

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0117893

(43) 공개일자 2020년10월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 49/10 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 49/10 (2013.01)

A61K 2123/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0040511

(22) 출원일자 2020년04월02일

심사청구일자 2020년04월02일

(30) 우선권주장

1020190039888 2019년04월05일 대한민국(KR)

(71) 출원인

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

주찬규

경기도 고양시 일산동구 산두로 88, 105동 202호 (마두동, 정발마을1단지건영빌라)

허용민

서울특별시 서초구 신반포로 270, 118동 302호(반포동, 반포자이아파트)

손혜영

서울특별시 서대문구 독립문로 10, 108동 604호(영천동, 독립문삼호아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 17 항

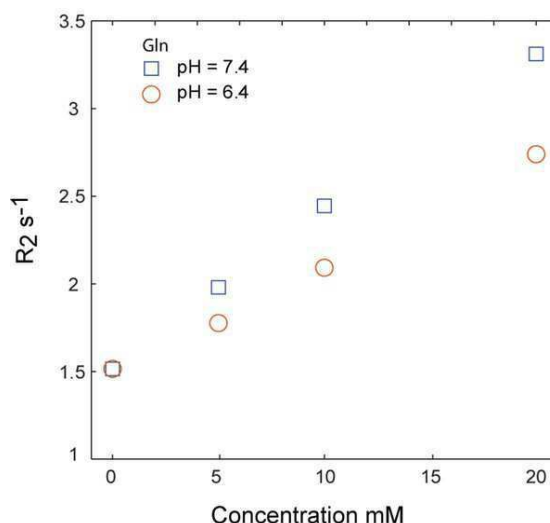
(54) 발명의 명칭 대사체를 유효성분으로 포함하는 신규한 조영제 조성물

(57) 요약

본 발명은 자기공명영상(MRI)용 조영제 조성물, 보다 구체적으로는 T_2 교환 (T_{2ex}) 자기공명영상용 조성물에 관한 것이다.

본 발명은 대사 이상, 구체적으로는 글루타민 대사 이상을 수반하는 다양한 질환 및 염증성 질환에 대한 진단적 정보를 제공할 수 있다. 본 발명은 대사과정을 실시간으로 보여주면서도 종래의 MRI 영상과 동일한 수준의 이미지 해상도를 가져 신뢰도 높은 비침습적 진단에 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1



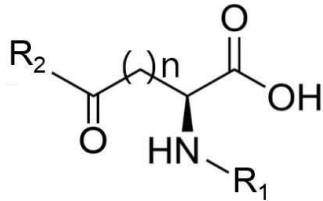
명세서

청구범위

청구항 1

다음의 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 자기공명영상(MRI)용 조영제 조성물:

화학식 1



상기 일반식에서,

n 은 1 내지 3의 정수이고, R_1 은 수소, 아세틸(acetyl) 또는 2-아미노프로판노일(2-aminopropanoyl)이며, R_2 는 아민 또는 하이드록시기이다.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 자기공명영상은 T_2 자기공명영상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 자기공명영상은 상기 화학식 1의 화합물과 물분자 간의 화학적 교환을 통해 신호를 발생시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 자기공명영상은 T_2 교환 (T_{2ex}) 자기공명영상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 화학식 1의 n 은 2인 것을 특징으로 하는 조성물.

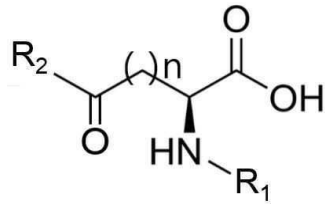
청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 L형의 입체화학을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

다음의 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 대사 활성부위 검출용 조성물:

화학식 1



상기 일반식에서,

n은 1 내지 3의 정수이고, R₁은 수소, 아세틸(acetyl) 또는 2-아미노프로판노일(2-aminopropanoyl)이며, R₂는 아민 또는 하이드록시기이다.

청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 화학식 1의 n은 2인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 L형의 입체화학을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제 7 항에 있어서, 상기 대사 활성부위는 암 조직, 근육 조직 및 뇌신경 조직으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 암은 교아종, 전립선암, 신장암, 비소세포 폐암, 유방암 및 뇌암으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

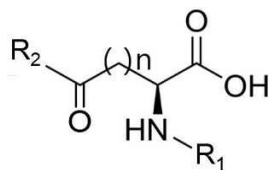
청구항 12

제 7 항에 있어서, 상기 조성물은 T₂ 교환 (T₂ex) 자기공명영상에 적용되어 대사 활성부위에 대한 영상신호를 제공하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

다음의 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 진단용 조성물:

화학식 1



상기 일반식에서,

n 은 1 내지 3의 정수이고, R_1 은 수소, 아세틸(acetyl) 또는 2-아미노프로파노일(2-aminopropanoyl)이며, R_2 는 아민 또는 하이드록시기이다.

청구항 14

제 13 항에 있어서, 상기 화학식 1의 n 은 2인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 15

제 14 항에 있어서, 상기 화학식 1의 화합물은 L형의 입체화학을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

제 13 항에 있어서, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 조르젠신드롬(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 베첷병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease), 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis), 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis), 궤양성대장염(ulcerative colitis), 이식편대숙주병(Graft-versus-host disease, GVHD) 및 크론병(Crohn's disease)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 17

제 13 항에 있어서, 상기 조성물은 T_2 교환 (T_{2ex}) 자기공명영상에 적용되어 대사 활성부위에 대한 영상신호를 제공하는 것을 특징으로 하는 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대사체, 구체적으로는 글루타민 및 이의 유도체를 유효성분으로 포함하는 조영제 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 암세포는 종종 생존을 위해 프로그래밍된 비정상적인 대사과정을 보인다. 글루타민은 혈액에서 가장 풍부한 아미노산이면서 동시에 암세포의 생존과 증식에 필수적인 핵심 영양분이다. 글루타민은 암세포에서 글루타미나제에 의해 탈아미노화되어 글루타메이트와 암모니아가 된다. 글루타메이트는 이후 알파-케토글루타레이트(α -KG)로 변환되어 TCA 사이클에 사용된다. 글루타민 대사는 생물에너지, 산화환원의 조절 및 거대분자 합성에 기여한다. 글루타민 분해(glutaminolysis)로 불리우는 이러한 과정은 치료제 개발에서 타겟이 되기 때문에 심도있게 연구되어 왔다. 따라서, 글루타민의 흡수 및 대사 활성을 측정할 수 있는 비침습적 조영기술의 개발은 중요한 과제이다.

[0004] ^{13}C 또는 ^{18}F 표지된 글루타민 유사체를 이용한 양전자 방출 단층촬영(Positron emission tomography, PET)은 글루타민의 대사 활성을 연구하는 중요한 도구이다. 과분극화(Hyperpolarized)된 ^{13}C MRI를 통해 ^{13}C 표지된 글루타민에서 분극화가 증가하면 이소시트레이트 디하이드로게나제 변이를 가지는 종양에서의 2-하이드록시글루타레이트 축적을 보여주는 영상이 획득될 수 있음을 알 수 있다.

[0005] 조영제는 대개 MRI에서 향상된 대비 영상을 제공한다. 가장 널리 사용되는 조영제 조성물은 물 양성자의 스핀 격자 이완시간(T_1)을 조절하는 Gd(III) 기반 조영제이다. T_2 교환(T_{2ex}) 조영제의 메카니즘은 전통적인 MRI 조영제와 근본적으로 상이한데, 이는 불안정한 양성자와 물 양성자 간의 화학적 교환을 이용한다. 화학적 교환은 확률적인 것으로, 벌크 물분자의 횡축 자기화(transverse magnetization)의 탈위상에 영향을 준다. 본 발명자들은 L-글루타민을 T_2 교환 조영제로 사용함으로써 종양에서의 글루타민 흡수 및 이의 대사활성이 실시간으로 영상화될 수 있음을 보였다.

[0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. 미국 공개특허공보 제2012-0189551호
(특허문헌 0002) 특허문헌 2. 미국 공개특허공보 제2007-0065520호

비특허문헌

[0010] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Jia Zhang, et al. Chem. Eur. J. 24, 15013 - 15018 (2018)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명자들은 인체 내 대량/장기간 투여가 가능하면서도 관심 조직에서의 대사 활성을 시계열적으로 실시간 영상화할 수 있어, 궁극적으로 다양한 질환에 대한 진단 정보를 제공할 수 있는 효율적인 조영제 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 자기공명영상용 조영제로 적용할 경우 화학식 1 화합물을 대사체로 하는 대사과정을 보여주는 실시간 영상을 획득할 수 있고, 이를 통해 대사체의 생체 내 흡수 및 소멸 특성의 주변 조직/ 정상 조직과의 차이점에 기반하여 환자의 표현형, 대사활성, 종양을 비롯한 다양한 질환의 발병률 높은 신뢰도로 측정할 수 있음을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 자기공명영상(MRI)용 조영제 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 대사 활성부위 검출용 조성물을 제공하는 데 있다.

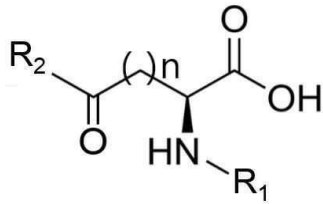
[0015] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 자기공명영상(MRI)용 조영제 조성물을 제공한다:

[0020] 화학식 1



[0021]

[0022] 상기 일반식에서,

[0023] n 은 1 내지 3의 정수이고, R_1 은 수소, 아세틸(acetyl) 또는 2-아미노프로판노일(2-aminopropanoyl)이며, R_2 는 아민 또는 하이드록시기이다.

[0024] 본 발명자들은 인체 내 대량/장기간 투여가 가능하면서도 관심 조직에서의 대사 활성을 시계열적으로 실시간 영상화할 수 있어, 궁극적으로 다양한 질환에 대한 진단 정보를 제공할 수 있는 효율적인 조영제 조성물을 개발하기 위하여 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물을 자기공명영상용 조영제로 적용할 경우 화학식 1 화합물을 대체로 하는 대사과정을 보여주는 실시간 영상을 획득할 수 있고, 이를 통해 대사체의 생체 내 흡수 및 소멸 특성의 주변 조직/ 정상 조직과의 차이점에 기반하여 환자의 표현형, 대사활성, 종양을 비롯한 다양한 질환의 발병을 높은 신뢰도로 측정할 수 있음을 발견하였다.

[0025] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다”는 본 발명의 조성물의 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.

[0026] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함한다. 구체적으로는, 본 발명의 대상체는 인간이다.

[0027] 본 명세서에서 용어 “유효량”은 대상체에게 투여했을 때 대상체의 표현형, 대사활성 및 질환 발병 여부 등에 대한 임상적 판단을 내리기에 충분한 정보를 제공할 수 있을 만큼의 유효한 조성물의 양을 의미하며, 이에 “진단학적 유효량(diagnostically effective amount)”으로 표현될 수 있다.

[0028] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 자기공명영상은 T_2 자기공명영상이다.

[0029] 본 명세서에서 용어 “ T_2 자기공명영상”은 물분자의 수소 핵스핀의 스핀-스핀 이완 과정에 영향을 주어 이완 시간 차이 신호를 증폭시킴으로써 물에 비해 어두운 조영효과(dark or negative contrast effect)를 나타내는 자기공명 영상을 의미한다. T_2 자기공명영상에는 예를 들어 T_2 강조영상(T_2 -weighted imaging), T_2^* 강조영상(T_2^* -weighted imaging), T_2 prepared 영상 및 T_2 -교환($T_2\text{ex}$) 영상을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 자기공명영상은 상기 화학식 1의 화합물과 물분자 간의 화학적 교환을 통해 신호를 발생시킨다. 구체적으로는, 본 발명의 자기공명영상은 T_2 -교환 ($T_2\text{ex}$) 자기공명영상이다.

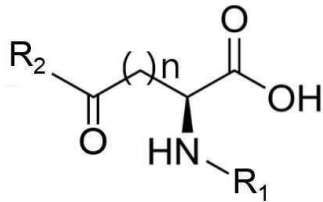
[0032] $T_2\text{ex}$ 자기공명영상은 초상자성 물질을 사용하는 T_2 자기공명영상과 달리 비금속의 반자성 물질이 사용되며, 물 분자와 양성자 교환을 일으킬 수 있는 양성자성 수소(protonic H)를 가지는 아민기, 아마이드기 또는 수산화기 등을 포함하는 조영물질을 이용하여, 화학적 교환을 통해 벌크 물분자의 횡축 자기화(transverse magnetization)의 탈위상에 영향을 주면서 신호를 발생시킨다. 반자성의 $T_2\text{ex}$ 조영제는 비금속 기반으로 독성이 낮아 다량 투여가 가능하고 대부분 다양한 용도로 인체에 투여되어오고 있던 물질로서, 이러한 안전성 및 다량, 장기 투여의 적합성은 지속적이고 집중적으로 병변 부위를 관찰하여 높은 신뢰도의 진단을 가능하게 하는 본원발명 특유의 장점이다.

[0033] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 화학식 1의 n 은 2이다.

[0034] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 화학식 1의 화합물은 L형의 입체화학을 가진다.

[0035] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 대사 활성부위 검출용 조성물을 제공한다:

[0036] 화학식 1



[0037]

[0038] 본 발명에서 이용되는 화학식 1의 화합물에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0039] 본 명세서에서 용어 “대사 활성 부위”는 주변 조직 또는 정상 조직에 비해 상기 화학식 1로 표시되는 대사체의 대사가 활발하여 흡수량 및 소모량은 증가하고 흡수(utake)된 후 소모(wash out)되기까지의 경로의 주기는 짧아진 부위를 의미한다. 이러한 부위의 검출은 암, 근육 손상, 뇌신경질환과 같이 대사 이상을 수반하는 질환의 발병여부를 판단하는 근거를 제공할 수 있으므로, 본 명세서에서 용어 “대사 활성부위 검출”은 “대사 이상을 수반하는 질환의 진단”으로 표현될 수도 있다.

[0040] 본 명세서에서 용어 “진단”은 특정 질병 또는 질환에 대한 대상체의 감수성(susceptibility)의 판정, 대상체가 특정 질병 또는 질환을 현재 가지고 있는 지 여부의 판정, 특정 질병 또는 질환에 걸린 대상체의 예후(prognosis)의 판정, 또는 치료 효능에 대한 정보를 제공하기 위하여 객체의 상태를 모니터링 하는 것을 모두 포함한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물을 이용하여 T₂ex 자기공명영상을 획득할 경우, 주변 정상부위와 구분되는 비정상적 대사 활성을 가지는 부위의 이미지를 통해 다양한 질환의 발병 여부에 대한 신뢰도 높은 정보를 얻을 수 있다.

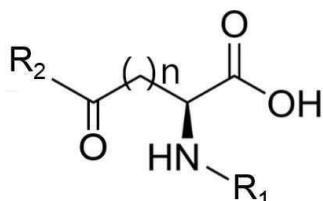
[0042] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 대사 활성부위는 암 조직, 근육 조직 및 뇌신경 조직으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0043] 대사체, 예를 들어 글루타민의 흡수는 정상조직과 종양조직 모두에서 관찰되지만, 종양 부위에서는 더 많은 글루타민 흡수가 나타난다. 따라서, 본 발명의 조영제 조성물을 이용하여 글루타민 등의 대사가 주변 정상조직에 비해 과도하게 활성화되었음을 보여주는 영상을 획득할 경우 종양의 존재를 비침습적으로 예측할 수 있다. 근육 조직의 손상으로 인해 근육 대사에 이상이 있을 경우 역시 글루타민의 흡수가 증가하는 바, 역시 육안으로 판단하기 어려운 근육 손상여부에 대한 비침습적 진단 정보가 제공될 수 있다. 아울러, 글루타민 흡수 이상을 수반하는 알츠하이머병을 비롯한 퇴행성 뇌신경질환 역시 본 발명의 조성물을 이용하여 발병 여부 또는 치료제에 대한 반응성을 높은 신뢰도로 예측할 수 있다.

[0044] 보다 구체적으로는, 상기 암은 교아종, 전립선암, 신장암, 비소세포 폐암, 유방암 및 뇌암으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0045] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 화학식 1의 화합물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 진단용 조성물을 제공한다:

[0046] 화학식 1



[0047]

[0048] 본 발명에서 이용되는 화학식 1의 화합물 및 상기 화합물을 이용하여 획득할 수 있는 자기공명영상에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 그 기재를 생략한다.

[0049] 본 발명에 따르면, 본 발명의 조성물은 생체 내에서 글루타민 등이 활발하게 흡수되는 영역에 대한 정확한 영상 정보를 제공하므로, 글루타민의 유입 통로가 되는 아미노산 운반자(amino acid transporter)인 ASCT2(Alanine,

Serine, Cysteine Transporter 2)의 분포에 대한 영상 정보 또한 제공할 수 있다. ASCT2의 우선적인 기질이 글루타민으로서 글루타민의 유입량은 조직 내 ASCT2의 양을 반영한다는 사실 및 ASCT2가 염증 상황에서 증가한다는 사실은 당업계에 잘 알려져 있으므로(*Immunity* (2014) 15;40(5): 692-705, *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (2018)6:96;), 본 발명의 조성물은 염증 부위에 대한 진단 이미지를 제공할 수 있다.

- [0050] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 염증성 질환은 예를 들어 류마티스 관절염, 전신성 홍반성 낭창, 다발성경화증, 특발성섬유성폐포염, 다발성근염, 피부근염, 국한피부경화증, 전신피부경화증, 대장염, 염증성 장질환, 조르젠신드롬(Sjorgen's syndrome), 레이노현상(Raynaud's phenomenon), 베철헤트병(Bechet's disease), 가와사키병(Kawasaki's disease), 원발성담즙성경화증(primary biliary sclerosis), 원발성경화성담관염(primary sclerosing cholangitis), 궤양성대장염(ulcerative colitis), 이식편대숙주병(Graft-versus-host disease, GVHD) 및 크론병(Crohn's disease)을 포함하나, 이에 제한되지 않고 과도하거나 원치 않는 면역반응 등으로 인해 발생한 염증을 병인으로 질환으로써 정상 대조군에 비해 유의하게 증가된 수준의 ASCT2를 발현하는 모든 질환을 포함한다.
- [0051] 보다 구체적으로는, 상기 염증성 질환은 류마티스 관절염이다.
- [0052] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 대사 활성부위 검출방법을 제공한다.
- [0053] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 본 발명의 조성물을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 진단방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0055] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:
- [0056] (a) 본 발명은 자기공명영상(MRI)용 조영제 조성물, 구체적으로는 T_2 교환 (T_{2ex}) 자기공명영상용 조영제를 제공한다.
- [0057] (b) 본 발명은 대사 활성부위, 구체적으로는 글루타민 대사 활성부위 검출에 이용될 수 있으며, 이를 통해 대사 이상을 수반하는 종양, 근육 손상을 비롯한 다양한 질환에 대한 진단적 정보를 제공할 수 있다.
- [0058] (c) 본 발명은 또한 글루타민의 유입 통로가 되는 아미노산 운반자(amino acid transporter)인 ASCT2의 생체 내 분포에 대한 정확한 정보를 제공함으로써 ASCT2가 과발현되는 다양한 염증성 질환에 대한 신뢰도 높은 진단 정보를 제공할 수 있다.
- [0059] (d) 본 발명은 대사과정을 실시간으로 보여주면서도 종래의 MRI 영상과 동일한 수준의 이미지 해상도를 가질 뿐 아니라 낮은 독성으로 인해 장기간 대량 투여가 가능하므로, 신뢰도 높은 비침습적 진단 수단으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0061] 도 1은 글루타민 농도에 따른 글루타민 용액의 T_2 이완률을 보여주는 그림이다.
- 도 2는 뇌의 각기 다른 부위에 대한 글루타민 주입에 따른 T_2 이완도의 변화를 보여주는 그림으로, 각각 관심부위(ROI)(도 2a) 및 (b) 이들의 프로파일(도 2b)를 나타낸다. 글루타민의 효과는 R_2 의 변화로 나타난다. 양의 변화는 MRI 강도가 감소하였음을, 음의 변화는 MRI 강도가 증가하였음을 각각 의미한다. ROI 1, 2, 3은 종양부위이며, ROI 4는 정상부위이다. 글루타민 주입 시점은 그늘진 부분으로 나타내었다.
- 도 3은 시각 함수로서 R_2 변화의 이미지를 보여주는 그림이다. 양의 변화($\Delta R_2 = 2 \sim 10$) 및 음의 변화($\Delta R_2 = -2 \sim -10$)를 도 3a 및 3b에 각각 나타내고, 도 3a에서 이를 함께 표시하였다.
- 도 4는 알라닐-글루타민(Ala-Gln)의 농도에 따른 용액의 T_2 이완률을 보여주는 그림이다.

도 5는 세포 내에서 글루타민이 글루타메이트로 전환되는 것을 보여주는 그림으로, 표시된 화학적 이동은 물 신호와의 차이를 나타낸다.

도 6은 37℃, 9.4 T에서 글루타민, 글루타메이트 및 암모니아 용액의 이완 및 확산 특성을 보여주는 그림이다. 횡이완률은 0 - 20 mM의 농도에서 선형을 나타냈으며(도 6a), 종(longitudinal) 이완률은 0 - 20 mM의 농도에 서 유의한 변화를 보이지 않았다(도 6b). 도 6c는 다양한 pH에서 측정된 R_{2ex} 값을 나타낸다. 도 2d는 Swift-Connick 공식을 이용한 R_{2ex} 의 시뮬레이션 결과를 보여준다. 농도(도 6e) 및 pH(도 6f)에 대한 함수로서 글루타민 용액의 확산 계수를 나타내었다. 확산 계수는 21℃에서 측정하였다.

도 7은 인 비보 MRI와 동일한 파라미터를 적용하여 37℃에서 측정한 글루타민 및 글루타메이트 용액의 T_2 강조 이미지를 나타낸다.

도 8는 종양을 이식한 마우스에서의 글루타민 흡수에 대한 동적 이미지를 보여주는 그림이다. T_2 강조 스핀 에코 시퀀스를 통해 30초의 시간 해상도로 측정하였다. 주사-후 경과 시간은 상단에 표시하였다. 주사-전 이미지의 평균값을 이용하여 주사-후 이미지의 강도 변화를 계산하였다. (a)열은 대상체 1의 슬라이스 이미지이다. (b) 내지 (d)열은 대상체 1(b) 대상체 2(c) 및 대상체 3(d)의 종양 영역만을 표시하였다.

도 9a는 큰 강도 변화를 보이는 영역(ROI 1), 나머지 종양 영역(ROI 2) 및 근육(ROI 3)에서의 시간 의존적인 강도의 변화를 보여준다. 도 9b는 각 ROI의 흡수 프로파일을 보여준다. 도 9c는 세 마리 마우스에서 측정된 ROI의 흡수 특성을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0064] 실시예

[0065] 실시예 1: 글루타민 및 알라닐-글루타민의 조영 효과

[0066] 실험방법

[0067] 팬텀 제작

[0068] 글루타민(Gln), 알라닐-글루타민(Ala-Gln), 글루탐산 및 수산화암모늄은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 각 화합물의 저장용액 100mM은 1x PBS(pH = 6.4 및 7.4, Biosesang, Korea)에서 제작하였다. 각 pH의 5mM, 10mM, 20mM 및 40mM 용액은 저장용액을 희석하여 제작하였다.

[0070] 팬텀 MRI

[0071] MRI 실험은 72mm 송수신 코일을 사용하는 9.4T Burkcr Biospec 스캐너(Ettlingen, Germany)로 수행하였다. T2는 MSME(multi-slice multi-echo) 프로토콜을 이용하여 TE/TR = 50ms/5000ms로 매핑하였다. T2 이완도는 Gln/ Ala-Gln 농도 함수의 T2 곡선으로부터 계산하였다.

[0073] 마우스 모델

[0074] PBS(Phosphate buffered saline: 10 mM, pH7.4), DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum) 및 항생-항진균 용액은 Gibco에서 구입하였다. U-87-MG 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)로부터 수득하였다. 모든 용액은 18.2 MΩcm 이하의 저항 하에서 25℃에서 Milipore 탈이온수(DW)를 이용하여 제작하였다(Vivendi Water Systems).

[0075] U-87-MG 세포주는 10% FBS 및 1% 항생-항진균제를 포함하는 DMEM 배지에서 37℃ 및 가습의 5% CO₂ 대기 조건에서 배양하였다.

[0076] 모든 동물실험은 국제실험동물관리평가인증협회(AAALAC-I)의 승인 하에 수행하였다. 12주령 수컷 BALB/c 누드 마우스를 2 % 이소플루레인(Hana. Pharm. Co.)으로 마취하고, 우측 전두엽에 Gastight 시린지(Hamilton Co.)를 이용하여 4.5 mm 깊이로 직접 U-87-MG 세포(1×10^5)를 이식하였다. 5 마리 마우스에 다중 미세주입(multiple microinfusion) 시린지 펌프(Harvard Apparatus)를 이용하여 동시에 $0.5 \mu\text{l}/\text{min}$ 속도로 세포를 주입하였다.

[0078] 인 비보 MRI

[0079] 200mM 글루타민(Gln) 용액 및 200mM 알리닐-글루타민(Ala-Gln)은 Sigma- Aldrich(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 몇몇 T2 강조 이미지를 매트릭스 256 x 128, FOV 18x18mm, 유효 TE = 22ms, TR 1870 ms의 RARE(rapid acquisition with relaxation enhancement) 프로토콜을 이용하여 1min 해상도로 획득하였다. 5장의 주입 전 이미지를 기록한 뒤 Gln 또는 Ala-Gln 용액을 주입하고($1 \text{ mmol}/\text{kg}$), 주입 후 이미지를 기록하였다.

[0081] 인 비보 MRI 데이터 분석

[0082] 모든 MRI 데이터는 Matlab (MathWorks, Natick MA)로 프로세싱하였다. 프로세싱 전에, T2 강조 MRI 이미지를 첫 번째 스캔 이미지로 재정렬하여(도 2의 time 1), 이미지 크기를 64 x 128 매트릭스로 재조정하였다. 주입 전 이미지의 평균 강도(S(0), 첫 5개 스캔 이미지의 평균)를 이용하여 주입 후 이미지(S(t))의 강도 변화를 계산하였다. T1의 변화를 무시할 수 있다고 가정할 때, 주입 후 T2 강조 이미지의 강도는 하기 식 [1]과 같이 나타낼 수 있다. 식 [1]은 식 [2]와 같이 재구성될 수 있다. T2에서 글루타민의 효과는 식 [3]을 이용하여 이미지의 강도 차이인 R2(t)로부터 계산할 수 있다.

$$\frac{S(t)}{S(0)} = \frac{e^{-TE \cdot R_2(t)}}{e^{-TE \cdot R_2(0)}} \quad [1]$$

$$\ln \left[\frac{S(t)}{S(0)} \right] = -TE \cdot (R_2(t) - R_2(0)) \quad [2]$$

$$\Delta R_2(t) = - \left(\frac{1}{TE} \right) \cdot \ln \left[\frac{S(t)}{S(0)} \right] \quad [3]$$

[0087] 실험결과

[0088] 글루타민 용액의 T2 이완도

[0089] 도 1에서 보는 바와 같이, 글루타민의 T2 이완도는 pH=7.4에서 $0.09 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 이고 pH=6.4에서 $0.065 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 이다. 그러나, 글루타메이트와 NH3의 이완도는 각각 0.007 및 $0.001 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 이다. T2 교환 조영효과의 메카니즘은 일반적으로 불안정한 양성자와 물분자의 양성자 간의 교환율로 설명되기 때문에, 높은 교환율이 높은 이완도로 이어질 것이라 예상할 수 있다.

[0090] 글루타민의 높은 이완도를 설명하는 가능한 메카니즘 중 하나는 $^{14}\text{N}-^1\text{H}$ J 짝지움의 영향이다. N-H 결합의 $^{14}\text{N}-^1\text{H}$ J 짝지움은 ~ 90 Hz이다. ^{14}N 는 사중극자 핵이므로(핵스핀은 1), N-H 양성자의 횡축 자기화는 빠르게 탈위상화된다. 양성자의 교환율이 J 짝지움 강도에 근접하면, 사중극자 짝지움으로 인한 횡축 자기화의 빠른 탈위상이 물의 양성자로 전이될 수 있다. 글루타민 분자는 하나의 아민기와 하나의 아마이드기를 가지고 있으며, 아민기의 교환율은 전형적으로 수천 Hz에 달하나, 아마이드기의 교환율은 10-100 Hz로 낮다. 따라서, 아마이드 양성자가 $^{14}\text{N}-^1\text{H}$ J 짝지움에 영향을 받아 물의 T2 감소로 이어졌을 수 있다.

[0091]

- [0092] 글루타민 MRI
- [0093] 도 2 및 도 3은 인 비보 MRI 측정으로부터 계산된 ΔR_2 를 보여준다.
- [0094] 1. 글루타민 흡수는 정상조직과 종양조직 모두에서 관찰되는데, 이는 글루타민이 대사체이기 때문에 자연스런 현상이다. 종양 부위(ROI 1 및 2)는 최초 5분 동안 정상 부위(ROI 4)에 비해 더 많은 글루타민 흡수가 나타났는데, 이는 글루타민이 종양을 검출하기 위한 조영제로 사용될 수 있음을 보여주는 것이다.
- [0095] 2. T_2 강조 이미지에서 어둡게 나타난 종양부위(ROI 3)는 최초 5분 동안 유의한 변화를 보이지 않았다. 이 부위는 괴사한 것으로 추정되어 많은 세포가 존재하지 않을 것으로 보인다. 도 3c에서 보는 바와 같이, 이 부위의 강도는 주입 직후부터 상승하는데(파란색 부분), 이는 팬텀 실험결과와 모순되는 것으로 보인다. 단순한 논리로서, 글루타민이 더 많이 존재할수록 물의 T_2 는 감소할 것으로 기대되므로, MRI 이미지의 강도는 보다 낮아야 한다. 이는 글루타민의 주입에 따라 이 부위의 T_2 가 증가하게 됨을 시사한다. 첫 5분 후, ROI 1 및 2는 괴사 부위만큼은 아니지만 역시 음의 ΔR_2 값을 보였다.
- [0096] 3. MRI 이미지에 입혀진 컬러 맵은 선택적인 범위의 ΔR_2 이다. (b) 및 (c)에서는 2 ~ 10 및 -2 ~ -10의 ΔR_2 를 나타냈다. (b)에서 보는 바와 같이, 글루타민이 흡수되는 지점은 종양부위로서, 실제로 이는 대사적으로 활발한 부위를 보여준다.
- [0098] 알라닐-글루타민 용액의 T_2 이완도
- [0099] 도 4에서 보는 바와 같이, 알라닐-글루타민(Ala-Gln) 용액의 T_2 이완도는 pH=7.4에서 $0.06 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 로 관찰되었다. 이에, 알라닐-글루타민 디펩타이드도 글루타민 모노펩타이드와 마찬가지로 유효한 T_2 교환 조영효과를 가짐을 확인하였다.
- [0101] 실시예 2: 글루타민 및 글루타메이트의 조영 효과
- [0102] 실험방법
- [0103] 팬텀 제작
- [0104] L-글루타민, L-글루탐릭 एस드 나트륨염 및 수산화암모늄은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)에서 구입하고, PBS(phosphate buffer saline) 용액은 Biosesang (Sungnam, Korea)에서 구입하였다. L-글루타민 및 글루타메이트 용액은 pH= 7.4, 7.2, 7.0, 6.7, 6.4, 6.1 및 5.8의 PBS 용액 내 5, 10 및 20 mM 농도로 제작하였다. pH = 7.4, 7.2 및 7.0의 PBS 용액에 용해된 5, 10 및 20 mM의 수산화암모늄용액을 제작하였다.
- [0106] 팬텀 MRI
- [0107] T_2 측정을 위해 용액을 3mm NMR 튜브에 넣었다. 모든 MRI 실험은 9.4T Bruker BioSpec 스캐너(Ettlingen, Germany)에서 수행하였다. T_2 측정 실험은 72mm 송수신기 코일을 이용하여 수행하였다. 횡이완물인 $R_2(R_2=1/T_2)$ 는 Carr-Purcell-Meiboom-Gill(CPMG)를 이용하여 37℃에서 8개 에코(echo) 이미지부터 계산하고 짧은 에코 시간 시퀀스와 이완 증강(RARE)을 통해 신속하게 획득하였으며, 온도는 순환 온수로 조절하였다. 32 x 32 mm 및 1 mm 슬라이스 두께의 FOV로부터 64 x 64 매트릭스를 이용하여 이미지를 획득하였다. 20ms의 t_{CPMG} 를 사용한 기간은 2배에서 16배로 다양하였다. 각 스캔 간의 지연은 15초로 설정하였다. 측정된 R_2 플롯을 용질 농도 함수로 사용하여 교환으로 인한 T_2 이완도(R_{2ex})를 계산하였다. T_1 은 37℃에서 다양한 반복 시간을 통한 이완 증강 프로토콜로 신속하게 획득(RAREVTR)함으로써 측정하였는데, 여기서 TR을 다양하게 함으로써 포화 회복(saturation recovery) 모드에서 T_1 강조(weighted) 영상을 획득하였다. 200, 400, 800, 1500, 3000 및 5000 ms의 6개의 TR 값의 T_1 강조 영상으로부터 T_1 을 계산하였다. 이미징 파라미터는 다음과 같다: TE= 20 ms, RARE 인자= 2, 매트릭스= 256 x 128, FOV= 32mm x 32mm, 공간 해상도= 0.125mm x 0.250mm. 확산 계수는 21℃에서

스핀에코 확산 강조영상 프로토콜을 이용하여 측정하였다.

[0108] R_{2ex} 는 $Dw \gg R_{2,solute}$ (교환 가능한 용질 양성자의 R_2)라는 가정 하에서 Swift-Connicke 공식(14)을 이용하여 시물레이션하였으며, 유동성(labile) 양성자의 물분율(P_B), 화학적 이동 차이($\Delta \omega$) 및 유동성 양성자와 물분자 양성자 사이의 교환율(k_{ex})은 다음 식[4]와 같다:

$$R_{2ex} = k_{ex} P_B \frac{\Delta \omega^2}{k_{ex}^2 + \Delta \omega^2} \quad [4]$$

[0111] *마우스 모델*

[0112] 모든 동물 실험은 연세대학교 동물실험윤리위원회에서 제공하는 실험동물 복지법, 실험동물의 관리와 사용에 대한 지침, 설치류 실험에 관한 정책을 준수하면서 수행하였다. pH7.4의 PBS, DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), FBS(fetal bovine serum) 및 항생/항진균 용액은 Gibco에서 구입하였다. U-87 MG 세포는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 수득하였다. 모든 용액은 18.2 MΩ cm 미만의 저항으로 Millipore 탈이온수(DW)를 이용하여 25℃에서 제작하였다(Vivendi Water Systems). U-87 MG 세포주는 10% FBS and 1% 항생/항진균 용액을 포함하는 DMEM 배지에서 37℃, 가습의 5% CO₂ 대기에서 배양하였다.

[0113] 12주령의 수컷 BALB/c 누드 마우스(n=3)를 2% 이소플루란(Hana. Pharm. Co.)으로 마취시켰다. 이후, U-87 MG 세포(1×10^5)를 29-게이지 바늘로 오른쪽 또는 왼쪽 허벅지에 직접 이식하였다. 40mm 송수신기 코일을 이용하여 인 비보 MRI 실험을 수행하였다. 마우스를 1-2% 이소플루란으로 마취하고, 순환 온수로 체온을 유지하였다.

[0115] *인 비보 MRI*

[0116] 글루타민 흡수는 RARE 프로토콜을 이용하여 매 30초마다 얻어지는 일련의 T₂ 강조 영상으로부터 측정하였다. 먼저, 10개의 주사-전 T₂ 강조 영상을 기록하고 약 200 mM 글루타민 용액 200mL를 20초 이상 정맥주사(2 mmol/kg)한 뒤, 50개의 주사-후 이미지를 기록하였다. 이미징 파라미터는 다음과 같다: 매트릭스 = 256 x 128, FOV = 34 mm x 20 mm, 5 - 9 슬라이스, 슬라이스 두께 1 mm, 유효 TE = 66 ms, NA = 2, TR = 1875 ms. 전체 이미지 획득 시간은 30분이며, 모든 MRI 데이터는 MATLAB(MathWorks, Natick MA)를 이용하여 처리하였다. T₂ 강조 MRI 이미지는 최초 스캔 이미지에 대해 재배열하고 128 x 64 매트릭스로 크기를 조정하였다. 주사-전 이미지의 평균 강도(S(0)) 및 주사-후 이미지의 강도(S(t))를 이용하여 아래의 식[5]를 통해 강도 변화를 계산하였다:

$$\Delta S(t) = \frac{S(0) - S(t)}{S(0)} \quad [5]$$

[0119] **실험결과**

[0120] 37℃에서 측정된 글루타민 용액의 이완 특성은 도 6에 나타내었다. 팬텀 실험에서 측정된 R_{2ex} 는 pH=7.2에서 글루타민 및 글루타메이트 용액에 대해 각각 $0.069 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 및 $0.102 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 였다. pH = 6.1 - 6.7에서의 글루타민의 R_{2ex} 는 $0.097 - 0.1 \text{ s}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 범위였다. Swift-Connick 공식(식[4])을 이용하여 9.4T에서 시물레이션된 R_{2ex} 값은 도 6d에 나타내었다. 글루타민 분자는 세 개의 교환 가능한 아민 양성자를 가지므로(도 5), 아민 양성자에 대해 식[4]의 P_B 는 2.7×10^{-5} (1 mM 글루타민 용액 내 3m M 아민 양성자 및 111M의 물분자 양성자)로 세팅하였다. 도 6에서, 다양한 pH에서 측정된 L-글루타민 용액의 R_{2ex} 를 9.4T에서의 시물레이션 결과와 비교하였다. 도 6b는 37℃에서 측정된 글루타민 용액의 R_1 값을 보여준다. 확산 실험 결과는 도 6e 및 6f에 나타내었다. 도 7은 인 비보 MRI와 동일한 파라미터를 적용하여 측정된 글루타민 및 글루타메이트 용액의 T₂ 강조 이미지를 나타낸다.

5mM 용액의 강도는 0mM 용액에 비하여 6.2%(Gln, pH=7.2), 7.7%(Glu, pH=7.2) 및 8.0% (Gln, pH=6.4) 만큼 낮았다.

[0121] 글루타민 용액을 정맥주사하는 동안 종양 슬라이스에서의 스핀 에코 T_2 강조 MRI를 매 30초마다 측정하였다. 도 8은 허벅지에 이식된 U-87MG 종양 영역의 이미지를 보여준다. 글루타민 흡수로 인한 낮은 강도는 양(positive)의 $\Delta S(t)$ 로 나타났다. 종양 슬라이스(대상체 1)에 대한 결과는 (a)열에 나타내었다. 3개 대상체의 종양 영역에서의 강도 변화는 (b)열 내지 (d)열에 나타내었다. 글루타민 주입 후 강도 변화가 종양이 위치한 부위에서 일차적으로 관찰되었다. 변화는 주사 후 첫 5분에 가장 뚜렷하였으며, 20 - 25분 경과 후 점차 주사 전 수준으로 돌아갔다.

[0122] 도 9는 종양 내에서 큰 변화를 보이는 영역(ROI 1), 종양 내에서 작은 변화를 보이는 영역(ROI 2) 및 근육 (ROI 3)에서의 시간 의존적인 강도의 변화를 보여준다. 3개 개체에서 큰 변화를 보이는 영역(ROI 1)의 특성은 도 9c에 나타내었으며, 초기에 증가하나 시간 경과에 따라 감소함을 알 수 있다. 그러나, 개체 및 영역에 따라 패턴은 다양하였다.

[0124] 결 론

[0125] 글루타민은 T_2 ex 조영제로서 성공적으로 적용되었으며, 글루타민 대사의 실시간 MRI가 실현되었다.

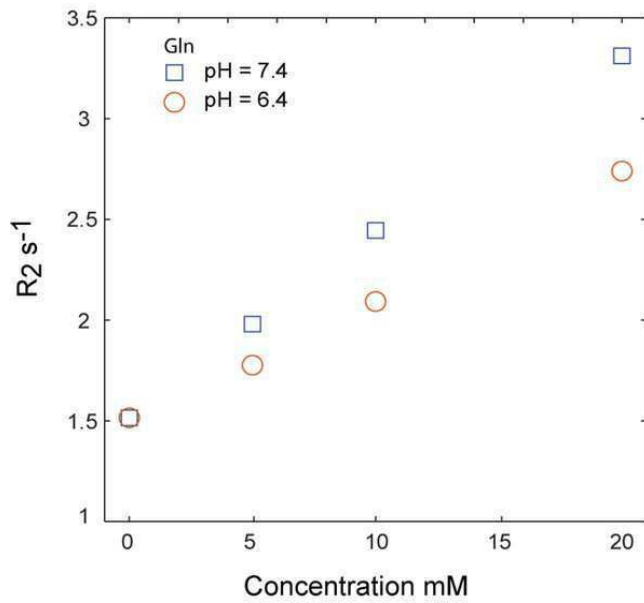
[0126] 글루타민을 조영제로 사용하는 데 있어서 중요한 장점 중 하나는 글루타민이 관여하는 대사과정을 실시간으로 보여주면서도 이미지의 해상도가 종래의 MRI 영상 프로토콜과 같은 수준이라는 점이다. PET 및 과분극화 MRI와 같은 통상적인 대사 이미징 방법이 가지는 공간적, 시간적 해상도의 한계를 고려할 때, 본 발명은 인 vivo에서 다양한 질환의 대사과정 연구에 유용하게 적용될 수 있다.

[0127] 글루타민, 글루타민아제에 의해 탈아민화된 형태인 글루타메이트 및 글라타민과 알라닌의 디펩타이드를 주입함으로써 T_2 강조 MRI 이미지에서 대사적으로 활성인 부위가 어디인지 알 수 있다. 글루타민의 흡수 및 제거 특성은 비침습적으로 암을 진단하기 위해 사용될 수 있으며, 글루타민 농도가 반영하는 아미노산 운반자 ASCT2의 분포를 통해 염증 질환의 진단 정보도 제공할 수 있다.

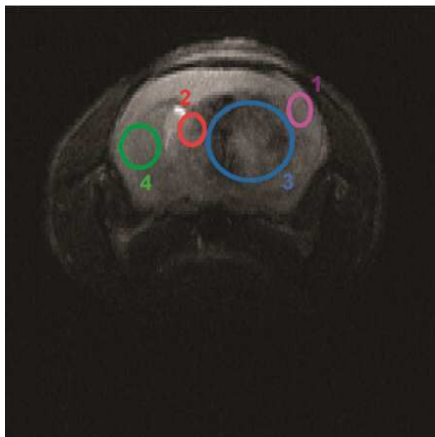
[0129] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

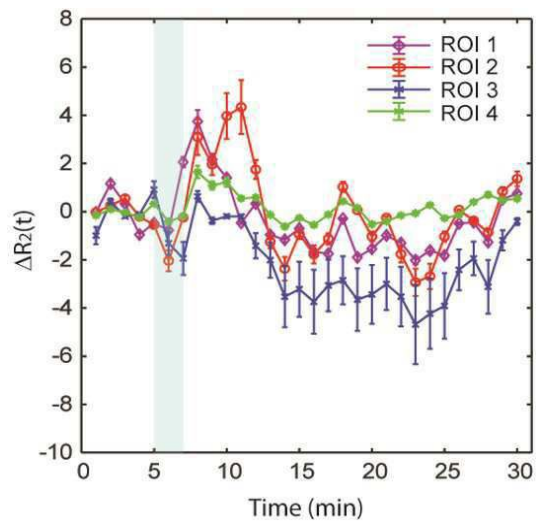
도면1



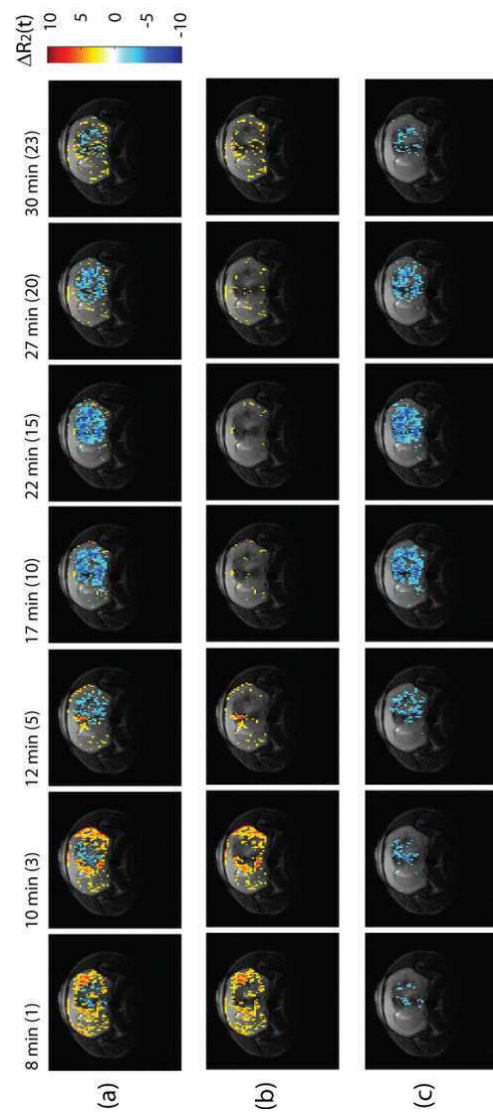
도면2a



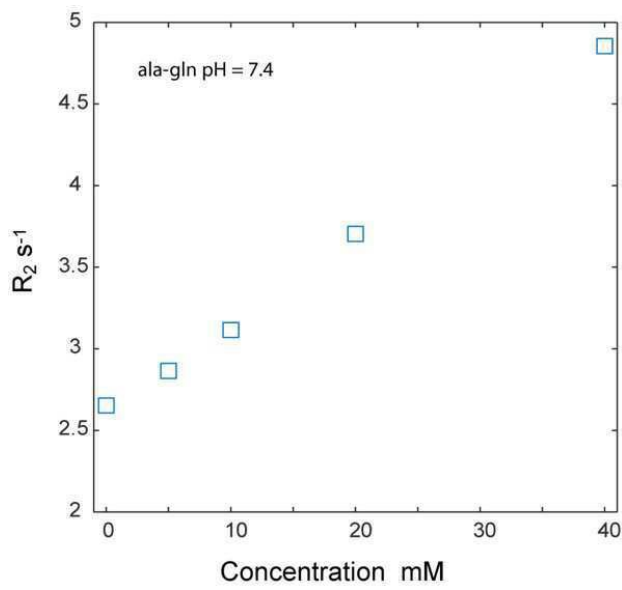
도면2b



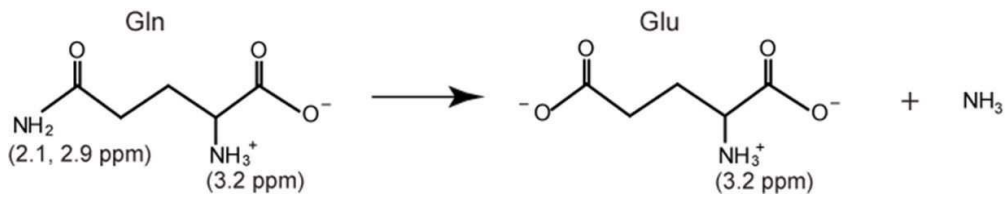
도면3



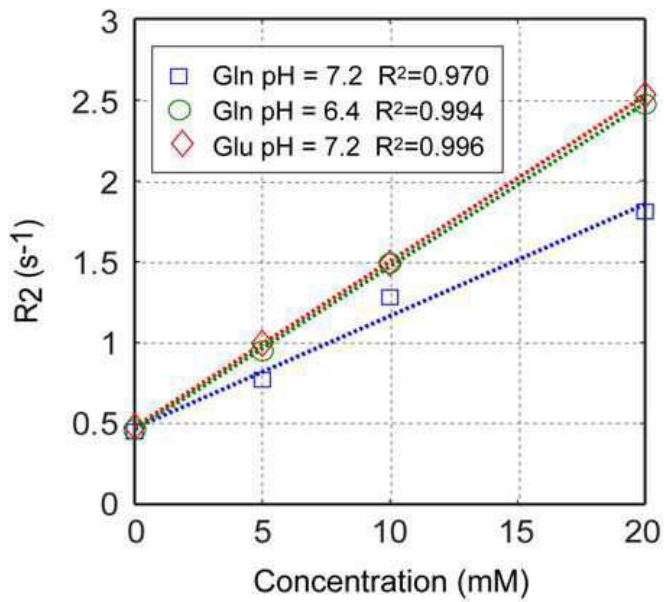
도면4



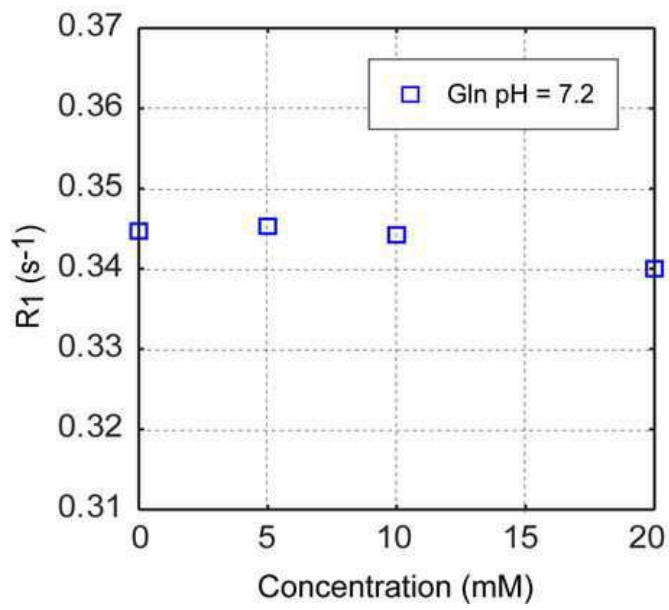
도면5



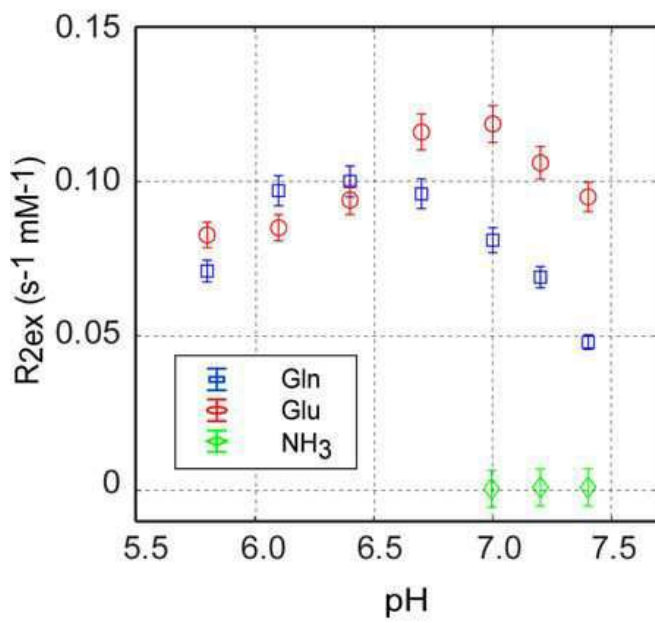
도면6a



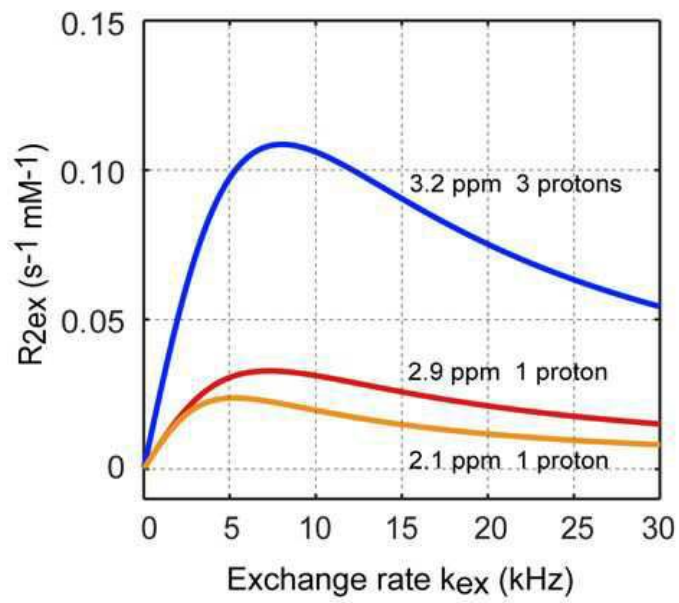
도면6b



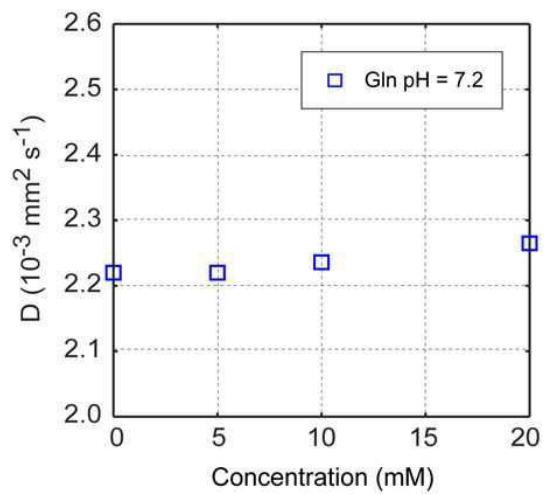
도면6c



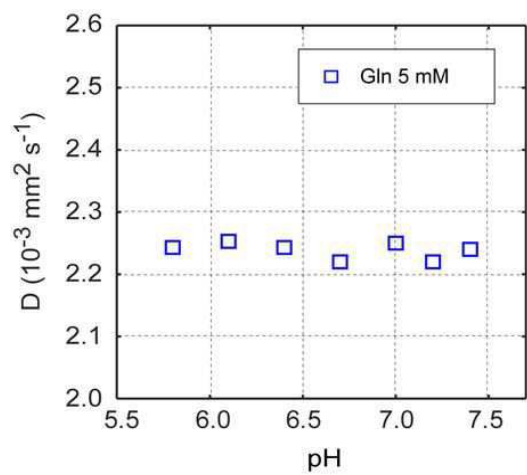
도면6d



도면6e



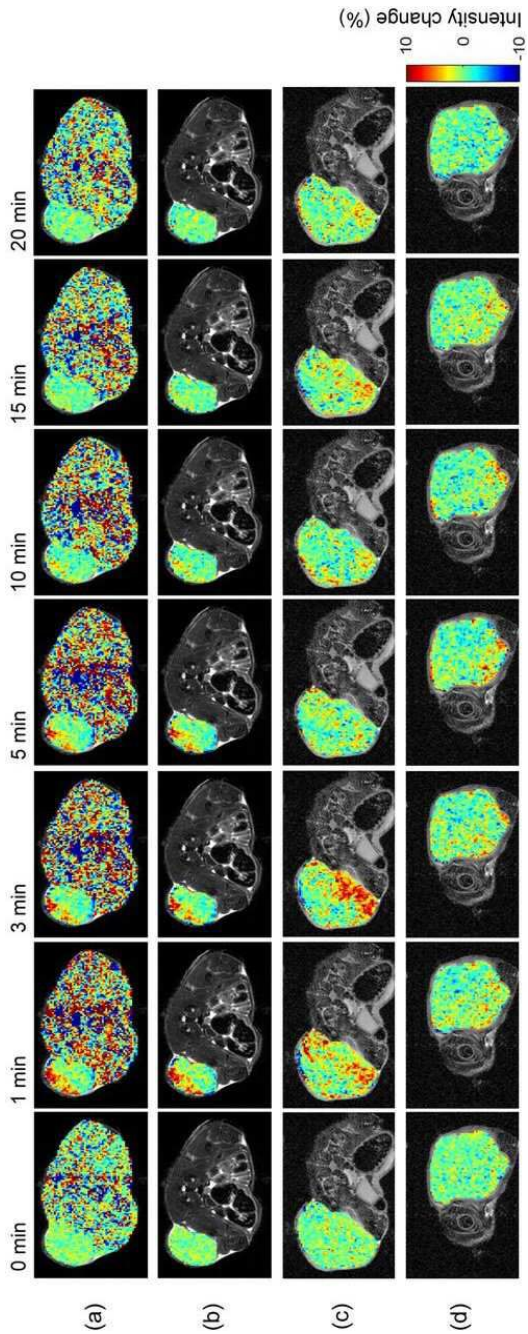
도면6f



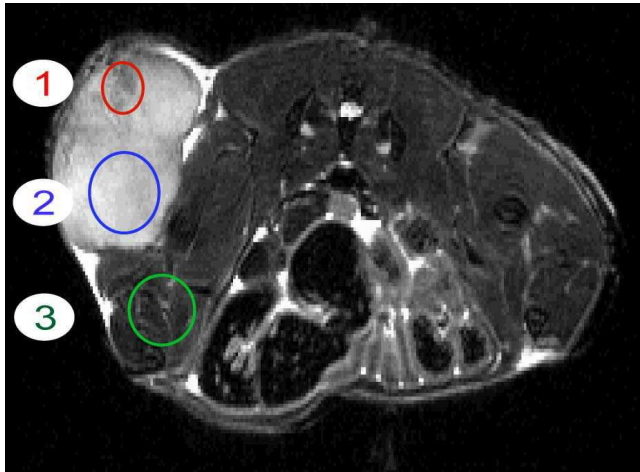
도면7



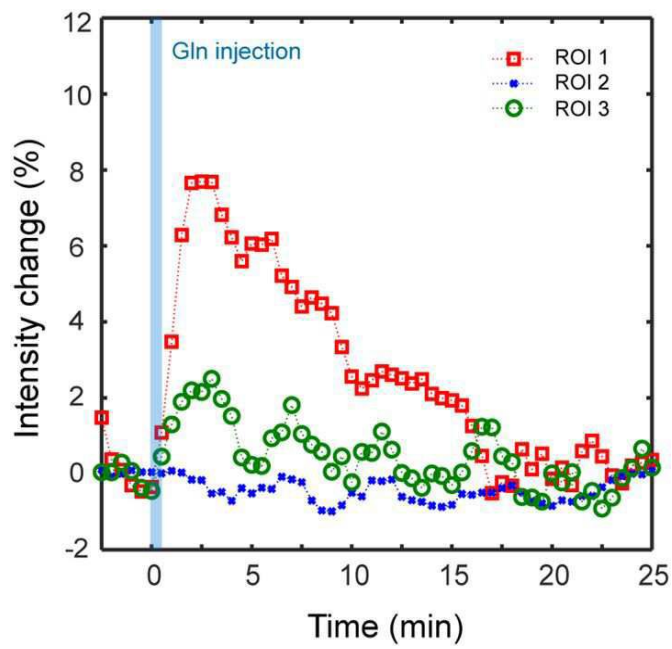
도면8



도면9a



도면9b



도면9c

