



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월15일

(11) 등록번호 10-2602463

(24) 등록일자 2023년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61B 5/055 (2006.01) A61B 5/00 (2021.01)

A61K 49/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61B 5/055 (2022.01)

A61B 5/0036 (2021.08)

(21) 출원번호 10-2021-0072080

(22) 출원일자 2021년06월03일

심사청구일자 2021년06월03일

(65) 공개번호 10-2022-0163657

(43) 공개일자 2022년12월12일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020180106716 A*

Stodkilde-Jorgensen H, et al., Pilot Study Experience With Hyperpolarized [1-13C]pyruvate MRI in Pancreatic Cancer Patients. J. Magnetic Resonance Imaging. Vol.51, Issue 3, pp.961~963 (March, 2020)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

송호택

인천광역시 연수구 해송로 143, 웰카운티1단지 111-702

최영숙

충청남도 천안시 서북구 공원로 176, 시티프라디움3차 308-4108

(74) 대리인

파도특허법인유한회사

전체 청구항 수 : 총 2 항

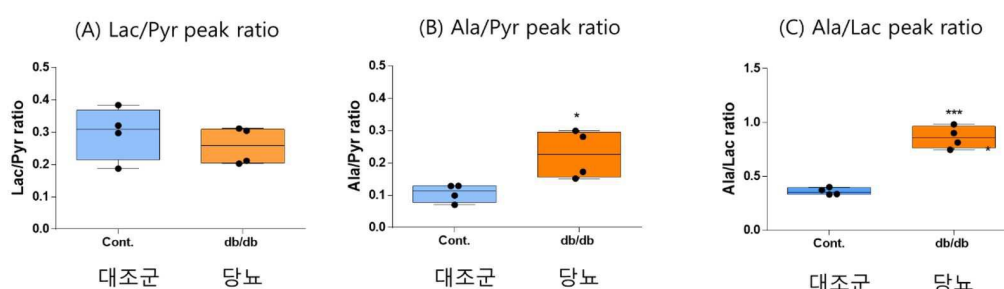
심사관 : 박찬아

(54) 발명의 명칭 13C-자기공명분광영상을 이용한 지방간 질환의 진단 방법

(57) 요약

본 발명은 13C-피루베이트(pyruvate)를 대사 이미징 마커로 이용하여 비알코올성 지방간을 진단하거나 비알코올성 지방간 치료제의 치료 반응을 조기에 평가하여 스크리닝할 수 있는 방법에 관한 것으로 13C-자기공명 분광영상법을 통해 피루베이트의 락테이트 또는 알라닌으로의 전환율을 계산하여 비알코올성 지방간을 진단할 수 있다. 또한, 본 발명은 피루베이트에 대한 알라닌으로의 전환율뿐만 아니라 락테이트에 대한 알라닌 비율을 측정하여 비알코올성 지방간 치료제를 스크리닝할 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61B 5/4244 (2013.01)

A61B 5/4848 (2013.01)

A61K 49/10 (2013.01)

A61K 2123/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345321088

과제번호 2020R1I1A1A01065063

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 이공학학술연구기반구축(R&D)

연구과제명 당뇨병성 신부전증의 대사이상 진단 및 모니터링을 위한 초분극 13C MRS 영상진단
바이오마커 개발

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2020.06.01 ~ 2023.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711118650

과제번호 2020R1F1A1074342

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(과기정통부)(R&D)

연구과제명 비알콜성 지방간 동물모델에서 ACLY target 치료효과 모니터링을 위한 초분극 13C
MRS 생체 분자영상

기 여 율 1/2

과제수행기관명 연세대학교

연구기간 2020.06.01 ~ 2021.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

초분극화된 13C-피루베이트(pyruvate)가 주입된 대상체로부터 획득된 13C-피루베이트 대사물질인 13C-알라닌 및 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 획득하는 단계;

상기 획득된 13C-알라닌 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적과 13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 하기 식 1에 대입하여 13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율을 계산하는 단계; 및

상기에서 계산된 식 1의 13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율을 계산한 값이 대조군에 비해 낮은 경우, 상기 대상체는 ATP 시트르산 분해효소(ATP citrate lyase; ACLY)의 활성화 정도가 높아 ACLY 억제제에 대한 감수성이 높을 것으로 예측하는 단계를 포함하는, 비알코올성 지방간 질환의 치료를 위한 ACLY 억제제 감수성에 관한 정보를 제공하는 방법;

[식 1]

13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율=(13C-알라닌의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적)/(13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적)

청구항 8

삭제

청구항 9

제 7항에 있어서,

상기 방법은, 계산된 상기 식 1의 13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율을 계산한 값이 0.70 내지 0.82의 유리수의 값 이하인 경우, 상기 대상체는 ACLY 억제제에 대한 감수성이 높을 것으로 예측하는 단계를 추가로 포함하는, 비알코올성 지방간 질환의 치료를 위한 ACLY 억제제 감수성에 관한 정보를 제공하는 방법.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 지방간 질환을 진단하고, 더 나아가 지방간 질환의 치료제를 스크리닝하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비알코올성 지방간 질환 (Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)은 음주나 지방간을 초래할 수 있는 다른 원인이 없음에도 알코올성 간 질환과 유사한 조직학적 소견을 보이는 질환으로 단순 지방간 (simple steatosis), 비알코올 지방간염 (nonalcoholic steatohepatitis; NASH), 간 섬유화와 최종적인 간경변증을 포함하는 일련의 질환군이다. 그러나 지방간염 및 섬유화 정도에 따라 예후에 큰 차이를 보이기 때문에 이들 환자에서 지방간염과 섬유화 동반 여부를 확인하는 것은 임상적으로 매우 중요하며 현재까지 이를 위한 가장 좋은 방법은 간 생검이다. 그러나 간 생검은 침습적 성격으로 인한 합병증 발생의 위험성, 표본 오류 (sampling error), 고비용 등의 이유로 모든 NAFLD 환자에서 시행하기는 현실적으로 어려우며 또한 불필요하기도 하다.

[0003] 비침습적인 방법으로 간 기능 검사로 흔히 사용되고 있는 아스파테이트 아미노전이효소(aspartate aminotransferase; AST), 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase; ALT), 알칼리 인산분해효소(alkaline phosphatase; ALP), 감마글루타밀 전이효소(gamma-glutamyl-transpeptidase; GGT) 등의 혈청검사를 이용하는 것으로 NAFLD 환자에서 약간 증가하는 소견을 보이기도 한다. 하지만 AST, ALT가 정상 상한치의 5 배 이상 증가하는 경우는 드물며 NASH 환자의 3 분의 2 이상에서는 정상 범위 내에서 변화를 보이므로 이를 이용한 진단에는 한계가 있다.

[0004] 복부 초음파 검사는 안전성, 반복성 및 경제적인 장점으로 인해 NAFLD의 영상학적 진단에 우선적으로 가장 많이 이용되고 있지만 결과가 시술자에 의존적이어서 시술자간 차이가 있을 수 있고 지방 침윤의 정량적 측정이 불가능 하며 NASH와 간섬유화 진단에는 민감도와 특이도가 떨어진다는 치명적 제한점이 있다. 최근에는 순간탄성측정법(transient elastography)을 통해 탄력도를 측정하여 간 섬유화를 추정하는 영상법이 각광을 받고 있지만 복부 비만인 NAFLD 환자에서는 기술적으로 제대로 시행할 수 없다는 한계가 있으며, ALT가 높거나 지방증이 있는 경우 순간탄성측정 (transient elastography) 결과에 영향을 미칠 수 있고 관찰자 내 변동성이 보고되는 등의 제한점이 있다. 이를 보완하여 자기 공명 탄성 검사 (Magnetic resonance elastography; MRE)는 비만인 NAFLD 환자에서 중등도 이상의 섬유화를 진단하는데 유용하며 단순 지방증은 정상 대조군과 같은 간의 경직도를 보인다는 새로운 연구도 발표되었지만 표준 진단법으로 자리잡기에는 염증 피사 반응과 섬유화를 진단할 수 없다는 단점이 존재한다.

[0005] 최근 과분극 13C (Hyperpolarized 13C) 영상법은 지방사선 물질을 이용하여 세포 내 대사 반응에 따른 산물을 MRI를 이용하여 실시간 검출함으로써 좀 더 실제적인 물질대사를 영상화 하는 기법으로 그 중요성이 대두되고

있다.

[0006] 본 발명자들은 비알코올성 지방간 질환의 주요 원인이 당뇨병이므로 당뇨병 동물 모델에서 13C-피루베이트를 대사영상을 시행하고 이를 이용함으로써 비알코올성 지방간 질환을 진단하거나 또는 비알코올성 지방간 치료제의 치료 효과를 평가하는 방법으로서의 영상 기법을 구축하였다.

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-1516634호

(특허문헌 0002) 한국 등록특허 제10-1789425호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명의 일 목적은 지방간 중에 특히 비알코올성 지방간을 진단하기 위한 조성물을 제공하고자 한다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 지방간 중에 특히 비알코올성 지방간 진단에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 지방간 중에 특히 비알코올성 지방간 치료제 감수성을 진단하기 위한 조성물을 제공하고자 한다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은 지방간 중에 특히 비알코올성 지방간 치료제 감수성에 관한 정보를 제공하는 방법을 제공하고자 한다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 지방간 중에 특히 비알코올성 지방간 치료제의 스크리닝 방법을 제공하고자 한다.
- [0012] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0013] 이하, 본원에 기재된 다양한 구체예가 도면을 참조로 기재된다. 하기 설명에서, 본 발명의 완전한 이해를 위해서, 다양한 특이적 상세 사항, 예컨대, 특이적 형태, 조성물 및 공정 등이 기재되어 있다. 그러나, 특정의 구체예는 이들 특이적 상세 사항 중 하나 이상 없이, 또는 다른 공지된 방법 및 형태와 함께 실행될 수 있다. 다른 예에서, 공지된 공정 및 제조 기술은 본 발명을 불필요하게 모호하게 하지 않게 하기 위해서, 특정의 상세사항으로 기재되지 않는다. "한 가지 구체예" 또는 "구체예"에 대한 본 명세서 전체를 통한 참조는 구체예와 결부되어 기재된 특별한 특징, 형태, 조성 또는 특성이 본 발명의 하나 이상의 구체예에 포함됨을 의미한다. 따라서, 본 명세서 전체에 걸친 다양한 위치에서 표현된 "한 가지 구체예에서" 또는 "구체예"의 상황은 반드시 본 발명의 동일한 구체예를 나타내지는 않는다. 추가로, 특별한 특징, 형태, 조성, 또는 특성은 하나 이상의 구체예에서 어떠한 적합한 방법으로 조합될 수 있다.
- [0014] 명세서 내에 특별한 정의가 없으면 본 명세서에 사용된 모든 과학적 및 기술적인 용어는 본 발명이 속하는 기술 분야에서 당업자에 의하여 통상적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가진다.
- [0016] 1. 지방간 질환의 진단 용도
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에 따르면, 지방간 질환을 진단하기 위한 조성물에 관한 것이다.
- [0018] 본 발명에서 상기 진단용 조성물은 초분극화된 13C-피루베이트(pyruvate)를 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0019] 본 발명에서 상기 "13C-피루베이트(pyruvate)"란 카복실산과 케톤 작용기를 가진 피루베이트에 지방산성 동위원소인 13C으로 표지된 것을 말하며, 알라닌 또는 락테이트 등과 같은 대사물질로 전환되는 양을 측정하기 위한 용도로 사용되는 것일 수 있다. 고체 상태의 13C-피루베이트는 염기가 첨가된 완충용액에 용해됨으로써 액체 상태의 13C-피루베이트로 전환되며, 상기 완충용액으로는 인산염 완충액이 사용될 수 있으며, 보다 바람직하게는

트리스(Tris)가 사용될 수 있고, 염기로는 탄산나트륨(Na_2CO_3) 수용액 또는 탄산수소나트륨(NaHCO_3) 수용액이 사용될 수 있으며, 보다 바람직하게는 수산화나트륨(NaOH) 수용액이 사용될 수 있다. 이 때, 완충용액에는 EDTA와 같은 킬레이팅제 및 삼투압을 유지하기 위한 염화나트륨(NaCl)이 포함될 수 있다. 상기 13C-피루베이트는 상용화된 제품으로, 예를 들어, Cambridge isotope laboratories사의 CLM-8077-1을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 본 발명에서 상기 대사물질은 기질과 산물들이 서로 피드백 회로를 형성하거나 유도하여 생성되는 물질을 통칭하며, 통상 생물학에서는 생화학적으로 효소들과 기질로 연결된 대사경로에 관여하여 발생된 산물을 말한다. 피루베이트는 해당과정을 통해 포도당으로부터 생성될 수 있으며, 포도당 신생합성을 통해 다시 탄수화물로 전환되거나, 아세틸 CoA와의 반응을 통해 지방산으로 전환될 수 있다. 특히, 본 발명에서의 대사물질은 피루베이트로부터 생성된 알라닌 또는 락테이트일 수 있다.

[0021] 본 발명에서 상기 "13C-피루베이트의 초분극화"는 동위원소가 농축된 ^3He , ^{129}Xe 또는 이러한 비활성 기체(noble gas)의 혼합물을 사용하거나; 매우 낮은 온도 및 높은 자기장에서 열역학적 평형에 의해 NMR 활성 핵으로 나누거나; 상자성 물질을 혼합한 후 자기장 내에서 물리적으로 회전시킴으로써 핵 스핀 편극화시키거나; 또는 DNP (동적 핵 분극화, dynamic nuclear polarization)을 통해 이루어질 수 있다. 즉, 초분극화된 13C-피루베이트를 얻기 위해 13C-피루베이트를 직접 분극화시키거나, 또는 13C-피루베이트를 분극화시킨 후 염기로 중화시킴으로써, 분극화된 13C-피루베이트를 초분극화된 13C-피루베이트로 전환시킬 수 있다. 바람직하게는, 본 발명은 초분극화된 13C-피루베이트를 얻기 위하여 DNP 방법을 이용할 수 있다. 보다 구체적으로, 분극화 화합물로 상자성 화합물을 사용하여 13C-피루베이트와 혼합하고, 마이크로파 방사선 형태의 에너지를 가하여 상자성 화합물을 여기시키고, 상자성 화합물의 쌍을 이루지 않은 전자로부터 13C-피루베이트의 13C의 핵으로 분극화가 이동함으로써 13C-피루베이트의 초분극화가 수행될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 상기 DNP 공정은 13C-피루베이트와 상자성 화합물의 혼합을 통해 이루어질 수 있고, 혼합되는 13C-피루베이트와 상자성 화합물의 몰 분율 비율은 3 내지 7 대 1의 비율로 수행될 수 있으며, 바람직하게는 5 대 1의 비율로 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, DNP 공정은 1 T 내지 25 T의 자기장 및 0.5 K 내지 8 K의 절대온도, 보다 바람직하게는 3.35 T의 자기장 및 4 K의 초저온에서 초분극장비를 이용하여 수행될 수 있다.

[0023] 본 발명에서 상기 DNP 공정에서 사용되는 상자성 화합물은 전이 금속, 유리 라디칼, 니트로시드 라디칼 등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 트리틸라디칼(trityl radical)이 포함되는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 트리틸 라디칼을 이용하는 경우 피루베이트에 용해시키기 위한 공용매로써의 물을 사용할 수 있다.

[0024] 본 발명에서 상기 초분극장비는 하이퍼센스(HyperSense)를 이용할 수 있으나, 당해 분야의 통상의 기술자에게 본 발명의 목적하는 효과를 발휘한다는 것이 자명한 범위 내에서 이에 제한 없이 모두 포함할 수 있다.

[0025] 본 발명에서 상기 "지방간 질환"은 정상 간의 경우 지방이 차지하는 비율은 5 % 이내인데, 이보다 많은 지방(주로 중성지방)이 간 내에 축적되어 발생하는 질환을 말한다. 지방간은 크게 과도한 음주로 인한 알코올성 지방간과 비만, 당뇨병, 고지혈증, 약물과 관련된 비알코올성 지방간으로 나눌 수 있다. 알코올성 지방간의 경우 알코올을 많이 섭취하게 되면 간에서 지방 합성이 촉진되고 정상적인 에너지 대사가 이루어지지 않아 발생하게 된다. 한편, 술을 마시지 않는 비알코올성 지방간 환자 중 간염이 관찰되는 경우가 있는데, 이러한 경우를 지방간과 구별하여 지방간염이라고 한다. 지방간염은 간에 지방이 축적될 뿐 아니라 간세포가 괴사되는 염증 징후가 동반된 경우를 말한다. 지방간과 지방간염이 진행되는 원인에 대하여는 밝혀진 바가 없다. 본 발명에서 지방간 질환은 알코올성 지방간 질환 또는 비알코올성 지방간 질환을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0026] 본 발명에서 상기 "비알코올성 지방간 질환(Nonalcoholic fatty liver disease; NAFLD)"은 음주나 지방간을 초래할 수 있는 다른 원인이 없음에도 알코올 간 질환과 유사한 조직학적 소견을 보이는 질환으로 단순 지방간(simple steatosis), 비알코올성 지방간염(nonalcoholic steatohepatitis; NASH), 간 섬유화와 최종적인 간경변증을 포함하는 일련의 질환 군에 해당한다. 비알코올성 지방간은 비만, 성인형 당뇨병, 고지혈증 등의 대사증후군과 연관되어 나타나는데 과도한 열량을 계속 섭취하게 되면 체내 지방세포 및 간에 지방이 축적되고 증가된 지방에서 간에 해로운 여러 가지 물질(사이토카인)이 분비되어 지방간염과 간경변증으로 진행하게 된다. 그 외에도 스테로이드, 소염진통제, 심장약 등의 약물이나 일부 한약 혹은 여러 가지 민간요법으로도 지방간이 될 수 있다. 지방간 질환의 진단에 조직검사가 반드시 필요한 것은 아니나, 지방간염으로 진행되었는지를 확인하기 위해서는 조직검사가 현재로서는 가장 정확한 검사이나 침습적인 검사에 해당하므로 개선된 진단 방법이 요구되는

실정이다. 본 발명에서 비알코올성 지방간 질환은 비알코올성 지방간, 비알코올성 지방간염 또는 간경변증 등을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0027] 본 발명에서 상기 "진단"은 지방간 질환 유무, 질환의 진행 정도 및 질환의 예후를 판정하는 것, 또는 상기 진단에 대한 정보를 제공하는 행위를 포함하는 넓은 개념으로 정의한다.
- [0029] 본 발명의 다른 구현 예에 따르면, 지방간 질환의 진단에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 상기 방법은 지방간 질환의 진단용 조성물이 주입된 대상체로부터 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상 및 13C-피루베이트 대사물질의 13C-자기공명분광영상을 획득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 상기 방법은 대상체로부터 획득된 13C-피루베이트 또는 13C-피루베이트 대사물질을 이용하여 지방간의 발생 유무를 선별하기 위한 것일 수 있다.
- [0032] 본 발명에서 13C-피루베이트 대사물질은 13C-락테이트(lactate) 및 13C-알라닌(alanine) 중 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 13C-락테이트(lactate) 및 13C-알라닌(alanine)일 수 있다.
- [0033] 본 발명에서 상기 "대상체"란 지방간이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 개체로, 인간을 포함하는 포유 동물일 수 있고, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0034] 본 발명에서 상기 방법은 추가로 13C-피루베이트의 대사체인 13C-락테이트 및 13C-알라닌의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 이용하여 아래의 식 1의 비율을 계산하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0035] [식 1]
- [0036]
$$13\text{C-락테이트에 대한 } 13\text{C-알라닌의 비율} = (13\text{C-알라닌의 } 13\text{C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적}) / (13\text{C-락테이트의 } 13\text{C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적})$$
- [0037] 본 발명의 상기 방법은 상기 식 1의 13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율을 계산한 값이 대조군에 비해 높은 경우 지방간 질환이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다. 여기서, 상기 대조군이란 지방간이 발생하지 아니한 정상 간 조직을 지닌 정상 대조군에서 얻어진 상기 식 1의 비율, 이의 중간 값 또는 평균 값이거나, 지방간 개체에서 얻어진 상기 식 1의 비율, 이의 중간 값 또는 평균 값일 수 있다.
- [0038] 본 발명에서 상기 지방간 질환은 알코올성 지방간 질환 또는 비알코올성 지방간 질환을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 비알코올성 지방간 질환으로 비알코올성 지방간, 비알코올성 지방간염 또는 간경변증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 본 발명의 정보 제공 방법에서 지방간, 비알코올성 지방간, 13C-피루베이트, 13C-피루베이트 대사물질 등에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.
- [0040] 본 발명의 13C-자기공명분광영상을 획득하기 위해서, 대상체를 자기공명분광기의 자석에 위치시킨 후, 13C-자기공명 RF 코일이 대상체의 간 영역을 덮도록 위치시키고, 그 후 대상체에 초분극화된 13C-피루베이트를 주사할 수 있으며, 주사 이후 60 초가 경과하기 전까지 대상체의 간에서 13C-자기공명분광영상(Averaged Spectrum)을 획득할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 13C-자기공명영상을 스펙트럼으로 영상화하기 위한 방법으로, 13C-피루베이트, 13C-알라닌 및 13C-락테이트의 자기공명분광영상에서 신호강도의 최대값으로 표준화시킬 수 있고, 기선(base line)과 전역 0 차 위상보정(Global zero order phasing)한 뒤, 각 대사체의 신호곡선의 최대값이 포함되도록 주파수 영역을 선택할 수 있다. 이로부터 13C-자기공명분광영상의 데이터는 13C-자기공명분광 형태로 나타나며, 13C-피루베이트, 13C-알라닌 및 13C-락테이트는 기 알려진 각각의 공명주파수에 따라 독특한 스펙트럼을 나타내고, 분광주파수에서 신호강도의 최대값을 나타낸다. 13C-자기공명분광영상을 검출하기 위하여 13C-자기공명 RF-코일이 사용되는데 이때, 13C-자기공명 RF-코일은 영상부위에 최적화된 13C-자기공명 RF-코일이 사용될 수 있고, 본 발명에서는 직경 20 mm의 13C 듀얼 튠 서페이스 트랜스미트/리시브 코일(dual-tuned surface transmit/receive coil)을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명은 비방사성 동위원소인 13C으로 표지된 13C-피루베이트를 영상 프로브로 사용하는 자기공명분광영상법을 통해 간에서 13C-피루베이트가 13C-알라닌 또는 13C-락테이트로 전환되는 세포 내 대사작용을 실시간으로 영

상화하여 간에서의 대사 활성도를 정량하는 것으로, 보다 구체적으로, 13C-피루베이트가 13C-알라닌으로 전환된 양 또는 13C-피루베이트가 13C-락테이트로 전환된 양을 그래프로 그린 후 일정 시간 동안 시간대 별로 각 그래프의 면적을 구하여 단위 시간당 알라닌/피루베이트 또는 알라닌/락테이트의 기울기로 간에서의 대사반응을 추적하는 13C-자기공명분광영상을 통해 지방간 질환을 진단할 수 있다.

[0044] 2. 지방간 질환 치료제의 감수성 진단 용도

[0045] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 지방간 질환 치료제의 감수성을 진단하기 위한 조성물에 관한 것이다.

[0046] 본 발명의 상기 진단용 조성물은 초분극화된 13C-피루베이트(pyruvate)를 유효성분으로 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에서 상기 "13C-피루베이트(pyruvate)"는 알라닌 또는 락테이트 등과 같은 대사물질로 전환되는 양을 측정하기 위한 용도로 사용되는 것일 수 있다. 상기 13C-피루베이트는 상용화된 제품으로, 예를 들어, Cambridge isotope laboratories사의 CLM-8077-1을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0048] 본 발명에서 상기 대사물질은 피루베이트로부터 생성된 알라닌 또는 락테이트일 수 있다.

[0049] 본 발명에서 상기 "지방간 질환 치료제"는 지방산 합성에 중추적인 아세틸 CoA (acetyl CoA)를 제공하는 역할을 하는 ATP 시트르산 분해효소(ATP citrate lyase; ACLY) 단백질과 직접 상호작용하거나 간접적으로 작용하여 ACLY 단백질의 활성을 음성적으로 조절하는 물질을 의미한다. 예를 들면, 상기 치료제는 ACLY의 단백질 발현 또는 이의 활성을 억제하는 물질 또는 상기 ACLY 단백질을 코딩하는 유전자의 발현 억제제일 수 있고, 구체적인 예로는 BMS-303141일 수 있으나, 지방산 합성과 관련하여 타겟팅하는 매커니즘을 지닌 물질에 해당한다면 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 본 발명에서 상기 "ATP 시트르산 분해효소(ATP citrate lyase; ACLY)"는 동물에서의 지방산 생합성에 중추적인 아세틸-CoA (acetyl-CoA)를 제공하는 역할을 하는 효소를 의미한다. 시트르산을 아세틸-CoA로 전환함으로써, 탄수화물 대사가 이루어진다. 상기 아세틸-CoA는 지방 생성 및 콜레스테롤 생성을 포함한 여러 중요한 생합성 경로에 사용되는 것으로 알려져있다.

[0051] 본 발명에서 상기 "치료제 감수성"이란 특정 치료제를 반복적으로 사용했을 때 해당 약물의 효과가 나타나는지 여부를 말하는 것으로, 예컨대 감수성이 높은 환자에게서 해당 치료제의 이전에 경험한 동일한 효과를 얻을 수 있는 상태가 나타나는 것을 말하며, 감수성이 낮은 환자에게서 이전에 경험한 동일한 효과를 얻기 위해서는 그 사용량을 늘리거나 사용 빈도를 증가시켜야 하거나 혹은 이전과 같은 용량의 물질을 투여해도 전과 똑같은 효과를 얻지 못하는 상태가 나타나는 것을 말한다. 환자의 대사 특성에 따라 특정 치료제의 치료 반응성이 다르게 나타나므로 본 발명은 13C-피루베이트로부터 전환된 대사물질을 활용하여 지방간 질환을 가진 환자에 대하여 치료제 선택 여부를 결정하는데 임상적으로 활용할 수 있다.

[0052] 본 발명의 감수성 진단용 조성물에서 지방간 질환, 비알코올성 지방간 질환, 13C-피루베이트, 13C-피루베이트 대사물질, 초분극화 등에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.

[0054] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 지방간 질환의 치료제 감수성에 관한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.

[0055] 본 발명의 상기 방법은 상기 감수성 진단용 조성물이 주입된 대상체로부터 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상 및 13C-피루베이트 대사물질의 13C-자기공명분광영상을 획득하는 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명의 상기 방법은 대상체로부터 획득된 13C-피루베이트 또는 13C-피루베이트 대사물질을 이용하여 지방간 치료제의 감수성 유무를 선별하기 위한 것일 수 있다.

[0057] 본 발명에서 상기 13C-피루베이트 대사물질은 13C-락테이트(lactate) 및 13C-알라닌(alanine) 중 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 13C-락테이트(lactate) 및 13C-알라닌(alanine)일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0058] 본 발명에서 상기 "대상체"란 지방간이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 개체로, 인간을 포함하는 포유 동물일 수 있고, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명에서 상기 방법은 추가로 13C-피루베이트의 대사체인, 13C-락테이트 및 13C-알라닌의 13C-자기공명분광

영상의 신호 곡선의 면적을 이용하여 아래의 식 1의 비율을 계산하는 단계를 포함할 수 있다.

[식 1]

13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율=(13C-락테이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적)/(13C-알라닌의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적)

본 발명에서 상기 방법은, 상기 식 1의 13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율을 계산한 값이 대조군에 비하여 낮은 경우, 상기 대상체는 ACLY의 활성화 정도가 높아 지방간 질환 치료제에 대한 감수성이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다. 여기서, 상기 대조군이란 지방간이 발생하지 아니한 정상 간 조직을 지닌 정상 대조군에서 얻어진 상기 식 1의 비율, 이의 중간 값 또는 평균 값이거나, 지방간 개체에서 얻어진 상기 식 1의 비율, 이의 중간 값 또는 평균 값일 수 있다.

또한, 본 발명에서 상기 방법은, 상기 식 1의 13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율을 계산한 값이 0.70 내지 0.82의 유리수의 값 이하인 경우, 상기 대상체는 ACLY의 활성화 정도가 높아 지방간 질환 치료제에 대한 감수성이 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다.

본 발명에서 상기 ACLY의 활성화 정도는 ACLY 발현량 대비 ACLY의 인산화된 정도 (pACLY/ACLY)를 계산함으로써 측정이 가능하며, ACLY는 지방산 합성에 필요한 아세틸 CoA를 제공하고 2탄당인 아세틸 CoA가 연결되어 지방산 (fatty acid)이 합성되므로 지방산 합성에 필수적인만큼 ACLY의 활성화 정도에 따라 간에서의 지방 축적이 더욱 증가될 것을 예상할 수 있다. 이를 통해 ACLY 활성화 정도가 높은 경우 간에서 지방 축적이 증가되어 예후가 나쁠 것으로 예측할 수 있으며, 상기 ACLY 활성화 정도로부터 지방간 질환의 치료제 감수성을 진단하는 데 이용 가능하다. 보다 구체적으로 ACLY 활성화 정도가 높을수록 상기 식 1의 13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율이 낮으며 지방간 질환 치료제에 대한 감수성이 높을 것으로 예측할 수 있다.

본 발명에서 상기 지방간 질환은 알코올성 지방간 질환 또는 비알코올성 지방간 질환을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 비알코올성 지방간 질환으로 비알코올성 지방간, 비알코올성 지방간염 또는 간경변증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명의 정보 제공 방법에서 지방간, 비알코올성 지방간, 13C-피루베이트, 13C-피루베이트 대사물질 등에 관한 기재는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기재를 생략한다.

본 발명의 13C-자기공명분광영상을 획득하기 위해서, 대상체를 자기공명분광기의 자석에 위치시킨 후, 13C-자기공명 RF 코일이 대상체의 간 영역을 덮도록 위치시키고, 그 후 대상체에 초분극화된 13C-피루베이트를 주사할 수 있으며, 주사 이후 60 초가 경과하기 전까지 대상체의 간에서 13C-자기공명분광영상(Averaged Spectrum)을 획득할 수 있다.

본 발명에서 13C-자기공명영상을 스펙트럼으로 영상화하기 위한 방법으로, 13C-피루베이트와 13C-알라닌의 자기공명분광영상에서 신호강도의 최대값으로 표준화시킬 수 있고, 기선(base line)과 전역 0 차 위상보정(Global zero order phasing)한 뒤, 각 대사체의 신호곡선의 최대값이 포함되도록 주파수 영역을 선택할 수 있다. 이로부터 13C-자기공명분광영상의 데이터는 13C-자기공명분광 형태로 나타나며, 13C-피루베이트 및 13C-알라닌은 기 알려진 각각의 공명주파수에 따라 독특한 스펙트럼을 나타내고, 분광주파수에서 신호강도의 최대값을 나타낸다. 13C-자기공명분광영상을 검출하기 위하여 13C-자기공명 RF-코일이 사용되는데 이때, 13C-자기공명 RF-코일은 영상부위에 최적화된 13C-자기공명 RF-코일이 사용될 수 있고, 본 발명에서는 직경 20 mm의 13C 듀얼 튠 서페이스 트랜스미트/리시브 코일(dual-tuned surface transmit/receive coil)을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.

본 발명은 비방사성 동위원소인 13C으로 표지된 13C-피루베이트를 영상 프로브로 사용하는 자기공명분광영상법을 통해 간에서 13C-피루베이트가 13C-알라닌 또는 13C-락테이트로 전환되는 세포 내 대사작용을 실시간으로 영상화하여 간에서의 대사 활성도를 정량하는 것으로, 보다 구체적으로, 13C-피루베이트가 13C-알라닌 또는 13C-락테이트로 전환된 양을 그래프로 그린 후 일정 시간 동안 시간대 별로 각 그래프의 면적을 구하여 단위 시간당 알라닌/락테이트의 기울기로 간에서의 대사반응을 추적하는 13C-자기공명분광영상을 통해 대사체의 지방간 질환 치료제에 대한 감수성 정도를 예측할 수 있다.

3. 지방간 질환 치료용 약물의 스크리닝 방법

본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, 지방간 질환 치료 약물의 스크리닝 방법에 관한 것이다.

- [0073] 본 발명의 스크리닝 방법은, 후보 물질이 투여된 대상체에 대하여 초분극화된 13C-피루베이트(pyruvate)를 포함하는 조성물을 투여한 뒤 13C-피루베이트의 자기공명분광영상 및 상기 13C-피루베이트의 대사물질의 13C-자기공명분광영상을 획득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명의 상기 방법은 후보 물질이 투여된 대상체로부터 획득된 13C-피루베이트 또는 13C-피루베이트 대사물질을 이용하여 지방간 질환 치료용 약물을 스크리닝하기 위한 것일 수 있다.
- [0075] 본 발명에서 상기 13C-피루베이트 대사물질은 13C-락테이트(lactate) 및 13C-알라닌(alanine) 중 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 13C-락테이트(lactate) 및 13C-알라닌(alanine)일 수 있다.
- [0076] 본 발명에서 상기 "스크리닝"이란, 여러 물질로 이루어진 후보군으로부터 목적으로 하는 어떤 특정한 성질을 갖는 물질을 특정한 조작 또는 평가 방법으로 선별하는 것이다.
- [0077] 본 발명에서 상기 후보 물질은 지방간 질환에 대한 치료 효과가 있을 것으로 예측되는 물질로, 천연 화합물, 합성 화합물, RNA, DNA, 폴리펩티드, 효소, 단백질, 리간드, 항체, 항원, 박테리아 또는 진균의 대사 산물 및 생 활성 분자로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0078] 본 발명에서 상기 방법은 추가로 13C-피루베이트의 대사체인 13C-락테이트 및 13C-알라닌의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 이용하여 아래의 식 1의 비율을 계산하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0079] [식 1]
- [0080]
$$13\text{C-락테이트에 대한 } 13\text{C-알라닌의 비율} = (13\text{C-알라닌의 } 13\text{C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적}) / (13\text{C-락테이트의 } 13\text{C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적})$$
- [0081] 본 발명의 상기 방법은 상기 식 1의 13C-락테이트에 대한 13C-알라닌의 비율을 계산한 값이 후보 물질의 투여 전에 비해 감소한 경우, 상기 후보 물질을 지방간 질환의 치료용 약물로 판별하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0082] 본 발명에서 상기 지방간 질환은 알코올성 지방간 질환 또는 비알코올성 지방간 질환을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 비알코올성 지방간 질환으로 비알코올성 지방간, 비알코올성 지방간염 또는 간경변증을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0083] 본 발명의 스크리닝 방법에서 초분극화된 13C-피루베이트, 대사물질, 13C-자기공명분광 방법 및 지방간 등에 대한 기재는 상기에서 기재한 바와 동일하여, 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 생략한다.
- [0084] 본 발명의 13C-자기공명분광영상을 획득하기 위해서, 대상체를 자기공명분광기의 자석에 위치시킨 후, 13C-자기공명 RF 코일이 대상체의 간 영역을 덮도록 위치시키고, 그 후 대상체에 초분극화된 13C-피루베이트를 주사할 수 있으며, 주사 이후 60 초가 경과하기 전까지 대상체의 간에서 13C-자기공명분광영상(Averaged Spectrum)을 획득할 수 있다.
- [0085] 본 발명에서 13C-자기공명영상을 스펙트럼으로 영상화하기 위한 방법으로, 13C-피루베이트와 13C-알라닌의 자기공명분광영상에서 신호강도의 최대값으로 표준화시킬 수 있고, 기선(base line)과 전역 0 차 위상보정(Global zero order phasing)한 뒤, 각 대사체의 신호곡선의 최대값이 포함되도록 주파수 영역을 선택할 수 있다. 이로부터 13C-자기공명분광영상의 데이터는 13C-자기공명분광 형태로 나타나며, 13C-피루베이트 및 13C-알라닌은 기 알려진 각각의 공명주파수에 따라 독특한 스펙트럼을 나타내고, 분광주파수에서 신호강도의 최대값을 나타낸다. 13C-자기공명분광영상을 검출하기 위하여 13C-자기공명 RF-코일이 사용되는데 이때, 13C-자기공명 RF-코일은 영상부위에 최적화된 13C-자기공명 RF-코일이 사용될 수 있고, 본 발명에서는 직경 20 mm의 13C 듀얼 튠 서페이스 트랜스미트/리시브 코일(dual-tuned surface transmit/receive coil)을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0086] 본 발명은 지방사성 동위원소인 13C으로 표지된 13C-피루베이트를 영상 프로브로 사용하는 자기공명분광영상법을 통해 간에서 13C-피루베이트가 13C-알라닌 또는 13C-락테이트로 전환되는 세포 내 대사작용을 실시간으로 영상화하여 간에서의 대사 활성도를 정량하는 것으로, 보다 구체적으로, 13C-피루베이트가 13C-알라닌 또는 13C-락테이트로 전환된 양을 그래프로 그린 후 일정 시간 동안 시간대 별로 각 그래프의 면적을 구하여 단위 시간당 알라닌/락테이트의 기울기로 간에서의 대사반응을 추적하는 13C-자기공명분광영상을 통해 대사체의 지방간 질환 치료용 약물을 스크리닝할 수 있다.
- [0088] 4. 알라닌 아미노전이효소 (alanine aminotransferase; ALT) 활성 평가를 위한 진단 용도

- [0089] 본 발명의 또 다른 구현 예에 따르면, ALT 활성 평가를 위한 정보를 제공하는 방법에 관한 것이다.
- [0090] 본 발명의 상기 방법은 지방간 질환의 진단용 조성물이 주입된 대상체로부터 13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상 및 13C-피루베이트 대사물질의 13C-자기공명분광영상을 획득하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0091] 본 발명의 상기 방법은 대상체로부터 획득된 13C-피루베이트 또는 13C-피루베이트 대사물질을 이용하여 ALT 활성을 평가하기 위한 것일 수 있다.
- [0092] 본 발명에서 상기 13C-피루베이트 대사물질은 13C-락테이트(lactate) 및 13C 알라닌(alanine) 중 적어도 하나일 수 있고, 바람직하게는 13C 알라닌(alanine)일 수 있다.
- [0093] 본 발명에서 상기 "대상체"란 지방간이 발병하였거나 발병 가능성이 높은 개체로, 인간을 포함하는 포유 동물일 수 있고, 예를 들면, 인간, 래트, 마우스, 모르모트, 햄스터, 토끼, 원숭이, 개, 고양이, 소, 말, 돼지, 양 및 염소로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 바람직하게는 인간일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0094] 본 발명에서 상기 방법은 추가로 13C-피루베이트 및 이의 대사체인 13C-알라닌의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적을 이용하여 아래의 식 2의 비율을 계산하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0095] [식 2]
- [0096] 13C-피루베이트에 대한 13C-알라닌의 비율=(13C-알라닌의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적)/(13C-피루베이트의 13C-자기공명분광영상의 신호 곡선의 면적)
- [0097] 본 발명에서 상기 방법은 상기 식 2의 13C-피루베이트에 대한 13C-알라닌의 비율을 계산한 값이 대조군에 비해 높은 경우 ALT 활성도가 높을 것으로 예측하는 단계를 더 포함할 수 있다. 여기서, 상기 대조군이란 지방간이 발생하지 아니한 정상 간 조직을 지닌 정상 대조군에서 얻어진 상기 식 2의 비율, 이의 중간 값 또는 평균 값이거나, 지방간 개체에서 얻어진 상기 식 2의 비율, 이의 중간 값 또는 평균 값일 수 있다.
- [0098] 본 발명의 방법은 간 조직에서의 ALT의 활성이 증가되어 있는지를 비침습적인 방법으로 진단 또는 평가할 수 있다는 점에서 혈액 내 ALT를 측정하는 것과 차별점이 존재한다.
- [0099] 본 발명의 정보 제공 방법에서 13C-피루베이트, 13C-피루베이트 대사물질 등에 관한 기제는 앞서 기재된 바와 중복되어 명세서의 과도한 복잡을 피하기 위하여 이하 그 자세한 기제를 생략한다.
- [0100] 본 발명의 13C-자기공명분광영상을 획득하기 위해서, 대상체를 자기공명분광기의 자석에 위치시킨 후, 13C-자기공명 RF 코일이 대상체의 간 영역을 덮도록 위치시키고, 그 후 대상체에 초분극화된 13C-피루베이트를 주사할 수 있으며, 주사 이후 60 초가 경과하기 전까지 대상체의 간에서 13C-자기공명분광영상(Averaged Spectrum)을 획득할 수 있다.
- [0101] 본 발명에서 13C-자기공명영상을 스펙트럼으로 영상화하기 위한 방법으로, 13C-피루베이트와 13C-알라닌의 자기공명분광영상에서 신호강도의 최대값으로 표준화시킬 수 있고, 기선(base line)과 전역 0 차 위상보정(Global zero order phasing)한 뒤, 각 대사체의 신호곡선의 최대값이 포함되도록 주파수 영역을 선택할 수 있다. 이로부터 13C-자기공명분광영상의 데이터는 13C-자기공명분광 형태로 나타나며, 13C-피루베이트 및 13C-알라닌은 기 알려진 각각의 공명주파수에 따라 독특한 스펙트럼을 나타내고, 분광주파수에서 신호강도의 최대값을 나타낸다. 13C-자기공명분광영상을 검출하기 위하여 13C-자기공명 RF-코일이 사용되는데 이때, 13C-자기공명 RF-코일은 영상부위에 최적화된 13C-자기공명 RF-코일이 사용될 수 있고, 본 발명에서는 직경 20 mm의 13C 듀얼 튠 서페이스 트랜스미트/리시브 코일(dual-tuned surface transmit/receive coil)을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0102] 본 발명은 비방사성 동위원소인 13C으로 표지된 13C-피루베이트를 영상 프로브로 사용하는 자기공명분광영상법을 통해 간에서 13C-피루베이트가 13C-알라닌으로 전환되는 세포 내 대사작용을 실시간으로 영상화하여 간에서의 대사 활성도를 정량하는 것으로, 보다 구체적으로, 13C-피루베이트가 13C-알라닌으로 전환된 양을 그래프로 그린 후 일정 시간 동안 시간대 별로 각 그래프의 면적을 구하여 단위 시간당 알라닌/피루베이트의 기울기로 간에서의 대사반응을 추적하는 13C-자기공명분광영상을 통해 ALT 활성을 평가할 수 있다.

발명의 효과

- [0103] 본 발명은 영상획득시간이 비교적 짧은 비방사성 동위원소인 13C(탄소-13) 프로브를 통한 자기공명분광영상을 이용하여 생체 내 간 조직에서의 간 대사반응을 추적하여 ALT 효소 활성도를 예측함으로써 비알코올성 지방간

질환을 방사선 피폭 없이 비침습적으로 진단이 가능하다. 13C-피루베이트의 알라닌 또는 락테이트로의 전환율, 전환된 알라닌/락테이트 비율을 계산하여 비알코올성 지방간을 조기에 진단하고, 치료할 수 있는 기회를 제공하며, 더 나아가 비알코올성 지방간 치료제를 스크리닝할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0104]

도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 정상 대조군인 C5BL6 동물과 당뇨병성 지방간이 발생한 동물의 간에서 획득한 초분극 13C-피루베이트(pyruvate) MRS 영상 결과를 확인한 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 주입된 13C-피루베이트로부터 생성된 13C-락테이트의 비율(Lac/Pyr ratio(A)), 주입된 13C-피루베이트로부터 생성된 13C-알라닌의 비율(Ala/Pyr ratio(B)) 및 락테이트 대비 알라닌으로 전환되는 선호도를 계산한 Ala/Lac ratio(C)의 결과를 MRS 영상 스펙트럼을 분석하여 확인한 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 대조군과 당뇨병 동물 모델의 간에서 측정된 알라닌과 락테이트의 양을 측정한 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 혈중(A, C)에서와 간 조직(B, D)에서 ALT와 AST를 측정된 결과를 확인한 도이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 대조군과 당뇨병 동물 모델에 BMS-303141 약물을 경구 투여한 뒤 시간에 따른 혈당 변화량을 측정한 도이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 대조군과 당뇨병 동물 모델에 BMS-303141 약물 투여 전 후의 초분극 13C-피루베이트 대사 영상을 수행한 결과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 약물 반응성을 확인하기 위해 도 6에서 약물 투여 전 후의 초분극 13C-피루베이트 대사 영상을 수행한 결과에 따른 스펙트럼을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 비알코올성 지방간 질환 동물 모델의 간에서 ACLY의 단백질의 활성 정도를 측정된 결과를 나타낸 도이다.

도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른, ACLY의 활성도와 13C 알라닌/락테이트 비율(13C alanine/lactate ratio)과의 관계를 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0105]

이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0107]

준비예: 실험재료의 준비 및 당뇨병 동물 모델의 제조

[0108]

13C-피루베이트(13C-pyruvate)는 캠브리지 이소테크실험실(Cambridge isotechLaboratory)로부터 구입하여 실험에 사용하였다. 본 발명의 발명자들은 동물 모델로 대표적인 당뇨병 동물 모델인 db/db mouse를 중앙실험동물에서 6 주령의 동물을 구입하였고, 1 주 간의 순화 기간을 거쳤다. 음수의 공급은 자율적으로 공급되도록 하였으며, 낮과 밤의 주기는 12 시간으로 하였다. 모든 실험 절차는 국립보건원(National Institutes of Health; NIH)의 동물실험에 관한 가이드라인에 따라 수행되었으며, 연세대학교 의과대학 실험동물 윤리위원회의 검토 하에 진행하였다.

[0110]

실시예 1: 13C-피루베이트의 주입

[0111]

75 mM의 13C-피루베이트(cambridge isotope laboratories 사의 CLM-8077-1)를 15 mM의 트리틸 라디칼(Trityl radical)과 섞어 충분히 녹여 준 후에 2 회 워터 배스(water bath)에서 분산(sonication)시켜서 피루베이트와 트리틸 라디칼이 충분히 잘 섞이도록 하였다. 실험하기 전에 1.5 M의 Doctarem[®]을 혼합하여 하이퍼센스(Hypersense) 장비를 이용하여 초저온에서 초분극화 과정을 통하여 13C 시그널을 증폭시켰다. 증폭된 13C-피루브산은 1 M Tris-HCl, 1 M NaCl, 2 g/L EDTA, 1 M NaOH 조성의 버퍼로 녹인 후에 상기 마우스 모델의 꼬리 정맥(tail vein)을 통하여 체내로 주입시켰다.

[0113]

실시예 2: MRI를 이용한 피루베이트 및 대사체 스펙트럼의 확인

- [0114] MRI를 이용하여 각 피루베이트 및 주요 대사체인 락테이트, 알라닌의 스펙트럼을 획득하기 위하여 마우스의 간에 $1H$ - ^{13}C dual-tuned mouse body transmit/receive coil (20mm diameter)과 9.4T Bruker MRI를 이용하여 각각의 스펙트럼에 따른 대사체(metabolite)의 신호(signal)를 획득하였다. 각 피루베이트의 대사체는 본 발명자들이 개발한 프로그램을 이용하여 automatic phasing, base line subtraction, frequency correction을 시행하여 유효한 스펙트럼을 획득하였다.
- [0116] **실시예 3: 대사전환 비율(Metabolic rate)의 측정**
- [0117] 정맥으로부터 주입된 ^{13}C -피루베이트는 세포 내에 존재하는 락테이트 탈수소효소(lactate dehydrogenase enzyme; LDH)에 의해 락테이트로 대사되고 알라닌 아미노전이효소(alanine aminotransferase; ALT)에 의해 알라닌으로 전환된다. 체내로 주입된 ^{13}C -피루베이트는 1 초마다 피루베이트, 락테이트, 알라닌의 스펙트럼을 얻었다. 주입된 피루베이트에 비해 락테이트로 전환되는 양은 1 초부터 108 초까지 각 신호(signal)의 합으로 그 래프화 하였다(도 1 참조).
- [0118] 상기 도 1을 참조하면 정상 대조군인 C5BL6 동물과 당뇨병성 지방간이 발생한 동물의 간에서 획득한 초분극 ^{13}C -피루베이트 MRS 영상결과로 ^{13}C -피루베이트로부터 ^{13}C -락테이트, ^{13}C -알라닌으로 전환되는 것을 볼 수 있다. 당뇨병 동물 모델의 간에서는 ^{13}C -알라닌의 피크(peak)가 현저하게 증가되어 있는 것이 특징적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다.
- [0119] 본 발명자들은 추가적으로 스펙트럼의 각 대사 피크(peak)를 이용하여 ^{13}C 락테이트/피루베이트 피크 비율(^{13}C lactate/pyruvate peak ratio), ^{13}C 알라닌/피루베이트 피크 비율(^{13}C alanine/pyruvate peak ratio), ^{13}C 알라닌/락테이트 피크 비율(^{13}C alanine/lactate peak ratio)을 구하였다(도 2 참조).
- [0120] 상기 도 2를 참조하면, 도 1에서 획득한 스펙트럼을 분석한 결과로 주입된 ^{13}C -피루베이트로부터 생성된 ^{13}C -락테이트의 전환 비율 (A; Lac/Pyr ratio), ^{13}C -알라닌으로 생성된 비율 (B; Ala/Pyr ratio), 그리고 ^{13}C -락테이트 대비 ^{13}C -알라닌으로 전환되는 선호도를 계산한 (C; Ala/Lac ratio)의 결과를 나타내었다. 알라닌/락테이트 비율(Alanine/lactate ratio)로 계산했을 때 알라닌/피루베이트 비율(alanine/pyruvate ratio)보다 훨씬 더 유의미하게 증가되어 있으므로 이는 곧 비알코올성 지방간 질환의 진단 영역에서는 알라닌/락테이트 비율을 이용하는 것이 더 좋을 수 있음을 나타낸다고 할 것이다. 또한, 도 3을 참조하면 대조군과 당뇨병 동물 모델의 간에서 측정된 알라닌과 락테이트의 양을 측정된 것으로 당뇨병성 지방간 그룹의 간에는 알라닌의 양과 락테이트의 양이 모두 증가되어 있는 것을 확인할 수 있었다. 이는 비알코올성 지방간에서는 피루베이트 대사산물인 락테이트와 알라닌을 생성하는 대사가 모두 증가되었지만, 초분극 ^{13}C -피루베이트 대사 영상에서는 ^{13}C -알라닌을 생성하는 대사반응을 더 선호하여 ^{13}C -알라닌의 생성을 증가시키는 결과가 나타남을 확인할 수 있었다.
- [0122] **실시예 4: 초분극 ^{13}C -피루베이트 대사영상의 진단 능력 검증**
- [0123] 혈액과 간 조직에서 ALT/AST 측정하여 비교함으로써 초분극 ^{13}C -피루베이트 대사영상의 진단 능력을 검증하고자 하였다. 약물 투여 및 이미징 실험이 종료된 후 1 달 후에 18 시간 금식 후 안락사 시킨 후에 복대정맥에서 혈액을 채취하여 EDTA 튜브에 담은 후 원심분리 기기(centrifuge)를 이용하여 혈장을 분리한 후 혈장 속의 ALT 및 AST를 측정하였으며, 이와 함께 이들 동물의 간 조직을 적출하여 ALT 및 AST 효소 활성도를 측정하였다. 이때 ALT는 Biovision Cat 752-100, AST는 Biovision Cat 753-100를 이용하여 제품에서 제공하는 실험 가이드라인에 따라 측정하였다.
- [0124] 상기 ALT와 AST를 혈중(A, C)에서와 간 조직(B, D)에서 측정한 결과를 도 4에 나타내었으며, 구체적으로 당뇨병 동물 모델에서는 AST만 혈중에서 증가하였으나 간 조직에서는 ALT, AST가 모두 증가되어 있어 글루타민 트랜스퍼레이스(glutamine transaminase) 대사 반응이 증가되었음을 나타낸다. 간 조직에서 증가된 ALT 반응은 실제 초분극 ^{13}C -피루베이트 대사영상 결과와 일치하여 초분극 ^{13}C -피루베이트로부터 ^{13}C -알라닌으로의 전환이 증가되는 연구 결과와도 일치하는 것으로 확인되었다. 따라서, 초분극 ^{13}C -피루베이트 대사영상은 비 침습적으로 ALT의 활성도를 측정할 수 있는 영상 방법으로 사용할 수 있음을 의미한다.
- [0126] **실시예 5: 초분극 ^{13}C -피루베이트 대사영상을 통한 약물 스크리닝의 우수성 확인**
- [0127] 간 조직에서의 락테이트 및 알라닌의 양의 측정을 통해 비알코올성 지방간 질환을 치료할 수 있는 약물을 스크리닝하거나 치료제의 치료 효과를 조기에 평가하는데 활용될 수 있는 우수성을 확인하고자 하였다. 먼저, 비알코올성 지방간 치료의 치료 타겟으로 제시되는 ATP 시트르산 분해효소(ATP citrate lyase; ACLY) 억제제를 스크리닝한 기존의 연구에서, 약물 스크리닝을 위해 1) 체중 변화, 2) 혈중 콜레스테롤, 3) 혈중 중성지방, 4) 혈당

변화를 측정하여 약물의 치료 효과를 확인하는 방법이 있었으나, 이는 비알코올성 지방간 질환 수치와 연관성이 있는 혈중 콜레스테롤과 혈중 중성지방에서 그 효과가 나타나는 것은 최소 25 일 후에나 그 효과가 발생하며 가장 빠르게 확인이 가능한 혈당의 감소는 7 일째가 되어야 나타나는 것을 확인한 내용이 개시되어 있다(Bioorg Med Chem Lett. 2007 Jun 1;17(11):3208-11.). 상기 문헌에 개시된 해당 약물(BMS-303141)을 이용하여 장기간 효과가 있지만 즉각적인 변화가 있는지를 보고자 가장 빠르게 효과가 나타난 혈당의 변화를 측정하여 2.5 mg/kg 용량으로 존대를 이용하여 경구투여 한 후 시간에 따른 혈당 변화를 측정한 결과 도 5에서 보는 바와 같이 당뇨병 동물 모델에서 투여 후 180 분 정도에 다소 감소되는 듯하였으나 유의미한 차이는 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0128] 이에 반하여 상기 레퍼런스에 포함된 약물(BMS-303141) 투여 전, 후에 따라 본 발명의 초분극 13C-피루베이트 대사영상을 시행하는 비교실험을 수행하였다. 마찬가지로 상기 약물을 2.5 mg/kg 용량으로 투여한 후 간에서 나타나는 효과를 비교하여 보았다. 이때, 간조직에서의 락테이트의 양은 Biovision Cat K607-100을 이용하여 측정하였고, 알라닌의 양은 Biovision Cat K652-100을 이용하여 제품에서 제공하는 실험 가이드라인에 따라 측정하였다. 비교 결과 도 6에서 보는 바와 같이 대조군 대비 당뇨병성 지방간 질환 동물 모델의 간에서는 13C-알라닌 피크(alanine peak)가 증가되어 있으며(B), 치료제를 투여한 후 2 내지 4 시간 사이에 측정한 결과에서는 13C-알라닌의 생성이 현저하게 감소되어 있는 것을 확인할 수 있었다(D).

[0129] 실시예 2에서와 마찬가지로 마우스의 간에 dual-tuned mouse body transmit/receive coil (20 mm diameter)과 9.4 T Bruker MRI를 이용하여 각각의 스펙트럼에 따른 대사체의 신호(signal)를 획득하였다. 각 피루베이트의 대사체는 본 발명자들이 개발한 프로그램을 이용하여 automatic phasing, base line subtraction, frequency correction을 시행하여 유효한 스펙트럼을 획득하였다. 도 7은 도 6의 스펙트럼을 분석한 결과를 나타낸 것으로 13C 락테이트/피루베이트 비율(13C lactate/pyruvate ratio)에는 군간 및 치료에 따른 효과가 발생하지 않는 반면(A), 13C 알라닌/피루베이트 피크 비율(13C alanine/pyruvate peak ratio)은 당뇨병 동물 모델의 간에서 증가되어 있으며 약물 투여 후에 현저하게 감소된 것을 볼 수 있었다(B). 특히, 도 7에서 알라닌/락테이트 피크 비율(Alanine/lactate peak ratio)로 계산한 결과 당뇨병 동물 모델에서 현저하게 증가되었던 것이 치료제 처리 후에는 감소된 것을 볼 수 있었다(C).

[0131] 실시예 6: 초분극 13C-피루베이트 대사영상을 통한 ACLY 약물 반응성 예측

[0132] ATP 시트르산 분해효소(ATP citrate lyase; ACLY)는 지방산 합성에 중추적인 아세틸 CoA(acetyl CoA)를 제공하는 역할을 하므로, 대조군에 비하여 당뇨병 동물 모델에서 pACLY/ACLY의 수준이 현저히 높게 측정되었는 바, 즉, ACLY가 매우 활성화되어 있는 것을 확인할 수 있었다(도 8 참조).

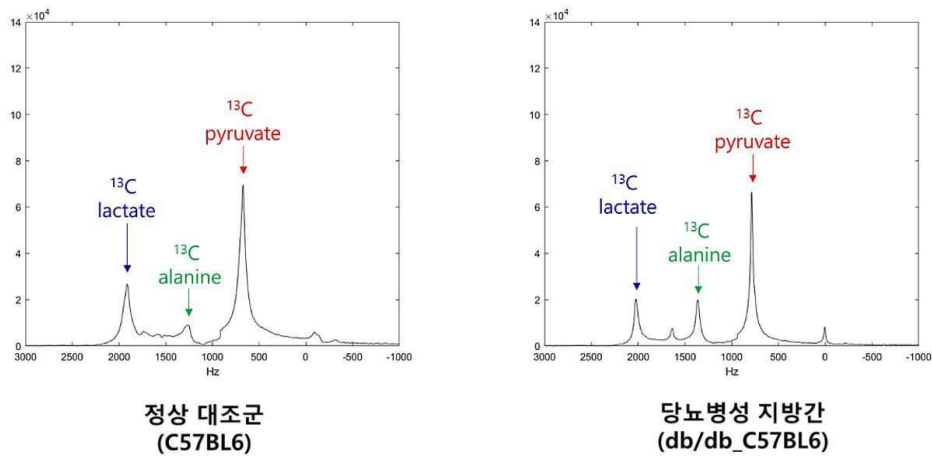
[0133] 이후, 초분극 13C-피루베이트 MRS를 이용하여 ACLY 치료제의 반응성을 예측할 수 있는지 확인하고자 하였다. 각 당뇨병 동물 모델에서 13C 알라닌/락테이트 비율(13C alanine/lactate ratio)과 ACLY 발현량 대비 pACLY의 발현량의 비율(pACLY/ACLY)의 상관 관계를 분석한 결과, 도 9에서 보는 바와 같이 ACLY의 활성화 정도가 높을수록 ACLY 억제제에 의해 13C 알라닌/락테이트 비율(13C alanine/lactate ratio)가 감소되는 것을 볼 수 있었다. 이는 곧 비알코올성 지방간 질환에서는 지방산 합성의 중추적인 역할을 하는 ACLY 단백질의 발현이 증가되므로 ACLY에 의해 생성되는 옥살로아세트산(oxaloacetate; OAA)과 피루베이트의 증가는 글루탐산을 αKG로 전환하는 효소인 ALT와 AST의 증가를 야기하는 것으로 볼 수 있으며, 초분극 13C-피루베이트 MRS를 통해 나타난 13C-알라닌의 생성량의 증가는 간에서 글루탐산(glutamate) 대사의 활성화를 반영하는 척도가 될 수 있음을 시사한다. 이처럼, 초분극 13C-피루베이트 MRS는 비알코올성 지방간 질환 치료제로 제시되는 여러 약물의 치료 반응 모니터링에 적용이 가능하다.

[0135] 상기 결과를 종합할 때, 초분극 13C-피루베이트 대사영상은 약물을 투여한 후 효과가 발생하기 전(도 5 참조)에 이미 약물이 반응하고 있다는 것을 매우 초기에 검증할 수 있는 가능성을 나타내므로, 이는 비알코올성 지방간 질환 치료제의 치료 효과를 평가하거나 개인 맞춤 치료 시 치료 반응을 평가하는 용도로 유용하게 활용할 수 있을 것으로 기대된다.

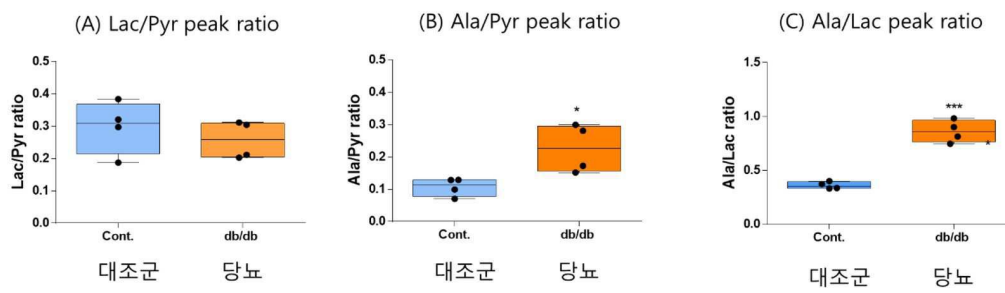
[0137] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

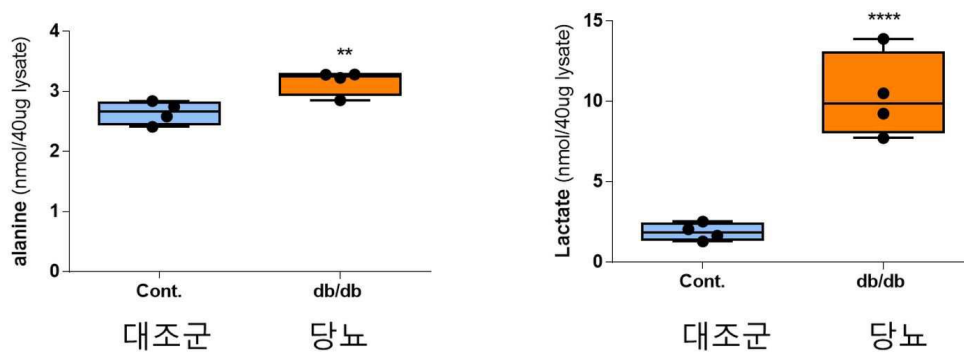
도면1



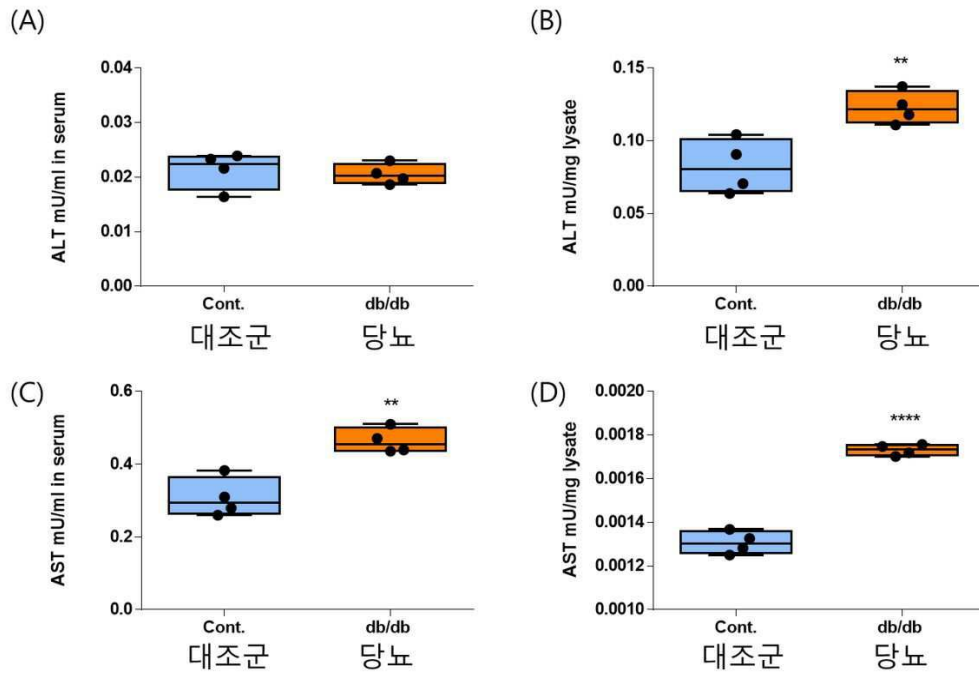
도면2



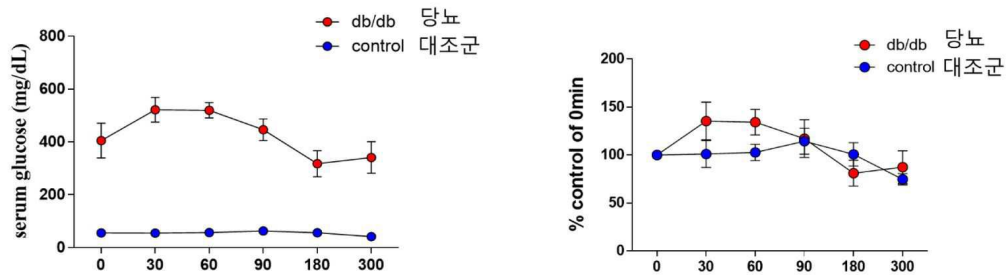
도면3



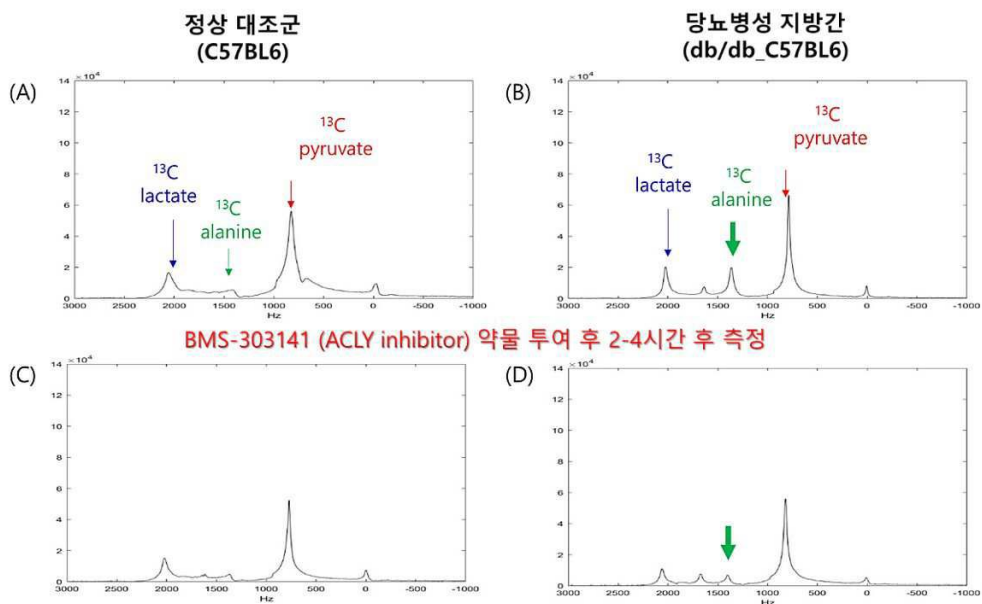
도면4



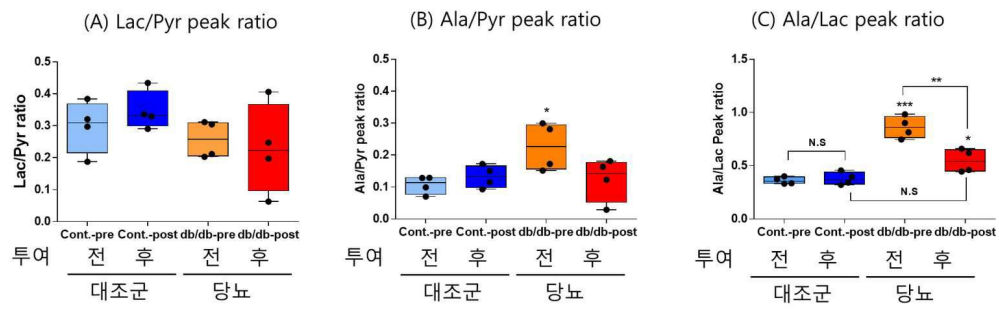
도면5



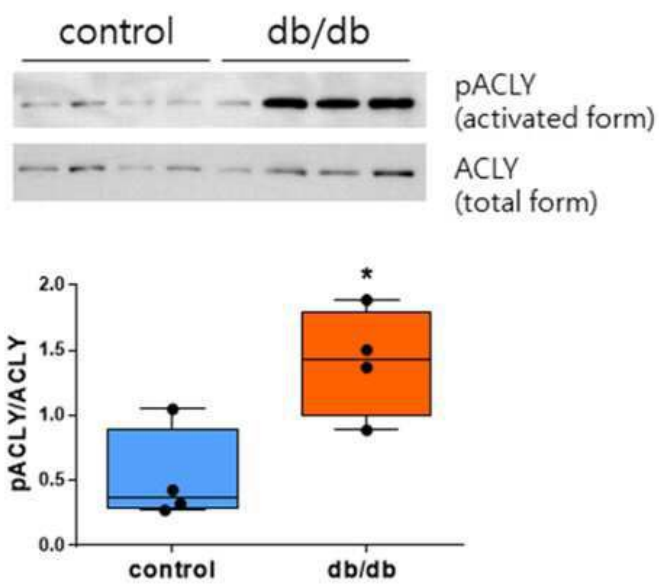
도면6



도면7



도면8



도면9

