

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일

2022년 8월 4일 (04.08.2022)



(10) 국제공개번호

WO 2022/164269 A1

(51) 국제특허분류:

A61K 48/00 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61K 38/15 (2006.01) A23L 33/13 (2016.01)
A61K 31/138 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2022/001622

(22) 국제출원일: 2022년 1월 28일 (28.01.2022)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2021-0012824 2021년 1월 29일 (29.01.2021) KR
10-2022-0012358 2022년 1월 27일 (27.01.2022) KR

(71) 출원인: 한국과학기술원 (KOREA ADVANCED INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [KR/KR]; 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

(72) 발명자: 조광현 (CHO, Kwang Hyun); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 최새롬 (CHOI, Sea Rom); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 황채영 (HWANG, Chae Young); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR). 이종훈 (LEE, Jong Hoon); 34141 대전광역시 유성구 대학로 291, Daejeon (KR).

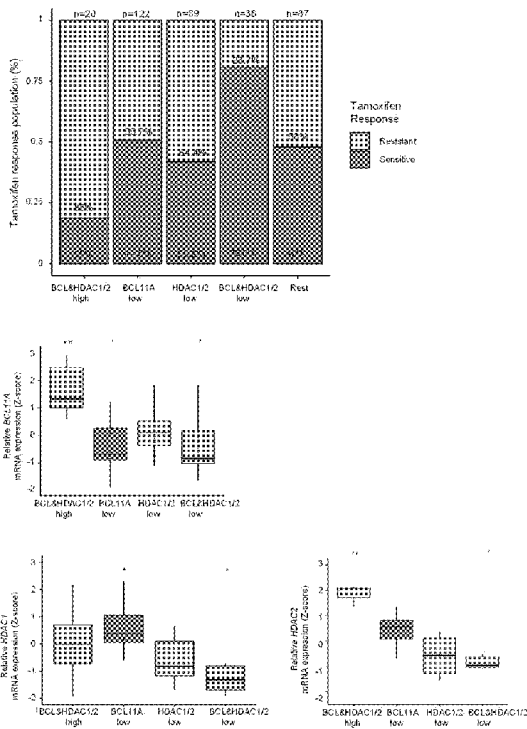
(74) 대리인: 김순웅 (KIM, Soon Woong); 08381 서울특별시 구로구 디지털로 29길 38, 505, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,

(54) Title: PHARMACEUTICAL COMPOSITION FOR TREATING OR PREVENTING MALIGNANT BREAST CANCER

(54) 발명의 명칭: 악성 유방암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물



(57) Abstract: The present invention relates to a pharmaceutical composition for treating or preventing malignant breast cancer and, more particularly, to a composition for transdifferentiation of ER-negative breast cancer to luminal breast cancer, comprising an HDAC1/2 inhibitor and a BCL11A inhibitor as active ingredients, and use of the composition. According to the present invention, when target genes of the present invention are inhibited, BLT is induced so that basal-like or triplet-negative breast cancer is transdifferentiated to luminal A subtype breast cancer which is responsive to anticancer therapy, that is, being curable by hormone therapy. Accordingly, an effective and novel drug treatment that has not been conventionally attempted may be provided, thereby not only increasing the survival rate of patients through targeted therapy by realizing personalized medicine, but also contributing to an improvement in the quality of life that results from unnecessary anticancer drug therapy.

(57) 요약서: 본 발명은 악성 유방암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로, HDAC1/2 억제제 및 BCL11A 억제제를 유효성분으로 포함하는 ER-음성 유방암의 내강형(Luminal) 유방암으로의 전환분화(transdifferentiation)용 조성물 및 이의 용도를 제공한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 타겟 유전자들을 억제하는 경우, BLT을 유발하여 기저양 또는 삼중 음성 유방암을, 항암 요법에 반응하는, 즉, 호르몬 치료가 가능한 내강 A형 유방암 아형으로 전환분화(transdifferentiation) 시키므로, 종래 시도되지 않았던 효과적이고 새로운 약물 치료법이 될 수 있으며, 개인별 맞춤의학을 실현하여 표적 치료를 통해 환자의 생존률을 증가시킬 뿐만 아니라, 불필요한 항암제 치료로 인한 삶의 질의 향상에 기여할 수 있다.



WO 2022/164269 A1

MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 악성 유방암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물 기술분야

- [1] 본 발명은 악성 유방암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물에 관한 것이다.
[2]

배경기술

- [3] 유방암은 임상 및 병리학적으로 매우 복잡하고 다양한 양상을 나타내는 암으로 알려져 있다. 최근 유방암 치료에 효과를 나타내는 다양한 표적 치료제가 개발되면서, 유방암도 점차 치료 표적의 발현 유무에 따라 분류하게 되었다.
- [4] 현재까지 잘 알려진 유방암 치료의 표적은 호르몬 수용체와 HER2의 과발현이며, 이들 표적에 대한 치료를 통해 유방암의 예후를 향상시키는 효과를 가져왔다. 최근에는 유전자 발현 양상에 따라 유전자 차원에서 유방암을 평가하고 있다. DNA 마이크로어레이(microarray) 방법에 의해 유방암을, 내강 A형(Luminal A)(에스트로겐 수용체 양성, HER2 음성); 내강 B형(Luminal B)(에스트로겐 수용체 양성, HER2 양성); HER2 과발현형(HER2-enriched)(에스트로겐 수용체 음성, HER2 양성); 기저양형(basal-like)(에스트로겐 수용체 음성, HER2 음성)과 정상형으로 분류하였다. 특히, 기저양(basal-like) 유방암은 주로 호르몬 수용체가 없고 HER2/neu 발현이 되지 않는 군으로, 나머지 군들에 비해 조기 재발이 많고, 예후가 불량하다고 알려져 있다. 그런데 이러한 유전자 발현 양상에 따른 분류 방법은 임상적으로 적용하기 어려워서, 현재는 면역조직화학염색을 통한 호르몬 수용체와 HER2의 발현 유무로 유방암을 구분하는 방법을 이용하고 있다.
- [5] 삼중 음성 유방암(triple-negative breast cancer, TNBC)은 면역조직화학염색에서 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER), 프로게스테론 수용체(progesterone receptor; PR)와 HER2(human epidermal growth factor receptor 2)의 발현이 모두 음성인 유방암으로 전체 유방암의 10~15%를 차지한다. 특히, 한국을 비롯한 아시아권에서 삼중 음성 유방암의 비율이 높게 나타나고 있다. 삼중 음성 유방암은 기저양(basal-like) 유방암과 엄밀하게 일치하지는 않으나 매우 비슷한 임상 경과를 나타내기 때문에 실제 임상 환경에서는 동일하게 여긴다. 삼중 음성 유방암은 비삼중 음성 유방암 환자에 비해 상대적으로 예후가 불량하고 생존율이 낮다.
- [6] 이러한 유방암은 유방 종양의 분자아형에 따라 예후가 다를 수 있다. 예를 들어, 에스트로겐 수용체의 발현이 양성인 암(예를 들어, 내강 A형, 내강 B형)은 다른 분자아형의 유방암에 비해 좋은 예후를 가질 수 있다.
- [7] 또한, HER2의 발현 수준이 양성인 암(예를 들어, HER2 형, 내강 B형)은 HER

수용체 차단제들의 개발에 따라, 삼중 음성 암(예를 들어, 기저양형)보다 좋은 예후를 가질 수 있다.

- [8] 더 나아가, 유방 종양의 분자아형에 따라 효과적인 치료제 또한 다를 수 있다. 예를 들어, 에스트로젠 수용체의 발현이 양성인 암(예를 들어, 내장 A형, 내장 B형)은 에스트로젠 수용체 길항제인 타목시펜이 효과적인 치료제일 수 있고, HER2의 발현 수준이 양성인 암(예를 들어, HER2 형, 내장 B형)은 항-HER2 항체, HER 활성화 수용체 타이로신 카이네이즈 저해제(예를 들어, 랍파티닙)가 효과적인 치료제일 수 있다.
- [9] 이전의 연구에서도 삼중 음성 유방암 환자들을 위한 효과적인 치료법을 개발하려는 시도들이 있었으나 암의 복잡하고 역동적인 특성으로 인해 거듭 실패했다. 그렇기 때문에 삼중 음성 유방암을 치료하기 위한 진단 및 치료요법이 비약적으로 발전되고 있음에도 이를 치료하는 방법은 항암화학요법 (chemotherapy) 외에는 아직까지도 난제로 남아있어, 다각적인 종양생물학적 규명이 필요한 상태이다.
- [10] 한편, 이러한 아형 중 내장 A형은 가장 덜 공격적인 유방암이고, 유방암 환자의 거의 70%가 내장 A형으로 진단되고 있으며, 에스트로젠 수용체 알파 (ER α) 발현으로 항-ER α 요법이 가능하다.
- [11] 따라서, 종래 항암제 불응성인 삼중 음성 유방암을, 종래 항암 요법에 반응하는 유방암 아형으로 전환분화시킬 수 있다면, 효과적이고 새로운 약물 치료법이 될 수 있으며, 이는, 개인별 맞춤의학을 실현, 표적 치료를 통해 환자의 생존률 및 불필요한 항암제 치료로 인한 삶의 질의 향상에 기여할 것이다.

[12]

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성(Negative)을 나타내는 악성 유방암인 삼중 음성 유방암(및 기저양 유방암)을 치료하기 위한 효과적인 방법을 개발하고자, 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 역학 정보와 각 환자 데이터를 이용하여 신호전달네트워크를 구축하고, 질병의 원인이 되는 세포의 성장 신호 흐름의 양상을 분석함으로써 삼중 음성 유방암 세포에 대한 효과적인 약물 타겟으로서 HDAC1/2와 BCL11A를 발굴하였다. 또한, 이러한 HDAC1/2와 BCL11A를 억제했을 때 EGFR-ERK의 신호전달경로가 저해되면서, 삼중 음성 유방암 세포에서 나타나지 않던 ER α (Estrogen receptor alpha)가 발현되었을 뿐만 아니라, 관련 신호 전달 경로가 활성화되는 것을 발견하였다. 이에, 상기 HDAC1/2 및 BCL11A를 억제시킨 삼중 음성 유방암 세포에, 내장 A형 유방암 환자를 위한 ER α 표적 약물인 타목시펜을 처리했을 때, 탁월한 암세포 사멸 효과를 나타내어 타목시펜에 대한 높은 민감성을 확인하였다. 이는, 본 발명의 HDAC1/2 및

BCL11A 억제에 의해 삼중 음성 유방암 세포가, 종래 공지된 항암 치료법, 예컨대, 항-ER α 요법으로 치료가 가능한 내강 A형 유방암으로 리프로그래밍 또는 전환분화(transdifferentiation)되었음을 입증한다. 따라서, 특정 유전자를 타겟팅하여 종래 약물에 불응성인 삼중 음성 유방암이 약물에 반응(감작)하도록 할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

- [14] 따라서, 본 발명의 일 목적은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성(Negative) 유방암의 내강형(Luminal) 유방암으로의 전환분화(transdifferentiation)용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [15] 또한, 본 발명의 다른 목적은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 항암제 민감성 증진용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [16] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 항암 보조제를 제공하는 데 있다.
- [17] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.
- [18] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 데 있다.
- [19] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 에스트로젠 수용체-음성 유방암의 내강형(Luminal) 유방암으로의 인 비트로 전환분화(transdifferentiation) 유도 방법을 제공하는 데 있다.
- [20] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 항암제 민감성 증진용 약물의 스크리닝 방법을 제공하는 데 있다.
- [21] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성(Negative) 유방암의 내강형(Luminal) 유방암으로의 전환분화(transdifferentiation) 방법을 제공하는 데 있다.
- [22] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 치료 또는 예방 방법을 제공하는 데 있다.

[23]

과제 해결 수단

- [24] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [25] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진

자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[26]

[27] 이하, 본 발명에 대하여 보다 상세히 설명한다.

[28]

[29] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 억제제 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성(Negative) 유방암의 내강형(Luminal) 유방암으로의 전환분화(transdifferentiation)용 조성물을 제공한다.

[30] 본 발명에서 상기 내강형(Luminal) 유방암은 내강 A형(Luminal A) 및 내강 B형(Luminal B)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있다.

[31] 본 명세서에서 사용되는 용어, "유방암"은 유방에 생긴 암 세포로 이루어진 종괴를 의미한다. 유방암은 유선에 젖을 공급하는 유방 소엽(lobules) 또는 유선의 내측 라이닝(lining)에 기원하는 암의 유형일 수 있다. 유선으로부터 기원하는 암은 관상암종(ductal carcinomas)일 수 있고, 소엽으로부터 유래하는 암은 소엽암종(lobular carcinomas)일 수 있다. 때로, 유방에 의한 전위 부위는 뼈, 간, 폐 및 뇌가 포함될 수 있다. 유방암은 인간 및 다른 포유동물에서 발생한다. 인간의 경우 유방암은 대부분 여성에게서 발생하지만, 남성에게도 발생할 수 있다. 유방암의 치료법에는 외과수술, 약물치료(호르몬요법 및 화학요법), 방사선 치료 및/또는 면역요법/표적화요법이 포함될 수 있다.

[32] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 ER-음성 유방암은, 프로게스테론 수용체(progesterone receptor; PR) 및 인간 상피세포 성장인자 수용체 2(human epidermal factor receptor 2; HER2)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이 음성인 것으로, 삼중 음성 유방암(Triple-Negative Breast Cancer, TNBC) 또는 기저양 유방암(basal-like breast cancer)을 포함한다.

[33] 구체적으로 본 발명에서 유방암은, 표적(receptor)의 발현 유무에 따라, 내강 A형(Luminal A)(에스트로젠 수용체 양성, HER2 음성); 내강 B형(Luminal B)(에스트로젠 수용체 양성, HER2 양성); HER2 과발현형(HER2-enriched)(에스트로젠 수용체 음성, HER2 양성); 기저양형(basal-like)(에스트로젠 수용체 음성, HER2 음성); 및 삼중 음성 유방암(triple-negative breast cancer, TNBC)(에스트로젠 수용체 음성, 프로게스테론 수용체 음성, HER2 음성)의 아형으로 분류될 수 있다.

[34] 이 중 기저양 유방암 및 삼중음성 유방암은, 모두 호르몬(에스트로젠) 수용체가 없고 HER2 발현이 되지 않는 아형으로, 나머지 아형들에 비해 조기 재발이 많고, 예후가 불량하다고 알려진 악성 유방암으로서, 유사한 임상 경과를 나타내기

- 때문에 이들은 임상에서도 동일하게 판단된다.
- [35] 따라서, 본 발명의 실시예 내에서 목적 대상인 ER-음성 유방암을 언급하면서 기재된 기저양형(basal-like) 또는 삼중음성형(triple-negative)은, 본 발명의 타겟 유전자가 목적 효과를 달성할 수 있는 한, 본 발명에서 특별한 언급이 없어도, 서로를 포함하여 의미하는 것으로 간주된다.
- [36] 본 발명의 BCL11A 억제제 및 HDAC1/2 억제제는, 본 발명의 타겟인 BCL11A 및 HDAC1/2를 억제할 수 있는 한, 임의의 억제제도 포함할 수 있으며, 예를 들어, 상기 억제제는 타겟 유전자인 BCL11A 및 HDAC1/2의 뉴클레오티드의 발현 또는 BCL11A 및 HDAC1/2 단백질의 활성을 억제하는 것을 모두 포함할 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [37] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 BCL11A 억제제는 BCL11A 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이고; 상기 HDAC1/2 억제제는, HDAC1/2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있다.
- [38] 또한, 상기 BCL11A 억제제는, BCL11A 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질유사체, 앵타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이고; 상기 HDAC1/2 억제제는, HDAC1/2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질유사체, 앵타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있다.
- [39] 또한, 본 발명의 BCL11A 억제제 및 HDAC1/2 억제제는, ER-음성 유방암, 예컨대, 삼중 음성 유방암(Triple-Negative Breast Cancer, TNBC) 또는 기저양 유방암(basal-like breast cancer, BLBC)의 EGFR(Epidermal growth factor receptor) 및 ERK1/2(Extracellular signal-regulated kinase 1/2)의 발현 수준 또는 활성을 감소시키고; Er α (Estrogen receptor alpha)의 발현 수준 또는 활성은 증가시키는 것을 특징으로 한다.
- [40] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 본 발명자들은 기저양(basal-like) 유방암세포와 내강 A형 유방암세포의 생물학적 조건을 나타낼 수 있는 분자 조절 네트워크 모델을 구축하고, 복잡한 네트워크 제어 전략을 적용하여, 가장 침습적인 기저양 유방암 유형에서 내강 A 유형으로 전환(BLT; basal-to-luminal transition)을 유도할 수 있는 잠재적 표적을 식별하였다. 또한, 네트워크 모델에서 주요 분자 간의 논리적 관계를 분석하여 BLT의 기본 메커니즘을 설명하였다. BLT를 리프로그래밍할 수 있는 새로운 표적으로서 BCL11A 및 HDAC1/2를 발견하였고, 시뮬레이션 분석과 세포주 실험을 통해 검증하였다.
- [41] 일 구현예에서, 역학 정보와 각 환자 데이터를 이용하여 신호전달네트워크를

구축하고, 질병의 원인이 되는 세포의 성장 신호 흐름의 양상을 분석함으로써 삼중 음성 유방암 세포에 대한 효과적인 약물 타겟으로서 HDAC1/2와 BCL11A를 발굴하였다. 또한, 이러한 HDAC1/2와 BCL11A를 억제했을 때 EGFR-ERK의 신호전달경로가 저해되면서, 삼중 음성 유방암 세포에서 나타나지 않던 ER α 가 발현되었을 뿐만 아니라, 관련 신호전달경로가 활성화되는 것을 발견하였다. 이에, 상기 HDAC1/2 및 BCL11A를 억제시킨 삼중 음성 유방암 세포에, 내장 A형 유방암 환자를 위한 ER α 표적 약물인 타목시펜을 처리했을 때, 탁월한 암세포 사멸 효과를 나타내어 타목시펜에 대한 높은 민감성을 확인하였다. 이는, 본 발명의 HDAC1/2 및 BCL11A 억제에 의해 삼중 음성 유방암 세포가, 종래 공지된 항암 치료법, 예컨대, 항-ER α 요법으로 치료가 가능한 내장 A형 유방암으로 리프로그래밍 또는 전환분화(transdifferentiation)되었음을 입증한다. 따라서, 특정 유전자를 타겟팅하여 종래 약물에 불응성인 삼중 음성 유방암이 약물에 민감하게 반응(감작)하도록 민감성(감수성)을 증진시킬 수 있음을 규명하였다.

[42] 따라서, 본 발명은 상기 BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 억제제 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2) 억제제를, 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 에스트로젠 수용체-음성 유방암의 내장형(Luminal) 유방암으로의 인 비트로 전환분화(transdifferentiation) 유도 방법; 및 상술한 본 발명의 전환분화용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 유방암의 항암제 민감성 증진용 조성물을 제공한다.

[43] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 억제제 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2) 억제제를 유효성분으로 포함하는, ER-음성 유방암 치료용 항암 보조제를 제공할 수 있다.

[44] 본 발명에서 항암 보조제란, 항암제 투여시 항암제와 병용하여 투여함으로써, 항암제의 항암 효과를 높일 수 있는 것을 의미한다.

[45] 본 발명에 따르면, HDAC1/2 및 BCL11A 억제가 삼중 음성 유방암 세포를, 항-ER α 요법으로 치료가 가능한 내장 A형 유방암 세포로 전환분화(transdifferentiation)시키므로, 종래 항암제-불응성인 삼중 음성 유방암의 항암제에 대한 민감성을 증가시켜 항암제의 효과를 배가시킬 수 있다.

[46] 본 발명의 상기 보조제는 항암약물과 동시에(simultaneous), 별도로(separate) 또는 순차적(sequential)으로 투여될 수 있다. 상기 본 발명에 따른 항암 보조제의 투여 순서 즉, 항암제와 항암 보조제 중에서 어떤 것을 어느 시점에서, 동시에, 개별적 또는 순차적으로 투여할 것인지의 여부는 의사나 전문가에 의해 결정될 수 있다. 이러한 투여 순서는 많은 인자에 따라 달라질 수 있다.

[47]

[48] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 HDAC1/2 억제제 및 BCL11A 억제제를 유효성분으로 포함하는, ER-음성 유방암의 내장형(Luminal) 유방암으로의 전환분화용 조성물; 및 항암제;를 유효성분으로 포함하는,

ER-음성 유방암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물을 제공한다.

- [49] 상기 항암제는 본 발명의 HDAC1/2 억제제 및 BCL11A 억제제가 목적 효과를 달성할 수 있는 한, 임상, 약학, 생의학적으로 사용 가능한 모든 항암제를 포함하나, 바람직하게는, 호르몬 수용체 양성 유방암인 내강 A형 유방암 환자를 위한 호르몬 요법제를 포함한다.
- [50] 본 발명의 호르몬 수용체 양성 내강 A형 유방암을 대상으로 하는 항암제로서 호르몬 요법제는, 선택적 에스트로겐 수용체 조절자(SERM), 선택적 에스트로겐 수용체 분해제(SERD) 및 아로마타제 억제제(AI)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 ER α 표적 제제인 선택적 에스트로겐 수용체 조절자(SERM) 또는 선택적 에스트로겐 수용체 분해제(SERD)이다.
- [51] 상기 SERM은, 예컨대, 타목시펜, 토레미펜, 라록시펜, 바제독시펜, 오스페미펜, 드롤록시펜 또는 요오독시펜이다.
- [52] 상기 SERD는, 예컨대, 풀베스트란트, RAD1901, ARN-810 (GDC0810), 또는 AZD9496이다.
- [53] 상기 AI는, 예컨대, 엑세메스탄, 아나스트로졸, 레트로졸, 보로졸, 포르메스탄 또는 파드로졸이다.
- [54] 본 발명에서 사용되는 용어 "유효성분으로 포함하는"이란, 본 발명의 유효 성분인 억제제를 소정의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양으로 포함하는 것을 의미한다. 상기 HDAC1/2 억제제 및 BCL11A 억제제는 약학적으로 유효한 양으로 투여할 수 있으며, 유효 용량수준은 개체의 종류 및 연령, 성별, 약물에 대한 민감도, 치료 기간, 동시에 사용되는 약물 및 기타 의학적 요소에 따라 결정될 수 있다.
- [55] 본 발명의 일 실시예에 따른 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나, 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있으며, 기존 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [56] 상기 약학적 조성물의 일일 투여량은 0.01 내지 500 mg/kg일 수 있으며, 하루 1 회 내지 수 회 나누어 투여할 수 있으나, 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율, 질환의 중증도 등을 고려하여, 부작용이 없고 최대 효과를 얻을 수 있는 양으로 통상의 기술자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [57] 상기 약학적 조성물은 경구, 피하, 복강 내, 폐 내, 비강 내, 근육 내, 정맥 내 및 동맥 등 다양한 경로로 투여될 수 있다.
- [58] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 및/또는 희석제를 포함하여 제제화할 수 있다.
- [59] 상기 약학제제는 산제, 과립제, 정제, 피복정, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 좌제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 주사제의 형태로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [60] 상기 약학제제는 하나 이상의 부형제, 예를 들어, 전분, 락토오스, 젤라틴,

- 수크로오스, 운할제, 보존제, 방향제, 감미제 등을 추가로 혼합하여 조제될 수 있다.
- [61] 본 발명의 조성물은 HDAC1/2 억제제, BCL11A 억제제 및 항암제와 함께 본 발명의 대상 유방암에 대하여 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [62] 본 발명의 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [63] 본 발명의 조성물은 실제 임상투여 시에 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제할 수 있으며, 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌 (Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 이용하는 것이 바람직하다.
- [64] 상기 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 운할제들도 사용된다. 또한, 상기 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [65] 상기 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [66] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 상기 약학적 조성물의 제제화 방법, 투여 방식, 투여 시간 및/또는 투여 경로 등에 의해 다양해질 수 있으며, 상기 약학적 조성물의 투여로 달성하고자 하는 반응의 종류와 정도, 투여 대상이 되는 개체의 종류, 연령, 체중, 일반적인 건강 상태, 질병의 증세나 정도, 성별, 식이, 배설,

해당 개체에 동시 또는 이시에 함께 사용되는 약물 기타 조성물의 성분 등을 비롯한 여러 인자 및 의약 분야에서 잘 알려진 유사 인자에 따라 다양해질 수 있으며, 당해 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 목적하는 치료에 효과적인 투여량을 용이하게 결정하고 처방할 수 있다.

- [67] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 예를 들어, 0.01 내지 500 mg/kg의 농도로 투여되는 것이 바람직하나, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [68] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로 및 투여 방식은 각각 독립적일 수 있으며, 그 방식에 있어 특별히 제한되지 아니하며, 목적하는 해당 부위에 상기 약학적 조성물이 도달할 수 있는 한 임의의 투여 경로 및 투여 방식에 따를 수 있다.
- [69] 상기 약학적 조성물은 경구 투여 또는 비경구 투여 방식으로 투여할 수 있다. 상기 비경구 투여 방식으로는 예를 들어 정맥 내 투여, 복강 내 투여, 근육 내 투여, 경피 투여 또는 피하 투여 등이 포함된다.
- [70] 본 발명의 약학적 조성물은 대상 적응증의 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [71]
- [72] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상기 BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 억제제 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 ER-음성 유방암의 예방 또는 개선용 식품 조성물 및 이를 함유하는 건강기능식품을 제공한다.
- [73] 본 명세서에서 사용되는 용어 "건강기능식품"은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미한다. 여기서, '기능성'이란 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [74] 상기 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형들은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [75] 상기 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 건강기능식품으로 이용될 수 있으며, 각종 식품에 첨가될 수 있다.
- [76] 구체적인 예로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15중량% 이하, 바람직하게는 10중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하여 장기간 섭취할 경우에는 상기 범위 이하의 양으로 첨가될 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 본 발명의 쿠커비타신 D를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자,

라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료, 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

- [77] 본 발명의 식품 조성물이 음료로 제조될 경우 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등의 추가 성분을 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당 등의 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드, 덱스트린, 사이클로덱스트린 등의 천연 감미제, 사카린, 아스파르트암 등의 합성 감미제 등이 사용될 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 10중량%, 바람직하게는 0.01 내지 0.1중량%로 포함된다.
- [78] 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있으며, 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기의 첨가제 비율은 크게 제한되지는 않으나, 본 발명의 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 0.1중량% 범위내로 포함되는 것이 바람직하다.
- [79]
- [80] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 항암제 민감성 증진용 약물의 스크리닝 방법을 제공한다:
- [81] (a) 분리된 ER-음성 유방암 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
- [82] (b) 상기 후보물질이 처리된 ER-음성 유방암 세포에서 BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2)의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
- [83] (c) 상기 (b) 단계에서 측정된 BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2)의 발현 수준이, 후보물질이 처리되지 않은 분리된 악성 유방암 세포에 비해 낮은 경우, 상기 후보물질을 ER-음성 유방암의 치료를 위한 항암제 민감성 증진용 약물로 사용할 수 있을 것으로 판정하는 단계.
- [84] 상기 항암제 민감성 증진용 약물은, 감작제로서, 항암제에 대한 종양 세포의 감수성을 증가시키거나, 항암제가 종양 세포 특이적으로 작용하도록 하여 적은 투여량으로도 치료 효과를 달성할 수 있도록 돕는 물질을 의미한다.
- [85] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 "후보물질"은 유전자의 발현량에 영향을 미치거나, 단백질의 발현 또는 활성에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 시험물질을 의미한다. 상기 후보물질은 예를 들어, 화합물, 뉴클레오타이드, 단백질, 항체 및 천연물

추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [86] 상기 BCL11A 및 HDAC1/2의 발현 수준을 측정하는 분석법은 상기 BCL11A 및 HDAC1/2 mRNA를 검출하기 위한 것으로, 역전사 중합효소반응, 경쟁적 역전사 중합효소반응, 실시간 역전사 중합효소반응, RNase 보호 분석법(RPA), 노던 블랏팅 및 DNA 칩으로 구성된 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [87] 상기 BCL11A 및 HDAC1/2의 발현 수준을 측정하는 분석법은 상기 BCL11A 및 HDAC1/2 단백질을 검출하기 위한 것으로, 웨스턴 블랏팅, ELISA (Enzymelinked immunosorbent assay), ELLA (enzyme-linked lectin assay), 방사선 면역분석법, 방사선 면역확산법, 오우크테로니(Ouchterlony) 면역확산법, 로케트 면역전기영동, 면역조직화학염색, 면역침전분석, 보체고정분석, FACS 및 단백질 칩으로 구성된 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [88] 본 발명의 ER-음성 유방암의 항암제 민감성 증진용 약물의 스크리닝 방법은, 후보 물질의 처리에 의해 BCL11A 및 HDAC1/2 발현이 감소되는 경우, ER-음성 유방암이 내강 A형 유방암으로 변환(transdifferentiation)되어, ER-음성 유방암 치료용 약물(예컨대, 항암제)에 대한 종양 세포의 감수성이 증가되므로, 상기 후보 물질을 ER-음성 유방암 치료를 위한 항암제 민감성 증진용 약물로 사용될 수 있을 것으로 판단할 수 있게 된다. 이러한 스크리닝 방법에 있어서, 그 활성 측정은 BCL11A 및 HDAC1/2 발현 수준에 따라 용이하게 판단될 수 있다.
- [89] 본 발명의 방법은 상술한 BCL11A 및 HDAC1/2의 발현 수준을 이용하므로, 이와 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [90] 본 발명에 따르면, 본 발명의 타겟 유전자들을 억제하는 경우, BLT을 유발하여 기저양 또는 삼중 음성 유방암을, 항암 요법에 반응하는, 즉, 호르몬 치료가 가능한 내강 A형 유방암 아형으로 전환분화(transdifferentiation)시키므로, 종래 시도되지 않았던 효과적이고 새로운 약물 치료법이 될 수 있으며, 개인별 맞춤형 의학을 실현하여 표적 치료를 통해 환자의 생존률을 증가시킬 뿐만 아니라, 불필요한 항암제 치료로 인한 삶의 질의 향상에 기여할 수 있다.

[91]

도면의 간단한 설명

- [92] 도 1은 BLT 네트워크 모델을 구성하기 위한 DEG 분석 결과를 보여준다. 도 1A는 TCGA 데이터를 사용하여 각 유형별 별 상대적으로 높게 발현되는 유전자군을 보여준다. 그중 발현도 차이가 가장 크게 나는 유전자 (빨간색)을 선별하여 각 삼중음성유방암과 내강 A형의 마커 유전자로서 네트워크에 포함시켰다. 1B는 선별된 유전자중 삼중음성유방암 유전자들이 CCLE 데이터에서도

내강 A형 세포주보다 삼중음성유방암 세포주에서 높게 발현되는지 박스그래프로 보여주었다. 1C는 선별된 유전자중 내강 A형 유전자들이 CCLE 데이터에서도 삼중음성유방암 세포주보다 내강 A형 세포주에서 높게 발현되는지 박스그래프로 보여주었다. 마찬가지로 도 1D 및 1E는 METABRIC 데이터, 도 1F 및 도 1G는 TCGA 데이터를 통해 검증하였다.

- [93] 도 2는 기저양(basal-like) 세포주의 게놈 정보를 매핑하여 만든 세포주 특이적 BLT 네트워크 모델을 보여준다. 도 2A는 완성된 네트워크이다. 도 2B는 CNA, 2C는 RNA 발현, 2D는 돌연변이 정보를 이용하여 매핑한 네트워크이다. 도 2E는 위 모든 게놈 정보를 이용하여 functional genomic alternation 이라는 척도를 만들고 그 정보를 매핑한 네트워크이다. 도 2F는 각 실험에 사용할 세포주의 게놈 정보를 매핑하여 만든 세포주의 네트워크이다.
- [94] 도 3은 BCL11A 및 HDAC1/2의 KO에 의해 유도된 BLT의 메커니즘을 보여준다. 도 3A는 찾아진 유전자를 제어해주었을 때 네트워크의 다른 유전자들의 상태 변화를 보여준다. 도 3B는 3A에서 보여준 변화 중 주요 유전자의 메커니즘이다. 도 3C는 메커니즘을 바탕으로 각 유전자를 제어 해주었을 때의 신호전달경로의 제어 메커니즘이다.
- [95] 도 4는 BCL11A 및 HDAC1/2의 KO 이후 수정된 어트랙터의 동적 안정성을 보여준다. 도 4A는 MDAMB231 세포주에서 각 유전자를 제어 해주었을 때 각 어트랙터의 표현형 비율이다. 도 4B는 BT20 세포주에서 각 유전자를 제어 해주었을 때 각 어트랙터의 표현형 비율이다.
- [96] 도 5는 BCL11A 및 HDAC1/2 KO가 ESR1 mRNA 및 ER α 의 발현에 미치는 영향을 보여준다. 도 5A는 MDAMB231 세포주에서 BCL11A 유전자를 shRNA를 사용하여 knockdown 시켜 발현을 줄어든 결과를 보여준다. 도 5B는 MDAMB231 세포주에서 각 타겟 유전자의 발현을 제어한 후 ESR1의 유전자 발현 변화를 보여준다. 도 5C는 BT20 세포주에서 BCL11A 유전자를 shRNA를 사용하여 knockdown 시켜 발현을 줄어든 결과를 보여준다. 도 5D는 BT20 세포주에서 각 타겟 유전자의 발현을 제어한 후 각 유전자의 발현을 제어한 후 ESR1의 유전자 발현 변화를 보여준다. 도 5E는 MDAMB231 세포주에서 각 타겟 유전자의 발현을 제어한 후 ER α 및 삼중음성유방 세포의 마커 단백질 변화 결과이다. 도 5F는 BT20 세포주에서 각 타겟 유전자의 발현을 제어한 후 ER α 및 삼중음성유방 세포의 마커 단백질 변화 결과이다.
- [97] 도 6은 BCL11A 및 HDAC1/2 KO 후 타목시펜 약물 반응을 보여준다. 도 6A는 MDAMB231 세포주에서 각 타겟 유전자 발현을 제어 한 뒤 세포의 타목시펜 약물에 대한 반응을 성장속도로 보여준다. 도 6B는 BT20 세포주에서 각 타겟 유전자 발현을 제어 한 뒤 세포의 타목시펜 약물에 대한 반응을 성장속도로 보여준다. 도 6C는 MDAMB231 세포주에서 각 컨디션별 타목시펜 약물에 대한 세포의 변화를 보여준다. 도 6D는 BT20 세포주에서 각 컨디션별 타목시펜 약물에 대한 세포의 변화를 보여준다.

- [98] 도 7는 BCL11A 및 HDAC1/2 과발현 후 타목시펜 약물 반응을 보여준다. 도 7A는 각 타겟 유전자를 T47D 세포주에서 과발현 시켜준 결과를 그래프로 나타낸다. 도 7B는 과발현 후 ESR1의 mRNA 변화이다. 도 7C는 과발현 후 EGFR의 mRNA 변화이다. 도 7D는 과발현 후 ERa 및 삼중음성유방 세포의 마커 단백질 변화 결과이다. 도 E는 각 컨디션별 타목시펜 약물에 대한 세포 변화를 보여준다. 도 7F는 BT20 각 타겟 유전자 발현을 제어 한 뒤 세포의 타목시펜 약물에 대한 반응을 성장속도로 보여준다. 도 7G는 세포의 타목시펜 약물에 대한 반응을 세포를 염색하여 보여준다. 도 7H 내지 7K는 동일한 실험을 MCF7 세포주에서 적용하여 mRNA 와 단백질 발현 변화가 비슷함을 검증 하였다.
- [99] 도 8은 BCL11A 및 HDAC1/2 발현에 따른 환자의 생존을 분석 결과를 보여준다. 도 8A 내지 8C는 METABRIC 삼중음성유방암 환자에서 각 유전자의 발현의 높고 낮음에 따른 생존을 분석 결과이다. 도 8D 내지 8F는 METABRIC 내강 A형 환자에서 각 유전자의 발현의 높고 낮음에 따른 생존을 분석 결과이다. 도 8G 내지 8I는 METABRIC 두 환자 그룹에서 각 유전자의 발현의 높고 낮음에 따른 생존을 분석 결과이다. 도 8J 내지 8L는 TCGA 삼중음성유방암 환자에서 각 유전자의 발현의 높고 낮음에 따른 생존을 분석 결과이다. 도 8M 내지 8O는 TCGA 내강 A형 환자에서 각 유전자의 발현의 높고 낮음에 따른 생존을 분석 결과이다. 도 8P 내지 8R은 TCGA 두 환자 그룹에서 각 유전자의 발현의 높고 낮음에 따른 생존을 분석 결과이다.
- [100] 도 9는 BCL11A 및 HDAC1/2 발현에 따른 환자의 타목시펜 약물 반응 결과를 보여준다. 도 9A는 각 유전자 발현에 따라 환자그룹을 나눈 후 타목시펜 약물 반응 결과를 바 그래프로 보여준다. 도 9B 내지 9C는 각 나누어진 환자그룹의 그룹의 유전자 발현패턴이 타겟 유전자 모두가 억제 되었을때 내강 A형의 유전자 발현패턴과 가까워짐을 GSVA 분석을 통하여 보여준다.

발명의 실시를 위한 형태

- [101] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[102]

- [103] 실시예 1. BLT(basal-to-luminal transition) 네트워크 모델을 구성하기 위한 DEG 분석

- [104] 본 발명자들은, 에스트로젠 수용체 음성(ER-) 및 HER2 음성(HER2-)의 공통점을 지닌 악성 유방암 유형인 기저양(basal-like) 유방암 및 삼중 음성 유방암(TNBC) 유형을 대상으로 하여, 기저양(basal-like) 유방암 또는 삼중 음성 유방암 유형에서 내강(luminal)형으로 전환(BLT; basal-to-luminal transition) 동안의 분자 조절 상호 작용을 탐구하고자, BLT 네트워크 모델을 구성하였다.

- [105] 먼저, 다수의 유방암 환자와 세포주 데이터(TCGA, CCLE, METABRIC) 분석을 통해, 당업계에서 임상적으로 삼중 음성 유방암과 동일하게 판단되는 기저양(basal-like) 유방암과 내강 A형 유방암에서 발현이 높은 유전자를 추출하였고, BLT에 대한 수학적 모델을 구축하였다. 본 발명자들이 구축한 네트워크 모델은, 내강 A형 및 기저양 유방암에서의 암세포 성장, 생존 및 종양 발생에 중요한 역할을 하는 경로인 ER α 및 EGFR 신호 경로를 기반으로 하며 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)를 이용하였다. 또한, 해당 각 유형에 대한 추가 표현형 마커로 DEG (differentially expressed genes)를 사용하였다.
- [106] 이를 위해 본 발명자들은 The Cancer Genome Atlas (TCGA)의 기저양 유방암 및 내강 A형 유방암 환자의 mRNA 발현 프로파일을 비교하고 해당 유형에서 DEG를 확인하였다. 두 유형(도 1A)에서 최상위 DEG 목록을 선택하여 네트워크 모델에 참여 구성 요소로 포함시켰다. 또한, Cancer Cell Lines Encyclopedia (CCLE) 및 유방암 국제 컨소시엄 (METABRIC)에서 DEG 분류법을 사용하여 TCGA의 해당 유형에서 차별적으로 발현되는 유전자의 패턴을 확인하였다(도 1B-G).
- [107] 그 결과, 도 2A에 나타낸 바와 같이, 상술한 여러 데이터 분석을 통해 총 30개의 노드와 73 개의 링크로 구성된, 기저양 유방암과 내강 A형 유방암에 특이적이고 필수적인 네트워크 모델을 구축하였다.
- [108] 또한, 도 2B 내지 2E에 나타낸 바와 같이, 실제 유방암 세포주에 네트워크를 대입시켜 세포 특이적 네트워크를 만들기 위해, CCLE 데이터에서 각 세포주의 게놈 정보인 유전자 복제수 변이 (CNA), mRNA 발현양, 유전자 돌연변이 정보를 이용하여 각 세포주의 functional genomic profile를 구축하였다.
- [109] 또한, 도 2F에 나타낸 바와 같이, 상기 결과를 해당 세포주에 대입시켜 그 세포주의 특이적 게놈정보를 가진 네트워크들을 구축하였다.
- [110]
- [111] 실시예 2. LDOI를 이용한 네트워크 컨트롤 방법에 의한 BLT를 유도하는 세포별 타겟 유전자들
- [112] 본 발명자들은, 상기 실시예 1의 결과를 기반으로, 네트워크 컨트롤 방법 중 하나인 Logical domain of influence (LDOI) 기반 표적 제어 전략을 통해 어떤 유전자 노드를 컨트롤했을 때 기저양(basal-like) 네트워크에서 내강 A형 네트워크로 리프로그래밍되어 전환분화되는지, 내강 A형의 대표적인 특징인 ER α 와 내강 A에서 높게 발현되는 노드들의 활성도를 통해 분석하였다.
- [113] 그 결과, 하기 표 1에 나타낸 바와 같이, 가장 최적의 조합으로 BCL11A BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A; NM_022893) 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2; NM_004964/NM_001527)를 억제시킬 때 내강 A형으로의 리프로그래밍이 가능함을 확인하였다.
- [114]

[115] [표 1]

[116]

Desired state

ON: ERa, C6orf97, KRT18, FOXA1, ESR1, CA12, ANXA9, GATA3

OFF: EGFR, AKT, ERK1/2

No.	LDOI Target solution	Total number of solution found
<i>Network without any genomic alteration</i>		
1	BCL11A OFF & HDAC1/2 OFF	46
2	PI3K OFF & HDAC1/2 OFF	11
3	KRAS OFF & HDAC1/2 OFF	10
<i>BT20 network</i>		
1	BCL11A OFF & HDAC1/2 OFF	16
2	KRAS OFF & HDAC1/2 OFF	12
<i>MDA-MB231 network</i>		
1	BCL11A OFF & HDAC1/2 OFF	32
2	PI3K OFF & HDAC1/2 OFF	4

[117]

[118] 실시예 3. BCL11A 및 HDAC1/2의 KO에 의해 유도된 BLT의 메커니즘 확인

[119] 본 발명자들은 상기 실시예 2의 결과를 기반으로, BCL11A 및 HDAC1/2의 KO(knockout)에 의해 유도된 BLT의 메커니즘을 확인하였다.

[120] LDOI 기반 표적 제어 전략에 의해 제공되는 확장된 네트워크는 네트워크의 규제 상호 작용 및 역학을 통합하는 하이퍼 그래프와 유사하다. 이에, BLT 모델의 확장된 네트워크를 사용하여 BCL11A 및 HDAC1/2와 다른 네트워크 구성 요소의 상호 작용을 분석하였다. 결과적으로 확장된 네트워크는 네트워크 구성 요소의 모든 state의 상태를 포함하고 있고 목적 상태인 내강 A 표현형을 가진 가능한 모든 초기 상태를 포함하게 된다.

[121] 다음으로, 도 3A에 나타낸 바와 같이, 각 섭동(Perturbation), HDAC1/2 KO (knockout) 혹은 [~ HDAC1/2], BCL11A KO 혹은 [~BCL11A] 및 [~ BCL11A & ~ HDAC1/2] 혹은 BCL11A 와 HDAC1/2를 모두 KO 시킨 후 전환을 일시적으로 탐색하여 BLT가 어떻게 발생하는지 분석하였다.

[122] 또한, 도 3B 및 3C에 나타낸 바와 같이, BCL11A와 HDAC1/2를 모두 억제했을 때 내강 A형 유방암 관련 노드는 올라가고 기저양 유방암 관련 노드의 활성도는

내려가는 것을 알 수 있다.

[123]

[124] 실시예 4. **BCL11A** 및 **HDAC1/2**의 **KO** 이후 수정된 어트랙터의 동적 안정성

[125] 본 발명자들은 상기 네트워크 분석을 통하여 선별된 각 타겟 유전자를 제어했을 때 구축된 네트워크의 attractor landscape과 표현형의 landscape을 비교하였다.

[126] 상태의 동적 안정성을 조사하고 BLT에 대한 목표의 효과를 조사하기 위해 각 어트랙터의 유역을 수학적으로 분석하여 어트랙터 경관 분석을 수행하였다. 어트랙터는 네트워크 내 분자의 이진 활동으로 정의 할 수 있는 네트워크 모델 내의 상태이다.

[127] 또한, 결과물인 각 attractor의 표현형을 정의하여 해당 타겟 유전자가 각각 다른 두개의 세포주 특이적 네트워크에서 제어되었을 때 각 기저양형과 내강 A형 표현형이 얼마만큼의 비율을 차지하는지 계산하였다.

[128] 그 결과, 도 4에 나타낸 바와 같이, 각각의 유전자가 제어되었을 때보다 모두가 제어되었을 때 100%의 내강 A형으로 표현형이 바뀌는 것을 알 수 있다.

[129]

[130] 실시예 5. **BCL11A** 및 **HDAC1/2 KO**가 **ESR1 mRNA** 및 **ER α** 의 발현에 미치는 영향

[131] 본 발명자들은 **BCL11A** 및 **HDAC1/2 KO**가 **ESR1 mRNA** 및 **ER α** 의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 기저양형이면서 삼중 음성형 유방암 세포주인 **MDA-MB231(ER-/PR-/HER2-)** 및 **BT20(ER-/PR-/HER2-)** 세포 내 **BCL11A**와 **HDAC1/2** 유전자를 억제시켰을 때, **ESR1 mRNA** 및 **ER α** 의 발현 수준 변화를 확인하였다. 이 때, **BCL11A** 억제제로는 **BCL11A** 유전자를 타겟으로 설계한 **shBCL11A(GCATAGACGATGGCACTGTTA; 서열번호 1)**를 이용하였고, **HDAC1/2** 억제제로는 **HDAC1/2** 타겟 약물인 **romidepsin(R)**을 이용하였다.

[132] 억제제들을 처리한 후 **ESR1 mRNA**, **ER α** 및 다른 **EGFR** 관련 단백질 발현 변화를 관찰하였다.

[133] 그 결과, 도 5A 내지 도 5D에 나타낸 바와 같이, 각 유전자가 억제되었을 때 **ESR1 mRNA** 발현이 각 세포주에서 증가하고, 모두 억제되었을 때 보다 더욱 발현이 증가하는 것을 확인하였다.

[134] 또한, 시뮬레이션 분석 결과와 동일한 결과를 나타내는 지 확인하기 위하여 내강 A형의 마커 수용체인 **ER α** 의 단백질 발현 수준을 확인하였다.

[135] 그 결과, 도 5E 및 도 5F에 나타낸 바와 같이, 각 유전자가 억제되었을 때 **ER α** 발현 수준이 증가하였고, 모두 억제되었을 때 더욱 더 높은 단백질 양을 나타냈다.

[136] 즉, **BCL11A** 및 **HDAC1/2 KO**에 의해 기저양형이자 삼중음성형인 세포주가 내강 A형 세포주로 전환분화가 유도되어, 내강 A형의 특징인 **ESR1** 및 **ER α** 를 발현함을 알 수 있다.

- [137] 또한, EGFR-ERK1/2 세포 신호 경로에 의한 것인지, 각 세포주에서, EGFR과 ERK1/2 활성을 나타내는 인산화(phosphorylated) 수준을 측정했을 때, 발현이 감소한 것을 확인하였다.
- [138]
- [139] 실시예 6. BCL11A 및 HDAC1/2 KO 후 타목시펜 약물 반응
- [140] 본 발명자들은, 상기 실시예 5의 결과를 기반으로, BCL11A 및 HDAC1/2 KO에 의해 기저양형 세포주가 내강 A형 세포주로의 전환분화가 유도되어, ER α 를 표적으로 하는 항호르몬 치료에 민감해질 수 있음을 규명하기 위해, 기저양형이면서 삼중 음성형 유방암 세포주인 MDA-MB231 및 BT20 세포에 항호르몬 치료 제제로서 내강형 유방암 환자용 ER α 표적 약물인 타목시펜을 처리하였다.
- [141] 간략하게는 다음과 같다: 각 세포를 1×10^4 개씩 플레이팅해주고 (각 컨디션당 3 반복; triplicate) 24시간이 지난 후 타목시펜 (10 μ M) 약물을 처리 하여 72시간 동안 Incucyte을 이용하여 3시간 간격으로 사진을 찍으며 모니터링 해준다. 그 후 찍힌 사진의 세포의 confluency를 계산하여 세포의 다양한 약물에 대한 민감성을 그래프로 나타냈다.
- [142] 그 결과, 도 6A 내지 도 6D에 나타낸 바와 같이, 대조군 세포 (shScrambled)는 민감도를 나타내지 않았으며, shBCL11A를 사용한 BCL11A KD (넉다운) 세포와 romidepsin (HDAC1/2 inhibitor)을 사용한 HDAC1/2 억제 세포는 타목시펜(Tamoxifen; Tam)에 약간의 민감성을 나타냈다.
- [143] 반면, shBCL11A와 romidepsin을 모두 처리한 세포는 타목시펜에 대한 민감도가 가장 높았다.
- [144]
- [145] 실시예 7. BCL11A 및 HDAC1/2 과발현 후 타목시펜 약물 반응
- [146] 본 발명자들은 BCL11A 및 HDAC1/2 과발현(OE; over expression)시 인간 유방암 세포주 T47D 및 MCF7에서의 타목시펜 약물 반응을 확인하였다.
- [147] 그 결과, 도 7a 내지 7d에 나타낸 바와 같이, 내강 A형(ER+/HER2-)인 T47D 세포주에서 BCL11A 및/또는 HDAC1/2 과발현은 ESR1 mRNA 발현 수준의 극적인 변화를 나타내지 않았다.
- [148] 반면, BCL11A 또는 HDAC1/2 과발현 후에 증가된 ER α 단백질 발현, 감소된 인산화 EGFR 및 인산화 ERK1/2가 관찰되었다. 이들 유전자가 T47D 세포에서 조합되어 과발현되었을 때 그들의 효과는 상승적이었다.
- [149] 또한, 도 7e 내지 도 7g에 나타낸 바와 같이, BCL11A 및 HDAC1/2 과발현 이후 내강 A형 세포에서 감소된 ER α 단백질의 발현 수준은 내강 A형 세포가 타목시펜에 반응하지 않는 기저양형 세포로 리프로그래밍되었음을 시사한다.
- [150] 또한, 대조군 세포가 타목시펜에 반응하는 동안, BCL11A-OE, HDAC1/2-OE 또는 모두 과발현시킨 세포에서는 타목시펜에 대한 민감성을 나타내지 않았다.
- [151] 또한, 도 7H 내지 7K에 나타낸 바와 같이, 또 다른 내강 A형(ER+/HER2-)인

MCF7 세포주에서도 동일한 결과를 확인할 수 있었다.

- [152] 이러한 결과는 BCL11A와 HDAC1/2 OE 모두 ERK1/2 및 EGFR의 상향조절된 활성과 ER α 의 하향조절된 발현을 통해 역-BLT를 유도할 수 있음을 의미한다.
- [153] 이에, 해당 유전자들을 내강 A형 세포주에서 과발현시키는 경우, 기저양형의 성질을 획득할 수 있음을 알 수 있다.
- [154]
- [155] 결론적으로, 본 발명의 타겟 유전자들을 억제함으로써 BLT를 유발하여 악성 유방암 유형을, 타목시펜과 같은 ER α 표적 약물에 반응하는 내강 A형으로 리프로그래밍하고, 내강 A형 환자들의 치료목적으로 쓰이는 종래 약물을 이용하여, 항암 화학요법 외에, 효과적인 항호르몬 치료 효과를 보장할 수 있다.
- [156]
- [157] **실시예 8. BCL11A 및 HDAC1/2 발현에 따른 환자의 생존율**
- [158] 본 발명자들은 추가적으로 METABRIC 및 TCGA 데이터 베이스를 분석하여 BCL11A 및 HDAC1/2 발현이 환자의 생존율에 미치는 영향을 확인하였다.
- [159] 그 결과, 도 8A 내지 도 8R에 나타난 바와 같이, METABRIC 및 TCGA 데이터 베이스에서 과발현된 BCL11A, HDAC1 또는 HDAC2 암세포를 가진 환자는, 이들에 비해 상대적으로 저발현된 BCL11A, HDAC1 또는 HDAC2 암세포를 가진 환자보다 현저하게 낮은 생존율을 보였다.
- [160] 즉, 이러한 증가된 ESR1 mRNA 및 ER α 단백질 발현과 타목시펜에 대한 약물 반응을 통해, BCL11A와 HDAC1/2의 고갈이 환자에서도 BLT를 유도할 수 있음을 제시한다.
- [161]
- [162] **실시예 9. BCL11A 및 HDAC1/2 발현에 따른 환자의 타목시펜 약물 반응**
- [163] 본 발명자들은 추가적으로 Gene Set Variation Analysis (GSVA)를 분석하여 BCL11A 및 HDAC1/2 발현이 유방암 환자의 타목시펜 약물 반응에 미치는 영향을 확인하였다.
- [164] 그 결과, 도 9A 나타낸 바와 같이, BCL11A와 HDAC1/2 발현이 높은 환자군에 비해 두 유전자의 발현이 낮은 환자군이 타목시펜 약물에 더 높은 민감성을 나타냈다.
- [165] 또한, 도 9B 및 도 9C에 나타난 바와 같이, BCL11A와 HDAC1/2 과발현 환자군의 유전자 발현 패턴은, EGFR 신호전달경로 혹은 기저양 유전자군에서 두드러져(enrich) 있는 반면, BCL11A와 HDAC1/2 저발현 환자군의 유전자 발현 패턴은, ER 신호전달경로 혹은 내강 A형 유전자군에서 두드러져 있었다.
- [166]
- [167] 따라서, 이러한 결과들은, 임상에서 기저양 유방암 또는 삼중 음성 유방암과 같은 ER 음성인 악성 유방암을 가진 환자를 대상으로, 치료 전에, 타겟 유전자로서 BCL11A와 HDAC1/2 발현 수준을 분석 및 조절(억제)함으로써, 에스트로젠 수용체 알파(ER α) 발현으로 항-ER α 요법이 가능한 내강 A형으로

리프로그래밍한 후, 종래 내강 A형 환자들의 치료 약물을 이용하여, 효과적인 항호르몬 치료 효과를 달성할 수 있음을 입증한다.

[168]

[169] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

청구범위

- [청구항 1] BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 억제제 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2) 억제제를 유효성분으로 포함하는, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성(Negative) 유방암의 내강형(Luminal) 유방암으로의 전환분화(transdifferentiation)용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 ER-음성 유방암은, 프로그스테론 수용체(progesterone receptor; PR) 및 인간 상피세포 성장인자 수용체 2(human epidermal factor receptor 2; HER2)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이 음성인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 3] 제1항에 있어서,
상기 ER-음성 유방암은 삼중 음성 유방암(Triple-Negative Breast Cancer, TNBC) 또는 기저양 유방암(basal-like breast cancer, BLBC)인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 4] 제1항에 있어서,
상기 내강형 유방암은 내강 A형(Luminal A) 및 내강 B형(Luminal B)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 5] 제1항에 있어서,
상기 BCL11A 억제제는 BCL11A 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이고;
상기 HDAC1/2 억제제는, HDAC1/2 유전자의 mRNA에 상보적으로 결합하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, siRNA(small interference RNA), shRNA(short hairpin RNA), miRNA(microRNA) 및 리보자임(ribozyme)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 6] 제1항에 있어서,
상기 BCL11A 억제제는, BCL11A 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질유사체, 앵타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상이고;
상기 HDAC1/2 억제제는, HDAC1/2 단백질에 특이적으로 결합하는 화합물, 펩티드, 펩티드 모방체, 기질유사체, 앵타머 및 항체로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 7] 제1항에 있어서,
상기 BCL11A 억제제 및 HDAC1/2 억제제는, EGFR(Epidermal growth factor receptor) 및 ERK1/2(Extracellular signal-regulated kinase 1/2)의 발현

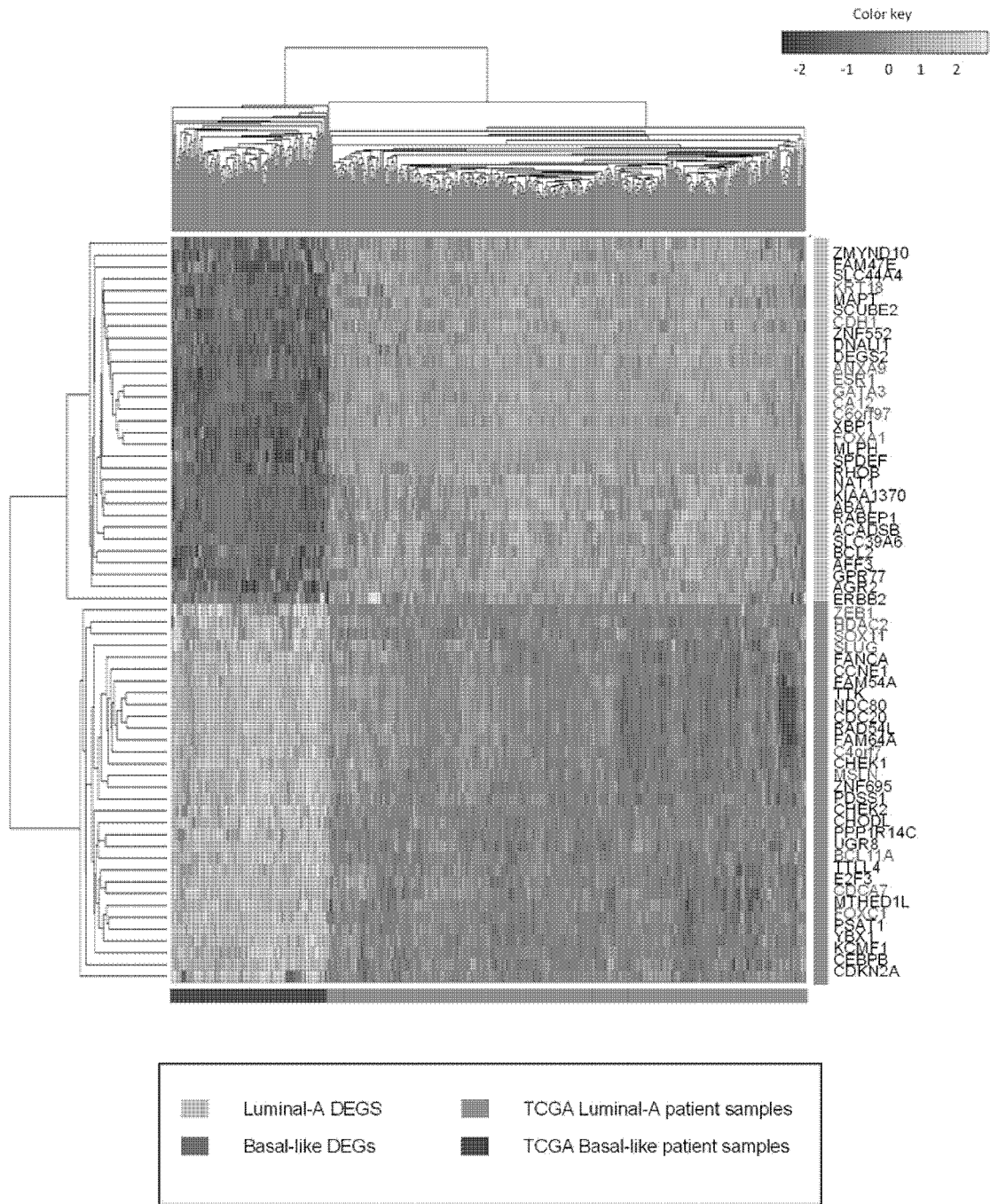
- 수준 또는 활성을 감소시키고; ER α (Estrogen receptor alpha)의 발현 수준 또는 활성은 증가시키는 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 8] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 전환분화용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 항암제 민감성 증진용 조성물.
- [청구항 9] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 전환분화용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 항암 보조제.
- [청구항 10] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 전환분화용 조성물; 및 항암제를 유효성분으로 포함하는, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 치료 또는 예방용 약학적 조성물.
- [청구항 11] 제10항에 있어서,
상기 항암제는 선택적 에스트로겐 수용체 조절자(SERM), 선택적 에스트로겐 수용체 분해제(SERD) 및 아로마타제 억제제(AI)로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 12] 제11항에 있어서,
상기 항암제는 ER α 표적 제제인 선택적 에스트로겐 수용체 조절자(SERM) 또는 선택적 에스트로겐 수용체 분해제(SERD)인 것을 특징으로 하는, 조성물.
- [청구항 13] BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 억제제 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2) 억제제를 유효성분으로 포함하는 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 예방 또는 개선용 식품 조성물.
- [청구항 14] BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 억제제 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2) 억제제를, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암 세포에 처리하는 단계를 포함하는, 에스트로겐 수용체-음성 유방암의 내강 형(Luminal) 유방암으로의 인 비트로 전환분화(transdifferentiation) 유도 방법.
- [청구항 15] 다음 단계를 포함하는, 에스트로겐 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 항암제 민감성 증진용 약물의 스크리닝 방법:
(a) 분리된 ER-음성 유방암 세포에 후보물질을 처리하는 단계;
(b) 상기 후보물질이 처리된 ER-음성 유방암 세포에서 BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2)의 발현 수준을 측정하는 단계; 및
(c) 상기 (b) 단계에서 측정된 BCL11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A) 및 HDAC1/2(Histone deacetylase 1/2)의 발현 수준이, 후보물질이 처리되지 않은 분리된 악성 유방암 세포에 비해 낮은 경우, 상기 후보물질을 ER-음성 유방암의 항암제 민감성 증진용 약물로 사용할 수 있을 것으로

판정하는 단계.

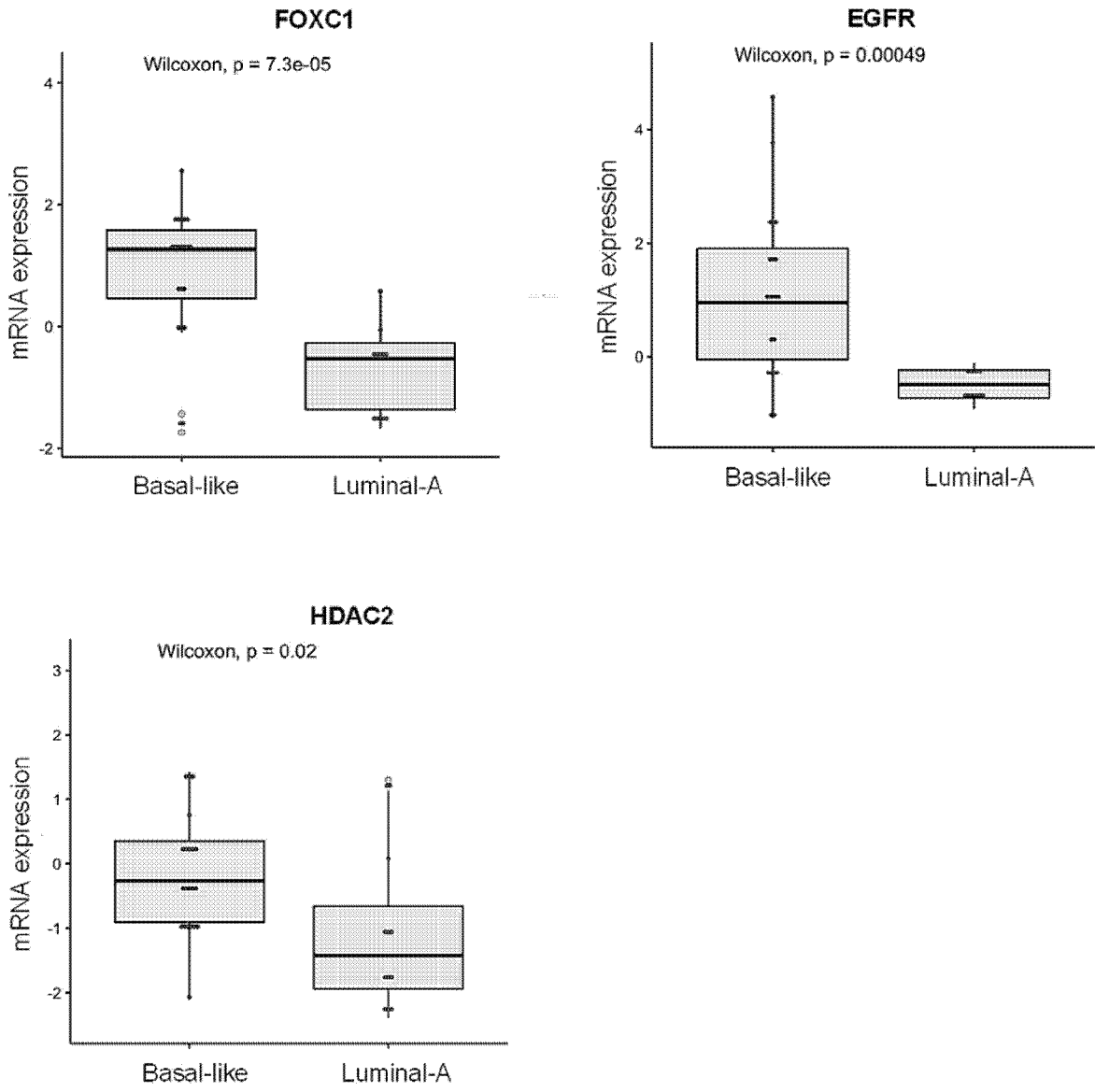
[청구항 16] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 전환분화용 조성물을 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성(Negative) 유방암의 내강형(Luminal) 유방암으로의 전환분화(transdifferentiation) 방법.

[청구항 17] 제1항 내지 제7항 중 어느 한 항의 전환분화용 조성물; 및 항암제를 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 에스트로젠 수용체(estrogen receptor; ER)-음성 유방암의 치료 또는 예방 방법.

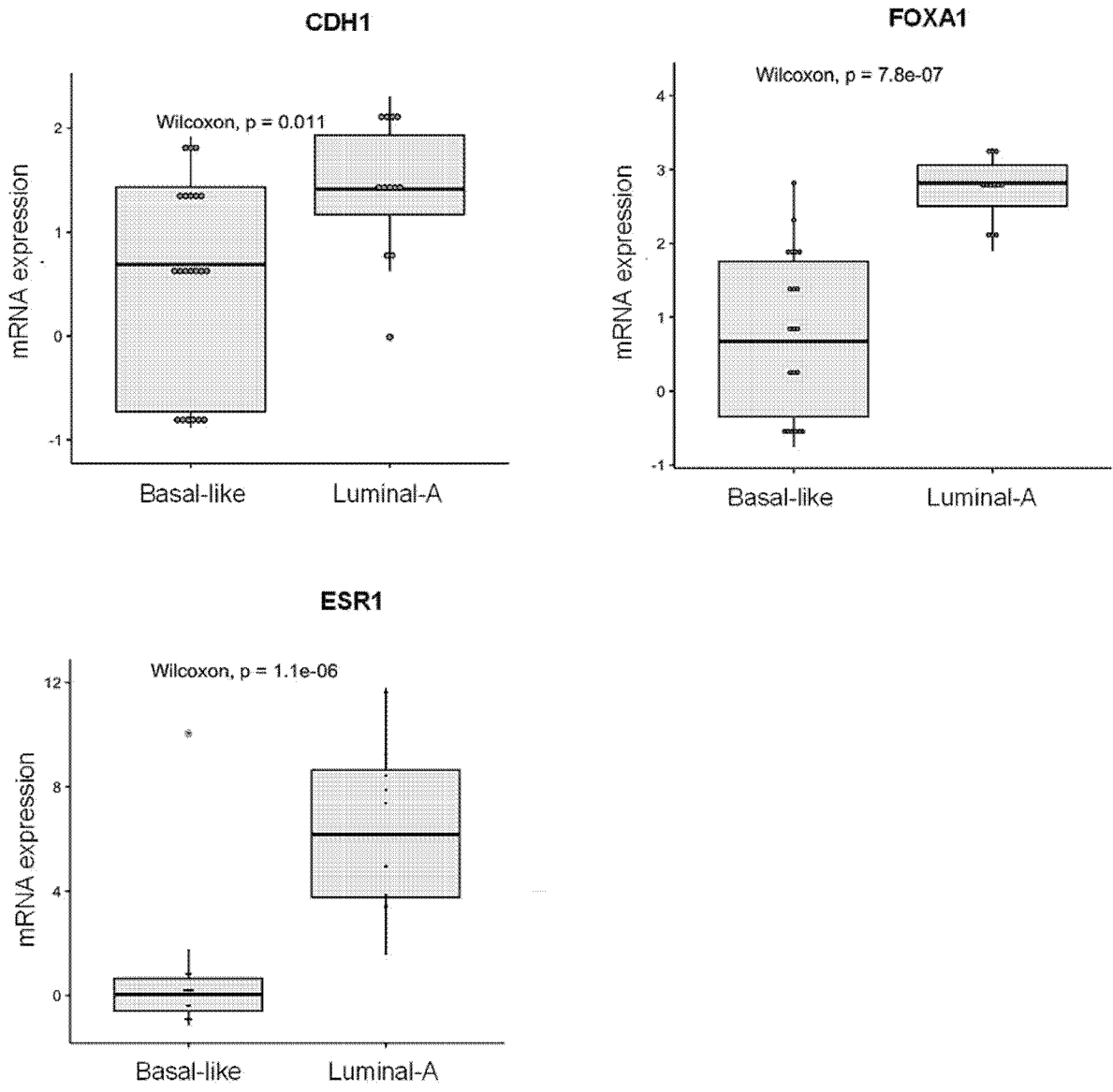
[도 1a]



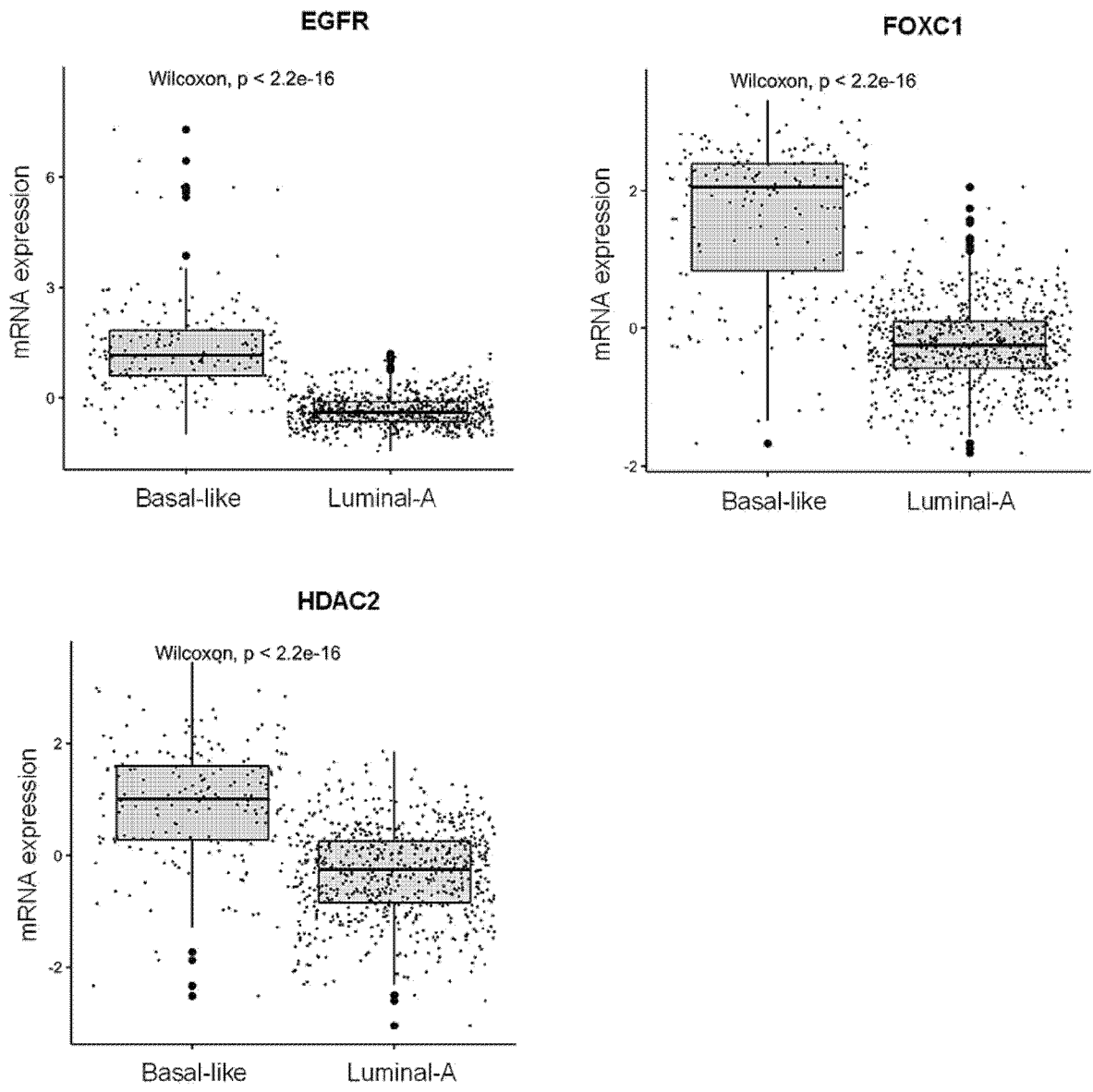
[Figure 1b]



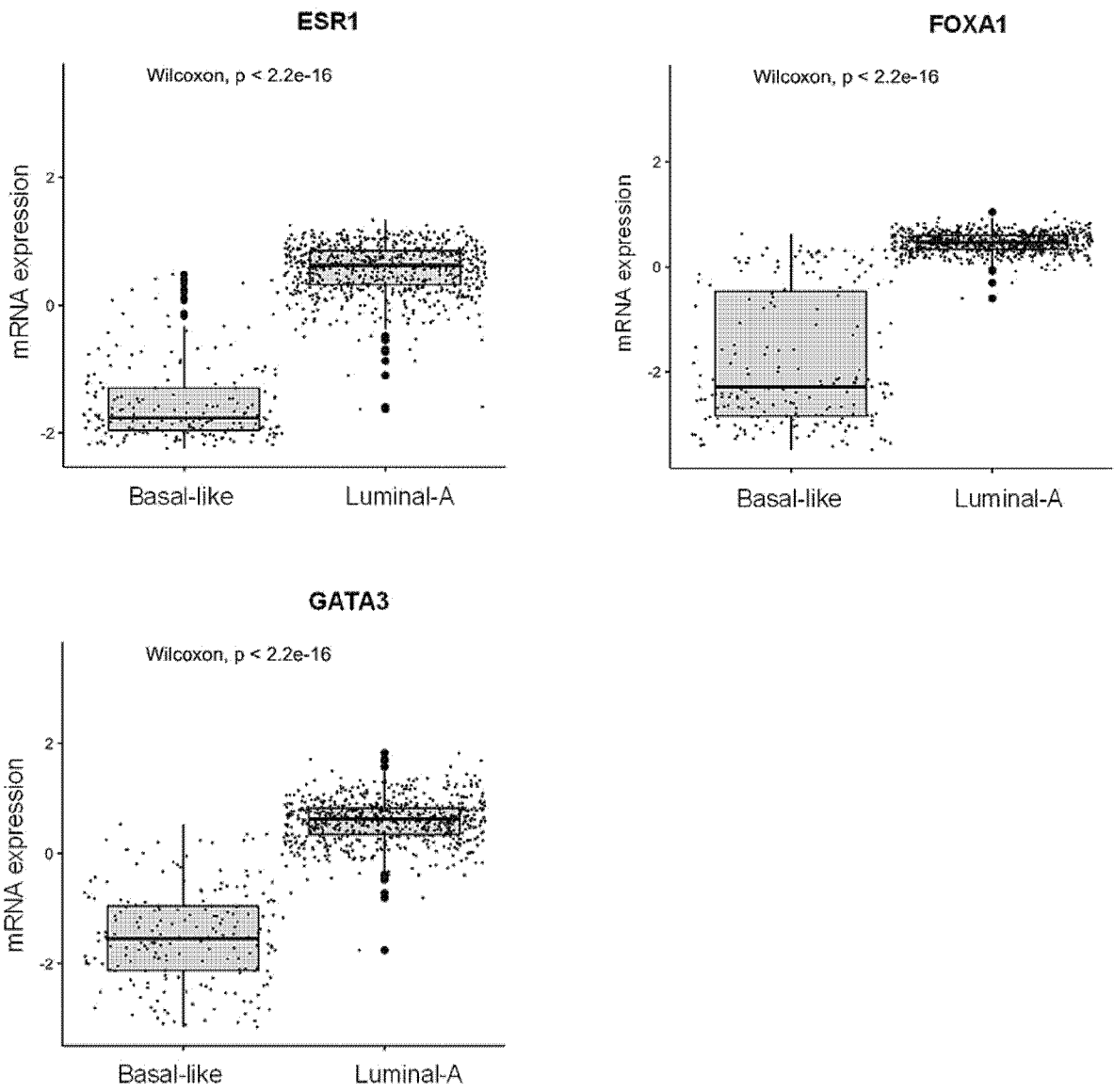
[Figure 1c]



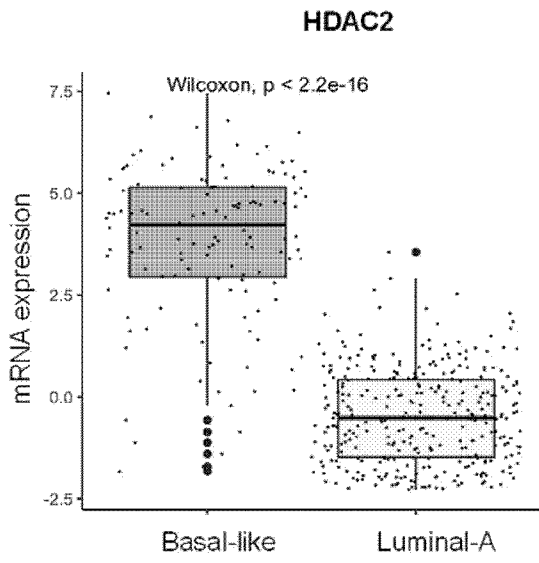
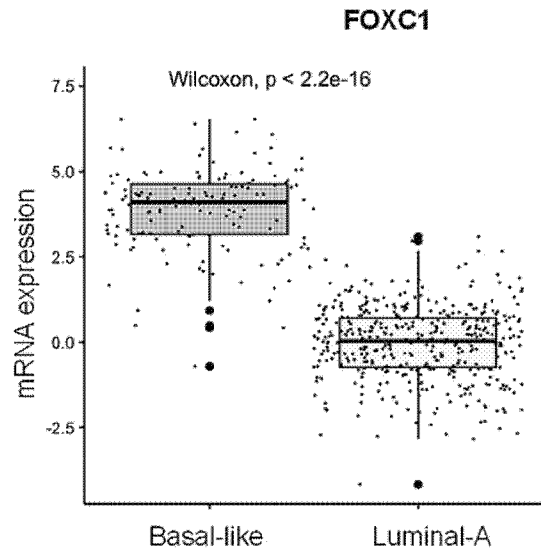
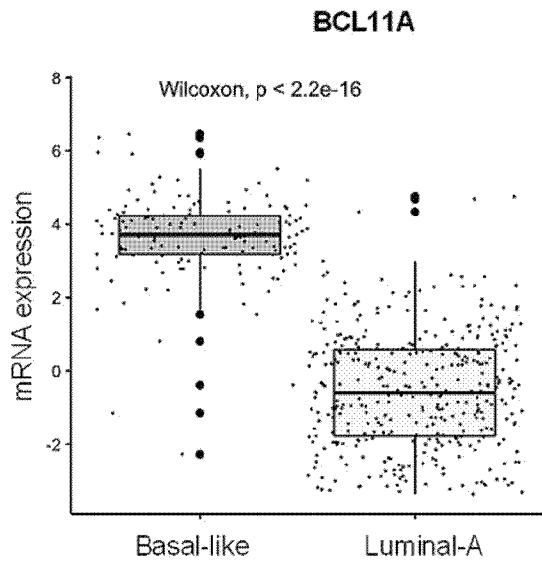
[Figure 1d]



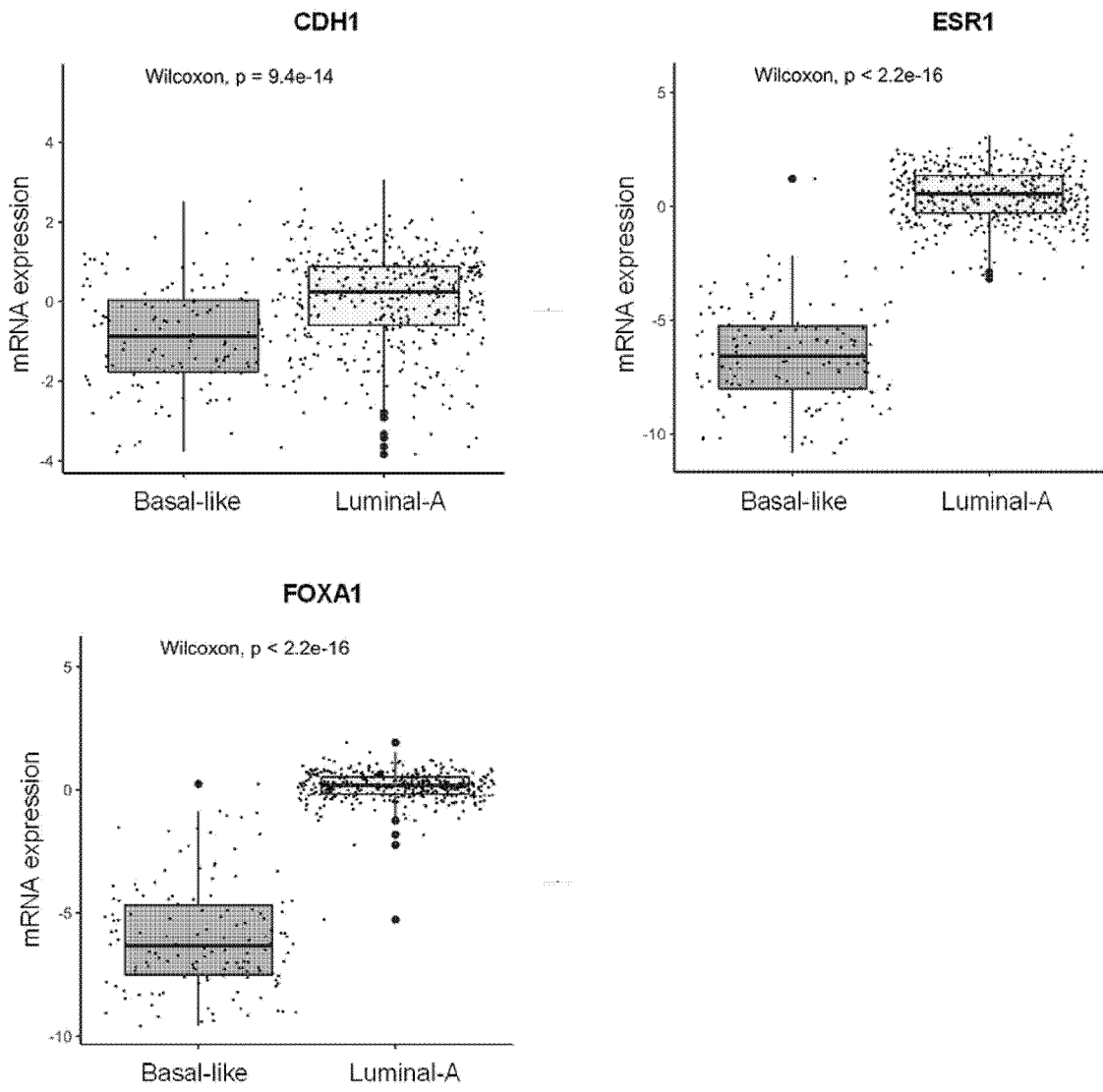
[Figure 1e]



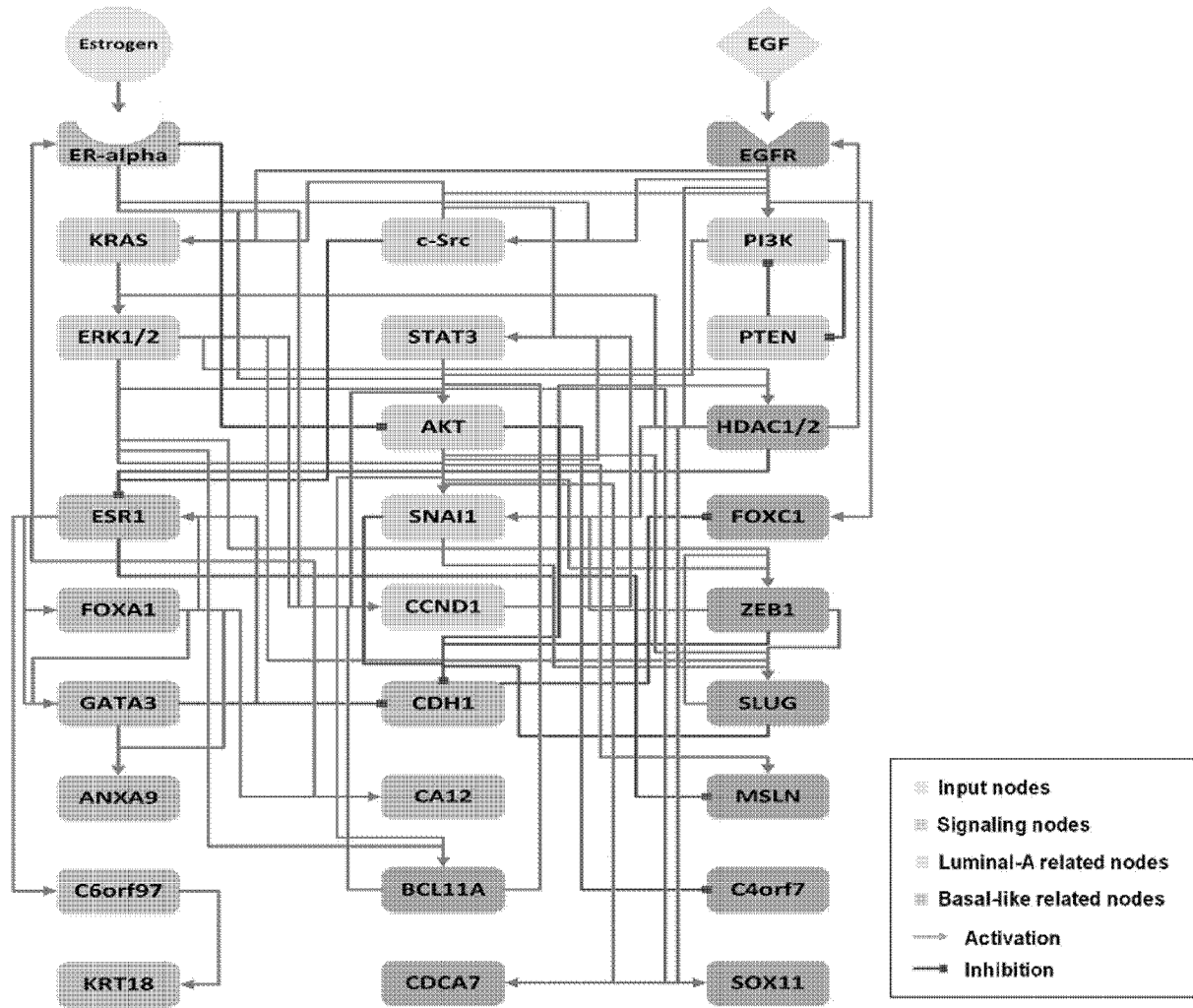
[Figure 1f]



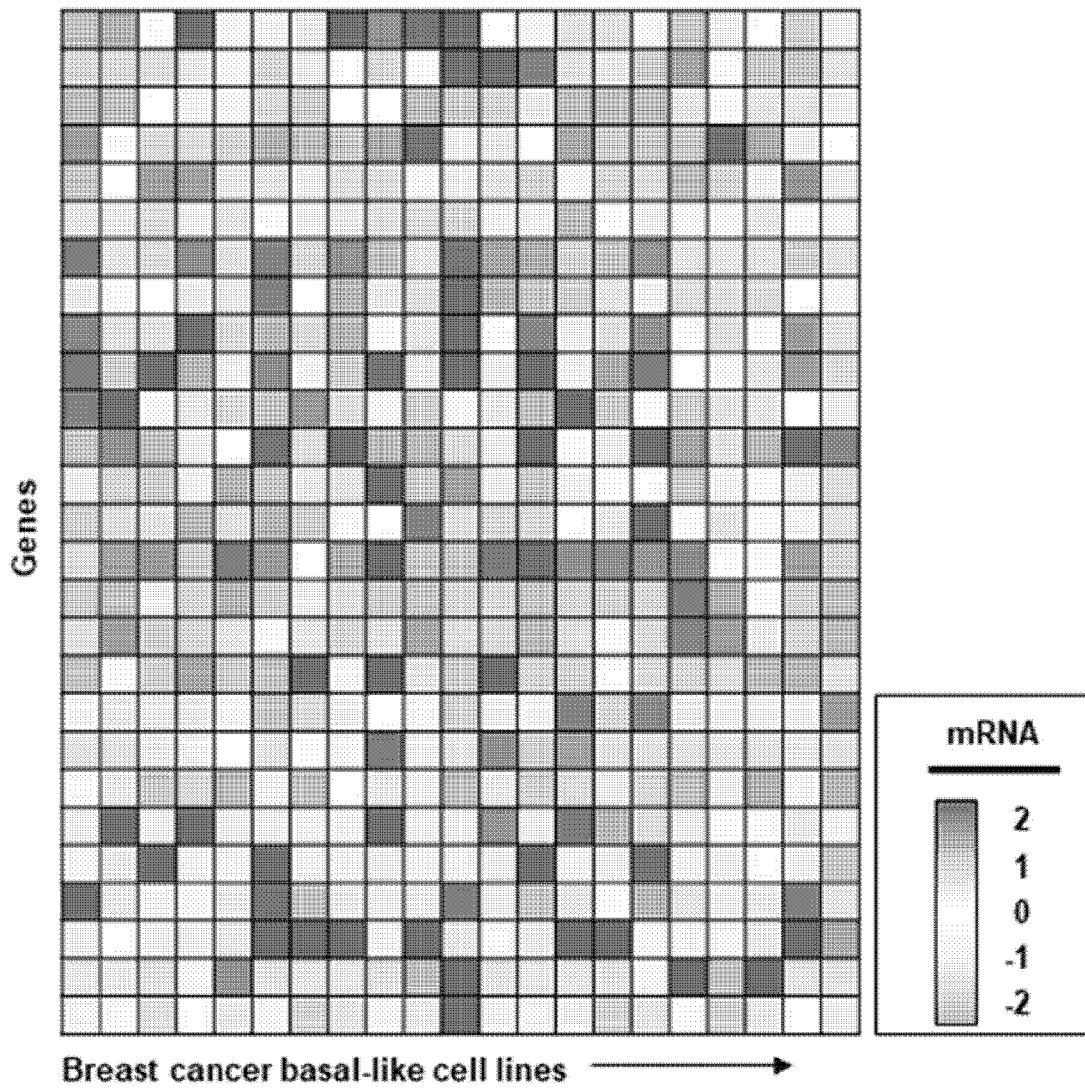
[표 1g]



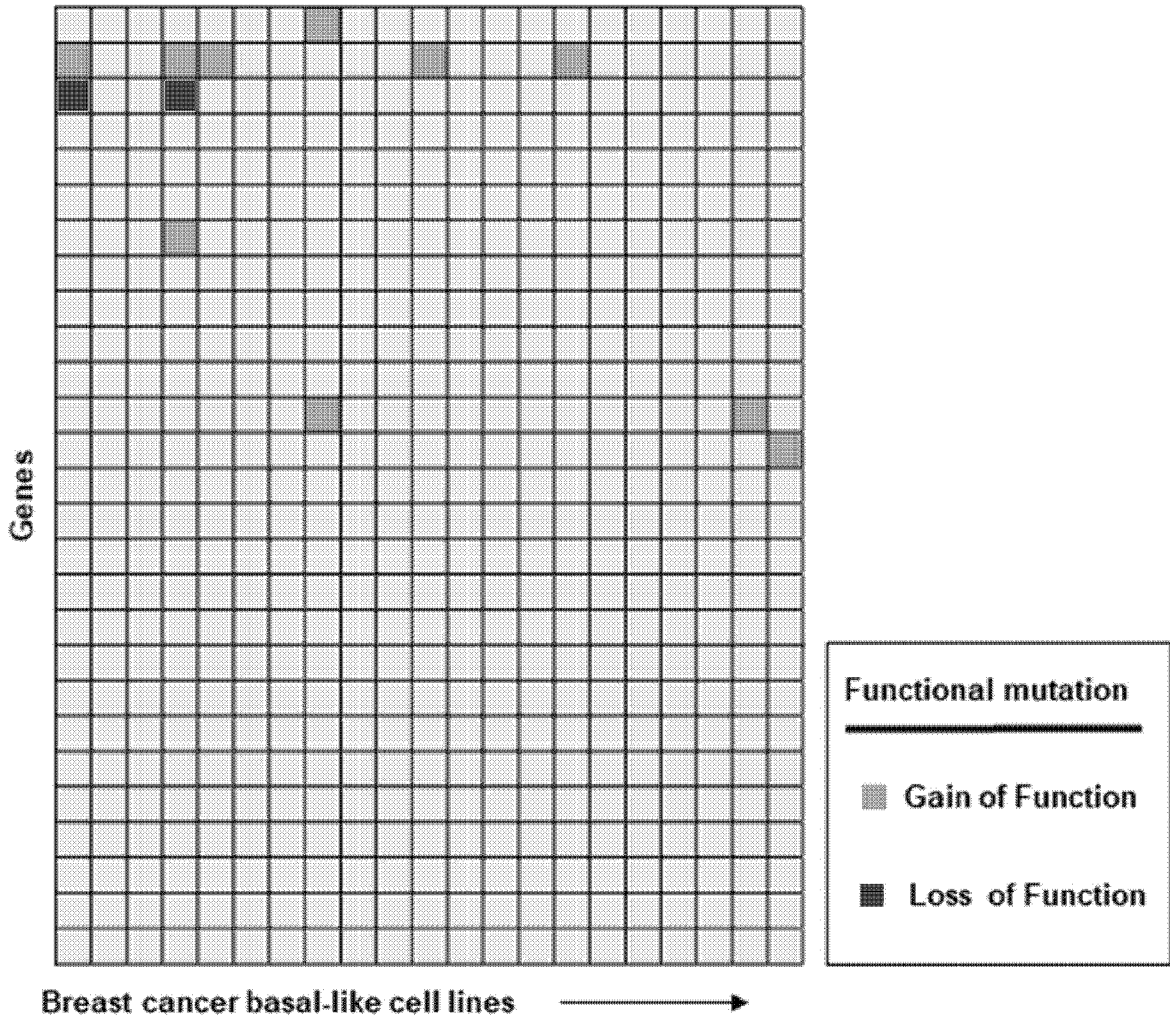
[도2a]



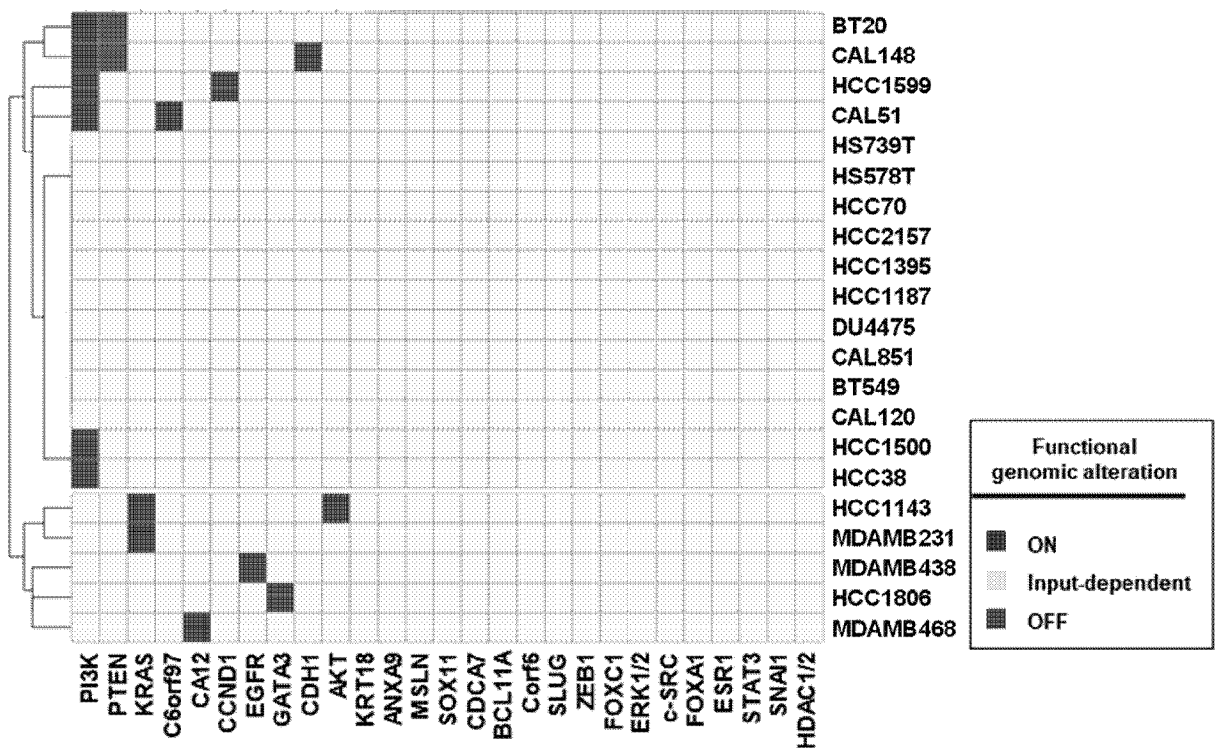
[도2c]



[도2d]

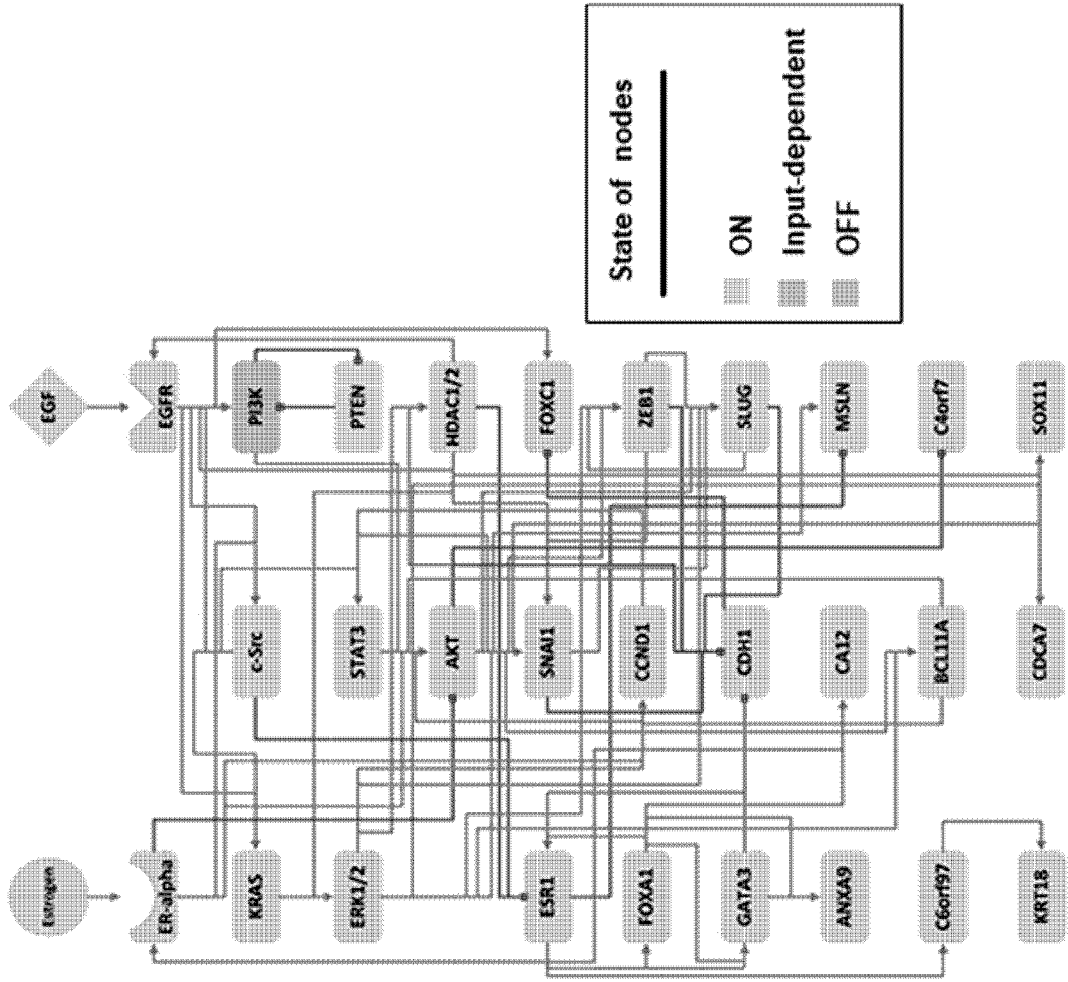


[도2e]

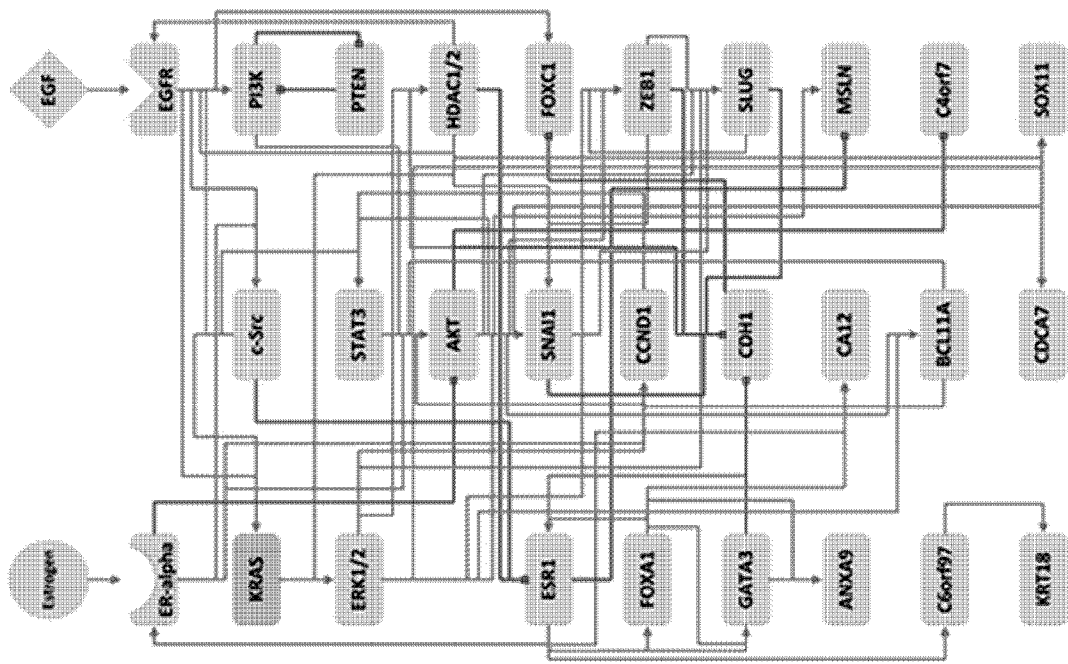


[도2f]

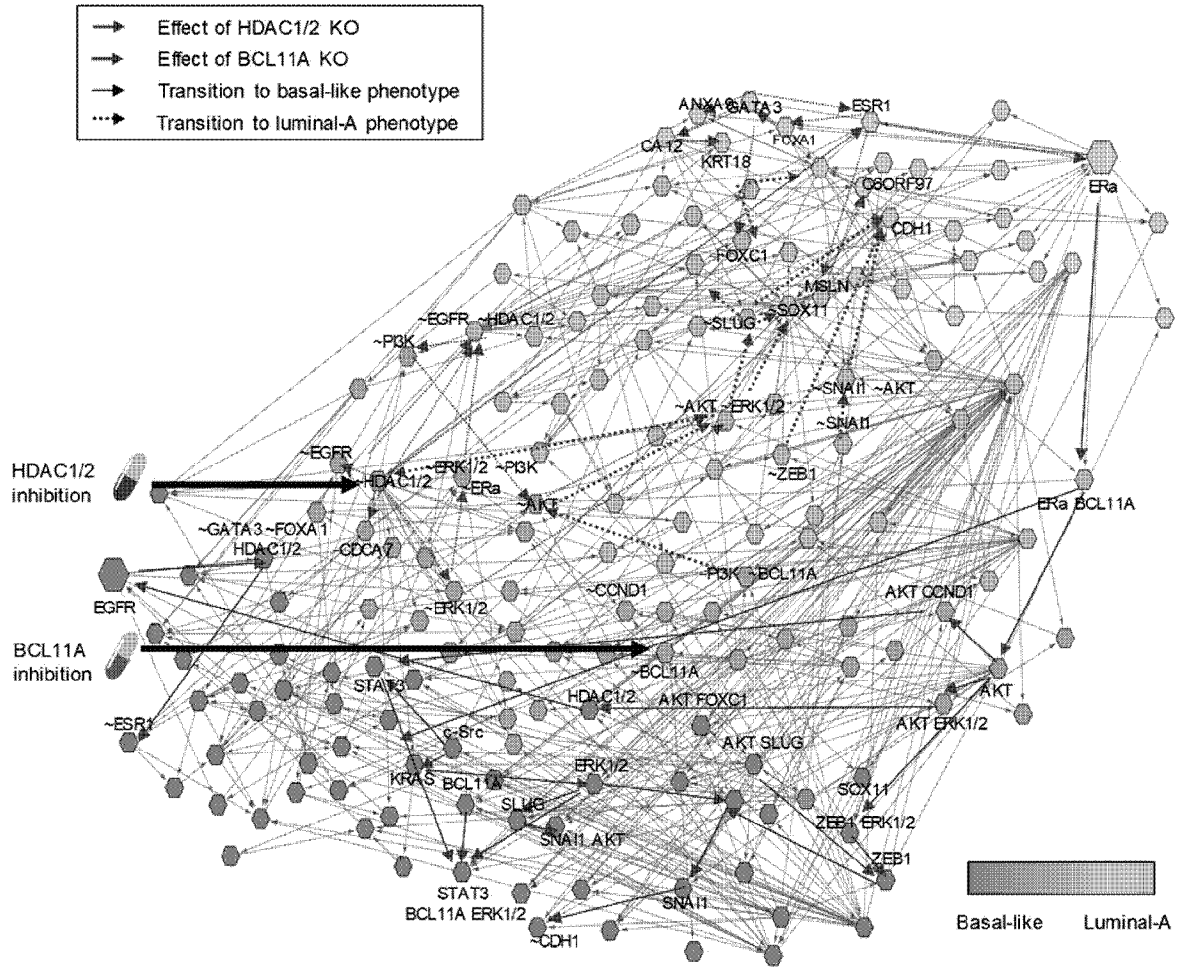
BT20 Network



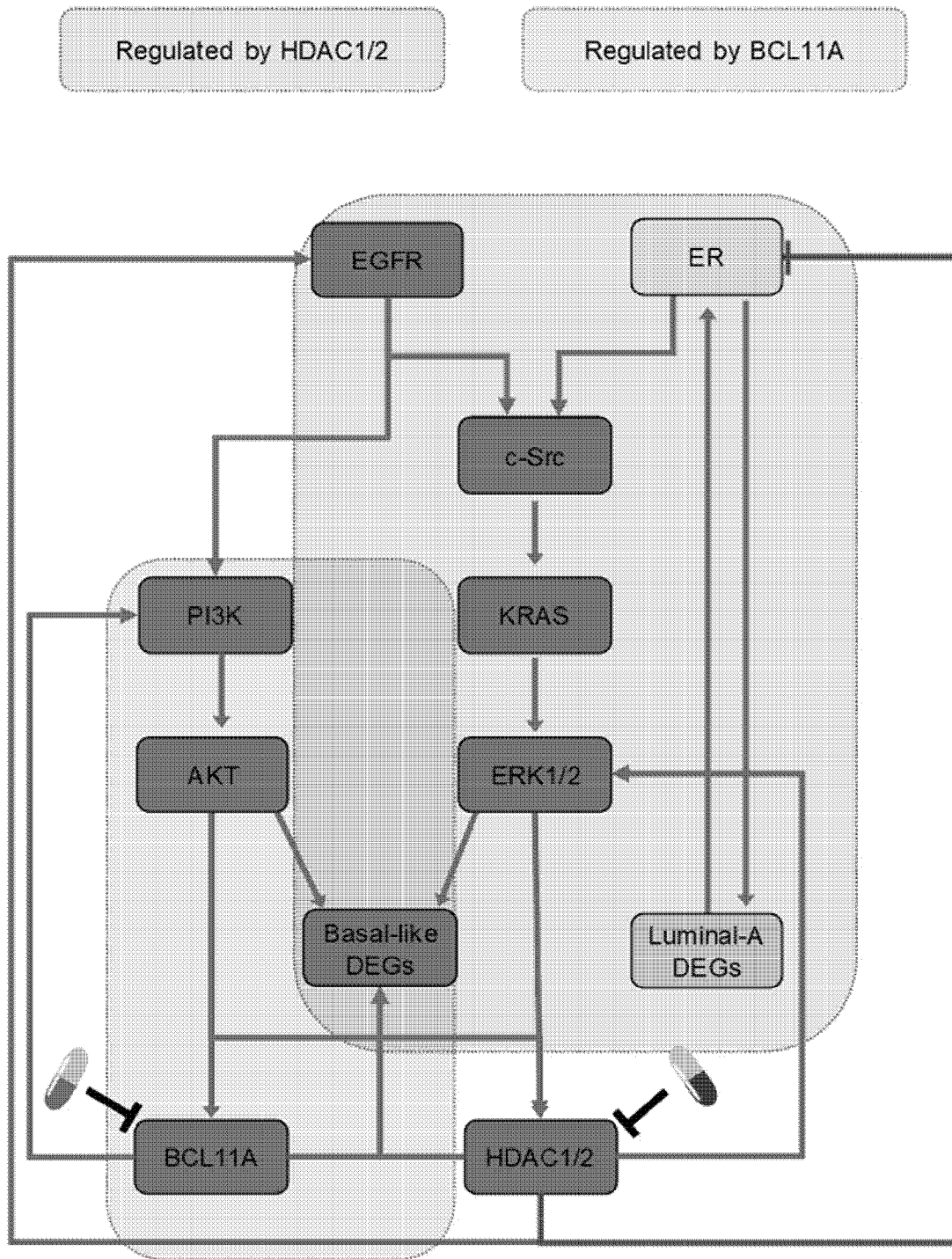
MDA-MB231 Network



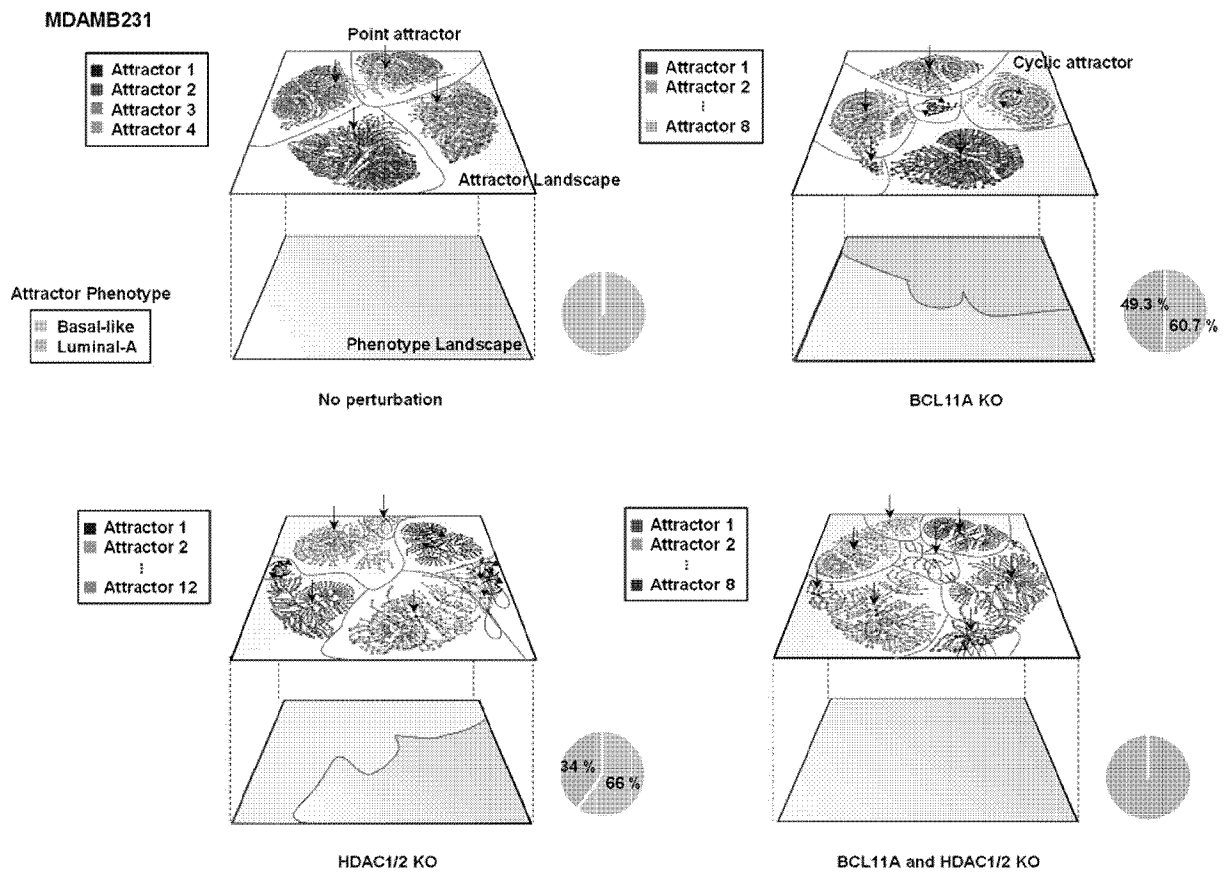
[도3a]



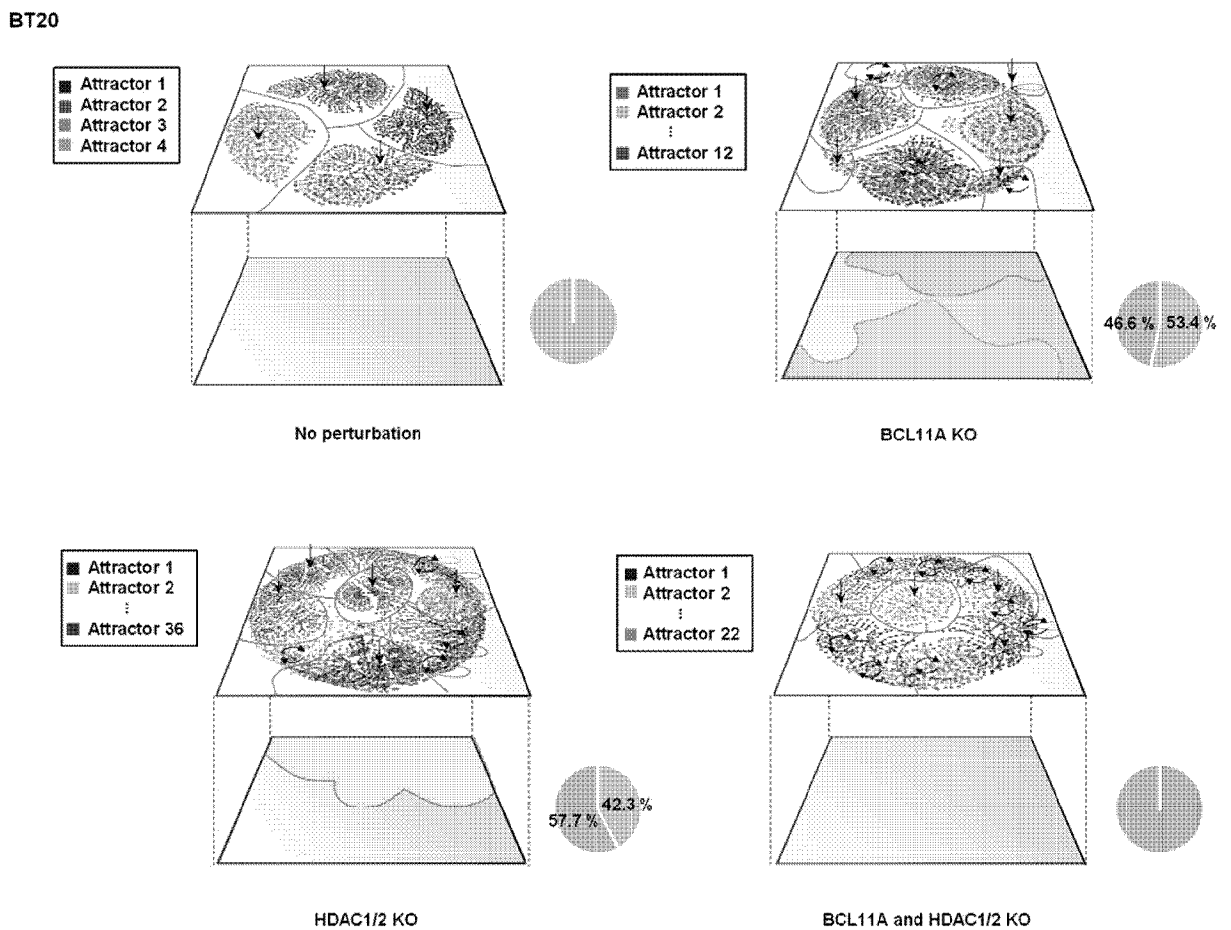
[도3c]



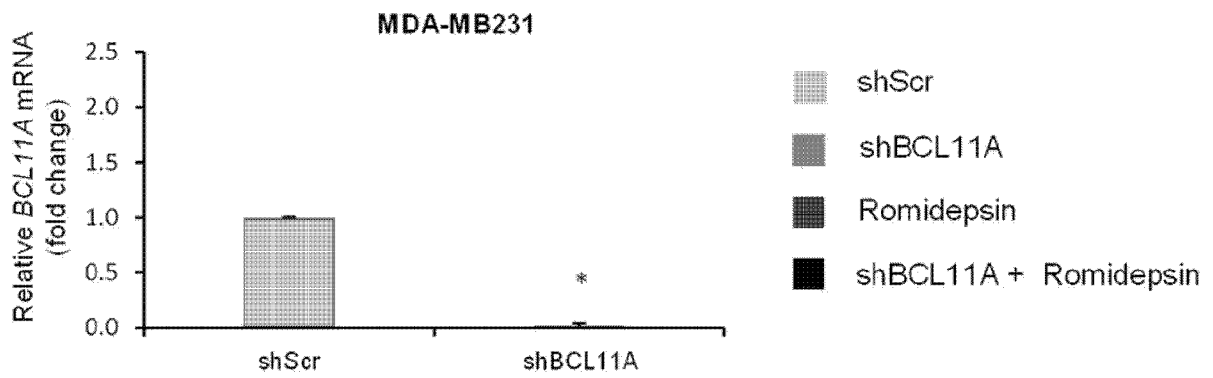
[도4a]



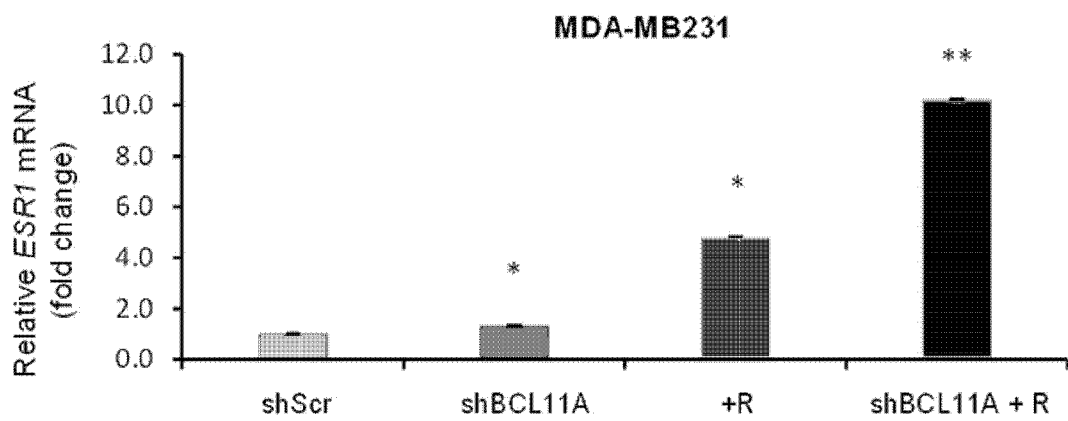
[도4b]



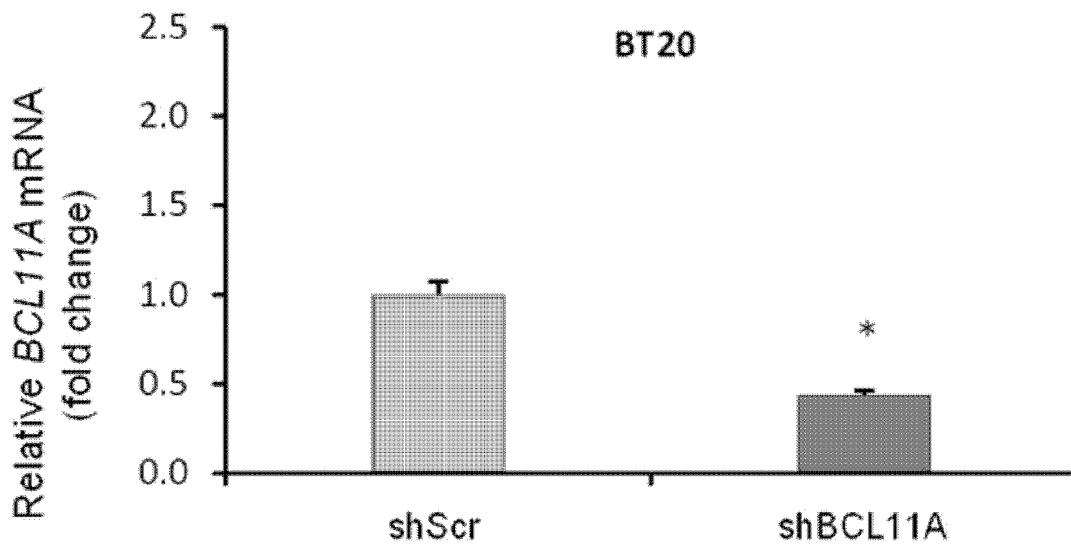
[도5a]



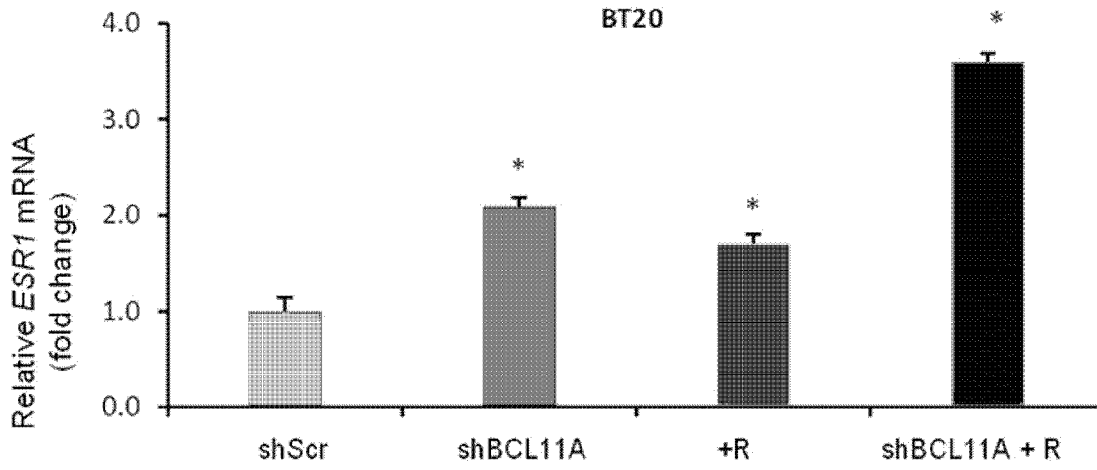
[도5b]



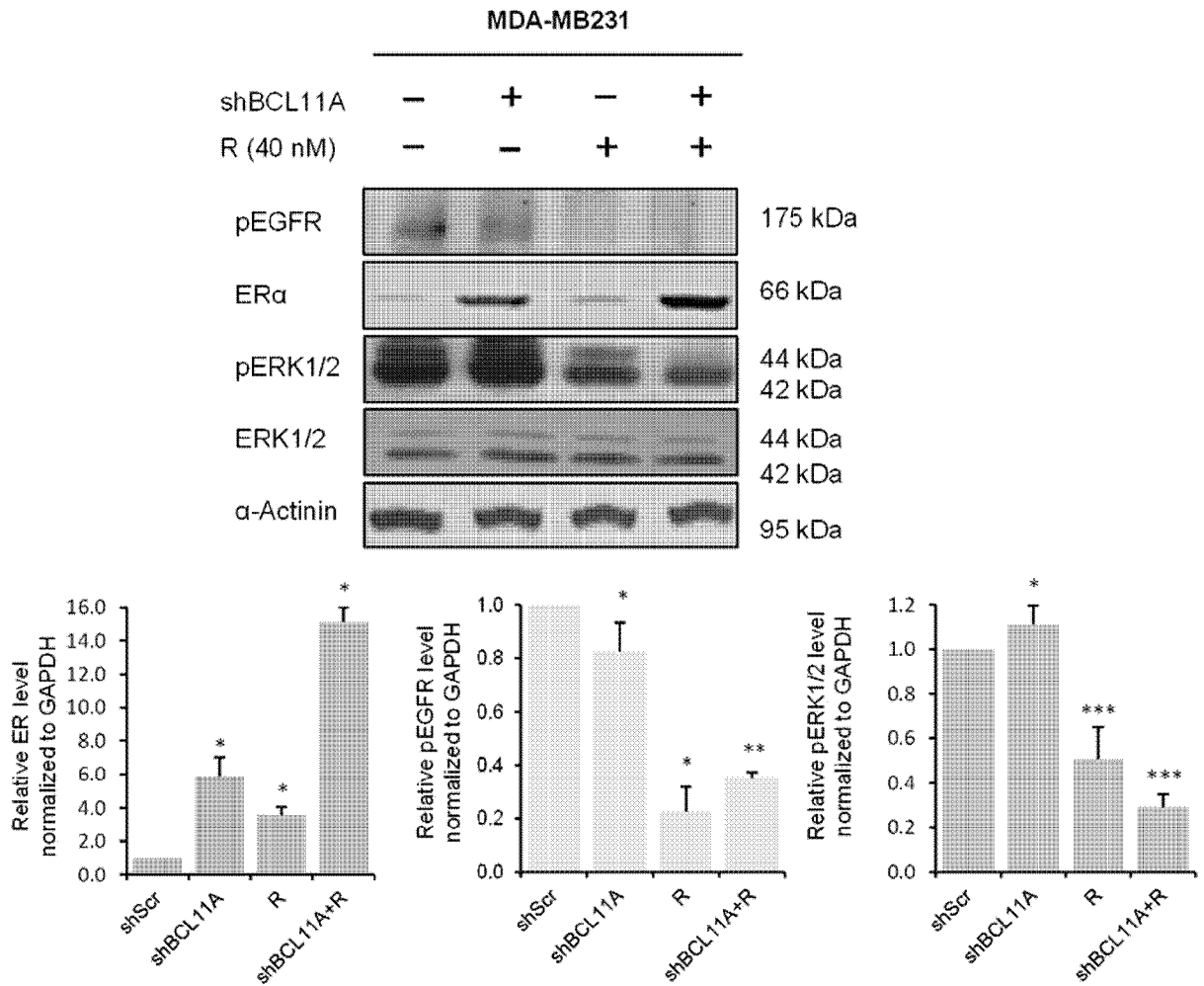
[도5c]



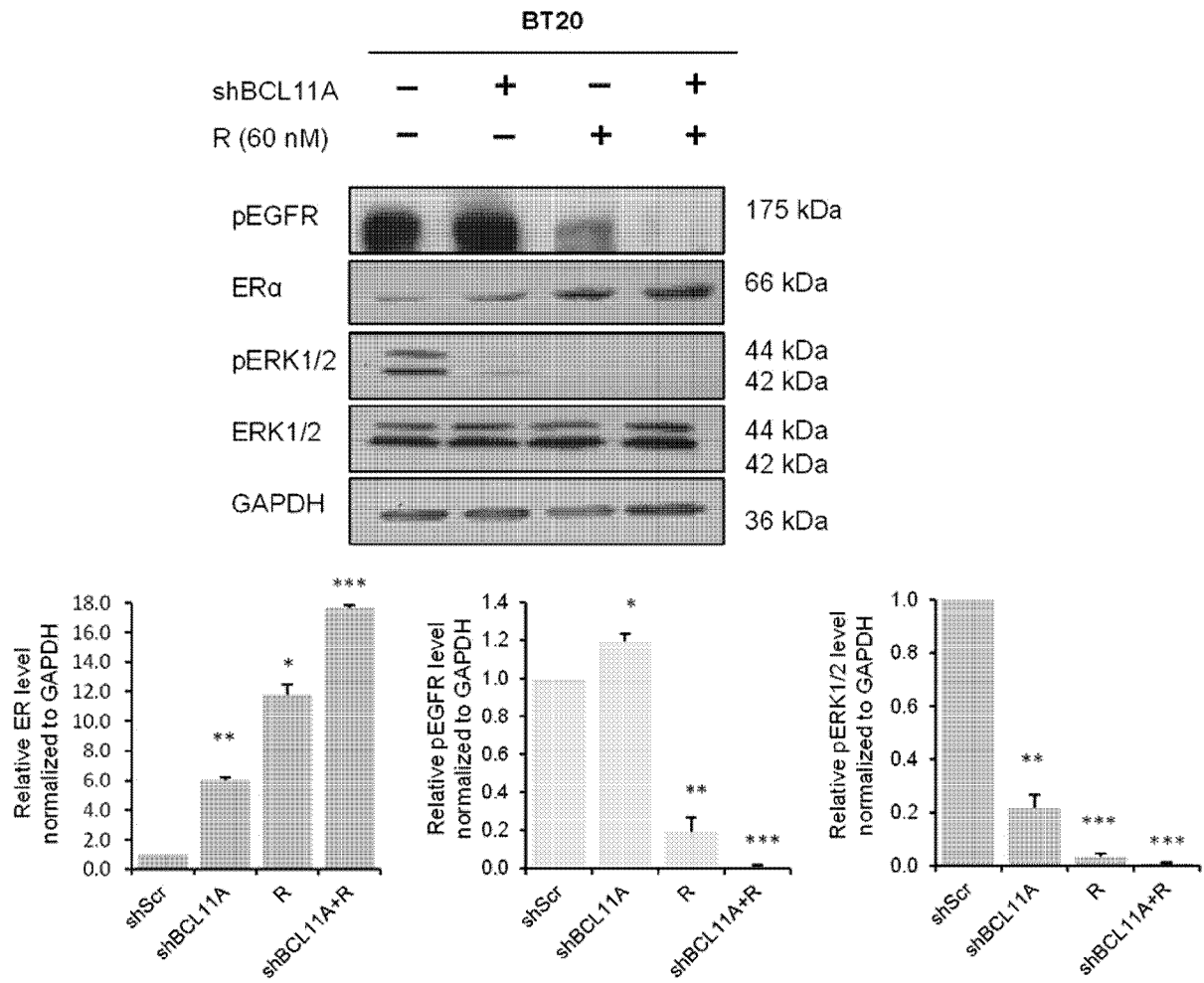
[도5d]



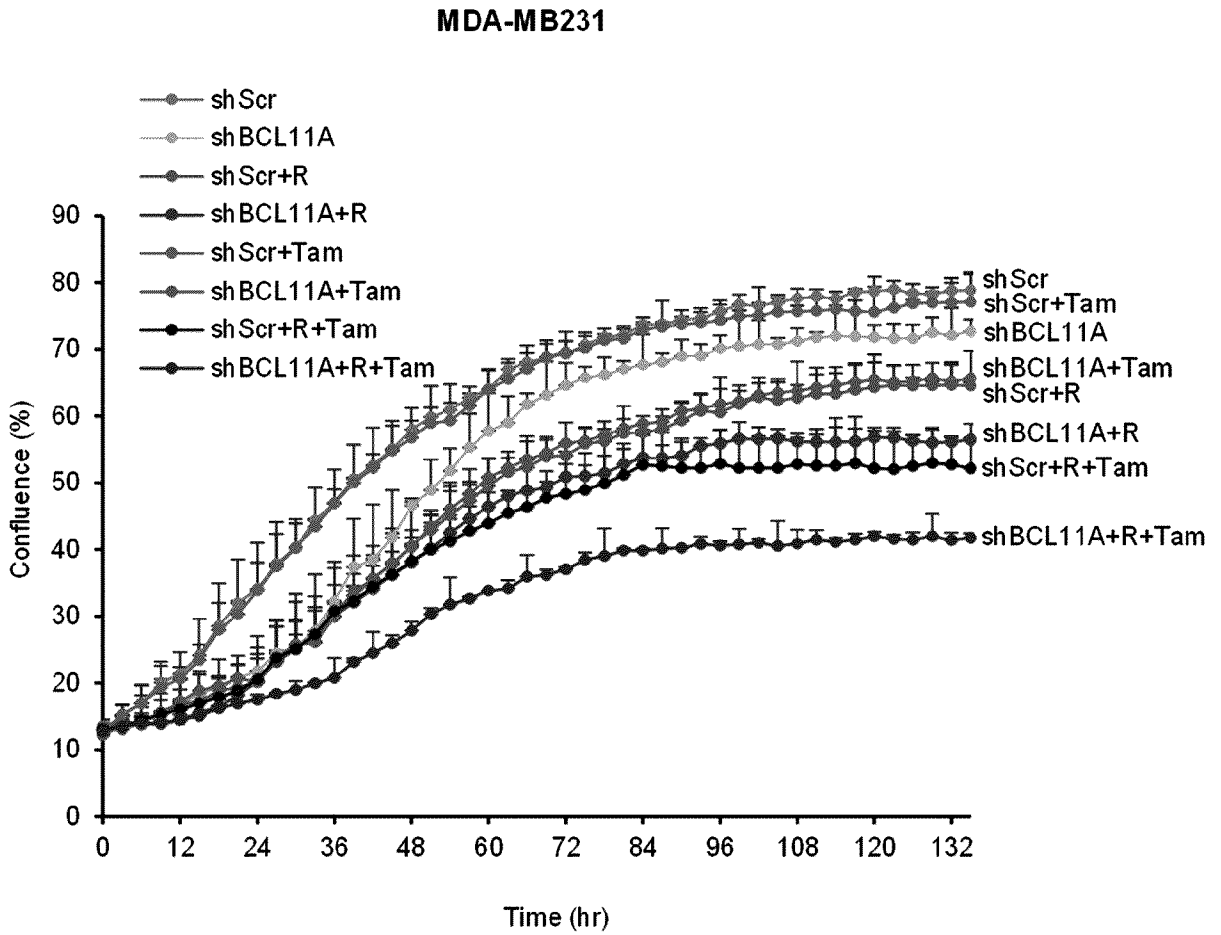
[도5e]



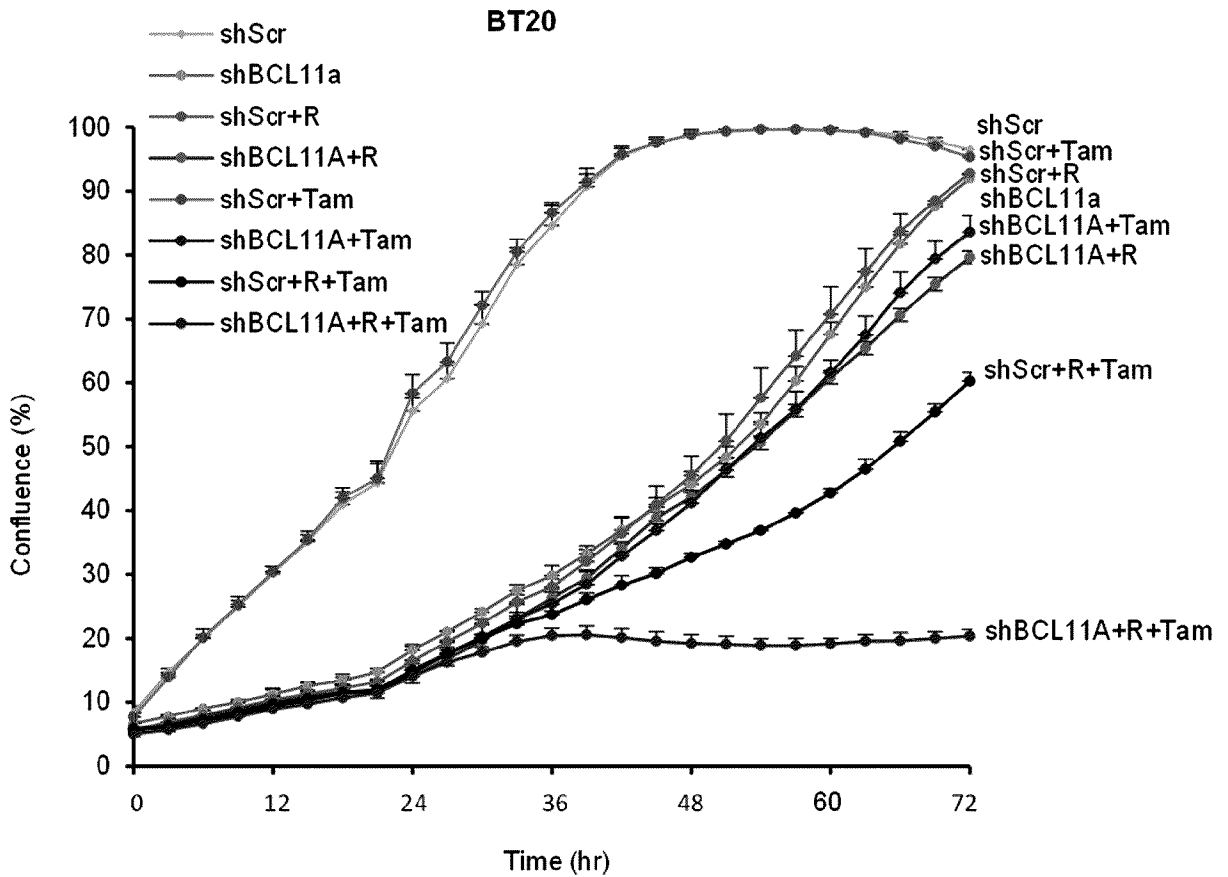
[도5f]



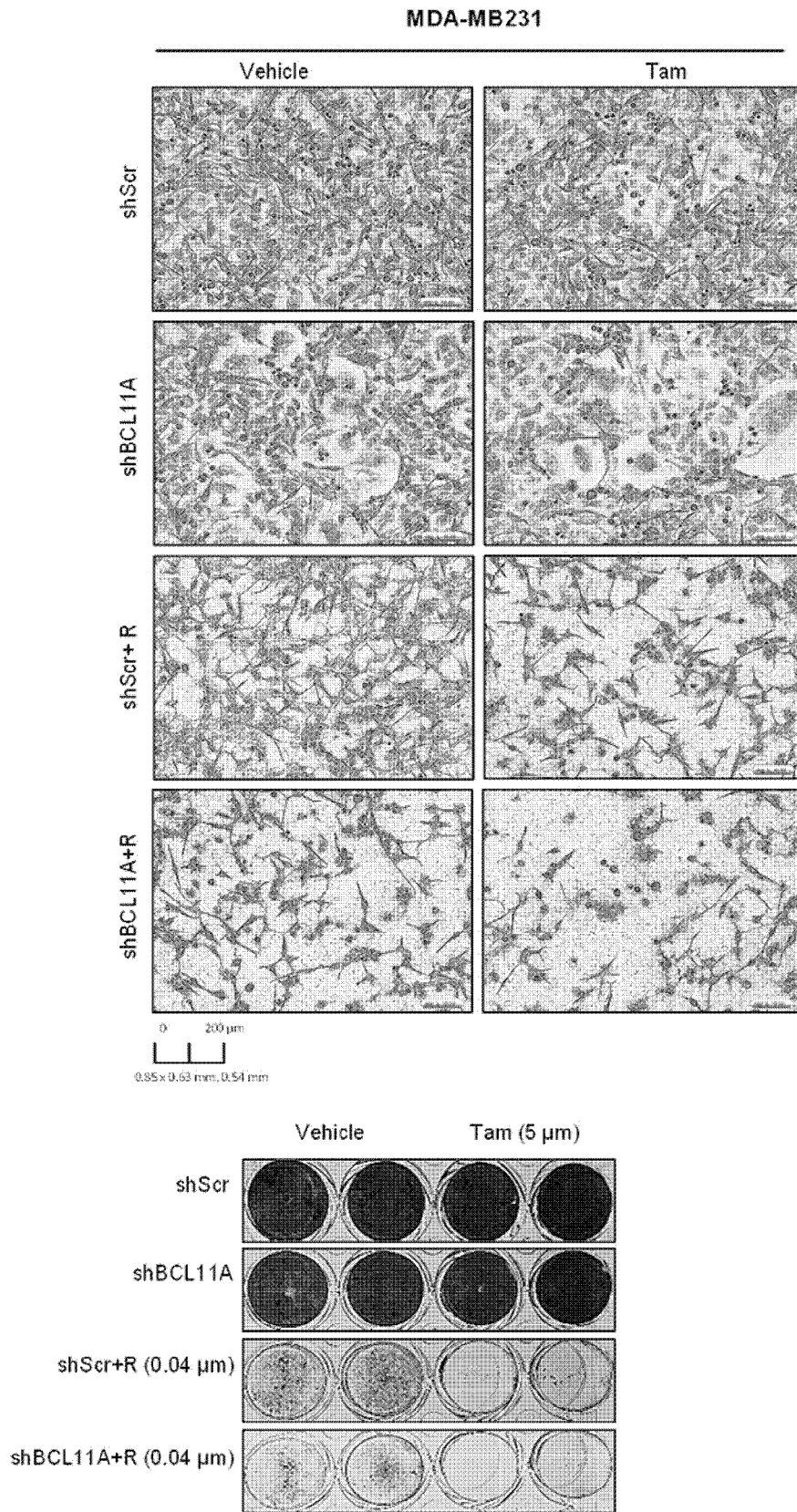
[도6a]



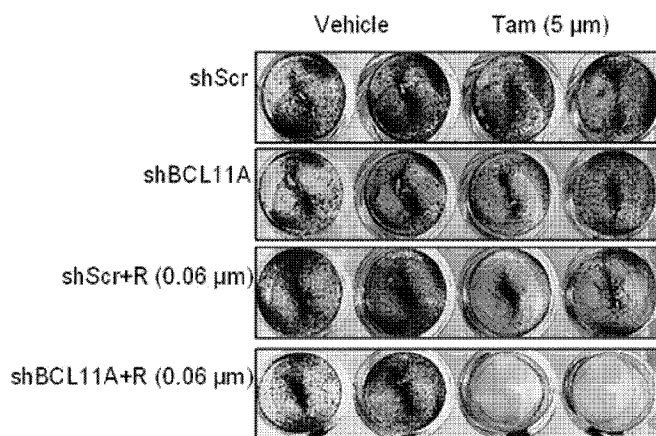
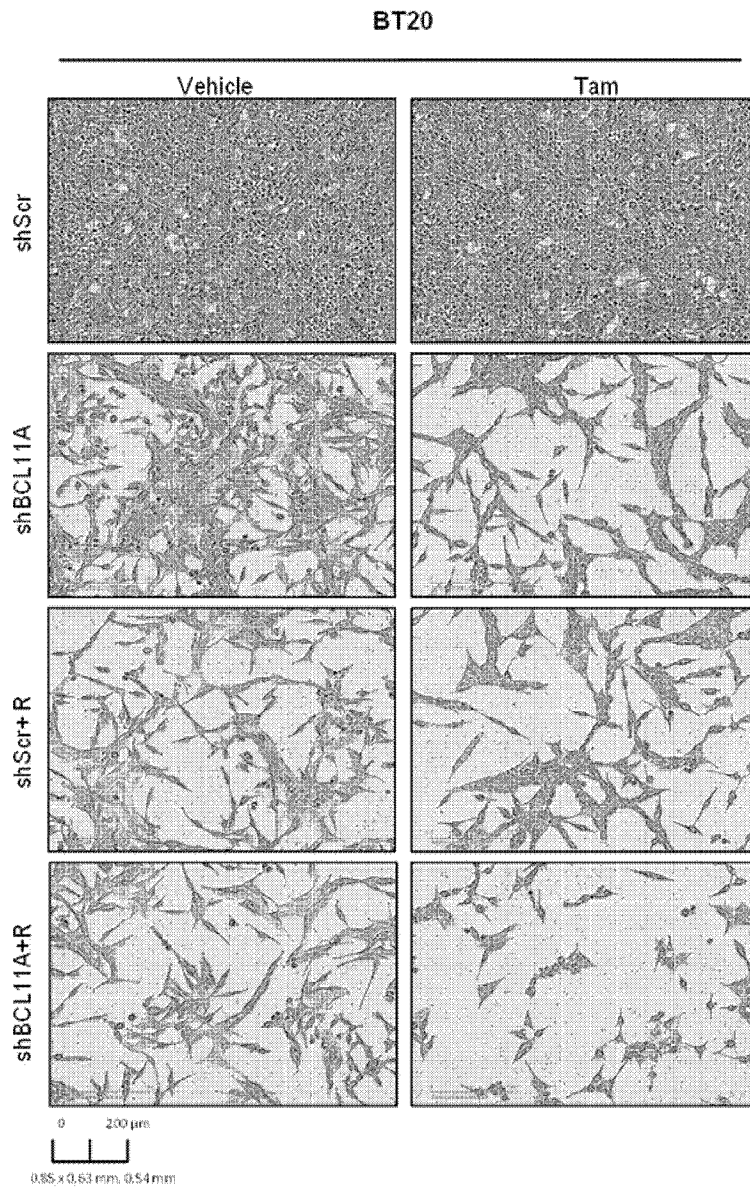
[도6b]



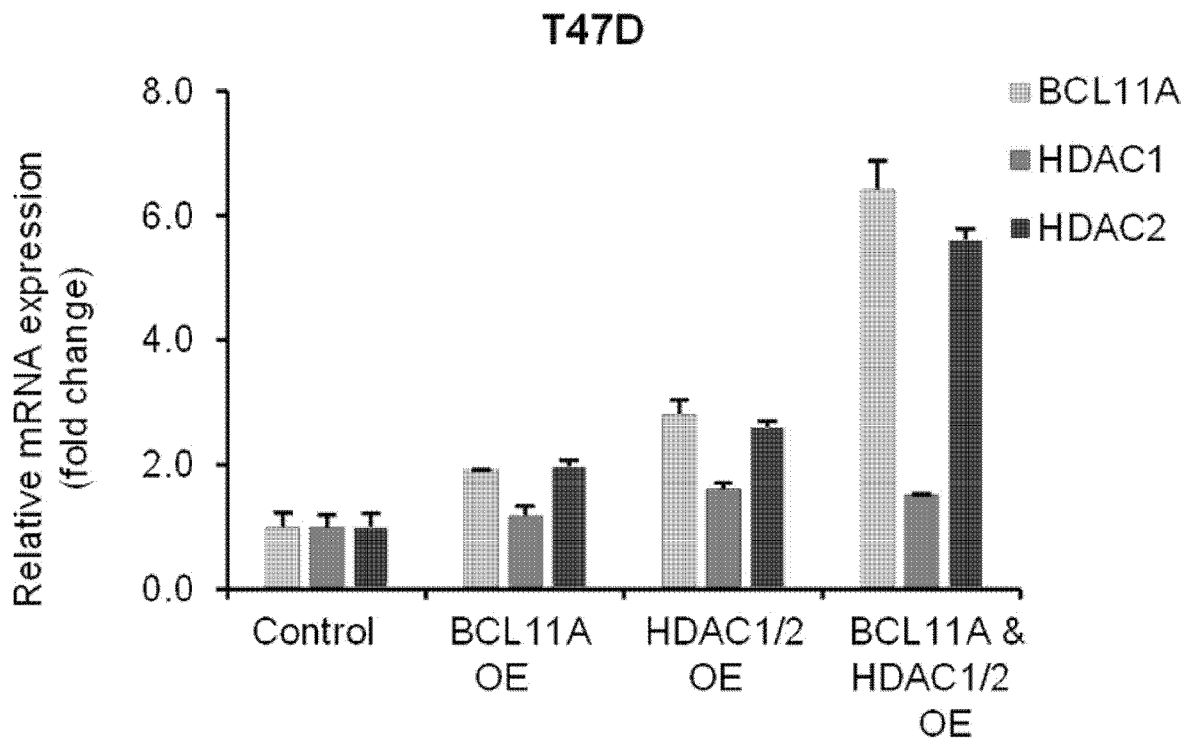
[도6c]



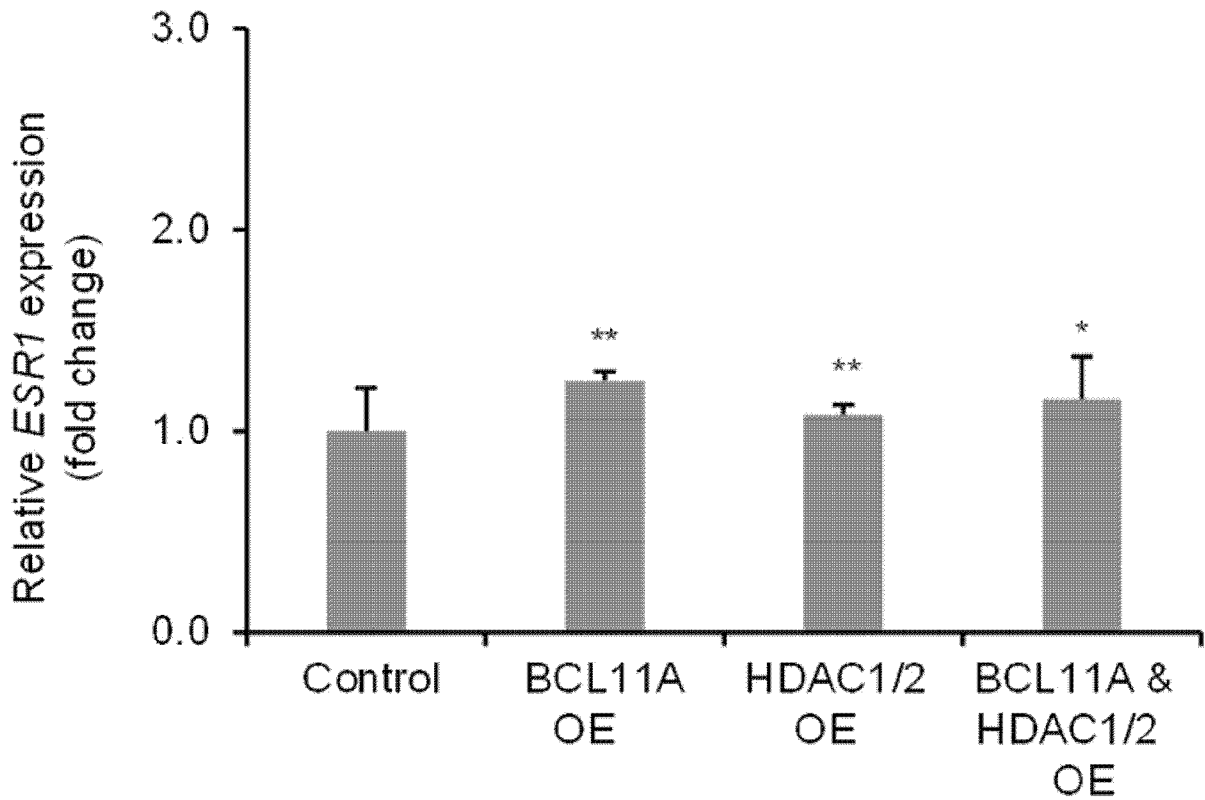
[도6d]



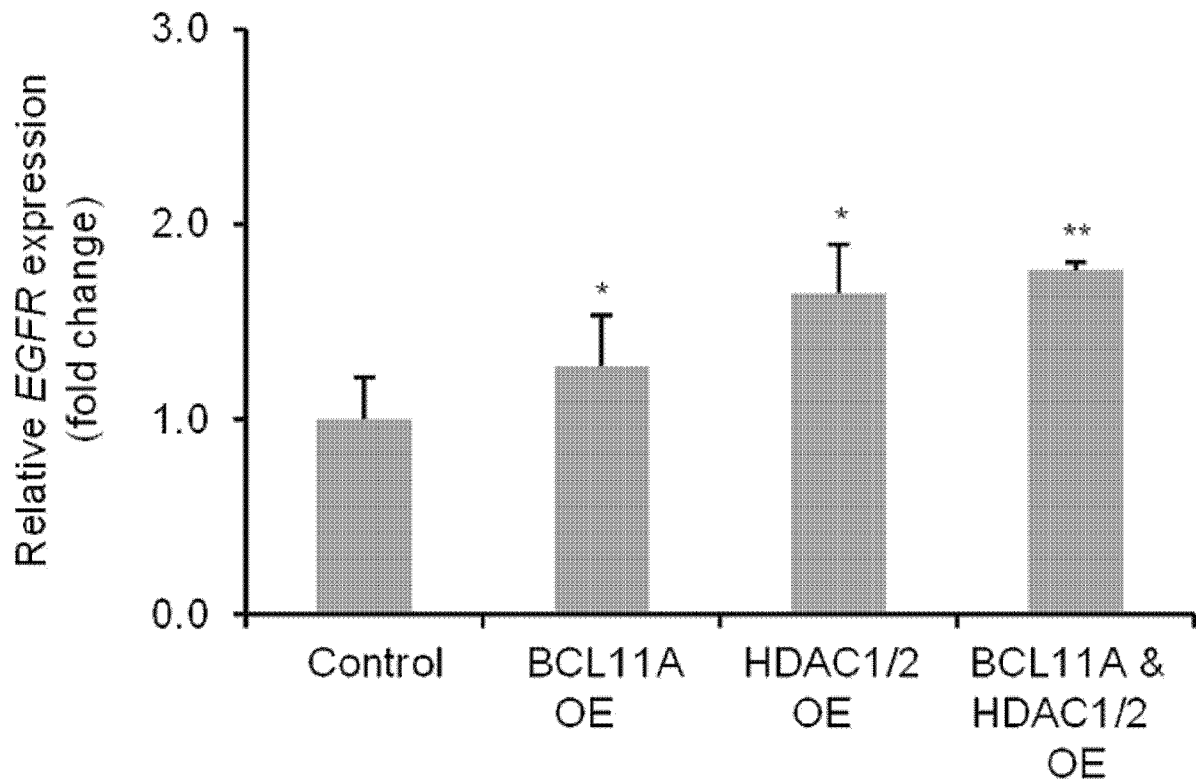
[도7a]



[도7b]

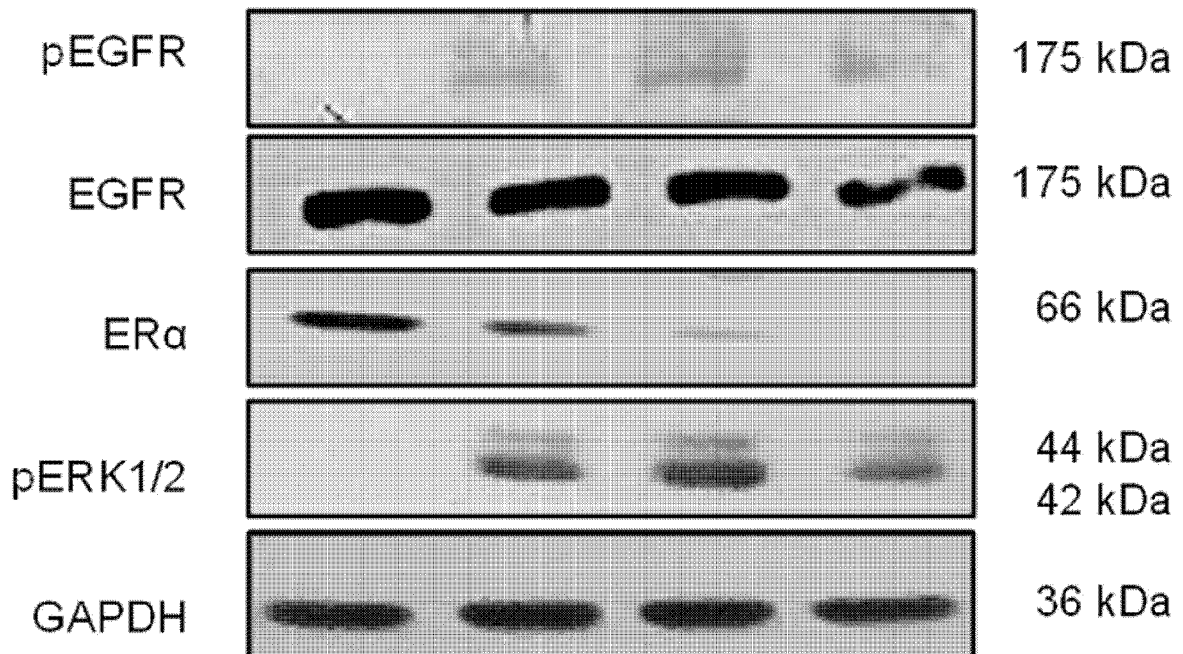


[도7c]

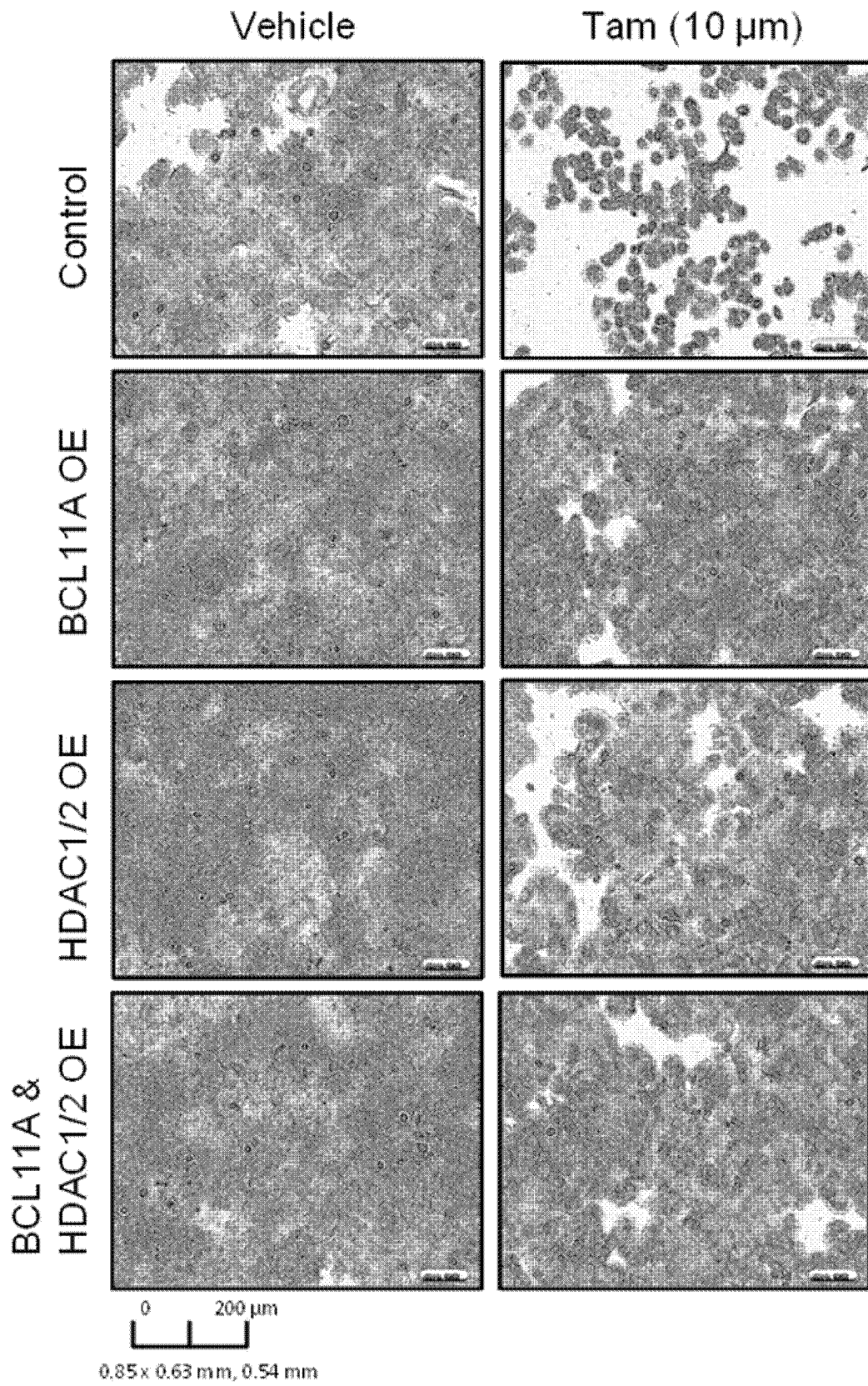


[도7d]

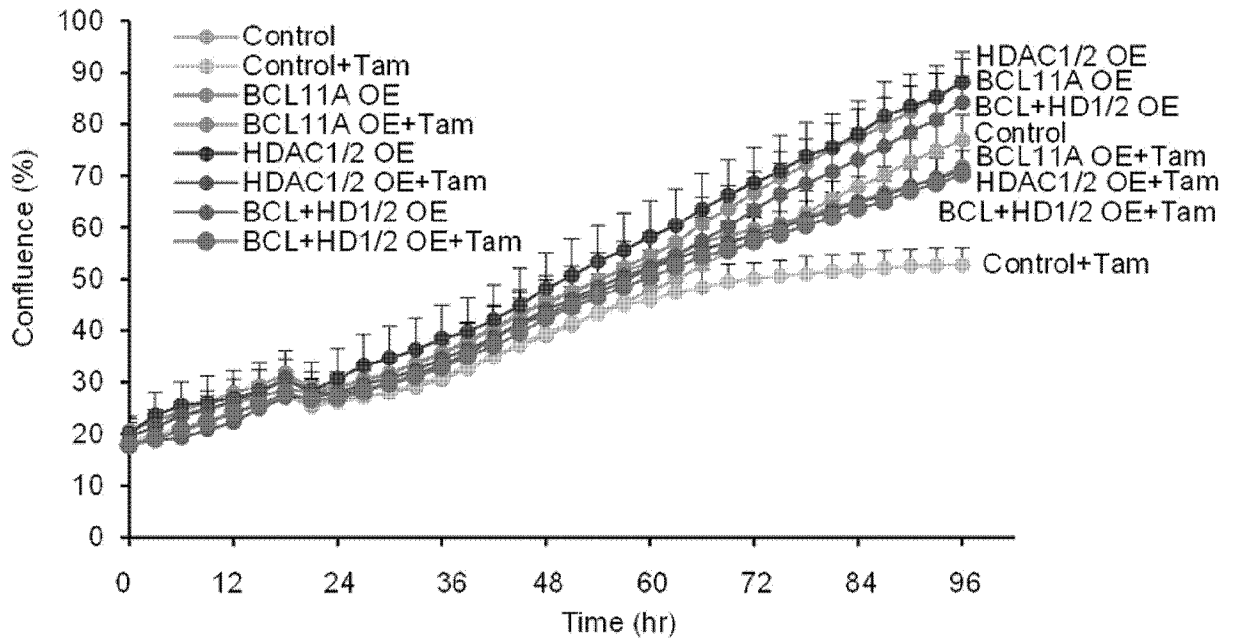
BCL11A OE	-	+	-	+
HDAC1 OE	-	-	+	+
HDAC2 OE	-	-	+	+



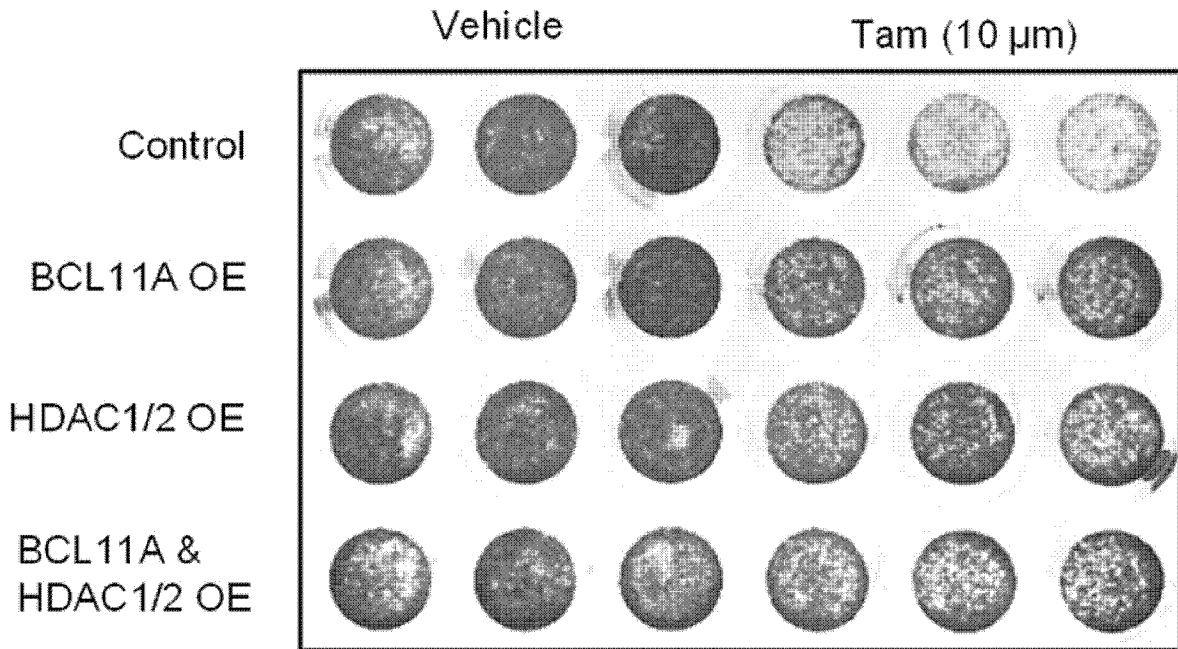
[도7e]



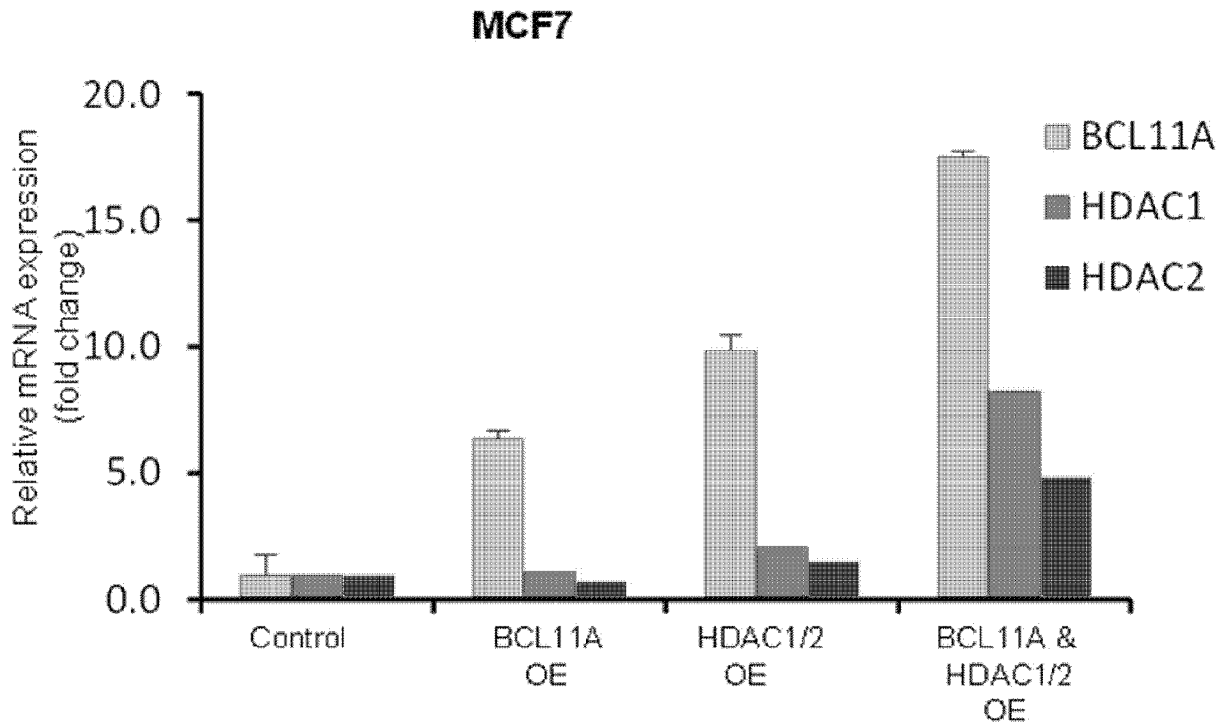
[도7f]



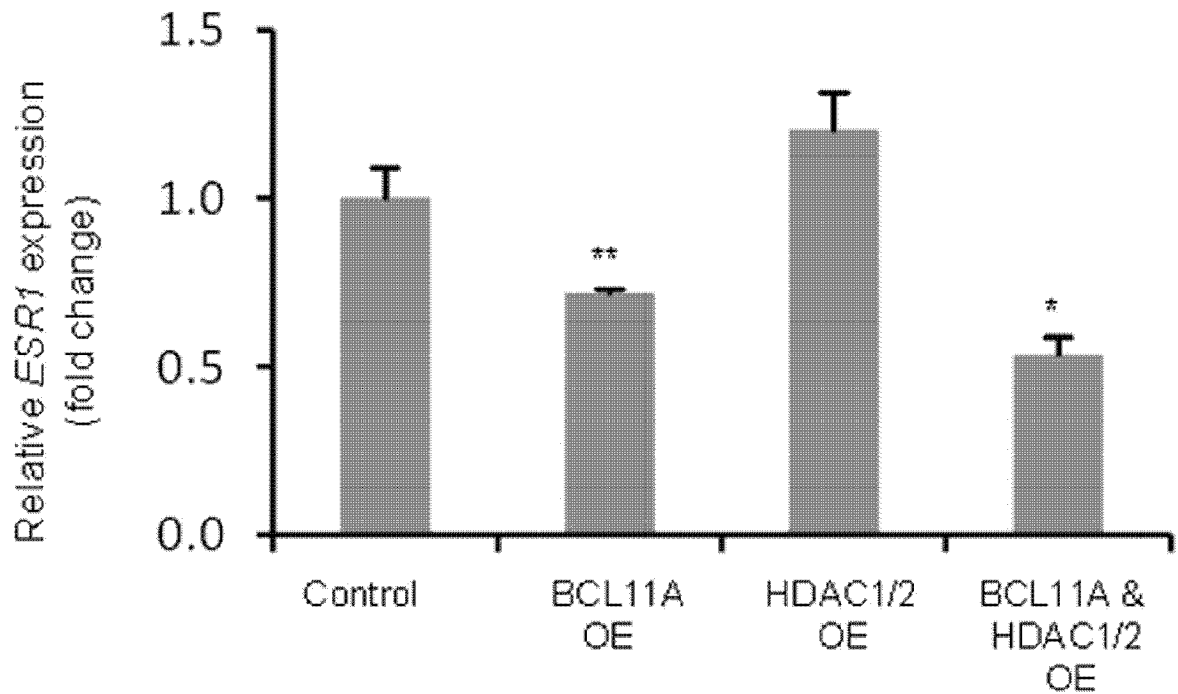
[도7g]



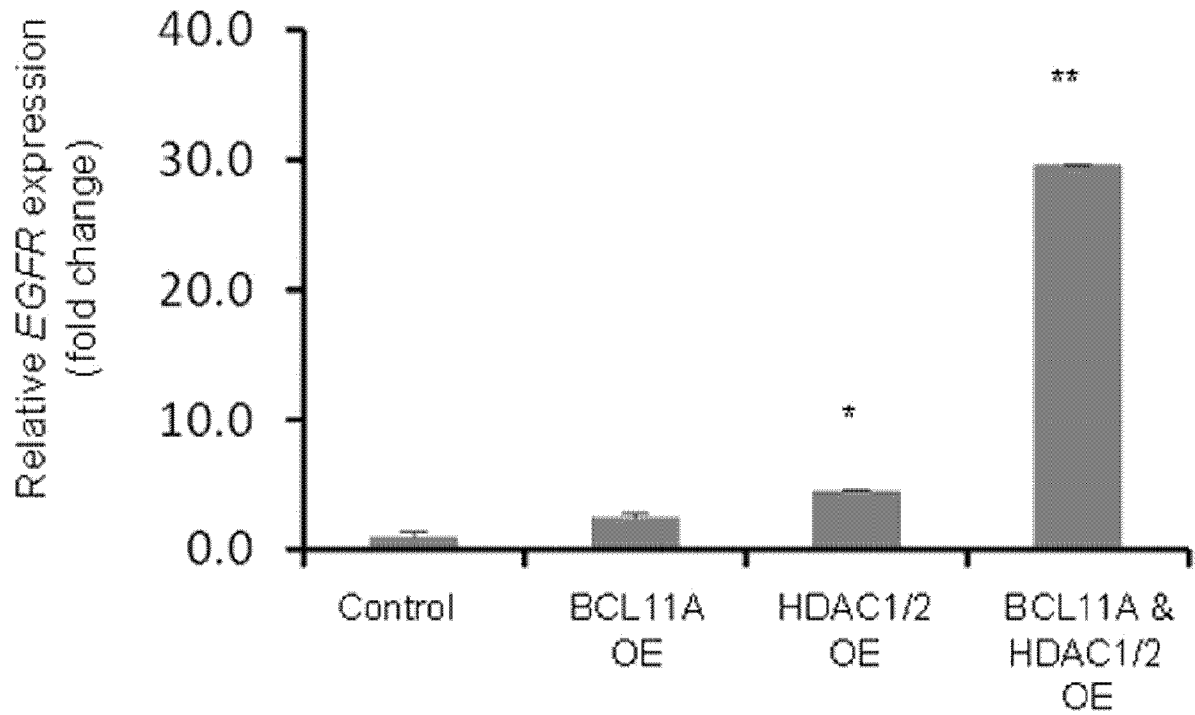
[도7h]



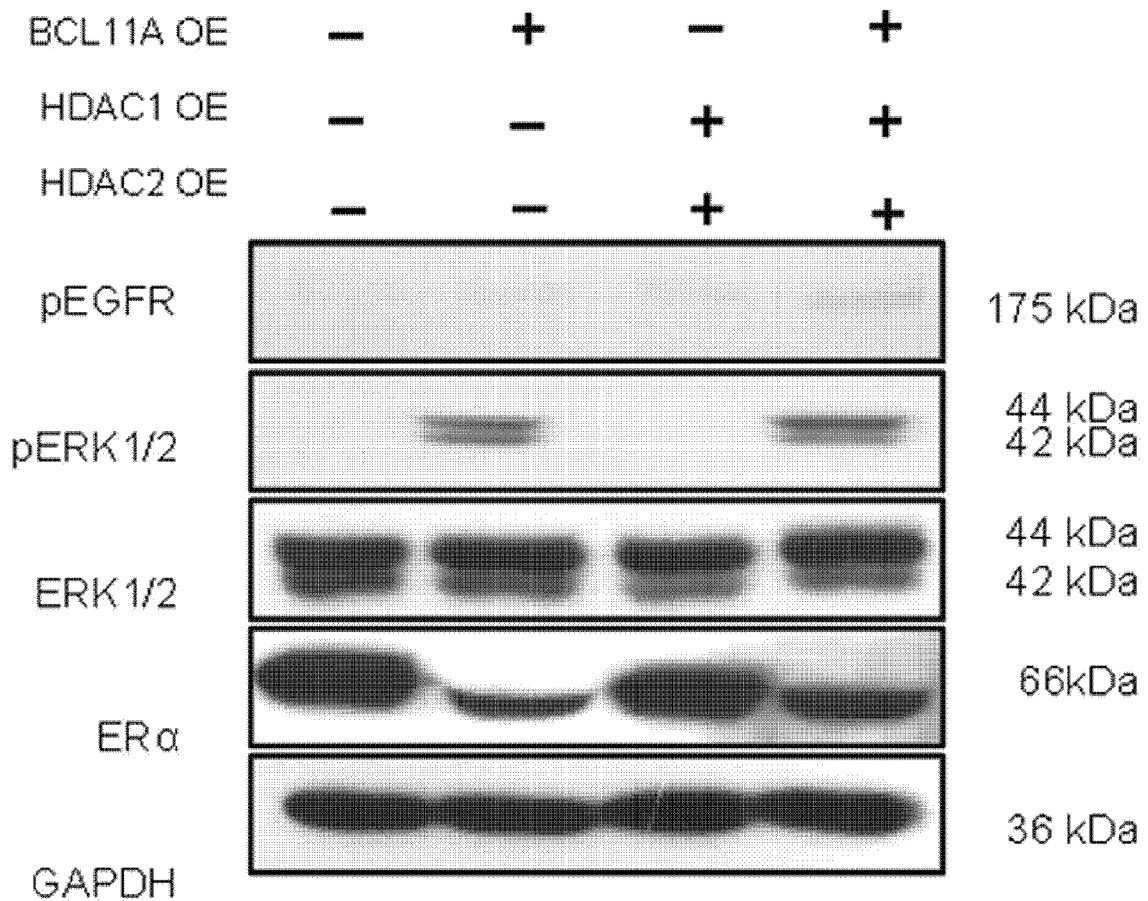
[도7i]



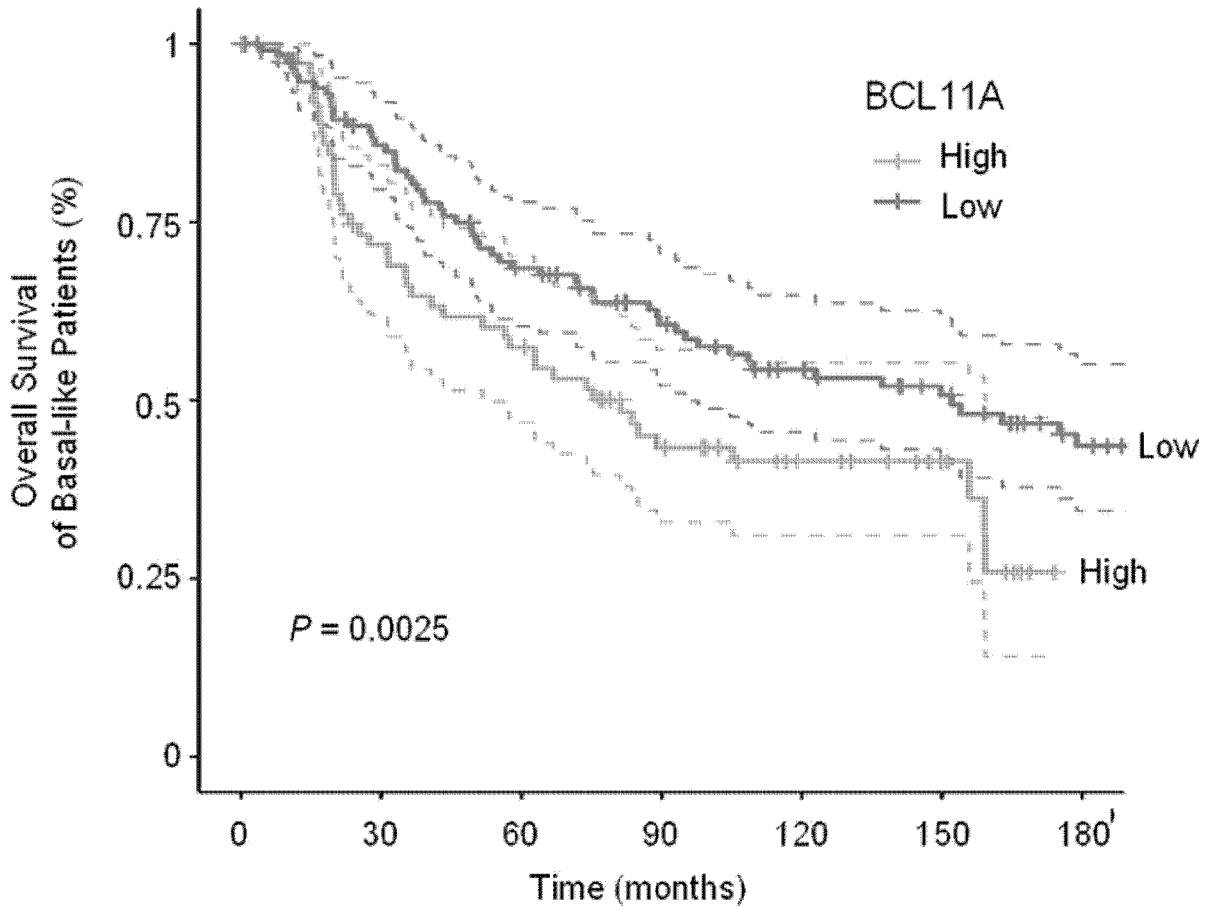
[도7j]



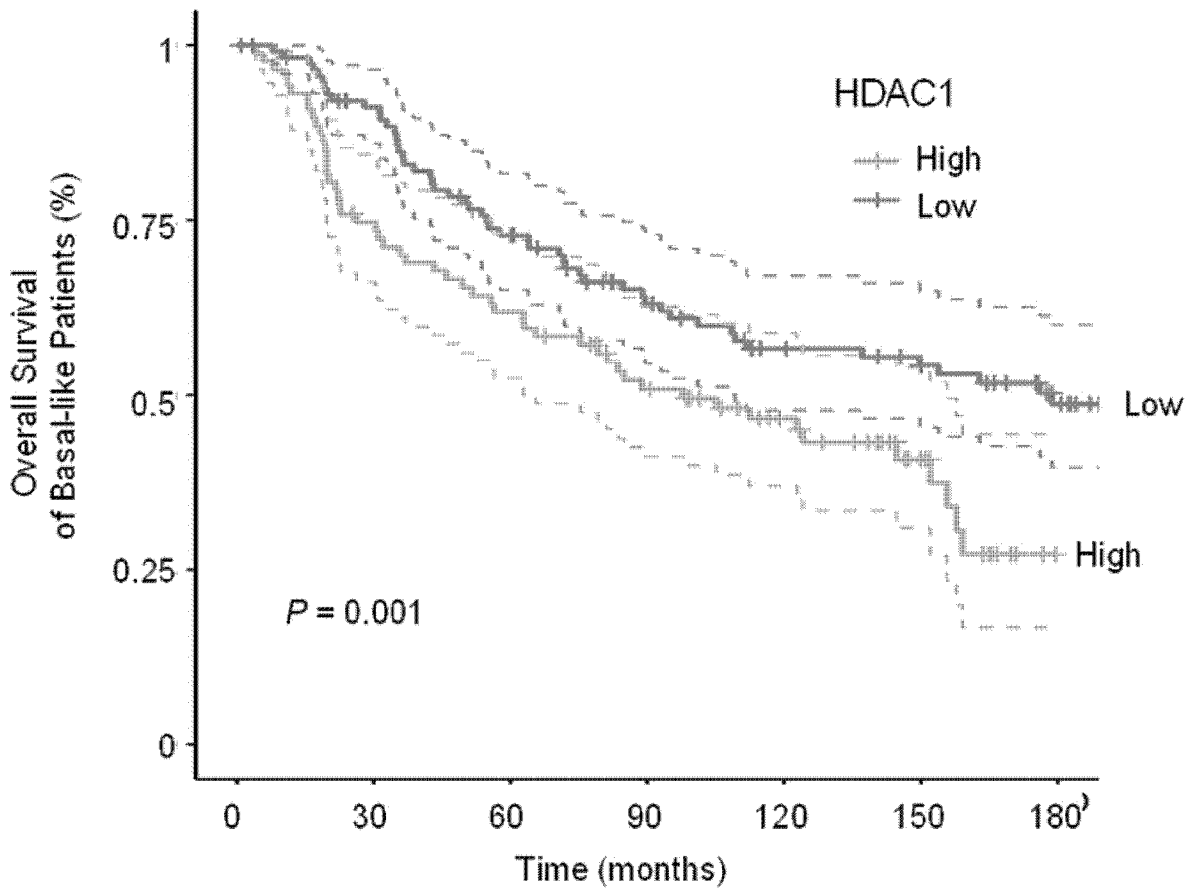
[도7k]



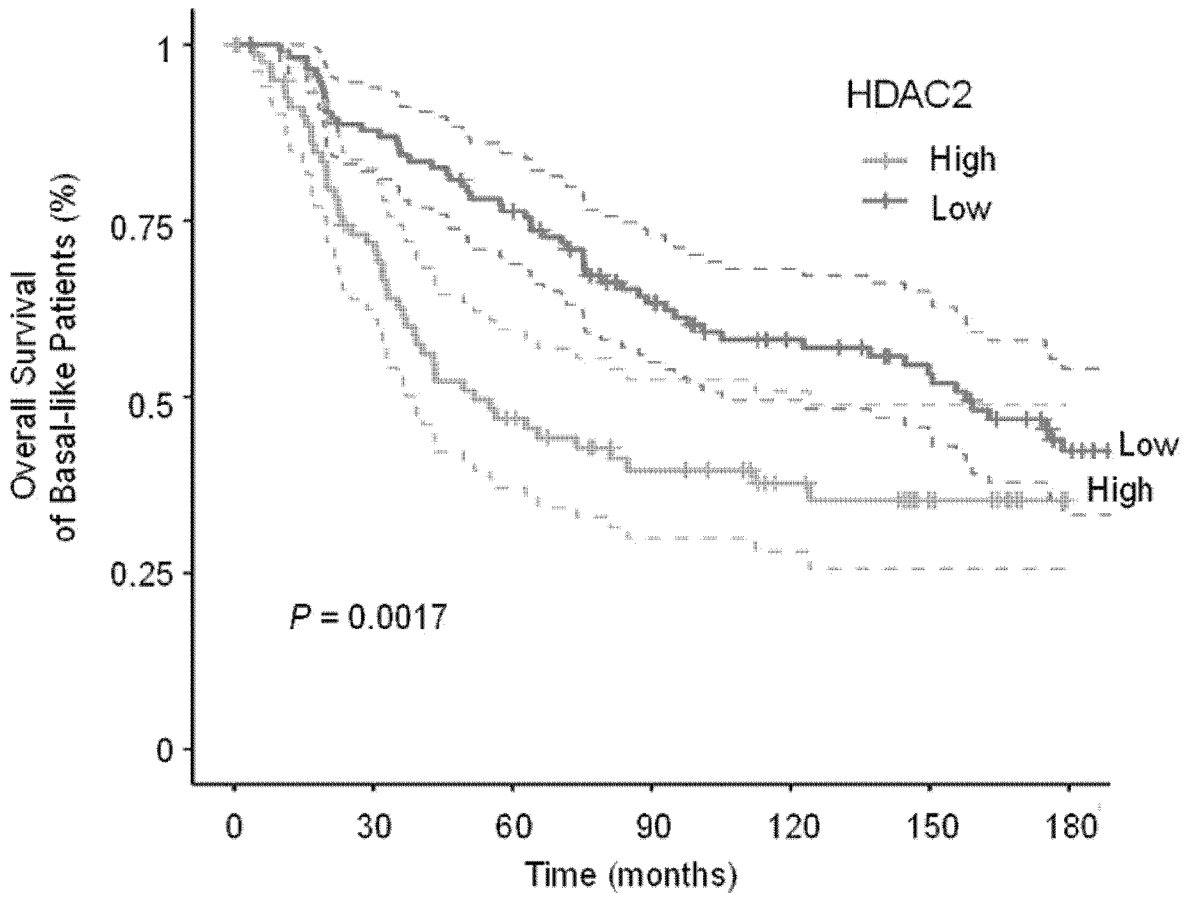
[도8a]



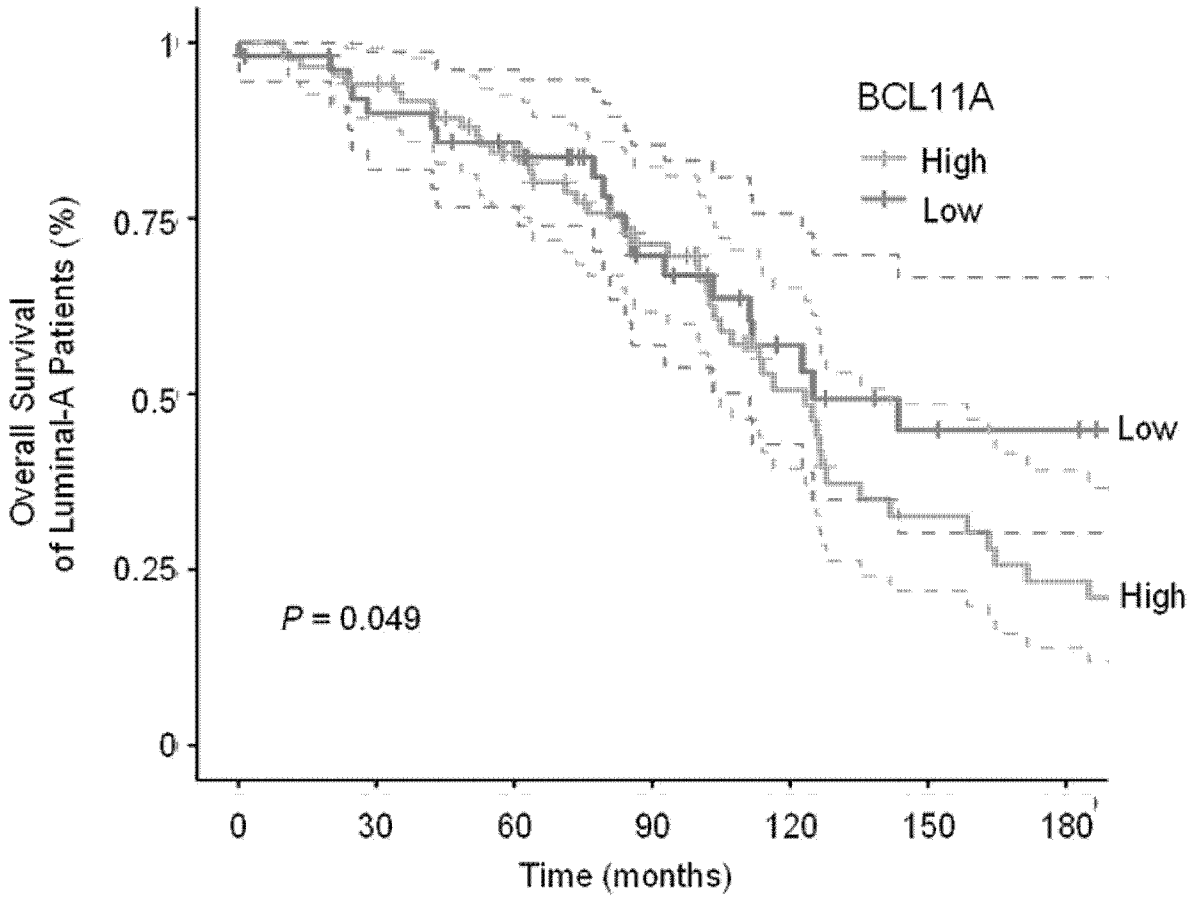
[도8b]



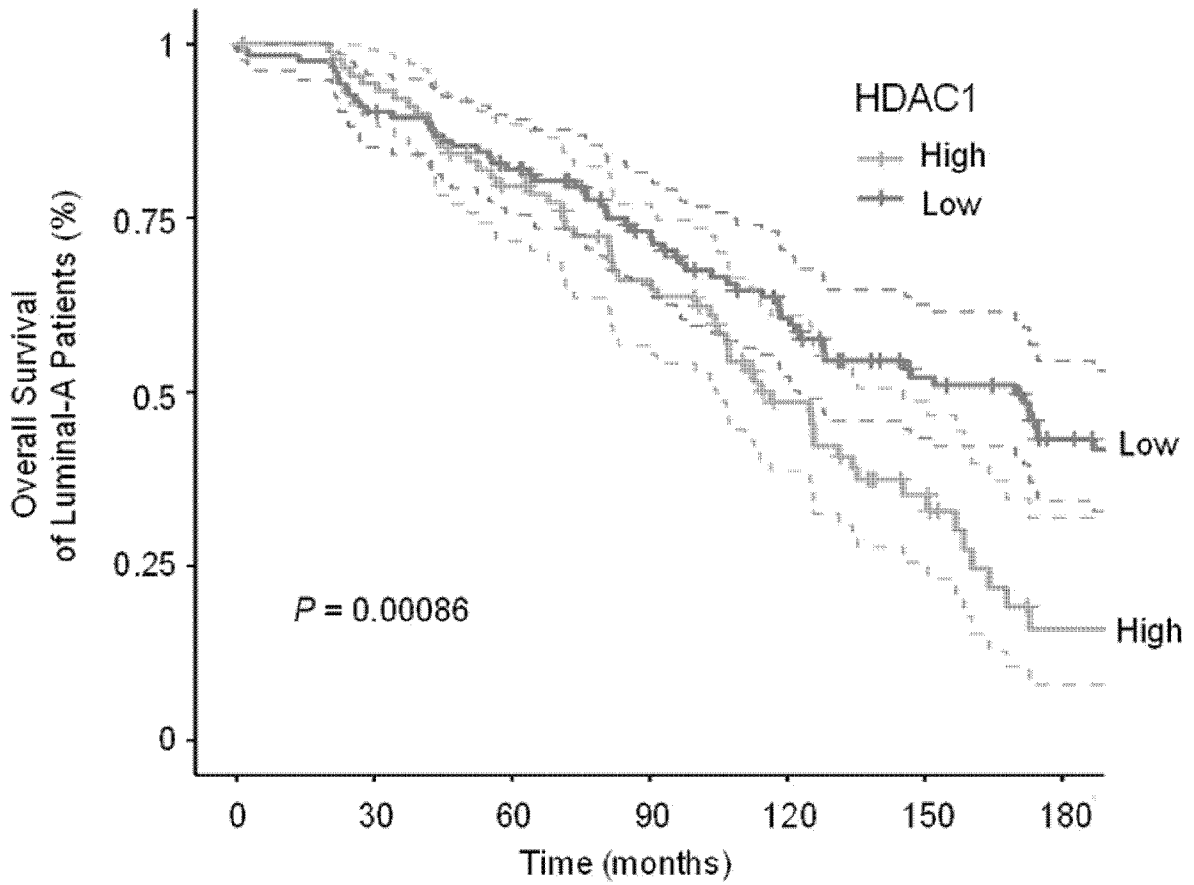
[도8c]



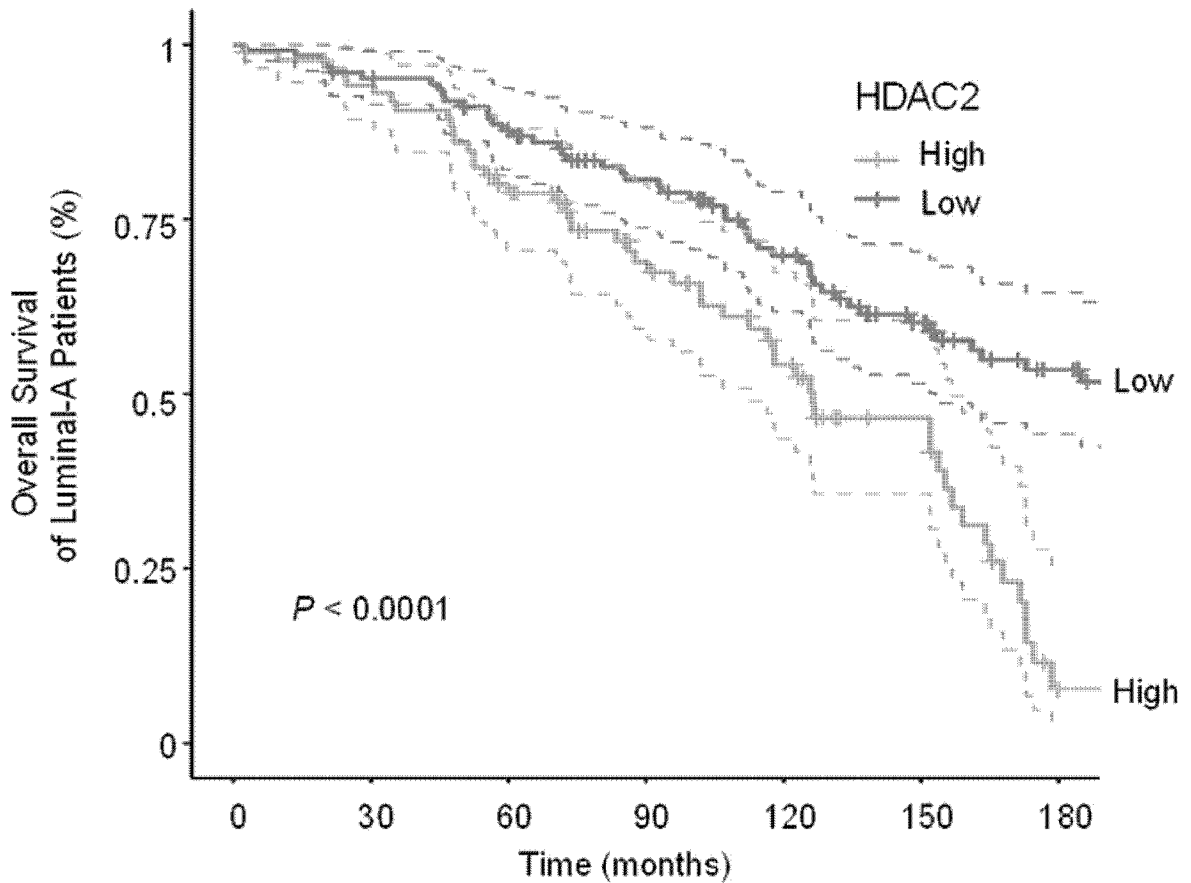
[도8d]



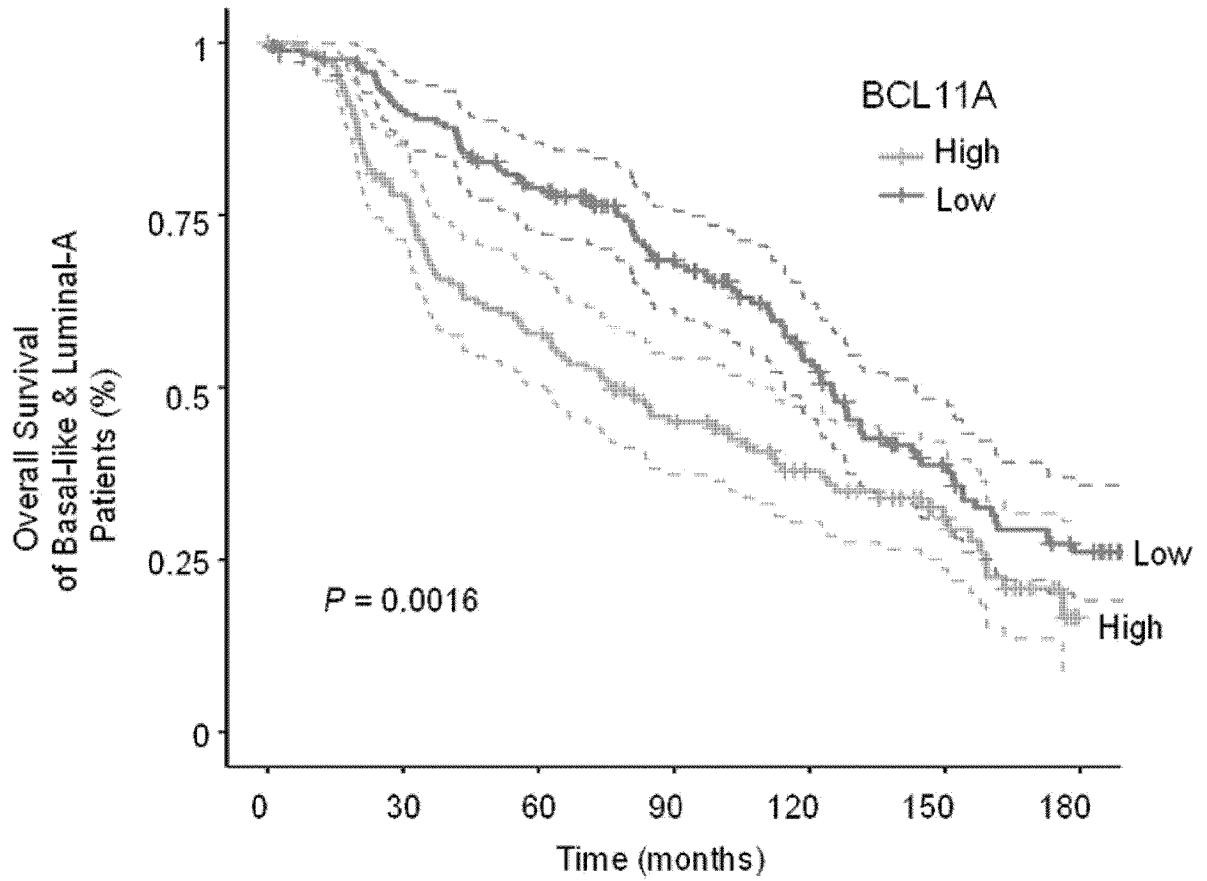
[도8e]



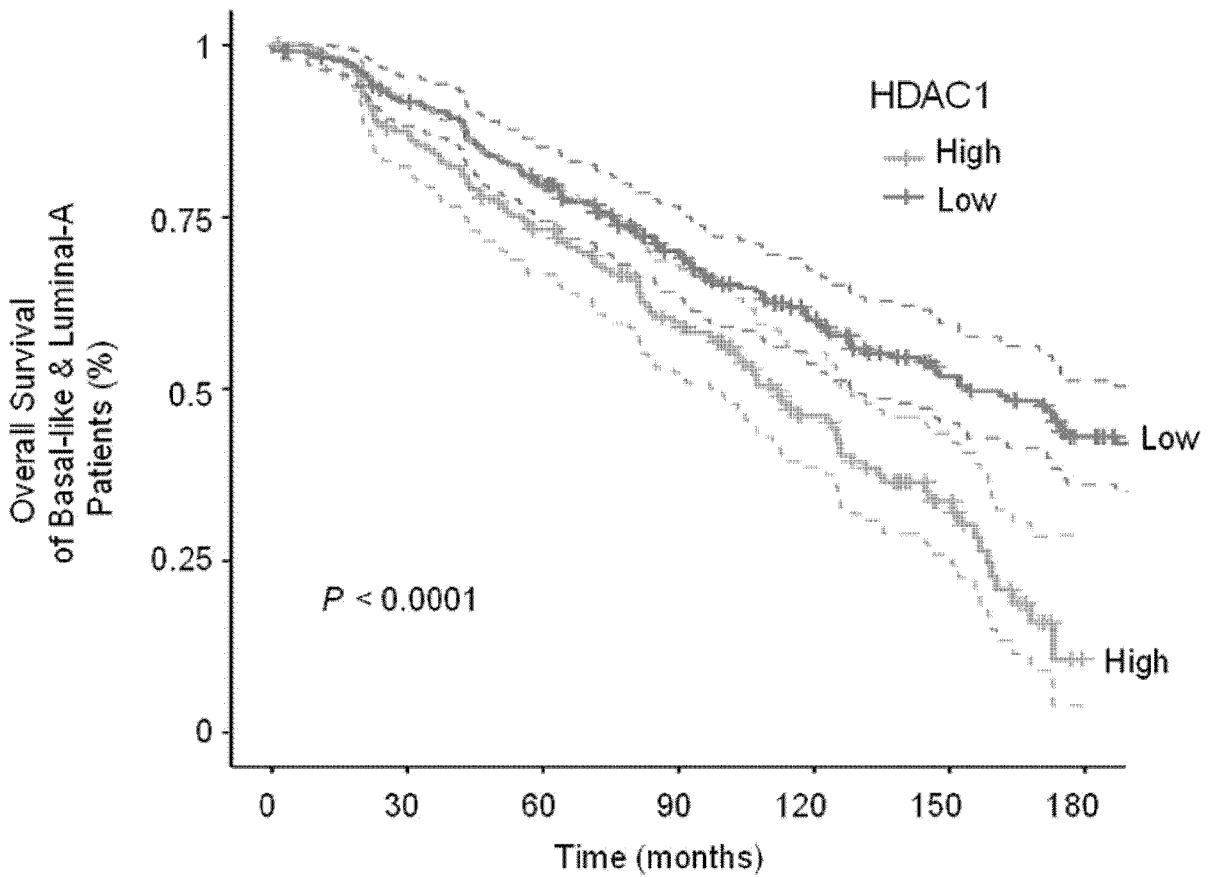
[도8f]



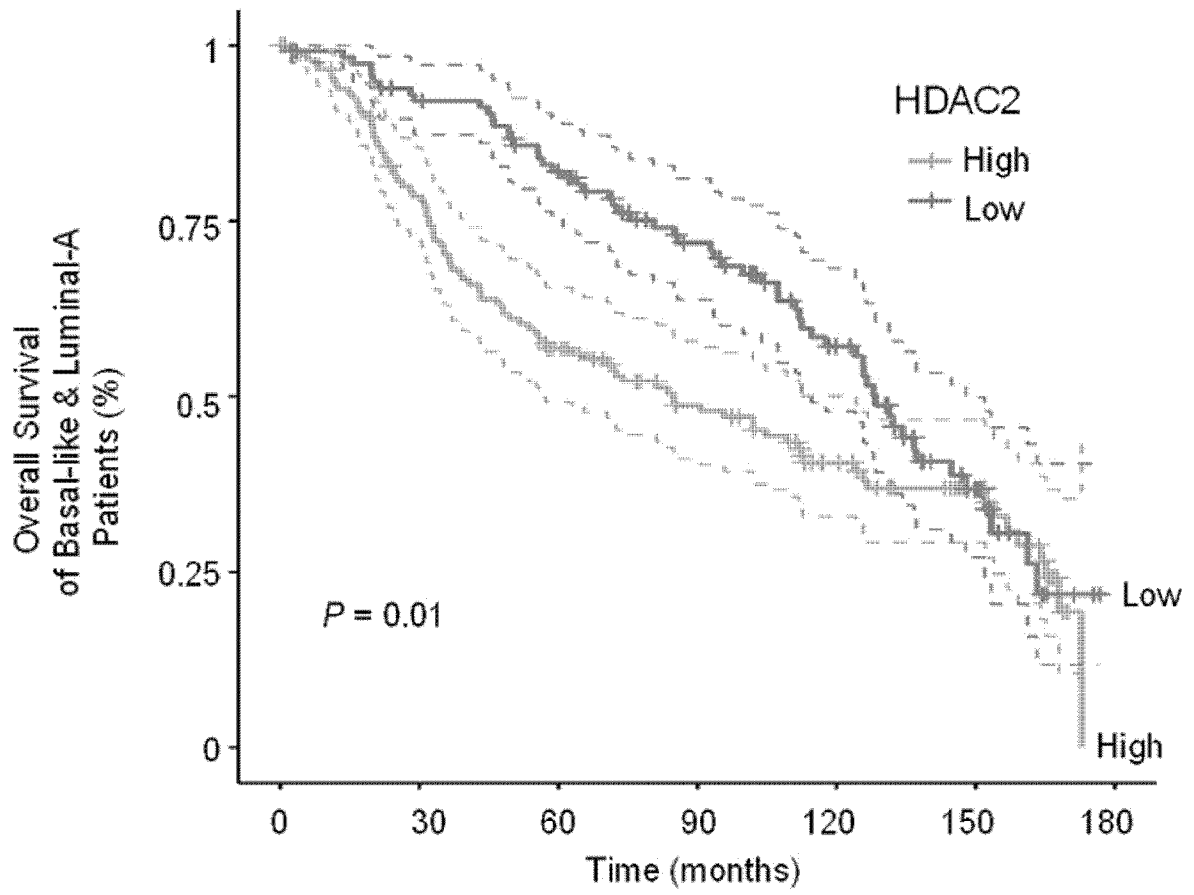
[도8g]



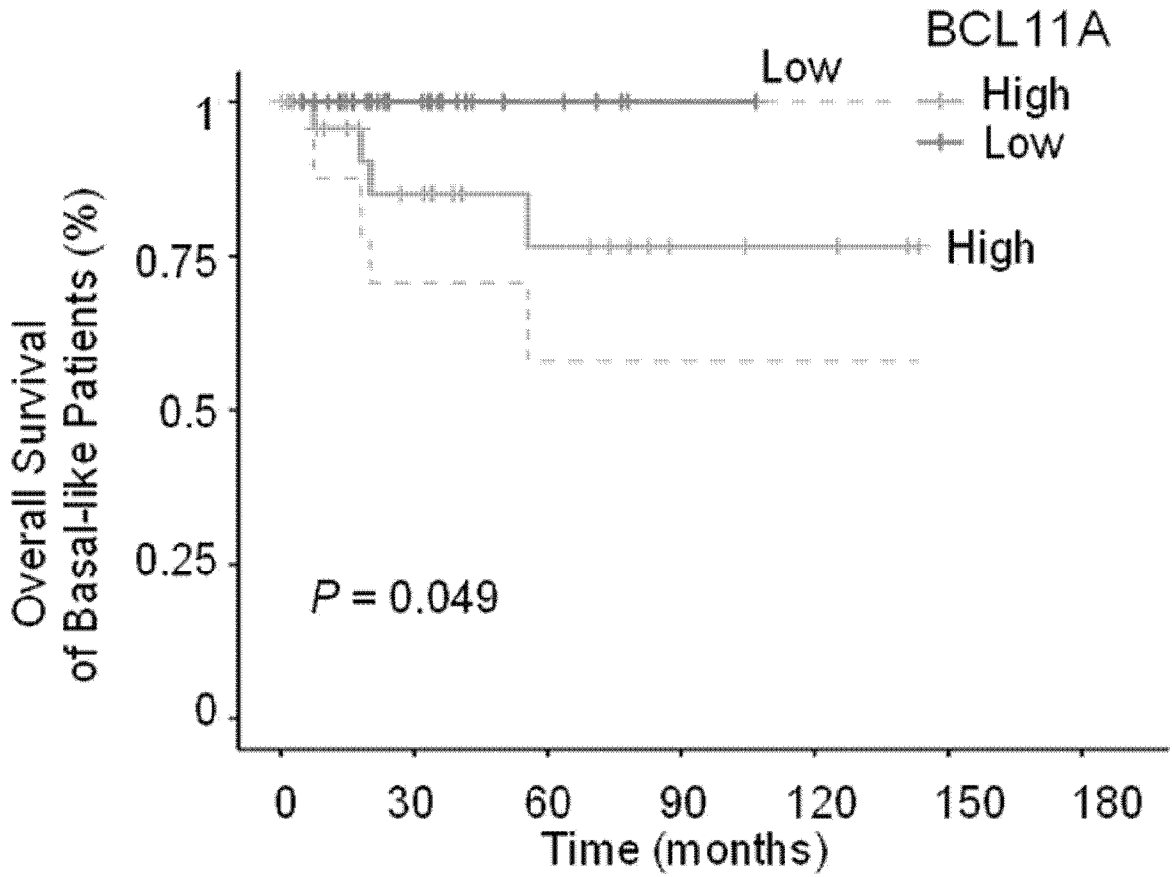
[도8h]



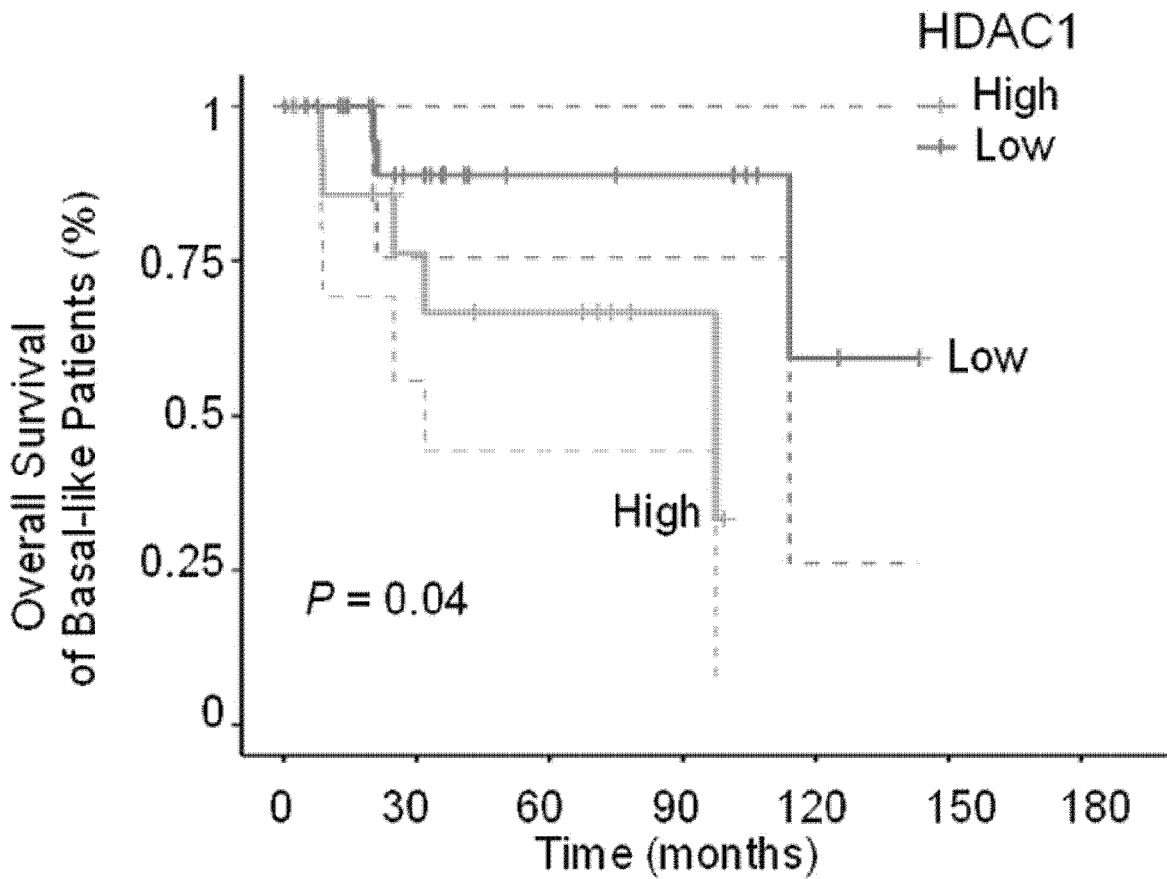
[도8i]



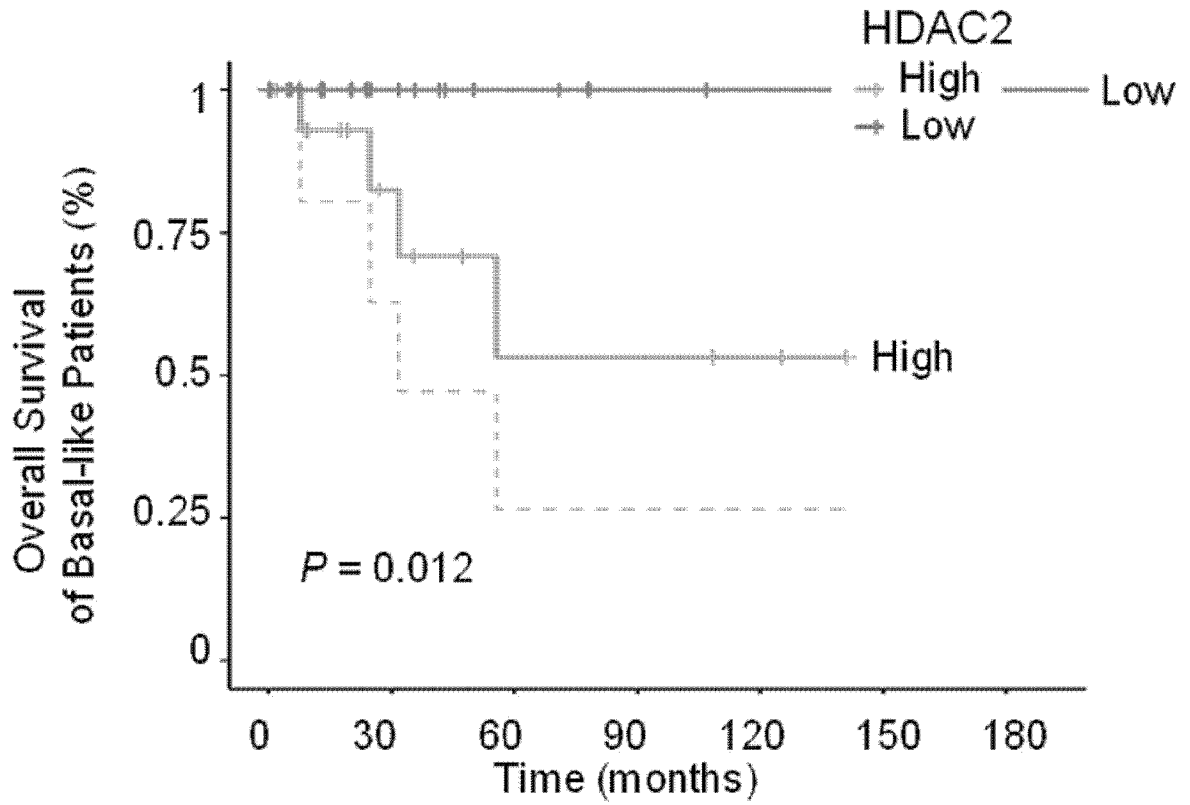
[도8j]



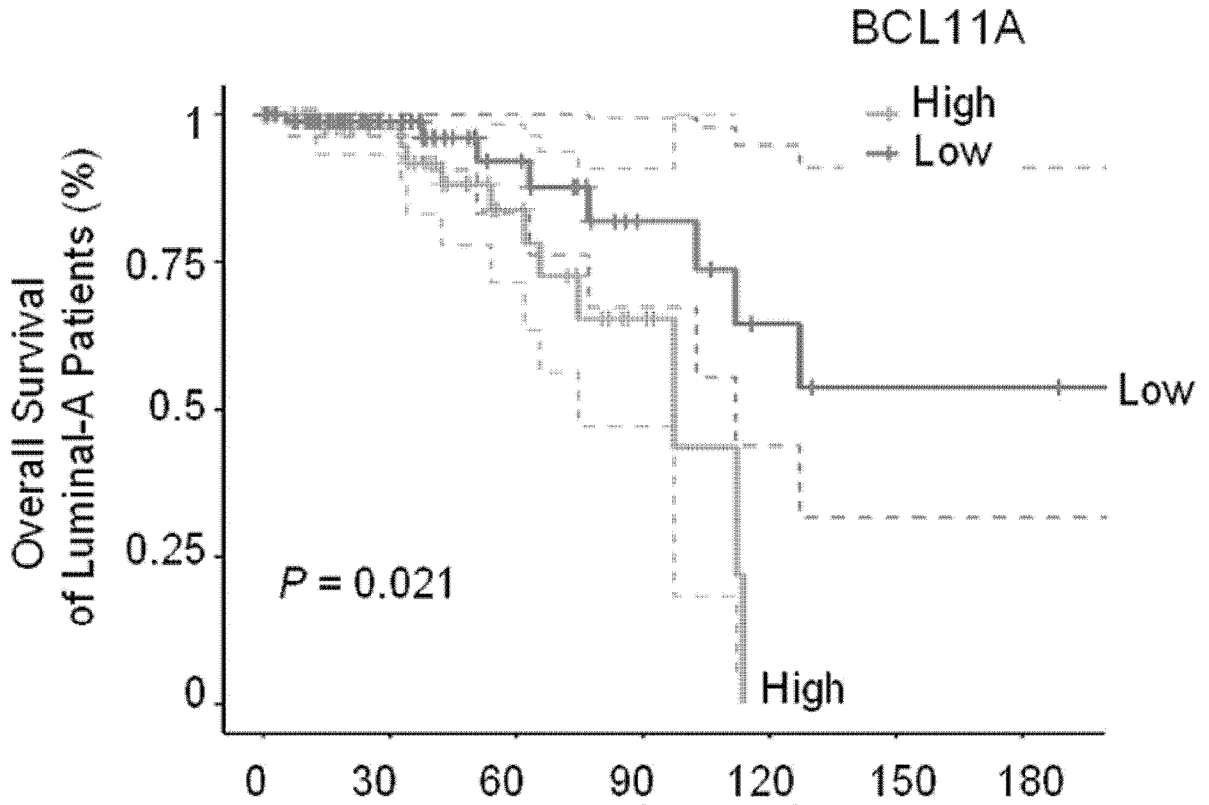
[도8k]



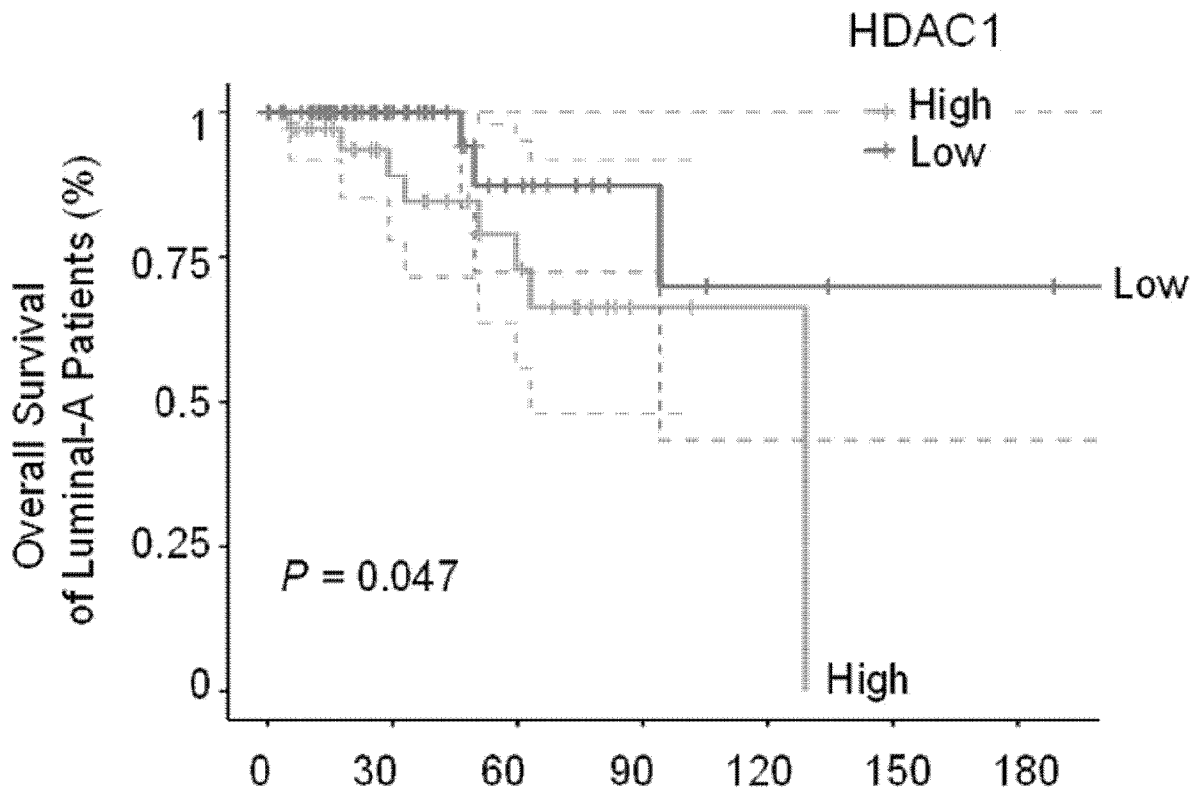
[도8]



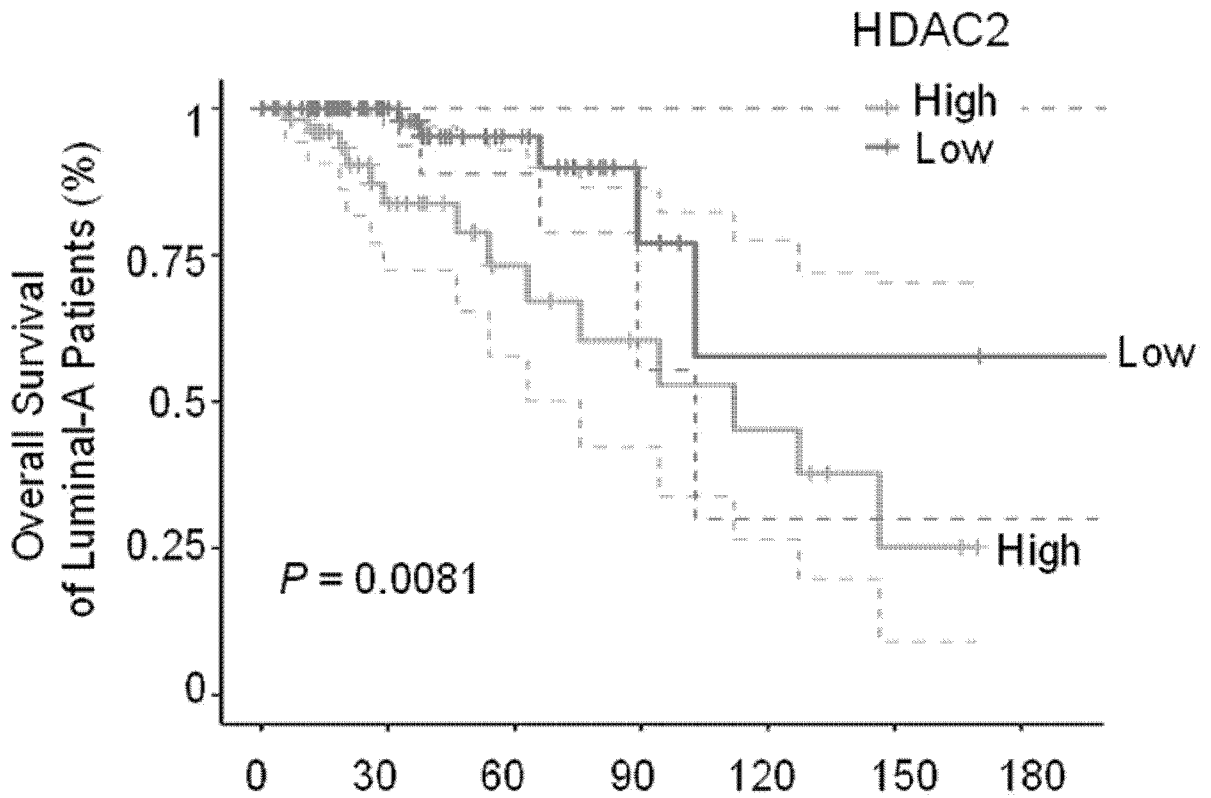
[도8m]



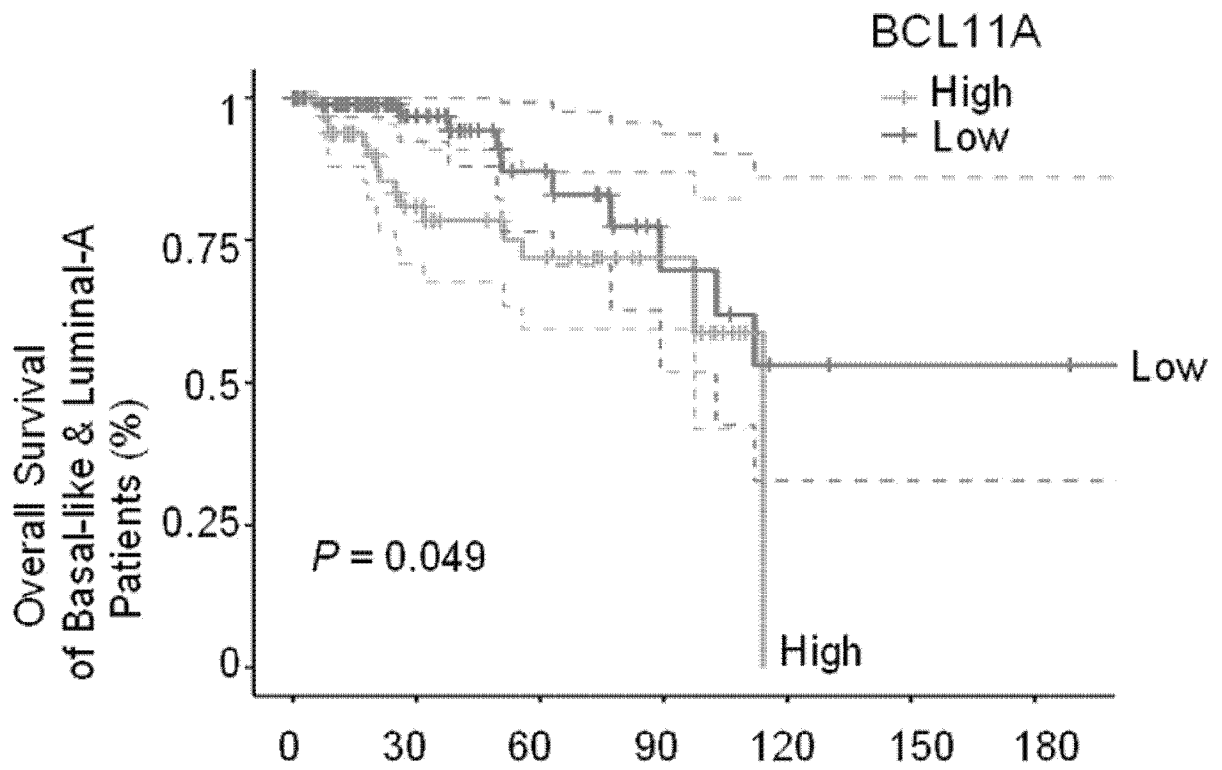
[도8h]



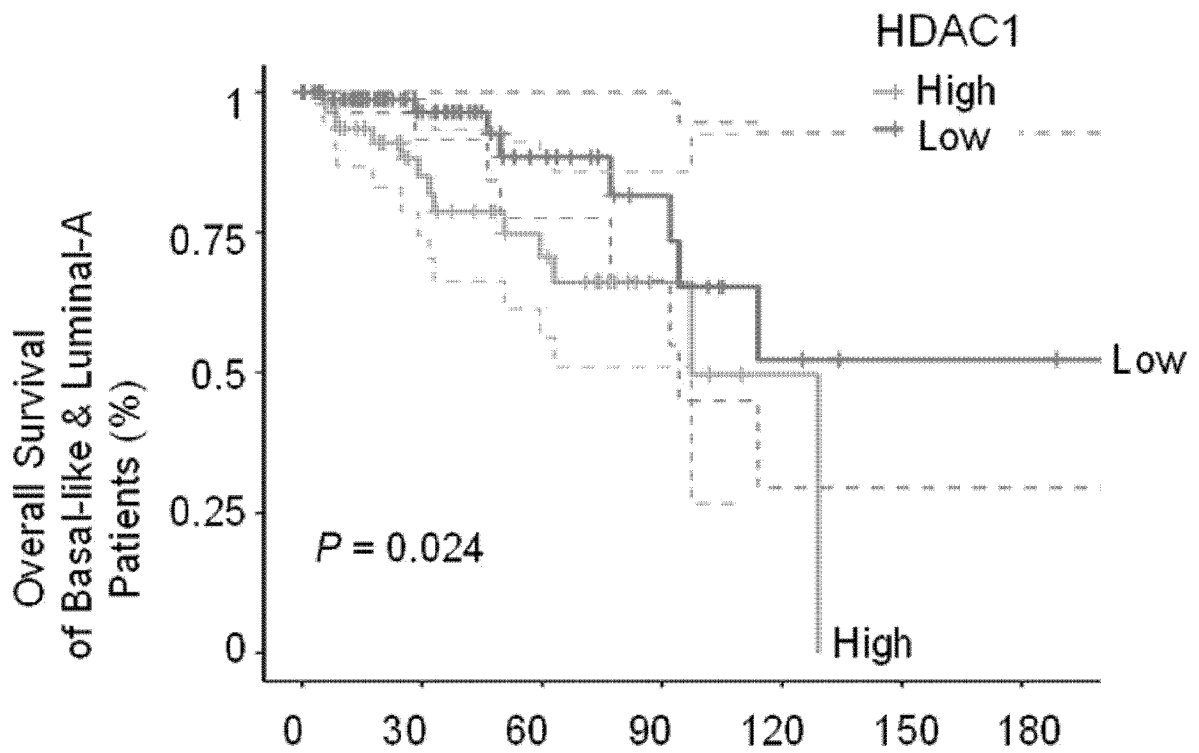
[도8o]



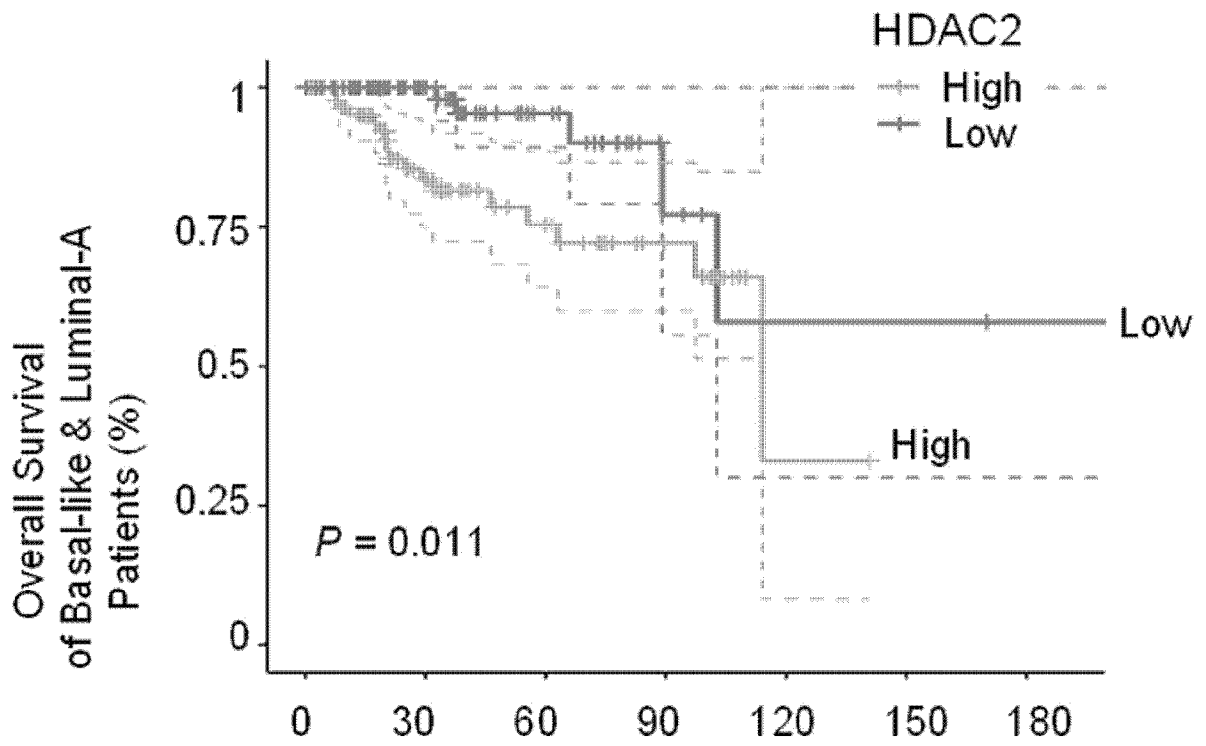
[도8p]



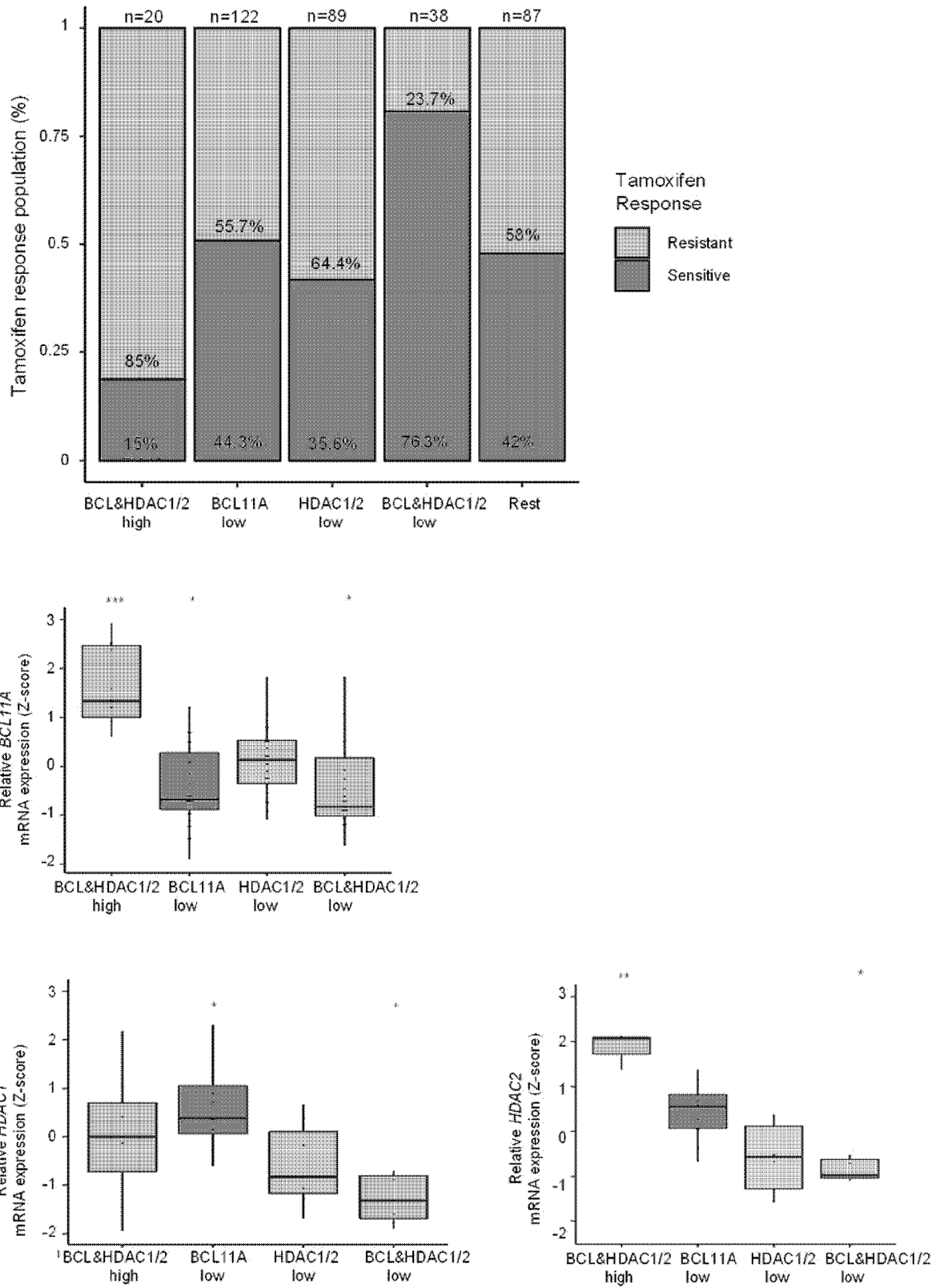
[도8q]



[도8r]



[도9a]



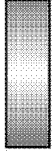
[도9b]

	BCL&HDAC1/2 high	BCL11A low	HDAC1/2 low	BCL&HDAC1/2 low
SMID_basal_high	0.61193388	-0.0639706	0.15554527	-0.1201651
HUPER_basal_high	0.61193388	-0.0639706	0.15554527	-0.1201651
CHARAFE_luminal_low	0.31288661	-0.0167576	0.14285048	-0.0587182
SMID_luminal_high	-0.3880661	0.01611336	0.19566728	0.14712868
CHARAFE_luminal_high	-0.1689043	0.36420694	-0.0491695	0.29527422

[도9c]

	BCL&HDAC1/2 high	BCL11A low	HDAC1/2 low	BCL&HDAC1/2 low
BIOCARTA_EGF	0.85322218	0.14076906	0.26514679	0.20957495
REACTOME_EGFR	0.47852929	0.45794587	0.48042745	-0.0284966
REACTOME_EGF_cancer	0.31958338	0.38922124	0.6416576	0.01916179
REACTOME_E2_dep_genes	0.14129122	0.49156867	0.10152396	0.35021269

GSVA
enrichment score



1
0
-1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/001622

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 38/15(2006.01)i; A61K 31/138(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A23L 33/13(2016.01)i; A23L 33/18(2016.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A61K 48/00(2006.01); A61K 31/138(2006.01); A61K 39/395(2006.01)		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models: IPC as above Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS (KIPO internal) & keywords: 에스트로겐 수용체-음성 유방암(estrogen receptor-negative breast cancer), 삼중 음성 유방암(triple-negative breast cancer), 기저양 유방암(basal-like breast cancer), 내강형 유방암(luminal breast cancer), basal-to-transition, 전환분화(transdifferentiation), B 세포 림프종/백혈병 11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A, BCL11A), 히스톤 디아세틸라제 1/2(Histone deacetylase 1/2, HDAC1/2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FAN, M. et al. Triggering a switch from basal- to luminal-like breast cancer subtype by the small-molecule diptoindonesin G via induction of GABARAPL1. Cell Death and Disease. 2020, vol 11, article no. 635, inner pp. 1-13 (online publication date: 15 August 2020). See abstract; inner pages 1-12; and figures 1 and 6.	1-15
A	ZHAO, H. et al. Inhibition of SHP2 in basal-like and triple-negative breast cells induces basal-to-luminal transition, hormone dependency, and sensitivity to anti-hormone treatment. BMC Cancer. 2015, vol. 15, article no. 109, inner pp. 1-12 (online publication date: 08 March 2015). See abstract; inner pages 1-11; and figures 1-5.	1-15
A	CYR, A. R. et al. TFAP2C governs the luminal epithelial phenotype in mammary development and carcinogenesis. Oncogene. 2015, vol. 34, pp. 436-444 (online publication date: 27 January 2014). See abstract; page 437, right column; and figure 3.	1-15
A	WO 2017-081171 A1 (PARACRINE THERAPEUTICS AB) 18 May 2017 (2017-05-18) See abstract; and page 2, lines 7-10.	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 13 May 2022		Date of mailing of the international search report 16 May 2022
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex-Daejeon Building 4, 189 Cheongsaro, Seo-gu, Daejeon 35208 Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2022/001622

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2017-0298360 A1 (MOHAMED, Bentires-Alj et al.) 19 October 2017 (2017-10-19) See abstract; and paragraph [0003].	1-15
PX	CHOI, S. R. et al. Network Analysis Identifies Regulators of Basal-Like Breast Cancer Reprogramming and Endocrine Therapy Vulnerability. Cancer Research. 15 January 2022 (publication date), vol. 82, no. 2, pp. 320-333. See abstract; pages 320-331; figures 1-6; and table 1.	1-15

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: **16, 17**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 16 and 17 pertain to a method for treatment of the human body by surgery or therapy, as well as a diagnostic method (PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39.1(iv)).
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No. PCT/KR2022/001622

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017-081171	A1	18 May 2017	AU	2016-352592	A1	18 May 2017
				AU	2016-352592	A1	26 April 2018
				CN	108348605	A	31 July 2018
				EP	3373967	A1	19 September 2018
				JP	2019-501957	A	24 January 2019
				US	2021-0186932	A1	24 June 2021
US	2017-0298360	A1	19 October 2017	EP	3197557	A1	02 August 2017
				WO	2016-046768	A1	31 March 2016

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) A61K 48/00(2006.01)i; A61K 31/7105(2006.01)i; A61K 38/15(2006.01)i; A61K 31/138(2006.01)i; A61K 45/06(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A23L 33/13(2016.01)i; A23L 33/18(2016.01)i		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) A61K 48/00(2006.01); A61K 31/138(2006.01); A61K 39/395(2006.01) 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 에스트로겐 수용체-음성 유방암(estrogen receptor-negative breast cancer), 삼중 음성 유방암(triple-negative breast cancer), 기저양 유방암(basal-like breast cancer), 내강형 유방암(luminal breast cancer), basal-to-transition, 전환분화(transdifferentiation), B 세포 림프종/백혈병 11A(B-cell lymphoma/leukemia 11A, BCL11A), 히스톤 디아세틸라제 1/2(Histone deacetylase 1/2, HDAC1/2)		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	FAN, M. 등, Triggering a switch from basal- to luminal-like breast cancer subtype by the small-molecule diptoindonesin G via induction of GABARAPL1, Cell Death and Disease, 2020년, 11권, 기사번호 635, 내부페이지 1-13 (온라인 공개일: 2020.08.15.) 요약; 내부페이지 1-12; 및 그림 1-6	1-15
A	ZHAO, H. 등, Inhibition of SHP2 in basal-like and triple-negative breast cells induces basal-to-luminal transition, hormone dependency, and sensitivity to anti-hormone treatment, BMC Cancer, 2015년, 15권, 기사번호 109, 내부페이지 1-12 (온라인 공개일: 2015.03.08.) 요약; 내부페이지 1-11; 및 그림 1-5	1-15
A	CYR, A. R. 등, TFAP2C governs the luminal epithelial phenotype in mammary development and carcinogenesis, Oncogene, 2015년, 34권, 페이지 436-444 (온라인 공개일: 2014.01.27.) 요약; 페이지 437, 오른쪽 컬럼; 및 그림 3	1-15
A	WO 2017-081171 A1 (PARACRINE THERAPEUTICS AB) 2017.05.18 요약; 및 페이지 2, 라인 7-10	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. <input checked="" type="checkbox"/> 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “D” 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일	
2022년05월13일(13.05.2022)	2022년05월16일(16.05.2022)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소	심사관	
대한민국 특허청 (35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)	허주형	
팩스 번호 +82-42-481-8578	전화번호 +82-42-481-5373	

C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 2017-0298360 A1 (MOHAMED BENTIREES-ALJ 등) 2017.10.19 요약; 및 단락 [0003]	1-15
PX	CHOI, S. R. 등, Network Analysis Identifies Regulators of Basal-Like Breast Cancer Reprogramming and Endocrine Therapy Vulnerability, Cancer Research, 2022년 1월 15일(공개일), 82권, 2호, 페이지 320-333 요약; 페이지 320-331; 그림 1-6; 및 표 1	1-15

제1기재란 핵산염기 및/또는 아미노산 서열(첫 번째 용지의 1.c의 계속)

1. 국제출원에 개시된 핵산염기 및/또는 아미노산 서열과 관련하여, 국제조사는 다음에 기초하여 수행되었습니다.
 - a. 아래의 형태로 출원시 국제출원의 일부를 구성하는 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일
 - 서면 혹은 이미지 파일
 - b. PCT 규칙 13의3.1(a)에 따라 국제출원과 함께 국제조사만을 목적으로 부록 C/ST.25 텍스트 파일의 형태로 제출된 서열목록
 - c. 국제조사만을 목적으로 국제출원일 이후에 아래 형태로 제출된 서열목록
 - 부록 C/ST.25 텍스트 파일 (규칙 13의3.1(a))
 - 서면 혹은 이미지 파일 (규칙 제13의3.1(b) 및 시행세칙 713).
2. 추가로 서열목록에 대하여 하나 이상의 버전이나 사본이 제출된 경우, 후속 버전 또는 추가된 사본에 기재되어 있는 정보가 출원시 출원의 일부를 구성하는 정보와 동일하거나 또는 출원시의 개시범위를 벗어나지 않는다는 진술서가 제출되었습니다.
3. 추가 의견:

제2기재란 일부 청구항을 조사할 수 없는 경우의 의견(첫 번째 용지의 2의 계속)

PCT 제17조(2)(a)의 규정에 따라 다음과 같은 이유로 일부 청구항에 대하여 본 국제조사보고서가 작성되지 아니하였습니다.

1. 청구항: **16, 17**
 이 청구항은 본 기관이 조사할 필요가 없는 대상에 관련됩니다. 즉,
 청구항 16, 17은 수술 또는 치료에 의한 사람의 처치방법 및 진단방법에 관한 것입니다(PCT 제 17조 (2)(a)(i) 및 PCT 규칙 39.1(iv)).

2. 청구항:
 이 청구항은 유효한 국제조사를 수행할 수 없을 정도로 소정의 요건을 충족하지 아니하는 국제출원의 부분과 관련됩니다. 구체적으로는,

3. 청구항:
 이 청구항은 종속청구항이나 PCT규칙 6.4(a)의 두 번째 및 세 번째 문장의 규정에 따라 작성되어 있지 않습니다.

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
WO 2017-081171 A1	2017/05/18	AU 2016-352592 A1	2017/05/18
		AU 2016-352592 A1	2018/04/26
		CN 108348605 A	2018/07/31
		EP 3373967 A1	2018/09/19
		JP 2019-501957 A	2019/01/24
		US 2021-0186932 A1	2021/06/24
US 2017-0298360 A1	2017/10/19	EP 3197557 A1	2017/08/02
		WO 2016-046768 A1	2016/03/31