



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

Isolated rat hepatocytes에서 rat
Organic Anion Transporting
Polypeptide(OATP) 1b2 기질의
hepatic uptake에 관한 동태학적
성질에 대한 연구

Characterization of Kinetic Properties of the
Hepatic Uptake for rOatp1b2 Substrates in
Isolated Rat Hepatocytes

2017 년 2 월

서울대학교 대학원

약학과 약제과학 전공

편 원 지

국문초록

신약 개발 과정 중 약물동태학적 특성 평가에서 약물 수송체(Drug transporter)와 관련된 약물-약물 상호작용 (DDI) 연구의 필요성은 최근 지속적으로 증대되어 왔다. 여기에서 장관에서 흡수된 약물이 처음으로 도달하는 장기인 간에 존재하는 약물 수송체로 인한 약물상호작용의 연구가 특히 활발하다. Isolated rat hepatocyte는 in vitro to in vivo extrapolation 연구에 사용되는 실험계의 하나로 원래 약물의 대사를 예측하기 위해서도 사용되었으나, 최근에는 약물의 간 수송 평가에도 쓰이고 있다. 그런데, rat hepatocytes에서 약물의 수송 기질성 평가 screening은 보고된 바 있지만 공통기질이 되는 두 가지 이상의 약물에서 DDI의 in vivo 예측 가능성에 대한 정보는 미흡하였다. 본 연구에서는 in vitro 수준에서 간 수송의 DDI에 대한 기여도를 평가할 수 있는 isolated rat hepatocyte system을 구축하고, 모델 약물군에서 수송체 수준의 in vitro DDI 정보를 얻고자 하였다.

본 연구실의 선행 연구에서 국내 당뇨 신약인 lobeglitazone의 (이하 LB) 체내동태에 OATP1B1가 관련되어 있을 가능성이 알려졌으며 in vivo 연구에서 LB와 atorvastatin (이하 ATV)의 병용 투여 시 단독 투여에 비해 간으로 LB의 distribution이 억제되었다. 이와 관련하여 수행된 연구에서 in vitro 수준에서의 기질성을 확인하기 위해 MDCK/FRT cell-rOatp1b2 transfected cell line을 이용하여 연구하였을 때 LB가 이 수송체의 기질이 됨을 확인하였다. 본 연구에서 구축한 isolated rat hepatocyte system로 구한 LB의 K_m 값은 $16.3 \pm 10.0 \mu\text{M}$, V_{max} 값은 $637 \pm 384 \text{ pmol/min}/10^6 \text{ cells}$ 이었으며 K_i 값은 $0.600 \pm 0.206 \mu\text{M}$ 였다. 실제로 isolated rat hepatocytes에서 얻어진 동태학 변수로 예측한 in vivo 체내 동태는 비교적 실측치와 유사함을 확인하였다. 이 결과는 본 연구에서 구축한 isolated rat hepatocyte system이 in vivo 체내동태 예측에 유용함을 시사하였다. rOatp1b2의 기질로 이미 알려진 고지혈증 약인 statin계열과 고혈압약인 sartan계열의 약물이 대사성 질환을 가진

환자에게 병용 요법으로 자주 쓰이지만 이들 사이의 DDI가 있는지에 대한 여부는 잘 알려지지 않았다. 본 연구에서 isolated rat hepatocyte system의 유용성을 확인하였으므로 이 실험계에서 valsartan (이하 VST) 과 대표적인 statin인 atorvastatin, rosuvastatin, pravastatin 또는 simvastatin이 간에 수송 단계에서의 DDI가 있는지를 in vitro 조건에서 screening 하였다. 그 결과 4가지 statin 계 약물 중 rosuvastatin과 atorvastatin은 비교적 낮은 VST의 농도에서도 그 수송이 차단 (IC_{50} 값으로서 약 20 μM 이하) 됨을 알았으므로 VST과 rosuvastatin / atorvastatin이 같이 처방되었을 때 이들 간의 약물 상호작용을 검토해야 할 필요성이 있을 것으로 사료되었다.

주요어 : 약물수송체, rat hepatocytes, statin, 약물상호작용, K_i

학 번 : 2015-21906

목 차

국문초록	i
목차	iii
표 목차	v
그림 목차	vi
1. Introduction	1
1.1. Hepatocytes	1
1.2. Drug transporter	2
1.2.1 Rat Oatp1b2	2
1.3. Drug–drug interaction	2
1.4. In vitro screening system	3
2. Materials	5
3. Methods	9
3.1. Isolation of rat hepatocytes	9
3.1.1. Two–step collagenase perfusion	9
3.1.2. Trypan blue exclusion assay	9
3.1.3. Hepatocytes plated in collagen I–coated well plate	10
3.2. Confirmation of function of isolated rat hepatocyte system	11
3.2.1. Function study	11
3.3. Calculation of K_m , P_{dif} and V_{max} value of rat Oatp1b2 for lobeglitazone	13
3.4. Calculation of K_i of atorvastatin	15
3.5. Further study; Determination of IC_{50} values of valsartan for	

4 representative statins	16
4. Results	17
4.1. Confirmation of function of isolated rat hepatocyte system	17
4.2. Calculation of Km and Vmax value of lobeglitazone	18
4.3. Calculation of IC ₅₀ of atorvastatin	20
4.4. Further study; Determination of IC ₅₀ values of valsartan for 4 representative statins	21
5. Discussion & Conclusion	25
참고문헌	28
Abstract	31

표 목 차

표 1. Perfusion media 조성	6
표 2. Plating media 조성	7
표 3. Uptake media 조성	8
표 4. Inhibition screening study에 사용된 4가지 상용약물들	16
표 5. LB에 대한 K_m , V_{max} , PS 값	18
표 6. ATV의 IC_{50} 와 K_i	20
표 7. 4개 statin의 IC_{50} 값	21

그림 목 차

그림 1. Hepatocyte의 의미 및 구조	4
그림 2. Rat hepatocyte에 발현되어 있는 drug transporter	4
그림 3. Transporter uptake assay - Oil filtration method	12
그림 4. Isolated rat hepatocyte function study 결과	17
그림 5. Rat hepatocyte의 기질 LB 농도에 따른 수송속도 그래프 ..	19
그림 6. ATV 농도에 따른 LB의 % uptake	20
그림 7. Inhibitory experiment of atorvastatin and rosuvastatin ..	22
그림 8. Inhibitory experiment of simvastatin and pravastatin	23

1. Introduction

1.1. Hepatocyte

간은 인체의 여러 장기 중 가장 크기가 크고 다양한 기능을 하는 장기로서 특히 약물의 대사나 수송에 관여하는 다양한 CYP enzyme이나 drug transporter들이 발현되어 있어 체내로 흡수, 분포된 약물의 임상학적인 약물-약물 상호작용이 발생하는 주요 기관이다. [그림 1]에서와 같이 간의 구조를 자세히 보면 기본 단위인 lobule로 구성되어있는데 간의 70% 정도를 차지하고 있는 실질세포가 간세포(hepatocyte)이다. 간세포는 체내로 흡수된 물질이 first pass metabolism 동안 반응 할 수 있는 enzyme 요소들을 다 갖추고 있기 때문에 physiologically relevant한 모델을 제공하고 이러한 이유 때문에 hepatocyte가 drug discovery에서 많이 이용되고 있다.

1.2. Drug transporter

약물 생체막 수송체는 liver, brain, intestine, kidney 등 다양한 장기의 세포막에 발현되어 있는 단백질로서 약물과 같은 외인성 및 내인성 물질의 흡수, 분포, 대사, 배설에 관여한다. 따라서 약물 생체막 수송체의 기질이 되는 약물은 체내 동태에 영향을 받게 되고, 이는 약물의 안정성과 유효성 측면에서 중요한 결정인자가 될 수 있다. 또한 약물-약물 상호작용 (DDI)에도 관여한다는 많은 선행 연구 결과들이 밝혀짐으로써 약물 생체막 수송체의 기질, 억제제, 유도제 등의 약물동태학적 특성을 파악하는 것은 신약개발 전임상단계에서 신약개발 성공률을 증대시킬 뿐만 아니라 약물상호작용의 평가에도 중요하다. 미국 FDA에서 발행

한 약물상호작용 연구에 대한 guidance에서 신약개발과정에서 약물상호작용에 주요한 영향을 끼치는 7가지 transporter (P-gp, BCRP, OATP1B1, OATP1B3, OCT2, OAT1, and OAT3) 에 대한 평가를 하도록 권고하였다.

1.2.1 Rat Oatp1b2

Rat Oatp1b2(Organic anion transporting polypeptide 1b2)는 solute carrier family에 속하는 influx transporter로서 human의 OATP1B1과 1B3의 ortholog라고 추측되어지는 rat의 약물 생체막 수송체이다. 또 다른 명칭인 liver-specific transporter에서 알 수 있듯이 간의 hepatocyte에서만 발현되어 있고 basolateral membrane에 존재한다. rOatp1b2는 유기음이온의 간 분포 및 동태에 영향을 주는 것으로 밝혀져있으며 현재까지 알려진 rOatp1b2의 주요 기질로 HMG-CoA reductase inhibitor인 statin계, angiotensin II receptor antagonist인 sartan계, fexofenadine, rifampicin 등의 약물이 알려져 있는데 이 계열의 약물들은 빈번하게 병용 처방되는 약물이므로 약물 간에 일어날 수 있는 상호작용을 연구하여 약물의 안정성과 유효성에 영향을 미치는 정도를 고려해야한다.

1.3. Drug-drug interaction

임상에서 좀 더 좋은 치료효과를 내거나 복합적인 질병을 치료하기 위해 여러 약물들이 병용 처방되어 지는 경우가 많다. 이렇게 여러 약물이 동시에 투여되는 경우 약물 간에 약물상호작용(drug-drug interaction, DDI)이 나타날 가능성이 높아진다. 특히, 여러 약물이 약물 수송 과정에 있어서 특정 약물 생체막 수송체를 공유하게 된다면 약물 수송체 매개된

DDI가 나타나 그 약물들의 흡수나 배설에 영향을 미칠 수가 있다. Drug transporter의 영향을 많이 받거나 therapeutic index가 좁은 약물의 경우에는 DDI에 의한 약물의 안정성이나 유효성에 더 많은 변화를 야기할 수 있으므로 DDI에 관한 연구의 중요성이 최근 지속적으로 강조되고 있다.

1.4. In vitro screening system – Isolated rat hepatocyte system

신약개발 과정 중 임상단계로 진행하기에 앞서 임상 시험에서의 위험성을 줄이면서 시간적, 경제적으로 효율적인 개발을 위하여 전임상단계에서는 in vitro와 in vivo 수준의 다양한 평가가 시행되어야한다. In vitro 수준에서의 약물상호작용에 대한 평가를 표준화되고 재현성 있는 screening system을 이용한다면 in vivo에서의 정보를 예측하거나 적용할 수 있다. 특히 isolated rat hepatocyte는 in vitro to in vivo extrapolation 연구에 사용되는 실험계의 하나로 원래 약물의 대사를 예측하기 위해서도 사용되었으나, 최근에는 약물의 간 수송 평가에도 쓰이고 있다.

따라서 본 연구에서는 rat에서 직접 hepatocyte를 분리하여 사용하는 in vitro screening system을 구축하였고, 이를 이용해 cell line을 이용하는 in vitro system보다 좀 더 in vivo system에 가까운 환경의 system으로 간에서의 약물 수송체와 관련된 in vitro DDI 정보를 얻고자 하였다.

그림 1.

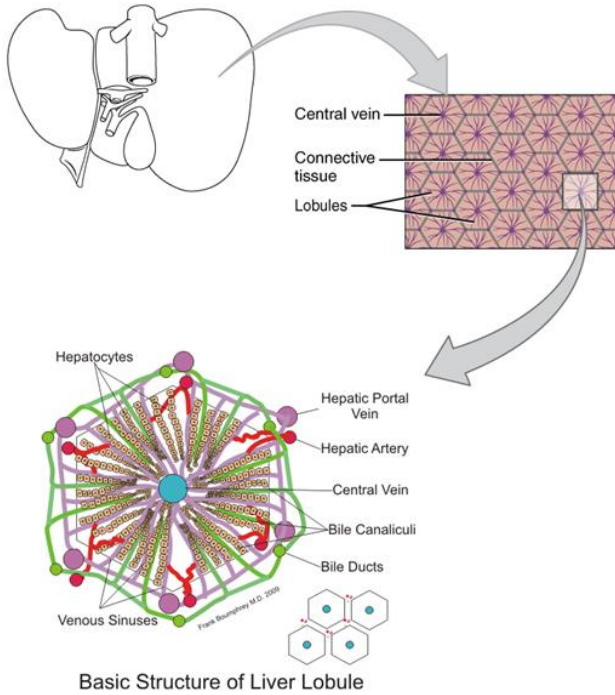


그림 2.

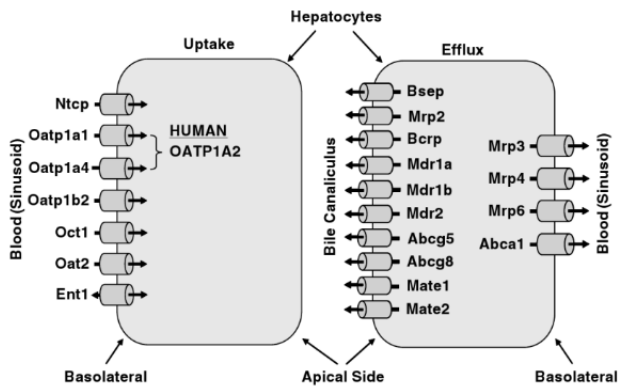


FIGURE 20.1. Cellular localization and transport direction of known transporters in liver. Uptake transporters from sinusoidal blood are depicted in the hepatocyte on the left. Efflux transporters in the sinusoidal (basolateral) or canalicular (apical) membrane are shown in the hepatocyte on the right.

2. Materials

2.1. Isolation of rat hepatocytes

2.1.1. Animals

실험에는 250–300g 수컷 Sprague–Dawley rat이 사용되었으며, 오리엔트바이오(경기도, 대한민국)에서 구입하였다. 본 연구에서 진행된 동물 실험은 서울대학교 동물실험윤리위원회의 규정을 준수하였다. 수컷 SD rat는 50mg/kg tiletamine HCl/zolazepam HCl (Zoletil 50[®]; Virbac Laboratories)과 10mg/kg xylazine HCl (Rompun[®]; Bayer Corp)를 근육주사로 투여하여 마취하였다.

2.1.2. Two–step collagenase perfusion

Peristaltic pump (Longo Pump)

Collagenase type4 (Worthington, Sigma)

CaCl₂ (Sigma)

20G catheter (Beckton–Dickinson)

Cotton ball (DAE HAN medical)

Specimen cup (SPL life sciences)

Sterile 50 mesh (280 μm sieve) (Bellco Glass)

Perfusion media (전체 1 L, 표 1)

Materials	Mass / Volume	제조사
Ca ²⁺ /Mg ²⁺ Free-Hank's Balanced Salts (HBSS)	9.5 g	Sigma
NaHCO ₃	0.35 g	

표 1. Perfusion media 조성

2.1.3. Trypan blue exclusion assay

0.4% Trypan blue solution (Sigma)

Hemocytometer (Hausser Scientific)

2.1.4. Hepatocytes plated in collagen I-coated well plate

Collagen type I solution (Sigma)

30% EtOH (Sigma)

24 well plate (Corning)

Plating media (전체 1 L, 표2)

Material	Mass / Volume	제조사
Williams' medium E	10.8 g	Sigma
Insulin-Transferrin-Selenite liquid media supplement	60 μ l	
Penicillin-streptomycin	10 ml	Welgene
Fetal Bovine Serum	100 ml	

표 2. Plating media 조성

2.1.5. Function study

[³H] Estradiol 17-d-glucuronide (PerkinElmer)

Silicon oil, Mineral oil (Sigma)

2 N NaOH (Welgene)

Ultima Gold LSC-cocktail (Packard bioscience)

Krebs-Henseleit buffer (KHB, Uptake media, 전체 1 L, 표 3)

Materials	Mass	제조사
Krebs–Henseleit buffer	9.6 g	
CaCl ₂	0.373 g	Sigma
NaHCO ₃	2.1 g	

표 3. Uptake media 조성

2.2. Uptake transporter assay

DPBS (Welgene)

Dimethyl sulfoxide (Sigma)

Bovine serum albumin (Sigma)

Sodium dodecyl sulfate (GeorgiaChem)

Substrate ;

Lobeglitazone (Chong Kun Dang Pharmaceuticals)

Atorvastatin, Simvastatin, Valsartan (Tokyo Chemical Industries)

Pravastatin (Sigma)

Rosuvastatin (한국유나이티드제약)

2.3. LC–MS/MS analysis

Acetonitrile (Fisher Scientific)

Formic acid (Sigma)

Glipizide (Sigma)

3. Methods

3.1. Isolation and plating of rat hepatocytes

3.1.1. Two-step collagenase perfusion

마취된 rat을 개복하여 portal vein에 20G catheter로 삽관한 후 peristaltic pump를 이용하여 perfusion media를 20 mL/min의 속도로 5분간 전관류 시킨다. 이 때, media는 37도가 유지되도록 항온조에 넣어 주고 carbogen gas(O₂ 95%/CO₂ 5%)를 녹여준다. 그 후 50 mM CaCl₂와 0.5 mg/mL collagenase type 4를 포함하는 perfusion media를 같은 속도로 10분간 전관류 시킨다. 간을 적출하여 perfusion media에 풀어준 뒤 sterile 50 mesh로 걸러진 cell suspension을 50g에서 5분 동안 centrifuge하였다. 상층액을 제거하고 남은 cell pellet은 KHB로 풀어준 뒤 50g에서 5분 동안 centrifuge하여 wash 하였다.

3.1.2. Trypan blue exclusion assay

위의 3.1.1까지의 과정으로 얻어진 cell pellet을 KHB에 풀어주고 이 cell suspension을 trypan blue solution 500 μ l과 KHB 300 μ l가 섞인 solution에 100 μ l를 넣어 5분 동안 incubation하였다. (희석배수 9) 이 solution에서 10 μ l를 hemacytometer에 옮겨 cover-slip으로 덮어준다. 현미경으로 stained(dead) cell과 unstained(viable) cell을 관찰하여 각각의 cell수를 세어 cell viability를 확인하고 1×10^6 viable cells/ml의 농도가 되도록 plating media로 희석하였다. 매 실험마다 cell viability가 80%이상인 것을 확인하고 이용하였다.

3.1.3. Hepatocytes plated in collagen I-coated well plate

본 실험 하루 전 clean banch에서 24 well plate에 30% EtOH과

collagen I solution을 25:1의 부피비율로 희석하고 이 solution을 각 well당 200 μ l를 넣어 overnight 동안 말려 coating하였다. Coating된 24 well plate에 위의 3.1.2 과정에서 얻어진 cell suspension을 500 μ l/well로 seeding하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 조건의 incubator에 4~6시간동안 incubation하여 cell을 부착시킨 후 현미경으로 이를 확인하였다.

3.2. Confirmation of function of isolated rat hepatocyte system

3.2.1. Function study

rOatp1b2의 모델 기질로 [³H] Estradiol 17-d-glucuronide(EG)의 세포내 uptake 수송능력을 시험하여 isolated rat hepatocyte에 발현되어 있는 rOatp1b2의 작동을 확인하였다. 수송체와 매개된 수송 과정은 온도에 민감하기 때문에 체내 온도 조건인 37°C에서 진행하여 active transport를 확인하였고 passive diffusion은 온도에 덜 민감한 과정이기 때문에 4°C 온도 조건에서 실험을 진행하여 uptake 수송능력의 대조군으로서 비교하였다. 먼저 [그림 3]에서와 같이 튜브에 cell을 lysis 할 수 있는 2N NaOH 100 μ l를 밑에 깔고 silicon oil과 mineral oil을 74.5:25.5의 부피비율로 mix된 oil 100 μ l를 layering 하였다. 위의 3.1.1의 과정에서 얻어진 cell suspension은 5×10^4 viable cells/well의 농도가 되도록 24 well에 넣어 두 가지 온도 조건을 유지 해주었다.

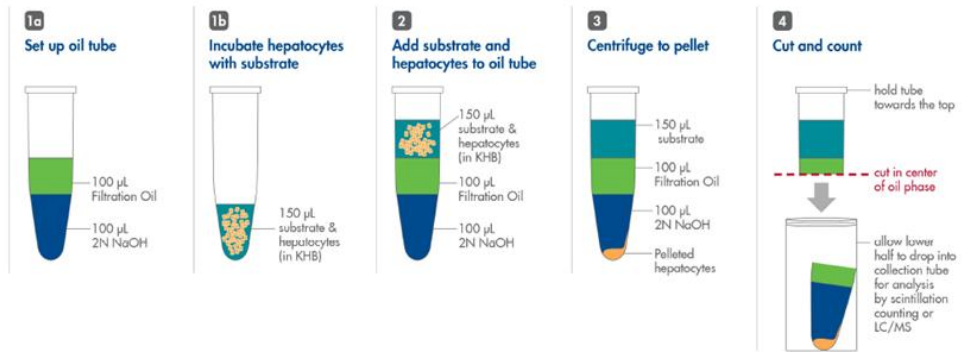
방사성 물질인 [³H] Estradiol 17-d-glucuronide를 hot substrate로 하여 cold substrate (EG)의 1%가 되도록 uptake media에 녹여 최종 EG는 1 μ M이 되게 하였다.

각 well에 담겨있는 cell suspension에 준비된 약물을 well 당 150 μ l 넣고 37°C, 4°C에서 0.25, 0.5, 1, 2분 incubation 후 cell suspension 150 μ l을 앞서 만들어놓은 튜브 상층으로 옮긴 후 13000rpm으로 30초 동안 centrifuge하여 2 N NaOH 층으로 cell이 내려간 것을 확인하였다. 이와 같은 상태로 overnight하여 cell이 충분히 lysis되도록 하였다. 그 후 oil층 중간을 칼로 cutting하여 튜브의 밑 부분만을 vial에 넣고 ultima gold liquid scintillation fluid 1 ml 가하여 섞은 후 liquid scintillation counter를 이용하여 시료의 dpm 값을 측정하였다. dpm 값으로부터 환산한 pmole을 BCA assay를 수행하여 구한 mg protein으로

보정하였다.

그림 3.

Diagram of Assay Set-up



3.3. Calculation of K_m , P_{dif} and V_{max} value of rat Oatp1b2 for lobeglitazone

위의 3.1.3까지의 과정으로 isolated rat hepatocyte가 plate에 잘 부착이 되었는지 확인한 후 각 well에 담겨있는 배지를 제거하고 well마다 prewarmed DPBS 400 μ l로 2회 wash 한 후 bovine serum albumin (이하 BSA) 5 μ M이 포함된 uptake media를 400 μ l 넣고 각각 37 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C에서 10분 동안 pre-incubation하였다. 이후 uptake media를 제거하고, lobeglitazone(LB)를 6가지 농도 (0.5, 1, 2, 5, 10, 20 μ M)로 n=3로 하여 각 well 당 200 μ l씩 처리하고 37 $^{\circ}$ C, 4 $^{\circ}$ C에서 incubation하였다. 이 때 incubation time은 사전에 incubation time-수송속도 실험을 수행하여 수송속도가 plateau에 도달하기 전인 2분으로 하였다. 0.1% (w/v) BSA가 포함된 cold DPBS 400 μ l로 수송을 중단시킨 후 2회 wash하고 BSA가 포함되지 않은 cold DPBS로 한 번 더 wash하였다. 0.1% (w/v) SDS 200 μ l를 넣고 30분간 shaking하여 cell을 lysis하고 이 중 100 μ l의 lysate에 internal standard(IS)인 glipizide(100 ng/mL)가 포함된 ACN 200 μ l를 넣고 vortex하였다. LC-MS/MS로 측정된 LB의 pmole 값은 BCA assay로 구한 protein 농도를 mg protein/mL과 10^6 hepatocytes 사이의 관계식을 이용해 구한 cell수로 보정해준다 (i.e., mg protein/mL=0.600 $\times 10^6$ cells-0.0072, $r^2=0.998$). 그리고 incubation time인 2분으로 나누어 10^6 cells 당 수송속도(pmol/ 10^6 cells/min)를 계산하였다. K_m , V_{max} 값은 nonlinear regression analysis (WinNonlin)로 기질 농도에 대한 수송속도 곡선으로부터 계산되었다. 사용한 식은 다음과 같다. 식에서 P_{dif} 는 4 $^{\circ}$ C 결과에서 transporter를 매개하지 않고 기질이 세포 내로 수송되는 경로에 대한 상수이다.

$$4^{\circ}\text{C의 경우} : v = P_{dif} \times [S]$$

$$37^{\circ}\text{C의 경우} : v = \frac{V_{\max} \times K_m}{K_m + [S]}$$

[S] : 기질의 농도 (μM)

v : 기질 수송 속도 ($pmol/10^6 cells/min$)

3.4. Calculation of K_i of atorvastatin

본 연구에서 확보한 isolated rat hepatocyte system을 이용해 기질로써 LB와 inhibitor로써 고농도 atorvastatin(ATV)을 co-incubation하여 rOatp1b2에 관한 기질 수송 억제능을 평가하였다. 기질 LB 10 μM 를 7가지 농도(0.0003, 0.003, 0.03, 0.3, 3, 30, 100 μM)의 ATV과 함께 총 200 μl 가 되게 하여 각 well 당 처리하였다. 각 농도마다 n=3로 하여 3.3.에서 기술한 방법으로 실시하였고 이 때 inhibitory effect를 좀더 확실히 보기위하여 pre-incubation단계에서 ATV을 농도별로 60분간 처리하였다. 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 IC_{50} 값을 구하였다. IC_{50} 값의 추정은 Winnonlin 프로그램을 이용하였다.

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

앞서 구한 K_m , IC_{50} 값을 다음 식에 적용하여 K_i 값을 구하였으며 $f_{u,ATV}$ 와 $f_{u,LB}$ 값은 본 연구실의 선행연구에서 참고하였다.

$$K_i = \frac{IC_{50} \times f_{u,ATV}}{1 + \frac{[S] \times f_{u,LB}}{K_m}}$$

3.5. Further study; Determination of IC₅₀ values of valsartan for 4 representative statins

rOatp1b2의 대표적인 기질인 statin계 약물(atorvastatin, rosuvastatin, pravastatin, simvastatin)과 valsartan에 대해 수송체와 관련된 DDI를 보기 위해 추가적인 inhibitory experiment를 수행하였다. Inhibitor로써 valsartan은 7가지 농도 (0.01~0.1, 1, 3, 10, 30, 100~300 μ M)로 하였고 기질로써 statin을 같이 처리하여 3.4.에서 기술한 방법으로 수행하여 IC₅₀값을 구하였다. 다만 BSA의 사용은 이 실험에서 하지 않았으며 inhibitory effect를 좀 더 확실하게 보기위하여 pre-incubation단계에서 valsartan을 농도별로 30분간 처리하였다. 4가지 statin의 처리 농도는 다음과 같다. (표 4)

약물	처리 농도 (μ M)
Atorvastatin	2
Rosuvastatin	2
Pravastatin	4
Simvastatin	4

표 4. Inhibition screening study에 사용된 4가지 상용약물들

4. Result

4.1. Confirmation of function of isolated rat hepatocyte system

Uptake transporter assay를 진행하여 isolated rat hepatocyte의 약물 생체막 수송체를 기능적으로 평가해 보았다. 실험 결과, 모델 기질인 EG 1 μM 를 처리하였을 때, 4°C 조건일 때 비해 37°C 조건에서 incubation time에 따라서는 모델 기질을 유의하게 높은 수준으로 uptake함을 확인할 수 있었고 그 중 incubation time이 2분일 때 4°C 조건일 때 비해 37°C 조건에서 약 5.23배로 높은 수준의 기질 수송을 보였다. (그림 2) 따라서 rat hepatocyte를 분리하는 방법을 확립하고 function test를 통해 transporter의 기능을 확인함으로써 in vitro system을 확보하였다.

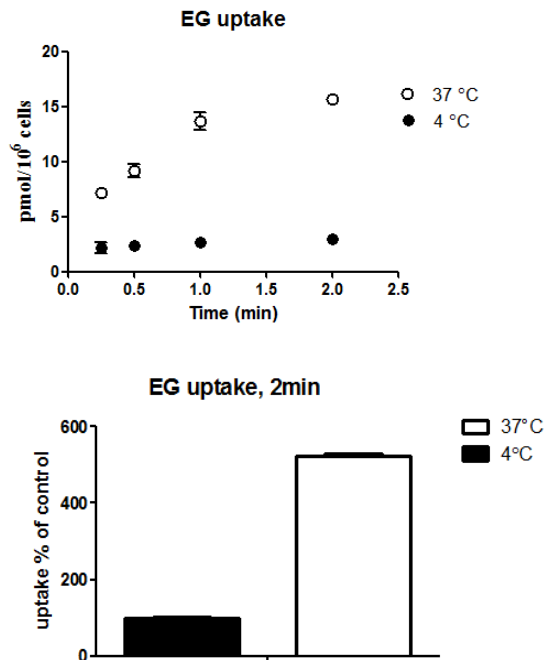


그림 4. Isolated rat hepatocyte function study 결과

4.2. Caculation of Km and Vmax value of lobeglitazone

완성된 isolated rat hepatocyte system을 이용해 LB에 대한 Km과 Vmax 값을 구하기 위해 기질 농도에 따른 기질수송속도를 측정하였다. (그림 4) Nonlinear regression analysis (Winnonlin)을 이용해서 구한 parameter들의 값은 표 5와 같다.

Parameters	평균
K_m (μM)	16.3 ± 10.0
V_{max} ($pmol/min/10^6 cells$)	637 ± 384
PS ($\mu l/min/10^6 cells$)	21.0 ± 6.03

표 5. LB에 대한 K_m , V_{max} , PS 값 (in triplicate runs)

LB에 대한 K_m , V_{max} , PS 값은 각각 $16.3 \pm 10.0 \mu M$, $14.7 \pm 4.13 pmol/min/10^6 cells$, $21.0 \pm 6.03 \mu l/min/10^6 cells$ 을 보였다. 각각의 parameter값들은 세 번의 반복실험을 통해 평균값과 SD값을 구한 것이며, 본 연구실의 in vivo 연구에 이 kinetic parameter들을 적용하여 in vivo 체내 동태를 예측하는데 사용되었다. (Yim et al., 2017)

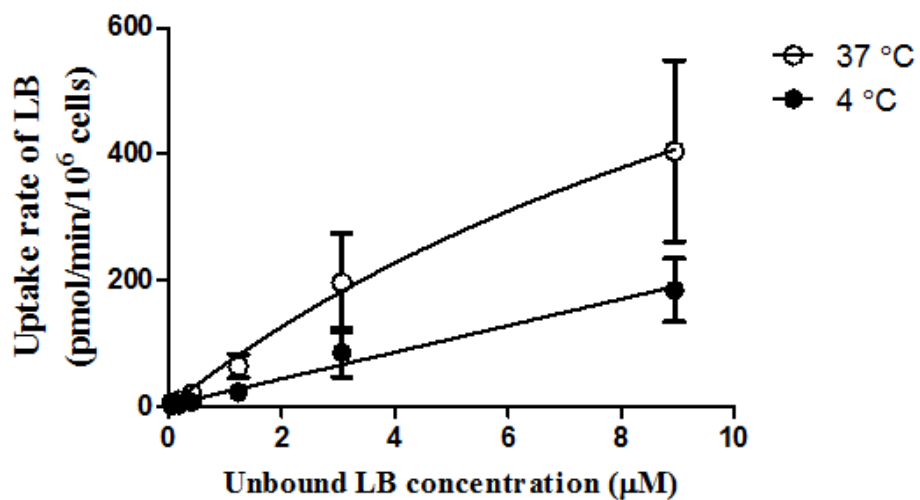


그림 5. Rat hepatocyte의 기질 LB 농도에 따른 수송속도 그래프

4.3. Calculation of IC₅₀ of atorvastatin

본 연구에서 구축한 isolated rat hepatocyte를 이용하여 기질인 LB의 농도는 10 μM로 고정하고 ATV를 다양한 농도 범위로 처리하여 inhibition study를 진행하였다.

실험 결과, sigmoid한 inhibition을 나타내었고 Winnonlin 프로그램을 이용해서 IC₅₀값을 구하였다. (그림 5, 표 6)

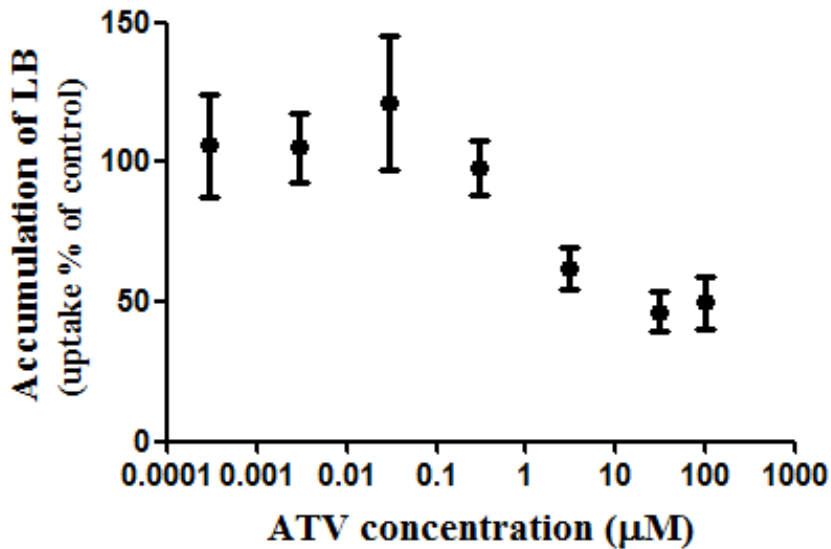


그림 6. ATV 농도에 따른 LB의 % uptake

Parameters	평균
IC ₅₀ (μM)	1.21 ± 0.416
K _i (μM)	0.600 ± 0.206

표 6. ATV의 IC₅₀와 K_i (in triplicate runs)

위의 구해진 IC_{50} 값은 세 번의 반복실험을 통해 평균값과 SD 값을 구한 것이며, 3.4에서 제시한 식에 IC_{50} 값을 적용하여 K_i 값을 구하였다.

4.4. Further study; Determination of IC_{50} values of valsartan for 4 representative statins

4개 약물에 대해 inhibitory experiment를 수행하여 IC_{50} 값을 계산하였다. 그 중 atorvastatin과 rosuvastatin에서는 sigmoid한 inhibition을 나타내어 IC_{50} 값을 구할 수 있었고 나머지 약물들에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않아 IC_{50} 값을 구할 수 없었다. (그림 6, 그림 7, 표 7)

Drug	IC_{50} (μ M)
Atorvastatin	10.6 ± 6.76
Rosuvastatin	18.3 ± 9.35
Pravastatin	—
Simvastatin	—

표 7. 4개 statin의 IC_{50} 값

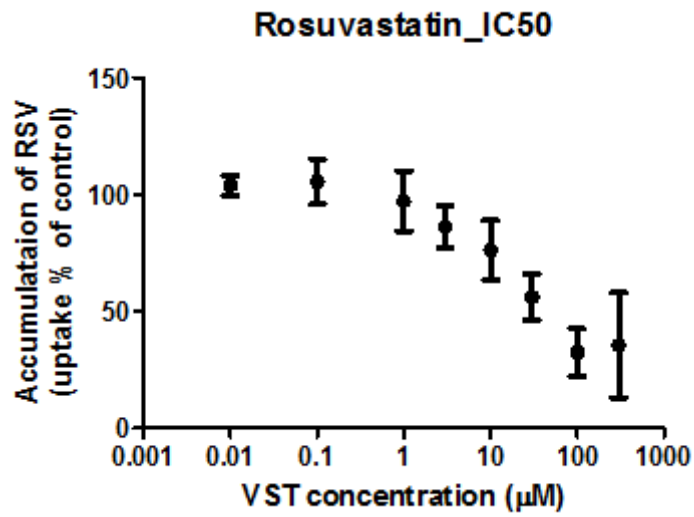
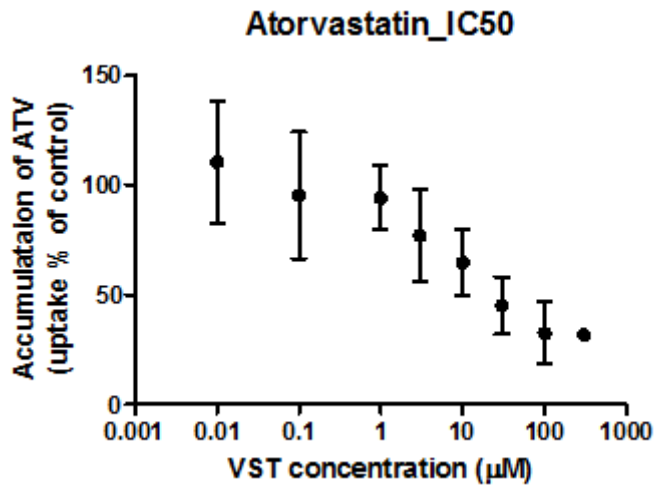


그림 7. Inhibitory experiment of atorvastatin and rosuvastatin

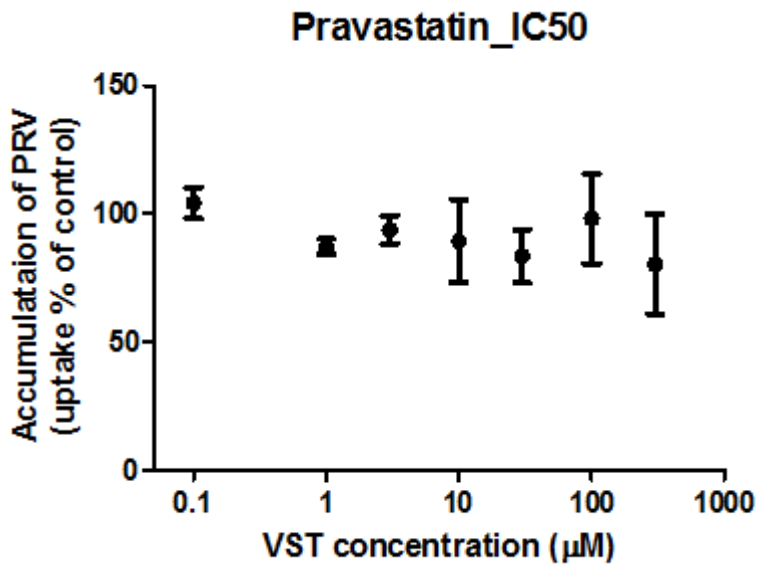
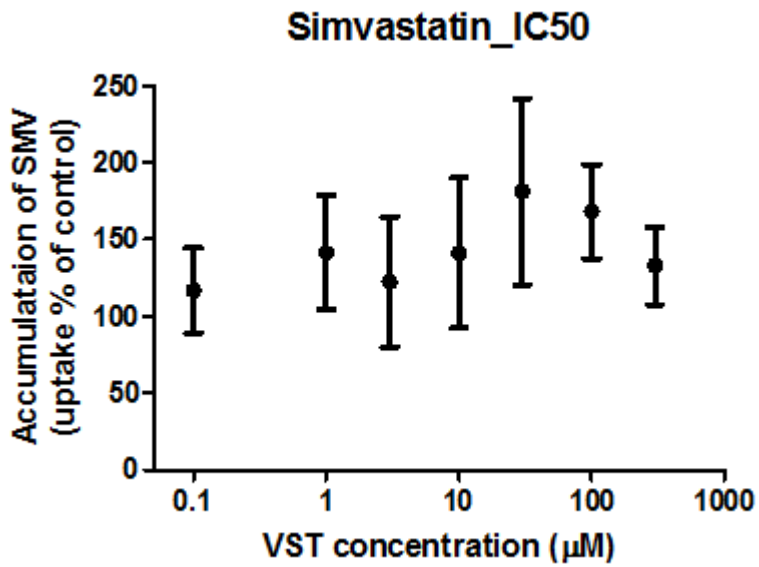


그림 8. Inhibitory experiment of simvastatin and pravastatin

Simvastatin은 sigmoid한 curve를 나타내지 않았을 뿐 아니라 valsartan을 처리하지 않은 군에 비해 100%가 넘는 accumulation이 보여 BSA가 포함된 uptake media를 이용하여 같은 실험을 시행하였지만 마찬가지로 inhibitory effect는 보이지 않았다. (data not shown)

본 실험에서 구한 atorvastatin과 rosuvastatin의 IC_{50} 값과 문헌치의 K_m 을 참고하여 다음 식을 이용해 K_i 값을 구해보면 각각 $7.31 \pm 5.32 \mu\text{M}$, $14.9 \pm 8.51 \mu\text{M}$ 으로 비교적 낮은 K_i 값을 가짐을 예측할 수 있다.

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

5. Discussion & Conclusion

본 연구에서는 FDA 지정 주요 7개 transporter 중 하나인 OATP1B1의 기질이 되는 약물의 약물-약물 상호작용(DDI)과 관련된 동태학적 성질에 관한 연구를 하였다. Human의 OATP1B1과 ortholog라 추측되어지는 rat에서의 Oatp1b2는 간에서만 specific하게 발현되는 약물수송체로 이 수송체의 기질이 되는 약물은 간에서의 동태학적인 성질에 Oatp1b2가 관여될 것으로 추측할 수 있을 것이다. 특히 체내로 흡수된 대부분의 약물은 hepatocyte에서 CYP enzyme등에 의해 hepatic metabolism을 겪게 되고 또한 대부분의 clinical한 DDI가 나타나는 곳도 hepatocyte이다. 이렇듯 hepatocyte는 compound가 first pass metabolism 동안 만날 수 있는 enzyme 요소들을 갖추고 있기 때문에 transfection을 통해 만들어진 cell line보다 좀 더 physiologically relevant한 in vitro 모델로써 제공하여 hepatocyte가 실제로 drug discovery 단계에서 많이 이용되고 있다. 즉, hepatocyte는 DDI를 연구하거나 나아가 in vitro system에서 in vivo system으로 extrapolation 할 수 있는 실험계로써의 choice가 될 수 있으며 간에서만 발현되는 Oatp1b2와 관여된 DDI를 연구하는데 적당한 실험계가 될 것이라 생각하여 rat hepatocyte를 이용하여 연구를 하였다.

기존에 구축되어있는 방법을 이용하여 rat에서 직접 hepatocyte을 isolation하여 in vitro screening system으로 이용하였다. Isolated rat hepatocyte system에서 cell viability가 항상 80% 이상임을 확인하였고 function test 결과 대조군에 비해 대표 기질인 ED를 높은 수준으로 uptake하는 것으로 보아 이 시스템의 transporter에 대한 기능적 확인과 반복 실험을 통해 재현성을 확인 할 수 있었다.

rOatp1b2의 기질임을 선행 연구에서 확인한 lobeglitazone을 이용하여 uptake study를 진행한 결과 연구에서 lobeglitazone의 K_m , V_{max} , 그리고

P_{dif} 값은 각각 $16.3 \pm 10.0 \mu\text{M}$, $637 \pm 384 \text{ pmol/min}/10^6\text{cells}$ 그리고 $21.0 \pm 6.03 \mu\text{l/min}/10^6\text{cells}$ 이며, 수송속도 단위에서 10^6cells 은 BCA assay로 구한 단백질 양 mg protein과 세포 수와의 비례식을 이용하여 환산된 세포 수로 보정한 것이다. 여기서 구해진 값들을 실제로 in vivo 체내 동태를 예측하는데 사용하였고 그 결과 비교적 실측치와 유사함을 확인하였다. 따라서 본 연구에서 구축한 isolated rat hepatocyte system이 in vitro to in vivo extrapolation 연구에 유용함을 시사하였다.

나아가 이 in vitro system을 이용하여 두 약물 lobeglitazone과 atorvastatin 간에 transporter와 관련된 DDI를 보기위해 inhibition screening study를 진행하였다. 이 과정에서 lobeglitazone과 atorvastatin의 약물 특성상 plasma protein에 매우 높게 binding할 뿐만 아니라 (i.e., 각각의 $f_{u,plasma}$ 값은 0.00267 그리고 0.0567, Yim et al., 2017) non-specific한 binding이 존재하기 때문에 incubation media와 wash buffer에 BSA를 각각 $5 \mu\text{M}$ 와 0.1% (w/v) 농도로 추가하여 기존의 cell uptake method보다 세포 표면이나 실험적 도구에서 나타날 수 있는 non-specific한 binding을 줄이고자 하였다(Takeuchi et al., 2011).

이러한 실험법을 적용하여 두 가지 약물을 병용 처리하였을 때 구해진 atorvastatin의 K_i 값은 $0.600 \pm 0.206 \mu\text{M}$ 였고 이 값은 꽤 낮은 농도의 atorvastatin으로도 lobeglitazone의 uptake를 inhibition 할 수 있음을 의미한다. 또한 실제로 isolated rat hepatocytes에서 얻어진 kinetic parameter(K_m , V_{max} , P_{dif})로 예측한 in vivo 체내 동태는 비교적 실측치와 유사함을 확인하였다. 이 결과는 본 연구에서 구축한 isolated rat hepatocyte system이 in vivo 체내동태 예측에 유용함을 시사하였다.

추가적으로 이 system을 이용하여 rOatp1b2의 기질로 이미 알려진 고지혈증약인 statin계열과 고혈압약인 sartan계열을 병용 처리하여 약물 수송체와 매개된 DDI를 연구하였다. 실제로 이러한 약물들은 임상에서

대사성 질환을 가진 환자에게 대표적인 병용 요법으로 흔히 쓰이지만 이들 사이의 DDI가 있는지에 대한 여부는 잘 알려져 있지 않기 때문에 본 연구에서 유용성을 확인한 isolated rat hepatocyte system을 통해 DDI를 확인하고자 한 것이다. 이 실험계에서는 sartan계열 중 약물 수송체에 대한 기질성이 높다고 알려진 valsartan과 대표적인 statin인 atorvastatin, rosuvastatin, pravastatin 또는 simvastatin을 약물로 선정하여 간으로의 수송 단계에서 DDI가 있는지를 in vitro 조건에서 screening 하였다. 기질로써 valsartan과 저해제로써 4가지 statin을 7가지 농도로 처리하였고 그 결과 winnonlin software를 통해 모델을 설정하여 fitting한 후 IC₅₀값을 구하였다. 그 결과 4가지 statin 계 약물 중 rosuvastatin과 atorvastatin은 비교적 낮은 valsartan의 농도에서도 그 수송이 inhibition 됨을 확인할 수 있었고 나머지 pravastatin과 simvastatin에서는 그러한 경향이 보이지 않았다. Atorvastatin과 rosuvastatin의 IC₅₀ 값이 각각 10.6 ± 6.76 μM, 18.3 ± 9.35 μM로 atorvastatin이 좀 더 약물 수송체에 대한 친화력이 높을 것으로 판단되고 둘 다 20 μM 이하의 값을 나타냄으로써 기질인 동시에 저해제로써 Oatp1b2에 대한 약물상호작용 가능성을 갖고 있다고 보여진다. 또한 valsartan과 rosuvastatin / atorvastatin이 같이 처방되었을 때 이들 간의 약물 상호작용을 검토해야 할 필요성이 있을 것으로 사료된다.

본 실험을 통해 결론적으로 Oatp1b2와 매개된 약물상호작용을 in vitro에서 평가할 수 있는 system으로써 rat hepatocyte을 직접 isolation하였고 이를 통해 신약개발의 초기단계에 후보물질들의 DDI 평가에 이용될 수 있을 것이라 기대된다.

참 고 문 헌

1. Amundsen, Rune, et al. "Cyclosporine A, but not tacrolimus, shows relevant inhibition of organic anion-transporting protein 1B1-mediated transport of atorvastatin." *Drug Metabolism and Disposition* 38.9 (2010): 1499-1504.
2. Di, Li, et al. "In vitro-in vivo correlation for low-clearance compounds using hepatocyte relay method." *Drug Metabolism and Disposition* 41.12 (2013): 2018-2023.
3. Gertz, Michael, et al. "Prediction of human intestinal first-pass metabolism of 25 CYP3A substrates from in vitro clearance and permeability data." *Drug Metabolism and Disposition* 38.7 (2010): 1147-1158.
4. Hirano, Masaru, et al. "Contribution of OATP2 (OATP1B1) and OATP8 (OATP1B3) to the hepatic uptake of pitavastatin in humans." *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 311.1 (2004): 139-146.
5. Izumi, Saki, et al. "Investigation of the impact of substrate selection on in vitro organic anion transporting polypeptide 1B1 inhibition profiles for the prediction of drug-drug interactions." *Drug Metabolism and Disposition* 43.2 (2015): 235-247.
6. Jiménez-Castro, M. B., et al. *Experimental Models in Liver Surgery*. INTECH Open Access Publisher, 2013.
7. Jung, Jin Ah, et al. "Pharmacokinetic interaction between pitavastatin and valsartan: a randomized, open-labeled crossover study in healthy male Korean volunteers." *Clinical therapeutics* 34.4 (2012): 958-965.

8. Karlgren, Maria, et al. "Classification of inhibitors of hepatic organic anion transporting polypeptides (OATPs): influence of protein expression on drug-drug interactions." *Journal of medicinal chemistry* 55.10 (2012): 4740–4763.
9. Klaassen, Curtis D., and Hong Lu. "Xenobiotic transporters: ascribing function from gene knockout and mutation studies." *Toxicological sciences* 101.2 (2008): 186–196.
10. Kotani, Naoki, et al. "Culture period-dependent changes in the uptake of transporter substrates in sandwich-cultured rat and human hepatocytes." *Drug Metabolism and Disposition* 39.9 (2011): 1503–1510.
11. Kunze, Annett, et al. "Prediction of organic anion-transporting polypeptide 1B1-and 1B3-mediated hepatic uptake of statins based on transporter protein expression and activity data." *Drug Metabolism and Disposition* 42.9 (2014): 1514–1521.
12. Lau, Yvonne Y., et al. "Pharmacokinetics of atorvastatin and its hydroxy metabolites in rats and the effects of concomitant rifampicin single doses: relevance of first-pass effect from hepatic uptake transporters, and intestinal and hepatic metabolism." *Drug metabolism and disposition* 34.7 (2006): 1175–1181.
13. Lee, Jong-Hwa, et al. "Kinetics of the Absorption, Distribution, Metabolism, and Excretion of Lobeglitazone, a Novel Activator of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma in Rats." *Journal of Pharmaceutical sciences* 104.9 (2015): 3049–3059.
14. McTaggart, Fergus, et al. "Preclinical and clinical pharmacology of rosuvastatin, a new 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor." *The American journal of cardiology* 87.5 (2001): 28–32.

15. Neuvonen, Pertti J., Janne T. Backman, and Mikko Niemi. "Pharmacokinetic comparison of the potential over-the-counter statins simvastatin, lovastatin, fluvastatin and pravastatin." *Clinical pharmacokinetics* 47.7 (2008): 463–474.
16. Poirier, Agnès, et al. "Prediction of pharmacokinetic profile of valsartan in human based on in vitro uptake transport data." *Journal of pharmacokinetics and pharmacodynamics* 36.6 (2009): 585–611.
17. Shitara, Yoshihisa, Kumiko Takeuchi, and Toshiharu Horie. "Long-lasting inhibitory effects of saquinavir and ritonavir on OATP1B1-mediated uptake." *Journal of pharmaceutical sciences* 102.9 (2013): 3427–3435.
18. Soars, Matthew G., et al. "The pivotal role of hepatocytes in drug discovery." *Chemico-biological interactions* 168.1 (2007): 2–15.
19. Umehara, Ken-ichi, and Gian Camenisch. "Novel in vitro-in vivo extrapolation (IVIVE) method to predict hepatic organ clearance in rat." *Pharmaceutical research* 29.2 (2012): 603–617.
20. Yabe, Yoshiyuki, Aleksandra Galetin, and J. Brian Houston. "Kinetic characterization of rat hepatic uptake of 16 actively transported drugs." *Drug Metabolism and Disposition* 39.10 (2011): 1808–1814.
21. Yim, et al. "Specific Inhibition of the Distribution of Lobeglitazone to the Liver by Atorvastatin in Rats: Evidence for an rOATP1B2-Mediated Interaction in Hepatic Transport." *Drug Metabolism and Disposition* (2017): dmd-116.
22. Zhang, Aijie, et al. "Involvement of organic anion-transporting polypeptides in the hepatic uptake of dioscin in rats and humans." *Drug Metabolism and Disposition* 41.5 (2013): 994–1003.

Abstract

Characterization of Kinetic Properties of the Hepatic Uptake for rOatp1b2 Substrates in Isolated Rat Hepatocytes

Wonji Pyeon

Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy

The Graduate School

Seoul National University

Objective. A variety of uptake transporters are expressed on the basolateral membrane of hepatocytes that are important for several classes of drugs. Recently, hepatocytes have been used to estimate the transporter-mediated drug-drug interaction(DDI) and could become the *in vitro* system of choice for predictive IVIVE. The purpose of this study is to develop methodology for the isolation of hepatocytes from the rat and to explore the feasibility of the identification for transporter-mediated interactions using isolated rat hepatocytes.

Methods. Rat hepatocytes were isolated from 250 to 300 g the male

Sprague–Dawley rats with a two–step collagenase perfusion procedure and their function is confirmed by function study using estradiol 17–d–glucuronide (EG; i.e., a standard substrate of the transporter). In addition, K_m and V_{max} as measured by the transport of lobeglitazone were determined and inhibitory ability of atorvastatin on the uptake of lobeglitazone was evaluated using nonlinear regression analysis (WinNonlin). In further study, inhibitory experiment was also carried out for valsartan in the transport of 4 representative statins.

Results. The uptake of lobeglitazone into the rat hepatocytes was apparently curvilinear, suggesting that mixed kinetic processes are involved in the transport. The estimated kinetic parameters were $16.3 \pm 10.0 \mu\text{M}$, $637 \pm 384 \text{ pmol/min}/10^6 \text{ cells}$, and $21.0 \pm 6.03 \mu\text{l/min}/10^6 \text{ cells}$ for K_m , V_{max} , and P_{dif} , respectively. The K_i for the inhibition of lobeglitazone transport by atorvastatin was $0.600 \pm 0.206 \mu\text{M}$, indicating that the distribution of lobeglitazone into the liver is inhibited even at a low concentration of atorvastatin in rats. When the transport of 4 representative statins (i.e., atorvastatin, rosuvastatin, pravastatin, simvastatin) was studied in the presence and the absence of valsartan, IC_{50} values of valsartan were $10.6 \pm 6.76 \mu\text{M}$ for atorvastatin and $18.3 \pm 9.35 \mu\text{M}$ for rosuvastatin. While the inhibitory activity of valsartan was not detected for the transport of pravastatin and simvastatin.

Conclusion. The methodology for the isolation of hepatocytes from the rat was adopted and validated. The transport of lobeglitazone into the liver is readily inhibited by atorvastatin, even at a very low concentration. The transport of two of the four statins was inhibited by valsartan with IC_{50} less than $20 \mu\text{M}$. Since the drugs are likely

to be co-administered in humans with metabolic diseases, the interaction identified in this study may be therapeutically important.

Keywords : Drug transporters, rat hepatocytes, DDI, statin, Ki

Student Number : 2015-21906