

시스템 약리학 기술을 이용한 통합 생체 심혈관 안전성 예측 모델 구축 연구 오건희^{1,2}, 김기석^{3,4}, 이향애³, 한승훈^{1,2}, 임동석^{1,2}

¹계량약리학연구소, 가톨릭대학교 의과대학, ²가톨릭대학교 서울성모병원 임상약리과, ³한국화학연구원 부설 안전성평가연구소 차세대약평가연구단, ⁴과학기술연합대학원대학교 인체 및 환경독성학과

Integrated *in vivo* cardiac safety evaluation using systemic pharmacology technique

Kunhee Oh^{1,2}, Ki-Suk Kim^{3,4}, Hyang-Ae Lee³, Seunghoon Han^{1,2}, Dong-Seok Yim^{1,2}

¹PIPET (Pharmacometrics Institute for Practical Education and Training), College of Medicine, The Catholic University of Korea, ²Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, The Catholic University of Korea Seoul St. Mary's Hospital, ³R&D center for Advanced Pharmaceuticals & Evaluation, Korea Institute of Toxicology, Korea Research Institute of Chemical Technology, Daejeon,

⁴Department of Human and Environmental Toxicology, University of Science and Technology, Daejeon

ABSTRACT. ICH S7B and E14 guidelines, which were first released in 2005, are focused on hERG blockade and QT prolongation by drugs. However, cumulated evidences on some pitfalls of the guidelines resulted in the initiation of the comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay (CiPA) project. Results of the CiPA are expected to change global regulatory environment on the cardiac safety of drugs. In this study, we reproduced two components of the CiPA to assess the performance of their *in silico* biomarker using *in vitro* ion channel assay data. The process to obtain qNET, a biomarker proposed by CiPA, was fully reproduced through *in vitro* and *in silico* studies in selected three drugs (verapamil, ranolazine, moxifloxacin). Throughout the reproducing research, we obtained many practical experiences not included in publications by the CiPA. For further understanding of this new regulatory paradigm, clinical ECG in human and another *in silico* method are to be performed.

KEY WORDS: CiPA initiative, *in vitro* ion channel assay, *in silico* methods, hERG channel, TdP

Introduction

1980년대 후반과 90년대 초반, 항부정맥제가 아닌 약제들로부터 TdP(Torsades de pointes)이 유발되는 사례들이 발견되어 경각심을 유발하였고, 실제로 몇몇

약들이 QT간격 연장과 TdP 발생 위험과의 관련성 때문에 영국과 유럽의 시장에서 철수되었다(Stockbridge *et al.*, 2013). 이러한 우려에 대응하여, the European Committee for Proprietary Medicinal Product (CPMP)는 약물이 심실 재분극을 지연시키는 경향을 평가하는 비임상 연구를 제안하였고, 이는 여러 종의 동물 조직에서 조기 후 탈분극(early after depolarization, EAD)과 유발되는 활동(변형되거나 방해된 재분극의 형태)에 관련된 활동전위 연장을 평가하는 실험실적(*in vitro*) 연구를 포함하였다. 그 결과, 심실 재분극 지연과 I_{Kr} 채널의 억제와 관련이 있는 여러 가지 비항 부정맥제의 상관관계와, 선천적 긴 QT 증후군(congenital long QT syndrome)과 I_{Kr} 채널의 감소의 상관 관계 등이 밝혀졌으며, 이러한 발견은 기능적인 I_{Kr} 채널에 대한 실험이 2005년 ICH S7B 가이드라인에 포함되는 것으로 귀결되었다(Gintant *et al.*, 2016).

Received: 18 December 2018

Revised: 27 December 2018

Accepted: 27 December 2018

*Corresponding author: Dong-Seok Yim, MD, PhD
Associate Professor

PIPET (Pharmacometrics Institute for Practical Education and Training), College of Medicine, The Catholic University of Korea, Department of Clinical Pharmacology and Therapeutics, The Catholic University of Korea Seoul St. Mary's Hospital, 222, Banpodaero, Seocho-gu, Seoul, Republic of Korea.

Tel: 82-2-2258-7327 Fax: 82-2-536-2485

E-mail: yimds@catholic.ac.kr

1990년대부터 비항부정맥제로 인해 유발되는 QT간격 증가와 잠재적으로 치명적인 약물로 인한 부정맥 (proarrhythmia)에 관한 안전성에 대한 우려로 2005년에 QT간격을 평가하는 ICH E14 임상 가이드라인이 제정되었는데, 이는 전신으로 흡수되는 모든 신약에서 QT간격 연장을 유발할 수 있는 가능성을 가진 경우, 전형적으로 건강한 대상자에서 철저한 QT시험(Thorough QT, TQT)을 수행하게 하는 등의 체계적인 약물 평가를 의무화하였다 (Darpo *et al.*, 2015). 현재 신약개발 단계에서 의약품으로 인하여 발생하는 심장부정맥을 측정하고 예측하는 것에 대한 필요성은 있으나, 현재 수행되고 있는 심혈관계 안전성 약리 시험법은 높은 진입장벽을 만들고 사람에서의 유사성도 높지 않다는 한계를 가지고 있다 (식품의약품안전처, 심혈관계 안전성약리시험 연구동향, 2016). 이러한 진입장벽은 특히 여러 이온 채널에 영향을 미치는 약물에서 두드러지는데, 이미 시판 중인 약물 중 L-type 칼슘 채널 (I_{CaL})을 억제하거나 (verapamil 등)이나 지연성 소듐 채널 ($I_{Na,late}$)까지 억제(ranolazine 등)하여 세포 내로 들어오는 전류를 차단하는 효과를 가져 결국 hERG 채널 (I_{Kr})이 막히는 효과를 상쇄하게 되어 TdP 발생 위험이 증가하지 않는 예시가 알려져 있다 (Johannesen *et al.*, 2014).

그 결과 기존 가이드라인이 가진 이러한 여러 문제점을 해결하기 위해 2013년 미국 FDA의 워크샵에서 Comprehensive *in vitro* Proarrhythmia Assay (CiPA) initiative (이하 CiPA 프로젝트)가 시작되었으며, 미국 FDA와 몇몇 다국적 제약회사 연구진을 중심으로 유럽, 일본 등의 관련 연구진이 참여하여 국제적 연구 프로젝트로 성장하였다. CiPA 프로젝트가 기존의 ICH S7B와 E14 가이드라인과 가장 차별화되는 부분은, 기존의 가이드라인이 약물에 의한 심실 재분극과 hERG 채널 영향에 의한 QTc간격 증가에만 초점을 맞추었다면, CiPA 프로젝트의 연구는 hERG 채널 외에 다양한 전류(Na^+ , Ca^{2+} , K^+)를 반영하는 다수의 이온채널에 의한 포괄적이고, 발생기전-중심의 부정맥 발생 위험을 평가한다는 점이다. CiPA 프로젝트는 이를 구성하는 4가지 연구그룹에서 각각 제시하는 표준화된 시험방법 (표준화된 이온채널 연구 프로토콜과, 공개적으로 발표된 *in silico* model의 코드와 자료들, 정량적이고 표준화된 인간줄기세포 유래 심근세포를 이용한 연구와 표준화된 1상 임상시험 심전도 프로토콜)을 통해, 기존의 ICH S7B와 E14을 대체할 수 있는 새로운 패러다임을 제시하는 것이 그 목적이다.

기존의 ICH S7B와 E14 가이드라인의 대표적인 문

제점으로 특이도(specificity)가 떨어져 실제 심장 독성이 없는 의약품도 허가를 위해 TQT 시험과 같은 광범위한 ECG 연구를 수행하여야 하여 신약개발 비용을 크게 증가시켰으며, 의약품 사용설명서에 주의 사항을 삽입하여 의약품의 가치 하락의 가능성이 높아지는 점을 꼽을 수 있다. 국내 실정 상 국내 제약사 또는 바이오 벤처기업들은 세계적인 기준에서 볼 때 그 규모가 크지 않은 현실에서 부정확한 TdP위험 예측으로 인한 위험도를 감당하기 힘들므로, 선도국가들과 보조를 맞춘 CiPA 개념의 도입은 글로벌 제약사보다도 우리나라의 제약산업 환경에서 더욱 절실하다고 할 수 있다. 또한 CiPA 프로젝트에는 미국, 유럽, 일본 등 선진국의 주요 규제기관, 학술단체, 산학기관 등이 광범위하게 참여하고 있어 현재 학계에서도 큰 관심을 나타내고 있으므로 CiPA 프로젝트의 연구 결과가 기존의 ICH S7B와 E14 가이드라인을 대체하거나 개선하는데 반영될 가능성이 높다고 할 수 있다. 국내에서 이러한 새로운 변화와 관련된 연구의 수행 역량이 갖춰지지 않을 경우, 신약의 국외 허가를 위해 전적으로 해외에 의존해야 하는 문제점이 추가적으로 발생할 수 있다.

본 연구의 목적은 CiPA 프로젝트의 4가지 연구 그룹 중 *in vitro* ion channel assay와 *in silico* model 연구를 재현 및 검증하여 그 학술적 타당성을 고찰하고, 국내에서의 수행 역량을 배양하여 CiPA 프로젝트의 결과로 인한 변화된 가이드라인의 국내 도입의 발판을 마련하기 위해 수행되었다.

Materials and Methods

1. 시험약물 선정

CiPA 프로젝트의 *in vitro* ion channel group에서 선정한 30가지의 평가 약물 중 (Crumb WJ Jr. *et al.*, 2016) 연구진 간 협의를 통해 임상시험이 이미 수행된바 있는 Ca^{2+} 채널 (Cav1.2) 억제제인 verapamil, Na^+ 채널 (Nav1.5) 억제제인 ranolazine을 선정하였고 hERG 채널 (Human ether-a-go-go-related gene, Kv11.1) 억제제로 알려진 moxifloxacin을 양성대조군으로 선정하여, 심장 활동전위에 관련된 주된 이온채널 hERG, Nav1.5 fast 및 late, Cav1.2에 대한 영향 평가를 계획하였다.

시험 약물인 verapamil, ranolazine 및 moxifloxacin은 Sigma-Aldrich Co. (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 이들 약물을 dimethyl

sulfoxide (DMSO)에 용해시켜 stock solution을 만들었다. 이 stock은 소분하여 사용 시까지 냉동 보관하였으며, 실험 당일에 녹여 bath solution에 추가로 희석하여 적절한 약물 농도를 갖는 최종 관류 용액 (final perfusion solutions)을 만들었다. 최종 관류 용액 내 DMSO 농도는 0.1%로 맞추었다. 시험 약물은 이전 참고문헌(Crumb WJ Jr. *et al.*, 2016)에 따른 최고 단백 비결합 혈중농도(free C_{max})에 기초한 4 가지 상이한 농도에서 시험하였다

2. 이온채널 발현 세포주

전압 개폐(Voltage-gated) fast sodium current (I_{Na}), the late sodium current ($I_{Na,late}$), L-type calcium channel current (I_{Ca})과 the rapid component of the outward rectifier potassium current (I_{Kr} , I_{hERG})에 대한 verapamil, ranolazine 및 moxifloxacin의 영향은 ChanTest (Cleveland, USA) 사(社)의 Nav1.5-CHO 세포 (hNav1.5 채널 발현), Cav1.2-CHO 세포 (hCav1.2 / $\beta 2 / \alpha 2\delta$ 채널 발현) 및 B'SYS GmbH(Witterswil, Switzerland) 사(社)의 hERG-CHO 세포(인간 Nav1.5, Cav1.2 및 Kv11.1 채널을 각각 코딩하는 인간 SCN5A, CACNA1C 및 KCNH2 유전자가 이중성으로 발현된 세포)들을 활용하여 평가하였다.

Nav1.5와 hERG채널 유전자는 CHO 세포막에 지속적으로 발현이 되어 있는 반면, Cav1.2 채널의 경우 지속적으로 발현하게 되면 세포에 독성을 나타내므로, 필요 시 1~2일 전에 발현을 유도하여 사용하였다. 시험 전 세포주 3가지에 대해서 세포의 형태, 염색체 수 검사, 배가시간(doubling time), 마이코플라즈마 (*Mycoplasma*) 오염여부, 이온채널 활성 확인을 통해 품질평가 후 실험에 활용하였다.

3. 이온채널 활성 분석 및 약물에 의한 억제 평가 실험

I_{Na} , $I_{Na,late}$, I_{Ca} , I_{hERG} 채널의 활성을 기록하기 위해 patch clamp 시험법을 이용하여, 각 이온채널이 활성화 될 수 있는 전압 프로토콜(voltage protocol)을 주입한 후, 전압 자극에 의해 유도된 전류를 측정하였다. Late Nav1.5 전류의 경우, 50 μ M의 veratridine을 처리하여 Nav1.5의 내향성 fast peak 전류 후 느려지며 활성화되는 전류를 분석하였다.

I_{Na} 와 $I_{Na,late}$ 를 측정하기위한 external solution은

NaCl 50, CsCl 110, HEPES 10, MgCl₂ 1, glucose 5 및 CaCl₂ 1.8(in mM)을 함유하고 CsOH로 pH 7.4로 조정되었다. I_{Ca} 및 I_{hERG} 를 측정하기 위한 외부 용액은 NaCl 145, KCl 5.4, HEPES 10, MgCl₂ 1, glucose 5, CaCl₂ 1.8 (in mM)을 함유하고 NaOH로 pH 7.4로 조정되었다. I_{Na} 및 I_{Ca} 기록을 위한 패치 피펫(patch pipettes)은 CsCl 20, Cs-Asp 120, NaCl 5, TEA-Cl 10, EGTA 10, HEPES 10, Mg-ATP 5 (in mM)를 함유했고, CsOH로 pH 7.2로 조정하였다. 또한, I_{hERG} 기록을 위한 internal solution은 KCl 20, K-Asp 120, NaCl 5, CaCl 2 2, EGTA 5, HEPES 10, Mg-ATP 5 (in mM)를 함유하였고 KOH로 pH 7.4로 조정되었다.

또한, 각 이온채널에 특이적인 억제제를 처리하여 전류가 억제되는 현상을 통해 각 전류의 민감성과 특이성을 확인하고, 4가지 이온채널의 약물 3종에 대한 영향평가를 위해 hERG채널에 대한 약물결합 parameter를 분석하였다. 이를 위해 디자인된 특정 전압 프로토콜(modified Milnes'protocol)을 활용하여 0 mV, 10초 동안 주입된 전압에 반응하여 형성된 전류 값들을 control 대비 fraction값으로 분석하였다.

4. 전체 세포 전압 클램프를 통한 이온채널 전류 기록

세포를 Nikon의 도립 현미경(inverted microscope) 스테이지(stage)의 챔버에 넣고 37°C bath solution으로 연속적으로 관류시켰다 (3 mL / min). 이온 전류는 패치 클램프 기법(patch clamp technique)을 사용하여 전체 세포 구성(whole-cell configuration)으로 기록되었다. I_{Na} , $I_{Na,late}$, I_{Ca} 과 I_{hERG} 를 생성하기 위해 사용된 전압 프로토콜(voltage protocols)은 Figure 1 과 Figure 2 내에 도식화 하였다. 시험 약물 용액을 약 3-5 분 동안 관류하여 I_{Na} , $I_{Na,late}$ 와 I_{Ca} 에서 전류가 억제된 후 안정화될 때 까지 기록하였다. I_{hERG} 전류에 대한 약물의 영향을 평가하기 위해, 안정된 hERG 전류를 확보한 후, 각 세포는 한 가지 농도의 약물만 처리하였다. 기존 논문의 변형된 Milnes 프로토콜을 사용하여 약물 결합 파라미터(drug-binding parameters) 및 약물에 의해 유도된 I_{hERG} 억제를 측정했다 (Li *et al.*, 2017). 전압 클램프(Voltage-clamp) 프로토콜 생성 및 데이터 수집은 A/D 변환기 및 Digidata1440 및 pClamp 소프트웨어 버전 10.2 (Molecular Devices, USA)가 장착 된 컴퓨터로 수행되었다. 패치 피펫(patch pipettes)은 피펫 플러

(pipette puller) PP-830 (Narishige, Japan)을 사용하여 유리 모세관 (Clark Electromedical Instruments, UK)으로 만들었다. 패치 피펫의 저항은 피펫 용액 (pipette solution)으로 채웠을 때 3-5 M Ω 되었다. 전류 신호는 5-10 kHz의 샘플링 속도로 필터링 되었다.

5. 데이터 통계처리

Clamfit (Molecular Devices, USA), GraphPad Prism version 5 (GraphPad Software Inc., USA) 및 Excel (Microsoft, USA)을 활용하여 데이터를 분석하였다. 데이터는 평균 \pm 표준오차(Standard Error of the Mean, S.E.M.)로 나타내었고, n은 실험의 반복 횟수를 나타낸다.

6. *In silico* code 확보 및 시뮬레이션 수행

ORd(O'Hara-Rudy dynamic) 모델은 건강한 사람의 심실 심근세포의 세포단위의 전기생물학적인 작용기전을 설명하기 위해 개발된 모델로, 심실 심근세포에 발현된 각 주요 이온채널 별(I_{Na} , $I_{Na,late}$, I_{to} , I_{CaL} , I_{Kr} , I_{Ks} , I_{K1} , I_{NaCa} , I_{NaK}) 전위의 합으로 전체 전위의 합으로 구성되는 활동전위(Action potential)를 시뮬레이션하여, 특정 약에 의해 각 채널이 억제되었을 때 심실의 활동 전위를 예측한다 (O'Hara *et al.*, 2011). CiPA 프로젝트에서 사용하는 I_{Kr} -dynamic ORd 모델은 기존의 ORd 모델에 Markov모델로 설명되는 hERG 채널(I_{Kr})과 약물이 상호작용에 의해 약물이 trapping되는 현상을 반영한 모델이다(Li *et al.*, 2017). 이러한 수학적 모델로 예측된 활동전위를 통해 TdP 발생 위험을 정량적으로 평가하는 통상적인 척도로는 활동전위의 길이로 평가하는 APD90 등 있지만 이는 TdP 발생 위험을 정확히 예측해주지 못하는 실정이다. 이러한 기존의 활동전위 기반 척도의 낮은 예측성을 보완하여 최근 새롭게 제안된 개념으로 qNET으로 대변되는 Torsade Metric Score가 있다. qNET은 활동전위 동안 발생하는 유출되는 K^+ 전위와 유입되는 Ca^{2+} 과 지연성 Na^+ 전위의 합으로 계산되는 net current의 곡선 하 면적을 계산하는 척도로서 이를 통해서 CiPA에서 선정한 12개 training 약물을 분류하였을 때 각 약물의 예상되는 TdP 발생 위험 카테고리(High, Intermediate, Low) 별로 잘 분류되는 것을 확인하였고 여기서 산출된 기준값 (Threshold)으로 16개의 CiPA 선정 validation 약물을 분류하였을 때도 각 약물의 예상되는 TdP 발생 위험 카테고리 (High,

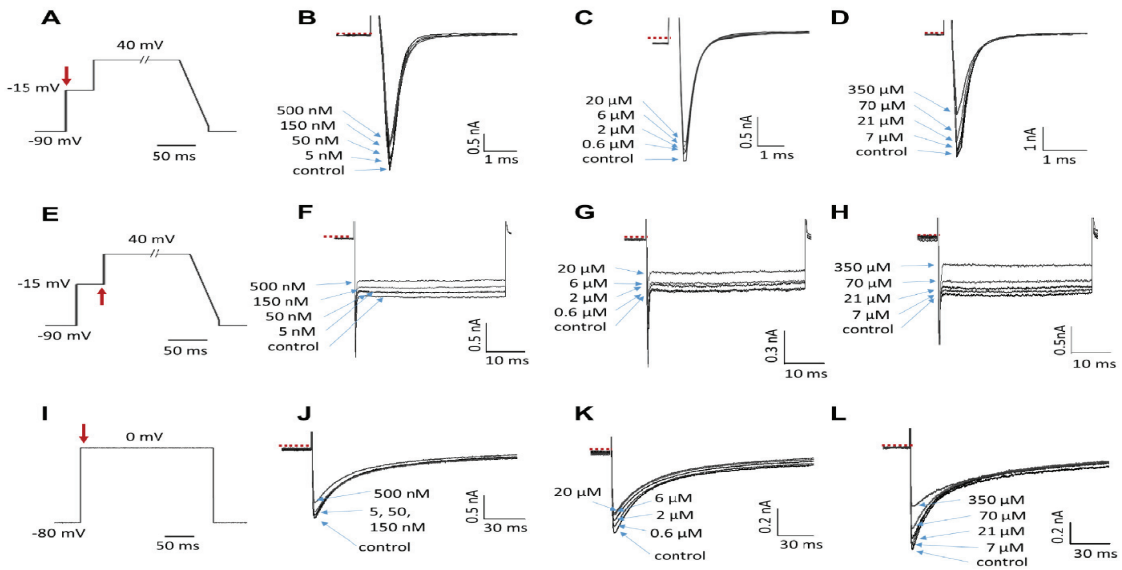
Intermediate, Low) 별로 잘 분류되는 것을 확인하였다 (Dutta *et al.*, 2017).

본 연구에서는 CiPA 프로젝트에서 선정한 28개 약물 군에서 verapamil을 선정하여 *in silico* 방법을 적용하여 구현하였다. CiPA 프로젝트의 Resources page (<https://github.com/FDA/CiPA>)로부터 공개된 *in silico* 방법의 적용을 위한 코드 (hERG fitting, AP simulation)를 확보하고 해석하였다. 확보한 code의 실제 실행 시간을 측정하여 활용 방안을 모색하였고, 최적의 실행 환경 등을 찾기 위해 여러 가지 컴퓨터 시스템(국가수리과학연구소, NIMS의 Jupyter Hub 등)을 이용해 평가하였다.

Results

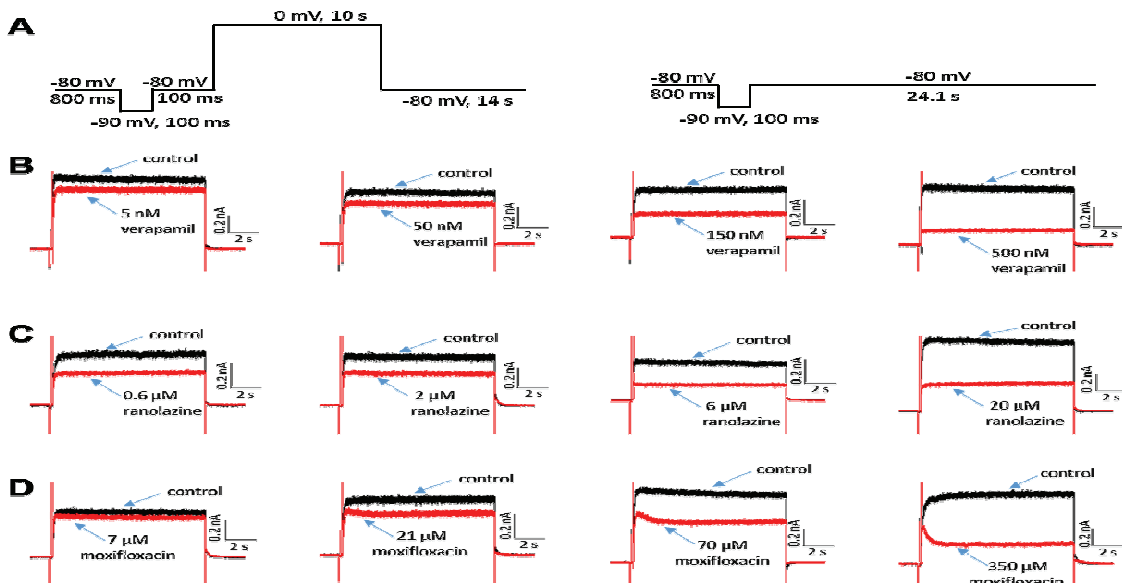
1. 선정된 약물에 대한 이온채널 영향평가

verapamil, ranolazine 및 moxifloxacin이 심장 이온 채널 전류에 미치는 영향을 알아보기 위해 CHO 세포에서 발현된 I_{Na} , $I_{Na,late}$, I_{Ca} 및 I_{hERG} 를 전체 세포 패치 클램프 기법(whole-cell patch clamp technique)을 사용하여 분석하였다 (Figure 1 및 Figure 2). verapamil, ranolazine 및 moxifloxacin의 C_{max} 는 각각 45 nM, 1.95 μ M, 3.56 μ M으로 알려져 있다 (Crumb WJ Jr. *et al.*, 2016). verapamil은 5, 50, 150 및 500 nM의 농도에서 I_{Na} 진폭을 각각 -2.0, 4.1, 13.7, 21.6 % 감소시켰고 (n = 4, Figure 1B 및 Figure 3A), $I_{Na,late}$ 진폭은 각각 -0.7, 5.9, 13.4, 18.7 % 감소되었다 (n = 3, Figure 1F 및 Figure 3A). 또한 verapamil에 의해 I_{Ca} 진폭은 각각 4.9, 10.8, 18.4, 35.4 %로 용량 의존적으로 억제되었고 (n = 3, Figure 1J 및 Figure 3A), I_{hERG} 진폭은 각각 8.2, 28.8, 41.1, 74.4 % 감소되었다 (n = 3, Figure 2B 및 Figure 3A). ranolazine은 0.6, 2, 6, 20 μ M의 농도에서 I_{Na} 진폭을 각각 4.1, -0.4, 8.1, 16.2 % (n = 3; Figure 1C 및 Figure 3B) 억제시켰고 및 $I_{Na,late}$ 진폭은 각각 3.8, 9.6, 24.5, 31.6 % 억제되었다 (n = 3, Figure 1G 및 Figure 3B). 또한 ranolazine에 의해 I_{Ca} 는 용량 의존적으로 각각 10.8, 18.1, 20.5, 24.4 % 감소되었고 (n = 3, Figure 1K 및 Figure 3B), I_{hERG} 는 각각 31.6, 40.3, 50.3, 74.6 % 억제되었다 (n = 3, Figure 2C 및 Figure 3B). moxifloxacin은 7, 21, 70, 350 μ M의 농도에서 I_{Na} 진폭을 -0.04, 1.5, 11.8, 35.6 % (n = 3, Figure 1D 및 Figure 3C)로 억제시켰고, $I_{Na,late}$ 진폭은 각각



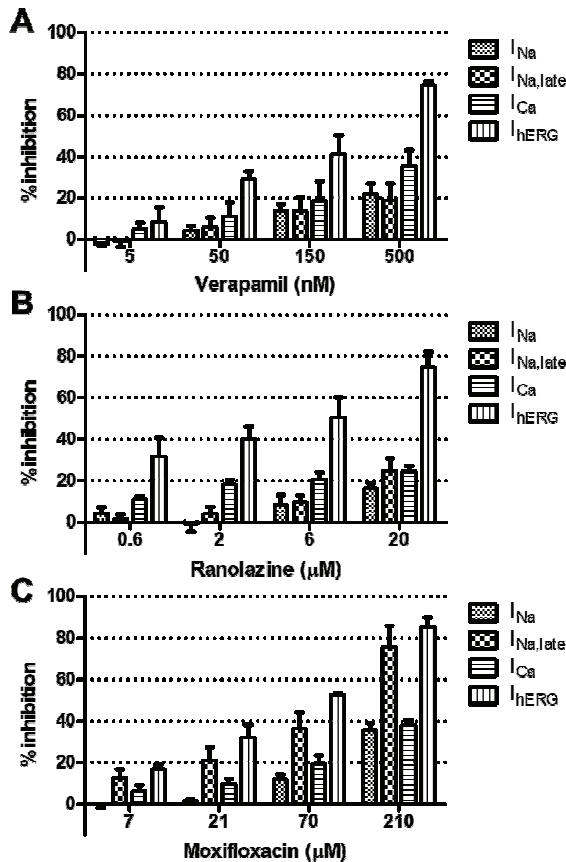
The voltage protocol used to elicit I_{Na} . (A), Peak inward current at beginning of the step to -15 mV was measured (red arrow). (B), Representative traces for the dose-dependent effects of verapamil (B), ranolazine (C), and moxifloxacin (D), on I_{Na} . (E), The voltage protocol used to elicit $I_{Na,late}$. Currents were measured at the end of the step to -15 mV (red arrow). The $I_{Na,late}$ were induced by the application of 50 μ M veratridine to the bath solution. Representative traces for the dose-dependent effects of verapamil (F), ranolazine (G), and moxifloxacin (H), on $I_{Na,late}$. (I), The voltage protocol used to elicit I_{Ca} . Peak inward current at beginning of the step to 0 mV was measured (red arrow). Representative traces for the dose-dependent effects of verapamil (J), ranolazine (K), and moxifloxacin (L), on I_{Ca} .

Figure 1. Effects of verapamil, ranolazine and moxifloxacin on I_{Na} , $I_{Na,late}$, and I_{Ca} .



(A), The voltage protocol used to study drug-binding parameters and drug-induced inhibition of I_{HERG} . Left, The voltage steps of one episode; 10 such episodes are applied consecutively for control (before drug wash-in) and drug-treated (after drug wash-in) conditions, respectively. Right, The no-pulse protocol applied during drug wash-in. (B), Representative current traces obtained before (control) and after application of 5, 50, 150 or 500 nM verapamil, respectively. (C), Representative current traces obtained before (control) and after applying 0.6, 2, 6 or 20 μ M ranolazine, respectively. (D) Representative current traces obtained before (control) and after treatment of 7, 21, 70 or 350 μ M moxifloxacin, respectively.

Figure 2. Effects of verapamil, ranolazine and moxifloxacin on I_{HERG} .



Bar graphs demonstrate the average inhibition rates of I_{Na} , $I_{Na,late}$, I_{Ca} , and I_{hERG} recorded with various concentration of verapamil (A), ranolazine (B), and moxifloxacin (C), Each $n = 3 \sim 4$.

Figure 3. Effects of verapamil, ranolazine and moxifloxacin on cardiac ionic currents, I_{Na} , $I_{Na,late}$, I_{Ca} , and I_{hERG} .

12.6, 20.9, 36.2, 75.4 % 억제되었다 ($n = 3$, Figure 1H 및 Figure 3C). moxifloxacin에 의해 I_{Ca} 는 각각 5.9, 9.5, 19.1, 37.7 % 감소하였고 ($n = 3$, Figure 1L 및 Figure 3C), I_{hERG} 도 각각 16.5, 31.8, 52.4, 85.2 % 감소하였다 ($n = 3$, Figure 2C 및 Figure 3B).

$hERG$ 채널의 경우, 다른 채널들과 달리 modified Milnes' protocol을 활용하여 0 mV, 10초 동안 유지된 전압에 반응하여 형성된 전류 값들을 control 대비 분율(fraction) 값을 구하여 *in silico* 분석에 이용하였다.

2. *In silico* translation

Ion channel assay 결과를 *in silico* 방법에 적용하기 위해 action potential (AP) simulation을 위한 파라미터를 확보하였다. $hERG$ channel에 대하여 단순한 IC_{50} 를 구하지 않고, CiPA 프로젝트의 방식대로 약물의 trapping 현상을 반영하기 위한 모델 (Li *et al.*, 2017)을 사용하였으며 그 모델 파라미터들의 분포가 Figure 4에 나타나 있다. verapamil의 경우 얻어진 분율 값이 시간에 따라 증가하는 세포와 감소하는 세포들이 있어서 trapping 모델의 파라미터인 Ku 나 V_{half} 값의 분포 역시 dichotomous 하게 갈라져 분포하는 결과를 나타낸 것으로 보인다.

이를 반영하여 다른 채널 세가지의 IC_{50} 과 Hill coefficient 값을 각기 구한 후 $hERG$ 채널의 파라미터들을 반영하여, O'Hara-Rudy (O-R) model을 수

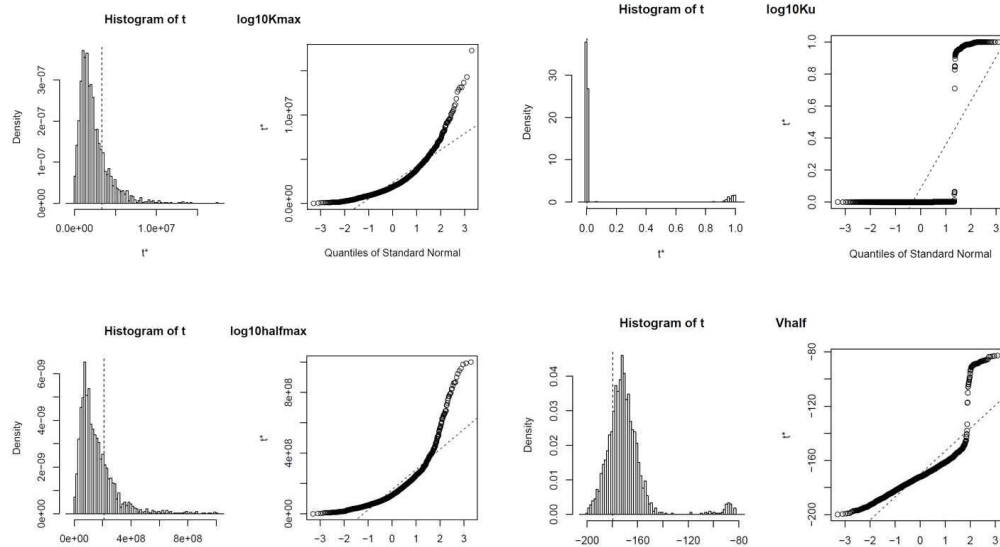
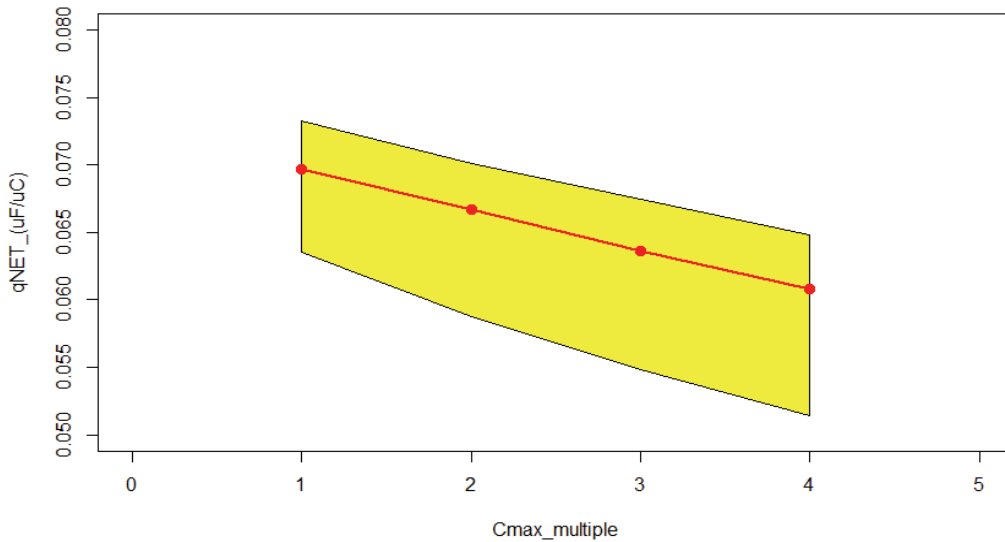


Figure 4. Results of *in silico* model simulation for $hERG$ trapping: distribution of parameter estimates



Line graph demonstrates qNET (Net amount of electronic charges carried by I_{net}, which is sum of select inward and outward) at various concentrations (C_{max} x1 to x4) of verapamil. Upper and lower limits of 95% confidence interval of qNet are represented as margins of the yellow polygon.

Figure 5. The qNET with one to four times of C_{max} of Verapamil

정한 I_{Kr} -dynamic O-R model로 AP를 시뮬레이션하였다. 이 시뮬레이션 된 AP에 대하여 CiPA 프로젝트에서 새로운 biomarker라 주장하는 qNET을 최고 단백 비결합 혈중농도(free C_{max})의 1배~4배까지의 범위에서 구하였다. (Figure 5) 이 때 얻어진 qNET의 분포는 CiPA 연구진에 의해 보고된 분포와 유사한 범위에 존재하였다.

Discussion

CiPA 프로젝트의 연구자들은 기존에 흔히 사용된 활동전위 기반의 척도들은 TdP 위험도의 지표로서 좋지 못한 것을 주장하며 새로운 척도로 qNET을 개발하였는데, qNET이 다른 척도보다 CiPA 프로젝트에서 제시한 시험약물(hERG 채널 억제 약물)을 저위험, 중등도 위험, 고위험군의 위험도별로 가장 우수하게 분류하는 것으로 나타났다 (Dutta *et al.*, 2017). 본 시험의 연구진은 각 농도마다 Bootstrap 시뮬레이션 2000회를 수행한 샘플에서 verapamil의 최고 단백 비결합 혈중농도의 1배에서 4배까지 증가함에 따라 qNET이 감소하는 양상을 CiPA 프로젝트의 연구진이 논문에서 밝힌 바와 같이 재현하였다.

각 약물의 농도마다 Bootstrap 시뮬레이션 2000회를 수행하여야 하므로, 일반 전산 환경에서는 수 개월 가량이 소요되는 한계가 있다. 이에 본 연구진은 필요

한 시뮬레이션 수행에 국가수리과학연구소 (NIMS)의 Jupyter hub의 슈퍼컴퓨터 이용하여 연구 기간을 단축하였다. 이후 동일한 *in silico* 프로토콜 수행 시 슈퍼컴퓨터 급의 전산환경 시스템을 구비 하거나 부득이한 경우 일반 전산 환경 환경에서도 단기간에 처리 가능한 수준으로 시뮬레이션 횟수를 낮춰야 할 것으로 보인다.

유도 만능 줄기세포 유래 심근세포 (iPSC-CM)를 이용하여 각 이온채널을 억제하는 약물의 농도에 따라 그 억제 효과를 APD90c, FDC90c 등의 척도로 평가하고 VSD(voltage-sensitive dye), MEA (Microelectrode arrays)의 방법을 통해 실제 부정맥이 발생하는지 여부를 통합적으로 평가할 수 있다. 다만 사용하는 iPSC-CM의 세포주 종류와 그에 따른 실제 성인 심근 세포와의 이온채널 발현 빈도 차이, 건강한 성인에서 얻은 세포주의 경우 실제 심혈관계 질환을 가진 환자의 상태를 반영하지 못하는 점 등의 한계가 존재하므로 결과 해석 시 유의해야 할 것이다 (Blinova *et al.*, 2017).

본 연구진은 CiPA 프로젝트에서 진행하고 있지 않는 대체적인 연구 방법으로 국내 연구진이 개발한 3D 심장 모델 이용한 *in silico* human ECG 예측연구를 진행 중이며, 이 원고에 소개된 3개 약물을 대상으로 건강인에서의 심전도 바이오마커(biomarker)를 측정하는 후속 연구를 계획 중이다.

Conclusion

본 연구는 2018년 5월부터 식약처 용역연구과제로 처음 시작되어 이후 약 6개월의 연구 기간 동안 수행한 결과, CiPA 프로젝트에서 제시한 *in vitro* ion channel assay와 *in silico* methods의 프로토콜은 국내에서도 충분히 재현하여 수행가능한 방법임이 밝혀졌으나 국내 실정에 맞는 표준화 작업이 추가적으로 필요할 것으로 보인다. 또한 국내 연구진들에게는 CiPA 프로젝트의 표준화된 시험방법을 통해 동일한 시험 결과 자체를 얻는 능력 또한 요구되지만, 한 걸음 더 나아가 실제로 수행한 시험 결과와 CiPA 프로젝트에서 제시된 결과가 다르게 도출된 경우, 그 차이점을 해석하는 능력을 배양하는 것이 더욱 중요하다고 할 수 있겠다.

Acknowledgements

본 연구는 2018년도 식품의약품안전처의 연구개발비 (18182임상평406)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

식품의약품안전처. (2016). 심혈관계 안전성약리시험 연구 동향

Blinova K, Stohman J, Vicente J, Chan D, Johannesen L, Hortigon-Vinagre MP, Zamora V, Smith G, Crumb WJ, Pang L, Lyn-Cook B, Ross J, Brock M, Chvatal S, Millard D, Galeotti L, Stockbridge N, Strauss DG. (2017). Comprehensive Translational Assessment of Human-Induced Pluripotent Stem Cell Derived Cardiomyocytes for Evaluating Drug-Induced Arrhythmias. *Toxicological Sciences*, 155(1): 234-247.

Crumb, W.J. Jr, Vicente, J., Johannesen, L., Strauss, D.G.

(2016) An evaluation of 30 clinical drugs against the comprehensive *in vitro* proarrhythmia assay (CiPA) proposed ion channel panel, 81:251-62.

Darpo B, Benson C, Dota C, Ferber G, Garnett C, Green CL, Jarugula V, Johannesen L, Keims J, Krudys K, Liu J, Ortemann-Renon C, Riley S, Sarapa N, Smith B, Stoltz RR, Zhou M, and Stockbridge N. (2015). Results from the IQ-CSRC prospective study support replacement of the thorough QT study by QT assessment in the early clinical phase. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 97(4):326-35.

Dutta S, Chang KC, Beattie KA, Sheng J, Tran PN, Wu WW, Wu M, Strauss DG, Colatsky T and Li Z. (2017). Optimization of an *In silico* Cardiac Cell Model for Proarrhythmia Risk Assessment. *Frontiers in Physiology*, 8:616.

Gintant G, Sager PT, Stockbridge N. (2016). Evolution of strategies to improve preclinical cardiac safety testing. *Nature Reviews Drug Discovery*, 15(7):457-71.

Li Z, Dutta S, Sheng J, Tran PN, Wu W, Chang K, Mdluli T, Strauss DG, and Colatsky T. (2017). Improving the *in silico* assessment of proarrhythmia risk by combining hERG (human ether-à-go-go-related gene) channel-drug binding kinetics and multichannel pharmacology. *Circulation: Arrhythmia and Electrophysiology*, 10(2):e004628.

Johannesen L, Vicente J, Mason JW, Sanabria C, Waite-Labott K, Hong M, Guo P, Lin J, Sørensen JS, Galeotti L, Florian J, Ugander M, Stockbridge N, Strauss DG. (2014). Differentiating drug-induced multichannel block on the electrocardiogram: randomized study of dofetilide, quinidine, ranolazine, and verapamil. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 96(5):549-58.

O'Hara, T., Virág, L., Varró, A., and Rudy, Y. (2011). Simulation of the undiseased human cardiac ventricular action potential: model formulation and experimental validation. *Public Library of Science; International Society for Computational Biology*, 7(5):e1002061

Stockbridge, N., Morganroth, J., Shah, R. R. & Garnett, C. (2013). Dealing with global safety issues: was the response to QT liability of non-cardiac drugs well coordinated? *Drug Safety*, 36: 167-182.