

Sepsis and Cytokine Storm

Biomarker Discovery and Therapeutic Development of Sepsis
and Cytokine Storm using the Wnt signalling pathway

1. 연구의 필요성

○ 연구의 필요성

- 패혈증(Sepsis)은 혈액으로 세균이 퍼지면서 전신성 염증 반응(systemic inflammatory response)이 나타나는 증상으로 다발성 장기 부전(multiple organ failure) 및 사망을 초래함. 고령화 및 만성질환자의 증가에 따라 패혈증의 발생빈도는 증가추세에 있으며, 국내 패혈증으로 인한 사망자 수는 2007년 10만 명당 2.3명에서 2017년 10만 명당 7.8명으로 10년 동안 3배 이상 증가하였음.¹⁾ 국내 패혈증 사망률은 40%에 육박하며, 이는 미국과 호주, 뉴질랜드 등의 사망률이 20% 미만임에 비하면 높은 수준임.²⁾³⁾⁴⁾
- 패혈성 급성 신손상(Septic Acute Kidney Injury)은 패혈증 환자의 50% 이상에서 발생하고 있으며, 그 예후는 매우 좋지 않고 10% 이상의 환자가 신대체(Renal Replacement, 투석)요법을 평생 시행 받아야 하는 상황임.⁵⁾ 따라서, 패혈성 급성 신손상의 바이오마커 및 치료제를 개발한다면 생존률을 높이고, 치료기간을 단축시킬 수 있으며, 신대체(투석)요법이 필요한 환자의 수를 줄일 수 있음.
- 본 연구진은 선행연구를 통하여 패혈성 급성 신손상 환자의 혈액 분석 및 패혈증 동물모델연구를 통해 Wnt signalling pathway의 활용 가능성에 대한 예비 결과를 얻었음. 본 과제를 통하여 Wnt signalling pathway를 활용한 패혈성 급성 신손상의 Biomarker 및 Drug repositioning 후보물질을 발굴하고 식품의약품안전처에 연구자임상시험 허가를 신청하고자 함.

○ 패혈성 급성 신손상 및 Wnt signalling pathway관련 연구 현황

- 많은 연구에도 불구하고 패혈증의 치료기술개발은 지속적인 실패를 거듭하고 있음. NF-kB와 AP-1 활성 경로를 억제하는 corticosteroid의 활용,⁶⁾ 대표적인 inflammatory cytokine인 TNF-alpha에 대한 항체의 사용,⁷⁾ NF-kB 활성의 상위조절자인 Toll-like receptor 4 경로 차단⁸⁾ 등 다양한 방법을 시도했으나 패혈증에 의한 사망 및 장기부전의 감소에 성공하지 못하였음.
- Wnt signalling pathway는 종양형성에 관여하고 있음이 매우 잘 알려져 있으며, 따라서 지금까지 수행된 대부분의 연구는 종양의 기전 연구 및 종양치료제 개발에 집중되었음.⁹⁾
- Wnt signalling pathway와 패혈증에 대하여는 현재까지 소수의 연구가 수행되었으나, 패혈증의 진단 및 치료기술 개발로 이어지지 못하고 있으며, 패혈성 급성 신손상과 Wnt signalling pathway에 대한 연구는 현재까지 수행된바가 없음.

○ 연구가설

Wnt signalling pathway는 패혈성 급성 신손상의 Biomarker 및 Therapeutic target으로 활용될 수 있다.

○ 연구가설의 도출근거 : 연구진의 선행연구 결과

- 연구책임자와 참여연구자(공동)의 공동연구에 의하면 패혈성 급성 신손상 환자에서 입원 시의 Wnt3a 및 Wnt5a의 혈중 농도는 대조군에 비해서 통계적으로 의미 있게 높음이 관찰됨 ($P < 0.001$).

- 패혈성 급성 신손상 환자군을 major adverse kidney event (MAKE)가 있는 환자군과 없는 환자군으로 나누어 혈청내의 Wnt3a 및 Wnt5a 단백질 농도를 비교한 결과, Wnt3a는 유의적인 차이가 없었으나, Wnt5a는 MAKE가 있는 환자군에서 유의적으로 높게 관찰됨 ($P < 0.05$).

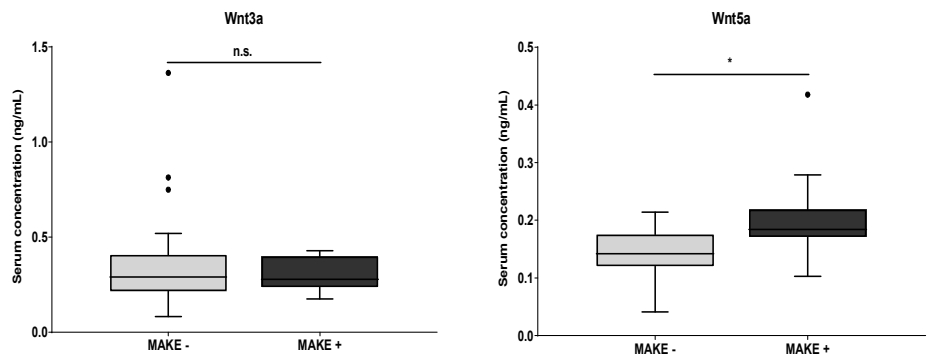


그림 1. MAKE의 발생 유무에 따른 환자군 혈청의 Wnt3a 및 Wnt5a 농도 비교

- ROC curve를 분석을 통하여 혈청 Wnt5a 단백질 농도가 MAKE의 발생가능성을 예측할 수 있는 가능성을 평가한 결과 Wnt5a는 유의적인 예측 가능성을 보였다(P=0.016). **Wnt5a의 AUC값은 0.74 (95% confidence interval 0.57 - 0.92) 정도로 나타나 입원시의 혈청내 Wnt5a 단백질 수준을 통해 환자에서 MAKE의 발생을 예측할 수 있는 가능성을 제시함.**

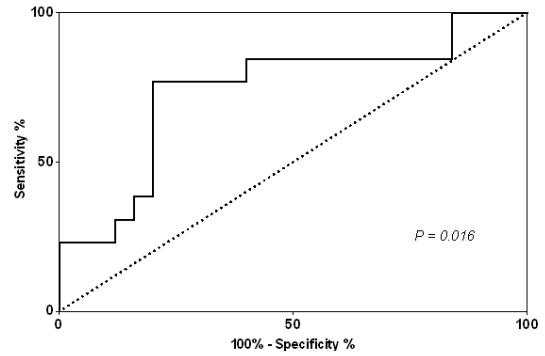


그림 2 Wnt5a 혈청 농도의 ROC 분석

- 본 연구진은 **Wnt signalling pathway의 억제제 LGK974가 LPS 및 대장균(E.coli)에 의해 유발된 패혈증 마우스의 생존률을 용량의존적으로 증가**시킴을 규명함.

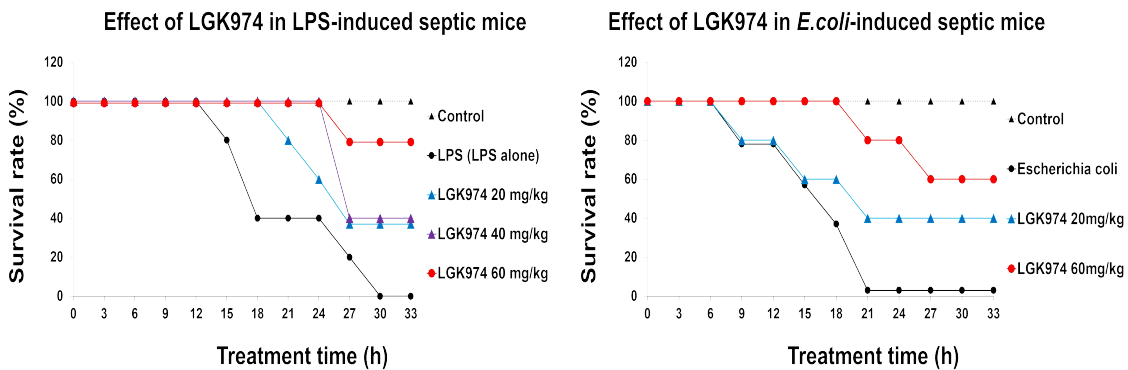


그림 3. Wnt signalling pathway 억제제 LGK974에 의한 패혈증 마우스의 생존률 증가

- 연구책임자와 참여연구자(공동)은 패혈성 마우스에서 **Wnt signalling pathway inhibitor인 LGK974에 의해 신장조직의 염증과 cytokine storm이 감소하고, 혈청중의 신장손상 마커인 Creatinin, Cystatin C 및 BUN(blood urea nitrogen)의 수준이 유의적으로 감소**함을 발견하여 'LGK를 포함하는 염증성 신장질환 예방 또는 치료용 조성물' 특허를 공동으로 출원함.

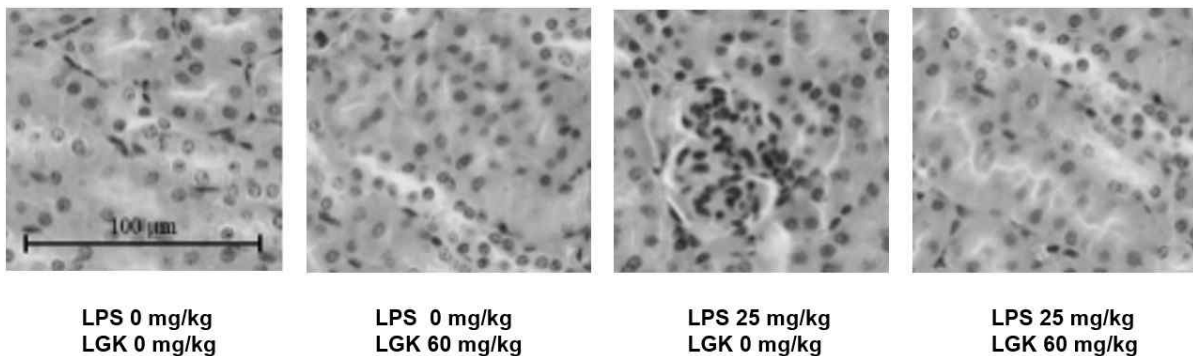


그림 4. Wnt signalling 억제제 LGK974에 의한 패혈증 마우스의 신장 염증 억제

- 본 연구진은 패혈증마우스의 신장조직에서 **Wnt signalling pathway의 실행자로 작용하는 β-catenin이 주요 염증인자인 NF-κB와 상호작용을 colocalization을 통해 입증**하였음. 아울러 Wnt signaling 억제제 Wnt-C59가 β-catenin과 NF-κB와 상호작용을 억제함을 발견함.

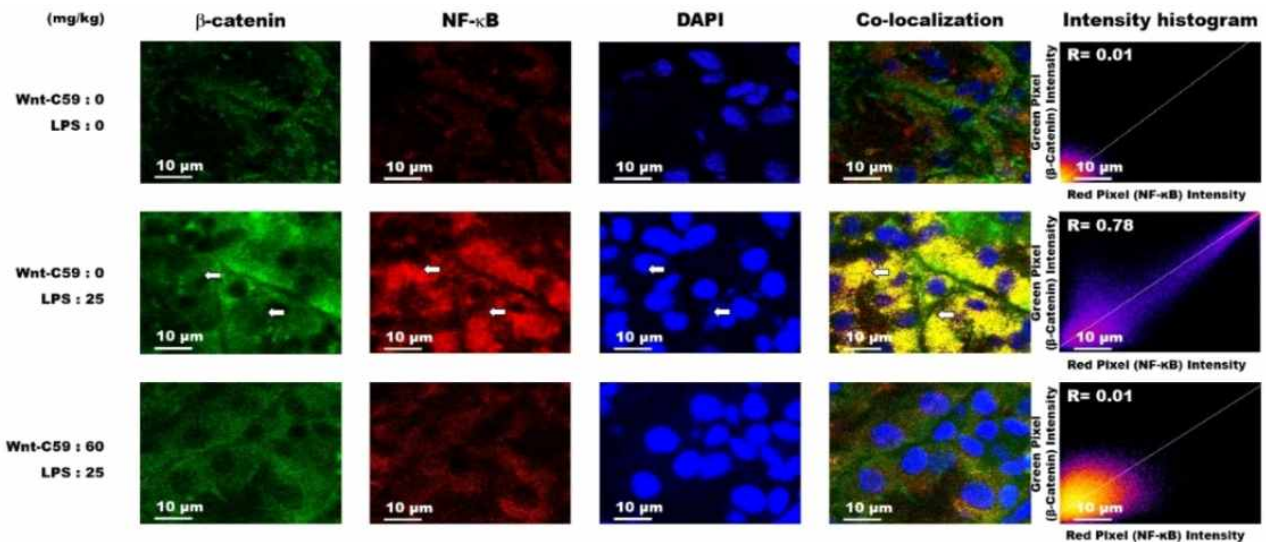


그림 5. 패혈증 마우스의 신장조직에서 Wnt-C59에 의한 β -catenin과 NF- κ B의 상호작용 억제

○ 공동연구의 필요성

- 연구의 성과를 달성을 위해 패혈증 환자의 임상 Data와 연동하여 혈액 및 뇨 Biomarker를 발굴할 수 있는 임상연구전문가와 패혈증 동물모델을 사용하여 치료제 후보물질을 발굴하고 전임상연구를 수행할 수 있는 기초연구전문가의 긴밀한 협력이 필요함.
- 기초연구전문가는 패혈증 동물모델을 사용하여 기허가의약품 또는 임상시험중 의약품을 대상으로 패혈성 급성 신손상 억제 후보물질을 발굴하고 전임상 효력자료 및 작용기전 자료를 확보할 수 있음.
- 임상연구전문가는 Biomarker를 발굴하고 이를 도입한 임상시험 Protocol을 작성할 수 있음.
- 기초연구전문가는 치료제 후보물질의 식약처 임상시험허가를 위한 전임상자료를 작성할 수 있음.
- 임상연구전문가는 치료제 후보물질의 전임상자료와 임상시험 프로코콜을 활용하여 식품의약품안전처에 연구자임상시험허가(IND, investigational new drug)를 신청할수 있음
- 본 연구진은 허가용 임상시험의 전임상연구완료 및 식품의약품안전처 임상시험(IND, investigationl new drug) 승인 경험을 보유하고 있어서 연구자임상시험 IND신청 및 승인 획득에 필요한 경험과 능력을 갖추고 있음
- 본 연구과제에서는 기초-임상 협력연구를 통해 Biomarker와 Drug repositioning을 활용한 연구자 임상시험 IND를 식품의약품안전처에 신청하고 승인받는 것을 목표로함.
- 본 연구과제 이후의 후속과제를 통해 연구자임상시험 수행, 기업체에 기술이전, 허가용 임상시험 IND 승인, 허가용 임상시험 수행을 순차적으로 진행할 계획임.

2. 연구의 목표 및 내용

1) 연구의 최종 목표

패혈성 급성 신손상의 Biomarker를 Wnt signalling pathway로부터 발굴하여 환자의 prognosis 유용성을 규명하고, Wnt signalling pathway 억제약물의 Drug repositioning에 의한 치료제 후보를 발굴하여 전임상 연구를 수행함. 발굴된 Biomarker와 Drug repositioning 약물을 활용한 임상시험 protocol을 작성하여 식약처에 연구자주도 임상시험 IND를 신청함.

2) 연구의 내용

- 패혈성 급성 신손상 환자의 임상 Data와 혈액 및 뇨 시료 160건 이상 수집
- 환자의 혈액 및 뇨로부터 Wnt signalling pathway 관련 Biomarker 5종 발굴 및 prognosis 유용성 평가

- 발굴된 Biomarker와 NGAL 등 기존 마커의 prognosis 유용성 비교
- Wnt signalling pathway 억제 약물의 Drug repositioning을 통한 패혈성 신손상 치료제 후보 3종 발굴
- Drug repositioning 치료제 후보의 전임상시험 자료 확보,
- Biomarker를 포함한 Drug repositioning 치료제 후보의 임상시험 Protocol 작성
- 식품의약품안전처에 연구자 임상시험 IND 신청 및 승인 획득
- **1년차 :**
 - 패혈성 급성 신손상 환자의 임상 Data와 혈액 및 뇨 시료 60건 이상 수집
 - 패혈성 급성 신손상 환자의 혈액 및 뇨로부터 Wnt signalling pathway 관련 Biomarker 2종이상 분석
 - Wnt signalling pathway 억제 약물의 Drug repositioning을 통한 패혈성 신손상 치료제 후보 1종 발굴
- **2년차 :**
 - 패혈성 급성 신손상 환자의 임상 Data와 혈액 및 뇨 시료 누적 120건 이상 수집
 - 패혈성 급성 신손상 환자의 혈액 및 뇨로부터 Wnt signalling pathway 관련 Biomarker 총 5종이상 분석
 - Wnt signalling pathway 억제 약물의 Drug repositioning을 통한 패혈성 신손상 치료제 후보 총 3종 발굴
- **3년차 :**
 - 패혈성 급성 신손상 환자의 임상 Data와 혈액 및 뇨 시료 누적 160건 이상 수집
 - 발굴된 Wnt signalling pathway 관련 Biomarker와 NGAL 등 기존 마커의 예후예측력 비교
 - 임상시험에 활용할 Wnt signalling pathway 관련 Biomarker와 Drug repositioning 치료제 선정
 - Drug repositioning 치료제의 전임상시험 자료 작성
 - Wnt signalling pathway 관련 Biomarker를 포함한 Drug repositioning 치료제의 임상시험 Protocol 작성
 - 식품의약품안전처에 연구자 임상시험 IND 신청 및 승인 획득

3. 연구의 추진전략·방법 및 추진체계

1) 연구의 추진전략·방법

□ 패혈성 급성 신손상의 Biomarker 연구 전략

- Wnt signalling pathway 관련 Biomarker 후보를 대조군 및 패혈성 급성 신손상 환자군의 혈액 및 뇨에서 분석 및 검증하고 주요 임상지표 및 prognosis와의 관련성을 규명함.
- **피험자 선정기준**
 - **중환자실에 패혈증(sepsis) 및 패혈성 속(septic shock)으로 입원한 환자를 대상으로 prospective observational study 양식으로 진행함.**
 - 패혈증(sepsis) 및 패혈성 속(septic shock)은 SEPSIS-3 진단기준에 따라 정의함 :
Sepsis 는 감염이 의심되는 환자에서 sequential organ failure assessment(SOFA) score가 2 이상인 경우로 정의함. Septic shock은 수액 치료에도 mean arterial pressure를 65 mmHg 이상 유지하기 위해 강심제가 필요하고, lactate 수치가 2 mmol/L를 초과한 경우로 정의함.¹⁰⁾
 - **급성 신손상 (Acute kidney injury, AKI)는 serum creatinine 또는 urinary output를 바탕으로 KDIGO diagnosis and staging 으로 정의함.¹¹⁾**
 - **Imminent AKI는 내원 48시간 이내 KDIGO stage 2-3 AKI 발생으로 정의함.**
 - **New AKI는 내원 12시간 이내 혈청 크레아티닌치의 기저치 대비 0.3 mg/dL 상승 또는 7일 이내 1.5배 상승, 혹은 내원일에 AKI 동반이 없는 환자에서 6시간 이상 0.5 ml/kg/h 이하의 요량 감소로 정의함.¹¹⁾**
 - **Major Adverse Kidney Event (MAKE)는 death, new renal replacement therapy, stage 3 AKI 로 정의함.**
- **임상 Data와 혈액 및 뇨 시료 수집을 위한 목표 환자 수 산출**
 - 패혈성 급성신손상 환자에서 신대체요법 발생빈율 (10%).¹²⁾
 - 선행 연구를 통해 기대되는 유병율의 최적 예측 (best guess) = 10% (0.10)
 - 요구되는 95% 신뢰구간 폭 = 10% (즉, ± 5%)
 - 연구대상 환자 수 산출

$$n = 15.4 \times p \times (1-p) / W^2 \quad 13)$$

n = 요구되는 연구대상자수, p = 기대되는 비율 (여기서는 0.10), W=신뢰구간의 폭 (여기서는 0.10)

$$n = 15.4 \times 0.10 \times 0.90 / 0.10^2 = 1.386 / 0.01 = 138.6 \text{ (약 139명)}$$

- 중도 탈락율 15% (추적 관찰 기간 평균 2주로 단기간)로 고려하여 최소 159.85 (약 160)명을 목표 환자 수로 산출함. 아울러, Age & sex-matched 정상 대조군 40명을 모집함.

○ 임상시료 분석

- 내원 일에 demographic data, comorbidity, APACHE score, presence of AKI, SOFA score를 평가함.
- **패혈성 급성 신손상 환자의 혈액 및 뇨 검체는 입원당시(admission date), 입원 후 12시간, 48시간, 7일, 퇴원일 (Discharge date)에 채취함.**
- 혈액/뇨 중 **Wnt signalling pathway 관련 Biomarker로서 Wnt3a, Wnt5a, Wnt11, DKK1, DKK3, LEF-1, Sclerostin 등의 농도를 multiplex luminex assay 또는 enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) 방법**으로 측정함.
- 기존 바이오파마인 혈청의 **NGAL 및 High-sensitivity CRP**, 소변의 NGAL을 ELISA 방법으로 측정함.

○ 임상 데이터 분석

- 생존자/사망자, 신기능 회복여부에 따른 시간 별 Wnt signalling pathway 관련 Biomarker 수준을 비교함.
- **입원당시(admission date), 입원 후 12시간, 48시간, 7일, 퇴원일 (Discharge date)에 MAKE(major adverse kidney event)와 연관 있는 위험 인자 감별은 multivariate Cox proportional hazards regression model with forward stepwise selection procedures 방법으로 수행함.**
- Wnt signalling pathway 관련 Biomarker의 혈액/뇨 농도와의 **MAKE 발생 예측 능력은 receiver operating characteristic (ROC) curves** 로 제시함.
- **Wnt signalling pathway 관련 Biomarker의 혈액/뇨 농도가 imminent or new AKI 발생 고위험성 환자를 감별할 수 있는 cut-off value 는 Biomarker 농도에 따라 환자를 소그룹화 하는 방법으로 규명함.**
- **Wnt signalling pathway 관련 Biomarker의 imminent or new AKI 발생 고위험성 환자 감별 cut-off value를 고려하여 향후 임상연구에서 Wnt inhibitor 치료 대상 기준을 제시함.**

□ **Wnt signalling pathway로부터 Biomarker 발굴 전략:** 아래의 후보들을 활용가능하지만 반드시 이에 국한하지는 않음. In silico 분석을 포함하여 다양한 Biomarker 후보 발굴전략을 활용 가능함.

- 본 연구진의 **선행연구에서 발견된 혈청 Wnt5A와 Wnt3A 바이오마커**
- 스트레스에 의해 renal tubular epithelia에서 분비되는 Wnt signalling pathway 억제자 **DKK3**는 급성신손상의 prediction에 유용한 biomarker로 보고되었음.¹⁴⁾
- Wnt signalling pathway 억제자인 **DKK1**의 혈청내 수준은 비만 및 과다지방축적의 potential biomarker로 유용성이 보고됨.¹⁵⁾
- Wnt signalling pathway inhibitor인 **Sclerostin**의 혈청내 수준은 비만 환자에서 동맥경화 발생을 예측하는 potential biomarker로 유용성이 보고됨.¹⁶⁾
- Wnt ligand의 하나인 **Wnt11**는 대장암의 prognosis 바이오마커로 가능성이 제기됨. Wnt-11의 mRNA 수준 및 immunohistochemistry에서의 증가는 높은 전이 및 낮은 5년 생존률과 연관되어 있음.¹⁷⁾
- Wnt signalling pathway의 마지막 부분에 위치한 **LEF-1**은 chronic lymphocytic leukemia, oral squamous cell carcinoma 등에서 전이와 낮은 생존률을 반영하는 prognosis 바이오마커로 활용가능성이 제시되었으며, colorectal cancer에서는 LEF-1이 높고 Notch2가 낮은 경우가 낮은 생존률과 연관됨.¹⁸⁾
- Wnt signalling pathway를 조절하는 **CLDN3**의 낮은 발현 및 promoter의 메틸화는 hepatocellular carcinoma의 짧은 생존기간과 연관된 prognosis 바이오마커로 작용함.¹⁹⁾

□ **Drug repositioning을 활용한 패혈성 급성 신손상의 치료제 후보 발굴:** 아래의 후보군에서 3종 이상 분석함

○ 후보물질군 1: 항암제로 개발되어 현재 임상시험중에 있는 Wnt signalling pathway 억제제

- Wnt signalling pathway가 종양의 형성과 관련되어 있으므로 여러 억제제들이 대장암, 췌장암, 흑색종, 유방암 등 Wnt 의존성 종양에 대한 항암제 후보물질로 개발되어 임상시험 중에 있음.²⁰⁾
- **Wnt signalling pathway는 종양 뿐아니라 인체의 정상적인 intestinal epithelium의 유지, bone turnover,**

hematopoiesis 작용하고 있으므로, Wnt signalling pathway 억제용 항암제는 위장관 및 골격계의 부작용을 일으키는 경우가 많음.

- 그러나, 패혈성 신손상 환자(투약기간 4주 이내)는 종양환자(투약기간 수 개월~수 년)에 비해 투약기간이 매우 짧기 때문에 종양환자에서 발생하는 부작용이 상당부분 감소할 것이 예상됨.
- 일부 부작용으로 인한 risk는 패혈증으로 인한 사망 및 평생 신대체(투석)요법을 피할 수 있는 benefit에 비하여 경미함.
- LGK974(다른이름 WNT974)는 경구복용이 가능한 Wnt signalling pathway 억제제로 first-in-class의 Porcupine inhibitor (Porcupine은 Wnt의 palmytoylation에 의해 secretion을 일으키는 효소)로서 Wnt 의 존성 종양 환자를 대상으로 한 제 1상 임상시험이 노바티스에 의해 진행되고 있음.²¹⁾ 본 연구진은 선행 연구를 통하여 패혈성 마우스에서 LGK974에 의해 신장조직의 염증과 cytokine storm이 감소하고, 혈중 신장손상 마커인 Creatinin, Cystatin C 및 BUN(blood urea nitrogen)의 수준이 유의적으로 감소함을 발견하여 'LGK를 포함하는 염증성 신장질환 예방 또는 치료용 조성물' 특허를 공동으로 출원함 (대표연구성과 6)
- PRI-724는 β -catenin과 CBP의 부착을 억제하는 약물로 Prism Pharma사에서 개발되어 advanced solid tumor를 대상으로 제 1상 임상시험을 수행함.²²⁾ 임상시험의 Biomarker로 혈청 S100A4의 분석을 수행함.
- OMP-18R5는 Wnt의 수용체 Frizzled에 대한 humanized antibody 치료제 metastatic breast cancer를 대상으로 제 1상 임상시험을 수행함.²³⁾
- OMP-54F28은 Wnt와 Frizzled의 부착을 억제하는 Frizzled-Fc fusion 단백질로 liver cancer를 대상으로 제 1상 임상시험을 수행함.²⁴⁾

○ 후보물질군 2: 기허가 의약품 중 Wnt signalling pathway 조절 활성이 알려져 있는 약물

- 구충제로 허가된 niclosamide는 Frizzled-1의 internalization과 Dishevelled-2의 감소를 촉진시킴으로서 Wnt signalling pathway를 억제함.²⁵⁾ Wnt signalling pathway 억제활성이 알려진 후 화학요법에 저항성이 있는 난치성 종양의 치료에 단독 또는 기존 항암제와 병용으로 활용이 모색됨.²⁶⁾ 최근 COVID-19 치료제로 drug repositioning 목적의 임상시험이 국내 및 해외에서 진행중에 있음.²⁷⁾²⁸⁾
- 구충제로 허가된 pyrvinium은 casein kinase 1 α 를 활성화를 통한 β -catenin의 분해에 의해 Wnt signalling pathway를 억제함이 알려져 있음.²⁹⁾
- NSAID와 Vitamine D 등도 Wnt signalling pathway를 억제함이 알려져 있음: NAISD(Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs)는 PPAR γ 를 활성화시킴으로써 Wnt signalling pathway의 억제제로 작용함.³⁰⁾ Vitamin D 및 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3는 핵수용체와 부착한 후 β -catenin과 CBP/p300에 대해 경쟁함으로써 Wnt signalling pathway를 억제함.³¹⁾

□ 패혈증 동물모델을 활용한 후보물질 효력 연구

- LPS에 의한 패혈증 동물모델, 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*) 등 그람음성균에 의한 패혈증 동물모델, 황색포도알균(*Staphylococcus aureus*) 등 그람양성균에 의한 패혈증 동물모델, Cecal ligation puncture에 의한 다균성 패혈증 동물모델 등을 활용함.
- 패혈증 동물모델에서 후보물질의 생존률 증가 효과 분석
- 전신성 cytokine storm 억제효과 분석 : TNF- β , IL-1 β , IL-6, INF- γ 등
- 신장 조직의 cytokine storm 억제효과 분석 : TNF- β , IL-1 β , IL-6, INF- γ 등
- 신장기능 생화학적 마커 (혈청 Creatin, Cystatin C, Blood urea nitrogen) 분석
- 신장의 조직병리 분석
- 임상연구에서 발굴된 바이오마커 조절 능력 분석

□ 전임상연구에서 도출된 Drug repositioning 후보물질의 임상 Biomarker 조절효력 및 작용기전 연구

- 동물모델에서 효력이 좋은 후보물질이 임상시험에서 실패하는 경우가 많은데, 이는 동물모델은 인체 질병의 일부분을 반영할 뿐 전체적으로 반영하지 못하기 때문임. 따라서 전임상 동물연구에서 발굴된 후보물질에 대하여 임상연구에서 검증된 바이오마커의 조절능을 평가함.

- 임상연구에서 환자의 생존율, AKI 발생 및 중증도, RRT 시행 가능성, renal recovery 예측 능력과 관련성을 보이는 Biomarker를 발굴한 후, Drug repositioning 후보물질의 Biomarker 조절 활성 및 이의 작용기전을 동물모델에서 규명

□ **패혈성 급성 신손상 Drug repositioning 치료제 후보물질의 전임상 자료 확보**

○ 식약처 IND 기준 분석

- 신물질 보다 Drug repositioning 후보물질으로 식약처 IND를 추진하는 것이 비용 및 시간면에서 적합함.
- IND 신청용 전임상자료의 범위는 의약품 임상시험 계획 승인에 관한 규정 (식품의약품안전처고시 제 2015-22호)에 제시되어 있으며, Drug repositioning의 경우 제출자료중 상당수를 감면받아 IND 승인에 매우 유리함.

□ **Biomarker가 도입된 Drug repositioning 패혈성 급성 신손상 치료제 후보물질의 임상시험 Protocol 작성 연구책임자는 관련 경험과 역량을 갖추고 있음.**

아래의 내용을 바탕으로 본 연구에서 발굴된 Wnt signalling pathway 관련 Biomarker를 도입하여 작성함.

○ 피험자 선정기준 및 제외기준 설정

대조군 : 건강검진을 시행받고 본 연구 참여를 동의하는 환자

1. 20세 이상
2. 추정 사구체 여과율 90 ml/min 이상
3. 제외기준
 - 과거력에서 악성 종양 병력이 있는 경우
 - 당뇨병 환자
 - 임신부

환자군 : 패혈증 연관 급성 신손상 환자

1. 내원시 패혈증(sepsis) 및 패혈성 속(septic shock)은 SEPSIS-3 진단기준에 합당한 20세 이상 환자.
2. 내원시 패혈성 연관 급성 신손상으로 신대체요법 (renal replacement therapy)이 필요한 환자.
3. 내원일 혹은 내원 48시간 내로 KDIGO AKI stage 2-3로 발생 혹은 진행된 환자 (Imminent or new AKI).
4. 본 연구에서 발굴될 Wnt 관련 Biomarker 혈액/뇨 농도의 cut-off value을 환자군 선정기준으로 활용 계획임.
5. 제외기준
 - 20세 미만 환자
 - 급성 폐색성 신질환이 동반된 환자
 - 말기 암환자
 - 본 연구에 동의하지 않는 환자

○ Primary endpoint 설정

Major Kidney Adverse Events (MAKE: death, new renal replacement therapy, stage 3 AKI) 발생을

○ Secondary endpoint 설정

- 1) Serum biomarker : creatinine, BUN, serum cystatin C, High-sensitivity CRP, NGAL
- 2) Urine biomarker : NGAL
- 3) 본 연구에서 발굴될 Wnt 관련 Biomarker에 대하여 패혈성 급성신손상의 surrogate marker로서의 가능성을 타진할 계획임.

○ 안전성 평가방법 설정

- 1) 활력징후
- 2) 임상실험실적 검사의 이상치 평가 - WHO 기준을 참조하여 설정.

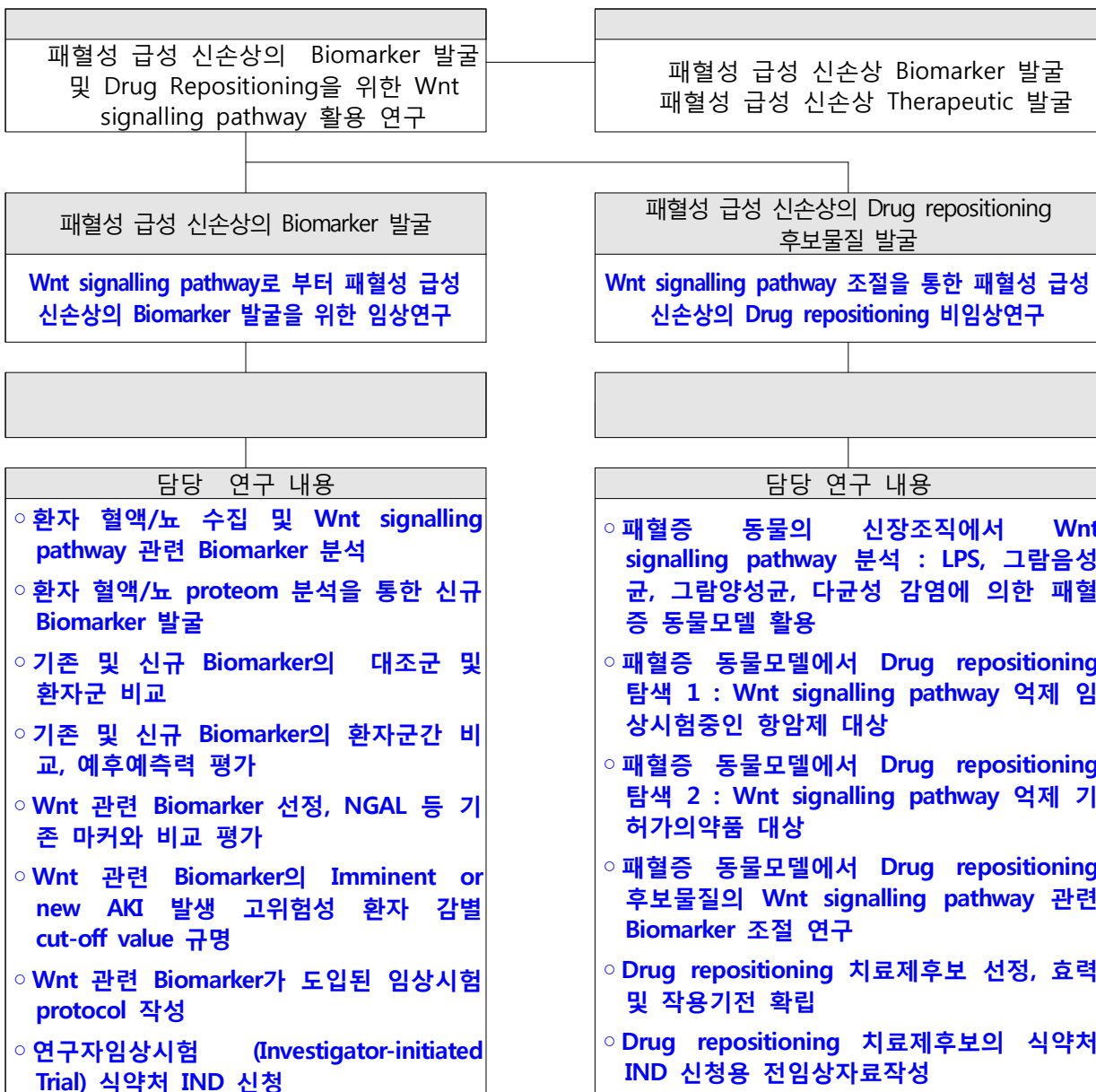
□ **패혈성 급성 신손상 치료제 drug repositioning 후보물질의 연구자임상시험 식품의약품안전처 IND 신청**

- 식품의약품안전처에 IND 신청을 위해 필요한 사항은 다음과 같음

- 개발계획
- 구조결정, 물리학적 및 생물학적 성질에 관한 자료 (원료의약품, 완제의약품)
- 전임상 효력연구 자료
- 전임상 안전성연구 자료
- 임상시험계획서
- 임상시험 피해자 보상에 관한 규약
- 임상시험자 자료집(IB)

○ **기허가의약품 및 임상시험용 의약품의 Drug repositioning은 자료의 일부만 제출하면 되는 장점이 있음.** Drug repositioning은 이미 시판 중이거나 임상단계의 약물을 대상으로 새로운 적응증을 규명해 신약으로 개발하는 방법으로 기존 신약 개발에 비해 상대적으로 적은 비용으로도 신속하게 신약을 출시할 수 있는 이점이 있음. **본 연구진은 허가용 임상시험(SIT, sponsor-initiated trial) IND 신청 및 승인 경험을 지니고 있으며, 따라서 연구자임상시험의 IND 신청 및 승인을 수행할 수 있는 충분한 역량이 있음.**

2) 연구과제의 추진체계



5. 연구과제의 활용방안 및 기대효과

1) 연구과제의 활용방안

- 패혈성 급성 신손상은 패혈증 환자의 50% 이상에서 발생하고 평생 신대체(투석)요법을 해야하는 상황으로 진행되고 있으나, 환자에게 보존적 처치가 이루어 지고 있을 뿐 치료제는 개발된 바 없음.
- 본 연구는 패혈성 급성 신손상의 질병기전으로 Wnt signalling pathway를 분석하고 이를 진단 및 치료에 활용하려는 연구로서 기존에 수행된 바 없고 혁신성이 있음. 현재 치료법이 없는 패혈성 급성 신손상 진단 및 치료에 있어서 새로운 돌파구를 마련할 가능성이 있음.
- 기허가의약품 또는 임상시험용 의약품의 Drug repositioning에 의해 패혈성 급성 신손상 치료제 후보를 발굴하고 연구자 임상시험 IND를 식약처에 하여 승인을 획득하여 임상시험에 진입할 수 있음. 본 연구를 통해 발굴된 Biomarker는 적합한 피험자 선별에 활용되어 임상시험의 성공확률을 높일 수 있음.
- 본 연구과제를 통하여 연구자 임상시험 IND승인을 받은 후, 후속연구를 통하여 연구자 임상시험을 실시하고, 이 결과를 바탕으로 제약기업에 기술이전 후 허가용 임상시험을 추진함. 연구자 임상시험에서 긍정적인 결과를 얻으면 기술이전 및 의약품 확률이 크게 높아질 것으로 사료됨.

2) 연구과제의 기대효과

- 과학기술적 측면
 - 패혈성 급성 신손상의 관리에 있어서 기존의 항생제 처치 및 보존적 치료를 보완하고 병용할 수 있는 새로운 치료기술 개발
 - 패혈성 급성 신손상의 관리 및 예후예측에 있어서 활용의 제한성이 있는 NGAL 등 기존의 Biomarker 보다 우수한 새로운 Biomarker의 개발
 - 패혈성 신손상 이외에도 cytokine storm에 의해 유도되는 다양한 급성 염증성 질환에 확대 적용 가능한 새로운 치료기술 개발
- 경제산업적 측면
 - 현재 치료법이 없는 패혈성 급성 신손상의 진단 및 치료기술 개발로 바이오의료분야 국제경쟁력 확보
 - 연구자임상을 통해 유용성이 검증된 치료기술 개발로 국내 제약기업에 우수 기술 제공
- 사회적 측면
 - 패혈성 급성 신손상으로 인한 신대체(투석)의 감소로 인한 환자의 삶의 질 증가
 - 신대체(투석)의 감소로 인한 의료비 지출 감소 및 국민건강보험 재정 보존

참고문헌(Reference)

- 1) 통계청, 보도자료, 2017년 사망원인통계, 2018년 9월 19일.
- 2) Oh SY, Cho S, Lee H, Chang EJ, Min SH, Ryu HG. Sepsis in Patients Receiving Immunosuppressive Drugs in Korea: Analysis of the National Insurance Database from 2009 to 2013. *Korean J Crit Care Med* 2015;30:249-257.
- 3) Kaukonen KM, Bailey M, Suzuki S, Pilcher D, Bellomo R. Mortality related to severe sepsis and septic shock among critically ill patients in Australia and New Zealand, 2000-2012. *JAMA* 2014;311:1308-1316.
- 4) Rhee C, Dantes R, Epstein L, Murphy DJ, Seymour CW, Iwashyna TJ, Kadri SS, Angus DC, Danner RL, Fiore AE, Jernigan JA, Martin GS, Septimus E, Warren DK, Karcz A, Chan C, Menchaca JT, Wang R, Gruber S, Klompas M; CDC Prevention Epicenter Program. Incidence and Trends of Sepsis in US Hospitals Using Clinical vs Claims Data, 2009-2014. *JAMA* 2017;318:1241-1249.
- 5) Nusslag C, Weigand MA, Zeier M, Morath C, Brenner T. Issues of Acute Kidney Injury Staging and Management in Sepsis and Critical Illness: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1387.
- 6) Klaitman V, Almog Y. Corticosteroids in sepsis: a new concept for an old drug. *Isr Med Assoc J*. 2003;5:51-5.
- 7) Lv S, Han M, Yi R, Kwon S, Dai C, Wang R. Anti-TNF- α therapy for patients with sepsis: a systematic meta-analysis. *Int J Clin Pract*. 2014;68:520-8.
- 8) Petronilho F, Vuolo F, Galant LS, Constantino L, Tomasi CD, Giombelli VR et al. Gastrin-releasing peptide receptor antagonism induces protection from lethal sepsis: involvement of toll-like receptor 4 signaling. *Mol Med*. 2012;18:1209-19.
- 9) Duchartre, Y., Kim, Y. M. & Kahn, M. The Wnt signaling pathway in cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol*. 2016;99:141-149.
- 10) Dellinger RP, Levy MM, Rhodes A, Annane D, Gerlach H, Opal SM, Sevransky JE, Sprung CL, Douglas IS, Jaeschke R et al: Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock, 2012. *Intensive Care Med* 2013;39:165-228.
- 11) KDIGO Clinical Practice Guideline for Acute Kidney Injury. *Kidney Int* 2012, 2(suppl):138.
- 12) Nusslag C, Weigand MA, Zeier M, Morath C, Brenner T. Issues of Acute Kidney Injury Staging and Management in Sepsis and Critical Illness: A Narrative Review. *Int J Mol Sci*. 2017;18:1387.
- 13) 임상연구 설계와 분석을 위한 기본통계 : 식품의약품안전청. 국립독성연구원. Page 46.
- 14) Federico G, Meister M, Mathow D et al. Tubular Dickkopf-3 promotes the development of renal atrophy and fibrosis. *JCI Insight*. 2016 Jan 21;1(1):e84916
- 15) Ali H et al. Wnt Pathway Inhibitor DKK1: A Potential Novel Biomarker for Adiposity. *J Endocrine Society*. 2019; 3: 488-495,
- 16) Popovic DS et al. The Wnt/ β -catenin Signalling Pathway Inhibitor Sclerostin is a Biomarker for Early Atherosclerosis in Obesity. *Current Neurovascular Research*. 2017; 14: 200-206.
- 17) Gorroño-Etxebarria I et al. Wnt-11 as a Potential Prognostic Biomarker and Therapeutic Target in Colorectal Cancer. *Cancers (Basel)*. 2019; 11(7): 908.
- 18) Santiago L. Wnt signaling pathway protein LEF1 in cancer, as a biomarker for prognosis and a target for treatment. *Am J Cancer Res*. 2017; 7(6): 1389-1406.

- 19) Jiang L et al. CLDN3 inhibits cancer aggressiveness via Wnt-EMT signaling and is a potential prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2014; 5(17): 7663–7676.
- 20) Jung YS, Park, JI. Wnt signaling in cancer: therapeutic targeing of Wnt siganling beyond beta-catenin and destruction complex. *Exp Mol Med* 2020; 52:183-191.
- 21) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01351103>
- 22) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01302405>
- 23) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT01973309>
- 24) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02069145>
- 25) Chen M et al. The anti-helminthic niclosamide inhibits Wnt/Frizzled 1 signaling. *Biochemistry* 2009;48 :10267-10274
- 26) Wei W et al. Targeting Wnt/ β -catenin by anthelmintic drug niclosamide overcoms paclitaxel resistance in esophageal cancer. *Fundamental Clinical Pharmaology* 2020; doi: 10.1111/fcp.12583
- 27) <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT04603924>
- 28) <https://www.dailypharm.com/Users/News/NewsView.html?ID=269262>
- 29) Thorne CA et al. Small-molecule inhibition of Wnt signaling through activation of casein kinase 1 α . *Nature Chem Biol* 2010;6:829-836
- 30) Valle A, Lecarpentier Y, Vallee JN. Targetint the canonical Wnt/beta-catenin pathway in cancer treatment using non-streoidal anti-inflammatory drugs. *Cell* 2019;8:726.
- 31) Palmer HG et al. Vitamin D3 promotes the differentiation of colon carinoma cells by the induction of E-cadrin and the inhibition of beta-catenin signaling. *J Cell Biol*. 2001;154:369-387