TSPM15050-073-3

극지 해양생물 유래 신규 선도물질 도출 및 정밀활성 규명

Generation of polar marine organism-derived novel lead substances and examination of precise activities



한양대학교

제 출 문

극지연구소장 귀하

본 보고서를 "양극해 미래자원 탐사 및 활용기술 개발"과제의 위탁연구 "양극해 해양 생물 유래 신규 항암 활성 물질 발굴"과제의 최종보고서로 제출합니다.



- (본과제) 총괄연구책임자 : 임정 한
 - 위탁연구기관명 : 한양대학교 산학협력단
 - 위탁연구책임자 : 정 희 경
 - 위탁참여연구원 : 김 소 진
 - " : 이 영 림
 - " : 최은 빈

보고서 초록

위탁연구과제 명	극지 해양생물 유래 신규 선도물질 도출 및 정밀활성 규명								
위탁연구책임 자	정 희 경	해당단계 참여연구원 수	4	해당단계 연구비	40,000,000원				
연구기관명 및 소속부서명	한양대학교	산학협력단	참여기업명						
국제공동연구	상대국명 : 상대국연구기관명 :								
요약(연구결과를 중심으로 개조식 500자이내)					보고 서면 수	63 (표지포함)			
↓ 수 (표시포함) I. 연구개발의 내용 1. 기확보 극지생물 유래 대사체의 정밀활성 및 분자적 기전 규명 (1) 세포교모종(GBM)에서 기확보 대사체의 생리활성 연구: 세포토화, 세포독성 (2) 급성전골수백혈병(APL)에서 기확보 대사체의 생리활성 연구: 세포분화, 세포독성 (3) 골모세포(osteoblast)에서 기확보 대사체의 생리활성 연구: 세포분화, 대사조절 2. 극지 해양생물유래 신규 생리활성물질 탐색 (1) 세포교모종(GBM)에서 신규생리활성 탐색: 세포독성 (2) 급성전골수백혈병(APL)에서 신규생리활성 탐색: 세포독성 (3) 급성전골수백혈병(APL)에서 신규생리활성 탐색: 세포독성 II. 연구개발결과 1. 기확보 극지생물 유래 대사체의 정밀활성 및 분자적 기전 규명 (1) 세포교모종(GBM)에서 lobarstin의 항암제(TMZ)에 대한 민감도 제고 활성 확인 및 기전 규명: DNA 회복 유전자의 발현 억제 (2) 세포교모종(GBM)에서 lobarstin의 in vitro 암권이 억제 활성 확인 및 기전 규명: small GTPase 발현, F-actin 형성, MMP2 발현 및 환성 억제 (3) 급성전골수백혈병(APL)에서 M11A salt 및 lobarstin의 항암제(ATO)에 대한 민감도 제고 활성 확인 및 기전 규명: autophagy 경유 apoptosis 증진 (4) 골모세포(osteoblast)에서 M11A salt 및 lobarstin의 행암제(ATO)에 대한 민감도 제고 환성 확인 및 기전 규명: autophagy 경유 apoptosis 증진 (4) 골모세포(osteoblast)에서 M11A salt 및 lobarstin의 생리활성 연구: 세포분 화, 세포독성, 인슐린 대사, 인슐린 저항성 개선 효과 검정 2. 극지 해양생물유래 신규 생리활성물질 탐색 (1) 2013 Ross Sea 해양미생물 추출물 분획의 생리활성 탐색 (2) GBM, APL에서 세포독성 효과 검정									
색 인 어	한 글 신	리활성물질텪	남색, 세포교모종, 세포독성, 세포퉌	급성전골수 문화, 대사조	백혈병, · 절	골모세포,			
(각 5개 이상)	영 어	screening, (diffe	GBM, APL, oste erentiation, met	otoxicity, cell Ilation					

요 약 문

- I.제 목
 국지 해양생물 유래 신규 선도물질 도출 및 정밀활성 규명
- Ⅱ. 연구개발의 목적 및 필요성
 신규 극지 해양생물 대사체의 탐색을 통한 유용 의료용 물질개발

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

기확보 극지생물 유래 대사체의 정밀활성 및 분자적 기전 규명을 위해 3가지 실험체계에서 분석하였다. 세포교모종(GBM)에서 기확보 대사체의 생리활성 연구로 세포독성을 연구하 였고, 급성전골수백혈병(APL)에서 기확보 대사체의 생리활성 연구로 세포분화와 세포독성 을 연구하였으며, 골모세포(osteoblast)에서 기확보 대사체의 생리활성 연구로 세포분화와 대사조절을 연구하였다.

극지 해양생물유래 신규 생리활성물질 탐색하기 위해 세포독성을 2가지 실험체계에서 분석 하였다. 세포교모종(GBM)과 급성전골수백혈병(APL)에서 신규생리활성 탐색하였다.

Ⅳ. 연구개발결과

기확보 극지생물 유래 대사체의 정밀활성 및 분자적 기전 규명을 4가지 실험체계에서 연구 하였다. 세포교모종(GBM)에서 lobarstin의 항암제(TMZ)에 대한 민감도 제고 활성 확인 하였고 분자적 기전으로 DNA 회복 유전자의 발현 억제를 통한 DNA 회복 억제를 규명하 였다. 세포교모종(GBM)에서 lobarstin의 in vitro 암전이 억제 활성을 확인하였고, 분자적 기전으로 small GTPase 발현 감소, F-actin 형성 감소, MMP2 발현 및 활성 억제 및 invadopodia의 형성 감소를 제시 하였다. 급성전골수백혈병(APL)에서 M11A salt 및 lobarstin의 항암제(ATO)에 대한 민감도 제고 활성을 확인하였고 분자적 기전으로 autophagy 경유 apoptosis (autophagy-mediated apoptosis)의 증진을 제시하였다. 골 모세포(osteoblast)에서 M11A salt 및 lobarstin의 생리활성 연구하여 세포분화, 세포독 성, 인슐린 대사, 인슐린 저항성 개선 효과 등을 밝혔다.

극지 해양생물유래 신규 생리활성물질 탐색을 위해 2013년 남극 Ross Sea에서 채취한 해양미생물 유래 추출물 분획의 생리활성을 탐색하였다. GBM, APL에서 세포독성 효과를 1, 2차 스크리닝을 통해 검정하였으나 세포독성을 보이는 추출물을 찾지 못하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

특허출원 1건과 연구논문게재 1건 및 국제학술대회 포스터 발표 3건을 완료하였으며, 특 허출원 2건과 연구논문게재 2건은 준비 중이다.

SUMMARY

I. Title

Generation of polar marine organism-derived novel lead substances and examination of precise activities

II. Purpose and Necessity of R&D Development of useful medicinal substance through screening novel metabolites from polar marine organisms

III. Contents and Extent of R&D

For the identification of precise activities and molecular mechanisms of previously secured, polar organism-derived metabolites, 3 experimental systems were analyzed. The physiological activities of previously secured metabolites were examined for cytotoxicity in glioblastoma (GBM) cells. The physiological activities of previously secured metabolites were examined for cytotoxicity and cell differentiation in acute promyelocytic leukemia (APL) cells. The physiological activities activities of previously secured metabolites were examined for cytotoxicity and cell differentiation in acute promyelocytic leukemia (APL) cells. The physiological activities activities of previously secured metabolites were examined for cell differentiation and metabolic regulation in pre-osteoblast cells.

Screening for novel physiologically active substances derived from polar marine organisms were also performed in 2 experimental systems. Screening for novel physiologically active substances that enhance cyctotoxicity were examined in GBM and APL cell systems.

IV. R&D Results

Identification of precise activities and molecular mechanisms of previously secured, polar organism-derived metabolites were studied in 4 experimental systems. Enhanced sensitivity to anti-cancer drug (TMZ) by concomitant treatment with lobarstin was observed in GBM cells and reduced DNA repair by inhibition of DNA repair gene expression were suggested as a molecular mechanism. Reduced in vitro metastasis was seen by lobarstin treatment in GBM cells and inhibition of small GTPase expression, F-actin formation, MMP2 gene expression and activity, and invadopodia formation were suggested as molecular mechanisms. Enhanced sensitivity to anti-cancer drug (ATO) was seen by concomitant treatment with lobarstin or M11A salt in APL cells and enhanced autophagy-mediated apoptosis was suggested as its molecular mechanism. Finally, physiological activities of M11A salt or lobarstin in osteoblasts were examines. Drug effects on cell differentiation, cytotoxicity, insulin metabolism, and improvement of insulin resistance were examined.

Screening for polar, marine organism-derived novel physiologically active substances were examined with extract fractions of marine microbes collected from Ross Sea in 2013. Cytotoxicity activity was screened in GBM and APL cells but no fraction had shown significant cytotoxicity.

V. Application Plans of R&D Results

During this study, 1 patent application, 1 research article publication, and 3 poster presentations at International Meetings have been completed. Two patent application and 2 research articles are in preparation.

제	1	장	서론 • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	;
제	2	장	국내외 기술개발 현황 · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	L
제	3	장	연구개발수행 내용 및 결과 · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	3
제	4	장	연구개발목표 달성도 및 대외기여도 • • • • • • • • • • • • • • • • 87	7
제	5	장	연구개발결과의 활용계획)
제	6	장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 · · · · · · · · · · · · · 10	1
제	7	장	참고문헌 · · · · · · · · · · · · · · · · · · ·	6

제1장 서론

1. 연구개발의 목표

본 위탁과제는 "양극해 미래자원 탐사 및 활용기술 개발(K-POD)" 사업 내 7개 위 탁과제 중 하나로 "신규 극지 해양생물 대사체의 탐색을 통한 유용 의료용 물질개발"을 최종목표로 한다 (Fig. 1).

2. 연구개발의 필요성

세계적인 유용 생물자원에 대한 선점 확보경쟁이 심화됨에 따라 국가차원의 생물자원 확보가 필수적인데 우리나라는 국가차원의 극지연구 인프라인 쇄빙연구선 "아라온" 및 "장보고기지" 확보하여 극지해 해양생물 연구의 활성화를 위한 기반이 구축된 상태이다. 그러므로, 구축된 극지연구 인프라를 활용하여 독자적인 극지해 해양생물 유래 대사체 다양 성을 확보하고 활용연구 기반구축을 통하여 국가생명과학산업에 기여하고자 한다.

3. 연구개발의 범위

유용 의료용 물질은 광범위한 효용을 가질 수 있으므로, 신약개발 paradigm에 국한하여 보고자 한다. 특히, 본 위탁과제는 항암과 골대사에서의 효용성을 endpoint로 하므로 신약 개발의 범위로 보는 것이 타당하다고 샤료된다. 일반적으로 신약개발(de novo drug development)은 대단히 어려운 목표로 성공 확률이 낮고 긴 시간이 소요되어 최근에는 기 존에 개발된 약제에 새로운 적응증을 추가하는 repositioning 또는 repurposing이 대두되 었다[1, 2]. 이런 이유로 오늘날 대부분의 신약개발 또는 repositioning/ repurposing은 막 대한 자본과 인력투입이 가능한 다국적 제약회사에서 진행된다. 그러나 본 총괄과제에서 확 보한 양극해 생물은 전세계적으로 미답지역에서 채취하였을 뿐만 아니라 독특한 생태환경 에서 진화한 생물체이므로, 지금껏 발견하지 못한 신규 대사체를 가지고 있을 가능성이 높 다. 이에 본 위탁과제는 쇄빙선 아라온호의 탐사로 채취한 해양생물 유래 분획물의 탐색/물 질특성규명/정밀활성 규명을 연구의 범위로 정하여 연구를 수행하고자 계획되었다 (Fig. 2).

총 5년의 연구기간 중 아라온호의 탐사는 2차년도에 계획되었고 실제 신규대사체의 스 크리닝이 개시되기까지 상당한 기간이 예상되어(빠르면 2차년도, 늦어도 3차년도인 2014 년부터 스크리닝이 가능할 것으로 예상하였으나, 실제로 확보된 시점은 4차년도 완료 직전 인 2015.03임)였기 때문에 기확보 대사체를 이용한 연구도 함께 수행하였다. 기확보 대사 체는 남극 지의류 유래 PTP-1B (GenBank 유전자명은 *PTPN1*)의 활성 억제제인 lobaric acid 유도체로 항암효과(교모세포종, 급성전골수백혈병)과 골대사 조절효과를 endpoint로 활성을 규명하고자 연구하였다 (Fig. 3).

이상의 연구범위를 요약하면 아래 그림과 같다 (Fig. 4).



[Fig. 1. Aim of this study related to the main project, Korea-Polar Ocean Development]



[Fig. 2. The scope of the current project, related to development of novel metabolites. Upper figure is from [3]]



[Fig. 3. The scope of the current project, related to previously secured metabolite]



[Fig. 4. Summary of the scope of the current project]

제2장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 동향

가. 국외 기술, 기술동향

선진국에서의 미답지역 생물자원으로부터의 신약개발: 개념 정립의 단계이다.

극지생물, 심해생물 자원의 확보를 위해 쇄빙선, 대륙기지, 국가 간 공동연구 수행
등을 통해 미답지역 생물자원의 확보가 가능하다. 신약개발을 위한 후보물질의 도출
은 천연물 유래 후보물질과 디자인 신약으로 대별할 수 있다. 전자는 전통적인 방법
으로 원주민들의 경험과 고문헌 등을 통해 찾는 방법과 신규 생물체에서의 대사체 등
을 스크리닝하는 방법이 사용된다. 디자인 신약은 최신 생물정보학, 유전체, 단백체,
3차원 구조예측 등을 통해 탐색하는 방법이다.

현재까지 미답지역 생물자원으로부터의 신약개발 사례는 없으나, 남북극 생물자원 유래 활성, 효용, 공정에 대한 특허는 1980년대부터 등록되기 시작했다.

나. 국내 기술, 산업동향



국내에서의 미답지역 생물자원으로부터의 신약개발: 연구 인프라 및 기술개발 수준은 아직 선진국 수준에 미치지 못한 실정이다.

미답지역 생물자원 확보와 관련하여 국내에서는 남극 과학기지(세종, 장보고) 설 치 및 쇄빙연구선(아라온호) 활용 등으로 양극해 생물자원 확보가 가능한 상황이다. 그러므로 한국해양과학기술원 부설 극지연구소를 중심으로 지속적이고 체계적인 자원 확보 및 관리가 요구된다.

한편, 생물자원 유래 신약개발 관련하여 국내에서는 천연물신약개발에 기초가 되는 천연물 생리활성 탐색기술과 약리작용 및 독성연구 등에 대한 기초연구가 아직 미흡 한 편이다.

다. 특허 동향: 극지 생물자원 관련 특허 분석

특허 동향을 파악하기 위하여 patent.ndsl.kr로 접속하여 데이터베이스를 검색했으 며, 검색 키워드로 (((*arctic not (instrument* or equipment* or stimulator* or device* or apparatu*)) and activ*) or lobarstin)로 검색한 결과 전체 75건이 검색 되었다. 검색된 75건을 일일이 검토한 결과 관련특허(출원 또는 등록) 43개로 좁힐 수 있었다.

이렇게 검색된 43개 관련특허를 몇 가지 기준으로 분석한 결과는 아래와 같다.

특허공개시기, 출원/등록국가별로 분류하면 선진국에 비해 우리나라의 특허 출원/등록 기간이 늦은 편이다(2000년대 이후). 생물자원, 출원/등록국가별로 분류하면 남극 유 래 생물자원이 압도적으로 많고(북극 유래는 전체 43건 중 1건에 불과하다) 그 중 남 극 크릴새우 유래 특허가 많은데, 우리나라의 특허는 모두 남극 지의류 유래한 것이다 (Fig. 5).

이상의 결과를 종합하면, 우리나라는 극지연구에 있어 선진국 대비 후발주자임에도 다수의 특허가 있으며, 지속적이고 체계적인 지원만 있다면 더 많은 특허가 예상된다.

라. 정부지원정책 현황

정부출연연구소인 한국해양과학기술원 부설 극지연구소가 쇄빙선 아라온호를 보유 하고 있으며 국가로부터 연구지원을 받고 있다. 전 교육과학기술부의 "해양·극지 기초 원천기술개발사업 기획연구(극지 분야)" 중형과제 제 7 연구주제인 '극지해양 유전 자원 확보 및 이용기술 개발' 부분에 해당하며, 2011년 전 국토해양부에서의 "쇄빙 연구선 아라온호를 활용한 종합연구계획(안) 도출 기획연구" 제안과제 1-3 '남극해 생태계 보전과 수산자원/희귀생물자원 활용 연구'부분에 해당한다.

마. 종합결론

으게 치여무에 대하 여그

특허 검색결과 극지 생물 유래 천연물에 대한 연구는 매우 유망한 분야로 사료된다. 특히 세계적으로도 희귀한 연구용 쇄빙선을 보유 및 남극 연구기지 건설 등으로 구축된 인프라를 적극 활용하여 연구개발로 발전시켜야 하는데, 본 연구과제와 같은 지속적인 연구를 통해 극지생물 유래 의료용 유망 물질 확보를 선점해야 한다.



[**Fig. 5.** Present state of polar, biological resources-related patents. Upper plot, sorted by time of publication; lower plot, sorted by polar organisms.]

2. 국내외 연구현황

가. 교모세포종(glioblastoma, GBM)

GBM은 중추신경계의 아교세포(glial cell)와 그 전구세포에서 기원하는 악성 종양 으로 뇌의 피질측두엽 내 대뇌반구의 피질하 백질(white matter)에 가장 흔히 발생한 다. 외과적 수술로 병변 제거 후 방사선요법과 화학요법을 병행하는 표준 치료법이 시행 되고 있으나 평균 생존율이 14.6개월에 불과한 매우 치명적인 종양이다[4].

표준 치료법에 사용하는 약물인 temozolomide (TMZ)는 alkylating agent의 일종 으로 DNA 손상을 유발하여 암세포를 제거한다[4, 5]. DNA 회복 유전자인 0⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT)나 약물의 세포 내 bioavailability를 조절하는 transporter(예, P-glycoprotein)의 발현이 높은 경우 약물 에 대한 저항성을 보이므로 사용할 수 없다는 문제가 있다. 재발률도 매우 높아 6개월 progression-free survival (PFS) 15-21%에 불과하고 평균 생존율도 25주로 예후가 극히 불량한 악성질환이다[6-8].

최근 약물에 대한 저항성이 매우 높고 암줄기세포(cancer stem cell)로 기능하여 재발을 유도하는 side population이 보고되어, 이 세포의 효과적인 제거를 통한 완치의 가능성이 제시 되었으나 구체적인 치료표적을 찾기 위한 상세한 기전연구가 필요한 단계 이다[9, 10].

GBM은 경계가 불분명하고 광범위하게 퍼져있어 수술 시 완전한 제거가 어렵다. 고 형암에 비해 타기관으로의 전이는 드물지만, 두개골 안에서 광범위하게 퍼지는 것 역시 전이(metastasis)로 볼 수 있어 암전이 억제 역시 치료에 있어 중요하다.

나. 급성전골수백혈병 (APL, acute promyelocytic leukemia)

APL은 급성골수백혈병(acute myelogenous leukemia AML)의 특이한 형태로, 전 (前)골수세포 단계에서 미분화 상태로 남은 세포로 인한 악성질환이다[11]. 일반적으로 약물의 독작용을 이용하여 암세포를 제거하는 항암치료와 달리, APL의 치료는 해당 암 에 대한 분자생물학적 수준의 이해 기반으로 한 표적치료(targeted therapy)를 통해 항 암제에 대해 반응하지 않는 난치성 암에서 표적치료를 통해 예후가 급격히 호전된 성공 적인 질환의 예에 해당한다[11].

APL 치료를 위한 표적치료로 분화요법(differentiation therapy)이 있는데, 이는 임 상적으로 미분화 상태의 암세포를 분화시켜 암을 치료하는 방법으로, APL 환자에게 all-trans retinoic acid (ATRA)를 투여하여 암세포를 과립구(granulocyte)로 분화시 킴으로써 완전관해(complete remission; CR)를 이룰 수 있다[12, 13]. 최초 진단 환자 에게 ATRA를 단독 투여하면 초기 CR율은 높으나 CR후 5년 내 재발률이 40%에 이르 며, 일부는 retinoic acid syndrome 등의 심각한 부작용도 나타난다는 문제가 있어 개 선의 여지가 있다[14]. 이와 같은 완치의 어려움은 부분적으로 분화하지 않고 남아 재 발을 일으킬 수 있는 leukemia-initiating cells (LICs leukemic stem cells, leukemia-repopulating cells 등으로도 불린다)에 기인하는 것으로 생각되므로, 재발없 는 완치를 위해 분화요법 외에 LIC까지 제거할 수 있는 치료법의 개발이 요구된다. LIC 제거의 surrogate marker로 retinoid acid receptor alpha (RARA) 단백질 분해를 이 용하기도 한다[15] (Fig. 6).

이와 같은 치료의 어려움을 극복하기 위해 ATRA와 병용투여가 가능한 보조치료제 의 개발이 활발한데, 현재 미국 식품의약국(FDA)의 승인을 받은 치료법으로 화학요법 (CT)과 arsenic trioxide (ATO)가 사용되고 있으나 사용이 매우 제한적이고 세포독성 이 비교적 높아 개선의 여지가 있다[16].

다. 골 대사 (bone remodeling)

뼈는 세포외기질 성분으로 구성된 풋뼈(osteoid), 인, 칼슘 등이 침착된 무기질 성분 및 다양한 세포로 구성되며, 일차적으로 개체의 내골격을 이루는 구조적인 기능이 있으 나, 최근 포도당 대사에 관여하는 등 내분비 기관으로서의 기능도 보고 되었다[17]. 뼈 의 세포성분 중 대표적인 두 세포는 뼈를 만들어내는 골모세포(조골세포라고도 불린다, osteoblast)와 뼈를 파괴하는 파골세포(osteoclast)이며, 이 두 가지 세포간의 정밀한 조절기전을 통해 뼈의 총량이 조절된다[18].

미분화 상태의 골모세포가 활성화되면 분화가 진행되면서 콜라겐(collagen)등의 세 포외기질 성분을 분비하고 여기에 무기질 성분이 침착하도록 하여 뼈의 생성을 촉진한다 [19]. 그러나 골모세포의 분화가 진행됨에 따라 osteoprotegrin (OPG), RANKL 등의 단백질을 분비하여 파골세포의 분화를 조절하는 매우 정교한 기전이 존재하며, 이 두 세 포에 의해 뼈의 리모델링(bone remodeling)이 진행된다[20, 21] (Fig. 7).

노화, 호르몬 변화, 약물 등에 의해 이러한 골대사가 원활히 일어나지 못하면 골감소 증(osteopenia), 골다공증(osteoporosis) 등이 일어날 수 있으며, 효과적인 골질환의 치료제 개발을 위한 기전연구가 활발히 진행되고 있다[22]. 현재 임상적으로 사용 중인 골다공증 치료제인 bisphosphonate는 파골세포의 분화를 억제하는 기전을 사용한다 [23, 24]. 그러므로 효과적인 골질환 치료제의 개발을 위해 조골세포와 파골세포의 분 화 조절기전을 이해하고, 관련 약물의 탐색이 요구된다.



[APL치료의 기전 요약. 좌측은 세포분화, 우측은 LICs 제거를 통한 치료기전을 보여주며, 각각 ATRA와 ATO를 대표 치료제로 사용함.]

[**Fig. 6.** Summary of APL therapeutic mechanisms. Left arm, cell differentiation; Right arm, therapy mediated by elimination of LICs. Each arm utilizes ATRA and ATO, respectively.]



[Bone remodeling: 골모세포(조골세포라고도 불림)과 파골세포의 작용으로 이루어짐 [22]]

[Fig. 7. Bone remodeling mediated by the actions of osteoblasts and osteoclasts [22]]

제3장 연구개발수행 내용 및 결과

- 1. 연구개발수행 내용
 - 가. 세포교모종(GBM)에서 기확보 대사체의 세포독성 효과를 연구한다.
 - in vitro 상태에서 세포주에 약물을 단시간(예, 3, 4일) 처리한 후 독성효과를 볼 수 있는 GBM 세포주의 세포독성 실험모델을 구축하여, 기확보 대사체의 효과 및 신규 대사체의 생리활성 탐색에도 이용한다. GBM 세포주에 대한 기확보 대사체의 세포독성 효과를 검정하기 위해 대조군으로 임상적으로 사용되는 GBM 치료제인 temozolomide (TMZ)를 처리한 세포를 사용하여 기확보 대사체를 단독 처리하였을 때의 독성효과를 검정한다. 나아가 기존 항암제와 기확보 대사체 병용 처리하였을 때의 독성효과를 검정하여 기존 항암제 단독처리 대비 병용처리 시 세포독성 효과를 비교한다. in vivo 상태에서의 기확보 대사체의 효과를 검정하기 위해 이종이식 (xenograft)을 하여 약물처리에 따른 암 크기의 변화를 추적한다. 이를 통해 기확보 대사체의 단독 또는 기존항암 제와의 병용처리 시 세포독성 효과가 기존 항암제 대비 탁월한 경우, GBM 세포주에서 기확보 대사체의 세포독성에 대한 정밀활성 및 상세기전을 규명한다.
 - 나. 급성전골수백혈병(APL)에서 기확보 대사체의 세포독성 효과를 연구한다.
 - in vitro 상태에서 세포주에 약물을 단시간(예, 3, 4일) 처리한 후 독성효과를 볼 수 있는 APL 세포주의 세포독성 실험모델을 구축하여, 기확보 대사체의 효과 및 신규 대사체의 생리활성 탐색에도 이용한다. APL 세포주에 대한 기확보 대사체의 세포독성 효과를 검정하기 위해 대조군으로 임상적으로 사용되는 APL 치료제인 arsenic trioxide (ATO)를 처리한 세포를 사용하여 기확보 대사체를 단독 처리하였을 때의 독성효과를 검정한다. 나아가 기존 항암제와 기확보 대사체 병용 처리하였을 때의 독성효과를 검정하여 기존 항암제 단독처리 대비 병용처리 시 세포독성 효과를 비교한다. 이를 통해 기확보 대사체의 단독 또는 기존항암제와의 병용처리 시 세포독성 효과가 기존 항암제 대비 탁월한 경우, APL 세포주에서 기확보 대사체의 세포독성에 대한 정밀활성 및 상세기전을 규명한다.
 - 다. 급성전골수백혈병(APL)에서 기확보 대사체의 세포분화 효과를 연구한다.
 - in vitro 상태에서 세포주에 약물을 단시간(예, 3, 4일) 처리한 후 세포분화 효과를 볼 수 있는 APL 세포주의 세포분화 실험모델을 구축하여, 기확보 대사체의 효과 및 신규 대사체의 생리활성 탐색에도 이용한다. APL 세포주에 대한 기확보 대사체의 세포분화 효과를 검정하기 위해 대조군으로 임상적으로 사용되는 APL 치료제인 all-trans retinoic acid (ATRA)를 처리한 세포를 사용하여 기확보 대사체를 단독 처리하였을 때의 분화효과를 검정한다. 나아가 기존 항암제와 기확보 대사체 병용 처리하였을 때의 분화효과를 검정하여 기존 항암제 단독처리 대비 병용처리 시 세포분화 효과를 비교한 다. 이를 통해 기확보 대사체의 단독 또는 기존항암제와의 병용처리 시 세포분화 효과

가 기존 항암제 대비 탁월한 경우, APL 세포주에서 기확보 대사체의 세포분화에 대한 정밀활성 및 상세기전 규명한다.

라. 골모세포(osteoblast)에서 기확보 대사체의 세포분화 효과를 연구한다.

in vitro 상태에서 세포주에 약물을 장시간(예, 1주, 2주) 처리한 후 세포분화 효과를 볼 수 있는 골모세포주의 세포분화 실험모델을 구축하여, 기확보 대사체의 효과 및 신 규 대사체의 생리활성 탐색에도 이용한다. 골모세포주에 대한 기확보 대사체의 세포분 화 효과를 검정하기 위해 대조군으로 collagen 합성에 중요한 proline hydroxylase의 cofactor인 ascorbic acid (= vitamin C)를 처리한 세포를 사용하여 기확보 대사체를 단독 처리하였을 때의 분화효과를 검정한다. 나아가 기존 분화 유도제와 기확보 대사체 병용 처리하였을 때의 분화효과를 검정하여 기존 분화 유도제 단독처리 대비 병용처리 시 세포분화 효과를 비교한다. 이를 통해 기확보 대사체의 단독 또는 기존 분화 유도제 와의 병용처리 시 세포분화 효과가 기존 분화 유도제 대비 탁월한 경우, APL 세포주에 서 기확보 대사체의 세포분화에 대한 정밀활성 및 상세기전을 규명한다.

- 마. 골모세포(osteoblast)에서 기확보 대사체의 대사조절 효과
 - in vitro 상태에서 세포주에 약물을 처리한 후 대사조절 효과를 볼 수 있는 골모세포주 의 실험모델을 구축하여, 기확보 대사체의 효과 및 신규 대사체의 생리활성 탐색에도 이용한다. 골모세포주에 대한 기확보 대사체의 대사조절 효과를 검정하기 위해 대조군 으로 대사조절에 중요한 호르몬인 인슐린(insulin)이나 인슐린유사성장인자 (insulin-like growth factor-1, IGF-1)를 처리한 세포를 사용하여 기확보 대사체를 단독 처리하였을 때의 대사조절 효과를 검정한다. 나아가 기존 분화 유도제와 기확보 대사체 병용 처리하였을 때의 대사조절 효과를 검정하여 기존 대사조절 호르몬 단독처 리 대비 병용처리 시 대사조절 효과를 비교한다. 한편, 일반적인 세포배양 상태에서의 대사조절 효과 검정 외에 인슐린 저항성을 유도한 상태에서의 기확보 대사체의 단독 또 는 대사조절 호르몬과의 병용처리 효과를 검정한다. 이를 통해 기확보 대사체의 단독 또는 기존 대사조절 호르몬과의 병용처리 치 대사조절 효과가 기존 대사조절 호르몬 대 비 탁월한 경우, 골모 세포주에서 기확보 대사체의 대사조절에 대한 정밀활성 및 상세 기전을 규명한다.
- 바. 극지 해양생물 유래 신규 생리활성물질 탐색

상기 (가~마)에서 구축한 검정 모델 활용하여 (GBM 세포주의 세포독성 모델, APL 세포주의 세포독성 모델, APL 세포주의 세포분화 모델, 골모세포주의 세포분화 모델, 골모세포주의 대사조절 모델) 신규 생리활성물질을 탐색한다. 실제 탐색과정은 생리활성탐색용 시료의 확보량에 따라 우선순위를 정하여 진행하는데, GBM, APL 등 의 악성종양 세포주의 모델은 1회, 단기간 처리하므로 소량의 시료만 필요하므로 우선 적으로 탐색하고, 골모세포주의 세포분화와 같이 장시간 반복 투여하여 다량의 시료 확 보가 필수적인 경우는 후순위로 진행한다.

2. 실험 방법

가. 세포배양

본 과제에서 사용한 세포주는 모두 American Type Culture Collection (ATCC)에 서 취득하였고, 개별 세포주는 다음과 같다. GBM 세포주로 MGMT-positive 하여 항 암제인 alkylating agent (예, temozolomide, TMZ)에 대한 저항성을 가진 인체암 유 래 세포주인 T98G 와 MGMT-negative 하여 항암제인 alkylating agent에 대한 민감 성을 가진 인체암 유래 세포주인 U87MG를 사용한다. APL 세포주로는 translocation 에 의한 PML-RARA fusion protein을 발현하는 인체암 유래 세포주로서 FOB classification 상 AML 중 M3에 해당하는 NB4를 사용한다. 골모세포주는 mouse neonate의 두개골에서 유래한 pre-osteoblast 상태의 MC3T3-E1을 사용한다.

세포 배양을 위해 모든 세포주는 세포배양기(섭씨 37도, humidified air, 5% CO₂) 에서 유지하며, GBM 세포주는 DMEM + 10% FBS, APL 세포주는 RPMI-1640 + 10% FBS, 골모세포주는 alpha-MEM (without ascorbic acid) + 10% FBS에 유지 한다.

나. 세포독성 시험법

다양한 시험법으로 세포독성을 분석한다. Cell viability assay (Cell proliferation assay 또는 WST-8 assay라고도 불린다)를 위해 water-soluble tetrazolium 사용하는 kit 사용하며, 일정 수의 세포를 96-well plate에 seeding 후 단기적인(3~4 days) 약물처리 효과 검정한다. Assay kit로 EZ-Cytox (DoGen)를 사용한다.

Colony formation assay는 일정 수의 세포를 6-well plae에 seeding 후 장기적인 (2~3 weeks) 약물처리 효과를 검정한다. 형성된 colony는 crystal violet으로 염색하여 계수한다.

LDH assay는 손상된 세포로부터 배양액으로 흘러나온 LDH의 활성을 측정하는 시 험법으로 일정 수의 세포 seeding 후 약물처리 하고 3~4일 후 배양액을 새로운 96-well plate로 aliquot한 후 시행한다. Assay kit로 LDH assay kit (Dojindo)를 사용한다.

Trypan blue 염색 후 계수하는 방법은 exlusion dye인 trypan blue의 특성을 응용 한 시험법인데, trypan blue로 세포 염색되는 죽은 세포만을 계수하여 독성효과를 정량 화 한다.

Xenograft assay는 in vivo 상태에서의 세포독성을 시험할 수 있는 방법으로, immunodeficient mice에 U87MG로 xenograft 형성한 후 매일 3주간 약물 투여하여 tumor volume과 body weight를 측정하고, sacrifice 후 tumor 분리하여 tumor weight 측정하여 정량화 한다.

다. RT-PCR 및 qPCR

다양한 유전자의 발현을 mRNA 수준에서 정량하기 위해 수행한다. RNA는 Trizol (Invitrogen)을 사용하여 분리한 후 M-MLV Reverse Transcriptase (Elpis Biotech)로 cDNA를 합성한다. RT-PCR은 HiPi Plus Thermostable DNA Polymerase (Elpis Biotech)를 사용하고, qPCR은 SYBR Green master mix (Bio-Rad) 사용한다.

라. 면역 블롯팅(immunoblotting)

다양한 유전자의 발현을 단백질 수준에서 정량하기 위해 수행한다. 세포를 RIPA buffer로 lysis한 후 soluble fraction을 분리하여 cell lysate으로 사용하며, SDS-PAGE 후 nitrocellulose membrane에 transfer, 적절한 primary, secondary antibody로 붙인 후 enhanced chemiluminescence로 검출한다.

마. Alkaline comet assay

Comet assay kit (Trevigen)를 사용하여 alkaline 상태에서 세포를 처리한 후 전 기영동 시켜 형광현미경으로 image 얻는다. Image는 분석 software인 Comet Assay IV v4.3 (Perceptive Instruments)로 분석하여 genomic DNA가 손상된 세포의 비율 을 계산하는데 사용한다.

바. Apoptosis assay

다양한 방법으로 apoptosis assay를 수행한다. 가장 간단하고 고전적인 방법으로 genomic DNA를 분리한 후 agarose gel에 전기영동하여 laddering pattern을 보이면 apoptosis가 일어날 가능성이 있는 것으로 판단한다.

세포를 DAPI로 염색한 후 고배율 형광현미경 image에서 핵이 쪼개진 세포를 계수 하면 전체 세포 중 apoptosis가 일어난 세포의 비율을 정량할 수 있다.

TUNEL assay를 통해 apoptosis를 정량화 할 수 있는데, TUNEL Apoptosis Detection Kit (EMD Millipore)를 사용하며 사용법은 제조사의 protocol을 따른다.

PI staining/flow cytometry를 통해 apoptosis를 정량할 수 있다. 세포 고정 후 PI (propidium iodide)로 염색한 세포를 flow cytometry로 분석하여 sub-G1 세포의 비율 계산하면 apoptotic cell의 비율이 된다.

Apoptosis의 marker protein을 면역블롯팅으로 분석할 수 있다. 특히, effector caspase의 활성화 검정할 수 있는데, western blotting으로 cleaved PARP-1, cleaved-Caspase 3 등을 검정한다.

사. Autophagy assay

Autophagy의 다양한 marker를 정량하는 방법을 사용한다. 대표적인 autophagy marker인 p62/SQSTM1 단백질이나 post-translational modification을 거쳐 lipidation이 된 형태의 LC3 (LC3-II) 단백질 발현을 western blotting을 이용하여 정량하거나 BECN1 (Beclin) mRNA의 발현변화를 qPCR로 정량한다. Autophagy의 또 다른 marker인 LC3 puncta를 계수하거나, 일정 수 이상의 puncta를 가진 세포의 비율을 계산하여 autophagy가 진행된 세포의 비율을 결정할 수 있는데, LC3 puncta는 anti-LC3 antibody로 형광염색하여 puncta 구조를 보이는 세포를 대상으로 분석하되 반드시 puncta의 위치가 핵 내에 위치한 것만 계수해야 한다(세포 외나 세포질에 puncta처럼 염색된 것은 제외해야 한다).

Autophagy는 autophagy inhibitor를 이용하여 검정할 수 있는데, 3-methyladenine (3MA)나 chloroquine (CQ)로 세포를 처리한 후 상기 marker를 분석한다.

아. 세포분화

APL 세포주의 세포분화 유도를 위해 1 μM all-trans retinoic acid (ATRA)f로 72 시간 이상 처리한다. 분화는 Wright-Geimsa 염색 또는 NBT assay로 정량하거나 분화 marker 유전자의 mRNA나 단백질 발현을 각각 RT-PCR이나 western blot analysis로 정량한다.

골모세포주의 세포분화 유도를 위해 세포를 50 μg/ml ascorbic acid과 organic phosphate가 포함된 differentiation media (DM)에 7일 이상 처리한다. 분화는 alkaline phosphatase의 활성을 측정하거나 무기질 침착을 검정하는 alizarin red 염색 을 수행한다. 분화 marker gene으로 RUNX2, osteocalcin, collagen I 등이 있는데, 이들의 발현을 RT-PCR, qPCR, western blot analysis 등으로 정량한다.

in vitro에서 간접적인 방법으로 암전이 분석을 시행한다. 전이가 일어나기 위해 세 포가 이동해야 하고, 세포 이동을 위해 세포골격의 변화 및 변화를 유도하는 신호전달 체계에 변화가 일어나며, invasion에 관여하는 invadopodia가 extracellular matrix를 분해하는 다양한 효소(예, matrix metalloproteinases, MMPs)를 분비한다. 이상의 과 정을 검정하는 시험법은 아래와 같다.

Scratch assay 또는 wound healing assay라 불리는 시험법으로 세포이동을 검정 할 수 있는데, confluent하게 자란 세포를 긁어(scratch) 빈 공간을 만들고, 일정시간 후 세포가 이동하여 그 빈 공간을 채우는 정도를 정량화 한다.

세포이동에 관여하는 유전자(예, CDC42, RHO, RAC 등)의 발현변화를 qPCR이나 western blot analysis로 정량하고, cytoskeleton 중 F-actin이 생성된 정도는

자. 암전이 분석

FITC-phalloidin으로 염색하여 정성적으로 분석한다.

Gelatin invadopodia assay는 형광으로 염색된 gelatin에 invadopodia가 형성되어 matrix를 분해하는 단배질 분해효소를 분비하면 gelatin이 분해되면서 형광을 잃어버리 는 현상을 응용한 assay로서, EMD Millipore kit를 사용한다. 정량화 방법은 (% degraded area)를 세포수로 나누어 보정한 값으로 plotting한다.

3. 연구개발수행 결과

- 가. 세포교모종(GBM)에서 기확보 대사체인 lobarstin의 항암제 민감도 제고 효과
 - (1) 단기 독성 모델에서 lobarstin의 효과

Lobarstin (Fig. 8A) was treated in various doses for three days on T98G glioblastoma cells. As seen in Fig. 8B, toxic effect of lobarstin in T98G was seen at the concentration as low as 10 μ M (n=5, p=0.002, Student' s *t*-test). However, lobarstin had no effect on cell viability in human normal fibroblast at 40 μ M (Fig. 8B; n=3, p=0.108, Student' s *t*-test). Because 40 μ M was toxic to T98G cells (n=5, p=5.16E-05, Student' s *t*-test) but was the highest tolerated dose in normal fibroblasts, we used the concentration of 40 μ M as the treatment dose in further experiments.

(2) 단기 독성모델에서 lobarstin의 TMZ의 민감도 제고 효과

TMZ is used as a standard chemotherapeutic agent in glioblastoma, but it is less effective in patients who express MGMT, a gene responsible for repairing alkylation induced by TMZ at the O6 position of guanine, than those who do not. We have chosen T98G cells to study the effect of lobarstin, because MGMT is known to be expressed in the specific cell line (Fig. 9A), rendering cells more resistant to TMZ. Statistically significant toxicity of TMZ was seen in all conditions tested (Student's *t*-test, not shown), but the toxicity was more prominent at high doses of 500 and 750 μ M (Fig. 9B). Intriguingly, co-treatment of lobarstin with high doses of TMZ resulted in enhanced toxicity (Fig. 9C). These results suggest that lobarstin treatment might have enhanced the toxicity of TMZ.



[Fig. 8. Chemical structure and cytotoxicity of lobarstin. (A) Chemical structure of lobarstin. (B) Primary human fibroblasts (Normal) and T98G (T98G) cells were tested for cell viability with lobarstin, as described in Materials and methods. Cells were treated with indicated doses of lobarstin for 72 h. L, lobarstin concentration (μM). Results are shown as average of three (Normal) and five (T98G) independent experiments with standard deviation as error bars.]



[Fig. 9. Lobarstin potentiates the sensitivity of TMZ in MGMT-positive T98G cells. (A) Expression of MGMT in T98G cells. Expression at the mRNA (left panels, RT-PCR) and protein (right panels, Immunoblot) levels were shown. MGMT-negative U87MG cells were used as negative control for MGMT expression. GAPDH was used as loading control. (B) Cytotoxicity of TMZ on T98G cells. T98G cells were treated with the indicated doses of TMZ for 72 h or 96 h. (C) The effect of concomitant treatment of lobarstin and TMZ on T98G cell viability. Cells were treated with indicated combination of drugs for 72 h. T, TMZ concentration (μM) ; V, vehicle; L, 40 μM lobarstin. *p<0.05, **p<0.01. Results Student's t-test, are shown as representative (A) or average of three independent experiments with standard deviation as error bars (B and C).]

(3) 단기 독성모델에서 lobarstin의 DNA 손상과 회복 효과

Because TMZ is known to damage DNA by methylating guanine (at O6 and N7 positions) and/or adenine (at N3 position) residues, we next quantified DNA damage by the alkaline comet assay (Fig. 10). We first examined the effect of lobarstin on DNA damage. Lobarstin-alone at 40 μ M for 26 h had a minimal effect on DNA damage, as the tail intensity (TI) was similar to that of vehicle-treated cells for 26 h (Fig. 10, L vs. V). We next examined the effect of cotreatment on DNA damage, by treating T98G cells with 500 μ M TMZ-alone, or with lobarstin for 2 h. Treatment time of 2 h was chosen because both conditions showed similarextent DNA lesion [Fig. 10, T(D) vs. LT(D)] and the time should be long enough to induce DNA damage but short enough not to overlap with the DNA repair system induced upon DNA damage [Fig. 10A; Damage(D)]. Therefore, cells were washed after 2 h of drug treatment and incubated with fresh culture medium to measure recovery from DNA damage [Fig. 10; Recovery (R)]. When damaged cells were challenged with fresh medium for 24 h, the cells incubated with lobarstin-containing medium showed higher TI than those with vehicle [Fig. 10, T(R) vs. LT(R)]. Using one-way ANOVA to examine the group differences, statistical significance was seen between the groups [F(1,5)=4058.828, p<0.001]. Results obtained by utilizing the post-hoc test using Scheffe were as follows: (1) Significant difference observed between V and T(D), and between T(D) and T(R), p < 0.001; (2) significant difference between L and LT(D), and between LT(D) and LT(R), p < 0.001; (3) not significant difference between V and L, p=1.000; (4) not significant between T(D) and LT(D), p=0.998; and (5) significant difference between T(R) and LT(R), p < 0.001. Taken together, these results suggest that lobarstin-alone may not induce DNA damage, but the DNA damage induced by TMZ may be sustained in the presence of lobarstin.



[Fig. 10. Effect of lobarstin on DNA damage and recovery. (A) Experimental paradigm of lobarstin and/or TMZ treatment for alkaline comet assay. Damage (D) and recovery (R) are defined in the solid line shown on the top (not drawn to scale). Six different experimental conditions are shown underneath the solid line as arrows [V, Vehicle; L, lobarstin; T(D), TMZ (damage); LT(D), lobarstin and TMZ (damage); T(R), TMZ (recovery); and LT(R), lobarstin and TMZ (recovery)]. The alkaline comet assay was performed at the end of each arrow. (B) Fluorescent image of cells subjected to alkaline comet assay. (C) Summary of alkaline comet assay. Results are shown as average of fold-change relative to the vehicle-treated group from 50 measurements obtained per treatment and three independent experiments (total of 150 measurements) and standard deviation as error bars.

- (4) 단기 독성모델에서 lobarstin의 DNA 손상과 회복 효과
 - Because lobarstin-treated cells showed greater DNA damage in the alkaline comet assays, we hypothesized that the DNA repair system may be affected by lobarstin. Treatment of T98G cells with lobarstin-alone for up to 48 h resulted in reduced expression of MGMT and PARP1 proteins, enzymes implicated in DNA repair, in a timedependent manner (Fig. 11A, left panels). Reduced expression was also seen at the transcription level (Fig. 11A, right panels). Moreover, co-treatment of lobarstin with TMZ resulted in lesser expression of MGMT, PARP1, LIG3 and XRCC1 (Fig. 11B). These results suggest reduced expression of DNA repair genes as a possible mechanism for enhanced sensitivity seen with lobarstin co-treatment (Fig. 12).
- (5) 장기 독성모델에서 lobarstin의 효과 U87MG 세포주를 15일간 lobarstin으로 처리한 후 생성된 colony의 수를 계수한 결과(colony formation assay 수행), lobarstin의 농도에 dose-dependent하게 독성효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 13).
- (6) 장기 독성모델에서 lobarstin에 의한 TMZ의 민감도 제고 효과
 U87MG 세포주를 15일간 기존 항암제 TMZ and/or lobarstin으로 처리한 후 생성 된 colony의 수를 계수한 결과(colony formation assay 수행), lobarstin의 농도 에 dose-dependent하게 독성효과가 있음을 알 수 있었다(Fig. 14, 15).
- (7) in vivo 장기 독성모델에서 lobarstin에 의한 TMZ의 민감도 제고 효과 U87MG 세포주를 면역결핍생쥐에 이종이식한 후(=xenograft) 기존 항암제 TMZ and/or lobarstin의 독성효과를 보았다. 실제 실험의 paradigm은 Fig. 16과 같다. 약물투여 후 21일까지 종양의 크기와 생쥐의 몸무게를 측정했으며, 21일째 sacrifice한 후 종양을 분리하여 무게를 측정하였다. TMZ처리만으로도 종양의 크 기가 매우 작아져서 TMZ 단독의 독성효과가 너무 컸기 때문에 lobarstin에 의한 독성제고효과가 미미하였다 (Fig. 17).



\

극지연구소

[Fig. 11. Effect of lobarstin on the expression of DNA repair genes. (A) The effect of lobarstin on DNA repair genes. Cells were treated with 40 μ M lobarstin for indicated times (left panels) or for 24 h (right panels) and subjected to immunoblot and RT-PCR, respectively. (B) The effect of 40 μ M lobarstin and/or 500 μ M TMZ on DNA repair genes. Cells were treated with indicated drugs for 24 h and subjected to immunoblot. Shown are representative results of three independent experiments. V, Vehicle; L, lobarstin-only; T, TMZ only; LT, lobarstin and TMZ.]



[Fig. 12. Role of lobarstin in GBM. In MGMT-positive, TMZ-resistant T98G cells, the sensitivity to TMZ was enhanced by lobarstin cotreatment. Recovery from TMZ-induced DNA damage was attenuated by concomitant lobarstin treatment, accompanied by reduced expression of genes in the MGMT and BER pathways.]



[**Fig. 13.** Toxic effect of the previously secured metabolite, lobarstin. U87MG human glioblastoma (GBM) cells were treated with indicated doses of lobarstin for 15 days. Formed colonies were stained with crystal violet, thus the colony formation assay.]



극지연구소

[Fig. 14. The effect of concomitant treatment of metabolite (= lobarstin) and TMZ on U87MG cell viability. Cells were treated with indicated combination of drugs for 15 days and subjected to colony formation assay. Left, representative results of three independent experiments. Right, plotted results from three independent experiments. Y axis, average colony number per well.]



[Fig. 15. The effect of concomitant treatment of metabolite (= lobarstin) and TMZ on U87MG cell viability. Cells were treated with indicated combination of drugs for 15 days and subjected to colony formation assay. Shown are results from 4 independent experiments.]



[Fig. 16. Paradigm of a xenograft experiment. Xenograft tumors were made by injecting U87MG human GBM cells into immunodeficient mice. Mice were subjected to daily injection of indicated drugs for 21 days. CTL, control, vehicle injected; Lob, lobarstin-injected; TMZ, temozolomide-injected; L+T, lobarstin- and TMZ-injected.]



[Fig. 17. Xenograft experiment to examine the in vivo effect of lobarstin. Groups of 10 mice each were subjected to daily injection with indicated drugs. A, tumor volume of live animals; B, body weight changes during the experimental period; C, tumor weight measured from sacrificed animals; D, representative xenograft tumors from sacrificed animals. Note that the difference between TMZ alone and TMZ+ Lobarstin is minimal, possibly due to the dramatic effect of TMZ alone. CTL, control, vehicle injected; Lob, lobarstin-injected; TMZ, temozolomide-injected; L+T, lobarstin- and TMZ-injected.]
- 나. 교모세포종(GBM)에서 기확보 대사체인 lobarstin의 in vitro 암전이 억제 효과
 - (1) Lobarstin의 장단기 독성효과 Human GBM 세포주인 T98G and/or U87MG에서 lobarstin 단독처리에 의한 독 성효과를 단기(Fig. 18, left)와 장기(Fig. 18, right) 독성모델에서 검정한 결과 dose-dependent toxicity를 보았다.
 - (2) Lobarstin의 세포이동(cell migration) 억제 효과

Scratch assay를 수행하여 in vitro 상태에서 lobarstin에 의한 U87MG 세포주의 세포이동을 검정한 결과, lobarstin은 U87MG의 세포이동을 억제한다는 결과를 얻 었다(Fig. 19).

(3) Lobarstin에 의한 cytoskeleton의 변화

세포이동에 중요한 세포골격(cytoskeleton)의 변화가 lobarstin에 의해 일어나는지 검정하였다. 생성된 F-actin의 양태를 보기 위해 형광표지된 phalloidin으로 염색한 결과, lobarstin을 처리한 세포에서 F-actin이 감소한다는 것을 관찰하였다(Fig. 20, left).

한편, 세포골격의 유지와 변화는 다양한 단백질에 의해 조절되므로, lobarstin에 의한 세포골격의 변화가 small GTPase의 발현 변화에 의해 매개되는지 검정하였 다. 조사한 3가지 small GTPase 중 CDC42 단백질의 발현량이 lobarstin을 처리 한 세포에서 감소함을 관찰하였다(Fig. 20, right).

(4) Lobarstin에 의한 MMP의 발현변화

GBM 세포는 gelatinase의 활성을 갖는 Matrix Metalloproteinase (MMP) 2와 9 를 발현하여 세포 외로 분비(즉, 세포배양액에 존재한다)하는 것으로 잘 알려져 있 으므로 그 중 MMP2에 대해 조사하였다.

MMP2의 효소활성을 zymography를 이용하여 검정하였다. Gelatin이 혼합된 acrylamide gel에 세포 배양액을 전기영동하여 gelatin이 분해된 protein band를 추적한다. 단백질분해효소의 반응 후 gel을 Coomassie blue dye로 염색하면 전체 적으로 청색을 띤 gel에서 gelatinase 활성에 의해 gelatin이 분해된 부분만 염색이 되지 않는다. 이렇게 보이는 band는 해당 gelatinase를 가진 단백질의 band size와 일치하며, band의 intensity는 gelatinase의 활성에 비례한다. Fig. 21은 두 가지 band로부터 얻은 결과인데, MMP2가 전구(precursor)형태로 있어 full activity를 갖지 않은 Pro-MMP2와, protease의 작용에 의해 processing 되어 full activity 를 갖는 final form의 MMP2에 해당하는 band에서의 gelatin이 분해되어 보이는 intensity를 얻은 후 vehicle을 처리한 대조군 대비 상대적인 활성으로 표시하였다. Precursor form (Pro-MMP2)와 final processed form (MMP2) 모두 lobarstin 에 의해 활성이 감소되었음을 관찰하였다. 또한 MMP2의 발현량도 mRNA 수준에 서 lobarstin에 의해 감소됨을 관찰하였다(Fig. 22).





[Fig. 18. Examination of in vitro toxicity in GBM cell lines. Left, short term (72 h) effect of lobarstin alone in two GBM cell lines, T98G and U87MG. Long term effect of lobarstin on U87MG cells assessed by colony formation assay. Cells were treated with indicated dosease of lobarstin.]



[Fig. 19. Wound healing effect assessed by scratch assay. U87MG cells were plated, grown to confluency and scratched to induce cell migration into empty space. Shown are results from immediately and 9 h-post scratching. Cells had been incubated with vehicle or 30 μ M lobarstin since 24 h prior to scratching. Shown are representative results from 3 independent experiments.]



[Fig. 20. Cytoskeletal changes by lobarstin. U87MG cells treated with vehicle (DMSO) or 30 μ M lobarstin were subjected to F-actin staining with phalloidin-FITC (left panels) or immunoblotting analysis with antibodies specific for small GTPases. Note that the expression of CDC42 was decreased upon lobarstin treatement.]



[Fig. 21. Inhibition of MMP2 activity by lobarstin. Culture media including the secreted pro- and active-MMP2 were subjected to zymography. The negative intensity of digested gelatin was measured and plotted as shown. Left, zymographys result for bands corresponding to Pro-MMP2; right, zymographys result for bands corresponding to Active-MMP2. X-axis, lobarstin concentration (μ M); Y-axis, relative gelatinase activity. Gelatinase activity of vehicle-treated medium was set at 100. Shown are average results of three independent experiments. Error bars, standard deviation.]



[Fig. 22. Reduction of MMP2 expression by lobarstin. MMP2 mRNA expression was assessed by qPCR with specific primers. Y axis, expression of MMP2 relative to vehicle-treated cells. Lobarstin was treated at 30 μ M.]

(5) Invadopodia assay

Zymography를 통해 MMP2의 활성이 lobarstin에 의해 억제됨을 보았으므로, 기 능적으로 gelatinase의 활성이 감소하는지 살펴보고자 invadopodia assay를 수행 하였다. Invadopodia assay는 전이의 in vitro 모델로서, 암세포가 주변 세포외기 질(ECM)에 침입(invasion)하려면 세포가 발(foot)과 유사한 구조를 만들어 뻗어 나가는 현상을 mimic한 시험법이다. Invadopodia는 구조적으로 발과 유사한 구조 를 가지고 있을 뿐만 아니라, 그 구조로부터 단백질분해효소(protease)가 분비되어 주변 ECM을 분해하여 암세포가 이동하는 길을 만든다. Invadopodia assay는 이 와 같이 invadopodia가 분비하는 단백질분해효소에 의해 형광표지된 ECM 구성분 중 단일단백질을 분해하여 형광을 잃은 부분의 면적을 측정할 수 있다. 이 값을 전 체면적 대비 면적 및 세포수 대비 면적으로 계산하면 약물에 의한 invadopodia의 기능을 정량화할 수 있다.

GBM 세포는 gelatinase활성을 가진 MMP2와 MMP9을 분비하므로, 형광표지 된 gelatinase로 invadopodia assay를 수행한 결과, lobarstin에 의해 invadopodia 가 감소함을 알 수 있었다(Fig. 23). 형광염색결과 녹색을 gelatin인데 흑색으로 보 이는 부분이 invadopodia의 작용으로 gelain이 분해된 부분이고, 청색으로 염색된 DAPI는 세포의 핵을 염색하여 단위 면적 당 세포 수를 알 수 있으며, 적색으로 염 색된 F-actin은 Fig. 20에서와 같이 lobarstin에 의해 감소하였다. 녹색으로 염색 된 사진에서 관찰된 흑색 부분의 면적을 세포 수와 전체면적으로 보정한 결과를 plotting하니 lobarstin에 의해 statistically significant하게 감소함을 알 수 있었 다.



[Fig. 23. Reduction in invadopodia formation by lobarstin. Upon digestion of FITC-labelled gelatin by invadopodia, green fluorscence is lost. The area of lost fluorescence was measured, normalized by cell number and plotted as (% Degraded area)/cell count. Green, FITC-gelatin; blue, DAPI; red, Cy3-phalloidin. **, Student' s *t*-test, p < 0.01.]

다. 급성전골수백혈병(APL)에서 기확보 대사체인 M11A salt의 세포독성 효과

(1) M11A salt의 세포독성 효과

M11A salt를 다양한 농도로 APL 세포주인 NB4에 24 h 처리한 후 trypan blue 염색하여 계수한 결과, 기존 항암제인 Arsenic trioxide (ATO) 대비 M11A salt 의 세포독성 효과 확인할 수 있었다(Fig. 24A). 1 μM ATO가 보인 세포독성 효 과와 유사한 독성을 보이는 농도는 15 μM였다.

NB4에 대한 대조군으로 human foreskin에서 유래한 primary normal human fibroblast에 ATO와 M11A salt를 처리한 결과, NB4에서 독성으로 보였던 1 µM ATO와 15 µM M11A salt가 정상세포에는 독성효과를 보이지 않음을 알 수 있었 다(Fig. 24B).

이 결과로부터 향후 실험에 1 μM ATO와 15 μM M11A salt로 이후 실험을 진행하였다.

 (2) M11A salt 병용처리 시 기존 항암제 ATO에 대한 세포독성(민감도) 제고 M11A salt와 ATO를 병용처리하면 세포독성이 증가함을 관찰하였다(Fig. 25A). ATO에 의한 세포독성을 apoptosis 유도에 의한 것임이 잘 알려져 있으므로, M11A salt 병용처리에 의해 제고된 세포독성 역시 apoptosis 증가에 의한 것인지 확인하고자 다양한 apoptosis assay를 수행하였다.

세포핵을 DAPI로 염색한 결과, 병용처리군에서 쪼개진 핵의 수가 유의미하게 증가함을 관찰하였다(Fig. 25B). 세포를 propidium iodide (PI)로 염색한 후 flow cytometry로 분석한 결과 apoptotic population에 해당하는 sub-G1 세포수가 증 가함을 알 수 있었다(Fig. 25C and D). 고전적인 apoptosis assay인 genomic DNA를 전기영동한 결과, 병행처리군에서 DNA laddering이 가장 많이 관찰되었으 며(Fig. 25E), apoptosis marker인 cleaved PARP1, cleaved Caspase 9, cleaved Capsase 3가 병행처리군에서 가장 발현량이 많았다.

이상의 결과로부터 M11A salt 병용처리 시 기존 항암제 ATO에 대한 세포독 성(민감도) 제고되며, 세포독성 기전으로 apoptosis를 제시할 수 있었다.



[Fig. 24. Cytotoxicity of MllA salt relative to ATO. A, effect in APL cell line, NB4. B, effect in foreskin normal fibroblast.]



[Fig. 25. Enhanced cytotosicity upon concomitant treatment of M11A salt and ATO is due to inducton of apoptosis. A, cytotoxicity assessed by trypan blue staining and cell counting. B, DAPI staining result. (left) fluorscence microscopy, (right) apoptotic body plotted as % control (vehicle-treated cells). C, Propdium iodine staining followed by flow cytometry. D, ratio of sub-G1 cells from the results of C. E, genomic DNA laddering. F, immunoblot of apoptotic markers, cleaved PARP1, cleaved CAPS9, and cleaved CAPS3. GAPDH was used as loading control. V, vehicle-treated control; A, ATO alone (1 μ M ATO); M, M11A salt alone (15 μ M M11A salt); AM, ATO and M11A salt (1 μ M ATO + 15 μ M M11A salt).]

(3) M11A salt에 의한 PML-RARA 단백질 분해 기전 규명

APL에서 중심적인 oncoprotein인 PML-RARA는 ATO에 의해 분해가 유도된다 고 알려져 있는데, 이 과정에 자가포식(autophagy)도 관여하는 것으로 알려져 있 다. 실험적으로 PML-RARA 단백질은 Triton X-100에 soluble한 분획보다 insoluble한 분획에 더 많이 존재하는 것으로 알려져 있고, 특히 이 insoluble 분획 의 PML-RARA가 autophagy에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다.

이에 insoluble 분획에서의 PML-RARA를 분석한 결과 autophagy marker인 p62와 LC3II가 soluble 분획보다 insoluble 분획에서 발현량이 많은 것을 알 수 있었다(Fig. 26A). 특이하게도 autophagy inhibitor인 chloroquine을 처리한 경우 autophagy marker의 발현량이 가장 높았다.

ATO와 M11A salt를 병용처리 하여(Fig. 26B, lane 6) PML-RARA 단백질 의 양이 가장 많이 감소하는 것을 관찰하였다. 이에 대한 기전을 보고자 다양한 항 체를 이용하여 western blot analysis를 수행한 결과, 병용처리군에서 apoptosis와 autophagy가 증가하였으나 ER-stress에 대한 marker 변화는 미미한 것을 알 수 있었다(Fig. 26B).

이상의 결과로부터 M11A salt에 의한 PML-RARA 단백질 분해는 autophagy 를 경유함을 알 수 있었다.

(4) ATO와 M11A salt 병용처리에 의한 독성의 분자적 기전 규명

Fig. 25에서 ATO와 M11A salt 병용처리에 의한 독성이 apoptosis를 경유하고, Fig. 26에서 ATO와 M11A salt 병용처리에 의한 PML-RARA의 분해가 autophagy를 경유함을 보았으므로, 병용처리에 의한 독성에 autophagy가 관여하 는지 살펴보았다.

이에 autophagy inhibitor인 chloroquine을 사용하여 autophagy가 억제되었을 때 병용처리에 의한 apoptosis가 영향을 받는지 살펴보았다. 세포독성을 trypan blue 염색 후 세포 계수로 분석한 결과 chloroquine 처리에 의해 죽는 세포의 수가 감소하고(Fig. 27A), DNA laddering도 감소하나(Fig. 27B) *PML-RARA* mRNA 의 발현은 변화가 없음을 관찰하였다(Fig. 27C). 더불어 soluble 분획에서 apoptosis marker인 cleaved Caspase 3 (CASP3)와 cleaved PARP1이 chloroquine에 의해 감소하고(vehicle AM 대비 chloroquine AM), insoluble 분 획에서 autophagy marker인 LC3II도 chloroquine에 의해 감소하였다(vehicle AM 대비 chloroquine AM) (Fig. 27D). 마지막으로 PML-RARA를 형광염색으 로 관찰한 결과, 병용처리에 의해 감소한 핵내 PML-RARA가 chloroquine 처리에 의해 회복되는 것을 관찰하였다(Fig. 27E).

이상의 결과를 종합하면, ATO와 M11A salt 병용처리에 의한 독성효과에 autophagy가 관여함을 알 수 있었다.



[Fig. 26. PML-RARA protein degradation by M11A salt is mediated by autophagy pathway. A, cells were treated with vehicle or authophagy inhibitors, 3-MA or chloroquine, lysed and subjected to western blot analysis. Soluble, soluble fraction upon lysis with RIPA buffer; insoluble, insoluble pellet upon Triton X-100 lysis solublized in 8 M urea. GAPDH and Tubulin were used as loading controls. B, Effect of concomitant treatment on the protein expression of ER stress markers and autophagy markers assessed by western blotting. 1, control (no treatment); 2, cell treated with ER-stress-inducing tunicamycin; 3, vehicle-treated cells; 4, ATO alone (1 μ M ATO); 5, M11A salt alone (15 μ M M11A salt); 6, ATO and M11A salt (1 μ M ATO + 15 μ M M11A salt). GAPDH was used as loading control.]



[Fig. 27. Apoptosis induced by concomitant treatment of ATO and M11A salt is mediated by autophagy. A, cell death was reduced (= cell count is increased) upon chloroquine treatment, an autophagy inhibitor. B, changes in DNA laddering, an apoptosis marker. C, conventional RT-PCR result of PML-RARA, the APL marker and LC3, an autophagy marker. D, the effect of concomitant treatment on apoptosis markers (cleaved CASP3 and cleaved PARP1) were reversed by chloroquine, an autophagy inhibitor, in soluble fractions. In the insoluble fractions, reduction of PML-RARA protein expression by concomitant treatment was reversed by chloroquine. E, PML bodies were stained by anti-PML antibody (green). Nuclei were stained with DAPI (blue). V, vehicle-treated control; A, ATO alone (1 μ M ATO); M, M11A salt alone (15 μ M M11A salt); AM, ATO and M11A salt (1 μ M ATO + 15 μ M M11A salt).]

D.

- (5) ATO와 M11A salt 병용처리에 의한 독성의 분자적 기전 규명
 - Autophagy 과정에 MAPK 경로가 관여한다는 보고가 있어 병용처리 과정에도 MAPK 경로가 관여하는지 살펴보았다(Fig. 28). MAPK 경로의 marker인 phospho-ERK의 발현은 병용처리군에서 가장 높았다(Fig. 28A). 특이하게도 MAPK 경로의 inhibitor인 PD098059 (PD)를 처리하니 phospho-ERK는 감소하 였으나 cleaved CASP9, cleaved CASP3, cleaved PARP1 등의 apoptosis marker는 PD를 처리한 병용처리 군에서 가장 발현량이 높았다. Apoptosis marker에서 본 결과와 유사하게 trypan blue 염색 후 계수 결과 역시 PD를 처리 한 병용처리 군에서 가장 독성효과가 높음을 알 수 있었다. 이상의 결과로부터 ATO와 M11A salt 병용처리에 의한 독성에 MAPK 경로가 관여함을 알 수 있었 다.





[Fig. 28. Cytotoxicity of concomitant treatment is mediated by ERK pathway. Note that the cytotoxicity is enhanced in PD098059 (PD, a ERK pathway inhibitor)-treated cells. A, western blot analysis; B, cell counting after trypan blue staining. V, vehicle-treated control; A, ATO alone (1 μ M ATO); M, M11A salt alone (15 μ M M11A salt); AM, ATO and M11A salt (1 μ M ATO + 15 μ M M11A salt); PD, PD-treated.]

- 라. 급성전골수백혈병(APL)에서 lobarstin의 세포독성 효과
 - (1) Lobarstin과 ATO의 병용처리에 의한 세포독성 제고

Lobarstin을 다양한 농도로 APL 세포주인 NB4에 다양한 시간동안 처리한 후 trypan blue 염색하여 계수한 결과, 기존 항암제인 Arsenic trioxide (ATO) 대비 lobarstin의 세포독성 효과 확인할 수 있었다(Fig. 29A, L 처리군). 1 µM ATO 가 보인 세포독성 효과와 유사한 독성을 보이는 농도는 10 µM이었다.

Lobarstin과 ATO를 병용처리하면 세포독성이 증가함을 관찰하였다(Fig. 29A, LA 처리군). Lobarstin 단독처리군(L군)과 ATO와의 병용처리군(LA군)을 비교하 면 L군 대비 LA군에서의 세포수가 감소하여 병용처리에 의해 세포독성이 제고됨을 알 수 있었다. 1 μ M ATO가 보인 세포독성 효과와 유사한 독성을 보이는 10 μ M lobarstin 대비 같은 농도의 ATO와 lobarstin의 병용처리 시 세포독성이 증가하 며, 특이하게도 전혀 독성이 없던 1 μ M lobarstin을 ATO와 병용처리해도 세포독 성이 제고되는 효과를 보았다. 이와 같은 결과에 착안하여 향후 실험은 1 μ M lobarstin 단독(1L), 1 μ M lobarstin + 1 μ M ATO (1LA), 10 μ M lobarstin 단독(10L), 10 μ M lobarstin + 1 μ M ATO (10LA)로 처리하였으며, 대조군으 로 vehicle 처리군 (V)와 1 μ M ATO 처리군 (A), 총 6개 군으로 진행하였다.

1LA와 10LA에서 제고된 세포독성은 추가 실험법으로 증명되었다. Fig. 29B는 WST-8을 이용한 viability assay 결과이고, Fig. 29C는 LDH assay를 이용한 cytotoxicity assay의 결과인데, trypan blue 염색 후 계수 결과와 동일하게 병용 처리에 의해 세포독성이 증가함을 보았다.

(2) Lobarstin과 ATO의 병용처리에 의한 세포독성 제고는 apoptosis의 증가에 기인한다.

ーヘビエエ

ATO에 의한 세포독성이 apoptosis 유도에 의한 것임이 잘 알려져 있으므로, lobarstin 병용처리에 의해 제고된 세포독성 역시 apoptosis 증가에 의한 것인지 확인하고자 다양한 apoptosis assay를 수행하였다.

TUNEL로 염색한 후 계수하니 1LA와 10LA군에서 TUNEKL로 염색된 세포 의 비율이 더 높았다(Fig. 30, left). Apoptosis marker인 cleaved PARP1은 병 행처리군에서 발현량이 가장 높았고, Capsase 3 (CASO)3)는 병행처리군에서 발 현량이 가장 낮았다(Fig. 30, right). 이상의 결과로부터 lobarstin 병용처리 시 기 존 항암제 ATO에 대한 세포독성(민감도) 제고되며, 세포독성 기전으로 apoptosis 를 제시할 수 있었다.





[Fig. 29. Effect of lobarstin alone or co-treatment with ATO on cell death. (A) cell count after trypan blue staining. (B) cell viability assay (WST-8 assay). (C) cytotoxicity test (LDH assay). 1, V (vehicle-treated control); 2, A (ATO alone); 3, 1L (1 μ M lobarstin); 4, 10L (10 μ M lobarstin); 5, 1LA (concomitant 1 μ M lobarstin and 1 μ M ATO); 6, 10LA (concomitant 10 μ M lobarstin and 1 μ M ATO). Student' s *t*-test; *, p < 0.05; **, p < 0.01; ***, ###, p < 0.001.]



[Fig. 30. Cell death induced by lobarstin alone or by co-treatment with ATO is mediated by apoptosis. Left, TUNEL staining results of the upper panel plotted as %TUNEL-positive cells relative to total cell count. Right, western analysis of apoptosis markers. Numbers under the blots indicate band intensities relative to control (lane 1). 1, V (vehicle-treated control); 2, A (ATO alone); 3, 1L (1 μ M lobarstin); 4, 10L (10 μ M lobarstin); 5, 1LA (concomitant 1 μ M lobarstin and 1 μ M ATO); 6, 10LA (concomitant 10 μ M lobarstin and 1 μ M ATO).]

(3) Lobarstin과 ATO의 병용처리에 의한 세포독성 제고는 autophagy의 증가에 기인한다.

ATO는 APL의 중요 oncoprotein인 PML-RARA 단백질의 분해에 관여하며, 그 기전으로 autophagy가 알려져 있으므로 Lobarstin과 ATO의 병용처리에 의한 세 포독성 제고가 autophagy에 의해 매개되는지 확인하였다(Fig. 31).

PML-RARA 단백질은 lobarstin 단독이나 ATO와의 병용처리에 의해 감소하 였는데 dose-dependent하게, 단독처리 보다 병용처리 군에서 더 많이 감소하였다 (Fig 31, upper left).

한편 autophagy marker의 발현을 분석한 결과 병용처리에 의해 SQSTM1 (p62라고도 불린다) 단백질은 감소하고, LC3II (MAP1LC3BII라고도 불린다) 단백질과 mRNA는 증가하며, *BECN1* mRNA도 증가하였다.

이상의 결과를 종합하면 Lobarstin과 ATO의 병용처리에 의한 세포독성 제고 는 autophagy의 증가에 기인한다는 것을 알 수 있었다.

(4) Lobarstin과 ATO의 병용처리에 의한 apoptosis는 autophagy를 경유한다.

Fig. 29에서 ATO와 lobarstin 병용처리에 의한 독성이 apoptosis를 경유하고, Fig. 30에서 ATO와 lobarstin 병용처리에 의한 PML-RARA의 분해가 autophagy 를 경유함을 보았으므로, 병용처리에 의한 독성에 autophagy가 관여하는지 살펴보 았다. 이에 autophagy inhibitor인 3-methyladenine (3MA)와 chloroquine (CQ)을 사용하여 autophagy가 억제되었을 때 병용처리에 의한 apoptosis가 영향 을 받는지 살펴보았다.

3MA와 CQ를 처리하니 autophagy marker인 LC3II가 감소하는데, 병용처리에 의해 감소하였던 PML-RARA 단백질이 약간 회복되는 것을 관찰하였다(Fig. 32). 그러나 이 과정은 단백질 분해의 억제에 의한 것이므로 mRNA 수준에서의 변화는 없었다(Fig 32). 이와 유사하게 authophagy marker인 BECN1 mRNA, total LC3 puncta per cell도 3MA와 CQ에 의해 감소하였다 (Fig. 33 and 34). 특이하 게도 authophagy inhibitor 처리에 의해 apoptotic cell의 수도 감소하였는데 이는 PI염색 후 flow cytometry, genomic DNA laddering, TUNEL 염색 후 계수, apoptosis marker인 Cleaved PARP1과 CASP3의 western blot analysis (Fig 35) 등 다양한 실험법으로 확인하였다.

이상의 결과를 종합하면, ATO와 lobarstin 병용처리에 의한 독성효과에 autophagy가 관여함을 알 수 있었다.



[Fig. 31. Reduction in PML-RARA protein expression by lobarstin is mediated by autophagy pathway. Upper left, PML-RARA protein expression assessed by western blotting. α -tubulin (TUBA) was used as loading control. Upper right, expression of autophagy markers, SQTM1 (= p62) and MAP1LC3B (= LC3). GAPDH was used as loading control. Numbers under the blots indicate band intensities relative to control (lane 1). Bottom, qPCR results of autophagy marker genes, *MAP1LC3B* (= *LC3*) and *BECN1* (= *BECLIN-1*). 1, V (vehicle-treated control); 2, A (ATO alone); 3, 1L (1 μ M lobarstin); 4, 10L (10 μ M lobarstin); 5, 1LA (concomitant 1 μ M lobarstin and 1 μ M ATO); 6, 10LA (concomitant 10 μ M lobarstin and 1 μ M ATO).]



[Fig. 32. Enhanced protein degradation of PML-RARA by concomitant lobarstin and ATO is mediated by autophagy. Left, qPCR of *PML-RARA*. Right, western blot analysis of PML-RARA. Note that the reduced PML-RARA protein expression was recovered by autophagy inhibitors, 3MA and CQ in lobarstin and ATO co-treated cells (lanes 5 and 6). 1, V (vehicle-treated control); 2, A (ATO alone); 3, 1L (1 μ M lobarstin); 4, 10L (10 μ M lobarstin); 5, 1LA (concomitant 1 μ M lobarstin and 1 μ M ATO); 6, 10LA (concomitant 10 μ M lobarstin and 1 μ M ATO).]



[Fig. 33. Establishment of experimental setting for autophagy inhibition in APL cells. Upper panels, western analysis of autophagy marker MAP1LC3B (= LC3). Numbers under the blots indicate band intensities relative to control (lane 1). Lower left, qPCR result of *BECN1* (= *BECLIN-1*). Lower right, number of cells with LC3 punta. Student' s *t*-test; * or #, p < 0.05; **, p < 0.01; ###, p < 0.001. 1, V (vehicle-treated control); 2, A (ATO alone); 3, 1L (1 μ M lobarstin); 4, 10L (10 μ M lobarstin); 5, 1LA (concomitant 1 μ M lobarstin and 1 μ M ATO); 6, 10LA (concomitant 1 μ M ATO).]



극지연구소

[Fig. 34. PML-RARA protein degradation by lobarstin and ATO co-treatment is mediated by autophagy. APL cells were stained with anti-PML antibody (green), anti-LC3 antibody (red) and DAPI (blue). 1, V (vehicle-treated control); 2, A (ATO alone); 3, 1L (1 μ M lobarstin); 4, 10L (10 μ M lobarstin); 5, 1LA (concomitant 1 μ M lobarstin and 1 μ M ATO); 6, 10LA (concomitant 10 μ M lobarstin and 1 μ M ATO).]



[Fig. 35. Cell death by lobarstin alone or by co-treatment with ATO is occurs by autophagy-mediated apoptosis. Upper left, sub-G1 cells assessed by PI staining and flow cytometry. Upper right, genomic DNA laddering. Lower left, TUNEL staining result. Lower right, protein expression of apoptosis markers. Numbers under the blots indicate band intensities of cleaved PARP1 over full-length PARP1 relative to control (lane 1). 1, V (vehicle-treated control); 2, A (ATO alone); 3, 1L (1 μ M lobarstin); 4, 10L (10 μ M lobarstin); 5, 1LA (concomitant 1 μ M lobarstin and 1 μ M ATO); 6, 10LA (concomitant 10 μ M lobarstin and 1 μ M ATO).]

- 마. 골모세포(osteoblast)에서 기확보 대사체의 효과
 - (1) Lobarstin의 세포독성 검정

골모세포에 lobarstin을 단독처리했을 때의 독성효과를 농도별, 시간별로 검정하였 다(Fig. 36). 생존 세포수는 WST-8 assay를 사용하였다. 0.1~10 μM 범위에서 독성이 전혀 없는 것으로 판단된다. 최고농도인 10 μM은 APL 세포주에서는 기존 항암제인 ATO와 유사한 독성을 보이는 농도이나, 암세포가 아닌, 정상세포에 가 까운 immortalized cell line인 MC3T3-E1 세포주는 lobarstin에 대한 독성에 더 저항성을 가지고 있음을 알 수 있다. 이는 Fig. 24B에서 foreskin 유래 normal human fibroblast가 약물에 대한 내성을 가지는 것과 유사하다.

(2) M11A salt의 세포분화 효과 검정

골모세포에 M11A salt를 단시간 처리하여 분화에 필수적인 RUNX2 transcription factor의 발현변화가 있는지 살펴보았다(Fig. 37). Osteoblast로의 분화가 유도되 면 RUNX2의 발현이 단기적으로 증가하는데 Fig. 37에서 보듯이, M11A salt 처리 6 h 까지 RUNX2의 발현이 증가하다가 12 h 이후로는 오히려 감소하는 것을 알 수 있었다. 이 결과로부터 M11A salt가 MC3T3-E1 세포주의 골모세포로의 분화 를 유도할 가능성을 확인할 수 있었다.

(3) M11A salt에 의한 골모세포 대사조절 검정

최근 골모세포가 인슈린수용체(insulin receptor, IR)를 발현하고, 췌장 베타세포에 서 분비된 인슐린(insulin)에 반응하여, 포도당의 대사에 관여한다는 보고가 있었 다. 이에 실험모델로 사용하는 pre-osteoblast 세포주인 MC3T3-E1 세포주에서 의 insulin 처리 효과를 검정하였다(Fig. 38).

MC3T3-E1 세포주에 M11A salt를 24 h 전처리한 상태에 insulin을 5 min부 터 24 h까지 다양한 시간동안 처리한 후 insulin 신호전달체계에의 영향 검정하였 다. Insulin receptor (IR), Insulin receptor substrate (IRS), AKT, ERK등의 인산화 및 Osteocalcin (OCN) 발현을 Western blot analysis로 관찰할 수 있었 다. 특히 5 min 처리 시 AKT의 활성화 정도는 insulin 단독보다 insulin과 M11A salt를 병용처리 하였을 때 더 강한 것을 관찰하였다.

한편 insulin에 의해 insulin 신호전달경로가 활성화 되면 기능적으로 포도당의 uptake가 증가할 것으로 예상하여 대사가 되지 않는, 형광으로 표지된 포도당 analog인 2-NBDG를 처리하여 glucose uptake를 정량화한 결과 insulin에 의해 미세하나마 glucose uptake가 증가하여(Fig. 39A) MC3T3-E1에서의 주요 glucose transporter인 GLUT1의 발현변화를 mRNA 수준에서 정량한 결과 약간 증가한 것을 알 수 있었다(Fig. 39B).

이상의 결과로부터, M11A salt는 insulin에 의한 MC3T3-E1 세포주에서의

신호전달경로를 더욱 활성화 시킨다는 것을 알 수 있었다.





[**Fig. 36.** Examination of lobarstin toxicity in MC3T3-E1 osteoblasts. Cell were treated with indicated doses for indicated times and subjected to cell viability test with WST-8 assay.]



[Fig. 37. Examination of differentiation induction of MC3T3-E1 osteoblast cell with M11A salt. Expression of Runx2, a differentiation marker, was assessed by western analysis.]



[Fig. 38. Effect of M11A salt on insulin signaling in MC3T3-E1 osteoblast cells. Cells were pre-treated with 6 μ M M11A for 24 h, treated with 100 nM insulin for indicated times and subjected to western analysis for proteins in the insulin signaling pathway. Note the increased phosphorylation of insulin receptor (IR), IRS1, AKT and ERK.]



Α

Glucose Uptake (2-NBDG assay)

[Fig. 39. Examination of the insulin and/or M11A salt effect on glucose uptake. (A) Glucose uptake assay with 2-NBDG. Treatment with insulin enhanced the uptake of glucose in MC3T3-E1 cells. (B) Changes in GLUT1 and osteocalcin (OCN) expression assessed by RT-PCR. GLUT1 encodes the osteoblast-specific glucose transporter gene and OCN encodes osteoblast-specific marker protein, Beta-actin was used as loading control.]

(4) Lobarstin에 의한 골모세포 대사조절 검정

MC3T3-E1 세포주에서의 인슐린(insulin)과 lobarstin의 병용처리 효과를 검정하 였다(Fig. 40). 인슐린 신호전달체계에의 영향을 검정하기 위해 Insulin receptor (IR), IRS, AKT, ERK, FOXO1 등의 인산화 및 Osteocalcin (OCN) 발현을 Western blot analysis로 분석한 결과, 특이하게도 활성화된 AKT (p473-AKT) 와 ERK (p-ERK)가 lobarstin을 병용처리한 세포에서 더 장시간동안 유지됨을 관 찰하였다(Fig. 40에서 황색 화살표). 그러므로 이 결과는 lobarstin이 insulin의 효 과를 좀 더 지속시킬 수 있는 가능성을 시사 하였다.

한편 insulin 대사와 관련된 질환모델 중 제2형 당뇨(type 2 diabetes)의 경 우, 인슐린 저항성(insulin resistance)을 가지는 경우가 많기 때문에 실험적으로 인슐린 저항성을 유도한 상태에서 lobarstin의 병용처리가 인슐린 신호전달체계 및 glucose uptake에 영향을 끼치는지 검정하였다(Fig. 41). 인슐린 저항성을 유도한 세포에 lobarstin을 처리하면 dose-dependent하게 AKT가 활성화 되는 것을 p473-AKT에 특이적인 항체를 이용한 western blot analysis로 관찰할 수 있었 고(Fig. 41, left), 2-NBDG assay를 이용한 glucose uptake 실험에서도 insulin uptake가 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig. 41, right). 이로부터 lobarstin 이 insulin resistance가 유도된 MC3T3-E1 세포에서도 insulin signaling 및 glucose uptake를 증진시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

이상의 결과로부터 lobarstin은 정상 osteoblast 및 insulin-resistant osteoblast 모두에서 insulin의 효과를 제고시키는 것을 확인할 수 있었다.



[Fig. 40. Effect of lobarstin on insulin signaling in MC3T3-E1 osteoblast cells. Cells were pre-treated with vehicle (DMSO) or 1 nM lobarstin for 24 h, treated with 10 nM insulin for indicated times and subjected to western analysis for proteins in the insulin signaling pathway. Note the increased phosphorylation of AKT, FOXA1 and ERK as well as enhanced expression of osteocalcin.]



[Fig. 41. Improvement of insulin resistance by lobarstin in osteoblasts. Left, MC3T3-E1 cells were treated with N-acetylglucosamine to induce insulin resistance, pre-treated with indicated doses of lobarstin for 24 h, treated with insulin for 6 h and subjected to western analysis. Note the enhanced phosphorylation of AKT at S473 by lobarstin in an dose-dependent manner (yellow arrow). Right, enhanced glucose uptake in insulin-resistant MC3T3-E1 cells by lobarstin. Glucose uptake was measured by flow cytometry for fluorescence due to 2-NBDG, a fluorescent non-metabolizing glucose analogue.]

바. 2013 Ross Sea 해양미생물 추출물 분획의 세포독성 효과

(1) 시료

2013년 Ross Sea에서 채집된 미생물에서 추출한 추출물 359개를 각 1.0 mg 내 외를 분양받아 DMSO에 reconstitution하여 100 mg/ml stock을 만들어 -70°C에 보관하였다(Fig. 42).

(2) GBM 세포주에서의 세포독성 효과 검정

GBM 세포주로 T98G와 U87MG를 사용하여 추출물을 10~50 µg/ml로 24~96 h 처리한 후, 추출물의 독성을 WST-8 assay로 검정하였다. 1차 스크리닝 결과 (Fig. 43~46) 미미하나마 독성을 보이는 분획이 있어 2차 스크리닝을 3회 반복하 였으나(Fig. 47~49) 최종적으로 독성을 보이는 분획을 구하지 못하였다.




2013 남극 Ross sea 해양미생물시료 추출물 List

[Fig. 42. List of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples. These extracts were reconstituted in DMSO to 100 mg/ml and stored at -70°C for future use.]



[Fig. 43. Primary screening for novel physiologically active substance in GBM cells (Sample numbers #1~144). U87MG cells were treated with 10 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 24 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. Upper row of X-axis, sample numbers. The first lane of each plot is from the vehicle-treated control (ctr). Bottom row of X-axis, viability relative to control(ctr). Y-axis, absorbance at 450 nm (A450). Error bar, standard deviation from duplicate experiments.]









[Fig. 44. Primary screening for novel physiologically active substance in GBM cells (Sample numbers #1~144). T98G cells were treated with 10 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 24 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. Upper row of X-axis, sample numbers. The first lane of each plot is from the vehicle-treated control (ctr). Bottom row of X-axis, viability relative to control (ctr). Y-axis, absorbance at 450 nm (A450) relative to control (ctr). Error bar, standard deviation from duplicate experiments.]



```
Sample No.: #145~#260
Orginal stock: 100 mg/ml (stored at -70℃)
Diluted stock: 10 mg/ml (stored at -70℃)
Final concentration: 10 ug/ml
Cells: T98G, U87MG (2E3 cells/0.1ml, 96 well plate)
Incubation Time: 72 h
Assay: WST-8 [EZ-Cytox cell viability assay kit (대일랩서비스)]
Detection:A450 (ELISA plate reader, 595 nm reference value)
```







[Fig. 45. Primary screening for novel physiologically active substance in GBM cells (Sample numbers $\#145\sim260$). U87MG and T98G cells were treated with 10 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 24 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. Upper row of X-axis, sample numbers. The first lane of each plot is from the vehicle-treated control (DMSO). Middle row of X-axis, viability relative to control (DMSO) in U87MG cells. Bottom row of X-axis, viability relative to control (DMSO) in T98G cells. Y-axis, absorbance at 450 nm (A450) relative to control (DMSO).]

- 78 -

Sample No.: #261~#359 , 64, 66, 70, 73, 77, 84, 93, 94, 95, 113, 119, 120, 123, 127, 139 Orginal stock: 100 mg/ml (stored at -70°C) Diluted stock: 10 mg/ml (stored at -70°C) Final concentration: 50 ug/ml Cells: T98G, U87MG (2E3 cells/0.1ml, 96 well plate) Incubation Time: 72h Assay: WST-8 [EZ-Cytox cell viability assay kit (대일랩서비스)] Detection:A450 (ELISA plate reader, 595 nm reference value)





[Fig. 46. Primary screening for novel physiologically active substance in GBM cells (Sample numbers #261~359). U87MG and T98G cells were treated with 50 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 72 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. Upper row of X-axis, sample numbers. The first lane of each plot is from the vehicle-treated control (DMSO). Middle row of X-axis, viability relative to control (DMSO) in T98G cells. Bottom row of X-axis, viability relative to control (DMSO) in U87MG cells. Y-axis, absorbance at 450 nm (A450) relative to control (DMSO).]

극지연구소

Sample No.: #1~#144 (selected fractions only) Original stock: 100 mg/ml (stored at -70°C) Diluted stock: 10 mg/ml (stored at -70°C) Final concentration: 10 ug/ml Cells: T98G, U87MG (2E3 cells/0.1ml, 96 well plate) Incubation Time: 96 h Assay: WST-8 [EZ-Cytox cell viability assay kit (대일랩서비스)] Detection:A450 (ELISA plate reader, 595 nm reference value)



[Fig. 47. Secondary screening for novel physiologically active substance in GBM cells (Selected samples among sample numbers $\#1\sim144$). T98G or U87MG cells were treated with 10 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 24 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. X-axis, sample numbers. The first lane of each plot is from the vehicle-treated control (c). Y-axis, absorbance at 450 nm (A450) relative to control (c).]





[Fig. 48. Secondary screening for novel physiologically active substance in GBM cells (Selected samples among sample numbers $\#1\sim359$). U87MG or T98G cells were treated with 50 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 72 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. Top row of X-axis, sample numbers. The first lane of each plot is from the vehicle-treated control (DMSO). Middle row of X-axis, viability relative to control (DMSO) in U87MG cells. Bottom row of X-axis, viability relative to control (DMSO) in T98G cells. Y-axis, absorbance at 450 nm (A450) relative to control (DMSO).]



[Fig. 49. Secondary screening for novel physiologically active substance in GBM cells (Selected 44 samples among sample numbers $\#1\sim359$). T98G cells were treated with 10 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 72 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. X-axis, sample numbers. Y-axis, absorbance at 450 nm (A450) relative to control (cell). Note that none of the sample seem to have cytotoxic effect on GBM cell lines when treated alone.]

cell #130 #131 #139 #305 #323 #327 #328 #330 #337 #351

3) APL 세포주에서의 세포독성 효과

APL 세포주인 NB4에 추출물을 단기 처리하여 세포독성을 WST-8 assay로 검정 하였다. 1차 screening (Fig. 50 and 51) 후 가능성이 있는 추출물만 2차 screening을 수행하였으나 (Fig. 52) 특별히 세포독성을 보이는 추출물을 관찰할 수 없었다.







[Fig. 50. Primary screening for novel physiologically active substance in APL cells (Sample numbers $#1\sim120$). NB4 cells were treated with 10 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 24 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. X-axis, sample numbers. The first lane of each plot is from the vehicle-treated control (Vehicle). Y-axis, absorbance at 450 nm (A450).] <2013 Ross Sea Bacteria extract (#121~#359)> Stock: 100 mg/ml, second stock: 10 mg/ml; stored at -70 °C Final conc: 30 ug/ml Cells: NB4 (1 E³ cells / 100 ul) Time: 72 h Cell viability method: WST test Elisa plate reader: 450 nm (595 nm reference value)



[Fig. 51. Primary screening for novel physiologically active substance in APL cells (Sample numbers #121~359). NB4 cells were treated with 30 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 72 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. X-axis, sample numbers. The first lane of each plot is from the vehicle-treated control (Vehicle). Y-axis, absorbance at 450 nm (A450).]

<2013 Ross Sea Bacteria extract> 검정대상: 1차 screening 후 가능성이 있는 40개 시료 Stock: 100 mg/ml, second stock: 10 mg/ml; stored at -70 °C Final conc: 30 ug/ml Cells: NB4 (4 E³ cells / 100 ul) Time: 72 h Cell viability method: WST test Elisa plate reader: 450 nm (595 nm reference value)



[Fig. 52. Secondary screening for novel physiologically active substance in APL cells (Selected 40 samples among sample numbers $\#1\sim359$). NB4 cells were treated with 30 μ g/ml of extracts from 2013 Ross Sea marine microbial samples for 72 h and subjected to cell viability test with WST-8 assay. X-axis, sample numbers. Y-axis, absorbance at 450 nm (A450) relative to control (cell). Note that none of the sample seem to have cytotoxic effect on GBM cell lines when treated alone.]

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구개발목표 달성도

- 가. 최종목표 (5차년도까지 완료 후) 유용 의료용 선도물질(lead compound) 도출 1건 및 정밀활성 기전 규명 특허 3건과 연구 논문 3건을 제시하였다.
- 나. 최종목표의 성격 및 설정근거는 '아이디어 개발'이다.
- 다. 총 연구기간 연구개발 목표 및 달성도

신규로 5차년도가 추가되어 총 연구기간이 증가하였으나, 신규 대사체 부족으로 4차년 도 중반부터 1차 스크리닝을 개시하여, 예상보다 늦어진 일정으로 시간적으로 일정이 너무 촉박하고, 359개 추출물 분획 중 생리활성이 충분히 높은 분획을 확보하지 못하 여 선도물질을 도출하지 못하였다.

또한 기 확보 대사체(M11A salt)의 안정성(stability) 문제로 특허출원과 논문투 고 단계의 결과를 폐기하고, lobarstin으로 대체하여 연구 진행하고 있으며, 4차년도 연 구기간이 7개월로 짧아 기간 내 목표달성이 매우 어려운 상황이다(5차년도 연구기간도 10 개월로 단축되었다).

본 연구과제는 신약개발 과정에서 치료제의 표적을 제시한 기초적인 단계이다.



일련	연차	세 부		달성도
번호	(연도)	연 구 목 표	달 싱 내 용	(%)
1			- APL 세포주의	
			독성모델 및	
	1차 (2012)	세포독성 분석체계 구축	탐색체계 구축	100
			- GBM 세포주의	
			독성모델 및	
			탐색체계 구축	
	1차 (2012)	세포분화 분석체계 구축	- APL 세포주의	100
0			분화모델 및	
			탐색체계 구축	
			- 골모세포주의	
			분화모델 및	
			탐색체계 구축	
		양극해 해양생물 유래 대사체의 정밀활성 규명 극지연극	- 기확보 천연물 유래	100
			대사체(lobarstin)에	
	1 0-5]		의한 GBM의	
3	1,2×F (2012-3)		항암제(TMZ)	
			민감도 제고	
			정밀활성 및 기전	
			규명	
	2,3末 (2013-4)	양극해 해양생물 유래 대사체의 분자적 기전 규명	- 기확보 천연물 유래	95
			대사체(M11A salt,	
			lobarstin)에 의한	
1			APL의	
4			항암제(ATO)	
			민감도 제고	
			정밀활성 및 기전	
			규명	
5	3,4 <i>ā</i> } (2014-5)		- 기확보 천연물 유래	
		양극해 해양생물 유래 대사체의 생리활성 규명	대사체(M11A salt,	
			lobarstin)에 의한	95
			골모세포의 대사조절	
			효과 검정	
6	4,5차 (2015-6)	양극해 해양생물 유래	- 기확보 천연물 유래	
		대사체의 정밀활성의	대사체(lobarstin)에	95
		분자적 기전 규명	의한 GBM의 in	

			vitro 암전이 억제 정밀활성 및 분자적 기전 규명	
7	4,5차 (2015-6)	극지해양생물 유래 신규 대사체 도출	- 4차년도 중후반부터 1차 스크리닝 개시, 2차 스크리닝 완료	80



- 2. 대외 기여도
 - 가. 연구성과
 - (1) 특허

출원 완료 1건과 출원 준비 중인 2건이 있다.

(2) 연구논문

연구논문 게재가 완료된 1건과 연구논문 준비 중인 2건이 있다.

(3) 학회 발표

포스터 발표 3건이 있다.

- 나. 연구성과 증빙자료
 - (1) 특허: 출원 완료(1건, Fig. 53)

로바스틴을 함유하는 뇌암의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용한 뇌암의 치료를 위한 병용요법

Pharmaceutical composition containing lobarstin for preventing or treating brain cancer and combined therapy for treating brain cancer using same

국내출원: 출원번호(10-2012-0118464), 출원일자(2012년10월24일),

공개번호(10-2014-0052396), 공개일자(2014년05월07일)

국제출원: 국제출원번호(PCT/KR2013/009366), 국제출원일(2013년10월21일), 국제공개번호(WO 2014/065545 A1), 국제공개일(2014년05월01일)

Kim, S., Jo, S., Lee, H., Kim, T.U., Kim, I.C., Yim, J.H., and Chung, H. (2013). Lobarstin Enhances Chemosensitivity in Human Glioblastoma T98G Cells. Anticancer research *33*, 5445–5451.

명칭	로바스틴을 함유하는 뇌암의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 이를 이용 한 뇌암의 치료를 위한 병용요법	
출원번호	1020120118464	
출원일자	2012.10.24	
등록번호		
등록일자		
공개번호	10-2014-0052396	
공개일자	2014.05.07	
IPC	A61P 35/00(2006.01);A61K 31/343(2006.01)	
발명자	임정한;김일찬;김덕규;한세종;정희경	
출원인	한국해양과학기술원	
등록권자	한국해양과학기술원	
초록	본 발명은 천연물 유래 대사체 로바스틴의 새로운 용도에 관한 것으로, 더 옥 상세하게는 로바스틴 또는 그의 약학적 허용이 가능한 염을 함유하는 뇌암의 예방 또는 치료용 용도 및 뇌암 치료를 위한 테모콜로마이드와의 병용요법에의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따른 화합물인 로바스틴 (Lobarstin)은 테모콜로마이드 내성 암세포주에 단독 처리 시 세포독성을 보 임을 확인한 바 항암제 내성을 극복할 수 있는 약제로 제조될 수 있으며, 표준치료법의 항암제인 테모콜로마이드와 방용처리 시 세포 사멸이 향진되 는 것으로 확인되는바, 기존 치료법에 대한 병용 치료제로의 개발도 가능한 바 유용하다.	
청구	 하기 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 그의 약제학적으로 허용가능한 염을 유효성분으로 함유하는 뇌암의 예방 또는 치료용 약학 조성물[화학식 11 	

- 특허정보 -

출처: https://tb.kibo.or.kr/ktms/supplyTe/view.do?rbsIdx=110&TECH_NO=KST2015196307

Pharmaceutical composition containing lobarstin for preventing or treating brain cancer and combined therapy for treating brain cancer using same

WO 2014065545 A1

초록

The present invention relates to a novel use of lobarstin which is a metabolite derived from a natural substance. More particularly, the present invention relates to the use of a composition containing lobarstin or a pharmaceutically acceptable salt thereof for preventing or treating brain cancer, and to the use thereof in combined therapy, in conjunction with temozolomide, for treating brain cancer. Since it has been confirmed that cell cytotoxicity is exhibited when a

발행 번호	WO2014065545 A1			
발행 유형	출원			
출원 번호	PCT/KR2013/009366			
공개 날짜	2014년 5월 1일			
출원일	2013년 10월 21일			
우선일 🕜	2012년 10월 24일			
발명자	Joung Han Yim, 9개 더보기 »			
신청자	Korea Institute Of Ocean Science And Technology, 한국해양과학기술원			
특허정보 내보내기	BiBTeX, EndNote, RefMan			
특허 인용 (4), 비특허 인용 (1), 분류 (4), 특허 관련 법적 내용 (4)				
외부 링크: Patentscope, Espacenet				

temozolomide resistant cancer cell line is treated solely with lobarstin, which is a compound according to the present invention, the present invention can be prepared as a drug for overcoming anticancer drug resistance. Further, it has been confirmed that cell death is promoted during combined treatment using lobarstin and temozolomide, which is a cancer drug for standard therapy, and thus, it is possible to develop the present invention as a drug for combined therapy in addition to conventional therapy. Therefore, the present invention is useful.

출처: http://www.google.com/patents/WO2014065545A1?cl=en

[Fig. 53. Patent information. Internet sources are as indicated.]

ANTICANCER RESEARCH 33: 5445-5452 (2013)

Lobarstin Enhances Chemosensitivity in Human Glioblastoma T98G Cells

SOJIN KIM^{1,2,3}, SUNGSIN JO^{3,4}, HONGKI LEE^{3,5}, TAE UE KIM¹, IL-CHAN KIM⁶, JOUNG HAN YIM⁶ and HEEKYOUNG CHUNG^{2,3}

¹Department of Biomedical Laboratory Science, College of Health Science, Yonsei University, Yonseidae-gil, Wonju, Gangwon-do, Republic of Korea;
²Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Seongdong-gu, Seoul, Republic of Korea; ³Hanyang Biomedical Research Institute, Hanyang University, Seongdong-gu, Seoul, Republic of Korea; ⁴Department of Biomedical Science, Graduate School of Biomedical Science and Bioengineering, Hanyang University, Seongdong-gu, Seoul, Republic of Korea; ⁵Department of Biomedical Science, Graduate School, Hanyang University, Seongdong-gu, Seoul, Republic of Korea; ⁶Department of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Korea Institute of Ocean Science and Technology, Yeonsu-gu, Incheon, Republic of Korea

Abstract. Background/Aim: Lobarstin is a metabolite occurring from the Antarctic lichen Stereocaulon alpnum. Human glioblastoma is highly resistant to chemotherapy with temozolomide. Lobarstin was examined for its effect on glioblastoma. Materials and Methods: Temozolomideresistant T98G cells were subjected to toxicity test with temozolomide and/or lobarstin. DNA damage and recovery was assessed by the alkaline comet assay and expression of DNA repair genes was examined by RT-PCR and western blot analysis, Results: Lobarstin alone at 40 uM was toxic against T98G, but had no effect in primary human fibroblasts. Cotreatment of lobarstin with temozolomide yielded enhanced toxicity. Temozolomide-alone or with lobarstin co-treatment gave similar extent of DNA damage. However, the recovery was reduced in co-treated cells. Expression of DNA repair genes, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, poly(ADPribose) polymerase 1 and ligase 3 were reduced in lobarstintreated cells. Conclusion: Enhanced sensitivity to temozolomide by lobarstin co-treatment may be attributed to reduced DNA repair.

Correspondence to: Heekyoung Chung, Ph.D., Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, 222 Wangsimni-ro, Scondong-gu, Seoul, 133-791, Republic of Korea. Tel: +82 222200631, Fax: +82 222202422, e-mail: hc2n@hanyang.ac.kr

Key Words: Lobarstin, glioblastoma, temozolomide, chemosensitivity, DNA repair.

0250-7005/2013 \$2.00+.40

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive form of glioblastoma tumors and is accompanied by extremely poor prognosis, despite standard treatment with surgery, radiation therapy and chemotherapy (1). Better understanding of the disease at the molecular level has prompted the development of novel therapeutic strategies, aiming to enhance responsiveness to standard chemotherapy. Temozolomide (TMZ) is an alkylating agent most frequently used in GBM chemotherapy, that generates various methyl adducts on DNA, among which are at O^6 -guanine, N^7 guanine and N^3 -adenine (2). The cytotoxicity of TMZ is dependent on DNA repair systems, such as mismatch repair (MMR) 06-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) repair and base excision repair (BER). Many agents, including the MGMT inhibitor (3), poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP1) inhibitor (4), ribonucleotide reductase inhibitors (5), anti-epileptic drugs (6, 7), resveratrol (8), rapamycin analogs (9) and cold atmospheric plasma (10), have been reported to enhance sensitivity of TMZ (11). However, further research remains to be performed until usage of these agents at the clinical level.

Several lichen extracts have been used for remedies in folk medicine, and recent research has identified various biological activities of lichen metabolites, including antibiotic, anti-mycobacterial, anti-viral, analgesic, and antipyretic properties (12, 13). We have recently reported isolation of several metabolites from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum* with biological activities (12, 14, 15). In the present study, we report on the effects of lobarstin (15) in GBM T98G cells.

5445

[Fig. 54. Cover page of published research article.]

- (3) 학회 발표: 포스터 발표(3건)
 - 국제 심포지움: The 20th International Symposium on Polar Sciences (ISPS) Korea Polar Research Institute, Incheon, Republic of Korea, May 27-29, 2014 (Fig. 55).
 - 포스터 발표 1: Kim, S., Jo, S., Lee, H., Kim, I.C., Yim, J.H., and Chung, H. (2014) Lobarstin enhances chemosensitivity in human glioblastoma T98G cells (Fig. 56).
 - 포스터 발표 2: Jo, S., Kim, S., Lee, H., Kim, I.C., Yim, J.H., and Chung, H. (2014) Lobarstin induces cell death in acute promylocytic leukemia NB4 cells (Fig. 57).
 - 국제학술대회: International Conference of the Genetics Society of Korea, 2015, Dec 04-05, 2015 (Fig. 58).
 - 포스터 발표 : Kim, S., Lee, Y., Kim, I.C., Yim, J.H., and Chung, H. (2015) Lobarstin inhibits U87MG human glioblastoma cell migration and invasion (Fig. 59).



The 20th International Symposium on Polar Sciences Our Collective Journey to Connect the Past and Future from the Antarctic



[**Fig. 55.** Cover page of Proceeding for the 20th International Symposium on Polar Sciences.]

The 20th International Symposium on Polar Sciences (ISPS) Korea Polar Research Institute, Incheon, Republic of Korea, May 27-29, 2014

LOBARSTIN ENHANCES CHEMOSENSITIVITY IN HUMAN GLIOBLASTOMA T98G CELLS

Sojin Kim^{1,4,*}, Sungsin Jo¹, Hongki Lee^{1,2}, Il-Chan Kim³, Joung Han Yim³ and Heekyoung Chung^{1,4}

¹Hanyang Biomedical Research Institute, Hanyang University, Korea ²Department of Biomedical Science, Hanyang University, Korea ³Department of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Korea ⁴Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Korea

hc2n@hanyang.ac.kr

ABSTRACT

Background/Aim

Lobarstin is a metabolite occurring from the Antarctic lichen Stereocaulon alpinum. Human glioblastoma is highly resistant to chemotherapy with temozolomide. Lobarstin was examined for its effect on glioblastoma.

Materials and Methods

Temozolomide-resistant T98G cells were subjected to toxicity test with temozolomide and/or lobarstin. DNA damage and recovery was assessed by alkaline comet assay and expression of DNA repair genes was examined by RT-PCR and western blot analysis.

Results

Lobarstin alone at 40 µm was toxic against T98G, but had no effect in primary human fibroblasts. Cotreatment of lobarstin with temozolomide yielded enhanced toxicity. Temozolomide-alone or with lobarstin co-treatment gave similar extent of DNA damage. However, the recovery was reduced in cotreated cells. Expression of DNA repair genes, O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase, poly (ADPribose) polymerase 1 and ligase 3 were reduced in lobarstin-treated cells. Conclusion: Our results suggest that enhanced sensitivity to temozolomide by lobarstin co-treatment may be attributed to reduced DNA repair.

115

[**Fig. 56.** Abstract of poster presentation in the Proceeding for the 20th International Symposium on Polar Sciences.]

The 20th International Symposium on Polar Sciences (ISPS) Korea Polar Research Institute, Incheon, Republic of Korea, May 27-29, 2014

LOBARSTIN INDUCES CELL DEATH IN ACUTE PROMYLOCYTIC LEUKEMIA NB4 CELLS

Sungsin Jo^{1,*}, Hongki Lee^{1,2}, Sojin Kim^{1,4}, Il-Chan Kim³, Joung Han Yim³ and Heekyoung Chung^{1,4}

¹Hanyang Biomedical Research Institute, Hanyang University, Korea ²Department of Biomedical Science, Hanyang University, Korea ³Department of Life Sciences, Korea Polar Research Institute, Korea ⁴Department of Pathology, College of Medicine, Hanyang University, Korea

hc2n@hanvang.ac.kr

ABSTRACT

Several lichen metabolites are known to harbor various biological activities including anti-biotic, antimycobacterial, anti-viral and anti-pyretic properties. Recently we have reported that lobarstin, a metabolite isolated from the Antarctic lichen *Stereocaulon alpinum*, acts as a potent anti-cancer agent in human glioblastoma cells (Kim et al., 2013). In the present study, we examined its possible anticancer effect in acute promylocytic leukemia (APL) cells. At 15 µM, lobarstin treatment resulted in reduced cell viability comparable to that of 1 µM arsenic trioxide (ATO) in NB4 cells, but showed no toxic effect in human normal fibroblast cells. Lobarstin or ATO alone induced growth inhibition of NB4 cells, but when treated together more growth inhibition was observed. Combination of lobarstin and ATO synergistically triggered cell death accompanied by accelerated caspases activation. Intriguingly, the amount of PML-RARA oncoprotein, which is a critical target in APL cancer therapy, was reduced upon lobarstin treatment. Enhanced expression of LC3, an autophagic marker, suggests autophagy as a possible molecular mechanism of PML-RARA deagradation. Taken together, our results open the possibility of lobarstin as an effective therapeutic candidate in APL.

Reference

KIM, S., JO, S., LEE, H., KIM, T. U., KIM, I. C., YIM, J. H. & CHUNG, H. 2013. Lobarstin enhances chemosensitivity in human glioblastoma T98G cells. *Anticancer Res*, 33, 5445-51.

116

[**Fig. 57.** Abstract of poster presentation in the Proceeding for the 20th International Symposium on Polar Sciences.]



[Fig. 58. Cover page of Proceeding for the International Conference of the Genetics Society of Korea, 2015.]



[**Fig. 59.** Abstract of poster presentation in the Proceeding for the International Conference of the Genetics Society of Korea, 2015.]

제5장 연구개발결과의 활용계획

1. 연구결과의 활용방안

본 위탁과제의 연구결과로부터 도출한 선도물질 수 있는 기술은 기술발전주기의 개념정립 단계에 해당하는데, 연구단 내 타 연구팀과의 유기적인 공조가 필수적이다. 본 과제 종료 후에도 신약개발을 하려면 별도의 과제로 추진되어야 한다(Fig. 60).

- 2. 기대성과 및 파급효과
 - 가. 기술적 측면

본 위탁과제의 연구결과로부터 도출할 수 있는 기술은 기술발전주기의 개념정립단계에 해당하며, 신약개발의 발견 단계 중 타겟 검증, 선도물질 탐색의 기초, 중개연구에 걸쳐 있다.

나. 경제·산업적 측면

본 위탁과제의 연구결과로부터 도출할 수 있는 기술은 기술발전주기의 개념정립단계에 해당하므로 직접적인 경제적 파급효과는 거의 없으나, 극지생물로부터 신규물질을 활성 탐색을 통해 선도물질을 발굴함으로써 향후 경제성이 있는 항암제 개발을 통한 경제적 효과를 예측할 수 있다.





[Fig. 60. Pipeline for novel drug discovery. Upper panel shows the result of the current project and the bottom panel shows the suggested future plan.]

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. MMP 억제제의 활용

가. 기확보 대사체인 Lobarstin이 MMP2 억제제일 가능성이 있다.

Zymography 시 lobarstin 처리 세포 배양액에서 MMP2 활성이 낮아지는 결과를 얻었는 데, 이는 Lobarstin이 세포 내로 침투하여 MMP2의 발현을 억제하여 결과적으로 MMP2 활성이 낮아지는 결과를 얻은 것일 수 있거나, Lobarstin이 직접적으로 MMP2의 활성을 낮출 가능성도 있다. 특히 후자는 GBM 세포주의 배양액에 Lobarstin을 혼합한 후 바로 zymography 실험을 수행했을 때 활성이 낮아지는 결과를 얻어(data not shown) 가능성 이 있다고 사료된다. 이와 같은 가능성은 in vitro MMP assay를 통해 가능성을 확인하 고 MMP에 대한 특이성도 검정 가능하다. 이 때 MMP inhibitor profiling kit (Enzo Life)를 활용하면 된다.

나. MMP 억제제 개발의 목적

암전이 억제효과를 기대하고 다수의 연구자들이 연구를 수행하고 있으나 지금껏 성공한 임상시험은 전무한 상황이다. 이와 같은 내용이 포함된 연구개발 과정에서 수집한 해외 과학기술정보로 Fig. 61의 중요문헌[28]이 있으며, MMP 억제제의 개발이 있어 신중한 접근이 필요할 것으로 생각된다.



Nat Rev Drug Discov. 2014 Dec;13(12):904-27. doi: 10.1038/nrd4390.

Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition?

Roosmarijn E. Vandenbroucke^{1,2} and Claude Libert^{1,2}

Abstract | Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent endopeptidases that form a family of 24 members in mammals. Evidence of the pathological roles of MMPs in various diseases, combined with their druggability, has made them attractive therapeutic targets. Initial drug discovery efforts focused on the roles of MMPs in cancer progression, and more than 50 MMP inhibitors have been investigated in clinical trials in various cancers. However, all of these trials failed. Reasons for failure include the lack of inhibitor specificity and insufficient knowledge about the complexity of the disease biology. MMPs are also known to be involved in several inflammatory processes, and there are new therapeutic opportunities for MMP inhibitors to treat such diseases. In this Review, we discuss the recent advances made in understanding the role of MMPs in inflammatory diseases and the therapeutic potential of MMP inhibition in those conditions.



[Fig. 61. Recent review article arguing the research aiming to develop therapy based on MMP inhibition.]

2. 골모세포 연구의 어려움

본 연구과제에서 사용한 실험체계로 생쥐 두개골 유래한 전골모세포인 MC3T3-E1을 사용 했는데, 이 세포주는 in vitro에서 골모세포로 분화 가능하다[29]. 분화유도 신호는 bone morphogenic protein (BMP), 부갑상샘호르몬 (parathyroid hormone, PTH), 성장호르몬 (growth hormone, GH), 인슐린유사성장인자 (insulin-like growth factor, IGF), 아스코르빈 산 (ascorbic acid) 등으로 다양한데[29], immortalized cell line인 MC3T3-E1은 암세포 유래 세포주 대비 세포증식 속도가 훨씬 느려서 실험 수행의 어려움이 있다. 연구개발 과정에서 수집한 해외과학기술정보로 Fig. 62 and 63의 중요문헌이 있는데, osteosarcoma 역시 osteoblast와 기원이 같다는 내용이다[30, 31]. 인간유래 세포주이면서 세포증식 속도가 월등 히 빠른 골육종 유래 세포주를 이용한 연구를 병행하여 세포분화, 대사조절, 세포독성 등을 연구할 수 있을 것으로 예상된다.



Bone 62 (2014) 56-63



[Fig. 62. Review article on the cell origin of osteosarcoma[30].]

Anticancer Agents Med Chem. 2015;15(7):881-7.

RUNX2 and Osteosarcoma

Author(s): Na Li, Dongwei Luo, Xiaoxia Hu, Wei Luo, Guanghua Lei, Qian Wang, Ting Zhu, Junxia Gu, Yaojuan Lu and Qiping Zheng

Affiliation: Department of Hematology and Hematological Laboratory Science, Jiangsu Key Laboratory of Medical Science and Laboratory Medicine, School of Medicine, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China.



cell cycle controlling of (pre)-osteoblasts, which subsequently convert to OS cells. The roles and mechanisms of RUNX2 during OS metastasis and bone metastasis in target cancers (herein prostate and breast cancers), were as described. The potential involvement of Runx2 in multiple mouse OS models that use human OS cell lines (Xenografts), tumor suppressor genes p53 and Rb1 were also discussed. Finally, we updated some microRNAs studies and their relation with RUNX2 in OS pathogenesis. This review provides a comprehensive understanding of RUNX2's function during OS pathogenesis and will help with the research designing and strategy in controlling OS.

[Fig. 63. Review article on Runx2, the master regulatory protein of osteoblastic differentiation, and osteosarcoma[31].]

제7장 참고문헌

- 1. Ashburn, T.T. and K.B. Thor, *Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs.* Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(8): p. 673-83.
- Oprea, T.I. and J. Mestres, Drug repurposing: far beyond new targets for old drugs. AAPS J, 2012. 14(4): p. 759-63.
- 3. 이탁순. '0상' 임상시험 기준 마련…비용·시간 절감. DailyPharm 2010 2010.03.30; Available from: http://www.dailypharm.com/Users/News/SendNewsPrint.html?mode=print&ID=12 4100.
- Wen, P.Y. and S. Kesari, *Malignant gliomas in adults*. N Engl J Med, 2008. 359(5): p. 492-507.
- Patel, M., et al., Molecular targeted therapy in recurrent glioblastoma: current challenges and future directions. Expert Opin Investig Drugs, 2012. 21(9): p. 1247-66.
- Bobola, M.S., et al., Role of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in resistance of human brain tumor cell lines to the clinically relevant methylating agents temozolomide and streptozotocin. Clin Cancer Res, 1996. 2(4): p. 735-41.
- Kanu, O.O., et al., *Glioblastoma multiforme: a review of therapeutic targets.* Expert Opin Ther Targets, 2009. 13(6): p. 701-18.
- 8. Zhang, X., et al., *Glioblastoma multiforme: Molecular characterization and current treatment strategy (Review).* Exp Ther Med, 2012. **3**(1): p. 9-14.
- Dell'Albani, P., Stem cell markers in gliomas. Neurochem Res, 2008. 33(12): p. 2407-15.
- Binda, E., et al., The EphA2 receptor drives self-renewal and tumorigenicity in stem-like tumor-propagating cells from human glioblastomas. Cancer Cell, 2012. 22(6): p. 765-80.
- Tallman, M.S. and J.K. Altman, *Curative strategies in acute promyelocytic leukemia*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2008: p. 391-9.
- 12. Huang, M.E., et al., Use of all-trans retinoic acid in the treatment of acute promyelocytic leukemia. Blood, 1988. **72**(2): p. 567-72.
- Wang, Z.Y. and Z. Chen, Differentiation and apoptosis induction therapy in acute promyelocytic leukaemia. Lancet Oncol, 2000. 1: p. 101-6.
- Patatanian, E. and D.F. Thompson, *Retinoic acid syndrome: a review.* J Clin Pharm Ther, 2008. 33(4): p. 331-8.
- 15. Wang, J., et al., Retinoid-induced G1 arrest and differentiation activation are

associated with a switch to cyclin-dependent kinase-activating kinase hypophosphorylation of retinoic acid receptor alpha. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43369-76.

- Soignet, S.L., et al., Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. N Engl J Med, 1998. 339(19): p. 1341-8.
- 17. Ferron, M., et al., *Insulin signaling in osteoblasts integrates bone remodeling* and energy metabolism. Cell, 2010. **142**(2): p. 296-308.
- Caetano-Lopes, J., H. Canhao, and J.E. Fonseca, Osteoblasts and bone formation. Acta Reumatol Port, 2007. 32(2): p. 103-10.
- Clarke, B., Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol, 2008. 3 Suppl 3: p. S131-9.
- de Vernejoul, M.C., Dynamics of bone remodelling: biochemical and pathophysiological basis. Eur J Clin Chem Clin Biochem, 1996. 34(9): p. 729-34.
- 21. Duplomb, L., et al., *Concise review: embryonic stem cells: a new tool to study osteoblast and osteoclast differentiation.* Stem Cells, 2007. **25**(3): p. 544-52.
- 22. Crockett, J.C., et al., *Bone remodelling at a glance.* J Cell Sci, 2011. **124**(Pt 7): p. 991-8.
- 23. Vashishth, D., *The role of the collagen matrix in skeletal fragility.* Curr Osteoporos Rep, 2007. **5**(2): p. 62-6.
- Warriner, A.H. and K.G. Saag, Osteoporosis diagnosis and medical treatment.
 Orthop Clin North Am, 2013. 44(2): p. 125-35.
- Mueller, S.C., Y. Yeh, and W.T. Chen, *Tyrosine phosphorylation of membrane proteins mediates cellular invasion by transformed cells.* J Cell Biol, 1992. 119(5): p. 1309-25.
- Berdeaux, R.L., et al., Active Rho is localized to podosomes induced by oncogenic Src and is required for their assembly and function. J Cell Biol, 2004. 166(3): p. 317-23.
- Diaz, B., et al., Notch increases the shedding of HB-EGF by ADAM12 to potentiate invadopodia formation in hypoxia. J Cell Biol, 2013. 201(2): p. 279-92.
- 28. Vandenbroucke, R.E. and C. Libert, *Is there new hope for therapeutic matrix metalloproteinase inhibition?* Nat Rev Drug Discov, 2014. **13**(12): p. 904-27.
- Darvin, P., Y.H. Joung, and Y.M. Yang, JAK2-STAT5B pathway and osteoblast differentiation. JAKSTAT, 2013. 2(4): p. e24931.
- Mutsaers, A.J. and C.R. Walkley, Cells of origin in osteosarcoma: mesenchymal stem cells or osteoblast committed cells? Bone, 2014. 62: p. 56-63.
- Li, N., et al., *RUNX2 and Osteosarcoma*. Anticancer Agents Med Chem, 2015.
 15(7): p. 881-7.



