건강기능식품 개발을 위한 독성평가시스템: 신약개발의 예시

Toxicity Testing Methods for the Development of Health Functional Food: Lesson from the Drug Development

김상겸[1] · 최한석[2] · 이병훈*

Sang-Kyum Kim[1] · Han-Suk Choe[2] · Byung-Hoon Lee*

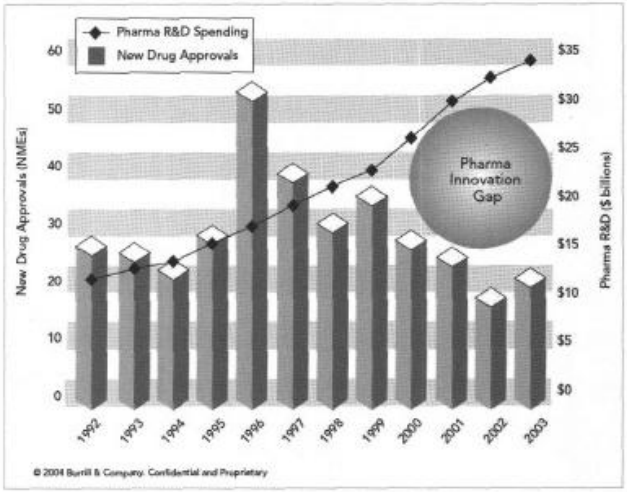
[1]충남대학교 약학대학 · [2]울산대학교 의과대학 · 서울대학교 약학대학

[1]College of Pharmacy, Chungnam National University · [2]College of Medicine, University of Ulsan · College of Pharmacy, Seoul National University

서론

1. Innovation Gap

신약개발은 진정한 지식기반-고부가가치 산업(품목당 평균 이익률 20-35%이상)이나 기술, 자본 등의 문제로 세계적으로 10위 이내의 기술선진국만이 가능하며 진정한 의미의 세계적 신약개발은 우리 제약기업의 숙제이다. 세계 신약시장의 규모는 2004년 현재 약 4960억불이며[1] 향후 7-10%이상 성장이 예상된다[2]. Tufts Center for the Study of Drug Development에서는 하나의 신약을 시장에 내놓기 위해서는 8억-17억불의 비용과 12-15년의 기간이 소요될 것이라 분석하고 있다[3]. 지난 10여 년간 신약개발 기반기술은 눈부신 발전을 하였고, 미국 제약기업의 R&D 투자액은 250% 증가하였으며, NIH의 생의학 연구예산은 130억불에서 270억불로 2배 이상 증가하였으나 FDA 허가를 받는 신약의 개수는 절반이하로 감소하였다 (그림 1)[4]. 이와 같은 innovation gap의 원인으로 허가기관의 기준강화와 이에 따른 전체적인 개발기간의 연장 등이 거론되고 있다.



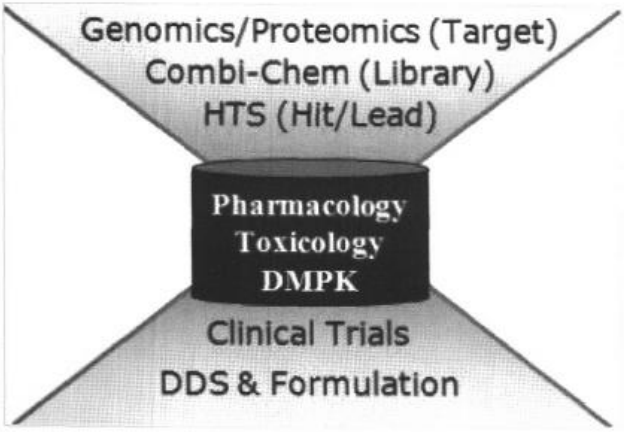
<그림 1> Innovation Gap

2. Bottle Neck

최근 생물, 화학분야 신기술의 발달로 신약개발 초기단계의 속도는 매우 빨라지고 있다. 즉, genomics, proteomics, informatics 등의 신기술을 통해 신약타겟 발굴 및 검증과정이 빨라졌고, combinatorial

* Corresponding Author: Byung-Hoon Lee
College of Pharmacy, Seoul National University
Gwanak-ro 1, Gwanak-gu, Seoul 151-742, Korea
Tel: +82-2-880-7843, E-mail: lee@snu.ac.kr

chemistry, focused library 구축기술 등을 통해 검색할 물질이 양적으로 크게 팽창했으며, high throughput screening 기술 등을 통해 초기 hit 검색속도는 매우 빨라졌다. 하지만 약리, 독성, DMPK특성의 검색은 아직도 대부분 고비용/저효율의 동물실험에 의존하고 있어 전체 신약개발과정의 병목현상을 초래하고 있고, 궁극적으로 신약개발의 innovation gap의 현상을 유발하고 있다 (그림 2). 이를 해소하고 저비용/고효율의 신약개발 구도를 구축하기 위해서는 약리, 독성, DMPK특성을 신속하고 정확하게 예측할 수 있는 in vitro 스크리닝 시스템의 구축이 요구되고 있다.



<그림 2> 신약개발 기술적 병목

3. 합리적 신약개발 스크리닝 시스템 구축 기술개발의 필요성

생물, 화학, 분자생물학 등 신약개발 요소기술의 획기적인 발전에도 불구하고 2003년 FDA 승인 신약의 수는 21개로 1994년 이후 최저수준이다5. 제약사의 신약 성공률이 낮아지는 것에는 여러 이유가 있지만 접근방법의 비효율성이 큰 문제로 제기고 있다. 실패(attrition)의 이유는 1991년 PK (39%), 효능(30%), 독성(21%: 비임상 11%; 임상 10%) 순이었으나 2000년에는 PK가 10%이하로 감소하고 독성이 33% (비임상 20%; 임상 13%)로 증가하는 등 환경의 변화를 보이고 있다 (그림 3). 최근 PK에 기인한 실패가 1/4로 감소한 이유로 전문가들은 Caco-2 screening 등을 포함한 간단한 in vitro 흡수특성 검색시험의 도입을 들고 있다. 이와 같은 사실은 약리, 독성, DMPK 등 신약개발의 모든 분야에 합리적 스크리닝 시스템의 도입을 통해 실패율을 획기적으로 낮출 수 있음을 시사하고 있다.

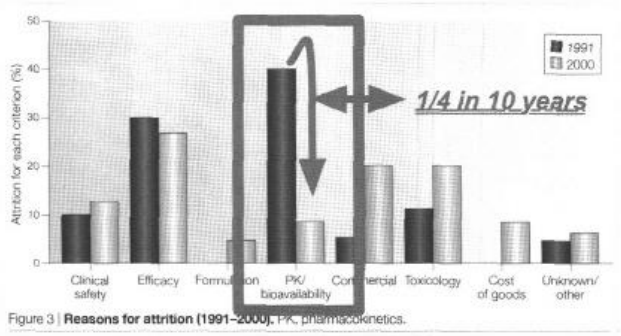
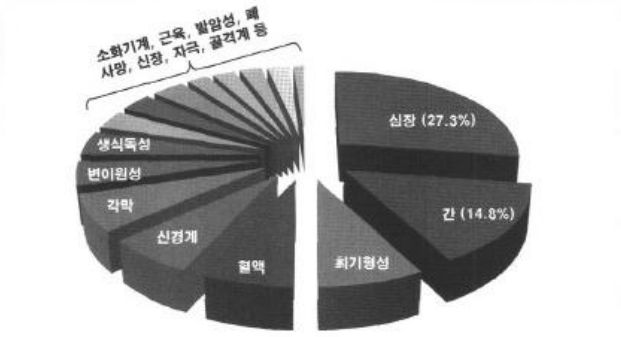


Figure 3 | **Reasons for attrition (1991–2000).** PK, pharmacokinetics.

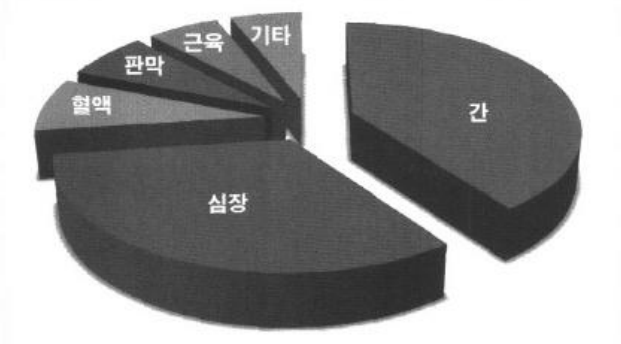
<그림 3> 신약개발 실패원인 (1991-2000)

본론

1. 독성 스크리닝 시스템 구축 기술개발의 필요성



<그림 4> BMS의 NCE 등록후 실패한 원인의 장기별 분석



<그림 5> '90이후 시장퇴출 약물의 원인

신약개발에서 독성에 기인한 실패요인이 매우 높으며 이 중 대부분은 간 및 심장독성이 차지하고 있다. 2000년 현재 신약개발에서 독성으로 인한 실패율은 비임상독성 약 20%, 임상안전성 약 13%로 매우 높다 (그림 3). NCE (New Chemical Entity) 등록 후 퇴출된 신약후보물질의 독성기전과 표적장기는 불분명하나 BMS의 1993-2006년 자료에서 비임상단계의 표적장기는 심장과 간을 합하여 약 42%로 가장 높다 (그림 4; 표 1). 또한 1990년 이후 시장퇴출 약품을 원인별로 분석해보면 13종(40%)은 간독성, 11종(33%)은 QT interval 증가에 따른 심장독성(부정맥)으로 이들 두 원인이 전체의 73%를 차지하고 있다 (그림 5; 표 2).

표 1. 독성에 의한 실패의 장기별 분석

target organ or tissue	percent
cardiovascular	27.3
liver	14.8
teratogenicity	8.0
hematologic	6.8
CNS & PNS	6.8
retina	6.8
mutagenicity & clastogenicity	4.5
reproductive toxicity	4.5
gastrointestinal & pancreatic	3.4
muscle	3.4
carcinogenicity	3.4
lung	2.3
acute death	2.3
renal	2.3
irritant	2.3
skeletal	1.1

2. 신약개발에서 간독성의 중요성 및 원인

간독성은 다양한 기전으로 발생하며 이는 기전별로 지방간, 간세포사멸, 면역반응, 담즙정체, 담도손상, 섬유화, 종양 등으로 분류되며, 지방간과 세포사멸은 간손상 초기에 일어나는 병변으로 많은 간독성물질들이 이 계열에 속하고 다수 (후보)약물들이 이로인해 실패하고 있다.

현재 사용되는 의약품 중 800종 이상이 간독성을 유발하며 이는 미국 전체 급성간부전(Acute Liver Failure)의 30% 이상을 차지하고, 황달 입원 환자의 2-20%를 차지하고 있다[6]. 약물유래간독성은 전임상단계에서 신약개발의 중단, 임상단계에서 임상시험의 중단 그리고 시판 후 시장에서 철수를 유발한 가장 큰 원인이다[7]. 간독성을 유발하는 의약품으로는 항생제나 항암제를 비롯하여 고혈압치료제, 항경련제, 고지혈증치료제, 향정신성의약품, NSAIDs, 흡입마취제, 당뇨병치료제, 생약제제 등으로 매우 다양하다. Guidance for industry drug-induced liver injury (2009.7, FDA), Non-clinical guideline on drug-induced hepatotoxicity (2008.8, European Medicines Agency), Recommendations from the scientific advisory panel subgroups on

표 2. 시장에서 철수한 약물의 독성 원인 분석 ('90년 이후)

	간독성	심장독성	기타독성
퇴출약물 및 연도	Dilevarol('90) Fipexide('91) Benzarone('92) Bendazac('93) Chlormezanone('96) Tolestat('96) Pemoline('97) Bromfenac('98) Ebrotidine('98) Tolcapone('98) Trovafloxacin('99) Troglitazone('00)	Terodiline('91) Encainide('91) Flosequinan('93) Terfenadine('98) Sertindole('98) Mibefradil('98) Astemizole('99) Grepafloxacin('99) Cisapride('00) Droperidol('01) Levacetylmethadol('01)	Triazolam('91) Temafloxacin('' 92) Remoxipride('93) Soruvidine('93) Minaprine('96) Dexfenfluramine('98) Fenfluamine('98) Alosetron('00) Cerivastatin('01)
비율	13/33 = 40%	11/33 = 33%	9/33 = 27%

표 3. 활성대사체가 관찰된 의약품

	퇴출약물	경고문 추가 약물
활성 대사체 보고	Iproniazid ('59) Fenclozic acid('70) Nialamide ('74) Tienilic acid ('80) Benoxaprofen ('82) Nomifensine ('86) Bromfenac ('98) Troglitazone ('00) Nefazodone ('04)	Dacarbazine Dantrolene Felbamate Flutamide Gemtuzumab Isoniazid Ketoconazole Nevirapine Tolcapone Valproic acid
비율	9/14	10/14
보고 되지 않음	Cincophen ('30) Pipamazine ('69) Oxyphenisatin ('73) Chlormezanone('96) Pemoline ('05)	Acitretin Bosentan Naltrexone Trovafloxacin
비율	5/14	4/14

hepatotoxicity (2004.7; 캐나다) 등을 보면 선진 각국에서 약물유래 간독성을 최소화하기 위해 노력함을 알 수 있다. 간독성 의약품의 간독성 기전을 분석하면 대사활성화가 큰 비중을 차지하며 미국 FDA에서는 2008년 2월 "Guidance for industry safety testing of drug metabolites"를 발행하여 약물대사체에 대한 연구가 신약개발에서 중요한 연구분야임을 강조하고 있다. 이에 의하면 퇴출약물 14개중 9종, 경고문 부착약물 14개중 10종에서 활성대사체가 보고되고 있다[8] (표 3).

간독성을 유발하는 의약품의 대사활성화는 친전자성의 독성대사체를 형성한다. 따라서 친전자성의 독성대사체 형성을 탐색할 수 있는 방법이 신약개발의 초기단계에 제안되고 있다. 대사활성화가 문제를 유발할 수 있는 화학적인 구조로는 1) hydrazines과 hydrazide, 2) arylacetic 또는 aryl propionic acid, 3) thiophene, furan과 pyrrole, 4) aniline과 anilide, 5) quinone와 quinoneimine, 6) medium chain fatty acids, 7) halogenated hydrocarbon과 일부 halogenated aromatic (Br > Cl > F), 8) nitroaromatic, 9) α,β-unsaturated enol-like structure, 10) Thiol 또는 thiono (thiazolidinedione과 thiourea) 11) aminothiazole 류 등 매우 다양한 구조를 갖는다.

또한 지질대사 교란에 의한 지방간은 현재 사용되거나 사용이 중지된 많은 약물에서 빈번히 나타나는 부작용이다 (tetracycline, doxycycline, orotic acid, valproic acid, amineptine, methotrexate, amiodarone, estrogens, tamoxifen 등 다수)

3. 신약개발에서 심장독성의 중요성 및 원인

신약 후보물질에 대한 많은 연구가 이루어지기 이전 신약개발 초기단계에 심장의 QT prolongation 여부를 조사해 잠재적 심장독성물질들을 미리 제거하여 효율적인 신약 개발을 해야 할 필요성이 대두되고 있다. 최근 Johnson & Johnson에서 새로운 화합물 576개를 가지고 HERG test를 해 본 결과 58%의 화합물이 HERG를 억제하는 것으로 나타났으며 39%의 화합물이 영향이 없는 것으로 나타났음. 물론 HERG 억제의 기준이 약간 느슨했다는 점을 감안하더라도 상당히 높은 비율의 화합물이 HERG channel을 억제하는 것을 알 수 있다.

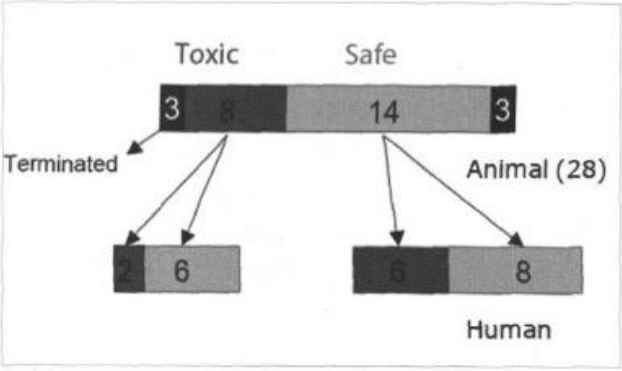
4. 간독성평가시스템의 비효율성

1) 간독성을 예측할 수 있는 특정 표적이 부재함.

심장독성의 경우 HERG channel assay가 심장독성 평가의 기준으로 제시되어 in vivo와의 연관성에 대한 논문이 보고되고 있으나 간독성은 특정 표적 단백질로 평가시스템을 구축하기 어려운 면이 있다.

2) 동물실험결과의 간독성 예측력이 미약함.

International Life Sciences Institute의 1999년 연구결과 238종의 신약후보물질 중에서 31개가 신약개발 과정에서 간독성이 있는 것으로 관찰되었으나 동물실험에서 간독성이 관찰된 것은 58% (18/31)로 동물실험에서 간독성의 예측력이 상대적으로 낮음을 알 수 있다. 또한 Rhone-Poulenc Rorer의 간독성 평가 결과 분석에서 동물실험결과는 임상결과와 차이가 큰 것으로 나타났다[9]. (그림 6)



<그림 6> 간독성평가 동물실험과 임상실험 결과의 불일치

3) 고감수성 개체에서 idiosyncratic hepatotoxicity의 발현

시장에서 철수한 간독성약물은 특징적으로 용량의존성과 기전이 불분명하고, 감수성이 강한 특정개체에서 매우 심각한 독성을 유발하므로 (대략 10,000명 또는 100,000명 중에서 한 명) NDA (new drug application)과정에서 간독성을 발견하지 못 할 수 있다[10]. 따라서 고전적인 동물시험에서 간독성의 예측력은 신약개발에서 산업체의 요구에 부합하지 못한다. 세포배양실험계로 HepG2(인간간암세포주) 세포, 형질전환 HepG2 세포(cytochrome P450 등 약물대사효소 과발현 세포주), immortalized human hepatocytes (SV40 T antigen 유전자삽입 등), primary hepatocytes (human 또는 rat 등) 등이 간독성 예측 모델로 사용되나 모두 한계를 가지고 있다. 지방간의 경우 현재 검증된 독성평가법이 구축되어있지 않으며 실제 이를 초기에 확인하기 위한 노력이 매우 부족하여 만성적으로 투여되는 약물의 경우 큰 위험을 내포하고 있다.

5. 심장독성 평가시스템의 문제점

1) 기존 심장독성 평가 동물실험 기술

동물 실험은 시간과 비용이 많이 들 뿐만 아니라 low throughput이다. 또한 동물의 ECG를 측정함에 있어서 스트레스등 주위 환경에 따라서 ECG가 영향을 받기 때문에 결과 해석에 주의가 필요하다.

2) 기존 심장독성 평가 action potential duration (APD) 측정 기술

APD 측정방법	장 점	단 점
심장세포 이용	medium throughput	• 세포의 질에 따라 다른 결과
Langendorff perfusion system	재현성 낮음	• low throughput
Purkinje fiber	세포분리 과정의 변수 배제	• 숙련된 기술이 필요 • purkinje fiber의 전기적 특성이 QT prolongation에 중요한 ventricular myocyte의 전기적 특성과 상이함

3) 기존 심장독성 평가 HERG test 기술

QT prolongation에 많은 영향을 주는 것이 APD인데 APD를 결정하는 중요한 요소중의 하나이면서 다양한 구조의 약물들에 의해 block 되는 HERG channel의 inhibition 여부를 미리 테스트하는 것이 중요하다. HERG test로는 gold-standard인 patch clamp를 위시하여 two-electrode voltage clamp, Rb efflux test, Binding assay 등이 있다. Membrane potential-sensitive dye를 이용해서 HTS 개발이 시도되고 하려고 있으며 이 방법이 성공할 경우 그 파급효과는 상당할 것으로 기대된다. 일부 HERG channel inhibitors는 QT 연장을 시키지 않

는다. 그 이유는 QT interval을 결정하는 심장의 APD가 HERG channel뿐만 아니라 다양한 ion channel과 transporter들에 의해 결정되기 때문이다. 예를 들어 verapamil은 HERG channel을 억제하지만 동시에 Ca channel도 억제하기 때문에 QT 연장을 유도하지 않으므로 심장의 APD 변화를 조사하는 것도 필요하다.

결론

1. 간독성평가의 기술제안

1) In vitro 대사활성화 평가 모델 개발

- Glutathione conjugates 형성 평가 (LC-MS 요구)
- 약물유래 covalent binding 평가 (동위원소 요구)
- Mechanism-based inhibition of cytochrome P450 (민감도가 낮음)

→ GSH 포합체의 생성속도를 높이고 안전성을 향상시킬 수 있는 새로운 trapping agent의 개발과 실험결과의 평가기준(cut-off value의 선정 등)에 대한 연구가 요구된다.

2) Cell-based in vitro 대사활성화 평가 모델 개발

- Human hepatocyte culture model (고비용, data-base구축에 한계)
- Human hepatocyte surrogate models: HepaRG (human hepatoma cell line), Fa-2N-4 (immortalized human hepatocyte cell line) 등

→ Human hepatocytes는 간독성 평가를 위한 "Gold Standard" model이나 여러 한계로 현재 human hepatocytes를 대체할 수 있는 모델이 개발 중이다. 새로운 세포주 개발의 기준은 1) 약물대사효소의 발현, 2) 약물대사효소의 유도/억제 유무, 3) 약물수송체의 발현, 4) 간특이 유전자의 발현(albumin등 혈청단백질, urea cycle의 단백질 등) 등이다.

3) 지질대사 이상에 의한 간독성 평가 기술의 개발

- cell-based assay system: 지방대사와 밀접한 관련이 있는 LXR, SREBP, PPAR-α 등의 reporter gene assay
- proteomic analysis system: 산화적 스트레스나 지질대사 관련 단백질들의 변화
- mitochondrial function analysis: 미토콘드리아 기능이상 및 지질과산화 측정
- HCS assay system: phospholipidosis등을 pholpholipid 형광 probe를 이용한 분석

2. 심장독성 평가분야의 기술제안

1) 최근에 이론적으로 다양한 약물에 의한 HERG channel inhibition의 IC_{50}를 예측하려는 시도가 QSAR 연구를 통해서 이루어지고 있다[10]. 이는 HERG channel을 억제하는 compounds들의 구조로부터 HERG channel의 binding site의 특징을 유추해 내는 방법이다.

2) 거의 모든 다국적 제약회사가 *in silico* prediction model을 사용하고 있는 것으로 추정되고 있으나 아직까지 *in silico* prediciton model이 실험을 대체할 수는 없다.

3) 심장의 APD는 HERG channel 뿐만 아니라 IKs, voltage-gated Ca 및 Na channel, 등에 의해서도 결정되며 약물이 HERG channel뿐 아니라 다른 채널들도 억제하기 때문에 향후 HERG channel뿐 아니라 IKs, voltage-gated Ca 및 Na channel 등에 대한 *in silico* prediction model이 개발된 후 cardiac myocyte의 APD를 계산하는 computer model에 incorportion 됨으로써 보다 정확하게 QT prologation을 예측할 수 있을 것으로 사료된다.

참고 문헌

(1) 보건산업진흥원 (2004) 의약품산업백서.

(2) IMS Health (2004) IMS World Review.

(3) Tufts Center for the Study of Drug Development. (2001) Backgrounder: How New Drugs Move Through the Drug Development and Approval Process.

(4) Goldberg, R., Pitts, P. (2006) Prescription for Progress: The Critical Path To Drug Development: A Working Paper of the 21st century, FDA Task Force, Center for Medical Progress, Manhattan Institute for Policy Research, NY. (Available at http://www.manhattan-institute.org/html/fda_task_1.htm accessed on March 3, 2010)

(5) Kola, I., Landis, J. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 711-715.

(6) Lewis, J.H., Ahmed, M., Shobassy, A., Palese, C. (2006) *Curr. Opin. Gastroenterol.* 22, 223-233.

(7) Kola, I.,Landis, J. (2004) *Nat. Rev. Drug Discov.* 3, 711-715.

(8) Guengerich, F.P., MacDonald, J.S. (2007) *Chem. Res. Toxicol.* 20, 344-369.

(9) Ballet F. (1997) J. Hepatol. 26, 26-36.

(10) Etwel, F.A., Rieder, M.J., Bend, J.R., Koren, G. (2008) *Drug Saf.* 31, 169-80.