



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0121962
(43) 공개일자 2016년10월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 15/63 (2006.01) C07K 14/80 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01) C12N 5/071 (2010.01)
G01N 33/50 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 15/63 (2013.01)
C07K 14/80 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0051874

(22) 출원일자 2015년04월13일
심사청구일자 2015년04월13일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

대한민국 (식품의약품안전처장)

충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 오송생명2로 187

(72) 발명자

동미숙

서울특별시 서초구 동광로22길 23, 504호 (방배동, 그랑씨엘)

최지윤

대구광역시 동구 팔공로24길 105 (도동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김순용

전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 사이토크롬 P450 아이소폼 과발현 벡터 및 이에 의하여 형질전환된 세포주

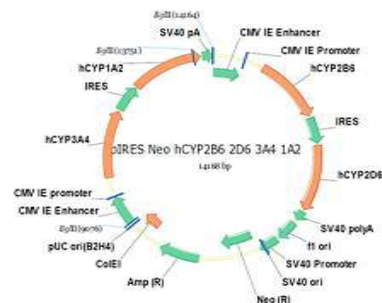
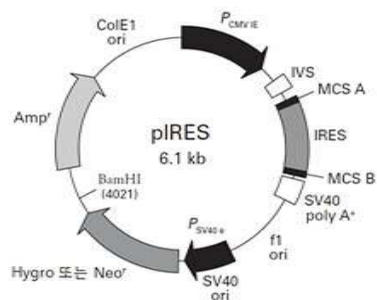
(57) 요약

본 발명은 약물대사 또는 독성 검사를 위하여 3종 이상의 사이토크롬 P450 아이소폼이 과발현 되도록 형질전환된 벡터 및 이에 의하여 형질전환된 세포주에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 세포주를 이용하여 약물대사 또는 독성을 검사하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 상기 세포주를 이용하는 경우 in vitro에서 정확하고 효과적인 약물 독성 검사가 가능하다. 특히, 본 발명에 따른 약물 독성 검사는 인체 위해성 평가 측면에서 단일 세포주 및 단일 장기를 표적으로 하는 기존 연구의 단점을 보완하며, 독성물질 노출 시 발생하는 장기 간 상호연계 작용과 이에 따라 증폭되는 독작용을 반영하기 위하여, 2종 세포 동시 배양 시스템을 이용한 다장기 상호연계독성을 판단할 수 있다.

대 표 도 - 도1

(가)



(나)

	set1	set2	set3	set4	set5	set6	set7
MCS A	CYP3A4	CYP2B6	CYP2C9	CYP2E1	CYP3A4 CYP1A2	CYP3A4 CYP1A2	CYP2E1 CYP2A6
MCS B	CYP1A2	CYP2D6	CYP2C19	CYP2A6	CYP2B6 CYP2D6	CYP2E1 CYP2A6	CYP3A4 CYP1A2

(52) CPC특허분류

C12N 15/85 (2013.01)

C12N 5/067 (2013.01)

G01N 33/5067 (2013.01)

C12N 2502/00 (2013.01)

(72) 발명자

나대승

경기도 수원시 팔달구 수성로101번길 20, 124동
801호 (화서동, 꽃피양지마을 (대우아파트))

성원근

세종특별자치시 조치원읍 도장말길 30, 301동 801
호 (신동아파밀리에)

정자영

세종특별자치시 달빛1로 158, 705동 1003호 (아름
동, 범지기마을 7단지)

노항식

충청북도 청주시 서원구 창직로 50, 410동 1602호
(사직동, 청주푸르지오캐슬아파트)

석지현

세종특별자치시 보듬2로 43, 1505동 704호 (도담동, 도람마을 15단지)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 13182다장기988-1

부처명 식품의약품안전처

연구관리전문기관 식품의약품안전평가원

연구사업명 다장기 상호연계독성평가기술개발 사업단

연구과제명 다장기 상호연계독성 평가를 위한 in vitro 시험법 개발

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교

연구기간 2013.02.15 ~ 2015.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 및 CYP2A6로 이루어진 군으로부터 3종 이상 선택된 사이토크롬 P450 (cytochrome P450)의 아이소폼 (isoform)을 함유하는 재조합 벡터.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 벡터는 바이시스트로닉 (bicistronic) 벡터인 것인, 재조합 벡터.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 재조합 벡터는 사이토크롬 P450 (cytochrome P450)의 아이소폼 (isoform)의 4종 이상이 2 종 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되며;

상기 사이토크롬 P450 (cytochrome P450)의 아이소폼 (isoform) 사이는 2 이상의 바이시스트로닉 (bicistronic) 사이트에 의하여 연결된 것인, 재조합 벡터.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 재조합 벡터는 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6 및 CYP2D6를 포함하는 것인, 재조합 벡터.

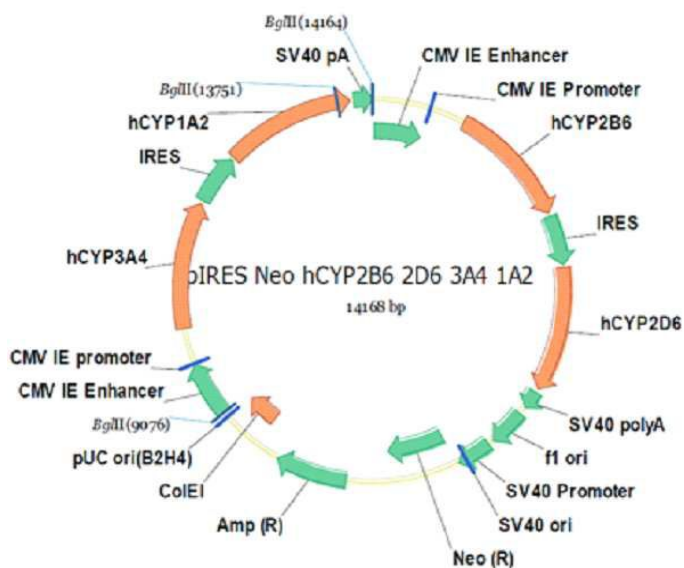
청구항 5

청구항 4에 있어서, 상기 재조합 벡터는

- (1) 제 1 프로모터에 작동적으로 연결된 CYP3A4 및 CYP1A2; 및
- (2) 제 2 프로모터에 작동적으로 연결된 CYP2B6 및 CYP2D6를 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 재조합 벡터는 하기의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터;



청구항 7

청구항 1 내지 6 중 어느 한 항의 재조합 벡터로 형질전환된 세포주.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 세포주는 간세포주인 것인, 세포주.

청구항 9

청구항 7에 있어서, 상기 세포주는 수탁번호 KCLRF-BP-00338인 것을 특징으로 하는, 세포주.

청구항 10

청구항 7의 세포주에 임의의 물질을 처리하는 단계; 및

상기 세포주의 생장을 확인하는 단계를 포함하는, 임의의 물질의 활성 또는 독성을 검사하는 방법.

청구항 11

청구항 10에 있어서, 상기 세포주는 1 종 이상의 장기 유래 세포주와 공배양된 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 12

청구항 11에 있어서, 상기 1종 이상의 장기 유래 세포주는 간, 신장, 혈관, 폐, 췌장, 심장, 피부, 내피, 골, 골수, 혈액, 치아, 위, 갑상선, 자궁, 전립선, 신경, 및 근육으로 이루어진 군으로부터 선택된 장기 유래 세포주인 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 13

청구항 10에 있어서, 상기 방법은 다장기 상호 연계 독성을 평가하기 위한 것인, 방법.

청구항 14

청구항 11에 있어서, 상기 공배양은 공배양된 1종 이상의 장기 유래 세포주의 배양 배지에서 실시되는 것인, 방법.

청구항 15

청구항 10에 있어서, 상기 임의의 물질의 활성은 약물대사 활성 측정 또는 약물상호작용 평가인 것인, 방법.

청구항 16

청구항 15에 있어서, 상기 방법은 사이토크롬 P450 (cytochrome P450)의 아이소폼의 효소 활성을 측정하는 단계를 포함하는 것인, 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 약물대사 또는 독성 검사를 위하여 3종 이상의 사이토크롬 P450 아이소폼이 과발현 되도록 형질전환된 벡터 및 이에 의하여 형질전환된 세포주에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 상기 형질전환된 세포주를 이용하여 약물대사 또는 독성을 검사하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 의약품이나 독성화학물질들은 생체내에서 대사되어 독성을 나타내거나 독성이 약해져서 체외로 배설된다. 이러한 대사에 가장 중요한 역할을 하는 효소가 사이토크롬 (cytochrome) P450(CYP)이다. CYP는 사람이나 동물에서 약물의 대사에 가장 중요한 장기인 간(liver)에 가장 많이 존재한다.

[0004] 이러한 CYP는 박테리아로부터 사람에 이르기까지 모두 생물에 존재하여 수백 종 이상의 isoform이 현재까지 알려져 있으며, 사람 간에서 주로 약물대사에 작용하는 CYP 아이소폼(isoform)은 약 8종으로 CYP3A4가 46%, CYP2C9 16%, CYP2C19와 CYP2D6가 12%, CYP1A2 9%, CYP2B6와 CYP2E1가 2% 등이 약 85%의 약물을 대사시키는 것

으로 보고되었다.

- [0005] 특히 종간의 CYP 아이소폼의 특이성이 있어 약물이나 독성물질에 대해 동물과 사람의 약물대사능이 달라 동물과 사람에서 독성이나 약효 시험결과가 사람과 다른 경우가 많다.
- [0006] 따라서 신약개발 시 약물의 대사나 독성을 연구하는 경우, 사람의 CYP를 함유하고 있는 동물이나 세포가 필요하나 간암세포주를 포함한 거의 모든 세포주에는 간에서 약물을 대사시키는 CYP 아이소폼들이 거의 발현되지 않는다. 이에 따라 사람 CYP 아이소폼을 과발현시킨 형질전환동물이나 형질전환 세포, 사람 일차배양 간세포를 사용하고 있다.
- [0007] CYP 과발현 기술과 관련된 선행기술을 살펴보면 한 종의 CYP 아이소폼을 세포 또는 E. coli에 영구 과발현시켜 이의 촉매작용을 화학합성에 이용하거나 CYP 과발현을 증가시키는 방법들이 있다. 그리고 독성평가를 위한 CYP 영구 과발현시킨 세포주의 경우 주로 암세포에 한 종류의 CYP isoform을 과발현시키거나 또는 bicistronic plasmid를 사용하여 CYP와 NADPH-cytochrome P450 reductase를 동시에 과발현시킨 것이 보고되어 있다.
- [0008] 그러나 현재까지 3종 이상의 CYP 아이소폼이나 관련 대사효소들을 한 플라스미드를 사용하여 포유류 세포에 과발현시켰다는 보고가 전세계적으로 아직 없으며, 세포주에 여러 CYP 아이소폼을 동시에 과발현시키기가 어렵다는 문제점이 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 출원번호: 10-2000-0028923

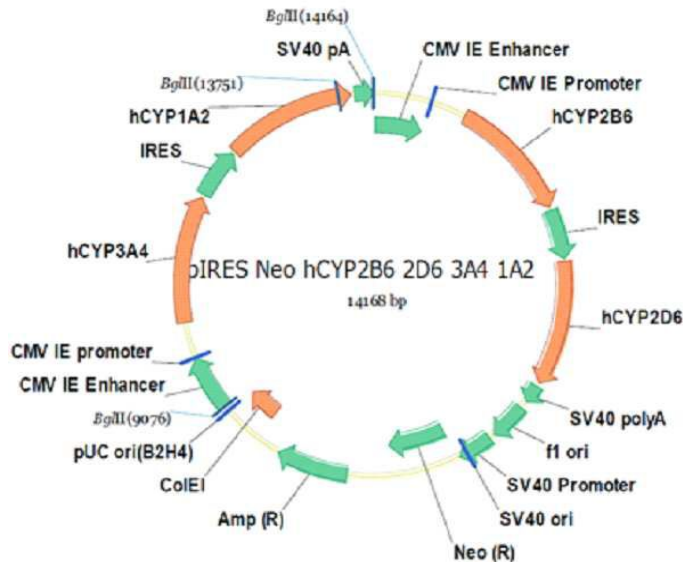
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 이에 본 발명자들은 3종 이상의 CYP 아이소폼을 성공적으로 하나의 세포에 동시에 형질전환시킴으로써, 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 일 양상은 본 발명은 약물대사 또는 독성 검사를 위하여 3종 이상의 CYP 아이소폼이 과발현되도록 형질전환된 벡터 및 이에 의하여 형질전환된 세포주를 제공하는 것이다.
- [0012] 또한 본 발명의 다른 양상은 상기 세포주를 이용하여 약물대사 또는 독성을 검사하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 따라서, 본 발명은 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 및 CYP2A6로 이루어진 군으로부터 3종 이상 선택된 CYP의 아이소폼을 함유하는 제조합 벡터를 제공한다.
- [0014] 상기 벡터는 바이시스트로닉 (bicistronic) 벡터일 수 있다.
- [0015] 또한, 상기 CYP 아이소폼은 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6 및 CYP2D6으로 이루어진 군으로부터 3종 이상 선택된 CYP 아이소폼일 수 있다.
- [0016] 상기 벡터의 바람직한 형태는 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6 및 CYP2D6를 포함하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 상기 제조합 벡터는 CYP 아이소폼의 4종 이상이 2 종 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되며; 상기 CYP 아이소폼 사이는 2 이상의 바이시스트로닉 사이트에 의하여 연결된 것일 수 있다. 더욱 바람직하게는 (1) 제 1 프로모터에 작동적으로 연결된 CYP3A4 및 CYP1A2; 및 (2) 제 2 프로모터에 작동적으로 연결된 CYP2B6 및 CYP2D6를 포함하는 것을 특징으로 하는, 제조합 벡터이며, 본 발명의 벡터의 가장 바람직한 예는 하기의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 제조합 벡터일 수 있다.



[0017]

[0018]

또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터로 형질전환된 세포주를 제공한다.

[0019]

상기 세포주는 간세포주일 수 있으며, 상기 세포주의 수탁번호는 KCLRf-BP-00338일 수 있다.

[0020]

또한, 본 발명은 상기 재조합 벡터를 이용하여 세포주를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 독성 검사용 세포주의 제조 방법을 제공한다.

[0021]

또한 본 발명은 상기의 형질전환된 세포주에 임의의 물질을 처리하는 단계; 및

[0022]

상기 세포주의 성장을 확인하는 단계를 포함하는, 임의 물질의 독성을 검사하는 방법을 제공한다.

[0023]

상기 세포주는 1 종 이상의 장기 유래 세포주와 공배양된 것일 수 있다. 상기 1종 이상의 장기 유래 세포주는 간, 신장, 혈관, 폐, 췌장, 심장, 피부, 내피, 골, 골수, 혈액, 치아, 위, 갑상선, 자궁, 전립선, 신경, 및 근육으로 이루어진 군으로부터 선택된 장기 유래 세포주일 수 있으며, 상기 방법은 다장기 상호 연계 독성을 평가하기 위한 것일 수 있다.

[0024]

상기 세포주는 부티오닌-설폭시민 (buthionine sulfoximine, BSO)으로 전처리 된 것일 수 있다. 공배양은 공배양된 1종 이상의 장기 유래 세포주의 배양 배지상에서 실시되는 것 일 수 있다.

[0025]

또한, 상기 방법에서, 상기 임의의 물질의 활성은 약물대사 활성 측정 또는 약물상호작용 평가일 수 있으며, 방법은 사이토크롬 P450 (cytochrome P450)의 아이소폼의 효소 활성을 측정하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0026]

본 발명에 따른 상기 세포주를 이용하는 경우 in vitro에서 정확하고 효과적인 약물 독성 검사가 가능하다. 특히, 본 발명에 따른 약물 독성 검사는 인체 위해성 평가 측면에서 단일 세포주 및 단일 장기를 표적으로 하는 기존 연구의 단점을 보완하며, 독성물질 노출 시 발생하는 장기 간 상호연계 작용과 이에 따라 증폭되는 독작용을 반영하기 위하여, 2종 세포 동시 배양 시스템을 이용한 다장기 상호연계독성을 판단할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0027]

도 1은 CYP 과발현 세포주 구축을 위한 (가) vector map 및 (나) 7가지 set 별 CYP isoforms을 나타낸 것이다.

도 2는 HepG2/CYPs5의 enzyme activity와 gene expression을 측정한 결과로 (가) RT-PCR을 이용한 CYP gene expression 관찰, (나) LC/MS를 이용한 enzyme activity 관찰, (다) Luciferase를 이용한 날짜별 enzyme

activity 관찰 결과이다.

도 3은 HepG2/CYPs7의 enzyme activity와 gene expression 측정한 결과로, (가) RT-PCR을 이용한 CYP gene expression 관찰, (나) Luciferase를 이용한 enzyme activity 관찰 결과이다.

도 4는 다장기 연계 Cyclosporine A 세포독성에 4종의 CYP 과발현이 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 5는 BSO 처리군과 비처리군의 시간에 따른 GSH levels을 측정한 결과이다.

그림 6은 IdMOC assay system에서 다장기 유래 세포의 상호 연계 독성실험 진행 과정을 나타낸 도이다.

도 7은 96well IdMOC assay system에서 BSO 처리군과 비처리군에서의 cyclosporin A 세포독성을 비교한 결과이다.

도 8은 24well IdMOC assay system에서 Amiodarone의 세포연계독성을 비교한 결과로, (가) HepG2 세포, (나) HK-2 세포, (다) HUVEC 세포를 나타낸다.

도 9는 24well IdMOC plate에서 Cyclophosphamide의 세포연계독성을 비교한 결과이다 (가) HepG2, (나) HK-2, (다) HUVEC 세포를 나타낸다.

도 10은 24well IdMOC assay system에서 Tacrolimus (FK506)의 세포연계독성을 비교한 결과이다. (가) HepG2 세포, (나) HK-2 세포, (다) HUVEC 세포를 나타낸다.

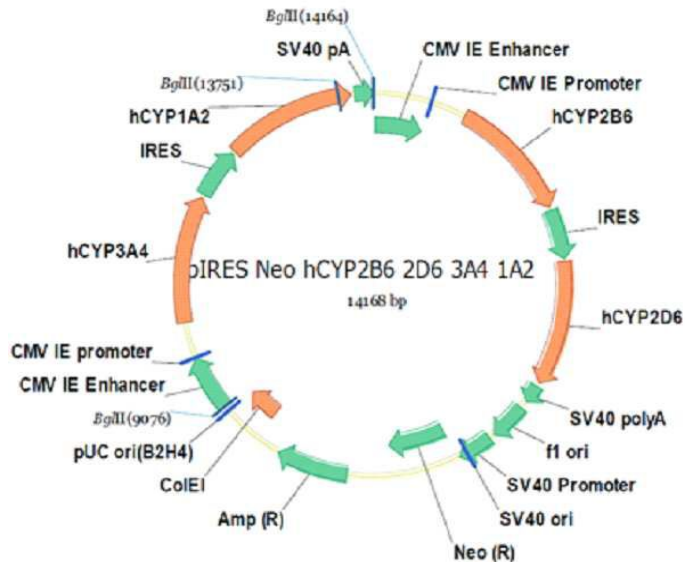
도 11은 24well IdMOC assay system에서 thioacetamide (FK506)의 세포연계독성을 비교한 결과이다. (가) HepG2 세포, (나) HK-2 세포, (다) HUVEC 세포를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명의 일 양상은 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 및 CYP2A6로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 사이토크롬 P450 (cytochrome P450)의 아이소폼 (isoform)을 함유하는 재조합 벡터를 제공한다.
- [0029] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명에서 사이토크롬 P450 (cytochrome P450, CYP)는 약물, 발암원 및 환경적 오염원 같은 외래물질과 스테로이드, 지방산 및 비타민과 같은 내부 기질의 산화를 촉진하는 헴(heme)단백질의 일원으로, 간을 포함하여 신장, 장관 및 폐와 같은 기관에서 다양한 아형이 발견되었다.
- [0031] 약물 산화대사의 약 80%를 담당하고 있는 슈퍼패밀리 CYP 효소는 인체에서만 현재 11가지의 패밀리가 알려져 있는데, 이 중 약물대사에는 1~4가지 패밀리가 관여하고 있으며, 30가지 이상의 동효소(isozymes)가 알려져 있다.
- [0032] 상기 CYP의 아이소폼은 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 및 CYP2A6 중 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6 및 CYP2D6으로 이루어진 군으로부터 3종 이상 선택될 수 있다.
- [0033] 상기 벡터(vector)는 숙주 세포에서 목적 유전자를 발현시키기 위한 수단을 의미한다. 예를 들어, 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터 및 박테리오파아지 벡터, 아데노바이러스 벡터, 레트로바이러스 벡터 및 아데노-연관 바이러스 벡터와 같은 바이러스 벡터를 포함한다. 상기 재조합 벡터로 사용될 수 있는 벡터는 당업계에서 종종 사용되는 플라스미드 (예를 들면, pSC101, pGV1106, pACYC177, ColE1, pKT230, pME290, pBR322, pUC8/9, pUC6, pBD9, pHCT9, pIJ61, pLAFR1, pHV14, pGEX 시리즈, pET 시리즈 및 pUC19 등), 파지 (예를 들면, λ gt4 λ B, λ -Charon, λ Δz1 및 M13 등) 또는 바이러스 (예를 들면, CMV, SV40 등)를 조작하여 제작될 수 있다.
- [0034] 상기 재조합 벡터에서 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 및 CYP2A6를 코딩하는 폴리뉴클레오티드는 프로모터에 작동적으로 연결될 수 있다. 용어 "작동적으로 연결된(operatively linked)"은 뉴클레오티드 발현 조절 서열(예를 들면, 프로모터 서열)과 다른 뉴클레오티드 서열 사이의 기능적인 결합을 의미한다. 따라서, 이에 의해 상기 조절 서열은 상기 다른 뉴클레오티드 서열의 전사 및/또는 해독을 조절할 수 있다.
- [0035] 상기 재조합 벡터는, 전형적으로 클로닝을 위한 벡터 또는 발현을 위한 벡터로서 구축될 수 있다. 상기 발현용 벡터는 당업계에서 식물, 동물 또는 미생물에서 외래의 단백질을 발현하는데 사용되는 통상의 것을 사용할 수

있다. 상기 재조합 벡터는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 구축될 수 있다.

- [0036] 상기 재조합 벡터는 원핵 세포 또는 진핵 세포를 숙주로 하여 구축될 수 있다. 예를 들어, 진핵 세포를 숙주로 하는 경우에는, 벡터에 포함되는 진핵 세포에서 작동하는 복제원점은 f1 복제원점, SV40 복제원점, pMB1 복제원점, 아데노 복제원점, AAV 복제원점, CMV 복제원점 및 BBV 복제원점 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 포유동물 세포의 계놈으로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 메탈로티오닌 프로모터) 또는 포유동물 바이러스로부터 유래된 프로모터 (예를 들어, 아데노바이러스 후기 프로모터, 백시니아 바이러스 7.5K 프로모터, SV40 프로모터, 사이토메갈로바이러스 (CMV) 프로모터 및 HSV의 tk 프로모터)가 이용될 수 있으며, 전사 종결 서열로서 폴리아데닐화 서열을 일반적으로 갖는다.
- [0037] 상기 벡터는 바이시스트로닉 (bicistronic) 벡터일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 용어, "바이시스트로닉(bicistronic)"이란, 진핵세포 내에서 mRNA의 내부에서도 리보솜이 폴리펩티드를 합성할 수 있게 되어 하나의 mRNA로부터 여러 단백질이 합성 가능하게 된 시스템을 의미하며, 본 발명에서는 다수의 CYP 아이소폼이 동시에 발현될 수 있도록 벡터를 디자인하였다.
- [0039] 일반적으로, 대장균과 같은 원핵세포가 하나의 mRNA의 여러 위치에 리보솜이 결합하여 한번에 여러 단백질을 합성할 수 있는 폴리스이스트로닉(polycistronic) 시스템을 가진 것과는 달리, 진핵세포에서는 mRNA로부터 단백질을 해독(translation)할 때, 리보솜이 mRNA의 5' 끝에 부착된 후 스캐닝(scanning) 방법을 통해서 개시 코돈인 AUG를 찾게 되고, 이 AUG 코돈으로부터 단백질의 합성이 시작됨에 따라 하나의 mRNA로부터 반드시 하나의 폴리펩티드가 형성되는 모노시스트로닉(monocistronic) 시스템을 갖게 되며, ATG의 인식 및 단백질 합성의 시작에 코작 서열(Kozac sequence)이 중요한 역할을 한다고 알려져 있다. 그러나 bicistronic IRES 벡터의 경우는, 내부 인트론 진입부분(Internal Ribosome Entry Site, IRES, 이하 'IRES'라 칭한다)이라 불리는 특별한 구조로 되어있는 RNA 서열을 갖고 있어, 진핵세포 내에서 하나의 mRNA로부터 여러 단백질 합성이 가능하다. 본 발명에서는 다수의 CYP 아이소폼이 동시에 발현될 수 있도록 하기 위하여, 일 CYP의 아이소폼 (isoform) 뒤에 IRES가 오도록 한 후, 그 뒤에 다른 CYP 아이소폼이 오도록 벡터를 디자인하였다.
- [0040] 본 발명에서 용어, "IRES(internal ribosome entry site, 내부리보솜유입점)"는 진핵세포에서 하나의 mRNA로부터 여러 단백질 합성이 가능하도록 리보솜이 직접 결합하는 mRNA 내부에 존재하고 있는 특정 영역을 의미하며, 본 발명의 발현벡터가 바이시스트로닉 발현벡터가 될 수 있도록 하는 역할을 한다.
- [0041] 또한, 상기 CYP의 아이소폼은 CYP3A4 (NCBI Reference Sequence: NM_017460.5), CYP1A2 (NCBI Reference Sequence: NM_000761.4), CYP2B6 (NCBI Reference Sequence: NM_000767.4) 및 CYP2D6 (NCBI Reference Sequence: NM_000106.5)으로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택된 CYP 아이소폼 일 수 있다.
- [0042] 특히, 본원 발명의 일 양상에서는 청구항 1에 있어서, 상기 재조합 벡터는 CYP의 아이소폼 4종 이상이 2 종 이상의 프로모터에 작동적으로 연결되며; 상기 CYP 아이소폼사이에는 2 이상의 바이시스트로닉 (bicistronic) 사이트에 의하여 연결된 형태의 재조합 벡터를 제공할 수 있다.
- [0043] 또한, 다수의 CYP 아이소폼을 일 벡터에서 발현시키기 위하여, 2개의 프로모터 각각에 2개 이상의 CYP 아이소폼을 작동적으로 연결할 수 있으며, 따라서, 본 발명의 바람직한 벡터의 양태는 바람직하게는 (1) 제 1 프로모터에 작동적으로 연결된 CYP3A4 및 CYP1A2; 및 (2) 제 2 프로모터에 작동적으로 연결된 CYP2B6 및 CYP2D6를 포함하는 것을 특징으로 하는, 재조합 벡터이며, 본 발명의 벡터의 가장 바람직한 예는 하기의 개열지도를 갖는 것을 특징으로 하는 재조합 벡터일 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 용어, "프로모터"는 전사조절인자들이 결합하는 DNA 염기서열 부위를 의미하며, 본 발명의 목적상 유전자 발현율을 높이기 위하여 강력하고 안정적인 유전자 발현을 유도할 수 있는 프로모터를 사용할 수 있다.



[0045]

[0046]

또한, 본 발명의 일 양상은 상기 제조합 벡터로 형질전환된 세포주를 제공한다.

[0047]

본 발명에서 용어, "형질전환(transfection)"은 배양동물세포에 DNA를 직접 도입하여 세포의 유전형질을 변이시키는 방법으로서, 일반적으로 목적으로 하는 유전자를 플라스미드 등의 매개체에 넣어 도입하는 방법을 사용한다. 상기 형질전환은 당 분야의 통상적인 방법에 따라 실시될 수 있으며, 바람직하게는 그 예로 인산칼슘공침법, DEAE-텍스트란처리법, 전기천공법, 재분포법 등이 있다.

[0048]

상기 동물세포는 한 당 분야에서 사용하는 동물세포를 제한 없이 사용할 수 있으며, 바람직하게는 인간유래 세포일 수 있으며, 예를 들면 인간 유래 간, 신장, 혈관, 폐, 췌장, 심장, 피부, 내피, 골, 골수, 혈액, 치아, 위, 갑상선, 자궁, 전립선, 신경, 또는 근육 세포일 수 있다. 바람직하게는 인간의 간세포일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 간암세포일 수 있고, 본 발명의 구체예에서는 인간의 간암세포인 HepG2 세포를 이용하였다.

[0049]

본 발명의 가장 바람직한 실시예는 상기 개열지도로 갖는 제조합 벡터로 형질전환된 인간의 간암세포 HepG2인 HepG2/CYP이며, 이는 2015년 02월 04일자로 한국세포주 은행에, KCLRF-BP-00338의 수탁번호로 수탁된 것일 수 있다.

[0050]

또한, 본 발명의 일 양상은 상기 제조합 벡터를 이용하여 세포주를 형질전환시키는 단계를 포함하는, 세포주의 제조 방법을 제공한다.

[0051]

상기 형질전환은 상기에 언급한 바와 같다.

[0052]

상기 독성 검사란 임의의 약물의 체내 독성 여부 및 정도를 확인하는 것으로서, 본 발명에 따른 상기 세포주를 이용하는 경우 in vitro에서 정확하고 효과적인 약물 독성 검사가 가능하다.

[0053]

따라서, 본 발명의 일 양상은 상기의 형질전환된 세포주에 임의의 물질을 처리하는 단계; 및 상기 세포주의 생장을 확인하는 단계를 포함하는, 임의의 물질의 활성 또는 독성을 검사하는 방법을 제공한다.

[0054]

상기 세포주는 1 종 이상의 장기 유래 세포주와 공배양된 것일 수 있다. 상기 1종 이상의 장기 유래 세포주는 간, 신장, 혈관, 폐, 췌장, 심장, 피부, 내피, 골, 골수, 혈액, 치아, 위, 갑상선, 자궁, 전립선, 신경, 및 근육으로 이루어진 군으로부터 선택된 장기 유래 세포주일 수 있다. 상기 방법은 다장기 상호 연계 독성을 평가하기 위한 것일 수 있다.

[0055]

다장기 상호연계 독성평가란, 생체가 독성물질에 노출될 때 생기는 장기 간 상호연계 작용과 그로 인하여 증가되는 독성물질에 대한 감수성을 종합적으로 반영하는, 즉 독성물질에 의한 인체 위해 영향을 종합적으로 판단하는 시스템 독성평가 기술을 말한다.

- [0056] 인체에 독성물질이 노출될 경우, 일차적으로는 간, 신장 등의 표적장기에 직접 독성을 유발하지만, 차츰 타 장기 손상으로 이어지고, 이러한 장기손상이 증폭되는 과정을 거치게 된다. 실제로 독성물질은 체내에서 위장관, 흡수 후 순환기계 통과 과정 중에 장기 손상, 염증반응을 일으키며 전신 또는 타 장기의 손상을 증폭시키는 것으로 보고된다. 이러한 독성물질에 의한 장관 내 경계벽 손상은 또, 내독소(endotoxin)라 불리는 독성물질의 흡수를 촉진시키는 물론 이러한 내독소가 전신 순환할 경우 특정 장기의 독성물질 감수성은 증폭되는 것으로 알려져 왔다. 그러나 기존의 동물실험을 통한 독성평가는 특정 장기에 국한돼 있어 장기 상호간의 독성 증감을 반영하기 어려운 점이 있었다.
- [0057] 따라서, 본 발명에 따른 상기 독성 검사는 인체 위해성 평가 측면에서 단일 세포주 및 단일 장기를 표적으로 하는 기존 연구의 단점을 보완하며, 독성물질 노출 시 발생하는 장기 간 상호연계 작용과 이에 따라 증폭되는 독작용을 반영하기 위하여, 2종 세포 동시 배양 시스템을 이용한 다장기 상호연계독성을 판단할 수 있다.
- [0058] 상기 배양은 1종 또는 2종 이상의 조직 또는 장기 유래 세포가 동시에 자랄 수 있는 배양 시스템의 경우 그 종류를 제한하지 않는다.
- [0059] 또한, 독성을 평가하는 방법은 그 종류를 제한하지 않으며, 1종 또는 2종 이상의 조직 또는 장기 유래 세포에서 특히 본 발명에서는 IdMOC (Integrated discrete Multiple Organ Culture)를 이용하였다.
- [0060] 상기 세포주는 부티오닌-설펍시민 (buthionine sulfoximine, BSO)으로 전처리 된 것일 수 있다.
- [0061] 또한, 상기 공배양은 1종 이상의 장기 유래 세포주의 배양 배지에서 수행되는 것일 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 방법에서, 상기 임의의 물질의 활성은 약물대사 활성 측정 또는 약물상호작용 평가일 수 있다. 본 발명의 상기 방법이 약물 대사 활성을 측정하거나, 약물 상호 작용을 평가하는 경우, 상기 방법은 CYP 아이소폼의 효소 활성을 측정하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0063] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0064] **실시예 1: 실험 방법**
- [0065] 1.1. 세포 배양
- [0066] 사람의 간세포주인 HepG2 (HB-8065)와 사람의 근위세뇨관 세포주인 HK-2 세포 (CRL-2190)는 American Type Culture Collection으로부터 분양받아 사용하였다. 사람의 혈관내피세포주인 HUVEC 세포(C2517A)는 LONZA사로부터 분양받아 사용하였다. HepG2 세포는 EMEM (Gibco-BRL, USA)에 10% fetal bovine serum (Gibco-BRL, USA)를 추가하고, HK-2 세포는 ATCC에서 권장하는 Keratinocyte Serum Free Media (K-SFM) Kit에 100U/ml penicillinG, 100U/ml streptomycin을 추가하여 사용하고, HUVEC 세포는 LONZA사에서 권장하는 Endothelial Basal Medium-2 (EBM-2, Lonza, USA) kit를 사용하여 95% air/5% CO₂, 37 °C에서 배양하였다.
- [0067] 1.2. CYP isoform 영구 과발현 HepG2/CYP 세포주 구축
- [0068] 사람 CYP expression을 위한 bicistronic plasmid는 lipofectamine 2000 (invitrogen 사)을 이용하여 6well plate 400,000 cells/well의 밀도로 seeding한 HepG2 또는 HepG2/C3A에 transfection한 후 24시간 배양하였다.
- [0069] 그 후 100mm culture plate에 single colony를 생성할 수 있도록 density를 매우 낮게 plating 하여 G418은 1000ug/ml, hygromycin은 400ug/ml 농도를 함유하는 EMEM 배지로 유지하였다. 약 2주 후에 생성되는 cell colony들을 각 isozyme 별로 약 80개 이상 분리하여 96 well plate에서 성장시킨 후 48, 24, 6 well plate로 옮기고 그 후 100mm plate로 옮겨 배양하였다. 24well로 이전할 때 CYP isoform의 발현을 확인하고 발현이 높은 colony를 선택하였다.
- [0070] 1.3. 독성 유발물질의 처리

[0071] 종래 연구된 공배양 시스템에서 의미있는 결과를 보였던 amiodarone, 대표적인 신장독성 유발물질인 cyclosporin A, 신장독성물질인 tacrolimus (FK506), CYP2B6에 의해 bioactivation이 되며 대사 후 mild한 신장독성을 유발하는 Cyclophosphamide, 간세포와 신장세포 독성물질인 thioacetamide를 농도, 시간 의존적으로 처리하였다.

[0072] 1.4. 세포독성 검사 (MTS assay)

[0073] 3종류의 세포를 24-well IdMOC plate에 seeding을 한 후 4시간 stabilization시킨다. 공통배지 (EBM-2, Lonza, USA)에 각 시험물질을 희석하여 농도별로 처리하였다. 24시간, 48시간, 72시간 후, 배지를 제거하고 새로운 배지와 MTS mixture의 비율을 5:1로 처리하여 4시간 동안 incubation 하였다. 그 후 490 nm의 파장에서 microplate reader (Model 680, Bio-Rad Laboratories Inc., USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

[0074] 1.5. Cytochrome P450 enzyme 활성측정실험

[0075] Luminescence 기질을 사용한 CYP isoform 활성측정은 CYP를 과발현시킨 HepG2/CYP 세포를 white luminometer 96 well plate에 30,000 cells/well의 밀도로 seeding하여 24시간 동안 배양 후 CYP 과발현에 대한 실험을 실시하였다. 세포에서 배지를 제거한 후, 하기 표에 나타난 각각의 substrate를 첨가한 PBS(phosphate buffered saline)와 37 °C에서 반응시킨 후 luciferin detection reagent를 첨가하여 생성된 luminescence를 luminometer로 측정하여 enzyme활성을 비교하였다.

[0076] HPLC로 대사체를 분석하는 시험에서는 24 well plate에 10^5 cells/well의 밀도로 세포를 칸 후 24시간 동안 부착시킨다. 배지를 제거하고 기질 혼합물을 녹인 400 μ L Krebs-Henslate buffer로 바꿔준다. 2-3시간동안 37 °C incubator 에서 배양한 후 0.1% acetic acid로 반응을 정지시킨 후 배지를 얻어 대사체를 분석하고, 세포는 harvesting 한 후 2분간 vortexing 하여 완전히 세포를 깬 후 단백질 정량한다. 대사체를 LC-MS/MS로 분석하며, 그 결과는 pmol/min/mg protein으로 나타낸다.

[0077] 각 CYP isoform의 활성을 측정하기 위한 Substrate 종류와 사용하는 최종 다음 표 1와 같다.

표 1

Substrates	CYP isoforms	Final conc (μ M)
Phenacetin	1A2	50
Coumarin	2A6	5
Bupropion	2B6	50
Rosiglitazone	2C8	5
Diclofenac	2C9	10
S-Mephenytoin	2C19	100
Dextromethorphan	2D6	5
Midazole	3A	2

[0078]

[0079] 1.6. Cytochrome P450 isoform mRNA 발현 측정

[0080] CYP를 과발현시킨 HepG2/CYP 세포를 6well plate 400,000 cells/well의 밀도로 seeding 하였다. 2 4시간 배양 후, phosphate buffered saline으로 세척하고 easy-BLUE total RNA extraction kit (iNtRON) 를 사용하여 RNA 를 준비하고 Reverse Transcription을 실시하였다. 생성된 cDNA를 이용하여 각각의 CYP isoform 선택적 primer 를 사용하여 PCR을 통하여 얻은 product를 전기영동하여 발현량을 비교하였다.

[0081] **실시예 2: CYP isoform 영구 과발현 간세포주 구축**

[0082] Metabolic activity가 있는 간세포주를 사용하기 위하여 HepG2 세포에 CYP3A4, CYP1A2, CYP2B6, CYP2D6,

CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1 및 CYP2A6 중 2-4종의 CYP isoform들을 과발현시켜 CYP 활성을 갖는 세포주 구축 및 평가를 실시하였다.

[0083] 구체적인 방법은 하기와 같다.

[0084] 도 1은 CYP 과발현 세포주 구축을 위한 (가) vector map 및 (나) 7가지 set 별 CYP isoforms을 나타낸 것이다.

[0085] 도 1과 같이, 2개의 MCS를 가지고 있는 pIRES vector를 이용하여 CYP 과발현 세포주를 구축하기 위하여 각 set 별로 90여개의 colony를 이용하여 test를 진행하였다. 4가지 isoform 있는 set5, set6에 추가로 set6의 구조를 변경한 set7번도 동시 진행하였다.

[0086] 또한, Luciferase를 이용한 enzyme activity 측정, RT-PCR을 이용하여 gene expression측정을 진행하여 stable cell-line구축을 진행하였으며, 2종의 CYP 과발현을 위한 set 1, 2, 3, 4 plasmid를 영구과발현시킨 HepG2/CYP 세포를 모두 구축하였다.

[0087] 특히 set 5의 4종의 CYP isoform이 과발현된 HepG2/CYPs5와 set 7 3종의 CYP isoform이 과발현된 HepG2/CYPs7의 과발현 측정 결과를 각각 도 2와 도 3에 나타내었다.

[0088] 도 2는 HepG2/CYPs5의 enzyme activity와 gene expression을 측정한 결과로 (가) RT-PCR을 이용한 CYP gene expression 관찰, (나) LC/MS를 이용한 enzyme activity 관찰, (다) Luciferase를 이용한 날짜별 enzyme activity 관찰 결과이다.

[0089] 도 2에 나타난 바와 같이, passage 24까지 진행된 HepG2/CYPs5의 CYP 유전자 발현양이 control인 MOCK 대비 증가하였다. enzyme activity를 LC/MS로 확인해보았을 때 CYP3A4, 1A2, 2B6, 2D6가 각각 0.060, 0.064, 0.953, 0.033 (pmol/min/mg protein)로 나타났으며 날짜별로 Luciferase를 이용하여 관찰하였을 때 MOCK 대비 CYP3A4, 1A2, 2B6가 각각 최대 804배, 4088배, 237배 증가하였다.

[0090] 도 3은 HepG2/CYPs7의 enzyme activity와 gene expression 측정한 결과로, (가) RT-PCR을 이용한 CYP gene expression 관찰, (나) Luciferase를 이용한 enzyme activity 관찰 결과이다.

[0091] 도 3과 같이, HepG2/CYPs7은 CYP3A4의 enzyme activity가 높은 수치를 보이는 후보군이 관찰되었으며, CYP1A2와 CYP2E1의 과발현을 PCR를 통해 확인하였으므로 CYP3A3, CYP1A2 및 CYP2E1에 의하여 bioactivation되는 물질의 독성을 확인하는 실험에 사용 가능 할 것으로 판단되었다.

[0092] 실시예 3: IdMOC assay system을 이용한 화학물질의 다장기 연계 세포독성 평가

[0093] 간세포 HepG2, 신장세포 HK-2, 혈관내피세포 Huvec 세포를 사용하여 관찰하고자 공통배지를 EBM-2 (FBS 2%, supplement 첨가)로 선정하였으며, 새롭게 구축한 IdMOC assay system을 이용하여 화학물질의 독성을 평가하였다.

[0094] 3.1. 4종 CYP 과발현 HepG2/CYPs5 세포와 HepG2 세포의 화학물질에 대한 독성 비교

[0095] CYP 과발현에 따른 화학물질의 독성 변화를 HepG2/CYPs5 세포와 HepG2/Mock (CYP gene을 cloning한 vector만 함유하는 대조군) 세포로 비교하였다.

[0096] 그 결과를 도 4에 나타내었다. 도 4는 다장기 연계 Cyclosporine A 세포독성에 4종의 CYP 과발현이 미치는 영향을 나타낸 도이다.

[0097] 도 4와 같이, CYP 과발현에 의해 cyclosporine A의 간세포독성이 약 15-20% 정도가 증가되었으며, HK-2나 Huvec 세포에서도 역시 유사하게 독성이 증가되었다.

[0098] 3.2. 세포내 GSH level이 화학물질에 의한 대한 독성 유발 비교

[0099] 세포내 GSH level은 reactive metabolite에 의한 세포독성 저해에 중요한 역할을 한다. 이에 따라, GSH level을 감소시켜 화학물질에 의한 세포독성을 증가시키고자 하였다.

[0100] 구체적으로, GSH level을 감소시키기 위하여 HepG2 세포에 γ -glutamylcysteine의 합성을 저해하여

glutathione (GSH)을 감소시키는 buthionine sulfoximine (BSO)를 전처리 하였다. 세포독성 실험에 앞서 GSH양과 세포독성과의 연관성을 찾기 위하여 시간별 간세포에서의 GSH levels 관찰하였으며, 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0101] 도 5는 BSO 처리군과 비처리군의 시간에 따른 GSH levels을 측정한 결과이다.

[0102] 도 5에 나타난 바와 같이, 간세포에 BSO를 50uM 처리 0시간, 24시간, 48시간 경과 후 GSH levels은 0시간 때 (cell seeding 4시간 후를 의미함) BSO 비처리군에 비해 50% 감소하였고, 시간이 경과함에 따라 GSH level이 증가하여 48시간이후에는 그 level이 정상 이상으로 증가하였다.

[0103] 3.3. IdMOC plate 상에서의 HepG2/CYPs5-15를 이용한 독성 유발 비교

[0104] 세포독성 평가를 위한 96 well IdMOC plate와 2중단위 샘플 제공을 위한 24well IdMOC plate를 이용하여 세포독성을 비교 관찰하였다. 구체적인 독성 실험진행과정은 도 6에 나타내었다.

[0105] 도 6과 같이 간세포에 50mM BSO를 24시간 처리한 후, IdMOC plate에 세포를 seeding한 후 4시간 지난 후 세포가 plate에 부착된 것을 확인한 다음, 독성물질이 들어있는 배지로 바꿔 24, 48 및 72 시간 후에 세포독성을 측정하였다.

[0106] 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0107] 도 7은 96well IdMOC assay system에서 BSO 처리군과 비처리군에서의 cyclosporin A 세포독성을 비교한 결과이다.

[0108] 도 7에 나타난 바와 같이, BSO를 비처리군과 처리군을 IdMOC assay system을 이용한 세포독성 평가를 실시한 결과 cyclosporin A에 의한 세포독성이 BSO 처리군에서 더 크게 나타났다. 따라서 화학물질에 대한 독성시험을 BSO를 전처리하고 실시하였다.

[0109] 또한, 도 8은 24well IdMOC assay system에서 Amiodarone의 세포연계독성을 비교한 결과로, (가) HepG2 세포, (나) HK-2 세포, (다) HUVEC 세포를 나타낸다.

[0110] Amiodarone은 96well plate를 이용한 독성실험 시 간세포에서 IC₅₀ 21.6mM, 15.5mM, 14mM (각각 24시간, 48시간, 72시간)과는 달리, IdMOC plate를 이용하면 IC₅₀ 4.4mM, 3.5mM, 3.7mM (각각 24시간, 48시간, 72시간)로 세포독성이 더 많이 관찰되었다. 3A에 의해 bioactivation되는 Amiodarone은 6mM로 24시간 처리하면 CYP 과발현세포에서 세포독성이 유의적으로 나타났다. 하지만 48시간, 72시간 경과하면 6uM에서 세포사멸이 나타났다.

[0111] 그림 8에서 나타난 바와 같이, 간세포와 신장세포에서 Amiodarone은 농도별, 시간별로 독성이 나타나며 CYP 과발현세포 연계독성이 유의적으로 나타났다. 하지만 혈관내피세포에서는 CYP 과발현세포 연계독성이 6mM, 24시간 처리 시 나타나고 나머지 농도, 시간에서는 두드러지게 나타나지 않았다.

[0112] 또한, 도 9는 24well IdMOC plate에서 Cyclophosphamide의 세포연계독성을 비교한 결과이다 (가) HepG2, (나) HK-2, (다) HUVEC 세포를 나타낸다.

[0113] CYP2B6에 의해 bioactivation이 되는 Cyclophosphamide는 48시간처리 후 CYP과발현세포에서 25mM, 50mM, 100mM 농도 모두에서 세포독성이 유의적으로 나타났다. 24시간, 72시간 처리 시 25mM, 50mM 농도에서 세포독성이 유의적으로 나타났다.

[0114] 신장세포와 혈관내피세포의 세포독성을 관찰하였을 때 간세포와는 달리 상호연계독성이 나타나지 않음을 관찰할 수 있었다.

[0115] 또한, 도 10은 24well IdMOC assay system에서 Tacrolimus (FK506)의 세포연계독성을 비교한 결과이다. (가) HepG2 세포, (나) HK-2 세포, (다) HUVEC 세포를 나타낸다.

[0116] 도 10에 나타난 바와 같이, 신장독성물질인 Tacrolimus (FK506)의 경우 간세포와 혈관내피세포에서는 저농도에 서 독성이 유의적으로 나타나는 것에 반해 신장세포에서는 24시간 처리군에서는 6uM, 48시간 처리군에서는 3mM 에서 독성이 유의적으로 관찰되었다.

[0117] 또한, 도 11은 24well IdMOC assay system에서 Thioacetamide의 세포연계독성을 비교한 결과이다. (가) HepG2 세포, (나) HK-2 세포, (다) HUVEC 세포를 나타낸다.

[0118] 도 11과 같이, 간세포와 신장세포 독성물질인 Thioacetamide는 CYP2E1에 의해 bioactivation되기 때문에 CYP과 발현 세포 HepG2/CYPs7 세포를 이용하여 실험을 실시하였다. 하지만 3종의 모든 세포에서 독성이 나타나지 않고 오히려 고농도에서 세포가 더 자라는 경향성을 보였다. 또한 모든 독성물질 실험에 사용하고 있는 HepG2/CYPs5 세포를 이용해서 실험을 실시하였을 때도 동일한 결과가 관찰되었다.

[0119] 실시예 4: 약물대사 활성 측정을 위한, HepG2 세포에서 cytochrome P450 활성 측정

[0120] CYP3A4, 1A2, 2B6 및 2D6를 동시에 과발한 시킨 Hep2/CYPs 5 세포에 각각의 기질인 Midazolam, Phenacetin, Bupropion, 및 Dextromethorphan을 첨가하고 2시간 동안 반응시킨 후 각각의 대사체를 분석하였을 때 표 2와 같은 CYP isoform의 효소활성을 나타내었다.

표 2

CYP isoform	Enzyme activity (pmol/min/mg protein)
CYP3A4	0.060 ± 0.011
CYP1A2	0.064 ± 0.019
CYP2B6	0.953 ± 0.167
CYP2D6	0.033 ± 0.010

[0121]

수탁번호

[0122]

기탁기관명 : 한국세포주연구재단

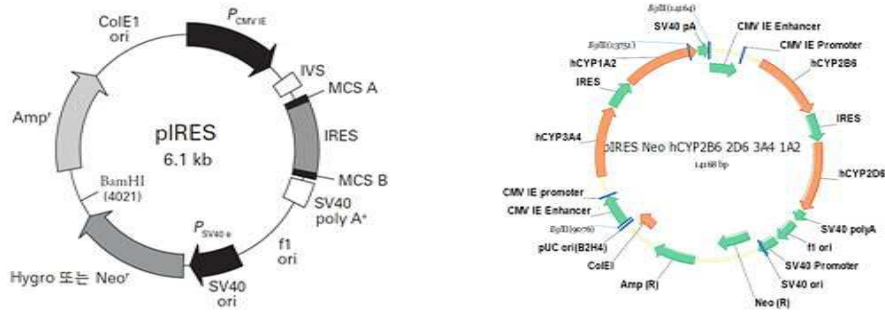
수탁번호 : KCLRFBP00338BP

수탁일자 : 20150121

도면

도면1

(가)

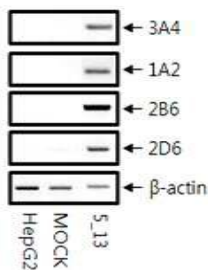


(나)

	set1	set2	set3	set4	set5	set6	set7
MCS A	CYP3A4	CYP2B6	CYP2C9	CYP2E1	CYP3A4 CYP1A2	CYP3A4 CYP1A2	CYP2E1 CYP2A6
MCS B	CYP1A2	CYP2D6	CYP2C19	CYP2A6	CYP2B6 CYP2D6	CYP2E1 CYP2A6	CYP3A4 CYP1A2

도면2

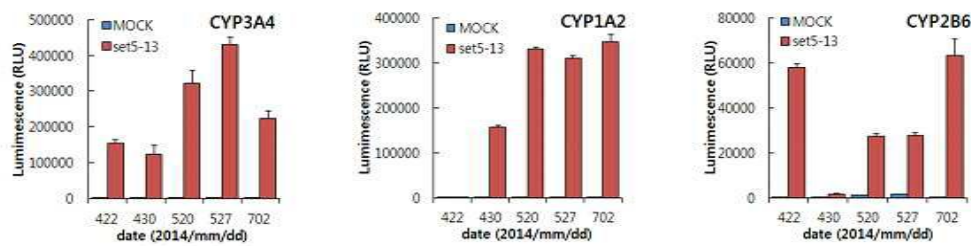
(가)



(나)

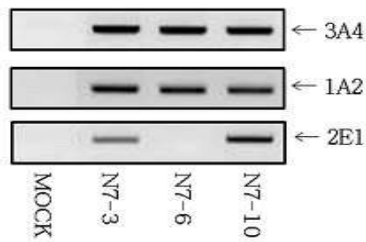
CYP isoform	Enzyme activity (pmol/min/mg protein)
CYP3A4	0.060 ± 0.011
CYP1A2	0.064 ± 0.019
CYP2B6	0.953 ± 0.167
CYP2D6	0.033 ± 0.010

(다)

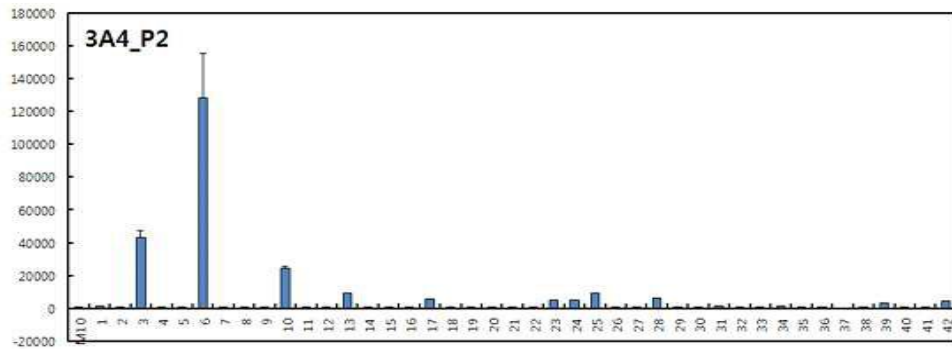


도면3

(가)

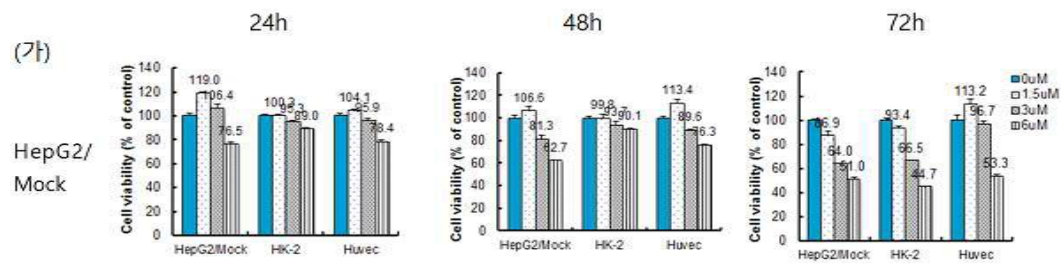


(나)

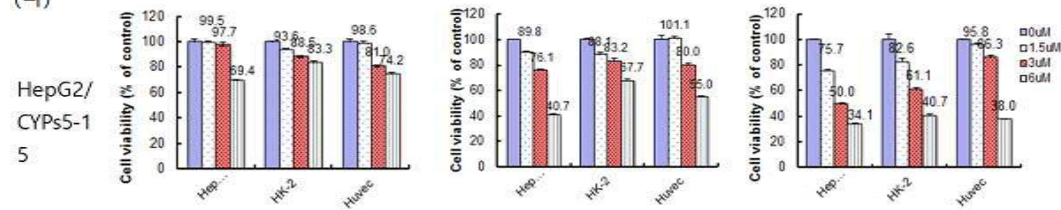


도면4

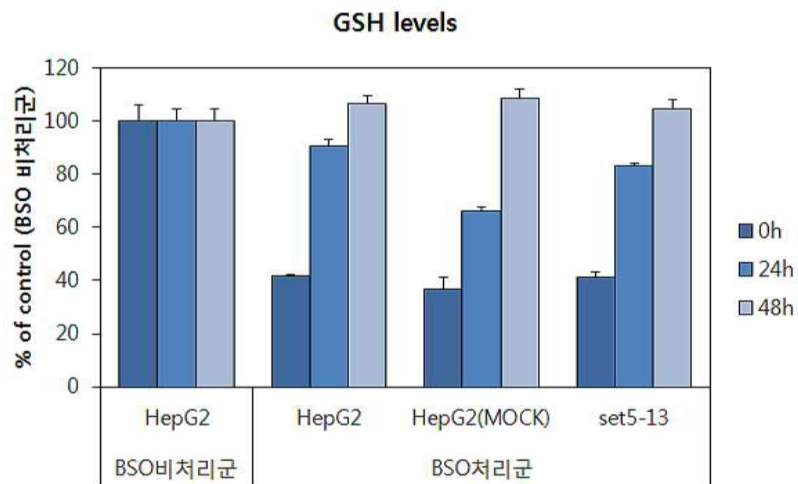
(가)



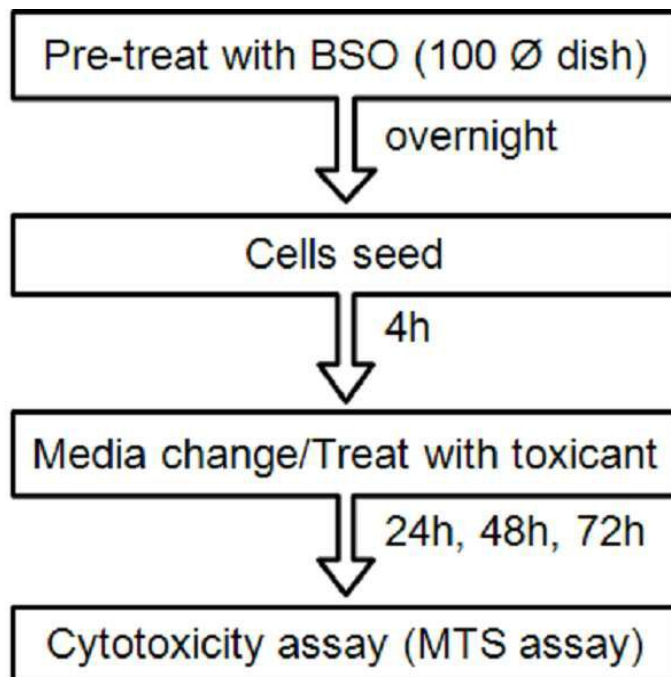
(나)



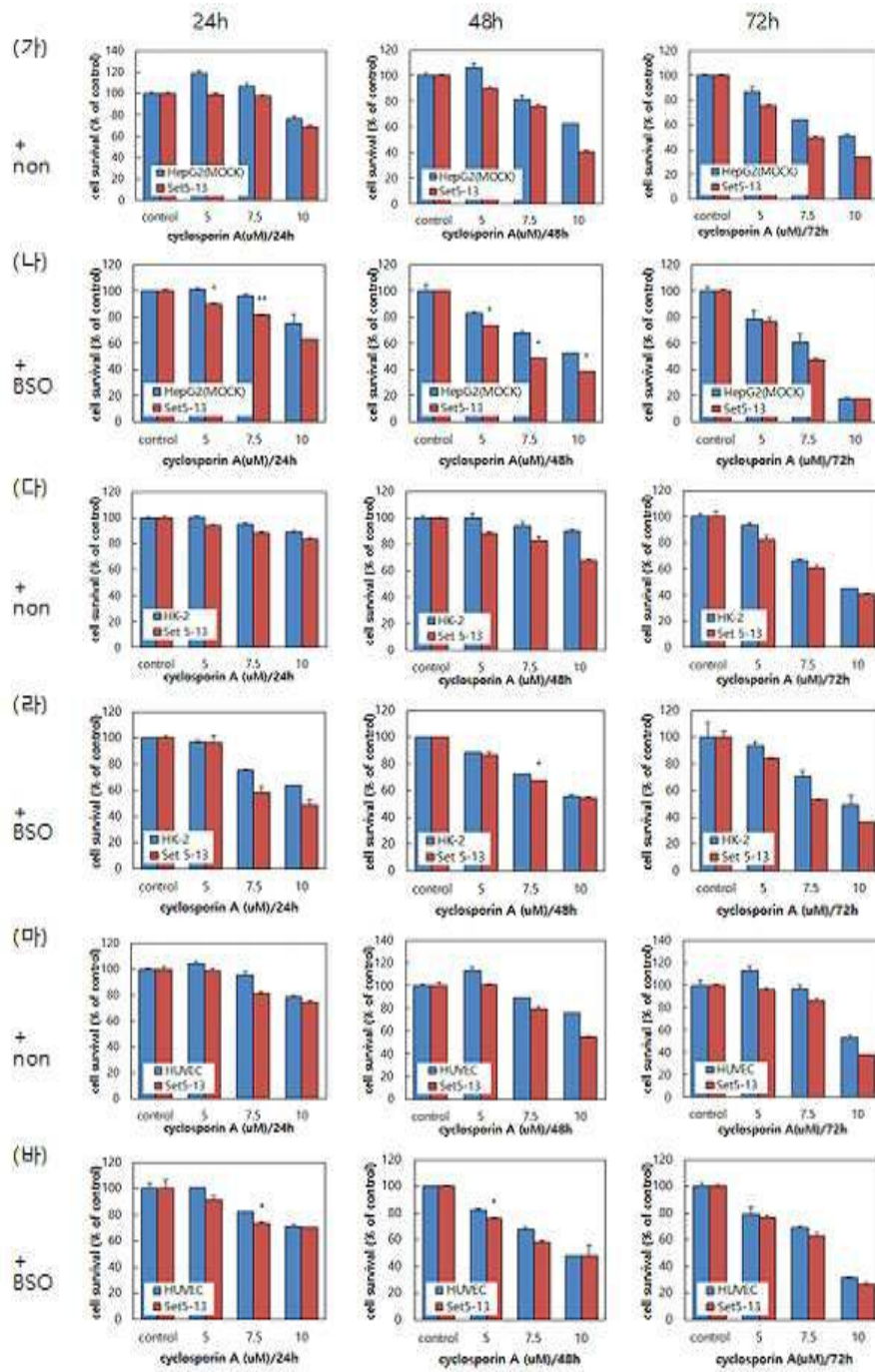
도면5



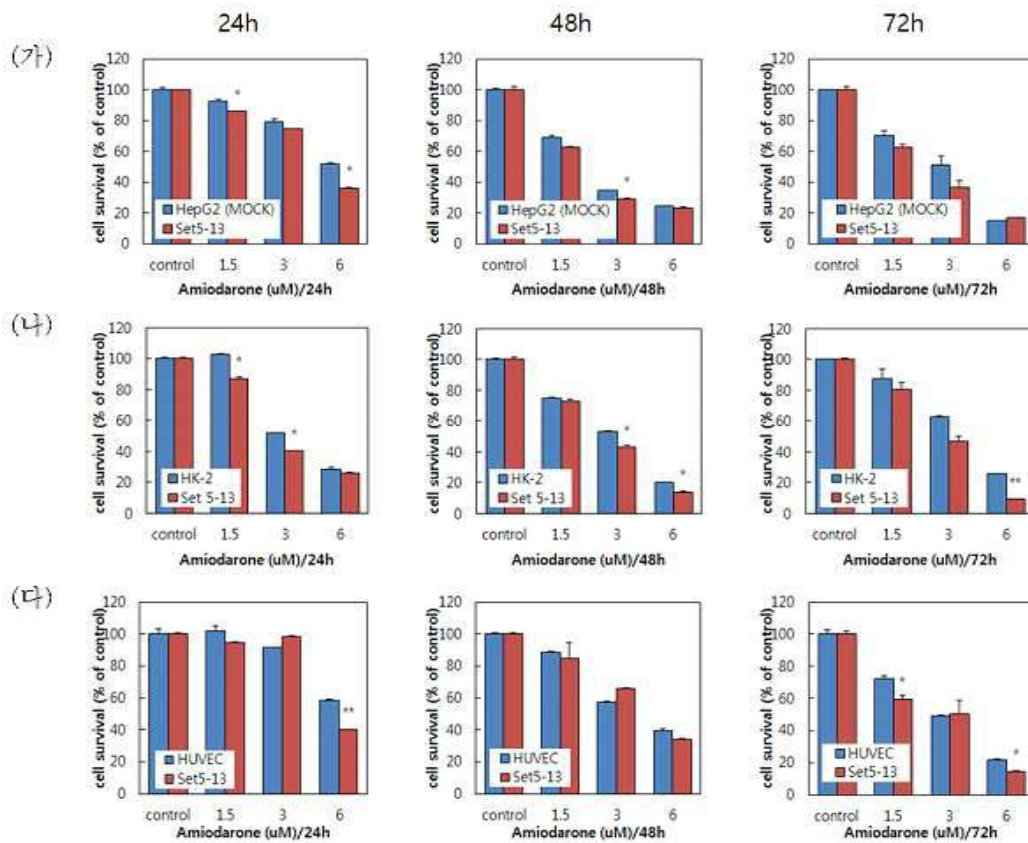
도면6



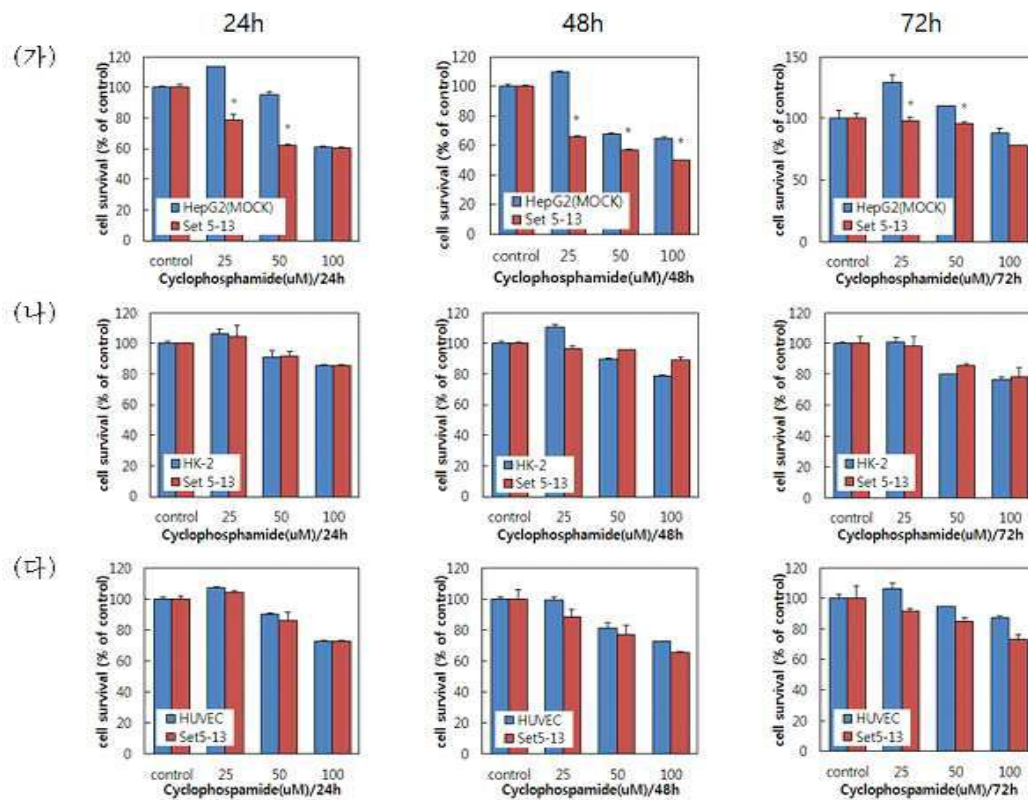
도면7



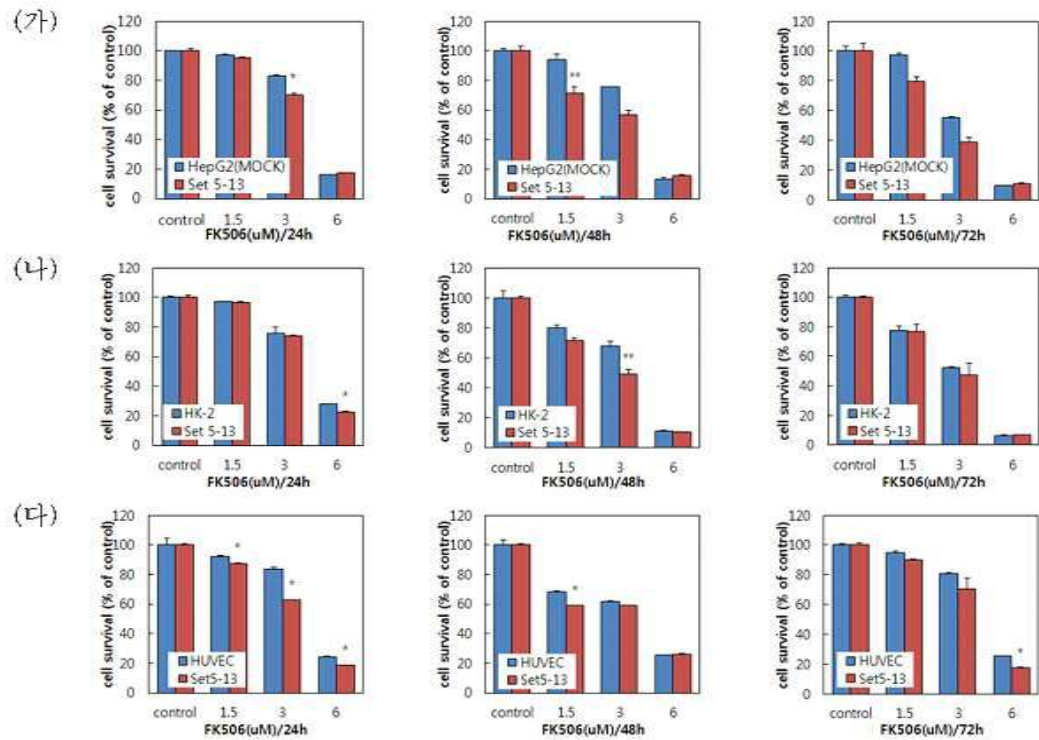
도면8



도면9



도면10



도면11

