



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년03월10일  
(11) 등록번호 10-2226219  
(24) 등록일자 2021년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12Q 1/68 (2018.01) A61K 31/7088 (2006.01)  
G01N 33/574 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2014-7035982  
(22) 출원일자(국제) 2013년06월06일  
심사청구일자 2018년06월07일  
(85) 번역문제출일자 2014년12월22일  
(65) 공개번호 10-2015-0028965  
(43) 공개일자 2015년03월17일  
(86) 국제출원번호 PCT/IB2013/001859  
(87) 국제공개번호 WO 2013/182912  
국제공개일자 2013년12월12일  
(30) 우선권주장  
61/656,372 2012년06월06일 미국(US)  
(56) 선행기술조사문헌  
US20110269637 A1\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
편다시오 인스티튜트 드 르세르카 바이오메디카  
(아이알비 바르셀로나)  
스페인, 이-08028 바르셀로나, 10-12, 발디리 레  
이삭  
편다시오 프리바다 인스티튜시오 카탈라나 드 르  
세르카 아이 에스투디스 아반카츠  
스페인 이-08010 바르셀로나, 23, 파세이그 루이  
스 컴패니즈  
(72) 발명자  
고미스 로저  
스페인 이-08021 바르셀로나 씨/아베니르 35  
플래닛 에바리스트  
스페인 이-08360 바르셀로나 카넬 드 마르 씨/드  
라이브 기테라스 17  
(74) 대리인  
김태홍, 김진희

전체 청구항 수 : 총 11 항

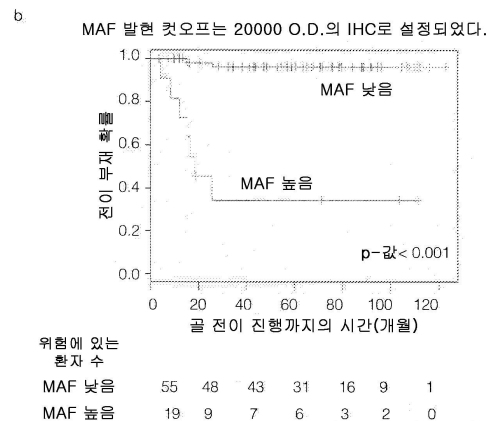
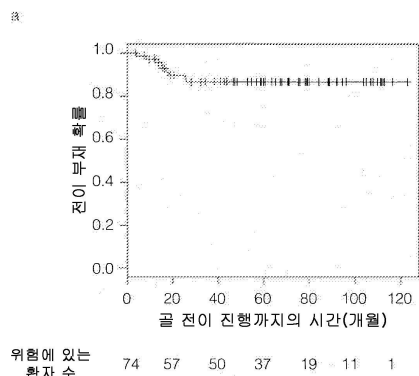
심사관 : 최수형

(54) 발명의 명칭 폐암 전이의 진단, 예후 및 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 c-MAF 유전자가 일차 종양 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 폐암에서 전이를 진단하거나 예후하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐암에서 전이를 진단하거나 예후하는 방법뿐만 아니라, c-MAF 유전자 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 다른 장기에서의 전이에 비해 골 전이를 일으키는 경향을 측정하는 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 폐암을 치료하기 위한 치료 표적으로서 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다.

대표도



## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

폐암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이를 진단하거나 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서,

- (i) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 증폭을 정량하는 단계; 및
- (ii) 앞서 수득된 증폭을 대조군 샘플과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 유전자의 증폭이 대조군 샘플에서 상기 유전자의 증폭에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 전이에 대한 양성 진단 또는 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는 것인, 폐암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이를 진단하거나 골 전이를 예측하는 시험관내 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

삭제

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

삭제

#### 청구항 6

삭제

#### 청구항 7

삭제

#### 청구항 8

삭제

#### 청구항 9

제1항에 있어서, c-MAF 유전자의 정량이 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 또는 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보적 DNA(cDNA), 또는 상기 cDNA의 단편을 정량하는 것을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 10

제9항에 있어서, c-MAF 유전자가 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA 또는 RNA 어레이에 의해 정량되는 것인 방법.

#### 청구항 11

제1항에 있어서, c-MAF 유전자의 정량이 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준을 정량하는 것을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, 단백질의 수준이 웨스턴 블롯, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 정량되는 것인 방법.

#### 청구항 13

기준 유전자 카피 수에 비해 폐암을 갖는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 상기 c-MAF 유전자의 증폭은 골 전이를 일으키는 증가된 위험을 나타내는 것인, 폐암을 갖는 대상체에서 골 전이를 예측하는 시험관내 방법.

#### 청구항 14

제13항에 있어서, c-MAF 유전자의 증폭은 좌위 16q22-q24의 증폭을 확인함으로써 확인되는 것인 방법.

#### 청구항 15

제13항 또는 제14항에 있어서, 대조군 샘플이 전이를 앓은 적이 없는 대상체로부터의 폐암의 종양 조직 샘플인 방법.

#### 청구항 16

제1항, 제13항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 증폭은 제자리 혼성화(*in situ* hybridization) 또는 PCR에 의해 확인되는 것인 방법.

#### 청구항 17

삭제

#### 청구항 18

삭제

#### 청구항 19

제1항, 제13항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 골 전이가 골용해성 전이인 방법.

#### 청구항 20

삭제

#### 청구항 21

삭제

#### 청구항 22

삭제

#### 청구항 23

삭제

#### 청구항 24

삭제

#### 청구항 25

삭제

#### 청구항 26

제1항, 제13항 및 제14항 중 어느 한 항에 있어서, 폐암이 소세포폐암(SCLC) 또는 비-소세포폐암(NSCLC)인 방법.

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

## 발명의 설명

## 기술 분야

[0001] 서열목록의 참조

[0002] 본원과 함께 출원된, 전자적으로 제출된 서열목록("3190002PC01SEQListing.txt", 48,392 bytes, 2013년 6월 6일 생성)의 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입된다.

[0003] 관련 출원의 교차참조

[0004] 본원은 2012년 6월 6일자로 출원되었고 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 미국 가특허출원 제61/656,372호에 대한 우선권을 미국 특허법 제119조 제e항(35 U.S.C. § 119(e)) 하에 주장한다.

[0005] 발명의 분야

[0006] 본 발명은 c-MAF 유전자가 일차 종양 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 것을 기초로 폐암에서 전이, 특히 골 전이를 진단하거나 예후하는 것에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐암에서 전이, 특히 골 전이를 진단하거나 예후하는 방법뿐만 아니라, c-MAF 유전자 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 폐암을 갖는 대상체에서 맞춤형 요법(customized therapy)을 디자인하는 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 폐암 전이, 특히 골 전

이의 치료를 위한 치료 표적으로서 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다.

## 배경 기술

- [0007] 상이한 중추 장기들에서 종양 세포와 주변 정상 조직 사이의 정교한 상호작용에 의해 야기된 복잡한 과정인 전이는 고형 종양을 갖는 환자에서 모든 암 사망의 90%를 차지한다. 일차 종양으로 하여금 전이를 형성하게 하는 분자 및 세포 기작은 이 주요 생명 위험 문제를 더 잘 해결하기 위해 이해되어야 한다. 전이 유전자 및 기작의 확인은 임상 실시를 위해 이 치명적인 상태의 기초 생물학 및 이의 관련성을 이해하는 데에 필수적이다. 종래 연구들이 전이 과정의 복잡성을 인지하였으나, 전이가 어떻게 왜 일어나는지, 어떤 기작이 전이를 종양 특이적 과정으로 만드는지, 어떤 사건이 일차 종양의 제거로부터 수년 후 휴면 전이를 활성화 및 치명적 전이가 되게 하는지, 및 어떤 전이 매개 유전자가 가치있는 진단 마커 및 치료 표적을 궁극적으로 구성할 것인지를 설명하지 못하였다.
- [0008] 폐 골 특이적 전이
- [0009] 폐암은 폐의 조직에서 비조절된 세포 성장을 특징으로 하는 질환이다. 치료받지 않은 상태로 방치되는 경우, 이 생장은 전이로 지칭되는 과정을 통해 폐를 넘어 인근 조직 및 궁극적으로 신체의 다른 부분으로 퍼질 수 있다. 일차 폐암으로서 공지된, 폐에서 시작되는 대다수의 암들은 상피 세포로부터 유래된 암종이다. 전 세계적으로, 폐암은 남성 및 여성에서 암 관련 사망의 가장 흔한 원인이고 2004년 현재 해마다 130만명 사망의 원인이다. 가장 흔한 증상은 호흡곤란, 기침(피를 토하는 기침을 포함함) 및 체중 손실이다.
- [0010] 폐암은 4개의 주요 유형의 폐암 및 다수의 소수 또는 희귀 형태들로 구성된다. 이들은 임상병리학적 이유로 종종 넓은 카테고리, 즉 연맥 세포암으로도 지칭되는 소세포폐암(SCLC)과 비-소세포폐암(NSCLC)으로 분류된다. NSCLC는 3개의 주요 유형인 편평세포암종(SCC), 선암종 및 대세포암종으로 더 분류된다. 대세포암종은 다른 유형의 암들의 잘 분화되지 않은 또는 미분화된 형태를 대표하기 때문에 모호하게 정의된 독립체이고, 그의 진단에 대한 기준은 광범위하게 다양하다. 폐암의 가장 흔한 원인은 담배 흡연에의 장기간 노출이다. 비흡연자는 폐암 사례들의 15%를 차지하고, 이들 사례들은 종종 유전적 인자, 라돈 가스, 석면, 및 간접 흡연을 포함하는 공기 오염의 조합에 기인한다.
- [0011] 많은 다른 암들과 유사하게 폐암은 발암유전자의 활성화 또는 종양 억제자 유전자의 불활성화에 의해 개시된다. 발암유전자는 사람들이 암에 보다 더 민감하게 만드는 것으로 생각되는 유전자이다. 원발암유전자는 특정 발암 물질에 노출되었을 때 발암유전자로 전환되는 것으로 생각된다. K-ras 원발암유전자에서의 돌연변이는 폐 선암종의 10% 내지 30%의 원인이다. 표피 성장인자 수용체(EGFR)는 세포 증식, 아포토시스, 혈관신생 및 종양 침습을 조절한다. EGFR의 돌연변이 및 증폭은 비-소세포폐암에서 공통되고, EGFR 억제제를 사용한 치료에 대한 근거를 제공한다. Her2/neu는 덜 빈번하게 영향받는다. 염색체 손상은 이형접합성의 상실을 초래할 수 있다. 이것은 종양 억제자 유전자의 불활성화를 야기할 수 있다. 염색체 3p, 5q, 13q 및 17p에 대한 손상은 특히 소세포폐암종에서 공통된다. 염색체 17p에 위치하는 p53 종양 억제자 유전자가 사례의 60% 내지 75%에서 영향받는다. 종종 돌연변이되거나 증폭되는 다른 유전자는 c-MET, NKX2-1, LKB1, PIK3CA 및 BRAF이다.
- [0012] 여러 유전학적 다형성이 폐암과 관련되어 있다. 이들은 인터류킨-1, 사이토크롬 P450, 아포토시스 촉진제, 예컨대, 캐스파제(caspas)-8, 및 DNA 복구 분자, 예컨대, XRCC1을 코딩하는 유전자에서의 다형성을 포함한다. 이들 다형성을 갖는 사람들은 발암물질에의 노출 후 폐암을 발생시킬 가능성이 더 높다.
- [0013] 분류
- [0014] 폐암은 조직학적 유형에 따라 분류된다. 이 분류는 질환의 임상 관리 및 예후에 있어서 중요한 의미를 갖는다. 대다수의 폐암은 상피 세포로부터 발생하는 암종-악성종양이다. 현미경 하에서 조직병리학자에 의해 관찰된 악성 세포의 크기 및 외관에 의해 분류되는 폐암종의 2개 가장 우세한 조직학적 유형이 비-소세포폐암종 및 소세포폐암종이다. 비-소세포 유형은 지금까지 가장 우세하다.
- [0015] 전이하는, 즉 퍼지는 폐암은 병리학자가 상당한 확신을 가지면서 종양이 폐로부터 발생되었다고, 즉 일차 폐암이라고 말할 수 있게 하는 세포 마커 프로파일을 종종 보유하기 때문에, 폐의 외부에서 발견된 암이 폐 내에서 발생된 것으로 결정될 수 있다. 선암종 조직학의 일차 폐암은 전형적으로 TTF-1에 의한 핵 면역염색을 갖는다.
- [0016] 비-소세포폐암종
- [0017] 비-소세포폐암종(NSCLC)들은 이들의 예후 및 관리가 유사하기 때문에 함께 분류된다. 3개의 주요 아류형이 존재

한다: 편평세포폐암종, 선암종 및 대세포폐암종.

- [0018] 폐암의 25%를 차지하는 편평세포폐암종은 통상적으로 중추 기관지 근처에서 시작된다. 빈 구멍 및 관련된 피사가 종양의 중심에서 공통적으로 발견된다. 잘 분화된 편평세포폐암은 종종 다른 유형의 암보다 더 느리게 성장한다.
- [0019] 선암종은 비-소세포폐암의 40%를 차지한다. 선암종은 통상적으로 말초 폐 조직으로부터 유래한다. 선암종의 대다수 사례들이 흡연과 관련되어 있으나, 흡연 경험이 없는 사람들("비-흡연자들") 중에서 선암종은 폐암의 가장 흔한 형태이다. 선암종의 아류형인 기관지폐포암종은 여성 비-흡연자에서 보다 더 흔하고, 치료에 대한 상이한 반응을 가질 수 있다.
- [0020] 소세포폐암종
- [0021] 소세포폐암종(SCLC)은 보다 덜 흔하다. 소세포폐암종은 이전에 "연맥 세포" 암종으로서 지칭되었다. 대다수 사례들이 보다 큰 기도(일차 및 이차 기관지)에서 발생하고 빠르게 성장하여 꽤 커진다. 소세포는 내분비/신생물 발달 증후군 관련성을 이 종양에게 제공하는 조밀한 신경분비 과립(신경내분비호르몬을 함유하는 소포)을 함유한다. 소세포폐암종은 처음에 화학치료 및 방사선에 보다 더 민감하지만, 발표된 대로 종종 전이성을 띠고 궁극적으로 보다 더 좋지 않은 예후를 보유했다. 소세포폐암은 오랫동안 제한된 병기 질환과 광범위한 병기 질환으로 이분법적으로 병기분류되었다. 이 유형의 폐암은 흡연과 밀접히 관련되어 있다.
- [0022] 예후
- [0023] 비-소세포폐암에서의 예후 인자는 폐 증상의 존재 또는 부재, 종양 크기, 세포 유형(조직학), 다수의 림프절로의 퍼짐(병기) 및 전이 정도, 및 혈관 침습을 포함한다. 수술불가능한 질환을 갖는 환자의 경우, 예후는 좋지 않은 수행 상태 및 10% 초과와 체중 손실에 의해 불리하게 영향받는다. 소세포폐암에서의 예후 인자는 수행 상태, 성별, 질환의 병기, 및 진단 시 중추신경계 또는 간의 관여를 포함한다.
- [0024] 비-소세포폐암종(NSCLC)의 경우, 예후는 일반적으로 좋지 않다. IA 기 질환의 완전한 수술적 절제 후, 5년 생존율은 67%이다. IB 기 질환의 경우, 5년 생존율은 57%이다. IV 기 NSCLC를 갖는 환자의 5년 생존율은 약 1%이다.
- [0025] 소세포폐암종의 경우에도 예후는 일반적으로 좋지 않다. SCLC를 갖는 환자에 대한 전체 5년 생존율은 약 5%이다. 광범위한 병기 SCLC를 갖는 환자는 1% 미만의 평균 5년 생존율을 갖는다. 제한된 병기 질환에 대한 중간 생존 시간은 20개월이고, 5년 생존율은 20%이다.
- [0026] 국립암연구소에 의해 제공된 데이터에 따르면, 미국에서 폐암의 진단 시 중간 연령은 70세이고, 사망 시 중간 연령은 72세이다. 미국에서, 의료 보험을 갖는 사람들은 보다 우수한 결과를 가질 가능성이 더 높다.
- [0027] 전이
- [0028] 일차 폐암은 그 자체가 가장 흔히 부신, 간, 뇌 및 골로 전이한다.
- [0029] 골격 전이는 진행된 병기의 폐암에서 일어나고 고수준의 이환율을 부여한다. 골 전이 질환의 최초 진단 시, 치료 개입은 통상적으로 주로 통증의 감소를 목적으로 하는 완화 방법인 전신 화학치료, 방사선치료 및 비스포스포네이트를 수반할 것이다.
- [0030] 건강한 골격 골에서, 새로운 골 매트릭스 형성과 오래된 골 매트릭스 재흡수의 동등한 균형은 골 분해 파골세포와 골 형성 조골세포의 조화된 활성을 통해 달성된다. 전이 골 질환 동안, 골 재흡수와 형성의 정상적인 균형은 침습 종양 세포, 조골세포 및 파골세포 사이에 일어나는 동형 세포-세포 상호작용 및 이형 세포-세포 상호작용에 의해 파괴된다. 폐암과 관련된 이차 골 종양을 비롯한 이차 골 종양을 갖는 대다수의 환자들은 골용해성 병변을 제시한다. 따라서, 전이 골 질환에서 현재 이용되고 있거나 평가되고 있는 대다수의 치료 방법들은 파골세포의 증가된 골 분해 활성으로부터 골 매트릭스를 보호하도록 디자인되었다. 폐의 골 전이 골용해성 병변은 전립선암과 대조적으로 유방의 골 전이 골용해성 병변과 공통된 특징이다. 후자의 경우, 거세 내성 전립선암 및 전이 골 질환에 존재하는 추가 합병증은 골경화성 병변(골 형성 또는 조골성 병변으로서도 공지되어 있음), 또는 골용해성 병변과 골경화성 병변의 조합물(혼합된 병변으로서도 지칭됨)이다. 골경화성 병변은 식물 외관 및 감소된 기계적 강도를 갖는, 잘 조직화되어 있지 않은 I형 콜라겐 피브릴로 구성된 다수의 층들을 갖는 골 침착물을 특징으로 한다. 폐암 골 전이와 유방암 골 전이의 공통된 표현형적 특징에 기초할 때, 상기 과정이 유사한 분자 기작에 근거할 가능성이 있다.
- [0031] 각각의 아류형 중에서 폐암 세포는 게놈 비정상에 의해 유도된 전사 변화를 높은 신뢰도로 보존한다. 발생한 우

성 유전자는 전체 시스템에서의 상당한 계층, 전사, 번역 및 생물학적 이중성의 존재에도 불구하고 전이 결과를 예측하는 분자 사건을 보여줄 것이다. 그러나, 암의 발생학적 역사가 부위 특이적 전이의 상이한 또는 공통된 매개자를 발생시킬 것인지는 공지되어 있지 않다. 기원 세포와 관련된 소인 인자는 전이 진행 동안 상이한 속도 제한 장벽을 발생시킬 수 있다. 본원은 상세한 신규 예후 인자가 골로의 전이를 예측하는 단계 및 치료 표적으로서의 그의 잠재적 가치를 설정하는 것이다.

[0032] 고형 종양 암을 갖는 환자의 대다수가 전이 후 사망한다는 사실은 종양이 전이하게 하는 분자 및 세포 기작을 이해하는 것이 중요하다는 것을 의미한다. 최근 공개문헌들은 어떻게 전이가 복잡하고 아직 거의 공지되지 않은 기작에 의해 야기되는지 및 어떻게 상이한 유형의 전이 세포가 특정 장기를 향한 친화성을 갖는지를 입증하였다. 이들 조직 특이적 전이 세포들은 그들이 특정 장기에서 콜로니화하게 하는 일련의 획득된 기능을 갖는다.

[0033] 그러나, 특정 폐암, 예컨대, NSCLC 폐암을 앓고 있는 환자가 전이를 앓을 것인지 아니면 앓지 않을 것인지를 진단 및/또는 예후를 가능하게 함으로써, 적합한 치료가 상기 암을 앓고 있는 대상체에게 적용될 수 있게 하는 유전적 마커는 최신기술 수준에서 존재하지 않는다. 따라서, 폐암을 앓고 있는 대상체에서 전이의 존재를 진단할 수 있게 하고/하거나 폐암을 앓고 있는 대상체가 전이, 특히 골 전이를 발생시킬 확률을 예측할 수 있게 하는 신규 마커를 확인할 필요성이 있다. 신규 예후 인자의 확인은 가장 적합한 치료의 선택에 있어서 지침으로서 작용할 것이다.

[0034] 골 전이를 예측하는 마커의 확인은 폐 세포에 의한 골 전이 조직의 퍼짐 및 콜로니화에 대한 제한을 부과함으로써 예방적 치료 기회를 제공할 것이고 치명적인 상태를 지연시키거나 변환시킬 것이다. 본 발명자들은 진정한 관련된 폐암 골 전이, 바람직한 실시양태에서 골용해성 전립선 골 전이 유전자 및 계층 변경으로서 c-MAF 및 16q22-24 계층 획득을 확인하였다.

### 발명의 내용

[0035] 본 발명자들은 과증성 폐암 세포 전이, 특히 골 전이에 영향을 미치는 신호의 균형을 확인하는 것이 상기 질환의 예후의 확립 및 상기 질환에 대한 예방적 치료 개입을 위한 귀중한 정보를 제공할 것이라는 것을 확인하였다. 본 발명자들은 MAF 및 16q22-24 계층 획득이 골로의 폐 전이 병변, 특히 골용해성 골 전이를 유발하는 데에 있어서 일정한 역할을 수행한다는 것을 확인하였다.

[0036] 본 발명자들은 폐암이 전이, 특히 골 전이를 야기할 보다 높은 경향과 관련된 마커로서 c-MAF를 확인하였다. MAF 과다발현은 c-MAF 유전자가 위치하는 좌위 16q22-q24의 증폭에 기인하는 듯하다.

[0037] c-MAF 발현 수준은 2개의 환자 코호트(cohort)에서 연구되었다. 제1 코호트는 폐암을 갖는 환자로부터의 일차 종양의 발현 프로파일 및 임상 소견을 함유한다. 제2 환자 코호트는 골로의 전이를 발생시킨 9개의 종양들, 골을 제외한 다른 부위로의 전이를 발생시켰고 5년의 최소 임상 추적기간을 갖는 16개의 종양들, 및 5년의 최소 임상 추적기간과 함께 전이를 발생시키지 않은 49개의 폐 일차 종양들을 포함하는 폐 일차 종양 샘플들로 구성된 조직 마이크로어레이의 형태로 존재하였고, 종양 세포 및 생검에서의 c-MAF 유전자(mRNA) 및 단백질 발현은 관찰되는 재발, 전이, 골 전이 및 전체 생존율을 포함하는 상이한 임상 파라미터와 양의 상관관계를 갖는다. 나아가, 이들 연구들은 폐암 전이, 특히 골 전이에서 예후에 대한 마커로서 및 표적 유전자로서 c-MAF의 역할을 보여주었다. 마찬가지로, 본 발명자들은 폐암을 갖는 대상체에서 c-MAF 유전자를 포함하는 좌위 16q22-q24의 증폭을 전이, 특히 골 전이의 존재와 연관시켰다.

[0038] 따라서, 제1 양태에서, 본 발명은

[0039] (i) 폐암을 갖는 대상체의 종양 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준 또는 16q22-24 카피 수 획득을 정량하는 단계; 및

[0040] (ii) 상기 단계에서 획득된 발현 수준 또는 카피 수를 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

[0041] 를 포함하는, 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 폐암을 갖는 대상체에서 전이, 특히 골 전이를 일으키는 경향을 예측하는 시험관내 방법으로서, 여기서 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있거나 계층 영역이 증폭되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이에 대한 양성 진단을 갖거나 전이, 특히 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다.



- [0042] 제2 양태에서, 본 발명은
- [0043] (i) 폐암을 갖는 대상체의 종양 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준 또는 16q22-24 카피 수 획득을 정량하는 단계; 및
- [0044] (ii) 상기 단계에서 획득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계
- [0045] 를 포함하는, 폐암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서, 여기서 상기 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있거나 16q22-24 카피 수가 획득되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 제공받기에 적합한 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받는다. 상기 기준 값에 비해 발현 수준이 증가되어 있지 않거나 16q22-24 카피 수가 획득되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하지 않다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받지 않는다. 일부 양태에서, 기준 값은 전이를 앓고 있지 않은 대상체로부터의 폐암 샘플에서의 c-MAF 유전자 발현 수준이다. 일부 양태에서, 폐암은 SCL이다. 일부 실시양태에서, 폐암은 NSCLC이다. 일부 양태에서, 폐암은 폐 선암종이다.
- [0046] 제3 양태에서, 본 발명은
- [0047] (i) 골 전이와 함께 폐암을 갖는 대상체의 골 전이성 종양 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준 또는 16q22-24 카피 수 획득을 정량하는 단계; 및
- [0048] (ii) 단계 (i)에서 획득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계
- [0049] 를 포함하는, 골 전이와 함께 폐암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자 발현 수준 또는 16q22-24 카피 수 획득이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합한 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받는다. 상기 기준 값에 비해 c-MAF 유전자 발현 수준이 증가되어 있지 않거나 16q22-24 카피 수가 획득되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 분해를 예방하기 위한 치료를 제공받기에 적합하지 않다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받지 않는다.
- [0050] 제4 양태에서, 본 발명은 폐암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자가 증폭되어 있거나 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향을 예측하는 시험관내 방법으로서, 여기서 상기 유전자가 대조군 샘플에 비해 증폭되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하거나 억제하는 하나 이상의 치료제를 투여받는다. 이 방법의 특정 양태에서, c-MAF 유전자가 상기 대상체의 종양 조직 샘플에서 증폭되어 있지 않거나 전위되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받지 않는다. 특정 양태에서, c-MAF의 평균 초과 발현 수준은 골 전이의 증가된 위험을 표시하고, 이 위험은 c-MAF 발현의 수준에 비례한다. 특정 양태에서, c-MAF의 발현 수준이 평균 수준에 비해 평균 + 1 표준 편차를 초과하는 경우, 상기 대상체가 이른 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다는 결론을 내릴 수 있다.
- [0051] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 폐암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 c-MAF 유전자의 증폭이 좋지 않은 임상 결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받는다. 이러한 증폭이 관찰되지 않는 경우, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받지 않는다. 제7 양태의 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 폐암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자의 전위(예를 들면, t(14,16))가 좋지 않은 임상 결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 c-MAF의 증폭 또는 전위를 갖는 환자를 위한 맞춤형 요법의 디자인에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 맞춤



형 요법은 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료 약물이다.

- [0052] 제5 양태에서, 본 발명은 폐암 전이, 특히 골 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위한 의약품의 제조에 있어서 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암으로부터의 골 전이를 예방하는 데 사용되는 c-MAF 억제제에 관한 것이다. 일부 양태에서, 본 발명은 골 분해를 피하거나 예방하는 데 사용되는 c-MAF 억제제에 관한 것이다.
- [0053] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 종양 조직 샘플에서 상승된 c-MAF 수준 또는 16q22-24 카피 수 획득을 갖는 대상체에서 골 전이를 치료하기 위한 의약품의 제조에 있어서 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질의 용도에 관한 것이다.
- [0054] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체에서 폐암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체에서 폐암의 골 전이를 예측하기 위한 이러한 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 키트의 사용 결과를 기초로 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받거나 투여받지 않는다.
- [0055] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체에서 폐암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자의 증폭, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF 유전자의 증폭된 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 기준물과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다. 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위와 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하기 위한 이러한 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 상기 키트의 사용 결과를 기초로 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받거나 투여받지 않는다.
- [0056] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체를 위한 치료를 결정하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 정량하는 수단; b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위와 비교하는 수단; 및 c) 정량된 발현 수준과 기준 발현 수준의 비교를 기초로 상기 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 감소시키기 위한 치료를 결정하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체를 위한 치료를 결정하기 위한 이러한 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 상기 키트의 사용 결과를 기초로 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받거나 투여받지 않는다.
- [0057] 또 다른 양태에서, 본 발명은 i) 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 정량하는 시약, 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계를 갖는 것으로 미리 확인된 하나 이상의 c-MAF 유전자 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위 지표를 포함하는 키트에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체에서 폐암의 골 전이를 예측하기 위한 이러한 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 상기 키트의 사용 결과를 기초로 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받거나 투여받지 않는다.
- [0058] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0059] a) 폐암을 앓고 있는 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- [0060] b) 상기 샘플에서 c-MAF의 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 정량하는 단계; 및
- [0061] c) c-MAF의 정량된 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 미리 측정된 기준 c-MAF 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 카피 수와 비교하여 상기 샘플을 유형분류하는(typing) 단계
- [0062] 를 포함하는, 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 유형분류가 상기 대상체에서 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 대상체는 유형분류에 의해 제공된 예후 정보를 기초로 하나 이상의 치료제를 투여받거나 투여받지

않는다.

[0063] 또 다른 양태에서, 본 발명은 골 전이를 예방하거나 감소시키는 물질을 폐암을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 폐암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 이때 상기 물질이 상기 대상체에서 c-MAF의 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 정량함으로써 결정된 치료 요법에 따라 투여되는 것인 방법에 관한 것이다.

[0064] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체를 코호트로 분류하는 방법으로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 발현 수준을 미리 측정된 기준 c-MAF 발현 수준 또는 정상 계수와 비교하는 단계; 및 c) 상기 샘플에서의 c-MAF의 상기 발현 수준, 또는 16q23 또는 16q22-24 좌위 증폭 또는 전위를 기초로 상기 대상체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 상기 방법은 골 전이의 증상의 보다 이른 표지를 가질 것으로 예측된 환자를 확인하는 데에 이용된다. 특정 양태에서, 상기 코호트는 임상시험의 수행을 위해 이용된다.

### 도면의 간단한 설명

[0065] 도 1: 폐 일차 종양에서 c-MAF의 유전자 발현은 카플란-메이에르 곡선에서 관찰되고 획득된 HR 및 p-값에 의해 강조되는 바와 같이 전이와 유의한 상관관계를 갖는다.

도 2: a) 일차 종양 절제 후 폐암 환자의 전체 집단에서 임의의 시간에서 골 전이 부재 생존의 확률을 보여주는 카플란-메이에르 곡선. b) 면역조직화학(IHC)에 의해 측정된 c-MAF 높은 또는 낮은 단백질 발현 카테고리에 따라 폐암 일차 종양 생검에서 임의의 시간에서 골 전이 부재 생존의 확률을 보여주는 카플란-메이에르 곡선. 표준 방법에 따라 수신 조작 곡선(ROC 곡선)(곡선 하의 면적 AUC는 0.80임)을 기초로 (20,000 광학 밀도(O.D.) 유닛의) c-MAF 발현 컷을 선택하였다.

도 3: a) 일차 종양 절제 시간부터 폐암 환자의 전체 집단에서 생존의 확률을 보여주는 카플란-메이에르 곡선. b) c-MAF 높은 또는 낮은 단백질 발현 카테고리에 따라 일차 폐암에서 생존의 확률을 보여주는 카플란-메이에르 곡선. 표준 방법에 따라 임의의 시간에서 골 전이에 기초한 수신 조작 곡선(ROC 곡선)을 기초로 (20,000 광학 밀도(O.D.) 유닛의) c-MAF 발현 컷을 선택하였다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0066] c-MAF 발현 수준을 기초로 폐암 전이를 진단하고 예후하는 방법

[0067] 본 발명자들은 c-MAF 유전자 및 단백질이 폐암 전이에서 과다발현된다는 것, 및 일차 폐 종양에서의 c-MAF 발현 수준이 폐암의 상이한 임상 파라미터, 특히 재발 및 전이 확률과 상관관계를 갖는다는 것을 확인하였다. 따라서, c-MAF 과다발현은 골에서의 폐 종양 전이의 발생과 상관관계를 갖는다. 따라서, c-MAF는 폐암을 갖는 대상체에서 전이, 특히 골 전이의 진단 및/또는 예후를 위한 마커로서 사용될 수 있다.

[0068] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은

[0069] (i) 폐암을 갖는 대상체로부터의 종양 샘플(예를 들면, 폐 종양 조직, 순환하는 폐 종양 세포, 순환하는 폐 종양 DNA)에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0070] (ii) 상기 단계에서 획득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

[0071] 를 포함하는, 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향을 예후하는 시험관내 방법으로서, 여기서 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이에 대한 양성 진단을 갖거나 전이, 바람직한 부위에서의 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0072] c-MAF 유전자(MAF 또는 MGC71685로서도 공지되어 있는 v-maf 근건막층(musculoaponeurotic) 섬유육종 발암유전자 상동체(조류))는 동종이량체 또는 이종이량체처럼 작용하는 류신 지퍼를 함유하는 전사 인자이다. DNA 결합 부위에 따라, 코딩된 단백질은 전사 활성화제 또는 억제제일 수 있다. c-MAF를 코딩하는 DNA 서열은 등록번호 NG\_016440(서열번호 1) 하에 NCBI 데이터베이스에 기재되어 있다. c-MAF의 코딩 서열은 서열번호 13에 기재되어 있다. 2개의 메신저 RNA가 상기 DNA 서열로부터 전사되고, 이들 각각은 2개의 c-MAF 단백질 동형체인 α 동형체 및 β 동형체 중 하나를 발생시킬 것이다. 상기 동형체들 각각에 대한 상보적 DNA 서열들은 각각 등록번호

NM\_005360.4(서열번호 2) 및 NM\_001031804.2(서열번호 3) 하에 NCBI 데이터베이스에 기재되어 있다.

- [0073] 본 발명의 내용에서, "전이"는 암이 시작된 장기로부터 상이한 장기로 증식되는 것으로서 이해된다. 이것은 일반적으로 혈액 또는 림프 시스템을 통해 일어난다. 암세포가 퍼져 새로운 종양을 형성하는 경우, 상기 새로운 종양은 이차 또는 전이성 종양으로서 지칭된다. 이차 종양을 형성하는 암세포는 원래의 종양의 암세포와 유사하다. 예를 들면, 폐암이 골로 퍼지는(전이되는) 경우, 이차 종양은 악성 폐암 세포로부터 형성된다. 골에서의 질환은 전이성 폐암이고 골암이 아니다. 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 전이는 골로 퍼지는(전이되는) 폐암이다.
- [0074] 본 발명에서, "폐암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하는"은 그의 징후를 연구함으로써, 즉 본 발명의 내용에서 대조군 샘플에 비해 폐암 종양 조직에서의 증가된 c-MAF 유전자 발현 수준(즉, 과다발현)으로 질환(전이)을 확인하는 것으로서 이해된다.
- [0075] 본 발명에서, "폐암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향을 예측하는"은 징후를 기초로 상기 대상체가 갖는 폐암이 장래에 전이할 것인지를 아는 것으로서 이해된다. 본 발명의 내용에서, 징후는 종양 조직에서의 c-MAF 유전자 과다발현이다.
- [0076] 본 발명의 방법은 대상체로부터의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다.
- [0077] 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.
- [0078] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "대상체" 또는 "환자"는 포유동물로서 분류된 모든 동물들을 지칭하고, 가축 및 농장 동물, 영장류 및 인간, 예를 들면, 인간, 비-인간 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 바람직하게는, 대상체는 임의의 연령 또는 인종의 인간 남성 또는 여성이다.
- [0079] 임상 결과를 지칭하기 위해 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "좋지 않은" 또는 "좋은"은 대상체가 유리한 또는 불리한 결과를 보일 것이라는 것을 의미한다. 당업자가 이해할 바와 같이, 확률의 이러한 평가는 진단되는 대상체의 100%에 대해 정확하지 않을 수 있지만, 정확한 것이 바람직하다. 그러나, 상기 용어는 대상체의 통계적으로 유의한 부분이 주어진 결과에 대한 성향을 갖는 것으로서 확인될 수 있을 것을 요구한다. 당업자는 다양한 잘 공지되어 있는 통계적 평가 수단, 예를 들면, 신뢰구간의 측정, p-값 측정, 스튜던트 T 검정, 만-휘트니 검정 등을 이용하여 부분이 통계적으로 유의한지를 용이하게 확인할 수 있다. 상세한 설명은 문헌(Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983)에서 발견된다. 바람직한 신뢰구간은 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.05, 0.01, 0.005 또는 0.0001 이하이다. 보다 바람직하게는, 집단의 대상체의 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상 또는 약 90% 이상이 본 발명의 방법에 의해 적절하게 확인될 수 있다.
- [0080] 본 발명에서, "종양 샘플"은 이차 폐암 종양으로부터 유래된 샘플(예를 들면, 종양 조직, 순환하는 종양 세포, 순환하는 종양 DNA)로서 이해된다. 상기 샘플은 통상의 방법, 예를 들면, 관련된 의학 기법에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있는 방법을 이용하는 생검에 의해 획득될 수 있다. 생검 샘플을 획득하는 방법은 종양을 큰 조각으로 분할하는 것, 또는 미세절개, 또는 당분야에서 공지되어 있는 다른 세포 분리 방법을 포함한다. 종양 세포는 작은 게이지 바늘을 이용한 흡입을 통해 세포학적 방법에 의해 획득될 수도 있다. 샘플 보존 및 취급을 단순화하기 위해, 샘플을 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 담글 수 있거나, 신속한 동결을 허용하는 고도 극저온 매질에 침지시킴으로써 먼저 동결시킨 후 조직 동결 매질, 예컨대, OCT 화합물에 담글 수 있다.
- [0081] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준을 측정함으로써 정량될 수 있다.
- [0082] 이를 목적으로, 생물학적 샘플은 조직 또는 세포 구조를 물리적으로 또는 기계적으로 파괴하여 세포내 성분을 핵산 제조용 수성 또는 유기성 용액 내로 방출하도록 처리될 수 있다. 핵산은 당업자에게 공지되어 있는 상업적으로 이용가능한 방법에 의해 추출된다(Sambrook, J., et al., "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3).
- [0083] 따라서, c-MAF 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 전사로부터 비롯된 RNA(메신저 RNA 또는 mRNA) 또는 대안적으로 상기 유전자의 상보적 DNA(cDNA)로부터 정량될 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정 실시양태에서, c-MAF 유전

자 발현 수준의 정량은 c-MAF 유전자의 메신저 RNA 또는 상기 mRNA의 단편, c-MAF 유전자의 상보적 DNA 또는 상기 cDNA의 단편, 또는 이들의 혼합물의 정량을 포함한다.

[0084] c-MAF 유전자에 의해 코딩된 mRNA 수준 또는 그의 상응하는 cDNA 수준을 검출하고 정량하기 위해 본 발명의 범위 내에서 사실상 임의의 통상의 방법이 이용될 수 있다. 비-한정적 예로서, 상기 유전자에 의해 코딩된 mRNA 수준은 통상의 방법, 예를 들면, mRNA 증폭 및 상기 mRNA 증폭 생성물의 정량을 포함하는 방법, 예컨대, 전기영동 및 염색, 또는 대안적으로 서던 블롯 및 임의의 적합한 프로브의 사용, 노던 블롯 및 관심있는 유전자(c-MAF)의 mRNA 또는 그의 상응하는 cDNA의 특이적 프로브의 사용, S1 뉴클레아제(nuclease)를 사용한 맵핑, RT-PCR, 혼성화, 마이크로어레이 등, 바람직하게는 적합한 마커를 사용한 실시간 정량적 PCR을 이용함으로써 정량될 수 있다. 마찬가지로, c-MAF 유전자에 의해 코딩된 상기 mRNA에 상응하는 cDNA 수준은 통상의 기법을 이용함으로써 정량될 수도 있고; 이 경우, 본 발명의 방법은 상응하는 mRNA의 역전사(RT)로 상응하는 cDNA를 합성하는 단계에 이어서, 상기 cDNA 증폭 생성물을 증폭하고 정량하는 단계를 포함한다. 발현 수준을 정량하는 통상의 방법들은 예를 들면, (상기 인용된) 문헌(Sambrook et al., 2001)에서 발견될 수 있다.

[0085] 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자 발현 수준은 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA 또는 RNA 어레이에 의해 정량된다.

[0086] 또한, c-MAF 유전자 발현 수준은 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질, 즉 c-MAF 단백질(c-MAF)[NCBI, 등록번호 075444], 또는 c-MAF 단백질의 임의의 기능성 등가 변이체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수도 있다. 2종의 c-MAF 단백질 동형체, 즉 403개의 아미노산(서열번호 4)으로 구성된  $\alpha$  동형체(NCBI, NP\_005351.2) 및 373개의 아미노산(서열번호 5)으로 구성된  $\beta$  동형체(NCBI, NP\_001026974.1)가 존재한다. c-MAF 유전자 발현 수준은 c-MAF 단백질 동형체들 중 임의의 동형체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준의 정량은 c-MAF 단백질의 정량을 포함한다.

[0087] 본 발명의 내용에서, "c-MAF 단백질의 기능성 등가 변이체"는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존된 또는 비-보존된 아미노산 잔기(바람직하게는, 보존된 아미노산 잔기)로 치환되어 있는 c-MAF 단백질(서열번호 4 또는 서열번호 5)의 변이체(이때, 이러한 치환된 아미노산 잔기는 유전 코드에 의해 코딩된 아미노산 잔기일 수 있거나 아닐 수 있음), 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 결실을 포함하고 c-MAF 단백질과 동일한 기능을 갖는, 즉 DNA 결합 전사 인자로서 작용하는 변이체로서 이해된다. c-MAF 단백질의 변이체는 국제 특허출원 공보 제W02005/046731호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 나타낸 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-MAF의 능력에 기초한 방법, 국제 특허출원 공보 제W02008098351호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응 영역(MARE 또는 c-MAF 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에서 레포트 유전자의 전사 능력을 차단하는 소위 억제체의 능력에 기초한 방법, 또는 미국 특허출원 공보 제2009048117A호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 NFATc2 및 c-MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 조절 하에서 레포트 유전자 발현을 차단하는 소위 억제체의 능력에 기초한 방법을 이용함으로써 확인될 수 있다.

[0088] 본 발명에 따른 변이체는 바람직하게는 c-MAF 단백질 동형체들 중 임의의 동형체의 아미노산 서열(서열번호 4 또는 서열번호 5)에 대한 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 유사성의 정도는 당업자에게 널리 공지되어 있는 알고리즘 및 컴퓨터 과정을 이용함으로써 측정된다. 2개의 아미노산 서열들 사이의 유사성은 바람직하게는 BLASTP 알고리즘[BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)]을 이용함으로써 측정된다.

[0089] c-MAF 단백질 발현 수준은 대상체로부터의 샘플에서 상기 단백질을 검출하고 정량할 수 있게 하는 임의의 통상의 방법에 의해 정량될 수 있다. 비-한정적 예로서, 상기 단백질 수준은 예를 들면, c-MAF 결합 능력을 갖는 항체(또는 항원성 결정인자를 함유하는 이의 단편)의 사용 및 형성된 복합체의 후속 정량에 의해 정량될 수 있다. 이들 분석들에서 사용된 항체는 표지될 수 있거나 표지되지 않을 수 있다. 사용될 수 있는 마커의 예시적 예로는 방사성 동위원소, 효소, 형광단, 화학발광 시약, 효소 기질 또는 보조인자, 효소 억제제, 입자, 염료 등이 있다. 비-표지된 항체(일차 항체) 및 표지된 항체(이차 항체)를 사용하는, 본 발명에서 사용될 수 있는 다양한 공지된 분석들이 존재하고, 이들 기법들은 웨스턴 블롯 또는 웨스턴 전달, ELISA(효소-연결된 면역흡착 분석), RIA(방사면역분석), 경쟁 EIA(경쟁 효소 면역분석), DAS-ELISA(이중 항체 샌드위치 ELISA), 면역세포화학적 및 면역조직화학적 기법, 특이적 항체를 포함하는 단백질 마이크로어레이 또는 바이오칩의 사용에 기초한 기법, 또



는 포맷, 예컨대, 딥스틱(dipstick)에서의 콜로이드 침전에 기초한 분석을 포함한다. 상기 c-MAF 단백질을 검출하고 정량하는 다른 방법은 친화성 크로마토그래피 기법, 리간드 결합 분석 등을 포함한다. 면역학적 방법이 이용되는 경우, 고친화성으로 c-MAF 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있는 임의의 항체 또는 시약이 그의 양을 검출하는 데에 사용될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 항체, 예를 들면, 다중클론 혈청, 하이브리도마의 상청액 또는 단일클론 항체, 항체 단편, Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')<sub>2</sub>, scFv, 인간화된 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 나노바디, 알파바디(alphabody), 스테이플드(stapled) 펩티드, 사이클로펩티드 및 항체들의 사용이 바람직하다. 본 발명의 내용에서 사용될 수 있는 시판되는 항-c-MAF 단백질 항체, 예컨대, 항체 ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071(에브캠 퍼엘씨(Abcam plc), 영국 캠브리지 씨비4 0에프엘 사이언스 파크 330 소재), 075444 단일클론 항체(마우스 항-인간 MAF 아지드 무함유 단일클론 항체, 비-접합됨, 클론 6b8)(에이비디 세로텍(AbD Serotec)) 등이 존재한다. 항-c-MAF 항체를 제공하는 많은 영리 회사들, 예컨대, 에브노바 코포레이션(Abnova Corporation), 베틀 라보라토리스(Bethyl Laboratories), 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 바이오월드 테크놀로지(Bioworld Technology), 진텍스(GeneTex) 등이 존재한다.

[0090] 특정 실시양태에서, c-MAF 단백질 수준은 웨스턴 블롯, 면역조직화학, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 정량된다.

[0091] 또 다른 특정 실시양태에서, c-MAF 단백질 수준은 엑소솜(exosome) 또는 순환하는 DNA로부터 정량된다. 엑소솜은 생체내에서 및 시험관내에서 대다수 유형의 세포들에 의해 분비되는 40 내지 100 nm 막 소포이다. 엑소솜은 구획의 내강 내로 내부를 향해 자라기 시작함으로써 다소포체(MVB)로서 지칭되는 특정 엔도솜 집단을 형성한다. MVB와 원형질막의 융합 시, 이들 내부 소포들이 분비된다. 엑소솜은 당분야에서 잘 공지되어 있는 여러 방법들에 의해 다양한 세포주 또는 체액으로부터 분리될 수 있다(Thery C. et al., Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 여러 시판되는 키트들, 예컨대, 엑소퀵(ExoQuick)<sup>TM</sup> 또는 엑소테스트(ExoTest)<sup>TM</sup>가 엑소솜의 단리를 위해 이용될 수 있다.

[0092] 본 발명의 제1 방법은 대상체로부터의 종양 샘플(일차 종양 생검, 순환하는 종양 세포 및 순환하는 종양 DNA를 포함하나 이들로 한정되지 않음)에서 수득된 c-MAF 유전자 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계를 제2 단계에서 포함한다.

[0093] 일단 폐암을 갖는 대상체로부터의 종양 조직 샘플, 순환하는 종양 세포 또는 순환하는 종양 DNA에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 대조군 샘플과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 그의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다는 결론을 내릴 수 있다.

[0094] c-MAF 유전자 발현 수준의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가져야 한다. 분석될 종양의 유형에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 진단이 평가되어야 하는 경우, 기준 샘플은 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체로부터의 종양 조직 샘플, 또는 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체로부터의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.

[0095] 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 수득된다. 일반적으로, 전형적인 기준 샘플은 임상적으로 잘 문서화되어 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. 마커의 기준 농도를 측정할 때 다양한 사항들을 고려한다. 이러한 고려사항들 중에는 환자의 연령, 체중, 성별, 일반적인 신체 상태 등이 있다. 예를 들면, 바람직하게는 상기 고려사항에 따라, 예를 들면, 다양한 연령 카테고리에 따라 분류된 2명 이상, 10명 이상, 100명 이상 내지 바람직하게는 1000명 초과 대상체들로 구성된 동등한 양의 군이 기준 군으로서 간주된다. 기준 값의 유도에 사용되는 샘플 채취물은 바람직하게는 연구의 대상 환자와 동일한 유형의 암(예를 들면, 폐암)을 앓고 있는 대상체에 의해 형성될 것이다. 유사하게, 환자의 코호트 내에서의 기준 값은 수신 조작 곡선(ROC)을 이용하고 모든 민감성 및 특이성 쌍에 대한 곡선 하의 면적을 측정하여 어떤 쌍이 기준 값에 상응하는 가장 우수한 값을 제공하는지를 확인함으로써 확립될 수 있다.

[0096] 일단 이 중간 또는 기준 값이 확립되면, 이 중간 값을 갖는 환자로부터의 종양 조직에서 발현된 이 마커의 수준이 비교되어 "증가된" 발현 수준으로 배정될 수 있다. 대상체들 사이의 가변성(예를 들면, 연령, 인종 등을 지칭하는 양태)으로 인해, c-MAF 발현의 절대적인 기준 값을 확립하는 것은 (사실상 불가능하지 않지만) 매우 어렵다. 따라서, 특정 실시양태에서, c-MAF 발현의 "증가된" 또는 "감소된" 발현에 대한 기준 값은 전술된 방법들

중 임의의 방법에 의해 잘 문서화된 질환을 갖는 대상체로부터 단리된 1개 또는 수개의 샘플에서 분석을 수행하는 단계를 포함하는 통상의 수단으로 c-MAF 발현 수준의 백분위수를 계산함으로써 결정된다. 그 다음, c-MAF의 "감소된" 수준은 바람직하게는 c-MAF 발현 수준이 정상 집단에서의 50번째 백분위수 이하(예를 들면, 정상 집단에서의 60번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 70번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 80번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 90번째 백분위수 이하의 발현 수준 및 정상 집단에서의 95번째 백분위수 이하의 발현 수준을 포함함)인 샘플로 지정될 수 있다. 그 다음, "증가된" c-MAF 유전자 발현 수준은 바람직하게는 c-MAF 유전자 발현 수준이 정상 집단에서의 50번째 백분위수 이상(예를 들면, 정상 집단에서의 60번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 70번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 80번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 90번째 백분위수 이상의 발현 수준 및 정상 집단에서의 95번째 백분위수 이상의 발현 수준을 포함함)인 샘플로 지정될 수 있다.

- [0097] 본 발명에서, "증가된 발현 수준"은 c-MAF 유전자의 수준을 지칭할 때 기준 샘플 또는 대조군 샘플에서의 발현 수준보다 더 높은 발현 수준으로서 이해된다. 구체적으로, 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 심지어 더 높은 배수일 때 높은 c-MAF 발현 수준을 갖는 것으로 간주될 수 있다.
- [0098] 본 발명의 내용에서, 대상체가 앓고 있는 폐암이 신체의 다른 장기, 특정 실시양태에서 골로 전이되었을 때 "대상체가 전이에 대한 양성 진단을 갖는" 것으로 이해된다.
- [0099] 보다 바람직한 실시양태에서, 골로의 전이는 골용해성 골 전이이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 표현 "골용해성 골 전이"는 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파골세포 활성화의 자극으로부터 비롯된 전이의 근처에서 발생되고 심한 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 한 유형을 지칭한다.
- [0100] 다른 한편으로, 본 발명에서 대상체가 앓고 있는 폐암이 장래에 전이할 확률이 높은 경우 "대상체는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는" 것으로 이해된다.
- [0101] 당업자는 일차 폐 종양이 전이될 경향의 예측이 확인될 모든 대상체들(즉, 100%의 대상체)에 대해 정확하기 위한 것이 아니라는 것을 이해할 것이다. 그럼에도 불구하고, 상기 용어는 대상체들(예를 들면, 코호트 연구에서 코호트)의 통계적으로 유의한 부분을 확인할 수 있을 것을 요구한다. 당업자는 다양한 잘 공지되어 있는 통계적 평가 수단, 예를 들면, 신뢰구간의 측정, p-값의 측정, 스튜던트 T 검정, 만-휘트니 검정 등을 이용하여 단순한 방식으로 부분이 통계적으로 유의한지를 확인할 수 있다. 상세한 설명은 문헌(Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983)에 제공되어 있다. 바람직한 신뢰구간은 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 또는 0.0001이다. 보다 바람직하게는, 집단의 대상체의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상이 본 발명의 방법에 의해 적절하게 확인될 수 있다.
- [0102] 본원에서 사용된 바와 같이, "골 분해를 피하거나 예방하는 물질"은 조골세포 증식을 자극하거나, 파골세포 증식을 억제하거나 골 구조를 고정함으로써 골 분해를 예방할 수 있거나, 억제할 수 있거나, 치료할 수 있거나, 감소시킬 수 있거나 중지시킬 수 있는 임의의 분자를 지칭한다.
- [0103] 본원에서 사용된 바와 같이, "c-MAF 억제제"는 c-MAF 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(c-MAF 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 c-MAF 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 c-MAF 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 c-MAF 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. c-MAF 유전자 발현 억제제는 예컨대, 국제 특허출원 공보 제W02005/046731호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 제시된 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-MAF의 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법; 예컨대, 국제 특허출원 공보 제W02008098351호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응 영역(MARE 또는 c-MAF 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에서 레포터 유전자의 전사 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법; 또는 예컨대, 미국 특허출원 공보 제2009048117A호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 NFATc2 및 c-MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 조절 하에서 레포터 유전자의 발현을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법을 이용함으로써 확인될 수 있다.
- [0104] 본원에서 사용된 바와 같이, 라파마이신(rapamycin)의 포유동물 표적(mTOR) 또는 "mTor"은 EC 2.7.11.1에 상응



하는 단백질을 지칭한다. mTor 효소는 세린/쓰레오닌 단백질 키나제이고, 세포 증식, 세포 이동성, 세포 성장, 세포 생존 및 전사를 조절한다.

[0105] 본원에서 사용된 바와 같이, "mTor 억제제"는 mTor 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(mTor 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 mTor 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 mTor 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 mTor 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. mTor 억제제는 mTor 활성의 억제 이외에 하나 이상의 표적을 갖는 억제제를 포함한다.

[0106] 본원에서 사용된 바와 같이, "Src"는 EC 2.7.10.2에 상응하는 단백질을 지칭한다. Src는 비-수용체 티로신 키나제 및 원발암유전자이다. Src는 세포 성장 및 배아 발생에 있어서 일정할 역할을 수행할 수 있다.

[0107] 본원에서 사용된 바와 같이, "Src 억제제"는 Src 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(Src 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 Src 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 Src 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 Src 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다.

[0108] 본원에서 사용된 바와 같이, "프로스타글란딘-엔도퍼록사이드 합성효소 2", "사이클로옥시게나제(cyclooxygenase)-2" 또는 "COX-2"는 EC 1.14.99.1에 상응하는 단백질을 지칭한다. COX-2는 아라키돈산을 프로스타글란딘 엔도퍼록사이드 H2로 전환시키는 것을 담당한다.

[0109] 본원에서 사용된 바와 같이, "COX-2 억제제"는 COX-2 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(COX-2 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 COX-2 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 COX-2 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 COX-2 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다.

[0110] 본원에서 사용된 바와 같이, "결과" 또는 "임상 결과"는 질환 및/또는 질환 진행의 발생된 과정을 지칭하고 예를 들면, 재발, 재발까지의 시간, 전이, 전이까지의 시간, 전이의 수, 전이 부위의 수 및/또는 질환으로 인한 사망을 특징으로 할 수 있다. 예를 들면, 좋은 임상 결과는 치유, 재발의 예방, 전이의 예방 및/또는 고정된 시간 이내의 (재발 없는) 생존을 포함하고, 좋지 않은 임상 결과는 질환 진행, 전이 및/또는 고정된 시간 이내의 사망을 포함한다.

[0111] 본원에서 사용된 바와 같이, "예측"은 폐암을 앓고 있는 대상체가 원거리 장기로의 전이를 발생시킬 확률의 측정을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "좋은 예후"는 대상체가 설정 시간 이내에 생존하고/하거나 재발 또는 원거리 전이를 갖지 않거나 가질 위험이 낮을 것으로 예상(예를 들면, 예측)된다는 것을 표시한다. 용어 "낮은"은 상대적인 용어이고, 본원의 내용에서 임상 결과(재발, 원거리 전이 등) 면에서 "낮은" 발현 군의 위험을 지칭한다. "낮은" 위험은 불균질한 암 환자 집단에 대한 평균 위험보다 더 낮은 위험으로서 간주될 수 있다. 문헌(Paik et al. (2004))의 연구에서 재발의 전체 "낮은" 위험은 15%보다 더 낮은 위험으로서 간주되었다. 또한, 위험은 시간의 함수로 변화할 것이다. 시간은 예를 들면, 암의 초기 진단 후 또는 예후가 수행된 후 5년, 10년, 15년 또는 심지어 20년일 수 있다.

[0112] 본원에서 사용된 바와 같이, "좋지 않은 예후"는 대상체가 설정 시간 이내에 생존하지 않고/않거나 재발 또는 원거리 전이를 갖거나 가질 위험이 높을 것으로 예상, 예를 들면, 예측된다는 것을 표시한다. 용어 "높은"은 상대적인 용어이고, 본원의 내용에서 임상 결과(재발, 원거리 전이 등) 면에서 "높은" 발현 군의 위험을 지칭한다. "높은" 위험은 불균질한 암 환자 집단에 대한 평균 위험보다 더 높은 위험으로서 간주될 수 있다. 문헌(Paik et al. (2004))의 연구에서 재발의 전체 "높은" 위험은 15%보다 더 높은 위험으로서 간주되었다. 또한, 위험은 시간의 함수로 변화할 것이다. 시간은 예를 들면, 암의 초기 진단 후 또는 예후가 수행된 후 5년, 10년, 15년 또는 심지어 20년일 수 있다.

[0113] 본원에서 사용된 바와 같이, "기준 값"은 환자 또는 환자로부터 채취된 샘플의 실험실 검사에 의해 수득된 값/데이터에 대한 기준으로서 사용된 실험실 값을 지칭한다. 기준 값 또는 기준 수준은 절대 값; 상대 값; 상한 및/또는 하한을 갖는 값; 값의 범위; 평균 값; 중간 값,; 중앙 값; 또는 특정 대조군 또는 기준 값과 비교된 값일 수 있다. 기준 값은 초기 시점에서의 개별 샘플 값, 예컨대, 시험되는 대상체의 샘플로부터 수득된 값에 기초할 수 있다. 기준 값은 다수의 샘플들, 예컨대, 역연령이 일치된 군의 대상체 집단으로부터의 샘플에 기초할 수 있거나, 시험될 샘플을 포함하거나 배제하는 샘플의 풀(pool)에 기초할 수 있다.

[0114] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료"는 본원에 기재된 임상 병태에 대한 감수성을 종결시키거나, 예방하거나, 호전시키거나 감소시키는 것을 목적으로 하는 임의의 유형의 요법을 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 용

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

[0115] 본원에서 사용된 바와 같이, "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 분리된 생물학적 물질을 의미한다. 생물학적 샘플은 c-MAF 유전자의 발현 수준을 측정하기에 적합한 임의의 생물학적 물질을 함유할 수 있다. 상기 샘플은 임의의 적합한 생물학적 조직 또는 체액, 예를 들면, 종양 조직, 혈액, 혈액 혈장, 혈청, 소변 또는 뇌척수액(CSF)으로부터 분리될 수 있다.

[0116] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 유전자의 "발현 수준"은 대상체의 샘플에서 유전자에 의해 생성된 유전자 생성물의 측정가능한 양을 지칭하는데, 이때 유전자 생성물은 전사 생성물 또는 번역 생성물일 수 있다. 따라서, 발현 수준은 핵산 유전자 생성물, 예컨대, mRNA 또는 cDNA, 또는 폴리펩티드 유전자 생성물에 관한 것일 수 있다. 발현 수준은 대상체의 샘플 및/또는 기준 샘플 또는 샘플들로부터 유도되고, 예를 들면, 새로(*de novo*) 검출될 수 있거나 이전 측정에 상응할 수 있다. 발현 수준은 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이 예를 들면, 마이크로어레이 방법, PCR 방법(예컨대, qPCR), 및/또는 항체-기초 방법을 이용함으로써 결정될 수 있거나 측정될 수 있다.

[0117] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 카피 수"는 세포에서 핵산 분자의 카피 수를 지칭한다. 유전자 카피 수는 세포의 게놈(염색체) DNA에서의 유전자 카피 수를 포함한다. 정상 세포(비-종양 세포)에서 유전자 카피 수는 정상적으로 2 카피(염색체 쌍의 각각의 구성원에서 1 카피)이다. 유전자 카피 수는 종종 세포 집단의 샘플로부터 수득된 유전자 카피 수의 절반을 포함한다.

[0118] "증가된 발현 수준"은 c-MAF 유전자의 수준을 지칭할 때 기준 샘플 또는 대조군 샘플에서의 발현 수준보다 더 높은 발현 수준으로서 이해된다. 이 증가된 수준은 유전자, 또는 16q23 또는 16q22-24 염색체 좌위 증폭 또는 전위에 의해 야기될 수 있으나 다른 기작을 배제하지 않는다. 구체적으로, 샘플은 환자로부터 분리된 샘플에서의 발현 수준이 기준 또는 대조군에 비해 적어도 약 1.1배, 1.2배, 1.3배, 1.4배, 1.5배, 2배, 3배, 4배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 심지어 더 높은 배수일 때 높은 c-MAF 발현 수준을 갖는 것으로 간주될 수 있다.

[0119] 본원에서 사용된 바와 같이, "프로브"는 관심있는 특정 핵산 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 프로브는 전위가 일어나는 것으로 공지되어 있는 염색체의 영역에 대한 특이성을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로브는 특이적 표지 또는 태그를 갖는다. 일부 실시양태에서, 태그는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브는 그의 표지 부착이 백금과 핵산 및 단백질의 안정한 배위결합에 기초한 DNA 제자리 혼성화(*in situ* hybridization) 프로브이다. 일부 실시양태에서, 프로브는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 제12/067532호 및 제12/181,399호에 기재되어 있거나 문헌(Swennenhuis et al. "Construction of repeat-free fluorescence in situ hybridization probes" *Nucleic Acids Research* 40(3):e20 (2012))에 기재되어 있다.

[0120] 본원에서 사용된 바와 같이, "태그" 또는 "표지"는 프로브, 또는 프로브가 부착되는 위치가 가시화되거나, 표시되거나 다른 방식으로 포착되게 하는, 프로브와 직접적으로 또는 간접적으로 관련되어 있는 임의의 물리적 분자를 지칭한다.

[0121] 본원에서 사용된 바와 같이, "전위"는 동등하지 않은 또는 동등한 양의 염색체 물질이 염색체들 사이에 교환되는 것을 지칭한다. 일부 경우, 전위는 동일한 염색체 상에서 일어난다. 일부 경우, 전위는 상이한 염색체들 사이에서 일어난다. 전위는 유방암 및 백혈병을 비롯한 많은 유형의 암들에서 높은 빈도로 일어난다. 전위는 일차 상호간 전위 또는 보다 복잡한 이차 전위일 수 있다. 많은 암들에서 개시 사건을 구성하는 것으로 생각되는 면역글로불린 중쇄(IgH) 좌위를 수반하는 여러 일차 전위가 존재한다(Eychene, A., Rocques, N., and Puopponnot,

C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693).

- [0122] 본원에서 사용된 바와 같이, "배수체(polyploid)" 또는 "배수성"은 세포가 2 카피 초과와 관심있는 유전자를 함 유한다는 것을 표시한다. 일부 경우, 관심있는 유전자는 MAF이다. 일부 실시양태에서, 배수성은 관심있는 유전자의 발현의 측정과 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 배수성은 게놈 불안정성과 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 게놈 불안정성은 염색체 전위를 초래할 수 있다.
- [0123] 본원에서 사용된 바와 같이, "전체 게놈 서열결정"은 유기체의 전체 게놈이 한번에 서열결정되는 과정이다. 예를 들면, 문헌(Ng., P.C. and Kirkness, E.F., Whole Genome Sequencing. 2010. Methods in Molecular Biology. 628: 215-226)을 참조한다.
- [0124] 본원에서 사용된 바와 같이, "엑솜(exome) 서열결정"은 유기체의 DNA의 전체 코딩 영역이 서열결정되는 과정이다. 엑솜 서열결정에서, mRNA가 서열결정된다. 게놈의 비-번역된 영역은 엑솜 서열결정에 포함되지 않는다. 예를 들면, 문헌(Choi, M. et al., Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. 2009. PNAS. 106(45): 19096-19101)을 참조한다.
- [0125] "종양 조직 샘플"은 순환하는 종양 세포 및 순환하는 종양 DNA를 포함하나 이들로 한정되지 않는, 폐암 종양으로부터 유래된 조직 샘플로서 이해된다. 상기 샘플은 통상의 방법, 예를 들면, 관련된 의학 기법에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있는 방법을 이용하는 생검에 의해 획득될 수 있다.
- [0126] "골용해성 골 전이"는 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파골세포 활성화의 자극으로부터 비롯된 전이의 근처에서 발생되고 심한 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 한 유형을 지칭한다.
- [0127] 폐 종양을 갖는 환자에서 본 발명의 맞춤형 요법을 디자인하는 방법
- [0128] 최신기술 수준에서 잘 공지되어 있는 바와 같이, 암을 앓고 있는 대상체에게 투여되는 치료는 상기 암이 악성 종양인지, 즉 전이될 확률이 높은지, 아니면 상기 암이 양성 종양인지에 달려 있다. 제1 가정에서, 선택되는 치료는 전신 치료, 예컨대, 화학치료이고, 제2 가정에서 선택되는 치료는 국소 치료, 예컨대, 방사선치료이다.
- [0129] 따라서, 본 발명에 기재된 바와 같이, 폐암 세포에서의 c-MAF 유전자 과다발현이 전이의 존재와 관련되어 있는 한, c-MAF 유전자 발현 수준은 상기 암을 앓고 있는 대상체에 대한 가장 적합한 치료의 관점에서 결정할 수 있게 한다.
- [0130] 따라서, 또 다른 양태에서 본 발명은
- [0131] (i) 폐암을 갖는 대상체의 종양 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0132] (ii) 상기 단계에서 획득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계
- [0133] 를 포함하는, 폐암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합한 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다. 본 발명의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받는다. 이때, c-MAF 유전자 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 분해를 예방하기 위한 치료를 제공받기에 적합하지 않다. 이 방법의 특정 양태에서, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받지 않는다.
- [0134] 특정 실시양태에서, 전이는 골 전이이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0135] 용어 및 표현 "대상체", "폐암", "종양 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.
- [0136] 본 발명의 제2 방법은 폐암을 앓고 있는 대상체의 종양 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다.
- [0137] 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.
- [0138] 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. 분석되는 종양의 유형에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 기준 샘플은 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플, 또는 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.

[0139] 또 다른 실시양태에서, 평균을 초과하는 c-MAF의 발현 수준은 골 전이의 증가된 위험을 표시하고, 이 위험은 c-MAF 발현 수준에 비례한다. 따라서, 폐암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험은 용량 의존적이다.

[0140] 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 대상체가 전이를 예방하고/하거나(대상체에서 아직 전이가 일어나지 않은 경우) 치료하는(대상체에서 이미 전이가 일어난 경우) 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하다는 결론을 내릴 수 있다. 이러한 증가된 발현이 관찰되지 않는 경우, 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 하나 이상의 치료제를 투여받지 않는다.

[0141] 암이 전이된 경우, 화학치료, 호르몬 치료, 면역치료 또는 이들의 조합을 포함하나 이들로 한정되지 않는 전신 치료가 이용된다. 또한, 방사선치료 및/또는 수술이 이용될 수 있다. 치료의 선택은 일반적으로 일차 암의 종류, 크기, 전이의 위치, 환자의 연령 및 일반적인 건강, 및 이전에 이용된 치료의 유형에 달려 있다.

[0142] 전신 치료는 전신에 도달하는 치료이고, 예컨대, 다음과 같은 치료이다:

[0143] - 화학치료는 암세포를 파괴하는 약물의 사용이다. 약물은 일반적으로 경구 또는 정맥내 경로를 통해 투여된다. 종종, 화학치료는 방사선치료와 함께 이용된다. 폐암에 적합한 화학치료제는 하기 치료제들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 안쓰라사이클린(anthracyclines)(독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 폐결합된(pegylated) 리포솜 독소루비신), 택산(Taxanes)(파클리탁셀(paclitaxel), 독세탁셀(docetaxel), 파클리탁셀에 결합된 알부민 나노입자), 5-플루오로우라실(연속 관주 5-FU, 카페시타빈(capecitabine)), 빈카 알칼로이드(Vinca alkaloids)(비노렐빈(vinorelbine), 빈블라스틴(vinblastine)), 겐시타빈(Gemcitabine), 백금 염(시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin)), 사이클로포스프아미드, 에토포사이드(Etoposide) 및 상기 치료제들 중 하나 이상의 조합물, 예컨대, 사이클로포스프아미드/안쓰라사이클린 +/- 5-플루오로우라실 요법(예컨대, 독소루비신/사이클로포스프아미드(AC), 에피루비신/사이클로포스프아미드(EC), 사이클로포스프아미드/에피루비신/5-플루오로우라실(CEF), 사이클로포스프아미드/독소루비신/5-플루오로우라실(CAF), 5-플루오로우라실/에피루비신/사이클로포스프아미드(FEC)), 사이클로포스프아미드/메토티렉세이트/5-플루오로우라실(CMF), 안쓰라사이클린/택산(예컨대, 독소루비신/파클리탁셀 또는 독소루비신/독세탁셀), 독세탁셀/카페시타빈, 겐시타빈/파클리탁셀, 택산/백금 요법(예컨대, 파클리탁셀/카보플라틴 또는 독세탁셀/카보플라틴).

[0144] - 호르몬 치료는 일부 호르몬들이 암 성장을 촉진한다는 사실에 기초한다. 예를 들면, 여성에서 난소에 의해 생성된 에스트로젠은 종종 유방암 성장을 촉진한다. 이들 호르몬들의 생성을 중단하는 여러 방법들이 존재한다. 한 방법은 이들을 생성하는 장기(여성의 경우 난소, 남성의 경우 정소)를 제거하는 것이다. 보다 빈번하게는, 이들 장기들이 호르몬을 생성하지 못하게 하거나 호르몬이 암세포에 작용하지 못하게 하는 약제가 사용될 수 있다.

[0145] - 면역치료는 환자의 면역 시스템 자체가 암과 싸우도록 돕는 치료이다. 전이 환자를 치료하는 데에 이용되는 여러 유형의 면역치료가 존재한다. 이들은 사이토카인, 단일클론 항체 및 항종양 백신을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0146] 또 다른 양태에서, 치료제는 알파라딘(Alpharadin)(라듐-223 디클로라이드)이다. 알파라딘은 라듐-223 붕괴로부터의 알파 방사선을 이용하여 암세포를 사멸시킨다. 라듐-223은 천연적으로 칼슘 유사체로서의 그의 성질을 통해 골 전이에 자가 표적화한다. 알파 방사선은 (베타 또는 감마 방사선에 기초한 현재의 방사선치료에 비해) 2 개 내지 10개 세포의 매우 짧은 범위를 가지므로, 주변 건강한 조직(특히 골수)에 보다 적은 손상을 야기한다. 라듐-223은 칼슘과 유사한 성질을 갖기 때문에 칼슘이 신체에서 골을 구축하는 데에 사용되는 부위(보다 빠른 비정상적인 골 성장의 부위, 예컨대, 진행된 거세 내성 전립선암을 갖는 남성의 골 전이에서 관찰되는 골 성장의 부위를 포함함)로 이동된다. 주입 후 라듐-223은 혈류를 통해 비정상적인 골 성장의 부위로 운반된다. 암이 신체에서 시작되는 부위는 일차 종양으로서 공지되어 있다. 이들 세포들 중 일부는 이탈되어 혈류를 통해 신체의 또 다른 부분으로 운반될 수 있다. 그 다음, 암세포는 신체의 그 부분에서 정착하여 새로운 종양을 형성할 수 있다. 이것은 일어나는 경우 이차 암 또는 전이로서 지칭된다. 후기 전립선암을 갖는 환자들의 대다수는 그



들의 골에서 질환의 최대 고통을 앓는다. 라툼-223을 사용하는 목적은 이 이차 암을 선택적으로 표적화하는 것이다. 골에서 흡수되지 않는 임의의 라툼-223은 신속히 장으로 이동되어 배출된다.

[0147]

또 다른 양태에서, 치료제는 mTor 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 이중 mTor/PI3 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABI0099(시롤리무스(sirolimus)), 라파마이신(rapamycin)(시롤리무스), 아브락산(Abraxane)(파클리탁셀), 아브소브(Absorb)(에버롤리무스(everolimus)), 아피니토르(Afinitor)(에버롤리무스), 글리벡(Gleevec)과 함께 아피니토르, AS703026(피마서티브(pimasertib)), 액세스(Axxess)(우미롤리무스(umirolimus)), AZD2014, BEZ235, 바이오프리덤(Biofreedom)(우미롤리무스), 바이오매트릭스(BioMatrix)(우미롤리무스), 바이오매트릭스 플렉스(우미롤리무스), CC115, CC223, 콤보 생물조작된 시롤리무스 용출 스텐트 오르부스니치(ORBUSNEICH)(시롤리무스), 쿠락신(Curaxin) CBLC102(메파크린(mepacrine)), DE109(시롤리무스), DS3078, 엔데버(Endeavor) DES(조타롤리무스(zotarolimus)), 엔데버 레졸루트(Resolute)(조타롤리무스), 페마라(Femara)(레트로졸(letrozole)), 호세나(Hocena)(안트로퀴놀론(antroquinonol)), INK128, 인스피론(Inspiron)(시롤리무스), IPI504(레타스피마이신(retaspimycin) 하이드로클로라이드), KRN951(티보자닙(tivozanib)), ME344, MGA031(테플리주맵(teplizumab)), 미스텐트(MiStent) SES(시롤리무스), MKC1, 노보리(Nobori)(우미롤리무스), OSI027, OVI123(코다이세핀(cordycepin)), 팔로미드(Palomid) 529, PF04691502, 프로무스 엘리먼트(Promus Element)(에버롤리무스), PWT33597, 라파문(Rapamune)(시롤리무스), 레솔루트(Resolute) DES(조타롤리무스), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75(보세투주맵 마포도틴(vorsetuzumab mafodotin)), 시너지(Synergy)(에버롤리무스), 탈토르빅(Taltorvic)(리다포롤리무스(ridaforolimus)), 타세바(Tarceva)(에를로티닙(erlotinib)), 토리셀(Torise1)(템시롤리무스(temsirolimus)), 자이언스 프라임(Xience Prime)(에버롤리무스), 자이언스 V(에버롤리무스), 조맥스(Zomaxx)(조타롤리무스), 조트레스(Zortress)(에버롤리무스), 조타롤리무스 용출 말초 스텐트 메드트로닉(MEDTRONIC)(조타롤리무스), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, 캔스타틴(canstatin) 젠자임(GENZYME)(캔스타틴), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, 라파마이신 온코이쿰(ONCOIMMUNE)(시롤리무스), SB2602, 시롤리무스 PNP 삼양 바이오파마슈티칼스(SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS)(시롤리무스), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, 애드바칸(Advacan)(에버롤리무스), AZD8055, 사이퍼 셀렉트 플러스(Cypher Select Plus) 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 사이퍼 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 약물 코팅된 풍선(시롤리무스), E-매직 플러스(Magic Plus)(시롤리무스), 엠토르(Emtor)(시롤리무스), 에스프릿(Esprit)(에버롤리무스), 에버토르(Evertor)(에버롤리무스), HBF0079, LCP-시로(Siro)(시롤리무스), 리무스 클라리스(Limus CLARIS)(시롤리무스), mTOR 억제제 셀죐(CELLZOME), 네보(Nevo) 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), nPT-mTOR, 라파칸(Rapacan)(시롤리무스), 레나셉트(Renacept)(시롤리무스), 레졸브(ReZolve)(시롤리무스), 로카스(Rocas)(시롤리무스), SF1126, 시롤림(Sirolim)(시롤리무스), 시롤리무스 노쓰 차이나(NORTH CHINA)(시롤리무스), 시롤리무스 란박시(RANBAXY)(시롤리무스), 시롤리무스 와슨(WATSON)(시롤리무스), 시로판(Siropan)(시롤리무스), 시로바(Sirova)(시롤리무스), 수프랄리무스(Supralimus)(시롤리무스), 수프랄리무스-코어(시롤리무스), 타크롤리무스(tacrolimus) 와슨(타크롤리무스), TAF93, 템시롤리무스 아코드(ACCORD)(템시롤리무스), 템시롤리무스 산도즈(SANDOZ)(템시롤리무스), TOP216, 자이언스 프라임(에버롤리무스), 및 자이언스 V(에버롤리무스). 특정 양태에서, mTor 억제제는 아피니토르(에버롤리무스)이다 ([http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&NovaId=4029462064338207963](http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=4029462064338207963); last accessed 11/28/2012). 또 다른 양태에서, 에버롤리무스는 아로마타제 억제제와 조합된다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366(6): 520-529) 참조). 또 다른 양태에서, mTor 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81) 참조). 일부 양태에서, mTor 억제제는 진행된 폐암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다.

[0148]

또 다른 양태에서, 치료제는 Src 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, Src 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: AZD0530(사라카티닙(saracatinib)), 보술리프(Bosulif)(보수티닙(bosutinib)), ENMD981693, KD020, KX01, 스프리셀(Sprycel)(다사티닙(dasatinib)), 예르보이(Yervoy)(이필리무맵(ipilimumab)), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, c-Src 키나제 억제제 KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948,

AP23451, 다사티닙 헤테로(HETERO)(다사티닙), 다사티닙 발린트(VALEANT)(다사티닙), 폰트락스(Fontrax)(다사티닙), Src 키나제 억제제 키넥스(KINEX), VX680(토자서티브(tozasertib) 락테이트), XL228 및 SUNK706. 일부 실시양태에서, Src 키나제 억제제는 다사티닙이다. 또 다른 양태에서, Src 키나제 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Sen, B. and Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 pages) 참조). 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 SRC 반응 시그너처(SRS)에 대한 양성을 나타내는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, 환자는 SRS+ 및 ER-를 나타낸다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Zhang, CH.-F, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16: 67-78) 참조). 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 진행된 폐암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다.

[0149]

또 다른 양태에서, 치료제는 COX-2 억제제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABT963, 아세트아미노펜(Acetaminophen) 이알 존슨(ER JOHNSON)(아세트아미노펜), 아쿨라(Acular) X(케토롤락 트로메타민(ketorolac tromethamine)), BAY1019036(아스피린), BAY987111(디펜하이드라민, 나프록센(naproxen) 나트륨), BAY11902(피록시캠(piroxicam)), BCIBUCH001(이부프로펜(ibuprofen)), 카폭시캠(Capoxigem)(아프리카콧(apricoxib)), CS502, CS670(펠루비프로펜(pelubiprofen)), 디클로페낙(Diclofenac) HPBCD(디클로페낙), 디락틴(Diractin)(케토프로펜(ketoprofen)), GW406381, HCT1026(니트로플루르비프로펜(nitroflurbiprofen)), 하이아날게스(Hyanalgesa)-D(디클로페낙), 하이드로코덱스(HydrocoDex)(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판(dextromethorphan), 하이드로코돈(hydrocodone)), 이부프로펜 나트륨 화이자(PFIZER)(이부프로펜 나트륨), 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자(아세트아미노펜, 이부프로펜), 임프라코르(Impracor)(케토프로펜), IP880(디클로페낙), IP940(인도메타신(indomethacin)), ISV205(디클로페낙 나트륨), JNS013(아세트아미노펜, 트라마돌(tramadol) 하이드로클로라이드), 케토프로펜 TDS(케토프로펜), LTNS001(나프록센 에테메실(etemesil)), 메살라민(Mesalamine) 살릭스(SALIX)(메살라민), 메살라민 소파르(SOFAR)(메살라민), 메살라진(Mesalazine)(메살라민), ML3000(리코펠론(licofelone)), MRX7EAT(에토돌락(etodolac)), 나프록센 이로코(IROKO)(나프록센), NCX4016(니트로아스피린(nitroaspirin)), NCX701(니트로아세트아미노펜(nitroacetaminophen)), 누프린(Nuprin) 스콜르(SCOLR)(이부프로펜), OMS103HP(아미트립틸린( amitriptyline) 하이드로클로라이드, 케토프로펜, 옥시메타졸린(oxymetazoline) 하이드로클로라이드), 오랄리스(Oralease)(디클로페낙), 옥시코덱스(OxycoDex)(텍스트로메토르판(dextromethorphan), 옥시코돈(oxycodone)), P54, 퍼코덱스(PercoDex)(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 옥시코돈), PL3100(나프록센, 포스파티딜 콜린), PSD508, R-케토프로펜(케토프로펜), 레무라(Remura)(브로페낙(bromfenac) 나트륨), ROX828(케토롤락 트로메타민), RP19583(케토프로펜 라이신), RQ00317076, SDX101(R-에토돌락(etodolac)), TDS943(디클로페낙 나트륨), TDT070(케토프로펜), TPR100, TQ1011(케토프로펜), TT063(S-플루르비프로펜(flurbiprofen)), UR8880(시미콧(cimicoxib)), V0498TA01A(이부프로펜), VT122(에토돌락, 프로프라놀롤(propranolol)), XP20B(아세트아미노펜, 텍스트로프로포키센(dextropropoxyphene)), XP21B(디클로페낙 칼륨), XP21L(디클로페낙 칼륨), 조에나사(Zoenasa)(아세틸시스테인, 메살라민), 아세펜(Acephen), 악티페드 플러스(Actifed Plus), 악티페드-P, 아쿨라, 아쿨라 LS, 아쿨라 PF, 아쿨라 X, 아쿠베일(Acuvail), 애드빌(Advil), 애드빌 알러지 비염(Allergy Sinus), 애드빌 감기 및 비염(Cold and Sinus), 애드빌 울혈 경감(Congestion Relief), 애드빌 PM, 애드빌 PM 캡슐, 에어 살론파스(Air Salonpas), 에어탈(Airtal), 알코올 무함유 나이퀸(NyQuil) 감기 및 플루 경감, 알레브(Aleve), 알레브 아브디 이브라힘(ABDI IBRAHIM), 알레브-D, 알카-셀트저(Alka-Seltzer), 알카-셀트저 바이엘(BAYER), 알카-셀트저 초강도(Extra Strength), 알카-셀트저 레몬-라임(Lemon-Lime), 알카-셀트저 오리지날(Original), 알카-셀트저 플러스, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침 제제, 알카-셀트저 플러스 낮과 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 낮에 졸립지 않는 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 플루 제제, 알카-셀트저 플러스 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 비염 제제, 알카-셀트저 플러스 스파클링 오리지날(Sparkling Original) 감기 제제, 알카-셀트저 PM, 알카-셀트저 수면각성제(Wake-Up Call), 아나신(Anacin), 아나프록스(Anaprox), 아나프록스 미네르바(MINERVA), 안사이드(Ansaid), 아피톡신(Apitoxin), 아프라낙스(Apranax), 아프라낙스 애브디(abdi), 아콧시아(Arcoxia), 관절염 제제 벤가이(Arthritis Formula Bengay), 아쓰로텍(Arthrotec), 아사콜(Asacol), 아사콜 HD, 아사콜 메두나 아즈네이미텔(MEDUNA ARZNEIMITTEL), 아사콜 오리팜(ORIFARM), 아스피린 바이엘, 아스피린 콤플렉스(Complex), 아스피린 미그란(Migran), AZD3582, 아줄피딘(Azulfidine), 바랄간(Baralgan) M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902,



BCIBUCH001, 베나드릴(Benadryl) 알러지, 베나드릴 낮과 밤, 베닐린(Benylin) 4 플루, 베닐린 감기 및 플루, 베닐린 감기 및 플루 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 플러스, 베닐린 낮과 밤 감기 및 플루 경감, 베닐린 1 올-인-원(All-In-One), 브렉신(Brexin), 브렉신 안젤리니(ANGELINI), 브롬데이(Bromday), 버퍼린(Bufferin), 버스코판 플러스(Buscopan Plus), 칼돌로르(Caldolor), 칼마텔(Calmatel), 캄비아(Cambia), 카나사(Canasa), 카폭시겔(Capoxigem), 카타플람(Cataflam), 셀레브렉스(Celebrex), 셀레브렉스 오리팜, 소아용 애드빌 알러지 비염, 소아용 타이레놀(Tylenol), 소아용 타이레놀 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 감기, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 기침, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 비한, 소아용 타이레놀 플러스 플루, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 알러지, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 인후통, 소아용 타이레놀 플러스 다증상 감기, 클리노릴(Clinoril), 코드랄(Codral) 감기 및 플루, 코드랄 낮과 밤 낮 정제, 코드랄 낮과 밤 밤 정제, 코드랄 밤시간(Nighttime), 콜라잘(Colazal), 컴부녹스(Combunox), 콘택(Contact) 감기 플러스 플루, 콘택 감기 플러스 플루 졸립지 않은 제제, 코리시딘(Coricidin) D, 코리시딘 HBP 감기 및 플루, 코리시딘 HBP 낮과 밤 다증상 감기, 코리시딘 HBP 최대 강도의 플루, 코리시딘 HBP 밤시간 다증상 감기, 코리시딘 II 초강도 감기 및 플루, CS502, CS670, 데이프로(Daypro), 데이프로 알타, DDS06C, 데마진(Demazin) 감기 및 플루, 데마진 기침, 감기 및 플루, 데마진 낮/밤 감기 및 플루, 데마진 PE 감기 및 플루, 데마진 PE 낮/밤 감기 및 플루, 디클로페낙 HPBCD, 디메탐(Dimetapp) 낮 경감, 디메탐 다증상 감기 및 플루, 디메탐 밤 경감, 디메탐 통증 및 발열 경감, 디메탐 PE 비염 통증, 디메탐 PE 비염 통증 플러스 알러지, 디펜텀(Dipentum), 디락틴(Diractin), 디스프린(Disprin) 감기 'n' 발열, 디스프린 엑스트라(Extra), 디스프린 포르테(Forte), 디스프린 플러스, 드리스탄(Dristan) 감기, 드리스탄 주니어(Junior), 드릭소랄(Drixoral) 플러스, 두엑시스(Duexis), 다이나스타트(Dynastat), 에페랄간(Efferalgan), 에페랄간 플러스 비타민 C, 에페랄간 비타민 C, 엘릭스슈어(Elixsure) IB, 엑세드린(Excedrin) 등 및 전신, 엑세드린 편두통, 엑세드린 PM, 엑세드린 비염 두통, 엑세드린 긴장성 두통, 팔콜(Falcol), 판사막(Fansamac), 펠덴(Feldene), 페버올(FeverAll), 피오리날(Fiorinal), 코데인(Codeine)과 함께 피오리날(Fiorinal), 플라낙스(Flanax), 플렉토르 패치(Flector Patch), 플루캠(Flucam), 포르타게식(Fortagesic), 게르빈(Gerbin), 지아조(Giazo), 글라디오(Gladio), 구디스(Goody's) 등 및 전신 통증, 구디스 쿨 오렌지(Cool Orange), 구디스 초강도, 구디스 PM, 그리스리스(Greaseless) 벤가이, GW406381, HCT1026, 허 싱 이(He Xing Yi), 하이날게스-D, 하이드로코텍스, 이부프로펜 나트륨 화이자, 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자, 아이시 핫(Icy Hot) 사노피 아벤티스(SANOFI AVENTIS), 임프라코르(Impracor), 인도신(Indocin), 인도메타신(Indomethacin) 에이피피 파마(APP PHARMA), 인도메타신 마일란(MYLAN), 유아용 타이레놀, IP880, IP940, 이레모드(Iremod), ISV205, JNS013, 청소년용 타이레놀, 주니펜(Junifen), 청소년용 강도의 애드빌, 청소년용 강도의 모트린(Motrin), 케토프로펜 TDS, 램십 맥스(Lemsip Max), 램십 맥스 올 인 원, 램십 맥스 올 나이트, 램십 맥스 감기 및 플루, 리알다(Lialda), 리스테린(Listerine) 구강 세척제, 로이즈(Lloyds) 크림, 로딘(Lodine), 로르핏(Lorfit) P, 록소닌(Loxonin), LTNS001, 머신돌(Mersyndol), 메살라민 살릭스(SALIX), 메살라민 소파(SOFAR), 메살라진, 메사살(Mesasal) 글락소(GLAXO), 메사살 사노피(SANOFI), 메술리드(Mesulid), 메트살 히트 룬(Metsal Heat Rub), 미돌 컴플리트(Midol Complete), 미돌 연장된 경감, 미돌 액체 겔, 미돌 PM, 미돌 심대용 제제, 미그라닌(Migranin) 피복정, ML3000, 모빅(Mobic), 모루스(Mohrus), 모트린(Motrin), 모트린 감기 및 비염 통증, 모트린 PM, 모발리스(Movalis) 아스펜(ASPEN), MRX7EAT, 날폰(Nalfon), 날폰 페디놀(PEDINOL), 나프렐란(Naprelan), 나프로신(Naprosyn), 나프로신 알피지 라이프 사이언스(RPG LIFE SCIENCE), 나프록센 이로코(IROKO), NCX4016, NCX701, 네오프로펜(NeoProfen) 런드백(LUNDBECK), 네바낙(Nevanac), 넥세드(Nexcede), 니플란(Niflan), 노르게식(Norgesic) 메디시스(MEDICIS), 노발진(Novalgin), 누프린(Nuprin) 스콜르(SCOLR), 누로펜(Nurofen), 누로펜 감기 및 플루, 누로펜 최대 강도의 편두통, 누로펜 플러스, 누로몰(Nuromol), 비타민 C 와 함께 나이퀵, 오큐펜(Ocufen), OMS103HP, 오랄리스(Oralease), 오루디스(Orudis) 애보트 저펜(ABBOTT JAPAN), 오루베일(Oruvail), 오스텔룩(Osteluc), 옥시코텍스(Oxycodex), P54, 파나돌(Panadol), 파나돌 악티패스트(Actifast), 파라딘(Paradine), 파라맥스(Paramax), 파페낙(Parfenac), 페데아(Pedea), 펜사이드(Pennsaid), 펜타사(Pentasa), 펜타사 오리팜, 페온(Peon), 퍼코단(Percodan), 퍼코단-데미, 퍼코텍스(PercoDex), 퍼코게식(Percogesic), 퍼팔간(Perfalgan), PL2200, PL3100, 폰스텔(Ponstel), 프렉시즈(Prexige), 프롤렌사(Prolensa), PSD508, R-케토프로펜, 란투딜(Rantudil), 렐라펜(Relafen), 레무라(Remura), 로박시살(Robaxisal), 로텍(Rotec), 로와사(Rowasa), ROX828, RP19583, RQ00317076, 루보르(Rubor), 살로팔크(Salofalk), 살론파스(Salonpas), 사리돈(Saridon), SDX101, 셀터치(Seltouch), 에스에프로와사(sfRowasa), 신바로(Shinbaro), 시누맥스(Sinumax), 시누탐(Sinutab), 시누탐 비염, 스팔트(Spalt), 스프릭스(Sprix), 스트레펜(Strefen), 수다페드(Sudafed) 감기 및 기침, 수다페드 코감기 및 비염, 수다페드 PE 감기 플러스 기침, 수다페드 PE 압박 플러스 통증, 수다페드 PE 중증 감기, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 낮 정제, 수다페드 PE 비염

낮과 밤 경감 밤 정제, 수다페드 PE 비염 플러스 소염 통증 경감, 수다페드 비염 어드밴스(Advance), 서감(Surgam), 시날고스(Synalgos)-DC, 신플렉스(Synflex), 타비스트(Tavist) 알러지/비염/두통, TDS943, TDT070, 테라플루(Theraflu) 감기 및 인후통, 테라플루 낮시간 중증 감기 및 기침, 테라플루 낮시간 발열 경감, 테라플루 발열 경감 당의정 낮시간 다증상 감기, 테라플루 발열 경감 감기 및 가슴 울혈, 토마피린(Thomapyrin), 토마피린 C, 토마피린 발포정, 토마피린 매질, 티코틸(Tilcotil), 티스폴(Tispol), 톨렉틴(Tolactin), 토라돌(Toradol), TPR100, TQ1011, 트라우마-살베(Trauma-Salbe), 트라우마-살베 퀴즈다(Kwizda), 트레오(Treo), 트렉시멧(Treximet), 트로벡스(Trovex), TT063, 타이레놀, 타이레놀 알러지 다증상, 타이레놀 등 통증, 타이레놀 감기 및 기침 낮시간, 타이레놀 감기 및 기침 밤시간, 타이레놀 감기 및 비염 낮시간, 타이레놀 감기 및 비염 밤시간, 타이레놀 코감기 울혈 중증, 타이레놀 감기 다증상 낮시간, 타이레놀 감기 다증상 밤시간 액체, 타이레놀 감기 다증상 중증, 타이레놀 감기 졸립지 않은 제제, 타이레놀 감기 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 완전한 감기, 기침 및 플루 밤시간, 타이레놀 플루 밤시간, 타이레놀 월경통, 타이레놀 PM, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 낮시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 밤시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 중증, 타이레놀 비염 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 울트라 경감, 카페인 및 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 초고강도 벤가이 크림, 울트라셋(Ultracet), UR8880, V0498TA01A, 빅스(Vicks) 나이퀴얼 감기 및 플루 경감, 비코프로펜(Vicoprofen), 비모보(Vimovo), 볼타렌(Voltaren) 에몰겔(Emulgel), 볼타렌 겔, 볼타렌 노바티스 퀴너머 헬스 케임베하(NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH), 볼타렌 XR, VT122, 제포(Xefo), 제포 래피드(Rapid), 제포캄(Xefocam), 지브롬(Xibrom), XL3, 조돌(Xodol), XP20B, XP21B, XP21L, 짐소르(Zipsor) 및 조에나사(Zenasa). 또 다른 양태에서, COX-2 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126) 참조). 일부 양태에서, COX-2 억제제는 진행된 폐암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된 제2 치료제와 함께 사용된다: 데노수맙(Denosumab), 조메타(Zometa)([http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&NovaId=2935376934467633633](http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633); last accessed 12/2/2012), 카르보잔티닙(Carbozantinib) 또는 카보잔티닙(Cabozantinib), 항체 또는 펩티드 차단 PTHLH(부갑상선 호르몬 유사 호르몬) 또는 PTHrP(부갑상선 호르몬 관련 단백질).

- [0150] 또 다른 양태에서, 골 분해를 피하고/하거나 예방하는 데에 사용되는 치료제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:
- [0151] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHLH) 억제제(차단 항체를 포함함) 또는 이의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7 내지 34에 상응하는 테리파라타이드(teriparatide)). 이 호르몬은 조골세포를 자극하고 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.
- [0152] - 스트론튬 라넬레이트(Strontium ranelate): 대안적인 경구 치료제이고, 조골세포 증식을 자극하고 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 물질"(DAGA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0153] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기작과 관계없이 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로게스타겐(progestagen), 에스트라디올(estradiol), 드록시펜(droloxifene), 랄록시펜(raloxifene), 라소폭시펜(lasofloxifene), TSE-424, 타목시펜(tamoxifen), 이독시펜(idoxifene), LY353381, LY117081, 토레피펜(toremifene), 플루베스트란트(fluevestrant), 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리디닐)에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646이 있다.
- [0154] - 칼시토닌: 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0155] - 비스포스포네이트: 골 흡수 및 재흡수를 갖는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 갖는 암의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이고, 이때 골 전이를 갖는 암은 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 갖거나 갖지 않는다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 치료에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트의 예로는 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트(pamidronate), 네리드로네이트(neridronate), 올파드로네이트(olpadronate), 알렌드로네이트(alendronate), 이반드로네이트(ibandronate), 리세드로네이트(risedronate), 인카드로네이트(incadronate), 졸레드로네이트(zoledronate) 또는 졸레드론산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트

트(예컨대, 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 틸루드로네이트(tiludronate) 등)가 있으나, 이들로 한정되지 않는다.

[0156] - "카텝신(Cathepsin) K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 지칭한다. 카텝신 K 억제제의 비-한정적 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(국제 특허출원 공보 제WO 03/020278호(노바티스 파마 게엠베하(Novartis Pharma GMBH))에 기재됨); 국제 특허출원 공보 제WO 03/020721호(노바티스 파마 게엠베하) 및 국제 특허출원 공보 제WO 04/000843호(아스트라제네카 아베(ASTRAZENECA AB))에 기재된 피롤로-피리미딘; 및 국제 특허출원 공보 제WO 00/55126호(악시스 파마슈티칼스(Axys Pharmaceuticals)) 및 국제 특허출원 공보 제WO 01/49288호(머크 프로스트 캐나다 앤드 컴파니(Merck Frosst Canada & Co.) 및 악시스 파마슈티칼스)에 기재된 억제제가 있다.

[0157] - 본원에서 사용된 바와 같이, "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고 골용해성 병변을 갖는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 물질은 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데에 있어서 일정한 역할을 수행할 수 있다. 노바티스의 BHQ880은 혁신 신약인 전체 인간 항-DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다(Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract).

[0158] - 본원에서 사용된 바와 같이, "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유발된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 지칭한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서 뿐만 아니라 조골세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 이들 유형의 세포들 모두에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에게 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 듯하다. 동시에, 조골세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 발생성 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)를 포함하는 골 전이의 병리학적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데에 있어서 실행가능한 전략일 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀릭시스 인코포레이티드(Exelixis, Inc.))은 MET에 의해 유발된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고 전이를 감소시키고 혈관 신생(종양 성장을 뒷받침하는 데에 필요한 새로운 혈관의 형성)을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또 다른 적합한 이중 억제제는 E7050(N-[2-플루오로-4-({2-[4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일]카보닐아미노피리딘-4-일}옥시)페닐]-N'-(4-플루오로페닐)사이클로프로판-1,1-디카복사미드(2R,3R)-타르트레이트)(CAS 928037-13-2) 또는 포레티닙(Foretinib)(GSK1363089 또는 XL880으로서도 공지되어 있음, CAS 849217-64-7)이다.

[0159] - 본원에서 사용된 바와 같이, "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. RANKL은 간질 및 T-림프구 세포의 조골세포 막의 표면 상에서 발견되고, 이들 T-림프구 세포는 RANKL을 분비하는 능력을 나타내는 유일한 세포이다. 그의 주요 기능은 골 재흡수에 관여하는 세포인 파골세포의 활성화이다. RANKL 억제제는 RANKL과 그의 수용체(RANK)의 결합을 차단함으로써, RANK-매개된 신호전달을 차단함으로써, 또는 RANKL의 전사 또는 번역을 차단하여 RANKL의 발현을 감소시킴으로써 작용할 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 적합한 RANKL 길항제 또는 억제제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:

[0160] o RANKL에 결합할 수 있고 RANK 단백질의 세포외 도메인의 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 무린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포외 도메인을 포함할 수 있거나, 대안적으로 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다.

[0161] o 오스테오프로테제린(Osteoprotegerin) 또는 RANKL 결합 능력을 갖는 그의 변이체.

[0162] o RANKL 특이적 안티센스 분자

[0163] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임(Ribozymes)

[0164] o 특이적 항-RANKL 항체. "항-RANKL 항체 또는 RANKL에 대해 유도된 항체"는 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는 핵 인자  $\kappa$ B에 대한 활성화 수용체의 리간드(RANKL)에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 본원에서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 억제될 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명의 내용에서 적합

한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, 단편 "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다.

- [0165] o 특이적 항-RANKL 나노바디. 나노바디는 천연 발생 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄를 결여하는 전체 기능성 항체를 보유한다는 발견 후 최초로 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고, 이때 FR1 내지 FR4는 골격 영역 1 내지 4이고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3이다. 이 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 함유한다. 중요한 것은 클로닝되고 단리된 VHH 도메인이 원래의 중쇄 항체의 전체 항원 결합 능력을 보유하는 완벽히 안정한 폴리펩티드라는 것이다. 그들의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애블린스(Ablynx)에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.
- [0166] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포로테게린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 데노수맵이다(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, CAS 번호 615258-40-7)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 데노수맵은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 전체 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 데노수맵의 다양한 양태는 미국 특허 제6,740,522호, 제7,411,050호, 제7,097,834호 및 제7,364,736호(이들 각각의 전체 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 데노수맵과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구축물이다.
- [0167] 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 나노바디는 국제 특허출원 공보 제WO2008142164호(이의 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 ALX-0141(애블린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 일부 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.
- [0168] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라넬레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 라툼-223, 칼시토닌, 및 카텝신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.
- [0169] 한 실시양태에서, 일차 폐암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록(Maraviroc)이다(Velasco-Velazquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 비크리비록(Vicriviroc)이다(Velasco-Velazquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 아플라비록(Aplaviroc)이다(Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2(Suppl. 1): S13). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘(spiropiperidine) CCR5 길항제이다(Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19 (18): 5401-5406). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2): 82-7).
- [0170] 보다 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0171] 바람직한 실시양태에서, 라툼-223 치료제는 알파라딘이다.
- [0172] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 상기 언급된 물질들 중 하나 초과와 물질들이 조합되거나, 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬 치료와 조합될 수 있는 조합된 치료가 수행될 수 있다.
- [0173] 골 전이를 갖는 폐암 환자에서 본 발명의 맞춤형 요법을 디자인하는 방법
- [0174] 이미 골로 전이되어 있고 c-MAF 수준이 상승되어 있는 폐암을 앓고 있는 환자는 증가된 파골세포 활성에 의해



야기된 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 치료로부터 특히 이익을 얻을 수 있다.

- [0175] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0176] (i) 골 전이와 함께 폐암을 갖는 대상체의 골로부터의 전이성 종양 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0177] (ii) 상기 단계에서 획득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계
- [0178] 를 포함하는, 골 전이와 함께 폐암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제3 방법)으로서, 이때 발현 수준이 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우 상기 대상체가 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하고, 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우 상기 대상체가 골 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하지 않은 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0179] 용어 및 표현 "대상체", "폐암", "종양 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.
- [0180] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0181] 본 발명의 제3 방법은 폐암을 앓고 있는 대상체의 종양 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 본 발명의 제3 방법의 경우, 샘플은 골 전이로부터의 조직 샘플이다.
- [0182] 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.
- [0183] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 획득된 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. 분석되는 종양의 유형에 따라, 대조군 샘플의 정확한 설정이 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제3 방법을 수반하는 경우, 기준 샘플은 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플, 또는 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.
- [0184] 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 대상체가 골 분해를 피하거나 예방하는 것을 목적으로 하는 치료를 제공받기에 적합하다는 결론을 내릴 수 있다.
- [0185] 본원에서 사용된 바와 같이, "골 분해를 피하거나 예방하는 물질(agent)"은 조골세포 증식을 자극하거나 파골세포 증식을 억제함으로써 골 분해를 치료할 수 있거나 중지시킬 수 있는 임의의 분자를 지칭한다.
- [0186] 골 분해 및/또는 골 전이를 피하고/피하거나 예방하기 위해 사용되는 물질의 예시적 예로는 하기 물질들이 있으나 이들로 한정되지 않는다:
- [0187] - 부갑상선 호르몬(PTH) 또는 이의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7 내지 34에 상응하는 테리파라타이드). 이 호르몬은 조골세포를 자극하고 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.
- [0188] - 스트로몬 라벨레이트: 대안적인 경구 치료제이고, 조골세포 증식을 자극하고 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 물질"(DAGA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0189] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기작과 관계없이 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로게스타겐, 에스트라디올, 드롤록시펜, 탈록시펜, 라소폭시펜, TSE-424, 타목시펜, 이독시펜, LY353381, LY117081, 토레피펜, 플루베스트란트, 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥스포프로폭시-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.
- [0190] - 칼시토닌: 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0191] - 비스포스포네이트: 골 흡수 및 재흡수를 갖는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 갖는 암의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이고, 이때 골 전이를 갖는 암은 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 갖거

나 갖지 않는다. 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.

[0192] - "카텝신 K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 지칭한다. 카텝신 K 억제제의 비-한정적 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(국제 특허출원 공보 제WO 03/020278호(노바티스 파마 게엠베하)에 기재됨); 국제 특허출원 공보 제WO 03/020721호(노바티스 파마 게엠베하) 및 국제 특허출원 공보 제WO 04/000843호(아스트라제네카 아베)에 기재된 피롤로-피리미딘; 및 국제 특허출원 공보 제WO 00/55126호(악시스 파마슈티칼스) 및 국제 특허출원 공보 제WO 01/49288호(머크 프로스트 캐나다 앤드 컴파니 및 악시스 파마슈티칼스)에 기재된 억제제가 있다.

[0193] - 본원에서 사용된 바와 같이, "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고 골용해성 병변을 갖는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 물질은 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데에 있어서 일정한 역할을 수행할 수 있다. 노바티스의 BHQ880은 혁신 신약인 전체 인간 항-DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다(Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract).

[0194] - 본원에서 사용된 바와 같이, "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유발된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 지칭한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서 뿐만 아니라 조골세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 이들 유형의 세포들 모두에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에게 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 듯하다. 동시에, 조골세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 발생성 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)를 포함하는 골 전이의 병리학적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데에 있어서 실행가능한 전략일 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀렉시스 인코포레이티드)은 MET에 의해 유발된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고 전이를 감소시키고 혈관신생(종양 성장을 뒷받침하는 데에 필요한 새로운 혈관의 형성)을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또 다른 적합한 이중 억제제는 E7050(N-[2-플루오로-4-({2-[4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일]카보닐아미노피리딘-4-일}옥시)페닐]-N'-(4-플루오로페닐)사이클로프로판-1,1-디카복사미드(2R,3R)-타르트레이트)(CAS 928037-13-2) 또는 포레티닙(GSK1363089 또는 XL880으로서도 공지되어 있음, CAS 849217-64-7)이다.

[0195] - 본원에서 사용된 바와 같이, "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. RANKL은 간질 및 T-림프구 세포의 조골세포 막의 표면 상에서 발견되고, 이들 T-림프구 세포는 RANKL을 분비하는 능력을 나타내는 유일한 세포이다. 그의 주요 기능은 골 재흡수에 관여하는 세포인 파골세포의 활성화이다. RANKL 억제제는 RANKL과 그의 수용체(RANK)의 결합을 차단함으로써, RANK-매개된 신호전달을 차단함으로써, 또는 RANKL의 전사 또는 번역을 차단하여 RANKL의 발현을 감소시킴으로써 작용할 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 적합한 RANKL 길항제 또는 억제제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:

[0196] o RANKL에 결합할 수 있고 RANK 단백질의 세포외 도메인의 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 뮤린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포외 도메인을 포함할 수 있거나, 대안적으로 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다.

[0197] o 오스테오프로테게린 또는 RANKL 결합 능력을 갖는 그의 변이체.

[0198] o RANKL 특이적 안티센스 분자

[0199] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임

[0200] o 특이적 항-RANKL 항체. "항-RANKL 항체 또는 RANKL에 대해 유도된 항체"는 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는 핵 인자  $\kappa$ B에 대한 활성화 수용체의 리간드(RANKL)에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 본원에서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 억제될 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler,



Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495))에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명의 내용에서 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, 단편 "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다.

[0201] o 특이적 항-RANKL 나노바디. 나노바디는 천연 발생 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄를 결여하는 전체 기능성 항체를 보유한다는 발견 후 최초로 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고, 이때 FR1 내지 FR4는 골격 영역 1 내지 4이고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3이다. 이 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 함유한다. 중요한 것은 클로닝되고 단리된 VHH 도메인이 원래의 중쇄 항체의 전체 항원 결합 능력을 보유하는 완벽히 안정한 폴리펩티드라는 것이다. 그들의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애플린스에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.

[0202] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포로테게린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 테노수맙이다(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, CAS 번호 615258-40-7). 본 발명의 내용에서, 테노수맙은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 테노수맙의 다양한 양태는 미국 특허 제6,740,522호, 제7,411,050호, 제7,097,834호 및 제7,364,736호(이들 각각의 전체 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 테노수맙과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구축물이다.

[0203] 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 나노바디는 국제 특허출원 공보 제W02008142164호(이의 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 ALX-0141(애플린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 일부 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.

[0204] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트로몬 라넬레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 라툼-223, 칼시토닌, 및 카텡신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.

[0205] 한 실시양태에서, 일차 폐암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록이다(Velasco-Velazquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 비크리비록이다(Velasco-Velazquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 아플라비록이다(Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2(Suppl. 1): S13). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘 CCR5 길항제이다(Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19 (18): 5401-5406). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2): 82-7).

[0206] 보다 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0207] 또 다른 양태에서, 치료제는 mTor 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 이중 mTor/PI3 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABI0099(시롤리무스), 라파마이신(시롤리무스), 아브락산(파클리탁셀), 아브소브(에버롤리무스), 아피니토르(에버롤리무스), 글리벡과 함께 아피니토르, AS703026(피마서티프), 악세스(우미롤리무스), AZD2014, BEZ235, 바이오프리돔(우미롤리무스), 바이오매트릭스(우미롤리무스), 바이오매트릭스 플렉스(우미롤리무스), CC115, CC223, 콤보 생물조작된 시롤리무스 용출 스텐트 오르부스니치(시롤리무스), 쿠락신 CBL102(메파크린), DE109(시롤리무스), DS3078, 엔테버 DES(조타롤리무스), 엔테버 레졸루트(조타롤리무스), 페마라(레트로졸), 호세나(안트로퀴놀), INK128, 인스피론(시롤리무스), IPI504(레타스

피마이신 하이드로클로라이드), KRN951(티보자닙), ME344, MGA031(테플리주맙), 미스텐트 SES, MKC1, 노보리(우미롤리무스), OSI027, OVI123(코다이세핀), 팔로미드 529, PF04691502, 프로무스 엘리멘트(에버롤리무스), PWT33597, 라파뮌(시롤리무스), 레솔루트 DES(조타롤리무스), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75(보세투주맙 마포도틴), 시너지(에버롤리무스), 탈토르빅(리다포롤리무스), 타세바(에를로티닙), 토리셀(템시롤리무스), 자이언스 프라임(에버롤리무스), 자이언스 V(에버롤리무스), 조맥스(조타롤리무스), 조트레스(에버롤리무스), 조타롤리무스 용출 말초 스텐트 메드트로닉(조타롤리무스), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, 캔스타틴 젠자임(캔스타틴), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, 라파마이신 온코이뮌(시롤리무스), SB2602, 시롤리무스 PNP 삼양 바이오파마슈티칼스(시롤리무스), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, 애드바칸(에버롤리무스), AZD8055, 사이퍼 셀렉트 플러스 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 사이퍼 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 약물 코팅된 풍선(시롤리무스), E-매직 플러스(시롤리무스), 엠토르(시롤리무스), 에스프릿(에버롤리무스), 에버토르(에버롤리무스), HBF0079, LCP-시로(시롤리무스), 리무스 클라리스(시롤리무스), mTOR 억제제 셀좁, 네보 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), nPT-mTOR, 라파칸(시롤리무스), 레나셉트(시롤리무스), 레졸브(시롤리무스), 로카스(시롤리무스), SF1126, 시롤림(시롤리무스), 시롤리무스 노쓰 차이나(시롤리무스), 시롤리무스 란박시(시롤리무스), 시롤리무스 와슨(시롤리무스), 시로판(시롤리무스), 시로바(시롤리무스), 수프랄리무스(시롤리무스), 수프랄리무스-코어(시롤리무스), 타크롤리무스(타크롤리무스) 와슨(타크롤리무스), TAF A93, 템시롤리무스 아코드(템시롤리무스), 템시롤리무스 산도즈(템시롤리무스), TOP216, 자이언스 프라임(에버롤리무스), 및 자이언스 V(에버롤리무스). 특정 실시양태에서, mTor 억제제는 아피니토르(에버롤리무스)이다

([http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&NovaId=4029462064338207963](http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=4029462064338207963); last accessed 11/28/2012). 또 다른 양태에서, mTor 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10(7): 571-81) 참조). 일부 양태에서, mTor 억제제는 진행된 폐암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다.

[0208] 또 다른 양태에서, 치료제는 Src 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, Src 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: AZD0530(사라카티닙), 보솔리프(보수티닙), ENMD981693, KD020, KX01, 스프리셀(다사티닙), 예르보이(이펠리루맙), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, c-Src 키나제 억제제 KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, 다사티닙 헤테로(다사티닙), 다사티닙 발린트(다사티닙), 폰트락스(다사티닙), Src 키나제 억제제 키넥스, VX680(토자서티닙 락테이트), XL228 및 SUNK706. 일부 실시양태에서, Src 키나제 억제제는 다사티닙이다. 또 다른 양태에서, Src 키나제 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Sen, B. and Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 pages) 참조). 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 SRC 반응 시그니처(SRS)에 대한 양성을 나타내는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, 환자는 SRS+를 나타낸다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Zhang, CH.-F, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16: 67-78) 참조). 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 진행된 폐암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, Src 키나제 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다.

[0209] 또 다른 양태에서, 치료제는 COX-2 억제제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABT963, 아세트아미노펜 이알 존슨(아세트아미노펜), 아쿨라 X(케토롤락 트로메타민), BAY1019036(아스피린), BAY987111(디펜하이드라민, 나프록센 나트륨), BAY11902(피록시캄), BCIBUCH001(이부프로펜), 카복시젠(아프리카십), CS502, CS670(펠루비프로펜), 디클로페낙 HPBCD(디클로페낙), 디락틴(케토프로펜), GW406381, HCT1026(니트로플루르비프로펜), 하이아날게스-D(디클로페낙), 하이드로코텍스(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 하이드로코돈), 이부프로펜 나트륨 화이자(이부프로펜 나트륨), 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자(아세트아미노펜, 이부프로펜), 임프라코르(케토프로펜), IP880(디클로페낙), IP940(인도메타신), ISV205(디클로페낙 나트륨), JNS013(아세트아미노펜, 트라마돌 하이드로클로라이드), 케토프로펜 TDS(케토프로펜), LTNS001(나프록센 에테메실), 메살라민 살릭스(메살라민), 메살라민 소파르(메살라민), 메살라진(메살라민), ML3000(리코펠론), MRX7EAT(에토돌락), 나프록센 이로코(나프록센), NCX4016(니트로아스피린), NCX701(니트로아세트아미노펜), 누

프린 스킨(이부프로펜), OMS103HP(아미트립틸린 하이드로클로라이드, 케토프로펜, 옥시메타졸린 하이드로클로라이드), 오랄리스(디클로페낙), 옥시코텍스(텍스트로메토르판, 옥시코돈), P54, 퍼코텍스(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 옥시코돈), PL3100(나프록센, 포스파티딜 콜린), PSD508, R-케토프로펜(케토프로펜), 레무라(브롬페낙 나트륨), ROX828(케톨락 트로메타민), RP19583(케토프로펜 라이신), RQ00317076, SDX101(R-에토돌락), TDS943(디클로페낙 나트륨)), TDT070(케토프로펜), TPR100, TQ1011(케토프로펜), TT063(S-플루르비프로펜), UR8880(시미콕십), V0498TA01A(이부프로펜), VT122(에토돌락, 프로프라놀롤), XP20B(아세트아미노펜, 텍스트로프로폭시펜), XP21B(디클로페낙 칼륨), XP21L(디클로페낙 칼륨), 조에나사(아세틸시스테인, 메살라민), 아세펜, 악티페드 플러스, 악티페드-P, 아쿨라, 아쿨라 LS, 아쿨라 PF, 아쿨라 X, 아쿠베일, 애드빌, 애드빌 알러지 비염, 애드빌 감기 및 비염, 애드빌 율혈 경감, 애드빌 PM, 애드빌 PM 캡슐, 에어살론파스, 에어탈, 알코올 무함유 나이퀼 감기 및 플루 경감, 알레브, 알레브 아브디 이브라힘, 알레브-D, 알카-셀트저, 알카-셀트저 바이엘, 알카-셀트저 초강도, 알카-셀트저 레몬-라임, 알카-셀트저 오리지날, 알카-셀트저 플러스, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침 제제, 알카-셀트저 플러스 낮과 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 낮에 졸립지 않는 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 플루 제제, 알카-셀트저 플러스 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 비염 제제, 알카-셀트저 플러스 스킨케어 오리지날 감기 제제, 알카-셀트저 PM, 알카-셀트저 수면각성제, 아나신, 아나프록스, 아나프록스 미네르바, 안사이드, 아피톡신, 아프라낙스, 아프라낙스 애브디, 아콕시아, 관절염 제제 벤가이, 아스로텍, 아사콜, 아사콜 HD, 아사콜 메두나 아즈네이미텔, 아사콜 오리팜, 아스피린 바이엘, 아스피린 콤플렉스, 아스피린 미그란, AZD3582, 아줄피딘, 바탈간 M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, 베나드릴 알러지, 베나드릴 낮과 밤, 베닐린 4 플루, 베닐린 감기 및 플루, 베닐린 감기 및 플루 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 플러스, 베닐린 낮과 밤 감기 및 플루 경감, 베닐린 1 올-인-원, 블랙신, 블랙신 안젤리니, 브롬데이, 버퍼린, 버스코판 플러스, 칼돌로르, 칼마텔, 캄비아, 카나사, 카폭시젠, 카타플람, 셀레브렉스, 셀레브렉스 오리팜, 소아용 애드빌 알러지 비염, 소아용 타이레놀, 소아용 타이레놀 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 감기, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 기침, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 비한, 소아용 타이레놀 플러스 플루, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 알러지, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 인후통, 소아용 타이레놀 플러스 다증상 감기, 클리노릴, 코드랄 감기 및 플루, 코드랄 낮과 밤 낮 정제, 코드랄 낮과 밤 밤 정제, 코드랄 밤시간, 콜라잘, 컴부녹스, 콘택 감기 플러스 플루, 콘택 감기 플러스 플루 졸립지 않은 제제, 코리시딘 D, 코리시딘 HBP 감기 및 플루, 코리시딘 HBP 낮과 밤 다증상 감기, 코리시딘 HBP 최대 강도의 플루, 코리시딘 HBP 밤시간 다증상 감기, 코리시딘 II 초강도 감기 및 플루, CS502, CS670, 데이프로, 데이프로 알타, DDS06C, 데마진 감기 및 플루, 데마진 기침, 감기 및 플루, 데마진 낮/밤 감기 및 플루, 데마진 PE 감기 및 플루, 데마진 PE 낮/밤 감기 및 플루, 디클로페낙 HPBCD, 디메타프 낮 경감, 디메타프 다증상 감기 및 플루, 디메타프 밤 경감, 디메타프 통증 및 발열 경감, 디메타프 PE 비염 통증, 디메타프 PE 비염 통증 플러스 알러지, 디펜탐, 디락틴, 디스프린 감기 'n' 발열, 디스프린 엑스트라, 디스프린 포르테, 디스프린 플러스, 드리스탄 감기, 드리스탄 주니어, 드릭소탈 플러스, 두엑시스, 다이나스타트, 에페탈간, 에페탈간 플러스 비타민 C, 에페탈간 비타민 C, 엘릭스슈어 IB, 엑세드린 등 및 전신, 엑세드린 편두통, 엑세드린 PM, 엑세드린 비염 두통, 엑세드린 긴장성 두통, 팔콜, 판사막, 펠텐, 페버올, 피오리날, 코데인과 함께 피오리날, 플라낙스, 플렉토르 패치, 플루카, 포르타게식, 게르빈, 지아조, 글라디오, 구디스 등 및 전신 통증, 구디스 쿨 오렌지, 구디스 초강도, 구디스 PM, 그리스리스 벤가이, GW406381, HCT1026, 허 싱 이, 하이날게스-D, 하이드로코텍스, 이부프로펜 나트륨 화이자, 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자, 아이시 핫 사노피 아벤티스, 임프라코르, 인도신, 인도메타신 에이피피 파마, 인도메타신 마일란, 유아용 타이레놀, IP880, IP940, 이레모드, ISV205, JNS013, 청소년용 타이레놀, 주니펜, 청소년용 강도의 애드빌, 청소년용 강도의 모트린, 케토프로펜 TDS, 렘십 맥스, 렘십 맥스 올 인 원, 렘십 맥스 올 나이트, 렘십 맥스 감기 및 플루, 리알다, 리스테린 구강 세척제, 로이즈 크림, 로딘, 로로프 P, 록소린, LTNS001, 머신돌, 메살라민 살릭스, 메살라민 소파, 메살라진, 메사살 글락소, 메사살 사노피, 메슬리드(Mesulid), 메트살 히트 룩, 미돌 컴플리트, 미돌 연장된 경감, 미돌 액체 겔, 미돌 PM, 미돌 십대용 제제, 미그란인 피복정, ML3000, 모빅, 모루스, 모트린, 모트린 감기 및 비염 통증, 모트린 PM, 모발리스 아스펜, MRX7EAT, 날폰, 날폰 페디놀, 나프렐란, 나프로신, 나프로신 알피지 라이프 사이언스, 나프록센 이로코, NCX4016, NCX701, 네오프로펜 런드백, 네바낙, 넥세드, 니플란, 노르게식 메디시스, 노발진, 누프린 스킨, 누로펜, 누로펜 감기 및 플루, 누로펜 최대 강도의 편두통, 누로펜 플러스, 누로물, 비타민 C와 함께 나이퀼, 오큐펜, OMS103HP, 오랄리스, 오루디스 애보트 저팬, 오루베일, 오스텔록, 옥시코텍스, P54, 파나돌, 파나돌 악티페스트, 파라딘, 파라맥스, 파페낙, 페데아, 펜사이드, 펜타사, 펜타사 오리팜, 페온, 퍼코단, 퍼코단-데미, 퍼코텍스, 퍼코게식, 퍼팔간, PL2200, PL3100, 폰스텔, 프렉시즈, 프롤렌사, PSD508, R-케토프로펜, 란투딜, 렐라펜, 레무라, 로박시살, 로텍, 로와사, ROX828, RP19583, RQ00317076, 루보르, 살로팔크, 살론파스, 사

리돈, SDX101, 셀터치, 에스에프로와사, 신바로, 시누맥스, 시누탑, 시누탑 비염, 스파트, 스프릭스 스트레펜, 수다페드 감기 및 기침, 수다페드 코감기 및 비염, 수다페드 PE 감기 플러스 기침, 수다페드 PE 압박 플러스 통증, 수다페드 PE 중증 감기, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 낮 정제, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 밤 정제, 수다페드 PE 비염 플러스 소염 통증 경감, 수다페드 비염 어드밴스, 서감, 시날고스-DC, 신플렉스, 타비스트 알러지/비염/두통, TDS943, TDT070, 테라플루 감기 및 인후통, 테라플루 낮시간 중증 감기 및 기침, 테라플루 낮시간 발열 경감, 테라플루 발열 경감 당의정 낮시간 다증상 감기, 테라플루 발열 경감 감기 및 가슴 울혈, 토마피린, 토마피린 C, 토마피린 발포정, 토마피린 매질, 티코틸, 티스폴, 톨렉틴, 토라돌, TPR100, TQ1011, 트라우마-살베, 트라우마-살베 퀴즈다, 트레오, 트렉시맷, 트로백스, TT063, 타이레놀, 타이레놀 알러지 다증상, 타이레놀 등 통증, 타이레놀 감기 및 기침 낮시간, 타이레놀 감기 및 기침 밤시간, 타이레놀 감기 및 비염 낮시간, 타이레놀 감기 및 비염 밤시간, 타이레놀 코감기 울혈 중증, 타이레놀 감기 다증상 낮시간, 타이레놀 감기 다증상 밤시간 액제, 타이레놀 감기 다증상 중증, 타이레놀 감기 줄립지 않은 제제, 타이레놀 감기 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 완전한 감기, 기침 및 플루 밤시간, 타이레놀 플루 밤시간, 타이레놀 월경통, 타이레놀 PM, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 낮시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 밤시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 중증, 타이레놀 비염 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 울트라 경감, 카페인 및 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 초고강도 벤가이 크림, 울트라셋, UR8880, V0498TA01A, 빅스 나이켈 감기 및 플루 경감, 비코프로펜, 비모보, 볼타렌 에물겔, 볼타렌 겔, 볼타렌 노바티스 컨슈머 헬스 게엠메하, 볼타렌 XR, VT122, 제포(Xeфо), 제포 래피드, 제포캡, 지브룸, XL3, 조돌, XP20B, XP21B, XP21L, 짐소르 및 조에나사. 또 다른 양태에서, COX-2 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126) 참조). 일부 양태에서, COX-2 억제제는 진행된 폐암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된 제2 치료제와 함께 사용된다: 데노수맙, 조메타 ([http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter\\_applied=true&Novald=2935376934467633633](http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&Novald=2935376934467633633); last accessed 12/2/2012), 카르보잔티닙 또는 카보잔티닙, 항체 또는 펩티드 차단 PTHLH(부갑상선 호르몬 유사 호르몬) 또는 PTHrP(부갑상선 호르몬 관련 단백질).

[0210] 바람직한 실시양태에서, 라뎀-223 치료제는 알파라딘(조피고(Xofigo)로서도 공지되어 있음)(라뎀-223 디클로라이드)이다. 알파라딘은 라뎀-223 붕괴로부터의 알파 방사선을 이용하여 암세포를 사멸시킨다. 라뎀-223은 천연적으로 칼슘 유사체로서의 그의 성질을 통해 골 전이에 자가 표적화한다. 알파 방사선은 (베타 또는 감마 방사선에 기초한 현재의 방사선치료에 비해) 2개 내지 10개 세포의 매우 짧은 범위를 가지므로, 주변 건강한 조직(특히 골수)에 보다 적은 손상을 야기한다. 라뎀-223은 칼슘과 유사한 성질을 갖기 때문에 칼슘이 신체에서 골을 구축하는 데에 사용되는 부위(보다 빠른 비정상적인 골 성장의 부위, 예컨대, 진행된 거세 내성 전립선암을 갖는 남성의 골격 전이에서 관찰되는 골 성장의 부위를 포함함)로 이동된다. 주입 후 라뎀-223은 혈류를 통해 비정상적인 골 성장의 부위로 운반된다. 암이 신체에서 시작되는 부위는 일차 종양으로서 공지되어 있다. 이들 세포들 중 일부는 이탈되어 혈류를 통해 신체의 또 다른 부분으로 운반될 수 있다. 그 다음, 암세포는 신체의 그 부분에서 정착하여 새로운 종양을 형성할 수 있다. 이것은 일어나는 경우 이차 암 또는 전이로서 지칭된다. 후기 전립선암을 갖는 환자들의 대다수는 그들의 골에서 질환의 최대 고통을 앓는다. 라뎀-223을 사용하는 목적은 이 이차 암을 선택적으로 표적화하는 것이다. 골에서 흡수되지 않는 임의의 라뎀-223은 신속히 장으로 이동되어 배출된다. 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.

[0211] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 상기 언급된 물질들 중 하나 초과와 물질들이 조합되거나, 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬 치료와 조합될 수 있는 조합된 치료가 수행될 수 있다.

[0212] c-MAF 유전자의 증폭의 검출을 기초로 폐암에서 전이를 진단하거나 예후하는 방법

[0213] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 c-MAF 유전자가 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제4 진단 방법) 및/또는 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향을 예후하는 시험관내 방법으로서, 여기서 상기 유전자가 대조군 샘플에 비해 증폭되어 있는 경우 상기 대상체가 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는 대상체인 시험관내 방법에 관한 것이다.



- [0214] 특정 실시양태에서, 본 발명의 제4 방법에서 진단된 폐암은 NSCLC이다.
- [0215] 용어 "c-MAF 유전자", "전이", "종양 샘플", "폐암", "폐암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하는", "폐암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향을 예측하는", "대상체", "환자", "전이의 양성 진단을 갖는 대상체", 및 "전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는 대상체"는 본 발명의 제1 방법의 내용에서 상세히 기재되어 있고 본 발명의 제4 방법에 동등하게 적용될 수 있다.
- [0216] 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 증폭을 측정함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는, 그의 증폭이 c-MAF 유전자의 증폭의 존재를 표시하는 염색체 영역은 c-MAF 유전자를 포함하는 좌위 16q22-q24이다. 좌위 16q22-q24는 16번 염색체, 상기 염색체의 긴 아암(arm) 및 밴드 22와 밴드 24 사이의 범위에 위치한다. 이 영역은 컨티그(contig) NT\_010498.15 및 NT\_010542.15를 갖는 NCBI 데이터베이스에 상응한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정될 수 있다.
- [0217] 본 발명의 제4 진단/예후 방법은 c-MAF 유전자가 대상체의 종양 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 이를 위해, 종양 샘플에서의 c-MAF 유전자의 증폭이 대조군 샘플과 비교된다.
- [0218] 본원에서 이해된 바와 같이, 용어 "유전자의 증폭"은 유전자 또는 유전자 단편의 다양한 카피가 개별 세포 또는 세포주에서 형성되는 과정을 지칭한다. 유전자의 카피가 동일한 염색체에 위치할 필요는 없다. 증폭된 영역은 종종 "애플리콘"으로서 지칭된다. 통상적으로, 생성된 mRNA의 양, 즉 유전자 발현 수준도 특정 유전자의 카피수에 비례하여 증가한다.
- [0219] 특정 실시양태에서, 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 폐암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향을 예측하는 본 발명의 제4 방법은 상기 대상체의 종양 샘플에서 c-MAF 유전자 카피 수를 측정하는 단계 및 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 c-MAF 카피 수가 대조군 샘플의 c-MAF 카피 수에 비해 더 큰 경우, 대상체는 전이의 양성 진단 또는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다.
- [0220] 대조군 샘플은 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 종양 샘플, 또는 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 카피 수의 중간 값에 상응하는 샘플을 지칭한다. 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 획득된다. c-MAF 유전자 카피 수가 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 카피 수에 비해 증가되어 있는 경우, 대상체는 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다.
- [0221] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 카피 수"는 세포에서 핵산 분자의 카피 수를 지칭한다. 유전자 카피 수는 세포의 게놈(염색체) DNA에서의 유전자 카피 수를 포함한다. 정상 세포(비-종양 세포)에서 유전자 카피 수는 정상적으로 2 카피(염색체 쌍의 각각의 구성원에서 1 카피)이다. 유전자 카피 수는 종종 세포 집단의 샘플로부터 획득된 유전자 카피 수의 절반을 포함한다.
- [0222] 본 발명에서, "증가된 유전자 카피 수"는 c-MAF 유전자 카피 수가 기준 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피 수보다 더 많은 경우로서 이해된다. 구체적으로, 카피 수가 c-MAF 유전자의 2 카피 초과, 예를 들면, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 또는 10 카피, 심지어 10 카피 초과 카피 수인 경우, 샘플은 증가된 c-MAF 카피 수를 갖는다고 간주될 수 있다.
- [0223] 일부 실시양태에서, 증폭은 16q23 좌위의 영역에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 약 16번 염색체의 약 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이(센트로미어(centromere)부터 텔로미어(telomere)까지)의 염색체 영역의 임의의 부분에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 약 16번 염색체의 약 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이의 게놈 영역(DNA 반복 요소는 배제됨)에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 그 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정된다.
- [0224] 특정 실시양태에서, 증폭 또는 카피 수는 제자리 혼성화 또는 PCR에 의해 측정된다.
- [0225] c-MAF 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 증폭되어 있는지를 확인하는 방법은 최신기술 수준에서 널리 공지되어 있다. 상기 방법은 제한 없이 제자리 혼성화(ISH)(예컨대, 형광 제자리 혼성화(FISH), 발색 제자리 혼성화(CISH) 또는 은 제자리 혼성화(SISH)), 게놈 비교 혼성화 또는 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량적 PCR)을 포함한다. 임의의 ISH 방법의 경우, 염색체 또는 핵에서 형광 점, 착색된 점 또는 은을 갖는 점의 수를 세어 증폭 또는 카피 수를 측정할 수 있다.

- [0226] 형광 제자리 혼성화(FISH)는 염색체에서 특정 DNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하고 위치를 확인하는 데에 이용되는 세포유전학적 기법이다. FISH는 고도의 서열 유사성을 보이는 염색체의 일부 부분들에만 결합하는 형광 프로브를 사용한다. 전형적인 FISH 방법에서, DNA 프로브는 전형적으로 효소 반응, 예컨대, 닉(nick) 번역 또는 PCR의 이용에 의해 DNA 내로 도입되는 플루오르(fluor)-dUTP, 디곡시제닌(digoxigenin)-dUTP, 바이오틴-dUTP 또는 헵텐-dUTP의 형태로 존재하는 형광 분자 또는 헵텐으로 표지된다. 유전물질(염색체)을 함유하는 샘플을 유리 슬라이드 상에 놓고 포름아미드 처리로 변성시킨다. 그 다음, 표지된 프로브를, 당업자에 의해 결정될 적합한 조건 하에서 유전물질을 함유하는 샘플과 혼성화시킨다. 혼성화 후, (불소로 표지된 프로브의 경우) 직접적으로 또는 (헵텐을 검출하기 위해 형광 표지된 항체를 사용하여) 간접적으로 샘플을 가시화한다.
- [0227] CISH의 경우, 프로브를 디곡시제닌, 바이오틴 또는 플루오레세인으로 표지하고 적합한 조건 하에서 유전물질을 함유하는 샘플과 혼성화시킨다.
- [0228] DNA에 결합할 수 있는 임의의 표시 또는 표지 분자를 사용하여 본 발명의 제4 방법에서 사용된 프로브를 표지함으로써, 핵산 분자를 검출할 수 있다. 표지 부착을 위한 표지의 예로는 방사성 동위원소, 효소 기질, 보조인자, 리간드, 화학발광 물질, 형광단, 헵텐, 효소 및 이들의 조합물이 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 표지 부착 방법, 및 상이한 목적으로 적합한 표지를 선택하기 위한 지침은 예를 들면, 문헌(Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989) 및 문헌(Ausubel et al., In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998)에서 발견될 수 있다.
- [0229] c-MAF 유전자의 증폭을 직접적으로 확인하거나 좌위 16q22-q24의 증폭을 확인함으로써 일단 증폭의 존재가 확인되면, 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 증폭과 비교된 후, c-MAF 유전자의 증폭이 검출되는 경우, 이것은 대상체가 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다는 사실을 표시한다.
- [0230] c-MAF 유전자의 증폭의 확인은 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 종양 조직 샘플에서 측정된 c-MAF 유전자의 증폭 수준에 상응하거나, 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자의 증폭의 중간 값에 상응하는 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가질 필요가 있다. 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단으로부터의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 수득된다. 일반적으로, 전형적인 기준 샘플은 임상적으로 잘 문서화되어 있고 전이의 부재가 잘 특징규명되어 있는 대상체로부터 수득될 것이다. 기준 수준의 유도에 사용된 샘플 채취물은 바람직하게는 연구의 대상 환자와 동일한 유형의 암(예를 들면, NSCLC)을 앓고 있는 대상체들로 구성될 것이다. 일단 이 중간 값이 확립되면, 환자의 종양 조직에서의 c-MAF의 증폭 수준이 이 중간 값과 비교될 수 있으므로, 증폭이 존재하는 경우, 대상체는 전이의 양성 진단 또는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다.
- [0231] 바람직한 실시양태에서, 전이는 골 전이이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 골 전이이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 표현 "골용해성 골 전이"는 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파골세포 활성의 자극으로부터 비롯된 전이의 근처에서 발생되고 심한 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 한 유형을 지칭한다.
- [0232] c-MAF 유전자의 전위의 검출을 기초로 폐암에서 전이를 예측하는 방법
- [0233] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자의 전위가 좋지 않은 임상 결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0234] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 c-MAF 유전자의 전위가 좋지 않은 임상 결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0235] 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 16q23 좌위의 영역으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 약 16번 염색체의 약 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이(센트로미어부터 텔로미어까지)의 염색체 영역의 임의의 부분으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 약 16번 염색체의 약 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이의 게놈 영역(DNA 반복 요소는 배제됨)으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위는 그 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정된다.
- [0236] 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자의 전위는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 전위를 측정함으로써 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 전위는 t(14,16) 전위이다. 또 다른 실시양태에서, 전위되는 염색체 영역은 좌위



16q22-q24로부터 전위된다. 좌위 16q22-q24는 16번 염색체, 상기 염색체의 긴 아암 및 밴드 22와 밴드 24 사이의 범위에 위치한다. 이 영역은 콘티그 NT\_010498.15 및 NT\_010542.15를 갖는 NCBI 데이터베이스에 상응한다. 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자는 14번 염색체의 좌위 14q32로 전위되어, 전위 t(14;16)(q32;q23)를 발생시킨다. 이 전위는 MAF 유전자를 IGH 좌위의 강한 인헨서 옆에 위치시킴으로써, 일부 경우 MAF의 과발현을 초래한다(Eychene, A., Rocques, N., and Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693).

[0237] 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 전위는 상기 전위에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 색채 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 융합 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 색채 이중 융합 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 2개의 별개 프로브들을 사용함으로써 측정된다.

[0238] 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 전위는 14q32 및 16q23에 대한 프로브를 포함하는 바이시스 LSI IGH/MAF 이중 색채 이중 융합 프로브(<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>; last accessed 11/5/2012)를 사용함으로써 측정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 전위는 크레아테크(Kreatech) 진단 MAF/IGH gt(14;16) 융합 프로브(<http://www.kreatech.com/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>; last accessed 11/5/2012), 애브노바(Abnova) MAF FISH 프로브([http://www.abnova.com/products/products\\_detail.asp?Catalog\\_id=FA0375](http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=FA0375); last accessed 11/5/2012), 캔서 제네틱스 이탈리아(Cancer Genetics Italia) IGH/MAF 이중 색채 이중 융합 전위 프로브(<http://www.cancergeneticsitalia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>; last accessed 11/5/2012), 크레아티브 바이오어레이(Creative Bioarray) IGH/MAF-t(14;16)(q32;q23) FISH 프로브(<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=35&page=10>; last accessed 11/5/2012), 아룹 라보라토리스(Arup Laboratories)의 FISH에 의한 다발성 골수종 패널(<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; last accessed 11/5/2012), 16q23 또는 14q32에 대해 특이적인 아질런트(Agilent) 프로브(<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; last accessed 11/5/2012; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; last accessed 11/5/2012), 16q23 또는 14q32에 대해 특이적인 다코(Dako) 프로브([http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts\\_surefish.htm?setCountry=true&purl=ar42/psg42806000/baseproducts\\_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country](http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&purl=ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country); last accessed 11/5/2012), 사이토셀(CytoCell) IGH/MAF 전위 이중 융합 프로브([http://www.zentech.be/uploads/docs/products\\_info/prenatalogy/cytoCell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf](http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatalogy/cytoCell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf); last accessed 11/5/2012), 메타시스템스(Metasystems) XL IGH/MAF 전위 - 이중 융합 프로브([http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com\\_joodb&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272](http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joodb&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272); last accessed 11/5/2012), 제이스(Zeiss) FISH 프로브 XL(100  $\mu$ l), IGH/MAFB(<https://www.microshop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&l=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=000000-0528-231-uk>; last accessed 11/5/2012), 또는 제니셀 바이오텍(Genycell Biotech) IGH/MAF 이중 융합 프로브([http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie6\\_\\_86.ppt&ei=MhGYUoi3GKWH0QGlt4DoDw&usg=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf3lVgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx\\_Ww](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie6__86.ppt&ei=MhGYUoi3GKWH0QGlt4DoDw&usg=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf3lVgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww); last accessed 11/5/2012)를 사용함으로써 측정된다.

[0239] 일부 실시양태에서, 프로브 상의 표지는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 주황색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 녹색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 적색 형광단이다. 일부 경우, 프로브 상의 형광단은 황색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 1개의 프로브는 적색 형광단으로 표지되고, 1개의 프로브는 녹색 형광단으로 표지된다. 일부 실시양태에서, 1개의 프로브는 녹색 형광단으로 표지되고, 1개의 프로브는 주황색 형광단으로 표지된다. 일부 경우, 프로브 상의 형광단은 황색 형광단이다. 예를 들면, MAF 특이적 프로브가 적색 형광단으로 표지되고 IGH 특이적 프로브가 녹색 형광단으로 표지되는 경우, 백색이 관찰되면, 이것은 신호가 중첩되고 전위가 발생하였다는 것을 표시한다.

[0240] 일부 실시양태에서, 형광단은 스펙트럼오렌지(SpectrumOrange)이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 스펙트럼그린(SpectrumGreen)이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 DAPI이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플라티늄브라이트

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

[0241] 본 발명의 한 실시양태는 제1 단계에서 c-MAF 유전자가 대상체의 샘플에서 전위되어 있는지를 확인하는 방법을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.

[0242] 특정 실시양태에서, 폐암을 갖는 대상체에서 골 전이를 일으키는 경향을 예측하는 본 발명의 방법은 c-MAF 유전자가 전위되어 있는 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자 카피 수를 측정하는 단계 및 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 여기서 c-MAF 카피 수가 대조군 샘플의 c-MAF 카피 수에 비해 더 큰 경우, 대상체는 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다. 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 매우 이른 골 전이이다. 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0243] 본원에서 사용된 바와 같이, "평균 수준"은 동등하지 않은 값들의 세트의 일반적인 유의성을 요약하거나 대표하는 (평균, 모드 또는 중간으로서) c-MAF 발현 수준의 단일 값을 의미한다. 바람직한 실시양태에서, 평균 수준은 폐암 종양의 대표적인 코호트로부터 수득된 발현 수준의 평균에 상응한다. 환자 코호트는 평가하고자 하는 개별 환자를 대표하는 연령에 의해 정의된다.

[0244] 본원에서 사용된 바와 같이, "표준 편차"는 숫자 집합의 분산의 척도를 의미한다. 예를 들면, c-MAF의 평균 정상 수준에 대한 표준 편차는 폐 종양 샘플에서 발견된 c-MAF 수준의 집합의 분산이다. 데이터가 보다 더 흩어져 있을수록 편차가 더 높다. 표준 편차는 관찰된 값의 제곱 편차의 평균의 제곱근을 빈도 분포에서의 그들의 평균으로부터 추출함으로써 수득될 수 있다.

[0245] 일단 폐암을 갖는 대상체로부터의 샘플에서 c-MAF 유전자 발현 수준이 측정되고 평균 수준과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 평균 + 평균 수준에 대한 1 표준 편차보다 더 높으면, 상기 대상체가 이른 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다는 결론을 내릴 수 있다.

[0246] c-MAF 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 전위되어 있는지를 확인하는 방법은 최신기술 수준에서 널리 공지되어 있고, c-MAF의 증폭에 대해 앞서 기재된 방법들을 포함한다. 상기 방법들은 제한 없이 제자리 혼성화(ISH)(예컨대, 형광 제자리 혼성화(FISH), 발색 제자리 혼성화(CISH) 또는 은 제자리 혼성화(SISH)), 게놈 비교 혼성화 또는 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량적 PCR)을 포함한다. 임의의 ISH 방법의 경우, 염색체 또는 핵에서 형광 점, 착색된 점 또는 은을 갖는 점의 수를 세어 증폭, 카피 수 또는 전위를 측정할 수 있다. 다른 실시양태에서, 카피 수 변경 및 전위의 검출은 전체 게놈 서열결정, 엑솜 서열결정, 또는 임의의 PCR 유래의 기술의 이용을 통해 검출될 수 있다. 예를 들면, 게놈 DNA의 샘플에 대한 PCR을 수행하여 전위를 검출할 수 있다. 한 실시양태에서, 정량적 PCR이 이용된다. 한 실시양태에서, c-MAF 유전자에 대해 특이적인 프라이머 및 IGH 프로모터 영역에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하고, 생성물이 생성되는 경우, 전위가 일어났다.

[0247] 일부 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭 및 카피 수는 c-MAF 유전자의 전위가 측정된 후 측정된다. 일부 실시양태에서, 프로브를 사용하여 세포가 c-MAF 유전자에 대한 배수체인지를 확인한다. 일부 실시양태에서, 관심있는 유전자로부터 2개 초과 신호가 존재하는지를 확인함으로써 배수성을 확인한다. 일부 실시양태에서, 관심있는 유전자에 대해 특이적인 프로브로부터의 신호를 측정하고 이 신호를 센트로미어 프로브 또는 다른 프로브와 비교함으로써 배수성을 확인한다.

[0248] c-MAF 유전자의 증폭 또는 전위의 검출을 기초로 폐암에서 임상 결과를 예측하는 방법

[0249] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있거나 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 폐암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제7 방법)으로서, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 c-MAF 유전자의 증폭

이 좋지 않은 임상 결과를 표시하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.

- [0250] 본 발명의 제7 방법은 c-MAF 유전자가 대상체의 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. c-MAF의 증폭의 확인은 본질적으로 본 발명의 제5 방법에 기재된 바와 같이 수행된다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다. 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 좌위 16q23 또는 16q22-q24의 증폭을 포함함으로써 확인된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자의 증폭은 c-MAF 유전자 특이적 프로브를 사용함으로써 확인된다.
- [0251] 제2 단계에서, 본 발명의 제7 방법은 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 이때 c-MAF 카피 수가 대조군 샘플의 c-MAF 카피 수에 비해 더 큰 경우, 이것은 좋지 않은 임상 결과를 표시한다.
- [0252] 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자 카피 수가 기준 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피 수보다 더 큰 경우, c-MAF 유전자는 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있다. 한 예에서, c-MAF 유전자의 게놈 카피 수가 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 적어도 2배(즉, 6 카피), 3배(즉, 8 카피), 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배 또는 50배 증가되어 있는 경우, c-MAF 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다. 또 다른 예에서, 세포 당 c-MAF 유전자의 게놈 카피 수가 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 등인 경우, c-MAF 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다.
- [0253] 또 다른 실시양태에서, 기준 유전자 카피 수는 골 전이를 앓고 있지 않은 대상체로부터의 폐암 샘플에서의 유전자 카피 수이다.
- [0254] 또 다른 실시양태에서, 증폭은 제자리 혼성화 또는 PCR에 의해 확인된다.
- [0255] 본 발명의 치료 방법
- [0256] c-MAF 억제제를 사용한 골 전이의 치료
- [0257] c-MAF 유전자 발현 억제제 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 억제제는 폐암 전이의 치료 및/또는 예방에 사용될 수 있다.
- [0258] 또 다른 양태에서, 본 발명은 골 전이 폐암의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한 c-MAF 억제제의 용도에 관한 것이다.
- [0259] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 폐암으로부터의 골 전이를 치료하거나 예방하는 방법으로서, c-MAF 억제제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0260] 또 다른 양태에서, 본 발명은 골 전이를 예방하거나 감소시키는 물질을 폐암을 앓고 있는 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는, 폐암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 이때 상기 물질이 상기 대상체에서 c-MAF의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 요법에 따라 투여되는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0261] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암 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 폐암 전이의 치료 및/또는 예방에 사용되는 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 폐암 전이를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0262] 본원에서 사용된 바와 같이, "c-MAF 억제제"는 c-MAF 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(c-MAF 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 c-MAF 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 c-MAF 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 c-MAF 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. c-MAF 유전자 발현 억제제는 예컨대, 국제 특허출원 공보 제W02005/046731호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 제시된 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-MAF의 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법; 예컨대, 국제 특허출원 공보 제W02008098351호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응 영역(MARE 또는 c-MAF 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에서 레포터 유전자의 전사 능력을 차단하는 소위 억제제의 능

력에 기초한 방법; 또는 예컨대, 미국 특허출원 공보 제2009048117A호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 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 능력에 기초한 방법을 이용함으로써 확인될 수 있다.

[0263] 비-한정적 예로서, 본 발명에서 사용되기에 적합한 c-MAF 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 간섭 RNA(siRNA), 촉매 RNA 또는 특이적 리보자임 및 억제 항체를 포함한다.

[0264] 안티센스 올리고뉴클레오타이드

[0265] 본 발명의 추가 양태는 발현을 억제하기 위한, 예를 들면, 억제될 활성을 갖는 c-MAF를 코딩하는 핵산의 전사 및/또는 번역을 억제하기 위한 단리된 "안티센스" 핵산의 용도에 관한 것이다. 안티센스 핵산은 통상의 염기 상보성에 의해, 또는 예를 들면, 이중 가닥 DNA에 결합하는 경우 이중 나선의 큰 홈(groove)에서의 특이적 상호작용을 통해 약물의 잠재적 표적에 결합될 수 있다. 일반적으로, 이들 방법들은 당분야에서 일반적으로 이용되는 다양한 기법들을 지칭하고, 올리고뉴클레오타이드 서열과의 특이적 결합에 기초한 임의의 방법을 포함한다.

[0266] 본 발명의 안티센스 구축물은 예를 들면, 세포에서 전사될 때 c-MAF를 코딩하는 세포 mRNA의 하나 이상의 독특한 부분에 상보적인 RNA를 생성하는 발현 플라스미드로서 투여될 수 있다. 대안적으로, 안티센스 구축물은 세포 내로 도입될 때 표적 핵산의 mRNA 및/또는 유전자 서열과 혼성화하여 유전자 발현을 억제하는, 생체외에서 발생된 올리고뉴클레오타이드 프로브이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 프로브는 바람직하게는 내생성 뉴클레아제, 예를 들면, 엑소뉴클레아제 및/또는 엔도뉴클레아제에 대한 내성을 나타내므로 생체내에서 안정한 변경된 올리고뉴클레오타이드이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드로서 사용되는 핵산 분자의 예로는 포스포라미데이트, 포스포티오네이트 및 메틸포스포네이트의 DNA 유사체(미국 특허 제5,176,996호, 제5,264,564호 및 제5,256,775호 참조)(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)가 있다. 안티센스 치료에 유용한 올리고머를 구축하기 위한 일반적인 방법은 예를 들면, 문헌(Van der Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988) 및 문헌(Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988)에서 검토되어 있다.

[0267] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우, 번역의 출발 부위, 예를 들면, 표적 유전자의 -10과 +10 사이의 부위로부터 유래된 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 영역이 바람직하다. 안티센스 방법은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 디자인(DNA 또는 RNA)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전사된 mRNA에 결합될 것이고, 번역은 방지될 것이다.

[0268] mRNA의 5' 말단, 예를 들면, 출발 코돈 AUG를 포함하는 비-번역 5' 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 번역을 억제하기에 가장 효율적인 방식으로 작용해야 한다. 그럼에도 불구하고, mRNA의 비-번역 3' 서열에 상보적인 서열도 mRNA 번역의 억제에 효율적이라는 것이 밝혀졌다(Wagner, Nature 372: 333, 1994). 따라서, 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 그 mRNA의 번역을 억제하기 위해 안티센스 방법에서 유전자의 비-코딩 영역인 비-번역 5' 또는 3' 영역에서 사용될 수 있다. mRNA의 비-번역 5' 영역에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 출발 코돈 AUG의 상보체를 포함해야 한다. mRNA의 코딩 영역에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 보다 덜 효율적인 번역 억제제이지만, 본 발명에 따라 사용될 수도 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드가 mRNA의 5' 영역, 3' 영역 또는 코딩 영역과 혼성화하도록 디자인되는 경우, 안티센스 핵산은 6개 이상의 뉴클레오타이드 길이를 가져야 하고, 바람직하게는 대략 100개 미만의 뉴클레오타이드 길이, 보다 바람직하게는 대략 50개, 25개, 17개 또는 10개 미만의 뉴클레오타이드 길이를 가져야 한다.

[0269] 바람직하게는, 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 능력을 정량하기 위해 먼저 시험관내 연구를 수행한다. 바람직하게는, 이 연구는 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 유전자 억제와 비-특이적 생물학적 효과를 구별하는 대조군을 사용한다. 또한, 바람직하게는, 이 연구는 표적 RNA 또는 단백질의 수준을 RNA 또는 단백질의 내부 대조군의 수준과 비교하였다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수득한 결과를, 대조군 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수득한 결과와 비교할 수 있다. 바람직하게는, 대조군 올리고뉴클레오타이드는 분석될 올리고뉴클레오타이드와 거의 동일한 길이를 갖고, 그 올리고뉴클레오타이드 서열은 표적 서열과의 특이적 혼성화를 방지하기 위해 필요하다고 간주되는 수준 이상으로 안티센스 서열과 상이하지 않다.

[0270] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA, 또는 키메라 혼합물 또는 유도체, 또는 이들의 변경된 버전일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 예를 들면, 분자의 안정성, 그의 혼성화 능력 등을 개선하기 위해 염기 기, 당 기 또는 포스페이트 골격에서 변경될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 다른 결합된 기, 예컨대, 세포막(예를 들면, 문헌(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556,



1989), 문헌(Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987) 및 국제 특허출원 공보 제WO 88/09810호 참조) 또는 혈액-뇌 장벽(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO 89/10134호 참조)을 통한 수송을 용이하게 하기 위한 펩티드(예를 들면, 올리고뉴클레오타이드를 숙주 세포의 수용체로 향하게 하는 펩티드) 또는 물질, 또는 인터칼레이팅제(예를 들면, 문헌(Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988) 참조)를 포함할 수 있다. 이를 목적으로, 상기 올리고뉴클레오타이드는 또 다른 분자, 예를 들면, 펩티드, 수송제, 혼성화-유발된 절단제 등에 접합될 수 있다.

[0271] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변경된 염기 기를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일로스 및 핵소스를 포함하나 이들로 한정되지 않는 군으로부터 선택된 하나 이상의 변경된 당 기도 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 중성 펩티드와 유사한 골격도 함유할 수 있다. 이러한 분자는 펩티드 핵산(PNA) 올리고머로서 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌(Perry-O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996) 및 문헌(Eglom et al., Nature 365: 566, 1993)에 기재되어 있다.

[0272] 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변경된 포스페이트 골격을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 알파-아노머성 올리고뉴클레오타이드이다.

[0273] 표적 mRNA 서열의 코딩 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있지만, 전사된 비-번역 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드도 사용될 수 있다.

[0274] 일부 경우, 내생성 mRNA 번역을 억제하기에 충분한 안티센스 세포내 농도에 도달하는 것이 어려울 수 있다. 따라서, 바람직한 방법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 강한 중합효소 III 또는 중합효소 II 프로모터의 조절 하에 놓여 있는 재조합 DNA 구축물을 사용한다.

[0275] 대안적으로, 유전자 조절 영역(즉, 프로모터 및/또는 인핸서)에 상보적인 테옥시리보뉴클레오타이드 서열이 체내의 표적 세포에서 유전자 전사를 방해하는 삼중 나선 구조를 형성하게 함으로써 표적 유전자 발현을 감소시킬 수 있다(일반적으로, 문헌(Helene, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991) 참조). 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 모르폴린이다.

[0276] siRNA

[0277] 작은 간섭 RNA 또는 siRNA는 RNA 간섭으로 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 물질이다. siRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나, 시험관내 전사에 의해 수득될 수 있거나, 생체내 표적 세포에서 합성될 수 있다. 전형적으로, siRNA는 15개 내지 40개 뉴클레오타이드 길이를 갖는 이중 가닥 RNA로 구성되고, 1개 내지 6개의 뉴클레오타이드로 구성된 3' 및/또는 5' 돌출 영역을 함유할 수 있다. 돌출 영역의 길이는 siRNA 분자의 총 길이와 무관하다. siRNA는 전사 후 표적 메신저를 분해하거나 침묵시킴으로써 작용한다.

[0278] 본 발명의 siRNA는 c-MAF 코딩 유전자의 mRNA, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열에 대한 상당한 상동성을 갖는다. "상당한 상동성을 갖는"은 siRNA가 RNA 간섭을 통해 표적 mRNA를 분해할 수 있도록 표적 mRNA와 충분히 상보적이거나 유사한 서열을 갖는 것으로서 이해된다. 상기 간섭을 야기하기에 적합한 siRNA는 RNA에 의해 형성된 siRNA뿐만 아니라 상이한 화학적 변경, 예컨대, 하기 변경을 함유하는 siRNA도 포함한다:

[0279] - 뉴클레오타이드들 사이의 결합이 천연 상태에서 관찰되는 결합, 예컨대, 포스포로티오네이트 결합과 상이한 siRNA;

[0280] - RNA 가닥과 작용 시약, 예컨대, 형광단의 접합체;

[0281] - RNA 가닥의 말단, 특히 2' 위치에서 상이한 하이드록실 작용기를 갖는 변경에 의한 3' 말단의 변경;

[0282] - 변경된 당, 예컨대, 2' 위치의 0-알킬화된 잔기, 예컨대, 2'-0-메틸리보스 또는 2'-0-플루오로리보스를 갖는 뉴클레오타이드; 또는

[0283] - 변경된 염기, 예컨대, 할로젠화된 염기(예를 들면, 5-브로모우라실 및 5-요오도우라실) 또는 알킬화된 염기(예를 들면, 7-메틸구아노신)를 갖는 뉴클레오타이드.

[0284] siRNA는 그 자체로, 즉 전술된 특성을 갖는 이중 가닥 RNA의 형태로 사용될 수 있다. 대안적으로, siRNA의 센스 가닥 서열 및 안티센스 가닥 서열을 함유하는 벡터의 사용은 관심있는 세포에서 그의 발현에 적합한 프로모터의 조절 하에서 가능하다.

- [0285] siRNA를 발현하기에 적합한 벡터는 siRNA의 2개 가닥들을 코딩하는 2개의 DNA 영역들이 전사 시 루프를 형성하는 스페이서 영역에 의해 분리된 상태로 1개의 동일한 DNA 가닥에서 직렬로 정렬되어 있는 벡터이고, 이때 단일 프로모터가 shRNA를 발생시키는 DNA 분자의 전사를 유도한다.
- [0286] 대안적으로, siRNA를 형성하는 가닥들 각각이 상이한 전사 유닛의 전사로부터 형성되는 벡터들의 사용도 가능하다. 이들 벡터들은 발산 전사 벡터와 수렴 전사 벡터로 나누어진다. 발산 전사 벡터에서, siRNA를 형성하는 DNA 가닥들 각각을 코딩하는 전사 유닛은 각각의 DNA 가닥의 전사가 동일할 수 있거나 상이할 수 있는 그 자신의 프로모터에 달려 있도록 벡터에서 직렬로 위치한다(Wang, J. et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100:5103-5106 and Lee, N.S., et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20:500-505). 수렴 전사 벡터에서, siRNA를 발생시키는 DNA 영역은 2개의 역방향 프로모터에 의해 플랭킹되어 있는 DNA 영역의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 형성한다. 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥의 전사 후, 안티센스 RNA 가닥은 기능성 siRNA를 형성하기 위해 혼성체를 형성할 것이다. 2개의 U6 프로모터(Tran, N. et al., 2003, BMC Biotechnol., 3:21), 1개의 마우스 U6 프로모터 및 1개의 인간 H1 프로모터(Zheng, L., et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 135-140 및 국제 특허출원 공보 제WO 2005026322호), 및 1개의 인간 U6 프로모터 및 1개의 마우스 H1 프로모터(Kaykas, A. and Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16)가 사용되는 역방향 프로모터 시스템을 갖는 벡터가 기재되어 있다.
- [0287] 수렴 또는 발산 발현 벡터로부터의 siRNA의 발현에서 사용되기에 적합한 프로모터는 siRNA가 발현될 세포와 상용가능한 임의의 프로모터 또는 프로모터 쌍을 포함한다. 따라서, 본 발명에 적합한 프로모터는 항시성(constitutive) 프로모터, 예컨대, 진행 바이러스, 예컨대, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, SV40, CMV, 조류 육종 바이러스 또는 B형 간염 바이러스의 게놈으로부터 유래된 항시성 프로모터, 메탈로티오네인 유전자 프로모터, 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제 유전자 프로모터, 레트로바이러스 LTR 영역, 면역글로불린 유전자 프로모터, 액틴 유전자 프로모터, EF-1 $\alpha$  유전자 프로모터뿐만 아니라, 단백질 발현이 분자 또는 외생성 신호의 첨가에 달려 있는 유도성 프로모터, 예컨대, 테트라사이클린 시스템, NF $\kappa$ B/UV 광 시스템, Cre/Lox 시스템 및 열 충격 유전자 프로모터, 국제 특허출원 공보 제WO/2006/135436호에 기재된 조절가능한 RNA 중합효소 II 프로모터 및 특정 조직 프로모터(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO2006012221호에 기재된 PSA 프로모터)도 포함하나, 반드시 이들로 한정되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 항시적으로 작용하는 RNA 중합효소 III 프로모터이다. RNA 중합효소 III 프로모터는 제한된 수의 유전자, 예컨대, 5S RNA, tRNA, 7SL RNA 및 U6 snRNA에서 발견된다. 다른 RNA 중합효소 III 프로모터와 달리, III형 프로모터는 임의의 유전자내 서열을 요구하지 않고 오히려 위치 -34 및 -24에서 5' 방향으로 TATA 박스를 포함하는 서열, 위치 -66과 -47 사이의 근거리 서열 요소 또는 PSE, 및 일부 경우 위치 -265와 -149 사이의 원거리 서열 요소 또는 DSE를 필요로 한다. 바람직한 실시양태에서, III형 RNA 중합효소 III 프로모터는 인간 또는 뮤린 H1 및 U6 유전자 프로모터이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 2개의 인간 또는 뮤린 U6 프로모터, 1개의 마우스 U6 프로모터 및 1개의 인간 H1 프로모터, 또는 1개의 인간 U6 프로모터 및 1개의 마우스 H1 프로모터이다.
- [0288] siRNA는 siRNA를 형성하는 역평행 가닥들이 루프 또는 헤어핀 영역에 의해 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 소위 shRNA(짧은 헤어핀 RNA)로부터 세포내에서 발생될 수 있다. shRNA는 플라스미드 또는 바이러스, 특히 레트로바이러스에 의해 코딩될 수 있고, 프로모터의 조절 하에 있다. shRNA를 발현하기에 적합한 프로모터는 siRNA의 발현에 대해 상기 단락에 기재된 프로모터이다.
- [0289] siRNA 및 shRNA를 발현하기에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터, 예컨대, pUC18, pUC19, Bluescript 및 이들의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, 파지 및 서틀 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28; 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-마이크론 플라스미드형 벡터, 삽입 플라스미드, YEP 벡터, 센트로미어성 플라스미드 등; 곤충 세포 발현 벡터, 예컨대, pAC 계열 벡터 및 pVL 계열 벡터; 식물 발현 벡터, 예컨대, pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE 계열 벡터 등; 및 바이러스 벡터-기초(아데노바이러스, 아데노바이러스와 관련된 바이러스뿐만 아니라, 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스) 고등 진핵 세포 발현 벡터 또는 비-바이러스 벡터, 예컨대, pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.
- [0290] 본 발명의 siRNA 및 shRNA는 당업자에게 공지되어 있는 일련의 기법들을 이용함으로써 수득될 수 있다. siRNA를 디자인하기 위한 기초로서 이용되는 뉴클레오티드 서열의 영역은 한정되지 않고, 코딩 서열(출발 코돈과 종결 코돈 사이)의 영역을 함유할 수 있거나, 대안적으로 출발 코돈을 기준으로 3' 방향 위치 중 임의의 위치에서 바람직하게는 25개 내지 50개 뉴클레오티드 길이를 갖는 비-번역 5' 또는 3' 영역의 서열을 함유할 수 있다.

siRNA를 디자인하는 한 방법은 N이 c-MAF 유전자 서열에서 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 AA(N19)TT 모티프의 확인, 및 높은 G/C 함량을 갖는 모티프의 선택을 포함한다. 상기 모티프가 발견되지 않는 경우, N이 임의의 뉴클레오티드일 수 있는 NA(N21) 모티프를 확인할 수 있다.

[0291] c-MAF 특이적 siRNA는 국제 특허출원 공보 제WO2005046731호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 siRNA(이의 가닥들 중 하나는 ACGGCUCGAGCAGCGACAA(서열번호 6)임)를 포함한다. 다른 c-MAF 특이적 siRNA 서열은 CUUACCAGUGUGUACACAA(서열번호 7), UGGAAGACUACUACUGGAUG(서열번호 8), AUUUGCAGUCAUGGAGAACC(서열번호 9), CAAGGAGAAUACGAGAAGU(서열번호 10), ACAAGGAGAAUACGAGAAG(서열번호 11) 및 ACCUGGAAGACUACUACUGG(서열번호 12)를 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0292] DNA 효소

[0293] 다른 한편으로, 본 발명은 본 발명의 c-MAF 유전자의 발현을 억제하기 위한 DNA 효소의 사용도 고려한다. DNA 효소는 안티센스 기술 및 리보자임 기술 둘다의 기작 특징들 중 일부를 도입한다. DNA 효소는 이 효소가 안티센스 올리고뉴클레오티드와 유사하게 특정 표적 핵산 서열을 인식함에도 불구하고, 리보자임처럼 촉매활성을 갖고 표적 핵산을 특이적으로 절단하도록 디자인된다.

[0294] 리보자임

[0295] 억제될 활성을 갖는 c-MAF를 코딩하는 mRNA의 번역을 방해하기 위해 표적 mRNA의 전사 생성물을 촉매처럼 절단하도록 디자인된 리보자임 분자도 사용될 수 있다. 리보자임은 특이적 RNA 절단을 촉매작용할 수 있는 효소 RNA 분자이다(검토를 위해서는 문헌(Rossi, Current Biology 4: 469-471, 1994) 참조). 리보자임 작용의 기작은 리보자임 분자 서열과 상보적 표적 RNA의 특이적 혼성화에 이어서 핵산내부용해성 절단 사건을 포함한다. 리보자임 분자의 조성물은 바람직하게는 표적 mRNA에 상보적인 하나 이상의 서열, 및 mRNA 또는 기능적 등가 서열의 절단을 담당하는 잘 공지된 서열을 포함한다(예를 들면, 미국 특허 제5093246호 참조).

[0296] 본 발명에서 사용되는 리보자임은 햄머-헤드(hammer-head) 리보자임 및 엔도리보뉴클레아제 RNA(이하, "체크형(Cech type) 리보자임")를 포함한다(Zaug et al., Science 224:574-578, 1984).

[0297] 리보자임은 (예를 들면, 안정성, 표적화 등을 개선하기 위해) 변경된 올리고뉴클레오티드에 의해 형성될 수 있고, 생체내에서 표적 유전자를 발현하는 세포에 분포되어야 한다. 바람직한 분포 방법은 형질감염된 세포가 내 생성 표적 메신저를 파괴하고 번역을 억제하기에 충분한 양의 리보자임을 생성하도록 강한 항시성 중합효소 III 또는 중합효소 II 프로모터의 조절 하에서 리보자임을 "코딩하는" DNA 구축물의 사용을 포함한다. 리보자임이 촉매활성을 갖기 때문에, 다른 안티센스 분자와 달리 낮은 세포내 농도가 그의 효율을 위해 요구된다.

[0298] 억제 항체

[0299] 본 발명의 내용에서, "억제 항체"는 c-MAF 단백질에 특이적으로 결합하여 상기 단백질의 기능들, 바람직하게는 전사와 관련된 기능들 중 하나 이상의 기능을 억제할 수 있는 임의의 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들(이들 중 일부는 전술되어 있음) 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 동물을 억제될 단백질로 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명의 내용에서, 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab", Fv, scFv 단편, 디아바디, 이중특이적 항체, 알파바디, 사이클로펩티드 및 스테이플드 펩티드를 포함한다. 일단 c-MAF 단백질 결합 능력을 갖는 항체가 확인되면, 이 단백질의 활성을 억제할 수 있는 항체는 억제제 확인 분석을 이용함으로써 선택될 것이다.

[0300] 억제 펩티드

[0301] 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.

[0302] 음성 c-MAF 우성형질(dominant)

[0303] maf 패밀리로부터의 단백질들이 AP-1 패밀리의 다른 구성원, 예컨대, Fos 및 Jun과 동종이량체 및 이종이량체를 형성할 수 있기 때문에, c-MAF 활성을 억제하는 한 방법은 c-MAF와 이량체를 형성할 수 있으나 전사를 활성화시키는 능력을 결여하는 음성 우성형질을 사용하는 것이다. 따라서, 음성 c-MAF 우성형질은 세포에 존재하고 전사 활성화 도메인을 함유하는 아미노 말단의 3분의 2를 결여하는 작은 maf 단백질들(예를 들면, mafK, mafF, mafg

및 pi 8) 중 임의의 maf 단백질일 수 있다(Fujiwara et al (1993) Oncogene 8, 2371-2380; Igarashi et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 7615-7624; Andrews et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11488-11492; Kataoka et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 2180-2190; Kataoka et al. (1996) Oncogene 12, 53-62).

[0304] 대안적으로, 음성 c-MAF 우성형질은 다른 단백질과 이량체를 형성하는 능력을 유지하되 전사를 활성화시키는 능력을 결여하는 c-MAF 변이체들을 포함한다. 이들 변이체들은 예를 들면, 단백질의 N 말단에 위치하는 c-MAF 전사활성화 도메인을 결여하는 변이체이다. 따라서, 음성 c-MAF 우성형질 변이체는 예시적 방식으로 적어도 아미노산 1 내지 122, 적어도 아미노산 1 내지 187 또는 적어도 아미노산 1 내지 257(미국 특허 제6274338호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 인간 c-MAF의 넘버링을 고려함)이 제거되어 있는 변이체를 포함한다.

[0305] 본 발명은 표적 세포에서의 발현에 적합한 프로모터의 작동 조절 하에서 음성 c-MAF 우성형질 변이체 및 c-MAF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 둘다를 사용하는 것을 고려한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하는 데에 사용될 수 있는 프로모터는 항시성 프로모터, 즉 기초 수준에서 전사를 유도하는 프로모터, 또는 전사활성이 외부 신호를 요구하는 유도성 프로모터일 수 있다. 전사를 조절하는 데에 적합한 항시성 프로모터는 특히, CMV 프로모터, SV40 프로모터, DHFR 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 1a 연장 인자(EF1a) 프로모터, 알부민 프로모터, ApoA1 프로모터, 케라틴 프로모터, CD3 프로모터, 번역글로불린 중쇄 또는 경쇄 프로모터, 신경필라멘트 프로모터, 신경 특이적 에놀라제(enolase) 프로모터, L7 프로모터, CD2 프로모터, 미요신 경쇄 키나제 프로모터, HOX 유전자 프로모터, 티미딘 키나제 프로모터, RNA 중합효소 II 프로모터, MyoD 유전자 프로모터, 포스포글리세레이트키나제(PGK) 유전자 프로모터, 저밀도 지단백질(LDL) 프로모터, 및 액틴 유전자 프로모터이다. 바람직한 실시양태에서, 전사활성화제의 발현을 조절하는 프로모터는 PGK 유전자 프로모터이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하는 프로모터는 T7 파지의 RNA 중합효소 프로모터이다.

[0306] 바람직하게는, 본 발명의 내용에서 사용될 수 있는 유도성 프로모터는 유도제의 부재 하에서 0 또는 무시할만한 기초 발현을 보이는, 유도제에 반응하는 프로모터이고 3' 위치에 위치하는 유전자의 활성화를 촉진할 수 있다. 유도제의 유형에 따라 유도성 프로모터는 Tet on/off 프로모터(Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Gossen, M. et al., 1995, Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); Pip on/off 프로모터(미국 특허 제6287813호); 안티프로게스틴(antiprogesterone) 의존성 프로모터(미국 특허출원 공보 제2004132086호), 엑디손(ecdyson) 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 제W09738117호), 메탈로티오네인 의존성 프로모터(국제 특허출원 공보 제W08604920호) 및 라파마이신 의존성 프로모터(Rivera et al., 1996, Nat. Med. 2:1028-32)로서 분류된다.

[0307] 음성 c-MAF 우성형질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하기에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터, 예컨대, pUC18, pUC19, Bluescript 및 이들의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 및 서플 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28; 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-미크론형 플라스미드 벡터, 삼입 플라스미드, YEP 벡터, 센트로미어성 플라스미드 등; 곤충 세포 발현 벡터, 예컨대, pAC 계열 벡터 및 pVL 계열 벡터; 식물 발현 벡터, 예컨대, pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCambia, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE 계열 벡터 등; 및 바이러스 벡터-기초(아데노바이러스, 아데노바이러스와 관련된 바이러스뿐만 아니라 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스) 고등 진핵 세포 발현 벡터 또는 비-바이러스 벡터, 예컨대, pSilencer 4.1-CMV(암비온), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCNV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1로부터 유래된 벡터들을 포함한다.

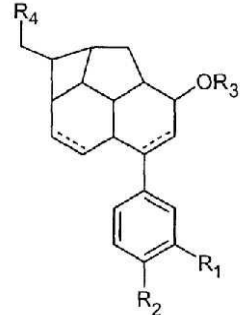
[0308] c-MAF 단백질 활성의 다른 억제 화합물

[0309] 본 발명에서 사용되기에 적합한 다른 c-MAF 억제 화합물은 하기 화합물들을 포함한다:

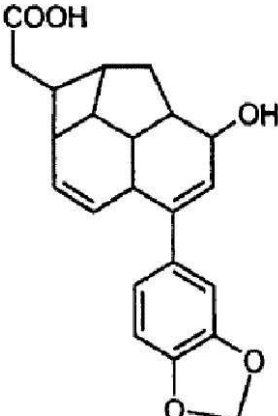
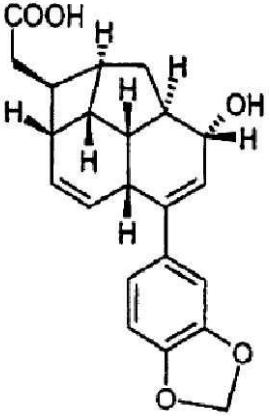


표 1

c-MAF 억제 능력을 갖는 소분자

I	<p>엔디안드르산(Endiandric acid) H 유도체, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제 WO2004014888 호에 기재된 하기 화학식에 상응하는 화합물</p>  <p>[상기 식에서,  <math>R_1</math> 및 <math>R_2</math>는 서로 독립적으로          1.0 H, 또는          2.0 <math>-O-C_1-C_6</math>-알킬, <math>-O-C_2-C_6</math>-알케닐, <math>-O-C_2-C_6</math>-알키닐 또는 <math>-O-C_6-C_{10}</math>-아릴          기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 알킬, 알케닐 및 알키닐          기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9 중 어느 하나로 일치환되거나 이치환되고:          2.1 <math>-OH</math>,          2.2 <math>=O</math>,          2.3 <math>-O-C_1-C_6</math>-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임),          2.4 <math>-O-C_2-C_6</math>-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임),          2.5 <math>C_6-C_{10}</math>-아릴,          2.6 <math>-NH-C_1-C_6</math>-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임),          2.7 <math>-NH-C_2-C_6</math>-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임),          2.8 <math>-NH_2</math>, 또는          2.9 할로젠,          이때, 아릴 기는 임의적으로 치환기 2.1 또는 2.3 내지 2.9 로 일치환되거나 이치환되고,          이때, 치환기 2.3, 2.4, 2.6 및 2.7 은 <math>-CN</math>, -아미드 또는 -옥심 작용기로 더 치환될 수          있고, 치환기 2.5 는 <math>-CN</math> 또는 아미드 작용기로 더 치환될 수 있거나, <math>R_1</math> 및 <math>R_2</math>는 함께          고리를 형성하고, 이때 <math>R_1</math> 및 <math>R_2</math>는 <math>-O-[(C_1-C_6)-알킬렌]-O-</math> 기를 의미하고,  <math>R_3</math>은          1.0 H, 또는          2.0 <math>-O-C_1-C_6</math>-알킬, <math>-O-C_2-C_6</math>-알케닐, <math>-O-C_2-C_6</math>-알키닐 또는 <math>-O-C_6-C_{10}</math>-아릴</p>
---	---

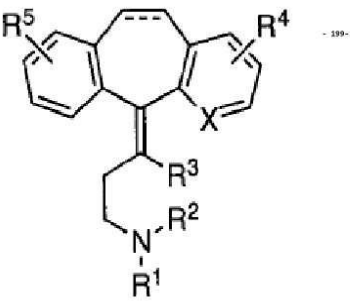
[0310]

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

[0311]

	<div><div><chem>R1c1cc(R2)c(O)c2c1ncccc2</chem><div>- 198 -</div></div><div><p>[상기 식에서, R<sub>1</sub>은 NO<sub>2</sub>, NH<sub>2</sub>, NH(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬) 및 N(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬)(C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-알킬)로 구성된 군으로부터 선택되고, R<sub>2</sub>는 H, 할로젠, C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬, 및 플루오로-치환된 C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> 알킬로부터 선택되거나; R<sub>1</sub>은 Cl 이고, R<sub>2</sub>는 Br 또는 H 이다.], 바람직하게는, 하기 화합물</p><div><div><chem>Nc1cc(O)c2c1ncccc2</chem><chem>[O-][N+](=O)c1cc(O)c2c1ncccc2</chem></div><div><chem>Clc1cc(I)c(O)c2c1ncccc2</chem><chem>Clc1cc(Br)c(O)c2c1ncccc2</chem></div><div><chem>Clc1cc(O)c2c1ncccc2</chem><chem>Ic1cc(O)c2c1ncccc2</chem></div></div></div></div>
III	국제 특허출원 공보 제 WO09049410호에 기재된 클리오퀴놀(5-클로로-7-

[0312]

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

[0313]

[0314]

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



표 2

c-MAF 억제제

길항제	cdk2 억제 활성에 대한 참고문헌
<p>퓨린 유사체</p> <p>푸르발라놀(Purvalanol), 예컨대, 상표명 푸르발라놀 A(#P4484, 시그마-알드리치, 미국 미조리주 세인트루이스 소재) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 <math>C_{15}H_{25}ClN_6O</math> 를 갖는 2-(1R-이소프로필-2-하이드록시에틸아미노)-6-(3-클로로아닐리노)-9-이소프로필푸린; 푸르발라놀 B; 아미노푸르발라놀; 화합물 52(이때, 푸르발라놀 A 의 이소프로필이 H 로 치환되어 있음)</p>	<p>Gray, N.S. <i>et al.</i>, Science, 281, 533-538 (1398); Chang, Y.T. <i>et al.</i>, Chem. Biol., 6, 361-375 (1999)</p>
<p>상표명 올로모우신(Olomoucine)(#O0886) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 <math>C_{15}H_{18}N_6O</math> 를 갖는 2-(하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-메틸푸린; 상표명 <math>N^9</math>-이소프로필올로모우신(#I0763) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 <math>C_{17}H_{22}N_6O</math> 를 갖는 2-(2'-하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-이소프로필푸린; CVT-313</p>	<p>Vesely, J. <i>et al.</i>, (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86, 11; Brooks, E.B., <i>et al.</i>, (1997) J. Biol. Chem., 272, 29207-11</p>
<p>상표명 로스코비틴(Roscovitin)(#R7772) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, <math>C_{19}H_{26}N_6O</math> 를 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; 메톡시로스코비틴</p>	<p>Wang, D. <i>et al.</i>, J. Virol., 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i>, J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L., <i>et al.</i>, (1997) Eur. J. Biochem., 243, 527-36</p>
<p>상표명 CGP74514(#C3353) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 <math>C_{19}H_{24}ClN_7O</math> 을 갖는 퓨린 유사체 N2-(시스-2-아미노사이클로헥실)-N6-(3-클로로페닐)-9-에틸-9H-푸린-2,6-디아민</p>	<p>Imbach, P. <i>et al.</i>, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).</p>
<p>CGP79S807, (상기) CGP74514 의 퓨린 유사체, 이때 Cl 은 CN 으로 치환되고, OH 는 제거되고, 사이클로헥산 고리의 오르토 위치는 <math>NH_2</math> 이다.</p>	<p>Imbach, P. <i>et al.</i>, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 44, 524-530 (2001).</p>
<p>퓨린 유사체, 예컨대, O6-사이클로헥실메틸 구아닌 NU2058</p>	<p>Arris, C.E. <i>et al.</i>, J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies <i>et al.</i>, Nature Structural Biology, 9:10, 745-749, 2002</p>

[0315]

푸린 유사체, 예컨대, NU6102	Arris, C.E. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 2797-2804 (2000); Davies, T.G. <i>et al.</i> , Nat. Struct. Biol., 9, 745-749 (2002).
이소펜테닐-아데닌	Vesely, J. <i>et al.</i> , (1994) Eur. J. Biochem., 224, 771-86
비-푸린계 물질	
인디루빈(indirubin), 예컨대, 상표명 (#10404) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 $C_{16}H_{11}N_3O_2$ 를 갖는 인디루빈-3'-모노옥심; 인디루빈-5-설포네이트; 5-클로로인디루빈	Davies, T.G. <i>et al.</i> , Structure, 9, 389-397 (2001); Marko, D. <i>et al.</i> , Br. J. Cancer, 84, 283-289 (2001); Hoessel, R., <i>et al.</i> , (1999) Nat. Cell Biol., 1, 60-7; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(HelFoerg <i>et al.</i> )
이 표의 2 열에서 인용된 문헌(Fischer)의 옥신들 1(#IN118, JMAR 케미칼)	Porcs-Makkay, M., <i>et al.</i> , Tetrahedron 2000, 56, 5893; Org. Process Res. Dev., 2000, 4, 10
인테노피라졸	Nugiel D.A. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 45, 5233-5248 (2002).
피리도(2,3-d)피리미딘-7-온, 피셔의 화합물 3	Barvian, M. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., Med. Res. Rev., 21, 487-498 (2001).
퀴나졸린, 예컨대, 아닐리노퀴나졸린	Sielecki, T.M. <i>et al.</i> , Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1157-1160 (2001); Mettey <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 2003, 46, 222-236.
티아졸, 예컨대, 융합된 티아졸, 상표명 GW8510(#G7791) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 $C_{21}H_{15}N_5O_3S_2$ 를 갖는 4-[(7-옥소-6,7-디하이드로-8H-[1,3]티아졸로[5,4-e]인돌-8-일리덴)메틸]아미노-N-(2-피리딜)벤젠설포나미드	Davis, S.T. <i>et al.</i> Science, 291, 134-137 (2001); 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(Hellberg <i>et al.</i> )
플라보피리돌, 예컨대, 플라보피리돌(LB86 8275; NCS 649890, 국립 암연구소, 미국 매릴랜드주 베테스다 소재) 및 데클로로 유도체	Carlson, B.A., <i>et al.</i> , (1996) Cancer Res., 56, 2973-8
알칼로이드, 예컨대, 스타우로스포린(#S1016, 에이.지. 사이언티픽(A.G. Scientific), 미국 캘리포니아주 샌디에고 소재) 또는 UCN-01(7-하이드록시스타우로스포린)(국립 암연구소, 미국 매릴랜드주 베테스다 소재)	Rialet, V., <i>et al.</i> , (1991) Anticancer Res., 11, 1581-90; Wang, Q., <i>et al.</i> , (1995) Cell Growth Differ., 6, 927-36; Akiyama, T., <i>et al.</i> , (1997) Cancer Res., 57, 1495-501; Kawakami, K., <i>et al.</i> , (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 219, 778-83

[0316]

파울론(paullone), 예컨대, 상표명 켄파울론(kenpaullone) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 $C_{16}H_{11}BrN_2O$ 를 갖는 9-브로모-7,12-디하이드로-인돌로 [3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5H)-온; 또는 상표명 알스터파울론(alstcrpaullone)(#A4847) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 $C_{16}H_{11}N_3O_3$ 을 갖는 9-니트로-7,12-디하이드로인돌로-[3,2-	Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i> , Cancer Res., 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W., <i>et al.</i> , (1999) Cancer Res., 59, 2566-9; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(Hellberg <i>et al.</i> )
CGP 41251, 알칼로이드	Begemann, M., <i>et al.</i> , (1998) Anticancer Res., 18, 2275-82; Fabbro <i>et al.</i> , <i>Pharmacol. Ther.</i> , 1999 May-Jun; 82(2-3):293-301
하이메니알디신(hymenialdisine), 예컨대, 에이. 지. 사이언티픽 인코포레이티드(미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)의 자회사인 바이오케미칼스 넷(Biochemicals. net)으로부터 입수가능한, 분자식 $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ 을 갖는 10z-하이메니알디신(H-1150)	Meijer, L., <i>et al.</i> , (1999) Chemistry & Biology, 7, 51-63; 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(Hellberg <i>et al.</i> )
CGP60474, 페닐아미노피리미딘	21; 국제 특허출원 공보 제 WO95/09853 호(Zimmermann <i>et al.</i> ) 1994 년 9 월 21 일
티아졸로피리미딘 2	Attaby <i>et al.</i> , Z, <i>Naturforsch.</i> 54b, 788-798 (1999)
디아릴우레아	Honma, T. <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 44, 4628-4640 (2001), Honma, T. <i>et al.</i> , J. Med. Chem, 44, 4615-4627 (2001)
상표명 부티로락톤-I(B7930) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 $C_{24}H_{24}O_7$ 을 갖는 (2R)-2,5-디하이드로-4-하이드록시-2-[(4-하이드록시-3-(3-메틸-2-부테닐)페닐)메틸]-3-(4-하이드록시페닐)-5-옥소-2-퓨란카복실산 메틸 에스테르	Kitagawa, M. <i>et al.</i> , <i>Oncogene</i> , 8, 2425-2432 (1993)
알로이신(Aloisine) A, 카탈로그 번호 128125(칼바이오크(Calbiochem), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)	Metty <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236

[0317]

[0318]

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

[0319]

c-MAF 억제제는 전형적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 투여된다.

[0320]

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

[0321]

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

우 안정화제, 현탁제, 보존제, 계면활성제 등을 함유할 수 있다.

[0322] 의약에서 사용되기 위한 c-MAF 억제제는 단리된 상태 또는 추가 활성 물질과 조합된 상태의 전구약물, 염, 용매 화물 또는 포접화합물의 형태로 발견될 수 있고, 약학적으로 허용가능한 부형제와 함께 제제화될 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 바람직한 부형제는 당, 전분, 셀룰로스, 고무 및 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학 조성물은 고체 약학 제형(예를 들면, 재구성되어 액체 제형을 제공할 수 있는 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 좌제, 멸균 결정 또는 비결정질 고체 등), 액체 약학 제형(예를 들면, 용액, 현탁액, 유화액, 엘릭시르, 로션, 연고 등), 또는 반고체 약학 제형(겔, 연고, 크림 등)으로 제제화될 것이다. 본 발명의 약학 조성물은 경구 경로, 정맥내 경로, 근육내 경로, 동맥내 경로, 골수내 경로, 척수강내 경로, 심실내 경로, 경피 경로, 피하 경로, 복강내 경로, 비내 경로, 장 경로, 국소 경로, 설하 경로 또는 직장 경로를 포함하나 이들로 한정되지 않는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 활성 성분을 투여하는 상이한 방법, 사용되는 부형제 및 이의 제조 공정의 검토는 문헌(Tratado de Farmacia Galenica, C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S.A., 1993 Edition) 및 문헌(Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20<sup>th</sup> edition, Williams & Wilkins PA, USA (2000))에서 발견될 수 있다. 약학적으로 허용가능한 담체의 예는 최신기술 수준에서 공지되어 있고, 인산염 완충 식염수 용액, 물, 유화액, 예컨대, 오일/물 유화액, 상이한 유형의 습윤화제, 멸균 용액 등을 포함한다. 상기 담체를 포함하는 조성물은 최신기술 수준에서 공지되어 있는 통상의 공정에 의해 제제화될 수 있다.

[0323] 핵산(siRNA; siRNA 또는 shRNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드; 또는 음성 c-MAF 우성형질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드)이 투여되는 경우, 본 발명은 특히 상기 핵산을 투여하기 위해 제조된 약학 조성물을 고려한다. 상기 약학 조성물은 노출된(naked) 핵산, 즉 신체의 뉴클레아제에 의한 분해로부터 핵산을 보호하는 화합물의 부재 하의 핵산을 포함할 수 있는데, 이것은 형질감염을 위해 사용된 시약과 관련된 독성이 제거된다는 장점을 수반한다. 노출된 화합물에 적합한 투여 경로는 혈관내 경로, 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, 콜레스테롤에 접합된 리포좀, 또는 세포막을 통한 전위를 촉진할 수 있는 화합물, 예컨대, HIV-1 TAT 단백질로부터 유래된 Tat 펩티드, 초파리 안테나페디아(antennapedia) 단백질의 호메오도메인의 제3 나선, 헤르페스 심플렉스 바이러스 VP22 단백질, 아르기닌 올리고머 및 국제 특허출원 공보 제W007069090호에 기재된 펩티드에 접합된 리포좀의 일부를 형성하는 핵산이 투여될 수 있다(Lindgren, A. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:99-103, Schwarze, S.R. et al., 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48, Lundberg, M et al., 2003, Mol Therapy 8:143-150 and Snyder, E.L. and Dowdy, S.F., 2004, Pharm. Res. 21:389-393). 대안적으로, 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터, 바람직하게는 아데노바이러스-기초 벡터, 아데노-관련 바이러스 또는 레트로바이러스, 예컨대, 무린 백혈병 바이러스(MLV) 또는 렌티바이러스(HIV, FIV, EIAV)에 기초한 바이러스의 일부를 형성하는 폴리뉴클레오티드가 투여될 수 있다.

[0324] c-MAF 억제제 또는 이를 함유하는 약학 조성물은 체중 kg 당 10 mg 미만, 바람직하게는 체중 kg 당 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 또는 0.00001 mg 미만의 용량으로 투여될 수 있다. 유닛 용량은 주사, 흡입 또는 국소 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0325] 용량은 치료되는 병태의 중증도 및 반응에 달려 있고, 수일 내지 수개월, 또는 병태가 진정될 때까지 변경될 수 있다. 최적 용량은 환자의 체내에서 약제의 농도를 주기적으로 측정함으로써 결정될 수 있다. 최적 용량은 동물 모델에서의 사전 시험관내 또는 생체내 분석에 의해 수득된 EC50 값으로부터 결정될 수 있다. 유닛 용량은 1일 1회, 또는 1일 1회 미만, 바람직하게는 2일, 4일, 8일 또는 30일마다 1회 미만으로 투여될 수 있다. 대안적으로, 출발 용량을 투여한 후, 일반적으로 출발 용량보다 더 적은 양의 1회 또는 수회 유지 용량을 투여할 수 있다. 유지 요법은 환자를 1일 당 체중 kg 당 0.01 µg 내지 1.4 mg, 예를 들면, 1일 당 체중 kg 당 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 또는 0.00001 mg의 용량으로 치료하는 것을 포함할 수 있다. 유지 용량은 바람직하게는 5일, 10일 또는 30일마다 최대 1회 투여된다. 치료는 환자가 앓고 있는 장애의 유형, 이의 중증도 및 환자의 상태에 따라 달라질 시간 동안 계속되어야 한다. 치료 후, 질환이 치료에 반응하지 않는 경우 용량을 증가시켜야 하는지, 아니면 질환의 개선이 관찰되거나 원치 않는 부작용이 관찰되는 경우 용량을 감소시켜야 하는지를 결정하기 위해 환자의 경과를 모니터링해야 한다.

[0326] 상승된 c-MAF 수준을 갖는 골 전이를 갖는 폐암 환자에서 골 분해의 치료 또는 예방

[0327] 본 발명자들은 c-MAF 수준이 전이, 바람직한 실시양태에서 골 전이에서 상승되어 있다는 것을 확인하였다. 골로 전이되어 있고 상기 전이에서 c-MAF 수준이 상승되어 있는 폐암을 앓고 있는 환자는 특히 증가된 파골세포 활성



에 의해 야기된 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 치료로부터 이익을 얻을 수 있다.

- [0328] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 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 피하거나 예방하는 물질의 용도에 관한 것이다.
- [0329] 대안적으로, 본 발명은 폐암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 종양 조직 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 치료하는 데에 사용되는, 골 분해를 피하거나 예방하는 물질에 관한 것이다.
- [0330] 대안적으로, 본 발명은 폐암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 종양 조직 샘플에서 상승된 c-MAF 수준을 갖는 대상체에서 골 분해를 예방하고/하거나 치료하는 방법으로서, 골 분해를 피하거나 예방하는 물질을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0331] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다. 또 다른 특정 실시양태에서, 폐암은 NSCLC이다.
- [0332] 용어 및 표현 "대상체", "폐암", "종양 샘플", "전이", "c-MAF 유전자", "증가된 또는 상승된 발현 수준" 및 "대조군 샘플"은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세히 기재되어 있고, 골분해를 피하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있다.
- [0333] 본 발명에 기재된 치료 방법에 적합한, 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질은 맞춤형 치료 방법의 내용에서 상세히 기술되어 있다.
- [0334] 기준 또는 대조군 샘플은 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 종양 샘플, 또는 전이되지 않은 폐암을 갖는 대상체의 생검 샘플 중 종양 조직 채취물에서 측정된 c-MAF 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.
- [0335] c-MAF 수준이 대조군 샘플에 비해 상승되어 있는지를 확인하거나 정량하는 방법은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세히 기재되어 있고, 골 분해를 피하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있다.
- [0336] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 전달된 물질들 중 골 분해를 피하거나 예방하는 하나 초과 의 물질들이 조합되거나, 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬과 조합될 수 있는 조합된 치료를 수행할 수 있다.
- [0337] 골 분해를 피하거나 예방하는 물질은 전형적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 투여된다. 용어 "담체" 및 담체의 유형뿐만 아니라, 이들이 투여될 수 있고 골 분해를 피하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있는 제형 및 용량도 c-MAF 억제제에 대해 상기 정의된 바와 같다.
- [0338] 본 발명의 키트
- [0339] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체에서 폐암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0340] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0341] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체를 위한 치료를 결정하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단; b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 수단; c) 정량된 발현 수준과 기준 발현 수준의 비교를 기초로 상기 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 감소시키기 위한 치료를 결정하는 수단; 및 d) 정량된 발현 수준과 기준 발현 수준의 비교를 기초로 상기 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 감소시키기 위한 치료를 배제하는 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0342] 또 다른 양태에서, 본 발명은 i) 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 시약, 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계를 갖는 것으로서 미리 결정된 하나 이상의 c-MAF 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0343] 상기 대상체의 샘플에서 16q23 및 16q22-24 좌위 증폭 및 전위를 포함하는 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단은 상세히 기술되어 있다.

- [0344] 바람직한 실시양태에서, 발현을 정량하는 수단은 c-MAF 유전자에 특이적으로 결합하고/하거나 c-MAF 유전자를 증폭하는 프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함한다.
- [0345] 특정 실시양태에서, 폐암은 SCLC 또는 NSCLC 암이다.
- [0346] 특정 실시양태에서, 키트는 폐암 생검, 순환하는 폐암 세포 및 순환하는 폐 종양 DNA에 적용되나, 이들로 한정되지 않는다.
- [0347] 본 발명의 방법의 모든 구체적인 실시양태들은 본 발명의 키트 및 이의 용도에 적용될 수 있다.
- [0348] 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 방법
- [0349] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0350] a) 폐암을 앓고 있는 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- [0351] b) 상기 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0352] c) c-MAF의 정량된 발현 수준을 c-MAF 발현의 미리 결정된 기준 수준과 비교함으로써 상기 샘플을 유형분류하는 단계
- [0353] 를 포함하는, 폐암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 유형분류가 상기 대상체에서 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0354] 상기 대상체의 샘플에서 16q23 및 16q22-24 좌위 증폭 및 전위를 포함하는 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단은 상세히 전술되어 있다. 특정 실시양태에서, 폐암은 SCLC 또는 NSCLC이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플, 순환하는 종양 세포 또는 순환하는 종양 DNA이다.
- [0355] 폐암을 앓고 있는 대상체를 분류하는 방법
- [0356] 또 다른 양태에서, 본 발명은 폐암을 앓고 있는 대상체를 코호트로 분류하는 방법으로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 c-MAF의 발현 수준을 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 c-MAF 발현 수준을 미리 결정된 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 샘플에서의 상기 c-MAF 발현 수준을 기초로 상기 대상체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0357] 상기 대상체의 샘플에서 16q23 및 16q22-24 좌위 증폭 및 전위를 포함하는 c-MAF의 발현 수준을 정량하는 수단은 상세히 전술되어 있다.
- [0358] 특정 실시양태에서, 폐암은 SCLC 또는 NSCLC이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플, 순환하는 종양 세포 또는 순환하는 종양 DNA이다. 바람직한 실시양태에서, 상기 코호트는 상기 기준 발현 수준에 비해 필적할만한 c-MAF 발현 수준을 갖는 것으로서 확인된 하나 이상의 다른 개체를 포함한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 샘플에서의 상기 c-MAF 발현 수준은 상기 미리 결정된 기준 수준에 비해 증가되어 있고, 이때 코호트의 구성원은 골 전이의 증가된 위험을 갖는 것으로서 분류된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 코호트는 임상시험을 수행하기 위한 코호트이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0359] 하기 실시예는 본 발명을 예시하고 그의 범위를 한정하지 않는다.
- [0360] 실시예
- [0361] 실시예 1
- [0362] 전이, 특히 골 전이의 위험에 있는 환자를 확인하기 위한 c-MAF 및 16q22-24의 임상 관련성 및 예후 값
- [0363] 상이한 폐암 환자 샘플 코호트에서 c-MAF를 시험하였다. 제1 코호트는 폐암 일차 종양의 전사체를 함유하는 유전자 발현 프로파일 및 전이에 대한 임상 소견을 포함하고, 제2 코호트는 조직 마이크로어레이 형태의 폐 종양 생검, 및 골 전이까지의 시간 및 전체 생존율에 대한 임상 소견에 기초하였다. 이들 종양들은 모든 폐암 아류형 및 병기를 대표한다. 제1 코호트에서, c-MAF 유전자의 발현은 전이까지의 시간을 포함하는 임상 파라미터와 상관관계를 갖는다. 유사하게, 일차 종양 진단 후 골 재발 및 전체 생존율에 대한 임상 소견이 입수될 수 있는 폐 일차 종양 생검의 제2 세트(n=74)는 c-MAF 특이적 항체 및 c-MAF 좌위 특이적 FISH 프로브를 사용하는 면역조직화학 및 형광 제자리 혼성화로 c-MAF 단백질 발현 및 16q23 게놈 획득의 수준을 측정하는 데에 사용되었고, c-MAF 발현 및 16q23 게놈 획득의 수준과 골 재발의 위험 사이의 관련성이 확립된다.

- [0364] 상세한 설명:
- [0365] 환자 코호트 I:
- [0366] 본 발명자들은 이들 종양들에서의 MAF 발현이 전이와 상관관계를 갖는지를 알아보기 위해 적절한 통계적 분석을 수행하였다. 본 발명자들은 EGFR 및 KRAS 돌연변이체, SCLC 및 NSCLC를 포함하는 폐 일차 종양의 코호트를 사용하였다. 환자의 정보는 하기 문헌으로부터 추출되었다: 문헌(Chitale D, Gong Y, Taylor BS, Broderick S, Brennan C, Somwar R, Golas B, Wang L, Motoi N, Szoke J, Reinersman JM, Major J, Sander C, Seshan VE, Zakowski MF, Rusch V, Pao W, Gerald W, Ladanyi M. "An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors." Oncogene. 2009; 28: 2773-83).
- [0367] 바이오컨덕터(Gentleman et al. (2004))를 이용하여 모든 통계적 분석을 R로 수행하였다.
- [0368] 본 발명자들은 MAF 발현을 통해 전이 표현형을 설명할 수 있는지를 알아보기 위해 (팩키지 서바이벌(survival)로부터의 R 함수 콕스프(coxph)를 이용하여) Cox 비례 위험 모델을 조절하였다. c-MAF는 (아피메트릭스(affymetrix) 어레이에서 c-MAF에 대해 특이적인 3개의 독립적인 프로브를 사용하였을 때) 통계적으로 유의한 효과를 가졌다. 폐 일차 종양에서 c-MAF의 유전자 발현은 카플란-메이에르 곡선에서 관찰되고 수득된 HR 및 p-값에 의해 강조되는 바와 같이 전이와 유의한 상관관계를 가졌다(도 1).
- [0369] 환자 코호트 II
- [0370] 유사하게, 일차 종양 진단 후 골 재발에 대한 임상 소견이 입수될 수 있는 폐 일차 종양의 데이터세트(74)를 확보하고, c-MAF 특이적 항체를 사용한 면역조직화학으로 c-MAF의 수준을 측정하고, c-MAF 발현의 수준과 골 재발의 위험 사이의 관련성을 확립한다. 폐암 환자로부터의 제2 파라핀-포매된 일차 종양 조직으로부터 샘플들을 수득하였다. 이들 샘플들은 필요한 관련 임상 데이터 및 임상 위원회의 승인과 함께 그의 임상 실시 동안 발데브론 종양 연구소에 의해 수집되었다.
- [0371] 하기 요건을 충족시키는 샘플들을 선택하였다:
- [0372] 9개의 샘플들은 추적조사의 임의의 시간에서 확인된 골 재발과 함께, 진단 시 국소 질환(M0)을 갖는 환자에 속하였다.
- [0373] 49개의 샘플들은 5년 이상 후 전이 부재 상태로 유지되는, 진단 시 환자에 속하였다.
- [0374] 남은 16개의 종양들은 나중에 골 이외의 임의의 위치에서 재발을 갖는, 진단 시 M0 환자로부터 유래된다.
- [0375] 실시예 2
- [0376] c-MAF 유전자 발현은 폐암에서 전이, 특히 골 전이의 위험과 관련되어 있다.
- [0377] 전술된 폐암 발현 데이터세트를 이용하였을 때 c-MAF 골 전이 유전자의 발현은 전이를 포함하는 임상 파라미터와 상관관계를 가졌다. 도 1에 기재된 바와 같이, c-MAF 발현은 전이의 높은 위험과 관련되어 있었다. 표준 통계적 분석 후, 본 발명자들은 이들 종양들에서의 MAF 발현이 전이와 유의한 상관관계를 갖는다는 것을 보여주었다. EGFR 및 KRAS 돌연변이체, SCLC 및 NSCLC를 포함하는 폐 일차 종양의 코호트를 사용하였다. 바이오컨덕터(Gentleman et al. (2004))를 이용하여 모든 통계적 분석을 수행하였다.
- [0378] 본 발명자들은 MAF 발현을 통해 전이 표현형을 설명할 수 있는지를 알아보기 위해 (팩키지 서바이벌로부터의 R 함수 콕스프를 이용하여) Cox 비례 위험 모델을 조절하였다. c-MAF는 (아피메트릭스 어레이에서 c-MAF에 대해 특이적인 3개의 독립적인 프로브를 사용하였을 때) 통계적으로 유의한 효과를 가졌다. 폐 일차 종양에서 c-MAF의 유전자 발현은 카플란-메이에르 곡선에서 관찰되고 수득된 HR 및 p-값에 의해 강조되는 바와 같이 전이와 유의한 상관관계를 가졌다(도 1). 종양을 c-MAF 발현의 3개 군들에 따라 분류하였다: 높음(> +1 평균의 표준 편차), 중간(< +1 평균의 표준 편차 및 > -1 평균의 표준 편차) 및 낮음(< -1 평균의 표준 편차).
- [0379] 실시예 3
- [0380] c-MAF 발현은 골 전이의 위험과 관련되어 있다.
- [0381] 면역조직화학 분석
- [0382] 다코 링크(Dako Link) 플랫폼에서 양으로 하전된 유리 슬라이드 상에서 c-MAF 면역염색을 수행하였다. 파라핀 제거 후, 항원 복구를 수행하였다. 내생성 퍼록시다제를 켜하였다. 항-MAF 항체를 사용한 후, 퍼록시다제와

커플링된 이차 항체와 함께 항온처리하였다. c-MAF 면역염색을 컴퓨터 이용 측정으로 점수화하였다.

[0383] 폐암에서 전이 및 골 전이에 대한 c-MAF의 예후 및 예측 값

[0384] 폐암의 전이에 대한 c-MAF 발현의 예후 및 예측 값을 평가하였다. c-MAF 단백질 수준을 면역조직화학(IHC)으로 측정하였다. MAF 면역염색을 컴퓨터 이용 측정으로 점수화하였다. 각각의 표본으로부터 수득된 9개의 대표적인 이미지를, 누안스(Nuance) FX 멀티스펙트럼 이미지화 시스템(씨알아이 인코포레이티드(CRI Inc.))을 갖춘 DM2000 레이카(Leica) 현미경을 이용하여 420 내지 700 nm에서 10 nm 파장 간격으로 획득하였다. 이미지의 스펙트럼 데이터세트를 획득하기 전, 광원 강도, 필터 투과 효율 및 카메라 감도에서의 편차를 보상하기 위해 각각의 파장에서 장치 벽을 대략 90% 충전시키는 데에 필요한 노출 시간을 측정하기 위해 슬라이드의 블랭크 영역을 이미지화하면서 자동노출 루틴(routine)을 수행하였다. 누안스 1.6.4 소프트웨어를 사용하여 순수한 DAB 및 헤마톡실린 염료 색채의 라이브러리를 생성하여 색채를 분리하는 데에 사용하였다. 그 다음, 기준물의 입방체(상이한 파장에서 촬영된 이미지의 적층체)를 각각의 새로운 사례에 대해 획득한 후, 동일한 노출 시간을 이용하여 3개의 대표적인 조직 시야의 스펙트럼 이미지화를 수행하였다. 이미지의 데콘볼루션(deconvolution) 후, 조영에 있어서의 불균등을 보상하기 위해 스펙트럼 데이터를 평면 시야 보정하고, 배경을 여과하였다. 비어(Beer) 규칙 변환을 이용하여 기준물 입방체로 나누어진 샘플의 비의 음성 로그를 취하여 양성 신호를 투과율로부터 광학 밀도 유닛으로 전환하였다. 모든 양성 신호들을 강조하는 의사-색채(pseudo-color) 이미지를 생성하는 컴퓨터-보조된 역치를 설정하였다. 분석은 관심있는 영역의 평균 강도로부터 c-MAF의 정량적 데이터를 제공하였다. 상이한 크기의 역치를 설정하여 상피 세포(정상 및 악성)의 핵뿐만 아니라 간질 세포 또는 림프구의 핵도 자동적으로 검출하고 병리학자에 의해 확인받았다. 통계적 분석을 위해 관심있는 모든 영역들의 신호 강도의 평균 값에 대해 각각의 사례를 계산하였다. 컴퓨터 이용 측정의 출력은 c-MAF 발현에 대한 1160 내지 99760 광학 밀도 유닛(O.D.)의 연속 데이터를 생성하였다. 높은 발현에 대한 컷오프(20000 O.D.)를 표준 절차에 따라 수신 조작 곡선을 기초로 결정하였다(AUC 0.802). 결과는 표 3에 요약되어 있다.

표 3

골 전이

		무	유
	<=20,000 OD	61	2
[0385] c-MAF	>20,000 OD	4	7

[0386] 이 값에 기초할 때, 낮은 발현 군에 비해 c-MAF 높은 발현 군에서 골 전이를 앓을 위험의 승산 비(odds ratio)는 OR(임의의 시간에서 골 전이) = 53.37(95% C.I. 8.24-345.92)이었다.

[0387] 다음으로, 연구의 전체 집단의 골 진행까지의 시간을 확인한 후(도 2a), 임의의 시간에서 상기 2개의 군들의 골 전이 부재 생존의 확률을 평가하였다(도 2b). 흥미롭게도, 연구의 코호트에서 c-MAF를 고수준으로 발현하는 종양은 저수준으로 발현하는 종양보다 더 작은 전체 생존율을 갖는다.

[0388] 분석된 제2 코호트를 기초로 진단 임상 특징을 추출하였다. c-MAF 고수준 발현은 0.778의 민감성, 0.938의 특이성, 63.6%의 양성 예측 값 및 96.8%의 음성 예측 값으로 골 전이를 예측한다.

[0389] 폐 종양에서 c-MAF 유전자 또는 단백질 발현은 임의의 시간에서 전이 및 골 전이와 유의한 상관관계를 갖는다.

[0390] 실시예 4

[0391] (c-MAF 유전자를 포함하는) 16q22-q24 염색체 증폭은 폐암에서 전이, 특히 골 전이를 예측하고 이러한 전이의 위험의 예후 표시자이다.

[0392] 다음으로, 본 발명자들은 c-MAF 유전자 좌위를 포함하는 chr16q22-q24에서의 획득이 폐암 환자에서 골 전이의 위험과 관련되어 있는지를 확인하였다. 이를 위해, chr16q22-q24 증폭을 확인하는 16q23-14q32 이중 형광 제자리 혼성화(FISH) 프로브를 사용하여 16q22-24 영역의 카피 수를 측정하였다. 또한, 14q32 프로브를 사용하여 종양 배수성을 표준화하였다.

[0393] 폐암에서의 골 전이와 관련된 16q22-24 CNA 획득의 예후 및 예측 값을 평가하였다. 16q23 및 14q32 카피를 FISH



로 측정하였다. 슬라이드를 16q23 MAF 및 14q32IGH 프로브 혼합물과 함께 항온처리하였다. 이 스펙트럼오렌지 프로브는 MAF 유전자 영역을 플랭킹하고, 대략 2.2 Mb의 겹을 갖는, 각각 대략 350 kb의 2개 절편들로 구성된다. 센트로미어 절편은 chr16:75729985-76079705에 위치하고(2006년 3월 어셈블리, UCSC 게놈 브라우저), 텔로미어 절편은 chr16:78290003-78635873에 위치한다(2006년 3월 어셈블리, UCSC 게놈 브라우저). 이 프로브는 (센트로미어부터 텔로미어까지 순서대로) 5개의 유전자 VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA 및 MAF를 플랭킹한다. 동시에, CEP16(센트로미어 16번 염색체) 프로브(애보트(Abbot))를 사용하여 상기 CNA를 확인하였다. CEP16(16q11.2)(애보트) 프로브를 사용하여 16q23 CNA를 점수화하였다. DAPI 반대염색을 적용하고 형광 현미경으로 이미지를 획득하였다.

[0394] 결과는 표 4 및 5에 요약되어 있다.

#### 표 4

중량은 16q23의 2.5 카피 이상의 컷오프에 기초할 때 16q22-24 획득에 대한 양성을 나타낼 것이다.

		골 전이	
		무	유
16q23	>2.5	13	9
FISH	<=2.5	44	0

[0395]

#### 표 5

중량은 14q23의 카피 수에 의해 표준화된 16q23의 1.5 카피 이상의 컷오프에 기초할 때 16q22-24 CNA 획득에 대한 양성을 나타낼 것이다.

		골 전이	
		무	유
16q23	>1.5	4	9
CNA	<=1.5	53	0

[0396]

[0397] 이들 값들을 기초로, 음성 군에 비해 16q22-24 획득 또는 CNA 획득 양성 군에서 골 전이를 앓을 위험의 승산 비를 계산하였다. 측정에 대한 음성을 기록하는 골 전이를 갖는 환자가 없었기 때문에 추정 시 오류를 피하기 위해, 표준 통계적 절차(Glas, A.S. et al., 2003, Journal of Clinical Epidemiology 56, 1129-1135)에 따라 0.5 유닛을 각각의 값에 더하고 파라미터를 다시 계산하였다. 이 추정에 기초할 때, 16q22-24 획득 양성 환자가 골 전이를 앓을 OR은 62.63(95%CI 3.42-1147.78)이었고, 대조군에 비해 14q32 양성 환자를 이용함으로써 표준화된 16q22-24 CNA 획득에 대한 OR은 225.89(95%CI 11.22-4546.99)이었다. 코호트의 작은 크기는 추정을 부정확하게 만들었지만, 각각의 경우 적어도 3.42 및 11.22의 임상적으로 적절한 OR 내에서 추정할 수 있게 하였다.

[0398] 16q23 획득을 측정하기 위해 FISH를 사용한 데이터를 기초로 진단 임상 특징을 추출하였다. 16q22-24 획득(세포당 >=2.5 카피)은 1.00의 민감성, 0.772의 특이성, 40.9%의 양성 예측 값 및 100.0%의 음성 예측 값으로 골 전이의 높은 위험에 있는 폐암 환자를 예측한다.

표 6

진단 임상 특징

		C.I. 95%
민감성	100.0%	70.1% - 100.0%
특이성	77.2%	64.8% - 86.2%
PPV	40.9%	23.3% - 61.3%
NPV	100.0%	92.0% - 100.0%

[0399]

[0400] 14q32 카피로 표준화된 16q23 획득을 측정하기 위해 FISH를 사용한 데이터를 기초로 진단 임상 특징을 추출하였다. 16q22-24 CNA 획득(14q32로 표준화된, 세포 당  $\geq 1.5$  16q23 카피)은 1.00의 민감성, 0.930의 특이성, 69.2%의 양성 예측 값 및 100.0%의 음성 예측 값으로 골 전이의 폐암 위험을 예측한다.

표 7

진단 임상 특징

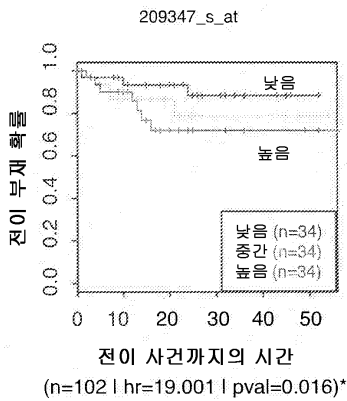
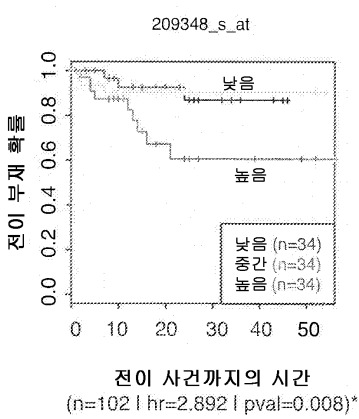
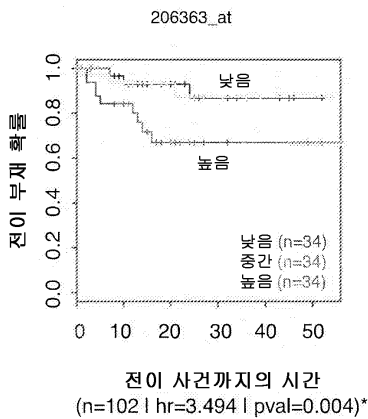
		CI 95%
민감성	100.0%	70.1% - 100.0%
특이성	93.0%	83.3% - 97.2%
PPV	69.2%	42.4% - 87.3%
NPV	100.0%	93.2% - 100.0%

[0401]

[0402] 폐 종양에서 16q22-24, 특히 16q23 증폭/획득 또는 CNA 획득은 임의의 시간에서 골 전이의 위험을 강력하게 예측하고 임의의 시간에서 골 전이의 위험과 관련되어 있다.

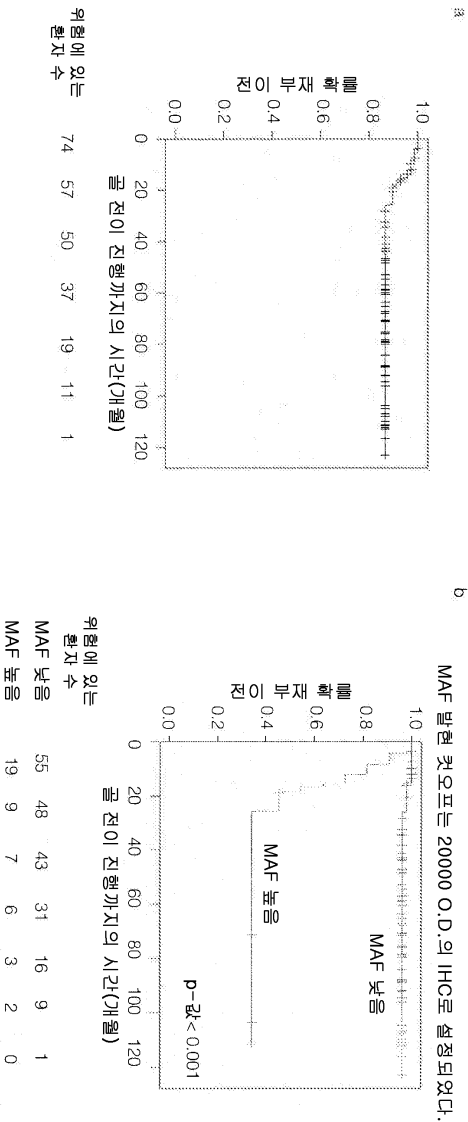
도면

도면1



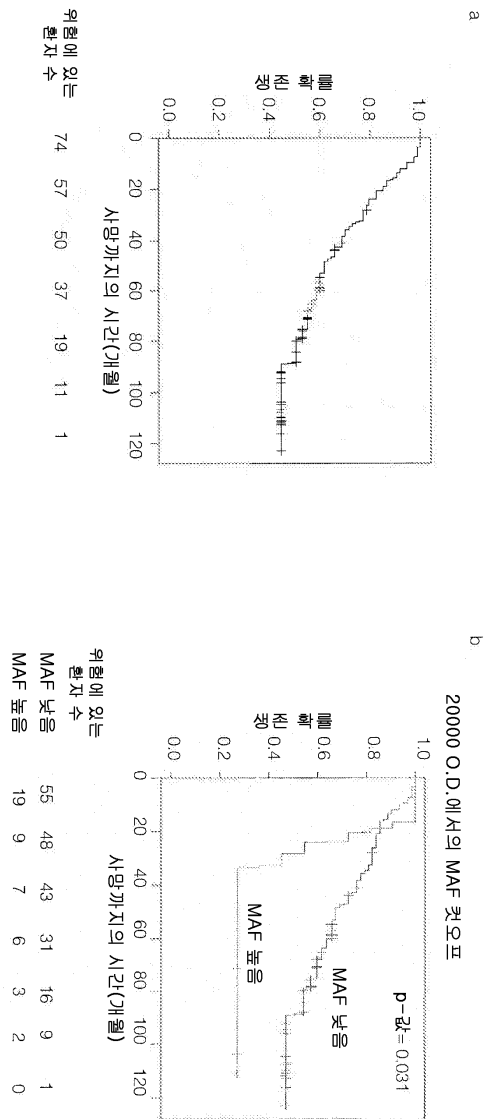
c-MAF 프로브 206363\_at  
209348\_s\_at  
209347\_s\_at

도면2





도면3



서열목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Fundacio Privada Institut de Recerca Biomedica  
Fundacio Privada Institutio Catalana de Recerca I Estudis Avancats  
Gomis, Roger  
Planet, Evarist
- <120> METHOD FOR THE DIAGNOSIS, PROGNOSIS AND TREATMENT OF LUNG CANCER METASTASIS
- <130> 3190.002PC01/TJS/E-H
- <140> To Be Assigned
- <141> Herewith
- <150> 61/656,372

<151> 2012-06-06

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6878

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400

> 1

```

agaggcttta aaatcttttt tcattcttcta gctgtagctc gggctgcttg tcggcttggc      60
ctccccctcc ccccttttgc tcttgccctcg tctttcccca ggacttcgct attttgcttt      120
tttaaaaaaa ggcaagaaag aactaaactc cccccctcct ctctccagc cgggctgcac      180
ctctgccttg cactttgcac agaggtagag agcgcgcgag ggagagagag gaaagaaaaa      240
aaataataaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactcccccg      300
tgccaaggcc cgcgcgcccc ggacagacgc ccgccgcgcc tccagccccg agcggacgcc      360
gcgcgcgccc tgctgcagc ccgggccggc gaggcgagcc cttccttatg caaagcgcgc      420

agcggagcgg cgagcggggg acgccgcgca ccgggccggg ctctccagc ttgccgcgcg      480
cagccaccac cgccgccacc gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgccggc      540
tcggcgcgca aggaggcgag cgagcaagga ggggccgggg cgagcgaggg agcacattgg      600
cgtgagcagg ggggagggag ggcgggcgcg gggggcgcgg gcagggcggg ggggtgtgtg      660
tgtgagcgcg ctcgagagtt tcgggccagc caccgcgcg caagctagaa gcgccccagc      720
ccggcaagct ggctcaccgc ctggccacc agcacagccc gctggcccct ctctgcagc      780
ccatctggcg gagcggcggc ggcggcggcg gcggcggcag gagaatggca tcagaactgg      840

caatgagcaa ctccgacctg cccaccagtc ccctggccat ggaatatgtt aatgacttcg      900
atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cgttgagagc cgaccgcac atcagccagt      960
gcggccgtct catcgccggg ggctcgctgt cctccacccc catgagcacg ccgtgcagct     1020
cgggtgcccc ttccccagc ttctcggcgc ccagccggg ctcgggcagc gagcagaagg     1080
cgcacctgga agactaetac tggatgaccg gctaccgcga gcagctgaac cccgaggcgc     1140
tgggcttcag ccccaggagc gcggtcgagg cgctcatcag caacagccac cagctccagg     1200
gcggcttcga tggtacgcg gcgggggcgc agcagctggc cgcggcggcc ggggccgggtg     1260

ccggcgccctc ctggggcggc agcggcgagg agatgggccc cgccgccgcc gtggtgtccg     1320
ccgtgatcgc cgcggccgcc gcgcagagcg gcgcgggccc gcactaccac caccaccacc     1380

```

accacgccgc cggccaccac caccacccga cggccggcgc gcccgggccc gcgggcagcg	1440
cggccgcctc ggccggtggc gctgggggcg cgggcggcgg tggcccgcc agcgtgggg	1500
gcggcgggcg cggcgggcgc ggcgaggcg gcgggggccc ggcgggggcg gggggcgccc	1560
tgcacccgca ccacgccgc ggcgccctgc acttcgacga ccgcttctcc gacgagcagc	1620
tggtagccat gtctgtgcgc gagctgaacc ggcagctgcg cggggtcagc aaggaggagg	1680
tgatccggct gaagcagaag aggcgggacc tgaaaaaccg cggtatgcc cagtctgcc	1740
gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgctgcagc	1800
aagtcgacca cctcaagcag gagatctcca ggctggtgcg cgagagggac gcgtacaagg	1860
agaaatcga gaagtgggtg agcagcggtc tccgagaaaa cggtcgcagc agcgacaacc	1920
cgtcctctcc cgagttttcc atgtgagctc gacacgcgat tccagctagc caccctgata	1980
agtgtccgc gggggtccgc ctcggtgtg ggcttcttag ttctagagcc atgtcgcca	2040
ccacctcacc acccccacc ccaccgagtt tggccccctt ggccccctac acacacaaa	2100
acccgcagc acacaccaca cacacacaca cacacccac accctgctcg	2160
agtttgggt ggtggtggct gttttaaaact ggggaggga tgggtgtctg gctcatggat	2220
tgccaatctg aaattctcca taacttgcta gcttgtttt tttttttt tacaccccc	2280
cgcaccacc cggacttg acaatgtca atgatctcag cagagtctt catgtgaaac	2340
gttgatcacc tttaagcct gcatcattca catattttt cttctcttc cccttcagtt	2400
catgaactgg tgttcattt ctgtgtgtgt gtgtgtttt tttgtttgg atttttttt	2460
ttaattttac ttttagagct tgtgtgttg ccacctttt ttccaacct caccctcact	2520
ctttctaac ccatctctc cgagatgaaa gaaaaaaaa agcaaagttt tttttcttc	2580
tcctgagttc tcatgtgag attgagcttg caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag	2640
acttgacg gcgcgagttc catcggttt ttttttagc attgttatgc taaaatagag	2700
aaaaaaaa ccatgaacct tccacaatca agcctgcac aaccttctgg gtgtgacttg	2760
tgagttttg cttgtgatg ccaaatctga gagtttagtc tgccattaaa aaaactcatt	2820
ctcatctcat gcattattat gcttgctact ttgtcttagc aacaatgaac tataactgtt	2880
tcaaagactt tatggaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcatgctgga	2940
catgtatggt ataattattt ttctctttt ttctctttt ggcttgaaa tggacgttcg	3000
aagacttata gcatggcatt catacttttg tttattgcc tcatgacttt tttgagtta	3060
gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa tttgcatct gtcctaaac	3120
tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgcactg aaggcattcc ttgtcaaaga	3180
taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgtttcttt	3240

ttaataagaa tgacgcccc ctttggggac taaaattgtg ctattgccga gaagcagtct	3300
aaaatttatt ttttaaaaag agaaactgcc ccattatfff tggittgttt tatfffftatt	3360
ttataffff tggctffffg tcatgtgcaa atgtggaatg ctctgggttt ctagtatata	3420
atttaattct agfffftata atctgttagc ccagttaaaa tgtatgctac agataaagga	3480
atgttataga taaatttgaa agagtttagt ctgttttagc gtagatffff taaacgattg	3540
atgcactaaa ttgtttacta ttgtgatgtt aaggggggta gagtttgcaa ggggactgtt	3600
taaaaaagt agcttataca gcatgtgctt gcaacttaaa tataagttgg gtatgtgtag	3660
tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagaggggaa acgcccctgt	3720
ttatactgt aggggtatff tacattcaaa aatgtatgtt ttttttctt ttcaaaatta	3780
aagtatfftg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa	3840
ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca	3900
cagttttaag atgatgcaga tttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattttct	3960
gtaacttaaa aaaaaatcca cagttttaaa ggcaataatc agtaaatgtt attttcaggg	4020
actgacatcc tgtctttaaa aagaaatgaa aagtaaatct taccacaata aatataaaaa	4080
aatcttgtca gttacttttc ttttacatat ttgtctgtgc aaaattgttt tatatcttga	4140
gttactaact aaccacgctt gttgttcta tgtgttttc tttcattttc aattctggtt	4200
atatcaagaa aagaataatc tacaataata aacggcatff ttttttgatt ctgtactcag	4260
tttcttagtg tacagtttaa ctgggcccc caacctcgtt aaaagtgtaa aatgcatcct	4320
tttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taattcaggg tgaaattata	4380
ggctgtffff tgaagtgagg aggcctggccc catatactga ttagcaatat ttaatataga	4440
tgtaaattat gacctcatff ttttctcccc aaagttttca gttttcaaat gagttgagcc	4500
ataattgccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggttc ctgagcatgg	4560
ccctacactt ctgatcagga gcaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc	4620
gcatcagagg tggtttgcgc acatatgcat tgaacggtaa agagaaacag cgcttgcttt	4680
ttcactaaag ttgactatff ttctttcttc tcttacacac cgagatfftc ttgttagcaa	4740
ggcctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagtt gtttgtttg ttttgctttt	4800
ctctttaaca ctgaagatca ttgtctttaa ataggaaaa gaaaatccac tccttacttc	4860
catatttcca agtacaatc tggtttaaac tatgttatca aatcatatff caccgtgaat	4920
attcagtgga gaacttctct acctggatga gctagtaatg atttcagatc atgctatccc	4980



cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaatatag gctgtgcttt gatttactgg 5040

tatttaccce aaaataggct gtgtatgggg gctgacttaa agatcccttg gaaagactca 5100

aaactacctt cactagtagg actcctaagc gctgacctat ttttaaatga cacaattca 5160

tgaaactaat gtiacaaatt catgcagttt gcactcttag tcatcttccc ctagcacacc 5220

aatagaatgt tagacaaagc cagcactgtt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt 5280

gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340

cttattttta agaaaacagg ttgtgtttgg tgctgctaag ttctggccag tttatcatct 5400

ggccttctg cctatttttt acaaaacacg aagacagtgt gtaacctcga cattttgacc 5460

ttcctttatg tgctagttaa gacaggctcc tgaatccaca cttaattttg cttacaaaa 5520

gtcttaatat taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt 5580

tctttccttt tttttttttt ttctcatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag 5640

cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaaa agcatctgat gaaagatttt aggcaaacat 5700

tctcaaaata agagtgatat tctggatgta gttattgcag ttatctcatg acaaatgagg 5760

cctggattgg aaggaaaata tagttgtgta gaattaagca ttttgatagg aatctacaag 5820

glagttgaat ataataagca ggtttgggcc cccaaacttt agaaaatcaa atgcaaaggt 5880

gctggcaaaa atgaggtttg agtggtggc tgtaagagaa ggttaactcc tagtaaaagg 5940

cattttttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caaacaata 6000

catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aaatcctgag taagtgccat tcattacaat 6060

aagtctctaa atttaaaaaa aaaaaaatca tatgaggaaa tctagctttc ccttttacgc 6120

tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcctttc attccaatta cagaactgag 6180

cccactcgca agttggagcc atcagtggga tacgccacat tttggaagcc ccagcatcgt 6240

gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaatc 6300

atcattatta ttattatttg cagtcatgga gaaccaccta cccctgactt ctgtttagtc 6360

tcctttttta ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct attaatgta gtagttaact 6420

atgcctcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa gcgcactcct gcttttcgat 6480

ttatggtgtg tgcaagtaaa cagggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaaa 6540

ttcactgaaa ttacaaagat acatatatat gcatatatat aatggaaagt ttcccggaat 6600

gcaacaatta gcattttaaa atcatatata ggcatgcaca ttctaaatag tactttttca 6660

tgcttcattg tttctctggc agataatttt actaagaaga aaaatagata ttcgactccc 6720

cttccctaaa caaatccacg ggcagaggct ccagcggagc cgagccccct ggttttctcg	6780
taggccttag acggtgttgc atttatcagt gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata	6840
gtgtgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaaat acaaagt	6878
<210> 2	
<211> 2656	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc	60
tccccctccc ccttttgcct tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt	120
ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcttccagtc gggctgcacc	180
cttgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa	240
aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt	300
gccaaggccc gcgccgccc gacagacgcc cgcgcgcct ccagccccga gcggacgccg	360
cgcgcgccct gcctgcagcc cgggcccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca	420
gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggcccggc tcttccagct tcgccccgc	480
agccaccacc gccgccaccg cagctcgcg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct	540
cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggcccgggc gagcgaggga gcacattggc	600
gtgagcaggg gggaggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt	660
gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc	720
cggcaagctg gtcacccgc tggccacca gcacagccc ctggcccctc tctgcagcc	780
catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cgccggcagg agaattggcat cagaactggc	840
aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttga	900
tctgatgaag tttagagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgatca tcagccagt	960
cggccgtctc atcgccgggg gctcgtgtc ctccacccc atgagcacgc cgtgcagctc	1020
ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc	1080
gcacctgga gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgaggcgt	1140
gggttcagc cccgaggacg cggctcaggg gctcatcagc aacagccacc agctccagg	1200
cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc	1260
cggcgctcc ttgggcggga gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccc tgggtgtccgc	1320
cgtgatcgcc gcggccgccc gcagagcgg cgccggcccc cactaccacc accaccacca	1380

ccacgccgcc ggccaccacc accacccgac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc 1440

ggccgcctcg gccggtggcg ctggggggcg ggccggcggt ggcccggcca gcgctggggg 1500

cggcgggggc ggccggcgcg gcggaggcgg cggggggcg cgggggcggg ggggcgccct 1560

gcaccgcac cagccgccg gcggcctgca ctccgacgac cgcttctccg acgagcagct 1620

ggtgaccatg tctgtgcgag agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680

gatccggctg aagcagaaga ggccggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgcgc 1740

cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800

agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860

gaaatcagag aagttggtga gcagcggcct ccgagaaaac ggctcagca gcgacaaccc 1920

gtcctctccc gagtttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata 1980

cgccacattt tggaagcccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcacaa aatgaaattt 2040

gtgtgagagc tgiacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcattggaga 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 tggaagttt cccggaatgc aacaattagc attttaaat catatatagg 2400

catgcacatt ctaaatacta ctttttcatt cttcattgtt tctctggcag ataattttac 2460

taagaagaaa aatagatatt cgactccctt tcctaaaca 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 ccttttgctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt 120

ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tctccagtc gggctgcacc 180

tctgccttgc actttgcaca gaggttagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240

aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt 300  
gccaaggccc gcgccgccc gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg 360  
  
cgcgcgccct gcctgcagcc cgggcccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca 420  
gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggcccggc tcctccagct tcgccccgc 480  
agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct 540  
cgcgcgcaaa ggaggcagc gagcaaggag gggcccgggc gagcgaggga gcacattggc 600  
gtgagcaggg gggaggagg gcggcgcgcg gggcgcggg caggcgggg ggggtgtgtgt 660  
gtgagcgcg tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cccccagcc 720  
cggaagctg gtcacccgc tggccacca gcacagccc ctggccctc tcctgcagcc 780  
  
catctggcgg agcggcggcg gcggcgcgcg cgccgcagc agaatggcat cagaactggc 840  
aatgagcaac tcgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttga 900  
tctgatgaag ttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagt 960  
cgccgtctc atcgccgggg gctcgtgtc ctccacccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020  
ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080  
gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgaggcgt 1140  
gggttccagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg 1200  
  
cggttccgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc 1260  
cgcgccctcc ttggggcgca gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccg tgggtgtccgc 1320  
cgtgatcgcc gcggccgccg cgagagcgg cgccggccc cactaccacc accaccacca 1380  
ccacgccgc gccaccacc accaccgac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc 1440  
ggccgcctcg gccggtggcg ctggggggcg gggcgcggt ggccggcca gcctggggg 1500  
cgcgcgcggc gccggcgcg gcggaggcgg cggggcgcg gcggggcgcg gggcgccct 1560  
gcaccgcac cagccgccg gcggcctgca ctccgacgc cgcttctccg acgagcagct 1620  
  
ggtgaccatg tctgtcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680  
gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgcc agtcctgccg 1740  
cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca 1800  
agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860  
gaaatcacgag aagtgtgtga gcagcggtt ccagaaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920  
gtctctccc gagtttttca tgtgagctg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa 1980



gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctcgccac	2040
cacctcacca cccccacccc caccgagttt ggcccccttg gccccctaca cacacacaaa	2100
cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acaccccaca cctgtctga	2160
gtttgtgggtg gtgggtggctg ttttaaacig gggaggggaat ggggtgtctgg ctcatggatt	2220
gccaatctga aattctccat aacttgctag ctgtgttttt tttttttttt acaccccccc	2280
gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagtcttc atgtgaaacg	2340
ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc ttcttcttc cttcagttc	2400
atgaactggt gttcattttc tgttgtgtgtg tgtgttttat tttgtttgga tttttttttt	2460
taattttact ttiagagctt gctgtgttgc ccaccttttt tccaacctcc accctcactc	2520
cttctcaacc catctcttc gagatgaaag aaaaaaaaaa gcaaagtttt ttttcttct	2580
cctgagtctt tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aaaatgtgaa atgttataga	2640
cttgacgctg gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga	2700
aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca accttctggg tgtgacttgt	2760
gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct gccattaaaa aaactcattc	2820
tcatctcatg cattattatg cttgtactt tgtcttagca acaatgaact ataactgttt	2880
caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa aaaaagcctg catgctggac	2940
atgtatggta taattatttt ttcccttttt ttcccttttg gcttggaat ggacgttcga	3000
agacttatag catggcattc atacttttgt ttattgcct catgactttt ttgagtttag	3060
aacaaaacag tgcaaccgta gagcttctt cccatgaaat ttgcatctg ctccaaaact	3120
gctttgagtt acicagaact tcaacctccc aatgactga aggcatcct tgtcaaagat	3180
accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt	3240
taataagaat gacgccccac ttgggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagtcta	3300
aaattttatt tttaaaaaga gaaactgccc cattattttt ggtttgtttt atttttattt	3360
tatatttttt ggcttttggc cattgtcaaa tgtggaatgc tctgggttct tagtatataa	3420
tttaattcta gttttataa tctgttagcc cagttaaaat gtatgctaca gataaaggaa	3480
tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgtttagctg tagatttttt aaacgattga	3540
tgcactaaat tgtttactat tgtgatgtta aggggggtag agtttgcaag gggactgttt	3600
aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat ataagttggg tatgtgtagt	3660
ctttgtcata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta agaggggaaa cgccccgttt	3720

tatatctgta ggggtatfff acattcaaaa atgtatgttt ffffftcttt tcaaaattaa	3780
agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag catataatac aaaaaaaaaat	3840
tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta taaaaatggc attactgcac	3900
agttttaaga tgatgcagat ffffftacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg	3960
taacttaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca gtaaatgtta ttttcaggga	4020
ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt accacaataa atataaaaaa	4080
atcttgtcag ttacttttct tttacataatt ttgctgtgca aaattgtttt atatcttgag	4140
ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct ttcattttca attctggtta	4200
tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatfff tttttgattc tgtactcagt	4260
ttcttagtgt acagtttaac tgggccaac aacctcgta aaagtgtaaa atgcatcctt	4320
ttctccagt gaaggattcc tggaggaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag	4380
gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat	4440
glaaattatg acctcatfff tttctccca aagttttcag ttttcaaag agttgagcca	4500
taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa ctaggcttcc tgagcatggc	4560
cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga ggagccggac aaatatggcg	4620
catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa gagaacacgc gcttgccttt	4680
tcactaaagt tgactatfff tccttcttct cttacacacc gagatfffct tgttagcaag	4740
gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgt tttgttttgt tttgcttttc	4800
tccttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag aaaatccact cttacttcc	4860
atatttcaa gtacatatct ggtttaaaact atgttatcaa atcatatttc accgtgaata	4920
ttcagtgag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga tttcagatca tgctatcccc	4980
agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg ctgtgctttg atttactggt	5040
atttacccta aaataggctg tgtatggggg ctgacttaaa gatcccttgg aaagactcaa	5100
aactaccttc actagtagga ctcttaagcg 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 tgtgttttgt gctgctaagt tctggccagt ttatcatctg	5400
gccttcctgc ctatftttta caaaacacga agacagtgtg taacctcgac attttgacct	5460
tcctttatgt gctagtttag acaggctcct gaatccacac ttaattttgc ttaacaaaag	5520
tcctaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt gttcttgact tcagatattt	5580

ctttcctttt tttttttttt 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 aaacaatac 6000  
 atgttttttt tttcttaca agaactccta aatcctgagt aagtgccatt cattacaata 6060  
 agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctagctttcc cttttacgct 6120  
 gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgtaaaa 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  
 cctttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaatgtag tagttaacta 6420  
 tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag cgcactcctg cttttcgatt 6480  
 tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540  
 tcaactgaaat tacaaagata catatatatg catatatata atggaaagt tcccggaatg 6600  
 caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat tctaaatagt actttttcat 6660

gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720  
 ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780  
 aggccctaga cgggtgttga tttatcagt 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

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 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 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
<210> 13	
<211> 13878	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 13	
aactatatat taaacacctc cggtctgaga ggccgtgttg ggtgtctttg tcaggagaag	60
aaagagaaga aggcctggtag accttcccag gaattctcac tgaagaaaac atctggattt	120
tttacatctc ttgtgcaaaa caaacaaga tttcattaag tgatgtatat tgttttccaa	180
ggaagaaacc tgcagagaca aaaacaaata agcaaataat tgaacaaaa atatgataaa	240
cccccaaatt cttccagtgc taatttactt gttatcatgg ttctctacaa aggcagagat	300

cactaattac aggtttttcc agaattcaca ttccacgtca agatcatcca atccaaacag 360  
 tgtacggaaa gcctagggcc ttcttcactt tgccccctac cccaccctac acacacgccc 420  
 ccatctaaat gatacccttg gaaagaaacc tacacatctc atttgtctat attttgcttc 480  
 ctccctcgcc tcccggtaac caaatgtgag ttgtttctta actgcactgg agaatacagaa 540  
 tttattgtac atatgtttgt gtccactta ataaaaaac ctatatatta agataaactt 600  
 tgtagtaat tcatgagga agtgactatt tatgctaac aggcagaaat atattctcaa 660  
  
 gcataatgca ttacataaat ttgaatgtaa aatgttcaat tatgaagtaa atacaggtaa 720  
 tgcaataat aaattacctc taataaaaat tataaaagat gtgccttgaa agagagagcg 780  
 gctttaactt acaactgtga attgcttaaa gagaaaagaa ttaataaatg ctgaattact 840  
 ctgatgatta tttagcacat aattcaccta ttcataacga ctccctagtaa tcagactgtt 900  
 gtttcacatc ctccaacatg aggcaagact gtttctcag caattttgcc cttatcagat 960  
 tatctcgctt gattctatta attttcttcc atgaatctgc taacagtgat ttgtgattta 1020  
 cttaccctgc taactgaaga ctgttaaaag gatttatcta acactggacc taagaacagt 1080  
  
 gtacgcctta tegtacagtt actctgaaga actctttctc aaatcaattt agttggtttc 1140  
 atagtgaat ttagtggaac ctggtagtt ctgcccata aaatcagccc ctaaacaag 1200  
 agtcagaca ccatacctga tgcacccat tctattcaga ttatggatgt ctgattccaa 1260  
 catgatatat ttgagttgct ataactcaca atcggggaaa atatatctt ttaagctttt 1320  
 aatctttgta atttgacat gaacaggggt tttgttttc attttgcag gaagtcatta 1380  
 tgtatgtact gacgtgaac tataattgtg tttctgatgt tactgtgtca caatattcta 1440  
 tgcgatgtaa cccatgtcct cctccccctc acaaatctcc tataaatatt cattgctttc 1500  
  
 aaaaacttta atactactgg tccgaattgg tcaataatga caaatgcatg gtttctaaat 1560  
 tactgtatat tgttctacag agattactag agtatatata gcaaggggat gtttaagcagt 1620  
 aagaaaacac agttcacatt gtatttggat tagattggct tggatagaag tgaaacaaac 1680  
 aatgttagca aagaagtcta aagacatgtg gccactgta attgtacaga atcaaaaacc 1740  
 tgaatagtac tcattaaaat gagagagctc aattgttata aaagaaatgc tgctaacaga 1800  
 gaactgtaaa tgtttagaca cccctgtgaa tcactaaata ataagttaa aaggataaaa 1860  
 atgagaatta agttataagc ctgagagcat tactgtctaca catctaaaaa aataattctg 1920  
  
 atcctctctt tttttttcc aagagaaaat gggcgactat aaaagacctt gcaataagag 1980  
 aaataaaaat accatgtctt cacagcagtg tacataaata aaccataaaa atgtgcagat 2040  
 aataatatat ttagctgccc aaacatgggc atttaatttc tagaaatgat atataacaat 2100  
 glaacaatta gatactcagc catgaatgtg tatggcacag tcttcatcat tagcaaactt 2160

tggtatataa atattattta ttatttattta taatactgct ttcagaggca atgatcatac	2220
cttacagctt ttaacacaaa tatgatgcaa aaggattaaa agtatatcat aaacaaacaa	2280
taaattcttt ctaaatacac ttaaattcat attttcatg aaaaatataa acttcctaca	2340
tttgtgacta ctgactttta aaaagaccia gaaaactatt gttacgggca atgttaaagt	2400
acataatgct tatgtaatgg aaagtgtgga ttttcctcta aataaactat aatcccttaa	2460
cttcattact agggaaaata ttgttaaaga gaaggaaagc aagggaattc tgctaggttg	2520
cataaatatt gacataatct tcactctttc tcccccaaac tggtaataga catagtttat	2580
tccacccaac aaaaatgctct tataagacca aaactaccct tattaacaac ttctctgcag	2640
tcacgatgaa aagaaacact acttgtctga aaaataccga cagcgctgcc cttttcagat	2700
taggggtgtgc ctacgaatct ttgggaagt cttccattaa ggattcctgg gtttgctgaa	2760
actgaagtct actaggatca gagaaattaa cacaggtcta atatggtgca aggaacgagt	2820
gagagacacc tgaggttata aatagcaaag catgctgcgg ggtggggaag accattctga	2880
agtgaatgt tcaagacgct ggcttaatat atgactaagt gtcagaagtc aggttttctg	2940
agaattactt tccagataaa caactttata gcaactgcact taatcttact tactagagac	3000
atctcattta tcaactgaatt acaagtaact ttaatcctat tgatattgcc ataaagcccc	3060
ttgaaaatcc atcctggcac ttttaaaggg ttggggccc tgttacatgg ggatcctctt	3120
gcaaaggctt cagccagaaa ttacaccccg aggggtgtctg tatccctgg cctctttgtc	3180
aacaatcaag gagaagagga ggggcaaaaa tgatctctgc atctgccagc actttcttcg	3240
gcccccttcc tatagggtcg ggttctccca cttcagtcac actaactttg tgtgtctctt	3300
tcctctctcc acactgggta accagctgct ttccacttca tcgacaaaac tggacacgga	3360
tcaatttcaa ctgaccttg ccgaaagggt gcgctgttga ggtaaaaacc aactcgtcc	3420
aacaatagtt tccactcttc gatccttttg caggcttttc agaatttttt tttttttta	3480
atgcaccctc ctacgctctc ccccttctca taaagtaaaa taaatagat taaaaacacc	3540
aatgcattt cattaatga aggaatcaac agtcccaact tctaagcaga cgggctggtc	3600
ttccaaaggc tgggtcgggt tcaggagctt tctctccaaa taaatctctg cttcttcgac	3660
ttgcctatcg ctttaaaatc ttagaaacag agttagtgt tggtttctt ctttttctt	3720
tttctttttt atttcttttt tgcataaact tttagagaat caatctagaa atttgaacta	3780
cttattagca ttigcaactg ggggtggggg gagcagcctc cccacccca ccccccactc	3840
tgcgtttccg gactagtctc agaaaccgcg gtttaaaatt taacccttcg agggtagctg	3900
gtgagggctg gggatttgtt tttcccccct gctccctgcc acgatcaagt ccgaaataat	3960



taaaggaaac gtaaaagtgc aaaggcgcg cctgaccctg ataacagag gtcagatttc	4020
gtaaggggac gggtagtgt gagtgttgt gtgttttgt gtgttgtgt aagagagaga	4080
gagagcgagc gcgcaatatg agtctcaaag gccaaactcc ggccagtcag gagccggaag	4140
gctgagcccc gctgacctga ctttgagctt ccccgagtt atctcgata ggcgctcgct	4200
ctgtccaagg gcacgcgacg ccagcgggca gccggtctcc gtgaagaatg gcctctaacc	4260
aacttatattt acctcgttgt aaagagaggg ataaaatggg ctttcctct ccacgatgc	4320
ccagccttct gggcaggcgc atggccgggc ggcgccagc ccgcagcccc gatccggaca	4380
ccccactgca tccctccctt cccggtccct tccccgcacg ggcgcccgag agacggacaa	4440
agagttagggg ccaagtttga gcgccgggca cggccaggct cagggaagga aggtccccgg	4500
cagacacctg ggtaccagag ttggtgcgag gaggaaaagc tgggaggcga attcacaatc	4560
ctgggggttg agggcaggca ggggagggga atcaggccaa tcccagccga gtgagcccc	4620
agcgagctgg ggctccgat gggaggcctg tctcgctc caaagaaaag caaacgccc	4680
tcccaggtec gcccgattg ccgaagcccc tctggaaaaa ctcttcccc tcttacacca	4740
aactttgcgc cgggcctcgt tccctcccg gtaggcagcg gcgcaggaag ggttaagcca	4800
gccccgccca gctgacagtc agctgattgg gcctgattg acagctccga aaagtttct	4860
tgtttctata ctattatgct aatcgggcc gctctcgcc cctccattg gcccgagtg	4920
ccagtcaatt tctcatttgg acctgacgtc acgagtgcta taaaactcag caattgcttt	4980
aaactcttct tgctggatca gagctttta aatcttttt catcttctag ctgtagctcg	5040
ggctgcttgt cggttggcc tccccctccc cctttgtc tctgcctcgt ctttccccag	5100
gacttcgcta ttttgccttt ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc	5160
tcctccagtc gggtgcacc tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg	5220
gagagagagg aaagaaaaa aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca	5280
tgaagtgtta actccccgt gccaaaggccc gcgccgccg gacagacgcc cgccgcgct	5340
ccagccccga gcggacgcg cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc	5400
ttccttatgc aaagcgcga gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc	5460
tcctccagct tcgccccgc agccaccacc gccgccaccg cagctcgcg aggatcttcc	5520
cgagcctgaa gccgccggt cgcgcgcaa ggaggcagc gagcaaggag gggccggggc	5580
gagcgaggga gcacattggc gtgagcaggg gggaggagg gcggcgcggg gggcgcggg	5640
caggcgggg gggtgttgt gtgagcgcgc tcggaggtt cgggccagcc accgccgcgc	5700

aagctagaag cgccccagcc cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagcccg 5760  
ctggccctc tctgcagcc catctggcg agcggcgcg gcggcgcg cggcgcagg 5820  
agaatggcat cagaactggc aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg 5880  
gaatatgtta atgacttcga tctgatgaag ttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc 5940  
gaccgcatca tcagccagtgc cggccgtctc atcgccgggg gctcgtctgc ctccacccc 6000  
atgagcacgc cgtgcagctc ggtgccccct tccccagct tctcgcgcc cagcccgggc 6060  
tcgggcagcg agcagaaggc gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag 6120  
  
cagctgaacc ccgaggcgtc gggcttcagc cccgaggacg cggtcgagcg gctcatcagc 6180  
aacagccacc agctccaggc cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc 6240  
gcggcgcccg gggccggtgc cggcgccctc ttggcgcgca gcggcgagga gatgggcccc 6300  
gccgcccgcg tgggtgtccg cgtgatcgcc gcggccgcgc cgcagagcgg cgcgggcccc 6360  
cactaccacc accaccacca ccacgccgc gccaccacc accaccgcg gccggcgcg 6420  
cccggcgccg cgggcagcgc ggccgcctcg gccggtggcg ctggggcgcg gggcgcggt 6480  
ggcccggcca gcgtggggg cggcggcggc ggcggcggcg gcggagggcg cggggcgcg 6540  
  
gcggggcgcg gggcgccct gcaccgcac cagcccgcg gcggcctgca cttcgacgac 6600  
cgcttctccg acgagcagct ggtgacctg tctgtgcgc agctgaaccg gcagctgcgc 6660  
ggggtcagca aggaggaggt gatccggctg aagcagaaga ggccggacct gaaaaaccgc 6720  
ggctatgcc agtcctgcc cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag 6780  
aagaaccagc tctgcagca agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc 6840  
gagagggcag cgtacaagga gaaatagag aagtgtgtga gcagcggctt ccgagaaaac 6900  
ggctcagca gcgacaacc gtctctccc gagttttca tgtgagtcg acacgcgatt 6960  
  
ccagctagcc accctgataa gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgcagc 7020  
tctagagcca tgctgccac caccaccca cccccccc caccagttt ggcccccttg 7080  
gccccctaca cacacacaaa ccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac 7140  
acacccaca cctgctcga gtttgtgtg gtggtggctg ttttaactg gggagggaat 7200  
gggtgtctgg ctcatggatt gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgttttt 7260  
ttttttttt acaccccc gccccccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc 7320  
agagtcttc atgtgaaacg ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atatttttc 7380  
  
ttcttcttc cttcagttc atgaactggi gttcatttc tgtgtgtgtg tgtgtttat 7440  
tttgtttgga tttttttt taattttact tttagagctt gctgtgttc ccacctttt 7500  
tccaacctcc accctcactc cttctcaacc catctcttc gagatgaaag aaaaaaaaaa 7560

gcaaagtttt tttttcttct cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa	7620
aaaatgtgaa atgttataga cttgcagcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca	7680
ttgttatgct aaaatagaga aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca	7740
accttctggg tggacttgt gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct	7800
gccattaaaa aaactcattc tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca	7860
acaatgaact ataactgttt caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa	7920
aaaaagcctg catgctggac atgtatggta taattatfff ttcctttttt tttccttttg	7980
gcttggaat ggacgttcga agacttatag catggcattc atacttttgt tttattgcct	8040
catgactttt ttgagtttag aacaaaacag tgcaaccgta gagccttctt cccatgaaat	8100
tttgcactg ctccaaaact gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga	8160
aggcattcct tgtcaaagat accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag	8220
aactcttaat gttttctttt taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc	8280
tattgccgag aagcagtcta aaatttatff tttaaaaaga gaaactgccc cattatffff	8340
ggttttgttt atttttatff tatatfffft ggcttttggg cattgtcaaa tgtggaatgc	8400
tctgggtttc tagtatataa ttttaattcia gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat	8460
gtatgctaca gataaaggaa tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgtttagctg	8520
tagatfffft aaacgattga tgcactaaat tgtttactat tgtgatgtta aggggggtag	8580
agtttgcaag gggactgttt aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat	8640
ataagtggg tatgttagt ctttgcata cactgactg tattgaaaac caagtatta	8700
agaggggaaa cgccctgtt tataatctga ggggtatfff acattcaaaa atgtatgttt	8760
ttttttcttt tcaaaattaa agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag	8820
catataatac aaaaaaaaaa tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta	8880
taaaaatggc attactgcac agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg	8940
gtgcagaact ggattttctg taacttaaaa aaaaatccac agttttaag gcaataatca	9000
gtaaatgtta ttttcaggga ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt	9060
accacaataa atataaaaaa atcttgtcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca	9120
aaattgtttt atatcttgag ttactaacta accacgcgtg ttgttctat gtgcttttct	9180
ttcattttca attctggta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt	9240
tttttgattc tgtactcagt ttcttagtgt acagttaac tgggccaac aacctcgta	9300
aaagtgtaaa atgcatcctt ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt	9360
aattcagggt gaaattatag gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat	9420

tagcaatatt taatatagat gtaaattatg acctcathtt tttctccca aagttttcag	9480
ttttcaaatg agttgagcca taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa	9540
ctaggettcc tgagcatggc cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga	9600
ggagccggac aaatatggcg catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa	9660
gagaaacagc gcttgccttt tcaactaaagt tgactathtt tctttcttct cttacacacc	9720
gagatthttt tgtagcaag gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgt	9780
tttgthttgt tttgcttttc tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag	9840
aaaatccact ctttacttcc atatttccaa gtacatatct ggthtaaaact atgttatcaa	9900
atcatatttc accgtgaata ttcagtggag aactttctta cctggatgag ctagtaatga	9960
tttcagatca tgctatcccc agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg	10020
ctgtgctttg atttactggg atttacccca aaataggctg tgtatggggg ctgacttaaa	10080
gatcccttgg aaagactcaa aactaccttc actagtagga ctcctaagcg ctgacctatt	10140
tttaaatgac acaaattcat gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt	10200
catcttcccc tagcacacca atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca	10260
gccaaacacg atgacttttg ttttgthttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat	10320
tgcaactctg actgaaagac ttatthttta gaaaacaggt tgtgttttgt gctgctaagt	10380
tctggccagt ttatcatctg gccttcctgc ctatthttta caaacacga agacagtgtg	10440
taacctcgac attttgacct tcttttatgt gctagttag acaggctcct gaatccacac	10500
ttatthttgc ttaacaaaag tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt	10560
gttcttgact tcagatattt ctttctttt ttttttttt tctcatcac aactaagaga	10620
tacacaaact ctgaagaagc agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg	10680
aaagatthta ggcaaacatt ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt	10740
tatctcatga caaatgaggc ctggattgga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat	10800
tttgatagga atctacaagg tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaaacttta	10860
gaaaatcaaa tgcaaagggt ctggcaaaaa tgaggthtga gtggctggct gtaagagaag	10920
gttaactcct agtaaaaggc atthtttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag	10980
tgggagtagc aaacaaatc atgtthtttt tttcttacia agaactccta aatctgagt	11040
aagtgcatt cattacaata agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat	11100
ctagctttcc cttttacgt gcgtttgatc ttgtctaaa tagtgtaaa attcctttca	11160

ttccaattac agaactgagc ccactcgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt	11220
ttggaagccc cagcatcgtg tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag	11280
ctgtacatta aaaaaaatca tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac	11340
ccctgacttc tgtttagtct cctttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta	11400
ttaaatgtag tagttaacta tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag	11460
cgcactcctg cttttcgatt tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct	11520
gccatactag ttttaaaaat tcactgaaat tacaagata catatatatg catatatata	11580
atggaaagtt tcccgaatg caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat	11640
tctaaatagt acittttcat gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa	11700
aaatagatat tcgactcccc ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc	11760
gagcccccgtg gttttctcgt aggccctaga cgggtgttgc tttatcagt atgtcaaacg	11820
tgctcatttg tcagacatag ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttagt	11880
taaatacaca ccctctgtgt gattttttgc tccttttct tttttgctcc tactcaaaaa	11940
aaaaaaaaat accctcttta catttccttg gcttcttgca tgtttccctt ttcaaaaacc	12000
atgtaataat tttttacaat gtatctgaca cattaatata ttgacatcaa ataggcagac	12060
attctacttt tgccctggcaa ataaatctgc tacggagaca tcatttctc actgtctcaa	12120
agccataact acctgggagt ctttcaacac agaccctcc gatgggaaat gctgtttatt	12180
actgaatgca ggatgctcac gctctgatct ttctccctt gtgcctttac ccagtcatt	12240
tttacttagc aacaccaatt ctagatactt ctgttctgaa gtagaaccac ccccttgcca	12300
cactgccagt ttctctgcta aaagcagtgg acagaagaca gatcatggtc accctcacia	12360
acatggcaca cagctgtctc ggtagctgca ttcccagcat gtcctggctc aaatatctag	12420
agttgcctat gacacgttca aaggttccca agcacagtac attgggaggc ttttgcctgt	12480
gtggccgttg ttttcgttta ggccaactta ctccgtatt cacatactct tggttttacg	12540
aaatacactc ctccagtcta ctaggccaat caatatattt aaaagtctga ttgccacata	12600
agtctctctc tctctctttt tgttttttgt ttgtttgttt ttttctgttt tggctgccgg	12660
tagttaaga ctgagatagg ttggaagact aaaatacagg agtacatgag tgacaacctt	12720
cagccgtctg atttccatgc cggtaaaaca cacaaccaag ctcttcttag cgctgcta	12780
ataaacattc actaagaggg aataggaagt gagatttacc agcttcactt tgctgatttg	12840
caaggttccc cactacgatt cactgtcatt tgatttttga aaaataattt tgtccgtctc	12900
tttgaagaaa tgtcttagtt cttttatttt gtttgtttgg ttttttttag agaagtttta	12960
tctgcagtga taggctacaa tttttatctc cgctgattat ttgtcaggat gctgaatgaa	13020



taatttggtc ctgtgccttc cttgttggtc tgaggaaaat aagagaaact tggagtttg	13080
tttactctt agcccatcct aaatctaaaa gaagatgtcc caggtccagg caggccatgt	13140
agtagttata aaggaggtgg tccaggtcca gccacctcaa tcaggatttg tttgttttga	13200
agcatttgct taaaagcgga gcaagagtct taaccaact tgccataaca ctgcttttct	13260
cgcttttgat gtaaattctc aaaattcaga catcaaacag cccagaaaa ggggaattct	13320
ctccaggcat tgctcggccc cagtcctga acaaaccag ctctgtctag catTTTTTtC	13380
cctagcgggg gtaggggaca gggtgagaga atttcagtct cccaggctgt ctcatgattg	13440
ttagggcata aagaaacaca gtctgccac aaattgggag catctttacc ctttagagag	13500
aaacaaaaca aaactaaaca aacaaatcaa attgctttgc atgaaggcgt agcaaataaa	13560
atctcgggct cctgttccc tgcaccattt gtaggaggtg agaaatgagg gaaacaagag	13620
aaaggggaac tttaaaagcg ggaggcccag aaataatccc tgttaccagt ctgaatttca	13680
cttgctccgt ggctaacgtc agacctagt tgcatgtatg ccagaagtaa actaggctcg	13740
gctgtccatt tctttaaata atgttcacat gtttcctttt tgaaaacaat tttggggact	13800
aaacccaaat ggagagattt gaggaatcg ttaatgtctt aacatttgag tatatttata	13860
aatgtatcag tctgtgat	13878