

Bio-Field Pioneer **"Komipharm"**
Make an value with customer!



Investor Relations 2019

KOMIPHARM International Co., Ltd.
New Leader of Bio-industry

New Product Development for Human Health

2019년 3월 27일(수) 15:30



(주) 코미팜
Komipharm International Co., Ltd.

유의사항

본 자료는 (주)코미팜 기관투자자 및 일반투자자들을 대상으로 하는 기업설명회에서 실시되는 Presentation에서 정보제공을 목적으로 (주)코미팜에 의해 작성되었으며, 이의 반출, 복사 또는 타인에 대한 재배포는 금지됨을 알려드립니다.

본 Presentation에서의 참석은 위와 같은 제한 사항의 준수에 대한 동의로 간주될 것이며 제한 사항에 대한 위반은 관련 증권 거래 법률에 대한 위반에 해당될 수 있음을 유념해주시기 바랍니다.

본 자료에 포함된 "예측정보"는 개별 확인 절차를 거치지 않은 정보들입니다. 이는 과거가 아닌 미래의 사건과 관계된 사항으로 회사의 향후 예상되는 경영현황 및 재무실적을 의미하고, 표현상으로는 "예상", "전망", "계획", "기대", "(E)" 등과 같은 단어를 포함합니다.

위 "예측정보"는 향후 경영 환경의 변화 등에 따라 영향을 받으며, 본질적으로 불확실성을 내포하고 있는 바, 이러한 불확실성으로 인하여 실제 미래 실적은 "예측정보"에 기재되거나 암시된 내용과 중대한 차이가 발생할 수 있습니다. 또한, 향후 전망은 Presentation실시일 현재를 기준으로 작성된 것이며 현재 시장상황과 회사의 경영방향 등을 고려한 것으로 향후 시장 환경의 변화와 전략수정 등에 따라 변경될 수 있으며, 별도의 고지 없이 변경될 수 있음을 양지하시기 바랍니다.

본 자료의 활용으로 인해 발생하는 손실에 대하여 회사 및 각 계열사, 자문역 또는 Representative들은 어떠한 책임도 부담하지 않음을 알려드립니다.(과실 및 기타의 경우 포함)

본 자료는 어떤 경우에도 투자자의 투자결과에 대한 법적 책임 소재의 입증자료로써 사용될 수 없습니다.

I. Our Company

인류 삶에 공헌
하는
글로벌 제약
기업으로 도약

(주)코미팜은 1972년 설립되어, 현재 동물의약품 백신제품을 세계 35개국에 수출하고 있으며, 지난 13년에 걸쳐 암성통증 진통제/항암제 신약 '코미녹스'를 개발, 국내외 암환자를 대상으로 임상시험 중에 있습니다.

회사소개

1. 회사개요

설립일	1972년 9월 (각자대표이사: 양용진, 문성철)
자본금	5,532백만원
종업원현황	174명
자기자본금	97,986백만원
기업공개일	2001년 10월 (KOSDAQ 등록)
본사소재지	경기도 시흥시 정왕동(시화산업단지 內)
해외자회사	Komipharm International America, Inc(미국) Komipharm International Australia PTY LTD(호주)
보유특허	국내14건(항암제3건, 백신11건) 해외15건(항암제 및 암성통증11건, 백신4건)-해외관계회사포함

2. 사업분야

동물용 의약사업부	■ 백 신 ■ 치료제 ■ 수산제 ■ 질병진단
인체용 의약사업부	■ 여러암의 전이암치료제 ■ 마약성대체 암성통증치료제 ■ 교모세포종 치료제 ■ 난소암 치료제 ■ 쓸개암 치료제 ■ 다발성골수종 치료제 ■ 전립선암 치료제

3. 코미팜 사업장 전경



본사 및 제1시흥공장



제2예산공장



제3오송공장

4. 성장과정

“동물용 의약품 line-up으로 지속 성장 및

신약개발에 의한 신성장 동력 확보”



5. 동물용 의약품사업의 해외 수출현황

“동물용 의약품의 해외시장 진출 확대”



“2018년 현재 35개 국가 진출 완료”



II. New Product Development for Human Health

1. 신약(PAX-1, KML001)개발의 개요

배경

“ 인간과 동물, 모든 생명의 공존을 위한 연구개발”

코미팜은 오래 전부터 연구목적의 동물사육사를 보유하고 있습니다. 동물사육사에서는 마우스, 랫트, 닭, 개, 돼지 등을 직접 사육하면서 연구원들이 수시로 항체검사를 비롯하여 여러 가지 검사와 연구를 함께 진행하여 왔습니다.

현재 연 매출액이 수백억 달러에 이르는 글로벌 제약사인 바이엘, 화이자, 베링거인겔하임 등도 당사와 같은 동물용 의약품분야의 사업을 영위하고 있으며, 이는 인체 의약품 개발을 위한 밑거름이 되어 왔습니다.

이러한 과정에서 당사는 여러 가지 신 물질을 동물에 투여하면서 신약개발을 시도하게 되었습니다.

코미팜은 인간과 동물, 모든 생명의 공존을 위한 연구개발을 통해서 세계적 글로벌 제약기업이 되는 것입니다.

이러한 목표를 달성하기 위해서 지난 10년 동안 인체의약품 연구개발에 전력을 다하고 있습니다.

비소[Arsenic]에 대한 진실

“ 비소[Arsenic]는 포유류에 필수적인 원소”

필수원소	■ 자연계(지구)에 존재하는 원소는 총 92종으로 이 중 비소를 포함한 28개의 원소는 우리 몸에 없어서는 안 되는 필수 원소이다.
필수원소의 판단요건 및 결핍시 발생증상	■ 원소 결핍이 생리적 기능 장애로 이어진다. ■ 이 때 원소를 보충해주면 기능장애가 개선된다. ■ 생리적 기능을 생화학적으로 설명할 수 있다.

보도자료

동아사이언스

2014년6월9일

“ 우리 몸에 없어서는 안 될 28가지 원소는?”

얼마 전 원자번호(원자핵 양성자 숫자) 117인 원소를 만들었다는 연구결과가 ‘피지컬리뷰레터스’에 실리며 주기율표 식구가 하나 더 늘어나는 게 확실시되고 있지만(국제순수응용물리화학연합의 승인만 남았다), 사실 이런 ‘합성’ 원소들은 수명이 무척 짧은, 실재할 수 있다는 걸 보여주는데 의의가 있는, ‘덧

그렇다면 이 92가지 원소 가운데 우리 몸을 이루는데 필요한 건 몇 가지나 될까. 물론 보통 사람들 몸을 ‘분석’ 하면 대략 60여 가지 원소가 검출된다고 하지만, 존재한다고 해서 꼭 필요한 건 아니다. 납이나 카드뮴처럼 우리 몸을 ‘오염’ 시켜 문제(중독)를 일으키는 원소도 있다. 따라서 어떤 원소가 우리의 생존에 필요한 것인가를 판단하려면 아래의 ‘기준’을 충족시키는지 알아봐야 한다.

- | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|----|-----|----|-----|-----|
| H | | | | | | | | | | | | | | | | | He | |
| Li | Be | | | | | | | | | | | B | C | N | O | F | Ne | |
| Na | Mg | | | | | | | | | | | Al | Si | P | S | Cl | Ar | |
| K | Ca | Sc | Ti | V | Cr | Mn | Fe | Co | Ni | Cu | Zn | Ga | Ge | As | Se | Br | Kr | |
| Rb | Sr | Y | Zr | Nb | Mo | Tc | Ru | Rh | Pd | Ag | Cd | In | Sn | Sb | Te | I | Xe | |
| Cs | Ba | * | Lu | Hf | Ta | W | Re | Os | Ir | Pt | Au | Hg | Tl | Pb | Bi | Po | At | Rn |
| Fr | Ra | ** | Lr | Rf | Db | Sg | Bh | Hs | Mt | Ds | Rg | Cn | Uut | Fl | Uup | Ly | Uus | Uuo |

The four organic basic elements	Quantity elements	Essential trace elements	Function suggested from active identified biochemical function
---------------------------------	-------------------	--------------------------	--

“ 여러암의 전이암 치료제 ” + “ 마약성 진통제 저감 및 대체 통증치료제 ” +
 “ 뇌암의 교모세포종 치료제 ” + “ 난소암 치료제 ” + “ 쓸개암 치료제 ” +
 “ 다발성 골수종 치료제 ” + “ 전립선암 치료제 ”

5

경구용으로 병원에 입원할 필요 없이 홈헬스케어(Health care homes)가 가능한 신약

전이암 치료제 + 원발성암 치료제 + 마약성진통제 대체 통증치료제
한 가지 약으로 모든 치료를 함으로써 국가 및 국민의 의료비 절감에 기여하는 신약

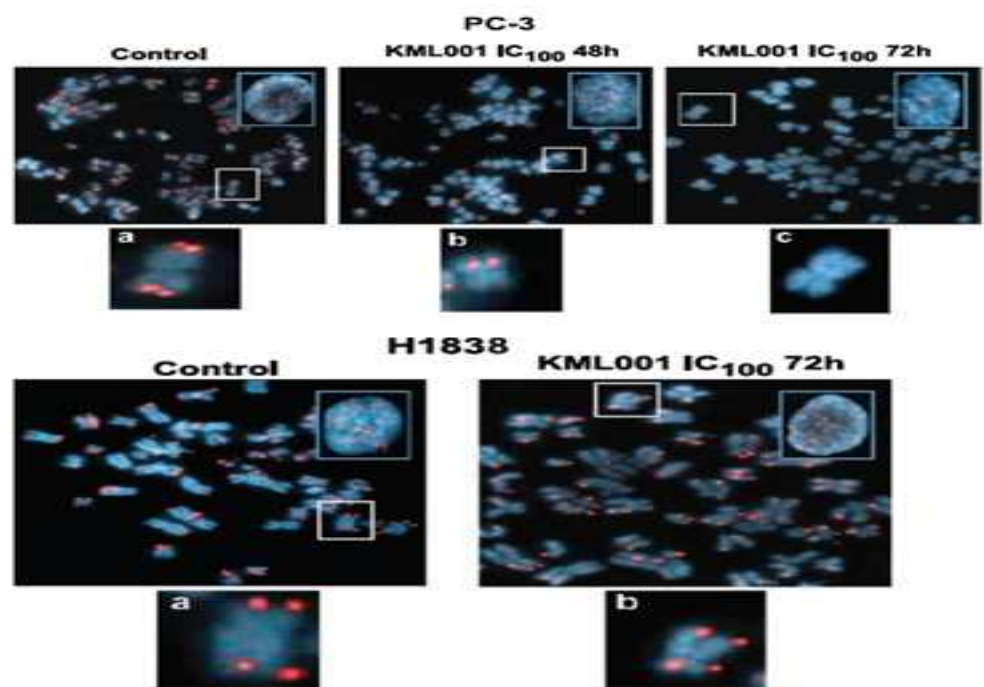
2. 신약개발(PAX-1, KML001, 상품명: KOMINOX)의 메커니즘

항암 및 통증치료 기전

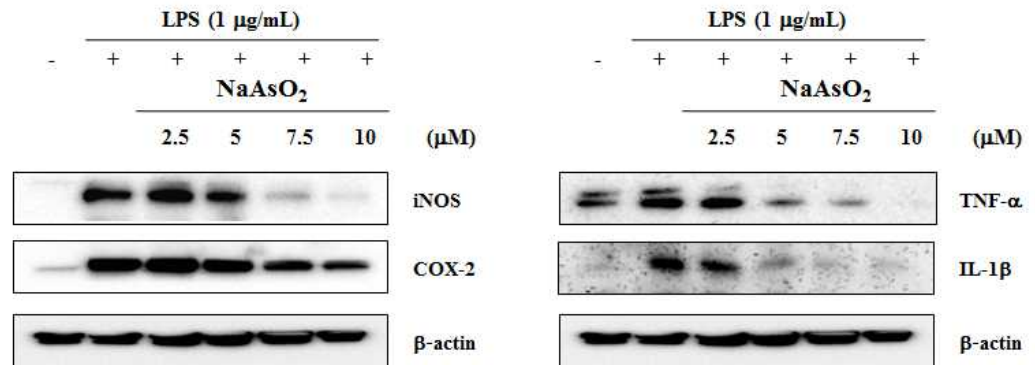
암세포의 텔로미어(Telomere)라는 증식인자를 녹이는 기전을 갖고 있다.
암세포의 텔로미어(Telomere)와 정상세포의 텔로미어는 차이가 존재하여
정상세포에는 부정적인 영향을 미치지 않는다.
전이된 암세포의 텔로미어(Telomere) 길이는 원발성 암세포의 길이보다 짧다.
PAX-1(KOMINOX)는 텔로미어(Telomer)가 짧으면 짧을수록 암세포 사멸에
효과적으로 작용하므로 전이암 치료에 매우 효과적이다. 전이암 세포는 원발성
암세포의 변이로 전이암 세포로 생성이 되어 20~30배 강하다.
통증기전에는 유전자 염증의 생성을 근원적으로 억제하여 통증의 근원을 없애 주는
기전을 갖고 있다.

항암작용 기전

Telomere erosion

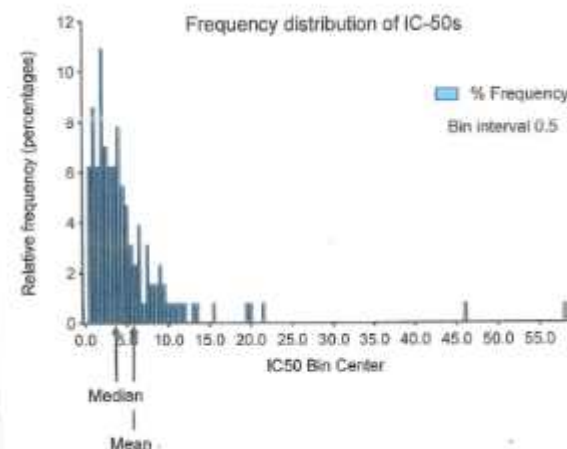
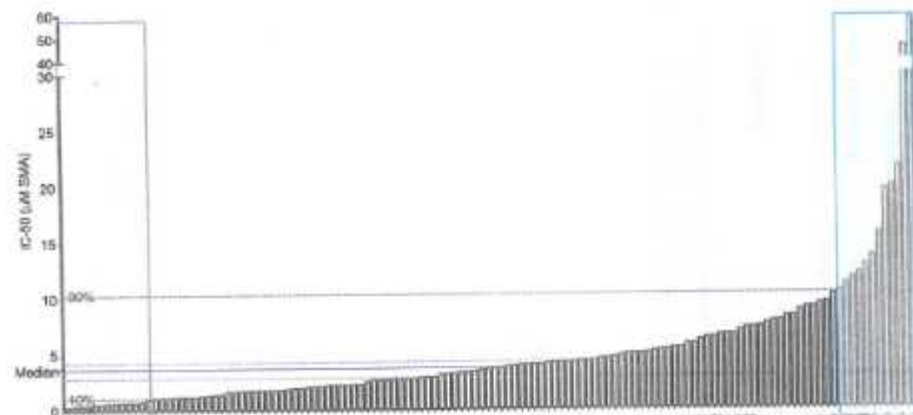


Anti-inflammation pro-inflammatory cytokines 과 signal transduction 조절



호주의 국영연구
기관에서 Nano-
Technology
Testing 방식으로
신약(PAX-1,
KML001)의
항암효과 측정을
위하여 실시한
200여개의 암세포
사멸실험 결과

Sodium metaarsenite (SMA) activity in vitro IC-50 range from 0.4 μM to 57.9 μM



Nano-Technology Testing 결과 설명

발생빈도수 기준으로 200여개의 암세포를 선정하여 특수 장비에서 신약(PAX-1, KML001)을 암세포 개별로 0.1 μ m부터 57.9 μ m 용량으로 접촉을 시킨 후 4시간 간격으로 영상을 촬영하면서 항암효과를 측정하였음.
(전임상에서의 항암효과 측정 방식으로는 가장 최선의 방법임)

암세포 사멸효과 예상 용량은 10 μ m 이하로 잠정 결정되었음.
200여개의 암세포중 90% (180여개)가 신약(PAX-1, KML001)으로 개발 할 가능성을 보여주고 있음.

5 μ m 미만에서 반응하는 암세포에서는 저 용량(7.5mg/day) 5 μ m이상 10 μ m이하에서 반응하는 암세포에서는 평균용량(10~15mg/day)으로 치료 가능성을 보여주고 있음.

향 후 본 실험결과를 참고하여 신약개발의 방향을 정할 것임.

한 가지 물질로 90% 종류의 암세포들을 사멸시킨다는 것은 믿기 어려울 것이나 이는 과학적으로 입증된 것임.

3. 신약(PAX-1, KML001) 작용기전 논문

논문개요

KML001은 전립선 암세포 속의 텔로미어 서열에 결합하여 텔로미어를 손상시킴으로써, 세포 사멸을 유도한다.

포니마 파텍¹, 황핑 대², 멜로디 버틀러⁴, MP 난다쿠머³, 피터 L. 게티레즈³, 마틴 J. 에델만³, 한스 헨드릭스⁵, 안젤리카 M 버거^{1,3}

저자의 소속기관 :

- 1,2.미국 메릴랜드대학, 세포유전학 연구소, 약리학, 실험치료학, 병리학부
3. 미국, 메릴랜드, 발티모어, 메릴랜드 의과대학, 말린 스튜어트 그린바움 암 센터
4. 독일, 프라이버그, 프라이버그대학, 해부세포생물학 연구소
5. 네덜란드, 퍼머랜드, 헨드릭스 약제 컨설팅

연구비 지원(Grant Support) : (주)코미팜, 한국

알림(Note) : 이 논문의 보충 자료(data)는 임상암연구지(Clinical Cancer Research)의 인터넷 사이트에서 얻을 수 있음.

KML001 Cytotoxic Activity Is Associated with Its Binding to Telomeric Sequences and Telomere Erosion in Prostate Cancer Cells

Pornima Phatak,¹ Fangping Dai,⁴ Melody Butler,² M.P. Nandakumar,³ Peter L. Gutierrez,³ Martin J. Edelman,³ Hans Hendriks,⁵ and Angelika M. Burger^{1,3}

Abstract **Purpose:** KML001 (sodium metaarsenite) is an orally bioavailable arsenic compound that has entered phase I/II clinical trials in prostate cancer. In this study, we elucidated the mode of action of KML001 and investigated its effects on telomerase and telomeres. **Experimental Design:** We compared telomere length to KML001 cytotoxic activity in a panel of human solid tumor cell lines. Duration of exposure and concentrations of KML001 that affect telomerase and telomeres were evaluated in relation to established mechanisms of arsenite action such as reactive oxygen species-related DNA damage induction. Binding of KML001 to telomeres was assessed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. **Results:** We established a significant inverse correlation ($r^2 = 0.9$) between telomere length and cytotoxicity. KML001 exhibited activity in tumor cells with short telomeres at concentrations that can be achieved in serum of patients. We found that telomerase is not directly inhibited by KML001. Instead, KML001 specifically binds to telomeric sequences at a ratio of one molecule per three TTAGGG repeats leading to translocation of the telomerase catalytic subunit into the cytoplasm. In prostate cancer cells with short telomeres, KML001 caused telomere-associated DNA damage signaling as shown by γ -H2AX induction and chromatin immunoprecipitation assays as well as a rapid telomere erosion shown by metaphase fluorescence *in situ* hybridization. These effects were not seen in a lung cancer cell line with long telomeres. Importantly, arsenification of telomeres preceded DNA lesions caused by reactive oxygen species production. **Conclusions:** Sodium metaarsenite is a telomere targeting agent and should be explored for the treatment of tumors with short telomeres.

Arsenic-based pharmaceuticals have been used in traditional medicine for centuries. Because of the successful use of arsenic trioxide (As_2O_3) for the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL) in China, arsenicals are experiencing a revival in modern cancer medicine (1–3). Arsenic exists in trivalent and pentavalent oxidation states as chemically unstable sulfide or oxide or as a salt of sodium, potassium, or calcium. Trivalent arsenicals, including sodium metaarsenite ($NaAsO_2$) and

arsenic trioxide, inhibit many enzymes by reacting with biological ligands that possess available sulfur groups (1, 2, 4, 5). Despite many medical uses, chronic exposure to arsenic has been associated with an increased incidence in cancers of the skin, lung, bladder, liver, and kidney in humans (6). However, the treatment of APL patients with arsenic trioxide is generally well tolerated and shows neither bone marrow depression nor other severe clinical side effects. Moreover, no increase in the incidence of secondary malignancies has been observed with up to 10 years of follow-up in APL patients who received arsenic trioxide in the initial studies. It is clear that the use of arsenite for anticancer therapy is safe and effective in both short-term and long-term (3, 7).

In vitro and *in vivo* studies have shown that arsenicals cause chromosome abnormalities, including an increase in the frequency of micronuclei, sister chromatid exchanges, chromosome aberrations, and gene amplification. The compounds have also been reported to induce DNA and chromosome damage, inhibit DNA repair, and modulate DNA methylation in mammalian cells (8–10). It has been suggested that the latter effects are a result of the generation of reactive oxygen species (ROS; ref. 11).

Recent studies, however, have shown that arsenic trioxide can alter telomere length (12), telomerase activity (13), and telomere binding proteins (14), indicating that the telomere/telomerase complex might be a direct target of arsenic trioxide.

Authors' Affiliations: Departments of ¹Pharmacology and Experimental Therapeutics and ²Pathology, Cyto genetics Laboratory, University of Maryland; ³Marlene and Stewart Greenebaum Cancer Center, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland; ⁴Institute of Anatomy and Cell Biology, University of Freiburg, Freiburg, Germany; and ⁵Hendriks Pharmaceutical Consulting, Purmerend, The Netherlands

Received 10/6/07; revised 1/2/08; accepted 1/17/08.

Grant support: Kompham International Co. Ltd., Korea.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Note: Supplementary data for this article are available at Clinical Cancer Research Online (<http://clincancerres.aacrjournals.org/>).

Requests for reprints: Angelika M. Burger, Marlene and Stewart Greenebaum Cancer Center, University of Maryland School of Medicine, Bressler Research Building, Room 9-039, 655 West Baltimore Street, Baltimore, MD 21201. Phone: 410-328-3914; Fax: 410-328-6558; E-mail: aburger@som.umaryland.edu.

© 2008 American Association for Cancer Research.
doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-4572

In a telomerase RNA component knockout mouse model, arsenic-induced "oxidative stress" promoted telomere attrition, chromosome end-to-end fusion, and apoptotic cell death (15).

Arsenic has also been found to be a potent inhibitor of the transcription of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT). This effect appears at doses comparable with or lower than those clinically achievable. The effect may result from a diminished level or function of two transcription factors, c-Myc and Sp1, which are both important for hTERT expression (9).

KML001, sodium metaarsenite, is an orally bioavailable, water-soluble, trivalent arsenical. KML001 has shown potent cytotoxic activity in solid human tumor cell lines and xenografts and is currently undergoing phase I/II clinical trials for the treatment of human prostate cancer (ref. 16 and investigators' brochure). Although little is known about the mechanism(s) of action of KML001, in a study involving both KML001 and arsenic trioxide no major differences were seen with respect to growth inhibition of leukemia cell lines and in assays assessing the induction of apoptosis or effects on hTERT transcription. It was observed that the induction of apoptosis was accompanied by down-regulation of hTERT mRNA in leukemia (17).

In this article, we report the effects of KML001 on telomerase enzyme activity and hTERT expression at the mRNA and protein levels as well as on telomeres and telomeric sequences. In a panel of solid cancer cell lines, we compared telomere length to the sensitivity of the cells to KML001. By using KML001-responsive prostate cancer cells, we carefully examined the dose levels and the time course/sequence at which these effects occurred and correlated them to that of established mechanisms of arsenite action such as oxidative stress induction. Our results indicate that telomerase activity is not directly inhibited by KML001 and that ROS production is not the cause of telomere erosion; instead, our data suggest that KML001 blocks the replication of telomeric repeats and induces rapid telomere loss through direct telomere binding.

Materials and Methods

Cell culture and drugs. Human prostate (PC-3 and DU145), colon (HT29), lung (H1838), and human breast cell lines (MCF7 parental) were purchased from the American Type Culture Collection. The ovarian cancer lines A2780 and A2780ds (cisplatin-resistant) were from the European Collection of Cell Cultures; the osteosarcoma cell line Saos-2 and the human embryonic kidney cells HEK293T were kind gifts from Dr. Arun Seth (Sunnybrook Health Sciences Centre). MCF7 stably transfected with an empty green fluorescent protein reporter gene vector (MCF7 wt hTERT) and with this vector expressing mt hTERT (dominant-negative hTERT⁺) were generated as reported previously (18). Cells were grown under standard conditions (5% CO₂, 37°C, humidified atmosphere) in their respective recommended medium such as RPMI 1640 or DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% FCS (Hyclone) and passaged routinely. Stably transfected MCF7 were kept under G418 selection (800 µg/mL; Calbiochem).

KML001 (sodium metaarsenite; Kominox) was obtained from Komipharm International. 50 mmol/L drug stocks were prepared in PBS, and aliquots were stored at -20°C. The stock solutions were stable for >1 year. Working concentrations were freshly prepared daily by diluting the stock with complete RPMI 1640.

In vitro cytotoxicity assay. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma) assay was used to measure KML001 effects on cancer cell proliferation following the procedure as described by Alley et al. (19). In brief, 2,000 cells per well were seeded

into 96-well plates (Nunc) in complete medium and cells were allowed to attach overnight at 37°C in 5% CO₂. Drug was added in final concentrations ranging between 0.001 and 100 µmol/L in replicates of 8. Assays were terminated after 5 days of continuous exposure to drug by adding 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide. The resulting purple formazan was measured at 550 nm using a Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader and KC4 software (Bio-Tek). Growth inhibition was assessed as inhibitory concentration 50% (IC₅₀) and 100% (IC₁₀₀) compared with vehicle-treated controls and relative to cell growth at the time of drug addition (day 0). Three independent experiments were done.

Mean telomere restriction fragment length. The Roche Diagnostics TeloTAGG telomere restriction fragment (TRF) length kit was used according to the manufacturer's instructions (Roche) and as described by us before (19). TRF length in tumor cell lines was compared to the *in vitro* cytotoxic activity of KML001 by using the Spearman rank coefficient test (18).

Telomeric repeat amplification protocol assay. Telomerase enzyme activity was measured by telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay in cell extracts treated with KML001 *in situ* at concentrations ranging from 0.1 to 20.0 µmol/L and in cell lysates of cells that were treated with KML001 at IC₅₀ and IC₁₀₀ concentrations for 8 and 24 h, respectively. For the TRAP assay, the TeloTAGG Telomerase PCR ELISA kit (Roche Diagnostics) was used as reported previously (20). The TRAPeze kit (Intergen) was employed to measure KML001 *in situ* effects on PC-3 cell lysates. Total cellular protein (250 ng) was used for each PCR. The PCR products were separated on a SDS PAGE gel as described (20).

Quantitative hTERT real-time PCR. Total RNA was extracted from cells treated for 8 and 24 h with IC₅₀ and IC₁₀₀ concentrations of KML001 and vehicle control (PBS) by using the Qiagen RNeasy mini kit (Qiagen). Quantitative detection of hTERT mRNA was done with the commercially available LightCycler TeloTAGG hTERT Quantification kit (Roche Diagnostics) using the LightCycler instrument (Roche Molecular Systems). The real-time procedure was essentially done according to the manufacturer's instructions: hTERT-encoding mRNA was first reverse transcribed (10 min at 60°C) followed by denaturation (30 s at 95°C) and amplification of a 198-bp fragment of the generated cDNA in 40 PCR cycles (0.5 s at 95°C, 10 s at 60°C, and 10 s at 72°C) with specific primers in a one-step real-time PCR. PCR was done with 100 ng/µL total RNA using primers for hTERT and primers for the housekeeping gene porphobilinogen deaminase. The porphobilinogen deaminase reaction product served as a control for real-time PCR and as a reference for normalization and relative quantification of hTERT mRNA. To establish an external standard curve, all experiments included five standards with *in vitro* transcribed hTERT mRNA containing 10⁶ to 10² copies as well as total RNA purified from a hTERT mRNA-expressing cell line supplied by the detection kit. Nuclease-free water without template was employed as negative control. Results were expressed as hTERT copy number relative to porphobilinogen deaminase.

Immunofluorescence and immunoblotting. The phosphorylated histone 2AX (γ-H2AX; Ser¹³⁹) antibody was purchased from Upstate, anti-hTERT was purchased from Novacastra, and anti-8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-oxo-dG) was purchased from Trevigen (clone 4E9). All primary antibodies were mouse monoclonal; mouse monoclonal FITC-labeled secondary antibodies were from Sigma. hTERT and γ-H2AX staining was done as described before (21). For 8-oxo-dG staining, the fixed cells were denatured with 4 N HCl for 5 min followed by neutralization in 50 mmol/L Tris for 5 min. After neutralization, cells were blocked for 30 min in 10 mmol/L Tris-HCl with 10% FCS followed by 1-h incubation with primary antibody (1:300 dilutions) and 30-min incubation with secondary antibody (1:100) at room temperature. Slides were washed with PBS and counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI). Photomicrographs were taken at ×63 magnification using a Leica DM4000 microscope and 5.0 Openlab Improvision software to document and quantify signals. Quantification

of γ -H2AX was done by measuring mean fluorescence intensity of the nuclei using a binary layer as a mask. Briefly, the region of interest was drawn around every nucleus in a given field of view to make the binary layer and objects were measured by Boolean operation. At least 100 nuclei per experiment were evaluated. The averages for untreated and treated cells were calculated separately from the measured objects and the mean intensity was presented in the form of a bar diagram.

Immunoblotting for γ -H2AX was done as described by us before (21).

KML001 binding to artificial telomeres. Measurement of KML001 binding to 5'-(TTAGGG)_n-3' (artificial telomeres) was done by adopting the method described by Ishibashi and Lippard for cisplatin telomere binding (22). Instead of atom absorption spectroscopy, high-resolution matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) mass spectrometry was used. Mass spectra were obtained with an Axima MALDI time-of-flight mass spectrometer (Kratos/Shimadzu).

Telomeric and mutant sequences were synthesized by our Biopolymer Core Facility. Cisplatin (1 mg/mL; Novaplus) was used as a positive control for the telomeric DNA-binding assay. In brief, oligonucleotides and KML001 were incubated for 24 h at 37°C at a fixed molar ratio of 1:10 in 100 μ L aqueous medium. The TTAGGG sequences were incubated with drug for additional time points at 48 and 72 h and then dried using a Speed Vac system and the pellet was resuspended in 2.5 μ L 3-hydroxypicolinic acid matrix (Sigma-Aldrich) before MALDI was done.

Metaphase spreads and telomere fluorescence in situ hybridization. Cells were grown to 70% confluency and treated with 0.23 and 9 μ M/L (for PC-3) or 14 and 25 μ M/L (H1838) KML001 or PBS (vehicle control) for 24, 48, and 72 h in a T75 tissue culture flask. Supernatants were then replaced with medium containing 10 μ g/mL colcemide (Invitrogen) and incubated for 90 min at 37°C. Cells were processed and slides were prepared as described before (21). Slides were dried at room temperature for at least 3 h before the hybridization procedure.

All human telomere probes labeled with a rhodamine fluorophore (PAHT1000R, Q-Biogene) were used for hybridization to metaphase preparations of PC-3 cells following a protocol provided by the manufacturer. The chromosomes were counterstained with DAPI (blue; Sigma). Images were captured with a rhodamine/DAPI/FTTC triple-band excitation filter (excitation wavelengths: 535-560, 395-410, and 490-505 nm) allowing the dual detection of red (rhodamine) and blue (DAPI) at a $\times$ 100 magnification with an AX70 Olympus fluorescence microscope. Telomere signal was quantified by counting detectable telomere repeats (rhodamine red) in metaphase chromosomes and was expressed as percent of total chromosomes counted. At least 100 chromosomes were assessed and the experiments repeated three times.

Chromatin immunoprecipitation assay. Logarithmically growing PC-3 cells (10^7) were treated with KML001 at the IC_{50} concentration (9 μ M/L) for 2, 8, and 24 h. Control cells were treated for 24 h with vehicle (PBS). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) assays for studying the specific association of γ -H2AX with telomeric repeat sequences were essentially done as described by d'Adda di Fagagna et al. (23). In brief, cells were washed twice with PBS, fixed in 1% formaldehyde in PBS for 10 min at 37°C, washed with ice-cold PBS, and lysed in 1% SDS, 50 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), and 10 mmol/L EDTA at a density of 10^7 /mL. Lysates were sonicated to shear the DNA and centrifuged for 10 min at 4°C. Lysates (200 μ L) diluted with 1.8 mL of 0.01% SDS, 1.1% Triton X-100, 1.2 mmol/L EDTA, 16.7 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), and 150 mmol/L NaCl were precleared with a protein G plus/protein A agarose suspension (Calbiochem)/salmon sperm DNA (Sigma). Lysates (2 μ g/500 μ L) of control IgG (mouse; Santa Cruz Biotechnology), mouse monoclonal anti-phospho-H2AX (Upstate; clone JBW301), or telomere repeat binding factor 1 antibodies (Santa Cruz; clone C-19) were added and incubated overnight at 4°C. Immunoprecipitated pellets were washed with 0.1% SDS, 1% Triton X-100, 2 mmol/L EDTA (pH 8.0), and 20 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) containing 150 mmol/L NaCl in the first wash and 500 mmol/L NaCl in the second wash. Further washes were with 0.25 mol/L LiCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1 mmol/L EDTA (pH 8.0), and 10

mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) and with 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) and 1 mmol/L EDTA. Chromatin was eluted from the beads with 500 μ L of 1% SDS and 0.1 mol/L NaHCO₃. After addition of 20 μ L of 5 mol/L NaCl, cross-links were reversed for 4 h at 65°C. Samples were then treated with 20 μ L of 1 mol/L Tris-HCl (pH 6.5), 10 μ L of 0.5 mol/L EDTA, and 20 μ g proteinase K (Qiagen) and incubated at 45°C for 1 h. Phenol-chloroform extractions were done and the DNA was precipitated overnight at -80°C. The precipitate was dissolved in 10 μ L water and denatured at 95°C for 10 min, and 250 ng DNA was spotted onto Hybond membranes (GE Healthcare) with a Schleicher & Schuell apparatus (Whatman). Membranes were then developed using the TeloTAGGG telomere length assay kit (Roche). Signals were quantified using the NIH ImageJ software by measuring the mean signal intensity (gray scale) value and its integrated density. Resulting absolute intensities were determined and a relative intensity value was obtained by dividing the absolute intensity by the absolute intensity of the control sample.

Statistical tests. Statistical significance between two treatment groups was evaluated using the Student's *t* test; *P* < 0.05 was considered significant. The software packages used were SPSS 2000 SigmaPlot and SYSTAT version 10 (SYSTAT Software).

Results

Cytotoxic activity of KML001 in human cancer cell lines is correlated to their telomere length. We tested KML001 in a panel of 10 cancer cell lines and the embryonic kidney cells HEK293T (Table 1). The cancer cell lines included the osteosarcoma Saos-2, a cell line without telomerase that maintains its telomeres through an alternative lengthening mechanism. The cytotoxicity of KML001 in these cells was compared to their telomere length (Table 1; Fig. 1A and B). Among prostate, ovarian, lung, breast, and colon cancer cell lines, the prostate cancer cell line PC-3 was the most sensitive to KML001 (IC_{50} , 0.23 μ M/L) and also had the shortest telomeres (2.5 kb). The alternative lengthening mechanism cell line Saos-2 was the least responsive to KML001 (IC_{50} , 25 μ M/L) and had long telomeres (TRF length, 13.5 kb). There was an >100-fold difference in the IC_{50} values (IC_{50} ratio, 108.7) between these two cancer cell lines (Table 1; Fig. 1). The human lung cancer cell line H1838 (13 kb) with a TRF length similar to that of Saos-2 (Fig. 1B) showed also a high IC_{50} ratio (60.8) relative to PC-3. HEK293T normal kidney cells despite having the longest telomeres were relatively sensitive to KML001 (IC_{50} ratio, 13.5; Table 1; Fig. 1A and B). In general, lower IC_{50} values correlated with shorter telomeres and vice versa (Table 1); when we applied the Spearman rank correlation coefficient test to the cytotoxicity and telomere length data, a significant correlation coefficient of $r^2 = 0.9$ was found, indicating an association between telomeres and cytotoxicity of KML001 (Fig. 1C). The correlation was most pronounced among the breast and prostate cancer cell lines (Table 1).

The prostate cancer cell lines PC-3 and DU145 were selected for the subsequent molecular studies because of ongoing phase II clinical trials in prostate cancer and their short telomeres. The H1838 lung cancer cell line was used as a cell line with long telomeres and to contrast KML001 effects in short telomere cells.

KML001 effects on telomerase activity and hTERT. To test whether KML001 has an effect on the enzymatic activity of telomerase or its catalytic subunit hTERT, we made telomerase extracts from PC-3 cells and added KML001 at various

Table 1. Correlation between TRF length and growth inhibition by KML001

Cell line	Mean $\pm$ SD IC ₅₀ (μ mol/L)	Fold ratio IC ₅₀	Rank IC ₅₀	Mean $\pm$ SD TRF length (kb)	TRF rank
PC-3 (prostate)	0.23 $\pm$ 0.04	1.0	1	2.5 $\pm$ 0.21	1
DU145 (prostate)	2 $\pm$ 0.43	8.7	3	4.26 $\pm$ 0.14	3
MCF7 parental (breast)	2 $\pm$ 0.35	8.7	3	5.5 $\pm$ 0.28	4
MCF7 wt hTERT	2.33 $\pm$ 0.43	10.1	4	5.5 $\pm$ 0.21	4
MCF7 mt hTERT	0.9 $\pm$ 0.04	3.9	2	3.1 $\pm$ 0.32	2
A2780 (ovarian)	2.5 $\pm$ 0.23	10.9	5	6.2 $\pm$ 0.28	5
A2780cis	2.6 $\pm$ 0.14	11.3	6	10 $\pm$ 0.35	7
HEK293T (embryonic kidney)	3.1 $\pm$ 2.3	13.5	7	16 $\pm$ 2.47	10
Saos-2 (osteosarcoma, ALT)	25 $\pm$ 5	108.7	10	13.5 $\pm$ 0.70	8
HT29 (colon)	3.5 $\pm$ 0.7	15.2	8	8.6 $\pm$ 0.42	6
H1838 (lung)	14 $\pm$ 4.3	60.8	9	13 $\pm$ 0	9

NOTE: IC₅₀ ratio, IC₅₀ value of a cell line divided by the IC₅₀ value of PC-3, the cell line with the shortest telomeres and highest sensitivity to KML001.

Abbreviation: ALT, alternative lengthening of telomeres.

concentrations to the TRAP assay reaction (Fig. 2A). We also measured telomerase activity in lysates of prostate cancer cells that were treated with KML001 at IC₅₀ and IC₁₀₀ concentrations, respectively, for 8 and 24 h before isolation of telomerase (Fig. 2B; Supplementary Fig. S1A). The expression of hTERT was further assessed at the mRNA level (Fig. 2D).

We found that KML001 had no direct effect on telomerase activity even at concentrations as high as 20 μ mol/L (Fig. 2A). Similarly, little effect on telomerase activity was seen in PC-3 or DU145 cells that were treated with KML001 for 8 h before extraction of telomerase (Fig. 2B). At 24 h, a small (not significant; $P \geq 0.05$), dose-dependent inhibition of telomerase activity was evident at the IC₅₀ and IC₁₀₀ concentrations of KML001 (Fig. 2B; Supplementary Fig. S1A). In line with this, telomerase protein, as exemplified by the catalytic subunit hTERT, was found relocalized from the nucleus into the cytoplasm at 24 h, with a more pronounced effect seen at the IC₁₀₀ in prostate cancer cells with short telomeres (Fig. 2C; Supplementary Fig. S1B). The displacement of hTERT from the telomeres renders the enzyme nonfunctional and might contribute to the inhibition of enzyme activity seen in the TRAP assay after 24 h (Fig. 2B). In lung cancer cells with long telomeres, a translocation of hTERT from the nucleus into the cytoplasm was not evident within 24 h (Fig. 2C).

Another possible explanation for the inhibition of telomerase activity by KML001 in intact cells (Fig. 2B) but not in telomerase extracts (Fig. 2A) could be the down-regulation of hTERT expression at the transcriptional level. To assess this possibility, we did real-time PCR analyses with RNA extracted from KML001-treated PC-3 cells and observed that hTERT mRNA expression was indeed significantly inhibited at the IC₁₀₀ after 8 h ($P = 0.04$) and the IC₅₀ and IC₁₀₀ after 24 h ($P = 0.002$ and 0.003 , respectively; Fig. 2D). These observations are consistent with prior reports on arsenic trioxide (9, 17). Together, the data suggest that telomerase activity is inhibited predominantly as a result of effects of KML001 on telomerase transcription and perhaps the displacement of hTERT from telomeres as well.

Direct binding of KML001 to telomeric sequences. It is well established that metal species have high affinity for the central guanine in GGG triplets of duplex DNA (22, 24, 25). For

example, cis-diamminedichloroplatinum (cisplatin) is known to form N7-Pt-N7 GG intrastrand cross-links. The G-rich sequence of telomeres (TTAGGG)_n, which extends beyond the C-rich strand in human telomeres for ~130 to 210 bp has been shown to react with cisplatin (22, 24, 25). It has been proposed that cisplatin might specifically poison telomeres because no transcription products from telomeres exist. Thus, damage to telomeric DNA will not be repaired by the transcription-coupled nucleotide excision repair system. On the other hand, double-stranded coding DNA will be repaired (22). Arsenic trioxide was also reported to interact with DNA and RNA at G-C, A-T, and A-U bases (26). To test whether the trivalent arsenic compound KML001 can bind to telomeric sequences, a possibility that could explain the hTERT displacement data, for example, in Fig. 2C, we incubated artificial telomeric sequences [(TTAGGG)₃ and (TTAGGG)₆] with KML001 and used cisplatin as a positive control. KML001 or cisplatin and [(TTAGGG)₃] were incubated at a 1:10 ratio for 24, 48, and 72 h as shown for the 24-h incubation at 37°C in Fig. 3A. The addition of KML001 to telomeric sequences led to a shift in molecular weight of ~130 m/z (mass-to-charge ratio) by high-resolution MALDI mass spectrometry. This is consistent with the addition of one molecule of KML001 (molecular weight, 129.91) per triple telomeric repeat (Table 2; Fig. 3A). A longer incubation time did not change the number of molecules binding to the triple TTAGGG repeat sequence but showed consistently the addition of one KML001 molecule (data not shown). When we used six telomeric repeat sequences [(TTAGGG)₆], two molecules of KML001 were found to be bound (Table 2). Mutation analyses revealed that guanine and the vicinity of a thymine base to the guanine triplet are important for KML001 binding (Table 2). Hexanucleotide repeats consisting of all guanines bound four molecules of KML001. TTT and three consecutive guanines bound 2 molecules of KML001, whereas AAAGGG showed no KML001 binding, suggesting that the presence of an adenine in the TTAGGG repeat prevents a higher arsenification (Table 2). Likewise, all A and all T hexanucleotides did not bind KML001. When cisplatin was added to (TTAGGG)₃ repeats, three molecules were bound, indicating that one Pt interacts with a GGG triplet (data not shown) as reported before (22, 25).

To evaluate whether KML001 binding to telomeric sequences has biological consequences for telomere maintenance in cancer cells and whether an effect would be telomere length dependent, we exposed PC-3 and H1838 cells to KML001 IC₅₀ and IC₁₀₀ concentrations for 24, 48, and 72 h and did fluorescence *in situ* hybridization analysis with metaphase preparations and all human telomere probes (chromosomes in blue and telomeres in red in Fig. 3B-D). Although IC₅₀-treated PC-3 metaphases showed little difference compared with control cells at any time point (Fig. 3B), we observed a relatively rapid erosion of entire telomeres starting at 48 h of exposure to KML001 at the IC₁₀₀. At this time point and drug concentration, each chromosome in PC-3 metaphases had lost two of their four telomere signals in a random fashion that seemed not related to a specific erosion at the long or short arms of chromosomes (Fig. 3C, b). Counting of detectable

telomeric repeat signals in 300 metaphase chromosomes revealed that $39 \pm 2.8\%$ of the telomere signal was lost (Fig. 3B; $P = 0.0014$). Seventy-two hours after KML001 exposure, very little telomere signal remained ($16.5 \pm 4.9\%$) and most of the chromosomes had almost completely lost their telomeres (Fig. 3C, c; $P = 0.0011$). This is also evident from interphase nuclei as shown in Fig. 3C (blue boxed inserts). In contrast, in H1838 cells (TRF, 13 kb), even a 72-h exposure to KML001 IC₁₀₀ concentrations did not cause loss of telomere signal compared with control cells (Fig. 3B and D, a-b). These data support the telomere binding/poisoning hypothesis outlined above. Effects, however, appear to be KML001 concentration dependent and telomere length dependent.

Specific induction of telomere-associated DNA damage by KML001. The "uncapping" signal for growth arrest, which is triggered when telomere-mediated chromosome end protection becomes insufficient due to reduction in telomere length and/or damage to telomere structure, has recently been elucidated (27, 28). It activates the double-strand break-mediated DNA damage response pathway, because a short, dysfunctional telomere can resemble a double-strand DNA break (28). Phosphorylation of γ -H2AX at Ser¹³⁹ is a very early event of double-strand break DNA damage signaling and has been described as a marker for telomere-initiated DNA damage checkpoint response (21, 28). We have therefore examined whether telomere binding and loss of nuclear hTERT following KML001 treatment would lead to a concomitant induction of γ -H2AX in cells and found that this is indeed the case (Fig. 4A-D). H2AX is phosphorylated in a concentration-dependent manner; more γ -H2AX foci were detected in PC-3 and DU145 prostate cancer cells treated with IC₁₀₀ concentrations compared with IC₅₀ concentrations of KML001 ($P < 0.0001$; Fig. 4A-B; Supplementary Fig. S1C). Induction of γ -H2AX was seen as early as 2 h after treatment of PC-3 cells with KML001 at both IC₅₀ and IC₁₀₀ concentrations by immunoblotting (Fig. 4C).

H1838 lung cancer cells, however, did not show any evidence of γ -H2AX focus formation at 24 h and IC₁₀₀ concentrations of KML001 (Fig. 4A).

To assess whether KML001 treatment causes a specific association of phosphorylated H2AX with telomeres in responsive prostate cancer cells, we did ChIP assays with PC-3 cells and anti- γ -H2AX antibodies and probed the precipitated protein/DNA complexes with telomeric sequences [(TTAGGG)_n; Fig. 4D]. We found a progressive accumulation of γ -H2AX-bound telomeric repeats consistent with the Western blot data in Fig. 4C for γ -H2AX expression. Marked induction of telomere-associated γ -H2AX protein (2-fold; signal intensity, 1.7) was found 2 h after exposure to KML001 and was further increased to 5-fold (signal intensity, 10.4-10.7) over control after 8 and 24 h (Fig. 4D). ChIP with the telomere-associated protein telomere repeat binding factor 1 (used as a positive control) detected a weak TTAGGG repeat signal in control-treated PC-3 cells, whereas the use of mouse IgG (negative control) for the immunoprecipitation did not pull-down any telomeric sequences (Fig. 4D), suggesting that specific telomere-associated DNA damage occurs. The latter was compared with DNA damage caused by arsenite-induced ROS production. The formation of 8-oxo-dG in response to ROS is well established and 8-oxo-dG is commonly used as a marker of oxidative stress. We have stained PC-3 and DU145 cells with anti-8-oxo-dG antibodies in parallel to the γ -H2AX

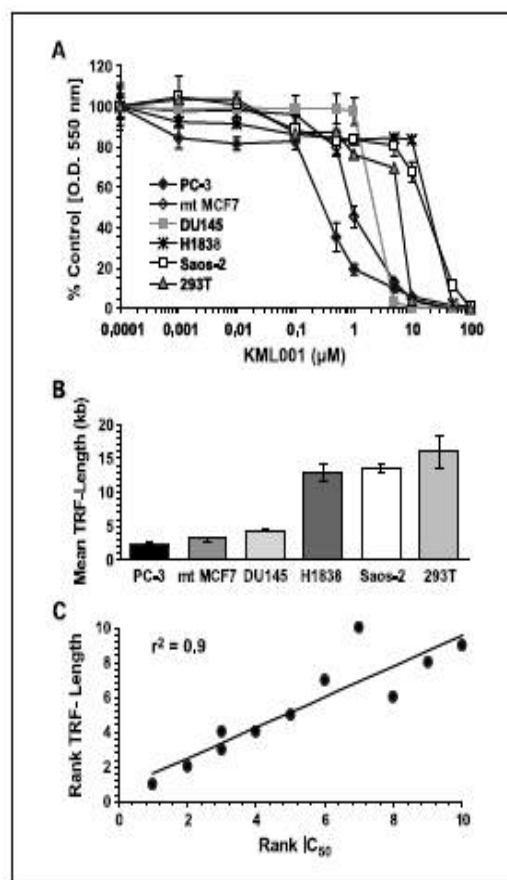


Fig. 1. Cell lines with shorter telomeres are more sensitive to KML001. **A**, growth curves for six KML001-treated cell lines with short and long telomeres. Cells were treated with increasing concentration of KML001 (0.001-100 μmol/L). 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide assays were done after 5 d and the mean absorbance for vehicle-treated control was set as 100% (mean $\pm$ SD absorbance 100%; PC-3 = 1.6 ± 0.351 , DU145 = 2.9 ± 0.367 , HEK293T = 1.6 ± 0.424 , Saos-2 = 1.2 ± 0.057 , MCF7 = 1.1 ± 0.057 , and H1838 = 0.7 ± 0.11). Mean $\pm$ SD of three independent experiments. **B**, presentation of TRF lengths $\pm$ SD as determined by Southern blot for the six cell lines in **A**. **C**, Spearman rank correlation coefficient analysis for fold ratio of mean IC₅₀ values versus telomere length in 11 cell lines (see Table 1). A highly significant correlation coefficient of $r^2 = 0.9$ was found for short telomere length and low IC₅₀ values/high cytotoxicity.

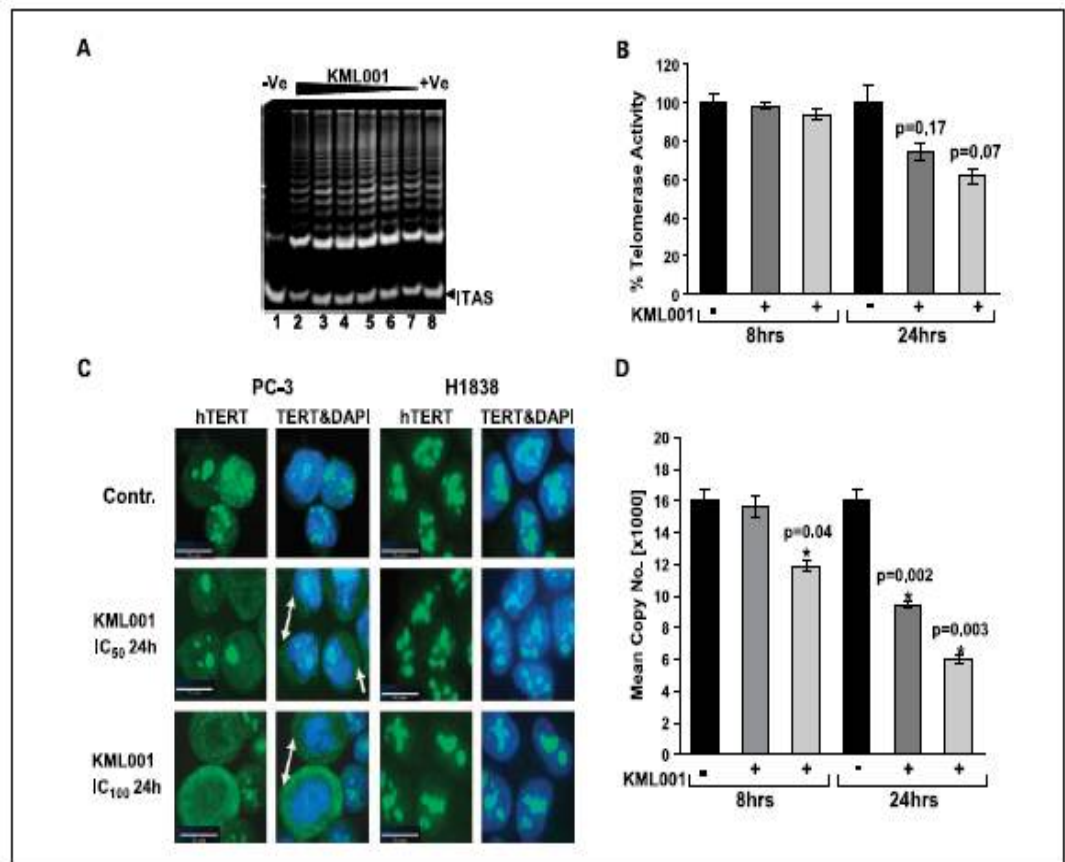


Fig. 2. Effects of KML001 on telomerase. **A**, polyacrylamide gel with the typical banding pattern of hexanucleotide repeats indicating telomerase activity in reactions from the TRAP assay. Telomerase activity in PC-3 cell lysates that were treated with different concentration of KML001 (0.1–20 $\mu\text{mol/L}$). **ITAS**, internal telomerase assay standard; lane 1, negative control = PC-3 lysate boiled at 95°C for 10 min; lane 2, PC-3 cell lysate + KML001 20 $\mu\text{mol/L}$; lane 3, PC-3 lysate + 10 $\mu\text{mol/L}$; lane 4, PC-3 lysate + 5 $\mu\text{mol/L}$; lane 5, PC-3 lysate + 2.5 $\mu\text{mol/L}$; lane 6, PC-3 lysate + 0.5 $\mu\text{mol/L}$; lane 7, PC-3 lysate + 0.1 $\mu\text{mol/L}$; lane 8, positive control = HeLa cell extract from kit. **B**, telomerase activity in PC-3 cells by TRAP-PCR-ELISA. PC-3 cells were treated with vehicle (■), IC₅₀ (□), and IC₁₀₀ (□) concentrations of KML001 for 8 and 24 h. Percent control of absorbance at 450 nm values from the TRAP ELISA. Mean $\pm$ SD of three independent experiments. The absorbance of control cells was set as 100% (mean absorbance: PC-3 control, 8 h = 1.96 ± 0.10 ; IC₅₀, 8 h = 1.92 ± 0.037 ; IC₁₀₀, 8 h = 1.84 ± 0.045 ; PC-3 control, 24 h = 2.72 ± 0.258 ; IC₅₀, 24 h = 2.02 ± 0.138 ; IC₁₀₀, 24 h = 1.67 ± 0.103). **Top of column**, *P* values based on a two-tailed Student's *t*-test. **C**, immunofluorescence staining for hTERT protein. **Top**, PC-3 and H1838 cells treated with vehicle control (PBS) show nuclear hTERT staining (green). Diffuse hTERT staining is seen in the nucleoplasm with an accumulation of hTERT in the nucleoli. **Middle**, PC-3 cells treated with KML001 for 24 h at 0.23 $\mu\text{mol/L}$ (IC₅₀) or H1838 cells treated for 24 h with 14 $\mu\text{mol/L}$ (IC₉₀). **Bottom**, PC-3 cells treated with 9 $\mu\text{mol/L}$ (IC₉₀) KML001 or H1838 cells treated with 25 $\mu\text{mol/L}$ (IC₁₀₀) KML001 for 24 h. A concentration-dependent translocation of hTERT from nuclei into cytoplasm is seen in PC-3 cells only (white arrows). Cells were counterstained with DAPI (blue, DNA). Bar, 15 μm . **D**, effects of KML001 on the expression of hTERT mRNA. PC-3 cells were treated with vehicle (■), IC₅₀ (□), and IC₁₀₀ (□) concentrations for 8 and 24 h. Mean $\pm$ SD copy number relative to the housekeeping gene porphobilinogen desaminase. Representative experiment of three independent experiments. Asterisk, statistical significance based on a two-tailed Student's *t*-test.

immunofluorescence experiments and found that 8-oxo-dG lesions occur much later and at higher concentrations of KML001 (Fig. 4E; Supplementary Fig. S1D). A careful titration of drug concentrations (IC₅₀, IC₇₀, IC₉₀, and IC₁₀₀) and a time course over 24 h revealed that ROS-induced 8-oxo-dG appears not before 24 h and exclusively at the IC₁₀₀ of KML001 in PC-3 cells. DU145 cells formed very little 8-oxo-dG even at the IC₁₀₀ of KML001 (Fig. 4E; Supplementary Fig. S1D).

Discussion

Arsenic is one of the oldest drugs in the world and one of the best known poisons. Interestingly, it also has proven useful for anticancer therapy and is a prime example of the paradigm that "poisons in small doses are the best medicines and the best

medicines in too large doses are poisonous" (29). Although the mechanisms underlying its paradoxical antineoplastic effects remain unclear, several reported observations point toward the involvement of telomeres and telomerase (1, 15, 29). For example, human cells are more sensitive to arsenic trioxide than are cells of rodent origin, and this difference has been attributed to the short telomeres found in human cells compared with the very long telomeres in mouse cells (15). Likewise, a hallmark that distinguishes human normal from cancer cells is the expression of the enzyme telomerase and the short but stable telomere length of cancer cells; this difference may be critical for the anticancer activity of trivalent arsenic (30, 31).

In this study, we provide clear evidence that sodium metaarsenite cytotoxicity is telomere length dependent in that cells with short telomeres are more sensitive to the drug than

those with longer telomeres (Table 1). Saos-2, a cell line that has long telomeres and regulates its telomere length independent of telomerase through alternative lengthening mechanisms (e.g., telomere exchange), was >100-fold "resistant" to sodium metaarsenite compared with sensitive PC-3 prostate cancer cells with short telomeres (2.5 kb; ref. 32). We further show that sodium metaarsenite can bind to human telomeric sequences and lead to rapid erosion of telomeres in prostate cancer cells with short telomeres but not in a lung cancer line with long telomeres (Fig. 3). Entire telomeres were lost as seen by metaphase and interphase fluorescence *in situ* hybridization with telomeric probes as early as 48 h after addition of IC_{100} concentrations of KML001 to PC-3 cells; at 72 h, most of the chromosomes lacked telomeres but had not undergone end-to-end fusions. In contrast, KML001 did not cause telomere loss in H1838 lung cancer cells even at 72 h. The latter might require a prolonged exposure time or higher than IC_{100} KML001 concentrations for telomere erosion to occur. These data are consistent with a previous study by Liu et al. evaluating the

effects of arsenic trioxide in telomerase-deficient ($hTTR^{-/-}$) and age-matched wild-type (wt) mouse embryos. Wild-type embryos with long telomeres showed telomere erosion after 72 to 96 h of exposure to 30 μ mol/L arsenic trioxide and this triggered end-to-end fusions at chromosomes where telomeres were no longer visible. Surprisingly, arsenic trioxide did not cause chromosome end-to-end fusions in embryos with shortened telomeres from late generation telomerase-deficient mice. However, telomerase-deficient mouse embryos with shortened telomeres were more sensitive than wild-type embryos to arsenic-mediated inhibition of cell survival (15). These wild-type and telomerase knockout mouse embryo experiments seem to mirror the effects of sodium metaarsenite on human normal and cancer cells reported by us here. Whereas Liu et al. attribute the differential effects of arsenic trioxide on mouse embryos with long and short telomeres to the production of ROS and ROS-related telomere attrition, we have strong evidence that a direct binding of sodium metaarsenite to telomeric repeat sequences leads to telomere erosion (Fig. 3A).

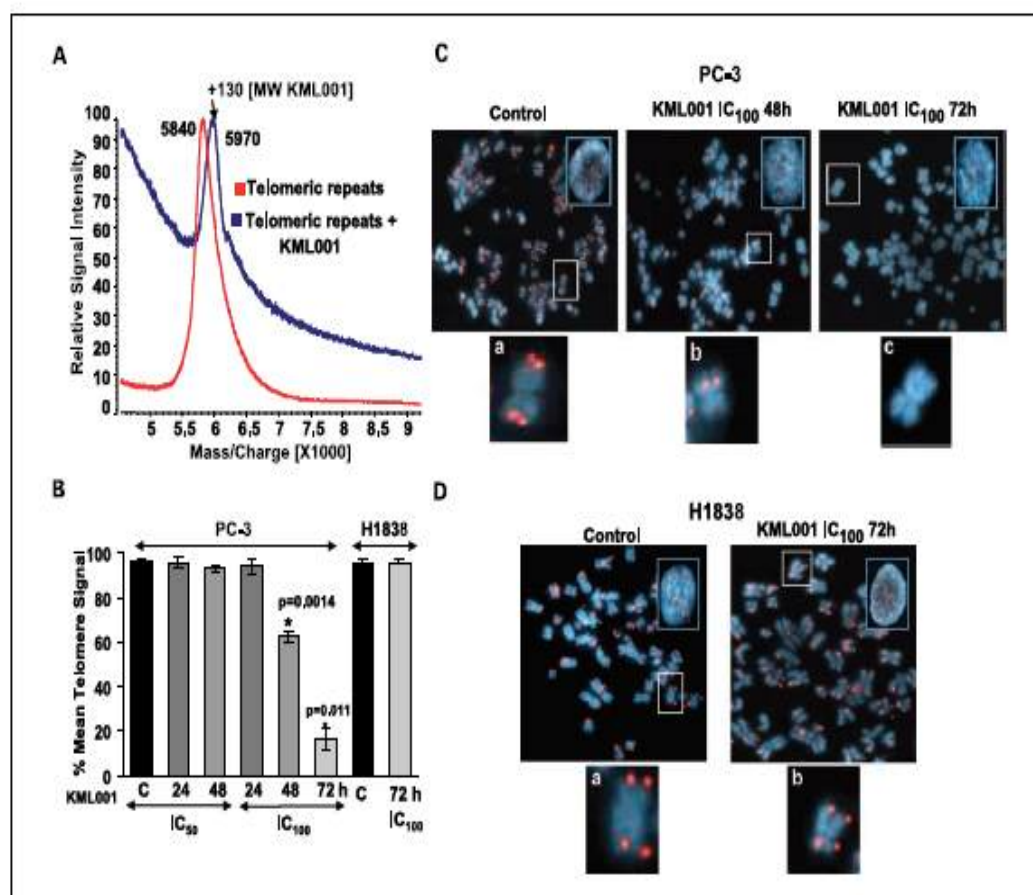


Fig. 3. KML001 effects on telomeres. **A**, KML001 binding to (TTAGGG)₃ by MALDI. Single-stranded 5'- (TTAGGG)₃-3' oligonucleotide was incubated with and without KML001 for 24 h in an aqueous solution at 37 °C and a molar ratio of 1:10. A shift to the right (blue curve) in the order of 130 (molecular weight of KML001) is observed in the sample treated with KML001, suggesting that KML001 can directly bind to telomeres (see Table 2). **B**, percent mean telomere signal in metaphase chromosomes from images captured in **C** and **D**. At least 100 chromosomes per experiment were counted (mean of three experiments). Asterisk, statistical significance based on a two-tailed Student's *t* test. **C**, fluorescence *in situ* hybridization of metaphase chromosomes (DAPI blue) of PC-3 cells with all human telomere probes (red). Interphase nuclei are inserted into the top right corner of each photomicrograph and boxed with a blue line. **a** to **c**, enlargements of individual chromosomes that are indicated in the individual photomicrographs as a white box. Treatments and time points are indicated on top. **D**, fluorescence *in situ* hybridization as in **C** for the lung cancer cell line H1838. **a** and **b**, enlargements of individual chromosomes. Magnification, $\times 100$ (metaphases and interphases).

Table 2. Binding of KML001 to telomeric and mutant sequences

Oligonucleotide sequence	Mass of oligonucleotide (m/z) ± SD	Mass of oligonucleotide + KML001 (m/z) ± SD	Δm* ± SD	No. molecules bound
(TTAGGG) ₃	5,840 ± 6.4	5,970 ± 8.0	130 ± 2.3	1
(TTAGGG) ₆	11,416 ± 7.3	11,632 ± 9.8	216 ± 1.15	2
(AAAGGG) ₃	5,763 ± 4.5	5,831 ± 8.5	68 ± 4.0	None
(TTTGGG) ₃	5,635 ± 1.2	5,927 ± 21.6	291 ± 22.1	2
(AAAAA) ₃	5,592 ± 5.8	5,602 ± 4.3	10 ± 2.3	None
(TTTTT) ₃	5,444 ± 9.3	5,458 ± 6.6	14 ± 3.3	None
(GGGGGG) ₃	5,869 ± 3.7	6,394 ± 3	525 ± 2.3	4

*Δm = [(mass of oligonucleotide treated with KML001) - (mass of oligonucleotide)]; m/z = mass/charge; cisplatin was used as positive control and three molecules found bound per (TTAGGG)₃ repeat.

We showed that the arsenification of telomeres induces DNA damage signaling as exemplified by a rapid and dose-dependent induction of H2AX phosphorylation that is associated with telomeres as shown by γ-H2AX ChIP assay and

precedes the formation of 8-oxo-dG, a ROS-specific DNA lesion (28, 33). 8-oxo-dG was only induced by the IC₁₀₀ concentration of KML001 in PC-3 cells and not earlier than 24 h after drug addition, whereas telomere-specific γ-H2AX expression

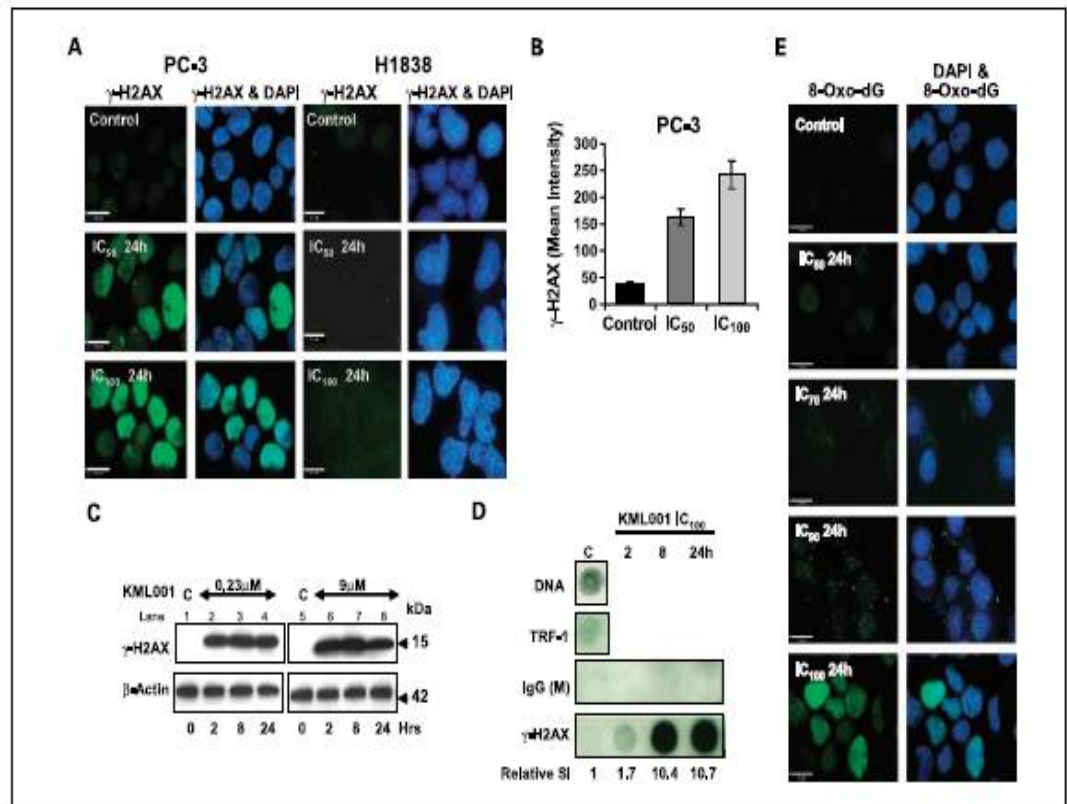


Fig. 4. Telomere-associated ROS-associated DNA damage caused by treatment with KML001. **A**, γ-H2AX foci formation (green) in PC-3 compared with H1838 cells that were treated with vehicle control (top) or KML001 at IC₅₀ (middle) and IC₁₀₀ (bottom) for 24 h. Nuclei were counterstained with DAPI. Images were captured with a Retiga cooled camera and Imposition Openlab 5.0 software using a ×63 objective (Leica DM4000). Bar, 15 μm. **B**, mean signal intensity of γ-H2AX foci from images captured in **A**. At least 100 nuclei per experiment were evaluated (mean of three experiments). Asterisk, statistical significance based on a two-tailed Student's *t* test. **C**, Western blot of H2AX phosphorylated at Ser¹³⁹. Lanes 1 and 5, vehicle-treated control cells; lanes 2 to 4, PC-3 cells treated with 0.23 μmol/L (IC₅₀) KML001 for 2, 8, and 24 h, respectively; lanes 6 to 8, PC-3 cells treated with 9 μmol/L (IC₁₀₀) KML001 for 2, 8, and 24 h. β-Actin was used as loading control. **D**, dot blot of ChIP with γ-H2AX, mouse IgG, and telomere repeat binding factor 1. Genomic PC-3 DNA (250 ng; equal amount of DNA used from the ChIP) was spotted as a positive control for TTAGGG repeats detection. Telomere repeat binding factor 1 ChIP of vehicle-treated PC-3 cells was used as a positive control for the immunoprecipitation of TTAGGG repeats with telomere-associated proteins and mouse IgG as a negative control to confirm the specificity of the ChIP reaction. ChIP with γ-H2AX revealed its very strong association with telomeres after KML001 treatment but not in untreated controls. Relative γ-H2AX signal intensity (SI) values were determined and are shown below the individual spots. **E**, formation of 8-oxo-dG caused by ROS. Top, vehicle control-treated PC-3 cells followed by a panel of PC-3 cells treated with 0.23 μmol/L KML001 (IC₅₀), 0.75 μmol/L (IC₇₅), and 3 μmol/L (IC₁₀₀) for 24 h. Only PC-3 cells treated with 9 μmol/L (IC₁₀₀) KML001 stained positive for 8-hydroxyguanine (green). Nuclei were counterstained with DAPI. Bar, 15 μm.

occurred as early as 2 h after exposure to IC_{50} concentrations of sodium metaarsenite (Fig. 4C). Our data suggest that arsenification of telomeres, and not ROS, causes sodium metaarsenite-associated telomere erosion and DNA damage signaling.

Experiments examining the effects of sodium metaarsenite on telomerase activity in the TRAP assay by treating either isolated enzyme activity directly with KML001, or by extracting enzyme activity from treated cells, showed that the drug does not affect telomerase activity. Nonetheless, hTERT protein was found translocated from the nucleus into the cytoplasm, a phenomenon observed by us for G-quadruplex ligands, a novel class of telomerase inhibitors that were specifically designed to target telomeres by stabilizing the formation of G-quadruplexes by the G-rich 3' overhang (21, 30, 31, 34). For the G-quadruplex ligand BRACO19, we could show that hTERT when displaced from the telomeres translocates into the cytoplasm and colocalizes with ubiquitin, suggesting its degradation in the ubiquitin-proteasome system (34). Arsenification of telomeric sequences in prostate cancer cells shown in this study appears to have a similar effect.

Whereas sodium metaarsenite had little effects on telomerase protein, effects on hTERT were seen at the transcriptional level. The detectable number of copies of hTERT amplified from mRNA by real-time PCR was significantly reduced at both IC_{50} and IC_{100} concentrations of sodium metaarsenite after 24 h, which is in line with what has been reported by others (9, 17). Based on our telomerase/telomere protein, RNA and DNA data, and a recent literature report, the reduction of hTERT mRNA is likely due to the possibility of the binding of sodium metaarsenite to A-U bases in RNA (26).

The mechanisms by which arsenic trioxide drives APL cells into apoptosis have been studied extensively and the inhibition of expression of hTERT mRNA has been shown (9, 17, 29). One intriguing mechanism, which is favored in APL, is the rapid degradation of the promyelocytic leukemia gene (PML), retinoic acid receptor- α fusion protein (35), which restores promyelocyte differentiation. Arsenic trioxide treatment was shown to cause PML to localize to the nuclear matrix, where it becomes sumoylated and is degraded after recruitment to the proteasome. PML resides in discrete nuclear subdomains, known as PML nuclear bodies (29). The latter have been implicated in alternative telomere lengthening and have been shown to colocalize with telomeric DNA (36). It is tempting to speculate that in APL arsenic trioxide can target telomere maintenance in a dual fashion. First, it binds to telomerase-regulated telomeric sequences and hTERT mRNA, inducing telomere-associated DNA damage signaling and rapid cell death; second, it degrades PML and prevents cells trying to escape the insult by using PML bodies to repair their telomeres via telomere exchange (32). Thus, the existence and importance of PML in APL might sensitize this tumor type to arsenic therapy.

Together, our data and that of others suggest that arsenite exerts effects on telomeres in a telomere length-dependent

manner and that the resulting telomere erosion without end-to-end fusion in cells with short telomeres such as cancer cells could help to explain a therapeutic window for anticancer therapy (15).

Based on our cytotoxicity data for a panel of human tumor cell lines (Table 1) and the telomere erosion shown in the PC-3 cell line, sodium metaarsenite could be useful for the treatment of a variety of cancers with short telomeres. Pharmacokinetic studies with sodium metaarsenite have shown peak plasma levels of 15 $\mu\text{mol/L}$ after i.v. infusion and 2.5 $\mu\text{mol/L}$ via oral administration (16). This is a dose range that encompasses most of the IC_{50} and IC_{100} values from our cell line studies, particularly the cell lines with short telomeres.

Importantly, arsenic trioxide and KML001 are identical substances in solution. Because arsenic trioxide is poorly water-soluble, it must be dissolved with sodium hydroxide and then adjusted to physiologic pH, yielding sodium metaarsenite. In fact, investigators that have studied "arsenic trioxide" have directly used sodium metaarsenite for their experiments (10). We have compared the *in vitro* cytotoxicity of KML001 and that of solubilized arsenic trioxide in the tumor cell lines from Table 1 and found no differences in potency between the two drugs (data not shown), suggesting that they might act very similar. Owing to its oral bioavailability, water solubility, and molecular antitumor effects, KML001 is a candidate for full clinical development.

A recently published meta-analysis of telomere length in cancer literature has revealed that telomere content, a proxy for telomere length, has prognostic relevance (37). In prostate carcinomas, low telomere content/short telomeres predict metastasis and recurrence. In breast cancers, low telomere content predicts poor clinical outcome and a reduced 5-year breast cancer-free survival interval (37–39). Thus, KML001-based combination treatments in these two difficult-to-treat tumor types should be considered, perhaps together with cisplatin, which also binds to telomeres, or more specific telomerase inhibitors such as GRN1631, a hTR antisense oligonucleotide, which has just entered phase I clinical trials (30, 31).

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

A. Burger received a major research grant from Komipharma, who sponsored the work. H. Hendriks received honoraria from Rephantox for consulting on KML001.

Acknowledgments

We thank Dr. Nicholas Ambulos for the synthesis of the telomeric and mutant oligonucleotide sequences and for help with interpreting the mass spectrometry data, Dr. Arundhati Ghosh for help with the ChIP assay, and Colette Burgess for technical assistance. MALDI analyses were done by the University of Maryland Marlene and Stewart Greenebaum Cancer Center Proteomics Core Facility under the direction of Dr. Austin Yang.

References

- Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS, Singer J, Weisman S. Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002;62:3893–903.
- Solignet SL, Mazlak P, Wang ZG, et al. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 1998;339:1341–8.
- Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL). II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997;89:3364–60.
- Dilda PJ, Hogg PJ. Arsenical-based cancer drugs. *Cancer Treat Rev* 2007;33:542–64.
- Chou WC, Dang CV. Acute promyelocytic leukemia: recent advances in therapy and molecular basis of response to therapies. *Curr Opin Hematol* 2006;12:1–6.
- Zhang TC, Schmitt MT, Mumford JL. Effects of arsenic on telomerase and telomeres in relation to cell proliferation and apoptosis in human keratinocytes and leukemia cells *in vitro*. *Carcinogenesis* 2003;24:1811–7.

7. Rust DM, Soignet SL. Risk/benefit profile of arsenic trioxide. *Oncologist* 2001;6 Suppl 2:29-32.
8. Zhang TC, Cao EH, Li JF, Ma W, Qin JF. Induction of apoptosis and inhibition of human gastric cancer MGC-803 cell growth by arsenic trioxide. *Eur J Cancer* 1999;35:1258-63.
9. Chou WC, Hawkins AL, Barrett JF, Griffin CA, Dang CV. Arsenic inhibition of telomerase transcription leads to genetic instability. *J Clin Invest* 2001;108:1541-7.
10. Yih LH, Tseng YY, Wu YC, Lee TC. Induction of centrosome amplification during arsenite-induced mitotic arrest in CGL-2 cells. *Cancer Res* 2006;66:2098-106.
11. Mei N, Kurugita N, Hirano T, Kasai H. Acute arsenite-induced 8-hydroxyguanine is associated with inhibition of repair activity in cultured human cells. *BBRC* 2002;297:924-30.
12. Poonepillai A, Balakrishnan L, Khaw AK, et al. Lack of poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene product enhances cellular sensitivity to arsenite. *Cancer Res* 2005;65:10977-83.
13. Wei YM, Ou YX, Bai H, Lu JH, Zhang RL. Down regulation of four arsenic antagonists on apoptosis and telomerase activity induced by arsenic trioxide in three myelocytic leukemia cell lines. *Acta Pharmacol Sin* 2001;8:725-30.
14. Zhang Y, Cao EH, Qin JF. Up-regulation of telomere binding TRF1, TRF2 related to reactive oxygen species induced by As_2O_3 in MGC-803 cells. *Eur J Pharmacol* 2005;517:1-9.
15. Liu L, Timaridi JR, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL. Oxidative stress contributes to arsenic-induced telomere attrition, chromosome instability and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:31998-2004.
16. Hendriks H, Dai F, Rademaker B, Yang YJ, Lee SB, Burger AM. The novel compound KML001 induces telomere attrition, senescence and chromosomal instability in tumor cell lines with short telomeres. *Eur J Cancer* 2004;40 Suppl 2:130.
17. Glenke W, Chow KJ, Bauer N, Bergmann L. Down-regulation of wt1 expression in leukemia cell lines as part of apoptotic effect in arsenic treatment using two compounds. *Leuk Lymphoma* 2006;47:1629-38.
18. Cookson JC, Dai F, Smith V, et al. Pharmacodynamics of the G-quadruplex-stabilizing telomerase inhibitor 3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quino[4,3,2-*k'*]acridinium methosulfate (RHPS4) *in vitro*: activity in human tumor cells correlates with telomere length and can be enhanced, or antagonized, with cytotoxic agents. *Mol Pharmacol* 2005;68:1551-8.
19. Alley MC, Scudiero DA, Monks A, et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* 1988;48:589-601.
20. Burger AM. Standard TRAP assay. In: Double JA, Thompson MJ, editors. *Telomeres and telomerase: methods in molecular biology*. Totowa: The Humana Press; 2002. p. 109-24.
21. Phatak P, Cookson JC, Dai F, et al. Telomere uncapping by the G-quadruplex ligand RHPS4 inhibits clonogenic tumour cell growth *in vitro* and *in vivo* consistent with a cancer stem cell targeting mechanism. *Br J Cancer* 2007;96:1223-33.
22. Ishibashi T, Lippard SJ. Telomere loss in cells treated with cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4219-23.
23. d'Adda di Fagnaga F, Hande MP, Tong WM, et al. Effects of DNA nonhomologous end-joining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Curr Biol* 2001;11:1192-6.
24. Upma AS, Glesler CW. Short telomeres induce a DNA damage response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 2003;14:987-1001.
25. Villanueva JM, Jia X, Yohannes PG, Doetsch PW, Marzilli LG. Cisplatin (*cis*-Pt(NH₃)(2)Cl₂) and *cis*-[Pt(NH₃)(2)(H₂O)(2)](2+) intrastrand cross-linking reactions at the telomere GGGT DNA sequence embedded in a duplex, a hairpin, and a bulged duplex: use of Mg(2+) and Zn(2+) to convert a hairpin to a bulged duplex. *Inorg Chem* 1999;38:60-80.
26. Nafisi S, Sobhanmanesh A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, Tajmir-Rashti HA. Interaction of arsenic trioxide As_2O_3 with DNA and RNA. *DNA Cell Biol* 2005;24:634-40.
27. Blackburn EH. Telomere states and cell fates. *Nature* 2000;408:53-6.
28. d'Adda di Fagnaga F, Reaper PM, Clay-Farrace L, et al. DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003;426:194-8.
29. Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, deThé H. How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic. *Nat Rev Cancer* 2002;2:705-13.
30. Phatak P, Burger AM. Telomerase and its potential for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 2007;152:1003-11.
31. Kalland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. *Clin Cancer Res* 2007;13:4960-3.
32. Londoño-Vallejo JA, Der Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res* 2004;64:2324-7.
33. Oikawa S. Sequence-specific DNA damage by reactive oxygen species: implications for carcinogenesis and aging. *Environ Health Prev Med* 2005;10:65-71.
34. Burger AM, Dai F, Schultes CM, et al. The G-quadruplex interactive molecule BRACO19 inhibits tumor growth, consistent with telomere binding and interference with telomerase function. *Cancer Res* 2005;65:1489-96.
35. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, et al. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumoylation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As_2O_3 -induced PML or PML-retinoic acid receptor degradation. *J Exp Med* 2001;193:1361-71.
36. Yeager TR, Naumann AA, Englezou A, Hushchitscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* 1999;59:4175-9.
37. Bisioff M, Heaphy CM, Griffith JK. Telomeres: prognostic markers for solid tumors. *Int J Cancer* 2006;119:2255-60.
38. Fordyce CA, Heaphy CM, Joste NE, Smith AY, Hunt WC, Griffith JK. Association between cancer-free survival and telomere DNA content in prostate tumors. *J Urol* 2005;173:610-4.
39. Griffith JK, Bryant JE, Fordyce CA, Gilliland FD, Joste NE, Moyzis RK. Reduced telomere DNA content is correlated with genomic instability and metastasis in invasive human breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1999;54:59-64.

Cancer Therapy
: Preclinical
(번역문)

암치료법: 전임상

KML001은 전립선 암세포 속의 텔로미어 서열에 결합하여 텔로미어를 손상시킴으로써, 세포 사멸을 유도한다.

포니마 파텍¹, 황핑 대², 멜로디 버틀러⁴, MP 난다쿠머³, 피터 L. 게티레즈³, 마틴 J. 에델만³, 한스 헨드릭스⁵, 안젤리카 M 버거^{1,3}

저자의 소속기관 :

- 1,2.미국 메릴랜드대학, 세포유전학 연구소, 약리학, 실험치료학, 병리학부
3. 미국, 메릴랜드, 발티모어, 메릴랜드 의과대학, 말린 스튜어트 그린바움 암 센터
4. 독일, 프라이버그, 프라이버그대학, 해부세포생물학 연구소
5. 네덜란드, 퍼머랜드, 헨드릭스 약제 컨설팅

연구비 지원(Grant Support) : (주)코미팜, 한국

알림(Note) : 이 논문의 보충 자료(data)는 임상암연구지(Clinical Cancer Research)의 인터넷 사이트에서 얻을 수 있음.

논문에 대한 요청 및 문의(Requests for reprints) :

안젤리카 M 버거 박사
메릴랜드대학교 의과대학
말린 스튜어트 그린바움 암 센터
부리슬러 연구 빌딩, *-***실
미국 메릴랜드 ***** , 발티모어, 서 발티모어가 ***
Tel : +1-**-328-3*1*, Fax : **0 3*8 65*9
E-mail : ab*r**r@so*.umaryland.edu

요약

목적 : KML001(소듐 메타 아르세나이트)은 전립선암 환자를 대상으로 1/2상 임상실험을 진행 중인 경구용 비소 화합물이다. 이 연구에서는, KML001의 작용 기작을 규명하였고, 텔로머라제와 텔로미어에 미치는 영향을 확인하였다.

실험 디자인 : 우리는 여러 인체 고형암 세포주에서 KML001의 세포독성과 텔로미어의 길이를 비교하였다.

지금까지 확립된 아르세나이트의 작용 기작인 활성산소종에 의한 DNA 손상 유발 현상과 연계지어 텔로머라제와 텔로미어에 영향을 미치는 KML001의 용량(농도)과 반응 시간을 측정하였다. 또한 고분해성 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온

화 질량분석기법 (matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry)으로 텔로미어와 KML001 사이의 결합을 확인하였다.

결과 : 우리는 텔로미어의 길이와 세포독성간의 유의성 있는 역 상관관계를 확립 하였다(세포독성 최고치의 50%를 유발하는 약물 농도(IC50)와 텔로미어 길이 사이의 상관관계수=0.9). 경구 투여 후 환자의 혈청에서 검출되는 수준의 KML001을 짧은 텔로미어를 가진 종양세포에 처리했을 때, 세포 사멸이 유도되었다. KML001은 텔로머라제 활성을 직접적으로 저해하는 것은 아니고, 텔로미어에 결합함으로써 작용하는 것으로 확인되었다. 세 번 반복된 TTAGGG 서열에 대해 KML001 한 분자의 비율로 서열 특이적으로 부착됨으로써, 텔로머라제 촉매 서브유닛이 텔로미어에 결합하지 못하고 세포질로 이동하도록 한다. 짧은 텔로미어 길이를 가진 전립선암 세포주에서, KML001은 텔로미어 부위에서의 DNA 손상 시작(신호)을 일으키는데 이것은 γ -H2AX 유도, 염색질 면역침강 분석, 세포 주기의 중기 FISH 분석에서 확인된 급격한 텔로미어의 손상을 통해 확인되었다. 이러한 효과는 긴 텔로미어 길이를 가진 폐암 세포주에서는 보이지 않았다. 중요한 점은, 활성산소종의 생성에 의한 DNA 손상 이전에 텔로미어의 비소화가 일어난다는 것이다.

결론 : 소듐 메타아르세나이트는 텔로미어에 대한 표적 약제로, 짧은 길이를 가진 종양의 치료를 위해 연구되어야 한다.

서론

비소에 기초한 제제는 수세기동안 전통적인 의학에서 사용되어져 왔다. 중국에서 확인된 급성전골수성백혈병에 대한 삼산화비소(비소 기초물질, As_2O_3)의 효과 때문에, 비소화합물은 현대 암치료제 영역(cancer medicine)에서 다시 주목받고 있다(1-3). 비소는 3가나 5가의 산화형태로 황화물이나 산화물처럼 화학적으로 불안정한 상태로 또는 나트륨 염이나, 칼륨염, 칼슘염으로 존재한다. 소듐 메타아르세나이트 그리고 삼산화비소(비소 기초물질)를 포함한 3가 비소화합물은 설파 그룹을 가지고 있는 생물학적 리간드(ligands)와 반응하여 많은 효소를 저해시킨다(1,2,4,5). 의학적으로 많이 사용됨에도 불구하고, 비소에 만성적으로 노출될 경우 피부, 폐, 방광, 간, 신장에서의 암 발병이 증가하는 것으로 확인되었다(6). 하지만, 삼산화비소(비소 기초물질)를 이용한 급성전골수성백혈병 환자의 치료는 상당히 긍정적인 결과를 보여준다. 골수의 기능 상실이나 다른 심각한 임상적인 부작용을 보이지는 않는다. 더욱이, 초기 실험에서 삼산화비소(비소 기초물질)로 급성전골수성백혈병 환자를 치료한 이후 10년동안 2차 악성종양의 발생의 증가는 관찰되지 않았다. 단기간 또는 장기간에 걸쳐 아르세나이트를 항암요법에 이용하는 것은 안전하고 효과적이라는 것은 확실하다(3,7).

생체실험과 실험관 실험에서 비소는 핵의 붕괴, 염색체 이동, 염색체 변형과 유전자 복제의 증가를 포함하는 염색체 이상을 유발한다. 또한 비소 화합물은 포유동물의 세포에서 DNA와 염색체의 손상을 유발하고, DNA 복구를 방해하며,

DNA 메틸화를 변화시키는 것으로 보고되었다(8-10). 포유동물의 세포에서의 DNA, 염색체 손상, DNA 복구 저해, DNA 메틸화 변형은 활성산소종(ROS) 발생으로 인한 것이라 제시되었다(11).

그러나, 최근의 연구에서는 삼산화비소(비소 기초물질)가 텔로미어의 길이(12)와 텔로머라제의 활성(13), 그리고 텔로미어 결합 단백질(14)을 변화시킬 수 있음을 확인하였는데, 이는 텔로미어/텔로머라제 결합체가 삼산화비소(비소 기초물질)의 직접적인 타겟일 수 있음을 시사한다. 특히 텔로머라제의 RNA 성분이 결여된 생쥐 모델에서의 실험을 통해, 비소로 유발된 산화스트레스는 텔로미어의 마모, 텔로미어 말단부끼리의 융합(infusion), 세포자살형태의 세포 사멸 등을 촉진시키는 것으로 확인되었다(15).

비소는 또한 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT)의 전사 과정을 억제하는 강력한 저해제로 밝혀졌다. 이 효과는 임상적으로 의미 있는 농도 즉 경구 투여 후 환자의 혈액에서 확인되는 농도나 그 이하의 농도에서 나타난다. 이 효과는 인간 텔로머라제 역전사효소 발현에 중요한 두 전사 요소인 c-Myc 와 Sp1 의 양 혹은 활성의 감소로 인한 결과로 여겨진다(9).

소듐 메타 아르세나이트, KML001은 수용성 3가 비소화합물로, 경구 섭취가 가능한 약물이다. KML001은 인간 고형암 세포주와 이종이식에서 강력한 세포독성을 보였으며, 현재 인간 전립선암에서 임상 1/2단계를 진행하고 있다(16 그리고 연구자들의 브로셔). KML001과 삼산화비소(비소 기초물질)에 대한 한 연구에서 KML001의 작용 기전에 대해서 많이 밝혀지지 않는 않지만, 백혈병 세포주의 성장 억제 효과, 인간 텔로머라제 역전사효소의 전사 억제 효과, 세포자살 유발 정도는 두 약물 간에 큰 차이가 없었다. 백혈병에 있어, 세포자살의 유발에는 인간 텔로머라제 역전사효소 mRNA 의 발현감소가 동반되는 것으로 확인되었다(17).

이 논문에서 우리는 텔로머라제 효소 활성, mRNA와 단백질 수준에서 인간 텔로머라제 역전사효소의 발현, 그리고 텔로미어와 텔로미어 서열에 미치는 KML001의 효과를 보고한다. 또한 여러 고형암 세포주에서, 텔로미어의 길이와 KML001에 대한 세포의 감수성을 비교하였다. KML001에 반응하는 전립선 암 세포주에서 용량과 시간 경과에 따른 약물 효과를 면밀히 검사하였고, 이를 산화 스트레스 유발과 같은 확립된 아르세나이트의 작용 기작과 연관시켜 해석하였다. 우리는 텔로머라제 활성이 KML001에 의해 직접적으로 저해되지 않았고, 활성세포종의 생성이 텔로미어의 감소의 원인이 아님을 확인하였다. KML001은 직접 텔로미어와 결합하여, 텔로미어 반복 서열의 복제를 막고, 빠른 텔로미어의 손실을 유발하는 것으로 확인되었다.

재료와 방법

세포배양과 약물. 인간 전립선 세포주(PC-3, DU145), 결장 세포주(HT29), 폐세포주(H183) 그리고 인간 유방 세포주(MCF7, parental)는 미국유전자은행(ATCC)에서 구입하였다. 난소암 세포주 A2780과 A2780cis(시스플라틴 저항형)는 유럽

세포주은행(European Collection of Cell Cultures)으로부터 구입하였다. 돌연변이형 인간 텔로머라제 역전사효소(우성 음성 hTERT-/-)를 포함하는 녹색형광 단백질 발현 리포터 벡터와 대조군 리포터 벡터를 안정되게 도입한 MCF-7 세포주는 이전에서 보고된 바와 같이 제작하였다(18). 세포들은 10% 우태아 혈청(Hyclone사)이 추가된 RPMI 1640, 또는 DMEM (invitrogen사) 배지를 이용하여 표준 환경(5% CO₂/37°C/습기 환경)하에서 키워졌고 연속적으로 배양되었다. 안정적으로 도입된 MCF-7은 G418 (800ug/ml, Calbiochem사)에서 배양되었다.

KML001(소듐 메타아르세나이트, 코미녹스)은 (주)코미팜에서 제공받았고 50mmol/L 농도로 인산완충식염수에 녹인 후 -20°C에 보관되었다. 이 용액은 1년 이상 안정하다. 실험을 위해서는 실험 당일 RPMI 1640 배지로 희석하여 사용하였다.

실험관내 세포독성 분석. 암세포 증식에 대한 KML001의 효과를 측정하기 위해, 알레이(Alley et al) 등에 의해 제시된 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide(Sigma사)검색법을 사용하였다(19). 요약하자면, 세포를 well 당 2,000 개씩 96-well 플레이트(Nunc사)에 분주한 후, 37°C CO₂ 5% 조건에서 하룻밤을 배양하여 세포가 부착되도록 하였다. 약물은 0.001에서 100 umol/L 농도로 처리하되, 동일한 농도를 8번 반복하여 처리하였다. 5일 동안 연속해서 약물에 노출시킨 후, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide를 첨가하여 분석하였다. 자주빛 포르마잔(purple formazan)은 Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader 와 KC4 software를 이용하여 550nm에서 측정되었다. 성장 저해 정도는 대조군과의 비교, 약의 추가(제 0 일)시간 당시의 세포 성장 정도와 비교 평가하여 50% 억제농도와 100% 억제농도로 표현하였다. 3개의 개별 실험이 진행되었다.

평균 텔로미어 제한 단편 길이(TRF). 로슈(Roche)사의 진단용 TeloTAGG 텔로미어 제한 단편 길이 키트를 제조자의 설명을 따라, 그리고 과거에 우리의 경험에 따라 이용하였다. 스피어만 순위계수 테스트(Spearman rank coefficient test)를 이용하여 종양세포주들에 있어 텔로미어 제한단편(TRF)의 길이와 실험관내 KML001의 세포독성 활성을 비교하였다.

텔로머라제 반복서열 증폭법 (TRAP) 분석. 세포추출액에 KML001을 0.1 ~ 20.0 umol/L 농도로 처리한 후, 혹은 50% 억제농도와 100% 억제농도로 KML001을 세포에 처리하여 각각 8시간 24시간 경과한 시점에서 세포 추출액을 얻은 후 텔로머라제 반복서열 증폭법 분석으로 텔로머라제 효소 활성을 측정하였다. 텔로머라제 반복서열 증폭법 분석을 위해 기 보고되었듯이 TeloTAGG Telomerase PCR ELISA 키트(로슈진단사)가 사용되었다(20). PC-3 세포 추출액에 KML001

을 처리한 효과를 측정하기 위해 TRAPeze 키트(Intergen사)가 이용되었다. 총 세포 단백질(250ng)이 각 RT-PCR 반응을 위해 이용되었다. PCR 산물은 보고되었듯이 SDS PAGE gel에서 분리되었다(20).

인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT)의 정량화를 위한 실시간 PCR. KML001을 50%억제농도와 100% 억제농도로 각각 8시간, 24시간 처리한 세포와 용매 대조군으로 인산완충용액을 처리한 세포로부터 Qiagen RNeasy mini 키트(Qiagen사)를 이용해 총RNA를 추출하였다. 인간 텔로머라제 역전사효소 mRNA의 정량적 검출은 LightCycler 기기와 Light Cycler TeloTAGGG hTERT 정량화 키트(Roche Diagnostics사)를 이용하여 수행하였다. 실시간 과정은 기본적으로 제조사의 지시사항에 따라 행하여졌다; hTERT-encoding mRNA를 60°C에서 10분간 역전사시킨 후, 95°C에서 30초간 변성시키고, 특이 프라이머를 이용하여 95°C에서 0.5초, 60°C에서 10초, 72°C에서 10초 조건으로 40 사이클 PCR 반응을 수행하여 198bp의 유전자 단편을 증식시켰다. 실시간 PCR 반응은 hTERT 프라이머와 housekeeping 유전자 porphobilinogen deaminase 프라이머를 이용하여 총 100ng/ul의 RNA로 수행하였다. Porphobilinogen deaminase 반응 산물은 RT-PCR의 대조군으로 hTERT mRNA의 표준화와 정량화를 위해 사용되었다.

면역형광검사법과 면역블로팅(immunoblotting). 인산화된 히스톤 2AX(γ -H2AX, ser¹³⁹) 항체는 업스테이트(Upstate)에서, hTERT 항체는 노바카스트라(Novacastra)에서, 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-oxo-dG) 항체는 Trevigen사(clone 4E9)에서 구입하였다. 모든 1차 항체는 쥐 유래 단클론(monoclonal)이며 FITC 형광이 부착된 2차 마우스 단클론항체는 시그마사에서 구입하였다. 이전에 보고된 것처럼 hTERT 와 γ -H2AX 염색을 수행하였다(21). 8-oxo-dG 염색을 위해, 고정된 세포를 4N HCl로 5분간 변성시킨 후 50 mmol/L Tris base로 5분간 중화시켰다. 중화 후, 10% 우태아혈청을 포함한 10 mmol/L Tris-HCl에서 30분간 처리하였다. 이어 1시간 동안 1:300 비율로 희석된 1차 항체를 처리한 후, 1:100 비율로 희석된 2차 항체를 30분간 실온에서 처리하였다. 슬라이드는 인산완충액으로 세척하고 DAPI로 대비염색하였다. 결과를 분석하고 신호를 정량하기 위해 Leica DM4000 현미경과 5.0 openlab improvision software를 이용하여 63배 확대한 현미경사진을 찍었다. γ -H2AX의 정량은 마스크로서 이중층을 이용하여 핵의 형광 광도를 측정하였다. 적어도 한 실험당 100개의 핵이 평가되었다. 처리군과 대조군의 평균은 측정된 수치로부터 각각 계산하였고, 형광 광도는 막대도형으로 표현되었다. γ -H2AX에 대해 면역블로팅은 기존에 보고된 방법대로 진행하였다(21).

인공 텔로미어와 KML001의 결합. 인공 텔로미어 서열 5'-(TTAGGG)_x-3'에 대한 KML001의 결합을 확인하기 위해, 시스플라틴의 텔로미어 결합에 대한 이쉬바쉬

와 리파드의 방법을 이용하였다(22). 원자흡수 분광기 대신, 고분해성 매트릭스 보조 레이저 탈착 이온화 질량분석기법을 이용하였다. 질량분광은 Axima MALDI-TOF 질량분석기를 통해 얻어졌다.(Kratos/Shimadzu) 텔로미어 그리고 변이 염기서열은 우리의 Biopolymer Core 시설에서 합성되었다. 시스플라틴 (1mg/mL; Novaplus)을 텔로미어 DNA 부착 분석에서 양성 대조군으로 이용하였다. 요약하면, 올리고뉴클레오티드와 KML001은 100ul 액상 용액에서 고정된 물 비율(molar ratio) 1:10으로 37°C에서 24시간 동안 방치되었다. TTAGGG배열은 약물과 함께 추가적으로 48시간, 72시간 방치되었다, 그 후 Speed Vac 시스템을 이용하여 건조시켰고, MALDI 를 행하기 전에 2.5ul의 3-hydroxypicolinic acid 매트릭스에 재부유하였다.

세포주기 중기에서의 텔로미어 FISH(telomere FISH).

70%의 밀도에 도달한 PC3 세포에 KML001 0.24umol/L와 9umol/L을 처리하거나, H183세포에 14umol/L, 25umol/L 처리한 후 T75조직배양 플라스크에서 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였다. 대조군은 인산완충액을 처리한 후 동일하게 배양하였다. 배지 제거 후 10g/ml 의 콜세마이드(colcemide)를 함유한 배지를 처리한 후 37°C에서 90분간 배양하였다. 세포 처리와 슬라이드 처리는 기존에 보고된것처럼 진행되었다(21). 슬라이드는 교잡(hybridization)과정 전에 적어도 3시간 동안 실내온도에서 건조시켰다. 로다민 발색단(rhodamine fluorophore)으로 라벨링한 인간 텔로미어를 이용하여 제조사의 프로토콜에 따라 PC-3 세포의 metaphase에 교잡(혼합) 실험을 진행하였다. 염색체는 DAPI로 대비 염색하였다. AX70 올림푸스 형광현미경의 100배 비율에서 빨간색(로다민)과 파란색(DAPI)이 동시에 검출 되는 rhodamine/DAPI/FITC Triple Band Excitation Filter를 이용하여 영상화했다. 텔로미어의 신호는 중기 염색체에서 검출 가능한 텔로미어의 반복 서열(rhodamine red)의 수를 세어 정량화하였고, 총 세어진 염색체에 대해 %로 표현하였다. 최소 100개의 염색체가 평가되었고, 실험은 3반복 하였다.

염색질 면역침강법

왕성하게 성장하고 있는 10^7 개의 PC-3 세포에 KML001을 IC₁₀₀ 농도(9umol/L)로 2, 8, 24시간 동안 처리한다. 대조 세포는 24시간 동안 인산완충액으로 처리한다. 아다박사 등(d'Adda di Fagagna)의 보고처럼, 염색질 면역침강법(ChIP assay)을 이용하여 염색체 말단 복제서열에 대한 γ -H2AX의 연관을 연구하였다.(23)

요약하자면, 세포는 인산완충용액(PBS)으로 두 번 세척한 후, 1% 포르말데하이드로 37°C, 10분간 고정시킨다. 차가운 PBS로 세척 후, 세포 10^7 /ml당 1% SDS, 50mmol/L tris-HCL, 10nmol/L EDTA 용액으로 용해시킨다. DNA를 절단하기 위해 초음파를 이용하였고, 4°C에서 10분간 원심 분리한다. 1.2ml의 0.01% SDS, 1.1% triton X-100, 1.2mmol/L EDTA, 16.7mmol/L Tris-HCL과

150mmol/L NaCl 용액에 희석시킨 200ul 세포 추출액에 protein G plus/protein A agarose suspension/salmonsperm DNA를 첨가하여 전처리한다. 여기에 생쥐 단클론 phospho-H2AX 항체나, telomere repeat binding factor 1 항체, 대조군으로 IgG를 첨가하여 4°C에 하룻밤 방치한다. 면역 침강된 고형물(pellet)을 처음에는 150mmol/L NaCl이 첨가된 0.1% SDS, 1% triton X-100, 2mmol/L EDTA, 20mmol/L Tris-HCl로 세척하고, 두 번째는 500mmol/L NaCl가 첨가된 동일 용액으로 세척한다. 그 다음, 0.25mmol/L LiCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 1mmol/L EDTA(pH 8.0), 10mmol/L Tris-HCl(pH 8.0), 1mmol/L EDTA 용액으로 세척한다. 염색질은 1% SDS와 0.1mol/L NaHCO₃가 함유된 비드500ul로 추출한 후, 5mol/L NaCl 20ul을 추가하여 4시간 동안 65°C에서 교차 결합 (cross-link)되도록 한다. 1mol/L Tris-HCl(pH 6.5) 20ul과 0.5mol/L EDTA 10ul, proteinase K 20ug를 넣고, 45°C에서 1시간 방치한다. 페놀 추출한 DNA를 -80°C에 하루 동안 침강시킨 후, 침강된 것을 10ul의 물에 용해시켜 95°C에 10분간 변성시키고, DNA 250ng을 schleicher&Schuell apparatus로 Hybond 막에 점적한다. 막은 teloTAGGG telomere length kit을 사용하여 발색하고, 발색 신호는 평균 신호 강도값과 총 농도를 측정한 후 NIH ImageJ software를 사용하여 정량한다. 이렇게 절대강도값을 결정하고, 절대강도값을 대조샘플의 절대강도값으로 나누어 상대강도값을 구하였다.

통계학적 테스트. 두 개의 처리군 사이의 통계학적 유의성은 Student's test를 이용하여 $P < 0.05$ 이면 유의성이 있는 것으로 평가하였다. 이용된 소프트웨어 SPSS 2000 SigmaPlot and SYSTAT version 10 이다.

결과

인체 암세포주에 대한 KML001의 세포독성 활성은 텔로미어의 길이와 상관성이 있다. 우리는 KML001을 10개의 암세포주와 배아 신장세포주 HEK293T에 처리한 후 결과를 평가하였다(Table 1). 암세포주에는 텔로머라제 없이 대체신장(伸張)기전(alternative lengthening mechanism)을 통해 텔로미어를 유지하는 골육종세포주 Saos2가 포함되어 있다. 각세포주에 대한 KML001의 세포독성을 그들의 텔로미어 길이와 비교하였다(Table 1, Fig. 1A 와 B). 전립선암, 난소암, 폐암, 유방암, 결장암 세포주 중에서 전립선 암세포주인 PC-3세포가 KML001(50% 억제농도, 0.23umol)에 대한 감수성이 가장 높았고, 가장 짧은 (2.5kb) 텔로미어를 가지고 있었다. 텔로미어에 대한 대체신장기전을 가진 세포주인 Saos2는 KML001(50% 억제농도, 25umol)에 가장 낮은 반응을 보였고, 텔로미어의 길이가 길었다(텔로미어 제한 절편 길이13.5kb). 이 두 가지 세포주에 대한 50%억제농도의 값은 100배(50%억제농도의 비율 108.7) 이상의 차이를 보였다(Table 1, Fig1). 텔로미어 제한 절편 길이가 Saos2와 비슷한 인간 폐암세포주 H183(13kb)도 PC-3 세포와 비교했을 때 50%억제농도 비율이 60.8로 높았

다 (Fig. 1B). HEK293T 정상 신장 세포는 가장 긴 텔로미어 길이에도 불구하고 KML001에 대한 감수성이 높았다(50%억제농도 13.5, Table1; Fig1A 와 B). 일반적으로 낮은 50%억제농도(IC50) 값은 짧은 텔로미어와 양의 상관 관계에 있었다 (Table 1); 우리가 세포독성과 텔로미어의 길이에 대해 스피어만 순위 상관 계수 (Spearman rank correlation coefficient) 방법을 적용했을 때, 유의 상관 계수는 $r^2=0.9$ 로 확인되었고, 이는 텔로미어와 KML001의 세포독성간의 상관성을 의미한다(Fig. 1C). 이런 상관성은 유방암과 전립선암 세포주에서 가장 명백하였다 (Table 1). 후속 분자생물학적 실험을 하기 위해 전립선 암 세포주 PC-3과 DU145이 선택된 이유는 전립선암에 대한 임상2상실험이 진행되고 있고, 비교적 짧은 텔로미어를 가지고 있기 때문이다. H183 폐암 세포주는 긴 텔로미어 길이를 가진 세포주로서 선택되어, 짧은 텔로미어를 가진 세포와 함께 KML001의 효과를 비교하기 위해 이용되었다.

텔로머라제 활성과 인간 텔로머라제 역전사효소(hTERT)에 대한 KML001의 영향. KML001 이 텔로머라제의 효소 활성화에 또는 그것의 촉매 서브유닛(subunit)인 텔로머라제 역전사효소에 미치는 영향을 확인하기 위해, PC-3 세포주로부터 텔로머라제 추출액을 얻은 후 다양한 농도의 KML001을 첨가하여 TRAP 분석을 수행하였다(Fig. 2A). 또한 KML001을 50% 억제농도, 100% 억제농도로 각각 8시간 24시간 처리한 전립선 암세포로부터 텔로머라제 추출액을 얻어 텔로머라제의 활성을 측정하였다(Fig. 2B, 2C, 그리고 보충 S1A). 인간 텔로머라제 역전사효소의 발현은 mRNA 레벨에서 평가되었다(Fig. 2D). KML001이 20umol/L 정도의 높은 농도에서도 텔로머라제의 활성화에 직접적으로 영향이 주지 않음을 확인하였다(Fig. 2A). 유사하게, 텔로머라제를 추출하기 전 KML001을 8시간 처리한 PC-3 세포 또는 DU145 세포에서 텔로머라제에 거의 영향이 없음을 확인하였다 (Fig. 2B). KML001을 50% 억제농도, 100% 억제농도로 24시간 처리한 경우에 작지만용량 의존적으로 텔로머라제 활성이 억제되는 것으로 확인되었다(통계적으로 의미 없음. $p>0.05$) (Fig. 2B, 보충 FigS1A). 이것과 동일선상에서, 촉매 서브유닛 인간 텔로머라제 역 전사효소와 같은, 텔로머라제 단백질은 24시간에 세포 핵으로부터 세포질로 이동되었다. 이런 현상은 짧은 텔로미어를 가진 전립선암세포에 100% 억제농도로 처리했을 때 더욱 두드러지게 나타나는 것으로 확인되었다(Fig. 2C, 보충 Fig. S1B). 텔로미어로부터 인간 텔로머라제 역전사효소의 분리, 이동은 효소 활성을 잃게 하여 24시간 후의 TRAP 분석에서 보는 것처럼 효소 활성이 확인되지 않는다(Fig. 2B). 긴 텔로미어를 가지는 폐암세포주에서 세포 핵으로부터 세포질로의 텔로머라제 역 전사효소의 이동(재배치)은 24시간 이내에는 보이지 않는다(결과가 논문에 제시되지는 않았다. Fig. 2C)

KML001에 의한 텔로머라제 효소의 저해에 대한 다른 가능한 설명은 전사 레벨에서의 인간 텔로머라제 역전사효소 발현의 감소이다. 약물을 살아있는 세포에 처리했을 경우 저해 효과가 확인되는데 반해(Fig. 2B), 세포 추출물(Fig. 2A)에서는 저해 효과가 확인되지 않는 이유가 전사 과정의 저해 때문이라 볼 수 있다.

이를 확인하기 위해 KML001을 처리한 PC-3 세포로부터 추출된 RNA를 가지고 실시간(real time) PCR 분석을 수행하였다. 인간 텔로머라제 역 전사효소 mRNA 발현이 100% 억제농도에서 8시간 후($p=0.04$)에 그리고 50% 억제농도와 100% 억제농도에서 24시간 후(각각 $p=0.002$ 그리고 0.003 , Fig. 2D)에 확실히 유의성 있게 억제되는 것을 관찰하였다. 이러한 관찰은 비소삼산화물에 대한 이전의 보고서들과 일치한다(9,17). 이러한 결과로부터, 텔로머라제의 전사에 대한 KML001의 영향과 텔로머라제 역전사 효소의 이동이 텔로머라제 활성 저하를 설명한다고 볼 수 있다.

텔로미어의 배열에 KML001의 직접 결합함. 금속종류들이 DNA 이중사설의 GGG 세 염기에서 중앙에 위치한 구아닌(guanine)에 대해 높은 친화성을 갖고 있다는 것은 잘 증명되어 있다(22,24,25). 예를 들면 cis diamminedichloroplatinum(CDDP, 시스플라틴)은 N7-Pt-N7 GG 사설 내부 교차결합(intra-strand cross-links)을 형성한다고 알려져 있다. 텔로미어의 G가 많은 서열, (TTAGGG) n 는 사람의 텔로미어의 경우 130-210염기쌍(bp)들의 C-rich strand를 지나서까지 연장되는데 이것은 시스플라틴과 반응한다고 한다(22,24,25). 시스플라틴은 특별히 텔로미어에 대한 독성을 가지는데, 이것은 텔로미어로부터 전사 생성물이 존재하지 않기 때문이다. 텔로미어의 DNA에 손상이 가해지면 전사와 연계된 뉴클레오타이드 절단 복구 시스템에 의해 복구되지 못한다. 다른 한편으로는 이중 나선의 단백질 암호화 DNA 서열은 복구될 것이다. 삼산화비소(비소 기초물질)는 DNA와 RNA의 G-C, A-T, A-U염기 부위에 반응하는 것으로 알려졌다(26). 3가 비소 화합물인 KML001이 텔로미어의 배열에 결합하는지, Fig. 2C에서의 인간 텔로머라제 역전사효소 이동을 설명하는 것이 가능한지 확인하기 위해 우리는 인위적인 텔로미어의 염기 서열 단편 ([TTAGGG]3와 [TTAGGG]6)을 KML001과 같이 방치하였다. 그리고 시스플라틴을 양성 대조군으로 사용하였다. KML001 또는 시스플라틴과 [TTAGGG]3을 1 : 10의 비율로 24, 48, 72시간 동안 37°C, 24시간 방치하였다 (Fig. 3A). 텔로미어의 DNA 단편에 KML001을 첨가하고 고해상도 MALDI 질량 스펙트럼 측정기로 측정하였더니 약 130m/z(질량-전하 비율)의 분자량 이동이 있었다. 이것은 세 개의 텔로미어 서열 반복에 한분자 비율로 KML001(분자량 129.91)이 부착됨을 의미한다(Table 2, Fig.3A). 방치 시간을 늘려도 세 개의 TTAGGG 반복 서열에 부착되는 KML001 분자의 수는 변화되지 않았다. 6개의 텔로미어 반복 배열인 [TTAGGG]6을 사용하면 두 분자의 KML001이 결합되었다(Table 2). 변이 분석을 통해서 구아닌(guanine)과 구아닌까지의 트리플렛(triplet) 주변의 티민(thymine) 염기가 KML001의 결합에 중요함을 밝혔다(Table 2). 구아닌만으로 구성되는 육핵산 반복은 4분자의 KML001과 결합한다. TTT와 3개의 연속된 구아닌은 두 분자의 KML001과 결합하는데 반해 AAAGGG는 KML001과 결합하지 않는데 이것은 TTAGGG의 반복에서 아데닌(adenine)의 존재는 비소화를 방해한다는 것을 시사한다(Table 2). 그리고 모든 A와 모든 T 육핵산은 KML001과 결합하지 않는다.

시스플라틴을 [TTAGGG]3 반복에 첨가되면 3개의 분자가 결합하고, 이것은 한개의 Pt분자가 GGG 트리플렛(triplet)에 반응한다는 기존 보고와 일치한다(22,25). 텔로미어의 배열에 결합하는 KML001이 암세포의 텔로미어 유지에 대한 생물학적인 영향력을 갖고 있는지 그리고 그 영향이 텔로미어의 길이에 의존하는지를 평가하기 위해 PC-3 세포와 H183 세포를 KML001 50% 억제농도와 100% 억제농도로 24, 48, 72시간동안 처리하였다. FISH분석을 위해 유사분열 중기 상태로 고정된 세포에 모든 인간 유래 텔로미어 탐침(探針, probe)을 처리하였다(염색체는 파란색, 텔로미어는 붉은색 Fig. 3B-D). 50%억제농도로 처리된 PC-3 세포의 중기를 대조군과 비교할 때 어떤 시점에서든 차이를 확인할 수 없었다(차이를 보이지 않았다, Fig 3B). KML001 100% 억제농도로 처리한 후 48시간째부터 전체 텔로미어의 빠른 소실을 관찰하였다; 이 시점과 이 약물의 농도에서 PC-3 세포 중기의 각 염색체들로부터 4개의 텔로미어중에서 2개의 텔로미어가 소실되었는데 이것은 염색체의 장완과 단완과 무관하게 임의적으로 진행되었다(Fig. 3C, b). 300개의 중기 염색체중 검출가능한 텔로미어 반복 신호를 세었으며(counting), $39 \pm 2.8\%$ 의 텔로미어 신호가 사라졌다(소실되었다. Fig. 3B; $P=0.0014$). KML001에 노출된 지 72시간 후 극소량의 텔로미어의 신호만 남았고($16.5 \pm 4.9\%$) 대부분의 염색체들은 거의 대부분 텔로미어를 소실하였다(Fig. 3C, c; $P=0.0011$). 이것은 또한 Fig.3C(파란색 박스로 삽입된 부분)에서 보여지는 것처럼 분열 간기 핵에서도 명백하다. 대조적으로 H183세포(텔로미어제한단편, 13kb)에서는 대조 세포와 비교할 때, KML001의 100% 억제농도에서 72시간을 노출시켜도 텔로미어 신호의 손실을 유발하지 않았다(Fig 3B and D a-b). 이러한 결과들은 앞서 이야기되었던 텔로미어의 결합/손실화 이론을 지지한다. 이런 영향은 KML001에 대해 농도의존성이 있으며, 텔로미어의 길이에 의존하는 것으로 확인되었다.

KML001에 의한 텔로미어 연관 DNA손상 유도의 특이성. 텔로미어 구조의 손상이나 텔로미어 길이 감소에 의해 염색체 말단의 보호가 불충분해지면 언캡핑(뚜껑제거, uncapping) 신호 발생으로 인해 세포 성장이 지연되는 현상이 유도된다고 최근 밝혀졌다(27,28). 이것은 DNA 이중나선 손상(DSB)에 의해 매개되는 DNA손상 반응 경로를 활성화한다. 왜냐하면 짧고 기능장애를 갖는 텔로미어는 이중 나선 DNA의 절단(double-strand DNA break)과 닮았기 때문이다(28). γ -H2AX의 139번 세린(serine)위치에서의 인산화는 DNA 이중나선 손상 신호 과정의 매우 초기에 해당하기 때문에 텔로미어 연관 DNA손상 점검(checkpoint)반응의 지표가 된다(21, 28). 따라서 KML001 처리후에 발생하는 인간텔로머라제 역전사효소의 손실과 텔로미어의 결합이 PC-3 세포에서의 γ -H2AX의 유도반응을 일으키는가를 시험하였다(Fig. 4A-D). 그 결과 H2AX는 농도 의존적인 방식으로 인산화 됨을 확인하였된다; 많은 H2AX 인산화 신호가 100% 억제농도로 처리된 PC-3 세포주와 DU145 전립선암세포주에서 관찰되었다($p,0.0001$, Fig.4B-C, 보충 FigS1C). γ -H2AX의 유도는 면역블로팅법에 의해서 관찰되었는

데, 50%억제농도와 100% 억제농도에서 2시간 동안 KML001을 처리한 PC-3 세포에서 빠르게 관찰되었다(Fig 4C). 그러나 H183 폐암세포들은 KML001의 100% 억제농도에서 24시간동안 처리하였으나, γ -H2AX 인산화 신호를 확인할 수 없었다.

KML001의 처리로 인산화한 H2AX와 텔로미어의 특이적인 결합이 유도되는지 평가하기 위해 반응성이 좋은 전립선 암세포 PC-3에 KML001를 처리한 후, anti- γ -H2AX 항체로 단백질/DNA 복합체를 침강시키고, 탐침이 부착된 텔로미어 서열 [(TTAGGG) n ;Fig 4D]로 확인하는 ChIP assay를 수행하였다.

γ -H2AX과 결합한 텔로미어 반복서열이 점차 증가하는 현상은 γ -H2AX 발현 양상을 보여주는 Fig.4C의 Western blot 데이터와 일치하는 것으로 확인되었다. 텔로미어에 결합된 γ -H2AX 단백질은 KML001에 노출한지 2시간 후에 2배 (신호 강도, 1.7) 증가하였고, 8시간과 24시간에 추가적으로는 5배(신호강도 10.4~10.7)까지 증가하였다(Fig. 4D). 텔로미어 결합 단백질인 텔로미어 반복서열 결합 인자 1 항체를 가지고 ChIP를 수행했을 때, 대조군 PC-3 세포에서 약한 TTAGGG 반복 시그널을 찾은 반면, 음성 대조군으로 마우스의 IgG를 사용하여 면역 침강을 수행하였을 때, 어떠한 텔로미어 배열도 침강되지 않았다(Fig. 4D). 이것은 특이적인 텔로미어 DNA 손상이 일어났음을 의미한다. 이것은 아르세나이트에 의해 생성된 ROS로 인한 DNA 손상과 비교된다. 활성산소종 생산에 의한 8-oxo-dG의 형성은 잘 연구되어 있으며, 8-oxo-dG는 일반적으로 산화 스트레스의 지표로 이용된다. PC-3 세포와 DU145 세포를 8-oxo-dG에 대한 항체를 사용하여 염색하고 동시에 γ -H2AX 면역형광실험을 수행하였다. 그 결과, 8-oxo-dG가 생성된 손상부위는 KML001의 높은 농도에서, 훨씬 나중에 발생하였다(Figure 4, Figure S1D). 24시간 이상 동안, 약물 농도별(50%억제농도, 70%억제농도, 90%억제농도, 100%억제농도)로 면밀히 분석한 결과, 활성산소종으로 유발된 8-oxo-dG의 형성은 24시간 이전에 발생하지 않았고, PC-3 세포에서 KML001의 100%억제농도에서만 관찰되었다. DU145세포에서는 KML001의 100% 억제농도에서도 아주 작은 8-oxo-dG만 형성되었다.

고찰

비소화합물은 세계적으로 가장 오래된 약물의 하나이며 잘 알려진 독성물질의 하나이다. 흥미롭게도 항암치료에 유용하며, “소량의 독성물질은 최상의 의약품이고 너무 많은 과량의 좋은 의약품은 독성을 일으킨다”라는 파라다임에 대한 최상의 예이다(29). 비소화합물의 역설적인 항암 효과에 대한 기전은 아직 명확히 밝혀지지 않았지만 몇가지 보고된 연구들은 텔로미어와 텔로머라제의 관여에 초점이 맞추어져 있다(1, 15, 29). 예를 들면 인간 세포는 설치류 동물의 세포보다 삼산화비소(비소 기초물질)에 더욱 민감하다. 이러한 차이는 쥐(mouse)의 세포에서 나타나는 매우 긴 텔로미어에 비해 인간세포에서 짧은 텔로미어가 발견되는 것과 관련있다(15). 암세포와 인간의 정상 세포를 구별하는 특징은 효소인 텔로머라제의 발현과 암세포의 짧지만 안정한 텔로미어의 길이에 있다 ; 이러한 차이는

3가 비소의 항암 활성화에 중요한 역할을 한다(30,31).

본 실험에서는 소듐 메타 아르세나이트의 세포독성은 텔로미어의 길이에 의존적이며, 짧은 텔로미어의 세포가 긴 텔로미어를 갖는 세포보다 약물에 더욱 민감하고 감수성이 있다라는 명확한 증거를 제공한다(Table1). Saos2세포는 긴 텔로미어를 갖는 세포 라인으로서 자체의 텔로미어의 길이를 유지하는 대체신장기전(ALT)(예, 텔로미어 교환)을 통해 텔로머라제와는 무관하게 텔로미어 길이를 조절한다. 짧은 텔로미어(2.5kb, 참조문32)를 가지는 감수성 높은 PC-3 전립선암 세포와 비교했을 때 소듐 메타 아르세나이트에 대한 100배 이상의 “저항성”을 보였다. 우리가 추가로 밝힌 내용은 소듐 메타 아르세나이트가 인간의 텔로미어의 염기서열에 결합하고, 매우 짧은 텔로미어(2.5kb)를 가진 PC-3 전립선 암 세포주에서 텔로미어의 급격한 손상을 유도하지만, 긴 텔로미어를 가지는 폐암세포주에서는 그렇지 않다는 것이다(Fig. 3). PC-3 세포에 KML001을 100%억제 농도로 첨가 후 텔로미어 탐침을 활용해 중기와 간기의 FISH를 수행한 결과, 전체적인 텔로미어는 48시간 경과 후 소실되는 것으로 확인되었다. 72시간 후에는 대부분의 염색체가 텔로미어를 잃게 되었지만 말단간 융합 현상을 보이지는 않았다. 대조적으로, KML001은 H183 폐암세포에 대해서는 72시간에도 텔로미어 손실을 유발하지 않았다. H183 폐암세포에서 텔로미어 손상을 일으키기 위해서는 노출시간의 연장 또는 100%억제 농도 이상의 KML001 처리를 필요로 할 것이라 여겨진다. 이러한 결과는 이전에 리우(Liu)등이 텔로머라제 유전자 결핍(hTR^{-/-}) 생쥐와, 연령이 상응하는 정상 생쥐의 배아를 가지고 수행한 연구 결과들과 일치한다. 긴 텔로미어를 갖는 정상 (Wt) 배아는 30 μ mol/L의 삼산화비소(비소 기초물질)에 노출 후 72~96 시간 후에 텔로미어의 손실 현상이 관찰되었으며, 이것은 염색체 말단의 융합 현상을 초래하여 텔로미어는 더 이상 관찰되지 않았다. 놀랍게도 늦은(late) 세대의 텔로머라제 결여 생쥐로부터 유래한 짧은 텔로미어를 갖는 배아 세포에서는 삼산화비소(비소 기초물질)에 의한 염색체 말단의 융합 현상이 관찰되지 않았다. 그러나 짧은 텔로미어를 갖는 텔로머라제 결여 생쥐 배아는 비소에 의한 세포 생존 억제에 대해 정상 배아보다 더 큰 감수성을 가졌다(15). 이러한 정상 생쥐와 텔로머라제 결여 생쥐 배아에서 진행된 실험 결과는, 정상 인간 세포와 암세포에 대한 소듐 메타 아르세나이트의 효과를 잘 반영한다. Liu 등은 긴 텔로미어를 가진 생쥐 배아와 짧은 텔로미어를 가진 생쥐 배아에 대한 삼산화비소(비소 기초물질)의 효과가 차이 나는 것이 활성산소종의 생성과 활성산소종에 의한 텔로미어의 손실에 의한 것이라 생각한 반면, 우리는 소듐 메타 아르세나이트가 텔로미어의 반복 서열에 직접 결합하여 텔로미어의 손상을 초래한다는 명확한 증거를 제시하였다(Fig. 3A). 텔로미어의 비소 결합은 DNA손상 신호를 유발하는데, 이것은 빠르며 용량 의존적인 H2AX의 인산화 현상으로 확인되었다. H2AX의 인산화는 γ -H2AX ChIP분석에서 확인된 것같이 텔로미어와 관련이 있으며, 활성산소종에 의한 DNA 손상인 8-oxo-dG의 형성에 선행되었다(28,33). 텔로미어에 특이적인 γ -H2AX 발현은 소듐 메타 아르세나이트 50% 억제농도에 노출시킨 후 2시간 경과 시점에서 빨리 발생하는 반면,

8-oxo-dG는 PC-3 세포에 KML001을 100% 억제농도로 첨가후 24시간 경과한 후에만 유도된다(Fig. 4). 우리의 결과들은, 소듐 메타 아르세나이트에 의한 텔로미어의 손실과 DNA 손상 신호는 활성산소종에 의해 매개되는 것이 아니라 텔로미어의 비소화에 의해 유발된다는 것을 보여준다.

텔로머라제 활성화에 대한 소듐 메타 아르세나이트의 효과를 검증하는 TRAP assay 실험을 수행할 때, KML001을 분리한 효소에 직접 처리하거나 또는 처리된 세포로부터 효소 활성을 추출하거나 약물은 텔로머라제 활성화에 영향을 주지 않았다. 그럼에도 불구하고 인간 텔로머라제 역전사효소 단백질은 핵으로부터 세포질로 이동되었고, 이런 현상은 G-rich 3' overhang을 통해 G-quadruplex의 생성을 안정화시킴으로서 작용하는, 텔로미어를 타겟으로 특별 디자인된 새로운 종류의 텔로머라제 억제제, G-quadruplex ligands에 의해서도 동일하게 관찰된다(21,30,31,34). G-quadruplex ligand인 BRACO19에 의해 인간 텔로머라제 역전사효소가 텔로미어에서 세포질로 이동되고, 유비퀴틴(ubiquitin)과 동일 영역에 재배치 되는 것을 관찰하였는데, 이것은 유비퀴틴-프로테아좀 시스템(단백질 분해 시스템)에 의해 텔로머라제 역전사효소가 분해됨을 시사한다(34). 본 실험에서 보여지는 전립선암 세포에서의 텔로미어의 염기서열의 비소화는 유사한 효과를 나타낸다.

소듐 메타 아르세나이트가 텔로머라제 단백질의 활성화에는 미미한 효과를 갖지만, 인간 텔로머라제 역전사효소의 전사를 저해하는 것이 관찰되었다. 실시간 PCR에 의해서 mRNA로부터 증폭된 인간 텔로머라제 역전사효소의 전사물은 소듐 메타 아르세나이트 50%억제농도와 100%억제농도 처리 후 24시간 경과시점에 급격히 감소하는데, 이것은 다른 연구자들에 의해 보고된 결과와 일치한다(9, 17). 우리의 텔로머라제/텔로미어 단백질, RNA, DNA 자료와 최근의 연구 레포트를 검토한 결과 인간 텔로머라제 역전사효소 mRNA의 감소는 RNA의 A-U 염기에 대한 소듐 메타 아르세나이트의 결합에 기인할 것이라는 추측이 가능하다(26).

급성 전골수구 백혈병 세포들을 자살시키는 삼산화비소(비소 기초물질)의 기전은 집중적으로 연구되어졌고 인간 텔로머라제 역전사효소 mRNA의 발현 억제현상도 보고되었다(9, 17, 29). 급성전골수성백혈병에서 자주 관찰되는 한 가지 흥미로운 기전은, 전골수구 백혈병 유전자(PML)인 retinoic acid receptor- α (RAR- α) 융합 단백질의 빠른 분해 유도인데, 이것은 전골수구 세포의 분화능을 회복시킨다(35). 삼산화비소(비소 기초물질)의 처리는 전골수성백혈병유전자를 핵기질에 위치하게끔하고 이것은 sumo의 결합을 유도하고, 결국 단백 분해 기구인 프로테아좀(proteasome)으로 이동되어 분해된다. 전골수성백혈병유전자는 세포핵내의 전골수성백혈병 핵체(PML nuclear bodies)라고 하는 독립된 공간에 존재한다(29). 이것은 대체신장 기전에 의한 텔로미어 길이 조절에 관련되어 있으며, 텔로미어 DNA와 동일한 위치에 존재하는 것으로 밝혀졌다(36). 급성전골수성백혈병에서 삼산화비소(비소 기초물질)는 텔로미어 유지를 억제하는 두 가지 기작을 가지는 것으로 여겨진다. 첫째, 텔로머라제에 의해 조절되는 텔로미어 배열과 인간

텔로머라제 역전사효소 mRNA와 결합하며 텔로미어 DNA 손상신호를 유도하고 빠른 세포 사멸을 유도하는 기작이다. 둘째, 전골수성 백혈병 유전자를 분해시킴으로써, 전골수성백혈병 핵체를 이용하여 텔로미어 교환이라는 경로로 텔로미어를 복구함으로써 세포사멸을 피하려고 하는 시도를 막는다(32). 따라서 급성전골수성백혈병에서 전골수성백혈병유전자의 존재여부는 비소 치료에 대한 감수성을 결정한다.

우리의 결과들과 다른 연구자들의 결과들은 함께 고려해 볼 때, 아르세나이트(arsenite)는 텔로미어 길이 의존적인 방식으로 텔로미어에 영향을 미친다고 판단된다. 암세포와 같이 짧은 텔로미어를 갖고 있는 세포에서 염색체 말단의 융합 없이 텔로미어의 손실을 통해 항암 효과를 발휘할 것으로 생각된다(15). 여러 인간 종양 세포주(Table 1)에 대한 세포독성 자료, 그리고 PC-3 세포주에서 보인 텔로미어 손실 결과를 고려할 때, 소듐 메타 아르세나이트는 다양한 종류의 짧은 텔로미어를 가지는 암의 치료에 유용하다는 결론을 내릴 수 있다. 소듐 메타 아르세나이트를 이용한 약동학 연구에서, 정맥 주사후 15 μ mol/L의 최고 혈장 농도와 경구 투여후 2.5 μ mol/L의 최고 혈장 농도를 확인하였다(16). 이것은 이 약물의 치료 범위로서, 우리의 세포주 연구와 짧은 텔로미어를 갖는 특별한 세포주로부터 얻어낸 50%억제농도와 100%억제농도의 대부분을 포함한다.

중요한 사실은 삼산화비소(비소기초물질)와 KML001은 액상 상태에서 동일한 물질이라는 점이다. 왜냐하면, 삼산화비소(비소기초물질)는 물에 잘 녹지 않아, 수산화나트륨sodium hydroxide에 녹여야 하며, 생리적 pH를 조절하면 소듐 메타아르세나이트를 생성하게 된다. 사실, 삼산화비소(비소기초물질)을 연구한 연구자들은 그들의 연구에서 소듐 메타아르세나이트를 직접 사용해 왔다(10). 우리는 Table 1에서와 같이 실험관 내에서 KML001 과 수용화된 삼산화비소(비소기초물질)의 세포독성을 비교하였고, 이 두 가지 약물의 효능에는 차이가 없다는 것을 발견했다(자료 첨부되지 않음). 이것은 그들은 매우 유사하게 작용할 가능성을 제시한다. 경구 섭취 가능성, 수용성, 분자적 항암 효과들을 가지고 있으므로, KML001 은 완전 임상 개발용 후보물질이다.

최근 암학회지에 발표된 텔로미어 길이에 관한 메타분석(meta-analysis)에 따르면 텔로미어 길이와 같은 개념인 텔로미어의 함량(TC)은 암의 예후와 관련 있다(37). 전립선 암에서 낮은 텔로미어 함량/짧은 텔로미어는 암전이와 재발을 의미한다. 유방암의 경우 낮은 텔로미어 함량은 부정적인 임상 결과를 예고하며, 5년간의 유방암 재발 없는 생존 기간도 감소시키는 것으로 나타났다(37-39). 이런 두 종류의 난치성 종양에 대해 KML001을 기초로 한 병행치료가 검토되어야 한다. 텔로미어와 부착하는 시스플라틴과 함께, 혹은 이제 막 임상1상을 진입한 더 특이적인 텔로머라제 저해제 hTR 안티센스(antisense) 올리고뉴클레오타이드, GRN163L와 함께 병행 치료를 고려할 수 있다(30,31).

이익 분쟁에 대한 공개(Disclosure of potential conflicts of interest)

A.Burger 는 연구를 후원한 (주)코미팜으로부터 주요 연구비를 지원받았다.

사사(Acknowledgments)

우리는 텔로미어 올리고뉴클레오타이드 서열과 그 변이 올리고뉴클레오타이드 서열의 합성, 질량 분광기술(mass spectrometry) 자료의 분석 도움에 대해 니콜라스 암볼로스 박사(Dr. Nicholas Ambulos)에게 감사를 드린다.

ChIP 분석에 도움을 주신 아룬하티박사(Dr.Arundhati Ghosh)와 기술조언을 해 주신 코레트박사(Colette Burgess)께 감사를 드린다.

MALDI 분석은 오스틴 양 박사(Dr. Austin Yang)의 감독하에 메릴랜드 대학, 말린 스튜어트 그린바움 암 센터, 프로테오믹스 코어(Preteomics Core Facility)에서 이루어졌다.

Table 1. 텔로미어 제한단편(TRF) 길이와 KML001에 의한 성장억제의 상관관계

세포주	50%억제농도 (umol/L)의 평균±표준편차	50% 억제 농도의 배 비율 (Fold ratio IC ₅₀)	IC ₅₀ 순위	텔로미어제한 절편 길이의 평균±표준편차	텔로미어 제한 절편 길이 순위
PC-3(전립선)	0.23± 0.04	1.0	1	2.5± 0.21	1
DU145(전립선)	2± 0.43	87	3	4.26± 0.14	3
MCF7 parental(유방)	2± 0.35	8.7	3	5.5± 0.28	4
MCF7 wt h TERT	2.33± 0.43	10.1	4	5.5± 0.21	4
MCF7 mt hTERT	0.9± 0.04	3.9	2	3.1± 0.32	2
A2780(난소)	2.5± 0.23	10.9	5	6.2± 0.28	5
A2780cis	2.6± 0.14	11.3	6	10± 0.35	7
HEK293T(태생기 신장)	3.1± 2.3	13.5	7	16± 2.47	10
Saos-2	25± 5	108.7	10	13.5± 0.70	8
HT29(결장,대장)	3.5± 0.7	15.2	8	8.6± 0.42	6
H183(폐)	14± 4.3	60.8	9	13± 0	9

알림 : 50% 억제농도의 배 비율은 각 세포주의 50% 억제농도를 PC-3 세포주의 50% 억제 농도의 값으로 나눈 값임. PC-3 세포주는 KML001에 대한 반응성이 높고 가장 짧은은 텔로미어를 가진 세포주임.

Table 2. 텔로미어 서열과 그 변이 배열에 결합되는 KML001

올리고뉴클레오타이드 배열	올리고뉴클레오타이드 질량 (m/z)	올리고뉴클레오타이드 +KML001의 질량	△m* ± 표준편차	부착된 분자량수
---------------	---------------------	------------------------	------------	----------

	±표준편차	(m/z) ±표준편차		
(TTAGGG) ₃	5,840 ± 6.4	5,970 ± 8.0	130 ± 2.3	1
(TTAGGG) ₆	11,416 ± 7.3	11,632 ± 9.8	216 ± 1.15	2
(AAAGGG) ₃	5,763 ± 4.5	5,831 ± 8.5	68 ± 4.0	없음
(TTTGGG) ₃	5,635 ± 1.2	5,927 ± 21.6	291 ± 22.1	2
(AAAAAA) ₃	5,592 ± 5.8	5,602 ± 4.3	10 ± 2.3	없음
(TTTTTT) ₃	5,444 ± 9.3	5,458 ± 6.6	14 ± 3.3	없음
(GGGGGG) ₃	5,869 ± 3.7	6,394 ± 3	525 ± 2.3	4

△m* : KML001 로 처리된 올리고뉴클레오타이드의 질량 - 올리고뉴클레오타이드의 질량

m/z = 질량/전하

시스플라틴은 양성 대조군으로 사용이 되었고, (TTAGGG)₃ 반복마다 3분자량이 결합됨.

그림 설명

그림.1 짧은 텔로미어를 갖는 세포주들이 KML001에 대해 더 높은 감수성을 가진다.

A. 짧은 텔로미어를 가진 세포주와 긴 텔로미어를 갖는 5종의 세포주에 KML001을 처리한 후 측정된 세포 성장 곡선. 세포들은 KML001 0.01~100μmol/L 사이의 농도로 처리되었다. 5일후 MTT분석을 실시하였고 대조군에 대한 평균 흡광도를 100%로 고정시켰다. 결과는 3번의 독립적인 실험의 평균과 표준편차로 표현했다.

B. A에서 보여진 6가지 세포주에 대한 서던 블롯(southern blot)로 평가된 텔로미어제한단편(TRF)길이와 표준편차를 보여제시하였다.

C. 11개의 세포주에서 평균 50%억제농도 대비 텔로미어의 길이에 대해 스피어만순위상관계수(Pearman rank correlation coefficient)를 계산하였다.(Table 1 참조). 짧은 텔로미어 길이와 낮은 50%억제농도 값(높은 세포독성) 사이에 의미 있는 상관 계수 r=0.9가 확인되었다.

그림. 2 텔로머라제에 대한 KML001의 효과

A. 옥핵산 반복 구조의 전형적인 밴딩 패턴(banding pattern)을 보여주는 polyacrylamide gel은 TRAP분석에서의 텔로머라제 활성을 보여준다.

0.1~20μmol/L의 농도로 KML001를 처리한 PC-3 세포 추출액에서의 텔로머라제의 활성임. ITAS = 내부 텔로머라제 분석 표준;

1레인, 음성대조 = PC-3 세포 추출액을 95°C에서 10분간 끓임

2레인, PC-3 세포 추출액 + KML001 20μmol/L

3레인, PC-3 세포 추출액 + KML001 10μmol/L

4레인, PC-3 세포 추출액 + KML001 5μmol/L

5레인, PC-3 세포 추출액 + KML001 2.5 μ mol/L

6레인, PC-3 세포 추출액 + KML001 0.5 μ mol/L

7레인, PC-3 세포 추출액 + KML001 0.1 μ mol/L

8레인, 양성대조 = 키트에서 제공하는 HeLa 세포 추출액

B. TRAP PCR-ELISA 를 통한 PC-3 세포에서의 텔로머라제의 활성 측정. PC-3 세포에 시료를 녹인 용매(vehicle)나 50%억제농도와 100%억제농도의 KML001을 8시간과 24시간 동안 처리하였다. 결과는 대조군에 대한 % 흡광도로 표시되었고, 3번의 독립적인 실험의 평균값으로 표시되었다. 대조군 세포의 흡광도를 100%로 세팅하였다. 막대의 꼭대기에 표시한 p수치는 student's 양측 검정(two-tailed Student's t-test)을 기초로 한다.

C. 인간 텔로머라제 역 전사효소 단백질에 대한 면역 형광 염색.

상층 그림, 대조군으로 인산완충식염수 처리한 PC-3 세포, H183 세포의 핵에서 인간 텔로머라제 역전사효소 염색(초록색)이 관찰된다. 핵소체(nucleoli) 속에서 인간 텔로머라제 역전사효소의 축적과 함께 핵질에 확산된 인간 텔로머라제 역전사효소의 염색이 보여진다.

중간 층 그림, 0.23 μ mol/L 농도의 KML001을 24시간 동안 처리한 PC-3 세포, 또는 24시간 동안 14 μ mol/L의 농도로 처리한 H183 세포 그림.

하층 그림, 9 μ mol/L 농도의 KML001로 24시간 동안 처리한 PC-3 세포, 또는 24시간 동안 25 μ mol/L의 농도로 처리한 H183세포. PC-3 세포에서만 핵에서 세포질로의 인간 텔로머라제 역전사효소의 이동이 관찰되며 이것은 농도 의존적인 경향을 보임(흰색 화살표). 세포들은 DAPI를 사용하여 대비염색 하였다. Bar = 15 μ m

D. 인간 텔로머라제 역전사효소 mRNA의 발현에 대한 KML001의 효과. PC-3 세포는 8시간과 24시간 동안 시료를 녹인 용매(vehicle)나 KML001 50%억제농도, 100%억제농도로 처리되었다. 하우스키핑 유전자인 prothobinogen deaminase에 대비하여 평균 복제수와 표준편차로 표시하였음. 3번의 독립적이고 대표적인 실험 값을 나타냄. 별표는 양측 검정(two-tailed Student's t-test)에 기초한 통계적인 유의성을 표시함.

그림.3 텔로미어에 대한 KML001의 효과.

A. MALDI에 의한 KML001과 [TTAGGG]3의 결합. 단일 사슬의 5'-[TTAGGG]3-3' 올리고뉴클레오타이드는 24시간 동안 KML001이 있는 상태와 없는 상태에서 수용액 상태로 37°C에서 방치되었음. KML001와 올리고뉴클레오타이드의 분자비율은 1 : 10임. KML001을 처리한 샘플에서 KML001 분자량에 해당하는 130 정도 파랑색 곡선이 오른쪽으로 치우치는 것이 보이며, 이것은 KML001이 텔로미어에 직접 결합했음을 시사함(Table 2 참조).

B. C와 D에서 잡은 영상으로부터 계산된 중기 염색체에서의 % 평균 텔로미어 신호

C. 모든 인간의 텔로미어 탐침(빨강)을 가지고 PC-3 세포의 분열중기 염색체에

대한 FISH 분석을 수행함. DAPI 염색은 파란색임. 분열간기의 핵은 각 현미경 사진에서 오른쪽 위쪽에 삽입되어 있으며, 파란색 선으로 네모가 그려짐. a-c는 각 염색체가 확장된 것이고 하얀 네모로 각 사진에 나타나 있다. 처리와 시간 지점은 상단에 표시되었다.

D. C에서와 같이 폐암세포주 H183의 FISH 분석을 수행함, a와 b는 개별 염색체의 확대, 100배 확대배율임(중기와 간기)

그림.4

KML001 처리에 의해 유발된 텔로미어 연계 DNA손상과 활성산소종 연계 DNA 손상.

A. H183세포와 비교하여, 용매 대조군(vehicle control, 상단), KML001 50%억제농도 처리군(중간), 100%억제농도 처리군(하단)에서 γ -H2AX foci 형성이 녹색으로 표시됨. PC-3 세포에서 24시간 동안 처리함. 핵은 DAPI를 사용하여 대비 염색함.

B. A에 캡춰된 영상으로부터의 γ -H2AX foci의 평균 신호 강도를 수치화함.

실험마다 최소한 100개의 세포핵이 평가한 후 3개 실험의 평균을 표시함.

별표는 양측 검정(two-tailed Student's t-test)에 기초한 통계적인 유의성을 나타냄.

C. ser 139번에서 인산화된 H2AX 에 대한 웨스턴블랏(western blot).

1레인 그리고 5레인, 용매처리한 대조군 세포;

2~4 레인, KML001 50%억제농도인 0.23 μ mol/L로 각각 2시간, 8시간, 24시간 동안 처리한 PC-3 세포

6~8 레인, KML001 100%억제농도인 9 μ mol/L 로 각각 2시간, 8시간, 24시간 동안 처리한 PC-3 세포

베타-액틴(β -Actin)은 정량 대조군(loading control)으로 사용됨.

D. γ -H2AX, mouse IgG, 텔로미어 반복서열 부착 인자 1에 대한 항체로 수행한 ChIP 분석의 점블랏.

PC-3세포의 염색체 DNA(250ng ; ChIP 에 사용한 DNA 와 동일한 양)은 TTAGGG 반복 서열 검출에 대한 양성 대조로 찍힘.

용매 처리한 PC-3 세포에서 텔로미어 반복 부착 인자 1의 ChIP는 텔로미어-연관된 단백질을 가진 TTAGGG의 면역침강에 대한 양성 대조로 사용됨.

Mouse IgG는 ChIP 반응의 특이성을 확인하는 음성 대조로 쓰임.

γ -H2AX의 ChIP는 KML001로 처리한 텔로미어에 아주 강한 상관성을 나타내지만 처리대지 않은 대조에서는 그렇지 않음.

γ -H2AX의 신호강도 상대값은 결정된 후 각 스팟의 밑에 수치로 표시됨.

E. 활성세포종에 의한 8-oxo-dG의 생성. 상단 : 용매 (vehicle control)나 혹은 50%억제농도인 0.23 μ mol/L, 70%억제농도인 0.75 μ mol/L, 90%억제농도인 3 μ mol/L으로 KML001을 24시간 동안 처리한 PC-3 세포의 그림.

오직 100%억제농도 9 μ mol/L으로 KML001을 처리한 PC-3 세포만이 8-하이드

록시아닌양성으로 염색됨(초록색). 세포핵은 DAPI로 대비염색하였음. 바(Bar), 15 μ m

참고 문헌

1. Miller WH, Jr., Schipper HM, Lee JS, Singer J, Waxman S. 삼산화비소(비소 기초물질)의 작용 기전. 암연구지(Cancer Research) 2002, 62:3893-903,
2. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, 등. 삼산화비소(비소 기초물질)로 급성 전골수구 백혈병 치료 후 완치. 영국 의학 저널(N Engl J Med) 1998; 339:1341-8,
3. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, 등. 급성 전골수구 백혈병(APL)의 치료에 삼산화비소(비소 기초물질)의 사용 : 재발된 환자의 혈액에서 임상효과와 약동학. 1997, 89, (9):3354-60,
4. Dilda PJ, Hogg PJ. 비소에 기초한 항암제. 암 치료 간행물(Cancer Treat Rev). 2007;33:542-64
5. Chou WC, Dang CV, 급성 전골수구 백혈병 : 치료의 최근 동향과 치료에 반응하는 분자 기초. 최신 혈액학 (Curr Opin Hemato)2005, 12:1-6.
6. Zhang TC, Schmitt MT, and Mumford JL. 실험관에서 인간의 각질 형성 세포와 백혈구 세포에서 세포 증식과 악성 종양 세포의 자살과 관련된 텔로미어와 텔로머라제에 대한 비소의 효능. 암생성(Carcinogenesis) 2003,24:1811-7.
7. Rust DM, Soignet SL.삼산화비소(비소 기초물질)의 위험/수혜 특성 인자. 종양학자(The Oncologist) 2001.6, Suppl 2:29-32.
8. Zhang TC, Cao EH, Li Jf, Ma W, Qin JF. 삼산화비소(비소 기초물질)에 의한 인간의 위장 암세포인 MGC-803 세포 성장의 억제와 세포자살의 유도. 유럽 암 저널(Eur J Cancer). 1999,35:1258-63.
9. Chou WC, Hawkins AL, Barrett JF, Griffin CA, Dang CV. 텔로머라제 전사를 비소가 억제하면 유전적 불안정 상태로 이어진다. 임상 연구 저널(J Clin Invest). 2001,108, (10) :1541-7.
10. Yih LH, Tseng YY, Wu YC, Lee TC. CGL-2 세포에서 비소로 유도된 유사분열 지연기간동안 세포중심체 증폭의 유도. 암연구(Cancer Research) 2006, 66 : 2098-106.
11. Mei N, Kunugita N, Hirano T, and Kasai H. 배양된 인간 세포에서 급성으로 비소로 유도시킨 8-하이드록시구아닌이 수복 활성의 억제와 연관이 있다. BBRC 2002, 297 :924-30.
12. Poonepalli A, Balakrishnan L, Khaw AK, Low GK, 등. poly(ADP-ribose) polymerase-1 gene product의 결여는 아르세나이트에 대한 세포 감수성을 강화시킨다. 암연구(Cancer Research). 2005. 65,:10977-83.
13. Wei YM, Ou YX, Bai H, Lu JH, Zhang RL. 3가지 골수구 백혈병 세포주에서 삼산화비소(비소 기초물질)에 의해 유도된 세포자살과 텔로머라제 활동에 대한 4가지 비소 길항제들의 하강 조절. Acta pharmacol. Sin 2001, (8)

:725-30.

14. Zhang Y, Cao EH, and Qin JF. MGC-803 세포에서 삼산화비소(비소 기초 물질)로 유도된 반응성의 활성산소종에 연관된 TRF1, TRF2와 결합하는 텔로미어의 상승조절. 유럽 약물학 저널(Eur J of Pharma). 2005, 517:1-9.
15. Liu L, Trimarchi JR, Navarro P, Blasco MA, Keefe DL. 산화 스트레스는 비소 유도의 텔로미어 마모, 염색체 불안정성, 세포자살에 기여한다. 생화학 저널(J Biol Chem). 2003, 278: 31998-2004.
16. Hendriks H, Dai F, Rademaker B, Yang YJ, Lee SB, Burger AM. 독창적 물질인 KML001은 짧은 텔로미어를 갖는 종양 세포주에서 텔로미어의 마모, 세포 노화, 염색체 불안정성을 유도한다. 유럽 암 저널(Eur J Cancer) 2004, 40 Suppl.2:130
17. Glienke W; Chow KU; Bauer N, and Bergmann, L. 백혈병 세포주에서 두가지 복합물을 사용한 비소 처리의 세포자살 작용에 관련한 wt1 발현의 하강 조절, 백혈병과 림프종(Leukemia and Lymphoma) 2006,47 :1629-38.
18. Cookson JC, Dai F, Smith V, 등. 실험관에서 G-quadruplex-stabilizing telomerase inhibitor인 3,11-difluoro-6,8,13-trimethyl-8H-quino[4,3,2-kl]acridinium methosulfate(RHPS4)의 약력학 : 인간 종양 세포의 활성은 텔로미어의 길이와 연관성이 있으며 세포 독성 약물에 의해 증강되거나 길항된다. 분자 약리학(Mol Pharmacol) 2005, 68:1551-8.
19. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., 등. Microculture tetrazolium assay를 사용하여 인간 종양 세포주의 패널을 이용한 약물 검사의 가능성. 암연구(Cancer Res), 1988, 48:589-601.
20. Burger, A.M., 표준 트랩 분석(Standard TRAP assay. In: Double, JA., Thompson, M.J..(Eds) 텔로미어와 텔로머라제 : 분자 생물학의 방법(Methods in Molecular Biology), Totowa:The Humana Press2002, p109-24
21. Phatak P, Cookson JC, Dai F, 등. 실험관과 생체실험상 암 줄기 세포를 타겟으로 하는 기전과 동일하게 G-quadruplex ligand RHPS4에 의해 텔로미어 언캡핑(telomere uncapping)이 클론성 종양 세포 성장을 억제하는 과정, Br J Cancer,2007,96:1223-33.
22. Ishibashi T, Lippard SJ, 시스플라틴으로 처리한 세포에서 telomere손실, 미국 국립 아카데미 사이언스(Proc Natl Acad Sci USA),1998,95 :4219-23.
23. d'Adda di Fagagna F, Hande MP, TongWM, 등 포유동물 세포에 있어 텔로미어 길이와 염색체 안정성에 대한 DNA nonhomologous 말단부 결합 요인에 대한 영향. Curr Biol 2001;11:1192-6
24. Ijpmma AS, Greider CW. 짧은 텔로미어는 Saccharomyces cerevisiae에서 DNA손상 반응을 유도한다. 분자 세포 생물학(Mol Biol Cell), 2003, 14:987-1001.
25. Villanueva JM, Jia X, Yohannes PG, Doetsch PW, Marzilli LG. 시스

플라틴과 $\text{cis-}[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$ 는 듀플렉스, 헤어핀, 부풀은 듀플렉스의 형태내에서 텔로미어 GGGT DNA 배열에서 사슬내 교차연결을 일으킨다 : $\text{Mg}(2+)$ 와 $\text{Zn}(2+)$ 가 헤어핀 구조를 부풀은 듀플렉스 형태로 전환시키는 용도. 무기화학(Inorg Chem), 1999, 38 : 60-80.

26. Nafisi S, Sobhanmanesh A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A, Tajmir-Riahi HA. DNA, RNA와 관련하여 삼산화비소(비소 기초물질)와의 상호작용. DNA 세포 생물학(DNA Cell Biol), 2005, 24:634-40.

27. Blackburn EH. 텔로미어의 상태와 세포의 운명. 네이처(Nature), 2000, 408:53-6.

28. d'Adda di Fagagna F, Reaper P M, Clay-Farrace L, et al. 텔로미어의 노화 시작에서 DNA손상 확인 반응. 네이처(Nature), 2003, 426:194-8.

29. Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, de The H. 급성 전골수구 백혈병은 어떻게 비소를 활성화시키는가. 국립 암 간행물(Nat Rev Cancer), 2002, 2:705-13.

30. Phatak P, Burger AM. 치료 영역에서 텔로머라제와 그 가능성. Br J Pharmacol. 2007, 152:1003-11

31. Kelland L. 암세포의 무한한 복제 능력을 타겟으로 함 : 텔로머라제/텔로미어 경로. 임상 암연구(Clin Cancer Res), 2007, 13:4960-3.

32. Londono-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR. 텔로미어의 상대적인 길이 연장은 높은 빈도의 텔로미어의 교환을 특징으로 한다. 암 연구 (Cancer Res), 2004, 64:2324-7.

33. Oikawa S. 활성 산소종에 의한 배열 특이적인 DNA 손상 : 암발생과 노화와 관련한 의미해석. 환경. 보건의료 개설편(Environ. Health Prev Med), 2005, 10:65-71.

34. Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP 등. G-quadruplex 반응 분자인 BRACO19는 종양 성장을 억제하는데 텔로미어 결합과 동시에 일어나고 텔로머라제의 기능을 방해한다. 암 연구(Cancer Res), 2005, 65:1489-96.

35. Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, 등. 핵소체 형성에서 전골수구 백혈병(PML) 수복, 11S proteasome 동원, 비소 유도 PML 또는 PML/retinoic acid receptor alpha 분해의 역할. 일본 의학 저널(J Exp Med), 2001, 193: 1361-71.

36. Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Novel JR, Reddel RR. 텔로머라제 음성의 사멸하지 않는 인간 세포는 새로운 형태의 전골수구 백혈병 소체를 갖는다. 암 연구(Cancer Res), 1999, 59:4175-9.

37. Bisoffi M, Heaphy CM, Griffith JK. 텔로미어; 고형암에 대한 예후 지표. 국제 암 저널(Int J Cancer), 2006, 119:2255-60.

38. Fordyce CA, Heaphy CM, Joste NE, Smith AY, Hunt WC, Griffith JK. 전립선 종양에서 텔로미어의 DNA함량과 암세포가 사라진 생존 세포와의 관련성. 비뇨기 저널(J Urol), 2005, 173:610-4.

39. Griffith JK, Bryant JE, Fordyce CA, Gilliland FD, Joste NE, Moyzis RK. 감소된 텔로미어 DNA함량은 위험한 인간 유방 선종에서 유전적인 불안정성과 암의 전이와 연관된다. 유방암 연구와 치료(Breast Cancer Res Treat), 1999,54:59-64.

3. 왜 신약(PAX-1, KML001)은 전이암 치료제가 될 수 있을까?

(암 텔로미어 사멸 물질인 KML001을 가지고 암 줄기세포의 자가 재생능력을 표적으로 삼는 논문 발표)

암세포는 줄기세포와 종속세포(성숙세포)로 구성되어 있다.

항암치료를 하면 일반적으로 종속세포가 주로 사멸하며 암 줄기세포는 점진적으로 강한 내성을 갖는다.

그래서 종양이 일시적으로 줄었다가 다시 커진다.

암 줄기세포가 내성을 가지면서 변이를 일으켜 전이암 세포로 변환된다.

내성을 가진 전이암 세포는 당초의 원발성 암보다 20~30배 강력한 저항성을 갖는다.

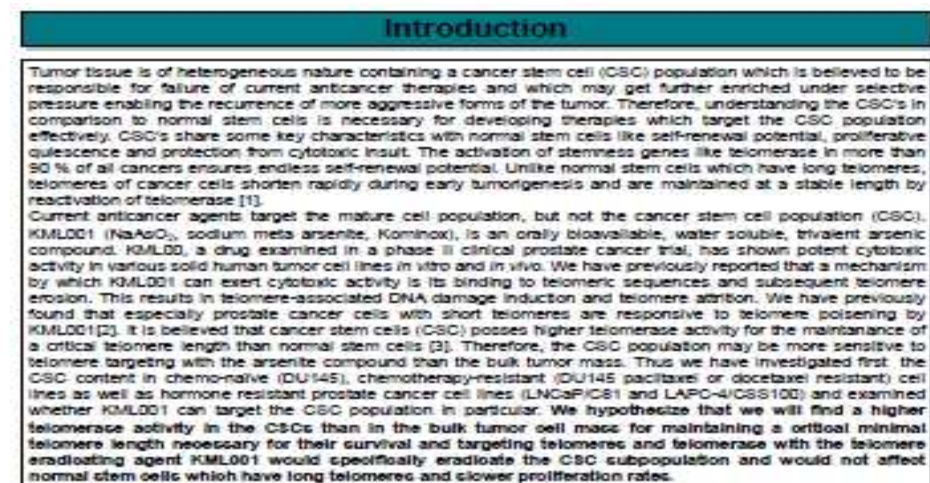
신약(PAX-1, KML001)은 암 줄기세포를 사멸시킴으로써 원발성 암은 물론 전이암까지 치료율이 높을 수 밖에 없다.

미국 미시간주 디트로이트 소재 웨인주립대의과대학원 카마노스 암 연구소에서 “암 줄기세포 사멸” 논문 발표

(암 줄기세포 사멸 84% 결과도출)

암줄기세포와
자가재생능력을
표적으로 삼는
논문 (원문)

Targeting the Self-renewal Capacity of Cancer Stem Cells with the Telomere Poisoning Agent KML001



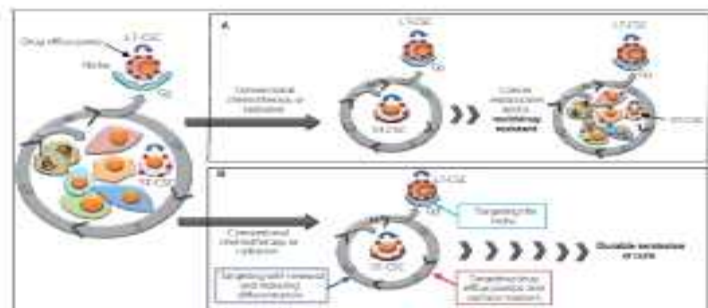


Fig. 1. A. Schematic overview of the role of cancer stem cells (CSCs) in the response of bulk tumor populations to conventional chemotherapy and disease relapse. Bulk tumor populations are shown as actively cycling cells. CSCs are presented as long-term (LT)-CSCs that are proliferatively quiescent (in G0 phase) and reside in a niche and as short-term (ST)-CSCs that are actively cycling. CSCs express a high density of drug efflux pumps such as the breast cancer resistance protein. Tumor relapse is caused by reconstitution of the bulk cell population from CSCs resulting into bulk cells that also express drug efflux pumps and renders the cells resistant to conventional cytotoxic agents. **B.** The addition of CSC-directed agents that target the self-renewal properties of the CSCs, the niche or block the drug efflux pumps are promising targets for improving outcomes of systemic cancer treatment. M: mitosis, S: synthesis. [1]

Objectives

- To identify the side population (SP), ATP Binding Cassette (ABC) transporters defining the SP, telomerase activity and telomere length in chemo-naïve, chemotherapy-resistant and hormone-resistant prostate cancer cell lines.
- To identify and isolate the CSC population (SP+) in the DU145/ Pac200 (paclitaxel resistant), and DU145/ Doc50 (docetaxel resistant) cell line.
- To investigate the effects of the telomere targeting/ poisoning agent KML001 on chemo-naïve, chemotherapy and hormone-resistant prostate cancer cell lines as well as the sorted CSC (SP+) and mature cell (SP-) population.
- To investigate the ability of KML001 to eradicate the CSC and/or mature cells of DU145/ Pac200 and DU145/ Doc50 when treated for 72hrs at drug concentrations that inhibit cell growth in a SP and clonogenic assay.

Methods

Drugs. KML001 was obtained from Kumpham International Co., Ltd. (Kyeonggi-Do, South Korea). 100mM drug stocks were prepared in PBS and aliquots stored at -20°C. Paclitaxel and Docetaxel were obtained from our hospital pharmacy and used as clinical formulations.

Cell lines. DU145 cells were from ATCC. DU145/ Pac200 and DU145/ Doc50 cells were established by Dr. Hussain, UMCC, University of Maryland. We thank him for his kind gift. The cell lines were cultured as recommended in 1:1 DMEM/ F12 media (Invitrogen) supplemented with 5% FBS, 1% antibiotic and grown under standard conditions at 37°C and 5% CO₂. Paclitaxel and docetaxel resistant clones were kept under selection pressure of the drugs.

Pre-treatment of Cell Lines. DU145 and DU145/ Pac200 cell lines were grown in media treated with KML at their IC50 and IC100 values (in μ M) for 72 hours prior to undergoing a side population assay.

Cell Proliferation Assay. Exponentially growing cells were seeded in 96-well plates at a density of 1,500 cells per well, and grown over night. KML001 was used at increasing concentrations ranging from 0.001 μ M to 100 μ M. MTT assays were performed after 5 days following standard protocols [4].

Clonogenic Assay. The clonogenic assay was performed in 24-well plates according to a modified two-layer soft agar assay [5].

Side population assay. Sub-confluent viable cells were counted (10⁶/tube) and treated with Dye Cycle Violet (DCV) (this dye differentiates between stem cells (Side Population) and mature cells. The protocol as described by Goodell et al. was used [5]. Of the samples, one was treated with DCV only, another was treated with DCV and 50 μ M Verapamil (P-gp inhibitor), and the last was treated with DCV and 10 μ M Fumitremorgin C (FTC, BCRP inhibitor). The samples were then read and analyzed using flow cytometry.

Quantitative RT-PCR. Total RNA was extracted from cells treated for 72 hours with IC50 and IC100 concentrations of KML001 and vehicle control with the RNeasy mini kit (Qiagen). Quantitative RT-PCR detection was done according to Ohuchida et al. [7].

Immunofluorescence. Exponentially growing cells were seeded in to 8-well chamber slides (Corning) and grown over night. KML001 was added at IC50 concentration for 72 hours. After treatment slides were washed twice with PBS and air dried for 5 minutes, followed by fixation in ice-cold acetone-methanol (1:1) and dried for 15 minutes. Then, slides were rehydrated in PBS for 10 minutes and blocked with 5% BSA in PBS (1hr). After blocking, primary antibody for Pgp (Mab, Santa Cruz, 1:300 dilution) was added for 2 hours, followed by FITC-labeled anti-mouse secondary antibody (1:300 dilution, Sigma) for 2 hours respectively. Nuclei were counter stained with DAPI (1:5000 dilution, 2 night Sigma). Results were documented using a DM4000 Leica microscope, Retiga camera and Openlab Imposition software.

Immunoblotting. Immunoblotting for P-glycoprotein Pgp (Mab, Santa Cruz), breast cancer related protein BCRP and β -actin (Sigma) was done using a chemiluminescence detection system (Millipore).

Southern Blotting. Southern blotting (TeloTAGGG-telomere length kit, from Roche) was used to determine mean telomere restriction fragment length (TRF).

RESULTS

All prostate cancer cell lines respond with similar sensitivity to KML001

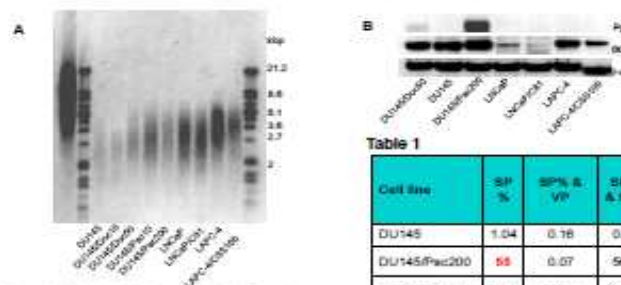


Fig. 2. A. Southern blot showing telomere length in 9 prostate cancer cell lines, chemo-naïve (DU145), telomerase-resistant and hormone resistant (LNCaP/C81 and LAPC-4/CSS100), flanked by TRF length marker. First lane is a high molecular TRF length standard. Mean TRF length was determined using the Roche Diagnostics TeloTAGGG kit. **B.** Western blot of cell lysates from 7 prostate cancer cell lines for expression of Pgp and BCRP drug efflux pumps. Pgp in particular is enriched in the drug resistant prostate cancer cell lines. Table 1, summarizes the percentage of DCV side population in prostate cancer cell lines and in cells pre-treated with the Pgp and BCRP transporter inhibitors (Verapamil and Fumitremorgin C, FTC), sensitivity to KML001, telomere length (TRF) and relative telomerase activity (TA).

Table 1

Cell line	SP %	SP% & VP	SP% & FTC	IC50 KML001 (μ M)	TRF Length (kbp)	TA ratio
DU145	1.04	0.18	0.06	4	2.7	1
DU145/Pac200	65	0.07	56.5	8	3	1.05
DU145/Doc50	40.3	1.35	18.35	5	3.4	0.97
LNCaP	0.85	0.12	0.04	4	3	1.18
LNCaP/C81	0.18	0.07	0.11	1	2.8	1.10
LAPC-4	1.54	1.83	2.24	4	8.7	1.27
LAPC-4/CSS100	0.38	0.19	0.30	3	4.9	1.26

Isolated CSCs from a chemo-resistant cell line have similar telomerase expression levels but higher telomerase activity than the bulk tumor mass

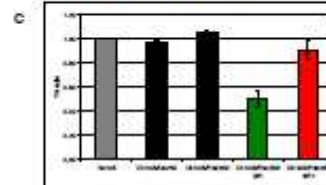
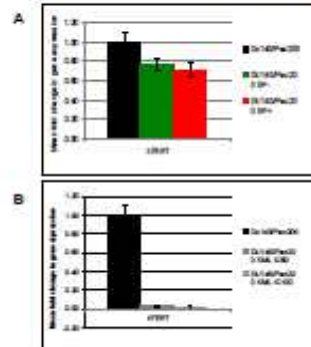


Fig. 3. hTERT gene expression measured by quantitative RT-PCR. A. Telomerase mRNA transcript level in the sorted fractions. DU145/Pac200 SP- and DU145/Pac200 SP+ seem to have similar expression levels. B. hTERT expression level reduction after 72hrs of KML001 treatment at IC50 and IC100 as determined in a standard MTT. C. Telomerase activity (TA) measured in prostate cancer cell lines relative to the parental cell line DU145 using the TRAP (telomeric repeat amplification protocol) assay. The last three columns show telomerase activity in the untreated DU145/Pac200 cells as well as in the sorted subfractions: DU145/Pac200 SP- and DU145/Pac200 SP+. SP+ cells have a significant higher telomerase activity. It appears that the telomerase activity in the total population is defined by the SP+ cells.

Results

CSC respond with similar sensitivity to KML001 than the bulk tumor mass

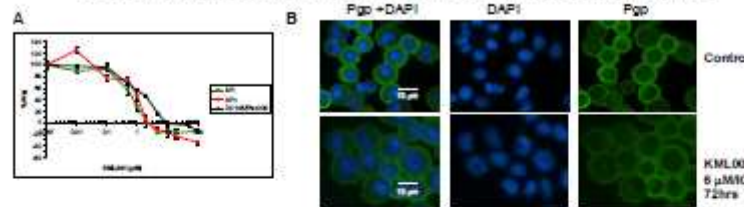


Fig. 4. A. Growth curves from a standard MTT with 5 days of KML001 treatment comparing the untreated cells, SP- and the SP+ fraction from the prostate cancer cell line DU145/Pac200. B. IF staining for the drug efflux pump Pgp (green, FITC secondary antibody) in control and KML001 treated DU145/Pac200 cell line. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Bar = 15 μ m.

KML001 targets the CSC population in the SP as well as clonogenic assay

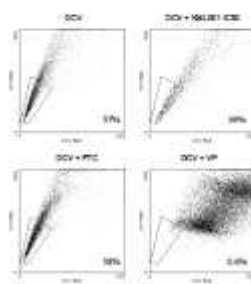


Fig. 5. KML001 effect on the DCV SP profile for DU145/Pac200. The gated SP is identified based on the Pgp inhibitor Versipamil (VP). In the presence of KML001 the gated SP is reduced by 38%.

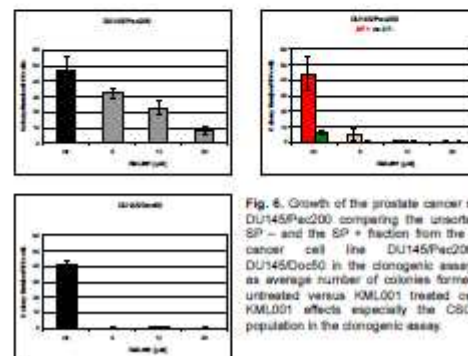


Fig. 6. Growth of the prostate cancer cell lines DU145/Pac200 comparing the untreated cells, SP- and the SP+ fraction from the prostate cancer cell line DU145/Pac200 and DU145/Doc50 in the clonogenic assay shown as average number of colonies formed in the untreated versus KML001 treated cell lines. KML001 effects especially the CSC (SP+) population in the clonogenic assay.

CONCLUSIONS

- All tested prostate cancer cell lines respond with similar sensitivity to KML001 regardless of their cancer stem cell (SP) content and regardless of their drug efflux pump expression pattern (Fig. 2B). The growth inhibitory concentrations at 50% (IC50s) of KML001 in prostate cancer cell lines range from 1 to 6 μ M (Tab. 1).
- The mean telomere restriction fragment length (TRF) in prostate cancer cell lines varies from very short (2.6 kb, LnCaP) to moderate long for the least aggressive prostate cancer cell line (6.7 kb, LAPC-4) (Tab. 1, Fig. 2A), whereas the telomerase activity is similar (Tab. 1).
- The cancer stem cell population (SP cells) isolated from the DU145/Pac200 cell line has almost 2 fold higher telomerase activity than the mature (non-SP) cell fraction (Fig. 3C) and responds with similar sensitivity to KML001 than the mature (non-SP) cell fraction (Fig. 4A).
- Growth inhibitory concentrations at 50% (IC50s) KML001 reduces the cancer stem cell population (SP) by 38% in the side population assay and by 30 % in the clonogenic assay for DU145/Pac200. The sorted cancer stem cell population (SP+ fraction) is reduced by 84% in the presence of KML001 at that concentration in the clonogenic assay.
- Our findings indicate that KML001 can effectively inhibit prostate cancer stem cells as well as mature tumor cell growth and should be further exploited clinically.

REFERENCES	
1.	Chun et al. and Burger AM. Cancer stem cell targeted agents: Therapeutic approaches and consequences. (2009); 10(6).
2.	Prasad, P., Dai F., Butler M., et al. (2005) cytotoxic activity is associated with its binding to telomeric sequences and telomeric erosion in prostate cancer cells. Clin Cancer Res (2005); 11:4595-602.
3.	Amarino M, Gendler CW. Telomerase and cancer stem cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. (2005); 70:205-6.
4.	Alley M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay Cancer Res (1990); 46:599-601.
5.	Goodell, M.A., Brisse, K., Parsels, G., Connor, A.D., and Mulligan, R.C., isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are self-renewing in vivo. J. Exp. Med. (1996); 183:1787-300.
6.	Hambarger AW and Salmon SE. Primary bioreactor of human tumor stem cells. Science (1977); 197: 461-465.
7.	Ochoa, K. et al. Quantitative Assessment of telomerase activity and human telomerase reverse transcription messenger RNA levels in pancreatic juice samples for diagnosis of pancreatic cancer.Clin.Cancer Res (2005); 11:2265-2282.
This work was in part supported by Komipharm International Co Ltd, South Korea and the Fund for Cancer Research.	

(번역문)

텔로미어 사멸 물질인 KML001을 가지고 암 줄기 세포의 자가 재생 능력을 표적으로 삼는다.

실케 수어, 니콜 네키포치, 안젤리카 버거 미국 미시건주 디트로이트시 소재, 웨인주립대 의과대학원, 카마노스 암연구소, 약리학자

도 입

종양 조직은 현재의 암 치료가 효과적이지 못하도록 하는, 종양이 적극적인 형태의 활성화에 더 충분한 선택적인 압력을 줄 수 있는 암 줄기세포군을 포함하는 복잡한 조직이다. 따라서 암 줄기세포군을 효과적으로 표적하기 위한(목표하기 위한) 치료법을 개발하기 위해서는 정상적인 줄기 세포와 암 줄기세포를 이해하는 것이 필요하다. 암 줄기세포는 정상적인 줄기세포의 자기 재생 가능성, 증식성의 무활동 및 세포독성 공격으로부터 보호하는 것과 같은 어떠한 주요 특징을 공통으로 갖고 있다. 텔로머라제와 같은 줄기세포 유전자의 활동은 90% 이상의 모든 암에서 끊임없는 자기 재생 가능성을 보장한다. 긴 텔로미어를 갖고 있는 정상 줄기세포와는 달리, 암세포의 텔로미어는 종양형성의 초기 기간 동안 빠르게 짧아지며, 텔로머라제의 활성화로 안정적인 길이를 유지한다. [1].

현재의 항암 작용제는 암 줄기 세포군 (CSC)가 아니라 성숙세포군을 표적으로 한다. KML001 (NaAsO₂, 소듐 메타 아르세나이트, 코미녹스)는 구강을 통해 생체학적으로 이용이 가능하며, 수용성이자, 3가 비소 화합물이다.전립선 암 임상 2상에서 검사한 약물인 KML00의 경우 생체내외에서 다양한 인체 고형암 세포주에서 강력한 세포 독성 활동을 보여주고 있다.KML001이 세포 독성 활동을 발휘할 수 있도록 하는 메커니즘은 텔로미어의 배열과 그에 수반하는 텔로미어의 부식과 결부된다는 것을 과거에도 보고했었습니다. 이는 텔로미어와 관련된 DNA 손상 유도 및 텔로미어 감소를 초래한다. 특히 짧은 텔로미어를 가지고 있는 전립선 암 세포의 경우 KML001 [2]에 의한 텔로미어 사멸에 반응한다는 것을 과거에도 발견했었다. 일반 줄기 세포 보다는 암 줄기 세포 (CSC)가 적절한 텔로미어의 길이를 유지하기 위해 더 높은 텔로머라제 활동을 지닌 것으로 알려져 있다. [3] 따라서 CSC군은 비소 화합물로 텔로미어를 표적하는 것에 있어 종양세포 덩어리 보다는 더 민감할 수도 있다. 그래서 우리는 먼저 1차 요법제 (DU 145), 화학요법제에 내성은 지닌 (DU 파클리탁셀 또는 도세탁셀 저항성) 세포주, 그리고 호르몬 저항성 전립선 암세포 주 (LNCaP/C81 및 LAPC-4/CSS100)에서 CSC의 함유량을 조사하여 KML001이 그 중에서도 CSC군을 표적으로 할 수 있는지 여부를 조사하였다. 우리는 생존을 위해, 적절한 작은 텔로미어 길이를 유지하는데 종양세포 덩어리보다 암 줄기세포가 더 높은 텔로머라제 활성을 가지고 있고, 그리고 텔로미어와 텔로머라제를 목표로, 텔로미어를 공격하는 약물 KML001이 암 줄기세포군을 선택적으로 부식시키고, 증식속도를 낮추고, 긴 텔로미어를 가진 정상세포는

공격하지 않을 것이라고 가정하였다.

Fig. 1. (A) 관습적인 화학요법에 대한 대량의 종양 군집들이 반응하는 모습에서의 암 줄기세포들(CSCs)의 역할과 질병의 재발에 대한 대략적인 모식도. 대량의 종양 군집들은 활발히 순환하는 세포들로 묘사되었다. 암줄기세포(CSCs)는 긴 $\square$ 암 줄기세포(long-term(LT)-CSCs)로 표현되었는데 이것은 증식적으로 비활동성이며(=Gap[G]0 phase) 생태적인 영역에(=성장 인자와 기질 단백질로 구성된 특별한 생태 환경) 살고있다. 또한 짧은 암줄기세포(short-term(ST)-CSCs)로 표현된 것은 활발히 순환하며 일시적으로 증폭된다. 암줄기세포(CSCs)는 유방암 저항 단백질처럼 높은 밀도의 약물 배출 펌프를 표현한다. 종양의 재발은 암줄기세포(CSCs)로부터 벌크 세포 군집의 재구성으로 발생한다. 결과로써 벌크 세포들은 약물 배출 펌프를 표현 해주며 이것은 다시 세포들에 펌프의 관습적인 세포독성 약물들에 저항성을 부여해 준다.

(B) 관습적인 제거 약물(debulking agent)들에 암줄기세포에 대한 직접적인(CSC-directed) 요법의 부가 결과. 암줄기세포에 대한 직접적인(CSC-directed) 요법의 부가(세포 재생과 세포 분화를 타겟으로 하는 약물), 약물 배출 펌프를 차단하는 생태적 영역의 약물(niche drugs)을 목적으로 하는 특이적 요소, 암줄기세포(CSCs)로의 그들의 배송을 위한 CSC 표면 표식자를 활용하는 약물들은 체계적인 암 치료의 결과를 개선하기 위한 커다란 전망을 유지시킨다. **M** 체세포 분열, **S** 합성 [1]

목 표

8 1차 요법제, 화학요법제 저항성 및 호르몬 저항성 전립선 암 세포주에서 SP, 텔로머라제 활동 및 텔로미어의 길이를 한정하는 ATP 결합 카세트 (ABC) 수송체 및 측면 군 (SP)을 확인 하는 것.

8 U145/ Pac200 (파클리탁셀 저항성) 및 DU145/Doc50 (도세탁셀 저항성) 세포주에서, CSC 군 (SP 양성)을 확인하고 분리 시키는 것.

8 1차 요법제, 화학 요법제 및 호르몬 저항성 전립선 암세포주 그리고 분류된 CSC (SP 양성) 및 성숙세포 (SP 음성)군에서 텔로미어 표적/ 사멸 물질인 KML001의 효과를 조사하는 것.

8 측면군 조사법 (SP) 및 집락형성 분석법에서 세포 성장을 억제하는 약물 농도로 72시간 동안 치료했을 때, DU145/Pac200과 DU145/ Doc50의 성숙 세포 또는 CSC를 사멸하는 KML001의 능력을 조사하는 것.

방 법

약물. KML001을 (주) 코미팜 (대한민국 경기도 소재)에서 준비되었음 100mM의 약품 재고를 PBS로 준비하고 그 나머지는 -20°C 에 보관함. 파클리탁셀 및 도세탁셀은 우리병원 약국에서 확보되어 임상제제로 사용되었음

세포주. DU1455 세포는 ATCC에서 확보함. DU145/Pac200 및 DU145/Doc50 세포는 메릴랜드 의과대학의 그린바움 암센터의 후세인 박사에 의해 확립되었음. 친절한

선물에 대해 감사드립니다. 세포주는 5%의 FBS를 추가한 DMEM/F12 배지 (인비트로젠)와 1%의 항생제를 1:1로 처리하여 권장한 대로 배양하고 37℃ 및 5% CO₂ 표준 조건하에서 배양되었다. 파클리탁셀 및 도세탁셀 저항성 클론은 약물 선택 압하에서 보관 되었다.

세포주의 전처리. 측면 군 분석법을 실행하기에 앞서, DU145and DU145/Pac200 세포주는 IC₅₀ 및 IC₁₀₀ (단위 μ M)의 농도로 KML로 처리한 배지에서 배양되었다.

세포 증식 분석법. 기하급수적으로 배양된 세포들은 96-well plates에서 well당 1,500 세포의 밀도로 seed 처리되어 하룻밤 동안 배양시켰다. 0.001 μ M ~ 100 μ M 범위로 농도를 증가시키면서 KML001을 사용하였다. 표준 실험 계획안 (프로토콜)을 실시한 뒤 5일이 지난 뒤 MTT 분석법을 실시하였다.

집락 형성 분석법. 수정된 2단 유한전 분석법에 따라 24-well plates에서 집락형성 분석법을 실행하였다.

측면 군 분석법. 하위 융합 생존 가능 세포의 수를 측정 (10⁶/tube) 및 DCV (Dye Cycle Violet)로 처리한다. 본 염료는 줄기세포 (측면군)과 성숙 세포를 식별하도록 해 준다. Goodell et al.이 묘사했던 대로 실험계획안을 사용하였다. [5]. 샘플 중에서 한가지는 DCV로만 처리를 하고, 나머지 한가지는 DCV와 50 μ M의 베라파밀 (PgP 억제인자)로 처리하였고, 나머지는 DCV와 10 μ M의 fumitremorgin C (FTC, BCRP 억제인자)로 처리하였다. 유세포 분석법을 활용하여 샘플들을 읽고 분석하였다.

hTERT RT-PCR 정량법. KML001을 IC₅₀및 IC₁₀₀의 농도로 72시간 동안 처리한 세포에서 및 Rneasy 미니 키트 (Qiagen)으로 매개체 통제한 세포들로부터 추출한 것으로서 총 RNA수. hTERT 검출 정량법을 Ohuchida et al.에 따라 실행함 [7]

면역형광 검사법. 기하급수적으로 성장한 세포들을 8-well 챔버 슬라이드 (코스타)에서 접종하여 하룻밤 동안 배양시킨다. IC₅₀의 농도로 72시간 동안 KML001을 추가하였다. 처리한 슬라이드를 PBS로 2회 세척한 뒤 5분 동안 건조 시킨 뒤, 얼음처럼 차가운 아세톤 대 메탄올 (1:1)로 하여 고정시킨 뒤 15분 동안 건조 시킨다. PBS로 10분 동안 슬라이드를 재 수화 시킨 뒤, PBS에서 5% BSA로 분을 뜬다. 그 뒤에 Pgp 1차 항체 (Mdr, 산타 클루즈, 1:200 희석)를 2시간 동안 추가 한 뒤, FITC로 라벨링한 안티 마우스 2차 항체 (1:200 희석, 시그마)를 2시간 동안 처리한다. 세포핵을 DAPI (1:5000 희석, 2 mg/ml, 시그마)를 이용하여 대비 염색한다. DM4000 도립 현미경 (Leica), 형광 전용 카메라 (Ratiga) 및 오픈랩 즉석 소프트웨어 (openlab improvision software)를 사용하여 결과를 자료화 한다.

면역블로팅 검사법. P-글리코프로테인 Pgp (Mdr, 산타클루즈), 유방암 관련 단백질 BCRP 및 b-actin (시그마)에 대한 면역 블로팅 검사법을 화학발광 검출 시스템 (밀리포레)를 사용하여 실시함.

서던 블로팅. 평균 텔로미어 제약 파편 길이 (TRF)를 결정하기 위해 서던 블로팅 (TeloTAGGG-텔로미어 길이 카트, 로슈사 제품)을 사용함.

결 과

모든 전립선 암세포주가 KML001과 유사한 민감도로 반응한다.

그림 2. A. TRF 길이 마커로 측면을 표기하여, 9가지 종류의 암세포주, 1차 요법제

(DU145), 택산 저항성 및 호르몬 저항성 (LNCaP/C81 및 LAPC-4/CSS100) 세포주에서의 텔로미어 길이를 나타낸 서던 블로팅. 첫번째 부분은 고 분자 TRF 길이 표준을 가리킨다. 평균 TRF 길이는 로슈사의 진단법 TeloTAGGG 키트를 사용하여 측정되었다.

B. Pgp 및 BCRP 약물 유출 펌프의 발현을 위한 7가지 전립선 암 세포주에서 확보한 세포 용해물의 웨스턴 블롯. 특히 Pgp는 약물 저항성 전립선 암세포주에서 짙게 처리되었다.

도표 1. 뇌종양 세포주와 Pgp 및 BCRP 전송 억제제(베라파밀과 Fumitremorgin C, FTC)로 전처리된 세포에서의 DCV 측면군 (Side population)의 퍼센트율, KML001에 대한 민감도, 텔로미어의 길이 (TRF) 그리고 그와 상관하는 텔로머라제의 활동도 (TA).

화학저항성 세포주로 부터 분리된 CSCs는 유사한 텔로미어 발현 수준을 갖고 있지만 종양세포 덩어리보다 더 높은 수준의 텔로미어 활동도를 갖고 있다.

그림 3. RT-PCR 정량법으로 측정된 hTERT 유전자 발현. A. 분류 파편에서의 텔로머라제 mRNA 전사 수준: DU145/Pac200 SP 음성 및 DU145/Pac200 SP 양성은 유사한 발현 수준을 갖고 있는 듯 하다. B. 표준 MTT 분석법으로 측정된 것으로 서, IC50 및 IC100의 농도로 KML001로 72시간 동안 처리한 뒤의 hTERT 발현 수준 감소 C. TRAP 분석법 (텔로미어의 반복 증식 조사법)을 사용하여 모세포주인 DU145에 상관하는 전립선 암 세포주에서 측정된 텔로머라제의 활동도 (TA). 마지막 세가지 컬럼에서는 무정렬된 DU145/Pac200 세포와 정렬된 하부세포 분획 Du145/Pac200 SP 음성 및 DU145/Pac200 SP 양성, SP양성에서의 텔로머라제가 상당히 큰 활동도를 나타내고 있다. 전체 모집단에서의 텔로머라제의 활동도는 SP 양성 세포로 정의되는 것 같다.

CSC는 종양 덩어리 보다는 KML001에 유사한 민감도로 반응한다.

그림 4 A. 전립선 암세포주인 DU145/ Pac200에서의 미 분류 세포, SP 양성 및 SP 음성 파편을 비교한 것으로, KML001로 5일간 치료했을 때의 표준 MTT 분석법에 따른 성장 곡선 B. KML001로 처리한 DU145/Pac200 세포주와 미 처리 대조인 약물 유출 펌프 Pgp (녹색, FITC 2차 항체)에 대한 면역형광 염색. 세포핵이 DAPI (파란색)으로 착색되었다. Bar = 15µm

그림 5. DU145/Pac200에 대한 DCV SP 프로파일의 KML001 효과. Pgp 억제제인 베라파밀 (VP)에 기초하여 SP가 확인되었다. KML001의 사용으로 SP가 38% 감소되었다.

그림 6. KML001로 처리한 세포주 대비 미 처리 세포주에서 형성된 평균 집락 수로서, 집락형성 분석법으로 전립선 암세포주 DU145/Pac200 및 DU145/Doc50에서 확보한 미분류 세포, SP 음성 및 SP 양성 파편과 비교한 전립선 암세포주 DU145/Pac200의 성장률

결론

- ▷ 시험한 모든 전립선 암세포주는 그 암줄기세포 (SP) 함유량 및 약물 유출 펌프 발현 패턴과는 상관없이 KML001과 유사한 민감도로 반응한다. (그림 2B). 전립선 암 세포주에서 KML001 50% (IC50s)의 성장 억제 농도가 1~ 6mM로 분포된다. (도표 1)
- ▷ 덜 공격적인 전립선 암 세포주 (6.7 kb, LAPC-4)에 대한 전립선 암세포주에서의 평균 텔로미어 억제 파편 길이 (TRF)는 매우 짧음 (2.6Kb, LnCaP)에서 부터 보통 정도의 길이까지 다양(도표 1, 그림 2A)한 반면 텔로머라제의 활동도는 유사하다. (도표 1)
- ▷ DU145/Pac200 세포주에서 분리된 암 줄기세포군 (SP 세포)는 성숙 (SP가 아닌) 세포 파편 (그림 3C)보다도 2배 가량 더 높은 텔로머라제 활동도를 갖고 있으며 성숙 (SP가 아닌) 세포 파편보다는 KML001과 유사한 민감도로 반응한다. (그림 4A)
- ▷ KML001 50% (IC50s)라는 성장 억제 농도를 통해, 측면 군 분석법 (side population assay)에서 암 줄기세포 군 (SP)를 38%까지 줄여 주었으며, Du145/Pac200에 대한 집락형성 분석법으로는 30%까지 줄여 주었다. 분류된 암 줄기세포군 (SP 양성 파편)은 집락 형성 분석법에서 그러한 농도의 KML001의 존재만으로도 84%까지 줄어들었다.
- ▷ 우리가 발견한 사항들에 따르면, KML001이 전립선 암 줄기세포 뿐만 아니라 종양 성숙세포의 성장을 효과적으로 억제시켜 줄 수 있을 뿐만 아니라 임상학적으로 좀더 개척되어야 한다.

참고문헌

1. Chumsri s andBurger AM, Cancer stem cell targeted agents: Therapeutic approaches andconsequences. (2008); 10(4).
2. Phatak P, Dai F, Butler M, et al. KML001 cytotoxic activity is associated with its binding to telomeric sequences and telomeric erosion in prostate cancer cells. Clin Cancer Res (2008), 14:4593-602.
3. Armanios M, Greider CW. Telomerase and cancer stem cells. Cold Spring Harb Symp Quant Biol. (2005); 70:205-8.
4. Alley, M. C., Scudiero, D. A., Monks, A., et al. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay Cancer Res (1988), 48:589-601.
5. Goodell M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C., Isolation and functional properties of murine hemapoeitic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* (1996), 183:1797-806.
6. Hamburger AW and Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem

cells. Science (1977), 197, 461-465.

7. Ochida K et al. Quantitative Assessment of telomerase activity and human telomerase reverse transcription messenger RNA levels in pancreatic juice samples for diagnosis of pancreatic cancer. Clin Cancer Res (2005), 11:2285-2292.

This work was in part supported by Komipharm International Co Ltd, South Korea and the Fund for Cancer Research.

5. 신약(PAX-1, KML001)개발의 진행사항

뇌암의 교모세포종 치료제 임상2상 준비

교모세포종은 성장 속도가 빠르고 위험한 잠재력을 지닌 가장 악성도가 높은 WHO의 기준으로 등급 4로 분류하고 있습니다.(뇌 신경에 붙어 있는 암)

신규 진단 교모세포종과 재발성 교모세포종 환자를 대상으로 2가지 임상을 진행하고 있습니다.

뇌 혈관장벽(BBB) 통과율이 98%이며, 현재 사용중인 항암제들은 30% 미만입니다.

교모세포종 암세포 6개중 4개는 저용량에서 2개는 평균용량과 약간의 고용량에서 사멸 된다는 사실을 확인하였습니다.

신규진단 교모세포종에서 완치율이 높을 것으로 기대하고 있습니다.

이유는 방사선 치료나 화학요법을 치료하는 과정에 모세혈관 파괴로 인하여 PAX-1이 암까지의 전달에 어려움이 존재하고 있어 이미 치료하고 있는 암보다 신규암 치료에 있어 효과적입니다.

임상을 하고 있는 병원은 호주의 교모세포종 수술의 80%를 점유하고 있어 환자 모집이 수월하여 금년내에 완료될 수 있을 것으로 기대하고 있습니다.

교모세포종은 임상2상의 결과만으로 미국 FDA에서 판매승인을 득할 수 있을 것으로 기대하고 있습니다.

뇌 전이 폐암 치료제 개발을 위한 임상2상 계획

뇌로 전이가 된 암의 치료율은 3%미만입니다.

뇌로 전이가 되면 거의 치료를 포기합니다.

뇌 전이를 발생시키는 폐암 세포 5개 모두가 저용량에서 암세포가 사멸함을 확인

하였습니다.

뇌 혈관 장벽(BBB) 통과율이 98%이므로 치료율이 높을 것으로 기대하고 있습니다.

폐암 치료제 임상 경우 뇌로 전이된 환자는 임상에서 제외 시키므로 환자 모집이 수월합니다.

임상이 내년 3월 이내에 종료될 수 있도록 계획을 수립하고 있습니다.

뇌 전이 폐암은 혁신치료제(Breakthrough Therapy)에 해당됨으로 임상2상의 결과 만으로 미국 FDA에서 조건부 판매승인이 가능할 수 있다고 전망하고 있습니다.

**미국에서 전이암
치료제 개발을
위한 임상2상
계획**

미국 FDA와 사전미팅(Pre-Meeting)에서 모든 전이암에 대하여 동시에 임상(바스켓임상) 실시하는데 미국 FDA가 동의를 하였습니다.

전이된 폐암, 방광암, 유방암, 자궁경부암, 대장암, 자궁내막암, 두경부암, 피부암, 골육종암, 난소암, 전립선암, 횡문근양암, 신장암, 연조직암, 위암 등 다수의 전이암을 동시에 임상 실시할 예정입니다.

1차로 240명의 전이암 환자를 대상으로 임상을 실시하면서 임상 환자가 증가될 가능성을 두고 있습니다.

임상시험중에 임상2상의 결과만으로 미국 FDA에 판매승인을 받을 수 있는 암종은 조건부 판매승인을 신청할것이며, 3상 임상시험이 필요한 암종은 즉시 3상 임상시험으로 전환하여 임상시험을 진행할 계획입니다.

암 텔로미어 사멸 물질인 KML001(PAX-1)이 암 줄기세포를 84% 사멸(축소)시켰다는 논문 발표는 전이암 치료제로서의 성공을 예상할 수 있습니다.

**전이암외의
원발성
암치료제를 위한
임상시험 계획**

췌장암(담도암, 담관암) 치료제 개발을 위하여 미국에 본원을 둔 췌장암 협회의 협조로 임상시험을 준비하고 있습니다.

임상2B와 3상을 동시에 미국에서 실시할 계획으로 추진하고 있습니다.

췌장암 역시 매우 악성 암으로 알려져 있으며, 미국 FDA의 신속판매승인 품목으로 기록되어 있습니다.

전립선 암 환자의 원발성암과 전이암에 대하여 동시에 임상시험 3상을 실시하는 것에 대하여 전문가들과 임상시험 방법 및 범위를 논의하고 있습니다.

다발성 골수종암 치료제 개발을 위한 임상시험 2상을 계획하고 있습니다.

한국의 응급의약품(모든 치료를 하였음에도 치료를 포기한 경우 제공할 수 있음) 제도로 공급한 환자에서 완치 환자가 발생한 사례도 있습니다.

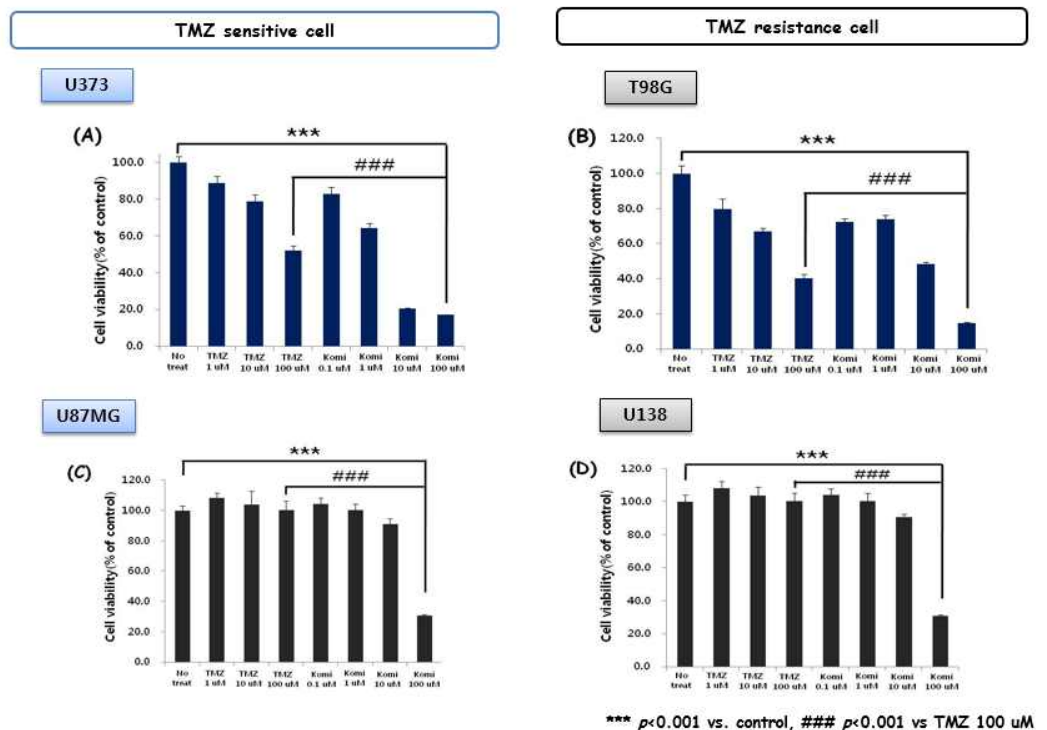
전문가들과 당사의 신약(PAX-1, KML001)으로 다발성 골수종 환자를 대상으로 임상시험을 실시할 경우 완치율 추정에 대하여 논의하고 있습니다.

Nano-Technology Testing 의 저용량에서 민감도를 보인 암세포부터 임상을 실시하기 위하여 전문가들과 논의하고 있습니다.

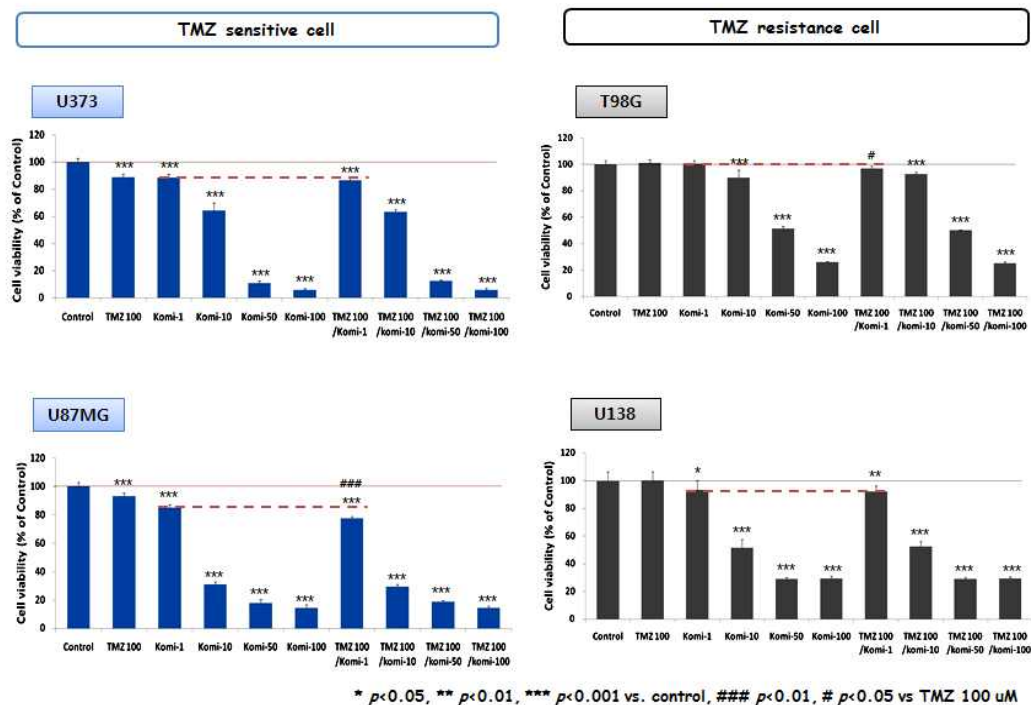
6. 뇌 암의 교모세포종(GBM) 세포를 대상으로 전임상 실시 결과

In vitro: Combinational effects of Kominox and TMZ in GBM cell Ling U87MG, U373, U138, T98G

Results (In vitro - CCK assay)



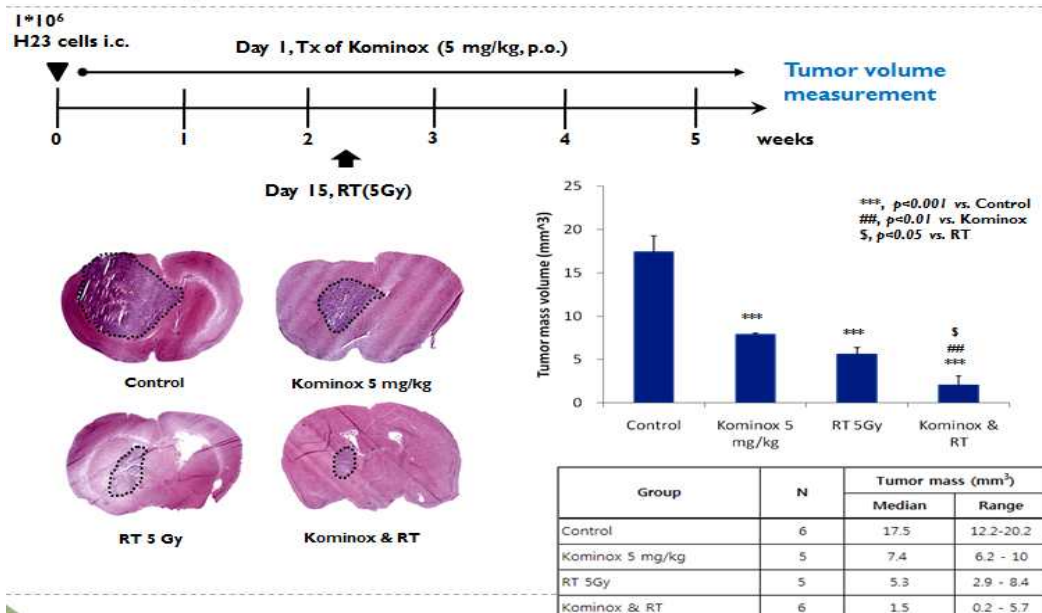
Results (*In vitro* – MTT assay : Effects of Combi. Tx.)



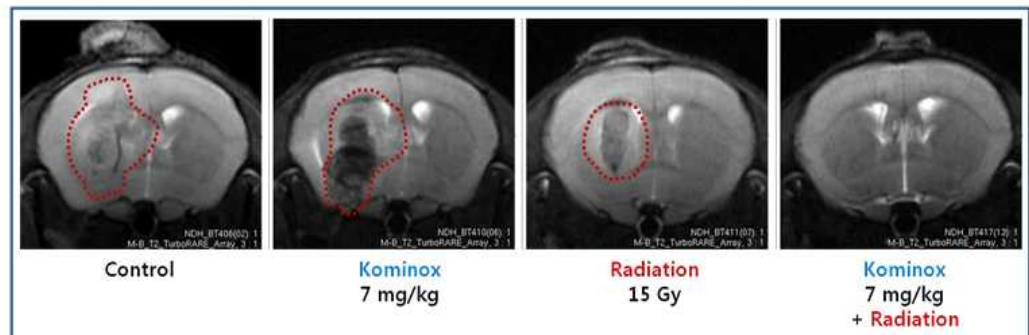
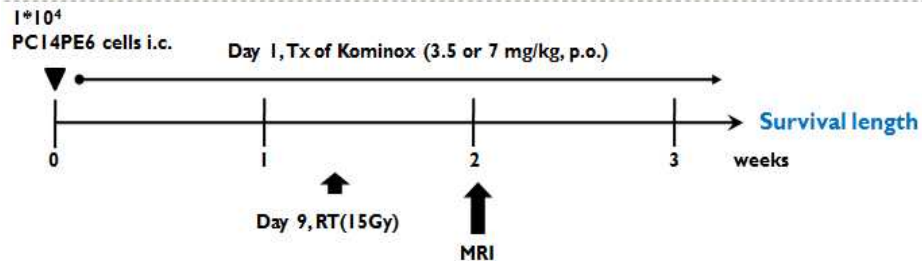
7. 뇌 전이 폐암 세포를 대상으로 전임상 실시 결과

In vitro: Radio-sensitizing effects of Kominox in Lung Cancer Brain metastasis
PC14PE6 lung cancer brain metastasis

Combination study of Kominox and radio-therapy in H23 lung cancer brain metastasis model



Combination study of Kominox and radio-therapy in PC14PE6 lung cancer brain metastasis model



Mass size

Control, Kominox only > Radiation > Kominox + Radiation

8. 뇌 혈관장벽 98% 통과 실험에 대한 기사

코미팜 'PAX-1'
뇌혈관장벽
통과율 98%... 암
정복 눈앞

뇌암치료 획기적 성과 기대...교모세포종 암세포 사멸 가능 연구도 순항

강철 기자 | 2019-01-03 08:47:53

코미팜의 대표 신약인 코미녹스(PAX-1)가 98%의 뇌·혈관장벽 통과율을 달성했다.

코미팜은 3일 'PAX-1'의 뇌·혈관장벽(BBB) 통과율 연구 결과를 발표했다. 연구 결과는 쥐를 대상으로 실시한 혈장과 뇌에서의 약동력학(Pharmacokinetic-PK) 분석을 기반으로 집계됐다. PK는 혈중 약물이 흡수, 분포, 대사, 배설 등을 통해 조직과 세포로 얼마나 이동하는지를 측정한다.

이번 실험을 진행한 MDS Pharma Services의 연구 결과에 따르면 PAX-1의 농도 합계(AUCall)는 일반 혈장에서 6.85, 뇌에서 6.73으로 나타났다. 뇌·혈관장벽을 약 98% 통과한 결과다. MDS Pharma Services는 싱가포르에 거점을 운영하는 글로벌 임상 안전시험 연구 기관이다.

혈장과 뇌에서 최고 혈중농도에 도달하는 시간(Tmax)은 각각 4시간, 8시간으로 측정됐다. 생체 내 이용효율(Bioavailability)은 혈장에서 101%, 뇌에서 87%다. PAX-1이 몸에 잔존하는 시간은 혈장·뇌 모두 최대 72시간으로 집계됐다.

현재 사용되는 뇌암 관련 치료제 약물은 뇌·혈관장벽(BBB) 통과율이 매우 저조하다. 이로 인해 치료 효과가 크지 않은 실정이다. 이번 실험 결과로 PAX-1이 뇌암 치료를 발전시킬 수 있는 획기적인 성과를 제시할 것이라는 기대가 커지고 있다.

코미팜이 호주에서 연구를 진행하고 하고 있는 교모세포종양(GBM) 1차 치료제는 현재 윤리위원회의 임상시험 승인을 기다리고 있다. 발견 즉시 투약하는 1차 치료제 그룹과 재발성 암에 투약하는 그룹으로 나누어 2개의 임상시험을 진행할 계획이다. 미국에서 5개 Cohort를 설정해 추진 중인 전이암 바스켓 임상시험은 조만간 승인 통보를 받을 것으로 예상된다. 연구 결과는 이들 임상 시험에도 긍정적인 영향을 미칠 것으로 보인다.

코미팜 측은 "뇌신경을 싸고 있어 치료가 가장 어렵다는 교모세포종양, 수술·방사선이 어려운 뇌암, 뇌로 전이된 암을 고칠 수 있는 대안은 없는 상황"이라며 "이번 연구 결과로 PAX-1 암 치료에 새로운 장을 열 기회가 왔다"고 밝혔다.

코미팜은 뇌·혈관장벽 통과율과 더불어 교모세포종 암세포사멸 가능 연구도 실시했다. 총 6개의 암세포에 PAX-1을 투약한 결과 4개에서 저용량 사멸 효과가 나타났다. 나머지 2개는 약간의 고용량에서 사멸되는 것을 확인했다.

교모세포종 외에 8개 뇌암 세포에서도 사멸가능 연구가 진행되고 있다. 이 중 마무리 된 3개의 뇌암 세포에서 저용량 사멸 효과가 나타났다. 비소세포 폐암종이 주류를 이루는 '뇌전이 암'에서도 5개 암세포에서 저용량 사멸 효과를 확인했다.

코미팜 측은 "PAX-1의 작용 기전은 정상세포의 텔로미어(증식 유전자)에는 영향을 주지 않는다"며 "암세포의 텔로미어를 녹이는 형태로 직접 사멸시키는 기전"이라고 설명했다. 이어 "뇌암의 교모세포종 암 치료제는 희귀의약품(Orphan Drug)으로 분류되며 뇌전이 폐암의 치료제도 혁신의약품에 해당한다"며 "임상 2상의 결과를 토대로 판매 승인을 받는 것이 충분히 가능하다"고 덧붙였다.

코미팜이 호주에서 실시할 예정인 마약성 저감 임상의 PAX-1 작용 기전은 암 환자의 통증을 유발하는 염증을 근원적으로 억제시킨다. PAX-1 효능에 대한 과학적 입증이 지속되고 있는 만큼 마약성 저감 임상 역시 신속한 진행이 이뤄질 것으로 보인다.

PAX-1은 현재 호주의 특별공급방식(SAS)에 맞춰 환자들에게 한정적으로 공급되고 있다. 코미팜은 향후 처방을 한 의사와 환자들의 정보공개 요청이 수락될 경우 임상 중이라도 기업 설명회(IR)를 열고 복용 결과를 공개할 계획이다.

양용진 코미팜 회장은 "다국적 제약사들도 성공하지 못한 뇌암, 뇌전이, 전이성 쓸개암, 전이성 췌장암 항암제 개발에 총력을 기울이겠다"며 "암 환자들이 많이 사용하는 마약성 진통제의 저감 및 대체와 관련한 성과도 낼 것"이라고 강조했다.

Study AA43102 Plasma PK Results - Group 1: PAX-1 (PO, 10mg/kg)

Pharmacokinetic(PK) Parameter	Units	PK Results (N=3) ¹
AUC ₀₋₁₂	mg×hr/Kg	6.85
C _{max}	mg/Kg	0.52
T _{max}	hr	4
F%	%	101%

1: Pharmacokinetic analysis completed using the mean (N=3) concentration value at each collection timepoint

Study AA43102 Brain PK Results - Group 1: PAX-1 (PO, 10mg/kg)

Pharmacokinetic(PK) Parameter	Units	PK Results (N=3) ¹
AUC ₀₋₁₂	mg×hr/Kg	6.73
C _{max}	mg/Kg	0.33
T _{max}	hr	8
F%	%	87%

1: Pharmacokinetic analysis completed using the mean (N=3) concentration value at each collection timepoint

PAX-1의 뇌-혈관장벽(BBB) 통과율 연구 결과

9. 신약(PAX-1, KML001) 복용사례 및 치료증례

체장암 환자 복용사례

코미팜이 개발중인 코미녹스 복용과정 진술서

□복용대상자 인적사항

성명 : 김 계 순

주민등록번호: 250806-111111111

주소 : 전남 고흥군 도화면 신성리 22

□진술인 : 정미종 (복용자와의 관계:2남3녀중 막내아들)

주민등록번호:661227-111111111

주소:서울 구로구 구로동 신원로1길 11 1층

코미녹스 복용시작일 : 2016년 12월 5일 오후부터 현재까지 복용중

상기 진술인(이하 복용자가 고령이어서 진술인이 보호자로서 대신 글을 씁니다.)은 응급의약품 공급규정에 의거 한국 식약처로부터 공급승인서를 받아 서울 한양대학교 의과대학 중앙내과 이영렬 교수에게서 코미녹스를 공급받아 복용하기 시작했고 현재 코미녹스만 복용중입니다.

체장암 경위 간략 설명

▲2016년 9월부터 소화가 안되고 통증이 있었으며 식사를 하지 못하면서 체중 감소하기 시작

▲2016년 10월 17일부터 10월 27일까지

전남 고흥군 고흥읍 소재 윤호병원에 입원하여 시티를 촬영결과 십이지장 근처 선종 발견되었으나 담당 의사께서 암상성 통증호소라며 일반 진통완화제 1개월치 처방받아 퇴원 곧 괜찮아 질거라 하였으나 지속적으로 식사 못하고 통증 호소하며 죽겠다고 하소연 하여 시티 영상 재 판독을 위해 곧바로 서울로 왔습니다.

▲2016년 11월 18일 서울 신내동 서울 의료원에서 상기 윤호병원 제공의 영상 자료판독결과 체장암 말기암 판정받았고 병원으로부터 약3개월정도 여생이 있을거란 말을 들었으며 입원중 화장실 수시로 들락거렸고 배가 꾸물거리며 아프다고 하였습니다. 마약성 진통완화제 복용은 아침 저녁 12시간용(용량인듯)으로 각각 1알씩 복용시작(수시로 배가 아파 중간에 한알씩 마약성 진통완화제 복용)했으며 이에 간호사대기실 앞에 앉아 통증완화제 달라고 하소연 하였습니다.

▲2016년 11월 23일 형제들이 모여 서울한양대병원에 입원하여 말기암 재확인했고 코미녹스 복용신청을 한 후 입원치료 하면서 마약성 통증완화제 본격 복용하기 시작함.

(하도 답답해하고 통증을 호소하는 바람에 마약성 진통완화제만 처방받아 중도 퇴원했습니다.)

▲2016년 11월 28일 식사를 못해 한양대병원에서 주사제인 영양제를 투여받았고 배가 너무 아파 마약성 알약 외 주사제인 통증완화제 추가 투여 받았으나 역시 아프면서 화장실을 수시로 들락거림. 다인승 병실에서 하도 자주 화장실을 가셔서 침대를 화장실 옆에 얻었을 정도였습니다. 드신게 없어 배설도 안되면서 계속 화장실을 들락 거리시더군요. 배가 꾸물 거리면서 아프다는 표현을 계속 하셨습니다.

▲2016년 12월 5일 오후부터 3일간 입원하면서 코미녹스를 하루 4정씩 복용 시작하였습니다. 3일후 부터는 하루 4정이 어머니에게는 과다하다는 느낌이 들어 하루 3정씩 복용하면서 휴약기간 없이 현재까지 계속 복용하고 계십니다.

▲12월 20일은 몇 달전부터 등 전체 통기가 있어 가려움과 고봉으로 지내서서 한양대 병원 피부과 가서 간단한 진료 받음. 아울러 그동안 식사량등의 부족으로 백혈구 수치 급격히 낮아짐. 이로인한 영양인지 폭 15센티미터에서 길이 30센티정도의 큰 대상포진 발생, 시골에서부터 등 전체에 종기가 나서 지속적 가려움증으로 긁아 터지는등 긁어달라 호소하였는데 코미녹

스 복용후 완전히 깨끗이 나았습니다. 저를 비롯한 우리가족은 코미녹스 약효 없이는 대상포진이 이렇게 큰경우 쉽게 고통없이 날지 않았을거라고 믿고 있습니다.

▲2017년 1월 13일부터 밥으로 식사를 정상적으로 수저들고 직접 시작했습니다.

▲2017년 1월 22일 마약성 진통완화제가 언제 먹었는지 기억하기 어려울정도 즉 2일정도~ 3일정도에 한번씩 복용하다가 1월 24일부터 마약성약은 완전히 중단하고 코미녹스로만 복용함.

◆2017년 2월 13일 한양대 의과대학에서 코미녹스 복용후 첫 시티촬영 및 정밀검사 결과◆ 시티촬영 및 검사결과 궤장암 진행이 정지되었다는 이영렬 교수님의 말씀을 듣고 환자와 보호자는 코미녹스의 효과에 "신이 내린 선물"이라며 놀라워 했습니다. 또한 통증에 대한 설명에서 제가 이영렬 교수님께 "무엇보다도 이미 통증은 없어졌고 또한 식사도 잘하시고 아주 정상생활 하십니다."라고 설명 드렸더니 "대단하시네"라고 하셨습니다. 그리고 그 광범위한 대상포진을 처음봤던 순간 어머니는 암때문이 아닌 대상포진으로 돌아가시겠구나...라는 생각들 정도로 염려스러웠습니다. 왜냐면 제 와이프가 초그마한 점박이 처럼의 대상포진을 치료하는 3주동안 고통스러운걸 보았는데 초 고령의 어머님이 그 큰 모양의 대상포진의 고통을 어떻게 이겨낼수 있을까였습니다. 그런데 그 넓은 대상포진과 종기치료가 말끔이 사라진것에 대해 코미녹스가 직접적 효과를 발휘하였다고 확신하고 있습니다. 암진행 중지결과 확인후 이영렬 교수님께 정중히 부탁드렸습니다. 코미녹스 공급을 한달치 가지고는 여행에 지장이 있으시니 두달치만 공급해주시면 이번에 그토록 원하시는 시골여행좀 보내드리고 싶습니다. 했더니 흔쾌히 허락하셔서 코미녹스약만 들고 시골여행을 장기적으로 다녀 왔습니다.서울에 계시는 내내 얼마나 답답해 하셨는데 정말 소원 풀어 드렸고 아젠 여한이 없다고 우리 형제들은 말하고 있습니다.

2016년 11월 16일 그 머나먼 시골에서 서울 큰병원 모실땐 서울에서 살아서 시골갈수 있을까...그리고 임종하실거라 준비중이었는데 이런 여행을 살수 있게 해주셔서 진심으로 감사하게 생각하고 있습니다.간호예 도움주신 한분은 "궤장암이 오진 아니냐" 그래서 왜 그러냐고 물었더니 친언니등 지인도 궤장암이었는데 식사를 전혀 못하고 통증이 엄청났는데 어머니는 전혀 그렇지 않다.라고까지 말하더군요. 어머니께서는 궤장암 발견후 코미녹스 복용외에는 어떤 항암치료도 하지 않고 있습니다.

그리고 통증이 없어진 후 코미녹스외에는 어떤 진통완화제도 복용하지 않고 현재 계십니다. 우리가족은 코미녹스가 없었으면 어머님께서는 이미 아주 고통스럽게 하늘나라로 가셨다고 확신하고 있으며 왜 이런 기적같은 약이 빨리 시판되지 않은지에 대해 걱정하고 있습니다. 또한 한양대병원 외래진료가 있는날이면 약공급 안될까봐 노심초사합니다. 부디 작은 이 진술서 자료나마 참고되셔서 우리 나라에도 몇몇하게 마음껏 복용할 그날이 오길 간절히 기도하고 있습니다. 읽어 주셔서 감사합니다.

첨부서류: 정미중 주민등록증 사본
김계순 주민등록증 사본
가족관계증명서

2017년 5월 11일

(주)코미팜 대표이사 귀중

진술자 성명 :

정미중
김계순

코미팜스 복용자 :

김계순

뇌 전이 및 기타
장기전이 폐암
환자 복용사례

58/M Mantle cell lymphoma(Abdomen CT)

베스앤가물치

기다림에 지친 주주 분들에게 힘을 주는 희망이야기

'13. 11.08 09:33 조회: 180

더보기



블로그 둘러보기
최근글 보기

선호회원 0
선호회원 등록하기

팔로잉 3
팔로잉 관리

125541

주식특강VOD
환타지와 주식
초딩 탈출기

다음의 암싸사카페에, 아래에 일부 인용한 바와 같이, 코미팜스에 관한 내용이 어제 날짜로 올라와 있네요. 기다림에 지친 주주 분들은 방문하셔서 읽어보시면 힘이 나실 거 같습니다. 아무쪼록 코미팜스가 탄생하는 그날까지 조금만 더 인내하시면 좋은 결과가 있을 거 같습니다. 주주 분들 모두 화이팅!

[희망이야기] 기적은 또 다른 기적을 만든다 ---이게 실현될줄이야 ♡(간암,담낭암,췌장암)
사****/조회577/추천1/2013.11.07.12:22

그리고 두번째기적입니다
바로 저희 친정어머니.
대전 대학병원서 78세 노령이신데다 심근경색이 있으시고 폐대동맥에서 시작된 폐암이 주변장기 전이와 뇌에 4센티차리 중앙과 1센티 넘는 것만 4개 관찰로 수술불가는 물론 조직검사를 위한 수술조차 위험한 상태이고 최대 3개월 생존판정을 받으셨습니다. 병원에서는 진통제투여 외에 해줄 것이 없다고.

황당함과 절망이 있었지만 포기하지 않고 서울로 모시고 올라갔고 2년 전 신랑을 위해 애썼던 응급의약품 코미팜스에 마지막 희망을 걸었습니다.

더이상 치료방법이 없었고 마약성 진통제를 세시간 간격으로 맞으며 버텼던 우리엄마.

병원 의사생의 응급소견서와 식약청허가로 응급의약품을 얻게 되었고 한달 드신 후 첫번째 결과는 일단 진통제를 세시간 간격으로 드시거나 주사로 맞았던 엄마는 하루 두알 진통제로 줄으셨고요 모든 혈액 수치가 좋아지셨습니다.

그리고 이렇게 두달이 다 되가는 요즘 병원서 퇴원해서 집으로 돌아와 일상생활 하시고요 진통제 완전히 끊으셨고요. 체중이 늘고 계시고요. 어제는 혼자 샤워하시고 속옷도 혼자 빨아서 널으셨고. 대전하고 안산 딸들집도 왔다갔다 하시고 계세요.

처음 엄마 폐암사실 알고 통증 없이 딱6개월만 우리 딸들과 함께 하게 해주세요 하고 기도 했는데 그 기저기 이루어 지고 있습니다.

주말마다 언니집에 계신 엄마보러 온가족이 대전서 안산가면서 이 기적을 우리 가족에게 주심을 감사합니다.

이렇게 글을 올리는건 여 기 계신 모든 환우와 가족들이 기적이 있다는 걸 꼭 알려드리고 싶어서입니다.

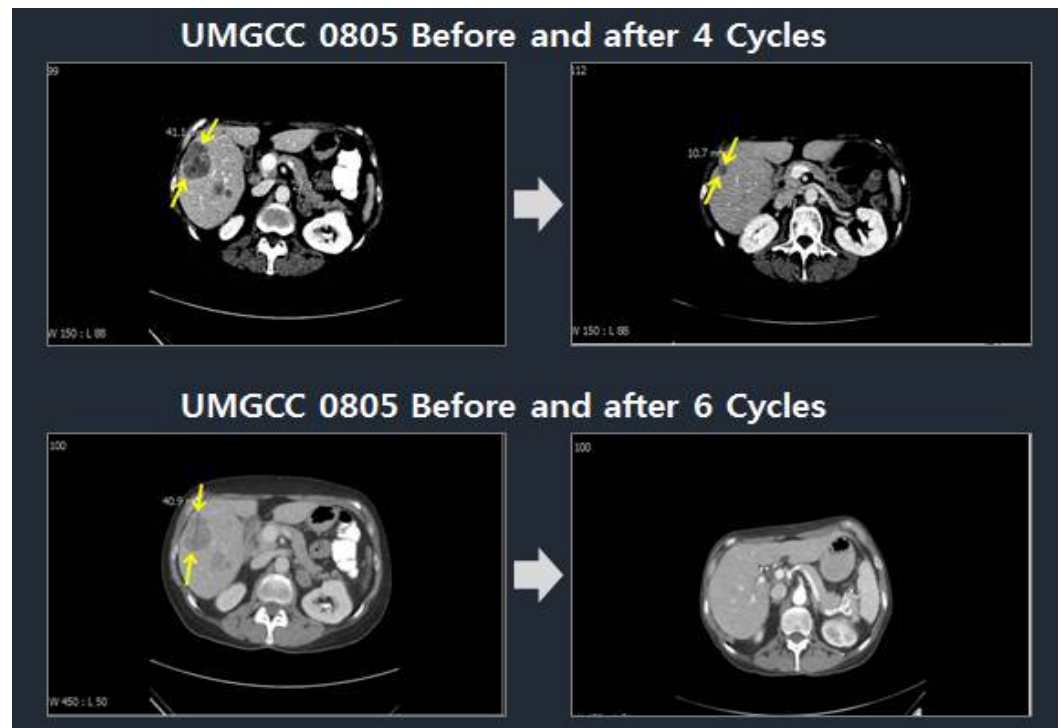
네. 임상결과가 가끔 좋지 않은 분들도 계신것 같더라고요. 저는 제 주변에 2년전 응급의약품 처방받은 4분이 모두 거의 완치나 관해상태이기에...고민없이 엄마처방을 받았습니다. 꼭 코미팜스가 아니더라도 암치료에 도움되는게 있다면 꼭 도움드리고 싶습니다.

[AD] (19금) 초당 12만원...경악
[AD] 재미를 똑똑하네, 현명하십니다! 오를스톡(업)
혈도보다 강력한 복합 재료로 100%실적 예약된 급등임박주

14

간 전이 폐암환자 치료사례

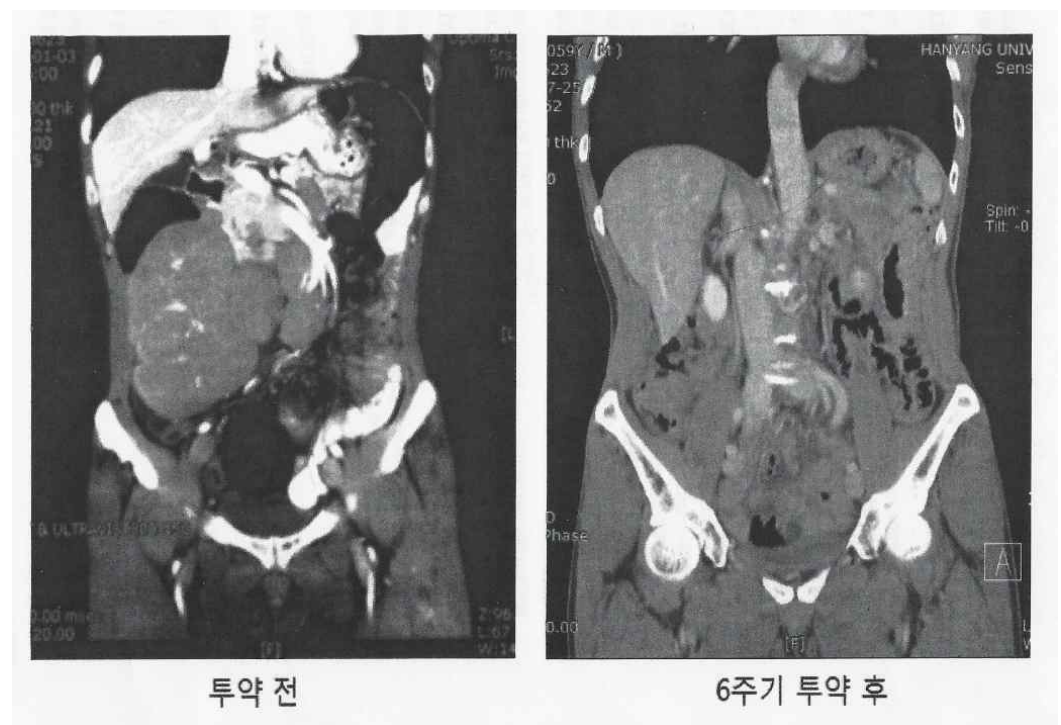
미국 폐암1상



*출처: 미국폐암1상

혈액암 림포마(Lymphom a)환자 치료사례

림포마(Lymphoma)환자 KOMINOX복용 후 치료사례



10. 신약(PAX-1, KML001) 투자내역 및 자산내역

투자내역	2018년까지 총 투자금액은 1,106억원입니다. 시설투자비용 384억원 중 277억원은 감가상각중이며, 그 외의 투자금액은 모두 손익에 반영되었습니다.
자산내역	자본금 55억원 자기자본 980억원

11. 신약(PAX-1, KML001) 개발을 위한 협력 연구기관

Network	미국4개기관 영국2개기관 호주4개기관 신약개발의 컨설팅 및 임상시험 대행기관: 미국소재 PPD 영국소재 Bionical-Emas
---------	---

12. 신약(PAX-1, KML001) 개발을 위한 임직원 현황

개발인력	외국국적인 11명 내국국적인 14명 총25명
------	--------------------------------

13. 신약(PAX-1, KML001) 개발 계획표

개발계획	■당사는 독일, 미국, 한국에서 다양한 암을 대상으로 임상시험 1상과 2상을 9회에 걸쳐 실시하였습니다. ■9번의 임상시험 프로토콜이 모두 수명을 다한 곧 죽음을 앞둔 환자를 대상으로 하였지만, 향후 대상 범위를 확대하여 임상을 실시할 예정입니다. ■가장 악성으로 판정된 뇌암의 교모세포종(GBM)에 대한 임상의 결과를 기반으로 2020년에 미국FDA에서 판매승인을 목표로 진행하고 있습니다. ■치료율 3% 미만인 뇌 전이 폐암에 대한 임상시험의 결과를 기반으로 2020년에 미국 FDA에서 판매승인을 받을 것으로 기대하고 있습니다.
------	---

- 거의 모든 암의 전이암 치료 목적으로 바스켓임상시험(Basket Trial)을 미국에서 금년 5~6월부터 실시할 계획이며, 그 중 임상결과에 따라 전이 폐암, 전이 난소암 등은 신속판매승인 대상 품목이므로 2021년 상반기에는 미국FDA에서 판매승인을 받을 것으로 기대하고 있습니다.
- 암 환자의 마약성 진통제 저감 또는 대체 목적으로 임상시험이 진행된다면, 진행 6개월정도 후에는 미국FDA에 혁신치료제 지정 승인신청을 계획하고 있으며, 2021년 상반기에는 미국FDA에서 판매승인을 득할 수 있을 것으로 기대하고 있습니다.
- 쓸개암 임상을 2020년말까지 마무리할 계획입니다.
- 난소암은 발견시 80%가 전이된 상태입니다. 원발성암과 같이 임상시험을 실시하여도 미국FDA에서 신속판매승인 여부의 가능성을 확인하고 있습니다.
- 다발성 골수종 임상시험실시 확대를 위해 검토하고 있습니다.

14. 30년 후에는 의료비용이 국민총생산의 50% 예상

30년후의 의료비용

5년후에는 모든 선진국들이 의료비용 절감을 위하여 여러 정책을 수립할 가능성이 높습니다.

그리고, 현재와 같이 환자를 대상으로 실시하는 임상시험은 감소하면서, AI가 이를 대신 할 것으로 예측됩니다.

AI를 이용하여 사용되고 있는 의약품에 대하여 의약품 재평가를 실시 할 것으로 예측되며, 의약품 재평가 작업에서 질병에 내성을 발현하는 약, 약의 내성이 있는 약, 부작용을 저감 시키기 위하여 부가적 처방이 필요한 약, 몇 개월 미만의 수명을 연장하는 약, 고가의 약 등이 집중적으로 재평가 대상이 될 것으로 예측됩니다.

의료비용에는 약 값만이 아니라 기술을 비롯한 병원 이용료도 포함되어 있기 때문에 경구용 위주의 약이 처방약으로 권장될 것으로 예측됩니다.

코미팜은 미래를 예측한 신약 개발에 중점을 두고 진행되어 왔습니다.

우선 치료를 목적으로 실시되는 임상시험이 승인된다면 의료계에 치료와 치료비용에 있어 혁신을 일으킬 수 있다고 확신합니다.

15. 연구보고서(Study Reports)목록

- S1. Study report 1027529. To evaluate possible analgesic activity of API in the analgesia, Acetic Acid Writhing assay, US. June 2007
- S2. Study report 1027530. To evaluate possible analgesic activity of API in the analgesia, Formalin, Mouse assay, US. June 2007.
- S3. Study report S07098. Test Article Efficacy in a Rat Model of Cancer Induced Bone Pain, US. February. 2008
- S4. Study report Neuropathic Pain. Efficacy of Panafix in animal model of neuropathic pain.
- S5. Report Notox Project 360326. Pre-pharmacokinetic study with PAX-1 after daily intravenous or oral administration for 5 days in the mouse. February 2003.
- S6. Report Repharto Project RPT01-002. Analysis of samples from pre-pharmacokinetic study with PAX-1 after daily intravenous or oral administration for 5 days in the mouse. Version 1, 28 August 2003
- S7. Study F003. a) The Comparison Between Arsenic Trioxide and Sodium Meta-Arsenite (F003) Clinical Chemistry and Haematology Report, Version 4, July 2006, b) The Comparison Between Arsenic Trioxide and Sodium Meta-Arsenite (F003) Pharmacokinetic Analysis Report, Version 5, July 2006, c) Comparison Between Arsenic Trioxide and Sodium Meta-Arsenite (F003) Macroscopic Pathology and Pathomorphological Results, Final Version, 21 July 2006.
- S8. Report Notox Project 349111: Pre-pharmacokinetic study with PAX-1 (KML001) after daily intravenous, intraperitoneal or oral administration for 5 days in the rat. September 2002.
- S9. Report Repharto RIR021. Human plasma binding of PAX-1 (KML001). April 2006.
- S10. Report Notox Project 367886. Dose range finding study with PAX-1 (KML001) by daily oral gavage for 14 days in the mouse. March 2003.
- S11. Report Notox Project 367875. Dose range finding study with PAX-1 (KML001) by daily oral gavage for 14 days in the rat. March 2003.
- S12. Report Notox Project 367908. Maximum tolerated dose assessment of PAX-1 (KML001) after daily oral gavage for 14 days in the mouse followed by a 14-day recovery period. May 2003.
- S13. Report Notox Project 367897. Maximum tolerated dose assessment of PAX-1 (KML001) after daily oral gavage for 14 days in the rat followed by a 14-day period. May 2003.
- S14. Report Bio Logic Study No. 03-101. Maximum tolerated dose assessment and kinetic analysis of PAX-1 (KML001) after daily oral administration for 14 days in the pig. February 2004.
- S15. Statistical Report Biometric Support BS031003. Maximum tolerated dose assessment and kinetic analysis of PAX-1 (KML001) after daily oral administration for 14 days in the pig. October 2003.

- S16. Chemon 09-RR-193P A 4-Week Dose Range-Finding Oral Toxicity Study of Sodium meta-arsenite in Sprague-Dawley Rats
- S17. Chemon 09-DR-194 A 4-Week Repeated Oral DRF Toxicity Study of Sodium meta-arsenite in Beagle Dogs
- S18. Report Notox Project 378258. Subacute toxicity study with PAX-1 after daily oral gavage for 14 days in the mouse followed by a 28-day recovery period. October 2003.
- S19. Chemon 09-RR-265 A 13-Week Repeated Oral Toxicity Studies of PAX-1 in Sprague-Dawley Rats Followed by a 4-Week Recovery Study
- S20. Chemon 09-DR-266 A 13-Week Repeated Oral Toxicity and Toxicokinetic Studies of Sodium meta-arsenite in Beagle Dogs Followed by a 4-Week Recovery Study
- S21. Clinical Report, IPSS Study No. D008. Clinical phase I study in cancer patients with oral PAX-1 (KML001) - A new cytostatic drug. August 2006.
- S22. Chemon 08-RA-303 A Single-dose Oral Toxicity Study of Sodium metaarsenite by Up and Down Procedure (UDP) in Sprague-Dawley Rats, October, 2008
- S23. Clinical Report IPSS-D039 A Clinical Phase II study in patients with prostate cancer and bone metastases with KML001 (Kominox™). A placebo controlled, randomized, multicentric trial. 19Feb2010
- S24. Study No. 11-DK-512N. Toxicokinetic Study of Sodium metaarsentie after 13 weeks Repeated Oral Administration in Beagle Dogs
- S25. Report Rephartox Project RPT01-002. Analysis of samples from a pharmacokinetic study after daily oral administration of KML001 for 14 days in the pig.
- S26. Study No. B12346. Cardiovascular Effects of Sodium metaarsenite (NaAsO₂) in Conscious Beagle Dogs after Oral Administration
- S27. Study No. B12345. Evaluation of Effect of Sodium metaarsenite (NaAsO₂) on the Respiratory Function in Conscious Sprague-Dawley Rats after Single Oral Dose by gavage
- S28. Study No. B12344. Evaluation of Effect of Sodium mataarsenite (NaAsO₂) on the Central Nervous System in ICR Mice after Single Oral Dose by gavage
- S29. Study 10-VG-511. Bacterial Reverse Mutation Assay with Sodium metaarsenite (NaAsO₂)
- S30. Study No. 10-VG-513. *In vitro* Mammalian Chromosome Aberration Test of Sodium metaarsenite (NaAsO₂) in Cultured Chinese Hamster Lung (CHL) Cells
- S31. Study No. 10-MG-515. Evaluation of Sodium metaarsenite (NaAsO₂) in the Mouse Bone Marrow Micronucleus Assay (Oral Gavage Study)
- S32. Study No. KNX 10-02. A Phase I Study of KOMINOX (KML001) for Refractory or Recurrent Solid Tumors

- S33. Study No. KNX 09-01. A Phase I Clinical Trial to Assess the Safety and Tolerability of Kominox in Patients with Progressive or Recurrent Glioma
- S34. Study No. UMGCC805. Phase I and Pharmacokinetic Trial of the Antitelomerase Agent KML001 (KML) and Cisplatin (CDDP) in Advanced Solid Tumors
- S35. Study No. KNX 11-01. A single-dose, non-controlled, open-label, single-centre, phase 1/2 clinical study to evaluate the efficacy and safety of KOMINOX (KML001) in patients with unresectable, advanced or metastatic cholangiocarcinoma
- S36. Study No. KNX 11-02. A Phase II, Open Label, Non-Comparative Multicenter Study to Evaluate the Efficacy and Safety of Kominox (KML001) Monotherapy in Patients with Metastatic or Locally Advanced Liver Cancer (Hepatocellular cancer) after Failure on Systemic Anticancer Therapy
- S37. Study No. KNX 11-03. A phase 2 clinical study to evaluate the efficacy of KOMINOX (KML001) in patients with refractory or relapsed non-Hodgkin's lymphoma
- S38. Study No. KNX 08-01. A Phase II study of Kominox (KML001) in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer after failure of systemic chemotherapy
- S39. Study No. 10-DK-238N. Toxicokinetic Study of Sodium metaarsentite after 13 weeks Repeated Oral Administration in Beagle Dogs

Memo



Thank You

CONTACT

(우) 15094 경기도 시흥시 경제로 17(정왕동)
Tel : 031) 498-6104(ext. 0143) / Fax : 031-498-6107
[http:// www.komipharm.com](http://www.komipharm.com)
IR문의 : webmaster@komipharm.com