(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월01일
(11) 등록번호 10-1944555
(24) 등록일자 2019년01월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2013-7011176
(22) 출원일자(국제) 2011년10월05일
심사청구일자 2016년10월05일
(85) 번역문제출일자 2013년04월30일
(65) 공개번호 10-2014-0071946
(43) 공개일자 2014년06월12일
(86) 국제출원번호 PCT/ES2011/070693
(87) 국제공개번호 WO 2012/045905
국제공개일자 2012년04월12일
(30) 우선권주장
P201031478 2010년10월06일 스페인(ES)
P201131073 2011년06월27일 스페인(ES)
(56) 선행기술조사문헌
EP01961825 A1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
펀다시오 인스티튜트 드 르세르카 바이오메디카(아이알비 바르셀로나)
스페인 이-08028 바르셀로나, 10, 시. 발디리 라이자크, 파크 사이언티픽 드 바르셀로나.
인스티튜시오 카탈라나 드 르세르카 아이 에스투디스 아반카츠
스페인 이-08010 바르셀로나 23 패세익 루이스 컴파니스
(72) 발명자
고미스 카브레 로저
스페인 이-08021 바르셀로나 씨/아베니르 35
타라고나 서니어 마리아
스페인 이-08006 바르셀로나 6-3 씨/아리바우 212
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김진희

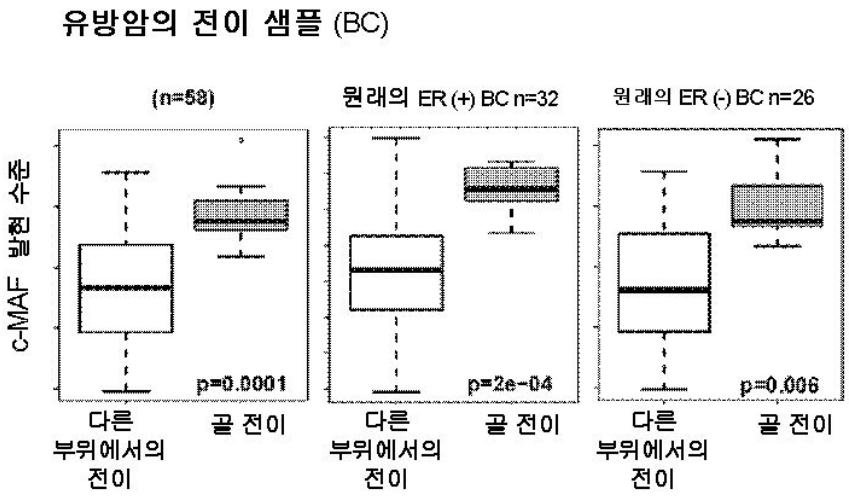
전체 청구항 수 : 총 14 항 심사관 : 이준혁

(54) 발명의 명칭 **유방암 전이의 진단, 예후 및 치료 방법**

(57) 요 약

본 발명은 c-MAF 유전자가 일차 종양 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 유방암 전이를 진단하거나 예후하는 방법에 관한 것이다. 나아가, 본 발명은 c-MAF 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, ER- 유방암 전이를 진단하거나 예후하는 방법, 및 다른 장기로의 전이와 대조적으로 골로의 전이를 발달시킬 성향을 측정하는 방법에 관한 것이다. 최종적으로, 본 발명은 ER- 유방암 전이를 치료하기 위한 치료제로서 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다.

대 표 도



(72) 발명자

아르날 에스타페 안나

스페인 이-08012 바르셀로나 엔트. 3에이 플라카델 솔 19-20

파블로빅 밀리카

스페인 이-08028 바르셀로나 10-12 씨/발디리 아이라이자크

명 세 서

청구범위

청구항 1

ER+ 유방암을 가진 대상체에서 골 전이를 진단하거나 ER+ 유방암을 가진 대상체에서 골 전이가 발생하는 성향을 예후하는 시험관내 방법으로서,

(i) 상기 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭을 정량하는 단계; 및

(ii) (i)에서 수득된 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭을 대조군 샘플에서의 c-MAF 유전자의 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭과 비교하는 단계

를 포함하고,

상기 종양 조직 샘플에서의 c-MAF 유전자의 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭이 대조군 샘플에서의 c-MAF 유전자의 발현 수준에 비하여 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 전이에 대한 양성 진단 또는 골 전이가 발생할 보다 큰 성향을 갖는 것인 시험관내 방법.

청구항 2

ER+ 유방암을 가진 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서,

(i) 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 c-MAF 유전자 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭을 정량하는 단계; 및

(ii) (i)에서 수득된 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭을 대조군 샘플에서의 c-MAF 유전자의 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭과 비교하는 단계

를 포함하고,

c-MAF 유전자의 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭이 대조군 샘플에 비하여 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 유방암의 골 전이를 예방하는 것을 목적으로 하는 요법, 유방암의 골 전이를 치료하는 요법, 유방암의 골 전이를 예방하고 치료하는 요법, 골 분해를 막거나 예방하는 것을 목적으로 하는 요법, 골 분해를 막거나 예방하는 것을 목적으로 하는 요법이면서 유방암의 골 전이를 예방하는 요법, 골 분해를 막거나 예방하는 것을 목적으로 하는 요법이면서 유방암의 골 전이를 치료하는 요법, 또는 골 분해를 막거나 예방하는 것을 목적으로 하는 요법이면서 유방암의 골 전이를 예방하고 치료하는 요법을 받기에 적합한 것인 시험관내 방법.

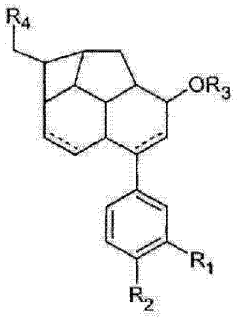
청구항 3

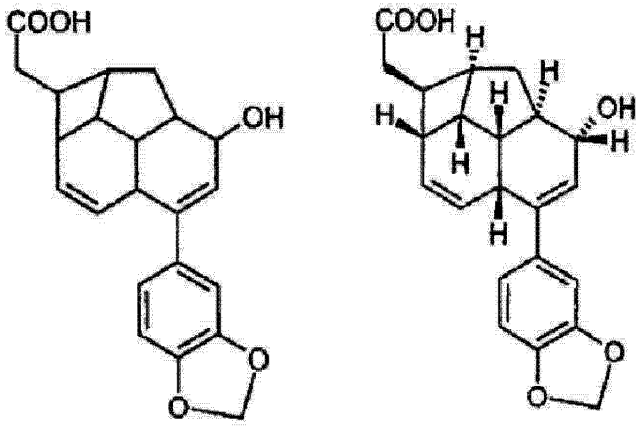
제2항에 있어서, 유방암의 골 전이를 예방하는 것을 목적으로 하는 요법 또는 유방암의 골 전이를 치료하는 요법이 c-MAF 억제제, 화학요법, 호르몬요법, 및 면역요법을 포함한 그러나 이에 한정되지 않는 전신 치료, 방사선요법, 수술로 구성된 군에서 선택되고, 골 분해를 막거나 예방하는 것을 의도하는 요법이 비스포스포네이트, RANKL 억제제, 부갑상선 호르몬, 스트론튬 라넬레이트, 에스트로겐 수용체 조절제, 칼시토닌, 및 카텝신 K 억제제로 구성된 군에서 선택되는 것인 시험관내 방법.

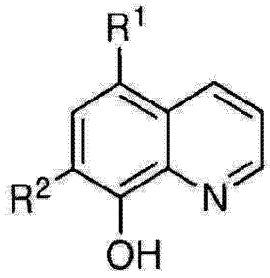
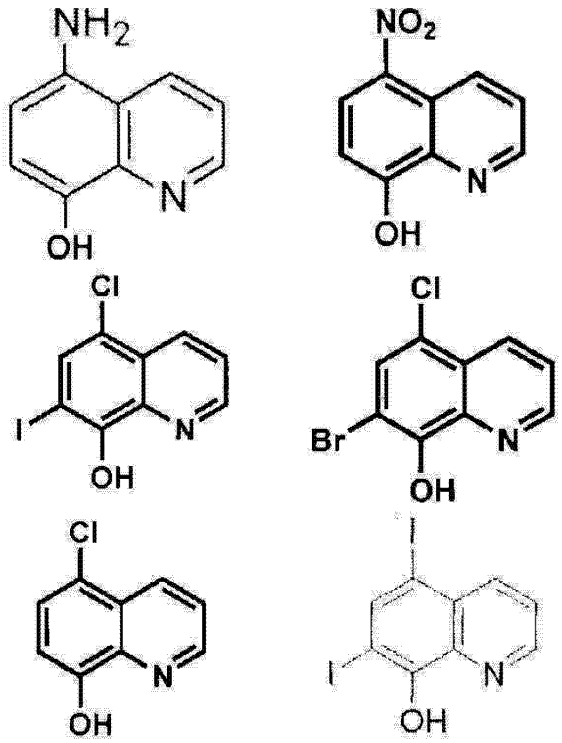
청구항 4

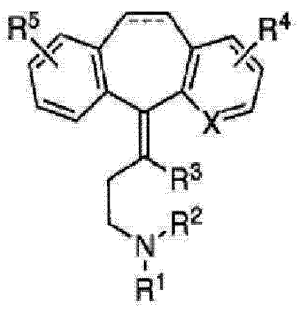
제3항에 있어서, c-MAF 억제제가 c-MAF 특이적 siRNA, c-MAF 특이적 안티센스 올리고뉴클레오티드, c-MAF 특이적 리보자임, c-MAF 억제 항체, 우성 음성 c-MAF 변이체, DNA 효소, 억제 펩티드, 하기 표 1의 c-MAF 특이적 소분자 또는 하기 표 2의 화합물로 구성된 군에서 선택되는 것인 시험관내 방법:

[표 1]

I	엔디안드르산(Endiandric acid) H 유도체, 국제 특허출원 공보 제 WO2004014888 호에 기재된 하기 화학식에 상응하는 유도체:  상기 식에서, R_1 및 R_2는 서로 독립적으로 1.0 H, 또는 2.0 O-C_1-C_6-알킬, -O-C_2-C_6-알케닐, -O-C_2-C_6-알키닐 또는 -O-C_6-C_{10}-아릴 기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9로 일치환되거나 이치환되고, 아릴 기는 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9로 일치환 또는 이치환될 수 있고, 이때 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7은 -CN, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수 있고, 치환기 2.5는 -CN 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있거나: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.4 -O-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.5 C_6-C_{10}-아릴, 2.6 -NH-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.7 -NH-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.8 -NH_2, 또는 2.9 할로겐; 또는 R_1 및 R_2는 함께 고리를 형성하고, 이때 R_1 및 R_2는 -O-[(C_1-C_6)-알킬렌]-O- 기를 의미하고; R_3은 1.0 H, 또는 2.0 -O-C_1-C_6-알킬, -O-C_2-C_6-알케닐, -O-C_2-C_6-알키닐 또는 -O-C_6-C_{10}-아릴 기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 알킬, 알케닐 및 알키닐

	기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9로 일치환되거나 이치환되고, 아릴 기는 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9로 일치환 또는 이치환될 수 있고, 이때 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7은 -CN, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수 있고, 치환기 2.5는 -CN 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있고: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.4 -O-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.5 -C_6-C_{10}-아릴, 2.6 -NH-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.7 -NH-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.8 -NH_2, 또는 2.9 할로겐; R_4는 CO_2R_3, CO_2NHR_3, CHO, CH_2OR_3, $CH_2OSi(R_3)_3$, CH_2Br 또는 CH_2CN 이고, 이때 R_3은 상기 정의된 바와 같다. 하기 화합물: 
II	8-하이드록시퀴놀린 유도체, 국제 특허출원 공보 제 WO2009146546 호에 기재된 하기 화학식의 화합물:

	 상기 식에서, R_1은 NO_2, NH_2, NH(C_1-C_6-알킬) 및 N(C_1-C_6-알킬)(C_1-C_6-알킬)로 구성된 군으로부터 선택되고; R_2는 H, 할로겐, C_1-C_6 알킬 및 플루오로-치환된 C_1-C_6 알킬로부터 선택되거나; 또는 R_1은 Cl 이고, R_2는 Br 또는 H 이다. 하기 화합물: 
III	국제 특허출원 공보 제WO09049410호에 기재된 바와 같은 클리오퀴놀(5-클로로-7-

	요오도퀴놀린-8-올)
IV	국제 특허출원 공보 제WO08098351호에 기재된 하기 화학식의 화합물과 같은 화합물:  상기 식에서, ==-:-:-:는 단일 또는 이중 결합이고; R^1은 H, C_1-C_4 알킬, C(O)O-C_1-C_4 알킬, C(O)-C_1-C_4 알킬 및 C(O)NH-C_1-C_4 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고; R^2는 H 및 C_1-C_4 알킬로부터 선택되고; R^3은 H 및 C_1-C_4 알킬로부터 선택되거나; 또는 R^2 및 R^3은 이들이 결합된 탄소 및 질소 원자와 함께 결합되어 피페리딘 고리를 형성하고; R^4 및 R^5는 H, 할로겐, 하이드록시, C_1-C_4 알킬, 플루오로-치환된 C_1-C_4 알킬 및 C_1-C_4 알콕시로부터 독립적으로 선택되고; X는 C 및 N으로부터 선택된다. 화합물은 다음과 같다: 사이프로헵타딘(Cyproheptadine) (4-(5H-디벤조-[a,d]사이클로헵텐-5-일리덴)-1-메틸피페리딘 하이드로클로라이드), 아미트립틸린(Amitriptyline) (3-(10,11-디하이드로-5H-디벤조[[*a,d*]]사이클로헵텐-5-일리덴)-N,N-디메틸-1-프로판아민), 로라타딘(Loratadine) (에틸 4-(8-클로로-5,6-디하이드로-11H-벤조[5,6]사이클로헵타[1,2-b]피리딘-11-일리덴)-1-피페리딘카복실레이트, 사이클로벤즈라핀(Cyclobenzrapine) (3-(5H-디벤조[a,d]사이클로헵텐-5-일리덴)-N,N-디메틸-1-프로판아민).
V	국제 특허출원 공보 제WO0359249호에 기재된 바와 같은 니발레놀(Nivalenol) (12,13-에폭시-3,4,7,15-테트라하이드록시트리코텍-9-엔-8-온)

[표 2]

길항제	cdk2 억제 활성에 대한 참고문헌
푸린 유사체	
상표명 푸르발로놀 A(#P4484, 시그마-알드리치, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재), 푸르발라놀 B, 아미노푸르발라놀, 또는 화합물 52(푸르발라놀 A 의 이소프로필이 H 로 치환됨) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한 푸르발라놀, $C_{19}H_{25}ClN_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(1R-이소프로필-2-하이드록시에틸아미노)-6-(3-클로로아닐리노)-9-이소프로필푸린	Gray, N.S. *et al.*, Science. 281, 533-538(1998); Chang, Y.T. *et al.*, Chem. Biol., 6, 361-375 (1999).
상표명 올로모우신(#O0886) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{15}H_{18}N_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-메틸푸린, 상표명 N^6-이소프로필올로모우신(#I0763) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{17}H_{22}N_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(2'-하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-이소프로필푸린; CVT-313	Vesely, J., *et al.*, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks, E.E., *et al.*, (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11
상표명 로스코비틴(#R7772) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{19}H_{26}N_6O$ 의 분자식을 갖는 6-(벤질아미노)-2(R)-[[1-(하이드록시메틸)프로필]아미노]-9-이소프로필푸린 2-(R)-[[9-(1-메틸에틸)-6-[(페닐메틸)아미노]-9H-푸린-2-일]아미노]-1-부탄올	Wang, D. *et al.*, J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. *et al.*, Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., *et al.*, (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
상표명 CGP74514(#C3353) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{19}H_{24}ClN_7$ 의 분자식을 갖는 푸린 유사체 N2-(시스-2-아미노사이클로헥실)-N6-(3-클로로페닐)-9-에틸-9H-푸린-2,6-디아민	Imbach, P. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
CGP79807, Cl 이 CN 으로 치환되고 OH 가 제거되고 사이클로헥산 고리의 오르토 위치가 NH_2 인 (상기) CGP74514 의 푸린 유사체	Imbach, P. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
푸린 유사체, O6-사이클로헥실메틸 구아닌 NU2058	Arris, C.E. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies *et al.*, Nature Structural Biology, 9:10, 745-746, 2002.

푸린 유사체, NU6102	Arris, C.E. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies *et al.*, Nat. Struc. Biol., 9:10, 745-746 (2002).
이소펜테닐-아데닌	Vesely, J., *et al.*, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86
비-푸린에 기초한 물질	
상표명(#I0404) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}N_3O_2$의 분자식을 갖는 인디루빈, 인디루빈-3'-모노옥심, 인디루빈 5-설포네이트, 5-클로로 인디루빈	Davies, T.G. *et al.*, Structure, 9, 389-397 (2001); Marko, D. *et al.*, Br. J. Canccer, 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., *et al.*, (1999) Nat. Cell Biol., 1, 60-7; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
이 표의 제 2 행에서 언급된 바와 같은 피셔의 옥시인돌 1(#IN118, JMAR 케미칼)	Porcs-Makkay, M., *et al.*, Tetrahedron 2000, 56, 5893; Org. Process Res. Dev. 2000, 4, 10
인데노피라졸	Nugiel, D.A. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. *et al.*, J. Med. Chem., 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. *et al.*, J. Med. Chem., 45, 5233-5248 (2002).
피리도(2,3-d)피리미딘-7-온, 피셔의 화합물 3	Barvian, M. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., Med. Res. Rev., 21, 487-498 (2001).
퀴나졸린, 아닐리노퀴나졸린	Sielecki, T.M. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1157-1160 (2001); Mattey *et al.*, J. Med. Chem. 2003, 46, 222-236
티아졸, 상표명 GW8510(#G7791) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{21}H_{15}N_5O_3S_2$의 분자식을 갖는 융합된 티아졸, 4-{[(7-옥소-6,7-디하이드로-8H-[1,3]티아졸로[5,4-e]인돌-8-일리덴)메틸]아미노}-N-(2-피리딜)벤젠설폰아미드	Davis, S.T. *et al.*, Science, 291, 134-137 (2001); 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
플라보피리돌, 플라보피리돌(L86 8275; NCS 649890, 국립암연구소, 미국 매릴랜드주 베데스다 소재) 및 데클로로 유도체	Carlson, B.A., *et al.*, (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
알칼로이드, 스타우로스포린(#S1016, 에이.지. 사이언티픽(A.G. Scientific), 미국	Rialet, V., *et al.*, (1991) Anticancer Res., 11, 1581-90;

캘리포니아주 샌 디에고 소재) 또는 UCN-01(7-하이드록시스타우로스포린)(국립암연구소, 미국 매릴랜드주 베데스다 소재)	Wang, Q., *et al.*, (1995) Cell Growth Differ., 6, 927-36; Akiyama, T., *et al.*, (1997) Cancer Res., 57, 1495-501; Kawakami, K., *et al.*, (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 778-83
파울론, 상표명 켄파울론(#K3888) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}BrN_2O$ 의 분자식을 갖는 9-브로모-7,12-디하이드로-인돌로[3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5H)-온, 또는 상표명 알스터파울론(#A4847) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}N_3O_3$ 의 분자식을 갖는 9-니트로-7,12-디하이드로인돌로[3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5)-온	Zaharevitz, D.W. *et al.*, Cancer Res., 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. *et al.*, J. Med. Chem., 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W. *et al.*, (1999) Cancer Res., 59, 2566-9; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
CGP 41251, 알칼로이드	Begemann, M., *et al.*, (1998) Anticancer Res., 18, 2275-82; Fabbro *et al.*, Pharmacol Ther. 1999 May-Jun;82(2-3):293-301.
하이메니알디신, 에이.지. 사이언티픽 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)의 자회사인 바이오케미칼스.넷(Biochemicals.Net)으로부터 입수가능한, $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ 의 분자식을 갖는 10z-하이메니알디신(H-1150)	Meijer, L., *et al.*, (1999) Chemistry & Biology, 7, 51-63; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
CGP60474, 페닐아미노피리미딘	21; 국제 특허출원 공보 제 WO 95/09853 호, Zimmermann *et al.*, September 21, 1994
티아졸로피리미딘 2	Attaby *et al.*, Z. Naturforsch. 54b, 788-798 (1999)
디아릴우레아	Honma. T. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 4628-4640 (2001); Honma. T. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 4615-4627 (2001)
상표명 부티로락톤-I(B7930) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{24}H_{24}O_7$ 의 분자식을 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. *et al.*, Oncogene, 8, 2425-2432 (1993).
알로이신 A, 카달로그 번호 128125(칼바이오켐(Calbiochem), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)	Mettey *et al.*, J. Med. Chem., 2003, 46, 222-236.

청구항 5

제3항에 있어서, RANKL 억제제가 RANKL 특이적 항체 및 오스테오프로테게린으로 구성된 군에서 선택되는 것인 시험관내 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, RANKL 억제제가 RANKL 특이적 항체 데노수맙이거나 비스포스포네이트가 졸레드론산인 시험관내 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, c-MAF 유전자 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭의 정량이 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 또는 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보적인 DNA(cDNA), 상기 cDNA의 단편을 정량하는 것, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 이의 변이체의 수준을 정량하는 것을 포함하는 것인 시험관내 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭이 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), DNA 또는 RNA 어레이, 인시츄(*in situ*) 혼성화, 웨스턴 블롯, ELISA, FISH, 면역조직화학 기법 또는 단백질 어레이에 의해 정량되는 것인 시험관내 방법.

청구항 9

ER+ 유방암을 가진 대상체에서 골 전이를 진단하거나 ER+ 유방암을 가진 대상체에서 골 전이가 발생하는 성향을 예후하는 시험관내 방법으로서, c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 상기 대상체의 종양 조직 샘플에서 증폭되어 있는 지를 확인하는 단계를 포함하고, 상기 기준에 비하여 c-MAF 유전자의 증가가 존재하는 경우, 상기 대상체가 골 전이에 대한 양성 진단 또는 골 전이가 발생할 보다 큰 성향을 갖는 것인 시험관내 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, c-MAF 유전자의 증폭이 좌위 16q22-q24의 증폭을 측정함으로써 확인되는 것인 시험관내 방법.

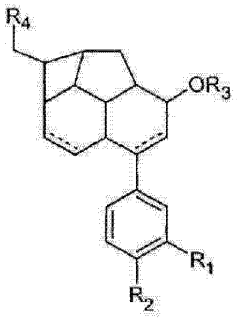
청구항 11

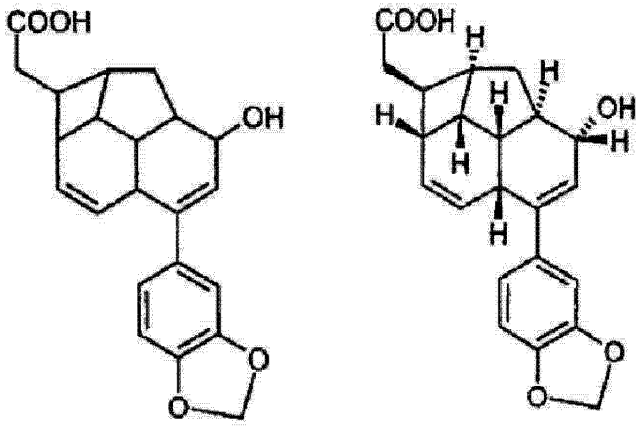
제9항 또는 제10항에 있어서, 증폭이 인시츄 혼성화, ELISA, 또는 PCR에 의해 측정되는 것인 시험관내 방법.

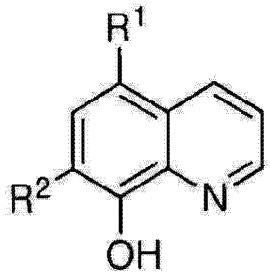
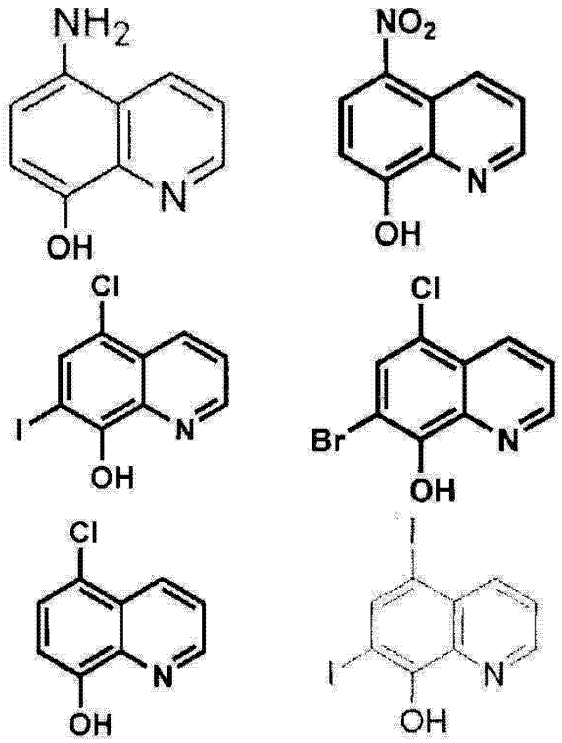
청구항 12

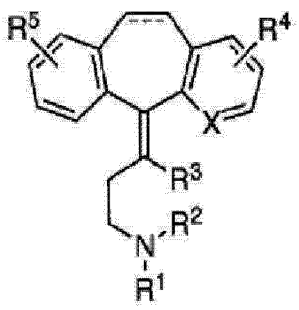
골 전이를 치료하거나 예방하는 작용제를 포함하는, 높아진 c-MAF 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭을 갖는 것으로 확인된 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이를 치료하거나 예방하기 위한 약학 조성물로서, 상기 작용제가 상기 대상체에서 c-MAF의 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭을 정량한 후에 투여되는 것이며, 상기 작용제는 c-MAF 특이적 siRNA, c-MAF 특이적 안티센스 올리고뉴클레오티드, c-MAF 특이적 리보자임, c-MAF 억제 항체, 우성 음성 c-MAF 변이체, 하기 표 1의 c-MAF 특이적 소분자 또는 하기 표 2의 화합물로 구성된 군에서 선택되는 c-MAF 억제제인 약학 조성물:

[표 1]

I	엔디안드르산(Endiandric acid) H 유도체, 국제 특허출원 공보 제 WO2004014888 호에 기재된 하기 화학식에 상응하는 유도체:  상기 식에서, R_1 및 R_2는 서로 독립적으로 1.0 H, 또는 2.0 O-C_1-C_6-알킬, -O-C_2-C_6-알케닐, -O-C_2-C_6-알키닐 또는 -O-C_6-C_{10}-아릴 기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9로 일치환되거나 이치환되고, 아릴 기는 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9로 일치환 또는 이치환될 수 있고, 이때 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7은 -CN, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수 있고, 치환기 2.5는 -CN 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있거나: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.4 -O-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.5 C_6-C_{10}-아릴, 2.6 -NH-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.7 -NH-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.8 $-NH_2$, 또는 2.9 할로겐; 또는 R_1 및 R_2는 함께 고리를 형성하고, 이때 R_1 및 R_2는 -O-[(C_1-C_6)-알킬렌]-O- 기를 의미하고; R_3은 1.0 H, 또는 2.0 -O-C_1-C_6-알킬, -O-C_2-C_6-알케닐, -O-C_2-C_6-알키닐 또는 -O-C_6-C_{10}-아릴 기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 알킬, 알케닐 및 알키닐

	기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9로 일치환되거나 이치환되고, 아릴 기는 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9로 일치환 또는 이치환될 수 있고, 이때 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7은 -CN, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수 있고, 치환기 2.5는 -CN 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있고: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.4 -O-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.5 -C_6-C_{10}-아릴, 2.6 -NH-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.7 -NH-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.8 -NH_2, 또는 2.9 할로겐; R_4는 CO_2R_3, CO_2NHR_3, CHO, CH_2OR_3, $CH_2OSi(R_3)_3$, CH_2Br 또는 CH_2CN 이고, 이때 R_3은 상기 정의된 바와 같다. 하기 화합물: 
II	8-하이드록시퀴놀린 유도체, 국제 특허출원 공보 제 WO2009146546 호에 기재된 하기 화학식의 화합물:

	 상기 식에서, R_1은 NO_2, NH_2, NH(C_1-C_6-알킬) 및 N(C_1-C_6-알킬)(C_1-C_6-알킬)로 구성된 군으로부터 선택되고; R_2는 H, 할로겐, C_1-C_6 알킬 및 플루오로-치환된 C_1-C_6 알킬로부터 선택되거나; 또는 R_1은 Cl 이고, R_2는 Br 또는 H 이다. 하기 화합물: 
III	국제 특허출원 공보 제WO09049410호에 기재된 바와 같은 클리오퀴놀(5-클로로-7-

	요오도퀴놀린-8-올)
IV	국제 특허출원 공보 제WO08098351호에 기재된 하기 화학식의 화합물과 같은 화합물:  상기 식에서, ==-:-:-:는 단일 또는 이중 결합이고; R^1은 H, C_1-C_4 알킬, C(O)O-C_1-C_4 알킬, C(O)-C_1-C_4 알킬 및 C(O)NH-C_1-C_4 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고; R^2는 H 및 C_1-C_4 알킬로부터 선택되고; R^3은 H 및 C_1-C_4 알킬로부터 선택되거나; 또는 R^2 및 R^3은 이들이 결합된 탄소 및 질소 원자와 함께 결합되어 피페리딘 고리를 형성하고; R^4 및 R^5는 H, 할로겐, 하이드록시, C_1-C_4 알킬, 플루오로-치환된 C_1-C_4 알킬 및 C_1-C_4 알콕시로부터 독립적으로 선택되고; X는 C 및 N으로부터 선택된다. 화합물은 다음과 같다: 사이프로헵타딘(Cyproheptadine) (4-(5H-디벤조-[a,d]사이클로헵텐-5-일리덴)-1-메틸피페리딘 하이드로클로라이드), 아미트립틸린(Amitriptyline) (3-(10,11-디하이드로-5H-디벤조[[*a,d*]]사이클로헵텐-5-일리덴)-N,N-디메틸-1-프로판아민), 로라타딘(Loratadine) (에틸 4-(8-클로로-5,6-디하이드로-11H-벤조[5,6]사이클로헵타[1,2-b]파리딘-11-일리덴)-1-피페리딘카복실레이트, 사이클로벤즈라핀(Cyclobenzrapine) (3-(5H-디벤조[a,d]사이클로헵텐-5-일리덴)-N,N-디메틸-1-프로판아민).
V	국제 특허출원 공보 제WO0359249호에 기재된 바와 같은 니발레놀(Nivalenol) (12,13-에폭시-3,4,7,15-테트라하이드록시트리코텍-9-엔-8-온)

[표 2]

길항제	cdk2 억제 활성에 대한 참고문헌
푸린 유사체	
상표명 푸르발로놀 A(#P4484, 시그마-알드리치, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재), 푸르발라놀 B, 아미노푸르발라놀, 또는 화합물 52(푸르발라놀 A 의 이소프로필이 H 로 치환됨) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한 푸르발라놀, $C_{19}H_{25}ClN_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(1R-이소프로필-2-하이드록시에틸아미노)-6-(3-클로로아닐리노)-9-이소프로필푸린	Gray, N.S. *et al.*, Science. 281, 533-538(1998); Chang, Y.T. *et al.*, Chem. Biol., 6, 361-375 (1999).
상표명 올로모우신(#O0886) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{15}H_{18}N_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-메틸푸린, 상표명 N^6-이소프로필올로모우신(#I0763) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{17}H_{22}N_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(2'-하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-이소프로필푸린; CVT-313	Vesely, J., *et al.*, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks, E.E., *et al.*, (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11
상표명 로스코비틴(#R7772) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{19}H_{26}N_6O$ 의 분자식을 갖는 6-(벤질아미노)-2(R)-[[1-(하이드록시메틸)프로필]아미노]-9-이소프로필푸린 2-(R)-[[9-(1-메틸에틸)-6-[(페닐메틸)아미노]-9H-푸린-2-일]아미노]-1-부탄올	Wang, D. *et al.*, J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. *et al.*, Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., *et al.*, (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
상표명 CGP74514(#C3353) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{19}H_{24}ClN_7$ 의 분자식을 갖는 푸린 유사체 N2-(시스-2-아미노사이클로헥실)-N6-(3-클로로페닐)-9-에틸-9H-푸린-2,6-디아민	Imbach, P. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
CGP79807, Cl 이 CN 으로 치환되고 OH 가 제거되고 사이클로헥산 고리의 오르토 위치가 NH_2 인 (상기) CGP74514 의 푸린 유사체	Imbach, P. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
푸린 유사체, O6-사이클로헥실메틸 구아닌 NU2058	Arris, C.E. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies *et al.*, Nature Structural Biology, 9:10, 745-746, 2002.

푸린 유사체, NU6102	Arris, C.E. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies *et al.*, Nat. Struc. Biol., 9:10, 745-746 (2002).
이소펜테닐-아데닌	Vesely, J., *et al.*, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86
비-푸린에 기초한 물질	
상표명(#I0404) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}N_3O_2$의 분자식을 갖는 인디루빈, 인디루빈-3'-모노옥심, 인디루빈 5-설포네이트, 5-클로로 인디루빈	Davies, T.G. *et al.*, Structure, 9, 389-397 (2001); Marko, D. *et al.*, Br. J. Canccer, 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., *et al.*, (1999) Nat. Cell Biol., 1, 60-7; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
이 표의 제 2 행에서 언급된 바와 같은 피셔의 옥시인돌 1(#IN118, JMAR 케미칼)	Porcs-Makkay, M., *et al.*, Tetrahedron 2000, 56, 5893; Org. Process Res. Dev. 2000, 4, 10
인데노피라졸	Nugiel, D.A. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. *et al.*, J. Med. Chem., 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. *et al.*, J. Med. Chem., 45, 5233-5248 (2002).
피리도(2,3-d)피리미딘-7-온, 피셔의 화합물 3	Barvian, M. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., Med. Res. Rev., 21, 487-498 (2001).
퀴나졸린, 아닐리노퀴나졸린	Sielecki, T.M. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1157-1160 (2001); Mattey *et al.*, J. Med. Chem. 2003, 46, 222-236
티아졸, 상표명 GW8510(#G7791) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{21}H_{15}N_5O_3S_2$의 분자식을 갖는 융합된 티아졸, 4-{[(7-옥소-6,7-디하이드로-8H-[1,3]티아졸로[5,4-e]인돌-8-일리덴)메틸]아미노}-N-(2-피리딜)벤젠설폰아미드	Davis, S.T. *et al.*, Science, 291, 134-137 (2001); 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
플라보피리돌, 플라보피리돌(L86 8275; NCS 649890, 국립암연구소, 미국 매릴랜드주 베데스다 소재) 및 데클로로 유도체	Carlson, B.A., *et al.*, (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
알칼로이드, 스타우로스포린(#S1016, 에이.지. 사이언티픽(A.G. Scientific), 미국	Rialet, V., *et al.*, (1991) Anticancer Res., 11, 1581-90;

캘리포니아주 샌 디에고 소재) 또는 UCN-01(7-하이드록시스타우로스포린)(국립암연구소, 미국 매릴랜드주 베데스다 소재)	Wang, Q., *et al.*, (1995) Cell Growth Differ., 6, 927-36; Akiyama, T., *et al.*, (1997) Cancer Res., 57, 1495-501; Kawakami, K., *et al.*, (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 778-83
파울론, 상표명 켄파울론(#K3888) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}BrN_2O$ 의 분자식을 갖는 9-브로모-7,12-디하이드로-인돌로[3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5H)-온, 또는 상표명 알스터파울론(#A4847) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}N_3O_3$ 의 분자식을 갖는 9-니트로-7,12-디하이드로인돌로[3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5)-온	Zaharevitz, D.W. *et al.*, Cancer Res., 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. *et al.*, J. Med. Chem., 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W. *et al.*, (1999) Cancer Res., 59, 2566-9; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
CGP 41251, 알칼로이드	Begemann, M., *et al.*, (1998) Anticancer Res., 18, 2275-82; Fabbro *et al.*, Pharmacol Ther. 1999 May-Jun;82(2-3):293-301.
하이메니알디신, 에이.지. 사이언티픽 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)의 자회사인 바이오케미칼스.넷(Biochemicals.Net)으로부터 입수가능한, $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ 의 분자식을 갖는 10z-하이메니알디신(H-1150)	Meijer, L., *et al.*, (1999) Chemistry & Biology, 7, 51-63; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
CGP60474, 페닐아미노피리미딘	21; 국제 특허출원 공보 제 WO 95/09853 호, Zimmermann *et al.*, September 21, 1994
티아졸로피리미딘 2	Attaby *et al.*, Z. Naturforsch. 54b, 788-798 (1999)
디아릴우레아	Honma, T. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 4628-4640 (2001); Honma, T. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 4615-4627 (2001)
상표명 부티로락톤-I(B7930) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{24}H_{24}O_7$ 의 분자식을 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. *et al.*, Oncogene, 8, 2425-2432 (1993).
알로이신 A, 카달로그 번호 128125(칼바이오켐(Calbiochem), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)	Mettey *et al.*, J. Med. Chem., 2003, 46, 222-236.

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

제2항에 있어서, c-MAF 유전자 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭의 정량이 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 또는 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보적인 DNA(cDNA), 상기 cDNA의 단편을 정량하는 것, 또는 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 이의 변이체의 수준을 정량하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 22

제21항에 있어서, 발현 수준, 카피 수, 획득 또는 증폭이 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), DNA 또는 RNA 어레이, 인시츄(*in situ*) 혼성화, 웨스턴 블롯, ELISA, 또는 단백질 어레이에 의해 정량되는 것인 방법.

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

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 c-MAF 유전자가 일차 종양 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 것에 기초한 유방암 전이의 진단 또는 예후에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 c-MAF 유전자 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 유방암 전이를 진단하거나 예후하는 방법 및 유방암을 갖는 대상체에서 맞춤형 요법(customized therapy)을 디자인하는 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 유방암 전이의 치료를 위한 치료 표적으로서 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 유방암은 전세계적으로 (10.4%; 폐암 다음으로) 두 번째로 가장 흔한 유형의 암이고 (폐암, 위암, 간암 및 결장암 다음으로) 암에 의한 사망의 다섯 번째로 가장 흔한 원인이다. 여성들 사이에서 유방암은 암에 의한 사망의 가장 흔한 원인이다. 2005년, 유방암은 전세계적으로 502,000명의 사망(암에 의한 사망의 7%; 모든 사망의 거의 1%)을 야기하였다. 전세계적으로 사례의 수는 1970년대부터 상당히 증가하였고, 이 현상은 부분적으로 서구세계에서의 현대 생활방식에 기인한다.

[0003] 유방암은 TNM 시스템에 따라 병기로 분류된다. 예후는 병기 분류의 결과와 밀접하게 관련되어 있고, 또한 병기 분류는 임상 시험 및 의료 행위 둘다에서 환자들을 치료에 배정하는 데에 이용된다. 병기로 분류하기 위한 정보는 다음과 같다:

[0004] • TX: 일차 종양이 평가될 수 없다. T0: 종양의 증거가 없다. Tis: 상피내암종(in situ carcinoma), 침습이 없다. T1: 종양이 2 cm 이하이다. T2: 종양이 2 cm 초과 내지 5 cm 미만이다. T3: 종양이 5 cm 초과이다. T4: 유방 또는 피부의 벽에서 성장하는 임의의 크기의 종양, 또는 염증성 유방암.

[0005] • NX: 인접 림프절이 평가될 수 없다. N0: 암이 국부적 림프절로 퍼지지 않았다. N1: 암이 1개 내지 3개의 액와 림프절 또는 1개의 내유 림프절로 퍼졌다. N2: 암이 4개 내지 9개의 액와 림프절 또는 다수의 내유 림프절로 퍼졌다. N3: 하기 사항들 중 하나가 적용된다:

[0006] - 암이 10개 이상의 액와 림프절로 퍼졌거나, 암이 쇄골하 림프절로 퍼졌거나, 암이 쇄골상 림프절로 퍼졌거나 암이 액와 림프절에 영향을 미치고 내유 림프절로 퍼졌거나, 또는 암이 4개 이상의 액와 림프절에 영향을 미치고 최소량의 암이 내유 림프절 또는 전초 림프절 생검에 존재한다.

[0007] • MX: 원격 퍼짐(전이)의 존재가 평가될 수 없다. M0: 원격 퍼짐이 존재하지 않는다. M1: 쇄골상 림프절을 포함하지 않는 원격 장기로의 퍼짐이 발생되었다.

[0008] 고형 종양 암을 갖는 환자의 대다수가 전이 후 사망한다는 사실은 종양이 전이될 수 있게 하는 분자 기작 및 세포 기작을 이해하는 것이 중요하다는 것을 의미한다. 최근 공개문헌들은 전이가 복잡하지만 아직 거의 공지되어 있지 않은 기작에 의해 어떻게 야기되는지, 및 상이한 전이성 세포 유형들이 특정 장기에 대한 향성(tropism)을 어떻게 갖는지를 입증하였다. 이들 조직 특이적 전이성 세포들은 이들이 특정 장기에서 콜로니화할 수 있게 하는 일련의 후천적 기능을 갖는다.

[0009] 모든 세포들이 그들의 표면 상에서, 그들의 세포질 내에서 및 세포 핵 내에서 수용체를 갖는다. 일부 화학적 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 양의 부호를 넣고 수용체가 부재하는 경우 음의 부호를 넣는다: ER 양성(ER+), ER 음성(ER-), PR+(양성), PR 음성(PR-), HER2+(양성) 및 HER2 음성(HER2-). 수용체 상태는 구체적인 치료, 예를 들면, 타목시펜(tamoxifen) 또는 트라스투주맙(trastuzumab) 사용의 적합성을 결정하기 때문에 모든 유방암에 대한 핵심적인 평가대상이 되었다. 에스트로겐 수용체(ER)의 알파 동형체(isoform)는 진단된 유방암 사례의 약 65%에서 과다발현된다. 이 유형의 유방암은 "ER-양성"(ER+)으로서 지칭된다. 이 경우, 에스트로겐과 ER의 결합은 종양 유선 세포 증식을 자극한다. ER+ 종양 세포는 증식하기 위해 이 자극에 주로 의존하므로, ER은 현재 치료 표적으로서 사용된다.

[0010] 종양이 (타목시펜 또는 아로마타제(aromatase) 억제제를 사용한) 가능한 보조 호르몬 요법, 화학요법 및/또는 방사선요법에 의해 국소화되어 있을 때 유방암의 치료를 위한 핵심은 수술이다. 현재, 수술 후 치료(보조 치료)에 대한 제안은 패턴을 따른다. 이 패턴은 전세계적인 다중심 연구의 실제 결과를 논의하기 위한 세계 회의가 2년마다 스위스 생갈에서 개최되기 때문에 변경된다. 또한, 상기 패턴은 국립보건원(NIH)의 합의 기준에 따라 검토된다. 이 기준에 기초할 때, 림프절에서 전이를 갖지 않는 환자의 85% 내지 90% 초과의 환자가 보조 전신 치료를 받을 후보가 될 것이다.

[0011] 현재, PCR 분석, 예컨대, 온코타입(Oncotype) DX 또는 마이크로어레이 분석, 예컨대, 맘마프린트(MammaPrint)가 특정 유전자의 발현에 기초하여 유방암 재발의 위험을 예측할 수 있다. 2007년 2월, 맘마프린트 분석은 식품의약청으로부터 공식적인 허가를 받은 첫 번째 유방암 표시자(indicator)가 되었다.

[0012] 유럽 특허출원 공보 제1961825-A1호는 종양 조직 샘플에서 c-MAF를 포함하는 하나 이상의 마커의 발현 수준을 대조군 샘플에서의 그들의 상응하는 발현 수준과 비교하여 측정하는 단계를 포함하는, 골, 폐, 간 또는 뇌로의 유방암 전이의 발생을 예측하는 방법을 기술한다. 그러나, 이 문헌은 유방암 환자의 생존을 측정할 수 있기 위해 여러 유전자들을 동시에 측정할 것을 필요로 하고, 골 전이로부터 자유로운 생존가능성을 예측하는 유전자 발현양상(signature)의 성능 사이의 상관관계가 통계적으로 유의하지 않았다.

[0013] 문헌(Bos, P.D., *et al*. [Nature, 2009, 459:1005-1009])은 뇌로의 유방암 전이에 관여하는 유전자를 기술한다.

[0014] 미국 특허출원 공보 제2005/0181375호는 전이성 종양 및 특히 뇌로 전이되는 종양에서 무작위적으로 조절되거나 하향조절되는 일련의 유전자들의 발현 수준의 검출에 기초한 전이성 유방암의 검출 방법을 기술한다.

[0015] 국제 특허출원 공보 제WO2010/000907호는 유방암 환자에서 원격 전이에 대한 게놈 예측자로서 유용한 유전자 발현양상을 기술한다.

[0016] 그러나, 특정 유방암, 예컨대, ER- 또는 ER+ 유방암을 앓고 있는 환자가 전이를 앓을지 아니면 앓지 않을지를 진단하고/하거나 예후하여 적합한 치료가 상기 암을 앓고 있는 대상체에게 적용될 수 있게 하는 유전적 마커가 당업계의 기술수준에서 존재하지 않는다. 따라서, ER+ 또는 ER- 유방암을 앓고 있는 대상체에서 전이의 존재를 진단할 수 있게 하고/하거나 ER+ 또는 ER- 유방암을 앓고 있는 대상체가 전이를 발달시킬 확률을 예측할 수 있게 하는 신규 마커를 확인할 필요가 있다. 신규 예후 인자의 확인은 가장 적합한 치료의 선택에 있어서 지침으로서 사용될 것이다.

발명의 내용

[0017] 본 발명의 요약

[0018] 본 발명의 발명자들은 ER+ 유방암이 전이 및 특히 골 전이를 야기할 보다 큰 성향과 관련된 마커로서 c-MAF를 확인하고 검증하였다. 이 과다발현은 부분적으로 c-MAF 유전자가 위치하는 좌위 16q22-q24의 증폭에 기인한다. 임의의 특정 이론에 구속받고자 하는 것은 아니지만, 에스트로겐 수용체(ER)의 신호전달 경로가 유방암 전이를 야기하는 데에 필요한 분자 사건(event)을 유발하여 유방암 전이에 기여하는 것으로 생각된다.

[0019] 본 발명자들은 MCF7 세포주(인간 ER+ 유방암 세포주)를 면역결핍 마우스 내로 접종한 후 상기 MCF7 세포의 골 전이로부터 수득된 세포주와 관련된 발현 프로파일(profile)을 수득함으로써 ER+ 유방암 전이에서 c-MAF 유전자의 역할을 특징규명하였다. 다양한 기준을 적용함으로써 상기 발현 프로파일로부터 c-MAF 유전자가 선택되었고, 골에서의 일차 유방암 종양의 재발을 예측하는 발현 수준의 변경이 입증되었다. 그 후, c-MAF 발현 수준은 유방암을 갖는 환자로부터의 일차 종양 및 유방암 환자로부터의 전이의 발현 프로파일 및 임상 특징(notes)을 함유하는 2개의 상이한 데이터베이스에서 연구되었고, c-MAF 유전자 발현은 재발 및 전이를 포함하는 상이한 임상 파라미터들과 양의 상관관계를 갖는다는 것이 관찰되었다. 추가로, 유방암으로부터의 골 전이에서 c-MAF 발현 수준이 측정되었고, ER+ 종양 및 ER- 종양으로부터 유래된 전이에서 높은 c-MAF 수준이 관찰되었다. 마지막으로, c-MAF 유전자는 생체내 전이 콜로니화 분석에 이어서 렌티바이러스 벡터에 의한 기능 획득(gain-of-function) 실험 및 간섭 RNA(siRNA)의 사용에 의한 기능 상실(loss-of-function) 실험에 의해 개별적으로 검증되었다. 이들 연구들은 유방암 전이, 특히 유방암으로부터의 골 전이에서 예후를 위한 마커로서 및 표적 유전자로서 c-MAF의 역할을 입증하였다. 또한, 본 발명자들은 c-MAF 유전자를 포함하는 좌위 16q22-q24의 증폭을, 유방암을 갖는 대상체에서의 전이의 존재 및 골 전이를 형성하는 성향을 갖는 유방암 세포주에서의 c-MAF 유전자의 증폭과 관련시켰다.

[0020] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은

[0021] (i) ER+ 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0022] (ii) 먼저 수득된 상기 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

[0023] 를 포함하는, ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 발달시킬 성향을 예후하는 시험관내 방법에 관한 것으로서, 이때 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다.

[0024] 제2 양태에서, 본 발명은

[0025] (i) ER+ 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0026] (ii) 먼저 수득된 상기 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

[0027] 를 포함하는, ER+ 유방암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법에 관한 것으로서, 이때 상기 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 상기 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받을 가능성이 있(susceptible)다.

[0028] 제3 양태에서, 본 발명은

[0029] (i) 골 전이와 함께 유방암을 갖는 대상체의 골 전이성 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0030] (ii) 단계 (i)에서 수득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

[0031] 를 포함하는, 골 전이와 함께 유방암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법에 관한 것으로서, 이때 상기 c-MAF 유전자 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 요법을 받을 가능성이 있다.

[0032] 제4 양태에서, 본 발명은 c-MAF 유전자가 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 발달시킬 성향을 예후하는 시험관내 방법에 관한 것으로서, 이때 상기 유전자가 대조군 샘플에 비해 증폭되어 있는 경우, 상기 대상체는 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다.

[0033] 제5 양태에서, 본 발명은 유방암 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위한 의약품의 제조에 있어서 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다.

[0034] 마지막 양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 종양 조직 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 전이를 치료하기 위한 의약품의 제조에 있어서 골 분해를 방지할 수 있거나 예방할 수 있는 물질(agent)의 용도에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0035] 도 1a는 종양 특이적 전이성 하위집단의 생체내 선택 과정의 도식화를 보여준다. 후속 골 전이성 세대 각각은 BoM0, BoM1 및 BoM2로서 표기되어 있다. 이들 세포 유형들의 전이 성능은 면역억제된 마우스에서 이식 모델 내로의 심장내 주입에 의해 분석되었다. 도 1b는 모 ER+ 유방암 세포들 및 이들의 후속 전이성 유도체 세포주 BoM0, BoM1 및 BoM2의 전사 프로파일로부터 수득된 계층별 클러스터링(clustering)을 보여준다. 도 1c는 환자의 군이 c-MAF 발현 수준에 따라 분리되어 있고 시간의 경과에 따라 골 전이를 재발하거나 앓을 확률이 환자의 군 각각에 대해 표시되어 있는 카플란-메이에르(Kaplan-Meier) 곡선을 보여준다. 데이터 세트는 560개의 일차 유방암 종양을 포함한다. 분석은 ER+ 종양 및 ER- 종양 각각으로 한정된다(유전자 발현 옴니버스 데이터베이스, 수탁번호 GSE 2603, 2034 및 12276). 도 1d는 c-MAF 발현 수준을 이용하여 NKI의 코호트(cohort)에서 기재된 338개의 일차 유방암 종양의 발현 프로파일을 분리하였다는 것을 보여준다. 시간의 경과에 따른 각각의 군으로부터의 환자의 생존 확률은 카플란-메이에르 곡선에 의해 비교되어 제시되어 있다. 도 1c 및 1d에 제시된 p-값 데이터는 이들 값들을 연속 변수로서 사용하여 COX 유형 다변량 모델(p-값 < 0.01)을 이용하였을 때 c-MAF 유전자 발현과 ER 사이의 교차점이 재발 또는 전이를 독립적인 유의한 방식으로 예측한다는 것을 보여준다.

도 2a는 유방암으로부터 유래된 골 전이에서 표준화된 c-MAF 유전자 발현 수준을 다른 전이 부위(뇌, 간 및

폐)와 비교하여 보여준다(GSE14020). 도 2b는 상이한 골 콜로니화 성능 및 MDA-MB-231(ER-) 유방암 세포 유도체를 갖는 상이한 하위집단들에서 표준화된 c-MAF 유전자 발현 수준을 보여준다. 도 1c는 상이한 골 콜로니화 성능 및 MDA-MB-231(ER-) 유방암 세포 유도체를 갖거나 c-MAF 유전자(긴 동형체)를 코딩하는 cDNA의 외인성 과다발현을 갖는 상이한 하위집단들에서 표준화된 CTGF 유전자(c-MAF의 전사 활성에 의해 유도된 유전자) 발현 수준을 보여준다.

도 3a는 MCF7 ER+ 유방암 세포들 및 이들의 전이성 유도체(BoM)에서의 c-MAF 발현 수준을 RT-정량-PCR로 분석한 결과를 보여준다. 도 3b 및 3c는 c-MAF의 기능 상실 및 기능 획득 실험을 보여준다. c-MAF 기능 상실 및 기능 획득은 각각 골에서 높은 전이성을 갖는 세포 및 낮은 전이성을 갖는 세포에서 수행되었다. c-MAF 발현을 갖는 세포주 유도체 및 c-MAF 발현을 갖지 않는 세포주 유도체가 면역억제된 마우스의 좌심실 내로 주입되고, ER+ 유방암에서 골 전이에의 c-MAF의 기여를 검증하기 위해 생체내 골 콜로니화가 생체발광 영상화 기법에 의해 실시간으로 분석된다. MAF-sho는 짧은 c-MAF(짧은 동형체)를 표시한다.

도 4는 MCF7 모 세포 또는 c-MAF 동형체들(짧은 - 짧은 동형체, 및 긴 - 긴 동형체) 중 임의의 동형체를 과다발현하는 세포로부터 유래된 컨디셔닝 배지로부터, 골수 유래 전구 세포로부터의 파골세포 분화를 분석한 결과를 보여준다. 파골세포의 수는 TRAP 기법에 의해 측정된다. 군들 사이의 통계적 차이는 양방 윌콕손(two-tailed wilcoxon) 검정에 의해 평가된다.

도 5a는 MCF7 세포와 비교하였을 때 BoM2 세포에서 16번 염색체의 유전자 발현 수준으로부터 카피 수를 분석한 결과를 보여준다. 상부는 발현 표시자를 보여준다. 이 도면의 중심부는 그들의 게놈 위치에 따라 배열되어 있는, 전사된 생성물 또는 유전자(이들의 발현 값이 제공되어 있음)의 기준 서열을 보여주고(Sec. Ref. 전사된 생성물); 도 5b는 ACE 분석(발현 데이터에 기초한 카피 수에 의한 변경 분석)이 348개의 일차 ER+ 유방암 종양에서 전이를 갖는 유방암 환자들에서 영역 16q12-q24에서의 재발성 게놈 획득을 확인시켜준다는 것을 보여준다. 상기 영역은 c-MAF 유전자를 함유하는 좌위 16q22-q24를 포함한다. "콕스 로그 위험비(HR)" 모델을 적용하여 상기 유전자 발현과 전이의 발달을 관련시켰다. 전체 게놈에서 HR 로그의 순열(1000개 순열)을 만들고 벤자미니-호크베르그(Benjamini-Hochberg)를 통해 p 값을 조절하여 FDR(가짜 발견율)을 0.05의 수준으로 제어함으로써 통계적 유의도를 수득하였다. 15개 이상의 연속적인 유의한 유전자들을 갖는 영역만이 회색으로 표시되어 있다.

도 6a는 c-MAF 유전자 특이적 프로브(별표를 갖는 화살표) 및 IGH 유전자 특이적 프로브(화살표)를 사용한 형광 인시츄(*in situ*) 혼성화(FISH)에 의한 MAF 및 IGH 유전자 카피 수의 검출을 보여준다. IGH 유전자는 대조군으로서 사용된다. 크기: 25 ㎛. 도 6b는 IGH 유전자 카피 수에 비해 MAF 유전자 카피 수 사이에 표시된 비를 갖는 세포의 백분율의 정량을 보여준다. (각각의 군에 대해 카운팅된 세포의 총 수가 표시되어 있다.)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] c-MAF 발현 수준에 기초한 유방암 전이의 진단 및 예후 방법

[0037] 본 발명자들은 c-MAF 유전자가 특히 ER+ 종양에서 유방암 전이에서 과다발현되고 일차 종양에서의 c-MAF 발현 수준이 유방암의 상이한 임상 파라미터들, 특히 재발 및 전이 확률과 상관관계를 갖는다는 것을 보여주었다. 따라서, 본 발명의 실시예(실시예 2 참조)에서 밝혀진 바와 같이, c-MAF 과다발현은 골에서 ER+ 유방 종양 전이의 발병과 상관관계를 갖는다(도 1 참조). 따라서, c-MAF는 ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 전이의 진단 및/또는 예후에 대한 마커로서 사용될 수 있다.

[0038] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은

[0039] (i) ER+ 유방암을 갖는 대상체로부터의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0040] (ii) 먼저 수득된 상기 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

[0041] 를 포함하는, ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 발달시킬 성향을 예후하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제1 방법)에 관한 것으로서, 이때 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다.

[0042] c-MAF 유전자(MAF 또는 MGC71685로도 공지되어 있는 v-maf 근건막 섬유육종 종양유전자 상동체(조류))는 동종이량체 또는 이종이량체처럼 작용하는, 류신 지퍼를 함유하는 전사 인자이다. 코딩된 단백질은 DNA 결합 부위에 따라 전사 활성화제 또는 억제제일 수 있다. c-MAF를 코딩하는 DNA 서열은 NCBI 데이터베이스에서 수탁번호

NG_016440(서열번호 1) 하에 기재되어 있다. 2개의 메신저 RNA가 상기 DNA 서열로부터 전사되고, 이들 각각은 2개의 c-MAF 단백질 동형체, 즉 α 동형체 및 β 동형체 중 하나를 발생시킬 것이다. 상기 동형체들 각각에 대한 상보적인 DNA 서열들은 NCBI 데이터베이스에서 각각 수탁번호 NM_005360.4(서열번호 2) 및 NM_001031804.2(서열번호 3) 하에 기재되어 있다.

[0043] 본 발명의 내용에서, "전이"는 암이 시작된 장기로부터 상이한 장기로의 암의 전파로서 이해된다. 이것은 일반적으로 혈액 또는 림프 시스템을 통해 일어난다. 암 세포가 퍼져 새로운 종양을 형성하는 경우, 후자는 이차 또는 전이성 종양으로 지칭된다. 이차 종양을 형성하는 암 세포는 원래 종양의 암 세포와 유사하다. 예를 들면, 유방암이 폐로 퍼진(전이된) 경우, 이차 종양은 악성 유방암 세포로 형성된다. 폐 내의 질환은 전이성 유방암이고 폐암이 아니다. 본 발명의 방법의 구체적인 실시양태에서, 전이는 골로 퍼진(전이된) ER+ 유방암이다.

[0044] 본 발명에서, "ER+ 유방암"은 에스트로겐 수용체(ER)를 발현하는 종양 세포를 갖는 유방암으로서 이해된다. 이것은 상기 종양이 에스트로겐에 민감하게 만드는데, 이는 에스트로겐이 암성 유방 종양을 성장하게 한다는 것을 의미한다. 대조적으로, "ER- 유방암"은 에스트로겐 수용체(ER)를 발현하지 않는 종양 세포를 갖는 유방암으로서 이해된다.

[0045] 본 발명에서, "유방암을 갖는 대상체에서 전이의 진단"은 그의 징후를 연구함으로써, 즉 본 발명의 내용에서 대조군 샘플에 비해 유방암 종양 조직에서의 증가된 c-MAF 유전자 발현 수준(즉, 과다발현)을 통해 질환(전이)을 확인하는 것으로서 이해된다.

[0046] 본 발명에서, "ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 발달시킬 성향의 예후"는 상기 대상체가 갖는 ER+ 유방암이 추후 전이될 것인지를 징후에 기초하여 아는 것으로서 이해된다. 본 발명의 내용에서, 상기 징후는 종양 조직에서의 c-MAF 유전자 과다발현이다.

[0047] 본 발명의 방법은 대상체로부터의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 제1 단계를 포함한다.

[0048] 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).

[0049] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체" 또는 "환자"는 포유동물로서 분류된 모든 동물을 지칭하고, 가축 및 농장 동물, 영장류 및 인간, 예를 들면, 인류, 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.

[0050] 본 발명에서, "종양 조직 샘플"은 일차 ER+ 유방암 종양으로부터 유래된 조직 샘플로서 이해된다. 상기 샘플은 통상적인 방법, 예를 들면, 관련 의학 기법에서 당업자에 의해 잘 공지된 방법을 이용하는 생검에 의해 수득될 수 있다. 생검 샘플을 수득하는 방법은 종양을 큰 조각으로 분할하는 방법, 미세절개, 또는 당업계에 공지된 다른 세포 분리 방법을 포함한다. 종양 세포는 작은 게이지 바늘을 사용한 흡인을 통한 세포학적 방법에 의해 수득될 수도 있다. 샘플 보존 및 취급을 단순화하기 위해, 샘플을 포르말린에서 고정시키고 파라핀 내에 함침시킬 수 있거나 먼저 동결시킨 후 빠른 동결을 가능하게 하는 극저온 매질에 침지시킴으로써 조직 동결 매질, 예컨대, OCT 화합물 내에 함침시킬 수 있다.

[0051] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준을 측정함으로써 정량될 수 있다.

[0052] 이를 위해, 조직 또는 세포 구조를 물리적으로 또는 기계적으로 파괴하여 세포내 성분들을 핵산 제조용 수성 또는 유기성 용액 내로 방출시키도록 생물학적 샘플을 처리할 수 있다. 핵산은 당업자에 의해 공지된 상업적으로 이용가능한 방법에 의해 추출된다(Sambroock, J., *et al*., "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.)

[0053] 따라서, c-MAF 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 전사로부터 발생된 RNA(메신저 RNA 또는 mRNA), 또는 대안적으로 상기 유전자의 상보적인 DNA(cDNA)로부터 정량될 수 있다. 따라서, 본 발명의 구체적인 실시양태에서, c-MAF 유전자 발현 수준의 정량은 c-MAF 유전자의 메신저 RNA 또는 상기 mRNA의 단편, c-MAF 유전자의 상보적인 DNA 또는 상기 cDNA의 단편, 또는 이들의 혼합물의 정량을 포함한다.

[0054] 사실상 임의의 통상적인 방법이 본 발명의 범위 내에서 c-MAF 유전자에 의해 코딩된 mRNA 수준 또는 이의 상응하는 cDNA의 수준을 검출하고 정량하는 데에 이용될 수 있다. 비-한정적 예로서, 상기 유전자에 의해 코딩된

mRNA 수준은 통상적인 방법, 예를 들면, mRNA 증폭 및 상기 mRNA 증폭 생성물의 정량을 포함하는 방법, 예컨대, 전기영동 및 염색, 또는 대안적으로 서던 블롯 및 적합한 프로브의 사용, 노던 블롯 및 관심있는 유전자(c-MAF)의 mRNA 또는 이의 상응하는 cDNA의 특이적 프로브의 사용, S1 핵산분해효소(nuclease)를 사용한 맵핑, RT-PCR, 혼성화, 마이크로어레이 등, 바람직하게는, 적합한 마커를 사용한 실시간 정량 PCR의 이용을 통해 정량될 수 있다. 마찬가지로, c-MAF 유전자에 의해 코딩된 상기 mRNA에 상응하는 cDNA 수준도 통상적인 기법의 이용을 통해 정량될 수 있고, 이 경우 본 발명의 방법은 상응하는 mRNA의 역전사(RT)를 통해 상응하는 cDNA를 합성한 후 증폭하고 상기 cDNA 증폭 생성물을 정량하는 단계를 포함한다. 발현 수준을 정량하는 통상적인 방법은 예를 들면, (상기 인용된) 문헌(Sambrook *et al.*, 2001)에서 찾을 수 있다.

[0055] 구체적인 실시양태에서, c-MAF 유전자 발현 수준은 정량 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA 또는 RNA 어레이에 의해 정량된다.

[0056] 추가로, c-MAF 유전자 발현 수준은 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질, 즉 c-MAF 단백질(c-MAF)[NCBI, 수탁번호 O75444], 또는 c-MAF 단백질의 임의의 기능적 등가 변이체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수도 있다. 2개의 c-MAF 단백질 동형체, 즉 403개의 아미노산으로 구성된 α 동형체(NCBI, NP_005351.2)(서열번호 4) 및 373개의 아미노산으로 구성된 β 동형체(NP_001026974.1)(서열번호 5)가 존재한다. c-MAF 유전자 발현 수준은 c-MAF 단백질 동형체들 중 임의의 동형체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수 있다. 따라서, 구체적인 실시양태에서, c-MAF 유전자에 의해 코딩된 단백질 수준의 정량은 c-MAF 단백질의 정량을 포함한다.

[0057] 본 발명의 내용에서, "c-MAF 단백질의 기능적 등가 변이체"는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존된 또는 비-보존된 아미노산 잔기(바람직하게는 보존된 아미노산 잔기)로 치환되어 있는 c-MAF 단백질의 변이체(서열번호 4 또는 서열번호 5)(이때, 이러한 치환된 아미노산 잔기는 유전 코드에 의해 코딩된 아미노산 잔기일 수 있거나 유전 코드에 의해 코딩된 아미노산 잔기가 아닐 수 있음), 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 결실을 포함하고 c-MAF 단백질과 동일한 기능, 즉 DNA 결합 전사 인자로서 작용하는 기능을 갖는 변이체로서 이해된다. c-MAF 단백질의 변이체는 국제 특허출원 공보 제WO2005/046731호에서 밝혀진 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-MAF의 성능; 국제 특허출원 공보 제WO2008/098351호에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응성 영역(MARE 또는 c-MAF 반응성 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에서 레포터 유전자의 전사 성능을 차단하는 소위 억제제의 성능; 또는 미국 특허출원 공보 제2009048117A호에 기재된 바와 같이 NFATc2 및 c-MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신(ionomycin)을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 조절 하에서 레포터 유전자 발현을 차단하는 소위 억제제의 성능에 기초한 방법의 이용을 통해 확인될 수 있다.

[0058] 본 발명에 따른 변이체는 바람직하게는 c-MAF 단백질 동형체들 중 임의의 동형체의 아미노산 서열에 대해 50% 이상, 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상, 90% 이상, 91% 이상, 92% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상의 서열 유사성을 갖는다. 앞서 정의된 변이체와 특정 c-MAF 단백질 서열 사이의 유사성 정도는 당업자에 의해 널리 공지된 알고리즘 및 컴퓨터 프로세스의 이용을 통해 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)]의 이용을 통해 측정된다.

[0059] c-MAF 단백질 발현 수준은 대상체로부터의 샘플에서 상기 단백질을 검출하고 정량하는 것을 가능하게 하는 임의의 통상적인 방법에 의해 정량될 수 있다. 비-한정적 예로서, 상기 단백질 수준은 예를 들면, c-MAF 결합 성능을 갖는 항체(또는 항원성 결정인자를 함유하는 이의 단편)의 사용 및 형성된 복합체의 후속 정량에 의해 정량될 수 있다. 이들 분석에서 사용되는 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. 비표지된 항체(일차 항체) 및 표지된 항체(이차 항체)를 사용하는, 본 발명에서 이용될 수 있는 광범위한 공지된 분석들이 존재하고, 이들 기법들은 웨스턴 블롯 또는 웨스턴 전달, ELISA(효소 연결된 면역흡착 분석), RIA(방사성면역분석), 경쟁 EIA(경쟁 효소 면역분석), DAS-ELISA(이중 항체 샌드위치 ELISA), 면역세포화학 및 면역조직화학 기법, 특이적 항체를 포함하는 단백질 마이크로어레이 또는 바이오칩의 사용에 기초한 기법 또는 딥스틱(dipsticks)과 같은 형식의 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, 높은 친화성으로 c-MAF 단백질에 결합하는 것으로 공지된 임의의 항체 또는 시약을 사용하여 상기 단백질의 양을 검출할 수 있다. 그럼에도 불구하고, 항체, 예를 들면, 다중클론 혈청, 하이브리도마의 상

청액 또는 단일클론 항체, 항체 단편, Fv, Fab, Fab' 및 $F(ab')_2$, scFv, 인간화된 디아바디, 트리아바디, 테트라바디 및 항체들의 사용이 바람직하다. 본 발명의 내용에서 사용될 수 있는 시판되는 상업적인 항-c-MAF 단백질 항체, 예를 들면, 항체 ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817 및 ab77071(애브캄 피엘씨(Abcam plc), 영국 캠브리지 씨비4 0에프엘 사이언스 파크 330 소재), AbD 세로텍(Serotec)의 075444 단일클론 항체(마우스 항-인간 MAF 아지드 무함유 단일클론 항체, 비접합됨, 클론 6b8) 등이 존재한다. 항-c-MAF 항체를 제공하는 많은 상업적인 회사, 예컨대, 애브노바 코포레이션(Abnova Corporation), 베틸 레이보레이토리스(Bethyl Laboratories), 바이오월드 테크놀로지(Bioworld Technology), 진텍스(GeneTex) 등이 존재한다.

[0060] 구체적인 실시양태에서, c-MAF 단백질 수준은 웨스턴 블롯, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 정량된다.

[0061] 본 발명의 제1 방법은 대상체로부터의 종양 샘플에서 수득된 c-MAF 유전자 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 제2 단계를 포함한다.

[0062] 일단 ER+ 유방암을 갖는 대상체로부터의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 대조군 샘플과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 상기 대조군 샘플에서의 그의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다는 결론이 도출될 수 있다.

[0063] c-MAF 유전자 발현 수준의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가져야 한다. 대조군 샘플의 정확한 성질은 분석될 종양의 유형에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 진단이 평가될 경우, 기준 샘플은 전이되지 않은 ER+ 유방암을 갖는 대상체로부터의 종양 조직 샘플이거나 전이되지 않은 ER+ 유방암을 갖는 대상체로부터의 생검 샘플 중의 종양 조직 수집물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응한다.

[0064] 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단으로부터 동등한 양의 샘플을 조합함으로써 수득된다. 일반적으로, 전형적인 기준 샘플은 임상적으로 충분히 입증되어 있고 전이의 부재가 잘 특징규명되어 있는 대상체로부터 수득될 것이다. 이러한 샘플에서, 생체마커(c-MAF 유전자)의 정상 농도(기준 농도)는 예를 들면, 기준 집단에 대한 평균 농도를 제공함으로써 측정될 수 있다. 상기 마커의 기준 농도를 측정할 때 다양한 사항들이 고려된다. 이러한 고려사항들 중에는 환자의 연령, 체중, 성별, 일반적인 신체적 상태 등이 있다. 예를 들면, 바람직하게는 상기 고려사항들에 따라, 예를 들면, 다양한 연령 카테고리에 따라 분류된 2명 이상, 10명 이상, 100명 이상 내지 바람직하게는 1000명 초과의 대상체들로 구성된 동등한 양의 군들이 기준 군으로서 간주된다. 기준 수준이 유도된 샘플 수집물은 바람직하게는 연구의 대상 환자와 동일한 유형의 암을 앓고 있는 대상체에 의해 형성될 것이다.

[0065] 일단 이 중간 값이 확립되면, 이 중간 값을 갖는 환자로부터의 종양 조직에서 발현된 이 마커의 수준은 비교되어 "증가된" 발현 수준으로 배정될 수 있다. 대상체들 사이의 가변성(예를 들면, 연령, 인종 등을 언급하는 양태)으로 인해, c-MAF 발현의 절대적인 기준 값을 확립하는 것은 매우 어렵다(사실상 불가능하지 않은 경우). 따라서, 구체적인 실시양태에서, c-MAF 발현의 "증가된" 또는 "감소된" 발현에 대한 기준 값은 상기 언급된 방법들 중 임의의 방법에 의해 충분히 입증된 질환을 갖는 대상체로부터 단리된 1개 또는 수개의 샘플들에서 c-MAF 발현 수준에 대한 분석을 수행하는 단계를 포함하는 통상적인 수단에 의한 백분위수의 계산에 의해 결정된다. 그 다음, c-MAF의 "감소된" 수준은 바람직하게는 c-MAF 발현 수준이 정상 집단에서의 50번째 백분위수 이하인(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) 샘플에 배정될 수 있다. 그 다음, "증가된" c-MAF 유전자 발현 수준은 바람직하게는 c-MAF 유전자 발현 수준이 정상 집단에서의 50번째 백분위수 이상인(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) 샘플에 배정될 수 있다.

[0066] 본 발명에서, "증가된 발현 수준"은 기준 샘플 또는 대조군 샘플에서의 c-MAF 유전자의 수준보다 더 높은 c-MAF 유전자의 수준을 언급할 때 발현 수준으로서 이해된다. 특히, 샘플은 기준 샘플에서의 발현 수준이 환자로부터 단리된 샘플에 비해 적어도 1.1배, 1.5배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 이보다 더 높을 때 높은 c-MAF 발현 수준을 갖는 것으로 간주될 수 있다.

[0067] 본 발명의 내용에서, 대상체가 앓고 있는 ER+ 유방암이 신체의 다른 장기, 구체적인 실시양태에서 골로 전이되었을 때 "대상체가 전이에 대한 양성 진단을 갖는다"고 이해된다.

[0068] 보다 바람직한 실시양태에서, 골로의 전이는 골용해성 골 전이이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 표현 "골용해

성 골 전이"는 골 흡수(골 밀도의 점진적인 상실)가 종양 세포에 의한 파골세포 활성의 자극으로부터 발생된 전이의 근처에서 일어나고 중증 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 발생된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 한 유형을 지칭한다.

[0069] 다른 한편으로, 본 발명에서 대상체가 앓고 있는 ER+ 유방암이 추후 전이할 확률이 높을 때 "대상체는 전이를 발생시킬 보다 큰 성향을 갖는다"고 이해된다.

[0070] 당업자는 일차 유방 종양이 전이할 성향의 예측이 확인될 모든 대상체들에 대해(즉, 100%의 대상체들에 대해) 정확하다는 것을 의도하는 것이 아님을 이해할 것이다. 그럼에도 불구하고, 상기 용어는 대상체(예를 들면, 코호트 연구에서 한 코호트)의 통계적으로 유의한 부분의 확인을 가능하게 할 것을 요구한다. 당업자는 한 부분이 통계적으로 유의한지를 다양한 잘 공지된 통계적 평가 수단, 예를 들면, 신뢰구간의 측정, p 값의 측정, 스튜던트(Student's) T 검정, 만-휘트니(Mann-Whitney) 검정 등을 이용하여 단순한 방식으로 확인할 수 있다. 세부사항은 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, 한 집단의 대상체들의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상이 본 발명의 방법에 의해 적합하게 확인될 수 있다.

[0071] ER+ 유방 종양을 갖는 환자에서 본 발명의 맞춤형 요법을 디자인하는 방법

[0072] 당업계의 기술수준에서 공지되어 있는 바와 같이, 암을 앓고 있는 대상체에게 투여되는 치료는 상기 암이 악성 종양인지, 즉 전이를 경험할 높은 확률을 갖는지 아니면 상기 암이 양성 종양인지에 의해 좌우된다. 첫 번째 가정에서 선택되는 치료는 전신 치료, 예컨대, 화학요법이고, 두 번째 가정에서 선택되는 치료는 국소 치료, 예컨대, 방사선요법이다.

[0073] 따라서, 본 발명에서 기재된 바와 같이, 유방암 세포에서의 c-MAF 유전자 과다발현이 전이의 존재와 관련되는 한, c-MAF 유전자 발현 수준은 상기 암을 앓고 있는 대상체를 위한 가장 적합한 치료를 결정할 수 있게 한다.

[0074] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은

[0075] (i) ER+ 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0076] (ii) 먼저 수득된 상기 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

[0077] 를 포함하는, ER+ 유방암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제2 방법)에 관한 것으로서, 이때 상기 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받을 가능성이 있다.

[0078] 구체적인 실시양태에서, 전이는 골 전이이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0079] 용어 및 표현 "대상체", "ER+ 유방암", "종양 조직 샘플", "전이", "발현 수준의 측정", "c-MAF 유전자", "증가된 발현 수준" 및 "대조군 샘플"은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세히 기재되어 있고 본 발명의 제2 방법 및 제3 방법에 동등하게 적용될 수 있다.

[0080] 본 발명의 제2 방법은 ER+ 유방암을 앓고 있는 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 제1 단계를 포함한다.

[0081] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제2 방법은 단일 마커로서 c-MAF 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다(즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다).

[0082] 본 발명의 제2 방법의 경우, 샘플은 대상체의 일차 종양 조직 샘플이다. 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 수득된 c-MAF 유전자 발현 수준은 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교된다. c-MAF 유전자 발현 수준의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 관련되어야 한다. 대조군 샘플의 정확한 성질은 분석될 종양의 유형에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 기준 샘플은 전이되지 않은 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플이거나 전이되지 않은 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중의 종양 조직 수집물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응한다.

[0083] 일단 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 대조군 샘플과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 그의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 전이를 예방하고/하거나(상기 대상체가 아직 전이를 경험하지 않은 경우) 치료하는(상기 대상체가 이미 전이를 경험한 경우) 것을 목적으로 하는 치료

를 받기에 적합하다는 결론이 도출될 수 있다.

[0084] 암이 전이된 경우, 화학요법, 호르몬 치료, 면역요법 또는 이들의 조합을 포함하나 이들로 한정되지 않는 전신 치료가 이용된다. 추가로, 방사선요법 및/또는 수술이 이용될 수 있다. 치료의 선택은 일반적으로 일차 암의 유형, 크기, 전이의 위치, 환자의 연령 및 일반적인 건강, 및 이전에 이용된 치료의 유형에 의해 좌우된다.

[0085] 전신 치료는 전체 신체에 도달하는 치료이다:

[0086] - 화학요법은 암 세포를 파괴하는 약제의 사용이다. 상기 약제는 일반적으로 경구 또는 정맥내 경로를 통해 투여된다. 종종, 화학요법은 방사선 치료와 함께 이용된다.

[0087] - 호르몬요법은 몇몇 호르몬들이 몇몇 암 성장을 촉진한다는 사실에 기초한다. 예를 들면, 여성에서 난소에 의해 생성된 에스트로겐은 종종 유방암 성장을 촉진한다. 이들 호르몬들의 생성을 중단하는 여러 방법이 있다. 한 방법은 이들을 생성하는 장기를 제거하는 것이다: 여성의 경우 난소, 남성의 경우 정소. 보다 빈번하게는, 이들 장기들이 호르몬을 생성하는 것을 방해하거나 호르몬이 암 세포에 작용하는 것을 방해하는 약제가 사용될 수 있다.

[0088] - 면역요법은 암과 싸우는 환자의 면역 시스템 자체를 보조하는 치료이다. 환자의 전이를 치료하기 위해 사용되는 여러 유형의 면역요법이 존재한다. 이들은 사이토카인, 단일클론 항체 및 항종양 백신을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0089] <u>골 전이를 갖는 유방암 환자에서 본 발명의 맞춤형 요법을 디자인하는 방법</u>

[0090] 본 발명의 발명자들은 높은 골 전이 야기 성능을 갖고 c-MAF를 과다발현하는 일차 유방 종양으로부터 유도된 세포주의 컨디셔닝된 배지가 c-MAF를 과다발현하지 않는 세포보다 더 높은 정도로 파골세포 형성을 유도할 수 있다는 것을 명확히 보여주었다. 따라서, 골로 이미 전이되어 있고 c-MAF 수준이 상승되어 있는 ER- 유방암을 앓고 있는 환자는 증가된 파골세포 활성에 의해 야기되는 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 치료로부터 특히 이익을 얻을 수 있다.

[0091] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은

[0092] (i) 골 전이와 함께 ER- 유방암을 갖는 대상체의 골로부터의 전이성 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0093] (ii) 먼저 수득된 상기 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

[0094] 를 포함하는, 골 전이와 함께 ER- 유방암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제3 방법)에 관한 것으로서, 이때 상기 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 요법을 받을 가능성이 있다.

[0095] 용어 및 표현 "대상체", "ER+ 유방암", "종양 조직 샘플", "전이", "발현 수준의 측정", "c-MAF 유전자", "증가된 발현 수준" 및 "대조군 샘플"은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세히 기재되어 있고 본 발명의 제2 방법 및 제3 방법에 동등하게 적용될 수 있다.

[0096] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0097] 본 발명의 제3 방법은 유방암을 앓고 있는 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 제1 단계를 포함한다. 본 발명의 제3 방법의 경우, 샘플은 골 전이로부터의 조직 샘플이다.

[0098] 바람직한 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).

[0099] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 수득된 c-MAF 유전자 발현 수준은 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교된다. c-MAF 유전자 발현 수준의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가져야 한다. 대조군 샘플의 정확한 성질은 분석될 종양의 유형에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제3 방법을 포함하는 경우, 기준 샘플은 전이를 앓고 있지 않은 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플이거나 전이를 앓고 있지 않은 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중의 종양 조직 수집물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응한다.

[0100] 일단 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 대조군 샘플과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 그의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체는 골 분해를 방지하거나 예방하는 것을 목

적으로 하는 요법을 받을 가능성이 있다는 결론이 도출될 수 있다.

[0101] 본원에서 사용된 바와 같이, "골 분해를 방지하거나 예방하는 물질(agent)"은 조골세포 증식을 자극하거나 파골세포 증식을 억제함으로써 골 분해를 치료하거나 중단할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. 골 분해를 방지하고/하거나 예방하는 데에 사용되는 물질의 예시적 예로는 하기 물질들이 있으나 이들로 한정되지 않는다:

[0102] - 부갑상선 호르몬(PTH) 또는 이의 재조합 형태(PTH의 아미노산 1 내지 34에 상응하는 테리파라티드(teriparatide)). 이 호르몬은 조골세포를 자극하고 그들의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.

[0103] - 스트론튬 라넬레이트: 대안적인 경구 치료제이고 조골세포 증식을 자극하고 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 약제"(DABAs)로 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.

[0104] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기작과 관계없이 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히, 에스트로겐 프로게스타겐, 에스트라디올, 드롤록시펜, 랄록시펜, 라소폭시펜, TSE-424, 타목시펜, 이독시펜, LY353381, LY117081, 토레미펜, 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.

[0105] - 칼시토닌: 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.

[0106] - 비스포스포네이트: 골 흡수 및 재흡수를 갖는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 갖는 암(유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 갖거나 갖지 않음)의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품들로 구성된 군이다. 본 발명의 제3 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 있으나 이들로 한정되지 않는다.

[0107] - "카텝신(cathepsin) K 억제제"는 카텝신 K 시스테인 단백질분해효소 활성을 방해하는 화합물을 지칭한다. 카텝신 K 억제제의 비-한정적 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(노바티스 파마 게엠베하(Novartis Pharma GMBH)의 명칭 하에 국제 특허출원 공보 제WO 03/020278호에 기재됨), 국제 특허출원 공보 제WO 03/020721호(노바티스 파마 게엠베하) 및 국제 특허출원 공보 제WO 04/000843호(아스트라제네카 아베(ASTRAZENECA AB))에 기재된 피롤로-피리미딘뿐만 아니라, 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.

[0108] - 본원에서 사용된 바와 같이, "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. RANKL은 간질의 조골세포 막 및 T-림프구 세포의 표면 상에서 발견되고, 이들 T-림프구 세포는 RANKL을 분비하는 성능을 나타내는 유일한 세포이다. 그의 주요 기능은 골 흡수에 관여하는 세포인 파골세포의 활성화이다. RANKL 억제제는 RANKL과 그의 수용체(RANK)의 결합을 차단함으로써, RANK에 의해 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:

[0109] 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, 또는 대안적으로 신호 펩티드가 제거된 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다.

[0110] o RANKL 결합 성능을 갖는 오스테오프로테게린(osteoprotegerin) 또는 이의 변이체;

[0111] o RANKL 특이적 안티센스 분자;

[0112] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임; 및

[0113] o 특이적 항-RANKL 항체. "항-RANKL 항체 또는 RANKL에 대해 유도된 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는 핵 인자 κB(RANKL)에 대한 활성화 수용체의 리간드에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에 의해 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법의 이용을 통해 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 동물을 억제될 단백질로 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein *et al.*, Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법의 이용을 통해 제조된다. 본 발명의 내용에서 적합

한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, 단편 "Fab", "$F(ab')_2$" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다.

[0114] 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 데노수맙(Denosumab)(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, CAS 번호 615258-40-7)이다. 본 발명의 내용에서, 데노수맙은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 단일클론 항체이다(이것은 RANK 수용체에 결합하지 않는다).

[0115] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.

[0116] 대안적으로, 상기 언급된 물질들 중 하나 초과의 물질들이 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 병용되거나 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬 치료와 병용될 수 있는 병용 치료가 수행될 수 있다.

[0117] c-MAF 유전자의 증폭의 검출에 기초하여 유방암에서 전이를 진단하거나 예후하는 방법

[0118] 본 발명의 발명자들은 높은 전이 성능을 갖는 ER+ 유방 종양으로부터 유도된 세포주가 c-MAF 유전자에 상응하는 좌위를 포함하는 좌위 16q22-q24의 증폭 및 c-MAF 유전자의 증폭을 보인다는 것을 확인하였다.

[0119] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자가 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나(이하, 본 발명의 제4 진단 방법) 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 발달시킬 성향을 예후하는 시험관내 방법에 관한 것으로서, 이때 상기 유전자가 대조군 샘플에 비해 증폭되어 있는 경우, 상기 대상체는 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다.

[0120] 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 제4 방법에서 진단된 유방암은 ER+ 또는 ER- 유방암이다.

[0121] 용어 "c-MAF 유전자", "전이", "종양 조직 샘플", "ER+ 유방암", "ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 전이의 진단", "ER+ 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 발달시킬 성향의 예후", "대상체", "환자", "전이의 양성 진단을 갖는 대상체", "전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는 대상체"는 본 발명의 제1 방법의 내용에서 상세히 기재되어 있고 본 발명의 제4 방법에 동등하게 적용될 수 있다.

[0122] 구체적인 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 증폭을 측정함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는, 상기 염색체 영역(이의 증폭은 c-MAF 유전자의 증폭의 존재를 표시함)은 c-MAF 유전자를 포함하는 좌위 16q22-q24이다. 좌위 16q22-q24는 16번 염색체의 긴 아암(arm)에서 밴드 22와 밴드 24 사이의 범위에 위치한다. 이 영역은 NCBI 데이터베이스에서 콘티그(contig) NT_010498.15 및 NT_010542.15에 상응한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자에 대해 특이적인 프로브의 사용을 통해 측정될 수 있다.

[0123] 본 발명의 제4 진단/예후 방법은 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자가 증폭되어 있는지를 확인하는 제1 단계를 포함한다. 이를 위해, 상기 종양 샘플에서 c-MAF 유전자의 증폭을 대조군 샘플과 비교한다.

[0124] 본원에서 이해된 바와 같이, 용어 "유전자의 증폭"은 다양한 카피의 유전자 또는 유전자 단편이 개별 세포 또는 세포주에서 형성되는 과정을 지칭한다. 유전자의 카피는 반드시 동일한 염색체에 위치하지 않는다. 중복된 영역은 종종 "앰플리콘(amplicon)"으로 지칭된다. 통상적으로, 생성된 mRNA의 양, 즉 유전자 발현 수준도 특정 유전자의 카피 수에 비례하여 증가한다.

[0125] 구체적인 실시양태에서, 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 발달시킬 성향을 예후하는 본 발명의 제4 방법은 상기 대상체의 종양 조직 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, 상기 대상체는 전이의 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다.

[0126] 대조군 샘플은 전이를 앓고 있지 않은 (대상체가 앓고 있는 암의 유형에 따라) ER+ 또는 ER- 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플을 지칭하거나, 또는 전이를 앓고 있지 않은 ER+ 또는 ER- 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중의 종양 조직 수집물에서 측정된 c-MAF 유전자 카피 수의 중간 값에 상응한다. 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단으로부터 동등한 양의 샘플들을 조합함으로써 수득된다. c-MAF 유전자 카피 수가 대조군 샘플

에서의 상기 유전자의 카피 수에 비해 증가되어 있는 경우, 대상체는 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다.

[0127] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 카피 수"는 세포 내의 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 2개의 카피(염색체 쌍의 구성원 각각에서 1개의 카피)이다. 유전자 카피 수는 종종 세포 집단의 샘플들로부터 수득된 유전자 카피 수의 절반을 포함한다.

[0128] 본 발명에서, "증가된 유전자 카피 수"는 c-MAF 유전자 카피 수가, 기준 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피 수를 초과하는 경우로서 이해된다. 특히, 카피 수가 c-MAF 유전자의 2개 초과의 카피, 예를 들면, 3개, 4개, 5개, 6개, 7개, 8개, 9개 또는 10개 카피, 심지어 10개 초과의 카피일 때 샘플이 증가된 c-MAF 카피 수를 갖는다고 간주될 수 있다.

[0129] 구체적인 실시양태에서, 증폭 또는 카피 수는 인시츄 혼성화 또는 PCR에 의해 측정된다.

[0130] c-MAF 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 증폭되어 있는지를 확인하는 방법은 당업계의 기술수준에서 널리 공지되어 있다. 상기 방법은 인시츄 혼성화(ISH)(예컨대, 형광 인시츄 혼성화(FISH), 발색 인시츄 혼성화(CISH) 또는 은 인시츄 혼성화(SISH)), 게놈 비교 혼성화 또는 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량 PCR)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 임의의 ISH 방법의 경우, 증폭 또는 카피 수는 염색체 또는 핵에서 형광 점, 착색된 점 또는 은을 갖는 점의 수를 카운팅함으로써 측정될 수 있다.

[0131] 형광 인시츄 혼성화(FISH)는 염색체에서 특정 DNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하고 위치를 확인하는 데에 이용되는 세포유전학 기법이다. FISH는 염색체의 몇몇 부분에만 결합하는 형광 프로브들을 사용하는데, 이때 상기 프로브들은 상기 몇몇 부분에 대해 고도의 서열 유사성을 보인다. 전형적인 FISH 방법에서, DNA 프로브는 전형적으로 효소 반응, 예컨대, 닉(nick) 번역 또는 PCR의 이용을 통해 DNA 내로 도입되는 플루오르-dUTP, 디곡시제닌-dUTP, 바이오틴-dUTP 또는 햅텐-dUTP의 형태로 존재하는 형광 분자 또는 햅텐으로 표지된다. 유전 물질(염색체)을 함유하는 샘플은 유리 슬라이드 상에 배치되고 포름아미드 처리에 의해 변성된다. 그 후, 표지된 프로브는 당업자에 의해 결정될 적합한 조건 하에서 유전 물질을 함유하는 샘플과 혼성화된다. 혼성화 후, 상기 샘플은 (불소로 표지된 프로브의 경우) 직접적으로 가시화되거나 (햅텐을 검출하기 위해 형광 표지된 항체를 사용함으로써) 간접적으로 가시화된다.

[0132] CISH의 경우, 프로브는 디곡시제닌, 바이오틴 또는 플루오레세인으로 표지되고 적합한 조건 하에서 유전 물질을 함유하는 샘플과 혼성화된다.

[0133] DNA에 결합할 수 있는 임의의 표식 또는 표지 분자를 사용하여 본 발명의 제4 방법에서 사용되는 프로브를 표지함으로써 핵산 분자의 검출을 가능하게 할 수 있다. 표지하기 위한 표지의 예로는 방사성 동위원소, 효소 기질, 보조인자, 리간드, 화학발광제, 형광단, 햅텐, 효소 및 이들의 조합물이 있으나 이들로 한정되지 않는다. 표지 방법 및 상이한 목적을 위한 적합한 표지의 선택에 대한 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 찾을 수 있다.

[0134] c-MAF 유전자의 증폭을 직접적으로 측정하거나 좌위 16q22-q24의 증폭을 측정한 후, 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 증폭과 비교함으로써 일단 증폭의 존재가 확인되면, c-MAF 유전자에서의 증폭이 검출된 경우 이것은 대상체가 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다는 사실을 표시한다.

[0135] c-MAF 유전자의 증폭의 확인은 전이를 앓고 있지 않은 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 측정된 c-MAF 유전자의 증폭 수준에 상응하거나 전이를 앓고 있지 않은 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중의 종양 조직 수집물에서 측정된 c-MAF 유전자의 증폭의 중간 값에 상응하는 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가질 필요가 있다. 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단으로부터 동등한 양의 샘플을 조합함으로써 수득된다. 일반적으로, 전형적인 기준 샘플은 임상적으로 충분히 입증되어 있고 전이의 부재가 잘 특징규명되어 있는 대상체로부터 수득될 것이다. 기준 수준이 유도된 샘플 수집물은 바람직하게는 연구의 대상 환자와 동일한 유형의 암을 앓고 있는 대상체들로 구성될 것이다. 일단 이 중간 값이 확립되면, 환자의 종양 조직에서 c-MAF의 증폭 수준은 이 중간 값과 비교될 수 있으므로, 증폭이 존재하는 경우 대상체는 전이의 양성 진단 또는 전이를 발달시킬 보다 큰 성향을 갖는다.

[0136] 바람직한 실시양태에서, 전이는 골 전이이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 골 전이이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 표현 "골용해성 골 전이"는 골 흡수(골 밀도의 점진적인 상실)가 종양 세포에 의한

파골세포 활성의 자극으로부터 발생된 전이의 근처에서 일어나고 중증 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 발생된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 한 유형을 지칭하다.

[0137] 본 발명의 치료 방법

[0138] c-MAF 억제제를 사용한 골 전이의 치료

[0139] 본 발명의 발명자들은 상기 목적을 달성하기 위해 실험적 이종이식 모델을 이용하여 유방암 세포에서의 c-MAF 발현의 억제가 상기 세포로부터의 골 전이의 형성에 있어서 통계적으로 유의한 감소를 야기한다는 것을 명확히 보여주었다. 대조적으로, 동일한 시스템에서 종양 세포에서의 c-MAF 과다발현은 상기 세포의 전이 성능을 증가시킨다. 따라서, c-MAF 유전자 발현 억제제 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 억제제는 유방암 전이의 치료 및/또는 예방을 위해 사용될 수 있다.

[0140] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암 전이의 치료 및/또는 예방을 위한 의약품의 제조에 있어서 c-MAF 유전자 발현 억제제 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 억제제(이하, 본 발명의 억제제)의 용도에 관한 것이다. 대안적으로, 본 발명은 유방암 전이의 치료 및/또는 예방을 위해 사용될 c-MAF 유전자 발현 억제제 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 억제제에 관한 것이다. 대안적으로, 본 발명은 c-MAF 억제제를 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 상기 대상체에서 유방암 전이를 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0141] 본원에서 사용된 바와 같이, "c-MAF 억제제"는 c-MAF 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(c-MAF 유전자 전사를 중단하고/하거나 c-MAF 유전자 발현으로부터 발생된 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 국제 특허출원 공보 제WO2005/046731호에서 밝혀진 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-MAF의 성능을 차단하는 소위 억제제의 성능; 국제 특허출원 공보 제WO2008/098351호에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응 영역(MARE 또는 c-MAF 반응성 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에서 레포터 유전자의 전사 성능을 차단하는 소위 억제제의 성능; 또는 미국 특허출원 공보 제2009048117A호에 기재된 바와 같이 NFATc2 및 c-MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 조절 하에서 레포터 유전자의 발현을 차단하는 소위 억제제의 성능에 기초한 방법의 이용을 통해 확인될 수 있다.

[0142] 비-한정적 예로서, 본 발명에서 사용되기에 적합한 c-MAF 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오티드, 간섭 RNA(siRNA), 촉매 RNA 또는 특이적 리보자임 및 억제 항체를 포함한다.

[0143] 안티센스 올리고뉴클레오티드

[0144] 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 통상적인 염기 상보성을 통해, 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 당업계에서 일반적으로 이용되는 다양한 기법들을 지칭하고 이들은 올리고뉴클레오티드 서열에의 특이적 결합에 기초한 임의의 방법을 포함한다.

[0145] 본 발명의 안티센스 구축물은 예를 들면, 세포 내에서 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 발현의 억제를 일으키는, 생체외에서 발생된 올리고뉴클레오티드 프로브이다. 이러한 올리고뉴클레오티드 프로브는 바람직하게는 내인성 핵산 분해효소, 예를 들면, 핵산말단분해효소(exonuclease) 및/또는 핵산내부분해효소(endonuclease)에 대한 내성을 나타냄으로써 생체 내에서 안정한 변형된 올리고뉴클레오티드이다. 안티센스 올리고뉴클레오티드로서 사용될 핵산 분자의 예는 포스포르아미데이트, 포스포티오네이트 및 메틸 포스포네이트의 DNA 유사체이다(미국 특허 제5176996호, 제5264564호 및 제5256775호 또한 참조). 추가로, 안티센스 치료에서 유용한 올리고머를 구축하는 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)에 검토되어 있다.

[0146] 안티센스 올리고뉴클레오티드와 관련하여, 번역의 출발 부위, 예를 들면, 표적 유전자의 -10과 +10 사이의 부위로부터 유도된 올리고데옥시리보뉴클레오티드 영역이 바람직하다. 안티센스 방법은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA에 상보적인 올리고뉴클레오티드(DNA 또는 RNA) 디자인을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 전사된

mRNA에 결합될 것이고, 번역은 방해될 것이다.

[0147] mRNA의 5' 말단, 예를 들면, 출발 코돈 AUG까지 포함하는 비-번역 5' 서열에 상보적인 올리고뉴클레오티드는 번역을 억제하는 가장 효율적인 방식으로 작용해야 한다. 그럼에도 불구하고, mRNA의 비-번역 3' 서열에 상보적인 서열도 mRNA 번역의 억제에 효율적이라는 것이 최근에 밝혀졌다(Wagner, Nature 372: 333, 1994). 따라서, 안티센스 방법에서 상보적인 올리고뉴클레오티드는 유전자의 비-코딩 영역인 비-번역 5' 또는 3' 영역에서 사용되어 해당 mRNA의 번역을 억제할 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. 이들이 mRNA의 5' 영역, 3' 영역 또는 코딩 영역과 혼성화하도록 디자인된 경우, 안티센스 핵산은 6개 이상의 뉴클레오티드 길이를 가져야 하고 바람직하게는 대략 100개 미만, 보다 바람직하게는 대략 50개, 25개, 17개 또는 10개 미만의 뉴클레오티드 길이를 가져야 한다.

[0148] 바람직하게는, 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오티드의 성능을 정량하기 위해 시험관내 연구를 먼저 수행한다. 바람직하게는, 이들 연구는 상기 올리고뉴클레오티드의 안티센스 유전자 억제와 비-특이적 생물학적 효과를 구별시켜주는 대조군을 사용한다. 또한, 바람직하게는, 이들 연구는 표적 RNA 또는 단백질의 수준을 RNA 또는 단백질의 내부 대조군의 수준과 비교하였다. 안티센스 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수득한 결과는 대조군 올리고뉴클레오티드를 사용하여 수득한 결과와 비교될 수 있다. 바람직하게는, 대조군 올리고뉴클레오티드는 분석될 올리고뉴클레오티드와 거의 동일한 길이를 갖고 올리고뉴클레오티드 서열은 표적 서열과의 특이적 혼성화를 방해하기 위해 필요하다고 간주되는 수준을 초과하는 수준만큼 안티센스 서열과 상이하지 않다.

[0149] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA, 또는 이들의 키메라 혼합물, 유도체 또는 변형된 버전일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 예를 들면, 분자의 안정성, 그의 혼성화 성능 등을 개선하기 위해 염기 기, 당 기 또는 포스페이트 주쇄에서 변형될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오티드는 (예를 들면, 이들을 숙주 세포의 수용체로 향하게 하는) 다른 결합된 기, 예컨대, 펩티드, 또는 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 촉진하는 물질, 또는 인터칼레이팅제(예를 들면, 문헌(Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988) 참조)를 포함할 수 있다. 이를 위해, 상기 올리고뉴클레오티드는 또 다른 분자, 예를 들면, 펩티드, 수송제, 혼성화 유발 절단제 등에 접합될 수 있다.

[0150] 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 염기 기를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일룰로스 및 헥소스를 포함하나 이들로 한정되지 않는 군으로부터 선택된 하나 이상의 변형된 당 기도 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오티드는 중성 펩티드와 유사한 주쇄도 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.

[0151] 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 하나 이상의 변형된 포스페이트 주쇄를 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 알파-아노머 올리고뉴클레오티드이다.

[0152] 표적 mRNA 서열의 코딩 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드가 사용될 수 있지만, 전사된 비-번역 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오티드도 사용될 수 있다.

[0153] 몇몇 경우, 내인성 mRNA 번역을 억제하기 위해 안티센스의 충분한 세포내 농도에 도달하는 것은 어려울 수 있다. 따라서, 바람직한 방법은 안티센스 올리고뉴클레오티드가 강한 pol III 또는 pol II 프로모터의 조절 하에 배치되어 있는 재조합 DNA 구축물을 사용한다.

[0154] 대안적으로, 표적 유전자 발현은 유전자 조절 영역(즉, 프로모터 및/또는 인핸서)에 상보적인 데옥시리보뉴클레오티드 서열이 삼중 나선 구조를 형성하게 하여 체내의 표적 세포에서 유전자 전사를 방해함으로써 감소될 수 있다(일반적으로, 문헌(Helene, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991) 참조). 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오티드는 안티센스 모르폴린이다.

[0155] siRNA

[0156] 작은 간섭 RNA 또는 siRNA는 RNA 간섭을 통해 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 물질이다. siRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나, 시험관내 전사에 의해 수득될 수 있거나, 또는 표적 세포에서 생체내 합성될 수 있다. 전형적으로, siRNA는 15개 내지 40개의 뉴클레오티드 길이를 갖는 이중 가닥 RNA로 구성되고 1개 내지 6개의 뉴

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

[0157] 본 발명의 siRNA는 c-MAF 코딩 유전자의 mRNA 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열에 대한 실질적인 상동성을 나타낸다. "실질적인 상동성"은 siRNA가 RNA 간섭을 통해 표적 mRNA를 분해할 수 있도록 상기 표적 mRNA에 충분히 상보적이거나 상기 표적 mRNA와 충분히 유사한 서열을 갖는 것으로서 이해된다. 상기 간섭을 야기하기에 적합한 siRNA는 RNA에 의해 형성된 siRNA뿐만 아니라 상이한 화학적 변형을 함유하는 siRNA, 예컨대, 하기 siRNA들을 포함한다:

[0158] - 자연에서 발견되는 뉴클레오티드들 사이의 결합과 상이한 뉴클레오티드들 사이의 결합, 예컨대, 포스포로티오네이트 결합을 갖는 siRNA.

[0159] - RNA 가닥과 기능성 시약, 예컨대, 형광단의 접합체.

[0160] - 2' 위치에서 상이한 하이드록실 작용기를 갖는 변형에 의한 RNA 가닥의 말단, 특히 3' 말단의 변형.

[0161] - 2' 위치에서 변형된 당, 예컨대, O-알킬화된 잔기를 갖는 뉴클레오티드, 예컨대, 2'-O-메틸리보스 또는 2'-O-플루오로리보스.

[0162] - 변형된 염기, 예컨대, 할로겐화된 염기(예를 들면, 5-브로모우라실 및 5-요오도우라실), 또는 알킬화된 염기(예를 들면, 7-메틸구아노신)를 갖는 뉴클레오티드.

[0163] siRNA는 있는 그대로, 즉 전술된 특징을 갖는 이중 가닥 RNA의 형태로 사용될 수 있다. 대안적으로, siRNA의 센스 및 안티센스 가닥 서열을 함유하는 벡터의 사용은 관심있는 세포에서 그의 발현에 적합한 프로모터의 조절하에서 가능하다.

[0164] siRNA의 발현에 적합한 벡터는 siRNA의 2개 가닥을 코딩하는 2개 DNA 영역들이 전사 시 루프를 형성하는 스페이서 영역에 의해 분리된 하나의 동일한 DNA 가닥에서 직렬로 정렬되어 있는 벡터이고, 이때 단일 프로모터가 shRNA를 발생시키는 DNA 분자의 전사를 유도한다.

[0165] 대안적으로, siRNA를 형성하는 가닥들 각각이 상이한 전사 유닛의 전사로부터 형성되는 벡터의 사용이 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 동일하거나 상이할 수 있는 그 자신의 프로모터에 의존하도록 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 역 프로모터에 의해 플랭킹되어 있는 DNA 영역의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 형성한다. 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥의 전사 후, 후자는 기능성 siRNA를 형성하도록 혼성체를 형성한다. 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 국제특허출원 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 역 프로모터 시스템을 갖는 벡터가 기재되어 있다.

[0166] 수렴 또는 발산 발현 벡터로부터의 siRNA의 발현에 사용되기에 적합한 프로모터는 상기 siRNA가 발현될 세포와 상용가능한 임의의 프로모터 또는 프로모터 쌍을 포함한다. 따라서, 본 발명에 적합한 프로모터는 항시적(constitutive) 프로모터, 예컨대, 진핵 바이러스, 예컨대, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, SV40, CMV, 조류 육종 바이러스 또는 B형 간염 바이러스의 게놈으로부터 유래된 항시적 프로모터, 메탈로티오네인 유전자 프로모터, 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 인산화효소(kinase) 유전자 프로모터, 레트로바이러스 LTR 영역, 면역글로불린 유전자 프로모터, 액틴 유전자 프로모터, EF-1α 유전자 프로모터뿐만 아니라, 단백질 발현이 분자 또는 외인성 신호의 첨가에 의존하는 유도성 프로모터, 예컨대, 테트라사이클린 시스템, NFκB/UV 광 시스템, Cre/Lox 시스템 및 열 충격 유전자 프로모터, 국제 특허출원 공보 제WO2006/135436호에 기재된 조절가능한 RNA 중합효소 II 프로모터 및 특이적 조직 프로모터(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO2006012221호에 기재된 PSA 프로모터)를 포함하나 반드시 이들로 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 항시적으로 작용하는 RNA 중합효소 III 프로모터이다. RNA 중합효소 III 프로모터는 한정된 수의 유전자들, 예컨대, 5S RNA, tRNA, 7SL RNA 및 U6 snRNA에서 발견된다. 다른 RNA 중합효소 III 프로모터와 달리, III형 프로모터는 임의의 유전자내 서열을 필요로 하지 않지만 오히려 위치 -34 및 -24에서 TATA 박스, -66과 -47 사이에서 근위 서열 요소 또는 PSE 및 몇몇 경우 위치 -265와 -149 사이에서 원위 서열 요소 또는 DSE를 5' 방향으로 포함하는 서열을 필요로 한다. 바람직한 실시양태에서, III형 RNA 중합효소 III 프로모터는 인간 또는 뮤린 H1 및 U6 유

전자 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 발명의 내용에서, ER α 유전자 프로모터 또는 사이클린 D1 유전자 프로모터가 특히 적합하므로 이들은 유방 종양, 바람직하게는 ER+ 유방 종양에서 관심있는 유전자를 특이적으로 발현하기에 특히 바람직하다.

[0167] 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. shRNA의 발현에 적합한 프로모터는 siRNA의 발현에 대해 상기 단락에 기재된 프로모터이다.

[0168] siRNA 및 shRNA의 발현에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터, 예컨대, pUC18, pUC19, 블루스크립트(Bluescript) 및 이의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, 파지 및 셔틀 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28, 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-마이크론 플라스미드 유형 벡터, 삽입 플라스미드, YEP 벡터, 동원체 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(아데노바이러스, 아데노바이러스와 관련된 바이러스뿐만 아니라, 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스)에 기초한 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 및 pKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0169] 본 발명의 siRNA 및 shRNA는 당업자에 의해 공지된 일련의 기법들의 이용을 통해 수득될 수 있다. siRNA의 디자인을 위한 기초로서 사용되는 뉴클레오티드 서열의 영역은 비-한정적이고 코딩 서열(출발 코돈과 종결 코돈 사이의)의 영역을 함유할 수 있거나 대안적으로 바람직하게는 출발 코돈에 대한 3' 방향 위치 중 임의의 위치에서 25개 내지 50개 뉴클레오티드 길이를 갖는 비-번역 5' 또는 3' 영역의 서열을 함유할 수 있다. siRNA를 디자인하는 한 방법은 AA(N19)TT 모티프(이때, N은 c-MAF 유전자 서열 내의 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)의 확인, 및 높은 G/C 함량을 갖는 모티프의 선택을 포함한다. 상기 모티프가 발견되지 않는 경우, NA(N21) 모티프(이때, N은 임의의 뉴클레오티드일 수 있음)를 확인하는 것이 가능하다.

[0170] 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.

[0171] DNA 효소

[0172] 다른 한편으로, 본 발명은 본 발명의 c-MAF 유전자의 발현을 억제하기 위한 DNA 효소의 용도도 고려한다. DNA 효소는 안티센스 기술 및 리보자임 기술 둘다의 기작 특징들 중 일부를 도입한다. DNA 효소는 이 효소가 안티센스 올리고뉴클레오티드와 유사하게 특정 표적 핵산 서열을 인식함에도 불구하고 리보자임처럼 촉매 활성을 갖고 상기 표적 핵산을 특이적으로 절단하도록 디자인된다.

[0173] 리보자임

[0174] 억제될 활성을 갖는 c-MAF를 코딩하는 mRNA의 번역을 방해하기 위해 표적 mRNA의 전사 생성물을 촉매작용적으로 절단하도록 디자인된 리보자임 분자도 사용될 수 있다. 리보자임은 특이적 RNA 절단을 촉매작용할 수 있는 효소적 RNA 분자이다(검토를 위해서는 문헌(Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994) 참조). 리보자임 작용의 기작은 리보자임 분자 서열과 상보적인 표적 RNA의 특이적 혼성화에 이어서 핵산내부분해 절단 사건을 포함한다. 리보자임 분자의 조성물은 바람직하게는 표적 mRNA에 상보적인 하나 이상의 서열, 및 상기 mRNA의 절단을 담당하는 잘 공지된 서열 또는 이의 기능적 등가 서열을 포함한다(예를 들면, 미국 특허 제5093246호 참조).

[0175] 본 발명에서 사용되는 리보자임은 내부리보핵산분해효소(endoribonuclease) RNA인 햄머-헤드(hammer-head) 리보자임(이하, "체크(Cech) 유형 리보자임")을 포함한다(Zaug *et al.*, Science 224:574-578, 1984).

[0176] 리보자임은 (예를 들면, 안정성, 표적화 등을 개선하기 위해) 변형된 올리고뉴클레오티드에 의해 형성될 수 있고 생체 내에서 표적 유전자를 발현하는 세포에 분포되어야 한다. 바람직한 분포 방법은 형질감염된 세포가 내인성 표적 메신저를 파괴하여 번역을 억제하기에 충분한 양의 리보자임을 생성하도록 강한 항시적 pol III 또는 pol II 프로모터의 조절 하에서 리보자임을 "코딩하는" DNA 구축물의 사용을 포함한다. 리보자임이 다른 안티센

스 분자와 달리 촉매활성을 갖기 때문에 그의 효율을 위해 낮은 세포내 농도가 필요하다.

[0177] 억제 항체

[0178] 본 발명의 내용에서, "억제 항체"는 c-MAF 단백질에 특이적으로 결합하여 상기 단백질의 기능들 중 하나 이상, 바람직하게는 전사와 관련된 기능을 억제할 수 있는 임의의 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에 의해 공지되어 있는 방법들(이들 중 일부는 상기 언급되어 있음) 중 임의의 방법의 이용을 통해 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 동물을 억제될 단백질로 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein *et al.*, Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법의 이용을 통해 제조된다. 본 발명의 내용에서, 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, "Fab", "$F(ab')_2$" 및 "Fab'", Fv, scFv 단편, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다. c-MAF 단백질 결합 성능을 갖는 항체가 일단 확인되면, 이 단백질의 활성을 억제할 수 있는 항체는 억제제 확인 분석의 이용을 통해 선택될 것이다.

[0179] 억제 펩티드

[0180] 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.

[0181] 음성 c-MAF 우성형질

[0182] maf 패밀리로부터의 단백질들이 동종이량체화할 수 있거나 AP-1 패밀리의 다른 구성원, 예컨대, Fos 및 Jun과 이종이량체화할 수 있기 때문에, c-MAF 활성을 억제하는 한 방법은 c-MAF와 이량체화할 수 있으나 전사를 활성화시킬 성능을 결여하는 음성 우성형질을 이용하는 것이다. 따라서, 음성 c-MAF 우성형질은 세포에 존재하고 전사활성화 도메인을 함유하는 아미노 말단 부분의 3분의 2를 결여하는 작은 maf 단백질들 중 임의의 maf 단백질일 수 있다(예를 들면, mafK, mafF, mafg 및 pi 8)(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).

[0183] 대안적으로, 음성 c-MAF 우성형질은 다른 단백질과 이량체화할 성능을 유지하되 전사를 활성화시킬 성능을 결여하는 c-MAF 변이체를 포함한다. 이들 변이체는 예를 들면, 상기 단백질의 N-말단 부분에 위치하는 c-MAF 전사활성화 도메인을 결여하는 변이체이다. 따라서, 음성 c-MAF 우성형질 변이체는 (미국 특허 제6274338호에 기재된 바와 같은 인간 c-MAF의 넘버링을 고려할 때) 적어도 아미노산 1 내지 122, 적어도 아미노산 1 내지 187 또는 적어도 아미노산 1 내지 257이 제거되어 있는 변이체를 예시적인 방식으로 포함한다.

[0184] 본 발명은 표적 세포에서의 발현에 적합한 프로모터의 작동 조절 하에서 상기 음성 c-MAF 우성형질 변이체의 사용 및 c-MAF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 사용을 고려한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하기 위해 사용될 수 있는 프로모터는 항시적 프로모터, 즉 기본 수준의 전사를 유발하는 프로모터, 또는 전사 활성이 외부 신호를 필요로 하는 유도성 프로모터일 수 있다. 전사의 조절에 적합한 항시적 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 인산화효소 프로모터, HOX 유전자 프로모터, 티미딘 인산화효소 프로모터, RNA 중합효소 II 프로모터, MyoD 유전자 프로모터, 포스포글리세레이트 인산화효소(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.

[0185] 바람직하게는, 본 발명의 내용에서 사용될 수 있는 유도성 프로모터는 유도제 물질의 부재 하에서 기본 발현을 보이지 않거나 무시할만한 기본 발현을 보이는, 유도제 물질에 반응하는 유도성 프로모터로서, 3' 위치에 위치하는 유전자의 활성화를 촉진할 수 있는 유도성 프로모터이다. 유도성 프로모터는 유도제 물질의 유형에 따라 Tet 온(on)/오프(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 온/오프 프로모터(미국 특허 제6287813호); 항프로게스틴 의존성 프로모터(미국 특허출원 공보 제2004132086호); 엑디손(ecdysone) 의존성 프로모터(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*

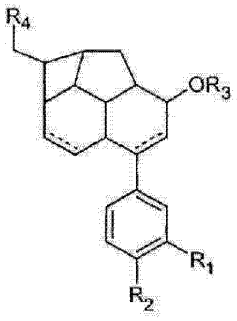
al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7999-8004, 및 국제 특허출원 공보 제WO9738117호); 메탈로티오네인 의존성 프로모터(국제 특허출원 공보 제WO8604920호); 및 라파마이신 의존성 프로모터(Rivera *et al*., 1996, Nat. Med. 2:1028-32)로서 분류된다.

[0186] 음성 c-MAF 우성형질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드의 발현에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터, 예컨대, pUC18, pUC19, 블루스크립트 및 이들의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 및 셔틀 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28, 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-마이크론 유형 플라스미드 벡터, 삽입 플라스미드, YEP 벡터, 동원체 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(아데노바이러스, 및 아데노바이러스와 관련된 바이러스뿐만 아니라, 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스)에 기초한 고등 진핵 세포 발현 벡터 또는 비-바이러스 벡터, 예컨대, pSilencer 4.1-CMV(암비온(Ambion)), 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 및 pKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1로부터 유도된 벡터를 포함한다.

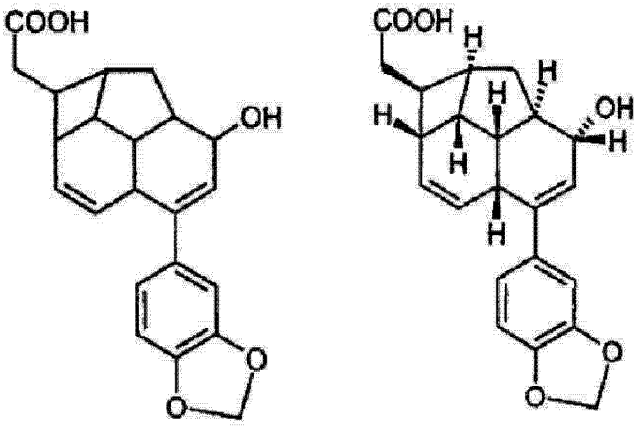
[0187] c-MAF 단백질 활성의 다른 억제 화합물

[0188] 본 발명에서 사용되기에 적합한 다른 c-MAF 억제 화합물은 하기 화합물들을 포함한다:

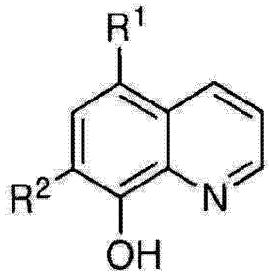
[0189] [표 1] : c-MAF 억제 성능을 갖는 소분자

I	엔디안드르산(Endiandric acid) H 유도체, 국제 특허출원 공보 제 WO2004014888 호에 기재된 하기 화학식에 상응하는 유도체:  상기 식에서, R_1 및 R_2는 서로 독립적으로 1.0 H, 또는 2.0 O-C_1-C_6-알킬, -O-C_2-C_6-알케닐, -O-C_2-C_6-알키닐 또는 -O-C_6-C_{10}-아릴 기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9로 일치환되거나 이치환되고, 아릴 기는 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9로 일치환 또는 이치환될 수 있고, 이때 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7은 -CN, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수 있고, 치환기 2.5는 -CN 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있거나: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.4 -O-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.5 C_6-C_{10}-아릴, 2.6 -NH-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.7 -NH-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.8 $-NH_2$, 또는 2.9 할로겐; 또는 R_1 및 R_2는 함께 고리를 형성하고, 이때 R_1 및 R_2는 -O-[(C_1-C_6)-알킬렌]-O- 기를 의미하고; R_3은 1.0 H, 또는 2.0 -O-C_1-C_6-알킬, -O-C_2-C_6-알케닐, -O-C_2-C_6-알키닐 또는 -O-C_6-C_{10}-아릴 기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 알킬, 알케닐 및 알키닐

[0190]

	기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9로 일치환되거나 이치환되고, 아릴 기는 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9로 일치환 또는 이치환될 수 있고, 이때 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7은 -CN, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수 있고, 치환기 2.5는 -CN 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있고: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.4 -O-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.5 -C_6-C_{10}-아릴, 2.6 -NH-C_1-C_6-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.7 -NH-C_2-C_6-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.8 -NH_2, 또는 2.9 할로겐; R_4는 CO_2R_3, CO_2NHR_3, CHO, CH_2OR_3, $CH_2OSi(R_3)_3$, CH_2Br 또는 CH_2CN 이고, 이때 R_3은 상기 정의된 바와 같다. 하기 화합물: 
II	8-하이드록시퀴놀린 유도체, 국제 특허출원 공보 제 WO2009146546 호에 기재된 하기 화학식의 화합물:

[0191]



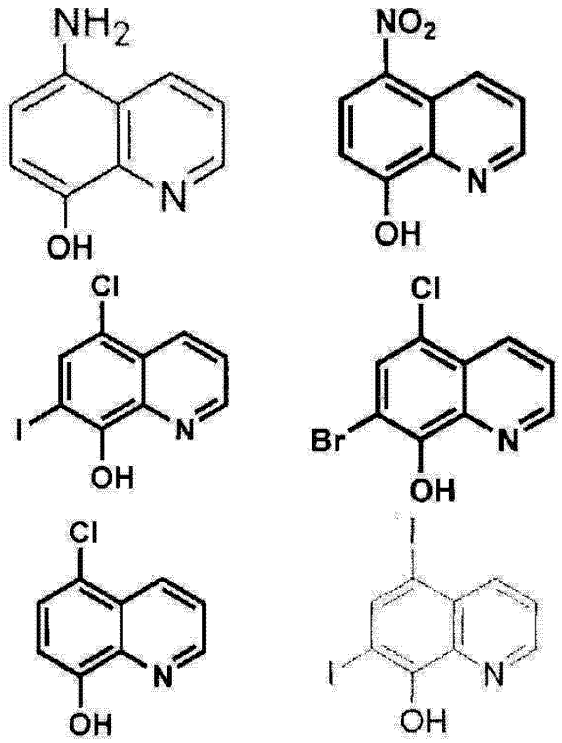
상기 식에서,

R_1은 NO_2, NH_2, NH(C_1-C_6-알킬) 및 N(C_1-C_6-알킬)(C_1-C_6-알킬)로 구성된 군으로부터 선택되고;

R_2는 H, 할로겐, C_1-C_6 알킬 및 플루오로-치환된 C_1-C_6 알킬로부터 선택되거나; 또는

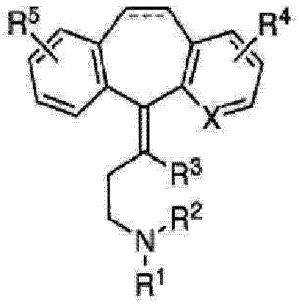
R_1은 Cl 이고, R_2는 Br 또는 H 이다.

하기 화합물:



III 국제 특허출원 공보 제 WO09049410 호에 기재된 바와 같은 클리오퀴놀(5-클로로-7-

[0192]

	요오도퀴놀린-8-올)
IV	국제 특허출원 공보 제WO08098351호에 기재된 하기 화학식의 화합물과 같은 화합물:  상기 식에서, ==-:-:-:는 단일 또는 이중 결합이고; R^1은 H, C_1-C_4 알킬, C(O)O-C_1-C_4 알킬, C(O)-C_1-C_4 알킬 및 C(O)NH-C_1-C_4 알킬로 구성된 군으로부터 선택되고; R^2는 H 및 C_1-C_4 알킬로부터 선택되고; R^3은 H 및 C_1-C_4 알킬로부터 선택되거나; 또는 R^2 및 R^3은 이들이 결합된 탄소 및 질소 원자와 함께 결합되어 피페리딘 고리를 형성하고; R^4 및 R^5는 H, 할로겐, 하이드록시, C_1-C_4 알킬, 플루오로-치환된 C_1-C_4 알킬 및 C_1-C_4 알콕시로부터 독립적으로 선택되고; X는 C 및 N으로부터 선택된다. 화합물은 다음과 같다: 사이프로헵타딘(Cyproheptadine) (4-(5H-디벤조-[a,d]사이클로헵텐-5-일리덴)-1-메틸피페리딘 하이드로클로라이드), 아미트립틸린(Amitriptyline) (3-(10,11-디하이드로-5H-디벤조[[a,d]]사이클로헵텐-5-일리덴)-N,N-디메틸-1-프로판아민), 로라타딘(Loratadine) (에틸 4-(8-클로로-5,6-디하이드로-11H-벤조[5,6]사이클로헵타[1,2-b]피리딘-11-일리덴)-1-피페리딘카복실레이트, 사이클로벤즈라핀(Cyclobenzrapine) (3-(5H-디벤조[a,d]사이클로헵텐-5-일리덴)-N,N-디메틸-1-프로판아민).
V	국제 특허출원 공보 제WO0359249호에 기재된 바와 같은 니발레놀(Nivalenol) (12,13-에폭시-3,4,7,15-테트라하이드록시트리코텍-9-엔-8-온)

[0193]

[0194] 다른 c-MAF 억제제는 국제 특허출원 공보 제WO2005063252호에 기재되어 있고, 예컨대, 하기 표(표 2)에 제시되어 있다:

[0195] [표 2]: c-MAF 억제제

길항제	cdk2 억제 활성에 대한 참고문헌
푸린 유사체	
상표명 푸르발로놀 A(#P4484, 시그마-알드리치, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재), 푸르발라놀 B, 아미노푸르발라놀, 또는 화합물 52(푸르발라놀 A 의 이소프로필이 H 로 치환됨) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한 푸르발라놀, $C_{19}H_{25}ClN_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(1R-이소프로필-2-하이드록시에틸아미노)-6-(3-클로로아닐리노)-9-이소프로필푸린	Gray, N.S. *et al.*, Science. 281, 533-538(1998); Chang, Y.T. *et al.*, Chem. Biol., 6, 361-375 (1999).
상표명 올로모우신(#O0886) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{15}H_{18}N_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-메틸푸린, 상표명 N^6-이소프로필올로모우신(#I0763) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{17}H_{22}N_6O$ 의 분자식을 갖는 2-(2'-하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-이소프로필푸린; CVT-313	Vesely, J., *et al.*, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks, E.E., *et al.*, (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11
상표명 로스코비틴(#R7772) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{19}H_{26}N_6O$ 의 분자식을 갖는 6-(벤질아미노)-2(R)-[[1-(하이드록시메틸)프로필]아미노]-9-이소프로필푸린 2-(R)-[[9-(1-메틸에틸)-6-[(페닐메틸)아미노]-9H-푸린-2-일]아미노]-1-부탄올	Wang, D. *et al.*, J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. *et al.*, Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., *et al.*, (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36
상표명 CGP74514(#C3353) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{19}H_{24}ClN_7$ 의 분자식을 갖는 푸린 유사체 N2-(시스-2-아미노사이클로헥실)-N6-(3-클로로페닐)-9-에틸-9H-푸린-2,6-디아민	Imbach, P. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
CGP79807, Cl 이 CN 으로 치환되고 OH 가 제거되고 사이클로헥산 고리의 오르토 위치가 NH_2 인 (상기) CGP74514 의 푸린 유사체	Imbach, P. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).
푸린 유사체, O6-사이클로헥실메틸 구아닌 NU2058	Arris, C.E. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies *et al.*, Nature Structural Biology, 9:10, 745-746, 2002.

[0196]

푸린 유사체, NU6102	Arris, C.E. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies *et al.*, Nat. Struc. Biol., 9:10, 745-746 (2002).
이소펜테닐-아데닌	Vesely, J., *et al.*, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86
비-푸린에 기초한 물질	
상표명(#I0404) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}N_3O_2$의 분자식을 갖는 인디루빈, 인디루빈-3'-모노옥심, 인디루빈 5-설포네이트, 5-클로로 인디루빈	Davies, T.G. *et al.*, Structure, 9, 389-397 (2001); Marko, D. *et al.*, Br. J. Canccer, 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., *et al.*, (1999) Nat. Cell Biol., 1, 60-7; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
이 표의 제 2 행에서 언급된 바와 같은 피셔의 옥시인돌 1(#IN118, JMAR 케미칼)	Porcs-Makkay, M., *et al.*, Tetrahedron 2000, 56, 5893; Org. Process Res. Dev. 2000, 4, 10
인데노피라졸	Nugiel, D.A. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. *et al.*, J. Med. Chem., 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. *et al.*, J. Med. Chem., 45, 5233-5248 (2002).
피리도(2,3-d)피리미딘-7-온, 피셔의 화합물 3	Barvian, M. *et al.*, J. Med. Chem., 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., Med. Res. Rev., 21, 487-498 (2001).
퀴나졸린, 아닐리노퀴나졸린	Sielecki, T.M. *et al.*, Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1157-1160 (2001); Mattey *et al.*, J. Med. Chem. 2003, 46, 222-236
티아졸, 상표명 GW8510(#G7791) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{21}H_{15}N_5O_3S_2$의 분자식을 갖는 융합된 티아졸, 4-{[(7-옥소-6,7-디하이드로-8H-[1,3]티아졸로[5,4-e]인돌-8-일리덴)메틸]아미노}-N-(2-피리딜)벤젠설폰아미드	Davis, S.T. *et al.*, Science, 291, 134-137 (2001); 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
플라보피리돌, 플라보피리돌(L86 8275; NCS 649890, 국립암연구소, 미국 매릴랜드주 베데스다 소재) 및 데클로로 유도체	Carlson, B.A., *et al.*, (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
알칼로이드, 스타우로스포린(#S1016, 에이.지. 사이언티픽(A.G. Scientific), 미국	Rialet, V., *et al.*, (1991) Anticancer Res., 11, 1581-90;

[0197]

캘리포니아주 샌 디에고 소재) 또는 UCN-01(7-하이드록시스타우로스포린)(국립암연구소, 미국 매릴랜드주 베데스다 소재)	Wang, Q., *et al.*, (1995) Cell Growth Differ., 6, 927-36; Akiyama, T., *et al.*, (1997) Cancer Res., 57, 1495-501; Kawakami, K., *et al.*, (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 778-83
파울론, 상표명 켄파울론(#K3888) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}BrN_2O$ 의 분자식을 갖는 9-브로모-7,12-디하이드로-인돌로[3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5H)-온, 또는 상표명 알스터파울론(#A4847) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{16}H_{11}N_3O_3$ 의 분자식을 갖는 9-니트로-7,12-디하이드로인돌로[3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5)-온	Zaharevitz, D.W. *et al.*, Cancer Res., 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. *et al.*, J. Med. Chem., 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W. *et al.*, (1999) Cancer Res., 59, 2566-9; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
CGP 41251, 알칼로이드	Begemann, M., *et al.*, (1998) Anticancer Res., 18, 2275-82; Fabbro *et al.*, Pharmacol Ther. 1999 May-Jun;82(2-3):293-301.
하이메니알디신, 에이.지. 사이언티픽 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)의 자회사인 바이오케미칼스.넷(Biochemicals.Net)으로부터 입수가능한, $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ 의 분자식을 갖는 10z-하이메니알디신(H-1150)	Meijer, L., *et al.*, (1999) Chemistry & Biology, 7, 51-63; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027 275 호로서 공개된 PCT/US02/30059 (Hellberg *et al.*)
CGP60474, 페닐아미노피리미딘	21; 국제 특허출원 공보 제 WO 95/09853 호, Zimmermann *et al.*, September 21, 1994
티아졸로피리미딘 2	Attaby *et al.*, Z. Naturforsch. 54b, 788-798 (1999)
디아릴우레아	Honma, T. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 4628-4640 (2001); Honma, T. *et al.*, J. Med. Chem., 44, 4615-4627 (2001)
상표명 부티로락톤-I(B7930) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, $C_{24}H_{24}O_7$ 의 분자식을 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. *et al.*, Oncogene, 8, 2425-2432 (1993).
알로이신 A, 카달로그 번호 128125(칼바이오켐(Calbiochem), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)	Mettey *et al.*, J. Med. Chem., 2003, 46, 222-236.

[0198]

[0199] 바람직한 실시양태에서, c-MAF 억제제는 골 전이의 치료 및/또는 예방을 위해 사용된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0200] c-MAF 억제제는 전형적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 조합되어 투여된다.

[0201] 용어 "담체"는 활성 성분이 투여되는 희석제 또는 부형제를 지칭한다. 이러한 약학적 담체는 멸균 액체, 예컨대, 물 및 오일(석유, 동물, 식물 또는 합성 유래의 오일, 예컨대, 땅콩유, 대두유, 광유, 참깨유 등을 포함함)일 수 있다. 물 또는 수성 식염수 용액 및 수성 덱스트로스 및 글리세롤 용액, 특히 주사용 용액이 담체로서 바람직하게 사용된다. 적합한 약학적 담체는 문헌("Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin, 1995)에 기재되어 있다. 바람직하게는, 본 발명의 담체는 동물 및 특히 인간에서의 그의 사용에 대해 주 정부 또는 연방 정부 규제 관청에 의해 승인되어 있거나 미국 약전 또는 일반적으로 인정된 다른 약전에 나열되어 있다.

[0202] 본 발명의 약학 조성물의 원하는 약학 투약 제형을 제조하는 데에 필요한 담체 및 보조 물질은 다른 인자들 중에서 선택된 약학 투약 제형에 의해 좌우될 것이다. 약학 조성물의 상기 약학 투약 제형은 당업자에 의해 공지된 통상적인 방법에 따라 제조될 것이다. 활성 성분을 투여하는 상이한 방법들, 사용될 부형제 및 이들을 제조하는 과정의 검토는 문헌("Tratado de Farmacia Galenica", C. Faulii Trillo, Luzan 5, S.A. 1993 Edition)에

서 찾을 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 에멀젼)이 있다. 더욱이, 약학 조성물은 필요한 것으로 간주되는 경우 안정화제, 현탁제, 방부제, 계면활성제 등을 함유할 수 있다.

[0203] 의약에서 사용되기 위해, c-MAF 억제제는 단리된 또는 추가 활성 물질과 조합된 전구약물, 염, 용매화물 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. 구체적인 실시양태에서, 본 발명의 약학 조성물은 고체 약학 투약 제형(예를 들면, 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 좌약제, 재구성되어 액체 제형 등을 제공할 수 있는 멸균 결정질 또는 비결정질 고체 등), 액체 약학 투약 제형(예를 들면, 용액, 현탁액, 에멀젼, 엘릭시르, 로션, 연고 등) 또는 반고체 약학 투약 제형(겔, 연고, 크림 등)으로 제제화될 것이다. 본 발명의 약학 조성물은 경구 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 동맥내 경로, 수질내 경로, 수막강내 경로, 심실내 경로, 경피 경로, 피하 경로, 복강내 경로, 비강내 경로, 장 경로, 국소 경로, 설하 경로 또는 직장 경로를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 활성 성분을 투여하는 상이한 방식, 사용될 부형제 및 이의 제조 과정의 검토는 문헌(Tratado de Farmacia Galenica, C. Faulii Trillo, Luzan 5, S.A., 1993 Edition and in Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20th edition, Williams & Wilkins PA, USA (2000))에서 찾을 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예는 당업계의 기술수준에서 공지되어 있고 인산염 완충 식염수 용액, 물, 에멀젼, 예컨대, 수중유 에멀젼, 상이한 유형의 습윤화제, 멸균 용액 등을 포함한다. 상기 담체를 포함하는 조성물은 당업계의 기술수준에서 공지된 통상적인 과정에 의해 제제화될 수 있다.

[0204] 핵산(siRNA; siRNA 또는 shRNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는 음성 c-MAF 우성형질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드)이 투여되는 경우, 본 발명은 상기 핵산을 투여하기 위해 특별히 제조된 약학 조성물을 고려한다. 상기 약학 조성물은 상기 네이키드 핵산, 즉 신체의 핵산분해효소에 의한 분해로부터 핵산을 보호하는 화합물의 부재하에서 상기 핵산을 포함할 수 있고, 이것은 형질감염을 위해 사용된 시약과 관련된 독성이 제거된다는 장점을 수반한다. 네이키드 화합물에 적합한 투여 경로는 혈관내 경로, 종양내 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, 핵산은 콜레스테롤에 접합된 리포좀, 또는 세포막을 통한 전위를 촉진할 수 있는 화합물, 예컨대, HIV-1 TAT 단백질로부터 유도된 Tat 펩티드, 초파리 안테나페디아(antennapedia) 단백질의 호메오도메인(homeodomain)의 제3 나선, 헤르페스 심플렉스 바이러스 VP22 단백질, 아르기닌 올리고머 또는 국제 특허출원 공보 제WO07069090호에 기재된 펩티드에 접합된 리포좀의 일부를 형성한 상태로 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, 폴리뉴클레오티드는 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터, 바람직하게는 아데노바이러스, 아데노 관련 바이러스 또는 레트로바이러스에 기초한 벡터, 예컨대, 뮤린 백혈병 바이러스(MLV) 또는 렌티바이러스(HIV, FIV, EIAV)에 기초한 벡터의 일부를 형성한 상태로 투여될 수 있다.

[0205] c-MAF 억제제 또는 이를 함유하는 약학 조성물은 체중 kg 당 10 mg 미만, 바람직하게는 체중 kg 당 5 mg, 2 mg, 1 mg, 0.5 mg, 0.1 mg, 0.05 mg, 0.01 mg, 0.005 mg, 0.001 mg, 0.0005 mg, 0.0001 mg, 0.00005 mg 또는 0.00001 mg 미만의 투여량으로 투여될 수 있다. 유닛 투여량은 주사, 흡입 또는 국소 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0206] 투여량은 치료될 병태의 중증도 및 반응에 의해 좌우되고 수일 내지 수개월 또는 상기 병태가 진정될 때까지 달라질 수 있다. 최적 투여량은 환자의 체내의 약제의 농도를 주기적으로 측정함으로써 결정될 수 있다. 최적 투여량은 동물 모델에서의 선행 시험관내 또는 생체내 분석에 의해 수득된 EC_{50} 값으로부터 결정될 수 있다. 유닛 투여량은 1일마다 1회 투여될 수 있거나 1일마다 1회 미만, 바람직하게는 2일, 4일, 8일 또는 30일마다 1회 미만으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 출발 투여량을 투여한 후, 일반적으로 상기 출발 투여량보다 더 적은 양의 유지 투여량을 1회 또는 수회 투여할 수 있다. 유지 요법은 환자를 1일 당 체중 kg 당 0.01 ㎍ 내지 1.4 mg, 예를 들면, 1일 당 체중 kg 당 10 mg, 1 mg, 0.1 mg, 0.01 mg, 0.001 mg 또는 0.00001 mg의 투여량으로 치료하는 단계를 포함할 수 있다. 유지 투여량은 바람직하게는 5일, 10일 또는 30일마다 최대 1회 투여된다. 치료는 환자가 앓고 있는 질환의 유형, 그의 중증도 및 환자의 상태에 따라 달라질 시간 동안 계속되어야 한다. 치료 후, 질환이 치료에 반응하지 않는 경우 투여량이 증가되어야 하는지 아니면 질환의 개선이 관찰되거나 원치 않는 부

작용이 관찰되는 경우 투여량이 감소되어야 하는지를 확인하기 위해 환자의 진행을 모니터링해야 한다.

[0207] 상승된 c-MAF 수준을 갖는 골 전이를 갖는 유방암 환자에서 골 분해의 치료 또는 예방

[0208] 본 발명의 발명자들은 c-MAF 수준이 유방 종양으로부터의 골 전이에서 상승되어 있다는 것을 입증하였다. 마찬가지로, 본 발명의 발명자들은 골 전이를 야기할 높은 성능을 갖고 c-MAF를 과다발현하는 일차 유방 종양으로부터 유도된 세포주의 컨디셔닝 배지가 c-MAF를 과다발현하지 않는 세포보다 더 높은 정도로 파골세포의 형성을 유도할 수 있다는 것을 명확히 보여주었다. 따라서, 골에 전이된 유방암을 앓고 있고 상기 전이에서 상승된 c-MAF 수준이 있는 환자들은 특히, 증가된 파골세포 활성에 의해 야기된 골 분해의 예방을 목적으로 하는 치료로부터 이점을 얻을 수 있다.

[0209] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 종양 조직 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 치료하기 위한 의약품의 제조에 있어서 골 분해를 방지하거나 예방하는 물질의 용도에 관한 것이다.

[0210] 대안적으로, 본 발명은 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 종양 조직 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 전이의 예방 및/또는 치료에 사용될, 골 분해를 방지하거나 예방하는 물질에 관한 것이다.

[0211] 대안적으로, 본 발명은 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 종양 조직 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 상기 분해를 예방하고/하거나 치료하는 방법으로서, 골 분해를 방지하거나 예방하는 물질을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0212] 구체적인 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다. 또 다른 구체적인 실시양태에서, 유방암은 ER+ 또는 ER- 유방암이다.

[0213] 용어 및 표현 "대상체", "ER+ 유방암", "종양 조직 샘플", "전이", "c-MAF 유전자", "증가된 또는 상승된 발현 수준" 및 "대조군 샘플"은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세히 기재되어 있고 골 분해를 방지하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있다.

[0214] 본 발명에서 기재된 치료 방법에 적합한, 골 분해를 방지할 수 있거나 예방할 수 있는 물질은 맞춤형 치료 방법의 내용에서 상세히 전술되어 있다.

[0215] 기준 또는 대조군 샘플은 전이를 앓고 있지 않은 ER+ 또는 ER- 유방암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플이거나 전이를 앓고 있지 않은 ER+ 유방암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중의 종양 조직 수집물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응한다.

[0216] c-MAF 수준이 대조군 샘플에 비해 상승되어 있는지를 확인하거나 정량하는 방법은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세히 기재되어 있고 골 분해를 방지하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있다.

[0217] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 상기 언급된 물질들 중 골 분해를 방지하거나 예방하는 하나 초과의 물질들이 조합되어 있거나 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬과 조합될 수 있는 조합 치료가 수행될 수 있다.

[0218] 골 분해를 방지하거나 예방하는 물질은 전형적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 조합되어 투여된다. 용어 "담체" 및 담체의 유형뿐만 아니라, 이들이 투여될 수 있는 형태 및 투여량은 c-MAF 억제제와 관련하여 상기 정의되어 있고 골 분해를 방지하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있다.

[0219] 하기 실시예는 본 발명을 예시하고 본 발명의 범위를 한정하지 않는다.

[0220] 실시예

[0221] I. 재료 및 방법

[0222] 실험 연구 동물

[0223] ER+ 유방암의 전이를 연구하기 위한 신규 실험 모델을 개발하였다. 이를 위해, GFP/루시퍼라제 발현을 가능하게 하는 벡터로 안정한 방식으로 형질감염된 MCF7로 지칭되는 인간 ER+ 유방암 세포주를 사용하였다. 상이한 장기들에서 전이 성능을 갖는 세포를 선택할 수 있도록 심실내 또는 꼬리 정맥 주사를 통해 이 세포주를 면역결핍 마우스(Balb-c/누드) 내로 접종하였다. 상기 마우스는 실험 전체 동안 에스트로겐의 존재를 보장하는 피하 에스

트로겐 이식재를 가졌다.

[0224] 전이성 집단의 선택

[0225] 전이성 병소의 세포를 확인하고 단리함으로써 상이한 조직들에서 전이성 집단을 선택하였다. 이를 위해, 상이한 시간에서 관심있는 장기에서의 종양 세포의 확립 및 성장을 검출할 수 있게 하고 존재하는 종양 세포의 수를 정량할 수 있게 하는 기술을 이용하는 생체발광 영상화 기법을 이용하였다. 이 기법을 적용하기 위해, 세포는 루시퍼라제 및 GFP 유전자를 발현하도록 번역되었고, 이로써 생체내 비-침습 실시간 추적 방법이 허용된다. 제노겐(Xenogen) IVIS 장치 및 소프트웨어 리빙이미지(Livingimage)를 이들의 민감성 및 속도로 인해 바람직한 방법으로서 이용하여 마취 하에 있는 동물로 발광 영상(루시퍼라제 활성)을 포착한다. 전이성 세포를 단리하기 위해, 종양 병소를 절개한 후, 형광(GFP)에 의한 레이저 스캐닝 세포계수 기법을 이용하여 숙주 유기체의 세포로부터 전이성 세포를 단리한다. 일단 이들 세포들이 단리되면, 상이한 조직들에 대한 그들의 향성을 강화하는 과정을 반복하였다. 이들 방법들을 이용하여 골 전이를 포함하는 조직 특이성을 갖는 상이한 전이성 집단들을 단리하였다.

[0226] 일단 전이성 집단이 확인되고 단리되면, 고성능 전사 분석을 수행하였다. 이 전략은 그의 전사가 증가된 유전자, 및 좋지 않은 예후를 갖는 암성 세포에서 전이 과정 매개자로서 작용하는 몇몇 유전자들의 확인을 일괄적으로 가능하게 하였다. 그의 발현이 변경된 유전자가 조직 및 특정 장기에서 전이성 세포에 의한 콜로니화에 관여한다는 것은 편견 없는 생체내 선택 방법에 의해 확인되었다.

[0227] ER+ 유방암의 골 전이에서 풍부해진 유전자의 군의 확인

[0228] 고도의 전이성 세포 하위집단의 유전자 발현 프로필과 약한 전이성 세포 하위집단의 유전자 발현 프로필을 비교함으로써 그의 과다발현 또는 억제가 골 전이의 골용해성 표현형과 관련되어 있는 유전자의 군을 확인하였다. 조골성(합성)과 달리 골 골용해성 전이성 병소(분해)는 임상적으로 보다 공격적인 골 전이성 유방암의 형태와 관련되어 있다. 높은 골 전이 성능을 갖는 세포주와 관련된 발현 프로파일을 표준화된 방법을 이용하여 수득하였다. ER+ 유선 세포로부터 유래된 상이한 골 전이성 유도체들을 그들의 골 공격성 표현형 및 그들의 발현 프로파일에 대한 편견 없는 분석을 통해 분류하였다. 두 경우에서, 전이성 세포주 유도체 BoM1 및 BoM2는 유전자 발현 프로파일 수준에서 및 표현형적으로 출발 세포(MCF7)의 전이성 거동과 상이한 전이성 거동을 나타내었다(도 1a).

[0229] ER+ 유방암의 골 전이를 위해 풍부해진 유전자의 군은 사이토카인, 세포 부착 분자, 막 단백질분해효소, 신호전달 매개자 및 전사 인자를 포함한다.

[0230] 그 다음, ER+ 유방암에서 골 전이 성능을 조절하는 후보자로서 선택된 유전자의 군을 인간에서 임상적으로 검증하였다. 이를 위해, 2개의 코호트, 즉 각각 560개의 유방 종양 및 58개의 전이를 포함하는, 일차 유방 종양으로부터의 코호트 및 전이로부터의 코호트의 유전자 발현 프로파일에서 발생하는 변화와 후보 유전자 발현의 변화를 비교하였다.

[0231] ER- 유방암의 골 전이와 관련된, ER+ 유방암의 골 전이에서 풍부해진 유전자의 확인

[0232] ER+ 유방암의 골 전이에서 풍부해진 유전자가 ER- 하위유형에서 수행하는 역할을 평가하였다. ER+ 유방암의 골 전이를 위해 풍부해진 유전자의 군은 c-MAF 전사 인자를 포함한다.

[0233] 생체정보학 및 컴퓨터 생물학

[0234] 통계적 R 패킷(packets) 및 생체전도체를 이용하여 전이에서 풍부해진 유전자의 군을 수득하고 그들의 임상적 상관관계를 검증하였다. 데이터 처리에 대해 특이적인 기능 및 구조가 이입되었고 이들은 웹사이트(www.bioconductor.org)를 통해 공개적으로 입수가능하다.

[0235] 실시예 1

[0236] 관련 유전자의 선택

[0237] 골 전이를 형성하는 성향을 갖는 ER+ 유방암 세포주로부터 유도된 세포에서 상이한 방식으로 발현되는 유전자를 선택하기 위한 분석을 수행하였다(도 1a). 수행된 분석은 골에서 전이할 수 있는 성능을 갖는 MCF7 ER+ 세포주로부터 유도된 세포주에서 풍부해지거나 침묵된 91개의 유전자의 확인을 가능하게 하였다(도 1b). 하기 기준에 따른 보다 상세한 연구를 위해 유전자 및 단일 결정인자 기능을 선택하였다:

[0238] i) 공격적인 ER+ 유방암 및 골 전이와의 임상적 상관관계,

[0239] ii) 공격적인 표현형(예를 들면, 골 재흡수, 염증, 혈관신생)과 양립가능한 과정에 참여함으로써 이미 공지된 기능,

[0240] iii) 전술된 바와 같이 모 집단과 비해 전이성 집단들 사이의 발현 수준의 변경, 및

[0241] iv) 유전자 조절 네트워크 및 세포 신호전달 경로에서의 중추적 역할.

[0242] 이들 기준에 기초하여 c-MAF 전사 인자를 확인하였고, 발현 수준에서의 그의 변경이 골에서 일차 ER+ 유방암 종양의 재발을 어떻게 예측하는지를 확인하였다.

[0243] 실시예 2

[0244] 유방암의 하위유형과 관계없이 골 전이를 위해 풍부해진 유전자의 치료 값 및 예후 값

[0245] 본원에서 실시되는 전이성 세포 집단의 선택을 위한 실험 시스템을 이용하여 골 전이에서 풍부해진 유전자를, 유방암 환자의 560개 일차 유방암 종양 및 58개 전이의 발현 프로파일 및 임상 특징을 함유하는 2개의 상이한 데이터베이스에 대해 평가하였다. 이들 종양들은 유방암의 모든 하위유형 및 전이 위치를 대표한다. 데이터베이스 및 이들의 임상 특징 둘다가 공개적으로 입수가능하다(GSE 2603, 2034, 12276 및 14020).

[0246] 골 전이의 유전자의 ER+ 일차 종양에서의 유전자 발현은 재발, 전이 부재 생존 및 생존과 유의한 상관관계를 갖는다(도 1c 및 1d).

[0247] 또한, 유방암 환자의 58개 전이의 코호트에서 전이성 조직 내의 c-MAF 유전자 발현 수준(GSE 14020)을 평가하였다. 이들 전이들은 폐, 간, 골 및 뇌로부터 단리되었다. 종양 또는 전이성 병소(도 2a)가 속하는 유방암의 하위유형, 즉 ER+ 또는 ER-와 관계없이 특히 골 전이에서 c-MAF 유전자가 풍부해진다는 것을 검증하였다.

[0248] 실시예 3

[0249] ER- 유방암에서 c-MAF 골 전이성 유전자의 생체내 기능적 검증

[0250] 분석에서 양성을 나타낸 c-MAF 전이성 유전자를 마우스에서 유방암 전이의 실험 이식 모델에서 골 전이성 콜로니화 분석에서 기능적으로 검증하였다. 골에서 성장하는 높은 능력을 갖는 ER- 유방암 세포의 선택은 높은 수준의 c-MAF 전이성 유전자의 선택을 동반한다(도 2b).

[0251] 전이 과정을 유발하는 후보 유전자를 검증하기 위해 수행된 방법은 기능 획득 분석이었다. 이를 위해, c-MAF 유전자를 모 MDA-MB-231 세포에서 발현시킨 후, 전이에 기여하는 유전자(CTGF)(도 2c)의 발현을 유도하는 그의 성능을 평가하였다.

[0252] 실시예 4

[0253] 조직 특이적 전이성 유전자의 생체내 기능적 검증

[0254] 분석에서 양성을 나타낸 c-MAF 전이성 유전자를 마우스에서 유방암 전이의 실험 이식 모델에서 골 전이성 콜로니화 분석에서 기능적으로 검증하였다.

[0255] 전이 과정을 유발하는 후보 유전자를 검증하기 위해 수행된 방법은 기능 상실 분석 및 기능 획득 분석이었다. 이를 위해, c-MAF 유전자를 모 세포 또는 고도의 골 전이성 세포 유도체에서 발현시키거나 침묵시킨 후, 그의 골 전이 성능을 생체 내에서 평가하였다.

[0256] 기능 획득 분석

[0257] c-MAF 유전자를 발현시키기 위해, 렌티바이러스 시스템을 사용하여 모 종양 세포 및 낮은 전이 성능을 갖는 선택된 종양 세포에서 후보 유전자의 이종 발현을 유도하였다. ("실험 연구 모델" 단락에 기재된 바와 같이) 심장내 경로를 통해 마우스 내로 접종된 전이성 세포의 생체발광에 의한 추적 기법을 이용하여 c-MAF 유전자의 전이 유도 성능을 측정하였다. 모든 경우에서, 단백질 c-MAF를 발현하지 않는 렌티바이러스 벡터로 감염된 상응하는 대조군 세포를 음성 대조군으로서 동물의 병행 코호트에 병행 방식으로 주입하였다(도 3b).

[0258] 기능 상실 분석

[0259] 높은 내인성 c-MAF 유전자 발현 수준을 갖는 고도의 골 전이성 BoM2 세포주에서 c-MAF 유전자 발현을 억제하였다(도 3a 및 3c). 이를 위해, c-MAF 유전자 발현을 BoM2 세포주에 존재하는 수준에 비해 80%까지 감소시키는 성

능을 갖는 간섭 RNA(siRNA)의 발현을 가능하게 하는 렌티바이러스 벡터를 사용하였다. c-MAF 유전자 발현이 침묵된 이 세포 집단을 ("실험 연구 모델" 단락에 기재된 바와 같이) 심장내 경로를 통해 면역억제된 마우스 내로 접종하였고, 생체발광 영상화 기법을 이용하여 이들 동물들을 모니터링하여 전이 활성을 검출하였다. 이들 실험에서, 전이 과정과 관련없는 또 다른 유전자의 발현에 대해 효과적으로 작용하는 siRNA를 코딩하는 렌티바이러스 벡터를 사용한 감염에 의해 BoM2 세포주로부터 수득된 세포를 음성 대조군으로서 사용하였다.

[0260] 실시예 5

[0261] 파골세포 분화 분석

[0262] 마우스의 골수로부터 유래된 일차 세포를 단리하고 M-CSF(대식세포 콜로니 자극 인자)의 존재 하에서 배양물에서 성장시켰다. 3일 후, 상기 세포를 트립신으로 처리하고 24-웰 플레이트에서 각각의 실험 조건에 대해 삼중으로 시딩하였다(웰 당 1.5 x 10^4개 세포). 파골세포 분화를 유도하기 위해, c-MAF 유전자의 "짧은" 동형체 및 "긴" 동형체 과다발현을 갖거나 갖지 않는 MCF7 ER+ 유방암 세포로부터의 컨디셔닝 배지를 사용하여 이들 전구체들을 RANK 리간드 및 M-CSF의 존재 하에서 배양하였다. 배지를 3일마다 교체하였고, 7일째 날 주석산염 내성 산성 인산분해효소(phosphatase)(TRAP)를 검출하는 단계로 구성된 파골세포의 특이적 염색을 수행하였다. 도립된 광선 광학 현미경관찰을 이용하여 영상을 수득하였다. TRAP 양성 세포의 수를 측정하고 필드 당 총 세포 수로 나누었다. 마지막으로, 모든 값들을 대조군인 MCF7의 값으로 표준화하였다. 도 4에서 관찰될 수 있는 바와 같이, 파골세포 전구체가 c-MAF의 짧은 동형체 또는 긴 동형체를 과다발현하는 MCF7 ER+ 유방암 세포로부터의 배지와 접촉되었을 때 파골세포의 수가 증가하였다.

[0263] 이 분석은 전이성 세포와 골의 전이성 환경 또는 적소로부터의 성분 사이의 상호작용을 측정할 수 있게 한다. 파골세포는 골의 분해를 담당하고 상기 분해는 골용해성 전이성 병소에서 나타난다.

[0264] 실시예 6

[0265] (c-MAF 유전자를 포함하는) 영역 chr16q22-q24에서의 염색체 증폭의 확인

[0266] 발현 프로파일 분석에 의한 카피 수 변경(CNA)의 검출은 게놈 변경과 영향받은 게놈 영역에서의 비정상적인 유전자 발현 사이에 강한 상관관계가 있기 때문에 이론적으로 가능하다(Pollack *et al*. 2002; PNAS; 99:12963-12968). 구체적으로, 유전자 발현 분석을 이용한 CNA의 정확한 검출이 가능하고 그의 어려움은 출발 발현 데이터의 유형으로부터 비롯된다(Hu *et al*. 2009 Cancer Cell, 15:9-20).

[0267] ER+ 유방암의 골 전이에서 풍부해진 유전자의 역할을 평가하였다. 이를 위해, 연구실 자체에서 발생되고 높은 c-MAF 유전자 수준의 발현을 특징으로 하는 MCF7 유방암 세포주로부터 유도된 고도의 골 전이성 세포인 BoM2 내의 게놈 카피 수의 변경을 분석하였다. 이 분석은 모 세포, 및 MCF7로부터 유도된 BoM2의 유전자 발현 프로파일의 비교에 기초하였다. 인간 세포에 존재하는 23개 유형의 염색체들에서 그의 위치에서 모 세포와 비교되었을 때 BoM2 세포에서 관찰된 유전자 발현의 차이들을 정렬하고 위치를 확인하였다.

[0268] 따라서, 게놈 영역(도 5)이 확인되었고, 이때 모 세포와 비교되었을 때 BoM2 세포에서 과다발현되거나 과소발현된 유전자가 표시되어 있고, 이것은 게놈 DNA의 증폭 또는 결실의 표시자이다(Hu *et al*. 2009, Cancer Cell, 15:9-20). 이를 위해, 소프트웨어 "파텍 게노믹 스위트(Partek Genomic Suite) 6.5"를 이용하였다. 이 소프트웨어는 모 세포와 비교되었을 때 BoM2 세포에서 그의 발현이 증가되거나 감소된 유전자들의 확인을 가능하게 하였다. 일단 이들 유전자들이 확인되면, 각각의 유전자에 대해 관찰된 발현 차이를 상기 유전자의 상응하는 염색체 위치에서 표시하였다. 이들 관찰결과의 도식화는 연속적인 염색체 위치를 갖는 연속적인 증가된 또는 감소된 유전자 발현에 기초한 염색체 영역 획득 또는 상실의 확인을 가능하게 하였다(도 5). 본 발명의 발명자들은 전술된 잘 공지된 사이토밴드(cytobands)를 사용하여 이들 영역들의 위치를 확인할 수 있었다.

[0269] MCF7 ER+ 모 유방암 세포와 비교되었을 때 BoM2 세포에서 상이하게 증폭된 영역들 사이에 c-MAF 유전자를 코딩하는 좌위를 포함하는 염색체 영역 16q22-q24의 획득이 관찰되었다.

[0270] 그 다음, 유방 종양 내의 유전자 카피 수의 변경과 유방암 환자에서의 전이 사이의 비를 평가하였다. 따라서, 환자에서의 전이와 관련된 상당한 수의 유전자를 갖는 염색체 영역을 "콕스 로그 위험비(HR)" 모델을 이용하여 확인하였다. 카피 수의 변경을 갖는 잠재적 영역들의 위치를 확인하는 ACE(데이터 발현에서 카피 수의 변경 분석)(상기 인용된 (Hu *et al*. 2009))의 개념을 따랐다. "페노테스트(PhenoTest)" R 패킷 함수를 사용하였다. 따라서, 교차 검증을 통해 파라미터를 선택하는 부가적 모델의 일반화를 통해 각각의 유전자에 대한 "로그 HR"을 수득하였고, 전체 게놈을 통해 "로그 HR"의 순열(1000개 순열)을 만들고 벤자미니-호크베르그를 통해 P 값을 조

절하여 가짜 발견율(FDR)을 0.05의 수준으로 제어함으로써 통계적 유의도를 평가하였다. 15개 이상의 연속적인 유의한 유전자들을 갖는 영역들만을 확인하였다(도 5b). 이들 영역들 중에서 c-MAF 유전자를 포함하는 영역 16q12-q24가 존재한다.

[0271] 그 후, MCF7 모 세포, 및 골 조직에서 전이를 형성할 높은 성향을 갖는 것을 특징으로 하는 세포주 BoM2에서 형광 인시츄 혼성화(FISH)를 이용하여 c-MAF 유전자 카피 수를 특징규명하였다. IGH 유전자 카피 수를 실험의 대조군으로서 동시에 측정하였다. 결과는 연구된 MCF7 세포들의 대다수가 c-MAF 유전자 카피 수와 IGF 유전자 카피 수 사이에 1.5 이하의 비를 갖는, 즉 두 유전자들의 카피 수가 유사한 반면(도 6), 연구된 BoM2 세포들의 대다수가 c-MAF 유전자 카피 수와 IGF 유전자 카피 수 사이에 2 초과의 비를 보였다는 것을 보여주었다(도 6). 이들 결과는 유방암 세포에 의한 골 전이성 표현형의 획득이 c-MAF 유전자 카피 수의 증가를 동반한다는 것을 입증한다.

[0272] 결론

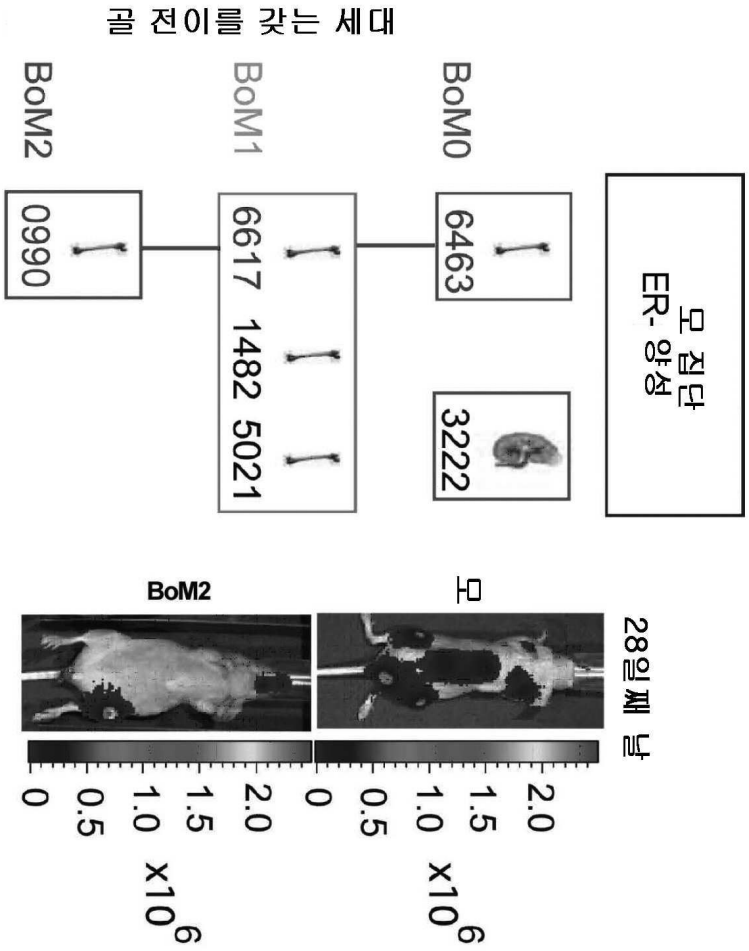
[0273] c-MAF는 유방암의 전이 과정, 특히 ER+ 유방암으로부터의 골 전이에서 진단 및 예후를 위한 마커이고 원인 표적 유전자이다. 이 결론은 본 발명의 일부를 형성하는 임상 검증 데이터, 및 기능 획득 및 기능 상실 실험에 의해 뒷받침된다.

[0274] 일차 종양에서의 c-MAF 발현이 유방암 환자에서 골 전이를 앓을 높은 위험을 예측한다는 것을 입증하는, 본 발명에서 제시된 결과를 고려할 때, 게놈 영역 chr16q22-q24에서의 증폭 또는 c-MAF 유전자의 증폭을 갖는 세포를 함유하는 종양을 갖는 환자들은 또한 골 전이의 높은 위험을 갖기 쉬울 것이다. 따라서, c-MAF 유전자 또는 좌위 16q22-q24의 증폭의 확인은 일차 유방암 종양으로부터의 골 전이를 진단하는 방법 및 예측하는 방법으로서 유용하다.

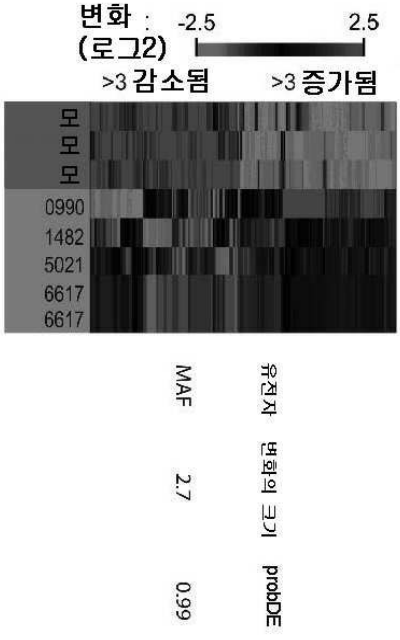
[0275] 또한, 본 발명의 실험(실시예 4 및 5)은 c-MAF가 (ER+ 및 ER- 종양 둘다로부터의) 전이의 치료 및/또는 예방을 위한 적합한 표적이라는 것을 암시한다. 따라서, c-MAF 억제제는 유방암을 갖는 대상체에서 전이의 치료에 유용할 것이다.

도면

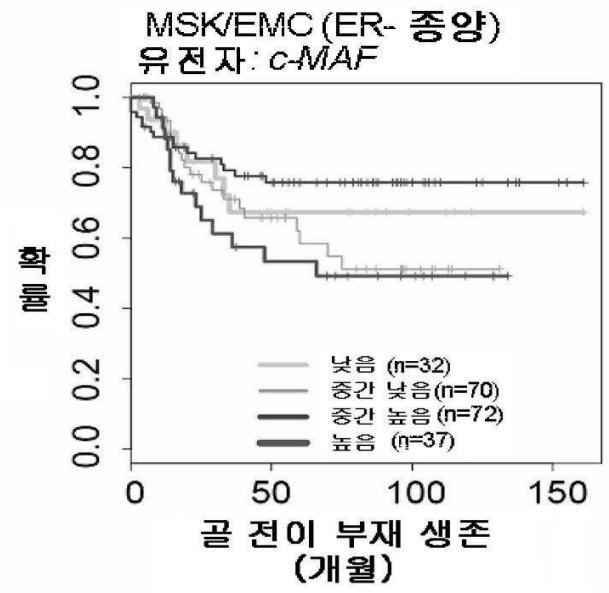
도면1a

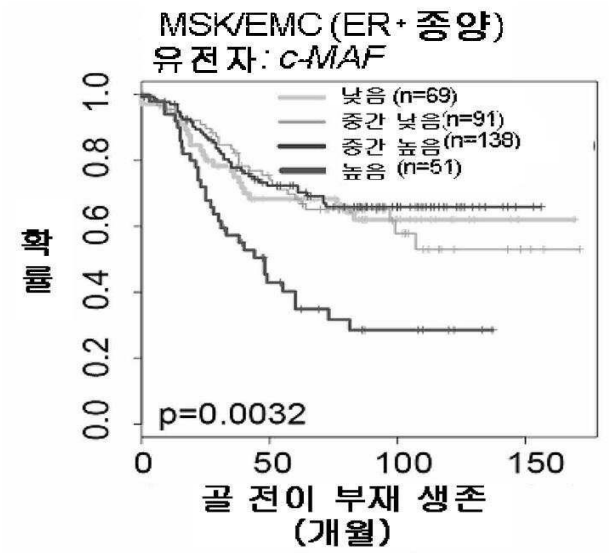

골 전이를 갖는 세대
BoM2
BoM1
BoM0
0990
6617 1482 5021
6463
3222
모 집단
ER- 양성
BoM2
모
28일째 날
0
0.5
1.0
1.5
2.0
x10^6
0
0.5
1.0
1.5
2.0
x10^6

도면1b

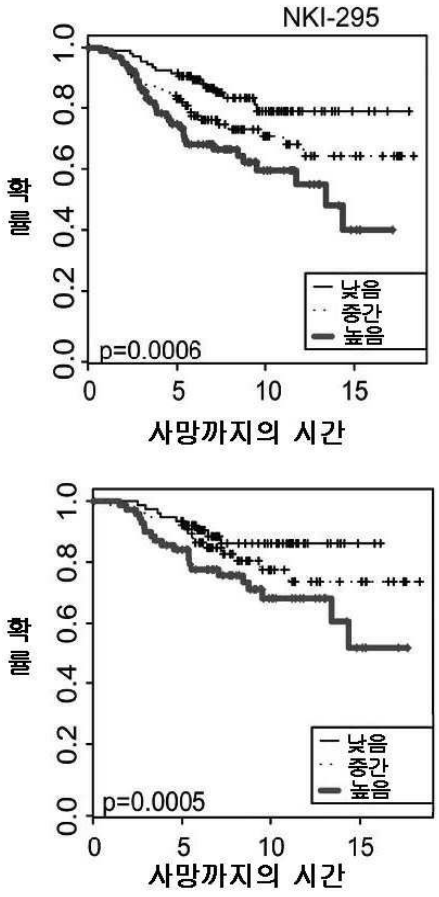

변화 : (로그2)
-2.5
2.5
>3 감소됨
>3 증가됨
모
모
모
0990
1482
5021
6617
6617
유전자
변화의 크기
probDE
MAF
2.7
0.99

도면1c

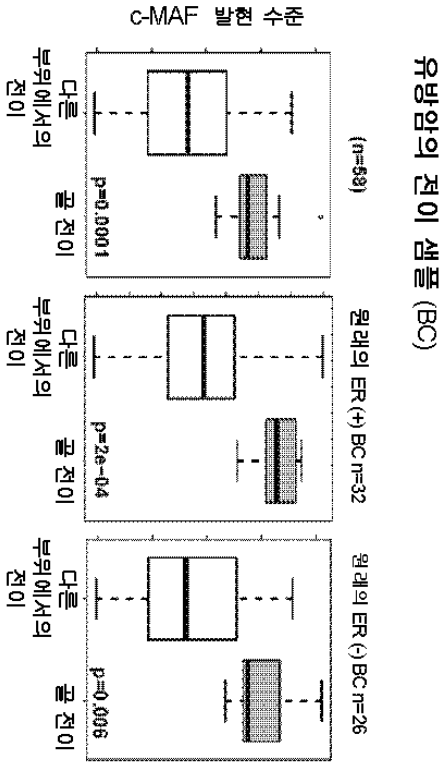

MSK/EMC (ER- 종양)
유전자: c-MAF
확률
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
낮음 (n=32)
중간 낮음(n=70)
중간 높음 (n=72)
높음 (n=37)
0 50 100 150
골 전이 부재 생존
(개월)


MSK/EMC (ER+ 종양)
유전자: c-MAF
확률
0.0 0.2 0.4 0.6 0.8 1.0
낮음 (n=69)
중간 낮음(n=91)
중간 높음(n=138)
높음 (n=51)
p=0.0032
0 50 100 150
골 전이 부재 생존
(개월)

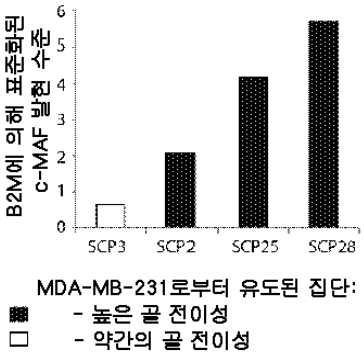
도면1d


NKI-295
확률
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0
5
10
15
사망까지의 시간
p=0.0006
낮음
중간
높음
확률
사망까지의 시간
p=0.0005
낮음
중간
높음

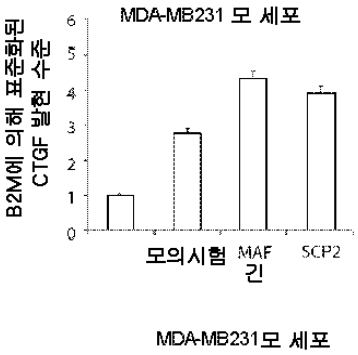
도면2a


c-MAF 발현 수준
유방암의 전이 샘플 (BC)
다른 부위에서의 전이
폐 전이
p=0.0001
(n=59)
원래의 ER (+) BC n=32
p=2e-04
원래의 ER (-) BC n=26
p=0.009

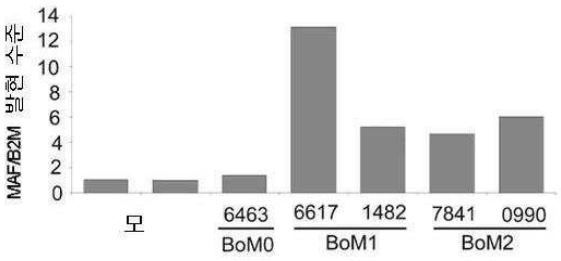
도면2b



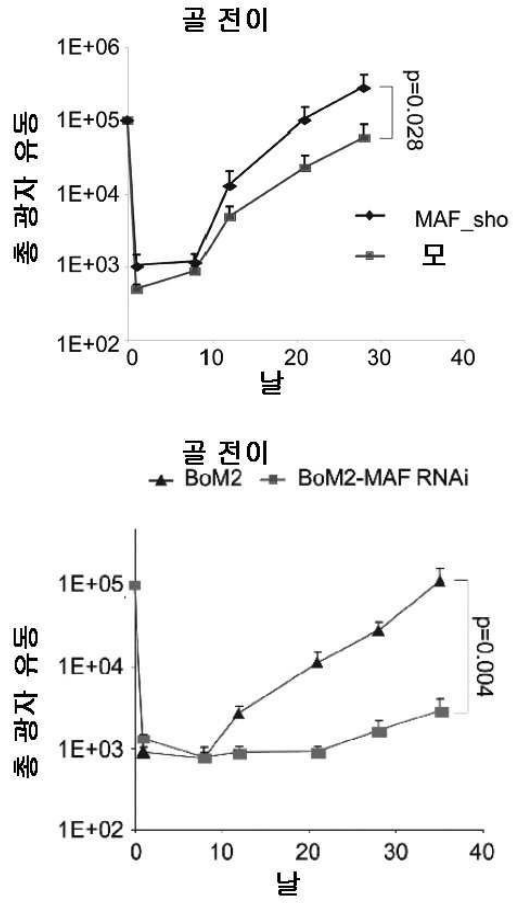
도면2c



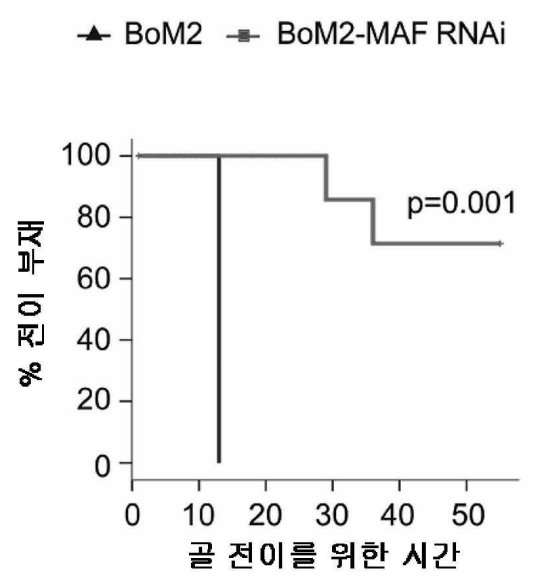
도면3a



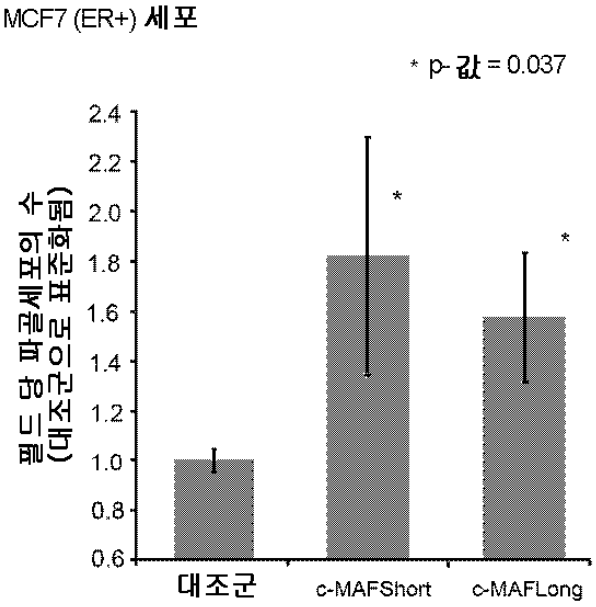
도면3b


골 전이
총 광자 유동
1E+06
1E+05
1E+04
1E+03
1E+02
0
10
20
30
40
날
p=0.028
MAF_sho
모
골 전이
BoM2
BoM2-MAF RNAi
총 광자 유동
1E+05
1E+04
1E+03
1E+02
0
10
20
30
40
날
p=0.004

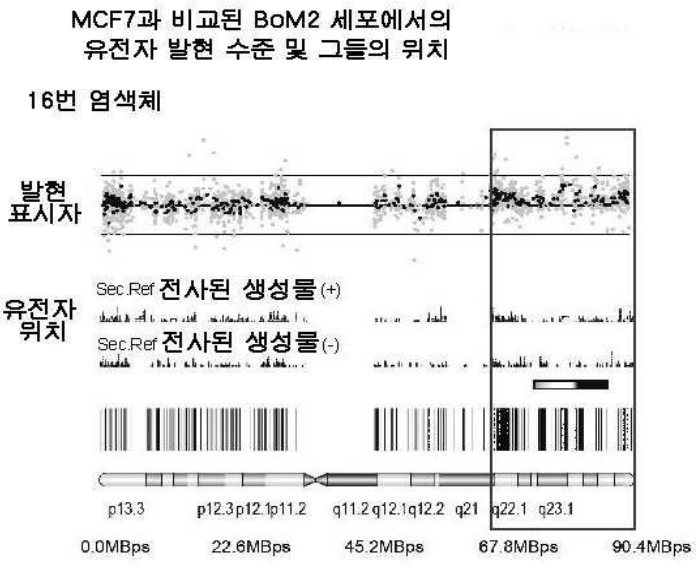
도면3c


BoM2
BoM2-MAF RNAi
% 전이 부재
100
80
60
40
20
0
0
10
20
30
40
50
골 전이를 위한 시간
p=0.001

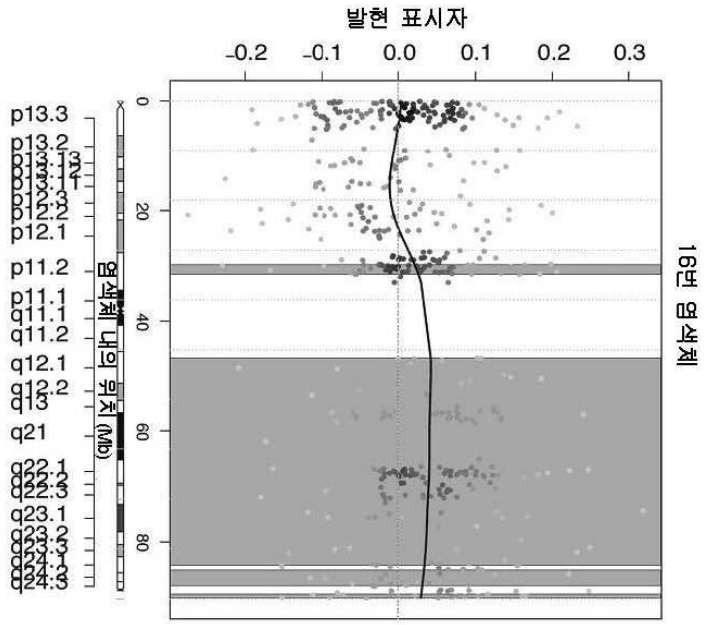
도면4


MCF7 (ER+) 세포
* p-값 = 0.037
폴드 당 파골세포의 수
(대조군으로 표준화됨)
2.4
2.2
2.0
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
*
*
대조군
c-MAFShort
c-MAFLong

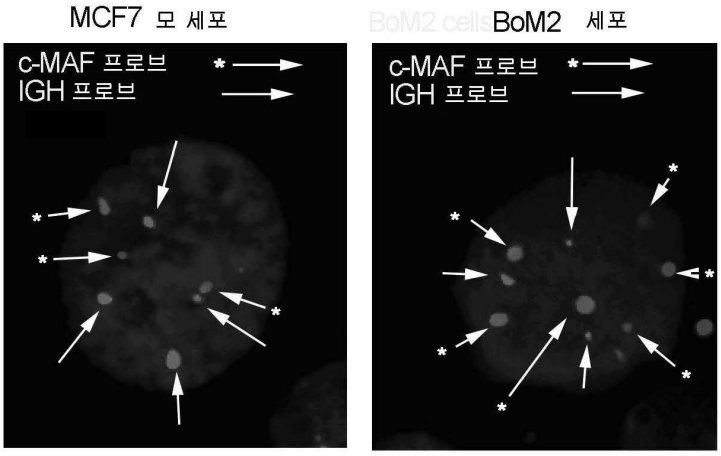
도면5a


MCF7과 비교된 BoM2 세포에서의
유전자 발현 수준 및 그들의 위치
16번 염색체
발현
표시자
유전자
위치
Sec.Ref 전사된 생성물 (+)
Sec.Ref 전사된 생성물 (-)
p13.3
p12.3 p12.1 p11.2
q11.2 q12.1 q12.2
q21
q22.1
q23.1
0.0MBps
22.6MBps
45.2MBps
67.8MBps
90.4MBps

도면5b



도면6a



도면6b

MAF/IGH 유전자 카피 수 사이의 비	MCF7 모 (n=199)	BoM2 (n=70)
≤ 1.5	67.3%	11.4%
> 1.5	32.7%	88.6%
≥ 2	21.1%	75.7%

서 열 목 록

<110> Fundacio Privada Institut de Recerca Biomedica

Fundacio Privada Institucio Catalana De Recerca I Estudis Avancats

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

<130> P6136ES01

<150> ES 201031478

<151> 2010-10-06

<150> ES 201131073

<151> 2011-06-27

<160> 12

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 6878

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

agaggcttta aaatcttttt tcatcttcta gctgtagctc gggctgcttg tcggcttggc 60

ctccccctcc ccctttgct ctctgcctcg tctttcccca ggacttcgct attttgcttt 120

tttaaaaaaa ggcaagaaag aactaaactc ccccctccct ctcctccagt cgggctgcac 180

ctctgccttg cactttgcac agaggtagag agcgcgcgag ggagagagag gaaagaaaaa 240

aaataataaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactcccccg 300

tgccaaggcc cgcgccgccc ggacagacgc ccgccgcgcc tccagccccg agcggacgcc 360

gcgcgcgccc tgcctgcagc ccgggccggc gaggcgagcc cttccttatg caaagcgcgc 420

agcggagcgg cgagcggggg acgccgcgca ccgggccggg ctcctccagc ttcgccgccg 480

cagccaccac cgccgccacc gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgccggc 540

tcggcgcgca aggaggcgag cgagcaagga ggggccgggg cgagcgaggg agcacattgg 600

cgtgagcagg ggggagggag ggcgggcgcg gggggcgcgg gcagggcggg ggggtgtgtg 660

tgtgagcgcg ctcggaggtt tcgggccagc caccgccgcg caagctagaa gcgccccagc 720

ccggcaagct ggctcacccg ctggccaccc agcacagccc gctggcccct ctcctgcagc 780

ccatctggcg gagcggcggc ggcggcggcg gcggcggcag gagaatggca tcagaactgg 840

caatgagcaa ctccgacctg cccaccagtc ccctggccat ggaatatgtt aatgacttcg 900

atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cggtggagac cgaccgcatc atcagccagt 960

gcggccgtct catcgccggg ggctcgctgt cctccacccc catgagcacg ccgtgcagct 1020

cggtgccccc ttcccccagc ttctcggcgc ccagcccggg ctcgggcagc gagcagaagg 1080

cgcacctgga agactactac tggatgaccg gctacccgca gcagctgaac cccgaggcgc 1140

tgggcttcag ccccgaggac gcggtcgagg cgctcatcag caacagccac cagctccagg 1200

gcggcttcga tggctacgcg cgcggggcgc agcagctggc cgcggcggcc ggggccggtg 1260

ccggcgcctc cttgggcggc agcggcgagg agatgggccc cgccgccgcc gtggtgtccg 1320

ccgtgatcgc cgcggccgcc gcgcagagcg gcgcgggccc gcactaccac caccaccacc 1380

accacgccgc cggccaccac caccacccga cggccggcgc gcccggcgcc gcgggcagcg 1440

cggccgcctc ggccggtggc gctgggggcg cgggcggcgg tggcccggcc agcgctgggg 1500

gcggcggcgg cggcggcggc ggcggaggcg gcgggggcgc ggcgggggcg gggggcgccc 1560

tgcacccgca ccacgccgcc ggcggcctgc acttcgacga ccgcttctcc gacgagcagc 1620

tggtgaccat gtctgtgcgc gagctgaacc ggcagctgcg cggggtcagc aaggaggagg 1680

tgatccggct gaagcagaag aggcggaccc tgaaaaaccg cggctatgcc cagtcctgcc 1740

gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgctgcagc 1800

aagtcgacca cctcaagcag gagatctcca ggctggtgcg cgagagggac gcgtacaagg 1860

agaaatacga gaagttggtg agcagcggct tccgagaaaa cggctcgagc agcgacaacc 1920

cgtcctctcc cgagtttttc atgtgagtct gacacgcgat tccagctagc caccctgata 1980

agtgctccgc gggggtccgg ctcgggtgtg ggcttgctag ttctagagcc atgctcgcca 2040

ccacctcacc acccccaccc ccaccgagtt tggcccccct ggcccccctac acacacacaa 2100

acccgcacgc acacaccaca cacacacaca cacacacaca cacaccccac accctgctcg 2160

agtttgtggt ggtggtggct gttttaaact ggggagggaa tgggtgtctg gctcatggat 2220

tgccaatctg aaattctcca taacttgcta gcttgttttt ttttttttt tacacccccc 2280

cgccccaccc ccggacttgc acaatgttca atgatctcag cagagttctt catgtgaaac 2340

gttgatcacc tttgaagcct gcatcattca catatttttt cttcttcttc cccttcagtt 2400

catgaactgg tgttcatttt ctgtgtgtgt gtgtgtttta ttttgtttgg attttttttt 2460

ttaattttac ttttagagct tgctgtgttg cccacctttt ttccaacctc caccctcact 2520

ccttctcaac ccatctcttc cgagatgaaa gaaaaaaaaa agcaaagttt ttttttcttc 2580

tcctgagttc ttcatgtgag attgagcttg caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag 2640

acttgcagcg tgccgagttc catcgggttt ttttttagc attgttatgc taaaatagag 2700

aaaaaaatcc tcatgaacct tccacaatca agcctgcatc aaccttctgg gtgtgacttg 2760

tgagttttgg ccttgtgatg ccaaatctga gagtttagtc tgccattaaa aaaactcatt 2820

ctcatctcat gcattattat gcttgctact ttgtcttagc aacaatgaac tataactgtt 2880

tcaaagactt tatggaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcatgctgga 2940

catgtatggt ataattattt tttccttttt ttttcctttt ggcttggaaa tggacgttcg 3000

aagacttata gcatggcatt catacttttg ttttattgcc tcatgacttt tttgagttta 3060

gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa ttttgcatct gctccaaaac 3120

tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgcactg aaggcattcc ttgtcaaaga 3180

taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgttttcttt 3240

ttaataagaa tgacgcccca 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 agagttaggt ctgtttagct gtagattttt taaacgattg 3540

atgcactaaa ttgtttacta ttgtgatgtt aaggggggta gagtttgcaa ggggactgtt 3600

taaaaaaagt agcttataca gcatgtgctt gcaacttaaa tataagttgg gtatgtgtag 3660

tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagaggggaa acgcccctgt 3720

ttatatctgt aggggtattt tacattcaaa aatgtatgtt tttttttctt ttcaaaatta 3780

aagtatttgg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa 3840

ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca 3900

cagttttaag atgatgcaga ttttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattttct 3960

gtaacttaaa aaaaaatcca cagttttaaa ggcaataatc agtaaatgtt attttcaggg 4020

actgacatcc tgtctttaaa aagaaatgaa aagtaaatct taccacaata aatataaaaa 4080

aatcttgtca gttacttttc ttttacatat tttgctgtgc aaaattgttt tatatcttga 4140

gttactaact aaccacgcgt gttgttccta tgtgcttttc tttcattttc aattctggtt 4200

atatcaagaa aagaataatc tacaataata aacggcattt ttttttgatt ctgtactcag 4260

tttcttagtg tacagtttaa ctgggcccaa caacctcgtt aaaagtgtaa aatgcatcct 4320

tttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taattcaggg tgaaattata 4380

ggctgttttt tgaagtgagg aggctggccc catatactga ttagcaatat ttaatataga 4440

tgtaaattat gacctcattt ttttctcccc aaagttttca gttttcaaat gagttgagcc 4500

ataattgccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggcttc ctgagcatgg 4560

ccctacactt ctgatcagga gcaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc 4620

gcatcagagg tggcttgcgc acatatgcat tgaacggtaa agagaaacag cgcttgcctt 4680

ttcactaaag ttgactattt ttccttcttc tcttacacac cgagattttc ttgttagcaa 4740
ggcctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagtt gtttgttttg ttttgctttt 4800
ctctttaaca ctgaagatca tttgtcttaa ataggaaaaa gaaaatccac tccttacttc 4860
catatttcca agtacatatc tggtttaaac tatgttatca aatcatattt caccgtgaat 4920
attcagtgga gaacttctct acctggatga gctagtaatg atttcagatc atgctatccc 4980
cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaatatag gctgtgcttt gatttactgg 5040
tatttacccc aaaataggct gtgtatgggg gctgacttaa agatcccttg gaaagactca 5100

aaactacctt cactagtagg actcctaagc gctgacctat ttttaaatga cacaaattca 5160
tgaaactaat gttacaaatt catgcagttt gcactcttag tcatcttccc ctagcacacc 5220
aatagaatgt tagacaaagc cagcactgtt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt 5280
gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340
cttatttta agaaaacagg ttgtgtttgg tgctgctaag ttctggccag tttatcatct 5400
ggccttcctg cctatttttt acaaaacacg aagacagtgt gtaacctcga cattttgacc 5460
ttcctttatg tgctagttta gacaggctcc tgaatccaca cttaattttg cttaacaaaa 5520

gtcttaatag taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt 5580
tctttccttt ttttttttt ttcctcatca 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

cattttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caaacaaata 6000
catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aaatcctgag taagtgccat tcattacaat 6060
aagtctctaa atttaaaaaa aaaaaaatca tatgaggaaa tctagctttc ccctttacgc 6120
tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcctttc attccaatta cagaactgag 6180
cccactcgca agttggagcc atcagtggga tacgccacat tttggaagcc ccagcatcgt 6240
gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaaatc 6300
atcattatta ttattatttg cagtcatgga gaaccaccta cccctgactt ctgtttagtc 6360

tccttttaa ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct attaaatgta gtagttaact 6420

atgcctcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa gcgcactcct gcttttcgat 6480

ttatggtgtg tgcaagtaaa caggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaaa 6540

ttcactgaaa ttacaaagat acatatatat gcatatatat aatggaaagt ttcccggaat 6600

gcaacaatta gcattttaaa atcatatata ggcatgcaca ttctaaatag tacttttca 6660

tgcttcattg tttctctggc agataatttt actaagaaga aaaatagata ttcgactccc 6720

cttccctaaa caaatccacg ggcagaggct ccagcggagc cgagcccccct ggttttctcg 6780

taggccctag 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 tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt 120

ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc 180

tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240

aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actcccccgt 300

gccaaggccc gcgccgcccg gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg 360

cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca 420

gcggagcggc gagcgggggа cgccgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgccgccgc 480

agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct 540

cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc 600

gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg gggtgtgtgt 660

gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc 720

cggcaagctg gctcacccgc tggccaccca gcacagcccg ctggcccctc tcctgcagcc 780

catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc 840

aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga 900

tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg 960

cggccgtctc atcgccgggg gctcgctgtc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020

ggtgcccccct tcccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080

gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctacccgcag cagctgaacc ccgaggcgct 1140

gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200

cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc 1260

cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccg tggtgtccgc 1320

cgtgatcgcc gcggccgccg cgcagagcgg cgcgggcccg cactaccacc accaccacca 1380

ccacgccgcc ggccaccacc accacccgac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc 1440

ggccgcctcg gccggtggcg ctgggggcgc gggcggcggt ggcccggcca gcgctggggg 1500

cggcggcggc ggcggcggcg gcggaggcgg cgggggcgcg gcgggggcgg ggggcgccct 1560

gcacccgcac cacgccgccg gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620

ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680

gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccg 1740

cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800

agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860

gaaatacgag aagttggtga gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920

gtcctctccc gagtttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata 1980

cgccacattt tggaagcccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcacaa aatgaaattt 2040

gtgtgagagc tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcatggaga 2100

accacctacc cctgacttct gtttagtctc ctttttaaat aaaaattact gtgttagaga 2160

agaaggctat taaatgtagt agttaactat gcctcttgtc tgggggtttc atagagaccg 2220

gtaggaaagc gcactcctgc ttttcgattt atggtgtgtg caagtaaaca ggtgcattgc 2280

tttcaacctg ccatactagt tttaaaaatt cactgaaatt acaaagatac atatatatgc 2340

atatatataa tggaaagttt cccggaatgc aacaattagc attttaaaat catatatagg 2400

catgcacatt ctaaatagta ctttttcatg cttcattgtt tctctggcag ataattttac 2460

taagaagaaa aatagatatt cgactcccct tccctaaaca aatccacggg cagaggctcc 2520

agcggagccg agccccctgg ttttctcgta ggccctagac ggtgttgcat ttatcagtga 2580

tgtcaaacgt gctcatttgt cagacatagc tgtaaatgaa aacaatgtgt ggcaaaatac 2640

aaagttaaaa aaaaaa 2656

<210> 3

<211> 6887

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc 60

tccccctccc ccctttgctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt 120

ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc 180

tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240

aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actcccccgt 300

gccaaggccc gcgccgcccg gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg 360

cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca 420

gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc tcctccagct tcgccgccgc 480

agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct 540

cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc 600

gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg gggtgtgtgt 660

gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc 720

cggcaagctg gctcacccgc tggccaccca gcacagcccg ctggcccctc tcctgcagcc 780

catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc 840

aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga 900

tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg 960

cggccgtctc atcgccgggg gctcgctgtc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020

ggtgcccccc tcccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080

gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctacccgcag cagctgaacc ccgaggcgct 1140

gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200

cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc 1260

cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccg tggtgtccgc 1320

cgtgatcgcc gcggccgccg cgcagagcgg cgcgggcccg cactaccacc accaccacca 1380

ccacgccgcc ggccaccacc accacccgac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc 1440

ggccgcctcg gccggtggcg ctgggggcgc gggcggcggt ggcccggcca gcgctggggg 1500

cggcggcggc ggcggcggcg gcggaggcgg cgggggcgcg gcgggggcgg ggggcgccct 1560

gcacccgcac cacgccgccg gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620

ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680

gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccg 1740
cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800
agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860
gaaatacgag aagttggtga gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920
gtcctctccc gagtttttca tgtgagtctg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa 1980
gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctcgccac 2040
cacctcacca cccccacccc caccgagttt ggccccccttg gccccctaca cacacacaaa 2100

cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acaccccaca ccctgctcga 2160
gtttgtggtg gtggtggctg ttttaaactg gggagggaat gggtgtctgg ctcatggatt 2220
gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt ttttttttt acacccccc 2280
gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagttcttc atgtgaaacg 2340
ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atatttttc ttcttcttcc ccttcagttc 2400
atgaactggt gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat tttgtttgga ttttttttt 2460
taattttact tttagagctt gctgtgttgc ccacctttt tccaacctcc accctcactc 2520

cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa gcaaagtttt ttttcttct 2580
cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aaaatgtgaa atgttataga 2640
cttgcagcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga 2700
aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca accttctggg tgtgacttgt 2760
gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct gccattaaaa aaactcattc 2820
tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca acaatgaact ataactgttt 2880
caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa aaaaagcctg catgctggac 2940

atgtatggta taattatttt ttccttttt tttccttttg gcttggaaat ggacgttcga 3000
agacttatag catggcattc atacttttgt tttattgcct catgactttt ttgagtttag 3060
aacaaaacag tgcaaccgta gagccttctt cccatgaaat tttgcatctg ctccaaaact 3120
gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga aggcattcct tgtcaaagat 3180
accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt 3240
taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagtcta 3300
aaatttattt tttaaaaaga gaaactgccc cattattttt ggtttgtttt atttttattt 3360

tatatttttt ggcttttggt cattgtcaaa tgtggaatgc tctgggtttc tagtatataa 3420

tttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat gtatgctaca gataaaggaa 3480

tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgtttagctg tagatttttt aaacgattga 3540

tgcactaaat tgtttactat tgtgatgtta agggggggtag agtttgcaag gggactgttt 3600

aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat ataagttggg tatgtgtagt 3660

ctttgctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta agaggggaaa cgcccctgtt 3720

tatatctgta ggggtatttt acattcaaaa atgtatgttt ttttttcttt tcaaaattaa 3780

agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag catataatac aaaaaaaaat 3840

tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta taaaaatggc attactgcac 3900

agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg 3960

taacttaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca gtaaatgtta ttttcaggga 4020

ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt accacaataa atataaaaaa 4080

atcttgtcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca aaattgtttt atatcttgag 4140

ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct ttcattttca attctggtta 4200

tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt tttttgattc tgtactcagt 4260

ttcttagtgt acagtttaac tgggcccaac aacctcgtta aaagtgtaaa atgcatcctt 4320

ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag 4380

gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat 4440

gtaaattatg acctcatttt tttctcccca aagttttcag ttttcaaatg agttgagcca 4500

taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa ctaggcttcc tgagcatggc 4560

cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga ggagccggac aaatatggcg 4620

catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa gagaaacagc gcttgccttt 4680

tcactaaagt tgactatttt tccttcttct cttacacacc gagattttct tgttagcaag 4740

gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagttg tttgttttgt tttgcttttc 4800

tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag aaaatccact ccttacttcc 4860

atatttccaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa atcatatttc accgtgaata 4920

ttcagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga tttcagatca tgctatcccc 4980

agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg ctgtgctttg atttactggt 5040

atttacccca aaataggctg tgtatggggg ctgacttaaa gatcccttgg aaagactcaa 5100

aactaccttc actagtagga ctcctaagcg ctgacctatt tttaaatgac acaaattcat 5160

gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt catcttcccc tagcacacca 5220

atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca gccaaacacg atgacttttg 5280

ttttgttttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat tgcaactctg actgaaagac 5340

ttatttttaa gaaaacaggt tgtgtttggt gctgctaagt tctggccagt ttatcatctg 5400

gccttcctgc ctatttttta caaaacacga agacagtgtg taacctcgac attttgacct 5460

tcctttatgt gctagtttag acaggctcct gaatccacac ttaattttgc ttaacaaaag 5520

tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt gttcttgact tcagatattt 5580

ctttcctttt ttttttttt tcctcatcac aactaagaga tacacaaact ctgaagaagc 5640

agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg aaagatttta ggcaaacatt 5700

ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt tatctcatga caaatgaggc 5760

ctggattgga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat tttgatagga atctacaagg 5820

tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaaacttta gaaaatcaaa tgcaaaggtg 5880

ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag gttaactcct agtaaaaggc 5940

atttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag tgggagtagc aaacaaatac 6000

atgtttttt tttcttacaa 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 ccctgacttc tgtttagtct 6360

ccttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaatgtag tagttaacta 6420

tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag cgcactcctg cttttcgatt 6480

tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540

tcactgaaat tacaaagata catatatatg catatatata atggaaagtt tcccggaatg 6600

caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat tctaaatagt acttttttcat 6660

gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720

ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780

aggccctaga cggtgttgca tttatcagtg atgtcaaacg 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
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
65 70 75 80

Gly Ser Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly
85 90 95

Tyr Pro Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp

100 105 110

Ala Val Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe
115 120 125

Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala
130 135 140

Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala
145 150 155 160

Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly
165 170 175

Ala Gly Pro His Tyr His His His His His His Ala Ala Gly His His
180 185 190

His His Pro Thr Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala
195 200 205

Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Pro Ala Ser Ala
210 215 220

Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala
225 230 235 240

Gly Ala Gly Gly Ala Leu His Pro His His Ala Ala Gly Gly Leu His

245 250 255

Phe Asp Asp Arg Phe Ser Asp Glu Gln Leu Val Thr Met Ser Val Arg

260 265 270

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
65 70 75 80
Gly Ser Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly
85 90 95
Tyr Pro Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp
100 105 110
Ala Val Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe

115 120 125
Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala
130 135 140
Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala
145 150 155 160
Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly
165 170 175
Ala Gly Pro His Tyr His His His His His His Ala Ala Gly His His
180 185 190

His His Pro Thr Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala
195 200 205
Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Pro Ala Ser Ala
210 215 220
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala
225 230 235 240
Gly Ala Gly Gly Ala Leu His Pro His His Ala Ala Gly Gly Leu His
245 250 255
Phe Asp Asp Arg Phe Ser Asp Glu Gln Leu Val Thr Met Ser Val Arg

260 265 270
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 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