



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0083335
(43) 공개일자 2009년08월03일

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01) G01N 33/576 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-7007160

(22) 출원일자 2007년09월07일
심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2009년04월07일

(86) 국제출원번호 PCT/GB2007/003362

(87) 국제공개번호 WO 2008/029145
국제공개일자 2008년03월13일

(30) 우선권주장
0617581.4 2006년09월07일 영국(GB)

(71) 출원인

유씨엘 비즈니스 피엘씨

영국 더블유1티 4티피 런던 토텐햄 코트 로드 97
더 네트워크 빌딩

(72) 벌명자

잘란 라지브

영국 런던 더블유씨1이 6에이치엑스 체니스 뮤스
69-75 런던대학교 의학부 간장학 연구소

무커지 라제쉬워 피

영국 런던 더블유씨1이 6에이치엑스 체니스 뮤스
69-75 런던대학교 의학부 간장학 연구소

데이비스 네이碜

영국 런던 더블유씨1이 6에이치엑스 체니스 뮤스
69-75 런던대학교 의학부 간장학 연구소

(74) 대리인

이덕록

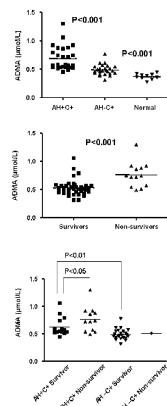
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 간 기능 평가용 바이오마커

(57) 요 약

개인에게서 하나 이상의 메틸아르기닌의 수준 및 국소빈혈 조절 알부민(IMA) : 알부민 비율(IMAR)의 비를 측정하여 개인의 간 기능을 분석하는 단계를 포함하는 개인의 간 기능 분석 방법.

대 표 도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

개인에게서 하나 이상의 메틸아르기닌의 수준 및 국소빈혈 조절 알부민(IMA) : 알부민 비율(IMAR)의 비를 측정하여 개인의 간 기능을 분석하는 단계를 포함하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 방법이 개인의 간 질환의 진행을 모니터링, 개인의 간 질환의 과정 예측, 후-간 이식(post-liver transplantation)에 있어 간 기능 분석, 후-간 이식 이식편에서 재관혈류에 있어 간 기능 분석 또는 다기관 기능부전 및(또는) 폐혈증이 진전된 환자들의 간 기능 분석을 위한 것임을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 메틸아르기닌이 비대칭성 디메틸아르기닌(ADMA) 및(또는) 대칭성 디메틸아르기닌(SDMA)인 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 결합된 ADMA 및 SDMA 수준을 측정하는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개인이 간 기능부전을 앓고 있는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 개인이 만성 간 기능부전, 급성 만성(acute-on-chronic) 간 기능부전 또는 급성 간 기능부전을 앓고 있는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 개인이 알코올성 간 질환을 앓고 있는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 개인이 간경변 또는 간경변 및(또는) 알코올성 간염을 앓고 있는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 간 질환을 앓지 않은 개인 또는 간 질환의 생존자인 개인에서 메틸아르기닌 수준과 비교하여 메틸아르기닌 수준의 증가가 개인의 증진된 사망률 위험을 나타내는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 간 질환을 앓지 않은 개인 또는 간 질환의 생존자인 개인에서 결합된 ADMA 및 SDMA 수준과 비교하여, 결합된 ADMA 및 SDMA 수준의 증가가 개인의 증진된 사망률 위험을 나타내는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 간 질환을 앓지 않은 개인 또는 간 질환의 생존자인 개인에서 IMAR와 비교하여, IMAR의 증가가 개인의 증진된 사망률 위험을 나타내는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 12

제9항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 간 질환을 앓지 않은 개인 또는 간 질환의 생존자인 개인과 비교하여, 결합된 ADMA와 SDMA 수준의 증가 및 IMAR의 증가가 개인의 증진된 사망률 위험을 나타내는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적 질환 예후 점수가 측정되는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 하나 이상의 추가적 간 질환 예후 점수가 하나 이상의 차일드-푸 점수 시스템(Child-Pugh scoring system), 웨스트 헤븐 크리테리아(West Haven Criteria), 글래스고 코마 스케일(Glasgow Coma Scale), 모디파이드 차일드-푸 점수 시스템(modified Child-Pugh scoring system), SOFA, MELD 또는 APACHE II인 지 제12항 중 어느 한 항에 있어서, 하나 이상의 추가적 질환 예후 점수가 측정되는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 방법이 개인으로부터 얻은 시료 상에서 수행되는 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 시료가 혈장 시료 또는 간 조직 시료인 것을 특징으로 하는 개인의 간 기능 분석 방법.

청구항 17

개인의 하나 이상의 메틸아르기닌 수준 및 국소빈혈 조절 알부민(IMA) : 알부민 비율(IMAR)의 비를 측정하는 수단을 포함하는 개인의 간 기능 분석 방법에 사용하는데 적절한 시험 키트.

청구항 18

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항의 방법에 따라 증진된 사망률 위험을 갖는 것으로 확인된 개인의 간질환 치료 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에 있어서 약품의 용도.

청구항 19

(i) 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 방법을 이용하여 개인이 증진된 사망 위험을 갖는지 여부를 측정하는 단계; 및 (ii) 상기 (i)에서 사망 위험이 있는 것으로 확인된 개인에게 간 질환의 치료에 유용한 약품을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 개인의 간 질환의 치료 방법.

청구항 20

(i) 개인에게서 하나 이상의 메틸아르기닌의 수준 및 국소빈혈 조절 알부민(IMA) : 알부민 비율(IMAR)의 비를 측정하기 위한 수단; 및 (ii) 치료요법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료 방법에 있어서 동시에, 개별 또는 연속 이용하기 위한 결합된 제형으로서 간 질환의 치료에 유용한 약품을 포함하는 제품.

명세서**기술분야**

<1>

본 발명은 간 기능 평가 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로 간 질환의 임상적 결과를 예측하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기의 방법에 이용하기 위한 키트 및 상기 방법을 이용하여 유해한 결과의 위험이 있는 것으로 확인된 개인을 치료하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

- <2> NIH의 통계는 미국에서 극발성 간장 기능부전 환자가 1년 간 3,000 명이 넘는 것으로 제시하고 있다. 이러한 데이터가 서양 및 저개발지역에서 바이러스성 및 알코올성 간 질환의 부담 증가를 구체화시키기 위해 추정된 것이라면, 다수의 사례들이 전세계적으로 년 당 백만을 넘고 있다.
- <3> 알코올 손상, 바이러스성 간염 및 보다 최근에 실재가 확인된 비알코올성 지방간 질환에 이은 말기 간질환의 발병률이 세계적으로 증가 및 간 이식 제공자 풀의 유의적 증가 결여로 인하여, 보조적이고 중재적인 치료를 필요로 하는 간 기능이 빠르게 악화되는 환자를 확인할 필요성이 현저하게 증가하고 있다.
- <4> <발명의 요약>
- <5> 본 발명자들은 대상부전 알코올성 간경변 환자들을 조사하고, 혈장 중 두 가지 메틸아르기닌인 비대칭형 디메틸아르기닌(ADMA)과 그의 입체이성질체인 대칭형 디메틸아르기닌(SDMA)의 혈장 수준이 알코올성 간염 환자 및 비생존자들에서 유의적으로 높았음을 확립하였다. 디메틸아르기닌 점수(DAS)로 지칭되는 ADMA와 SDMA의 결합된 합 또한 알려진 다른 생물학적 점수 시스템 또는 디메틸아르기닌 단독에서 보다 알코올성 간경변 환자들에서의 임상적 과정의 우수한 예보자였다. 따라서 상승된 메틸아르기닌 수준은 기관 손상 및 폐혈증의 발병률 또한 높은 알코올성 간염 환자의 유독한 과정의 중요한 생물학적 마커에 상당하다. 이를 마커는 간 이식을 받은 간 질환 환자들 또는 다기관 손상 및 폐혈증이 있는 환자들의 진행 및 과정의 신뢰성 있는 예보자로서 사용될 수 있다.
- <6> 본 발명자들은 알코올성 간 질환 환자들에 있어서, 상기 사망한 환자들은 유의적으로 증가된 국소빈혈 조절 알부민(ischemia modified albumin; IMA): 알부민 비율 (또는 "IMAR")을 갖는다는 사실을 추가로 확립하였다.
- <7> 메틸아르기닌 수준, DAS 및 IMAR가 질환 진행 및 과정에 대한 마커로서 여겨짐에도 불구하고, 본 발명자들은 결합된 바이오마커로서 메틸아르기닌 측정과 IMAR의 결합이 열악한 과정의 예측 기능을 향상시키고, 그에 따라 상기와 같은 조합이 사망률 위험을 분석하기 위한 예측적 기능을 제공한다는 사실을 밝혀냈다. 특히 본 발명자들은 결합된 바이오마커("DASIMAR")로서 DAS와 IMAR의 결합이 사망률 위험을 분석하기 위한 훌륭한 예측 기능을 제공한다는 사실을 밝혀냈다.
- <8> 본 발명에 따르면, 개인에게서 하나 이상의 메틸아르기닌의 수준 및 국소빈혈 조절 알부민(IMA) : 알부민 비율 (IMAR)의 비를 측정하는 단계를 포함하는 개인의 간 기능 분석 방법을 제공한다.
- <9> 본 발명은 또한 개인의 하나 이상의 메틸아르기닌의 수준 및(또는) 국소빈혈 조절 알부민(IMA) : 알부민 비율 (IMAR)의 비를 측정하기 위한 수단을 포함하는 개인의 간 질환의 과정을 예측하기 위한 방법에 이용하는 데 적절한 시험 키트;
- <10> 본 발명의 방법에 따라 사망률의 위험이 증가된 것으로 확인된 개인의 간 질환의 치료 방법에 이용하기 위한 약제의 제조에서 약품의 용도;
- <11> (i) 본 발명에 다른 방법을 이용하여 개인의 사망 위험이 증지되었는지 여부를 측정하는 단계 및 (ii) 상기 (i)에서 사망 위험이 있다고 확인된 개인에게 간 질환의 치료에 유용한 약품을 치료적 유효량으로 투여하는 단계를 포함하는 개인의 간 질환 치료 방법; 및
- <12> (i) 개인의 하나 이상의 메틸아르기닌의 수준 및 국소빈혈 조절 알부민(IMA) : 알부민 비율(IMAR)의 비를 측정하기 위한 수단 및 (ii) 치료요법에 의한 인간 또는 동물 신체의 치료 방법에 있어서 동시, 개별 또는 연속 이용하기 위한 결합된 제형으로서 간 질환의 치료에 유용한 약품을 포함하는 제품을 제공한다.

발명의 상세한 설명

- <13> 본 명세서 전체에 걸쳐, 용어 "포함한다", 또는 그의 변형, 예를 들어 "포함되다" 또는 "포함하는"은 언급된 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 군이 포함되지만, 임의의 다른 요소, 정수 또는 단계, 또는 요소들, 정수들 또는 단계들의 군을 배제하지도 않음을 암시하도록 이해될 것이다.
- <14> 본 명세서 중 임의의 선행기술에 대한 참조문헌은 그러한 선행기술이 호주 또는 다른 곳에서 일반상식의 일부를 형성한다는 인정 또는 임의 형태의 제시로서 고려되지 않으며, 고려되어서도 안 된다.
- <15> 현재 사용되고 있는 간 기능부전에 대한 예후 점수는 특이성이 부족하며, 이는 관찰자 차이에 의존하게 되는 임상적 변수들의 이용에 부분적으로 관련된다. 이러한 점수는 또한 생물학적 변수, 예를 들어 빌리루빈 및 프로트롬빈 시간을 포함하고, 이에 대한 분석은 실험실에 따라 다양하며, 다른 생물학적 변수, 예를 들어 크레아티

닌은 진행성 간 기능부전 환자들에 있어 영양 상태 및 담즙 분비 중지에 영향을 받게 된다.

<16> 따라서 환자 및 연구실 상태에 의존하는 변화에 영향 받기 쉬운 임상적 및 생물학적 변수들에 관계없이 남아 있는 진행성 간 기능장애의 특이적 및 민감성 마커를 개발할 필요가 있다. 이 마커는 또한 특히 염증 및 기관 기능장애에 관한 병상의 전개를 반영하여야 한다.

<17> 본 발명은 두 가지 형태의 마커, 메틸아르기닌(메틸아르기닌)과 국소빈혈 조절 알부민(ischemia modified albumin; IMA)의 조합을 기반으로 한다.

<18> 혈장 중에는 두 가지 메틸화된 아르기닌인 비대칭 디메틸아르기닌(asymmetric di메틸아르기닌; ADMA)과 그의 임체이성질체인 대칭 디메틸아르기닌(symmetric di메틸아르기닌; SDMA)이 존재한다. 본 발명에 따른 메틸아르기닌의 측정은 하나 이상의 메틸아르기닌, 예를 들어 상기 디메틸아르기닌 중 하나 또는 모두의 측정을 포함한다. 예를 들어, 본 발명의 일 실시형태에 있어서, 본 발명에 따른 메틸아르기닌의 측정은 결합된 ADMA 및 SDMA를 측정하여 결합된 디메틸아르기닌 점수(di메틸아르기닌 score; DAS)를 제공하는 것일 수 있다.

<19> 본 발명자들은 결합된 미메틸아르기닌 점수(DAS 점수)를 이용하여 정상 전이후(post-translational) 단백질 변이의 생성물인 디메틸아르기닌의 측정이 현재 사용되고 있는 생물학적 점수 시스템의 결점을 극복하도록 하는 동시에, 최근의 파일럿 연구에서 나타낸 바와 같이, 조기(28일) 사망 형태 간 기능부전의 신뢰성 있는 예측 실용성으로 병상의 전개를 반영하도록 한다는 사실을 밝혀냈다.

<20> DAS 점수는 측정된 ADMA와 SDMA 값을 합하여 계산한다. 본 발명에서는 이들 두 가지 변수 모두가 염증 상태를 반영하고 기관 손상의 초기 전개를 확인시켜준다는 사실을 제시한다(도 1 참조). 더욱이 사망 환자들은 DAS가 상대적으로 감소한 생존자들에 비해 DAS의 유의적인 비율 증가를 갖는다(도 4 참조).

<21> 본 발명자들은 이러한 측정을 이용하는 것이 간 이식으로 인한 변화를 포함한 급성 간 기능부전 환자뿐만 아니라 ACLF 환자에 있어서 과정(outcome)의 신뢰성 있는 예보자로서 작용한다는 사실은 보여주었다. 이러한 시험 또는 점수의 응용이, 현재 이용되고 있는 진단 점수(DF, MELD, Child-Pugh)와 비교하여, 간 유지 시스템에 의한 조기 간섭이 보장되는 진행성 간 기능부전 환자들을 규정하는데 도움이 된다고 여겨진다(도 6 참조 : ROC 곡선).

<22> 이러한 용도는 또한 (i) 이식을 기다리는 환자 집단에게 이식용 기관의 사용을 만족시키거나 같은 자리 간 이식 후 기관 기능의 측정할 수 있게 하고, (ii) 다기관 손상 환자 및 간 기능장애로 인한 패혈증 환자에게 본 명세서에 기재된 바와 같은 방법, 예를 들어 결합된 DAS 값의 분석 방법을 빤약한 과정을 예측하는데 사용할 수 있도록 확장될 수 있다. 메틸아르기닌 또는 DAS 점수 시스템의 잠재적 이점은 영향 섭취(크레아티닌과 같은) 뿐만 아니라 현재 점수 시스템에 적용되는 프로토콜 빈 시간 측정의 사용으로 발생하는 것과 같은 대륙간 분석 편차에 의존하지 않는 편재적인 메틸아르기닌의 고도로 정밀한 측정을 포함한다는 것이다. DAS 측정은 또한 임상적 변수에 의존하지 않고, 그의 수리적 계산은 컴퓨터를 이용할 필요 없이 바로 유도할 수 있다. 현재 유효한 측정 시스템은 고성능 액상 크로마토그래피 및(또는) 질량-분광법을 이용하여 임체이성질체들을 재연 가능하고 신뢰성 있게 분리하는 것을 포함한다. 그러나 메틸아르기닌 측정 또는 DAS 점수는 임의의 적절한 방법, 예를 들어 임상적 환경 내에서 간단하게 측정할 수 있는 ELISA를 이용하여 임상에서 수행할 수 있는 분석 형태를 이용하여 측정할 수도 있다.

<23> 간 환자들의 다양한 알부민 수준이 부분적으로는 영양에 의해 그리고 대부분은 나머지 간 합성 기능에 의해 측정된다는 가정 하에, 본 발명자들은 알부민-코발트 결합 분석의 응용을 IMA 대 혈청 중 최초 알부민의 비율-혈청 IMA:알부민 비율, 또는 "IMAR"의 인자로 변형하였다. 알코올성 간 질환을 갖는 일련의 52명의 대상부전 환자들의 데이터는 사망 환장들이 유의적으로 증가된 IMA:알부민 비율($P<0.01$)을 갖는다는 사실을 제시한다. 더욱이 메틸아르기닌 또는 DAS 값을 이용함으로써, IMAR가 염증 상태를 반영하고 그에 따라 질환의 근원적인 병리적 전개를 반영할 수 있다는 사실을 제시한다(도 8 참조). 사망률을 예측하기 위해 리시버 오퍼레이터 곡선을 이용함으로써, 곡선 아래의 영역이 코호트 스터디드(cohort studied)에 대해 $0.73(\pm 0.06)$ 로 밝혀졌고, 이는 IMAR가 이들 환자들에 있어 사망률 예측 테스트에 유용할 수 있음을 제시한다.

<24> 그러나 본 발명자들은 결합된 바이오마커로서 메틸아르기닌 측정(예를 들어 DAS)과 IMAR의 조합이 열악한 결과의 예측 기능을 개선시켰다는 사실을 밝혀냈다. DAS 점수와 IMAR의 조합은 0.81-0.99의 95% 신뢰 구간으로 $0.91(\pm 0.04)$ 의 AUROC, 및 74%의 민감성 및 92%의 특이성을 가져온다. 이는 사망률 위험을 분석하기 위한 훌륭한 예측 기능(도 9 참조)을 제공하는 동시에, 알부민 투석 및 염증 감소를 위한 치료요법과 같은 특정 개입에 의해 목적화될 수 있는 악화된 기관 손상 및 염증, 즉 간 기능부전의 병태생리학 요소를 반영한다. 따라서

DASIMAR와 같은 본 발명의 방법은 또한 개입에 대한 반응을 모니터링하는데 이용될 수 있다.

- <25> 따라서 메틸아르기닌(예를 들어 DAS) 및 IMAR은 질병 진행에 대한 암시적인 마커이며, 조합하여 사용될 수 있다. 따라서 본 발명은 진행성 간 기능장애의 가능성 및 다기관 손상의 발생을 분석하기 위한 방법에 관한 것이다.
- <26> 간 기능장애의 분석은 광범위한 상황에서 유용할 수 있다. 예를 들어, 상기 방법은 간 기능장애를 갖는 환자들을 간 기능장애가 없는 환자들과 구별하게 해준다. 따라서 본 발명의 방법을 이용하여 간 질환의 진행을 모니터링할 수 있고, 특히 독한 과정을 앓고 있을 것이라고 여겨지는 환자들을 확인할 수 있다. 즉, 본 발명의 방법은 간 질환의 과정을 예측하는데 이용될 수 있다. 본 발명의 방법은 또한 그 중에서도 특히 간이식 후 간 기능을 분석, 간 이식 후 이식편에서 재관류 질환의 간 기능장애 분석 또는 다기관 손상 및 폐혈증이 진전된 환자들의 간 기능을 분석하는데 이용될 수 있다.
- <27> 간 기능부전은 간 질환의 최종 단계이다. 간 기능부전은 발병 속도에 따른 형태로 나눠진다. 급성 간 기능부전은 빠르게 진전되나, 만성 간 기능부전은 진전되는데 수개월 또는 수년이 걸릴 수도 있다. 자명한 일로서, 간 기능부전은 간이 심하게 병들고, 기능이 심히 열악할 때 발생하고, 이는 뇌증이 명백하다. 예를 들어, 아세트아미노펜 독성, 간경변, 바이러스성 간염, 및 전이성 간암을 포함하는 임의의 진행성 간 질환 이 간 기능부전을 야기시킬 수 있다. 황달(jaundince), 복수(ascites), 간탁입냄새(fetor hepaticus) 및 응고 결핍과 같은 간 질환의 다른 징후는 간이 정상적인 생리적 임무를 수행하는데 곤란하다는 사실을 지시하나, 정신적 상태 변화가 나타나기 전까지는 이를 간 기능부전이라 칭하지는 않는다.
- <28> 간 질환 환자의 예후는 증상이 많은 원인이 있기 때문에 판단하기가 어렵다. 그러나 본 발명에 따르면, 간 질환, 특히 급성 간 기능부전 환자들 뿐만 아니라 ACLF 환자들의 임상적 과정을 예측할 수 있다. 또한 장기 기능부전의 초기 진전을 확인할 수도 있다. 또한, 초기 개입이 용인된 진행성 간 기능부전 환자들을 확인할 수도 있다. 간 이식에 포함된 변화 또한 본 발명의 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법은 간이 대상부전된 개인 또는 간 뇌증의 특징을 보이는 개인에게 수행할 수 있다. 상기 개인의 간은 보상 상태일 수 있다. 상기 개인은 만성 간 질환을 가질 수 있다. 상기 개인은, 예를 들어 알코올성 간염을 갖거나 갖지 않는 간 경변을 가질 수 있다. 상기 개인은 급성 간 기능부전을 가질 수 있다. 상기 개인은 간 뇌증을 가질 수 있다.
- <29> 급성 및 만성 간 질환의 발병은 생체이물의 원인에 기인할 수 있다. 예를 들어, 상기 개인은 간 손상을 야기시키는 화학물질, 약물 또는 몇몇 다른 약품에 노출되었을 수 있다. 상기 개인은 간 손상을 야기시키는 일반 판매약, 조제약 또는 “개조” 약과의 반응을 가질 수 있다. 상기 개인은 탈크화(talcine) Rezulin(TM) (troglitazone; Parke-Davis), Serzone(TM) (nefazodone; Bristol-Myers Squibb) 또는 간 손상을 야기시킨다고 여겨지는 다른 약물을 복용했을 수 있다. 상기 개인은 간 손상을 야기시킬 수 있는 특정 약물의 과투여 또는 약물의 권장 투여량을 초과한 사람일 수 있다. 예를 들어, 상기 개인은 파라세타몰이 과잉투여될 수 있다. 상기 개인은, 예를 들어 작업현장에서 간 손상을 야기시킬 수 있는 화학물질에 노출되었을 수 있다. 예를 들어, 상기 개인은 산업 또는 농업 환경에서 상기 화학물에 노출되었을 수 있다. 상기 개인은 간 손상을 야기시킬 수 있는 화합물을 함유한 식물을 소비했을 수 있으며, 이는 특히 상기 개인이 초식동물과 같은 동물인 경우에 해당된다. 예를 들어, 상기 개인은 개쑥갓(ragwort)과 같은 필드롤리지딘 알칼로이드를 함유한 식물을 소비했을 수 있다. 상기 개인은 간 질환을 야기시킨다고 여겨지는 환경적 독성물질에 노출되었을 수 있다.
- <30> 약물-관련 간 독성은 급성 간 질환(급성 간 기능부전)에 대한 모든 케이스의 50% 이상을 포함한다. 아세트아미노펜-(파라세타몰 및 JV- 아세틸-p-아미노페놀로 알려짐) 독성이 미국 및 영국에서 급성 간 기능부전의 가장 일반적인 원인이다.
- <31> 장기간 절제 중인 심한 알코올 사용자가 아세트아미노펜을 치료적 또는 적당한 과량으로 투여하면 심각한 간 손상 및 가능한 급성 간 기능부전의 위험이 있다. 알코올 사용은 아세트아미노펜의 독성 효과를 상승시킨다. 특이체질 약물 독성 또한 급성 간 기능부전에 기여한다. 특이체질 약물 독성은 개인이 약리학적으로 비정상적인 방식으로 약물에 반응하는 과민감성 반응으로 여겨지고 있다. 이러한 비정상적 반응이 급성 간 기능부전을 야기시킬 수 있다.
- <32> 급성 간 기능부전 또는 만성 간 질환은 병원성 유기체에 의한 감염으로 야기될 수도 있다. 예를 들어, 간 질환은 바이러스성 감염에 기인할 수 있다. 특히, 개인은 간경변을 야기시키는 바이러스에 감염되거나 감염되었을 수 있다. 상기 개인은 만성 바이러스성 간경변을 가질 수 있다. 상기 바이러스는, 예를 들어, B, C 또는 D형

간염 바이러스, 몇몇의 경의 hi이며, 특히 개인이 바이러스성 간염을 갖는 경우, 개인은 HIV-1 또는 II에 감염될 수 있다. 개인은 AIDS를 보유할 수 있다. 개인이 간 질환을 야기시키는 다른 유기체, 및 특히 그들의 생명주기의 몇몇 단계 동안 간에 존재하는 것들에 의해 감염되었거나 감염될 수 있다. 예를 들어, 개인은 간 흡충을 갖거나, 가졌을 수 있다.

<33> 개인은 유전 질환을 보유할 수 있고, 이는 만성 간 질환의 위험을 야기시키거나, 증가시킨다. 예를 들어, 개인은 하나 이상의 간 혈색소침착증(hemochromatosis), 월슨 질환 또는 α-1-항트립신 결핍을 가질 수 있다. 개인은 유전 장애를 가질 수 있고, 이는 간에 몇몇 종류의 구조적 또는 기능적 기형을 야기시키고, 간 섬유증의 가능성을 증가시킨다. 개인은 유전적으로 병에 걸리기 쉬워 자가면역 질환이 발병될 수 있고, 이는 간에 손상을 주어 간 섬유증에 기여할 수 있다.

<34> 만성 간 질환은 알코올-유발성일 수 있다. 치료되는 남 또는 여는 알코올 중독이거나 중독이었을 수 있다. 그 또는 그녀는 알코올을 주 당 평균 50 유니트 이상, 주당 평균 60 유니트 이상, 주 당 평균 70 유니트 이상 및 주 당 평균 100 유니트 이상을 소비하거나, 소비하였을 수 있다. 남 또는 여는 알코올을 주 당 100 유니트 이하, 주 당 150 유니트 이하 및 주 당 200 유니트 이하로 소비하거나, 소비하였을 수 있다. 알코올 1 유니트의 측정은 나라마다 다르다. 본 발명에서 1 유는 영국 표준에 따라 에탄올 8 g에 상응한다. 남 또는 여는 상기 수준의 알코올을 5년 이상, 10년 이상, 15년 이상 또는 20년 이상 소비하였을 수 있다. 개인은 이러한 수준의 알코올을 10년 이사, 20년 이하, 30년 이하 및 40년 이하로 소비하였을 수 있다. 알코올-유발성 간 경변의 경우, 개인은 예를 들어, 25세 이상, 35세 이상, 45세 이상 또는 60세 이상일 수 있다.

<35> 개인은 남성 또는 여성일 수 있다. 여성은 남성 보다 알코올의 역효과 쉽게 영향 받을 수 있다. 여성은 보다 적은 양의 알코올로도 남성 보다 짧은 시간 프레임에서 알코올성 만성 간 질환이 발병한다. 여성의 알코올성 간 손상 민감성 증가의 이유를 설명하기 위한 인자는 하나가 아닐 것으로 여겨지나, 알코올 대사 상의 호르몬의 영향이 중요한 역할을 할 것이다.

<36> 따라서 개인은 알코올성 간염을 겪을 수 있다. 알코올성 간염은 변칙적 실험실 시험으로만 질환이 지시되는 가벼운 간염으로부터 황달(빌리루빈 정체에 기인한 황색 피부), 간 뇌증, 복수, 출혈성 식도 정맥류, 비정상 혈액응고 및 코마와 같은 합병증을 갖는 심한 간 기능장애에 까지 다양할 수 있다.

<37> 본 발명에서는, 개인은 간 손상의 결과로 알려진 하나 이상의 다른 증상, 예를 들어, 1기 담즙 경변, 자가면역 만성 활성 간염, 및(또는) 주혈흡충증(기생충 감염)을 가질 수 있다. 개인은 담즙관 봉쇄(bile duct blockage)를 가질 수 있다. 몇몇 경우에 있어서, 간 질환의 근원적인 원인은 알려져 있지 않을 수 있다. 예를 들어, 개인은 원인불명의 경변으로 진단될 수 있다. 따라서 개인은 본 명세서에 열거된 임의의 증상을 갖는다고 의심될 수 있다. 급성 간 기능부전 및 간 뇌증과 같은 간 질환의 진단 방법은 당업계, 특히 임상의 및 수의사 분야에서 잘 알려져 있다. 바람직하게는, 개인은, 예를 들어 의료 또는 수의 전문가에 의해 간 질환 및 간 뇌증으로 갖는 것으로 진단 될 것일 것이다. 개인은 황달, 복수, 피부 변화, 유체 정체, 손톱 변화, 쉬운 명, 코피, 식도 정맥류와 같은 간 질환과 관련된 하나 이상의 징후를 나타낼 것이며, 수컷 개인은 유방 확장을 가질 수 있다.

<38> 개인은 기진, 피로, 식욕 저하, 메스꺼움, 허약 및(또는) 체중 손실을 나타낼 것이다. 개인은 또한 하나 이상의 혼란, 혼미, 치매, 인사불성, 코마, 뇌부종, 다기관 기능부전(호흡기 기능부전, 심혈관 기능부전 또는 신장 기능부전), 근육 경직/경축, 졸도 또는 언어 장애와 같은 간 뇌증과 관련된 하나 이상의 징후를 나타낼 것이다. 치료되는 개인은 간 질환 치료를 위해 다른 약물을 복용하거나 복용하지 않을 수 있다. 간 질환은 초음파와 같은 기법을 포함하는 물리적 조사에 의해 확인되었거나 확인될 수 있다. 간 생검은 섬유증, 괴사 세포, 세포변성 및(또는) 염증의 형성 및 간 질환의 다른 특이적 특징을 찾아내는데 사용될 수 있다. 개인의 간기능이 손상되었는지 여부를 측정하기 위하여 개인의 간기능을 분석할 수 있다. 간 질환은 본래 및 잠재적인 원인을 특징화시킬 수 있다. 간 질환의 원인이 되는 약품에 노출된 임의의 경력을 측정할 수 있다.

<39> 치료되는 개인은 간 뇌증 발현의 위험이 있을 수 있는, 예를 들어, 간 이식을 기다리는 환자, 외과적 및(또는) 문맥 고혈압 환자일 수 있다. 간 뇌증 발현 위험이 있는 사람은 어떠한 간 뇌증 발현도 겪지 않거나 또는 연장된 기간 동안(약 12 주 이상) 어떠한 간 뇌증 발현도 겪지 않았지만, 간 뇌증 발현의 위험이 발생하는 질환 또는 의료적 증상을 갖는 사람이다. 간 뇌증 발현은 간 질환 또는 기능장애 환자들에서 대뇌 기능장애의 존재를 특징으로 하는 임상적 증상이다. 간 뇌증에서는 주 효과가 삶의 질 저하인 최소 상태에서 코마 및 궁극적인 사망에 이르는 명백한 상태에 걸친 광범위한 정신적 장애가 존재한다.

- <40> 본 발명의 방법은 간 기능장애를 모니터링하는데 응용될 수 있다. 즉 간 기능의 시험으로서 상황에 따라, 예를 들어 (i) 후-간 이식 - 본 발명자들은, 급성 간 기증부전 환자들의 간 이식 후, 보다 낮은 DAS 점수를 반영하는 ADMA의 진행성 감소 및 SDMA의 느린 저하가 있음을 나타내었음; (ii) 간 이식 후 이식편에서 재관혈류 손상; (iii) 다기관 기능부전이 진전된 위독한 환자 - 간 기능장애는 1차 작인일 수 있고, 따라서 본 발명의 방법은 이를 조기에 확인하고 이의 진행을 추적할 수 있고, 즉, 이들이 추가의 기관 기능부전(예를 들어, 1, 2 또는 3 개의 기간) 및 사망에 이를 지 여부를 예측할 수 있다. 따라서 본 발명의 방법이 실시된 개인은 간 이식 환자, 예를 들어 간 이식 후 이식편에 재관혈류 손상을 겪는 개인, 또는 다기관 기능부전이 진전되었거나 진전될 위험이 있는 환자일 수 있다.
- <41> 본 발명에 있어서, 개인의 메틸아르기닌(들)의 수준 및 IMAR를 측정한다.
- <42> 전형적으로, 본 발명의 방법은 개인으로 취한 시료에 대해 *in vitro*에서 수행된다. 상기 시료는 일반적으로 메틸아르기닌(들) 및 IMA 및 알부민을 함유한다고 알려진 조직으로부터 취해질 것이다. 상기 시료는 전형적으로 개인의 체액을 포함하며, 따라서 예를 들어 혈청일 수도 있다. 택일적으로 또는 추가적으로, 상기 시료는 소변, 뇌척수액 또는 간 조직을 포함할 수 있다. 이러한 시료들은 임의의 방식으로 수득될 수 있다. 혈청 및 간 조직을 수득하는 방법은 당업계의 숙련자들에게 잘 알려져 있다. 개인의 메틸아르기닌(들)의 수준, 특히 ADMA 및 SDMA5는 임의의 편리한 방식으로 측정될 수 있다. 예를 들어, 시료 중의 메틸아르기닌(들)의 수준은 분획 특이적 안정 동위원소 희석 일렉트로스프레이 직렬 질량 분광분석법(fragmentation specific stable isotope dilution electrospray tandem mass spectrometry)을 이용하거나, 또는 이온 교환 추출 후 형광 검출을 이용한 HPLC에 의해 측정할 수 있다.
- <43> IMAR은 또한 당업계의 숙련자들에게 공지된 임의의 편리한 방법을 임요하여 측정할 수 있다. 예를 들어, 애보트 에아로세트 보모크레솔 퍼플(Abbott AeroSet BomoCresol Purple; BCP) 테스트를 혈청 알부민의 측정에 사용할 수 있다. 이어서, IMA 농도는, 혈청 표본에 공지된 양의 Co(II)를 가하고 디티오트레이톨을 이용하는 비색 분석(colorimetric assay)에 의해 풀린 Co(II)를 측정하여 측정될 수 있다.
- <44> 메틸아르기닌의 수준은 개별적으로 또는 조합으로(예를 들어, ADMA+SDMA = DAS 점수)으로 측정되고, IMAR를 이용하여 개인의 간 질환의 임상적 과정을 예측할 수 있다.
- <45> 바람직하게는 메틸아르기닌(들)(예를 들어 ADMA 및 SDMA) 및 IMAR의 수준을 측정하는데 이용되는 방법은 비교적 빠르고 저렴하게 수행할 수 있는 하나 일 것이다. 사용된 방법은 임상에서 수행할 수 있어서 임상적 세팅 내에서 간단히 측정할 수 있는 것이다. 예를 들어, ELISA와 같은 분석 키트를 사용하여 메틸아르기닌의 수준을 측정하거나 IMAR을 측정할 수 있다.
- <46> DAS 점수 혈장 중 두 가지 메틸화 아르기닌(비대칭성 디메틸아르기닌 [ADMA] 및 그의 입체이성질체인 대칭성 디메틸아르기닌 [SDMA]) 측정 값의 합으로부터 계산된다. 이들 두 가지 변수는 염증성 상태를 반영하고, 기관 기능부전의 초기 전개를 확인시켜준다. 사망한 환자들은, DAS가 상대적으로 감소한 생존자에 비해 유의적인 비율의 DAS 증가를 갖는다.
- <47> 따라서 본 발명의 방법에 있어서, 상승된 DAS 점수(또는 그의 성분들 중 하나 또는 다른 것으로부터 생성된 점수)는, 간 질환을 앓지 않은 환자 또는 간 질환의 생존자에서의 상응한 점수와 비교할 때, 기관 기능부전의 진행 또는 보다 중요하게는 유독한 과정, 즉 사망률의 신뢰성 있는 예보자이다.
- <48> 상승된 DAS 점수(또는 그의 성분들 중 하나 또는 다른 것으로부터 생성된 점수)는 따라서 간 이식으로 인한 변화를 포함하는 환자들뿐만 아니라 ACLF 환자들의 과정의 신뢰성 있는 예보자로서 작용한다.
- <49> 이 상승된 점수는(비-간질환 개인들 또는 간 질환 생존자들과 비교할 때) 간 지원 시스템의 초기 개입이 보장되는 진행성 간 기능부전 환자들을 정의하는데 도움을 준다. 또한, 이러한 상승된 점수는 간 이식을 받을 지원자들 균으로부터 개인을 선택하는데 이용될 수 있다.
- <50> 사망한 알코올성 간 질환 환자들은 생존자들과 비교하여 유의적으로 증가된 IMA:알부민 비율을 갖는다. 더욱이 DAS 값과 비교하여, IMAR는 염증 상태 및 그에 따른 질환의 근원적인 병리적 전개를 반영하는 것으로 여겨진다. 따라서 IMAR은 간 질환 진행 및 특히 이들 환자의 사망률의 예측 테스트로서 유용할 수 있다.
- <51> 결합된 바이오마커로서 디메틸아르기닌 점수(DAS)와 IMAR의 조합은, 0.81-0.99의 95% 신뢰 간격, 및 74% 민간도 및 92%의 특이성을 갖는 0.91(± 0.04)의 AUROC으로 열악한 과정의 예측 기능을 개선시킨다. 이는, 사망률을 위험을 분석하는 한편, 알부민 투석 및 염증을 감소시키기 위한 치료요법과 같은 특이적 개입에 의해 표적화될 수

있는 간 기능부전의 병태생리학 요소인 심해진 기관 기능부전 및 염증을 반영하는 훌륭한 예측 기능을 제공한다. 따라서 본 발명의 방법에 있어서, 증진된 메틸아르기닌(들)의 수준은, 간 질환을 앓지 않은 개인 또는 간 질환의 생존자인 개인의 메틸아르기닌(들)의 수준과 비교할 때, 개인의 간 질환의 전개, 손상된 간 기능, 증진된 사망률 위험을 나타낸다. 결합된 ADMA 및 SDMA의 증가는, 간 질환을 앓지 않은 개인 또는 간 질환의 생존자인 개인의 결합된 ADMA 및 SDMA의 수준과 비교할 때, 개인의 간 질환의 전개, 손상된 간 기능, 증진된 사망률 위험을 나타낸다. IMAR의 증가 또한, 간 질환을 앓지 않은 개인 또는 간 질환의 생존자인 개인의 IMAR와 비교할 때, 개인의 간 질환의 전개, 손상된 간 기능, 증진된 사망률 위험을 나타낸다.

<52> 상기에 기술한 방법에 있어서, 결합된 ADMA와 SDMA 수준의 증가, 및 IMAR의 증가와 같은 메틸아르기닌(들) 수준의 증가는, 간 질환을 앓지 않은 개인 또는 간 질환의 생존자인 개인의 IMAR와 비교할 때, 개인의 간 질환의 전개, 손상된 간 기능, 증진된 사망률 위험을 나타낸다.

<53> 이상적으로는, DAS 점수(또는 그의 성분 점수) 또는 DASIMAR 점수는 사망률과 같은 특이적 과정을 예보하여야 하는데, 이상적으로 숙련자들은 임상적 과정, 예를 들어, 상기 점수를 기준으로 생존 또는 사망을 결정할 수 있을 것이다.

<54> 리시버 오퍼레이팅 특징(receiver operating characteristic; ROC) 곡선은 이를 성취하도록 허용할 수 있다. 이러한 곡선은 다양한 상이한 컷 포인트에 대한 임상적 시험의 민감성과 특이성 사이의 관계, 예를 들어 DAS 또는 DASIMAR를 조사하여 최적 컷 포인트를 결정하도록 하며, 즉 윗 부분이 간 질환의 유독한 과정을 지시하고 아랫 부분이 생존을 지시하는 컷 포인트를 선택하는 것이 바람직할 것이다.

<55> 통상적으로 사용되는 임상적 시험의 수행 수단은 민감성과 특이성이다. 민감성은 질환(또는 본 발명의 경우 과정)이 실제로 존재할 때 진단되는 가능성이고, 특이성은 질환이 완전하게 없을 때 없는 것으로 확인되는 가능성이다. 이상적으로, 민감성과 특이성은 하나가 되어야 한다. 하지만, 컷 포인트를 변화시켜 민감성과 특이성 중 하나를 증가시키려는 시도는 통상적으로 다른 하나를 감소시킬 것이다.

<56> ROC 곡선은 최적 컷 포인트를 확립하기 위한 그래프적 기법이다. ROC 곡선을 작도하기 위하여, 각각의 가능한 컷 포인트 값에 대한 민감성과 특이성을 계산할 필요가 있다. ROC 그래프를 만들기 위하여, X 축은 1-특이성이고, Y 축은 민감성이다. 대각선을 하부 좌측 코너에서 상부 우측 코너로 그린다. 이 그래프는 식별력 없는 시험의 특징을 반영한다. 그래프가 상부 우측 코너에 보다 근접할 수록 케이스와 비케이스 간을 보다 잘 식별할 수 있다. 시험이 장점 지수는 곡선 아래의 영역이고, 이 값이 근접할 수록 시험의 식별력이 좋아진다. 따라서 ROC 곡선은 DAS 점수(또는 그의 성분 점수) 또는 DASIMAR 점수를 위한 컷 포인트를 확립하는데 이용될 수 있다. 컷 포인트 위의 점수는 사망률과 같은 유독한 과정을 지시하는 반면, 컷 포인트 아래의 점수는 생존과 같은 비유독한 과정을 나타낼 것이다. 컷 포인트는 시험의 필요성, 예를 들어 위양성(false positive)을 배제하는 것이 보다 중요한지 또는 진양성(true positive)을 확인하는 것이 보다 중요한지 여부에 따라 선택될 수 있다.

<57> 사망하게 될 간 기능부전으로 공인된 환자들을 확인하기 위한 시험의 경우에 있어서, 이를 환자 모두를 확인하는 것이 중요하며, 이 경우 컷 포인트는 위양성의 수로 확인될 수 있다.

<58> 본 발명의 방법에 있어서, 컷 포인트는 간 질환의 특정 과정, 예를 들어 생존을 지시하거나, 간 질환의 진행, 예를 들어 급성 간 질환의 발명을 지시할 것이다.

<59> 적절한 컷 포인트가 당업계의 숙련자들에 의해 확인될 수 있다. 예를 들어, 1.52의 DAS 컷 포인트가 알코올성 간염을 갖는 알코올성 간 경변을 앓고 있는 환자들의 생존을 평가할 때 유용한 예보자인 것으로 나타났다.

<60> 본 발명의 방법은 간 질환 및 간 뇌증의 심각성 및 개체의 예후를 분석하는데 이용되는 하나 이상의 추가적 점수 시스템과 조합하여 수행될 수 있다. 예를 들어, 약 2, 3, 4 또는 그 이상에서 약 5, 6, 7, 8 또는 그 이상의 점수 시스템을 본 발명의 점수 시스템과 결합할 수 있다. 이러한 부가적인 점수 시스템은 차일드-푸(Child-Pugh), 웨스트 헤븐 크리테리아(West Haven Criteria), 글래스고우 코마 스케일(Glasgow Coma Scale) 또는 모디파이드 차일드-푸(modified Child-Pugh) 점수 시스템을 포함한다. 다른 방법으로 또는 부가하여, DF, SOFA, MELD 또는 APACHE II를 점수 시스템으로 사용할 수 있다. 포인트들은 혈청 빌리루빈 수준, 혈청 알부민 수준을 포함한은 파라미터 및 복수 또는 뇌증의 존재를 포함하는 신호에 할당된다. 처리되는 개체는 차일드-부 클래스 A, B 또는 C로 구분될 수 있다. 일반적으로 처리되는 개체는 차일드-푸 클래스 C로 구분된다. 본 발명은 또한 개인의 하나 이상의 메틸아르기닌 및 IMAR 수준을 측정하기 위한 수단을 포함하는 개인의 간 질환의 과정을 예측하는데 적절한 시험 키트를 제공한다.

- <61> 본 발명의 시험 키트는 간 질환의 치료에 유용한 약품을 포함할 수 있다.
- <62> 본 발명의 시험 키트는 적절한 완충제(들), 효고, 예를 들어, Taq 폴리머라아제 및(또는) 대조 폴리뉴클레오타이드와 같은 열안정성 폴리머라아제를 임의로 포함할 수 있다. 본 발명의 키트는 또한 개인의 간 질환의 과정을 예측하기 위한 방법에 사용하기 위한 적절한 포장 및 지시를 포함할 수 있다.
- <63> 본 발명은 사망률의 위함이 증가된 개인을 확인하도록 해준다. 또한 이는 간 질환의 진행을 결정될 개입의 효과를 모니터링되도록 허용할 수 있으며, 즉, 개인의 간 질환 치료의 효능을 모니터링할 수 있다. 따라서 상기 방법은 동일한 개인 및 간 질환 치료 과정의 유효성을 평가하기 위한 처리에 관해서 수차례 수행될 수 있다.
- <64> 증가된 사망률의 위험에 있는 것으로 확인된 개인은 그에 따라 치료될 수 있다.
- <65> 따라서 본 발명은 상기에 기술한 방법을 이용하여 개인이 증가된 사망률 위험을 갖는지 여부를 결정하는 단계, 및 이어서 개인에게 치료적 유효량의 간 질환 치료에 유용한 약품을 투여하는 단계를 포함하는 간 질환의 치료 방법을 제공한다.
- <66> 본 발명은 또한 상기에 기술한 방법을 이용하여 개인이 증진된 사망률 위험을 앓고 있는 것으로 확인된, 개인의 간 질환 치료 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용하기 위한 간 질환의 치료에 유용한 약품의 용도를 제공한다.
- <67> 따라서 증진된 사망률 위험을 갖는 것으로 확인된 개인의 증상은 간 질환의 치료에 사용되는 약품의 투여로 개선될 수 있다. 간 질환의 치료에 이용되는 약품의 치료적 유효량이 본 발명의 방법에 따라 확인된 개인에게 투여될 수 있다.
- <68> 개인이 증진된 사망률 위험을 갖는 것으로 확인되었을 때 조차도, 간 기능부전으로 가는 진행은 되돌릴 수 없다. 이 경우, 간 기능의 감소를 약화시키기 위한 조치들이 취해질 수 있다. 환자들의 식이가 제한될 수 있다. 단백질 소비는 전형적으로 최적 수준으로 유지될 것이고, 이는 너무 높은 경우 뇌 기능장애를 일으킬 수 있고, 너무 낮은 경우 체중 감소를 일으킬 수 있다. 알코올은 완전히 피해야하며, 나트륨 소비는 복부에 유체가 축적되는 복수를 방지하는데 도움이 되도록 적은 양으로 유지할 수 있다. 간 투석이 적절할 수 있다. 간 이식은 간 기능부전의 최후 치료이지만, 이는 모든 환자들이 선택할 수는 없고, 간의 공급이 제한되어 있다. 따라서 본 발명의 방법은 간 이식의 잠재적 수용자를 계증화하는데 이용될 수 있고, 가장 높은 사망 위험이 있는 환자들을 확인할 수 있다. 락툴로즈(lactulose)와 같은 약물을 투여하여 간 기능부전의 정후를 완화시킬 수 있다.
- <69> 간 질환의 치료에 사용되는 약품은 다양한 투여 형태로 투여될 수 있다. 따라서 약품은, 예를 들어 정제, 트로키제, 로젠지, 수성 또는 유성 혼탁제, 분산성 분말 또는 과립으로 경구 투여될 수 있다. 질환 치료에 사용되는 약품은 또한 피하, 정맥 내, 근육 내, 흉골 내, 경피적으로 또는 주입 기법에 의해 투여될 수 있다. 상기 약품은 또한 좌약 형태로 투여될 수도 있다. 의사가 각각의 특정 환자를 위한 필요한 투여 경로를 결정할 수 있을 것이다.
- <70> 간 질환의 치료에 사용되는 약물의 제형은 정확한 약품의 특성, 약제학적 또는 수의학적 사용이 의도되었는지 여부 등과 같은 인자에 의존할 것이다. 간 질환의 치료에 사용되는 약품은 동시적, 개별적 또는 연속적 사용을 위해 제형화될 수 있다.
- <71> 간 질환의 치료에 사용되는 약품은 전형적으로 약제학적으로 허용가능한 담체 또는 희석제와 함께 본 발명의 투여를 위해 제형화된다. 약제학적 담체 또는 희석제는, 예를 들어, 등장성 용액일 수 있다. 예를 들어, 고형 경구 형태는 활성 화합물과 함께, 희석제, 예를 들어, 락토오스, 텍스트로오스, 사카로오스, 셀룰로오스, 옥수수 전분 또는 감자 전분; 윤활제, 예를 들어, 실리카, 탈크, 스테아르산, 스테아르산 마그네슘 또는 칼슘, 및 (또는) 폴리에틸렌 글리콜; 결합제, 예를 드Ring, 전분, 아라빅 검, 젤라틴, 메틸셀룰로오스, 카복시메틸셀룰로오스 또는 폴리비닐 피르룰리돈; 붕해제, 예를 들어, 전분, 알긴산, 알기네이트 또는 나트륨 전분 글리콜레이트; 비등 혼합물; 색소; 감미제; 습윤제, 예를 들어, 렉틴, 폴리소르베이트, 라우릴설페이트; 및 일반적으로 약제학적 제형에 사용되는 비독성 및 약제학적으로 불황성인 물질을 함유할 수 있다. 이러한 약제학적 제제는 공지된 방법, 예를 들어, 혼합, 과립화, 정제화, 당-코팅 또는 필름 코팅 공정으로 제조될 수 있다.
- <72> 경구 투여를 위한 액상 분산제는 시럽, 에멀전 또는 혼탁액일 수 있다. 상기 시럽은 담체, 예를 들어, 사카로오스 또는 사카로오스와 글리세린 및(또는) 만나톨 및(또는) 소르비톨을 함유한다. 혼탁제 및 에멀전은 담체로서, 예를 들어, 천연 검, 한천, 알긴산 나트륨, 펙틴, 메틸셀룰로오스, 카복시메틸셀룰로오스 또는 폴라비닐알

코올을 함유할 수 있다. 근육 내 주사를 위한 혼액제 또는 용액제는, 활성 성분과 함께, 약제학적으로 허용 가능한 담체, 예를 들어, 멜균수, 올리브 오일, 에틸 올레이트, 글리콜, 예를 들어, 프로필렌 글리콜, 및 바람직한 경우, 적절한 영의 리도카인 하이드로클로라이드를 함유할 수 있다.

<73> 정맥 내 투여 또는 주입을 위한 용액제는 담체로서, 예를 들어, 멜균수를 함유할 수 있고, 바람직하게는 이들은 멜균, 수성, 등장성 살린 용액의 형태일 수 있다.

<74> 간 질환의 치료에 이용되는 치료적 유효량의 약품은 본 발명의 방법을 이용하여 간 질환을 갖는 것으로 확인된 환자에게 투여될 수 있다. 간 질환의 치료에 사용되는 약품의 투여량은 다양한 파라미터, 특히 사용된 물질; 치료될 환자의 연령, 체중 및 증상; 투여 경로; 및 요구되는 식이 요법에 따라 결정될 수 있다. 또한, 의사가 임의의 특정 환자에 대해 요구되는 투여 경로 및 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 전형적인 1일 투여량은 약 특정 저해제의 활성, 치료될 개인의 연령, 체중 및 증상, 변성의 유형 및 엄중 및 투여 주기 및 경로에 따라 체중 kg 당 약 0.1 내지 50 mg이다. 바람직하게는 1일 투여 수준은 5 mg 내지 2 g이다.

<75> 적절한 약품은 상기에 기술한 바와 같은 본 발명의 방법에 따라 간 질환으로 앓고 있는 것으로 확인된 개인의 간 질환의 치료 방법에 사용하기 위한 약제의 제조에 사용할 수 있다.

<76> 따라서 개인의 간 질환 치료 방법은 (i) 상기에 기술한 바와 같은 본 발명의 방법을 이용하여 개인이 사망률의 위험에 있는지 여부를 결정하는 단계; 및 (ii) 상기 (i) 단계에서 사망률의 위험이 있다고 확인된 개인에게 상기에서 개시한 바와 같은 치료적 유효량의 약품을 투여하는 단계를 포함한다.

<77> 제품은 개인에서 간 질환의 과정을 예측하기 위한 수단 및 치료요법에 의해 인체 또는 동물 육체의 치료 방법에 동시, 개별 또는 연속 사용을 위해 결합된 제제로서 간의 치료에 사용될 수 있는 약품을 함유한다. 따라서 이러한 제품은 진단 수단 및 치료요법을 위한 수단을 포함할 수 있다.

<78> 본 명세서에서 언급된 모든 문헌 및 특히 출원서는 본 발명이 속하는 기술분야의 숙련자들의 수준을 나타낸다.

<79> 모든 문헌 및 특히 출원서는, 각 개별 문헌 및 특히 출원서가 특정하게 및 개별적으로 참고문헌으로 포함된 것과 같이 동일한 정도로 본 명세서에 참고문헌으로 포함된다.

실시예

<91> 상기에서 이해를 위한 목적으로 실례 및 예시의 방법으로 발명을 어느 정도 상세하게 기술하였음에도, 특정한 변경 및 개선이 하기의 청구항의 범위 내에서 실시 가능할 수 있다는 사실이 당업계의 숙련자들에게 자명할 것이다.

<92> 하기의 실시예로 본 발명을 예시한다:

실시예

<94> 실시예 1 : 증가된 디메틸아르기닌 수준은 심각한 알코올성 간염의 역 임상적 과정과 관련이 있다.

방법

<96> **연구 설계 :** 모든 환자 또는 그들의 친척들은 각각 헬싱키 선언(Declaration of Helsinki of the World)에 따라 동의 또는 승낙을 알리는 서면을 제출하였다. 본 연구는 1989년 의료 협회(Medical Association)의 지역 윤리 위원회로부터 승인받았다. 환자들은 알코올성 간 질환의 급성 대상부전(복수 증가, 족부 부종 또는 진행성 횡달)의 증거, 간 경변의 임상적 및 방사선적 증거 및 현재 알코올 남용 이력 (투여 시까지 남성은 알코올 소비량 >80g alcohol/day, 여성은 알코올 소비량 >60g/day) 이 있었다. 환자들은 <18 또는 >75 세이며, 추가의 또는 또 다른 간 질환의 원인; 심각한 심장 기능장애 또는 신장 기능부전(크레아티닌 150 μ mol.L); 간/간외 악성종양; 간 뇌증 >2 기(자세한 동의서로 미리 배제함)의 증거를 갖고, 광폭-스펙트럼 항생제 치료요법 72시간 후 감염을 지시하는 미생물학적 증거(소변, 혈액, 타액 및 복수의 배양)가 있는 경우 배제하였다.

<97> 환자들은 경경정맥 간 생검(투여 1-3일 내) 시에 조사하고, 복수 및(또는) 응고병증이 있는 환자들의 간 기능장애의 심각성 평가를 수행하였다. 환자들을 후속 조직학적 검사 시에 간경변(AH+C+)에 부가하여 알코올성 간염을 갖는지 여부로 분류하였다. AH+C+를 정의하는데 사용된 조직학적 범주는 간세포 별분 변성(hepatocyte balloon degeneration); 말로이 바디(Mallory bodies); 호중구 침윤 및 아폽토시스 호산샘 바디(apoptotic acidophilic bodies)의 존재를 포함하였다. 모든 환자들은 72g protein/day을 포함한 2000 kCal/day의 영양공급; 초기 비경구 비타민 B 보충(2일 동안 1일 정맥 내 파브리넥스 3 회 투여) 후 1일 당 1 복합비타민 캡슐 및

200mg 티아민으로 비타민 보충을 포함하는 보조 치료요법을 받았다. 패혈증(배양 후 항균물질); 간콩팥 증후군(염 부족 알부민 60g과 함께 1일 6회까지 텔리프레신 0.5-2mg 정맥 내 투여[20g/ 100m1]); 기관 기능부전(지시된 바와 같은 혈액여과 및(또는) 환기를 포함한 집중 관리 부양)을 포함하는 합병증을 유발시키기 위하여 국소프로토콜 구동 치료를 개시하였다. 영국에서 급성 알코올성 간염을 위해 코르티코스테로이드 및 항-TNF 항체 치료의 사용에 대해 진행되고 있는 논란을 고려하여, 연구 동안 이러한 치료요법은 환자들에게 사용하지 않았다.

<98> **측정방법** : 밤새 절식 및 1 시간 무관심 휴식 기간 후 혈액학(Haemodynamic) 연구를 수행하였다. 환자들을 미다졸람(평균 투여량 4 mg: Phoenix Pharma Ltd., Gloucester, UK)을 이용하는 과정을 위해 진정시키고, 심박수 및 비-침습성 평균 동맥 혈압 모니터링을 시종 수행하였다. 온도 >38 °C; 심박수 > 90 beats/minute; 빈호흡 >20 breaths/minute; 백혈구 수 >12 x 10⁹/L 또는 < 4 x 10⁹/L 또는 10% 이상의 미숙 호중의 존재하의 기준을 이용하여 각 환자에 대한 전신성 염증 반응 증후군(Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS) 점수를 확립하였다.

<99> **간경맥 압력차(Hepatic venous pressure gradient; HVPG)**: 투시 스크리닝(Toshiba Spot Film Device Model: SA-900U; Tochigi-ken, Japan) 하에서 5 Fr 베렌스테인 폐쇄 벌룬 카테터(Berenstein occlusion balloon catheter; Boston Scientific, Cork, Ireland)을 우측 체내 경정맥 경로를 통해 우측 간 정맥에 삽입하였다. 웨지 및 프리 간경맥 압력측정(Wedged and free hepatic venous pressure measurements)을 3회 수행하고, 압력 변환 세트(pressure transducer sets; Medex Medical, Rossendale, Lancashire, UK)를 통해 휴렛 팩커드 모니터(Model 86S, HP, USA) 상에 기록하였다. HVPG를 웨지와 프리 간경맥 압력 사이의 차로서 계산하였다.

<100> **샘플링 및 분석** : 혈액을 예냉한 혜파린첨가/EDTA 코팅 튜브(Becton Dickinson, Drogheda, Ireland) 중 동맥 및 간 정맥에서 수집하였다. 상례적인 혈액학, 간 생화학 및 C-반응성 단백질을 모든 환자들에게서 측정하였다. 혈장 크레아티닌을, 담즙정체 상태에서 제이프(Jaffe) 분석의 정밀도의 어려움을 가정하여, 질량 분광법으로 분석하였다. 추가의 혈장 시료를 원심분리로 분리하고, 혈장을 -80°C에서 후속 사이토카인, 케모카인 및 ADMA 분석을 위해 보관하였다. 획득한 간 조직을 포르말린 고정하거나 액체 질소에서 스냅-냉동하여, -80°C에서 후속 조직 ADMA 농도 분석 및 PRMT 1 및 DDAH II의 단백질 평가를 위해 보관하였다. 알코올 남용 이력이 없고 알려진 과거 치료 이력이 없는 12 명의 건강한 지원자(남성 9인)의 대조군으로부터 얻은 혈액 시료를 사용하여 ADMA 및 SDMA의 “정상” 범위를 구하였다.

<101> **사이토카인/케모카인** : TNF α, 인터류킨-6 (IL-6), 인터류킨-8 (IL-8) 및 가용성 TNF 수용체 I 및 II (TNF-RI, TNF-RII)를 표준 상업적 분석 키트(BioSource, Nivelles, Belgium)를 이용하여 상기에서 기술한 바와 같이 측정하였다. 검출 하한은 5pg/mL로 평가하였고, 변수의 내부-분석 계수는 4.5-5.5 %였다.

<102> **ADMA** : 분획 특이적 안정 동위원소 희석 일렉트로스프레이 직렬 질량 분광법(fragmentation specific stable isotope dilution electrospray tandem mass spectrometry)을 이용하여 혈장 ADMA를 측정하였다. 시료(50 μL)를 H6-ADMA를 함유한 아세토니트릴을 이용하여 탈양성자화시키고, 테이코플라닌 가드 컬럼(Teicoplanin guard column) 10mm x 2.1mm ID (Chirobiotic T, ASTEC Ltd, Congleton, UK) 상에서 크로마토그래피하고(아세토니트릴:물, 1:1, with 0.025% 포름산), 양성자 이온 다중 반응 모니터링 모드에서 SCIEX API4000 (Applied Biosystems, Warrington, UK)를 이용하여 분석하였다. 획득 시간은 < 3 분의 주입에서 주입 간의 시간에서, 2.5 분이었다. 분석 내에서, ADMA에 대한 부정확도는 0.37 μmol/L의 농도에서 2.1%였다. ADMA에 대한 내부 분석 부정확도는 각각 0.39, 1.15, 및 3.96 μmol/L의 농도에서 7.4%, 5.8%, 및 5.1%였다.

<103> 조직 균등질을, EDTA (1mM); 수크로오스 (250mM); 발린 (60mM); 프로테아제 저해제 칵테일(1 mL/20g 조직에서, 4-(2-아미노에틸)벤젠су포닐 플루오라이드(AEBSF), pepstatinA, E-64, 베스타틴, 류펩틴 및 아프로티닌 함유; Sigma-Aldrich Co, UK); 및 PMSF (3.4mg/ml)를 함유하는 빙냉 HEPES 완충액 (200mM, pH 7.4) 중에서 스냅 냉동 간 조직으로부터 제조하였다. 이를 원심분리하고(1000g, 10 분, 4°C), 상청액을 남겨, 뷔렛 방법(Biurret method)으로 단백질 함량을 측정하였다. 이를 제조물 유래 상청액을 추출하고, 상기에 간략히 기재한 방법을 이용하였으나 10 μL의 각 균등물 시료는 사용하지 않고 ADMA를 분석하였다. 조직 ADMA 농도를 단백질 mg 당 μmol로 나타내었다.

<104> **DDAH 및 PRMT 웨스턴 블로트 분석** : 마지막 8명(4 명은 AH+C+로 판명되었고, 4 명은 알코올성 간경변만 판명되었음)의 환자의 생검 표본을 분석하여 DDAH 및 PRMT를 정량화하였다. 균질화환 냉동 간 조직을 100 μL의 용리 완충액(PBS, pH 6.6, 0.1% SDS3 0.5% 나트륨 테옥시콜레이에트 및 1% 노니테트 함유)에 재현탁시켰다. 단백질 농도를 측정한 후, 단백질 30 ug을 SDS 폴리아크릴아마이드 겔(12%)로 분리하고, 0.1 또는 항 래빗 폴리클로날

PRMT-I 항체[Abeam pic, UK; 1:1000]를 함유한 PBS 중에서 5% 무지방 건조 밀크로 블록킹된 니트로셀룰로오스 멤브레인으로 이송하고, 세척한 후 1:3000로 희석된 항-마우스 또는 항 래빗 호스래디쉬 퍼옥시다아제-컨쥬게이티드 2차 항체(각각 DDAH II 및 PRMT-I)로 배양하였다. 상기 멤브레인을 증진된 화학발광 기질 플러스(ECL plus, Amersham, UK)로 현상하였다. 블롯을 이미지화하고, Genesnap/Gene 툴(Syngene, SLS, UK)을 이용하여 정량하였다. 이어서 멤브레인을 55°C에서 벗기소, α -튜블린 마우스 항-인간 모노클로날 1차 항체(Sigma-Aldrich, UK) 및 이어서 2차 항-마우스 항체를 이용하여 재탐색한 후, 상기와 같이 현상하여, PRMT 및 DDAH를 α -튜블린 함량에 대해 보정하여 PRMT 및 DDAH의 발현을 정량화하였다.

<105> 통계적 분석 : 데이터는 평균(범위) 또는 평균±표준편차(SEM)으로 나타내었다. 투-테일드 언페어드 t-테스트(Two-tailed unpaired t-tests)를 사용하여 상업적으로 시판되는 팩키지(Graph Pad Prism, version 4.0; Graph Pad Software, Inc., SanDiego, CA, USA)로 동일한 편차의 정상적으로 분포된 데이터 평균들 사이의 차이를 정의하였다. 정상적으로 분포되지 않은 데이터를 통계적으로 평가하기 위하여, 만-휘트니 테스트(Mann-Whitney test; Graph Pad Prism)를 이용하였다. 결과를 $P<0.05$ 인 경우 유의적인 것으로 고려하였다. 다중 비교를 위한 본페로니 보정(Bonferroni correction)으로 편차 분석(ANOVA)에 의해 다중 군들 간을 비교하였다. 변수들 간의 상호관계 계산을 회귀 분석 소프트웨어(Excel 2003; Microsoft Corporation, WA)으로 수행하였다.

<106> 결과

<107> 환자 : 총 64 명의 환자들을 15 개월에 걸쳐 분석하였고, 10 ± 0.3 군에 대해 평균 푸 점수(Pugh score)를 갖는 52 명의 환자들이 본 연구에 포함되었으며, 이는 이 코호트에서 대상부전 간경변을 반영하였다. 이러한 상승된 심각성 지수는 전체 군에 대하여 증가된 MELD 점수 및 19 ± 1 mmHg의 상승된 평균 간 정맥 압력차(HVPG)로 보완되었고, 이는 진보된 문맥 고혈압을 반영한다. 12 명의 환자가 배제되었는데, 7 명은 부수적 바이러스성 간염을 갖고 있었고, 3 명은 심각한 신장 기능장애가 있었으며, 1 명은 간경변의 조직학적 증거가 없었고, 1 명은 패혈증이 과도하였다. 상기에서 정의한 표준 조직학적 기준을 이용하여, 본 발명에 포함된 52 명의 환자들을, 상기 환자 특징 표 1에 나타낸 바와 같이, 간경변과 알코올성 간염 [AH+C+] ($n=27$)으로서 염증을 갖는 군, 알코올성 간경변만[AH- C+] ($n=25$)을 갖는 군으로 나누었다. AH+C+ 생검에서 괴사염증(necroinflammation)의 심각도 등급화 비-알코올성 지방간염에 대해 제시한 것과 유사한 점수 시스템을 응용하였고, 모든 포함된 환자들은 2 명의 독립적 조직병리학자가 동의한 적절-심각 등급을 가졌다.

<108> 조직학적 기준에 부가하여, 모든 AH+C+ 환자들은 46 + 6의 평균 매드레이 판별함수(mean Maddrey discriminant function) 점수에 의해 명백한 바와 같이 급성의 심각한 AH를 가졌고, 이는 표 1에 요약한 바와 같이, AH-C+ 환자들과 비교하여 유의적으로 상승된 혈장 빌리루빈 수준 및 프로트롬빈 시간을 반영하였다. 혈청 아미노트랜스페라아제는 군들 간에 통계적으로 차이가 없었다($P=0.46$). 평균 혈청 크레아티닌 수준은, 평균 크레아티닌 값이 AH- C+와 비교하여 AH+ C+ 환자들에서 보다 높았음에도 불구하고 양 군이 정상 실험실 참조 범위 내에 있었다($P=0.01$). 27 명의 AH+C+환자들 중 20 명이, 25 명의 AH- C+환자들 중 10 명인 것과 비교하여 적절 내지 심각한 복수를 가졌다($P=0.008$). 12 명의 AH+C+ 환자들이, 25 명의 AH- C+환자들 중 4 명인 것과 비교하여, >2 등급 간 뇌증을 가졌다($P=0.02$).

<109> 염증 마커 : AH+C+ 환자들은, AH- C+ 환자들과 비교하여, 보다 높은 혈장 CRP($P<0.001$)에 의해 명백한 바와 같이 유의적으로 상승된 염증 지수, 상승된 혈액 세포 수($P<0.001$) 및 전신 염증 반응성 증후군(Systemic Inflammatory Response Syndrome; SIRS) 점수($P<0.001$)를 가졌다. AH+C+ 환자들에 있어서, 진행성 염증의 추가적 증거는 유의적으로 보다 큰 혈장 TNF α ($P<0.01$), TNF-R1 ($P<0.01$) 및 TNF-R2 ($P<0.001$) 수준, 및 AH+C+ 환자들에서, AH-C+ 환자들과 비교하여, 상승된 IL-6 ($P<0.01$)로부터 명백하였다.

<110> HVPG : AH+C+ 환자들은, AH-C+ 환자들과 비교하여 유의적으로 높은 평균 HVPG를 가졌고(22 ± 1.9 대 15.5 ± 1.6 mmHg, $P<0.01$), 이는 보다 증가된 문맥 고혈압을 반영한다.

<111> 환자 과정 : 52 명의 연구된 환자들 중 13 명의 입원환자가 사망하였고, 이 중 12 명인 AH+C+를 갖고 있었고, 1 명은 단지 간경변만 갖고 있었다. AH+C+ 사망자 중, 8명이 신장 기능부전이 발병했고, 4 명이 부수적 패혈증 및 다기관 기능부전이 발병했다. 2 명의 환자가 비조절 GI 출혈로 사망한 반면, 2 명의 환자가 응고병증 및 다기관 기능부전의 발병으로 인해 그램 음성 미생물로 인한 자발적 세균 복막염으로부터 회복하지 못하였다(표 2 참조). 28일 내에 생존하여 성공적으로 퇴원한 15 명의 AH+C+ 환자들 중, 6 명은 입원 도안 감염의 증거를 가졌고, 1 명은 보조 치료요법에 반응하여 신장 기능부전을 가졌고, 2 명은 조절된 정맥류 출혈의 증상발현을 가졌다. 사망한 AH+C+ 환자들은, 생존한 AH+C+ 환자들과 비교하여, 유의적이지 않은 판별 함수 차이($P=0.3$), 푸 점수 ($P=0.2$) 또는 MELD ($P=0.6$) 점수를 가졌다.

<112> 간 경변 만(AH- C+)을 가진 군에 있어서, 입원환자 1 명이 보조적 치료요법에도 불구하고 신장 기능부전으로 사망하였다. 성공적으로 퇴원한 남은 24 명의 AH- C+ 환자들 중, 5명이 입원 동안 기록된 감염의 발현 증상을 가졌고, 1 명이 조절된 정맥류 출혈이 있었다. AH- C+ 환자들은, AH+C+ 생존자들(n= 15)과 비교하여, 유의적으로 보다 낮은 푸 점수 ($P<0.001$) 및 MELD 점수($P<0.001$)를 가졌다.

<113> **ADMA** : 평균 혈장 ADMA 수준은 52 명의 환자들이, 12 명의 건강한 대조군과 비교하여 보다 높았다[연령 : 38 (31-55); 9 남자]: 0.59 ± 0.03 대 $0.37 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$; $P<0.001$]. 더욱이 AH+C+ 환자들은, AH- C+ 군과 비교하여, 도 1a에 도시한 바와 같이, 유의적으로 보다 높은 ADMA 값을 가졌다[0.69 ± 0.04 대 $0.49 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$; $P<0.001$]. 간 조직 ADMA 수준 또한 AH- C+와 비교하여 AH+C+ 환자들에게서 현저하게 높았고(97 ± 23 대 $27 \pm 13 \mu\text{mol/mg}$ 단백질, $P<0.05$), 문맥 암에 상응함을 보여주었다($R= 0.61$, $P<0.05$). 혈장 ADMA 수준은 입원 동안 사망한 환자들(n=13)에게서, 생존자들(n=39)과 비교하여 유의적으로 보다 컸다(0.77 ± 0.08 대 $0.53 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$; $P<0.001$)(도 1b 참조). 또한, 하위-분석이 퇴원한 AH+C+ 환자들과 비-감염된 AH-C+ 환자들 사이에서 유의적으로 보다 높은 ADMA수준을 나타내었다(0.62 ± 0.04 대 $0.49 \pm 0.02 \mu\text{mol/L}$, $P<0.01$). 더욱이, ADMA 수준은 사망한 AH+C+ 환자들에게서, AH+C+ 생존자들과 비교하여, 보다 높았다($P<0.05$. 도 1c 참조).

<114> **SDMA** : 52 명 환자들에 대한 평균 혈장 SDMA 수준은 대조구 보다 높았음에도 불구하고, 통계적으로 유의적으로 크지는 않았다(0.77 ± 0.08 대 $0.46 \pm 0.01 \mu\text{mol/L}$, $P=0.08$). 그러나 SDMA 수준은 AH+C+ 환자들에게서, AH-C+ 와 비교하여 유의적으로 높았다(1.03 ± 0.1 대 $0.48 \pm 0.03 \mu\text{mol/L}$; $P<0.001$). AH- C+ 환자들 중 SDMA 수준은 건강한 지원자들과 유사하였다($P=0.67$)(도 2a 참조). SDMA 수준은 입원 동안 사망한 환자들에게서, 모든 생존자들과 비교하여 유의적으로 높았다(1.6 ± 0.35 대 $0.6 \pm 0.05 \mu\text{mol/L}$; $P<0.001$)(도 2b참조). 또한, AH+C+ 환자들의 하위-분석은 사망한 환자들에게서, 생존자들과 비교하여 유의적으로 보다 큰 SDMA를 나타내었고, 여기서 평균 SDMA는 $0.8 \pm 0.1 \mu\text{mol/L}$ 이었다($P<0.05$)(도 2c 참조). 그러나 AH+C+ 생존자들과 비-염증 AH- C+ 생존자들 사이에 SDMA의 유의적 차이가 있었다. 여기서, 평균 SDMA 수준은 0.48 ± 0.03 이었다($P<0.01$).

<115> **생존 예보자** : ADMA 및 SDMA의 베이스라인 측정(0-3 일째)과 더불어 이 시간 지점에서의 계산된 MELD, 푸 점수 및 판별 함수를 사용하여, 리시버 오퍼레이터 곡선(ROC)에 대한 곡선(AUC) 아래 영역을 이용함으로써 입원 생존자의 결정에 있어 이들 측정의 예측 기능을 비교하였다. 모든 환자들에 대한 각각의 예측 측정의 AUC 및 AH+C+ 환자들에 대한 개별 분석을 표 3에 열거하였다. 또한 도 3에 나타낸 바와 같이, AH+C+환자들에서 ADMA를 SDMA 와 비교할 때, 그의 ROC로부터 유도한 SDMA에 대한 컷오프 값(<0.9)은 ADMA 컷오프 값인 <0.65 를 사용하여 예측한 바와 같은 모든 사망자를 포함하지 못하였다. 따라서 본 발명에서는 ADMA와 SDMA의 합[DAS= ADMA + SDM A]으로부터 계산한 결합된 디메틸아르기닌 점수(DAS) 생존자를 결정함에 있어 개별 디메틸아르기닌 수준의 예측 기능을 개선시키고자 이용하였다. 계산된 DAS는 AH+C+ 환자들에서, AH-C+와 비교하여 유의적으로 보다 높았다 (1.9 ± 0.2 대 0.96 ± 0.04 ; $P<0.001$). 더욱이, DAS 값은 비생존 AH+C+ 환자들에게서, 생존자들과 비교하여 유의적으로 보다 높았다(2.5 ± 0.38 대 1.4 ± 0.16 ; $P<0.01$). 실제로, DAS 값은 개선된 반면, 모든 환자들에 있어 예측 과정의 높은 민감성을 유지되었고, 푸 점수, DF 또는 MELD로서 과정을 결정하는 것과 적어도 우수함을 나타내었다(표 3 참조). 사망한 12명의 환자들에게서, 반복 혈액 시료를 입수할 수 있는 18명의 생존자(6 명의 AH- C+)와 비교하여, 입원 동안 취한 혈액으로부터의 반복 디메틸아르기닌 측정은 사망한 환자들에게서, 생존자 와 비교하여, DAS의 유의적인 비율 증가를 나타내었다($P<0.01$)(도 4 참조). 모든 연구된 환자들에 대한 카플란-메이서 플롯을 도 5에 나타내었고, 이는 이들 환자들 중 입원 생존자에게서 $P<0.001$ 의 로그 순위로 입원 DAS 값 > 1.23 으로 유의적인 감소를 나타낸다. 더욱이, 1.52의 DAS 컷오프는, 도 6에 나타낸 바와 같이, AH+C+ 환자들 중 생존자를 평가할 때, 다른 모든 점수 시스템 보다 유용한 것으로 보여졌다.

<116> **DDAH II 및 PRMT-I 발현** : 간 DDAH II 발현(α -튜블린 발현에 대해 보정됨)은 측정된 4 명의 AH+C+환자들에게서, 4 명의 AH- C+환자들과 비교하여 유의적으로 보다 낮았다($P<0.01$). 반대로, PRMT-I의 발현은, 도 7에 나타낸 바와 같이, AH+C+ 환자들의 간에서 유의적으로 증가하였다($P<0.01$). 7 명의 환자에 대한 PRMT-I 데이터는 적절한 겔 적재를 허용하기 위한 1 명의 AH- C+ 환자에게서 추출된 한정된 균등질에 기인하여 나타났다.

논의

<117> 본 실시예의 결과는 조직학적으로 입증된 부과된 염증 및 증진된 염증전 사이토카인 및 SIRS 성분을 갖는 알코올성 간경변 환자들(AH+C+)이, 단지 간경변 만을 갖는 환자들(AH- C+)과 비교하여, 보다 높은 간 정맥 압력차를 갖는다는 사실을 보여준다. 본 발명자들은 대상부전 간경변에서 증가된 자유 순환 ADMA에 대한 이전의 관찰을 염증성 AH+C+ 환자들에게서, AH-C+와 비교하여, 증진된 혈장 및 간 조직 ADMA의 새로운 추가의 발견으로 확장하

고, 증가된 ADMA와 증진된 문맥 압 간의 관련을 나타내었다. 더욱이 본 발명의 결과는 대상부전 간경변의 생존자들에게서 유의적으로 보다 낮은 ADMA 및 SDMA 수준을 나타낸 동시에, SDMA는 사망이 주로 신장 기능부전과 관련이 있는 염증성 AH+C+ 환자들의 하위군에서 생존자들과 비생존자들 간을 식별하도록 한다. 현재 유효한 점수 시스템(Child-Pugh, DF 및 MELD)을 조기 과정(입원 사망률)을 측정하기 위해 사용하거나, 알코올성 간염의 개입에 대한 필요성을 본 발명의 환자들의 코호트 적용할 때, 이들의 예측 기능은 제한되었다. ADMA, SDMA 또는 이들 디메틸아르기닌 합(DAS)의 순환 수준이 사망 위험에 있는 환자들을 예측하였다. 본 발명의 결과는 AH+C+ 환자들이, AH-C+ 환자들과 비교하여 유의적으로 증진된 TNF α , TNF-RI 및 RII의 혈장 수준을 갖는다는 이전의 결과를 확인시켜준다. TNF α 를 통해 조절되는 염증은 알코올 유발 간 손상에 있어 중요한 것으로 여겨지며, 알코올성 손상의 동물 모델에 있어 그의 저해는 간 염증을 유의적으로 완화시킨다. 더욱이 최근의 동물 모델 데이터 또한 추가의 염증이 간경변에서 증진된 간내 저항성에 있어 중요할 수 있고, 이는 상승된 문맥 압력을 일으킨다고 제시하고 있다. 따라서 문맥 고혈압 동물 및 인간에 있어 문맥 압력을 탈리도마이드 및 TNF α 모노클로날 항체와 같은 염증의 매개자로 유도된 개입에 의해 감소된다. 항-TNF α 모노클로날 항체로 처리된 알코올성 간염이 부과된 간경변 환자들에 있어서 문맥 압력의 현저한 감소에 대한 본 발명자들의 최근의 관찰은 염증과 혈관내 상태를 조절하는 인자들 사이의 관계에 대한 가정을 지지할 수 있다.

<119> 간경변에서 증가된 간내 저항성이 감소된 간 eNOS 활성에 부차적인 감소된 국소 NO 이용가능성에 의해 기여된다 는 사실이 문헌에 일반적으로 합치되고 있다. ADMA는 경쟁적이고, 내인성인 단백질 분해 동안 생성된 eNOS 저해제이며, 간이 ADMA 대사의 중요한 위치라는 사실을 제시된 바 있다. 상승된 ADMA는 다양한 증상에서 내피성 기능장애와 관련이 있다고 나타난 반면, ADMA의 증가된 소변 배출이 만성 활성 간염 환자들에서 나타내진 바 있다. 최근 들어, ADMA는 건강한 대조군과 비교하여 말기 간경변에서 상승된다고 밝혀졌고, 같은 자리 간 이식 전의 간 기능부전 환자들에 있어서, 그 수준이 간 이식 후 유의적으로 감소되었다. 이러한 연구는 간 질환 및 문맥 고혈압의 진행에 따라 ADMA가 상승하고, 간 이식 후, 빠르게 감소함을 암시하고, 이는 간 이식 후 증명된 염증성 지수의 감소와 관련된 ADMA 대사에 있어서의 장애가 보정됨을 제시한다. 본 발명에 있어서, 본 발명자들은 간 염증이 부과된 AH+C+ 환자들에서, AH-C+ 환자들과 비교하여, 유의적으로 감소된 ADMA의 혈장 및 간 조직 수준을 나타내었다. 염증의 효과는 알코올성 간경변 단독에 대하여 예상된 것 보다 위 및 아래인 것으로 여겨진다. 이러한 데이터는 간 염증성 매개자의 증가에 따라 간 ADMA 대사 및(또는) 생성이 변할 수 있다는 가정을 지지할 수 있다.

<120> ADMA 항상성은 간과 신장에 특히 풍부한 DDAH 효소를 통한 그의 대사에 의해 유지된다. DDAH 활성은 TNF α 와 같은 염증성 자극에 의해 감소되는 것으로 나타났다. AH+C+ 환자들에서 볼 수 있는 바와 같이, TNF α 의 수준이 현저하게 증가하였을 때, 손상된 물질대사를 통해 간 ADMA 수준이 보다 높아질 것으로 예상할 수 있고, 이는 또한 국소 간 NOS 활성을 감소시킬 수 있다. 이러한 주장은 HVG가 유의적으로 증가된 본 발명의 AH+C+ 환자들에서 감소된 간 DDAH II 단백 발현과 결합된 증가된 간 조직 ADMA의 관찰에 의해 부분적으로 지지된다.

<121> 본 발명에서 AH+C+ 환자들에서 증진된 ADMA의 관찰에 대한 다른 설명은 증진된 ADMA 생산을 통해서 가능하다. ADMA는 단백질 내에서 아르기닌의 측쇄 질소를 메틸화시키는 효소 군인 PRMT의 작용에 의해 생성된다. 몇 가지 형태의 PRMT가, N<G>-모노메틸-L-아르기닌 (L-NMM A) 및 ADMA를 생성시킬 수 있는 I형, 및 L-NMMA 및 대칭성 디메틸아르기닌 (SDMA)을 생성시킬 수 있는 II 형으로 나타내지고 있다. 간경변 및 염증과 같은 초과 대사 상태에서 증가되는 단백질 분해 시에, 유의적인 양의 ADMA가 생성된다. 따라서 ADMA 및 SDMA 생성률은 PRMT의 존재 및 활성과 단백질 분해율에 의존할 것이다. 이와 마찬가지로, 본 발명자들은 증진된 염증이 있는 AH+C+ 환자들에서, AH-C+ 환자들과 비교하여 PRMT-I의 발현 증가를 관찰하였다. 이러한 관찰은, 산화된 LDL-콜레스테롤에 노출된 인간 내피 세포에 대한 연구로부터 얻은 데이터에 의해 추가로 지지되며, 여기서 상향조절된 ADMA 방출은 증가된 PRMT 발현과 관련이 있다.

<122> 본 발명이 생존율을 결정하는데 있어 디메틸아르기닌의 역할을 강화하거나 조사하기 위한 목적이 아님에도 불구하고, 본 발명에서 밝혀낸 가장 중요한 발견 중 하나는 모든 군의 알코올성 간경변 환자들(25%) 및 특히 종래의 발표된 문헌과 일치하게 사망률이 44%인 AH+C+ 환자들에 있어서 상승된 ADMA 및 SDMA 수준과 입원환자 사망률과의 관련성이었다. 알코올성 간염의 과정을 예측하는 현재의 점수 시스템은 생화학적(빌리루빈, 프로트롬빈 시산 및 크레이틴) 및 임상적 변수들(복수 및 뇌증의 정도)에 중점을 두고 있으며, 염증전 상태의 유의적인 변화 또는 이 증상과 관련된 현저한 혈액학적 변화는 특별한 인자가 아니었다.

<123> 본 발명에서, 본 발명자들은 측정가능한 생물학적 마커(최소 내부-분석 변이성으로)로서 디메틸아르기닌 수준의 잠재적 용도를 확인하였고, 이는 현재 사용되고 있는 예후 점수 보다 우수한 민감성(73%) 및 특이성(83%)으로 입원환자의 사망률을 조기에 예측할 수 있다. 본 발명의 데이터는 또한 열악한 과정의 환자들에게서 추가의 일

시적인 디메틸아르기닌 증가를 제시하지만, 반복된 측정의 식별력 있는 값에 대한 안정된 결론은 연구된 환자들의 수가 소수여서 제한된 것이다. ADMA 수준이 신장 순환 베드 내에 포함되는 관 기능장애가 발생한 AH에서 염증 상태를 부분적으로 반영할 수는 있다. 증가된 ADMA는 감소된 유효 신장 혈장 유동 및 증가된 신혈관 저항성과 관련이 있고, 이는 증가된 SDMA 정체를 가져올 수 있다. 실제로, 최근 간콩팥 증후군 환자들에서, 신장 기능부전 없는 간경변 환자들와 비교하여 SDMA가 상승된 것으로 나타난 바 있다. 따라서 결합된 디메틸아르기닌 (DAS) 점수는 각각 염증 및 초기 신장 기능장애(본 발명의 AH+C+ 환자 코호트에서 사망률의 주 원인)의 인자이며, 본 발명에서 확인된 상기 점수의 보다 우수한 예측 기능을 설명할 수 있다.

<124> 결론적으로, 본 발명자들은 AH+C+ 환자들이 보다 현저한 HVPG 상승을 가지며, 이는 혈장 및 간조직 ADMA의 증가와 관련이 있다는 사실을 관찰하였다. AH+C+ 환자들에게서 증가된 ADMA는 각각 감소된 쇠약(감소된 간 DDAH) 및(또는) 증가된 생산(증가된 PRMT 발현 및(또는) 단백질 분해)에 기인한 것일 수 있다. 증진된 디메틸아르기닌 수준은 알코올성 간염의 유해한 과정에 대한 중요한 생물학적 마커일 수 있으나, ADMA가 원인으로서 참여하는지를 측정하기 위하여 적절한 모델에 대한 추가의 연구가 필요하다.

실시예 2 : 알코올성 간 질환으로 사망한 환자들은 유의적으로 증가된 IMA: 알부민 비율을 갖는다

방법

<127> **IMA 분석 방법** : 알부민 비율 : 애보트 에어로세트 브로모크레졸 퍼플(Abbott AeroSet Bromocresol Purple; BCP) 시험을 사용하여 혈청 알부민을 측정하였다(Duly et al; J Clin Pathol 2003). 공지된 양의 Co(II)를 혈청 표면에 첨가하고, 디티오프레이톨(DTT)(Bhagavan, NV; Clin Chem 2003 and Bar-Or D; Eur J Biochem 2001)를 사용하는 유세포 분석법에 의해 미결합 Co(II)를 측정하여 IMSA(ischemia modified serum albumin)의 농도를 측정할 수 있다. 따라서 알부민 결합 코발트의 양과 색 형성의 강도 사이에 역 관계가 존재한다. 간략하게, 모든 반응을 실온에서 에펜도르프(Eppendorf) 1.5 mL 중에서 수행하였다. 환자 혈청 200 μL를 1 g/L 염화코발트 용액 50 μL에 가한 후, 격렬하게 혼합하고, 10분 동안 배양하였다. 이어서 DTT (1.5g/L 용액 50 μL)를 가하고, 혼합하였다. 2 분 동안 배양한 후, 9.0 g/L NaCl 용액 1.0 mL를 가하였다. 휴렉 팩커드 8452A 디이오드 어레이 스펙트로포토미터(Hewlett Packard 8452A Diode Array Spectrophotometer)를 이용하여 분석 혼합물의 흡수능을 470 nm에서 읽었다. 참조 시료를 DTT를 배제하여 유사하게 제조하였다. 염화 코발트 및 DTT를 포함하는 AU 화학물질은 시그마-알드리치(Sigma-Aldrich)에서 구입하였다.

결과

<129> **신규한 바이오마커의 개발** : "DASIMAR": 본 발명에서는 간 환자들의 다양한 알부민 수준이 부분적으로 영양에 의해, 대부분 잔여 간 합성 기능에 의해 결정된다고 가정하고, 알부민-코발트 결합 분석의 응용을 IMA 대 혈청 중의 최초 알부민의 비율-혈청 IMA:알부민 비율, 또는 "IMAR" 인자로 수정하였다. 알코올성 간 질환을 갖는 일련의 52명의 대상부전 환자들로부터의 데이터는 사망한 환자들이 유의적으로 증가된 IMA:알부민 비율($P<0.01$)를 갖는 사실을 제시한다. 더욱이, DAS 값을 이용함으로써 IMAR가 염증 상태 및 그에 따른 질환의 근원적인 병리학적 전개를 반영할 수 있다는 사실을 제시한다. 리시버 오퍼레이터 곡선을 이용하여 사망률을 예측함으로써, 상기 곡선 아래의 영역이 코호트 스타디드에 대해 $0.72(\pm 0.06)$ 으로 밝혀졌고, 이는 IMAR가 이들 환자들에게서 유용한 사망률 예측 시험일 수 있음을 제시한다.

논의

<131> 각각 DAS 및 IMAR가 질환 진행 및 과정을 위한 암시적인 마커임에도 불구하고, 본 발명에서는 결합된 바이오마커로서 디메틸아르기닌 점수(DAS - 실시예 1 참조)와 IMAR를 결합함으로써 0.81-0.99의 95% 신뢰 구간으로 0.91(± 0.04)의 AUROC, 및 74%의 민감성 및 92%의 특이성으로 열악한 과정의 예측 기능을 개선시켰음을 밝혀냈다. 이는 사망률 위험을 분석하기 위한 훌륭한 예측 기능을 제공하는 한편(도 9 및 10 참조), 알부민 투석 및 염증 감소를 위한 치료요법과 같은 특이적 개입에 이해 표적화될 수 있는, 악화되는 기관 기능부전 및 간 기능부전의 병리학적 요소인 염증을 반영한다. 따라서 DASIMAR은 잠재적으로 개입에 대한 반응을 모니터링하는데 이용될 수 있다.

실시예 3 : 설치류 간 기능부전 모델에서 생존률을 예측하기 위한 IMAR, DAS 및 DASIMAR

<133> 래트를 간 손상을 일으킨다고 알려진 약품인 갈락토사민(Sigma, Poole UK) 1 g/kg ($n=22$)을 복막내 주입(IP)하여 처리하고, 24 시간 후 하위군에 리포폴리사카라이드(LPS - Klebsiella pneumonia, $n=11$)를 1 mg/kg IP 투여하여 추가의 감염/염증을 촉진시켰다. 이어서 혈액 시료를 살생 직전에 수득하였다. 24 시간에서 LPS를 투여한 동물들은, 갈락토사민 만을 투여한 래트 또는 유사한 투여량의 LPS를 투여한 모의 동물과 비교하여, 모두 6

시간 후 사망하였다. ADMA, SDMA, 및 IMAR 측정을 상기 실시예에 기재된 방법과 동일한 방법을 이용하여 수행하였다. 인간 환자들로부터 얻은 데이터를 사용함으로써, DASIMAR가 DAS 또는 IMAR 단독에서 보다 더 우수한 사망률 예보자(AUROC 0.96)임을 알 수 있었다(도 11 참조). 실제로, 이 모델에 있어서, DASIMAR는 과정을 예측하고, 결합된 DAS와 IMAR 성분의 효과를 강조하고, 상이한 간 질환 모델에서 및 패혈증과 관련하여 상기 점수의 기능을 강조함에 있어 높은 민감성(96%) 및 특이성(91%)을 가졌다.

<134> <표 1>

<135> 모든 환자들 및 이드르이 하위 군인 알코올성 간염 환자(AH+C+) 및 염증 없는 간경변 환자(AH-C+)에 대한 기준 특징

	모든 환자 (n= 52)	알코올성 간염 (AH+C+, n=27)	간경변 단독(AH- C+, n=25)
연령 (세)	50 [32-69]	47 ns	51 [38-67]
빌리루빈 [mmol/L] [3-17]	169 ± 26	291 ***	56 ± 13
프로트롬빈(secs) [10-12]	15.6 ± 0.7	18 **	13.4 ± 0.6
ALT [8-50]	55 ± 9	60 ns	47 ± 9
크레아티닌 [mmol/L] [66-112]	76.5 ± 9.7	92.5 *	59.8 ± 5
총 점수	10 ± 0.3	11.5 ***	8.4 ± 0.4
MELD 점수	7.4 ± 1.7	15 ***	0.26 ± 1.4
HVPG (mmHg) [<5]	19 ± 1	22 **	15.5 ± 1.6
CRP (mg/L) [0-5]	33.5 ± 6.5	50 ***	17 ± 3
WBC (x10 ⁹ /L) [3-10]	10.2 ± 1.4	14.3 ***	6.4 ± 0.5
SIRS [0]	0.9 ± 0.2	1.6 ***	0.3 ± 0.1
TNF _α [0-5]	21 ± 11	46 ± 20**	4 ± 0.5
TNFR1 (ng/ml) [0-1.6]	726 ± 76	885 **	455 ± 74
TNFR2 (ng/ml) [0-3.5]	1237 ± 141	1798 ***	759 ± 136
IL-6 [0-5]	29.5 ± 9.6	55.7 *	9.3 ± 2

<137> <표 2>

<138> 연구된 환자들 사이의 과정 특징

	알코올성 간염 사망자 (n=12)	알코올 간염 퇴원자 (n=15)	간경변 단독 퇴원자 (n=24)
신장 기능부전	8	1	0
위장관 출혈	2	2	1
주입	6 (2 with SBP)	6	5

푸 점수	11.9 ± 0.5	11.1 ± 0.4	8.4 ± 0.4	***
MELD	16.2 ± 3.9	14.2 ± 3.1	0.7 ± 1.7	***
판별 함수	53 ± 13	41 ± 6	-	

<140> *** P<0.001 : 퇴원한 알코올성 간염 환자와 비교한 알코올성 간경변

<141> <표 3>

<142> 리시버 오버레이터 곡선을 이용한 모든 연구된 알코올성 간경변 환자 및 알코올성 간염 하위군에서 예측 과정에 대한 디메틸아르기닌 수준과 예후 점수의 비교

<143>

점수 시스템/디메틸아르기닌 수준	컷-오프 값 (%민감성; 특이성)	AU ROC	컷-오프 값 (%민감성; 특이성)	AU ROC
Pugh	10.5 (63; 75)	0.81 ± 0.07	11.5 (60; 64)	0.65 ± 0.11
DF	36 (76; 73)	0.78 ± 0.08	39 (53; 70)	0.55 ± 0.13
MELD	10.3 (74; 73)	0.76 ± 0.08	18.9 (60; 40)	0.53 ± 0.12
ADMA	0.57 (74; 77)	0.83 ± 0.06	0.65 (73; 75)	0.74 ± 0.09
SDMA	0.7 (77; 85)	0.87 ± 0.06	0.89 (73; 67)	0.82 ± 0.08
DAS	1.23 (77; 92)	0.9 ± 0.05	1.52 (73; 83)	0.85 ± 0.07

<144> 모든환자 알코올성 간염 (AH+C+)

<145> DAS (디메틸아르기닌 점수) = ADMA와 SDMA의 합

<146> AUROC (곡선 밑의 영역)±SEM

<147> 각 컷-오프 값에서 민감성 및 특이성은 각각 팔호안에 특정됨

<148> 참조문헌

1. Tome S, Lucey MR. Review article: current management of alcoholic liver disease. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:707-14.
2. Duvoux C, Radier C, Roudot-Thoraval F, Maille F, Anglade MC, Van Nhieu JT, Rosa I, Hospitel S, Abd-Alsamad I, Sitruk V, Seror O, Ziol M, Blondon H, Dhumeaux D, Richardet JP. Low-grade steatosis and major changes in portal flow as new prognostic factors in steroid-treated alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2004;40:1370-8.
3. Ripoll C, Banares R, Rincon D, Catalina MV, Lo Iacono O, Salcedo M, Clemente G, Nunez O, Matilla A, Molinero LM. Influence of hepatic venous pressure gradient on the prediction of survival of patients with cirrhosis in the MELD Era. *Hepatology* 2005;42:793-801.
4. Wiest R, Groszmann RJ. The paradox of nitric oxide in cirrhosis and portal hypertension: too much, not enough. *Hepatology* 2002;35:478-91.
5. Gupta TK, Toruner M, Chung MK, Groszmann RJ. Endothelial dysfunction and decreased production of nitric oxide in the intrahepatic microcirculation of cirrhotic rats. *Hepatology* 1998;28:926-31.
6. Rockey DC, Chung JJ. Reduced nitric oxide production by endothelial cells in cirrhotic rat liver: endothelial dysfunction in portal hypertension. *Gastroenterology* 1998;114:344-51.
7. Fiorucci S, Antonelli E, Brancaleone V, Sanpaolo L, Orlandi S, Distrutti E, Acuto G, Clerici C, Baldoni M, Del Soldato P, Morelli A. NCX-1000, a nitric oxide-releasing derivative of ursodeoxycholic acid, ameliorates portal hypertension and lowers norepinephrine-induced intrahepatic resistance in the isolated and perfused rat liver. *J Hepatol* 2003;39:932-9.
8. Van De Casteele M, Omasta A, Janssens S, Roskams T, Desmet V, Nevens F, Fevery J. In vivo gene

transfer of endothelial nitric oxide synthase decreases portal pressure in anaesthetised carbon tetrachloride cirrhotic rats. Gut 2002;51:440-445.

<157> 9. Shah V, Chen AF, Cao S, Hendrickson H, Weiler D, Smith L, Yao J, Katusic ZS. Gene transfer of recombinant endothelial nitric oxide synthase to liver in vivo and in vitro. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol 2000;279:G1023-30.

<158> 10. Morales-Ruiz M, Cejudo-Martn P, Fernandez-Varo G, Tugues S, Ros J, Angeli P, Rivera F, Arroyo V, Rodes J, Sessa WC, Jimenez W. Transduction of the liver with activated Akt normalizes portal pressure in cirrhotic rats. Gastroenterology 2003;125:522-31.

<159> 11. Leiper J, Vallance P. Biological significance of endogenous methylarginines that inhibit nitric oxide synthases. Cardiovasc Res 1999;43:542-8.

<160> 12. MacAllister RJ, Parry H, Kimoto M, Ogawa T, Russell RJ, Hodson H, Whitley GS, Vallance P. Regulation of nitric oxide synthesis by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Br J Pharmacol 1996;119:1533-40.

<161> 13. Nijveldt RJ, Teerlink T, Siroen MP, van Lambalgen AA, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA). Clin Nutr 2003;22:17-22.

<162> 14. Lluch P, Torondel B, Medina P, Segarra G, Del Olmo JA, Serra MA, Rodrigo JM. Plasma concentrations of nitric oxide and asymmetric dimethylarginine in human alcoholic cirrhosis. J Hepatol 2004;41:55-9.

<163> 15. Siroen MP, Warle MC, Teerlink T, Nijveldt RJ, Kuipers EJ, Metselaar HJ, Tilanus HW, Kuik DJ, van der Sijp JR, Meijer S, van der Hoven B, van Leeuwen PA. The transplanted liver graft is capable of clearing asymmetric dimethylarginine. Liver Transpl 2004;10:1524-30.

<164> 16. Nijveldt RJ, Teerlink T, Van Der Hoven B, Siroen MP, Kuik DJ, Rauwerda JA, van Leeuwen PA. Asymmetrical dimethylarginine (ADMA) in critically ill patients: high plasma ADMA concentration is an independent risk factor of ICU mortality. Clin Nutr 2003;22:23-30.

<165> 17. Ito A, Tsao PS, Adimoolam S, Kimoto M, Ogawa T, Cooke JP. Novel mechanism for endothelial dysfunction: dysregulation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase. Circulation 1999;99:3092-5.

<166> 18. MacSween RN, Burt AD. Histologic spectrum of alcoholic liver disease. Semin Liver Dis 1986;6:221-32.

<167> 19. Bone RC, Sibbald WJ, Sprung CL. The ACCP-SCCM consensus conference on sepsis and organ failure. Chest 1992;101:1481-3.

<168> 20. Owen LJ, Wear JE, Keevil BG. Validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry assay for serum creatinine and comparison with enzymatic and Jaffe methods. Ann Clin Biochem 2006;43:118-23.

<169> 21. Tilg H, Jalan R, Kaser A, Davies NA, Offner FA, Hodges SJ, Ludwiczek O, Shawcross D, Zoller H, Alisa A, Mookerjee RP, Graziadei I, Datz C, Trauner M, Schuppan D, Obrist P, Vogel W, Williams R. Anti-tumor necrosis factor-alpha monoclonal antibody therapy in severe alcoholic hepatitis. J Hepatol 2003;38:419-25.

<170> 22. Gornall AG. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. J. Biol. Chem 1949;177:751-766.

<171> 23. Infante-Rivard C, Esnaola S, Villeneuve JP. Clinical and statistical validity of conventional prognostic factors in predicting short-term survival among cirrhotics. Hepatology 1987;7:660-4.

<172> 24. Kamath PS, Wiesner RH, Malinchoc M, Kremers W, Therneau TM, Kosberg CL, D'Amico G, Dickson ER, Kim WR. A model to predict survival in patients with end-stage liver disease. Hepatology 2001;33:464-

70.

<173> 25. Brunt EM, Janney CG, Di Bisceglie AM, Neuschwander-Tetri BA, Bacon BR. Nonalcoholic steatohepatitis: a proposal for grading and staging the histological lesions. *Am J Gastroenterol* 1999;94:2467-74.

<174> 26. Maddrey WC, Boitnott JK, Bedine MS, Weber FL, Jr., Mezey E, White RI, Jr. Corticosteroid therapy of alcoholic hepatitis. *Gastroenterology* 1978;75:193-9.

<175> 27. Tsikas D, Rode I, Becker T, Nashan B, Klempnauer J, Frolich JC. Elevated plasma and urine levels of ADMA and 15(S)-8-iso-PGF2alpha in end-stage liver disease. *Hepatology* 2003;38:1063-4.

<176> 28. Khoruts A, Stahnke L, McClain CJ, Logan G, Allen JI. Circulating tumor necrosis factor, interleukin-1 and interleukin-6 concentrations in chronic alcoholic patients. *Hepatology* 1991;13:267-76.

<177> 29. Lopez-Talavera JC, Merrill WW, Groszmann RJ. Tumor necrosis factor alpha: a major contributor to the hyperdynamic circulation in prehepatic portal-hypertensive rats. *Gastroenterology* 1995;108:761-7.

<178> 30. Iimuro Y, Gallucci RM, Luster MI, Kono H, Thurman RG. Antibodies to tumor necrosis factor alfa attenuate hepatic necrosis and inflammation caused by chronic exposure to ethanol in the rat. *Hepatology* 1997;26:1530-7.

<179> 31. Austin AS, Mahida YR, Clarke D, Ryder SD, Freeman JG. A pilot study to investigate the use of oxpentifylline (pentoxifylline) and thalidomide in portal hypertension secondary to alcoholic cirrhosis. *Aliment Pharmacol Ther* 2004;19:79-88.

<180> 32. Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996;23:1616-21.

<181> 33. Mookerjee RP, Sen S, Davies NA, Hodges S, Williams R, Jalan R. TNF is an important mediator of portal and systemic haemodynamic derangements in alcoholic hepatitis. *Gut* 2003;52:1182-87.

<182> 34. Achan V, Broadhead M, Malaki M, Whitley G, Leiper J, MacAllister R, Vallance P. Asymmetric dimethylarginine causes hypertension and cardiac dysfunction in humans and is actively metabolized by dimethylarginine dimethylaminohydrolase. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:1455-9.

<183> 35. Zoccali C, Bode-Boger S, Mallamaci F, Benedetto F, Tripepi G, Malatino L, Cataliotti A, Bellanuova I, Fermo I, Frolich J, Boger R. Plasma concentration of asymmetrical dimethylarginine and mortality in patients with end-stage renal disease: a prospective study. *Lancet* 2001;358:2113-7.

<184> 36. Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frolich JC, Vallance P, Nicolaides KH. Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia. *Lancet* 2003;361:1511-7.

<185> 37. Carnegie PR, Fellows FC, Symington GR. Urinary excretion of methylarginine in human disease. *Metabolism* 1977;26:531-7.

<186> 38. Jalan R, Pollock A, Shah SH, Madhavan K, Simpson KJ. Liver derived pro-inflammatory cytokines may be important in producing intracranial hypertension in acute liver failure. *J Hepatol* 2002;37:536-8.

<187> 39. Ogawa T, Kimoto M, Sasaoka K. Occurrence of a new enzyme catalyzing the direct conversion of NG,NG-dimethyl-L-arginine to L-citrulline in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 1987;148:671-7.

<188> 40. McBride AE, Silver PA. State of the arg: protein methylation at arginine comes of age. *Cell* 2001;106:5-8.

<189> 41. Marliss EB, Chevalier S, Gougeon R, Morais JA, Lamarche M, Adegoke OA, Wu G. Elevations of

plasma methylarginines in obesity and ageing are related to insulin sensitivity and rates of protein turnover. *Diabetologia* 2006;49:351-9.

<190> 42. Inoue R, Miyake M, Kanazawa A, Sato M, Kakimoto Y. Decrease of 3-methylhistidine and increase of NG,NG-dimethylarginine in the urine of patients with muscular dystrophy. *Metabolism* 1979;28:801-4.

<191> 43. Boger RH, Sydow K, Borlak J, Thum T, Lenzen H, Schubert B, Tsikas D, Bode-Boger SM. LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine-dependent methyltransferases. *Circ Res* 2000;87:99-105.

<192> 44. Akriviadis E, Botla R, Briggs W, Han S, Reynolds T, Shakil O. Pentoxyfylline improves short-term survival in severe acute alcoholic hepatitis: a double-blind, placebo-controlled trial. *Gastroenterology* 2000;119:1637-48.

<193> 45. Carithers RL, Jr., Herlong HF, Diehl AM, Shaw EW, Combes B, Fallon HJ, Maddrey WC. Methylprednisolone therapy in patients with severe alcoholic hepatitis. A randomized multicenter trial. *Ann Intern Med* 1989;110:685-90.

<194> 46. Forrest EH, Evans CD, Stewart S, Phillips M, Oo YH, McAvoy NC, Fisher NC, Singhal S, Brind A, Haydon G, O'Grady J, Day CP, Hayes PC, Murray LS, Morris AJ. Analysis of factors predictive of mortality in alcoholic hepatitis and derivation and validation of the Glasgow alcoholic hepatitis score. *Gut* 2005;54:1174-9.

<195> 47. Dunn W, Jamil LH, Brown LS, Wiesner RH, Kim WR, Menon KV, Malinchoc M, Kamath PS, Shah V. MELD accurately predicts mortality in patients with alcoholic hepatitis. *Hepatology* 2005;41:353-8.

<196> 48. Mookerjee RP DN, Hodges SJ, Dalton RN, Williams R, Jalan R. Hepatic inflammation increases portal pressure through inhibition of eNOS activity - potential mechanisms. *Gut* 2006;Abstract.

<197> 49. Kielstein JT, Tsikas D, Fliser D. Effects of asymmetric dimethylarginine (ADMA) infusion in humans. *Eur J Clin Pharmacol* 2006;62 Suppl 13:39-44.

<198> 50. Lluch P, Mauricio MD, Vila JM, Segarra G, Medina P, Del Olmo JA, Rodrigo JM, Serra MA. Accumulation of symmetric dimethylarginine in hepatorenal syndrome. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231:70-5.

도면의 간단한 설명

<80> 도 1은 환자들과 건강한 지원자들의 ADMA 수준을 나타낸 도로서, (a) 알코올성 간염이 부가된 간경변 환자 (AH+C+)는 간경변 만을 보유한 환자 (AH- C+)와 비교하여 유의적으로 보다 높은 ADMA 수준 (P<0.001)을 가졌다. AU 간경변 환자는 정상 지원자 (P<0.001)와 비교하여 유의적으로 보다 높은 ADMA 수준을 가졌다. (b) 대상부전 간경변 (decompensated cirrhosis)을 갖는 입원환자 생존자들 (n=39)은 사망한 자들 (n=19) 보다 유의적으로 낮은 ADMA 수준을 가졌다 (P<0.001). (c) 환자의 하위 분석은 AH- C+ 생존자들 (n=12)과 비교하여 AH+ C+ 생존자들 (n=24)에서 보다 큰 ADMA 수준을 나타내었다 (P<0.01). ADMA 수준은 사망한 AH+C+ 환자들 (n=12)에서 AH+C+ 생존자들과 비교하여 보다 컸다 (P<0.05).

<81> 도 2는 환자들과 건강한 지원자들의 SDMA 수준을 나타낸 도로서, (a) AH+C+ 환자들이 AH- C+ 환자들과 비교하여 유의적으로 보다 높은 SDMA 수준을 가졌다 (P<0.001). AH- C+ 환자들과 건강한 지원자들 사이의 SDMA 수준 차이는 없었다. (b) 대상부전 간경변 (decompensated cirrhosis)을 갖는 입원환자 생존자들 (n=39)은 사망한 자들 (n=13) 유의적으로 보다 낮은 SDMA 수준을 가졌다 (P<0.001). (c) 환자의 하위 분석은 AH+ C+ 생존자들 (n=12)과 비교하여 AH+ C+ 사망자들 (n=12)에서 보다 큰 SDMA 수준을 나타내었다 (P<0.01). AH+C+ 생존자들 (n=15)은 또한 AH- C+ (비염증성 간경변) 생존자들 (n=24)과 비교하여 보다 높은 SAMA 수준을 나타내었다 (P<0.01).

<82> 도 3은 ADMA와 SDMA의 비교를 나타낸 도로서, AH+C+ 환자들의 ADMA 대 SDMA의 플롯은 리시버-오퍼레이터 곡선 (receiver operator curve)에서 유도한 0.9 $\mu\text{mol/L}$ 의 SDMA 컷오프 값에서, 컷오프 0.65 $\mu\text{mol/L}$ 을 이용하여 ADMA로 예측한 바와 같은 사망자 수는 계산할 수 없음을 나타내었고 (음영 영역으로 표시됨), 이는 결과를 측정하기 위한 ADMA+SDMA (DAS)의 결합된 점수의 잠재적 이점을 제시한다.

<83> 도 4는 생존자와 비생존자의 인정 과정에서 디메틸아르기닌 점수 (di methylarginine score; DAS)의 비율 변화를 나

타낸다. 상기 도면은 DAS 값이 순 감소한($P<0.01$) 6명의 AH+C+환자를 포함한 18 명의 생존 환자들과 비교하여 비생존 AH+C+ 환자들(n=12)의 DAS [ADMA+SDMA] 값의 비율 변화를 나타낸다.

<84> 도 5는 인용 디메틸아르기닌 점수(DAS)의 카플란-메이어 생존 곡선(Kaplan-Meier Survival curve)을 나타낸다. 상기 도면은 인용 DAS 값 < 1.23 또는 > 1.23 ($P<0.0005$)를 기준으로 연구된 모든 알코올성 간경변 환자들 중 입원 사망자를 포함하는 카플란-메이어 생존 분석을 나타낸다. 보다 높은 DAS 점수가 입원 사망자의 위험을 유의적으로 증가시킨다.

<85> 도 6은 알코올성 간염 (AH + C+) 환자들의 예후 점수 - 판별 함수(Discriminant Function; DF), 차일드-푸 점수(Child-Pugh score), 말기 간 질환 모델(Model for End-stage Liver Disease; MELD) 및 디메틸아르기닌 점수 (Di 메틸아르기닌 Score; DAS)를 계산한 리시버 오퍼레이터 곡선을 나타낸다. DF, 차일드-푸, MELD 및 DAS에 대한 ROC 곡선은 열거된 곡선(AUROC) 밑의 영역으로 나타난다. 이러한 도면으로부터 AH+C+ 환자들의 하위그룹에서 DAS 값은 1.52의 DAS 컷오프를 이용하여 가장 신뢰할 수 있는 사망률 산정자(AUROC =0.84)를 제공한다는 사실이 분명해지며, 이는 75%의 민감성 및 83%의 한정성 제공한다.

<86> 도 7은 DDAH II 및 PRMT-I 단백질 발현을 나타낸다. 표본 웨스턴 블롯(Representative Western blots)은 연구된 AH+C+ 및 AH- C+ 환자들에서 디메틸아르기닌-디메틸아미노하이드롤라아제-II (DDAH-II) 및 단백질-아르기닌-메틸트렌스퍼라아제-1 (PRMT-I) 발현과 더불어, 젤 적재를 조절하기 위한 이들의 상응하는 α -튜블린 단백질 블롯을 나타낸다. 모든 분석된 환자 생검의 웨스턴 블롯 상의 DDAH II 및 PRMT-I 밀도의 정량화는, α -튜블린 발현에 대하여 수집되어진 AH+C+ 및 AH- C+ 환자들에 대한 컬럼 바에 나타난다. AH+C+ 환자들은 유의적으로 보다 낮은 DDAH II 발현($P<0.01$) 및 유의적으로 보다 높은 PRMT-I ($P<0.01$) 발현을 갖는다.

<87> 도 8은 대상부전 알코올성을 나타내고, 도 8은 사망한 대상부전 알코올성 간경변 환자들이, 생존자들과 비교하여 유의적으로 증가된 IMA/Alb 비율을 갖고, 이는 이들 환자에 있어 질환 심각성의 악화 및 보다 높은 염증 지수를 반영할 것이라는 사실을 보여준다. 상기 포인트는 알코올성 간염(AH)의 추가의 염증 성분을 갖는 환자들이, 안정한 간경변 환자들 보다 높은 DAS 및 IMAR를 가지며, AH의 생존자들이 이들 질환의 진행으로 사망한 환자들 보다 낮은 DASIMAR 점수를 갖는다는 사실을 볼 수 있는 하부 패널에 예시된다.

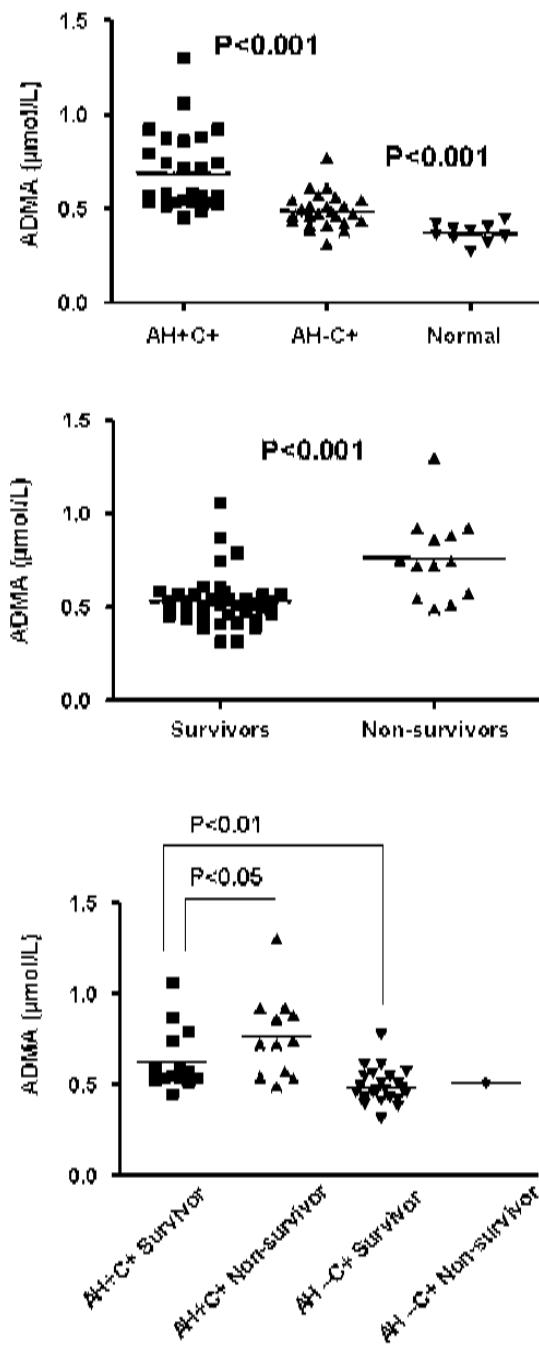
<88> 도 9는 각각 IMAR 및 DASIMAR에 대한 생존 리시버 오퍼레이터 곡선을 나타낸다. 예측 기능이 IMAR 단독 보다 DASIMAR에서 보다 크고, 이는 두 가지 예측 점수인 DAS와 IMAR를 합한 병상에 대한 상승적이고 부가적인 기여와 관련이 있으며, 간 및 다기관 기능부전이 전개됨에 따라, 간 기능장애의 진행성 심각성에 부가한 염증 및 혈액학적 변화를 반영한다.

<89> 도 10은 DASIMAR 점수의 모든 3가지 요소(즉 ADMA, SDMA, 및 IMAR)의 수학적 표시를 나타내고, DAS와 IMAR 점수를 결합하기 위한 이론적 근거를 명확히 나타내어 민감한 환자(susceptible patient)가 생존할 것같이 않은지를 확인시킨다. 상기 도면에서, 중회색 점(IMAR 축 상에서 보다 높은 값으로 나타남)은 생존자들 및 간경변 만을 보유한 환자들로부터 명확히 구별할 수 있는 사망한 알코올성 환자를 포함한 환자를 나타내는 수리적 평면을 보여준다.

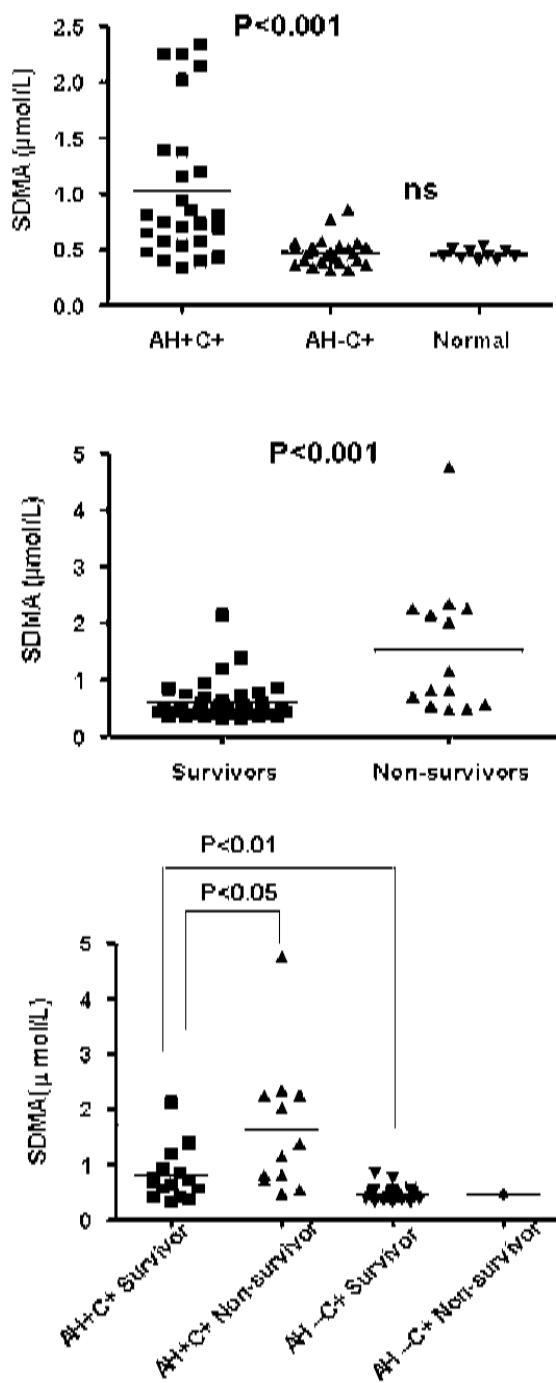
<90> 도 11은 갈락토사민(Sigma, Poole UK)을 1 g/kg(n=12) 복막 내 주사(IP)하여 처리하고, 24시간 후 리포폴리사카라이드(LPS - Klebsiella pneumonia, n=11)을 1 mg/kg IP 투여한 하위그룹에서 추가 공격한 래트에서 수행한 실험으로부터 얻은 IMAR5 DAS 및 DASIMAR에 대한 ROC 곡선을 나타낸다.

도면

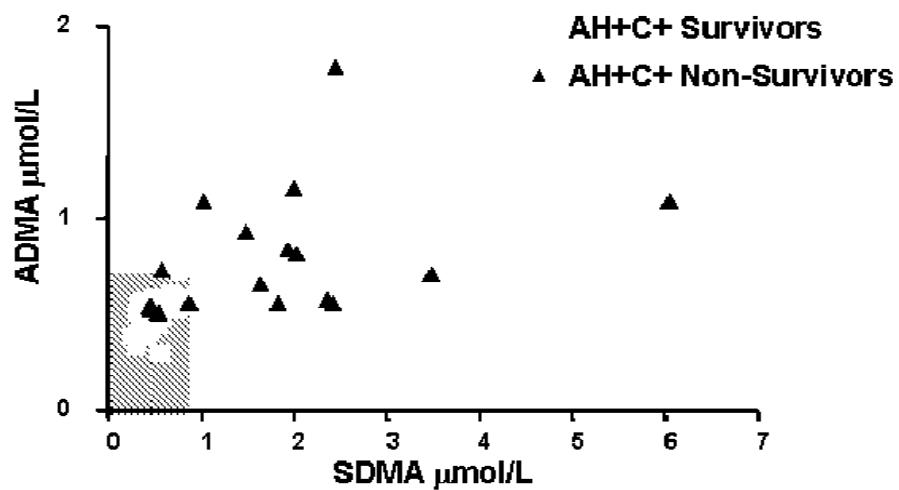
도면1



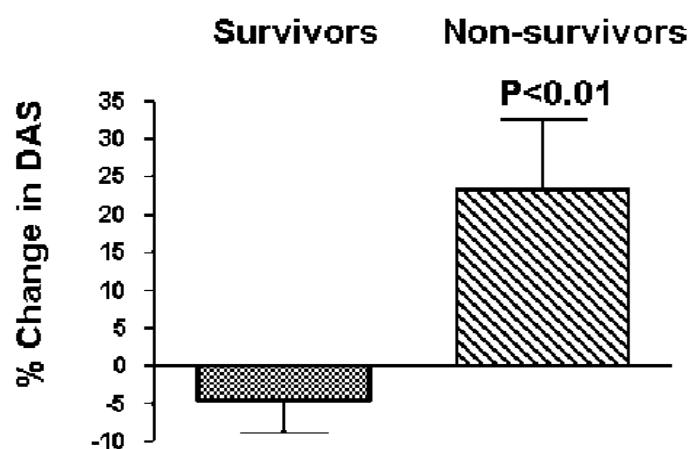
도면2



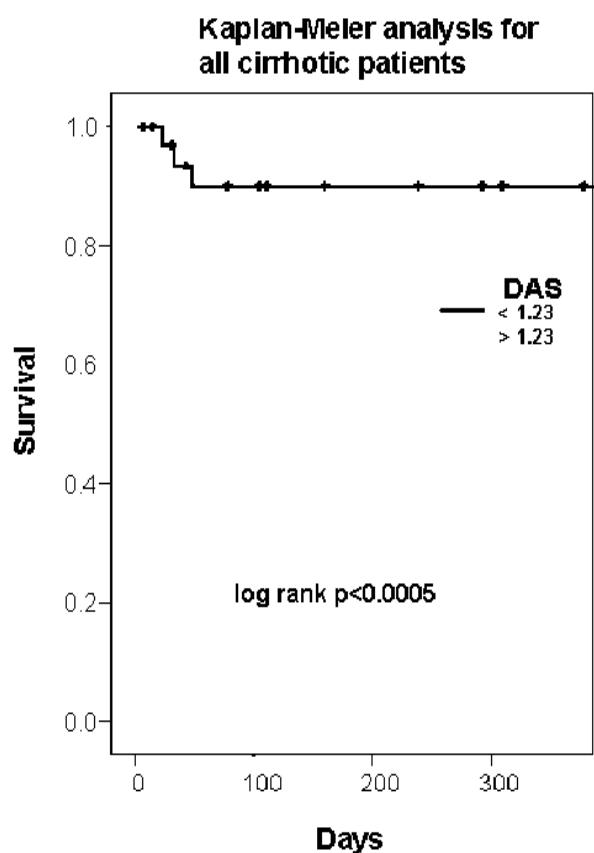
도면3



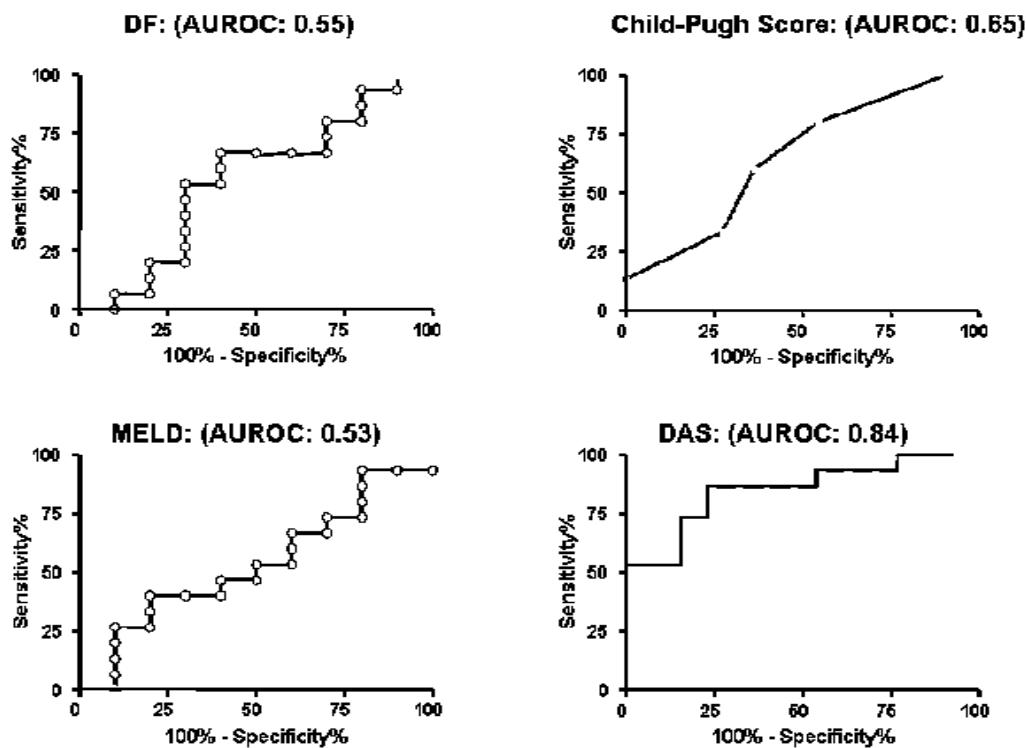
도면4



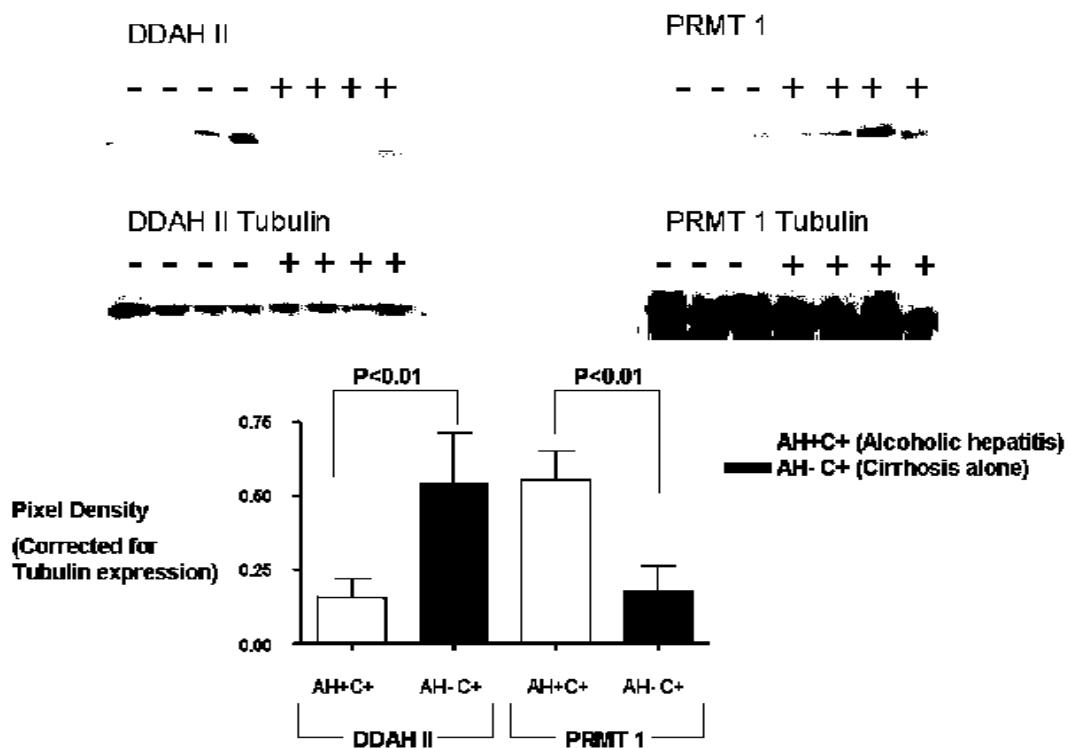
도면5



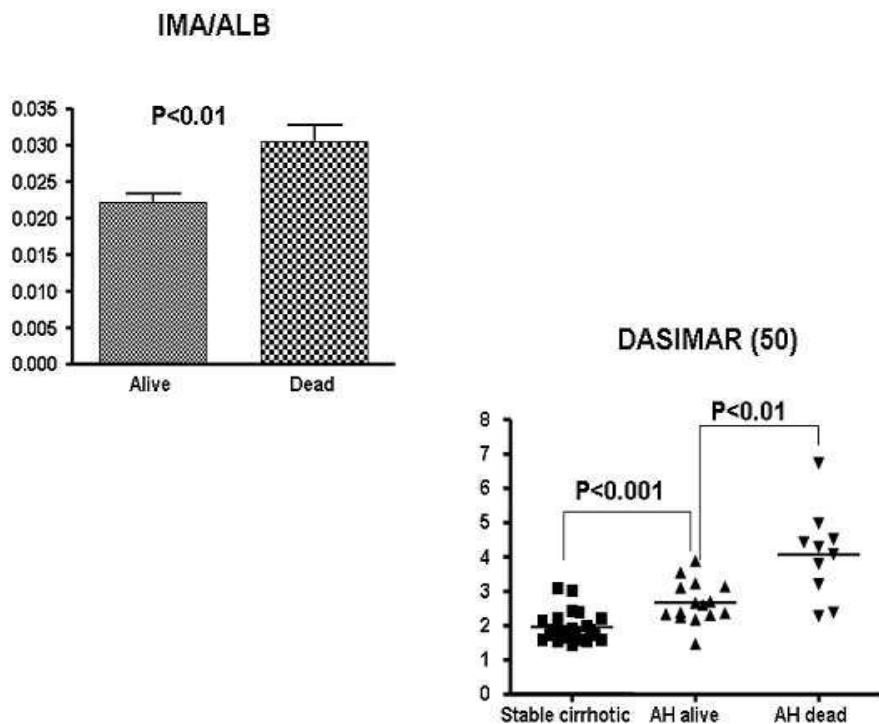
도면6



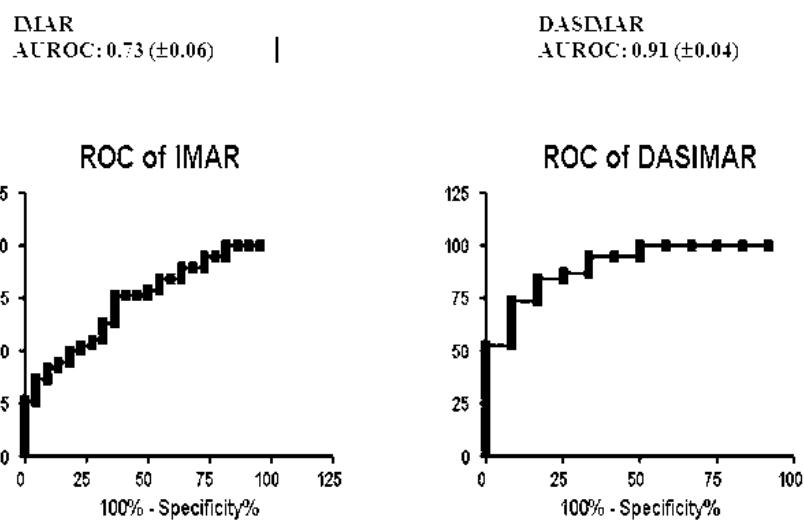
도면7



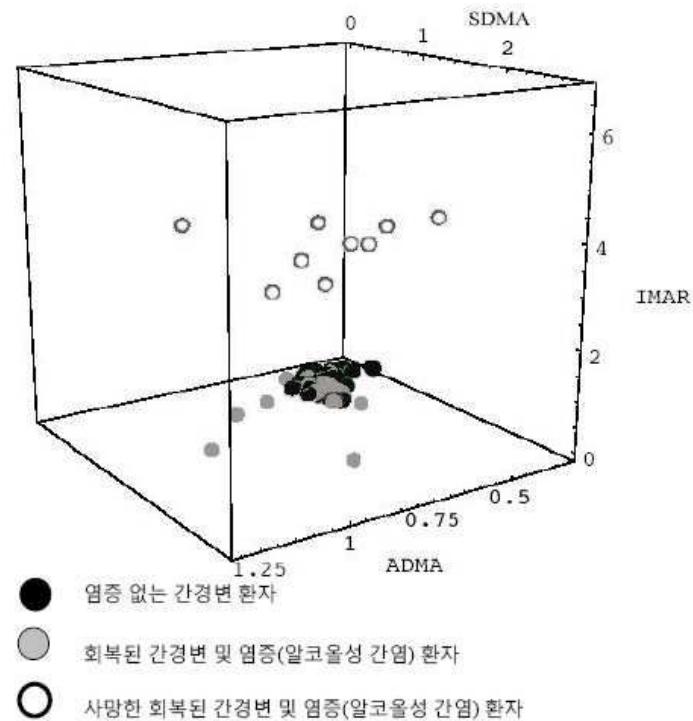
도면8



도면9



도면10



도면11

