	<b>(19) 대한민국특허청(KR)</b> <b>(12) 공개특허공보(A)</b>	<b>(11) 공개번호</b> 10-2016-0061424 <b>(43) 공개일자</b> 2016년05월31일
<hr/>		
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>C12Q 1/68</i> (2006.01) <i>G01N 33/574</i> (2006.01)	(71) 출원인 편다시오 인스티튜트 드 르세르카 바이오메디카 (아이알비 바르셀로나) 스페인, 이-08028 바르셀로나, 10-12, 발디리 레 이삭 인스티튜시오 카탈라나 드 르세르카 아이 에스투 디스 아반카츠 스페인 이-08010 바르셀로나, 23, 파세이그 루이 스 컴패니즈	
(52) CPC특허분류 <i>C12Q 1/6886</i> (2013.01) <i>G01N 33/57415</i> (2013.01)	(72) 발명자 고미스 로저 스페인 이-08021 바르셀로나 씨/아베니르 35 플래닛 에바리스트 스페인 이-08360 바르셀로나 카넷 드 마르 씨/드 라이브 기테라스 17 (뒷면에 계속)	
(21) 출원번호 10-2016-7011949	(74) 대리인 김진희, 김태홍	
(22) 출원일자(국제) 2014년10월07일 심사청구일자 없음		
(85) 번역문제출일자 2016년05월04일		
(86) 국제출원번호 PCT/IB2014/002675		
(87) 국제공개번호 WO 2015/052583 국제공개일자 2015년04월16일		
(30) 우선권주장 61/888,984 2013년10월09일 미국(US)		

전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 **유방암으로부터 기원하는 골의 전이성 암의 예후 및 치료 방법**

### (57) 요약

본 발명은 MAF 유전자가 원발성 종양 샘플에서 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는, HER2+ 유방암에서 골 전이를 예후하는 방법에 관한 것이다. 유사하게, 본 발명은 또한 MAF 유전자 발현 수준, 증폭 또는 전위를 결정하는 단계를 포함하는, 다른 장기에서의 전이와 관련하여 골 전이가 발생할 수 있는 경향을 결정하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 유방암을 앓고 있는 피험체에서 조기 골 전이를 예측하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 HER2+ 유방암 전이 치료에서 사용하기 위한 치료제로서의 c-Maf 억제제에 관한 것이다. 본 발명은 골 전이를 앓고 있는 피험체의 골 전이를 예측하기 위한, 및 상기 피험체의 임상 결과를 예측하기 위한 키트에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 유방암을 앓고 있는 피험체를 유형분류하는 방법 및 유방암을 앓고 있는 피험체를 코호트로 분류하는 방법에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류

C12Q 2600/112 (2013.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/158 (2013.01)

G01N 2800/52 (2013.01)

(72) 발명자

**파블로빅 밀리카**

세르비아 14224 라코박 크랄자 페트라 프르보그 56

**아르날 안나**

스페인 이-08021 바르셀로나 플라카 델 줄 19-20

엔트. 3에이

---

**타라고나 마리아**

스페인 이-08006 바르셀로나 씨/아리바우 212 60  
3에이

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서,

- i) 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계, 및
- ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 참조 값에 비하여 상기 유전자의 증가된 발현 수준은 골 전이가 발생할 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 2

HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서,

- i) 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 참조 값에 비하여 상기 유전자의 증가된 발현 수준은 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 3

HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 맞춤형 요법(customized therapy)을 디자인하는 시험관내 방법으로서,

- i) 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- ii) i)에서 획득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 발현 수준이 상기 참조 값에 비하여 증가되어 있다면, 상기 피험체가 골 전이를 예방 및/또는 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격인(susceptible) 시험관내 방법.

#### 청구항 4

HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서,

- iii) 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- iv) i)에서 획득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 발현 수준이 상기 참조 값에 비하여 증가되어 있지 않다면, 상기 피험체는 골 전이를 예방 및/또는 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격이지 않는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서, 상기 유전자의 발현 수준이 평균보다 높다는 것은 골 전이의 위험이 증가되어 있다는 것을 나타내는 것이고, 상기 위험은 MAF 발현 수준에 비례하는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 6

유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이의 위험을 결정하는 시험관내 방법으로서, 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 유전자의 발현 수준이 평균값 + 1 표준 편차보다 높다는 것은 조기 골 전이의 위험이 증가되어 있다는 것을 나타내는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 7

제6항에 있어서, 유방암이 HER2+ 유방암인 방법.

#### 청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 골 전이가 골용해성 전이인 방법.

#### 청구항 9

골 전이를 동반하는 HER2+ 유방암을 앓는 피험체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서,

i) 상기 피험체의 골 전이성 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계, 및

ii) 단계 (i)에서 획득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 MAF 유전자 발현 수준이 상기 참조 값에 비하여 증가되어 있다면, 상기 피험체는 골 분해 예방을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적절한 시험관내 방법.

#### 청구항 10

골 전이를 동반하는 HER2+ 유방암을 앓는 피험체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서,

iii) 상기 피험체의 골 전이성 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계, 및

iv) 단계 (i)에서 획득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 MAF 유전자 발현 수준이 상기 참조 값에 비하여 증가되어 있지 않다면, 상기 피험체는 골 분해 예방을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격이지 않는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 11

제3항, 제4항, 제9항 및 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 요법이 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라넬레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 칼시토닌, 및 카텝신 K 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 12

제11항에 있어서, RANKL 억제제가 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포테게린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 방법.

#### 청구항 13

제12항에 있어서, RANKL 특이적 항체가 데노수맙(denosumab)인 방법.

#### 청구항 14

제12항에 있어서, RANKL 특이적 나노바디가 ALX-0141인 방법.

#### 청구항 15

제11항에 있어서, 비스포스포네이트가 졸레드론산인 방법.

#### 청구항 16

제11항에 있어서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제가 카보잔티닙(Cabozantinib)인 방법.

#### 청구항 17

제11항에 있어서, 라듐-223이 알파라딘(alpharadin)인 방법.

#### 청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, MAF 유전자 발현 수준을 결정하는 단계가 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 또는 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보성 DNA(cDNA), 또는 상기 cDNA의 단편을 정량하는 것을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 19

제18항에 있어서, 발현 수준이 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA, RNA 어레이 또는 뉴클레오티드 하이

브리드화 기법에 의해 정량되는 것인 방법.

#### 청구항 20

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, MAF 유전자 발현 수준을 결정하는 단계가 상기 유전자에 의해 코딩되는 단백질 또는 이의 변이체의 수준을 정량하는 것을 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 21

제20항에 있어서, 단백질 수준이 웨스턴 블롯, ELISA, 면역조직화학, 또는 단백질 어레이에 의해 정량되는 것인 방법.

#### 청구항 22

제1항 내지 제21항 중 어느 한 항에 있어서, 참조 값이 전이를 앓지 않은 피험체로부터의 HER2+ 유방암의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준인 방법.

#### 청구항 23

HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 HER2+ 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 참조 유전자 카피수에 비하여 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 참조 유전자 카피수에 비하여 MAF 유전자의 증폭은 골 전이가 발생할 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 24

HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 HER2+ 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 피험체의 샘플에서 MAF 유전자가 전위되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하는 시험관내 방법.

#### 청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 골 전이가 골용해성 전이인 방법.

#### 청구항 26

HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 참조 유전자 카피수에 비하여 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 참조 유전자 카피수에 비하여 MAF 유전자의 증폭은 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 27

HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 피험체의 샘플에서 MAF 유전자가 전위되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 MAF 유전자의 전위는 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 28

제24항 또는 제27항에 있어서, 유전자좌 16q23 또는 16q22-q24가 전위되어 있는 것인 방법.

#### 청구항 29

제24항, 제27항, 또는 제28항에 있어서, 유전자좌 16q23 또는 16q22-q24가 염색체 14의 유전자좌 14q32로 전위되어 있는 것인 방법.

#### 청구항 30

제23항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 참조 유전자 카피수에 비하여 증폭되어 있는지 여부를 추가로 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 참조 유전자 카피수에 비하여 MAF 유전자의 증폭은 골 전이가 발생할 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것인 방법.

#### 청구항 31

제23항 내지 제30항 중 어느 한 항에 있어서, MAF 유전자의 증폭 및 전위가 유전자좌 16q23 또는 16q22-q24의 증폭 또는 전위를 결정함으로써 결정되는 것인 방법.

#### 청구항 32

제23항 내지 제31항 중 어느 한 항에 있어서, MAF 유전자의 증폭 또는 전위가 MAF 유전자 특이적 프로브를 사용하여 결정되는 것인 방법.

#### 청구항 33

제32항에 있어서, MAF 유전자 특이적 프로브가 바이시스(Vysis) LSI/IGH MAF 이중 색상 이중 융합 프로브인 방법.

#### 청구항 34

제23항 내지 제33항 중 어느 한 항에 있어서, 참조 유전자 카피수가 전이를 앓지 않은 피험체로부터의 HER2+ 유방암의 종양 조직 샘플에서의 유전자 카피수인 방법.

#### 청구항 35

제23항 내지 제34항 중 어느 한 항에 있어서, 증폭은 인시츄 하이브리드화 또는 PCR에 의해 결정되는 것인 방법.

#### 청구항 36

제23항 내지 제35항 중 어느 한 항에 있어서, 피험체 샘플이 MAF 유전자에 대한 배수체인지 여부를 추가로 결정하는 단계를 포함하는 방법.

#### 청구항 37

제1항 내지 제36항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 종양 조직 샘플, 순환 종양 세포 또는 순환 종양 DNA인 방법.

#### 청구항 38

HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 예방하는 데 사용하기 위한 c-Maf 억제제.

#### 청구항 39

HER2+ 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비하여 전이성 종양 조직 샘플에서 MAF 수준이 상승되어 있는 피험체에서 골 전이를 치료하는 데 사용하기 위한, c-Maf 억제제, 또는 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제(agent).

#### 청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 상기 c-Maf 억제제가 MAF 특이적 siRNA, MAF 특이적 안티센스 올리고뉴클레오타이드, c-Maf 특이적 리보자임, c-Maf 억제성 항체 또는 나노바디, 우성(dominant) 음성 c-Maf 변이체, 표 1 또는 표 2로부터의 화합물, c-Maf 특이적 소형 분자, c-Maf 특이적 항체, c-Maf 특이적 항체 유사 분자, c-Maf 특이적 구조적으로 구속된(환형) 펩티드, c-Maf 특이적 스테이플드(stapled) 펩티드, 또는 c-Maf 특이적 알파바디로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사용하기 위한 c-Maf 억제제.

#### 청구항 41

제39항에 있어서, 상기 작용제가 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 또는 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 칼시토닌, 라툼-223 및 카텡신 K 억제제로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사

용하기 위한 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제.

#### 청구항 42

제41항에 있어서, RANKL 억제제가 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포로테게린으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사용하기 위한 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제.

#### 청구항 43

제42항에 있어서, RANKL 특이적 항체가 데노수맙인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사용하기 위한 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제.

#### 청구항 44

제42항에 있어서, RANKL 특이적 나노바디가 ALX-0141인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사용하기 위한 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제.

#### 청구항 45

제41항에 있어서, 비스포스포네이트가 졸레드론산인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사용하기 위한 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제.

#### 청구항 46

제41항에 있어서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제가 카보잔티닙인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사용하기 위한 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제.

#### 청구항 47

제41항에 있어서, 라툼-223이 알파라딘인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사용하기 위한 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제.

#### 청구항 48

제38항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 골 전이가 골용해성 전이인, 골 전이 또는 골 분해의 치료, 억제 또는 예방에 사용하기 위한 c-Maf 억제제, 또는 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제.

#### 청구항 49

유방암을 앓고 있는 피험체에서 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 키트로서, a) 상기 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트.

#### 청구항 50

유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 피험체의 임상 결과를 예측하기 위한 키트로서, a) 상기 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트.

#### 청구항 51

유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 요법을 결정하기 위한 키트로서, a) 상기 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단; 및 c) 정량된 발현 수준의 참조 발현 수준과의 비교에 기초하여 상기 피험체에서 골 전이를 예방 및/또는 감소시키기 위한 요법을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트.

#### 청구항 52

i) 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 시약, 및 ii) 골 전이의 위험과

상관관계가 있는 것으로 미리 결정된 하나 이상의 MAF 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트.

#### 청구항 53

제49항 내지 제52항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 발현을 정량하기 위한 수단이 MAF 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역에 특이적으로 결합하고/거나 이를 증폭시키는 프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함하는 것인 키트.

#### 청구항 54

제49항 내지 제53항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 HER2+ 유방암인 키트.

#### 청구항 55

HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플을 유형분류(typing)하는 시험관내 방법으로서,

- a) 상기 피험체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- b) 상기 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하는 단계;
- c) 정량된 MAF의 발현 수준을 미리 결정된 참조 MAF 발현 수준과 비교하여 상기 샘플을 유형분류하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 유형분류가 상기 피험체에서의 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험관내 방법.

#### 청구항 56

HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이의 위험을 예방 또는 감소시키는 방법으로서, 상기 피험체에게 골 전이를 예방 또는 감소시키는 작용제를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 작용제는 상기 피험체에서의 MAF의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 계획(treatment regimen)에 따라 투여되는 것인 예방 또는 감소 방법.

#### 청구항 57

유방암을 앓고 있는 피험체를 코호트로 분류하는 방법으로서, a) 상기 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 결정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 미리 결정된 참조 MAF 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 샘플에서의 MAF의 상기 발현 수준에 기초하여 상기 피험체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는 분류 방법.

#### 청구항 58

제57항에 있어서, 상기 코호트가 상기 참조 발현 수준과 비교하여 필적할만한 MAF 발현 수준을 갖는 것으로 결정된 1명 이상의 다른 개체를 포함하는 것인 방법.

#### 청구항 59

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 샘플에서의 MAF의 상기 발현 수준이 상기 미리 결정된 참조 수준에 비하여 증가되어 있고, 여기서 코호트의 구성원은 골 전이 위험이 증가되어 있는 것으로 분류되는 것인 방법.

#### 청구항 60

제57항 또는 제58항에 있어서, 상기 코호트가 임상 시험 수행을 위한 것인 방법.

#### 청구항 61

제57항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 유방암이 HER2+ 유방암인 방법.

#### 청구항 62

제55항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, 샘플이 종양 조직 샘플인 방법.

#### 청구항 63

제55항 내지 제60항 중 어느 한 항에 있어서, MAF 유전자, 16q23 또는 16q22-16q24 염색체 영역이 증폭 또는 전



위되어 있는 것인 방법.

#### 청구항 64

제3항에 있어서, 골 전이를 치료 또는 예방하는 데 사용되는 요법이 mTor 억제제인 방법.

#### 청구항 65

제64항에 있어서, mTor 억제제가 에버롤리무스(Everolimus)인 방법.

#### 청구항 66

제3항에 있어서, 골 전이를 치료 또는 예방하는 데 사용되는 요법이 Src 키나제 억제제인 방법.

제66항에 있어서, Src 키나제 억제제가 다사티닙인 방법.

#### 청구항 67

제3항에 있어서, 골 전이를 치료 또는 예방하는 데 사용되는 요법이 COX-2 억제제인 방법.

#### 청구항 68

제67항에 있어서, 제2 치료가 COX-2 억제제와 함께 사용되는 것인 방법.

#### 청구항 69

제3항에 있어서, 골 전이를 치료 또는 예방하는 데 사용되는 요법이 알파라딘인 방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 서열 목록에 대한 참조

[0002] 본 출원과 함께 출원된, 전자적으로 제출된 서열 목록(2014년 10월 7일 작성된, 48,430 바이트의 "3190\_011PC01\_SequenceListing\_ascii.txt")의 내용은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0003] 본 발명의 분야

[0004] 한 실시양태에서, 본 발명은 원발성 종양 샘플에서의 MAF 유전자, 및/또는 16q23 또는 16q22-24 유전자와 증폭 또는 전위 수준 결정에 기반한, ERBB2 양성(인간 표피 수용체 2 양성(human epidermal receptor 2 positive: HER2+)) 유방암에서의 골 전이 예후에 관한 것이다. 유사하게, 한 실시양태에서, 본 발명은 또한 MAF 유전자 발현 수준, 및/또는 16q23 또는 16q22-24 유전자와 증폭 또는 전위를 결정하는 단계를 포함하는, ERBB2 양성(인간 표피 수용체 2 양성, HER2+) 유방암을 앓고 있는 피험체에서 맞춤형 요법을 디자인하는 방법에 관한 것이다. 마지막으로, 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 HER2+ 유방암 전이, 특히, 골 전이의 치료에서 치료제로서의 c-Maf 억제제의 용도에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0005] 유방암은 전세계에서 두 번째로 가장 흔한 유형의 암이고(10.4%; 폐암 다음), 암에 의한 사망 원인 중 다섯 번째로 가장 흔한 것이다(폐암, 위암, 간암 및 결장암 다음). 유방암은 여성들 사이에서 암에 의한 사망 원인 중 가장 흔한 것이다. 2005년, 전세계에서 502,000명이 유방암으로 사망하였다(암에 의한 사망의 7%; 모든 사망의 거의 1%). 전세계에서 유방암 사례의 수는 1970년대부터 현저히 증가하고 있으며, 이러한 현상은 부분적으로는 서방 세계에서의 현대 생활습관 때문이다.

[0006] 유방암은 TNM 체계에 따라 병기로 분류된다(문헌 [American Joint Committee on Cancer. *AJCC Cancer Staging Manual*. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002](이 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 예후는 병기 분류의 결과와 밀접한 관련이 있으며, 병기 분류는 또한 임상 시험 및 의료 행위, 둘 모두에서 환자를 치료에 배치하는 데에도 이용된다. 병기 분류를 위한 정보는 하기와 같다:

[0007] · TX: 원발성 종양은 평가될 수 없다. T0: 종양의 증거가 없다. Tis: 상피내 암종, 침습 없다. T1: 종양의 크

기가 2 cm 이하이다. T2: 종양의 크기가 2 cm 초과 내지 5 cm 미만이다. T3: 종양의 크기가 5 cm이다. T4: 유방 또는 피부의 벽에서 성장하는 임의의 크기의 종양 또는 염증성 유방암.

[0008] · NX: 근처 림프절이 평가될 수 없다. N0: 암이 국부 림프절로 퍼져 있지 않다. N1: 암이 1개 내지 3개의 액와 림프절 또는 1개의 내유 림프절로 퍼져 있다. N2: 암이 4개 내지 9개의 액와 림프절 또는 다수의 내유 림프절로 퍼져 있다. N3: 하기 사항들 중 하나가 적용된다:

[0009] · 암이 10개 이상의 액와 림프절로 퍼져 있거나, 암이 쇄골하 림프절로 퍼져 있거나, 암이 쇄골상 림프절로 퍼져 있거나, 암이 액와 림프절에 영향을 미치고, 내유 림프절로 퍼져 있거나, 암이 4개 이상의 액와 림프절에 영향을 미치고, 최소량의 암이 내유 림프절 또는 감시 림프절 생검에 존재한다.

[0010] · MX: 원거리로의 퍼짐(전이)이 존재하는 것은 평가될 수 없다. M0: 원거리로의 퍼짐은 없다. M1: 쇄골상 림프절을 포함하지 않는 원거리 장기로의 퍼짐이 발생되어 있다.

[0011] 고형 종양 암을 앓고 있는 환자 대부분이 전이 이후에 사망한다는 사실은 종양이 전이될 수 있도록 하는 분자 및 세포 기전을 이해하는 것이 중요하다는 것을 의미한다. 최근의 공개 문헌들을 통해 전이가 복잡하지만, 아직은 거의 알려지지 않은 기전에 의해 어떻게 유발되는지, 및 또한 상이한 전이성 세포 유형이 어떻게 특이적 장기로 향하는 친화성을 갖는지 입증되었다. 이러한 조직 특이적 전이성 세포는 그가 특정 장기에서 전이 증식할 수 있도록 하는 일련의 획득된 기능을 가진다.

[0012] 모든 세포는 그의 표면 상에, 그의 세포질에 및 세포 핵에 수용체를 가진다. 특정 화학 메신저, 예컨대, 호르몬은 상기 수용체에 결합하고, 이는 세포에서 변화를 일으킨다. 유방암 세포에 영향을 미칠 수 있는 3개의 중요한 수용체 3개: 에스트로겐 수용체(ER: estrogen receptor), 프로게스테론 수용체(PR: progesterone receptor) 및 HER2/neu가 존재한다. 이들 수용체 중 임의의 수용체를 갖는 세포를 명명하기 위해, 수용체가 존재하는 경우에는 그에 양성 부호로 표기하고, 수용체가 존재하지 않는 경우에는, 음성 부호로 표기한다: ER 양성(ER+), ER 음성(ER-), PR 양성(PR+), PR 음성(PR-), HER2 양성(HER2+) 및 HER2 음성(HER2-). 수용체 상태는 특정 치료, 예를 들면, 타목시펜 또는 트라스투주맙의 사용 적합성을 결정하기 때문에 모든 유방암들에 대한 중요한 평가 대상이 되었다.

[0013] 무감독 유전자 발현 어레이 프로파일링은 고유한 서브타입, 예컨대, 내강형 A, 내강형 B, HER2+/ER- 및 기저양 서브타입의 확인을 통해 유방암의 불균질성에 대한 생물학적 증거를 제공하였다.

[0014] HER2+ 암은 다른 수준의 과다발현을 포함하는, 유전자 HER2를 과다발현하는 종양으로서 정의되어 있다. 이 하위군은 모든 유형의 유방암의 30%를 차지한다. 이는 질환 재발 증가 및 좋지 않은 예후와 강한 관련성을 가진다. 과다발현 또한 난소암, 위암, 및 공격적 형태의 자궁암, 예컨대, 자궁 장액 자궁내막암에서 발생하는 것으로 알려져 있다.

[0015] 유방암을 치료하는 근본 원리는 종양이 국재화되어 있는 경우에는 가능한 아주번트 호르몬 요법(타목시펜 또는 아로마타제 억제제 이용), 화학요법, 및/또는 방사선요법 함께 수술하는 것이다. 현재, 수술 이후(아주번트 요법) 치료를 위해 제안되는 사항은 패턴을 따른다. 전세계 다기관을 실제 연구 결과를 논의하기 위해 매 2년마다 스위스 장트 갈렌에서 세계 회의가 개최되기 때문에, 이 패턴은 변경될 수 있다. 유사하게, 상기 패턴은 또한 미국 국립보건원(NIH: National Institute of Health)의 합의 기준에 따라 리뷰된다. 상기 기준에 기초하여, 림프절에 전이를 가지지 않은 환자 중 85-90% 초과는 아주번트 전신 요법을 받을 수 있는 후보가 될 것이다. HER2+ 환자는 HER2에 대한 아주번트 표적화된 요법에 수용적이다. HER2는 단일클론 항체인 트라스투주맙(허셉틴(Herceptin)으로 시판)의 표적이다. 트라스투주맙은 오직 HER2가 과다발현되는 암에서만 효과적이다. 대안적 단일클론 항체, 예컨대, 약물, T-DM1, 및 소형 억제제에 조합된 항체인, HER2 및 HER3 수용체의 이량체화를 억제시키는 퍼투주맙(Pertuzumab)은 강력한 효능을 가진 표적화된 치료학적 옵션이다. 예후를 평가하고, 트라스투주맙 요법에 대한 적합성을 결정하기 위해 유방암 환자에서 HER2 검사가 수행된다. 트라스투주맙은 고가이고, 심장 독성과 관련이 있기 때문에, 이는 HER2-양성 개체로 한정된다는 점이 중요하다. HER2- 종양의 경우, 트라스투주맙의 위험이 이점보다 더 크다는 점은 명백하다.

[0016] 일반적으로 테스트는 미세 니들 흡인, 코어 니들 생검, 진공 지원 유방 생검, 또는 외과적 절제에 의해 취득된 생검 샘플에 대해 수행된다. 면역조직화학은 샘플 중에 존재하는 HER2 단백질의 양을 측정하는 데 사용된다. 별법으로, 형광 인시츄 하이브리드화(FISH: fluorescence *in situ* hybridization)는 존재하는 유전자의 카피수를 측정하는 데 사용될 수 있다.

[0017] 현재, PCR 검정법, 예컨대, 온코타입 DX(Oncotype DX) 또는 마이크로어레이 검정법, 예컨대, 맘마프린트

(MammaPrint)가 특이적 유전자의 발현에 기초하여 유방암의 재발의 위험을 예측할 수 있다. 2007년 2월, 맘마프린트 검정법이 미국 식품의약국(Food and Drug Administration)으로부터의 공식적인 허가를 받는 것을 달성하는데 있어 제1의 유방암 지표가 되었다.

[0018] 특허 출원 EP1961825-A1에는 그 중에 MAF를 포함하는 대조군 샘플에서의 그의 상응하는 발현 수준과의 비교로 중앙 조직 샘플 중에서의 하나 이상의 마커의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하는, 골, 폐, 간 또는 뇌로의 유방암 전이의 발생을 예측하는 방법이 기술되어 있다. 그러나, 상기 출원은 유방암 환자의 생존율을 결정할 수 있기 위해 여러 유전자들을 동시에 결정할 것을 요구하고, 골 전이 부재 생존가능성을 예측하기 위한 유전자 시그니처(signature)의 능력들 사이의 상관관계가 통계적으로 유의하지 않았다.

[0019] 특허 출원 US2011/0150979에는 FOXC1의 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 기저양 유방암의 예후를 예측하는 방법이 기술되어 있다.

[0020] 특허 출원 US2010/0210738은 샘플에서의 무작위적으로 상향 조절되어 있거나, 또는 하향 조절되어 있는 일련의 유전자의 발현 수준을 검출하는 단계를 포함하는, 삼중 음성 유방암을 앓고 있는 피험체에서 암을 예후하는 방법에 관한 것이다.

[0021] 특허 출원 US2011/0130296은 삼중 음성 유방암의 진단 및 예후에서 유용한 마커 유전자의 확인에 관한 것이다.

[0022] 삼중 음성 유방암을 앓고 있는 피험체에서 전이가 발생할 확률을 예측할 수 있게 하는 신규 마커를 확인하는 것이 요구된다. 가장 적합한 치료법을 선택함에 있어 신규한 예후 인자를 확인하는 것이 가이드로서의 역할을 할 것이다.

## 발명의 내용

[0023] 본 발명의 요약

[0024] 한 측면에서, 본 발명은

[0025] i) Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계; 및

[0026] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

[0027] 를 포함하고, 여기서 상기 참조 값과 비교하여 상기 유전자의 발현 수준이 증가되어 있다면, 이는 골 전이가 발생할 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것인, Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 발현 수준 증가는 유전자와 증폭을 통해 이루어진다. 일부 실시양태에서, 발현 수준 증가는 유전자와 전위를 통해 이루어진다.

[0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0029] i) 골 전이성 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0030] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

[0031] 를 포함하고, 여기서 상기 참조 값과 비교하여 상기 유전자의 발현 수준이 증가되어 있다면, 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것인, 골 전이성 HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0032] 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0033] i) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계; 및

[0034] ii) i)에서 수득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계

[0035] 를 포함하고, 여기서 상기 참조 값과 비교하여 발현 수준이 증가되어 있다면, 상기 피험체는 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격인(susceptible), HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법에 관한 것이다. 본 방법의 특정 측면에서, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받는다. 상기 참조 값과 비교하여 발현 수준이 증가되어 있지 않는 경우, 이때 상기 피험체는 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격이 아니다. 본 방법의 특정 측면에서, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받지 않는다.

- [0036] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유방암, 예를 들어, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 유전자의 발현 수준이 평균값 + 1 표준 편차보다 높다면, 이는 조기 골 전이의 위험이 증가되어 있다는 것을 나타내는 것인, 유방암, 예를 들어, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이의 위험을 결정하는 방법에 관한 것이다. 본 방법의 특정 측면에서, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 또는 억제하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받는다.
- [0037] 또 다른 측면에서, 본 발명은
- [0038] i) 골 전이를 동반하는 HER2+ 유방암을 앓는 피험체의 골 전이성 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0039] ii) 단계 (i)에서 수득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계
- [0040] 를 포함하고, 여기서 상기 참조 값과 비교하여 MAF 유전자 발현 수준이 증가되어 있다면, 상기 피험체는 골 분해 예방을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격인, 골 전이를 동반하는 HER2+ 유방암을 앓는 피험체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법에 관한 것이다. 본 방법의 특정 측면에서, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 억제, 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받는다. 상기 참조 값과 비교하여 MAF 유전자 발현 수준이 증가되어 있지 않는 경우, 이때 상기 피험체는 골 분해 예방을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격이 아니다. 본 방법의 특정 측면에서, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받지 않는다.
- [0041] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 참조 유전자 카피수와 비교하여 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 참조 유전자 카피수와 비교하여 MAF 유전자가 증폭되어 있다면, 이는 골 전이가 발생할 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 HER2+ 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법에 관한 것이다. 본 방법의 특정 측면에서, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 또는 억제하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받는다.
- [0042] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유방암, 예를 들어, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서 MAF 유전자가 전위되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서 MAF 유전자가 전위되어 있다면, 이는 골 전이가 발생할 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것인, 유방암, 예를 들어, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 상기 암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법에 관한 것이다. 본 방법의 특정 측면에서, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 또는 억제하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받는다.
- [0043] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 참조 유전자 카피수와 비교하여 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 참조 유전자 카피수와 비교하여 MAF 유전자가 증폭되어 있다면, 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법에 관한 것이다. 본 방법의 특정 측면에서, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받는다. 상기 증폭이 관찰되지 않는 경우, 이때, 이어서, 피험체는 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받지 않는다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서 MAF 유전자가 전위되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, MAF 유전자가 전위(즉,  $t(14,16)$ )되어 있다면, 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 본 발명은 MAF의 증폭 또는 전위를 포함하는 환자를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 것에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 맞춤형 요법은 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물이다.
- [0044] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암으로부터 골 전이를 예방하는 데 사용하기 위한 c-Maf 억제제에 관한 것이다.
- [0045] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있고 대조군 샘플과 비교하여 전이성 샘플에서 MAF 수준이 상승되어 있는 피험체에서 골 전이를 치료하는 데 사용하기 위한 c-Maf 억제제, 또는 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제에 관한 것이다.
- [0046] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 정량하기 위한 수단, 및 b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는, Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 키트에 관한 것이다



다. 본 발명은 또한 Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 상기 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이어서, 피험체는 키트 사용 결과에 기초하여 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받거나, 또는 받지 않는다.

[0047] 예를 들어, 항EGFR 요법(즉, 세특시맙)은 KRAS 상류의 수용체를 표적화하고, 따라서, 돌연변이는 상류의 작용을 무용지물로 만들고, 환자는 상기 요법으로부터 어떤 이익도 얻지 못하는 바, 이에 KRAS 돌연변이체 환자는 상기 요법을 받지 않는다. KRAS가 야생형인 환자는 RAS 경로를 차단하는 약물 사용으로 이익을 얻게 된다. 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 전위, 16q23 또는 16q22-24 유전자와 증폭 또는 전위를 결정하기 위한 수단; 및 b) 상기 샘플 중의 MAF 유전자의 전위, 16q23 또는 16q22-24 유전자와 증폭 또는 전위를 참조 MAF 샘플과 비교하기 위한 수단을 포함하는, Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 키트에 관한 것이다. 본 발명은 또한 유방암을 앓고 있는 피험체에서 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 상기 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이어서, 피험체는 키트 사용 결과에 기초하여 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받거나, 또는 그로부터 배제된다.

[0048] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 증폭, 16q23 또는 16q22-24 유전자와 증폭 또는 전위를 정량하기 위한 수단; 및 b) 상기 샘플 중의 MAF 유전자의 증폭된 수준, 16q23 또는 16q22-24 유전자와 증폭 또는 전위를 참조와 비교하기 위한 수단을 포함하는, Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0049] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는, HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 피험체의 임상 결과를 예측하기 위한 키트에 관한 것이다. 본 발명은 또한 HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 피험체의 임상 결과를 예측하기 위한 상기 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이어서, 피험체는 키트 사용 결과에 기초하여 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받거나, 또는 받지 않는다.

[0050] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단; 및 c) 참조 발현 수준과의 정량된 발현 수준의 비교에 기초하여 상기 피험체에서 골 전이를 예방 및/또는 감소시키기 위한 요법을 결정하는 수단을 포함하는, Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 요법을 결정하기 위한 키트에 관한 것이다. 본 발명은 또한 유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 요법을 결정하기 위한 상기 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이어서, 피험체는 키트 사용 결과에 기초하여 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받거나, 또는 받지 않는다.

[0051] 또 다른 측면에서, 본 발명은 i) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 시약, 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계가 있는 것으로 미리 결정된 하나 이상의 MAF 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트에 관한 것이다. 본 발명은 또한 Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 상기 키트의 용도에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 이어서, 피험체는 키트 사용 결과에 기초하여 골 전이를 예방, 억제 및/또는 치료하는 1개 이상의 치료 약물을 투여받거나, 또는 받지 않는다.

[0052] 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0053] a) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체로부터의 샘플을 제공하는 단계;

[0054] b) 상기 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하는 단계;

[0055] c) 정량된 MAF의 발현 수준을 미리 결정된 참조 MAF 발현 수준과 비교하여 상기 샘플을 유형분류하는 단계

[0056] 를 포함하고, 여기서, 상기 유형분류가 상기 피험체에서의 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플을 유형분류하는 시험관내 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 피험체는 유형분류에 의해 제공되는 예후 정보에 기초하여 1개 이상의 치료제를 투여받거나, 또는 투여받지 않는다.

[0057] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에게 골 전이를 예방 또는 감소시키는 작용제를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 작용제는 상기 피험체에서의 MAF의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 계획(treatment regimen)에 따라 투여되는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이의 위험을

예방 또는 감소시키는 방법에 관한 것이다.

[0058] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 결정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 미리 결정된 참조 MAF 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 샘플에서의 MAF의 상기 발현 수준에 기초하여 상기 피험체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체를 코호트로 분류하는 방법에 관한 것이다. 특정 측면에서, 코호트는 임상 시험을 수행하는 데 사용된다.

## 도면의 간단한 설명

[0059] 도 1: 유방암 원발성 종양에서 골 전이 발생률과 관련된 MAF 유전자를 포함하는, 16q22-24.

a) HER2+ 원발성 유방암 조직에서의 16q22-24 DNA 증폭을 측정하기 위한, 16q22-24 DNA 증폭된 영역 내의 16q23 영역 프로브, 및 CEP16(16q11.2) 프로브를 이용한 FISH. 16q23이 증폭되지 않은 (케이스1, 16q23/CEP16 CNA < 1.5개의 카피수) 환자 샘플, 및 16q23이 증폭된 (케이스2, 16q23/CEP16 CNA > 1.5개의 카피수) 환자 샘플의 대표 영상.

b) I, II 및 III기 BC 인간 원발성 종양 데이터 세트에서 골에서의 재발 이전에 사망한 경우를 경쟁 이벤트로서 사용한, 임의 시점에서의 골 전이의 누적 발생률(n=334). 환자를 세포당 1.5개의 16q23/CEP16 카피수인 컷 오프에 기초한 16q23/CEP16 CNA 음성군(<1.5) 및 16q23/CEP16 CNA 양성군(> 또는 = 1.5)에 따라 계층 분류하였다. 코어 1개당 최소 50개의 세포 및 종양 1개당 3개의 코어를 점수화하였다. HR(hazard ratio)-위험 비율, CI(Confidence Interval)-신뢰 구간.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0060] 본 발명의 상세한 설명

[0061] 일반 용어 및 표현에 대한 정의

[0062] 본원에서 사용되는 경우, "및/또는"은 언급된 두 특징 또는 성분들 각각의 구체적인 개시내용을 나머지 다른 하나와 함께, 또는 나머지 다른 하나 없이 개시하는 것으로 이해하여야 한다. 예를 들어, 'A 및/또는 B'는 (i) A, (ii) B 및 (iii) A 및 B 각각의 구체적인 개시내용을 마치 각각이 본원에서 개별적으로 기술된 것과 같이 개시하는 것으로 이해하여야 한다.

[0063] 본원에서 사용되는 바, "골 분해를 회피하거나, 예방하기 위한 작용제"는 골모세포 증식을 자극하거나, 파골세포 증식을 억제하거나, 또는 골 구조를 고정시킴으로써 골 분해를 예방하거나, 억제하거나, 치료하거나, 감소시키거나, 또는 중단시킬 수 있는 임의의 분자를 의미한다.

[0064] 본원에서 사용되는 바, "유전자의 증폭"이라는 용어는 유전자의 또는 유전자 단편의 다양한 카피가 개별 세포 또는 세포주에서 형성되는 과정을 의미한다. 유전자의 카피가 반드시 동일한 염색체에 위치할 필요는 없다. 증폭된 영역은 종종 "애플리온"으로 명명된다. 보통, 생성된 mRNA의 양, 즉, 유전자 발현 수준 또한 특정 유전자의 카피수에 비례하여 증가한다.

[0065] 본원에서 사용되는 바, "HER2+"는 보통 세포 표면 상에 위치하는 수용체인 표피 성장 인자 수용체 타입 2(HER2 또는 ErbB2)의 발현이 검출가능하고/거나, HER2 유전자에 대한 증폭이 있는 종양 세포를 특징으로 하는 유방암을 지칭한다. 본원에서 사용되는 바, 종양 세포는 다중클론 항HER2 1차 항체를 사용하는 반정량적 면역조직화학적 검정법인 헤르셉테스트(HerceptTest)<sup>TM</sup> 키트(코드 K5204, 다코 노쓰 아메리카 인크.(Dako North America, Inc.: 미국 캘리포니아주 카운테리아)로 테스트되었을 때, 그의 테스트 결과 점수가 0, 또는 1+ 또는 2+일 경우, 또는 HER2 FISH 음성인 경우, HER2 과다발현에 대한 음성인 것으로 간주된다.

[0066] 본원에서 사용되는 바, "c-MAF 유전자" 또는 "MAF"(MAF 또는 MGC71685로도 공지되어 있는 v-maf 근건막층(musculoaponeurotic) 섬유육종 온코진 상동체(조류))는 동종이량체 또는 이종이량체와 같이 작용하는 류신 지퍼를 함유하는 전사 인자이다. DNA 결합 부위에 따라, 코딩된 단백질은 전사 활성인자 또는 억제인자일 수 있다. MAF를 코딩하는 DNA 서열은 수탁 번호 NG\_016440(서열 번호 1(코딩))하에 NCBI 데이터베이스에 기술되어 있다. MAF의 게놈 서열은 서열번호 13에 기술되어 있다. 본 발명의 방법은 상기 코딩 서열 또는 상기 게놈 DNA 서열을 사용할 수 있다. 2개의 메신저 RNA가 상기 DNA 서열로부터 전사되고, 이들 각각은 2개의 MAF 단백질 이소폼인  $\alpha$  이소폼 및  $\beta$  이소폼 중 하나를 생성할 것이다. 상기 이소폼들 각각에 대한 상보적 DNA 서열들은 각각 수탁 번호 NM\_005360.4(서열 번호 2) 및 NM\_001031804.2(서열 번호 3)하에 NCBI 데이터베이스에 기술되어

있다. 암의 예후를 예측하기 위한 MAF 유전자의 용도는 예를 들어, 국제 출원 번호 PCT/IB2013/001204 및 PCT/ES2011/070693 및 미국 출원 번호 제13/878,114호 및 제13/878,114호(삼중-음성 유방암 및 ER+ 유방암), 국제 출원 번호 PCT/US2014/026154(신장 세포 암종), 국제 출원 번호 PCT/US2014/028722(유방암), 국제 출원 번호 PCT/US2013/044584(폐암), 미국 출원 번호 제14/050,262호 및 국제 출원 번호 PCT/IB2013/002866(전립선암), 미국 출원 번호 제14/213,670호 및 국제 출원 번호 PCT/US2014/028569(전이성 암)(상기 출원은 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에서 살펴볼 수 있다.

[0067] 본원에서 사용되는 바, "MAF 억제제"는 MAF 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(MAF 유전자 전사를 중단시키고/시키거나, MAF 유전자 발현으로부터 비롯되는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 MAF 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써, 이 둘 모두에 의해 MAF 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 의미한다. MAF 유전자 발현 억제제는 국제 특허 공보 WO2005/046731(그의 전문이 본원에서 참조로 포함)에 제시된 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-Maf의 능력에 기초하는 방법; 국제 특허 공보 WO2008098351(그의 전문이 본원에서 참조로 포함)에 기술된 바와 같이, c-Maf를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-Maf 반응 영역(MARE 또는 c-Maf 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 제어하에 리포터 유전자의 전사 능력을 차단하는 억제제 또는 테스트 화합물의 능력에 기초하는 방법을 사용하여 확인할 수 있다. c-Maf의 변이체는 또한 미국 공개 번호 US2009/048117A(그의 전문이 본원에서 참조로 포함)에 기술된 바와 같이 NFATc2 및 c-Maf를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 제어하에 리포터 유전자의 발현을 차단하는 억제제의 능력에 기초하여 확인할 수 있다.

[0068] 본원에서 사용되는 바, 라파마이신의 포유동물 표적(mTOR) 또는 "mTor"은 EC 2.7.11.1에 상응하는 단백질을 지칭한다. mTor 효소는 세린/트레오닌 단백질 키나제이고, 세포 증식, 세포 이동성, 세포 성장, 세포 생존 및 전사를 조절한다.

[0069] 본원에서 사용되는 바, "mTor 억제제"는 mTor 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(mTor 유전자 전사를 중단시키고/시키거나, mTor 유전자 발현으로부터 비롯되는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 mTor 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써, 이 둘 모두에 의해 mTor 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 의미한다. 2개 이상의 표적들 및 그 중에서도 mTor 단백질 활성이 있는 것을 갖는 억제제를 포함한다.

[0070] 본원에서 사용되는 바, "Src"는 EC 2.7.10.2에 상응하는 단백질을 지칭한다. Src는 비수용체 티로신 키나제 및 프로토-온코진이다. Src는 세포 성장 및 배아 발생에서 중요한 역할을 할 수 있다.

[0071] 본원에서 사용되는 바, "Src 억제제"는 Src 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(Src 유전자 전사를 중단시키고/시키거나, Src 유전자 발현으로부터 비롯되는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 Src 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써, 이 둘 모두에 의해 Src 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 의미한다.

[0072] 본원에서 사용되는 바, "프로스타글란딘-엔도퍼옥시드 신타제 2", "사이클로옥시게나제-2" 또는 "COX-2"는 EC 1.14.99.1에 상응하는 단백질을 지칭한다. COX-2는 아라키돈산을 엔도퍼옥시드 H2로 전환시키는 것을 담당한다.

[0073] 본원에서 사용되는 바, "COX-2 억제제"는 COX-2 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(COX-2 유전자 전사를 중단시키고/시키거나, COX-2 유전자 발현으로부터 비롯되는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 COX-2 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써, 이 둘 모두에 의해 COX-2 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 의미한다.

[0074] 본원에서 사용되는 바, "결과" 또는 "임상 결과"는 는 발생된 질환 및/또는 질환 진행 과정을 의미하고, 예를 들어, 재발, 재발까지의 시간, 전이, 전이까지의 시간, 전이 수, 전이 부위의 개수 및/또는 질환으로 인한 사망을 특징으로 할 수 있다. 예를 들어, 좋은 임상 결과는 치유, 재발의 예방, 전이의 예방 및/또는 고정된 시간 이내의(재발 없이) 생존을 포함하고, 좋지 않은 임상 결과는 질환 진행, 전이 및/또는 고정된 시간 이내의 사망을 포함한다.

[0075] 본원에서 사용되는 바, 유전자의 "발현 수준"이라는 용어는 시험체의 샘플에서 유전자에 의해 생성된 유전자 생성물의 측정가능한 양을 의미하며, 여기서, 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 시험체의 샘플 및/또는 참조 샘플 또는 샘플들로부터 유도되고, 예를 들어, 새로 검출될 수 있거나, 이전 결정에 상응할 수 있다. 발현 수준은 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이, 예를 들어, 마이크로어

레이 방법, PCR 방법(예컨대, qPCR), 및/또는 항체 기반 방법을 이용함으로써 결정될 수 있거나 측정될 수 있다.

- [0076] 본원에서 사용되는 바, "유전자 카피수"라는 용어는 세포에서의 핵산 분자의 카피수를 의미한다. 유전자 카피수는 세포의 게놈(염색체) DNA에서의 유전자 카피수를 포함한다. 정상 세포(비종양 세포)에서 유전자 카피수는 보통 2 카피(염색체 쌍의 각각의 구성원에서 1 카피)이다. 유전자 카피수는 종종 세포 집단의 샘플로부터 수득된 유전자 카피수의 절반을 포함한다.
- [0077] "발현 수준 증가"는 MAF 유전자의 수준을 언급할 때, 참조 샘플 또는 대조군 샘플에서의 발현 수준보다 발현 수준이 더 큰 것으로 이해된다. 수준 증가는 유전자 또는 16q23 또는 16q22-24 염색체 유전자와 증폭 또는 전위에 의한 다른 기전의 배제 없이 유발될 수 있다. 특히, 환자로부터 단리된 샘플에서의 발현 수준이 참조 또는 대조군과 비교하여 적어도 약 1.1배, 약 1.5배, 약 5배, 약 10배, 약 20배, 약 30배, 약 40배, 약 50배, 약 60배, 약 70배, 약 80배, 약 90배, 약 100배 또는 심지어 그 초과인 경우에, 샘플은 높은 MAF 발현 수준을 갖는 것으로 간주될 수 있다.
- [0078] 본원에서 사용되는 바, "프로브"란 관심의 대상이 되는 특정 핵산 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 의미한다. 일부 실시양태에서, 프로브는 전위가 일어나는 것으로 공지되어 있는 염색체의 영역에 대해 특이적일 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로브는 특이적 표지 또는 태그를 가진다. 일부 실시양태에서, 태그는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브는 그의 표지화가 백금과 핵산 및 단백질의 안정한 배위결합에 기초하는 것인 DNA 인시츄 하이브리드화 프로브이다. 일부 실시양태에서, 프로브는 미국 특허 출원 12/067532 및 미국 특허 출원 12/181,399(그의 전문이 참조로 포함된다)에 기술되어 있거나, 또는 문헌 [Swennenhuis *et al.* "Construction of repeat-free fluorescence in situ hybridization probes" *Nucleic Acids Research* 40(3):e20 (2012)]에 기술되어 있는 바와 같다.
- [0079] 본원에서 사용되는 바, "태그" 또는 "표지"는 프로브, 또는 프로빙되는 위치가 시각화되거나, 마킹되거나, 또는 다른 방식으로 포착되게 하는, 프로브와 직접적으로 또는 간접적으로 회합되는 임의의 물리적 분자를 의미한다.
- [0080] 본원에서 사용되는 바, "전위"는 동등하지 않은 또는 동등한 양의 염색체 물질이 염색체들 사이에 교환되는 것을 의미한다. 일부 경우에서, 전위는 동일한 염색체 상에서 일어난다. 일부 경우에서, 전위는 상이한 염색체들 사이에서 일어난다. 전위는 유방암 및 백혈병을 비롯한 많은 유형의 암들에서 높은 빈도로 일어난다. 전위는 1차 상호간 전위 또는 보다 복잡한 2차 전위일 수 있다. 많은 암들에서 개시 이벤트를 구성하는 것으로 생각되는 면역글로불린 중쇄(IgH) 유전자좌를 포함하는 수개의 1차 전위가 존재한다(문헌 [Eychene, A., Rocques, N., and Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. *Nature Reviews: Cancer*. 8: 683-693]).
- [0081] 본원에서 사용되는 바, "배수체" 또는 "배수성"은 세포가 관심의 대상이 되는 유전자를 2 카피 초과로 함유한다는 것을 나타낸다. 일부 경우에서, 관심의 대상이 되는 유전자 MAF이다. 일부 실시양태에서, 배수성은 관심의 대상이 되는 유전자의 발현의 추적과 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 배수성은 게놈 불안정성과 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 게놈 불안정성은 염색체 전위를 유발할 수 있다.
- [0082] 본원에서 사용되는 바, "전체 게놈 서열분석"은 유기체의 전체 게놈이 한번에 서열분석되는 과정이다. 예컨대, 문헌 [Ng., P.C. and Kirkness, E.F., Whole Genome Sequencing. 2010. *Methods in Molecular Biology*. 628: 215-226]을 참조할 수 있다.
- [0083] 본원에서 사용되는 바, "엑솜 서열분석"은 유기체의 DNA의 전체 코딩 영역이 서열분석되는 과정이다. 엑솜 서열분석에서, mRNA가 서열분석된다. 게놈의 비번역된 영역은 엑솜 서열분석에 포함되지 않는다. 예컨대, 문헌 [Choi, M. *et al.*, Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. 2009. *PNAS*. 106(45): 19096-19101]을 참조할 수 있다.
- [0084] 본원에서 사용되는 바, "전이"는 암이 시작된 장기로부터 다른 장기로 증식되는 것으로서 이해된다. 이는 일반적으로 혈액 또는 림프계를 통해 일어난다. 암 세포가 퍼져 새로운 종양을 형성하는 경우, 상기 새로운 종양은 2차 또는 전이성 종양으로 지칭된다. 2차 종양을 형성하는 암 세포는 원래의 종양의 암 세포와 유사하다. 예를 들어, 유방암이 폐로 퍼지는(전이되는) 경우, 2차 종양은 악성 유방암 세포로 형성된다. 폐에서의 질환은 전이성 유방암이고, 폐암이 아니다. 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 전이는 골로 퍼진(전이된) HER2+ 유방암이다.
- [0085] 본원에서 사용되는 바, "예측"은 "HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 원거리 장기로의 전이가 발생할 확률을 결정하는 것을 의미한다. 본원에서 사용되는 바, "좋은 예후"는 피험체가 지정된 시간 이내에 생존하고/거나,



재발 또는 원거리 전이를 갖지 않거나, 가질 위험이 낮을 것으로 예상(예컨대, 예측)된다는 것을 나타낸다. "낮은"이라는 용어는 상대적인 용어이고, 본 출원과 관련하여 임상 결과(재발, 원거리 전이 등) 면에서 "낮은" 발현 군의 위험을 지칭한다. "낮은" 위험은 불균질한 암 환자 집단에 대한 평균 위험보다 더 낮은 위험으로 간주될 수 있다. 문헌 [Paik et al. (2004)]의 연구에서 전체적으로 "낮은" 재발 위험은 15% 미만인 것으로 간주되었다. 또한, 위험은 시간의 함수로 변화할 것이다. 시간은 예를 들어, 암의 초기 진단 후 또는 예후가 수행된 후 5년, 10년, 15년 또는 심지어 20년일 수 있다.

[0086] 본원에서 사용되는 바, "중지 않은 예후"는 피험체가 지정된 시간 이내에 생존하지 못하고/거나, 재발 또는 원거리 전이를 갖거나, 가질 위험이 높을 것으로 예상, 예컨대, 예측된다는 것을 나타낸다. "높은"이라는 용어는 상대적인 용어이고, 본 출원과 관련하여 임상 결과(재발, 원거리 전이 등) 면에서 "높은" 발현 군의 위험을 지칭한다. "높은" 위험은 불균질한 암 환자 집단에 대한 평균 위험보다 더 높은 위험으로 간주될 수 있다. 문헌 [Paik et al. (2004)]의 연구에서 전체적으로 "높은" 재발 위험은 15% 초과인 것으로 간주되었다. 또한, 위험은 시간의 함수로 변화할 것이다. 시간은 예를 들어, 암의 초기 진단 후 또는 예후가 수행된 후 5년, 10년, 15년 또는 심지어 20년일 수 있다.

[0087] 본원에서 사용되는 바, "참조 값(reference value)"은 환자 또는 환자로부터 채취된 샘플의 실험실 검사에 의해 획득된 값/데이터에 대한 참조로서 사용된 실험실 값을 의미한다. 참조 값 또는 참조 수준은 절대값; 상대값; 상한 및/또는 하한을 갖는 값; 값의 범위; 평균값; 중간값; 중앙값; 또는 특정 대조군 또는 기준선 값과 비교된 값일 수 있다. 참조 값은 보다 이른 초기 시점에서의 개별 샘플 값, 예컨대, 테스트되는 피험체의 샘플로부터 획득된 값에 기초할 수 있다. 참조 값은 다수의 샘플들, 예컨대, 역연령이 일치된 군의 피험체 집단으로부터의 샘플에 기초할 수 있거나, 또는 테스트될 샘플을 포함하거나 배제하는 샘플 풀에 기초할 수 있다.

[0088] 본원에서 사용되는 바, "피험체" 또는 "환자"는 포유동물로서 분류된 모든 동물들을 지칭하고, 가축 및 농장 동물, 영장류 및 인간, 예를 들어, 인간, 비인간 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류를 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 바람직하게는, 피험체는 임의의 연령 또는 인종의 인간 남성 또는 여성이다.

[0089] 본원에서 사용되는 바, "치료"는 본원에 기술된 임상 병태에 대한 감수성을 종결시키거나, 예방하거나, 호전시키거나 감소시키는 것을 목적으로 하는 임의의 유형의 치료를 의미한다. 바람직한 실시양태에서, 치료라는 용어는 본원에 정의된 장애 또는 병태의 예방 치료법(즉, 임상 병태에 대한 감수성을 감소시키는 요법)을 의미한다. 따라서, "치료," "치료하는" 및 그의 등가 용어는 인간을 비롯한 포유동물에서 병리학적 병태 또는 장애의 임의의 치료를 포함하는, 원하는 약리학적 또는 생리학적 효과를 획득하는 것을 의미한다. 상기 효과는 장애 또는 그의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 관점에서 예방 효과일 수 있고/거나, 장애 및/또는 장애에 기인하는 불리한 효과에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료 효과일 수 있다. 즉, "치료"는 (1) 피험체에서 장애가 발생하거나, 재발하는 것을 예방하는 것, (2) 장애를 억제하는 것, 예컨대, 그의 발생을 정지시키는 것, (3) 숙주가 장애 또는 그의 증상을 더 이상 앓지 않도록 장애 또는 적어도 그와 관련된 증상을 중지시키거나 종결하는 것, 예컨대, 상실된, 손실된 또는 결함 기능을 복구시키거나 회복시킴으로써, 또는 불충분한 과정을 자극함으로써 장애 또는 그의 증상의 관해를 야기하는 것, 또는 (4) 장애 또는 그와 관련된 증상을 경감시키거나, 완화하거나 또는 호전시키는 것(여기서, 호전은 넓은 의미에서 적어도 파라미터, 예컨대, 염증, 통증 또는 면역 결핍의 크기의 감소를 지칭하는 데 사용)을 포함한다.

[0090] 본원에서 사용되는 바, "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 피험체로부터 분리된 생물학적 물질을 의미한다. 생물학적 샘플은 MAF 유전자의 발현 수준을 결정하는 데 적합한 임의의 생물학적 물질을 함유할 수 있다. 상기 샘플은 임의의 적합한 생물학적 조직 또는 체액, 예컨대, 종양 조직, 혈액, 혈액 혈장, 혈청, 뇨 또는 뇌 척수액(CSF: cerebral spinal fluid)으로부터 분리될 수 있다.

[0091] "종양 조직 샘플"은 원발성 HER2+ 유방암 종양으로부터 기원하는 조직 샘플로서 이해된다. 상기 샘플은 관련된 의학 기법에서 숙련가에게 널리 공지되어 있는 방법을 이용하여 통상의 방법, 예를 들어, 생검에 의해 획득될 수 있다.

[0092] "골용해성 골 전이"는 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파골세포 활성의 자극으로부터 비롯된 전이의 근위부에서 발생되고, 중증의 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이 유형을 의미한다.

[0093] MAF 발현 수준에 기초한 HER2+ 유방암의 골 전이 예측 방법

[0094] HER2+ 유방암의 샘플에서의 MAFdm1 발현 수준은 골 전이를 앓을 수 있는 위험과 상관관계가 있다. 또한, HER2+

원발성 종양에서 MAF의 유전자 발현은 골 전이 재발과 유의적인 상관관계가 있고, 골 전이를 앓지 않고 생존 및 생존과 역의 상관관계가 있다. 또한, MAF 발현 수준은 용량에 의존하는 방식으로 골 전이를 예측한다.

- [0095] 제1 측면에서, 본 발명은
- [0096] i) Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계, 및
- [0097] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계
- [0098] 를 포함하고, 여기서, 상기 참조 값과 비교하여 상기 유전자의 발현 수준이 증가되어 있다면, 이는 골 전이가 발생할 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것인, Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제1 방법)에 관한 것이다.
- [0099] 본 발명의 방법은 제1 단계에서 피험체로부터의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 결정하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0100] 생검 샘플을 수득하는 방법은 종양을 큰 조각으로 분할하는 것, 또는 미세절개, 또는 당업계에서 공지되어 있는 다른 세포 분리 방법을 포함한다. 종양 세포는 추가로 작은 게이지 니들을 이용한 흡인을 통해 세포학적 방법에 의해 수득될 수 있다. 샘플 보존 및 취급을 간소화하기 위해, 샘플을 포르말린에 고정시키고, 파라핀에 침지시킬 수 있거나, 급속 동결을 허용하는 고도 극저온 매질에 침지시킴으로써 먼저 동결시킨 후, 조직 동결 매질, 예컨대, OCT 화합물에 침지시킬 수 있다.
- [0101] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제1 방법은 단일 마커로서 단지 MAF 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함하고, 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 결정하는 단계는 포함하지 않는다.
- [0102] 당업자에 의해 이해되는 바와 같이, 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 메신저 RNA 수준 또는 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준을 측정함으로써 정량될 수 있을 뿐만 아니라, 상기 유전자를 함유하는 게놈 영역 카피 또는 전위의 수를 측정함으로써 정량될 수도 있다.
- [0103] 상기 목적을 위해, 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(문헌 [Sambrook, J., *et al.*, "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3]).
- [0104] 따라서, MAF 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 전사로부터 비롯된 RNA(메신저 RNA 또는 mRNA) 또는 별법으로, 상기 유전자의 상보성 DNA(cDNA)로부터 정량될 수 있다. 그러므로, 본 발명의 특정 실시양태에서, MAF 유전자 발현 수준의 정량은 MAF 유전자의 메신저 RNA 또는 상기 mRNA의 단편, MAF 유전자의 상보성 DNA 또는 상기 cDNA의 단편, 또는 그의 혼합물의 정량을 포함한다.
- [0105] MAF 유전자에 의해 코딩된 mRNA 수준 또는 그의 상응하는 cDNA 수준을 검출하고 정량하는 사실상 임의의 통상의 방법이 본 발명의 범위 내에서 이용될 수 있다. 비제한적인 예로서, 상기 유전자에 의해 코딩된 mRNA 수준은 통상의 방법, 예를 들어, mRNA 증폭, 예컨대, 전기영동 및 염색, 또는 별법으로, 적합한 프로브를 사용한 서던 블롯, 관심의 대상이 되는 유전자(MAF)의 mRNA 또는 그의 상응하는 cDNA의 특이적 프로브를 사용한 노던 블롯, S1 뉴클레아제를 사용한 지도화, RT-PCR, 하이브리드화, 마이크로어레이 등, 바람직하게는, 적합한 마커를 사용한 실시간 정량 PCR에 의한 상기 mRNA 증폭 생성물의 정량을 포함하는 방법을 이용함으로써 정량될 수 있다. 유사하게, MAF 유전자에 의해 코딩된 상기 mRNA에 상응하는 cDNA 수준은 또한 통상의 기법을 이용함으로써 정량될 수도 있고; 이 경우, 본 발명의 방법은 상응하는 mRNA의 역전사(RT: reverse transcription)로 상응하는 cDNA를 합성한 후, 증폭시키고, 상기 cDNA 증폭 생성물을 정량하는 단계를 포함한다. 발현 수준을 정량하는 통상의 방법들은 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.*, 2001. 상기 문헌 동일]에서 살펴볼 수 있다. 이들 방법들은 당업계에서 공지되어 있고, 당업자는 각각의 기법에 필요한 정규화를 알고 있을 것이다. 예를 들어, 다중 PCR을 이용하여 수득한 발현 측정치는 측정되는 유전자의 발현을, 그의 발현이 모든 샘플들에 걸쳐 일정하여야 하고, 따라서, 비교될 기준선 발현을 제공하는 소위 "하우스키핑" 유전자 또는 그의 발현이 암에 의해 조정되는 것으로 공지되어 있는 다른 대조군 유전자와 비교함으로써 정규화되어야 한다.
- [0106] 특정 실시양태에서, MAF 유전자 발현 수준은 정량적 증합효소 연쇄 반응(PCR: polymerase chain reaction), 또는 DNA/RNA 어레이 또는 뉴클레오타이드 하이브리드화 기법에 의해 정량된다.
- [0107] 추가로, MAF 유전자 발현 수준은 또한 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질, 즉, c-Maf 단백질(c-Maf)[NCBI, 수탁

번호 075444], 또는 c-Maf 단백질의 임의의 기능성 등가 변이체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수 있다. 2종의 c-Maf 단백질 이소폼인, 403개의 아미노산(서열 번호 4)으로 구성된  $\alpha$  이소폼(NCBI, NP\_005351.2) 및 373개의 아미노산(서열 번호 5)으로 구성된  $\beta$  이소폼(NCBI, NP\_001026974.1)가 존재한다. MAF 유전자 발현 수준은 c-Maf 단백질 이소폼 중 임의의 이소폼의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, MAF 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준의 정량은 c-Maf 단백질의 정량을 포함한다.

[0108] 본 발명과 관련하여, "c-Maf 단백질의 기능성 등가 변이체"는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존된 또는 비보존된 아미노산 잔기(바람직하게는, 보존된 아미노산 잔기)로 치환되어 있는 c-Maf 단백질(서열 번호 4 또는 서열 번호 5)의 변이체(여기서, 상기 치환된 아미노산 잔기는 유전자 코드에 의해 코딩된 아미노산 잔기일 수 있거나, 그러한 잔기가 아닐 수 있다), 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 결실을 포함하고, c-Maf과 동일한 기능을 갖는, 즉, DNA 결합 전사 인자로서 작용하는 변이체로서 이해된다. c-Maf 단백질의 변이체는 국제 특허 출원 WO2005/046731(그의 전문이 본원에서 참조로 포함)에 제시된 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-Maf의 능력에 기초하는 방법, WO2008098351(그의 전문이 본원에서 참조로 포함)에 기술된 바와 같이, MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 Maf 반응 영역(MARE 또는 Maf 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 제어하에 리포터 유전자의 전사 능력을 차단하는 소위 억제제라 하는 것의 능력에 기초하는 방법, 또는 US2009048117A(그의 전문이 본원에서 참조로 포함)에 기술된 바와 같이 NFATc2 및 MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 제어하에 리포터 유전자의 발현을 차단하는 소위 억제제라 하는 것의 능력에 기초하는 방법을 사용하여 확인할 수 있다.

[0109] 본 발명에 따른 변이체는 바람직하게는 c-Maf 단백질 이소폼(서열 번호 4 또는 서열 번호 5) 중 임의의 것의 아미노산 서열과 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 서열 유사성을 갖는다. 앞서 정의된 변이체와 특정 c-Maf 단백질 서열 사이의 유사성 정도는 당업자에게 널리 공지되어 있는 알고리즘 및 컴퓨터 프로세스를 이용함으로써 결정된다. 두 아미노산 서열 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 결정된다.

[0110] c-Maf 단백질 발현 수준은 피험체로부터의 샘플에서 상기 단백질을 검출하고 정량할 수 있게 하는 임의의 통상의 방법에 의해 정량될 수 있다. 비제한적 예로서, 상기 단백질 수준은 예를 들어, c-Maf 결합 능력을 갖는 항체(또는 항원 결정기를 함유하는 그의 단편)의 사용 및 후속되는, 형성된 복합체의 정량에 의해 정량될 수 있다. 이들 검정법에서 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 등을 포함한다. 비표지된 항체(1차 항체) 및 표지된 항체(2차 항체)를 사용하는, 본 발명에서 사용될 수 있는 다양한 공지 검정법들이 존재하고; 이들 기법은 웨스턴 블롯 또는 웨스턴 전달, ELISA(효소 결합 면역 흡착 검정법: enzyme-linked immunosorbent assay), RIA(방사면역검정법), 경쟁 EIA(경쟁 효소 면역검정법: competitive enzyme immunoassay), DAS-ELISA(이중 항체 샌드위치 ELISA: double antibody sandwich ELISA), 면역세포화학적 및 면역조직화학적 기법, 특이적 항체를 포함하는 단백질 마이크로어레이 또는 바이오칩의 사용에 기초한 기법, 또는 포맷, 예컨대, 디프틱에서의 콜로이드 침전에 기초한 검정법을 포함한다. 상기 c-Maf 단백질을 검출하고 정량하는 다른 방법은 친화성 크로마토그래피 기법, 리간드 결합 검정법 등을 포함한다. 면역학적 방법이 이용되는 경우, 고친화도로 c-Maf 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있는 임의의 항체 또는 시약이 그의 양을 검출하는 데 사용될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 항체, 예를 들어, 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, 스테이플드(stapled) 펩티드, 사이클로펩티드 및 항체들의 사용이 바람직하다. 예를 들어, 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 시판되는 상업적 항c-Maf 단백질 항체, 예컨대, 항체 ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071(에브캄 plc(Abcam plc: 영국 캠브리지 CB4 0FL 사이언스 파크 330)), AbD 세로텍(AbD Serotec)의 075444 단일클론 항체(마우스 항인간 MAF 아지드 무함유 단일클론 항체, 비컨주게이트됨, 클론 6b8) 등이 존재한다. 항c-Maf 항체를 제공하는 많은 영리 회사들, 예컨대, 에브노바 코퍼레이션(Abnova Corporation), 베틀 라보라토리즈(Bethyl Laboratories), 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 바이오월드 테크놀로지(Bioworld Technology), 진텍스(GeneTex) 등이 존재한다.

[0111] 특정 실시양태에서, c-Maf 단백질 수준은 웨스턴 블롯, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 정량된다.

[0112] 또 다른 특정 실시양태에서, c-Maf 단백질 수준은 엑소솜, 순환 DNA 또는 순환 종양 세포로부터 정량된다. 엑소솜은 생체내에서 및 시험관내에서 대부분의 세포 유형에 의해 분비되는 40 - 100 nm 막 소포체이다. 엑소솜은

구획의 내강 내로 내부를 향해 자라기 시작함으로써 다소포체(MVB: multivesicular body)로서 지칭되는, 특정 엔도솜 집단을 형성한다. MVB와 원형질막의 융합시, 이들 내부 소포체들이 분비된다. 엑소솜은 당업계에서 잘 공지되어 있는 여러 방법들에 의해 다양한 세포주 또는 체액으로부터 단리될 수 있다(문헌 [Thery C. et al., *Curr Protoc Cell Biol.* 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22](상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 여러 상업적 키트, 예컨대, 엑소퀵(ExoQuick)<sup>TM</sup> 또는 엑소테스트(ExoTest)<sup>TM</sup>가 엑소솜의 단리를 위해 이용될 수 있다.

[0113] 본 발명의 제1 방법은 제2 단계에서 피험체로부터의 샘플(예를 들어, 종양 샘플)에서 수득된 MAF 유전자의 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계를 포함한다.

[0114] 일단 유방암을 앓고 있는 피험체로부터의 샘플에서 MAF 유전자 발현 수준을 측정하고, 참조 값과 비교하고 나면, 상기 유전자의 발현 수준이 참조 값에 비해 증가되어 있다면, 상기 피험체에서 골 전이가 발생할 경향이 더 크다는 결론을 도출할 수 있다.

[0115] MAF 유전자 발현 수준 결정은 참조 값과 상관관계에 있어야 한다.

[0116] 한 실시양태에서, 본원에서 의도된 참조 값(들)은 MAF의 절대적 양을 의미할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 테스트된 피험체로부터의 샘플에서 임의의 하나 이상의 바이오마커의 양은 (예컨대, 증가 또는 감소, 또는 증가 배수 또는 감소 배수의 관점에서) 참조 값과의 비교로 직접적으로 결정될 수 있다. 유리하게는, 이는 임의의 하나 이상의 바이오마커의 각각의 절대적 양을 먼저 결정할 필요 없이 피험체로부터의 샘플에서 임의의 하나 이상의 바이오마커의 양을 참조 값과 비교하게(즉, 참조 값과 비교하여 피험체로부터의 샘플에서 임의의 하나 이상의 바이오마커의 상대적 양을 측정하게) 할 수 있다.

[0117] 바람직한 실시양태에서, 참조 값은 대조군 샘플 또는 참조 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준이다. 분석하고자 하는 종양 유형에 따라, 대조군 또는 참조 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 예후가 평가되어야 하는 경우, 참조 샘플은 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체로부터의 샘플, 또는 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체들로부터의 생검 샘플 중 종양 조직 집단에서 측정된 MAF 유전자 발현 수준의 중간값에 상응하는 샘플이다.

[0118] 상기 참조 샘플은 전형적으로 피험체 집단으로부터의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 수득된다. 일반적으로, 전형적인 참조 샘플은 임상적으로 잘 문서화되어 있고, 전이의 부재가 잘 특징 규정되어 있는 피험체로부터 수득될 것이다. 상기 샘플에서, 바이오마커(MAF 유전자)의 정상 농도(참조 농도)는 예를 들어, 참조 집단에 대한 평균 농도를 제공함으로써 결정될 수 있다. 마커의 참조 농도를 결정할 때 다양한 사항들을 고려한다. 이러한 고려사항들 중에는 환자의 연령, 체중, 성별, 일반적인 신체 상태 등이 있다. 예를 들어, 바람직하게는 상기 고려사항에 따라, 예를 들어, 다양한 연령 카테고리에 따라 분류된 약 2명 이상, 약 10명 이상, 약 100명 이상 내지 바람직하게는 약 1,000명 초과 피험체들로 구성된 동등한 양의 군이 참조 군으로서 간주된다. 참조 수준의 유도 기점이 되는 샘플 집단은 바람직하게는 연구의 객체인 환자와 동일한 유형의 암을 앓고 있는 피험체에 의해 형성될 것이다.

[0119] 특정 실시양태에서, MAF 발현의 "증가된" 또는 "감소된" 발현에 대한 참조 값은 전술된 방법들 중 임의의 방법에 의해 잘 문서화된 질환을 앓고 있는 피험체로부터 단리된 1개 또는 수개의 샘플에서 검정을 수행하는 단계를 포함하는 통상의 수단으로 MAF 발현 수준을 백분위수로 계산함으로써 결정된다. 이어서, "감소된" MAF 수준은 바람직하게는 MAF 발현 수준이 정상 집단에서의 약 50번째 백분위수 이하(예를 들어, 정상 집단에서의 약 60번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 약 70번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 80번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 약 90번째 백분위수 이하의 발현 수준 및 정상 집단에서의 약 95번째 백분위수 이하의 발현 수준을 포함)인 샘플로 배정될 수 있다. 이어서, "증가된" MAF 유전자 발현 수준은 바람직하게는 MAF 유전자 발현 수준이 정상 집단에서의 약 50번째 백분위수 이상(예를 들어, 정상 집단에서의 약 60번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 약 70번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 약 80번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 약 90번째 백분위수 이상의 발현 수준 및 정상 집단에서의 약 95번째 백분위수 이상의 발현 수준을 포함)인 샘플로 배정될 수 있다.

[0120] 당업자는 원발성 유방 종양이 전이될 경향을 예측하는 것이 확인하고자 하는 모든 피험체들(즉, 100%의 피험체)에 대해 정확하여야 할 필요는 없다는 것을 이해할 것이다. 그럼에도 불구하고, 상기 용어는 피험체들(예를 들어, 코호트 연구에서 코호트)의 통계학적 유의적인 부분을 확인할 수 있을 것을 요구한다. 당업자는 널리 공지되어 있는 각종의 통계학적 평가 도구, 예를 들어, 신뢰구간의 결정, p 값의 결정, 스튜던트의 t 검정



(Student's t test), 만-휘트니 검정(Mann-Whitney test) 등을 이용하여 간단한 방식으로 부분이 통계학상 유의적인지 여부를 결정할 수 있다. 상세한 설명은 문헌 [Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983]에 제공되어 있다. 바람직한 신뢰구간은 약 90% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상이다. p 값은 바람직하게는 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 또는 0.0001이다. 더욱 바람직하게는, 집단의 피험체의 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상 또는 약 90% 이상이 본 발명의 방법에 의해 적절하게 확인될 수 있다.

- [0121] 추가의 또 다른 실시양태에서, 골로의 전이는 골용해성 골 전이이다.
- [0122] 추가의 또 다른 실시양태에서, 평균을 초과하는 MAF의 발현 수준은 골 전이의 위험이 증가되어 있음을 나타내며, 여기서, 상기 위험은 MAF 발현 수준에 비례한다. 따라서, 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이의 위험은 용량 의존적이다.
- [0123] MAF의 발현 수준에 기초한 HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 방법
- [0124] 또 다른 측면에서, 본 발명은
- [0125] i) 골 전이성 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계,
- [0126] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계
- [0127] 를 포함하고, 여기서, 상기 참조 값과 비교하여 상기 유전자의 발현 수준이 증가되어 있다면, 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것인, 골 전이성 HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제2 방법)에 관한 것이다.
- [0128] 본 발명의 제2 방법은 제1 단계에서 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0129] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제2 방법은 단일 마커로서 단지 MAF 유전자의 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함하고, 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 결정하는 단계는 포함하지 않는다.
- [0130] 제2 단계에서, 피험체의 종양 샘플에서 수득된 MAF 유전자 발현 수준은 참조 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 참조 값은 대조군 샘플에서 상기 유전자의 발현 수준이다. MAF 유전자 발현 수준의 결정은 대조군 샘플 또는 참조 샘플의 값과 관련되어야 한다. 분석되는 종양의 유형에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제2 방법을 포함하는 경우에, 참조 샘플은 골 전이를 앓지 않은 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플, 또는 전이를 앓지 않은 유방암을 앓고 있는 피험체의 생검 샘플 중 종양 조직 집단에서 측정된 MAF 유전자 발현 수준의 중간값에 상응하는 샘플이다.
- [0131] 일단 샘플에서 MAF 유전자 발현 수준을 측정하고, 참조 값과 비교하고 나면, 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 그의 발현 수준과 비교하여 증가되어 있다면, 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것이다.
- [0132] 구체적인 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0133] 또 다른 구체적인 실시양태에서, MAF 유전자 발현 수준의 정량은 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보성 DNA(cDNA) 또는 상기 cDNA의 단편의 정량을 포함한다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 발현 수준은 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA 또는 RNA 어레이에 의해 정량된다.
- [0134] 또 다른 실시양태에서, MAF 유전자 발현 수준의 정량은 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질 또는 이의 변이체의 수준의 정량을 포함한다. 추가로 더욱 바람직한 실시양태에서, 단백질 수준은 웨스턴 블롯, 면역조직화학, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 결정된다.
- [0135] 또 다른 실시양태에서, 참조 샘플은 전이를 앓지 않은 피험체로부터의 HER2+ 유방암의 종양 조직 샘플이다.
- [0136] 제한 없이 하기를 포함하는, 환자의 임상 결과를 결정하기 위해 널리 허용되는 임의의 파라미터가 본 발명에서 사용될 수 있다:
- [0137] · 본원에서 사용되는 바, 연구 기간 동안 질환이 재발되지 않은, 완전히 관해된 피험체의 비율을 의미하는 무 질환 진행.
- [0138] · 본원에서 사용되는 바, 질환에 대한 치료 후 피험체가 질환의 징후 없이 생존하는 기간으로서 이해되는 무 질환 생존(DFS: disease-free survival).

- [0139] · 본원에서 사용되는 바, 완전한 또는 부분적인 반응이 관찰되는 치료받은 피험체의 비율을 의미하는 목적 반응.
- [0140] · 본원에서 사용되는 바, 완전한 반응, 부분적인 반응, 미미한 반응 또는 6개월 이상 동안 안정한 질환이 관찰되는 치료받은 피험체의 비율을 의미하는 중양 제어.
- [0141] · 본원에서 사용되는 바, 치료 시작 시점부터 암 성장의 1차 측정까지의 시간으로서 정의되는 무진행 생존.
- [0142] · 본원에서 사용되는 바, 질환이 치료된 후, 질환이 악화되기 시작할 때까지의 시간에 관한 진행까지의 시간 (TTP: Time to progression)("진행"이라는 용어는 앞서 정의되어 있다).
- [0143] · 본원에서 사용되는 바, 요법의 개시 후 처음 6개월 이내에 진행이 없는 피험체의 백분율(%)에 관한 6개월 무진행 생존율 또는 "PFS6." 및
- [0144] · 본원에서 사용되는 바, 연구에 등록된 피험체 중 절반이 여전히 생존하고 있는 시간에 관한 중간 생존.
- [0145] 임상 결과를 언급하기 위해 본원에서 사용되는 " 좋지 않은 " 또는 " 좋은 "은 피험체가 유리한 또는 불리한 결과를 보일 것이라는 것을 의미한다. 당업자가 이해하는 바와 같이, 이러한 확률 평가는 비록 정확한 것이 바람직하지만, 진단되는 피험체의 100%에 대해 정확하지 않을 수도 있다. 그러나, 상기 용어는 피험체 중 통계학상 유의적인 부분이 주어진 결과에 대한 성향을 갖는 것으로서 확인될 수 있는 것을 요구한다. 당업자는 널리 공지되어 있는 각종의 통계학적 평가 도구, 예를 들어, 신뢰구간의 결정, p 값 결정, 스튜던트의 t 검정, 만-휘트니 검정 등을 이용하여 부분이 통계학상 유의적인지 여부를 용이하게 결정할 수 있다. 상세한 설명은 문헌 [Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley & Sons, New York 1983]에서 살펴볼 수 있다. 바람직한 신뢰구간은 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 95% 이상이다. p 값은 바람직하게 0.05, 0.01, 0.005, 또는 0.0001 또는 그 미만이다. 더욱 바람직하게, 집단 중 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상 또는 약 90% 이상의 피험체가 본 발명의 방법에 의해 적절하게 확인될 수 있다.
- [0146] HER2+ 유방 종양을 앓고 있는 환자에서의 맞춤형 요법을 디자인하는 방법
- [0147] 최신기술 수준에서 공지되어 있는 바와 같이, 암을 앓고 있는 피험체에게 투여되는 치료는 상기 암이 악성 종양인지, 즉, 전이될 확률이 높은지, 또는 상기 암이 양성 종양인지 여부에 의존한다. 제1 가정에서, 선택되는 치료는 전신 치료, 예컨대, 화학요법이고, 제2 가정에서, 선택되는 치료는 국부 치료, 예컨대, 방사선요법이다.
- [0148] 그러므로, 본 발명에 기술되어 있는 바와 같이, HER2+ 암 세포에서의 MAF 유전자의 과다발현이 골 전이의 존재와 관련되어 있다고 가정할 때, MAF 유전자의 발현 수준은 상기 암을 앓고 있는 피험체를 위해 가장 적합한 요법의 관점에서 결정하는 데 유용하다.
- [0149] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은
- [0150] i) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 종양 샘플(예컨대, 종양 조직 샘플, 순환 종양 세포, 순환 종양 DNA 또는 종양 유래 엑소솜)에서의 MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0151] ii) i)에서 획득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계
- [0152] 를 포함하고, 여기서, 상기 참조 값과 비교하여 발현 수준이 증가되어 있다면, 상기 피험체는 골 전이를 예방, 및/또는 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적절한, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제3 방법)에 관한 것이다. 상기 참조 값과 비교하여 발현 수준이 증가되어 있지 않는 경우, 이때 상기 피험체는 골 전이를 예방, 및/또는 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격이지 않다. 일부 실시양태에서, 샘플은 종양 샘플, 순환 종양 샘플, 순환 종양 DNA, 또는 종양 유래 엑소솜을 비롯한, 종양 유래 샘플이다.
- [0153] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0154] 본 발명의 제3 발명은 제1 단계에서 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 정량하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0155] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제3 발명은 단일 마커로서 단지 MAF 유전자의 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함하고, 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 결정하는 단계는 포함하지 않는다.
- [0156] 본 발명의 제3 방법의 경우, 샘플은 피험체의 원발성 종양 조직 샘플일 수 있다.

- [0157] 제2 단계에서, 피험체의 종양 샘플에서 수득된 MAF 유전자 발현 수준은 참조 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 참조 값은 대조군 샘플에서 상기 유전자의 MAF 유전자 발현 수준이다. MAF 유전자 발현 수준의 결정은 대조군 샘플 또는 참조 샘플의 값과 관련되어야 한다. 분석되는 종양의 유형에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 참조 샘플은 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플, 또는 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 생검 샘플 중 종양 조직 집단에서 측정된 MAF 유전자 발현 수준의 중간값에 상응하는 샘플이다.
- [0158] 일단 샘플에서 MAF 유전자 발현 수준을 측정하고 참조 값과 비교하고 나면, 상기 유전자의 발현 수준이 참조 값에 비해 증가되어 있다면, 상기 피험체가 전이를 예방(피험체에서 아직 전이가 일어나지 않은 경우)하고/거나 치료하거나 전이를 예방하지 않고/거나 치료하는(피험체에서 이미 전이가 일어난 경우) 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것 또는 받지 않는 것에 적격일 수 있다는 결론을 도출할 수 있다.
- [0159] 암이 전이된 경우, 화학요법, 호르몬 치료, 면역요법 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는 전신 치료가 이용될 수 있다. 추가로, 방사선요법 및/또는 수술이 이용될 수 있다. 치료의 선택은 일반적으로 원발성암의 유형, 크기, 전이의 위치, 환자의 연령 및 일반적인 건강 상태, 및 이전에 사용된 치료의 유형에 의존한다.
- [0160] 전신 치료는 전신에 도달하는 것이며, 이는 전이를 예방 또는 억제(피험체에서 아직 전이가 일어나지 않은 경우), 및/또는 치료(피험체에서 이미 전이가 일어난 경우)하는 것을 목적으로 하는 요법인 요법들을 나타낼 수 있고, 그 예는 하기와 같다:
- [0161] - 화학요법은 암 세포를 파괴하는 의약의 사용이다. 의약은 일반적으로 경구 또는 정맥내 경로를 통해 투여된다. 종종, 화학요법은 방사선 치료와 함께 사용된다. 유방암에 적합한 화학요법 치료제로는 제한 없이, 안트라사이클린 (독소루비신, 에피루비신, 폐결화된 리포솜 독소루비신), 탁산(Taxanes)(파클리탁셀, 독세탁셀, 파클리탁셀에 결합된 알부민 나노입자), 5-플루오로우라실(연속 주입 5-FU, 카페시타빈), 빈카 알칼로이드(비도렐빈, 빈블라스틴), 겐시타빈(Gemcitabine), 백금 염(시스플라틴, 카보플라틴), 사이클로포스파미드, 에토포시드 및 상기 치료제들 중 하나 이상의 것의 조합, 예컨대, 사이클로포스파미드/안트라사이클린 +/- 5-플루오로우라실 요법(예컨대, 독소루비신/사이클로포스파미드(AC), 에피루비신/사이클로포스파미드, (EC) 사이클로포스파미드/에피루비신/5-플루오로우라실(CEF), 사이클로포스파미드/독소루비신/5-플루오로우라실(CAF), 5-플루오로우라실/에피루비신/사이클로포스파미드(FEC)), 사이클로포스파미드/메토트렉세이트/5-플루오로우라실(CMF), 안트라사이클린/탁산(예컨대, 독소루비신/파클리탁셀 또는 독소루비신/독세탁셀), 독세탁셀/카페시타빈, 겐시타빈/파클리탁셀, 탁산/백금 요법(예컨대, 파클리탁셀/카보플라틴 또는 독세탁셀/카보플라틴)을 포함한다.
- [0162] - 면역요법은 환자의 면역계 그 자체가 암을 퇴치할 수 있도록 돕는 치료이다. 환자에서 전이를 치료하는 데 사용되는 면역요법에는 여러 유형이 있다. 이들은 사이토카인, 단일클론 항체 및 항종양 백신을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0163] 또 다른 측면에서, 치료제는 알파라딘(Alpharadin)(라듐-223 디클로라이드)이다. 알파라딘은 라듐-223 붕괴로부터의 알파 방사선을 이용하여 암 세포를 사멸시킨다. 라듐-223은 천연적으로 칼슘 모방체로서의 그의 성질을 통해 골 전이에 자가 표적화한다. 알파 방사선은 (베타 또는 감마 방사선에 기초한 현재의 방사선요법에 비해) 2-10개 세포의 매우 짧은 범위를 가지며, 따라서, 주변 건강한 조직(특히, 골수)을 더 적게 손상시킨다. 라듐-223은 칼슘과 성질이 유사하기 때문에, 칼슘이 신체의 골을 구축하는 데에 사용되는 부위(더욱 빠른 비정상적인 골 성장의 부위, 예컨대, 진행성 거세 저항성 전립샘암을 앓는 남성의 골격 전이에서 관찰되는 것 포함)로 이동된다. 주입 후 라듐-223은 혈류를 통해 비정상적인 골 성장의 부위로 운반된다. 암이 신체에서 시작되는 부위는 원발성 종양으로서 공지되어 있다. 이들 세포들 중 일부는 이탈되어 혈류를 통해 신체의 또 다른 부분으로 운반될 수 있다. 이어서, 암 세포는 신체의 상기 부분에서 정착하여 새로운 종양을 형성할 수 있다. 이것이 발생하는 경우, 2차 암 또는 전이로 명명된다. 말기 전립샘암을 앓고 있는 환자들 대부분은 그의 골에서 최대의 질환 부담을 겪게 된다. 라듐-223을 사용하는 목적은 이 2차 암을 선택적으로 표적화하는 것이다. 골에서 흡수되지 않은 임의의 라듐-223은 신속히 장으로 이동되어 배출된다.
- [0164] 또 다른 측면에서, 치료제는 mTor 억제제이다. 일부 측면에서, mTor 억제제는 이중 mTor/PI3 키나제 억제제이다. 일부 측면에서, mTor 억제제는 전이를 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, mTor 억제제는 하기의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: ABI009(시롤리무스), 라파마이신(시롤리무스), 아브락산(Abraxane)(파클리탁셀), 압소브(Absorb)(에버롤리무스(Everolimus)), 아피니토르(Afinitor)(에버롤리무스),

글리벡(Gleevec)과 함께 아피니토르, AS703026(피마서팁), 악세스(Axxess)(우미롤리무스), AZD2014, BEZ235, 바이오프리덤(Biofreedom)(우미롤리무스), 바이오매트릭스(BioMatrix)(우미롤리무스), 바이오매트릭스 플렉스(우미롤리무스), CC115, CC223, 콤보 생물 조작된 시롤리무스 용출 스텐트 오르부스니치(Combo Bio-engineered Sirolimus Eluting Stent ORBUSNEICH)(시롤리무스), 쿠락신(Curaxin) CBLC102(메파크린), DE109(시롤리무스), DS3078, 엔데버(Endeavor) DES(조타롤리무스), 엔데버 레졸루트(Endeavor Resolute)(조타롤리무스), 페마라(Femara)(레트로졸), 호세나(Hocena)(안트로퀴노놀), INK128, 인스피론(Inspiron)(시롤리무스), IPI504(레타스 피마이신 하이드로클로라이드), KRN951(티보자닙), ME344, MGA031(테플리주맵), 미스텐트(MiStent) SES(시롤리무스), MKC1, 노보리(Nobori)(우미롤리무스), OSI027, OVI123(코다이세핀), 팔로미드(Palomid) 529, PF04691502, 프로무스 엘리먼트(Promus Element)(에버롤리무스), PWT33597, 라파문(Rapamune)(시롤리무스), 레졸루트 DES(조타롤리무스), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75(보세투주맵 마포도틴), 시너지(Synergy)(에버롤리무스), 탈토르빅(Taltorvic)(리다포롤리무스), 타세바(Tarceva)(에를로티닙), 토리셀(Torisel)(탐시롤리무스), 자이언스 프라임(Xience Prime)(에버롤리무스), 자이언스 V(Xience V)(에버롤리무스), 조맥스(Zomaxx)(조타롤리무스), 조트레스(Zortress)(에버롤리무스), 조타롤리무스 용출 말초 스텐트 메드트로닉(Zotarolimus Eluting Peripheral Stent MEDTRONIC)(조타롤리무스), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, 캔스타틴 겐자임(Canstatin GENZYME)(캔스타틴), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, 라파마이신 온코이뮤( Rapamycin ONCOIMMUNE)(시롤리무스), SB2602, 시롤리무스 PNP 삼양 바이오과마슈티칼즈(Sirolimus PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS)(시롤리무스), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, 애드바칸(Advacan)(에버롤리무스), AZD8055, 사이퍼 셀렉트 플러스 시롤리무스 용출 관상 스텐트(Cypher Select Plus Sirolimus eluting Coronary Stent)(시롤리무스), 사이퍼 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 드러그 코티드 벌룬(Drug Coated Balloon)(시롤리무스), E-매직 플러스(E-Magic 플러스)(시롤리무스), 엠토르(Emtor)(시롤리무스), 에스프릿(Esprit)(에버롤리무스), 에버토르(Evertor)(에버롤리무스), HBF0079, LCP-시로(LCP-Siro)(시롤리무스), 리무스 클라리스(Limus CLARIS)(시롤리무스), mTOR 억제제 셀죐(CELLZOME), 네보 시롤리무스 용출 관상 스텐트(Nevo Sirolimus eluting Coronary Stent)(시롤리무스), nPT-mTOR, 라파칸(Rapacan)(시롤리무스), 레나셉트(Renacept)(시롤리무스), 레졸브(ReZolve)(시롤리무스), 로카스(Rocas)(시롤리무스), SF1126, 시롤림(시롤리무스), 시롤리무스 노쓰 차이나(Sirolimus NORTH CHINA)(시롤리무스), 시롤리무스 란박시(Sirolimus RANBAXY)(시롤리무스), 시롤리무스 왓슨(Sirolimus WATSON)(시롤리무스) 시로판(Siropan)(시롤리무스), 시로바(Sirova)(시롤리무스), 수프랄리무스(Supralimus)(시롤리무스), 수프랄리무스-코어(시롤리무스), 타크롤리무스 왓슨(Tacrolimus WATSON)(타크롤리무스), TAFA93, 템시롤리무스 아코드(Temsirolimus ACCORD)(템시롤리무스), 템시롤리무스 산도즈(Temsirolimus SANDOZ)(템시롤리무스), TOP216, 자이언스 프라임(에버롤리무스), 자이언스 V(에버롤리무스). 구체적인 측면에서, 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); 최종 접속일 2012년 11월 28일). 또 다른 측면에서, 에버롤리무스는 아로마타제 억제제와 조합된다(예컨대, 문헌 [Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. *N. Engl. J. Med.* 366(6): 520-529](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 또 다른 측면에서, mTOR 억제제는 당업계에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예컨대, 문헌 [Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. *Anticancer Agents Med. Chem.* 10(7): 571-81](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 일부 측면에서, mTOR 억제제는 호르몬 수용체에 대해 양성인 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다(예컨대, 문헌 [Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. *N. Engl. J. Med.* 366(6): 520-529] 참조). 일부 실시양태에서, 환자는 ER+이다. 일부 측면에서, mTOR 억제제는 진행성 유방암을 앓고 있는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, mTOR 억제제는 제2 치료와 함께 사용된다. 일부 측면에서, 제2 치료는 본원에 기술된 임의의 치료이다.

[0165]

또 다른 측면에서, 치료제는 Src 키나제 억제제이다. 일부 측면에서, Src 억제제는 전이를 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, Src 키나제 억제제는 하기 군으로부터 선택된다: AZD0530(사라카티닙), 보술리프(Bosulif)(보수티닙), ENMD981693, KD020, KX01, 스프리셀(Sprycel)(다사티닙), 예르보이(Yervoy)(이필리무맵), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, c-Src 키나제 억제제 KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, 다사티닙 헤테로(Dasatinib HETERO)(다사티닙), 다사티닙 밸리언트(Dasatinib VALEANT)(다사티닙), 폰트렉스(Fontrax)(다사티닙), Src 키나제 억제제 키넥스(KINEX), VX680,(토자서팁 락테이트), XL228, 및 SUNK706. 일부 실시양태에서, Src 키나제 억제제는 다사티닙이다. 또 다른 측면에서, Src 키나제 억제제는 당업계에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예컨대, 문헌 [Sen, B. and



Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. *J. Signal Transduction*. 2011: 14 pages](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 일부 측면에서, Src 키나제 억제제는 SRC 반응 시그니처(SRS: SRC-responsive signature)에 대해 양성인 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, 환자는 SRS+ 및 ER-이다(예컨대, 문헌 [Zhang, CH.-F, *et al.* Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. *Cancer Cell*. 16: 67-78](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 일부 측면에서, Src 키나제 억제제는 진행성 유방암을 앓고 있는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, Src 키나제 억제제는 제2 치료와 함께 사용된다. 일부 측면에서, 제2 치료는 본원에 기술된 임의의 치료이다.

[0166]

또 다른 측면에서, 치료제는 COX-2 억제제이다. 일부 측면에서, COX-2 억제제는 전이를 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, COX-2 억제제는 하기 군으로부터 선택된다: ABT963, 아세트아미노펜 ER 존슨(Acetaminophen ER JOHNSON)(아세트아미노펜), 아쿨라 X(아쿨라 X)(케토롤락 트로메타민), BAY1019036(아스피린), BAY987111(디펜하이드라민, 나프록센 소듐), BAY11902(피록시캄), BCIBUCH001(이부프로펜), 카폭시겔(Capoxigel)(아프리카코심), CS502, CS670(펠루비프로펜), 디클로페낙(Diclofenac) HPBCD(디클로페낙), 디락틴(디락틴)(케토프로펜), GW406381, HCT1026(니트로플루르비프로펜), 하이아날게스-D(Hyalalgese-D)(디클로페낙), 하이드로코텍스(하이드로코텍스)(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 하이드로코돈), 이부프로펜 소듐 화이자(Ibuprofen Sodium PFIZER)(이부프로펜 소듐), 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자(아세트아미노펜, 이부프로펜), 임프라코르(Impracor)(케토프로펜), IP880(디클로페낙), IP940(인도메타신), ISV205(디클로페낙 소듐), JNS013(아세트아미노펜, 트라마돌 하이드로클로라이드), 케토프로펜(Ketoprofen) TDS(케토프로펜), LTNS001(나프록센 에테세일), 메살라민 살릭스(메살라민 살릭스)(메살라민), 메살라민 소파르(메살라민 소파르)(메살라민), 메살라진(메살라진)(메살라민), ML3000(리코펜론), MRX7EAT(에토돌락), 나프록센 이록코(Naproxen IROKO)(나프록센), NCX4016(니트로아스피린), NCX701(니트로아세트아미노펜), 누프린 스콜르(Nuprin SCOLR)(이부프로펜), OMS103HP(아미트립틸린 하이드로클로라이드, 케토프로펜, 옥시메타졸린 하이드로클로라이드), 오랄리스(Oralase)(디클로페낙), 옥시코텍스(OxycoDex)(텍스트로메토르판, 옥시코돈), P54, 퍼코텍스(PercoDex)(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 옥시코돈), PL3100(나프록센, 포스포티딜 콜린), PSD508, R-케토프로펜(케토프로펜), 레무라(레무라)(브로페낙 소듐), ROX828(케토롤락 트로메타민), RP19583(케토프로펜 리신), RQ00317076, SDX101(R-에토돌락), TDS943(디클로페낙 소듐), TDT070(케토프로펜), TPR100, TQ1011(케토프로펜), TT063(S-플루르비프로펜), UR8880(시미코심), V0498TA01A(이부프로펜), VT122(에토돌락, 프로프라놀롤), XP20B(아세트아미노펜, 텍스트로프로폭시펜), XP21B(디클로페낙 포타슘), XP21L(디클로페낙 포타슘), 조에나사(조에나사)(아세틸시스테인, 메살라민), 아세펜(Acephen), 악티페드 플러스(Actifed 플러스), 악티페드-P(Actifed-P), 아쿨라(Acular), 아쿨라 LS, 아쿨라 PF, 아쿨라 X, 아쿠베일(Acuveil), 애드빌(Advil), 애드빌 알러지 시누스(Advil Allergy Sinus), 애드빌 콜드 앤드 시누스(AdvilCold and Sinus), 애드빌 콘제스션 릴리프(Advil Congestion Relief), 애드빌 PM, 애드빌 PM 캡슐, 에어 살론파스(Air 살론파스), 에어탈(Airtal), 알콜-프리 나이퀸 콜드 & 플루 릴리프(Alcohol-Free NyQuil Cold & Flu Relief), 알레브(Aleve), 알레브 아브디 이브라힘(ABDI IBRAHIM), 알레브-D, 알카-셀트저(Alka-Seltzer), 알카-셀트저 바이엘(BAYER), 알카-셀트저 엑스트라 스트렙스(Extra Strength), 알카-셀트저 레몬-라임(Lemon-Lime), 알카-셀트저 오리지널(Original), 알카-셀트저 플러스(Plus), 알카-셀트저 플러스 콜드 앤드 코프(plus Cold and Cough), 알카-셀트저 플러스 콜드 앤드 코프 포뮬러(Formula), 알카-셀트저 플러스 데이 앤드 나이트 콜드 포뮬러(Day and Night Cold Formula), 알카-셀트저 플러스 데이 논-드라우지 콜드 포뮬러(Day 논-드라우지 Cold Formula), 알카-셀트저 플러스 플루 포뮬러(Flu Formula), 알카-셀트저 플러스 나이트 콜드 포뮬러(Night Cold Formula), 알카-셀트저 플러스 시누스 포뮬러(Sinus Formula), 알카-셀트저 플러스 스파클링 오리지널 콜드 포뮬러(Plus Sparkling Original Cold Formula), 알카-셀트저 PM, 알카-셀트저 웨이크-업 콜(Wake-Up Call), 아나신(Anacin), 아나프록스(Anaprox), 아나프록스 미네르바(MINERVA), 안사이드(Ansaid), 아피톡신(Apitoxin), 아프라낙스(Apranax), 아프라낙스 애브디(abdi), 아콕시아(Arcoxia), 아트리티스 포뮬러 벤가이(Arthritis Formula Bengay), 아트록텍(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 데이 앤드 나이트, 베닐린(Benlynin) 4 플루, 베닐린 콜드 앤드 플루, 베닐린 콜드 앤드 플루 데이 앤드 나이트, 베닐린 콜드 앤드 시누스 데이 앤드 나이트, 베닐린 콜드 앤드 시누스 플러스, 베닐린 데이 앤드 나이트 콜드 앤드 플루 릴리프, 베닐린1 올-인-원(All-In-One), 브렉신(Brexin), 브렉신 안젤리니(ANGELINI), 브롬데이(Bromday), 부페린(Bufferin), 버스코판 플러스(Buscopan Plus), 칼돌로르(Caldolor), 칼마텔(Calmatel), 캄비

아, 카나사(Canasa), 카복시겔, 카타플람(Cataflam), 셀레브렉스, 셀레브렉스 오리팜, 칠드런즈(Children's) 애드빌 알러지 시누스, 칠드런즈 타이레놀(Tylenol), 칠드런즈 타이레놀 코프 앤드 러니 노즈(Cough and Runny Nose), 칠드런즈 타이레놀 플러스 감기, 칠드런즈 타이레놀 플러스 콜드 앤드 코프, 칠드런즈 타이레놀 플러스 감기 및 코 막힘, 칠드런즈 타이레놀 플러스 플루, 칠드런즈 타이레놀 플러스 감기 & 알레르기, 칠드런즈 타이레놀 플러스 코프 & 러니 노즈, 칠드런즈 타이레놀 플러스 코프 & 소어 쓰로트(plus Cough & Sore Throat), 칠드런즈 타이레놀 플러스 복합 증상 감기, 클리노릴(Clinoril), 코드랄(Codral) 콜드 앤드 플루, 코드랄 데이 앤드 나이트 데이 타블렛츠, 코드랄 데이 앤드 나이트 나이트 타블렛츠, 코드랄 나이트타임, 콜라잘(Colazal), 콤부녹스(Combunox), 콘택(Contac) 콜드 앤드 플루, 콘택 콜드 앤드 플루 눈-드라우지(Non-Drowsy), 코리시딘(Coricidin) D, 코리시딘 HBP 콜드 앤드 플루, 코리시딘 HBP 데이 앤드 나이트 멀티-심텀 콜드(Multi-Symptom Cold), 코리시딘 HBP 맥심 스트렝쓰 플루(HBP Maximum Strength Flu), 코리시딘 HBP 나이트타임 멀티-심텀 콜드, 코리시딘 II 엑스트라 스트렝쓰 콜드 앤드 플루, CS502, CS670, 데이프로(Daypro), 데이프로 알타(Daypro Alta), DDS06C, 데마진(Demazin) 콜드 앤드 플루, 데마진 코프, 콜드 앤드 플루, 데마진 낮/밤 콜드 앤드 플루, 데마진 PE 콜드 앤드 플루, 데마진 PE 낮/밤 콜드 앤드 플루, 디클로페낙 HPBCD, 디메탐(Dimetapp) 데이 릴리프(Day Relief), 디메탐 멀티-심텀 콜드 앤드 플루, 디메탐 나이트 릴리프, 디메탐 페인 앤드 피버 릴리프, 디메탐 PE 시누스 페인, 디메탐 PE 시누스 페인 플러스 알러지, 디펜탐(Dipentum), 디락틴, 디스프린 콜드 '앤' 피버(Disprin Cold 'n' Fever), 디스프린 엑스타(Extra), 디스프린 포르테(Forte), 디스프린 플러스, 드리스탄(Dristan) 콜드, 드리스탄 주니어, 드릭소랄(Drixoral) 플러스, 두엑시스(Duexis), 다이나스타트, 에페랄간, 에페랄간 플러스 비타민 C, 에페랄간 비타민 C, 엘릭시어(Elixure) IB, 엑세드린(Excedrin) 백 앤드 바디(Back and Body), 엑세드린 마이그레이인(Migraine), 엑세드린 PM, 엑세드린 시누스 헤드에이크(Sinus Headache), 엑세드린 텐션 헤드에이크(Tension Headache), 팔콜(Falcol), 판사막, 펠덴(Feldene), 피버올(FeverAll), 피오리날(Fiorinal), 코데인(Codeine)과 함께 피오리날, 플라낙스(Flanax), 플렉토르 패치(Flector Patch), 플루캠(Flucam), 포트타게식(Fortagesic), 게르빈(Gerbin), 지아조(Giazo), 글라디오(Gladio), 구디스(Goody's) 백 앤드 바디 페인, 구디스 쿨 오렌지(Cool Orange), 구디스 엑스트라 스트렝쓰, 구디스 PM, 그리슬리스 벤가이(Greaseless Bengay), GW406381, HCT1026, 허 싱 이(He Xing Yi), 하이아날게스-D, 하이드로코텍스(HydrocoDex), 이부프로펜 소듐 화이자, 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자, 아이시 핫 사노피 아벤티스(Icy Hot SANOFI AVENTIS), 임프라코르, 인도신(Indocin), 인도메타신(Indomethacin) APP 파마(PHARMA), 인도메타신 마이란(MYLAN), 인펀츠(Infants') 타이레놀, IP880, IP940, 이레모드(Iremod), ISV205, JNS013, Jr. 타이레놀, 주니펜(Junifen), 주니어 스트렝쓰(Junior Strength) 애드빌, 주니어 스트렝쓰 모트린(Motrin), 케토프로펜 TDS, 렘십 맥스(Lemsip Max), 렘십 맥스 올 인 원(All in One), 렘십 맥스 올 나이트(All Night), 렘십 맥스 콜드 앤드 플루, 리알다(Lialda), 리스테린(Listerine) 마우스 워시(Mouth Wash), 로이즈 크림(Lloyds Cream), 로딘(Lodine), 로르핏(Lorfit) P, 록소닌(Loxonin), LTNS001, 머신돌(Mersyndol), 메살라민 살릭스(Mesalamine SALIX), 메살라민 소파(SOFAR), 메살라진(Mesalazine), 메사살(Mesasal) 글락소(GLAXO), 메사살 사노피(SANOFI), 메술리드(Mesulid), 메트살 히트 립(Metsal Heat Rub), 미돌(Midol) 컴플리트(Complete), 미돌 익스텐디드 릴리프(Extended Relief), 미돌 리퀴드 겔즈(Liquid Gels), 미돌 PM, 미돌 틴(Teen) 포물러, 미그라닌 코티드 타블렛츠(Migranin COATED TABLETS), ML3000, 모빅(Mobic), 모루스(Mohrus), 모트린, 모트린 콜드 앤드 시누스 페인, 모트린 PM, 모발리스 아스펜(Movalis ASPEN), MRX7EAT, 날폰(Nalfon), 날폰 페디놀(PEDINOL), 나프렐란(Naprelan), 나프로신(Naprosyn), 나프로신 RPG 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 스콜르, 누로펜(Nurofen), 누로펜 콜드 앤드 플루, 누로펜 맥스 스트렝쓰 마이그레이인, 누로펜 플러스, 누로몰(Nuromol), 비타민 C와 함께 나이퀵, 오큐펜(Ocufen), OMS103HP, 오랄리스, 오루디스 애보트 재팬(Orudis ABBOTT JAPAN), 오루베일(Oruvail), 오스텔룩(Osteluc), 옥시코텍스, P54, 파나돌(Panadol), 파나돌 악티페스트(Actifast), 파라딘(Paradine), 파라맥스, 파페낙(Parfenac), 페데아(Pedea), 펜사이드(Pennsaid), 펜타사(Pentasa), 펜타사 오리팜, 페온(Peon), 퍼코단(Percodan), 퍼코단-데미(Demi), 퍼코텍스, 퍼코게식(Percogesic), 퍼팔간(Perfalgan), PL2200, PL3100, 폰스텔(Ponstel), 프렉시게(Prexige), 프로렌사(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(사리돈), SDX101, 셀터치, sf로와사(sfRowasa), 신바로(Shinbaro), 시누맥스(Sinumax), 시누탐(Sinutab), 시누탐, 시누스, 스팔트(Spalt), 스프릭스(Sprix), 스트레펜(Strefen), 수다페드(Sudafed) 콜드 앤드 코프, 수다페드 헤드 콜드 앤드 시누스, 수다페드 PE 콜드 플러스 코프, 수다페드 PE 프레셔 플러스 페인(Pressure plus Pain), 수다페드 PE, 시비어 콜드(Severe Cold), 수다페드 PE 시누스 데이 플러스 나이트 릴리프 데이

타블렛츠, 수다페드 PE 시누스 데이 플러스 나이트 릴리프 나이트 타블렛츠, 수다페드 PE 시누스 플러스 안티-인플라마토리 페인 릴리프, 수다페드 시누스 어드밴스(Sinus Advance), 서감(Surgam), 시날고스(Synalgos)-DC, 신플렉스(Synflex), 타비스트(Tavist) 알레르기/시누스/두통, TDS943, TDT070, 테라플루(Theraflu) 콜드 앤드 소어 쓰로트(Cold and Sore Throat), 테라플루 데이타임 시비어 콜드 앤드 코프, 테라플루 데이타임 워밍 릴리프(Warming Relief), 테라플루 워밍 릴리프 캐플릿츠(Caplets) 데이타임 멀티-심텅 콜드, 테라플루 워밍 릴리프 콜드 앤드 체스트 컨제스천(Cold and Chest Congestion), 토마피린(Thomapyrin), 토마피린 C, 토마피린 에퍼페센트(Effervescent), 토마피린 미디움(Medium), 틸코틸(Tilcotil), 티스폴(Tispol), 톨렉틴(Tolactin), 토라돌(Toradol), TPR100, TQ1011, 트라우마-살베(Trauma-Salbe), 트라우마-살베 퀴즈다(Kwizda), 트레오(Treo), 트렉시메트(Treximet), 트로벡스(Trovex), TT063, 타이레놀, 타이레놀 알러지 멀티-심텅, 타이레놀 백 페인, 타이레놀 콜드 & 코프 데이타임, 타이레놀 콜드 & 코프 나이트타임, 타이레놀 콜드 앤드 시누스 데이타임, 타이레놀 콜드 앤드 시누스 나이트타임, 타이레놀 콜드 헤드 컨제스천 시비어, 타이레놀 콜드 멀티 심텅 데이타임, 타이레놀 콜드 멀티 심텅 나이트타임 리퀴드, 타이레놀 콜드 멀티 심텅 시비어, 타이레놀 콜드 논-드라우지니스(Non-Drowsiness) 포물러, 타이레놀 콜드 시비어 컨제스천 데이타임, 타이레놀 컴플리트 콜드, 코프 앤드 플루 나이트 타임, 타이레놀 플루 나이트타임, 타이레놀 멘스트럴(Menstrual), 타이레놀 PM, 타이레놀 시누스 컨제스천 & 페인 데이타임, 타이레놀 시누스 컨제스천 & 페인 나이트타임, 타이레놀 시누스 컨제스천 & 페인 시비어, 타이레놀 시누스 시비어 컨제스천 데이타임, 타이레놀 울트라 릴리프(Ultra Relief), 카페인 및 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 초고강도 벤가이 크림(Ultra Strength Bengay Cream), 울트라셋(Ultracet), UR8880, V0498TA01A, 빅스 나이퀸 콜드 앤드 플루 릴리프(Vicks NyQuil Cold and Flu Relief), 비코프로펜, 비모보(Vimovo), 볼타렌(Voltaren) 에몰겔(Emulgel), 볼타렌 GEL, 볼타렌 노파르티스 컨슈머 헬스 게엠베하(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(ZoenaSa). 또 다른 측면에서, COX-2 억제제는 당업계에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예컨대, 문헌 [Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors- current status and future prospects. 2001. *Eur. J. Med. Chem.* 36: 109-126](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 일부 측면에서, COX-2 억제제는 진행성 유방암을 앓고 있는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, COX-2 억제제는 제2 치료와 함께 사용된다. 일부 측면에서, 제2 치료는 본원에 기술된 임의의 치료이다. 일부 측면에서, COX-2 억제제는 하기의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 치료와 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);  
최종 접속일 2012년 12월 2일), 카르보잔티닙(Carbozantinib) 또는 카보잔티닙(Cabozantinib), 항체 또는 펩티드 차단 PTHLH(부갑상선 호르몬 유사 호르몬) 또는 PTHrP(부갑상선 호르몬 관련 단백질) 및 에버롤리무스.

- [0167] 또 다른 측면에서, 골 분해를 회피하거나, 및/또는 예방할 수 있는 치료 작용제로는 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다:
- [0168] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHLH) 억제제(차단 항체를 포함) 또는 그의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7-34에 상응하는 테리파라티드). 이 호르몬은 파골세포를 자극하고, 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.
- [0169] - 스트론튬 라벨레이트: 이는 대안적인 경구용 치료제이고, 골모세포 증식을 자극하고, 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 작용제"(DABA: dual action bone agent)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0170] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기전과 상관없이, 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로게스타겐, 에스트라디올, 드롤록시펜, 랄록시펜, 라소폭시펜, TSE-424, 타목시펜, 이독시펜, L Y353381, LY117081, 토레피펜, 플루베스트란트, 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리디닐)에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4'-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646을 포함한다.
- [0171] - 칼시토닌: 이는 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0172] - 비스포스포네이트: 이는 골 흡수 및 재흡수가 있는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 동반하는 암(여기서, 후자는 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 동반하거나, 동반하지 않는다)의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 요법에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트

트의 예로는 비록 제한하는 것은 아니지만, 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트, 네리드로네이트, 올파드로네이트, 알렌드로네이트, 이반드로네이트, 리세드로네이트, 인카드로네이트, 졸레드로네이트 또는 졸레드로산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트(예컨대, 에티드로네이트, 클로드로네이트, 틸루드로네이트 등)를 포함한다.

[0173] - "카텝신 K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 의미한다. 카텝신 K 억제제의 비제한적인 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(노파르티스 파마 게엠베하(Novartis Pharma GmbH) 명의 하의 국제 특허 출원 WO 03/020278에 기술되어 있음); 공보 WO 03/020721(노파르티스 파마 게엠베하) 및 공보 WO 04/000843(아스트라제네카 아베(ASTRAZENECA AB))에 기술되어 있는 피롤로-피리미딘; 뿐만 아니라, 공보 PCT WO 00/55126(악시스 파마슈티칼즈(Axys Pharmaceuticals)), WO 01/49288(머크 프로스트 캐나다 & 컴파니(Merck Frosst Canada & Co.) 및 악시스 파마슈티칼즈)에 기술된 억제제를 포함한다.

[0174] - 본원에서 사용되는 바, "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고, 골용해성 병변이 있는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 작용제는 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데 있어서 중요한 역할을 할 수 있다. 노파르티스의 BHQ880은 혁신 신약인 완전한 인간 항DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다 (문헌 [Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract]).

[0175] - 본원에서 사용되는 바, "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유도된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 의미한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서 뿐만 아니라, 골모세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 모든 상기 세포 유형에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 것으로 보인다. 동시에, 골모세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 분아형 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)를 포함하는 골 전이의 병리학 적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데 있어서 실행가능한 전략이 될 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀릭시스 인크)은 MET에 의해 유도된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고, 전이를 감소시키고, 혈관신생(종양 성장을 지지하는 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, XL880, CAS 849217-64-7로도 공지)이다.

[0176] - 본원에서 사용되는 바, "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. RANKL은 간질의 골모세포 막 및 T 림프구 세포의 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 억제제로는 제한없이 하기의 것을 포함한다:

[0177] o RANKL에 결합할 수 있고, RANK 단백질의 세포외 도메인 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 뮤린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포외 도메인을 포함할 수 있거나, 별법으로, 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다:

[0178] o 오스테오프로테게린 또는 RANKL 결합 능력이 있는 이의 변이체.

[0179] o RANKL 특이적 안티센스 분자.

[0180] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임.

[0181] o 특이적 항RANKL 항체. "항RANKL 항체 또는 RANKL에 대한 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는, 핵 인자  $\kappa$ B에 대한 활성화 수용체의 리간드(RANKL)에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 억제시키고자 하는 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌 [Kohler,



Milstein et al. (Nature, 1975, 256: 495)]에 기술된 방법을 사용하여 제조된다. 본 발명과 관련하여 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 무손상 항체, 단편 "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이특이적 항체를 포함한다.

- [0182] o 특이적 항RANKL 나노바디. 나노바디는 천연적으로 발생된 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 원래 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄가 결여된 완전한 기능적 항체를 가진다는 발견 이후에 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는
- [0183] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고,
- [0184] 여기서, 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 완전한 항원 결합 능력을 보유하는 완벽하게 안정한 폴리펩티드이다. 그의 독특한 구조적 및 기능적 특성을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애플린스에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.
- [0185] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포로테게린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 항RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 항RANKL 항체는 데노수맵이다(문헌 [Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215], CAS 번호 615258-40-7)(상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 데노수맵은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 완전한 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 데노수맵의 다양한 측면은 미국 특허 번호 제6,740,522호; 제7,411,050호; 제7,097,834호; 제7,364,736호(상기 특허는 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 데노수맵과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구성물이다.
- [0186] 바람직한 실시양태에서, 항RANKL 나노바디는 W02008142164(그의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 항RANKL 항체는 ALX0141(애플린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 특정 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고, 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.
- [0187] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 작용제는 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 라툼-223, 칼시토닌, 및 카텡신 K 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 작용제는 비스포스포네이트이다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.
- [0188] 한 실시양태에서, 원발성 유방암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소형 분자(소분자)이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록이다(문헌 [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(문헌 [Velasco-Velazquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850]). 일부 측면에서, CCR5 길항제는 아플라비록이다(문헌 [Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2(Suppl. 1): S13]). 일부 측면에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘 CCR5 길항제이다(문헌 [Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (18): 5401-5406]). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(문헌 [Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 4(2): 82-7]).
- [0189] 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0190] 바람직한 실시양태에서, 라툼 223 요법은 알파라딘이다.
- [0191] 별법으로, 전이를 치료 및/또는 예방하기 위해 상기 언급된 것로부터의 1개 초과 작용제가 조합되거나, 또는 상기 작용제가 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D와 함께, 또는 호르몬 치료와 함께 조합될 수 있는 조합 치료가 수행될 수 있다.

- [0192] 유방암 환자에서 조기 골 전이를 예측하는 방법
- [0193] 또 다른 측면에서, 본 발명은 유방암, 예컨대, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 유전자의 발현 수준이 평균값 + 1 표준 편차보다 높다면, 이는 조기 골 전이의 위험이 증가되어 있다는 것을 나타내는 것인, 유방암, 예를 들어, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이의 위험을 결정하는 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0194] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 극조기 골 전이이다.
- [0195] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0196] 본원에서 사용되는 바, "조기 골 전이"란 유방암을 앓고 있는 환자에서 수술 후 5년 이내에 나타나는 골 전이에 관한 것이다.
- [0197] 본원에서 사용되는 바, "극조기 골 전이"란 유방암을 앓고 있는 환자에서 수술 후 3년 이내에 나타나는 골 전이에 관한 것이다.
- [0198] 본 발명의 제4 방법은 제1 단계에서 유방암, 예컨대, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 정량화하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0199] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제4 방법은 단일 마커로서 단지 MAF 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함하고, 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 결정하는 단계는 포함하지 않는다. MAF 유전자 발현 수준은 앞서 본 발명의 제1 방법에 대해 개시된 바와 같이 정량화될 수 있다.
- [0200] 바람직한 실시양태에서, 유방암은 HER2+ 유방암이다.
- [0201] 제2 단계에서, 상기 유전자의 발현 수준이 평균값 + 1 표준 편차보다 높다는 것은 조기 골 전이의 위험이 증가되어 있다는 것을 나타내는 것이다.
- [0202] 본원에서 사용되는 바, "평균 수준"은 동등하지 않은 값으로 이루어진 세트의 일반적인 유의성을 요약하거나, 대표하는 (평균, 모드 또는 중간으로서) 발현 수준의 단일 값에 관한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 평균 수준은 유방암 종양 종양의 대표적인 코호트로부터 취득된 발현 수준의 평균에 상응한다. 환자 코호트는 평가하고자 하는 개체 환자를 대표하는 연령에 의해 정의된다.
- [0203] 본원에서 사용되는 바, "표준 편차"는 수 집합의 분산의 척도에 관한 것이다. 예를 들어, MAF의 평균 정상 수준에 대한 표준 편차는 유방 종양 샘플에서 발견된 MAF 수준의 집합의 분산이다. 데이터가 더 흩어져 있을수록, 편차는 더 높다. 표준 편차는 관찰된 값의 제곱 편차의 평균의 제곱근을 빈도 분포에서의 그의 평균으로부터 차감함으로써 취득될 수 있다.
- [0204] 일단 유방암, 예컨대, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체로부터의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준을 측정하고, 평균 수준과 비교하고 나면, 상기 유전자의 발현 수준이 MAF 유전자 발현 수준과 비교하여 평균 + 1 표준 편차보다 높을 경우, 이때 상기 피험체에서 조기 골 전이가 발생할 수 있는 경향이 더 크다는 결론을 도출할 수 있다.
- [0205] 골 전이를 동반하는 HER2+ 유방암 환자에서의 맞춤형 요법을 디자인하는 방법
- [0206] 또 다른 측면에서, 본 발명은
- [0207] i) 골 전이를 동반하는 HER2+ 유방암을 앓는 피험체의 골 전이성 샘플에서의 MAF 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0208] ii) 단계 (i)에서 취득된 발현 수준을 참조 값과 비교하는 단계
- [0209] 를 포함하고, 여기서, 상기 참조 값과 비교하여 MAF 유전자 발현 수준이 증가되어 있다면, 상기 피험체는 골 분해 예방을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적절한, 골 전이를 동반하는 HER2+ 유방암을 앓는 피험체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제5 방법)에 관한 것이다.
- [0210] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0211] 본 발명의 제5 방법은 제1 단계에서 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 발현 수준(또는 MAF 전위 또는 증폭)을 정량하는 것을 포함한다. 본 발명의 제5 방법의 경우에서, 샘플은 골 전이로부터의 조직

샘플일 수 있다.

- [0212] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제5 방법은 단일 마커로서 단지 MAF 유전자의 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함하고, 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 결정하는 단계는 포함하지 않는다.
- [0213] 제2 단계에서, 피험체의 종양 샘플에서 수득된 MAF 유전자 발현 수준(또는 MAF 전위 또는 증폭)은 참조 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 참조 값은 대조군 샘플에서 MAF 유전자 발현 수준이다. 분석되는 종양의 유형에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제5 방법을 포함하는 경우, 이때 참조 샘플은 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플, 또는 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 생검 샘플 중 종양 조직 집단에서 측정된 MAF 유전자 발현 수준의 중간값에 상응하는 샘플이다.
- [0214] 일단 샘플에서 MAF 유전자 발현 수준을 측정하고, 참조 값(예컨대, 대조군 샘플의 MAF 유전자 발현 수준)과 비교하고 나면, 상기 유전자의 발현 수준이 참조 값에 비해 증가되어 있다면, 이는 상기 피험체가 골 분해를 회피하거나, 또는 예방하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격이라는 것을 나타낸다.
- [0215] 비록 제한하는 것은 아니지만, 골 분해를 회피하고/거나, 예방하는 데 사용되는 작용제의 예시적인 예로는 하기의 것을 포함한다:
- [0216] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHrH) 억제제(차단 항체를 포함) 또는 그의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7-34에 상응하는 테리파라티드). 이 호르몬은 파골세포를 자극하고, 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.
- [0217] - 스트론튬 라벨레이트: 이는 대안적인 경구용 치료제이고, 골모세포 증식을 자극하고, 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 작용제"(DABA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0218] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기전과 상관없이, 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로그스테라겐, 에스트라디올, 드롤록시펜, 탈록시펜, 라소폭시펜, TSE-424, 타목시펜, 이독시펜, L Y353381, LY117081, 토레피펜, 플루베스트란트, 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리딘)]에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646을 포함한다.
- [0219] - 칼시토닌: 이는 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0220] - 비스포스포네이트: 이는 골 흡수 및 재흡수가 있는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 동반하는 암(여기서, 후자는 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 동반하거나, 동반하지 않는다)의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 요법에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트의 예로는 비록 제한하는 것은 아니지만, 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트, 네리드로네이트, 올파드로네이트, 알렌드로네이트, 이반드로네이트, 리세드로네이트, 인카드로네이트, 졸레드로네이트 또는 졸레드로산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트(예컨대, 에티드로네이트, 클로드로네이트, 틸루드로네이트 등)를 포함한다.
- [0221] - 알파라딘(라툼-223 디클로라이드). 알파라딘은 라툼-223 붕괴로부터의 알파 방사선을 이용하여 암 세포를 사멸시킨다. 라툼-223은 천연적으로 칼슘 모방체로서의 그의 성질을 통해 골 전이에 자가 표적화한다. 알파 방사선은 (베타 또는 감마 방사선에 기초한 현재의 방사선요법에 비해) 2-10개 세포의 매우 짧은 범위를 가지며, 따라서, 주변 건강한 조직(특히, 골수)을 더 적게 손상시킨다. 라툼-223은 칼슘과 성질이 유사하기 때문에, 칼슘이 신체의 골을 구축하는 데에 사용되는 부위(더욱 빠른 비정상적인 골 성장의 부위, 예컨대, 진행성 거세 저항성 전립샘암을 앓는 남성의 골격 전이에서 관찰되는 것 포함)로 이동된다. 주입 후 라툼-223은 혈류를 통해 비정상적인 골 성장의 부위로 운반된다. 암이 신체에서 시작되는 부위는 원발성 종양으로서 공지되어 있다. 이들 세포들 중 일부는 이탈되어 혈류를 통해 신체의 또 다른 부분으로 운반될 수 있다. 이어서, 암 세포는 신체의 상기 부분에서 정착하여 새로운 종양을 형성할 수 있다. 이것이 발생하는 경우, 2차 암 또는 전이로 명명된다. 말기 전립샘암을 앓고 있는 환자들 대부분은 그의 골에서 최대의 질환 부담을 겪게 된다. 라툼-223을 사용하는 목적은 이 2차 암을 선택적으로 표적화하는 것이다. 골에서 흡수되지 않은 임의의 라툼-223은 신속히 장으로 이동되어 배출된다.
- [0222] - "카텝신 K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 의미한다. 카텝신 K 억제제의 비제한적인 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(노파르티스 파마 게엠베하 명의 하의 국제 특

허 출원 WO 03/020278에 기술되어 있음); 공보 WO 03/020721(노파르티스 파마 게엠베하) 및 공보 WO 04/000843(아스트라제네카 아베)에 기술되어 있는 피롤로-피리미딘; 뿐만 아니라, 공보 PCT WO 00/55126(악시스 파마슈티칼즈), WO 01/49288(머크 프로스트 캐나다 & 컴파니 및 악시스 파마슈티칼즈)에 기술된 억제제를 포함한다.

[0223] - 본원에서 사용되는 바, "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고, 골용해성 병변이 있는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 작용제는 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데 있어서 중요한 역할을 할 수 있다. 노파르티스의 BHQ880은 혁신 신약인 완전한 인간 항DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다 (문헌 [Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract]).

[0224] - 본원에서 사용되는 바, "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유도된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 의미한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서 뿐만 아니라, 골모세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 모든 상기 세포 유형에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 것으로 보인다. 동시에, 골모세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 분아형 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)를 포함하는 골 전이의 병리학 적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데 있어서 실행가능한 전략이 될 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀릭시스 인크)은 MET에 의해 유도된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고, 전이를 감소시키고, 혈관신생(종양 성장을 지지하는 데에 필요한 새로운 혈관의 형성)을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또 다른 적합한 이중 억제제는 E7050(N-[2-플루오로-4-({2-[4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일]카보닐아미노피리딘-4-일}옥시)페닐]-N'-(4-플루오로페닐) 사이클로프로판-1,1-디카복사아미드(2R,3R)-타르트레이트)(CAS 928037-13-2) 또는 포레티닙(GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7로도 공지))이다.

[0225] - 본원에서 사용되는 바, "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. RANKL은 간질의 골모세포 막 및 T 림프구 세포의 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 억제제로는 제한없이 하기의 것을 포함한다:

[0226] o RANKL에 결합할 수 있고, RANK 단백질의 세포외 도메인 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 뮤린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포외 도메인을 포함할 수 있거나, 별법으로, 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다:

[0227] o 오스테오프로테게린 또는 RANKL 결합 능력이 있는 이의 변이체.

[0228] o RANKL 특이적 안티센스 분자.

[0229] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임.

[0230] o 특이적 항RANKL 항체. "항RANKL 항체 또는 RANKL에 대한 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는, 핵 인자  $\kappa$ B에 대한 활성화 수용체의 리간드(RANKL)에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 억제시키고자 하는 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌 [Kohler, Milstein et al. (Nature, 1975, 256: 495)]에 기술된 방법을 사용하여 제조된다. 본 발명과 관련하여 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 무손상 항체, 단편 "Fab," "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이특이적 항체를 포함한다.

[0231] o 특이적 항RANKL 나노바디. 나노바디는 천연적으로 발생된 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 원래 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄가 결여된 완전한 기능적 항체를 가진다는 발견 이후에 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는



- [0232] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고,
- [0233] 여기서, 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 완전한 항원 결합 능력을 보유하는 완벽하게 안정한 폴리펩티드이다. 그의 독특한 구조적 및 기능적 특성을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애플린스에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.
- [0234] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포로테게린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 항RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 항RANKL 항체는 데노수맵이다(문헌 [Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215], CAS 번호 615258-40-7)(상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 데노수맵은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 완전한 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 데노수맵의 다양한 측면은 미국 특허 번호 제6,740,522호; 제7,411,050호; 제7,097,834호; 제7,364,736호(상기 특허는 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 데노수맵과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구성물이다.
- [0235] 바람직한 실시양태에서, 항RANKL 나노바디는 W02008142164(그의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 항RANKL 항체는 ALX0141(애플린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 특정 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고, 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.
- [0236] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 작용제는 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 라툼-223, 칼시토닌, 및 카텅신 K 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 작용제는 비스포스포네이트이다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.
- [0237] 한 실시양태에서, 원발성 유방암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소형 분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록이다(문헌 [Velasco-Velaquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850]). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 비크리비록이다(문헌 [Velasco-Velaquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850]). 일부 측면에서, CCR5 길항제는 아플라비록이다(문헌 [Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2(Suppl. 1): S13]). 일부 측면에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘 CCR5 길항제이다(문헌 [Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (18): 5401-5406]). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(문헌 [Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 4(2): 82-7]).
- [0238] 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0239] 바람직한 실시양태에서, 라툼 223 요법은 알파라딘이다.
- [0240] 별법으로, 전이를 치료 및/또는 예방하기 위해 상기 언급된 것로부터의 1개 초과 작용제가 조합되거나, 또는 상기 작용제가 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D와 함께, 또는 호르몬 치료와 함께 조합될 수 있는 조합 치료가 수행될 수 있다.
- [0241] MAF 유전자의 증폭 검출에 기초한 HER2+ 유방암에서의 전이 예후 방법
- [0242] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 참조 유전자 카피수와 비교하여 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 참조 유전자 카피수와 비교하여 MAF 유전자가 증폭되어 있다면, 이는 골 전이가 발생할 위험이 증가되어 있음을 나타내는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 HER2+ 유방암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제6 방법)에 관한 것이다.

- [0243] 일부 실시양태에서, 증폭은 16q23 유전자좌의 영역에 있다. 일부 실시양태에서, 증폭은 대략 Chr. 16-대략 79,392,959 bp 내지 약 79,663,806 bp(센트로미어부터 텔로미어까지) 사이의 염색체 영역 중 임의의 부분에 있다. 일부 실시양태에서, 증폭은 대략 Chr. 16-79,392,959 bp 내지 대략 79,663,806 bp 사이의 게놈 영역에, 단, DNA 반복 요소가 배제된 영역에 있다. 일부 실시양태에서, 전위는 상기 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 측정된다.
- [0244] 특정 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 증폭을 결정함으로써 결정될 수 있다. 바람직하게는, 그의 증폭이 MAF 유전자의 증폭의 존재를 나타내는 것인 염색체 영역은 MAF 유전자를 포함하는 유전자좌 16q22-q24이다. 유전자좌 16q22-q24는 16번 염색체, 상기 염색체의 긴 아암, 및 밴드 22와 밴드 24 사이의 범위에 위치한다. 이 영역은 콘티그(contig) NT\_010498.15 및 NT\_010542.15를 갖는 NCBI 데이터베이스에 상응한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 결정될 수 있다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭은 14q32 및 16q23에 대한 프로브를 포함하는 바이시스(Vysis) LSI IGH/MAF 이중 색상 이중 융합 프로브를 사용함으로써 결정된다.
- [0245] 본 발명의 제6 방법은 제1 단계에서 MAF 유전자가 피험체의 샘플에서 증폭되어 있는지를 결정하는 것을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다. 이를 위해, 종양 샘플에서의 MAF 유전자의 증폭을 대조군 샘플과 비교한다.
- [0246] 특정 실시양태에서, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이가 발생할 수 있는 경향을 예측하는 본 발명의 제6 방법은 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 카피수를 결정하고, 상기 카피수를 대조군 또는 참조 샘플의 카피수와 비교하고, 여기서, MAF 카피수가 대조군 샘플의 MAF 카피수에 비해 더 크다면, 이때 피험체에서 골 전이가 발생할 수 있는 경향이 더 크다는 것인 단계를 포함한다.
- [0247] 대조군 샘플은 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플, 또는 각각 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 생검 샘플 중 종양 조직 집단에서 측정된 MAF 유전자 발현 수준의 중간값에 상응하는 것이다. 상기 참조 샘플은 전형적으로 피험체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 취득된다. 유전자 카피수가 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 카피수에 비해 증가되어 있는 경우, 피험체에서 전이가 발생할 수 있는 경향은 더 크다.
- [0248] 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자 카피수가, 참조 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피수보다 높을 때, MAF 유전자는 참조 유전자 카피수와 비교하여 증폭되어 있는 것이다. 한 예에서, MAF 유전자의 게놈 카피수가 대조군 샘플과 비교하여 테스트 샘플 중에서 약 2배(즉, 카피수 약 6), 약 3배(즉, 카피수 약 8), 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 35배, 약 40배, 약 45배, 또는 약 50배 이상만큼 증가되어 있다면, MAF 유전자는 "증폭되어 있다"고 말할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포 1개당 MAF 유전자의 게놈 카피수가 적어도 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30 등인 경우, MAF 유전자는 "증폭되어 있다"고 말할 수 있다.
- [0249] 특정 실시양태에서, 증폭 또는 카피수는 인시츄 하이브리드화 또는 PCR에 의해 결정된다.
- [0250] MAF 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 방법은 최신기술 수준에서 널리 공지되어 있다. 상기 방법으로는 제한 없이 인시츄 하이브리드화(ISH: *in situ* hybridization)(예컨대, 형광 인시츄 하이브리드화(FISH), 발색성 인시츄 하이브리드화(CISH: chromogenic *in situ* hybridization) 또는 은 인시츄 하이브리드화(SISH: silver *in situ* hybridization), 게놈 비교 하이브리드화 or 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량 PCR)을 포함한다. 임의의 ISH 방법의 경우, 염색체 또는 핵에서 형광점, 발색점 또는 은이 있는 점의 개수를 계수하여 증폭, 또는 카피수를 결정할 수 있다.
- [0251] 형광 인시츄 하이브리드화(FISH)는 염색체에서 특정 DNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하고, 위치를 확인하는데 사용되는 세포유전학적 기법이다. FISH는 고도의 서열 유사성을 보이는 염색체의 일부 부분들에만 결합하는 형광 프로브를 사용한다. 전형적인 FISH 방법에서, DNA 프로브는 전형적으로 효소 반응, 예컨대, Nick 번역 또는 PCR의 이용에 의해 DNA 내로 도입되는 플루오르-*d*UTP, 디곡시게닌-*d*UTP, 바이오틴-*d*UTP 또는 합텐-*d*UTP 형태의 형광 분자 또는 합텐으로 표지된다. 유전물질(염색체)을 함유하는 샘플을 유리 슬라이드 상에 놓고, 포름아미드 처리로 변성시킨다. 이어서, 표지된 프로브를, 당업자에게 의해 결정될 적합한 조건하에 유전물질을 함유하는 샘플과 하이브리드화시킨다. 하이브리드화 후, (불소로 표지된 프로브의 경우) 직접적으로 또는 (합텐을 검출하

기 위해 형광 표지된 항체를 사용하여) 간접적으로 샘플을 가시화한다.

- [0252] CISH의 경우, 프로브를 디코시게닌, 비오틴 또는 플루오레세인으로 표지하고, 적합한 조건하에 유전물질을 함유하는 샘플과 하이브리드화시킨다.
- [0253] DNA에 결합할 수 있는 임의의 표지 또는 표지 분자를 사용하여 본 발명의 제4 방법에서 사용되는 프로브를 표지함으로써, 핵산 분자를 검출할 수 있다. 표지화를 위한 표지의 예로는 비록 제한하는 것은 아니지만, 방사성 동위원소, 효소 기질, 보조인자, 리간드, 화학발광 물질, 형광단, 합텐, 효소 및 그의 조합을 포함한다. 표지화하는 방법 및 상이한 목적에 적합한 표지를 선택하는 것에 대한 가이드라인은 예를 들어, 문헌 [Sambrook *et al.* (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989)] 및 [Ausubel *et al.* (Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998)]에서 살펴볼 수 있다.
- [0254] 일단 MAF 유전자의 증폭, 16q23 유전자좌의 증폭을 직접적으로 결정하거나, 유전자좌 16q22-q24의 증폭을 결정함으로써 증폭이 존재한다는 것을 결정하고, 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 증폭과 비교한 후, MAF 유전자의 증폭이 검출되면, 이는 피험체에서 골 전이가 발생할 수 있는 경향이 더 크다는 사실을 나타낸다.
- [0255] MAF 유전자의 증폭의 결정은 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플, 또는 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 생검 샘플 중 종양 조직 집단에서 측정된 MAF 유전자 증폭의 중간값에 상응하는 대조군 샘플 또는 참조 샘플의 값과 상관관계를 가져야 한다. 상기 참조 샘플은 전형적으로 피험체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 취득된다. 일반적으로, 전형적인 참조 샘플은 임상적으로 잘 문서화되어 있고, 전이의 부재의 특징이 잘 규명되어 있는 피험체로부터 취득될 것이다. 참조 수준의 유래 기점이 된 샘플 집단은 바람직하게는 연구의 객체인 환자와 동일한 유형의 암을 앓고 있는 피험체들로 구성될 것이다. 일단 이 중간값이 확립되면, 환자의 종양 조직에서의 c-MAF의 증폭 수준이 이 중간값과 비교될 수 있으며, 따라서, 증폭되어 있다면, 피험체에서 전이가 발생할 수 있는 경향은 더 크다.
- [0256] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 골 전이이다. 본원에서 사용되는 바, "골용해성 골 전이"라는 표현은 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파괴세포 활성의 자극으로부터 비롯된 전이의 근위부에서 발생되고, 중증 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박, 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이 유형을 의미한다.
- [0257] MAF 유전자의 전위 검출에 기초한 HER2+ 유방암에서의 전이 예후 방법
- [0258] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 전위되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, MAF 유전자가 전위되어 있다면, 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0259] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 전위되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, MAF 유전자가 전위되어 있다면, 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0260] 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 16q23 유전자좌의 영역으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 대략 Chr. 16-대략 79,392,959 bp 내지 79,663,806 bp(센트로미어부터 텔로미어까지) 사이의 염색체 영역 중 임의의 부분으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 전위된 유전자는 대략 Chr. 16 - 약 79,392,959 bp 내지 79,663,806 bp 사이의 계놈 영역으로, 단, DNA 반복 요소가 배제된 것으로부터의 것이다. 일부 실시양태에서, 전위는 상기 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용하여 측정된다.
- [0261] 특정 실시양태에서, MAF 유전자의 전위는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 전위를 결정함으로써 결정될 수 있다. 한 실시양태에서, 전위는 t(14,16) 전위이다. 또 다른 실시양태에서, 전위되는 염색체 영역은 유전자좌 16q22-q24로부터의 것이다. 유전자좌 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, MAF 유전자는 14번 염색체의 유전자좌 14q32로 전위되어, 전위 t(14,16)(q32,q23)를 일으킨다. 이 전위는 MAF 유전자를 IgH 유전자좌 내의 강력한 인핸서 옆에 위치시킴으로써, 일부 경우에서, MAF의 과다발현을 유도한다 (문헌 [Eychene, A., Rocques, N., and Puopponnot, C., A new *MAF*ia in cancer. 2008. *Nature Reviews: Cancer*. 8: 683-693]).
- [0262] 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 전위는 상기 전위에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 결정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 색상 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중

융합 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 색상, 이중 융합 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 별개의 두 프로브를 사용함으로써 측정된다.

[0263] 또 다른 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 전위는 14q32 및 16q23에 대한 프로브를 포함하는 바이시스 LSI IGH/MAF 이중 색상 이중 융합 프로브(<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>; 최종 접속일 2012년 11월 5일)를 사용함으로써 결정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 전위는 크레아테크(Kreatech) 진단 MAF/IGH gt(14;16) 퓨전(Fusion) 프로브(<http://www.kreatech.com/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>; 최종 접속일 2012년 11월 5일), 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); 최종 접속일 2012년 11월 5일), 캔서 제네틱스 이탈리아 IGH/MAF 투 칼라, 투 퓨전(Cancer Genetics Italia IGH/MAF Two Color, Two Fusion) 전위 프로브 (<http://www.cancergeneticsitalia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>; 최종 접속일 2012년 11월 5일), 크레아티브 바이오어레이(Creative Bioarray) IGH/MAF-t(14;16)(q32;q23) FISH 프로브 (<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=35&page=10>; 최종 접속일 2012년 11월 5일), 아룹 라보라토리즈(Arup Laboratories)의 FISH에 의한 다발성 골수종 패널 (<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; 최종 접속일 2012년 11월 5일), 16q23 또는 14q32에 특이적인 애질런트(Agilent) 프로브 (<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; 최종 접속일 2012년 11월 5일; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; 최종 접속일 2012년 11월 5일), 16q23 또는 14q32에 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); 최종 접속일 2012년 11월 5일), 사이토셀 IGH/MAF 트랜스로케이션, 듀얼 퓨전 프로브(Cytocell IGH/MAF Translocation, Dual Fusion Probe)([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); 최종 접속일 2012년 11월 5일), 메타시스템즈 XL IGH/MAF 트랜스로케이션 - 듀얼 퓨전 프로브(Metasystems XL IGH / MAF Translocation - Dual Fusion Probe)([http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com\\_joobd&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272](http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joobd&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272); 최종 접속일 2012년 11월 5일), 자이스 FISH 프로브스 XL(Zeiss FISH Probes 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>; 최종 접속일 2012년 11월 5일) 또는 제니셀 바이오테크 IGH/MAF 듀얼 퓨전 프로브(Genycell Biotech IGH/MAF Dual Fusion Probe)([http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie\\_\\_86.ppt&ei=MhGYUOi3GKWHQGl4DoDw&usg=AFQjCNEqQMbt8vQGjJbi9riEf3lVgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx\\_Ww](http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie__86.ppt&ei=MhGYUOi3GKWHQGl4DoDw&usg=AFQjCNEqQMbt8vQGjJbi9riEf3lVgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww); 최종 접속일 2012년 11월 5일)를 사용함으로써 결정된다.

[0264] 일부 실시양태에서, 프로브 상의 표지는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 오렌지색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 녹색 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브 상의 형광단은 적색 형광단이다. 일부 경우에, 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 오렌지색 형광단으로 표지된다. 일부 경우에, 프로브 상의 형광단은 황색 형광단이다. 예를 들어, MAF 특이적 프로브가 적색 형광단으로 표지되고, IGH 특이적 프로브가 녹색 형광단으로 표지된 경우, 백색이 관찰되었다면, 이는 신호가 중첩되고 전위가 발생하였다는 것을 나타내는 것이다.

[0265] 일부 실시양태에서, 형광단은 스펙트럼오렌지(SpectrumOrange)이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 스펙트럼그린(SpectrumGreen)이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 DAPI이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트(PlatinumBright)405이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트415이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트495이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트505이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트550이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트547이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트570이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트590이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트647이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트495/550이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 플래티넘브라이트415/495/550이다. 일부 실시양태에서, 형광단은 DAPI/플래티넘브라이트495/550이다. 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 대조 염색제를 이용하여 전위, 증폭 또는 카피수 변경을 시각화한다.

[0266] 본 발명의 한 실시양태는 제1 단계에서, 피험체의 샘플에서 MAF 유전자가 전위되어 있는지 여부를 결정하는 것인 방법을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.

[0267] 특정 실시양태에서, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이가 발생할 수 있는 경향을 예측하는 본 발명의 방법은 MAF 유전자가 전위되어 있는 상기 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 카피수를 결정하고, 상기 카피수를 대조군 또는 참조 샘플의 카피수와 비교하고, 여기서, MAF 카피수가 대조군 샘플의 MAF 카피수에 비해 더 크다면, 이때 피험체에서 골 전이가 발생할 수 있는 경향이 더 크다는 것인 단계를 포함한다.

[0268] MAF 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 전위되어 있는지 여부를 결정하는 방법은 최신기술 수준에서 널리 공지되어 있고, 앞서 MAF의 증폭에 대해 기술되어 있는 방법들을 포함한다. 상기 방법으로는 제한 없이 인시츄 하이브리드화(ISH)(예컨대, 형광 인시츄 하이브리드화(FISH), 발색성 인시츄 하이브리드화(CISH) 또는 은 인시츄 하이브리드화(SISH)), 계능 비교 하이브리드화 또는 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량 PCR)을 포함한다. 임의의 ISH 방법의 경우, 염색체 또는 핵에서 형광점, 발색점 또는 은이 있는 점의 개수를 계수하여 증폭, 카피수 또는 전위를 결정할 수 있다. 다른 실시양태에서, 카피수의 변경 및 전위의 검출은 전체 계능 서열분석, 엑솜 서열분석, 또는 임의의 PCR 유래의 기술의 이용을 이용함으로써 검출될 수 있다. 예를 들어, 계능 DNA의 샘플에 대해 PCR을 수행함으로써 전위를 검출할 수 있다. 한 실시양태에서, 정량 PCR이 이용된다. 한 실시양태에서, MAF 유전자에 대해 특이적인 프라이머 및 IGH 프로모터 영역에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하고, 생성물이 생성되었다면, 전위가 일어난 것이다.

[0269] 일부 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭 및 카피수는 MAF 유전자의 전위가 결정된 후 결정된다. 일부 실시양태에서, 프로브를 사용하여 세포가 MAF 유전자에 대한 배수체인지 여부를 결정한다. 일부 실시양태에서, 관심 유전자로부터 2개 초과 신호가 존재하는지 여부를 결정함으로써 배수성을 결정한다. 일부 실시양태에서, 관심 유전자에 대해 특이적인 프로브로부터의 신호를 측정하고, 이 신호를 센트로미어 프로브 또는 다른 프로브와 비교함으로써 배수성을 결정한다.

[0270] MAF 유전자의 증폭 검출에 기초한 HER2+ 유방암에서의 임상 결과 예측 방법

[0271] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 참조 유전자 카피수와 비교하여 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 참조 유전자 카피수와 비교하여 MAF 유전자가 증폭되어 있다면, 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제7 방법)에 관한 것이다.

[0272] 본 발명의 제7 방법은 제1 단계에서, 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자가 증폭되어 있는지 여부를 결정하는 것을 포함한다. MAF 증폭 결정은 본질적으로 본 발명의 제5 방법에 기술된 바와 같이 수행된다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다. 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭은 유전자와 16q23 또는 16q22-q24의 증폭을 결정함으로써 결정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭은 MAF 유전자 특이적 프로브를 사용함으로써 결정된다.

[0273] 제2 단계에서, 본 발명의 제7 방법은 상기 카피수를 대조군 또는 참조 샘플의 카피수와 비교하고, 여기서, MAF 카피수가 대조군 샘플의 MAF 카피수에 비해 더 크다면, 이때 이는 임상 결과가 좋지 않다는 것을 나타내는 것인 단계를 포함한다.

[0274] 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자 카피수가, 참조 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피수보다 높을 때, MAF 유전자는 참조 유전자 카피수와 비교하여 증폭되어 있는 것이다. 한 예에서, MAF 유전자의 계능 카피수가 대조군 샘플과 비교하여 테스트 샘플 중에서 약 2배(즉, 카피수 약 6), 약 3배(즉, 카피수 약 8), 약 4배, 약 5배, 약 6배, 약 7배, 약 8배, 약 9배, 약 10배, 약 15배, 약 20배, 약 25배, 약 30배, 약 35배, 약 40배, 약 45배, 또는 약 50배 이상만큼 증가되어 있다면, MAF 유전자는 "증폭되어 있다"고 말할 수 있다. 또 다른 예에서, 세포 1개당 MAF 유전자의 계능 카피수가 적어도 약 3, 약 4, 약 5, 약 6, 약 7, 약 8, 약 9, 약 10, 약 11, 약 12, 약 13, 약 14, 약 15, 약 16, 약 17, 약 18, 약 19, 약 20, 약 21, 약 22, 약 23, 약 24, 약 25, 약 26, 약 27, 약 28, 약 29, 약 30 등인 경우, MAF 유전자는 "증폭되어 있다"고 말할 수 있다.

[0275] 또 다른 실시양태에서, 참조 유전자 카피수는 골 전이를 앓고 있지 않은 피험체로부터의 HER2+ 유방암 샘플에서



의 유전자 카피수이다.

[0276] 또 다른 실시양태에서, 증폭은 인시츄 하이브리드화 또는 PCR에 의해 결정된다.

[0277] HER2+ 유방 종양을 앓고 있는 환자에서의 맞춤형 요법을 디자인하는 방법

[0278] 최신기술 수준에서 공지되어 있는 바와 같이, 암을 앓고 있는 피험체에게 투여되는 치료는 상기 암이 악성 종양 인지, 즉, 전이될 확률이 높은지, 또는 상기 암이 양성 종양인지에 의존한다. 제1 가정에서, 선택되는 치료는 전신 치료, 예컨대, 화학요법이고, 제2 가정에서, 선택되는 치료는 국부 치료, 예컨대, 방사선요법이다.

[0279] 그러므로, 본 출원에 기술되어 있는 바와 같이, HER2+ 유방암 세포에서의 MAF 유전자 증폭 또는 전위가 골 전이의 존재와 관련되어 있다고 가정할 때, MAF 유전자 증폭 또는 전위는 상기 암을 앓고 있는 피험체를 위해 가장 적합한 요법의 관점에서 결정하는 데 유용하다. 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭은 유전자좌 16q23 또는 16q22-q24의 증폭을 결정함으로써 결정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭은 MAF 유전자 특이적 프로브를 사용함으로써 결정된다.

[0280] 따라서, 또 다른 측면에서, 본 발명은

[0281] iii) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF 유전자 증폭 또는 전위를 정량하는 단계, 및

[0282] iv) i)에서 획득된 유전자 증폭 또는 전위를 참조 값과 비교하는 단계

[0283] 를 포함하고, 여기서, 상기 참조 값과 비교하여 MAF 유전자 증폭 또는 전위가 증가되어 있다면, 상기 피험체는 골 전이를 예방 및/또는 치료하는 것을 목적으로 하는 요법 또는 그렇지 않은 요법을 받는 것에 적절한, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제3 방법)에 관한 것이다. 상기 참조 값과 비교하여 MAF 유전자 증폭 또는 전위가 증가되어 있지 않다면, 이때 상기 피험체는 골 전이를 예방 및/또는 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 적격이지 않다.

[0284] 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭은 유전자좌 16q23 또는 16q22-q24의 증폭을 결정함으로써 결정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, MAF 유전자의 증폭은 MAF 유전자 특이적 프로브를 결정함으로써 결정된다.

[0285] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0286] 본 발명의 또 다른 방법은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 샘플 중 MAF 유전자 증폭 또는 전위를 정량하는 단계를 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.

[0287] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 방법은 단일 마커로서 단지 MAF 유전자 증폭 또는 전위만을 정량하는 단계를 포함하고, 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 결정하는 단계는 포함하지 않는다.

[0288] 본 발명의 상기 특정 방법의 경우, 샘플은 피험체의 원발성 종양 조직 샘플일 수 있다.

[0289] 제2 단계에서, 피험체의 종양 샘플에서 획득된 MAF 유전자 증폭 또는 전위는 참조 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 참조 값은 대조군 샘플에서 상기 유전자의 MAF 유전자 증폭 또는 전위이다. MAF 유전자 증폭 또는 전위의 결정은 대조군 샘플 또는 참조 샘플의 값과 관련되어야 한다. 분석되는 종양의 유형에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 참조 샘플은 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플, 또는 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 생검 샘플 중 종양 조직 집단에서 측정된 MAF 유전자 증폭 또는 전위에 상응하는 샘플이다.

[0290] 일단 샘플에서 MAF 유전자 증폭 또는 전위를 측정하고, 참조 값과 비교하고 나면, 상기 유전자의 유전자 증폭 또는 전위가 참조 값에 비해 증가되어 있다면, 상기 피험체가 전이를 예방(피험체에서 아직 전이가 일어나지 않은 경우)하고/거나 치료하거나 전이를 예방하지 않고/거나 치료하는(피험체에서 이미 전이가 일어난 경우) 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것 또는 받지 않는 것에 적격이라는 결론을 도출할 수 있다.

[0291] 암이 전이된 경우, 화학요법, 호르몬 치료, 면역요법 또는 그의 조합을 포함하나, 이에 한정되지 않는 전신 치료가 이용될 수 있다. 추가로, 방사선요법 및/또는 수술이 이용될 수 있다. 치료의 선택은 일반적으로 원발성 암의 유형, 크기, 전이의 위치, 환자의 연령 및 일반적인 건강 상태, 및 이전에 사용된 치료의 유형에 의존한다.

[0292] 전신 치료는 전신에 도달하는 것이며, 이는 전이를 예방 또는 억제(피험체에서 아직 전이가 일어나지 않은 경우), 및/또는 치료(피험체에서 이미 전이가 일어난 경우)하는 것을 목적으로 하는 요법을 나타낼 수 있고, 그

예는 하기와 같다:

- [0293] - 화학요법은 암 세포를 파괴하는 의약의 사용이다. 의약은 일반적으로 경구 또는 정맥내 경로를 통해 투여된다. 종종, 화학요법은 방사선 치료와 함께 사용된다. 유방암에 적합한 화학요법 치료제로는 제한 없이, 안트라사이클린 (독소루비신, 에피루비신, 폐길화된 리포솜 독소루비신), 탁산(파클리탁셀, 독세탁셀, 파클리탁셀에 결합된 알부민 나노입자), 5-플루오로우라실(연속 주입 5-FU, 카페시타빈), 빈카 알칼로이드(비노렐빈, 빈블라스틴), 겐시타빈, 백금 염(시스플라틴, 카보플라틴), 사이클로포스파미드, 에토포시드 및 상기 치료제들 중 하나 이상의 것의 조합, 예컨대, 사이클로포스파미드/안트라사이클린 +/- 5-플루오로우라실 요법(예컨대, 독소루비신/사이클로포스파미드(AC), 에피루비신/사이클로포스파미드, (EC) 사이클로포스파미드/에피루비신/5-플루오로우라실(CEF), 사이클로포스파미드/독소루비신/5-플루오로우라실(CAF), 5-플루오로우라실/에피루비신/사이클로포스파미드(FEC)), 사이클로포스파미드/메토트렉세이트/5-플루오로우라실(CMF), 안트라사이클린/탁산(예컨대, 독소루비신/파클리탁셀 또는 독소루비신/독세탁셀), 독세탁셀/카페시타빈, 겐시타빈/파클리탁셀, 탁산/백금 요법(예컨대, 파클리탁셀/카보플라틴 또는 독세탁셀/카보플라틴)을 포함한다.
- [0294] - 면역요법은 환자의 면역계 그 자체가 암을 퇴치할 수 있도록 돕는 치료이다. 환자에서 전이를 치료하는 데 사용되는 면역요법에는 여러 유형이 있다. 이들은 사이토카인, 단일클론 항체 및 항종양 백신을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0295] 또 다른 측면에서, 치료제는 알파라딘(라툼-223 디클로라이드)이다. 알파라딘은 라툼-223 붕괴로부터의 알파 방사선을 이용하여 암 세포를 사멸시킨다. 라툼-223은 천연적으로 칼슘 모방체로서의 그의 성질을 통해 골 전이에 자가 표적화한다. 알파 방사선은 (베타 또는 감마 방사선에 기초한 현재의 방사선요법에 비해) 2-10개 세포의 매우 짧은 범위를 가지며, 따라서, 주변 건강한 조직(특히, 골수)을 더 적게 손상시킨다. 라툼-223은 칼슘과 성질이 유사하기 때문에, 칼슘이 신체의 골을 구축하는 데에 사용되는 부위(더욱 빠른 비정상적인 골 성장의 부위, 예컨대, 진행성 거세 저항성 전립샘암을 앓는 남성의 골격 전이에서 관찰되는 것 포함)로 이동된다. 주입 후 라툼-223은 혈류를 통해 비정상적인 골 성장의 부위로 운반된다. 암이 신체에서 시작되는 부위는 원발성 종양으로서 공지되어 있다. 이들 세포들 중 일부는 이탈되어 혈류를 통해 신체의 또 다른 부분으로 운반될 수 있다. 이어서, 암 세포는 신체의 상기 부분에서 정착하여 새로운 종양을 형성할 수 있다. 이것이 발생하는 경우, 2차 암 또는 전이로 명명된다. 말기 전립샘암을 앓고 있는 환자들 대부분은 그의 골에서 최대의 질환 부담을 겪게 된다. 라툼-223을 사용하는 목적은 이 2차 암을 선택적으로 표적화하는 것이다. 골에서 흡수되지 않은 임의의 라툼-223은 신속히 장으로 이동되어 배출된다.
- [0296] 또 다른 측면에서, 치료제는 mTor 억제제이다. 일부 측면에서, mTor 억제제는 이중 mTor/PI3 키나제 억제제이다. 일부 측면에서, mTor 억제제는 전이를 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, mTor 억제제는 하기의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된다: ABI009(시롤리무스), 라파마이신(시롤리무스), 아브락산(파클리탁셀), 압소브(에버롤리무스), 아피니토르(에버롤리무스), 글리벡과 함께 아피니토르, AS703026(피마서틴), 악세스(우미롤리무스), AZD2014, BEZ235, 바이오프리덤(우미롤리무스), 바이오매트릭스(우미롤리무스), 바이오매트릭스 플렉스(우미롤리무스), CC115, CC223, 콤보 생물 조각된 시롤리무스 용출 스텐트 오르부스니치(시롤리무스), 쿠락신 CBLC102(메파크린), DE109(시롤리무스), DS3078, 엔데버 DES(조타롤리무스), 엔데버 레졸루트(조타롤리무스), 페마라(레트로졸), 호세나 (안트로퀴노놀), INK128, 인스피론(시롤리무스), IPI504(레타스피마이신 하이드로클로라이드), KRN951(티보자닙), ME344, MGA031(테플리주맵), 미스텐트 SES(시롤리무스), MKC1, 노보리 (우미롤리무스), OSI027, OVI123(코다이세핀), 팔로미드 529, PF04691502, 프로무스 엘리멘트(에버롤리무스), PWT33597, 라파문(시롤리무스), 레졸루트 DES(조타롤리무스), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75(보세투주맵 마포도틴), 시너지(에버롤리무스), 탈토르빅(리다포롤리무스), 타세마(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 겐자임(캔스타틴), CU906, EC0371, EC0565, KI1004, LOR220, NV128, 라파마이신 온코이퀀(시롤리무스), SB2602, 시롤리무스 PNP 삼양 바이오파마슈티칼즈(시롤리무스), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, 애드바칸(에버롤리무스), AZD8055, 사이퍼 셀렉트 플러스 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 사이퍼 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 드러그 코티드 벌룬(시롤리무스), E-매직 플러스(시롤리무스), 엠토르(시롤리무스), 에스프릿(에버롤리무스), 에버토르(에버롤리무스), HBF0079, LCP-시로(시롤리무스), 리무스 클라리스(시롤리무스), mTOR 억제제 셀줌, 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(시롤

리무스) 시로판(시롤리무스), 시로바(시롤리무스), 수프랄리무스(시롤리무스), 수프랄리무스-코어(시롤리무스), 타크롤리무스 와슨 (타크롤리무스), TAF93, 템시롤리무스 아코드(템시롤리무스), 템시롤리무스 산도즈(템시롤리무스), TOP216, 자이언스 프라임(에버롤리무스), 자이언스 V(에버롤리무스). 구체적인 측면에서, mTor 억제제 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); 최종 접속 일 2012년 11월 28일). 또 다른 측면에서, 에버롤리무스는 아로마타제 억제제와 조합된다(예컨대, 문헌 [Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. *N. Engl. J. Med.* 366(6): 520-529](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 또 다른 측면에서, mTor 억제제는 당업계에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예컨대, 문헌 [Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. *Anticancer Agents Med. Chem.* 10(7): 571-81](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 일부 측면에서, mTor 억제제는 호르몬 수용체에 대해 양성인 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다(예컨대, 문헌 [Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. *N. Engl. J. Med.* 366(6): 520-529] 참조). 일부 실시양태에서, 환자는 ER+이다. 일부 측면에서, mTor 억제제는 진행성 유방암을 앓고 있는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, mTor 억제제는 제2 치료와 함께 사용된다. 일부 측면에서, 제2 치료는 본원에 기술된 임의의 치료이다.

[0297] 또 다른 측면에서, 치료제는 Src 키나제 억제제이다. 일부 측면에서, Src 억제제는 전이를 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, Src 키나제 억제제는 하기 군으로부터 선택된다: AZD0530(사라카티닙), 보솔리프(보수티닙), ENMD981693, KD020, KX01, 스프리셀(다사티닙), 예르보이(이필리무맵), AP23464, AP23485, AP23588, AZD0424, c-Src 키나제 억제제 KISSEI, CU201, KX2361, SKS927, SRN004, SUNK706, TG100435, TG100948, AP23451, 다사티닙 헥테로(다사티닙), 다사티닙 벨리언트(다사티닙), 폰트렉스(다사티닙), Src 키나제 억제제 키넥스, VX680,(토자서티닙 락테이트), XL228, 및 SUNK706. 일부 실시양태에서, Src 키나제 억제제는 다사티닙이다. 또 다른 측면에서, Src 키나제 억제제는 당업계에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예컨대, 문헌 [Sen, B. and Johnson, F.M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. *J. Signal Transduction.* 2011: 14 pages](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 일부 측면에서, Src 키나제 억제제는 SRC 반응 시그너처(SRS)에 대해 양성인 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, 환자는 SRS+ 및 ER-이다(예컨대, 문헌 [Zhang, CH.-F, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. *Cancer Cell.* 16: 67-78](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 일부 측면에서, Src 키나제 억제제는 진행성 유방암을 앓고 있는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, Src 키나제 억제제는 제2 치료와 함께 사용된다. 일부 측면에서, 제2 치료는 본원에 기술된 임의의 치료이다.

[0298] 또 다른 측면에서, 치료제는 COX-2 억제제이다. 일부 측면에서, COX-2 억제제는 전이를 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, COX-2 억제제는 하기 군으로부터 선택된다: ABT963, 아세트아미노펜 ER 존슨(아세트아미노펜), 아쿨라 X(케톨락 트로메타민), BAY1019036(아스피린), BAY987111(디펜하이드라민, 나프록센 소듐), BAY11902(피록시카), BCIBUCH001(이부프로펜), 카폭시겐(아프리카콕시), CS502, CS670(펠루비프로펜), 디클로페낙 HPBCD(디클로페낙), 디락틴(케토프로펜), GW406381, HCT1026(니트로플루르비프로펜), 하이아날게스-D(디클로페낙), 하이드로코텍스(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 하이드로코돈), 이부프로펜 소듐 화이자(이부프로펜 소듐), 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자(아세트아미노펜, 이부프로펜), 임프라코르(케토프로펜), IP880(디클로페낙), IP940(인도메타신), ISV205(디클로페낙 소듐), 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), 누프린 스콜르(이부프로펜), OMS103HP(아미트립틸린 하이드로클로라이드, 케토프로펜, 옥시메타졸린 하이드로클로라이드), 오랄리스(디클로페낙), 옥시코텍스(텍스트로메토르판, 옥시코돈), P54, 피코텍스(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 옥시코돈), PL3100(나프록센, 포스파티딜 콜린), PSD508, R-케토프로펜(케토프로펜), 레무라(브롬페낙 소듐), ROX828(케톨락 트로메타민), RP19583(케토프로펜 리신), RQ00317076, SDX101(R-에토돌락), TDS943(디클로페낙 소듐), TDT070(케토프로펜), TPR100, TQ1011(케토프로펜), TT063(S-플루르비프로펜), UR8880(시미콕시), V0498TA01A(이부프로펜), VT122(에토돌락, 프로프라놀롤), XP20B(아세트아미노펜, 텍스트로프로콕시), XP21B(디클로페낙 포타슘), XP21L(디클로페낙 포타슘), 조에나사(아세틸시스테인, 메살라민), 아세펜, 악티페드 플러스, 악티페드-P, 아쿨라, 아쿨라 LS, 아쿨라 PF, 아쿨라 X, 아쿠베일, 애드빌, 애드빌 알러지 시누스, 애드빌 콜드 앤드 시누스, 애드빌 콘제스

천 릴리프, 애드빌 PM, 애드빌 PM 캡슐, 에어 살론파스, 에어탈, 알콜-프리 나이켈 콜드 & 플루 릴리프, 알레브, 알레브 아브리 이브라힘, 알레브-D, 알카-셀트저, 알카-셀트저 바이엘, 알카-셀트저 엑스트라 스트렝쓰, 알카-셀트저 레몬-라임, 알카-셀트저 오리지널, 알카-셀트저 플러스, 알카-셀트저 플러스 콜드 앤드 코프, 알카-셀트저 플러스 콜드 앤드 코프 포물러, 알카-셀트저 플러스 데이 앤드 나이트 콜드 포물러, 알카-셀트저 플러스 데이논-드라우지 콜드 포물러, 알카-셀트저 플러스 플루 포물러, 알카-셀트저 플러스 나이트 콜드 포물러, 알카-셀트저 플러스 시누스 포물러, 알카-셀트저 플러스 스파클링 오리지널 콜드 포물러, 알카-셀트저 PM, 알카-셀트저 웨이크-업 콜, 아나신, 아나프록스, 아나프록스 미네르바, 안사이드, 아피톡신, 아프라낙스, 아프라낙스 애브리, 아콕시아, 아트리티스 포물러 벤가이, 아트록, 아사콜, 아사콜 HD, 아사콜 메두나 아즈네이미텔, 아사콜 오리팜, 아스피린 바이엘, 아스피린 콤플렉스, 아스피린 미그란, AZD3582, 아줄피딘, 바탈간 M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, 베나드틸 알러지, 베나드틸 데이 앤드 나이트, 베닐린 4 플루, 베닐린 콜드 앤드 플루, 베닐린 콜드 앤드 플루 데이 앤드 나이트, 베닐린 콜드 앤드 시누스 데이 앤드 나이트, 베닐린 콜드 앤드 시누스 플러스, 베닐린 데이 앤드 나이트 콜드 앤드 플루 릴리프, 베닐린1 올-인-원, 블랙신, 블랙신 안젤리니, 브롬데이, 부페린, 버스코판 플러스, 칼돌로르, 칼마텔, 캄비아, 카나사, 카폭시겔, 카타플람, 셀레브렉스, 셀레브렉스 오리팜, 칠드런즈 애드빌 알러지 시누스, 칠드런즈 타이레놀, 칠드런즈 타이레놀 코프 앤드 러니 노즈, 칠드런즈 타이레놀 플러스 감기, 칠드런즈 타이레놀 플러스 콜드 앤드 코프, 칠드런즈 타이레놀 플러스 감기 및 코 막힘, 칠드런즈 타이레놀 플러스 플루, 칠드런즈 타이레놀 플러스 감기 & 알레르기, 칠드런즈 타이레놀 플러스 코프 & 러니 노즈, 칠드런즈 타이레놀 플러스 코프 & 소어 쓰로트, 칠드런즈 타이레놀 플러스 복합 증상 감기, 클리노틸, 코드랄 콜드 앤드 플루, 코드랄 데이 앤드 나이트 데이 타블렛츠, 코드랄 데이 앤드 나이트 나이트 타블렛츠, 코드랄 나이트타임, 콜라잘, 콤부녹스, 콘택 콜드 앤드 플루, 콘택 콜드 앤드 플루 논-드라우지, 코리시딘 D, 코리시딘 HBP 콜드 앤드 플루, 코리시딘 HBP 데이 앤드 나이트 멀티-심탐 콜드, 코리시딘 HBP 맥심 스트렝쓰 플루, 코리시딘 HBP 나이트타임 멀티-심탐 콜드, 코리시딘 II 엑스트라 스트렝쓰 콜드 앤드 플루, CS502, CS670, 데이프로, 데이프로 알타, DDS06C, 데마진 콜드 앤드 플루, 데마진 코프, 콜드 앤드 플루, 데마진 낮/밤 콜드 앤드 플루, 데마진 PE 콜드 앤드 플루, 데마진 PE 낮/밤 콜드 앤드 플루, 디클로페낙 HPBCD, 디메탐 데이 릴리프, 디메탐 멀티-심탐 콜드 앤드 플루, 디메탐 나이트 릴리프, 디메탐 페인 앤드 피버 릴리프, 디메탐 PE 시누스 페인, 디메탐 PE 시누스 페인 플러스 알러지, 디펜탐, 디락틴, 디스프린 콜드 '앤' 피버, 디스프린 엑스타, 디스프린 프르테, 디스프린 플러스, 드리스탄 콜드, 드리스탄 주니어, 트릭소탈 플러스, 두엑시스, 다이나스타트, 에페탈간, 에페탈간 플러스 비타민 C, 에페탈간 비타민 C, 엘릭스슈어 IB, 엑세드린 백 앤드 바디, 엑세드린 마이그레인, 엑세드린 PM, 엑세드린 시누스 헤드에이크, 엑세드린 텐션 헤드에이크, 팔콜, 판사막, 펠덴, 피버올, 피오리날, 코데인과 함께 피오리날, 플라낙스, 플렉토르 패치, 플루감, 포르타게식, 게르빈, 지아조, 글라디오, 구디스 백 앤드 바디 페인, 구디스 쿨 오렌지, 구디스 엑스트라 스트렝쓰, 구디스 PM, 그리스리스 벤가이, GW406381, HCT1026, 허 싱 이, 하리아날게스-D, 하이드로코텍스, 이부프로펜 소름 화이자, 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자, 아이시 핫 사노피 아벤티스, 임프라코르, 인도신, 인도메타신 APP 파마, 인도메타신 마일란, 인펜즈 타이레놀, IP880, IP940, 이레모드, ISV205, JNS013, Jr. 타이레놀, 주니펜, 주니어 스트렝쓰 애드빌, 주니어 스트렝쓰 모트린, 케토프로펜 TDS, 램십 맥스, 램십 맥스 올 인 원, 램십 맥스 올 나이트, 램십 맥스 콜드 앤드 플루, 리알다, 리스테린 마우스 워시, 로이즈 크림, 로딘, 로르팻 P, 록소닌, LTNS001, 머신돌, 메살라민 살릭스, 메살라민 소파, 메살라진, 메사살 글락소, 메사살 사노피, 메슬리드, 메트살 히트 립, 미돌 컴플리트, 미돌 익스텐디드 릴리프, 미돌 리퀴드 겔즈, 미돌 PM, 미돌 Teen 포물러, 미그란 코티드 타블렛츠, ML3000, 모빅, 모루스, 모트린, 모트린 콜드 앤드 시누스 페인, 모트린 PM, 모발리스 아스펜, MRX7EAT, 날폰, 날폰 페디놀, 나프렐란, 나프로신, 나프로신 RPG 라이프 사이언스, 나프록센 이로코, NCX4016, NCX701, 네오프로펜 런드백, 네바낙, 넥세드, 니플란, 노르게식 메디시스, 노발진, 누프린 스콜르, 누로펜, 누로펜 콜드 앤드 플루, 누로펜 맥스 스트렝쓰 마이그레인, 누로펜 플러스, 누로물, 비타민 C와 함께 나이켈, 오큐펜, OMS103HP, 오탈리스, 오루디스 애보트 재팬, 오루베일, 오스텔록, 옥시코텍스, P54, 파나돌, 파나돌 악티팩스트, 파라딘, 파라맥스, 파페낙, 페데아, 펜사이드, 펜타사, 펜타사 오리팜, 페온, 피코단, 피코단-데미, 피코텍스, 피코게식, 피칼간, PL2200, PL3100, 폰스텔, 프렉시제, 프롤렌사, PSD508, R-케토프로펜, 란투딜, 렐라펜, 레무라, 로박시살, 로텍, 로와사, ROX828, RP19583, RQ00317076, 루보르, 살로팔크, 살론파스, 사리돈, SDX101, 셀터치, sf로와사, 신바로, 시누맥스, 시누탑, 시누탑, 시누스, 스파트, 스프릭스, 스트레펜, 수다페드 콜드 앤드 코프, 수다페드 헤드 콜드 앤드 시누스, 수다페드 PE 콜드 플러스 코프, 수다페드 PE 프레셔 플러스 페인, 수다페드 PE, 시비어 콜드, 수다페드 PE 시누스 데이 플러스 나이트 릴리프 데이 타블렛츠, 수다페드 PE 시누스 데이 플러스 나이트 릴리프 나이트 타블렛츠, 수다페드 PE 시누스 플러스 안티-인플라마토리 페인 릴리프, 수다페드 시누스 어드밴스, 서감, 시날고스-DC, 신플렉스, 타비스트 알레르기/시누스/두통, TDS943, TDT070, 테라플루 콜드 앤드 소어 쓰로트, 테라플루 데이터타임 시비어 콜드 앤드 코프, 테라



플루 데이타임 위밍 릴리프, 테라플루 위밍 릴리프 캐플릿츠 데이타임 멀티-심텀 콜드, 테라플루 위밍 릴리프 콜드 앤드 체스트 컨제스천, 토마피린, 토마피린 C, 토마피린 에페센트, 토마피린 미디움, 킬코틸, 티스폴, 톨렉틴, 토라돌, TPR100, TQ1011, 트라우마-살베, 트라우마-살베 퀴즈다, 트레오, 트렉시메트, 트로백스, TT063, 타이레놀, 타이레놀 알러지 멀티-심텀, 타이레놀 백 페인, 타이레놀 콜드 & 코프 데이타임, 타이레놀 콜드 & 코프 나이트타임, 타이레놀 콜드 앤드 시누스 데이타임, 타이레놀 콜드 앤드 시누스 나이트타임, 타이레놀 콜드 헤드 컨제스천 시비어, 타이레놀 콜드 멀티 심텀 데이타임, 타이레놀 콜드 멀티 심텀 나이트타임 리퀴드, 타이레놀 콜드 멀티 심텀 시비어, 타이레놀 콜드 논-드라우지니스 포물러, 타이레놀 콜드 시비어 컨제스천 데이타임, 타이레놀 컴플리트 콜드, 코프 앤드 플루 나이트 타임, 타이레놀 플루 나이트타임, 타이레놀 벤스트릴, 타이레놀 PM, 타이레놀 시누스 컨제스천 & 페인 데이타임, 타이레놀 시누스 컨제스천 & 페인 나이트타임, 타이레놀 시누스 컨제스천 & 페인 시비어, 타이레놀 시누스 시비어 컨제스천 데이타임, 타이레놀 울트라 릴리프, 카페인 및 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 울트라 스트랭스 벤가이 크림, 울트라셋, UR8880, V0498TA01A, 빅스 나이퀼 콜드 앤드 플루 릴리프, 비코프로펜, 비모보, 볼타렌 에물겔, 볼타렌 GEL, 볼타렌 노파르티스 컨슈머 헬스 게엠베하, 볼타렌 XR, VT122, 제포, 제포 래피드, 제포캠, 지브롬, XL3, 조돌, XP20B, XP21B, XP21L, 짐소르, 및 조에나사. 또 다른 측면에서, 또 다른 측면에서, COX-2 억제제는 당업계에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예컨대, 문헌 [Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors- current status and future prospects. 2001. *Eur. J. Med. Chem.* 36: 109-126](상기 문헌은 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 일부 측면에서, COX-2 억제제는 진행성 유방암을 앓고 있는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방 또는 억제하는 데 사용된다. 일부 측면에서, COX-2 억제제는 제2 치료와 함께 사용된다. 일부 측면에서, 제2 치료는 본원에 기술된 임의의 치료이다. 일부 측면에서, COX-2 억제제는 하기의 것으로 이루어진 군으로부터 선택된 제2 치료와 함께 사용된다: 데노수맙, 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); 최종 접속일 2012년 12월 2일), 카르보잔티닙 또는 카보잔티닙, 항체 또는 펩티드 차단 PTHLH(부갑상선 호르몬 유사 호르몬) 또는 PTHrP(부갑상선 호르몬 관련 단백질) 및 에버롤리무스.

- [0299] 또 다른 측면에서, 골 분해를 회피하거나, 및/또는 예방할 수 있는 치료 작용제로는 하기를 포함하나, 이에 한정되지 않는다:
- [0300] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHrP) 억제제(차단 항체를 포함) 또는 그의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7-34에 상응하는 테리파라티드). 이 호르몬은 파골세포를 자극하고, 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.
- [0301] - 스트론튬 라벨레이드: 이는 대안적인 경구용 치료제이고, 골모세포 증식을 자극하고, 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 작용제"(DABA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0302] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기전과 상관없이, 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로게스타겐, 에스트라디올, 드롤록시펜, 탈록시펜, 라소폭시펜, TSE-424, 타목시펜, 이독시펜, L Y353381, LY117081, 토레피펜, 플루베스트란트, 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리딘일)에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646을 포함한다.
- [0303] - 칼시토닌: 이는 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0304] - 비스포스포네이트: 이는 골 흡수 및 재흡수가 있는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 동반하는 암(여기서, 후자는 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 동반하거나, 동반하지 않는다)의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 요법에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트의 예로는 비록 제한하는 것은 아니지만, 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트, 네리드로네이트, 올파드로네이트, 알렌드로네이트, 이반드로네이트, 리세드로네이트, 인카드로네이트, 졸레드로네이트 또는 졸레드론산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트(예컨대, 에티드로네이트, 클로드로네이트, 티루드로네이트 등)를 포함한다.
- [0305] - "카텝신 K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 의미한다. 카텝신 K 억제제의 비제한적인 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(노파르티스 파마 게엠베하 명의 하의 국제 특허 출원 WO 03/020278에 기술되어 있음); 공보 WO 03/020721(노파르티스 파마 게엠베하) 및 공보 WO 04/000843(아스트라제네카 아베)에 기술되어 있는 피롤로-피리미딘; 뿐만 아니라, 공보 PCT WO 00/55126(악시스



파마슈티칼즈), WO 01/49288(머크 프로스트 캐나다 & 컴파니 및 악시스 파마슈티칼즈)에 기술된 억제제를 포함한다.

- [0306] - 본원에서 사용되는 바, "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고, 골용해성 병변이 있는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 작용제는 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데 있어서 중요한 역할을 할 수 있다. 노파르티스의 BHQ880은 혁신 신약인 완전한 인간 항DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다 (문헌 [Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract]).
- [0307] - 본원에서 사용되는 바, "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유도된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 의미한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서 뿐만 아니라, 골모세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 모든 상기 세포 유형에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 것으로 보인다. 동시에, 골모세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 분아형 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)을 포함하는 골 전이의 병리학 적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데 있어서 실행가능한 전략이 될 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀렉시스 인크)은 MET에 의해 유도된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고, 전이를 감소시키고, 혈관신생(종양 성장을 지지하는 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, XL880, CAS 849217-64-7로도 공지))이다.
- [0308] - 본원에서 사용되는 바, "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 의미한다. RANKL은 간질의 골모세포 막 및 T 림프구 세포의 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 억제제로는 제한없이 하기의 것을 포함한다:
- [0309] o RANKL에 결합할 수 있고, RANK 단백질의 세포외 도메인 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 뮤린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포외 도메인을 포함할 수 있거나, 별법으로, 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다:
- [0310] o 오스테오프로테게린 또는 RANKL 결합 능력이 있는 이의 변이체.
- [0311] o RANKL 특이적 안티센스 분자.
- [0312] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임.
- [0313] o 특이적 항RANKL 항체. "항RANKL 항체 또는 RANKL에 대한 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는, 핵 인자  $\kappa B$ 에 대한 활성화 수용체의 리간드(RANKL)에 특이적으로 결합할 수 있는 모든 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 억제시키고자 하는 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌 [Kohler, Milstein et al. (Nature, 1975, 256: 495)]에 기술된 방법을 사용하여 제조된다. 본 발명과 관련하여 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 무손상 항체, 단편 "Fab," "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이특이적 항체를 포함한다.
- [0314] o 특이적 항RANKL 나노바디. 나노바디는 천연적으로 발생된 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 원래 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄가 결합된 완전한 기능적 항체를 가진다는 발견 이후에 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는
- [0315] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고,

- [0316] 여기서, 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 완전한 항원 결합 능력을 보유하는 완벽하게 안정한 폴리펩티드이다. 그의 독특한 구조적 및 기능적 특성을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애플린스에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.
- [0317] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포로테케린으로 이루어진 군으로부터 선택된다. 구체적인 실시양태에서, 항RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 더욱 구체적인 실시양태에서, 항RANKL 항체는 데노수맙이다(문헌 [Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215], CAS 번호 615258-40-7)(상기 문헌은 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)). 데노수맙은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 완전한 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 데노수맙의 다양한 측면은 미국 특허 번호 제6,740,522호; 제7,411,050호; 제7,097,834호; 제7,364,736호(상기 특허는 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 데노수맙과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구성물이다.
- [0318] 바람직한 실시양태에서, 항RANKL 나노바디는 W02008142164(그의 내용은 본원에 참조로 포함됨)에 기술된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 항RANKL 항체는 ALX0141(애플린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 특정 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고, 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.
- [0319] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 작용제는 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 라툼-223, 칼시토닌, 및 카텡신 K 억제제로 이루어진 군으로부터 선택된다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 작용제는 비스포스포네이트이다. 더욱 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.
- [0320] 한 실시양태에서, 원발성 유방암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대부분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소형 분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록이다(문헌 [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(문헌 [Velasco-Velazquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research*. 72:3839-3850]). 일부 측면에서, CCR5 길항제는 아플라비록이다(문헌 [Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2(Suppl. 1): S13]). 일부 측면에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘 CCR5 길항제이다(문헌 [Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 19 (18): 5401-5406]). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(문헌 [Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS*. 4(2): 82-7]).
- [0321] 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0322] 바람직한 실시양태에서, 라툼 223 요법은 알파라딘이다.
- [0323] 별법으로, 전이를 치료 및/또는 예방하기 위해 상기 언급된 것으로부터의 1개 초과 작용제가 조합되거나, 또는 상기 작용제가 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D와 함께, 또는 호르몬 치료와 함께 조합될 수 있는 조합 치료가 수행될 수 있다.
- [0324] c-Maf 억제제를 사용하여 HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 치료하는 방법
- [0325] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방에 사용하기 위한 c-Maf 억제제(이하, 본 발명의 억제제)에 관한 것이다.
- [0326] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암으로부터의 골 전이의 치료용 또는 예방용 의약의 제조를 위한 c-Maf 억제제의 용도에 관한 것이다.
- [0327] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방을 필요로 하는 피험체에게 c-Maf 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, HER2+ 유방암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방을 필요로 하는 피

협체에서 HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 치료 또는 예방하는 방법에 관한 것이다.

- [0328] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에게 골 전이를 예방 또는 감소시키는 작용제를 투여하는 단계를 포함하고, 여기서, 상기 작용제는 상기 피험체에서의 c-Maf의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 계획에 따라 투여되는 것인, HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골 전이의 위험을 예방 또는 감소시키는 방법에 관한 것이다.
- [0329] 비제한적인 예로서, 본 발명에서 사용되기에 적합한 c-Maf 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 간섭 RNA(siRNA), 촉매 RNA, 특이적 리보자임, 억제성 항체 또는 나노바디, 우성 음성 c-Maf 변이체, 또는 하기 표 1 또는 2의 화합물을 포함한다.
- [0330] 안티센스 올리고뉴클레오타이드
- [0331] 본 발명의 추가 측면은 발현을 억제하기 위한, 예를 들어, 억제시키고자 하는 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 들어, 이중 가닥 DNA에 결합하는 경우 이중 나선의 큰 홈(groove)에서의 특이적 상호작용을 통해 약물의 잠재적 표적에 결합될 수 있다. 일반적으로, 이들 방법들은 당업계에서 일반적으로 이용되는 다양한 기법들을 지칭하고, 올리고뉴클레오타이드 서열과의 특이적 결합에 기초한 임의의 방법을 포함한다.
- [0332] 본 발명의 안티센스 구성물은 예를 들어, 세포에서 전사될 때, c-MAF를 코딩하는 세포 mRNA의 1개 이상의 독특한 부분에 상보적인 RNA를 생성하는 발현 플라스미드로서 분포될 수 있다. 별법으로, 안티센스 구성물은 세포 내로 도입될 때, 표적 핵산의 mRNA 및/또는 유전자 서열과 하이브리드화하여 유전자 발현을 억제하는, 생체외에서 생성된 올리고뉴클레오타이드 프로브이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 프로브는 바람직하게는 내인성 뉴클레아제, 예를 들어, 엑소뉴클레아제 및/또는 엔도뉴클레아제에 대한 내성을 나타내므로 생체내에서 안정한 변경된 올리고뉴클레오타이드이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드로서 사용되는 핵산 분자의 예로는 포스포라미데이트, 포스포티오네이트 및 메틸포스포네이트의 DNA 유사체(또한 미국 특허 번호 제5,176,996호; 제5,264,564호; 및 제5,256,775호(상기 특허는 각각 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다) 참조). 추가로, 안티센스 요법에 유용한 올리고머를 구성하기 위한 일반적인 방법은 예를 들어, 문헌 [Van der Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988]; 및 [Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988]에 리뷰되어 있다.
- [0333] 안티센스 올리고뉴클레오타이드와 관련하여, 번역의 출발 부위, 예를 들어, 표적 유전자의 약 -10 내지 약 +10 사이의 부위로부터 유래된 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 영역이 바람직하다. 안티센스 접근법은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 디자인(DNA 또는 RNA)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전사된 mRNA에 결합될 것이고, 번역은 방지될 것이다.
- [0334] mRNA의 5' 말단, 예를 들어, 출발 코돈 AUG까지 포함하는 비번역 5' 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 번역을 억제하는 데 가장 효율적인 방식으로 작용해야 한다. 그럼에도 불구하고, mRNA의 비번역 3' 서열에 상보적인 서열도 mRNA 번역을 억제하는 데 효율적이라는 것이 최근에 밝혀졌다(문헌 [Wagner, Nature 372: 333, 1994]). 그러므로, 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 상기 mRNA의 번역을 억제하기 위한 안티센스 근사법에서 유전자의 비코딩 영역인 비번역 5' 또는 3' 영역에서 사용될 수 있다. mRNA의 비번역 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 하이브리드화하도록 디자인되는 경우, 안티센스 핵산의 길이는 6개 이상의 뉴클레오타이드 길이를 가져야 하고, 바람직하게는 대략 100개 미만의 뉴클레오타이드 길이, 및 더욱 바람직하게는 대략 50개, 25개, 17개 또는 10개 미만의 뉴클레오타이드 길이를 가져야 한다.
- [0335] 바람직하게, 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 능력을 정량하기 위해 먼저 시험관내 연구를 수행한다. 바람직하게, 이 연구는 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 유전자 억제와 비특이적인 생물학적 효과를 구별하는 대조군을 사용한다. 또한, 바람직하게, 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. 바람직하게, 대조군 올리고뉴클레오타이드는 분석하고자 하는 올리고뉴클레오타이드와 길이가 거의 동일하고, 올리고뉴클레오타이드 서열은 표적 서열과의 특이적 하이브리드화를 방지하는 데 필요하다고 간주되는 것보다 클 정도로 안티센스 서열과 상이하지는 않다.
- [0336] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA, 또는 키메라 혼합물 또는 유도체, 또는 그

의 변형된 버전일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 예를 들어, 분자의 안정성, 그의 하이브리드화 능력 등을 개선하기 위해 염기 기, 당 기 또는 포스페이트 골격에서 변형될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 다른 결합된 기, 예컨대, 세포막(예를 들어, 문헌 [Letsinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86: 6553-6556, 1989]; [Lemaitre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 648-652, 1987]; PCT 공보 번호 WO 88/09810 참조), 또는 혈액-뇌 장벽(예를 들어, PCT 공보 번호 WO 89/10134 참조)을 통한 수송을 용이하게 하기 위한 펩티드(예를 들어, 올리고뉴클레오타이드를 숙주 세포의 수용체로 향하게 지시하는 펩티드) 또는 작용제, 또는 인터칼레이팅제(예를 들어, 문헌 [Zon, *Pharm. Res.* 5: 539-549, 1988] 참조)를 포함할 수 있다. 이러한 목적을 위해, 상기 올리고뉴클레오타이드는 또 다른 분자, 예를 들어, 펩티드, 수송제, 하이브리드화 유발된 절단제 등에 컨쥬게이트될 수 있다.

[0337] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 1개 이상의 변형된 염기 기를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 크실룰로스 및 헥소스를 포함하나, 이에 한정되지 않는 군으로부터 선택되는 1개 이상의 변형된 당 기 또한 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 중성 펩티드와 유사한 골격 또한 함유할 수 있다. 이러한 분자는 펩티드 핵산(PNA: peptide nucleic acid) 올리고머로서 공지되어 있고, 예를 들어, 문헌 [Perry-O'Keefe *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 14670, 1996], 및 [Eglom *et al.*, *Nature* 365: 566, 1993]에 기술되어 있다.

[0338] 추가의 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변형된 포스페이트 골격을 포함한다. 추가의 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 알파-아노머성 올리고뉴클레오타이드이다.

[0339] 표적 mRNA 서열의 코딩 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있지만, 전사된 비번역 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드 또한 사용될 수 있다.

[0340] 일부 경우에서, 내인성 mRNA 번역을 억제하기에 충분한 세포내 안티센스 농도에 도달하는 것이 어려울 수 있다. 따라서, 바람직한 접근법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 강한 pol III 또는 pol II 프로모터의 제어하에 배치되어 있는 재조합 DNA 구성물을 사용한다.

[0341] 별법으로, 유전자 조절 영역(즉, 프로모터 및/또는 인핸서)에 상보적인 테옥시리보뉴클레오타이드 서열이 체내 표적 세포에서 유전자 전사를 방해하는 삼중 나선 구조를 형성하게 함으로써 표적 유전자 발현을 감소시킬 수 있다(일반적으로, 문헌 [Helene, *Anticancer Drug Des.* 6(6): 569-84, 1991] 참조). 특정 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 모르폴린이다.

[0342] siRNA

[0343] 작은 간섭 RNA 또는 siRNA는 RNA 간섭으로 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 작용제이다. siRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나, 시험관내 전사에 의해 수득될 수 있거나, 생체내 표적 세포에서 합성될 수 있다. 전형적으로, siRNA는 길이가 15개 내지 40개 뉴클레오타이드 길이인 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 침묵화시킴으로써 작용한다.

[0344] 본 발명의 siRNA는 MAF 코딩 유전자의 mRNA, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열에 대해 실질적으로 상동성이다. "실질적으로 상동성"이라는 것은 siRNA가 RNA 간섭을 통해 표적 mRNA를 분해할 수 있도록 표적 mRNA에 충분히 상보적이거나, 유사한 서열을 갖는 것으로서 이해된다. 상기 간섭을 야기하기에 적합한 siRNA는 RNA에 의해 형성된 siRNA 뿐만 아니라, 상이한 화학적 변형, 예컨대, 하기 변형을 함유하는 siRNA도 포함한다:

[0345] - 뉴클레오타이드들 사이의 결합이 천연 상태에서 관찰되는 결합, 예컨대, 포스포로티오네이트 결합과 상이한 siRNA.

[0346] - RNA 가닥과 작용 시약, 예컨대, 형광단의 컨쥬게이트.

[0347] - RNA 가닥의 말단, 특히, 2' 위치에서 상이한 하이드록실 작용기를 사용한 변형에 의한 3' 말단의 변형.

[0348] - 변형된 당, 예컨대, 2' 위치의 0-알킬화된 잔기, 예컨대, 2'-0-메틸리보스 또는 2'-0-플루오로리보스를 갖는 뉴클레오타이드.

[0349] - 변형된 염기, 예컨대, 할로젠화된 염기(예를 들어, 5-브로모우라실 및 5-요오도우라실) 또는 알킬화된 염기(예를 들어, 7-메틸구아노신)를 갖는 뉴클레오타이드.



- [0350] siRNA는 그 자체로, 즉, 상기 언급된 특징을 갖는 이중 가닥 RNA의 형태로 사용될 수 있다. 별법으로, siRNA의 센스 가닥 서열 및 안티센스 가닥 서열을 함유하는 벡터의 사용은 관심의 대상이 되는 세포에서 그의 발현에 적합한 프로모터의 제어하에 가능하다.
- [0351] siRNA를 발현하기에 적합한 벡터는 siRNA의 두 가닥을 코딩하는 두 DNA 영역들이 전사시 루프를 형성하는 스페이서 영역에 의해 이격되어 있는 1개의 동일한 DNA 가닥에서 직렬로 정렬되어 있는 벡터이고, 여기서, 단일 프로모터가 shRNA를 생성하는 DNA 분자의 전사를 유도한다.
- [0352] 별법으로, siRNA를 형성하는 가닥이 각각 상이한 전사 유닛의 전사로부터 형성되는 벡터들의 사용도 가능하다. 이들 벡터들은 발산 전사 벡터와 수렴 전사 벡터로 나누어진다. 발산 전사 벡터에서, siRNA를 형성하는 DNA 가닥 각각 코딩하는 전사 유닛은 각각의 DNA 가닥의 전사가 동일할 수 있거나, 상이할 수 있는 그 자신의 프로모터에 의존하도록 벡터에서 직렬로 위치한다(문헌 [Wang, J. et al., 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100:5103-5106] 및 [Lee, N.S., et al., 2002, *Nat. Biotechnol.*, 20:500-505]). 수렴 전사 벡터에서, siRNA를 생성하는 DNA 영역은 2개의 역방향 프로모터가 측면에 위치하는 DNA 영역의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 형성한다. 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥의 전사 후, 안티센스 RNA 가닥은 기능성 siRNA를 형성하기 위해 하이브리드를 형성할 것이다. 2개의 U6 프로모터 (문헌 [Tran, N. et al., 2003, *BMC Biotechnol.*, 3:21]), 1개의 마우스 U6 프로모터 및 1개의 인간 H1 프로모터 (문헌 [Zheng, L., et al., 2004, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 135-140] 및 WO 2005026322), 및 1개의 인간 U6 프로모터 및 1개의 마우스 H1 프로모터(문헌 [Kaykas, A. and Moon, R., 2004, *BMC Cell Biol.*, 5:16])가 사용되는 역방향 프로모터 시스템을 갖는 벡터가 기술되어 있다.
- [0353] 수렴 또는 발산 발현 벡터로부터의 siRNA의 발현에서 사용되기에 적합한 프로모터는 siRNA가 발현되는 세포와 상용가능한 임의의 프로모터 또는 프로모터 쌍을 포함한다. 따라서, 본 발명에 적합한 프로모터는 구성적 프로모터, 예컨대, 진핵 바이러스, 예컨대, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, SV40, CMV, 조류 육종 바이러스 또는 B형 간염 바이러스의 게놈으로부터 유래된 구성적 프로모터, 메탈로티오네인 유전자 프로모터, 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제 유전자 프로모터, 레트로바이러스 LTR 영역, 면역글로불린 유전자 프로모터, 액틴 유전자 프로모터, EF-1알파 유전자 프로모터 뿐만 아니라, 단백질 발현이 분자 또는 외인성 신호의 첨가에 의존하는 유도성 프로모터, 예컨대, 테트라사이클린 시스템, NF카파B/UV 광 시스템, Cre/Lox 시스템 및 열 충격 유전자 프로모터, WO/2006/135436에 기술된 조절가능한 RNA 폴리머라제 II 프로모터 및 특이적 조직 프로모터 (예를 들어, WO2006012221에 기술된 PSA 프로모터)도 포함하나, 반드시 이에 한정되지 않는다. 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 구성적으로 작용하는 RNA 폴리머라제 III 프로모터이다. RNA 폴리머라제 III 프로모터는 제한된 개수의 유전자, 예컨대, 5S RNA, tRNA, 7SL RNA 및 U6 snRNA에서 발견된다. 다른 RNA 폴리머라제 III 프로모터와 달리, III형 프로모터는 임의의 유전자내 서열을 요구하지 않고, 오히려 위치 -34 내지 -24에서 5' 방향으로 TATA 박스를 포함하는 서열, 위치 -66 내지 -47 사이의 근위 서열 요소 또는 PSE, 및 일부 경우에서, 위치 -265 내지 -149 사이의 원위 서열 요소 또는 DSE를 필요로 한다. 바람직한 실시양태에서, III형 RNA 폴리머라제 III 프로모터는 인간 또는 뮤린 H1 및 U6 유전자 프로모터이다. 추가로 더욱 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 2개의 인간 또는 뮤린 U6 프로모터, 1개의 마우스 U6 프로모터 및 1개의 인간 H1 프로모터, 또는 1개의 인간 U6 프로모터 및 1개의 마우스 H1 프로모터이다. 본 발명과 관련하여, ER 알파 유전자 프로모터 또는 사이클린 D1 유전자 프로모터가 특히 적합하므로, 이들은 유방 종양에서, 바람직하게는, HER2+ 유방 종양에서 관심의 대상이 되는 유전자를 특이적으로 발현하기에 특히 바람직하다.
- [0354] siRNA는 siRNA를 형성하는 역평행 가닥들이 루프 또는 헤어핀 영역에 의해 연결되어 있는 것을 특징으로 하는 소위 shRNA(짧은 헤어핀 RNA)로부터 세포내에서 생성될 수 있다. shRNA는 플라스미드 또는 바이러스, 특히, 레트로바이러스에 의해 코딩될 수 있고, 프로모터의 제어하에 있다. shRNA를 발현하기에 적합한 프로모터는 siRNA의 발현에 대해 상기 단락에 명시된 프로모터이다.
- [0355] siRNA 및 shRNA를 발현하기에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터, 예컨대, pUC18, pUC19, Bluescript 및 그의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, CoIE1, pCR1, RP4, 파지 및 서틀 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28; 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-마이크론 플라스미드형 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 바이러스 뿐만 아니라, 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스) 고등 진핵 세포 발현 벡터 또는 비바이러스 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 실시



양태에서, 벡터는 렌티바이러스 벡터이다.

[0356] 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, 별법으로 출발 코돈을 참조으로 3' 방향 위치 중 임의의 위치에서 바람직하게는 25개 내지 50개 뉴클레오티드 길이를 갖는 비번역 5' 또는 3' 영역의 서열을 함유할 수 있다. siRNA를 디자인하는 한 방법은 N이 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.

[0357] MAF 특이적 siRNA는 WO2005046731에 기술된 siRNA를 포함한다(그의 가닥 중 하나는 ACGGCUCGAGCAGCGACAA(서열 번호 6)이다). 다른 MAF 특이적 siRNA 서열로는 CUUACCAGUGUGUUCACAA(서열 번호 7), UGGAAGACUACUACUGGAUG(서열 번호 8), AUUUGCAGUCAUGGAGAACC(서열 번호 9), CAAGGAGAAAUCGAGAAGU(서열 번호 10), ACAAGGAGAAAUCGAGAAG(서열 번호 11) 및 ACCUGGAAGACUACUACUGG(서열 번호 12)를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[0358] DNA 효소

[0359] 다른 한편으로, 본 발명은 또한 본 발명의 MAF 유전자의 발현을 억제하기 위한 DNA 효소의 사용도 고려한다. DNA 효소는 안티센스 기술 및 리보자임 기술 둘 모두의 기계적 특징들 중 일부를 도입한다. DNA 효소는 이 효소가 안티센스 올리고뉴클레오티드와 유사하게 특정 표적 핵산 서열을 인식함에도 불구하고, 리보자임처럼 촉매 활성을 갖고, 표적 핵산을 특이적으로 절단하도록 디자인된다.

[0360] 리보자임

[0361] 억제시키고자 하는 활성을 갖는 MAF를 코딩하는 mRNA의 번역을 방해하기 위해 표적 mRNA의 전사 생성물을 촉매적으로 절단하도록 디자인된 리보자임 분자 또한 사용될 수 있다. 리보자임은 특이적 RNA 절단을 촉매화할 수 있는 효소 RNA 분자이다(리뷰를 위해, 문헌 [Rossi, *Current Biology* 4: 469-471, 1994] 참조). 리보자임 작용 기전은 리보자임 분자 서열과 상보적 표적 RNA의 특이적 하이브리드화에 이어서 엔도뉴클레오티드 용해성 절단 이벤트를 포함한다. 리보자임 분자의 조성물은 바람직하게는 표적 mRNA에 상보적인 하나 이상의 서열, 및 mRNA 또는 기능적 등가 서열의 절단을 담당하는 널리 공지된 서열을 포함한다(예를 들어, 미국 특허 번호 제5093246호 참조).

[0362] 본 발명에서 사용되는 리보자임은 햄머-헤드(hammer-head) 리보자임 및 엔도리보뉴클레아제 RNA(이하, "체크형(Cech type) 리보자임")를 포함한다(문헌 [Zaug et al., *Science* 224:574-578, 1984]).

[0363] 리보자임은 (예를 들어, 안정성, 표적화 등을 개선하기 위해) 변형된 올리고뉴클레오티드에 의해 형성될 수 있고, 생체내에서 표적 유전자를 발현하는 세포에 분포되어야 한다. 바람직한 분포 방법은 형질감염된 세포가 내인성 표적 메신저를 파괴하고, 번역을 억제하기에 충분한 양의 리보자임을 생성하도록 강력한 구성적 pol III 또는 pol II 프로모터의 제어하에 리보자임을 "코딩하는" DNA 구성물을 사용하는 단계를 포함한다. 리보자임이 촉매활성을 갖기 때문에, 다른 안티센스 분자와 달리 낮은 세포내 농도가 그의 효율을 위해 요구된다.

[0364] 억제성 항체

[0365] 본 발명과 관련하여, "억제성 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 방법(그 중 일부는 상기 언급되어 있다) 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 동물을 억제시키고자 하는 단백질로 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌 [Kohler, Milstein et al. (*Nature*, 1975, 256: 495)]에 기술된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명과 관련하여, 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 무손상 항체, "Fab", "F(ab')<sub>2</sub>" 및 "Fab'", Fv, scFv 단편, 디아바디, 이특이적 항체, 알파바디, 사이클로펩티드 및 스테이플드 펩티드를 포함한다. 일단 c-Maf 단백질 결합 능력을 갖는 항체가 확인되고 나면, 이 단백질의 활성을 억제할 수 있는 항체는 억제제 확인 검정법을 이용함으로써 선택될 것이다.

[0366] 억제성 펩티드

[0367] 본원에서 사용되는 바, 본원에서 사용되는 바, "억제성 펩티드"라는 용어는 상기 설명된 바와 같이 c-M 단백질에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있는, 즉, c-Maf가 유전자 전사를 활성화시키지 못하도록 막을 수 있는 펩

티드를 의미한다.

[0368] 음성 c-Maf 우성형질

[0369] 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 있지만, 전사를 활성화시키는 능력은 결여되어 있는 음성 우성형질을 사용하는 것이다. 따라서, 음성 c-Maf 우성형질은 세포에 존재하고, 전사 활성화 도메인을 함유하는 아미노 말단 단부의 ⅔가 결여되어 있는 작은 maf 단백질(예를 들어, mafK, mafF, mafg 및 pi 8) 중 임의의 것일 수 있다(문헌 [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]).

[0370] 별법으로, 음성 c-Maf 우성형질은 다른 단백질과 이량체를 형성하는 능력은 유지하지만, 전사를 활성화시키는 능력은 결여되어 있는 c-Maf 변이체를 포함한다. 이러한 변이체는 예를 들어, 단백질의 N 말단 단부에 위치하는 c-Maf 전사활성화 도메인이 결여되어 있는 것이다. 따라서, 음성 c-Maf 우성형질 변이체는 예시적 방식으로 (US6274338에 기술된 바와 같이 인간 MAF의 넘버링을 고려하여) 적어도 아미노산 1 내지 122, 적어도 아미노산 1 내지 187 또는 적어도 아미노산 1 내지 257이 제거되어 있는 변이체를 포함한다.

[0371] 본 발명은 표적 세포에서의 발현에 적합한 프로모터의 작동적 제어하에 음성 c-Maf 우성형질 변이체 및 MAF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 둘 모두를 사용하는 것을 고려한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하는 데 사용될 수 있는 프로모터는 구성적 프로모터, 즉, 기초 수준에서 전사를 유도하는 프로모터, 또는 전사 활성이 외부 신호를 요구하는 유도성 프로모터일 수 있다. 전사를 조절하는 데 적합한 구성적 프로모터는 특히, CMV 프로모터, SV40 프로모터, DHFR 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV: mouse mammary tumor virus) 프로모터, 1a 연장 인자(EF1a: 1a elongation factor) 프로모터, 알부민 프로모터, ApoA1 프로모터, 케라틴 프로모터, CD3 프로모터, 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 프로모터, 신경필라멘트 프로모터, 신경 특이적 에놀라제 프로모터, L7 프로모터, CD2 프로모터, 미오신 경쇄 키나제 프로모터, HOX 유전자 프로모터, 티미딘 키나제 프로모터, RNA 폴리머라제 II 프로모터, MyoD 유전자 프로모터, 포스포글리세레이트키나제(PGK) 유전자 프로모터, 저밀도 지단백질(LDL: low density lipoprotein) 프로모터, 및 액틴 유전자 프로모터이다. 바람직한 실시양태에서, 전사활성인자의 발현을 조절하는 프로모터는 PGK 유전자 프로모터이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하는 프로모터는 T7 파지의 RNA 폴리머라제 프로모터이다.

[0372] 바람직하게는, 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 유도성 프로모터는 유도제 작용제의 부재하에 0 또는 무시할 만한 기초 발현을 보이는, 유도제 작용제에 반응하는 프로모터이고, 3' 위치에 위치하는 유전자의 활성화를 촉진할 수 있다. 유도제 작용제의 유형에 따라, 유도성 프로모터는 Tet 온/오프 프로모터(문헌 [Gossen, M. and H. Bujard (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:5547-5551]; [Gossen, M. *et al.*, 1995, *Science* 268:1766-1769]; [Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 1998, *Curr. Opin. Biotechnol.* 9:451-456]); Pip 온/오프 프로모터(US 6287813); 안티프로게스틴 의존성 프로모터(US 2004132086), 엑디손 의존성 프로모터(문헌 [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 W09738117), 메탈로티오네인 의존성 프로모터(W08604920) 및 라파마이신 의존성 프로모터(문헌 [Rivera *et al.*, 1996, *Nat. Med.* 2:1028-32])로서 분류된다.

[0373] 음성 c-Maf 우성형질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하기에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터, 예컨대, pUC18, pUC19, Bluescript 및 그의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 및 서플로미 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28; 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-미크론형 플라스미드 벡터, 삽입 플라스미드, YEP 벡터, 센트로미어성 플라스미드 등; 곤충 세포 발현 벡터, 예컨대, pAC 계열 벡터 및 pVL 계열 벡터, 식물 발현 벡터, 예컨대, pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCAMBIA, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE 계열 벡터 등, 및 바이러스 벡터 기초(아데노바이러스, 아데노바이러스와 관련된 바이러스뿐만 아니라, 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스) 고등 진핵 세포 발현 벡터 또는 비바이러스 벡터, 예컨대, pSilencer 4.1-CMV(암비온(Ambion)), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, pZeoSV2, pCI, pSVL, pKSV-10, pBPV-1, pML2d 및 pTDT1로부터 유도된 벡터들을 포함한다.

[0374] 소분자

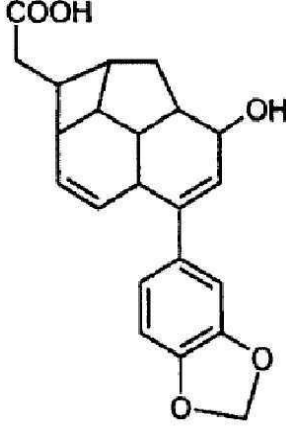
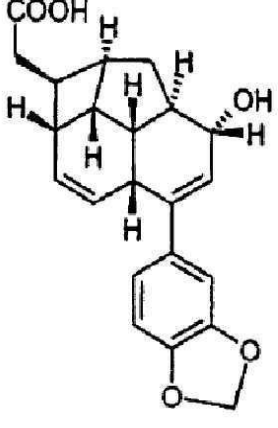
[0375] 본 발명에서 사용하는 데 적합한 다른 c-Maf 억제성 화합물로는 하기의 것을 포함한다:

표 1

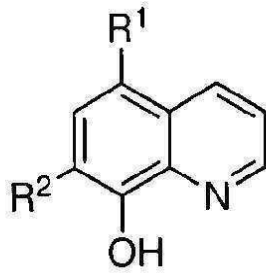
c-MAF 억제 능력을 갖는 소분자

I	엔디안드르산(Endiandric acid) H 유도체, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제 WO2004014888 호에 기재된 하기 화학식에 상응하는 화합물
	<div data-bbox="459 450 687 757" data-label="Chemical-Block"> </div> <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>

[0376]

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

[0377]



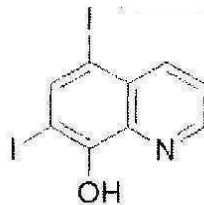
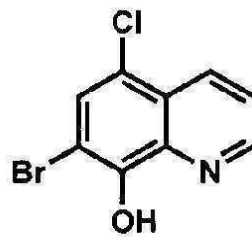
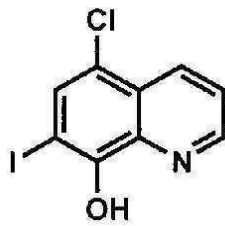
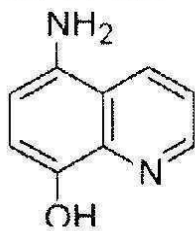
[상기 식에서,

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

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

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

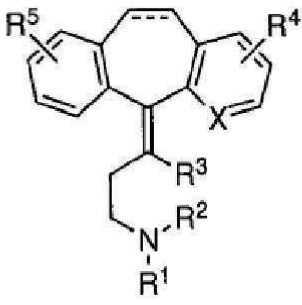
바람직하게는, 하기 화합물



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

[0378]



	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 N으로부터 선택된다.]</p> <p>바람직하게는, 하기 화합물들:          사이클로헥타딘(4-(5H-디벤조-[a,d]사이클로헥텐-5-일리텐)-1-메틸피페리딘 하이드로클로라이드),          아미트립틸린(3-(10,11-디하이드로-5H-디벤조[[a,d]]사이클로헥텐-5-일리텐)-N,N-디메틸-1-프로판아민),          로라타딘(에틸 4-(8-클로로-5,6-디하이드로-11H-벤조[5,6]사이클로헥타[1,2-b]피리딘-11-일리텐)-1-피페리딘카복실레이트,          사이클로벤즈라핀(3-(5H-디벤조[a,d]사이클로헥텐-5-일리텐)-N,N-디메틸-1-프로판아민).</p>
V	국제 특허출원 공보 제 WO0359249 호에 기재된 니발레놀(12,13-에폭시-3,4,7,15-테트라하이드록시트리코텍-9-엔-8-온)

[0379]

[0380]

다른 c-Maf 억제제는 특허 출원 W02005063252(상기 출원은 그 전문이 본원에서 참조로 포함)에 기술되어 있으며, 그 예는 예컨대, 하기 표(하기 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 (1998); Chang, Y.T. <i>et al.</i>, Chem. Biol., 6, 361-375 (1999)</p>
<p>상표명 올로모우신(Olomoucine)(#O0886) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가능한, 분자식 <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(Roscovitine)(#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_7</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>

[0381]

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-일리렌)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 테클로로 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

[0382]

파울론(paullone), 예컨대, 상표명 켄파울론(kenpaullone) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 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 입수가 가능한, 분자식 $C_{16}H_{11}N_3O_3$ 을 갖는 9-니트로-7,12-디하이드로인돌로-[3,2-d][1]벤즈아제핀-6(5)-온	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 입수가 가능한, 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> , <i>Z. 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 입수가 가능한, 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(칼바이오캠(Calbiochem), 미국 캘리포니아주 샌 디에고 소재)	Metty <i>et al.</i> , <i>J. Med. Chem.</i> 2003, 46, 222-236

[0383]

[0384]

바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0385]

c-Maf 억제제는 전형적으로 약학적으로 허용되는 담체와 함께 투여된다.

[0386]

"담체"라는 용어는 활성 성분이 투여되게 하는 희석제 또는 부형제를 의미한다. 이러한 약학 담체는 멸균 액체, 예컨대, 물 및 오일(석유, 동물, 식물 또는 합성 기원의 오일, 예컨대, 땅콩유, 콩유, 광물유, 참깨유 등 포함)일 수 있다. 특히 주사가 가능한 용액을 위한 물 또는 수성 염수 용액, 및 수성 텍스트로스와 글리세롤 용액은 바람직하게 담체로서 사용된다. 적합한 약학 담체는 문헌 ["Remington's Pharmaceutical Sciences" by E.W. Martin, 1995]에 기술되어 있다. 바람직하게, 본 발명의 담체는 동물, 및 더욱 특히 인간에서의 그의 사용에 대해 주정부 또는 연방정부 규제 관청에 의해 승인받은 것이거나, 또는 미국 약전 또는 일반적으로 인정되는 다른 약전에 열거되어 있는 것이다.

[0387]

본 발명의 약학 조성물의 원하는 약학 제형을 제조하는 데 필요한 담체 및 보조 물질은 다른 인자들 중에서 선택된 약학 제형에 의존할 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 공정에 관한 리뷰는 문헌 ["Tratado de Farmacia Galenica", C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S.A. 1993 Edition]에서 살펴볼 수 있다. 약학 조성물의 예로는 경구, 국소 또는 비경구 투여를 위한 임의의 고체 조성물(정제, 환제, 캡슐제, 과립제 등) 또는 액체 조성물(액제, 현탁제 또는 에멀전)을 포함한다. 추가로, 약학 조성물은 필요하다고 간주



되는 경우, 안정제, 현탁액, 보존제, 계면활성제 등을 함유할 수 있다.

[0388] 의약에서 사용되기 위한 c-MAF 억제제는 단리된 상태 또는 추가 활성 물질과 조합된 상태의 프로드럭, 염, 용매 화물 또는 포접화합물의 형태로 발견될 수 있고, 약학적으로 허용되는 부형제와 함께 제제화될 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 바람직한 부형제로는 당, 전분, 셀룰로스, 고무 및 단백질을 포함한다. 특정 실시양태에서, 본 발명의 약학 조성물은 고체 약학 제형(예를 들어, 재구성되어 액체 제형을 제공할 수 있는 정제, 캡슐제, 환제, 과립제, 좌제, 멸균 결정 또는 무정형 고체 등), 액체 약학 제형(예를 들어, 액제, 현탁제, 에멀전, 엘릭시르, 로션, 연고 등), 또는 반고체 약학 제형(젤제, 연고제, 크림제 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, 이에 한정되지 않는 임의의 경로에 의해 투여될 수 있다. 활성 성분을 투여하는 상이한 방식, 사용되는 부형제 및 그의 제조 공정에 관한 리뷰는 문헌 [Tratado de Farmacia Galenica, C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S.A., 1993 Edition] 및 [Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 20<sup>th</sup> edition, Williams & Wilkins PA, USA (2000)]에서 살펴볼 수 있다. 약학적으로 허용되는 담체의 예는 최신기술 수준에서 공지되어 있고, 포스페이스트 완충처리된 염수 용액, 물, 에멀전, 예컨대, 오일/물 에멀전, 상이한 유형의 습윤화제, 멸균 용액 등을 포함한다. 상기 담체를 포함하는 조성물은 최신기술 수준에서 공지되어 있는 통상의 공정에 의해 제제화될 수 있다.

[0389] 핵산(siRNA, siRNA 또는 shRNA를 코딩하는 폴리뉴클레오티드, 또는 음성 cMAF 우성형질을 코딩하는 폴리뉴클레오티드)이 투여되는 경우, 본 발명은 특히 상기 핵산을 투여하기 위해 제조된 약학 조성물을 고려한다. 상기 약학 조성물은 상기 네이키드 핵산, 즉, 신체의 뉴클레아제에 의한 분해로부터 핵산을 보호하는 화합물의 부재하의 핵산을 포함할 수 있는데, 이는 형질감염을 위해 사용된 시약과 관련된 독성이 제거된다는 장점을 수반한다. 네이키드 화합물에 적합한 투여 경로는 혈관내 경로, 종양내 경로, 두개내 경로, 복강내 경로, 비장내 경로, 근육내 경로, 망막하 경로, 피하 경로, 점막 경로, 국소 경로 및 경구 경로를 포함한다(문헌 [Templeton, 2002, *DNA Cell Biol.*, 21:857-867]). 별법으로, 콜레스테롤에 컨쥬게이트된, 또는 세포막을 통한 전위를 촉진할 수 있는 화합물, 예컨대, HIV-1 TAT 단백질로부터 유래된 Tat 펩티드, D. 멜라노가스터(*D. melanogaster*) 안테나페디아 단백질의 호메오도메인의 제3 나선, 헤르페스 심플렉스 바이러스 VP22 단백질, 아르기닌 올리고머 및 WO07069090호에 기술된 펩티드에 컨쥬게이트된 리포솜의 일부를 형성하는 핵산이 투여될 수 있다(문헌 [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] 및 [Snyder, E.L. and Dowdy, S.F., 2004, *Pharm. Res.* 21:389-393]). 별법으로, 플라스미드 벡터 또는 바이러스 벡터, 바람직하게, 아데노바이러스 기반 벡터, 아데노 관련 바이러스 또는 레트로바이러스, 예컨대, 뮤린 백혈병 바이러스(MLV: murine leukemia virus) 또는 렌티바이러스(HIV, FIV, EIAV)에 기초한 바이러스의 일부를 형성하는 폴리뉴클레오티드가 투여될 수 있다.

[0390] c-Maf 억제제 또는 이를 함유하는 약학 조성물은 체중 1 kg당 10 mg 미만, 바람직하게, 체중 1 kg당 약, 약 2, 약 1, 약 0.5, 약 0.1, 약 0.05, 약 0.01, 약 0.005, 약 0.001, 약 0.0005, 약 0.0001, 약 0.00005 또는 약 0.00001 mg 미만의 용량으로 투여될 수 있다. 단위 용량은 주사, 흡입 또는 국소 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0391] 용량은 치료하고자 하는 병태의 중증도 및 반응에 의존하고, 수일 내지 수개월, 또는 병태가 진정될 때까지 달라질 수 있다. 최적 투여량은 환자의 체내에서 작용제의 농도를 주기적으로 측정함으로써 결정될 수 있다. 최적 용량은 동물 모델에서의 사전 시험관내 또는 생체내 분석에 의해 수득된 EC50 값으로부터 결정될 수 있다. 단위 용량은 1일 1회, 또는 1일 1회 미만, 바람직하게는 약 매 2일마다, 약 매 4일마다, 약 매 8일마다 또는 약 매 30일마다 1회 미만으로 투여될 수 있다. 별법으로, 출발 용량을 투여한 후, 일반적으로 출발 용량보다 더 적은 양의 1회 또는 수회 유지 용량을 투여할 수 있다. 유지 요법은 환자를 1일당 체중 1 kg당 약 0.01  $\mu$ g 내지 약 1.4 mg 범위의 용량, 예를 들어, 약 10, 약 1, 약 0.1, 약 0.01, 약 0.001, 또는 약 0.00001 mg의 용량으로 치료하는 것을 포함할 수 있다. 유지 용량은 바람직하게는 약 매 5일마다, 약 매 10일마다 또는 약 매 30일마다 최대 1회 투여된다. 치료는 환자가 앓고 있는 장애 유형, 그의 중증도 및 환자의 상태에 따라 달라질 시간 동안 계속되어야 한다. 치료 후, 질환이 치료에 반응하지 않는 경우, 용량을 증량시켜야 하는지, 또는 질환의 개선이 관찰되거나, 원치 않는 부작용이 관찰되는 경우, 용량을 감량시켜야 하는지를 결정하기 위해 환자의 경과를 모니터링하여야 한다.

[0392] MAF 수준이 상승되어 있는, 골 전이를 동반하는 유방암 환자에서의 골 분해 치료 또는 예방



- [0393] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고, 대조군 샘플과 비교하여 전이성 샘플에서 MAF 수준이 상승되어 있는 피험체에서 골 전이를 치료하는 데 사용하기 위한 c-Maf 억제제, 또는 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제에 관한 것이다.
- [0394] 또 다른 측면에서, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고, 대조군 샘플과 비교하여 전이성 샘플에서 MAF 수준이 상승되어 있는 피험체에서의 골 전이 치료용 의약 제조를 위한, c-Maf 억제제, 또는 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제의 용도에 관한 것이다.
- [0395] 별법으로, 본 발명은 HER2+ 유방암을 앓고, 대조군 샘플과 비교하여 전이성 샘플에서 MAF 수준이 상승되어 있는 피험체에게 c-Maf 억제제, 또는 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제를 투여하는 단계를 포함하는, 상기 피험체에서 분해를 예방 및/또는 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0396] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0397] 본 발명에 기술된 치료 방법에 적합한 c-Maf 억제제, 및 골 분해를 회피 또는 예방할 수 있는 작용제는 맞춤형 요법 방법과 관련하여 앞서 상세하게 기술되어 있다.
- [0398] 참조 또는 대조군 샘플은 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플, 또는 전이되지 않은 HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 생검 샘플 중 중앙 조직 집단에서 측정된 MAF 유전자 발현 수준의 중간값에 상응하는 것이다.
- [0399] 대조군 샘플과 비교하여 MAF 수준이 상승되어 있는지 여부를 결정 또는 정량하는 방법은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세하게 기술되어 있으며, 골 분해를 회피하거나, 또는 예방하기 위한 작용제에 동등하게 적용가능하다.
- [0400] 별법으로, 전이를 치료 및/또는 예방하기 위해 상기 언급된 것으로부터의 골 분해를 회피하거나, 또는 예방하기 위한 1개 초과 작용제가 조합되거나, 또는 상기 작용제가 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D와 함께, 또는 호르몬과 함께 조합될 수 있는 조합 치료가 수행될 수 있다.
- [0401] 골 분해를 회피하거나, 또는 예방하기 위한 작용제는 전형적으로 약학적으로 허용되는 담체와 함께 조합되어 투여된다. "담체"라는 용어 및 담체 유형 뿐만 아니라, 그가 투여될 수 있는 제형 및 용량은 c-Maf 억제제에 대해 상기 정의되어 있고, 이는 골 분해를 회피하거나, 또는 예방하기 위한 작용제에 동등하게 적용가능하다.
- [0402] 하기 실시예는 본 발명을 예시하고, 그의 범주를 한정하지 않는다.
- [0403] 본 발명의 키트
- [0404] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단, 및 b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는, Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체에서 Her2+ 유방암의 골 전이를 예측하기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0405] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는, HER2+ 유방암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 피험체의 임상 결과를 예측하기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0406] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; b) 상기 샘플에서의 MAF의 정량된 발현 수준을 참조 MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단; 및 c) 참조 발현 수준과의 정량된 발현 수준의 비교에 기초하여 상기 피험체에서 골 전이를 예방 및/또는 감소시키기 위한 요법을 결정하는 수단을 포함하는, Her2+ 유방암을 앓고 있는 피험체를 위한 요법을 결정하기 위한 키트에 관한 것이다.
- [0407] 또 다른 측면에서, 본 발명은 i) HER2+ 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 시약, 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계가 있는 것으로 미리 결정된 하나 이상의 MAF 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트에 관한 것이다.
- [0408] 16q23 및 16q22-24 유전자와 증폭 및 전위를 비롯한, 상기 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단은 상기에 상세하게 기술되어 있다.
- [0409] 바람직한 실시양태에서, 발현을 정량하기 위한 수단은 MAF 유전자에 특이적으로 결합하고/거나 이를 증폭시키는

프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함한다.

- [0410] 특정 실시양태에서, 유방암은 HER2+ 유방암이다.
- [0411] 본 발명의 방법의 모든 특정 실시양태는 본 발명의 키트 및 그의 용도에 적용가능하다.
- [0412] 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플을 유형분류하는 방법
- [0413] 또 다른 측면에서, 본 발명은
- [0414] a) 유방암을 앓고 있는 피험체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- [0415] b) 상기 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하는 단계;
- [0416] c) 정량된 MAF의 발현 수준을 미리 결정된 참조 MAF 발현 수준과 비교하여 상기 샘플을 유형분류하는 단계
- [0417] 를 포함하고, 여기서, 상기 유형분류가 상기 피험체에서의 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인, 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플을 유형분류하는 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0418] 16q23 및 16q22-24 유전자좌 증폭 및 전위를 비롯한, 상기 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단은 상기에 상세하게 기술되어 있다.
- [0419] 특정 실시양태에서, 유방암은 HER2+ 유방암이다.
- [0420] 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0421] 유방암을 앓고 있는 피험체를 분류하는 방법
- [0422] 또 다른 측면에서, 본 발명은 a) 유방암을 앓고 있는 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 결정하는 단계;
- [0423] b) 상기 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 미리 결정된 참조 MAF 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 샘플에서의 MAF의 상기 발현 수준에 기초하여 상기 피험체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는, 유방암을 앓고 있는 피험체를 코호트로 분류하는 방법에 관한 것이다.
- [0423] 16q23 및 16q22-24 유전자좌 증폭 및 전위를 비롯한, 상기 피험체의 샘플에서의 MAF의 발현 수준을 정량하기 위한 수단은 상기에 상세하게 기술되어 있다.
- [0424] 특정 실시양태에서, 유방암은 HER2+ 유방암이다.
- [0425] 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0426] 바람직한 실시양태에서, 상기 코호트는 상기 참조 발현 수준과 비교하여 필적할만한 MAF 발현 수준을 갖는 것으로 결정된 1명 이상의 다른 개체를 포함한다.
- [0427] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 샘플에서의 MAF의 상기 발현 수준이 상기 미리 결정된 참조 수준에 비하여 증가되어 있고, 여기서, 코호트의 구성원은 골 전이 위험이 증가되어 있는 것으로 분류된다.
- [0428] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 코호트는 임상 시험 수행을 위한 것이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0429] 실시예
- [0430] 실시예 1
- [0431] 실험 과정 및 데이터 세트
- [0432] 유방암 원발성 종양 샘플 코호트:
- [0433] 사용된 유방암 코호트는 I, II 또는 III 기 BC를 앓고, 전이 부위를 포함하는, 임상적 추적 조사 소견을 갖는 환자로부터 획득된 334개 초과 원발성 유방암 표본으로 구성되었다(문헌 [Rojo F., *Ann Oncol* (2012) 23(5): 1156-1164]). 조직 마이크로레이를 표준 절차에 따라 프로세싱하였다. 유방암 종양은 ER+, 삼중 음성 및 HER2+를 포함하는, 다양한 서브타입으로 분류되었고, 이어서, 이들 종양에서의 MAF (MAF) 발현과 16q22-24 증폭이 관심의 대상이 되는 서브타입에서의 골 전이 이벤트와 상관관계가 있는지 여부를 테스트하기 위해 적절한 통계학적 분석을 수행하였다.
- [0434] 통계학적 분석은 하기 전제를 기반으로 하였다:

- [0435] A) 누적 발생률
- [0436] 도 1b의 경우, p 값은 콕스(Cox) 원인 특이적인 비례적 위험도 모델을 경쟁 이벤트(임의 시점에서의 골 전이 이전에 사망한 경우)로 피팅하고, 우도비 검정을 수행한 후, 수득하였다.
- [0437] B) 기준선 특징(하기 표 S1) 비교.
- [0438] 연령차는 스튜던트의 t 검정으로 검정하였다. 모든 다른 변수는 피셔의 정확 검정(Fisher's exact test)으로 검정하였다.
- [0439] FISH 결정에 의한 16q22-24 DNA 게놈 증폭이 골 전이를 예측할 수 있는 예후 능력 검증
- [0440] 16q22-24 게놈 증폭이 특이적으로 골 전이 위험을 예측할 수 있는 능력을 추가로 검증하기 위해, 본 발명자들은 I, II 또는 III 기 BC를 앓고, 전이 부위를 포함하는, 추적 조사 소견을 갖는 환자로부터 수득된 334개의 원발성 유방암 표본으로 구성된 세트에서(문헌 [Rojo F., *Ann Oncol* (2012) 23 (5): 1156-1164]) FISH에 의해 16q22-24 염색체 영역 게놈 획득을 분석하였다(본 발명자들은 16q23 게놈 영역을 확인하는 상업적으로 이용가능한 진단 프로브인 IGH/MAF 애보트 바이시스(Abbot Vysis) 프로브를 사용하였고, 센트로미어 chr 16 프로브인 16q11.2(CEP16)를 사용하여 16q23 카피수를 정규화하였다). 조직 마이크로어레이를 표준 절차에 따라 프로세싱하였다. 슬라이드를 MAF(16q23)와 함께 인큐베이션시키고, CEP16 프로브를 사용하여 독립적으로 염색시켰다. DAPI 대조 염색제를 적용시키고, 적절한 현미경으로 영상을 획득하였다. 평균적으로 종양 1개당 50개의 세포에 기초하여 16q23/CEP16 <1.5 FISH는 음성, 및 16q23/CEP16 >1.5 FISH는 양성인 것에 따라 환자를 계층화하였다(도 1a).
- [0441] I, II 및 III 기 BC 인간 원발성 종양 세트(n=334)에서의 임의 시점에서의 골 전이(실선) 및 골에서의 재발 이전에 사망한 경우(파선)에 대한 누적 발생률 플롯(도 1b)을 결정하였고, 이는 통계학상 유의성을 보였다.
- [0442] MAF 발현 수준에 기초한 HER2+ 진단을 받은 피험체에서의 치료 계획 결정
- [0443] HER2+ 유방암을 앓고 있는 것으로 진단받은 피험체로부터 종양 조직 샘플을 수득한다. 샘플을 조직의 얇은 슬라이드로 절편화하고, 파라핀에 포매시킨다. 각 파라핀 절편을 슬라이드 위에 탑재한다. 슬라이드를 항MAF 항체와 함께 인큐베이션시킨다. MAF에 결합된 항체의 시각화 및 검출을 위해, 형광 염료에 컨쥬게이트된 항체를 사용한다. 형광 염료에 여기 빔을 제공함으로써 슬라이드를 시각화한다. 형광 현미경에 의해 형광 신호 영상을 촬영한다. 종양 샘플에서의 형광 신호를 참조 샘플의 것과 비교함으로써 종양 샘플에서의 MAF의 상대적인 발현 수준을 얻는다. 종양 샘플에서의 강도는 참조 샘플에서의 강도와 상관관계가 있으며, 여기서, 참조 샘플과 비교하여 더 높은 종양 샘플에서의 강도는 원발성 유방암을 앓고 있는 피험체에서 골로 전이될 위험이 증가되어 있는 것과 상관관계가 있다. 별법으로, 16q22-24 유전자좌, 16q23 유전자좌 또는 MAF 유전자 증폭 또는 전위는 인시츄 하 이브리드화 기법 또는 유사 기법을 사용하여 결정된다.
- [0444] 골 전이 위험의 증가 예후에 기초하여, 골 전이에 대한 예방 치료법으로서 항RANKL 항체인 데노수맙을 피험체에게 투여한다. 120 mg의 데노수맙을 5개월 동안 매월 1회에 걸쳐 피하로(SC) 피험체에게 투여한다. 다음 4년 6개월 동안 매 3개월마다 120 mg을 SC로 투여한다. 5년 동안 경구용 칼슘(500 mg 이상) 및 비타민 D(400 IU 이상)를 투여한다. 5년 후, 피험체에서는 골 전이에 대한 어떤 증거도 없다. 골 전이 위험의 증가가 없는 예후에 기초하여, 환자에게 상기 항RANKL 항체를 투여하지 않는다.
- [0445] 본원에 기술된 실시예 및 실시양태는 단지 예시 목적으로 기술된 것이며, 그에 비추어 다양한 변형 또는 변화가 당업자에게 제안될 것이며, 그는 본 출원의 정신 및 범위에 포함된다는 것을 이해한다.
- [0446] 본원에서 인용된 모든 공개문헌, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트, 및 수탁 번호/폴리뉴클레오타이드 및 폴리펩티드 서열, 둘 모두를 포함하는 데이터베이스 서열은 마치 각 개별 공개문헌, 특허, 특허 출원, 인터넷 사이트, 또는 수탁 번호/데이터베이스 서열이 참조로 포함되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 명시된 것과 같은 정도로 모든 목적을 위해 그 전문이 본원에서 참조로 포함된다.

[0447] <표 S1>

16q23 CNA에 따른 기준선 특징

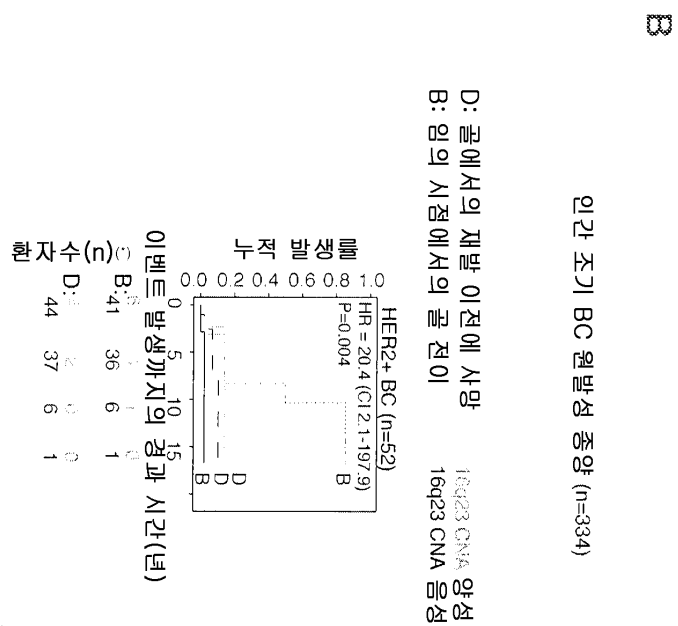
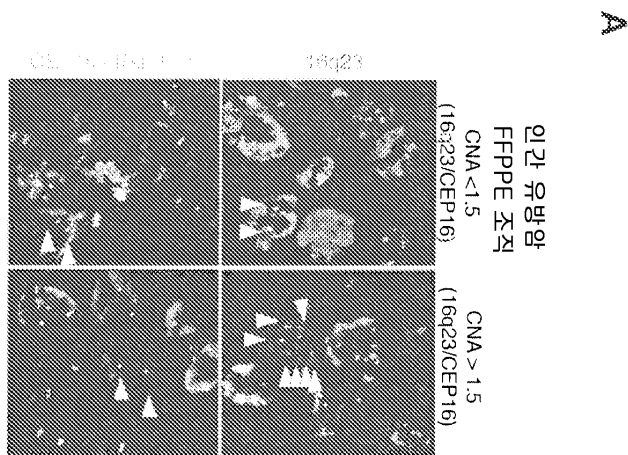
특징	완전한 시리즈 (n=334)		16q23 CNA < 1.5 (n=279)		16q23 CNA > 또는 =1.5 (n=55)		P
	환자수	비율 (%)	환자수	비율 (%)	환자수	비율 (%)	
연령(중간값, 범위)	58, 26-90		58, 31-90		58, 26-90		
배경 상태							0.632
배경 이전	104	31.1	85	30.5	19	34.5	
배경 이후	230	68.9	194	69.5	36	65.5	
종양 크기(mm)							0.008
≤20	204	61.0	179	64.2	25	45.4	
21-50	100	30.0	80	28.7	20	36.4	
>50	30	9.0	20	7.1	10	18.2	
종양 등급							0.011
I	57	17.0	52	18.6	5	9.1	
II	159	47.6	138	49.4	21	38.2	
III	118	35.3	89	32.0	29	52.7	
림프절							0.091
없음	203	60.7	175	62.7	28	50.9	
1-3	86	25.7	72	25.8	14	25.4	
4-9	29	8.6	21	7.5	8	14.6	
>9	16	4.7	11	4.0	5	9.1	
에스트로겐 수용체 상태							0.174
음성	84	25.1	66	23.7	18	32.7	
양성	250	74.9	213	76.3	37	67.3	
프로게스테론 수용체 상태							0.282
음성	118	35.3	95	34.0	23	41.8	
양성	216	64.6	184	66.0	32	58.2	
HER2 상태							0.850
음성	271	81.2	227	81.4	44	80.0	
양성	63	18.8	52	18.6	11	20.0	
임의 시점에서 골 전이가 일어난 경우							9e-12
음성	306	91.6	271	97.13	35	63.64	
양성	28	8.4	8	2.87	20	36.36	
(후속 기간(중간값(개월))							
골 전이 또는 사망 이전에							0.998
연성 및 대장 전이가 일어난 경우							
음성	318	95.2	265	94.9	53	96.3	
양성	16	4.7	14	5.0	2	3.6	
P 증식 (Ki-67)							0.005
저증식(<15%)	229	68.5	200	71.7	29	52.7	
고증식 (≥15%)	84	25.1	62	22.22	22	40.0	
증식(n.a.)	21	6.2	17	6.1	4	7.3	

약어: HER2, 인간 표피 성장 수용체 2, n.a. 이용불가

[0448]

도면

도면1



서열 목록

# SEQUENCE LISTING

<110> Fundacio Institut de Recerca Biomedica (IRB Barcelona) and Institutio Catalana de Recerca i Estudis Avancats

GOMIS, Roger

PLANET, Evarist

PAVLOVIC, Milica

ARNAL, Anna

TARRAGONA, Maria



<120> METHOD FOR THE PROGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER METASTASIS  
 <130> 3190.011PC01/TJS/EJH  
 <140> To Be Assigned  
 <141> Herewith  
 <150> 61/888,984  
 <151> 2013-10-09  
 <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 tgcctgcagc ccgggccggc gaggcgagcc cttccttatg caaagcgcgc      420
agcggagcgg cgagcggggg acgccgcgca ccgggccggg ctctccagc ttcgccgcgc      480
cagccaccac cgcgccacc gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgccggc      540
tcggcgcgca aggaggcgag cgagcaagga ggggccgggg cgagcgaggg agcacattgg      600
cgtgagcagg ggggagggag ggccggcgcg gggggcgcg gcagggcggg ggggtgtgtg      660
tgtgagcgcg ctggaggtt tcgggccagc caccgccgcg caagctagaa gcgccccagc      720
ccggcaagct ggctcaccgc ctggccacc agcacagccc gctggcccct ctctgcagc      780

ccatctggcg gagcggcggc ggccggcgcg gcggcgcgag gagaatggca tcagaactgg      840
caatgagcaa ctccgacctg cccaccagtc ccttgccat ggaatatgtt aatgacttcg      900
atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cgttgagac cgaccgcatc atcagccagt      960
gcggccgtct catcgccggg ggctcgctgt cctccacccc catgagcacg ccgtgcagct     1020
cggtgcccc ttccccagc ttctcggcgc ccagcccggg ctcgggcagc gagcagaagg     1080
    
```

cgcacctgga agactactac tggatgaccg gctaccgcga gcagctgaac cccgaggcgc	1140
tgggcttcag ccccaggagc gcggtcgagg cgctcatcag caacagccac cagctccagg	1200
gcggcttcga tggctacgcg cgcggggcgc agcagctggc cgcggcgcc gccggccggtg	1260
ccggcgccctc ctggggcggc agcggcgagg agatggggcc cgcggcgcc gtggtgtccg	1320
ccgtgatcgc cgcggcgcc gcgcagagcg gcgcggggcc gactaccac caccaccac	1380
accacgccgc cggccaccac caccaccga cggccggcgc gcccgcgcc gcgggcagcg	1440
cggccgcctc gccgggtggc gctgggggcg cggcgggcgg tggcccgcc agcgtgggg	1500
gcggcgggcg cggcgggcgc ggcggaggcg gcgggggcgc ggcgggggcg gggggcgccc	1560
tgcaccgcga ccacgccgc ggcggcctgc acttcgacga ccgtttctcc gacgagcagc	1620
tggtgaccat 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 gaagtgtgtg agcagcggtc tccgagaaaa cggtcgagc agcgacaacc	1920
cgctctctcc cgagtttttc atgtgagctc gacacgcgat tccagctagc caccctgata	1980
agtgtctcgc ggggggtccg ctcgggtgtg ggcttgctag ttctagagcc atgtcgcca	2040
ccacctcacc acccccacc ccaccgagtt tggccccctt ggccccctac acacacacaa	2100
accgcgacgc acacaccaca cacacacaca cacacccac accctgctcg	2160
agtttgtggt ggtggtggct gttttaaaact ggggagggaa tgggtgtctg gctcatggat	2220
tgccaatctg aaattctcca taacttgcta gcttgTTTTT ttttttttt tacaccccc	2280
cgcaccccc cggacttgc acaatgttca atgatctcag cagagttctt catgtgaaac	2340
gttgatcacc tttgaagcct gcatcattca catattttt cttctcttc ccttcagtt	2400
catgaactgg tgttcatttt ctgtgtgtgt gtgtgtttta tttgttttg atttttttt	2460
ttaattttac ttttagagct tgctgtgttg ccacaccttt ttccaacctc caccctcact	2520
ctttctcaac ccatctcttc cgagatgaaa gaaaaaaaa agcaaagttt tttttcttc	2580
tcctgagttc ttcattgtgag attgagcttg caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag	2640
acttgacgcg tgccgagttc catcggtttt tttttttagc attgttatgc taaaatagag	2700
aaaaaaaaatcc tcatgaacct tccacaatca agcctgcac aaccttctgg gtgtgacttg	2760
tgagtttttg cttgtgatg ccaaatctga gagtttagtc tgccattaaa aaaactcatt	2820

ctcatctcat gcattattat gcttgctact ttgtcttagc aacaatgaac tataactgtt	2880
tcaaagactt tatggaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcatgctgga	2940
catgtatggt ataattatit tttccctttt ttttcccttt ggcttggaat tggacgttcg	3000
aagacttata gcatggcatt catacttttg ttttattgcc tcatgacttt tttgagtta	3060
gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa ttttgcattc gctccaaaac	3120
tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgcactg aaggcattcc ttgtcaaaga	3180
taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgttttcttt	3240
ttaataagaa tgacgcccc ctttggggac taaaattgtg ctattgccga gaagcagtct	3300
aaaatttatt ttttaaaaag agaaactgcc ccattatit tggtttggtt tatitttatt	3360
ttatatitit tggcttttgg tcattgtcaa atgtggaatg ctctgggttt ctagtatata	3420
atttaattct agtttttata atctgttagc ccagttaaaa tgtatgctac agataaagga	3480
atgttataga taaatttgaa agagtttagt ctgttttagt gtagatitit taaacgattg	3540
atgcactaaa ttgtttacta ttgtgatgtt aaggggggta gagtttgcaa ggggactgtt	3600
taaaaaaagt agcttataca gcatgtgctt gcaacttaaa tataagttgg gtatgtgtag	3660
tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagaggggaa acgccccgtt	3720
ttatatctgt aggggtatit tacattcaaa aatgtatgtt ttttttctt ttcaaaatta	3780
aagtatttgg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa	3840
ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca	3900
cagttttaag atgatgcaga tttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattitct	3960
gtaacttaaa aaaaaatcca cagtttttaa ggcaataatc agtaaatgtt attttcaggg	4020
actgacatcc tgtcttttaa aagaaatgaa aagtaaatct taccacaata aatataaaaa	4080
aatcttgtca gttacttttc ttttacatat ttgtctgtgc aaaattgttt tatatcttga	4140
gttactaact aaccacgctt gttgttccta tgtgcttttc tttcattttc aattctggtt	4200
atatcaagaa aagaataatc tacaataata aacggcattt ttttttgatt ctgtactcag	4260
tttcttagtg tacagtttaa ctgggccccaa caacctcgtt aaaagtgtaa aatgcatcct	4320
tttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taattcaggg tgaaattata	4380
ggctgttttt tgaagtgagg aggttggtccc catatactga ttagcaatat ttaatataga	4440
tgtaaatat gacctcattt ttttctcccc aaagttttca gttttcaaat gagttgagcc	4500
ataattgccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggcttc ctgagcatgg	4560

ccctacactt ctgatacagga gcaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc	4620
gcatcagagg tggcttgcgc acatatgcat tgaacggtaa agagaaacag cgcttgcctt	4680
ttcactaaag ttgactatit ttccttcttc tcttacacac cgagattttc ttgttagcaa	4740
ggcctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagt tttgttttg ttttgccttt	4800
ctctttaaca ctgaagatca tttgtcttaa ataggaaaa gaaaatccac tccttacttc	4860
catatttcca agtacatatc tggtttaaac tatgttatca aatcatatit caccgtgaat	4920
attcagtggga 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 gttacaaatt catgcagttt gcactcttag tcactttccc ctgacacacc	5220
aatagaatgt tagacaaagc cagcactgtt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt	5280
gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga	5340
cttattttta agaaaacagg ttgtgtttgg tctgctaag ttctggccag tttatcatct	5400
ggccttctctg cctatttttt acaaaacacg aagacagtgt gtaacctga catittgacc	5460
ttcctttatg tgctagttaa gacaggctcc tgaatccaca cttatttttg cttacaaaaa	5520
gtcttaatat taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt	5580
tctttccttt tttttttttt ttcctcatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag	5640
cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaaa agcatctgat gaaagatttt aggcaaacat	5700
tctcaaaata agagtgatat tctggatgia gttattgcag ttatctcatg acaaatgagg	5760
cctggattgg aaggaaaata tagttgtgta gaattaagca ttttgatagg aatctacaag	5820
gtagttgaat ataataagca ggtttgggcc cccaaacttt agaaaatcaa atgcaaaggt	5880
gctggcaaaa atgaggtttg agtggctggc tgtaagagaa ggttaactcc tagtaaaagg	5940
cattttttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caaacaata	6000
catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aaatcctgag taagtgccat tcattacaat	6060
aagtctctaa atttaaaaaa aaaaaaatca tatgaggaaa tctagctttc ccctttacgc	6120
tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcctttc attccaatta cagaactgag	6180
cccactcgca agttggagcc atcagtggga tacgccacat tttggaagcc ccagcatcgt	6240
gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaatc	6300
atcattatta ttattatttg cagtcatgga gaaccaccta ccctgactt ctgttttagtc	6360
tcctttttta ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct attaaatgta gtagttaact	6420

atgcctcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa gcgcactcct gcttttcgat	6480
ttatggtgtg tgcaagtaaa caggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaaa	6540
ttcactgaaa ttacaaagat acatatatat gcatatatat aatggaaaagt ttcccggaat	6600
gcaacaatta gcatttttaa atcatatata ggcatgcaca ttctaaatag tactttttca	6660
tgcttcattg tttctctggc agataatfff actaagaaga aaaatagata ttcgactccc	6720
cttcctaaa caaatccacg ggccagaggt ccagcggagc cgagccccct ggttttctcg	6780
taggccttag acggtgttgc atttatcagc gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata	6840
gctgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaaat acaaagtt	6878
<210> 2	
<211> 2656	
<212> DNA	
<213> Homo sapiens	
<400> 2	
gaggctttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttggcc	60
tccccctccc ccttttctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt	120
ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tctccagtc gggtgcacc	180
tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa	240
aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt	300
gccaaggccc gcgcccccgc gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg	360
cgcgcgccct gcctgcagcc cgggcccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca	420
gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggcccggc tctccagct tcgcccgccg	480
agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct	540
cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc	600
gtgagcaggg gggaggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt	660
gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgcgccagcc	720
cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagccc ctggcccctc tctgcagcc	780
catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaattggcat cagaactggc	840
aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttga	900
tctgatgaag tttagagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg	960
cggccgtctc atcgccgggg gctcgtctgc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc	1020
ggtgccccct tccccagct tctcgccgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc	1080



gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctacccgcag cagctgaacc ccgaggcgct	1140
gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg	1200
cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc	1260
cggcgccctc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccg tgggtgtccgc	1320
cgtgatcgcc gcggccgccg cgcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca	1380
ccacgccgcc ggccaccacc accacccgac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc	1440
ggccgcctcg gccggtggcg ctggggcgcg ggccggcggt ggcccgcca gcgtggggg	1500
cggcgcgccg ggccggcgcg gcggagggcg cggggcgcg gcggggcgcg gggcgccct	1560
gcaccgcac cagccgccg gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct	1620
ggtgaccatg tctgtgcgc agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt	1680
gatccggctg aagcagaaga ggccgaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtctgccg	1740
cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca	1800
agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga	1860
gaaatacgag aagtgtgtga gcagcggctt ccgagaaaaac ggctcgagca gcgacaaccc	1920
gtcctctccc gaggttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata	1980
cgccacattt tggaagcccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcacaa aatgaaattt	2040
gtgtgagagc tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcattgaga	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 ctaaatagta ctttttcatt cttcattgtt tctctggcag ataattttac	2460
taagaagaaa aatagatatt cgactccct tccctaaaca aatccacggg cagaggctcc	2520
agcggagccg agccccctgg ttttctcgta ggccctagac ggtgttgcat ttatcagtga	2580
tgtcaaactg gtcattttgt 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 ccccttgctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt	120
ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggtgcacc	180
tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa	240
aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt	300
gccaaaggccc gcgccgccc gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg	360
gcgcgcgcct gcctgcagcc cgggcccggcg aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcga	420
gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggcccggc tcctccagct tcgccgccgc	480
agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct	540
cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggcccgggc gagcgaggga gcacattggc	600
gtgagcaggg gggaggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg caggcgggg gggtgtgtgt	660
gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc	720
cggaagctg gctcacccgc tggccacca gcacagccc ctggccctc tcctgcagcc	780
catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cgccgcgagg agaatggcat cagaactggc	840
aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttga	900
tctgatgaag ttgaaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg	960
cggcgtctc atcgccgggg gctcgtgtc ctccacccc atgagcacgc cgtgcagctc	1020
ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc	1080
gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgaggcgct	1140
gggcttcagc cccgaggacg cggctcaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg	1200
cggcttcgat ggetacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggcgg gggccggtgc	1260
cggcgcctcc ttggggcgca gcggcgagga gatgggccc gccgcccgcc tgggtgtccgc	1320
cgtgatcgcc gcggccgccc gcagagcgg cgcgggccc cactaccacc accaccacca	1380
ccacgccgc gcccaaccacc accacccgac ggccggcgcg cccggcgccc cgggcagcgc	1440
ggccgcctcg gccggtggcg ctgggggcgc gggcggcggt ggcccggcca gcgctggggg	1500
cggcggcggc ggcggcggcg gcggaggcgg cgggggcgcg gcgggggcgg ggggcgcct	1560
gcaccgcac cagccgccc gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct	1620
ggtgacctg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt	1680
gatccggctg aagcagaaga ggcggacct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccg	1740
cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca	1800

agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagaggacg cgtacaagga	1860
gaaatacagag aagttggtga gcagcggtt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc	1920
gtcctctccc gagtttttca tgtgagtctg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa	1980
gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctcgccac	2040
cacctcacca cccccaccc caccgagttt ggcccccttg gccccctaca cacacacaaa	2100
cccgacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acaccccaca ccctgctcga	2160
gtttgtggtg gtggtggctg ttttaaacgt gggaggggaat ggggtgtctgg ctcatggatt	2220
gccaatctga aattctccat aacttgctag ctgtgttttt tttttttttt acaccccccc	2280
gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagtcttc atgtgaaacg	2340
ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttt ttcttcttcc ccttcagttc	2400
atgaactggt gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat tttgtttgga tttttttttt	2460
taattttact ttiagagctt gctgtgttgc ccaccttttt tccaacctcc accctcactc	2520
cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa gcaaagtttt ttttcttct	2580
cctgagtctt tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aaaatgtgaa atgttataga	2640
cttgacgctg gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga	2700
aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca acctctggg tgtgacttgt	2760
gagttttggc ctgtgatgc caaatctgag agtttagtct gccattaaaa aaactcattc	2820
tcatctcatg cattattatg ctgtctactt tgccttagca 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 gagccttctt cccatgaaat ttgcatctg ctccaaaact	3120
gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga aggcatctct tgtcaaagat	3180
accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt	3240
taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagtcta	3300
aaattttatt tttaaaaaga gaaactgcc cattattttt ggtttgtttt atttttattt	3360
tatatTTTTT ggcttttggc cattgtcaaa tttggaatgc tctgggttcc tagtatataa	3420
tttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat gtatgctaca gataaaggaa	3480
tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgttttagct tagatttttt aaacgattga	3540
tgactaaat tgtttactat tgtgatgtta aggggggtag agtttgcaag gggactgttt	3600

aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaata ataagttggg tatgtgtagt	3660
ctttgctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta agaggggaaa cgcccctgtt	3720
tatatctgta ggggtatatt acattcaaaa atgtatgttt ttttttcttt tcaaaattaa	3780
agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag catataatac aaaaaaaat	3840
tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta taaaaatggc attactgcac	3900
agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg	3960
taacttaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca gtaaatgtta ttttcaggga	4020
ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt accacaataa atataaaaaa	4080
atcttctcag ttacttttct tttacataatt ttgctgtgca aaattgtttt atatcttgag	4140
ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct ttcattttca attctggtta	4200
tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt tttttgattc tgtactcagt	4260
ttcttagtgt acagtttaac tgggccaac aacctcgta aaagtgtaaa atgcatcctt	4320
ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag	4380
gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat	4440
glaaattatg acctcatatt ttttccccca aagttttcag ttttcaaatg agttgagcca	4500
taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa ctaggcttcc tgagcatggc	4560
cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga ggagccggac aaatatggcg	4620
catcagaggt ggcttgcga catatgcatt gaacggtaaa gagaacacgc gcttgccttt	4680
tcactaaagt tgactatttt tccttttctt cttacacacc gagattttct tgttagcaag	4740
gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgt ttgttttgt tttgcttttc	4800
tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag aaaatccact cttacttcc	4860
atatttccaa gtacatatct gggttaaaact atgttatcaa atcatatttc accgtgaata	4920
ttcagtgagg aacttctcta cctggatgag ctagtaatga tttcagatca tgctatcccc	4980
agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg ctgtgctttg atttactggt	5040
atttacccca aaataggctg tgtaatggggg ctgacttaaa gatcccttgg aaagactcaa	5100
aactaccttc actagtagga ctctaagcg ctgacctatt tttaaatgac acaaattcat	5160
gaaactaatg ttacaaattc atgcagtgtt cactcttagt catcttcccc tagcacacca	5220
atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaaaatata gccaaacacg atgacttttg	5280
ttttgttttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat tgcaactctg actgaaagac	5340

ttatttttaa gaaaacaggt tgtgtttggt gctgctaagt tctggccagt ttatcatctg 5400  
gccttcctgc ctatttttta caaacacga agacagtgtg taacctcgac attttgacct 5460  
tcctttatgt gctagtttag acaggtcctt gaatccacac ttaattttgc ttaacaaaag 5520  
tcttaatagt aaacctcccc tcatgagcct 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 tgcaaagggtg 5880  
ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag gtttaactcct agtaaaaggc 5940  
attttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag tgggagtagc aaacaaatac 6000  
atgttttttt tttcttacaaga aactcctta aatcctgagt aagtgccatt cattacaata 6060  
agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctagctttcc cttttacgct 6120  
gcgtttgata tttgtctaaa tagtgttaaa attcctttca ttccaattac agaactgagc 6180

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

caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat tctaaatagt actttttcat 6660  
gttctattgt 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

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 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 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 aggctggtag accttcccag gaattctcac tgaagaaaac atctggattt	120
tttacatctc ttgtgcaaaa caaacaaga tttcattaag tgatgtatat tgttttccaa	180
ggaagaaacc tgcagagaca aaaacaaata agcaaataat tgaacaaaa atatgataaa	240
ccccaaatt cttccagtc taatttactt gttatcatgg ttctctacaa aggagagat	300
cactaattac aggtttttcc agaattcaca tttcacgtca agatcatcca atccaaacag	360
tgtacggaaa gcctagggcc ttcttcactt tgccccctac cccacctac acacagccc	420
ccatctaaat gatacccttg gaaagaaacc tacacatctc attgtctat attttgcctc	480
ctccctcgcc tcccggtaac caaatgtgag ttgttctcta actgcactgg agaatacaga	540
tttattgtac atatgtttgt gttccactta ataaaaaac ctatatatta agataaactt	600
tgtagtaaat tcatgaggta agtgactatt tatgctaate aggagaaat atattctcaa	660
gcataatgca ttacataaat ttgaatgtaa aatgttcaat tatgaagtaa atacaggtaa	720
tgcaataat aaattacctc taataaaaaat tataaaagat gtgccttgaa agagagagcg	780
gctttaactt acaactgtga attgcttaaa gagaaaagaa ttaataaatg ctgaattact	840
ctgatgatta ttagcacat aattcacctt ttcataacga ctctagtaa tcagactgtt	900
gtttcacatc ctccaacatg aggcaagact gtttctcag caattttgcc cttatcagat	960
tatctcgtct gattctatta attttcttc atgaatctgc taacagtgat ttgtgattta	1020
cttacctgc taactgaaga ctgttaaaag gatttatcta acactggacc taagaacagt	1080
gtacgcctta tcgttcagtt actctgaaga actctttctc aaatcaattt agttggtttc	1140
atagtgaat ttagtgaca ctggttagtt ctgcccata aaatcagccc ctaacaaaag	1200
agtccagaca ccatacctga tgcacccat tctattcaga ttatggatgt ctgattccaa	1260
catgatatat ttgagttgct ataactcaca atcggggaaa atatattcct ttaagctttt	1320
aatctttgta atttgacat gaacaggggt ttgtttttc atttttgcat gaagtcatta	1380
tgtagtact gacgtgaaac tataattgtg ttctgatgt tactgtgtca caatattcta	1440
tgcatgtaa ccatgtcct cctccccctc acaaatctcc tataaatatt cattgctttc	1500
aaaaacttta atactactgg tccgaattgg tcaataatga caaatgcatg gtttctaaat	1560
tactgtatat tttctacag agattactag agtatatata gcaaggggat gtttaagcagt	1620
aagaaaacac agttcacatt gtatttgat tagattggct tggatagaag tgaacaaac	1680
aatgttagca aagaagtcta aagacatgtg gccactgta attgtacaga atcaaaaacc	1740

tgaatagtac tcattaaaaat gagagagctc aattgttata aaagaaatgc tgctaacaga	1800
gaactgtaaa tgtttagaca ccctgtgaa tcactaaata ataatgtaaa aaggataaaa	1860
atgagaatta agttataagc ctgagagcat tactgctaca catctaaaaa aataattctg	1920
atcctctctt ttttttttcc aagagaaaaat gggcgactat aaaagacctt gcaataagag	1980
aaataaaaaat accatgtctt cacagcagtg tacataaata aaccataaaa atgtgcagat	2040
aataatatat ttagctgccc aaacatgggc atttaatttc tagaaatgat atataacaat	2100
glaacaatta gatactcagc catgaatgtg tatggcacag tcttcatcat tagcaaactt	2160
tgtgtataaa atattattta ttatttatta taatactgct ttcagaggca atgatcatac	2220
cttacagctt ttaacacaaa tatgatgcaa aaggattaaa agtatatcat aaacaacaa	2280
taaattcttt ctaaatacac ttaaattcat attttacatg aaaaataaa acttcctaca	2340
tttgtgacta ctgactttta aaaagacctt gaaaactatt gttacgggca atgttaaatz	2400
acataatgct tatgtaatgg aaagtgtgga ttttcctcta aataaactat aatccctta	2460
cttcattact agggaaaaata ttgttaaaga gaaggaaagc aagggaattc tgctaggttg	2520
cataaatatt gacataatct tcaactcttc tcccccaaac tggtaataga catagtatat	2580
tccaccaaac aaaaatgctct tataagacca aaactaccct tattaacaac ttctctgcag	2640
tcacgatgaa aagaaacact acttgtctga aaaataccga cagcgtgcc cttttcagat	2700
taggggtgtc ctacgaatct ttgggaagt ctccattaa ggattcctgg gtttgctgaa	2760
actgaagtct actaggatca gagaattaa cacaggtcta atatggtgca aggaacgagt	2820
gagagacacc tgaggttata aatagcaaag catgctgcgg ggtggggaag accattctga	2880
agtgcaatgt tcaagacgct ggcttaatat atgactaagt gtcagaagtc aggttttctg	2940
agaattactt tccagataaa caactttata gcaactgact taatcttact tactagagac	3000
atctcattta tcaactgaatt acaagtaact ttaatcctat tgatattgcc ataaagcccg	3060
ttgaaaatcc atcctggcac ttttaaaggg ttggggccc tgttacatgg ggatcctctt	3120
gcaaaggctc cagccagaaa ttacaccccg aggggtgtctg tatccctgg cctctttgtc	3180
aacaatcaag gagaagagga ggggcaaaaa tgatctctgc atctgccagc actttcttcg	3240
gcccctttcc tatagggtcg ggttctccca cttcagtcaa actaactttg tgtgtctctt	3300
tcctctccc acactgggta accagctgct ttcaacttca tcgacaaaac tggacacgga	3360
tcaatttcaa ctgacctttg ccgaaaggig gcgctgttga ggtaaaaacc aactcgtccc	3420
aacaatagtt tccactcttc gatccttttg caggcttttc agaatttttt tttttttta	3480

atgcaccctc ctacgtctc ccccttctca taaagtaaaa taaatacgat taaaaacacc	3540
aatgcattt cattaatga aggaatcaac agtcccaact tctaagcaga cgggctggtc	3600
ttccaaaggc tgggtcgggt tcaggagctt tctctccaaa taaatctctg cttcttcgac	3660
ttgcctatcg ctttaaaatc ttagaacacag agttagttgt tggtttcctt ctttttctt	3720
tttctttttt atttctttt tgcataaact tttagagaat caatctagaa atttgaacta	3780
cttattagca tttgcaactg ggggtggggg gagcagcctc cccacacca cccccactc	3840
tgcgtttccg gactagtcc agaaaccgcg gtttaaaatt taacccttcg agggtagctg	3900
gtgagggtg gggatattgt tttccctt gtccttgcc acgatcaagt ccgaaataat	3960
taaaggaaac gtaaaagtgc aaaggcgcg cctgacctg ataacagag gtcagatttc	4020
gtaaggggac gggtagtgt gagtgtgtgt gtgtttgtgt gtgtgtgtgt aagagagaga	4080
gagagcgagc gcgcaatat agtctcaaag gccaaactcc ggccagtcag gagccggaag	4140
gctgagcccg gctgacctga ctttagctt ccccgagtt atctcgata ggcgctcgct	4200
ctgtccaagg gcacgcgacg ccagcgggca gccggtctcc gtgaagaatg gcctctaac	4260
aacttatatt accctgtgt aaagagaggg ataaaatggg ctttccctct ccacggatgc	4320
ccagccttct gggcaggcgc atggccgggc ggcgccagc ccgcagcccc gatccggaca	4380
ccccactgca tccctccctt cccgtccct tccccgcacg ggcgcccgag agacggacaa	4440
agagttgggg ccaagtttga gcgccgggca cggccaggct cagggaagga aggtccccgg	4500
cagacacctg ggtaccagag ttggtcgcg gaggaagc tgggagcgca attcacaatc	4560
ctgggggtgg agggcaggca ggggagggga atcaggccaa tcccagccga gtgagcccc	4620
agcagctgg ggtccggat gggagggctg tctcgctc caaagaaaag caaacgccc	4680
tcccaggtcc gcccgattg ccgaagcccc tctggaaaaa ctcttcccc tcttacacca	4740
aactttgcgc cgggcctcgt tccctcccgg gtaggcagcg gcgcaggaag ggttaagcca	4800
gcccgtccca gctgacagtc agctgattgg gccctgattg acagctccga aaagtttctt	4860
tgtttctata ctattatgct aatcgcgcc gctctcgcc cctccattg gcccgagtg	4920
ccagtcaatt tctcatttgg acctgacgtc acgagtgcta taaaactcag caattgcttt	4980
aaactcttct tgctggatca gaggtttta aatcttttt catcttctag ctgtagctcg	5040
ggctgcttgt cggcttgcc tccccctcc cctttgctc tctgcctcgt ctttccccag	5100
gacttcgcta ttttgccttt ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc	5160
tcctccagtc gggctgcacc tctgccttgc actttgcaca gagtagaga gcgcgcgagg	5220
gagagagagg aaagaaaaa aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca	5280
tgaagtgtta actccccgt gccaaaggccc gcgccgccg gacagacgcc cgccgcct	5340

ccagccccga gcggacgccc cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc 5400

ttccttatgc aaagcgcgca gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc 5460

tcctccagct tcgccccgc agccaccacc gccgccaccg cagctcgcg aggatcttcc 5520

cgagcctgaa gccgccggct cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc 5580

gagcgaggga gcacattggc gtgagcaggg gggaggagg gcggcgcgcg gggcgcggg 5640

caggcgggg ggggtgtgt gtgagcgcg tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc 5700

aagctagaag cccccagcc cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagccc 5760

ctggccctc tcctgcagcc catctggcg agcggcgcg gcggcgcgcg cggcgcgagg 5820

agaatggcat cagaactggc aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg 5880

gaatatgtta atgacttca tctgatgaag ttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc 5940

gaccgcatca tcagccagtg cggccgtctc atcgccgggg gctcgctgtc ctccacccc 6000

atgagcacgc cgtgcagctc ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc 6060

tcgggcagcg agcagaaggc gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag 6120

cagctgaacc ccaggcgct gggcttcagc ccgaggacg cggtcgagcg gctcatcagc 6180

aacagccacc agctccagg cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc 6240

gcggcgggcg gggccgtgc cggcgccctc ttggcgggca gcggcgagga gatgggccc 6300

gccgccggcg tgggtgtccg cgtgatcgcc gcggccggcg cgcagagcgg cgcggggccc 6360

cactaccacc accaccacca ccacgccgc ggccaccacc accaccgcg gccggcgcg 6420

cccggcgccg cgggcagcgc ggccgcctcg gccggtggcg ctggggcgcg gggcgcggt 6480

ggcccggcca gcgttgggg cggcgcgcg gccggcgcg gcggagcgg cggggcgcg 6540

gcggggcgcg gggcgccct gcaccgcac cagccgccg gcggcctgca cttcgacgac 6600

cgcttctccg acgagcagct ggtgacctg tctgtcgcg agctgaacc gcagctgcgc 6660

ggggtcagca aggaggagt gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc 6720

ggctatgccc agtcctgcc cttcaaggagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtggag 6780

aagaaccagc tgctgcagca agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc 6840

gagagggacg cgtacaagga gaaatacgag aagtgtgtga gcagcgctt ccgagaaaac 6900

ggctcgagca gcgacaacct gtectctccc gagtttttca tgtgagtctg acacgcgatt 6960

ccagctagcc accctgataa gtgctccgc ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt 7020

tctagagcca tgctgccac cactcacca ccccccccc caccgagttt ggcaccttg 7080

gccccctaca cacacacaaa ccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac 7140

acacccaca ccctgctcga gtttgtggtg gtggtggctg ttttaactg gggagggaat 7200

gggtgtctgg ctcatggatt gccaatctga aattctccat aacttgctag ctgtttttt	7260
ttttttttt acaccccc gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc	7320
agagtctctc atgtgaaacg ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc	7380
ttcttcttcc ccttcagttc atgaactggi gtctattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat	7440
tttgtttgga ttttttttt taattttact tttagagctt gctgtgttgc ccaccttttt	7500
tccaacctcc accctcactc cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaa	7560
gcaaagtttt tttttcttct cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa	7620
aaaatgtgaa atgttataga cttgcagcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca	7680
ttgttatgct aaaatagaga aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca	7740
accttctggg tgtgacttgt gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct	7800
gccattaaaa aaactcattc tcatctcatg cattattatg cttgtctactt tgtcttagca	7860
acaatgaact ataactgttt caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa	7920
aaaaagcctg catgctggac atgtatggta taattatttt ttcctttttt tttccttttg	7980
gcttggaat ggacgttcca agacttatag catggcattc atacttttgt tttattgcct	8040
catgactttt ttgagtttag aacaaaacag tgcaaccgta gagccttctt cccatgaaat	8100
tttgcatctg ctccaaaact gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga	8160
aggcattcct tgcataagat accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag	8220
aactcttaat gttttctttt taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc	8280
tattgccgag aagcagtcta aaatttatit tttaaaaaga gaaactgccc cattattttt	8340
ggtttgtttt atttttattt tatatttttt ggcttttggg catgttcaaa tgtggaatgc	8400
tctgggtttc tagtatataa ttttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat	8460
gtatgctaca gataaaggaa tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgttttagctg	8520
tagatttttt aaacgattga tgcactaaat tgtttactat tgtgatgtta aggggggtag	8580
agtttgcaag gggactgttt aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat	8640
ataagttggg tatgtgtagt ctttgctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta	8700
agaggggaaa cgccctgtt tatactctga ggggtatttt acattcaaaa atgtatgttt	8760
ttttttcttt tcaaaattaa agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag	8820
cataataac aaaaaaaaaat tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta	8880
taaaaatggc attactgcac agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg	8940



gtgcagaact ggattttctg taacttaaaa aaaaatccac agttttaag gcaataatca	9000
glaaatgtta ttttcaggga ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt	9060
accacaataa atataaaaa atcttgtcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca	9120
aaattgtttt atatcttgag ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct	9180
ttcattttca attctgggta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt	9240
tttttgattc tgtactcagt ttcttagtgt acagttaaac tgggccaac aacctcgta	9300
aaagtgtaaa atgcatcctt ttctccagt gaaggattcc tggaggaata gggagacagt	9360
aattcagggt gaaattatag gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat	9420
tagcaatatt taatatagat gtaaattatg acctcatttt tttctccca aagttttcag	9480
ttttcaaatg agttgagcca taattgccct tggtaggaaa aaaaaaaca aacagtggaa	9540
ctaggtcttc tgagcatggc cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga	9600
ggagccggac aaatatggcg catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa	9660
gagaaacagc gcttgccctt tactaaagt tgactatttt tctttcttct cttacacacc	9720
gagattttct tgttagcaag gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgt	9780
tttgttttgt ttgcttttc tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag	9840
aaaatccact cttacttcc atatttccaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa	9900
atcatatttc accgtgaata ttcagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga	9960
tttcagatca tgctatcccc agaaataaaa gaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg	10020
ctgtgctttg atttactggt atttacccea aaataggctg tgtatggggg ctgacttaaa	10080
gatcccttgg aaagactcaa aactaccttc actagtagga ctctaagcg ctgacctatt	10140
tttaaatgac acaaatcat gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt	10200
catcttcccc tagcacacca atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca	10260
gccaaacacg atgacttttg ttttgttttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat	10320
tgcaactctg actgaaagac ttatttttaa gaaaacaggt tgtgttttgt gctgctaagt	10380
tctggccagt ttatcatctg gccttcctgc ctatttttta caaacacga agacagtgtg	10440
taacctcgac attttgacct tcttttatgt gctagttag acaggctcct gaatccacac	10500
ttaattttgc ttaacaaaag tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt	10560
gttcttgact tcagatatit ctttctttt ttttttttt tctcatcac aactaagaga	10620
tacacaaact ctgaagaagc agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg	10680
aaagatttta ggcaaacatt ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt	10740
tatctcatga caaatgagcg ctggattgga aggaaaaat agttgtgtag aattaagcat	10800

tttgatagga atctacaagg tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaaacttta	10860
gaaaatcaaa tgcaaagggtg ctggcaaaaa tgaggtttga gtggttggt gtaagagaag	10920
gttaactcct agtaaaaggc attttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag	10980
tgggagtagc aaacaaatac atgttttttt tttcttacaa agaactccta aatcctgagt	11040
aagtgccatt cattacaata agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat	11100
ctagctttcc cctttacgtg gcgtttgatc tttgtctaaa 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 tcaactgaaat tacaaagata catatatatg catatatata	11580
atggaaagt tcccggaatg caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat	11640
tctaaatagt actttttcat gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa	11700
aaatagatat tcgactcccc ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc	11760
gagccccctg gttttctcgt aggccttaga cgggtgttga tttatcagtg atgtcaaacg	11820
tgctcatttg tcagacatag ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttagt	11880
taaatacaca ccctctgtgt gattttttgc tcccttttct tttttgctcc tactcaaaaa	11940
aaaaaaaaac accctcttta catttccctg gcttcttgca tgtttccctt ttcaaaaacc	12000
atgtaataat tttttacaat gtatctgaca cattaatata ttgacatcaa ataggcagac	12060
attctacttt tgcttgcaa ataaatctgc tacggagaca tcatttctc actgtctcaa	12120
agccataact acctgggagt ctttcaacac agaccctcc gatgggaaat gctgtttatt	12180
actgaatgca ggatgctcac gctctgatct tttctccctt gtgcctttac cccagtcatt	12240
tttacttagc aacaccaatt ctagatactt ctgttctgaa gtagaaccac ccccttgcca	12300
cactgccagt tttctgcta aaagcagtgg acagaagaca gatcatggtc accctcacia	12360
acatggcaca cagctgtctc ggtagctgca ttcccagcat gtcttggtct aaatatctag	12420
agttgcctat gacacgttca aaggttccca agcacagtac attgggaggc ttttgctgct	12480
giggccgttg ttttcgttta ggccaactta cttccgtatt cacatactct tggctttacg	12540
aaatacactc ctccagtcta ctaggccaat caatatatit aaaagtctga ttgccacata	12600
agtctctctc tcctcttttt tgtttttgtt ttgtttgttt ttttctgttt tggctgccgg	12660

tagttaaaga ctgagatagg ttggaagact aaaatacagg agtacatgag tgacaacctt	12720
cagccgtctg atttccatgc cggtaaaaca cacaaccaag ctcttcttag cgctgctaata	12780
ataaacattc actaagaggg aataggaagt gagatttacc agcttcactt tgctgatttg	12840
caagggtccc cactacgatt cactgtcatt tgatttttga aaaataattt tgtccgtctc	12900
tttgaagaaa tgtcttagtt cttttatttt gtttgtttgg ttttttttag agaagtttta	12960
tctgcagtga taggctacaa tttttatctc cgctgattat ttgtcaggat gctgaatgaa	13020
taatttggtc ctgtgccttc cttgttgttc tgaggaaaat aagagaaact tggagtttg	13080
tttactctt agcccatcct aaatctaaaa gaagatgtcc caggtcagg caggccatgt	13140
agtagttata aaggaggtgg tccaggcca gccacctcaa tcaggatttg ttgttttga	13200
agcatttgc taaaagcgga gcaagagtct taaccaact tgccataaca ctgcttttct	13260
cgcttttgat gtaaattctc aaaattcaga catcaaacag cccagaaaaa ggggaattct	13320
ctccaggcat tgctccgcc cagctcctga acaaaccag ctctgtctag ctttttttc	13380
cctagcgggg gtaggggaca gggtagaga atttcagtct cccaggctgt ctcattgattg	13440
ttaggcata aagaaacaca gtctgtccac aaattgggag catctttacc ctttagagag	13500
aaacaaaaca aaactaaca aacaaatcaa attgctttgc atgaaggcgt agcaaataaa	13560
atctcgggct cctgttccc tgcaccattt gtaggaggtg agaaatgagg gaaacaagag	13620
aaagggaac tttaaaagcg ggaggcccag aaataatccc tgtiaccagt ctgaatttca	13680
cttgctccgt ggctaacgtc agacctagtg tgcattgatg ccagaagtaa actaggtctc	13740
gctgtccatt tctttaaaat atgttcacat gtttctttt tgaaaacaat tttggggact	13800
aaacccaaat ggagagattt gaggaatcg ttaatgtctt aacatttgag tatatttata	13860
aatgtatcag tctgtgat	13878