



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월23일

(11) 등록번호 10-2194536

(24) 등록일자 2020년12월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 33/68 (2006.01) A61K 31/138 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)

C12Q 1/6886 (2018.01) G01N 33/574 (2006.01)

(52) CPC특허분류

G01N 33/6893 (2013.01)

A61K 31/138 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0067685

(22) 출원일자 2019년06월10일

심사청구일자 2019년06월10일

(65) 공개번호 10-2020-0141116

(43) 공개일자 2020년12월18일

(56) 선행기술조사문헌

US20180037566 A1*

US20140171483 A1

US20060246470 A1

US20080113345 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

연세대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 연세로 50 (신촌동, 연세대학교)

(72) 발명자

김명희

서울특별시 종로구 사직로8길 24, 4층 402(아파트)호(내수동)

오지훈

서울특별시 서대문구 이화여대3길 28, 505호(대현동)

이지연

경기도 고양시 일산동구 강석로 152, 713동 1601호(마두동, 강촌마을7단지아파트)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 10 항

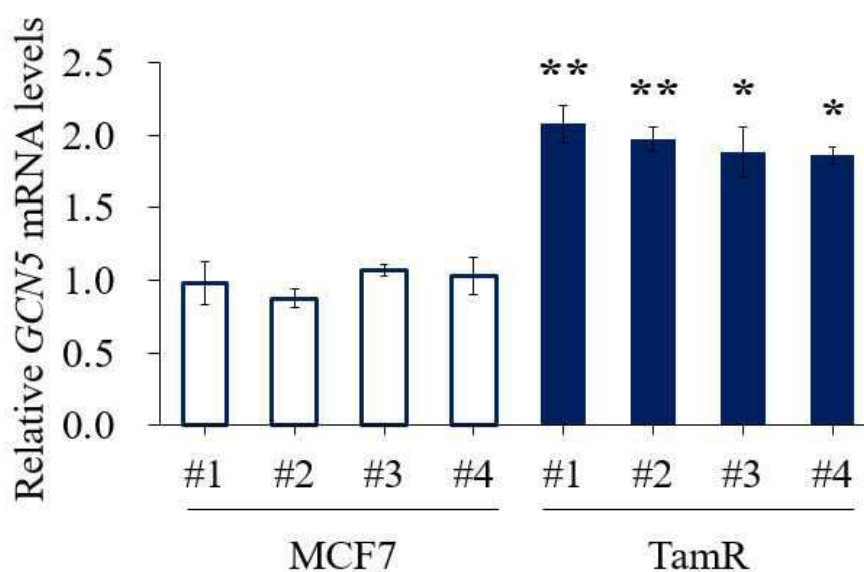
심사관 : 차명훈

(54) 발명의 명칭 타목시펜의 반응성 예측용 조성물

(57) 요약

본 발명은 암에 대한 대상체의 타목시펜 반응성 예측용 조성물 및 이를 이용한 타목시펜 반응성 예측방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 타목시펜의 치료 효과를 현저히 강화시키는 암의 치료 보조제 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 타목시펜에 대한 환자의 치료 민감성을 높은 신뢰도로 예측하여 에스트로겐 수용체 억제에 따른 여러 부작용이 뒤따르는 타목시펜의 장기 투약 필요성을 조기에 결정하고 궁극적으로 합리적인 치료 전략을 수립하는데 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C12Q 1/6886 (2018.05)
G01N 33/57415 (2019.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/136 (2013.01)
G01N 2500/04 (2013.01)
G01N 2800/52 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1A2B2011821
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	앞뒤축 형태형성에 관여하는 혹스 코드: CTCF에 의한 혹스 발현 조절과 질병에의 응
기 여 율	40/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019R1A2C1002223
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	중견연구자지원사업
연구과제명	배아발생과 암발생에 공통으로 기여하는 noncoding RNA 발굴을 통한 암 제어기전 연
기 여 율	25/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2019R1I1A1A01050780
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	창의도전연구기반지원
연구과제명	내분비내성 유방암의 형성과 전이에서 GCN5의 역할 규명 및 임상적 가치 평가
기 여 율	35/100
과제수행기관명	연세대학교 산학협력단
연구기간	2019.06.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 유방암에 대한 대상체의 타목시펜 반응성 예측용 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 GCN5 단백질은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, GCN5 단백질을 인코딩하는 유전자는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 GCN5 단백질의 발현량을 측정하는 제제는 상기 GCN5 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타머인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 GCN5 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자가 고발현될 경우 상기 대상체는 타목시펜 저항성을 가지는 것으로 판단하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 유방암에 대한 대상체의 타목시펜 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 GCN5 단백질은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서, GCN5 단백질을 인코딩하는 유전자는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 가지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

다음의 단계를 포함하는 대상체의 타목시펜에 대한 민감성을 향상시키거나 저항성을 감소시키는 타목시펜 보조제의 스크리닝 방법:

(a) GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

(b) 상기 시료 내 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

상기 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험물질은 타목시펜 보조제 조성물로 판정한다.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 대상체의 타목시펜에 대한 치료 반응성을 예측하기 위한 바이오 마커 조성물 및 이를 이용한 반응성 예측 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 유방암은 유병률이 가장 높은 암 중의 하나이며, 전 세계적으로 암으로 인한 여성의 주요 사망요인 중 하나이다. 모든 유방암 환자의 약 70%는 에스트로겐 수용체(ER)-양성으로, 내분비 요법으로 치료가 시도된다. 타목시펜은 아로마타제(aromatase) 억제제와 함께 가장 널리 사용되는 내분비요법 치료제로서 ER-양성 유방암의 진행을 개선시키는 데 있어 다양한 장점을 가진다. 하지만, 타목시펜의 높은 치료효율에도 불구하고, 타목시펜을 5년간 투여한 ER-양성 유방암 환자의 3분의 1은 15년 내에 재발한다.

[0004] 프로토타입 히스톤 아세틸전이효소(HAT, Histone Acetyltransferase)인 GCN5(General control non-derepressible 5)는 코어 히스톤의 라이신 잔기(H3K9, H3K14, H3K18, 및 H3K23) 아세틸화를 통해 다양한 세포 반응 및 다운스트림 타겟 유전자 조절에 관여한다. 나아가, 전사인자로서의 Gcn5는 프로모터 부위에 결합하여 특정 유전자 발현을 조절함으로써 초기 마우스 배아발달을 유지하는 데 중요한 역할을 하는 것으로 알려졌다. 최근 다양한 인간 암에서 GCN5의 조절장애가 관찰되었다. 그러나, 아직까지 암의 진행에 GCN5가 영향을 미치는 명확한 기작은 알려져 있지 않다.

[0005] 본 발명자들은 GCN5가 어떻게 ER-양성 유방암에서 타목시펜-저항성에 기여하는지를 인 비트로, 인 비보 및 환자

시료 분석을 통해 조사하였다. 나아가, 본 발명의 인 비트로 연구를 통해 GCN5가 전사인자인 AIB1(amplified in breast cancer 1)의 발현을 활성화하고, p53의 단백질 안정성을 저하시킴으로써 타목시펜-저항성을 유도한다는 사실이 밝혀졌다. 이러한 현상은 이식모델을 통해서도 확인되었다. 이를 종합하면, 본 발명자들의 연구결과는 GCN5가 AIB1 및 p53을 매개하여 ER-양성 유방암에서 타목시펜 저항성을 부여한다는 사실을 새롭게 제안한다.

- [0007] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

선행기술문헌

비특허문헌

- [0009] (비특허문헌 0001) 비특허문헌 1. Daniel R. Ciocca et al. Molecular markers for predicting response to tamoxifen in breast cancer patients. Endocrine 13(1):1-10 (2000)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명자들은 에스트로겐 수용체(ER)-양성 유방암을 비롯한 다양한 인간 고형암의 치료제로 적용되고 있는 타목시펜(Tamoxifen)의 반응성을 높은 신뢰도로 예측하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 히스톤 아세틸전이효소(HAT)인 GCN5 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현량과 대상체의 타목시펜 저항성이 양의 상관관계에 있다는 사실을 발견함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0011] 따라서 본 발명의 목적은 암에 대한 대상체의 타목시펜 반응성 예측용 조성물 및 타목시펜 반응성 예측방법을 제공하는 데 있다.
- [0012] 본 발명의 다른 목적은 암의 치료 보조제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명, 청구범위 및 도면에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0016] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제를 유효성분으로 포함하는 암에 대한 대상체의 타목시펜 반응성 예측용 조성물을 제공한다.
- [0017] 본 발명자들은 에스트로겐 수용체(ER)-양성 유방암을 비롯한 다양한 인간 고형암의 치료제로 적용되고 있는 타목시펜(Tamoxifen)의 반응성을 높은 신뢰도로 예측하는 방법을 개발하고자 예의 연구 노력하였다. 그 결과, 히스톤 아세틸전이효소(HAT)인 GCN5 또는 이를 코딩하는 유전자의 발현량과 대상체의 타목시펜 저항성이 양의 상관관계에 있다는 사실을 발견하였다.
- [0018] 본 명세서에서 용어 “대상체”는 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하기 위한 시료를 제공하고, 궁극적으로 타목시펜 반응성의 분석 대상이 되는 개체를 의미한다. 개체는 제한없이 인간, 마우스, 래트, 기니아 피그, 개, 고양이, 말, 소, 돼지, 원숭이, 침팬지, 비비 또는 붉은털 원숭이를 포함하며, 구체적으로는 인간이다. 본 발명의 조성물은 타목시펜의 암에 대한 치료적 반응성 뿐 아니라 예방적 반응성을 예측하기 위한 정보도 제공하기 때문에, 본 발명의 대상체는 암환자일 수도 있고 아직 암으로 확진되지 않은 정상개체(healthy subject)일 수도 있다.
- [0019] 본 명세서에서 용어 “치료”는 (a) 질환, 질병 또는 증상의 발전의 억제; (b) 질환, 질병 또는 증상의 경감; 또는 (c) 질환, 질병 또는 증상을 제거하는 것을 의미한다. 따라서 “치료적 반응성”은 타목시펜이 암환자에게 치료적 유효량으로 투여되었을 때 생체 내에서 위와 같은 작용을 하는 정도를 의미한다.
- [0020] 본 명세서에서, 용어 “예방”은 질환 또는 질병을 보유하고 있다고 진단된 적은 없으나, 이러한 질환 또는 질병에 걸릴 가능성이 있는 대상체에서 질환 또는 질병의 발생을 억제하는 것을 의미한다. 따라서 “예방적 반응성”은 타목시펜이 아직 암으로 확진되지 않은 정상인에게 예방적 유효량으로 투여되었을 때 생체 내에서 암의 발

병을 억제하는 작용을 하는 정도를 의미한다.

- [0021] 본 명세서에서 용어 “투여” 또는 “투여하다” 는 타목시펜의 치료적 유효량을 대상체에 직접적으로 투여함으로써 대상체의 체내에서 동일한 양이 형성되도록 하는 것을 말한다.
- [0022] 본 명세서에서 용어 “타목시펜 반응성 예측용 조성물” 은 대상체의 타목시펜 반응성을 예측하기 위해 GCN5 단백질 또는 GCN5 유전자의 발현량 측정수단을 포함하는 통합적인 혼합물(mixture) 또는 장비(device)를 의미하며, 이에 “타목시펜 반응성 예측용 키트” 로 표현될 수도 있다.
- [0023] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 GCN5 단백질은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열을 가진다.
- [0024] 본 명세서에서 용어 “단백질”은 펩타이드 결합에 의해 아미노산 잔기들이 서로 결합되어 형성된 선형의 분자를 의미한다. 본 발명의 GCN5 단백질은 서열목록 제1서열의 아미노산 서열에 대하여 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 아미노산 서열도 포함한다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 아미노산 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 70%의 상동성, 구체적으로는 최소 80%의 상동성, 보다 구체적으로는 최소 90%의 상동성, 가장 구체적으로는 최소 95%의 상동성을 나타내는 아미노산 서열을 의미한다.
- [0025] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 GCN5 단백질을 인코딩하는 유전자는 서열목록 제2서열의 뉴클레오타이드 서열을 가진다.
- [0026] 본 명세서에서 용어 “뉴클레오타이드” 는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드 뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다. 본 발명에서 발현량을 측정하고자 하는 뉴클레오타이드 서열은 첨부한 서열목록에 기재된 뉴클레오타이드 서열에 한정되지 않는다는 것은 당업자에게 명확하다. 뉴클레오타이드에서의 변이는 단백질에서 변화를 가져오지 않는 것도 있는데, 이러한 핵산은 기능적으로 균등한 코돈, 코돈의 축퇴성에 의해 동일한 아미노산을 코딩하는 코돈, 또는 생물학적으로 균등한 아미노산을 코딩하는 코돈을 가지는 핵산분자를 모두 포괄한다.
- [0027] 상술한 생물학적 균등 활성을 갖는 변이를 고려한다면, 본 발명에서 발현량을 측정하고자 하는 뉴클레오타이드는 서열목록에 기재된 서열과 실질적인 동일성(substantial identity)을 나타내는 서열도 포함하는 것으로 해석된다. 상기의 실질적인 동일성은, 상기한 본 발명의 서열과 임의의 다른 서열을 최대한 대응되도록 열라인하고, 당업계에서 통상적으로 이용되는 알고리즘을 이용하여 열라인된 서열을 분석한 경우에, 최소 70%의 상동성, 구체적으로는 80%의 상동성, 보다 구체적으로는 90%의 상동성, 가장 구체적으로는 95%의 상동성을 나타내는 서열을 의미한다. 서열비교를 위한 열라인먼트 방법은 당업계에 공지되어 있다. 열라인먼트에 대한 다양한 방법 및 알고리즘은 Huang et al., *Comp. Appl. BioSci.* 8:155-65(1992) and Pearson et al., *Meth. Mol. Biol.* 24:307-31(1994)에 개시되어 있다. NCBI Basic Local Alignment Search Tool(BLAST)(Altschul et al., *J. Mol. Biol.* 215:403-10(1990))은 NCBI(National Center for Biological Information) 등에서 접근 가능하며, 인터넷 상에서 blastp, blastm, blastx, tblastn and tblastx와 같은 서열 분석 프로그램과 연동되어 이용할 수 있다.
- [0028]
- [0029] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 GCN5 단백질의 발현량을 측정하는 제제는 상기 GCN5 단백질에 특이적으로 결합하는 항체 또는 앵타미이다.
- [0030] 본 발명에 따르면, 본 발명의 GCN5 단백질을 항원-항체 반응을 이용한 면역분석(immunoassay) 방법에 따라 검출하여 개체의 타목시펜 반응성을 분석하는 데 이용될 수 있다. 이러한 면역분석은 종래에 개발된 다양한 면역분석 또는 면역염색 프로토콜에 따라 실시될 수 있다.
- [0031] 예를 들어, 본 발명의 방법이 방사능면역분석 방법에 따라 실시되는 경우, 방사능동위원소(예컨대, C^{14} , I^{125} , P^{32} 및 S^{35})로 표지된 항체가 이용될 수 있다. 본 발명에서 GCN5 단백질을 특이적으로 인식하는 항체는 폴리클로날 또는 모노클로날 항체이며, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [0032] 본 발명의 항체는 당업계에서 통상적으로 실시되는 방법들, 예를 들어, 융합 방법(Kohler and Milstein, *European Journal of Immunology*, 6:511-519 (1976)), 제조합 DNA 방법(미국 특허 제4,816,567호) 또는 파아지 항체 라이브러리 방법(Clackson et al., *Nature*, 352:624-628(1991) 및 Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:58,

1-597(1991))에 의해 제조될 수 있다. 항체 제조에 대한 일반적인 과정은 Harlow, E. and Lane, D., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, New York, 1999; 및 Zola, H., *Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, 1984에 상세하게 기재되어 있다.

[0033] 상술한 면역분석 과정에 의한 최종적인 시그널의 강도를 분석함으로써, 타목시펜 반응성을 예측할 수 있다. 즉, 개체의 시료에서 GCN5 단백질에 대한 시그널이 정상 시료 보다 강하게 나오는 경우에는 타목시펜에 대한 반응성이 낮은(혹은 저항성이 있는) 것으로 판단된다.

[0034] 본 발명은 항체 대신 GCN5 단백질에 특이적으로 결합하는 앵타머를 이용할 수도 있다. 본 명세서에서 용어 “앵타머”는 특정 표적물질에 높은 친화력과 특이성으로 결합하는 단일 줄기의(single-stranded) 핵산(RNA 또는 DNA) 분자 또는 펩타이드 분자를 의미한다. 앵타머의 일반적인 내용은 Hoppe-Seyler F, Butz K "Peptide aptamers: powerful new tools for molecular medicine". *J Mol Med*. 78(8):426-30(2000); Cohen BA, Colas P, Brent R. "An artificial cell-cycle inhibitor isolated from a combinatorial library". *Proc Natl Acad Sci USA*. 95(24):14272-7(1998)에 상세하게 개시되어 있다.

[0035] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 GCN5 단백질을 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 제제는 상기 유전자의 핵산 분자에 특이적으로 결합하는 프라이머 또는 프로브이다.

[0036] 본 명세서에서, 용어 “핵산 분자”는 DNA(gDNA 및 cDNA) 그리고 RNA 분자를 포괄적으로 포함하는 의미를 가지며, 핵산 분자에서 기본 구성 단위인 뉴클레오타이드는 자연의 뉴클레오타이드뿐만 아니라, 당 또는 염기 부위가 변형된 유사체 (analogue)도 포함한다(Scheit, *Nucleotide Analogs*, John Wiley, New York(1980); Uhlman 및 Peyman, *Chemical Reviews*, 90:543-584(1990)).

[0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 “프라이머”는 핵산쇄(주형)에 상보적인 프라이머 연장 산물의 합성이 유도되는 조건, 즉, 뉴클레오타이드와 DNA 중합효소와 같은 중합제의 존재, 적합한 온도와 pH의 조건에서 합성의 개시점으로 작용하는 올리고뉴클레오타이드를 의미한다. 구체적으로는, 프라이머는 디옥시리보뉴클레오타이드 단일쇄이다. 본 발명에서 이용되는 프라이머는 자연(naturally occurring) dNMP(즉, dAMP, dGMP, dCMP 및 dTMP), 변형 뉴클레오타이드 또는 비-자연 뉴클레오타이드를 포함할 수 있으며, 리보뉴클레오타이드도 포함할 수 있다.

[0038] 본 발명의 프라이머는 타겟 핵산에 어닐링 되어 주형-의존성 핵산 중합효소에 의해 타겟 핵산에 상보적인 서열을 형성하는 연장 프라이머(extension primer)일 수 있으며, 이는 고정화 프로브가 어닐링 되어 있는 위치까지 연장되어 프로브가 어닐링 되어 있는 부위를 차지한다.

[0039] 본 발명에서 이용되는 연장 프라이머는 타겟 핵산, 예를 들어 *GCN5* 유전자의 특정 염기서열에 상보적인 혼성화 뉴클레오타이드 서열을 포함한다. 용어 “상보적”은 소정의 어닐링 또는 혼성화 조건하에서 프라이머 또는 프로브가 타겟 핵산 서열에 선택적으로 혼성화할 정도로 충분히 상보적인 것을 의미하며, 실질적으로 상보적(substantially complementary)인 경우 및 완전히 상보적(perfectly complementary)인 경우를 모두 포괄하는 의미이며, 구체적으로는 완전히 상보적인 경우를 의미한다. 본 명세서에서 용어 “실질적으로 상보적인 서열”은 완전히 일치되는 서열뿐만 아니라, 특정 서열에 어닐링하여 프라이머 역할을 할 수 있는 범위 내에서, 비교 대상의 서열과 부분적으로 불일치되는 서열도 포함되는 의미이다.

[0040] 프라이머는, 중합제의 존재 하에서 연장 산물의 합성을 프라이밍시킬 수 있을 정도로 충분히 길어야 한다. 프라이머의 적합한 길이는 다수의 요소, 예컨대, 온도, pH 및 프라이머의 소스(source)에 따라 결정되지만 전형적으로 15-30 뉴클레오타이드이다. 짧은 프라이머 분자는 주형과 충분히 안정된 혼성 복합체를 형성하기 위하여 일반적으로 보다 낮은 온도를 요구한다. 이러한 프라이머의 설계는 타겟 뉴클레오타이드 서열을 참조하여 당업자가 용이하게 실시할 수 있으며, 예컨대, 프라이머 디자인용 프로그램(예: PRIMER 3 프로그램)을 이용하여 할 수 있다.

[0041] 본 명세서에서 용어 “프로브”는 특정 뉴클레오타이드 서열에 혼성화될 수 있는 디옥시리보뉴클레오타이드 및 리보뉴클레오타이드를 포함하는 자연 또는 변형되는 모노머 또는 결합을 갖는 선형의 올리고머를 의미한다. 구체적으로, 프로브는 혼성화에서의 최대 효율을 위하여 단일가닥이며, 더욱 구체적으로는 디옥시리보뉴클레오타이드이다. 본 발명에 이용되는 프로브로서, 상기 *GCN5* 유전자의 특정 염기서열에 완전하게(perfectly) 상보적인 서열이 이용될 수 있으나, 특이적 혼성화를 방해하지 않는 범위 내에서 실질적으로(substantially) 상보적인 서열이 이용될 수도 있다. 일반적으로, 혼성화에 의해 형성되는 듀플렉스(duplex)의 안정성은 말단의 서열의 일치에 의해 결정되는 경향이 있기 때문에, 타겟 서열의 3' -말단 또는 5' -말단에 상보적인 프로브를 사용

하는 것이 바람직하다.

- [0042] 혼성화에 적합한 조건은 Joseph Sambrook, et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.(2001) 및 Haymes, B. D., et al., *Nucleic Acid Hybridization, A Practical Approach*, IRL Press, Washington, D.C.(1985)에 개시된 사항을 참조하여 결정할 수 있다.
- [0044] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 조성물로 대상체의 타목시펜의 치료 반응성을 예측하는 대상 질환은 유방암이며, 보다 구체적으로는 에스트로겐 수용체(ER)-양성 유방암이다.
- [0045] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 상기 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자가 고발현될 경우 상기 개체는 타목시펜 저항성을 가지는 것으로 판단한다.
- [0046] 본 명세서에서 용어 “고발현”은 GCN5 단백질 또는 GCN5 유전자의 발현량이 타목시펜 저항성을 가지지 않은 대상체에 비하여 유의하게 높은 경우를 의미하며, 구체적으로는 그 발현량이 정상인의 125% 이상인 경우를, 보다 구체적으로는 150% 이상인 경우를, 가장 구체적으로는 170% 이상인 경우를 의미한다.
- [0048] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량을 측정하는 단계를 포함하는 암에 대한 대상체의 타목시펜 반응성을 예측하기 위한 정보를 제공하는 방법을 제공한다.
- [0049] 본 발명의 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자에 대해서는 이미 상술하였으므로, 과도한 중복을 피하기 위해 이를 생략한다.
- [0051] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 GCN5의 억제제를 유효성분으로 포함하는 암의 치료 보조제 조성물을 제공한다.
- [0052] 본 명세서에서 용어 “치료 보조제(adjuvant)”는 단독으로 사용할 경우 질병 및 증상의 발전을 억제, 경감, 제거할 수는 없으나, 주된 약리성분과 함께 사용할 경우 해당 약리활성을 강화하거나, 지속시간을 연장하거나 또는 상승효과를 발휘하도록 하는 성분을 의미한다. 본 발명에 따르면, GCN5의 억제제는 주된 항암 약리성분인 타목시펜과 함께 사용될 경우 타목시펜이 투여된 대상체의 치료 반응성을 증가시켜 치료 효과를 현저히 개선시키는 역할을 한다.
- [0053] 본 명세서에서 용어 “억제제”는 GCN5의 활성 또는 발현의 저하를 야기시키는 물질을 의미하며, 이에 의해 GCN5의 활성 또는 발현이 탐지 불가능해지거나 무의미한 수준으로 존재하게 되는 경우 뿐 아니라, GCN5에 의해 유도되는 타목시펜 저항성이 유의하게 억제될 수 있을 정도로 GCN5의 활성 또는 발현을 저하시키는 물질을 의미한다. GCN5의 억제제는 예를 들어 당업계에서 이미 그 서열 및 구조가 공지된 효소인 GCN5의 발현을 유전자 수준에서 억제하는 shRNA, siRNA, miRNA, 리보자임(ribozyme), PNA(peptide nucleic acids) 또는 안티센스 올리고뉴클레오타이드와, 단백질 수준에서 억제하는 항체 또는 앵타머 뿐 아니라, GCN5의 활성을 억제하는 화합물, 펩타이드 및 천연물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0054] 본 명세서에서 용어 “shRNA(small hairpin RNA)”는 *in vivo* 상에서 스템-루프(stem-loop) 구조를 이루는 단일 가닥으로 50-70개로 구성된 뉴클레오타이드로서, RNA 간섭을 통해 타겟 유전자의 발현을 억제하기 위한 타이트한 헤어핀 구조를 만드는 RNA 서열을 의미한다. 통상적으로 5-10개의 뉴클레오타이드의 루프 부위 양쪽으로 상보적으로 19-29개의 뉴클레오타이드의 긴 RNA가 염기쌍을 이루어 이중가닥의 스템을 형성하며, 언제나 발현되도록 하기 위하여 U6 프로모터를 포함하는 벡터를 통해 세포 내로 형질도입되며 대개 딸세포로 전달되어 타겟 유전자의 발현억제가 유전되도록 한다.
- [0055] 본 명세서에서 용어 “siRNA”는 특정 mRNA의 절단(cleavage)을 통하여 RNAi(RNA interference) 현상을 유도할 수 있는 짧은 이중사슬 RNA를 의미한다. 타겟 유전자의 mRNA와 상동인 서열을 가지는 센스 RNA 가닥과 이와 상보적인 서열을 가지는 안티센스 RNA 가닥으로 구성된다. 전체 길이는 10 내지 100 염기, 바람직하게는 15 내지 80 염기, 가장 바람직하게는 20 내지 70 염기이고, 타겟 유전자의 발현을 RNAi 효과에 의하여 억제할 수 있는 것이면 평활(blunt)말단 혹은 점착(cohesive) 말단 모두 가능하다. 점착 말단 구조는 3 말단 돌출한 구조와 5 말단 쪽이 돌출한 구조 모두 가능하다.
- [0056] 본 명세서에서 용어 “miRNA(microRNA)”는 세포내에서 발현되지 않는 올리고뉴클레오타이드로서 짧은 스템-루프 구조를 가지면서 타겟 유전자의 mRNA와 상보적인 결합을 통하여 타겟 유전자 발현을 억제하는 단일 가닥 RNA 분자를 의미한다.
- [0057] 본 명세서에서 용어 “리보자임(ribozyme)”은 RNA의 일종으로 특정한 RNA의 염기 서열을 인식하여 자체적으로

이를 절단하는 효소와 같은 기능을 가진 RNA 분자를 의미한다. 리보자임은 타겟 mRNA 가닥의 상보적인 염기서열로 특이성을 가지고 결합하는 영역과 타겟 RNA를 절단하는 영역으로 구성된다.

[0058] 본 명세서에서 용어 “PNA(Peptide nucleic acid)”는 핵산과 단백질의 성질을 모두 가지면서 DNA 또는 RNA와 상보적으로 결합이 가능한 분자를 의미한다. PNA는 자연계에서는 발견되지 않고 인공적으로 화학적인 방법으로 합성되며, 상보적인 염기 서열의 천연 핵산과 혼성화(hybridization)를 통해 이중가닥을 형성하여 타겟 유전자의 발현을 조절한다.

[0059] 본 명세서에서 용어 “안티센스 올리고뉴클레오타이드”는 특정 mRNA의 서열에 상보적인 뉴클레오타이드 서열로서 타겟 mRNA 내의 상보적 서열에 결합하여 이의 단백질로의 번역, 세포질내로의 전위(translocation), 성숙(maturation) 또는 다른 모든 전체적인 생물학적 기능에 대한 필수적인 활성을 저해하는 핵산 분자를 의미한다. 안티센스 올리고뉴클레오타이드는 효능을 증진시키기 위하여 하나 이상의 염기, 당 또는 골격(backbone)의 위치에서 변형될 수 있다(De Mesmaeker et al., *Curr Opin Struct Biol.*, 5(3):343-55, 1995). 올리고뉴클레오타이드 골격은 포스포로티오에이트, 포스포트리에스테르, 메틸 포스포네이트, 단쇄 알킬, 시클로알킬, 단쇄 헤테로원자 등으로 변형될 수 있다.

[0061] 본 발명의 구체적인 구현예에 따르면, 본 발명의 보조제 조성물은 타목시펜과 병용 투여된다. 병용투여는 하나의 제형에 본 발명의 보조제와 타목시펜이 모두 포함된 채로, 또는 각각의 조성물에 별도로 포함된 채로 동시에 투여되거나 또는 임의의 순서로 적절한 시간 차를 두고 순차적으로 투여될 수 있다.

[0063] 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 대상체의 타목시펜에 대한 민감성을 향상시키거나 저항성을 감소시키는 타목시펜 보조제의 스크리닝 방법을 제공한다:

[0064] (a) GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자를 포함하는 생물학적 시료에 시험물질을 접촉시키는 단계; 및

[0065] (b) 상기 시료 내 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계,

[0066] 상기 GCN5 단백질 또는 이를 인코딩하는 유전자의 발현량 또는 활성이 감소한 경우, 상기 시험물질은 타목시펜 보조제 조성물로 판정한다.

[0067] 본 발명에서 용어 “생물학적 시료”는 인간을 포함한 포유동물로부터 얻어지는, GCN5를 발현하는 세포를 포함하고 있는 모든 시료로서, 조직, 기관, 세포 또는 세포 배양액을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0068] 본 발명의 스크리닝 방법을 언급하면서 사용되는 용어 “시험물질”은 GCN5를 발현하는 세포를 포함하는 시료에 첨가되어 GCN5의 활성 또는 발현량에 영향을 미치는지 여부를 검사하기 위하여 스크리닝에서 이용되는 미지의 물질을 의미한다. 상기 시험물질은 화합물, 뉴클레오타이드, 펩타이드 및 천연 추출물을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 시험물질을 처리한 생물학적 시료에서 GCN5의 발현량 또는 활성을 측정하는 단계는 당업계에 공지된 다양한 발현량 및 활성 측정방법에 의해 수행될 수 있다. 측정 결과, GCN5의 발현량 또는 활성이 감소한 경우 상기 시험물질은 타목시펜 보조제 조성물로 판정될 수 있다.

[0069] 본 명세서에서 용어 “발현량 또는 활성의 감소”는 GCN5에 의해 유도되는 타목시펜 저항성이 유의하게 억제되어 타목시펜에 의한 치료 효율이 측정 가능한 수준으로 개선될 정도로 GCN5의 발현량 또는 GCN5의 생체 내 고유한 기능이 감소하는 것을 의미한다. 구체적으로는 대조군에 비하여 활성 또는 발현량이 20% 이상 감소한 상태, 보다 구체적으로는 40% 이상 감소한 상태, 더욱 구체적으로는 60% 이상 감소한 상태를 의미할 수 있다.

발명의 효과

[0071] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0072] (a) 본 발명은 암에 대한 대상체의 타목시펜 반응성 예측용 조성물 및 이를 이용한 타목시펜 반응성 예측방법을 제공한다.

[0073] (b) 본 발명은 또한 타목시펜의 치료 효과를 현저히 강화시키는 암의 치료 보조제 조성물을 제공한다.

[0074] (c) 본 발명은 타목시펜에 대한 환자의 치료 민감성을 높은 신뢰도로 예측하여 에스트로겐 수용체 억제에 따른 여러 부작용이 뒤따르는 타목시펜의 장기 투약 필요성을 조기에 결정하고 궁극적으로 합리적인 치료 전략을 수립하는 데에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0076]

도 1은 GCN5이 타목시펜-저항성 유방암과 관련되어 있음을 보여주는 그림이다. 도 1a는 MCF7 및 TamR 유방암 세포에서의 GCN5의 mRNA 발현수준을, 도 1b는 MCF7 및 TamR 유방암 세포에서의 GCN5 단백질 발현 수준을 각각 나타낸다. 도 1c는 GCN5 단백질 발현이 높거나 낮은 내강형 A군 유방암 환자의 TRGated 무병생존 곡선을 나타낸다. 도 1d는 TRGated로 분석한 내강형 A군 유방암 환자에서의 불량한 예후에 대한 마커를 보여준다. 도 1e는 TRGated로 분석한 내강형 A군 유방암 환자에서의 불량한 예후 마커 발현에 대한 비례 비교 결과를 보여준다. 도 1f는 음성 대조군(siCon) 및 GCN5 siRNA(siGCN5)로 각각 4일간 형질전환된 MCF7, TamR, 및 TamR 세포에서의 GCN5 단백질 수준을 보여준다. 도 1g는 10 μ M 타목시펜을 처리한 MCF7, TamR, siCon/siGCN5 TamR 세포의 세포 생존 곡선을 나타낸다. 도 1h는 음성 대조군(MCF7-vec) 및 GCN5(MCF7-GCN5)을 형질전환한 MCF7 세포에서 GCN5가 과발현됨을 보여주는 그림이다. 도 1i는 10 μ M 타목시펜을 처리한 MCF7, TamR, MCF7-vec 및 GCN5-과발현 MCF7 세포의 세포 생존 곡선을 보여주는 그림이다. 도 1j는 PI 염색 후의 MCF7-vec, GCN5-과발현 MCF7 및 TamR 세포의 세포 주기 분석 결과를 보여주는 그림이다. 도 1k는 타목시펜의 존재 또는 부재 하에서의 G1, S, 및 G2기의 세포 비율을 보여준다. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

도 2는 TamR에 낮은 농도로 존재하는 GCN5와 CUL4-DDB1-CDT2 E3 유비퀴틴 라이게이즈와의 상호작용을 보여주는 그림으로, 이러한 상호작용은 TamR에서의 GCN5에 대한 프로테오솜성 분해가 저해되는 원인일 수 있다. 도 2a는 GCN5 단백질 안정성에 대한 1, 2, 4 및 8시간 동안의 사이클로헥사마이드 추적 분석 후 MCF7 및 TamR 세포에서의 GCN5에 대한 웨스턴 블롯 결과를 보여준다. 도 2b는 사이클로헥사마이드 추적 분석에 대한 면역 블롯팅 결과의 정량화를 나타낸다. 도 2c는 MG132 처리 후 MCF7 및 TamR 세포에서의 GCN5에 대한 웨스턴 블롯 결과를 나타내는 그림이다. 도 2d는 MG132 처리에 대한 면역 블롯팅 결과의 정량화를 보여준다. 도 2e는 MCF7 및 TamR 세포에서의 CUL4A-DDB1-CDT2 E3 유비퀴틴 라이게이즈의 단백질 수준을 나타낸 그림이다. 도 2f는 MCF7 및 TamR 세포에서의 GCN5와 CUL4A-DDB1-CDT2 E3 유비퀴틴 라이게이즈의 공-면역침강 결과를 보여주는 그림이다. *** $P < 0.001$.

도 3은 AIB1가 타목시펜에 대한 GCN5-유도 저항성에 대해 핵심적 역할을 함을 보여주는 그림이다. 도 3a는 CCLE 데이터 뱅크를 통해 GCN5 및 AIB1 mRNA 발현 간의 양의 상관관계를 보여주는 그림이다. 도 3b는 MCF7 및 TamR 세포에서 GCN5 및 AIB1 단백질 수준 간의 양의 상관관계를 보여주는 그림이다. 도 3c는 MCF7 세포에서 과발현되었을 때 GCN5 및 AIB1 단백질 발현이 양의 상관관계를 가짐을 보여주는 그림이다. 도 3d는 10 μ M 타목시펜을 처리한 shAIB1 GCN5-과발현 MCF7 세포의 세포 생존 곡선을 나타낸 그림이다. 도 3e는 PI 염색 후 MCF7, TamR, GCN5-과발현 MCF7 및 shAIB1 GCN5-과발현 MCF7 세포의 세포 주기 분석 결과를 보여주는 그림이다. 도 3f는 타목시펜의 존재 또는 부재 하에서의 G1, S, 및 G2기의 세포 비율을 보여준다. 도 3g는 히스톤 마커 및 프로모터 부위로 추정되는 부분을 보여주는 AIB1의 유전자 모식도이다. 도 3h는 AIB1의 프로모터 추정 부위에서의 GCN5 및 H3K9ac에 대한 ChIP-qPCR 분석결과를 보여주는 그림이다. *** $P < 0.001$.

도 4는 p53의 탈유비퀴틴화가 타목시펜-저항성 유방암 세포를 타목시펜-처리에 대해 다시 민감화시킴을 보여주는 그림이다. 도 4a는 야생형, GCN5-과발현/녹다운, 및 AIB1이 변형된 유방암 세포에서의 GCN5-관련 단백질의 발현 수준을 보여준다. 도 4b는 MCF7 및 TamR 세포에서 15, 30 및 60분간의 사이클로헥사마이드 추적 후 p53에 대한 웨스턴 블롯 결과를 보여주는 그림이다. 도 4c는 사이클로헥사마이드 추적에 대한 면역 블롯팅 결과의 정량화를 나타내는 그림이다. 도 4d는 p53 단백질의 안정성을 위해 MG132 처리 후 MCF7 및 TamR 세포에서 p53에 대한 웨스턴 블롯 결과를 보여주는 그림이다. 도 4e는 MG132 처리에 대한 면역 블롯팅 결과의 정량화를 보여준다. 도 4f는 shAIB1를 처리 또는 비처리한 MCF7, TamR 및 GCN5-과발현 MCF7 세포에서의 HAUSP와 p53의 공-면역침강 결과를 보여준다. 도 4g는 GCN5-과발현 MCF7 세포에서 p53을 과발현시킨 뒤의 p53 단백질 발현 수준을 측정된 결과를 보여주는 그림이다. 도 4h는 GCN5 및 p53을 공발현하는 MCF7 세포의 10 μ M 타목시펜 처리 후의 세포 생존 곡선을 나타낸다. *** $P < 0.001$.

도 5는 인 비보 및 환자 시료의 분석결과를 보여주는 그림이다.

도 6은 타목시펜을 투여받은 ER-양성 유방암 환자에서 높은 수준의 GCN5 및 AIB1가 전체 생존률(OS) 및 원격 무전이 생존률(DMFS)과 연관되어 있음을 보여주는 그림이다. 종양에서의 GCN5 발현량이 높거나 낮은 ER-양성 유방암 환자의 OS(n=548, 사건 횟수=367, $p=0.039$)(도 6a) 및 DMFS(n=664, 사건 횟수=401, $p=6.1e-0.5$)(도 6b)에 대한 곡선을 각각 나타냈으며, 종양에서의 AIB1 발현량이 높거나 낮은 ER-양성 유방암 환자의 OS (n=548, 사건 횟수=149, $p=0.022$)(도 6c) 및 DMFS(n=664, 사건 횟수=462, $p=0.029$)(도 6d)에 대한 곡선을 각각 나타냈다. 아울러, 종양에서의 GCN5/AIB1 모두의 발현량이 높거나 낮은 ER-양성 유방암 환자의 OS (n=548, 사건 횟수=412, $p=0.01$)(도 6e) 및 DMFS(n=664, 사건 횟수=333, $p=0.000022$)(도 6f)에 대한 곡선을 각각 나타냈다. 생

존 분석을 위해 GCN5(202182_at) 및 AIB1(209061_at) 프로브를 선정하고 분석하였다.

도 7은 타목시펜-처리에 따른 MCF7 및 TamR 세포의 세포 생존 곡선을 나타낸 그림이다. 10 μ M 타목시펜을 처리한 MCF7 및 TamR 세포의 성장 곡선을 CCK-8 어세이로 1~4일 동안 측정하였다. *** $P < 0.001$.

도 8은 GCN5 발현에 따른 유방암 환자의 Kaplan-Meier 생존 분석을 보여주는 그림이다. 도 8a는 ER-양성 유방암 환자의 OS(n=548, 사건 횟수=274, $p=0.73$) 곡선을, 도 8b는 타목시펜-처리 후의 ER-양성 유방암 환자의 OS(n=548, 사건 횟수=367, $p=0.039$) 곡선을 각각 나타낸다. 생존 분석을 위해 GCN5(202182_at) 프로브를 선정하였다.

도 9는 유방암 세포에서 GCN5가 타목시펜-저항성에 미치는 영향을 보여주는 그림이다. GCN5-과발현 MCF7(녹색 세포) 및 부모 MCF7 세포를 동일한 양(50:50)으로 플레이팅하고 10 μ M 타목시펜 처리 하에 5일간 배양하였다.

도 10은 TamR 세포에서 c-Myc이 증가함으로 보여주는 그림으로, MCF7 및 TamR 유방암 세포에서의 c-Myc의 mRNA 발현(상단:a) c-Myc의 단백질 발현 수준(하단:b)을 각각 나타낸다.

도 11은 GCN5 및 세포주기-관련 분자의 연관성을 보여주는 그림이다. GCN5와 세포주기-관련 분자 간의 관계를 단백질-단백질 상호작용에 대한 접근 가능한 데이터 베이스인 STRING으로 분석하였다.

도 12는 MCF7 및 TamR 세포에서 H3K9ac가 사이트-특이적으로 증가하고 AIB1의 프로모터 부위에 GCN5가 결합함을 보여주는 그림이다. GCN5에 대한 항체를 이용하여 ChIP 어세이를 수행하였으며, H3K9ac 또는 IgG를 음성 대조군으로 사용하였다. 면역침강된 DNA를 AIB1 앰플리콘 사이트 특이적 프라이머를 이용한 PCR을 통해 분석하였다.

도 13은 유방암 세포에서 p53이 타목시펜-저항성에 미치는 영향을 보여주는 그림이다. MCF7, TamR 및 공백터와 p53을 각각 형질전환시킨 TamR 세포(TamR-vec 및 TamR-p53)에서의 p53 단백질 수준(도 13a)과, 10 μ M 타목시펜을 처리하거나 처리하지 않은 MCF7, TamR 및 TamR-vec/-p53 세포의 세포 생존 곡선(도 13b)을 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

[0079] 실시예

[0080] 실험방법

[0081] 세포주

[0082] GCN5를 안정적으로 과발현하는 MCF7, TamR 및 MCF7 유방암 세포주를 종래 보고된 방법에 따라 제작하고 배양하였다¹. 과발현 실험을 위해, GFP-GCN5 플라스미드(pcDNA6.2/N-EmGFP-DEST: 벡터 백본; Addgene, Watertown, MA, USA) 및 p53 플라스미드(pcDNA-HA: 벡터 백본; 국립암센터, Goyang, Gyeonggi-do, Korea)를 Attractene 형질전환 시약(Qiagen, Hilden, Germany)을 이용하여 제조자의 프로토콜에 따라 24시간 동안 형질전환하였다. GFP-GCN5 플라스미드가 형질전환된 세포에 2주간 블라스티시딘(5 μ g/ml; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)을 처리하여 GCN5를 과발현하는 안정적인 세포주를 제작하였다. 일시적 녹다운을 위해, GCN5-siRNA(Genolution, Seoul, Korea) 및 AIB1-siRNA(Genolution) 또는 대조군 siRNA를 20nM 최종농도로 24시간 동안 사용하였다. 또한, AIB1의 안정적인 녹다운 실험을 위해, GCN5-과발현 MCF7 세포에 shRNA-AIB1(렌티바이러스 GFP 벡터 내의 shRNA 컨스트럭트; OriGene Technologies, Inc., Rockville, MD, USA) 또는 대조군 shRNA를 형질전환하였다. 이들 세포에 푸로마이신(0.5 μ g/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)을 7일간 처리하여 안정적인 세포주를 제작하였다.

[0084] 동물실험

[0085] 이종이식 실험용 BALB/c 누드 마우스를 Orient Bio, Inc.(Sunnam, Gyeonggi-do, Korea)에서 구입하였다. TamR 세포, GCN5-과발현 MCF7 세포, 동일한 양의 공백터를 과발현하는 MCF7 세포 및 AIB1 녹다운된 GCN5-과발현 MCF7 세포를 사용하였다. 각 마우스에서, 1×10^7 세포를 염화칼슘 및 염화마그네슘(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 없이 차가운 멸균 PBS로 두 번 세척하고, 마트리젤과 함께 50:50(v/v)으로 혼합하였다. 세포들을 7주

령 수컷 Balb/C 누드 마우스의 지방 패드(fat pad)에 주입하여 1차 종양을 확립하였다. 각 실험군은 5마리의 마우스로 구성되었다. 주입 3주 후 마우스를 CO₂ 챔버에서 희생시키고, 분석을 위해 종양 조직을 회수하였다. 모든 동물실험은 연세대학교 동물실험 윤리위원회의 승인 하에 이루어졌으며, 윤리위원회의 가이드라인 및 규정을 준수하였다.

[0087] 실시간 PCR

[0088] 실시간 PCR 분석은 종래에 보고된 방법대로 수행하였다². 정량적 PCR 분석을 위해, StepOnePlus™ Realtime PCR System(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 및 Power SYBR Green PCR Master Mix(Applied Biosystems) 키트를 이용하였다. 모든 시료는 3회 분석하였으며 GCN5 발현 수준은 내부 로딩 대조군인 *b-Actin*에 대해 정규화하였다. PCR용 프라이머는 표 1에 나열되어 있다.

표 1

실시간 PCR에 사용된 프라이머 서열

유전자	서열 (5' → 3')
GCN5	F- CAA CCT CAG GTT TTG GAA CC
	R- CGA TGC CGT AAA CAC TTT GC
<i>b-Actin</i>	F- CATGTTTGAGACCTTCAACACCCC
	R- GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG

[0091] 웨스턴 블롯팅 및 항체

[0092] 웨스턴 블롯 분석은 종래에 보고된 방법대로 수행하였다². 각 단백질을 검출하기 위해 항-GCN5 (Cell signaling, Danvers, USA), 항-AIB1(Abcam, Cambridge, UK), 항-TRAF4(Abcam), 항-USP7(Bethyl, Montgomery, Texas), 항-p53(Abcam), 항-p21(BD, Franklin Lakes, USA), 항-CUL4A(Bethyl), 항-DDB-1(Sigma, St. Louis, MO, USA), 항-CDT2(Abcam), 항-유비퀴틴(Abcam), 항-c-Myc(Abcam) 및 항-b-Actin(Sigma) 항체를 사용하였다.

[0094] 면역침강 (IP) 어세이

[0095] IP 어세이는 종래 보고된 방법을 조금 변형하여 수행하였다³. 면역 침강을 위해 항-GCN5(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 및 항-USP7(Bethyl) 항체를 사용하였다.

[0097] 크로마틴 면역침강 (ChIP) 어세이

[0098] ChIP 분석을 종래에 보고된 방법을 조금 변형하여 수행하였다². MCF7 및 TamR 유방암 세포주로부터 크로마틴을 수득하였다. 요약하면, 1×10^6 세포를 1% 포름알데히드로 15분 간 교차결합시킨 뒤 글리신 125mM를 첨가하였다. 1% SDS, 1% Triton X-100, 0.1% 디옥시콜산나트륨, 10 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl(pH 8.0) 및 프로테아제 억제제 콕테일(Roche Applied Science, Basel, Switzerland)를 포함하는 완충액에서 초음파를 이용해 크로마틴을 0.5-1kb 사이의 절편으로 잘랐다. 크로마틴을 p50% 슬러리(Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) 및 연어 정자 DNA를 포함하는 단백질 A/G 비드로 사전 클리어링하고, 단백질 A/G 비드에 커플링된 항-GCN5 항체(Santa Cruz Biotechnology)로 각 실험조건 하에서 면역침강하였다. 비-면역 마우스 IgG(Santa Cruz Biotechnology)를 대조군으로 사용하였다. ChIP-PCR 데이터는 IgG로 정규화한 뒤의 입력값 백분율로 표시하였다. ChIP-PCR에 사용된 프라이머는 표 2에 표시하였다.

표 2

ChIP-PCR 분석에 사용된 프라이머 서열

애플리콘 사이트	서열 (5' → 3')
pAIB1	F- GGA TCC CAC GGT TCT ACG C
	R- GCG ACC GGA GAG AGG CTA
Gene desert	F- TGG TGG TCT GCC TTC TGC CAG T
	R- TCA CGT GGG AGG AAG AAG TAG GGC

- [0101] 세포 생존 분석
- [0102] Cell Counting Kit-8(CCK-8; Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)을 이용하여 종래에 보고된 방법¹에 따라 세포생존 분석을 수행하였다.
- [0104] 세포 주기 분석
- [0105] 세포를 24시간 동안 타목시펜으로 처리하거나 처리하지 않고 수집 후 70% 에탄올에서 고정한 다음 프로피디움 이오다이드(PI)로 염색하여 분석하였다.
- [0107] 단백질 안정성 추적 분석
- [0108] MCF7 및 TamR 세포에 10 μ g/ml의 사이클로헥사마이드 (CHX; Sigma-Aldrich)를 15분에서 8시간 동안 처리하거나 20 μ M의 MG132(Sigma-Aldrich)를 2시간 동안 처리하였다. 웨스턴 블롯 분석을 위해 세포 용해물을 분리하였다.
- [0110] 인 실리코 분석
- [0111] 생존 분석을 위해 Kaplan-Meier 플롯터(<http://kmplot.com>) 및 TRGated(<https://nborcherding.shinyapps.io/TRGated>)를 사용하였다. 다양한 유방암 세포주에서 GCN5 및 AIB1 유전자 발현 간의 관계를 분석하기 위해 CCLE(Cancer 세포 Line Encyclopedia; <https://portals.broadinstitute.org/ccle>)를 이용하였다. 웹에서 이용 가능한 STRING 버전 10.5(<https://string-db.org>)를 사용하여 세포 주기와 관련된 GCN5 상호작용 파트너를 조사하였다.
- [0113] 통계 분석
- [0114] 데이터는 평균값 및 그에 대한 표준오차로 표시하였다. 통계적 차이는 스튜던트 *t*-검정으로 결정하였으며, *P* < 0.05인 경우 통계적 유의성이 있는 것으로 간주하였다.
- [0116] 실험결과
- [0117] GCN5는 타목시펜-저항성 유방암과 관련되어 있다.
- [0118] 타목시펜-저항성 유방암 세포주는 종래 보고된 방법에 따라 MCF7 세포로부터 제작하였다(도 7). GCN5가 타목시펜-저항성과 관련되었는지를 확인하기 위해 실시간-qPCR 및 웨스턴 블롯을 수행한 결과 GCN5의 mRNA 및 단백질 수준은 MCF7 세포에서보다 TamR 세포에서 유의하게 증가함을 확인하였다(도 1a 및 1b).
- [0119] GCN5 증가의 임상적 중요도를 시험하기 위해 Kaplan-Meier 및 TRGated 인 실리코 생존 분석을 이용하여 이의 예후적 중요도를 조사하였다. GCN5의 고발현은 타목시펜을 투여받은 ER-양성 유방암 환자의 불량한 원격 무전이 생존율(DMFS)과 관련되었다(도 8). 증가된 GCN5 단백질 수준은 내강형 A군 유방암 환자의 불량한 무병생존 가능성과 관련되어 있었다(도 1c). 나아가, 공개적으로 열람 가능한 TRGated 유방암 환자의 데이터 세트에는 GCN5가 내강형 A군 유방암 환자의 불량한 예후에 대한 마커중 하나로 소개되어 있다(도 1d). 이들 데이터 세트 중 전체 내강형 A군 유방암 환자에서, 약 25%의 GCN5는 높은 수준을 보이고 나머지 75%는 낮은 수준을 보였다(도 1e).
- [0120] GCN5 과발현이 타목시펜-저항성에 미치는 명확한 영향을 조사하기 위해, TamR 세포에서 siRNA를 이용하여 GCN5를 녹다운시켰다(도 1f). 본 발명자들은 CCK-8 분석을 통해 GCN5 녹다운 TamR 세포에서의 타목시펜에 대한 민감성이 유의하게 증가함을 확인한 반면(도 1g), GCN5-과발현 MCF7 세포는 타목시펜 민감성이 감소하였다(도 1h, 1i 및 도 9). 다음으로, 타목시펜-저항성에서의 GCN5의 역할을 다양한 측면에서 추가 조사하기 위해 FACS 분석을 수행한 결과, GCN5가 세포 주기 진행에 관여함을 발견하였다(도 1j). GCN5-과발현 MCF7 및 TamR 세포는 세포 타목시펜을 처리한 경우 세포 주기에 어떤 유의한 변화를 보이지 않았으나, MCF7 세포는 타목시펜을 처리한 경우 G1 기에서 어레스트됨을 확인하였다(도 1k).
- [0121] 이를 종합하면, GCN5이 타목시펜-저항성 유방암과 관련되어 있음을 알 수 있었다.
- [0123] CUL4A-DDB1-CDT2 E3 유비퀴틴 라이게이즈는 TamR에서 낮은 농도로 존재하는 GCN5와 반응하여 TamR에서의 GCN5의 프로테오좀성 분해를 저해한다.
- [0124] GCN5 mRNA 수준은 c-Myc에 의해 전사적으로 유도된다고 보고되었다⁴. GCN5의 증가된 전사 수준이 c-Myc에 의한 것인지를 확인하기 위해, c-Myc의 단백질 수준을 웨스턴 블롯으로 분석한 결과 GCN5와 유사하게 단백질 발현량

은 MCF7 세포보다 TamR 세포에서 유의하게 높았다(도 10). 이에, 본 발명자들은 MCF7 및 TamR 세포 모두에서 GCN5 단백질의 안정성을 조사하였다. 우선, 이들 세포에 사이클로헥사마이드(CHX, 드 노보 단백질 합성의 억제제) 투여 후 1, 2, 4 및 8시간 뒤에 웨스턴 블롯팅 분석을 수행함으로써 함으로써 CHX 추적분석을 통한 GCN5의 반감기를 측정하였다. TamR 세포에서 GCN5 단백질의 반감기가 8시간 이상임에 반하여, 모세포인 MCF7 세포에서 단백질 안정성은 약 3시간 지속되었다(도 2a). 이들 세포에서 면역블롯팅 결과를 GCN5에 대해 정량화하였다(도 2b). 나아가 프로테오좀 억제제인 MG132의 존재 하에, MCF7 세포에서 GCN5 단백질 안정성이 회복되었다(도 2c 및 2d). 앞선 연구에서 스캐폴드 단백질인 CUL4A가 DDB1과 유비퀴틴 라이게이즈 E3 복합체를 이룸으로써 특정 기질의 유비퀴틴화 및 분해를 매개한다고 보고한 바 있다⁵. 본 발명자들은 유비퀴틴 라이게이즈 복합체에 의한 프로테오좀성 분해가 GCN5 단백질 안정성의 조절과 관련이 있을 것이라 가정하였다. 이를 조사하기 위해 MCF7 및 TamR 세포에서 CUL4A-DDB1-CDT2 E3 유비퀴틴 라이게이즈의 단백질 수준을 측정한 결과 이들 단백질 수준은 TamR 세포보다 MCF7 세포에서 더 높았다(도 2e). 뿐만 아니라, GCN5 단백질이 이들 복합체와 상호작용을 한다는 사실 및 유비퀴틴이 TamR에 비해 MCF7에서 증가되어 있다는 사실을 공-면역침강 실험을 통해 확인하였다(도 2f). 종합하면, 이들 결과로부터 는 유비퀴틴 라이게이즈 복합체 및 GCN5 간의 상호작용이 TamR 세포에서 GCN5의 프로테오좀성 분해를 저해할 수 있음을 알 수 있다.

[0126] AIB1은 타목시펜에 대한 GCN5-유도된 저항성에서 주요 역할을 한다.

[0127] GCN5가 유방암 세포의 세포주기 진행에 영향을 준다는 사실이 확인되었으므로(도 1j 및 1k), 본 발명자들은 STRING에서 수득한 인 실리코 데이터를 이용하여 GCN5와 세포주기 관련 분자들 간의 관계를 분석하였다(도 11). 그 결과, AIB1이 GCN5의 다운스트림 인자임을 확인하였다. 따라서, 본 발명자들은 GCN5이 TamR 세포에서 AIB1을 매개함으로써 타목시펜에 대한 민감성을 감소시킬 것이라 가정하였다. 이 가설을 조사하기 위해, 본 발명자들은 CCLE 데이터뱅크로부터 인 실리코 데이터 분석을 이용하여 유방암 세포주에서의 GCN5 및 AIB1 간의 관계를 조사한 결과, GCN5유전자를 과발현하는 상위 20% 유방암 세포주에서 GCN5 및 AIB1의 mRNA 발현수준이 양의 상관관계에 있음을 발견하였다(도 3a; 피어슨 상관관계수, $r=0.868032$, $p=0.000252$). GCN5 및 AIB1의 단백질 수준에서의 양의 상관관계 역시 GCN5를 각각 과발현 및 녹다운한 세포주의 웨스턴 블롯팅 결과 확인되었다(도 3b 및 3c). 다음으로, AIB1이 유방암 세포에서의 GCN5-매개 타목시펜-저항성과 관련되어 있는지를 조사하였다. AIB1의 녹다운은 TamR 세포에서 타목시펜 민감성을 증가시키고(도 3d), 타목시펜 처리 후 G1 기에서의 세포주기 어레스트도 보다 촉진시킨다(도 3e 및 3f).

[0128] GCN5가 코어 히스톤의 몇몇 라이신에 대해 히스톤 아세틸전이효소 활성을 가지기 때문에, GCN5이 AIB1유전자의 프로모터 추정 부위에서 히스톤을 아세틸화할 수 있는지를 ChIP 어세이로 조사해보았다. PCR 증폭 부위를 AIB1의 프로모터 추정 부위 부근인 TSS로부터 +40~+350 bp로 설계하였다(도 3g). ChIP-PCR 데이터는 MCF7 세포에 비해 TamR 세포의 프로모터 부위에서 H3K9 아세틸화가 유도됨을 보여주었다(도 3h 및 도 12). 한편, 이러한 분석 결과를 통해 GCN5가 AIB1 유전자의 프로모터 부위에 결합한다는 사실을 알 수 있다(도 3h). 이를 종합하면, AIB1이 GCN5에 의해 유도된 타목시펜 저항성의 핵심 인자임을 알 수 있다.

[0130] p53의 탈유비퀴틴화에 의해 타목시펜-저항성 유방암 세포가 타목시펜 투여에 대한 민감성을 회복한다.

[0131] 다음으로, 본 발명자들은 유방암 세포에서 GCN5/AIB1-매개 타목시펜-저항성이 발생하는 메커니즘을 조사하고자 하였다. AIB1에 의해 유도되는 TRAF4는 디유비퀴티네이즈인 HAUSP(헤르페스 바이러스-관련 유비퀴틴-특이적 프로테아제; USP7로도 불림)에 경쟁적으로 결합함으로써 p53 단백질 안정성의 조절에 관여한다⁶⁻⁸. 유방암 세포가 타목시펜-저항성을 가지도록 하는 p53의 조절에 있어 TRAF4의 역할을 조사하기 위해, 본 발명자들은 MCF7 및 TamR 세포에서 이들 분자의 단백질 수준을 측정하였다(도 4a 왼쪽). 면역 블롯팅 결과 GCN5-과발현 MCF7 세포 및 녹다운 TamR 세포에서 GCN5, AIB1 및 TRAF4는 양의 상관관계를 가지는 반면, GCN5 및 p53/p21은 음의 상관관계를 가짐이 확인되었다(도 4a, 중간). 나아가, p53/p21 단백질 수준은 AIB1 및 이를 조절하는 GCN5에 의해 저해되었다(도 4a, 오른쪽).

[0132] 이러한 분자 수준의 현상에 기반하여, MCF7 및 TamR 세포에서 p53의 반감기를 측정하기 위해 CHX 처리 후 15, 30, 60분 뒤에 CHX 추적 어세이를 수행하였다. 그 결과, p53 단백질은 TamR 세포에서보다 MCF7 세포에서 보다 안정적임을 알 수 있었다(도 4b 및 4c). 나아가, TamR 세포에서 MG132가 존재할 경우 p53 단백질 안정성이 회복되었다(도 4d 및 4e). MCF7 및 TamR 세포에서 p53과 HAUSP간, 그리고 HAUSP과 TRAF4 간에 구별되는 상호작용이 있는지를 확인하기 위하여 HAUSP로 면역침강을 수행하였다(도 4f). MCF7 세포에서 p53 및 HAUSP 간의 상호작용은 TAMR 세포에서보다 활발하였다. 그러나, MCF7 세포에서 GCN5를 과발현시키자 p53 및 HAUSP 간의 상호작용이 TamR 세포에서와 같이 감소하였다. 나아가, GCN5-과발현 세포에서 AIB1을 녹다운시키자, p53 및 HAUSP

간의 상호작용이 MCF7 세포에서 관찰된 수준으로 복귀하였다. 한편, TRAF4 및 HAUSP 간의 상호작용은 p53 및 HAUSP간의 상호작용과 완전히 반대였다(도 4f). 또한, GCN5-유도 타목시펜-저항성이 p53에 의해 매개되는지를 확인하기 위해, MCF7 및 TamR 세포에서의 p53 과발현에 의한 효과를 조사하였다(도 13a). 흥미롭게도, p53 과발현은 MCF7 및 TamR 세포의 증식률과 타목시펜 투여에 대한 TamR 세포의 저항성을 유의하게 감소시켰다(도 13b). 본 발명자들은 추가적으로 MCF7, TamR, GCN5/p53 과발현 MCF7 #1, 2, 공백터 형질전환된 GCN5-과발현 MCF7 #1 및 2 세포에서 세포 성장 및 타목시펜 저항성을 조사하였다(도 4g). p53 과발현은 GCN5-과발현 MCF7 세포의 타목시펜 민감성을 회복시킨 반면, 대조군인 GCN5-과발현 MCF 세포는 타목시펜을 투여해도 증식할 수 있었다(도 4h). 이들 결과를 통해 GCN5/AIB1/TRAF4를 이용하여 p53의 탈유비퀴틴화를 억제하면 타목시펜 투여에 반응하지 않는 타목시펜-저항성 유방암 세포를 획득할 수 있음을 알 수 있다.

[0134] GCN5는 인 비보에서 AIB1를 매개함으로써 유방암의 타목시펜 저항성을 촉진시킨다.

[0135] 생체 내 타목시펜-저항성 유방암의 진행에 GCN5 및 AIB1의 역할을 추가적으로 조사하기 위하여, 이들 분자가 유방암 이식모델에서 타목시펜-저항성에 미치는 영향을 측정하였다. 본 발명자들은 TamR, MCF7-vec, GCN5-과발현 MCF7 및 shAIB1 GCN5-과발현 MCF7 세포를 누두 마우스에 주입하고 삼투 펌프를 이용하여 계속적으로 타목시펜을 투여하였다. 종양의 성장을 3주간 매 2일마다 측정하였다. 그 결과 TamR 및 GCN5-과발현 MCF7 세포를 주입한 마우스에서는 타목시펜 처리기간 동안에도 종양 성장이 유지된 반면, MCF7-vec를 주입한 군에서는 타목시펜 처리에 의해 종양 성장이 억제되었다(도 5). 또한 종양의 성장이 AIB1 녹다운된 GCN5-과발현 MCF7 세포를 주입한 마우스에서 타목시펜 처리에 의해 억제됨을 관찰하였다(도 5).

[0136] 이들 결과를 통해 GCN5 및 AIB1가 ER-양성 유방암에서 생체 내 타목시펜-저항성을 촉발시킴을 알 수 있다.

[0138] 높은 수준의 GCN5 및 AIB1는 타목시펜을 투여한 ER-양성 유방암 환자에서의 OS 및 DMFS의 감소와 연관되어 있다.

[0139] GCN5 및 AIB1의 임상적 타당성을 조사하기 위해, 유전자 발현 데이터를 통해 환자의 유방암 생존에 대한 Kaplan-Meier 플롯을 적용하였다. 높은 수준의 GCN5는 타목시펜 투여를 받은 ER-양성 유방암 환자에서 OS 및 DMFS의 감소와 연관되어 있다(도 6a 및 6b). GCN5-과발현 ER-양성 유방암 환자와 유사하게, 타목시펜을 투여받은 AIB1-과발현 ER-양성 유방암 환자도 OS 및 DMFS 모두에서 불량한 생존 곡선을 보였다(도 6c 및 6d). 다중-유전자 분석 결과 GCN5와 AIB1 모두 양성인 타목시펜을 투여받은 유방암 환자는 둘다 음성인 환자에 비해 예후가 유의하게 불량했다(도 6e 및 6f). 종합하면, 이들 결과는 ER-양성 유방암의 타목시펜-저항성에서 GCN5/AIB1의 높은 임상적 적합성 및 기능적 역할을 가짐을 보여준다.

[0141] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0143] 참고문헌

[0144] 1. Yang, S. *et al. BMB Rep* **51**, 450-455 (2018).

[0145] 2. Oh, J. H. *et al. Sci Rep* **9**, 2977, doi:10.1038/s41598-019-39574-8 (2019).

[0146] 3. Kong, K. A., *et al. Biochim Biophys Acta* **1839**, 793-799, doi:10.1016/j.bbagr.2014.06.011 (2014).

[0147] 4. Yin, Y. W. *et al. Gene Expr* **16**, 187-196, doi:10.3727/105221615X 14399878166230 (2015).

[0148] 5. Pan, Y. *et al. Sci Rep* **5**, 17006, doi:10.1038/srep17006 (2015).

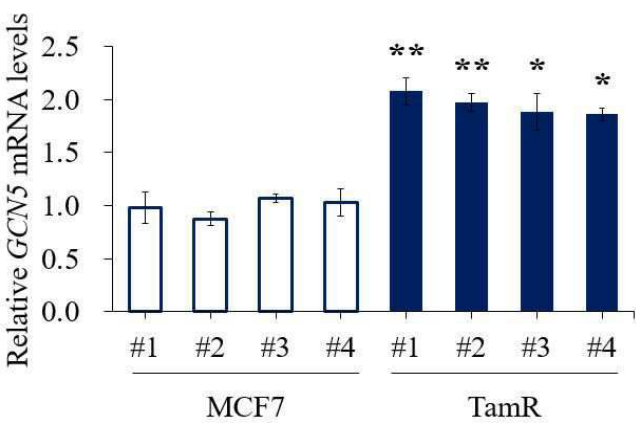
[0149] 6. Yi, P. *et al. Genes Dev* **27**, 274-287, doi:10.1101/gad.203760.112 (2013).

[0150] 7. Ma, J. *et al. Arch Biochem Biophys* **503**, 207-212, doi:10.1016/j.abb.2010.08.020 (2010).

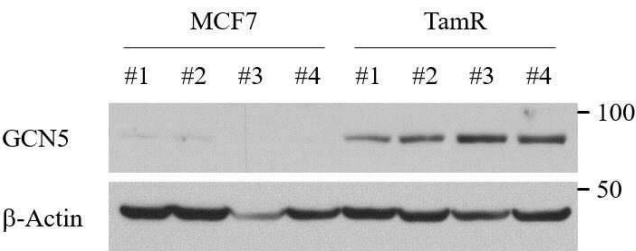
[0151] 8. Li, M. *et al. Nature* **416**, 648-653, doi:10.1038/nature737 (2002).

도면

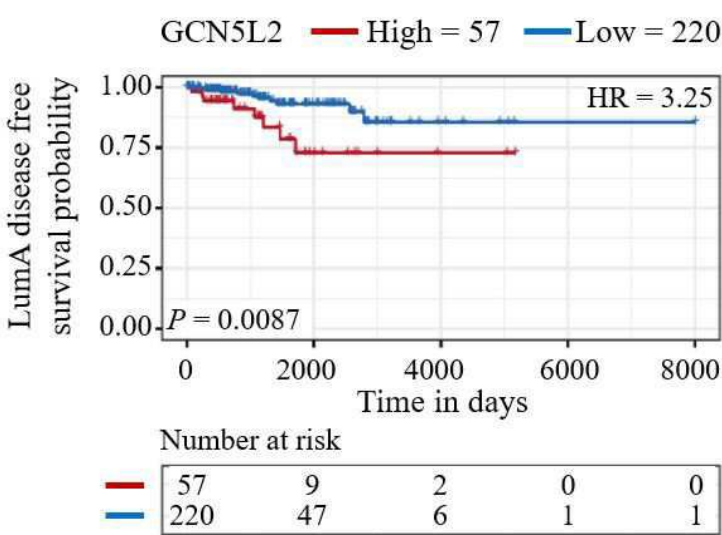
도면1a



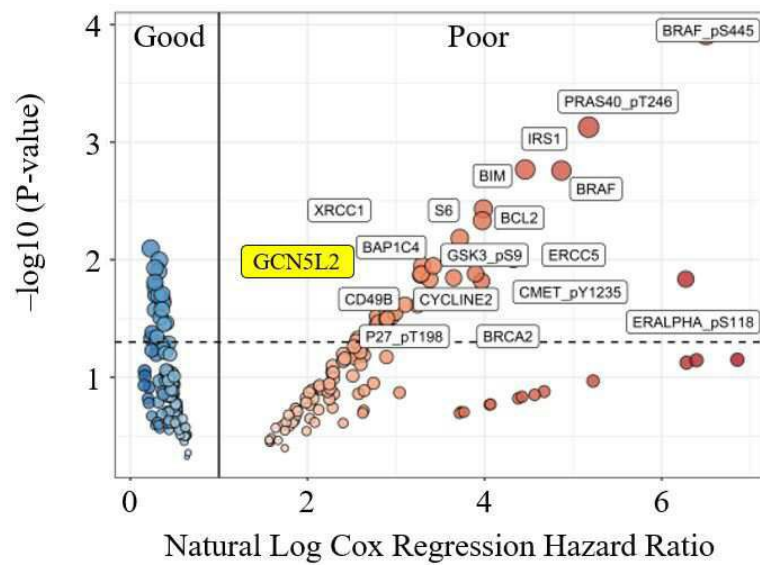
도면1b



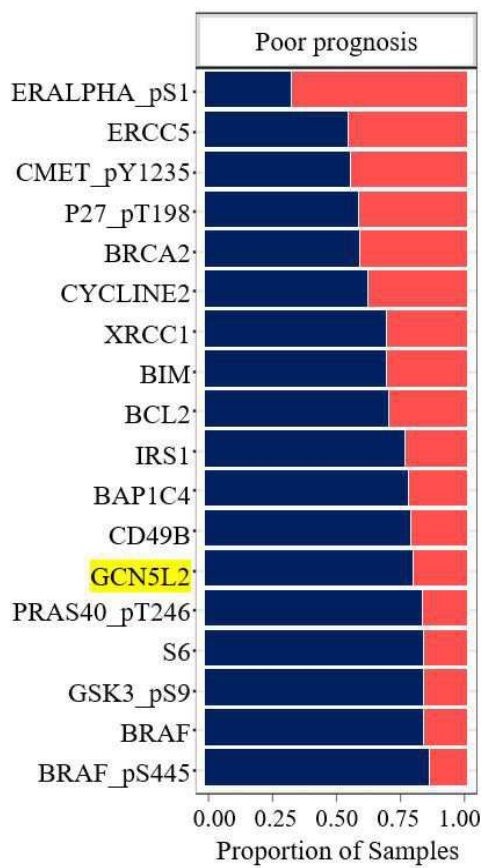
도면1c



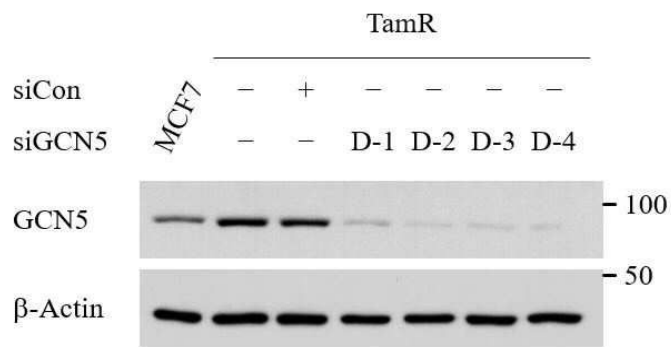
도면1d



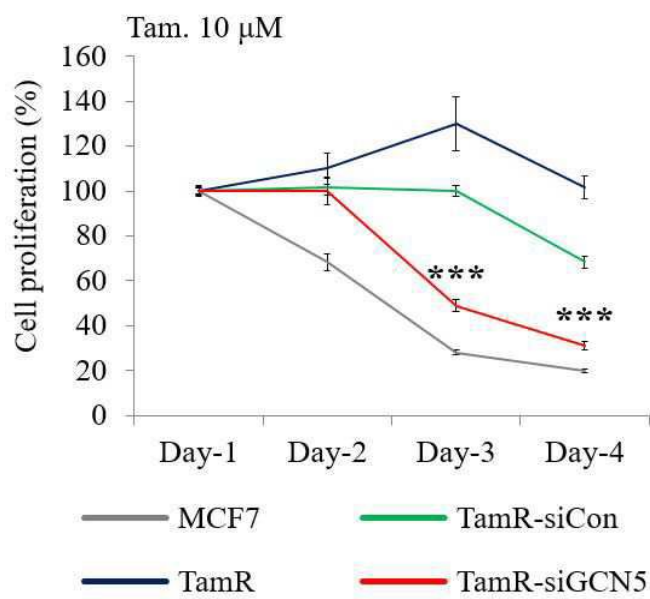
도면1e



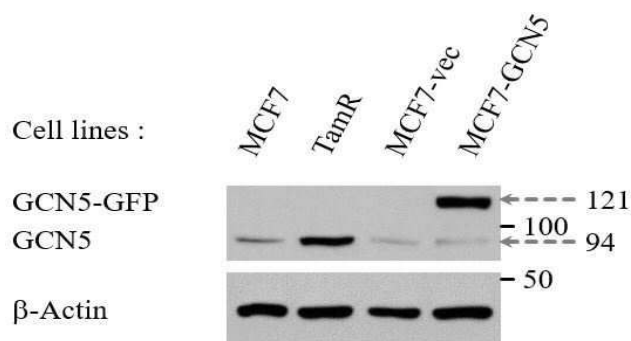
도면1f



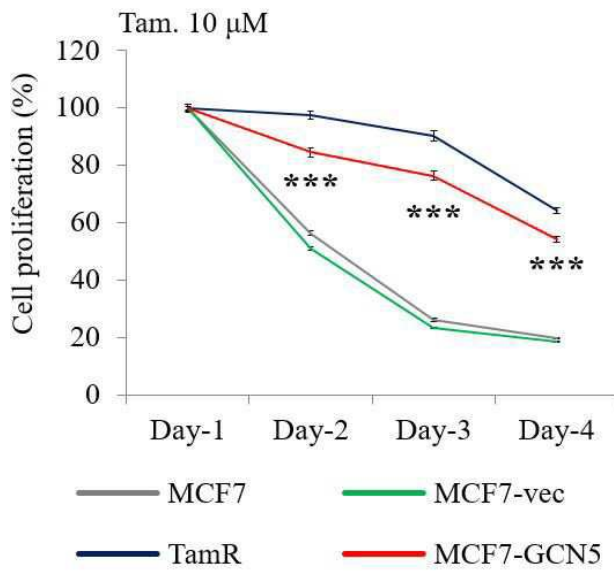
도면1g



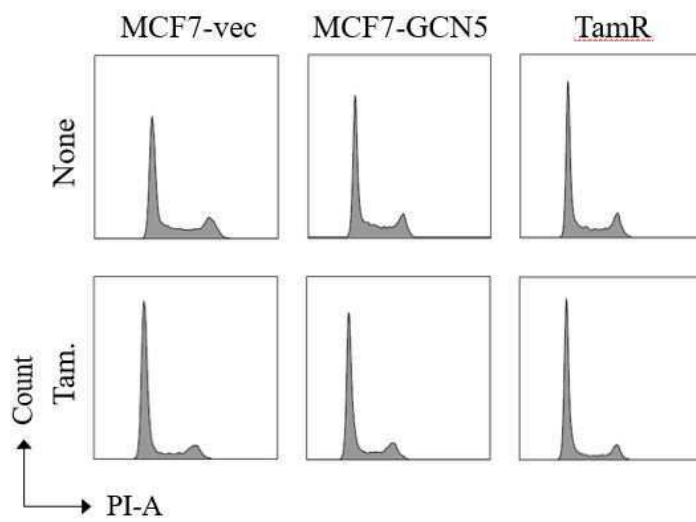
도면1h



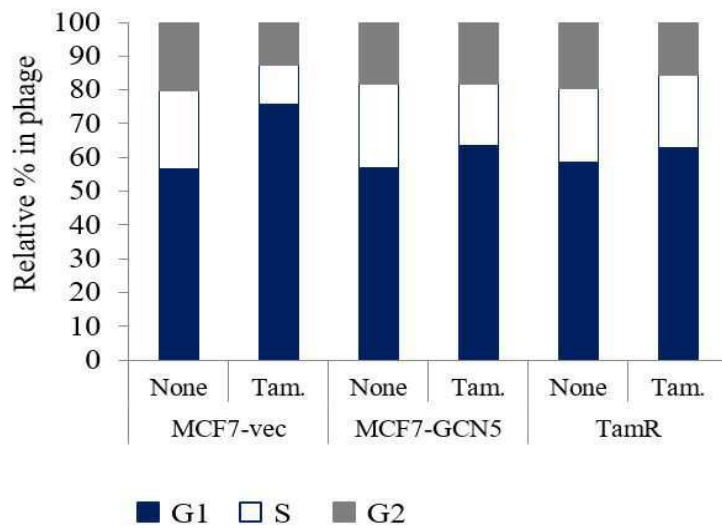
도면1i



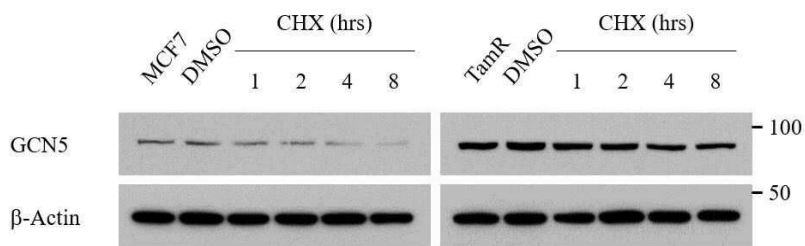
도면1j



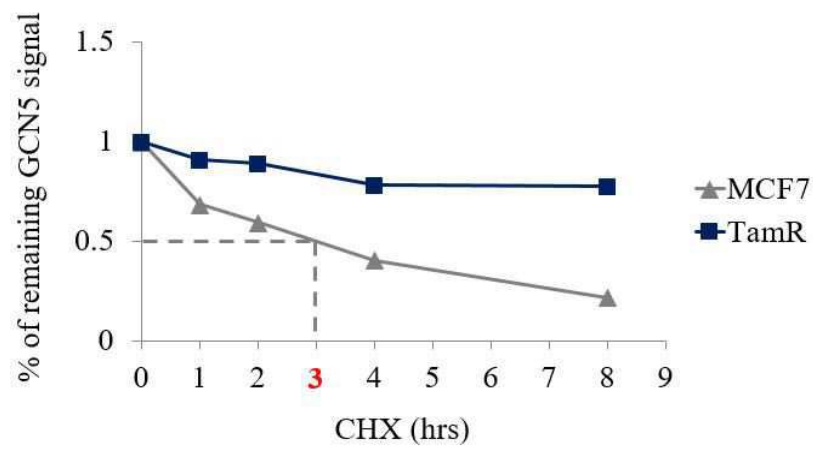
도면1k



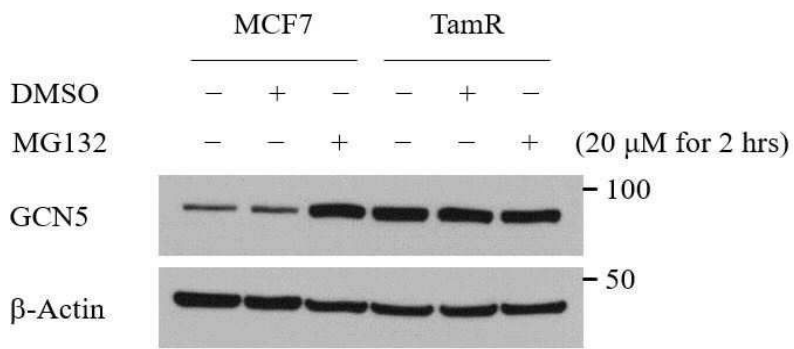
도면2a



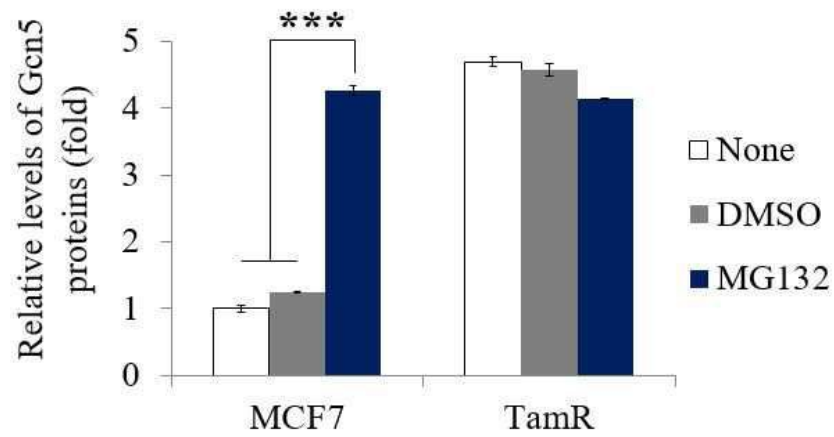
도면2b



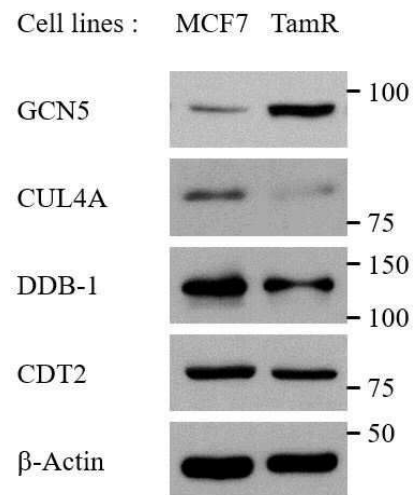
도면2c



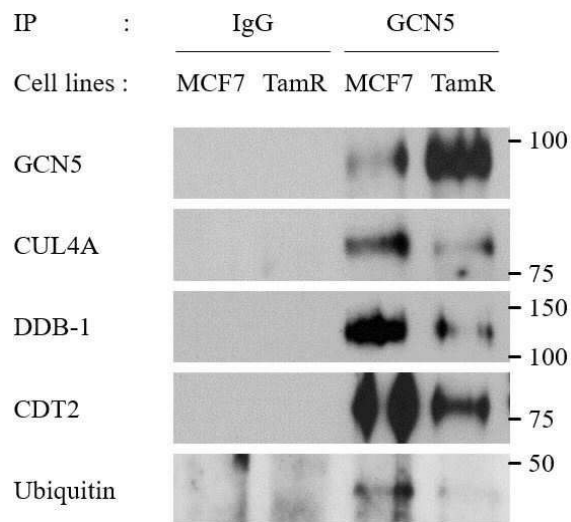
도면2d



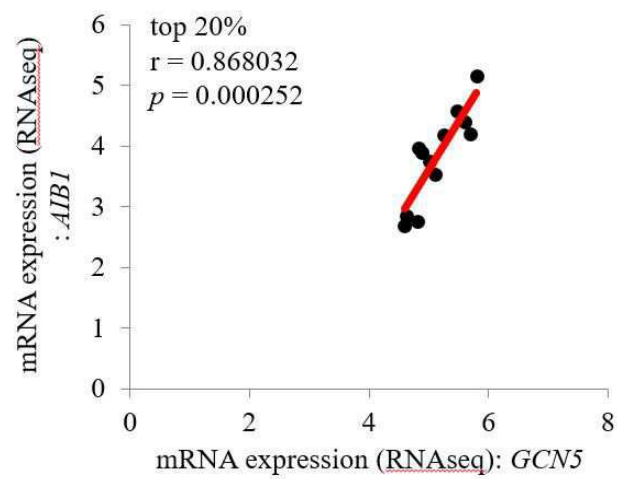
도면2e



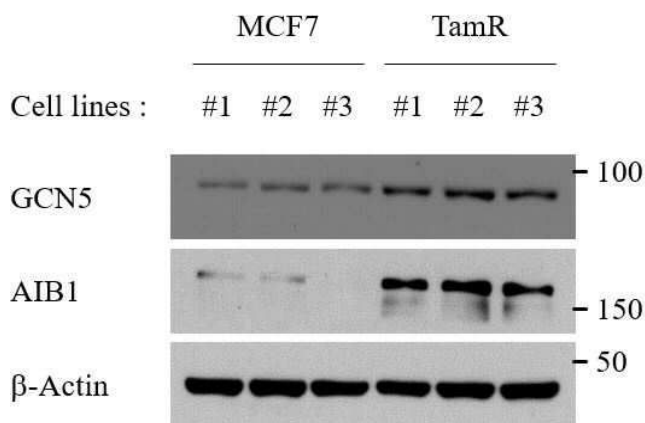
도면2f



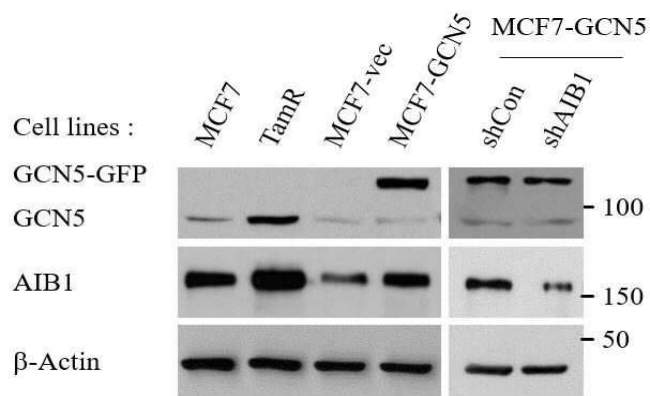
도면3a



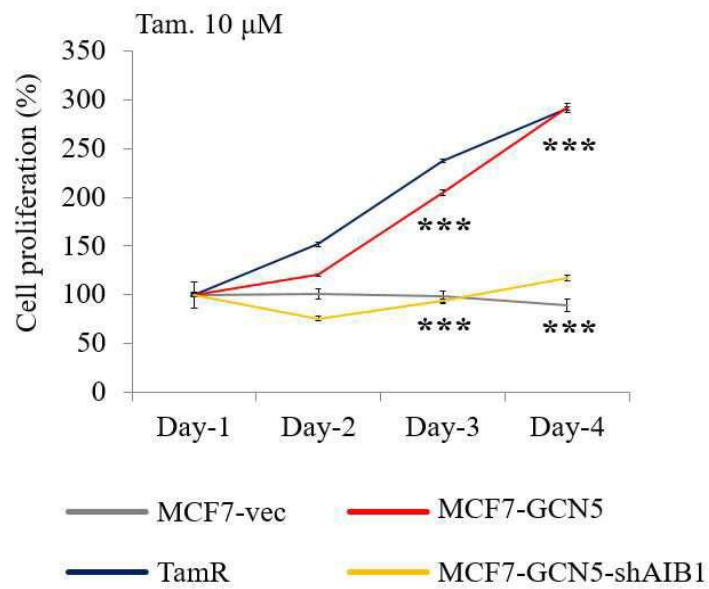
도면3b



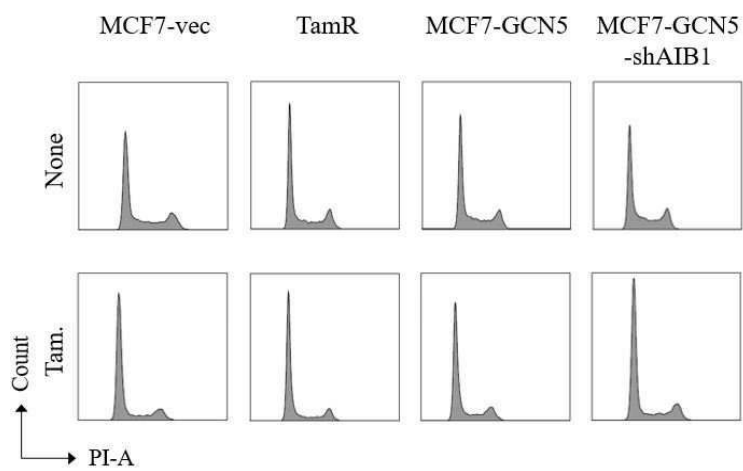
도면3c



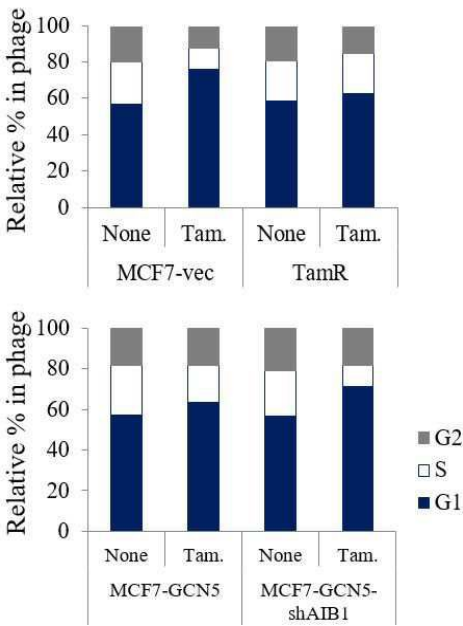
도면3d



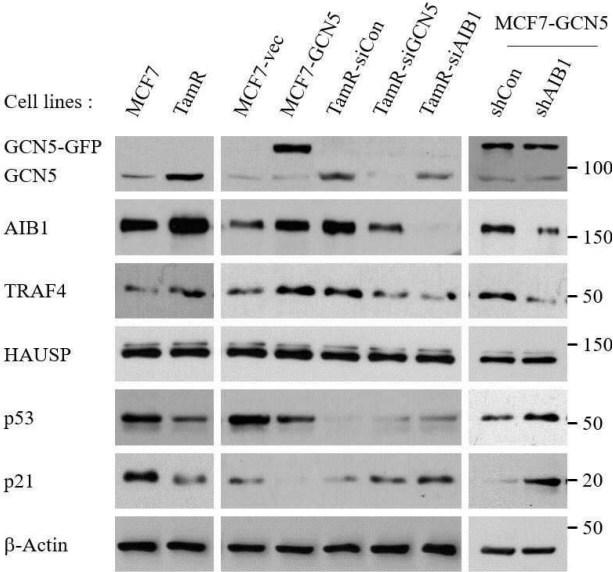
도면3e



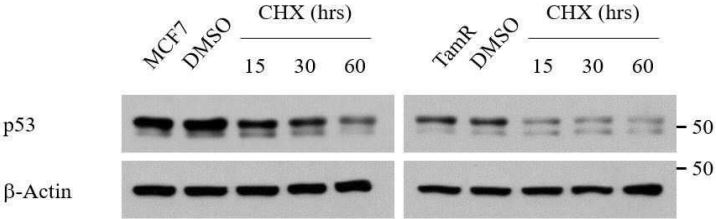
도면3f



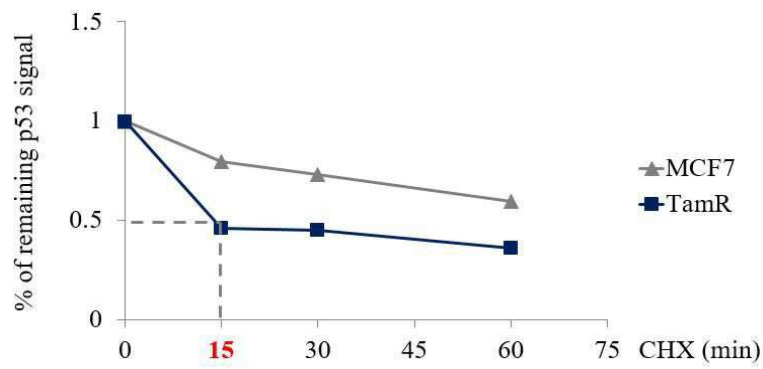
도면4a



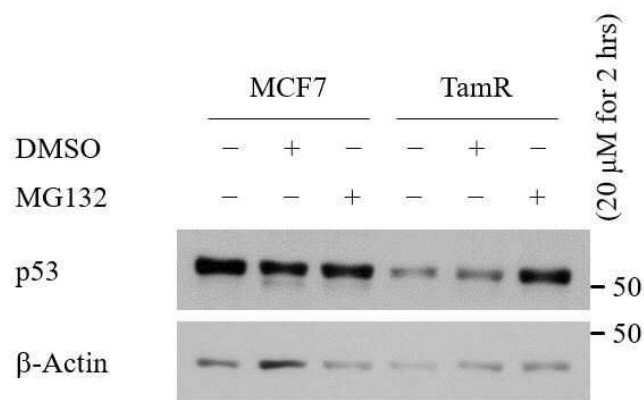
도면4b



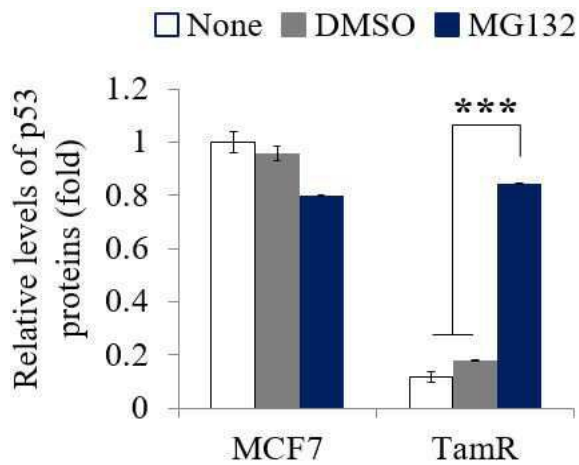
도면4c



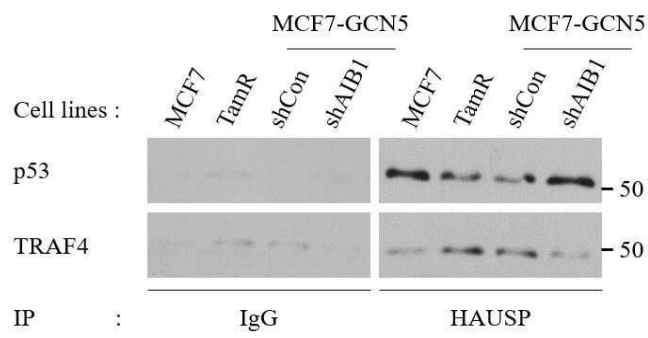
도면4d



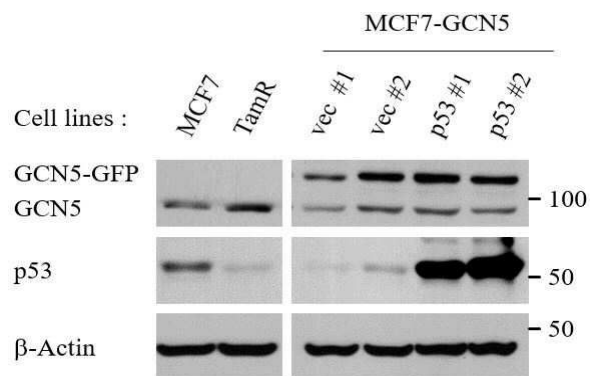
도면4e



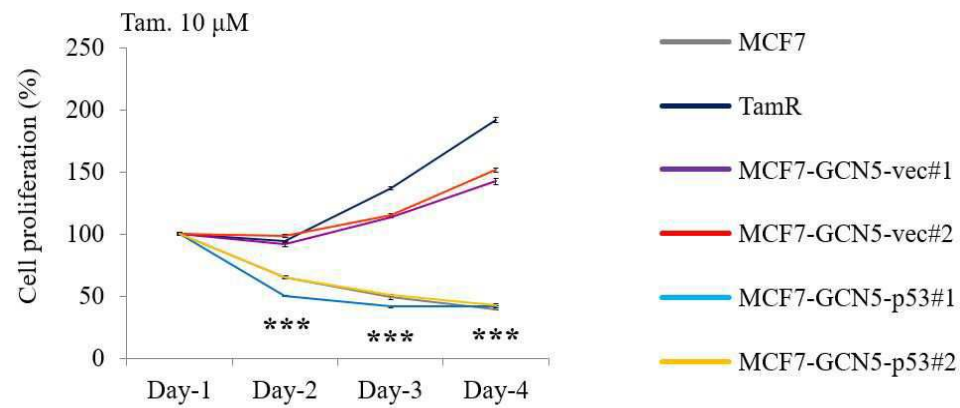
도면4f



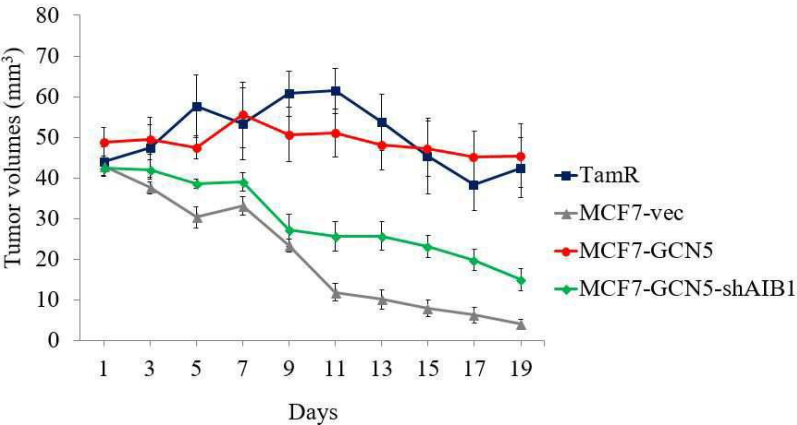
도면4g



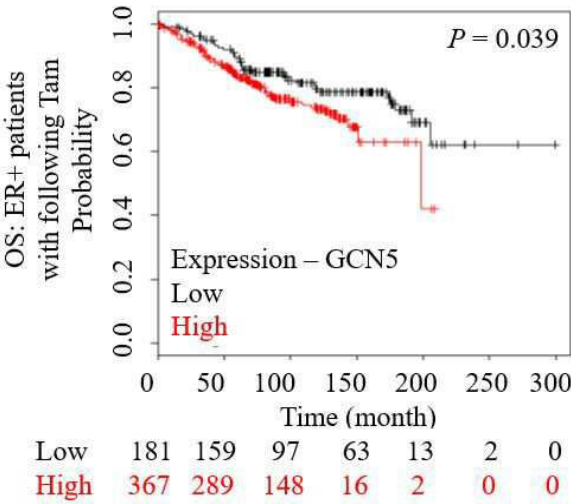
도면4h



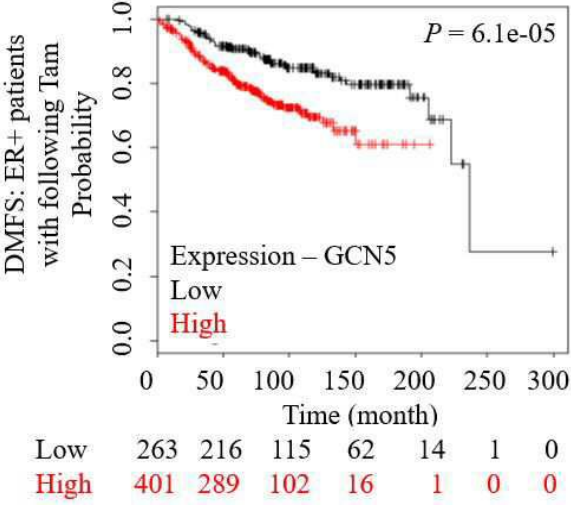
도면5



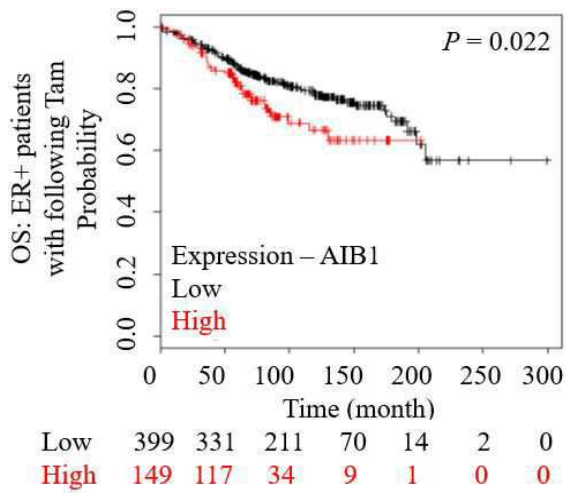
도면6a



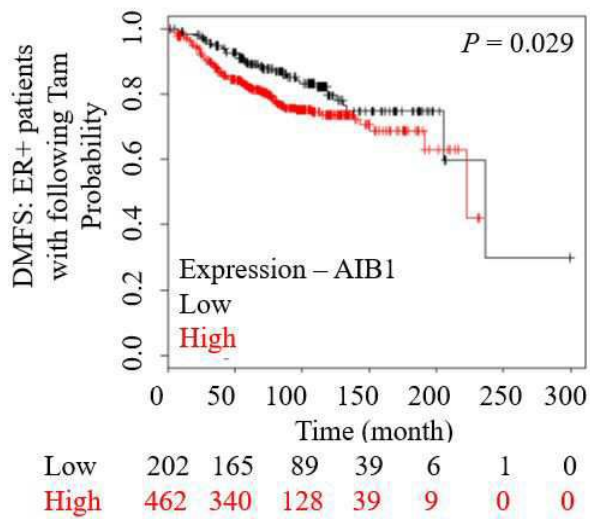
도면6b



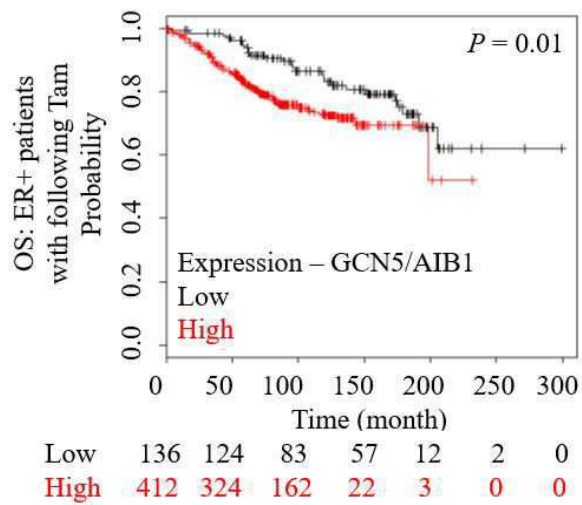
도면6c



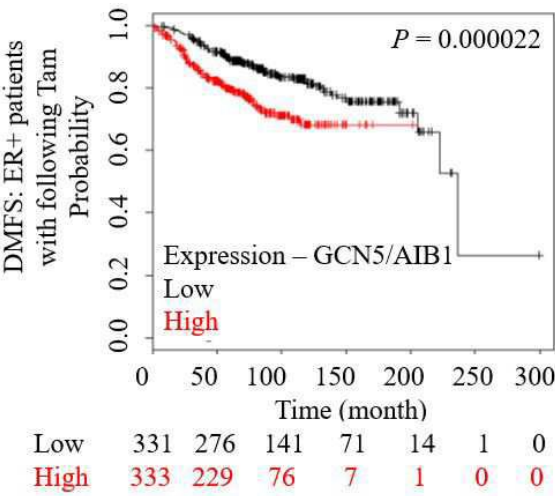
도면6d



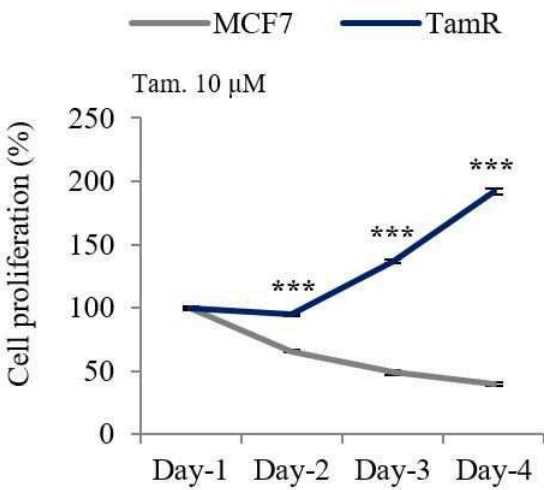
도면6e



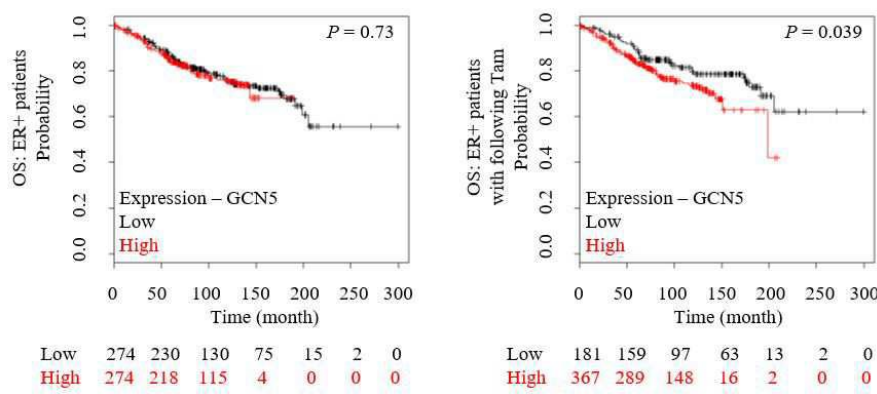
도면6f



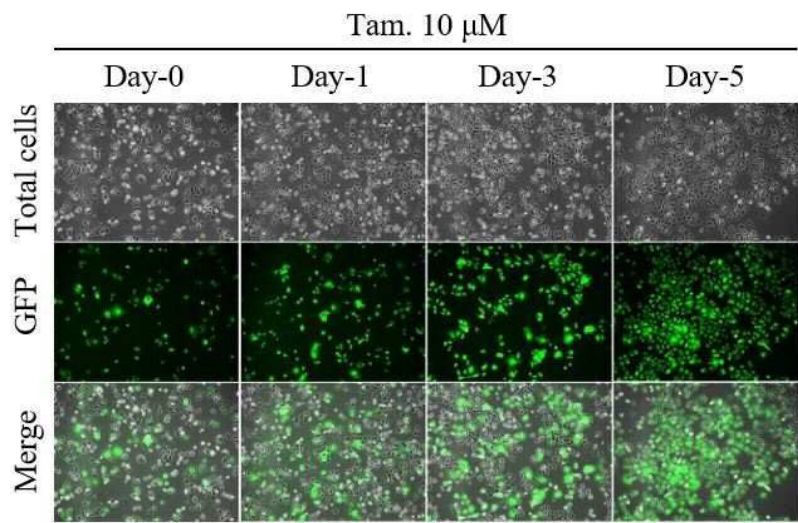
도면7



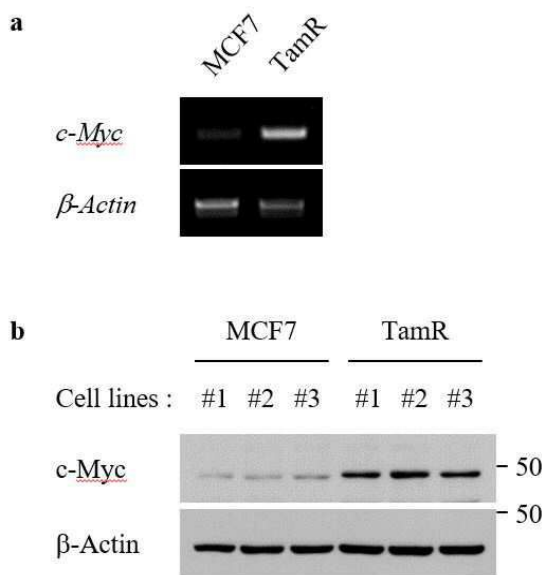
도면8



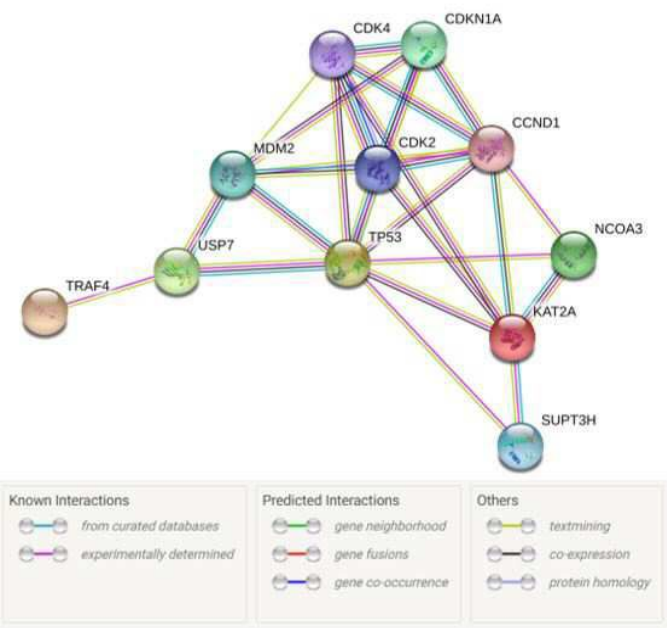
도면9



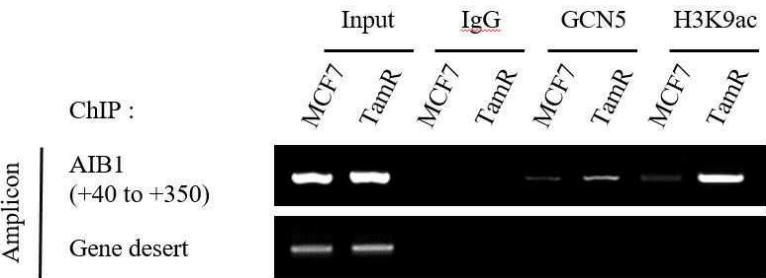
도면10



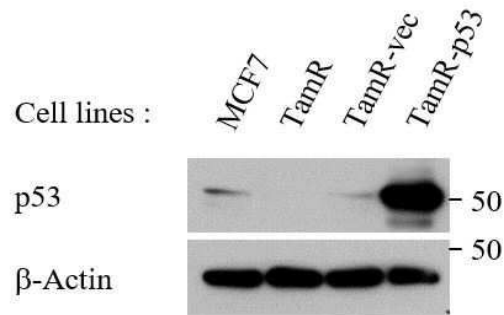
도면11



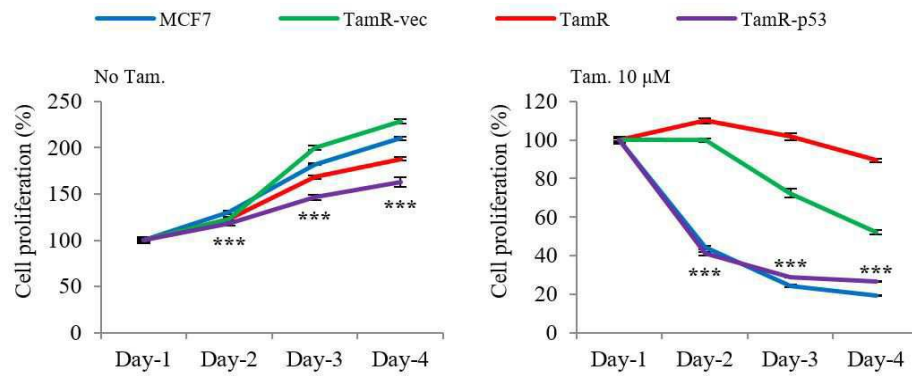
도면12



도면13a



도면13b



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation Yonsei University

<120> A Composition for Predicting Response to Tamoxifen

<130> HPC8689

<160> 10

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 837

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Ala Glu Pro Ser Gln Ala Pro Thr Pro Ala Pro Ala Ala Gln Pro

1 5 10 15

Arg Pro Leu Gln Ser Pro Ala Pro Ala Pro Thr Pro Thr Pro Ala Pro

20 25 30

Ser Pro Ala Ser Ala Pro Ile Pro Thr Pro Thr Pro Ala Pro Ala Pro

35 40 45

Ala Pro Ala Ala Ala Pro Ala Gly Ser Thr Gly Thr Gly Gly Pro Gly

50 55 60

Val Gly Ser Gly Gly Ala Gly Ser Gly Gly Asp Pro Ala Arg Pro Gly

65 70 75 80

Leu Ser Gln Gln Gln Arg Ala Ser Gln Arg Lys Ala Gln Val Arg Gly

85 90 95

Leu Pro Arg Ala Lys Lys Leu Glu Lys Leu Gly Val Phe Ser Ala Cys

100	105	110	
Lys Ala Asn Glu Thr Cys Lys Cys Asn Gly Trp Lys Asn Pro Lys Pro			
115	120	125	
Pro Thr Ala Pro Arg Met Asp Leu Gln Gln Pro Ala Ala Asn Leu Ser			
130	135	140	
Glu Leu Cys Arg Ser Cys Glu His Pro Leu Ala Asp His Val Ser His			
145	150	155	160
Leu Glu Asn Val Ser Glu Asp Glu Ile Asn Arg Leu Leu Gly Met Val			
165	170	175	
Val Asp Val Glu Asn Leu Phe Met Ser Val His Lys Glu Glu Asp Thr			
180	185	190	
Asp Thr Lys Gln Val Tyr Phe Tyr Leu Phe Lys Leu Leu Arg Lys Cys			
195	200	205	
Ile Leu Gln Met Thr Arg Pro Val Val Glu Gly Ser Leu Gly Ser Pro			
210	215	220	
Pro Phe Glu Lys Pro Asn Ile Glu Gln Gly Val Leu Asn Phe Val Gln			
225	230	235	240
Tyr Lys Phe Ser His Leu Ala Pro Arg Glu Arg Gln Thr Met Phe Glu			
245	250	255	
Leu Ser Lys Met Phe Leu Leu Cys Leu Asn Tyr Trp Lys Leu Glu Thr			
260	265	270	
Pro Ala Gln Phe Arg Gln Arg Ser Gln Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr			
275	280	285	
Lys Val Asn Tyr Thr Arg Trp Leu Cys Tyr Cys His Val Pro Gln Ser			
290	295	300	
Cys Asp Ser Leu Pro Arg Tyr Glu Thr Thr His Val Phe Gly Arg Ser			
305	310	315	320
Leu Leu Arg Ser Ile Phe Thr Val Thr Arg Arg Gln Leu Leu Glu Lys			
325	330	335	
Phe Arg Val Glu Lys Asp Lys Leu Val Pro Glu Lys Arg Thr Leu Ile			
340	345	350	
Leu Thr His Phe Pro Lys Phe Leu Ser Met Leu Glu Glu Glu Ile Tyr			

355 360 365
 Gly Ala Asn Ser Pro Ile Trp Glu Ser Gly Phe Thr Met Pro Pro Ser
 370 375 380
 Glu Gly Thr Gln Leu Val Pro Arg Pro Ala Ser Val Ser Ala Ala Val

 385 390 395 400
 Val Pro Ser Thr Pro Ile Phe Ser Pro Ser Met Gly Gly Gly Ser Asn
 405 410 415
 Ser Ser Leu Ser Leu Asp Ser Ala Gly Ala Glu Pro Met Pro Gly Glu
 420 425 430
 Lys Arg Thr Leu Pro Glu Asn Leu Thr Leu Glu Asp Ala Lys Arg Leu
 435 440 445
 Arg Val Met Gly Asp Ile Pro Met Glu Leu Val Asn Glu Val Met Leu
 450 455 460

 Thr Ile Thr Asp Pro Ala Ala Met Leu Gly Pro Glu Thr Ser Leu Leu
 465 470 475 480
 Ser Ala Asn Ala Ala Arg Asp Glu Thr Ala Arg Leu Glu Glu Arg Arg
 485 490 495
 Gly Ile Ile Glu Phe His Val Ile Gly Asn Ser Leu Thr Pro Lys Ala
 500 505 510
 Asn Arg Arg Val Leu Leu Trp Leu Val Gly Leu Gln Asn Val Phe Ser
 515 520 525
 His Gln Leu Pro Arg Met Pro Lys Glu Tyr Ile Ala Arg Leu Val Phe

 530 535 540
 Asp Pro Lys His Lys Thr Leu Ala Leu Ile Lys Asp Gly Arg Val Ile
 545 550 555 560
 Gly Gly Ile Cys Phe Arg Met Phe Pro Thr Gln Gly Phe Thr Glu Ile
 565 570 575
 Val Phe Cys Ala Val Thr Ser Asn Glu Gln Val Lys Gly Tyr Gly Thr
 580 585 590
 His Leu Met Asn His Leu Lys Glu Tyr His Ile Lys His Asn Ile Leu
 595 600 605

Tyr Phe Leu Thr Tyr Ala Asp Glu Tyr Ala Ile Gly Tyr Phe Lys Lys
 610 615 620
 Gln Gly Phe Ser Lys Asp Ile Lys Val Pro Lys Ser Arg Tyr Leu Gly
 625 630 635 640
 Tyr Ile Lys Asp Tyr Glu Gly Ala Thr Leu Met Glu Cys Glu Leu Asn
 645 650 655
 Pro Arg Ile Pro Tyr Thr Glu Leu Ser His Ile Ile Lys Lys Gln Lys
 660 665 670
 Glu Ile Ile Lys Lys Leu Ile Glu Arg Lys Gln Ala Gln Ile Arg Lys
 675 680 685
 Val Tyr Pro Gly Leu Ser Cys Phe Lys Glu Gly Val Arg Gln Ile Pro
 690 695 700
 Val Glu Ser Val Pro Gly Ile Arg Glu Thr Gly Trp Lys Pro Leu Gly
 705 710 715 720
 Lys Glu Lys Gly Lys Glu Leu Lys Asp Pro Asp Gln Leu Tyr Thr Thr
 725 730 735
 Leu Lys Asn Leu Leu Ala Gln Ile Lys Ser His Pro Ser Ala Trp Pro
 740 745 750
 Phe Met Glu Pro Val Lys Lys Ser Glu Ala Pro Asp Tyr Tyr Glu Val
 755 760 765
 Ile Arg Phe Pro Ile Asp Leu Lys Thr Met Thr Glu Arg Leu Arg Ser
 770 775 780
 Arg Tyr Tyr Val Thr Arg Lys Leu Phe Val Ala Asp Leu Gln Arg Val
 785 790 795 800
 Ile Ala Asn Cys Arg Glu Tyr Asn Pro Pro Asp Ser Glu Tyr Cys Arg
 805 810 815
 Cys Ala Ser Ala Leu Glu Lys Phe Phe Tyr Phe Lys Leu Lys Glu Gly
 820 825 830
 Gly Leu Ile Asp Lys
 835
 <210> 2
 <211> 2514

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

atggcggaac cticccaggc cccgaccccg gccccggctg cgcagccccc gcccccttcag	60
tccccagccc ctgccccaac tccgactcct gcacccagcc cggcttcagc cccgattccg	120
actccccccc cggcaccagc ccctgccccca gctgcagccc cagccggcag cacagggact	180
ggggggcccc gggtagggaag tggggggggc ggagagcggg ggatccggc tcgacctggc	240
ctgagccagc agcagcgcgc cagtcagagg aaggcgcaag tccgggggct gccgcgcgcc	300
aagaagcttg agaagctagg ggtcttctcg gcttgcaagg ccaatgaaac ctgtaagtgt	360
aatggctgga aaaaccccaa gccccccact gcaccccgca tggatctgca gcagccagct	420
gccaacctga gtgagctgtg ccgcagttgt gagcacccct tggctgacca cgtatcccac	480
ttggagaatg tgcagagga tgagataaac cgactgctgg ggatgggtgt ggatgtggag	540
aatctcttca tgtctgttca caaggaagag gacacagaca ccaagcaggt ctatttctac	600
ctcttcaagc tactgcggaa atgcatcctg cagatgaccc ggctgtgtgt ggaggggtcc	660
ctgggcagcc ctccatttga gaaacctaat attgagcagg gtgtgctgaa ctttgtgcag	720
tacaagttaa gtcacctggc tccccgggag cggcagacga tgttcgagct ctcaaagatg	780
ttcttgctct gccttaacta ctggaagctt gagacacctg ccagtttctg gcagaggctt	840
caggctgagg acgtggctac ctacaaggta aattacacca gatggctctg ttactgccac	900
gtgccccaga gctgtgatag cctccccgcg tacgaaacca ctcatgtctt tgggcgaagc	960
cttctccggt ccattttcac cgttaccgcg cggcagctgc tggaaaagt cccagtgagg	1020
aaggacaaat tggtgcccc gaagaggacc ctcatcctca ctacttccc caaattcctg	1080
tccatgctgg aggaggagat ctatggggca aactctccaa tctgggagtc aggcctcacc	1140
atgccaccct cagaggggac acagctggtt ccccgccag cttcagtcag tgcagcggtt	1200
gttcccagca ccccatctt cagccccagc atgggtgggg gcagcaacag ctccctgagt	1260
ctggattctg caggggcccga gcctatgcca ggcgagaaga ggacgctccc agagaacctg	1320
accctggagg atgccaagcg gctccgtgtg atgggtgaca tccccatgga gctggtaaat	1380
gaggtcatgc tgaccatcac tgacctgct gccatgctgg ggctgagac gagcctgctt	1440
tggccaatg cggccccgga tgagacagcc cgcctggagg agcgcgcgg catcatcgag	1500
ttcatgtca tggcaactc actgacgccc aaggccaacc ggcgggtgtt gctgtggctc	1560
gtggggctgc agaattgtct ttcccaccag ctgccgcga tgccaaagga gtatatgcc	1620
cgctcgtct ttgacccgaa gcacaagact ctggccttga tcaaggatgg gcgggtcatc	1680

gggtggcatct gcttccgcat gtttcccacc cagggcttca cggagattgt cttctgtgct	1740
gtcacctcga atgagcaggt caagggttat gggacccacc tgatgaacca cctgaaggag	1800
tatcacatca agcacaacat tctctacttc ctcacctacg cgcacgagta cgccatcggc	1860
tacttcaaaa agcagggttt ctccaaggac atcaagggtgc ccaagagccg ctacctgggc	1920
tacatcaagg actacgaggg agcgacgctg atggagtgtg agctgaatcc ccgcaccccc	1980
tacacggagc tgtcccacat catcaagaag cagaaagaga tcatcaagaa gctgattgag	2040
cgcaaacagg ccagatccg caaggtctac ccggggctca gctgcttcaa ggagggcgtg	2100
aggcagatcc ctgtggagag cgttcctggc attcgagaga caggctggaa gccattgggg	2160
aaggagaagg ggaaggagct gaaggacccc gaccagctct acacaaccct caaaaacctg	2220
ctggcccaaa tcaagtctca cccagtgcc tggcccttca tggagcctgt gaagaagtcg	2280
gaggccctg actactacga ggtcatccgc ttccccattg acctgaagac catgactgag	2340
cggtgcgaa gccgctacta cgtgacccgg aagctctttg tggccgacct gcagcgggtc	2400
atcgccaact gtcgcgagta caacccccg gacagcgagt actgccgtg tgccagcgcc	2460
ctggagaagt tcttctactt caagctcaag gagggaggcc tcattgacaa gtag	2514
<210> 3	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GCN5 F primer	
<400> 3	
caacctcagg ttttgaacc	20
<210> 4	
<211> 20	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	
<220><223> GCN5 R primer	
<400> 4	
cgatgccgta aacactttgc	20
<210> 5	
<211> 24	
<212> RNA	
<213> Artificial Sequence	

<220><223>	b-Actin F primer	
<400>	5	
	catgtttgag accttcaaca cccc	24
<210>	6	
<211>	23	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	b-Actin R primer	
<400>	6	
	gccatctcct gctcgaagtc tag	23
<210>	7	
<211>	19	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pAIB1 F primer	
<400>	7	
	ggatcccacg gttctacgc	19
<210>	8	
<211>	18	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	pAIB1 R primer	
<400>	8	
	gcgaccggag agaggcta	18
<210>	9	
<211>	22	
<212>	RNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	Gene desert F primer	
<400>	9	
	tggtggtctg ccttctgccca gt	22
<210>	10	
<211>	24	

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Gene desert R primer

<400> 10

tcacgtggga ggaagaagta gggc

24