



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0122731
(43) 공개일자 2015년11월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12Q 1/6886 (2013.01)
A61K 38/17 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7026432
- (22) 출원일자(국제) 2014년03월14일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년09월24일
- (86) 국제출원번호 PCT/IB2014/001253
- (87) 국제공개번호 WO 2014/140933
국제공개일자 2014년09월18일
- (30) 우선권주장
61/801,718 2013년03월15일 미국(US)

- (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 컴페니즈
- (72) 발명자
고미스 로저
스페인 이-08021 바르셀로나 씨/아베니르 35
플래닛 에바리스트
스페인 이-08360 바르셀로나 카넬 드 마르 씨/드
라이브 기테라스 17
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
김진희, 김태홍

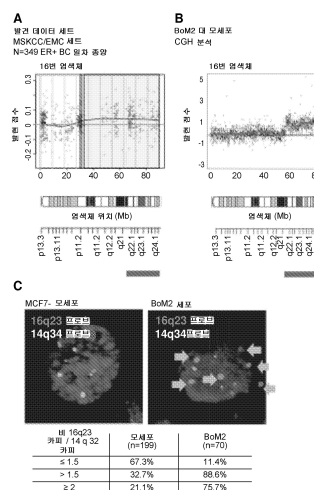
전체 청구항 수 : 총 69 항

(54) 발명의 명칭 암 전이의 예후 및 치료 방법

(57) 요약

본 발명은 프로브를 사용하여 관심 유전자가 일차 종양 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 암에서 골 전이를 예후하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 프로브를 사용하여 관심 유전자의 발현 수준, 또는 관심 유전자의 증폭 또는 전위를 측정하는 단계를 포함하는, 다른 장기에서의 전이에 비해 골 전이를 일으키는 경향을 측정하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체에서 이른 골 전이를 예측하는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 암 전이의 치료에 사용되는 치료제로서의 c-MAF 억제제에 관한 것이다. 본 발명은 골 전이를 예측하고 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 키트에 관한 것이다. 마지막으로, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체를 유형분류하고 암을 앓고 있는 대상체를 코호트(cohort)로 분류하는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 39/395 (2013.01)

A61K 48/00 (2013.01)

G01N 33/574 (2013.01)

C12Q 2600/106 (2013.01)

C12Q 2600/112 (2013.01)

C12Q 2600/118 (2013.01)

C12Q 2600/156 (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-08012 바르셀로나 플라카 델 줄 19-20

엔트. 3에이

타라고나 마리아

스페인 이-08006 바르셀로나 씨/아리바우 212 6°
3에이

명세서

청구범위

청구항 1

암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향을 예측하는 시험관내 방법으로서,

- (i) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- (ii) 단계 (i)에서 획득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이에 대한 양성 진단 또는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는 것인 시험관내 방법.

청구항 2

암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법(customized therapy)을 디자인하는 시험관내 방법으로서,

- (i) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- (ii) 단계 (i)에서 획득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 암의 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하도록 의도된 요법을 받는 것에 수용적인(susceptible) 시험관내 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 전이가 골 전이인 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 골 전이가 골용해성 전이인 방법.

청구항 5

골 전이와 함께 암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서,

- (i) 상기 대상체의 골 전이성 종양 조직 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- (ii) 단계 (i)에서 획득된 발현 수준을 대조군 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준과 비교하는 단계

를 포함하고, 여기서 종양 조직 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 분해를 예방하거나 억제하도록 의도된 요법을 받는 것에 수용적인 시험관내 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 골 분해를 예방하거나 억제하도록 의도된 요법이 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH, PTHLH 억제제(중화 항체 및 펩티드를 포함함), PRG 유사체, 스트론튬 라넬레이트(strontium ranelate), DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 칼시토닌, 라툼-223, CCR5 길항제, Src 키나제 억제제, COX-2 억제제, mTor 억제제 및 카텝신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, RANKL 억제제가 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오프로테게린(osteoprotegerin)으로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, RANKL 특이적 항체가 데노수맙(denosumab)인 방법.

청구항 9

제6항에 있어서, 비스포스포네이트가 졸레드론산인 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 유전자의 발현 수준의 정량이 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 또는 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보적 DNA(cDNA), 또는 상기 cDNA의 단편을 정량하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제10항에 있어서, 발현 수준이 정량적 증합효소 연쇄 반응(PCR) 또는 DNA 또는 RNA 어레이 또는 뉴클레오티드 혼성화 기법에 의해 정량되는 것인 방법.

청구항 12

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 유전자의 발현 수준의 정량이 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질 또는 이의 변이체의 수준을 정량하는 것을 포함하는 것인 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 단백질의 수준이 웨스턴 블롯, ELISA, 면역조직화학 또는 단백질 어레이에 의해 정량되는 것인 방법.

청구항 14

암을 갖는 대상체에서 전이를 진단하고/하거나 암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향을 예측하는 시험관 내 방법으로서, 관심 유전자가 상기 대상체의 종양 샘플에서 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 관심 유전자의 증폭이 전이의 존재 또는 전이를 일으키는 증가된 위험을 나타내는 것인 시험관내 방법.

청구항 15

제14항에 있어서, 관심 유전자의 증폭이 유전자좌 16q22-q24의 증폭을 확인함으로써 확인되는 것인 방법.

청구항 16

제14항 또는 제15항에 있어서, 관심 유전자의 증폭이 c-MAF 유전자 특이적 프로브를 사용함으로써 확인되는 것인 방법.

청구항 17

제14항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서, 기준 유전자 카피 수가 전이를 앓고 있지 않은 대상체로부터의 암의 종양 조직 샘플의 유전자 카피 수인 방법.

청구항 18

제14항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서, 증폭이 제자리 혼성화(*in situ* hybridization) 또는 PCR에 의해 확인되는 것인 방법.

청구항 19

제14항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서, 전이가 골 전이인 방법.

청구항 20

제19항에 있어서, 골 전이가 골용해성 전이인 방법.

청구항 21

암으로부터의 골 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위한 의약품의 제조에 있어서 관심 유전자에 대한 억제제의 용도.

청구항 22

제21항에 있어서, 관심 유전자에 대한 억제제가 c-MAF 특이적 siRNA, c-MAF 특이적 안티센스 올리고뉴클레오타이드, c-MAF 특이적 리보자임, c-MAF 억제 항체 또는 나노바디, 우성형질(dominant) 음성 c-MAF 변이체, 표 1 또는 표 2의 화합물, c-MAF 특이적 소분자, c-MAF 특이적 항체, c-MAF 특이적 항체 유사 분자, c-MAF 특이적 구조적으로 구속된 (환형) 펩티드, c-MAF 특이적 스테이플드(stapled) 펩티드, 및 c-MAF 특이적 알파바디(alphabody)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 23

암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 종양 샘플에서 관심 유전자의 상승된 발현 수준을 갖는 대상체에서 골 전이를 치료하기 위한 의약품의 제조에 있어서 골 분해를 예방할 수 있거나 억제할 수 있는 작용제(agent)의 용도.

청구항 24

제23항에 있어서, 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 작용제가 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH, PTHLH 억제제(중화 항체 및 펩티드를 포함함), PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, EGFR 억제제, 칼시토닌, 라툼-223, CCR5 길항제, Src 키나제 억제제, COX-2 억제제, mTor 억제제 및 카텡신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 25

제24항에 있어서, RANKL 억제제가 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포테게린의 군으로부터 선택되는 것인 용도.

청구항 26

제25항에 있어서, RANKL 특이적 항체가 테노수맙인 용도.

청구항 27

제24항에 있어서, 비스포스포네이트가 졸레드론산인 용도.

청구항 28

제24항 내지 제27항 중 어느 한 항에 있어서, 골 전이가 골용해성 전이인 용도.

청구항 29

암을 앓고 있는 대상체에서 암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 종양 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; 및 b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 기준 c-MAF 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트.

청구항 30

암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류(typing)하는 시험관내 방법으로서,

- 상기 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- 상기 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계;
- 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 미리 결정된 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하여 상기 샘플을 유형 분류하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 유형분류가 상기 대상체에서 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험관내 방법.

청구항 31

암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나, 억제하거나, 또는 감소시키는 방법으로서, 골 전이를 예방하거나 감소시키는 작용제를 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 작용제가 상기 대상체에서 관심 유전자의 발현 수준의 정량으로부터 결정된 치료 계획(treatment regimen)에 따라 투여되는 것인 방법.

청구항 32

암을 앓고 있는 대상체를 코호트(cohort)로 분류하는 방법으로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준을 미리 결정된 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 상기 샘플에서의 상기 관심 유전자의 발현 수준을 기초로 상기 대상체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 33

제6항에 있어서, RANKL 특이적 나노바디가 ALX-0141인 방법.

청구항 34

제6항에 있어서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제가 카보잔티닙(Cabozantinib)인 방법.

청구항 35

제24항에 있어서, RANKL 특이적 나노바디가 ALX-9141인 용도.

청구항 36

제24항에 있어서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제가 카보잔티닙인 용도.

청구항 37

제16항에 있어서, 유전자 특이적 프로브가 바이시스(Vysis) LSI/IGH MAF 이중 색채 이중 융합 프로브인 방법.

청구항 38

암을 앓고 있는 대상체를 위한 요법을 결정하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하기 위한 수단; b) 상기 샘플에서의 c-MAF의 정량된 발현 수준을 관심 유전자에 대한 기준 발현 수준과 비교하기 위한 수단; 및 c) 상기 정량된 발현 수준과 기준 발현 수준의 비교를 기초로 상기 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 감소시키기 위한 요법을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트.

청구항 39

i) 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하기 위한 시약; 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계가 있는 것으로 미리 확인된 하나 이상의 c-MAF 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트.

청구항 40

제38항 또는 제39항에 있어서, 발현을 정량하기 위한 상기 수단이 관심 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역에 특이적으로 결합하고/하거나, 관심 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역을 증폭하는 프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함하는 것인 키트.

청구항 41

암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 시험관내 방법으로서,

(i) 상기 대상체로부터의 종양 샘플을 제공하는 단계;

(ii) 상기 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계;

(iii) 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 미리 결정된 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교함으로써 상기 샘플을 유형분류하는 단계

를 포함하고, 여기서 상기 유형분류가 상기 대상체에서 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험관내 방법.

청구항 42

암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나, 억제하거나, 또는 감소시키는 방법으로서, 골 전이를 예방하거나 감소시키는 작용제를 상기 대상체에게 투여하거나 투여하지 않는 단계를 포함하고, 여기서 상기 작용제가 적어도 부분적으로 상기 대상체에서 관심 유전자의 발현 수준의 정량으로부터 결정된 치료 계획에 따라 투여되는 것인 방법.

청구항 43

암을 앓고 있는 대상체를 코호트로 분류하는 방법으로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준을 미리 결정된 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 상기 발현 수준을 기초로 상기 대상체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는 방법.

청구항 44

제43항에 있어서, 상기 코호트가 상기 기준 발현 수준과 비교하여 관심 유전자의 필적할만한 발현 수준을 갖는 것으로 확인된 하나 이상의 다른 개체를 포함하는 것인 방법.

청구항 45

제43항 또는 제44항에 있어서, 상기 샘플에서의 관심 유전자의 상기 발현 수준이 상기 미리 결정된 기준 수준에 비해 증가되어 있고, 코호트의 구성원이 골 전이의 증가된 위험을 갖는 것으로서 분류되는 것인 방법.

청구항 46

제43항 내지 제45항 중 어느 한 항에 있어서, 코호트가 임상 시험을 수행하기 위한 것인 방법.

청구항 47

암을 앓고 있는 대상체에서 암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서, 관심 유전자가 상기 대상체의 샘플에서 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하고, 여기서 관심 유전자의 전위가 골 전이의 증가된 위험을 나타내는 것인 시험관내 방법.

청구항 48

골 전이와 함께 암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서, 관심 유전자가 상기 대상체의 샘플에서 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하고, 여기서 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 관심 유전자의 증폭이, 상기 대상체가 골 분해를 예방하거나 억제하도록 의도된 요법을 받기 위한 후보자임을 나타내는 것인 시험관내 방법.

청구항 49

제48항에 있어서, 골 분해를 예방하거나 억제하도록 의도된 요법이 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH, PTHLH 억제제(중화 항체 및 펩티드를 포함함), PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 칼시토닌, 라툼-223, CCR5 길항제, Src 키나제 억제제, COX-2 억제제, mTor 억제제 및 카텡신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 50

제49항에 있어서, RANKL 억제제가 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포테게린으로 구성

된 군으로부터 선택되는 것인 방법.

청구항 51

제50항에 있어서, RANKL 특이적 항체가 테노수맙인 방법.

청구항 52

제49항에 있어서, 비스포스포네이트가 졸레드론산인 방법.

청구항 53

제23항 내지 제28항 중 어느 한 항에 있어서, 발현을 정량하기 위한 상기 수단이 관심 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역에 특이적으로 결합하고/하거나, 관심 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역을 증폭하는 프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 54

제29항 내지 제32항 중 어느 한 항에 있어서, 발현을 정량하기 위한 상기 수단이 관심 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역에 특이적으로 결합하고/하거나, 관심 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역을 증폭하는 프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 55

제41항 내지 제47항 중 어느 한 항에 있어서, 발현을 정량하기 위한 상기 수단이 c-MAF 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역에 특이적으로 결합하고/하거나, c-MAF 유전자, 16q23 유전자좌 또는 16q22-16q24 염색체 영역을 증폭하는 프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함하는 것인 방법.

청구항 56

제1항 내지 제28항, 제30항 내지 제37항, 및 제41항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 유전자가 MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA인 방법 또는 용도.

청구항 57

제56항에 있어서, 관심 유전자가 MAF인 방법.

청구항 58

제56항에 있어서, 관심 유전자가 VAT1L인 방법.

청구항 59

제56항에 있어서, 관심 유전자가 CLEC3A인 방법.

청구항 60

제56항에 있어서, 관심 유전자가 WWOX인 방법.

청구항 61

제56항에 있어서, 관심 유전자가 5sRNA인 방법.

청구항 62

제29항 및 제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 관심 유전자가 MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA인 키트.

청구항 63

제62항에 있어서, 관심 유전자가 MAF인 키트.

청구항 64

제62항에 있어서, 관심 유전자가 VAT1L인 키트.

청구항 65

제62항에 있어서, 관심 유전자가 CLEC3A인 키트.

청구항 66

제62항에 있어서, 관심 유전자가 WWOX인 키트.

청구항 67

제62항에 있어서, 관심 유전자가 5sRNA인 키트.

청구항 68

제1항 내지 제28항, 제30항 내지 제37항, 및 제41항 내지 제55항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 유방암, 전립선암, 폐암, 갑상선암 또는 신세포암종인 방법 또는 용도.

청구항 69

제29항 및 제38항 내지 제40항 중 어느 한 항에 있어서, 암이 유방암, 전립선암, 폐암, 갑상선암 또는 신세포암종인 키트.

발명의 설명

기술 분야

서열목록의 참조

본원과 함께 출원된, 전자적으로 제출된 서열목록("3190_008PC01_SEQIDListing_ascii.txt", 48,452 bytes, 2014년 3월 13일 생성됨)의 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입된다.

발명의 분야

본 발명은 유전적 기형(abnormalities)의 검출, 및 이에 기초한 암에서의 골 전이의 예후에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 본 발명은 프로브를 사용하여 일차 종양 샘플에서 관심 유전자의 수준을 측정하는 것을 포함한다. 또한, 본 발명은 예를 들면, 프로브를 사용하여 샘플에서 관심 유전자의 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암을 갖는 대상체에서 맞춤형 요법을 디자인하는 방법에 관한 것이다. 한 실시양태에서, 관심 유전자는 MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 및 5srRNA로 구성된 군으로부터 선택된다. 또 다른 실시양태에서, 암은 유방암, 폐암, 전립선암, 갑상선암 및 신장암으로 구성된 군으로부터 선택된다.

배경 기술

상이한 중추 장기들에서 종양 세포와 주변 정상 조직 사이의 정교한 상호작용에 의해 야기된 복잡한 과정인 전이는 고형 종양을 갖는 환자에서 모든 암 사망의 90%를 차지한다. 일차 종양으로 하여금 전이를 형성하게 하는 분자 및 세포 기작은 이 주요 생명 위협 문제를 더 잘 해결하기 위해 이해되어야 한다. 전이 유전자 및 기작의 확인은 임상 실시를 위해 이 치명적인 상태의 기초 생물학 및 이의 관련성을 이해하는 데에 필수적이다. 종래 연구들이 전이 과정의 복잡성을 인지하였으나, 전이가 어떻게 왜 일어나는지, 어떤 기작이 전이를 종양 특이적 과정으로 만드는지, 어떤 사건이 일차 종양의 제거로부터 수년 후 휴면 전이를 활성화 및 치명성을 갖게 하는지, 및 어떤 전이 매개 유전자가 가치있는 진단 마커 및 치료 표적을 궁극적으로 구성할 것인지를 설명하지 못하였다.

본 발명은 골 전이를 예측하는 마커의 확인이 암세포에 의한 골 전이성 조직의 퍼짐 및 콜로니화를 제한함으로써 예방적 치료 기회를 제공할 것이고 치명적 상태를 지연시키거나 변환시킬 것이라는 인식에 기초한다. 따라서, 예를 들면, 다른 잠재적 기작들 중에서 16q22-24(16q23) 증폭 또는 16q23 전위에 의해 획득된 MAF(진짜 유방암 골 전이 유전자) 단백질 및 mRNA 축적도 암 골 전이성 병변 및 바람직한 실시양태에서 골용해성 암 골

전이를 유발하는 데에 책임이 있다는 것을 밝혔다.

발명의 내용

- [0007] 본 발명자들은 과중성 암세포 골 전이에 영향을 미치는 신호의 균형을 확인하는 것이 질환에 대한 예후의 확립 및 예방적 치료 개입을 위한 귀중한 단서를 제공할 것이라는 것을 확인하였다.
- [0008] 따라서, 한 양태에서, 본 발명은 암, 예를 들면, 유방암, 폐암, 전립선암, 갑상선암 또는 신장암을 앓고 있는 대상체에서 상기 암의 골 전이를 예측하거나, 진단하거나 예후하는 시험관내 방법으로서,
- [0009] i) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준 또는 카피 수 변경을 측정하거나 정량하는 단계; 및
- [0010] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준 또는 카피 수를 기준 값과 비교하는 단계
- [0011] 를 포함하고, 이때 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준 또는 카피 수가 골 전이를 일으키는 증가된 위험을 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0012] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암, 예를 들면, 유방암, 폐암, 전립선암, 갑상선암 또는 신장암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서,
- [0013] i) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준 또는 카피 수를 정량하는 단계; 및
- [0014] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준 또는 카피 수를 기준 값과 비교하는 단계
- [0015] 를 포함하고, 이때 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준 또는 카피 수가 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0016] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암, 예를 들면, 유방암, 폐암, 전립선암, 갑상선암 또는 신장암을 앓고 있는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서,
- [0017] i) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자, 예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA의 발현 수준 또는 카피 수를 정량하는 단계; 및
- [0018] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준 또는 카피 수를 기준 값과 비교하는 단계
- [0019] 를 포함하고, 이때 상기 발현 수준 또는 카피 수가 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 수용적인(susceptible) 시험관내 방법에 관한 것이다. 상기 발현 수준 또는 카피 수가 상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나, 억제하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 수용적이지 않다.
- [0020] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암, 예를 들면, 유방암, 전립선암, 폐암, 갑상선암 또는 신장암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 측정하는 방법으로서, 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA)의 발현 수준 또는 카피 수를 측정하는 단계를 포함하고, 이때 평균 값 + 1 표준 편차를 초과하는 상기 유전자의 발현 수준 또는 카피 수가 이른(early) 골 전이의 증가된 위험을 나타내는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0021] 또 다른 양태에서, 본 발명은 골 전이와 함께 암을 갖는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법으로서,
- [0022] i) 프로브를 사용하여 상기 대상체의 골 전이성 샘플에서 관심 유전자의 유전자 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0023] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0024] 를 포함하고, 이때 상기 관심 유전자의 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 분해를 예방하기 위한 요법을 받는 것에 수용적인 시험관내 방법에 관한 것이다. 관심 유전자의 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 분해를 예방하기 위한 요법을 받는 것에 수용적이지 않다.
- [0025] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암, 예를 들면, 유방암, 전립선암, 폐암, 갑상선암 또는 신장암을 앓고 있는 대상체에서 상기 암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서, 프로브를 사용하여 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA)가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는

단계를 포함하고, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 관심 유전자의 증폭은 골 전이를 일으키는 증가된 위험을 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0026] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암, 예를 들면, 유방암, 폐암, 전립선암, 갑상선암 또는 신장암을 앓고 있는 대상체에서 상기 암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하고, 이때 관심 유전자의 전위가 골 전이를 일으키는 증가된 위험을 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0027] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암, 예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하고, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 관심 유전자의 증폭이 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 암, 예를 들면, 폐암, 신장암, 유방암, 갑상선암 또는 전립선암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하고, 이때 관심 유전자의 전위(즉, t(14,16))가 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0028] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암, 예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 샘플에서 상승된 수준의 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)를 갖는 대상체에서 골 전이의 치료에 사용될, 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질(작용제)에 관한 것이다.

[0029] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체에서 상기 암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 발현 수준을 정량하기 위한 프로브; 및 b) 상기 샘플에서 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0030] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체에서 상기 암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 전위를 확인하기 위한 프로브; 및 b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 전위를 관심 유전자의 기준 샘플과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0031] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체에서 상기 암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 증폭을 정량하기 위한 프로브; 및 b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 증폭된 수준을 관심 유전자의 기준 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0032] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)으로부터의 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 발현 수준을 정량하기 위한 프로브; 및 b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0033] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체를 위한 요법을 결정하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 발현 수준을 정량하기 위한 프로브; b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하기 위한 수단; 및 c) 정량된 발현 수준과 기준 발현 수준의 비교를 기초로 상기 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 감소시키는 요법을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0034] 또 다른 양태에서, 본 발명은 i) 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 발현 수준을 정량하기 위한 시약; 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계를 갖는 것으로서 미리 확인된 하나 이상의 관심있는 c-MAF 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0035] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는(typing) 시험관내 방법으로서,

- [0036] a) 상기 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- [0037] b) 프로브를 사용하여 상기 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0038] c) 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 미리 측정된 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교함으로써 상기 샘플을 유형분류하는 단계
- [0039] 를 포함하고, 이때 상기 유형분류가 상기 대상체에서 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험 관내 방법에 관한 것이다.
- [0040] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 골 전이를 예방하거나 감소시키는 물질을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하고, 이때 상기 물질이 상기 대상체에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 요법에 따라 투여되는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0041] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 골 전이를 예방하거나 감소시키는 물질을 상기 대상체에게 투여하지 않는 단계를 포함하고, 이때 상기 물질이 상기 대상체에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 계획(treatment regimen)에 따라 투여되지 않는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0042] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암(예컨대, 유방암, 폐암, 전립선암, 신장암 또는 갑상선암)을 앓고 있는 대상체를 코호트(cohort)로 분류하는 방법으로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5srRNA)의 발현 수준을 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준을 미리 측정된 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 상기 발현 수준을 기초로 상기 대상체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다. 특정 양태에서, 코호트는 임상 시험을 수행하기 위해 사용된다.

도면의 간단한 설명

- [0043] 도 1: 16q23 과다발현은 골 전이와 관련되어 있다. a) 유전자 발현에 기초한 카피 수 변경의 분석(ACE 알고리즘). 음영으로 표시된 영역은 ER+ 유방암 종양에서 재발과 유의하게 관련된 DNA 게놈 증폭을 표시한다(일군의 GSE2603, GSE2034 및 GSE12276 데이터 세트). b) 16번 염색체의 경우, 흑색 점 및 회색 수평선은 각각 표준화된 log2 강도 비 및 절편을 나타낸다. BoM2는 MCF7 모세포와 비교된다. 16q23 게놈 증폭을 포함하는 16q22-24 DNA가 하부에 회색으로 강조되어 있다. c) 16q23 유전자 카피(사용된 프로브는 (센트로미어부터 텔로미어까지 정렬된) 5개의 유전자 VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA 및 MAF를 플랭킹함)와 14q32 유전자 카피 사이의 비를 기초로 MAF 유전자 증폭을 갖는 모세포 및 BoM2 골 전이성 세포의 백분율을 표시하는 패널. FISH에 의해 염색된 모세포 및 BoM2 세포의 대표적인 이미지.
- 도 2: 16q23 게놈 DNA 영역의 증폭(사용된 프로브는 (센트로미어부터 텔로미어까지 정렬된) 5개의 유전자 VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA 및 MAF를 플랭킹함)은 유방암 골 전이와 관련되어 있다. a) 및 b) I, II 및 III 기 BC 인간 일차 종양 세트(n=334)에서 골 전이 부재(a) 또는 전체(b) 생존의 카플란-메이에르(Kaplan-Meier) 곡선. 종양 당 3개의 코어를 사용하여 평균으로서 세포 당 2.5 16q23 카피의 컷-오프를 기초로 환자들을 16q23 FISH 음성 군과 16q23 FISH 양성 군으로 나누었다. Se - 민감성; Sp - 특이성; HR - 위험 비. c) I, II 및 III 기 BC 인간 일차 종양 세트(각각 n=250 및 n=43)에서 ER 양성(좌측) 또는 삼중 음성(우측) 환자에 대한 골 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 곡선. 종양 당 3개의 코어를 사용하여 평균으로서 세포 당 2.5 16q23 카피의 컷-오프를 기초로 환자들을 16q23 FISH 음성 군과 16q23 FISH 양성 군으로 나누었다. HR - 위험 비. d) 및 e) 전체 유방암(d) 및 ER+ 유방암(e)에서 16q23 증폭의 진단 성능에 대한 수신자 조작 특징(ROC) 곡선. ROC 곡선에서, 진성(true) 양성률(민감성)은 상이한 컷-오프 점들에 대한 가성(false) 양성률(100-특이성)의 함수로 작도되어 있다. ROC 곡선 상의 각각의 점은 특정 결정 역치에 상응하는 민감성/특이성 쌍을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0044] 일반 용어 및 표현의 정의

- [0045] 본원에서 사용된 바와 같이, "골 분해를 피하거나 예방하는 물질(작용제)"은 조골세포 증식을 자극하거나 파골 세포 증식을 억제함으로써 골 분해를 예방하거나, 억제하거나, 치료하거나, 감소시키거나 중지시킬 수 있는 임 의의 분자를 지칭한다.
- [0046] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자의 증폭"은 유전자 또는 유전자 단편의 다양한 카피가 개별 세포 또는 세포주에서 형성되는 과정을 지칭한다. 유전자의 카피가 동일한 염색체에 위치할 필요는 없다. 증폭된 영역은 종종 "애플리콘"으로서 지칭된다. 통상적으로, 생성된 mRNA의 양, 즉 유전자 발현 수준도 특정 유전자의 카피 수에 비례하여 증가한다.
- [0047] 본원에서 사용된 바와 같이, "암"은 임의의 암을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 암은 유방암(삼중 음성, 기저형 (basal-like) 및 ER+ 유방암을 포함함), 전립선암, 폐암, 갑상선암 또는 신세포암종(renal cell carcinoma)일 수 있다.
- [0048] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "기저형", "기저형 서브타입", "기저형 서브타입의 유방암" 등은 2개의 음성 수용체 ER 및 HER2, 및 CK5/6, CK14, CK17 및 EGFR로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 양성 수용체를 특 징으로 하는 특정 서브타입의 유방암을 지칭한다. 따라서, 삼중 음성 유방암(ER, HER-2, PgR)을 언급하고 지칭 하는 본원의 모든 문장들은 ER 및 HER2가 음성이고 CK5/6, CK14, CK17 및 EGFR 중 하나 이상이 양성인 기저형 유방암도 언급하고 지칭할 수 있다. 대안적으로, "기저형"은 하기 10개의 유전자들의 상향조절 및/또는 하향조 절에 기초한 유전자 발현 프로파일을 특징으로 하는 유방암도 지칭한다: (1) 포크헤드 박스(Forkhead box) CI(FOXC 1); (2) 흑색종 억제 활성(MIA); (3) NDC80 상동체, 키네토코어(kinetochore) 복합체 성분(KNTC2); (4) 센트로솜(Centrosomal) 단백질 55 kDa(CEP55); (5) 아닐린(Anillin), 액틴 결합 단백질(ANLN); (6) 모계 배아 류신 지퍼 키나제(kinase)(MELK); (7) G 단백질-커플링된 수용체 160(GPR160); (8) 경막 단백질 45B(TMEN45B); (9) 에스트로겐 수용체 1(ESR1); (10) 포크헤드 박스 A1(FOXA1). 유방암 종양을 기저형 서브타 입으로서 분류하는 데에 이용되는 유전자 발현 프로파일이 에스트로겐 수용체, 프로게스테론 수용체 또는 Her2 를 포함하지 않기 때문에, 삼중 음성 유방암 및 비-삼중 음성 유방암 둘다가 기저형 서브타입으로서 분류될 수 있다.
- [0049] 본원에서 사용된 바와 같이, "삼중 음성 유방암"은 (바람직하게는, ER 및 PR의 발현 측정이 문헌(M. Elizabeth H et al., Journal of Clinical Oncology, 28(16): 2784-2795, 2010)에 개시된 방법에 의해 수행될 때) ER 및 PR 둘다의 검출가능한 발현의 부재를 특징으로 하는 유방암을 지칭하고, 종양 세포는 정상적으로 세포 표면에 위치하는 수용체인 표피 성장인자 수용체 2형(HER2 또는 ErbB2)에 대해 증폭되지 않는다. 표준 면역조직화학적 기법을 이용할 때 종양 세포 핵의 5% 미만이 ER 및 PR 발현에 대해 염색되는 경우 종양 세포는 ER 및 PR의 발현 에 대한 음성 세포로서 간주된다. 본원에서 사용된 바와 같이, 종양 세포는 다중클론 항-HER2 일차 항체를 사용 하는 반-정량 면역조직화학적 분석인 헤르셉테스트(HerceptTest)TM 키트(코드 K5204, 다코 노쓰 아메리카 인코포 레이트드(Dako North America, Inc.), 미국 캘리포니아주 카운테리아 소재)로 시험되었을 때 0, 1+ 또는 2+의 시험 결과 점수를 제공하는 경우 또는 HER2 FISH 음성을 나타내는 경우 HER2 과다발현에 대한 음성 세포로서 간 주된다.
- [0050] "폐암"은 폐로부터 유래된 임의의 암을 지칭한다. 폐암은 4종의 주요 폐암 및 다수의 소수 또는 드문 형태들로 구성된다. 임상-병리학적 이유로, 폐암은 귀리세포암으로도 지칭되는 소세포 폐암(SCLC), 및 비-소세포 폐암 (NSCLC)의 넓은 카테고리로 종종 나누어진다. NSCLC는 3종의 주요 암종인 편평세포암종(SCC), 선암종 및 대세포 암종으로 더 나누어진다.
- [0051] "전립선암"은 전립선으로부터 유래된 임의의 암을 지칭한다. 전립선암은 정상 정액-분비 전립선 세포가 암세포 로 돌연변이될 때 시작되는 선암종 또는 선암으로서 분류된다. 선암종이 가장 흔한 전립선의 영역은 말초 대역 이다. 초기에, 암세포의 작은 덩어리가 정상 전립선에 국한되는데, 이 상태는 제자리 암종 또는 전립선 상피내 신생물(PIN)로서 공지된 상태이다. PIN이 암 전구체라는 증거는 없지만, PIN은 암과 밀접하게 관련되어 있다.
- [0052] "갑상선암"은 소포성 갑상선 세포 및 소포결 C 세포 둘다로부터 유래된 암을 포함한다. 소포성 갑상선 세포로부 터 유래된 종양은 유두암(PTC), 소포암(FTC), 잘 분화되지 않은 암(PDTC) 및 역형성 암(ATC)을 포함한다. PTC 및 FTC는 분화된 암(DTC)로서 함께 분류된다. 소포결 C 세포로부터 유래된 수질암(MTC)은 소포결 C 세포로부터 유래된다. 다른 종류의 암은 갑상선 림프종, 편평세포 갑상선암종 및 갑상선 육종을 포함한다.
- [0053] 본원에서 사용된 바와 같이, "관심 유전자"는 16q22-24 좌위(유전자좌) 내의 임의의 유전자를 지칭한다. 관심 유전자는 MAF일 수 있다. 관심 유전자는 VAT1L(유전자 ID: 57687, 16번 염색체에 위치함; NC_000016.9

(77822483..78014001))일 수 있다. 관심 유전자는 CLEC3A(유전자 ID: 10143, 16번 염색체에 위치함; NC_000016.9 (78056443..78066003))일 수 있다. 관심 유전자는 WWOX(유전자 ID: 51741, 16번 염색체; NC_000016.9 (78133327..79246564))일 수 있다. 관심 유전자는 5srRNA(유전자 ID: 645957, 16번 염색체에 위치함; NC_000016.9 (78859149..78859982))일 수 있다.

[0054]

본원에서 사용된 바와 같이, "c-MAF 유전자" 또는 "MAF"(MAF 또는 MGC71685로서도 공지되어 있는 v-maf 근건막층(musculoaponeurotic) 섬유육종 발암유전자 상동체(조류))는 동종이량체 또는 이종이량체처럼 작용하는 류신 지퍼를 함유하는 전사 인자이다. DNA 결합 부위에 따라, 코딩된 단백질은 전사 활성화제 또는 억제제일 수 있다. c-MAF를 코딩하는 DNA 서열은 등록번호 NG_016440(서열번호 1(게놈)) 하에 NCBI 데이터베이스에 기재되어 있다. c-MAF의 코딩 서열은 서열번호 13에 기재되어 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 c-MAF 단백질 동형체인 α 동형체 및 β 동형체 중 하나를 생성할 것이다. 상기 동형체들 각각에 대한 상보적 DNA 서열들은 각각 등록번호 NM_005360.4(서열번호 2) 및 NM_001031804.2(서열번호 3) 하에 NCBI 데이터베이스에 기재되어 있다.

[0055]

본원에서 사용된 바와 같이, "c-MAF 억제제"는 c-MAF 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(c-MAF 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 c-MAF 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 c-MAF 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 c-MAF 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자를 지칭한다. c-MAF 유전자 발현 억제제는 예컨대, 국제 특허출원 공보 제WO2005/046731호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 제시된 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 c-MAF의 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법; 예컨대, 국제 특허출원 공보 제WO2008098351호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응 영역(MARE 또는 c-MAF 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에 레포터 유전자의 전사 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법; 또는 예컨대, 미국 특허출원 공보 제2009048117A호(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 NFATc2 및 c-MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신(ionomycin)을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 조절 하에 레포터 유전자의 발현을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법을 이용함으로써 확인될 수 있다.

[0056]

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

[0057]

본원에서 사용된 바와 같이, "mTor 억제제"는 mTor 유전자의 발현 생성물이 생성되는 것을 방해함으로써(mTor 유전자 전사를 중단시키고/시키거나 mTor 유전자 발현으로부터 나오는 mRNA의 번역을 차단함으로써) 및 mTor 단백질 활성을 직접적으로 억제함으로써 mTor 유전자 발현을 완전히 또는 부분적으로 억제할 수 있는 임의의 분자(2개 이상의 표적들(이들 중에는 mTor 단백질 활성이 있음)을 갖는 억제제를 포함함)를 지칭한다.

[0058]

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

[0059]

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

[0060]

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

[0061]

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

[0062]

본원에서 사용된 바와 같이, "결과" 또는 "임상 결과"는 발생된 질환 및/또는 질환 진행 과정을 지칭하고 예를 들면, 재발, 재발까지의 시간, 전이, 전이까지의 시간, 전이의 수, 전이 부위의 수 및/또는 질환으로 인한 사망

을 특징으로 할 수 있다. 예를 들면, 좋은 임상 결과는 치유, 재발의 예방, 전이의 예방 및/또는 고정된 시간 이내의 (재발 없는) 생존을 포함하고, 좋지 않은 임상 결과는 질환 진행, 전이 및/또는 고정된 시간 이내의 사망을 포함한다.

[0063] 본원에서 사용된 바와 같이, "ER+ 유방암"은 에스트로겐 수용체(ER)를 발현하는 종양 세포를 갖는 유방암으로서 이해된다. 이것은 상기 종양이 에스트로겐에 민감하게 만드는데, 이는 에스트로겐으로 인해 양성 유방 종양이 성장한다는 것을 의미한다. 대조적으로, "ER- 유방암"은 에스트로겐 수용체(ER)를 발현하지 않는 종양 세포를 갖는 유방암으로서 이해된다.

[0064] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 유전자의 "발현 수준"은 대상체의 샘플에서 유전자에 의해 생성된 유전자 생성물의 측정가능한 양을 지칭하는데, 이때 유전자 생성물은 전사 생성물 또는 번역 생성물일 수 있다. 따라서, 발현 수준은 핵산 유전자 생성물, 예컨대, mRNA 또는 cDNA, 또는 폴리펩티드 유전자 생성물에 관한 것일 수 있다. 발현 수준은 대상체의 샘플 및/또는 기준 샘플 또는 샘플들로부터 유도되고, 예를 들면, 새로(de novo) 검출될 수 있거나 이전 측정에 상응할 수 있다. 발현 수준은 당업자에게 공지되어 있는 바와 같이 예를 들면, 마이크로어레이 방법, PCR 방법(예컨대, qPCR), 및/또는 항체-기초 방법을 이용함으로써 결정될 수 있거나 측정될 수 있다.

[0065] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "유전자 카피 수"는 세포에서 핵산 분자의 카피 수를 지칭한다. 유전자 카피 수는 세포의 게놈(염색체) DNA에서의 유전자 카피 수를 포함한다. 정상 세포(비-종양 세포)에서 유전자 카피 수는 정상적으로 2 카피(염색체 쌍의 각각의 구성원에서 1 카피)이다. 유전자 카피 수는 종종 세포 집단의 샘플로부터 수득된 유전자 카피 수의 절반을 포함한다.

[0066] "증가된 발현 수준"은 c-MAF 유전자의 수준을 지칭할 때 기준 샘플 또는 대조군 샘플에서의 발현 수준보다 더 높은 발현 수준으로서 이해된다. 구체적으로, 샘플은 환자로부터 단리된 샘플에서의 발현 수준이 기준 또는 대조군에 비해 적어도 약 1.1배, 1.5배, 5배, 10배, 20배, 30배, 40배, 50배, 60배, 70배, 80배, 90배, 100배 또는 심지어 더 높은 배수일 때 높은 c-MAF 발현 수준을 갖는 것으로 간주될 수 있다.

[0067] 본원에서 사용된 바와 같이, "프로브"는 관심있는 특정 핵산 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 서열을 지칭한다. 일부 실시양태에서, 프로브는 전위가 일어나는 것으로 공지되어 있는 염색체의 영역에 대한 특이성을 나타낼 수 있다. 일부 실시양태에서, 프로브는 특이적 표지 또는 태그를 갖는다. 일부 실시양태에서, 태그는 형광단이다. 일부 실시양태에서, 프로브는 그의 표지 부착이 백금과 핵산 및 단백질의 안정한 배위결합에 기초한 DNA 제자리 혼성화(*in situ* hybridization) 프로브이다. 일부 실시양태에서, 프로브는 온전히 그대로 본원에 참고로 도입되는 미국 특허출원 제12/067532호 및 제12/181,399호에 기재되어 있거나 문헌(Swennenhuis et al. "Construction of repeat-free fluorescence in situ hybridization probes" Nucleic Acids Research 40(3):e20 (2012))에 기재되어 있다.

[0068] 본원에서 사용된 바와 같이, "태그" 또는 "표지"는 프로브, 또는 프로브가 부착되는 위치가 가시화되거나, 표시되거나 다른 방식으로 포착되게 하는, 프로브와 직접적으로 또는 간접적으로 관련되어 있는 임의의 물리적 분자를 지칭한다.

[0069] 본원에서 사용된 바와 같이, "전위(translocation)"는 동등하지 않은 또는 동등한 양의 염색체 물질이 염색체들 사이에 교환되는 것을 지칭한다. 일부 경우, 전위는 동일한 염색체 상에서 일어난다. 일부 경우, 전위는 상이한 염색체들 사이에서 일어난다. 전위는 유방암 및 백혈병을 비롯한 많은 종류의 암들에서 높은 빈도로 일어난다. 전위는 일차 상호간 전위 또는 보다 복잡한 이차 전위일 수 있다. 많은 암들에서 개시 사건을 구성하는 것으로 생각되는 면역글로불린 중쇄(IgH) 좌위를 수반하는 여러 일차 전위가 존재한다(Eychene, A., Rocques, N., and Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693).

[0070] 본원에서 사용된 바와 같이, "배수체(polyploid)" 또는 "배수성(polyploidy)"은 세포가 2 카피 초과 관심 유전자를 함유한다는 것을 표시한다. 일부 경우, 관심 유전자는 MAF이다. 일부 실시양태에서, 배수성은 관심 유전자의 발현의 측정과 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 배수성은 게놈 불안정성과 관련되어 있다. 일부 실시양태에서, 게놈 불안정성은 염색체 전위를 유발할 수 있다.

[0071] 본원에서 사용된 바와 같이, "전체 게놈 서열결정"은 유기체의 전체 게놈이 한번에 서열결정되는 과정이다. 예를 들면, 문헌(Ng., P.C. and Kirkness, E.F., Whole Genome Sequencing. 2010. Methods in Molecular Biology. 628: 215-226)을 참조한다.

[0072] 본원에서 사용된 바와 같이, "엑솜(exome) 서열결정" 또는 "엑소솜(exosome) 서열결정"은 유기체의 DNA의 전체

코딩 영역이 서열결정되는 과정이다. 엑솜 서열결정에서, mRNA가 서열결정된다. 게놈의 비-번역된 영역은 엑솜 서열결정에 포함되지 않는다. 예를 들면, 문헌(Choi, M. et al., Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. 2009. PNAS. 106(45): 19096-19101)을 참조한다.

[0073] 본원에서 사용된 바와 같이, "전이"는 암이 시작된 장기로부터 상이한 장기로 증식되는 것으로서 이해된다. 이것은 일반적으로 혈액 또는 림프 시스템을 통해 일어난다. 암세포가 퍼져 새로운 종양을 형성하는 경우, 상기 새로운 종양은 이차 또는 전이 종양으로서 지칭된다. 이차 종양을 형성하는 암세포는 원래의 종양의 암세포와 유사하다. 예를 들면, 유방암이 폐로 퍼지는(전이되는) 경우, 이차 종양은 악성 유방암 세포로 형성된다. 폐에서의 질환은 전이성 유방암이고 폐암이 아니다. 본 발명의 방법의 특정 실시양태에서, 전이는 골로 퍼진다(전이된다).

[0074] 본원에서 사용된 바와 같이, "예측"은 암을 앓고 있는 대상체가 원거리 장기로의 전이를 발생시킬 확률의 측정을 지칭한다. 본원에서 사용된 바와 같이, "좋은 예후"는 대상체가 지정된 시간 이내에 생존하고/하거나 재발 또는 원거리 전이를 갖지 않거나 가질 위험이 낮을 것으로 예상(예를 들면, 예측)된다는 것을 표시한다. 용어 "낮은"은 상대적인 용어이고, 본원과 관련하여 임상 결과(재발, 원거리 전이 등) 면에서 "낮은" 발현 군의 위험을 지칭한다. "낮은" 위험은 불균질한 암 환자 집단에 대한 평균 위험보다 더 낮은 위험으로서 간주될 수 있다. 문헌(Paik et al. (2004))의 연구에서 재발의 전체 "낮은" 위험은 15%보다 더 낮은 위험으로서 간주되었다. 또한, 위험은 시간의 함수로 변화할 것이다. 시간은 예를 들면, 암의 초기 진단 후 또는 예후가 수행된 후 5년, 10년, 15년 또는 심지어 20년일 수 있다.

[0075] 본원에서 사용된 바와 같이, "중지 않은 예후"는 대상체가 지정된 시간 이내에 생존하지 않고/않거나 재발 또는 원거리 전이를 갖거나 가질 위험이 높을 것으로 예상, 예를 들면, 예측된다는 것을 표시한다. 용어 "높은"은 상대적 용어이고, 본원과 관련하여 임상 결과(재발, 원거리 전이 등) 면에서 "높은" 발현 군의 위험을 지칭한다. "높은" 위험은 불균질한 암 환자 집단에 대한 평균 위험보다 더 높은 위험으로서 간주될 수 있다. 문헌(Paik et al. (2004))의 연구에서 재발의 전체 "높은" 위험은 15%보다 더 높은 위험으로서 간주되었다. 또한, 위험은 시간의 함수로 변화할 것이다. 시간은 예를 들면, 암의 초기 진단 후 또는 예후가 수행된 후 5년, 10년, 15년 또는 심지어 20년일 수 있다.

[0076] 본원에서 사용된 바와 같이, "기준 값"은 환자 또는 환자로부터 채취된 샘플의 실험실 검사에 의해 수득된 값/데이터에 대한 기준으로서 사용된 실험실 값을 지칭한다. 기준 값 또는 기준 수준은 절대 값; 상대 값; 상한 및/또는 하한을 갖는 값; 값의 범위; 평균 값; 중간 값; 중앙 값; 또는 특정 대조군 또는 기준 값과 비교된 값일 수 있다. 기준 값은 초기 시점에서의 개별 샘플 값, 예컨대, 시험되는 대상체의 샘플로부터 수득된 값에 기초할 수 있다. 기준 값은 다수의 샘플들, 예컨대, 역연령이 일치된 군의 대상체 집단으로부터의 샘플에 기초할 수 있거나, 시험될 샘플을 포함하거나 배제하는 샘플의 풀(pool)에 기초할 수 있다.

[0077] 본원에서 사용된 바와 같이, "대상체" 또는 "환자"는 포유동물로서 분류된 모든 동물들을 지칭하고, 가축 및 농장 동물, 영장류 및 인간, 예를 들면, 인간, 비-인간 영장류, 소, 말, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이 또는 설치류를 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 바람직하게는, 대상체는 임의의 연령 또는 인종의 인간 남성 또는 여성이다.

[0078] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "치료"는 본원에 기재된 임상 병태에 대한 감수성을 종결시키거나, 예방하거나, 호전시키거나 감소시키는 것을 목적으로 하는 임의의 종류의 치료를 지칭한다. 바람직한 실시양태에서, 용어 치료는 본원에 정의된 장애 또는 병태의 예방적 치료(즉, 임상 병태에 대한 감수성을 감소시키는 치료)를 지칭한다. 따라서, "치료", "치료하는" 및 이들의 등가 용어는 인간을 포함하는 포유동물에서 병리학적 상태 또는 장애의 임의의 치료를 포함하는, 원하는 약리학적 또는 생리학적 효과를 수득하는 것을 지칭한다. 상기 효과는 장애 또는 이의 증상을 완전히 또는 부분적으로 예방한다는 관점에서 예방 효과일 수 있고/있거나, 장애 및/또는 장애에 기인하는 불리한 효과에 대한 부분적 또는 완전한 치유의 관점에서 치료 효과일 수 있다. 즉, "치료"는 (1) 대상체에서 장애가 발생하거나 재발하는 것을 예방하는 것, (2) 장애를 억제하는 것, 예컨대, 그의 발생을 정지시키는 것, (3) 숙주가 장애 또는 그의 증상을 더 이상 앓지 않도록 장애 또는 적어도 그와 관련된 증상을 중지시키거나 종결하는 것, 예컨대, 상실된, 손상된 또는 결함 기능을 복구시키거나 회복시킴으로써, 또는 불충분한 과정을 자극함으로써 장애 또는 그의 증상의 관해를 야기하는 것, 또는 (4) 장애 또는 그와 관련된 증상을 경감시키거나, 완화하거나 또는 호전시키는 것(이때, 호전은 넓은 의미에서 적어도 파라미터, 예컨대, 염증, 통증 또는 면역 결핍의 크기의 감소를 지칭하기 위해 사용됨)을 포함한다.

[0079] 본원에서 사용된 바와 같이, "샘플" 또는 "생물학적 샘플"은 대상체로부터 단리된 생물학적 물질을 의미한다.

생물학적 샘플은 c-MAF 유전자의 발현 수준을 측정하기에 적합한 임의의 생물학적 물질을 함유할 수 있다. 상기 샘플은 임의의 적합한 생물학적 조직 또는 체액, 예를 들면, 종양 조직, 혈액, 혈액 혈장, 혈청, 소변 또는 뇌척수액(CSF)으로부터 단리될 수 있다.

[0080] "종양 조직 샘플"은 일차 암 종양으로부터 유래된 조직 샘플로서 이해된다. 상기 샘플은 통상의 방법, 예를 들면, 관련된 의학 기법에서 숙련된 자에게 잘 공지되어 있는 방법을 이용하는 생검에 의해 획득될 수 있다.

[0081] "골용해성 골 전이"는 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파괴세포 활성의 자극으로부터 비롯된 전이의 근처에서 발생되고 심한 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 일종을 지칭한다.

[0082] 제1 양태에서, 본 발명은

[0083] i) 프로브를 사용하여 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계, 및

[0084] ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계

[0085] 를 포함하는, 상기 암을 앓고 있는 대상체에서 상기 암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제1 방법)으로서, 이때 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준이 골 전이를 일으키는 증가된 위험을 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0086] 본 발명의 방법은 대상체로부터의 샘플에서 관심 유전자 발현 수준을 측정하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.

[0087] 생검 샘플을 획득하는 방법은 종양을 큰 조각으로 분할하는 것, 또는 미세절개, 또는 당분야에서 공지되어 있는 다른 세포 분리 방법을 포함한다. 종양 세포는 작은 게이지 바늘을 이용한 흡입을 통해 세포학적 방법에 의해 획득될 수도 있다. 샘플 보존 및 취급을 단순화하기 위해, 샘플을 포르말린으로 고정시키고 파라핀에 담글 수 있거나, 신속한 동결을 허용하는 고도 극저온 매질에 침지시킴으로써 먼저 동결시킨 후 조직 동결 매질, 예컨대, OCT 화합물에 담글 수 있다.

[0088] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제1 방법은 단일 마커로서 관심 유전자 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.

[0089] 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.

[0090] 이를 목적으로, 생물학적 샘플은 조직 또는 세포 구조를 물리적으로 또는 기계적으로 파괴하여 세포내 성분을 핵산 제조용 수성 또는 유기성 용액 내로 방출하도록 처리될 수 있다. 핵산은 당업자에게 공지되어 있는 상업적으로 이용가능한 방법에 의해 추출된다(Sambrook, J., et al., "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3).

[0091] 따라서, 관심 유전자 발현 수준은 상기 유전자의 전사로부터 비롯된 RNA(메신저 RNA 또는 mRNA) 또는 대안적으로 상기 유전자의 상보적 DNA(cDNA)로부터 정량될 수 있다. 따라서, 본 발명의 특정 실시양태에서, 관심 유전자 발현 수준의 정량은 c-MAF 유전자의 메신저 RNA 또는 상기 mRNA의 단편, c-MAF 유전자의 상보적 DNA 또는 상기 cDNA의 단편, 또는 이들의 혼합물의 정량을 포함한다.

[0092] MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA에 의해 코딩된 mRNA 수준 또는 그의 상응하는 cDNA 수준을 검출하고 정량하는 사실상 임의의 통상의 방법이 본 발명의 범위 내에서 이용될 수 있다. 비-한정적 예로서, 상기 유전자에 의해 코딩된 mRNA 수준은 통상의 방법, 예를 들면, mRNA 증폭, 예컨대, 전기영동 및 염색 또는 대안적으로 적합한 프로브를 사용한 서던 블롯, 관심 유전자의 mRNA 또는 그의 상응하는 cDNA의 특이적 프로브를 사용한 노던 블롯, S1 뉴클레아제(nuclease)를 사용한 맵핑, RT-PCR, 혼성화, 마이크로어레이 등, 바람직하게는 적합한 마커를 사용한 실시간 정량 PCR에 의한 상기 mRNA 증폭 생성물의 정량을 포함하는 방법을 이용함으로써 정량될 수 있다. 마찬가지로, 관심 유전자에 의해 코딩된 상기 mRNA에 상응하는 cDNA 수준은 통상의 기법을 이용함으로써 정량될 수도 있고; 이 경우, 본 발명의 방법은 상응하는 mRNA의 역전사(RT)로 상응하는 cDNA를 합성한 후 증폭하고 상기 cDNA 증폭 생성물을 정량하는 단계를 포함한다. 발현 수준을 정량하는 통상의 방법들은 예를 들면, (상기 인용된) 문헌(Sambrook et al., 2001)에서 발견될 수 있다. 이들 방법들은 당분야에서 공지되어 있고, 당업자는 각각의 기법에 필요한 표준화를 알고 있을 것이다. 예를 들면, 다중 PCR을 이용하여 획득한 발현 측정치

는 측정되는 유전자의 발현을, 그의 발현이 모든 샘플들에 걸쳐 일정하여 비교될 기준 발현을 제공하는 소위 "하우스킵핑(housekeeping)" 유전자 또는 그의 발현이 압에 의해 조절되는 것으로 공지되어 있는 다른 대조군 유전자와 비교함으로써 표준화되어야 한다.

[0093] 특정 실시양태에서, 관심 유전자 발현 수준은 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA/RNA 어레이 또는 뉴클레오티드 혼성화 기법에 의해 정량된다.

[0094] 또한, 관심 유전자 발현 수준은 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질, 예를 들면, c-MAF 단백질(c-MAF)[NCBI, 등록번호 075444], 또는 c-MAF 단백질, VAT1L 단백질, CLEC3A 단백질, WWOX 단백질 또는 5sRNA 단백질의 임의의 기능성 등가 변이체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수도 있다. 2종의 c-MAF 단백질 동형체, 즉 403개의 아미노산(서열번호 4)으로 구성된 α 동형체(NCBI, NP_005351.2) 및 373개의 아미노산(서열번호 5)으로 구성된 β 동형체(NCBI, NP_001026974.1)가 존재한다. c-MAF 유전자 발현 수준은 c-MAF 단백질 동형체들 중 임의의 동형체의 발현 수준을 정량함으로써 정량될 수 있다. 따라서, 특정 실시양태에서, c-MAF 유전자에 의해 코딩된 단백질의 수준의 정량은 c-MAF 단백질의 정량을 포함한다.

[0095] 본 발명과 관련하여, "관심 유전자, 예를 들면, c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA의 기능성 등가 변이체"는 (i) 하나 이상의 아미노산 잔기가 보존된 또는 비-보존된 아미노산 잔기(바람직하게는, 보존된 아미노산 잔기)로 치환되어 있는 관심 유전자 단백질의 변이체(이때, 이러한 치환된 아미노산 잔기는 유전 코드에 의해 코딩된 아미노산 잔기일 수 있거나 아닐 수 있음), 또는 (ii) 하나 이상의 아미노산의 삽입 또는 결실을 포함하고 관심 유전자 단백질과 동일한 기능을 갖는, 즉 DNA 결합 전사 인자로서 작용하는 변이체로서 이해된다. 관심 유전자 단백질의 변이체는 국제 특허출원 공보 제W02005/046731호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 나타난 바와 같이 시험관내 세포 증식을 촉진하는 관심 유전자의 능력에 기초한 방법, 국제 특허출원 공보 제W02008098351호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 c-MAF를 발현하는 세포에서 사이클린 D2 프로모터 또는 c-MAF 반응 영역(MARE 또는 c-MAF 반응 요소)을 함유하는 프로모터의 조절 하에 레포터 유전자의 전사 능력을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법, 또는 미국 특허출원 공보 제 2009048117A호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 바와 같이 NFATc2 및 c-MAF를 발현하는 세포에서 PMA/이오노마이신을 사용한 자극에 반응하여 IL-4 프로모터의 조절 하에 레포터 유전자 발현을 차단하는 소위 억제제의 능력에 기초한 방법을 이용함으로써 확인될 수 있다.

[0096] 본 발명에 따른 변이체는 바람직하게는 관심 유전자들 중 어느 한 유전자의 아미노산 서열에 대한 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상, 약 91% 이상, 약 92% 이상, 약 93% 이상, 약 94% 이상, 약 95% 이상, 약 96% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상 또는 약 99% 이상의 서열 유사성을 갖는다. 앞서 정의된 변이체와 특정 관심 유전자 단백질 서열 사이의 유사성 정도는 당업자에게 널리 공지되어 있는 알고리즘 및 컴퓨터 과정을 이용함으로써 측정된다. 2개의 아미노산 서열들 사이의 유사성은 바람직하게는 BLASTP 알고리즘 [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215: 403-410 (1990)]을 이용함으로써 측정된다.

[0097] 관심 유전자의 단백질 발현 수준은 대상체로부터의 샘플에서 상기 단백질을 검출하고 정량할 수 있게 하는 임의의 통상의 방법에 의해 정량될 수 있다. 비-제한적 예로서, 상기 단백질 수준은 예를 들면, 관심 유전자에 대한 결합 능력을 갖는 항체(또는 항원성 결정인자를 함유하는 이의 단편)의 사용 및 형성된 복합체의 후속 정량에 의해 정량될 수 있다. 이들 분석들에서 사용된 항체는 표지될 수 있거나 표지되지 않을 수 있다. 사용될 수 있는 마커의 예시적 예로는 방사성 동위원소, 효소, 형광단, 화학발광 시약, 효소 기질 또는 보조인자, 효소 억제제, 입자, 염료 등이 있다. 비-표지된 항체(일차 항체) 및 표지된 항체(이차 항체)를 사용하는, 본 발명에서 사용될 수 있는 다양한 공지된 분석들이 존재하고, 이들 기법들은 웨스턴 블롯 또는 웨스턴 전달, ELISA(효소-연결된 면역흡착 분석), RIA(방사면역분석), 경쟁 EIA(경쟁 효소 면역분석), DAS-ELISA(이중 항체 샌드위치 ELISA), 면역세포화학적 및 면역조직화학적 기법, 특이적 항체를 포함하는 단백질 마이크로어레이 또는 바이오칩의 사용에 기초한 기법, 또는 포맷, 예컨대, 덤스틱(dipstick)에서의 콜로이드 침전에 기초한 분석을 포함한다. 상기 관심 유전자 단백질을 검출하고 정량하는 다른 방법은 친화성 크로마토그래피 기법, 리간드 결합 분석 등을 포함한다. 면역학적 방법이 이용되는 경우, 고친화성으로 관심 유전자 단백질에 결합하는 것으로 공지되어 있는 임의의 항체 또는 시약이 그의 양을 검출하는 데에 사용될 수 있다. 그럼에도 불구하고, 항체, 예를 들면, 다중클론 혈청, 하이브리도마의 상층액 또는 단일클론 항체, 항체 단편, Fv, Fab, Fab' 및 F(ab')₂, scFv, 인간화된 디아바디, 트리아바디, 테트라바디, 나노바디, 알파바디(alphabody), 스테이플드(stapled) 펩티드, 사이클로펩티드 및 항체들의 사용이 바람직하다. 예를 들면, 본 발명과 관련하여 사용될 수 있는 시판되는 항-c-MAF 단백질 항체, 예컨대, 항체 ab427, ab55502, ab55502, ab72584, ab76817, ab77071(애브캅 피엘씨(Abcam plc),

영국 캠브리지 씨비4 0에프엘 사이언스 파크 330 소재), 075444 단일클론 항체(마우스 항-인간 MAF 아지드 무함 유 단일클론 항체, 비-접합됨, 클론 6b8)(에이비디 세로텍(AbD Serotec)) 등이 존재한다. 항-c-MAF 항체를 제공하는 많은 영리 회사들, 예컨대, 애브노바 코퍼레이션(Abnova Corporation), 베틸 라보라토리스(Bethyl Laboratories), 산타 크루즈 바이오테크놀로지(Santa Cruz Biotechnology), 바이오월드 테크놀로지(Bioworld Technology), 진텍스(GeneTex) 등이 존재한다.

[0098] 특정 실시양태에서, 관심 유전자의 단백질 수준은 웨스턴 블롯, 면역조직화학, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 정량된다.

[0099] 또 다른 특정 실시양태에서, 관심 유전자의 단백질 수준은 엑소솜(exosome) 또는 순환 DNA로부터 정량된다. 엑소솜은 생체내에서 및 시험관내에서 대다수의 종류의 세포들에 의해 분비되는 40 내지 100 nm 막 소포이다. 엑소솜은 구획의 내강 내로 내부를 향해 자라기 시작함으로써 다소포체(MVB)로서 지칭되는 특정 엔도솜 집단을 형성한다. MVB와 원형질막의 융합 시, 이들 내부 소포들이 분비된다. 엑소솜은 당분야에서 잘 공지되어 있는 여러 방법들에 의해 다양한 세포주 또는 체액으로부터 분리될 수 있다(Thery C. et al., Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 여러 시판되는 키트들, 예컨대, 엑소퀵(ExoQuick)TM 또는 엑소테스트(ExoTest)TM가 엑소솜의 단리를 위해 이용될 수 있다.

[0100] 본 발명의 제1 방법은 대상체로부터의 샘플(예를 들면, 종양 샘플)에서 수득된 관심 유전자의 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계를 제2 단계에서 포함한다.

[0101] 암을 갖는 대상체로부터의 샘플에서 관심 유전자 발현 수준이 측정되고 기준 값과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 곧 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다는 결론을 도출할 수 있다.

[0102] 관심 유전자의 발현 수준의 측정은 기준 값과 상관관계를 가져야 한다.

[0103] 한 실시양태에서, 본원에서 의도된 기준 값(들)은 관심 유전자의 절대적 양을 의미할 수 있다. 또 다른 실시양태에서, 시험된 대상체로부터의 샘플에서 임의의 하나 이상의 생체마커의 양은 (예를 들면, 증가 또는 감소, 또는 증가 배수 또는 감소 배수의 관점에서) 기준 값에 비해 직접적으로 측정될 수 있다. 유리하게는, 이것은 임의의 하나 이상의 생체마커의 각각의 절대적 양을 먼저 측정할 필요 없이 대상체로부터의 샘플에서 임의의 하나 이상의 생체마커의 양을 기준 값과 비교하게(즉, 기준 값과 비교하여 대상체로부터의 샘플에서 임의의 하나 이상의 생체마커의 상대적 양을 측정하게) 할 수 있다.

[0104] 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플 또는 기준 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준이다. 분석될 종양의 종류에 따라, 대조군 또는 기준 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 예후가 평가되어야 하는 경우, 기준 샘플은 전이되지 않은 암을 갖는 대상체로부터의 샘플, 또는 전이되지 않은 암을 갖는 대상체들로부터의 생검 샘플들 중 종양 조직 집단에서 측정된 관심 유전자의 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.

[0105] 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단으로부터의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 수득된다. 일반적으로, 전형적인 기준 샘플은 임상적으로 잘 문서화되어 있고 전이의 부재가 잘 특징규명되어 있는 대상체로부터 수득될 것이다. 이러한 샘플에서, 생체마커(관심 유전자)의 정상 농도(기준 농도)는 예를 들면, 기준 집단에 대한 평균 농도를 제공함으로써 측정될 수 있다. 마커의 기준 농도를 측정할 때 다양한 사항들을 고려한다. 이러한 고려사항들 중에는 환자의 연령, 체중, 성별, 일반적인 신체 상태 등이 있다. 예를 들면, 바람직하게는 상기 고려사항에 따라, 예를 들면, 다양한 연령 카테고리에 따라 분류된 약 2명 이상, 약 10명 이상, 약 100명 이상 내지 바람직하게는 약 1000명 초과 대상체들로 구성된 동등한 양의 군이 기준 군으로서 간주된다. 기준 값의 유도에 사용되는 샘플 집단은 바람직하게는 연구의 객체인 환자와 동일한 종류의 암을 앓고 있는 대상체에 의해 형성될 것이다.

[0106] 특정 실시양태에서, 관심 유전자 발현의 "증가된" 또는 "감소된" 발현에 대한 기준 값은 전술된 방법들 중 임의의 방법에 의해 잘 문서화된 질환을 갖는 대상체로부터 분리된 1개 또는 수개의 샘플에서 분석을 수행하는 단계를 포함하는 통상의 수단으로 관심 유전자의 발현 수준을 백분위수로 계산함으로써 결정된다. 그 다음, 관심 유전자의 "감소된" 수준은 바람직하게는 관심 유전자의 발현 수준이 정상 집단에서의 50번째 백분위수 이하(예를 들면, 정상 집단에서의 60번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 70번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 80번째 백분위수 이하의 발현 수준, 정상 집단에서의 90번째 백분위수 이하의 발현 수준 및 정상 집단에서의 95번째 백분위수 이하의 발현 수준을 포함함)인 샘플로 배정될 수 있다. 그 다음, 관심 유전자의 "증가된" 발현 수준은 바람직하게는 c-MAF 유전자 발현 수준이 정상 집단에서의 50번째 백분위수 이상

(예를 들면, 정상 집단에서의 60번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 70번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 80번째 백분위수 이상의 발현 수준, 정상 집단에서의 90번째 백분위수 이상의 발현 수준 및 정상 집단에서의 95번째 백분위수 이상의 발현 수준을 포함함)인 샘플로 지정될 수 있다.

[0107] 당업자는 일차 암 종양이 전이될 경향을 예측하는 것이 확인될 모든 대상체들(즉, 100%의 대상체)에 대해 정확할 필요가 없다는 것을 이해할 것이다. 그럼에도 불구하고, 상기 용어는 대상체들(예를 들면, 코호트 연구에서 코호트)의 통계적으로 유의한 부분을 확인할 수 있을 것을 요구한다. 당업자는 다양한 잘 공지되어 있는 통계적 평가 수단, 예를 들면, 신뢰구간의 측정, p-값의 측정, 스튜던트 T 검정, 만-휘트니 검정 등을 이용하여 단순한 방식으로 부분이 통계적으로 유의한지를 확인할 수 있다. 상세한 설명은 문헌(Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983)에 제공되어 있다. 바람직한 신뢰구간은 90% 이상, 95% 이상, 97% 이상, 98% 이상 또는 99% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.1, 0.05, 0.01, 0.005 또는 0.0001이다. 보다 바람직하게는, 집단의 대상체의 60% 이상, 70% 이상, 80% 이상 또는 90% 이상이 본 발명의 방법에 의해 적절하게 확인될 수 있다.

[0108] 또 다른 실시양태에서, 골로의 전이는 골용해성 골 전이이다.

[0109] 또 다른 실시양태에서, 평균을 초과하는 관심 유전자의 발현 수준이 골 전이의 증가된 위험을 나타내는 것은 상기 위험이 관심 유전자의 발현 수준에 비례한다는 것이다. 따라서, 암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험은 용량 의존적이다.

[0110] 관심 유전자의 발현 수준을 기초로 암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 방법

[0111] 또 다른 양태에서, 본 발명은

[0112] i) 프로브를 사용하여 골 전이성 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계, 및

[0113] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계

[0114] 를 포함하는, 프로브를 사용하여 골 전이성 암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제2 방법)으로서, 이때 상기 기준 값에 비해 상기 유전자의 증가된 발현 수준이 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0115] 본 발명의 제2 방법은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.

[0116] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제2 방법은 단일 마커로서 관심 유전자의 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.

[0117] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 수득된 관심 유전자의 발현 수준은 기준 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 발현 수준이다. 관심 유전자의 발현 수준의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가져야 한다. 분석되는 종양의 종류에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제2 방법을 이용하는 경우, 기준 샘플은 골 전이를 앓고 있지 않은 암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이를 앓고 있지 않은 암을 갖는 대상체들의 생검 샘플들 중 종양 조직 집단에서 측정된 관심 유전자의 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.

[0118] 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준이 측정되고 대조군 샘플과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 대조군 샘플에서의 그의 발현 수준에 비해 증가되어 있는 경우, 이것은 좋지 않은 임상 결과를 나타낸다.

[0119] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0120] 또 다른 특정 실시양태에서, 관심 유전자의 발현 수준의 정량은 상기 유전자의 메신저 RNA(mRNA), 상기 mRNA의 단편, 상기 유전자의 상보적 DNA(cDNA) 또는 상기 cDNA의 단편의 정량을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 발현 수준은 정량적 중합효소 연쇄 반응(PCR), 또는 DNA 또는 RNA 어레이에 의해 정량된다.

[0121] 또 다른 실시양태에서, 관심 유전자의 발현 수준의 정량은 상기 유전자에 의해 코딩된 단백질 또는 이의 변이체의 수준의 정량을 포함한다. 보다 바람직한 실시양태에서, 단백질 수준은 웨스턴 블롯, 면역조직화학, ELISA 또는 단백질 어레이에 의해 측정된다.

[0122] 또 다른 실시양태에서, 기준 샘플은 전이를 앓고 있지 않은 대상체로부터의 암의 종양 조직 샘플이다.

- [0123] 하기 파라미터들을 포함하나 이들로 한정되지 않는, 환자의 임상 결과를 확인하기 위해 널리 허용되는 임의의 파라미터가 본 발명에서 사용될 수 있다:
- [0124] • 본 발명에서 사용된 바와 같이, 연구 기간 동안 질환이 재발되지 않은, 완전히 관해된 대상체의 비율을 의미하는 질환 부재 진행;
- [0125] • 본 발명에서 사용된 바와 같이, 질환에 대한 치료 후 대상체가 질환의 증상 없이 생존하는 기간으로서 이해되는 질환 부재 생존(DFS);
- [0126] • 본 발명에서 사용된 바와 같이, 완전한 또는 부분적인 반응이 관찰되는 치료된 대상체의 비율을 의미하는 목적 반응;
- [0127] • 본 발명에서 사용된 바와 같이, 완전한 반응, 부분 적인 반응, 미미한 반응 또는 6개월 이상 동안 안정한 질환이 관찰되는 치료된 대상체의 비율을 의미하는 중양 제어;
- [0128] • 본원에서 사용된 바와 같이, 치료의 시작부터 암 성장의 첫 번째 측정까지의 시간으로서 정의되는 진행 부재 생존;
- [0129] • 본원에서 사용된 바와 같이, 질환이 치료된 후 질환이 악화되기 시작할 때까지의 시간을 의미하는 진행까지의 시간(TTP)(용어 "진행"은 앞서 정의되어 있음);
- [0130] • 본원에서 사용된 바와 같이, 치료의 시작 후 처음 6개월 이내에 진행을 갖지 않는 대상체의 백분율을 의미하는 6개월 진행 부재 생존율 또는 "PFS6"; 및
- [0131] • 본원에서 사용된 바와 같이, 연구에 등록된 대상체의 절반이 여전히 생존하고 있는 시간을 의미하는 중간 생존.
- [0132] 임상 결과를 지칭하기 위해 본원에서 사용된 용어 "중지 않은" 또는 "좋은"은 대상체가 유리한 또는 불리한 결과를 보일 것이라는 것을 의미한다. 당업자가 이해할 바와 같이, 확률의 이러한 평가는 정확한 것이 바람직하지만, 진단되는 대상체의 100%에 대해 정확하지 않을 수 있다. 그러나, 상기 용어는 대상체의 통계적으로 유의한 부분이 주어진 결과에 대한 성향을 갖는 것으로서 확인될 수 있을 것을 요구한다. 당업자는 다양한 잘 공지되어 있는 통계적 평가 수단, 예를 들면, 신뢰구간의 측정, p-값 측정, 스튜던트 T 검정, 만-휘트니 검정 등을 이용하여 부분이 통계적으로 유의한지를 용이하게 확인할 수 있다. 상세한 설명은 문헌(Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983)에서 발견된다. 바람직한 신뢰구간은 약 50% 이상, 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상, 약 90% 이상 또는 약 95% 이상이다. p-값은 바람직하게는 0.05, 0.01, 0.005 또는 0.0001 미만이다. 보다 바람직하게는, 집단의 대상체의 약 60% 이상, 약 70% 이상, 약 80% 이상 또는 약 90% 이상이 본 발명의 방법에 의해 적절하게 확인될 수 있다.
- [0133] 암을 갖는 환자에서 맞춤형 요법을 디자인하는 방법
- [0134] 최신기술 수준에서 잘 공지되어 있는 바와 같이, 암을 앓고 있는 대상체에게 투여되는 치료는 상기 암이 양성 종양인지, 즉 전이될 확률이 높은지, 아니면 상기 암이 양성 종양인지에 의존한다. 제1 가정에서, 선택되는 치료는 전신 치료, 예컨대, 화학요법이고, 제2 가정에서 선택되는 치료는 국소 치료, 예컨대, 방사선요법이다.
- [0135] 따라서, 본 발명에 기재된 바와 같이, 암세포에서의 관심 유전자의 과다발현이 골 전이의 존재와 관련되어 있는 한, 관심 유전자의 발현 수준은 상기 암을 앓고 있는 대상체를 위한 가장 적합한 요법의 관점에서 결정하는 데에 유용하다.
- [0136] 따라서, 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0137] i) 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- [0138] ii) 단계 i)에서 획득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0139] 를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제3 방법)으로서, 이때 상기 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 수용적인 시험관내 방법에 관한 것이다. 발현 수준이

상기 기준 값에 비해 증가되어 있지 않은 경우, 상기 대상체는 골 전이를 예방하고/하거나 치료하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 수용적이지 않다.

[0140] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0141] 본 발명의 제3 방법은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.

[0142] 또 다른 특정 실시양태에서, 본 발명의 제3 방법은 단일 마커로서 관심 유전자의 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.

[0143] 본 발명의 제3 방법의 경우, 샘플은 대상체의 일차 종양 조직 샘플일 수 있다.

[0144] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 수득된 관심 유전자의 발현 수준은 기준 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플에서 상기 유전자의 발현 수준이다. 관심 유전자의 발현 수준의 측정은 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 관련되어야 한다. 분석되는 종양의 종류에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 바람직하게는, 기준 샘플은 전이되지 않은 암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 암을 갖는 대상체들의 생검 샘플들 중 종양 조직 집단에서 측정된 관심 유전자의 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.

[0145] 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준이 측정되고 기준 값과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 전이를 예방하고/하거나(대상체에서 아직 전이가 일어나지 않은 경우) 치료하는(대상체에서 이미 전이가 일어난 경우) 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 수용적이라는 결론을 도출할 수 있다.

[0146] 암이 전이된 경우, 화학요법, 호르몬 치료, 면역요법 또는 이들의 조합을 포함하나 이들로 한정되지 않는 전신 치료가 이용될 수 있다. 또한, 방사선요법 및/또는 수술이 이용될 수 있다. 치료의 선택은 일반적으로 일차 암의 종류, 크기, 전이의 위치, 환자의 연령 및 일반적인 건강, 및 이전에 사용된 치료의 종류에 의존한다.

[0147] 전신 치료는 전신에 도달하는 치료, 예컨대, 다음과 같은 치료이다:

[0148] - 화학요법은 암세포를 파괴하는 약제의 사용이다. 약제는 일반적으로 경구 또는 정맥내 경로를 통해 투여된다. 종종, 화학요법은 방사선 치료와 함께 사용된다. 암에 적합한 화학요법 치료제는 하기 치료제들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다: 안트라사이클린(anthracyclines)(독소루비신(doxorubicin), 에피루비신(epirubicin), 페길화된(pegylated) 리포솜 독소루비신), 택산(Taxanes)(파클리탁셀(paclitaxel), 독세탁셀(docetaxel), 파클리탁셀에 결합된 알부민 나노입자), 5-플루오로우라실(연속 관주 5-FU, 카페시타빈(capecitabine)), 빈카 알칼로이드(Vinca alkaloids)(비노렐빈(vinorelbine), 빈블라스틴(vinblastine)), 겐시타빈(Gemcitabine), 백금 염(시스플라틴(cisplatin), 카보플라틴(carboplatin)), 사이클로포스프아미드, 에토포사이드(Etoposide) 및 상기 치료제들 중 하나 이상의 조합물, 예컨대, 사이클로포스프아미드/안트라사이클린 +/- 5-플루오로우라실 요법(예컨대, 독소루비신/사이클로포스프아미드(AC), 에피루비신/사이클로포스프아미드(EC), 사이클로포스프아미드/에피루비신/5-플루오로우라실(CEF), 사이클로포스프아미드/독소루비신/5-플루오로우라실(CAF), 5-플루오로우라실/에피루비신/사이클로포스프아미드(FEC)), 사이클로포스프아미드/메토트렉세이트/5-플루오로우라실(CMF), 안트라사이클린/택산(예컨대, 독소루비신/파클리탁셀 또는 독소루비신/독세탁셀), 독세탁셀/카페시타빈, 겐시타빈/파클리탁셀, 택산/백금 요법(예컨대, 파클리탁셀/카보플라틴 또는 독세탁셀/카보플라틴).

[0149] - 면역요법은 환자의 면역 시스템 자체가 암과 싸우도록 돕는 치료이다. 환자에서 전이를 치료하는 데에 사용되는 여러 종류의 면역요법이 존재한다. 이들은 사이토카인, 단일클론 항체 및 항종양 백신을 포함하나 이들로 한정되지 않는다.

[0150] 또 다른 양태에서, 암은 수술을 요구할 수 있다. 통상의 수술은 갑상선절제술 또는 폐엽절제술이다.

[0151] 또 다른 양태에서, 방사성 요오드-131은 수술 후 및 암의 치료 동안 잔류 갑상선 조직의 절제를 위해 유두암 또는 소포암을 갖는 환자에서 사용된다. 수질암, 역형성 암 및 대다수의 휘르틀레(Hurthle) 세포암을 갖는 환자는 이 요법으로부터 이익을 얻지 않는다.

[0152] 또 다른 양태에서, 암이 절제불가능할 때, 암이 절제 후 재발할 때, 또는 골 전이로부터의 통증을 경감시키기 위해 외부 방사선조사가 사용될 수 있다.

[0153] 또 다른 양태에서, 치료제는 알파라딘(Alpharadin)(라듐-223 디클로라이드)이다. 알파라딘은 라듐-223 붕괴로부

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

[0154] 또 다른 양태에서, 치료제는 반데타닙(vandetanib)이다. 반데타닙은 수질암(MTC)을 갖는 환자에서 임상 이익을 입증한, 혈관 내피 성장인자 수용체(VEGFR), 표피 성장인자 수용체(EGFR) 및 RET 티로신 키나제의 소분자 억제제이다.

[0155] 또 다른 양태에서, 치료제는 소라페닙(sorafenib) 또는 수니티닙(sunitinib)이다. 소라페닙 및 수니티닙은 암에 대한 가능성을 보인 다른 증상을 위해 승인되어 있고 임상 시험에 대한 적격을 갖추지 않은 일부 환자들을 위해 사용되고 있다.

[0156] 또 다른 양태에서, 치료제는 mTor 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 이중 mTor/PI3 키나제 억제제이다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, mTor 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABI0099(시롤리무스(sirolimus)), 라파마이신(rapamycin)(시롤리무스), 아브락산(Abraxane)(파클리탁셀), 아브소브(Absorb)(에버롤리무스(everolimus)), 아피니토르(Afinitor)(에버롤리무스), 글리벡(Gleevec)과 함께 아피니토르, AS703026(피마서티브(pimasertib)), 악세스(Axcess)(우미롤리무스(umirrolimus)), AZD2014, BEZ235, 바이오프리덤(Biofreedom)(우미롤리무스), 바이오 매트릭스(BioMatrix)(우미롤리무스), 바이오 매트릭스 플렉스(우미롤리무스), CC115, CC223, 콤보 생물조직된 시롤리무스 용출 스텐트 오르부스니치(ORBUSNEICH)(시롤리무스), 쿠락신(Curaxin) CBLC102(메파크린(mepacrine)), DE109(시롤리무스), DS3078, 엔데버(Endeavor) DES(조타롤리무스(zotarolimus)), 엔데버 레졸루트(Resolute)(조타롤리무스), 페마라(Femara)(레트로졸(letrozole)), 호세나(Hocena)(안트로퀴놀론(antroquinolon)), INK128, 인스피론(Inspiron)(시롤리무스), IPI504(레타스피마이신(retaspimycin) 하이드로 클로라이드), KRN951(티보자닙(tivozanib)), ME344, MGA031(테플리주맵(teplizumab)), 미스텐트(MiStent) SES(시롤리무스), MKC1, 노보리(Nobori)(우미롤리무스), OSI027, OVI123(코다이세핀(cordycepin)), 팔로미드(Palomid) 529, PF04691502, 프로무스 엘리먼트(Promus Element)(에버롤리무스), PWT33597, 라파문(Rapamune)(시롤리무스), 레솔루트(Resolute) DES(조타롤리무스), RG7422, SAR245409, SF1126, SGN75(보세투주맵 마포도틴(vorsetuzumab mafodotin)), 시너지(Synergy)(에버롤리무스), 탈토르빅(Taltorvic)(리다포롤리무스(ridaforolimus)), 타세바(Tarceva)(에를로티닙(erlotinib)), 토리셀(Torisel)(템시롤리무스(temsirolimus)), 자이언스 프라임(Xience Prime)(에버롤리무스), 자이언스 V(에버롤리무스), 조맥스(Zomaxx)(조타롤리무스), 조트레스(Zortress)(에버롤리무스), 조타롤리무스 용출 말초 스텐트 메드트로닉(MEDTRONIC)(조타롤리무스), AP23841, AP24170, ARmTOR26, BN107, BN108, 캔스타틴(canstatin) 첸자임(GENZYME)(캔스타틴), CU906, ECO371, ECO565, KI1004, LOR220, NV128, 라파마이신 온코이뮤(ONCOIMMUNE)(시롤리무스), SB2602, 시롤리무스 PNP 삼양 바이오파마슈티칼스(SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS)(시롤리무스), TOP216, VLI27, VS5584, WYE125132, XL388, 애드바칸(Advacan)(에버롤리무스), AZD8055, 사이퍼 셀렉트 플러스(Cypher Select Plus) 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 사이퍼 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), 약제 코팅된 풍선(시롤리무스), E-매직 플러스(Magic Plus)(시롤리무스), 엠토르(Emtor)(시롤리무스), 에스프릿(Esprit)(에버롤리무스), 에버토르(Evertor)(에버롤리무스), HBF0079, LCP-시로(Siro)(시롤리무스), 리무스 클라리스(Limus CLARIS)(시롤리무스), mTOR 억제제 셀쑈(CELLZOME), 네보(Nevo) 시롤리무스 용출 관상 스텐트(시롤리무스), nPT-mTOR, 라파칸(Rapacan)(시롤리무스), 레나셉트(Renacept)(시롤리무스), 레졸브(ReZolve)(시롤리무스), 로카스(Rocas)(시롤리무스), SF1126, 시롤림(Sirolim)(시롤리무스), 시롤리무스 노쓰 차이나(NORTH CHINA)(시롤리무스), 시롤리무스 란박시(RANBAXY)(시롤리무스), 시롤리무스 와슨(WATSON)(시롤리무스), 시로판(Siropam)(시롤리무스), 시로바(Sirova)(시롤리무스), 수프랄리무스(Supralimus)(시롤리무스), 수프랄리무스-코어(시롤리무스), 타크롤리무스(tacrolimus) 와슨(타크롤리무스), TAF93, 템시롤리무스 아코드(ACCORD)(템시롤리무스), 템시롤리무스 산도즈(SANDOZ)(템시롤리무스), TOP216, 자이언스 프라임(에버롤리무스), 및 자이언스 V(에버롤리무스). 특정 실시양

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

[0157]

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

[0158]

또 다른 양태에서, 치료제는 COX-2 억제제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 전이를 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된다: ABT963, 아세트아미노펜(Acetaminophen) 이알 존슨(ER JOHNSON)(아세트아미노펜), 아쿨라(Acular) X(케토롤락 트로메타민(ketorolac tromethamine)), BAY1019036(아스피린), BAY987111(디펜하이드라민, 나프록센(naproxen) 나트륨), BAY11902(피록시캅(piroxicam)), BCIBUCH001(이부프로펜(ibuprofen)), 카폭시캠(Capoxigem)(아프리카복심(apricoxib)), CS502, CS670(펠루비프로펜(pelubiprofen)), 디클로페낙(Diclofenac) HPBCD(디클로페낙), 디락틴(Diractin)(케토프로펜(ketoprofen)), GW406381, HCT1026(니트로플루르비프로펜(nitroflurbiprofen)), 하이아날게스(Hyanalgesic)-D(디클로페낙), 하이드로코텍스(HydrocoDex)(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판(dextromethorphan), 하이드로코돈(hydrocodone)), 이부프로펜 나트륨 화이자(PFIZER)(이부프로펜 나트륨), 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자(아세트아미노펜, 이부프로펜), 임프라코르(Impracor)(케토프로펜), IP880(디클로페낙), IP940(인도메타신(indomethacin)), ISV205(디클로페낙 나트륨), JNS013(아세트아미노펜, 트라마돌(tramadol) 하이드로클로라이드), 케토프로펜 TDS(케토프로펜), LTNS001(나프록센 에테메실(etemesil)), 메살라민(Mesalamine) 살릭스(SALIX)(메살라민), 메살라민 소파르(SOFAR)(메살라민), 메살라진(Mesalazine)(메살라민), ML3000(리코펠론(licofelone)), MRX7EAT(에토돌락(etodolac)), 나프록센 이로코(IROKO)(나프록센), NCX4016(니트로아스피린(nitroaspirin)), NCX701(니트로아세트아미노펜(nitroacetaminophen)), 누프린(Nuprin) 스콜르(SCOLR)(이부프로펜), OMS103HP(아미트립틸린(amitriptyline) 하이드로클로라이드, 케토프로펜, 옥시메타졸린(oxymetazoline) 하이드로클로라이드), 오랄리스(Oralase)(디클로페낙), 옥시코텍스(OxycoDex)(텍스트로메토르판(dextromethorphan), 옥시코돈(oxycodone)), P54, 퍼코텍스(PercoDex)(아세트아미노펜, 텍스트로메토르판, 옥시코돈), PL3100(나프록센, 포스파티딜 콜린), PSD508, R-케토프로펜(케토프로펜), 레무라(Remura)(브로페낙(bromfenac) 나트륨), ROX828(케토롤락 트로메타민), RP19583(케토프로펜 라이신), RQ00317076, SDX101(R-에토돌락(etodolac)), TDS943(디클로페낙 나트륨), TDT070(케토프로펜), TPR100, TQ1011(케토프로펜), TT063(S-플루르비프로펜(flurbiprofen)), UR8880(시미복심

(cimicoxib)), V0498TA01A(이부프로펜), VT122(에토돌락, 프로프라놀롤(propranolol)), XP20B(아세트아미노펜, 텍스트로프로폭시펜(dextropropoxyphene)), XP21B(디클로페낙 칼륨), XP21L(디클로페낙 칼륨), 조에나사(Zoenasa)(아세트시스테인, 메살라민), 아세펜(Acephen), 악티페드 플러스(Actifed Plus), 악티페드-P, 아쿨라, 아쿨라 LS, 아쿨라 PF, 아쿨라 X, 아쿠베일(Acuvail), 애드빌(Advil), 애드빌 알러지 비염(Allergy Sinus), 애드빌 감기 및 비염(Cold and Sinus), 애드빌 울혈 경감(Congestion Relief), 애드빌 PM, 애드빌 PM 캡슐, 에어 살론파스(Air Salonpas), 에어탈(Airtal), 알코올 무함유 나이퀸(NyQuil) 감기 및 플루 경감, 알레브(Aleve), 알레브 아브디 이브라힘(ABDI IBRAHIM), 알레브-D, 알카-셀트저(Alka-Seltzer), 알카-셀트저 바이엘(BAYER), 알카-셀트저 초강도(Extra Strength), 알카-셀트저 레몬-라임(Lemon-Lime), 알카-셀트저 오리지날(Original), 알카-셀트저 플러스, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침, 알카-셀트저 플러스 감기 및 기침 제제, 알카-셀트저 플러스 낮과 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 낮에 졸립지 않는 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 플루 제제, 알카-셀트저 플러스 밤 감기 제제, 알카-셀트저 플러스 비염 제제, 알카-셀트저 플러스 스파클링 오리지날(Sparkling Original) 감기 제제, 알카-셀트저 PM, 알카-셀트저 수면각성제(Wake-Up Call), 아나신(Anacin), 아나프록스(Anaprox), 아나프록스 미네르바(MINERVA), 안사이드(Ansaid), 아피톡신(Apitoxin), 아프라낙스(Apranax), 아프라낙스 애브디(abdi), 아콕시아(Arcoxia), 관절염 제제 벤가이(Arthritis Formula Bengay), 아스로텍(Arthrotec), 아사콜(Asacol), 아사콜 HD, 아사콜 메두나 아즈네이미텔(MEDUNA ARZNEIMITTEL), 아사콜 오리팜(ORIFARM), 아스피린 바이엘, 아스피린 콤플렉스(Complex), 아스피린 미그란(Migran), AZD3582, 아줄피딘(Azulfidine), 바랄간(Baralgan) M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, 베나드릴(Benadryl) 알러지, 베나드릴 낮과 밤, 베닐린(Benylin) 4 플루, 베닐린 감기 및 플루, 베닐린 감기 및 플루 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 낮과 밤, 베닐린 감기 및 비염 플러스, 베닐린 낮과 밤 감기 및 플루 경감, 베닐린 1 올-인-원(All-In-One), 브렉신(Brexin), 브렉신 안젤리니(ANGELINI), 브롬데이(Bromday), 버퍼린(Bufferin), 버스코판 플러스(Buscopan Plus), 칼돌로르(Caldolor), 칼마텔(Calmatel), 캄비아(Cambia), 카나사(Canasa), 카폭시겔(Capoxigem), 카타플람(Cataflam), 셀레브렉스(Celebrex), 셀레브렉스 오리팜, 소아용 애드빌 알러지 비염, 소아용 타이레놀(Tylenol), 소아용 타이레놀 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 감기, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 기침, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 비한, 소아용 타이레놀 플러스 플루, 소아용 타이레놀 플러스 감기 및 알러지, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 콧물, 소아용 타이레놀 플러스 기침 및 인후통, 소아용 타이레놀 플러스 다증상 감기, 클리노릴(Clinoril), 코드랄(Codral) 감기 및 플루, 코드랄 낮과 밤 낮 정제, 코드랄 낮과 밤 밤 정제, 코드랄 밤시간(Nighttime), 콜라잘(Colazal), 컴부녹스(Combunox), 콘택(Contac) 감기 플러스 플루, 콘택 감기 플러스 플루 졸립지 않은 제제, 코리시딘(Coricidin) D, 코리시딘 HBP 감기 및 플루, 코리시딘 HBP 낮과 밤 다증상 감기, 코리시딘 HBP 최대 강도의 플루, 코리시딘 HBP 밤시간 다증상 감기, 코리시딘 II 초강도 감기 및 플루, CS502, CS670, 데이프로(Daypro), 데이프로 알타, DDS06C, 데마진(Demazin) 감기 및 플루, 데마진 기침, 감기 및 플루, 데마진 낮/밤 감기 및 플루, 데마진 PE 감기 및 플루, 데마진 PE 낮/밤 감기 및 플루, 디클로페낙 HPBCD, 디메타프(Dimetapp) 낮 경감, 디메타프 다증상 감기 및 플루, 디메타프 밤 경감, 디메타프 통증 및 발열 경감, 디메타프 PE 비염 통증, 디메타프 PE 비염 통증 플러스 알러지, 디펜텀(Dipentum), 디락틴(Diractin), 디스프린(Disprin) 감기 'n' 발열, 디스프린 엑스트라(Extra), 디스프린 포르테(Forte), 디스프린 플러스, 드리스탄(Dristan) 감기, 드리스탄 주니어(Junior), 드릭소랄(Drixoral) 플러스, 두엑시스(Duexis), 다이나스타트(Dynastat), 에페탈간(Efferalgan), 에페탈간 플러스 비타민 C, 에페탈간 비타민 C, 엘릭스슈어(Elixsure) IB, 엑세드린(Excedrin) 등 및 전신, 엑세드린 편두통, 엑세드린 PM, 엑세드린 비염 두통, 엑세드린 긴장성 두통, 팔콜(Falcol), 판사막(Fansamac), 펠덴(Feldene), 페버올(FeverAll), 피오리날(Fiorinal), 코데인(Codeine)과 함께 피오리날(Fiorinal), 플라낙스(Flanax), 플렉토르 패치(Flector Patch), 플루캅(Flucam), 포트타게식(Fortagesic), 게르빈(Gerbin), 지아조(Giazo), 글라디오(Gladio), 구디스(Goody's) 등 및 전신 통증, 구디스 쿨 오렌지(Cool Orange), 구디스 초강도, 구디스 PM, 그리스리스(Greaseless) 벤가이, GW406381, HCT1026, 허 싱 이(He Xing Yi), 하이날게스-D, 하이드로코텍스, 이부프로펜 나트륨 화이자, 아세트아미노펜과 함께 이부프로펜 화이자, 아이시 핫(Icy Hot) 사노피 아벤티스(SANOFI AVENTIS), 임프라코르(Impracor), 인도신(Indocin), 인도메타신(Indomethacin) 에이피피 파마(APP PHARMA), 인도메타신 마일란(MYLAN), 유아용 타이레놀, IP880, IP940, 이레모드(Iremod), ISV205, JNS013, 청소년용 타이레놀, 주니펜(Junifen), 청소년용 강도의 애드빌, 청소년용 강도의 모트린(Motrin), 케토프로펜 TDS, 램십 맥스(Lemsip Max), 램십 맥스 올 인 원, 램십 맥스 올 나이트, 램십 맥스 감기 및 플루, 리알다(Lialda), 리스테린(Listerine) 구강 세척제, 로이즈(Lloyds) 크림, 로딘(Lodine), 로르핏(Lorfit) P, 록소닌(Loxonin), LTNS001, 머신돌(Mersyndol), 메살라민 살릭스(SALIX), 메살라민 소파(SOFAR), 메살라진, 메사살(Mesasal) 글락소(GLAXO), 메사살 사노피(SANOFI), 메술리드(Mesulid), 메트살 히트 룬(Metsal Heat Rub), 미돌 컴플리트(Midol Complete), 미돌 연장된 경감, 미돌 액체 젤, 미돌 PM, 미돌 침대용 제제, 미그란

(Migranin) 피복정, ML3000, 모빅(Mobic), 모루스(Mohrus), 모트린(Motrin), 모트린 감기 및 비염 통증, 모트린 PM, 모발리스(Movalis) 아스펜(ASPEN), MRX7EAT, 날폰(Nalfon), 날폰 페디놀(PEDINOL), 나프렐란(Napreelan), 나프로신(Naprosyn), 나프로신 알피지 라이프 사이언스(RPG LIFE SCIENCE), 나프록센 이로코(IROKO), NCX4016, NCX701, 네오프로펜(NeoProfen) 런드백(LUNDBECK), 네바낙(Nevanac), 넥세드(Nexcede), 니플란(Niflan), 노르게식(Norgesic) 메디시스(MEDICIS), 노발진(Novalgin), 누프린(Nuprin) 스콜르(SCOLR), 누로펜(Nurofen), 누로펜 감기 및 플루, 누로펜 최대 강도의 편두통, 누로펜 플러스, 누로몰(Nuromol), 비타민 C와 함께 나이켈, 오큐펜(Ocufen), OMS103HP, 오랄리스(Oralease), 오루디스(Orudis) 애보트 저펜(ABBOTT JAPAN), 오루베일(Oruvail), 오스텔록(Osteluc), 옥시코텍스(OxycoDex), P54, 파나돌(Panadol), 파나돌 악티패스트(Actifast), 파라딘(Paradine), 파라맥스(Paramax), 파페낙(Parfenac), 페데아(Pedea), 펜사이드(Pennsaid), 펜타사(Pentasa), 펜타사 오리팜, 페온(Peon), 퍼코단(Percodan), 퍼코단-데미, 퍼코텍스(PercoDex), 퍼코게식(Percogesic), 퍼팔간(Perfalgan), PL2200, PL3100, 폰스텔(Ponstel), 프렉시즈(Prexige), 프롤렌사(Prolensa), PSD508, R-케토프로펜, 란투딜(Rantudil), 렐라펜(Relafen), 레무라(Remura), 로박시살(Robaxisal), 로텍(Rotec), 로와사(Rowasa), ROX828, RP19583, RQ00317076, 루보르(Rubor), 살로팔크(Salofalk), 살론파스(Salonpas), 사리돈(Saridon), SDX101, 셀터치(Seltouch), 에스에프로와사(sfRowasa), 신바로(Shinbaro), 시누맥스(Sinumax), 시누탐(Sinutab), 시누탐 비염, 스팔트(Spalt), 스프릭스(Sprix), 스트레펜(Strefen), 수다페드(Sudafed) 감기 및 기침, 수다페드 코감기 및 비염, 수다페드 PE 감기 플러스 기침, 수다페드 PE 압박 플러스 통증, 수다페드 PE 중증 감기, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 낮 정제, 수다페드 PE 비염 낮과 밤 경감 밤 정제, 수다페드 PE 비염 플러스 소염 통증 경감, 수다페드 비염 어드밴스(Advance), 서감(Surgam), 시날고스(Synalgos)-DC, 신플렉스(Synflex), 타비스트(Tavist) 알러지/비염/두통, TDS943, TDT070, 테라플루(Theraflu) 감기 및 인후통, 테라플루 낮시간 중증 감기 및 기침, 테라플루 낮시간 발열 경감, 테라플루 발열 경감 당의정 낮시간 다증상 감기, 테라플루 발열 경감 감기 및 가슴 울혈, 토마피린(Thomapyrin), 토마피린 C, 토마피린 발포정, 토마피린 매질, 티코틸(Tilcotil), 티스폴(Tispol), 톨렉틴(Tolactin), 토라돌(Toradol), TPR100, TQ1011, 트라우마-살베(Trauma-Salbe), 트라우마-살베 퀴즈다(Kwizda), 트레오(Treo), 트렉시멧(Treximet), 트로벡스(Trovex), TT063, 타이레놀, 타이레놀 알러지 다증상, 타이레놀 등 통증, 타이레놀 감기 및 기침 낮시간, 타이레놀 감기 및 기침 밤시간, 타이레놀 감기 및 비염 낮시간, 타이레놀 감기 및 비염 밤시간, 타이레놀 코감기 울혈 중증, 타이레놀 감기 다증상 낮시간, 타이레놀 감기 다증상 밤시간 액체, 타이레놀 감기 다증상 중증, 타이레놀 감기 졸립지 않은 제제, 타이레놀 감기 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 완전한 감기, 기침 및 플루 밤시간, 타이레놀 플루 밤시간, 타이레놀 월경통, 타이레놀 PM, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 낮시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 밤시간, 타이레놀 비염 울혈 및 통증 중증, 타이레놀 비염 중증 울혈 낮시간, 타이레놀 울트라 경감, 카페인 및 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 코데인 포스페이트와 함께 타이레놀, 초고강도 벤가이 크림, 울트라셋(Ultracet), UR8880, V0498TA01A, 빅스(Vicks) 나이켈 감기 및 플루 경감, 비코프로펜(Vicoprofen), 비모보(Vimovo), 볼타렌(Voltaren) 에몰젤(Emulgel), 볼타렌 젤, 볼타렌 노바티스 컨슈머 헬스 게엠베하(NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH), 볼타렌 XR, VT122, 제포(XeFo), 제포 래피드(Rapid), 제포캠(Xefocam), 지브롬(Xibrom), XL3, 조돌(Xodol), XP20B, XP21B, XP21L, 짐소르(Zipsor) 및 조에나사(Zoenasa). 또 다른 양태에서, COX-2 억제제는 당분야에서 공지되어 있는 방법을 통해 확인될 수 있다(예를 들면, 본원에 참고로 도입되는 문헌(Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36: 109-126) 참조). 일부 양태에서, COX-2 억제제는 진행되는 암을 갖는 환자에서 전이를 치료하거나, 예방하거나 억제하는 데에 사용된다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 제2 치료제와 함께 사용된다. 일부 양태에서, 제2 치료제는 본원에 기재된 임의의 치료제이다. 일부 양태에서, COX-2 억제제는 하기 물질들로 구성된 군으로부터 선택된 제2 치료제와 함께 사용된다: 데노수맙(Denosumab), 조메타(Zometa)(http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633; last accessed 12/2/2012), 카르보잔티닙(Carbozantinib) 또는 카보잔티닙(Cabozantinib), 항체 또는 펩티드 차단 PTHLH(부갑상선 호르몬 유사 호르몬) 또는 PTHrP(부갑상선 호르몬 관련 단백질) 및 에버롤리무스.

[0159] 또 다른 양태에서, 골 전이를 예방하거나 억제하는 치료제는 하기 물질들로부터 선택된다:

[0160] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHLH) 억제제(차단 항체를 포함함) 또는 이의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7 내지 34에 상응하는 테리파라타이드(teriparatide)). 이 호르몬은 파골세포를 자극하고 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.

[0161] - 스트론튬 라벨레이트(Strontium ranelate): 대안적인 경구 치료제이고, 조골세포 증식을 자극하고 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 물질"(DAGA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.

- [0162] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기작과 관계없이 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로게스타겐(progestagen), 에스트라디올(estradiol), 드롤록시펜(droloxifene), 랄록시펜(raloxifene), 라소폭시펜(lasofloxifene), TSE-424, 타목시펜(tamoxifen), 이독시펜(idoxifene), LY353381, LY117081, 토레피펜(toremifene), 플루베스트란트(fluevestrant), 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리디닐)에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646이 있다.
- [0163] - 칼시토닌: 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0164] - 비스포스포네이트: 골 흡수 및 재흡수를 갖는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 갖는 암의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이고, 이때 후자는 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 갖거나 갖지 않는다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 요법에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트의 예로는 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트(pamidronate), 네리드로네이트(neridronate), 올파드로네이트(olpadronate), 알렌드로네이트(alendronate), 이반드로네이트(ibandronate), 리세드로네이트(risedronate), 인카드로네이트(incadronate), 졸레드로네이트(zoledronate) 또는 졸레드론산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트(예컨대, 에티드로네이트(etidronate), 클로드로네이트(clodronate), 틸루드로네이트(tiludronate) 등)가 있으나, 이들은 한정되지 않는다.
- [0165] - "카텝신(Cathepsin) K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 지칭한다. 카텝신 K 억제제의 비-한정적 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(국제 특허출원 공보 제WO 03/020278호(노바티스 파마 게엠베하(Novartis Pharma GmbH))에 기재됨); 국제 특허출원 공보 제WO 03/020721호(노바티스 파마 게엠베하) 및 국제 특허출원 공보 제WO 04/000843호(아스트라제네카 아베(ASTRAZENECA AB))에 기재된 피롤로-피리미딘; 및 국제 특허출원 공보 제WO 00/55126호(악시스 파마슈티칼스(Axys Pharmaceuticals)) 및 국제 특허출원 공보 제WO 01/49288호(머크 프로스트 캐나다 앤드 컴파니(Merck Frosst Canada & Co.) 및 악시스 파마슈티칼스)에 기재된 억제제가 있다.
- [0166] - 본원에서 사용된 "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고 골용해성 병변을 갖는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 물질은 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데에 있어서 일정한 역할을 수행할 수 있다. 노바티스의 BHQ880은 혁신 신약인 전체 인간 항-DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다(Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract).
- [0167] - 본원에서 사용된 "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유발된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 지칭한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서만 아니라 조골세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 이들 종류의 세포들 모두에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 듯하다. 동시에, 조골세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 발생성 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)를 포함하는 골 전이의 병리학적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데에 있어서 실행 가능한 전략일 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀릭시스 인코포레이티드(Exelixis, Inc.))은 MET에 의해 유발된 종양 이탈을 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고 전이를 감소시키고 혈관신생(종양 성장을 뒷받침하는 데에 필요한 새로운 혈관의 형성)을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또 다른 적합한 이중 억제제는 E7050(N-[2-플루오로-4-({2-[4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일]카보닐아미노피리딘-4-일}옥시)페닐]-N'-(4-플루오로페닐)사이클로프로판-1,1-디카복사미드(2R,3R)-타르트레이트)(CAS 928037-13-2) 또는 포레티닙(Foretinib)(GSK1363089 또는 XL880으로서도 공지되어 있음, CAS 849217-64-7)이다.
- [0168] - 본원에서 사용된 "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. RANKL은 간질의 조골세포 막 및 T-림프구 세포의 표면 상에서 발견되고, 이들 T-림프구 세포는 RANKL을 분비하는 능력을 나타내

는 유일한 세포이다. 그의 주요 기능은 골 재흡수에 관여하는 세포인 파골세포의 활성화이다. RANKL 억제제는 RANKL과 그의 수용체(RANK)의 결합을 차단함으로써, RANK-매개된 신호전달을 차단함으로써, 또는 RANKL의 전사 또는 번역을 차단하여 RANKL의 발현을 감소시킴으로써 작용할 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 적합한 RANKL 길항제 또는 억제제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:

- [0169] o RANKL에 결합할 수 있고 RANK 단백질의 세포의 도메인의 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 무인 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포의 도메인을 포함할 수 있거나, 대안적으로 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다.
- [0170] o 오스테오프로테게린(Osteoprotegerin) 또는 RANKL 결합 능력을 갖는 그의 변이체.
- [0171] o RANKL 특이적 안티센스 분자
- [0172] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임(Ribozymes)
- [0173] o 특이적 항-RANKL 항체. "항-RANKL 항체 또는 RANKL에 대해 유도된 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는, 핵 인자 κ 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 억제될 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명과 관련하여 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, 단편 "Fab", "F(ab')₂" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0174] o 특이적 항-RANKL 나노바디. 나노바디는 천연 발생 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 원래 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄를 결여하는 전체적으로 기능적인 항체를 갖는다는 발견 후 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고, 이때 FR1 내지 FR4는 골격 영역 1 내지 4이고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3이다. 이 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 함유한다. 중요한 것은 클로닝되고 단리된 VHH 도메인이 원래의 중쇄 항체의 전체 항원 결합 능력을 보유하는 완벽히 안정한 폴리펩티드라는 것이다. 그들의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애플린스(Ablynx)에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.
- [0175] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오프로테게린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 데노수맵이다(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, CAS 번호 615258-40-7)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 데노수맵은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 전체 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 데노수맵의 다양한 양태는 미국 특허 제6,740,522호, 제7,411,050호, 제7,097,834호 및 제7,364,736호(이들 각각의 전체 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 데노수맵과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구조물이다.
- [0176] 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 나노바디는 국제 특허출원 공보 제WO2008142164호(이의 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 ALX-0141(애플린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 일부 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.
- [0177] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라벨레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 칼시토닌 및 카텝신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.
- [0178] 한 실시양태에서, 일차 암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록(Maraviroc)이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 비크리비록(Vicriviroc)이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850). 일부 양태에서, CCR5 길항제는

아플라비록(Aplaviroc)이다(Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2(Suppl. 1): S13). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘(spiropiperidine) CCR5 길항제이다(Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19 (18): 5401-5406). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS. 4(2): 82-7).

- [0179] 보다 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0180] 바람직한 실시양태에서, 라툼-223 염은 라툼-223 디클로라이드로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0181] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 상기 언급된 물질들 중 하나 초과와 물질들이 조합되거나, 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬 치료와 조합될 수 있는 조합 치료가 수행될 수 있다.
- [0182] 암 환자에서 이른 골 전이를 예측하는 방법
- [0183] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체에서 프로브를 사용하여 골 전이의 위험을 측정하는 시험관내 방법으로서, 이때 평균 값 + 1 표준 편차보다 더 높은 상기 유전자의 발현 수준이 이른 골 전이의 증가된 위험을 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0184] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 매우 이른 골 전이이다.
- [0185] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0186] 본원에서 사용된 바와 같이, "이른 골 전이"는 암을 갖는 환자에서 수술 후 5년 이내에 나타나는 골 전이를 의미한다.
- [0187] 본원에서 사용된 바와 같이, "매우 이른 골 전이"는 암을 갖는 환자에서 수술 후 3년 이내에 나타나는 골 전이를 의미한다.
- [0188] 본 발명의 제4 방법은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0189] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제4 방법은 단일 마커로서 관심 유전자의 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 다른 마커가 정량되지 않는다. 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다. 관심 유전자의 발현 수준은 본 발명의 제1 방법에 대해 이전에 개시된 바와 같이 정량될 수 있다.
- [0190] 제2 단계에서, 평균 값 + 1 표준 편차보다 더 높은 상기 유전자의 발현 수준은 이른 골 전이의 증가된 위험을 나타낸다.
- [0191] 본원에서 사용된 바와 같이, "평균 수준"은 동등하지 않은 값들의 세트의 일반적인 유의성을 요약하거나 대표하는 (평균, 모드 또는 중간으로서) 발현 수준의 단일 값을 의미한다. 바람직한 실시양태에서, 평균 수준은 암 종양의 대표적인 코호트로부터 획득된 발현 수준의 평균에 상응한다. 환자 코호트는 평가하고자 하는 개별 환자를 대표하는 연령에 의해 정의된다.
- [0192] 본원에서 사용된 바와 같이, "표준 편차"는 숫자 집합의 분산의 척도를 의미한다. 예를 들면, 관심 유전자의 평균 정상 수준에 대한 표준 편차는 암 샘플에서 발견된 관심 유전자 수준의 집합의 분산이다. 데이터가 보다 더 흩어져 있을수록 편차가 더 높다. 표준 편차는 관찰된 값의 제곱 편차의 평균의 제곱근을 빈도 분포에서의 그들의 평균으로부터 차감함으로써 취득될 수 있다.
- [0193] 일단 암을 갖는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준이 측정되고 평균 수준과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 평균 + 평균 수준에 대한 1 표준 편차보다 더 높은 경우, 상기 대상체가 이른 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다는 결론을 도출할 수 있다.
- [0194] 골 전이를 갖는 암 환자에서 맞춤형 요법을 디자인하는 방법
- [0195] 또 다른 양태에서, 본 발명은

- [0196] i) 암을 갖는 대상체의 골 전이성 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계, 및
- [0197] ii) 단계 i)에서 수득된 발현 수준을 기준 값과 비교하는 단계
- [0198] 를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 위한 맞춤형 요법을 디자인하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제5 방법)으로서, 이때 관심 유전자의 발현 수준이 상기 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 상기 대상체가 골 분해를 예방하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 수용적인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0199] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.
- [0200] 본 발명의 제5 방법은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준(또는 관심 유전자의 전위 또는 증폭)을 정량하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 본 발명의 제5 방법의 경우, 샘플은 골 전이로부터의 조직 샘플일 수 있다.
- [0201] 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 제5 방법은 단일 마커로서 관심 유전자의 발현 수준만을 정량하는 단계를 포함한다. 즉, 상기 방법은 임의의 추가 마커의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하지 않는다.
- [0202] 제2 단계에서, 대상체의 종양 샘플에서 수득된 관심 유전자의 발현 수준(또는 관심 유전자의 전위 또는 증폭)은 기준 값과 비교된다. 바람직한 실시양태에서, 기준 값은 대조군 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준이다. 분석될 종양의 종류에 따라, 대조군 샘플의 정확한 성질이 달라질 수 있다. 따라서, 본 발명의 제5 방법을 수반하는 경우, 기준 샘플은 전이되지 않은 암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 암을 갖는 대상체들의 생검 샘플들 중 종양 조직 집단에서 측정된 관심 유전자의 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.
- [0203] 일단 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준이 측정되고 기준 값(예를 들면, 대조군 샘플의 관심 유전자의 발현 수준)과 비교되면, 상기 유전자의 발현 수준이 기준 값에 비해 증가되어 있는 경우, 이것은 상기 대상체가 골 분해를 피하거나 예방하는 것을 목적으로 하는 요법을 받는 것에 수용적이라는 것을 나타낸다.
- [0204] 골 분해를 피하고/피하거나 예방하기 위해 사용되는 물질의 예시적 예로는 하기 물질들이 있으나 이들로 한정되지 않는다:
- [0205] - 부갑상선 호르몬(PTH) 및 부갑상선 유사 호르몬(PTHrP) 억제제(차단 항체를 포함함) 또는 이의 재조합체 형태(PTH의 아미노산 7 내지 34에 상응하는 테리파라타이드). 이 호르몬은 파골세포를 자극하고 그의 활성을 증가시킴으로써 작용한다.
- [0206] - 스트론튬 라벨레이트: 대안적인 경구 치료제이고, 조골세포 증식을 자극하고 파골세포 증식을 억제하기 때문에 "이중 작용 골 물질"(DAGA)로서 지칭되는 약물 군의 일부를 형성한다.
- [0207] - "에스트로겐 수용체 조절제"(SERM)는 기작과 관계없이 에스트로겐과 수용체의 결합을 방해하거나 억제하는 화합물을 지칭한다. 에스트로겐 수용체 조절제의 예로는 특히 에스트로겐 프로그스테라겐, 에스트라디올, 드롤록시펜, 탈록시펜, 라소폭시펜, TSE-424, 타목시펜, 이독시펜, LY353381, LY117081, 토레피펜, 플루베스트란트, 4-[7-(2,2-디메틸-1-옥소프로폭시-4-메틸-2-[4-[2-(1-피페리디닐)에톡시]페닐]-2H-1-벤조피란-3-일]-페닐-2,2-디메틸프로파노에이트 4,4'-디하이드록시벤조페논-2,4-디니트로페닐-하이드라존 및 SH646이 있다.
- [0208] - 칼시토닌: 칼시토닌 수용체를 통해 파골세포 활성을 직접적으로 억제한다. 칼시토닌 수용체는 파골세포의 표면 상에서 확인되었다.
- [0209] - 비스포스포네이트: 골 흡수 및 재흡수를 갖는 질환, 예컨대, 골다공증 및 골 전이를 갖는 암의 예방 및 치료를 위해 사용되는 의약품의 군이고, 이때 후자는 유방암 및 전립선암과 관련된 고칼슘혈증을 갖거나 갖지 않는다. 본 발명의 제5 방법에 의해 디자인된 요법에서 사용될 수 있는 비스포스포네이트의 예로는 질소성 비스포스포네이트(예컨대, 파미드로네이트, 네리드로네이트, 올파드로네이트, 알렌드로네이트, 이반드로네이트, 리세드로네이트, 인카드로네이트, 졸레드로네이트 또는 졸레드론산 등) 및 비-질소성 비스포스포네이트(예컨대, 에티드로네이트, 클로드로네이트, 틸루드로네이트 등)가 있다.
- [0210] - "카텝신 K 억제제"는 카텝신 K에서 시스테인 프로테아제 활성을 방해하는 화합물을 지칭한다. 카텝신 K 억제제의 비-한정적 예로는 4-아미노-피리미딘-2-카보니트릴 유도체(국제 특허출원 공보 제WO 03/020278호(노바티스 파마 게엠베하)에 기재됨); 국제 특허출원 공보 제WO 03/020721호(노바티스 파마 게엠베하) 및 국제 특허출원 공보 제WO 04/000843호(아스트라제네카 아베)에 기재된 피롤로-피리미딘; 및 국제 특허출원 공보 제WO 00/55126호(악시스 파마슈티칼스) 및 국제 특허출원 공보 제WO 01/49288호(머크 프로스트 캐나다 앤드 컴파니 및 악시스

파마슈티칼스)에 기재된 억제제가 있다.

- [0211] - 본원에서 사용된 바와 같이, "DKK-1(Dickkopf-1) 억제제"는 DKK-1 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. DKK-1은 주로 성인 골에서 발현되고 골용해성 병변을 갖는 골수종 환자에서 상향조절되어 있는 가용성 Wnt 경로 길항제이다. DKK-1을 표적화하는 물질은 다발성 골수종 환자에서 골용해성 골 질환을 예방하는 데 있어서 일정한 역할을 수행할 수 있다. 노바티스의 BHQ880은 혁신 신약인 전체 인간 항-DKK-1 중화 항체이다. 임상전 연구는 BHQ880이 골 형성을 촉진하여 종양에 의해 유도된 골용해성 질환을 억제한다는 가설을 뒷받침한다(Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract).
- [0212] - 본원에서 사용된 바와 같이, "이중 MET 및 VEGFR2 억제제"는 MET에 의해 유발된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제인 임의의 화합물을 지칭한다. MET는 종양 세포 및 내피 세포에서 뿐만 아니라 조골세포(골 형성 세포) 및 파골세포(골 제거 세포)에서도 발현된다. HGF는 이들 종류의 세포들 모두에서 MET에 결합하여 다수의 자가분비 및 측분비 루프에서의 중요한 역할을 MET 경로에 제공한다. 종양 세포에서 MET의 활성화는 전이성 골 병변의 확립에 있어서 중요한 듯하다. 동시에, 조골세포 및 파골세포에서 MET 경로의 활성화는 비정상적인 골 성장(즉, 발생성 병변) 또는 파괴(즉, 용해성 병변)를 포함하는 골 전이의 병리학적 특징을 초래할 수 있다. 따라서, MET 경로의 표적화는 전이성 골 병변의 확립 및 진행을 예방하는 데 있어서 실행가능한 전략일 수 있다. 이전에 XL184(CAS 849217-68-1)로서 공지되어 있던 카보잔티닙(엑셀렉시스 인코포레이티드)은 MET에 의해 유발된 종양 이타를 차단하도록 디자인된, MET 및 VEGF 경로의 강력한 이중 억제제이다. 다수의 임상전 연구에서, 카보잔티닙은 종양 세포를 사멸시키고 전이를 감소시키고 혈관신생(종양 성장을 뒷받침하는 데에 필요한 새로운 혈관의 형성)을 억제하는 것으로 밝혀졌다. 또 다른 적합한 이중 억제제는 E7050(N-[2-플루오로-4-(2-[4-(4-메틸피페라진-1-일)피페리딘-1-일]카보닐아미노피리딘-4-일)옥시]페닐]-N'-(4-플루오로페닐)사이클로프로판-1,1-디카복사아미드(2R,3R)-타르트레이트)(CAS 928037-13-2) 또는 포레티닙(GSK1363089 또는 XL880으로서도 공지되어 있음, CAS 849217-64-7)이다.
- [0213] - 본원에서 사용된 바와 같이, "RANKL 억제제"는 RANK 활성을 감소시킬 수 있는 임의의 화합물을 지칭한다. RANKL은 간질의 조골세포 막 및 T-림프구 세포의 표면 상에서 발견되고, 이들 T-림프구 세포는 RANKL을 분비하는 능력을 나타내는 유일한 세포이다. 그의 주요 기능은 골 재흡수에 관여하는 세포인 파골세포의 활성화이다. RANKL 억제제는 RANKL과 그의 수용체(RANK)의 결합을 차단함으로써, RANK-매개된 신호전달을 차단함으로써, 또는 RANKL의 전사 또는 번역을 차단하여 RANKL의 발현을 감소시킴으로써 작용할 수 있다. 본 발명에서 사용되기에 적합한 RANKL 길항제 또는 억제제는 하기 물질들을 포함하나 이들로 한정되지 않는다:
- [0214] o RANKL에 결합할 수 있고 RANK 단백질의 세포외 도메인의 전체 또는 단편을 포함하는 적합한 RANK 단백질. 가용성 RANK는 무린 또는 인간 RANK 폴리펩티드의 신호 펩티드 및 세포외 도메인을 포함할 수 있거나, 대안적으로 신호 펩티드가 제거되어 있는 단백질의 성숙 형태가 사용될 수 있다.
- [0215] o 오스테오포로테게린 또는 RANKL 결합 능력을 갖는 그의 변이체.
- [0216] o RANKL 특이적 안티센스 분자
- [0217] o RANKL의 전사된 생성물을 프로세싱할 수 있는 리보자임
- [0218] o 특이적 항-RANKL 항체. "항-RANKL 항체 또는 RANKL에 대해 유도된 항체"는 본원에서 하나 이상의 RANKL 기능을 억제하는, 핵 인자 κ 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 억제될 단백질로 동물을 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명과 관련하여 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, 단편 "Fab", "F(ab')₂" 및 "Fab'", Fv, scFv, 디아바디 및 이중특이적 항체를 포함한다.
- [0219] o 특이적 항-RANKL 나노바디. 나노바디는 천연 발생 중쇄 항체의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 함유하는 항체 유래의 치료 단백질이다. 나노바디 기술은 원래 낙타과 동물(낙타 및 라마)이 경쇄를 결여하는 전체적으로 기능적인 항체를 갖는다는 발견 후 개발되었다. 나노바디의 일반적인 구조는 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4이고, 이때 FR1 내지 FR4는 골격 영역 1 내지 4이고, CDR1 내지 CDR3은 상보성 결정 영역 1 내지 3이다. 이 중쇄 항체는 단일 가변 도메인(VHH) 및 2개의 불변 도메인(CH2 및 CH3)을 함유한다. 중요한 것은 클로닝되고 단리된 VHH 도메인이 원래의 중쇄 항체의 전체 항원 결합 능력을 보유하는 완벽히 안정한 폴리펩티드라는 것이다. 그들

의 독특한 구조적 및 기능적 성질을 갖는 이들 새로 발견된 VHH 도메인들은 애플린스에 의해 나노바디로 명명된 신세대 치료 항체의 기초를 형성한다.

[0220] 한 실시양태에서, RANKL 억제제는 RANKL 특이적 항체, RANKL 특이적 나노바디 및 오스테오포로테게린으로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 단일클론 항체이다. 보다 구체적인 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 테노수맙이다(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3): 210-215, CAS 번호 615258-40-7)(이의 전체 내용은 본원에 참고로 도입됨). 테노수맙은 RANKL에 결합하여 그의 활성화를 방해하는 전체 인간 단일클론 항체이다(이 항체는 RANK 수용체에 결합하지 않는다). 테노수맙의 다양한 양태는 미국 특허 제6,740,522호, 제7,411,050호, 제7,097,834호 및 제7,364,736호(이들 각각의 전체 내용은 온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 의해 커버된다. 또 다른 실시양태에서, RANKL 억제제는 테노수맙과 동일한 에피토프에 결합하는 항체, 항체 단편 또는 융합 구축물이다.

[0221] 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 나노바디는 국제 특허출원 공보 제WO2008142164호(이의 내용은 본원에 참고로 도입됨)에 기재된 나노바디들 중 임의의 나노바디이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 항-RANKL 항체는 ALX-0141(애플린스)이다. ALX-0141은 폐경후 골다공증, 류마티스 관절염, 암 및 일부 약물치료와 관련된 골 손실을 억제하고 건강한 골 대사의 균형을 회복하도록 디자인되었다.

[0222] 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트, RANKL 억제제, PTH 및 PTHLH 억제제 또는 PRG 유사체, 스트론튬 라넬레이트, DKK-1 억제제, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제, 에스트로겐 수용체 조절제, 칼시토닌, 및 카텅신 K 억제제로 구성된 군으로부터 선택된다. 보다 바람직한 실시양태에서, 골 분해를 예방하는 물질은 비스포스포네이트이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 비스포스포네이트는 졸레드론산이다.

[0223] 한 실시양태에서, 일차 유방암 종양이 골로 전이되는 것을 예방하거나 억제하기 위해 CCR5 길항제가 투여된다. 한 실시양태에서, CCR5 길항제는 대분자이다. 또 다른 실시양태에서, CCR 길항제는 소분자이다. 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 마라비록이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012, CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research, 72:3839-3850). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 비크리비록이다(Velasco-Velaquez, M. et al. 2012, CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research, 72:3839-3850). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 아플라비록이다(Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2(Suppl. 1): S13). 일부 양태에서, CCR5 길항제는 스피로피페리딘 CCR5 길항제이다(Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 19 (18): 5401-5406). 일부 실시양태에서, CCR5 길항제는 INCB009471이다(Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an overview. Curr. Opin. HIV AIDS, 4(2): 82-7).

[0224] 보다 바람직한 실시양태에서, 이중 MET 및 VEGFR2 억제제는 카보잔티닙, 포레티닙 및 E7050으로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0225] 바람직한 실시양태에서, 라툼-223 염은 라툼-223 디클로라이드로 구성된 군으로부터 선택된다.

[0226] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 상기 언급된 물질들 중 하나 초과와 물질들이 조합되거나, 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬 치료와 조합될 수 있는 조합 치료가 수행될 수 있다.

[0227] 관심 유전자의 증폭의 검출을 기초로 암에서 전이를 예측하는 방법

[0228] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 상기 암을 앓고 있는 대상체에서 암의 골 전이를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제6 방법)으로서, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 관심 유전자의 증폭이 골 전이를 일으키는 증가된 위험을 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0229] 일부 실시양태에서, 증폭은 16q23 좌위의 영역에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 약 16번 염색체의 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이(센트로미어(centromere)부터 텔로미어(telomere)까지)의 염색체 영역의 임의의 부분에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 약 16번 염색체의 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이의 게놈 영역(DNA 반복 요소는 배제됨)에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 그 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정된다.

[0230] 특정 실시양태에서, 증폭되는 관심 유전자는 MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA이다. 특정 실시양태에서, 관

심 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 증폭을 측정함으로써 측정될 수 있다. 바람직하게는, 그의 증폭이 관심 유전자의 증폭의 존재를 표시하는 염색체 영역은 MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 및 5sRNA 유전자를 포함하는 좌위 16q22-q24이다. 좌위 16q22-q24는 16번 염색체, 상기 염색체의 긴 아암(arm), 및 밴드 22와 밴드 24 사이의 범위에 위치한다. 이 영역은 콘티그(contig) NT_010498.15 및 NT_010542.15를 갖는 NCBI 데이터베이스에 상응한다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 유전자의 증폭 정도는 상기 유전자에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정될 수 있다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 관심 유전자의 증폭은 14q32 및 16q23에 대한 프로브를 포함하는 바이시스(Vysis) LSI IGH/MAF 이중 색체 이중 융합(Dual Color Dual Fusion) 프로브를 사용함으로써 측정된다.

[0231] 본 발명의 제6 방법은 관심 유전자가 대상체의 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다. 이를 위해, 종양 샘플에서의 관심 유전자의 증폭이 대조군 샘플과 비교된다. 특정 실시양태에서, 증폭되는 관심 유전자는 MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA이다.

[0232] 특정 실시양태에서, 암을 갖는 대상체에서 골 전이를 일으키는 경향을 예측하는 본 발명의 제6 방법은 상기 대상체의 샘플에서 유전자 카피 수를 측정하는 단계 및 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 이때 상기 카피 수가 대조군 샘플의 관심 유전자 카피 수보다 더 큰 경우, 대상체는 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다.

[0233] 대조군 샘플은 전이되지 않은 암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 암을 갖는 대상체들의 생검 샘플들 중 종양 조직 집단에서 측정된 유전자 카피 수의 중간 값에 상응하는 샘플을 지칭한다. 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 수득된다. 유전자 카피 수가 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 카피 수에 비해 증가되어 있는 경우, 대상체는 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다.

[0234] 바람직한 실시양태에서, 관심 유전자는 이 유전자의 카피 수가 기준 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피 수보다 더 큰 경우 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있다. 한 예에서, 관심 유전자는 이 유전자의 게놈 카피 수가 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 적어도 2배(즉, 6 카피), 3배(즉, 8 카피), 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배 또는 50배 증가되어 있는 경우 "증폭"되어 있다고 주장된다. 또 다른 예에서, 세포 당 c-MAF 유전자의 게놈 카피 수가 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 중인 경우, c-MAF 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다.

[0235] 특정 실시양태에서, 증폭 또는 카피 수는 제자리 혼성화 또는 PCR에 의해 측정된다.

[0236] 관심 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 증폭되어 있는지를 확인하는 방법은 최신기술 수준에서 널리 공지되어 있다. 상기 방법은 제자리 혼성화(ISH)(예컨대, 형광 제자리 혼성화(FISH), 발색 제자리 혼성화(CISH) 또는 은 제자리 혼성화(SISH)), 게놈 비교 혼성화 또는 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량 PCR)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 임의의 ISH 방법의 경우, 염색체 또는 핵에서 형광 점, 착색된 점 또는 은을 갖는 점의 수를 세어 증폭 또는 카피 수를 측정할 수 있다.

[0237] 형광 제자리 혼성화(FISH)는 염색체에서 특정 DNA 서열의 존재 또는 부재를 검출하고 위치를 확인하는 데에 사용되는 세포유전학적 기법이다. FISH는 고도의 서열 유사성을 보이는 염색체의 일부 부분들에만 결합하는 형광 프로브를 사용한다. 전형적인 FISH 방법에서, DNA 프로브는 전형적으로 효소 반응, 예컨대, 닉(nick) 번역 또는 PCR의 이용에 의해 DNA 내로 도입되는 플루오르(fluor)-dUTP, 디곡시제닌(digoxigenin)-dUTP, 바이오틴-dUTP 또는 헵텐-dUTP 형태의 형광 분자 또는 헵텐으로 표지된다. 유전물질(염색체)을 함유하는 샘플을 유리 슬라이드 상에 놓고 포름아미드 처리로 변성시킨다. 그 다음, 표지된 프로브를, 당업자에게 의해 결정될 적합한 조건 하에 유전물질을 함유하는 샘플과 혼성화시킨다. 혼성화 후, (불소로 표지된 프로브의 경우) 직접적으로 또는 (헵텐을 검출하기 위해 형광 표지된 항체를 사용하여) 간접적으로 샘플을 가시화한다.

[0238] CISH의 경우, 프로브를 디곡시제닌, 바이오틴 또는 플루오레세인으로 표지하고 적합한 조건 하에 유전물질을 함유하는 샘플과 혼성화시킨다.

[0239] DNA에 결합할 수 있는 임의의 표지 또는 표지 분자를 사용하여 본 발명의 제4 방법에서 사용되는 프로브를 표지함으로써, 핵산 분자를 검출할 수 있다. 표지 부착을 위한 표지의 예로는 방사성 동위원소, 효소 기질, 보조인자, 리간드, 화학발광 물질, 형광단, 헵텐, 효소 및 이들의 조합물이 있으나, 이들로 한정되지 않는다. 표지 부착 방법, 및 상이한 목적을 위해 적합한 표지를 선택하는 것에 대한 지침은 예를 들면, 문헌(Sambrook et al.,

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989) 및 문헌(Ausubel et al., In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998)에서 발견될 수 있다.

[0240] 관심 유전자의 증폭을 직접적으로 확인하거나 16q22-q24 좌위의 증폭을 확인함으로써 일단 증폭의 존재가 확인되면, 대조군 샘플에서의 상기 유전자의 증폭과 비교된 후, 관심 유전자의 증폭이 검출되는 경우, 이것은 대상체가 골 전이를 일으키는 보다 큰 경향을 갖는다는 사실을 표시한다. 특정 실시양태에서, 증폭되어 있고 대상체가 골 전이를 일으키는 보다 더 큰 경향을 갖는다는 사실을 나타내는 관심 유전자는 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA이다.

[0241] 관심 유전자의 증폭의 확인은 전이되지 않은 암을 갖는 대상체의 샘플에서 측정된 관심 유전자의 증폭 수준에 상응하거나, 전이되지 않은 암을 갖는 대상체들의 생검 샘플들 중 종양 조직 집단에서 측정된 관심 유전자의 증폭의 중간 값에 상응하는 대조군 샘플 또는 기준 샘플의 값과 상관관계를 가질 필요가 있다. 상기 기준 샘플은 전형적으로 대상체 집단의 샘플들을 동등한 양으로 조합함으로써 취득된다. 일반적으로, 전형적인 기준 샘플은 임상적으로 잘 문서화되어 있고 전이의 부재가 잘 특징규명되어 있는 대상체로부터 취득될 것이다. 기준 수준의 유도에 사용된 샘플 집단은 바람직하게는 연구의 객체인 환자와 동일한 종류의 암을 앓고 있는 대상체들로 구성될 것이다. 일단 이 중간 값이 확립되면, 환자의 종양 조직에서의 관심 유전자의 증폭 수준이 이 중간 값과 비교될 수 있으므로, 증폭이 존재하는 경우, 대상체는 전이를 일으키는 보다 더 큰 경향을 갖는다.

[0242] 바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 골 전이이다. 본원에서 사용된 바와 같이, 표현 "골용해성 골 전이"는 골 재흡수(골 밀도의 점진적인 손실)가 종양 세포에 의한 파골세포 활성의 자극으로부터 비롯된 전이의 근처에서 발생되고 심한 통증, 병리학적 골절, 고칼슘혈증, 척수 압박, 및 신경 압박으로부터 비롯된 다른 증후군을 특징으로 하는 전이의 일종을 지칭한다.

[0243] 관심 유전자의 전위의 검출을 기초로 암에서 전이를 예후하는 방법

[0244] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 관심 유전자의 전위가 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 전위되는 관심 유전자는 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA이다.

[0245] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자가 전위되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법으로서, 이때 관심 유전자의 전위가 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.

[0246] 일부 실시양태에서, 전위되는 유전자는 16q23 좌위의 영역으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위되는 유전자는 약 16번 염색체의 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이(센트로미어부터 텔로미어까지)의 염색체 영역의 임의의 부분으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위되는 유전자는 약 16번 염색체의 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이의 게놈 영역(DNA 반복 요소는 배제됨)으로부터 전위된다. 일부 실시양태에서, 전위는 그 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정된다.

[0247] 특정 실시양태에서, 관심 유전자의 전위는 상기 유전자를 함유하는 염색체 영역의 전위를 측정함으로써 측정될 수 있다. 한 실시양태에서, 전위는 t(14,16) 전위이다. 또 다른 실시양태에서, 전위되는 염색체 영역은 16q22-q24 좌위로부터 전위된다. 16q22-q24 좌위는 16번 염색체, 상기 염색체의 긴 아암, 및 밴드 22와 밴드 24 사이의 범위에 위치한다. 이 영역은 콘티그 NT_010498.15 및 NT_010542.15를 갖는 NCBI 데이터베이스에 상응한다. 바람직한 실시양태에서, c-MAF 유전자는 14번 염색체의 14q32 좌위로 전위되어, 전위 t(14,16)(q32,q23)를 발생시킨다. 이 전위는 관심 유전자를 IgH 좌위 내의 강한 인핸서 옆에 위치시킴으로써, 몇몇 경우 관심 유전자의 과다발현을 유발한다(Eychene, A., Rocques, N., and Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8: 683-693). 일부 실시양태에서, 전위되고 과다발현되는 관심 유전자는 c-MAF이다.

[0248] 바람직한 실시양태에서, 관심 유전자의 전위는 상기 전위에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정될 수 있다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 색채 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 융합 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 이중 색채 이중 융합 프로브를 사용함으로써 측정된다. 일부 실시양태에서, 전위는 2개의 별개의 프로브들을 사용함으로써 측정된다.

[0249] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 관심 유전자의 전위는 14q32 및 16q23에 대한 프로브를 포함하는 바이시스 LSI IGH/MAF 이중 색채 이중 융합 프로브(<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>; last accessed 11/5/2012)를 사용함으

로써 측정된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 관심 유전자의 전위는 크레아테크(Kreatech) 진단 MAF/IGH gt(14;16) 융합 프로브(<http://www.kreatech.com/products/repeat-freetm-poseidontm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>; last accessed 11/5/2012), 애브노바(Abnova) MAF FISH 프로브(http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=FA0375; last accessed 11/5/2012), 캔서 제네틱스 이탈리아(Cancer Genetics Italia) IGH/MAF 이중 색채 이중 융합 전위 프로브(<http://www.cancergeneticsitalia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>; last accessed 11/5/2012), 크레아티브 바이오어레이(Creative Bioarray) IGH/MAF-t(14;16)(q32;q23) FISH 프로브(<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=35&page=10>; last accessed 11/5/2012), 아루프 라보라토리스(Arup Laboratories)의 FISH에 의한 다발성 골수종 패널(<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>; last accessed 11/5/2012), 16q23 또는 14q32에 대해 특이적인 아질런트(Agilent) 프로브(<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>; last accessed 11/5/2012; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>; last accessed 11/5/2012), 16q23 또는 14q32에 대해 특이적인 다코(Dako) 프로브(http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&purl=ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country; last accessed 11/5/2012), 사이토셀(CytoCell) IGH/MAF 전위 이중 융합 프로브(http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatology/cytoCell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf; last accessed 11/5/2012), 메타시스템스(Metasystems) XL IGH/MAF 전위 - 이중 융합 프로브(http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joob&view=article&joobase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272; last accessed 11/5/2012), 제이스(Zeiss) FISH 프로브 XL(100 μ l), IGH/MAFB(<https://www.microshop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&l=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=000000-0528-231-uk>; last accessed 11/5/2012), 또는 제니셀 바이오텍(Genycell Biotech) IGH/MAF 이중 융합 프로브(http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie6%2886.ppt&ei=MhGYU0i3GKWH0QGlt4DoDw&usg=AFQjCNEqQMBT8vQGjJbi9riEf3lVgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww; last accessed 11/5/2012)를 사용함으로써 측정된다.

[0250]

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

[0251]

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

[0252]

본 발명의 한 실시양태는 제1 단계에서 관심 유전자가 대상체의 샘플에서 전위되어 있는지를 확인하는 방법을 포함한다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 중앙 조직 샘플이다.

[0253]

특정 실시양태에서, 암을 갖는 대상체에서 골 전이를 일으키는 경향을 예측하는 본 발명의 방법은 관심 유전자

가 전위되어 있는 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 카피 수를 측정하는 단계 및 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 이때 관심 유전자의 카피 수가 대조군 샘플의 관심 유전자의 카피 수보다 더 큰 경우, 대상체는 골 전이를 일으키는 보다 더 큰 경향을 갖는다.

[0254] 관심 유전자 또는 염색체 영역 16q22-q24가 전위되어 있는지를 확인하는 방법은 최신기술 수준에서 널리 공지되어 있고, c-MAF의 증폭 및 전위에 대해 앞서 기재된 방법들을 포함한다. 상기 방법들은 제자리 혼성화(ISH)(예컨대, 형광 제자리 혼성화(FISH), 발색 제자리 혼성화(CISH) 또는 은 제자리 혼성화(SISH)), 계층 비교 혼성화 또는 중합효소 연쇄 반응(예컨대, 실시간 정량 PCR)을 포함하나 이들로 한정되지 않는다. 임의의 ISH 방법의 경우, 염색체 또는 핵에서 형광 점, 착색된 점 또는 은을 갖는 점의 수를 세어 증폭, 카피 수 또는 전위를 측정할 수 있다. 다른 실시양태에서, 카피 수 변경 및 전위의 검출은 전체 계층 서열결정, 엑솜 서열결정, 또는 임의의 PCR 유래의 기술의 이용을 통해 검출될 수 있다. 예를 들면, 계층 DNA의 샘플에 대한 PCR을 수행하여 전위를 검출할 수 있다. 한 실시양태에서, 정량 PCR이 이용된다. 한 실시양태에서, c-MAF 유전자에 대해 특이적인 프라이머 및 IGH 프로모터 영역에 대해 특이적인 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하고, 생성물이 생성되는 경우, 전위가 일어났다.

[0255] 일부 실시양태에서, 관심 유전자의 증폭 및 카피 수는 관심 유전자의 전위가 측정된 후 측정된다. 일부 실시양태에서, 프로브를 사용하여 세포가 관심 유전자에 대한 배수체인지를 확인한다. 일부 실시양태에서, 관심 유전자로부터 2개 초과 신호가 존재하는지를 확인함으로써 배수성을 확인한다. 일부 실시양태에서, 관심 유전자에 대해 특이적인 프로브로부터의 신호를 측정하고 이 신호를 센트로미어 프로브 또는 다른 프로브와 비교함으로써 배수성을 확인한다.

[0256] 관심 유전자의 증폭의 검출을 기초로 암에서 임상 결과를 예측하는 방법

[0257] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자가 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 환자의 임상 결과를 예측하는 시험관내 방법(이하, 본 발명의 제7 방법)으로서, 이때 상기 기준 유전자 카피 수에 비해 관심 유전자의 증폭이 좋지 않은 임상 결과를 나타내는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다. 일부 실시양태에서, 관심 유전자는 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA이다.

[0258] 본 발명의 제7 방법은 관심 유전자가 대상체의 샘플에서 증폭되어 있는지를 확인하는 단계를 제1 단계에서 포함한다. 관심 유전자의 증폭의 확인은 본질적으로 본 발명의 제5 방법에 기재된 바와 같이 수행된다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다. 바람직한 실시양태에서, 관심 유전자의 증폭은 16q22-q24 좌위의 증폭을 확인함으로써 확인된다. 또 다른 바람직한 실시양태에서, 관심 유전자의 증폭은 관심 유전자 특이적 프로브를 사용함으로써 확인된다.

[0259] 일부 실시양태에서, 증폭은 16q23 좌위의 영역에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 약 16번 염색체의 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이(센트로미어부터 텔로미어까지)의 염색체 영역의 임의의 부분에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 약 16번 염색체의 79,392,959 bp와 약 79,663,806 bp 사이의 계층 영역(DNA 반복 요소는 배제됨)에 존재한다. 일부 실시양태에서, 증폭은 그 영역에 대해 특이적인 프로브를 사용함으로써 측정된다.

[0260] 제2 단계에서, 본 발명의 제7 방법은 상기 카피 수를 대조군 또는 기준 샘플의 카피 수와 비교하는 단계를 포함하고, 이때 관심 유전자의 카피 수가 대조군 샘플의 관심 유전자의 카피 수보다 더 큰 경우, 이것은 좋지 않은 임상 결과를 표시한다.

[0261] 바람직한 실시양태에서, 관심 유전자의 카피 수가 기준 샘플 또는 대조군 샘플이 갖는 카피 수보다 더 큰 경우, 관심 유전자는 기준 유전자 카피 수에 비해 증폭되어 있다. 한 예에서, 관심 유전자의 계층 카피 수가 대조군 샘플에 비해 시험 샘플에서 적어도 2배(즉, 6 카피), 3배(즉, 8 카피), 4배, 5배, 6배, 7배, 8배, 9배, 10배, 15배, 20배, 25배, 30배, 35배, 40배, 45배 또는 50배 증가되어 있는 경우, 관심 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다. 또 다른 예에서, 세포 당 c-MAF 유전자의 계층 카피 수가 적어도 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 등인 경우, c-MAF 유전자는 "증폭"되어 있다고 주장된다.

[0262] 또 다른 실시양태에서, 기준 유전자 카피 수는 골 전이를 앓고 있지 않은 대상체로부터의 암 샘플에서의 유전자 카피 수이다.

- [0263] 또 다른 실시양태에서, 증폭은 제자리 혼성화 또는 PCR에 의해 확인된다.
- [0264] c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제를 사용하여 암으로부터의 골 전이를 치료하는 방법
- [0265] 또 다른 양태에서, 본 발명은 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA에 대해 특이적인 프로브를 진단제로서 사용한 후 골 전이 암의 치료 또는 예방에서 사용되기 위한 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제의 용도에 관한 것이다.
- [0266] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방용 약제의 제조를 위한 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제의 용도에 관한 것이다.
- [0267] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암으로부터의 골 전이의 치료 또는 예방을 필요로 하는 대상체에서 암으로부터의 골 전이를 치료하거나 예방하는 방법으로서, c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제를 상기 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0268] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체에게 골 전이를 예방하거나 감소시키는 물질을 투여하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체에서 골 전이의 위험을 예방하거나 감소시키는 방법으로서, 이때 상기 물질이 상기 대상체에서 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA의 발현 수준을 정량함으로써 결정된 치료 계획에 따라 투여되는 것인 방법에 관한 것이다.
- [0269] 비-한정적 예로서, 본 발명에서 사용되기에 적합한 c-MAF 억제제는 안티센스 올리고뉴클레오타이드, 간섭 RNA(siRNA), 촉매 RNA, 특이적 리보자임, 억제 항체 또는 나노바디, 우성 음성 c-MAF 변이체, 또는 표 1 또는 2의 화합물을 포함한다.
- [0270] 안티센스 올리고뉴클레오타이드
- [0271] 본 발명의 추가 양태는 발현을 억제하기 위한, 예를 들면, 억제될 활성을 갖는 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA를 코딩하는 핵산의 전사 및/또는 번역을 억제하기 위한 단리된 "안티센스" 핵산의 용도에 관한 것이다. 안티센스 핵산은 통상의 염기 상보성에 의해, 또는 예를 들면, 이중 가닥 DNA에 결합하는 경우 이중 나선의 큰 홈(groove)에서의 특이적 상호작용을 통해 약물의 잠재적 표적에 결합될 수 있다. 일반적으로, 이들 방법들은 당분야에서 일반적으로 이용되는 다양한 기법들을 지칭하고, 올리고뉴클레오타이드 서열과의 특이적 결합에 기초한 임의의 방법을 포함한다.
- [0272] 본 발명의 안티센스 구축물은 예를 들면, 세포에서 전사될 때 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA를 코딩하는 세포 mRNA의 하나 이상의 독특한 부분에 상보적인 RNA를 생성하는 발현 플라스미드로서 분포될 수 있다. 대안적으로, 안티센스 구축물은 세포 내로 도입될 때 표적 핵산의 mRNA 및/또는 유전자 서열과 혼성화하여 유전자 발현을 억제하는, 생체외에서 생성된 올리고뉴클레오타이드 프로브이다. 이러한 올리고뉴클레오타이드 프로브는 바람직하게는 내생성 뉴클레아제, 예를 들면, 엑소뉴클레아제 및/또는 엔도뉴클레아제에 대한 내성을 나타내므로 생체내에서 안정한 변경된 올리고뉴클레오타이드이다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드로서 사용되는 핵산 분자의 예로는 포스포라미데이트, 포스포티오네이트 및 메틸포스포네이트의 DNA 유사체(미국 특허 제5,176,996호, 제5,264,564호 및 제5,256,775호 참조)(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)가 있다. 안티센스 요법에 유용한 올리고머를 구축하기 위한 일반적인 방법은 예를 들면, 문헌(Van der Krol et al., BioTechniques 6: 958-976, 1988) 및 문헌(Stein et al., Cancer Res 48: 2659-2668, 1988)에서 검토되어 있다.
- [0273] 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 경우, 번역의 출발 부위, 예를 들면, 표적 유전자의 -10과 +10 사이의 부위로부터 유래된 올리고데옥시리보뉴클레오타이드 영역이 바람직하다. 안티센스 요법은 표적 폴리펩티드를 코딩하는 mRNA에 상보적인 올리고뉴클레오타이드 디자인(DNA 또는 RNA)을 포함한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 전사된 mRNA에 결합될 것이고, 번역은 방지될 것이다.
- [0274] mRNA의 5' 말단, 예를 들면, 출발 코돈 AUG까지 포함하는 비-번역 5' 서열에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 번역을 억제하기에 가장 효율적인 방식으로 작용해야 한다. 그럼에도 불구하고, mRNA의 비-번역 3' 서열에 상보적인 서열도 mRNA 번역의 억제에 효율적이라는 것이 최근에 밝혀졌다(Wagner, Nature 372: 333, 1994). 따라서, 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 그 mRNA의 번역을 억제하기 위한 안티센스 요법에서 유전자의 비-코딩 영역인 비-번역 5' 또는 3' 영역에서 사용될 수 있다. mRNA의 비-번역 5' 영역에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 출발 코돈 AUG의 상보체를 포함해야 한다. mRNA의 코딩 영역에 상보적인 올리고뉴클레오타이드는 보다 덜 효율적인 번역 억제제이지만, 본 발명에 따라 사용될 수도 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드가 mRNA의 5' 영역, 3' 영역 또는 코딩 영역과 혼성화하도록 디자인되는 경우, 안티센스 핵산은 6개 이상의 뉴클레오타이드 길이를 가져야 하고, 바

람직하게는 대략 100개 미만의 뉴클레오타이드 길이, 보다 바람직하게는 대략 50개, 25개, 17개 또는 10개 미만의 뉴클레오타이드 길이를 가져야 한다.

[0275] 바람직하게는, 유전자 발현을 억제하는 안티센스 올리고뉴클레오타이드의 능력을 정량하기 위해 먼저 시험관내 연구를 수행한다. 바람직하게는, 이 연구는 올리고뉴클레오타이드의 안티센스 유전자 억제와 비-특이적 생물학적 효과를 구별하는 대조군을 사용한다. 또한, 바람직하게는, 이 연구는 표적 RNA 또는 단백질의 수준을 RNA 또는 단백질의 내부 대조군의 수준과 비교하였다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수득한 결과를, 대조군 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 수득한 결과와 비교할 수 있다. 바람직하게는, 대조군 올리고뉴클레오타이드는 분석될 올리고뉴클레오타이드와 거의 동일한 길이를 갖고, 올리고뉴클레오타이드 서열은 표적 서열과의 특이적 혼성화를 방지하기 위해 필요하다고 간주되는 수준 초과와 수준 이하로 안티센스 서열과 상이하지 않다.

[0276] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 단일 또는 이중 가닥 DNA 또는 RNA, 또는 키메라 혼합물 또는 유도체, 또는 이들의 변경된 버전일 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 예를 들면, 분자의 안정성, 그의 혼성화 능력 등을 개선하기 위해 염기 기, 당 기 또는 포스페이트 골격에서 변경될 수 있다. 상기 올리고뉴클레오타이드는 다른 결합된 기, 예컨대, 세포막(예를 들면, 문헌(Letsinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86: 6553-6556, 1989), 문헌(Lemaitre et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84: 648-652, 1987) 및 국제 특허출원 공보 제WO 88/09810호 참조) 또는 혈액-뇌 장벽(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO 89/10134호 참조)을 통한 수송을 용이하게 하기 위한 펩티드(예를 들면, 올리고뉴클레오타이드를 숙주 세포의 수용체로 향하게 하는 펩티드) 또는 물질, 또는 인터칼레이팅제(예를 들면, 문헌(Zon, Pharm. Res. 5: 539-549, 1988) 참조)를 포함할 수 있다. 이를 목적으로, 상기 올리고뉴클레오타이드는 또 다른 분자, 예를 들면, 펩티드, 수송제, 혼성화-유발된 절단제 등에 접합될 수 있다.

[0277] 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 변경된 염기의 하나 이상의 기를 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 아라비노스, 2-플루오로아라비노스, 자일로스 및 핵소스를 포함하나 이들로 한정되지 않는 군으로부터 선택된 하나 이상의 변경된 당 기도 포함할 수 있다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 중성 펩티드와 유사한 골격도 함유할 수 있다. 이러한 분자는 펩티드 핵산(PNA) 올리고머로서 공지되어 있고, 예를 들면, 문헌(Perry-O'Keefe et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 14670, 1996) 및 문헌(Eglom et al., Nature 365: 566, 1993)에 기재되어 있다.

[0278] 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 하나 이상의 변경된 포스페이트 골격을 포함한다. 또 다른 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 알파-아노머성 올리고뉴클레오타이드이다.

[0279] 표적 mRNA 서열의 코딩 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 사용될 수 있지만, 전사된 비-번역 영역에 상보적인 안티센스 올리고뉴클레오타이드도 사용될 수 있다.

[0280] 일부 경우, 내생성 mRNA 번역을 억제하기에 충분한 세포내 안티센스 농도에 도달하는 것이 어려울 수 있다. 따라서, 바람직한 방법은 안티센스 올리고뉴클레오타이드가 강한 중합효소 III 또는 중합효소 II 프로모터의 조절하에 놓여 있는 재조합 DNA 구축물을 사용한다.

[0281] 대안적으로, 유전자 조절 영역(즉, 프로모터 및/또는 인핸서)에 상보적인 테옥시리보뉴클레오타이드 서열이 체내의 표적 세포에서 유전자 전사를 방해하는 삼중 나선 구조를 형성하게 함으로써 표적 유전자 발현을 감소시킬 수 있다(일반적으로, 문헌(Helene, Anticancer Drug Des. 6(6): 569-84, 1991) 참조). 일부 실시양태에서, 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 안티센스 모르폴린이다.

[0282] siRNA

[0283] 작은 간섭 RNA 또는 siRNA는 RNA 간섭으로 표적 유전자의 발현을 억제할 수 있는 물질이다. siRNA는 화학적으로 합성될 수 있거나, 시험관내 전사에 의해 수득될 수 있거나, 생체내 표적 세포에서 합성될 수 있다. 전형적으로, siRNA는 15개 내지 40개 뉴클레오타이드 길이를 갖는 이중 가닥 RNA로 구성되고, 1개 내지 6개의 뉴클레오타이드로 구성된 3' 및/또는 5' 돌출 영역을 함유할 수 있다. 돌출 영역의 길이는 siRNA 분자의 총 길이와 무관하다. siRNA는 전사 후 표적 메신저를 분해하거나 침묵시킴으로써 작용한다.

[0284] 본 발명의 siRNA는 c-MAF 코딩 유전자의 mRNA, 또는 상기 단백질을 코딩하는 유전자 서열에 대한 상당한 상동성을 갖는다. "상당한 상동성을 갖는"은 siRNA가 RNA 간섭을 통해 표적 mRNA를 분해할 수 있도록 표적 mRNA에 충분히 상보적이거나 유사한 서열을 갖는 것으로서 이해된다. 상기 간섭을 야기하기에 적합한 siRNA는 RNA에 의해 형성된 siRNA뿐만 아니라 상이한 화학적 변경, 예컨대, 하기 변경을 함유하는 siRNA도 포함한다:

- [0285] - 뉴클레오타이드들 사이의 결합이 천연 상태에서 관찰되는 결합, 예컨대, 포스포로티오네이트 결합과 상이한 siRNA;
- [0286] - RNA 가닥과 작용 시약, 예컨대, 형광단의 접합체;
- [0287] - RNA 가닥의 말단, 특히 2' 위치에서 상이한 하이드록실 작용기를 사용한 변경에 의한 3' 말단의 변경;
- [0288] - 변경된 당, 예컨대, 2' 위치의 0-알킬화된 잔기, 예컨대, 2'-0-메틸리보스 또는 2'-0-플루오로리보스를 갖는 뉴클레오타이드; 또는
- [0289] - 변경된 염기, 예컨대, 할로겐화된 염기(예를 들면, 5-브로모우라실 및 5-요오도우라실) 또는 알킬화된 염기(예를 들면, 7-메틸구아노신)를 갖는 뉴클레오타이드.
- [0290] siRNA는 그 자체로, 즉 전술된 특성을 갖는 이중 가닥 RNA의 형태로 사용될 수 있다. 대안적으로, siRNA의 센스 가닥 서열 및 안티센스 가닥 서열을 함유하는 벡터의 사용은 관심있는 세포에서 그의 발현에 적합한 프로모터의 조절 하에 가능하다.
- [0291] siRNA를 발현하기에 적합한 벡터는 siRNA의 2개 가닥들을 코딩하는 2개의 DNA 영역들이 전사 시 루프를 형성하는 스페이서 영역에 의해 분리된 상태로 1개의 동일한 DNA 가닥에서 직렬로 정렬되어 있는 벡터이고, 이때 단일 프로모터가 shRNA를 생성하는 DNA 분자의 전사를 유도한다.
- [0292] 대안적으로, siRNA를 형성하는 가닥들 각각이 상이한 전사 유닛의 전사로부터 형성되는 벡터들의 사용도 가능하다. 이들 벡터들은 발산 전사 벡터와 수렴 전사 벡터로 나누어진다. 발산 전사 벡터에서, siRNA를 형성하는 DNA 가닥들 각각을 코딩하는 전사 유닛은 각각의 DNA 가닥의 전사가 동일할 수 있거나 상이할 수 있는 그 자신의 프로모터에 의존하도록 벡터에서 직렬로 위치한다(Wang, J. et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100:5103-5106 and Lee, N.S., et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20:500-505). 수렴 전사 벡터에서, siRNA를 생성하는 DNA 영역은 2개의 역방향 프로모터에 의해 플랭킹되어 있는 DNA 영역의 센스 가닥 및 안티센스 가닥을 형성한다. 센스 RNA 가닥 및 안티센스 RNA 가닥의 전사 후, 안티센스 RNA 가닥은 기능성 siRNA를 형성하기 위해 혼성체를 형성할 것이다. 2개의 U6 프로모터(Tran, N. et al., 2003, BMC Biotechnol., 3:21), 1개의 마우스 U6 프로모터 및 1개의 인간 H1 프로모터(Zheng, L., et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 135-140 및 국제 특허출원 공보 제WO 2005026322호), 및 1개의 인간 U6 프로모터 및 1개의 마우스 H1 프로모터(Kaykas, A. and Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16)가 사용되는 역방향 프로모터 시스템을 갖는 벡터가 기재되어 있다.
- [0293] 수렴 또는 발산 발현 벡터로부터의 siRNA의 발현에서 사용되기에 적합한 프로모터는 siRNA가 발현될 세포와 상용가능한 임의의 프로모터 또는 프로모터 쌍을 포함한다. 따라서, 본 발명에 적합한 프로모터는 항시성(constitutive) 프로모터, 예컨대, 진핵 바이러스, 예컨대, 폴리오마 바이러스, 아데노바이러스, SV40, CMV, 조류 육종 바이러스 또는 B형 간염 바이러스의 게놈으로부터 유래된 항시성 프로모터, 메탈로티오네인 유전자 프로모터, 헤르페스 심플렉스 바이러스의 티미딘 키나제 유전자 프로모터, 레트로바이러스 LTR 영역, 면역글로불린 유전자 프로모터, 액틴 유전자 프로모터, EF-1 α 유전자 프로모터뿐만 아니라, 단백질 발현이 분자 또는 외생성 신호의 첨가에 의존하는 유도성 프로모터, 예컨대, 테트라사이클린 시스템, NF κ B/UV 광 시스템, Cre/Lox 시스템 및 열 충격 유전자 프로모터, 국제 특허출원 공보 제WO/2006/135436호에 기재된 조절가능한 RNA 중합효소 II 프로모터 및 특이적 조직 프로모터(예를 들면, 국제 특허출원 공보 제WO2006012221호에 기재된 PSA 프로모터)도 포함하나, 반드시 이들로 한정되지는 않는다. 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 항시적으로 작용하는 RNA 중합효소 III 프로모터이다. RNA 중합효소 III 프로모터는 제한된 수의 유전자, 예컨대, 5S RNA, tRNA, 7SL RNA 및 U6 snRNA에서 발견된다. 다른 RNA 중합효소 III 프로모터와 달리, III형 프로모터는 임의의 유전자내 서열을 요구하지 않고 오히려 위치 -34 및 -24에서 5' 방향으로 TATA 박스를 포함하는 서열, 위치 -66과 -47 사이의 근거리 서열 요소 또는 PSE, 및 일부 경우 위치 -265와 -149 사이의 원거리 서열 요소 또는 DSE를 필요로 한다. 바람직한 실시양태에서, III형 RNA 중합효소 III 프로모터는 인간 또는 뮤린 H1 및 U6 유전자 프로모터이다. 보다 바람직한 실시양태에서, 프로모터는 2개의 인간 또는 뮤린 U6 프로모터, 1개의 마우스 U6 프로모터 및 1개의 인간 H1 프로모터, 또는 1개의 인간 U6 프로모터 및 1개의 마우스 H1 프로모터이다. 본 발명과 관련하여, ER 알파 유전자 프로모터 또는 사이클린 D1 유전자 프로모터가 특히 적합하므로, 이들은 암 중앙에서 관심 유전자를 특이적으로 발현하기에 특히 바람직하다.
- [0294] 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 레트

로바이러스에 의해 코딩될 수 있고, 프로모터의 조절 하에 있다. shRNA를 발현하기에 적합한 프로모터는 siRNA의 발현에 대해 상기 단락에 기재된 프로모터이다.

[0295]

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

[0296]

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

[0297]

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

[0298]

DNA 효소

[0299]

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

[0300]

리보자임

[0301]

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

[0302]

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

[0303]

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

[0304]

억제 항체

[0305]

본 발명의 내용에서, "억제 항체"는 관심 유전자에 의해 발현된 단백질(예컨대, MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA)에 특이적으로 결합하여 상기 단백질의 기능들, 바람직하게는 전사와 관련된 기능들 중 하나 이상의 기능을 억제할 수 있는 임의의 항체로서 이해된다. 상기 항체는 당업자에게 공지되어 있는 방법들(이들 중 일부는

전술되어 있음) 중 임의의 방법을 이용함으로써 제조될 수 있다. 따라서, 다중클론 항체는 동물을 억제될 단백질로 면역화시킴으로써 제조된다. 단일클론 항체는 문헌(Kohler, Milstein et al., Nature, 1975, 256: 495)에 기재된 방법을 이용함으로써 제조된다. 본 발명의 내용에서, 적합한 항체는 가변 항원 결합 영역 및 불변 영역을 포함하는 온전한 항체, "Fab", "F(ab')₂" 및 "Fab", Fv, scFv 단편, 디아바디, 이중특이적 항체, 알파바디, 사이클로펩티드 및 스테이플드 펩티드를 포함한다. 일단 관심 유전자 단백질 결합 능력을 갖는 항체가 확인되면, 이 단백질의 활성을 억제할 수 있는 항체는 억제제 확인 분석을 이용함으로써 선택될 것이다.

[0306] 억제 펩티드

[0307] 본원에서 사용된 바와 같이, 용어 "억제 펩티드"는 상기 설명된 바와 같이 관심 유전자에 의해 발현된 단백질에 결합하여 그의 활성을 억제할 수 있는 펩티드를 지칭한다.

[0308] 음성 c-MAF 우성형질(dominant)

[0309] MAF 패밀리로부터의 단백질들이 AP-1 패밀리의 다른 구성원, 예컨대, Fos 및 Jun과 동종이량체 및 이종이량체를 형성할 수 있기 때문에, c-MAF 활성을 억제하는 한 방법은 c-MAF와 이량체를 형성할 수 있으나 전사를 활성화시키는 능력을 결여하는 음성 우성형질을 사용하는 것이다. 따라서, 음성 c-MAF 우성형질은 세포에 존재하고 전사 활성화 도메인을 함유하는 아미노 말단의 3분의 2를 결여하는 작은 maf 단백질들(예를 들면, mafK, mafF, mafg 및 pi 8) 중 임의의 maf 단백질일 수 있다(Fujiwara et al (1993) Oncogene 8, 2371-2380; Igarashi et al. (1995) J. Biol. Chem. 270, 7615-7624; Andrews et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 11488-11492; Kataoka et al. (1995) Mol. Cell. Biol. 15, 2180-2190; Kataoka et al. (1996) Oncogene 12, 53-62).

[0310] 대안적으로, 음성 c-MAF 우성형질은 다른 단백질과 이량체를 형성하는 능력을 유지하되 전사를 활성화시키는 능력을 결여하는 c-MAF 변이체들을 포함한다. 이들 변이체들은 예를 들면, 단백질의 N 말단에 위치하는 c-MAF 전사활성화 도메인을 결여하는 변이체이다. 따라서, 음성 c-MAF 우성형질 변이체는 적어도 아미노산 1 내지 122, 적어도 아미노산 1 내지 187 또는 적어도 아미노산 1 내지 257(미국 특허 제6274338호에 기재된 인간 c-MAF의 넘버링을 고려함)이 제거되어 있는 변이체를 예시적 방식으로 포함한다.

[0311] 본 발명은 표적 세포에서의 발현에 적합한 프로모터의 작동 조절 하에 음성 c-MAF 우성형질 변이체 및 c-MAF를 코딩하는 폴리뉴클레오티드 둘다를 사용하는 것을 고려한다. 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하기 위해 사용될 수 있는 프로모터는 항시성 프로모터, 즉 기초 수준에서 전사를 유도하는 프로모터, 또는 전사 활성이 외부 신호를 요구하는 유도성 프로모터일 수 있다. 전사를 조절하는 데에 적합한 항시성 프로모터는 특히, CMV 프로모터, SV40 프로모터, DHFR 프로모터, 마우스 유선 종양 바이러스(MMTV) 프로모터, 1a 연장 인자(EF1a) 프로모터, 알부민 프로모터, ApoA1 프로모터, 케라틴 프로모터, CD3 프로모터, 면역글로불린 중쇄 또는 경쇄 프로모터, 신경필라멘트 프로모터, 신경 특이적 에놀라제(enolase) 프로모터, L7 프로모터, CD2 프로모터, 미요신 경쇄 키나제 프로모터, HOX 유전자 프로모터, 티미딘 키나제 프로모터, RNA 중합효소 II 프로모터, MyoD 유전자 프로모터, 포스포글리세레이트키나제(PGK) 유전자 프로모터, 저밀도 지단백질(LDL) 프로모터, 및 액틴 유전자 프로모터이다. 바람직한 실시양태에서, 전사활성화제의 발현을 조절하는 프로모터는 PGK 유전자 프로모터이다. 바람직한 실시양태에서, 본 발명의 폴리뉴클레오티드 전사를 조절하는 프로모터는 T7 파지의 RNA 중합효소 프로모터이다.

[0312] 바람직하게는, 본 발명의 내용에서 사용될 수 있는 유도성 프로모터는 유도제의 부재 하에 0 또는 무시할만한 기초 발현을 보이는, 유도제에 반응하는 프로모터이고 3' 위치에 위치하는 유전자의 활성화를 촉진할 수 있다. 유도제의 종류에 따라 유도성 프로모터는 Tet on/off 프로모터(Gossen, M. and H. Bujard (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5547-5551; Gossen, M. et al., 1995, Science 268:1766-1769; Rossi, F.M.V. and H.M. Blau, 1998, Curr. Opin. Biotechnol. 9:451-456); Pip on/off 프로모터(미국 특허 제6287813호); 안티프로게스틴(antiprogesterone) 의존성 프로모터(미국 특허출원 공보 제2004132086호), 엑디손(ecdysone) 의존성 프로모터(Christopherson et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:6314-6318; No et al., 1996, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 93:3346-3351; Suhr et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95:7999-8004; 및 국제 특허출원 공보 제W09738117호), 메탈로티오네인 의존성 프로모터(국제 특허출원 공보 제W08604920호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)) 및 라파마이신 의존성 프로모터(Rivera et al., 1996, Nat. Med. 2:1028-32)로서 분류된다.

[0313] 음성 c-MAF 우성형질 변이체를 코딩하는 폴리뉴클레오티드를 발현하기에 적합한 벡터는 원핵 발현 벡터,

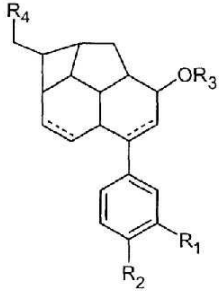
예컨대, pUC18, pUC19, Bluescript 및 이들의 유도체, mp18, mp19, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, 파지 및 서플렉스 벡터, 예컨대, pSA3 및 pAT28; 효모 발현 벡터, 예컨대, 2-미크론형 플라스미드 벡터, 삼입 플라스미드, YEP 벡터, 센트로미어성 플라스미드 등; 곤충 세포 발현 벡터, 예컨대, pAC 계열 벡터 및 pVL 계열 벡터; 식물 발현 벡터, 예컨대, pIBI, pEarleyGate, pAVA, pCambia, pGSA, pGWB, pMDC, pMY, pORE 계열 벡터 등; 및 바이러스 벡터-기초(아데노바이러스, 아데노바이러스와 관련된 바이러스뿐만 아니라 레트로바이러스 및 특히 렌티바이러스) 고등 진핵 세포 발현 벡터 또는 비-바이러스 벡터, 예컨대, pSilencer 4.1-CMV(암비온), pcDNA3, pcDNA3.1/hyg 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.

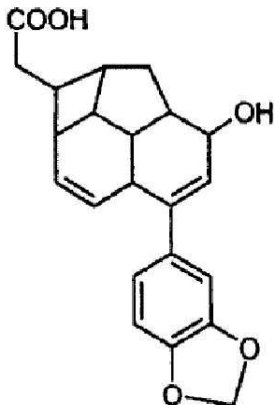
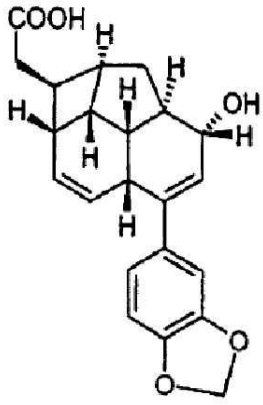
[0314] 소분자

[0315] 본 발명에서 사용되기에 적합한 다른 c-MAF 억제 화합물은 하기 화합물들을 포함한다:

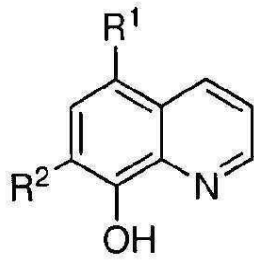
표 1

c-MAF 억제 능력을 갖는 소분자

| | |
|---|---|
| I | <p>엔디안드르산(Endiandric acid) H 유도체, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제 WO2004014888 호에 기재된 하기 화학식에 상응하는 화합물</p>  <p>[상기 식에서, R₁ 및 R₂는 서로 독립적으로 1.0 H, 또는 2.0 -O-C₁-C₆-알킬, -O-C₂-C₆-알케닐, -O-C₂-C₆-알키닐 또는 -O-C₆-C₁₀-아릴 기이고, 이때 알킬, 알케닐 및 알키닐은 직쇄 또는 분지쇄이고, 알킬, 알케닐 및 알키닐 기는 하기 치환기 2.1 내지 2.9 중 어느 하나로 일치환되거나 이치환되고: 2.1 -OH, 2.2 =O, 2.3 -O-C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.4 -O-C₂-C₆-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.5 C₆-C₁₀-아릴, 2.6 -NH-C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.7 -NH-C₂-C₆-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임), 2.8 -NH₂, 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 아마이드 작용기로 더 치환될 수 있거나, R₁ 및 R₂는 함께 고리를 형성하고, 이때 R₁ 및 R₂는 -O-[(C₁-C₆)-알킬렌]-O- 기를 의미하고, R₃ 은 1.0 H, 또는 2.0 -O-C₁-C₆-알킬, -O-C₂-C₆-알케닐, -O-C₂-C₆-알키닐 또는 -O-C₆-C₁₀-아릴</p> |
|---|---|

| | |
|----|--|
| | <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,</p> <p>2.2 =O,</p> <p>2.3 -O-C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임),</p> <p>2.4 -O-C₂-C₆-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임),</p> <p>2.5 -C₆-C₁₀-아릴,</p> <p>2.6 -NH-C₁-C₆-알킬(이때, 알킬은 직쇄 또는 분지쇄임)</p> <p>2.7 -NH-C₂-C₆-알케닐(이때, 알케닐은 직쇄 또는 분지쇄임),</p> <p>2.8 -NH₂, 또는</p> <p>2.9 할로젠,</p> <p>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,</p> <p>R₄ 는 CO₂R₃, CO₂NHR₃, CHO, CH₂OR₃, CH₂OSi(R₃)₃, CH₂Br 또는 CH₂CN 이고, 이때 R₃ 은 상기 정의된 바와 같다.]</p> <p>특히, 하기 하합물</p> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;">   </div> |
| II | <p>8-하이드록시퀴놀린 유도체, 예컨대, 국제 특허출원 공보 제 WO2009146546 호에 기재된 하기 화학식의 화합물</p> |

[0317]



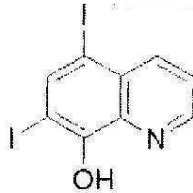
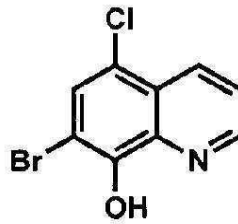
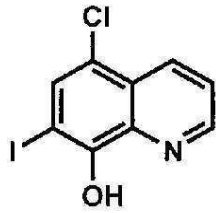
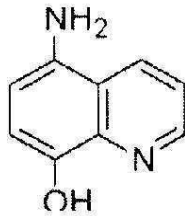
[상기 식에서,

R₁은 NO₂, NH₂, NH(C₁-C₆-알킬) 및 N(C₁-C₆-알킬)(C₁-C₆-알킬)로 구성된 군으로부터 선택되고,

R₂는 H, 할로겐, C₁-C₆알킬, 및 플루오로-치환된 C₁-C₆알킬로부터 선택되거나;

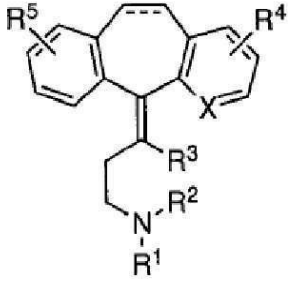
R₁은 Cl 이고, R₂는 Br 또는 H 이다.],

바람직하게는, 하기 화합물



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

[0318]

| | |
|----|--|
| | 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; R¹은 H, C₁-C₄알킬, C(O)OC₁-C₄알킬, C(O)C₁-C₄알킬 및 C(O)NHC₁-C₄알킬로 구성된 군으로부터 선택되고, R²는 H 및 C₁-C₄알킬로부터 선택되고, R³은 H 및 C₁-C₄알킬로부터 선택되거나; R² 및 R³은 이들이 결합된 탄소 원자 및 질소 원자와 함께 결합되어 피페리딘 고리를 형성하고; R⁴ 및 R⁵는 H, 할로젠, 하이드록시, C₁-C₄알킬, 플루오로-치환된 C₁-C₄알킬 및 C₁-C₄알콕시로부터 독립적으로 선택되고; X는 C 및 N 으로부터 선택된다.]</p> <p>바람직하게는, 하기 화합물들: 사이클로헥사딘(4-(5H-디벤조-[a,d]사이클로헥텐-5-일리덴)-1-메틸피페리딘 하이드로클로라이드), 아미트립틸린(3-(10,11-디하이드로-5H-디벤조[[a,d]]사이클로헥텐-5-일리덴)-N,N-디메틸-1-프로판아민), 로라타딘(에틸 4-(8-클로로-5,6-디하이드로-11H-벤조[5,6]사이클로헥타[1,2-b]피리딘-11-일리덴)-1-피페리딘카복실레이트, 사이클로벤즈라핀(3-(5H-디벤조[a,d]사이클로헥텐-5-일리덴)-N,N-디메틸-1-프로판아민).</p> |
| V | 국제 특허출원 공보 제 WO0359249 호에 기재된 니발레놀(12,13-에폭시-3,4,7,15-테트라하이드록시트리코텍-9-엔-8-온) |

[0319]

[0320]

다른 c-MAF 억제제는 국제 특허출원 공보 제WO2005063252호(온전히 그대로 본원에 참고로 도입됨)에 기재되어 있고, 예컨대, 하기 표(표 2)에 제시되어 있다:

표 2

c-MAF 억제제

| 길항제 | cdk2 억제 활성에 대한 참고문헌 |
|---|---|
| <p>푸린 유사체</p> <p>푸르발라놀(Purvalanol), 예컨대, 상표명 푸르발라놀 A(#P4484, 시그마-알드리치, 미국 미조리주 세인트 루이스 소재) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 $C_{15}H_{25}ClN_6O$ 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>상표명 올로모우신(Olomoucine)(#O0886) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 $C_{15}H_{18}N_6O$ 를 갖는 2-(하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-메틸푸린; 상표명 N^9-이소프로필올로모우신(#I0763) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 $C_{17}H_{22}N_6O$ 를 갖는 2-(2'-하이드록시에틸아미노)-6-벤질아미노-9-이소프로필푸린; CVT-313</p> <p>상표명 로스코비틴(Roscovitine)(#R7772) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, $C_{19}H_{26}N_6O$ 를 갖는 6-(벤질아미노)-2-(R)-[[1-(하이드록시에틸)프로필]아미노]-9-이소프로필푸린 2(R)-[[9-(1-메틸에틸)-6-[(페닐메틸)아미노]-9H-푸린-2-일]아미노]-1-부탄올; 메톡시로스코비틴</p> <p>상표명 CGP74514(#C3353) 하에 시그마-알드리치로부터 입수가 가능한, 분자식 $C_{19}H_{24}ClN_7$ 을 갖는 푸린 유사체 N2-(시스-2-아미노사이클로헥실)-N6-(3-클로로페닐)-9-에틸-9H-푸린-2,6-디아민</p> <p>CGP79S807, (상기) CGP74514 의 푸린 유사체, 이때 Cl 은 CN 으로 치환되고, OH 는 제거되고, 사이클로헥산 고리의 오르토 위치는 NH_2 이다.</p> <p>푸린 유사체, 예컨대, O6-사이클로헥실메틸 구아닌 NU2058</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>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>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>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>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>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> |

[0321]

| | |
|---|---|
| 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 입수가능한, 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). |
| 페리도(2,3-d)페리미딘-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 입수가능한, 분자식 $C_{21}H_{15}N_5O_3S_2$ 를 갖는 4-[(7-옥소-6,7-디하이드로-8H-[1,3]티아졸로[5,4-e]인돌-8-일리덴)메틸]아미노-N-(2-피리딜)벤젠설포나미드 | Davis, S.T. <i>et al.</i> Science, 291, 134-137 (2001); 국제 특허출원 공보 제 WO 03/027275 호로서 공개된 국제 특허출원 제 PCT/US02/30059 호(Hellberg <i>et al.</i>) |
| 플라보피리돌, 예컨대, 플라보피리돌(LB86 8275; NCS 649890, 국립 암연구소, 미국 메릴랜드주 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 메릴랜드주 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 |

[0322]

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

바람직한 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

c-MAF 억제제는 전형적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 투여된다.

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

본 발명의 약학 조성물의 원하는 약학 제형을 제조하는 데에 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 공정의 검토는 문헌("Tratado de Farmacia Galenica", C. Fauli i Trillo, Luzan 5, S.A. 1993 Edition)에서 발견될 수 있다. 약학 조성물의 예로는 경구, 국소 또는 비경구 투여를 위한 임의의 고체 조성물(정제, 환제, 캡슐제, 과립제 등) 또는 액체 조성물(용액, 현탁액 또는 유화액)이 있다. 나아가, 약학 조성물은 필요하다고 간주되는 경

우 안정화제, 현탁제, 보존제, 계면활성제 등을 함유할 수 있다.

[0328]

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

[0329]

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

[0330]

c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제 또는 이를 함유하는 약학 조성물은 체중 kg 당 10 mg 미만, 바람직하게는 체중 kg 당 5, 2, 1, 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.001, 0.0005, 0.0001, 0.00005 또는 0.00001 mg 미만의 용량으로 투여될 수 있다. 유효 용량은 주사, 흡입 또는 국소 투여에 의해 투여될 수 있다.

[0331]

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

[0332]

상승된 c-MAF 수준을 갖는 골 전이를 갖는 암 환자에서 골 분해의 치료 또는 예방

[0333]

또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있고 c-MAF에 대해 특이적이거나 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA를 함유하는 염색체 영역에 대해 특이적인 프로브의 사용을 통해 대조군 샘플에 비해 전이성 샘플에서 상

승된 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 수준이 있는 것으로 확인된 대상체에서 골 전이의 치료에 사용되는 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제, 또는 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질에 관한 것이다.

[0334] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있고 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA에 대해 특이적이거나 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA를 함유하는 염색체 영역에 대해 특이적인 프로브의 사용을 통해 대조군 샘플에 비해 전이성 샘플에서 상승된 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 수준을 갖는 대상체에서 골 전이의 치료용 약제의 제조를 위한 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제, 또는 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질의 용도에 관한 것이다.

[0335] 대안적으로, 본 발명은 암을 앓고 있고 대조군 샘플에 비해 전이성 샘플에서 상승된 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 수준을 갖는 대상체에서 골 분해를 예방하고/하거나 치료하는 방법으로서, c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제 또는 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질을 상기 대상체에게 투여하는 단계를 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0336] 특정 실시양태에서, 골 전이는 골용해성 전이이다.

[0337] 본 발명에 기재된 치료 방법에 적합한 c-MAF 억제제 및 골 분해를 피할 수 있거나 예방할 수 있는 물질은 맞춤형 요법 방법과 관련하여 상세히 기술되어 있다.

[0338] 기준 또는 대조군 샘플은 전이되지 않은 암을 갖는 대상체의 샘플, 또는 전이되지 않은 암을 갖는 대상체들의 생검 샘플들 중 중앙 조직 집단에서 측정된 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 유전자 발현 수준의 중간 값에 상응하는 샘플이다.

[0339] c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 수준이 대조군 샘플에 비해 상승되어 있는지를 확인하거나 정량하는 방법은 본 발명의 제1 방법과 관련하여 상세히 기재되어 있고, 골 분해를 피하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있다.

[0340] 대안적으로, 전이를 치료하고/하거나 예방하기 위해 전술된 물질들 중 골 분해를 피하거나 예방하는 하나 초과의 물질들이 조합되거나, 상기 물질들이 다른 보충제, 예컨대, 칼슘 또는 비타민 D, 또는 호르몬과 조합될 수 있는 조합 치료를 수행할 수 있다.

[0341] 골 분해를 피하거나 예방하는 물질은 전형적으로 약학적으로 허용가능한 담체와 함께 투여된다. 용어 "담체" 및 담체의 종류뿐만 아니라, 이들이 투여될 수 있고 골 분해를 피하거나 예방하는 물질에 동등하게 적용될 수 있는 제형 및 용량도 c-MAF, VAT1L, CLEC3A, WWOX 또는 5sRNA 억제제에 대해 상기 정의되어 있다.

[0342] 하기 실시예는 본 발명을 설명하고 그의 범위를 한정하지 않는다.

[0343] 본 발명의 키트

[0344] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체에서 암의 골 전이를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준, 증폭 또는 전위를 정량하기 위한 프로브; 및 b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0345] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암으로부터의 골 전이를 앓고 있는 대상체의 임상 결과를 예측하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준, 증폭 또는 전위를 정량하기 위한 프로브; 및 b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 정량된 발현 수준, 증폭 또는 전위를 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0346] 또 다른 양태에서, 본 발명은 암을 앓고 있는 대상체를 위한 요법을 결정하는 키트로서, a) 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하기 위한 프로브; b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 관심 유전자의 기준 발현 수준과 비교하기 위한 수단; 및 c) 정량된 발현 수준과 기준 발현 수준의 비교를 기초로 상기 대상체에서 골 전이를 예방하고/하거나 감소시키기 위한 요법을 결정하기 위한 수단을 포함하는 키트에 관한 것이다.

[0347] 또 다른 양태에서, 본 발명은 i) 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하기 위한 프로브, 및 ii) 골 전이의 위험과 상관관계를 갖는 것으로서 미리 확인된 하나 이상의 관심 유전자 발현 수준 지표를 포함하는 키트에 관한 것이다.

- [0348] 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준, 증폭 또는 전위를 정량하기 위한 프로브는 상세히 전술되어 있다. 바람직한 실시양태에서, 발현을 정량하기 위한 프로브는 관심 유전자에 특이적으로 결합하고/하거나 관심 유전자를 특이적으로 증폭하는 프로브 및/또는 프라이머의 세트를 포함한다.
- [0349] 본 발명의 방법의 모든 구체적인 실시양태들은 본 발명의 키트 및 이의 용도에 적용될 수 있다.
- [0350] 암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 방법
- [0351] 또 다른 양태에서, 본 발명은
- [0352] a) 암을 앓고 있는 대상체로부터의 샘플을 제공하는 단계;
- [0353] b) 프로브를 사용하여 상기 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준을 정량하는 단계; 및
- [0354] c) 관심 유전자의 정량된 발현 수준을 관심 유전자의 미리 측정된 기준 발현 수준과 비교함으로써 상기 샘플을 유형분류하는 단계
- [0355] 를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체의 샘플을 유형분류하는 시험관내 방법으로서, 이때 상기 유형분류가 상기 대상체에서 골 전이의 위험과 관련된 예후 정보를 제공하는 것인 시험관내 방법에 관한 것이다.
- [0356] 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자(예를 들면, c-MAF)의 발현 수준, 증폭 또는 전위를 정량하기 위한 프로브는 상세히 전술되어 있다.
- [0357] 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0358] 암을 앓고 있는 대상체를 분류하는 방법
- [0359] 또 다른 양태에서, 본 발명은 a) 프로브를 사용하여 암을 앓고 있는 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준, 증폭 또는 전위를 측정하는 단계; b) 상기 샘플에서의 관심 유전자의 발현 수준, 증폭 또는 전위를 관심 유전자의 미리 측정된 기준 발현 수준과 비교하는 단계; 및 c) 샘플에서의 관심 유전자의 상기 발현 수준을 기초로 상기 대상체를 코호트로 분류하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 대상체를 코호트로 분류하는 방법에 관한 것이다.
- [0360] 상기 대상체의 샘플에서 관심 유전자의 발현 수준, 증폭 또는 전위를 정량하기 위한 프로브는 상세히 전술되어 있다.
- [0361] 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0362] 바람직한 실시양태에서, 상기 코호트는 상기 기준 발현 수준과 비교될 때 관심 유전자의 필적할만한 발현 수준을 갖는 것으로서 확인된 하나 이상의 다른 개체를 포함한다.
- [0363] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 샘플에서의 관심 유전자의 상기 발현 수준, 증폭 또는 전위는 상기 미리 측정된 기준 수준에 비해 증가되어 있고, 이때 코호트의 구성원은 골 전이의 증가된 위험을 갖는 구성원으로서 분류된다.
- [0364] 또 다른 바람직한 실시양태에서, 상기 코호트는 임상시험을 수행하기 위한 코호트이다. 바람직한 실시양태에서, 샘플은 종양 조직 샘플이다.
- [0365] 실시예
- [0366] 실시예 1
- [0367] 바이시스(Vysis) 프로브를 사용한 유방암 종양 샘플의 분석
- [0368] 코호트 I. 발견 유방암 일차 종양 코호트
- [0369] GEO(Barrett et al.(2007)(T. Barrett, D. B. Troup, S. E. Wilhite, P. Ledoux, D. Rudnev, C. Evangelista, I. F. Kim, A. Soboleva, M. Tomashevsky, and R. Edgar. NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles-database and tools update. Nucleic Acids Research, 35, January 2007. ISSN 1362-4962))로부터 환자의 정보를 다운로드하였다. 하기 데이터 세트를 사용하였다: 일군의 GSE12276. 이 코호트는 GEO에 기재된 바와 같이 204개의 유방암 환자 일차 종양 생검 유전자 발현 프로파일, 및 원거리 전이의 시간 및 부위에 대한 그의 임상 소견을 갖는다. 시스템적인 편차를 제거하기 위해, 병합하기 전에 발현 측정치들을 모든 유전자들에 대한 z-점수로 전환하였다. 바이오컨덕터(Bioconductor)를 이용하여 모든 통계적 분석을 수행하였다(Gentleman

et al. (2004)(R.C. Gentleman, V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, oS. Du- doit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y.H. Yang, and J. Zhang. Bioconductor: Open software development for computational biology and bioinformatics. Genome Biology, 5:R80, 2004. URL <http://genomebiology.com/2004/5/10/R80>)).

[0370]

코호트 II. 검증 유방암 일차 종양 샘플 코호트

[0371]

상기 환자 종양 샘플 코호트 I로 발견한 가설을 검증하기 위해 제2 인간 유방 종양 코호트를 사용하였다. 독립적인 검증 세트는 I, II 또는 III 기 BC 및 추적조사 소견을 갖는 환자로부터 수득된 380개 초과 일차 유방암 표본들로 구성되어 있다(Rojo F., Ann Oncol 23 (5): 1156-1164 (2012)). 조직 마이크로어레이를 표준 절차에 따라 프로세싱하였다. 종양은 ER+, 삼중 음성 및 HER2+에 따라 3개의 서브타입으로 분류될 수 있었다. 이들 종양 내에 포함된 16q23 증폭 또는 유전자들의 일부의 발현이 전체 집단 또는 주어진 서브타입들 중 일부에서의 골 전이 사건과 상관관계를 갖는지를 알아보기 위해 적절한 통계적 분석을 수행하였다.

[0372]

이 제2 코호트에서의 통계적 분석은 하기 전체에 기초하였다:

[0373]

i) 기준 특성들의 비교

[0374]

연령의 분산 동질성을 폴디드 F 검정(Folded F test)으로 검정한다. 분산 동질성에 따라 연령의 평균의 차이를 풀링된(pooled) 또는 사터와이트(Satterhwaite) t-검정(다중 카테고리 비교를 위한 ANOVA 또는 크루스칼-왈리스(Kruskal-Wallis))으로 검정한다. 적용가능한 경우 카테고리형 변수를 카이(Chi)-제곱 또는 피셔(Fisher) 검정과 비교한다.

[0375]

ii) 진단 성능 FISH 및 IHC

[0376]

- 변수를 도입하기 위한 $p < 0.2$ 의 p-값 기준 및 조절 후 모델에서 변수를 유지하기 위한 $p < 0.10$ 의 기준을 사용한다. 단계적 선택을 통해 다변량 분석을 수행한다. ROC 곡선의 AUC를 비교하여 진단 성능을 평가할 것이다. 모델의 적합도(Goodness of fit)를 호스머-레메쇼우(Hosmer-Lemeshow) 검정으로 평가할 것이다(유의한 경우, 추가 분석을 수행하지 않을 것이다).

[0377]

- 대다수의 예측 변수들(16q23 FISH)을 기초로 각각의 분류 카테고리에 대한 민감성(Se), 특이성(Sp), 양성 예측 값(PPV) 및 음성 예측 값(NPV)을 계산할 것이다.

[0378]

iii) 예후 역할

[0379]

- 유대관계(ties)의 "에프론(efron)" 관리를 이용하여 골 전이까지의 결과 시간의 콕스(Cox) 회귀 모델링을 수행하였다. 사건의 수는 모델 내로 들어가는 변수의 수를 유도할 것이다(5개 내지 10개의 사건마다 약 1개의 변수).

[0380]

실시예 2

[0381]

VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA 및 MAF 유전자를 포함하는 16q23에 위치하는 염색체 영역의 증폭은 골 전이와 관련되어 있다.

[0382]

ACE 알고리즘(발현 데이터에 의한 카피 수 변경(CNA)의 분석)을 채택하여 전이의 위험과 관련된 CNA를 일차 유방암 표본에서 확인하였다(도 1의 A). 이들 중에서 염색체 16q23에 위치하는 증폭된 영역은 전이의 위험과 유의하게($p < 0.05$) 관련되어 있었고, 그의 증가된 발현이 ER+ 인간 유방암에서의 골 전이의 위험과 개별적으로 및 독립적으로 관련되어 있을 것으로 예상되는 유전자인 VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA 및 MAF를 포함하였다(즉, WWOX 발현, HR=1.33 $p=0.044$, GSE12276 코호트에 기초한 유방암 일차 종양 데이터 세트). 유사하게, FISH(16q23) 및 비교 계층 혼성화(CGH)를 통해 MCF7(ER+) 모세포와 골 전이성 MCF7 유도체(BoM2) 세포를 비교하였을 때, 16q23 염색체 영역에서 획득을 확인하였다(도 1의 A 및 B). 모세포의 서브세트(32.7%)는 이 계층 증폭을 보유하고 있었지만, 생체내 골 전이 선택은 이의 잔류 집단(88.6%)이 상기 계층 증폭을 보유하지 않는다는 것을 입증하였다. 따라서, 본 발명자들은 16q23이 전이, 특히 골 전이의 위험을 갖는 유방암들에서 증폭되어 있다는 것을 보였고, 골로 전이하는 그들의 능력을 생체내 선택된 세포에서 입증하였다.

[0383]

실시예 3

[0384]

FISH에 의해 확인된 16q23 DNA 계층 증폭이 골 전이를 예측하는 예후 능력을 코호트 II에서 검증한다.

- [0385] 골 전이 위험을 특이적으로 예측하는 16q23 계놈 증폭의 능력을 더 검증하기 위해, I, II 또는 III 기 BC 및 추적조사 소견을 갖는 환자로부터 수득된 334개의 일차 유방암 표본들로 구성된 독립적인 검증 세트에서 FISH를 통해 16q23 염색체 영역 계놈 획득을 분석하였다(16q23 계놈 영역을 확인하는 상업적으로 입수가능한 진단 프로브인 IGH/MAF 애보트 바이시스 프로브를 사용하였다)(Rojo F., Ann Oncol 23 (5): 1156-1164 (2012)).
- [0386] 애보트 디아그노스틱스(Abbott Diagnostics)로부터 상업적으로 입수가능한 진단 프로브를 사용하였다. 이 스펙트럼오렌지 프로브는 MAF 유전자 영역을 플랭킹하고, 대략 2.2 Mb의 갭과 함께 각각 대략 350 kb의 길이를 갖는 2개 절편들로 구성된다. 센트로미어 절편은 chr16:75729985-76079705에 위치하고(2006년 3월 어셈블리, UCSC 계놈 브라우저), 텔로미어 절편은 chr16:78290003-78635873에 위치한다(2006년 3월 어셈블리, UCSC 계놈 브라우저). 이 프로브는 (센트로미어부터 텔로미어까지 정렬된) 5개의 유전자 VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA 및 MAF를 플랭킹한다.
- [0387] 본 발명자들은 FISH 프로브에 의해 플랭킹된 (센트로미어부터 텔로미어까지 정렬된) 5개의 유전자 VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA 및 MAF를 주목하였다.
- [0388] 조직 마이크로어레이를 표준 절차에 따라 프로세싱하였다. 슬라이드를 16q23 및 IGH 14q32 프로브 혼합물(애보트 바이시스 프로브)과 함께 항온처리하였다. DAPI 반대염색을 적용하고 적절한 현미경으로 이미지를 획득하였다.
- [0389] I, II 및 III 기 BC 인간 일차 종양 세트(n=334)에서 골 전이 부재(도 2의 A) 또는 전체(도 2의 B) 생존의 카플란-메이어 곡선을 작도하였다. 종양 당 3개의 코어를 사용하여 평균으로서 세포 당 2.5 16q23 카피의 컷-오프를 기초로 환자들을 16q23 FISH 음성 군과 16q23 FISH 양성 군으로 분류하였다. 골 전이를 예측하는 마커의 위험 비(골 전이), 특이성 및 민감성을 계산하였다. 데이터 세트의 기준 특성 및 전체 유방암에 대한 콕스 다변량 분석을 전술된 바와 같이 수행하였다(표 3 및 4).

표 3

세포 당 2.5 카피 초과인 16q23 FISH에 의한 기준 특성의 비교(종양 당 3개의 코어에서 측정됨)(*이 변수에 대한 손실 값을 갖지 않는 환자에 대해 계산된 백분율)

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

[0390]

표 4

I, II 및 III 기 유방암
재발 첫 부위로서 골 전이까지의 시간의 콕스 회귀
세포 당 2.5 카피 초과 16q23 FISH(종양 당 3 개의 코어에서 측정됨)

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

[0391]

표 5

I, II 및 III기 ER+ 유방암
재발 첫 부위로서 골 전이까지의 시간의 콕스 회귀
세포 당 2.5 카피 초과 16q23 FISH(종양 당 3 개의 코어에서 측정됨)

| 변수 | 일변량 | | 다변량 | |
|-----------|-----------------|--------|-----------------|--------|
| | HR(95% CI) | p-값 | HR(95% CI) | p-값 |
| 16q23Fish | 53.5(7.0-406.7) | 0.0001 | 49.5(6.5-376.3) | 0.0002 |
| pT | | | | |
| 1 | 기준 | | 기준 | |
| 2-4 | 3.4(1.2-9.4) | 0.018 | 2.8(1.0-7.9) | 0.047 |
| pN | | | | |
| 0 | 기준 | | | |
| 1-2 | 2.6(0.8-8.0) | 0.094 | | |
| 3 | 6.8(1.6-28.8) | 0.0089 | | |

[0392]

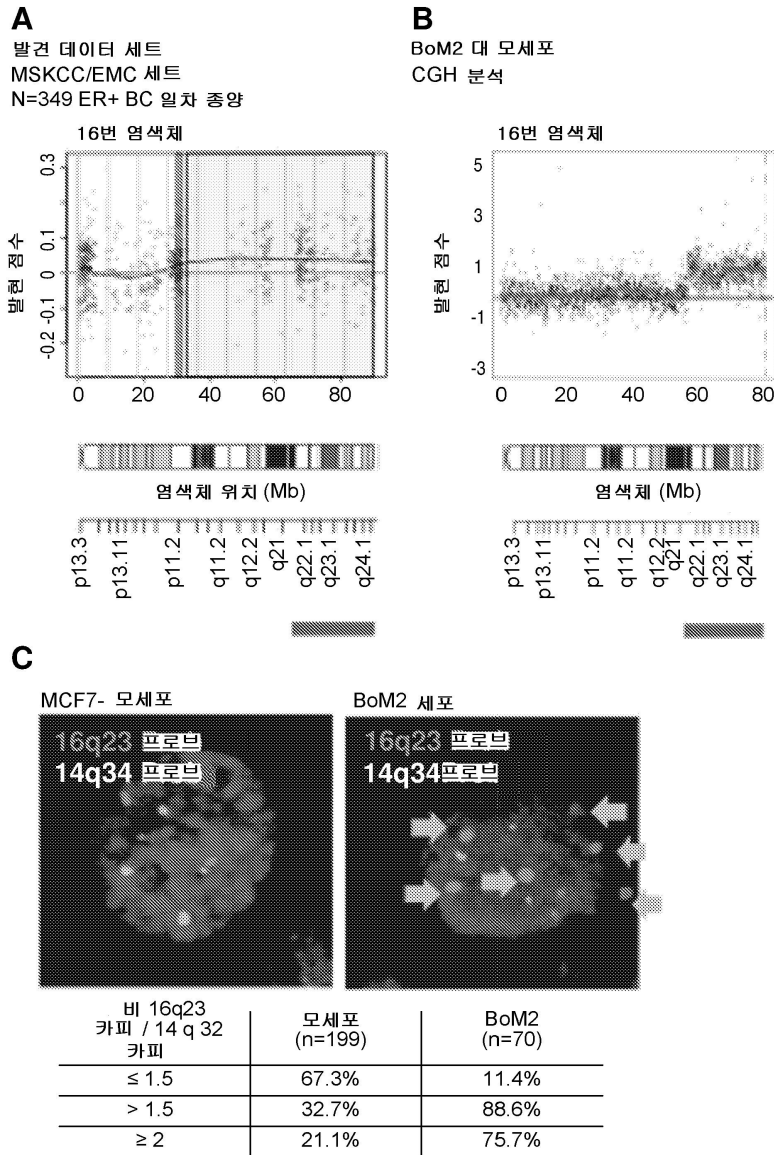
[0393]

I, II 및 III 기 BC 인간 일차 종양 세트(각각 n=250 및 n=43)에서 ER 양성(좌측) 또는 삼중 음성(우측) 환자들에 대한 골 전이 부재 생존의 카플란-메이에르 곡선도 작도하였다(도 2의 C). 종양 당 3개의 코어를 사용하여 평균으로서 세포 당 2.5 16q23 카피의 컷-오프를 기초로 환자들을 16q23 FISH 음성 군과 16q23 FISH 양성 군으로 나누었다. ER+ 유방암에 대한 콕스 다변량 분석을 전술된 바와 같이 수행하였다(표 5).

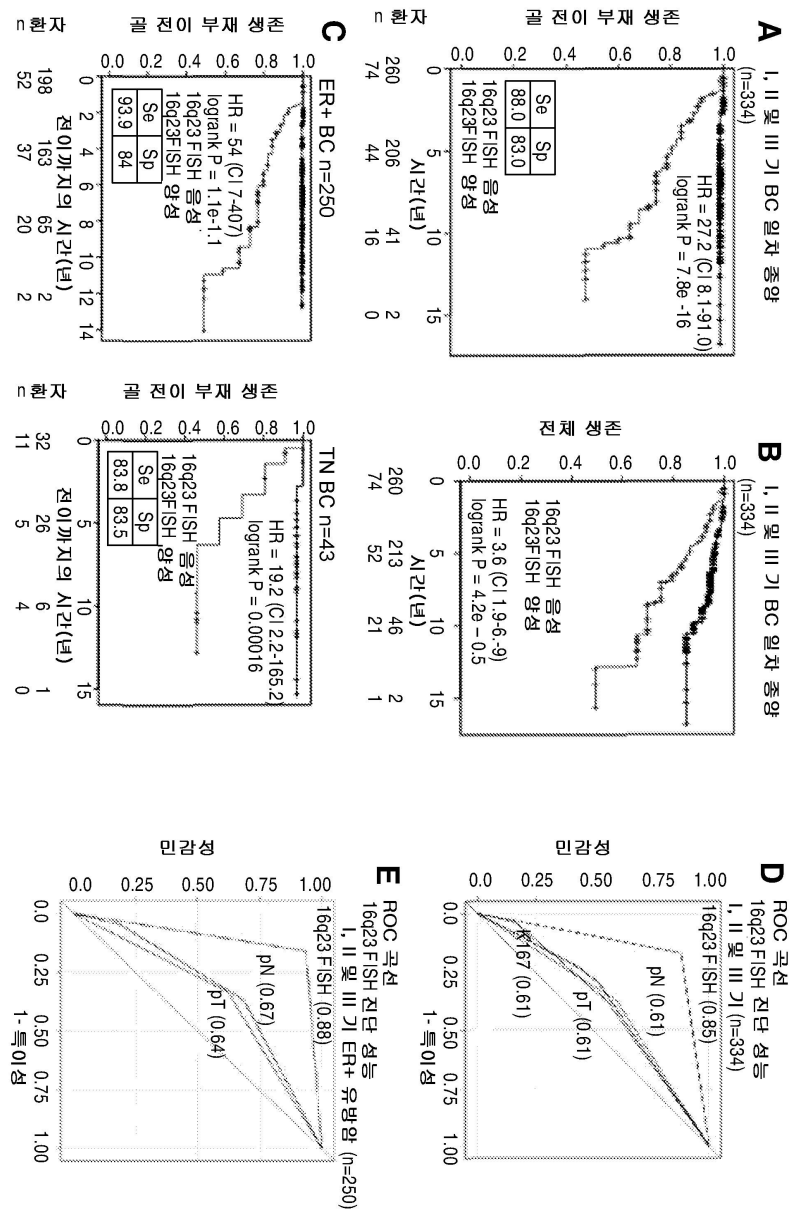
- [0394] 전체(도 2의 D) 및 ER+ 유방암(도 2의 E)에서 16q23 증폭의 진단 성능에 대한 수신자 조작 특성(ROC) 곡선도 계산하여 진단 성능을 평가하였다. ROC 곡선에서 진성 양성률(민감성)은 상이한 컷-오프 점들에 대한 가성 양성률(100-특이성)의 함수로 작도되어 있다. ROC 곡선 상의 각각의 점은 특정 결정 역치에 상응하는 민감성/특이성 쌍을 나타낸다.
- [0395] 요약하건대, (센트로미어부터 텔로미어까지 정렬된) 5개의 유전자 VAT1L, CLEC3A, WWOX, 5srRNA 및 MAF를 플랭킹하는 16q23 FISH 프로브를 사용하여 본원에서 측정한 16q23 증폭은 유방암 일차 종양, 특히 TN 및 ER+ 유방암 서브타입에서 골 전이의 위험을 유의하게 예측한다. 따라서, 원칙적으로 이들 5개의 유전자들 중 임의의 유전자의 mRNA 또는 단백질 발현 수준을 사용하여 골 전이를 예측할 수 있었다.
- [0396] 실시예 4
- [0397] 코호트 유방암에서 골 전이를 예측하는 WWOX 유전자 발현 능력의 분석
- [0398] 코호트 I(GSE12276)에서 골 전이를 분석할 때, (팩키지드 서바이벌(Packaged survival)로부터의 R 함수 콕스프(coxph)를 이용하여) 콕스 비례 위험 모델을 조절함으로써 골 전이가 WWOX 발현을 통해 설명될 수 있는지를 알아보았다. WWOX는 유방암 일차 종양에서 골 전이(HR(골 전이)=1.23 p=0.02)를 예측하는 통계적으로 유의한 능력을 가졌다. 일차 종양에서의 WWOX 발현을 이용하여 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향의 예후를 결정할 수 있다.
- [0399] 유사하게, WWOX는 ER+ 유방암 일차 종양에서 골 전이(HR(골 전이)=1.33 p=0.044)를 예측하는 통계적으로 유의한 능력을 가졌다. 일차 종양에서의 WWOX 발현을 이용하여 유방암을 갖는 대상체에서 전이를 일으키는 경향의 예후를 결정할 수 있다.
- [0400] 본원에 기재된 예 및 실시양태는 단지 설명 목적으로 제공된 것이고, 이들에 비추어 볼 때 다양한 변경 또는 변화가 당업자에게 암시될 것이고 본원의 사상 및 범위에 포함된다는 것이 이해된다.
- [0401] 본원에서 인용된 폴리뉴클레오티드 및 폴리펩티드 서열을 포함하는 모든 공개문헌들, 특허들, 특허출원들, 인터넷 사이트 및 등록번호/데이터베이스 서열은, 각각의 개별 공개문헌, 특허, 특허출원, 인터넷 사이트 또는 등록번호/데이터베이스 서열이 참고로 도입되는 것으로 구체적으로 및 개별적으로 표시되는 것처럼 동일한 정도로 모든 목적을 위해 온전히 그대로 본원에 참고로 도입된다.

도면

도면1



도면2



서열목록

SEQUENCE LISTING

<110> Fundacio Privada Institut de Recerca Biomedica

Fundacio Privada 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> 3190.008PC01/TJS/E-H

<140> To Be Assigned

<141> Herewith

<150> 61/801,718

<151> 2013-03-15

<160> 13

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6878

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

| | |
|---|------|
| agaggcttta aaatcttttt tcattttcta gctgtagctc gggctgcttg tcggcttggc | 60 |
| ctccccctcc cccctttgct ctctgcctcg tctttcccca ggacttcgct attttgcttt | 120 |
| tttaaaaaaa ggcaagaaag aactaaactc ccccttcct ctctccagt cgggctgcac | 180 |
| ctctgccttg cactttgcac agaggtagag agcgcgcgag ggagagagag gaaagaaaaa | 240 |
| aaataataaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactcccccg | 300 |
| tgccaaggcc cgcgccgcc ggacagacgc ccgccgcgcc tccagccccg agcggacgcc | 360 |
| gcgcgcgccc tgcctgcagc ccgggccggc gaggcgagcc cttccttatg caaagcgcgc | 420 |
| agcggagcgg cgagcggggg acgccgcga ccgggccggg ctctccagc ttcgccgcg | 480 |
| cagccaccac cgcgccacc gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgccggc | 540 |
| tcggcgcgca aggaggcgag cgagcaagga ggggccgggg cgagcgaggg agcacattgg | 600 |
| cgtgagcagg ggggaggaggg ggccggcgcg gggggcgcg gcaggcgggg ggggtgtgtg | 660 |
| tgtgagcgcg ctcgagggtt tcgggccagc caccgccgcg caagctagaa gcgccccagc | 720 |
| ccggcaagct ggctaccgcg ctggccacc agcacagccc gctggccct ctctgcagc | 780 |
| ccatctggcg gagcggcggc ggccggcgcg gcgcggcgag gagaatggca tcagaactgg | 840 |
| caatgagcaa ctccgacctg cccaccagtc ccctggccat ggaatatgtt aatgacttcg | 900 |
| atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cggaggagac cgaccgcatc atcagccagt | 960 |
| ggccgcgtct catcgccggg ggctcgctgt cctccacccc catgagcacg ccgtgcagct | 1020 |
| cgggtgcccc ttccccagc ttctcggcgc ccagccggg ctcgggcagc gagcagaagg | 1080 |

| | |
|--|------|
| cgcacctgga agactactac tggatgaccg gctacccgca gcagctgaac cccgaggcgc | 1140 |
| tgggcttcag ccccaggagac gcggtcgagg cgctcatcag caacagccac cagctccagg | 1200 |
| gcggcttcga tggctacgcg cgcggggcgc agcagctggc cgcggcggcc ggggccggtg | 1260 |
| ccggcgccctc cttgggcggc agcggcgagg agatgggccc cgccgccgcc gtggtgtccg | 1320 |
| ccgtgatcgc cgcggcgccc gcgcagagcg gcgcgggccc gcactaccac caccaccacc | 1380 |
| accacgccgc cggccaccac caccaccga cggccggcgc gcccggcgcc gcgggcagcg | 1440 |
| cggccgcctc ggccggtggc gctggggcgc cgggcggcgg tggcccgccc agcgtctggg | 1500 |
| gcggcggcgg cggcgggcgc ggccggagcg gcgggggcgc ggccggggcg gggggcgccc | 1560 |
| tgcacccgca ccacgccccc ggccggcctgc acttcgacga ccgtttctcc gacgagcagc | 1620 |
| tggtgaccat gtctgtgcgc gagctgaacc ggcagctcgc cggggtcagc aaggaggagg | 1680 |
| tgatccggct gaagcagaag aggcggaccc tgaaaaaccg cggtatgcc cagtcctgcc | 1740 |
| gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgctgcagc | 1800 |
| aagtcgacca cctcaagcag gagatctcca ggctggtcgc cgagagggac gcgtacaagg | 1860 |
| agaaatacga gaagttggtg agcagcggct tccgagaaaa cggtcgcagc agcgacaacc | 1920 |
| cgtcctctcc cgagtttttc atgtgagtct gacacgcgat tccagctagc caccctgata | 1980 |
| agtgtctcgc gggggtccgg ctcggtgtg ggcttgctag ttctagagcc atgctcgcca | 2040 |
| ccacctcacc acccccaccc ccaccgagtt tggcccccctt ggccccctac acacacacaa | 2100 |
| accgcacgc acacaccaca cacacacaca cacacccac accctgctcg | 2160 |
| agtttgtggt ggtggtggct gttttaact ggggagggaa tgggtgtctg gctcatggat | 2220 |
| tgccaatctg aaattctcca taacttgcta gcttgttttt ttttttttt tacaccccc | 2280 |
| cgcgccccc ccggacttgc acaatgttca atgatctcag cagagttctt catgtgaaac | 2340 |
| gttgatcacc tttgaagcct gcatcattca cataatTTTT cttctcttc cccttcagtt | 2400 |
| catgaactgg tgttcatttt ctgtgtgtgt gtgtgtttta tttgtttgg attttttttt | 2460 |
| ttaatTTTtac ttttagagct tgctgtgttg cccacctttt ttccaacctc caccctcact | 2520 |
| ccttctcaac ccatctcttc cgagatgaaa gaaaaaaaaa agcaaagttt tttttcttc | 2580 |
| tcctgagttc ttcattgtgag attgagcttg caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag | 2640 |
| acttgagcgc tgccgagttc catcggtttt tttttttagc attgttatgc taaaatagag | 2700 |
| aaaaaaaaatcc tcatgaacct tccacaatca agcctgcac aaccttctgg gtgtgacttg | 2760 |
| tgagttttgg ctttgtgatg ccaaatctga gagtttagtc tgccattaaa aaaactcatt | 2820 |

| | |
|--|------|
| ctcatctcat gcattattat gcttgctact ttgtcttagc aacaatgaac tataactgtt | 2880 |
| | |
| tcaaagactt tatggaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcatgctgga | 2940 |
| catgtatggt ataattatit tttccttttt ttttcctttt ggcttggaaa tggacgttcg | 3000 |
| aagacttata gcatggcatt catacttttg ttttattgcc tcatgacttt tttgagttta | 3060 |
| gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa ttttgcactt gctccaaaac | 3120 |
| tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgcactg aaggcattcc ttgtcaaaga | 3180 |
| taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgttttcttt | 3240 |
| ttaataagaa tgacgcccc a tttggggac taaaattgtg ctattgccga gaagcagtct | 3300 |
| | |
| aaaatttatt ttttaaaaag agaaactgcc ccattatit tggtttgttt tatititatt | 3360 |
| ttatattttt tggcttttgg tcatgttcaa atgtggaatg ctctgggttt ctagtatata | 3420 |
| atttaattct agtttttata atctgttagc ccagttaaaa tgtatgtctac agataaagga | 3480 |
| atgttataga taaatttgaa agagtttagt ctgttttagt gtagattttt taaacgattg | 3540 |
| atgcactaaa ttgtttacta ttgtgatgtt aaggggggta gagtttgcaa ggggactgtt | 3600 |
| taaaaaaagt agcttataca gcatgtgctt gcaacttaaa tataagttgg gtatgtgtag | 3660 |
| tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagaggggaa acgcccctgt | 3720 |
| | |
| ttatattctgt aggggtatit tacattcaaa aatgtatgtt tttttttctt ttcaaaatta | 3780 |
| aagiatittg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa | 3840 |
| ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca | 3900 |
| cagttttaag atgatgcaga tttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattttct | 3960 |
| gtaacttaaa aaaaaatcca cagtttttaa ggcaataatc agtaaagtgt attttcaggg | 4020 |
| actgacatcc tgtcttttaa aagaaatgaa aagtaaactt taccacaata aatataaaaa | 4080 |
| aatcttgica gttacttttc ttttacaat tttgctgtgc aaaattgttt tataatctga | 4140 |
| | |
| gttactaact aaccacgcgt gttgttccca tgtgcttttc tttcattttc aattctggtt | 4200 |
| atatcaagaa aagaataatc tacaataata aacggcattt ttttttgatt ctgtactcag | 4260 |
| tttcttagtg tacagtttaa ctgggcccac caacctcgtt aaaagtgtaa atgcatcct | 4320 |
| tttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taattcaggg tgaaattata | 4380 |
| ggctgttttt tgaagtgagg aggtctggcc catatactga ttagcaatat ttaatataga | 4440 |
| tgtaaattat gacctcattt ttttctcccc aaagttttca gttttcaaat gagttgagcc | 4500 |
| ataattgccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggcttc ctgagcatgg | 4560 |

| | |
|---|------|
| ccctacactt ctgatcagga gcaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc | 4620 |
| gcatcagagg tggcttgcgc acatatgcat tgaacggtaa agagaaacag cgcttgcctt | 4680 |
| ttcactaaag ttgactatit ttccttcttc tcttacacac cgagattttc ttgttagcaa | 4740 |
| ggcctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagtt gtttgttttg ttttgctttt | 4800 |
| ctctttaaca ctgaagatca tttgtcttaa ataggaaaa gaaaatccac tccttacttc | 4860 |
| catatttcca agtacatatc tggtttaaac tatgttatca aatcataatt caccgtgaat | 4920 |
| attcagtgga gaacttctct acctggatga gctagtaatg atttcagatc atgctatccc | 4980 |
| | |
| cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaatatag gctgtgcttt gatttactgg | 5040 |
| tatttacccc aaaataggct gtgtatgggg gctgacttaa agatcccttg gaaagactca | 5100 |
| aaactacctt cactagtagg actcctaagc gctgacctat ttttaaatga cacaaattca | 5160 |
| tgaactaat gttacaaatt catgcagttt gcactcttag tcacttccc ctagcacacc | 5220 |
| aatagaatgt tagacaaagc cagcactgtt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt | 5280 |
| gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga | 5340 |
| cttattttta agaaaacagg ttgtgtttgg tgctgctaag ttctggccag tttatcatct | 5400 |
| | |
| ggccttctcg cctatttttt acaaaacacg aagacagtgt gtaacctcga cattttgacc | 5460 |
| ttcctttatg tgctagttaa gacaggctcc tgaatccaca cttatttttg cttacaaaa | 5520 |
| gtcttaatag taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt | 5580 |
| tctttccttt tttttttttt ttcctcatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag | 5640 |
| cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaaa agcatctgat gaaagatttt aggcaaact | 5700 |
| tctcaaaata agagtgatat tctggatgta gttattgcag ttatctcatg acaaatgagg | 5760 |
| cctggattgg aaggaaaata tagttgtgta gaattaagca ttttgatagg aatctacaag | 5820 |
| | |
| gtagtgaat ataataagca ggtttgggcc cccaaacttt agaaaatcaa atgcaaaggt | 5880 |
| gctggcaaaa atgaggtttg agtggctggc tgtaagagaa ggtaactcc tagtaaaagg | 5940 |
| catttttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caaacaata | 6000 |
| catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aaatcctgag taagtcccat tcattacaat | 6060 |
| aagtctctaa atttaaaaaa aaaaaaatca tatgaggaaa tctagctttc ccttttacgc | 6120 |
| tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcctttc attccaatta cagaactgag | 6180 |
| cccactcgca agttggagcc atcagtggga tacgccacat tttggaagcc ccagcatcgt | 6240 |
| | |
| gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaatc | 6300 |
| atcattatta ttattatttg cagtcagga gaaccaccta cccctgactt ctgtttagtc | 6360 |
| tcctttttta ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct attaaatgta gtagttaact | 6420 |

| | |
|--|------|
| atgcctcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa gcgcactcct gcttttcgat | 6480 |
| ttatggtgtg tgcaagtaaa caggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaaa | 6540 |
| ttcactgaaa ttacaagat acatatatat gcatatatat aatggaaaagt ttcccgaat | 6600 |
| gcaacaatta gcattttaaa atcatatata ggcatgcaca ttctaaatag tactttttca | 6660 |
| | |
| tgcttcattg tttctctggc agataatfff actaagaaga aaaatagata ttcgactccc | 6720 |
| cttcctataa caaatccacg ggagagggtt ccagcggagc cgagccccct gggtttctcg | 6780 |
| taggccctag acggtgttgc atttatcagt gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata | 6840 |
| gctgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaaat acaaagtt | 6878 |
| | |
| <210> 2 | |
| <211> 2656 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |
| <400> 2 | |
| gaggttttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggtttggcc | 60 |
| tccccctccc ccttttctc tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgctttt | 120 |
| | |
| ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcttccagtc gggctgcacc | 180 |
| tctgccttgc actttgcaca gaggttagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa | 240 |
| aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt | 300 |
| gccaaggccc gcgcccccgc gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg | 360 |
| cgcgcgccct gcctgcagcc cgggcccggc aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca | 420 |
| gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggcccggc tcttccagct tcgccgccgc | 480 |
| agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct | 540 |
| | |
| cgcgcgcaaa ggaggcgcgc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc | 600 |
| gtgagcaggg gggaggagg gcgggcgcgc ggggcgcggg caggcgggg ggggtgtgtgt | 660 |
| gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc | 720 |
| cggcaagctg gctcacccgc tggccacca gcacagcccg ctggcccctc tctgcagcc | 780 |
| catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc | 840 |
| aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga | 900 |
| tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg | 960 |
| | |
| cgcccgcttc atcgccgggg gctcgtctgc ctccacccc atgagcacgc cgtgcagctc | 1020 |
| gggtccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc | 1080 |

| | |
|--|------|
| gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctacccgcag cagctgaacc ccgaggcgct | 1140 |
| gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg | 1200 |
| cggtctcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccggtgc | 1260 |
| cggcgcctcc ttgggcggca gcggcgagga gatgggcccc gccgccgccc tgggtgccgc | 1320 |
| cgtgatcgcc gcggccgccc cgcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca | 1380 |
| ccacccgcc ggccaccacc accaccgcac ggccggcgcg cccggcgccc cgggcagcgc | 1440 |
| ggccgcctcg gccggtggcg ctggggcgcg gggcggcggt ggcccggcca gcgtggggg | 1500 |
| cggcgccgccc ggccggcgcg gcggaggcgg cggggcgcg gcggggcgcg gggcgccct | 1560 |
| gcacccgcac cagccgccc gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct | 1620 |
| ggtgacctat tctgtgcgc agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt | 1680 |
| gatccggctg aagcagaaga ggccggacct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccg | 1740 |
| cttcaaggagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca | 1800 |
| agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc gagaggacg cgtacaagga | 1860 |
| gaaatacgag aagttggtga gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc | 1920 |
| gtcctctccc gagtttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata | 1980 |
| cgccacattt tggaagcccc agcatcgtgt acttaccagt gtgttcacaa aatgaaattt | 2040 |
| gtgtgagagc tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca 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 tggaaagttt cccggaatgc aacaattagc attttaaaat catatatagg | 2400 |
| catgcacatt ctaaatagta ctttttcatt cttcattgtt tctctggcag ataattttac | 2460 |
| taagaagaaa aatagatatt cgactccctt tcctaaaca aatccacggg cagaggctcc | 2520 |
| agcggagccg agccccctgg ttttctcgta ggccctagac ggtgttgcat ttatcagtga | 2580 |
| tgtcaaactg gctcatttgt cagacatagc tgtaaatgaa aacaatgtgt ggcaaaatac | 2640 |
| aaagttaaaa aaaaaa | 2656 |
| <210> 3 | |
| <211> 6887 | |
| <212> DNA | |
| <213> Homo sapiens | |

<400> 3

| | |
|--|------|
| gaggttttaa aatctttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggtttggcc | 60 |
| tccccctccc ccttttgcct tctgcctcgt ctttccccag gacttcgcta ttttgccttt | 120 |
| ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc | 180 |
| tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa | 240 |
| aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccct | 300 |
| | |
| gccaaggccc gcgccgccc gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg | 360 |
| cgcgcgccct gcctgcagcc cgggcccggc aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca | 420 |
| gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggcccggc tcctccagct tcgccgcgc | 480 |
| agccaccacc gccgccaccg cagctcgagg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggct | 540 |
| cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc | 600 |
| gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt | 660 |
| gtgagcgcg tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cggcccagcc | 720 |
| | |
| cggcaagctg gctcaccgcg tggccaccca gcacagccc ctggcccctc tcctgcagcc | 780 |
| catctggcgg agcggcgcg gcggcgcggg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc | 840 |
| aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga | 900 |
| tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagtg | 960 |
| cggccgtctc atcgccgggg gctcgtgtc ctcaccccc atgagcacgc cgtgcagtc | 1020 |
| ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc | 1080 |
| gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcgag cagctgaacc ccgaggcgct | 1140 |
| | |
| gggttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccaggg | 1200 |
| cggttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcgggcg gggccggtgc | 1260 |
| cggcgccctc ttggggcgca gcggcgagga gatgggccc gccgccgccc tgggtgccgc | 1320 |
| cgtgatcgcc gcggccgccc gcagagcgg cgcgggccc cactaccacc accaccacca | 1380 |
| ccacgccgcc ggccaccacc accaccgac ggccggcgcg cccggcgccc cgggcagcgc | 1440 |
| ggccgcctcg gccggtggcg ctgggggcgc gggcgggcgt ggcccggcca gcgctggggg | 1500 |
| cggcgggcgc ggccggcgcg gcggaggcgg cgggggcgcg gcggggcgcg ggggcgcct | 1560 |
| | |
| gcacccgcac cagccgccc gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct | 1620 |
| ggtgacctat tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt | 1680 |
| gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtctgccg | 1740 |
| cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgctgcagca | 1800 |

| | |
|--|------|
| agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtgcgc gagaggacg cgtacaagga | 1860 |
| gaaatacgag aagttgggtga gcagcggctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc | 1920 |
| gtcctctccc gagtttttca tgtgagtcgt acacgcgatt ccagctagcc accctgataa | 1980 |
| | |
| gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctcgccac | 2040 |
| cacctcacca cccccacccc caccgagttt ggcccccttg gccccctaca cacacacaaa | 2100 |
| ccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acacccacac ccttgctcga | 2160 |
| gtttgtgtg gtggtggctg ttttaactg gggagggaat ggggtgtctgg ctcatggatt | 2220 |
| gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt tttttttttt acaccccccc | 2280 |
| gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc agagtctctc atgtgaaacg | 2340 |
| ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc ttcttcttcc ccttcagttc | 2400 |
| | |
| atgaactggt gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat tttgtttgga tttttttttt | 2460 |
| taattttact tttagagctt gctgtgttgc ccacctttt tccaacctcc accctcactc | 2520 |
| cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa gcaaagtttt ttttcttct | 2580 |
| cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aaaatgtgaa atgttataga | 2640 |
| cttgacgct gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga | 2700 |
| aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca accttctggg tgtgacttgt | 2760 |
| gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct gccattaaaa aaactcattc | 2820 |
| | |
| tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca acaatgaact ataactgttt | 2880 |
| caaagacttt atgaaaaaga gacattatat taataaaaaa aaaaagcctg catgctggac | 2940 |
| atgtatggta taattatttt ttcttttttt ttctcttttg gcttggaat ggacgttcga | 3000 |
| agacttatag catggcattc atacttttgt ttattgcct catgactttt ttgagtttag | 3060 |
| aacaaaacag tgcaaccgta gagecttctt cccatgaaat ttgcatctg ctccaaaact | 3120 |
| gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga aggcatctct tgtcaaagat | 3180 |
| accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt | 3240 |
| | |
| taataagaat gacccccac tttggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagtcta | 3300 |
| aaatttattt tttaaaaaga gaaactgccc cattattttt ggtttgtttt atttttattt | 3360 |
| tatatTTTTT ggcttttggT cattgtcaaa tgtggaatgc tctgggttct tagtatataa | 3420 |
| tttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat gtatgctaca gataaaggaa | 3480 |
| tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgtttagctg tagatttttt aaacgattga | 3540 |
| tgcactaaat tgtttactat tgtgatgtta aggggggtag agtttgcaag gggactgttt | 3600 |

| | |
|--|------|
| aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat ataagttggg tatgtgtagt | 3660 |
| | |
| ctttgctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta agaggggaaa cgcccctgtt | 3720 |
| tatatctgta ggggtatfff acattcaaaa atgtatgttt ttttttcttt tcaaaattaa | 3780 |
| agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag catataatac aaaaaaaaaat | 3840 |
| tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta taaaaatggc attactgcac | 3900 |
| agttttaaga tgaatcagat ttttttacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg | 3960 |
| taacttaaaa aaaaatccac agttttaag gcaataatca gtaaatgtta ttttcaggga | 4020 |
| ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaattctt accacaataa atataaaaaa | 4080 |
| | |
| atcttgtcag ttacttttct tttacatatt ttgctgtgca aaattgtttt atatcttgag | 4140 |
| ttactaacta accacgcgtg ttgttcttat gtgcttttct ttcattttca attctggtta | 4200 |
| tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt tttttgattc tgtactcagt | 4260 |
| ttcttagtgt acagttaaac tgggccaac aacctcgta aaagtgtaaa atgcatcctt | 4320 |
| ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag | 4380 |
| gctgtttttt gaagttagga ggctggcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat | 4440 |
| gtaaattatg acctcatttt tttctcccca aagttttcag ttttcaaag agttgagcca | 4500 |
| | |
| taattgcctt tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa ctaggcttcc tgagcatggc | 4560 |
| cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga ggagccggac aaatatggcg | 4620 |
| catcagaggt ggcttgca catatgcatt gaacggtaaa gagaacagc gcttgccttt | 4680 |
| tcactaaagt tgactatttt tccttcttct cttacacacc gagattttct tgttagcaag | 4740 |
| gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgt tttgttttgt tttgcttttc | 4800 |
| tccttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag aaaatccact ccttacttcc | 4860 |
| atatttccaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa atcatatttc accgtgaata | 4920 |
| | |
| ttcagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga tttcagatca tgctatcccc | 4980 |
| agaaataaaa gcaaaaaata ataccttgtt ggaatatagg ctgtgctttg atttactggt | 5040 |
| atttacccca aaataggctg tgtatggggg ctgacttaaa gatcccttgg aaagactcaa | 5100 |
| aactaccttc actagtagga ctctaagcg ctgacctatt tttaaatgac acaaattcat | 5160 |
| gaaactaatg ttacaatttc atgcagtttg cactcttagt catcttcccc tagcacacca | 5220 |
| atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaaaaata gccaacacg atgacttttg | 5280 |
| ttttgttttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat tgcaactctg actgaaagac | 5340 |

ttatttttaa gaaaacaggt tgtgtttggt gctgctaagt tctggccagt ttatcatctg 5400
 gccttctctgc ctatttttta caaaacacga agacagtgtg taacctcgac attttgacct 5460
 tccttttatgt gctagtttag acaggctcct gaatccacac ttaattttgc ttaacaaaag 5520
 tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt gttcttgact tcagatatit 5580
 ctttcctttt tttttttttt tcctcatcac aactaagaga tacacaaact ctgaagaagc 5640
 agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg aaagatttta ggcaaacatt 5700
 ctcaaaaata gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt tatctcatga caaatgaggc 5760

 ctggattgga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat ttgatagga atctacaagg 5820
 tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaaacttta gaaatcaaa tgcaaagggtg 5880
 ctggcaaaaa tgaggtttga gtgctggct gtaagagaag gtttaactct agtaaaaggc 5940
 attttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag tgggagtagc aaacaatac 6000
 atgttttttt tttcttaca agaactccta aatcctgagt aagtgccatt cattacaata 6060
 agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctactttcc cttttacgt 6120
 gcgtttgatc ttgtctaaa tagtgtaaaa attcctttca ttccaattac agaactgagc 6180

 ccactcgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt ttggaagccc cagcatcgtg 6240
 tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag ctgtacatta aaaaaaatca 6300
 tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac ccctgacttc tgtttagtct 6360
 cttttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaatgtag tagttaacta 6420
 tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag cgcactcctg cttttcgatt 6480
 tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540
 tcactgaaat tacaagata catatatatg catatatata atggaaagt tcccggaatg 6600

 caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat tctaaatagt actttttcat 6660
 gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720
 ttccctaacc aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780
 aggccctaga cgggtgttga tttatcagt atgtcaaagc tgctcatttg tcagacatag 6840
 ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttaaa aaaaaaa 6887

 <210> 4
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 4

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

1 5 10 15
 Leu Ala Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe Asp Leu Met Lys Phe Glu Val
 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 |
| 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 |
| 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 |
| 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 cggctctgaga ggccgtgttg ggtgtctttg tcagggtgaag | 60 |
| aaagagaaga aggctggtac accttcccag gaattctcac tgaagaaaac atctggattt | 120 |
| tttacatctc ttgtgcaaaa caaacaaga tttcattaag tgatgtatat tgttttccaa | 180 |
| ggaagaaacc tgcagagaca aaaacaaata agcaaataat tgaacaaaa atatgataaa | 240 |
| cccccaaatt cttccagtgc taatttactt gttatcatgg ttctctacaa aggagagat | 300 |
| cactaattac aggtttttcc agaattcaca tttcacgtca agatcatcca atccaaacag | 360 |
| tgtacggaaa gcctagggcc ttcttcactt tgccccctac cccaccctac acacacgccc | 420 |
| ccatctaaat gatacccttg gaaagaaacc tacacatctc atttgtctat attttgcttc | 480 |
| ctccctcgcc tcccggtaac caaatgtgag ttgttctcta actgcactgg agaatcagaa | 540 |
| tttattgtac atatgtttgt gttccactta ataaaaaac ctatatttta agataaactt | 600 |
| tgtagtaaat tcatgaggta agtgactatt tatgctaatac aggagaaat atattctcaa | 660 |
| gcataatgca ttacataaat ttgaatgtaa aatgttcaat tatgaagtaa atacaggtaa | 720 |
| tgcaataat aaattacctc taataaaaat tataaaagat gtgccttgaa agagagagcg | 780 |
| gctttaactt acaactgtga attgcttaaa gagaaaagaa ttaataaatg ctgaattact | 840 |
| ctgatgatta tttagcacat aattcaccta ttcataacga ctctagtaa tcagactgtt | 900 |
| gtttcacatc ctccaacatg aggcaagact gtttcctcag caattttgcc cttatcagat | 960 |
| tatctcgtct gattctatta attttcttcc atgaatctgc taacagtgat ttgtgattta | 1020 |
| cttaccctgc taactgaaga ctgttaaaag gatttatcta aactggacc taagaacagt | 1080 |
| gtacgcctta tcgttcagtt actctgaaga actctttctc aaatcaattt agttggtttc | 1140 |
| atagtgaat ttagtggaca ctggttagtt ctgccccata aaatcagccc ctaaacaaag | 1200 |
| agtccagaca ccataacctga tgcattccat tctattcaga ttatggatgt ctgattccaa | 1260 |
| catgatatat ttgagttgct ataactcaca atcggggaaa atatattcct ttaagctttt | 1320 |
| aatctttgta atttggacat gaacaggggt ttgttttttc atttttgcat gaagtcatta | 1380 |
| tgtatgtact gacgtgaaac tataattgtg tttctgatgt tactgtgtca caatattcta | 1440 |
| tgcgatgtaa cccatgtcct cctccccctc acaaatctcc tataaatatt cattgttttc | 1500 |
| aaaaacttta atactactgg tccgaattgg tcaataatga caaatgcatg gtttctaaat | 1560 |
| tactgtatat tgttctacag agattactag agtatatata gcaaggggat gttaagcagt | 1620 |
| aagaaaacac agttcacatt gtatttggat tagattggct tggatagaag tgaacaaac | 1680 |
| aatgttagca aagaagtcta aagacatgtg gccactgtat attgtacaga atcaaaaacc | 1740 |

| | |
|--|------|
| tgaatagtac tcattaaaat gagagagctc aattgttata aaagaaatgc tgctaacaga | 1800 |
| | |
| gaactgtaaa tgtttagaca cccctgtgaa tctactaaata ataatgtaaa aaggataaaa | 1860 |
| atgagaatta agttataagc ctgagagcat tactgctaca catctaaaaa aataattctg | 1920 |
| atcctctctt ttttttttcc aagagaaaat gggcgactat aaaagacctt gcaataagag | 1980 |
| aaataaaaat accatgtctt cacagcagtg tacataaata aaccataaaa atgtgcagat | 2040 |
| aataatatat ttagctgccc aaacatgggc atttaatttc tagaaatgat atataacaat | 2100 |
| gtaacaatta gatactcagc catgaatgtg tatggcacag tcttcatcat tagcaaaactt | 2160 |
| tgtgtataaa atattattta ttatttatta taatactgct ttcagaggca atgatcatac | 2220 |
| | |
| cttacagctt ttaacacaaa tatgatgcaa aaggattaaa agtatatcat aaacaaacaa | 2280 |
| taaattcttt ctaaatcac ttaaattcat attttcatg aaaaatataa acttcctaca | 2340 |
| tttgtgacta ctgactttta aaaagaccta gaaaactatt gttacgggca atgttaaag | 2400 |
| acataatgct tatgtaatgg aaagtgtgga ttttctcta aataaactat aatcccttaa | 2460 |
| cttcattact agggaaaata ttgttaaaga gaaggaaagc aagggaattc tgctaggttg | 2520 |
| cataaatatt gacataatct tctctcttcc tcccccaac tggtaataga catagtttat | 2580 |
| tccacccaac aaaatgctct tataagacca aaactacct tattaacaac ttctctgcag | 2640 |
| | |
| tcacgatgaa aagaacact acttgtctga aaaataccga cagcgctgcc cttttcagat | 2700 |
| taggggtgtc ctacgaatct tttgggaagt cttccattaa ggattcctgg gtttgctgaa | 2760 |
| actgaagtct actaggatca gagaatttaa cacaggtcta atatggtgca aggaacgagt | 2820 |
| gagagacacc tgaggttata aatagcaaag catgctgcgg ggtggggaag accattctga | 2880 |
| agtgcaatgt tcaagacgct ggcttaatat atgactaagt gtcagaagtc aggttttctg | 2940 |
| agaattactt tccagataaa caactttata gcactgcact taatcttact tactagagac | 3000 |
| atctcattta tcaactgaatt acaagtaact ttaatcctat tgatattgcc ataaagcccg | 3060 |
| | |
| ttgaaaatcc atcctggcac ttttaaaggg tttggggccc tgttacctgg ggatcctctt | 3120 |
| gcaaaggctc cagccagaaa ttacaccccg aggggtgtctg tatcccttgg cctctttgtc | 3180 |
| aacaatcaag gagaagagga ggggcaaaaa tgatctctgc atctgccagc actttcttgc | 3240 |
| gcccctttcc tatagggtcg ggttctccca cttcagtcaa actaactttg tgtgtctctt | 3300 |
| tcctctctcc acactgggta accagctgct ttctacttca tcgacaaaac tggacacgga | 3360 |
| tcaatttcaa ctgacctttg ccgaaagggt gcgctgttga ggtaaaaacc aactcgctcc | 3420 |
| aacaatagtt tccactcttc gatccttttg caggcttttc agaatttttt ttttttttta | 3480 |

| | |
|---|------|
| atgcaccctc ctagegtctc ccccttctca taaagtaaaa taaatacgat taaaaacacc | 3540 |
| aaatgcattt cattaattga aggaatcaac agtcccaact tctaagcaga cgggctggtc | 3600 |
| ttccaaaggc tgggtcggtt tcaggagctt tctctccaaa taaatctctg cttcttcgac | 3660 |
| ttgcctatcg ctttaaaatc ttagaaacag agttagtgtg tggtttcctt cttttttctt | 3720 |
| tttctttttt atttcttttt tgcataaact tttagagaat caatctagaa atttgaacta | 3780 |
| cttattagca ttgcaactg ggggtggggg gagcagcctc cccacccca ccccccactc | 3840 |
| tgcgtttccg gactagtcc agaaaccgcg gtttaaaatt taacccttcg agggtagctg | 3900 |
| | |
| gtgagggctg gggattgtt tttccccctt gtcctctgcc acgatcaagt ccgaataat | 3960 |
| taaaggaaac gtaaaagtgc aaagggcgcg cctgacctg ataacagag gtcagatttc | 4020 |
| gtaaggggac gggtagtgt gagtgttgt gtgttttgt gtgtgttgt aagagagaga | 4080 |
| gagagcgagc gcgcaatatg agtctcaaag gccaaactcc ggccagttag gagccggaag | 4140 |
| gctgagcccg gctgacctga ctttgagctt ccccgagtt atctcgata ggcgctcgct | 4200 |
| ctgtccaagg gcacgcgacg ccagcgggca gccggtctcc gtgaagaatg gcctctaaac | 4260 |
| aacttatatt acctcgttgt aaagagaggg ataaaatggg ctttccctct ccacggatgc | 4320 |
| | |
| ccagccttct gggcaggcgc atggccgggc ggcccccagc ccgcagcccc gatccggaca | 4380 |
| ccccactgca tccctccctt cccggtccct tccccgcacg ggcccccag agacggacaa | 4440 |
| agagttgggg ccaagtttga gcgccgggca cggccaggct cagggaagga aggtccccgg | 4500 |
| cagacacctg ggtaccagag ttggtgcgag gaggaaaaag tgggaggcga attcacaatc | 4560 |
| ctgggggttg agggcaggca ggggagggga atcaggccaa tcccagccga gtgagcccc | 4620 |
| agcgagctgg ggctccggat gggaggcctg tctcgcgctc caaagaaaag caaacgccc | 4680 |
| tcccaggtcc gcccgattg ccgaagcccc tctggaaaaa ctcttcccc tcttacacca | 4740 |
| | |
| aactttgcgc cgggcctcgt tccctcccg gtaggcagcg gcgcaggaag ggtaagcca | 4800 |
| gcccgctcca gctgacagtc agctgattgg gccctgattg acagctccga aaagtctct | 4860 |
| tgtttctata ctattatgct aatcgcgcc gctctcgccg cctccattg gcccgagtg | 4920 |
| ccagtcaatt tctcatttgg acctgacgac acgagtgcta taaaactcag caattgcttt | 4980 |
| aaactcttct tgctggatca gaggttttaa aatcttttt catcttctag ctgtagctcg | 5040 |
| ggctgcttgt cgcttggtc tccccctccc ccttttctc tctgcctcgt ctttcccag | 5100 |
| gacttcgcta ttttgctttt ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc | 5160 |
| | |
| tcctccagtc gggctgcacc tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg | 5220 |
| gagagagagg aaagaaaaa aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca | 5280 |
| tgaagtgtta actccccgt gccaaaggccc gcgccgccg gacagacgcc cgccgcgcct | 5340 |

| | |
|--|------|
| ccagccccga gcgagacgacg cgcgcgccct gcctgcagcc cgggccggcg aggcgagccc | 5400 |
| ttctttatgc aaagcgcgca gcgagcggc gagcggggga cgccgcgcac cgggccgggc | 5460 |
| tcctccagct tcgccgcgcg agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc | 5520 |
| cgagcctgaa gccgccggct cggcgcgcaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc | 5580 |
| | |
| gagcgaggga gcacattggc gtgagcaggg gggaggagg gcggcgcgcg gggcgcggg | 5640 |
| caggcgggg ggggtgtgt gtgagcgcg tcggaggttt cgggccagcc accgccgcg | 5700 |
| aagctagaag cggccagcc cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagccg | 5760 |
| ctggccctc tcctgcagcc catctggcg agcgcgcgcg gcggcgcgcg cggcgcgagg | 5820 |
| agaatggcat cagaactggc aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg | 5880 |
| gaatatgta atgacttcga tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc | 5940 |
| gaccgcatca tcagccagtg cggccgtctc atcgccgggg gctcgctgtc ctccacccc | 6000 |
| | |
| atgagcacgc cgtgcagctc ggtgccccct tccccagct tctcgcgcc cagcccggc | 6060 |
| tcgggcagcg agcagaaggc gcacctgga gactactact ggatgaccgg ctaccgcag | 6120 |
| cagctgaacc ccgaggcgct gggcttcagc cccgaggacg cggtcgagcg gctcatcagc | 6180 |
| aacagccacc agctccaggg cggttcgat ggctacgcg gcggggcgca gcagctggcc | 6240 |
| gcggcgggcg gggccgggtg cgcgccctcc ttggcgcgca gcggcgagga gatgggcccc | 6300 |
| gccgccggcg tgggttcgc cgtgatcgcc gcggccggcg cgcagagcgg cgcgggccc | 6360 |
| cactaccacc accaccacca ccacgccgc ggccaccacc accaccgac ggccggcgcg | 6420 |
| | |
| cccggcgccg cgggcagcg ggccgcctcg gccggtggcg ctggggcgcg gggcgcggt | 6480 |
| ggccccggca gcgtggggg cgggcgcgcg ggccggcgcg gcggaggcgg cggggcgcg | 6540 |
| gcggggcgcg gggcgccct gcacccgcac cagcccgcg gcggcctgca cttcgacgac | 6600 |
| cgcttctccg acgagcagct ggtgacctg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc | 6660 |
| ggggtcagca aggaggagg gatccggctg aagcagaaga ggcggacct gaaaaaccgc | 6720 |
| ggctatgccc agtctgccc cttcaaggagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag | 6780 |
| aagaaccagc tgctgcagca agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtgcgc | 6840 |
| | |
| gagagggagc cgtacaagga gaaatacgag aagttggtga gcagcggtt ccgagaaaac | 6900 |
| ggctcgagca gcgacaacc gtctctccc gagtttttca tgtgagtctg acacgcgatt | 6960 |
| ccagctagcc acctgataa gtgctcccg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt | 7020 |
| tctagagcca tgctgccac cacctacca cccccaccc caccgagttt gggcccttg | 7080 |
| gccccctaca cacacacaaa ccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac | 7140 |
| acaccccaca ccctgctcga gttgtggtg gtggtggctg ttttaactg gggagggaat | 7200 |

| | |
|--|------|
| gggtgtctgg ctcattgatt gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt | 7260 |
| | |
| ttttttttt acaccccccc gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcagc | 7320 |
| agagttcttc atgtgaaacg ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc | 7380 |
| ttcttcttcc ctttcagttc atgaactggg gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat | 7440 |
| tttgtttgga tttttttttt taattttact tttagagctt gctgtgttgc ccaccttttt | 7500 |
| tccaacctcc accctcactc cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa | 7560 |
| gcaaagtttt tttttcttct cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa | 7620 |
| aaaatgtgaa atgttataga cttgcagcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca | 7680 |
| | |
| ttgttatgct aaaatagaga aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca | 7740 |
| accttctggg tgtgacttgt gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct | 7800 |
| gccattaaaa aaactcattc tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca | 7860 |
| acaatgaact ataactgttt caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa | 7920 |
| aaaaagcctg catgctggac atgtatggta taattatttt ttcctttttt tttccttttg | 7980 |
| gcttggaagt ggacgttcga agacttatag catggcattc atacttttgt tttattgcct | 8040 |
| catgactttt ttgagtttag aacaaaacag tgcaaccgta gagccttctt cccatgaaat | 8100 |
| | |
| tttgcactcg ctccaaaact gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga | 8160 |
| aggcattcct tgtcaaagat accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag | 8220 |
| aactcttaat gttttctttt taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc | 8280 |
| tattgccgag aagcagtcta aaatttatit tttaaaaaga gaaactgccc cattattttt | 8340 |
| ggtttgtttt atttttatit tatatttttt ggcttttggg cattgtcaaa tgtggaatgc | 8400 |
| tctgggttct tagtatataa ttttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat | 8460 |
| gtatgctaca gataaaggaa tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgtttagctg | 8520 |
| | |
| tagatttttt aaacgattga tgcactaaat tgtttactat tgtgatgtta aggggggtag | 8580 |
| agtttgcaag gggactgttt aaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat | 8640 |
| ataagttggg tatgttagt ctttgctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta | 8700 |
| agaggggaaa cggccctgtt tatactgtga ggggtatit acattcaaaa atgtatgttt | 8760 |
| ttttttcttt tcaaaattaa agtatitggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag | 8820 |
| catataatc aaaaaaaaaa tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta | 8880 |
| taaaaatggc attactgcac agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg | 8940 |

| | |
|--|-------|
| gtgcagaact ggattttctg taacttaaaa aaaaatccac agttttaag gcaataatca | 9000 |
| gtaaatgtta ttttcagga ctgacatcct gtctttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt | 9060 |
| accacaataa atataaaaa atcttgtcag ttacttttct ttacatatt ttgctgtgca | 9120 |
| aaattgtttt ataicttgag ttactaacta accacgcgtg ttgttcctat gtgcttttct | 9180 |
| ttcattttca attctggta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt | 9240 |
| tttttgattc tgtactcagt ttcttagtgt acagttaac tgggccaac aacctcgta | 9300 |
| aaagtgtaaa atgcatcctt ttctccagt gaaggattcc tggaggaata gggagacagt | 9360 |
| | |
| aattcagggt gaaattatag gctgtttttt gaagtgagga ggctggcccc atatactgat | 9420 |
| tagcaatatt taatatagat gtaaatatg acctcatttt ttctcccca aagttttcag | 9480 |
| ttttcaaatg agttgagcca taattgcctt tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa | 9540 |
| ctaggcttcc tgagcatggc cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga | 9600 |
| ggagccggac aaatatggcg catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa | 9660 |
| gagaaacagc gcttgccttt tcaactaaagt tgactatttt tccttcttct cttacacacc | 9720 |
| gagattttct tgttagcaag gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgt | 9780 |
| | |
| tttgttttgt tttgcttttc tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag | 9840 |
| aaaatccact ccttacttcc atatttccaa gtacatatct ggtttaaaact atgttatcaa | 9900 |
| atcatatttc accgtgaata ttcagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga | 9960 |
| tttcagatca tgctatcccc agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg | 10020 |
| ctgtgctttg atttacttgt atttacccca aaataggctg tgtatggggg ctgacttaaa | 10080 |
| gatcccttgg aaagactcaa aactaccttc actagtagga ctctaagcg ctgacctatt | 10140 |
| tttaaatgac acaaattcat gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt | 10200 |
| | |
| catcttcccc tagcacacca atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca | 10260 |
| gccaaacacg atgacttttg tttgttttc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat | 10320 |
| tgcaactctg actgaaagac ttatttttaa gaaaacaggt tgtgttttgt gctgctaagt | 10380 |
| tctggccagt ttatcatctg gccttctgc ctatttttta caaaacacga agacagtgtg | 10440 |
| taacctgac attttgacct tectttatgt gctagttag acaggtcctt gaatccacac | 10500 |
| ttaattttgc ttaacaaaag tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaagt | 10560 |
| gttcttgact tcagatattt ctttctttt ttttttttt tctcatcac aactaagaga | 10620 |
| | |
| tacacaaact ctgaagaagc agaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcatctgatg | 10680 |
| aaagatttta ggcaaacatt ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt | 10740 |
| tatctcatga caaatgagcg ctggattgga aggaaaaatat agttgtgtag aattaagcat | 10800 |

| | |
|--|-------|
| tttgatagga atctacaagg tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaaacttta | 10860 |
| gaaaatcaaa tgcaaagggt ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag | 10920 |
| gttaactcct agtaaaaggc atttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag | 10980 |
| tgggagtagc aaacaaatac atgttttttt tttcttaca agaactccta aatcctgagt | 11040 |
| | |
| aagtgccatt cattacaata agtctctaaa tttaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat | 11100 |
| ctagctttcc cctttacgtc gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgttaaa attcctttca | 11160 |
| ttccaattac agaactgagc ccaactgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt | 11220 |
| ttggaagccc cagcatcgtg tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag | 11280 |
| ctgtacatta aaaaaatca tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac | 11340 |
| ccctgacttc tgtttagtct cctttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta | 11400 |
| ttaaatgtag tagttaacta tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag | 11460 |
| | |
| cgcaactctg cttttcgatt tatggttgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct | 11520 |
| gccatactag ttttaaaat tcaactgaaat tacaagata catatatatg catatatata | 11580 |
| atggaaagt tcccggaatg caacaattag ctttttaaaa tcatatatag gcatgcacat | 11640 |
| tctaaatagt actttttcat gcttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa | 11700 |
| aaatagatat tcgactcccc ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc | 11760 |
| gagcccccctg gttttctcgt aggccttaga cgggtgttga tttatcagtg atgtcaaacg | 11820 |
| tgtcatttgc tcagacatag ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttagt | 11880 |
| | |
| taaatacaca ccctcttgt gattttttgc tcccttttct tttttgctcc tactcaaaaa | 11940 |
| aaaaaaaaac acctccttta catttccctg gcttcttga tgtttccctt ttcaaaaacc | 12000 |
| atgtaataat tttttacaat gtatctgaca cattaatata ttgacatcaa ataggcagac | 12060 |
| attctacttt tgcctggcaa 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 aaagcagtg acagaagaca gatcatggc accctcaca | 12360 |
| acatggcaca cagctgtctc ggtagctgca ttcccagcat gtctgggtct aaatatctag | 12420 |
| agttgcctat gacacgttca aaggttccca agcacagtac attgggaggc ttttgcgtct | 12480 |
| gtggccgttg ttttcgttta ggccaactta cttccgtatt cacatactct tggctttacg | 12540 |
| aaatacactc ctccagtcta ctaggccaat caatatattt aaaagtctga ttgccacata | 12600 |
| agtctctctc tctctctttt tgttttttgt ttgtttgttt ttttctgttt tggtgccgg | 12660 |

| | |
|--|-------|
| tagttaaga ctgagatagg ttggaagact aaaatacagg agtacatgag tgacaacctt | 12720 |
| | |
| cagccgtctg atttccatgc cggtaaaaca cacaaccaag ctcttcttag cgctgcta | 12780 |
| ataaacattc actaagaggg aataggaagt gagatttacc agcttcactt tgctgattg | 12840 |
| caaggttccc 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 caggtccagg caggccatgt | 13140 |
| | |
| agtagttata aaggaggtgg tccaggtcca gccacctcaa tcaggatttg tttgtttga | 13200 |
| agcatttgct taaaagcgga gcaagagtct taaccaact tgccataaca ctgcttttct | 13260 |
| cgcttttgat gtaaatcttc aaaattcaga catcaaacag ccccagaaaa ggggaattct | 13320 |
| ctccaggcat tgctccgcc cagctcctga acaaaccag ctctgtctag cattttttc | 13380 |
| cctagcgggg gtaggggaca gggtagaga atttcagtct ccaggctgt ctcattgattg | 13440 |
| ttagggcata aagaaacaca gtctgccac aaattgggag catctttacc ctttagagag | 13500 |
| aaacaaaaca aaactaaaca aacaaatcaa attgctttgc atgaaggcgt agcaaataaa | 13560 |
| | |
| atctcgggct ccctgttccc tgcaccattt gtaggagtg agaaatgagg gaaacaagag | 13620 |
| aaaggggaac tttaaaagcg ggaggcccag aaataatccc tgttaccagt ctgaatttca | 13680 |
| cttgctccgt ggctaacgtc agacctagtg tgcattgtatg ccagaagtaa actaggctcg | 13740 |
| gctgtccatt tctttaaat atgttcacat gtttccttt tgaaaacaat tttggggact | 13800 |
| aaacccaaat ggagagattt gaggaatcg ttaatgtctt aacatttgag tatatttata | 13860 |
| aatgtatcag tctgtgat | 13878 |