furosemide는

rOat3보다 hOAT3에서 K_i 값이 더 작아 다른 네 약물과는 반대 경향을 보였다.

5. Discussion & Conclusion

본 연구에서는 FDA 지정 주요 7개 transporter 중의 하나인 OAT3의 중간 차이에 대해 연구하기 위해 MDCK cell을 발현 시스템으로 하여 in vitro screening system을 구축 및 이용하였다. 구축한 system은 mRNA 수준에서 hOAT3 및 rOat3을 발현하였고, 발현된 transporter는 function test 결과 대조군에 비해 기질 E3S를 높은 수준으로 uptake하였다. OAT3의 E3S에 대한 Km, Vmax 값은 human type에서는 $7.45 \pm 0.709 \mu\text{M}$, $39.3 \pm 1.78 \text{ pmol/mg protein/min}$, rat type에서는 $14.7 \pm 4.13 \mu\text{M}$, $7.92 \pm 1.24 \text{ pmol/mg protein/min}$ 이며, 수송속도 단위에서 mg protein은 BCA assay로 구한 단백질 양으로, 세포 수를 보정한 것이다. MDCK/FRT cell의 FRT site가 한 군데가 아니기 때문에 transfection으로 삽입된 유전자의 발현은 cell마다 그 양이 다를 수 있다. 따라서 구한 Vmax 값은 hOAT3와 rOat3 고유의 값을 의미하지는 않는다. 이 cell line을 이용하여 OAT3의 대표적인 inhibitor로 알려진 probenecid의 IC₅₀ 값을 구한 결과, hOAT3에서 $5.08 \pm 1.32 \mu\text{M}$, rOat3에서 $1.06 \pm 0.375 \mu\text{M}$ 으로 문헌에 보고된 값(Khamdang, Suparat, et al., 2004)과 근접하므로 이 시스템의 신뢰성을 확보할 수 있었다.

선정한 22개 약물을 hOAT3와 rOat3에 대해 rough screening을 수행하였을 때 metoprolol과 uric acid를 제외한 20개 약물이 OAT3에 의한 E3S의 수송을 억제하였다. 이 때 E3S의 % uptake를 10% 미만 이 되게 OAT3 기능을 강하게 억제한 약물은 OAT3의 억제제로 잘 알려진 ibuprofen을 포함한 NSAIDs (Khamdang, Suparat, et al., 2002)였고, chlorothiazide, cimetidine, penicillin G도 기존에 보고된 바와 같이 OAT3의 기능을 비교적 높은 수준으로 억제하였다. (Hasannejad, Habib, et al., 2004) 그 외에 OAT3의 inhibitor로 보고

된 바 없는 donepezil, rosuvastatin, buspirone도 % uptake를 20% 미만으로 낮추었다. Rough screening을 통해 hOAT3와 rOat3에서 중간 차이의 여부를 확인하고자 했는데 5개 약물이 hOAT3와 rOat3의 % uptake에 약 두 배 또는 그 이상의 값 차이를 보였다. 이를 통해 실제로 human과 rat 간에 OAT3 기능 차이가 존재하며 구축한 in vitro OAT3 screening system을 이용하여 차이를 볼 수 있음을 확인하였다.

Rough screening에서 차이를 보인 5개 약물의 hOAT3와 rOat3 각각에 대한 친화도를 수치적으로 비교하기 위해 추가적인 inhibitory experiment를 수행하였다. 그 결과, rough screening에서 rOat3에서 억제능이 더 컸던 cephadrine, rifampicin, theophylline은 rOat3의 K_i 값이 hOAT3의 K_i 값보다 더 작았고, 반대로 hOAT3에서 억제능이 더 컸던 furosemide는 hOAT3의 K_i 값이 더 작았다. 특히 rifampicin은 hOAT3에서는 충분한 수송 억제를 하지 않아 K_i 값을 구할 수 없었던 반면에 rOat3에서는 K_i 값이 $12.9 \mu\text{M}$ 로 비교적 강한 억제능을 보였다. Rough screening 결과와 구한 K_i 값을 보았을 때, 약물의 K_i 값이 작을수록, 즉 transporter와의 친화도가 높을수록 더 강하게 기질 수송을 억제한다는 것을 확인할 수 있었다. 한편 diphenhydramine은 본 연구에서 농도-% uptake 곡선이 simoid를 그리지 않아 K_i 값을 구할 수 없었다.

본 연구는 human과 rat OAT3의 중간 차이가 있음을 구축한 in vitro screening system을 통해 확인하고 차이를 보인 5개 약물에 대해 직접 K_i 값을 구함으로써 수치적으로 비교했다는 점에서 의미가 있다. Transporter 연구에서 재조합 cell line, xenopus oocyte, membrane vesicle 등 다양한 발현 시스템을 이용하여 OAT3에 의한 약물 수송이 평가되어왔는데, 중간 차이를 평가하기 위해 동일한 발현 시스템을 이용한 in vitro data는 아직 부족한 실정이다. 본 연구에서는 MDCK/FRT cell을 이용하여 동일한 발현 시스템 하에서 다양한 계열에

속하는 약물에 대한 human과 rat 종간의 OAT3 기능 차이를 보았다는 점에서 가치가 있다. 향후 이 시스템을 이용해 더 많은 약물들에 대한 OAT3 종간 차이에 대한 기초적인 연구 database 확보가 가능할 것이며, 나아가 종차가 크게 나는 약물들의 구조적 및 생리 화학적 특징에 대해 연구하여 약물 특징과 종간 차이의 연관성에 대한 정보를 얻을 수 있을 것이다. Transporter의 종간 기능 차이는 실험동물 연구결과로부터 인간에서의 약물 체내 동태 예측을 어렵게 만드는 요인 중 하나이다. 따라서 확보한 in vitro 종차 정보는 in vivo에서의 종간 차이 연구에 크게 기여할 수 있을 것이며 이는 약물개발 과정 전체의 효율을 낮출 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Chu, Xiao-Yan, et al. "Transport of the dipeptidyl peptidase-4 inhibitor sitagliptin by human organic anion transporter 3, organic anion transporting polypeptide 4C1, and multidrug resistance P-glycoprotein." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 321.2 (2007): 673-683.
2. Chu, Xiaoyan, Kelly Bleasby, and Raymond Evers. "Species differences in drug transporters and implications for translating preclinical findings to humans." *Expert opinion on drug metabolism & toxicology* 9.3 (2013): 237-252.
3. 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.
4. Dresser, Mark J., Maya Kaushal Leabman, and Kathleen M. Giacomini. "Transporters involved in the elimination of drugs in the kidney: organic anion transporters and organic cation transporters." *Journal of pharmaceutical sciences* 90.4 (2001): 397-421.
5. Duan, Peng, et al. "Potent inhibitors of human organic aniontransporters 1 and 3 from clinical drug libraries: discovery and molecular characterization." *Molecular pharmaceutics* 9.11 (2012): 3340-3346.
6. Giacomini, Kathleen M., et al. "Membrane transporters in drug development." *Nature reviews Drug discovery* 9.3 (2010): 215-236.

7. Giacomini, K. M., and S. M. Huang. "Transporters in drug development and clinical pharmacology." *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 94.1 (2013): 3–9.
8. Hasannejad, Habib, et al. "Interactions of human organic anion transporters with diuretics." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 308.3 (2004): 1021–1029.
9. Inotsume, N., et al. "The inhibitory effect of probenecid on renal excretion of famotidine in young, healthy volunteers." *The Journal of Clinical Pharmacology* 30.1 (1990): 50–56.
10. Keogh, J. P. "Membrane transporters in drug development." *Advances in pharmacology* (San Diego, Calif.) 63 (2011): 1–42.
11. Khamdang, Suparat, et al. "Interactions of human organic anion transporters and human organic cation transporters with nonsteroidal anti-inflammatory drugs." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 303.2 (2002): 534–539.
12. Khamdang, Suparat, et al. "Interactions of human- and rat-organic anion transporters with pravastatin and cimetidine." *Journal of pharmacological sciences* 94.2 (2004): 197–202.
13. Kusuhara, Hiroyuki, et al. "Molecular cloning and characterization of a new multispecific organic anion transporter from rat brain." *Journal of Biological Chemistry* 274.19 (1999): 13675–13680.
14. Lee, Woon, and Richard B. Kim. "Transporters and renal drug elimination." *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 44 (2004): 137–166.
15. Li, Meng, et al. "Identification of interspecies difference in efflux transporters of hepatocytes from dog, rat, monkey and human." *European journal of pharmaceutical sciences* 35.1

(2008): 114–126.

16. 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.

17. Ryoji Kojima et al, "Immunolocalization of Multispecific Organic Anion Transporters, OAT1, OAT2, and OAT3, in Rat Kidney", *JASN*, 2002, 13(4):848–857

18. Shiew-Mei Huang et al, "New Era in Drug Interaction Evaluation: US Food and Drug Administration Update on CYP Enzymes, Transporters, and the Guidance Process" , *The Journal of Clinical Pharmacology*, 2008, 48(6):662–670

19. Sweet, Douglas H., et al. "Impaired organic anion transport in kidney and choroid plexus of organic anion transporter 3 (Oat3 (Slc22a8)) knockout mice." *Journal of Biological Chemistry* 277.30 (2002): 26934–26943.

20. 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.

21. Takeda, Michio, et al. "Evidence for a role of human organic anion transporters in the muscular side effects of HMG-CoA reductase inhibitors." *European journal of pharmacology* 483.2 (2004): 133–138.

22. 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.
23. Windass, Amy S., et al. "The contribution of organic aniontransporters OAT1 and OAT3 to the renal uptake of rosuvastatin." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 322.3 (2007):1221–1227.
24. Zhu, Yanna, et al. "Organic anion transporters involved in the excretion of bestatin in the kidney." *Peptides* 33.2 (2012): 265–271.

Abstract

Study of functional differences between human and rat OAT3 (SLC22A8/*slc22a8*) in MDCK cells

Kyeongmin Kim

Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Objective. It is now increasingly clear that drug transporters represent crucial determinant in pharmacokinetics. Consistent with this, FDA recently proposed that drug–drug interaction (DDI) be studied for the 7 major transporters for new drugs. It is well known that there are interspecies differences in the function of transporters, which may potentially lead to the specie–difference in the pharmacokinetics (PK) between the animal and human. The purpose of this study is to document the difference in the function of between hOAT3 and rOat3 using in vitro system expressing the anion transporters.

Methods. Vectors incorporating human and rat OAT3 were transfected individually in MDCK/FRT cells and their expression

/ function is confirmed by RT-PCR and function study. In addition, K_m and V_{max} as measured by the transport of estrone-3-sulfate (E3S; i.e., a standard substrate of the transporter) were determined using nonlinear regression analysis (WinNonlin). Twenty-two drugs encompassing diverse classes were selected and their inhibitory ability on the uptake of E3S is evaluated. Inhibitory experiment was also carried out for the drugs showing significant difference in the inhibition between the function of human and rat OAT3.

Results. RT-PCR study showed the transfected MDCK cells stably expressed human and rat OAT3. When E3S was used as the substrate, the uptake were 4.59-fold and 6.64-fold higher in MDCK cells expressing human and rat OAT3, respectively, than that of corresponding control cell. This observation suggests that the stable cell lines are adequate for the function study for the human / rat form of OAT3. Calculated K_m and V_{max} value were $7.45 \pm 0.709 \mu\text{M}$, $39.3 \pm 1.78 \text{ pmol/mg protein/min}$ for hOAT3 and $14.7 \pm 4.13 \mu\text{M}$, $7.92 \pm 1.24 \text{ pmol/mg protein/min}$ for rOat3. Amongst the 22 drugs screened, 5 drugs (cephradine, diphenhydramine, furosemide, rifampicin, theophylline) showed significant differences in the inhibition of E3S uptake between hOAT3 and rOat3. To study the specie-difference in the function further, K_i values for hOAT3 and rOat3 were determined for those 5 drugs; It was found that K_i values of rOat3 were lower than those of hOAT3 for cephradine and theophylline, while K_i of hOAT3 was lower than that of rOat3 for furosemide. In particular, we noted that K_i value of rifampicin against rOat3 was $12.9 \mu\text{M}$ while the inhibition of hOAT3

function could not be measured for rifampicin. K_i value of diphenhydramine was not determined in this study.

Conclusion. This study showed that there is specie-difference of OAT3 between human and rat and the extent of the specie-difference was summarized by comparing the respective K_i values. Although similar screening may be necessary for the complete delineation of the underlying mechanism for the specie-difference, the in vitro system expressing the anion transporter from the human and rat form appeared useful in the study of the specie-difference of the function of the organic anion transporter 3.

Keywords : Drug transporters, OAT3, estrone-3-sulfate, DDI, interspecies differences, K_i

Student Number : 2014-25279