



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월07일
(11) 등록번호 10-1896637
(24) 등록일자 2018년09월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61B 5/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61B 5/4845 (2013.01)

G01N 2800/32 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0068839

(22) 출원일자 2017년06월02일

심사청구일자 2017년06월02일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020170059600 A

JP2008086588 A

KR1020090041817 A

JP2002143111 A

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

윤취열

대전광역시 유성구 죽동로 321, 109동 101호(죽동, 금성백조예미지)

권광일

대전광역시 유성구 대덕대로 616-16(도룡동)

백현문

대전광역시 유성구 온천북로33번길 21-9(봉명동)

(74) 대리인

특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 5 항

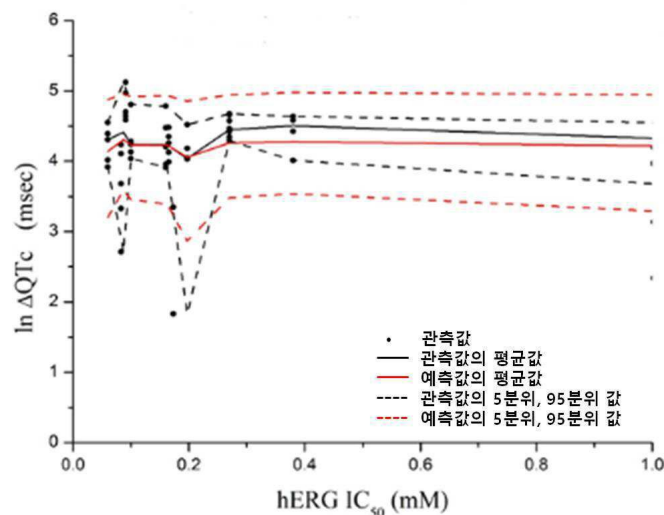
심사관 : 이봉수

(54) 발명의 명칭 약물에 의한 QT 연장 증후군 예측 방법

(57) 요약

본 발명은 약물에 의한 QT 연장 증후군을 평가할 수 있는 새로운 QT 간격 연장 예측 모델 및 이를 이용한 QT 연장 증후군 예측 방법에 관한 것이다. 보다 자세하게는, 약물의 hERG IC₅₀ 값 및 약물의 최대 혈중 농도(C_{max})와 곡선하 면적(AUC_{inf})을 활용한 QT 간격 연장 예측 모델을 개발하였고, 이러한 모델을 이용하여 약물에 의한 QT 연장 증후군을 예측한 결과, 그 정확도가 높음을 확인함으로써, 본 발명의 QT 연장 증후군 예측 방법을 이용하여 신약 개발 과정에서 신뢰성 있는 새로운 QT 연장 평가를 할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

G01N 2800/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2009-0093815
부처명 교육부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 대학중점연구소사업
연구과제명 심혈관계질환 치료제 개발기반연구
기 여 율 1/3
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2009.09.01 ~ 2018.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014R1A1A1006006
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 일반연구(신진연구)
연구과제명 hERG assay 결과 및 약물 체내 동태를 고려한 QT 연장 예측 모델 개발 및 모델을 활용한
심혈관계 안정성 평가 decision tree 개발 연구
기 여 율 1/3
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2014.05.01 ~ 2017.04.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014-2173-01
부처명 교육부
연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단
연구사업명 CNU학술연구지원사업
연구과제명 식이에 따른 체내 약물동태 변화 예측을 위한 model 개발
기 여 율 1/3
주관기관 충남대학교 산학협력단
연구기간 2014.11.01 ~ 2015.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

약물의 hERG(human ether-a-go-go-related gene) IC₅₀ 값을 측정하여 입력하는 단계;

약물이 투여된 실험 동물의 혈중 약물 농도를 측정하여 입력하는 단계;

상기 입력된 혈중 약물 농도를 통해 약물의 최대 혈중 농도(C_{max}) 및 곡선하 면적(area under the curve, AUC_{inf})을 산출하는 단계; 및

상기의 hERG IC₅₀ 값, 약물의 최대 혈중 농도(C_{max}) 및 곡선하 면적(AUC_{inf})을 QT 간격 연장 예측 모델에 적용하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 QT 연장 증후군 예측 방법.

상기 QT 간격 연장 예측 모델은 하기 수학식 2로 표현되는 것으로,

[수학식 2]

$$\Delta QTc\ interval = Base * e^{-\alpha * hERG\ IC_{50}}$$

$$TV\alpha = \theta_1 * (1 + \theta_1 * \ln C_{max}) * (1 + \theta_2 * \ln AUC_{inf}) * e^{\eta_i}$$

여기서 Base는 hERG IC₅₀ 값이 0으로 수렴될 때의 QTc 간격 변화(ΔQTc)이며, α는 hERG IC₅₀ 값이 증가함에 따라 Base 값으로부터 QTc 간격의 최대 변화량이 감소하는 기울기를 의미한다. TVα는 최종적으로 약물의 C_{max}와 AUC_{inf}를 고려한 α값을 의미하는 것으로, θ₁는 α의 대표 값을 의미하며, θ₁은 약물의 C_{max}에 따라 α값에 영향을 주는 정도를, θ₂는 약물의 AUC_{inf}에 따라 α값에 영향을 주는 정도를, η_i는 각 약물별 α값의 차이를 의미한다.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 hERG IC₅₀값은 생체 외(in vitro)에서 hERG 어세이(assay)를 통해 얻는 것을 특징으로 하는 QT 연장 증후군 예측 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 약물의 최대 혈중 농도(C_{max}) 및 곡선하 면적(AUC_{inf})은 생체 내(in vivo)에서 얻어진 시간에 따른 약물의 혈중 농도 수치를 통해 비구획분석(noncompartment analysis)을 수행하여 얻는 것을 특징으로 하는 QT 연장 증후군 예측 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 QT 간격 연장 예측 모델은 QT 연장 증후군 예측의 정확성을 높이기 위해 약물의 hERG IC₅₀ 값, 최대 혈중 농도(C_{max}) 및 곡선하 면적(AUC_{inf})을 조합한 것을 특징으로 하는 QT 연장 증후군 예측 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 QT 연장 증후군 예측 방법은 신약 후보 물질의 심혈관계 안정성 시험 수행시 약물에 의한 QT 연장 평가에 이용하는 것을 특징으로 하는 QT 연장 증후군 예측 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신약 개발 과정에서 좀 더 정확하게 약물에 의한 QT 연장 증후군을 평가할 수 있는 새로운 QT 간격 연장 예측 모델 및 이를 이용한 QT 연장 증후군 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 1990년 대 초반, 항히스타민제인 테르페나딘(terfenadine)이 심장 부작용을 나타내어 350건의 사망 사고를 유발 하였고, 1998년 시장에서 퇴출되었다. 또 다른 항히스타민제인 아스테미졸(astemizole) 또한 투여 후 QT 연장 증후군에 의한 다형성 심실빈맥(torsades de pointes)이 나타나 시장에서 퇴출되었고, 이를 통해 심혈관계에 작용하는 약물을 제외한 다른 약물에서 다형성 심실빈맥이나 돌연사 등이 유발될 수 있다는 것을 알 수 있었다 (Crumb W. et al., 1999).

[0003] 미국, 유럽, 일본 등의 규제 당국은 돌연사까지 발생할 수 있는 의약품의 심혈관계 부작용, 특히 QT 연장 증후군에 주목하였으며, 기존의 약품과 개발 중인 신물질의 심혈관계 부작용을 평가 및 예측할 필요성을 느끼고 안전성 시험에 관한 가이드라인을 제정하였다. ICH(The International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of pharmaceuticals for human use) 가이드라인은 약물의 심혈관계 부작용의 위험성을 평가하는데 있어 생체 외(*in vitro*) 및 생체 내(*in vivo*) 연구를 권고하고 있다.

[0004] 생체 내(*in vivo*) 연구는 약물 주입 후 동물의 QT 간격(QT interval)을 측정하고 양성 대조군과의 결과를 비교, 평가하여 QT 연장 증후군을 예측한다. QT 간격이란, 심전도에서 심실의 탈분극(depolarization)을 의미하는 QRS 군과 심실의 재분극(repolarization)을 의미하는 T파의 끝까지의 간격을 의미하며, 이런 QT 간격의 연장은 심장이 탈분극을 하며 심장 근육을 수축하고, 수축 이후에 심장이 재분극 되는 시기가 보통보다 길어지게 되어 나타나게 된다. 이러한 과정이 지속되게 되면 유발활동(early-after depolarization, EAD)을 일으키며, 결과적으로 심실 세동이 발생할 가능성이 높아진다. 이처럼 QT 간격은 다형성 심실빈맥 심계항진, 실신 그리고 돌연사의 발생 기전에 관여하고 있는 중요한 요인 중 하나이다. QT 간격은 심박도수에 따라 변하게 되어, 심박동 수가 빨라지면 짧아지고, 늦어지면 길게 변하게 된다. 그러므로 심장 부작용의 QT 간격을 평가할 때는 심박동 수를 보정한 QT 간격(corrected QT interval, QTc interval) 수치를 이용한다.

[0005] 생체 외(*in vitro*) 연구는 심장의 칼륨 채널(potassium channel)의 활성을 나타내는 hERG(human ether-a-go-go-related gene)의 억제 활성, 즉, hERG 어세이(hERG assay)로부터 얻어진 IC₅₀ 수치를 평가하는 것이다 (Sanguinetti M.C. et al., 1995). hERG 채널이 약물에 의해 저해되면 칼륨 이온의 수송에 의해 심장의 재분극이 억제되고, 칼슘 이온(calcium ion)이 유입되어 초기 탈분극 상태를 유발한다(January C.T. et al., 1991).

[0006] hERG IC₅₀ 값에 따른 QT 간격 연장 여부의 분류는 현재 가이드라인에는 정확하게 제시되어 있지 않지만, 많은 논문 및 제약회사에서 사용하고 있는 기준이 존재한다. 이 분류 기준에 따르면 hERG IC₅₀ 값이 0.1μM 미만을 나타내는 물질은 개발을 중단하며, 10μM 이상은 QT 간격 연장 가능성을 제외하고 개발을 진행한다.

[0007] 그러나 hERG 어세이를 통해 얻어진 IC₅₀ 값에 따른 QT 간격 연장 여부의 평가 방법은 약물의 체내 동태를 고려하지 않는다는 한계점이 있으며, 생체 내(*in vivo*)에서 약물에 의한 QT 연장 예측에 대한 상관성이 낮다고 보고되었다. 이렇게 낮은 상관관계는 개발 중인 신물질의 약물 개발 진행 결정에 있어 큰 영향을 미친다(Fermini B., et al., 2003). 예를 들면, 신물질의 약동학적(pharmacokinetics) 매개변수(parameter)를 고려한다면 QT 간격 연장에 영향을 미치지 않지만, hERG IC₅₀값에 의해 개발이 중단 될 가능성이 있으며, 반대로 QT 연장 증후군 유발 가능성이 있는 약물이 hERG IC₅₀ 값만으로 QT 간격 연장이 나타나지 않는다는 판단에 의해 개발이 진행되어 문제가 될 가능성이 있다. 이처럼 hERG 어세이 값만으로는 약물 안전성 평가 시 판단에 충분한 요인이 되지 않는다는 것을 알 수 있다.

[0008] 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위해, 약물의 약동학적 매개변수인 약물의 최대 혈중 농도(C_{max})를 이용해

hERG 억제 값을 보정한 안전역(safety margin) 값이 제안되었다. 안전역 값은 hERG 억제를 통해 얻어진 IC_{50} 값을 결합하지 않은 혈중 약물의 C_{max} 값(free C_{max})으로 나누어 보정함으로써 약물의 약동학적 매개변수를 고려한 평가방법이다. 안전역 값은 30을 기준으로 30보다 작은 값을 갖는 약물들은 QT 간격 연장이 나타날 것으로 예상되는 약물이고, 30보다 큰 값은 QT 간격 연장이 나타나지 않을 것으로 예상되는 약물로 분류되며, 300 이상이 되는 것은 QT 간격 연장에 관한 안전성이 확보된 약물로 분류하고 있다(Yao X., et al., 2008). 하지만, 약물의 약동학적 매개변수를 도입하여 보정하였음에도 불구하고, 실제 생체 내 시험이나 임상에서의 QT 간격 연장의 정도를 예측하는 것에는 한계가 있다는 보고가 있다.

[0009] 이에 본 발명자들은, 약물에 의한 QT 연장 증후군의 예측 정확도를 높이기 위해 생체 외에서 얻어진 hERG IC_{50} 값과 약물의 분포 및 배설에 영향을 주는 약동학적 매개변수인 약물의 최대 혈중 농도(C_{max})와 곡선하 면적(area under the curve, AUC_{inf}) 및 생체 내에서 얻어진 QTc 값의 변화율을 활용하여 QT 간격 연장 예측 모델을 개발하고, 이를 이용하여 약물에 의한 QT 연장 증후군 발생 여부를 확인함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.

[0010] 한편, 미국공개특허 제2009-0326401호에서는 화합물의 처리에 의한 심전도 변화를 나타내는 심전도 데이터를 이용해 심기능 장애 리스크를 진단하는 방법이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2013-0091574호에서는 심전도 데이터를 이용한 심방세동 예측 모델에 대해 개시하고 있으나, 본 발명의 hERG IC_{50} 값과 약물의 약동학적 매개변수인 약물의 최대 혈중 농도(C_{max}), 곡선하 면적(area under the curve, AUC_{inf})을 이용한 QT 연장 증후군 예측 방법은 기재된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 미국공개특허 제2009-0326401호, Method and system for dynamical systems modeling of electrocardiogram data, 2009. 12. 31. 공개.

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제2013-0091574호, 심방세동 예측 모델 생성장치 및 방법과, 심방세동 예측장치 및 방법, 2013. 08. 19. 공개.

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Crumb W. et al., QT interval prolongation by non-cardiovascular drugs: issues and solutions for novel drug development, Pharm. Sci. Technol. Today, 2, 270-280, 1999.

(비특허문헌 0002) Fermini B. et al., The impact of drug-induced QT interval prolongation on drug discovery and development, Nat. Rev. Drug Discov., 2, 439-447, 2003.

(비특허문헌 0003) January C.T. et al., Triggered activity in the heart: cellular mechanisms of early after-depolarizations, Eur Heart J., 12, 4-9, 1991.

(비특허문헌 0004) Sanguinetti M.C., et al., A mechanistic link between an inherited and an acquired cardiac arrhythmia: HERG encodes the IKr potassium channel, Cell, 81, 299-307, 1995.

(비특허문헌 0005) Yao X., et al., Predicting QT prolongation in humans during early drug development using hERG inhibition and an anaesthetized guinea-pig model, British Journal of Pharmacology, 154(7), 1446-1456, 2008.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명의 목적은 신약 개발 과정에서 좀 더 정확하게 약물에 의한 QT 연장 증후군을 평가할 수 있는 새로운 QT 간격 연장 예측 모델 및 이를 이용한 QT 연장 증후군 예측 방법을 제공하는 하는데 있다.

과제의 해결 수단

- [0014] 본 발명은 약물의 hERG(human ether-a-go-go-related gene) IC₅₀ 값을 측정하여 입력하는 단계; 약물이 투여된 실험 동물의 혈중 약물 농도를 측정하여 입력하는 단계; 상기 입력된 혈중 약물 농도를 통해 약물의 최대 혈중 농도(C_{max}) 및 곡선하 면적(area under the curve, AUC_{inf})을 산출하는 단계; 및, 상기의 hERG IC₅₀ 값, 약물의 최대 혈중 농도 및 곡선하 면적을 QT 간격 연장 예측 모델에 적용하는 단계;를 포함하는 QT 연장 증후군 예측 방법에 관한 것이다.
- [0015] 상기 QT 간격 연장 예측 모델은 하기 수학식 2로 표현되는 것으로,
- [0016] [수학식 2]
- $$\Delta QTc \text{ interval} = Base * e^{-\alpha * hERG IC_{50}}$$
- $$TV\alpha = \theta_i * (1 + \theta_1 * \ln C_{max}) * (1 + \theta_2 * \ln AUC_{inf}) * e^{\eta_i}$$
- [0017]
- [0018] 여기서 Base는 hERG IC₅₀ 값이 0으로 수렴될 때의 QTc 간격의 변화(ΔQTc 간격)이며, α는 hERG IC₅₀ 값이 증가함에 따라 Base 값으로부터 QTc 간격의 최대 변화량이 감소하는 기울기를 의미한다. TV α는 최종적으로 약물의 C_{max}와 AUC_{inf}를 고려한 α 값을 의미하는 것으로, θ_i는 α의 대표 값을 의미하며, θ₁은 약물의 C_{max}에 따라 α 값에 영향을 주는 정도를, θ₂는 약물의 AUC_{inf}에 따라 α 값에 영향을 주는 정도를, η_i는 각 약물별 α 값의 차이를 의미한다.
- [0019] 상기 hERG IC₅₀ 값은 생체 외(in vitro)에서 hERG 어세이(assay)를 통해 얻을 수 있다.
- [0020] 상기 약물의 최대 혈중 농도(C_{max}) 및 곡선하 면적(AUC_{inf})은 생체 내에서 얻어진, 시간에 따른 약물의 혈중 농도 수치를 통해 비구획분석(noncompartment)을 수행하여 얻을 수 있다.
- [0021] 상기 QT 간격 연장 예측 모델은 QT 연장 증후군 예측의 정확성을 높이기 위해 약물의 hERG IC₅₀ 값, 최대 혈중 농도 및 곡선하 면적을 조합할 수 있다.
- [0022] 상기 QT 연장 증후군 예측 방법은 신약 후보 물질의 심혈관계 안정성 시험 수행시 약물에 의한 QT 연장 평가에 이용할 수 있다.
- [0023] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0024] 본 발명은 QT 연장 증후군 예측 방법에 관한 것으로, 하기 수학식 2로 표현되는 QT 간격 연장 예측 모델을 이용할 수 있다.
- [0025] [수학식 2]
- $$\Delta QTc \text{ interval} = Base * e^{-\alpha * hERG IC_{50}}$$
- $$TV\alpha = \theta_i * (1 + \theta_1 * \ln C_{max}) * (1 + \theta_2 * \ln AUC_{inf}) * e^{\eta_i}$$
- [0026]
- [0027] 상기 QT 간격 연장 예측 모델은 QT 연장 증후군 예측의 정확성을 높이기 위해 약물의 hERG IC₅₀ 값, 약물의 최대 혈중 농도 및 곡선하 면적을 조합한 것이다.
- [0028] 상기 약물의 hERG IC₅₀ 값은 생체 외에서 hERG 어세이를 통해 얻을 수 있다.
- [0029] 상기 hERG 어세이는 심장의 칼륨 채널(I_{Kr} channel)을 발현시키는 hERG의 약물에 의한 억제 정도를 판단하는 시험으로, 패치 클램프(patch clamp) 방법 및 결합 어세이(binding assay) 방법을 이용할 수 있다.
- [0030] 상기 패치 클램프 방법은 hERG 유전자를 가진 세포주를 전체-세포 전압 클램프(whole-cell voltage clamp) 방법으로 실험하여, hERG 전류의 최대 억제량의 50%를 야기시키는 농도인 IC₅₀ 값을 구할 수 있다.
- [0031] 상기 결합 어세이 방법은 세포막에 약물을 투여한 후, 형광지시약 등을 이용하여 칼륨이온(K⁺)에 대한 형광의 변화를 관찰하여 IC₅₀ 값을 구할 수 있다.

- [0032] 상기 약물의 최대 혈중 농도 및 곡선하 면적은 생체 내 실험, 즉, 동물 모델을 이용하여 시간에 따른 약물의 혈중 농도를 확인한 결과를 통해 얻을 수 있다.
- [0033] 상기 동물 모델은 심장의 칼륨 채널을 가져야 하는 것으로, 대표적인 동물 모델은 비글견(Beagle dog), 사이노몽거스 원숭이(Cynomolgus monkey) 및 기니피그(Guinea pig)일 수 있다.
- [0034] 상기 약물의 최대 혈중 농도 및 곡선하 면적은 동물 모델을 통해 얻은 시간에 따른 약물의 혈중 농도 수치를 이용하여 비구획분석을 수행하여 얻을 수 있다.
- [0035] 상기 비구획분석은 시간에 따른 약물의 혈중 농도 변화를 구획을 설정하지 않고 분석하는 방법으로서, 시간에 따른 약물의 혈중 농도 그래프에서 최대 약물 혈중 농도를 산출할 수 있으며, 시간에 따른 약물의 혈중 농도 그래프의 면적을 사다리꼴 법칙을 이용하여 산출함으로써 곡선하 면적을 산출할 수 있는 방법이다.
- [0036] 상기 약물의 최대 혈중 농도는 약물 투약 후 체내에 노출 수 있는 혈액 내 최대 약물의 농도를 의미한다.
- [0037] 상기 곡선하 면적은 약물 투약 후 체내에 노출되는 약물의 총 양을 의미한다.
- [0038] 상기 QT 간격 연장 예측 모델은 약물의 hERG IC₅₀ 값과 약물의 최대 혈중 농도 및 곡선하 면적을 조합함으로써 QT 연장 증후군 예측의 정확성을 높인 것이다.
- [0039] 상기 QT 연장 증후군 예측의 정확성을 높인 QT 간격 연장 예측 모델을 이용한 QT 연장 증후군 예측 방법은 신약 후보 물질의 심혈관계 안정성 시험 수행시 약물에 의한 QT 연장 평가의 신뢰도 및 예측력을 높임으로써, 신약 후보 물질의 개발 중에 개발에서 제외되는(drop) 약물의 물질 수를 줄여주고, 신약 개발의 성공률과 심혈관계 안정성을 높일 수 있으며, 이에 따른 신약 개발 비용을 낮출 수 있다.

발명의 효과

- [0040] 본 발명은 약물에 의한 QT 연장 증후군을 평가할 수 있는 새로운 QT 간격 연장 예측 모델 및 이를 이용한 QT 연장 증후군 예측 방법에 관한 것으로, 약물의 hERG IC₅₀ 값 및 약물의 최대 혈중 농도(C_{max})와 곡선하 면적(area under the curve, AUC_{inf})을 이용한 QT 간격 연장 예측 모델을 개발하였고, 이러한 모델을 이용한 QT 연장 증후군 예측 결과의 정확도가 높음을 확인하였다.
- [0041] 이를 통해, 본 발명의 QT 간격 연장 예측 모델 및 이를 이용한 QT 연장 증후군 예측 방법을 이용하여 신약 개발 과정에서 신뢰성 있는 새로운 QT 연장 평가를 할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 약물의 투여에 따른 기니피그의 QT 간격 변화 분석 결과를 보여주고 있다.
- 도 2는 본 발명의 QT 간격 연장 예측 모델을 구축하기 위한 hERG IC₅₀ 값에 따른 자연로그를 취한 QTc 간격의 최대 변화량의 양상이며, 선형 회귀 방정식 유도를 위한 직선을 보여주고 있다.
- 도 3은 본 발명의 QT 간격 연장 예측 모델의 정확성을 확인한 결과를 보여주고 있다.
- 도 4는 본 발명의 QT 연장 증후군 예측 방법의 알고리즘을 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0043] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0044] <실시예 1. 시험 약물의 선정>
- [0045] 본 발명의 QT 연장 증후군 예측 방법을 이용하여 QT 연장 증후군 발생 여부를 확인하기 위해 이용할 시험 약물을 선정하였다.
- [0046] 문헌 조사를 통해 hERG IC₅₀ 값과 안전역의 기준 값이 밝혀진 약물들을 찾은 후, 다양한 hERG IC₅₀ 값과 혈중 농도를 가지는 약물을 선정하기 위해, 하기 표 1과 같이, hERG IC₅₀ 값의 평가 기준으로 많이 사용되고 있는 1μM

및 10 μ M과 안전역의 기준 값인 30 및 300을 기준으로 하여 약물을 총 4개의 그룹으로 나누었고, 하기 표 2와 같이 총 13개의 약물을 선정하였다.

표 1

그룹	hERG IC ₅₀ (μ M)	안전역 기준 값	QT 연장증후군 발생 정도
I	< 1	< 30	높음
II	< 1	> 30 및 < 300	보통
III	< 1	> 300	낮음
IV	> 1 및 < 10	> 300	없음

표 2

번호	약물명	hERG IC ₅₀ (μ M)	시험 농도 (mg/kg)	그룹
1	도페틸리드(dofetilide)	0.06	0.05	I
2	드로페리돌(droperidol)	0.091	2.5	
3	아스테미졸(astemizole)	0.1	0.5	
4	할로판트린(halofantrine)	0.197	25	
5	케탄세린(ketanserin)	0.38	3	
6	클로미프라민(clomipramine)	0.083	5	II
7	돔페리돈(domperidone)	0.16	1.5	
8	솔리페나신(solifenacin)	0.27	3	
9	수니티닙(sunitinib)	0.27	15	
10	지프라시돈(ziprasidone)	0.165	10	III
11	로라타딘(loratadine)	0.173	3	
12	페르페나진(perphenazine)	1.003	1.5	IV
13	올란자핀(olanzapine)	6	1	

<실시에 2. 실험 동물 관리>

동물 실험인 기니피그(SPF Hartley male guinea pig, 6주령)를 오리엔트바이오사(대한민국)로부터 구입하여 이용하였다. 기니피그는 2주 동안, 온도 20±3℃, 습도 50±10%로 유지되는 동물실험실에서 사육하며 적응시켰으며, 물과 식이를 자유롭게 섭취하도록 하였다.

<실시에 3. 약물의 약력학(pharmacodynamic) 실험>

실시에 2에서 2주 동안 적응시킨 기니피그를 펜토바르비탈나트륨(sodium pentobarbital)(60mg/kg)으로 복강주사(intraperitoneal)하여 마취시킨 후, 체온 유지 장치(homeothermic blanket)(Havard, USA) 위에 올려놓고, 직장 내에 프로브(probe)를 삽입하여 기니피그의 체온을 37℃로 유지시켰다. 체모부위를 70% 에탄올로 소독한 후, 기니피그 인공호흡기(SAR 830/P ventilator, CWE, Ardmore, PA, USA)를 이용하여 호흡을 유지시켰다. 시험 약물의 투여를 위해 기니피그의 경정맥(jugular vein)에 폴리에틸렌 튜브(polyethylene tubing)(PE10, PE50, Intramedic Clay Adams of Becton Dickinson)를 삽입하고, Lead II 전극을 연결하여 심전도를 기록하였다. 기니피그를 약 20분간 안정시켜 심박동 수가 일정하게 유지되도록 한 후, 상기 표 2의 시험 약물을 각각의 시험 농도에 맞추어 경정맥을 통해 1분에 걸쳐 투여하고 심전도를 기록하였다. 이때, 시험 약물은 PEG400(polyethylene glycol 400)에 용해시켜 사용하였다.

QT 간격 및 보정을 위한 심박동률(RR 간격)은 PO-NEH-MA 시스템(Gould, USA)을 이용하여 분석하였으며, QT 간격의 보정은 QTcF(Fridericia's formular), 즉, QT 간격을 RR 간격의 세제곱근으로 나누어 나타낸 값

($QTcF = \frac{QT}{\sqrt[3]{RR}}$)을 이용하였다. 시험 결과는 시험 약물을 투여하기 전의 수치에 대한 변화율(%)로 표기하였고, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

도 1에서 보여주듯이, 6종의 약물 투여 후 각각의 약물 군에서 QT 간격이 유의하게 증가한 것을 확인하였으며, 도 1의 6종의 약물 이외의 나머지 6종의 약물에서도 동일한 결과가 나타나는 것을 확인하였다.

[0055] <실시예 4. 약물의 약동학(pharmacokinetic) 실험>

[0056] 실시예 4-1. 시험 약물의 혈장 농도 분석을 위한 LC-MS/MS 분석법 확립

[0057] 시험 약물의 혈장 농도 분석을 위해 액체 크로마토그래피가 연결되어 있는 질량분석기(liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)를 이용한 분석법을 확립하였다.

[0058] 선정된 약물의 표준(standard) 물질을 구입(Sigma-Aldrich, O.N., CAN)하여 아세토니트릴(acetonitrile, ACN)에 1mg/ml이 되도록 녹여 저장 샘플(stock sample)을 만들었다. 각 물질의 저장 샘플을 아세토니트릴을 이용하여 100 μ g/ml, 50 μ g/ml, 10 μ g/ml, 1 μ g/ml, 0.5 μ g/ml, 0.1 μ g/ml로 희석하였다. 희석한 샘플 중 0.1 μ g/ml 농도의 샘플을 질량분석기에 주입한 후 MRM(multiple reaction monitoring) 모드를 활용하여 분석하였다.

[0059] 최적의 질량 분석기 조건 확립을 위해 분석 물질의 이온화 후의 질량값(Q1)과 이온화된 분석 물질을 전기에너지로 분해하여 생성되는 분해 이온 물질의 질량값(Q3) 및 각 전기에너지 값을 비교하여 최종 분석 조건을 확립하였다. 질량분석기에서 사용되는 대표적인 전기에너지는 DP(declustering potential, 각 물질이 이온화 될 때 이온들이 뭉쳐서 클러스터를 생성하는 것을 막기 위한 에너지), EP(enhance potential, 이온화된 물질이 Q1, Q3 분석을 위해 질량분석기 내부로 들어가기 위해 필요한 에너지) 및 CE(collision energy, 전구체 이온을 Q3의 최종 이온으로 만들기 위한 에너지)가 있다.

[0060] 품질관리(quality control) 샘플을 만들기 위해서 공혈장 45 μ l에 상기 희석한 저장 샘플 5 μ l를 주입하며, 아세토니트릴에 녹인 내부 표준물질(Internal Standard, I.S.) 200 μ l를 첨가한 뒤 5분 동안 진탕(vortexing)하고, 4℃에서 13,200rpm으로 10분간 원심 분리하였다. 원심분리 한 뒤 상층액을 채취하여 품질관리 샘플을 만들고, 이 샘플을 이용하여 질량분석기 분석 조건을 확립하는데 이용하였다. 최종 개발된 질량분석기 분석 조건을 이용하여 검량선(calibration curve)을 그리고, 유효검사(validation)를 수행하여 약물의 혈중 농도 분석을 위한 LC-MS/MS 분석법을 확립하였고, 그 결과를 표 3에 나타내었다. 이때, 유효검사는 FDA 가이드라인(Bioanalytical Method Validation)에 부합하게 수행하였다.

표 3

[0061]

약물명	Q1→Q3	DP	EP	CE	컬럼	이동상A	이동상B	이동상 비율	유속 (ml/min)
도페틸리드	441.4 → 198	23	10	38.3	Gemini	증류수	메탄올	10:90	0.35
드로페리돌	380.2 → 165	86	10	41	X-terra	증류수	아세토니트릴	10:90	0.4
아스테미졸	459.3 → 135	121	10	51	Gemini	증류수	아세토니트릴	10:90	0.5
할로판트린	501 → 142.2	41	10	34.98	X-terra	증류수	아세토니트릴	2:98	0.45
케탄세린	395.7 → 189	117	10	36.5	Gemini	증류수	아세토니트릴	10:90	0.4
클로미프라민	315.19 → 58.1	101	10	59	Gemini	증류수	아세토니트릴	2:98	0.6
돔페리돈	426.3 → 175	121	10	43	Gemini	증류수	아세토니트릴	10:90	0.4
솔리페나신	362.8 → 193	54	7.8	43.7	X-terra	증류수	아세토니트릴	5:95	0.4
수니티닙	398.56 → 282.7	42	8	32	Gemini	0.1% 포름산	아세토니트릴	5:95	0.45
지프라시돈	413.26 → 194	116	10	39	X-terra	증류수	아세토니트릴	5:95	0.4
로라타딘	382.5 → 336.6	71	11	28.8	Gemini	증류수	아세토니트릴	5:95	0.4
페르페나진	403.5 → 143	28	10	37.2	X-terra	증류수	아세토니트릴	10:90	0.4
올란자핀	313.2 → 256.2	91	10	39	Gemini	증류수	아세토니트릴	10:90	0.4

DP : declustering potential
EP : enhance potential
CE : collision energy

[0062] 실시예 4-2. 혈중 약물 농도 측정

[0063] 상기 실시예 2의 기니피그에 졸레틸(Zoletil) 50mg/kg를 투여하여 마취시킨 후 수술대 위에 고정시킨 뒤, 수술 부위를 70% 에탄올로 소독한 후 제모하였다. 제모 후 경정맥의 위치를 확인하고 핀셋으로 피부를 얇게 들어주고 수술 가위로 절단 한 뒤, 포셉(forcep)과 핀셋을 이용하여 경정맥 혈관을 찾았다. 찾은 경정맥에 미리 준비한 카테터(catheter, MRE tube + PE50 튜브)를 삽입해 주고, 실험동물이 갇혀 먹을 수 없도록 등 뒤로 빼준 뒤 잘 봉합하고, 하루 정도 안정화 시켜주었다.

[0064] 기니피그가 안정화 된 뒤 상기 표 2에 기재되어 있는 약물 및 농도를 바탕으로 시험 약물을 투여한 후 5분, 10분, 15분, 20분, 25분, 30분, 1시간, 2시간, 4시간, 6시간에 혈액을 250 μ l씩 채혈하였다. 채혈은 경정맥에 삽입한 카테터를 통해 채혈하였다.

[0065] 채혈한 혈액을 4℃에서 13,200rpm으로 10분간 원심 분리하여 혈장을 채취하고, 분석하기 전까지 -80℃에서 보관하였다. 분석 시에서는 혈장 50 μ l에 상기 실시예 4-1에서 준비한 내부 표준물질 200 μ l를 추가한 뒤 5분간 진탕하고, 4℃에서 13,200rpm으로 10분간 원심 분리한 뒤 상층액을 채취하여 상기 실시예 4-1에서 확립한 LC-MS/MS 분석법으로 분석하였다.

[0066] 실시예 4-3. 약물의 약동학적 매개변수 산출

[0067] LC-MS/MS 분석법으로 확인한 혈중 약물 농도 결과를 이용하여 비구획 분석(noncompartment analysis) 기술을 이용하여 약물의 약동학적 매개변수(parameter)를 계산하였다.

[0068] 상기 실시예 4-2에서 얻은 시간에 따른 약물의 혈중 농도 수치를 통해 비구획 분석을 수행하여 기본적인 약동학적 매개변수인 약물의 최대 혈중 농도(C_{max}) 및 곡선하 면적(area under the curve, AUC_{inf})을 산출하였고, 그 결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

약물명	C_{max} (μ g/ml)	AUC_{inf} (μ g · h/ml)
도페틸리드	0.12 $\pm$ 0.11	0.07 $\pm$ 0.06
드로페리돌	3.50 $\pm$ 1.00	0.79 $\pm$ 0.38
아스테미줄	0.55 $\pm$ 0.21	0.33 $\pm$ 0.11
할로판트린	380.17 $\pm$ 184.44	72.38 $\pm$ 26.79
케탄세린	3.22 $\pm$ 0.59	1.04 $\pm$ 0.24
클로미프라민	45.41 $\pm$ 13.30	16.51 $\pm$ 4.97
뮌페리돈	0.45 $\pm$ 0.20	0.28 $\pm$ 0.03
솔리페나신	0.88 $\pm$ 0.18	1.53 $\pm$ 0.34
수니티닙	1.39 $\pm$ 0.46	2.37 $\pm$ 0.75
지프라스돈	2.97 $\pm$ 0.67	1.63 $\pm$ 0.60
로라타딘	1.52 $\pm$ 1.20	0.59 $\pm$ 0.50
페르페나진	2.60 $\pm$ 1.32	1.17 $\pm$ 0.67
올란자핀	2.62 $\pm$ 0.39	1.43 $\pm$ 0.39

[0070] 상기 표 4에서 보여주듯이, 각각의 시험 약물의 최대 혈중 농도(C_{max}) 및 곡선하 면적(AUC_{inf})과 같은 약동학적 정보를 확인할 수 있었다.

[0071] <실시예 5. QT 연장 증후군 예측 모델의 구축>

[0072] QT 연장 증후군 평가를 위해 무료 공개 통계 소프트웨어인 r 프로그램을 통해 선형회귀모델(linear regression model), 다중회귀모델(multiple regression model) 등의 회귀분석을 이용하여 회귀분석으로 인해 생성된 회귀선에 관측값이 얼마나 잘 맞는지를 의미하는 r^2 값과 예측력을 비교하고자 하였으나, 간단한 회귀 분석을 통해서만 QT 연장 증후군과 약물동태 매개변수간의 연관성을 설명하기 어렵다는 단점이 있어, 비선형 혼합 효과 모델

(nonlinear mixed effect model)을 이용하여 본 발명의 QT 간격 연장 예측 모델을 구축하였다.

[0073] 본 발명의 QT 간격 연장 예측 모델을 구축하기 위해, 약물의 hERG IC₅₀ 값에 따라 약물 투여 후 변하는 QTc 간격의 최대 변화량을 관측한 값을 이용하였다. 이때, 약물의 hERG IC₅₀ 값을 x축으로 하고, QTc 간격의 최대 변화량 관측값에 자연로그를 취한 값을 y축으로 하여 도 2에 나타내었다.

[0074] 도 2에서 보여주는 것과 같이 약물의 hERG IC₅₀ 값이 증가함에 따라 QTc 간격의 최대 변화량이 전체적으로 감소하였고, 이러한 양상을 설명하기 위해 회귀 분석을 수행하여 도 2의 회귀 분석 직선을 얻었으며, 이러한 회귀 분석 직선을 설명할 수 있는 하기 수학식 1의 선형 회귀 방정식을 얻었다.

[0075] [수학식 1]

[0076]
$$\ln(\Delta QTc \text{ interval}) = \ln(Base) - \alpha \cdot hERG IC_{50}$$

[0077] 상기 수학식 1에서 $\ln(\Delta QTc \text{ interval})$ 은 약물들에서 hERG IC₅₀ 값에 따라 변하는 QTc 간격의 최대 변화량에 자연로그를 취한 값이며, $\ln(Base)$ 는 hERG IC₅₀ 값이 0으로 수렴될 때의 QTc 간격 변화(ΔQTc)에 자연로그를 취한 값이다. α 는 약물의 hERG IC₅₀ 값에 따른 감소 정도, 즉 기울기를 의미한다.

[0078] 상기 수학식 1의 선형 회귀 방정식에 역함수를 취하여 본 발명의 QT 간격 연장 예측 모델인 약물의 hERG IC₅₀ 값에 따라 QTc 간격이 1차 속도로 줄어드는 양상을 설명하는 하기 수학식 2의 수학식 2-1을 유도하였다.

[0079] 또한, 본 발명의 hERG IC₅₀ 값에 따른 QTc 간격의 최대 변화량은 약물의 노출 정도에 영향을 받는다. 따라서, 본 발명에서 QT 연장 증후군의 예측성을 높이기 위해 약물의 노출을 대변하기 위해 약물의 최대 혈중 농도(C_{max})와 곡선하 면적(AUC_{inf})를 이용하였다. C_{max}는 약물을 투여 한 뒤 약물의 혈중 농도가 최대가 되었을 때의 혈중 농도 값이며, AUC_{inf}은 시간에 따른 약물의 혈중 농도 그래프의 곡선하 면적으로 약물이 체내에 노출되는 정도를 의미하는 값이다. 즉, 본 발명에서 hERG IC₅₀ 값에 따라 변하는 QTc 간격의 최대 변화량을 설명하는 매개변수인 α 을 산출할 때, 약물의 노출을 대변하는 대표적인 매개변수인 C_{max}와 AUC_{inf}를 자연로그 취한 뒤 공변량으로 넣어 하기 수학식 2의 수학식 2-2를 유도하였다. 이때, 상기 수학식 2-2의 수학식에 C_{max}와 AUC_{inf}가 추가될 때 본 발명의 QT 연장 증후군 예측 모델의 예측력의 증가 혹은 감소를 판단하기 위하여 목적 함수(Objective function value)를 측정하여 최적의 수학식인 하기 수학식 2를 도출하였다.

[0080] [수학식 2]

[0081]
$$\Delta QTc \text{ interval} = Base \cdot e^{-\alpha \cdot hERG IC_{50}} \quad \text{수학식 2-1}$$

$$TV\alpha = \theta_1 \cdot (1 + \theta_1 \cdot \ln C_{max}) \cdot (1 + \theta_2 \cdot \ln AUC_{inf}) \cdot e^{\eta_1} \quad \text{수학식 2-2}$$

[0082] 상기 수학식 2에서 Base는 hERG IC₅₀ 값이 0으로 수렴될 때의 QTc 간격 변화(ΔQTc)이며, α 는 hERG IC₅₀ 값이 증가함에 따라 Base 값으로부터 QTc 간격의 최대 변화량이 감소하는 기울기를 의미하는 것으로 QTc 간격의 최대 변화량에 영향을 주는 매개변수이다. TV α 는 최종적으로 약물의 C_{max}와 AUC_{inf}를 고려한 α 값을 의미하는 것으로, θ_1 는 α 의 대표 값을 의미하며, θ_1 은 약물의 C_{max}에 따라 α 값에 영향을 주는 정도를, θ_2 는 약물의 AUC_{inf}에 따라 α 값에 영향을 주는 정도를, η_1 는 각 약물별 α 값의 차이를 의미한다.

[0083] 상기의 본 발명의 QT 연장 증후군 예측 모델의 예측력의 증가 혹은 감소를 판단하기 위해 이용한 목적 함수값은 하기 수학식 3과 같은 수학식을 통해 측정되었다.

[0084] [수학식 3]

[0085]
$$\text{목적함수} = n \cdot \ln(2\pi) + \sum \left[\frac{(obs_j - pred_j)^2}{var_j} + \ln(var_j) \right]$$

[0086] 상기 수학식 3에서, n은 데이터의 총 개수를 의미하며, obs_j는 관측값을, pred_j는 모델에 의해 예측된 값을 의미하며, var_j는 모델의 잔차들의 분산을 의미한다. 그러므로 목적 함수값이 낮을수록 관측값과 모델에 의한 예측값

들의 잔차가 적으며, 통계적으로 좋은 모델이라고 할 수 있으며, 모델에서 1개의 변수가 추가 될 때 목적 함수값이 3.84이 낮아지면 통계적으로 유의하게($p < 0.05$) 발전된 모델이라고 할 수 있다.

[0087] 본 발명의 QT 연장 증후군 예측 모델에서 α 에 공변량으로 C_{max} 와 AUC_{inf} 를 추가하지 않았을 때의 목적 함수값은 6.461이었으며, 공변량으로 C_{max} 와 AUC_{inf} 를 추가한 최종 모델에서의 목적 함수값이 -19.185로, 목적 함수값이 25.646 감소하여 통계적으로 유의하게 발전된 것을 알 수 있었다. 따라서, 상기 수학식 2와 같이 약물의 hERG IC_{50} 값과 기울기 α 에 따라 QTc 간격의 최대 변화량을 예측할 수 있었으며, 기울기 α 에는 약물의 노출을 의미하는 C_{max} 와 AUC_{inf} 를 고려한 최종 모델을 개발하였다.

[0088] <실시예 6. QT 간격 연장 예측 모델의 정확성 확인>

[0089] 상기 실시예 5에서 구축한 QT 간격 연장 예측 모델의 정확성을 확인하기 위해 시각 예측 검사(visual predictive check)를 사용하여 평가하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0090] 도 3은 약물의 hERG IC_{50} 값과 AUC_{inf} 및 C_{max} 에 따른 $\ln \Delta QTc$ 값을 보여주는 것으로, 상기 실시예 5에서 구축한 예측 모델을 이용하여 얻은 시뮬레이션의 5분위와 중앙값 95분위의 값과 실제 관측한 값의 5분위와 중앙값 95분위의 값이 거의 일치하는 것을 확인하였다.

[0091] 이를 통해, 본 발명의 QT 간격 연장 예측 모델의 hERG IC_{50} 값과 약물의 AUC_{inf} 및 C_{max} 에 따른 QTc 간격 변화 예측을 위한 모델의 예측력이 충분했음을 알 수 있었다.

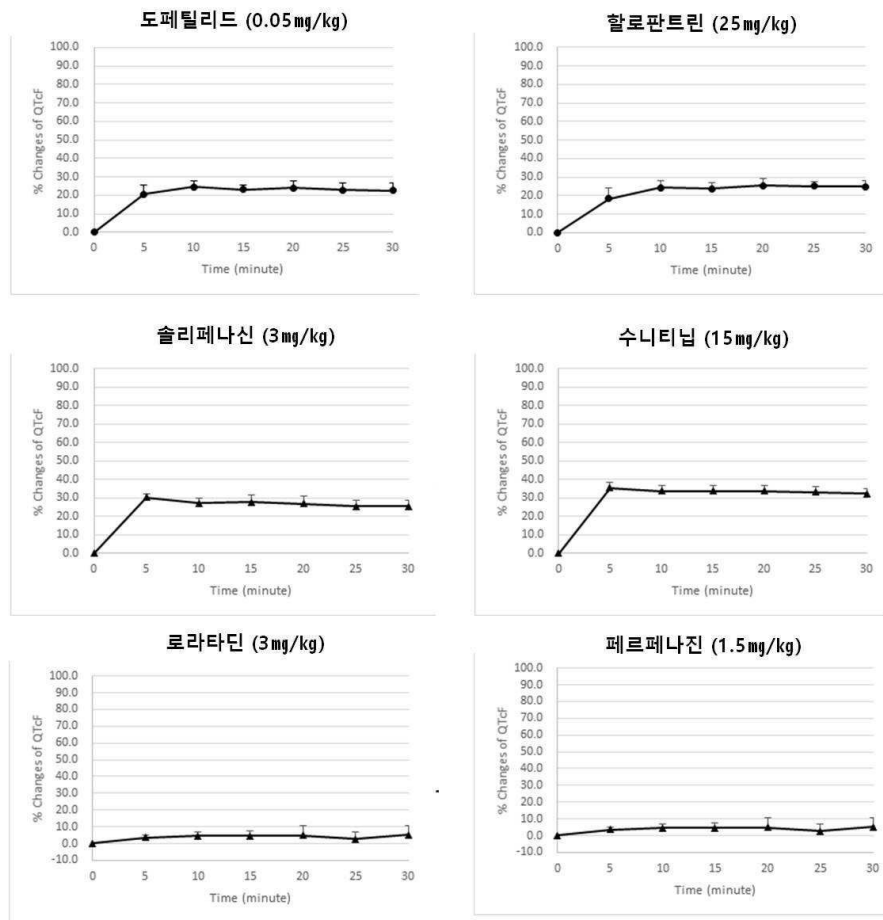
[0092] <실시예 7. QT 연장 증후군 예측 방법 알고리즘 구축>

[0093] 상기 실시예 5에서 구축한 QT 간격 연장 예측 모델을 이용하여, QT 연장 증후군 예측 방법의 알고리즘을 도 4와 같이 도식화 하였다.

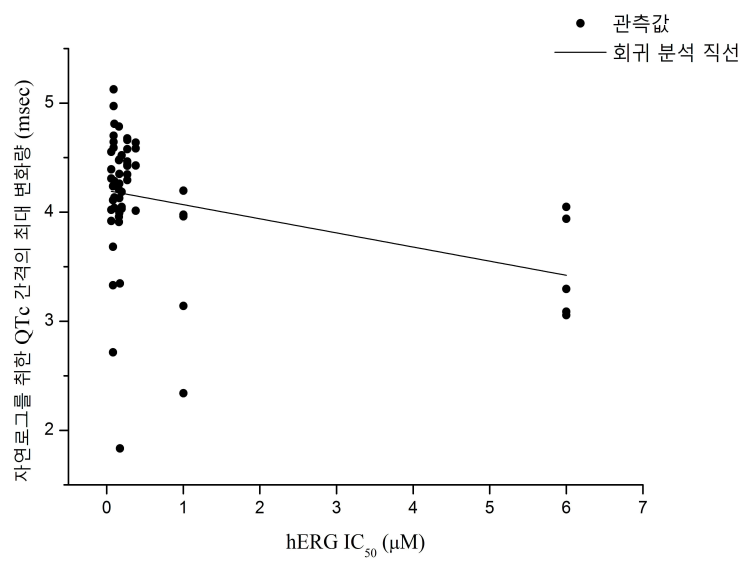
[0094] 도 4의 알고리즘을 신약 후보 물질의 심혈관계 안정성 시험 수행 시 약물에 의한 QT 연장 증후군 예측에 적용함으로써, 약물에 의한 QT 연장 평가의 신뢰도 및 예측력을 높일 수 있고, 이에 따라 신약 후보 물질의 개발 중에 개발에서 제외되는 약물의 수를 줄여주고, 신약 개발 성공률과 심혈관계 안전성을 높일 수 있을 것으로 기대된다.

도면

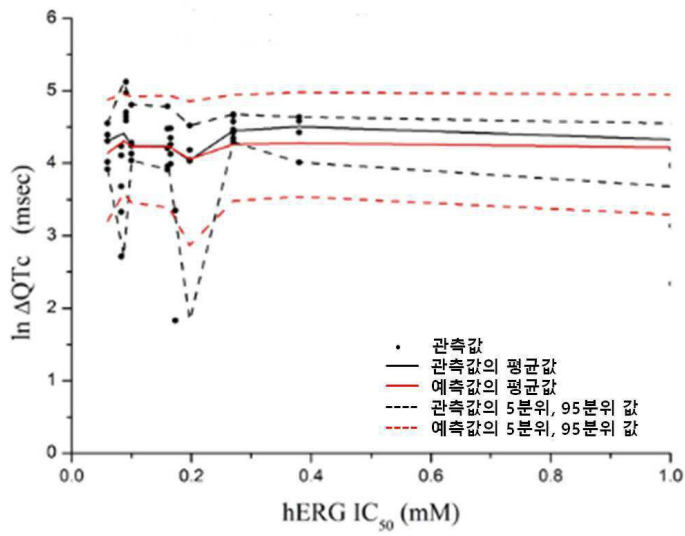
도면1



도면2



도면3



도면4

