(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.[6]
C12N 9/10
A61K 38/43
C07K 64/40

(45) 공고일자 2003년10월30일
(11) 등록번호 10-0392057
(24) 등록일자 2003년07월07일

(21) 출원번호	10-1996-0702850	(65) 공개번호	특1996-0706552
(22) 출원일자	1996년05월30일	(43) 공개일자	1996년12월09일
번역문제출일자	1996년05월30일		
(86) 국제출원번호	PCT/CA1994/00659	(87) 국제공개번호	WO 1995/15373
(86) 국제출원일자	1994년11월30일	(87) 국제공개일자	1995년06월08일
(81) 지정국	국내특허 : 오스트레일리아 바베이도스 불가리아 브라질 캐나다 중국 체코 에스토니아 그루지야 헝가리 일본 북한 대한민국 스리랑카 라이베리아 리투아니아 라트비아 마다가스카르 몽고 노르웨이 뉴질랜드 폴란드 루마니아 슬로베니아 AP ARIPO특허 : 케냐 말라위 수단 EA 유라시아특허 : 아르메니아 벨라루스 키르기즈 카자흐스탄 몰도바 러시아 EP 유럽특허 : 오스트리아 스위스 리히텐슈타인 독일 덴마크 스페인 핀랜드 영국 룩셈부르크 네덜란드 포르투칼 스웨덴 OA OAPI특허 : 부르키나파소 베넹 중앙아프리카 콩고 코트디브와르 카메룬 가봉 기네 말리 모리타니 니제르 세네갈 차드 토고		

(30) 우선권주장	2,110,213 1993년11월30일 캐나다(CA) 9413680.1 1994년07월07일 영국(GB)
(73) 특허권자	맥길 유니버시티 캐나다, 퀘벡 에이치3에이 2에이7, 몬트리올 유니버시티 스트리 트 3550, 오피스 오브 테크놀로지 트랜스퍼
(72) 발명자	찌프 모쉬 캐나다 2C7 H4W 퀘백 몬트리올 루크, 코트 스트리트 멜링 5770
(74) 대리인	이화익, 권태복

심사관 : 권오희

(54) 세포의 CpG 디뉴클레오티드 내의 시토신의 메틸화를 감소하는 방법

명세서

기술분야

<1> 본 발명은 DNA 메틸전이효소(Methyltransferase)의 레벨과 디메틸라제(demethase)활성 사이의 상호작용과 세포가 증식하고, 변이되고, 종양을 발생하고 그리고 항상성 상태에서 상기 상호작용의 역할에 관련된 것이다.

배경기술

<2> 전사 인자가 모든 생물체의 유전자 발현윤곽을 편성하는 데 중요한 역할을 하는 반면에, 다른 일정 유전자 내용의 다양한 프로그람을 암호화하는 정보의 후성(epipgenic) 레벨이 존재한다. DNA의 메틸화는 다양화 프로그람(레진등 1980, Science210 : 604-610)의 중요한 결정소로 인식되고 있다.

<3> DNA 메틸화는 DNA 메틸전이효소 (MeTase)(쿠마등, 1994, Nucl, Acids, Res. 22 : 1-10 : 및 배스터등, 1988, J. Mol. Biol. 203 : 974-983)에 의해 촉매되는 DNA의 후복제 공유 변경이다. 척추동물에서, CpG 염기배열의 단편에서 시토신 성분은 유전자 및 조직 특효약 (이스라엘리 및 M.시프, 1985, DNA methylarion : Biochemistry and Biological significance, PP. 353-378, 레진등, (Ed), 스프링게-베르라그, 뉴욕) 인 메틸화의 패턴을 발생하는 작위의 방법에서 메틸화(60-80%)된다.

<4> 유전자의 규정 지역에서 메틸화는 유전자의 억제된 상태와 상호 관계가 있다(이스라일리 및 시프, 1985, DNA 메틸화 : Biochemistry 및 Biological significance, PP 353-378, 레진등 (Ed), 스프링거-배르라그, 뉴욕 ; 및 레진등, 1991, Microbiol. Rev. 55 : 451-458). 최근의 데이터는 DNA 메틸화가 규정배열에 전사요인의 결합을 억제함으로서 직접으로, 유전자 활성의 억제를 나타내는 메틸화 DNA 결합을 신호함으로서 간접으로 유전자 발현을 억제할 수 있는 것을 암시한다 (레진등, 1991, Microbiol. Rev. 55 : 451-458).

<5> DNA 메틸화의 패턴에서 조절된 변화는 발전 및 세포변형 동안에 발생한다 (레진등, 1991, Microbiol. Rev. 55 : 451-458 ; 및 브랜디등, 1993, Bioessays 13 ; 709-713)는 것은 잘 알려져 있다.

변형에의 DNA 메틸화의 중요한 역할은 근래에 증명되었다(리등, 1992, Cell 69 : 915-926 : 및 시프 등, 1992, J. Biol. Chem. 267 : 1283]-12836).

<6> 메틸화의 패턴은 복제시에 DNA 메타제(MeTase)에 의해 유지되고 DNA 메타제 활성 레벨 및 유전자 발현은 다른 최초 사물(시프등, 1985, J. Biol. Chem. 260 : 8653-8656) 및 불사의 세포라인(시프등, 1991, J. Bol. Chem. 266 : 10027-10030)의 성장 상태로서 조절된다.

<7> DNA 메타제의 조절된 발현은 메틸화의 패턴을 보존하기 위하여 중요하며 많은 라인이 전환된 세포의 메틸화 패턴에서 변형을 나타낸다. 일례로, 망막아종(Rb) 및 빌름스 종양(WT)유전자의 5'지역은 종양의 작은 부분에서 메틸화되고, 각각의 종양내의 상기 유전자의 불활성화는 변이보다 메틸화로부터 야기된다는 것이 암시된다.

<8> 추가로, 어떤 종양 세포에 내 염색체11의 짧은 가지는 지역적으로 과도하게 메틸화되며 몇몇의 종양 억제유전자는 상기 지역에 밀집되는 것으로 생각된다. 만일 DNA 메타제 활성의 레벨이 상기에 암시된 것과 같이 (시프, 1991, Biochem. Cell Biol, 64 : 764-769), 메틸화의 패턴을 유지하기 위해 중요하다면, 상기 관찰된 과메틸화(hypermethylation)는 DNA 메타제가 DNA 합성의 비율에서 변화 이상으로 많은 종양 세포내에서 극적으로 유도된다는 사실을 설명할 수 있다.

<9> DNA 메타제 촉진자가 Ras-AP-1 신호 경로에 의해 활성화되는 사실은 암에서 DNA 메타제 활성 및 의 상승 및 야기된 과메탈화가 Ras-Jun 신호 경로의 활성 효과라는 가설과 일치된다.

<10> 체세포내에서 유지되는 메틸화의 패턴은 연속의 새로운 메틸화 및 메틸분해(레진 등, 1991, Microbiol. Rev. 55 : 451-458 및 브랜디등, 1993, Bioessays 13 : 709-713)에 의한 발전 동안에 이루어진다는 것이 분명하다.

<11> 그러나, 어떻게 생체내에서 메틸화 패턴이 형성되고 유지되는지 아직도 불분명하다. 단순한 모델이 메틸화 패턴의 클론의 유전질을 설명하기 위해 제안되었으나 (레진등, 1980, Science 210 : 604-610), 어떻게 특이부위가 변형 및 세포전환 과정동안에 새로이 메틸화되거나 메틸분해 되는지 설명되지 않는다. 몇몇 라인이 선조 사상체의 메틸화 상태라기 보다, 인자가 메틸화를 위한 특이 부위를 목표로 하는데 관련된다는 것을 암시한다.

<12> 유사한 미스테리는 어떻게 특이부위가 발전 및 세포 변형 동안 메틸분해 되는가 하는 것이다. 메틸분해가 독립적 효소의 기관에 의해 이루어진다는 다른 가설이 있으나, 하나의 가능한 메커니즘은 메틸화의 피동적 손실일 수 있다는 것이다.

<13> 메틸화의 부위 특이 손실은 척추동물 변형의 하나의 증명된 관점이다 (이스라엘리 및 시프, 1985, DNA 메틸화 : Biochemistry 및 Biological Significance, PP. 353-378, 레진 등, (Ed), 스프링기-베르라그뉴욕 : 레진 등 1991, Microbiol. Rev. 55 : 451-458 및 브랜디등, 1993, Bioessays 13 : 709-713).

<14> 메틸화의 손실이 상기에 기재된 바와 같이 피동과정에 의해 이루어질 수 있는 반면에, 메틸분해의 능동과정은 포유류 세포내에서 발생한다는 것을 관찰할 수 있다(이스라엘리등, 1986, Cell 46 : 409-416). 새로운 메틸화와 유사하게, 메틸 분해는 DNA 염기배열내의 특이 신호에 의해 지시되고 (이스라엘리등, 1986, Cell 46 : 409-416 및 제1도를 보라) 메틸화 되거나 메틸분해된 부위의 가능성은 DNA메타제 중의 하나 또는 메틸분해 효소에의 상기 부위의 친화성에 의해 결정된다. 상기 효소에의 각 부위의 친화성은 부위 주위의 크로마틴 구조에 의해 결정된다 (시프, 1991, Biolchem. Cell Biol, 64 : 764-769).

<15> 정상 세포에서, DNA 메틸전이효소는 종양 억제자의 하나에 의해 조절되고 억제된다. DNA 메틸전이효소와 메틸라제 활성 사이의 균형은 메틸화 패턴을 유지한다. 메틸화된 부위는 제1도에서 (M)으로 표시된다. 억제자의 억제는 DNA 메타제 (실선에 의해 표시됨)의 과도발현을 야기하고 게놈은 과도 메틸화되어 종양발생이 시작된다(종양 a).

<16> DNA 메틸전이효소를 상승조절하기 위한 다른 작용은 DNA 메타제의 과도발현 및 Jun의 활성을 야기하는 Ras 종양유전자의 경로의 활성화이다. 그러나, Ras 경로는 또한 메틸라제를 활성화할 수 있는 것으로 보인다. 종양의 상기 클라스에서 관찰된 메틸화의 마지막 패턴은 디메틸라제 (부위 3, 4, 5)에의 낮은 또는 중간 친화성을 나타내는 부위의 과도 메틸화 (M) 및 높은 친화성을 가지나 원래세포(부위번호 6)에서 메틸화되는 부위의 저메틸화의 두가지 활성을 반영할 것이다.

<17> 링크 암 (link cancer) 및 과도메틸화는 그러나 여전히 그때 그때의 상황에 따른다. 남아있는 중요한 의문은 DNA 메틸화 내의 상기 변화가 발암현상에서 원인 역할을 하는가 하는 것이다.

<18> 과도 메틸화가 발암현상과 상호관계를 가지는 표시는 암환자의 치료 뿐 아니라 세포의 발암 가능성을 평가하는 방법을 이끌 수 있으므로 매우 유용하다. DNA 메타제의 레벨이 포유류 세포에서 제한된다는 사실은 NIH 3T3 세포내로 외인성으로 유도된 DNA 메틸전이효소의 강제된 발현에 의한 세포의 DNA메타제 레벨의 적은 상승이 메틸화 패턴에서 현저한 변화를 야기한다는 관찰에 의해 지지된다 (우등, 1994, Proc. Natl. Acad Sci, 미국 90 : 8891-8895).

<19> 만일 DNA 메틸화가 포유류 세포의 변형 상태에 중요한 제어를 제공한다면, DNA 메틸화 변경인자는 예측할 수 있는 방법에서 유전자 프로그람을 변경하거나 DNA 메틸화의 통제 철폐에 의해 분열될 때 확실한 프로그람을 복원하기 위하여 중요한 치료요법의 동인으로 역할할 수 있다.

<20> 디메틸라제 활성에 책임이 있는 분자의 동정은 유전자 발현 변형 및 세포의 항상성의 조절이 DNA 메타제 레벨과 디메틸라제 활성 사이의 균형에 의존하는 것으로 나타나기 때문에, 상기에 언급된 것과 같이 매우 유용하다.

<21> 발명의 공개

<22> 본 발명은 DNA 메틸전이효소의 레벨과 디메틸라제 활성 사이의 상호작용과 세포가 증식하고, 변

이되고, 종양발생하고 그리고 항상성 상태에서 상기 상호작용의 역할에 관련된 것이다.

<23> 본 발명은 또한 세포의 변형된 상태를 전환하기 위한, 세포의 DNA 내의 이상 메틸화 패턴을 바로 하기 위한, 또는 세포의 DNA 내의 메틸화 패턴을 변경하기 위한 CpG 디뉴클레오티드 (dinucleotrde)에서 메틸화된 시토신의 레벨 감소의 방법에 관련된 것이다.

<24> 본 발명에 따라서, DNA 메틸전이효소 (DNA 메타제) 억제자는 암 세포에서 DNA메타제의 과도활성 또는 과도메틸화는 억제하기 위하여 사용될 수 있고 원 세포 종양 억제 프로그람을 유도한다.

<25> 상기 억제자는 대응 유전자 발현 프로그람을 시작하기 위하여 사용될 수 있다.

<26> 특이 DNA 메틸전이효소 길항근은 유전자 정보 조절의 노드 포인트에 지시된 치료요법을 제공할 수 있다.

<27> 본 발명은 세포의 메틸화 패턴내의 특이 변화가 상기 세포의 DNA 메타제 및 디메틸라제 활성의 일반적 레벨을 조정함으로서 얻어질 수 있는 사실에 의해 제공된 약학 조성물에 관련된 것이다.

<28> 그러므로, 무음의 유전자는 DNA의 메틸화 패턴내의 변화를 통하여 활성화될 수 있다.

<29> 일례로, 해양빈혈(β-thalessemia) 및 겸상 적혈구 빈혈은 메틸화 패턴내의 변화에 따르는 β-글로빈 (β-globin)유전자를 활성화함으로서 치료될 수 있다.

<30> 세포 전환이 야기된 NIH 3T3 세포내의 DNA메타제의 과도 발현이 나타나는 것에 기초하여 (우등, 1994, Proc. Natl. Acad Sci. 미국 90 :8891-8895), 본 발명은 또한 항암요법을 위한 후보 타겟으로서 DNA 메타제에 관련된 것이다.

<31> 본 발명은 또한 P19 세포로부터 최근에 정제된 메틸분해효소활성과 상기 디메틸라제가 RAS 로 전환된 P19 세포에서 유도된다는 사실에 관련된 것이다.

<32> 암에서 증가된 저메틸화 및 P19 세포로부터의 디메틸라제가 RAS에 의해 유도된다는 사실에 근거하여, 본 발명은 항압요법을 위한 후보 타겟으로서의 디메틸라제에 관련된 것이다.

<33> 디메틸라제 활성은 제한 매핑(mapping) 또는 클로닝(cloning)과 같은 분자 분석에 사용되어지는 메틸화된 DNA 샘플의 처리에 특별히 유용하다.

<34> 본 발명은 DNA 메타제 또는 메틸라제에 대하여 지시된 다클론 또는 단클론 항체와, 치료요법제로서 상기 항체의 사용에 관련된 것이다.

<35> 본 발명은 일반적이거나 특이하거나 함암 요법제로서의 DNA 메타제 억제자의 사용에 관련된 것이다.

<36> 실시예에서, 특이 함암 요법제는 항 감각인자 올리고 핵산염(oligonucleotide)이며 DNA 메타제 mRNA 염기 배열에 특이하다. 종양 억제자 위치의 과도 메틸화가 억제를 야기하고, 메틸분해가 종양자극자를 암호화하여 종양발생을 유도하는 유전자 활성을 야기하는 경우에서, DNA 메틸전이효소에 대항하는 억제항 감각인자 요법은 DNA메타제 활성, 메틸분해 및 종양 억제 유전자의 반응을 감소시킨다. 상기 유전자의 산물은 종양 자극 유전자에 의해 유도된 종양발생 효과를 억제하여, 과도 메틸화의 억제가 또한 저메틸화 효과를 억제할 것이다.

<37> 다른 실시예에서, Hhal 메틸라제의 결정성 구조에 기초하여 (쿠마 등, 1994, Nucl. Acids Res, 22 : 1-10), DNA 메틸전이효소의 상세한 원자구조를 나타내어, 고도로 특별한 길항제를 합리적으로 설계할 수 있다. 상기 새로운 길항제는 항암 및 유전자 유도 요법을 위한 잠재적 후보자가 될 수 있다. 대응 화학요법접근상의 항 DNA 메타제 요법의 잠재적 이득은 항 DNA메타제 요법이 비특이 증식 기능이라기 보다 암 상태의 잠재적 조절자를 목표로 하는 것이다.

<38> DNA 메타제 억제자는 유전자 정보의 조절에서 지시된 요법의 새로운 루트를 제공할 수 있다.

<39> 또 다른 실시예에서, 항 감각인자 요법을 사용하여, 종양발생 표현형의 반체가 관찰될 수 있다.

<40> 본 발명의 상세한 설명 및 특허청구 범위에서, 항 감각인자 지정은 목표로 되는 것에 대하여 2개의 DNA 가지를 향하거나 mRNA를 보완하는 RNA 분자 또는 DNA로서 설명되어져야 한다. 상기 항센스는 목표 배열의 보완 전체길이, 파편 또는 상기로부터 파생된 올리고 뉴클레오티드이다. 상기 항 감각인자는 생물공학 방법으로 얻어질 수 있거나 화학적으로 합성될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<41> 제 1 도는 DNA 메타제 및 디메틸라제 활성이 종양세포에서 DNA메틸화 패턴을 결정하는 것을 설명한다.

<42> 제 2A 도는 플라스미드 pZEM 및 pZαM을 설명한다.

<43> 메탈로티오닌(metallothionine)(MT) 촉진자, 인간 성장 호르몬 3' 지역 (HGH), 메타제 cDNA 염기 배열이 표시된다.

<44> 제 2B 도는 트랜스펙턴트 (transfectant)내에서 트랜스팩트된 플라스미드의 존재를 다양화하는 서던 블롯 분석(Southern bolt analysis)을 나타낸다.

<45> 제 2C 도는 예상되는 1.3 kb 이상 mRNA 를 발현하는 양성 클론의 노던 블롯 분석(nothern blot analysis)을 나타낸다.

<46> 전체 RNA(5ug)는 3개의 pZαM 라인 (7 및 9) 및 pZEM으로부터 준비된다.

<47> 제 3A, B 도는 pZαM 트랜스팩턴트(4) 및 pZEM 대조로부터 추출된 2㎍ DNA의 가장 근접한 이웃 분석에 의하여 YlpZαM 내의 전체 게놈 DNA의 메틸화 상태를 나타낸다.

<48> 제 3A 도는 대표 TLC 플레이트의 오토라디오그람(autoradiogram)을 나타낸다.

<49> 표준 레인(lane)은 시험관내에서 합성된 반메틸화된 M13 DNA이다.

<50> 제 3B 도는 C 및 5-메틸C에 대응하는 스폿으로 부터의 신틸레이션(scintillation) 계수를 나타낸다.

<51> 계수는 평균 ± SEM 을 나타낸다.

<52> 제 3C-F 도는 Y1pZαM 트랜스팩턴트에서, 특이유전자: C : C21 5' 지역, D : C21 유전자, E : 망막아종 (RB) 유전자 및 F : p53 유전자의 메틸화 상태를 설명하는 DNA의 MspI/Hpall 효소분해(M/H) 다음의 서틴 블롯 분석을 나타낸다.

<53> 제 3C-E 도에서, 투명한 삼각형은 메틸분해된 단편위치를 표시한다.

<54> 제 4A-C 도는 pZαM으로 트랜스팩트된 Y1세포의 형태학적 전환 및 독립 성장을 나타낸다.

<55> 제 4A 도는 pZαM 및 Y1 대조를 가진 Y1 클론 트랜스팩턴트의 생배양액의 X200배율에서 상(phase) 대조 검경을 나타낸다.

<56> 제 4B 도는 Y1 pZEM 세포(4 및 7클론) 및 Y1 트랜스팩턴트(4, 7 및 9 클론)의 21일간 한천배지 분석의 x10배율에서의 상대조 검경 모양을 나타낸다.

<57> 제 4C 도는 한천배지에서 성장 21일 후 독립 성장분석 : Y1 pZEM(4 및 7클론) 및 Y1 pZαM 트랜스팩턴트(4, 7 및 9클론)을 나타낸다.

<58> 제 5A-B 도는 Y1'pZαM 트랜스팩턴트의 생체내 종양발생을 나타낸다.

<59> 제 5A 도는 2개의 대조라인 (Y1 및 pZEM4) 및 3개의 Y1pZαM 트랜스팩턴트(4, 7 및 9)의 LAF-1 마우스에 종양을 형성하는 능력뿐 아니라 상기 종양내의 신혈관화 레벨을 설명한다.

<60> 제 5B 도는 균질화된 종양의 사진을 나타낸다.

<61> 제 6A-B 도는 노던 블롯 분석에 의해 Y1pZαM 트랜스팩턴트로부터 파생된 종양에서 항 감각인자 발현 손실을 나타낸다.

<62> 1.3 kb 항 감각인자 메시지는 단지 원래 세포라인 pZαM7에서만 나타내지고, pZαM7 또는 Y1 세포라인으로부터 발생한 종양에서는 검출되지 않는다.

<63> 적용된 RNA 양용 대조가 또한 나타낸다.

<64> 제 6B 도는 18S 신호의 발현으로 정상화된 항 감각인자의 상대 발현을 나타낸다.

<65> 제 7A 도는 대조 pZEM 트랜스팩턴트에 대하여 Y1 pZαM의 밀도 제한 성장분석을 나타낸다.

<66> 제 7B 도는 혈청 결손(1% 말 혈청)을 따르는 트리판 블루(trypan blue) 염색을 사용하여 결정되는 생존가능 세포의 백분율을 나타낸다.

<67> 제 7C 도는 1% 혈청포함 배지에서 성장하고 1 및 2일후 채취하여 표시된 트랜스팩턴트로부터의 전체 세포의 DNA의 서던 분석을 나타낸다. 어팝토시스(apoptosis)로 죽은 세포의 130bp 뉴클레오좀내부의 사디리 특성은 단지 Y1pZdM 트랜스팩턴트로부터 파생된 종양에서만 보여질 수 있다.

<68> 제 7D 도는 1% 혈청 배지에서 24시간 동안 세포를 성장시킨후, 다양한 Y1 트랜스팩턴트 세포 섹션(I-V)의 전자 현미경 분석을 나타낸다.

<69> 제 8A-D 도는 Y1세포의 5 azaCdR-처리 (0-10㎛) 의 효과를 나타낸다.

<70> 제 8A 도는 가장 가까운 이웃 분석에 의해 결정됨으로서 디뉴클레오티드 염기 배열 CpG에서 메틸화되지 않은 시토신의 함유량을 나타낸다.

<71> 제 8B 도는 낮은 (1%) 혈청 배지에서 성장된 세포의 생존력에의 5azaCdR 의 효과를 나타낸다.

<72> 제 8C 도는 한천 (5azaCdR 이 없음) 배지에서 독립성장을 나타낸다.

<73> 제 8D 도는 5azaCdR 처리하의 콜로니수를 나타낸다.

<74> 제 9 도는 DNA 메틸화 패턴 및 세포 전환을 결정하는 DNA 메타제 촉진자의 조절작용을 설명한다.

<75> **본 발명은 수행하기 위한 모드**

<76> DNA 메타제 메시지(pZαM)의 최대 600bp로 "항감각인자" mRNA의 강제된 표현은 10T 1/2 세포에서 제한된 DNA 메틸화를 유도할 수 있다 (시프등, 1992, J. Biol. Chem, 267 : 12831-12836)는 것이 앞에서 설명되었다. Y1 세포의 종양발생이 DNA 메타제에 의해 조절되는 가설을 직접으로 시험하기 위하여, Y1 세포는 pZαM 또는 pZEM 대조로서 트랜스팩트된다.

<77> **Ⅰ. Y1 세포에서 DNA 메틸전이효소 유전자로 항 감각인자 발현은 제한된 DNA 메틸분해를 유발한다.**

<78> Y1 세포에서 DNA 메틸화를 직접으로 억제하기 위하여 DNA 메타제 항 감각 인자 발현 구성 pZαM 또는 pZEM 대조 벡터 (시프등, 1992, J. Biol. Chem. 267 : 12831-12836)가 유전자 전이가 중개된 DNA에 의해 Y1 세포내로 유도된다.

<79> Y1 세포는 7.25% 가열 불활성화 말 혈청 및 2.5% 가열 불활성화 태아 송아지 혈청으로 보충된 F-10 배지에서 단층으로서 유지된다.

<80> 세포 배양을 위한 모든 다른 배지 및 시약은 GIBCO-BRL로부터 얻어진다.

<81> Y1 세포($1x10^6$)는 트랜스팩션전에 15시간동안 150mm 디쉬 상에 도말된다.

<82> 마우스과의 DNA 메타제 cDNA(10㎍)의 5'를 암호화한 pZαM 발현 벡터는 인산칼슘 프로토콜을 사용한 유전자 전이가 중개된 DNA 에 의해 선별 표시로서 pUCSVneo 1㎍을 가진 Y1 세포내로 유입된다(어슈벨등, 1988, In Current Protocols in Molecular Biology, 윌리 및 손스, 뉴욕).

<83> 선택은 배지에 0.25mg/㎖ G418을 첨가함으로서 트랜스팩션 48 시간후 개시된다.

<84> G418 저항세포는 선택배지에서 클론된다.

<85> 한천 배지에서 성장 분석을 위하여, $1x10^3$ 세포는 7.5% 말혈청, 2.5% FCS, 0.25mg/㎖ G418(트랜스팩턴트용) 및 0.33% 한천 용액을 포함하는 F-10 배지 4㎖를 가지는 30mm 디쉬상으로 3중으로 37。C에서 종균된다 (프리드만등, 1974, Cell 3 : 355-359).

<86> 세포는 매2일마다 G418를 첨가한 배지 2㎖로서 공급된다.

<87> 성장은 >10세포를 포함하는 콜로니로서 도말21일후에 계수된다.

<88> G418 저항 콜로니는 분리되고 증식된다.

<89> 트랜스팩턴트가 유입된 구조를 함유함을 확인하기 위하여, 트랜스팩턴트로부터 DNA를 준비하여 MspI 또는 HpaII 로서 효소분해, 서던블롯 분석 및 0.6kb DNA 메타제 cDNA 단편이 라벨된 32p 로서 교배한다 (제 2A 도).

<90> 라벨링(베링거 맨하임 으로부터 무작위 라벨링 키드를 사용)과 같은 모든 다른 표준 분자 생물학 조작 및 게놈 DNA의 준비는 어수벨 등에 따라서 (Ausubel 등, 1988, In Current Protocols in Molecular Biology 윌리 및 손스, 뉴욕) 행해진다.

<91> MspI 및 HpaII 제한 효소(베링거 맨하임)는 37。C에서 8시간 동안 2.5 유니트/mg의 농도에서 DNA에 첨가된다.

<92> 라디오 뉴클레오티드(3000mCi/mmol)는 아메르샴(Amersham)으로부터 구입된다.

<93> 제 2B 도에서 보여지는 결과는 대조 트랜스팩턴트가 맑게 되는 반면에 3개의 pZαM 트랜스팩턴트는 DNA 메타제 cDNA 염기 배열의 현저한 레벨이 함유된 것을 나타낸다.

<94> pZαM 구조가 트랜스팩턴트에 발현되고 메탈로티오네인(metallothionein) 촉진자가 상기 세포에서 기능하는가 시험하기 위하여, 50μM ZnSO4 를 가진 트랜스팩턴트를 배양하고 다른 시각 포인트에서 RNA를 준비하고 노던 블롯 분석과 MET 0.6 소식자가 라벨된 32p로서 교배한다.

<95> 전체세포의 RNA의 준비는 하이본드-N+(Hybond-N+)상으로 RNA를 블로팅하여 어수벨등(1988, In Current Protocols in Molecular Biology 윌리 및 손스, 뉴욕)에 따라서 행해진다.

<96> 제 2C 도에서 관찰된바와 같이, 트랜스팩턴트 7 및 9는 ZnSO4로서 유도전일지라도 MET 0.6 cDNA의 실제량을 발현한다.

<97> ZnSO4 유도는 ZnSO4가 항감각인자 메시지(유도되지 않은 RNA 샘플 내의 도말에서 유발됨)의 전체 발현이 아닌 불연속 부위로부터 전환 개시를 유도하는 것을 암시하는 MET 0.6에 교배한 1.3kb RNA 의 상대적 강도를 증가한다.

<98> 그러므로, 계속하는 실시예에서는, ZnSO4로서 트랜스팩턴트의 유도는 행하지 않는다.

<99> DNA 메타제 유전자로 항 감각인자 RNA 의 발현이 게놈의 메틸화 레벨을 일반적으로 감소시키는가 결정하기 위하여 앞에 행해진 것과 같이 [α-32p]-dGTP를 사용하는 가장 근접한 이웃 분석으로 재분류한다.

<100> 상기분석은 디뉴클레오티드 임기 배열 CpG (레진등, 1985, In Biochemistry and Biology DNA Methylation, P. 239, 레진등, (Ed), 알란 R. 리스, Inc. N.Y.)에 존재하는 메틸화된 시토신의 백분율 측정을 가능하게 한다.

<101> 2㎍ DNA는 디엔에이아제(DNAase)의 0.1 유니트로서 15분간 37。C에서 배양되고, 32P-α-dGTP(아메르샴으로부터 3000Ci/mmol) 2.5 및 2유니트의 콘버그(kornberg) DNA 폴리머라제(Polymerase)가 첨가되고 반응은 30。C에서 추가 25분 동안 배양된다.

<102> 50㎕물이 첨가되고 결합되지 않은 뉴클레오티드는 30초 동안 최대속도에서 마이크로콘 칼럼(microcon™ column)(Amicon)을 통하여 회전함으로서 제거된다.

<103> 라벨된 DNA(20㎕)는 37。C에서 10시간 동안 버퍼에서 구균의 뉴클레아제(nuclease) 70㎍으로 효소분해된다.

<104> 동량의 방사능이 TLC 포스포 셀룰로스 (Phosphocellulose) 플레이트 상에 적용되고 3' 모노뉴클레오티드는 하나의 용적(66:33:1비율의 이소부티르산 :H_2O : NH_4OH)에서 크로마토그라피에 의해 분리된다.

<105> 크로마토그람은 XAR™ 필림에 노출되고 시토신 및 5-메틸시토신에 대응하는 스폿이 스크랩되고 β-신틸레이션(β-scintillation)계수기에서 계수된다.

<106> 트랜스팩턴트 및 대조 DNA는 디엔에이아제 I 로서 니크(nick)되고, DNA 폴리머라제를 사용한 단일 뉴클레오티드 [α-32P]-dGTP 로 해석된 니크 및 라벨된 DNA는 DNA 3'가 유입된 α-32P로 쪼개는 구균 뉴클레아제로서 모노뉴클레오티드 인산염으로 효소분해된다.

<107> GMP의 5' 이웃이 라벨된 [α-32P]는 TLC 플레이트상에서 크로마토그라피에 의해 분리되고, dCMP 및 dc^{met} MP를 위한 결과 스폿은 스크랩되고 액체 신틸레이션에 의해 계수된다.

<108> 제 3A 도 및 B도에 나타난 3중 실험의 결과는 대조 라인 pZEM에 비교될때, DNA 메틸화 (트랜스팩턴트 4 용 12% 및 7용 22%) 전체 레벨내의 제한되지만 현저한 감소가 pZαM 구조를 발현하는 트랜스팩턴트에서 일어난다는 것을 암시한다.

<109> **II. Y1 pZαM 트랜스팩턴트 내 특이유전자의 메틸분해**

<110> 메틸분해에서 pZαM 결과의 발현을 확인하고 특이유전자가 메틸분해 되었는가 결정하기 위하여, 특이 유전자 소식자로서 서던 블롯팅 및 교배를 한다음 HpaII/MspI 제한 효소분석을 한다.

<111> MspI 가 메틸화의 상태에 상관없이 동일 염기 배열을 쪼개는 반면에 단지 부위가 메틸화되지 않았을 때 만이, HpaII는 CCGG 배열, CpG 디뉴클레오티드 염기 배열의 작은 가지를 쪼갠다.

<112> 선조 Y1 또는 단지 벡터를 잠복하는 세포유전자를 가진 pZαM을 발현하는 세포에서 특이 유전자의 HpaII분절의 패턴을 비교함으로서, 유전자가 항감각인자 트랜스팩턴트에서 메틸분해되는가를 결정할 수 있다.

<113> 스테로이드 21-가수분해효소유전자 C21(시프등, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 86:6853-6857) 및 시프등, 1990, Mol. Endocrinol. 4:1144-1152)의 메틸화상태는 일차로 분석된다.

<114> 상기 유전자는 부신피질에서 특별히 발현되고, 저메틸화되나 Y1세포에서는 비활성화되고 과도메틸화된다.

<115> Y1세포에서 C21의 과도메틸화는 어떤 변이된 기능을 막는 전환프로그람의 부분이라는 것은 앞에 기재되었다.

<116> Y1, pZaM 및 pZEM(베르나르드 등. 1989. Proc, Natl. Acad. Sci. 미국 86:6474-6478)트랜스팩턴트로부터 준비된 DNA는 MspI 또는 HpaII효소분해, C21유전자의 증강자 및 촉진자 지역을 포함하는 0.36kb Xba-BamHI단편으로서 서던블록분석 및 교배를 행한다(시프등. 1989. Proc. Natl. Acad. Sci. 미국 86:6853-6857 및 시프등. 1990. Mol. Endocrinol. 4:1144-1152, 소식자의 신체적 맵용).

<117> 상기 소식자는 촉진자 지역이 충분히 메틸분해되었을 때 0.3kb 및 0.16kb HpaII단편을 검출하여야 한다.

<118> 촉진자 및 증강자 지역은 3.8 및 2kb에서 과분자량 부분 HpaII단편의 존재 및 어떤 저분자량 단편의 결여로서 표시되는 것과 같이 Y1세포 및 pZEM트랜스팩턴트에서 과도로 메틸화된다(제 3C 도).

<119> 대조적으로, Y1 pZEM 트랜스팩턴트는 3.8 및 2kb부분의 상대적 하강 및 0.36kb에서 충분히 메틸분해된 페인트밴드의 출현으로서 표시되는 것뿐아니라 HpaII 분절이 증강자 지역으로 부위 상류 및 하류의 부분적 저메틸화를 표시하는 0.56 및 ~1kb에서 부분적 단편을 얻는 사실과 같이 부분적으로 메틸분해된 C21 5'지역을 포함한다.

<120> 저메틸화가 증강자 지역에 제한되는가 또는 만일 상기가 C21 유전자 위치를 통하여 전개한다면을 결정하기 위하여 Y1세포로부터 추출된 DNA의 다른 준비에서 동일한 HpaII 효소분해 및 서던블롯전이가 수행된다.

<121> 대조 pZEM(베르나르드등, 1989. Proc. Natl. Acsd. Sci 미국 86:6474-6478) 트랜스팩턴트 및 3개의 pZEM 항감각인자 트랜스팩턴트로부터의 DNA는 C21유전자 및 3'염기배열체를 포함하는 3.8kb BamHI 단편을 가진 필터로 교배된다.

<122> 상기 지역의 충분한 메틸분해는 0.1-0.2kb에서 다수의 저분자량 단편뿐 아니라 ~kb, 0.8kb단편 및 0.4kb단편 한 쌍을 얻어야한다.

<123> 제 3D 도에서 관찰된 것과 같이, C21 위치는 23kb이상에서 고분자량 단편에 의해 표시되듯이 대조 트랜스팩턴트뿐 아니라 Y1세포에서 고도로 메틸화된다.

<124> 페인트 밴드만이 예측된 1kb 분자량 범위뿐 아니라 1.9kb에서 부분에 존재한다(제 3D 도).

<125> 항감각인자 트랜스팩턴트로부터 추출된 DNA는 고분자량 단편의 상대적 하강 및 1.9kb에서 부분적 단편의 상대적 강화뿐아니라 C21 유전자의 3'지역에 포함된 다수의 HpaII 부위에서 부분적 저메틸화를 표시하는 1과 0.4kb사이의 저분자량 범위에서 새로운 부분적 단편의 출현을 나타낸다.

<126> 다수의 부분적 HpaII 단편에 의해 표시된(제 3D 도) 메틸분해의 패턴은 C21 유전자의 특정지역에서 메틸화의 특이손실이라기보다 일반적 부분 저메틸화와 일치한다.

<127> 메틸분해가 부신피질특이 C21유전자와 같은 Y1세포에서 잠정적으로 발현가능한 유전자에 제한되는가 또는 만일 메틸분해가 게놈에서 넓게 전개된다면을 결정하기위하여, 근육 특이 MyoD 유전자뿐아니라 해마특이 5HT1A 수용기유전자와 같은 다른 유전자들이 분석되고, 유전자들은 저메틸화되는 것으로 나타난다.

<128> 특별한 저메틸화가 진행되는 유전자의 또 다른 클라스는 종양억제유전자를 포함한다.

<129> 상기 클라스로부터의 2개의 유전자인 세포 사이클 조절에 관련된 종양억제유전자인 p53 및 망막아종(RB)의 메틸화상태가 결정된다.

<130> 상기 유전자산물중의 하나의 손실은 세포 사이클 및 신생물의 통제철폐를 유발하는 것이 보여진다.

<131> 마우스 p53 유전자의 5' 지역용 올리고프리머(Oligoprimer)는 프리머(Primer)선택프로그람(PC Gene™)을 사용하는 공개된 게놈염기배열(액세션 번호: X01235)로부터 선택된다.

<132> 154-172 : 5 ' TLC GAA TCG GTT TLC ACCC 3' 베이스에 대응하는 5'프리머 및 472-492 베이스에 대응하는 3 '프리머는 제조자(아메르샴 Hot tub™ ; 1.5mM $Mgcl_2$)에 의해 제안된 배양조건을 사용한 마우스 DNA 100ng을 포함하는 확대반응혼합물에 첨가되고 DNA는 95℃에서 2분, 55℃에서 2분 및 72℃에서 0.5분의 40사이클에 확대된다.

<133> 반응산물은 저용해 아가로스(agarose)겔(BRL)상에 분리되고 예측된 크기에 대응하는 밴드는 표준 프로토콜(어수벨 등, 1988. In Current Protocols in Molecular Biology, 윌리 및 손스, 뉴욕)에 따라 절제되고 추출된다.

<134> 마우스 RB유전자의 게놈염기배열이 겐뱅크(Genbank)를 통하여 불가능하기 때문에, 제조자에 의해 제안된 조건하에서 수퍼스크립트(Superscript ™)역전사 효소를 가진 임의의 올기고뉴클레오티드 프리머(베링거)를 사용하는 전체 마우스 RNA(C2Cl2 세포로부터) 0.5㎍으로부터 망막아종 mRNA를 역전사한다.

<135> RB염기배열은 공개된 cDNA(베르나르드등, 1989. Proc. Natl. Acad. Sci 미국 86:6474-6478)의 2-628베이스에 대응하는 올리고뉴클레오티드를 사용하는 역전사된 cDNA로부터 확대된다.

<136> 사용된 올리고프리머는 5' GGA CTG GGG TGA GGA CGG (3' (1-18) 및 5' TTT CAG TAG ATA ACG CAC TGC TGG 3'(620-610)이다.

<137> 확대조건은 상기에 기술된 바와 같다.

<138> 마우스 RB cDNA의 5' 지역으로부터 300bp염기배열에 소식자를 사용하여, pZaM 트랜스팩턴트뿐아니라 콘트롤벡터로 트랜스팩트된 Y1세포내의 상기 유전자의 메틸화레벨이 결정된다(제 3E 도).

<139> HpaII를 기진 상기 지역의 분절은 0.6kb 및 0.1kb 단편을 얻는다(제 3E 도).

<140> RB위치는 고분자량 단편으로 소식자의 교배에 의해 표시된 것과 같이 대조세포에서 과도로 메틸화된다.

<141> 상기 위치는 고분자량단편의 강도의 상대적 하강, 23과 0.6kb 사이의 부분적 단편의 많은 출현 및 0.6 및 ~0.1kb에서 메틸분해된 단편의 출현에 의해 표시되는 것과 같이 pZaM트랜스팩턴트에서 부분적으로 저메틸화된다.

<142> p53위치는 5' 지역 300bp상류에서 개시부위까지 소식자로서 0.3kb단편을 사용하여 연구된다(제 3F 도).

<143> MspI를 가진 p53위치(2개의 p53 유전자가 마우스 게놈내에 존재함)의 분절은 4.4, 2.5, 0.56 및 0.44kb분자량 범위내의 단편을 얻는다(제 3F 도, 제 1레인).

<144> 대조 Y1 pZEM 트랜스팩턴트의 분절은 0.56kb단편의 측면에 위치한 부위에서만 Y1세포에서 메틸분해된다는 것을 나타낸다.

<145> 나머지위치는 >4.4kb범위에서 신호의 강도에 의해 표시된 것과 같이 과도로 메틸화된다(제 3F 도, 2-4레인).

<146> 대조 트랜스팩턴트와 비교하여, P53유전자는 4.4kb이상의 고분자량 단편의 강도의 상대적 감소 및, 4.4kb HpaII단편, 4kb에서 부분적으로 분할된 HpaII 단편, 3.5kb주위의 페인트 부분 단면 및 2.5kb에서 페인트 단편의 출현에 의해 나타난 것과 같이 DNA메타제로 항감각인자 메시지를 발현하는 Y1세포에서 부분적으로 저메틸화된다.

<147> 상기 결과는 DNA메타제로 항감각인자의 발현이 게놈와이즈(genome-wide) 부분적 저메틸화를 유발한다는 결론을 실증한다.

<148> 어떤 연구된 유전자도 메틸분해에서 특정선택성을 나타내지 않는다.

<149> **실시예 1**

<150> DNA메타제로 항감각인자를 발현하는 Y1세포의 독립성장의 형태적 전환 및 손실

<151> DNA메타제 항감각인자구조에 의해 유도된 메틸분해가 암세포의 성장특성에서 변화를 야기하는가 결정하기 위하여, pZαM 트랜스팩턴트대 대조의 성장 및 형태적 특성을 비교한다.

<152> pZαM트랜스팩턴트와 대조의 성장커브를 비교하기위하여, $5x10^4$ Y1pZEM 및 pZaM트랜스팩턴트(4 및 7) 세포가 3중으로 도말된다.

<153> 세포는 채취되고 표시된 시간포인트에서 계수된다(제 7A 도).

<154> 상기 실험의 결과는 항감각인자 트랜스팩턴트가 트랜스팩턴트가 암세포에서 소실된 특성중의 하나인 "접촉억제" (contact inhibition)를 요구한다는 것을 암시하는 대조세포보다 더 낮은 농도에서 포화밀도에 달한다는 것을 보여준다.

<155> Y1 pZαM트랜스팩턴트의 형태적 특성은 상기 결론을 더욱 확실하게 한다(제 4A 도).

<156> 대조 Y1 및 Y1 pZEM 세포가 제한된 접촉억제를 나타내고 다층병소를 형성하는 반면에, Y1 pZαM

트랜스팩턴트는 더욱 둥글고 특정한 형태를 나타내고 단층에서 독점적으로 성장한다(제 4A 도).

<157> DNA 메타제로 항감각인자의 발현이 종양발생가능성의 역전을 야기하는가 결정하기위하여, 종양발생의 척도로 간주되는 고정 독립패션에서 성장하는 트랜스팩턴트의 능력 또한 결정된다.

<158> Y1 pZaM 트랜스팩턴트는 한천배지에서 콜로니를 형성하는 능력이 완전히 소실되는 것이 나타나며, 더하여 형성한 콜로니는 제 4B 도에 나타난 바와 같이 단지 약간의 세포만을 포함한다는 것을 나타낸다.

<159> 한천배지상의 성장은 가시적 시험으로서 측량되고 제 4C 도에 그래프로서 나타난다.

<160> 상기 실험은 DNA 메타제로 항감각인자 메시지의 발현으로서 DNA메틸화억제가 시험관내 종양발생의 소실을 유도한다는 것을 나타낸다.

<161> 실시예 2

<162> DNA메타제로 항감각인자를 발현하는 Y1세포는 생체내 감소된 종양발생을 나타낸다.

<163> 메틸분해가 시험관내 종양발생의 억제를 야기할 수 있는가를 결정하기 위하여, LAF-1마우스(6-8주 수컷)가 각각의 Y1 pZaM, Y1 및 Y1 pZEM 트랜스팩턴트용 10^6 세포로서 피하주사된다.

<164> 마우스는 매일의 동계(palpitation)로서 종양의 존재가 감시된다.

<165> 직경 1cm이상의 종양을 가진 마우스는 CO_2로 질식되어 죽게되고, 종양은 해부하여 제거되고 구아니다움 이소티오시안산염(guanidium isothiocyanate)에서 균질화된다.

<166> 종양이 없는 마우스는 90일 동안 생존되고 다음 죽게 된다.

<167> RNA는 기술된바와 같이(어수벨 등, 1988. In Current Protocols in Moldecular Biology, 윌리 및 손스, 뉴욕) $CsCl_2$ 밀도구배(gradient) 원심분리에 의해 종양으로부터 준비된다.

<168> Y1세포로 주사된 모든 동물이 주사후 2-3주에 종양을 형성하는 반면에, pZαM 트랜스팩턴트로 주사된 동물에서 종양형성비율은 현저하게 낮았다(제 5A 도; P>0.005).

<169> 많은 라인이 세포라인의 맥관형성력 및 전이력이 직경으로 관련된다는 것을 증명한다.

<170> Y1세포 또는 대조 트랜스팩턴트로서 주사된 동물에서 형성된 종양은 고도로 혈관화되는 반면에(제 5B 도), pZαM 트랜스팩턴트로부터 발생하는 종양은 매우 제한된 신혈관화를 나타낸다.

<171> 신혈관화에서의 상기 차이는 Y1 pZαM 트랜스팩턴트로 주사된 동물로부터 제거된 종양의 균등질의 흐린 색깔에 대하여 대조라인으로부터 발생한 종양균등질의 매우 진한 색깔로서 표시된다(Y1 및 Y1pZEM; 제 5B 도).

<172> pZαM 트랜스팩턴트로 주사된 동물에서 소수의 종양이 형성된다는 사실은 종양이 생체내에서 선택된 압력하에서 DNA 메타제로 항감각인자의 발현이 소실된 복귀돌연변이체(revertants)로부터 유래된다는 것을 설명할 수 있다.

<173> 상기 가설은 Y1PZaM 트랜스팩턴트로부터 발생하는 종양으로부터 분리된 RNA로 시험되고, 시험관내 트랜스팩턴트라인을 위하여 관찰된 0.6kb 항감각인자메시지의 발현레벨과 비교된다.

<174> 분리된 RNA는 MET0.6단편이 라벨된 32p로 노던블롯분석 및 교배를 행한다.

<175> 필터는 방사능이 제거되고 앞에 기술된 바와 같이(시프 등, 1990. Mol. Endocrinal, 4:1144-1152) 18s RNA용의 올리고뉴클레오티드 소식자가 라벨된 32p로 재교배된다.

<176> 오토라디오그람(autoradiogram)은 정밀조사되고 MET 0.6발현레벨은 18S 소식자로 얻어진 신호에 비례하여 결정된다(제 6B 도).

<177> 항센스메시지의 발현은 DNA메타제로 항감각인자 메시지의 발현이 종양발생과 일치하지않는다는 가설이 입증되는 종양에서 현저히 감소된다.

<178> 실시예 3

<179> Y1 세포에서 pZαM발현은 혈청박탈하에서 아폽토시스의 (apoptotic)사망프로그람을 유도한다.

<180> 종양세포는 혈청에서 제한된 의존도를 나타내고 일반적으로 혈청에 의존하지 않고 성장할 수 있다.

<181> 혈청에 존재하는 인자는 많은 종양발생이 아닌 세포의 성장에 필수적이다.

<182> 몇몇 라인이 종양발생세포의 증강된 생존력은 프로그람된 세포사망의 억제와밀접한 관련이 있는 것이 최근에 암시되었다.

<183> 일례로, 종양유전자 bcl-2는 세포증식의 자극자가 아니고 아폽토시스(apoptosis)의 억제를 야기한다.

<184> 종양억제자 p53은 라인이 유래된 인체콜론종양내의 아폽토시스를 유도할 수 있고 어떤 화학요법제는 암세포내의 아폽토시스를 유도하는 것으로 보인다.

<185> pZαM 트랜스팩턴트가 혈청상에 증강된 의존도 및 혈청이 박탈된 조건하에서 제한된 생존력을 나타내기 때문에, 메틸분해가 Y1세포에서 아폽토시스의 프로그람을 유도할 수 있는 가능성이 분석된다.

<186> 혈청내의 인자는 세포를 위한 생존인자로서 작용한다는 것이 알려졌으므로, 아폽토시스 프로그람

은 단지 상기 인자가 제거되었을 때만 활성화될 수 있다.

<187> pZαM 트랜스팩턴트가 혈청이 없는 조건하에서 프로그람된 세포사망을 진행하는가 시험하기위하여, 상기 트랜스팩턴트상의 혈청결핍효과가 연구된다.

<188> pZαM 트랜스팩턴트 및 대조 Y1 pZEM 트랜스팩턴트(웰당 $3x10^5$)가 6개의 웰(well) 플레이트의 낮은 혈청(1% 말혈청)배지에 도말되고, 매 24시간마다 채취되고, 트리판 블루염색에 의해 생존력이 시험된다(제 7B 도).

<189> 대조세포가 혈청이 없는 배지 내로 전이후 74시간까지 거의 100% 생존력을 나타내는 반면에, Y1 pZαM 세포는 48시간에서 생존력이 75%까지 손실되는 것이 나타난다(제 7B 도).

<190> 혈청이 없는 조건하에서 Y1 pZαM 클론에서 사망의 빠른 징후는 활성과정이 관련된다는 것을 암시한다.

<191> 아폽토시스는 새로운 단백질 합성을 요하는 활성과정이고; 조직의 조각 또는 지역이 죽은 회저(necrosis)와 다르게, 아폽토시스는 분리된 세포의 사망과 관련되고; 아폽토시스에 의해 죽은 세포는 면역반응을 유도하지 않고; 아폽토시스의 최대 진단상 특색은 아폽토시스세포로부터 DNA퇴화 패턴이라는 몇가지 관찰 가능한 변화가 회저와 아폽토시스를 구별한다(엘리스등, 1991. Annu, Rev, Cell Biol. 7:663-698).

<192> 아폽토시스에 의해 죽은 세포로부터의 DNA는 Ca^{2+}/Mg^{2+}의존 엔도뉴클레아제(endonuclease)가 내부 뉴클레오좀의 지역에서 DNA를 쪼개기 때문에 겔 전기영동에 의해 분석되어질 때 특이한 사다리를 나타낸다(엘리스등, 1991. Annu. Rev. Cell Biol. 7:663-698).

<193> 180bp 내부 뉴클레오좀 사다리의 출현이 아폽토시스 사망의 진단적 특색이지만, 크로마틴응축, 세포단편화 및 아폽토시스체의 형성과 같은 다른 형태학적 변화는 아폽토시스 과정에서 초기성과로 간주되어 유용한 표식제로서 역할한다.

<194> 혈청이 박탄된 Y1 pZαM세포가 활성화된 아폽토시스사망 프로그람의 결과로서 죽는가 시험하기위하여, 세포는 혈청결핍(1% 말혈청)배지에 도말되고 24시간 간격으로 채취된다.

<195> 전체세포 DNA는 세포로부터 분리되고 나일론 멤브레인(membrane)으로 전이에 의한 1.5% 아가로스(agarose) 겔상에 전기영동시키고 임의 라벨된 Y1 게놈 DNA로 교배시킨다.

<196> 혈청이 결핍된 조건에서 48시간 후에, 대조 pZEM 트랜스팩턴트가 상기 시간 포인트에서 아폽토시스를 나타내지 않는 반면에 pZαM 트랜스팩턴트는 특징적인 180bp 내부 뉴클레오좀 DNA 사다리를 나타낸다(제 7C 도).

<197> DNA 메타제로 항감각인자를 발현하는 세포가 아폽토시스의 초기 형태적 표식제로 나타나는가 결정하기위하여, 세포는 24시간동안 혈청이 결핍(2% 말혈청)되고, 채취되어 전자현미경에 의해 분석된다.

<198> 전자현미경을 위하여, 세포는 카코딜산염버퍼에서 글루탈알데하이드(glutaraldehyde)(2%)에 1시간동안 고정되고 1% 오스뮴 4산화물(osmium tetroxide)에서 추가 고정된다.

<199> 샘플은 에농축알코올에서 탈수되고 에폰(Epon)에 엠베딩(embedding)하여 프로필렌 산화물 처리한다.

<200> 박편 섹션(1㎛)은 초박편 절단기로서 블록으로부터 절단되고, 우라닐아세트산염(uranil acetate) 및 납 시트르산염(lead citrate)으로서 염색된다.

<201> 샘플은 필립스 410 전자현미경을 사용하여 분석된다(메이싱거등, 1993. Neurochem Intl. 23:123-129).

<202> 제 7D 도는 다양한 확대배율(I -V)에서 대조 Y1 pZEM 및 Y1 pZαM 트랜스팩턴트의 전자현미경그라프를 나타낸다.

<203> pZαM 세포가 크로마틴의 농축 및 핵주변에서의 변연추향(margination)(패널 I 및 II), 크로마틴 농축(패널 II), 핵 단열(패널 III), 아폽토시스체 형성(패널 V) 및, 세포 단열(패널 IV)의 아폽토시스 기본표식을 나타내는 반면에 대조세포는 미세하고 균일한 핵멤브레인을 가진다.

<204> 상기 실시예들은 메틸분해가 종양발생을 억제할 수 있다는 것을 통한 하나의 가능한 반응이 프로그람된 세포사망을 활성화하는 것이라는 것을 암시한다.

<205> 상기는 세포사망은 엔도뉴클레아제(endonuclease)활성에 의해 시작된다는 데이터에 의해 지지된다(엘리스등, 1991. Annu. Rev, Cell Biol, 7:663-698).

<206> 그러므로, DNA 메틸화레벨상의 효과는 아폽토시스를 이끄는 경로에 영향을 미칠 수 있다.

<207> 실시예 4

<208> <u>5azaCdR로서 Y1세포의 처리</u>

<209> $1x10^5$ Y1세포가 성장배지에 도말된다.

<210> 도말후 24시간후에, 배지는 다양한 농도(0-10μM)의 5azaCdR(시그마)를 포함한 신선배지로 교체된다.

<211> 배지가 제거되고 72시간동안 매 12시간마다 5azaCdR을 함유한 신선배지로서 교체된다.

<212> 5azaCdR 처리 다음에 세포는 콜로니형성결정을 위하여 성장배지(웰당 100, 300, 500세포), 독립

성장(웰당 $3x10^3$ 세포)을 위한 한천배지 및 혈청박탈조건하의 생존력을 결정하기위한 5일 동안의 낮은 혈청(1%말혈청)의 6개의 웰디쉬상으로 도말된다.

<213> 모든 상기 분석들은 5azaCdR이 없이 수행된다.

<214> 제 8 도에 보여지듯이, 5azaCdR로 Y1세포의 처리는 메타제용 항감각인자의 발현활동을 의태한다.

<215> 실제적으로, 5azaCdR로 Y1세포처리는 메틸화되지않은 시토신의 레벨을 증가하고(제 8A 도), 혈청결핍세포의 생존력을 감소하고(제 8B 도), 마지막으로 한천 배지상의 Y1세포성장을 철저하게 억제하는 것(제 8C-D) 도)이 보여진다.

<216> Y1세포상의 5azaCdR 효과는 동일 조건하에서 동일한 실험을 하므로 세포라인에 의존하지 않는 것으로 보이나 Rb-인체종양 및 인체 소세포 폐암종세포를 사용하는 것도 동일한 결과를 보인다.

<217> 그러므로 본 실시예는 5azaCdR이 게놈프로그람을 변경하거나 DNA메틸화의 통체 철폐로서 분열된 진성프로그람을 복원함으로서, 항암제로서 사용될 수 있다는 것을 암시한다.

<218> 여기에 나타난 데이터는 과도메틸화가 전환된 세포의 유지에 결정적 역할을 한다는 가설을 지지하고, 심지어 메틸화증가는 전환된 상태에 결정적이라는 것을 예측한다.

<219> RAS신호경로가 DNA 메타제 촉진자의 활성을 유도한다는 사실은 암세포의 DNA메틸화능력에서 상기 증가원리를 설명할 수 있게 한다(제 9 도).

<220> 그러므로 DNA 메타제는 RAS신호경로의 중요한 효과제라는 것을 나타낸다.

<221> 상기에 나타난 데이터들은 DNA메틸화의 치료학에 대한 아래의 기본원리를 제공한다.

<222> 첫째, DNA 메타제활성레벨은 DNA메틸화패턴의 하나의 결정인자이기 때문에, DNA메타제활성의 부분적 억제는 메틸화패턴의 변화를 유발할 수 있다.

<223> 만일 암세포에서 이상 과도메틸화가 DNA 메틸전이효소의 과도발현에 기인된다면, 메틸화의 부분억제는 원래 메틸화패턴을 복원할 수 있을 것이다.

<224> 둘째, 상기 패턴은 DNA 메타제활성에 의해 독점적으로 결정되는 것이 아니고 유전자 부위에서 시스(Cis-) 및 트랜스(trans-) 활성신호에 의해 또한 규정되기 때문에, DNA메타제의 부분억제는 세포의 무질서한 전환이라기보다 유전자 발현에서 프로그람된 변화를 야기할 것이다.

<225> 더군다나, DNA 메타제 억제자는 세포에 잠복하는 프로그람을 유도하기 위하여 사용될 수 있다.

<226> 본 발명이 설명된 실시예를 참조하여 기술되었으나 다양한 변형이 숙련된 기술에서 나타날 수 있다.

<227> 따라서, 상기 설명 및 첨부된 도면은 발명의 설명이며 제한되는 것은 아니다.

(57) 청구의 범위

청구항 1

DNA 메틸전이효소의 레벨을 억제하는 단계, 세포의 DNA내의 비정상 메틸화 패턴을 교정하는 단계, 세포의 발암성 상태를 전환하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 세포의 CpG디뉴클레오티드내의 시토신의 메틸화를 감소하는 방법.

요약

본 발명은 DNA메틸전이효소와 디메틸라제의 활성 레벨 사이의 상호작용, 세포가 증식하고, 변이되고, 종양을 발생하고 그리고 항상성 상태상의 상기 레벨 사이의 상호작용 역할, 및 목표로서 DNA 메틸전이효소 및 디메틸리제에 관련된 것이다.

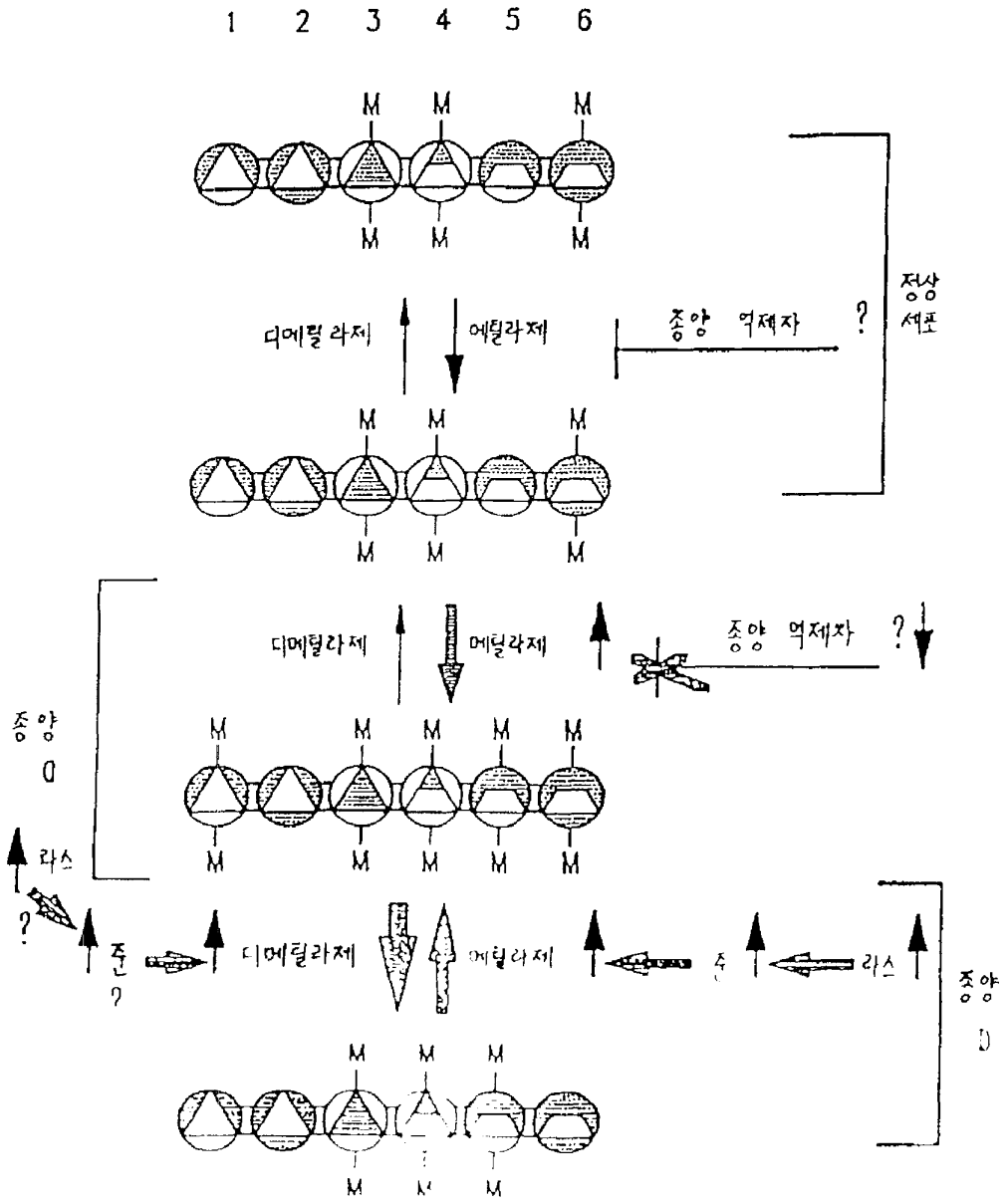
본 발명은 원세포 종양억제 프로그람을 유도하고, 대체 유전자 발현 프로그람을 시작하고, 유전자 정보조절의 노드 포인트에 지시된 치료법을 제공하고, 그리고 세포의 메틸화 패턴내의 특이변화를 주기위해 메틸라제 및 디메틸라제의 일반 레벨을 조정하도록 암세포내의 DNA메타제의 과도메틸화 또는 과도활성을 억제하기위하여 억제자 및 길항제로서 DNA메틸화 레벨을 감소하는 것에 또한 관련된 것이다.

대표도

도1

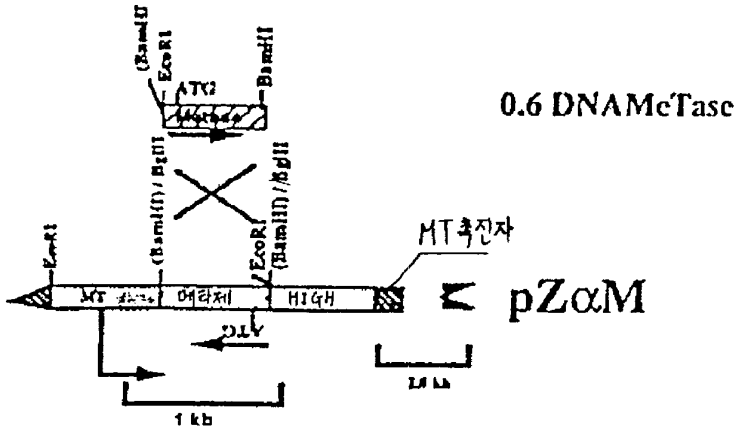
도면

도면1



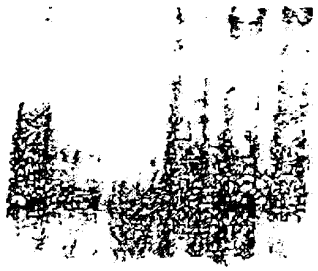
DNA 메타제 및 디메틸라제 활성은 종양세포에서 메틸화 패턴을 결정한다

도면2a



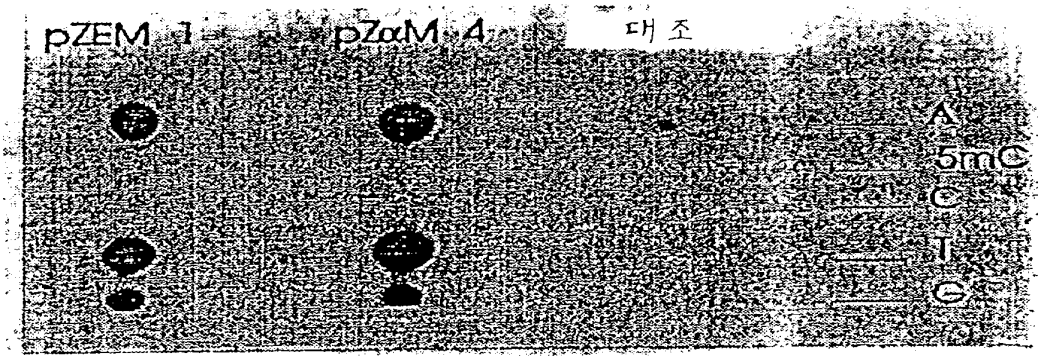
도면2b

플라스미드	:	pZEM		pZαM					
클론	:	4		4		7		9	
효소	:	M	H	M	H	M	H	M	H

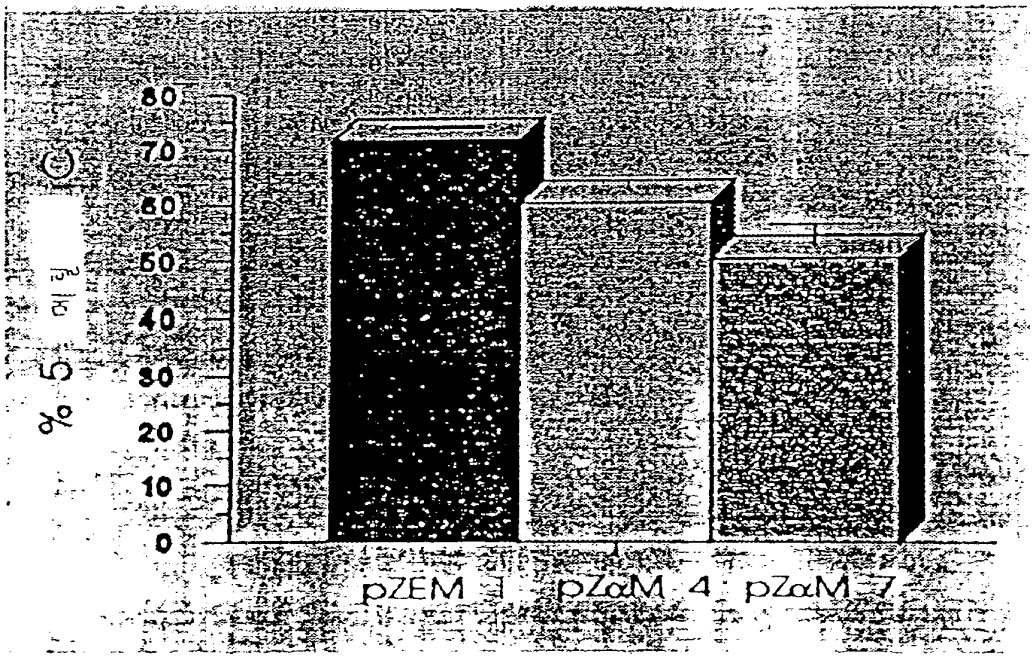


소식자 : 메트 0.6

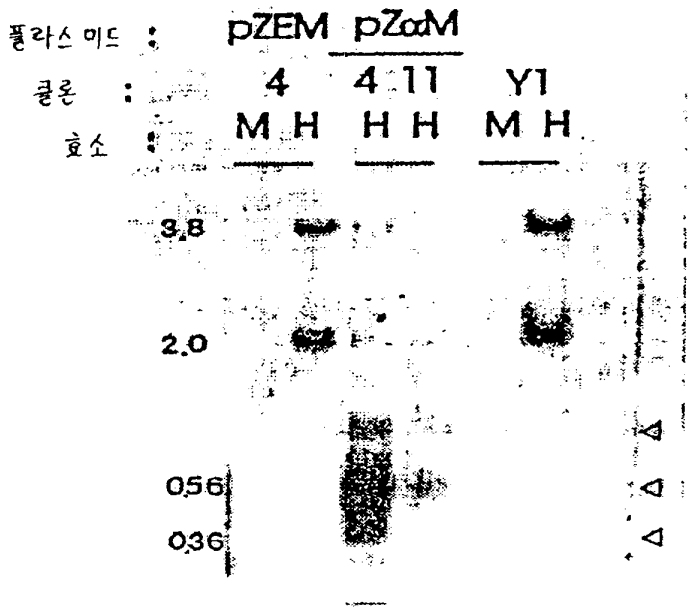
도면3a


pZEM 1
pZαM 4
대 조
A
5mC
C
T
G

도면3b

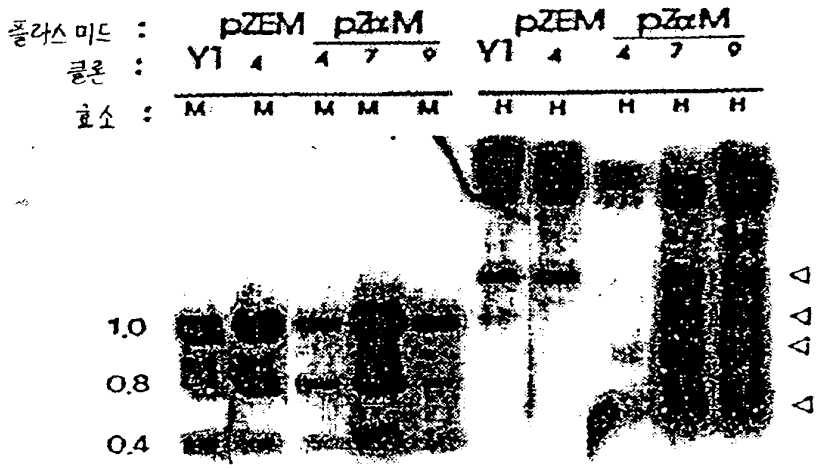

80
70
60
50
40
30
20
10
0
% 5 메틸
pZEM 1
pZαM 4
pZαM 7

도면3c



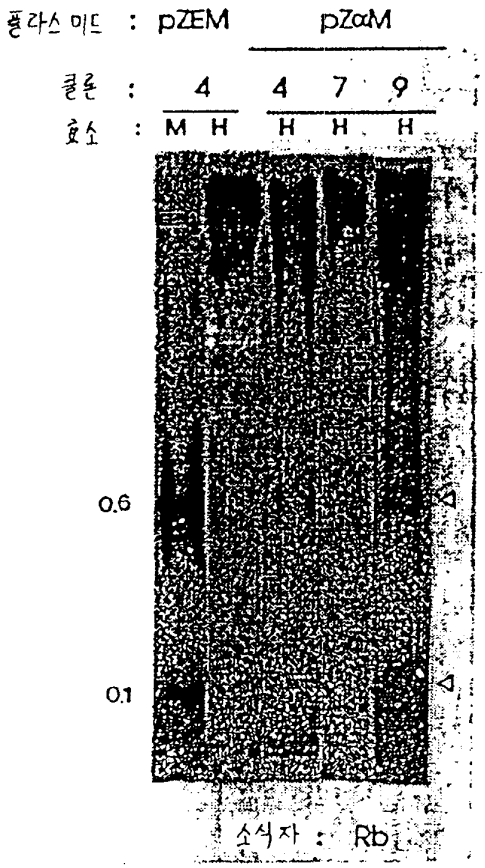
소식자 : C21 5'

도면3d

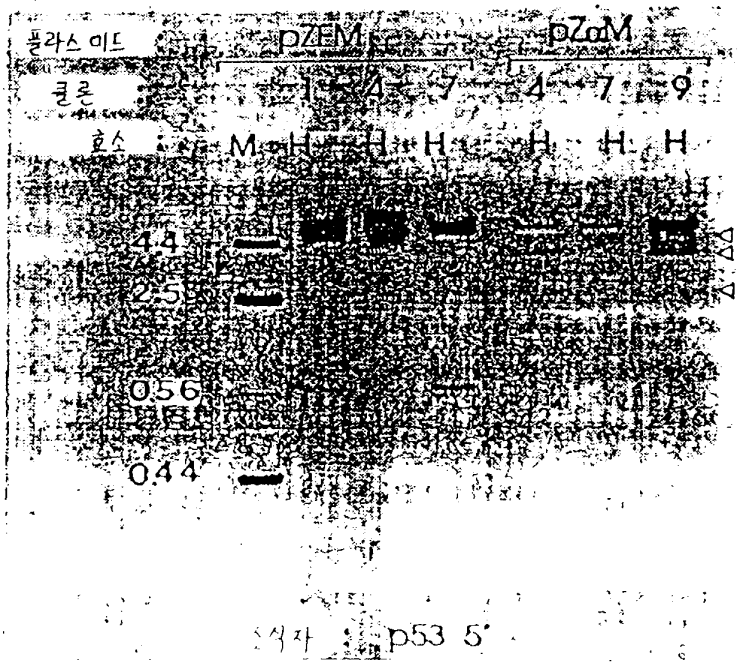


소식자 : C21 3.8

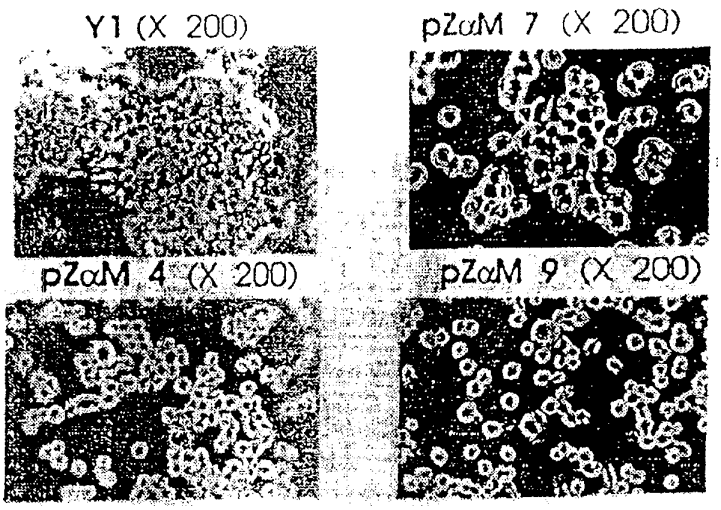
도면3e


플라스미드 : pZEM pZαM
클론 : 4 4 7 9
효소 : M H H H H
0.6
0.1
소식자 : Rb

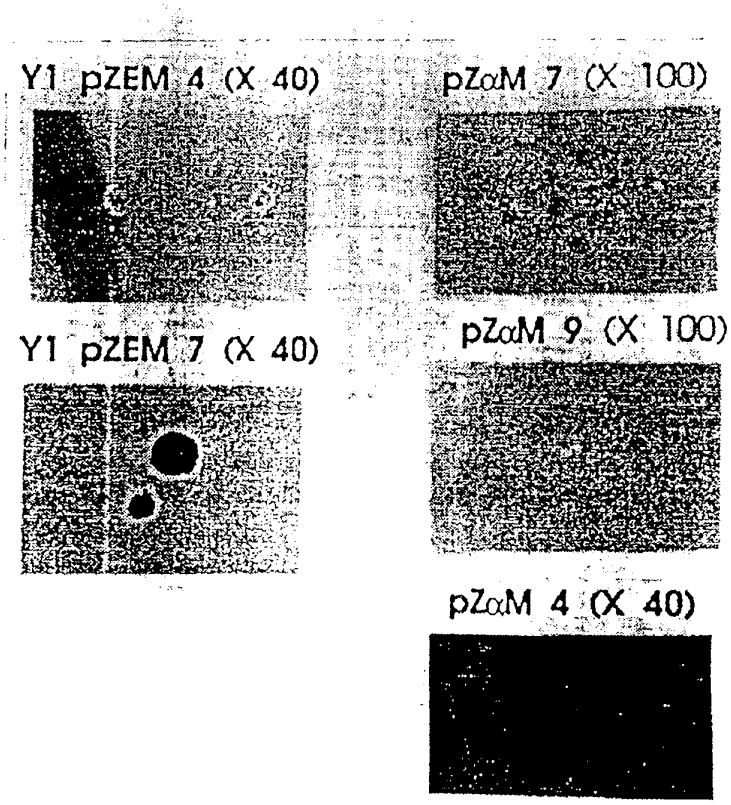
도면3f


플라스미드 pZEM pZαM
클론 4 4 7 9
효소 M H H H H H H
4.4
2.5
0.56
0.44
소식자 : p53 5'

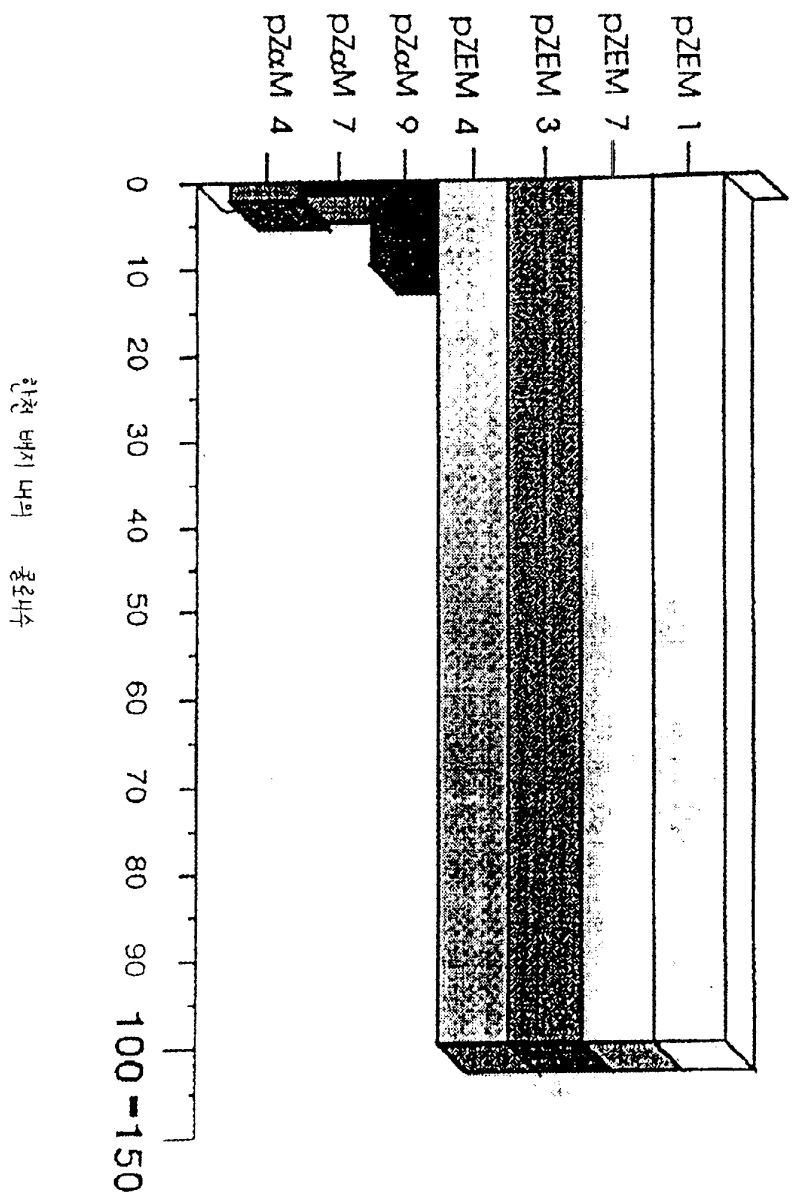
도면4a


Y1 (X 200)
pZαM 7 (X 200)
pZαM 4 (X 200)
pZαM 9 (X 200)

도면4b


Y1 pZEM 4 (X 40)
pZαM 7 (X 100)
Y1 pZEM 7 (X 40)
pZαM 9 (X 100)
pZαM 4 (X 40)

도면4c

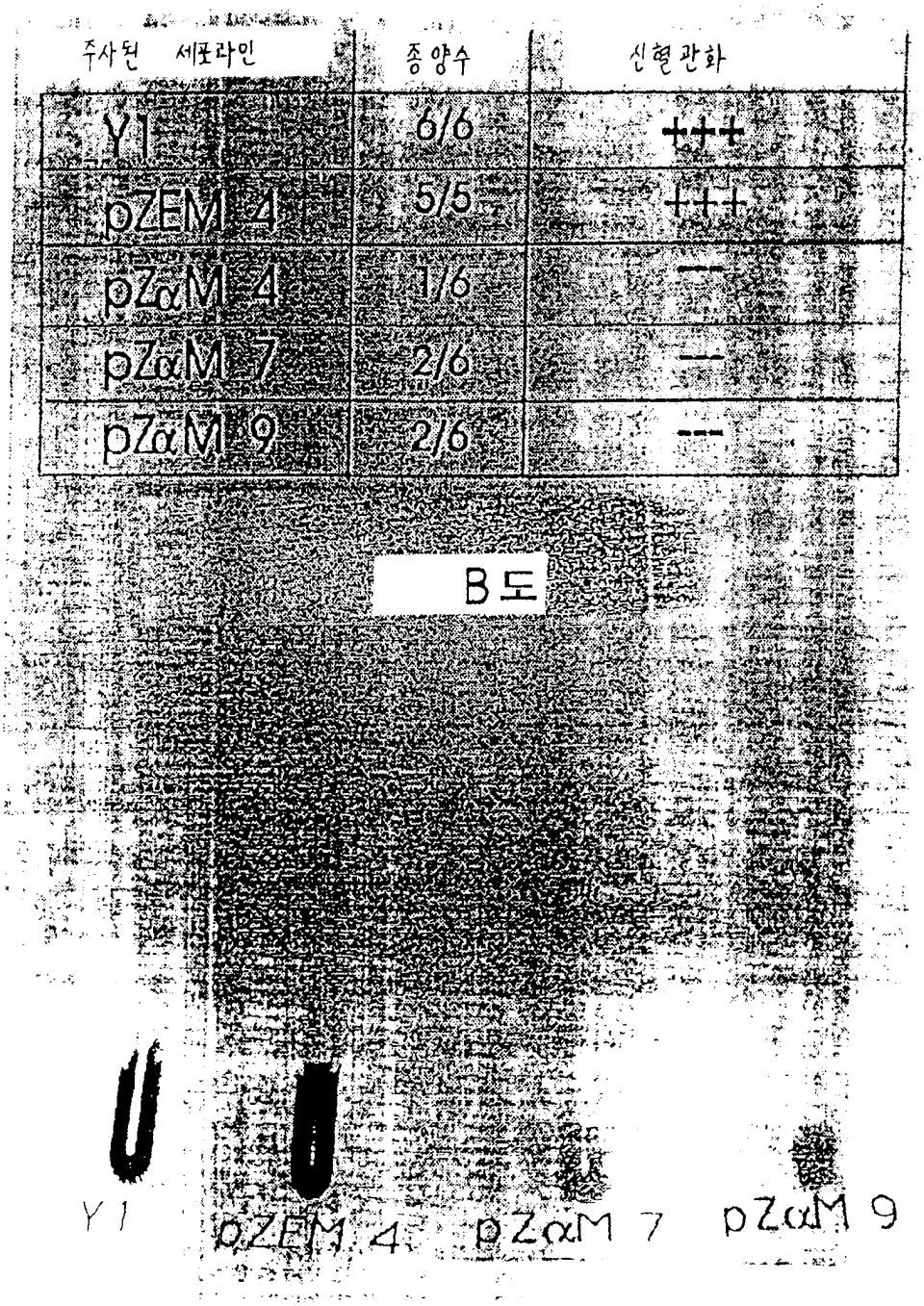

pZEM 1
pZEM 7
pZEM 3
pZEM 4
pZαM 9
pZαM 7
pZαM 4
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100-150
인천 배지 내의 콜로니수

도면5

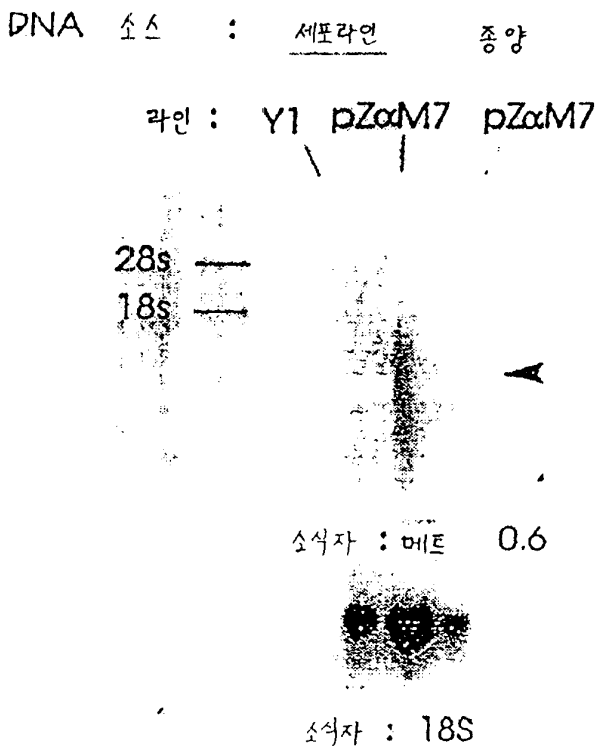
A도

주사된 세포라인	종양수	신혈관화
Y1	6/6	+++
pZEM 4	5/5	+++
pZαM 4	1/6	—
pZαM 7	2/6	—
pZαM 9	2/6	—

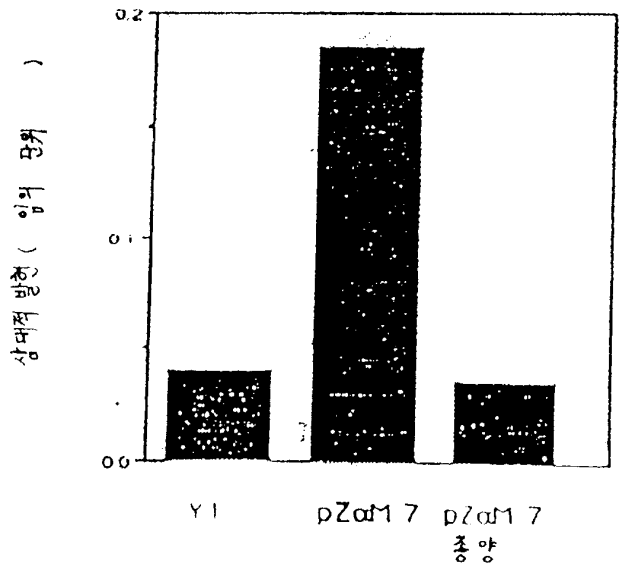
B도



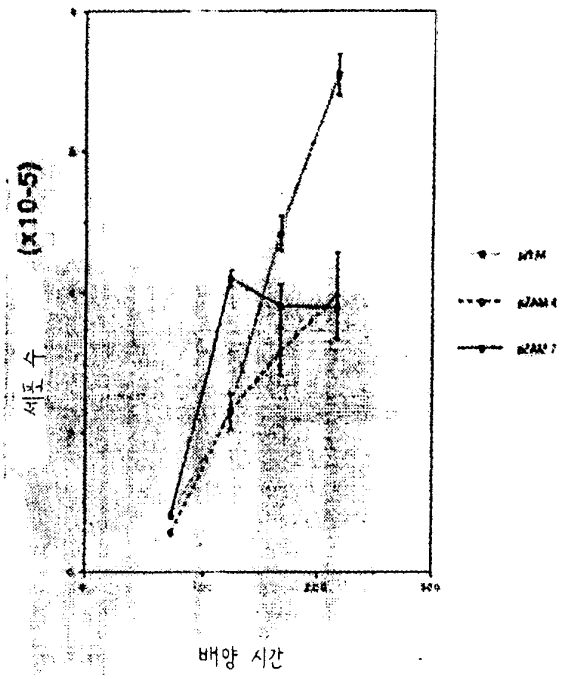
도면6a


DNA 소스 : 세포라인 종양
라인 : Y1 pZαM7 pZαM7
28s
18s
소식자 : 메트 0.6
소식자 : 18S

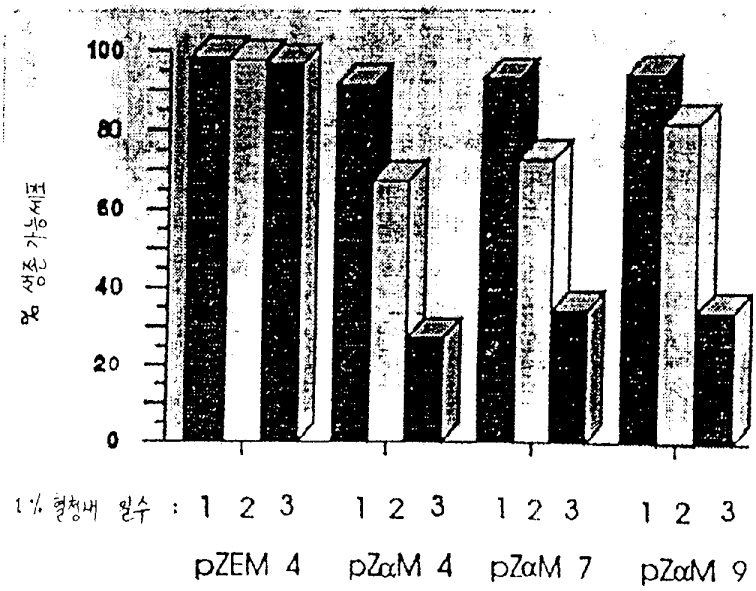
도면6b


0.2
0.1
0.0
상대적 발현 (임의 단위)
Y1
pZαM7
pZαM7
종양

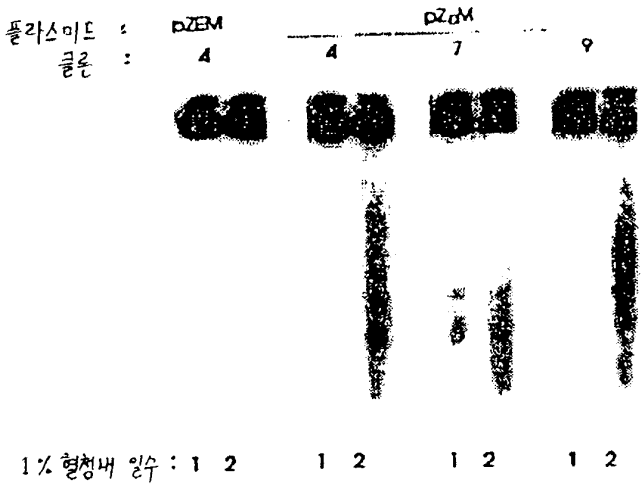
도면7a


(×10-5)
세포수
배양 시간

도면7b

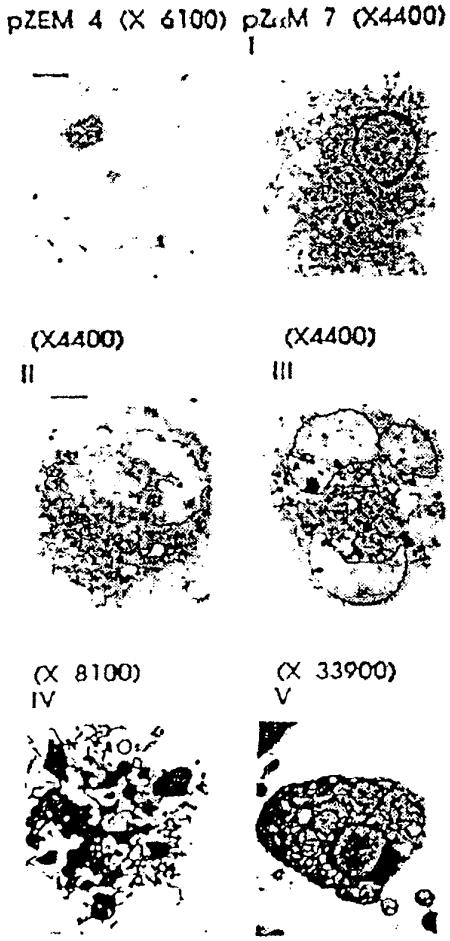

% 생존 가능세포
100
80
60
40
20
0
1% 형청버 원수 : 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3
pZEM 4 pZαM 4 pZαM 7 pZαM 9

도면7c

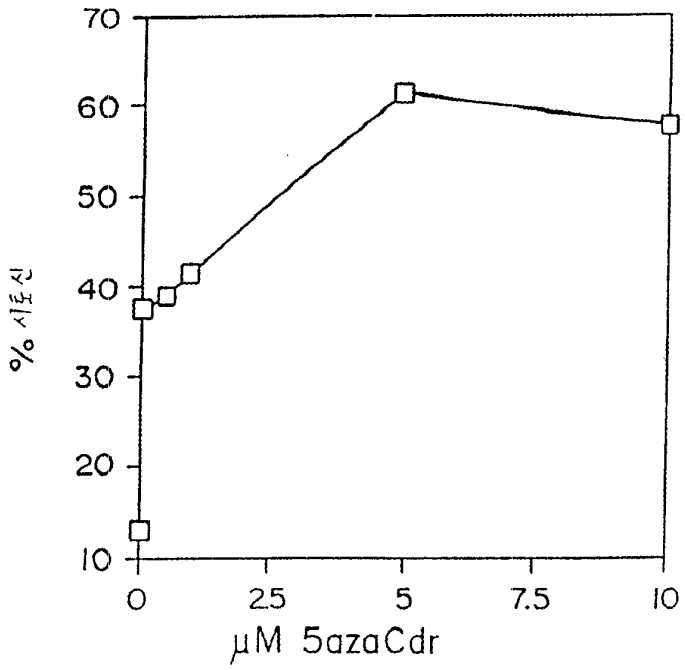


프로브 : 임의 준비된 Y1 DNA

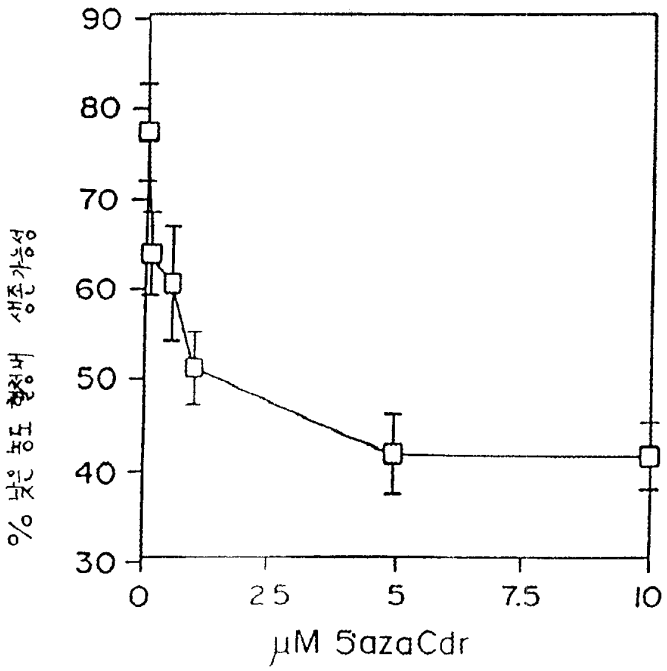
도면7d



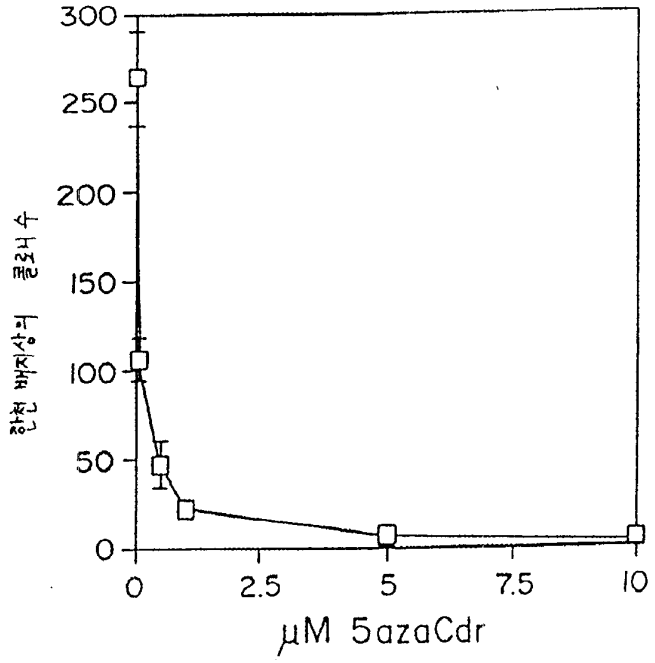
도면8a


70
60
50
40
30
20
10
% 시토신
0
2.5
5
7.5
10
μM 5azaCdr

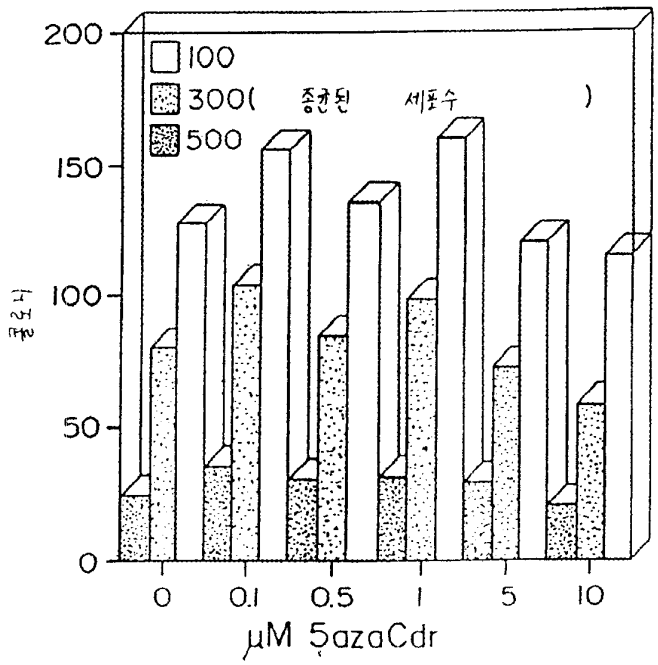
도면8b


90
80
70
60
50
40
30
% 낮은 농도 형질내 생존가능성
0
2.5
5
7.5
10
μM 5azaCdr

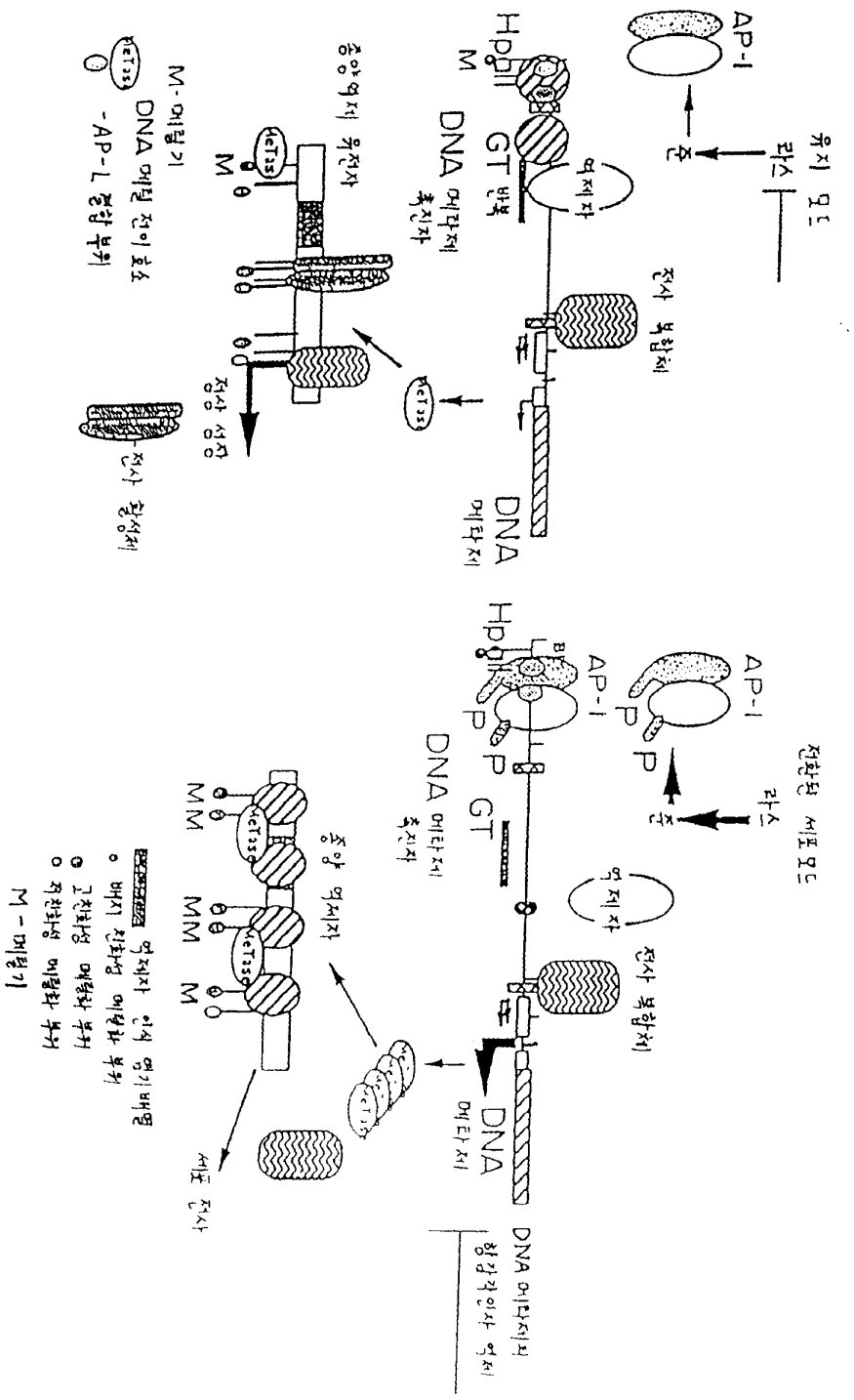
도면8c


300
250
200
150
100
50
0
한천 배지상의 콜로니 수
0
2.5
5
7.5
10
μM 5azaCdr

도면8d


200
150
100
50
0
콜로니
100
300(증착된 세포수)
500
0
0.1
0.5
1
5
10
μM 5azaCdr

도면9


AP-1
유지 모드
라스
준
Hp
M
GT
반복
역제자
DNA 메타제 촉진자
전사 복합체
DNA 메타제
중앙 역제자 유전자
M-메틸기
DNA 메틸 전이효소
-AP-1 결합 부위
전사 활성체
전환된 세포 모드
P
MM
중앙 역제자
세포 전사
DNA 메타제 항상적인사 역제
M-메틸기