



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0012717  
(43) 공개일자 2019년02월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
G01N 33/50 (2017.01) A61B 5/00 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
G01N 33/5014 (2013.01)  
A61B 5/4845 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2017-0096137  
(22) 출원일자 2017년07월28일  
심사청구일자 2018년02월07일

(71) 출원인  
건국대학교 글로벌산학협력단  
충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로벌캠퍼스)  
(72) 발명자  
김보경  
충청북도 충주시 호암중앙2로 5, 104동 804호  
원경중  
서울특별시 송파구 백제고분로42길 14-19, 201호  
(송파동, 유성빌리지)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
특허법인이름리온

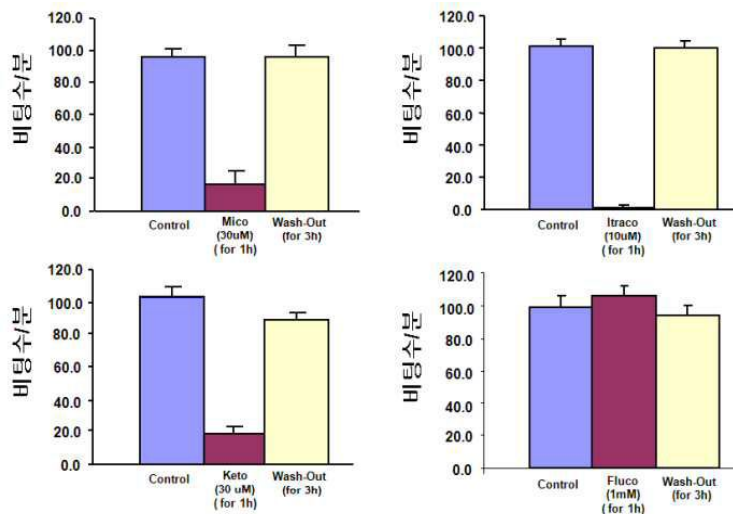
전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발명의 명칭 심장기능 표지자간 알고리즘 분석을 통한 약물의 심장 독성 평가법

(57) 요약

본 발명은 심장 세포에 대한 약물의 독성을 정확히 평가하기 위한 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 심장 기능을 나타내는 9개 기능표지자(O2-, H2O2, Kin, Kout, Ca, HERG, apoptosis, beating, 독성 등)를 이용하여 이들의 심장세포독성과의 연계성을 바탕으로 수식을 만들고 이를 바탕으로 심장독성을 평가하는 방법 및 그 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**G01N 33/5044** (2013.01)

(72) 발명자

**배영민**

경기도 광주시 오포읍 능평로30번길 39-35, A301  
(그린헤이븐빌리지)

**이강파**

경상북도 포항시 북구 양학로34번길 14, 105동  
1403호(학잠동, 대림힐타운)

**백수지**

서울특별시 구로구 서해안로34가길 18, 102동 603  
호 (오류동, 금강아파트)

**정승효**

서울특별시 중랑구 면목로30가길 33, 102동 201호  
(면목동, 용마아파트)

**최룡**

서울특별시 광진구 광나루로32길 8, 201호(구의동,  
대덕연립)

**류윤경**

경기도 양평군 양평읍 삼산길 27-3, 102호 (   
글로빌)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 HI15C1540

부처명 보건복지부

연구관리전문기관 한국보건산업진흥원

연구사업명 임상연구인프라조성

연구과제명 바이오이미징 개방형 혁신센터

기 여 율 1/1

주관기관 건국대학교글로벌산학협력단

연구기간 2016.10.01 ~ 2017.09.30

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

- (a) 개체로부터 분리된 심장세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- (b) 상기 (a) 단계에서 i)  $O_2^-$  및  $H_2O_2$ 의 증가 또는 억제를 측정하고, ii) HERG, Kin, Kout 및 Ca의 세포막 채널의 활성 또는 차단을 측정하며 iii) 세포 사멸 및 세포의 독성을 측정하고 iv) 세포의 자발성 수축을 측정하고 측정하는 단계; 및
- (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 값에 기초하여 후보물질의 독성을 하기 수학적 식 1에 따라 계산하고, 하기 수학적 식의 T값이 0.5 이상이면 독성이 있는 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 후보물질의 심장 독성을 평가하는 방법:

[수학적 식 1]

$$T = [(a \times 0.75) + (b \times 0.25) + (c \times 0.5) + (d \times 0.75) + (e \times 2.0) + (f \times 0.75) + (g \times 0.5) + (h \times 2.0) + (i \times 2.0)]/9$$

상기 수학적 식 1에서,

- a는  $O_2^-$ 가 증가하는 효과가 없을 경우 0점이고, 증가하는 효과가 있을 경우에 1점으로 계산하고,
- b는  $H_2O_2$ 가 증가하는 효과가 없을 경우 0점이고, 증가하는 효과가 있을 경우에 1점으로 계산하며,
- c는 Kin의 IC50이  $10 \mu M$  이상인 경우 0점,  $10 \mu M$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- d는 Kout의 IC50이  $10 \mu M$  이상인 경우 0점,  $10 \mu M$  이하일 경우에 1점으로 계산하며,
- e는 HERG의 IC50이  $20 \mu M$  이상인 경우 0점,  $10 \mu M$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- f는 CaIC50이  $10 \mu M$  이상인 경우 0점,  $10 \mu M$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- g는 세포사멸이 없으면 0점, 세포 사멸이 있으면 1점으로 계산하며,
- h는 세포의 자발성 수축에 영향을 주지 않으면 0점, 세포의 자발성 수축에 영향을 주면 1점으로 계산하고,
- i는 세포의 독성이 없으면 0점, 세포의 독성이 있으면 1점으로 계산한 뒤, 각각의 지수를 곱한 뒤, 이들의 값을 모두 더한 뒤 9로 나누어 T값을 구한다.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 심장 세포에 대한 약물의 독성을 평가하기 위한 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 심장 기능을 나타내는 9개 기능표지자( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , Kin, Kout, Ca, HERG, 세포 사멸, 세포의 자발성 수축 및 독성)를 이용하여 이들의 심장세포독성과의 연계성을 바탕으로 수식을 만들고 이를 바탕으로 심장독성을 평가하는 방법 및 그 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 인간의 고령화로 인한 만성질환 및 장애 발생증가의 예방 및 해결책 마련을 위해 그리고 건강한 삶에 대한 욕구 증가로 인해 의약품에 대한 수요가 세계적으로 계속 증가하고 있다. 이에 따른 세계 의약품 시장의 규모 또한 증가 추세에 있음. 이에 대응하여 선진국과 글로벌 제약사들은 세계 시장 주도권 보유를 위한 혁신적인 신약개발에 투자를 강화하고 있는 추세이다. 국내외의 신약개발 분야의 연구개발비는 매년 큰 폭으로 증가하고 있 것 에 비해 개발 신약 승인 건수는 매년 감소하는 추세이며, 또한 제약회사들은 성공률이 희박한 후기 임상시험과 주요 특허의 만기 등 향후 몇 년 안에 대면할 어두운 전망에 직면해 있다. 또한, 신약개발에 있어서는 약물의

독성이 중요한 걸림돌이 되고 있다. 약물개발의 전임상단계 에서는 약물의 효능성 판정도 중요하지만 약물의 독성판정 또한 중요한 부분이다. 또한 임상(1, 2, 3상)에 진입한 약물에서도 인체에 독성이 있다는 것은 약물이 시장에 나올 수 있는지 없는지를 결정하는 가장 중요한 인자이다. 따라서 신약개발 과정에서 약물의 독성 유무를 신속하고도 정확히 판정하는 것은 가장 시급히 해결해야할 분야이다.

[0004] 전신 진균감염증의 증가 추세에도 불구하고 별다른 약제의 발전없이 오랫동안 AmB가 표준약제로 사용되다가, 1980년대 imidazole계 항진균제를 시작으로 1990년대 triazole계 항진균제가 임상에 사용되면서 다양한 약제의 선택이 가능해졌다. 이들은 작용기전상 cytochrome P450 enzyme system을 통해 대사되는 약제와 빈번한 약물 상호 작용을 나타내는 것이 큰 특징으로, 임상에서 다른 약제와의 병용투여에 있어 주의가 요구된다. Azole 계열의 약물은 간기능 저하 환자에게 사용 시 간염에 의한 사망을 초래할 수도 있으므로 투여 전에 반드시 간기능 검사가 선행되어야 한다. Ketoconazole은 용량 의존적으로 테스토스테론 및 콜티솔 합성을 저해하여 복용 환자의 5~21%에서 발기부전, 여성유방증 등 부작용이 보고되어 있고, 고용량으로 장기 복용한 환자에서 무기질코르티코이드 과잉증에 의한 고혈압이 발생한 것으로 보고되었다. Itraconazole, voriconazole은 심근 수축력 저하 효과 및 여러 형태의 부정맥 유발 가능성이 높기 때문에 울혈성 심부전 환자에게 있어서 금기이다.

[0006] 심혈관계 이상을 가져오는 항진균제의 개략적으로 보면 진균류에 의한 감염질환은 진균증(mycosis)라 하며 대체로 만성질환으로서 크게 피하조직 진균증, 전신성 진균증 및 표재성 진균증으로 나눈다. voriconazole, fluconazole, itraconazole, ketoconazole은 Azole계의 항진균제로서 그 작용기작은 진균세포막의 구성성분인 ergosterol의 생합성을 저해를 통한 세포막의 기능과괴 및 투과성을 증가시켜 항진균활성을 나타내는 것으로 알려져 있다. 이들 Azole계의 항진균제는 피하조직 진균증, 전신성 진균증, 표재성 진균증에 이용될 수 있어 그 항진균 활성이 광범위 하다는 것과 특히 대표적 진균감염증 치료제인 amphotericin에 비해 그 부작용이 작다는 장점을 갖고 있다. 현재 Azole계의 항진균제인 ketoconazole은 전신감염증 및 피부나 점막의 만성 Candida증, fluconazole은 식도, 구강인두, 질의 Candida증 및 Coccidioides와 Cryptococcus에 의한 감염증, itraconazole은 Blastomyces와 Sporothrix에 의한 전신감염증, 식도 Candida증, 피부사상균증의, voriconazole은 침습성 Aspergillus 감염 및 Scedosporium apiospermum과 Fusarium속 곰팡이에 의한 중증 진균감염증의 치료약으로 사용되고 있는 유용한 항진균제들이다. 그러나 이들 Azole계 항진균제들은 구토, 설사, 발진, 간독성의 부작용을 갖고 있는 것으로 보고되어져 있으며 최근 이들 약물들은 심장의 torsades de pointes나 QT간격의 연장을 초래한다는 보고나 그 가능성이 시사되고 있다. 혈관계 이상을 가져오는 항진균제의 경제 손실효과로는 유용 생리활성물질의 개발은 중요한 고부가가치 산업의 일종으로 잘 알려져 있으나 하나의 유용 신약이 상품화되기 위한 확률은 500만분1이며 최소한 10~15년의 기간과 약 1조이상의 비용이 소비되는 것으로 알려져 있다. 또한 상품화 이후에도 부작용에 대한 지속적인 검토가 요구되어지며 추후 부작용에 의한 문제가 발생하면 약품으로서의 퇴출에 따른 경제적인 타격은 이루 말할 수 없으리라 사료된다. 따라서 현재 세계적으로 많은 제약회사들의 신약개발은 상대적으로 그 부작용이 적고 그 활성이 유용한 Azole계 항진균제에 초점이 맞춰져 있다. 이러한 유용약물의 부작용이 추후 발견되어 의약품으로서의 퇴출이 생긴다면 이는 엄청난 경제적인 손실을 유발할 수 있으리라 사료된다.

[0008] 각 항진균제의 IKr, IKs, IK1, INa, ICa 등에 대한 효과 분석을 통한 각 약물들의 이온 채널 조절기전의 규명 및 각 항진균제의 작용 부위의 규명은 심혈관계 이상을 가져오는 항진균제의 심혈관계 부작용을 예측 하기위해 필요할 것이다. 또한 각 약물의 구조를 변형함으로써, 심혈관계 부작용을 없애거나 대폭 부작용을 감소시킨 약제의 개발을 가능하게 할 것이다. 게다가 향후 이들 분석을 이용한 각 항진균제와 항진균제에 대한 정보는 이들 균제의 다른 용도의 치료 약물 개발을 위해 응용될 수 있다.

[0010] 이에 본 발명자들은 신약개발에서 꼭 필요한 과정인 심장독성 유무를 판정하는 새로운 평가법의 개발을 위하여 각종 심장기능 표지자를 이용하여 약물-심장세포 독성 수식을 만들었다. 이 평가법은 분리된 심장세포에서의 약물의 ROS(O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 생산능, 약물의 심장세포에서의 Kin, Kout, Ca 등 세포막 채널의 활성 및 HERG 채널의 활성에 기여하는 효과, 심장세포에서의 약물의 apoptosis의 발생 정도 및 최적화 시험관 환경에서의 분당 beating 수와 세포독성의 발생 정도를 수식화하여 만들었다. 본 수식화는 신약을 개발하는 연구자/개발자들이 혼란에 빠

지기 쉬운 심장 독성의 평가를 가능한 오차를 최소화하고 효과적으로 해결하는 평가법으로 신약개발과정에서의 다양한 긍정적 효과를 제공하기위해 본 발명을 성공적으로 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0011] 상기의 문제를 해결하기 위해, 발명의 하나의 목적은, 하기의 단계를 포함하는 후보물질의 심장 독성을 평가하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0012] (a) 개체로부터 분리된 심장세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0013] (b) 상기 (a) 단계에서 i)  $O_2^-$  및  $H_2O_2$ 의 증가 또는 억제를 측정하고, ii) HERG, Kin, Kout 및 Ca의 세포막 채널의 활성 또는 차단을 측정하며 iii) 세포 사멸 및 세포의 독성을 측정하고 iv) 세포의 자발성 수축을 측정하고 측정하는 단계; 및
- [0014] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 값에 기초하여 후보물질의 독성을 하기 수학식 1에 따라 계산하고, 하기 수학식의 T값이 0.5 이상이면 독성이 있는 것으로 판단하는 단계:
- [0015] [수학식 1]
- [0016]  $T = [(a \times 0.75) + (b \times 0.25) + (c \times 0.5) + (d \times 0.75) + (e \times 2.0) + (f \times 0.75) + (g \times 0.5) + (h \times 2.0) + (i \times 2.0)]/9$
- [0017] 상기 수학식 1에서,
- [0018] a는  $O_2^-$ 가 증가하는 효과가 없을 경우 0점이고, 증가하는 효과가 있을 경우에 1점으로 계산하고,
- [0019] b는  $H_2O_2$ 가 증가하는 효과가 없을 경우 0점이고, 증가하는 효과가 있을 경우에 1점으로 계산하며,
- [0020] c는 Kin의 IC50이 10  $\mu$ M 이상인 경우 0점, 10  $\mu$ M 이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0021] d는 Kout의 IC50이 10  $\mu$ M 이상인 경우 0점, 10  $\mu$ M 이하일 경우에 1점으로 계산하며,
- [0022] e는 HERG의 IC50이 20  $\mu$ M 이상인 경우 0점, 10  $\mu$ M 이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0023] f는 CaIC50이 10  $\mu$ M 이상인 경우 0점, 10  $\mu$ M 이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0024] g는 세포사멸이 없으면 0점, 세포 사멸이 있으면 1점으로 계산하며,
- [0025] h는 세포의 자발성 수축에 영향을 주지 않으면 0점, 세포의 자발성 수축에 영향을 주면 1점으로 계산하고,
- [0026] I는 세포의 독성이 없으면 0점, 세포의 독성이 있으면 1점으로 계산한 뒤, 각각의 지수를 곱한 뒤, 이들의 값을 모두 더한 뒤 9로 나누어 T값을 구한다.

**과제의 해결 수단**

- [0027] 본 발명의 하나의 목적은, 하기의 단계를 포함하는 후보물질의 심장 독성을 평가하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0028] (a) 개체로부터 분리된 심장세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0029] (b) 상기 (a) 단계에서 i)  $O_2^-$  및  $H_2O_2$ 의 증가 또는 억제를 측정하고, ii) HERG, Kin, Kout 및 Ca의 세포막 채널의 활성 또는 차단을 측정하며 iii) 세포 사멸 및 세포의 독성을 측정하고 iv) 세포의 자발성 수축을 측정하고 측정하는 단계; 및
- [0030] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 값에 기초하여 후보물질의 독성을 하기 수학식 1에 따라 계산하고, 하기 수학식의 T값이 0.5 이상이면 독성이 있는 것으로 판단하는 단계:
- [0031] [수학식 1]
- [0032]  $T = [(a \times 0.75) + (b \times 0.25) + (c \times 0.5) + (d \times 0.75) + (e \times 2.0) + (f \times 0.75) + (g \times 0.5) + (h \times 2.0) + (i \times 2.0)]/9$

- [0033] 상기 수식식 1에서,
- [0034] a는  $O_2^-$ 가 증가하는 효과가 없을 경우 0점이고, 증가하는 효과가 있을 경우에 1점으로 계산하고,
- [0035] b는  $H_2O_2$ 가 증가하는 효과가 없을 경우 0점이고, 증가하는 효과가 있을 경우에 1점으로 계산하며,
- [0036] c는 Kin의 IC50이  $10\ \mu\text{M}$  이상인 경우 0점,  $10\ \mu\text{M}$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0037] d는 Kout의 IC50이  $10\ \mu\text{M}$  이상인 경우 0점,  $10\ \mu\text{M}$  이하일 경우에 1점으로 계산하며,
- [0038] e는 HERG의 IC50이  $20\ \mu\text{M}$  이상인 경우 0점,  $10\ \mu\text{M}$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0039] f는 CaIC50이  $10\ \mu\text{M}$  이상인 경우 0점,  $10\ \mu\text{M}$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0040] g는 세포사멸이 없으면 0점, 세포 사멸이 있으면 1점으로 계산하며,
- [0041] h는 세포의 자발성 수축에 영향을 주지 않으면 0점, 세포의 자발성 수축에 영향을 주면 1점으로 계산하고,
- [0042] I는 세포의 독성이 없으면 0점, 세포의 독성이 있으면 1점으로 계산한 뒤, 각각의 지수를 곱한 뒤, 이들의 값을 모두 더한 뒤 9로 나누어 T값을 구한다.

**발명의 효과**

- [0043] 상술한 바와 같이, 본 발명에서 창출한 수식화는 분리된 심장세포에서의 약물의 ROS( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) 생산능, 약물의 심장세포에서의 Kin, Kout, Ca 등 세포막 채널의 활성 및 HERG 채널의 활성에 기여하는 효과, 심장세포에서의 약물의 apoptosis의 발생 정도 및 최적화 환경에서의 분당 beating 수와 세포독성의 발생 정도를 정량화하여 만든 것으로 신약 개발하는 연구자/개발자들이 혼란에 빠지기 쉬운 심장 독성의 평가를 신속하게 해결하기 위하여 만든 것으로 신약개발과정에서 유용하게 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0044] 도 1은 본 발명의 쥐 심장에서 분리한 세포의 시험관 내 자동성 수축( beating)에 대한 항진균제의 효과를 조사한 것이다.
- 도 2은 본 발명의 쥐 심장에서 분리한 세포에 항진균제의 세포독성 유도 효과를 조사한 것이다.
- 도 3은 본 발명의 쥐 심장세포의 세포막 채널(Kin, Kout, 및 Ca)에 대한 항진균제의 효과를 조사한 것이다.
- 도 4은 본 발명의 쥐 심장세포의 세포막 HERG 채널에 대한 항진균제의 효과를 조사한 것이다.
- 도 5은 본 발명의 쥐 심장세포에서 항진균제가 ROS( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ) 생산에 미치는 효과를 조사한 것이다.
- 도 6은 본 발명의 쥐 심장세포에서 항진균제가 apoptosis에 미치는 효과를 조사한 것이다.
- 도 7은 본 발명의 시험결과로부터 얻은 각 파라미터의 심장독성 기여도를 계산식으로 나타낸 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0045] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.
- [0046] 상술한 바와 같이, 본 발명은 심장 세포에 대한 약물의 독성을 정확히 평가하기 위한 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 심장 기능을 나타내는 9개 기능표지자( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ , Kin, Kout, Ca, HERG, apoptosis, beating, 독성 등)를 이용하여 이들의 심장세포독성과의 연계성을 바탕으로 수식을 만들어 완성하였다.
- [0047] 본 발명은 본 발명의 하나의 목적은, 하기의 단계를 포함하는 후보물질의 심장 독성을 평가하는 방법을 제공하는 것이다.
- [0048] (a) 개체로부터 분리된 심장세포를 포함하는 생물학적 시료에 후보물질을 처리하는 단계;
- [0049] (b) 상기 (a) 단계에서 i)  $O_2^-$  및  $H_2O_2$ 의 증가 또는 억제를 측정하고, ii) HERG, Kin, Kout 및 Ca의 세포막 채널의 활성 또는 차단을 측정하며 iii) 세포 사멸 및 세포의 독성을 측정하고 iv) 세포의 자발성 수축을 측정하고

측정하는 단계; 및

- [0050] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 값에 기초하여 후보물질의 독성을 하기 수학식 1에 따라 계산하고, 하기 수학식의 T값이 0.5 이상이면 독성이 있는 것으로 판단하는 단계를 포함하는, 후보물질의 심장 독성을 평가하는 방법:
- [0051] [수학식 1]
- [0052]  $T = [(a \times 0.75) + (b \times 0.25) + (c \times 0.5) + (d \times 0.75) + (e \times 2.0) + (f \times 0.75) + (g \times 0.5) + (h \times 2.0) + (i \times 2.0)]/9$
- [0053] 상기 수학식 1에서,
- [0054] a는  $O_2^-$ 가 증가하는 효과가 없을 경우 0점이고, 증가하는 효과가 있을 경우에 1점으로 계산하고,
- [0055] b는  $H_2O_2$ 가 증가하는 효과가 없을 경우 0점이고, 증가하는 효과가 있을 경우에 1점으로 계산하며,
- [0056] c는 Kin의 IC50이  $10 \mu M$  이상인 경우 0점,  $10 \mu M$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0057] d는 Kout의 IC50이  $10 \mu M$  이상인 경우 0점,  $10 \mu M$  이하일 경우에 1점으로 계산하며,
- [0058] e는 HERG의 IC50이  $20 \mu M$  이상인 경우 0점,  $10 \mu M$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0059] f는 CaIC50이  $10 \mu M$  이상인 경우 0점,  $10 \mu M$  이하일 경우에 1점으로 계산하고,
- [0060] g는 세포사멸이 없으면 0점, 세포 사멸이 있으면 1점으로 계산하며,
- [0061] h는 세포의 자발성 수축에 영향을 주지 않으면 0점, 세포의 자발성 수축에 영향을 주면 1점으로 계산하고,
- [0062] I는 세포의 독성이 없으면 0점, 세포의 독성이 있으면 1점으로 계산한 뒤, 각각의 지수를 곱한 뒤, 이들의 값을 모두 더한 뒤 9로 나누어 T값을 구한다.
- [0064] 본 발명의  $O_2^-$  및  $H_2O_2$ 는 대표적인 활성 산소종이다. 상기 활성 산소종은 세포내 축적에 의해 발생하여 심근세포의 세포사멸을 유발하는 주요 원인 중의 하나이다. 상기 활성 산소종은 생체 내에서 지속적으로 생성되며 DNA, 단백질 및 지질에 대하여 산화적 손상을 유발하여 세포사멸에 의한 세포죽음에 이르게 하며, 암을 비롯하며 동맥경화, 관절염, 뇌졸중, 파킨슨병, 자가면역질환 등의 각종 질병 원인으로 작용함과 동시에 노화의 주요 원인으로 작용한다고 알려져 있다. 허혈/재관류 손상은 심장근세포 내 산화스트레스의 주요 원인이다.
- [0065] 본 발명의 Kin, Kout, Ca는 심장 세포를 포함한 대부분 세포막에 존재하는 이온 채널이다. 이들이 활성화될 경우 K, Ca 등 이온 이동이 증가하여 세포의 생리적 또는 병리적 현상이 발생한다.
- [0067] 본 발명의 HERG는 세포막에 있는 K 이온 통로로서 심장세포에서 이 채널이 차단되면 임상적으로 QT 연장증후군(LQTS)가 나타나 부정맥이 나타날 수 있다.
- [0069] 본 발명의 세포 사멸은 세포의 죽음을 의미하는 것으로 심장세포의 사멸은 약물의 독성에 기인하여 나타나며 이는 결국 부정맥 등 심장 부작용을 일으키는 원인이 될 수 있다.
- [0071] 본 발명의 세포의 자발성 수축은 심장세포가 가장 생리적인 환경에서는 나타내는 특성으로 in vivo적으로는 심장 박동을 의미한다.
- [0073] 본 발명의 독성은 심장조직 또는 심장세포가 받는 약물의 독작용을 의미하는 것으로 독성이 있는 경우 심장의 자발성 수축 감소, 세포 사멸, 부정맥 등이 일어날 수 있다.

[0075] 본원에서 생물학적 시료란, 바이오마커 검출이 가능한 하나 이상의 성분을 포함하는 물질 또는 물질의 혼합물을 일컫는 것으로 생물체, 특히 인간 유래의 세포, 조직 또는 체액, 예를 들면 전혈, 뇨, 혈장, 및 혈청을 포함하나 이로 제한하는 것은 아니다. 또한 생물체에서 직접적으로 유래된 것은 물론 인비트로에서 배양된 세포 또는 조직을 포함하지만, 이로 제한하는 것은 아니다.

[0077] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시 일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0079] **[실시예 1] 쥐 심장에서 분리한 세포의 시험관 내 자발성 수축에 대한 항진균제의 효과**

[0081] 심근세포는 출생 1~2일 된 Sprague Dawley(SD) Rat 심장의 심실만을 분리하여 1mm 크기로 세절한 후, 효소액(0.15% 트립신, 0.1% DTT, 0.1% collagenase 및 1% glucose 등을 포함한 PBS)을 처리하여 분리되었다. 즉, 세절한 심실 조직을 효소액에 넣어 37°C에서 10분 간격으로 4회 반복했다. 1회 효소처리 때의 상청액은 버리고 2~4회 효소처리에서 생긴 상청액 만을 분리하여 4°C 배양액(DMEF/F12: 5% horse serum, 10% FBS, 1% penicillin-streptomycin)속에 수집했다. 이 수집된 용액을 원심분리(2000rpm/7min at 4°C)하여 하층의 cell pallet만을 수집하고, 수집된 cell pallet을 신선한 배양액에 넣고 씻은 후, 배양용기에 넣어 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에서 1.5시간 배양했다. 배양용기에서 배양액만을 수집하여 심근세포의 수를 측정하였다. 그 후 필요한 양의 세포들을 농도 별로 작성하여 각각 37°C의 CO<sub>2</sub> 배양기에 넣어 2일 동안 배양한 후 3일째 새 배양액으로 교체해 주었다. 그 후 부터는 1~2일 마다 배양액을 교체하여 주었다. 분리 배양된 심장근세포의 확인을 위해 세포 분리 직후, 배양 3일, 5일 및 7일에 심근세포 특이항체(alpha-sarcomeric actin 항체)를 심근세포에 처리하면 배양일이 증가함에 따라 심근세포에서 액틴의 발현범위가 증가하였다. 또한 웨스턴방법에 의한 확인에서 배양한 심장 세포는 alpha-sarcomeric actin의 발현이 관찰되었다. 배양된 심장세포는 분리 후 배양에 따라 자발성 수축이 발생하는 것을 관찰 할 수 있다. 분리된 심장세포를 60mm dish에 5만개 세포를 넣어 37°C 5% CO<sub>2</sub> 존재의 환경에서 배양을 시작하였다. 배양 3일부터 7일까지의 심장세포의 자발성 수축의 변화를 상온환경 및 배양과 동일한 환경 조건하에서 관찰하였다. 배양된 세포를 상온 조건하에서 관찰 한 자발성 수축의 빈도는 4일 배양 한 세포에서 최대를 나타내었고, 7일 배양 한 세포에서 가장 작은 빈도를 나타내었다. 한편, 배양조건과 동일한 환경 조건하에서 관찰한 세포의 자발성수축의 빈도는 배양일 수에 따른 변화가 거의 나타나지 않았다 (도 1). 심근의 자발성 수축에 대한 항진균제(miconazole, itraconazole, ketoconazole, fluconazole)의 고농도 처치효과가 관찰되어졌다. 도 1과 같이, miconazole(30 μM), ketoconazole(30 μM), itraconazole(10 μM)을 분리 배양된 심근 세포에 1시간동안 처치하는 경우 이들 세포의 자발성 수축의 빈도는 비처치한 세포에 비해 유의적으로 억제되는 것이 관찰되었으나, fluconazole(1mM)는 심근세포의 자발성 수축의 빈도에 영향을 주지 않았다 (도 1). 심근세포의 자발성 수축의 빈도는 miconazole의 농도(0.1, 1 10 μM) 변화에 비례하여 그 수축의 빈도가 억제되는 것으로 관찰되었다 (도 1). 이들 사용된 약물의 작성 시 이용된 DMSO가 심근세포의 자발성 수축의 빈도에 어떤 영향을 미치는지 관찰하였다. DMSO는 세포의 자발성 수축빈도에 영향을 미치지 않은 것으로 관찰되었다.

[0083] **[실시예 2] 쥐 심장에서 분리한 세포에 항진균제의 세포독성 유도 효과**

[0085] 항진균제는 심근세포에 이들 약물을 처리하여 심근세포가 20%가 죽는 각 약물의 농도(LC20)를 XTT방법을 이용하여 측정하였다(도 2).

[0087] **[실시예 3] 쥐 심장세포의 세포막 채널(Kin, Kout)에 대한 항진균제의 효과**

[0089] Whole cell mode of the patch-clamp technique은 파이펫 용액을 분리된 단일 심근세포내로 관류시킴으로 일정한 조건에서 원하는 이온채널 전류를 기록할 수 있다. 세포외액에는 정상 생리적 식염수(143mM NaCl, 5.4mM

KCl, 0.33mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.8mM CaCl<sub>2</sub>, 0.5mM MgCl<sub>2</sub>, 5mM HEPES, and 11mM glucose, adjusted to pH 7.4 with NaOH)를 사용하고, 세포내 관류될 파이펫 용액의 조성은 다음과 같다: 140mM KCl, 5mM NaCl, 5mM MgATP, 10mM HEPES, 5mM EGTA, adjusted to pH 7.2 with KOH. Miconazole과 ketoconazole 처치군에서 뚜렷하게 심근 K전류 및 Ca 전류의 차단효과를 관찰 할 수 있었다 (도 3). miconazole의 outward K에 대한 IC<sub>50</sub>은 2.45 μM, inward rectifier K IC<sub>50</sub>은 10.38 μM, Ca전류에 대한 IC<sub>50</sub>은 2.45 μM로 나타났다. ketoconazole은 outward K 전류에 대한 IC<sub>50</sub>가 3.11 μM로 나타났으며, inward K 전류 억제에 대한 IC<sub>50</sub>은 1.232 μM, 그리고 Ca 전류 억제에 대한 IC<sub>50</sub>은 4.09 μM로 관찰되었다. itraconazole과 fluconazole은 HERG 전류에도 별다른 억제 효과를 나타내지 않았다(도 3).

[0091] [실시예 4] 쥐 심장세포의 세포막 Ca 채널에 대한 항진균제의 효과

[0093] Ca channel current는 심근 활동전압의 긴 plateau 및 심근세포내로의 칼슘의 유입 밀접하게 연관된 전류이다. 특히, L-type Ca channel current가 inactivation이 상대적으로 느려서 지속적으로 활성화되어 plateau의 유지에 중요한데, 유지전압을 -40mV로 하면 전압-의존성 Na channel current나 다른 종류의 칼슘 전류는 완전히 비활성화 하므로 쉽게 구별이 가능하여 이 조건에서 약물의 전압-의존성 차단 효과 및 use-dependency를 분석하였다. Charge carrier로는 Ca 및 Ba를 사용하였다(도 3).

[0095] [실시예 5] 쥐 심장세포의 세포막 HERG 채널에 대한 항진균제의 효과

[0097] 심근에는 inward rectifier K channels, A-type K channels 및 몇 가지 아형(subtype)의 delayed rectifier K channels 등이 존재하였다. 심장에서 약물에 의한 부정맥으로 Torsades de Pointes를 유발하는 약물들이 주로 human-ether-a-go-go-related gene(HERG)이 code하는 delayed rectifier K channels를 차단하여 나타나는 것으로 알려져 있다. IKr 형태의 전류를 발생시키는 HERG channels는 심근의 긴 활동전압을 재분극시키는 초기의 이온 전류를 발생시키는 채널로서, 이 채널이 유전적 결함이 있거나 약물에 의해 차단될 때 EAD(early after depolarization)이나 long QT syndrome(LQT-2)을 일으키게 되어 치명적일 수 있다. 따라서, 본 실험에서는 HERG current에 대한 약물의 효과 관찰 및 분석에 우선 중점을 둘 계획이다. HERG current는 활성화 및 비활성화 kinetics가 독특한 양상을 띠고, 세포외의 다양한 양이온들에 의해 특징적인 차단을 보이기 때문에 다양한 막전압 고정 pulse protocol로 대상 항진균제와 항진균제의 전압-의존적 효과 및 약물의 결합 부위 등을 분석할 예정이다. 이 외에도 IKs에 대한 약물의 효과도 유사한 방법으로 분석하여, 전압-의존성 차단 효과 및 use-dependency 등을 분석하고 결합 부위를 예측하였다. RFP-HERG 채널을 발현하는 세포주는 HEK293T-REx 세포주에 pcDNA4/TO-RFP-HERG 유전자를 도입하여 blastocidin과 zeocin 2종류의 antibiotics를 배양액에 처리하면서 RFP-HERG 채널을 발현하는 단일세포를 선별하여 구축하였다. HERG 채널 발현세포주는 10% FBS를 포함하는 DMEM 배지에서 배양하였다. 전기생리학적인 실험을 수행하기 위해서는 HERG 채널발현 세포를 poly-L-lysine coated coverslip에 분주한 후 1 μg/ml의 tetracycline을 배양액에 처리하여 RFP-HERG 채널의 발현을 유도하여 24시간 후 실험에 사용하였다. 본 약물들은 모두 HERG 차단 효과가 전혀 없었다(도 4).

[0099] [실시예 6] 쥐 심장세포에서 항진균제가 ROS(O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 생산 및 apoptosis에 미치는 효과

[0100] (1) 분리 배양된 심근세포에 항진균제처리에 의한 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 발생

[0101] 분리 배양된 심근세포에 항진균제의 처리에 의한 세포내의 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 정도의 변화를 관찰 한 바, fluconazole(1 μM) 및 ketoconazole(10 μM)을 심근세포에 1시간 동안 처리는 비 처리 세포군보다 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 수준이 감소하는 경향을 나타내었으나, 항진균제인 miconazole(30 μM) 및 itraconazole(7 μM)을 심근세포에 1시간 동안 처리하면 비 처리 세포군에 비해 O<sub>2</sub><sup>-</sup> 발생이 크게 증가하였다(도 5).

[0103] (2) 분리 배양된 심근세포에 항균제 처리에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 발생

[0104] 항진균제인 itraconazole(7 μM) 및 miconazole(30 μM)를 분리 배양된 심근세포에 1시간 처리 시, 비처리군에 비해 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 수준이 감소하는 경향을 나타내었다. Fluconazole(2 μM) 및 ketoconazole(10 μM)을 처리에 의해 유도되는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 발생수준이 비처리군에 비해 두드러지게 증가하는 것이 관찰되었다(도 5).

[0106] (3) 심근세포에서의 항진균제 및 항생제 처리에 의한 apoptosis 발생

[0107] 분리 배양된 심근세포에 항진균제(itraconazole 7mM, miconazole 30mM, fluconazole 2mM, ketoconazole 10mM)의 처리에 의해 apoptosis가 발생되는지에 대해 검토하였다. 그 결과 항진균제인 miconazole만이 24시간 심근세포 처리에 의해 apoptosis가 발생하는 것이 관찰되었다(도 6).

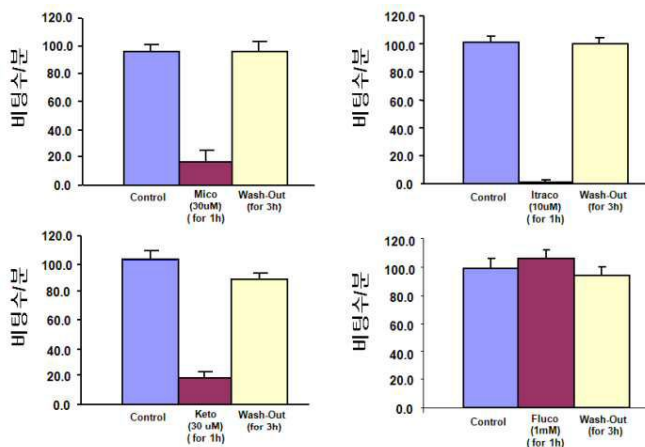
[0109] [실시예 7] 각 심장기능 파라미터의 심장독성 관여도에 따른 계산식

[0111] 상기의 결과를 토대로 도 7의 수학적식으로 계산하여 각 항생제의 독성을 평가한 결과, 도 7의 결과와 같이 miconazole, ketoconazole, Itraconazole은 심장 세포의 독성이 있는 반면에 fluconazole은 심장 세포에 독성이 없는 것으로 확인되었다.

[0113] 이상으로 본 발명 내용의 특정부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 것은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

**도면**

**도면1**



도면2

약 물	LC20
fluconazole	90.00 $\mu$ M
itraconazole	0.78 $\mu$ M
Ketoconazol	1.23 $\mu$ M
miconazole	10.40 $\mu$ M

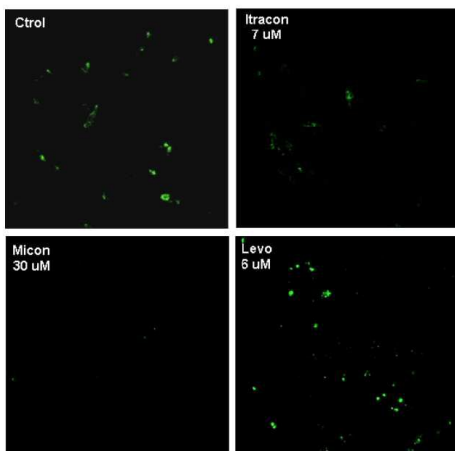
도면3

약 물	HERG IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M)	K(in) =Kir2.1	K(out) =KV1.X	Ca
fluconazole	730 $\mu$ M	x	x	x
itraconazole	20 $\mu$ M	x	x	x
Ketoconazol	1.7-49 $\mu$ M(r)	1.23 $\mu$ M	3.11 $\mu$ M	1.08 $\mu$ M
miconazole	2.2 $\mu$ M(r)	10.4 $\mu$ M	2.45 $\mu$ M	2.12 $\mu$ M

도면4

약 물	농도	current %(mean $\pm$ SE)
itraconazole	10 $\mu$ M	104.5 $\pm$ 2.2
	50 $\mu$ M	97.1 $\pm$ 2.9
fluconazole	200 $\mu$ M	100.3 $\pm$ 4.0
	1000 $\mu$ M	93.7 $\pm$ 0.9
acetate	500 $\mu$ M	88.4 $\pm$ 3.1
DMSO	0.5%	99.7 $\pm$ 6.3

도면5



도면6

	itraconazole	miconazole	fluconazole	ketoconazole
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	↓	↓	↑	↑
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	↑	↑	↓	↓
apoptosis	-	↑	-	-

도면7

$$T = [(a \times 0.75) + (b \times 0.25) + (c \times 0.5) + (d \times 0.75) + (e \times 2.0) + (f \times 0.75) + (g \times 0.5) + (h \times 2.0) + (i \times 2.0)] / 9$$

\*본 항에서 T값은 약물의 독성 정도를 나타내는 지표를 의미하는 것으로 T값 0.5이상이면 독성이 있는 것으로 한다.

a = O <sub>2</sub> <sup>-</sup> all or none <sup>(1)</sup>	f = Ca IC50 10μM <sup>(2)</sup>
b = H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> all or none <sup>(1)</sup>	g = apoptosis all or none <sup>(1)</sup>
c = Kin IC50 10μM <sup>(2)</sup>	h = beating all or none <sup>(1)</sup>
d = Kout IC50 10μM <sup>(2)</sup>	i = 독성 all or none <sup>(2)</sup>
e = HERG IC50 20μM <sup>(2)</sup>	

<sup>(1)</sup> 증가(억제) 효과가 없을 경우 0점, 있을 경우 각 지수값(0.25 ~ 2.0점)  
<sup>(2)</sup> IC50이 10μM 이상인 경우 0점, 이하인 경우 각 지수값(0.5, 0.75, 2점)  
<sup>(3)</sup> IC50이 20μM 이상인 경우 0점, 이하인 경우 2점

약물명	지수값	miconazole		fluconazole		ketoconazole		Itraconazole	
		값	기여도	값	기여도	값	기여도	값	기여도
a. O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	0.75	1	0.75	0	0	0	0	1	0.75
b. H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	0.25	0	0	1	0.25	1	0.25	0	0
c. Kin	0.5	1	0.5	0	0	1	0.5	0	0
d. Kout	0.75	1	0.75	0	0	1	0.75	0	0
e. HERG	2	1	2	0	0	1	2	1	2
f. Ca	0.75	1	0.75	0	0	1	0.75	0	0
g. Apoptosis	0.5	1	0.5	0	0	0	0	0	0
h. Beating	2	1	2	0	0	1	2	1	2
I. Toxicity	2	1	2	0	0	1	2	1	2
T값		1.028		0.028		0.917		0.750	
독성 판정		독성있음		독성없음		독성있음		독성있음	

专利名称(译)	心功能标志物分析评价药物的心脏毒性		
公开(公告)号	<a href="#">KR1020190012717A</a>	公开(公告)日	2019-02-11
申请号	KR1020170096137	申请日	2017-07-28
申请(专利权)人(译)	건국대학교글로벌산학협력단		
[标]发明人	김보경 원경종 배영민 이강파 백수지 정승효 최릉 류윤경		
发明人	김보경 원경종 배영민 이강파 백수지 정승효 최릉 류윤경		
IPC分类号	G01N33/50 A61B5/00		
CPC分类号	G01N33/5014 A61B5/4845 G01N33/5044		
其他公开文献	KR102126608B1		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种准确评估药物对心脏细胞毒性的方法，更具体地说，涉及九种功能标记物 (O<sub>2</sub><sup>-</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Kin, Kout, Ca, HERG, 凋亡, 跳动, 毒性等, 以及基于它们与心脏细胞毒性的关系的配方, 以及基于其与心脏的毒性评价方法及其用途。

