



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0036481
(43) 공개일자 2024년03월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/4439 (2006.01) A23L 33/10 (2022.01)
A61K 45/06 (2006.01) A61P 27/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 31/4439 (2013.01)
A23L 33/10 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2023-0119511
(22) 출원일자 2023년09월08일
심사청구일자 2023년09월08일
(30) 우선권주장
1020220115202 2022년09월13일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
한국과학기술연구원
서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)
(72) 발명자
최준
경기도 안산시 단원구 광덕동로 26, 111동 1002호 (고잔동, 푸르지오1차아파트)
이인균
서울특별시 중구 다산로 32, 32동 302호 (신당동, 남산타운)
(74) 대리인
특허법인태백

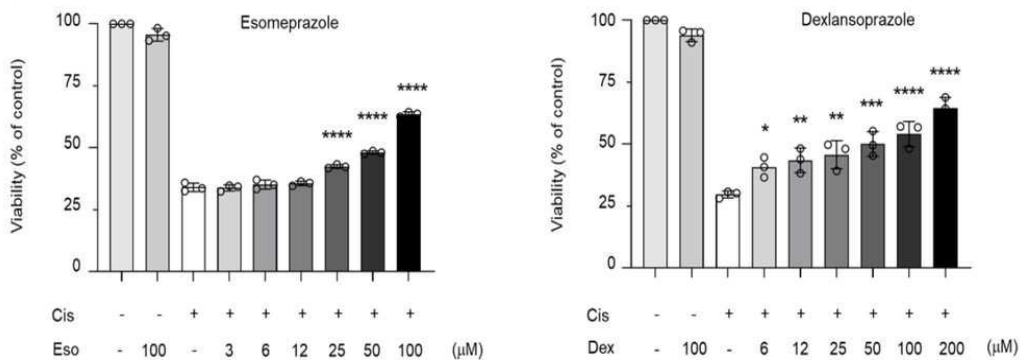
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 에스오메프라졸 또는 텍스란소프라졸을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것으로, 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)이 시스플라틴에 의한 유모세포의 세포사멸을 보호해주며, 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 시스플라틴의 흡수를 저해시키는 효과를 확인함에 따라, 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 항암제인 시스플라틴을 사용함에 따른 부작용인 난청을 예방 및 치료하는데 활용될 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)

A61P 27/16 (2018.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/30 (2013.01)

A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자

허우영

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

전한울

서울특별시 성북구 화랑로14길 5 (하월곡동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711165166

과제번호 2020R1F1A1069424

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)

연구과제명 이독성 난청 분자기전 규명과 치료제 개발을 위한 분자 타겟 도출 연구

기 여 율 50/100

과제수행기관명 고려대학교

연구기간 2022.03.01 ~ 2023.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711152094

과제번호 2E31150

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국과학기술연구원

연구사업명 한국과학기술연구원연구운영비지원(R&D)(주요사업비)

연구과제명 초연결 의료기기 리버스 중개연구사업

기 여 율 50/100

과제수행기관명 한국과학기술연구원

연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 난청은 이독성 난청, 돌발성 난청, 소음성 난청 또는 노화성 난청에서 선택된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 이독성 난청은 항암제 또는 아미노글루코시드계 항생제에서 선택된 약물에 의한 난청인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 항암제는 시스플라틴(cisplatin) 또는 카르보플라틴(carboplatin)인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서 상기 아미노글루코시드계 항생제는 아미카신(amikacin), 아르베카신(arbekacin), 카나마이신(kanamycin), 겐타마이신(gentamicin), 네오마이신(neomycin), 네틸마이신(netilmicin), 디베카신(dibekacin), 시소마이신(sisomicin), 스트렙토마이신(streptomycin), 토브라마이신(tobramycin), 리보도마이신(livodomyacin) 및 파로모마이신(paromomycin)으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)은 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 시스플라틴의 흡수를 저해시키는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 7

에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 8

에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 시스플라틴 흡수 저해용 시약 조성물.

청구항 9

에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)에서 선택된 하나 이상의 프로톤 펌프 억제제; 및 항암제 또는 아미노글루코시드계 항생제에서 선택된 약물을 포함하며, 상기 프로톤 펌프 억제제가 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 상기 약물 흡수를 저해하고, 유모세포 생존율을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 약제학적 복합 제제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 1960년대에 항암 효과가 발견된 이후 시스플라틴(cis-diamminedichloroplatinum II)은 난소, 폐, 방광 등에서 발견되는 고형 종양에 유효한 화학 요법 약물로 널리 사용되었다.

[0003] 시스플라틴(cisplatin)은 확산(diffusion) 또는 운반체(transporter)에 의해 세포로 들어가고 수화(hydrate)되어 세포 내부의 염화 농도(chloride ions)를 낮추기 때문에 염화 이온(chloride ions)을 방출하게 한다. 수화된 형태의 시스플라틴은 핵과 미토콘드리아 DNA의 뉴클레오타이드와 교차결합(cross-links)하여 부가물(adducts)을 형성하여 암세포의 무제한적인 복제를 억제시킨다.

[0004] 그러나 시스플라틴을 이용한 임상 치료는 정상 조직의 부작용으로서 신독성(nephrotoxicity), 신경독성(neurotoxicity) 및 이독성(ototoxicity)을 유발하기 때문에 사용에 제한이 있다. 특히 시스플라틴에 의해 유발된 이독성(ototoxicity)은 돌이킬 수 없는 감각신경성 청력손실, 즉 난청(hearing loss)을 유발시킬 수 있으며, 특히 소아 집단에서 더욱 심각한 문제가 된다.

[0005] 난청(hearing loss)은 환자의 삶의 질을 크게 저하시킬 수 있다. 특히 언어 습득 및 소아 환자의 말하기와 같은 사회 발전에 상당한 영향을 줄 수 있다. 비록 시스플라틴의 이독성을 일으키는 근원적인 분자 기전이 완전하게 밝혀지지 않았지만, 이전 연구에서는 시스플라틴이 정상 세포에서 사멸 수용체 경로(death receptor pathway), 소포체 스트레스 경로(endoplasmic reticulum-stress pathway) 및 미토콘드리아 활성 산소종(ROS) 생성 경로(mitochondrial reactive oxygen species(ROS)-generating pathway)를 활성화시킴을 보여 주었고, 결국 세포 죽음으로 이어짐을 밝힌 바 있다. 과도한 ROS의 생성은 시스플라틴으로부터 유도된 이독성 난청의 주요 원인으로 여겨지며, 또한 이는 DNA에 대한 시스플라틴의 직접적인 공격으로 간주된다. 특히 달팽이관(cochlea) 내의 코르티(corti) 기관, 나선형 신경절(spiral ganglion) 및 측벽(lateral wall)은 강력한 ROS 생성을 위한 시스플라틴의 주요 표적이라고 제안되어 왔다.

[0006] 현재까지 개발되어 임상시험이 진행 중인 이독성 난청 보호 약물 대부분은 시스플라틴 약물의 활성산소 차단을 기전으로 하고 있다. 활성산소 차단 기전의 약물은 강력한 친핵체를 가지고 있어 시스플라틴과 착화합물을 형성하여 활성산소의 생성을 억제하는 효능을 가지고 있으나 시스플라틴의 항암 효과 또한 이로 인하여 저하되며, 비특이적 기작으로 인하여 그 효과가 미미하다는 근본적 한계를 가지고 있다. 따라서, 시스플라틴의 항암 효과가 저해되지 않고 이독성 난청에 대한 치료효과가 있는 치료제의 개발이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 1. 미국 등록특허 US 20080242703(2008.10.02. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 유도세포에서 OCT2(Organ Cation Transpoter 2) 단백질의 시스플라틴 흡수 저해용 시약 조성물을 제공하는 데에 있다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)에서 선택된 하나 이상의 프로톤 펌프 억제제; 및 항암제 또는 아미노글루코시드계 항생제에서 선택된 약물을 포함하며, 상기

프로톤 펌프 억제제가 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 상기 약물 흡수를 저해하고, 유모세포 생존율을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 약제학적 복합 제제를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0013] 또한, 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0014] 또한, 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 시스플라틴 흡수 저해용 시약 조성물을 제공한다.
- [0015] 또한, 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)에서 선택된 하나 이상의 프로톤 펌프 억제제; 및 항암제 또는 아미노글루코시드계 항생제에서 선택된 약물을 포함하며, 상기 프로톤 펌프 억제제가 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 상기 약물 흡수를 저해하고, 유모세포 생존율을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 약제학적 복합 제제를 제공한다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 따르면, 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)이 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 시스플라틴의 흡수를 저해시키는 효과를 확인함에 따라, 이를 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 항암제인 시스플라틴을 사용함에 따른 부작용 난청을 예방 및 치료하는데 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 청각세포에서 시스플라틴(Cisplatin)의 세포독성을 분석한 결과이다. ns: not significant, ****p<0.0001.
- 도 2는 청각세포에서 시스플라틴에 의한 세포독성에 대한 세포 보호 효과를 나타내는 물질을 확인하기 위해, 화합물 스크리닝 분석을 수행한 결과이다.
- 도 3은 상기 화합물 스크리닝을 통해 확인한 8종의 1차 유효물질의 청각세포에서 시스플라틴에 의한 세포독성에 대한 세포 보호 효과를 분석한 결과이다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.
- 도 4는 에스오메프라졸(Esomeprazole) 및 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)의 청각세포에서 시스플라틴에 의한 세포독성에 대한 세포 보호 효과를 분석한 결과이다. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001, ****p<0.0001.
- 도 5 및 6은 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸의 청각세포에서 시스플라틴에 의한 세포사멸에 대한 세포 보호 효과를 분석한 결과이다.
- 도 7은 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸이 OCT2(Organ Cation Transporter 2)에 미치는 영향을 분석한 결과이다. ***p<0.001
- 도 8은 동물모델에서 에스오메프라졸의 시스플라틴에 의한 세포 사멸에 대한 세포 보호 효과를 분석한 결과이다. ****p<0.0001.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.
- [0021] 상기 난청은 이독성 난청, 돌발성 난청, 소음성 난청 또는 노화성 난청에서 선택된 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

- [0022] 상기 이독성 난청은 항암제 또는 아미노글루코시드계 항생제에서 선택된 약물에 의한 것일 수 있다.
- [0023] 상기 항암제는 시스플라틴(cisplatin) 또는 카르보플라틴(carboplatin)인 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 아미노글루코시드계 항생제는 아미카신(amikacin), 아르베카신(arbekacin), 카나마이신(kanamycin), 겐타마이신(gentamicin), 네오마이신(neomycin), 네틸마이신(netilmicin), 디베카신(dibekacin), 시소마이신(sisomycin), 스트렙토마이신(streptomycin), 토브라마이신(tobramycin), 리보도마이신(livodomycin) 및 파로모마이신(paromomycin)으로 구성된 군에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0025] 상기 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)은 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transpoter 2) 단백질의 시스플라틴의 흡수를 저해시킬 수 있다.
- [0026] 본 발명의 다른 구체예에서, 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제, 봉해제, 감미제, 피복제, 팽창제, 율활제, 활택제, 향미제, 향산화제, 완충액, 정균제, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 율활제로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 첨가제를 추가로 포함할 수 있다. 구체적으로 담체, 부형제 및 희석제는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 사용할 수 있으며, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 율활제들도 사용할 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 있으며 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등이 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다. 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 약학 조성물은 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 동맥내, 복강내, 흉골내, 경피, 비측내, 흡입, 국소, 직장, 경구, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 대상체로 투여할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 대상체의 상태 및 체중, 질환의 종류 및 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 1일 투여량이 0.01mg/kg 내지 200mg/kg, 바람직하게는 0.1mg/kg 내지 200mg/kg, 보다 바람직하게는 0.1mg/kg 내지 100mg/kg 일 수 있다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회로 나누어 투여할 수도 있으며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 또한, 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 난청 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0029] 상기 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 "식품첨가물공전"에 수제된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다. 이때, 건강기능식품을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 유효성분은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 1 중량부 내지 90 중량부 포함되도록 첨가될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)을 유효성분으로 포함하는 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 시스플라틴 흡수 저해용 시약조성물을 제공한다.

[0033] 또한, 본 발명은 에스오메프라졸(Esomeprazole) 또는 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)에서 선택된 하나 이상의 프로톤 펌프 억제제; 및 항암제 또는 아미노글루코시드계 항생제에서 선택된 약물을 포함하며, 상기 프로톤 펌프 억제제가 유모세포에서 OCT2(Organ Cation Transporter 2) 단백질의 상기 약물 흡수를 저해하고, 유모세포 생존율을 향상시키는 것을 특징으로 하는, 약제학적 복합 제제를 제공한다.

[0035] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0037] [실험예 1] 세포 배양

[0038] 마우스 청각 세포주인 HEI-OC1 세포(House Ear Institute, Los Angeles, CA, USA)는 DMEM(Dulbecco modified eagle medium, Welgene, Korea)에 항생제 첨가 없이 5% FBS(Fetal bovine serum, Welgene) 및 50U/mL IFN- γ (interferon gamma, Peprotech, USA)를 첨가하고, 33°C 및 10% CO₂ 조건에서 배양하였다. 인간 배아 신장에서 유래한 세포주인 HEK293T 세포(CRL-1573; American Type Culture Collection, Rockville, MD)는 DMEM 배지에 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin) 용액(Welgene) 및 8% FBS를 첨가하고, 37°C 및 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

[0040] [실험예 2] 화합물 스크리닝

[0041] HEI-OC1 세포에서 시스플라틴(cisplatin; 이하 CIS라 함)에 의한 세포독성에 대한 보호 효과를 나타내는 물질을 찾기 위해, Prestwick Chemical 사로부터 구매한 923개의 FDA 승인된 약물 라이브러리를 사용하여 스크리닝을 수행하였다. 923개의 약물을 96-웰 플레이트의 100 μ L 배양배지에 균등히 분주하고, 18시간 동안 배양한 세포에 약물을 0.5 μ L씩 처리하여 최종 약물의 농도가 50 μ M이 되도록 처리하였다. 2시간 후 20 μ M의 CIS를 첨가하였다. 각 플레이트마다 DMSO(Dimethyl sulfoxide)만 넣은 웰을 음성대조군으로 설정하고, 2mM 에르도스테인(erdosteine, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)만 넣은 웰을 양성대조군으로 설정하였다. 약물 스크리닝은 0.82 $\pm$ 0.06 정도의 Z' 값(Z' factor)을 나타냈다. 세포 생존율은 CellTiter-Glo luminescent assay(Promega, USA) 이용하여 제조사의 지침에 따라 측정하였다. 각 웰에 50 μ L의 CellTiter-Glo 시약(reagent)을 첨가하여 15분간 상온의 암실에서 반응시킨 후, automated EnVision plate reader(Perkin-Elmer)로 발광을 측정하였다. DMSO만 첨가된 웰의 측정 신호 값을 기준(0%)으로 하고, 에르도스테인이 들어간 웰의 측정 신호 값을 100%로 설정하였다. 첫 번째 스크리닝에서 양성대조군보다 CIS에 의한 세포독성에 대한 보호효과가 우수한 물질을 유효물질로 정의하였다. 이후 식별된 유효물질들을 2차 스크리닝을 통해 용량-반응 평가를 확인하였다. 선별된 유효물질들은 다양한 농도에서(3~100 μ M) 검증되었으며, 세포 생존율 측정은 하기 실험예 3과 동일한 방식으로 수행하였다.

[0043] [실험예 3] 세포생존율 측정

[0044] HEI-OC1 세포는 96-웰 플레이트에 IFN- γ 가 들어있지 않은 배지를 사용하여 1,000 cells/well로 100 μ L씩 균등히 분주하였다. 분주된 HEI-OC1 세포는 상기 실험예 2의 유효물질 처리 전 16시간 동안 33°C 및 10% CO₂에서 배양하였다. 상기 유효물질의 CIS에 의한 세포독성에 대한 보호효과를 확인하기 위해, 상기 배양한 HEI-OC1 세포에 유효물질을 농도별로 먼저 처리하고, 2시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포독성을 유도하기 위해, 20 μ M의 CIS가 들어있는 배지로 교체한 후 48시간 배양하였다. 대조군은 유효물질을 처리하지 않고 DMSO를 처리한 후, 동일한 조건에서 배양하였다. 세포 생존율 측정은 CellTiter-Glo assay(Promega Corp., Madison, WI, USA)을

이용하여 ATP 수준을 측정을 통해 수행하였다. 100 μ L의 배양액 내 세포를 함유하는 플레이트의 각 웰에 50 μ L의 ATP 검출 용액을 첨가하여 10분간 상온의 암실에서 반응시킨 후, automated EnVision plate reader(Perkin-Elmer, Waltham, MA, USA)로 발광을 측정하였다. 실험은 3번 독립적으로 반복 수행하였고, 결과의 수치는 6개의 독립적인 웰에서 수행한 값을 사용하였다.

[실험예 4] CIS에 의한 세포사멸에 대한 보호 효과 분석(*in vitro*)

상기 유효물질(에스오메프라졸 또는 텍스란소프라졸)이 CIS에 의한 세포사멸에 대한 보호효과를 나타내는지 확인하기 위해, V-FITC(fluorescein isothiocyanate)/PI(propidium iodide) 염색을 수행하였다. HEI-OC1 세포를 6-웰 배양 플레이트에 분주하고, 유효물질(에스오메프라졸 또는 텍스란소프라졸)을 2시간 동안 처리하였다. 그 후, 20 μ M의 CIS를 48시간 동안 처리하였다. DMSO만을 처리한 배양배지를 대조군으로 설정하였다. 그 후, PBS로 1회 세척하고, binding buffer[10mM HEPES/NaOH(pH 7.4), 140mM NaCl 및 2.5mM CaCl_2]에 상기 유효물질을 재부유(resuspend)하였다. 그 후, 세포를 세포 분류 튜브로 옮기고, 제조사 지침에 따라 Annexin V-FITC apoptosis detection kit(BD Biosciences, San Diego, CA, USA)를 사용하여 Annexin V-FITC 및 PI를 첨가하여 15분간 반응시켜 염색한 후, 유세포 분석을 수행하였다. 세포 사멸율은 Annexin V-FITC 양성(positive) 세포의 백분율로 정량화하였다. 모든 실험은 3번 반복 수행하였다.

[실험예 5] 세포 형질주입 및 형광 정량분석

fluorescence uptake assay를 수행하기 위해, HEK293T 세포는 인간 유기 양이온 수송체(hOCT2)를 발현하는 플라스미드로 일시적인 형질주입을 하였다. 형질주입 하루 전, HEK293T 세포는 1×10^6 의 밀도로 cell confluency가 70~80%가 되도록 24시간 동안 계대배양하였다. 폴리에틸렌이민(polyethylenimine; PEI) 및 hOCT2-발현 플라스미드로 형질주입하였다. hOCT를 발현하지 않는 공벡터를 사용하여 형질주입한 HEK293T 세포를 대조군으로 설정하였다. 형질주입된 HEK293T 세포는 black poly L-lysine-coated 96-웰 플레이트(Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany)에 100,000 cells/well로 균등히 분주하고, 18시간 동안 배양하였다. 그 후, 세포는 상온에 보관된 assay buffer(Hanks' Balanced Salt SolutionL; HBSS)(5.6mM D-glucose 함유, pH 7.4)로 2회 세척하고, 유효물질(에스오메프라졸 또는 텍스란소프라졸)을 농도별로(0.0001~1000 μ M) 처리한 후 5분 반응시켰다. Fluorescence uptake assay는 10 μ M fluorescent substrate organic cation 4-(4-(dimethylamino)styryl)-N-methylpyridinium iodide(ASP+)가 들어있는 uptake buffer를 넣어 반응을 시작하였다. 실온에서 3분간 반응시킨 후 반응 혼합물을 흡입하고(aspirating), 500 μ M 시메티딘(Cimetidine)이 들어간 assay buffer로 2회 세척하여 반응을 종결시켰다. 그 후 100 μ L RIPA buffer를 넣고 5분 간 상온에서 세포를 용해시켰다. ASP+fluorescence는 EnVision plate reader(Perkin-Elmer)를 사용하여 excitation 및 emission을 각각 485nm 및 500nm에서 흡광도를 측정하였다.

[실험예 6] 동물모델

형질전환 제브라피쉬(Brn3C:EGFP) 배아는 고려대학교 안산병원 제브라피쉬 시설에서 28.5 $^{\circ}$ C로 유지된 성체 제브라피쉬의 짝짓기를 통해 획득하였다. 형광 현미경을 사용하여 염색하지 않고 볼 수 있는 형질전환 제브라피쉬(Brn3C:EGFP)에서 자연적으로 발생하는 녹색 신경구(neuromast)는 이독성을 모니터링하기 위해 사용하였다. 수정 5일 후, 형질전환 제브라피쉬 배아에게 살아있는 짚신벌레(live paramecia) 및 식물성 음식(plant-based food)을 먹였다. 배아는 배아 배지(1mM MgSO_4 , 120 μ M KH_2PO_4 , 74 μ M Na_2HPO_4 , 1mM CaCl_2 , 500 μ M KCl, 15 μ M NaCl 및 500 μ M NaHCO_3)에서 100mm² 페트리 접시당 약 50개의 배아 밀도로 유지하였다. 본 동물실험은 고려대학교 동물실험실무위원회의 승인을 받고 수행하였다(승인번호: KOREA-2022-0097). 모든 프로토콜은 고려대학교 의료원 동물보호윤리위원회 및 국립보건원 지침에 따라 수행하였다.

[실험예 7] 약물 투여 및 제브라피쉬의 준비

순수한 CIS를 배아 배지에 첨가하여 CIS 용액을 제조하였다. 제브라피쉬 수정 후 5일째에 27마리의 제브라피쉬

배아를 용매 대조군(EtOH 1.36%), 1000 μ M CIS(Sigma-Aldrich) 및 에스오메프라졸(Aldrich, Milwaukee, WI, USA)(2, 20 및 200 μ M)에 4시간 동안 노출시켰다. 그 후, 배아 배지로 배아를 3회 세척하고, 트리카인(tricaine)(MS-222, Sigma-Aldrich, Darmstadt, Germany, A5040)으로 5분 동안 마취하였다.

[실험예 8] 제브라피쉬 신경구 분석

제브라피쉬의 신경구 분석을 위해, 제브라피쉬를 슬라이드에서 메틸셀룰로오스(methylcellulose)로 고정하고, 제브라피쉬의 안와상부(S01 및 S02), 귀(O1) 및 후두부(OC1) 측선(lateral line)의 신경구(neuromast) 내 유모세포(hair cell)를 분석하였다(n=27). 형광 현미경(ECLIPSE Ni-U; Nikon, Tokyo, Japan) 및 공초점 현미경(Nikon, Spinning Disc Confocal Microscope)을 사용하여 신경구에서 유모세포의 평균수를 측정하였다.

[실험예 9] CIS에 의한 세포사멸에 대한 보호 효과 분석(*in vivo*)

in-situ cell detection kit(Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Germany) 및 TdT(terminal deoxynucleotidyl transferase) 매개 dUTP-biotin nick-end labeling(TUNEL) 방법을 이용하여 (체조업체의 지침에 따라) 제브라피쉬의 신경구 내 세포사멸을 분석하였다. 배아를 1000 μ M CIS 및 200 μ M 에스오메프라졸이 함유된 배지에 4시간 동안 노출시켰다. 그 후, 배아를 PBS로 세척하고 4% 파라포름알데하이드(Paraformaldehyde)로 고정시켰다. 그 후, 배아를 TUNEL 반응 혼합물(TdT 및 fluorescein-dUTP) 50mL에서 37°C로 60분 동안 배양하였다. 제브라피쉬는 AxioCam MRC5 형광 현미경(Nikon, Spinning Disc Confocal Microscope)을 사용하여 분석하였다.

[실험예 10] 통계 분석

통계 분석은 GraphPad Prism 9.0(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 사용하여 수행하였다. 데이터는 Student's t-test 또는 one-way analysis of variance(ANOVA)를 사용하여 비교 및 분석하였다. 데이터는 최소 3번 이상의 독립적인 실험에서 구해진 값의 평균값±표준오차(SEM) 또는 평균±표준편차(SD)로 표현하였다. 구체적으로, 실시예 1에 대한 데이터(도 2~4)는 평균±표준편차(SD)로, 나머지 데이터는 평균값±표준오차(SEM)로 표현하였다. p-값은 *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001 및 ****p<0.0001로 표시하였다. IC₅₀(half maximal inhibitory concentration) 값은 비선형 회귀(nonlinear regression) 분석을 통해 계산하였다.

[실시예 1] 화합물 스크리닝

상기 실험예 2에 따라, HEI-OC1 세포에서 CIS에 의한 세포독성에 대한 보호 효과를 나타낸 물질 확인을 위해 화합물 스크리닝을 수행하였다. 스크리닝을 위한 CIS의 최적 농도를 결정하기 위해, HEI-OC1 세포에 CIS를 농도별로(1~30 μ M) 48시간 동안 처리한 결과, 도 1A와 같이, 세포 생존력이 용량 의존적으로 감소하였고, CIS 20 μ M 처리군의 세포생존율은 대조군(DMSO 처리군)의 33% 수준으로 나타났다. 이에, 후속 약물 스크리닝을 위한 CIS의 최적의 농도를 20 μ M로 설정했다. 또한, 도 1B와 같이, CIS 처리군(20 μ M)에서는 세포 수축이 나타나고, 세포가 배지에서 떠다니는 모습을 보였다. 그 후, FDA에서 승인한 923개 약물 라이브러리를 사용하여 스크리닝을 수행하였다. 그 결과, 도 2와 같이, 8개의 1차 유효물질을 확인하였다. 상기 1차 유효물질을 하기와 같다.

1) 에스오메프라졸(Esomeprazole)

2) 텍스란소프라졸(Dexlansoprazole)

3) 오메프라졸(Omeprazole)

4) 디다노신(Didanosine)

5) 엠트리씨타빈(Emtricitabine)

6) 시메티딘(Cimetidine)

7) 메토프롤롤(Metoprolol)

[0076] 8) 프로게스테론(Progesterone)

[0077] 또한, 상기 실험예 3에 따라, 상기 1차 유효물질의 CIS에 의한 세포독성에 대한 보호효과를 확인하기 위해, HEI-OC1 세포에 상기 1차 유효물질을 농도별로(8, 20 및 100 μ M)로 처리한 결과, 도 3과 같이, 상기 8종의 유효물질 모두 모든 처리 농도에서 유의한 세포 보호효과를 나타냈고, 그 중 5종의 유효물질(에스오메프라졸, 텍스란소프라졸, 엠트리시타빈, 메토프롤롤 및 시메티딘)은 용량 의존적인 세포 보호효과를 나타냈다. 그 중 가장 효과가 우수한 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸에 대해 처리 농도를 증가시켜 용량에 따른 세포 보호효과를 분석한 결과, 도 4와 같이, 대조군(DMSO 처리군) 대비 상기 2종의 유효물질 처리군에서 각각 세포생존율이 유의하게 증가했고, 에스오메프라졸은 100 μ M 처리 농도에서, 텍스란소프라졸은 200 μ M 처리 농도에서 가장 우수한 세포 보호효과를 나타냈다.

[0079] [실시예 2] CIS에 의한 세포사멸에 대한 보호 효과 분석(*in vitro*)

[0080] 상기 실험예 4에 따라, 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸의 CIS에 의한 세포독성에 대한 세포 보호 효과를 확인하기 위해, HEI-OC1 세포를 이용한 유세포 분석을 수행한 결과, 도 5A 및 5B와 같이, 대조군 대비 CIS 처리군에서 세포사멸이 유의하게 증가하였다. 반면, 도 5B 및 5C와 같이, 에스오메프라졸 100 μ M 처리군 및 텍스란소프라졸 200 μ M 처리군은 CIS 처리군 대비 세포사멸이 유의하게 감소하였다. 구체적으로, 도 6과 같이, 에스오메프라졸 100 μ M 처리군 및 텍스란소프라졸 200 μ M 처리군에서 세포사멸의 초기(Annexin V+/PI-) 및 후기(Annexin V+/PI+) 단계 모두에서 세포사멸 비율이 감소하였다. 상기 결과로부터, 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸이 CIS에 의한 세포사멸 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0082] [실시예 3] OCT2 특이적 억제 효과 분석

[0083] 상기 실험예 5에 따라, 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸의 CIS에 의한 세포독성에 대한 보호효과가 CIS을 세포질로 운반하는 것으로 알려진 OCT2를 차단하는 능력을 통해 매개되는지 확인하기 위해, OCT2의 특이적 기질인 ASP+의 흡수를 평가하여 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸이 OCT2가 과발현된 HEK293T 세포에서 OCT2를 억제하는지 분석한 결과, 도 7A와 같이, OCT2 과발현 HEK293T 세포(hOCT2)의 ASP+(10 μ M) 흡수는 공백터를 발현하는 HEK293 세포(Mock) 대비 약 25배 더 높게 나타났고, 시메티딘 처리군에서는 ASP+ 흡수가 감소하였다. 또한, 도 7B와 같이, 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸은 농도 의존적으로(0.001~1mM) ASP+(10 μ M)의 흡수를 억제하였다. 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸을 매개로 한 ASP+ 축적(accumulation) 저해의 IC₅₀ 값은 각각 6.4 및 1.3 μ M로 나타났다. 상기 결과로부터, 에스오메프라졸 및 텍스란소프라졸이 OCT2 매개 수송을 특이적으로 억제하는 것을 확인하였다.

[0085] [실시예 4] 제브라피쉬 신경구 분석

[0086] 상기 실험예 8에 따라, CIS 및 에스오메프라졸에 노출시킨 제브라피쉬 신경구를 분석한 결과, 도 8A 및 8B와 같이, 대조군 대비 CIS 단독 처리군에서는 생존 유모세포 평균 수가 유의하게 감소한 반면, CIS 단독 처리군 대비 에스오메프라졸 처리군에서 생존 유모세포 평균 수가 유의하게 증가하였다(n=27). 구체적으로 각 실험군 간 생존 유모세포 평균 수는 하기 표 1과 같다. 사후 분석을 통한 일원 분산 분석(Tukey 방법) 결과, 200 μ M 에스오메프라졸이 CIS에 의한 유모세포 손실 감소 효과가 가장 효과적이었다(p = 0.001).

표 1

[0087]

실험군	생존 유모세포 평균 수
대조군(음성대조군)	41.7 ± 4.5
CIS 단독 처리군	14.7 ± 5.6
에스오메프라졸 2 μ M 처리군	22.8 ± 6.5
에스오메프라졸 20 μ M 처리군	22.9 ± 4.8
에스오메프라졸 200 μ M 처리군	28.8 ± 5.6

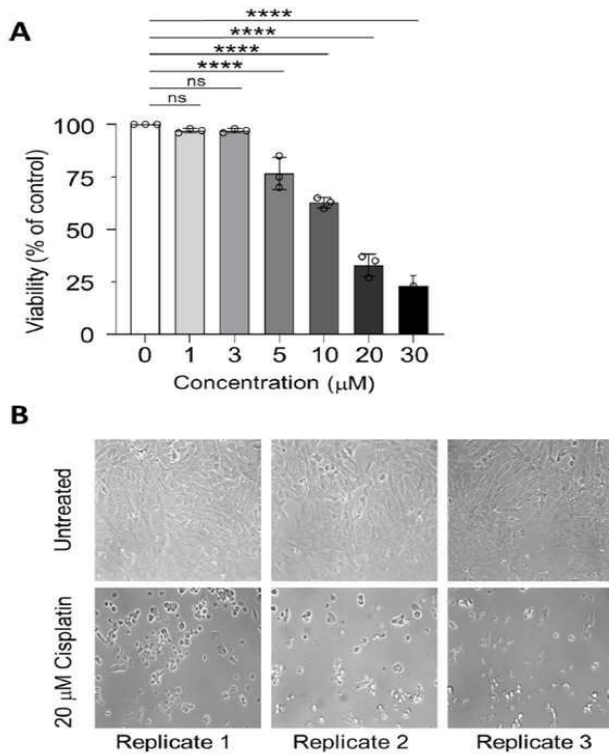
[0089] [실시예 5] CIS에 의한 세포사멸에 대한 보호 효과 분석(*in vivo*)

[0090] 상기 실험예 9에 따라, 상기 에소메프라졸의 CIS에 의한 세포(신경구)사멸에 대한 보호효과를 분석한 결과, 도 8C와 같이, 대조군(Control) 대비 CIS(1000 μ M) 단독 처리군에서 TUNEL 양성 세포(붉은색) 수가 유의하게 증가한 반면, CIS 단독 처리군 대비 에소메프라졸(200 μ M) 처리군에서 TUNEL 양성 세포(붉은색) 수가 유의하게 감소하였다. 상기 결과로부터, 에소메프라졸이 제브라피쉬의 유모세포에서 CIS에 의한 세포사멸을 억제하는 것을 확인하였다.

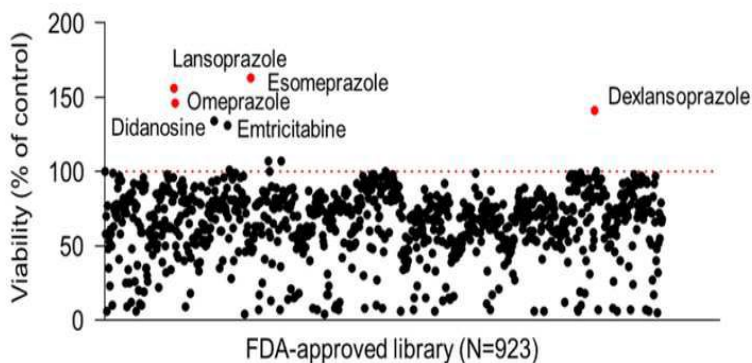
[0092] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

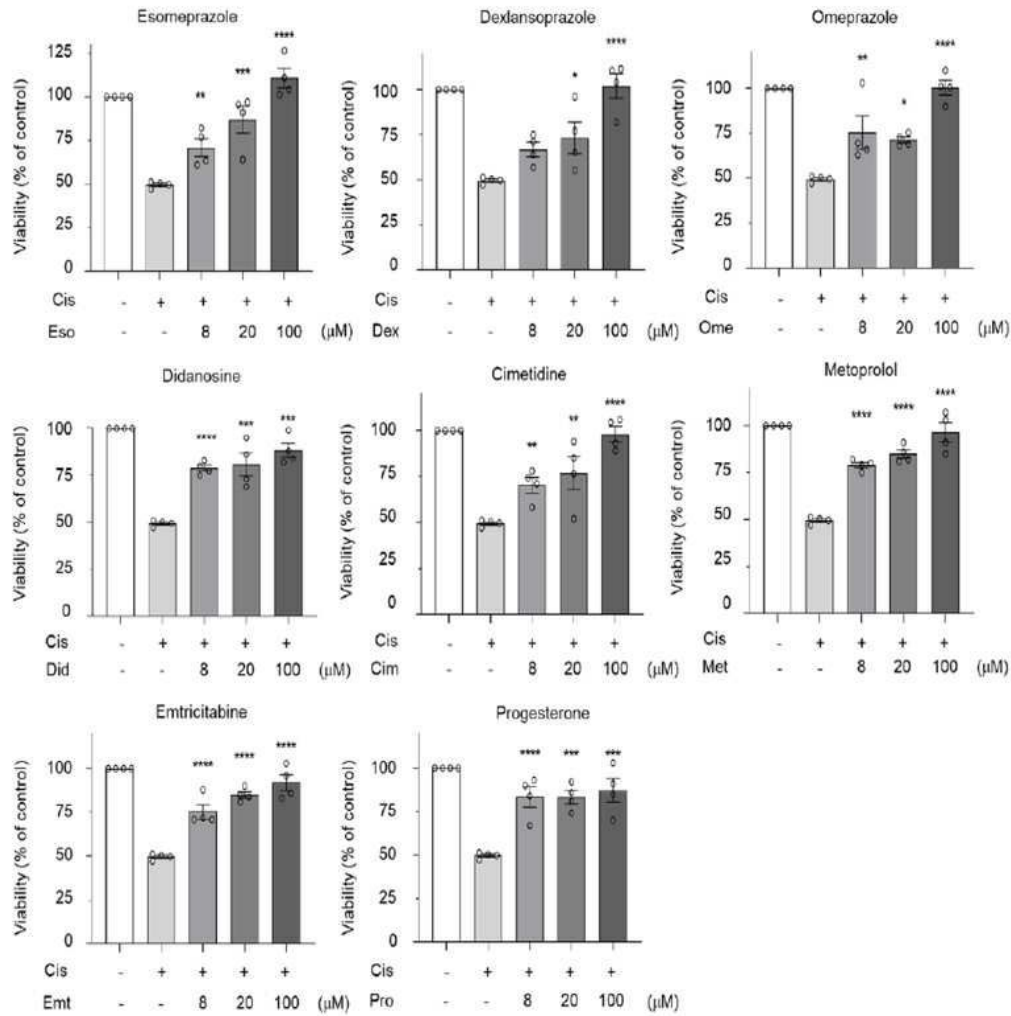
도면1



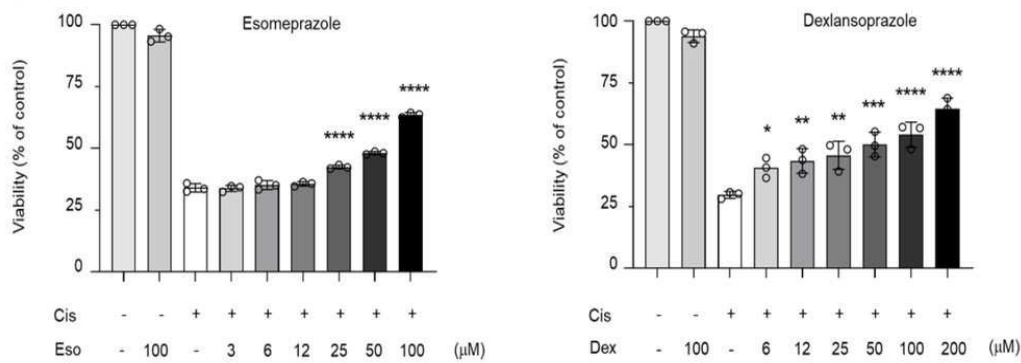
도면2



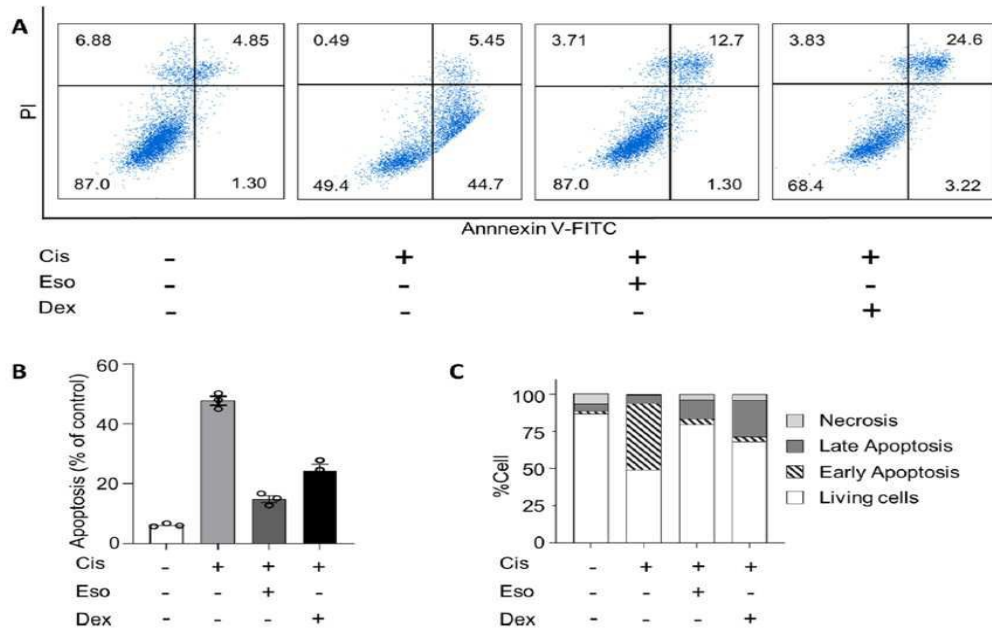
도면3



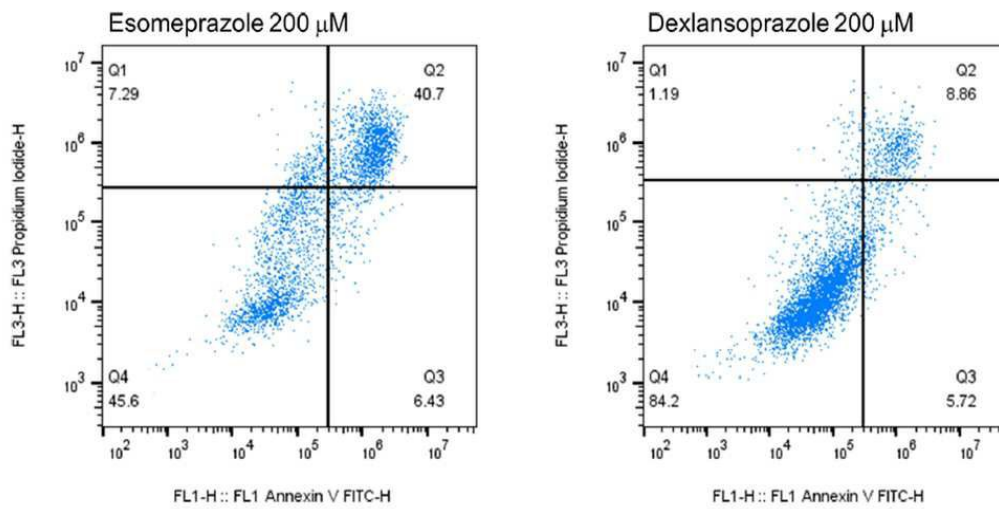
도면4



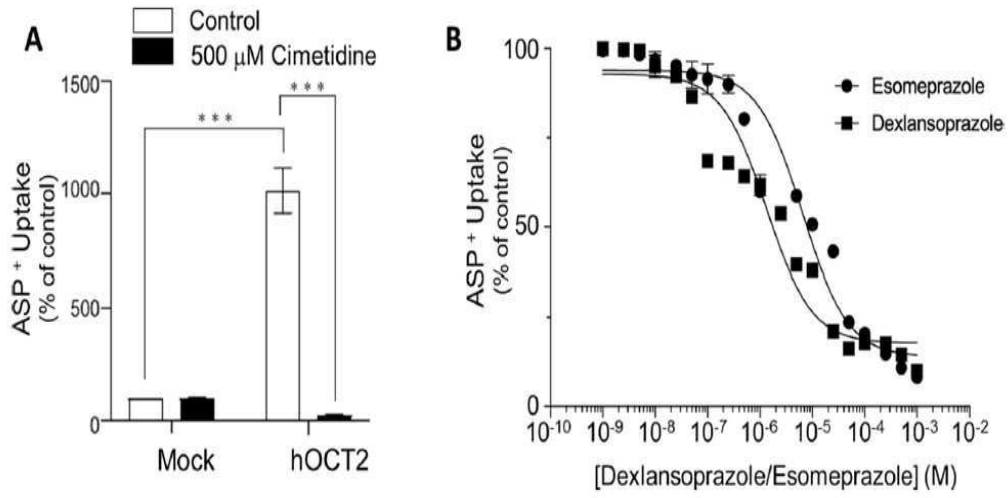
도면5



도면6



도면7



도면8

