

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0033900
(43) 공개일자 2024년03월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/4162 (2006.01) *A23L 33/10* (2022.01)*A61P 35/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/4162 (2013.01)*A23L 33/10* (2022.01)

(21) 출원번호 10-2022-0112759

(22) 출원일자 2022년09월06일

심사청구일자 2022년09월06일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

충남대학교병원

대전광역시 중구 문화로 282 (대사동)

(72) 발명자

강예은

대전광역시 서구 둔산북로 215, 7동 502호

송민호

대전광역시 중구 계백로1716번길 87, 306동 1202호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인주원

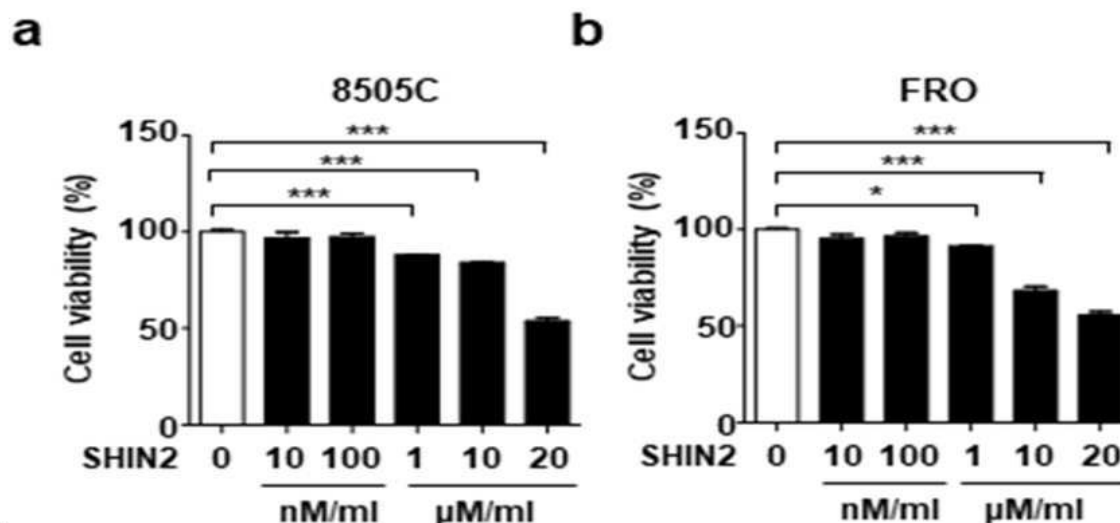
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 SHMT2를 타겟으로 하는 갑상선암 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 SHMT2를 타겟으로 하는 갑상선암 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물 또는 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61P 35/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/308 (2013.01)
A23V 2250/30 (2013.01)

이성은

대전광역시 중구

(72) 발명자

구본석

대전광역시 서구 둔산북로 215, 12동 901호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711169488
과제번호	2021R1C1C1011183
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공분야기초연구사업
연구과제명	단일세포 다중오믹스 분석 기반 미분화 갑상선암의 종양 클론 진화 과정과 종양 내
세포 이질성 규명	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2021.03.01 ~ 2026.02.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711166981
과제번호	2019R1A2C1084125
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구(개인연구)
연구과제명	두경부암 유전체 분석 기반 치료저항성 분자표지자 패널 개발 및 환자유래 오가노이
드 기반 치료반응 예측 플랫폼 확립	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2019.09.01 ~ 2024.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345353994
과제번호	2022R1I1A1A01071876
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	두경부종양 및 종양 미분화과정에서 단일탄소 대사회로의 역할 규명 및 단일탄소 대
사 타겟의 효능 검증	
기 여 율	1/3
과제수행기관명	충남대학교
연구기간	2022.06.01 ~ 2025.05.31

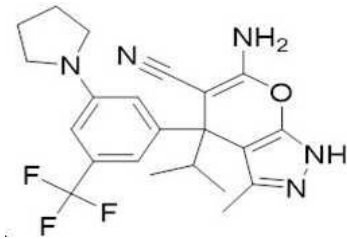
명세서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 갑상선암 예방 또는 치료용 약학 조성물

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 상기 갑상선암은 역형성갑상선암인 것을 특징으로 하는 갑상선암 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 SHMT2 억제제는 미토콘드리아 산화적인산화 관련 마커인 ATP5A, UQCRC2, MTCO1, SDHB 및 NDUFA8로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 억제하는 것을 특징으로 하는 갑상선암 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 SHMT2 억제제는 일일 0.001 내지 10 g 투여하는 것을 특징으로 하는 갑상선암 예방 또는 치료용 약학 조성물

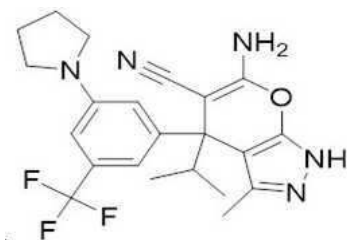
청구항 5

제1항에 있어서, 상기 조성물은 갑상선암에 효과가 있는 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 갑상선암 예방 또는 치료용 약학 조성물

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 갑상선암 예방 또는 개선용 식품 조성물

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서, 상기 갑상선암은 역형성갑상선암인 것을 특징으로 하는 갑상선암 예방 또는 개선용 식품 조성물

물

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 SHMT2 억제제는 미토콘드리아 산화적인산화 관련 마커인 ATP5A, UQCRC2, MTCO1, SDHB 및 NDUF8로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 억제하는 것을 특징으로 하는 갑상선암 예방 또는 개선용 식품 조성물

청구항 9

제6항에 있어서, 상기 SHMT2 억제제는 일일 0.001 내지 10 g 투여하는 것을 특징으로 하는 갑상선암 예방 또는 개선용 식품 조성물

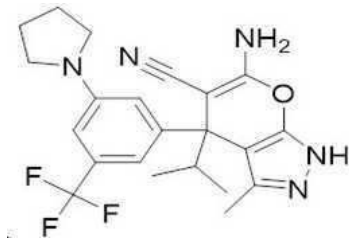
청구항 10

제6항에 있어서, 상기 조성물은 갑상선암에 효과가 있는 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 갑상선암 예방 또는 개선용 식품 조성물

청구항 11

하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는 비인간동물에서 갑상선암을 예방 또는 치료하는 방법

[화학식 1]



발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 SHMT2를 타겟으로 하는 갑상선암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 갑상선암은 내분비계의 가장 흔한 악성종양이며 지난 수십 년 동안 발병률이 급격히 증가하였다. 갑상선암 유래 여포상피세포는 유두갑상선암(papillary thyroid cancer, PTC)과 여포갑상선암(follicular thyroid cancer, FTC)을 포함하는 잘 분화된 갑상선암(well-differentiated thyroid cancer, DTC), 저분화 갑상선암(poorly differentiated thyroid cancer, PDTC), 역형성 갑상선암(anaplastic thyroid cancer, ATC)으로 나눌 수 있다. 차별화 정도에 따라, DTC는 대부분 수술 및/또는 방사성 요오드(radioactive iodine, RAI)로 치료되며 일반적으로 예후가 좋다. 그러나 분화 정도가 감소함에 따라 RAI에 대한 불응성 및 원격 전이가 발생할 수 있다. PDTC/ATC로 진단된 환자의 평균 수명은 약 6개월로 매우 짧다. 표적 제제는 갑상선암 치료에 승인되었지만 그 효능이 충분하지 않다. 따라서 진행성 갑상선암에 대한 새로운 치료 옵션이 필요하다.

[0004] SHMT(serine hydroxymethyltransferase)는 가역적인 반응을 촉진하여 세린을 글리신으로 전환하고, 이는 세포질 MTHFD1 및 미토콘드리아 MTHFD2를 포함하는 다운스트림 효소 5,10-methylene-tetrahydrofolate dehydrogenase(MTHFD)에 의해 추가로 산화되어 NAD(P)H와 포르메이트를 생성한다. 최근에 SHMT에 의존하는 세린 이화작용은 1탄소 단위의 주요 공급원이며 스트레스 조건에서 세포 산화환원 조절을 유지하는데 중요한 것으로 입증되었다. SHMT1 및 SHMT2의 전사 변화는 여러 종양에서 발견되었으며 대부분의 암세포는 뉴클레오타이드 합성을 위해 세포질 SHMT1보다 미토콘드리아 SHMT2의 활성을 선호하는 것으로 알려져 있어 종양 형성에서 미토콘드리아 엽산 합성의 영향을 시사한다. 또한 SHMT2 전사체의 5' 비번역 영역(untranslated region, UTR)과

SHMT1 단백질의 결합은 SHMT1의 효소 활성을 억제하는 것으로 나타났으며, 이는 암 진행에서 미토콘드리아와 세포질 1탄소 경로 사이의 중요한 연결을 시사한다. 갑상선 유두암에서 세린의 변화와 SHMT2의 상향 조절이 확인되었다. 그러나 이전의 연구에서는 갑상선암에서 역분화 과정에서 serine/glycine metabolic pathway(SGP)의 역할을 해부한 적이 없다.

[0005] 한국공개특허 제2020-0127878호는 암 예후 예측방법 및 이의 조성물에 관한 것으로, 암 예후 지표 중 하나로 SHMT2를 개시하고 있고, 한국등록특허 제2071491호는 차세대 염기서열분석을 이용한 기계학습 기반 유방암 예후 예측 방법 및 예측 시스템에 관한 것으로, 유방암 예후 지표 중 하나로 SHMT2를 개시하고 있다.

[0006] 하지만, 본 발명의 SHMT2를 표적으로 하는 갑상선암 예방 또는 치료 효과에 대해서는 아직까지 개시된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제2020-0127878호

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제2071491호

발명의 내용

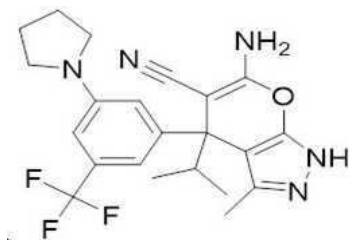
해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, SHMT2를 표적으로 하는 SHIN2의 갑상선암에 대한 예방 또는 치료 효과를 확인하여, SHIN2를 유효성분으로 포함하는 갑상선암 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 갑상선암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] [화학식 1]



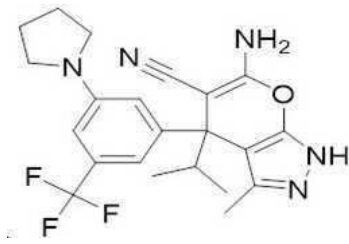
[0013]

[0014] 상기 갑상선암은 역형성갑상선암인 것이고, 상기 SHMT2 억제제는 미토콘드리아 산화적인산화 관련 마커인 ATP5A, UQCRC2, MTCO1, SDHB 및 NDUFA8로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 억제하는 것일 수 있다.

[0015] 상기 SHMT2 억제제는 일일 0.001 내지 10 g 투여하는 것이고, 상기 조성물은 갑상선암에 효과가 있는 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 다른 예로, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 갑상선암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] [화학식 1]



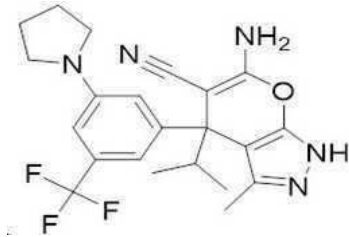
[0018]

[0019]

[0020]

또 다른 예로, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는 비인간동물에서 갑상선암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[화학식 1]



[0021]

발명의 효과

[0023]

본 발명은, SHMT2 억제제를 유효성분으로 포함하는 갑상선암 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, SHMT2 억제제 또는 이의 염은 갑상선암의 예방 또는 치료제로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025]

도 1은 본 발명에 따른 역형성갑상선암 세포주에서 SHIN2에 의한 세포 생존율 감소를 나타내는 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 역형성갑상선암 세포주에서 SHIN2에 의한 미토콘드리아 산소 소모율 감소를 나타내는 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 역형성갑상선암 세포주에서 SHIN2에 의한 OXPHOS 발현 변화를 나타내는 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 SHMT2 억제된 세포의 종양형성 감소를 나타내는 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 shSHMT2/shControl FRO-luc세포 주입에 의해 생성된 종양 조직에서 갑상선 분화 마커의 발현 변화를 나타내는 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 SHIN2에 의한 종양형성 감소를 나타내는 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 동물모델에서 SHIN2에 의한 갑상선 분화마커의 발현 변화를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026]

이하, 본 발명의 바람직한 구현예에 대하여 상세히 설명한다. 또한, 하기의 설명에서는 구체적인 구성요소 등과 같은 많은 특정 사항들이 도시되어 있는데, 이는 본 발명의 보다 전반적인 이해를 돕기 위해서 제공된 것일 뿐 이러한 특정 사항들 없이도 본 발명이 실시될 수 있음은 이 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게는 자명하다 할 것이다. 그리고, 본 발명을 설명함에 있어서, 관련된 공지 기능 혹은 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.

[0028]

본 발명에서 용어, "예방" 또는 "방지"라 함은 질환의 원인으로부터 발생을 억제하거나 지연시키는 것을 의미한다.

[0029]

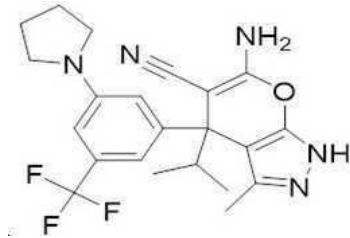
본 명세서에서, "치료"라 함은 완전히 치유하지 않아도 증상의 진전 및/또는 악화를 억제하여 손상의 진행을 멈

추거나, 또는 증상의 일부 혹은 전부를 개선하여 치유의 방향으로 유도하는 것을 의미한다.

[0030] 본 발명에서 용어 “개선”은 증상이 호전 또는 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0031] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 갑상선암 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0032] [화학식 1]



[0033]

[0034] 상기 SHMT2 억제제는 화학식 1의 구조를 갖는 화합물로, SHIN2로 명명되어 있고, Cas No. 2204289-53-0 화합물이다.

[0035] 본 발명의 SHMT2 억제제는 약제학적으로 허용 가능한 염 형태를 포함할 수 있고, 이는 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 의해 제조될 수 있는 것으로, 예를 들면, 염산, 브롬화수소, 황산, 황산수소나트륨, 인산, 탄산 등의 무기산과의 염 또는 개미산, 초산, 옥살산, 벤조산, 시트르산, 타르타르산, 글루콘산, 게스티스산, 푸마르산, 락토비온산, 살리실릭산, 또는 아세틸살리실릭산(아스피린)과 같은 유기산과 함께 산의 염을 형성하거나, 또는 나트륨, 칼륨 등의 알칼리금속이온과 반응하여 이들의 금속염을 형성하거나, 또는 암모늄 이온과 반응하여 또 다른 형태의 약제학적으로 허용 가능한 염을 형성하는 것을 의미한다.

[0036] 본 발명의 일 예에서, 갑상선암은 바람직하게는 역형성갑상선암인 것이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0037] 본 발명의 다른 예에서, 상기 SHMT2 억제제는 미토콘드리아 산화적인산화 관련 마커인 ATP5A, UQCRC2, MTCO1, SDHB 및 NDUFA8로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 억제하는 것을 특징으로 한다.

[0038] 본 발명의 조성물은 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함하여 모든 형태의 조성물로 제조될 수 있고, 바람직하게는 약학 조성물, (건강기능) 식품 조성물의 형태로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 약학 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제제화될 수 있으며, 산제, 정제, 캡슐제, 주사제 및 액제가 보다 바람직하다. 이러한 제제화는 약제학 분야에서 통상적으로 행하여지는 방법으로 수행될 수 있으며, Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0040] 상기 약학 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, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트, 및 광물유 등을 포함한다.

[0041] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 추가로 사용하여 조제될 수 있다.

[0042] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로오스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

[0043] 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성

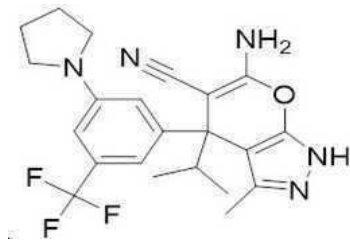
기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기재로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween), 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0044] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서 본 발명의 약학 조성물은 1 일 0.001 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 99 중량%로 포함될 수 있다. 일일 투여량은 약 0.01 내지 1,000 mg/kg으로, 바람직하게는 100~300 mg/kg일 수 있다. 필요에 따라 유효성분은 일일 0.001 내지 10 g 투여하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0045] 또한, 본 발명의 일 구현예에 따른 조성물에서, 상기 조성물은 갑상선암 예방, 치료 또는 개선에 유용한 추가성분을 포함할 수 있고, 추가성분은 화합물, 천연물을 포함하는 석회화에 효과가 공지된 모든 성분을 포함할 수 있다.

[0046] 다른 예로, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 유효성분으로 포함하는 갑상선암 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0047] [화학식 1]



[0048]

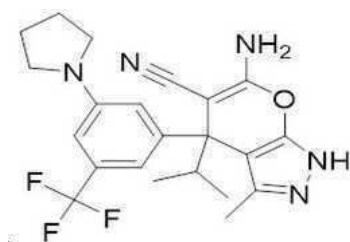
[0049] 상기 조성물을 첨가할 수 있는 (건강기능) 식품 조성물로는 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료 등의 형태로 제조될 수 있다. 예를 들어, 각종 일반식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 또는 건강보조 식품류 등이 있다.

[0050] 본 발명의 식품 조성물은 알리티아민, 푸르셀티아민, 벤포티아민 또는 이들의 염뿐만 아니라, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상술한 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스, 올리고당 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 사이클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 향미제로서 천연 향미제 [타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다. 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 알리티아민, 푸르셀티아민, 벤포티아민 또는 이들의 염 이외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두충 추출액, 대추 추출액, 감초 추출액 등을 추가로 포함시킬 수 있다.

[0051] 또한, 상기 조성물은 질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 유효성분의 양은 전체 식품 중량의 0.001 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 식품 조성물은 100 g을 기준으로 0.002 내지 5 g, 바람직하게는 0.03 내지 1 g의 비율로 가할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0052] 또 다른 예로, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 SHMT2 억제제 또는 이의 약제학적으로 허용되는 염을 투여하는 단계를 포함하는 비인간동물에서 갑상선암을 예방 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0053] [화학식 1]



[0054]

[0056] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다

[0058] <실시예 1> 세포배양 및 세포 증식 실험

[0059] 역형성갑상선암 세포주인 8505C 및 FRO 세포는 10% fetal bovine serum 이 포함된 RPMI1640 배지에서 5% CO₂ 배양기에서 배양하였다. 세포증식 측정을 위해 96-well plate에 1×10^4 cells/well의 8505C 또는 FRO 세포를 배양하였다. 다음날 SHMT2 억제제인 SHIN2를 농도별로 48시간 동안 처리 한 후, 세포 증식능을 WST-1 assay 방법으로 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0061] <실시예 2> 미토콘드리아 산소 소모율 측정

[0062] 미토콘드리아 산소 소모율 측정을 위해 2×10^4 cells/well 세포를 XF-24 plate에 깔고, SHMT2 억제제인 SHIN2를 24시간 동안 처리하였다. 본 실험 4시간 전에 센서 카트리지에 XF24 calibrant solution을 각 well에 넣고 CO₂가 없는 배양기에서 센서 카트리지를 준비해 두었다. 산소 소모율을 측정하기 직전에 세포 배양 및 약물 처리를 한 XF-24 plate에 포도당이 없는 DMEM 미디어로 변경한 뒤, oligomycin A, CCCP, rotenone을 넣어주었다. XF24 analyzer(Seahorse)를 통해 산소 소모율을 측정하였다.

[0064] <실시예 3> Western blot analysis

[0065] 세포를 RIPA 버퍼를 넣고 용해 시킨 후 30-50ug의 단백질을 획득하였다. 전기영동을 통하여 membrane에 단백질이 부착되도록 한 뒤 상업적으로 판매하는 항체를 활용하여 단백질의 발현을 확인하였다. 단백질 정량 확인을 위해 β -actin 항체 (abcam)를 사용했으며, 미토콘드리아 산화적인산화와 관련된 인자를 확인하기 위해 total-OXPHOS cocktail 항체(abcam)를 사용하여 complex 1부터 complex 5까지 확인하였다. Odyssey 이미징 시스템을 활용하여 이미지를 스캔하고 Image studio digits를 통해 정량화하였다.

[0067] <실시예 4> SHMT2 발현이 저해된 세포주 제작

[0068] SHMT2의 발현이 저해된 세포주 제작을 위해 SHMT2 short hairpin RNA(shRNA) lentiviral particles (Origene)를 구매하였다. 12-well plate의 각 well에 5×10^4 cells 세포를 깔고, SHMT2 shRNA lentiviral particles를 polybrene (Santa cruz)과 함께 24시간 동안 처리하였다. 그 후, 2ug/ml puromycin (Sigma-Aldrich)를 이용하여 SHMT2 shRNA lentiviral particles이 감염된 세포만 선택적으로 배양하여 SHMT2의 발현이 안정적으로 저해된 세포주를 제작하였다.

[0070] <실시예 5> 갑상선암 동물모델

[0071] 갑상선암 동물모델을 위해 6주령 수컷 누드 마우스에 luciferase가 있는 FRO-luc 세포 (5×10^4 cells)를 matrigel과 1:1 비율로 주입하였다. 2주 후, Lumina XRMS instrument(PerkinElmer)의 bioluminescence imaging system(IVIS)를 이용하여 종양 형성을 관찰하였다.

[0072] 또한, 갑상선암 동물모델에서 SHMT2 억제제인 SHIN2의 종양 억제 효능을 평가하기 위하여, FRO-luc 세포를 6주령 수컷 누드 마우스에 주입하고, 일주일 후, SHIN2 (200mg/kg) 또는 vehicle을 하루에 두 번씩 2주 동안 주사하였다. 종양 형성 관찰을 위해 2% isofurane을 활용하여 마우스를 마취하고, D-luciferin (150mg/kg)를 주입한 뒤 IVIS를 통해 종양 형성을 관찰하였다.

[0074] <실시예 6> 면역염색

[0075] 마우스 부검 후 획득한 조직을 10% formalin에 고정 한 뒤, paraffin-embedded block을 제작하였다. Paraffin-embedded block을 4um 두께로 자르고 56℃에서 3시간 동안 말렸다. Tissue section을 deparaffin 및 hydrated 등의 과정을 시행한 후 H&E 염색 및 면역염색을 시행하였다. 면역염색시 SHMT2(Invitrogen), TSHR(Invitrogen), TTF1(Abcam) 항체를 사용했으며 UltraVision LP Large Volume Detection system(Thermos Fisher Scientific)을 이용하여 확인하였다.

[0077] <시험예 1> 갑상선세포주에서 SHMT2 억제제(SHIN2)의 세포 증식 감소 효능 확인

[0078] SHMT2의 억제제인 SHIN2의 세포증식 억제 효능을 평가하기 위하여, 역형성갑상선암 세포주인 8505C 및 FRO 세포에 SHIN2를 농도별로 처리하였다. 48시간 후 세포의 생존율을 관찰한 결과, 8505C 및 FRO 세포에서 모두 SHIN2 농도에 비례하게 세포 생존율이 감소하였다 (도 1).

[0080] <시험예 2> SHMT2 억제제(SHIN2)에 의한 미토콘드리아 산소 소모율 감소 효능

[0081] SHMT2는 세린/글리신 대사 회로 (serine/glycine metabolic pathway) 중 미토콘드리아 엽산회로 (mitochondrial folate cycle)의 구성인자이다. SHMT2와 미토콘드리아 산소소모율의 관련성을 확인하고자 역형성갑상선암 세포주 (8505C, FRO)에 SHMT2 억제제(SHIN2)를 처리하여 세포 내 미토콘드리아 산소 소모율을 측정하였다. 그 결과, 역형성갑상선암 세포주에서 SHIN2에 의하여 미토콘드리아 산소 소모율이 유의하게 감소하였다 (도 2). 따라서, SHMT2가 미토콘드리아의 정상적인 기능을 위한 중요한 인자임을 확인하였다.

[0083] <시험예 3> SHMT2 억제에 의한 미토콘드리아 산화적인산화 관련 마커의 감소

[0084] 도 2에서 SHIN2에 의한 미토콘드리아 산소 소모율의 감소를 관찰하여 SHIN2에 의한 미토콘드리아 산화적인산화 (OXPHOS, oxidative phosphorylation) 마커들의 변화를 확인하였다. OXPHOS는 complex 1부터 5로 구성되어 있으며, complex 1은 NDUFB8, complex 2는 SDHB, complex 3은 UQCRC2, complex 4는 MTCO1, complex5는 ATP5A를 확인할 수 있는 항체를 이용한 western blot 방법을 시행하였다. 8505C 및 FRO 세포에 SHIN2를 24시간동안 농도별로 처리 한 후 각각의 콤플렉스를 대표하는 인자들의 발현 변화를 관찰한 결과, 산화적인산화 마커의 발현이 SHIN2에 의해 유의하게 감소하였다 (도 3).

[0086] <시험예 4> SHMT2의 발현이 저해된 역형성갑상선암 세포주의 종양형성 감소

[0087] 도 1에서 SHMT2 억제제 의한 8505C, FRO의 세포 생존율 감소를 확인 한 바 있다. 본 발명에서는 SHMT2의 발현이 저해된 역형성갑상선암 세포주를 제작하여 SHMT2의 발현이 종양형성에 미치는 영향을 관찰하였다. 발광유전자인 luciferase를 삽입한 FRO 세포주(FRO-luc)에 short hairpin RNA (shRNA) lentiviral particles를 활용하여 SHMT2의 발현이 저해된 FRO-luc 세포를 제작하였다 (FRO-luc shSHMT2). FRO-luc shSHMT2 세포의 대조군으로 control shRNA lentiviral particles를 이용하여 제작한 FRO-luc shControl을 사용하였다. 6주령 수컷 누드마우스에 FRO-luc shSHMT2 및 FRO-luc shControl 세포를 주입하고, 2주 후 in vivo imaging system (IVIS)를 통하여 종양 형성을 관찰하였다. 대조군에 비해 SHMT2의 발현이 저해된 세포를 주입한 마우스의 종양이 유의하게 감소하였다 (도 4).

[0089] <시험예 5> SHMT2 발현이 저해된 세포로 형성된 종양에서 갑상선 분화 마커의 감소

[0090] 예후가 나쁜 갑상선암 일수록 갑상선 분화마커의 감소는 여러 참고문헌을 통해 확인된 바 있다. 본 발명에서는 SHMT2의 발현이 저해된 세포에 의해 형성된 종양에서 면역염색을 통하여 갑상선 분화 마커인 TSHR 및 TTF-1의 발현을 확인하였다. shControl에 비해 shSHMT2 세포에 의해 생성된 종양 조직에서 SHMT2의 발현이 현저하게 감소하였다. 반대로, 갑상선 마커인 TSHR 및 TTF-1의 발현은 shSHMT2 세포에 의해 생성된 종양 조직에서 발현이

증가하였다 (도 5). 따라서, SHMT2의 발현이 갑상선 분화도와 관련이 있음을 시사하였다.

[0092] <시험예 6> 역형성갑상선암 세포주입에 의해 형성된 종양에서 SHMT2 억제제 (SHIN2)의 항암효능

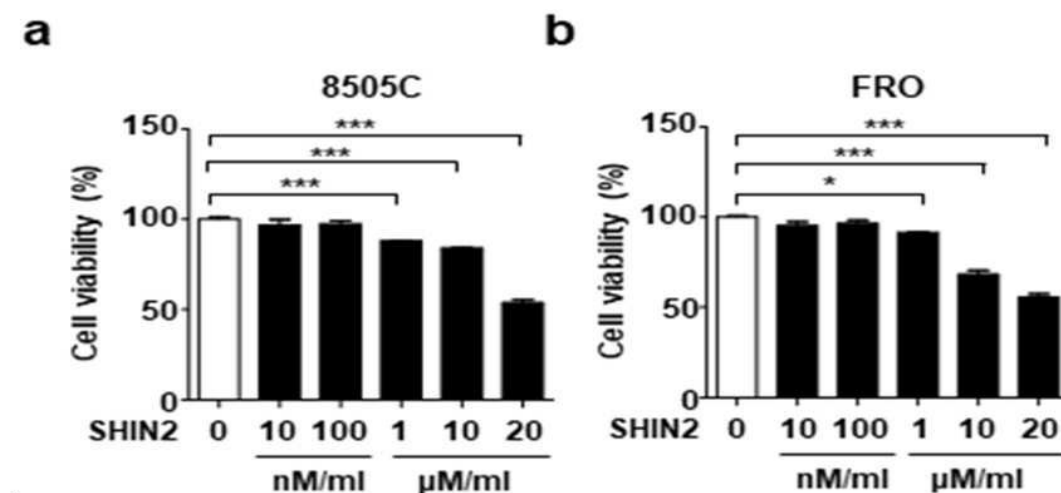
[0093] SHMT2 억제제인 SHIN2의 항암효능 평가를 위하여 FRO-luc세포를 6주령 수컷 누드마우스에 주입하였다. 일주일 후, SHIN2를 2주간 하루에 2번씩 주사하여 SHIN2의 항암효능을 평가하였다. in vivo imaging system (IVIS)를 통하여 vehicle을 주사한 대조군에 비하여 SHIN2를 주사한 실험군에서 종양이 유의하게 감소함을 확인하였다 (도 6).

[0095] <시험예 7> 역형성갑상선암 세포주입에 의해 형성된 종양에서 SHMT2 억제제 (SHIN2)에 의한 갑상선 분화 마커의 감소

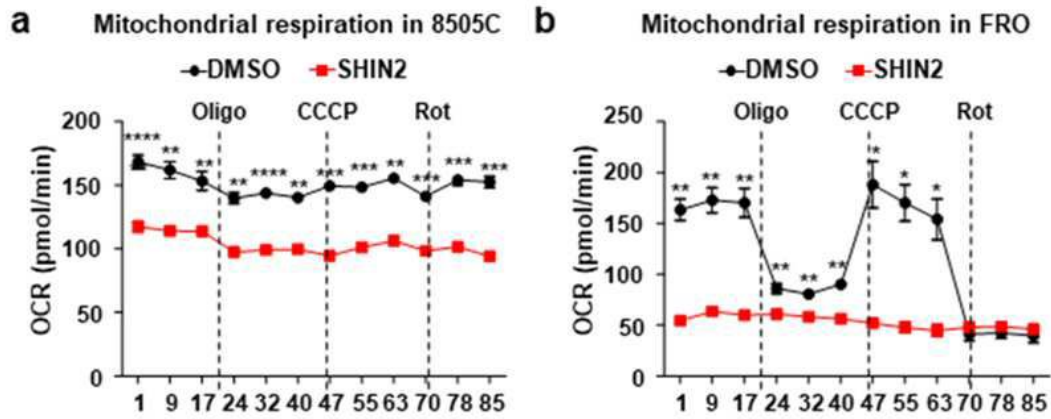
[0096] FRO-luc 세포를 주입하여 형성된 동물모델에 SHMT 억제제인 SHIN2를 주사한 뒤 획득한 종양조직에서 면역염색을 통해 갑상선 분화 마커의 발현을 관찰하였다. 그 결과, SHMT2 억제제인 SHIN2를 처리한 군에서 갑상선 분화 마커인 TSHR 및 TTF-1의 발현이 증가하였다. 따라서, 도 5의 결과와 유사하게 SHIN2에 의한 SHMT2의 억제가 갑상선 분화도에 영향을 미치는 것을 증명하였다.

도면

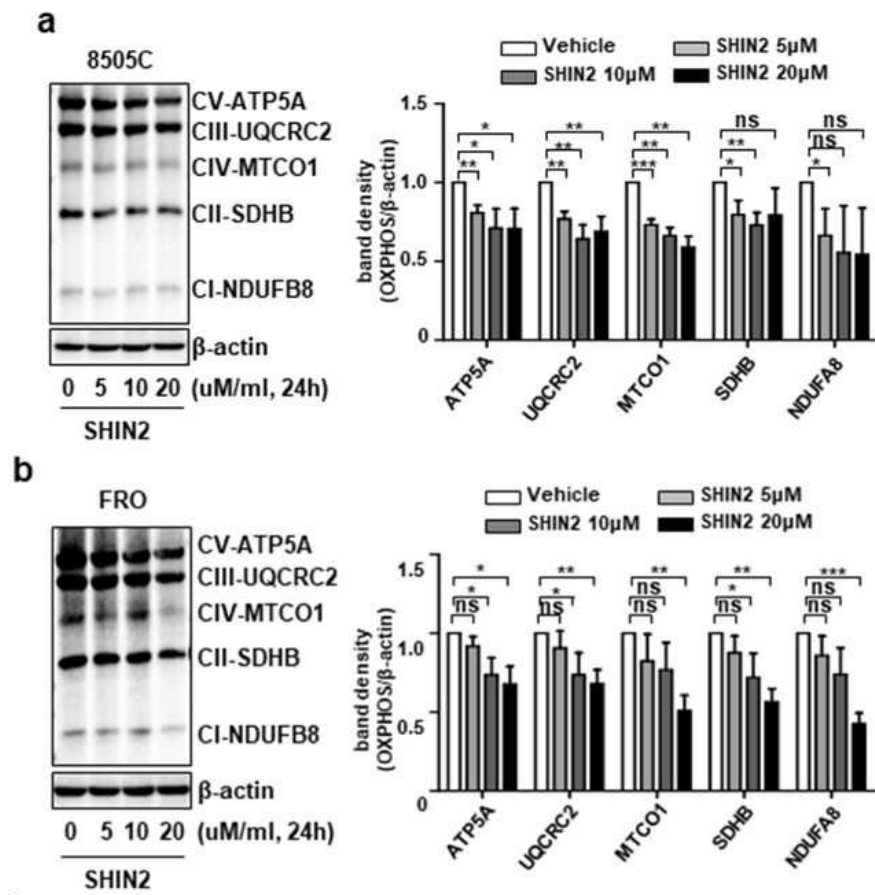
도면1



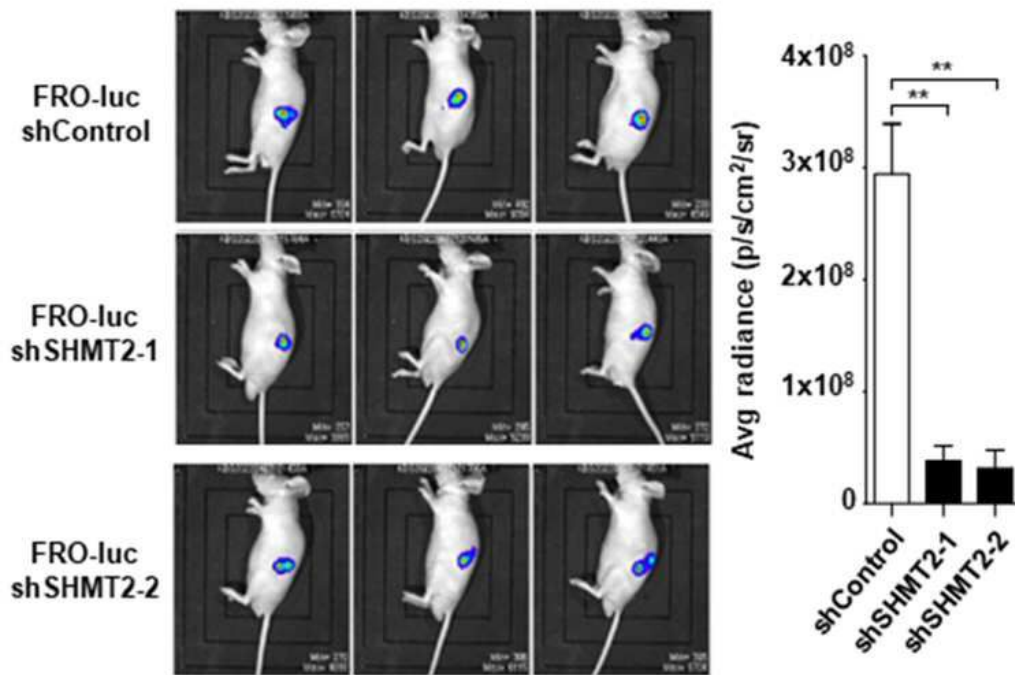
도면2



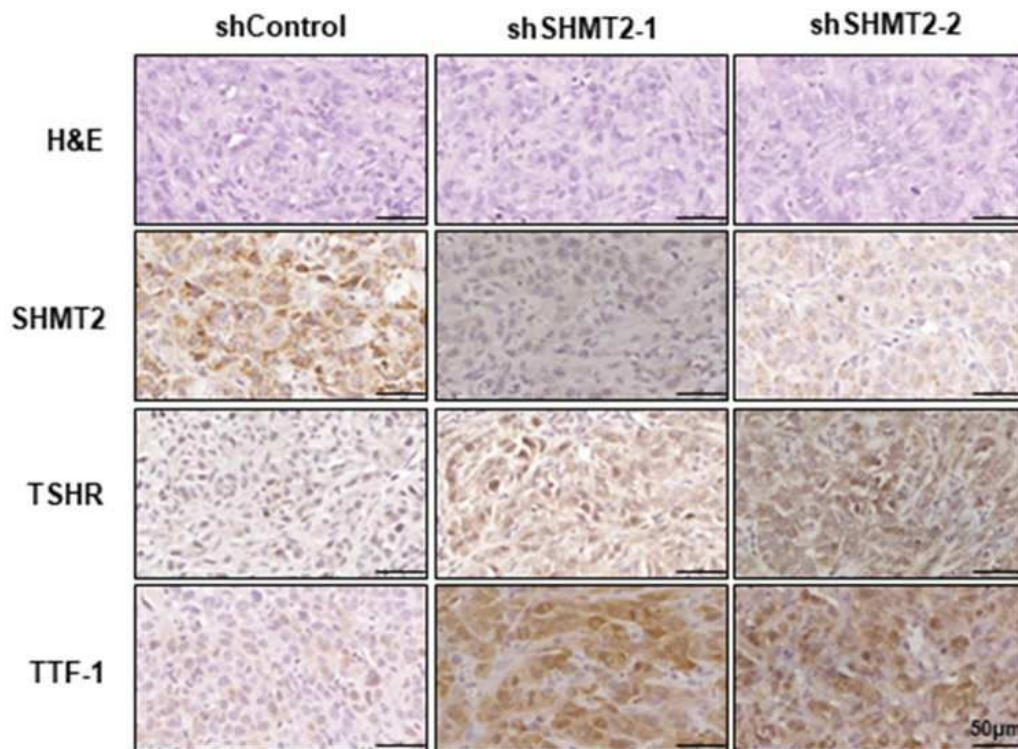
도면3



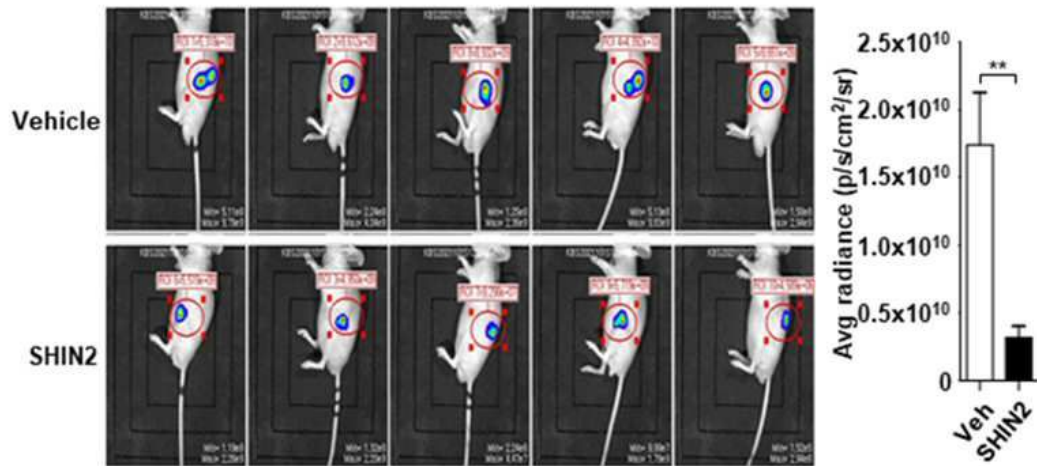
도면4



도면5



도면6



도면7

