

음이온계 약물의 간수송과정에 있어서 담체매개 수송의 약물동력학적 모델링 및 시뮬레이션

이준섭* · 강민희 · 김묘경 · 이명구 · 정석재** · 심창구** · 정연복#

충북대학교 약학대학, *충북대학교병원 약제부, **서울대학교 약학대학

(Received April 7, 2003; Revised April 14, 2003)

Pharmacokinetic Modeling and Simulation of the Carrier-Mediated Hepatic Transport of Organic Anions

Jun Seup Lee*, Min Hee Kang, Myo-Kyoung Kim, Myung Koo Lee, Suk-Jae Chung**,
Chang-Koo Shim** and Youn Bok Chung#

College of Pharmacy, Chungbuk National University,

*Chungbuk National University Hospital, Cheongju, Chungbuk 361-763, Korea

**College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — The purpose of the present study was to kinetically investigate the carrier-mediated uptake in the hepatic transport of organic anions, and to simulate the “*in vivo* counter-transport” phenomena, using kinetic model which was developed in this study. The condition that the mobility of carrier-ligand complex is greater than that of free carrier is not essential for the occurrence of “counter-transport” phenomenon. To examine the inhibitory effects on the initial uptake of a ligand by the liver, it is necessary to judge whether the true counter-transport mechanism (trans-stimulation) is working or not. The initial plasma disappearance curves of a organic anion were then kinetically analyzed based on a flow model, in which the ligand is eliminated only from the peripheral compartment (liver compartment). Moreover, “*in vivo* counter-transport” phenomena were simulated based on the perfusion model which incorporated the carrier-mediated transport and the saturable intracellular binding. The “*in vivo* counter-transport” phenomena in the hepatic transport of a organic anion were well demonstrated by incorporating the carrier-mediated process. However, the “*in vivo* counter-transport” phenomena may be also explained by the enhancement of back diffusion due to the displacement of intracellular binding. In conclusion, one should be more cautious in interpreting data obtained from so-called “*in vivo* counter-transport” experiments.

Keywords □ Organic anions, hepatic transport, counter-transport, pharmacokinetic modeling, simulation

유기음이온계 약물은 혈중에서 대부분 간장으로만 이행되는 특성¹⁻⁴ 때문에 약물의 간-담즙 수송 연구의 모델물질 및 임상에서의 간기능 진단시약으로 사용되고 있다.⁵⁻⁹ 음이온은 담즙산,¹⁰⁻¹³ 지방산¹⁴ 및 색소류(cholephils)¹⁵⁻¹⁸로 크게 구별된다. 이들은 간내 이행 과정에서 독립된 수송계를 경유하거나 서로 공유한다.^{1,2} 간기능 검사약으로 사용되고 있는 bromosulphthalein(BSP) 및 indocyanine green(ICG)은 담즙산과 Na⁺ 비의존성 수송계(multispecific organic anion transporter)를 공유한다.^{15,19,20} ATP 비의존성에 따라 구별하면, BSP 등의 대부분의 색소류는 ATP 비의존성으로 촉진확산에 의한다고 보고되고 있

다.²¹⁻²³

일반적으로 유기 음이온계 약물이 간으로 이행되는 과정에 있어서 담체가 관여하는 “대향수송(counter-transport)” 현상이 검토되고 있다. Scharschmidt 등²⁴은 이러한 현상의 검출이 *in vivo*에 있어서도 가능한가에 대해 검토하여 긍정적인 결과를 보고하였다. 즉, 담체의 막내 순환(cycle)을 증명하기 위해 사용되고 있는 대향수송현상이 *in vivo*에 있어서도 일어날 수 있다는 사실을 시사하여, 그 후 이 분야의 많은 종설 및 교과서 등에 인용되어 정착되고 있다. Scharschmidt 등²⁴은 tracer량의 약물 A(예를 들면, 방사성 동위원소를 표지시킨 BSP)를 정맥주사한 수분 후에 약물 B(예를 들면, BSP, ICG 등)을 비교적 과량으로 투여하는 것에 의해, 간장내로 이행되었던 표지체(tracer)가 혈중으로 efflux되어 일시적으로 표지체의 혈중농도가 높아지는 현상을 보고하였다. 즉, 대측이라고 볼 수 있는 혈액 중에 첨가된 과량의 지표

#본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-261-2824 (팩스) 043-274-0752
(E-mail) chungyb@cucc.chungbuk.ac.kr

지체에 의해 간장내에 이행되었던 표지체의 efflux 가 촉진된 것을 반영한 것으로, 적어도 “겉보기 대항수송” 현상을 나타낸 것이라고 할 수 있다.

본래 의미의 “대항수송” 현상은 혈액측에 가해진 약물 B에 의해 막내 비결합형 담체의 분포가 간장측에 풍부하게 된 결과, 같은 약체에 의해 수송되는 약물 A의 efflux가 촉진된다고 생각되고 있다. 본 연구자 등^{4,25,26)}은 *in vivo*에 있어서의 대항수송현상이 1-anilino-8-naphthalene sulfonate(ANS)에 있어서도 관찰된 사실을 보고하였다. 또한, 이러한 현상이 막내 담체에 의해서 뿐만 아니라 간세포내 단백질결합의 치환에 의해서도 설명될 수 있다는 가능성을 시사하였다. 즉, 혈액측에 가해진 약물 B가 간장내로 이행된 후, 약물 A(ANS)의 단백질결합을 치환시킨 결과, 유리형 A의 농도를 증가시켜 efflux를 촉진시킨다고 추정할 수 있었다.

따라서, 본 연구에 있어서는 다음과 같은 목적으로 담체매개 “대항수송” 현상에 관한 속도론적 모델을 구축하고, 실제 *in vivo*에서 일어나는 혈장중 농도 변화 추이를 검토하여 그 기전을 밝히고자 하였다.

첫째, 담체매개 수송의 속도론적 모델을 구축하고자 하였다. 이를 통해 “대항수송(counter-transport)”, “대촉촉진(trans-stimulation)” 및 “대촉저해(trans-inhibition)” 현상에 대해 그 기전을 밝히고 각각 구분하여 설명하였다. 즉, 약물-담체 결합체의 막내 환산정수(P_1, P_3)와 비결합형 담체의 막내 환산정수(P_2)가 서로 같을 경우($P_1=P_3=P_2$) 및 $P_1=P_3>P_2$ 인 경우로 구분하여 검토하였다. 즉, “겉보기 대항수송” 현상을 “대촉효과가 없는 경우” 및 “대촉촉진” 과정으로 구분하여 설명하고자 하였다.

둘째, 상기의 담체매개 수송 모델을 사용하여 *in vivo* 혈장중 농도를 설명할 수 있는 flow 모델을 구축하여 *in vivo* “대항수송” 현상에 대해 검토하였다. 특히, 간세포내 단백질결합 저해 및 담체매개 수송의 저해효과를 구분하여 검토하였다.

연구방법

담체매개 대항수송 모델의 구축

담체매개 수송의 경쟁적 저해 모델을 Fig. 1에 나타내었다. 약물 i와 약물 j는 담체 X를 공유하며, 각 약물과 담체와의 친화력은 막내측과 외측에서 동일하다고 가정하였다. 담체와 약물과의 결합체의 해리는 매우 빠르게 일어나므로,

$$C_i^c [X^i] - K_1 [iX^0] = 0 \tag{1}$$

$$C_j^c [X^j] - K_2 [jX^0] = 0 \tag{2}$$

$$C_i^i [X^i] - K_1 [iX^i] = 0 \tag{3}$$

$$C_j^i [X^i] - K_2 [jX^i] = 0 \tag{4}$$

가 성립한다. 또한, 막내 담체의 총농도 $[X_t]$ 는 일정하고, 정상상태

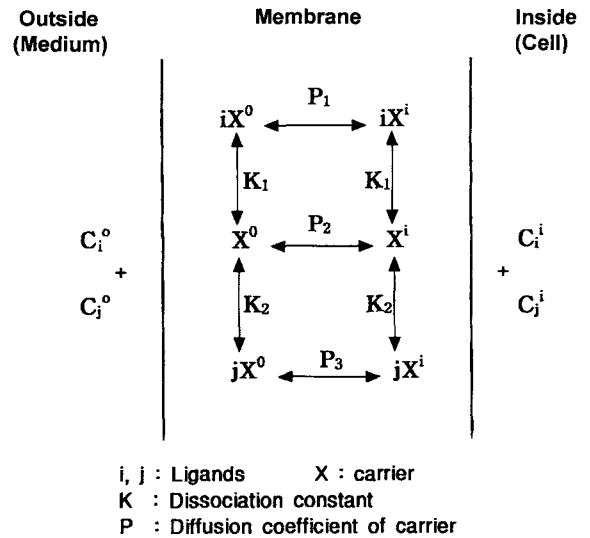


Fig. 1 - A model to explain the counter-transport. Assumptions; (1) ligand i and j share the same carrier, (2) diffusion coefficient of carrier can be changed depending on whether it is bound to ligand or not (usually, $P_1 > P_2$ is assumed), (3) assuming facilitated diffusion, the affinities of ligands to the carriers are the same both at outer and inner sides.

에서 막내·외측의 담체의 분포가 일정하므로 다음 식이 성립한다.

$$[X^0] + [X^i] + [iX^0] + [iX^i] + [jX^0] + [jX^i] = [X_t] \tag{5}$$

$$P_1[iX^0] - P_1[iX^i] + P_2[X^0] - P_2[X^i] + P_3[jX^0] - P_3[jX^i] = 0 \tag{6}$$

(1)식 및 (2)식으로부터,

$$[X^0] = \frac{K_1[iX^0]}{C_i^0} = \frac{K_2[jX^0]}{C_j^0} \quad \therefore [jX^0] = \frac{K_1[iX^0]C_j^0}{C_i^0K_2} \tag{7}$$

또한, (3)식 및 (4)식으로부터,

$$[X^i] = \frac{K_1[iX^i]}{C_i^i} = \frac{K_2[jX^i]}{C_j^i} \quad \therefore [jX^i] = \frac{K_1C_j^i[iX^i]}{C_i^iK_2} \tag{8}$$

를 산출할 수 있다. (7)식 및 (8)식을 (5)식 및 (6)식에 대입하여 각각 다음식으로 나타낼 수 있다.

$$\frac{K_1[iX^0]}{C_i^0} + \frac{K_1[iX^i]}{C_i^i} + [iX^0] + [iX^i] + \frac{K_1[iX^0]C_j^0}{C_i^0K_2} + \frac{K_1C_j^i[iX^i]}{C_i^iK_2} = [X_t] \tag{9}$$

$$P_1[iX^0] - P_1[iX^i] + \frac{K_1P_2[iX^0]}{C_i^0} - \frac{K_1P_2[iX^i]}{C_i^i} + \frac{K_1P_3[iX^0]C_j^0}{C_i^0K_2} + \frac{P_3K_1C_j^i[iX^i]}{C_i^iK_2} = 0 \tag{10}$$

(10)식으로부터

$$[iX^i] = \frac{[iX^0] \left(P_1 + \frac{K_1 P_2}{C_i^0} + \frac{K_1 P_3 C_i^0}{C_i^0 K_2} \right)}{P_1 + \frac{K_1 P_2}{C_i^0} + \frac{P_3 K_1 C_i^0}{C_i^0 K_2}} \quad (11)$$

를 얻을 수 있으며, 이를 (9)식에 대입하여 정리하면,

$$[X_t] = [iX^0] \times \left[\left(\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{C_i^0 K_2} \right) + \frac{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0}{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0} \right. \\ \left. \times \frac{C_i^0}{C_i^0} \times \left(\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{C_i^0 K_2} \right) \right] \quad (12)$$

가 된다. 따라서, 약물 i의 influx(J_i^{0i})를 나타내는 식은 다음과 같다.

$$J_i^{0i} = P_1 [iX^0] \\ = \frac{P_1 [X_t]}{\left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{K_2 C_i^0} \right] + \frac{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0}{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0} \\ \cdot \frac{C_i^0}{C_i^0} \cdot \left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{K_2 C_i^0} \right]} \quad (13)$$

같은 방법으로 약물 i의 efflux(J_i^{i0})를 나타내는 식을 구하면 다음 식이 된다.

$$J_i^{i0} = P_1 [iX_0] \\ = \frac{P_1 [X_t]}{\left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{K_2 C_i^0} \right] + \frac{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0}{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0} \\ \cdot \frac{C_i^0}{C_i^0} \cdot \left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{K_2 C_i^0} \right]} \quad (14)$$

대향수송 모델의 구축

담체매개 수송에서 약물 i에 대한 약물 j의 경쟁적 저해모델을 Fig. 1에 설명한 바 있다. 여기서, 약물 i를 소량(tracer)으로, 약물 j를 과량으로 사용하여 각각 외측(medium)에 존재시켰을 경우, 약물 i 및 j의 influx(J_i^{0i}) 및 efflux(J_i^{i0})는 각각 다음과 같이 계산할 수 있다. 즉, 약물 i의 influx(J_i^{0i})는

$$J_i^{0i} = \frac{P_1 [X_t]}{\left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{K_2 C_i^0} \right] + \frac{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0}{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0} \\ \cdot \frac{C_i^0}{C_i^0} \cdot \left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{K_2 C_i^0} \right]} \quad (15)$$

가 되며, 약물 i의 efflux(J_i^{i0})는

$$J_i^0 = \frac{P_1 [X_t]}{\left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{K_1 C_i^0} \right] + \frac{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0}{C_i^0 K_2 P_1 + K_1 P_2 K_2 + K_1 P_3 C_i^0} \\ \cdot \frac{C_i^0}{C_i^0} \cdot \left[\frac{K_1}{C_i^0} + 1 + \frac{K_1 C_i^0}{K_2 C_i^0} \right]} \quad (16)$$

로 나타낼 수 있다. 즉, (16)식은 (15)식에서 $C_i^0 \rightarrow C_i^i, C_i^i \rightarrow C_i^0, C_j^i \rightarrow C_j^0, C_j^0 \rightarrow C_j^i$ 로 치환하여 얻은 결과와 같다.

한편 약물 j의 flux에 관해서는 (15)식 및 (16)식에 있어서 $P_1 \rightarrow P_3, P_3 \rightarrow P_1, C_i^0 \rightarrow C_j^0, C_j^0 \rightarrow C_i^0, C_i^i \rightarrow C_j^i, C_j^i \rightarrow C_i^i, K_1 \rightarrow K_2, K_2 \rightarrow K_1$ 으로 치환하는 것에 의해, 각각 influx(J_i^{0i}) 및 efflux(J_i^{i0})를 나타낼 수 있다. 즉, 약물 j의 influx(J_j^{0i})는

$$J_j^{0i} = \frac{P_3 [X_t]}{\left[\frac{K_2}{C_j^0} + 1 + \frac{K_2 C_j^0}{K_1 C_j^0} \right] + \frac{C_j^0 K_1 P_3 + K_1 P_2 K_2 + K_2 P_1 C_j^0}{C_j^0 K_1 P_3 + K_1 P_2 K_2 + K_2 P_1 C_j^0} \\ \cdot \frac{C_j^0}{C_j^0} \cdot \left[\frac{K_2}{C_j^0} + 1 + \frac{K_2 C_j^0}{K_1 C_j^0} \right]} \quad (17)$$

가 되며, 약물 j의 efflux(J_j^{i0})는

$$J_j^{i0} = \frac{P_3 [X_t]}{\left[\frac{K_2}{C_j^0} + 1 + \frac{K_2 C_j^0}{C_j^0 K_1} \right] + \frac{C_j^0 K_1 P_3 + K_2 P_2 K_1 + K_2 P_1 C_j^0}{C_j^0 K_1 P_3 + K_2 P_2 K_1 + K_2 P_1 C_j^0} \\ \cdot \frac{C_j^0}{C_j^0} \cdot \left[\frac{K_2}{C_j^0} + 1 + \frac{K_2 C_j^0}{K_2 C_j^0} \right]} \quad (18)$$

로 나타낼 수 있다. 여기서 약물 i의 약물 j에 비해 매우 낮아서 약물 j에 대한 약물 i의 영향을 무시할 수 있으므로, 약물 j의 flux는 각각 다음과 같이 간단하게 나타낼 수 있다.

$$J_j^{0i} = \frac{P_3 [X_t]}{\left[1 + \frac{K_2}{C_j^0} \right] + \frac{P_3 C_j^0 + K_2 P_2}{P_3 C_j^0 + K_2 P_2} \cdot \frac{C_j^0}{C_j^0} \cdot \left[\frac{1 + K_2}{C_j^0} \right]} \quad (19)$$

$$J_j^{i0} = \frac{P_3 [X_t]}{\left[1 + \frac{K_2}{C_j^0} \right] + \frac{P_3 C_j^0 + K_2 P_2}{P_3 C_j^0 + K_2 P_2} \cdot \frac{C_j^0}{C_j^0} \cdot \left[\frac{1 + K_2}{C_j^0} \right]} \quad (20)$$

In vivo 데이터의 시뮬레이션 모델

음이온계 약물의 *in vivo* 혈장중 농도추이의 시뮬레이션을 위해서는 Fig. 2의 모델을 사용하였다. 대부분의 유기음이온계 약물들은 혈중 알부민과 강력히 결합하고, 간장이외의 조직으로의 분포는 무시할 수 있다. 따라서, 간의 세포외, 세포내 사이에는 Fig. 1에서 구한 influx(J_i^{0i}) 및 efflux(J_i^{i0})를 나타내는 식을 쓸 수

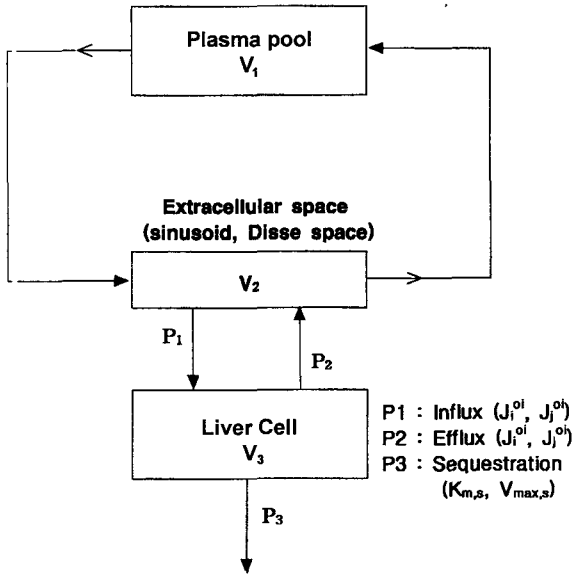


Fig. 2 - A perfusion model for simulation of counter-transport phenomenon *in vivo*. Calculation procedure and assumptions; (1) equations representing the flux of ligands *i* and *j* (J_i^{oi}, J_i^{oh}) are obtained from a model in Fig. 1, (2) kinetic parameters are determined so that they can explain the *in vivo* plasma disappearance curves of ligands, (3) efflux of ligands depends on the unbound concentrations in the liver cytosol.

있다. 또한 간으로부터 혈액으로의 efflux 및 sequestration 과정에는 간세포내 비결합형 약물 농도에 의존하는 것으로 가정하였다. 각 컴파트먼트내의 mass-balance를 식으로 나타내면 다음과 같다. 즉,

약물 *i*에 대해서

$$V_1 \cdot \frac{dC_1}{dt} = -Q_p C_1 + Q_p \cdot C_2 / f_2 \quad (21)$$

$$\frac{V_2}{f_2} \cdot \frac{dC_2}{dt} = Q_p \left(C_1 - \frac{C_2}{f_2} \right) J_i^{oi} + J_i^{io} \quad (22)$$

$$V_3 \cdot \frac{dC_3}{dt} = J_i^{oi} - J_i^{io} - v_{metab,i} \quad (23)$$

$$\text{단, } v_{metab,i} = \frac{V_{max,s}^i \cdot C_{3,f}}{K_{m,s}^i + C_{3,f}} \quad (24)$$

여기서 f_2 는 각 컴파트먼트내에서의 비결합형분율(free fraction)을 나타낸다. (22)식 및 (23)식에 있어서 J_i^{oi} 및 J_i^{io} 는 (15)식 및 (16)식을 적용하였다. 단, $C_1^0 = C_2$, $C_1^i = C_{3,f}$, $C_j^0 = C_5$, $C_j^i = C_6$ 를 각각 나타낸다.

약물 *j*에 대해서

$$V_1 \cdot \frac{dC_4}{dt} = -Q_p C_4 + Q_p \cdot C_5 / f_5 \quad (25)$$

$$\frac{V_2}{f_5} \cdot \frac{dC_5}{dt} = Q_p \left(C_4 - \frac{C_5}{f_5} \right) J_j^{oi} + J_j^{io} \quad (26)$$

$$V_3 \cdot \frac{dC_{6,total}}{dt} = J_j^{oi} - J_j^{io} - v_{metab,j} \quad (27)$$

$$\text{단, } v_{metab,j} = \frac{V_{max,s}^j \cdot C_6}{K_{m,s}^j + C_6} \quad (28)$$

여기서 (26)식의 좌변을 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$v_3 \cdot \frac{dC_{6,total}}{dt} = V_3 \cdot \frac{dC_{6,total}}{dC_6} \cdot \frac{dC_6}{dt} = \left[\frac{R_{1,j} \cdot K_{1,j}}{(K_{1,j} + C_6)^2} + \frac{R_{2,j} \cdot K_{2,j}}{(K_{2,j} + C_6)^2} + 1 \right] \cdot V_3 \cdot \frac{dC_6}{dt} \quad (29)$$

(29)식을 (27)식에 대입하여 정리하면,

$$V_3 \cdot \frac{dC_6}{dt} = \frac{J_j^{oi} - J_j^{io} - v_{metab,j}}{\left[\frac{R_{1,j} \cdot K_{1,j}}{(K_{1,j} + C_6)^2} + \frac{R_{2,j} \cdot K_{2,j}}{(K_{2,j} + C_6)^2} + 1 \right]} \quad (30)$$

간 세포내 결합단백으로는 모델약물에 따라 ligandin(Y단백질)으로 가정하고 후술하는 *in vivo* 세포레벨의 단백질합측정법으로 산출한 파라미터를 이용하여 세포내 비결합하여 약물농도를 계산하였다. 본 모델에서 담체매개에 의한 막수송 과정을 시뮬레이션하여 *in vivo*에 있어서 약물의 혈중소실곡선을 예측할 수 있는 검색방법을 확립하고자 하였다. 이를 위해서 상기의 모델에 의한 이론적인 방법과 함께 다음과 같이, 음이온계약물의 속도론적 파라미터를 적용하여 검토하였다.

간 세포내 단백질결합 저해의 파라미터 산출

대부분의 음이온계 약물들은 혈장단백과 강력하게 결합할 뿐만 아니라, 간 세포질내 ligandin(Y단백질) 등의 단백질과도 결합력이 강하다. 따라서, 약물 *i*(tracer량) 및 약물 *j*(과량)의 간 세포질내 단백질결합 부위를 두종류(즉, 고친화성 부위 및 저친화성 부위)로 가정하고, 약물 *i* 및 *j*가 서로 경쟁적으로 결합한다면, 약물 *i*의 단백질결합에 관한 식은

$$C_{b,i} = \frac{R_{1,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{1,i}(1 + C_{f,j}/Kd_{1,j}) + C_{f,i}} + \frac{R_{2,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{2,i}(1 + C_{f,j}/Kd_{2,i}) + C_{f,i}} \quad (31)$$

로 나타낼 수 있다. 여기서 $R_{1,i}$ 및 $R_{2,i}$ 는 약물 *i*의 고친화성 및 저친화성 결합부위의 결합용량을 각각 나타낸다. $Kd_{1,i}$ 및 $Kd_{2,i}$ 는 각 결합부위의 해리정수를 나타내고, $Kd_{1,j}$ 및 $Kd_{2,j}$ 는 약물 *j*에 대한 값을 말한다. 또한 $C_{f,j}$ 는 약물 *j*에 대한 비결합형 약물 농도를 나타낸다.

약물 i의 총농도 $C_{T,i}$ 는

$$C_{T,i} = C_{b,i} + C_{f,i} \quad (32)$$

이므로, (31)식을 (32)식에 대입하면,

$$C_{T,i} = \frac{R_{1,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{1,i}(1 + C_{f,i}/Kd_{1,i}) + C_{f,i}} + \frac{R_{2,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{2,i}(1 + C_{f,i}/Kd_{2,i}) + C_{f,i}} + C_{f,i} \quad (33)$$

가 된다. 여기서 약물의 단백질결합을 나타내는 R_1 , R_2 , Kd_1 및 Kd_2 는 각각 간세포질과의 단백질결합실험에서 산출한 값³⁾을 사용하고, 또한 $C_{T,i}$ 도 실험적으로 계산할 수 있다. 따라서 약물 i의 비결합형 농도 $C_{f,i}$ 를 (33)식을 사용하여 피팅(fitting)함으로써 산출할 수 있다.

한편, 약물 j의 간세포질내 단백질결합에 관한 식은 약물 i와 같은 방법으로 다음과 같이 나타낼 수 있다. 즉, 약물 j의 총농도 $C_{T,j}$ 는

$$C_{T,j} = \frac{R_{1,j} \cdot C_{f,j}}{Kd_{1,j}(1 + C_{f,j}/Kd_{1,j}) + C_{f,j}} + \frac{R_{2,j} \cdot C_{f,j}}{Kd_{2,j}(1 + C_{f,j}/Kd_{2,j}) + C_{f,j}} + C_{f,j} \quad (34)$$

가 된다. 여기서 약물 i를 약물 j에 비해 소량(tracer)만을 사용하는 경우에는 (34)식에서 $C_{f,i}/Kd_{1,i} = 0$ 의 조건이 성립되므로 $C_{T,j}$ 를 나타내는 식은 다음과 같이 간단하게 표현된다.

$$C_{T,j} = \frac{R_{1,j} \cdot C_{f,j}}{Kd_{1,j} + C_{f,j}} + \frac{R_{2,j} \cdot C_{f,j}}{Kd_{2,j} + C_{f,j}} + C_{f,j} \quad (35)$$

실제로, 본 연구에서 약물 i로서 1-anilino-8-naphthalene sulfonate(ANS)를 사용한 경우의 단백질결합 실험결과,³⁾ 하나의 고친화성 결합부위 및 비특이적 결합부위가 있다는 사실이 밝혀졌다. 따라서, 약물 i의 총농도 $C_{T,i}$ 를 나타내는 (33)식을 다음과 같이 간단히 나타낼 수 있다.

$$C_{T,i} = \frac{R_{1,i} \cdot C_{f,i}}{Kd_{1,i(app)} + C_{f,i}} + \alpha \cdot C_{f,i} + C_{f,i} \quad (36)$$

따라서, 약물 i의 비결합형 농도 $C_{f,i}$ 는

$$C_{f,i} = \frac{B + \sqrt{B^2 + 4Kd_{1,i(app)} \cdot C_{T,i} \cdot (\alpha + 1)}}{2\alpha} + 1 \quad (37)$$

$$\text{단, } \left[\begin{array}{l} B = C_{T,i} - R_{1,i} - Kd_{1,i(app)} \cdot (\alpha + 1) \\ Kd_{1,i(app)} = Kd_{1,i}(1 + C_{f,i}/Kd_{1,i}) \end{array} \right]$$

가 된다. 본 연구의 시뮬레이션 모델에서 약물 i 및 j의 간세포내 비결합형 약물농도는 (37)식 및 (35)식을 사용하여 각각 산출하였다.

결과 및 고찰

겉보기 대항수송 현상의 시뮬레이션

약물 i의 소량(0.01 $\mu\text{mol/kg}$)을 정맥주사한 10분 후, 다른 음이온계 약물 j의 투여량을 변화시켜 정맥주사하였을 때, 약물 i의 혈장 중 농도추이의 시뮬레이션 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 여기서, Fig. 3(A-C)는 $P_1 = P_3 = 10P_2$ 인 경우를, Fig. 3(D-F)는 $P_1 = P_3 = P_2$ 인 경우를 각각 나타낸다. 또한, Fig. 3(A, D)는 담체매개수송의 경쟁적 저해 및 간세포질내 단백질결합을 모두 반영한 모델(Model AL)을, Fig. 3(B, E)는 간세포질내 단백질결합만을 반영한 모델(Model BI)을, Fig. 3(C, F)는 담체매개수송의 경쟁적 저해만을 반영한 모델(Model CF)을 각각 나타낸다.

$P_1 > P_2$ 인 경우가 $P_1 = P_2$ 인 경우보다 저해제(약물 j)를 가한 후 약물 i의 초기 혈장 중 농도 증가율이 현저하게 나타내었다. 이러한 현상은 “대측축진”에 기인한 결과라고 생각된다. 그러나, $P_1 = P_2$ 인 경우에도 “겉보기 대항수송” 현상이 관찰되었으며, 따라서 $P_1 > P_2$ 의 조건은 “대항수송”을 위한 필수조건은 될 수 없다고 생각되었다.

한편, Model BI(Fig. 3(B, E)) 및 Model CF(Fig. 3(C, F))의 시뮬레이션 결과, 각각 “겉보기 대항수송” 현상이 관찰되었다. 이러한 현상은 $P_1 > P_2$ 및 $P_1 = P_2$ 의 두 조건에서 모두 관찰되었으며, Model BI 및 Model CF의 시뮬레이션 결과는 Model AL의 “겉보기 대항수송” 현상보다는 작게 나타났다. 그러나, 이러한 결과는 “겉보기 대항수송” 현상을 간세포질내 단백질결합 저해 과정으로도 설명할 수 있다는 새로운 가설을 제시하는 것이다. 즉, “겉보기 대항수송” 현상이 담체매개 수송의 경쟁적 저해에 기인한다는 일반적인 이론에 대해, 간세포질내 단백질결합 저해 과정으로도 설명할 수 있다는 결과라고 생각된다.

담체 매개 수송의 저해 효과

약물 i의 소량 (0.01 $\mu\text{mol/kg}$)을 정맥주사한 10분 후, 다른 음이온계 약물 j(10 $\mu\text{mol/kg}$)를 정맥주사하였을 때, 약물 i의 혈장 중 농도 추이의 시뮬레이션 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 약물 j가 약물 i의 influx 과정의 담체매개 수송을 저해한다고 가정하여 $K_{m,j}$ 의 값을 0.5~5000 μM 로 변화시켰다. Fig. 4(A, D)는 담체매개 수송의 경쟁적 저해 및 간세포질내 단백질결합을 모두 반영한 모델(Model AL)을, Fig. 4(B, E)는 간세포질내 단백질결합 저해만을 반영한 모델(Model BD)을, Fig. 4(C, F)는 담체매개 수송의 경쟁적 저해만을 반영한 모델(Model CF)을 각각 나타낸다.

각 모델을 사용한 결과에서 $P_1 > P_2$ 인 경우가 $P_1 = P_2$ 인 경우보다 약물 i의 혈장 중 농도 증가율이 약간 상승하였으나, 큰 차이를 보이지 않았다. 한편, Model AL에서 $K_{m,j}$ 의 값이 작을 때의 현저한 “겉보기 대항수송” 현상은 담체매개 수송의 저해(Model CF)를 반영한 결과라고 생각된다. 그러나, 전체적인 “겉보기 대

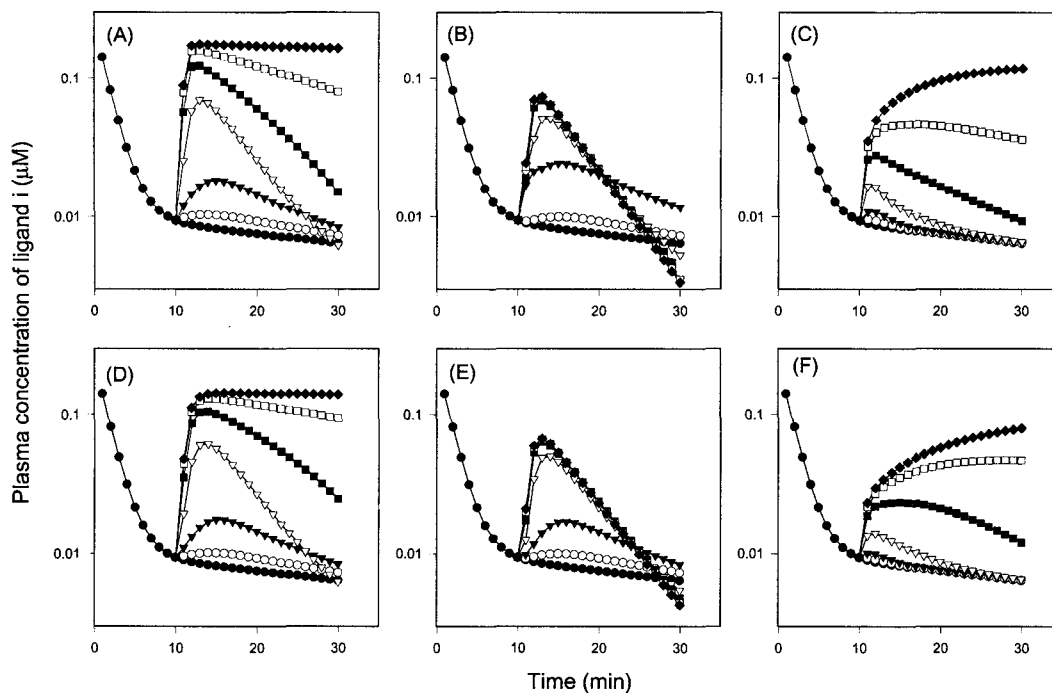


Fig. 3 – Effect of the pulse administration of inhibitor on the plasma disappearance curve of ligand i. Ligand i ($0.01 \mu\text{mol/kg}$) was injected intravenously, followed 10 min later by a bolus i.v. administration of each dose of inhibitor j. (A) Model AL ($P_1=10P_2$), (B) Model BI ($P_1=10P_2$), (C) Model CF ($P_1=10P_2$), (D) Model AL ($P_1=P_2$), (E) Model BI ($P_1=P_2$), (F) Model CF ($P_1=P_2$). Keys: (-●-) control; (-○-) inhibitor $1 \mu\text{mol/kg}$; (-▼-) inhibitor $3 \mu\text{mol/kg}$; (-▽-) inhibitor $10 \mu\text{mol/kg}$; (-■-) inhibitor $30 \mu\text{mol/kg}$; (-□-) inhibitor $100 \mu\text{mol/kg}$; (-◆-) inhibitor $1000 \mu\text{mol/kg}$.

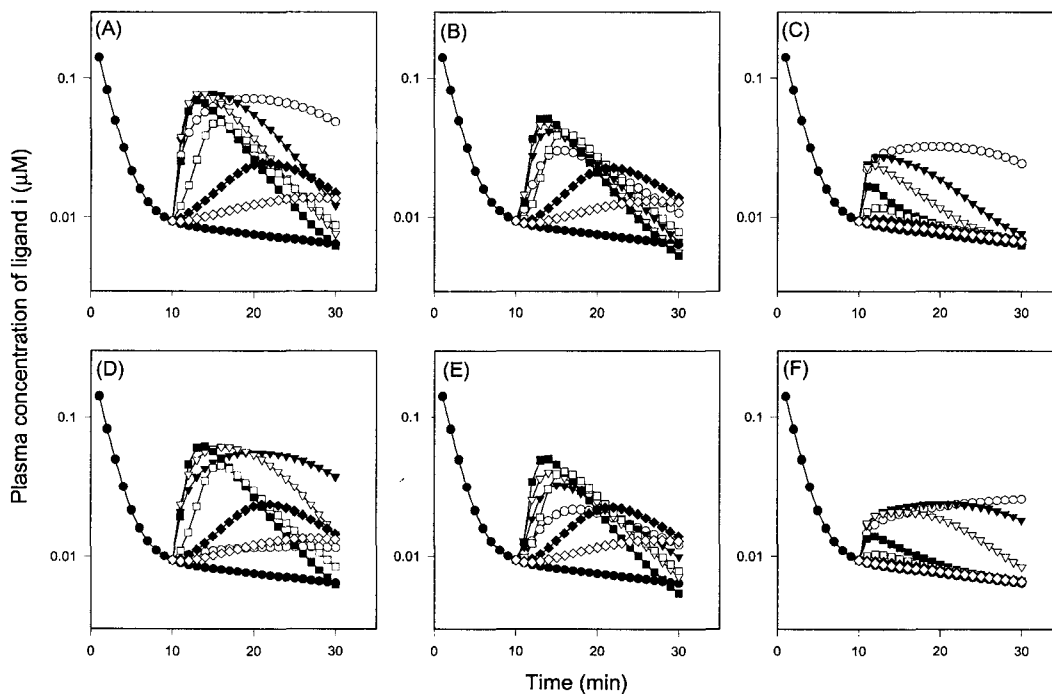


Fig. 4 – Effect of inhibitor for the transport process of ligand i. Ligand i ($0.01 \mu\text{mol/kg}$) was injected intravenously, followed 10 min later by a bolus i.v. administration of inhibitor j ($10 \mu\text{mol/kg}$). (A) Model AL ($P_1=10P_2$), (B) Model BI ($P_1=10P_2$), (C) Model CF ($P_1=10P_2$), (D) Model AL ($P_1=P_2$), (E) Model BI ($P_1=P_2$), (F) Model CF ($P_1=P_2$). Keys: (-●-) control; (-○-) $K_{m,j}=0.5 \mu\text{M}$; (-▼-) $K_{m,j}=2 \mu\text{M}$; (-▽-) $K_{m,j}=5 \mu\text{M}$; (-■-) $K_{m,j}=50 \mu\text{M}$; (-□-) $K_{m,j}=500 \mu\text{M}$; (-◆-) $K_{m,j}=2000 \mu\text{M}$; (-◇-) $K_{m,j}=5000 \mu\text{M}$.

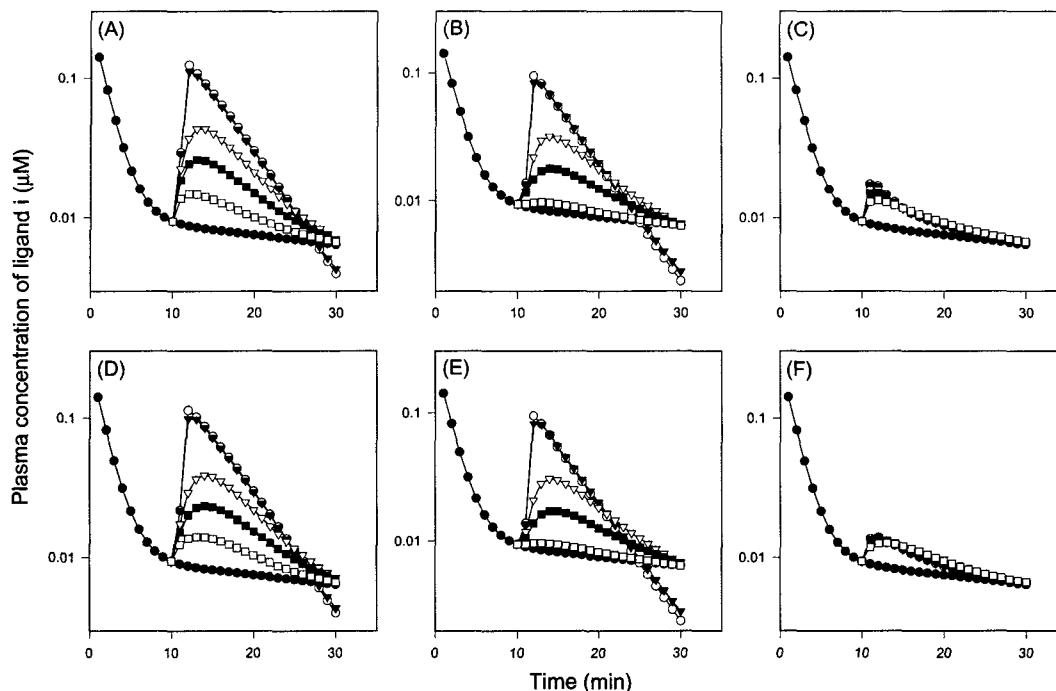


Fig. 5 – Effect of inhibitor for the intracellular binding. Ligand *i* (0.01 µmol/kg) was injected intravenously, followed 10 min later by a bolus i.v. administration of inhibitor *j* (10 µmol/kg). (A) Model AL ($P_1=10P_2$), (B) Model BI ($P_1=10P_2$), (C) Model CF ($P_1=10P_2$), (D) Model AL ($P_1=P_2$), (E) Model BI ($P_1=P_2$), (F) Model CF ($P_1=P_2$). Keys: (-●-) control; (-○-) $K_{d1,j}=0.01$ µM; (-▼-) $K_{d1,j}=0.1$ µM; (-▽-) $K_{d1,j}=3$ µM; (-■-) $K_{d1,j}=10$ µM; (-□-) $K_{d1,j}=100$ µM.

항수송” 현상은 오히려 간세포질내 단백질결합 저해만을 반영한 Model BI의 결과가 Model CF에 비해 크게 나타났다.

간세포질내 단백질결합의 저해 효과

약물 *j*가 약물 *i*의 간세포질내 단백질의 고친화성 부위에 대한 결합을 경쟁적으로 저해하는 경우를 가정하여, $K_{d1,j}$ 의 값을 0.01~100 µM로 변화시켜 시뮬레이션하였다(Fig. 5). Fig. 5(A, D)는 담체매개 수송의 경쟁적 저해 및 간세포질내 단백질결합을 모두 반영한 모델(Model AL)을, Fig. 5(B, E)는 간세포질내 단백질결합만을 반영한 모델(Model BI)을, Fig. 5(C, F)는 담체매개 수송의 경쟁적 저해만을 반영한 모델(Model CF)을 각각 나타낸다.

각 모델을 사용한 결과에서 $P_1>P_2$ 및 $P_1=P_2$ 인 조건에서 약물 *i*의 혈장 중 농도 증가율은 큰 차이를 나타내지 않았다. 한편, Model AL의 “겔보기 대항수송” 현상은 간세포질내 단백질결합 저해(Model BI)를 반영한 결과라고 생각된다. 즉, 담체매개 수송의 저해(Model CF)는 기여율이 현저히 낮았다. 이러한 결과는 “겔보기 대항수송” 현상을 간세포질내 단백질결합 치환에 의해서도 설명할 수 있다는 전항의 결과를 지지해 주고 있다.

Sequestration 과정의 저해 효과

약물 *j*가 약물 *i*의 배설 및 대사를 반영하는 sequestration 과정에 대해 경쟁적으로 저해하는 경우를 가정하여, $V_{max,s}$ 의 값을

10~1,000,000 nmol/min/kg으로 변화시켜 시뮬레이션하였다(Fig. 6). Fig. 6는 담체매개 수송의 경쟁적 저해 및 간세포질내 단백질결합을 모두 반영한 모델(Model AL)의 $P_1>P_2$ 인 조건에서의 결과를 나타낸 것이다.

$V_{max,s}$ 가 10~3000 nmol/min/kg으로 변화시, 약물 *i*의 혈장 중 농도는 큰 차이를 보이지 않았다. 또한, “겔보기 대항수송” 현상의 변화도 전술한 담체매개 수송과정의 저해 및 간세포질내 단백질결합 저해 효과에 비해 작게 나타났다. 그러나, Fig. 6의 결과로부터 전체적인 “겔보기 대항수송” 현상에 대해 담체매개 수송 및 간세포질내 단백질결합 뿐만 아니라 sequestration 과정도 기여도는 작으나 일부 기여할 수 있다고 추정되었다.

간세포질내 결합단백 농도의 영향

음이온계 약물은 간내 세포질 단백질(Y-단백 등)과 강력히 결합하므로, 약물 *i*에 대한 단백질용량($R_{1,i}$)을 0.1~500 µM로 변화시켜 시뮬레이션하였다(Fig. 7). 단백질결합 저해만을 반영한 모델(Model BI)의 $P_1>P_2$ 의 조건에서 시뮬레이션하였으며, 저해제인 약물 *j*의 영향은 반영시키지 않았다.

Fig. 7(A)는 약물 *i*의 sequestration이 비결합형 농도에 의존하는 경우를, Fig. 7(B)는 총농도에 의존하는 경우의 결과를 각각 나타낸다. 두 경우 모두 단백질용량이 증가함에 따라 약물 *i*의 혈장 중 소실이 빠르게 나타났다. 이는 간세포내로 이행된 약물 *i*

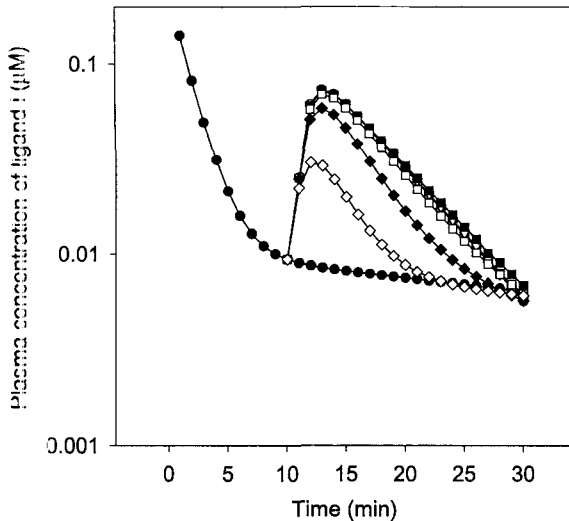


Fig. 6 – Effect of inhibitor for the sequestration process. Ligand i (0.01 μ mol/kg) was injected intravenously, followed 10 min later by a bolus i.v. administration of inhibitor j (10 μ mol/kg). Keys: (-●-) control; (-○-) $V_{m,s}^j=1$ μ mol/min/kg; (-▼-) $V_{m,s}^j=10$ μ mol/min/kg; (-▽-) $V_{m,s}^j=100$ μ mol/min/kg; (-■-) $V_{m,s}^j=1,000$ μ mol/min/kg; (-□-) $V_{m,s}^j=3,000$ μ mol/min/kg; (-◆-) $V_{m,s}^j=10,000$ μ mol/min/kg; (-◇-) $V_{m,s}^j=100,000$ μ mol/min/kg.

가 세포질내 단백질과 강력히 결합하여 efflux가 억제된 것에 기인한 것으로 생각된다. 따라서, 간세포내 단백질결합은 약물의 influx 및 efflux에 영향을 미친다고 추정된다. 이러한 결과는 세포내 단백질결합치환이 “겉보기 대항수송” 현상에 영향을 미칠 수 있다는 전술한 결과를 지지해 주고 있다.

이상의 시뮬레이션 결과를 종합하면, *in vivo* “대항수송”의 혈장중 농도패턴을 재현할 수 있었다. 따라서, 본 연구에서 구축한 속도론적 모델은 담체매개 수송, 간세포내 단백질결합 및 소실과

정의 각 과정을 고려하여 음이온 약물의 간-담즙 수송을 검색하는 방법으로 활용이 기대된다.

한편, 시뮬레이션 결과, “겉보기 대항수송” 현상의 요인으로 담체매개 수송 뿐만 아니라 간세포내 단백질결합 치환도 기여하는 것으로 나타났다. 특히, 음이온 약물의 혈장중 농도추이에 미치는 저해제의 영향에서는, “겉보기 대항수송” 현상에 대한 기여율은 담체매개 수송의 저해에 비해 간세포내 단백질결합의 저해가 큰 것으로 나타났다. 따라서, 음이온계 약물의 *in vivo* “겉보기 대항수송” 현상을 담체매개 수송의 저해만으로 설명하고 있는 종래의 결과²⁴⁾에 대해, 본 연구를 통하여 간세포내 단백질결합 저해에 의해서도 *in vivo* “겉보기 대항수송” 현상을 일정 비율 설명할 수 있다는 것을 알 수 있었다.

결 론

1. 음이온계 약물 i를 정맥주사한 후 다른 음이온계 약물의 과량을 정맥주사하면, 약물 i의 혈장 중 농도가 일시적으로 증가하는 “겉보기 대항수송” 현상을 나타낸다. 본 연구에서 구축한 속도론적 모델을 이용하여 이러한 현상을 재현시키고 그 기전을 밝혔다. 즉, $P_1 > P_2$ 인 경우가 $P_1 = P_2$ 인 경우보다 저해제(약물 j)를 가한 후 약물 i의 초기 혈장 중 농도 증가율이 현저하게 나타내었다. 이러한 현상은 “대측축진”에 기인한 결과라고 생각된다. 그러나, $P_1 = P_2$ 인 경우에도 *in vivo* “겉보기 대항수송” 현상이 관찰되었다. 따라서 $P_1 > P_2$ 의 조건은 *in vivo* “겉보기 대항수송”을 위한 필수조건은 될 수 없다고 생각되었다.

2. 담체매개 수송 및 간세포내 단백질결합 저해 과정을 각각 반영시킨 모델을 사용하여 *in vivo* 대항수송 현상을 시뮬레이션한 결과, 각각의 경우 “겉보기 대항수송” 현상이 관찰되었다. 이러한 현상은 두 과정을 모두 반영시킨 모델보다 작게 나타났다. 그

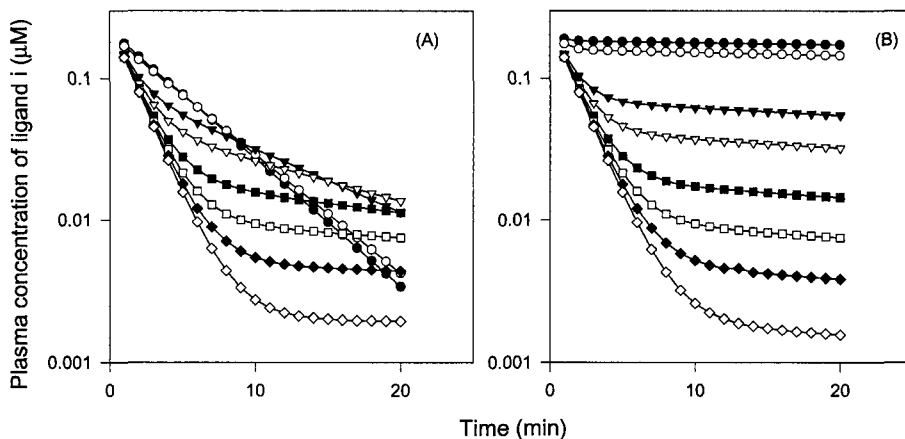


Fig. 7 – Effect of the concentration of intracellular binder. The intracellular sequestration (elimination and/or metabolism) is assumed to be a function of unbound drug concentration. Keys: (-●-) $R_{1,i}=0.1$ μ M; (-○-) $R_{1,i}=1$ μ M; (-▼-) $R_{1,i}=10$ μ M; (-▽-) $R_{1,i}=20$ μ M; (-■-) $R_{1,i}=50$ μ M; (-□-) $R_{1,i}=100$ μ M; (-◆-) $R_{1,i}=200$ μ M; (-◇-) $R_{1,i}=500$ μ M.

러나, 이러한 결과는 “겉보기 대항수송” 현상이 담체매개 수송의 경쟁적 저해에 의해서만 기인한다는 종래의 결과에 대해, 간세포질내 단백질결합 저해과정으로도 설명이 가능하다는 새로운 사실을 나타내 주고 있다.

감사의 말씀

이 연구는 보건복지부 지원 ‘96보건의료기술개발연구(#HMP-96-D-2-1035)의 지원을 받아 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) Yamazaki, M., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. : Recent advances in carrier-mediated hepatic uptake and biliary excretion of xenobiotics. *Pharm. Res.* **13**, 497 (1996).
- 2) Kusuhara, H., Suzuki, H. and Sugiyama, Y. : The role of p-glycoprotein and canalicular multispecific organic anion transporter in the hepatobiliary excretion of drugs. *J. Pharm. Sci.* **87**, 1025 (1998).
- 3) Chung, Y. B., Miyauchi, S., Sugiyama, Y., Harashima, H., Iga, T. and Hanano, M. : Kinetic analysis of the dose-dependent hepatic handling of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate in rats. *J. Pharmacokin. Biopharm.* **18**, 313 (1990).
- 4) Chung, Y. B., Miyauchi, S., Sugiyama, Y., Harashima, H., Iga, T. and Hanano, M. : Effect of various organic anions on the plasma disappearance of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS). *J. Hepatology.* **11**, 240 (1990).
- 5) Goresky, B. F. : Initial distribution and rate of uptake of Sulfobromophthalein in the liver. *Am. J. Physiol.* **207**, 13 (1964).
- 6) Paumgartner, G. and Reichen, J. : Kinetics of hepatic uptake unconjugated bilirubin. *Clin. Sci. Mol. Med.* **51**, 169 (1976).
- 7) Gartner, U., Stockert, R. J., Levine, W. G. and Wolkoff, A. W. : Effect of nafenopin on the uptake of bilirubin and sulfobromophthalein by isolated perfused rat liver. *Gastroenterology.* **83**, 1163 (1982).
- 8) Schwenk, M., Burr, R., Schwarz, L. and Pfaff, E. : Uptake of bromosulfophthalein by isolated liver cells. *Eur. J. Biochem.* **64**, 189 (1976).
- 9) Berk, P. D., Potter, B. J. and Stremmel, W. : Role of plasma membrane ligand bound organic anions. *Hepatology.* **7**, 165 (1987).
- 10) Petzinger, E. and Frimmer, M. : Driving forces in hepatocellular uptake of phalloidin and cholate. *Biochim. Biophys. Acta.* **778**, 539 (1984).
- 11) Petzinger, E., Muller, N., Folimann, W., Deutscher, J. and Kinne, R. K. H. : Uptake of bumetanide into isolated rat hepatocytes and primary liver cell cultures. *Am. J. Physiol.* **256** (Gastrointest. Liver Physiol. 19), G78-G86 (1989).
- 12) Ziegler, K., Frimmer, M., Kessler, H., Damm, J., Eiermann, V., Koll, S. and Zarbock, J. : Modified somatostatins as inhibitors of a multispecific transport system for bile acids and phallotoxins in isolated hepatocytes. *Biochim. Biophys. Acta.* **845**, 86 (1985).
- 13) Zimmerli, B., Valantinas, J. and Meier, P. J. : Multispecificity of Na⁺-dependent taurocholate uptake in basolateral (sinusoidal) rat liver plasma membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **250**, 301 (1989).
- 14) Stremmel, W., Strohmeyer, S. and Berk, P. D. : Hepatocellular uptake of oleate is energy dependent, sodium linked, and inhibited by an antibody to a hepatocyte plasma membrane fatty acid binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 3584 (1986).
- 15) Laperche, Y., Preaux, A. M. and Berthelot, P. : Two systems are involved in the sulfobromophthalein uptake by rat liver cells: one is shared with bile salts. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1333 (1981).
- 16) Scharschmidt, B. F., Waggondr, J. G. and Berk, P. D. : Hepatic organic anion uptake in the rat. *J. Clin. Invest.* **56**, 1280 (1975).
- 17) Schwenk, M., Burr, R., Schwarz, L. and Pfaff, E. : Uptake of sulfobromophthalein by isolated rat liver cells. *Eur. J. Biochem.* **64**, 189 (1976).
- 18) Wolkoff, A. W., Samuelson, A. C., Johansen, K. L., Nakata, R., Withers, D. M. and Sosiak, A. : Influence of Cl⁻ on organic anion transport in short-term cultured rat hepatocytes and isolated rat liver. *J. Clin. Invest.* **79**, 1259 (1987).
- 19) Anwer, M. S. and Hegner, D. : Effect of Na⁺ on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes; evidence for a heterogeneous system. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 181 (1978).
- 20) Anwer, M. S. and Hegner, D. : Effect of organic anions on bile acid uptake by isolated rat hepatocytes. *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.* **359**, 1027 (1978).
- 21) Blom, A., Keulemans, K. and Meijer, D. K. F. : Transport of dibromosulfophthalein by isolated rat hepatocytes. *Biochem. Pharmacol.* **30**, 1809 (1981).
- 22) Lin, J. H., Sugiyama, Y., Awazu, S. and Hanano, M. : Kinetic studies on the deethylation of ethoxybenzamide. A comparative study with isolated hepatocytes and liver microsomes of rat. *Biochem. Pharmacol.* **29**, 2825 (1980).
- 23) Yamazaki, M., Suzuki, H., Sugiyama, Y., Iga, T. and Hanano, M. : Uptake of organic anions by isolated rat hepatocytes: a classification in terms of ATP-dependency. *J. Hepatol.* **14**, 41 (1992).
- 24) Scharschmidt, B. F., Waggoner, J. G. and Berk, P. D. : Hepatic

- organic anion uptake in the rat. *J. Clin. Invest.* **56**, 1280 (1975).
- 25) Chung, Y. B. and Han, K. : Metabolism of an anionic fluorescent dye 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) by rat liver microsomes. *Arch. Pharm. Res.* **21**, 677 (1998).
- 26) Bae, W. T., Chung, Y. B. and Han, K. : Kinetic analysis of the hepatic uptake and biliary excretion of 1-anilino-8-naphthalene sulfonate (ANS) *in vivo*. *J. Kor. Pharm. Sci.* **31**, 209 (2001).