

## 면역억제제의 약물속도론적/약력학적 파라미터에 기초한 표현형과 유전형의 상관성

이용복\* · 조혜영†

\*전남대학교 약학대학 부속 생물학적동등성 및 가교시험연구소,  
약리연구부, 국립독성과학원/식품의약품안전청  
(2007년 11월 29일 접수 · 2007년 12월 14일 승인)

### Phenotype Based on Pharmacokinetic/Pharmacodynamic Parameters and Genotype Correlations of Immunosuppressants

Yong-Bok Lee\* and Hea-Young Cho†

\*College of Pharmacy and Institute of Bioequivalence and Bridging Study, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea  
Pharmacological Research Department, NITR, KFDA, Seoul 122-704, Korea

(Received November 29, 2007 · Accepted December 14, 2007)

**ABSTRACT** – Cyclosporine (CsA) and tacrolimus (FK506) have a narrow therapeutic range, and their pharmacokinetic (PK) characteristic varies among individual. They are also substrates for cytochrome P450 (*CYP*) 3A4, 3A5 genes, and P-glycoprotein, the product of the multidrug resistance 1 (*MDR1*). The aims were to investigate the relationship between *CYP3A* and *MDR1* genotypes and their PK parameters among healthy subjects. We investigated the genotype for *CYP3A* and *MDR1* gene in human using a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. After oral administration of CsA and FK506 (100 mg and 1 mg, respectively), whole blood samples were taken up to 24 hours. Blood CsA and FK506 concentrations were measured by LC/MS/MS. Each PK parameters were compared using Kruskal-Wallis test according to the *CYP3A* and *MDR1* genotype. We found that the values of AUC for CsA were significantly different among *CYP3A5* and *MDR1* exon 26 (C3435T) genotypes ( $P=0.037$  and  $P=0.049$ ). On the other hand, the AUC for FK506 was significantly different only among *CYP3A5* genotypes ( $P=0.013$ ). The results clearly demonstrate the effects of *CYP3A5* and *MDR1* exon 26 on CsA and FK506 disposition.

**Key words** – Cyclosporine, Tacrolimus, *CYP3A*, *MDR1*, Genotype, Pharmacokinetics

21세기 과학기술의 발달과 함께 장기이식은 첨단의학의 하나로 말기 장기부전증 치료에 최상의 치료법으로써 소개되고 있으며, 장기이식의 필요성 증대와 더불어 면역억제제의 수요가 급증하고 있다. 증가하는 수요와 맞물려 장기이식 환자가 평생 복용해야 하는 면역억제제의 수요도 큰 폭으로 증가하고 있으나 비싼 가격에 대한 어려움뿐만 아니라 장기복용에 따르는 부작용 등으로 인하여 환자들의 생존율 연장에도 불구하고 삶의 질의 향상이 오히려 저해되고 있다. 따라서 개개인의 약물반응을 예측하고 부작용 없이 최대의 치료효과를 얻을 수 있는 맞춤형약물요법이 임상에서 적용되어 환자의 약물 복용 시 안전성 및 유효성을 확보할 수 있는 기술을 개발, 이용해야 할 필요성이 대두되고 있다.

면역억제제는 장기이식뿐만 아니라 루프스, 천식, 당뇨병 등과 같은 자가면역질환은 물론 알러지성 질환 및 류마티스

관절염 등의 분야에서도 필요한 약물로 대두되고 있으므로 면역억제제와 관련된 연구는 환자들의 생존율 연장과 삶의 질을 증진시키게 될 뿐만 아니라 타 치료제의 보조요법제로 사용되어 여러 분야의 치료효과를 증대시킬 수 있는 중요한 약물로 알려져 있다. 그러나 현재 사용되고 있는 면역억제제는 거의 모두가 비특이적인 면역억제제로서 거부반응을 억제하는 용량에서 숙주의 정상 면역반응까지 저해하여, 감염증, 악성종양 등의 합병증을 일으키고, 임상적 필요에 따라 용량을 증가하는 경우에는 여러 심각한 부작용을 초래할 수 있어 우리나라를 포함한 OECD 가입국가 모든 병원에서는 이러한 면역억제제를 투약 받은 모든 환자에 대해 혈중농도 모니터링(therapeutic drug monitoring)을 실시하도록 하고 있다.

한편, 전 세계적으로 면역체계의 과민반응으로 인한 질환이 증가해 감에 따라 면역억제제의 관심이 고조되면서 면역억제제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 면역억제제에 대한 기술 개발에 있어는 세계적으로 미국이 선도적인 위치를 점하고 있으며, 유럽이 그 뒤를 따르고 있고, 국내에서

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 02)380-1804-5, E-mail : hycho@kfda.go.kr

도 새로운 맞춤형 면역억제제의 개발을 시도하고 있지만 그 성과는 아직 미미한 상태이다. 따라서 현재까지는 부작용이 있기는 하지만 싸이클로스포린 A와 타크로리무스가 면역억제제의 치료에 주로 사용되고 있으며(80-90% 정도), 이러한 면역억제제는 사이토카인(IL-1, IL-2, IL-6, IFN- $\alpha$ 와 TNF- $\alpha$ ) 유전자 발현을 조절(글루코코르티코이드)하거나 T세포 수용체에서 인터루킨(IL)-2 등의 사이토카인 생성에 이르는 정보 전달경로를 차단함으로써, 즉 키나제 및 포스파타제 저해인자로서 면역억제작용을 나타내고 있다.<sup>1,4)</sup> 싸이클로스포린과 타크로리무스는 주로 간과 위장관내에서 CYP3A family에 의해 대사되고, 약물수송 단백 중 efflux pump인 P-당단백질(P-GP)의 기질로 알려져 있다.<sup>5)</sup> 이로 인하여 경구 투여시 흡수율 즉, 생체이용률은 약 30%로써 개체내 및 개체간 변동이 매우 커서 실제 생체이용률은 5%-90%까지 다양하게 나타나며, 유효혈중농도범위가 매우 좁고 또한, 고농도에 있어서 신독성, 고혈압, 간독성 및 신경독성 등의 심각한 부작용 때문에 약물모니터링을 실시하고 있다.<sup>6-7)</sup>

약물의 효능은 생체의 유전적 특성 즉 유전형과 밀접한 상관성이 있을 뿐만 아니라 약력학적 특성치나 약물속도론적 체내동태 특성치에 의해서 기술될 수 있으므로 궁극적으로 생체의 유전형과 약력학적 특성치나 약물체내동태 특성

치와는 밀접한 상관성을 나타내게 된다.<sup>8,9)</sup> 따라서 약물유전체학에서는 약물의 용법·용량의 결정(사용법) 측면에서 이러한 유전형과 표현형 즉, 약력학적 특성치나 약물체내동태 특성치와의 상관성 연구를 통해 맞춤 약물요법을 추구하고 있는 것이다.<sup>10)</sup> 특히, 싸이클로스포린과 타크로리무스 등의 면역조절제와 같이 그 효과가 광범위한 제제에 대해 부작용을 최소화 할 수 있고 개개인에 맞는 맞춤요법이 성공적으로 효과를 거두기 위해서는 환자 개개인의 유전형을 찾아내고, 면역억제제의 생체내 거동, 즉 안전성·유효성을 분석·평가할 수 있는 기술의 확립이 중요하다 할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 주요 면역억제제로서 역할을 해온 싸이클로스포린(CsA)과 타크로리무스(tacrolimus)를 모델약물로 하여 CYP3A family와 다제내성 유전자1 (multidrug resistance 1, *MDR1*)의 유전형과 표현형과의 상관성 연구를 통해 환자 개개인에 대한 투여 용량을 조절하는 맞춤약물요법의 근간을 마련하고자 하였다. 본 시험은 임상시험 심사위원회(institutional review board, IRB)를 거쳐 시험계획서의 승인을 받은 후 시험계획서에 따라 수행되었으며 모든 피험자의 동의를 받아서 이루어졌다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

싸이클로스포린 A(Figure 1) 표준품과 내부표준물질로 사용한 싸이클로스포린 D(CsD)는 노바티스(Basal, 스위스)에서, FK506(Figure 1) 표준품은 후지사(Deerfield, IL, 미국)에서 제공받았으며, 내부표준물질로 사용한 아스코마이신 표준품은 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하였다. HPLC용 메탄올은 J.T.Baker사(Phillipsburg, NJ, 미국), 초산, 초산암모늄과 황산이연은 Merck사(Darmstadt, 독일)로부터 구입하였고, 아세토니트릴은 Fisher사(Fair Lawn, NJ, 미국)로부터 구입하여 사용하였다.

약물속도론시험에 사용된 제제는 노바티스(Basal, 스위스)에서 시판하고 있는 “산디문뉴오랄 연질캡슐(싸이클로스포린 A, 100 mg/캡슐)과 후지사(Deerfield, IL, 미국)에서 시판하고 있는 프로그래프 정(FK-506, 1 mg/정)이었다.

혈액시료 분석에 있어서 HPLC용 펌프 및 시료자동주입기로 Perkin-Elmer Series 200 LC 및 Autosampler(Perkin-Elmer, Norwalk, CT, 미국)를, HPLC용 칼럼으로는 Luna phenyl-hexyl column(2×50 mm, 5  $\mu$ m, Phenomenex, Torrance, CA, 미국)을, 컬럼 오븐으로는 HPLC-column oven(Perkin-Elmer Series 200 Column oven)을, MS/MS 검출기로는 API 3000 mass spectrometer(Applied Biosystems PE/

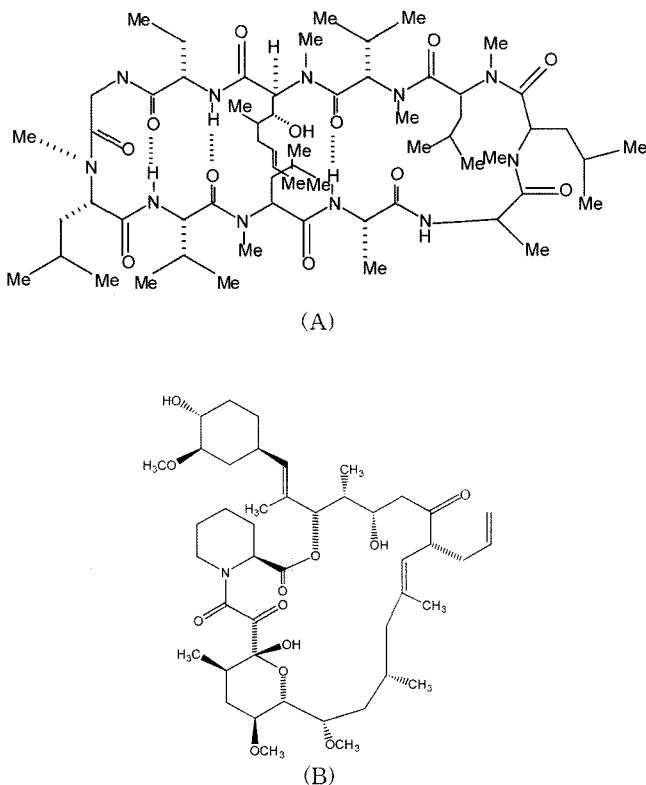


Figure 1—Chemical structures of (A) cyclosporine A and (B) FK506.

SCIEX, Foster City, CA, 미국)를, 데이터 처리장치로는 Analyst(Ver. 1.1.)를 사용하였다.

#### 약물 투약 및 혈액 채취

약물속도론시험을 위하여 14명(싸이클로스포린 A) 및 10명(FK506)의 피험자에 대하여 난수발생법에 따라 무작위 배열한 다음, “산디문뉴오랄 연질캡슐(싸이클로스포린 A) 및 프로그램 정(FK506) 각 1개씩을 경구 투여하였다.

채혈 시간은 약물 투약 직전과 투약 후 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 6, 8, 12 및 24시간에 총 12회 채혈하였다. 채혈 방법은 I.V. catheter 중에 남아 있는 헤파린 처리 생리식염수를 완전히 제거하기 위해 매번 약 2 mL의 혈액을 빼내어 버리고 약 8 mL의 혈액을 채취하여 피험자 관리번호와 채혈시간이 기재되어 있는 헤파린 처리 튜브에 넣고 분석시까지 영하 80°C에서 보관하였다. 채혈 후마다 I.V. catheter 안에 잔류하는 혈액의 응고를 방지하기 위하여 주사용 헤파린을 넣은 주사용 생리식염수를 주입하였다.

#### 전혈 중 싸이클로스포린 A와 FK506의 정량

CsA와 FK506 표준품을 메탄올에 녹여 농도를 1 mg/mL로 만든 후 냉장 보관시키고, 이 용액을 냉동 보관하였던 blank 전혈로 희석하여 CsA의 전혈 중 농도가 각각 10, 20, 50, 100, 500 및 1000 ng/mL, FK506의 전혈 중 농도가 각각 1, 2, 5, 10, 20 및 50 ng/mL가 되도록 검량선용 표준전혈을 조제하였다. 각각의 표준전혈 100 µL을 Eppendorf tube에 넣고 여기에 내부표준물질인 CsD(100 ng/mL)와 아스코마이신(20 ng/mL) 100 µL를 가하고 2분간 vortexing한 다음, 여기에 200 µL의 황산아연(0.2 M 황산아연 20 mL와 80 mL의 메탄올 혼합용액)를 가하고 15분간 vortexing하여 추출한 후 20,800 g에서 15분간 원심분리시켰다. 상층액을 취하여 깨끗한 시험관에 옮긴 다음 질소기류로 증발 건조시켰다. 잔사에 이동상 200 µL로 reconstitution을 시키고 이중 25 µL를 취하여 LC/MS/MS에 주입하였다. 여기에서 얻은 내부표준물질의 피크 면적에 대한 각 약물(CsA와 FK506)의 피크 면적비를 가지고 검량선을 작성하였다. 하루에 실험을 5번 시행하여 일내 재현성을 구하였고, 5일간 실험을 행하여 일간 재현성을 구하였다.

이 때의 LC/MS/MS의 조건은 이미 보고된 싸이클로스포린과 FK506 LC/MS/MS 분석법을 참고,<sup>11-12)</sup> 일부 수정하여 상기 기기 조건하에서 이동상으로 0.1%(v/v) 초산+10 mM 초산암모늄 용액:메탄올(3:97, v/v)의 혼합용액을 사용하였으며 칼럼은 Luna phenyl-hexyl column(2×50 mm, 5 µm, Phenomenex, Torrance, CA, 미국)을 사용하였고, 40°C로

유지하였다. 유속은 0.6 mL/min이었으며, 피이크 검출은 MRM (multiple reaction monitoring) 방법으로 검출하였고 이온화는 electrospray ionization(ESI)을 사용하여 positive mode로 분석하였다.

CsA와 CsD는 m/z 1220/1203과 1234/1217, FK506과 아스코마이신은 m/z 821/768과 809/756의 ion을 precursor ion으로 선정하였다. 선정한 precursor ion의 product ion을 통하여, 가장 잘 검출되는 CsA와 CsD의 product ion은 m/z 1203과 1217, FK506과 아스코마이신의 product ion은 m/z 768과 756의 ion으로 선정하였다. 또한 CsA와 CsD 피이크 유지시간은 약 2.1과 2.2분, FK506과 아스코마이신 피이크 유지시간은 약 2.0과 1.9분이었으며, MS/MS의 높은 선택성 때문에 분석물질에 방해되는 물질은 나타나지 않았다.

한편, 전혈 시료의 분석은 먼저 피험자로부터 각 시간별로 채취하여 영하 80°C에 보관했던 전혈 시료를 실온에 방치하여 녹인 후 3초간 진탕한 다음 이 전혈 100 µL를 취하여 Eppendorf tube에 옮기고 여기에 내부표준물질인 CsD(100 ng/mL)와 아스코마이신(20 ng/mL) 100 µL를 가한 후 상기 검량선 작성을 위한 추출법에 따라 추출하여 얻어진 크로마토그램으로부터 내부표준물질의 피크 면적에 대한 CsA와 FK506의 피크 면적비를 구하여 미리 작성된 검량선에 의해 전혈 시료 중 CsA와 FK506의 농도를 산출하였다.

#### 인체의 대사효소 CYP3A 및 흡수수송체에 대한 유전형 결정

CYP3A4와 CYP3A5에 대한 유전자형 분석을 위한 CYP3A4\*1B(A-392G transition)와 CYP3A5\*3(A-6986G transition) 유전자형 검색은 채취된 혈액으로부터 얻은 백혈구로부터 추출하여 냉동 보관된 DNA를 사용하여 Polymerase Chain Reaction(PCR)-Restriction Fragment Length Polymorphism(RFLP)를 이용, 동정하고자 하는 단일염기다형성이 포함된 유전자 일부분을 증폭시켜 시행하였다.

CYP3A4의 경우 반응은 1 X buffer(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 50 mmol/L KCl, 0.01 g/L gelatin; Perkin-Elmer), 0.2 mmol/L deoxyribonucleoside triphosphate(dNTP, Roche), 1.25 U AmpliTagGold(Perkin-Elmer), 50 ng genomic DNA와 각각 40 pmol primers (forward, reverse)를 포함하는 전체 50 µL 용적의 반응액으로 반응을 시켰다. 94°C에서 1분간, 55°C에서 1분간, 72°C에서 2분간으로 전체 35회의 cycle을 거친 후 72°C에서 7분간 마지막 extension을 시행하였다. 또한 CYP3A5의 경우에는 PCR premix에 DNA 1 µL를 tube에 넣고 F/R-primer

**Table I-Primer Sequence for CYP3A4, CYP3A5 SNP and MDR1 Gene Analysis**

Name	Sequence
(1) CYP3A4*1B Forward	5'-GGACAGCCATAGAGACAACACTGCA-3'
(2) CYP3A4*1B Reverse	5'-CTTTCCTGCCCTGCACAG-3'
(3) CYP3A5*3 Forward	5'-CATCAGTTAGTAGACAGATGA-3'
(4) CYP3A5*3 Reverse	5'-GGTCCAAACAGGGAAGAAATA-3'
(5) MDR1 exon 21 Forward	5'-TGCAGGCTATAGGTTCCAGG-3'
(6) MDR1 exon 21 Reverse	5'-TTTAGTTTGACTCACCTTCCCG-3'
(7) MDR1 exon 26 Forward	5'-TGTTTTTCAGCTGCTTGATGG-3'
(8) MDR1 exon 26 Reverse	5'-AAGGCATGTATGTTGGCCTC-3'

각각 1  $\mu$ L씩을 autoclave한 증류수 17  $\mu$ L에 넣은 후 19  $\mu$ L를 PCR premix에 넣어 전체 20  $\mu$ L 용적의 반응액으로 반응을 시켰다. 94에서 7분간, 94°C에서 1분간, 55°C에서 1분간, 72°C에서 1분간으로 전체 35회의 cycle을 거친 후 72°C에서 7분간 마지막 extension을 시행하였고, 여기에 사용한 Primer의 종류는 모두 Table I에 나타내었다.

각각의 PCR product(334 bp 및 293 bp)는 다시 제한효소인 *Pst*I(Roche)과 *Ssp*I을 이용하여 37°C에서 2시간 incubation시켜 절단하였다. 잘라진 DNA 조각은 3% agarose/Tris-borate-EDTA gel로 전기영동 후 EtBr로 30분 정도 겔을 염색한 후에 UV 아래에서 wild, hetero 및 mutant형을 확인하였다.

#### 인체의 흡수수송체(MDR1)에 대한 유전형 결정

CYP3A4 및 CYP3A5의 방법과 마찬가지로 추출한 DNA로부터 PCR-RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 이용하여 동정하고자 하는 단일염기다형성이 포함된 유전자 일부분을 증폭시켰다.

PCR PreMix에 DNA 추출액 1  $\mu$ L, 10 pmol primer (forward, reverse) 각각 1  $\mu$ L씩, D.I.W. 17  $\mu$ L를 넣어 전체 20  $\mu$ L가 되도록 하였다. 반응 횟수는 전체 35 cycles를 시행하였고, MDR1 exon 21(G2677T) 및 26(C3435T)의 PCR 반응 조건은 동일하며, Primer의 종류는 Table I에 나타내었다. MDR1 G2677T 및 C3435T는 PCR에 의해 전체 224 bp 및 197 bp가 증폭되었고 여기에 *Ban* 10 unit 및 *Sau*3AI 2 unit을 넣어 37°C에서 16시간 동안 반응시켰다. 잘라진 DNA 조각은 2% agarose gel로 전기영동 후 EtBr로 30분 정도 겔을 염색한 후에 UV 아래에서 wild, hetero 및 mutant형을 확인하였다.

#### 약물속도론적 파라미터의 산출 및 평가

실험을 통해 얻은 시간에 따른 혈중농도-시간 곡선으로부터 각 약물에 대한 최고 혈중 농도( $C_{max}$ ), 최고 혈중 농도

도달시간( $T_{max}$ ), 혈중 약물농도-시간 곡선하 면적(AUC), 클리어런스(CI/F) 및 최종상 반감기( $t_{1/2,z}$ ) 등을 WinNonlin 프로그램을 이용하여 평가하였다.

한편 사이클로스포린과 타크로리무스의 체내동태 파라미터 즉, 표현형과 CYP3A5 및 MDR1 유전형과의 상관성을 비모수적 통계 수법을 통해 분석·평가하였다. 모든 측정치와 계산치는 평균·표준편차로 나타내고  $P < 0.05$ 인 경우에만 유의성이 있다고 판정하였다.

## 결과 및 고찰

#### 전혈 중 사이클로스포린 A와 FK506 분석법 검증

전혈 시료로부터 구한 CsA 및 FK506 검량선의 계산식은 각각 CsA 피이크 면적비 =  $0.0087 \times \text{CsA 농도}(\text{ng/mL}, x) + 0.1026$  ( $R^2 = 0.9999$ ,  $P < 0.01$ ) 및 FK506 피이크 면적비 =  $0.1768 \times \text{FK506 농도}(\text{ng/mL}, x) + 0.0723$  ( $R^2 = 0.9998$ ,  $P < 0.01$ )으로 검량선 작성 농도 범위에서 모두 양호한 직선성을 나타내었다. 전혈 중 CsA 및 FK506 최저정량한계(LLOQ, lower limit of quantitation)는 신호대 잡음비(S/N ratio)를

**Table II-Precisions and Accuracies for the Determination of CsA and FK506**

Analyte	Concentration (ng/mL)	Coefficient of Variation (%)		Accuracy (%; n=5)
		Within Day (n=5)	Between Day (n=5)	
CsA	10	10.20	10.20	103.7
	20	4.89	5.08	99.2
	100	3.16	3.67	98.6
	500	2.80	2.98	100.5
FK506	1	11.07	14.76	95.3
	2	7.82	8.36	92.1
	10	6.25	7.91	94.8
	20	4.52	4.20	102.6

C.V.(Coefficient of Variation) = (S.D./mean)  $\times$  100

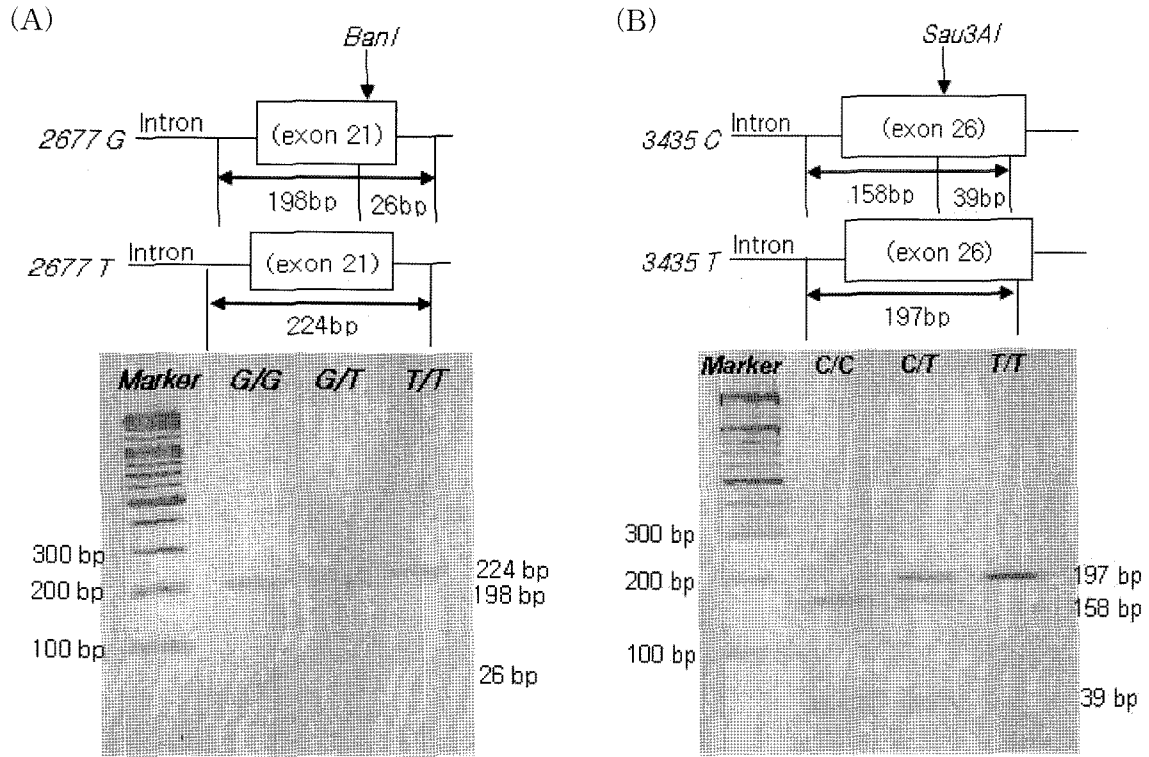


Figure 2-PCR-based diagnostic test for MDRI (A) G2677T and (B) C3435T mutation.

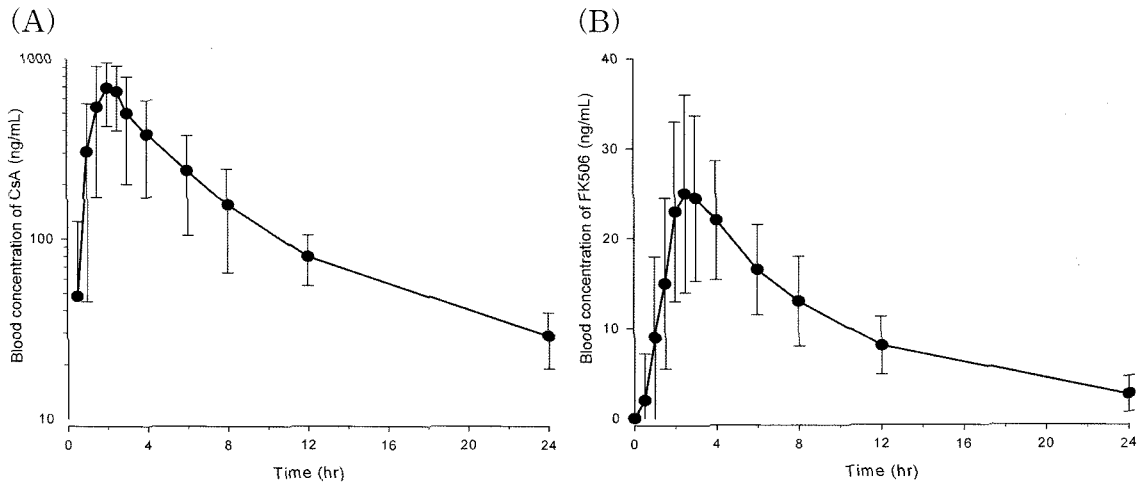


Figure 3-Mean blood CsA (A) and FK506 (B) concentration-time curves after oral administration to normal subjects. Each point represents mean concentration ( $\pm$ S.D.) of 14 (CsA) and 10 (FK506) subjects.

10으로 하고 정밀성이 20% 이하이고, 정확성이 80~120%인 조건을 만족하는 10 및 1 ng/mL이었다. 최저정량한계를 제외한 검량선 농도 범위에서 CsA 및 FK506의 일내 및 일간 변동계수(C.V.)는 모두 15% 이하로 나타났고, 정확성은 92.1~103.7%이었다(Table II).

이로부터 전혈 중 CsA 및 FK506에 대한 본 분석법은 인체에 대한 약물속도론 시험에 이용될 수 있는 충분한 감

도와 특이성, 직선성, 정밀성 및 정확성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

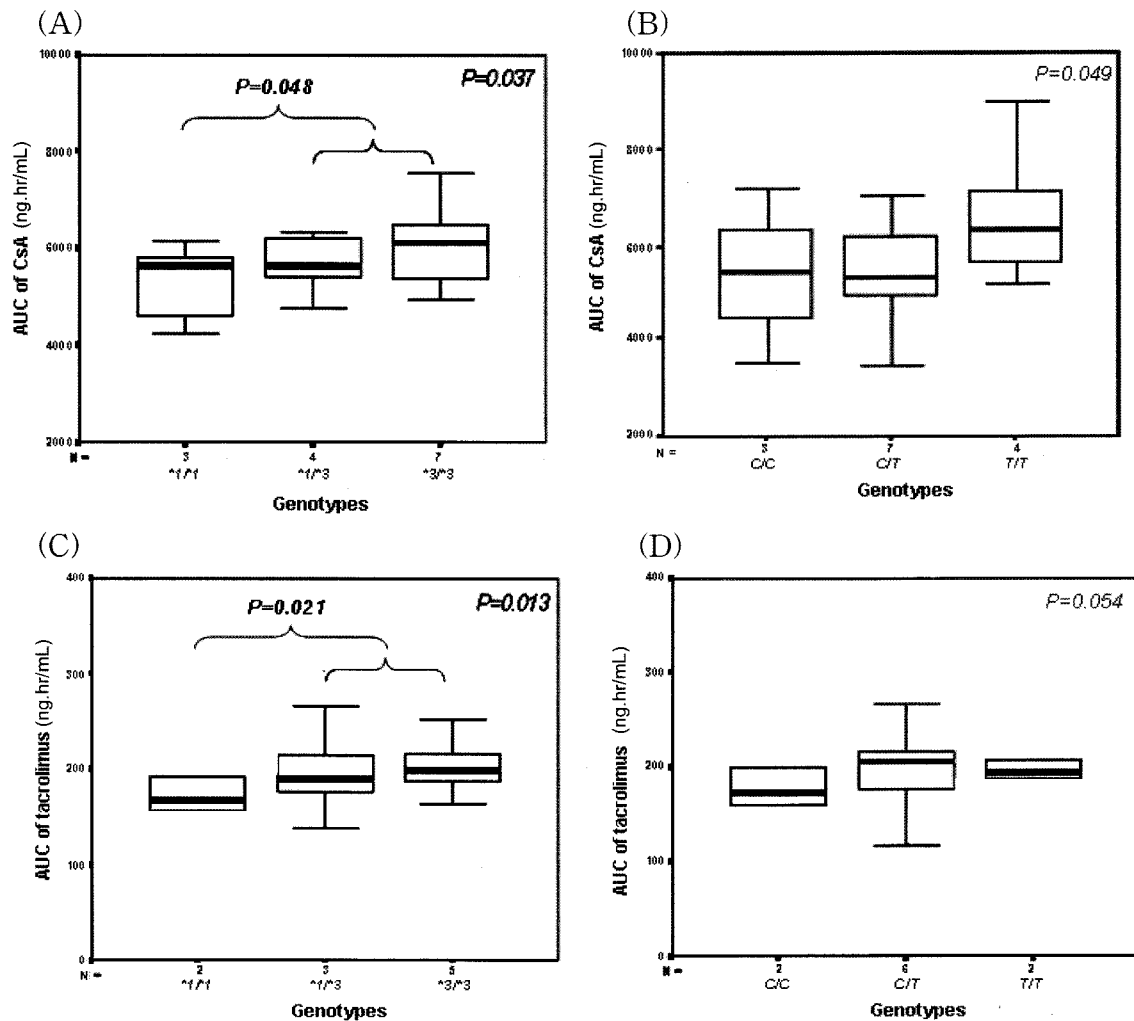
**CYP3A4, CYP3A5와 MDRI 유전자 유전형결과**

CYP3A4와 CYP3A5 각각의 PCR product(334 bp와 293 bp)에 대해 전기영동으로 잘라진 DNA 절편의 크기를 확인한 결과 CYP3A4\*1B allele이 없는 피험자의 경우 199, 81,

**Table IV**—Pharmacokinetic Parameters of CsA and FK506 in the Different *CYP3A5* and *MDR1* Genotype Groups

Genotype	<i>CYP3A5</i>			<i>MDR1</i> (3435C>T)		
	*1/*1	*1/*3 + *3/*3	<i>P</i> -value	C/C	C/T + T/T	<i>P</i> -value
CsA	n=3	n=4+n=7		n=3	n=7+n=4	
<i>AUC</i> (ng·hr/mL)	5642±1442	6012±1721	0.048	5418±1673	6902±1832	0.046
<i>C<sub>max</sub></i> (ng/mL)	571±267	725±298	0.041	534±245	843±278	0.039
<i>T<sub>max</sub></i> (hr)	2.9±0.3	3.2±0.4	>0.05	3.0±0.4	3.2±0.5	>0.05
<i>T<sub>1/2</sub></i> (hr <sup>-1</sup> )	16.2±1.1	18.6±1.5	>0.05	17.8±1.2	18.2±1.4	>0.05
<i>Cl/F</i> (L/hr)	70.8±21.7	66.5±19.7	0.048	73.8±19.1	57.9±18.2	0.046
FK506	n=2	n=3+n=5		n=2	n=6+n=2	
<i>AUC</i> (ng·hr/mL)	171	220±34	0.021	168	198±58	0.052
<i>C<sub>max</sub></i> (ng/mL)	16.1	25.3±10.0	0.049	15.4	21.9±11.8	0.051
<i>T<sub>max</sub></i> (hr)	2.0	2.3±0.2	>0.05	1.8	2.2±0.3	>0.05
<i>T<sub>1/2</sub></i> (hr <sup>-1</sup> )	9.7	11.3±0.3	>0.05	8.7	11.2±0.7	>0.05
<i>Cl/F</i> (L/hr)	2.8	2.1±0.8	0.021	3.0	2.5±1.4	0.052

Data represent mean±S.D.

**Figure 4**—Comparison of the AUC of CsA (A and B) and FK506 (C and D) among the three different *CYP3A5* (A and C) and *MDR1* C3435T (B and D) genotype groups.

33 및 21 bp의 4개의 밴드가 얻어지지만 mutation이 있는 경우 220, 81 및 33 bp 크기의 3개의 밴드가 얻어졌으며, *CYP3A5*\*3 allele이 없는 피험자의 경우 148, 125 및 20 bp의 3개의 밴드가 얻어지지만 mutation이 있는 경우 168 및 125 bp 크기의 2개의 밴드가 얻어졌다.

한편, *MDR1* exon 21 및 26에 대해 잘라진 DNA 절편의 크기를 확인한 결과 exon 21 wild 형에서는 198과 26 bp 크기의 DNA 절편이 생기고 mutant 형에서는 원래의 PCR product 크기인 224 bp 크기의 절편만이 관찰되었으며, exon 26 wild 형에서는 158과 39 bp 크기의 DNA 절편이 생기고 mutant 형에서는 원래의 PCR product 크기인 197 bp 크기의 절편만이 관찰된다. 또 hetero 형에서는 C allele과 T allele이 모두 존재하므로 197, 158 및 39 bp 크기의 절편이 모두 관찰되었다(Figure 2).

#### 약물속도론적 파라메타 산출 및 유전형과 상관성 평가

단회투여의 피험자 14명(CsA) 및 10명(FK506) 피험자로부터 일정 시간마다 채혈하여 얻은 각 평균 전혈 중 약물농도-시간 곡선은 Figure 3에 나타내었다. 또한, 각 피험자의 전혈 중 약물농도-시간 곡선으로부터 구한 약물속도론적 파라미터를 바탕으로 CsA와 FK506 체내동태 파라미터와 *CYP3A4*, *3A5* 및 *MDR1* gene의 유전적 다형성과의 상관성 분석을 수행하였다. 이를 위한 유전형 검색 결과 *CYP3A4*에서는 변이형 allele을 가진 피험자는 나타나지 않았고, *MDR1* exon21 유전형 군 간에는 두 약물 모두 통계적으로 유의한 차이는 나타나지 않았다. 반면, CsA는 AUC 및  $C_{max}$ 에서 *CYP3A5* 유전형 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내었을 뿐 아니라( $P=0.037$  및  $P=0.030$ ). *MDR1* exon26(C3435T) 유전형 군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다( $P=0.049$  및  $P=0.041$ ). 그러나 FK506의 경우에는 *CYP3A5* 및 *MDR1* exon26(C3435T) 유전적 변이를 나타낸 군에서의 AUC가 증가되는 경향을 나타냈으나 *CYP3A5* 유전형 군 간에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다( $P=0.013$ ) (Table IV, Figure 4).

## 결 론

의약품들의 임상치료효과나 부작용 발생 등은 개인에 따라 차이가 발생하여 동일한 조건에서 같은 양의 약물을 투여하였을 때 개개인에 따라 혈중 약물 농도는 100배 이상 차이가 날 수 있다. 약물반응에 대한 이러한 차이는 나이, 성별, 환경 및 유전적 결정인자 등 수많은 요인 이외에도 약물대사효소나 약물수송체의 유전자 변형으로 인한 차이에 기

인한다는 것이 밝혀지면서 약물요법에 있어서 환자 개개인의 유전적 다양성에 대한 관심이 커지고, 약물요법에 있어서 유전적 다양성의 중요성이 크게 부각되기 시작하였다. 특히 사이클로스포린과 타크로리무스 등의 면역조절제와 같이 그 치료영역이 매우 좁은 약물의 투여에 있어서는 부작용을 최소화 할 수 있고 개개인에 맞는 맞춤형이 더욱 절실히 요구되고 있으므로 개개인의 유전형과 이러한 면역억제제의 생체내 거동의 상관성을 규명함으로써 약물의 투약 설계에 있어서 유용한 정보를 제공할 수 있다.

따라서 본 연구에서는 개개인의 유전형과 면역억제제 약물에 대한 표현형과의 상관성을 규명하기 위해 주요 면역억제제로 사용되고 있는 사이클로스포린 A와 타크로리무스 약물 체내동태의 개인 간 차이가 *CYP3A4*, *3A5* 및 *MDR1*의 exon 21과 26에서의 유전적 다형성에 기인하는지를 연구한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 먼저, 14명과 10명(총24명)의 피험자에 대해 PCR-RFLP 진단법을 사용하여 유전형 검색 결과 *CYP3A4*에서는 변이형 allele을 가진 피험자는 나타나지 않았다. 한편 *CYP3A5*와 *MDR1* 유전자의 유전형을 검색 결과를 바탕으로(*CYP3A5*\*1/\*1; 5명, \*1/\*3; 7명, \*3/\*3; 12명, *MDR1* C3435T C/C; 5명, C/T; 13명, T/T; 6명) 각 피험자에게 CsA 100 mg 캡슐과 FK506 1 mg 정제를 경구 투여한 후 24시간에 걸쳐 얻은 전혈 중 각 약물 농도를 분석하여 약물 동태 특성치를 구하였다. 그 결과 CsA는 AUC 및  $C_{max}$ 에서 *CYP3A5* 유전형 군 간에 통계적으로 유의한 차이를 나타내었을 뿐 아니라( $P=0.037$  및  $P=0.030$ ). *MDR1* exon26(C3435T) 유전형 군 간에서도 통계적으로 유의한 차이를 나타내었으나( $P=0.049$  및  $P=0.041$ ) FK506의 경우에는 *CYP3A5* 유전형 군 간에서만 통계적으로 유의한 차이를 나타내었다( $P=0.013$ ). 따라서 이러한 면역억제제에 대한 약물 대사효소와 수송체에서의 SNPs를 규명함으로써 개인 맞춤형 약물요법 설계를 위한 유용한 정보를 제공, 향후 약물치료에 유용한 자료로 활용될 수 있을 것으로 사료되었다.

## 감사의 말씀

이 논문은 2005년도 정부(교육인적자원부)의 재원으로 한국학술진흥재단의 지원을 받아 수행된 연구(KRF-2005-214-E00014)이며, 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- 1) S. Matsuda, F. Shibasaki, K. Takehana, H. Mori, E. Nishida and S. Koyasu, Two distinct action mechanisms of immunophilin-ligand complexes for the blockade of T-cell

- activation, *EMBO rep.*, **1**, 428-434 (2000).
- 2) P. Pintavorn and B.J. Ballermann, TGF-beta and the endothelium during immune injury, *Kidney Int.*, **51**, 1401-1412 (1997).
  - 3) M.G. Crespo-Leiro, Tacrolimus in heart transplantation. *Transpl. Proc.*, **35**, 1981-1983 (2003).
  - 4) R. Lama, F. Santos, F.J. Algar, A. Alvarez and C. Baamonde, Lung transplants with tacrolimus and mycophenolate mofetil, *Transpl. Proc.*, **35**, 1968-1973 (2003).
  - 5) M.F. Herbert, Contributions of hepatic and intestinal metabolism and P-glycoprotein to cyclosporine and tacrolimus oral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **27**, 201-214 (1997).
  - 6) P. Belitsky, G.A. Levy and A. Johnston, Neoral absorption profiling: and evolution in effectiveness, *Transpl. Proc.*, **32**(Suppl 3A), 45S-52S (2000).
  - 7) V.W. Armstrong and M. Oellerich, New developments in the immunosuppressive drug monitoring of cyclosporine, tacrolimus and azathioprine, *Clin. Biochem.*, **34**, 9-16 (2001).
  - 8) W. Sadée, Pharmacogenomics: the implementation phase, *AAPS PharmSci.*, **4**(2), E5 (2002).
  - 9) M. Ingelman-Sundberg, M. Oscarson and R.A. McLellan, Polymorphic human cytochrome P450 enzymes: an opportunity for individualized drug treatment, *Trends Pharmacol. Sci.*, **20**, 342-349 (1999).
  - 10) W.E. Evans and M.V. Relling, Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics, *Science*, **286**(5439), 487 (1999).
  - 11) U. Ceglarek, J. Lembcke, G.M. Fiedler, M. Werner, H. Witzigmann, J.P. Hauss and J. Thiery, Rapid simultaneous quantification of immunosuppressants in transplant patients by turbulent flow chromatography combined with tandem mass spectrometry, *Clin. Chim. Acta.*, **346**(2), 181-190 (2004).
  - 12) A. Volosov, K.I. Napoli and S.J. Soldin, Simultaneous simple and fast quantification of three major immunosuppressants by liquid chromatography- tandem mass spectrometry, *Clin. Biochem.*, **34**(4), 285-290 (2001).