



등록특허 10-2649965



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년03월22일

(11) 등록번호 10-2649965

(24) 등록일자 2024년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/574 (2006.01) A61B 6/03 (2024.01)

G01N 33/60 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/57484 (2013.01)

A61B 6/037 (2020.08)

(21) 출원번호 10-2020-0003665

(22) 출원일자 2020년01월10일

심사청구일자 2022년03월03일

(65) 공개번호 10-2020-0087714

(43) 공개일자 2020년07월21일

(30) 우선권주장
1020190003836 2019년01월11일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
Van Veelen et al, Journal of Internal
Medicine (2009.), vol 266, pp 126-140.

(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 6 항

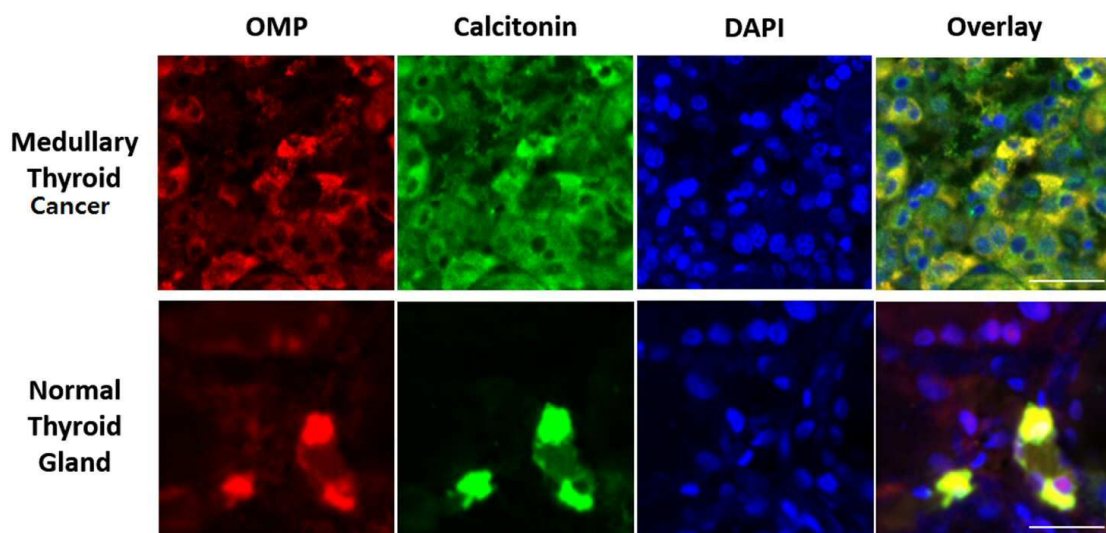
심사관 : 이수진

(54) 발명의 명칭 갑상선 수질암 표적용 조성물

(57) 요약

본 발명은 진단용 방사성 핵종으로 표지된 후각 수용체 OR51E2의 리간드를 포함하는 갑상선 수질암 표적용 조성물에 관한 것으로, 상기 조성물은 갑상선의 소포결 C-세포에서 발현되는 후각 수용체 OR51E2에 의하여 소포결 C-세포 내로 함입되므로 소포결 C-세포에서 유래한 갑상선 수질암의 진단 및 전이 여부 확인 용도로 유용하게 사용될 수 있다. 또한, 아세테이트와 결합된 치료용 방사성 핵종을 포함하는 갑상선 수질암 치료용 약학적 조성물은 아세테이트와 후각 수용체 OR51E2의 결합에 의하여 암세포 내로 함입되므로 갑상선 수질암 치료 용도로 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

G01N 33/57407 (2013.01)

G01N 33/60 (2020.05)

(56) 선행기술조사문헌

Karagiannis A K A et al, Anticancer Research
(2016.), vol 3, pp 3803-3810.

KR1020170106084 A

W02015071876 A2

W02018008048 A1

명세서

청구범위

청구항 1

후각 수용체 OR51E2의 리간드인 아세테이트를 포함하되, 상기 아세테이트는 진단용 방사성 핵종 탄소-11(C-11) 또는 산소-15(O-15)로 표지된 것인, 갑상선 수질암 표적용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 갑상선 수질암은 소포결 C-세포(parafollicular C-cell)에서 유래한 것인, 갑상선 수질암 표적용 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

- (a) 제1항 또는 제2항의 갑상선 수질암 표적용 조성물을 갑상선 수질암의 발병이 의심되는 개체에 투여하는 단계;
- (b) 투여한 조성물의 진단용 방사성 핵종의 신호를 검출하는 단계; 및
- (c) 검출된 진단용 방사성 핵종의 신호를 정상 개체의 신호와 비교하는 단계를 포함하는, 갑상선 수질암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 방법은 (c)단계에서 상기 검출된 신호가 정상 개체의 신호보다 높은 경우 개체에 갑상선 수질암이 발병한 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함하는 것인, 갑상선 수질암의 진단을 위한 정보 제공 방법.

청구항 7

- (a) 제1항 또는 제2항의 갑상선 수질암 표적용 조성물을 갑상선 수질암이 발병한 개체에 투여하는 단계;
- (b) 투여한 조성물의 진단용 방사성 핵종의 신호를 검출하는 단계; 및
- (c) 검출된 진단용 방사성 핵종의 신호가 갑상선 이외의 부위에서 나타나는지 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 갑상선 수질암의 전이 여부를 확인하기 위한 정보 제공 방법.

청구항 8

후각 수용체 OR51E2의 리간드인 아세테이트를 포함하되, 상기 아세테이트는 치료용 방사성 핵종 탄소-11(C-11) 또는 산소-15(O-15)로 표지된 것인, 갑상선 수질암 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 갑상선 수질암이 기원하는 소포결 C-세포(parafollicular C-cell)에서 후각 수용체 OR51E2가 발현되는 점을 이용한 갑상선 수질암 표적용 조성물 및 갑상선 수질암 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 갑상선에 생긴 혹을 갑상선 결절이라고 하며, 크게 양성과 악성으로 나뉜다. 이중 악성 결절들을 갑상선암(thyroid cancer)이라고 하며, 갑상선암을 치료하지 않고 방치하면 암이 커져 주변조직을 침범하거나 림프절전이, 원격전이를 일으켜 심한 경우 생명을 잃을 수 있다. 갑상선암은 기원이 된 세포의 종류 및 세포의 성숙도에 따라 여포세포에서 기원하는 유두암(papillary thyroid cancer)과 여포암(follicular thyroid cancer), 저분화암(poorly differentiated thyroid cancer) 및 미분화암(역형성암, undifferentiated thyroid cancer, anaplastic thyroid cancer)으로 나눌 수 있다. 비여포세포에서 기원하는 갑상선암에는 수질암과 림프종 및 전이성 암 등이 있다.

[0004] 상기 갑상선암 종류 중에서 갑상선 수질암(medullary thyroid cancer)은 전체 갑상선암의 1% 미만을 차지하며, 몸 속의 칼슘량을 조절하는 칼시토닌(calcitonin)을 분비하는 소포결 C-세포(parafollicular C-cell)에서 발생한다. 갑상선 수질암은 다발성인 경우가 많고 전이가 비교적 잘 나타나며, 수술 후에 방사성 요오드 치료가 잘 듣지 않기 때문에 근본적인 치료 방법은 외과적 수술로 갑상선을 제거하는 것이다. 대부분의 갑상선 수질암 환자에서는 칼시토닌과 CEA(carcino embryonic antigen)의 혈중 수치가 증가하므로 상기 두 인자의 혈중 수치는 갑상선 수질암의 예후 예측 및 재발 관련 인자로 활용된다. 그러나 상기 두 인자는 갑상선 수질암이 형성된 이후에 증가하므로 갑상선 수질암을 조기에 진단하기 어렵고, 이에 따라 갑상선 수질암의 치료 또한 늦어지는 단점이 있다.

[0005] 본 발명자들은 갑상선 수질암의 표적화제 발굴을 위하여 노력한 결과, 갑상선의 소포결 C-세포에서 후각 수용체 OR51E1 및 OR51E2가 많이 발현되는 것을 확인하고 이를 갑상선 수질암의 진단, 표적 및 치료 용도로 사용할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Eva M. Neuhaus et al., J Biol Chem. 12;284(24):16218-16225
(비특허문헌 0002) 2. Lian Gelis et al., J Biol Chem. 19;291(34):17772-17786

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 진단용 방사성 핵종으로 표지된 후각 수용체 OR51E2의 리간드를 포함하는 갑상선 수질암 표적용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 갑상선 수질암 표적용 조성물을 사용하여 갑상선 수질암을 진단하는 방법, 갑상선 수질암의 전이 여부를 확인하는 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 아세테이트 및 이와 결합된 치료용 방사성 핵종을 유효성분으로 포함하는 갑상선 수질암 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 양상은 진단용 방사성 핵종으로 표지된 후각 수용체 OR51E2의 리간드를 포함하는 갑상선 수질암 표적용 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 명세서에 사용된 용어, "갑상선 수질암(medullary thyroid cancer)"은 칼시토닌을 분비하는 소포결 C-세포(parafollicular C-cell)에서 유래한 갑상선암으로 발병율은 낮은 편이나, 다발성인 경우가 많고 전이가 비교적 잘 나타나므로 갑상선암 중에서는 예후가 나쁜 편에 속한다. 또한, 수술 후에 방사성 요오드 치료가 잘 듣지 않기 때문에 근본적인 치료 방법은 외과적 수술로 갑상선을 절제하는 것이다.
- [0014] 본 명세서에 사용된 용어, "후각 수용체(olfactory receptor, OR)"는 냄새 물질과 선택적으로 결합하는 수용체로 인간은 약 390개의 후각 수용체를 갖고 있다. 냄새 물질과 후각 수용체 간의 선택적인 결합에 의해 후각 신경세포에서 후각 신경신호가 발생하고, 발생한 후각 신경신호를 대뇌에서 감지하여 냄새를 인지하게 된다. 그러나 최근 연구에 의하면 코 이외에 피부, 근육, 신장, 전립선 등에서도 후각 수용체가 발현되고 있으며(이소성 발현, ectopic expression), 냄새 인지 이외에 후각 수용체의 다양한 기능에 대한 연구가 이루어지고 있다.
- [0015] 본 발명에 사용되는 후각 수용체 OR51E2(Olfactory receptor 51E2)는 전립선에서 많이 발현되어 PSGR(Prostate-Specific G-Protein Coupled Receptor)로도 불린다. 전립선암의 악성화에 관여하는 것으로 알려져 있으나, 갑상선 및 갑상선암에서의 기능에 대해서는 알려진 바가 없다.
- [0016] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 후각 수용체 OR51E2의 리간드는 아세테이트(acetate), 노난산(nonanoic acid), 프로피오네이트(propionate), 베타-이오논(β -ionone), 아젤라산(azelaic acid), 에스트리올(estriol), 에피테스토스테론(epitestosterone), 19-OH AD(19-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione), 팔미트산(palmitic acid), 안드로스테네디온(androstenedione), D-알라닐-d-알라닌(D-alanyl-d-alanine), 글리실글리신(glycylglycine), 코지비오스(kojibiose), 우레아(urea), AFMK(N-acetyl-N-formyl-5-metoxynurenamine), 펠라르고니딘(pelargonidin), 하이드록시피루브산(hydroxypyruvic acid), 브래디키닌(bradykinin), 8-하이드록시구아닌(8-hydroxyguanine), 이미다졸론(imidazolone), 2-피롤리디논(2-pyrrolidinone), 2-케토글루타르산(2-ketoglutaric acid), L-글리세르산(L-glyceric acid), 글리신(glycine) 및 13-시스 레티노산(13-cis retinoic acid)으로 이루어진 군에서 선택될 수 있으며, 바람직하게는 아세테이트가 사용될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 진단용 방사성 핵종은 탄소-11(C-11), 질소-13(N-13), 산소-15(O-15), 불소-18(F-18), 인-32(P-32), 구리-64(Cu-64), 갈륨-67(Ga-67), 갈륨-68(Ga-68), 루비듐-82(Rb-82), 지르코늄-89(Zr-89), 테크네튬-99m(Tc-99m), 인듐-111(In-111), 아이오딘-123(I-123), 아이오딘-131(I-131), 크세논-133(Xe-133), 탈륨-201(Tl-201) 및 토륨-229(Th-229)로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0018] 본 명세서에 사용된 용어, "방사성 핵종(radionuclide)"은 불안정한 원자핵을 가진 원자를 말하며, 원자핵이 안정한 방향으로 변하는 과정에서 핵반응이 일어나고, 이 과정에서 알파선, 베타선, 감마선 등의 방사선이 방출된다. 일반적으로 알파선과 베타선은 투과력은 약하지만 물질의 변성을 일으키고 특히 살아 있는 세포의 DNA에 변성을 일으킬 경우 그 세포를 사멸하게 하는 성질이 강하여 암세포를 죽이는 용도로 사용된다. 감마선은 전자기파이며, 진행하다가 어떤 물질을 만나면 그 물질의 화학결합 사이로 빠져 나가는 확률이 높으므로 투과력이 높고, 암세포 사멸 용도보다는 질병 진단 용도로 많이 사용된다.
- [0019] 본 발명에서, OR51E2의 리간드에 방사성 핵종을 표지하는 방법은 당업계에 알려진 방법을 사용할 수 있다. 예를 들어 OR51E2의 리간드에 방사성 핵종에 해당하는 원소가 포함되어 있는 경우, 리간드 합성시 방사성 핵종을 포함시켜 리간드 자체가 방사선을 방출하도록 제조할 수 있다. 또한, 리간드가 OR51E2에 결합하는 능력을 방해하지 않는 범위에서 리간드의 일부 작용기 또는 작용기의 일부 원소를 방사성 핵종으로 치환할 수 있다. 다른 방법으로는 링커(linker)를 통해 리간드와 방사성 핵종 또는 방사성 핵종을 포함하는 화합물을 연결시킬 수 있다. 상기 링커에는 DOTA (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7,10-tetraacetic acid), DTPA (Diethylene triamine penta acetic acid), DO3A (1,4,7,10-tetraazacyclododecane-1,4,7-triacetic acid), NOTA (1,4,7-triazacyclononane-1,4,7-triacetic acid), NODAGA (1,4,7-Triazacyclononane,1-glutaric acid-4,7-acetic acid), TETA (1,4,8,11-tetraazacyclotetradecane-N,N',N'',N'''-tetraacetic acid) 등의 양기능성 킬레이트제(bifunctional chelating agent, BCA)가 사용될 수 있다. 상기 링커는 금속성 방사성 동위원소와 배위결합을 형성할 수 있으며, 링커 중에서 DOTA 또는 NOTA는 Ga-68의 표지에 자주 이용되고, DOTA는 In-111, Y-90, Lu-177, Ga-68 등의 표지에 널리 사용된다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 OR51E2의 리간드로는 아세테이트를 사용할 수 있으며, 이 경우 아세테이트의 탄소 원소를 탄소-11로 치환하여 사용할 수 있다. 탄소-11은 반감기가 20분으로 탄소가 모든 유기물의 구성 원소

가 되므로 유기물의 성질을 변화시키지 않고 표지할 수 있다.

[0022] 본 발명의 또 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 갑상선 수질암의 진단 방법을 제공한다:

[0023] (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 갑상선 수질암의 발병이 의심되는 개체에 투여하는 단계;

[0024] (b) 투여한 조성물의 진단용 방사성 핵종의 신호를 검출하는 단계; 및

[0025] (c) 검출된 진단용 방사성 핵종의 신호를 정상 개체의 신호와 비교하는 단계.

[0026] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 갑상선 수질암의 진단 방법은 (c) 단계에서 상기 검출된 신호가 정상 개체의 신호보다 높은 경우 개체에 갑상선 수질암이 발병한 것으로 판단하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에서, 후각 수용체 OR51E2는 정상 소포결 C-세포에서도 발현되나, 갑상선 수질암이 발병된 경우 소포결 C-세포의 수가 증가하게 되고, 정상 개체(갑상선 수질암이 발병하지 않은 개체)와 비교하여 진단용 방사성 핵종의 신호가 높게 나타나므로 갑상선 수질암의 발병 여부를 판단할 수 있다.

[0029] 본 발명의 또 다른 양상은 하기 단계를 포함하는 갑상선 수질암의 전이 여부를 확인하는 방법을 제공한다:

[0030] (a) 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물을 갑상선 수질암이 발병한 개체에 투여하는 단계;

[0031] (b) 투여한 조성물의 진단용 방사성 핵종의 신호를 검출하는 단계; 및

[0032] (c) 검출된 진단용 방사성 핵종의 신호가 갑상선 이외의 부위에서 나타나는지 여부를 확인하는 단계.

[0033] 본 발명에서, 후각 수용체 OR51E2는 갑상선의 소포결 C-세포에서 발현되고, 갑상선 수질암이 전이되면 소포결 C-세포의 이동에 의하여 갑상선 이외의 부위에서 진단용 방사성 핵종의 신호가 나타나므로 방사성 핵종의 신호가 나타나는 위치를 파악하여 갑상선 수질암의 전이 여부 및 전이 위치를 판단할 수 있다.

[0034] 본 발명자들은 갑상선에서 발현되는 후각 수용체를 확인한 결과, 갑상선의 소포결 C-세포에서 특이적으로 OR51E1 및 OR51E2가 발현되고, OR51E2의 리간드인 아세테이트를 처리한 경우 OR51E2가 세포 내로 이동하는 것을 확인하였다. 따라서, 방사성 핵종으로 표지된 OR51E2의 리간드는 OR51E2와 함께 소포결 C-세포 내로 이동할 수 있으며, 결과적으로 소포결 C-세포를 방사성 핵종으로 확인할 수 있다.

[0036] 본 발명의 또 다른 양상은 아세테이트 및 이와 결합된 치료용 방사성 핵종을 유효성분으로 포함하는 갑상선 수질암 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0037] 본 발명에서, 상기 약학적 조성물의 유효성분은 아세테이트 및 이와 결합된 치료용 방사성 핵종, 또는 방사성 핵종으로 표지된 아세테이트 모두를 포함한다.

[0038] 본 발명에서, 치료용 방사성 핵종은 생체 내에서 암 등 목표한 표적에 도달하면 방사선을 방출하여 암세포를 파괴하는 물질을 말한다. 예를 들어, 상기 치료용 방사성 핵종은 탄소-11(C-11), 질소-13(N-13), 산소-15(O-15), 불소-18(F-18), 인-32(P-32), 구리-64(Cu-64), 갈륨-67(Ga-67), 갈륨-68(Ga-68), 루비듐-82(Rb-82), 지르코늄-89(Zr-89), 테크네튬-99m(Tc-99m), 인듐-111(In-111), 아이오딘-123(I-123), 아이오딘-131(I-131), 크세논-133(Xe-133), 탈륨-201(Tl-201), 토륨-229(Th-229), 이트륨-90(Y-90), 홀름-166(Ho-166) 및 레늄-188(Re-188) 으로 이루어진 군에서 선택될 수 있다. 바람직하게는 아이오딘-123(I-123) 또는 아이오딘-131(I-131)이 사용될 수 있으며, 아이오딘-131(I-131)을 사용하는 것이 가장 바람직하다.

[0039] 본 발명자들은 갑상선 수질암의 기원세포인 소포결 C-세포에서 특이적으로 OR51E1 및 OR51E2가 발현되고, OR51E2의 리간드인 아세테이트를 처리한 경우 OR51E2가 세포 내로 이동하는 것을 확인하였다. 따라서, 치료용 방사성 핵종과 결합하거나, 방사성 핵종으로 표지된 아세테이트는 OR51E2와 함께 소포결 C-세포 내로 이동할 수 있으며, 세포 내에서 방사선을 방출하여 암세포를 사멸시킬 수 있다. 특히, 이미 치료 효과가 알려진 방사성 핵종을 사용하므로 갑상선 수질암 세포의 사멸 효과를 높일 수 있다. 아세테이트와 치료용 방사성 핵종의 결합 방법은 상기 진단용 방사성 핵종의 표지 방법과 동일한 방법을 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨,

자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘_포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0042] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘(calcium carbonate), 슈크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텔솔(witepsol), 마크로글, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0043] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여법이라면 어느 것이나 사용 가능하고, 전신 투여 또는 국소 투여가 가능하나, 전신 투여가 더 바람직하며, 정맥 내 투여가 가장 바람직하다.

[0044] 상기 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량 및 투여시기는 투여대상의 나이, 성별, 질병의 종류, 상태, 체중, 투여경로, 투여 횟수, 약의 형태에 따라서 달라질 수 있다. 일일 투여량은 약 0.00001 내지 1000 mg/kg이고, 바람직하게는 0.0001 내지 100 mg/kg이다. 상기 투여량은 질환이 종류, 암의 진행 정도, 투여 경로, 성별, 나이, 체중 등에 따라 적절히 증감될 수 있다.

발명의 효과

[0046] 본 발명의 갑상선 수질암 표적용 조성물은 갑상선의 소포결 C-세포에서 발현되는 후각 수용체 OR51E2에 의하여 소포결 C-세포 내로 함입되므로 소포결 C-세포에서 유래한 갑상선 수질암의 진단 및 전이 여부 확인 용도로 유용하게 사용될 수 있으며, 갑상선 수질암 치료용 약학적 조성물은 아세테이트와 후각 수용체 OR51E2의 결합에 의하여 암세포 내로 함입되므로 갑상선 수질암을 치료할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1은 정상 갑상선 세포와 갑상선 수질암 세포를 후각 마커 단백질(olfactory marker protein, OMP) 및 칼시토닌(calcitonin)으로 염색한 결과를 나타낸다.

도 2는 갑상선 수질암 세포주 MZ-CRC1 및 TT, 미분화 갑상선암 세포주 FRO 및 SW1736, 갑상선 유두암 세포주 TPC-1 및 갑상선 여포암 세포주 FTC-133을 후각 마커 단백질 항체로 염색한 결과를 나타낸다.

도 3에서 A는 다양한 갑상선암 세포주에서 OR51E1(olfactory receptor 51E1) 및 OR51E2의 발현 여부를 확인한 결과이고, B 및 C는 갑상선 수질암 세포주 MZ-CRC1 및 TT를 각각 OR51E1 및 OR51E2 항체로 염색한 결과를 나타낸다.

도 4에서 A는 소포결 C-세포 세포주에 후각 수용체 리간드인 아세테이트, 노난산, 프로피오네이트 및 아젤라산을 처리한 후 p42/44의 인산화 수준을 확인한 결과이고, B는 소포결 C-세포 세포주에 아세테이트를 처리한 후 CREB 및 p42/44의 인산화 수준을 확인한 결과이며, C는 cAMP의 수준을 확인한 결과를 나타낸다.

도 5에서 A는 소포결 C-세포 세포주에 아세테이트를 처리한 후 브로모데옥시우리딘으로 세포 증식 정도를 분석한 결과이고, B는 세포내 칼시토닌의 발현 수준을 확인한 결과이며, C는 siRNA로 OR51E2의 발현을 억제한 후 아세테이트를 처리하여 칼시토닌의 방출 수준을 확인한 결과를 나타낸다.

도 6은 마우스의 갑상선 조직을 각각 후각 마커 단백질(OMP), 칼시토닌 및 OR51E2 항체로 염색한 결과를 나타낸다.

도 7에서 A는 OR51E2 유전자가 녹색 형광 단백질(GFP)로 치환된 형질전환 마우스의 갑상선 조직을 항체로 염색한 결과이고, B는 야생형 마우스 및 상기 형질전환 마우스에 아세테이트를 투여한 후 혈청에서 칼시토닌 수준을 측정하여 결과를 나타낸다.

도 8에서 A는 다양한 갑상선암 세포주에 ^{11}C -아세테이트를 처리한 후 양전자 방출 정도를 측정한 결과이고, B는 CPM(counter per minute)을 측정한 결과이며, C는 갑상선 수질암 세포주에 siOR51E2를 도입시킨 후 ^{11}C -아세테이트를 처리하여 CPM을 측정한 결과이고, D는 OR51E2 녹아웃 마우스에 ^{11}C -아세테이트를 처리한 후 CPM을 측정한 결과를 나타낸다.

도 9는 갑상선 수질암 세포주인 MZ-CRC-1 및 TT 세포주에 콜드 아세테이트(cold acetate)를 먼저 처리한 후 ^{11}C -아세테이트를 경쟁적으로 처리하거나(A 및 B), 또는 ^{11}C -아세테이트를 먼저 처리한 후 콜드 아세테이트를 경쟁적으로 처리하여(C 및 D) CPM을 측정한 결과를 나타낸다.

도 10은 MZ-CRC-1 세포주에 아세테이트를 처리한 후 OR51E2 항체로 세포를 염색한 결과를 나타낸다.

도 11에서 A는 MZ-CRC-1 세포주를 투여하여 종양이 형성된 누드 마우스에 ^{11}C -아세테이트를 투여한 후 양전자 방출 단층 촬영(PET)을 수행한 결과이고, B는 상기 누드 마우스의 혈청에서 칼시토닌 수준을 측정한 결과를 나타낸다.

도 12는 갑상선 수질암 환자에 ^{11}C -아세테이트를 투여한 후 PET를 수행한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0051] 실시예 1: 후각 마커 단백질의 발현 확인

[0052] 1-1. 갑상선 조직 및 갑상선암 세포주 염색

[0053] 갑상선에서 후각 수용체(olfactory receptor)가 발현되는지 확인하기 위해 후각 마커 단백질(olfactory marker protein; 이하, OMP로 기재함)의 발현을 확인하였다. 정상 갑상선(thyroid gland) 조직과 갑상선 수질암(medullary thyroid cancer, MTC) 세포를 OMP 항체(Rabbit anti-OMP; Santa Cruz, CA, USA)로 염색한 결과, 갑상선에서 OMP가 발현되는 것을 확인할 수 있었고, 갑상선을 구성하는 세포 중에서 소포결 C-세포(parafollicular C-cell)에서만 OMP가 발현되는 것을 알 수 있었다(도 1). 갑상선 수질암은 소포결 C-세포에서 유래한 악성 갑상선 종양으로, 칼시토닌은 소포결 C-세포의 마커 단백질이다.

[0055] 1-2. 갑상선암 세포주 염색

[0056] 갑상선 수질암 세포주인 MZ-CRC1 및 TT, 미분화 갑상선암(anaplastic thyroid cancer) 세포주인 FRO 및 SW1736, 갑상선 유두암(papillary thyroid cancer) 세포주인 TPC-1, 갑상선 여포암(follicular thyroid cancer) 세포주인 FTC-133을 OMP 항체로 염색하였다.

[0057] 그 결과, 다양한 갑상선암 세포주 중에서도 소포결 C-세포에서 유래하는 갑상선 수질암 세포주인 MZ-CRC1 및 TT 세포주에서 OMP가 많이 발현되는 것을 확인할 수 있었다(도 2).

[0059] 1-3. 후각 수용체의 종류 확인

[0060] 갑상선암 세포주에서 발현되는 후각 수용체의 종류를 확인하기 위하여 RNA를 분리한 후 cDNA를 합성하여 당업계에 알려진 방법에 따라 실시간-중합효소연쇄반응(real-time polymerase chain reaction, RT-PCR)을 수행하였다.

[0061] 그 결과, 갑상선 수질암 세포주인 MZ-CRC1 및 TT 세포주에서는 OR51E1 (Olfactory receptor 51E1)과 OR51E2가 많이 발현되나, 다른 갑상선 암세포주에서는 거의 발현되지 않는 것을 확인할 수 있었다(도 3의 A). 또한, MZ-CRC1 및 TT 세포주를 각각 OR51E1 및 OR51E2 항체로 염색한 결과, 상기 후각 수용체의 발현이 OMP의 발현 양상과 거의 일치하는 것을 알 수 있었다(도 3의 B 및 C).

[0063] 실시예 2: 후각 수용체 리간드의 영향 확인

[0064] 2-1. 소포결 C-세포에 후각 수용체 리간드 처리

[0065] 갑상선 수질암 세포주에서 OR51E1 및 OR51E2가 많이 발현되므로 소포결 C-세포주인 MZ-CRC1 및 TT 세포주에 후각 수용체 리간드(ligand)인 아세테이트(acetate), 노난산(nonanoic acid), 프로피오네이트(propionate) 및 아

젤라산(azelaic acid)을 각각 100 μ M씩 처리하여 그 영향을 확인하였다.

[0066] 실험 결과, 여러 리간드 중에서 아세테이트에 의해서 p42/44 MAPK(mitogen-activated protein kinase)의 인산화 수준이 증가하는 것을 알 수 있었다(도 4의 A). 또한, 아세테이트 처리 농도에 비례하여 p42/44 MAPK 및 CREB(cAMP response element-binding protein)의 인산화 수준이 증가하고(도 4의 B), CREB의 인산화 수준이 증가함에 따라 세포내 cAMP의 수준도 증가하였다(도 4의 C).

[0067] 이후 소포결 C-세포에 아세테이트를 농도별로 처리하여 배양한 후 브로모데옥시우리딘(Bromodeoxyuridine, BrdU) 세포 증식 분석 키트(Millipore, 메사추세츠주)로 제조자의 프로토콜에 따라 BrdU 결합 정도를 분석하였다.

[0068] 그 결과, 아세테이트 처리에 의하여 BrdU 결합 수준이 증가하는 것을 확인하여 세포 증식이 증가하는 것을 알 수 있었다(도 5의 A). 또한, 아세테이트 처리에 의하여 세포내 칼시토닌의 발현 수준이 증가하였으며(도 5의 B), siRNA로 OR51E2의 발현을 억제한 경우 아세테이트를 처리하여도 칼시토닌 방출은 증가하지 않았다(도 5의 C).

[0070] 2-2. 마우스의 갑상선 조직 염색

[0071] 8주령의 암컷 C57BL/6 마우스에서 갑상선을 분리하여 조직 절편을 제작하고, OR51E2, 칼시토닌 및 OMP를 각각의 항체로 염색하였다. 그 결과, OR51E2, OMP 및 칼시토닌이 갑상선 조직에서 같은 부위에 위치(co-localization)하는 것을 알 수 있었다(도 6).

[0073] 2-3. OR51E2 녹아웃(knockout) 마우스

[0074] OR51E2 유전자 위치에 녹색 형광 단백질(GFP)이 삽입된 C57/BL6 마우스를 구입(Jackson Laboratory, USA)하여 무균 조건에서 사육하였다. 일주일 동안의 순화 기간을 거친 후 99% 아세테이트 100 μ l를 주사하고, 30분 후 마우스를 희생시켜 갑상선 및 혈청을 분리하였다. 갑상선은 칼시토닌 및 GFP 항체로 각각 염색하고, 분리한 혈청에서는 칼시토닌 농도를 측정하였다.

[0075] 갑상선 염색 결과, 칼시토닌과 GFP가 같은 부위에 위치하는 것을 확인할 수 있었고(도 7의 A), 야생형 마우스의 경우 아세테이트에 의해 혈청 내 칼시토닌 수준이 상승하지만 OR51E2 녹아웃 마우스는 칼시토닌 수준이 거의 일정하게 유지되는 것을 알 수 있었다(도 7의 B).

[0077] 실시예 3: 후각 수용체 OR51E2에 대한 아세테이트의 영향 확인

[0078] 3-1. 11 C-아세테이트 처리

[0079] 기원이 상이한 갑상선암 세포주에 방사성 동위원소로 표지된 11 C-아세테이트를 처리(20 μ Ci)하고, 양전자 방출(positron emission) 정도를 확인하였다. 대조군으로는 가장 흔히 이용하는 방사성 의약품인 F-18-불화디옥시포도당(F-18-fluorodeoxyglucose)을 처리하였다.

[0080] 그 결과, 갑상선 수질암 세포주에서 양전자 방출 수준이 높은 것으로 나타나 소포결 C-세포의 OR51E2에 아세테이트가 결합하는 것을 확인할 수 있었고(도 8의 A), CPM(counter per minute) 측정 결과 또한 갑상선 수질암 세포주에서 가장 높은 것으로 나타났다(도 8의 B).

[0081] 갑상선 수질암 세포주에 siOR51E2를 처리하여 OR51E2의 발현을 억제한 경우, 11 C-아세테이트를 처리하여도 CPM이 증가하지 않았으며(도 8의 C), OR51E2 녹아웃 마우스의 경우 11 C-아세테이트를 처리하여도 야생형 마우스와 비교하여 CPM이 증가하지 않았다(도 8의 D).

[0083] 3-2. 아세테이트 결합 경쟁 실험

[0084] 갑상선 수질암 세포주인 MZ-CRC-1 및 TT 세포주에 콜드 아세테이트(cold acetate; 방사성 동위원소로 표지되지 않은 아세테이트) 100 μ M을 처리한 후 11 C-아세테이트를 2, 5, 10, 20, 40 및 60 μ Ci 농도로 처리하고 CPM을 측정하였다. 또한, MZ-CRC-1 및 TT 세포주에 11 C-아세테이트를 처리(20 μ Ci)한 후 콜드 아세테이트를 0, 20, 40, 80, 150 및 300 μ M 농도로 처리하여 CPM을 측정하였다.

[0085] 콜드 아세테이트를 먼저 처리하고, 11 C-아세테이트를 처리한 경우, 처리 농도가 증가할수록 CPM이 증가하였다(도

9의 A 및 B). 반대로 ^{11}C -아세테이트를 처리한 후 콜드 아세테이트를 처리한 경우, 처리 농도가 증가할수록 CPM 이 감소하였다(도 9의 C 및 D). 이 결과는 콜드 아세테이트와 ^{11}C -아세테이트가 서로 경쟁적으로 OR51E2에 결합 하는 것을 의미한다.

[0087] **3-3. 아세테이트의 갑상선암 진단 용도**

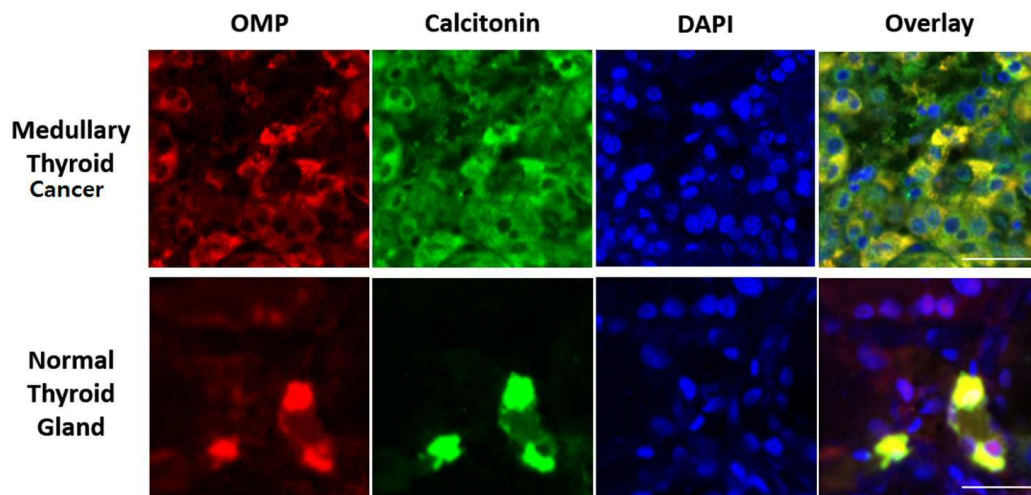
[0088] 아세테이트와 OR51E2의 결합이 갑상선암 진단에 활용될 수 있는지 확인하기 위하여, MZ-CRC-1 세포주(소포결 C-세포)에 아세테이트 100 μM 을 처리하고, 1분, 5분 및 30분 후에 세포를 염색하여 OR51E2를 확인하였다. 그 결과, 아세테이트 처리에 의하여 OR51E2가 세포 내로 이동하는 것을 확인할 수 있었다(도 10).

[0089] 누드 마우스(BALB/c)에 MZ-CRC-1 세포주를 투여(4×10^6 세포/마우스)하여 종양 생성을 유도하고, ^{11}C -아세테이트를 투여한 후 양전자 방출 단층 촬영(positron emission tomography, PET)을 수행하였다. 그 결과, MZ-CRC-1 세포주에 의한 종양 생성 부위에 ^{11}C -아세테이트가 축적되는 것을 알 수 있었고(도 11의 A), 혈청 내 칼시토닌 농도는 ^{11}C -아세테이트 투여에 의하여 상승하는 것을 확인할 수 있었다(도 11의 B).

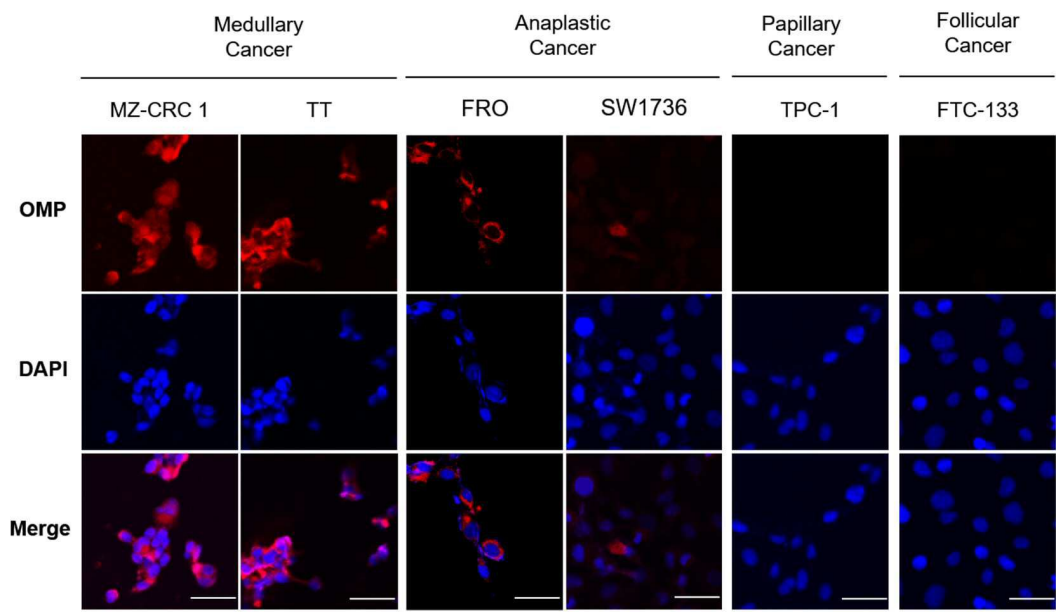
[0091] 지금까지의 결과를 통하여, 후각 수용체 OR51E2의 리간드가 아세테이트임을 확인하였고, OR51E2와 아세테이트의 결합에 의하여 OR51E2가 세포 내로 이동하므로 아세테이트와 방사성 핵종을 갑상선 수질암 진단 및 치료 용도로 활용할 수 있음을 확인하였다.

도면

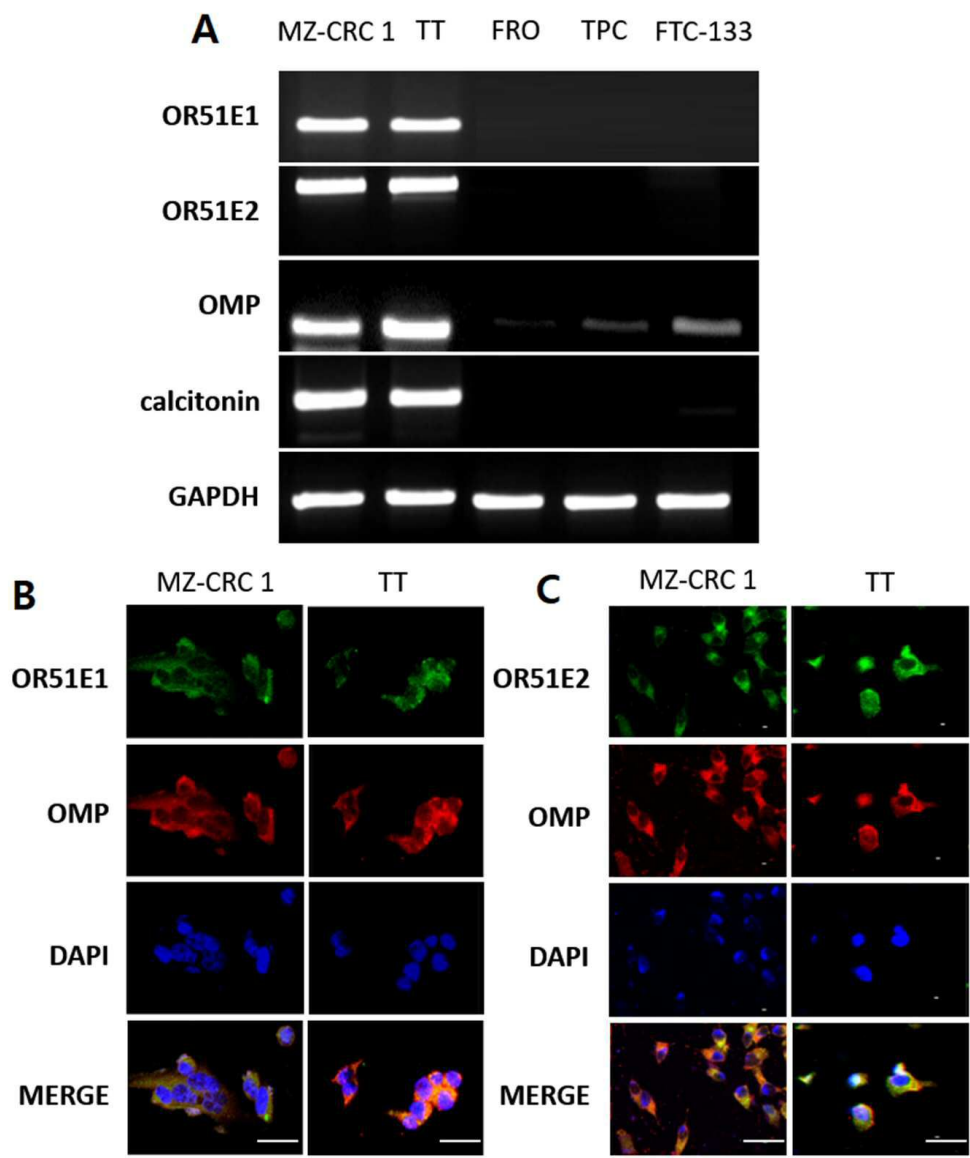
도면1



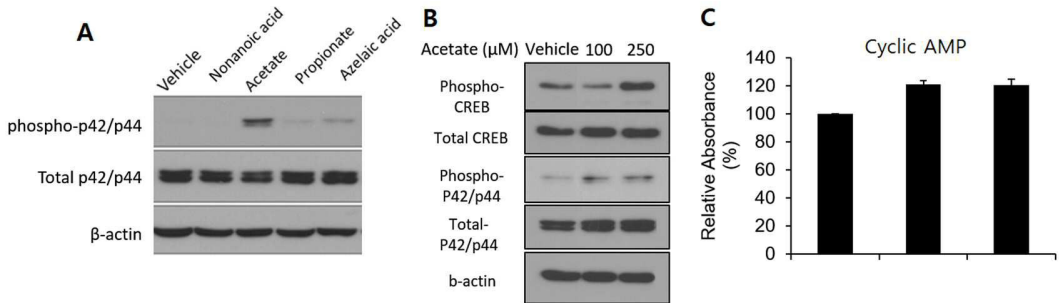
도면2



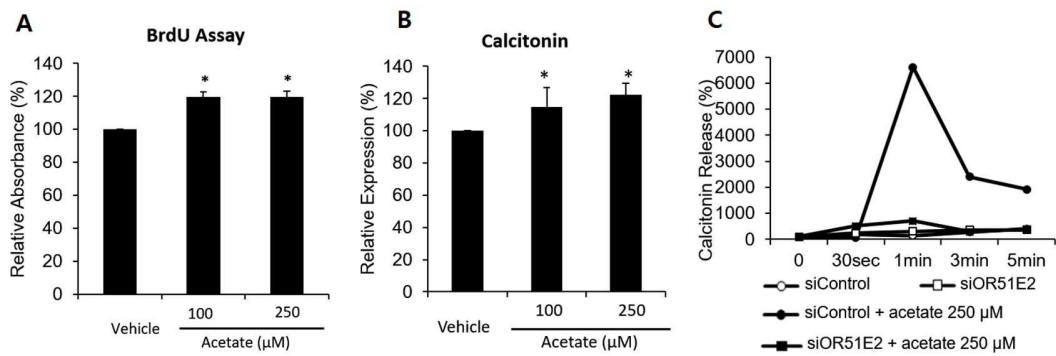
도면3



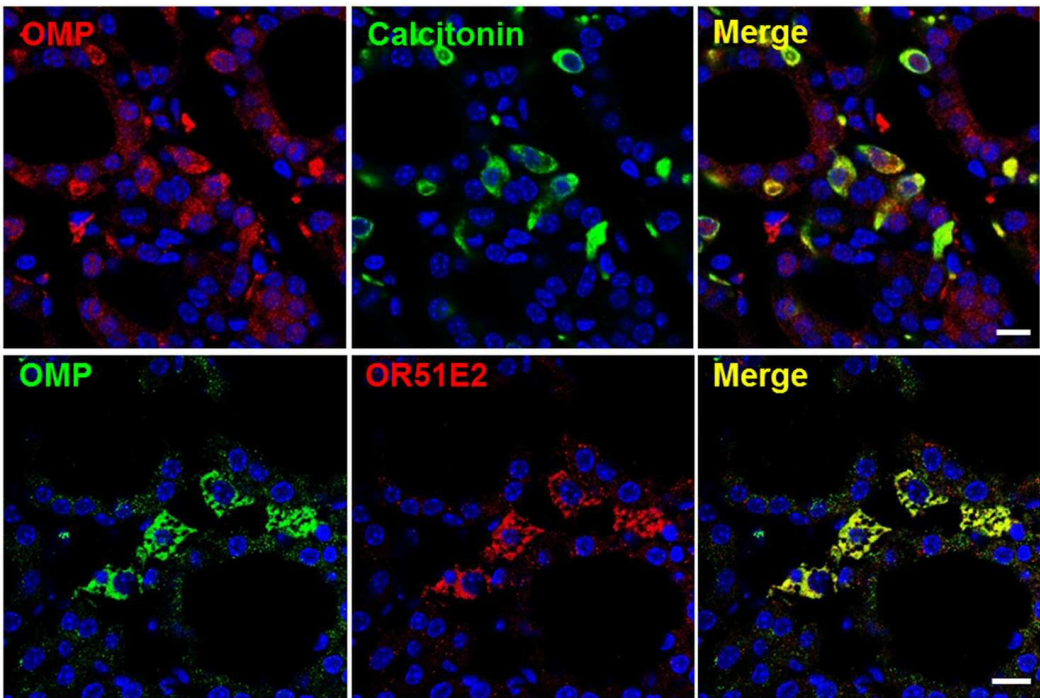
도면4



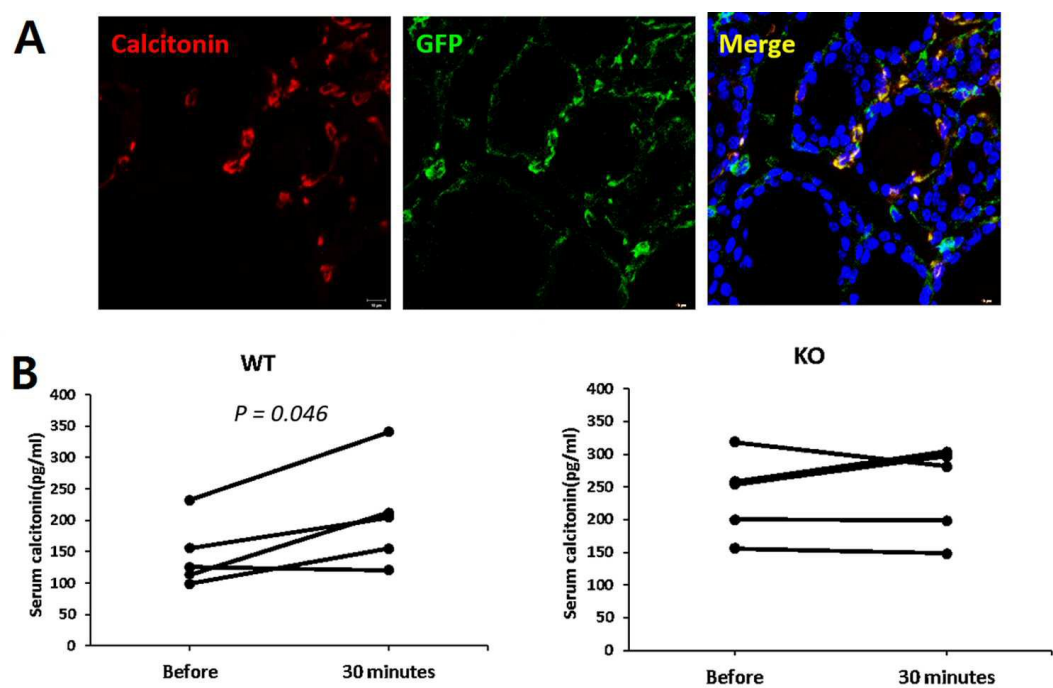
도면5



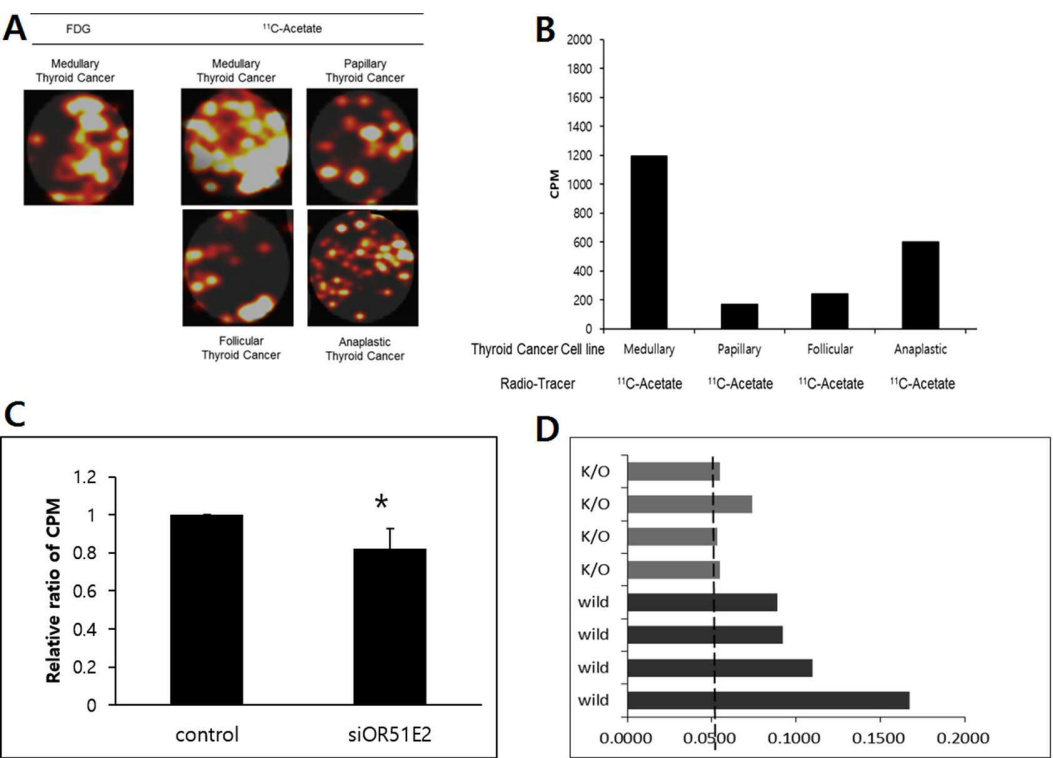
도면6



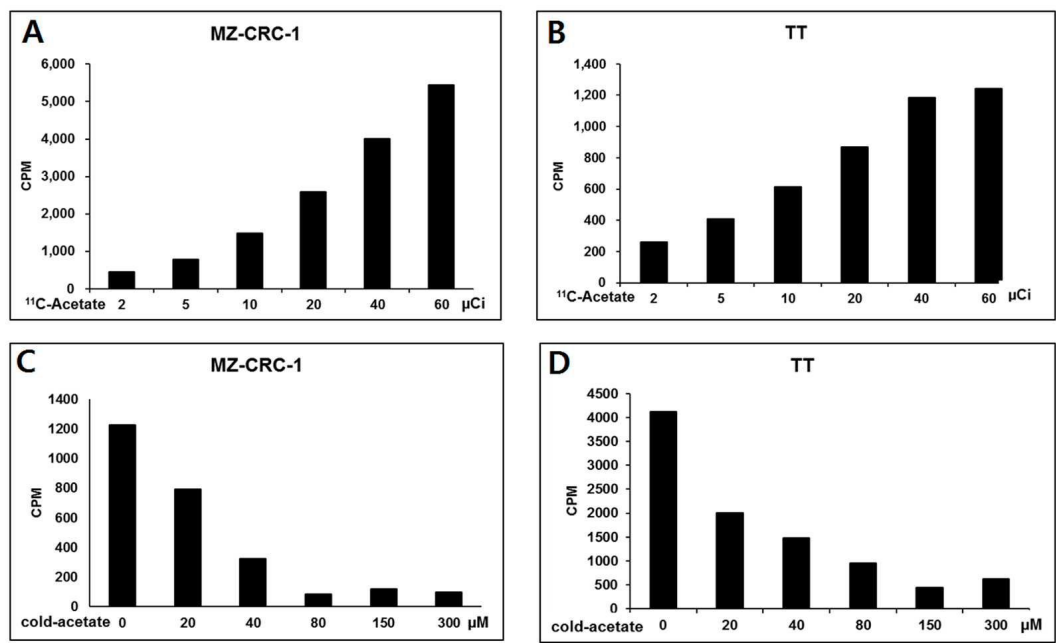
도면7



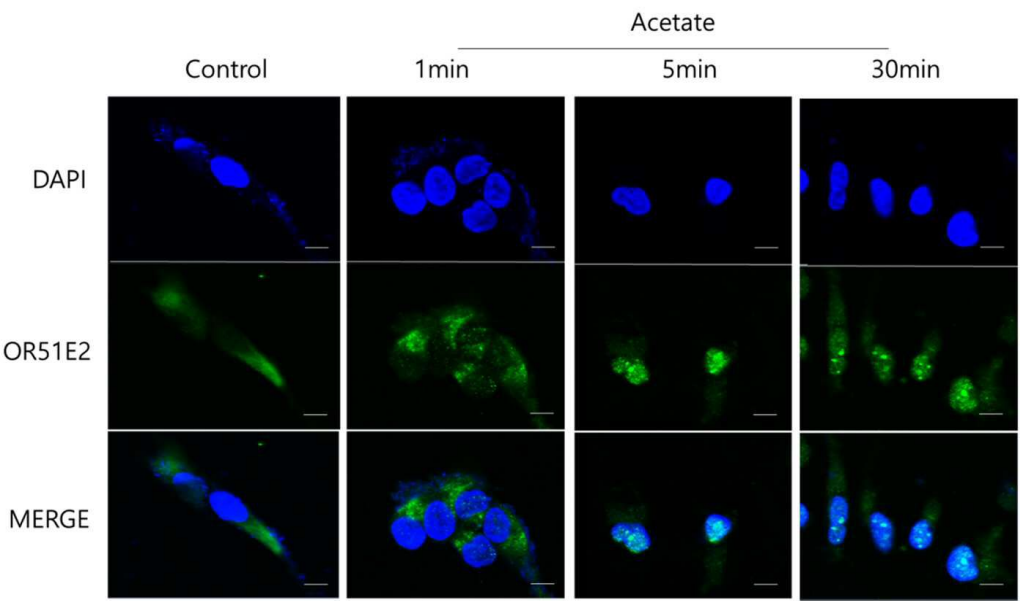
도면8



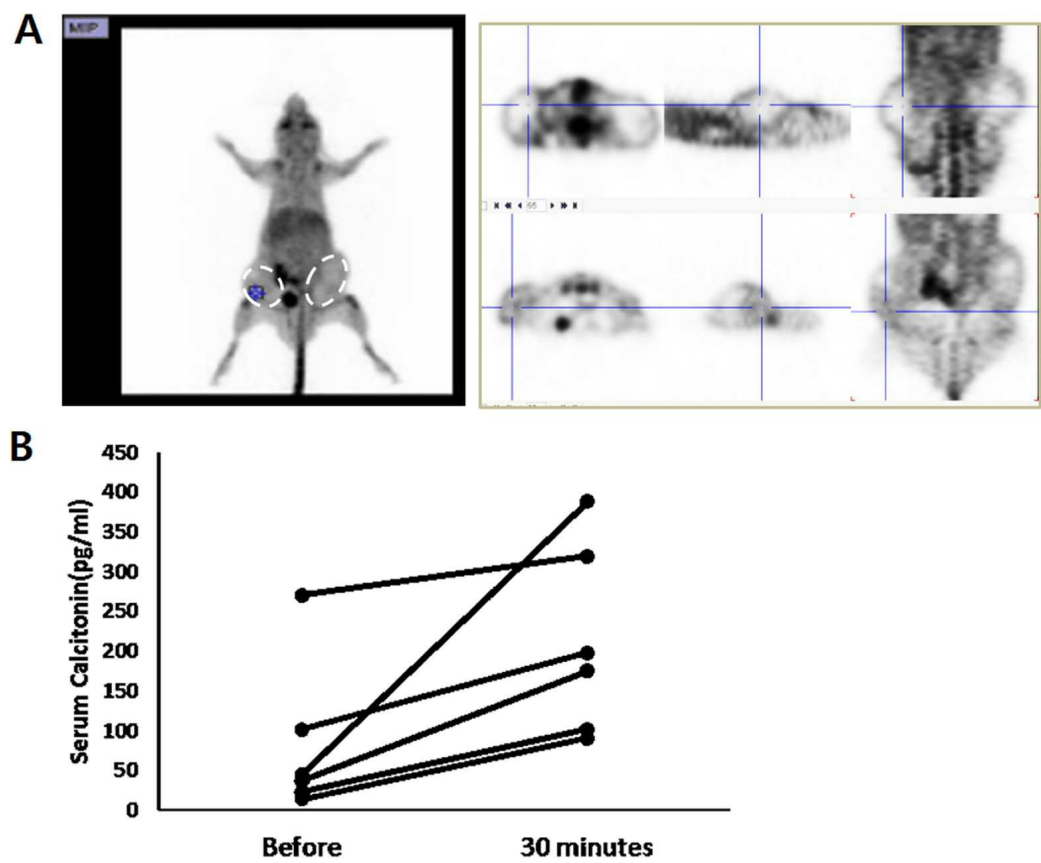
도면9



도면10



도면11



도면12

