



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년09월08일  
(11) 등록번호 10-2442275  
(24) 등록일자 2022년09월06일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/6851 (2018.01) C12Q 1/6886 (2018.01)  
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
C12Q 1/6851 (2018.05)  
C12Q 1/6886 (2022.01)
- (21) 출원번호 10-2021-7014022(분할)
- (22) 출원일자(국제) 2013년03월15일  
심사청구일자 2021년06월09일
- (85) 번역문제출일자 2021년05월10일
- (65) 공개번호 10-2021-0057834
- (43) 공개일자 2021년05월21일
- (62) 원출원 특허 10-2014-7031148  
원출원일자(국제) 2013년03월15일  
심사청구일자 2018년03월15일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2013/001204
- (87) 국제공개번호 WO 2013/153458  
국제공개일자 2013년10월17일
- (30) 우선권주장  
12382139.9 2012년04월09일  
유럽특허청(EPO)(EP)  
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌  
Drugs Aging, 2008, 25(11): 963-986\*  
Oncogene 24, 1434-1444 (2005)  
Mol Oncol. 4(3):174-191 (2010)  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

- (73) 특허권자  
판다시오 인스티튜트 드 르세르카 바이오메디카  
(아이알비 바르셀로나)  
스페인, 이-08028 바르셀로나, 10-12, 발디리 레  
이삭  
판다시오 프리바다 인스티튜시오 카탈라나 드 르  
세르카 아이 에스투디스 아반카츠  
스페인 이-08010 바르셀로나, 23, 파세이그 루이  
스 컴패니즈
- (72) 발명자  
아르날 안나  
스페인 이-08029 바르셀로나 1-1에이 씨/론드레스  
2 이에스씨 비  
타라고나 마리아  
스페인 이-08029 바르셀로나 1-1에이 씨/론드레스  
2 이에스씨 비  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
김진희, 김태홍

전체 청구항 수 : 총 20 항

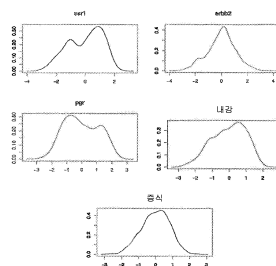
심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 암 전이의 예후 및 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 c-MAF 유전자가 일차 종양 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암(내강형 A 및 B를 포함함)에서 골 전이를 예후하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 c-MAF 유전자 발현 수준, 증폭 또는 전위를 확인하는 단계를 포함하는, 다른 장기에서 (뒷면에 계속)

대표도



의 전이에 비해 골 전이를 발생시킬 경향을 확인하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체에서 이른 골 전이를 예측하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 전이 또는 대안적으로 ER+ 유방암(내강형 A 및 B를 포함함) 전이의 치료에 사용되는 치료제로서의 c-MAF 억제제에 관한 것이다. 본 발명은 골 전이를 예측하고 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상결과를 예측하는 키트에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체를 유형분류하고 유방암을 앓고 있는 대상체를 코호트(cohort)로 분류하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

*G01N 33/57415* (2019.01)  
*G01N 33/57434* (2013.01)  
*C12Q 2600/112* (2013.01)  
*C12Q 2600/158* (2013.01)

(30) 우선권주장

61/621,949	2012년04월09일	미국(US)
61/724,807	2012년11월09일	미국(US)
61/732,175	2012년11월30일	미국(US)

(72) 발명자

**파블로빅 밀리카**

스페인 카르벳 드 마르 1-1에이 씨/룬드레스 2 이  
 에스씨 비

**플래닛 에바리스트**

스페인 이-08029 바르셀로나 1-1에이 씨/룬드레스  
 2 이에스씨 비

**고미스 로저**

스페인 이-08029 바르셀로나 1-1에이 씨/룬드레스  
 2 이에스씨 비

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

i) 골 전이성 삼중 음성 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계, 및  
ii) 단계 i)에서 취득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계

를 포함하는 골 전이성 삼중 음성 유방암을 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준은 좋지 않은 임상결과를 표시하는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, c-MAF 유전자 발현 수준의 정량이 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보적 DNA(cDNA), 또는 상기 cDNA의 단편의 정량을 포함하는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 발현 수준이 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA, RNA 어레이 또는 뉴클레오티드 혼성화 기법에 의해 정량되는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서, c-MAF 유전자 발현 수준의 정량이 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질 또는 이의 변이체의 수준의 정량을 포함하는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 5

제4항에 있어서, 단백질의 수준이 웨스턴 블롯, ELISA, 면역조직화학 또는 단백질 어레이에 의해 정량되는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 6

삼중 음성 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있거나 또는 상기 대상체의 샘플에서 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 삼중 음성 유방암을 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 c-MAF 유전자의 증폭 또는 c-MAF 유전자의 전위는 좋지 않은 임상결과를 표시하고, 좌위 16q23 또는 16q22-q24가 전위되는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 좌위 16q23 또는 16q22-q24가 좌위 14q32에서 14번 염색체로 전위되는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 삼중 음성 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 추가로 포함하고, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 c-MAF 유전자의 증폭이 골 전이를 발생시킬 증가된 위험을 표시하는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, c-MAF 유전자의 증폭 및 전위가 좌위 16q23 또는 16q22-q24의 증폭 또는 전위를 확인함으로써 확인되는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, c-MAF 유전자의 증폭 또는 전위가 c-MAF 유전자 특이적 프로브의 사용을 통해 확인되는 것인

시험관내 방법.

**청구항 11**

제6항 또는 제7항에 있어서, 기준 유전자 카피 수가 전이를 앓고 있지 않은 대상체로부터의 삼중 음성 유방암의 종양 조직 샘플에서의 유전자 카피 수인 시험관내 방법.

**청구항 12**

제6항 또는 제7항에 있어서, 증폭이 제자리 혼성화(*in situ* hybridization) 또는 PCR에 의해 확인되는 것인 시험관내 방법.

**청구항 13**

제6항 또는 제7항에 있어서, 대상체 샘플이 c-MAF 유전자에 대한 배수체(polyploid)인지를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 시험관내 방법.

**청구항 14**

a) 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 발현 수준을 c-MAF 발현의 미리 결정된 기준 수준과 비교하는 단계; 및 c) 상기 샘플에서의 c-MAF의 상기 발현 수준을 기초로 상기 대상체를 코호트(cohort)로 분류하는 단계를 포함하는, 유방암을 앓고 있는 대상체를 코호트로 분류하는 시험관내 방법.

**청구항 15**

제14항에 있어서, 상기 코호트가 상기 기준 발현 수준과 동등한 c-MAF의 발현 수준을 갖는 것으로 확인된 하나 이상의 다른 개체를 포함하는 것인 시험관내 방법.

**청구항 16**

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 샘플에서의 c-MAF의 상기 발현 수준이 상기 미리 결정된 기준 수준에 비해 증가되어 있고, 코호트의 구성원이 골 전이의 증가된 위험을 갖는 것으로서 분류되는 것인 시험관내 방법.

**청구항 17**

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 코호트가 임상시험을 수행하기 위한 것인 시험관내 방법.

**청구항 18**

제14항 또는 제15항에 있어서, 상기 유방암이 삼중 음성 유방암 또는 ER+ 유방암인 시험관내 방법.

**청구항 19**

제1항 내지 제7항, 제14항 및 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 샘플이 종양 조직 샘플인 시험관내 방법.

**청구항 20**

제1항 내지 제7항, 제14항 및 제15항 중 어느 한 항에 있어서, 골 전이가 골용해성 전이인 시험관내 방법.

**청구항 21**

삭제

**청구항 22**

삭제

**청구항 23**

삭제

- 청구항 24
- 삭제
- 청구항 25
- 삭제
- 청구항 26
- 삭제
- 청구항 27
- 삭제
- 청구항 28
- 삭제
- 청구항 29
- 삭제
- 청구항 30
- 삭제
- 청구항 31
- 삭제
- 청구항 32
- 삭제
- 청구항 33
- 삭제
- 청구항 34
- 삭제
- 청구항 35
- 삭제
- 청구항 36
- 삭제
- 청구항 37
- 삭제
- 청구항 38
- 삭제
- 청구항 39
- 삭제

- 청구항 40
- 삭제
- 청구항 41
- 삭제
- 청구항 42
- 삭제
- 청구항 43
- 삭제
- 청구항 44
- 삭제
- 청구항 45
- 삭제
- 청구항 46
- 삭제
- 청구항 47
- 삭제
- 청구항 48
- 삭제
- 청구항 49
- 삭제
- 청구항 50
- 삭제
- 청구항 51
- 삭제
- 청구항 52
- 삭제
- 청구항 53
- 삭제
- 청구항 54
- 삭제
- 청구항 55
- 삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

**발명의 설명**

**기술 분야**

- [0001] 서열목록에 대한 참조
- [0002] 본원과 함께 출원된, 전자적으로 제출된 서열목록("3190\_001PC03\_SEQIDListing\_ascii.txt", 48,269 bytes, 2013년 3월 15일 생성)의 내용은 전체적으로 본원에 참고로 도입된다.
- [0003] 발명의 분야
- [0004] 본 발명은 일차 종양 샘플에서 c-MAF 유전자, 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위의 수준을 측정하는 것을 기초로 삼중 음성(기저형(basal-like)를 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암(내강형(luminal) A 및 내강형 B를 포함함)에서 골 전이를 예측하는 것에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 맞춤형 치료를 디자인하는 방법으로서, c-MAF 유전자 발현 수준, 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 측정하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 전이 또는 ER+ 유방암 전이, 특히 골 전이의 치료에 있어서 치료제로서의 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0005] 유방암은 전세계에서 두 번째로 가장 흔한 종류의 암이고(10.4%; 폐암 다음), 암에 의한 사망의 다섯 번째로 가장 흔한 원인이다(폐암, 위암, 간암 및 결장암 다음). 유방암은 여성들 사이에서 암에 의한 사망의 가장 흔한 원인이다. 2005년, 유방암은 전세계에서 502,000명의 사망(암에 의한 사망의 7%; 모든 사망의 거의 1%)을 야기하였다. 전세계에서 유방암 사례의 수는 1970년대부터 유의하게 증가하고 있고, 이러한 현상은 주로 서방 세계에서의 현대 생활습관 때문이다.
- [0006] 유방암은 TNM 시스템에 따라 병기로 분류된다(전체적으로 본원에 참고로 도입되는 문헌(American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002) 참조). 예후는 병기 분류의 결과와 밀접하게 관련되어 있고, 병기 분류는 임상시험 및 의료행위 둘다에서 환자를 치료에 배정하는 데에도 이용된다. 병기 분류를 위한 정보는 다음과 같다:
  - [0007] • TX: 일차 종양이 평가될 수 없다. T0: 종양의 증거가 없다. Tis: 상피내 암종, 침습 없다. T1: 종양의 크기가 2 cm 이하이다. T2: 종양의 크기가 2 cm 초과 내지 5 cm 미만이다. T3: 종양의 크기가 5 cm를 초과한다. T4: 유방 또는 피부의 벽에서 성장하는 임의의 크기의 종양 또는 염증성 유방암.
  - [0008] • NX: 근처 림프절이 평가될 수 없다. N0: 암이 국부 림프절로 퍼져 있지 않다. N1: 암이 1개 내지 3개의 액와 림프절 또는 1개의 내유 림프절로 퍼져 있다. N2: 암이 4개 내지 9개의 액와 림프절 또는 다수의 내유 림프절로 퍼져 있다. N3: 하기 사항들 중 하나가 적용된다:
    - [0009] • 암이 10개 이상의 액와 림프절로 퍼져 있거나, 암이 쇄골하 림프절로 퍼져 있거나, 암이 쇄골상 림프절로 퍼져 있거나, 암이 액와 림프절에 영향을 미치고 내유 림프절로 퍼져 있거나, 암이 4개 이상의 액와 림프절에 영향을 미치고 최소량의 암이 내유 림프절 또는 또는 감시 림프절 생검에 존재한다.
    - [0010] • MX: 원거리 퍼짐(전이)의 존재가 평가될 수 없다. M0: 원거리 퍼짐이 없다. M1: 쇄골상 림프절을 포함하지 않는 원거리 장기로의 퍼짐이 발생되어 있다.
- [0011] 고형 종양 암을 갖는 환자의 대다수가 전이 후 사망한다는 사실은 종양이 전이하게 하는 분자 기작 및 세포 기작을 이해하는 것이 중요하다는 것을 의미한다. 최근 공개문헌들은 어떻게 전이가 복잡하고 아직 거의 공지되지 않은 기작에 의해 야기되는지 및 어떻게 상이한 종류의 전이성 세포가 특정 장기를 향한 친화성을 갖는지를 입증한다. 이들 조직 특이적 전이성 세포들은 그들이 특정 장기에서 콜로니화하게 하는 일련의 획득된 기능을 갖는다.
- [0012] 모든 세포들이 그들의 표면, 그들의 세포질 및 세포 핵에서 수용체를 갖는다. 일부 화학 메신저, 예컨대, 호르몬은 상기 수용체에 결합하고, 이것은 세포에서 변화를 야기한다. 유방암 세포에 영향을 미칠 수 있는 3개의 유의한 수용체들이 존재한다: 에스트로겐 수용체(ER), 프로게스테론 수용체(PR) 및 HER2/neu. 이들 수용체들 중 임의의 수용체를 갖는 세포를 명명하기 위해, 수용체가 존재하는 경우 양성 부호가 표기되고, 수용체가 존재하지 않는 경우 음성 부호가 표기된다: ER 양성(ER+), ER 음성(ER-), PR 양성(PR+), PR 음성(PR-), HER2 양성(HER2+) 및 HER2 음성(HER2-). 수용체 상태는 특정 치료제, 예를 들면, 타목시펜(tamoxifen) 또는 트라스투주맙(trastuzumab)의 사용 적합성을 결정하기 때문에 모든 유방암들에 대한 중요한 평가대상이 되었다.



- [0013] 무감독 유전자 발현 어레이 프로파일링은 고유의 하위형, 예컨대, 내강형 A, 내강형 B, HER2+/ER- 및 기저형 하위형의 확인을 통해 유방암의 불균질성에 대한 생물학적 증거를 제공하였다.
- [0014] 삼중 음성 암은 에스트로겐 수용체(ER), 프로게스테론 수용체(PR) 및 HER2에 대한 유전자들을 발현하지 않는 종양으로서 정의되어 있다. 이 하위군은 모든 종류의 유방암의 15%를 차지하고, 폐경전 아프리카 여성 및 아프리카-미국 여성에서 발생하는 유방암의 보다 높은 백분율을 차지한다. 삼중 음성 유방암은 에스트로겐 수용체 양성 유방암과 매우 상이한 재발 패턴을 갖는다: 재발 위험은 처음 3년 내지 5년 동안 훨씬 더 높지만, 그 후 급격히 떨어져 에스트로겐 수용체 양성 유방암의 재발 위험보다 상당히 더 낮다.
- [0015] 기저형 하위형(subtype)은 유전자의 ER 및 HER2 클러스터 둘다의 낮은 발현을 특징으로 하므로, 전형적으로 임상시험에서 ER 음성, RP 음성 및 HER2 음성이고, 이러한 이유로 종종 "삼중 음성" 유방암으로서 지칭된다(Breast Cancer Research 2007, 9(Suppl 1):S13). 기저형 암은 정상 유방의 "기저"/근상피 세포에서 통상적으로 발견되는 유전자(고분자량 사이토케라틴(5/6, 14 및 17), P-카드헤린, 카베올린 1 및 2, 네스틴, αB 결정성 표면 성장인자 수용체를 포함함)를 발현한다(Reis-Fiho J. et al., <http://www.uscap.org/site~/98th/pdf/companion03h03.pdf>).
- [0016] 기저형 유방암에 대한 국제적으로 승인된 정의가 없다는 점을 고려할 때, 삼중 음성 유방암과 기저형 유방암이 동의어인지에 대한 큰 혼동이 있다는 것은 놀랍지 않다. 여러 연구진들이 이들 용어들을 상호교환적으로 사용하였지만, 모든 기저형 암이 ER, PR 및 HER2를 결여하지는 않고, 모든 삼중 음성 암이 기저형 표현형을 나타내지는 않는다는 것을 인지해야 한다. 대다수의 삼중 음성 암들이 기저형 표현형을 나타낸다. 마찬가지로, "기저" 마커를 발현하는 대다수의 종양들이 삼중 음성을 나타낸다. 그러나, 기저 마커를 발현하지 않는 상당한 수의 삼중 음성 암이 존재하지만, 호르몬 수용체 또는 HER2를 발현하는 기저형 암의 상당한 하위군이 여전히 존재한다는 것을 인지해야 한다. 베투시와 그의 동료들(Bertucci et al.)(Int J Cancer. 2008 Jul 1;123(1):236-40)은 이 문제를 직접적으로 해결하였고 유전자 발현 프로파일링에 의해 분석되었을 때 모든 삼중 음성 종양들이 기저형 암으로서 분류되지는 않고(즉, 71%만이 기저형 표현형을 나타냄) 발현 어레이에 의해 분류된 모든 기저형 유방암종이 삼중 음성 표현형을 나타내지는 않는다는(즉, 77%) 것을 확인하였다.
- [0017] 유방암의 치료를 위한 핵심은 종양이 국한되어 있을 때 (타목시펜 또는 아로마타제(aromatase) 억제제를 사용한) 가능한 보조 호르몬 치료, 화학치료 및/또는 방사선치료와 함께 수술을 이용하는 것이다. 현재, 수술 후 치료(보조 치료)에 대한 제안은 패턴을 따른다. 이 패턴은 2년마다 세계 회의가 스위스 샤프탈렌에서 개최되어 전세계 다중심 연구의 실제 결과를 논의하기 때문에 변화한다. 또한, 상기 패턴은 국립 보건원(NIH)의 합의 기준에 따라서도 검토된다. 이들 기준을 기초로, 림프절에서 전이를 갖지 않는 85% 내지 90% 이상의 환자들이 체계적인 보조 치료를 제공받을 후보가 될 것이다.
- [0018] 현재, PCR 분석, 예컨대, 온코타입(Oncotype) DX 또는 마이크로어레이 분석, 예컨대, 맘마프린트(MammaPrint)는 특정 유전자의 발현을 기초로 유방암 재발의 위험을 예측할 수 있다. 2007년 2월, 맘마프린트 분석은 식약청으로부터 공식적인 허가를 달성하는 데에 있어서 첫 번째 유방암 표시자가 되었다.
- [0019] 유럽 특허출원 제1961825-A1호에는 골, 폐, 간 또는 뇌로의 유방암 전이의 발생을 예측하는 방법으로서, 대조군 샘플에서의 상응하는 발현 수준에 비해 하나 이상의 마커(c-MAF를 포함함)의 발현 수준을 종양 조직 샘플에서 측정하는 단계를 포함하는 방법이 기재되어 있다. 그러나, 이 문헌은 유방암 환자의 생존률을 결정할 수 있기 위해 여러 유전자들을 동시에 측정할 것을 요구하고, 골 전이 부재 생존가능성을 예측하기 위한 유전자 시그니처(signature)의 능력들 사이의 상관관계가 통계적으로 유의하지 않았다.
- [0020] 미국 특허출원 공보 제2011/0150979호에는 기저형 유방암의 예후를 예측하는 방법으로서, FOXC1의 수준을 검출하는 단계를 포함하는 방법이 기재되어 있다.
- [0021] 미국 특허출원 공보 제2010/0210738호는 삼중 음성 유방암을 갖는 환자에서 암을 예후하는 방법으로서, 무작위적으로 상향조절되어 있거나 하향조절되어 있는 일련의 유전자들의 발현 수준을 샘플에서 검출하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0022] 미국 특허출원 공보 제2011/0130296호는 삼중 음성 유방암의 진단 및 예후에 유용한 마커 유전자들의 확인에 관한 것이다.
- [0023] 삼중 음성 유방암을 앓고 있는 대상체가 전이를 발생시킬 확률을 예측할 수 있게 하는 신규 마커를 확인할 필요성이 존재한다.

**발명의 내용**

- [0024] 한 양태에서, 본 발명은
- [0025] i) 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암(내강형 A 및 B를 포함함)을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계, 및
- [0026] ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0027] 를 포함하는, 상기 암을 앓고 있는 대상체에서 상기 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준이 골 전이를 발생시킬 증가된 위험을 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0028] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0029] i) 골 전이성 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 골 전이성 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- [0030] ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0031] 를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준이 좋지 않은 임상결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0033] i) 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- [0034] ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0035] 를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체를 위한 맞춤형 치료를 디자인하는 시험관내 방법으로서, 이때 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합한(susceptible) 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받는다. 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하지 않다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받지 않는다.
- [0036] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암, 예를 들면, 삼중 음성 유방암 또는 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 측정하는 방법으로서, 이때 평균 값 + 1 표준 편차보다 더 높은 상기 유전자의 발현 수준이 이른(early) 골 전이의 증가된 위험을 표시하는 것인 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하거나 억제하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받는다.
- [0037] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0038] i) 골 전이를 갖는 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 골 전이 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- [0039] ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0040] 를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체를 위한 맞춤형 치료를 디자인하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 분해를 예방하기 위한 치료를 제공받기에 적합한 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받는다. c-MAF 유전자 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 분해를 예방하기 위한 치료를 제공받기에 적합하지 않다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받지 않는다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대

상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 암을 앓고 있는 대상체에서 상기 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 c-MAF 유전자의 증폭이 골 전이를 발생시킬 증가된 위험을 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하거나 억제하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받는다.

[0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암, 예를 들면, 삼중 음성 유방암 또는 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 암을 앓고 있는 대상체에서 상기 유방암의 골전이를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자의 전위가 골 전이를 발생시킬 증가된 위험을 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하거나 억제하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받는다.

[0043] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 c-MAF 유전자의 증폭이 좋지 않은 임상결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받는다. 이러한 증폭이 관찰되지 않는 경우, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 유방암을 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자(즉, t(14,16))의 전위가 좋지 않은 임상결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 c-MAF의 증폭 또는 전위를 갖는 환자를 위한 맞춤형 치료의 디자인에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 맞춤형 치료는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물이다.

[0044] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 ER+ 유방암으로부터의 골 전이를 예방하는 데에 사용되는 c-MAF 억제제에 관한 것이다.

[0045] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 전이를 치료하는 데에 사용되는 c-MAF 억제제 또는 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 제제(agent)에 관한 것이다.

[0046] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체에서 유방암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0047] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체에서 유방암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 전위를 측정하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 전위를 기준 c-MAF 샘플과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체에서 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 이러한 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 상기 키트의 사용 결과를 기초로 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받거나 투여받지 않는다.

[0048] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체에서 유방암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 증폭, 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서 c-MAF 유전자의 증폭된 수준, 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 기준물과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0049] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상결과를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상결과를 예측하기 위한 이러한 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 상기 키트의 사용 결과를 기초로 골 전이를 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받거나 투여받지 않는다.

[0050] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체를 위한 치료를 결정하는 키트로서, a) 상기 대상체의

샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단; 및 c) 정량된 발현 수준과 기준 발현 수준의 비교를 기초로 상기 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 감소시키기 위한 치료를 결정하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체를 위한 치료를 결정하기 위한 이러한 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 상기 키트의 사용 결과를 기초로 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받거나 투여받지 않는다.

[0051] 또 다른 양태에서, 본 발명은 i) 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 시약, 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계를 갖는 것으로 미리 결정되어 있는 하나 이상의 c-MAF 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체에서 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 이러한 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 상기 키트의 사용 결과를 기초로 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물을 투여받거나 투여받지 않는다.

[0052] 또 다른 양태에서, 본 발명은

[0053] a) 유방암을 앓고 있는 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;

[0054] b) 상기 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0055] c) c-MAF의 정량된 발현 수준을 c-MAF 발현의 미리 결정된 기준 수준과 비교하여 상기 샘플을 유형분류(typing)하는 단계

[0056] 를 포함하는, 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 유형분류가 상기 대상체에서 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 유형분류에 의해 제공된 예후 정보를 기초로 하나 이상의 치료제를 투여받거나 투여받지 않는다.

[0057] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암을 앓고 있는 대상체에게 골 전이를 예방하거나 감소시키는 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 이때 상기 제제가 상기 대상체에서 c-MAF의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 요법에 따라 투여되는 것인 방법에 관한 것이다.

[0058] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체를 코호트(cohort)로 분류하는 방법으로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 발현 수준을 c-MAF 발현의 미리 결정된 기준 수준과 비교하는 단계; 및 c) 상기 샘플에서의 c-MAF의 발현 수준을 기초로 상기 대상체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 특정 양태에서, 상기 코호트는 임상시험의 수행을 위해 이용된다.

**도면의 간단한 설명**

[0059] 도 1: 각각의 점수의 밀도 도표. ESR1, ERBB2, PGR, 내강, 증식.

도 2: 삼중 음성(삼중-음성) 유방암을 갖는 환자에 대한 골 전이까지의 시간 카플란-메이에르(Kaplan-Meier) 그래프(p-값=0.04). 각각의 그래프의 군은 c-MAF의 수준에 의해 정의된다. (-), (uk) 및 (+)는 하기 방식으로 c-MAF 발현 수준을 나타낸다: (-)(<평균 - SD), (uk)(≥ 평균 - SD 및 ≤ 평균 + SD) 및 (+)(> 평균 + SD). SD는 표준 편차를 표시한다.

도 3: c-MAF(mRNA)는 ER+ 유방암에서 유방암 골 전이에 대한 임상 생체마커이다.

ER+ 일차 유방암 환자(일군의 GSE2603, GSE2034 및 SE12276 데이터 세트 또는 코호트 I)에서 골(좌측), 뇌(우측 위) 및 폐(우측 아래) 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 곡선. 낮음, 중간 및 높음은 하기 방식으로 c-MAF 발현 수준을 나타낸다: 낮음(<평균 - SD), 중간(≥ 평균 - SD 및 ≤ 평균 + SD) 및 높음(> 평균 + SD). 골 전이를 갖는 환자는 뇌 및 폐 전이 분석으로부터 배제되었다.

도 4: c-MAF(단백질)는 유방암 골 전이에 대한 임상 생체마커이다.

a) 일차 유방암 조직의 대표적인 c-MAF 면역염색. 케이스(case) 1은 c-MAF 음성 종양을 나타낸다(OD<1000). 케이스 2 및 케이스 3은 MAF 양성 종양이다(각각 OD>1000 및 OD>25000).

b) 도표는 380개의 유방암 종양들로 구성된 코호트(코호트 II)에서 c-MAF 단백질 발현(OD)을 보여준다. 종양은

BC 하위형(ER+, HER2+ 및 TN)에 따라 나누어진다. 바닥에 있는 회색 막대는 골 전이를 갖는 종양을 나타낸다. OD-광학 밀도는 c-MAF 면역염색을 기초로 한 것이다.

c) 및 d) 380개의 일차 유방암 종양들(I 기, II 기 및 III 기)로 구성된 코호트에서 질환 부재 생존(c) 및 골 전이 부재 생존(d)의 카플란-메이에르 곡선. c-MAF가 높은 군(적색 선, OD>1000); c-MAF가 낮은 군(녹색 선, OD<1000).

e) 상이한 BC 하위형(ER+, HER2+ 및 TN)에서 c-MAF의 골 전이 진단 성능을 보여주는 표. CI(신뢰구간); Se - 민감성; Sp - 특이성; PPV(양성 예후 값); NPV(음성 예후 값).

도 5: 유방암 세포 골 전이에의 c-MAF 기여.

a) c-MAF(짧은 동형체 및 긴 동형체) 발현을 갖거나 갖지 않는 모 MCF7 세포를 마우스의 좌심실 내로 주입하였고, 골 콜로니화를 생체내 생체발광 이미지화로 분석하였다. 골 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 도표가 제시되어 있다. 종점에서 대표적인 골의 총 광자 유입, HandE 염색 및 CT-스캔에 반응하는 이미지가 제시되어 있다.

b) c-MAF(짧은 동형체 및 긴 동형체) 발현을 갖거나 갖지 않는 모 T47D 세포를 마우스의 좌심실 내로 주입하였고, 골 콜로니화를 생체내 생체발광 이미지화로 분석하였다. 골 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 도표가 제시되어 있다.

c) c-MAF(조합된 또는 독립적으로 짧은 동형체 및 긴 동형체)의 발현이 고갈되었거나 레스큐된(rescued) BoM2 골 전이성 MCF7 세포 유도체를 마우스의 좌심실 내로 주입하였고, 골 콜로니화를 생체내 생체발광 이미지화로 분석하였다. 골 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 도표가 제시되어 있다. 종점에서 대표적인 골의 총 광자 유입, HandE 염색 및 CT-스캔에 반응하는 이미지가 제시되어 있다.

d) c-MAF(짧은 동형체 및 긴 동형체) 발현을 갖거나 갖지 않는 모 MCF7 세포를 마우스의 꼬리 정맥을 통해 주입하였고, 폐 콜로니화를 생체내 생체발광 이미지화로 분석하였다. 폐 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 도표가 제시되어 있다. 통계적 차이를 윌콕슨 부호-순위 검정(Wilcoxon signed-rank test)으로 결정하였다.

도 6: MCF7 모 세포 및 골 전이성 유도체 BoM에서의 MAF 수준.

a) 대조군, c-MAF 짧은, c-MAF 긴 또는 c-MAF 짧은 및 긴 동형체 발현 구축물로 형질감염된 모 세포(좌측) 및 BoM2 대조군, shMAF 또는 레스큐 BoM2 세포(우측)에서의 MAF 발현 수준. 택만(TaqMan) 프로브를 사용하여 MAF 긴 동형체 발현 수준을 측정하고 BoM2 수준으로 표준화하였다. 표시된 프라이머를 사용한 사이버 그린(Syber Green) 반응을 이용하여 MAF 짧은 동형체 내생 수준을 측정하고 베타 액틴 수준으로 표준화하였다. 이소적으로 발현된 c-MAF 짧은 동형체의 존재를 PCR 반응을 이용하여 검출하였다.

b) 모 대조군, MAF 짧은 동형체 및 MAF 긴 동형체 (동시) 과다발현 세포, 및 BoM2 대조군, shMAF 또는 레스큐 BoM2 세포에서의 c-MAF 단백질 수준을 보여주는 WB. α-튜블린을 적재 대조군으로서 사용하였다.

c) a) 및 b)에 기재된 바와 같은 MCF7, BoM2 및 MAF-고갈된 BoM2 사이의 직접적인 c-MAF mRNA 및 단백질 발현 비교.

d) 대조군, c-MAF 짧은 동형체, c-MAF 긴 동형체 또는 c-MAF 짧은 및 긴 동형체 발현 벡터로 일시적으로 형질감염된 모 세포에서 C-MARE(c-MAF 반응 요소) 레포터 플라스미드의 레닐라(Renilla) 활성. C-MARE 프로모터의 활성은 대조군 조건으로 표준화되어 임의 유닛으로 제시되어 있다. 데이터는 3회 독립적인 실험의 평균(표준 편차를 가짐)이다.

도 7: MAF는 실험 유방암 전이 마우스 모델에서 골 전이를 유도한다.

(좌측) 골 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 곡선. 모 대조군, c-MAF 짧은 동형체 및 c-MAF 긴 동형체 과다발현 세포를 좌심실 내로 주입하였고, 전이를 생체발광으로 확인하였다. (우측) 각각의 군에 대한 골 전이의 마우스 뒷다리의 대표적인 CT-스캔 및 H&E 염색과 함께 0일째 날 및 종점인 54일째 날에서의 대표적인 생체발광 이미지가 제시되어 있다. 축적 막대: 100 μm. 골용해 영역-황색 채선. (우측) 생체의 뒷다리의 총 광자 유입을 종점인 54일째 날에 측정하여 0일째 날 값으로 표준화하였다. 대조군으로 형질감염된 모 세포를 동시에(좌측) 또는 따로(우측) c-MAF 짧은 동형체 발현 벡터 및 c-MAF 긴 동형체 발현 벡터 둘다로 감염된 모 세포와 비교함으로써 P 값을 계산하였다.

도 8: c-MAF는 골로의 유방암 전이의 원인 매개자이다.

골 전이 발생의 생체발광 이미지화 도표가 제시되어 있다. 값은 0일째 날의 값으로 표준화되어 있다. 대조군, shMAF 또는 레스큐 BoM2 세포는 누드 마우스의 좌심실 내로 주입하였다.

골 전이를 재발시킨 동물만을 포함시켜 통계자료를 계산하였다.

도 9: c-MAF는 유방암 골 전이 병변에서 파골세포 분화를 유발한다.

a) (발광에 의해 측정된) 골 병변의 총 수 당 (X-선에 의해 측정된) 골용해성 병변의 백분율. 모 대조군, c-MAF 짧은 동형체, c-MAF 긴 동형체 및 c-MAF 짧은 및 긴 동형체 발현 모 세포 및 BoM 골 전이성 MCF7 세포 유도체를 마우스의 좌심실 내로 주입하였고, 골 콜로니화를 생체내 생체발광 이미지화로 분석하였다.

b) MCF7 모 세포 또는 상기 c-MAF 동형체들(짧은 - 짧은 동형체 및 긴 - 긴 동형체) 중 임의의 동형체를 과다발현하는 세포로부터 유래된 컨디셔닝된 배지를 사용하여 마우스 골수 유래의 전구체 세포로부터의 파골세포 분화를 분석하였다. 파골세포의 수를 TRAP 기법으로 측정하였다(>3 다핵 세포).

c) 및 d) 모 대조군, c-MAF 짧은 동형체, c-MAF 긴 동형체 및 c-MAF 짧은 및 긴 동형체 발현 모 세포 및 BoM2 골 전이성 MCF7 세포 유도체를 심장내로 주입받은 마우스로부터의 대표적인 골 전이성 병변의 TRAP 염색. 골 종양 계면을 따라 TRAP 양성 파골세포(자주색)의 수를 4마리의 독립적인 마우스들로부터 4개 이상의 상이한 시야에서 세어 SD 값으로 작도하였다. 축적 막대: 50  $\mu$ m. 군들 사이의 통계적 차이를 양방 윌콕슨 검정으로 평가하였다.

도 10: c-MAF는 유방암 증식을 뒷받침하지 않는다.

피하 주사의 개략도. (상부) 모 대조군, 또는 c-MAF 짧은 동형체 및 c-MAF 긴 동형체 (동시) 과다발현 세포로부터의 피하 종양의 성장 곡선. 값은 표준 편차를 갖는 평균을 나타낸다. (하부) 대조군, 또는 c-MAF 짧은 동형체 및 c-MAF 긴 동형체 (동시) 과다발현 세포로부터의 피하 종양에서 Ki67 양성 세포의 백분율. 각각의 종양에 대한 최소 10개의 무작위 시야에서 Ki67 양성 세포의 수를 세었다. 값은 표준 편차를 갖는 평균이다(n=4).

도 11: c-MAF의 PTHLH 다운스트림은 유방암 골 전이에 기여하고 유방암 골 전이를 매개한다.

a) B2M 발현 수준으로 표준화된, 모 대조군, c-MAF 짧은 동형체, c-MAF 긴 동형체 및 c-MAF 짧은 및 긴 동형체 발현 모 세포, 및 BoM2 골 전이성 MCF7 세포 유도체에서의 PTHLH 상대적 발현 수준. \* p-값 < 0.05.

b) GSE14020 데이터 세트로부터 인간 유방암 전이에서 PTHLH의 표준화된 발현과 대비하여 MAF의 표준화된 발현을 보여주는 점도표. 적색 점은 골 전이를 보여주는 반면, 흑색 점은 다른 연조직 전이를 보여준다. 점선은 전이 샘플에서 평균 MAF 또는 PTHLH 발현을 보여준다.

c) 50:50 파골세포 분화 및 컨디셔닝된 배지(CM) 모 대조군, c-MAF 짧은 및 긴 동형체 발현 모 세포 및 BoM2 골 전이성 MCF7 세포 유도체, 또는 CM 없이 인간 PTHLH 길항제 펩티드(7-34)(5  $\mu$ g/ml)로 처리된 골수 세포. 파골세포의 수를 TRAP 기법으로 측정하고(파골세포는 >3 다핵 세포이고, 백색 화살표로 강조되어 있음) 대조군으로 표준화하였다.

d) 루시페라제 유전자로 표지된 모 대조군, c-MAF 짧은 및 긴 동형체 발현 모 세포를 마우스의 좌심실 내로 주입하였고, 골 콜로니화를 생체내 생체발광 이미지화로 분석하였다. c-MAF 짧은 및 긴 동형체 발현 모 세포를 주입받은 마우스를 실험 과정 동안 1일 당 2회 복강내로 접종된(6  $\mu$ g/동물) PTHLH 길항제 펩티드(7-34)로 치료하였거나 치료하지 않았다. 도표는 병변 당 전이성 세포의 수를 반영하는, 실험 중점에서의 생체의 총 광자 유입을 나타낸다(좌측 패널). 골용해성 골 전이 병변이 도시되어 있다(우측 패널).

e) 군 당 대표적인 골용해성 병변의 X-선(CT-스캔) 이미지. 골 종양 계면을 따라 TRAP 양성 파골세포(흑색, 백색 화살표로 강조되어 있음)가 상이한 군에 대해 도시되어 있다. 병변으로부터 골 종양 계면을 따라 TRAP 양성 파골세포(흑색)의 수를 각각의 독립적인 마우스로부터 4개 이상의 상이한 시야에서 세어 SD 값으로 작도하였다. 축적 막대: 50  $\mu$ m. 군들 사이의 통계적 차이를 양방 윌콕슨 검정으로 평가하였다.

도 12: 4차 스플라인(spline)을 갖는 Cox 회귀 모델을 통한 c-MAF 발현과 골 전이 위험 비 사이의 관계의 평가 (팩키지 페노테스트(phenoTest)에서 스무쓰콕스프(smoothCoxph) 함수). 도표는 표시된 군에 상응한다: c-MAF 발현 수준이 평균(0으로 표시됨)보다 더 높은 종양에서 골 전이를 예측하는 c-MAF 성능의 HR 비 및 p-값(일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276 데이터 세트, 코호트 I). 발현 수준에서 1은 이하에서 1 표준 편차를 표시한다.

도 13: c-MAF 발현 및 골 전이 위험의 측정. 본 발명자들은 c-MAF의 용량이 높을수록 골 재발의 위험이 높다는

것이 얼마나 확장되는지를 검증 코호트 II에서 분석하였다. 본 발명자들은 전술된 바와 같이(도 4의 a 및 b) 전산화된 시스템을 이용하여 염색의 광학 밀도를 측정함으로써 면역조직화학(IHC)으로 c-MAF 발현을 정량하였다. 2종의 c-MAF 양성 유방암 종양들을 기초로, 본 발명자들은 이들이 이원(bimodal) 거동을 갖기 때문에(좌측 패널) 이들을 2개의 군으로 분리할 수 있다. 이 2개의 카테고리를 기초로, 본 발명자들은 c-MAF의 염색이 높을 수록 골 전이의 위험이 높고(HR(골 전이)=19.45; p-값<0.001) 골 전이가 보다 빨리 일어난다(우측 패널)는 관찰 결과를 검증하였다.

도 14: 상이한 시점에서 c-MAF 및 골 전이의 독립성을 검증하기 위한 피셔 정확성 검정의 결과를 보여주는 그래프(일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276 데이터 세트, 코호트 I). 분할 표의 비율 및 피셔 검정 p-값이 각각의 패널에 표시되어 있다.

도 15: c-MAF 과다발현은 카피 수 변경 때문에 일어날 수 있다.

a) 유전자 발현에 기초한 카피 수 변경의 분석(ACE 알고리즘). 음영 영역은 ER+ 유방암 종양에서 재발과 유의하게 관련된 DNA 게놈 증폭을 보여준다(일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276 데이터 세트, 코호트 I).

b) MAF 유전자 카피(16q23)와 IGH(14q32) 유전자 카피 사이의 비에 기초한 MAF 유전자 증폭을 갖는 모 세포 및 BoM2 골 전이성 세포의 백분율을 보여주는 패널. FISH 염색된 모 세포 및 BoM2 세포의 대표적인 이미지.

c) 염색체 16의 경우, 흑색 점 및 회색 수평선은 각각 표준화된 log2 강도 비 및 선분을 나타낸다. BoM2를 MCF7 모 세포와 비교한다. 도표 아래에서 16q22-24 DNA 게놈 증폭이 회색으로 강조되어 있다.

도 16: 16q22-24 게놈 DNA 영역의 증폭은 유방암 골 전이와 관련되어 있다.

a) 및 b) I 기, II 기 및 III 기 BC 인간 일차 종양 세트(n=334)(코호트 II)에서 (a) 골 전이 부재 또는 (b) 전체 생존의 카플란-메이에르 곡선. 종양 당 3개의 코어를 사용하여, 세포 당 평균 2.5 16q23 카피의 컷-오프를 기초로 환자들을 16q23 FISH 음성 군과 16q23 FISH 양성 군으로 나누었다. Se - 민감성; Sp - 특이성; HR - 위험 비.

c) I 기, II 기 및 III 기 BC 인간 일차 종양 세트(각각 n=250 및 n=43)(코호트 II)에서 ER 양성(좌측) 또는 삼중 음성(우측) 환자에 대한 골 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 곡선. 종양 당 3개의 코어를 사용하여, 세포 당 평균 2.5 16q23 카피의 컷-오프를 기초로 환자들을 16q23 FISH 음성 군과 16q23 FISH 양성 군으로 나누었다. HR - 위험 비.

d) 및 e) 전체(d) 및 ER+ 유방암(e)에서 16q23 증폭의 진단 성능에 대한 수신자 조작 특성(ROC) 곡선. ROC 곡선에서 진짜 양성률(민감성)은 상이한 컷-오프 점들에 대한 거짓 양성률(100-특이성)의 함수로 작도되어 있다. ROC 곡선 상의 각각의 점은 특정 결정 역치에 상응하는 민감성/특이성 쌍을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0060] 일반적인 용어 및 표현의 정의
- [0061] 본원에서 사용된 바와 같이, "골 분해를 피하거나 예방하는 제제"는 조골세포 증식을 자극하거나, 파골세포 증식을 억제하거나 골 구조를 고정함으로써 골 분해를 예방하거나, 억제하거나, 치료하거나, 감소시키거나 중지시킬 수 있는 임의의 분자를 지칭한다.
- [0062] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자의 증폭"은 유전자 또는 유전자 단편의 다양한 카피가 개별 세포 또는 세포주에서 형성되는 과정을 지칭한다. 유전자의 카피가 동일한 염색체에 위치할 필요는 없다. 증폭된 영역은 종종 "암플리콘"으로서 지칭된다. 통상적으로, 생성된 mRNA의 양, 즉 유전자 발현 수준도 특정 유전자의 카피 수에 비례하여 증가한다.
- [0063] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "기저형", "기저형 하위형", "기저형 하위형의 유방암" 등은 2개의 음성 수용체 ER 및 HER2, 및 CK5/6, CK14, CK17 및 EGFR로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 양성 수용체를 특징으로 하는 특정 하위형의 유방암을 지칭한다. 따라서, 삼중 음성 유방암(ER, HER-2, PgR)을 언급하고 지칭하는 본원의 모든 문장들은 ER 및 HER2가 음성이고 CK5/6, CK14, CK17 및 EGFR 중 하나 이상이 양성인 기저형 유방암도 언급하고 지칭할 수 있다. 대안적으로, "기저형"은 하기 10개의 유전자들의 상향조절 및/또는 하향조절에 기초한 유전자 발현 프로파일을 특징으로 하는 유방암도 지칭한다: (1) 포크헤드 박스(Forkhead box) CI(FOXC 1); (2) 흑색종 억제 활성(MIA); (3) NDC80 상동체, 키네토크어(kinetochore) 복합체 성분(KNTC2); (4) 센트로솜(Centrosomal) 단백질 55 kDa(CEP55); (5) 아닐린(Anillin), 액틴 결합 단백질(ANLN); (6) 모계 배아 류신 지

퍼 키나제(kinase)(MELK); (7) G 단백질-커플링된 수용체 160(GPR160); (8) 경막 단백질 45B(TMEM45B); (9) 에스트로젠 수용체 1(ESR1); (10) 포크헤드 박스 A1(FOXA1). 유방암 종양을 기저형 하위형으로서 분류하는 데에 이용되는 유전자 발현 프로파일이 에스트로젠 수용체, 프로게스테론 수용체 또는 Her2를 포함하지 않기 때문에, 삼중 음성 유방암 및 비-삼중 음성 유방암 둘다가 기저형 하위형으로서 분류될 수 있다.

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이, "삼중 음성 유방암"은 (바람직하게는, ER 및 PR의 발현 측정이 문헌(M. Elizabeth H et al., Journal of Clinical Oncology, 28(16): 2784-2795, 2010)에 개시된 방법에 의해 수행될 때) ER 및 PR 둘다의 검출가능한 발현의 부재를 특징으로 하는 유방암을 지칭하고, 종양 세포는 통상적으로 세포 표면에 위치하는 수용체인 표피 성장인자 수용체 2형(HER2 또는 ErbB2)에 대해 증폭되지 않는다. 표준 면역조직화학적 기법을 이용할 때 종양 세포 핵의 5% 미만이 ER 및 PR 발현에 대해 염색되는 경우 종양 세포는 ER 및 PR의 발현에 대한 음성 세포로서 간주된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 종양 세포는 다중클론 항-HER2 일차 항체를 사용하는 반-정량 면역조직화학적 분석인 헤르셉테스트(Herceptest)<sup>TM</sup> 키트(코드 K5204, 다크 노스 아메리카 인코포레이티드(Dako North America, Inc.), 미국 캘리포니아주 카핀테리아 소재)로 시험되었을 때 0, 1+ 또는 2+의 시험 결과 점수를 제공하는 경우 또는 HER2 FISH 음성을 나타내는 경우 HER2 과다발현에 대한 음성 세포로서 간주된다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같이, "c-MAF 유전자"(MAF 또는 MGC71685로서도 공지되어 있는 v-maf 근건막층(musculoaponeurotic) 섬유육종 발암유전자 상동체(조류))는 동종이량체 또는 이종이량체처럼 작용하는 티신 지퍼를 함유하는 전사 인자이다. DNA 결합 부위에 따라, 코딩된 단백질은 전사 활성화제 또는 억제제일 수 있다. c-MAF를 코딩하는 DNA 서열은 등록번호 NG\_016440(서열번호 1(개놈)) 하에 NCBI 데이터베이스에 기재되어 있다. c-MAF의 코딩 서열은 서열번호 13에 기재되어 있다. 본 발명의 방법은 코딩 서열 또는 개놈 DNA 서열을 사용할 수 있다. 2개의 메신저 RNA가 상기 DNA 서열로부터 전사되고, 이들 각각은 2개의 c-MAF 단백질 동형체인  $\alpha$  동형체 및  $\beta$  동형체 중 하나를 발생시킬 것이다. 상기 동형체들 각각에 대한 상보적 DNA 서열들은 각각 등록번호 NM\_005360.4(서열번호 2) 및 NM\_001031804.2(서열번호 3) 하에 NCBI 데이터베이스에 기재되어 있다.

[0066] 본원에서 사용된 바와 같이, "c-MAF 억제제"는 c-MAF 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(c-MAF 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 c-MAF 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 c-MAF 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 c-MAF 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. c-MAF 유전자 발현 억제제는 예컨대, 국제 특허출원 공보 제W02005/046731호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 제시된 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-MAF의 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법; 예컨대, 국제 특허출원 공보 제W02008098351호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응 영역(MARE 또는 c-MAF 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에 레포터 유전자의 전사 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법; 또는 예컨대, 미국 특허출원 공보 제2009048117A호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 NFATc2 및 c-MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신(ionomycin)을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 조절 하에 레포터 유전자의 발현을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법을 이용함으로써 확인될 수 있다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같이, 라파마이신(rapamycin)의 포유동물 표적(mTOR) 또는 "mTor"은 EC 2.7.11.1에 상응하는 단백질을 지칭한다. mTor 효소는 세린/쓰레오닌 단백질 키나제이고, 세포 증식, 세포 이동성, 세포 성장, 세포 생존 및 전사를 조절한다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같이, "mTor 억제제"는 mTor 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(mTor 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 mTor 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 mTor 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 mTor 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭하고, 2개 이상의 표적을 갖고 이들 중 mTor 단백질 활성을 갖는 억제제를 포함한다.

[0069] 본원에서 사용된 바와 같이, "Src"는 EC 2.7.10.2에 상응하는 단백질을 지칭한다. Src는 비-수용체 티로신 키나제 및 원발암유전자이다. Src는 세포 성장 및 배아 발생에 있어서 역할을 수행할 수 있다.

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이, "Src 억제제"는 Src 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(Src 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 Src 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 Src 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 Src 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다.



- [0071] 본원에서 사용된 바와 같이, "프로스타글란딘-엔도퍼록사이드 합성효소 2", "사이클로옥시게나제(cyclooxygenase)-2" 또는 "COX-2"는 EC 1.14.99.1에 상응하는 단백질을 지칭한다. COX-2는 아라키돈산을 프로스타글란딘 엔도퍼록사이드 H2로 전환시키는 것을 담당한다.
- [0072] 본원에서 사용된 바와 같이, "COX-2 억제제"는 COX-2 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(COX-2 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 COX-2 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 COX-2 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 COX-2 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다.
- [0073] 본원에서 사용된 바와 같이, "결과" 또는 "임상결과"는 발생한 질환 및/또는 질환 진행 과정을 지칭하고 예를 들면, 재발, 재발까지의 시간, 전이, 전이까지의 시간, 전이의 수, 전이 부위의 수 및/또는 질환으로 인한 사망을 특징으로 할 수 있다. 예를 들면, 좋은 임상결과는 치유, 재발의 예방, 전이의 예방 및/또는 고정된 시간 이내의 (재발 없는) 생존을 포함하고, 좋지 않은 임상결과는 질환 진행, 전이 및/또는 고정된 시간 이내의 사망을 포함한다.
- [0074] 본원에서 사용된 바와 같이, "ER+ 유방암"은 에스트로겐 수용체(ER)를 발현하는 종양 세포를 갖는 유방암으로서 이해된다. 이것은 상기 종양이 에스트로겐에 민감하게 만드는데, 이는 에스트로겐으로 인해 양성 유방 종양이 성장한다는 것을 의미한다. 대조적으로, "ER- 유방암"은 에스트로겐 수용체(ER)를 발현하지 않는 종양 세포를 갖는 유방암으로서 이해된다. ER+ 유방암들 중에는 내강형 A 하위형 및 B 하위형이 포함된다.
- [0075] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 유전자의 "발현 수준"은 대상체의 샘플에서 유전자에 의해 생성된 유전자 생성물의 측정가능한 양을 지칭하는데, 이때 유전자 생성물은 전사 생성물 또는 번역 생성물일 수 있다. 따라서, 발현 수준은 핵산 유전자 생성물, 예컨대, mRNA 또는 cDNA, 또는 폴리펩티드 유전자 생성물에 관한 것일 수 있다. 발현 수준은 대상체의 샘플 및/또는 기준 샘플 또는 샘플들로부터 유도되고, 예를 들면, 새로(de novo) 검출될 수 있거나 이전 측정에 상응할 수 있다. 발현 수준은 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이 예를 들면, 마이크로어레이 방법, PCR 방법(예컨대, qPCR), 및/또는 항체-기초 방법을 이용함으로써 결정될 수 있거나 측정될 수 있다.
- [0076] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 카피 수"는 세포에서 핵산 분자의 카피 수를 지칭한다. 유전자 카피 수는 세포의 게놈(염색체) DNA에서의 유전자 카피 수를 포함한다. 정상 세포(비-종양 세포)에서 유전자 카피 수는 정상적으로 2 카피(염색체 쌍의 각각의 구성원에서 1 카피)이다. 유전자 카피 수는 종종 세포 집단의 샘플로부터 수득된 유전자 카피 수의 절반을 포함한다.
- [0077] "증가된 발현 수준"은 c-MAF 유전자의 수준을 지칭할 때 기준 샘플 또는 대조군 샘플에서의 발현 수준보다 더 높은 발현 수준으로서 이해된다. 이 증가된 수준은 유전자, 또는 16q23 또는 16q22-24 염색체 좌위 증폭 또는 전위에 의해 야기될 수 있으나 다른 기작을 배제하지 않는다. 구체적으로, 샘플은 환자로부터 단리된 샘플에서의 발현 수준이 기준 또는 대조군에 비해 적어도 약 1.1배, 1.5배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 심지어 더 높은 배수일 때 높은 c-MAF 발현 수준을 갖는 것으로 간주될 수 있다.
- [0078] 본원에서 사용된 바와 같이, "프로브"는 관심있는 특정 핵산 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 프로브는 전위가 일어나는 것으로 공지되어 있는 염색체의 영역에 대한 특이성을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로브는 특이적 표지 또는 태그를 갖는다. 일부 실시양태에서, 태그는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브는 그의 표지 부착이 백금과 핵산 및 단백질의 안정한 배위결합에 기초한 DNA 제자리 혼성화(*in situ* hybridization) 프로브이다. 일부 실시양태에서, 프로브는 전체적으로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 제12/067532호 및 제12/181,399호에 기재되어 있거나 문헌(Swennenhuis et al. "Construction of repeat-free fluorescence in situ hybridization probes" Nucleic Acids Research 40(3):e20 (2012))에 기재되어 있다.
- [0079] 본원에서 사용된 바와 같이, "태그" 또는 "표지"는 프로브, 또는 프로브가 부착되는 위치가 가시화되거나, 표시되거나 다른 방식으로 포착되게 하는, 프로브와 직접적으로 또는 간접적으로 관련되어 있는 임의의 물리적 분자를 지칭한다.
- [0080] 본원에서 사용된 바와 같이, "전위(translocation)"는 동등하지 않은 또는 동등한 양의 염색체 물질이 염색체들 사이에 교환되는 것을 지칭한다. 일부 경우, 전위는 동일한 염색체 상에서 일어난다. 일부 경우, 전위는 상이한 염색체들 사이에서 일어난다. 전위는 유방암 및 백혈병을 비롯한 많은 종류의 암들에서 높은 빈도로 일어난다. 전위는 일차 상호간 전위 또는 보다 복잡한 이차 전위일 수 있다. 많은 암들에서 개시 사건을 구성하는 것으로

생각되는 면역글로불린 중쇄(IgH) 좌위를 수반하는 여러 일차 전위가 존재한다(Eychene, A., Rocques, N., and Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693).

- [0081] 본원에서 사용된 바와 같이, "배수체(polyploid)" 또는 "배수성(polyploidy)"은 세포가 2 카피 초과에 관심있는 유전자를 함유한다는 것을 표시한다. 일부 경우, 관심있는 유전자는 MAF이다. 일부 실시양태에서, 배수성은 관심있는 유전자의 발현의 축적과 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 배수성은 게놈 불안정성과 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 게놈 불안정성은 염색체 전위를 초래할 수 있다.
- [0082] 본원에서 사용된 바와 같이, "전체 게놈 서열결정"은 유기체의 전체 게놈이 한번에 서열결정되는 과정이다. 예를 들면, 문헌(Ng., P.C. and Kirkness, E.F., Whole Genome Sequencing. 2010. Methods in Molecular Biology. 628: 215-226)을 참조한다.
- [0083] 본원에서 사용된 바와 같이, "엑솜(exome) 서열결정"은 유기체의 DNA의 전체 코딩 영역이 서열결정되는 과정이다. 엑솜 서열결정에서, mRNA가 서열결정된다. 게놈의 비-번역된 영역은 엑솜 서열결정에 포함되지 않는다. 예를 들면, 문헌(Choi, M. et al., Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. 2009. PNAS. 106(45): 19096-19101)을 참조한다.
- [0084] 본원에서 사용된 바와 같이, "전이"는 암이 시작된 장기로부터 상이한 장기로 증식되는 것으로서 이해된다. 이것은 일반적으로 혈액 또는 림프 시스템을 통해 일어난다. 암세포가 퍼져 새로운 종양을 형성하는 경우, 상기 새로운 종양은 이차 또는 전이 종양으로서 지칭된다. 이차 종양을 형성하는 암세포는 원래의 종양의 암세포와 유사하다. 예를 들면, 유방암이 폐로 퍼지는(전이되는) 경우, 이차 종양은 악성 유방암 세포로부터 형성된다. 폐에서의 질환은 전이성 유방암이고 폐암이 아니다. 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 전이는 골로 퍼지는(전이되는) 삼중 음성 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암(내강형 A 및 B를 포함함)이다.
- [0085] 본원에서 사용된 바와 같이, "예측"은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체가 원거리 장기로의 전이를 발생시킬 확률의 측정을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "좋은 예후"는 대상체가 지정된 시간 이내에 생존하고/하거나 재발 또는 원거리 전이를 갖지 않거나 가질 위험이 낮을 것으로 예상(예를 들면, 예측)된다는 것을 표시한다. 용어 "낮은"은 상대적인 용어이고, 본원과 관련하여 임상결과(재발, 원거리 전이 등) 면에서 "낮은" 발현 군의 위험을 지칭한다. "낮은" 위험은 불균질한 암 환자 집단에 대한 평균 위험보다 더 낮은 위험으로서 간주될 수 있다. 문헌(Paik et al. (2004))의 연구에서 재발의 전체 "낮은" 위험은 15%보다 더 낮은 위험으로서 간주되었다. 또한, 위험은 시간의 함수로 변화할 것이다. 시간은 예를 들면, 암의 초기 진단 후 또는 예후 후 5년, 10년, 15년 또는 심지어 20년일 수 있다.
- [0086] 본원에서 사용된 바와 같이, " 좋지 않은(poor) 예후"는 대상체가 지정된 시간 이내에 생존하지 않고/않거나 재발 또는 원거리 전이를 갖거나 가질 위험이 높을 것으로 예상, 예를 들면, 예측된다는 것을 표시한다. 용어 "높은"은 상대적 용어이고, 본원과 관련하여 임상결과(재발, 원거리 전이 등) 면에서 "높은" 발현 군의 위험을 지칭한다. "높은" 위험은 불균질한 암 환자 집단에 대한 평균 위험보다 더 높은 위험으로서 간주될 수 있다. 문헌(Paik et al. (2004))의 연구에서 재발의 전체 "높은" 위험은 15%보다 더 높은 위험으로서 간주되었다. 또한, 위험은 시간의 함수로 변화할 것이다. 시간은 예를 들면, 암의 초기 진단 후 또는 예후 후 5년, 10년, 15년 또는 심지어 20년일 수 있다.
- [0087] 본원에서 사용된 바와 같이, "기준 값"은 환자 또는 환자로부터 채취된 샘플의 실험실 검사에 의해 획득된 값/데이터에 대한 기준으로서 사용된 실험실 값을 지칭한다. 기준 값 또는 기준 수준은 절대 값; 상대 값; 상한 및/또는 하한을 갖는 값; 값의 범위; 평균 값; 중간 값; 중앙 값; 또는 특정 대조군 또는 기준 값과 비교된 값일 수 있다. 기준 값은 초기 시점에서의 개별 샘플 값, 예컨대, 시험되는 대상체의 샘플로부터 획득된 값에 기초할 수 있다. 기준 값은 다수의 샘플들, 예컨대, 역연령이 일치된 군의 대상체 집단의 샘플, 또는 시험될 샘플을 포함하거나 배제하는 샘플의 풀(pool)에 기초할 수 있다.
- [0088] 본원에서 사용된 바와 같이, "대상체" 또는 "환자"는 포유동물로서 분류된 모든 동물들을 지칭하고, 가축 및 농장 동물, 영장류 및 인간, 예를 들면, 인간, 비-인간 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 바람직하게는, 대상체는 임의의 연령 또는 인종의 인간 남성 또는 여성이다.
- [0089] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료"는 본원에 기재된 임상 병태에 대한 감수성을 종결시키거나, 예방하거나, 호전시키거나 감소시키는 것을 목적으로 하는 임의의 종류의 치료를 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 용어 치료는 본원에 정의된 장애 또는 병태의 예방적 치료(즉, 임상 병태에 대한 감수성을 감소시키는 치료)를 지

칭한다. 따라서, "치료", "치료하는" 및 이들의 등가 용어는 인간을 포함하는 포유동물에서 병리학적 상태 또는 장애의 임의의 치료를 포함하는, 원하는 약리학적 또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 지칭한다. 상기 효과는 장애 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 관점에서 예방 효과일 수 있고/있거나, 장애 및/또는 장애에 기인하는 불리한 효과를 부분적으로 또는 완전히 치유한다는 관점에서 치료 효과일 수 있다. 즉, "치료"는 (1) 대상체에서 장애가 발생하거나 재발하는 것을 예방하는 것, (2) 장애를 억제하는 것, 예컨대, 그의 발생을 정지시키는 것, (3) 숙주가 장애 또는 그의 증상을 더 이상 앓지 않도록 장애 또는 적어도 그와 관련된 증상을 중지시키거나 종결하는 것, 예컨대, 상실된, 손실된 또는 결함 기능을 복구시키거나 회복시킴으로써, 또는 불충분한 과정을 자극함으로써 장애 또는 그의 증상의 관해를 야기하는 것, 또는 (4) 장애 또는 그와 관련된 증상을 경감시키거나, 완화하거나 또는 호전시키는 것(이때, 호전은 넓은 의미에서 적어도 파라미터, 예컨대, 염증, 통증 또는 면역 결핍의 크기의 감소를 지칭하기 위해 사용됨)을 포함한다.

- [0090] 본원에서 사용된 바와 같이, "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 분리된 생물학적 물질을 의미한다. 생물학적 샘플은 c-MAF 유전자의 발현 수준을 측정하기에 적합한 임의의 생물학적 물질을 함유할 수 있다. 상기 샘플은 임의의 적합한 생물학적 조직 또는 체액, 예를 들면, 종양 조직, 혈액, 혈액 혈장, 혈청, 소변 또는 뇌척수액(CSF)으로부터 분리될 수 있다.
- [0091] "종양 조직 샘플"은 일차 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 종양 또는 대안적으로 ER+ 유방암 종양으로부터 유래된 조직 샘플로서 이해된다. 상기 샘플은 통상의 방법, 예를 들면, 관련된 의학 기법에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있는 방법을 이용하는 생검에 의해 수득될 수 있다.
- [0092] "골용해성 골 전이"는 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파골세포 활성의 자극으로부터 비롯된 전이의 근처에서 발생되고 심한 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 일종을 지칭한다.
- [0093] c-MAF의 발현 수준에 기초한 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 ER+ 유방암의 골 전이를 예측하는 방법
- [0094] 놀랍게도, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암의 샘플 및 ER+ 유방암의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준이 골 전이를 앓을 위험과 상관관계를 갖는다는 것을 발견하였다. 더욱이, 삼중 음성(기저형을 포함함) 일차 종양 및 ER+ 일차 종양에서 c-MAF의 유전자 발현이 골 전이 재발과 유의한 상관관계를 가졌고 골 전이 부재 생존 및 생존과 역의 상관관계를 가졌다. 나아가, c-MAF 발현 수준이 용량 의존적 방식으로 골 전이를 예측한다는 것을 발견하였다.
- [0095] 제1 양태에서, 본 발명은
- [0096] i) 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계, 및
- [0097] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0098] 를 포함하는, 상기 앓고 있는 대상체에서 상기 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제1 방법)으로서, 이때 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준이 골 전이를 발생시킬 증가된 위험을 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0099] 본 발명의 방법은 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 측정하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0100] 생검 샘플을 수득하는 방법은 종양을 큰 조각으로 분할하는 것, 또는 미세절개, 또는 당분야에서 공지되어 있는 다른 세포 분리 방법을 포함한다. 종양 세포는 작은 게이지 바늘을 이용한 흡입을 통해 세포학적 방법에 의해 수득될 수도 있다. 샘플 보존 및 취급을 단순화하기 위해, 샘플을 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 담글 수 있거나, 신속한 동결을 허용하는 고도 극저온 매질에 침지시킴으로써 먼저 동결시킨 후 조직 동결 매질, 예컨대, OCT 화합물에 담글 수 있다.
- [0101] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제1 방법은 단일 마커로서 c-MAF 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.
- [0102] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준을 측정함으로써 정량될 수 있을 뿐만 아니라, 상기 유전자를 함유하는 게놈 영역 카피 또는 전위의 수를 측정함으로써 정량될 수도 있다.

- [0103] 이를 목적으로, 생물학적 샘플은 조직 또는 세포 구조를 물리적으로 또는 기계적으로 파괴하여 세포내 성분을 핵산 제조용 수성 또는 유기성 용액 내로 방출하도록 처리될 수 있다. 핵산은 당업자에게 공지되어 있는 상업적으로 이용가능한 방법에 의해 추출된다(Sambrook, J., et al., "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3).
- [0104] 따라서, c-MAF 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 전사로부터 비롯된 RNA(메신저 RNA 또는 mRNA) 또는 대안적으로 상기 유전자의 상보적 DNA(cDNA)로부터 정량될 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자 발현 수준의 정량은 c-MAF 유전자의 메신저 RNA 또는 상기 mRNA의 단편, c-MAF 유전자의 상보적 DNA 또는 상기 cDNA의 단편, 또는 이들의 혼합물의 정량을 포함한다.
- [0105] 사실상, c-MAF 유전자에 의해 코딩된 mRNA 수준 또는 그의 상응하는 cDNA 수준을 검출하고 정량하는 임의의 통상의 방법이 본 발명의 범위 내에서 이용될 수 있다. 비-한정적 예로서, 상기 유전자에 의해 코딩된 mRNA 수준은 통상의 방법, 예를 들면, mRNA 증폭, 및 상기 mRNA 증폭 생성물의 정량, 예컨대, 전기영동 및 염색, 또는 대안적으로 임의의 적합한 프로브를 사용한 서던 블롯, 관심있는 유전자(c-MAF)의 mRNA 또는 그의 상응하는 cDNA의 특이적 프로브를 사용한 노던 블롯, S1 뉴클레아제(nuclease)를 사용한 맵핑, RT-PCR, 혼성화, 마이크로어레이 등, 바람직하게는 적합한 마커를 사용한 실시간 정량적 PCR에 의한 상기 mRNA 증폭 생성물의 정량을 포함하는 방법을 이용함으로써 정량될 수 있다. 마찬가지로, c-MAF 유전자에 의해 코딩된 상기 mRNA에 상응하는 cDNA 수준은 통상의 기법을 이용함으로써 정량될 수도 있고; 이 경우, 본 발명의 방법은 상응하는 mRNA의 역전사(RT)로 상응하는 cDNA를 합성하는 단계에 이어서, 상기 cDNA 증폭 생성물을 증폭하고 정량하는 단계를 포함한다. 발현 수준을 정량하는 통상의 방법들은 예를 들면, (상기 인용된) 문헌(Sambrook et al., 2001)에서 발견될 수 있다. 이들 방법들은 당분야에서 공지되어 있고, 당업자는 각각의 기법에 필요한 표준화를 알고 있을 것이다. 예를 들면, 다중 PCR을 이용하여 수득한 발현 측정치는 측정되는 유전자의 발현을, 그의 발현이 모든 샘플들에 걸쳐 일정하여 비교될 기준 발현을 제공하는 소위 "하우스킵핑(housekeeping)" 유전자 또는 그의 발현이 압에 의해 조절되는 것으로 공지되어 있는 다른 대조군 유전자와 비교함으로써 표준화되어야 한다.
- [0106] 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자 발현 수준은 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA/RNA 어레이 또는 뉴클레오티드 혼성화 기법에 의해 정량된다.
- [0107] 또한, c-MAF 유전자 발현 수준은 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질, 즉 c-MAF 단백질(c-MAF)[NCBI, 등록번호 075444], 또는 c-MAF 단백질의 임의의 기능성 등가 변이체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수도 있다. 2종의 c-MAF 단백질 동형체, 즉 403개의 아미노산(서열번호 4)으로 구성된  $\alpha$  동형체(NCBI, NP\_005351.2) 및 373개의 아미노산(서열번호 5)으로 구성된  $\beta$  동형체(NCBI, NP\_001026974.1)가 존재한다. c-MAF 유전자 발현 수준은 c-MAF 단백질 동형체들 중 임의의 동형체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준의 정량은 c-MAF 단백질의 정량을 포함한다.
- [0108] 본 발명과 관련하여, "c-MAF 단백질의 기능성 등가 변이체"는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존된 또는 비-보존된 아미노산 잔기(바람직하게는, 보존된 아미노산 잔기)로 치환되어 있는 c-MAF 단백질(서열번호 4 또는 서열번호 5)의 변이체(이때, 이러한 치환된 아미노산 잔기는 유전 코드에 의해 코딩된 아미노산 잔기일 수 있거나 아닐 수 있음), 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 결실을 포함하고 c-MAF 단백질과 동일한 기능을 갖는, 즉 DNA 결합 전사 인자로서 작용하는 변이체로서 이해된다. c-MAF 단백질의 변이체는 국제 특허출원 공보 제W02005/046731호(전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 나타난 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-MAF의 능력에 기초한 방법, 국제 특허출원 공보 제W02008098351호(전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응 영역(MARE 또는 c-MAF 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에 레포터 유전자의 전사 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법, 또는 미국 특허출원 공보 제2009048117A호(전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 NFATc2 및 c-MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 조절 하에 레포터 유전자 발현을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법을 이용함으로써 확인될 수 있다.
- [0109] 본 발명에 따른 변이체는 바람직하게는 c-MAF 단백질 동형체들 중 어느 하나의 아미노산 서열(서열번호 4 또는 서열번호 5)에 대한 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상의 서열 유사성을 갖는다. 앞서 정의된 변이체와 특정 c-MAF 단백질 서열 사이의 유사성의 정도는 당업자에게 널리 공지되어 있는 알고리즘 및 컴퓨터 과정을 이용함으로써 측정된다. 2개의 아미노산 서열들 사이의 유사성은 바람직하게는 BLASTP 알고리즘[BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894,

Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)]을 이용함으로써 측정된다.

- [0110] c-MAF 단백질 발현 수준은 대상체의 샘플에서 상기 단백질을 검출하고 정량할 수 있게 하는 임의의 통상의 방법에 의해 정량될 수 있다. 비-제한적 예로서, 상기 단백질 수준은 예를 들면, c-MAF 결합 능력을 갖는 항체(또는 항원성 결정인자를 함유하는 이의 단편)의 사용 및 형성된 복합체의 후속 정량에 의해 정량될 수 있다. 이들 분석들에서 사용된 항체는 표지될 수 있거나 표지되지 않을 수 있다. 사용될 수 있는 마커의 예시적 예로는 방사성 동위원소, 효소, 형광단, 화학발광 시약, 효소 기질 또는 보조인자, 효소 억제제, 입자, 염료 등이 있다. 비-표지된 항체(일차 항체) 및 표지된 항체(이차 항체)를 사용하는, 본 발명에서 사용될 수 있는 다양한 공지된 분석들이 존재하고, 이들 기법들은 웨스턴 블롯 또는 웨스턴 전달, ELISA(효소-연결된 면역흡착 분석), RIA(방사면역분석), 경쟁 EIA(경쟁 효소 면역분석), DAS-ELISA(이중 항체 샌드위치 ELISA), 면역세포화학적 및 면역조직화학적 기법, 특이적 항체를 포함하는 단백질 마이크로어레이 또는 바이오칩의 사용에 기초한 기법, 또는 포맷, 예컨대, 덤스틱(dipstick)에서의 콜로이드 침전에 기초한 분석을 포함한다. 상기 c-MAF 단백질을 검출하고 정량하는 다른 방법은 친화성 크로마토그래피 기법, 리간드 결합 분석 등을 포함한다. 면역학적 방법이 이용되는 경우, 고친화성으로 c-MAF 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있는 임의의 항체 또는 시약이 그의 양을 검출하는 데 사용될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 항체, 예를 들면, 다중클론 혈청, 하이브리도마의 상청액 또는 단일클론 항체, 항체 단편, Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>, scFv, 인간화된 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 나노바디, 알파바디(alphabody), 스테이플드(stapled) 펩티드, 사이클로펩티드 및 항체들의 사용이 바람직하다. 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 시판되는 항-c-MAF 단백질 항체, 예컨대, 항체 ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071(애브캠 피엘씨(Abcam plc), 영국 캠브리지 씨비4 0에프엘 사이언스 파크 330 소재), 075444 단일클론 항체(마우스 항-인간 MAF 아지드 무함유 단일클론 항체, 비-접합됨, 클론 6b8)(에이비디 세로텍(AbD Serotec)) 등이 존재한다. 항-c-MAF 항체를 제공하는 많은 영리 회사들, 예컨대, 애브노바 코포레이션(Abnova Corporation), 베틀 라보라토리스(Bethyl Laboratories), 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 바이오월드 테크놀로지(Bioworld Technology), 진텍스(GeneTex) 등이 존재한다.
- [0111] 특정 실시양태에서, c-MAF 단백질 수준은 웨스턴 블롯, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 정량된다.
- [0112] 또 다른 특정 실시양태에서, c-MAF 단백질 수준은 엑소솜(exosome) 또는 순환 DNA로부터 정량된다. 엑소솜은 생체내에서 및 시험관내에서 대다수의 종류의 세포들에 의해 분비되는 40 내지 100 nm 막 소포이다. 엑소솜은 구획의 내강 내로 내부를 향해 자라기 시작함으로써 다소포체(MVB)로서 지칭되는 특정 엔도솜 집단을 형성한다. MVB와 원형질막의 융합 시, 이들 내부 소포들이 분비된다. 엑소솜은 당분야에서 잘 공지되어 있는 여러 방법들에 의해 다양한 세포주 또는 체액으로부터 단리될 수 있다(Thery C. et al., Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 여러 시판되는 키트들, 예컨대, 엑소퀵(ExoQuick)<sup>TM</sup> 또는 엑소테스트(ExoTest)<sup>TM</sup>가 엑소솜의 단리를 위해 이용될 수 있다.
- [0113] 본 발명의 제1 방법은 대상체의 샘플(예를 들면, 종양 샘플)에서 수득된 c-MAF 유전자 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계를 제2 단계에서 포함한다.
- [0114] 유방암, 예를 들면, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 기준 값과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 전이를 발생시킬 보다 큰 경향을 갖는다는 결론을 도출할 수 있다.
- [0115] c-MAF 유전자 발현 수준의 측정은 기준 값과 상관관계를 가져야 한다.
- [0116] 한 실시양태에서, 본원에서 의도된 기준 값(들)은 c-MAF의 절대적 양을 의미할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 시험된 대상체의 샘플에서 어느 하나 이상의 생체마커의 양은 (예를 들면, 증가 또는 감소, 또는 증가 배수 또는 감소 배수의 관점에서) 기준 값과 비교되어 직접적으로 측정될 수 있다. 유리하게는, 이것은 어느 하나 이상의 생체마커의 각각의 절대적 양을 먼저 측정할 필요 없이 대상체의 샘플에서 상기 어느 하나 이상의 생체마커의 양을 기준 값과 비교하게(즉, 기준 값과 비교하여 대상체의 샘플에서 어느 하나 이상의 생체마커의 상대적 양을 측정하게) 할 수 있다.
- [0117] 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플 또는 기준 샘플에서의 c-MAF 유전자 발현 수준이다. 분석될 종양의 종류에 따라, 대조군 또는 기준 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 예후가 평가되어야 하는 경우, 기준 샘플은 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.

- [0118] 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 획득된다. 일반적으로, 전형적인 기준 샘플은 임상적으로 잘 문서화되어 있고 전이의 부재가 잘 특징규명되어 있는 대상체로부터 획득될 것이다. 이러한 샘플에서, 생체마커(c-MAF 유전자)의 정상 농도(기준 농도)는 예를 들면, 기준 집단에 대한 평균 농도를 제공함으로써 측정될 수 있다. 마커의 기준 농도를 측정할 때 다양한 사항들을 고려한다. 이러한 고려사항들 중에는 환자의 연령, 체중, 성별, 일반적인 신체 상태 등이 있다. 예를 들면, 바람직하게는 상기 고려사항에 따라, 예를 들면, 다양한 연령 카테고리에 따라 분류된 약 2명 이상, 약 10명 이상, 약 100명 이상 내지 바람직하게는 약 1000명 초과 대상체들로 구성된 동등한 양의 군이 기준 군으로서 간주된다. 기준 값의 유도에 사용되는 샘플 채취물은 바람직하게는 연구의 대상 환자와 동일한 종류의 암을 앓고 있는 대상체에 의해 형성될 것이다.
- [0119] 특정 실시양태에서, c-MAF 발현의 "증가된" 또는 "감소된" 발현에 대한 기준 값은 전술된 방법들 중 임의의 방법에 의해 잘 문서화된 질환을 갖는 대상체로부터 단리된 1개 또는 수개의 샘플에서 분석을 수행하는 단계를 포함하는 통상의 수단으로 c-MAF 발현 수준의 백분위수를 계산함으로써 결정된다. 그 다음, c-MAF의 "감소된" 수준은 바람직하게는 c-MAF 발현 수준이 정상 집단에서의 50번째 백분위수 이하(예를 들면, 정상 집단에서의 60번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 70번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 80번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 90번째 백분위수 이하의 발현 수준 및 정상 집단에서의 95번째 백분위수 이하의 발현 수준을 포함함)인 샘플로 배정될 수 있다. 그 다음, "증가된" c-MAF 유전자 발현 수준은 바람직하게는 c-MAF 유전자 발현 수준이 정상 집단에서의 50번째 백분위수 이상(예를 들면, 정상 집단에서의 60번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 70번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 80번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 90번째 백분위수 이상의 발현 수준 및 정상 집단에서의 95번째 백분위수 이상의 발현 수준을 포함함)인 샘플로 배정될 수 있다.
- [0120] 당업자는 일차 유방 종양이 전이될 경향을 예측하는 것이 확인될 모든 대상체들(즉, 100%의 대상체)에 대해 정확할 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 그럼에도 불구하고, 상기 용어는 대상체들(예를 들면, 코호트 연구에서 코호트)의 통계적으로 유의한 부분을 확인할 수 있을 것을 요구한다. 당업자는 다양한 잘 공지되어 있는 통계적 평가 수단, 예를 들면, 신뢰구간의 측정, p-값의 측정, 스튜던트 T 검정, 만-휘트니 검정 등을 이용하여 단순한 방식으로 부분이 통계적으로 유의한지를 확인할 수 있다. 상세한 설명은 문헌(Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983)에 제공되어 있다. 바람직한 신뢰구간은 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 또는 0.0001이다. 보다 바람직하게는, 집단의 대상체의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상이 본 발명의 방법에 의해 적절하게 확인될 수 있다.
- [0121] 또 다른 실시양태에서, 골로의 전이는 골용해성 골 전이이다.
- [0122] 또 다른 실시양태에서, 평균을 초과하는 c-MAF의 발현 수준이 골 전이의 증가된 위험을 표시한다는 것은 상기 위험이 c-MAF 발현 수준에 비례한다는 것이다. 따라서, 유방암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험은 용량 의존적이다.
- [0123] c-MAF의 발현 수준을 기초로, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 방법
- [0124] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0125] i) 골 전이성 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 골 전이성 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- [0126] ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0127] 를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제2 방법)으로서, 이때 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준이 좋지 않은 임상결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0128] 본 발명의 제2 방법은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0129] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제2 방법은 단일 마커로서 c-MAF 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포

함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.

- [0130] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 수득된 c-MAF 유전자 발현 수준은 기준 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준이다. c-MAF 유전자 발현 수준의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가져야 한다. 분석되는 종양의 종류에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제2 방법을 이용하는 경우, 기준 샘플은 골 전이를 앓고 있지 않은 유방암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이를 앓고 있지 않은 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.
- [0131] 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 대조군 샘플과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 그의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 좋지 않은 임상결과를 표시한다.
- [0132] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0133] 또 다른 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자 발현 수준의 정량은 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보적 DNA(cDNA) 또는 상기 cDNA의 단편의 정량을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 발현 수준은 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA 또는 RNA 어레이에 의해 정량된다.
- [0134] 또 다른 실시양태에서, c-MAF 유전자 발현 수준의 정량은 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질 또는 이의 변이체의 수준의 정량을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 단백질 수준은 웨스턴 블롯, 면역조직화학, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 측정된다.
- [0135] 또 다른 실시양태에서, 기준 샘플은 전이를 앓고 있지 않은 대상체의 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암의 종양 조직 샘플이다.
- [0136] 하기 파라미터들을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 환자의 임상결과를 확인하는 데에 널리 이용되는 임의의 파라미터가 본 발명에서 사용될 수 있다:
- [0137] • 본원에서 사용된 바와 같이, 연구 기간 동안 질환이 재발되지 않은, 완전히 관해된 대상체의 비율을 의미하는 질환 부재 진행;
- [0138] • 본원에서 사용된 바와 같이, 질환에 대한 치료 후 대상체가 질환의 증상 없이 생존하는 기간으로서 이해되는 질환 부재 생존(DFS);
- [0139] • 본 발명에서 사용된 바와 같이, 완전한 또는 부분적인 반응이 관찰되는 치료된 대상체의 비율을 의미하는 목적 반응;
- [0140] • 본 발명에서 사용된 바와 같이, 완전한 반응, 부분적인 반응, 미미한 반응 또는 6개월 이상 동안 안정한 질환이 관찰되는 치료된 대상체의 비율을 의미하는 종양 제어;
- [0141] • 본원에서 사용된 바와 같이, 치료의 시작부터 암 성장의 첫 번째 측정까지의 시간으로서 정의되는 진행 부재 생존;
- [0142] • 본원에서 사용된 바와 같이, 질환이 치료된 후 질환이 악화되기 시작할 때까지의 시간을 의미하는 진행까지의 시간(TTP);
- [0143] • 본원에서 사용된 바와 같이, 치료의 시작 후 처음 6개월 이내에 진행을 갖지 않는 대상체의 백분율을 의미하는 6개월 진행 부재 생존율 또는 "PFS6"; 및
- [0144] • 본원에서 사용된 바와 같이, 연구에 등록된 대상체의 절반이 여전히 생존하고 있는 시간을 의미하는 중간 생존.
- [0145] 임상결과를 지칭하기 위해 본원에서 사용된 용어 "좋지 않은" 또는 "좋은"은 대상체가 유리한 또는 불리한 결과를 보일 것이라는 것을 의미한다. 당업자가 이해할 바와 같이, 확률의 이러한 평가는 진단되는 대상체의 100%에 대해 정확하지 않을 수 있지만, 정확한 것이 바람직하다. 그러나, 상기 용어는 대상체의 통계적으로 유의한 부분이 주어진 결과에 대한 성향을 갖는 것으로서 확인될 수 있을 것을 요구한다. 당업자는 다양한 잘 공지되어 있는 통계적 평가 수단, 예를 들면, 신뢰구간의 측정, p-값 측정, 스튜던트 T 검정, 만-휘트니 검정 등을 이용

하여 부분이 통계적으로 유의한지를 용이하게 확인할 수 있다. 상세한 설명은 문헌(Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983)에서 발견된다. 바람직한 신뢰구간은 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.05, 0.01, 0.005 또는 0.0001이다. 보다 바람직하게는, 집단의 대상체의 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상 또는 약 90% 이상이 본 발명의 방법에 의해 적절하게 확인될 수 있다.

- [0146] 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방 종양 또는 대안적으로 ER+ 유방 종양, 또는 Src 반응 시그너처+ 또는 HER2+ 유방 종양을 갖는 환자에서 맞춤형 치료를 디자인하는 방법
- [0147] 최신기술 수준에서 잘 공지되어 있는 바와 같이, 암을 앓고 있는 대상체에게 투여되는 치료는 상기 암이 양성 종양인지, 즉 전이될 확률이 높은지, 아니면 상기 암이 양성 종양인지에 달려 있다. 제1 가정에서, 선택되는 치료는 전신 치료, 예컨대, 화학치료이고, 제2 가정에서 선택되는 치료는 국소 치료, 예컨대, 방사선치료이다.
- [0148] 따라서, 본 발명에 기재된 바와 같이, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 세포 또는 대안적으로 ER+ 유방암 세포에서의 c-MAF 유전자 과다발현이 골 전이의 존재와 관련되어 있는 한, c-MAF 유전자의 발현 수준은 상기 암을 앓고 있는 대상체에 가장 적합한 치료를 결정하는 데에 유용하다.
- [0149] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0150] i) 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- [0151] ii) i)에서 획득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0152] 를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체를 위한 맞춤형 치료를 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제3 방법)으로서, 이때 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합한 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다. 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하지 않다.
- [0153] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0154] 본 발명의 제3 방법은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0155] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제3 방법은 단일 마커로서 c-MAF 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.
- [0156] 본 발명의 제3 방법의 경우, 샘플은 대상체의 일차 종양 조직 샘플일 수 있다.
- [0157] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 획득된 c-MAF 유전자 발현 수준은 기준 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플에서 상기 유전자의 c-MAF 유전자 발현 수준이다. c-MAF 유전자 발현 수준의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 관련되어야 한다. 분석되는 종양의 종류에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 기준 샘플은 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.
- [0158] 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 기준 값과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이를 예방하고/하거나(대상체에서 아직 전이가 일어나지 않은 경우) 치료하는(대상체에서 이미 전이가 일어난 경우) 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하다는 결론을 도출할 수 있다.
- [0159] 암이 전이된 경우, 화학치료, 호르몬 치료, 면역치료 또는 이들의 조합을 포함하나 이들로 한정되지 않는 전신 치료가 이용될 수 있다. 또한, 방사선치료 및/또는 수술이 이용될 수 있다. 치료의 선택은 일반적으로 일차 암의 종류, 크기, 전이의 위치, 환자의 연령 및 일반적인 건강, 및 이전에 이용된 치료의 종류에 달려 있다.
- [0160] 전신 치료는 전신에 도달하는 치료이고, 예컨대, 다음과 같은 치료이다:



- [0161] - 화학치료는 암세포를 파괴하는 약물의 사용이다. 약물은 일반적으로 경구 또는 정맥내 경로를 통해 투여된다. 종종, 화학치료는 방사선치료와 함께 이용된다. 유방암에 적합한 화학치료제는 하기 치료제들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 안쓰라사이클린(anthracyclines)(독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 페길화된(pegylated) 리포솜 독소루비신), 탁산(Taxanes)(파클리탁셀(paclitaxel), 독세탁셀(docetaxel), 파클리탁셀에 결합된 알부민 나노입자), 5-플루오로우라실(연속 관주 5-FU, 카페시타빈(capecitabine)), 빈카 알칼로이드(Vinca alkaloids)(비노렐빈(vinorelbine), 빈블라스틴(vinblastine)), 겐시타빈(Gemcitabine), 백금 염(시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin)), 사이클로포스프아미드, 에토포사이드(Etoposide) 및 상기 치료제들 중 하나 이상의 조합물, 예컨대, 사이클로포스프아미드/안쓰라사이클린 +/- 5-플루오로우라실 요법(예컨대, 독소루비신/사이클로포스프아미드(AC), 에피루비신/사이클로포스프아미드(EC), 사이클로포스프아미드/에피루비신/5-플루오로우라실(CEF), 사이클로포스프아미드/독소루비신/5-플루오로우라실(CAF), 5-플루오로우라실/에피루비신/사이클로포스프아미드(FEC)), 사이클로포스프아미드/메토텍세이트/5-플루오로우라실(CMF), 안쓰라사이클린/탁산(예컨대, 독소루비신/파클리탁셀 또는 독소루비신/독세탁셀), 독세탁셀/카페시타빈, 겐시타빈/파클리탁셀, 탁산/백금 요법(예컨대, 파클리탁셀/카보플라틴 또는 독세탁셀/카보플라틴).
- [0162] - 면역치료는 환자의 면역 시스템 자체가 암과 싸우도록 돕는 치료이다. 환자에서 전이를 치료하는 데에 이용되는 여러 종류의 면역치료가 존재한다. 이들은 사이토카인, 단일클론 항체 및 항종양 백신을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0163] 또 다른 양태에서, 치료제는 알파라딘(Alpharadin)(라듬-223 디클로라이드)이다. 알파라딘은 라듬-223 붕괴로부터의 알파 방사선을 이용하여 암세포를 사멸시킨다. 라듬-223은 천연적으로 칼슘 유사체로서의 그의 성질을 통해 골 전이에 자가 표적화한다. 알파 방사선은 (베타 또는 감마 방사선에 기초한 현재의 방사선치료에 비해) 2 개 내지 10 개 세포의 매우 짧은 범위를 가지므로, 주변 건강한 조직(특히 골수)에 보다 적은 손상을 야기한다. 라듬-223은 칼슘과 유사한 성질을 갖기 때문에 칼슘이 신체의 골을 구축하는 데에 사용되는 부위(보다 빠른 비정상적인 골 성장의 부위, 예컨대, 진행된 거세 내성 전립선 암을 갖는 남성의 골 전이에서 관찰되는 골 성장의 부위를 포함함)로 이동된다. 주입 후 라듬-223은 혈류를 통해 비정상적인 골 성장의 부위로 운반된다. 암이 신체에서 시작되는 부위는 일차 종양으로서 공지되어 있다. 이들 세포들 중 일부는 이탈되어 혈류를 통해 신체의 또 다른 부분으로 운반될 수 있다. 그 다음, 암세포는 신체의 그 부분에서 정착하여 새로운 종양을 형성할 수 있다. 이것은 일어나는 경우 이차 암 또는 전이로서 지칭된다. 후기 전립선암을 갖는 환자들의 대다수는 그들의 골에서 질환의 최대 고통을 앓는다. 라듬-223을 사용하는 목적은 이 이차 암을 선택적으로 표적화하는 것이다. 골에서 흡수되지 않는 임의의 라듬-223은 신속히 장으로 이동되어 배출된다.
- [0164] 또 다른 양태에서, 치료제는 mTor 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 이중 mTor/PI3 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABI0099(시롤리무스(sirolimus)), 라파마이신(rapamycin)(시롤리무스), 아브락산(Abraxane)(파클리탁셀), 아브소브(Absorb)(에버롤리무스(everolimus)), 아피니토르(Afinitor)(에버롤리무스), 글리벡(Gleevec)과 함께 아피니토르, AS703026(피마서티브(pimasertib)), 악세스(Axcess)(우미롤리무스(umiroliumus)), AZD2014, BEZ235, 바이오프리덤(Biofreedom)(우미롤리무스), 바이오 매트릭스(BioMatrix)(우미롤리무스), 바이오 매트릭스 플렉스(우미롤리무스), CC115, CC223, 콤보 생물조작된 시롤리무스 용출 스텐트 오르부스니치(ORBUSNEICH)(시롤리무스), 쿠락신(Curaxin) CBL102(메파크린(mepacrine)), DE109(시롤리무스), DS3078, 엔데버(Endeavor) DES(조타롤리무스(zotarolimus)), 엔데버 레졸루트(Resolute)(조타롤리무스), 페마라(Femara)(레트로졸(letrozole)), 호세나(Hocena)(안트로퀴놀(antroquinonol)), INK128, 인스피론(Inspiron)(시롤리무스), IPI504(레타스피마이신(retaspimycin) 하이드로클로라이드), KRN951(티보자닙(tivozanib)), ME344, MGA031(테플리주맵(teplizumab)), 미스텐트(MiStent) SES(시롤리무스), MKC1, 노보리(Nobori)(우미롤리무스), OSI027, OVI123(코다이세핀(cordycepin)), 팔로미드(Palomid) 529, PF04691502, 프로무스 엘리먼트(Promus Element)(에버롤리무스), PWT33597, 라파뮌(Rapamune)(시롤리무스), 레솔루트(Resolute) DES(조타롤리무스), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75(보세투주맵 마포도틴(vorsetuzumab mafodotin)), 시너지(Synergy)(에버롤리무스), 탈토르빅(Taltorvic)(리다포롤리무스(ridaforolimus)), 타세바(Tarceva)(에를로티닙(erlotinib)), 토리셀(Torisel)(템시롤리무스(temsirolimus)), 자이언스 프라임(Xience Prime)(에버롤리무스), 자이언스 V(에버롤리무스), 조맥스(Zomaxx)(조타롤리무스), 조트레스(Zortress)(에버롤리무스), 조타롤리무스 용출 말초 스텐트 메드트로닉(MEDTRONIC)(조타롤리무스), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, 캔스타틴(canstatin) 젠자임(GENZYME)(캔스타틴), CU906, ECO371, ECO565, KI1004, LOR220, NV128, 라파마이신 온코이뮤(ONCOIMMUNE)(시롤리무스), SB2602, 시롤리무스 PNP 삼양

바이오파마슈티칼스(SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS)(시롤리무스), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, 애드바칸(Advacan)(에버롤리무스), AZD8055, 사이퍼 셀렉트 플러스(Cypher Select Plus) 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 사이퍼 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 약물 코팅된 풍선(시롤리무스), E-매직 플러스(Magic Plus)(시롤리무스), 엠토르(Emtor)(시롤리무스), 에스프릿(Esprit)(에버롤리무스), 에버토르(Evertor)(에버롤리무스), HBF0079, LCP-시로(Siro)(시롤리무스), 리무스 클라리스(Limus CLARIS)(시롤리무스), mTOR 억제제 셀좁(CELLZOME), 네보(Nevo) 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), nPT-mTOR, 라파칸(Rapacan)(시롤리무스), 레나셉트(Renacept)(시롤리무스), 레졸브(ReZolve)(시롤리무스), 로카스(Rocas)(시롤리무스), SF1126, 시롤림(Sirolim)(시롤리무스), 시롤리무스 노쓰 차이나(NORTH CHINA)(시롤리무스), 시롤리무스 란박시(RANBAXY)(시롤리무스), 시롤리무스 와슨(WATSON)(시롤리무스), 시로판(Siropan)(시롤리무스), 시로바(Sirova)(시롤리무스), 수프랄리무스(Supralimus)(시롤리무스), 수프랄리무스-코어(시롤리무스), 타크롤리무스(tacrolimus) 와슨(타크롤리무스), TAF93, 탬시롤리무스 아코드(ACCORD)(탐시롤리무스), 탬시롤리무스 산도즈(SANDOZ)(탐시롤리무스), TOP216, 자이언스 프라임(에버롤리무스), 및 자이언스 V(에버롤리무스). 특정 실시양태에서, mTor 억제제는 아피니토르(에버롤리무스)이다 ([http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&NovaId=4029462064338207963](http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=4029462064338207963); last accessed 11/28/2012). 또 다른 양태에서, 에버롤리무스는 아로마타제 억제제와 조합된다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529) 참조). 또 다른 양태에서, mTor 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81) 참조). 일부 양태에서, mTor 억제제는 호르몬 수용체에 대한 양성을 나타내는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다(예를 들면, 문헌(Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529) 참조). 일부 실시양태에서, 환자는 ER+를 나타낸다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 진행된 유방암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다.

[0165] 또 다른 양태에서, 치료제는 Src 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, Src 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: AZD0530(사라카티닙(saracatinib)), 보술리프(Bosulif)(보수티닙(bosutinib)), ENMD981693, KDO20, KX01, 스프리셀(Sprycel)(다사티닙(dasatinib)), 예르보이(Yervoy)(이필리무맙(ipilimumab)), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, c-Src 키나제 억제제 KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, 다사티닙 헤테로(HETERO)(다사티닙), 다사티닙 발린트(VALEANT)(다사티닙), 폰트락스(Fontrax)(다사티닙), Src 키나제 억제제 키넥스(KINEX), VX680(토자서티닙(tozasertib) 락테이트), XL228 및 SUNK706. 일부 실시양태에서, Src 키나제 억제제는 다사티닙이다. 또 다른 양태에서, Src 키나제 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Sen, B. and Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 pages) 참조). 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 SRC 반응 시그너처(SRS)에 대한 양성을 나타내는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, 환자는 SRS+ 및 ER-를 나타낸다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Zhang, CH.-F, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16: 67-78) 참조). 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 진행된 유방암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다.

[0166] 또 다른 양태에서, 치료제는 COX-2 억제제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABT963, 아세트아미노펜(Acetaminophen) 이알 존슨(ER JOHNSON)(아세트아미노펜), 아쿨라(Acular) X(케토롤락 트로메타민(ketorolac tromethamine)), BAY1019036(아스피린), BAY987111(디펜하이드라민, 나프록센(naproxen) 나트륨), BAY11902(피록시캠(piroxicam)), BCIBUCH001(이부프로펜(ibuprofen)), 카폭시캠(Capoxigem)(아프리카복심(apricoxib)), CS502, CS670(펠루비프로펜(pelubipirofen)), 디클로페낙(Diclofenac) HPBCD(디클로페낙), 디락틴(Diractin)(케토프로펜(ketoprofen)), GW406381, HCT1026(니트로플루르비프로펜(nitroflurbiprofen)), 하이아날게스(Hyanalgesin)-D(디클로페낙), 하이드로코텍스(HydrocoDex)(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판(dextromethorphan), 하이드로코돈(hydrocodone)), 이부프로펜 나트륨 화이자(PFIZER)(이부프로펜 나트륨), 아

세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자(아세트아미노펜, 이부프로펜), 임프라코르(Impracor)(케토프로펜), IP880(디클로페낙), IP940(인도메타신(indomethacin)), ISV205(디클로페낙 나트륨), JNS013(아세트아미노펜, 트라마돌(tramadol) 하이드로클로라이드), 케토프로펜 TDS(케토프로펜), LTNS001(나프록센 에테메실(etemesil)), 메살라민(Mesalamine) 살릭스(SALIX)(메살라민), 메살라민 소파르(SOFAR)(메살라민), 메살라진(Mesalazine)(메살라민), ML3000(리코펠론(licofelone)), MRX7EAT(에토돌락(etodolac)), 나프록센 이로코(IROKO)(나프록센), NCX4016(니트로아스피린(nitrospirin)), NCX701(니트로아세트아미노펜(nitroacetaminophen)), 누프린(Nuprin) 스콜르(SCOLR)(이부프로펜), OMS103HP(아미트립틸린( amitriptyline) 하이드로클로라이드, 케토프로펜, 옥시메타졸린(oxymetazoline) 하이드로클로라이드), 오랄리스(Oralease)(디클로페낙), 옥시코텍스(OxycoDex)(덱스트로메토르판(dextromethorphan), 옥시코돈(oxycodone)), P54, 퍼코텍스(PercoDex)(아세트아미노펜, 덱스트로메토르판, 옥시코돈), PL3100(나프록센, 포스파티딜 콜린), PSD508, R-케토프로펜(케토프로펜), 레무라(Remura)(브롬페낙(bromfenac) 나트륨), ROX828(케톨락 트로메타민), RP19583(케토프로펜 라이신), RQ00317076, SDX101(R-에토돌락(etodolac)), TDS943(디클로페낙 나트륨), TDT070(케토프로펜), TPR100, TQ1011(케토프로펜), TT063(S-플루르비프로펜(flurbiprofen)), UR8880(시미콕십(cimicoxib)), V0498TA01A(이부프로펜), VT122(에토돌락, 프로프라놀롤(propranolol)), XP20B(아세트아미노펜, 덱스트로프로포시펜(dextropropoxyphene)), XP21B(디클로페낙 칼륨), XP21L(디클로페낙 칼륨), 조에나사(Zoenasa)(아세틸시스테인, 메살라민), 아세펜(Acephen), 악티페드 플러스(Actifed Plus), 악티페드-P, 아쿨라, 아쿨라 LS, 아쿨라 PF, 아쿨라 X, 아쿠베일(Acuvail), 애드빌(Advil), 애드빌 알러지 비염(Allergy Sinus), 애드빌 감기 및 비염(Cold and Sinus), 애드빌 울혈 경감(Congestion Relief), 애드빌 PM, 애드빌 PM 캡슐, 에어 살론파스(Air Salonpas), 에어탈(Airtal), 알코올 무함유 나이퀸(NyQuil) 감기 및 플루 경감, 알레브(Aleve), 알레브 아브디 이브라힘(ABDI IBRAHIM), 알레브-D, 알카-셀트저(Alka-Seltzer), 알카-셀트저 바이엘(BAYER), 알카-셀트저 초강도(Extra Strength), 알카-셀트저 레몬-라임(Lemon-Lime), 알카-셀트저 오리지널(Original), 알카-셀트저 플러스, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침 제제, 알카-셀트저 플러스 낮과 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 낮에 졸립지 않는 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 플루 제제, 알카-셀트저 플러스 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 비염 제제, 알카-셀트저 플러스 스파클링 오리지널(Sparkling Original) 감기 제제, 알카-셀트저 PM, 알카-셀트저 수면각성제(Wake-Up Call), 아나신(Anacin), 아나프록스(Anaprox), 아나프록스 미네르바(MINERVA), 안사이드(Ansaid), 아피톡신(Apitoxin), 아프라낙스(Apranax), 아프라낙스 애브디(abdi), 아콕시아(Arcoxia), 관절염 제제 벤가이(Arthritis Formula Bengay), 아스로텍(Arthrotec), 아사콜(Asacol), 아사콜 HD, 아사콜 메두나 아즈네이미텔(MEDUNA ARZNEIMITTEL), 아사콜 오리팜(ORIFARM), 아스피린 바이엘, 아스피린 콤플렉스(Complex), 아스피린 미그란(Migran), AZD3582, 아줄피딘(Azulfidine), 바랄간(Baralgan) M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, 베나드릴(Benadryl) 알러지, 베나드릴 낮과 밤, 베닐린(Benylin) 4 플루, 베닐린 감기 및 플루, 베닐린 감기 및 플루 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 플러스, 베닐린 낮과 밤 감기 및 플루 경감, 베닐린 1 올-인-원(All-In-One), 브렉신(Brexin), 브렉신 안젤리니(ANGELINI), 브롬데이(Bromday), 버퍼린(Bufferin), 버스코판 플러스(Buscopan Plus), 칼돌로르(Caldolor), 칼마텔(Calmatel), 캄비아(Cambia), 카나사(Canasa), 카폭시젬(Capoxigem), 카타플람(Cataflam), 셀레브렉스(Celebrex), 셀레브렉스 오리팜, 소아용 애드빌 알러지 비염, 소아용 타이레놀(Tylenol), 소아용 타이레놀 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 감기, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 기침, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 비한, 소아용 타이레놀 플러스 플루, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 알러지, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 인후통, 소아용 타이레놀 플러스 다증상 감기, 클리노릴(Clinoril), 코드랄(Codral) 감기 및 플루, 코드랄 낮과 밤 낮 정제, 코드랄 낮과 밤 밤 정제, 코드랄 밤시간(Nighttime), 콜라잘(Colazal), 컴부녹스(Combunox), 콘택(Contact) 감기 플러스 플루, 콘택 감기 플러스 플루 졸립지 않은 제제, 코리시딘(Coricidin) D, 코리시딘 HBP 감기 및 플루, 코리시딘 HBP 낮과 밤 다증상 감기, 코리시딘 HBP 최대 강도의 플루, 코리시딘 HBP 밤시간 다증상 감기, 코리시딘 II 초강도 감기 및 플루, CS502, CS670, 데이프로(Daypro), 데이프로 알타, DDS06C, 데마진(Demazin) 감기 및 플루, 데마진 기침, 감기 및 플루, 데마진 낮/밤 감기 및 플루, 데마진 PE 감기 및 플루, 데마진 PE 낮/밤 감기 및 플루, 디클로페낙 HPBCD, 디메탐(Dimetapp) 낮 경감, 디메탐 다증상 감기 및 플루, 디메탐 밤 경감, 디메탐 통증 및 발열 경감, 디메탐 PE 비염 통증, 디메탐 PE 비염 통증 플러스 알러지, 디펜텀(Dipentum), 디락틴(Diractin), 디스프린(Disprin) 감기 'n' 발열, 디스프린 엑스트라(Extra), 디스프린 포르테(Forte), 디스프린 플러스, 드리스탄(Dristan) 감기, 드리스탄 주니어(Junior), 드릭소랄(Drixoral) 플러스, 두엑시스(Duexis), 다이나스타트(Dynastat), 에페랄간(Efferalgan), 에페랄간 플러스 비타민 C, 에페랄간 비타민 C, 엘릭스슈어(Elixsure) IB, 엑세드린(Excedrin) 등 및 전신, 엑세드린 편두통, 엑세드린 PM, 엑세드린 비염 두통, 엑세드린 긴장성 두통, 팔콜(Falcol), 판사막(Fansamac), 펠덴(Feldene), 페

버울(FeverAll), 피오리날(Fiorinal), 코데인(Codeine)과 함께 피오리날(Fiorinal), 플라낙스(Flanax), 플렉토르 패치(Flector Patch), 플루캠(Flucam), 포르타게식(Fortagesic), 게르빈(Gerbin), 지아조(Giazo), 글라디오(Gladio), 구디스(Goody's) 등 및 전신 통증, 구디스 쿨 오렌지(Cool Orange), 구디스 초강도, 구디스 PM, 그리스리스(Greaseless) 벤가이, GW406381, HCT1026, 허 싱 이(He Xing Yi), 하이날게스-D, 하이드로코텍스, 이부프로펜 나트륨 화이자, 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자, 아이시 핫(Icy Hot) 사노피 아벤티스(SANOFI AVENTIS), 임프라코르(Impracor), 인도신(Indocin), 인도메타신(Indomethacin) 에이피피 파마(APP PHARMA), 인도메타신 마일란(MYLAN), 유아용 타이레놀, IP880, IP940, 이레모드(Iremod), ISV205, JNS013, 청소년용 타이레놀, 주니펜(Junifen), 청소년용 강도의 애드빌, 청소년용 강도의 모트린(Motrin), 케토프로펜 TDS, 렘십 맥스(Lemsip Max), 렘십 맥스 올 인 원, 렘십 맥스 올 나이트, 렘십 맥스 감기 및 플루, 리알다(Lialda), 리스테린(Listerine) 구강 세척제, 로이즈(Lloyds) 크림, 로딘(Lodine), 로르핏(Lorfit) P, 록소닌(Loxonin), LTNS001, 머신돌(Mersyndol), 메살라민 살릭스(SALIX), 메살라민 소파(SOFAR), 메살라진, 메사살(Mesasal) 글락소(GLAXO), 메사살 사노피(SANOFI), 메솔리드(Mesulid), 메트살 히트 룬(Metsal Heat Rub), 미돌 컴플리트(Midol Complete), 미돌 연장된 경감, 미돌 액체 겔, 미돌 PM, 미돌 심대용 체제, 미그라닌(Migranin) 피복정, ML3000, 모빅(Mobic), 모루스(Mohrus), 모트린(Motrin), 모트린 감기 및 비염 통증, 모트린 PM, 모발리스(Movalis) 아스펜(ASPEN), MRX7EAT, 날폰(Nalfon), 날폰 페디놀(PEDINOL), 나프렐란(Naprelan), 나프로신(Naprosyn), 나프로신 알피지 라이프 사이언스(RPG LIFE SCIENCE), 나프록센 이로코(IROKO), NCX4016, NCX701, 네오프로펜(NeoProfen) 런드백(LUNDBECK), 네바낙(Nevanac), 넥세드(Nexcede), 니플란(Niflan), 노르게식(Norgesic) 메디시스(MEDICIS), 노발진(Novalgin), 누프린(Nuprin) 스콜르(SCOLR), 누로펜(Nurofen), 누로펜 감기 및 플루, 누로펜 최대 강도의 편두통, 누로펜 플러스, 누로몰(Nuromol), 비타민 C 와 함께 나이퀼, 오큐펜(Ocufen), OMS103HP, 오랄리스(Oralease), 오루디스(Orudis) 애보트 저펜(ABBOTT JAPAN), 오루베일(Oruvail), 오스텔룩(Osteluc), 옥시코텍스(OxycoDex), P54, 파나돌(Panadol), 파나돌 악티패스트(Actifast), 파라딘(Paradine), 파라맥스(Paramax), 파페낙(Parfenac), 페데아(Pedea), 펜사이드(Pennsaid), 펜타사(Pentasa), 펜타사 오리팜, 페온(Peon), 퍼코단(Percodan), 퍼코단-데미, 퍼코텍스(PercoDex), 퍼코게식(Percogesic), 퍼팔간(Perfalgan), PL2200, PL3100, 폰스텔(Ponstel), 프렉시즈(Prexige), 프롤렌사(Prolensa), PSD508, R-케토프로펜, 란투딜(Rantudil), 렐라펜(Relafen), 레무라(Remura), 로박시살(Robaxisal), 로텍(Rotec), 로와사(Rowasa), ROX828, RP19583, RQ00317076, 루보르(Rubor), 살로팔크(Salofalk), 살론파스(Salonpas), 사리돈(Saridon), SDX101, 셀터치(Seltouch), 에스에프로와사(sfRowasa), 신바로(Shinbaro), 시누맥스(Sinumax), 시누탐(Sinutab), 시누탐 비염, 스팔트(Spalt), 스프릭스(Sprix), 스트레펜(Strefen), 수다페드(Sudafed) 감기 및 기침, 수다페드 코감기 및 비염, 수다페드 PE 감기 플러스 기침, 수다페드 PE 압박 플러스 통증, 수다페드 PE 중증 감기, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 낮 정제, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 밤 정제, 수다페드 PE 비염 플러스 소염 통증 경감, 수다페드 비염 어드밴스(Advance), 서감(Surgam), 시날고스(Synalgos)-DC, 신플렉스(Synflex), 타비스트(Tavist) 알러지/비염/두통, TDS943, TDT070, 테라플루(Theraflu) 감기 및 인후통, 테라플루 낮시간 중증 감기 및 기침, 테라플루 낮시간 발열 경감, 테라플루 발열 경감 당의정 낮시간 다증상 감기, 테라플루 발열 경감 감기 및 가슴 울혈, 토마피린(Thomapyrin), 토마피린 C, 토마피린 발포정, 토마피린 매질, 티코틸(Tilcotil), 티스폴(Tispol), 톨렉틴(Tolectin), 토라돌(Toradol), TPR100, TQ1011, 트라우마-살베(Trauma-Salbe), 트라우마-살베 퀴즈다(Kwizda), 트레오(Treo), 트렉시멧(Treximet), 트로벡스(Trovex), TT063, 타이레놀, 타이레놀 알려지 다증상, 타이레놀 등 통증, 타이레놀 감기 및 기침 낮시간, 타이레놀 감기 및 기침 밤시간, 타이레놀 감기 및 비염 낮시간, 타이레놀 감기 및 비염 밤시간, 타이레놀 코감기 울혈 중증, 타이레놀 감기 다증상 낮시간, 타이레놀 감기 다증상 밤시간 액체, 타이레놀 감기 다증상 중증, 타이레놀 감기 졸립지 않은 체제, 타이레놀 감기 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 완전한 감기, 기침 및 플루 밤시간, 타이레놀 플루 밤시간, 타이레놀 월경통, 타이레놀 PM, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 낮시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 밤시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 중증, 타이레놀 비염 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 울트라 경감, 카페인 및 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 초고강도 벤가이 크림, 울트라셋(Ultracet), UR8880, V0498TA01A, 빅스(Vicks) 나이퀼 감기 및 플루 경감, 비코프로펜(Vicoprofen), 비모보(Vimovo), 볼타렌(Voltaren) 에물겔(Emulgel), 볼타렌 겔, 볼타렌 노바티스 컨슈머 헬스 게엠베하(NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH), 볼타렌 XR, VT122, 제포(Xefo), 제포 래피드(Rapid), 제포캠(Xefocam), 지브롬(Xibrom), XL3, 조돌(Xodol), XP20B, XP21B, XP21L, 짐소르(Zipsor) 및 조에나사(Zoenasa). 또 다른 양태에서, COX-2 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126) 참조). 일부 양태에서, COX-2 억제제는 진행된 유방암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제

는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된 제2 치료제와 함께 사용된다: 데노수맙(Denosumab), 조메타(Zometa)([http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&NovaId=2935376934467633633](http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633); last accessed 12/2/2012), 카르보잔티닙(Carbozantinib) 또는 카보잔티닙(Cabozantinib), 항체 또는 펩티드 차단 PTHLH(부갑상선 호르몬 유사 호르몬) 또는 PTHrP(부갑상선 호르몬 관련 단백질) 및 에버롤리무스.

- [0167] 또 다른 양태에서, 골 분해를 피하고/하거나 예방하는 데에 사용되는 치료제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:
- [0168] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHLH) 억제제(차단 항체를 포함함) 또는 이의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7 내지 34에 상응하는 테리파라타이드(teriparatide)). 이 호르몬은 파골세포를 자극하고 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.
- [0169] - 스트론튬 라벨레이트(Strontium ranelate): 대안적인 경우 치료제이고, 조골세포 증식을 자극하고 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 물질"(DAGA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0170] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기작과 관계없이 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로게스타겐(progestagen), 에스트라디올(estradiol), 드록시펜(droloxifene), 랄록시펜(raloxifene), 라소폭시펜(lasofloxifene), TSE-424, 타목시펜(tamoxifen), 이독시펜(idoxifene), LY353381, LY117081, 토레피펜(toremifene), 플루베스트란트(fluevestrant), 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리디닐)에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646이 있다.
- [0171] - 칼시토닌: 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0172] - 비스포스포네이트: 골 흡수 및 재흡수를 갖는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 갖는 암의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이고, 이때 골 전이를 갖는 암은 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 갖거나 갖지 않는다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 치료에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트의 예로는 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트(pamidronate), 네리드로네이트(neridronate), 올파드로네이트(olpadronate), 알렌드로네이트(alendronate), 이반드로네이트(ibandronate), 리세드로네이트(risedronate), 인카드로네이트(incadronate), 졸레드로네이트(zoledronate) 또는 졸레드론산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트(예컨대, 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 틸루드로네이트(tiludronate) 등)가 있으나, 이들로 한정되지 않는다.
- [0173] - "카텝신(Cathepsin) K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 지칭한다. 카텝신 K 억제제의 비-한정적 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보닐리틸 유도체(국제 특허출원 공보 제WO 03/020278호(노바티스 파마 게엠베하(Novartis Pharma GMBH))에 기재됨); 국제 특허출원 공보 제WO 03/020721호(노바티스 파마 게엠베하) 및 국제 특허출원 공보 제WO 04/000843호(아스트라제네카 아베(ASTRAZENECA AB))에 기재된 피롤로-피리미딘; 및 국제 특허출원 공보 제WO 00/55126호(악시스 파마슈티칼스(Axys Pharmaceuticals)) 및 국제 특허출원 공보 제WO 01/49288호(머크 프로스트 캐나다 앤드 컴파니(Merck Frosst Canada & Co.) 및 악시스 파마슈티칼스)에 기재된 억제제가 있다.
- [0174] - 본원에서 사용된 "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고 골용해성 병변을 갖는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 물질은 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데에 있어서 일정한 역할을 수행할 수 있다. 노바티스의 BHQ880은 혁신 신약인 전체 인간 항-DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다 (Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract).
- [0175] - 본원에서 사용된 "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유발된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 지칭한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서뿐만 아니라 조골세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 이들 종류의 세포들 모두에서

MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 듯하다. 동시에, 조골세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 발생성 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)를 포함하는 골 전이의 병리학적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데에 있어서 실행 가능한 전략일 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀릭시스 인코포레이티드(Exelixis, Inc.))은 MET에 의해 유발된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고 전이를 감소시키고 혈관신생(종양 성장을 뒷받침하는 데에 필요한 새로운 혈관의 형성)을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또 다른 적합한 이중 억제제는 E7050 (N-[2-플루오로-4-({2-[4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일]카보닐아미노피리딘-4-일}옥시)페닐]-N'-(4-플루오로페닐)사이클로프로판-1,1-디카복사아미드(2R,3R)-타르트레이트)(CAS 928037-13-2) 또는 포레티닙(Foretinib)(GSK1363089 또는 XL880으로서도 공지되어 있음, CAS 849217-64-7)이다.

- [0176] - 본원에서 사용된 "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. RANKL은 간질 및 T-림프구 세포의 조골세포 막의 표면 상에서 발견되고, 이들 T-림프구 세포는 RANKL을 분비하는 능력을 나타내는 유일한 세포이다. 그의 주요 기능은 골 재흡수에 관여하는 세포인 파골세포의 활성화이다. RANKL 억제제는 RANKL과 그의 수용체(RANK)의 결합을 차단함으로써, RANK-매개된 신호전달을 차단함으로써, 또는 RANKL의 전사 또는 번역을 차단하여 RANKL의 발현을 감소시킴으로써 작용할 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 적합한 RANKL 길항제 또는 억제제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:
- [0177] o RANKL에 결합할 수 있고 RANK 단백질의 세포의 도메인의 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 뮤린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포의 도메인을 포함할 수 있거나, 대안적으로 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다.
- [0178] o 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin) 또는 RANKL 결합 능력을 갖는 그의 변이체.
- [0179] o RANKL 특이적 안티센스 분자
- [0180] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임(Ribozymes)
- [0181] o 특이적 항-RANKL 항체. "항-RANKL 항체 또는 RANKL에 대해 유도된 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는 핵 인자  $\kappa$ B에 대한 활성화 수용체(RANKL)의 리간드에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 억제될 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명과 관련하여 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, 단편 "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0182] o 특이적 항-RANKL 나노바디. 나노바디는 천연 발생 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 원래 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄를 결여하는 전체 기능성 항체를 갖는다는 발견 후 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고, 이때 FR1 내지 FR4는 골격 영역 1 내지 4이고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3이다. 이 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 함유한다. 중요한 것은 클로닝되고 단리된 VHH 도메인이 원래의 중쇄 항체의 전체 항원 결합 능력을 보유하는 완벽히 안정한 폴리펩티드라는 것이다. 그들의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 अबल린스(Ablynx)에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.
- [0183] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오프로테게린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 데노수맵이다(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, CAS 번호 615258-40-7)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 데노수맵은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 전체 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 데노수맵의 다양한 양태는 미국 특허 제6,740,522호, 제7,411,050호, 제7,097,834호 및 제7,364,736호(이들 각각의 전체 내용은 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 데노수맵과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구축물이다.
- [0184] 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 나노바디는 국제 특허출원 공보 제W02008142164호(이의 내용은 본원에 참고로

도입됨)에 기재된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 ALX-0141(애블린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 일부 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.

- [0185] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 제제는 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라닐레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 라툼-223, 칼시토닌, 및 카텡신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 제제는 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.
- [0186] 한 실시양태에서, 일차 유방암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록(Maraviroc)이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 비크리비록(Vicriviroc)이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012, CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 아플라비록(Aplaviroc)이다(Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2(Suppl. 1): S13). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘(spiropiperidine) CCR5 길항제이다(Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19 (18): 5401-5406). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2): 82-7).
- [0187] 보다 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0188] 바람직한 실시양태에서, 라툼-223 치료는 알파라딘이다.
- [0189] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 상기 언급된 제제들 중 하나 초과와 제제들이 조합되거나, 상기 제제들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬 치료와 조합될 수 있는 조합된 치료가 수행될 수 있다.
- [0190] 유방암 환자에서 이른 골 전이를 예측하는 방법
- [0191] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암, 예컨대, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 측정하는 시험관내 방법으로서, 이때 평균 값 + 1 표준 편차보다 더 높은 상기 유전자의 발현 수준이 이른 골 전이의 증가된 위험을 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0192] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 매우 이른 골 전이이다.
- [0193] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0194] 본원에서 사용된 "이른 골 전이"는 유방암을 갖는 환자에서 수술 후 5년 이내에 나타나는 골 전이를 의미한다.
- [0195] 본원에서 사용된 "매우 이른 골 전이"는 유방암을 갖는 환자에서 수술 후 3년 이내에 나타나는 골 전이를 의미한다.
- [0196] 본 발명의 제4 방법은 유방암, 예컨대, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0197] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제4 방법은 단일 마커로서 c-MAF 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다.
- [0198] 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다. c-MAF 유전자 발현 수준은 본 발명의 제1 방법에 대해 이미 개시된 바와 같이 정량될 수 있다.
- [0199] 바람직한 실시양태에서, 유방암은 기저형 유방암을 포함하는 삼중 음성 유방암, 또는 대안적으로 내강형 A 및 내강형 B를 포함하는 ER+ 유방암이다.
- [0200] 제2 단계에서, 평균 값 + 1 표준 편차보다 더 높은 상기 유전자의 발현 수준은 이른 골 전이의 증가된 위험을

표시한다.

- [0201] 본원에서 사용된 "평균 수준"은 동등하지 않은 값들의 세트의 일반적인 유의성을 요약하거나 대표하는 (평균, 모드 또는 중간으로서) c-MAF 발현 수준의 단일 값을 의미한다. 바람직한 실시양태에서, 평균 수준은 유방암 종양의 대표적인 코호트로부터 취득된 발현 수준의 평균에 상응한다. 환자 코호트는 평가하고자 하는 개별 환자를 대표하는 연령에 의해 정의된다.
- [0202] 본원에서 사용된 "표준 편차"는 숫자 집합의 분산의 척도를 의미한다. 예를 들면, c-MAF의 평균 정상 수준에 대한 표준 편차는 유방 종양 샘플에서 발견된 c-MAF 수준의 집합의 분산이다. 데이터가 보다 더 흩어져 있을수록 편차가 더 높다. 표준 편차는 관찰된 값의 제곱 편차의 평균의 제곱근을 빈도 분포에서의 그들의 평균으로부터 차감함으로써 취득될 수 있다.
- [0203] 일단 유방암, 예컨대, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 평균 값과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 평균 + 평균 수준에 대한 1 표준 편차보다 더 높으면, 상기 대상체가 이른 골 전이를 발생시킬 보다 큰 경향을 갖는다는 결론을 도출할 수 있다.
- [0204] 골 전이를 갖는 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 환자 또는 대안적으로 ER+ 유방암 환자에서 맞춤형 치료를 디자인하는 방법
- [0205] 또 다른 양태에서, 본 발명은
  - [0206] i) 골 전이를 갖는 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 골 전이를 갖는 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 골 전이 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계, 및
  - [0207] ii) 단계 i)에서 취득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0208] 를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체를 위한 맞춤형 치료를 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제5 방법)으로서, 이때 c-MAF 유전자 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합한 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0209] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0210] 본 발명의 제5 방법은 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준(또는 c-MAF 전위 또는 증폭)을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 본 발명의 제5 방법의 경우, 샘플은 골 전이로부터의 조직 샘플일 수 있다.
- [0211] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제5 방법은 단일 마커로서 c-MAF 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.
- [0212] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 취득된 c-MAF 유전자 발현 수준(또는 c-MAF 전위 또는 증폭)은 기준 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플에서의 c-MAF 유전자 발현 수준이다. 분석될 종양의 종류에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제5 방법을 이용하는 경우, 기준 샘플은 전이되지 않은 유방암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.
- [0213] 일단 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 기준 값(예를 들면, 대조군 샘플의 c-MAF 유전자 발현 수준)과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 이것은 상기 대상체가 골 분해를 피하거나 예방하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하다는 것을 표시한다.
- [0214] 골 분해를 피하고/피하거나 예방하기 위해 사용되는 물질의 예시적 예로는 하기 물질들이 있으나 이들로 한정되지 않는다:
- [0215] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHrH) 억제제(차단 항체를 포함함) 또는 이의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7 내지 34에 상응하는 테리파라타이드). 이 호르몬은 파골세포를 자극하고 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.
- [0216] - 스트론튬 라벨레이트: 대안적인 경우 치료제이고, 조골세포 증식을 자극하고 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 물질"(DAGA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0217] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기작과 관계없이 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화



합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로그스테라겐, 에스트라디올, 드롤록시펜, 칼록시펜, 라소폭시펜, TSE-424, 타목시펜, 이독시펜, LY353381, LY117081, 토레피펜, 플루베스트란트, 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리디닐)에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646이 있다.

[0218] - 칼시토닌: 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.

[0219] - 비스포스포네이트: 골 흡수 및 재흡수를 갖는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 갖는 암의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이고, 이때 골 전이를 갖는 암은 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 갖거나 갖지 않는다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 치료에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트의 예로는 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트, 네리드로네이트, 올파드로네이트, 알렌드로네이트, 이반드로네이트, 리세드로네이트, 인카드로네이트, 졸레드로네이트 또는 졸레드론산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트(예컨대, 에티드로네이트, 클로드로네이트, 틸루드로네이트 등)가 있다.

[0220] - 알파라딘(라툼-223 디클로라이드). 알파라딘은 라툼-223 붕괴로부터의 알파 방사선을 이용하여 암세포를 사멸시킨다. 라툼-223은 천연적으로 칼슘 유사체로서의 그의 성질을 통해 골 전이에 자가 표적화한다. 알파 방사선은 (베타 또는 감마 방사선에 기초한 현재의 방사선치료에 비해) 2개 내지 10개 세포의 매우 짧은 범위를 가지므로, 주변 건강한 조직(특히 골수)에 보다 적은 손상을 야기한다. 라툼-223은 칼슘과 유사한 성질을 갖기 때문에 칼슘이 신체의 골을 구축하는 데에 사용되는 부위(보다 빠른 비정상적인 골 성장의 부위, 예컨대, 진행된 거세 내성 전립선 암을 갖는 남성의 골 전이에서 관찰되는 골 성장의 부위를 포함함)로 이동된다. 주입 후 라툼-223은 혈류를 통해 비정상적인 골 성장의 부위로 운반된다. 암이 신체에서 시작되는 부위는 일차 종양으로서 공지되어 있다. 이들 세포들 중 일부는 이탈되어 혈류를 통해 신체의 또 다른 부분으로 운반될 수 있다. 그 다음, 암세포는 신체의 그 부분에서 정착하여 새로운 종양을 형성할 수 있다. 이것은 일어나는 경우 이차 암 또는 전이로서 지칭된다. 후기 전립선암을 갖는 환자들의 대다수는 그들의 골에서 질환의 최대 고통을 앓는다. 라툼-223을 사용하는 목적은 이 이차 암을 선택적으로 표적화하는 것이다. 골에서 흡수되지 않는 임의의 라툼-223은 신속히 장으로 이동되어 배출된다.

[0221] - "카텝신 K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 지칭한다. 카텝신 K 억제제의 비-한정적 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(국제 특허출원 공보 제WO 03/020278호(노바티스 파마 게엠베하)에 기재됨); 국제 특허출원 공보 제WO 03/020721호(노바티스 파마 게엠베하) 및 국제 특허출원 공보 제WO 04/000843호(아스트라제네카 아베)에 기재된 피롤로-피리미딘; 및 국제 특허출원 공보 제WO 00/55126호(악시스 파마슈티칼스) 및 국제 특허출원 공보 제WO 01/49288호(머크 프로스트 캐나다 앤드 컴파니 및 악시스 파마슈티칼스)에 기재된 억제제가 있다.

[0222] - 본원에서 사용된 "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발견되고 골용해성 병변을 갖는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 물질은 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데에 있어서 일정한 역할을 수행할 수 있다. 노바티스의 BHQ880은 혁신 신약인 전체 인간 항-DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다 (Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract).

[0223] - 본원에서 사용된 "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유발된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 지칭한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서만뿐만 아니라 조골세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발견된다. HGF는 이들 종류의 세포들 모두에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 듯하다. 동시에, 조골세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 발생성 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)을 포함하는 골 전이의 병리학적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데에 있어서 실행 가능한 전략일 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀렉시스 인코포레이티드)은 MET에 의해 유발된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고 전이를 감소시키고 혈관신생(종양 성장을 뒷받침하는 데에 필요한 새로운 혈관의 형성)을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또 다른 적합한 이중 억제제는 E7050 (N-

[2-플루오로-4-({2-[4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일]카보닐아미노피리딘-4-일}옥시)페닐]-N'-(4-플루오로페닐)사이클로프로판-1,1-디카복시아미드(2R,3R)-타르트레이트)(CAS 928037-13-2) 또는 포레티닙(GSK1363089 또는 XL880)으로서도 공지되어 있음, CAS 849217-64-7)이다.

- [0224] - 본원에서 사용된 "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. RANKL은 간질 및 T-림프구 세포의 조골세포 막의 표면 상에서 발견되고, 이들 T-림프구 세포는 RANKL을 분비하는 능력을 나타내는 유일한 세포이다. 그의 주요 기능은 골 재흡수에 관여하는 세포인 파골세포의 활성화이다. RANKL 억제제는 RANKL과 그의 수용체(RANK)의 결합을 차단함으로써, RANK-매개된 신호전달을 차단함으로써, 또는 RANKL의 전사 또는 번역을 차단하여 RANKL의 발현을 감소시킴으로써 작용할 수 있다. 본 발명에서 사용되기 적합한 RANKL 길항제 또는 억제제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:
- [0225] o RANKL에 결합할 수 있고 RANK 단백질의 세포외 도메인의 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 뮤린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포외 도메인을 포함할 수 있거나, 대안적으로 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다.
- [0226] o 오스테오프로테게린 또는 RANKL 결합 능력을 갖는 그의 변이체.
- [0227] o RANKL 특이적 안티센스 분자
- [0228] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임
- [0229] o 특이적 항-RANKL 항체. "항-RANKL 항체 또는 RANKL에 대해 유도된 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는 핵 인자  $\kappa$ B에 대한 활성화 수용체(RANKL)의 리간드에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 억제될 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명과 관련하여 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, 단편 "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0230] o 특이적 항-RANKL 나노바디. 나노바디는 천연 발생 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 원래 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄를 결여하는 전체 기능성 항체를 갖는다는 발견 후 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고, 이때 FR1 내지 FR4는 골격 영역 1 내지 4이고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3이다. 이 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 함유한다. 중요한 것은 클로닝되고 단리된 VHH 도메인이 원래의 중쇄 항체의 전체 항원 결합 능력을 보유하는 완벽히 안정한 폴리펩티드라는 것이다. 그들의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애플린스에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.
- [0231] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오프로테게린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 데노수맵이다(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, CAS 번호 615258-40-7)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 데노수맵은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 전체 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 데노수맵의 다양한 양태는 미국 특허 제6,740,522호, 제7,411,050호, 제7,097,834호 및 제7,364,736호(이들 각각의 전체 내용은 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 데노수맵과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구축물이다.
- [0232] 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 나노바디는 국제 특허출원 공보 제W02008142164호(이의 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 ALX-0141(애플린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 일부 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.
- [0233] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 제제는 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 라툼-223, 칼시토닌, 및 카텡신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 제제는 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.

- [0234] 한 실시양태에서, 일차 유방암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012, CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 비크리비록이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012, CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 아플라비록이다(Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2(Suppl. 1): S13). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘 CCR5 길항제이다(Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19 (18): 5401-5406). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2): 82-7).
- [0235] 보다 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0236] 바람직한 실시양태에서, 라툼-223 치료는 알파라딘이다.
- [0237] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 상기 언급된 제제들 중 하나 초과와 제제들이 조합되거나, 상기 제제들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬 치료와 조합될 수 있는 조합된 치료와 수행될 수 있다.
- [0238] c-MAF 유전자의 증폭의 검출을 기초로 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암에서 전이를 예후하는 방법
- [0239] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 암을 앓고 있는 대상체에서 상기 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제6 방법)으로서, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 c-MAF 유전자의 증폭이 골 전이를 발생시킬 증가된 위험을 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0240] 일부 실시양태에서, 증폭은 16q23 좌위의 영역에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 약 16번 염색체의 약 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이(센트로미어(centromere)부터 텔로미어(telomere)까지)의 염색체 영역의 임의의 부분에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 16번 염색체의 약 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이의 게놈 영역(DNA 반복 요소는 배제됨)에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 그 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정된다.
- [0241] 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 증폭을 측정함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는, 그의 증폭이 c-MAF 유전자의 증폭의 존재를 표시하는 염색체 영역은 c-MAF 유전자를 포함하는 좌위 16q22-q24이다. 좌위 16q22-q24는 16번 염색체, 상기 염색체의 긴 아암(arm) 및 밴드 22와 밴드 24 사이의 범위에 위치한다. 이 영역은 콘티그(contig) NT\_010498.15 및 NT\_010542.15를 갖는 NCBI 데이터베이스에 상응한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정될 수 있다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 14q32 및 16q23에 대한 프로브를 포함하는 바이시스(Vysis) LSI IGH/MAF 이중 색채 이중 융합(Dual Color Dual Fusion) 프로브를 사용함으로써 측정된다.
- [0242] 본 발명의 제6 방법은 c-MAF 유전자가 대상체의 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다. 이를 위해, 종양 샘플에서의 c-MAF 유전자의 증폭이 대조군 샘플과 비교된다.
- [0243] 특정 실시양태에서, 유방암을 갖는 대상체에서 골 전이를 발생시킬 경향을 예후하는 본 발명의 제6 방법은 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 카피 수를 측정하는 단계 및 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 이때 c-MAF 카피 수가 대조군 샘플의 c-MAF 카피 수보다 더 큰 경우, 대상체는 골 전이를 발생시킬 보다 큰 경향을 갖는다.
- [0244] 대조군 샘플은 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중

종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 카피 수의 중간 값에 상응하는 샘플을 지칭한다. 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 취득된다. c-MAF 유전자 카피 수가 대조군 샘플에서의 상기 유전자 카피 수에 비해 증가되어 있는 경우, 대상체는 전이를 발생시킬 보다 큰 경향을 갖는다.

[0245] 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자 카피 수가 기준 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피 수보다 더 큰 경우, c-MAF 유전자는 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있다. 한 예에서, c-MAF 유전자의 계놈 카피 수가 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 적어도 2배(즉, 6 카피), 3배(즉, 8 카피), 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배 또는 50배 증가되어 있는 경우, c-MAF 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다. 또 다른 예에서, 세포 당 c-MAF 유전자의 계놈 카피 수가 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 등인 경우, c-MAF 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다.

[0246] 특정 실시양태에서, 증폭 또는 카피 수는 제자리 혼성화 또는 PCR에 의해 측정된다.

[0247] c-MAF 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 증폭되어 있는지를 확인하는 방법은 최신기술 수준에서 널리 공지되어 있다. 상기 방법은 제한 없이 제자리 혼성화(ISH)(예컨대, 형광 제자리 혼성화(FISH), 발색 제자리 혼성화(CISH) 또는 은 제자리 혼성화(SISH)), 계놈 비교 혼성화 또는 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량적 PCR)을 포함한다. 임의의 ISH 방법의 경우, 염색체 또는 핵에서 형광 점, 착색된 점 또는 은을 갖는 점의 수를 세어 증폭 또는 카피 수를 측정할 수 있다.

[0248] 형광 제자리 혼성화(FISH)는 염색체에서 특정 DNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하고 위치를 확인하는 데에 사용되는 세포유전학적 기법이다. FISH는 고도의 서열 유사성을 보이는 염색체의 일부에만 결합하는 형광 프로브를 사용한다. 전형적인 FISH 방법에서, DNA 프로브는 전형적으로 효소 반응, 예컨대, 닉(nick) 번역 또는 PCR의 이용에 의해 DNA 내로 도입되는 플루오르(fluor)-dUTP, 디곡시제닌(digoxigenin)-dUTP, 바이오틴-dUTP 또는 헵텐-dUTP 형태의 형광 분자 또는 헵텐으로 표지된다. 유전물질(염색체)을 함유하는 샘플을 유리 슬라이드 상에 놓고 포름아미드 처리로 변성시킨다. 그 다음, 표지된 프로브를, 당업자에게 의해 결정될 적합한 조건 하에 유전물질을 함유하는 샘플과 혼성화시킨다. 혼성화 후, (불소로 표지된 프로브의 경우) 직접적으로 또는 (헵텐을 검출하기 위해 형광 표지된 항체를 사용하여) 간접적으로 샘플을 가시화한다.

[0249] CISH의 경우, 프로브를 디곡시제닌, 바이오틴 또는 플루오레세인으로 표지하고 적합한 조건 하에 유전물질을 함유하는 샘플과 혼성화시킨다.

[0250] DNA에 결합할 수 있는 임의의 표시 또는 표지 분자를 사용하여 본 발명의 제4 방법에서 사용된 프로브를 표지함으로써, 핵산 분자를 검출할 수 있다. 표지 부착을 위한 표지의 예로는 방사성 동위원소, 효소 기질, 보조인자, 리간드, 화학발광 물질, 형광단, 헵텐, 효소 및 이들의 조합물이 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 표지 부착 방법, 및 상이한 목적으로 적합한 표지를 선택하기 위한 지침은 예를 들면, 문헌(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989) 및 문헌(Ausubel et al., In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998)에서 발견될 수 있다.

[0251] c-MAF 유전자의 증폭 또는 16q23 좌위의 증폭을 직접적으로 확인하거나 16q22-q24 좌위의 증폭을 확인함으로써 일단 증폭의 존재가 확인되면, 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 증폭과 비교된 후, c-MAF 유전자의 증폭이 검출되는 경우, 이것은 대상체가 골 전이를 발생시킬 보다 큰 경향을 갖는다는 사실을 표시한다.

[0252] c-MAF 유전자의 증폭의 확인은 전이되지 않은 유방암을 갖는 대상체의 샘플에서 측정된 c-MAF 유전자의 증폭 수준에 상응하거나, 전이되지 않은 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자의 증폭의 중간 값에 상응하는 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가질 필요가 있다. 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 취득된다. 일반적으로, 전형적인 기준 샘플은 임상적으로 잘 문서화되어 있고 전이의 부재가 잘 특징규명되어 있는 대상체로부터 취득될 것이다. 기준 수준의 유도에 사용된 샘플 채취 집단은 바람직하게는 연구의 대상 환자와 동일한 종류의 암을 앓고 있는 대상체들로 구성될 것이다. 일단 이 중간 값이 확립되면, 환자의 종양 조직에서의 c-MAF의 증폭 수준이 이 중간 값과 비교될 수 있으므로, 증폭이 존재하는 경우, 대상체는 전이를 발생시킬 보다 큰 경향을 갖는다.

[0253] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 골 전이이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 표현 "골용해성 골 전이"는 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파골세포 활성의 자극으로부터 비롯된 전이의 근처에서 발생되고 심한 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 일종을 지칭한다.

- [0254] c-MAF 유전자의 전위의 검출을 기초로 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암에서 전이를 예후하는 방법
- [0255] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자의 전위가 좋지 않은 임상결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0256] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자의 전위가 좋지 않은 임상결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0257] 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 16q23 좌위의 영역으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 약 16번 염색체의 약 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이(센트로미어부터 텔로미어까지)의 염색체 영역의 임의의 부분으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 약 16번 염색체의 약 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이의 게놈 영역(DNA 반복 요소는 배제됨)으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위는 그 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정된다.
- [0258] 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자의 전위는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 전위를 측정함으로써 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 전위는 t(14,16) 전위이다. 또 다른 실시양태에서, 전위되는 염색체 영역은 16q22-q24 좌위로부터 전위된다. 16q22-q24 좌위는 16번 염색체, 상기 염색체의 긴 아암 및 밴드 22와 밴드 24 사이의 범위에 위치한다. 이 영역은 콘티그 NT\_010498.15 및 NT\_010542.15를 갖는 NCBI 데이터베이스에 상응한다. 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자는 14번 염색체의 14q32 좌위로 전위되어, 전위 t(14,16)(q32;q23)를 발생시킨다. 이 전위는 MAF 유전자를 IgH 좌위의 강한 인핸서 옆에 위치시킴으로써, 몇몇 경우 MAF의 과다발현을 초래한다(Eychene, A., Rocques, N., and Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693).
- [0259] 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 전위는 상기 전위에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 색채 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 융합 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 색채 이중 융합 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 2개의 별개 프로브들을 사용함으로써 측정된다.
- [0260] 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 전위는 14q32 및 16q23에 대한 프로브를 포함하는 바이시스 LSI IGH/MAF 이중 색채 이중 융합 프로브(<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>; last accessed 11/5/2012)를 사용함으로써 측정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 전위는 크레아테크(Kreatech) 진단 MAF/IGH gt(14;16) 융합 프로브(<http://www.kreatech.com/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>; last accessed 11/5/2012), 애브노바(Abnova) MAF FISH 프로브([http://www.abnova.com/products/products\\_detail.asp?Catalog\\_id=FA0375](http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=FA0375); last accessed 11/5/2012), 캔서 제네틱스 이탈리아(Cancer Genetics Italia) IGH/MAF 이중 색채 이중 융합 전위 프로브(<http://www.cancergeneticsitalia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>; last accessed 11/5/2012), 크레아티브 바이오어레이(Creative Bioarray) IGH/MAF-t(14;16)(q32;q23) FISH 프로브(<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=35&page=10>; last accessed 11/5/2012), 아릅 라보라토리스(Arup Laboratories)의 FISH에 의한 다발성 골수종 패널(<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; last accessed 11/5/2012), 16q23 또는 14q32에 대해 특이적인 아질런트(Agilent) 프로브(<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; last accessed 11/5/2012; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; last accessed 11/5/2012), 16q23 또는 14q32에 대해 특이적인 다코(Dako) 프로브([http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts\\_surefish.htm?setCountry=true&pur1=ar42/psg42806000/baseproducts\\_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country](http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&pur1=ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country); last accessed 11/5/2012), 사이토셀(CytoCELL) IGH/MAF 전위 이중 융합 프로브([http://www.zentech.be/uploads/docs/products\\_info/prenatalogy/cytoCELL%202012-](http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatalogy/cytoCELL%202012-)

2013%20catalogue%5B3%5D.pdf; last accessed 11/5/2012), 메타시스템스(Metasystems) XL IGH/MAF 전위 - 이중 융합 프로브([http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com\\_joobd&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272](http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joobd&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272); last accessed 11/5/2012), 제이스(Zeiss) FISH 프로브 XL(100  $\mu$ l), IGH/MAFB(<https://www.microshop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&l=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=000000-0528-231-uk>; last accessed 11/5/2012), 또는 제니셀 바이오텍(Genycell Biotech) IGH/MAF 이중 융합 프로브([http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie6\\_\\_86.ppt&ei=MhGYU0i3GKWH0QG1t4DoDw&usq=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf31VgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx\\_Ww](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie6__86.ppt&ei=MhGYU0i3GKWH0QG1t4DoDw&usq=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf31VgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww); last accessed 11/5/2012)를 사용함으로써 측정된다.

[0261] 일부 실시양태에서, 프로브 상의 표지는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 주황색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 녹색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 적색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 황색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 1개의 프로브는 적색 형광단으로 표지되고, 1개의 프로브는 녹색 형광단으로 표지된다. 일부 실시양태에서, 1개의 프로브는 녹색 형광단으로 표지되고, 1개의 프로브는 주황색 형광단으로 표지된다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 황색 형광단이다. 예를 들면, MAF 특이적 프로브가 적색 형광단으로 표지되고 IGH 특이적 프로브가 녹색 형광단으로 표지되는 경우, 백색이 관찰되면, 이것은 신호가 중첩되고 전위가 발생하였다는 것을 표시한다.

[0262] 일부 실시양태에서, 형광단은 스펙트럼오렌지(SpectrumOrange)이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 스펙트럼그린(SpectrumGreen)이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 DAPI이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트(PlatinumBright)405이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트415이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트495이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트505이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트550이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트547이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트570이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트590이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트647이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트495/550이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트415/495/550이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 DAPI/플라티늄브라이트495/550이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 FITC이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 텍사스 레드(Texas Red)이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 DEAC이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 R6G이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 Cy5이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 FITC, 텍사스 레드 및 DAPI이다. 일부 실시양태에서, DAPI 반대염색을 이용하여 전위, 증폭 또는 카피 수 변경을 가시화한다.

[0263] 본 발명의 한 실시양태는 제1 단계에서 c-MAF 유전자가 대상체의 샘플에서 전위되어 있는지를 확인하는 방법을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 중앙 조직 샘플이다.

[0264] 특정 실시양태에서, 유방암을 갖는 대상체에서 골 전이를 발생시킬 경향을 예측하는 본 발명의 방법은 c-MAF 유전자가 전위되어 있는 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 카피 수를 측정하는 단계 및 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 이때 c-MAF 카피 수가 대조군 샘플의 c-MAF 카피 수보다 더 큰 경우, 대상체는 골 전이를 발생시킬 보다 큰 경향을 갖는다.

[0265] c-MAF 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 전위되어 있는지를 확인하는 방법은 최신기술 수준에서 널리 공지되어 있고, c-MAF의 증폭에 대해 앞서 기재된 방법들을 포함한다. 상기 방법들은 제한 없이 제자리 혼성화(ISH)(예컨대, 형광 제자리 혼성화(FISH), 발색 제자리 혼성화(CISH) 또는 은 제자리 혼성화(SISH)), 계놈 비교 혼성화 또는 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량적 PCR)을 포함한다. 임의의 ISH 방법의 경우, 염색체 또는 핵에서 형광 점, 착색된 점 또는 은을 갖는 점의 수를 세어 증폭, 카피 수 또는 전위를 측정할 수 있다. 다른 실시양태에서, 카피 수 변경 및 전위의 검출은 전체 계놈 서열결정, 엑솜 서열결정, 또는 임의의 PCR 유래의 기술의 이용을 통해 검출될 수 있다. 예를 들면, 계놈 DNA의 샘플에 대한 PCR을 수행하여 전위를 검출할 수 있다. 한 실시양태에서, 정량적 PCR이 이용된다. 한 실시양태에서, c-MAF 유전자에 대해 특이적인 프라이머 및 IGH 프로모터 영역에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하고, 생성물이 생성되는 경우, 전위가 일어났다.

[0266] 일부 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭 및 카피 수는 c-MAF 유전자의 전위가 측정된 후 측정된다. 일부 실시양태에서, 프로브를 사용하여 세포가 c-MAF 유전자에 대한 배수체인지를 확인한다. 일부 실시양태에서, 관심있는 유전자로부터 2 초과 신호가 존재하는지를 확인함으로써 배수성을 확인한다. 일부 실시양태에서, 관심있는 유전자에 대해 특이적인 프로브로부터의 신호를 측정하고 이 신호를 센트로미어 프로브 또는 다른 프로브와 비

교함으로써 배수성을 확인한다.

- [0267] c-MAF 유전자의 증폭의 검출을 기초로 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암에서 임상결과를 예후하는 방법
- [0268] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 환자의 임상결과를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제7 방법)으로서, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 c-MAF 유전자의 증폭이 좋지 않은 임상결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0269] 본 발명의 제7 방법은 c-MAF 유전자가 대상체의 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. c-MAF의 증폭의 확인은 본질적으로 본 발명의 제5 방법에 기재된 바와 같이 수행된다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다. 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 16q23 또는 16q22-q24 좌위의 증폭을 확인함으로써 확인된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 c-MAF 유전자 특이적 프로브를 사용함으로써 확인된다.
- [0270] 제2 단계에서, 본 발명의 제7 방법은 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 이때 c-MAF 카피 수가 대조군 샘플의 c-MAF 카피 수보다 더 큰 경우, 이것은 좋지 않은 임상결과를 표시한다.
- [0271] 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자 카피 수가 기준 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피 수보다 더 큰 경우, c-MAF 유전자는 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있다. 한 예에서, c-MAF 유전자의 게놈 카피 수가 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 적어도 2배(즉, 6 카피), 3배(즉, 8 카피), 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배 또는 50배 증가되어 있는 경우, c-MAF 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다. 또 다른 예에서, 세포 당 c-MAF 유전자의 게놈 카피 수가 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 등인 경우, c-MAF 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다.
- [0272] 또 다른 실시양태에서, 기준 유전자 카피 수는 골 전이를 앓고 있지 않은 대상체의 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암의 샘플에서의 유전자 카피 수이다.
- [0273] 또 다른 실시양태에서, 증폭은 제자리 혼성화 또는 PCR에 의해 확인된다.
- [0274] 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방 종양, 또는 대안적으로 ER+ 유방 종양 또는 HER2+ 유방 종양을 갖는 환자에서 맞춤형 치료를 디자인하는 방법
- [0275] 최신기술 수준에서 공지되어 있는 바와 같이, 암을 앓고 있는 대상체에게 투여되어야 하는 치료는 상기 암이 악성 종양인지, 즉 전이될 확률이 높은지, 아니면 상기 암이 양성 종양인지에 달려 있다. 제1 가정에서, 선택되는 치료는 전신 치료, 예컨대, 화학치료이고, 제2 가정에서 선택되는 치료는 국소 치료, 예컨대, 방사선치료이다.
- [0276] 따라서, 본원에 기재된 바와 같이, 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 세포 또는 대안적으로 ER+ 유방암 세포에서의 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위가 골 전이의 존재와 관련되어 있는 한, c-MAF 유전자 증폭 또는 전위는 상기 암을 앓고 있는 대상체에 가장 적합한 치료를 결정하는 데에 유용하다. 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 16q23 또는 16q22-q24 좌위의 증폭을 확인함으로써 확인된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 c-MAF 유전자 특이적 프로브를 사용함으로써 확인된다.
- [0277] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0278] i) 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위를 정량하는 단계, 및
- [0279] ii) i)에서 획득된 유전자 증폭 또는 전위를 기준 값과 비교하는 단계
- [0280] 를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체를 위한 맞춤형 치료를 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제3 방법)으로서, 이때 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위가 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합한 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다. c-MAF 유전자 증폭 또는 전위가 상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하지 않다. 바람직한 실시

양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 16q23 또는 16q22-q24 좌위의 증폭을 확인함으로써 확인된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 c-MAF 유전자 특이적 프로브를 사용함으로써 확인된다.

- [0281] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0282] 본 발명의 또 다른 방법은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위를 정량하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 중앙 조직 샘플이다.
- [0283] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 단일 마커로서 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.
- [0284] 본 발명의 이 특정 방법의 경우, 샘플은 대상체의 일차 종양 조직 샘플일 수 있다.
- [0285] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 수득된 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위는 기준 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위이다. c-MAF 유전자 증폭 또는 전위의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 관련되어야 한다. 분석되는 종양의 종류에 따라 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 기준 샘플은 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위에 상응하는 샘플이다.
- [0286] 일단 샘플에서 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위가 측정되고 기준 값과 비교되면, 상기 유전자의 유전자 증폭 또는 전위가 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이를 예방하고/하거나(대상체에서 아직 전이가 일어나지 않은 경우) 치료하는 것(대상체에서 이미 전이가 일어난 경우)을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하다는 결론을 도출할 수 있다.
- [0287] 암이 전이된 경우, 화학치료, 호르몬 치료, 면역치료, 또는 이들의 조합을 포함하나 이들로 한정되지 않는 전신 치료가 이용될 수 있다. 추가로, 방사선치료 및/또는 수술이 이용될 수 있다. 치료의 선택은 일반적으로 일차 암의 종류, 크기, 전이의 위치, 환자의 연령 및 일반적인 건강, 및 이전에 이용된 치료의 종류에 달려 있다.
- [0288] 전신 치료는 전신에 도달하는 치료이고, 예컨대, 다음과 같다:
- [0289] - 화학치료는 암세포를 파괴하는 약물의 사용이다. 약물은 일반적으로 경구 또는 정맥내 경로를 통해 투여된다. 종종, 화학치료는 방사선치료와 함께 이용된다. 유방암에 적합한 화학치료제는 하기 치료제들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 안쓰라사이클린(독소루비신, 에피루비신, 폐결화된 리포솜 독소루비신), 탁산(파클리탁셀, 독세탁셀, 파클리탁셀에 결합된 알부민 나노입자), 5-플루오로우라실(연속 관주 5-FU, 카페시타빈), 빈카 알칼로이드(비노렐빈, 빈블라스틴), 겐시타빈, 백금 염(시스플라틴, 카보플라틴), 사이클로포스프아미드, 에토포사이드 및 상기 치료제들 중 하나 이상의 조합물, 예컨대, 사이클로포스프아미드/안쓰라사이클린 +/- 5-플루오로우라실 요법(예컨대, 독소루비신/사이클로포스프아미드(AC), 에피루비신/사이클로포스프아미드(EC), 사이클로포스프아미드/에피루비신/5-플루오로우라실(CEF), 사이클로포스프아미드/독소루비신/5-플루오로우라실(CAF), 5-플루오로우라실/에피루비신/사이클로포스프아미드(FEC)), 사이클로포스프아미드/메토트렉세이트/5-플루오로우라실(CMF), 안쓰라사이클린/탁산(예컨대, 독소루비신/파클리탁셀 또는 독소루비신/독세탁셀), 독세탁셀/카페시타빈, 겐시타빈/파클리탁셀, 탁산/백금 요법(예컨대, 파클리탁셀/카보플라틴 또는 독세탁셀/카보플라틴).
- [0290] - 면역치료는 환자의 면역 시스템 자체가 암과 싸우도록 돕는 치료이다. 환자에서 전이를 치료하는 데에 이용되는 여러 종류의 면역치료가 존재한다. 이들은 사이토카인, 단일클론 항체 및 항종양 백신을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.
- [0291] 또 다른 양태에서, 치료제는 알파라딘(라툼-223 디클로라이드)이다. 알파라딘은 라툼-223 붕괴로부터의 알파 방사선을 이용하여 암세포를 사멸시킨다. 라툼-223은 천연적으로 칼슘 유사체로서의 그의 성질을 통해 골 전이에 자가 표적화한다. 알파 방사선은 (베타 또는 감마 방사선에 기초한 현재의 방사선치료에 비해) 2개 내지 10개 세포의 매우 짧은 범위를 가지므로, 주변 건강한 조직(특히 골수)에 보다 적은 손상을 야기한다. 라툼-223은 칼슘과 유사한 성질을 갖기 때문에 칼슘이 신체의 골을 구축하는 데에 사용되는 부위(보다 빠른 비정상적인 골 성장의 부위, 예컨대, 진행된 거세 내성 전립선 암을 갖는 남성의 골 전이에서 관찰되는 골 성장의 부위를 포함함)로 이동된다. 주입 후 라툼-223은 혈류를 통해 비정상적인 골 성장의 부위로 운반된다. 암이 신체에서 시작되는 부위는 일차 종양으로서 공지되어 있다. 이들 세포들 중 일부는 이탈되어 혈류를 통해 신체의 또 다른



부분으로 운반될 수 있다. 그 다음, 암세포는 신체의 그 부분에서 정착하여 새로운 종양을 형성할 수 있다. 이것은 일어나는 경우 이차 암 또는 전이로서 지칭된다. 후기 전립선암을 갖는 환자들의 대다수는 그들의 골에서 질환의 최대 고통을 앓는다. 라툼-223을 사용하는 목적은 이 이차 암을 선택적으로 표적화하는 것이다. 골에서 흡수되지 않는 임의의 라툼-223은 신속히 장으로 이동되어 배출된다.

[0292]

또 다른 양태에서, 치료제는 mTor 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 이중 mTor/PI3 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABI0099(시롤리무스), 라파마이신(시롤리무스), 아브락산(파클리탁셀), 아브소브(에버롤리무스), 아피니토르(에버롤리무스), 글리벡과 함께 아피니토르, AS703026(피마서티프), 악세스(우미롤리무스), AZD2014, BEZ235, 바이오프리돔(우미롤리무스), 바이오매트릭스(우미롤리무스), 바이오매트릭스 플렉스(우미롤리무스), CC115, CC223, 콤보 생물조작된 시롤리무스 용출 스텐트 오르부스니치(시롤리무스), 쿠락신 CBLC102(메파크린), DE109(시롤리무스), DS3078, 엔테버 DES(조타롤리무스), 엔테버 레졸루트(조타롤리무스), 페마라(레트로졸), 호세나(안트로퀴놀), INK128, 인스피론(시롤리무스), IPI504(레타스피마이신 하이드로클로라이드), KRN951(티보자닙), ME344, MGA031(테플리주맵), 미스텐트 SES, MKC1, 노보리(우미롤리무스), OSI027, OVI123(코다이세핀), 팔로미드 529, PF04691502, 프로무스 엘리멘트(에버롤리무스), PWT33597, 라파문(시롤리무스), 레솔루트 DES(조타롤리무스), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75(보세투주맵 마포도틴), 시너지(에버롤리무스), 탈토르빅(리다포롤리무스), 타세바(에를로티닙), 토리셀(템시롤리무스), 자이언스 프라임(에버롤리무스), 자이언스 V(에버롤리무스), 조맥스(조타롤리무스), 조트레스(에버롤리무스), 조타롤리무스 용출 말초 스텐트 메드트로닉(조타롤리무스), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, 캔스타틴 젠자임(캔스타틴), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, 라파마이신 온코이핀(시롤리무스), SB2602, 시롤리무스 PNP 삼양 바이오파마슈티칼스(시롤리무스), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, 애드바칸(에버롤리무스), AZD8055, 사이퍼 셀렉트 플러스 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 사이퍼 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 약물 코팅된 풍선(시롤리무스), E-매직 플러스(시롤리무스), 엠토르(시롤리무스), 에스프릿(에버롤리무스), 에버토르(에버롤리무스), HBF0079, LCP-시로(시롤리무스), 리무스 클라리스(시롤리무스), mTOR 억제제 셀좁, 네보 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), nPT-mTOR, 라파칸(시롤리무스), 레나셉트(시롤리무스), 레졸브(시롤리무스), 로카스(시롤리무스), SF1126, 시롤림(시롤리무스), 시롤리무스 노쓰 차이나(시롤리무스), 시롤리무스 란박시(시롤리무스), 시롤리무스 와슨(시롤리무스), 시로판(시롤리무스), 시로바(시롤리무스), 수프랄리무스(시롤리무스), 수프랄리무스-코어(시롤리무스), 타크롤리무스(타크롤리무스) 와슨(타크롤리무스), TAF093, 템시롤리무스 아코드(템시롤리무스), 템시롤리무스 산도즈(템시롤리무스), TOP216, 자이언스 프라임(에버롤리무스), 및 자이언스 V(에버롤리무스). 특정 실시양태에서, mTor 억제제는 아피니토르(에버롤리무스)이다

([http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&NovaId=4029462064338207963](http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=4029462064338207963); last accessed 11/28/2012). 또 다른 양태에서, 에버롤리무스는 아로마타제 억제제와 조합된다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529) 참조). 또 다른 양태에서, mTor 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81) 참조). 일부 양태에서, mTor 억제제는 호르몬 수용체에 대한 양성을 나타내는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다(예를 들면, 문헌(Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529) 참조). 일부 실시양태에서, 환자는 ER+를 나타낸다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 진행된 유방암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다.

[0293]

또 다른 양태에서, 치료제는 Src 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, Src 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: AZD0530(사라카티닙), 보솔리프(보수티닙), ENMD981693, KD020, KX01, 스프리셀(다사티닙), 예르보이(이필리무맵), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, c-Src 키나제 억제제 KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, 다사티닙 헤테로(다사티닙), 다사티닙 발린트(다사티닙), 폰트락스(다사티닙), Src 키나제 억제제 키넥스, VX680(토자서티프 락테이트), XL228 및 SUNK706. 일부 실시양태에서, Src 키나제 억제제는 다사티닙이다. 또 다른 양태에서, Src 키나제 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Sen, B. and Johnson, F.M. Regulation of Src

Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 pages) 참조). 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 SRC 반응 시그너처(SRS)에 대한 양성을 나타내는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, 환자는 SRS+ 및 ER-를 나타낸다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Zhang, CH.-F, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16: 67-78) 참조). 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 진행된 유방암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다.

[0294]

또 다른 양태에서, 치료제는 COX-2 억제제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABT963, 아세트아미노펜 이알 존슨(아세트아미노펜), 아콜라 X(케톨락 트로메타민), BAY1019036(아스피린), BAY987111(디펜하이드라민, 나프록센 나트륨), BAY11902(피록시캅), BCIBUCH001(이부프로펜), 카복시첼(아프리카십), CS502, CS670(펠루비프로펜), 디클로페낙 HPBCD(디클로페낙), 디락틴(케토프로펜), GW406381, HCT1026(니트로플루르비프로펜), 하이아날게스-D(디클로페낙), 하이드로코렉스(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 하이드로코돈), 이부프로펜 나트륨 화이자(이부프로펜 나트륨), 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자(아세트아미노펜, 이부프로펜), 임프라코르(케토프로펜), IP880(디클로페낙), IP940(인도메타신), ISV205(디클로페낙 나트륨), JNS013(아세트아미노펜, 트라마돌 하이드로클로라이드), 케토프로펜 TDS(케토프로펜), LTNS001(나프록센 에테메실), 메살라민 살릭스(메살라민), 메살라민 소파르(메살라민), 메살라진(메살라민), ML3000(리코켈론), MRX7EAT(에토돌락), 나프록센 이코코(나프록센), NCX4016(니트로아스피린), NCX701(니트로아세트아미노펜), 누프린 스킨(이부프로펜), OMS103HP(아미트립틸린 하이드로클로라이드, 케토프로펜, 옥시메타졸린 하이드로클로라이드), 오랄리스(디클로페낙), 옥시코텍스(텍스트로메토르판, 옥시코돈), P54, 퍼코텍스(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 옥시코돈), PL3100(나프록센, 포스파티딜 콜린), PSD508, R-케토프로펜(케토프로펜), 레무라(브롬페낙 나트륨), ROX828(케톨락 트로메타민), RP19583(케토프로펜 라이신), RQ00317076, SDX101(R-에토돌락), TDS943(디클로페낙 나트륨), TDT070(케토프로펜), TPR100, TQ1011(케토프로펜), TT063(S-플루르비프로펜), UR8880(시미콕십), V0498TA01A(이부프로펜), VT122(에토돌락, 프로프라놀롤), XP20B(아세트아미노펜, 텍스트로프로폭시펜), XP21B(디클로페낙 칼륨), XP21L(디클로페낙 칼륨), 조에나사(아세틸시스테인, 메살라민), 아세펜, 악티페드 플러스, 악티페드-P, 아콜라, 아콜라 LS, 아콜라 PF, 아콜라 X, 아쿠베일, 애드빌, 애드빌 알러지 비염, 애드빌 감기 및 비염, 애드빌 울혈 경감, 애드빌 PM, 애드빌 PM 캡슐, 에어살론파스, 에어탈, 알코올 무함유 나이퀵 감기 및 플루 경감, 알레브, 알레브 아브디 이브라힘, 알레브-D, 알카-셀트저, 알카-셀트저 바이엘, 알카-셀트저 초강도, 알카-셀트저 레몬-라임, 알카-셀트저 오리지날, 알카-셀트저 플러스, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침 제제, 알카-셀트저 플러스 낮과 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 낮에 졸립지 않는 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 플루 제제, 알카-셀트저 플러스 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 비염 제제, 알카-셀트저 플러스 스파클링 오리지날 감기 제제, 알카-셀트저 PM, 알카-셀트저 수면각성제, 아나신, 아나프록스, 아나프록스 미네르바, 안사이드, 아피톡신, 아프라낙스, 아프라낙스 애브디, 아콕시아, 관절염 제제 벤가이, 아쓰로텍, 아사콜, 아사콜 HD, 아사콜 메두나 아즈네이미텔, 아사콜 오리팜, 아스피린 바이엘, 아스피린 콤플렉스, 아스피린 미그란, AZD3582, 아줄피딘, 바탈간 M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, 베나드릴 알러지, 베나드릴 낮과 밤, 베닐린 4 플루, 베닐린 감기 및 플루, 베닐린 감기 및 플루 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 플러스, 베닐린 낮과 밤 감기 및 플루 경감, 베닐린 1 올-인-원, 블랙신, 블랙신 안젤리니, 브롬데이, 버퍼린, 버스코판 플러스, 갈돌로르, 갈마텔, 캄비아, 카나사, 카복시첼, 카타플람, 셀레브렉스, 셀레브렉스 오리팜, 소아용 애드빌 알러지 비염, 소아용 타이레놀, 소아용 타이레놀 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 감기, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 기침, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 비한, 소아용 타이레놀 플러스 플루, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 알러지, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 인후통, 소아용 타이레놀 플러스 다증상 감기, 클리노릴, 코드랄 감기 및 플루, 코드랄 낮과 밤 낮 정제, 코드랄 낮과 밤 밤 정제, 코드랄 밤시간, 콜라잘, 컴부녹스, 콘택 감기 플러스 플루, 콘택 감기 플러스 플루 졸립지 않은 제제, 코리시딘 D, 코리시딘 HBP 감기 및 플루, 코리시딘 HBP 낮과 밤 다증상 감기, 코리시딘 HBP 최대 강도의 플루, 코리시딘 HBP 밤시간 다증상 감기, 코리시딘 II 초강도 감기 및 플루, CS502, CS670, 데이프로, 데이프로알타, DDS06C, 데마진 감기 및 플루, 데마진 기침, 감기 및 플루, 데마진 낮/밤 감기 및 플루, 데마진 PE 감기 및 플루, 데마진 PE 낮/밤 감기 및 플루, 디클로페낙 HPBCD, 디메탐 낮 경감, 디메탐 다증상 감기 및 플루, 디메탐 밤 경감, 디메탐 통증 및 발열 경감, 디메탐 PE 비염 통증, 디메탐 PE 비염 통증 플러스 알러지, 디펜텀, 디락틴, 디스프린 감기 'n' 발열, 디스프린 엑스트라, 디스프린 포르테, 디스프린 플러스, 드리스탄 감기, 드리

스탄 주니어, 트릭소랄 플러스, 두엑시스, 다이나스타트, 에페탈간, 에페탈간 플러스 비타민 C, 에페탈간 비타민 C, 엘릭스슈어 IB, 액세드린 등 및 전신, 액세드린 편두통, 액세드린 PM, 액세드린 비염 두통, 액세드린 긴장성 두통, 팔콜, 판사막, 펠텐, 페버올, 피오리날, 코데인과 함께 피오리날, 플라낙스, 플렉토르 패치, 플루감, 포르타게식, 게르빈, 지아조, 글라디오, 구디스 등 및 전신 통증, 구디스 쿨 오렌지, 구디스 초강도, 구디스 PM, 그리스리스 벤가이, GW406381, HCT1026, 허 싱 이, 하이날게스-D, 하이드로코텍스, 이부프로펜 나트륨 화이자, 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자, 아이시 핫 사노피 아벤티스, 임프라코르, 인도신, 인도메타신 에이피피 파마, 인도메타신 마일란, 유아용 타이레놀, IP880, IP940, 이레모드, ISV205, JNS013, 청소년용 타이레놀, 주니켄, 청소년용 강도의 애드빌, 청소년용 강도의 모트린, 케토프로펜 TDS, 램십 맥스, 램십 맥스 올 인 원, 램십 맥스 올 나이트, 램십 맥스 감기 및 플루, 리알다, 리스테린 구강 세척제, 로이즈 크림, 로딘, 로르팻 P, 록소닌, LTNS001, 머신들, 메살라민 살릭스, 메살라민 소파, 메살라진, 메사살 글락소, 메사살 사노피, 메술리드(Mesulid), 메트살 히트 룬, 미돌 컴플리트, 미돌 연장된 경감, 미돌 액체 겔, 미돌 PM, 미돌 십대용 제제, 미그라닌 피복정, ML3000, 모빅, 모루스, 모트린, 모트린 감기 및 비염 통증, 모트린 PM, 모발리스 아스펜, MRX7EAT, 날폰, 날폰 페디놀, 나프렐란, 나프로신, 나프로신 알피지 라이프 사이언스, 나프록센 이 로코, NCX4016, NCX701, 네오프로펜 런드백, 네바낙, 넥세드, 니플란, 노르게식 메디시스, 노발진, 누프린 스킨, 누로펜, 누로펜 감기 및 플루, 누로펜 최대 강도의 편두통, 누로펜 플러스, 누로몰, 비타민 C와 함께 나이퀼, 오큐펜, OMS103HP, 오랄리스, 오루디스 애보트 저펜, 오루베일, 오스텔록, 옥시코텍스, P54, 파나돌, 파나돌 약티패스트, 파라딘, 파라맥스, 파페낙, 페테아, 펜사이드, 펜타사, 펜타사 오리팜, 페온, 퍼코단, 퍼코단-데미, 퍼코텍스, 퍼코게식, 퍼팔간, PL2200, PL3100, 폰스텔, 프렉시즈, 프롤렌사, PSD508, R-케토프로펜, 란투딜, 렐라펜, 레무라, 로박시살, 로텍, 로와사, ROX828, RP19583, RQ00317076, 루보르, 살로팔크, 살론파스, 사리돈, SDX101, 셀터치, 에스에프로와사, 신바로, 시누맥스, 시누담, 시누담 비염, 스파트, 스프릭스 스트레펜, 수다페드 감기 및 기침, 수다페드 코감기 및 비염, 수다페드 PE 감기 플러스 기침, 수다페드 PE 압박 플러스 통증, 수다페드 PE 중증 감기, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 낮 정제, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 밤 정제, 수다페드 PE 비염 플러스 소염 통증 경감, 수다페드 비염 어드밴스, 서감, 시날고스-DC, 신플렉스, 타비스트 알러지/비염/두통, TDS943, TDT070, 테라플루 감기 및 인후통, 테라플루 낮시간 중증 감기 및 기침, 테라플루 낮시간 발열 경감, 테라플루 발열 경감 당의정 낮시간 다증상 감기, 테라플루 발열 경감 감기 및 가슴 울혈, 토마피린, 토마피린 C, 토마피린 발포정, 토마피린 매질, 킬코틸, 티스폴, 톨렉틴, 토라돌, TPR100, TQ1011, 트라우마-살베, 트라우마-살베 퀴즈다, 트레오, 트렉시멧, 트로박스, TT063, 타이레놀, 타이레놀 알러지 다증상, 타이레놀 등 통증, 타이레놀 감기 및 기침 낮시간, 타이레놀 감기 및 기침 밤시간, 타이레놀 감기 및 비염 낮시간, 타이레놀 감기 및 비염 밤시간, 타이레놀 코감기 울혈 중증, 타이레놀 감기 다증상 낮시간, 타이레놀 감기 다증상 밤시간 액체, 타이레놀 감기 다증상 중증, 타이레놀 감기 줄립지 않은 제제, 타이레놀 감기 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 완전한 감기, 기침 및 플루 밤시간, 타이레놀 플루 밤시간, 타이레놀 월경통, 타이레놀 PM, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 낮시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 밤시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 중증, 타이레놀 비염 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 울트라 경감, 카페인 및 코데인 포스페이티브와 함께 타이레놀, 코데인 포스페이티브와 함께 타이레놀, 초고강도 벤가이 크림, 울트라셋, UR8880, V0498TA01A, 빅스 나이퀼 감기 및 플루 경감, 비코프로펜, 비모보, 볼타렌 에물겔, 볼타렌 겔, 볼타렌 노바티스 컨슈머 헬스 게엠베하, 볼타렌 XR, VT122, 제포(Xeфо), 제포 래피드, 제포감, 지브룸, XL3, 조돌, XP20B, XP21B, XP21L, 짐소르 및 조에나사. 또 다른 양태에서, COX-2 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126) 참조). 일부 양태에서, COX-2 억제제는 진행된 유방암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된 제2 치료제와 함께 사용된다: 데노수맙, 조메타 ([http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&NovaId=2935376934467633633](http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633); last accessed 12/2/2012), 카르보잔티닙 또는 카보잔티닙, 항체 또는 펩티드 차단 PTHLH(부갑상선 호르몬 유사 호르몬) 또는 PTHrP(부갑상선 호르몬 관련 단백질) 및 에버롤리무스.

[0295] 또 다른 양태에서, 골 분해를 피하고/하거나 예방하는 데에 사용되는 치료제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:

[0296] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHLH) 억제제(차단 항체를 포함함) 또는 이의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7 내지 34에 상응하는 테리파라타이드). 이 호르몬은 파골세포를 자극하고 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.

- [0297] - 스트론튬 라벨레이트: 대안적인 경구 치료제이고, 조골세포 증식을 자극하고 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 물질"(DAGA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0298] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기작과 관계없이 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로게스타겐, 에스트라디올, 드롤록시펜, 탈록시펜, 라소폭시펜, TSE-424, 타목시펜, 이독시펜, LY353381, LY117081, 토레피펜, 플루베스트란트, 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리디닐)에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646이 있다.
- [0299] - 칼시토닌: 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0300] - 비스포스포네이트: 골 흡수 및 재흡수를 갖는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 갖는 암의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이고, 이때 골 전이를 갖는 암은 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 갖거나 갖지 않는다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 치료에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트의 예로는 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트, 네리드로네이트, 올파드로네이트, 알렌드로네이트, 이반드로네이트, 리세드로네이트, 인카드로네이트, 졸레드로네이트 또는 졸레드론산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트(예컨대, 에티드로네이트, 클로드로네이트, 탈루드로네이트 등)가 있다.
- [0301] - "카텝신 K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 지칭한다. 카텝신 K 억제제의 비-한정적 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보닐리틸 유도체(국제 특허출원 공보 제WO 03/020278호(노바티스 파마 게엠베하)에 기재됨); 국제 특허출원 공보 제WO 03/020721호(노바티스 파마 게엠베하) 및 국제 특허출원 공보 제WO 04/000843호(아스트라제네카 아베)에 기재된 피롤로-피리미딘; 및 국제 특허출원 공보 제WO 00/55126호(악시스 파마슈티칼스) 및 국제 특허출원 공보 제WO 01/49288호(머크 프로스트 캐나다 앤드 컴파니 및 악시스 파마슈티칼스)에 기재된 억제제가 있다.
- [0302] - 본원에서 사용된 "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고 골용해성 병변을 갖는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 물질은 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데에 있어서 일정한 역할을 수행할 수 있다. 노바티스의 BHQ880은 혁신 신약인 전체 인간 항-DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다 (Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract).
- [0303] - 본원에서 사용된 "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유발된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 지칭한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서만 아니라 조골세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 이들 종류의 세포들 모두에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 듯하다. 동시에, 조골세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 발생성 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)을 포함하는 골 전이의 병리학적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데에 있어서 실행 가능한 전략일 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀렉시스 인코포레이티드)은 MET에 의해 유발된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고 전이를 감소시키고 혈관신생(종양 성장을 뒷받침하는 데에 필요한 새로운 혈관의 형성)을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또 다른 적합한 이중 억제제는 E7050 (N-[2-플루오로-4-({2-[4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일]카보닐아미노피리딘-4-일}옥시)페닐]-N'-(4-플루오로페닐)사이클로프로판-1,1-디카복스아미드(2R,3R)-타르트레이트)(CAS 928037-13-2) 또는 포레티닙(GSK1363089 또는 XL880)으로서도 공지되어 있음, CAS 849217-64-7)이다.
- [0304] - 본원에서 사용된 "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. RANKL은 간질 및 T-림프구 세포의 조골세포 막의 표면 상에서 발견되고, 이들 T-림프구 세포는 RANKL을 분비하는 능력을 나타내는 유일한 세포이다. 그의 주요 기능은 골 재흡수에 관여하는 세포인 파골세포의 활성화이다. RANKL 억제제는 RANKL과 그의 수용체(RANK)의 결합을 차단함으로써, RANK-매개된 신호전달을 차단함으로써, 또는 RANKL의 전사 또는 번역을 차단하여 RANKL의 발현을 감소시킴으로써 작용할 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 적합한 RANKL

길항제 또는 억제제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:

- [0305] o RANKL에 결합할 수 있고 RANK 단백질의 세포외 도메인의 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 뮤린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포외 도메인을 포함할 수 있거나, 대안적으로 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다.
- [0306] o 오스테오프로테게린 또는 RANKL 결합 능력을 갖는 그의 변이체.
- [0307] o RANKL 특이적 안티센스 분자
- [0308] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임(Ribozymes)
- [0309] o 특이적 항-RANKL 항체. "항-RANKL 항체 또는 RANKL에 대해 유도된 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는 핵 인자  $\kappa$ B에 대한 활성화 수용체(RANKL)의 리간드에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 억제될 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명과 관련하여 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, 단편 "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0310] o 특이적 항-RANKL 나노바디. 나노바디는 천연 발생 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 원래 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄를 결여하는 전체 기능성 항체를 갖는다는 발견 후 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고, 이때 FR1 내지 FR4는 골격 영역 1 내지 4이고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3이다. 이 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 함유한다. 중요한 것은 클로닝되고 단리된 VHH 도메인이 원래의 중쇄 항체의 전체 항원 결합 능력을 보유하는 완벽히 안정한 폴리펩티드라는 것이다. 그들의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애플린스에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.
- [0311] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오프로테게린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 데노수맵이다(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, CAS 번호 615258-40-7)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 데노수맵은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 전체 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 데노수맵의 다양한 양태는 미국 특허 제6,740,522호, 제7,411,050호, 제7,097,834호 및 제7,364,736호(이들 각각의 전체 내용은 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 데노수맵과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구축물이다.
- [0312] 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 나노바디는 국제 특허출원 공보 제WO2008142164호(이의 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 ALX-0141(애플린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 일부 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.
- [0313] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 제제는 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 라툼-223, 칼시토닌, 및 카텡신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 제제는 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.
- [0314] 한 실시양태에서, 일차 유방암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 비크리비록이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012, CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 아플라비록이다(Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2(Suppl. 1): S13). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘 CCR5 길항제이다(Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19 (18): 5401-5406). 일부 실시양태에서, CCR5 길

항제는 INCB009471이다(Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2): 82-7).

- [0315] 보다 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0316] 바람직한 실시양태에서, 라툼-223 치료제는 알파라딘이다.
- [0317] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 상기 언급된 제제들 중 하나 초과와 제제들이 조합되거나, 상기 제제들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬 치료와 조합될 수 있는 조합된 치료와 수행될 수 있다.
- [0318] c-MAF 억제제를 사용하여 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암으로부터의 골 전이를 치료하는 방법
- [0319] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방에 사용되는 c-MAF 억제제(이하, 본 발명의 억제제)에 관한 것이다.
- [0320] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방용 약물의 제조를 위한 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다.
- [0321] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 상기 유방암으로부터의 골 전이를 치료하거나 예방하는 방법으로서, c-MAF 억제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0322] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체에게 골 전이를 예방하거나 감소시키는 제제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 이때 상기 제제가 상기 대상체에서 c-MAF의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 요법에 따라 투여되는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0323] 비-한정적 예로서, 본 발명에서 사용되기에 적합한 c-MAF 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 간섭 RNA(siRNA), 촉매 RNA, 특이적 리보자임, 억제 항체 또는 나노바디, 우성(dominant) 음성 c-MAF 변이체, 또는 표 1 또는 2의 화합물을 포함한다.
- [0324] 안티센스 올리고뉴클레오티드
- [0325] 본 발명의 추가 양태는 발현을 억제하기 위한, 예를 들면, 억제될 활성을 갖는 c-MAF를 코딩하는 핵산의 전사 및/또는 번역을 억제하기 위한 단리된 "안티센스" 핵산의 용도에 관한 것이다. 안티센스 핵산은 통상의 염기 상보성에 의해, 또는 예를 들면, 이중 가닥 DNA에 결합하는 경우 이중 나선의 큰 홈(groove)에서의 특이적 상호작용을 통해 약물의 잠재적 표적에 결합될 수 있다. 일반적으로, 이들 방법들은 당분야에서 일반적으로 이용되는 다양한 기법들을 지칭하고, 올리고뉴클레오티드 서열과의 특이적 결합에 기초한 임의의 방법을 포함한다.
- [0326] 본 발명의 안티센스 구축물은 예를 들면, 세포에서 전사될 때 c-MAF를 코딩하는 세포 mRNA의 하나 이상의 독특한 부분에 상보적인 RNA를 생성하는 발현 플라스미드로서 분포될 수 있다. 대안적으로, 안티센스 구축물은 세포 내로 도입될 때 표적 핵산의 mRNA 및/또는 유전자 서열과 혼성화하여 유전자 발현을 억제하는, 생체외에서 발생된 올리고뉴클레오티드 프로브이다. 이러한 올리고뉴클레오티드 프로브는 바람직하게는 내재성 뉴클레아제, 예를 들면, 엑소뉴클레아제 및/또는 엔도뉴클레아제에 대한 내성을 나타내므로 생체내에서 안정한 변경된 올리고뉴클레오티드이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드로서 사용되는 핵산 분자의 예로는 포스포라미데이트, 포스포티오네이트 및 메틸포스포네이트의 DNA 유사체(미국 특허 제5,176,996호, 제5,264,564호 및 제5,256,775호 참조)(이들 각각은 전체적으로 본원에 참고로 도입됨)가 있다. 안티센스 치료에서 유용한 올리고머를 구축하기 위한 일반적인 방법은 예를 들면, 문헌(Van der Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988) 및 문헌(Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988)에서 검토되어 있다.
- [0327] 안티센스 올리고뉴클레오티드의 경우, 번역의 출발 부위, 예를 들면, 표적 유전자의 -10과 +10 사이의 부위로부터 유래된 올리고데옥시리보뉴클레오티드 영역이 바람직하다. 안티센스 방법은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드 디자인(DNA 또는 RNA)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 전사된 mRNA에 결합될 것이고, 번역은 방지될 것이다.
- [0328] mRNA의 5' 말단, 예를 들면, 출발 코돈 AUG를 포함하는 비-번역 5' 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 가장

효율적인 방식으로 번역을 억제하는 기능을 수행해야 한다. 그럼에도 불구하고, mRNA의 비-번역 3' 서열에 상보적인 서열도 mRNA 번역의 억제에 효율적이라는 것이 최근에 밝혀졌다(Wagner, Nature 372: 333, 1994). 따라서, 상보적인 올리고뉴클레오티드는 그 mRNA의 번역을 억제하는 안티센스 방법에서 유전자의 비-코딩 영역인 비-번역 5' 또는 3' 영역에서 사용될 수 있다. mRNA의 비-번역 5' 영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 출발 코돈 AUG의 상보체를 포함해야 한다. mRNA의 코딩 영역에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 보다 덜 효율적인 번역 억제제이지만, 본 발명에 따라 사용될 수도 있다. 상기 올리고뉴클레오티드가 mRNA의 5' 영역, 3' 영역 또는 코딩 영역과 혼성화하도록 디자인되는 경우, 안티센스 핵산은 6개 이상의 뉴클레오티드 길이를 가져야 하고, 바람직하게는 대략 100개 미만의 뉴클레오티드 길이, 보다 바람직하게는 대략 50개, 25개, 17개 또는 10개 미만의 뉴클레오티드 길이를 가져야 한다.

[0329] 바람직하게는, 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 능력을 정량하기 위해 먼저 시험관내 연구를 수행한다. 바람직하게는, 이 연구는 올리고뉴클레오티드의 안티센스 유전자 억제와 비-특이적 생물학적 효과를 구별하는 대조군을 사용한다. 또한, 바람직하게는, 이 연구는 표적 RNA 또는 단백질의 수준을 RNA 또는 단백질의 내부 대조군의 수준과 비교한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수득한 결과를, 대조군 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수득한 결과와 비교할 수 있다. 바람직하게는, 대조군 올리고뉴클레오티드는 분석될 올리고뉴클레오티드와 거의 동일한 길이를 갖고, 올리고뉴클레오티드 서열은 표적 서열과의 특이적 혼성화를 방지하기 위해 필요하다고 간주되는 수준 이상으로 안티센스 서열과 상이하지 않다.

[0330] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA, 또는 키메라 혼합물 또는 유도체, 또는 이들의 변경된 버전일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 분자의 안정성, 그의 혼성화 능력 등을 개선하기 위해 염기 기, 당 기 또는 포스페이트 골격에서 변경될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 다른 결합된 기, 예컨대, 세포막(예를 들면, 문헌(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989), 문헌(Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987) 및 국제 특허출원 공보 제WO 88/09810호 참조) 또는 혈액-뇌 장벽(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO 89/10134호 참조)을 통한 수송을 용이하기 위한 펩티드(예를 들면, 올리고뉴클레오티드를 숙주 세포의 수용체로 향하게 하는 펩티드) 또는 제제, 또는 인터칼레이팅제(예를 들면, 문헌(Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988) 참조)를 포함할 수 있다. 이를 목적으로, 상기 올리고뉴클레오티드는 또 다른 분자, 예를 들면, 펩티드, 수송제, 혼성화-유발된 절단제 등에 결합될 수 있다.

[0331] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변경된 염기 기를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일로스 및 핵소스를 포함하나 이들로 한정되지 않는 군으로부터 선택된 하나 이상의 변경된 당 기도 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 중성 펩티드와 유사한 골격도 함유할 수 있다. 이러한 분자는 펩티드 핵산(PNA) 올리고머로서 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌(Perry-O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996) 및 문헌(Eglom et al., Nature 365: 566, 1993)에 기재되어 있다.

[0332] 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변경된 포스페이트 골격을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 알파-아노머성 올리고뉴클레오티드이다.

[0333] 표적 mRNA 서열의 코딩 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 사용될 수 있지만, 전사된 비-번역 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드도 사용될 수 있다.

[0334] 일부 경우, 내재성 mRNA 번역을 억제하기에 충분한 안티센스의 세포내 농도에 도달하는 것이 어려울 수 있다. 따라서, 바람직한 방법은 안티센스 올리고뉴클레오티드가 강한 중합효소 III 또는 중합효소 II 프로모터의 조절 하에 놓여 있는 재조합 DNA 구축물을 사용한다.

[0335] 대안적으로, 유전자 조절 영역(즉, 프로모터 및/또는 인핸서)에 상보적인 데옥시리보뉴클레오티드 서열이 체내 표적 세포에서 유전자 전사를 방해하는 삼중 나선 구조를 형성하게 함으로써 표적 유전자 발현을 감소시킬 수 있다(일반적으로, 문헌(Helene, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991) 참조). 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 모르폴린이다.

[0336] siRNA

[0337] 작은 간섭 RNA 또는 siRNA는 RNA 간섭으로 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 제제이다. siRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나, 시험관내 전사에 의해 수득될 수 있거나, 생체내 표적 세포에서 합성될 수 있다. 전형적으로, siRNA는 15개 내지 40개 뉴클레오티드 길이를 갖는 이중 가닥 RNA로 구성되고, 1개 내지 6개의 뉴

클레오티드로 구성된 3' 및/또는 5' 돌출 영역을 함유할 수 있다. 돌출 영역의 길이는 siRNA 분자의 총 길이와 무관하다. siRNA는 전사 후 표적 메신저를 분해하거나 침묵시킴으로써 작용한다.

- [0338] 본 발명의 siRNA는 c-MAF 코딩 유전자의 mRNA, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열에 대한 상당한 상동성을 갖는다. "상당한 상동성을 갖는"은 siRNA가 RNA 간섭을 통해 표적 mRNA를 분해할 수 있도록 표적 mRNA와 충분히 상보적이거나 유사한 서열을 갖는 것으로서 이해된다. 상기 간섭을 야기하기에 적합한 siRNA는 RNA에 의해 형성된 siRNA뿐만 아니라 상이한 화학적 변경, 예컨대, 하기 변경을 함유하는 siRNA도 포함한다:
- [0339] - 뉴클레오티드들 사이의 결합이 천연 상태에서 관찰되는 결합, 예컨대, 포스포리보네이트 결합과 상이한 siRNA;
- [0340] - DNA 가닥과 작용 시약, 예컨대, 형광단의 접합체;
- [0341] - RNA 가닥의 말단, 특히 2' 위치에서 상이한 하이드록실 작용기를 갖는 변경에 의한 3' 말단의 변경;
- [0342] - 변경된 당, 예컨대, 2' 위치의 0-알킬화된 잔기, 예컨대, 2'-O-메틸리보스 또는 2'-O-플루오로리보스를 갖는 뉴클레오티드; 또는
- [0343] - 변경된 염기, 예컨대, 할로겐화된 염기(예를 들면, 5-브로모우라실 및 5-요오도우라실), 알킬화된 염기(예를 들면, 7-메틸구아노신)을 갖는 뉴클레오티드.
- [0344] siRNA는 그 자체로서, 즉 전술된 특성을 갖는 이중 가닥 RNA의 형태로 사용될 수 있다. 대안적으로, siRNA의 센스 가닥 서열 및 안티센스 가닥 서열을 함유하는 벡터의 사용은 관심있는 세포에서 그의 발현에 적합한 프로모터의 조절 하에 가능하다.
- [0345] siRNA를 발현하기에 적합한 벡터는 siRNA의 2개 가닥들을 코딩하는 2개의 DNA 영역들이 전사 시 루프를 형성하는 스페이서 영역에 의해 분리된 상태로 1개의 동일한 DNA 가닥에서 직렬로 정렬되어 있는 벡터이고, 이때 단일 프로모터가 shRNA를 발생시키는 DNA 분자의 전사를 유도한다.
- [0346] 대안적으로, siRNA를 형성하는 가닥들 각각이 상이한 전사 유닛의 전사로부터 형성되는 벡터들의 사용도 가능하다. 이들 벡터들은 발산 전사 벡터와 수렴 전사 벡터로 나누어진다. 발산 전사 벡터에서, siRNA를 형성하는 DNA 가닥들 각각을 코딩하는 전사 유닛은 각각의 DNA 가닥의 전사가 동일할 수 있거나 상이할 수 있는 그 자신의 프로모터에 달려 있도록 벡터에서 직렬로 위치한다(Wang, J. et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100:5103-5106 and Lee, N.S., et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20:500-505). 수렴 전사 벡터에서, siRNA를 발생시키는 DNA 영역은 2개의 역방향 프로모터에 의해 플랭킹되어 있는 DNA 영역의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 형성한다. 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥의 전사 후, 안티센스 RNA 가닥은 기능성 siRNA를 형성하기 위해 혼성체를 형성할 것이다. 2개의 U6 프로모터(Tran, N. et al., 2003, BMC Biotechnol., 3:21), 1개의 마우스 U6 프로모터 및 1개의 인간 H1 프로모터(Zheng, L., et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 135-140 및 국제 특허출원 공보 제WO 2005026322호), 및 1개의 인간 U6 프로모터 및 1개의 마우스 H1 프로모터(Kaykas, A. and Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16)가 사용되는 역방향 프로모터 시스템을 갖는 벡터가 기재되어 있다.
- [0347] 수렴 또는 발산 발현 벡터로부터의 siRNA의 발현에서 사용되기에 적합한 프로모터는 siRNA가 발현될 세포와 상용가능한 임의의 프로모터 또는 프로모터 쌍을 포함한다. 따라서, 본 발명에 적합한 프로모터는 항시성(constitutive) 프로모터, 예컨대, 진핵 바이러스, 예컨대, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, SV40, CMV, 조류 육종 바이러스 또는 B형 간염 바이러스의 게놈으로부터 유래된 항시성 프로모터, 메탈로티오네인 유전자 프로모터, 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제 유전자 프로모터, 레트로바이러스 LTR 영역, 면역글로불린 유전자 프로모터, 액틴 유전자 프로모터, EF-1 $\alpha$  유전자 프로모터뿐만 아니라, 단백질 발현이 분자 또는 외재성 신호의 첨가에 달려 있는 유도성 프로모터, 예컨대, 테트라사이클린 시스템, NF $\kappa$ B/UV 광 시스템, Cre/Lox 시스템 및 열 충격 유전자 프로모터, 국제 특허출원 공보 제WO/2006/135436호에 기재된 조절가능한 RNA 중합효소 II 프로모터 및 특정 조직 프로모터(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO2006012221호에 기재된 PSA 프로모터)를 포함하나, 반드시 이들로 한정되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 항시적으로 작용하는 RNA 중합효소 III 프로모터이다. RNA 중합효소 III 프로모터는 제한된 수의 유전자, 예컨대, 5S RNA, tRNA, 7SL RNA 및 U6 snRNA에서 발견된다. 다른 RNA 중합효소 III 프로모터와 달리, III형 프로모터는 임의의 유전자내 서열을 요구하지 않고 오히려 위치 -34 및 -24에서 5' 방향으로 TATA 박스를 포함하는 서열, 위치 -66과 -47 사이의 근거리 서열 요소 또는 PSE, 및 일부 경우 위치 -265와 -149 사이의 원거리 서열 요소 또는 DSE를 필요로 한다. 바람직한 실시양태에서, III형 RNA 중합효소 III 프로모터는 인간 또는 뮤린 H1 및 U6 유전자



프로모터이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 2개의 인간 또는 뮤린 U6 프로모터, 1개의 마우스 U6 프로모터 및 1개의 인간 H1 프로모터, 또는 1개의 인간 U6 프로모터 및 1개의 마우스 H1 프로모터이다. 본 발명과 관련하여, ER $\alpha$  유전자 프로모터 또는 사이클린 D1 유전자 프로모터가 특히 적합하므로, 이들은 유방 종양, 바람직하게는 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방 종양에서 관심있는 유전자를 특이적으로 발현하는 데에 특히 바람직하다.

[0348] siRNA는 siRNA를 형성하는 역평행 가닥들이 루프 또는 헤어핀 영역에 의해 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 소위 shRNA(짧은 헤어핀 RNA)로부터 세포내에서 발생될 수 있다. shRNA는 플라스미드 또는 바이러스, 특히 레트로바이러스에 의해 코딩될 수 있고, 프로모터의 조절 하에 있다. shRNA를 발현하기에 적합한 프로모터는 siRNA의 발현에 대해 상기 단락에 기재된 프로모터이다.

[0349] siRNA 및 shRNA를 발현하기에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터, 예컨대, pUC18, pUC19, Bluescript 및 이들의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, 과지 및 서틀 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28; 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-마이크론 플라스미드형 벡터, 삽입 플라스미드, YEP 벡터, 센트로미어성 플라스미드 등; 곤충 세포 발현 벡터, 예컨대, pAC 계열 벡터 및 pVL 계열 벡터; 식물 발현 벡터, 예컨대, pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE 계열 벡터 등; 및 바이러스 벡터-기초(아데노바이러스, 아데노바이러스와 관련된 바이러스뿐만 아니라, 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스) 고등 진핵 세포 발현 벡터 또는 비-바이러스 벡터, 예컨대, pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0350] 본 발명의 siRNA 및 shRNA는 당업자에게 공지되어 있는 일련의 기법들을 이용함으로써 수득될 수 있다. siRNA를 디자인하기 위한 기초로서 이용되는 뉴클레오티드 서열의 영역은 한정되지 않고, 코딩 서열(출발 코돈과 종결 코돈 사이)의 영역을 함유할 수 있거나, 대안적으로 출발 코돈을 기준으로 3' 방향 위치 중 임의의 위치에서 바람직하게는 25개 내지 50개 뉴클레오티드 길이를 갖는 비-번역 5' 또는 3' 영역의 서열을 함유할 수 있다. siRNA를 디자인하는 한 방법은 N이 c-MAF 유전자 서열에서 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 AA(N19)TT 모티프의 확인, 및 높은 G/C 함량을 갖는 모티프의 선택을 포함한다. 상기 모티프가 발견되지 않는 경우, N이 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 NA(N21) 모티프를 확인할 수 있다.

[0351] c-MAF 특이적 siRNA는 국제 특허출원 공보 제WO2005046731호에 기재된 siRNA(이의 가닥들 중 하나는 ACGGCUCGAGCAGCGACAA(서열번호 6)임)를 포함한다. 다른 c-MAF 특이적 siRNA 서열은 CUUACCAGUGUGUUCACAA(서열번호 7), UGGAAGACUACUACUGGAUG(서열번호 8), AUUUGCAGUCAUGGAGAACC(서열번호 9), CAAGGAGAAAUACGAGAAGU(서열번호 10), ACAAGGAGAAAUACGAGAAG(서열번호 11) 및 ACCUGGAAGACUACUACUGG(서열번호 12)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0352] DNA 효소

[0353] 다른 한편으로, 본 발명은 본 발명의 c-MAF 유전자의 발현을 억제하기 위한 DNA 효소의 사용도 고려한다. DNA 효소는 안티센스 기술 및 리보자임 기술 둘다의 기작 특징들 중 일부를 갖는다. DNA 효소는 이 효소가 안티센스 올리고뉴클레오티드와 유사하게 특정 표적 핵산 서열을 인식함에도 불구하고, 리보자임처럼 촉매활성을 갖고 표적 핵산을 특이적으로 절단하도록 디자인된다.

[0354] 리보자임

[0355] 억제될 활성을 갖는 c-MAF를 코딩하는 mRNA의 번역을 방해하기 위해 표적 mRNA의 전사 생성물을 촉매처럼 절단하도록 디자인된 리보자임도 사용될 수 있다. 리보자임은 특이적 RNA 절단을 촉매작용할 수 있는 효소 RNA 분자이다(검토를 위해서는 문헌(Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994) 참조). 리보자임 작용의 기작은 리보자임 분자 서열과 상보적 표적 RNA의 특이적 혼성화에 이어서 핵산내부용해성 절단 사건을 포함한다. 리보자임 분자의 조성물은 바람직하게는 표적 mRNA에 상보적인 하나 이상의 서열, 및 mRNA 또는 기능적 등가 서열의 절단을 담당하는 잘 공지된 서열을 포함한다(예를 들면, 미국 특허 제5093246호 참조).

[0356] 본 발명에서 사용되는 리보자임은 햄머-헤드(hammer-head) 리보자임 및 엔도리보뉴클레아제 RNA(이하 "체크형(Cech type) 리보자임")을 포함한다(Zaug et al., Science 224:574-578, 1984).

[0357] 리보자임은 (예를 들면, 안정성, 표적화 등을 개선하기 위해) 변경된 올리고뉴클레오티드에 의해 형성될 수 있고, 생체내에서 표적 유전자를 발현하는 세포에 분포되어야 한다. 바람직한 분포 방법은 형질감염된 세포가 내재성 표적 메신저를 파괴하고 번역을 억제하기에 충분한 양의 리보자임을 생성하도록 강한 항시성 증합효소 III

또는 중합효소 II 프로모터의 조절 하에 리보자임을 "코딩하는" DNA 구축물의 사용을 포함한다. 리보자임이 촉매활성을 갖기 때문에, 다른 안티센스 분자와 달리 낮은 세포내 농도가 그의 효율을 위해 요구된다.

[0358] 억제 항체

[0359] 본 발명과 관련하여, "억제 항체"는 c-MAF 단백질에 특이적으로 결합하여 상기 단백질의 기능들, 바람직하게는 전사와 관련된 기능들 중 하나 이상의 기능을 억제할 수 있는 임의의 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들(이들 중 일부는 전술되어 있음) 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 동물을 억제될 단백질로 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명과 관련하여, 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab", Fv, scFv 단편, 디아바디, 이중특이적 항체, 알파바디, 사이클로펩티드 및 스테이플드 펩티드를 포함한다. 일단 c-MAF 단백질 결합 능력을 갖는 항체가 확인되면, 이 단백질의 활성을 억제할 수 있는 항체는 억제제 확인 분석을 이용함으로써 선택될 것이다.

[0360] 억제 펩티드

[0361] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "억제 펩티드"는 상기 설명된 바와 같이 c-MAF 단백질에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있는, 즉 c-MAF가 유전자 전사를 활성화시킬 수 없게 하는 펩티드를 지칭한다.

[0362] 음성 c-MAF 우성형질

[0363] MAF 패밀리의 단백질들이 AP-1 패밀리의 다른 구성원, 예컨대, Fos 및 Jun과 동종이량체 및 이종이량체를 형성할 수 있기 때문에, c-MAF 활성을 억제하는 한 방법은 c-MAF와 이량체를 형성할 수 있으나 전사를 활성화시키는 능력을 결여하는 음성 우성형질을 사용하는 것이다. 따라서, 음성 c-MAF 우성형질은 세포에 존재하고 전사활성화 도메인을 함유하는 아미노 말단의 3분의 2를 결여하는 작은 maf 단백질들(예를 들면, mafK, mafF, mafg 및 pi 8) 중 임의의 maf 단백질일 수 있다(Fujiwara et al (1993) Oncogene 8, 2371-2380; Igarashi et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 7615-7624; Andrews et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11488-11492; Kataoka et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 2180-2190; Kataoka et al. (1996) Oncogene 12, 53-62).

[0364] 대안적으로, 음성 c-MAF 우성형질은 다른 단백질과 이량체를 형성하는 능력을 유지하되 전사를 활성화시키는 능력을 결여하는 c-MAF 변이체들을 포함한다. 이들 변이체들은 예를 들면, 단백질의 N 말단에 위치하는 c-MAF 전사활성화 도메인을 결여하는 변이체이다. 따라서, 음성 c-MAF 우성 변이체는 예를 들면, 적어도 아미노산 1 내지 122, 적어도 아미노산 1 내지 187 또는 적어도 아미노산 1 내지 257(미국 특허 제6274338호에 기재된 인간 c-MAF의 넘버링을 고려함)이 제거되어 있는 변이체를 포함한다.

[0365] 본 발명은 표적 세포에서의 발현에 적합한 프로모터의 작동 조절 하에 음성 c-MAF 우성형질 변이체 및 c-MAF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 둘다를 사용하는 것을 고려한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하는 데에 사용될 수 있는 프로모터는 항시성 프로모터, 즉 기초 수준에서 전사를 유도하는 프로모터, 또는 전사 활성이 외부 신호를 요구하는 유도성 프로모터일 수 있다. 전사를 조절하는 데에 적합한 항시성 프로모터는 특히, CMV 프로모터, SV40 프로모터, DHFR 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 1a 연장 인자(EF1a) 프로모터, 알부민 프로모터, ApoA1 프로모터, 케라틴 프로모터, CD3 프로모터, 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 프로모터, 신경필라멘트 프로모터, 신경 특이적 에놀라제(enolase) 프로모터, L7 프로모터, CD2 프로모터, 미요신 경쇄 키나제 프로모터, HOX 유전자 프로모터, 티미딘 키나제 프로모터, RNA 중합효소 II 프로모터, MyoD 유전자 프로모터, 포스포글리세레이트키나제(PGK) 유전자 프로모터, 저밀도 지단백질(LDL) 프로모터, 및 액틴 유전자 프로모터이다. 바람직한 실시양태에서, 전사활성화제의 발현을 조절하는 프로모터는 PGK 유전자 프로모터이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하는 프로모터는 T7 파지의 RNA 중합효소 프로모터이다.

[0366] 바람직하게는, 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 유도성 프로모터는 유도제의 부재 하에 0 또는 무시할만한 기초 발현을 보이는, 유도제에 반응하는 프로모터이고 3' 위치에 위치하는 유전자의 활성화를 촉진할 수 있다. 유도제의 종류에 따라 유도성 프로모터는 Tet on/off 프로모터(Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Gossen, M. et al., 1995, Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); Pip on/off 프로모터(미국 특허 제6287813호); 안티프로게스틴(antiprogestin) 의존성 프로모터(미국 특허출원 공보 제2004132086호), 액디손(ecdysone) 의존성 프로모터

터(Christopherson et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6314-6318; No et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351; Suhr et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7999-8004; 및 국제 특허출원 공보 제W09738117호), 메탈로티오네인 의존성 프로모터(국제 특허출원 공보 제W08604920호) 및 라파마이신 의존성 프로모터(Rivera et al., 1996, Nat. Med. 2:1028-32)로서 분류된다.

[0367] 음성 c-MAF 우성형질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하기에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터, 예컨대, pUC18, pUC19, Bluescript 및 이들의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 및 서플 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28; 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-미크론형 플라스미드 벡터, 삽입 플라스미드, YEP 벡터, 센트로미어성 플라스미드 등; 곤충 세포 발현 벡터, 예컨대, pAC 계열 벡터 및 pVL 계열 벡터; 식물 발현 벡터, 예컨대, pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE 계열 벡터 등; 및 바이러스 벡터-기초(아데노바이러스, 아데노바이러스와 관련된 바이러스뿐만 아니라 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스) 고등 진핵 세포 발현 벡터 또는 비-바이러스 벡터, 예컨대, pSilencer 4.1-CMV(암비온), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1로부터 유래된 벡터들을 포함한다.

[0368] 소분자

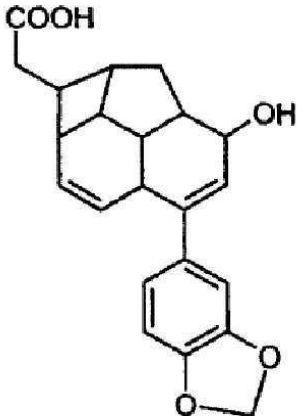
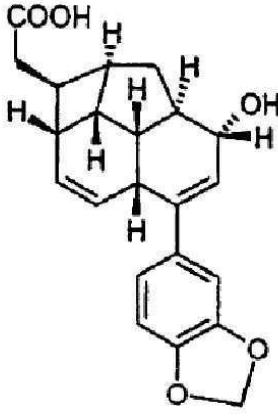
[0369] 본 발명에서 사용되기에 적합한 다른 c-MAF 억제 화합물은 하기 화합물들을 포함한다:

표 1

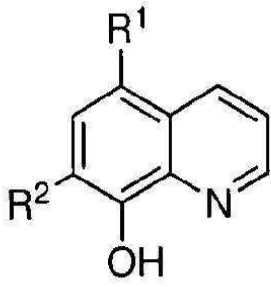
c-MAF 억제 능력을 갖는 소분자

I	<p>엔디안드르산(Endiandric acid) H 유도체, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제 WO2004014888 호에 기재된 하기 화학식에 상응하는 화합물</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>[상기 식에서, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 서로 독립적으로 1.0 H, 또는 2.0 O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬, -O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알케닐, -O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알키닐 또는 -O-C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-아릴 기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9 중 어느 하나로 일치환되거나 이치환되고: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.4 -O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.5 C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-아릴, 2.6 -NH-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.7 -NH-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.8 -NH<sub>2</sub>, 또는 2.9 할로젠, 이때, 아릴 기는 임의적으로 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9 로 일치환되거나 이치환되고, 이때, 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7 은 -CN, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수 있고, 치환기 2.5 는 -CN 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있거나, R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 함께 고리를 형성하고, 이때 R<sub>1</sub> 및 R<sub>2</sub>는 -O-[(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-알킬렌]-O- 기를 의미하고, R<sub>3</sub> 은 1.0 H, 또는 2.0 -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬, -O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알케닐, -O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알키닐 또는 -O-C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-아릴</p>
---	---

[0370]

	<p>기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9 중 어느 하나로 일치환되거나 이치환되고:</p> <p>2.1 -OH,                  2.2 =O,                  2.3 -O-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임),                  2.4 -O-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임),                  2.5 -C<sub>6</sub>-C<sub>10</sub>-아릴,                  2.6 -NH-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임)                  2.7 -NH-C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임),                  2.8 -NH<sub>2</sub>, 또는                  2.9 할로젠,                  이때, 아릴 기는 임의적으로 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9 로 일치환되거나 이치환되고,                  이때, 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7 은 -CN, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수 있고, 치환기 2.5 는 -CN 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있고,                  R<sub>4</sub> 는 CO<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, CO<sub>2</sub>NHR<sub>3</sub>, CHO, CH<sub>2</sub>OR<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>OSi(R<sub>3</sub>)<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>Br 또는 CH<sub>2</sub>CN 이고, 이때 R<sub>3</sub> 은 상기 정의된 바와 같다.]                  특히, 하기 하합물</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div>
II	<p>8-하이드록시퀴놀린 유도체, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제 WO2009146546 호에 기재된 하기 화학식의 화합물</p>

[0371]



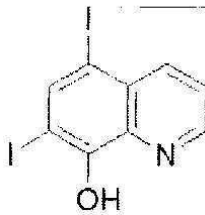
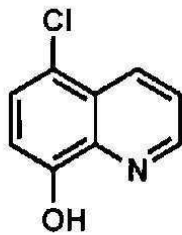
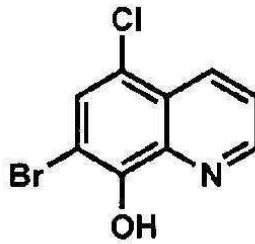
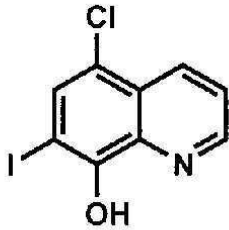
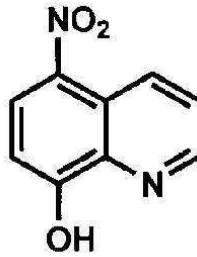
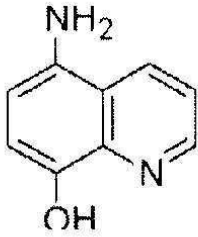
[상기 식에서,

R<sub>1</sub>은 NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬) 및 N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬)(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬)로 구성된 군으로부터 선택되고,

R<sub>2</sub>는 H, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 및 플루오로-치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬로부터 선택되거나;

R<sub>1</sub>은 Cl 이고, R<sub>2</sub>는 Br 또는 H 이다.],

바람직하게는, 하기 화합물



III 국제 특허출원 공보 제 WO09049410호에 기재된 클리오퀴놀(5-클로로-7-

[0372]

	<p>요오도퀴놀린-8-올)</p>
<p>IV</p>	<p>하기 화학식의 화합물, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제 WO08098351 호에 기재된 화합물</p> <div style="text-align: center;"> </div> <p>[상기 식에서,          ==-:--:는 단일 또는 이중 결합이고;          R<sup>1</sup>은 H, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬, C(O)OC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬, C(O)C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬 및 C(O)NHC<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬로 구성된 군으로부터 선택되고,          R<sup>2</sup>는 H 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬로부터 선택되고,          R<sup>3</sup>은 H 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬로부터 선택되거나;          R<sup>2</sup> 및 R<sup>3</sup>은 이들이 결합된 탄소 원자 및 질소 원자와 함께 결합되어 피페리딘 고리를 형성하고;          R<sup>4</sup> 및 R<sup>5</sup>는 H, 할로젠, 하이드록시, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬, 플루오로-치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알킬 및 C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>알콕시로부터 독립적으로 선택되고;          X는 C 및 N 으로부터 선택된다.]</p> <p>바람직하게는, 하기 화합물들:          사이클로헵타딘(4-(5H-디벤조-[a,d]사이클로헵텐-5-일리텐)-1-메틸피페리딘 하이드로클로라이드),          아미트립틸린(3-(10,11-디하이드로-5H-디벤조[[a,d]사이클로헵텐-5-일리텐)-N,N-디메틸-1-프로판아민),          로라타딘(에틸 4-(8-클로로-5,6-디하이드로-11H-벤조[5,6]사이클로헵타[1,2-b]피리딘-11-일리텐)-1-피페리딘카복실레이트,          사이클로벤즈라핀(3-(5H-디벤조[a,d]사이클로헵텐-5-일리텐)-N,N-디메틸-1-프로판아민).</p>
<p>V</p>	<p>국제 특허출원 공보 제 WO0359249 호에 기재된 니발레놀(12,13-에폭시-3,4,7,15-테트라하이드록시트리코텍-9-엔-8-온)</p>

[0373]

[0374]

다른 c-MAF 억제제는 국제 특허출원 공보 제W02005063252호(전체적으로 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있고, 예컨대, 하기 표(표 2)에 제시되어 있다:

표 2

c-MAF 억제제

길항제	cdk2 억제 활성화에 대한 참고문헌
<p>퓨린 유사체</p> <p>푸르발라놀(Purvalanol), 예컨대, 상표명 푸르발라놀 A(#P4484, 시그마-알드리치, 미국 미조리주 세인트루이스 소재) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 C<sub>15</sub>H<sub>25</sub>ClN<sub>6</sub>O 를 갖는 2-(1R-이소프로필-2-하이드록시에틸아미노)-6-(3-클로로아닐리노)-9-이소프로필퓨린; 푸르발라놀 B; 아미노푸르발라놀; 화합물 52(이때, 푸르발라놀 A 의 이소프로필이 H 로 치환되어 있음)</p>	<p>Gray, N.S. <i>et al.</i>, Science, 281, 533-538 (1998); Chang, Y.T. <i>et al.</i>, Chem. Biol., 6, 361-375 (1999)</p>
<p>상표명 올로모우신(Olomoucine)(#O0886) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>6</sub>O 를 갖는 2-(하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-메틸퓨린; 상표명 N<sup>9</sup>-이소프로필올로모우신(#I0763) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O 를 갖는 2-(2'-하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-이소프로필퓨린; CVT-313</p>	<p>Vesely, J. <i>et al.</i>, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks. E.B., <i>et al.</i>, (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11</p>
<p>상표명 로스코비틴(Roscovitine)(#R7772) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>N<sub>6</sub>O 를 갖는 6-(벤질아미노)-2-(R)-[[1-(하이드록시메틸)프로필]아미노]-9-이소프로필퓨린 2(R)-[[9-(1-메틸에틸)-6-[(페닐메틸)아미노]-9H-퓨린-2-일]아미노]-1-부탄올; 메톡시로스코비틴</p>	<p>Wang, D. <i>et al.</i>, J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i>, J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., <i>et al.</i>, (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36</p>
<p>상표명 CGP74514(#C3353) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 C<sub>19</sub>H<sub>24</sub>ClN<sub>7</sub> 을 갖는 퓨린 유사체 N2-(시스-2-아미노사이클로헥실)-N6-(3-클로로페닐)-9-에틸-9H-퓨린-2,6-디아민</p>	<p>Imbach, P. <i>et al.</i>, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).</p>
<p>CGP79S807, (상기) CGP74514 의 퓨린 유사체, 이때 Cl 은 CN 으로 치환되고, OH 는 제거되고, 사이클로헥산 고리의 오르토 위치는 NH<sub>2</sub> 이다.</p>	<p>Imbach, P. <i>et al.</i>, Bioorg. Med. Chem Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).</p>
<p>퓨린 유사체, 예컨대, O6-사이클로헥실메틸 구아닌 NU2058</p>	<p>Arris, C.E. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies <i>et al.</i>, Nature Structural Biology, 9:10, 745-749, 2002</p>

[0375]



푸린 유사체, 예컨대, NU6102	Arris, C.E. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies, T.G. <i>et al.</i> , Nat, Struct. Biol., 9, 745-749 (2002).
이소펜테닐-아데닌	Vesely, J. <i>et al.</i> , (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86
비-푸린계 물질	
인디루빈(indirubin), 예컨대, 상표명 (#10404) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> 를 갖는 인디루빈-3'-모노옥심; 인디루빈-5-설포네이트; 5-클로로인디루빈	Davies, T.G. <i>et al.</i> , Structure, 9, 389-397 (2001); Marko, D. <i>et al.</i> , Br. J. Cancer, 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., <i>et al.</i> , (1999) Nat. Cell Biol., 1, 60-7; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(HelFoerg <i>et al.</i> )
이 표의 2 열에서 인용된 문헌(Fischer)의 옥신들 1(#IN118, JMAR 케미칼)	Porcs-Makkay, M., <i>et al.</i> , Tetrahedron 2000, 56, 5893; Org. Process Res. Dev., 2000, 4, 10
인테노피라졸	Nugiel D.A. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , J. Med Chem., 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. <i>et al.</i> , J. Med Chem., 45, 5233-5248 (2002).
피리도(2,3-d)피리미딘-7-온, 피셔의 화합물 3	Barvian, M. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., Med. Res. Rev., 21, 487-498 (2001).
퀴나졸린, 예컨대, 아닐리노퀴나졸린	Sielecki, T.M. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1157-1160 (2001); Mettey <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 2003, 46, 222-236.
티아졸, 예컨대, 융합된 티아졸, 상표명 GW8510(#G7791) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 C <sub>21</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> 를 갖는 4-[[[(7-옥소-6,7-디하이드로-8H-[1,3]티아졸로[5,4-e]인돌-8-일리덴)메틸]아미노]-N-(2-피리딜)벤젠설포나미드	Davis, S.T. <i>et al.</i> Science, 291, 134-137 (2001); 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(Hellberg <i>et al.</i> )
플라보피리돌, 예컨대, 플라보피리돌(LB86 8275; NCS 649890, 국립 암연구소, 미국 매릴랜드주 베테스다 소재) 및 데클로로 유도체	Carlson, B.A., <i>et al.</i> , (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
알칼로이드, 예컨대, 스타우로스포린(#S1016, 에이.지. 사이언티픽(A.G. Scientific), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재) 또는 UCN-01(7-하이드록시스타우로스포린)(국립 암연구소, 미국 매릴랜드주 베테스다 소재)	Rialet, V., <i>et al.</i> , (1991) Anticancer Res., 11, 1581-90; Wang, Q., <i>et al.</i> , (1995) Cell Growth Differ., 6, 927-36; Akiyama, T., <i>et al.</i> , (1997) Cancer Res., 57, 1495-501; Kawakami, K., <i>et al.</i> , (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 778-83

[0376]

파울론(paullone), 예컨대, 상표명 켄파울론(kenpaullone) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> BrN <sub>2</sub> O 를 갖는 9-브로모-7,12-디하이드로-인돌로[3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5H)-온; 또는 상표명 알스터파울론(alstcrpaullone)(#A4847) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 C <sub>16</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> 을 갖는 9-니트로-7,12-디하이드로인돌로-[3,2-	Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i> , <i>Cancer Res.</i> , 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W., <i>et al.</i> , (1999) <i>Cancer Res.</i> , 59, 2566-9; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(Hellberg <i>et al.</i> )
CGP 41251, 알칼로이드	Begemann, M., <i>et al.</i> , (1998) <i>Anticancer Res.</i> , 18, 2275-82; Fabbro <i>et al.</i> , <i>Pharmacol. Ther.</i> , 1999 May-Jun; 82(2-3):293-301
하이메니알디신(hymenialdisine), 예컨대, 에이. 지. 사이언티픽 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)의 자회사인 바이오케미칼스 넷(Biochemicals. net)으로부터 입수가 가능한, 분자식 C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> BrN <sub>5</sub> O <sub>2</sub> 을 갖는 10z-하이메니알디신(H-1150)	Meijer, L., <i>et al.</i> , (1999) <i>Chemistry &amp; Biology</i> , 7, 51-63; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(Hellberg <i>et al.</i> )
CGP60474, 페닐아미노피리미딘	21; 국제 특허출원 공보 제 WO95/09853 호(Zimmermann <i>et al.</i> ) 1994 년 9 월 21 일
티아졸로피리미딘 2	Attaby <i>et al.</i> , <i>Z. Naturforsch.</i> 54b, 788-798 (1999)
디아릴우레아	Honma, T. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 4628-4640 (2001), Honma, T. <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> , 44, 4615-4627 (2001)
상표명 부티로락톤-I(B7930) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 C <sub>24</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> 을 갖는 (2R)-2,5-디하이드로-4-하이드록시-2-[(4-하이드록시-3-(3-메틸-2-부테닐)페닐)메틸]-3-(4-하이드록시페닐)-5-옥소-2-퓨란카복실산 메틸 에스테르	Kitagawa, M. <i>et al.</i> , <i>Oncogene</i> , 8, 2425-2432 (1993)
알로이신(Aloisine) A, 카탈로그 번호 128125(칼바이오켄(Calbiochem), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)	Mettey <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236

[0377]

바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0378]

c-MAF 억제제는 전형적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 투여된다.

[0379]

용어 "담체"는 활성 성분이 투여되게 하는 희석제 또는 부형제를 지칭한다. 이러한 약학 담체는 멸균 액체, 예컨대, 물 및 오일(석유, 동물, 식물 또는 합성 유래의 오일, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광물유, 참깨유 등을 포함함)일 수 있다. 특히 주사가 가능한 용액을 위한 물 또는 수성 식염수 용액, 및 수성 텍스트로스 및 글리세롤 용액이 바람직하게는 담체로서 사용된다. 적합한 약학 담체는 문헌("Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin, 1995)에 기재되어 있다. 바람직하게는, 본 발명의 담체는 동물, 특히 인간에서의 그의 사용에 대해 주정부 또는 연방정부 규제 관청에 의해 승인되어 있거나 미국 약전 또는 일반적으로 인정되는 다른 약전에 나열되어 있다.

[0381]

본 발명의 약학 조성물의 원하는 약학 제형을 제조하는 데에 필요한 담체 및 보조 물질은 다른 인자들 중에서 선택된 약학 제형에 달려 있을 것이다. 상기 약학 조성물의 상기 약학 제형은 당업자에게 공지되어 있는 통상의 방법에 따라 제조될 것이다. 활성 성분을 투여하는 상이한 방법, 사용되는 부형제 및 이를 제조하는 방법의 검토는 문헌("Tratado de Farmacia Galenica", C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S.A. 1993 Edition)에서 발견될 수 있다. 약학 조성물의 예로는 경구, 국소 또는 비경구 투여를 위한 임의의 고체 조성물(정제, 환제, 캡슐제, 과립제 등) 또는 액체 조성물(용액, 현탁액 또는 유화액)이 있다. 나아가, 약학 조성물은 필요하다고 간주되는 경

우 안정화제, 현탁제, 보존제, 계면활성제 등을 함유할 수 있다.

[0382] 의약에서 사용되기 위한 c-MAF 억제제는 단리된 상태 또는 추가 활성 물질과 조합된 상태의 전구약물, 염, 용매 화물 또는 포접화합물의 형태로 발견될 수 있고, 약학적으로 허용가능한 부형제와 함께 제제화될 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 바람직한 부형제는 당, 전분, 셀룰로스, 고무 및 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학 조성물은 고체 약학 제형(예를 들면, 재구성되어 액체 제형을 제공할 수 있는 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 좌제, 멸균 결정 또는 비결정질 고체 등), 액체 약학 제형(예를 들면, 용액, 현탁액, 유화액, 엘릭시르, 로션, 연고 등), 또는 반고체 약학 제형(겔, 연고, 크림 등)으로 제제화될 것이다. 본 발명의 약학 조성물은 경구 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 동맥내 경로, 골수내 경로, 척수강내 경로, 심실내 경로, 경피 경로, 피하 경로, 복강내 경로, 비내 경로, 장 경로, 국소 경로, 설하 경로 또는 직장 경로를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 활성 성분을 투여하는 상이한 방법, 사용되는 부형제 및 이의 제조 방법의 검토는 문헌(Tratado de Farmacia Galenica, C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S.A., 1993 Edition) 및 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20<sup>th</sup> edition, Williams & Wilkins PA, USA (2000))에서 발견될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예는 최신기술 수준에서 공지되어 있고, 인산염 완충 식염수 용액, 물, 유화액, 예컨대, 오일/물 유화액, 상이한 종류의 습윤화제, 멸균 용액 등을 포함한다. 상기 담체를 포함하는 조성물은 최신기술 수준에서 공지되어 있는 통상의 방법에 의해 제제화될 수 있다.

[0383] 핵산(siRNA; siRNA 또는 shRNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는 음성 c-MAF 우성형질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드)이 투여되는 경우, 본 발명은 특히 상기 핵산을 투여하기 위해 제조된 약학 조성물을 고려한다. 상기 약학 조성물은 노출된(naked) 핵산, 즉 신체의 뉴클레아제에 의한 분해로부터 핵산을 보호하는 화합물의 부재 하의 핵산을 포함할 수 있는데, 이것은 형질감염을 위해 사용된 시약과 관련된 독성이 제거된다는 장점을 수반한다. 노출된 화합물에 적합한 투여 경로는 혈관내 경로, 중양내 경로, 두개내 경로, 복강내 경로, 비장내 경로, 근육내 경로, 망막하 경로, 피하 경로, 점막 경로, 국소 경로 및 경구 경로를 포함한다(Templeton, 2002, DNA Cell Biol., 21:857-867). 대안적으로, 콜레스테롤에 접합된 리포좀, 또는 세포막을 통한 전위를 촉진할 수 있는 화합물, 예컨대, HIV-1 TAT 단백질로부터 유래된 Tat 펩티드, 초파리 안테나페디아(antennapedia) 단백질의 호메오도메인의 제3 나선, 헤르페스 심플렉스 바이러스 VP22 단백질, 아르기닌 올리고머 및 국제 특허출원 공보 제W007069090호에 기재된 펩티드에 접합된 리포좀의 일부를 형성하는 핵산이 투여될 수 있다(Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol Therapy 8:143-150 and Snyder, E.L. and Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393). 대안적으로, 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터, 바람직하게는 아데노바이러스-기초 벡터, 아데노-관련 바이러스 또는 레트로바이러스, 예컨대, 무린 백혈병 바이러스(MLV) 또는 렌티바이러스(HIV, FIV, EIAV)에 기초한 바이러스의 일부를 형성하는 폴리뉴클레오티드가 투여될 수 있다.

[0384] c-MAF 억제제 또는 이를 함유하는 약학 조성물은 체중 kg 당 10 mg 미만, 바람직하게는 체중 kg 당 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 또는 0.00001 mg 미만의 용량으로 투여될 수 있다. 단위 용량은 주사, 흡입 또는 국소 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0385] 용량은 치료된 병태의 증증도 및 반응에 달려 있고, 수일 내지 수개월, 또는 병태가 진정될 때까지 달라질 수 있다. 최적 용량은 환자의 체내에서 약제의 농도를 주기적으로 측정함으로써 결정될 수 있다. 최적 용량은 동물 모델에서의 사전 시험관내 또는 생체내 분석에 의해 수득된 EC50 값으로부터 결정될 수 있다. 단위 용량은 1일 1회, 또는 1일 1회 미만, 바람직하게는 2일, 4일, 8일 또는 30일마다 1회 미만으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 출발 용량을 투여한 후, 일반적으로 출발 용량보다 더 적은 양의 1회 또는 수회 유지 용량을 투여할 수 있다. 유지 요법은 환자를 1일 체중 kg 당 0.01 µg 내지 1.4 mg, 예를 들면, 1일 체중 kg 당 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 또는 0.00001 mg의 용량으로 치료하는 것을 포함할 수 있다. 유지 용량은 바람직하게는 5일, 10일 또는 30일마다 최대 1회 투여된다. 치료는 환자가 앓고 있는 장애의 종류, 이의 증증도 및 환자의 상태에 따라 달라질 시간 동안 계속되어야 한다. 치료 후, 질환이 치료에 반응하지 않는 경우 용량을 증가시켜야 하는지, 아니면 질환의 개선이 관찰되거나 원치 않는 부작용이 관찰되는 경우 용량을 감소시켜야 하는지를 결정하기 위해 환자의 진행을 모니터링해야 한다.

[0386] 상승된 c-MAF 수준을 갖는, 골 전이를 갖는 유방암 환자에서 골 분해의 치료 또는 예방

[0387] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 전이의 치료에 사용되는 c-MAF 억제

제, 또는 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질에 관한 것이다.

- [0388] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 전이의 치료용 약물의 제조를 위한 c-MAF 억제제, 또는 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질의 용도에 관한 것이다.
- [0389] 대안적으로, 본 발명은 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 분해를 예방하고/하거나 치료하는 방법으로서, c-MAF 억제제 또는 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0390] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0391] 본 발명에 기재된 치료 방법에 적합한 c-MAF 억제제 또는 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질은 맞춤형 치료 방법과 관련하여 상세히 기술되어 있다.
- [0392] 기준 또는 대조군 샘플은 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 중앙 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.
- [0393] c-MAF 수준이 대조군 샘플에 비해 상승되어 있는지를 확인하거나 정량하는 방법은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세히 기재되어 있고, 골 분해를 피하거나 방지하는 물질에 동등하게 적용될 수 있다.
- [0394] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 전술된 물질들 중 골 분해를 피하거나 예방하는 하나 초과의 물질들이 조합되거나, 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬과 조합될 수 있는 조합된 치료를 수행할 수 있다.
- [0395] 골 분해를 피하거나 예방하는 물질은 전형적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 투여된다. 용어 "담체" 및 담체의 종류뿐만 아니라, 이들이 투여될 수 있고 골 분해를 피하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있는 제형 및 용량도 c-MAF 억제제에 대해 상기 정의된 바와 같다.
- [0396] 하기 실시예는 본 발명을 설명하고 본 발명의 범위를 한정하지 않는다.
- [0397] 본 발명의 키트
- [0398] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체에서 상기 유방암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0399] 또 다른 양태에서, 본 발명은 기저형의 삼중 음성 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상결과를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0400] 또 다른 양태에서, 본 발명은 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체를 위한 치료를 결정하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단; 및 c) 정량된 발현 수준과 기준 발현 수준의 비교를 기초로 상기 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 감소시키기 위한 치료를 결정하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0401] 또 다른 양태에서, 본 발명은 i) 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 또는 대안적으로 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 시약, 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계를 갖는 것으로서 미리 결정된 하나 이상의 c-MAF 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0402] 상기 대상체의 샘플에서 16q23 및 16q22-24 좌위 증폭 및 전위를 포함하는 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단은 상세히 기술되어 있다.
- [0403] 바람직한 실시양태에서, 발현을 정량하는 수단은 c-MAF 유전자에 특이적으로 결합하고/하거나 c-MAF 유전자를 특이적으로 증폭하는 프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함한다.

- [0404] 특정 실시양태에서, 유방암은 삼중 음성(기저형을 포함함) 또는 ER+(내강형 A 및 B를 포함함) 유방암이다.
- [0405] 본 발명의 방법의 모든 구체적인 실시양태들은 본 발명의 키트 및 이의 용도에 적용될 수 있다.
- [0406] 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 방법
- [0407] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0408] a) 유방암을 앓고 있는 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- [0409] b) 상기 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0410] c) c-MAF의 정량된 발현 수준을 c-MAF 발현의 미리 결정된 기준 수준과 비교함으로써 상기 샘플을 유형분류하는 단계
- [0411] 를 포함하는, 유방암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 유형분류가 상기 대상체에서 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0412] 상기 대상체의 샘플에서 6q23 및 16q22-24 좌위 증폭 및 전위를 포함하는 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단은 상세히 기술되어 있다.
- [0413] 특정 실시양태에서, 유방암은 삼중 음성(기저형을 포함함) 또는 ER+(내강형 A 및 B를 포함함) 유방암이다.
- [0414] 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0415] 유방암을 앓고 있는 대상체를 분류하는 방법
- [0416] 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 대상체를 코호트로 분류하는 방법으로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 c-MAF 발현 수준을 미리 결정된 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 샘플에서의 상기 c-MAF 발현 수준을 기초로 상기 대상체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0417] 상기 대상체의 샘플에서 6q23 및 16q22-24 좌위 증폭 및 전위를 포함하는 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단은 상세히 기술되어 있다.
- [0418] 특정 실시양태에서, 유방암은 삼중 음성(기저형을 포함함) 또는 ER+(내강형 A 및 B를 포함함) 유방암이다.
- [0419] 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0420] 바람직한 실시양태에서, 상기 코호트는 상기 기준 발현 수준에 비해 필적할만한 c-MAF 발현 수준을 갖는 것으로서 확인된 하나 이상의 다른 개체를 포함한다.
- [0421] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 샘플에서의 상기 c-MAF 발현 수준은 상기 미리 결정된 기준 수준에 비해 증가되어 있고, 이때 코호트의 구성원은 골 전이의 증가된 위험을 갖는 것으로서 분류된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 코호트는 임상시험을 수행하기 위한 코호트이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0422] 실시예
- [0423] 코호트 I: 발견 유방암 일차 종양 코호트:
- [0424] 인간 유방 종양들을 PAM50 유방암 고유 분류자(Breast Cancer Intrinsic Classifier)에 기재되어 있는 5개의 하위형으로 분류한 후, 이들 종양들에서의 c-MAF(MAF) 발현이 주어진 하위형들 중 일부에서의 골 전이 사건과 상관관계를 갖는지를 알아보기 위해 적절한 통계적 분석을 수행하였다. PAM50은 기저형으로 명명된 하위형을 갖는다. 대신에 삼중 음성 군을 사용하였다. GEO(T. Barrett, D. B. Troup, S. E. Wilhite, P. Ledoux, D. Rudnev, C. Evangelista, I. F. Kim, A. Soboleva, M. Tomashevsky, and R. Edgar. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles-database and tools update. Nucleic Acids Research, 35, January 2007. ISSN 1362-4962)로부터 환자의 정보를 다운로드하였다. 하기 데이터 세트를 사용하였다: 일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276. 이 일군의 코호트는 560명의 환자들을 가졌다. 병합하기 전에 시스템적인 편차를 제거하기 위해, 발현 측정치들을 모든 유전자들에 대한 z-점수로 전환하였다. 바이오컨덕터(Bioconductor)를 이용하여 모든 통계적 분석을 수행하였다(R.C. Gentleman, V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, oS. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry,

F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y.H. Yang, and J. Zhang. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biology, 5:R80, 2004. URL <http://genomebiology.com/2004/5/10/R80>)

- [0425] 코호트 II, 검증 유방암 일차 종양 샘플 코호트:
- [0426] 상기 환자 종양 샘플 코호트 I로 발견한 가설을 검증하기 위해 제2 인간 유방 종양 코호트를 사용하였다. 독립적인 검증 세트는 I 기, II 기 또는 III 기 BC를 갖고 해독된 추적조사를 받은 환자로부터 획득된 380개 초과 일차 유방암 표본으로 구성되어 있다(Rojo F., Ann Oncol (2012) 23 (5): 1156-1164). 조직 마이크로어레이를 표준 절차에 따라 프로세싱하였다. 종양을 ER+, 삼중 음성 및 HER2+에 따라 3개의 하위형으로 분류한 후, 이들 종양에서의 c-MAF(MAF) 발현 및 16q22-24 증폭이 주어진 하위형들 중 일부에서 골 전이 사건과 상관관계를 갖는지를 알아보기 위해 적절한 통계적 분석을 수행하였다.
- [0427] 이 제2 코호트에서의 통계적 분석은 하기 전체에 기초하였다:
- [0428] i) 기준 특성들의 비교(표 3 및 6).
- [0429] 연령의 분산 동질성을 폴디드 F 검정(Folded F test)으로 검정한다. 분산 동질성에 따라 연령의 평균의 차이를 풀링된(pooled) 또는 사터와이트(Satterthwaite) t-검정(다중 카테고리 비교를 위한 ANOVA 또는 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis))으로 검정한다. 적용가능한 경우 범주형 변수를 카이-제곱 또는 피셔 검정과 비교한다.
- [0430] ii) 진단 성능 FISH 및 IHC
- [0431] -  $p < 0.2$ 의 변수를 도입하기 위한 p-값 기준 및  $p < 0.10$ 의 조절 후 모델에서 변수를 유지하기 위한 기준을 사용한 단계적 선택을 통해 다변량 분석을 수행한다. ROC 곡선의 AUC를 비교하여 진단 성능을 평가할 것이다. 모델의 적합도(Goodness of fit)를 호스머-레메쇼우(Hosmer-Lemeshow) 검정으로 평가할 것이다(유의한 경우, 추가 분석을 수행하지 않을 것이다).
- [0432] - 대다수의 예측 변수들(16q23 FISH 및 MAF IHC)을 기초로 각각의 분류 카테고리에 대한 민감성(Se), 특이성(Sp), 양성 예측 값(PPV) 및 음성 예측 값(NPV)을 계산할 것이다. 데이터 오버-피팅(over-fitting) 문제를 극복하기 위해, PPV 및 NPV의 자동처리(bootstrapping)를 수행할 것이다.
- [0433] iii) 예후 역할
- [0434] - 골 전이까지 소요되는 결과 시간의 Cox 회귀 모델링을 "에프론(efron)" 관계 관리로 수행할 것이다. 사건의 수는 모델에 도입된 변수의 수(각각 5개 내지 10개의 사건에 대한 약 1개의 변수)를 유도할 것이다.
- [0435] - SAS 9.3에서 실행된 비례 위험 가정에 대한 상한(supremum) 검정을 이용하여 비례 위험 가정을 확인할 것이다. 이 검정은 이 가정이 위배되는 경우 유의한 p-값을 제공한다.
- [0436] 유방암 하위형의 분류
- [0437] 일군의 코호트(발견 코호트 I)의 PAM50 유전자들을 PAM50 유전자 시그니처에서 대조군 유전자로서 기재된 유전자에 따라 표준화하였다. 각각의 환자에 대해, 그 동일한 환자에 대한 대조군 유전자의 평균을 차감함으로써 발현 추정치를 표준화하였다.
- [0438] 5개의 점수를 계산하여 환자를 분류하였다:
- [0439] - ESR1 상태: 유전자 ESR1의 분포는 이원성(bimodality)을 나타내었다(도 1). 2개의 모드는 ESR1 낮은 환자 및 ESR1 높은 환자를 확인시켜준다. 팩키지 "mclust"를 사용하여 2개의 요소들을 갖는 정상 분포의 혼합물을 피팅하고 각각의 환자가 ESR1 낮은 요소 및 ESR1 높은 요소에 속할 사후 확률을 획득하였다. 이 군에 속하는 사후 확률이 80%보다 더 큰 경우 환자는 ESR1 낮은 환자로서 간주되었다. ESR1 높은 환자에 대해 동일한 기준을 사용하였다. 환자가 ESR1 높은 환자 및 ESR1 낮은 환자 둘다가 아닌 경우, ESR1 중간 환자로서 간주되었다.
- [0440] - 내강 상태: 각각의 환자에 대해, 내강 유전자 목록에서 모든 유전자들의 발현의 평균을 산출함으로써 내강 점수를 계산하였다. 내강 점수의 분포는 이원성을 나타내었으므로(도 1), 내강 상태는 ESR1 상태와 동일한 방식으로 기재되었다.
- [0441] - 증식 상태: 각각의 환자에 대해, 내강 유전자 목록 내의 모든 유전자들의 발현의 평균을 산출함으로써 증식 점수를 계산하였다. 증식 유전자의 평균은 이원성을 나타내지 않았다(도 1). 따라서, 가장 낮은 평균 값을 갖는

환자의 절반은 증식 낮은 환자로서 간주되었다. 나머지 환자들은 증식 높은 환자로서 간주되었다.

- [0442] - PGR1 상태: 유전자 PGR1은 이원성을 보이므로(도 1), PGR1 상태는 내강 상태와 동일한 방식으로 기재되었다.
- [0443] - ERBB2 상태: 유전자 ERBB2는 이원성을 보이지 않는다(도 1). ERBB2 발현 값이 ERBB2 평균 + ERBB2의 1 표준 편차보다 더 높을 때 샘플은 ERBB2 높은 샘플로서 기재되었다. 그렇지 않은 경우, 샘플은 ERBB2 낮은 샘플로서 간주되었다.
- [0444] 2개의 내강 유전자들 및 1개의 증식 유전자는 상기 일군의 코호트에 존재하지 않았다. 이들은 사용되지 않았다. 모든 환자를 PAM50에 따라 하위형으로 배정하였다.
- [0445] PAM50의 분류에 따라 임의의 하위형으로 배정될 수 없는 58명의 환자들이 존재하였다. 본 발명자들은 1개 초과 의 하위형에 속하는 환자를 발견하지 못하였다.
- [0446] 에스트로겐 수용체 양성(ER+) 종양은 ESR1 높은 종양으로서 정의된다.
- [0447] 삼중 음성 종양은 ESR1, PGR1 및 ERBB2 낮은 종양으로서 정의된다.
- [0448] 검증 코호트 II의 경우, 환자 분류는 진단 목적에 따라 상용적인 병리학자 점수에 기초하였다. ER+ 종양은 ESR1 을 발현하는 종양으로서 정의되었고, 삼중 음성 유방암 종양은 ESR1, PR 및 HER2를 발현하지 않는 종양으로서 정의되었다. HER2+ 종양은 병리학자 점수에 따라 2+ 및 3+ HER2 종양으로서 정의되었다. 상기 하위형들 중 임의 의 하위형으로 배정될 수 없는 6명의 환자들이 존재하였다. 본 발명자들은 1개 초과 의 하위형에 속하는 환자를 발견하지 못하였다.
- [0449] 삼중 음성 유방암의 코호트에서 전이, 특히 골 전이를 예측하는 c-MAF 유전자 발현 능력의 분석
- [0450] 코호트 I에서 골 전이를 분석할 때, 사건까지의 시간만을 보고하면서 골 전이 및 또 다른 전이를 동시에 갖기 때문에 33명의 환자들을 제거하였다. 본 발명자들은 제1 전이에 관심을 가졌고, 어떤 전이인지를 아는 방법이 없다는 점을 고려하여, 먼저 2개의 전이 부위가 확인된 환자들을 분석으로부터 제거하였다.
- [0451] 일단 본 발명자들이 관심있는 하위형, 즉 삼중 음성 유방암(큰 비율의 기저형 유방암을 포함함)을 확인하고 환 자를 선택하면, 본 발명자들은 조절 변수로서 코호트를 포함하는, 하위형 및 c-MAF 발현을 통해 각각의 표현형 (골 전이)을 설명할 수 있는지를 알아보기 위해 (팩키지 서바이벌(survival)로부터의 R 함수 콕스프(coxph)를 이용하여) Cox 비례 위험 모델을 조절하였다. c-MAF는 하위형과 통계적으로 유의한 상호작용 효과를 가졌다 (p=0.043). 이것은 c-MAF와 생존 사이의 관계가 환자 하위형에 따라 유의하게 상이하다는 것을 본 발명자들에게 알려주었다. 삼중 음성 유방암 일차 종양에서의 c-MAF의 유전자 발현은 골 전이와 유의한 상관관계를 가졌다(표 3 및 도 2).

**표 3**

**생존 분석**

하위형	n	위험 비	95% 신뢰구간	p-값
삼중 음성	164	1.444	[1.016-2.054]	0.040

- [0452]
- [0453] c-MAF를 사용하여 삼중 음성 유방암(큰 비율의 기저형 유방암을 포함함)을 갖는 대상체에서 전이를 발생시킬 경 향의 예후를 결정할 수 있다(표 3 및 도 2).
- [0454] ER+ 유방암 종양에서 전이, 특히 골 전이를 예측하는 c-MAF 유전자 발현 능력의 분석
- [0455] 본 발명자들은 ER+ 유방암(A 하위형 및 B 하위형을 포함하는 큰 비율의 내강형 유방암을 포함함)에 초점을 두었 다. 본 발명자들은 c-MAF 발현을 통해 각각의 표현형(골 전이, 폐 전이 또는 뇌 전이)을 설명할 수 있는지를 알 아보기 위해 (팩키지 서바이벌로부터의 R 함수 콕스프를 이용하여) Cox 비례 위험 모델을 조절하였다. ER+ 유방 암 일차 종양에서의 c-MAF의 유전자 발현은 골 전이와 유의한 상관관계를 가졌다(표 4 및 도 3).

표 4

생존 분석

하위형	n	위험 비	95% 신뢰구간	p-값
에스트로겐 수용체 양성	349	1.22	[1.014-1.473]	0.032

[0456]

[0457]

[0458]

[0459]

[0460]

[0461]

[0462]

c-MAF를 사용하여 ER+ 유방암(A 하위형 및 B 하위형을 포함하는 큰 비율의 내강형 유방암을 포함함)을 갖는 대상체에서 전이를 발생시킬 경향의 예후를 결정할 수 있다(표 4 및 도 3).

c-MAF가 특히 ER+ 및 TN에서 면역조직화학에 의해 코호트 II에서 유방암 골 전이에 대한 임상 생체마커인지에 대한 검증

다코 링크(Dako Link) 플랫폼에서 양으로 하전된 유리 슬라이드 상에 놓여진 3 μm 인간 BC 종양 조직 박편을 사용하여 c-MAF 면역염색을 수행하였다. 파라핀 제거 후, pH 6.1의 0.01 mol/l 시트레이트-기체의 완충된 용액(다코)에서 열 항원 복구를 수행하였다. 내재성 퍼록시다제를 켜고 있었다. 토끼 다중클론 항-MAF 항체를 실온에서 1:100 희석비로 30분 동안 사용한 후, 퍼록시다제와 커플링된 항-토끼 Ig 텍스트란 중합체와 함께 항온처리 하였다(Flex+, 다코). 그 다음, 박편을 3,3'-디아미노벤지딘(DAB)으로 가시화하고 헤마톡실린으로 반대염색하였다.

c-MAF 항체 민감성(1:100)을 1:10 내지 1:1000의 증가하는 일차 항체 희석 범위에서 계산하였다. 모 세포 및 c-MAF 과다발현(플러스 c-MAF 긴/짧은) MCF7 및 T47D 인간 BC 세포를 사용하여 특이성을 측정하였다. 포르말린-고정된 세포 펠렛을 IHC에 대해 기재된 바와 같이 프로세싱하고, 결과를 전체 용해물로부터의 웨스턴 블롯으로 확인하였다. 특이성은 BALB-c 누드 마우스의 이소성 MCF7 및 c-MAF 과다발현 MCF7 이중이식편에서도 나타났다. 일차 항체 대신에 정상 토끼 IgG2(IS600, 다코)와 함께 항온처리된 동일한 표본으로부터의 박편을 음성 대조군으로서 사용하였다.

MAF 면역염색을 전산화된 측정으로 점수화하였다. 각각의 표본으로부터 취득된 9개의 대표적인 이미지를, 누انس(Nuance) FX 멀티스펙트럼 이미지화 시스템(씨알아이 인코포레이티드(CRI Inc.))을 갖춘 DM2000 레이카(Leica) 현미경을 이용하여 420 내지 700 nm에서 10 nm 파장 간격으로 획득하였다. 이미지의 스펙트럼 데이터셋을 획득하기 전, 광원 강도, 필터 투과 효율 및 카메라 감도에서의 편차를 보상하기 위해 각각의 파장에서 장치 벽을 대략 90% 충전시키는 데에 필요한 노출 시간을 측정하기 위해 슬라이드의 블랭크 영역을 이미지화하면서 자동노출 루틴(routine)을 수행하였다. 누انس 1.6.4 소프트웨어를 사용하여 순수한 DAB 및 헤마톡실린 염료 색채의 라이브러리를 생성하여 색채를 분리하는 데에 사용하였다. 그 다음, 기준물의 입방체(상이한 파장에서 촬영된 이미지의 적층체)를 각각의 새로운 케이스에 대해 획득한 후, 동일한 노출 시간을 이용하여 3개의 대표적인 조직 시야의 스펙트럼 이미지화를 수행하였다. 이미지의 데콘볼루션(deconvolution) 후, 조영에 있어서의 불균등을 보상하기 위해 스펙트럼 데이터를 평면 시야 보정하고, 배경을 여과하였다. 비어(Beer) 규칙 전환을 이용하여 기준물 입방체로 나누어진 샘플의 비의 음성 로그를 취하여 양성 신호를 투과율로부터 광학 밀도 단위로 전환하였다. 모든 양성 신호들을 강조하는 의사-색채(pseudo-color) 이미지를 생성하는 컴퓨터-보조된 역치를 설정하였다. 분석은 관심있는 영역의 평균 강도로부터 c-MAF의 정량적 데이터를 제공하였다. 상이한 크기의 역치를 설정하여 상피 세포(정상 및 악성)의 핵뿐만 아니라 간질 세포 또는 림프구의 핵도 자동적으로 검출하고 병리학자에 의해 확인받았다. 통계적 분석을 위해 관심있는 모든 영역들의 신호 강도의 평균 값에 대해 각각의 케이스를 계산하였다. 전산화된 측정의 출력은 c-MAF 발현에 대한 56 내지 70,367의 연속 데이터를 생성하였다.

일차 유방암 조직의 대표적인 c-MAF 면역염색(IHC)이 제시되어 있다(도 4의 a). 케이스 1은 c-MAF 음성 종양(OD<1000)을 나타낸다. 케이스 2 및 3은 c-MAF 양성 종양(각각 OD>1000 및 OC>25000)이다(도 4의 a). 이어서, 380개의 일차 유방암 종양들의 코호트에서 c-MAF 단백질 발현(전산화된 측정에 의해 측정되어 광학 밀도 임의 단위(OD)로서 표현됨)을 보여주는 도표는 모든 종양 IHC 신호 정량을 요약하였다. 종양을 BC 하위형(ER+, HER2+ 및 TN)에 따라 분리하였다(도 4의 b). 상기 IHC 염색을 기초로, c-MAF(양성 또는 음성) 분류에 따라 380개의 일차 유방암 종양들(I 기, II 기 및 III 기)의 코호트에서 질환 부재 생존(도 4의 c) 및 골 전이 부재 생존(도 4의 d)의 카플란-메이에르 곡선을 작도하였다. 상이한 BC 하위형(ER+, HER2+ 및 TN)에서의 c-MAF의 진단 성능(도 4의 e)도 계산하였다. 기준 특성 및 Cox 다변량 분석을 상기 정의된 바와 같이 수행하여, 임의의 다른 임상 병



리학적 파라미터의 일차 유방암 종양에서 골 전이 예측을 위한 분류 기준으로서 c-MAF에 대한 영향을 확인하였다(표 5 및 6). 나타낸 바와 같이, 9개 초과 림프절 양성을 갖는 것을 제외하고 임의의 다른 파라미터와의 유의한 관련성은 없다.

표 5

c-MAF IHC 발현에 따른 기준 특성

특성	완전한 시리즈 (n=380)		c-MAF 비-과다발현 (n=309)		c-MAF 과다발현 (n=71)		P
	환자의 수	%	환자의 수	%	환자의 수	%	
연령(중간, 범위)	58, 26-90		58, 31-90		59, 26-90		
폐경 상태							0.726
폐경 전	111	29.2	89	28.8	22	31.0	
폐경 후	269	70.8	220	71.2	49	69.0	
종양 크기, mm							0.447
≤20	209	55.0	168	54.4	41	57.7	
21-50	113	35.0	112	36.2	21	29.6	
>50	38	10.0	29	9.4	9	12.7	
종양 등급							0.782
I	67	17.6	56	18.1	11	15.5	
II	184	48.4	150	48.5	34	47.9	
III	129	33.9	103	32.9	26	36.6	
림프절							0.622
없음	227	59.7	182	58.9	45	63.4	
1-3	90	23.7	78	25.2	12	16.9	
4-9	40	10.5	31	10.0	9	12.7	
>9	23	5.1	18	5.8	5	7.0	
에스트로겐 수용체 상태							0.807
음성	97	25.5	78	25.2	19	26.8	
양성	283	74.5	231	74.8	52	73.2	
프로게스테론 수용체 상태							0.481
음성	133	35.0	106	34.3	27	38.0	
양성	247	65.0	203	65.7	44	62.0	
HER2 상태							0.358
음성	303	79.7	243	78.6	60	84.5	
양성	77	20.3	66	21.4	11	15.5	
중식(Ki-67)							0.105
낮은 중식(<15%)	278	73.2	232	75.1	46	64.8	
높은 중식(≥15%)	102	26.8	77	24.9	25	35.2	

약어: HER2, 인간 표피 성장인자 수용체 2

[0463]

표 6

c-MAF IHC 발현을 갖는 환자에서의 BDFS 분석

변수	일변량(n=380)			다변량(n=380)		
	HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
폐경 상태			0.818			-
폐경 전				-		
폐경 후	1.00	0.42 내지 1.97		-	-	
종양 크기, mm	0.91		0.067			-
≤20				-		
21-50	1.00	1.08 내지 5.41		-	-	
>50	2.42	0.76 내지 7.70		-	-	
종양 등급	2.41		0.062			0.130
I				1.00		
II	1.00	0.81 내지 45.8		4.41	0.58 내지 33.503	
III	5.71	0.74 내지 44.27		2.61	0.31 내지 21.57	
림프절			0.005			0.006
없음	1.00			1.00		
1-3	1.59	0.65 내지 3.90		1.47	0.59 내지 3.68	
4-9	0.88	0.20 내지 4.09		0.96	0.21 내지 4.35	
>9	6.72	2.64 내지 17.10		6.89	2.56 내지 18.56	
호르몬 수용체 상태			0.124			
음성	1.00			-		
양성	0.54	0.25 내지 1.15		-		
HER2 상태			0.775			-
음성	1.00			-		
양성	0.87	0.33 내지 2.28		-	-	
중식(Ki-67)			0.029			0.133
낮은 중식(<15%)	1.00			1.00		
높은 중식(≥15%)	2.32	1.11 내지 4.82		1.85	0.84 내지 4.06	
c-MAF(IHC)			<0.001			1e-05
비-과다발현	1.00			1.00		
과다발현	5.24	2.53 내지 10.87		5.62	2.65 내지 11.95	

[0464]

[0465]

약어: BDFS, 골 질환 부재 생존; HR, 위험비; CI, 신뢰구간; HER2, 인간 표피 성장인자 수용체 2

[0466]

골 전이 콜로니화 분석에서 c-MAF의 기능적 검증

[0467]

임상전 실험 이종이식 마우스 모델을 사용하여 골 전이 콜로니화 분석에서 c-MAF의 원인 기여를 기능적으로 검증하였다. ER+ 인간 유방 세포주들, 즉 GFP/루시퍼라제 벡터로 표지된 MCF7 및 T47D를 사용하였고 이 세포주들을 심실내 또는 꼬리 정맥 주사로 면역결핍 마우스 내로 접종하였다. 이들 마우스는 이종이식 모델에서 인접한 종양 세포를 위한 호르몬 공급을 보장하도록 에스트로겐 펠릿을 보유해야 한다.

[0468]

표준 방법은 기능성 손실 및 획득 실험이었다. 전이에서의 c-MAF의 기능을 검증하기 위해 MCF7 모세포, T47D, 또는 높은 수준의 c-MAF 발현 때문에 선택된 고도의 골 전이성 세포 유도체(BoM2)에서 c-MAF를 발현시켰거나 침묵시켰다(도 5 및 6). 마우스 내로 심장내 접종된 전이성 세포의 생물발광 검출을 이용하여 c-MAF 유전자 골 전이 기능을 생체내에서 확인하였다. 본 발명자들은 BoM2 세포에서 내재성 c-MAF의 수준을 80% 이상까지 감소시키고 c-MAF 외재성 과다발현에 의해 레스큐될 수 있는 shRNA-매개 c-MAF 킥다운을 발생시켰다(도 6). 나아가, 본 발명자들은 각각의 c-MAF 동형체를 발현하는 세포도 개별적으로 또는 집합적으로 발생시켰고, 레포터 분석에서 전사 활성화제로서의 그의 기능성을 시험하였다(도 6). 모 MCF7 세포, c-MAF(집합적으로 또는 독립적으로 짧은 동형체 및 긴 동형체)를 갖거나 갖지 않는 모 T47D 세포, 및 c-MAF(짧은 동형체 및 긴 동형체)의 발현이 고갈되었거나 레스큐된 BoM2 골 전이성 MCF7 세포 유도체를 마우스의 좌심실 내로 주입하고, 골 콜로니화를 생체내 생물발광 이미징으로 분석하였다. 모든 경우에서, 상응하는 대조군을 접종하였다(도 5, 6, 7 및 8).

[0469]

주입 후 52일째 날, sh대조군 BoM2 세포(즉, c-MAF 발현) 중 90%의 세포 또는 레스큐 군에서 50%의 세포가 골 전이를 발생시킨 것에 비해 BoM2 c-MAF 킥다운 세포를 접종받은 마우스들 중 23%만이 골 전이를 발생시켰다(도 5의 c 및 도 8). c-MAF가 고갈된 세포에서의 골 전이 감소는 뒷다리 골용해성 병변의 정도의 급격한 감소를 동

반하였다(도 5의 c). 반대로, MAF(개별적으로 또는 집합적으로 각각의 동형체) 과다발현은 심장내 주입 후 골을 전이시키는 ER+ 유방암 세포(MCF7 및 T47D)의 능력 및 전이 부하를 향상시켰다(도 5의 a 및 b, 및 도 7). 흥미롭게도, MAF 발현 세포는 모 MCF7 세포에 비해 골용해성 골 전이를 더 많이 발생시켰고(도 5의 a, 도 6 및 도 9의 a), 전이성 병변 둘레에서 타르트레이트 내성 산 포스파타제(TRAP+) 과골세포의 증가된 수가 검출될 수 있었다(도 9의 b, c 및 d). MAF 과다발현은 피하 이식되었을 때 모 MCF7 세포의 본질적인 증식 활성을 증가시키지 않았다(도 10). 높은 수준의 MAF 발현은 폐 콜로니화를 뒷받침하지 않았다(도 5의 d).

[0470] 유방암 일차 종양에서의 임상 검증과 함께 기능의 손실 및 획득 실험은 에스트로겐 수용체 양성 유방암 하위형(내강형 A 및 B 분자 하위형을 포함함) 및 삼중 음성 유방암 하위형(기저형 분자 하위형을 포함함)의 골 전이 과정에서 예후 및 예측 마커 및 원인 표적 유전자로서 c-MAF를 기능적으로 검증하였다.

[0471] MAF는 과골세포 분화의 종양 세포 자극, 예를 들면, PTHLH 사이토카인의 전사 조절을 통한 골용해성 골 전이를 매개한다.

[0472] 골 전이 기능을 유방암 세포에 제공하는 데에 있어서 c-MAF의 직접적인 활성 없이, c-MAF는 골을 콜로니화하기 위해 귀소(homing) 및 골 리모델링 능력을 촉진하는 유전자의 활성을 전사 수준에서 조절할 수 있다. PTHLH 발현은 c-MAF의 조절 하에 있었다. 관찰결과를 qPCR 분석으로 확인하였다(도 11의 a). 추가로, 골에서 성장하는 환자 유방암 전이(GSE14020)는 다른 부위에서의 전이에 비해 c-MAF 발현을 유지하였다(도 11의 b). 나아가, MAF 및 PTHLH를 평균보다 더 많이 발현하는 전이의 77%가 골 전이이었다(도 11의 b). PTHLH는 악성종양의 체액성 고칼슘혈증을 담당하는 인자로서 확인되었다. 더욱이, PTHLH는 부분적으로 과골세포 분화의 자극으로 인해 골용해성 골 전이에 있어서 기본적인 역할을 수행한다는 것이 밝혀졌다. 실제로, c-MAF를 발현하는 세포로부터의 컨디셔닝된 배지는 PTHLH 길항제 펩티드(7-34Aa, PTHLH-AN)와 함께 항온처리되었을 때 방지되는 과정인 시험관내 과골세포 분화의 유도를 향상시켰다(도 11의 c).

[0473] PTHLH가 유방암 세포에서 c-MAF에 의해 유도된 골 전이를 매개하는지를 시험하기 위해, 본 발명자들은 c-MAF 발현 MCF7 유방암 세포를 심장내로 주입하고 47일의 기간 동안 PTHLH-AN의 존재 또는 부재 하에 골 전이를 확립하고 성장시키는 그의 능력을 평가하였다. 생체내에서 PTHLH 활성을 차단하기 위해, PBS에 용해된 6 µg의 (7-34Aa) PTHLH-AN을 동물에게 1일 2회 투여하였다. 대조군을 PBS로 처리하였다. c-MAF 발현 세포는 유사한 침투를 갖는 골 전이를 발생시켰지만, PTHLH-AN을 사용한 치료는 뒷다리 골용해성 병변의 정도를 급격히 감소시켰다(도 11의 d 및 e). 이 감소는 전이성 병변 둘레에서의 과골세포(TRAP+ 세포)의 수의 감소를 동반하였다(도 11의 d 및 e). 이들 결과는 c-MAF가 유방암 골용해성 골 전이를 유도한다는 것을 시사한다. 더욱이, PTHLH 발현은 c-MAF에 의해 유발된 골용해성 유방암 골 전이를 위해 필요한 인자이다. 최종적으로, 과골세포 분화 과정의 차단은 c-MAF에 의해 유발된 유방암 골 전이를 예방하였다.

[0474] 골로의 전이를 예측하는 c-MAF 능력은 용량 의존적이다.

[0475] 먼저, 본 발명자들은 골 전이를 예측하는 c-MAF 발현 능력이 용량 의존적인지를 평가하였다.

[0476] GEO(Barrett et al.(2007))로부터 환자의 정보를 다운로드하였다. 하기 데이터 세트를 사용하였다: 일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276. 이 일군의 코호트는 560명의 환자들을 가졌다. 병합하기 전에 시스템적인 편차를 제거하기 위해, 발현 측정치들을 모든 유전자들에 대한 z-점수로 전환하였다.

[0477] 바이오컨덕터를 이용하여 모든 통계적 분석을 수행하였다(Gentleman RC et al. Genome Biology, 5:R80, 2004. URL <http://genomebiology.com/2004/5/10/R80>).

[0478] 본 발명자들은 4차 스플라인을 갖는 Cox 회귀 모델((팩키지 페노테스트에서의 스무쓰콕스프 함수)을 통해 c-MAF 발현과 골 전이 위험 비 사이의 관계의 평활 추정치를 획득하였다. 팩키지 페노테스트의 스무쓰콕스프 함수는 유전자 발현 수준에 의해 평활해진 Cox 비례 위험을 작도한다. 따라서, 위험이 주어진 유전자의 상이한 발현 수준에 걸쳐 어떻게 거동하는지를 보여주는 도표를 구축한다. 신뢰구간도 제공된다(용법: 스무쓰콕스프(시간, 사건, x, xlim, ylim, 기타...)). 독립변수: 시간) 생존까지의 시간이 저장되는 변수; 사건) 생존 사건이 저장되는 변수; x) 주어진 유전자의 발현 수준을 함유하는 수치; xlim) 도표에 대한 xlim; Ylim) 도표에 대한 ylim; 기타...) 도표를 통과할 다른 독립변수.

[0479] 4차 스플라인을 갖는 Cox 회귀 모델을 통해 획득된 c-MAF 발현과 골 전이 위험 비 사이의 관계를 도 12에서 알 수 있다. 모든 유방암 종양들이 상기 일군의 코호트에 존재하고, 에스트로겐 수용체 양성 유방암 종양이 상기 일군의 코호트에 존재하고, 삼중 음성 종양이 상기 일군의 코호트에 존재한다. 분석을 수행하였고 이 분석은 c-MAF 발현 수준이 평균(0으로 표시됨)보다 더 높은 종양에서 골 전이를 예측하는 c-MAF 능력의 위험 비(HR) 및

p-값을 표시하였다. 발현 수준에서 1은 1 표준 편차를 표시한다.

- [0480] 본 발명자들은 "높은 c-MAF" 발현 유방암 일차 종양을 유방암 일차 종양의 대표적인 코호트에서의 평균 발현보다 더 많은 c-MAF를 발현하는 종양의 군으로서 정의하였다. 본 발명자들은 "낮은 c-MAF" 발현 유방암 일차 종양을 유방암 일차 종양의 대표적인 코호트에서 수득된 평균보다 더 적은 c-MAF를 발현하는 종양의 군으로서 정의하였다.
- [0481] 높은 c-MAF 발현 수준을 갖는 유방암 종양에서, c-MAF 발현은 골 전이의 위험을 용량 의존적 방식으로 예측한다(도 12). 유사하게, ER 양성 유방암 하위형(내강형 A 및 B 분자 하위형을 포함함) 및 삼중 음성 유방암 하위형(기저형 분자 하위형을 포함함)에서 본 발명자들은 동일한 거동을 관찰하였다(도 12).
- [0482] 종합하건대, 대표적인 유방암 종양 세트의 평균보다 더 높은 c-MAF 수준을 발현하는 ER+ 및 TN 유방암 종양에서 c-MAF 발현 수준이 높을수록 골 전이에 대한 위험이 더 높다.
- [0483] 본 발명자들은 c-MAF의 용량이 높을수록 골 재발 위험이 높아진다는 것을 얼마나 확장할 수 있는지를 검증 코호트 II에서 분석하였다. 이를 위해, 본 발명자들은 전술된 전산화된 시스템을 이용하여 염색의 광학 밀도를 측정함으로써 면역조직화학(IHC)으로 c-MAF 발현을 정량하였다(도 4의 a 및 b). c-MAF 염색은 종양 세포에 대해 특이적이다(도 4의 a). 본 발명자들은 염색을 기초로 2종의 c-MAF 양성 유방암 종양을 관찰할 수 있다(케이스 2 및 3, 도 4의 a 및 b). c-MAF 양성 유방암 종양에서 이들 2종의 c-MAF IHC 염색에 따라, 본 발명자들은 이들이 이원 거동을 갖기 때문에 이들을 2개의 군으로 분리할 수 있다(도 13의 좌측 패널). 본 발명자들은 이들 2개의 카테고리를 기초로 c-MAF의 염색이 높을수록 골 전이의 위험이 높아지고(HR(골 전이)=19.45; p-값<0.001) 골 전이가 보다 일찍 일어난다는(도 13의 우측 패널) 관찰결과를 검증하였다.
- [0484] 이른 골 전이를 예측하는 c-MAF 능력
- [0485] 유방암 종양은 일차 종양 검출과 수술 절제 사이의 기간 및 원거리 재발의 관찰 시간에 따라 이른(<5년) 재발 종양과 늦은(>5년) 재발 종양으로 분류되었다. 실제로, 특정 환경 하에 이른 원거리 재발은 심지어 보다 더 짧은 기간으로 한정되었다. ER 양성 종양 및 음성 종양이 이른 골 재발의 관점에서 상이하게 거동하는 것으로 기재되어 있다는 점을 고려할 때, 이 분류는 임상적으로 중요하다. 구체적으로, 삼중 음성 종양 및 기저형 종양을 포함하는 ER 음성 종양은 이른 시점에서 재발하는 반면, ER 양성 종양은 늦은 시점 및 이른 시점에서 재발하는 동일한 경향을 갖는다(Knight WA, et al Cancer Research 1997: 37, 4669-4671, Goss PE Nature Rev Cancer 2010: 10, 871-877).
- [0486] 본 발명자들은 c-MAF 발현이 유방암, 특히 ER 양성(내강형 A 및 B를 포함함) 및 삼중 음성(기저형을 포함함) 유방암 일차 종양에서 이른 골 전이를 예측할 수 있는지를 평가하였다.
- [0487] GEO부터 환자의 정보를 다운로드하였다. 하기 데이터 세트를 사용하였다: 일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276. 이 일군의 코호트는 560명의 환자들을 가졌다. 병합하기 전에 시스템적인 편차를 제거하기 위해, 발현 측정치들을 모든 유전자들에 대한 z-점수로 전환하였다. 바이오컨덕터를 이용하여 모든 통계적 분석을 수행하였다
- [0488] 본 발명자들은 상이한 시점에서 c-MAF 및 골 전이의 독립성을 검정하기 위한 피셔의 정확성 검정을 수행하였다. 분할 표와 피셔의 검정 p-값의 비율은 도 14에서 볼 수 있다.
- [0489] 본 발명자들은 "매우 높은 c-MAF" 발현 유방암 일차 종양을 평균 + 1 표준 편차보다 더 많은 c-MAF를 발현하는 종양의 군으로서 정의하였다. 본 발명자들은 "낮은 c-MAF" 발현 유방암 일차 종양을 유방암 일차 종양의 대표적인 코호트에서의 평균 + 1 표준 편차보다 더 적은 c-MAF를 발현하는 종양의 군으로서 정의하였다.
- [0490] 유방암 일차 종양에서, 매우 높은 c-MAF 수준(RNA 또는 단백질)은 유방암 일차 종양의 수술 후 3년 및 5년 둘다에서 이른 골 전이를 예측한다(도 14).
- [0491] 특히, 에스트로겐 수용체 양성 유방암(내강형 A 및 B 분자 하위형을 포함함)에서 c-MAF 수준(RNA 또는 단백질)이 수술 후 3년 및 5년 둘다에서 이른 골 전이를 갖는 종양의 비율을 유의하게 정의한다는 것을 밝혔다(도 14).
- [0492] 종합하건대, 높은 수준의 c-MAF 발현은 이른 유방암 골 전이를 포함하는 골 전이의 높은 위험에 있는 유방암 일차 종양을 식별하거나 예측하는 데에 사용될 수 있다.
- [0493] 표 7은 유방암 일차 종양(일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276), 에스트로겐 수용체 양성(내강형 A 및 B 분자 하위형을 포함함) 유방암 일차 종양 및 삼중 음성(기저형 분자 하위형을 포함함) 유방암 하위형에서 골 전이,

이른 골 전이 및 매우 이른 골 전이의 예측을 보여준다.

표 7

ER+ 유방암 일차 종양(c-MAF > 평균, n=189)			
HR	CI.낮음	CI.높음	p-값
골 전이	1.56	3.87	0.00017
이른 골 전이(< 5년)	1.20	3.20	0.00853
매우 이른 골 전이(< 3년)	1.25	3.62	0.00694

삼중 음성 유방암 일차 종양(c-MAF > 평균, n=96)			
HR	CI.낮음	CI.높음	p-값
골 전이	1.15	3.97	0.02262
이른 골 전이(< 5년)	1.04	4.02	0.04534
매우 이른 골 전이(< 3년)	1.09	3.87	0.03276

HR(위험 비), CI(신뢰구간)

[0494]

[0495]

c-MAF를 포함하는 16q22-q24에 위치하는 염색체 영역의 증폭은 골 전이와 관련되어 있다.

[0496]

본 발명자들은 ACE 알고리즘(발현 데이터에 의한 카피 수 변경(CNA)의 분석)을 채택하여 전이의 위험과 관련된 일차 유방암 표본에서 CNA를 확인하였다(도 15의 a). 이들 중에서 염색체 16q22-q24에 위치하는 증폭된 영역은 전이의 위험과 유의하게(p<0.05) 관련되어 있었고, 그의 증가된 발현이 ER+ 인간 유방암에서의 골 전이의 위험과 개별적으로 및 독립적으로 관련되어 있는 유전자인 c-MAF를 포함하였다(HR=1.22 p=0.032, 일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276에 기초한 유방암 일차 종양 데이터 세트). 유사하게, FISH(16q23) 및 비교 게놈 혼성화(CGH)를 통해 모 MCF7(ER+) 세포와 골 전이성 MCF7 유도체(BoM2) 세포를 비교하였을 때, 본 발명자들은 16q22-24 염색체 영역에서의 획득을 확인하였다(도 15의 b 및 c). 모 세포의 하위세트(32.7%)는 이 게놈 증폭을 보유하고 있지만, 생체내 골 전이 선택을 통해 나머지 잔류 집단(88.6%)이 이 증폭을 보유하지 않는다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명자들은 16q22-q24가 전이, 특히 골 전이의 위험을 갖는 유방암들에서 증폭되어 있다는 것을 보였고, 골로 전이하는 그들의 능력을 생체내 선택된 세포에서 확인하였다.

[0497]

코호트 II에서 FISH에 의해 확인된 16q22-24 DNA 게놈 증폭이 골 전이를 예측하는 예후 능력의 검증

[0498]

골 전이 위험을 특이적으로 예측하는 16q22-24 게놈 증폭의 능력을 더 검증하기 위해, 본 발명자들은 I 기, II 기 또는 III 기 BC를 갖고 해독된 추적조사를 받은 환자로부터 수득된 334개의 일차 유방암 표본들로 구성된 독립적인 검증 세트에서 FISH를 통해 16q22-24 염색체 영역 게놈 획득을 분석하였다(본 발명자들은 16q23 게놈 영역을 확인하는 상업적으로 입수가능한 진단 프로브인 IGH/MAF 애보트 바이시스 프로브를 사용하였다)(Rojo F., Ann Oncol (2012) 23 (5): 1156-1164). 조직 마이크로어레이를 표준 절차에 따라 프로세싱하였다. 슬라이드를 MAF(16q23) 및 IGH(14q32) 프로브 혼합물(애보트 바이시스 프로브)과 함께 항온처리하였다. DAPI 반대염색을 적용하고 이미지를 적절한 현미경으로 획득하였다.

[0499]

I 기, II 기 및 III 기 BC 인간 일차 종양 세트(n=334)에서 골 전이 부재(도 16의 a) 또는 전체(도 16의 b) 생존의 카플란-메이에르 곡선을 작도하였다. 종양 당 3개의 코어를 사용하여 세포 당 평균 2.5 16q23 카피의 컷-오프를 기초로 환자들을 16q23 FISH 음성 군과 16q23 FISH 양성 군으로 분류하였다(도 16의 a 및 b). 골 전이를 예측하는 마커의 위험 비(골 전이), 특이성 및 민감성을 계산하였다. 데이터 세트의 기준 특성 및 전체 유방암에 대한 Cox 다변량 분석을 전술된 바와 같이 수행하였다(표 8 및 9).

[0500]

I 기, II 기 및 III 기 BC 인간 일차 종양 세트(각각 n=250 및 n=43)에서 ER 양성(좌측) 또는 삼중 음성(우측) 환자들에 대한 골 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 곡선도 작도하였다(도 16의 c). 종양 당 3개의 코어를 사용하여 세포 당 평균 2.5 16q23 카피의 컷-오프를 기초로 환자들을 16q23 FISH 음성 군과 16q23 FISH 양성 군으로 나누었다. ER+ 유방암에 대한 Cox 다변량 분석을 전술된 바와 같이 수행하였다(표 10).

표 8

중앙 당 3 개의 코어에서 측정된, 세포 당 2.5 카피 초과 16q23 (MAF) FISH 에 의한 기준 특성의 비교(\*이 변수에 대한 손실 값을 갖지 않는 환자에 대해 계산된 백분율)

	16q23(MAF) FISH ≤2.5 (n=262)	16q23(MAF) FISH > 2.5 (n=75)	p-값
중간 연령(IQR), 년	58(17)	58(21)	0.32
폐경후(%)	187(71.4)	46(61.3)	0.10
ER+ (%)	200(76.4)	53(70.7)	0.32
PR+ (%)	172(65.7)	45(60.0)	0.37
고등급(%)	83(31.7)	35(36.7)	0.016
Ki67*(%)	55(22.3)	29(41.4)	0.0014
하위형*(%)			0.58
내강	151(66.5)	39(66.1)	
Her2	44(19.4)	9(15.3)	
TN	32(14.1)	11(18.6)	
HER2+ (%)	51(19.5)	13(17.3)	0.68
pT(%)			0.21
1	164(62.6)	41(54.7)	
2-4	98(37.4)	34(45.3)	
pN(%)			0.27
0	163(62.2)	42(56.0)	
1-2	89(34.0)	27(36.0)	
3	10(3.8)	6(8.0)	

[0501]

표 9

I 기, II 기 및 III 기 유방암

재발 첫 부위로서 골 전이까지의 시간의 Cox 회귀

종양 당 3 개의 코어에서 측정된, 세포 당 2.5 카피 초과 16q23 (MAF) FISH

변수	일변량		다변량	
	HR(95% CI)	p-값	HR(95% CI)	p-값
16q23Fish>2.5	27.2(8.1-91.0)	<0.0001	26.1(7.8-87.4)	<0.0001
Ki67	2.8(1.2-6.4)	0.014		
pT				
1	기준		기준	
2-4	2.4(1.1-5.3)	0.035	2.1(0.9-4.6)	0.077
pN				
0	기준			
1-2	1.4(0.6-3.3)	0.44		
3	4.8(1.5-15.1)	0.0076		

[0502]

표 10

I 기, II 기 및 III 기 ER+ 유방암

재발 첫 부위로서 골 전이까지의 시간의 Cox 회귀

종양 당 3 개의 코어에서 측정된, 세포 당 2.5 카피 초과 16q23 (MAF) FISH

변수	일변량		다변량	
	HR(95% CI)	p-값	HR(95% CI)	p-값
16q23Fish	53.5(7.0-406.7)	0.0001	49.5(6.5-367.3)	0.0002
pT				
1	기준		기준	
2-4	3.4(1.2-9.4)	0.018	2.8(1.0-7.9)	0.047
pN				
0	기준			
1-2	2.6(0.8-8.0)	0.094		
3	6.8(1.6-28.81)	0.0089		

[0503]

[0504]

전체(도 16의 d) 및 ER+ 유방암(도 16의 e)에서 16q23 증폭의 진단 성능에 대한 수신자 조작 특성(ROC) 곡선도 계산하여 진단 성능을 평가하였다. ROC 곡선에서 진짜 양성률(민감성)은 상이한 컷-오프 점들에 대한 거짓 양성률(100-특이성)의 함수로 작도되어 있다. ROC 곡선 상의 각각의 점은 특정 결정 역치에 상응하는 민감성/특이성 쌍을 나타낸다.

[0505]

요약하건대, 16q23 FISH 프로브를 사용하여 본원에서 측정된 16q22-24 증폭은 유방암 일차 종양, 특히 TN 및

ER+ 유방암 하위형에서 골 전이의 위험을 유의하게 예측한다.

[0506] 삼중 음성 유방암으로 진단받은 대상체에서 c-MAF 발현 수준에 기초한 치료 요법의 결정

[0507] 삼중 음성 유방암을 갖는 대상체로서 진단받은 대상체로부터 종양 조직 샘플을 취득한다. 샘플을 얇은 조직 슬라이스로 절개하고 파라핀에 포매한다. 각각의 파라핀 박편을 슬라이드 상에 올려놓는다. 슬라이드를 항-MAF 항체와 함께 항온처리한다. MAF에 결합된 항체의 가시화 및 검출을 위해, 형광 염료와 접합된 항체를 사용한다. 여기 광선을 형광 염료에 제공하여 슬라이드를 가시화한다. 형광 신호의 이미지를 형광 현미경으로 취득한다. 종양 샘플의 형광 신호를 기준 샘플의 형광 신호와 비교함으로써 종양 샘플에서의 c-MAF의 상대적 발현 수준을 취득한다. 종양 샘플에서의 강도는 기준 샘플에서의 강도와 상관관계를 갖는데, 이때 기준 샘플에 비해 종양 샘플에서의 보다 높은 강도는 골로 전이된 일차 유방암을 갖는 대상체의 증가된 위험과 상관관계를 갖는다. 대안적으로, 16q22-24 좌위, 16q23 좌위 또는 c-MAF 유전자 증폭 또는 전위를 제자리 혼성화 기법 또는 유사한 기법을 이용하여 확인한다.

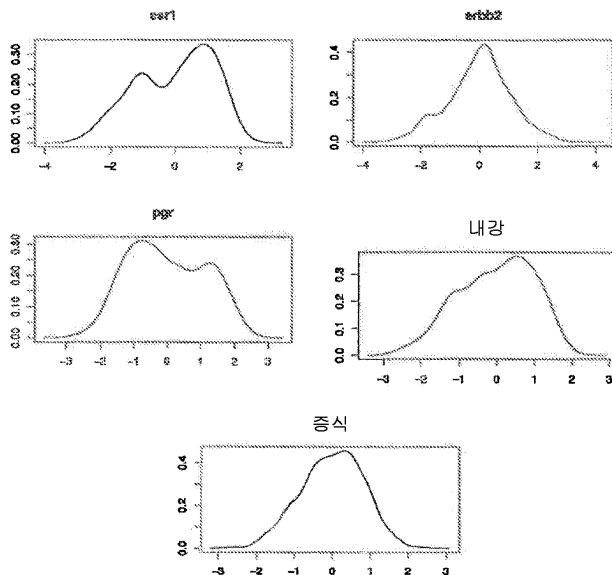
[0508] 골 전이의 증가된 위험의 예후를 기초로, 골 전이에 대한 예후 치료제로서 항-RANKL 항체 데노수맵을 대상체에게 투여한다. 120 mg의 데노수맵을 대상체에게 6개월 동안 매달 1회 피하(SC) 투여한 후, 120 mg의 데노수맵을 다음 4년 반 동안 3개월마다 피하 투여하고 5년 동안 경구 칼슘(500 mg 이상) 및 비타민 D(400 IU 이상)를 투여한다. 5년 후, 대상체는 골 전이의 어떠한 증거도 갖지 않는다. 골 전이의 증가된 위험이 없다는 예후를 기초로, 이 항-RANKL 항체를 환자에게 투여하지 않는다.

[0509] 본원에 기재된 예 및 실시양태는 단지 설명 목적으로 제공된 것이고, 이들에 비추어 볼 때 다양한 변경 또는 변화가 당업자에게 암시될 것이고 본원의 사상 및 범위에 포함된다는 것이 이해된다.

[0510] 본원에서 인용된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열을 포함하는 모든 공개문헌들, 특허들, 특허출원들, 인터넷 사이트 및 등록번호/데이터베이스 서열은, 각각의 개별 공개문헌, 특허, 특허출원, 인터넷 사이트 또는 등록번호/데이터베이스 서열이 참고로 도입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시되는 것처럼 동일한 정도로 모든 목적을 위해 전체적으로 본원에 참고로 도입된다.

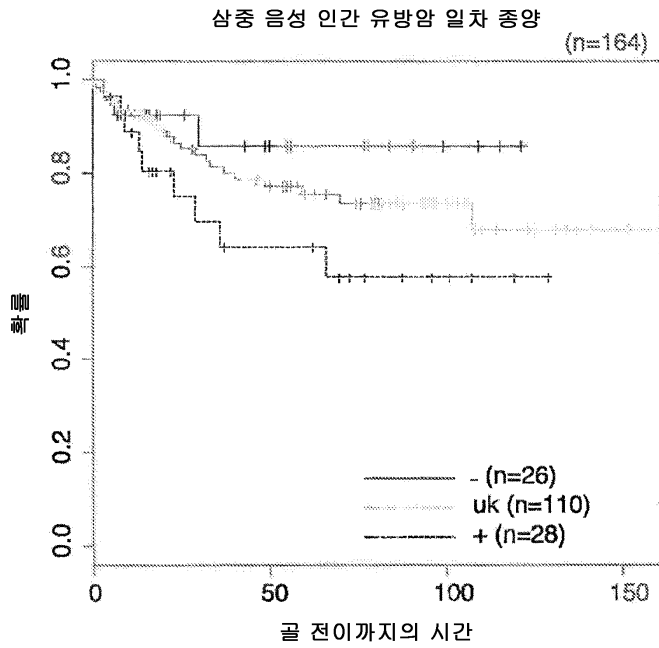
**도면**

**도면1**

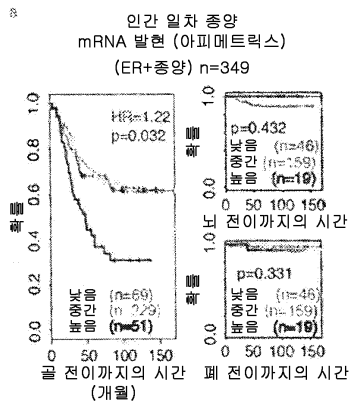




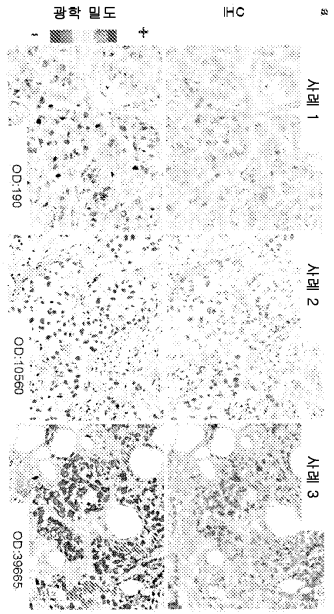
도면2



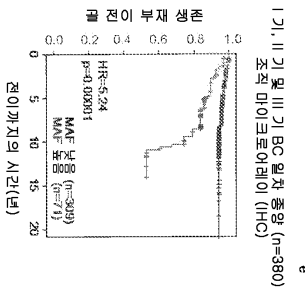
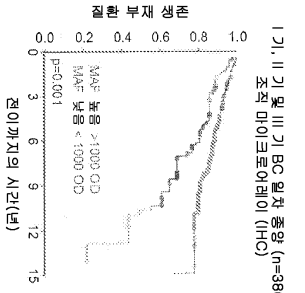
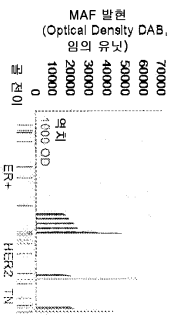
도면3



도면4



1기, II기 및 III기 BC 일차 종양 (n=380) 조직 마이크로아레이 (IHC)



복스 위험 비 (다변량 분석)

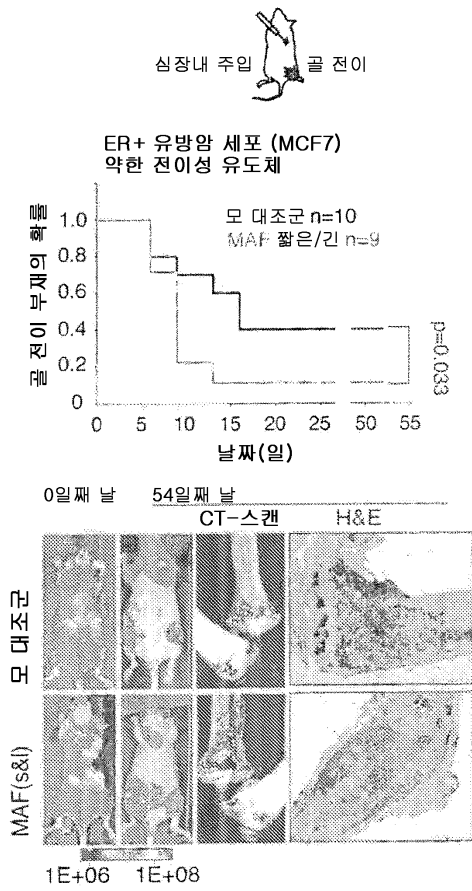
	HR	CI <sub>95%</sub>	P-값
ER+ 환자 (n=235)	1.64	1.14 ~ 2.36	0.0723
TN 환자 (n=62)	3.09	1.50 ~ 6.39	0.0005
HER2+ 환자 (n=77)	1.34	-1.56 ~ 2.81	0.4740

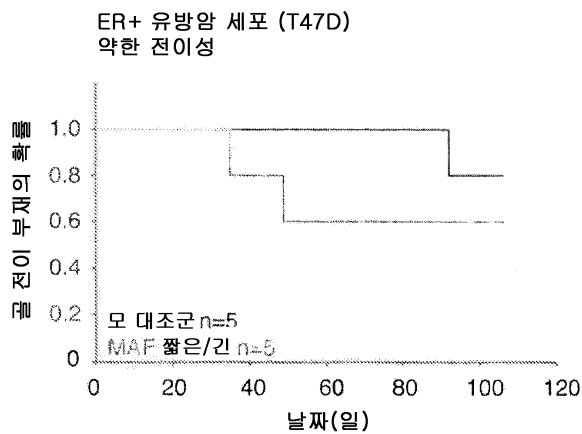
MAF (IHC) 진단 성능 스펙트럼 데이터 세트

BC 하위형	Se	Sp	PPV	NPV
ER+	46.7	63.2	15.9	95.8
ER-	75.0	83.3	40.0	95.7

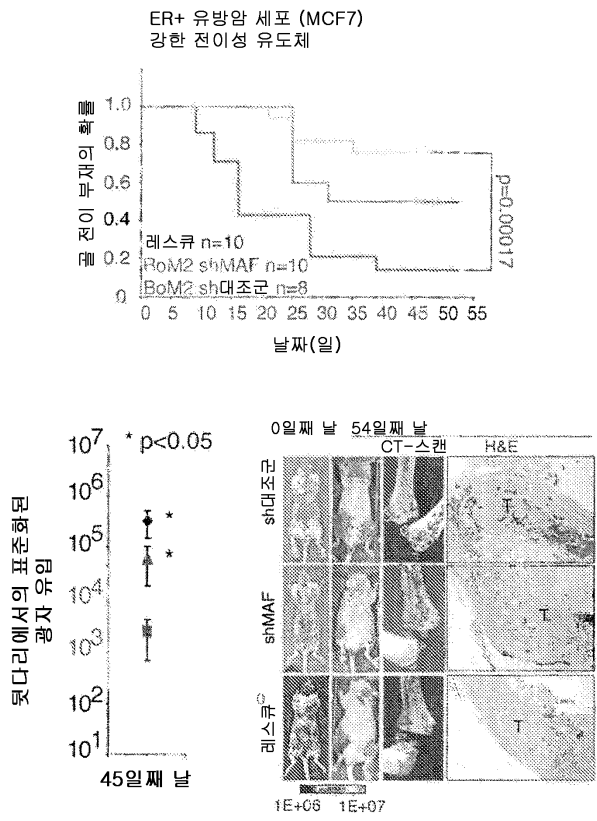
도면5a



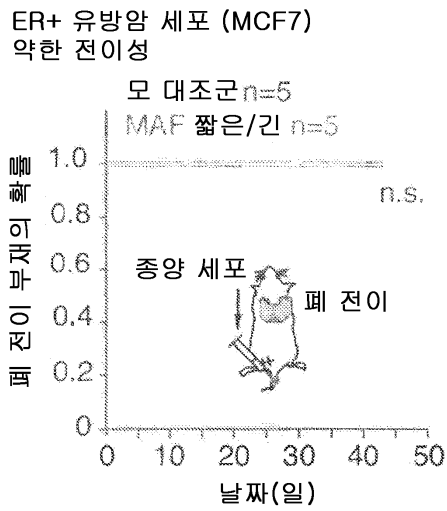
도면5b



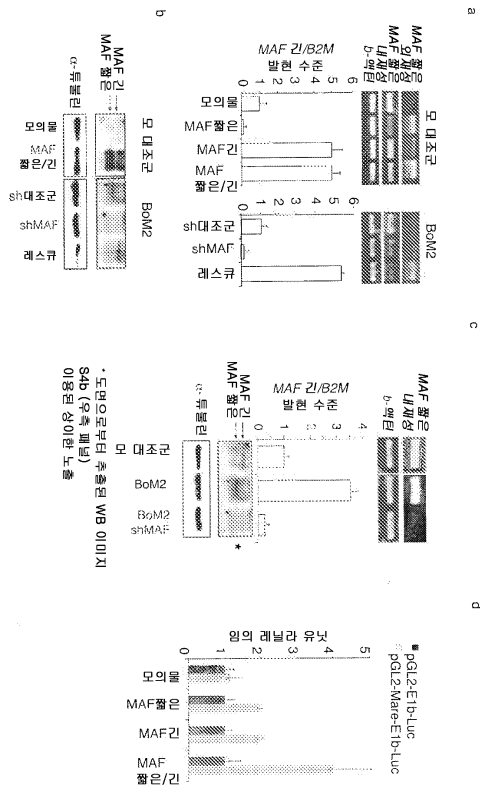
도면5c



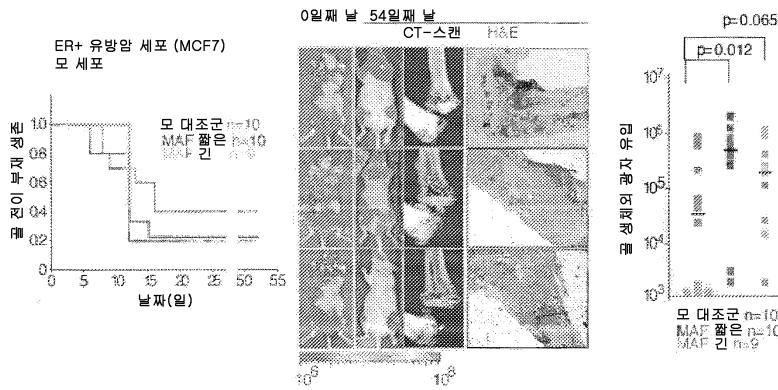
도면5d



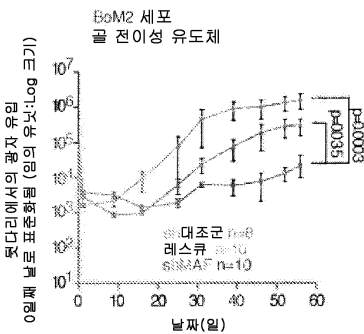
도면6



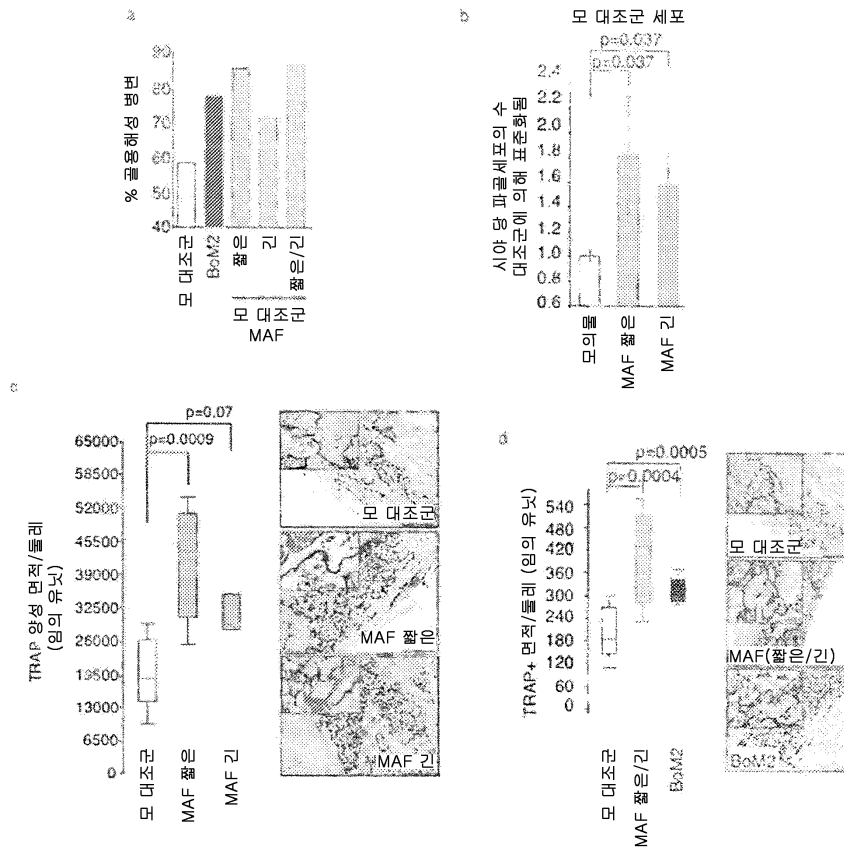
도면7



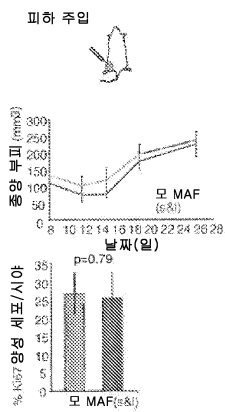
도면8



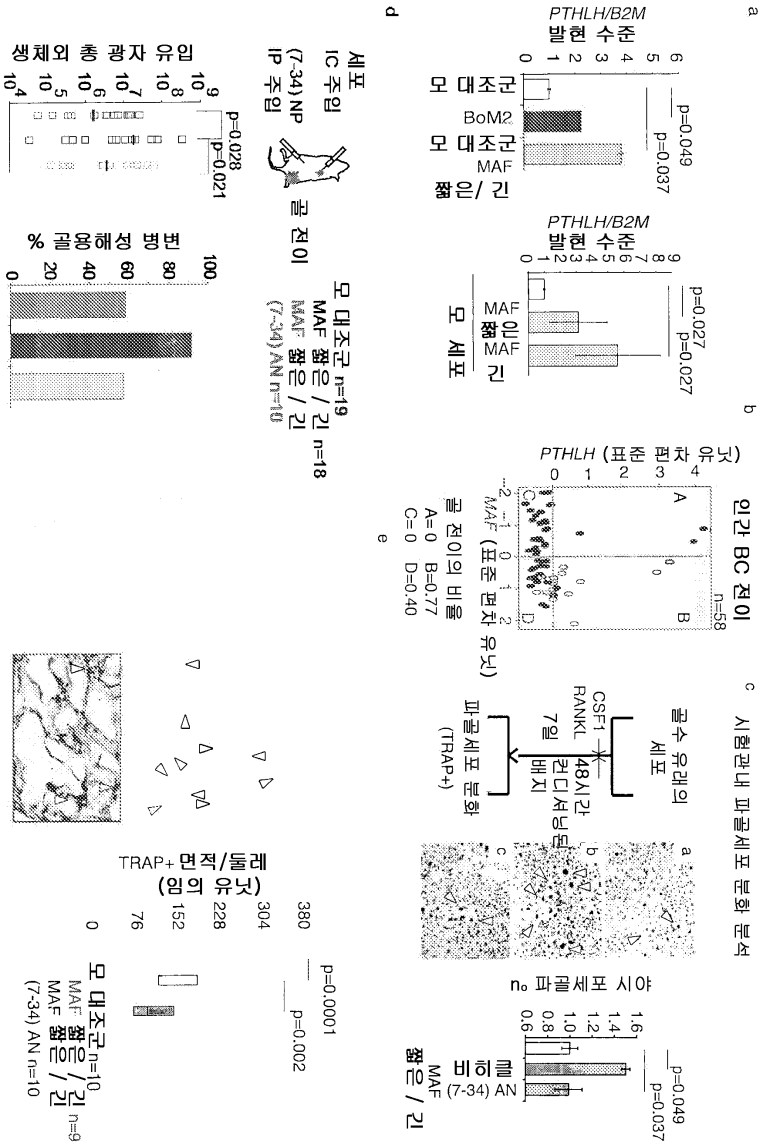
도면9



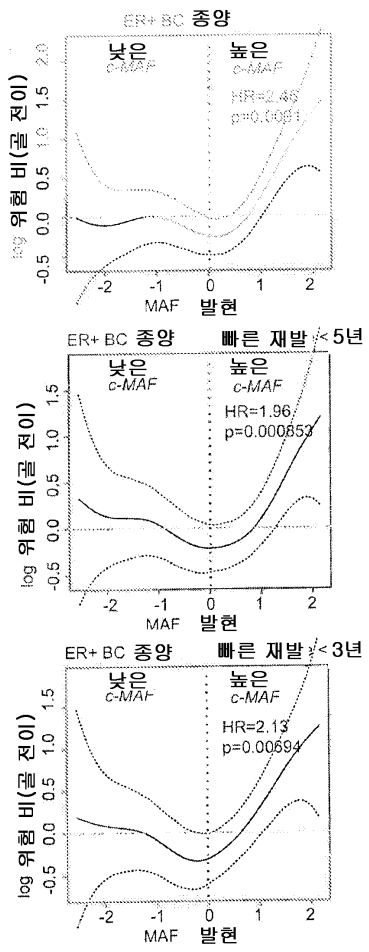
도면10



도면11

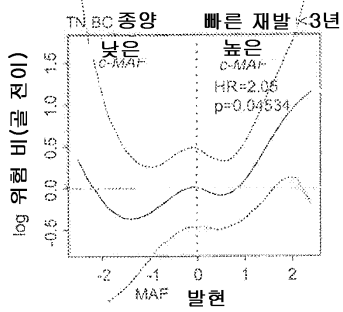
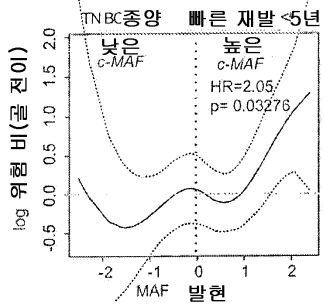
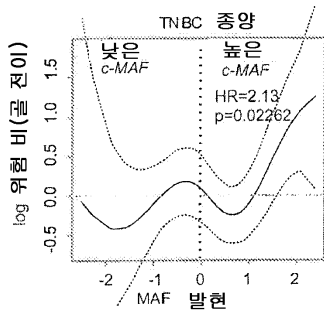


도면12a

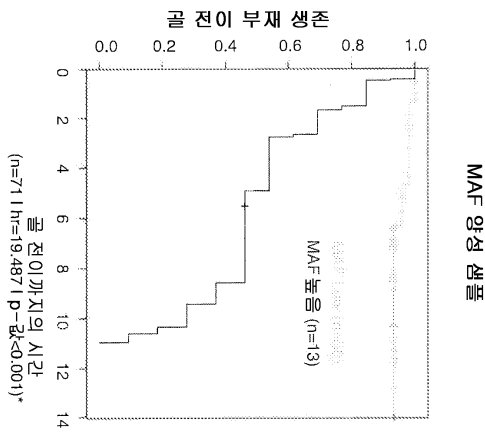
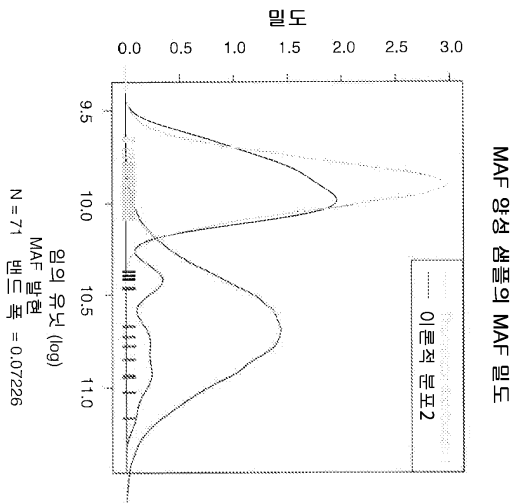




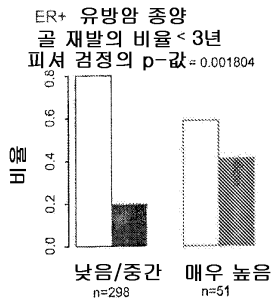
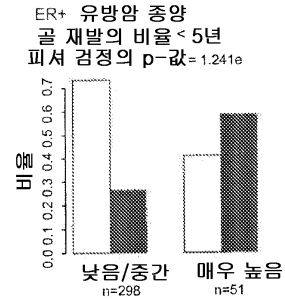
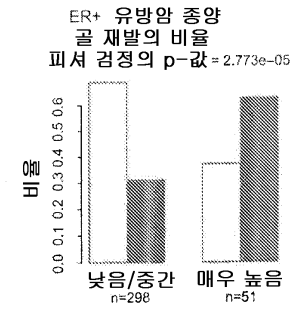
도면12b



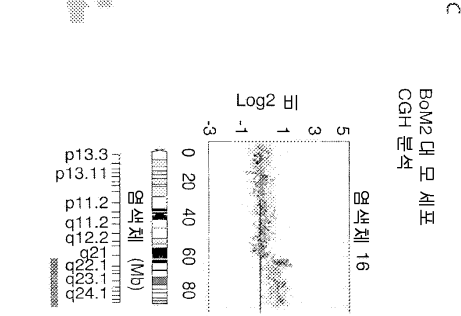
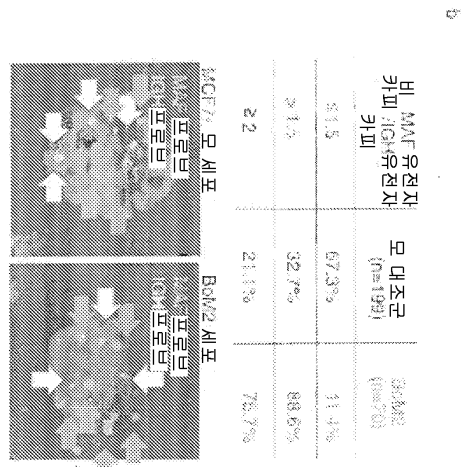
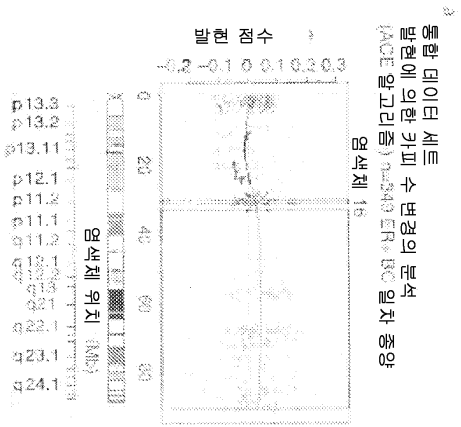
도면13



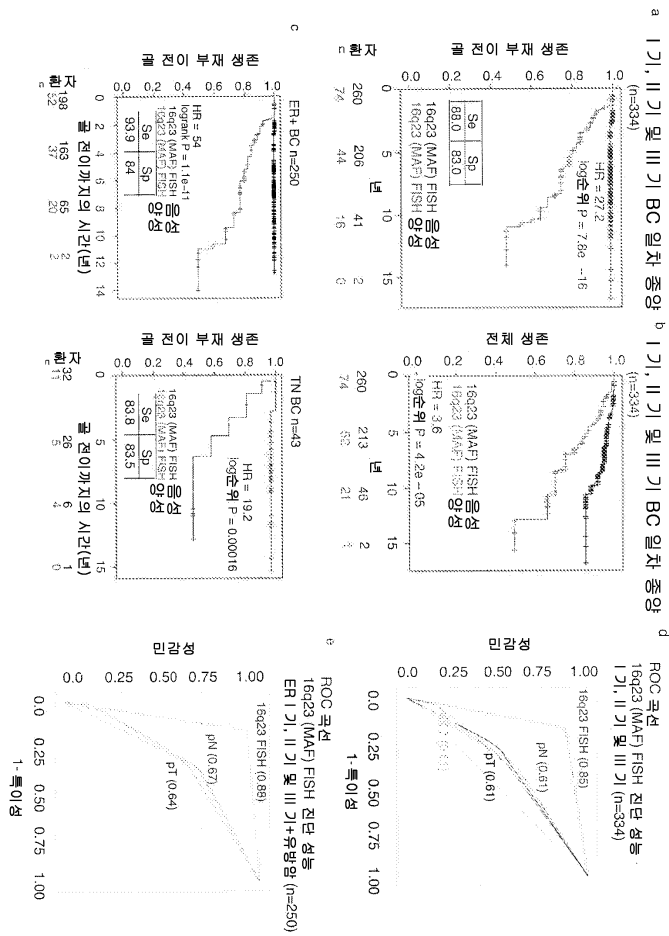
도면14



도면15



도면16



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> InBioMotion, S.L.  
 Gomis, Roger  
 Pavlovic, Milica  
 Planet, Evarist  
 Arnal, Anna  
 Tarragona, Maria

<120> METHOD FOR THE PROGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER METASTASIS

<130> 3190.001PC03/TJS

<140> To Be Assigned

<141> Herewith

<150> 61/621,949

<151> 2012-04-09

<150> EP1232139.3  
 <151> 2012-04-09  
 <150> 61/724,807  
 <151> 2012-11-09  
 <150> 61/732,175  
 <151> 2012-11-30  
 <160> 13  
 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1  
 <211> 6878  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

```

agaggcttta aaatcttttt tcatcttctia gctgtagctc gggctgcttg tcggcttggc      60
ctccccctcc cccctttgct ctctgcctcg tctttcccca ggacttcgct attttgcttt      120
tttaaaaaaa ggcaagaaag aactaaactc ccccctcctc ctctccagt cgggctgcac      180
ctctgccttg cactttgcac agaggtagag agcgcgcgag ggagagagag gaaagaaaaa      240
aaataataaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactcccccg      300
tgccaaggcc cgcgccgecc ggacagacgc ccgccgcgcc tccagccccg agcggacgcc      360

gcgcgcgccc tgctgcagc ccgggccggc gaggcgagcc cttccttatg caaagcgcgc      420
agcggagcgg cgagcggggg acgccgcgca ccgggccggg ctctccagc ttcgccgccg      480
cagccaccac cgcgcgccac gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgccggc      540
tcggcgcgca aggaggcgag cgagcaagga ggggccgggg cgagcgaggg agcacattgg      600
cgtgagcagg ggggagggag ggcgggcgcg gggggcgcgg gcagggcggg ggggtgtgtg      660
tgtgagcgcg ctcgagggtt tcgggccagc caccgccgcg caagctagaa gcgccccagc      720
cggcaagct ggctcacccg ctggccacc agcacagccc gctggcccct ctctgcagc      780

ccatctggcg gagcggcggc ggcggcggcg gcggcgagc gagaatggca tcagaactgg      840
caatgagcaa ctccgacctg cccaccagtc ccttgccat ggaatatgtt aatgacttcg      900
atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cggtgagac cgaccgatc atcagccagt      960
gcggcctct catcgccggg ggctcgtgt cctccacccc catgagcacg ccgtgcagct      1020
cggtgcccc ttccccagc ttctcggcgc ccagcccggg ctcgggcagc gagcagaagg      1080
cgacctgga agactactac tggatgaccg gctaccgca gcagctgaac cccgaggcgc      1140
    
```

tgggcttcag ccccgaggac gcggtcaggg cgctcatcag caacagccac cagctccagg 1200  
  
 gcggcttcga tggtacgcg cgcggggcgc agcagctggc cgcggcggcc ggggccggtg 1260  
 ccggcgccte ctggggcggc agcggcgagg agatgggccc cgcccgcccg gtggtgtccg 1320  
 ccgtgatcgc cgcggccgcc gcgcagagcg gcgcgggccc gcaactaccac caccaccacc 1380  
 accacgccgc cggccaccac caccaccga cggccggcgc gcccggcgcc gcgggcagcg 1440  
 cggccgccte ggccggtggc gctggggcgc cggcgggcgg tggcccggcc agcgtgggg 1500  
 gcggcggcgg cggcggcggc ggcggaggcg gcggggcgc ggccggggcg gggggcgccc 1560  
 tgcaccgca ccacccgcc ggccgcctgc acttcgacga ccgcttctcc gacgagcagc 1620  
  
 tggtgacat gtctgtgcg gagctgaacc ggcagctgcg cggggtcagc aaggaggagg 1680  
 tgatccggt gaagcagaag aggcggacc tgaaaaaccg cggctatgcc cagtctgcc 1740  
 gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgctgcagc 1800  
 aagtcacca cctcaagcag gagatctcca ggctggtgcg cgagaggac gcgtacaagg 1860  
 agaaatagc gaagtgtgtg agcagcggct tccgagaaaa cggctcgagc agcgacaacc 1920  
 cgtcctctcc cgagttttc atgtgagtct gacacgcgat tccagctagc caccctgata 1980  
 agtgctccgc gggggtccgg ctccgggtgt ggcttgctag ttctagagcc atgctcgcca 2040  
  
 ccacctacc acccccacc ccaccgagt tggcccctt ggcccctac acacacaaa 2100  
 acccgcagc acacaccaca cacacacaca cacacccac accctgctcg 2160  
 agtttgggt ggtggtggct gtttaaac tgggagggaa tgggtgtctg gctcatggat 2220  
 tgccaatctg aaattctcca taactgcta gcttgtttt tttttttt tacaccccc 2280  
 cgccccacc cggacttgc acaatgttca atgatctcag cagagtctt catgtgaaac 2340  
 gttgatcacc ttgaagcct gcatattca catattttt ctctcttc cccttcagtt 2400  
 catgaactgg tgttcattt ctgtgtgtgt gtgtgttta tttgtttg attttttt 2460  
  
 ttaattttac ttttagagct tgctgtgtt gccaccttt tccaacctc caccctcact 2520  
 cttctcaac ccatctctc cgagatgaaa gaaaaaaaa agcaaagtt tttttcttc 2580  
 tcctgagttc tcatgtgag attgagctt caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag 2640  
 acttgacgcg tgccgagtt catcgggtt ttttttagc attgttatgc taaaatagag 2700  
 aaaaaatcc tcatgaacct tccacaatca agcctgcac aacctctgg gtgtgacttg 2760  
 tgagttttg cctgtgatg ccaaatctga gagtttagtc tgccattaaa aaaactcatt 2820  
 ctcatctcat gcattattat gcttctact ttgtcttagc aacaatgaac tataactgtt 2880

tcaaagactt tatgaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcatgctgga 2940  
 catgtatggt ataattattt tttcctttt tttcctttt ggcttgaaa tggacgttcg 3000  
 aagacttata gcatggcatt catacttttg ttttattgcc tcatgacttt tttgagtta 3060  
 gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa ttttgcactc gtcctaaaac 3120  
 tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgactg aaggcattcc ttgtcaaaga 3180  
 taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgttttcttt 3240  
 ttaataagaa tgacgccca ctttggggac taaaattgtg ctattgccga gaagcagtct 3300

aaaatttatt ttttaaaaag agaaactgcc ccattatttt tggtttgttt tatttttatt 3360  
 ttatatTTTT tggcttttgg tcattgtcaa atgtggaatg ctctgggttt ctagtatata 3420  
 atttaattct agtttttata atctgttagc ccagttaaaa tgtatgctac agataaagga 3480  
 atgttataga taaatttgaa agagtttagt ctgttttagct gtagatTTTT taaacgattg 3540  
 atgcactaaa ttgtttacta ttgtgatggt aaggggggta gagtttgcaa ggggactggt 3600  
 taaaaaagt agcttataca gcatgtgctt gcaacttaaa tataagttgg gtatgtgtag 3660  
 tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagaggggaa acgccctgt 3720

ttatatctgt aggggtattt tacattcaaa aatgtatggt ttttttctt ttcaaaatta 3780  
 aagtatttgg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa 3840  
 ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca 3900  
 cagttttaag atgatgcaga tttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattttct 3960  
 gtaacttaaa aaaaaatcca cagttttaaa ggcaataatc agtaaatggt attttcaggg 4020  
 actgacatcc tgcctttaaa aagaaatgaa aagtaaatct taccacaata aatataaaaa 4080  
 aatcttgca gttacttttc ttttacatat tttgctgtgc aaaattgttt tatatcttga 4140

gttactaact aaccacgctt gttgttctta tgtgcttttc tttcattttc aattctggtt 4200  
 atatcaagaa aagaataatc tacaataata aacggcattt ttttttgatt ctgtactcag 4260  
 tttcttagtg tacagtttaa ctgggcccaa caacctcgtt aaaagtgtaa aatgcatcct 4320  
 tttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taattcaggg tgaattata 4380  
 ggctgttttt tgaagtgagg aggctggccc catatactga ttagcaatat ttaatataga 4440  
 tgtaaattat gacctattt ttttctcccc aaagttttca gttttcaaat gagttgagcc 4500  
 ataattgccc ttgtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggcttc ctgagcatgg 4560

ccctacactt ctgatcagga gcaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc 4620  
 gcatcagagg tggcttgccg acatatgcat tgaacggtaa agagaacag cgcttgccct 4680  
 ttcactaaag ttgactattt ttccttcttc tcttacacac cgagattttc ttgtagcaa 4740



ggccctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagtt gtttgttttg ttttgctttt 4800  
 ctctttaaca ctgaagatca tttgtcttaa ataggaaaa gaaaatccac tccttacttc 4860  
 cataattcca agtacatatac tggtttaaac tatgttatca aatcatattt caccgtgaat 4920  
 attcagtgga gaacttctct acctggatga gctagtaatg atttcagatc atgctatccc 4980  
  
 cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaatatag gctgtgcttt gatttactgg 5040  
 tatttaccce aaaataggct gtgtatgggg gctgacttaa agatcccttg gaaagactca 5100  
 aaactacctt cactagtagg actcctaagc gctgacctat ttttaaatga cacaaattca 5160  
 tgaaactaat gttacaaatt catgcagttt gcactcttag tcactttccc cttagcacacc 5220  
 aatagaatgt tagacaaagc cagcactggt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt 5280  
 gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340  
 cttattttta agaaaacagg ttgtgtttgg tctgctaaag ttttgccag tttatcatct 5400  
  
 ggcccttctg cctatTTTTT acaaaacacg aagacagtgt gtaacctga cttttgacc 5460  
 ttctttatg tgctagttaa gacaggctcc tgaatccaca cttaatTTTg cttacaaaa 5520  
 gtcttaatat taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt 5580  
 tctttccttt tttttttttt ttctcatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag 5640  
 cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaaa agcatctgat gaaagatttt aggcaaacat 5700  
 tctcaaaata agagtgatat tctggatgta gttattgcag ttatctcatg acaaatgagg 5760  
 cctggattgg aaggaaaata tagttgtgta gaattaagca ttttgatagg aatctacaag 5820  
  
 gtagttgaat ataataagca ggtttgggcc cccaaacttt agaaaatcaa atgcaaaggt 5880  
 gctggcaaaa atgaggtttg agtggctggc tgtaagagaa ggttaactcc tagtaaaagg 5940  
 cttttttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caaacaata 6000  
 catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aaatcctgag taagtgccat tcattacaat 6060  
 aagtctctaa atttaaaaaa aaaaaatca tatgaggaaa tctagctttc ccttttacgc 6120  
 tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcctttc attccaatta cagaactgag 6180  
 cccactcgca agttggagcc atcagtggga tacgccacat tttggaagcc ccagcatcgt 6240  
  
 gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaatc 6300  
 atcattatta ttattatttg cagtcatgga gaaccaccta cccctgactt ctgttttagtc 6360  
 tcctttttaa ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct attaatgta gtagttaact 6420  
 atgcctcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa gcgcactcct gcttttcgat 6480  
 ttatggtgtg tgcaagtaaa caggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaaa 6540  
 ttcactgaaa ttacaaagat acatatatat gcatatatat aatggaaagt ttcccgaat 6600

gcaacaatta gcattttaaa atcatatata ggcatgcaca ttctaataag tactttttca 6660

tgcttcattg tttctctggc agataatfff actaagaaga aaaatagata ttcgactccc 6720

cttccetaaa caaatccacg ggcagagget ccagcggagc cgagccccct ggtttttctcg 6780

taggccttag acggtgttgc atttatcagt gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata 6840

gctgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaaat acaaagtt 6878

<210> 2

<211> 2656

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc 60

tccccctccc ccctttgctc tctgctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgccttt 120

ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc 180

tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240

aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt 300

gccaaggccc gcgcccccg gacagacgcc cgcgcgcct ccagccccga gcggacgccg 360

cgcgcgccct gectgcagcc cggggcggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagecgcga 420

gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggcccggc tcctccagct tcgcccccgc 480

agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct 540

cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc 600

gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt 660

gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc 720

cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagccc ctggcccctc tctgcagcc 780

catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cgccggcagg agaatggcat cagaactggc 840

aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttca 900

tctgatgaag ttigaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgatca tcagccagtg 960

cgccctctc atcgccgggg gctcgtctc ctcaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020

ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagccccggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080

gcacctgga gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgagcgcct 1140

gggcttcage cccgaggacg cggctcaggg gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200

cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggctc 1260

cggcgcctcc ttggcgcgca gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccc tgggtgccgc 1320  
 cgtgatcgcc gcggccgccc gcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca 1380  
  
 ccacgccgce ggccaccacc accaccgac ggccggcgcg cccggcgccc cgggcagcgc 1440  
 ggcccctcgc gccggtggcg ctgggggccc gggcgcggt ggcccggcca gcgctggggg 1500  
 cggcgcgccc ggcgcgccc gcggagggcg cgggggccc gcgggggccc ggggcgcct 1560  
 gcaccgcac cagccgccc gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620  
 ggtgaccatg tctgtgcgc agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680  
 gatccggctg aagcagaaga ggccgacct gaaaaaccgc ggctatgccc agtctgccc 1740  
 cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800  
  
 agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860  
 gaaatagcag aagtgtgta gcagcgctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaacc 1920  
 gtccctctcc gagttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata 1980  
 gccacattt tggaagcccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcaca aatgaaattt 2040  
 gtgtgagage tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttga gtcattgaga 2100  
 accacctacc ccgacttct gtttagtctc cttttaaat aaaaattact gtgttagaga 2160  
 agaaggctat taaatgtagt agttaactat gcctctgtc tgggggtttc atagagaccg 2220  
  
 gtaggaaagc gactcctgc ttttcgattt atggtgtgtg caagtaaca ggtgcattgc 2280  
 tttcaacctg ccatactagt tttaaaaatt cactgaaatt acaaagatac atatatatgc 2340  
 atatatataa tggaagttt cccggaatgc acaattagc attttaaat catatatagg 2400  
 catgcacatt ctaaatagta cttttcatg cttcattgtt tctctggcag ataattttac 2460  
 taagaagaaa aatagatatt cgactcccct tcctaaaca aatccacggg cagagctcc 2520  
 agcggagccc agccccctgg ttttctgta ggccttagac ggtgttgcatt ttatcagtga 2580  
 tgtcaaacgt gtcatttgt cagacatagc tgtaaatgaa aacaatgtgt ggcaaaatac 2640  
  
 aaagttaaaa aaaaaa 2656  
 <210> 3  
 <211> 6887  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 3  
 gagcttttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttgccc 60  
 tccccctccc ccctttgctc tctgctcgt ctttcccag gacttcgcta ttttgctttt 120

ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc ccctccctc tcctccagtc gggtgcacc 180  
 tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240  
 aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt 300  
  
 gccaaaggccc gcgccgccc gacagacgcc cgccgcgctt ccagccccga gcggacgcc 360  
 cgcgccctt gcctgcagcc cgggcccggc agcgagccc ttccttatgc aaagcgcga 420  
 gcggagcggc gagcggggga cgccgcgac cgggcccggc tcctccagct tcgcccgc 480  
 agccaccacc gccgccacc cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggt 540  
 cggcgcgcaa ggagcgcagc gagcaaggag gggcccgggc gagcagggga gcacattggc 600  
 gtgagcaggg gggagggagg gcggcgcgcg gggcgcgggg caggcggggg ggggtgtgtgt 660  
 gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgcgcgc aagctagaag cgccccagcc 720  
  
 cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagccc ctggccctc tectgcagcc 780  
 catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cgcgcgagg agaatggcat cagaactggc 840  
 aatgagcaac tcgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttca 900  
 tctgatgaag ttgaaagta aaaaggaacc ggtggagacc gaccgatca tcagccagtg 960  
 cggccgtctc atcgccggg gctcgtgtc ctccacccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020  
 ggtgccccct tccccagct tctcgcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080  
 gcacctgaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgagcgt 1140  
  
 gggttcagc cccgaggac cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200  
 cggcttcgat ggetacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggcgg gggccggtgc 1260  
 cggcgcctcc ttggcgcca gcggcgagga gatgggccc gccgcccggc tgggtgccgc 1320  
 cgtgatgcc gcggcccgc cgagagcgg cgcgggccc cactaccacc accaccacca 1380  
 ccacgccgc gccaccacc accaccgac ggccggcgcg cccggcggc cgggcagcgc 1440  
 ggcccctcg gccggtggcg ctgggggccc gggcgcggt ggcccggcca gcgtggggg 1500  
 cggcggcggc ggcggcggcg gcggagggcg cgggggcgc gcggggcggg ggggcgcct 1560  
  
 gcaccgcac cagcccggc gcggcctgca cttcgacgac cgcttctcc acgagcagct 1620  
 ggtgacctg tctgtgcgc agctgaacc gcagctgcgc ggggtcagca aggaggagt 1680  
 gatccggctg aagcagaaga ggcggacct gaaaaaccgc ggctatgcc agtctgccg 1740  
 cttaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800  
 agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860  
 gaaatagag aagtgggtga gcagcgctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaacc 1920

gtcctctccc gagtttttca tgtgagctcg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa 1980

gtgctccgcg ggggtccggc tccgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctcgccac 2040

cacctcacca cccccaccc caccgagttt ggcccccttg gccccctaca cacacacaaa 2100

cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acaccccaca cctgtctcga 2160

gtttgtgggt gtgggtggctg ttttaaacctg gggaggggaat ggggtgtctgg ctcatggatt 2220

gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt tttttttttt acaccccccc 2280

gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagtcttc atgtgaaacg 2340

ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc ttcttcttcc ctttcagttc 2400

atgaactggt gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat tttgtttgga tttttttttt 2460

taattttact tttagagctt gctgtgttgc ccaccttttt tccaacctcc accctcactc 2520

cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa gcaaagtttt tttttcttct 2580

cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aaaatgtgaa atgttataga 2640

cttgcagcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga 2700

aaaaaatcct catgaacctt ccacaateca gctgcatca accttctggg tgtgacttgt 2760

gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct gccattaaaa aaactcattc 2820

tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgccttagca acaatgaact ataactgttt 2880

caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa aaaaagcctg catgctggac 2940

atgtatggta taattatfff ttcctttttt ttccttttg gcttggaaat ggacgttcga 3000

agacttatag catggcattc atacttttgt ttattgcct catgactttt ttgagtttag 3060

aacaaaacag tgcaaccgta gaccccttct cccatgaaat ttgcatctg ctccaaaact 3120

gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgactga aggcattcct tgtcaaagat 3180

accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt 3240

taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagtcta 3300

aaatttattt tttaaaaaga gaaactgccc cattatffff ggtttgtttt atttttattt 3360

tatatttttt ggcttttggc cattgtcaaa tgtggaatgc tctgggtttc tagtatataa 3420

tttaattcta gttttataa tctgttagcc cagttaaaat gtatgctaca gataaaggaa 3480

tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgttttagct tagatfffft aaacgattga 3540

tgactaaat tgtttactat tgtgatgtta aggggggttag agtttgcaag gggactgttt 3600

aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat ataagttggg tatgtgtagt 3660

ctttgcata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta agaggggaaa cgcccctgtt 3720  
 tataatctgta ggggtatfff acattcaaaa atgtatgttt tttttcttt tcaaaattaa 3780  
 agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag catataatac aaaaaaaaaat 3840  
 tgcaaaactg ttiagaacgc taataaaatt tatgcagtta taaaaatggc attactgcac 3900  
 agttttaaga tgatgcagat tttttacag ttgtatttg gtgcagaact ggattttctg 3960  
 taacttaaaa aaaaatccac agttttaag gcaataatca gtaaatgtta ttttcagga 4020  
 ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt accacaataa atataaaaa 4080  
  
 atcttgcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca aaattgtttt atatcttgag 4140  
 ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct ttcattttca attctggtta 4200  
 tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt ttttgattc tgtactcagt 4260  
 ttcttagtgt acagtttaac tgggccaac aacctcgtta aaagtgtaaa atgcatcctt 4320  
 ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag 4380  
 gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat 4440  
 gtaaattatg acctcatttt tttctccca aagttttcag ttttcaatg agttgagcca 4500  
  
 taattgccct tggtaggaaa aacaaaaca aacagtggaa ctaggcttcc tgagcatggc 4560  
 cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga ggagccggac aaatatggcg 4620  
 catcagaggt ggcttgcga catatgcatt gaacggtaaa gagaacacgc gcttgccttt 4680  
 tcactaaagt tgactatfff tcttcttct cttacacacc gagatfffct tgttagcaag 4740  
 gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagttg tttgttttg tttgcttttc 4800  
 tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag aaaatccact ccttacttcc 4860  
 atatttcaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa atcatatttc accgtgaata 4920  
  
 ttcagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga tttcagatca tgctatcccc 4980  
 agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg ctgtgctttg atttactggt 5040  
 atttacccea aaataggctg tgatggggg ctgacttaaa gatcccttgg aaagactcaa 5100  
 aactaccttc actagtagga ctctaaagcg ctgacctatt tttaaatgac acaaattcat 5160  
 gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt catcttcccc tagcacacca 5220  
 atagaatggt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca gccaacacg atgacttttg 5280  
 tttgttttc tgcgcttctt aaaagaaaaa aagataatat tgcaactctg actgaaagac 5340  
  
 ttatttttaa gaaaacaggt tgtgtttgt gctgctaagt tctggccagt ttatcatctg 5400  
 gccttctgc ctatfffcta caaaacacga agacagtgtg taacctcgac attttgacct 5460  
 tctttatgt gctagtttag acaggctcct gaatccacac ttaatfffgc ttaacaaaag 5520

tcttaatagt aaacctcccc tcatgagcitt gaagtcaagt gttcttgact tcagatattt 5580  
 ctttcctttt tttttttttt tcctcatcac aactaagaga tacacaaact ctgaagaagc 5640  
 agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg aaagatttta ggcaaacatt 5700  
 ctcaaaataa gagt gatatt ctggatgtag ttattgcagt tatctcatga caaatgaggc 5760

ctggattgga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat ttgatagga atctacaagg 5820  
 tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaacttta gaaaatcaaa tgcaaaggtg 5880  
 ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag gttaactcct agtaaaaggc 5940  
 atttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag tgggagtagc aaacaaatac 6000  
 atgttttttt tttcttacia agaactccta aatcctgagt aagtgccatt cattacaata 6060  
 agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctagctttcc cctttacgct 6120  
 gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgttaaa attcctttca ttccaattac agaactgagc 6180

ccactcgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt ttggaagccc cagcatcgtg 6240  
 tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag ctgtacatta aaaaaaatca 6300  
 tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac cctgacttc tgtttagtct 6360  
 cctttttaa taaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaatgtag tagttaacta 6420  
 tgcccttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag cgcactcctg cttttcgatt 6480  
 tatgggtgtg gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540  
 tcaactgaaat tacaagata catatatatg catatatata atggaaagt tcccggaatg 6600

caacaattag ctttttaaaa tcatatatag gcatgcacat tctaaatagt actttttcat 6660  
 gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720  
 ttcctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780  
 aggcctaga cgggtgttga tttatcagtg atgtcaaagc tgctcatttg tcagacatag 6840  
 ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttaaa aaaaaaa 6887

<210> 4

<211> 403

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Met Ala Ser Glu Leu Ala Met Ser Asn Ser Asp Leu Pro Thr Ser Pro

1 5 10 15

Leu Ala Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe Asp Leu Met Lys Phe Glu Val





Glu Leu Asn Arg Gln Leu Arg Gly Val Ser Lys Glu Glu Val Ile Arg  
 275 280 285  
 Leu Lys Gln Lys Arg Arg Thr Leu Lys Asn Arg Gly Tyr Ala Gln Ser  
 290 295 300  
 Cys Arg Phe Lys Arg Val Gln Gln Arg His Val Leu Glu Ser Glu Lys  
 305 310 315 320  
 Asn Gln Leu Leu Gln Gln Val Asp His Leu Lys Gln Glu Ile Ser Arg  
 325 330 335  
 Leu Val Arg Glu Arg Asp Ala Tyr Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Val  
 340 345 350  
 Ser Ser Gly Phe Arg Glu Asn Gly Ser Ser Ser Asp Asn Pro Ser Ser  
 355 360 365  
 Pro Glu Phe Phe Ile Thr Glu Pro Thr Arg Lys Leu Glu Pro Ser Val  
 370 375 380  
 Gly Tyr Ala Thr Phe Trp Lys Pro Gln His Arg Val Leu Thr Ser Val  
 385 390 395 400  
 Phe Thr Lys  
  
 <210> 5  
 <211> 373  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 5  
 Met Ala Ser Glu Leu Ala Met Ser Asn Ser Asp Leu Pro Thr Ser Pro  
 1 5 10 15  
 Leu Ala Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe Asp Leu Met Lys Phe Glu Val  
 20 25 30  
 Lys Lys Glu Pro Val Glu Thr Asp Arg Ile Ile Ser Gln Cys Gly Arg  
 35 40 45  
  
 Leu Ile Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ser Thr Pro Met Ser Thr Pro Cys  
 50 55 60  
 Ser Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Phe Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ser



Asn Gln Leu Leu Gln Gln Val Asp His Leu Lys Gln Glu Ile Ser Arg  
 325 330 335  
 Leu Val Arg Glu Arg Asp Ala Tyr Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Val  
 340 345 350  
 Ser Ser Gly Phe Arg Glu Asn Gly Ser Ser Ser Asp Asn Pro Ser Ser  
 355 360 365

Pro Glu Phe Phe Met  
 370

<210> 6

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-MAF specific siRNA

<400> 6

acggcucgag cagcgacaa 19

<210> 7

<211> 19

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-MAF specific siRNA

<400> 7

cuuaccagug uguucacaa 19

<210> 8

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-MAF specific siRNA

<400> 8

uggaagacua cuacuggaug 20

<210> 9

<211> 20

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> c-MAF specific siRNA  
 <400> 9  
 auuugcaguc auggagaacc 20  
 <210> 10  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> c-MAF specific siRNA  
 <400> 10  
 caaggagaaa uacgagaagu 20  
 <210> 11  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> c-MAF specific siRNA  
 <400> 11  
 acaaggagaa auacgagaag 20  
 <210> 12  
 <211> 20  
 <212> RNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> c-MAF specific siRNA  
 <400> 12  
 accuggaaga cuacuacugg 20  
 <210> 13  
 <211> 13878  
 <212> DNA  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 13  
 aactatatat taaacacctc cggctcgaga ggccgtgttg ggtgtctttg tcagggaag 60  
 aaagagaaga aggctggtag accttcccag gaattctcac tgaagaaaac atctggattt 120  
  
 ttacatctc ttgtgcaaaa caaacaaga ttccattaag tgatgtatat tgttttcaa 180  
 ggaagaacc tgcagagaca aaaacaata agcaaataat tgaacaacaaa atatgataaa 240

ccccaaat cttccagtc taatttactt gttatcatgg ttctctacaa aggcagagat 300  
 cactaattac aggtttttcc agaattcaca tttcacgtca agatcatcca atccaaacag 360  
 tgtacggaaa gcctagggcc ttcttcaactt tgccccctac cccaccctac acacacgccc 420  
 ccatctaaat gatacccttg gaaagaaacc tacacatctc atttctctat attttgcctc 480  
 ctccctcgcc tcccggtaac caaatgtgag ttgttctcta actgcactgg agaatcagaa 540  
  
 tttattgtac atatgtttgt gttccactta ataaaaaaaa ctatatttta agataaactt 600  
 tgtagtaat tcatgaggta agtgactatt tatgctaadc aggcagaaat atattctcaa 660  
 gcataatgca ttacataaat ttgaatgtaa aatgttcaat tatgaagtaa atacaggtaa 720  
 tgcaataat aaattacctc taataaaaaat tataaaagat gtgccttgaa agagagagcg 780  
 gctttaactt acaactgtga attgcttaaa gagaaaagaa ttaataaatg ctgaattact 840  
 ctgatgatta tttagcacat aattcaccta ttcataacga ctctagtaa tcagactggt 900  
 gtttcacatc ctccaacatg aggcaagact gtttcctcag caattttgcc cttatcagat 960  
  
 tatctcgtct gattctatta attttcttcc atgaatctgc taacagtgat ttgtgattta 1020  
 cttaccctgc taactgaaga ctgttaaaaag gatttatcta acaactggacc taagaacagt 1080  
 gtacgcctta tcgttcagtt actctgaaga actctttctc aaatcaattt agttggtttc 1140  
 atagtgaat ttagtggaca ctggttagtt ctgcccata aaatcagccc ctaaacaaag 1200  
 agtcagaca ccatactga tgcacccat tctattcaga ttatggatgt ctgattccaa 1260  
 catgatatat ttgagttgct ataactcaca atcggggaaa atatttcct ttaagctttt 1320  
 aatctttgta atttggacat gaacaggggt tttgtttttc atttttgcat gaagtcatta 1380  
  
 tgtatgtact gacgtgaaac tataattgig ttctctgatgt tactgtgtca caatattcta 1440  
 tgcgatgtaa ccatgtctc cctccccctc acaaatctcc tataaatatt cattgctttc 1500  
 aaaaacttta atactactgg tccgaattgg tcaataatga caaatgcatg gtttctaata 1560  
 tactgtatat tgttctacag agattactag agtatatata gcaaggggat gtttaagcagt 1620  
 aagaaaacac agttcacatt gtatttggat tagattggct tggatagaag tgaacaaaac 1680  
 aatgtagca aagaagtcta aagacatgtg gccactgta attgtacaga atcaaaaacc 1740  
 tgaatgtac tcattaaat gagagagctc aattgttata aaagaaatgc tgctaacaga 1800  
  
 gaactgtaaa tgtttagaca cccctgtgaa tcaactaaata ataatgtaaa aaggataaaa 1860  
 atgagaatta agttataagc ctgagagcat tactgctaca catctaaaaa aataattctg 1920  
 atctctctt tttttttcc aagagaaaat gggcgactat aaaagacctt gcaataagag 1980  
 aaataaaaat accatgtctt cacagcagtg tacataaata aaccataaaa atgtgcagat 2040  
 aataatatat ttagctgccc aaacatgggc atttaatttc tagaaatgat atataacaat 2100

gtaacaatta gatactcagc catgaatgtg tatggcacag tcttcatcat tagcaaactt 2160  
 tgtgtataaa atattattta ttatttatta taatactgct ttcagaggca atgatcatac 2220  
  
 cttacagctt ttaacacaaa tatgatgcaa aaggattaaa agtatatcat aaacaaacaa 2280  
 taaattcttt ctaaatacac ttaaattcat attttcatg aaaaataaa acttcctaca 2340  
 tttgtgacta ctgactttta aaaagacctt gaaaactatt gttacgggca atgttaaatg 2400  
 acataatgct tatgtaatgg aaagtgtgga ttttctctta aataaactat aatcccttaa 2460  
 cttcattact agggaaaata ttgttaaaga gaaggaaagc aagggaattc tgctaggttg 2520  
 cataaatatt gacataatct tcaactcttc tccccaaac tggtaataga catagtttat 2580  
 tccaccaaac aaaatgctct tataagacca aaactaccct tattaacaac ttctctgcag 2640  
  
 tcacgatgaa aagaaacact acttgtctga aaaataccga cagcgtgcc cttttcagat 2700  
 taggggtgtgc ctacgaatct tttgggaagt ctccattaa ggattcctgg gtttgcgaa 2760  
 actgaagtct actaggatca gagaattaa cacaggtcta atatggtgca aggaacgagt 2820  
 gagagacacc tgaggttata aatagcaaag catgctgcgg ggtggggaag accattctga 2880  
 agtgcaatgt tcaagacgct ggcttaatat atgactaagt gtcagaagtc aggttttctg 2940  
 agaattactt tccagataaa caactttata gcaactgact taactttact tactagagac 3000  
 atctcattta tcaactgaatt acaagtaact ttaatcctat tgatattgcc ataaagcccc 3060  
  
 ttgaaaatcc atcctggcac ttttaaaggg tttggggccc tgttacctgg ggatcctctt 3120  
 gcaaaggctc cagccagaaa ttacaccccg aggggtgtctg tatcccctgg cctctttgtc 3180  
 aacaatcaag gagaagagga ggggcaaaaa tgatctctgc atctgccagc actttcttgc 3240  
 gccctttcc tatagggctg ggttctccca cttcagtcaa actaactttg tgtgtctctt 3300  
 tcctctccc aactgggta accagctgct tttcaactca tcgacaaaac tggacacgga 3360  
 tcaatttcaa ctgaccttg ccgaaagggt gcgctgttga ggtaaaaacc aactcgtctc 3420  
 aacaatagtt tcaactctc gatccttttg caggcttttc agaattttt tttttttta 3480  
  
 atgcaccctc ctacgctctc ccccttctca taaagtaaaa taaatcagat taaaaacacc 3540  
 aatgcattt cattaattga aggaatcaac agtcccaact tctaagcaga cgggctggtc 3600  
 ttccaaagc tgggtcgggt tcaggagctt tctctccaaa taaatctctg cttcttcgac 3660  
 ttgcctatcg ctttaaaate ttagaacag agttagtgt tggtttctt ctttttctt 3720  
 tttcttttt atttctttt tgcataaact tttagagaat caatctagaa atttgaacta 3780  
 cttattagca tttgcaactg ggggtggggg gagcagctc cccacccca cccccactc 3840

tgcgtttccg gactagtcc agaaaccgcg gtttaaaatt taacccttcg agggtagctg 3900  
  
 gtgagggtg ggttattgtt tttccccctt gctccctgcc acgatcaagt ccgaaataat 3960  
 taaaggaaac gtaaaagtgc aaagggcgcg cctgaccctg ataaacagag gtcagatttc 4020  
 gtaaggggac ggtlgagtgt gagtgtgtgt gtgtttgtgt gtgtgtgtgt aagagagaga 4080  
 gagagcgagc gcgcaatatg agtctcaaag gccaaactcc ggccagtcag gagccggaag 4140  
 gctgagcccc gctgacctga ctttgagctt ccccggagtt atctcgata ggcgctcgct 4200  
 ctgtccaagg gcacgcgacg ccagcgggca gccggtctcc gtgaagaatg gcctctaac 4260  
 aacttatttt acctcgttgt aaagagaggg ataaaatggg ctttcctctt ccacggatgc 4320  
  
 ccagccttct gggcaggcgc atggccgggc ggcgccagc ccgcagcccc gatccggaca 4380  
 ccccactgca tcctccctt cccggtcctt tccccgcag ggcgccag agacggacaa 4440  
 agagtggggg ccaagttaga gcgccgggca cggccaggct caggaagga aggtccccgg 4500  
 cagacacctg ggtaccagag ttggtgcgag gaggaaaagc tgggaggcga attcacaatc 4560  
 ctgggggtgg agggcaggca ggggagggga atcaggccaa tcccagccga gtgagcccc 4620  
 agcgagctgg ggtccggat gggaggcctg tctcgcgctc caaagaaaag caaacgcc 4680  
 tcccaggtcc gcccgattg ccgaagcccc tctggaaaaa ctcttcccc tcttacacca 4740  
  
 aactttgcgc cgggcctcgt tcctcccgg gtaggcagcg gcgcaggaag ggttaagcca 4800  
 gcccgtccca gctgacagtc agctgattgg gcctgattg acagctccga aaagtttctt 4860  
 tgtttctata ctattatgct aatcgcggcc gctctcgccg cctccattg gcccgagtg 4920  
 ccagtcaatt tctcatttgg acctgacgtc acgagtgcta taaaactcag caattgcttt 4980  
 aaactcttct tgctggatca gaggttttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg 5040  
 ggctgcttgt cggtttggcc tccccctccc ccttttctc tctgcctcgt ctttccccag 5100  
 gacttcgcta ttttgcTTTT ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctcctc 5160  
  
 tcctccagtc gggctgcacc tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg 5220  
 gagagagagg aaagaaaaaa aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca 5280  
 tgaagtgtta actccccgt gccaaaggccc gcgccgccg gacagacgcc cggcgcct 5340  
 ccagccccga gcggacgccg cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc 5400  
 ttcttatgc aaagcgcga gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc 5460  
 tcctccagct tcgccgccg agccaccacc gccgccaccg cagctcgagg aggatcttcc 5520  
 cgagcctgaa gccgccggt cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc 5580

gagcgaggga gcacattggc gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg 5640  
 cagggcgggg ggggtgtgtg gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc 5700  
 aagctagaag cgcgccagcc cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagcccg 5760  
 ctggcccctc tctgcagcc catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg 5820  
 agaatggcat cagaactggc aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg 5880  
 gaatatgtta atgacttcca tctgatgaag ttggaagtga aaaaggaacc ggtggagacc 5940  
 gaccgcatca tcagccagtg cggccgtctc atcgccgggg gctcgtctgc ctccaccccc 6000  
  
 atgagcacgc cgtgcagctc ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc 6060  
 tcgggcagcg agcagaaggc gcacctgga gactactact ggatgaccgg ctaccgcag 6120  
 cagctgaacc ccgaggcgt gggcttcagc cccgaggacg cggtcgagc gctcatcagc 6180  
 aacagccacc agctccaggg cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc 6240  
 gcggcggccg gggccggctg cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc 6300  
 gccgcccccg tgggtgtccg cgtgatcgcc gcggcccccg cgcagagcgg cgcgggcccc 6360  
 cactaccacc accaccacca ccacgccgc ggccaccacc accaccgcac ggccggcgcg 6420  
  
 cccggcgccc cgggcagcgc ggccgcctcg gccggtggcg ctggggcgcc gggcggcggc 6480  
 ggccccggca gcgctggggg cggcggcggc ggccggcggc gcggagggcg cggggcgccg 6540  
 gcggggggcg ggggcgcctc gcaccgcac caccgcccg gcggcctgca cttcgacgac 6600  
 cgcttctccg acgagcagct ggtgacctg tctgtgcgc agctgaaccg gcagctgcgc 6660  
 ggggtcagca aggaggaggt gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc 6720  
 ggctatgcc agtcctgcc cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtggag 6780  
 aagaaccagc tgctgcagca agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtgcg 6840  
  
 gagagggacg cgtacaagga gaaatacgag aagtgtgtga gcagcggctt ccgagaaaac 6900  
 ggctcgagca gcgacaacc gtcctctcc gagttttca tgtgagtctg acacgcgatt 6960  
 ccagctagcc accctgataa gtgctccgc ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt 7020  
 tctagagcca tgetgccac caccacca cccccccc caccgagttt ggcccccttg 7080  
 gccccctaca cacacacaaa cccgcagca cacaccacac acacacacac acacacacac 7140  
 acaccccaca cctgctcga gtttgtggtg gtggtggctg ttttaactg gggaggggat 7200  
 ggggtgctgg ctcatggatt gccaatctga aattctecat aacttgctag cttgtttttt 7260  
  
 tttttttttt acaccccc gccccacc cggacttga caatgttcaa tgatctcagc 7320  
 agagtcttc atgtgaaac ttgatcact ttgaagctg catcattcac atatttttc 7380  
 ttcttcttc cctcagttc atgaactggt gttcatttc tgttgtgtg tgtgtttat 7440



ttgttttga ttttttttt taattttact ttttagagcctt gctgtgttgc ccaccttttt 7500  
 tccaactcc accctcactc cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa 7560  
 gcaaagtttt tttttcttct cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa 7620  
 aaaatgtgaa atgttataga cttgcagcgt gccgagtcc atcgggtttt ttttttagca 7680  
  
 ttgttatgct aaaatagaga aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca 7740  
 accttctggg tgtgacttgt gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct 7800  
 gccattaaaa aaactcattc tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca 7860  
 acaatgaact ataactgttt caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa 7920  
 aaaaagcctg catgctggac atgtatggta taattatfff ttcctttttt tttccttttg 7980  
 gcttggaat ggacgttcga agacttatag catggcattc atacttttgt tttattgcct 8040  
 catgactttt ttgagtttag aacaaaacag tgcaaccgta ggccttctt cccatgaaat 8100  
  
 ttgcatctg ctccaaaact gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgactga 8160  
 aggcattcct tgtcaaagat accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag 8220  
 aactcttaat gttttctttt taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc 8280  
 tattgccgag aagcagtcta aaatttattt tttaaaaaga gaaactgccc cattatfff 8340  
 ggtttgtttt atfffatfff tatatfff ttgcttttggc cattgtcaa tgtggaatgc 8400  
 tctgggttct tagtatataa ttttaattcta gttttataa tctgttagcc cagttaaaat 8460  
 gtatgtaca gataaaggaa tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgtttagctg 8520  
  
 tagatfff aaacgattga tgcactaaat tgtttactat tgtgatgta agggggtag 8580  
 agtttgcaag gggactgttt aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat 8640  
 ataagttggg tatgtgtagt ctttctata cactgactg tattgaaaac caaagtatta 8700  
 agaggggaaa cgccccgtt tatactgta ggggtatfff acattcaaaa atgtatgttt 8760  
 tttttcttt tcaaaattaa agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag 8820  
 catataatac aaaaaaaaaat tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta 8880  
 taaaaatggc attactgcac agttttaaga tgatgcagat tttttacag ttgtattgtg 8940  
  
 gtgcagaact ggattttctg taacttaaaa aaaaatccac agttttaag gcaataatca 9000  
 gtaaagtta ttttcagga ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt 9060  
 accacaataa atataaaaa atcttctcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca 9120  
 aaattgtttt atatcttgag ttactaacta accacgcgtg ttgttctat gtgcttttct 9180  
 ttcattttca attctggtta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt 9240  
 tttttgattc tglactcagt ttcttagtgi acagtttaac tgggccaac aacctgta 9300

aaagtgtaaa atgcatcctt ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt 9360  
  
 aattcagggt gaaattatag gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat 9420  
 tagcaatatt taatatagat gtaaattatg acctcatttt ttctcccca aagttttcag 9480  
 ttttcaaatg agttgagcca taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa 9540  
 ctaggcttcc tgagcatggc cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga 9600  
 ggagccggac aaatatggcg catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa 9660  
 gagaaacagc gcttgccttt tcaactaaagt tgactatfff tccttcttct cttacacacc 9720  
 gagatfffft tgttagcaag gcctgacaag attaacata aacatgacaa atcatagttg 9780  
  
 tttgttttgt ttgcttttc tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaa taggaaaaag 9840  
 aaaatccact ccttacttcc atatttcaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa 9900  
 atcatatfff accgtgaata ttcagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga 9960  
 tttcagatca tgctatcccc agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg 10020  
 ctgtgctttg atttactggg atttaccaca aaataggctg tgtatggggg ctgacttaaa 10080  
 gatcccttgg aaagactcaa aactaccttc actagtagga ctctaaagcg ctgacctatt 10140  
 tttaaatgac acaaatcat gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt 10200  
  
 catcttcccc tagcacacca atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca 10260  
 gccaaacacg atgacttttg ttttgttttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat 10320  
 tgcaactctg actgaaagac ttatftttta gaaaacaggt tgtgttttgg gctgctaagt 10380  
 tctggccagt ttatcatctg gccttctctg ctatftttta caaacacga agacagtgtg 10440  
 taacctcgac atfttgacct tctfttatgt gctagfttag acaggctcct gaatccacac 10500  
 ttaatfttgc ttaacaaaag tcttaaatgt aaacctcccc tcatgagctt gaagtaagt 10560  
 gftcttgact tcaatatttt cfttctfttt ftftftfttt tctcatcac aactaagaga 10620  
  
 tacacaaact ctgaagaagc agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg 10680  
 aaagatftta ggcaaacatt ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ftattgcagt 10740  
 tatctcatga caaatgaggc ctggattgga aggaaaaat agftgtgtag aattaagcat 10800  
 fttgatagga atctacaagg tagftgaata taataagcag gfttgggccc ccaactftta 10860  
 gaaaatcaaa tgcaaaagtg ctggcaaaaa tgaggfttga gtggctggct gtaagagaag 10920  
 gftaactcct agftaaaaggc atftfttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagftatag 10980  
 tgggagtagc aaacaaatc atgtftfttt ftctfttaca agaactccta aatcctgagt 11040

aagtgccatt cattacaata agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat 11100  
ctagctttcc cctttacgct gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgtaaa attcctttca 11160  
ttccaattac agaactgagc ccaactcgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt 11220  
ttggaagccc cagcatcgtg tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag 11280  
ctgtacatta aaaaaaata tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac 11340  
ccctgacttc tgtttagtct cctttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta 11400  
ttaaatgtag tagttaacta tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag 11460  
  
cgcactcctg cttttcgatt tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct 11520  
gccatactag ttttaaaaat tcaactgaaat tacaagata catatatatg catatatata 11580  
atggaaagt tcccggaatg caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat 11640  
tctaaatagt actttttcat gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa 11700  
aaatagatat tcgactcccc ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc 11760  
gagccccctg gttttctcgt aggcctaga cgggtttgca tttatcagtg atgtcaaacg 11820  
tgctcatttg tcagacatag ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttagt 11880  
  
taaatacaca ccctctgtgt gatTTTTTgc tccttttct ttttTgctcc tactcaaaaa 11940  
aaaaaaaaac acctccttta catttccctg gcttcttgca tgtttccctt ttcaaaaacc 12000  
atgtaataat tttttacaat gtatctgaca cattaatata ttgacatcaa ataggcagac 12060  
attctacttt tgcttgcaa ataaatctgc tacggagaca tcatttctc actgtctcaa 12120  
agccataact acctgggagt ctttcaacac agaccctcc gatgggaaat gctgtttatt 12180  
actgaatgca ggatgctcac gctctgatct tttctccctt gtgcctttac cccagtcatt 12240  
tttacttagc aacaccaatt ctagatactt ctgttctgaa gtagaaccac cccttgcca 12300  
  
cactgccagt tttctgcta aaagcagtgg acagaagaca gatcatggtc accctcacia 12360  
acatggcaca cagctgtctc ggtagctgca ttcccagcat gtcctggctc aaatatctag 12420  
agttgcctat gacacgttca aaggttcca agcacagtac attgggagge ttttTgctgct 12480  
gtggccgttg ttttcttta ggccaactta ctccctatt cacatactct tggctttacg 12540  
aaatacactc ctccagtcta ctaggccaat caatatattt aaaagtctga ttgccacata 12600  
agtctctctc tctctctttt tgtttttgt ttgtttgtt ttttctgtt tggctgccgg 12660  
tagttaaaga ctgagatagg ttggaagact aaaatacagg agtacatgag tgacaacctt 12720  
  
cagccgtctg atttcaatgc cggtaaaaca cacaaccaag ctcttcttag cgctgctaat 12780  
ataaacatte actaagaggg aataggaagt gagatttacc agcttcactt tgctgatttg 12840  
caaggttccc cactacgatt cactgtcatt tgattttga aaaataattt tgtccgtctc 12900

tttgaagaaa tgccttagtt cttttatattt gtttgtttgg ttttttttag agaagtttta	12960
tctgcagtga taggctacaa tttttatctc cgctgattat ttgtcaggat gctgaatgaa	13020
taatttggtc ctgtgccttc cttgttgttc tgaggaaaat aagagaaact tgggaagtttg	13080
tttactctt agcccatcct aaatctaaaa gaagatgtcc caggtccagg caggccatgt	13140
agtagttata aaggaggtgg tccaggtcca gccacctcaa tcaggatttg tttgttttga	13200
agcatttgct taaaagcggg gcaagagtct taaccaact tgccataaca ctgcttttct	13260
cgcttttgat gtaaacttcc aaaattcaga catcaaacag ccccagaaaa ggggaattct	13320
ctccaggcat tgcctccgcc cagctcctga acaaaccag ctctgtctag catttttttc	13380
cctagcgggg gtaggggaca gggtgagaga atttcagtct cccaggctgt ctcattgattg	13440
ttagggcata aagaaacaca gtcctgccac aaattgggag catctttacc ctttagagag	13500
aaacaaaaca aactaaaca aacaaatcaa attgctttgc atgaaggcgt agcaaataaa	13560
atctcgggct ccctgttccc tgcaccattt gtaggaggtg agaaatgagg gaaacaagag	13620
aaaggggaac tttaaaagcg ggaggcccag aaataatccc tgttaccagt ctgaatttca	13680
cttgcctcgt ggetaacgtc agacctagtg tgcattgatg ccagaagtaa actaggctcg	13740
gctgtccatt tctttaaata atgttcacat gtttcctttt tgaaaacaat tttggggact	13800
aaacccaaat ggagagattt gaggaatcg ttaatgtctt aacatttgag tatatttata	13860
aatgtatcag tctgtgat	13878