(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0049993
(43) 공개일자 2014년04월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/02 (2006.01) *C12Q 1/68* (2006.01)
G01N 33/52 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-7035101
(22) 출원일자(국제) 2012년06월01일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2013년12월31일
(86) 국제출원번호 PCT/US2012/040361
(87) 국제공개번호 WO 2012/167011
국제공개일자 2012년12월06일
(30) 우선권주장
61/492,738 2011년06월02일 미국(US)

(71) 출원인
메사추세츠 인스티튜트 오브 테크놀로지
미국 02139 메사추세츠 캠브리지 메사추세츠 애브뉴 77
터프츠 유니버시티
미국 매사추세츠 메드포드 발루 홀 (우편번호: 02155)
(72) 발명자
틸리, 윌리엄, 쥐.
미국 01890 메사추세츠 윈체스터 사우스 보더 로드 438
고스트제바, 엘레나, 브이.
미국 01890 메사추세츠 윈체스터 사우스 보더 로드 438
스톨라, 비., 데이비드
미국 02459 메사추세츠 뉴튼 클라크 스트리트 158
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 34 항

(54) 발명의 명칭 **메타핵 줄기 세포의 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈 복제 중간체**

(57) 요 약

본 발명은 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 검출함에 의한 메타핵 줄기 세포의 동정 방법뿐 아니라 이들 세포의 성장, 이동, 복제 및/또는 생존을 선택적으로 조절하는 작용제의 동정 방법을 제공한다. 또한, 장애, 예를 들어, 죽상동맥경화증, 재협착증 및 양성 또는 악성 종양을 위한 진단, 예후 및 치료 방법이 제공된다.

특허청구의 범위

청구항 1

a) 시료에서 세포의 핵을 가시화시키는 단계로서, 상기 시료가 약 50 미크론 이하의 최대 직경을 갖는 핵에서 핵 구조의 온전성(integrity)을 실질적으로 유지시키는 방법에 의해 제조되는 단계; 및

b) 상기 시료에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스(duplex) 게놈을 함유하는 세포를 동정하여, 이에 의해 메타핵 줄기 세포(metakaryotic stem cell)를 동정하는 단계를 포함하는 메타핵 줄기 세포의 동정 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 메타핵 줄기 세포가 동물 줄기 세포인 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, c) 단계 b)에서 동정된 세포를 계수(enumerating)하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 메타핵 줄기 세포가 태아, 청소년, 성인 또는 종양 줄기 세포로부터 선택되는 방법.

청구항 5

제2항에 있어서, 상기 동물이 포유류, 예를 들어, 인간인 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 시료가 단리된 조직 생검 시료 또는 조직 배양 시료인 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 가시화가 상기 세포를 dsRNA/DNA 듀플렉스에 특이적인 검출가능하게 표지된 항체와 접촉시키는 것의 결과인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 표지가 형광인 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 가시화가 상기 세포를 단일 가닥과 이중 가닥 핵산을 구별시키는 염료와 접촉시키는 것의 결과인 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 염료가 아크리딘 오렌지(acridine orange)이며, 상기 세포가 가시화 전에 RNAse로 처리되는 방법.

청구항 11

제1항 또는 제9항에 있어서, 상기 시료가 상기 핵의 가시화 전에 RNAse로 처리되는 방법.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 가시화가 상기 세포를 ssDNA에 특이적인 검출가능하게 표지된 항체와 접촉시키는 것의 결과인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 표지가 형광인 방법.

청구항 14

제6항에 있어서, 상기 시료가 종양, 상처 치유 병변 또는 죽상동맥경화증 병변을 함유하는 것으로 의심되는 조직 유래의 조직 생검이며, 상기 상처 치유 병변이 임의로 재협착증 병변일 수 있는 방법.

청구항 15

a) 시료에서 세포 중의 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 포함하는 핵의 존재 및/또는 개수 및/또는 분포를 결정하는 단계로서, 상기 시료가 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 포함하는 메타핵 줄기 세포를 포함하며, 후보 작용제가 상기 핵과 상호작용하기에 적절한 조건 하에서 상기 작용제와 접촉되게 유지되고, 상기 시료가 약 50 미크론 이하의 최대 직경을 갖는 핵의 온전성을 실질적으로 유지시키는 방법에 의해 제조되는 단계; 및

b) 상기 후보 작용제와 접촉된 세포에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 포함하는 핵의 존재 및/또는 개수를 메타핵 줄기 세포를 포함하나 상기 후보 작용제와 접촉되지 않은 대조군 세포에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 포함하는 핵의 존재 및/또는 개수와 비교하여, 이에 의해, 상기 후보 작용제와 접촉되지 않은 대조군 세포에 비하여, 상기 후보 작용제와 접촉된 세포에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 포함하는 핵의 개수 및/또는 분포의 변화가 작용제의 효율성을 나타내는 단계를 포함하는 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 또는 생존을 조절하는 작용제의 동정 방법.

청구항 16

제15항에 있어서, 상기 세포가 배양 중에 상기 후보 작용제와 접촉되는 방법.

청구항 17

제16항에 있어서, 상기 세포가 동물 세포인 방법.

청구항 18

제15항에 있어서, 상기 동물 세포가 생체 내에서 상기 후보 작용제와 접촉되는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 상기 동물 세포가 이종이식 고형 종양으로부터 수득된 포유류 세포인 방법.

청구항 20

제15항에 있어서, 상기 가시화가 상기 세포를 dsRNA/DNA 듀플렉스에 특이적인 항체와 접촉시키는 것의 결과인 방법.

청구항 21

제20항에 있어서, 상기 항체가 형광 표지되는 방법.

청구항 22

제15항에 있어서, 상기 가시화가 상기 세포를 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 구별시키는 염료와 접촉시키는 것의 결과인 방법.

청구항 23

제22항에 있어서, 상기 염료가 아크리딘 오렌지이며, 상기 세포가 가시화 전에 RNAse로 처리되는 방법.

청구항 24

제15항 또는 제22항에 있어서, 상기 시료가 상기 핵의 가시화 전에 RNAse로 처리되는 방법.

청구항 25

제15항에 있어서, 상기 가시화가 RNAse 처리 후에 상기 세포를 ssDNA에 특이적인 항체와 접촉시키는 것의 결과인 방법.

청구항 26

제25항에 있어서, 상기 항체가 형광 표지되는 방법.

청구항 27

제15항에 있어서, 상기 후보 작용제가 DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 또는 RNAse H1로부터 선택되는 분자를 포함하는 복제 복합체를 표적화하는 방법.

청구항 28

제27항에 있어서, 상기 후보 작용제가 DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 또는 RNAse H1과 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈의 회합을 방해하거나, 또는 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈으로부터의 DNA 중합효소 베타-매개의 복제 또는 DNA 중합효소 제타-매개의 DNA 복제, 또는 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈으로부터의 RNAse H1-매개의 RNA의 제거를 방해하는 방법.

청구항 29

제15항에 있어서, 상기 후보 작용제와 접촉된 세포에서 메타핵 무사분열(amitosis)을 겪는 벨(bell)-형상의 핵의 개수의 증가가 검출되는 방법.

청구항 30

제15항에 있어서, 상기 후보 작용제와 접촉된 세포에서 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 개수의 감소가 검출되는 방법.

청구항 31

중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 함유하는 메타핵 줄기 세포에서 후보 거대분자(macromolecule)를 검출하는 단계로서, 상기 후보 거대분자와 상기 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈의 공동-국소화(co-localization)가 상기 거대분자가 상기 메타핵 줄기 세포 배가(duplication)와 관련이 있는 것을 나타내는 단계를 포함하는 메타핵 줄기 세포 배가와 관련이 있는 거대분자의 동정 방법.

청구항 32

제31항에 있어서, 상기 후보 거대분자가 검출가능하게 표지된 항체로 검출되는 방법.

청구항 33

제31항에 있어서, 상기 메타핵 줄기 세포가 동물 줄기 세포인 방법.

청구항 34

제1항, 제15항 또는 제31항에 있어서, 상기 메타핵 줄기 세포가 식물 줄기 세포인 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] **관련 출원**

[0002] 본 출원은 미국 가특허 출원 제61/492,738호(출원일 : 2011년 6월 2일)의 이익을 주장한다. 상기 출원의 전체 교시는 본 명세서에 참조로 포함된다.

배 경 기 술

[0003] **발명의 배경**

[0004] 과학자들은 임신 중기의 태아의 세포 및 조직과, 종양 세포 및 병리학적 조직 구조(tissue architecture)(예를 들어, 선암종)가 유사함을 오랫동안 인식하여 왔다(문헌[Cohnheim, 1876]). 악성 종양은 초기 태아와 유사한 속도로 성장하며, 태아 조직과 같이, 조직학적으로 중간엽(국소 비조직화(disorganized)) 또는 상피(국소 조직화)

중 어느 하나인 니치(niche)를 함유한다. 태아 및 암 줄기 세포 둘 모두는 개수가 증가하고, 기관 또는 종양 종괴 내에 고도로 이질적인 니치를 채우는(populating) 다양한 분화된 세포 유형이 생기게 하는 것으로 예상된다. 이에 따라, 태아 및 암 줄기 세포 둘 모두는 대칭적으로 분열하여 2개의 줄기 세포를 생성하고, 비대칭적으로 분열하여 줄기 세포와 분화된 비-줄기 세포가 생기게 하는 것으로 예상되었다. 대칭적 줄기 세포 분열은 기관 또는 종양의 순성장(net growth)을 추진할 것이나, 비대칭적 분열은 스스로 분열하고, 장기 또는 종양에서 매우 다양한 세포를 제공하는 전이 세포(transition cell)를 제공할 것이다. 유사한 맥락에서, 비-암성 과다증식성 장애, 예를 들어, 죽상동맥경화증 또는 상처 치유 장애, 예를 들어, 수술후 재협착증도 또한 대칭적 및 비대칭적 줄기 세포 분열에 의한 줄기 세포 집단의 비정상적인 성장에 의해 추진될 것 같다. 암 및 기타 과다증식성 질환의 효과적인 치료가 이들 장애의 근원이 되는 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 또는 생존을 선택적으로 조절하도록 지향된 신규한 치료법을 필요로 할 것임이 일반적으로 인식되어 있다. 따라서, 이들 병적 측면의 근원이 되는 줄기 세포를 동정하고, 상기 줄기 세포에 특유한 분자적 표적 분자 및 생화학 경로를 동정하고, 환자에서 줄기 세포를 사멸시키거나 줄기 세포의 성장을 제한하는 작용제(agent)를 동정하기 위한 수단이 필요하다.

발명의 내용

[0005] **발명의 요약**

[0006] 본 발명은 특히, 과다증식성, 상처-치유 또는 종양 장애의 근원이 되는 줄기 세포, 특히 메타핵 줄기 세포의 동정 방법뿐 아니라, 상기 병적 줄기 세포에 특유한 분자적 표적 분자 및 생화학적 경로의 동정 방법 및 병적 줄기 세포를 사멸시키거나 병적 줄기 세포의 성장, 이동 또는 생존을 제한하는 작용제의 동정 방법을 제공한다. 본 발명은 부분적으로는 인간 태아/청소년 성장을 추진할 뿐 아니라, 비-암성 과다증식성, 상처 치유 및 종양 병적 측면을 추진하는 줄기 세포 계통 - 본 명세서에서 메타핵세포(metakaryote)로 지칭 - , 임의의 다른 공지되어 있는 식물, 동물 또는 박테리아 세포 유형의 형태에 의해서 사용되지 않는 메타핵세포의 예상치 못한 방식의 핵 DNA 가닥 분리 및 복제의 출원인에 의한 발견에 기초한다. 신규한 형태의 핵 게놈 복제는 복제 중간체 dsRNA/DNA 하이브리드(dsRNA/DNA 나선 듀플렉스(duplex), dsRNA/DNA 듀플렉스, dsRNA/DNA 나선, 또는 간단하게 dsRNA/DNA로도 지칭됨) 게놈의 형성을 수반한다. 이러한 관찰은, 핵 DNA 합성이 하위염색분체 길이의 DNA의 반복 카피에 이어서, 염색분체 응축 및 이중 가닥 DNA(dsDNA/DNA) 형태의 유사분열에서의 분리에 의해 진행되는 이전의 인간 진핵 비-줄기 세포 분열의 관찰과 대조적이다. 그러나, 비-줄기 진핵 세포에서 인간 세포 미토콘드리아 DNA의 일부 또는 전부가 dsRNA/DNA 중간체를 통해 합성되는 증거가 제공되었다. 구체적으로, 문헌에는 임의의 형태의 핵 게놈 복제 및/또는 분리에서의 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈에 대한 언급 또는 이의 제시가 포함되어 있지 않다.

[0007] 따라서, 일 태양에서, 본 발명은 메타핵 줄기 세포, 특히 핵 복제 및 분리를 겪는 메타핵 줄기 세포의 동정 방법을 제공한다. 상기 방법은 시료에서, 예를 들어, 조직 또는 종양 시료 또는 세포 배양물에서, 세포의 핵을 가시화시키는 단계로서, 시료가 최대 약 50 미크론의 최대 직경을 갖는 핵에서 중공(hollow), 벨(bell) 형상의 메타핵 핵 구조의 온전성(integrity)을 실질적으로 유지시키는 방법에 의해 제조되는 단계에 이어서, 메타핵세포의 벨-형상의 핵에 의해 메타핵세포를 동정하는 단계 및/또는 시료에서 메타핵 무사분열(amitosis)(다시 말하면, 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련)을 겪는 메타핵 세포를 인식하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기 방법은 동정된 세포를 계수(enumerating)하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 특정 실시형태에서, 상기 방법은 동정된 세포를 단리하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 다른 실시형태에서, 상기 방법은 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 함께 공동국소화된(colocalized) 거대분자(macromolecule)를 동정하는 단계를 추가로 포함한다.

[0008] 특정 실시형태에서, 메타핵 줄기 세포는 포유류 줄기 세포, 예를 들어, 인간 세포이다. 특정 실시형태에서, 세포는 태아, 청소년, 성인 및/또는 종양 줄기 세포 및/또는 죽상동맥경화증, 정맥경화증, 수술후 재협착증에서와 같은 과다증식성 병리학적 병변의 줄기 세포 중 어느 하나일 수 있다.

[0009] 본 발명의 방법에 의해 동정되는 세포는 조직, 종양 생검 또는 죽상동맥경화증, 정맥경화증, 수술후 재협착증에서와 같은 기타 과다증식성 병리학적 병변의 단리된 시료, 또는 세포 배양 시료 내에 존재할 수 있다. 특정 실시형태에서, 세포가 배양되고, 핵을 가시화하기 전에, 배양물이 방사선 조사되거나 다르게 처리된다. 더욱 특정한 실시형태에서, 배양된 세포를 처리하여, 메타핵 줄기 세포의 관찰 전에 대부분의 진핵 비-줄기 세포를 바람직하게는 사멸시키고, 차폐시킨다. 이러한 처리의 예에는 400 rad 초과의 선량에서의 x-선 조사, 또는 진핵 비-줄기 세포의 사멸을 야기하나 유의미하게 더 낮은 정도로 메타핵 세포의 사멸을 야기하는 것으로 공지되어 있는 농도에서의 화학 작용제(예를 들어, 5-플루오로우라실, 메토트렉세이트, 콜히친)에 대한 노출이 포함된다.

[0010] 다른 실시형태에서, 세포는 종양, 상처 치유 병변(예를 들어, 재협착증 병변), 죽상동맥경화증 또는 정맥경화증 병변을 함유하는 것으로 의심되는 조직으로부터의 조직 생검에 존재한다.

[0011] dsRNA/DNA 하이브리드 게놈을 사용한 게놈 복제 및 분리를 겪는 메타핵 줄기 세포의 핵은 다양한 수단에 의해 가시화될 수 있으며, 특정 실시형태에서, 가시화는 시료의 세포를 dsRNA/DNA 듀플렉스에 특이적인 검출가능하게 표지된 항체와 접촉시키는 것의 결과일 수 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 항체는 형광 표지된다. 다른 실시형태에서, 세포는 간접적 면역형광에 의해, 예를 들어, 세포를 이에 특이적인 항체와 접촉시킨 다음 검출가능하게 표지된 이차 항체를 사용하여 일차 항체를 검출함으로써 가시화된다.

[0012] 다른 실시형태에서, 핵은 세포를 단일 가닥과 이중 가닥 핵산을 구별시키는 염료, 예를 들어, 아크리딘 오렌지(acridine orange)와 접촉시키는 것의 결과로서 가시화된다. 더욱 특정한 실시형태에서, 핵의 핵산 내용물의 가시화 전에, 예를 들어, RNase 처리에 의하여 RNA를 제거하도록 시료 중의 세포가 처리된다. 다른 특정 실시형태에서, 핵의 가시화는 RNA를 제거하기 위한 처리 후에, 세포를 ssDNA에 특이적인 검출가능하게 표지된 항체, 예를 들어, ssDNA에 특이적인 형광 표지된 항체와 접촉시키는 것의 결과이다. 유사하게, dsRNA/DNA 중간체를 함유하는 세포는 dsRNA/DNA에 특이적으로 결합하며, 형광 작용제에 컨쥬게이트되는 작용제, 예를 들어, 악티노마이신(actinomycin) D에 의해 검출될 수 있다.

[0013] 다른 실시형태에서, 다량(1 내지 24 pg)의 dsRNA/DNA를 함유하는 핵은 염료, 예를 들어, DAPI(4',6-다이아미디노-2-페닐인돌) 및/또는 Hoechst 33258의 형광의 부재 또는 뚜렷한 감소에 의해 인식되며, 이들 염료는 염료가 dsDNA에 결합하는 경우에 밝게 형광을 내나, 오직 dsRNA/DNA 만을 함유하는 핵의 형광을 야기하지 않는다. "Hoechst-음성" 핵이 골수 또는 종양으로부터 유래된 세포의 혼합물로부터 단리된 적이 있으며, 상기 단리물이 이식 실험에서 조혈 또는 종양 줄기 세포에 대해 농축된 것으로 보고된 적이 있는 것이 본 명세서에서 강조된다. 그러나, Hoechst-음성 핵이 있는 단일의 세포가 줄기 세포 특성, 예를 들어, 중공 벨 형상의 핵을 갖는 것으로 보고된 적도 없고, 이전에 "Hoechst-음성" 조건이 게놈 복제 및/또는 분리를 겪는 세포와 연관된 적도 없고, 이러한 조건이 다량의 dsRNA/DNA를 함유하는 세포 핵과 연관된 적도 없다.

[0014] 다른 태양에서, 본 발명은 게놈 복제 및 분리를 겪는 메타핵 줄기 세포에 특유한 거대분자 및/또는 생화학 경로의 동정 방법을 제공한다. 이러한 거대분자 또는 경로의 생물학적 기능(들)의 저해는 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 및/또는 생존을 저해하는 것으로 예상될 수 있다. 이들 방법은 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 함유하는 세포를 동정하는 단계 및 (직접적으로 또는 간접적으로) 후보 거대분자를 검출하는 단계를 포함하며, 여기서, 후보 거대분자와 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈의 공동-국소화에 의해, 거대분자가 메타핵 줄기 세포 배가(duplication)와 관련이 있음이 나타난다. 특정 실시형태에서, 후보 거대분자는 검출가능하게 표지된 항체로 검출된다. 일부 실시형태에서, 이제 다량의 dsRNA/DNA를 함유하는 것으로 알려져 있는 무사 분열을 겪는 메타핵의 핵을 예를 들어, 특정 거대분자 또는 생화학 경로의 존재에 대하여 현미경 하에서 시험한다. 특정 거대분자의 가시화는 시료의 세포를 인간 게놈에 의해 엔코딩되는(encoded) 임의의 유전자 산물에 특이적인 검출가능하게 표지된 항체와 접촉시키는 것의 결과일 수 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 항체는 형광 표지된다. 다른 실시형태에서, 세포는 간접적 면역형광에 의해, 예를 들어, 세포를 이에 특이적인 항체와 접촉시킨 다음, 검출가능하게 표지된 이차 항체를 사용하여 일차 항체를 검출하는 것에 의해 가시화된다. 이들 특정 실시형태의 예로서, 출원인은 각각 게놈 복제 및 분리를 겪는 메타핵의 핵에서 공동국소화되어, 다량(핵당 100,000개 이상의 분자)이 관찰되나, 간기 메타핵의 핵에서, 또는 임의의 진핵의 핵에서는 검출되지 않는 3개의 특정 거대분자의 출원인의 관찰을 제공한다: DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 및 RNAse H1. 이들 및 기타 거대분자는 메타핵 줄기 세포의 무사분열에 의한 개별 핵으로의 분리 후에 dsRNA/DNA를 dsDNA/DNA 형태로 전환시키는 생화학 경로의 필수적인 부분인 것으로 본 출원인에 의해 가정되었다.

[0015] 개별 실시형태에서, 특정 거대분자, 예를 들어, 효소의 존재가 다량의 dsRNA/DNA를 함유하는 무사분열 중인 메타핵의 핵을 함유하는 세포에서, 발색 또는 형광 효소 기질 또는 산물의 생성 또는 파괴를 가시화시킴으로써 검출될 수 있다.

[0016] 개별 실시형태에서, 특정 거대분자, 예를 들어, 특정 RNA 서열, 예를 들어, mRNA, iRNA의 존재는 각각의 원하는 RNA 서열에 특이적인 표지된 프로브를 사용한 혼성화에 의해 검출될 수 있다. 대안적으로, RNA 서열은 인 시츄(*in situ*) PCR과 같은 방법에 의해 검출될 수 있다.

[0017] 이들 기술 및 유사 기술의 분야의 숙련자는 과학 문헌에 제공되거나 통상적인 실험에 의해 고안된 방법을 적합하게 함으로써 이러한 면역학적 또는 화학적 검정을 용이하게 적용할 수 있다.

[0018] 이들 방법은 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵이 있는 메타핵 줄기 세포를 포함하는 세포를 후보 작용제와 접촉시키는 단계 및 시료 중의 세포의 핵을 가시화시키는 단계로서, 시료가 약 50 미크론 이하의 최대 직경을 갖는 핵에서 핵 구조의 온전성을 실질적으로 유지시키는 방법에 의해 제조되는 단계 및 세포에서 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 존재 및/또는 개수를 결정하는 단계를 포함한다. 후보 작용제와 접촉된 세포에서의 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 존재 및/또는 개수를 메타핵 줄기 세포를 포함하나 후보 작용제와는 접촉되지 않은 대조군 세포에서의 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 존재 및/또는 개수와 비교함으로써, 당업자는 예를 들어, 후보 작용제와 접촉되지 않은 대조군 세포에 비한, 후보 작용제와 접촉된 세포에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련된 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 개수의 변화를 검출함으로써, 메타핵 줄기 세포에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련된 무사분열을 조절하고, 이에 의해, 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 또는 생존을 조절하는 작용제를 동정할 수 있다. 상이한 응용에서, 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 또는 생존의 증가 또는 감소가 바람직할 수 있다.

[0019] 다른 태양에서, 본 발명은 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 및/또는 생존을 저해하는 작용제를 동정하기 위한 방법을 제공한다. 더욱 구체적으로, 메타핵 세포가 줄기 세포 계통을 포함하는 병적인 성장에서 증가된 세포 개수에 필요한 무사분열 과정을 작용제가 방해하는지의 발견 방법을 제공한다. 이들 방법은 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵이 있는 메타핵 줄기 세포를 포함하는 세포를 후보 작용제와 접촉시키는 단계 및 시료 중의 세포의 핵을 가시화시키는 단계로서, 시료가 약 50 미크론 이하의 최대 직경을 갖는 핵에서 핵 구조의 온전성을 실질적으로 유지시키는 방법에 의해 제조되는 단계 및 세포에서 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 존재 및/또는 개수를 결정하는 단계를 포함한다. 후보 작용제와 접촉된 세포에서 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 존재 및/또는 개수를 메타핵 줄기 세포를 포함하나 후보 작용제와는 접촉되지 않은 대조군 세포에서 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 존재 및/또는 개수와 비교함으로써, 당업자는 예를 들어, 후보 작용제와 접촉되지 않은 대조군 세포에 비하여, 후보 작용제와 접촉된 세포에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련된 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 개수의 변화를 검출함으로써, 메타핵 줄기 세포에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련된 무사분열을 조절하고, 이에 의해, 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 또는 생존을 조절하는 작용제를 동정할 수 있다. 더욱 구체적으로, dsRNA/DNA를 게놈 복제 중간체로서 사용하는 무사분열을 겪는 메타핵의 핵의 개수를 다량의 dsRNA/DNA를 함유하는 핵의 검출을 위해 상기 기재된 임의의 수단에 의해 검출하고 계수할 수 있다. 예를 들어, 다량의 dsRNA/DNA를 함유하는 메타핵의 핵의 개수는 dsRNA/DNA를 위한 면역형광 검정, RNAse-처리된 제제에서의 핵의 밝은 오렌지색 형광, 또는 염료, 예를 들어, DAPI 또는 Hoechst 33258로 처리된 제제 내의 핵에서의 형광의 부재 또는 현저한 감소에 의해 검출될 수 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, dsRNA/DNA 하이브리드 게놈의 형성 과정에서 또는 분리된 자매(sister) 핵에서 dsRNA/DNA를 dsDNA/DNA 형태로 전환시키는 과정에서 메타핵의 핵은 dsDNA/DNA 및 dsRNA/DNA 둘 모두를 동시에 가시화시킴으로써, 예를 들어, 항체에 부착되거나 이와 회합된 형광 표지가 DAPI의 청색 형광과 구별될 수 있는 파장에서 형광을 내는 점을 고려하여, 고정된 조직 또는 세포를 dsDNA/DNA를 위한 DAPI 및 dsRNA/DNA에 특이적인 형광 항체로 동시에 염색함으로써 검출될 수 있다.

[0020] 특정 실시형태에서, 배양된 세포를 처리하여, 메타핵 줄기 세포의 관찰 전에 대부분의 진핵 비-줄기 세포를 바람직하게는 사멸시키고, 차폐시킨다. 이러한 처리의 예에는 400 rad 초과의 선량에서의 x-선 조사, 또는 진핵 비-줄기 세포의 사멸을 야기하나 유의미하게 더 낮은 정도로 메타핵 세포의 사멸을 야기하는 것으로 공지되어 있는 농도에서의 화학 작용제(예를 들어, 5-플루오로우라실, 메토트렉세이트, 콜히친)에 대한 노출이 포함된다.

[0021] 일부 실시형태에서, 세포는 포유류 세포이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 포유류 세포는 생체 내에서 후보 작용제와 접촉하며, 더욱 특정한 실시형태에서, 포유류 세포는 이종이식 고형 종양으로부터 수득된다.

[0022] 생체 내 및 시험관 내 스크리닝 방법 둘 모두를 위하여, 핵은 메타핵세포의 동정을 위해 상기 기재된 임의의 방법 또는 출원에 개시된 임의의 방법에 의해 가시화될 수 있다.

[0023] 본 발명에 의해 제공되는 스크리닝 방법에 의해, 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 또는 생존을 조절하는 다양한 작용제를 동정할 수 있다. 일부 실시형태에서, 후보 작용제는 DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 및/또는 RNAse H1로부터 선택되는 분자를 포함하는 복제 복합체를 표적화한다. 더욱 특정한 실시형태에서, 후보 작용제는 DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 또는 RNAse H1과 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈의 회합을 방해하거나, 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈으로부터의 DNA 중합효소 베타-매개의 및/또는 DNA 중합효소 제타-매개의 DNA 복제 및/또는 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈으로부터의 RNAse H1-매개의 RNA의 제거를 방해한다. 본 발명에 의해 제공되는 스크리닝 방법은 메타핵세포의 성장, 이동, 복제 및/또는 생존을 다양한 방식으로 조절하는 작용제를 동정할 것이다. 일부 실시형태에서, 후보 작용제와 접촉된 세포에서 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형

상의 핵의 개수의 증가가 검출되며 - 예를 들어, 작용제는 복제의 완료를 저해하고, 복제 중간체가 축적되거나, 작용제는 복제를 겪는 메타핵 줄기 세포의 개수의 증가를 자극한다. 다른 실시형태에서, 후보 작용제와 접촉된 세포에서 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 개수의 감소가 검출되며, 예를 들어, 작용제는 복제의 개시를 저해하거나, 비정상적인 복제를 촉발시켜, 복제 중간체의 제거를 야기한다. 다른 실시형태, 예를 들어, 상처 치유 또는 병원성 상태, 예를 들어, 수술후 재협착증에서, 메타핵 무사분열을 겪는 이동하는 메타핵 줄기 세포의 개수를 조절하는 작용제가 동정되며 - 예를 들어, 작용제는 이동하는 메타핵 줄기 세포의 개수를 증가시키거나 감소시킨다.

[0024] 다른 태양에서, 본 발명은 포유류 대상체, 예를 들어, 인간에서 장애를 치료하기 위한 방법을 제공한다. 이들 방법은 대상체에서의 메타핵 줄기 세포를 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 또는 생존을 조절하는 작용제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 일부 실시형태에서, 작용제는 DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 및/또는 RNAse H1으로부터 선택되는 분자를 포함하는 복제 복합체를 저해한다. 전형적으로, 메타핵 줄기 세포는 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵을 포함한다. 더욱 특정한 실시형태에서, 작용제는 DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 및/또는 RNAse H1과 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈의 회합을 저해하는 화학 작용제이다.

[0025] 일부 실시형태에서, 작용제는 dsRNA/DNA 듀플렉스 결합 모이어티(moiety)를 포함한다. 더욱 특정한 실시형태에서, dsRNA/DNA 듀플렉스 결합 모이어티는 dsRNA/DNA 듀플렉스에 특이적인 모노클로날(monoclonal) 항체 또는 이의 단편이다. 다른 더욱 특정한 실시형태에서, dsRNA/DNA 듀플렉스 결합 모이어티는 dsRNA/DNA 듀플렉스에 특이적인 폴리클로날(polyclonal) 항체 또는 이의 단편이다. 특정 실시형태에서, 본 발명에 의해 제공되는 방법에서 사용하기 위한 항체 또는 이의 단편은 폴리(A)/폴리(dT), 폴리(dC)/폴리(I) 및 ΦX174 dsRNA/DNA 하이브리드로부터 선택되는 적어도 하나의 면역원과 결합할 수 있다.

[0026] 일부 실시형태에서, 본 발명에 의해 제공되는 치료 방법에 사용되는 작용제는 제2 모이어티를 포함한다. 더욱 특정한 실시형태에서, 제2 모이어티는 dsRNA/DNA 듀플렉스를 분해하거나 화학적으로 변형시킨다. 일부 실시형태에서, 제2 모이어티는 방사성이다.

[0027] 특정 실시형태에서, 본 발명에 의해 제공되는 방법으로 치료될 장애는 종양 또는 병변을 포함하며, 여기서, 병변은 상처 치유 장애 또는 비-암성 과다증식성 장애와 관련된다. 더욱 특정한 실시형태에서, 병변은 죽상동맥경화증 또는 정맥경화증 병변이다. 다른 실시형태에서, 병변은 상처 치유 장애, 예를 들어, 재협착증 병변과 관련이 있다. 본 발명에 의해 제공되는 방법으로 치료될 장애는 모노클로날(단일의 비정상적인 메타핵 줄기 세포에 의해 추진) 및 폴리클로날(2개 이상의 비정상적인 메타핵 줄기 세포에 의해 추진) 장애 둘 모두를 포함할 수 있다.

[0028] 다른 태양에서, 본 발명은 포유류 대상체에서의 종양, 비-암성 과다증식성 장애, 또는 상처 치유 장애의 진단 방법을 제공하며, 여기서, 본 출원인은 메타핵 세포가 무사분열시에 분리되는 dsRNA/DNA 복제 중간체를 사용함을 교시한다. 이들 방법은 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵이 있는 메타핵 줄기 세포를 포함하는 세포를 후보 작용제와 접촉시키는 단계 및 시료 중의 세포의 핵을 가시화시키는 단계로서, 시료가 약 50 미크론 이하의 최대 직경을 갖는 핵에서 핵 구조의 온전성을 실질적으로 유지시키는 방법에 의해 제조되는 단계 및 세포에서 메타핵 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 존재 및/또는 개수를 결정하는 단계를 포함한다. 수술 시료 또는 생검에서, 당업자는 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 함유하는 핵을 동정할 수 있다. 더욱 구체적으로, dsRNA/DNA를 게놈 복제 중간체로서 사용하는 무사분열을 겪는 메타핵의 핵의 개수를 알아내고 계수할 수 있다. 예를 들어, 다량의 dsRNA/DNA를 함유하는 메타핵의 핵의 개수는 dsRNA/DNA를 위한 면역형광 검정, RNAse-처리된 제제에서 아크리딘 오렌지-처리 핵의 밝은 오렌지색 형광, 또는 염료, 예를 들어, DAPI 또는 Hoechst 33258로 처리된 제제에서 핵에서의 형광의 부재 또는 현저한 감소에 의해 알아낼 수 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 분리된 자매 핵에서 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈의 형성 과정에서 또는 dsRNA/DNA를 dsDNA/DNA 형태로 전환시키는 과정에서 메타핵의 핵은 dsDNA/DNA 및 dsRNA/DNA 둘 모두를 동시에 가시화시킴으로써, 예를 들어, 항체에 부착되거나 이와 회합된 형광 표지가 DAPI의 청색 형광과 구별될 수 있는 파장에서 형광을 내는 점을 고려하여, 고정된 조직 또는 세포를 dsDNA/DNA를 위한 DAPI 및 dsRNA/DNA에 특이적인 형광 항체로 동시에 염색함으로써 검출될 수 있다. 다량의 dsRNA/DNA가 있는 상기 핵의 존재에 의해 암성 또는 전암성 병변 또는 병리학적 과다증식성 장애, 예를 들어, 죽상동맥경화증 또는 정맥경화증 또는 수술-치유 장애, 예를 들어, 수술후 재협착증으로 진단된다.

[0029] 더욱 특정한 실시형태에서, 이들 방법의 결정 단계는 시료에서 dsRNA/DNA 게놈 복제 중간체를 사용하는 메타핵 무사분열을 겪는 메타핵 줄기 세포의 개수 및/또는 분포를 결정하는 것을 포함한다. 특정 실시형태에서, 상기

방법은 대상체(예를 들어, 인간)를 예후하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 여기서, 시료에서 메타핵 무사분열을 겪는 세포의 개수 및/또는 분포는 산만한 과다증식의 상태와 대조적으로, 종양, 비-암성 과다증식성 장애 또는 상처 치유 장애, 예를 들어, 조기 악성 상태가 될 것으로 의심되는 전립선의 수술 생검의 낮은, 중등의 또는 높은 위험의 예후를 나타낸다. 더욱 특정한 실시형태에서, 상기 방법은 대상체에 적절한 예방을 실시하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 예를 들어, 대상체는 대상체에서의 종양의 존재 하에서, 수술뿐 아니라 보조요법, 예를 들어, 화학요법을 겪을 수 있다. 특정 실시형태에서, 대상체에는 본 명세서에 개시된 바와 같은 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 또는 생존을 조절하는 작용제가 투여되고/거나 본 명세서에 개시된 임의의 치료 방법에 의해 치료될 수 있다. 더욱 특별히, 투여되는 작용제는 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈의 형성 및 분리의 저해제 또는 dsRNA/DNA 저해제를 간기 dsDNA/DNA 게놈 형태로 전환시키는 과정의 저해제일 수 있다. 더욱 특별히, 작용제는 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈과 물리적으로 회합되는 것으로 밝혀진 임의의 효소, 예를 들어, 본 출원인에 의해 발견되는 것들. DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 또는 RNAse H1의 기능을 저해할 수 있다.

[0030] **도면의 간단한 설명**

[0031] 특허 또는 출원 파일은 컬러로 만들어진 적어도 하나의 도면을 포함한다. 컬러 도면(들)과 함께 본 특허 또는 특허 출원 공보의 사본은 요청 및 필요 요금의 지불 시에 특허청에 의해 제공될 것이다.

[0032] 도 1은 인간 태아 결장 메타핵 줄기 세포(5 내지 7주)의 대칭적인 무사분열을 보여주는 현미경 사진이다. 이는 인간에서의 기관형성, 발암 및 병리학적 맥관 병변에 사용되는 대칭적 무사분열의 하나의 공통 방식, "적층된 컵"을 예시한다(문헌[Gostjeva *et al.*, 2006, 2009]).

[0033] 도 2는 태아 결장 메타핵 줄기 세포(5 내지 7주)의 비대칭적 무사분열을 보여주는 현미경 사진이다. 비대칭적 분열은 줄기 세포의 필수 성질이다(문헌[Gostjeva *et al.*, 2006, 2009]).

[0034] 도 3은 태아 기관(5 내지 9주)에서 메타핵 줄기 세포 대칭적 무사분열 동안 및 그 후의 DNA 양(상측 패널, 보라색 컬러; 하측 그래프에서 정량화)의 정량적 포일겐(Feulgen) 세포계수를 보여준다. 데이터에 의해, DNA가 메타핵 무사분열 동안 그리고 그 직후에 배가되는 것이 입증되었으나(y-축에 나타낸 바와 같이 1×로부터 2×로 증가), 게놈의 중간체 형태의 생화학적 성질은 드러나지 않았다(문헌[Gostjeva *et al.*, 2009]). 벨 입구(mouth)에서 응축된 DNA의 2개의 고리가 DNA 배가를 최초로 나타내는 것임을 주목한다. 이들 이미지에 의해 게놈 DNA 배가 및 분리가 무사분열 동안 동시에 발생하였음이 입증되었으며, 특히 한 설명은 DNA 나선의 반대 가닥의 자매 핵으로의 분리에 이어서, dsDNA/DNA 게놈을 재생성하기 위한 카피(copying)를 포함한다.

[0035] 도 4는 메타핵 복제의 현미경 사진을 보여준다. 좌측 패널 (a): 2개의 메타핵은 다른 형태의 메타핵 무사분열, 투과광과 함께 정량적 포일겐 염색(DNA에 대해서는 자주색)을 사용한 조기 태생기에 통상적인 "키싱 벨(kissing bell)"을 무사분열시킨다. 우측 2개의 패널(b 및 c): ssDNA의 검출을 방해할 리보솜 RNA를 제거하기 위하여 RNAse로 전처리된 "키싱 벨" 형태에서 2개의 메타핵이 무사분열된 다음 아크리딘 오렌지로 표지된다. 녹색 형광은 이중 가닥 DNA를 나타내는 한편, 오렌지색 형광은 이러한 RNAse 처리된 시료 중의 단일 가닥 DNA를 나타낸다. 이중 가닥 RNA/DNA가 이러한 경우 RNAse로의 전처리에 의해 단일 가닥 DNA로 변환되었음이 이후에 이해되었다. 화살표는 이중 가닥 RNA/DNA 중간체의 형성이 벨 형상의 핵 입구에서 응축된 DNA의 2개의 고리에서 시작한 다음, 2개의 자매 핵의 분리 전에 핵의 바디(body) 내의 게놈의 약 90%까지 계속 "스프레딩"된다는 본 발명자들의 설명을 나타낸다.

[0036] 도 5는 조기 인간 태아 발생의 2개의 메타핵 다핵 합포체(syncytia) 형광 현미경 사진을 보여준다. 시편을 RNAse로 전처리한 다음 아크리딘 오렌지로 염색하였다. 상측 패널(a): 핵이 처리에 의해 오렌지색으로 표지되지 않은 합포체. 이는 시료추출 및 RNAse 처리시에 게놈 복제를 겪지 않은 합포체의 일 예이다. 하측 패널(b): 모든 핵이 벨 입구에서 오렌지색으로 표지되어, 시료추출 및 염색시에 이러한 핵의 부분에서의 다량의 dsRNA/DNA의 존재를 나타내는 합포체. 이러한 현미경 사진은 추가로 동일한 합포체 내의 핵이 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈을 통한 게놈 배가와 함께 동시 발생 무사분열을 겪는 것을 나타낸다. 벨 형상의 메타핵의 핵을 함유하는 합포체에서의 동시 발생 무사분열은 이전에 포일겐 세포계수를 사용하여 관찰되었다(문헌[Gostjeva *et al.*, 2006]).

[0037] 도 6은 도 5에서 검사된 동일한 조직을 사용한, 조기 태아 발생의 다핵 합포체의 2개의 형광 현미경 사진을 보여준다. 단일 가닥 DNA(ssDNA)에 대한 항체는 RNAse 전처리 후의 단핵 및 합포체 메타핵 세포에서의 ssDNA(녹색 형광)를 보여준다. 본 발명자들은 (a)에서의 벨 형상의 주형과, (b)에서의 화살표를 중첩시켜, 메타핵의 핵을 보여주는 벨 형상을 나타내었다. RNAse로 처리하지 않은 동일한 시편에서는 신호가 관찰되지 않았다. 이중 가닥 DNA에 결합하는 염료 DAPI로부터 청색 형광이 야기된다. 이는 RNAse 처리 후에, 메타핵의 핵의 무사분열 도면이

다량의 단일 가닥 DNA 성분을 함유함을 입증하는 독립적인 수단을 나타낸다.

[0038] 도 7은 2개의 형광 현미경 사진을 보여준다. 합포체를 도 5 및 6에 사용된 동일한 인간 태아 시편으로부터 RNAse로 전처리한 다음, 단일 가닥 DNA에 대한 녹색 형광 항체(a), 또는 단일 가닥 DNA에 결합시 오렌지색 형광을 내는 아크리딘 오렌지(b)로 표지하였다. 이러한 도면은 RNAse 처리 및 단일 가닥 DNA에 대한 독립적인 프로브를 사용한 염색 후의 메타핵 무사분열의 표지 분포의 본질적 아이덴티티(identity)를 나타낸다. 무사분열을 겪는 RNAse-처리된 메타핵의 핵에서 ssDNA를 인식하는 2개의 물리적으로 독립적인 수단의 이용이 시험되고, RNA가 어떤식으로든 무사분열 동안 생성되는 메타핵 게놈 중간체에 포함되었다는 가정이 뒷받침된다.

[0039] 도 8은 태아 조직에서 관형 합포체 내의 메타핵 벨 형상의 핵 내의 dsRNA/DNA 듀플렉스의 분포를 보여준다. 도 8a는 5개의 합포체 벨 형상의 핵이 dsDNA/DNA(DAPI, 청색) 및 dsRNA/DNA(TRITC, 적색), dsRNA/NA 듀플렉스에 특이적인 표지된 항체 복합체를 함유함을 보여준다. 이들 5개의 벨 형상의 핵은 합포체 내에서 정렬되었으며, 이는 합포체 내의 분열하는 "벨"과의 연관성을 보여준다. 도 8b는 적색 형광을 보여주며, 이는 동일한 5개의 벨 형상의 핵에서의 dsDNA/DNA의 DAPI 염색으로부터의 청색 형광 없이 나타난 dsRNA/DNA 듀플렉스 결합(TRITC, 적색)의 존재를 나타낸다. 도 8c는 벨 형상이 아니었던 몇몇 다른 핵과 대조적으로, 이들이 벨-형상의 핵이었음을 보여주는 동일한 5개의 합포체 핵의 비염색 이미지를 보여준다. 스케일 바(scale bar) - 5 ㎛. 인간 태아(9주), 척수, 합포체. dsRNA/DNA 듀플렉스에 대한 면역형광 염색(AB n3 및 TRITC - 적색). 대조염색은 DAPI를 사용하였다(핵 - 청색).

[0040] 도 9는 태아 조직에서 무사 분열하는 메타핵 벨 형상의 핵 내의 dsRNA/DNA 듀플렉스의 분포를 예시하는 제2 세트의 이미지를 보여준다. 도 9a는 모든 4개의 합포체 벨 형상의 핵이 dsDNA/DNA(DAPI, 청색) 및 dsRNA/DNA(TRITC, 적색), dsRNA/DNA 듀플렉스에 특이적인 표지된 항체 복합체를 함유함을 보여준다. 이들 4개의 벨 형상의 핵은 합포체 내에서 정렬되었으며, 이는 합포체 내의 분열하는 "벨"과의 연관성을 보여준다. 도 9b는 적색 형광을 보여주며, 이는 동일한 4개의 벨 형상의 핵에서의 dsDNA/DNA의 DAPI 염색으로부터의 청색 형광 없이 나타난 dsRNA/DNA 듀플렉스 결합(TRITC, 적색)의 존재를 나타낸다. 도 9c는 벨 형상이 아니었던 다른 핵(좌측 상부)과 대조적으로, 이들이 벨-형상의 핵이었음을 보여주는 동일한 4개의 합포체 핵의 비염색 이미지를 보여준다. 스케일 바 - 5 ㎛. 인간 태아(9주), 척수, 합포체. dsRNA/DNA 듀플렉스에 대한 면역형광 염색(AB n3 및 TRITC - 적색). DAPI를 사용한 대조염색(핵 - 청색).

[0041] 도 10은 HT-29 인간 결정 선암종 유래의 세포주의 세포 중에 관찰되는 단핵 메타핵 세포에서의 비대칭적 무사분열 동안의 벨 형상 및 유래된 구형 핵의 이미지를 보여준다. 도 10a는 DAPI-양성 청색 벨-형상의 핵(좌측) 및 TRITC 표지된 항체 복합체, 적색 구형 진핵의 핵(우측)을 보여준다. 이러한 이미지는 일부 예에서 비대칭적 무사분열에서 하나의 핵이 간기 dsDNA/DNA 형태로 전환될 수 있는 한편, 다른 핵은 적어도 일시적으로 복제 중간체의 dsRNA/DNA 형태로 유지됨을 교시한다. 이미지는 또한 무사분열을 통해 생성된 자매 세포의 게놈의 본질적으로 100%가 dsRNA/DNA로 이루어질 수 있음을 교시한다. 도 10b는 dsRNA/DNA 물질의 존재가 검출되지 않은 하나의 벨 형상의 핵을 보여주는 비염색 이미지를 보여준다(화살표). 스케일 바 - 5 ㎛. 그러나, HT-29 세포(인간 결장 선암종 세포주). dsRNA/DNA 듀플렉스에 대한 면역형광 염색(AB n2 및 TRITC - 적색). DAPI를 사용한 대조염색(핵 - 청색).

[0042] 도 11은 인간 결장 선암종-유래의 세포주 HT-29의 살아 있는 염색되지 않은 콜로니의 이미지를 보여준다. 자주색 벨 형상의 물체는 벨의 입구 내의 타원형 바디로 관찰되는 진핵 세포 핵이 막 생기게 된 메타핵 암 줄기 세포의 핵이었다. 이러한 이미지는 메타핵 세포 핵이 무사분열 과정에서 보통의 현미경 또는 위상차 광학을 사용하여 고정 또는 염료 없이 관찰되었음을 교시한다.

[0043] 도 12는 도 11에 나타낸 바와 같은 세포주 HT-29의 메타핵 세포의 자주색 벨 형상의 핵이 Hoechst 염료, 예를 들어, Hoechst 33342 또는 33258의 존재 하에 특이적으로 염색되지 않았음을 보여준다. 일부를 도면에 보여준 콜로니 내의 진핵 세포의 모든 핵은 유사분열을 겪는 (도시되지 않은) 진핵 세포를 포함하는 진핵 게놈의 dsDNA로의 염료의 결합에 의해 밝은 청색을 나타내었다. 상측 및 하측 열의 좌측 패널에서, 자주색 벨 형상의 핵(화살표)은 이후에 유사분열을 겪는 거의-구형의 진핵의 핵이 막 생기게 되었다. 둘 모두의 열의 중간의 패널에서 Hoechst 33342 염료는 벨 형상의 메타핵 줄기 세포 핵을 제외하고 모든 핵을 청색으로 표지하는 것으로 관찰되었으며, 벨 형상의 메타핵 줄기 세포 핵은 청색 형광을 방출하지 않고, 상기 현상이 처음 본 출원인에 의해 관찰되었을 때 본 출원인에 의해 "블랙 홀"로 명명되었다. 둘 모두의 열의 우측 패널은 좌측 및 중간의 패널을 합하여, 2개의 이미지가 동일한 물체, 유사분열을 겪는 벨 형상의 메타핵의 핵을 확인시켜주는 것을 입증한다. 출원인은 메타핵 무사분열에서 출원인에 의해 발견된 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈이 주로 "A" 형태의 핵산 나선일

것이며, 염료, 예를 들어, Hoechst 염료 또는 DAPI 또는 특이적으로 "B" 형태의 핵산 나선, 예를 들어, dsDNA가 형광을 내게 하는 기타의 것에 의해 형광을 내는 것으로 예상되지 않을 것임을 주목한다.

[0044] 도 13은 무사분열 및 게놈 복제와 관련된 거대분자, 본 명세서에서는 효소가 dsRNA/DNA 게놈 복제 중간체를 사용하는 무사분열을 겪는 인간 메타핵 태아 세포에서 이들의 항원성에 의하여 이들을 관찰함으로써 동정되었음을 입증하는 이미지를 보여준다. 3가지 효소가 이에 따라 예로서 동정된다: 도 13a, d, g: 특이적 형광(FITC-그린) 인간 POL 베타 항체 복합체에 의해 염색되는 DNA 중합효소 베타, 도 13b, e, h: 특이적 형광(TRITC-레드) 인간 POL 제타 항체 복합체에 의해 염색되는 DNA 중합효소 제타, 도 13c, f, i: 특이적 형광(FITC-그린) 인간 항체 RNAse H1 항체 복합체에 의해 염색되는 RNAse H1. 도 13a, b, c, d, e, f, g, h, i 인간 태아, 척수 신경절, 9주. 도 13a, b, c는 분열하는 벨-형상의 핵이 있는 메타핵 관형 합포체를 보여준다. 도 13d, e, f는 "키싱-벨" 형태의 대칭적 무사분열을 보여준다. 도 13g, h, i는 메타핵 벨 형상의 핵의 다양한 형태의 대칭적 및 비대칭적 무사분열을 보여준다.

[0045] 상술한 것은 첨부한 도면들에 도시된 바와 같이, 하기의 본 발명의 예시적인 실시형태의 더 구체적인 설명으로부터 명백해질 것이며, 첨부된 도면에서 유사한 참조 부호는 상이한 도면들에 걸쳐서 동일한 요소를 지칭한다. 도면은 본 발명의 실시형태의 설명에 주안점이 있고 반드시 척도를 따르지는 않는다.

[0046] **발명의 상세한 설명**

[0047] 본 발명의 예시적인 실시형태의 설명이 뒤따른다.

[0048] 과학자들은 줄기 세포가 발생 기관 및 종양의 비-줄기 세포로부터 줄기 세포를 구분짓는 생리학적 특징을 갖는 것으로 오랫동안 의심하여 왔으며, 인간 또는 실험 동물로의 도입시에 조직, 즉, 조혈백혈구형성(hematoleukopoietic) 시스템 또는 종양을 재구성하는 능력에 의해 줄기 세포를 함유하는 것을 입증할 수 있는 조직 시료 또는 종양으로부터 줄기 세포를 농축하기 위한 간접적인 수단을 고안하였다. 그러나, 출원인은 이들 기관형성 및 발암 줄기 세포가 이들의 구별되는 핵 형태, 대칭적 및 비대칭적 무사 핵분열에서의 참여 및 포일겐 시약에 의해 밝게 형광을 내는 세포질내 소기관에 대한 부속물(appendage)에 기초하여 직접적으로 그리고 특이적으로 인식될 수 있음을 이전에 발견하였다. 이들 예상치 못한 특징은 암성 또는 전암성 증상의 진단을 위하여 조직 생검에서 줄기 세포를 인식 및 계수하고, 작용제 또는 작용제 조합물이 병원성 줄기 세포의 성장 능력을 제한하고/거나 이를 사멸시키는 능력을 시험하는데 가치가 있을 것으로 관찰되었다. 조직 또는 종양에서 대다수의 세포를 구성하는 진핵 세포와 이들 비-유사분열 줄기 세포 간의 명백한 차이는 별개의 세포 생명 형태로서의 이들의 명명으로 이어졌다: 메타핵 세포.

[0049] 또한, 인간 유전자 계통이 이중 가닥 DNA 나선(dsDNA/DNA)을 카피하여, 2개의 자매 dsDNA/DNA 나선 형태의 2개의 카피를 형성함으로써 생성됨이 널리 받아들여진다. 배아 세포의 형성에서, 자매 dsDNA/DNA 나선은 감수분열의 과정에 의해 이후에 분리된다. 일반적으로 99% 초과의 식물 및 동물의 조직 세포를 구성하는 실질 세포에서, 자매 dsDNA/DNA 나선은 유사분열의 과정에 의해 분리된다. 성장 및 발생의 원인이 되는 기관형성의 줄기 세포가 유사하게 게놈 복제 및 이후의 유사분열에 의한 분리에서 오직 dsDNA/DNA 나선만을 사용할 것이라고 추정된다. 그러나 출원인은 인간 태아 기관형성의 줄기 세포뿐 아니라 인간 발암의 줄기 세포가 먼저 2개의 dsRNA/DNA 나선 카피 형태의 모 dsDNA/DNA 게놈의 판게놈(pangenomic) 카피를 생성하며, 이는 이후에 몇몇 임의의 무사분열 방식에 의해 2개의 자손 세포로 분리되는 것을 이제 발견하였다. 무사분열 분리 과정 동안 그리고 그 후에, dsRNA/DNA 게놈 복제 중간체는 RNAse-H1, DNA 중합효소 베타 및 제타 및 dsRNA/DNA 중간체의 dsDNA/DNA 나선으로의 변환과 일치하는 기타 분자를 포함하는 효소와 물리적으로 회합된다.

[0050] 무사분열 도면의 핵에서 인식가능한 양의 dsRNA/DNA의 존재에 의해서 세포 분열을 겪는 메타핵 줄기 세포를 인식하고 계수하고, 이에 따라 암성 또는 전암성 증상의 진단을 위하여 조직 생검에서 줄기 세포를 인식 및 계수할 뿐 아니라, 치료법의 표적으로 소용될 수 있는 세포 분열 및 게놈 복제 동안 진핵세포가 아닌 메타핵세포에 의해 사용되는 추가의 거대분자 및 생화학적 경로를 동정하고, 작용제 또는 작용제 조합물이 병원성 줄기 세포의 성장 능력을 제한하고/거나 이를 사멸시키는 능력을 시험하는데 가치있는 독립적인 수단이 본 명세서에 개시된다. dsRNA/DNA 나선 그 자체가 치료제의 설계 및/또는 선택을 위한 특이적인 표적임이 추가로 개시되는데, 이는 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈의 형성 및 분리, 및 이의 dsDNA/DNA 형태로의 변환에 요구되는 분자이기 때문이다.

[0051] 본 발명은 비정상적인 형태로 분열하고 과다증식성 장애, 예를 들어 암을 유발하는 메타핵 줄기 세포가 벨 형상의 핵을 특징으로 하며, 독특한 형태의 복제를 겪는다는 이전의 관찰에 관한 것이다(문헌[Gostjeva, E.V. *et*

al., *Cancer Genet. Cytogenet.*, 164: 16-24 (2006)]; 문헌[Gostjeva, E.V. and Thilly, W.G., stem cell *Rev.*, 243-252 (2005)] 참조). 벨 형상의 핵은 결장 및 췌장 인간 종양에서, 비-유사 분열 과정에 의해, 대칭적으로, 그리고 비대칭적으로 분열한다(문헌[Gostjeva, *et al.*, *Cancer Genet. Cytogenet.*, 164:16-24 (2006)]; 문헌[Gostjeva, E.V. and Thilly, W.G., stem cell *Rev.*, 243-252 (2005)]). 이들 벨-형상의 핵은 둘 모두 5 내지 7주 배아 후장에서 다수 나타나며, 여기서, 이들은 관형 합포체 내에 둘러싸이며, 예를 들어, 모든 핵 및 종양 조직의 30%를 구성하며, 여기서, 이들은 "미분화된" 니치에 풍부하다. 이들은 몇몇 줄기 세포-유사 성질, 특히 인간 결장 전신생물(preneoplastic) 및 신생물 조직의 성장 속도와 일치하는 독특한 비대칭적 분열 및 핵 분열 빈도의 특징을 갖는다(문헌[Herrero-Jimenez *et al.*, *Mutat. Res.* 400:553-78 (1998)]; 문헌[Herrero-Jimenez *et al.*, *Mutat. Res.* 447:73-116 (2000)]; 또한, 특히 메타핵세포가 줄기 세포임을 입증하는 미국 특허 제7,427,502호 참조). 암 줄기 세포로서의 비정상적인 메타핵세포의 역할의 측면에서, 그리고 추가로 암 줄기 세포가 전형적으로 표준 방사선 및 화학요법을 견뎌낸다는 사실의 측면에서, 핵 형태가 이전에 인식되지 않았던 이들 세포는 치료 전략을 위한 표적이다.

[0052] 이들 벨-형상의 핵이, 게놈이 완전히 또는 실질적으로 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈으로 표현되는 단계를 겪는다는 본 발명의 관찰은 이들의 동정 방법, 진단 및 예후 방법, 치료적 처치의 스크리닝 방법뿐 아니라 예를 들어, 무사분열 세포 분열 동안 이중 가닥 DNA로의 이들의 복제를 담당하는 DNA 중합효소를 표적화함에 의해 이들을 표적화하고 파괴하는 방법을 가능하게 한다. 특정 실시형태에서, DNA 중합효소 베타 및/또는 DNA 중합효소 제타를 포함하는 복제 복합체가 본 발명에서 표적화된다. 이들 중합효소를 함유하는 복제 복합체는 예를 들어, 중합효소를 개별적으로 또는 공동적으로, 직접적으로 표적화시킴으로써 표적화될 수 있다. 따라서, 본 발명에 의해 제공되는 방법은 DNA 중합효소 베타 활성, DNA 중합효소 제타 활성 또는 DNA 중합효소 베타 활성과 DNA 중합효소 제타 활성 둘 모두를 실질적으로 동시에 또는 순차적으로 저해하여, 메타핵 줄기 세포의 복제를 저해할 수 있다. 일부 실시형태에서, RNAse H-1을 포함하는 복제 복합체는 예를 들어, RNAse H-1 그 자체를 표적화함으로써 표적화된다. 더욱 특정한 실시형태에서, RNAse H-1은 중합효소 베타 및/또는 제타와 동시에 표적화된다.

[0053] *메타핵 세포*

[0054] 메타핵 줄기 세포는 두드러진, 그러나 최근에야 인식된 핵 형태형을 나타낸다: 중공, 벨-형상의 핵. 검토를 위하여, 문헌[Gostjeva and Thilly, *stem cell Reviews* 2: 243-252 (2005)]을 참조하며, 또한 미국 특허 제7,427,502호로부터의 도 1, 2, 3, 6 및 7 및 이들의 설명을 참조하며, 이는 또한 본 명세서에 그들 전문이 참조로 포함된다. 이들 세포는 또한 대칭적(추가의 벨-형상의 핵이 생기게 함) 및 비대칭적(비-벨-형상의 핵이 생기게 함) "무사분열" - 정규 유사분열 및 완전한 중기 염색체 응축이 없는 분열을 겪는다. 메타핵 줄기 세포는 이들 무사분열을 통하여, 벨-형상, 시가(cigar)-형상, 응축된-구형, 구형, 타원형, 소시지-형상, 신장-형상, 총알-형상, 불규칙적 스핀들(spindle) 형상 및 이들의 조합을 포함하는 이형 핵 형태형이 생기게 될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 제7,427,502호fhqnxjdml 도 1을 참조한다. "메타핵세포", "메타핵 줄기 세포", "메타핵 줄기 세포", "상처 치유 메타핵세포" 등은 중공, 벨-형상의 핵이 있는 세포를 지칭하며, 여기서, 세포는 대칭적 또는 비대칭적 무사분열에 의해 분열한다. 메타핵세포는 동물 및 식물 세포 둘 모두에서 관찰되었다.

[0055] 당업자는 본 발명에 의해 제공되는 방법을 실시하는 경우 메타핵 줄기 세포를 용이하게 동정할 수 있을 것이다. 예를 들어, 본 명세서에 제공되는 동정, 스크리닝, 진단, 예후 및 치료 방법은 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈을 검출함으로써 조직 시료로부터 또는 배양된 세포에서 메타핵 줄기 세포를 검출하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 방법에 의해 가시화되는 조직 시료 내의 세포 또는 이로부터 배양된 세포는 약 10, 20, 30, 40, 50, 60 또는 70 미크론 이하 - 더욱 특정한 실시형태에서는 약 50 미크론 이하의 최대 직경을 갖는 핵 내의 핵 구조의 온전성을 실질적으로 유지시키는 방식으로 준비된다. 세포의 준비 방법은 또한 미국 특허 제7,427,502호에 기재되어 있으며, 이의 교시는 그들 전문이 참조로 포함된다. 특정 실시형태에서, 상기의 준비는 약 10 내지 15 미크론의 핵 내의 핵 구조의 온전성을 실질적으로 유지시킨다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 조직 시료는 적어도 약 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750, 1000, 1250, 1500 미크론 이상의 두께의 제제로서 분석할 수 있다. 특정 실시형태에서, 조직 시료는 예를 들어, 분석을 위한 제제에서 약 45%(예를 들어, 약 25, 30, 35, 40, 42, 45, 47, 50, 55, 60 또는 65%)의 아세트산에서의 인큐베이션에 의해 침연(macerated)된다.

[0056] 일부 실시형태에서, 메타핵세포의 검출을 추가로 용이하게 하기 위하여, 배양된 세포 또는 조직 시료를 염색할 수 있다. 특정한 실시형태에서, 염색은 예를 들어, 쉬프(Schiff)의 염기 시약, 포울젠 시약 또는 푸신(fuchsin)을 사용한 염색을 포함할 수 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 조직 시료는 추가로 제2 착색제로 추가로 염색

될 수 있다. 더더욱 특정한 실시형태에서, 제2 착색제는 김사(Giemsa) 착색제일 수 있다.

[0057] 특정 실시형태에서, 메타핵 줄기 세포는 비-형광 착색제, 예를 들어, 쉬프 시약으로의 처리 후에, 이들의 세포질의 형광에 의해 검출될 수 있다. 예를 들어, 모두가 참조로 포함되는 실시예 5, 도 20 내지 27 및 이들의 설명을 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2010/0075366 A1호를 참조한다. 본 발명에서, "상처 치유 장애와 관련된 메타핵 줄기 세포", "상처 치유 메타핵세포" 등은 예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2010/0075366 A1호에 기재된 메타핵 줄기 세포의 대형 풍선-형상의 세포질과 대조적으로, 풍선-형상의 세포질을 나타내지 않는 메타핵 줄기 세포이다.

[0058] *메타핵 "세포질내 소기관"*

[0059] 현재까지 발견된 모든 비-분열 메타핵 세포는 벨 입구의 가장자리에서 응축된 DNA의 이중 밴드를 갖는 중공형의 오목한 핵(벨 형상의 핵)을 갖는다. 벨 입구의 직경은 통상 약 12 내지 15 미크론이나, 벨 형상의 핵의 깊이는 특정 조직 유형 및 유래 암에서, 예를 들어, 말초 순환 중의 골수 또는 백혈병 세포 유래의 조혈 세포 제제에서 3 내지 5 미크론으로부터, 종양, 예를 들어, 인간 결장 선암종 내의 몇몇 메타핵세포에서 15 내지 25 미크론까지 연장된다.

[0060] 진핵세포에서, 핵은 외부 세포막에 의해 범위가 정해진 부피 내의 세포소기관으로서 핵막에 의해 둘러싸이며; 통상 핵은 중심에 또는 거의 중심에 위치하며, 핵막은 세포막과 접촉하지 않는다. 그러나, 메타핵 세포에서, 분명한 핵막이 존재하지 않으며, 중공형 핵은 이러한 세포질 소기관을 둘러싸는 막에 의해 둘러싸이기 보다는 이에 부착되는 것으로 보인다. 인간 태아 조직 또는 종양의 소정의 처리, 예를 들어, 동결 온도에서 24시간 동안의 MATRISPERSE(상표명)로의 처리는 벨 형상의 핵의 세포질 소기관으로부터의 물리적 분리를 야기한다.

[0061] 메타핵의 핵이 편심적으로 회합되는 세포질 소기관은 크기 및 직경이 다양하다. 거의 모두는 포울젠 시약(푸친)으로의 처리에 의해 형광을 내며, 태아/암-뮤신에 대한 항체로 강력하게 표지된다. 세포질 소기관에서 뮤신에 대한 강력한 표지에 대한 예외는 태아 기관의 혈관신생 및 수술후 재협착증의 병적 증상에서 평활근 세포가 생기게 하는 메타핵 세포이다.

[0062] 세포질 소기관은 얕은 벨 형상의 핵과 회합된 거의 구형의 바디일 수 있다. 이들은 출원인에 의해 관찰된 15 미크론 미만의 직경의 가장 작은 메타핵 세포이다. 본 출원인은 거의 구형의 세포질 소기관 및 야물커(yarmulke)(스컬캡(skullcap))를 닮은 얕은 벨 형상의 핵으로서 이들에 부착된 핵을 갖는 이들 가장 작은 메타핵 세포가 몇몇 기관, 예를 들어, 위막공, 조혈작용 및 특정 조혈 질환, 예를 들어, 백혈병의 발생에서 종종 언급된 "시그넷 링(signet ring)" 세포로서 문헌에 기재된 것들임을 교시한다. 출원인은 이들 가장 작은 메타핵세포가 조직 또는 병태, 예를 들어, 이들이 관찰되는 백혈병에서 중요한 줄기 세포 계통을 구성함을 교시한다.

[0063] 세포질 소기관은 또한 매우 큰 길이를 갖는 장축 타원체 또는 풍선 형상일 수도 있다. 200 미크론을 초과하는 메타핵 세포질 소기관의 예는 인간 종양에서 출원인에 의해 관찰된다.

[0064] 또한, 일부 실시형태에서, 메타핵세포는 "농축된" 세포 물질의 이식 및 이종이식 검정에 의해 제시되는 것으로 추정되는 줄기 세포에 대하여, 골수, 고형 조직 또는 종양 시료를 농축시키기 위한 간접적인 방법에서 유용한 것으로 입증된 특정 마커 유전자를 검출함으로써, 검출되고/거나 추가로 특성화될 수 있다. 특정 실시형태에서, 마커 유전자는 CD133(프로미닌(prominin) 1; 인간 GeneID 8842, 가장 긴 아이소형에 대한 참조 mRNA 및 단백질은 각각 NM_006017.2 및 NP_006008.1이다) 및 CD44(인간 GeneID 960, 아이소형 1 전구체에 대한 참조 mRNA 및 단백질 서열은 각각 NM_000610.3 및 NP_000601.3이다) 중 하나 이상을 포함할 수 있다. 마커 유전자는 핵산(예를 들어, RNA) 또는 단백질 수준으로 검출될 수 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 마커 유전자는 메타핵세포의 풍선-형상의 세포질의 가장자리에서 검출될 수 있다. 상기 GeneID를 사용하여, NCBI 웹사이트로부터 공개-이용 가능한 주석이 달린 mRNA 또는 단백질 서열을 검색할 수 있다. 참조 서열 및 이들의 관련 주석을 포함하는 이들 GeneID와 관련된 정보는 모두 참조로 포함된다. 다른 유기체로부터의 참조 서열도 또한 NCBI 웹사이트로부터 용이하게 수득될 수 있다. 그러나, 출원인은 또한 마커, 예를 들어, CD133 및 CD44가 비-메타핵 세포 및 다른 비-세포 구조와 관련된 조직 및 종양의 도처에서 관찰됨을 교시한다.

[0065] 본 발명은 부분적으로 메타핵 줄기 세포가 예기치 않게, 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련된 무사분열의 중간체를 검출함으로써 특이적으로 동정될 수 있다는 발견에 기초한다. "중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈" 또는 "중간체 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈" 또는 "dsRNA/DNA 하이브리드 게놈" 등은 전에 dsDNA/DNA 핵 게놈의 상당한 부분이 데옥시리보핵산의 상보성 가닥에 혼성화되는 리보핵산을 가닥을 포함하는 이중 가닥 핵산의 형태 - dsRNA/DNA 듀플렉스로 존재하는 메타핵 줄기 세포의 복제 중간체이다. 상당한 부분은 dsRNA/DNA 듀플렉스 형태

로 존재하는 핵 DNA의 적어도 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 42, 45, 47, 50, 52, 55, 57, 60, 62, 65, 67, 70, 80, 90, 95, 99%이상을 말한다. 특정 실시형태에서, 상당한 부분은 dsRNA/DNA 듀플렉스 형태로 존재하는 핵 DNA의 적어도 50, 90, 95, 99% 이상을 말한다. 다른 실시형태에서, 상당한 부분은 약 1 내지 24 피코그램, 예를 들어, 약 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22 또는 24 pg이다. 이러한 독특한 구조는 예를 들어, 특히 매우 적은 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈을 사용할 수 있는 바이러스 게놈과 극명한 대조를 보인다. 또한, 메타핵 줄기 세포의 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈은 예를 들어, 전사 동안 진핵 세포에서의 dsRNA/DNA 하이브리드의 보고와 용이하게 구별되는데, 이는 이러한 보고가 복제 중간체의 것이 아니기 때문이다. 추가로, 상대적으로 오직 적은 부분의 게놈이 dsRNA/DNA 듀플렉스 내에 존재하는 것으로 추정되었다 - 0.01 내지 0.1%. 예를 들어, 문헌[Szeszak and Pihl *Biochem. Biophys. Acta* 247: 363-67 (1971)], 문헌[Alcover *et al., Chromosoma* 8: 263-77 (1982)]을 참조한다. 따라서, 본 출원에 사용될 수 있는 바와 같이, "메타핵 무사분열"은 메타핵세포의 무사분열(대칭적 또는 비대칭적)이며, 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련이 있다.

[0066] *중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈의 검출*

[0067] 메타핵 줄기 세포의 복제 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈은 다양한 수단에 의해, 예를 들어, 무사분열에 수반되는 단백질(하기 논의됨)의 검출 및/또는 dsRNA/DNA 듀플렉스 그 자체의 검출에 의해 검출될 수 있다.

[0068] dsRNA/DNA 듀플렉스는 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 구별시키는 핵산 염료를 사용하여 검출될 수 있다. "단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 구별시키는" 염료는 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산에 대하여 차등적인 친화성을 나타내고/거나 이중 가닥 핵산에 결합되는 경우에 비해 단일 가닥 핵산에 결합되는 경우에 상이한 스펙트럼 특성(예를 들어, 여기, 흡광 또는 방출 스펙트럼)을 나타낸다. 소정의 염료는 비색성, 예를 들어, 형광일 수 있고, 다른 것들은 비색성이 아니나 특정 핵산에 대하여 친화성을 가질 수 있으며, 이에 따라 가시화를 위해 추가의 분자에 컨쥬게이트될 수 있다.

[0069] 예를 들어, 일부 실시형태에서, 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 구별시키는 염료는 이중 가닥 핵산에 대하여 보다 큰 친화성을 나타내며, 염료, 예를 들어, DAPI 또는 Hoechst 염료, 예를 들어, Hoechst 33342 또는 Hoechst 33258을 포함한다. 예를 들어, DAPI는 dsRNA/DNA를 염색시키지 않으나, dsDNA/DNA를 염색시킨다. 메타핵의 핵이 100% dsDNA/DNA 형태로 존재하는 경우, 이는 청색을 나타낼 것이며, 약 100% dsRNA/DNA 형태의 핵은 검출가능한 DAPI 염색을 나타내지 않을 것이다. 다른 실시형태에서, 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 구별시키는 염료는 단일 가닥 핵산에 대하여 더 큰 친화성을 나타내며, 염료, 예를 들어, TOTO(등록 상표)3 및 OLIGREEN(등록 상표)(INVITROGEN(등록 상표))를 포함한다. 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 구별시키는 기타 염료는 단일 가닥 또는 이중 가닥 핵산에 결합되는 경우 상이한 스펙트럼 특성을 나타내며, 단일 가닥 핵산에 결합되는 경우 적색 형광을 내며, 이중 가닥 핵산에 결합되는 경우 녹색 형광을 내는 아크리딘 오렌지를 포함한다. 일부 실시형태에서, 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 구별시키는 염료는 또한 dsRNA/DNA 하이브리드에 대하여 증가된 친화성을 가질 수 있으며, 그 전문이 참조로 포함되는 문헌[Shaw and Arya *Biochimie* 90:1026-39 (2008)]의 표 3에 기재된 분자를 포함하고, 에티듐 브로마이드, 프로피듐 아이오다이드, 엘립티신(ellipticine), 악티노마이신 D 및 유도체(예를 들어, N8 또는 F8 AMD), 파라모마이신(paramomycin), 리보스타마이신(ribostamycin), 네오마이신(neomycin) 및 네오마이신(neomycin)-메티듐 클로라이드 컨쥬게이트 "NM" 뿐만 아니라 렉시트롭신(lexitropsin) 및 폴리아미드, 이를 테면 디스타마이신(distamycin)(예를 들어, 비스-디스타마이신, 특히 오르토/파라) 및 네트롭신(netropsin)을 포함한다.

[0070] 단일 가닥 및 이중 가닥 핵산을 구별시키는 염료는 단독으로 또는 가시화를 용이하게 하기 위한 컨쥬게이트 (예를 들어, 그들 자체가 비색성이 아닌 염료의 경우에)와 함께 사용될 수 있으며, RNAse와 협력하여 추가로 사용될 수 있다. 예를 들어, RNAse는 상기 논의된 특정 염료의 예상되는 비색성 반응의 변화의 검출을 통한 dsRNA/DNA 듀플렉스의 동정에 유용할 수 있다. 특정 예는 아크리딘 오렌지가 이중 가닥 핵산 대신에 단일 가닥 핵산에 결합되는 경우 관찰되는 스펙트럼 이동이다. 따라서, 특정 실시형태에서, dsRNA/DNA 듀플렉스는 듀플렉스의 단일 가닥 DNA만을 남기는 RNAse 처리 후에 아크리딘 오렌지 염색에 의해 검출된다. 다른 유사한 접근법이 본 발명에 의해 제공되는 방법에서의 사용을 위해 적합하게 될 수 있다. 예를 들어, 하기 표 1은 단일 가닥 DNA에 결합하며, 이에 따라 RNA의 분해(예를 들어, 알칼리 또는 바람직하게는 RNAse 처리에 의한) 후에 본 발명에 의해 제공되는 방법에서 사용될 수 있는 작용제를 제공한다.

[0071] 표 1

화학 작용제	메카니즘
악티노마이신 D	광범위하게 연구된 항-종양제, 단일 가닥 DNA에 풍부한 헤어핀 DNA 구조에 결합, DNA 주형으로부터의 RNA 합성을 차단, 가능한 dsRNA/DNA 결합제.
브로모아세트알데히드	아데닌 및 시토신의 염기-페어링(pairing) 위치에서 반응, 단일 가닥 루프 및 십자형에서 염기와 우선적으로 반응.
클로로아세트알데히드	단일 가닥 DNA와 용이하게 상호작용하여 대개 에테노 손상부(etheno lesion)를 형성하는 염화비닐의 대사물질.
다이에틸 피로카르보네이트	N-7 위치에서 퓨린을 카르복시에틸화시켜 이미다졸 고리를 개환시킴, DNA의 단일 가닥 영역에 대해 실질적으로 반응성.
오스뮴 테트록시드	피리딘의 존재 하에 피리미딘의 C-5, C-6 이중 결합에 부가되어, 오스뮴산 에스테르를 형성함, 이중 가닥 DNA보다 단일 가닥 DNA에 대하여 실질적으로 더 반응성임.
과망간산칼륨	피리미딘-특이적 및 단일-가닥 특이적, 산화를 통해 염기를 변형시킴.

단일 가닥 DNA에 결합하는 화학 작용제

[0072]

[0073] 특정 실시형태에서, dsRNA/DNA 듀플렉스는 항체를 사용하여 검출된다. 본 명세서에 사용되는 바와 같이, 용어 "항체"는 면역글로불린 또는 이의 항원-결합 단편을 지칭하며, 공급원, 기원의 종, 생성 방법 또는 특징과 관계 없이, 항원-결합 부위를 포함하는 임의의 폴리펩티드를 포함한다. 비제한적인 예로서, 용어 "항체"는 인간, 오랑우탄, 토끼, 마우스, 랫트(rat), 염소, 양 및 닭 항체를 포함한다. 상기 용어는 폴리클로날, 모노클로날, 단일특이적, 다중특이적, 비특이적, 인간화, 낙타화(camelized), 단쇄, 키메라, 합성, 재조합, 하이브리드, 돌연변이 및 CDR-그라프트된 항체를 포함하나 이들에 한정되지 않는다. 본 발명의 목적을 위하여, 다르게 언급되지 않는 한, 이는 또한 항체 단편, 예를 들어, Fab, F(ab')2, Fv, scFv, Fd, dAb, VHH(나노바디로도 지칭) 및 항원-결합 기능을 보유하는 다른 항체 단편을 포함한다. 또한, 항체는 하기에 추가로 기재되는 바와 같이, 면역글로불린을 기반으로 하지 않는 항원-결합 분자를 포함한다.

[0074] 항체는 예를 들어, 통상의 하이브리도마 기술(문헌[Kohler and Milstein, *Nature* 256: 495-499 (1975)]), 재조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 항체 라이브러리를 사용한 파지 디스플레이 기술(문헌[Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624-628 (1991)]; 문헌[Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1991)])을 통해 제조될 수 있다. 다양한 다른 항체 생성 기술을 위하여, 문헌[*Antibodies: A Laboratory Manual*, eds. Harlow *et al.*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988]을 참조한다.

[0075] 일부 실시형태에서, 용어 "항체"는 면역글로불린 이외의 스캐폴드(scaffold)에 기초한 항원-결합 분자를 포함한다. 예를 들어, 당업계에 공지되어 있는 비-면역글로불린 스캐폴드는 작은 모듈식 면역약제(예를 들어, 각각 2008년 7월 31일 및 2008년 9월 18일에 공개된 미국 특허 출원 공개 제2008/0181892호 및 제2008/0227958호 참조), 테트라넥틴(tetranectin), 피브로넥틴(fibronectin) 도메인(예를 들어, AdNectins, 2007년 4월 12일에 공개된 미국 특허 출원 공개 제2007/0082365호 참조), 단백질 A , 리포칼린(lipocalin)(예를 들어, 미국 특허 제7,118,915호 참조), 안키린 반복 및 티오레독신을 포함한다. 비-면역글로불린 스캐폴드에 기초한 분자는 일반적으로 파지 디스플레이에 의한 라이브러리의 시험관 내 선택(예를 들어, 문헌[Hoogenboom, *Method Mol. Biol.* 178:1-37 (2002)] 참조), 리보솜 디스플레이(예를 들어, 문헌[Hanes *et al.*, *FEBS Lett.* 450:105-110 (1999)] 및 문헌[He and Taussig, *J. Immunol. Methods* 297:73-82 (2005)] 참조), 또는 고친화성 결합 서열을 동정하기 위한 당업계에 공지되어 있는 다른 기술(또한, 문헌[Binz *et al.*, *Nat. Biotech.* 23:1257-68 (2005)]; 문헌[Rothe *et al.*, *FASEB J.* 20:1599-1610 (2006)]; 및 미국 특허 제7,270,950호; 제6,518,018호; 및 제6,281,344호 참조)에 의해 생성된다.

[0076] 본 발명에 의해 제공되는 방법에 유용한 dsRNA/DNA 듀플렉스에 특이적인 항체를 생성하기 위한 면역원은 예를 들어, 폴리(A)/폴리(dT)(예를 들어, 참조로 포함되는 문헌[Kitagawa and Stollar *Mol. Immunol.* 19: 413-20 (1982)] 및 미국 특허 제4,732,847호 6:2-14 참조), 폴리(dC)/폴리(I)(예를 들어, 문헌[Kitagawa and Stollar 1982] 참조) 및 ΦX174 dsRNA/DNA 하이브리드(예를 들어, 참조로 포함되는 문헌[Nakazato *Biochemistry* 19:2835-40 (1980)] 또는 미국 특허 제5,200,313호 14:53-15:13 참조)를 포함한다. 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명의 방법에 사용하기 위한 항체는 폴리(A)/폴리(dT), 폴리(dC)/폴리(I) 및 ΦX174 dsRNA/DNA 하이브리드; 또는 상보성의 혼합된 염기 서열을 갖는 한 가닥의 RNA와 한 가닥의 DNA를 포함하는 다른 이중 가닥 핵산 분자로부터 선택되는 적어도 하나의 항원에 결합한다. 특정 실시형태에서, 항체는 약 1×10^{6}, 5×10^{6}, 1×10^{7}, 5×10^{7}, 1×10^{8}, 5×10^{8}, 1×10^{9} M^{-1} 또는 그 이상보다 높은 Ka로 이들 항원 중 하나 이상에 결합한다. 본 발명에 의해 제공되는 방법에 사용하기 위한 특이적 항체는 수탁 번호 ATCC HB 8730, HB 8076, HB 8077 및 HB 8078 하에 ATCC(등록 상표)(아메리칸 타입 컬쳐 콜렉션(American Type Culture Collection))에 기탁된 하이브리도마에 의해 생성되는 항체뿐 아니라 이들 항체의 키메라 및 CDR-그라프트된 변이체를 포함한다.

[0077] 다른 실시형태에서, 단일 가닥 DNA에 특이적인 항체는 듀플렉스 중의 RNA의 분해 후에, 예를 들어, RNAse 처리 후에 본 발명에 의해 제공되는 방법에서 사용될 수 있다. ssDNA-결합 항체를 생성하는데 적절한 면역원은 변성된 DNA 제제, 예를 들어, 송아지 흉선 DNA를 포함한다. ssDNA-특이적 항체는 메틸화 BSA 복합체와 ssDNA(문헌[Plescia *et al.*, *PNAS*, 52: 279, 1964]) 또는 합성 단일 가닥 폴리뉴클레오티드(문헌[Seaman *et al.*, *Biochemistry*, 4: 2091, 1965])의 복합체로의, 또는 단백질에 컨쥬게이트된 DNA의 단편(문헌[Stollar, Nucleic Acid Antigens, in The Antigens Vol 1, M. Sela Ed., Academic Press, 1973]의 표 1)으로의 동물의 면역화에 의해 유도될 수 있다. 또한, ssDNA-특이적 항체는 전신 홍반성 낭창이 있는 몇몇 환자(문헌[Stollar and Levine, *J. Immunol.*, 87:, 477, 1961], 문헌[*Arch. Biochem Biophys.* 101:417, 1963]) 또는 낭창 마우스(문헌[Munns and Freeman, Biochemistry, 28: 10048, 1989])의 혈청으로부터의 폴리클로날 자가항체로서; 또는 인간 또는 마우스 하이브리도마(문헌[Shoenfeld *et al., J. Clin. Invest.*, 70: 205, 1982]; 문헌[Andrzejewsky *et al., J. Immunol*, 126, 226, 1981]; 문헌[Eilat, D Molec Immunol. 31:1377, 1994])로부터의 모노클로날 자가항체로서 수득될 수 있다.

[0078] 특정 실시형태에서, ssDNA에 대한 항체는 모노클로날 항체, 예를 들어, 모노클로날 항체 Mab F7-26(MILLIPORE(등록 상표) 카탈로그 번호 MAB3299) 또는 이의 키메라 또는 CDR-그라프트된 변이체이다. 또한, ssDNA 결합 특이성을 갖는 다른 작용제를 사용하여, dsRNA/DNA 하이브리드로부터 RNA의 제거 후에 단일 가닥 올리고뉴클레오티드(ssDNA, RNA, PNA 또는 ssDNA에 혼성화할 수 있는 다른 인공 핵산을 포함)를 포함하는 ssDNA를 검출하거나 또는 예를 들어, 폴리 (ADP-리보스) 중합효소, hnRNP 단백질, 단일 가닥 DNA 결합 단백질 및 RecA를 포함하는 ssDNA 특이성을 갖는 단백질을 검출할 수 있다.

[0079] 본 발명에 의해 제공되는 방법에 사용하기 위한 임의의 작용제, 예를 들어, dsRNA/DNA 듀플렉스 또는 ssDNA 항체는 검출가능하게 표지될 수 있다. 대안적으로, 작용제는 표지되지 않을 수 있으며, 제2 작용제, 예를 들어, 검출가능하게 표지된 2차 항체를 사용하여 간접적으로 검출될 수 있다. 검출가능한 표지는 효소(예를 들어, HRP 또는 알칼리성 포스파타제), 형광, 방사성표지, 화학 모이어티(소분자, 예를 들어, 비오틴), 단백질 모이어티(예를 들어, 아비딘 또는 폴리퓁티드 태그) 등등일 수 있다.

[0080] *무사분열에 수반되는 단백질*

[0081] 출원인은 본 발명에 의해, 메타핵세포의 무사분열 복제에 수반될 것 같은, DNA 중합효소 베타, DNA 중합효소 제타 및 RNAse H1을 포함하는 몇몇 분자를 동정하였다. 따라서, 본 발명에 의해 제공되는 방법에서, 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈은 예를 들어, 상기 기재된 방법에 의해 dsRNA/DNA 듀플렉스 그 자체를 검출하거나, dsRNA/DNA 듀플렉스의 검출과의 조합을 포함하여, 메타핵 줄기 세포의 복제에 수반되는 유전자의 발현 산물, 예를 들어, 중합효소 베타 및 제타, RNAseH1, 및 이들의 조합을 (핵산 또는 단백질 수준에서) 검출함으로써 동정될 수 있다.

[0082] DNA 중합효소 베타는 염기-절제 수선(BER) 경로에서의 주요 DNA 수선 중합효소 중 하나이다. DNA 중합효소 베타는 39 kDa 단백질이고 주요 BER 중합효소(GenBank 수탁 번호 NM 002690)이나, 고충실도(high fidelity) 복제 DNA 중합효소와 대조적으로, DNA 중합효소 베타는 3'으로부터 5'으로의 엑소뉴클레아제 활성과 교정(proof-reading) 능력이 결여되어서, 감소된 충실도를 야기한다(문헌[Chyan, Y., *et al.*, *Nucleic AcidsRes.* vol. 22, no.14, pp. 2719-2725 (1994)]). 중합효소 베타 유전자가 표 2에 확인된 바와 같이 다수의 유기체에서 동정되었

다.

[0083] 표 2

종	GeneID
호모 사피엔스(*Homo sapiens*)	5423
무스 무스쿨루스(*Mus musculus*)	18970
라투스 노르베지쿠스(*Rattus norvegicus*)	29240
보스 타우루스(*Bos taurus*)	614688
갈루스 갈루스(*Gallus gallus*)	426794
판 트로글로다이테스(*Pan troglodytes*)	737210
카니스 루푸스 파밀리아리스(*Canis lupus familiaris*)	494001

PolBeta 유전자

[0084]

[0085] 오류-유발 DNA 중합효소의 일 예는 DNA 중합효소 제타, Rev3 유전자에 의해 암호화된 173 kDa 단백질(문헌[Gibbs, P.E.M., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, vol.95, pp. 6876-6880 (1998)]; GenBank 수탁 번호 AF058701))이다. DNA 중합효소 제타는 서열 손상부를 수선하는 것보다는 서열 손상부의 반대편에 뉴클레오티드를 혼입시켜 서열에 남아있는 미스매치된 뉴클레오티드와 함께, 합성이 계속되게 함으로써, DNA 손상을 우회하는 트랜스손상부(translesion) 합성 중합효소이다(문헌[Gan, G.N., *et al.*, *Cell Res.* 18: 174-183 (2008)]). 중합효소 제타 유전자는 표 3에서의 것들과 같이 다수의 유기체에서 동정되었다.

[0086] 표 3

종	GeneID
호모 사피엔스	5980
사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)	855936
판 트로글로다이테스	462942
라투스 노르베지쿠스	309812
무스 무스쿨루스	19714
마카카 물라타(*Macaca mulatta*)	695894
아일루로포다 멜라노레우카(*Ailuropoda melanoleuca*)	100466621
카니스 루푸스 파밀리아리스	481963
제노푸스 라에비스(*Xenopus laevis*)	100316923

Pol Zeta/REV3L 유전자

[0087]

[0088] RNAse H1은 dsRNA/DNA 듀플렉스의 RNA 가닥을 절단한다. RNAseH1 활성에 대한 검정이 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제20050014708 A1호의 단락 32에 기재되어 있다. RNAseH 유전자가 다양한 유기체, 예를 들어, 표 4에 보고된 것들에서 동정되었다. 또한, MMDB ID: 63294는 12-mer RNA/DNA와의 복합체 중의 인간 RNAse H1의 하이브리드-결합 도메인의 구조를 제공한다. 이러한 구조는 예를 들어, 본 발명에 의해 제공되는 방법에서 사용하기 위한 치료제의 합리적인 설계 및 선택에서 사용될 수 있다.

[0089] 표 4

종	GeneID
호모 사피엔스	246243
무스 무스쿨루스	19819
라투스 노르베지쿠스	298933
에쿠스 카발루스(Equus caballus)	100072832
판 트로글로다이테스	743012
보스 타우루스	613354
갈루스 갈루스	395848
다니오 레리오(*Danio rerio*)	436932

RNAse H1 유전자

[0090]

[0091] 표 2 내지 4의 이들 유전자 식별자를 사용하여, 특히 NCBI 웹사이트, //www.ncbi.nlm.nih.gov와 같은 공급처로

부터 공개적으로 이용가능한 주석이 달린 mRNA 또는 단백질 서열을 검색할 수 있다. 참조 서열 및 이들의 관련 주석을 포함하는 이들 식별자와 관련된 정보는 모두 참조로 포함된다. ID를 전환시키거나 유전자에 대한 추가의 정보를 수득하기 위한 추가의 유용한 도구는 당업계에 공지되어 있으며, 예를 들어, DAVID, 클론/GeneID 컨버터(converter) 및 SNAD를 포함한다. 문헌[Huang *et al., Nature Protoc.* 4(1):44-57 (2009)], 문헌[Huang *et al., Nucleic Acids Res.* 37(1)1-13 (2009)], 문헌[Alibes *et al., BMC Bioinformatics* 8:9 (2007)], 문헌[Sidorov *et al., BMC Bioinformatics* 10:251 (2009)]을 참조한다.

[0092] 메타핵 무사분열에 수반되는 추가의 거대분자, 예를 들어, 단백질(뿐 아니라 지질, 탄수화물 및 핵산)은 본 발명에 의해 제공되는 방법에 의해, 예를 들어, 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과의 공동국소화에 의해 후보 거대분자를 검출함으로써 동정될 수 있다. 이어서, 거대분자(및 이들의 관련 생화학적 경로)는 예를 들어, 다음 섹션에 기재된 바와 같이 표적화될 수 있다.

[0093] *무사분열에 수반되는 단백질의 저해제*

[0094] 중합효소 베타 및 제타뿐 아니라 RNAseH1은 당업계의 통상적인 수단, 예를 들어, 중화 항체, 우성 음성 돌연변이체 및 핵산 기반의 기술, 예를 들어, 안티센스, siRNA 및 트리플렉스(triplex) 형성 올리고뉴클레오티드에 의해 저해될 수 있다. 다른 저해제가 당업계에 공지되어 있다.

[0095] 중합효소 베타의 저해제는 예를 들어, 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제2010/0048682호의 단락 49, 50 및 표 1에 개시된 것들을 포함한다. 추가의 중합효소 베타 저해제는 신규한 테르페노이드 및 트라이코데론산(trichoderonic acid) A 및 B를 기술하는 문헌[Wilson *et al.Cell Mol Life Sci.* 67(21):3633-47 (2010)] 및 문헌[Yamaguchi *et al., Biosci Biotechnol Biochem.* 74(4):793-801 (2010]에 기재된 것들을 포함한다.

[0096] RNAse H1 저해제는 트리플렉스 형성 올리고뉴클레오티드를 포함한다(WO 94/05268호, 문헌[Duval-Valentin *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 504-508 (1992)]; 문헌[Fox, *Curr. Med. Chem.*, 7:17-37 (2000)]; 문헌[Praseuth *et al., Biochim. Biophys. Acta*, 1489: 181-206 (2000)] 참조). 다른 저해제는 1-하이드록시-1,8-나프티리딘 화합물, 예를 들어, 참조로 포함되는 미국 특허 출원 공개 제2010/0056516 A1호의 단락 43 내지 101에 개시된 것들 및 미국 특허 제7,501,503호의 발명의 요약에 개시된 화합물을 포함한다. 다른 RNAseH1 저해제는 dsRNA/DNA 듀플렉스를 표적화하는 작용제, 예를 들어, 네오마이신(neomycin), 카나마이신(kanamycin), 파로모마이신(paromomycin), 토브라마이신(tobramycin) 및 리보스타마이신(ribostamycin)을 포함하는 아미노글리코시드를 포함할 수 있다.

[0097] 추가의 RNAseH1 저해제는 치환된 티엔(예를 들어, 제WO2006/026619 A2호 참조), 다이티오카르바메이트(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2005/0203176 A1호 참조), 다이하이드로퀴놀린 유도체(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2005/0203129 A1호 참조), 하이단토인 유도체(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2005/0203156 A1호 참조), 올리고뉴클레오티드 작용제(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2004/0138166 A1호 참조), 마피신(mappicine) 관련 화합물(예를 들어, 미국 특허 제5,527,819호 참조), 티오펜 유도체(예를 들어, 제WO 2006/026619 A2호 참조), 카르바메이트 유도체(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2005/203176 A1호 참조), 하이단토인(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2005/203156 A1호 참조), 1,2-다이하이드로퀴놀린 유도체(예를 들어, 미국 특허 출원 공개 제2005/203129 A1호 참조), 락톤(예를 들어, 문헌[Dat, *et al., Journal of Natural Products*, 70: 839-841(2007)] 참조), 하이드록실화 트로폴론(tropolone)(예를 들어, 문헌[Didierjean, *et al., Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: 4884-4894 (2005)] 참조), 하이드록실화 트로폴론(예를 들어, 문헌[Budihas *et al., Nucleic Acids Res.* 33: 1249-56 (2005)] 참조), DNA 티오압타머(thioaptamer)(예를 들어, 문헌[Somasunderam *et al., Biochemistry* 44: 10388-95 (2005)] 참조), 다이케토산(예를 들어, 문헌[Shaw-Reid *et al., Biochemistry* 44: 1595-1606 (2005)] 및 문헌[Shaw-Reid *et al., J. Biol. Chem.* 278: 2777-80 (2003)] 참조), 올리고뉴클레오티드 헤어핀(예를 들어, 문헌[Hannoush *et al., Nucleic Acids Res.* 32: 6164-6175 (2004)] 참조), 2-하이드록시아이소퀴놀린-1,3(2H,4H)-다이온(예를 들어, 문헌[Klumpp *et al., Nucleic Acids Res.* 31: 6852-59 (2003)] 및 문헌[Qi Hang *et al., Biochem. Biophy. Res. Comm.* 317: 321-29 (2004)] 참조), 아실하이드라존(예를 들어, 문헌[G. Borko *et al., Biochemistry*, 36: 3179-3185 (1997)] 참조), 노베나민(novenamine)(예를 들어, 문헌[Althaus et al., *Experimentia* 52 Birkhauser-Verlag, pp. 329-335 (1996)] 참조), 나프탈렌설폰산 유도체(예를 들어, 문헌[Mohan *et al., J. Med. Chem.*, 37: 2513-2519 (1994)] 참조), 세팔로스포린 분해 산물(예를 들어, 문헌[P. Hafkemer *et al., Nucleic Acids Res.* 19: 4059-65 (1991)] 참조) 및 퀴논(예를 들어, 문헌[Loya *et al., Antimicrobial Agents and Chemother.* 34: 2009-12 (1990)] 참조)을 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2010/0056516 A1호의 배경기술 섹션에 참조된 것들을 포함한

다.

[0098] 상기 화합물의 조합, 예를 들어, 상기 화합물의 적어도 1, 2, 3, 4, 5개 이상을 포함하는 상기 화합물은 DNA 중합효소 베타 또는 제타 및/또는 RNAseH1 중 하나 이상을 포함하는 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 회합된 복제 복합체를 저해하기 위한 본 발명에 의해 제공되는 방법에 사용될 수 있다.

[0099] *방법*

[0100] 본 발명은 메타핵 세포를 포함하는 임의의 유기체에서 다양한 장애에 대한 진단, 예후 및 치료 방법을 제공한다. 예시적인 방법은 종양, 비-암성 과다증식성 장애 및 상처 치유 장애의 진단, 예후 및/또는 치료뿐 아니라, 메타핵 줄기 세포의 동정 방법, 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 및/또는 생존을 조절하고, 이에 따라 본 발명에 의해 제공되는 치료 방법에 사용될 수 있는 작용제의 스크리닝 방법 및 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈을 함유하는 무사분열 메타핵 줄기 세포에 존재하거나 이에서 발현되는 거대분자 또는 생화학적 경로를 발견함으로써 항-줄기 세포 치료법을 위한 추가의 표적을 동정하는 방법을 포함한다. 본 발명의 방법은 중간체 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈과 관련된 무사분열 - 다시 말하면, 메타핵 무사분열을 겪는 메타핵 줄기 세포를 동정하는 단계를 포함한다. 임의의 메타핵 세포, 예를 들어, 동물 또는 다세포 식물(문헌[Gostjeva et al., 2009])은 메타핵 세포의 동정 방법뿐 아니라 작용제에 대한 스크리닝 방법, 또는 거대분자 또는 생화학적 경로의 발견에 사용될 수 있다.

[0101] *대상체 및 조직 시료*

[0102] 본 발명에 의해 제공되는 방법으로 진단되거나, 예후되거나, 스크리닝되거나, 치료될 대상체는 메타핵 세포를 포함하는 임의의 유기체를 포함한다. 특정 실시형태에서, 유기체는 다세포 동물, 예를 들어, 척추동물이다. 특정 실시형태에서, 대상체는 포유류, 예를 들어, 영장류, 설치류, 개, 고양이, 돼지, 양, 소 또는 토끼일 수 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 대상체는 영장류, 예를 들어, 인간이다. 다른 실시형태에서, 대상체는 설치류이다.

[0103] 다른 실시형태에서, 대상체는 식물이며, 예를 들어, 본 발명은 식물에서 병리학적 병태(pathological disease state) 및 메카니즘을 동정하는 방법을 제공하며, 다른 태양에서, 식물에서 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동 및/또는 증식을 조절하는 작용제, 예를 들어, 제초제를 동정하는 방법을 제공한다.

[0104] 본 발명은 종양, 비-암성 과다증식성 장애 및 상처 치유 장애를 위한 진단, 예후 및 치료 방법뿐 아니라 메타핵 줄기 세포의 성장, 이동, 복제 및/또는 생존을 조절하고, 이에 따라 본 발명에 의해 제공되는 치료 방법에서 사용될 수 있는 작용제에 대한 스크리닝 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은 중간체 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈과 관련된 무사분열 - 다시 말하면, 메타핵 무사분열을 겪는 메타핵 줄기 세포를 동정하는 단계를 포함한다.

[0105] 대상체는 임의의 발생 단계, 예를 들어, 배아, 태아, 신생아, 유아, 소아, 청소년, 성인 또는 노인으로 존재할 수 있다. 특정 실시형태에서, 대상체는 소아, 청소년, 성인 또는 노인이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 대상체는 성인 또는 노인이다. 특정 실시형태에서, 대상체는 적어도 약 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75세 이상, 예를 들어, 약 1 내지 5, 5 내지 10, 10 내지 20, 18 내지 25, 25 내지 35, 35 내지 45, 45 내지 55, 55 내지 65 또는 65 내지 75세 이상이다. 특정 실시형태에서, 대상체는 고인(deceased)이며, 다시 말하면, 상기 방법은 사후 진단 방법이다.

[0106] 특정 실시형태에서, 대상체 유래의 조직 시료는 외과적으로 예를 들어, 수술, 예를 들어, 이식, 혈관성형술 또는 스텐트 삽입(stenting) 동안 또는 생검 절차에서 수득된다. 조직 시료는 종양 조직, 비-종양 조직 또는 이들의 조합을 포함할 수 있으며, 조직, 예를 들어, 혈액, 혈관 조직, 지방 조직, 림프 조직, 연결 조직(예를 들어, 근막, 인대, 힘줄), 외피, 장막, 건막, 내분비 조직, 점막 조직, 간, 폐, 신장, 비장, 위, 췌장, 결장, 소장, 방광, 생식선, 유선 조직, 중추 신경 조직, 말초 신경 조직, 피부, 평활근, 심근 또는 골격근을 포함할 수 있다. 일부 실시형태에서, 조직 시료는 1, 2, 3, 4, 5개 이상의 상기 조직을 포함할 수 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 조직 시료는 주로 하나의 조직을 포함하거나 본질적으로 이로 이루어질 수 있으며, 예를 들어, 조직 시료는 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 95 또는 100 중량%의 단일의 조직이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 조직 시료는 혈관 조직을 포함하며, 더욱 특정한 실시형태에서, 혈관벽 조직을 포함한다. 일부 실시형태에서, 조직 시료는 본질적으로 혈관 조직으로 이루어진다. 특정 실시형태에서, 혈관 조직은 추가로 외피를 포함한다. 더욱 특정한 실시형태에서, 혈관 조직은 본질적으로 외피 및 혈관 조직으로 이루어진다. 소정의 특정 실시형태에서, 조직 시료는 의심되는 종양 조직을 포함한다.

[0107] *진단 방법*

[0108] 본 발명의 방법에 의해 제공되는 진단 방법은 대상체 유래의 조직 시료에서 메타핵 줄기 세포의 존재 및/또는 양 및/또는 이동을 결정하여(예를 들어, 측정하여) 대상체에서 장애, 예를 들어, 종양, 상처 치유 장애 또는 비-암성 과다증식성 장애를 진단하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 메타핵 무사분열을 겪는 메타핵 줄기 세포의 존재 및/또는 양 및/또는 분포가 결정된다.

[0109] *진단을 위한 장애*

[0110] 종양, 상처 치유 장애 및 비-암성 과다증식성 장애를 포함하는 다양한 장애가 본 발명에 의해 제공되는 방법을 사용하여 진단될 수 있다.

[0111] "상처 치유 장애"는 외과적 시술(surgical intervention), 감염(예를 들어, 육식 감염)으로부터의 회복 및/또는 급성 외상 후에 조직 및/또는 기관에 대한 손상의 수선 동안의 비정상적인 조직 생성을 특징으로 하는 질환 또는 장애이며, 여기서, 비정상적인 조직 생성은 비-암성 및 비-전암성이다. "비-암성" 및 "비-전암성" 성장(들)의 체세포는 배양되는 경우 정상의(야생형) 염색체 핵형과 정상의 접촉 저지를 나타낸다. 일부 실시형태에서, 상처 치유 장애는 비정상적인 과도한 조직 생성을 특징으로 한다. 다른 실시형태에서, 상처 치유 장애는 비정상적인 부적당한 조직 생성을 특징으로 한다. 예시적인 상처 치유 장애는 혈관 상처 치유 장애, 척수 상처 치유 장애, 기관 이식과 관련된 상처 치유 장애 및 외상성 손상과 관련된 상처 치유 장애를 포함한다. 더욱 특정한 실시형태에서, 상처 치유 장애는 수술후에 일어난다. 수술, 예를 들어, 기관 이식, 예를 들어, 심장, 간, 폐, 각막 등등 또는 외과적 시술, 예를 들어, 혈관성형술, 스텐트 삽입 등등은 종종 재협착증(동맥 또는 정맥)을 야기한다. 이러한 재협착증은 이식 수여자에서의 빈번한 사망 원인이다. 급성 외상은 예를 들어, 화상, 절상(cut) 및 총상을 포함할 수 있다.

[0112] "혈관 상처 치유 장애"는 맥관 조직 내의 상처 치유 장애이다. 특정 실시형태에서, 혈관 상처 치유 장애는 맥관 조직, 특히 관강 표면, 예를 들어, 내막에서의 비정상적인 과도한 평활근 생성 및/또는 메타핵 세포의 증식을 특징으로 한다. 예시적인 혈관 상처 치유 장애에는 예를 들어, 손상-유도 신생내막 과다증식(neointimal hyperplasia) 및 재협착증(예를 들어, 이식 또는 외상 후)이 포함된다. 더욱 특정한 실시형태에서, 혈관벽 장애는 재협착증이다. "재협착증"은 전형적으로, 외과적 시술, 예를 들어, 혈관성형술, 스텐트 삽입 또는 이식 후에, 내막 표면이 두꺼워짐에 의해 동맥이 다시-좁아지는 것을 말한다. 일부 실시형태에서, 혈관벽 장애는 수술, 감염 또는 급성 외상 후에 발생한다. 더욱 특정한 실시형태에서, 혈관벽 장애는 수술후에 일어난다.

[0113] 따라서, 본 발명에 의해 제공되는 진단 또는 예후 방법의 일부 실시형태에서, 대상체는 상처 치유 장애를 갖는 것으로 의심된다. 더욱 특정한 실시형태에서, 대상체는 혈관 상처 치유 장애를 갖는 것으로 의심된다.

[0114] 특정 실시형태에서, 상처 치유 장애를 갖는 것으로 의심되는 대상체는 이전에 수술을 겪은 적이 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 수술은 스텐트 삽입 및/또는 풍선 혈관성형술이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 대상체에는 1개 초과의 스텐트, 예를 들어, 적어도 2, 3, 4, 5개 이상의 스텐트가 이전에 제공된 적이 있다. 이들 실시형태에서, 스텐트는 약물-용리(예를 들어, 시롤리무스(sirolimus) 또는 파클리탁셀(paclitaxel)(이의 유사체 포함)-용리; 뿐만 아니라 항-CD-34 또는 항-VEGF 항체-코팅된 스텐트), 비-약물-용리 또는 이들의 조합일 수 있다.

[0115] 일부 실시형태에서, 상처 치유 장애를 갖는 것으로 의심되는 대상체는 이전에 이식, 예를 들어, 동종이식, 자가이식 또는 이종이식을 받은 적이 있다. 특정 실시형태에서, 대상체는 완전 또는 부분 기관 이식(예를 들어, 심장, 간, 신장, 방광, 피부, 폐 또는 각막 이식), 또는 판막 또는 혈관 이식을 가진 적이 있다. 이식된 혈관은 동맥 및/또는 정맥 중 어느 하나일 수 있다. 특정 실시형태에서, 대상체는 수술후 재협착증을 갖는 것으로 의심된다.

[0116] 당업자는 데노보(*de novo*) 장애, 예를 들어, 죽상동맥경화증이 본 발명의 목적을 위한 상처 치유 장애가 아님을 인식할 것이다. 그럼에도 불구하고, 특정 실시형태에서, 본 발명은 본 발명의 방법에 의해 비-암성 과다증식성 병변을 함유하는 것으로 의심되는 조직을 가시화시킴에 의한 비-암성 과다증식성 장애, 예를 들어, 죽상동맥경화증의 진단 방법을 제공한다. 예를 들어, 시료, 예를 들어, 생검 중의 세포의 핵이 가시화되며, 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련된 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 존재가 결정된다.

[0117] "종양"은 신생물성 성장을 말하며, 성장 속도, 건강한 조직 침습의 위치 및 정도, 전이 및 활동적으로 분열하는 유사분열 세포 및 불규칙적 형상의 형성이상 염색 핵이 있는 세포의 존재에 기초하여 수술 병리학자에 의해 인식되는 바와 같은 양성 및 악성 신생물 둘 모두를 포함한다. 본 발명을 실시하여, 병리학자는 항 dsRNA/DNA 항

체, 또는 dsRNA/DNA 분자를 특이적으로 염색하는 염료와 강력하게 반응하는 시편의 핵을 관찰하고 계수할 수 있을 것이다. 예를 들어, 결장의 전형적인 선암종에서, 메타핵 줄기 세포는 약 12일마다 대칭적 또는 비대칭적 유사분열을 겪는 것으로 예상될 것이며, 종양 시편 내의 메타핵 세포의 약 0.2 내지 2%를 구성한다. 문헌 [Herrero-Juminez *et al*. 1988, 2000]을 참조한다.

[0118] "전신생물 병변"은 결장 조직의 잠재적으로 전이성인 선암종을 갖는 결장의 선종성 용종(adenomatous polyp)이 그러하듯이, 추정상 전구체로서 종양과 관련된 느리게 성장하는 작은 편평 또는 선종 바디를 지칭한다. 전신생물 줄기 세포의 대칭적 분열이 예상되나 5 내지 6년에 1회이고, 40일마다 약 1회의 비대칭적 분열의 빈도는 메타핵의 오직 약 1/4000이 전신생물 병변, 예를 들어, 선종성 결장 용종에서 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈과 함께 관찰될 것이라는 예상으로 이어질 것이다.

[0119] 일부 실시형태에서, 장애는 모노클로날이며; 다시 말하면, 장애는 비대칭적 분열에 비하여 단일의 메타핵 줄기 세포로부터의 직선형 성장으로 비정상적인 과도한 조직 성장을 형성함으로써 발생한다. 다른 실시형태에서, 장애는 폴리클로날이며; 다시 말하면, 장애, 예를 들어 수술후 재협착증은 대칭적 및 비대칭적 분열 둘 모두에 의해서 2개 이상의 메타핵 세포로부터 발생한다.

[0120] *스크리닝 방법*

[0121] 본 발명은 메타핵 줄기 세포의 성장, 복제, 이동 및/또는 생존을 조절하기 위한 작용제의 시험관내 및 생체내 스크리닝 방법 둘 모두를 제공한다. 시험관내 및 생체내 방법 둘 모두에서, 후보 작용제는 이들이 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련된 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵을 함유하는 세포의 개수 및/또는 이동을 조절하는 능력에 의해 평가된다. 후보 작용제는 소분자 약제 또는 생물제제, 예를 들어, 단백질(예를 들어, 성장 인자, 항체 또는 압타머), 핵산(안티센스 분자 및 압타머 포함), 지질, 탄수화물 또는 이들의 조합을 포함하는 임의의 화학적 엔티티를 포함할 수 있다. 작용제는 전형적으로, 소정의 투여량 또는 투여량 범위, 예를 들어, 2, 3, 4, 5, 6회 이상의 투여량으로 투여되어, 배양물 또는 유기체에서 중간체 dsRNA/DNA 듀플렉스 게놈과 관련된 무사분열을 겪는 벨-형상의 핵의 개수에 대한 영향을 유도할 것이다.

[0122] 시험관내 스크리닝 방법은 증식하는 메타핵 줄기 세포를 포함하는 배양된 세포를 후보 작용제와 접촉시키는 단계를 포함한다. 더욱 특정한 실시형태에서, 세포는 동물, 예를 들어, 척추동물, 예를 들어, 포유류, 예를 들어, 영장류, 설치류, 개, 고양이, 돼지, 양, 소 또는 토끼로부터 수득된다. 더욱 특정한 실시형태에서, 세포는 인간으로부터 수득된다. 특정 실시형태에서, 배양된 세포는 탯줄, 외피, 중간엽 조직 또는 대동맥으로부터 수득된다. 다른 실시형태에서, 배양된 세포는 종양, 예를 들어, 고형 종양, 예를 들어, 유방, 전립선, 폐 또는 결장 종양으로부터 수득된다. 특정 실시형태에서, 배양된 세포는 모두 참조로 포함되는 도 28 내지 30과 이들의 설명을 포함하는 미국 특허 출원 공개 제2010/0075366 A1호의 실시예 6에 기재된 바와 같은 HT29 인간 결장 선암종 세포이다. 다른 실시형태에서, 메타핵 세포는 식물 유래의 것이다. 이들 실시형태에서, 예를 들어, 원치 않은 식물(예를 들어, 잡초)에 특이적이나, 원하는 식물(예를 들어, 작물)에는 특이적이지 않은 메타핵 세포를 표적화하는 제초제를 스크리닝할 수 있다.

[0123] 소정의 특정 실시형태에서, 배양된 세포는 증식하는 메타핵 줄기 세포 및 근세포를 포함한다. 더욱 특정한 실시형태에서, 세포는 일차 세포이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 일차 세포는 탯줄, 혈관 외피 또는 대동맥으로부터 수득된다.

[0124] 배양물은 다양한 방식으로 메타핵 줄기 세포가 농축될 수 있다. 특정 실시형태에서, 배양물은 대부분의 진핵 세포를 사멸시키는데 충분하나 예외적인 방사선 저항력에 때문에 메타핵 줄기 세포를 사멸시키지 않는 선량으로 전리 방사선, 예를 들어, X-선으로 처리된다. 특정 실시형태에서, 세포는 150, 200, 250, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 1000, 1600 rad 이상의 선량으로 x선 조사된다. 더욱 특정한 실시형태에서, 세포는 400 rad, 예를 들어, 800 rad 또는 1600 rad 초과의 선량으로 x선 조사된다.

[0125] 생체내 스크리닝 방법은 메타핵 줄기 세포를 포함하는 유기체, 예를 들어, 동물 또는 식물에게 후보 작용제를 투여하는 단계를 포함한다. 특정 실시형태에서, 유기체는 동물이며, 더욱 특정한 실시형태에서, 포유류이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 포유류는 비-인간 포유류이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 포유류는 비-인간 영장류, 설치류, 개, 고양이, 돼지, 양, 소 또는 토끼이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 포유류는 설치류, 예를 들어, 마우스, 랫트 또는 기니피그이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 포유류는 기니피그이다. 일부 실시형태에서, 포유류는 상처 치유 장애, 비-암성 과다증식성 장애 또는 종양에 걸리기 쉽다(예를 들어, 유전적으로, 또는 식이 또는 약물 처리를 통해). 예를 들어, 특정 실시형태에서, 상처 치유 장애는 외과적 시술, 예를 들어, 외과적 손상,

예를 들어, 이식, 혈관성형술, 스텐트 삽입 또는 직접적인 의도적 조직 손상으로부터, 예를 들어, 화학적 고정, 방사선, 과도한 열 또는 냉, 경색, 자상(stabbing), 절상(cutting) 또는 둔상(blunt trauma)에 의해 야기된다. 더욱 특정한 실시형태에서, 포유류는 상처 치유 장애에 걸리기 쉬울 뿐 아니라 외과적 시술에 노출된다. 특정 실시형태에서, 상처 치유 장애는 혈관 상처 치유 장애이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 혈관 상처 치유 장애는 재협착증이다.

[0126] 다른 실시형태에서, 유기체는 종양이 발병하기 쉽거나 종양에 걸려 있다. 더욱 특정한 실시형태에서, 유기체는 동물, 예를 들어, 종양이 발병하기 쉽거나 종양에 걸려 있는 포유류이다. 특정 실시형태에서, 포유류는 종양유전자(oncogene)(예를 들어, RAS 또는 HER2)를 발현하도록 조작된 트랜스제닉 동물일 수 있거나, 종양 억제 유전자(예를 들어, p53)에 대하여 낙아웃이거나 정상 하위 대립 인자(hypomorph)이거나, 이들의 조합이고/거나 돌연변이유발 처리가 제공될 수 있다. 다른 실시형태에서, 유기체는 이종이식되며, 예를 들어, 인간 종양 세포가 이식된이다. 더욱 특정한 실시형태에서, 종양 세포는 고형 종양 유래의 것이다. 특정 실시형태에서, 포유류는 설치류, 예를 들어, 랫트, 마우스 또는 기니피그이다. 이종이식편을 고형 종양으로 성숙되게 하고, 이어서, 이를 절제하고 추가로 연구할 수 있다. 이들 실시형태에서, 설치류는 전형적으로 면역-약화될 것이다. 당업자는 이종이식 기술에 익숙하다.

[0127] *치료 방법*

[0128] 상기 기재된 스크리닝 방법은 비정상적인 메타핵 줄기 세포 활성에 의해 추진되는 장애, 예를 들어, 상처 치유 장애, 비-암성 과다증식성 장애 또는 종양을 치료하기 위해 사용될 수 있는 작용제를 제공한다. 따라서, 본 발명은 또한 비정상적인 메타핵 줄기 세포 활성에 의해 추진되는 장애를 갖는 대상체의 치료 방법을 제공한다. 예를 들어, 임의의 상처 치유 장애가 있는 대상체에게는 예를 들어, 증식하는 메타핵 줄기 세포의 개수 또는 증식하는 메타핵 줄기 세포의 이동을 조절하는 유효량의 작용제가 투여될 수 있다. 예를 들어, 비정상적인 과도한 조직 생성을 특징으로 하는 상처 치유 장애에서, 대상체에게 증식하는 메타핵 줄기 세포의 개수 또는 증식하는 메타핵 줄기 세포의 이동을 감소시키는 작용제가 투여된다. 역으로, 비정상적인 불충분한 조직 생성을 특징으로 하는 상처 치유 장애에서, 대상체에게 증식하는 메타핵 줄기 세포의 개수 또는 증식하는 메타핵 줄기 세포의 이동을 증가시키는 유효량의 작용제가 투여된다. "작용제"는 단일-활성 작용제 화합물뿐 아니라 활성 작용제의 조합물 둘 모두를 지칭한다.

[0129] 종양이 있는 대상체에서, 대상체에게 메타핵 줄기 세포의 개수, 이동, 복제 또는 생존을 조절하는 작용제가 투여된다. 특정 실시형태에서, 작용제는 메타핵 줄기 세포의 개수, 이동, 복제 또는 생존을 감소시킨다. 더욱 특정한 실시형태에서, 작용제는 중간체 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈과 관련된 무사분열을 겪는 복제하는 메타핵 세포의 개수를 감소시킨다. 다른 더욱 특정한 실시형태에서, 작용제는 중간체 dsRNA/DNA 하이브리드 게놈과 관련된 무사분열을 겪는 복제하는 메타핵 세포의 개수를 일시적으로 증가시키나, 복제의 완료를 저해한다.

[0130] 용어 "치료"는 예를 들어, 암종의 전이를 감소시키거나, 예방하거나, 또는 지연시키고/거나; 하나 이상의 종양의 개수, 체적 및/또는 크기를 감소시키고/거나; 암종 또는 병적 측면의 징후의 중증도, 기간 또는 빈도를 줄이는 것뿐 아니라, 메타핵 줄기 세포의 개수, (대칭적 또는 비대칭적 무사분열에 의해) 증식하는 메타핵 줄기 세포의 개수 및/또는 메타핵 줄기 세포의 이동을 조절하는 것을 포함하여, 장애와 관련된 징후를 개선시키는 것을 말한다.

[0131] 일반적으로, 진핵 dsDNA/DNA 합성을 저해하는 작용제/조건 및 유사분열은 메타핵 dsRNA/DNA에서 dsDNA/DNA로의 처리와, 대칭적 및/또는 비대칭적 무사분열 과정을 저해하는 중첩되지 않는 세트의 작용제/조건을 구성할 것으로 예상된다. 이것은 임상 시험에서 종양을 줄어들게 하는 것으로 관찰되나 종양 재발로 이어지는 화학물질이 메타핵 줄기 세포를 사멸시키거나 궁극적으로 암을 치유하는데 유용한 것으로 예상되지 않기 때문이다. 이것은 상기 메타핵 세포가 X선 조사 및 방사선유사작용(radio-mimetic) 약물, 예를 들어, 알킬화제 및 메타핵세포에 의해 사용되지 않는 진핵의 DNA 복제 방식 또는 유사분열을 공격하는 작용제로의 처리에 의한 사멸에 대하여 강력하게 저항성이기 때문이다.

[0132] 그럼에도 불구하고, 일부 실시형태에서, 본 발명에 의해 제공되는 종양이 있는 대상체에 대한 치료 방법은 수술, 호르몬 제거(hormone ablation) 요법, 방사선요법 또는 화학요법 중 하나 이상과 함께 사용된다. 화학치료제, 호르몬제 및/또는 방사선치료제 및 본 발명에 따른 치료는 동시에, 따로 또는 순차적으로 시행될 수 있다. 예를 들어, 일부 실시형태에서, 대상체는 종양 줄기 세포를 제거하기 위한 하나 이상의 "살메타핵세포제(metakaryocide)"(메타핵세포를 사멸시키거나 그 개수를 감소시키는 작용제)뿐 아니라, 비-줄기 세포 종양 종괴를 제거하기 위한 치료법으로 치료될 수 있다.

[0133] 특정 실시형태에서, 본 발명에 의해 제공되는 방법에 사용하기 위한 치료제는 활성 작용제 성분/모이어티 및 표적화제 성분/모이어티를 포함한다. 표적화제 성분은 본 명세서에 기재된 바와 같이, dsRNA/DNA 듀플렉스에 특이적으로 결합하는 작용제이거나 이를 포함한다. 특정 실시형태에서, 표적화제는 임의의 상기 기재된 작용제, 예를 들어, 항체 또는 이의 항원 결합 단편을 포함한다. 표적화제 성분은 활성 작용제 성분에 결합된다. 예를 들어, 이들은 서로 직접적으로 또는 링커 분자를 통하여 공유 결합될 수 있다. 2개가 서로 공유 결합에 의해 직접 결합되는 경우, 각 모이어티 상의 활성 기를 통한 적절한 공유 결합의 형성에 의해 결합이 형성될 수 있다. 예를 들어, 한 화합물 상의 산성 기는 다른 화합물 상의 아민, 산 또는 알코올과 축합되어, 각각 상응하는 아미드, 무수물 또는 에스테르를 형성할 수 있다. 카르복실산기, 아민기 및 하이드록실기에 더하여, 표적화제 성분과 활성 작용제 성분 사이에 결합을 형성하기 위한 다른 적절한 활성 기에는 설포닐기, 설프하이드릴기, 및 카르복실산의 할로산 및 산 무수물 유도체가 포함된다.

[0134] 다른 실시형태에서, 치료제는 2개 이상의 모이어티 또는 성분, 전형적으로, 하나 이상의 활성 작용제 모이어티가 있는 표적화제 모이어티를 포함할 수 있다. 활성 작용제를 표적화제 성분에 결합시키기 위하여 링커가 사용될 수 있으며, 여기서, 표적화제는 dsRNA/DNA 하이브리드와 특이적으로 상호작용하여, 이에 의해, 활성 작용제를 복제 중간체 구조으로 운반하고, 벨-형상의 핵의 추가의 복제를 저해한다.

[0135] 표적화제 성분에 결합된 활성 작용제 성분은 작용제, 예를 들어, 방사성핵종(예를 들어, I125, 123, 124, 131 또는 다른 방사능제); 화학치료제(예를 들어, 항생제, 항바이러스제 또는 항진균제); 면역 자극제(예를 들어, 사이토카인); 항신생물제: 항염증제; 아폽토시스 유발제(pro-apoptotic agent)(예를 들어, 펩티드); 독소(예를 들어, 리신(ricin), 장독소, LPS); 항생제; 호르몬; 단백질(예를 들어, 계면활성 작용제 단백질, 응고 단백질뿐 아니라 성장 인자); 용해제(lytic agent); 소분자(예를 들어, 무기 소분자, 유기 소분자, 소분자의 유도체, 복합 소분자); 나노입자(예를 들어, 지질 또는 비-지질계 제형); 지질; 지단백질; 리포펩티드; 리포솜; 지질 유도체; 천연 리간드; 변경된 단백질(예를 들어, 알부민 또는 기타 혈액 운반체 단백질-기반의 전달 시스템); 핵산 용해(nucleolytic) 효소; 종양 줄기 세포의 성장 또는 이동을 조절하는 작용제; 유전자 또는 핵산(예를 들어, 안티센스 올리고뉴클레오티드); 바이러스 또는 비-바이러스 유전자 전달 벡터 또는 시스템; 또는 전구약물 또는 전구분자(promolecule)를 포함하는 목적하는 치료 결과를 달성하는 임의의 작용제일 수 있거나, 이를 포함한다. 당업자는 활성 작용제의 설계 및 응용이 익숙할 것이다.

[0136] 제한된 집단의 취약한 종양 세포에서의 dsRNA/DNA 하이브리드의 선택적 표적화와 함께, 투여 요법이 향상된 효능을 위해 다시 계산될 수 있는 것으로 여기는 것이 타당하다.

[0137] 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위해 제공되며, 어떠한 방식으로든 제한되는 것으로 의도되지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0138] **실시예:**

[0139] 하기의 일반 프로토콜을 사용하여 도면에 나타내고 상세한 설명에 기재된 데이터를 생성하였다. 실험 조건은 표 5에 요약되어 있다.

[0140] 표 5

프로토콜	0.1% Triton-X-100	블로킹 용액 n1	블로킹 용액 n2	일차 항체	이차 항체	DAPI
N1	1 시간 30 분	1% BSA + 3 방울의 정상 염소 혈청	없음	1:10, 냉장고에서 하룻밤	당나귀 항-염소 IgG-TRITC, 1:200, 1 시간, 실온	1:1000
N2	합포체에 대해서 40 분; 세포에 대해서 20 분	1% BSA, 1 시간	5% 정상 소 혈청, 1 시간	1:10, 냉장고에서 하룻밤	소 항-염소 IgG-TRITC, 1:200, 1 시간, 실온	1:1000
N3	40 분	1% BSA, 1 시간	5%, 정상 염소 혈청, 1 시간	1:10, 냉장고에서 하룻밤	당나귀 항-염소 IgG-TRITC, 1:200, 1 시간, 실온	1:1000
N4	합포체에 대해서 40 분; 세포에 대해서 20 분	1% BSA, 1 시간	5%, 정상 염소 혈청, 1 시간	1:10, 냉장고에서 하룻밤	당나귀 항-염소 IgG-TRITC, 1:200, 1 시간, 실온	1:1000
N5	합포체에 대해서 40 분; 세포에 대해서 20 분	1% BSA	5%, 정상 염소 혈청, 1 시간	1:20, 냉장고에서 하룻밤	당나귀 항-염소 IgG-TRITC, 1:200, 1 시간, 실온	1:1000
N6	합포체에 대해서 40 분; 세포에 대해서 20 분	1% BSA	5%, 정상 염소 혈청, 1 시간	1:20, 냉장고에서 하룻밤	당나귀 항-염소 IgG-TRITC, 1:200, 1 시간, 실온	1:1000
N7	1 시간 20 분	1% BSA	5% 정상 당나귀 혈청, 1 시간	1:20, 냉장고에서 하룻밤	당나귀 항-염소 IgG-TRITC, 1:200, 1 시간, 실온	1:1000
N8	20 분	1% BSA	5% 정상 당나귀 혈청, 1 시간	1:20, 냉장고에서 하룻밤	당나귀 항-염소 IgG-TRITC, 1:200, 1 시간, 실온	1:1000

[0141]

[0142] 높은 백그라운드 노이즈를 야기하는 합포체 자가형광과, 항체가 벽을 가로지르는 것을 막는 두꺼운 합포체 세포벽 때문에, 합포체의 염색은 세포막을 투과화시키기 위하여 Triton-X-100과의 인큐베이션을 필요로 한다. 또한, 제2 블로킹제를 가하여, 백그라운드 노이즈를 감소시키는 것이 필요하였다(표 5에서 블로킹 용액 n2).

[0143] 하기의 항체를 사용하여 dsRNA-DNA 듀플렉스를 검출하기 위한 실험을 수행하였다: 1) 염소 4A-E, 폴리(dT)가 흡수된 IgG, 롯트 JH012680, 1.07 mg/mℓ 스톡 용액, 각각 1:20 및 1:10 희석률에서, 0.05 및 0.1 mg/mℓ의 최종 검정 농도; 2) 염소 4H, 폴리(dT), 폴리(A) 및 폴리(A).폴리(U)가 흡수된 IgG(변성된 DNA 또는 dsRNA와의 임의의 반응성을 제거하기 위함), A280 = 3.4, 2.4 mg/mℓ 스톡 용액, 1:20 희석률에서, 0.12 mg/mℓ의 최종 검정 농도; 및 3) 염소 4A-E, 폴리(dT)가 흡수된 IgG, 롯트 021580, A280=3.2, 2.3 mg/mℓ 스톡 용액, 1:20 희석률에서, 0.12 mg/mℓ 최종 검정 농도.

[0144] 상기 3개의 항체 각각을 하기의 조직 상에서 개별적으로 시험하였다: 1) 인간 태아 조직, 9 내지 10주, 척수 또는 늑간근 프렙(prep); 2) 인간 태아 결장; 3) 인간 결장 선암종, M.68; 4) HT-29 세포주, DMEM(둘베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)), 5% 말 혈청 또는 DMEM, 10% BSA; 및 5) HT-29 세포주, DMEM, 5% 말 혈청, 1600 RAD로 조사.

[0145] dsRNA/DNA에 대한 고정 및 IF(면역형광) 염색을 위하여 하기의 프로토콜을 사용하였다. HT-29 세포, 태아 및 신생 조직을 포함하는 모든 조직을 카노이 고정액(Carnoy fixative)을 사용하여 3시간 동안 고정시켰다. 카노이 고정액은 3:1, 에탄올(4℃): 빙초산(고정 직전에 함께 혼합)이었다. 고정액을 3시간의 기간에, 신선한 시료로 3회 교체하였다. 카노이 고정액을 70% 메탄올로 교체하고, 4℃에서 저장하였다. 태아 또는 신생 조직(Calbiochem, 100 mg(활성 277U/mg), 15 U/mℓ의 작동 농도으로 희석)을 37℃에서 스프레딩시킨 다음, 45% 아세트산 한 방울 중에 스프레딩시켜, 보다 온건한 침연(maceration) 조건을 달성함으로써 슬라이드를 준비하였다. HT-29 세포를 사용한 실험에서 이러한 스프레딩/침연 단계를 생략하였다.

[0146] 이어서, 조직이 있는 슬라이드를 공기 건조시켰다. 다음으로, 슬라이드를 5분 동안 1× PBS 완충제로 옮긴 다음, 실온에서 20 내지 80분 동안 1× PBS 중의 0.1% Triton X-100으로 처리하였다(표 5 참조). 다음으로, 슬라이드를 5분 동안 1× PBS 세척 완충제로 2회 세척하였다. 이어서, 1× PBS 중의 1% BSA(블로킹 용액 n1)를 실온에서 60분 동안 가하였다. 이어서, 1× PBS 중의 5% 당나귀 혈청(블로킹 용액 n2)을 실온에서 60분 동안 가하였다.

[0147] 일차 dsRNA/DNA-특이적 항체를 1× PBS 중의 0.1% BSA 중에 작동 농도(1:20 내지 1:10, 각각 제제 1, 2 및 3에 대하여 0.05 mg/mℓ(때때로 1:10 희석률에서 0.1 mg/mℓ), 0.12 mg/mℓ 및 0.12 mg/mℓ의 작동 농도를 야기)로 희석하고, 냉장고(4℃)에서 하룻밤 인큐베이션시켰다.

[0148] 다음으로, 슬라이드를 1× PBS 완충제를 사용하여 3회(각각 10분) 세척하였다. 1× PBS에서 희석시킨 이차 항체(TRITC-컨쥬게이트, Santa-Cruz)를 사용 직전에 제조하고(1:200), 실온에서 60분 동안 슬라이드와 인큐베이션시켰다. 슬라이드를 1× PBS 완충제로 3회(각각 10분) 세척하였다.

[0149] 이어서, 조직을 실온에서 1 내지 5분 동안 DAPI(MILLIPORE(등록 상표) Corp., 0.1 mg/mℓ 스톡 용액, 1:1000 희석)와 인큐베이션시킴으로써 핵 대조염색을 수행한 다음 1× PBS 완충제를 사용하여 조직을 3회(각각 5 내지 10분) 세척하였다.

[0150] 하기와 같이 수행한 폴리(A)-폴리(dT)를 사용한 블로킹 시험에 의하여 항체에 의한 염색의 특이성을 확인하였다.

[0151] *10 ㎍/mℓ에서 블로커(blocker)로서의 폴리(A)-폴리(dT) 시험*

[0152] 동 부피의 폴리(A)-폴리(dT)(20 ㎍/mℓ) 및 항체(1/10)를 혼합하여, 10 ㎍/mℓ A.dT 및 1/20의 혈청(항체)의 최종 농도를 제공하였다. 대조군에 있어서, PBS를 폴리(A)-폴리(dT) 대신에 사용하였다. 시료를 실온에서 10 내지 15분 동안 인큐베이션시켰다.

[0153] *다양한 농도의 폴리(A)-폴리(dT)의 시험*

[0154] 이어서, 시료를 10, 2.0, 0.5 및 0.08 ㎍/mℓ의 최종 농도에서 시험하고, 각 경우에, 동일한 부피의 폴리뉴클레오티드와 항체를 인큐베이션시켰으며, 이는 상기와 같은 최종 농도의 2배이다. dsRNA/DNA-특이적 항체를 사용한 염색은 음성이었으며, 10 ㎍/mℓ의 폴리(A)-폴리(dT)의 첨가에 의해 완전하게 블로킹시켰다.

[0155] 본 출원에서 몇몇 파라미터를 기재하는 모든 수치 경계, 예를 들어, "약", "적어도", "미만 " 및 "초과"에 있어서, 상기 기재가 필수적으로 언급된 값에 의해 경계지어진 임의의 범위도 또한 포함하는 것이 이해되어야 한다. 따라서, 예를 들어, 적어도 1, 2, 3, 4 또는 5라는 기재는 특히 범위 1 내지 2, 1 내지 3, 1 내지 4, 1 내지 5, 2 내지 3, 2 내지 4, 2 내지 5, 3 내지 4, 3 내지 5 및 4 내지 5 등도 또한 기술하는 것이다.

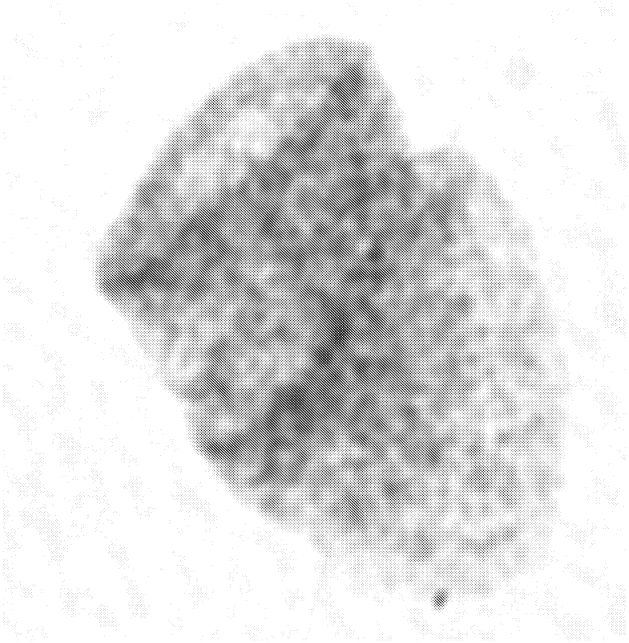
[0156] 본 명세서에 언급된 모든 특허, 출원 또는 기타 참조문헌, 예를 들어, 비-특허 문헌 및 참조 서열 정보에 있어서, 그 전문이 모든 목적뿐 아니라 열거된 서술에 대하여 참조로 포함되는 것이 이해되어야 한다. 참조로 포함된 문헌과 본 출원 간에 상충되는 부분이 존재하는 경우에, 본 출원이 좌우할 것이다. 본 출원에 개시된 참조 유전자 서열과 관련된 모든 정보, 예를 들어, 유전자좌, 게놈 서열, 작용 주석, 대립형질 변이체 및 참조 mRNA(예를 들어, 엑손 경계 또는 반응 요소) 및 단백질 서열(예를 들어, 보존된 도메인 구조)을 비롯한 GeneID 또는 수탁 번호(전형적으로 NCBI 수탁 번호 참조)는 본 명세서에 그들 전문이 참조로 포함된다.

[0157] 본 출원에 사용되는 제목은 오직 편의를 위한 것이며, 본 출원의 해석에 영향을 미치지 않는다.

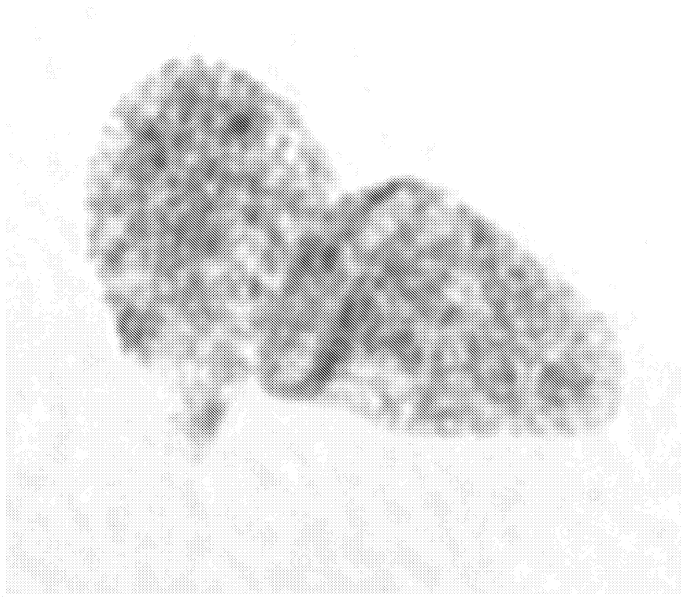
[0158] 본 발명이 본 발명의 바람직한 실시형태를 참조하여 특별히 도시되고 기술되었으나, 당업자는 형태와 세부내용에 있어서 다양한 변형이 하기 첨부된 특허청구범위에 포함된 발명의 범위를 벗어나지 않으면서 행해질 수 있는 것을 이해할 것이다.

도면

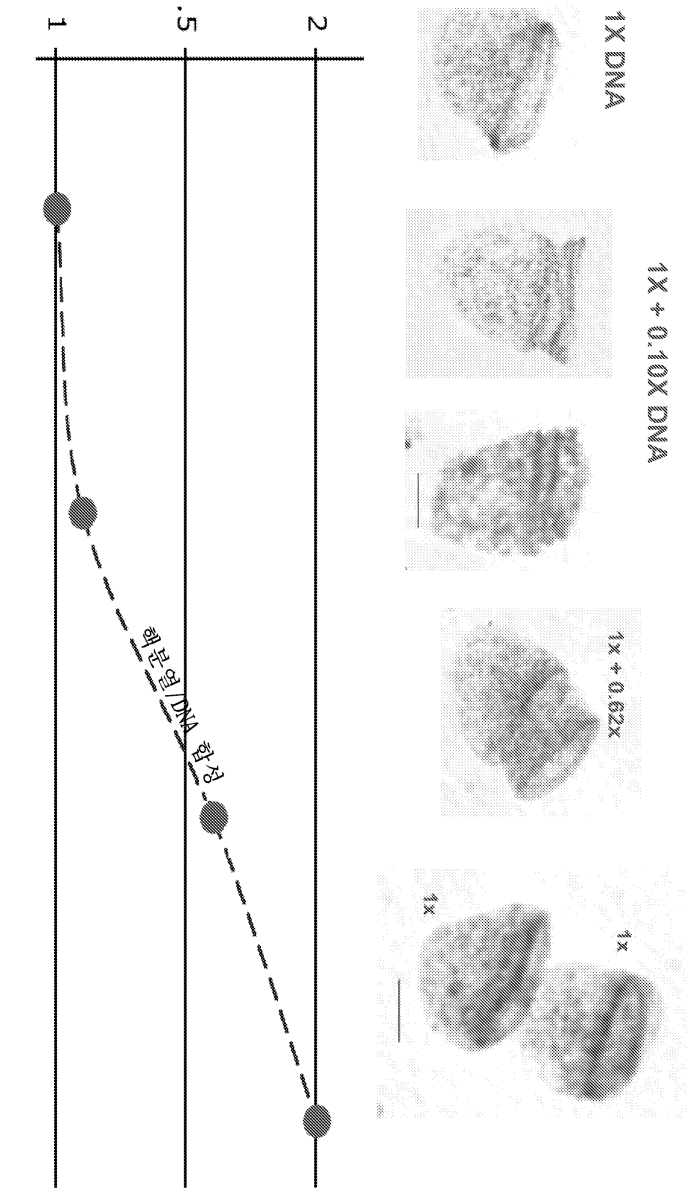
도면1



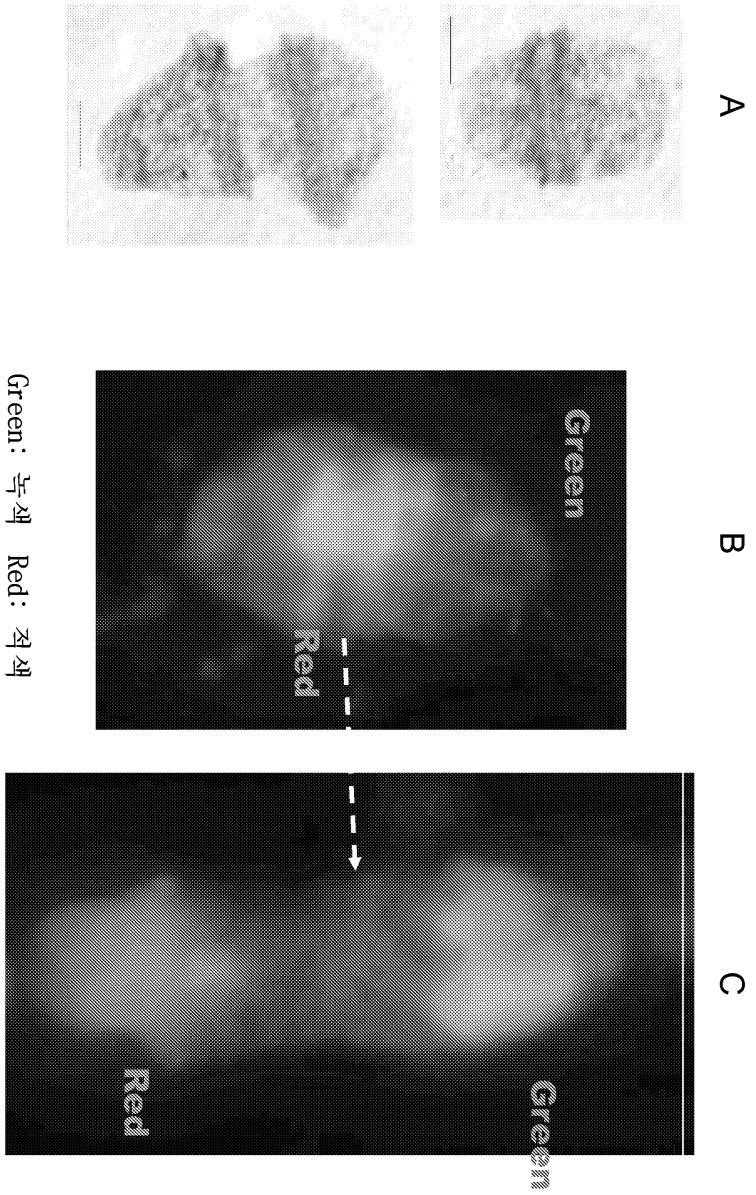
도면2



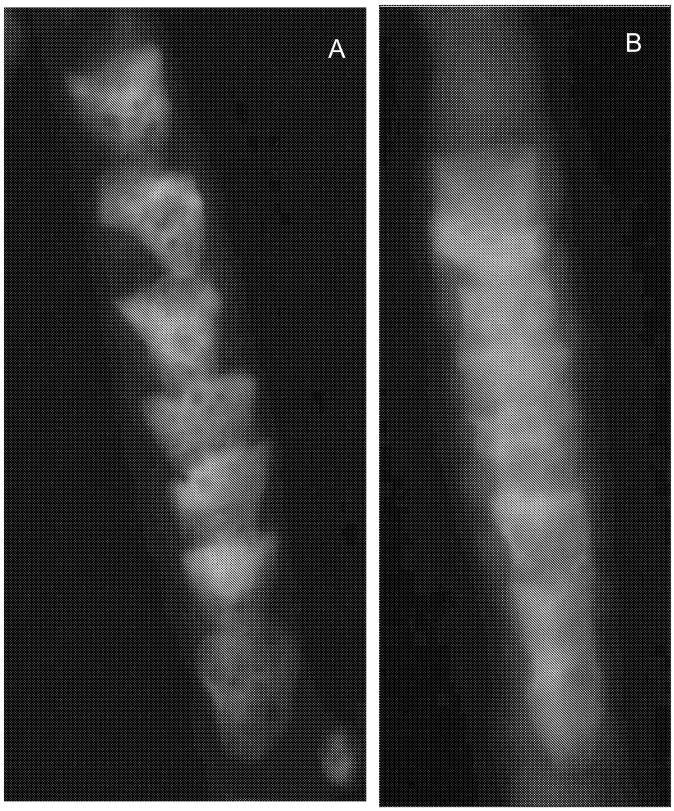
도면3



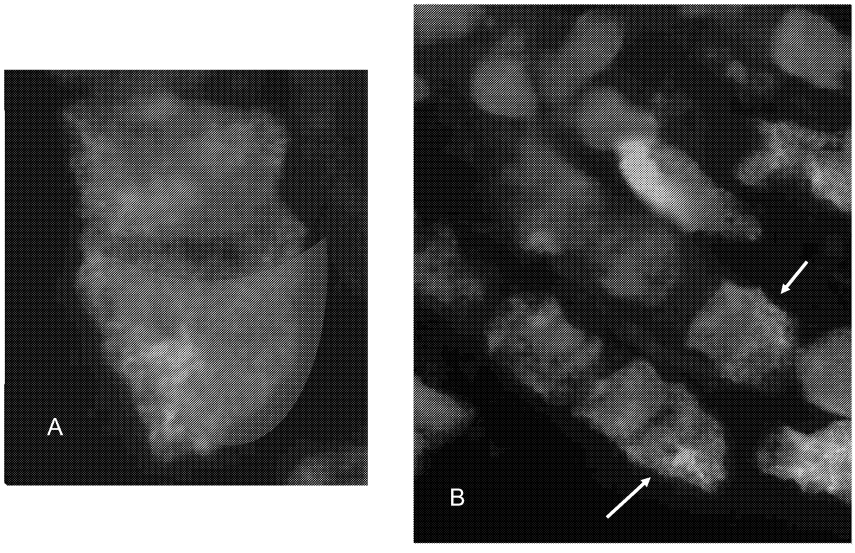
도면4



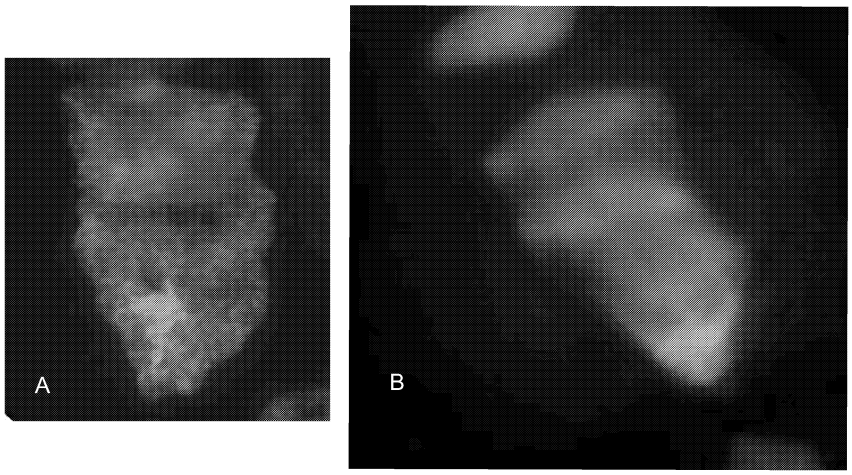
도면5



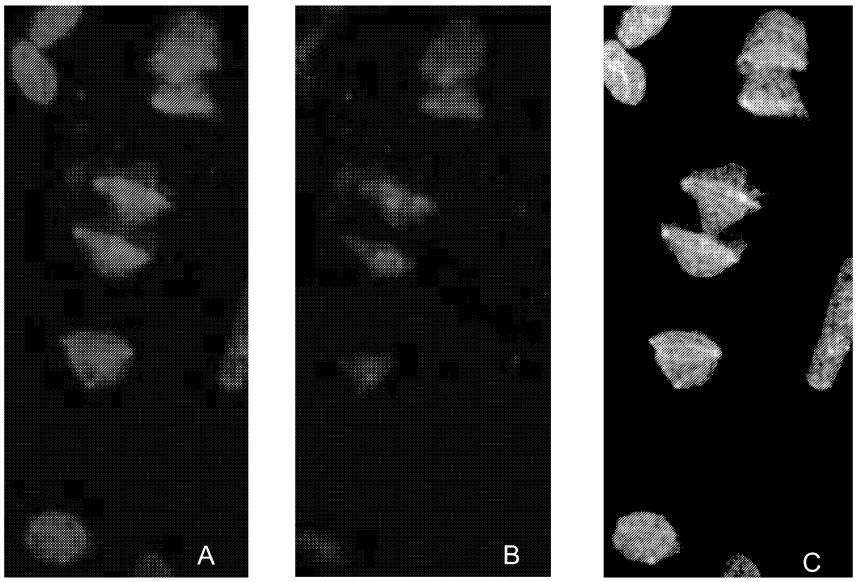
도면6



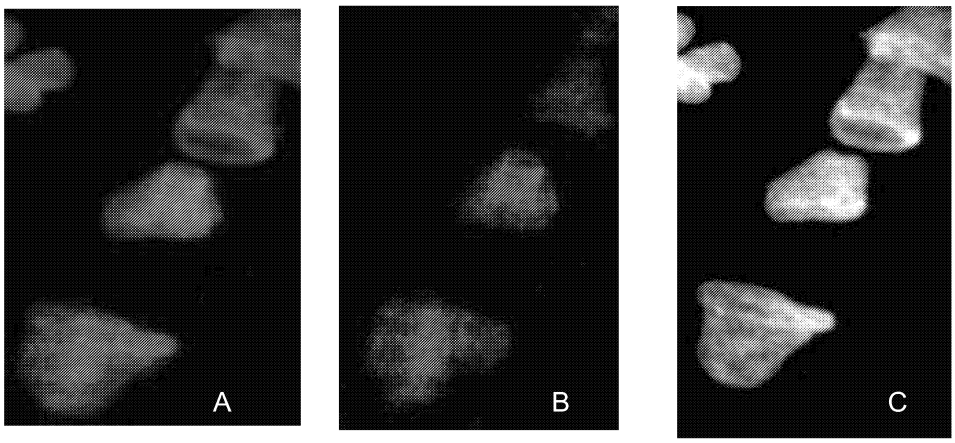
도면7



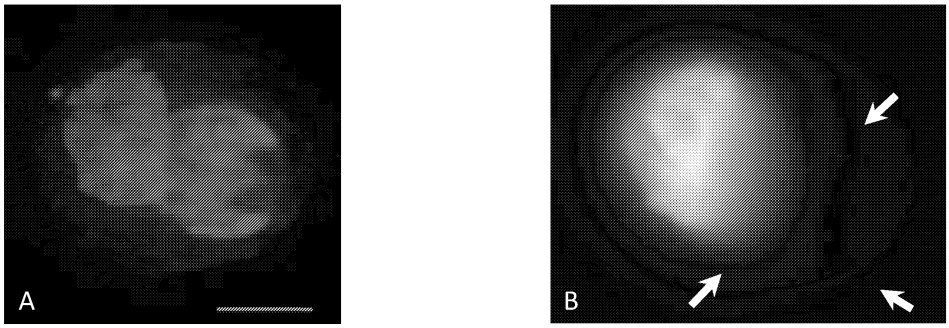
도면8



도면9

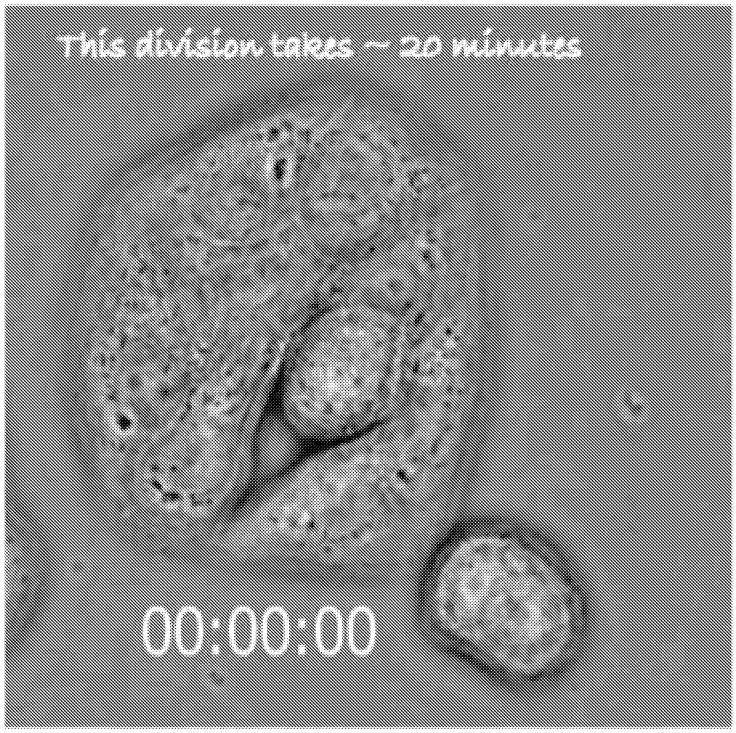


도면10



도면11

HT-29 세포주, 대조군(미처리), 24시간 성장



This division takes ~ 20 minutes: 이러한 분열은 약 20분이 걸린다

도면12

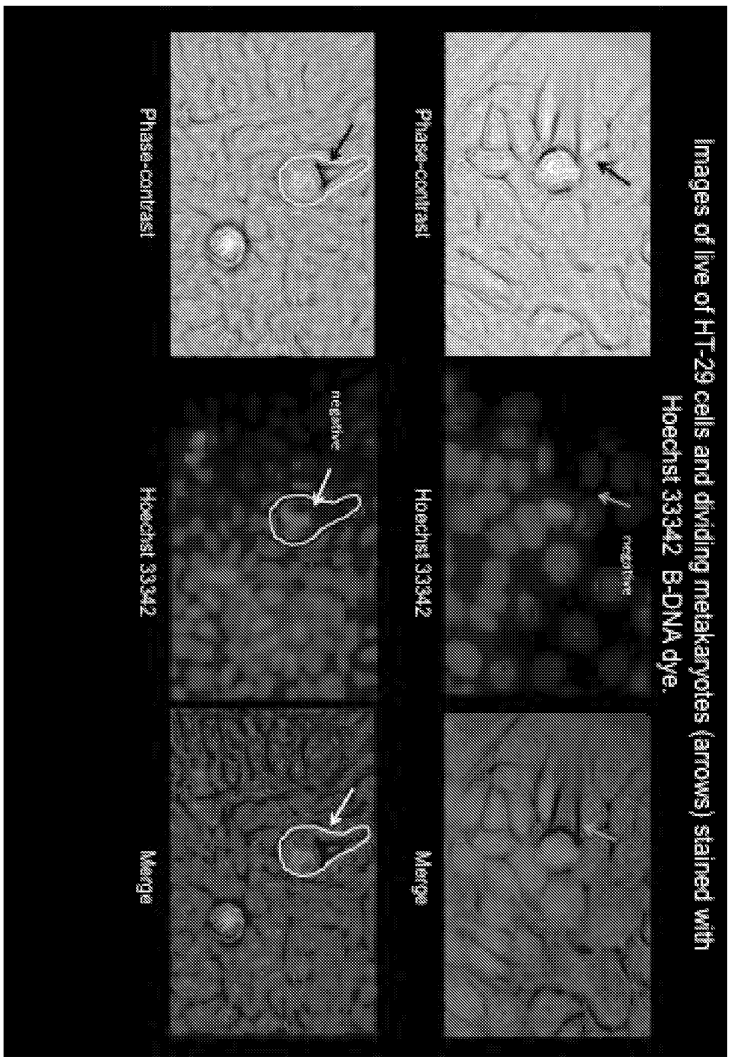


Image of live of HT-29 cells and dividing metakaryotes(arrow) stained with Hoechst 33342 B-DNA dye: Hoechst 33342 B-DNA 염료로 염색된 생 HT-29 세포 및 분열하는 메타-핵세포(화살표)의 이미지
phase contrast: 위상차, negative: 음성, merge: 병합

도면13

