



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104603288 B

(45)授权公告日 2018.12.14

(21)申请号 201380037529.4

专利权人 卡塔兰研究和高级研究院

(22)申请日 2013.06.06

(72)发明人 R·古米斯 E·帕拉内特

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104603288 A

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

(43)申请公布日 2015.05.06

代理人 刘晓东

(30)优先权数据

61/656,372 2012.06.06 US

(51)Int.Cl.

G12Q 1/6886(2018.01)

G01N 33/574(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2015.01.14

(56)对比文件

WO 2012045905 A2, 2012.04.12,

US 20110269637 A1, 2011.11.03,

CN 1471587 A, 2004.01.28,

WO 2005086891 A2, 2005.09.22,

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2013/001859 2013.06.06

审查员 王斌

(87)PCT国际申请的公布数据

W02013/182912 EN 2013.12.12

权利要求书3页 说明书60页

序列表18页 附图3页

(73)专利权人 生物医学研究机构基金会

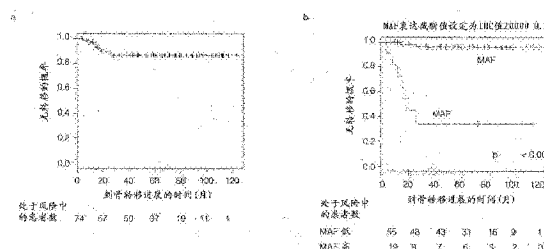
地址 西班牙巴塞罗那

(54)发明名称

用于肺癌转移的诊断、预后和治疗的方法

(57)摘要

本发明涉及用于在肺癌中转移的诊断或预后的方法,其包括确定在原发肿瘤样品中c-MAF基因是否出现扩增。同样地,本发明还涉及用于在肺癌中转移的诊断或预后的方法,以及涉及用于确定相对于向其他器官转移而言形成向骨转移的倾向的方法,其包括测定c-MAF基因的表达水平。最后,本发明涉及c-MAF的抑制剂作为用于治疗肺癌的治疗性靶标的用途。



1. 用于定量在受试者的肿瘤样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数的物质在制备用于体外对患有肺癌的受试者中骨转移进行诊断和/或用于体外对患有肺癌的受试者中形成骨转移的倾向进行预后的制剂中的用途,其中所述诊断或预后包括:

(i) 定量在所述受试者的肿瘤样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数,和

(ii) 将所获得的表达水平、扩增或拷贝数与在对照样品中所述基因的水平进行比较,

其中如果所述基因的表达水平、扩增程度或拷贝数相对于在对照样品中所述基因的水平而言增加,那么所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向。

2. 用于定量在受试者的肿瘤样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数的物质在制备用于体外确定对于患有具有骨转移的肺癌的受试者的个性化疗法的制剂中的用途,其中所述确定包括:

(i) 定量在所述受试者的肿瘤样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数,和

(ii) 将所获得的表达水平、扩增或拷贝数与在对照样品中所述基因的水平进行比较,

其中如果所述表达水平、扩增程度或拷贝数相对于在对照样品中所述基因的水平而言增加,那么所述受试者容易接受旨在预防和/或治疗所述转移的疗法。

3. 根据权利要求1或2的用途,其中所述骨转移为溶骨性转移。

4. 用于定量在受试者的肿瘤样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数的物质在制备用于体外确定对于患有具有骨转移的肺癌的受试者的个性化疗法的制剂中的用途,其中所述确定包括:

(i) 定量在所述受试者的骨肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数,和

(ii) 将所获得的表达水平、扩增或拷贝数与在对照样品中所述基因的水平进行比较,

其中如果所述基因的表达水平、扩增程度或拷贝数相对于在对照样品中所述基因的水平而言增加,那么所述受试者容易接受旨在避免或防止骨降解的疗法。

5. 根据权利要求4的用途,其中所述旨在避免或防止骨降解的疗法选自二磷酸类、RANKL的抑制剂、PTH的抑制剂或PTHrP的抑制剂、雷尼酸锶、DKK-1抑制剂、双重MET和VEGFR2抑制剂、降钙素、镭223和组织蛋白酶K的抑制剂。

6. 根据权利要求5的用途,其中所述PTH的抑制剂或PTHrP的抑制剂是中和抗体或肽。

7. 根据权利要求5的用途,其中所述RANKL的抑制剂选自RANKL特异性抗体、RANKL特异性纳米抗体和护骨蛋白。

8. 根据权利要求7的用途,其中所述RANKL特异性抗体为地舒单抗。

9. 根据权利要求5的用途,其中所述二磷酸类为唑来膦酸。

10. 根据权利要求4至9中任一项的用途,其中所述肺癌为SCLC或NSCLC。

11. 根据权利要求1、2和4中任一项的用途,其中所述c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数的定量包括所述基因的信使RNA即mRNA,或所述mRNA的片段,所述基因的互补DNA即cDNA,或所述cDNA的片段的定量。

12. 根据权利要求11的用途,其中所述表达水平、扩增或拷贝数的定量通过定量聚合酶链反应或者DNA或RNA阵列或FISH来进行。

13. 根据权利要求1、2和4中任一项的用途,其中所述c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数的定量包括由所述基因编码的蛋白质或其变体的水平的定量。

14. 根据权利要求13的用途,其中所述蛋白质的水平的定量通过Western印迹、ELISA、

免疫组织化学或蛋白质阵列来进行。

15. 用于确定在受试者的肿瘤样品中c-MAF基因是否被扩增或转位的物质在制备用于体外对患有肺癌的受试者中骨转移进行诊断和/或用于体外对患有肺癌的受试者中形成骨转移的倾向进行预后的制剂中的用途,其中所述诊断或预后包括确定在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因是否有扩增或转位,其中如果存在所述基因的扩增或转位,那么所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向。

16. 根据权利要求15的用途,其中所述肺癌为SCLC或NSCLC。

17. 根据权利要求1、2、4和15中任一项的用途,其中所述c-MAF基因的扩增或转位的确定通过基因座16q22-q24的扩增或转位的确定来进行。

18. 根据权利要求1、2、4和15中任一项的用途,其中所述c-MAF基因的扩增或转位的确定通过使用特异于c-MAF基因的探针来进行。

19. 根据权利要求15或16的用途,其中所述对照样品为没有遭受转移的受试者的肺癌肿瘤组织样品。

20. 根据权利要求1、2、4和15中任一项的用途,其中所述扩增通过原位杂交或PCR来进行确定。

21. 根据权利要求15或16的用途,其中所述骨转移为溶骨性转移。

22. 能够避免或防止骨降解的试剂在制备药物产品中的用途,所述药物产品用于在受试者中治疗骨转移,所述受试者患有肺癌,其中所述受试者已被鉴定为在肿瘤组织样品中具有相对于对照样品而言升高的c-MAF基因表达水平、扩增或拷贝数。

23. 根据权利要求22的用途,其中所述能够避免或防止骨降解的试剂选自二膦酸类、RANKL的抑制剂、PTH的抑制剂或PTHrH的抑制剂、雷尼酸锶、DKK-1抑制剂、双重MET和VEGFR2抑制剂、镭223、EGFR的抑制剂、降钙素和组织蛋白酶K的抑制剂。

24. 根据权利要求23的用途,其中所述PTH的抑制剂或PTHrH的抑制剂是中和抗体或肽。

25. 根据权利要求23的用途,其中所述RANKL的抑制剂选自RANKL特异性抗体、RANKL特异性纳米抗体和护骨蛋白。

26. 根据权利要求25的用途,其中所述RANKL特异性抗体为地舒单抗,和/或所述RANKL特异性纳米抗体为ALX-0141。

27. 根据权利要求23的用途,其中所述二膦酸类为唑来膦酸。

28. 根据权利要求22至27中任一项的用途,其中所述肺癌为SCLC或NSCLC。

29. 根据权利要求22至27中任一项的用途,其中所述骨转移为溶骨性转移。

30. 根据权利要求1的用途,其中所述肺癌是肺腺癌。

31. 用于在患有肺癌的受试者中预测肺癌的骨转移的试剂盒,所述试剂盒包括:a) 用于定量在所述受试者的样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数的装置;和b) 将在所述样品中c-MAF基因的定量的表达水平、扩增或拷贝数与参考c-MAF水平进行比较的装置。

32. 用于定量受试者的样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数的物质在制备用于对患有肺癌的受试者的样品进行分型的制剂中的用途,所述分型包括:

a) 定量所述受试者的样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数;

b) 通过将c-MAF基因的定量的表达水平、扩增或拷贝数与c-MAF的预先确定的参考水平进行比较来对所述样品进行分型;

其中所述分型提供在所述受试者中骨转移的风险相关的预后信息。

33. 预防或降低骨转移的试剂在制备用于在患有肺癌的受试者中预防或降低骨转移的风险的药物中的用途,其中所述受试者已被鉴定为具有升高的c-MAF基因表达水平、扩增或拷贝数,其中所述试剂根据定量在所述受试者中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数所确定的治疗方案进行施用。

34. 用于确定受试者的样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数的物质在制备用于将患有肺癌的受试者分类成组群的制剂中的用途,其中所述分类包括:a) 确定在所述受试者的样品中c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数;b) 将在所述样品中的c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数与c-MAF基因的预先确定的参考水平进行比较;和c) 基于在所述样品中所述c-MAF基因的表达水平、扩增或拷贝数将所述受试者分类成组群。

35. 权利要求2所述的用途,其中旨在预防和/或治疗转移的疗法选自下述中:全身性疗法;放疗;手术;mTor抑制剂;Src激酶抑制剂;CCR5拮抗剂;COX-2抑制剂;Alpharadin;及其组合。

36. 权利要求35所述的用途,其中所述全身性疗法选自化疗、激素疗法和免疫疗法及其组合。

37. 权利要求34所述的用途,其中所述受试者在分类到组群中后基于其c-MAF基因表达水平、扩增或拷贝数来施用疗法。

用于肺癌转移的诊断、预后和治疗的方法

[0001] 参考序列表

[0002] 与本申请一起电子提交的序列表(“3190002PC01SEQListing.txt”,48,392字节,创建于2013年6月6日)的内容以其全部内容通过引用的方式在此引入本文。

[0003] 相关申请的交叉参考

[0004] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求2012年6月6日提交的美国临时专利申请序列号61/656,372的优先权,以其全部内容通过引用的方式在此引入本文。

发明领域

[0005] 本发明涉及肺癌中转移(特别是骨转移)的诊断或预后,其基于确定在原发肿瘤样品中c-MAF基因是否出现扩增。同样地,本发明还涉及用于肺癌中转移(特别是骨转移)的诊断或预后的方法,以及涉及用于设计在患有肺癌的受试者中的个性化疗法的方法,其包括确定c-MAF基因的表达水平。最后,本发明涉及c-MAF的抑制剂作为用于治疗肺癌转移(特别是骨转移)的治疗性靶标的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 转移,在不同重要器官中肿瘤细胞和周围的正常组织之间的复杂相互作用引起的一种复杂过程,占在患有实体瘤的患者中的所有癌症死亡的90%。为了更好地解决这一重大威胁生命的问题,必须理解导致原发肿瘤形成转移的分子和细胞机制。转移基因和机制的鉴定对于理解该致命状况(condition)的基础生物学及其对临床实践的意义是至关重要的。以前的工作提供了转移过程复杂性的感觉,但未能解释转移如何并且为何发生,是什么样的机制使得转移是组织特异性的过程,是什么样的事件使得在原发肿瘤去除多年之后休眠的转移变得活化并致命,以及是什么样的介导转移的基因将最终构成有价值的诊断标志物和治疗靶标。

[0008] 肺骨特异性转移

[0009] 肺癌是一种特征在于肺组织中不受控制的细胞生长的疾病。如果不进行治疗,这种生长可以在一个称之为转移的过程中扩散至肺之外,进入附近的组织并最终进入身体的其它部分。开始于肺的大多数癌症(称为原发肺癌)是衍生自上皮细胞的癌。在世界范围内,肺癌是男性和女性中癌症相关死亡的最常见的原因,并且导致每年130万人死亡(如2004年的)。最常见的症状是气短、咳嗽(包括咳血)和体重下降。

[0010] 肺癌由四个主要肺癌类型和多个次要或罕见形式组成。由于临床病理学原因,它们通常被分为小细胞肺癌(SCLC)(也称为燕麦细胞癌)和非小细胞肺癌(NSCLC)的大类。NSCLC进一步被分为三个主要类型,鳞状细胞癌(SCC)、腺癌和大细胞癌。因为大细胞癌可能代表其它类型癌症的较差分化或未分化的形式,它是一个定义模糊的概念,并且用于其诊断的标准千差万别。肺癌最常见的病因是长期接触烟草烟雾。不吸烟者占肺癌病例的15%,并且这些病例通常归因于遗传因素、氡气、石棉和包括二手烟的空气污染的组合。

[0011] 与许多其它癌症类似,肺癌是由癌基因的活化或肿瘤抑制基因的失活引发的。癌基因是被认为使人们更易患癌症的基因。原癌基因被认为当暴露于特定的致癌物质时变成

癌基因。K-ras原癌基因的突变与10—30%的肺腺癌有关。表皮生长因子受体(EGFR)调节细胞增殖、凋亡、血管生成和肿瘤侵袭。EGFR的突变和扩增在非小细胞肺癌中常见并且给用EGFR抑制剂进行治疗提供了基础。Her2/neu受到影响的频率较低。染色体损伤可能导致杂合性缺失。这可能导致肿瘤抑制基因的失活。染色体3p、5q、13q和17p的损伤在小细胞肺癌中尤其常见。定位于染色体17p的p53肿瘤抑制基因在60-75%的病例中受到影响。通常突变或扩增的其它基因是c-MET、NKX2-1、LKB1、PIK3CA和BRAF。

[0012] 几个遗传多态性与肺癌有关。这些包括编码白介素-1、细胞色素p450、凋亡启动子(例如caspase-8)和DNA修复分子(例如XRCC1)的基因中的多态性。具有这些多态性的人们更可能在接触致癌物质后患上肺癌。

[0013] 分类

[0014] 根据组织学类型对肺癌进行分类。该分类对于临床管理和该疾病的预后具有重要意义。绝大多数肺癌是癌(carcinoma)——由上皮细胞产生的恶性病变。由组织病理学家通过在显微镜下见到的恶性细胞的大小和外观进行分类的肺癌两个最流行的组织学类型是非小细胞肺癌和小细胞肺癌。非小细胞类型是迄今为止最流行的。

[0015] 发现于肺之外的癌症可以被确定为已经在肺内产生,因为转移即扩散的肺癌通常保留了细胞标志物谱,其使得病理学家可以非常肯定地说该肿瘤起源于肺,即原发性肺癌。具有腺癌组织学的原发性肺癌通常具有TTF-1核免疫染色。

[0016] 非小细胞肺癌

[0017] 因为它们的预后和管理是相似的,非小细胞肺癌(NSCLC)被一起分组。存在三个主要亚型:鳞状细胞肺癌、腺癌和大细胞肺癌。

[0018] 占肺癌的25%的鳞状细胞肺癌通常开始于靠近中央支气管处。在肿瘤的中央一般会找到空腔和相关坏死。分化良好的鳞状细胞肺癌通常生长慢于其它癌症类型。

[0019] 腺癌占非小细胞肺癌的40%。它通常起源于周围肺组织。多数腺癌病例与吸烟有关;但是,在从不吸烟的人(“不吸烟者(never-smoker)”)中,腺癌是肺癌最常见的形式。腺癌的亚型,细支气管肺泡癌,在女性不吸烟者中更常见,并且对治疗可能具有不同的反应。

[0020] 小细胞肺癌

[0021] 小细胞肺癌(SCLC)不太常见。它之前被称为“燕麦细胞”癌。大多数病例起源于较大的气道(初级和二级支气管)并快速生长,变得非常大。小细胞含有密集的神分泌颗粒(含有神经内分泌激素的囊泡),其给该肿瘤关联了内分泌/副肿瘤综合征。虽然最初对化疗和放疗更敏感,但其常常显示转移性的,并最终带来更差的预后。小细胞肺癌早已二分演化为局限期和广泛期疾病。这种类型的肺癌与吸烟密切相关。

[0022] 预后

[0023] 非小细胞肺癌的预后因素包括存在或不存在肺部症状、肿瘤大小、细胞类型(组织学)、扩散程度(阶段)以及向多个淋巴结的转移和血管侵入。对于患有不能手术的疾病的患者,预后受到不佳表现状态和超过10%的体重下降的不利影响。小细胞肺癌的预后因素包括表现状态、性别、疾病的阶段和诊断时中枢神经系统或肝的涉及。

[0024] 对于非小细胞肺癌(NSCLC),预后普遍不佳。IA阶段疾病的完全手术切除之后,五年存活率为67%。对于IB阶段疾病,五年存活率为57%。患有IV阶段NSCLC的患者的五年存活率约为1%。

[0025] 对于小细胞肺癌,预后也普遍不佳。患有SCLC的患者的总五年存活率为约5%。患有广泛期SCLC的患者具有低于1%的平均五年存活率。局限期疾病的中位存活时间为20个月,五年存活率为20%。

[0026] 根据国家癌症研究所提供的数据,美国的肺癌诊断的中位年龄是70岁,并且死亡的中位年龄是72岁。在美国,有医疗保险的人们更可能有一个更好的结果。

[0027] 转移

[0028] 原发肺癌本身最常转移至肾上腺、肝、脑和骨。

[0029] 骨转移发生于晚期肺癌并且它们赋予高水平的发病率。骨转移疾病诊断之初,介入治疗通常会涉及全身化疗、放疗和二膦酸类(bisphosphonate),其主要是旨在减少疼痛的治标选项。

[0030] 在健康骨骼中,新骨基质形成和旧骨基质吸收的均衡是通过降解骨的破骨细胞和形成骨的成骨细胞的协调活性来实现的。在骨转移疾病过程中,骨吸收和形成的正常平衡被侵入的肿瘤细胞、成骨细胞和破骨细胞之间发生的同型和异型细胞-细胞相互作用打乱。大多数患有继发性骨肿瘤的患者(包括那些与肺癌相关的患者)表现出溶骨性病变。因此,在目前使用的或正在骨转移疾病中评估的大多数治疗策略已被设计为保护骨基质免受破骨细胞的增强的骨降解活性影响。肺的骨转移溶骨性病变是与乳腺癌的共同特征,而与前列腺癌相反。在后者中,在去势抗性(castration-resistant)前列腺癌和骨转移疾病中存在的另外的并发症是骨硬化病变——也称为骨形成或成骨病变——或溶骨和骨硬化病变二者的组合——也称为混合病变。骨硬化病变是以具有多层组织不佳的I型胶原纤维的骨沉积为代表,所述胶原纤维具有梭织外观和降低的机械强度。基于肺癌和乳腺癌的共同表现特征,骨转移可能是该过程显示相似分子机制。

[0031] 在每个亚型中,肺癌细胞高保真地保持了基因组畸变引起的转录改变。尽管在整个系统中存在大量基因组的、转录的、翻译的和生物学的异质性,所得到的显性基因将会显现预测转移结果的分子事件。但是,不清楚癌症的发展历史是否会导致位点特异性转移的不同或共同的介质(mediator)。与这些细胞的起源相关的诱发因素可以在转移进程过程中产生不同的限速障碍。本专利旨在寻求预测向骨转移的详细的新预后因素及其作为治疗靶标的潜在价值。

[0032] 在具有实体瘤癌症的患者中大多数在转移后死亡这一事实意味着理解允许肿瘤转移的分子和细胞机制是关键。最近的出版物已证明了转移如何通过仍然知之甚少的复杂机制而产生,并且还证明了不同的转移性细胞类型如何具有向着特定器官的向性。这些组织特异的转移性细胞具有一系列获得性功能,其允许它们定居于特定的器官。

[0033] 然而,现有技术中不存在这样的基因标志物,其使得能够诊断和/或预测患有特定肺癌(如NSCLC肺癌)的患者是否将遭受或不遭受转移,从而能够向患有所述癌症的受试者应用合适的疗法。因此,存在鉴定新的标志物的需要,该新的标志物使得能够诊断在患有肺癌的受试者中转移的存在和/或预测患有肺癌的受试者形成转移(特别是骨转移)的可能性。新的预后因素的鉴定将在选择最合适的治疗中用作指导。

[0034] 预测骨转移的标志物的鉴定将会通过对由肺细胞的骨转移组织的扩散和定居施加限制来提供预防性的治疗机会并延迟或转化致命性病症。在一个优选的溶骨性前列腺癌骨转移实施方案中,发明人鉴定了c-MAF和16q22-24基因组增益(genomic gain)作为真正

的肺癌相关骨转移基因和基因组改变。

[0035] 发明概述

[0036] 本发明的发明人已经确定,鉴定影响传播肺癌的细胞转移(特别是骨转移)的信号平衡将会给建立该疾病的预后以及针对该疾病的预防性治疗介入提供有价值的信息。发明人鉴定到MAF和16q22-24基因组增益在驱动肺至骨的转移病变(特别是溶骨性骨转移)中起作用。

[0037] 本发明的发明人已经将c-MAF鉴定为肺癌引起转移并且特别是骨转移的更大趋势的相关标志物。MAF过表达似乎是由于c-MAF基因所位于的基因座16q22-q24的扩增。

[0038] 在两个患者组群中研究了c-MAF表达水平。第一组群含有来自患有肺癌的患者的原发肿瘤的表达谱和临床记录。第二患者组群是由肺原发肿瘤活检组织构成的组织微阵列的形式,包括形成骨转移的9个肿瘤,形成除骨以外的其它位点的转移的16个肿瘤并具有最少5年的临床随访,以及没有形成转移、具有最少5年的临床随访的49个肺原发肿瘤,观察到肿瘤细胞和活检组织中的c-MAF基因(mRNA)和蛋白表达与不同临床参数(包括复发、转移、骨转移和总存活率)正相关。另外,这些研究显示了c-MAF在肺癌转移(特别是骨转移)中作为预后标志物和作为靶标基因的作用。同样地,发明人已将基因座16q22-q24(其包括c-MAF基因)的扩增与患有肺癌的受试者中转移(特别是骨转移)的存在相关联。

[0039] 因此,在第一个方面,本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中对转移进行诊断和/或用于在患有肺癌的受试者中对形成转移的倾向进行预后的体外方法,其包括:

[0040] (i) 定量在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平或16q22-24拷贝数增益;和

[0041] (ii) 将前面所获得的表达水平或拷贝数与在对照样品中所述基因的表达水平进行比较;

[0042] 其中如果相对于在对照样品中所述基因的表达水平而言所述基因的表达水平增加或基因组区域有扩增,那么所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向,特别是骨转移。

[0043] 在第二个方面,本发明涉及用于设计对于患有肺癌的受试者的个性化疗法的体外方法,其包括:

[0044] (i) 定量在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平或16q22-24拷贝数增益;和

[0045] (ii) 将前面所获得的表达水平与在对照样品中所述基因的表达水平进行比较;

[0046] 其中如果相对于在对照样品中所述基因的表达水平而言所述表达水平增加了或16q22-24拷贝数增益了,那么所述受试者容易接受旨在预防和/或治疗转移的疗法。那么,在该方法的特定方面,向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。如果相对于所述参考值而言所述表达水平没有增加或16q22-24拷贝数没有增益,那么所述受试者不容易接受旨在预防、抑制和/或治疗骨转移的疗法。那么,在该方法的特定方面,不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。在一些方面,所述参考值是来自没有遭受转移的受试者的肺癌样品中的c-MAF基因表达水平。在一些方面,所述肺癌是SCLC。在一些实施方案中,所述肺癌是NSCLC。在一些方面,所述肺癌是肺腺癌。

[0047] 在第三个方面,本发明涉及用于设计对于患有具有骨转移的肺癌的受试者的个性

化疗法的体外方法,其包括:

[0048] (i) 定量在所述受试者的骨转移性肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平或16q22-24拷贝数增益;和

[0049] (ii) 将在步骤(i)中所获得的表达水平与在对照样品中所述基因的表达水平进行比较;

[0050] 其中如果相对于在对照样品中所述基因的表达水平而言c-MAF基因的表达水平或16q22-24拷贝数增益增加,那么所述受试者容易接受旨在防止骨降解的疗法。那么,在该方法的一个特定方面,向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。如果相对于所述参考值而言所述C-MAF基因表达水平没有增加或16q22-24拷贝数没有增益,那么所述受试者不容易接受旨在预防骨降解的疗法。在该方法的一个特定方面,不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。

[0051] 在第四个方面,本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中对转移进行诊断和/或用于在患有肺癌的受试者中对形成转移的倾向进行预后的体外方法,其包括确定在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因是否出现扩增或易位;其中如果相对于对照样品而言存在所述基因的扩增,那么所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向。那么,在该方法的一个特定方面,向所述受试者施用预防或抑制骨转移的至少一种疗法。在该方法的一个特定方面,如果在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因没有出现扩增或易位,那么,不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。在一个特定方面,c-MAF的表达水平高于平均表达水平指示增加的骨转移风险,并且该风险与c-MAF表达水平成正比。在一个特定方面,如果相对于平均水平而言c-MAF的表达水平高于平均值加上一个标准差,那么可以得出所述受试者具有更大的形成早期骨转移的倾向的结论。

[0052] 在另一个方面,本发明涉及预测患有肺癌的患者的临床结果的体外方法,其包括确定在所述受试者的样品中相对于参考基因拷贝数而言c-MAF基因是否出现扩增,其中相对于所述参考基因拷贝数而言c-MAF基因的扩增意味着不佳的临床结果。那么,在该方法的一个特定方面,向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。如果没有观察到这样的扩增,那么不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。在第七方面的另一个实施方案中,本发明涉及预测患有肺癌的患者的临床结果的体外方法,其包括确定在所述受试者的样品中c-MAF基因是否出现易位,其中c-MAF基因的易位(例如t(14,16))意味着不佳的临床结果。在一些实施方案中,本发明涉及设计用于具有c-MAF扩增或易位的患者的个性化疗法。在一些实施方案中,所述个性化疗法是预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种治疗药物。

[0053] 在第五个方面,本发明涉及c-MAF的抑制性试剂在制备药物中的用途,所述药物用于治疗 and/或预防肺癌的转移(特别是骨转移)。在另一个方面,本发明涉及c-MAF的抑制性试剂用于在预防肺癌骨转移中的用途。在一些方面,本发明涉及c-MAF的抑制性试剂用于在避免或防止骨降解中的用途。

[0054] 在另一个方面,本发明涉及能够避免或防止骨降解的试剂在制备药物中的用途,所述药物用于在受试者中治疗骨转移,所述受试者患有肺癌并且在转移性肿瘤组织样品中具有相对于对照样品而言升高的c-MAF水平或16q22-24拷贝数增益。

[0055] 在另一个方面,本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中预测肺癌的骨转移的试剂

盒,所述试剂盒包括:a)用于定量在所述受试者的样品中c-MAF表达水平的装置;和b)用于将在所述样品中c-MAF表达的定量水平与参考c-MAF表达水平进行比较的装置。本发明还涉及这样的试剂盒在患有所述癌症的受试者中预测肺癌的骨转移的用途。那么,在一个实施方案中,基于使用所述试剂盒的结果向或者不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。

[0056] 在另一个方面,本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中预测肺癌的骨转移的试剂盒,所述试剂盒包括:a)用于定量在所述受试者的样品中c-MAF基因的扩增、16q23或16q22-24基因座扩增或易位的装置;和b)用于将在所述样品中c-MAF基因的扩增水平、16q23或16q22-24基因座扩增或易位与参考进行比较的装置。在另一个方面,本发明涉及用于预测患有肺癌骨转移的受试者的临床结果的试剂盒,所述试剂盒包括:a)用于定量在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平或16q23或16q22-24基因座扩增或易位的装置;和b)用于将在所述样品中c-MAF的定量表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位与参考c-MAF表达水平或者16q23或16q22-24基因座进行比较的装置。本发明还涉及这样的试剂盒用于预测患有肺癌骨转移的受试者的临床结果的用途。那么,在一个实施方案中,基于使用所述试剂盒的结果,向或者不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。

[0057] 在另一个方面,本发明涉及用于确定用于患有肺癌的患者的疗法的试剂盒,所述试剂盒包括:a)用于定量在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位的装置;和b)用于将所述样品中c-MAF的定量表达水平与参考c-MAF表达水平或者16q23或16q22-24基因座进行比较的装置;和c)用于基于所定量的表达水平与参考表达水平的比较而确定用于在所述受试者中预防和/或降低骨转移的疗法的装置。本发明还涉及这样的试剂盒用于确定用于患有肺癌的患者的疗法的用途。那么,在一个实施方案中,基于使用所述试剂盒的结果而向或者不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。

[0058] 在另一个方面,本发明涉及一种试剂盒,包括:i)用于定量在患有肺癌的受试者的样品中c-MAF的表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位的试剂,和ii)已经预先确定与骨转移的风险相关的一个或多个c-MAF基因表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位指标。本发明还涉及这样的试剂盒在患有所述癌症的受试者中预测肺癌的骨转移的用途。那么,在一个实施方案中,基于使用所述试剂盒的结果向或者不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。

[0059] 在另一个方面,本发明涉及用于对患有肺癌的受试者的样品进行分型的体外方法,所述方法包括:

[0060] a) 提供所述受试者的样品;

[0061] b) 定量在所述样品中c-MAF的表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位;

[0062] c) 通过将c-MAF的定量的表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位与c-MAF表达或者16q23或16q22-24基因座拷贝数的预先确定的参考水平进行比较来对所述样品进行分型;

[0063] 其中所述分型提供在所述受试者中骨转移的风险相关预后信息。在一个实施方案中,基于分型提供的预后信息向或者不向所述受试者施用至少一种治疗剂。

[0064] 在另一个方面,本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中预防或降低骨转移的风险

的方法,所述方法包括给所述受试者施用预防或降低骨转移的试剂,其中所述试剂根据定量在所述受试者中c-MAF的表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位所确定的治疗方案进行施用。

[0065] 在另一个方面,本发明涉及将患有肺癌的受试者分类成组群的方法,包括:a)确定在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位;b)将所述样品中c-MAF的表达水平与c-MAF表达的预先确定的参考水平或正常基因组进行比较;和c)基于在所述样品中所述c-MAF的表达水平或者16q23或16q22-24基因座扩增或易位将所述受试者分类成组群。在一个实施方案中,该方法用于鉴定被预测为具有骨转移的症状的早期表现的患者。在一个特定方面,所述组群被用于进行临床试验。

[0066] 附图简述

[0067] 图1:如在卡-迈(kaplan meier)图中所观察到的,并被所获得的HR和p值突出显示的,在肺原发性肿瘤中的c-MAF的基因表达与转移显著相关。

[0068] 图2:a)描绘了原发性肿瘤切除后肺癌患者的总群体中在任何时间点无骨转移存活的概率的卡-迈图。b)描绘了根据通过免疫组化(IHC)测得的c-MAF高或低蛋白表达分类,在肺癌原发性肿瘤活检组织中在任何时间点无骨转移存活的概率的卡-迈图。按照标准方法(曲线下面积,AUC,为0.80)基于接收工作曲线(ROC曲线)选择c-MAF表达的截断值(20,000光密度,0.D.,单位)。

[0069] 图3:a)描绘了从原发性肿瘤切除时肺癌患者总群体中的存活概率的卡-迈图。b)描绘了根据c-MAF高或低蛋白表达分类在肺癌原发性肿瘤患者中存活概率的卡-迈图。按照标准方法在任何时间点基于接收工作曲线(ROC曲线)根据骨转移选择c-MAF表达的截断值(20,000光密度,0.D.,单位)。

[0070] 发明详述

[0071] 基于c-MAF基因表达水平用于肺癌转移的诊断和预后的方法

[0072] 发明人已经鉴定了在肺癌转移中c-MAF基因和蛋白是过表达的,并且在原发性肺肿瘤中c-MAF的表达水平与肺癌的不同临床参数(特别是与复发和转移概率)相关。因此,c-MAF的过表达与肺肿瘤转移至骨中的出现相关。因此,c-MAF可以用作用于患有肺癌的受试者中转移(特别是骨转移)的诊断和/或预后的标志物。

[0073] 因此,在一个方面,本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中对转移进行诊断和/或用于在患有肺癌的受试者中对形成转移的倾向进行预后的体外方法(在下文中,本发明的第一个方法),其包括

[0074] (i)定量在所述受试者的肿瘤组织样品(例如肺肿瘤组织、循环肺肿瘤细胞、循环肺肿瘤DNA)中c-MAF基因的表达水平,和

[0075] (ii)将前面所获得的表达水平与在对照样品中所述基因的表达水平进行比较;

[0076] 其中如果所述基因的表达水平相对于在对照样品中所述基因的表达水平而言增加,那么所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移(在一个优选的部位则为骨转移)的倾向。

[0077] c-MAF基因(v-maf肌腱膜纤维肉瘤癌基因同源物(鸟类),也称为MAF或MGC71685)是包含亮氨酸拉链的转录因子,其以同二聚体或以异二聚体起作用。取决于DNA结合位点,所编码的蛋白质可以是转录激活蛋白或转录阻遏蛋白。编码c-MAF的DNA序列以登录号NG_

016440描述在NCBI数据库中(SEQ ID NO:1)。c-MAF的编码序列列于SEQ ID NO:13中。从所述DNA序列中转录出两种信使RNA,各产生c-MAF蛋白的两种同种型(α 同种型和 β 同种型)之一。关于所述同种型中的每一种同种型的互补DNA序列分别以登录号NM_005360.4(SEQ ID NO:2)和NM_001031804.2(SEQ ID NO:3)描述在NCBI数据库中。

[0078] 在本发明的背景下,“转移”是指癌症从其所起始的器官至不同的器官的扩展(propagation)。转移通常通过血液或淋巴系统发生。当癌细胞散布并形成新的肿瘤时,后者称为继发性肿瘤或转移性肿瘤。形成继发性肿瘤的癌细胞与原始肿瘤的细胞相像。例如,如果肺癌散布(转移)至骨,那么继发性肿瘤由恶性肺癌细胞形成。在骨中的疾病是转移性肺癌而不是骨癌。在本发明方法的一个特定的实施方案中,所述转移是已散布(转移)至骨的肺癌。

[0079] 在本发明中,“在患有肺癌的受试者中转移的诊断”是指通过研究其指征(sign),即在本发明的背景下,通过c-MAF基因在肺癌肿瘤组织中相对于对照样品而言增加的表达水平(即,过表达),来鉴定疾病(转移)。

[0080] 在本发明中,“在患有肺癌的受试者中形成转移的倾向的预后”是指基于指征而知晓所述受试者所患的肺癌将来是否会转移。在本发明的背景下,所述指征是在肿瘤组织中c-MAF基因的过表达。

[0081] 本发明的方法包括,在第一个步骤中,定量在来自受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平。

[0082] 在一个优选的实施方案中,本发明的第一个方法包括仅定量c-MAF基因的表达水平作为唯一标志物,即该方法不涉及确定任何另外的标志物的表达水平。

[0083] 在本文中所使用的术语“受试者”或“患者”是指所有被归类为哺乳动物的动物,并且包括但不限于,家畜和农场动物、灵长类和人,例如人类、非人灵长类、奶牛、马、猪、绵羊、山羊、狗、猫或啮齿类。优选地,所述受试者是任何年龄或种族的男人或女人。

[0084] 如本文中用于指临床结果时,术语“不佳”(差)或“好”是指受试者将呈现有利或不利的结果。本领域技术人员将会理解,概率的这种评估,并非对于100%的所诊断的受试者是正确的,尽管优选如此。但是,该术语要求受试者的统计学上显著的部分可以被鉴定为具有针对给定结果的倾向。一个部分是否是在统计学显著的,可以由本领域技术人员采用各种公知的统计评价工具(例如,置信区间的确定、p值的确定、Student t-检验、Mann-Whitney检验等)简单地来进行确定。详情提供在Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley&Sons, New York 1983中。优选的置信区间为至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%。p值优选地为0.05、0.01、0.005或0.0001或更低。更优选地,一个群体的受试者的至少60%、至少70%、至少80%或至少90%可以通过本发明的方法合适地得到鉴定。

[0085] 在本发明中,“肿瘤样品”是指起源于原发肺癌肿瘤的样品(例如,肿瘤组织、循环肿瘤细胞、循环肿瘤DNA)。这样的样品可以通过常规方法(例如活检,采用相关医学技术领域技术人员公知的方法)获得。获得活检样品的方法包括将肿瘤分割成大块,或显微切割,或其它本领域中已知的分开细胞的方法。另外,可以通过经由用细针进行抽吸的细胞学来获得肿瘤细胞。为了简化样品的保存和操作,可以将样品在福尔马林中进行固定并包埋在石蜡中,或者首先进行冷冻,然后包埋在组织冷冻介质(例如OCT化合物)中(通过浸没在允

许快速冷冻的高度深冷介质中)。

[0086] 如本领域技术人员所理解的,基因表达水平可以通过测量所述基因的信使RNA的水平或由所述基因编码的蛋白质的水平来进行定量。

[0087] 为此目的,可以处理生物样品以便物理地或机械地使组织结构或细胞解体,从而将细胞内组分释放到水溶液或有机溶液中以制备核酸。通过本领域技术人员已知的和商业上可得的方法(Sambroock, J., et al., "Molecular cloning: a Laboratory Manual", 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., Vol. 1-3.)来提取核酸。

[0088] 因此, c-MAF基因的表达水平可以从由所述基因的转录而得的RNA(信使RNA或mRNA)定量,或备选地,从所述基因的互补DNA(cDNA)定量。因此,在本发明的一个特定的实施方案中, c-MAF基因的表达水平的定量包括c-MAF基因的信使RNA或所述mRNA的片段, c-MAF基因的互补DNA或所述cDNA的片段,或者其混合物的定量。

[0089] 实际上,在本发明的范围内可以使用任何常规方法来检测和定量由c-MAF基因编码的mRNA或其相应的cDNA的水平。举例说明而非限制性地,由所述基因编码的mRNA的水平可以以下述方式来进行定量:通过使用常规方法,例如包括mRNA的扩增和所述mRNA扩增产物的定量(例如电泳和染色)的方法,或者备选地,通过Southern印迹并使用合适的探针, Northern印迹并使用目的基因(c-MAF)的mRNA或其相应的cDNA的特异性探针,用S1核酸酶的作图, RT-PCR, 杂交, 微阵列等, 优选通过使用合适标记的实时定量PCR。类似地,相应于由c-MAF基因编码的所述mRNA的cDNA水平也可以通过使用常规技术来进行定量;在这种情况下,本发明的方法包括通过相应mRNA的反转录(RT)来合成相应cDNA的步骤,随后是扩增和所述cDNA扩增产物的定量。定量表达水平的常规方法可以例如在Sambrook et al., 2001(根据上面所引用的)中找到。

[0090] 在一个特定的实施方案中, c-MAF基因的表达水平通过定量聚合酶链反应(PCR)或者DNA或RNA阵列来进行定量。

[0091] 此外, c-MAF基因的表达水平的定量也可以通过由所述基因编码的蛋白质即c-MAF蛋白(c-MAF) [NCBI, 登录号075444]或者c-MAF蛋白的任何在功能上等价的变体的表达水平的定量来进行。存在两种c-MAF蛋白的同种型,由403个氨基酸(SEQ ID NO:4)组成的 α 同种型(NCBI, NP_005351.2)和由373个氨基酸(SEQ ID NO:5)组成的 β 同种型(NP_001026974.1)。c-MAF基因的表达水平的定量可以通过c-MAF蛋白的任一种同种型的表达水平的定量来进行。因此,在一个特定的实施方案中,由c-MAF基因编码的蛋白质的水平的定量包括c-MAF蛋白的定量。

[0092] 在本发明的背景下,“c-MAF蛋白的在功能上等价的变体”是指:(i) c-MAF蛋白(SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)的变体,其中一个或多个氨基酸残基被保守的或非保守的氨基酸残基(优选地,保守的氨基酸残基)置换,其中这样的经置换的氨基酸残基可以由或可以不由遗传密码编码,或者(ii)包含一个或多个氨基酸的插入或缺失并且具有与c-MAF蛋白相同的功能(即作为DNA结合转录因子起作用)的变体。c-MAF蛋白的变体可以通过使用基于下述方面的方法来鉴定:基于c-MAF在体外促进细胞增殖的能力,如在国际专利申请W02005/046731中所显示的;基于所谓的抑制剂在表达c-MAF的细胞中阻断在细胞周期蛋白D2启动子或包含c-MAF应答区域(MARE或c-MAF应答元件)的启动子的控制之下报道基因的转录能力的的能力,如在W02008098351(以其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所描述的;

或者基于所谓的抑制剂在表达NFATc2和c-MAF的细胞中阻断响应于用PMA/离子霉素进行的刺激在IL-4启动子的控制之下报道基因的表达能力,如在US2009048117A(以其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所描述的。

[0093] 优选地,根据本发明的变体与任一种c-MAF蛋白同种型(SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)的氨基酸序列具有至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的序列相似性。所述变体与上面所定义的特定c-MAF蛋白序列之间的相似性程度通过使用本领域技术人员广泛知晓的算法和计算机程序来进行测定。氨基酸序列之间的相似性优选地通过使用BLASTP算法[BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]来进行确定。

[0094] c-MAF蛋白表达水平可以通过允许检测和定量受试者样品中的所述蛋白质的任何常规方法来进行定量。举例说明而非限制性地,所述蛋白质水平可以通过下述方式来进行定量:例如通过使用具有与c-MAF(或包含抗原决定簇的其片段)结合的能力的抗体和随后定量所形成的复合物。在这些试验中使用的抗体可以经标记或不经标记。可以使用的标记的举例说明性例子包括放射性同位素、酶、荧光团、化学发光试剂、酶底物或辅因子、酶抑制剂、颗粒、着色剂等。存在多种多样的可以在本发明中使用的已知测定法,其使用未标记的抗体(一抗)和经标记的抗体(二抗);在这些技术之中包括Western印迹或Western转移、ELISA(酶联免疫吸附测定)、RIA(放射免疫测定)、竞争性EIA(竞争性酶免疫测定)、DAS-ELISA(双抗体夹心ELISA)、免疫细胞化学和免疫组化技术、基于使用包括特异性抗体的蛋白质生物芯片或微阵列的技术或者基于以诸如浸渍片(dipsticks)的形式的胶体沉淀的试验。其他用于检测和定量所述c-MAF蛋白的方式包括亲和层析技术、配体结合试验等。当使用免疫学方法时,可以使用已知以高亲和力与c-MAF蛋白结合的任何抗体或试剂以检测c-MAF蛋白的量。然而,优先使用抗体,例如多克隆血清、杂交瘤上清液或单克隆抗体、抗体片段、Fv、Fab、Fab'和F(ab')₂、scFv、人源化双链抗体、三链抗体、四链抗体、纳米抗体、α抗体、装订肽(stapled peptide)、环肽和抗体。在市场上,存在可以在本发明的背景下使用的针对c-MAF蛋白的商业抗体,例如抗体ab427、ab55502、ab55502、ab72584、ab76817、ab77071(Abcam plc, 330 Science Park, Cambridge CB40FL, United Kingdom), AbD Serotec的单克隆抗体075444(小鼠抗人MAF的无叠氮化物的单克隆抗体,未缀合的,克隆6b8)等。提供抗c-MAF抗体的商业公司有多家,例如Abnova Corporation、Bethyl Laboratories、Santa Cruz Biotechnology、Bioworld Technology、GeneTex等。

[0095] 在一个特定的实施方案中,c-MAF蛋白的水平通过Western印迹、免疫组化、ELISA或蛋白质阵列来进行定量。

[0096] 在另一个特定的实施方案中,c-MAF蛋白的水平从外泌体或循环DNA进行定量。外泌体是由大多数细胞类型在体内或体外分泌的40-100nm膜囊泡。外泌体构成内涵体的一个特定群体(称为多泡体(MVBs)),其通过向区室(compartment)的内腔向内出芽形成。MVBs与质膜一旦融合,这些内囊泡被分泌。外泌体可以通过本领域公知的几种方法(Théry C. et al., Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3: Unit 3.22)(其全部内容通过引用的方式在此引入本文)从多种细胞系或体液中分离。几种商业试剂盒可用于外泌体的分离,例如ExoQuick™或ExoTest™。

[0097] 本发明的第一个方法包括,在第二个步骤中,将在受试者的肿瘤样品(包括但不限于原发肿瘤活检组织、循环肿瘤细胞和循环肿瘤DNA)中获得的c-MAF基因表达水平与对照样品中所述基因的表达水平进行比较。

[0098] 一旦测量了在患有肺癌的受试者的肿瘤组织样品、循环肿瘤细胞或循环肿瘤DNA中c-MAF基因的表达水平并将其与对照样品进行了比较,如果所述基因的表达水平相对于其在对照样品中的表达水平而言增加了,那么可以得出所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向的结论。

[0099] 必须将c-MAF基因的表达水平的确定与对照样品或参考样品的值相关联。取决于作为分析对象的肿瘤的类型,对照样品确切性质可以变化。因此,在待评价诊断的情况下,那么参考样品为还未转移的肺癌受试者的肿瘤组织样品,或者相应于在还未转移的肺癌受试者的活组织检查样品的肿瘤组织集合中所测量的c-MAF基因表达水平中位值。

[0100] 通常,通过将等量的来自受试者群体的样品相合并来获得所述参考样品。通常,典型的参考样品将从在临床上经充分证明的并且其中转移的不存在经充分表征的受试者获得。在这样的样品中,可以确定生物标志物(c-MAF基因)的正常浓度(参考的浓度),例如通过提供关于参考群体的平均(mean)浓度。在确定该标志物的参考浓度时,要顾及各种考虑。在这样的考虑之中,包括患者的年龄、体重、性别、总体身体状况(condition)等。例如,作为参考组,采用等量的至少2个、至少10个、至少100个至优选地多于1000个受试者的组,这些受试者优选地根据前面的考虑进行分类,例如根据各种年龄类别。从其得出参考水平的样品集合将优选地由患有与研究对象(例如肺癌)患者相同类型的癌症的受试者构成。类似地,患者组群内的参考值可以采用接收的工作曲线(ROC)并测量针对所有灵敏度和特异性对的曲线下面积以确定哪对提供最佳值及其相应的参考值来建立。

[0101] 一旦建立了该中位值或参考值,就可以将在患者的肿瘤组织中表达的该标志物的水平与该中位值进行比较,并且因此被分配至“增加的”表达水平。由于受试者之间的可变性(例如,涉及年龄、种族等的方面),建立c-MAF表达的绝对参考值是非常困难的(如果不是实际上不可能的)。因此,在特定的实施方案中,关于c-MAF表达的“增加的”或“降低的”表达的参考值通过用常规手段计算分布百分数来确定,其牵涉在分离自其中该疾病经充分证明的受试者的一个或多个样品中通过任一种上面提及的方法来确定c-MAF的表达水平。那么,可以将c-MAF的“减少的”水平优选地分配给这样的样品,其中在所述样品中c-MAF的表达水平等于或低于在正常群体中的第50个分布百分数,包括例如,等于或低于在正常群体中的第60个分布百分数的表达水平,等于或低于在正常群体中的第70个分布百分数的表达水平,等于或低于在正常群体中的第80个分布百分数的表达水平,等于或低于在正常群体中的第90个分布百分数的表达水平,以及等于或低于在正常群体中的第95个分布百分数的表达水平。那么,可以将c-MAF基因的“增加的”表达水平优选地分配给这样的样品,其中在所述样品中c-MAF基因的表达水平等于或高于在正常群体中的第50个分布百分数,包括例如,等于或大于在正常群体中的第60个分布百分数的表达水平,等于或大于在正常群体中的第70个分布百分数的表达水平,等于或大于在正常群体中的第80个分布百分数的表达水平,等于或大于在正常群体中的第90个分布百分数的表达水平,以及等于或大于在正常群体中的第95个分布百分数的表达水平。

[0102] 在本发明中,“增加的表达水平”当指c-MAF基因的水平时,是指高于在参考样品或

对照样品中出现的水平的表达水平。特别地,当相对于分离自患者的样品而言,在参考样品中的表达水平为至少1.1倍、1.5倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或者甚至更高倍数时,可以将一个样品视为具有高的c-MAF表达水平。

[0103] 在本发明的背景下,应当理解,当由所述受试者所患有的肺癌已经转移至身体的其他器官(在一个特定的实施方案中,向骨的转移)时,“受试者具有关于转移的阳性诊断”。

[0104] 在一个更加优选的实施方案中,所述骨转移为溶骨性骨转移。根据在本文中所使用的,表述“溶骨性骨转移”是指这样的转移类型,其中在转移附近产生骨吸收(骨密度的逐渐丧失),其由于肿瘤细胞刺激了破骨细胞的活性而导致,并且以严重的疼痛、病理性骨折、高钙血症、脊髓压迫和其他由于神经压迫而导致的症状为特征。

[0105] 另一方面,在本发明中,应当理解,当由所述受试者所患有的肺癌在未来发生转移的概率高时,“受试者具有更大的形成转移的倾向”。

[0106] 本领域技术人员将会理解,不企望关于遭受从原发肺肿瘤开始的转移的倾向的预测对于所有待鉴定的受试者(即,对于100%的受试者)都是正确的。然而,该术语要求,可以鉴定出统计学上显著部分的受试者(例如,在组群研究中的一个组群)。一个部分是否是在统计学上显著的,可以由本领域技术人员通过使用各种熟知的统计学评价工具(例如,置信区间的确定、p值的确定、Student t-检验、Mann-Whitney检验等)简单地来进行确定。详情提供在Dowdy and Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, New York 1983中。优选的置信区间为至少90%、至少95%、至少97%、至少98%或至少99%。p值优选地为0.1、0.05、0.01、0.005或0.0001。更优选地,一个群体的受试者的至少60%、至少70%、至少80%或至少90%可以通过本发明的方法合适地得到鉴定。

[0107] 根据在本文中所使用的,“用于避免或防止骨降解的试剂”是指任何这样的分子,其能够防止、抑制、治疗、减少或终止骨降解,要么通过刺激成骨细胞的增殖,要么通过抑制破骨细胞的增殖,要么通过固定骨结构来实现。

[0108] 根据在本文中所使用的,“c-MAF的抑制性试剂”是指既通过阻碍所述基因的表达产物产生(中断c-MAF基因的转录和/或阻断来自c-MAF基因表达的mRNA的翻译),也通过直接抑制c-MAF蛋白的活性而能够全部地或部分地抑制c-MAF基因表达的任何分子。c-MAF基因表达的抑制剂可以通过使用基于下述方面的方法来鉴定:基于假定的抑制剂阻断c-MAF在促进体外细胞增殖的能力的能力,如在国际专利申请W02005/046731(其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所显示的;基于假定的抑制剂在表达c-MAF的细胞中阻断在细胞周期蛋白D2启动子或包含c-MAF应答区域(MARE或c-MAF应答元件)的启动子控制之下报道基因的转录能力的能力,如在W02008098351(其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所描述的;或者基于假定的抑制剂在表达NFATc2和c-MAF的细胞中阻断响应于用PMA/离子霉素进行的刺激在IL-4启动子控制之下的报道基因的表达能力,如在US2009048117A(其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所描述的。

[0109] 根据在本文中所使用的,雷帕霉素的哺乳动物靶标(mTOR)或“mTor”是指相应于EC 2.7.11.1的那些蛋白。mTor酶是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,其调控细胞增殖、细胞运动、细胞生长、细胞存活和转录。

[0110] 根据在本文中所使用的,“mTor的抑制剂”是指能够全部地或部分地抑制mTor基因表达的任何分子,其既通过阻碍所述基因的表达产物产生(中断mTor基因的转录和/或阻断

来自mTor基因表达的mRNA的翻译),也通过直接抑制mTor蛋白活性来实现。mTor的抑制剂包括除了抑制mTor活性之外还具有一个或多个靶标的抑制剂。

[0111] 根据在本文中所使用的,“Src”是指相应于EC 2.7.10.2的那些蛋白。Src是非受体酪氨酸激酶和原癌基因。Src可以在细胞生长和胚胎发育中起作用。

[0112] 根据在本文中所使用的,“Src抑制剂”是指能够全部地或部分地抑制Src基因表达的任何分子,其既通过阻碍所述基因的表达产物产生(中断Src基因的转录和/或阻断来自Src基因表达的mRNA的翻译),也通过直接抑制Src蛋白活性来实现。

[0113] 根据在本文中所使用的,“前列腺素内过氧化物合酶2”、“环氧合酶-2”或“COX-2”是指相应于EC 1.14.99.1的那些蛋白。COX-2负责将花生四烯酸转变成前列腺素内过氧化物H₂。

[0114] 根据在本文中所使用的,“COX-2抑制剂”是指能够全部地或部分地抑制COX-2基因表达的任何分子,其既通过阻碍所述基因的表达产物产生(中断COX-2基因的转录和/或阻断来自COX-2基因表达的mRNA的翻译),也通过直接抑制COX-2蛋白活性来实现。

[0115] 根据在本文中所使用的,“结果(outcome)”或“临床结果”是指所导致的疾病和/或疾病进展进程,其特征可以为例如复发、直到复发的时间段、转移、直到转移的时间段、转移的数量、转移位点的数量和/或疾病所致的死亡。例如,好的临床结果包括治愈、防止复发、防止转移和/或在固定时间段内的存活(没有复发),不佳的临床结果包括疾病进展、转移和/或在固定时间段内的死亡。

[0116] 根据在本文中所使用的,“预测”是指患有肺癌的受试者将会形成对远处的器官转移的可能性的确定。根据在本文中所使用的,“好的预后”是指预期(如预测)受试者会存活和/或在设定的时间段内没有复发或远距离转移,或风险低。在本申请的背景下,术语“低”是相对术语,是指“低”的表达群体中临床结果(复发、远距离转移等)的风险。“低”风险可以被认为比异质性癌症患者群体的平均风险更低的风险。在Paik et al. (2004)的研究中,复发的总体“低”风险被认为低于15%。所述风险也会在时间段的函数中发生变化。例如,所述时间段可以是癌症初始诊断之后或作出预后之后的五年、十年、十五年或甚至二十年。

[0117] 根据在本文中所使用的,“不佳的预后”是指预期例如预测受试者在设定的时间段内不会存活和/或具有复发或远距离转移,或风险高。在本申请的背景下,术语“高”是相对术语,是指“高”表达群体在临床结果(复发、远距离转移等)方面的风险。“高”风险可以被认为比异质性癌症患者群体的平均风险更高的风险。在Paik et al. (2004)的研究中,复发的总体“高”风险被认为高于15%。所述风险也会在时间段的函数中发生变化。例如,所述时间段可以是癌症初始诊断之后或作出预后之后的五年、十年、十五年或甚至二十年。

[0118] 根据在本文中所使用的,“参考值”是指用作由患者或采集自患者的样品的实验室检查获得的数值/数据的参考的实验室值。参考值或参考水平可以是绝对值;相对值;具有上限和/或下限的值;范围值;平均值;中位值、算术平均值或与特定对照或基线值相比的值。参考值可以基于个体样品值,例如,由所测试的受试者的样品于较早的时间点获得的值。参考值可以基于大量样品,例如来自实足年龄匹配组的受试者群体,或基于包括或排除所测试的样品的样品池。

[0119] 根据在本文中所使用的,术语“治疗”是指任何类型的治疗,其目的在于终止、防止、改善或降低如本文所述的临床状况(condition)的易感性。在一个优选的实施方案中,

术语治疗涉及如本文所定义的紊乱或状况 (condition) 的预防性治疗 (即降低临床疾病的易感性的治疗)。因此,“治疗 (treatment)”、“治疗 (treating)”和它们的等效术语是指获得期望的药理学或生理学效果,涵盖哺乳动物 (包括人类) 中病理状况 (condition) 或紊乱的任何治疗。所述效果从全部地或部分地防止紊乱或其症状来说可以是预防性的,和/或,从紊乱和/或可归因于该紊乱的不良作用的部分或全部治愈来说可以是治疗性的。即,“治疗”包括 (1) 防止受试者中该紊乱的发生或复发, (2) 抑制该紊乱,如阻止其发展, (3) 停止或终止该紊乱或至少其相关症状,使得宿主不再遭受该紊乱或其症状,如引起该紊乱或其症状的消退,例如,通过恢复或修复丢失、缺失或缺陷的功能,或刺激低效过程,或 (4) 减轻、缓解或改善该紊乱或其相关症状,其中在广义上使用改善,其是指至少降低参数 (如炎症、疼痛或免疫缺陷) 的幅度 (magnitude)。

[0120] 根据在本文中所使用的,“样品”或“生物样品”是指从受试者分离的生物材料。生物样品可以含有适合用于确定c-MAF基因的表达水平的任何生物材料。样品可以从任何合适的生物组织或流体 (例如,肿瘤组织、血液、血浆、血清、尿或脑脊液 (CSF)) 分离。

[0121] 根据在本文中所使用的,术语基因的“表达水平”是指在受试者的样品中由所述基因产生的基因产物的可测量的量,其中所述基因产物可以是转录产物或翻译产物。因此,所述表达水平可以与核酸基因产物 (如mRNA或cDNA) 或多肽基因产物有关。所述表达水平衍生自受试者的样品和/或参考样品或样品们,并且可以例如从头检测或相应于前面的确定。例如,可以采用本领域技术人员已知的微阵列方法、PCR方法 (如qPCR) 和/或基于抗体的方法确定或测量所述表达水平。

[0122] 根据在本文中所使用的,术语“基因的拷贝数”是指细胞中核酸分子的拷贝数。基因的拷贝数包括细胞的基因组 (染色体) DNA中的基因拷贝数。在正常细胞 (非肿瘤细胞) 中,基因的拷贝数通常是两个拷贝 (在染色体对的每个成员中具有一个拷贝)。基因的拷贝数有时包括从细胞群体样品中获取的基因拷贝数的一半。

[0123] “增加的表达水平”当指c-MAF基因的水平时,意指该表达水平高于在参考样品或对照样品中出现的水平。该增加的水平可以 (不排除其它机制) 由基因或者16q23或16q22-24染色体基因座的扩增或易位造成。特别地,当相对于参考或对照而言,在分离自患者的样品中的表达水平为至少约1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或者甚至更高倍数时,样品可以被视为具有高的c-MAF表达水平。

[0124] 根据在本文中所使用的,“探针”是指与特定目的核酸序列互补的寡核苷酸序列。在一些实施方案中,所述探针可以特异于已知经历易位的染色体区域。在一些实施方案中,所述探针具有特定的标记或标签。在一些实施方案中,所述标签是荧光团。在一些实施方案中,所述探针是DNA原位杂交探针,其标记是基于铂与核酸和蛋白的稳定配位结合。在一些实施方案中,所述探针如美国专利申请12/067532和美国专利申请12/181,399中所述,其全部内容通过引用的方式在此引入本文,或如Swennenhuis et al. “Construction of repeat-free fluorescence in situ hybridization probes” *Nucleic Acids Research* 40 (3) :e20 (2012) 中所述。

[0125] 根据在本文中所使用的,“标签”或“标记”是指直接或间接与探针结合的任何物理分子,使得探针或所探测的位置被可视化、标记或以其它方式捕获。

[0126] 根据在本文中所使用的,“易位”是指在染色体之间以不等量或等量的形式进行染色体物质的交换。在一些情况下,所述易位是在同一染色体上。在一些情况下,所述易位是在不同的染色体之间。在许多类型的癌症(包括乳腺癌和白血病)中易位高频发生。易位可以或者是一级相互易位或者是更复杂的二级易位。存在几种一级易位,其涉及被认为构成许多癌症中的始发事件的免疫球蛋白重链(IgH)基因座。(Eychène, A., Rocques, N., and Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8:683-693.)

[0127] 根据在本文中所使用的,“多倍体的”或“多倍体”是指细胞含有多于两个拷贝的目的基因。在一些情况下,目的基因是MAF。在一些实施方案中,多倍体与目的基因的表达的积累有关。在一些实施方案中,多倍体与基因组的不稳定性有关。在一些实施方案中,基因组的不稳定性可以导致染色体易位。

[0128] 根据在本文中所使用的,“全基因组测序”是有机体的整个基因组被单次测序的过程。参见,例如,Ng, P.C. and Kirkness, E.F., Whole Genome Sequencing. 2010. Methods in Molecular Biology. 628:215-226。

[0129] 根据在本文中所使用的,“外显子测序”是有机体的DNA的整个编码区域被测序的过程。在外显子测序中,mRNA被测序。基因组的非翻译区不包括在外显子测序中。参见,例如,Choi, M. et al., Genetic diagnosis by whole exome capture and massively parallel DNA sequencing. 2009. PNAS. 106 (45):19096-19101。

[0130] “肿瘤组织样品”是指起源于肺癌肿瘤的组织样品,包括但不限于循环肿瘤细胞和循环肿瘤DNA。所述样品可以通过常规方法(例如活检,采用相关医学技术领域技术人员公知的方法)获得。

[0131] “溶骨性骨转移”是指这样的转移类型,其中在转移附近产生骨吸收(骨密度的逐渐丧失),其由于肿瘤细胞刺激了破骨细胞的活性而导致,并且以严重的疼痛、病理性骨折、高钙血症、脊髓压迫和其他由于神经压迫而导致的症状为特征。

[0132] 在患有肺肿瘤的患者中设计本发明的个性化疗法的方法

[0133] 正如现有技术中知晓的,待向患有癌症的受试者施用的治疗取决于所述癌症是否是恶性肿瘤,即其是否具有高的发生转移的概率,或者所述癌症是否是良性肿瘤。在第一个假设中,所选择的治疗是全身治疗(如化疗),而在第二个假设中,所选择的治疗是局部治疗(如放疗)。

[0134] 因此,如本发明所述,鉴于肺癌细胞中c-MAF基因的过表达与转移的存在有关,c-MAF基因表达水平允许在最适合于患有所述癌症的受试者的疗法方面作出决定。

[0135] 因此,在另一个方面,本发明涉及用于设计对于患有肺癌的受试者的个性化疗法的体外方法,其包括:

[0136] (i) 定量在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平,和

[0137] (ii) 将前面所获得的表达水平与在对照样品中所述基因的表达水平进行比较,

[0138] 其中如果所述表达水平相对于在对照样品中所述基因的表达水平而言增加,那么所述受试者容易接受旨在预防和/或治疗转移的疗法。那么,在本发明的一个特定方面,向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法,

[0139] 其中如果c-MAF基因表达水平相对于所述参照值而言没有增加,那么所述受试者不容易接受旨在预防骨降解的疗法。那么,在本发明的一个特定方面,不向所述受试者施用

预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。

[0140] 在一个特定的实施方案中,所述转移为骨转移。在一个更优选的实施方案中,所述骨转移为溶骨性转移。

[0141] 已经针对本发明的第一个方法详细描述了术语和表述“受试者”、“肺癌”、“肿瘤样品”、“转移”、“表达水平的确定”、“c-MAF基因”、“增加的表达水平”和“对照样品”,并且它们同样可应用于本发明的第二个和第三个方法。

[0142] 本发明的第二个方法包括,在第一个步骤中,定量在患有肺癌的受试者中的肿瘤样品中c-MAF基因表达水平。

[0143] 在一个优选的实施方案中,本发明的第二个方法包括定量c-MAF基因表达水平作为唯一标志物,即该方法不涉及确定任何另外的标志物的表达水平。

[0144] 在本发明的第二个方法的情况下,所述样品是所述受试者的原发肿瘤组织样品。在第二个步骤中,将在所述受试者的肿瘤样品中获得的c-MAF基因表达水平与在对照样品中所述基因的表达水平进行比较。必须将c-MAF基因的表达水平的确定与对照样品或参考样品的值相关联。取决于所分析的肿瘤的类型,对照样品确切性质可以变化。因此,优选地,参考样品为还未转移的肺癌受试者的肿瘤组织样品,或者其相应于在还未转移的肺癌受试者的活组织检查样品中在肿瘤组织集合中所测量的c-MAF基因表达水平的中位值。

[0145] 在又一个实施方案中,高于平均值的c-MAF的基因表达水平意味着增加的骨转移风险,该风险与c-MAF表达的水平成比例,因此,患有肺癌的受试者中骨转移的风险是剂量依赖性的。

[0146] 一旦已经测量了样品中c-MAF基因的表达水平并将其与对照样品比较了,如果所述基因的表达水平相对于在对照样品中它们的表达水平而言增加,那么可以得出所述受试者容易接受旨在预防(如果所述受试者还没有发生转移)和/或治疗转移(如果所述受试者已经经历转移)的疗法的结论。如果没有观察到这样的增加的表达,那么不向所述受试者施用预防、抑制和/或治疗骨转移的至少一种疗法。

[0147] 当癌症已经转移时,采用包括但不限于化疗、激素治疗、免疫治疗或其组合的全身治疗。此外,可以采用放疗和/或手术。治疗的选择通常取决于原发癌症的类型、大小、转移的定位、年龄、患者的总体健康状况和先前所采用的治疗类型。

[0148] 全身治疗是达到整个身体的那些治疗:

[0149] 一化疗为用于破坏癌细胞的药物的使用。通常,所述药物通过口服途径或静脉内途径进行施用。有时,化疗与放射治疗一起使用。合适的化疗治疗包括,不限于,蒽环类(多柔比星、表柔比星、聚乙二醇化脂质体多柔比星)、紫杉烷类(紫杉醇、多西紫杉醇、白蛋白纳米颗粒结合紫杉醇)、5-氟尿嘧啶(连续输注5-FU、卡培他滨)、长春花生物碱类(长春瑞滨、长春花碱)、吉西他滨、铂盐(顺铂、卡铂)、环磷酰胺、依托泊苷和一种或多种上述的组合,例如环磷酰胺/蒽环+/-5-氟尿嘧啶方案(例如多柔比星/环磷酰胺(AC)、表柔比星/环磷酰胺(EC)、环磷酰胺/表柔比星/5-氟尿嘧啶(CEF)、环磷酰胺/多柔比星/5-氟尿嘧啶(CAF)、5-氟尿嘧啶/表柔比星/环磷酰胺(FEC))、环磷酰胺/甲胺喋呤/5-氟尿嘧啶(CMF)、蒽环类/紫杉烷类(例如多柔比星/紫杉醇或多柔比星/多西紫杉醇)、多西紫杉醇/卡培他滨、吉西他滨/紫杉醇、紫杉烷类/铂方案(例如紫杉醇/卡铂或多西紫杉醇/卡铂)。

[0150] 一激素疗法基于以下事实:某些激素促进癌症的生长。例如,在女性中由卵巢产生

的雌激素有时促进乳腺癌的生长。存在有各种阻止这些激素产生的方式。一种方式是摘除产生激素的器官：在女性的情况下是卵巢；在男性的情况下是睾丸。更经常地，可以使用用于阻止这些器官产生激素或用于避免激素对癌细胞起作用的药物。

[0151] 一免疫疗法是辅助患者自身的免疫系统以对抗癌症的治疗。有各种类型的免疫疗法，其被用于治疗具有转移的患者。这些包括但不限于，细胞因子、单克隆抗体和抗肿瘤疫苗。

[0152] 在另一个方面，所述治疗是Alpharadin (镭-223二氯化物)。Alpharadin使用来自镭-223衰变的 α 辐射杀死癌细胞。由于其作为钙模拟物的特征，镭-223天然地自我靶向骨转移。(当与基于 β 或 γ 辐射的当前放射疗法相比) α 辐射具有非常短的2-10个细胞的范围，因此导致对周围健康组织的损伤小(特别是骨髓)。具有与钙相似的性质，镭-223被吸引到钙用于在身体里建立骨的地方，包括更快的、异常骨生长的位点——例如在患有晚期、去势抗性前列腺癌的男子的骨转移中所见到的。注射后，镭-223在血流中被携带至异常骨生长的位点。身体内癌症开始的地方已知是原发肿瘤。其中一些细胞可能脱离并在血流中被携带至身体的另一个部分。然后，癌细胞可以定居在身体的该部分并形成新的肿瘤。如果发生这种情况，就被称为继发性癌症或转移。大多数患有晚期前列腺癌的患者在他们的骨中遭受疾病的最大负担。镭-223的目标是选择性靶向该继发性癌症。在骨中没有吸收的任何镭-223被迅速排到肠道并排出体外。

[0153] 在另一个方面，所述治疗是mTor抑制剂。在一些方面，所述mTor抑制剂是双功能mTor/PI3激酶抑制剂。在一些方面，所述mTor抑制剂用于预防或抑制转移。在一些方面，所述mTor抑制剂选自以下组成的组：ABI009(西罗莫司)、雷帕霉素(西罗莫司)、Abraxane(紫杉醇)、Absorb(依维莫司)、Afinitor(依维莫司)、具有格列维克的Afinitor、AS703026(pimasertib)、Axxess(umirolimus)、AZD2014、BEZ235、Biofreedom(umirolimus)、BioMatrix(umirolimus)、BioMatrix flex(umirolimus)、CC115、CC223、康宝生物工程西罗莫司洗脱支架ORBUSNEICH(西罗莫司)、Curaxin CBL102(米帕林)、DE109(西罗莫司)、DS3078、Endeavor DES(佐他莫司)、Endeavor Resolute(佐他莫司)、Femara(来曲唑)、Hocena(antroquinonol)、INK128、Inspiron(西罗莫司)、IPI504(retaspimycin hydrochloride)、KRN951(tivozanib)、ME344、MGA031(teplizumab)、MiStent SES(西罗莫司)、MKC1、Nobori(umirolimus)、OSI027、OVI123(虫草素)、Palomid 529、PF04691502、Promus Element(依维莫司)、PWT33597、Rapamune(西罗莫司)、Resolute DES(佐他莫司)、RG7422、SAR245409、SF1126、SGN75(vorsetuzumab mafodotin)、Synergy(依维莫司)、Taltorvic(ridaforolimus)、Tarceva(厄洛替尼)、Torisel(坦罗莫司)、Xience Prime(依维莫司)、Xience V(依维莫司)、Zomaxx(佐他莫司)、Zortress(依维莫司)、佐他莫司洗脱外围支架MEDTRONIC(佐他莫司)、AP23841、AP24170、ARmTOR26、BN107、BN108、Canstatin GENZYME(血管能抑素)、CU906、EC0371、EC0565、KI1004、LOR220、NV128、雷帕霉素 ONCOIMMUNE(西罗莫司)、SB2602、西罗莫司PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS(西罗莫司)、TOP216、VLI27、VS5584、WYE125132、XL388、Advacan(依维莫司)、AZD8055、Cypher Select+ 西罗莫司洗脱冠脉支架(西罗莫司)、Cypher西罗莫司洗脱冠脉支架(西罗莫司)、涂覆药物的球囊(西罗莫司)、E-Magic+(西罗莫司)、Emtor(西罗莫司)、Esprit(依维莫司)、Evertor(依维莫司)、HBF0079、LCP-Siro(西罗莫司)、Limus CLARIS(西罗莫司)、mTOR抑制剂

CELLZOME、Nevo西罗莫司洗脱冠脉支架(西罗莫司)、nPT-mTOR、Rapacan(西罗莫司)、Renacept(西罗莫司)、ReZolve(西罗莫司)、Rocas(西罗莫司)、SF1126、Sirolim(西罗莫司)、西罗莫司NORTH CHINA(西罗莫司)、西罗莫司RANBAXY(西罗莫司)、西罗莫司WATSON(西罗莫司)Siropam(西罗莫司)、Sirova(西罗莫司)、Supralimus(西罗莫司)、Supralimus-Core(西罗莫司)、他克莫司WATSON(他克莫司)、TAF A93、坦罗莫司ACCORD(坦罗莫司)、坦罗莫司SANDOZ(坦罗莫司)、TOP216、Xience Prime(依维莫司)、Xience V(依维莫司)。在一个特定方面,所述mTor抑制剂是Afinitor(依维莫司)(http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&No_vald=4029462064338207963;最后一次登录11/28/2012)。在另一个方面,依维莫司与芳香酶抑制剂组合。(参见例如Baselga, J., et al., Everolimus in Postmenopausal Hormone-Receptor Positive Advanced Breast Cancer. 2012. N. Engl. J. Med. 366 (6): 520-529, 其通过引用的方式在此引入本文)。在另一个方面,可以通过本领域已知的方法鉴定mTor抑制剂。(参见例如Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10 (7): 571-81, 其通过引用的方式在此引入本文)。在一些方面,所述Src激酶抑制剂被用于在SRC反应性标签(SRS)是阳性的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面,所述患者是SRS+和ER-。(参见例如……P33……)在一些方面,所述mTor抑制剂被用于在患有晚期肺癌的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面,所述mTor抑制剂与第二种治疗联合使用。在一些方面,所述第二种治疗是本发明所述的任何治疗。

[0154] 在另一个方面,所述治疗是Src激酶抑制剂。在一些方面,所述Src抑制剂被用于预防或抑制转移。在一些方面,所述Src激酶抑制剂选自以下组: AZD0530(saracatinib)、Bosulif(bosutinib)、ENMD981693、KD020、KX01、Sprycel(dasatinib)、Yervoy(ipilimumab)、AP23464、AP23485、AP23588、AZD0424、c-Src激酶抑制剂KISSEI、CU201、KX2361、SKS927、SRN004、SUNK706、TG100435、TG100948、AP23451、Dasatinib HETERO(dasatinib)、Dasatinib VALEANT(dasatinib)、Fontrax(dasatinib)、Src激酶抑制剂KINEX、VX680(tozasertib乳酸盐)、XL228和SUNK706。在一些实施方案中,所述Src激酶抑制剂是dasatinib。在另一个方面,可以通过本领域已知的方法鉴定Src激酶抑制剂(参见例如Sen, B. and Johnson, F. M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14页, 其通过引用的方式在此引入本文)。在一些方面,所述Src激酶抑制剂被用于在SRC反应性标签(SRS)阳性的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面,所述患者是SRS+和ER-。(参见例如Zhang, CH.-F, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16: 67-78, 通过引用并入本文中)。在一些方面,所述Src激酶抑制剂被用于在患有晚期肺癌的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面,所述Src激酶抑制剂与第二种治疗联合使用。在一些方面,所述第二种治疗是本发明所述的任何治疗。

[0155] 在另一个方面,所述治疗是COX-2抑制剂。在一些方面,所述COX-2抑制剂被用于预防或抑制转移。在一些方面,所述COX-2抑制剂选自以下组: ABT963、对乙酰氨基酚ER JOHNSON(对乙酰氨基酚)、Acular X(酮咯酸氨丁三醇)、BAY1019036(阿司匹林)、BAY987111(苯海拉明, 萘普生钠)、BAY11902(吡罗昔康)、BCIBUCH001(布洛芬)、Capoxigem(apricoxib)、CS502、CS670(培比洛芬)、双氯芬酸HPBCD(双氯芬酸)、Diractin(酮洛芬)、

GW406381, HCT1026 (硝基氟比洛芬)、Hyanalges-D (双氯芬酸)、HydrocoDex (对乙酰氨基酚, 右美沙芬, 氢可酮)、布洛芬钠PFIZER (布洛芬钠)、具有对乙酰氨基酚的布洛芬PFIZER (对乙酰氨基酚, 布洛芬)、Impracor (酮洛芬)、IP880 (双氯芬酸)、IP940 (吡罗美辛)、ISV205 (双氯芬酸钠)、JNS013 (对乙酰氨基酚, 盐酸曲马多)、酮洛芬TDS (酮洛芬)、LTNS001 (萘普生 etemesil)、美沙拉嗪SALIX (美沙拉嗪)、美沙拉嗪SOFAR (美沙拉嗪)、美沙拉嗪 (美沙拉嗪)、ML3000 (licofelone)、MRX7EAT (依托度酸)、萘普生IROKO (萘普生)、NCX4016 (硝基阿司匹林)、NCX701 (硝基对乙酰氨基酚)、Nuprin SCOLR (布洛芬)、OMS103HP (盐酸阿米替林, 酮洛芬, 盐酸羟甲唑啉)、Oralease (双氯芬酸)、OxycoDex (右美沙芬, 羟考酮)、P54, PercoDex (对乙酰氨基酚, 右美沙芬, 羟考酮)、PL3100 (萘普生, 磷脂酰胆碱)、PSD508, R-酮洛芬 (酮洛芬)、Remura (溴芬酸钠)、ROX828 (酮咯酸氨丁三醇)、RP19583 (酮洛芬赖氨酸)、RQ00317076, SDX101 (R-依托度酸)、TDS943 (双氯芬酸钠)、TDT070 (酮洛芬)、TPR100, TQ1011 (酮洛芬)、TT063 (S-氟比洛芬)、UR8880 (cimicoxib)、V0498TA01A (布洛芬)、VT122 (依托度酸, 普萘洛尔)、XP20B (对乙酰氨基酚, 右旋丙氧吩)、XP21B (双氯芬酸钾)、XP21L (双氯芬酸钾)、Zoenasa (乙酰半胱氨酸, 美沙拉嗪)、Acephen、Actifed+、Actifed-P、Acular、Acular LS、Acular PF、Acular X、Acuvail、雅维、雅维抗窦抗过敏、雅维抗感冒和抗窦、雅维解除堵塞、雅维PM、雅维PM胶囊、空气撒隆巴斯、Airtal、无酒精NyQuil解除感冒&流感、Aleve、Aleve ABDI IBRAHIM、Aleve-D、Alka-Seltzer、Alka-Seltzer BAYER、超强Alka-Seltzer、Alka-Seltzer柠檬-酸橙、原始Alka-Seltzer、Alka-Seltzer+、Alka-Seltzer+抗感冒和抗咳嗽、Alka-Seltzer+抗感冒和抗咳嗽配方、Alka-Seltzer+日夜抗感冒配方、Alka-Seltzer+白天无昏睡抗感冒配方、Alka-Seltzer+抗流感配方、Alka-Seltzer+夜晚抗感冒配方、Alka-Seltzer+抗窦配方、Alka-Seltzer+闪闪发光的原始抗感冒配方、Alka-Seltzer PM、Alka-Seltzer唤醒、Anacin、Anaprox、Anaprox MINERVA、Ansaid、蜂毒素、Apranax、Apranax abdi、Arcoxia、抗关节炎配方Bengay、Arthrotec、Asacol、Asacol HD、Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL、Asacol ORIFARM、阿司匹林BAYER、复合阿司匹林、阿司匹林Migran、AZD3582、Azulfidine、Baralgan M、BAY1019036、BAY987111、BAY11902、BCIBUCH001、苯海拉明抗过敏、日夜苯海拉明、Benylin 4抗流感、Benylin抗感冒和抗流感、Benylin日夜抗感冒和抗流感、Benylin日夜抗感冒和抗窦日夜、Benylin抗感冒和抗窦+、Benylin日夜解除感冒和流感、Benylin1All-In-One、Brexin、Brexin ANGELINI、Bromday、百服宁、Buscopan+、Caldolor、Calmatel、Cambia、Canasa、Capoxigem、Cataflam、西乐葆、西乐葆ORIFARM、儿童雅维抗窦抗过敏、儿童泰诺、儿童泰诺抗咳嗽和抗流涕、儿童泰诺+抗感冒、儿童泰诺+抗感冒和抗咳嗽、儿童泰诺+抗感冒和抗流涕、儿童泰诺+抗流感、儿童泰诺+抗感冒&抗过敏、儿童泰诺+抗咳嗽&抗流涕、儿童泰诺+抗咳嗽&抗咽喉痛、儿童泰诺+抗多症状感冒、Clinoril、Codral抗感冒和流感、Codral日夜日片、Codral日夜夜片、晚间Codral、Colazal、Combunox、康泰克抗感冒+抗流感、康泰克抗感冒+抗流感无昏睡、Coricidin D、Coricidin HBP抗感冒和抗流感、Coricidin HBP日夜抗多症状感冒、Coricidin HBP抗最强流感、Coricidin HBP晚间抗多症状感冒、Coricidin II超强抗感冒和抗流感、CS502、CS670、Daypro、Daypro Alta、DDS06C、Demazin抗感冒和抗流感、Demazin抗咳嗽、抗感冒和抗流感、Demazin日/夜抗感冒和抗流感、Demazin PE抗感冒和抗流感、Demazin PE日/夜抗感冒和抗流感、双氯芬酸HPBCD、Dimetapp日解除、Dimetapp抗多症状感冒和流感、Dimetapp夜解除、Dimetapp解除疼

痛和发烧、Dimetapp PE抗寒抗疼痛、Dimetapp PE抗寒抗疼痛+抗过敏、Dipentum、Diractin、Disprin抗感冒'n'抗发烧、Disprin Extra、Disprin Forte、Disprin+、Dristan抗感冒、初级Dristan、Drixoral+、Duexis、Dynastat、Efferalgan、Efferalgan+维生素C、Efferalgan维生素C、Elixsure IB、Excedrin背部和身体、Excedrin抗偏头痛、Excedrin PM、Excedrin抗寒抗头痛、Excedrin抗紧张性头痛、Falcol、Fansamac、Feldene、FeverAll、Fiorinal、具有可待因的Fiorinal、Flanax、Flector Patch、Flucam、Fortagesic、Gerbin、Giazo、Gladio、Goody's抗背部和身体疼痛、Goody's酷橙、Goody's超强、Goody's PM、无油脂的Bengay、GW406381、HCT1026、He Xing Yi、Hyanalgesic-D、HydrocoDex、布洛芬钠PFIZER、具有对乙酰氨基酚的布洛芬PFIZER、Icy Hot SANOFI AVENTIS、Impracor、Indocin、吲哚美辛APP PHARMA、吲哚美辛MYLAN、婴幼儿泰诺、IP880、IP940、Iremod、ISV205、JNS013、小泰诺、Junifen、初级强度雅维、初级强度美林、酮洛芬TDS、Lemsip Max、Lemsip Max All in One、夜Lemsip Max All、Lemsip Max抗感冒和抗流感、Lialda、李施德林漱口水、劳埃德霜、Lodine、Lorfit P、Loxonin、LTNS001、Mersyndol、美沙拉嗪SALIX、美沙拉嗪SOFAR、美沙拉嗪、Mesasal GLAXO、Mesasal SANOFI、Mesulid、Metsal Heat Rub、Midol Complete、Midol扩展解除、Midol液体凝胶、Midol PM、Midol青少年配方、Migranin包衣片、ML3000、Mobic、Mohrus、美林、美林抗感冒和抗寒抗疼痛、美林PM、Movalis ASPEN、MRX7EAT、Nalfon、Nalfon PEDINOL、Naprelan、萘普生、萘普生RPG生命科学、萘普生IROKO、NCX4016、NCX701、NeoProfen LUNDBECK、Nevanac、Nexcede、Niflan、Norgesic MEDICIS、安乃近、Nuprin SCOLR、Nurofen、Nurofen抗感冒和抗流感、Nurofen最强抗偏头痛、Nurofen+、Nuromol、具有维生素C的NyQuil、Ocufen、OMS103HP、Oralease、Orudis ABBOTT JAPAN、Oruvail、Osteluc、OxycoDex、P54、必理通、必理通Actifast、Paradine、Paramax、Parfenac、Pedeal、Pennsaid、颇得斯安、颇得斯安ORIFARM、Peon、Percodan、Percodan-Demi、PercoDex、Percogesic、Perfalgan、PL2200、PL3100、Ponstel、Prexige、Prolensa、PSD508、R-酮洛芬、Rantudil、Relafen、Remura、Robaxisal、Rotec、Rowasa、ROX828、RP19583、RQ00317076、Rubor、Salofalk、Salonpas、Saridon、SDX101、Seltouch、sfRowasa、Shinbaro、Sinumax、Sinutab、Sinutab、sinus、Spalt、Sprix、Strefen、Sudafed抗感冒和抗咳嗽、Sudafed抗头感冒和抗寒、Sudafed PE抗感冒+抗咳嗽、Sudafed PE抗压+抗疼痛、Sudafed PE、严重感冒、Sudafed PE抗寒日+夜解除日片、Sudafed PE抗寒日+夜解除夜片、Sudafed PE抗寒+抗炎疼痛解除、Sudafed高级抗寒、Surgam、Synalgos-DC、Synflex、Tavist抗过敏/抗寒/抗头痛、TDS943、TDT070、Theraflu抗感冒和抗咽喉痛、Theraflu日间抗严重感冒和咳嗽、Theraflu日间变暖解除、Theraflu变暖解除片日间抗多症状感冒、Theraflu变暖解除抗感冒和抗胸闷、Thomapyrin、Thomapyrin C、Thomapyrin Effervescent、Thomapyrin Medium、Tilcotil、Tispol、Tolectin、Toradol、TPR100、TQ1011、Trauma-Salbe、Trauma-Salbe Kwizda、Treo、Treximet、Trovex、TT063、泰诺、泰诺抗多症状过敏、泰诺抗背部疼痛、泰诺抗感冒&抗咳嗽日间、泰诺抗感冒&抗咳嗽晚间、泰诺抗感冒和抗寒日间、泰诺抗感冒和抗寒夜间、泰诺抗严重感冒头堵塞、泰诺抗多症状感冒日间、泰诺抗多症状感冒夜间液体、泰诺抗严重多症状感冒、泰诺抗感冒无昏睡配方、泰诺抗感冒严重堵塞日间、泰诺抗完全感冒、夜间抗咳嗽和流感、泰诺抗流感夜间、经期泰诺、泰诺PM、泰诺抗寒堵塞&抗疼痛日间、泰诺抗寒堵塞&抗疼痛晚间、泰诺抗寒堵塞&抗疼痛严重、泰诺抗寒严重堵塞日间、泰诺超级解除、

具有咖啡因和磷酸可待因的泰诺、具有磷酸可待因的泰诺、超强Bengay霜、Ultracet、UR8880、V0498TA01A、Vicks NyQuil解除感冒和流感、Vicoprofen、Vimovo、扶他林乳胶剂、扶他林凝胶、扶他林NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH、扶他林XR、VT122、Xefo、快速Xefo、Xefocam、Xibrom、XL3、Xodol、XP20B、XP21B、XP21L、Zipsor和Zoenasa。在另一个方面，可以通过本领域已知的方法鉴定COX-2抑制剂（参见例如Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36:109-126, 其通过引用的方式在此引入本文）。在一些方面，所述COX-2抑制剂用于在患有晚期肺癌的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面，所述COX-2抑制剂与第二种治疗联合使用。在一些方面，所述第二种治疗是本发明所述的任何治疗。在一些方面，所述COX-2抑制剂与选自由以下组成的组的第二种治疗联合使用：地舒单抗（Denosumab）、Zometa ([http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633;last accessed 12/2/2012](http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633;last%20accessed%2012%2F2%2F2012))、Carbozantinib或Cabozantinib、阻断PTHLH（甲状旁腺激素样激素）或PTHrP（甲状旁腺激素相关蛋白）的抗体或肽。

[0156] 在另一个方面，用于避免和/或防止骨降解的治疗试剂包括，但不限于：

[0157] 一甲状旁腺激素（PTH）和甲状旁腺激素样激素（PTHLH）的抑制剂（包括阻断抗体）或其重组形式（特立帕肽，其相应于PTH的氨基酸7-34）。该激素通过刺激成骨细胞和增加其活性而起作用。

[0158] 一雷尼酸锶：其是口服治疗的备选方案，并且构成称为“双重作用骨试剂”（DABAs）的药物组的一部分，因为它们刺激成骨细胞的增殖和抑制破骨细胞的增殖。

[0159] 一“雌激素受体的调节剂”（SERM）是指干扰或抑制雌激素与受体结合的化合物，不论机制为何。雌激素受体的调节剂的例子包括，尤其是雌激素、孕激素、雌二醇、屈洛昔芬、雷洛昔芬、拉索昔芬、TSE-424、他莫昔芬、艾多昔芬、LY353381、LY117081、托瑞米芬、氟维司群、4-[7-(2,2-二甲基-1-氧代丙氧基)-4-甲基-2-[4-[2-(1-哌啶基)乙氧基]苯基]-2H-1-苯并吡喃-3-基]-苯基-2,2-二甲基丙酸酯、4,4'-二羟基二苯甲酮-2,4-二硝基苯基-脲和SH646。

[0160] 一降钙素：其通过降钙素受体而直接抑制破骨细胞的活性。已在破骨细胞的表面上鉴定出了降钙素受体。

[0161] 一二膦酸类：其是一组这样的药物，所述药物用于预防和治疗具有骨吸收和重吸收的疾病，例如骨质疏松症和具有骨转移的癌症，后者具有或没有高钙血症，与乳腺癌和前列腺癌相关联。可以在通过本发明的第五个方法而设计出的疗法中使用的二膦酸类的例子包括但不限于，含氮的二膦酸类（例如，帕米膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐、阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、利塞膦酸盐、伊卡膦酸盐、唑来膦酸盐或唑来膦酸等）和不含氮的二膦酸类（例如，依替膦酸盐、氯膦酸盐、替鲁膦酸盐等）。

[0162] 一“组织蛋白酶K的抑制剂”是指干扰组织蛋白酶K的半胱氨酸蛋白酶的活性的化合物。组织蛋白酶K的抑制剂的非限制性例子包括：4-氨基-嘧啶-2-甲腈的衍生物（描述在以Novartis Pharma GMBH的名义的国际专利申请WO 03/020278中），在出版物WO 03/020721（Novartis Pharma GMBH）和出版物WO 04/000843（ASTRAZENECA AB）中所描述的吡咯并嘧啶类，以及在Axys Pharmaceuticals的PCT W000/55126、Merck Frosst Canada&Co.

和Axys Pharmaceuticals的W001/49288这些出版物中所描述的抑制剂。

[0163] 一根据在本文中所使用的,“DKK-1 (Dickkopf-1) 抑制剂”是指能够降低DKK-1活性的任何化合物。DKK-1是可溶性Wnt通路拮抗剂,其主要在成年骨中表达并在具有溶骨性病变的骨髓瘤患者中上调。靶向DKK-1的试剂可以在多发性骨髓瘤患者中起到预防溶骨性骨疾病的作用。来自Novartis的BHQ880是一线的全人抗DKK-1中和抗体。临床前研究支持BHQ880促进骨形成并从而抑制肿瘤诱发的溶骨性疾病的假说 (Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract)。

[0164] 一根据在本文中所使用的,“双重MET和VEGFR2抑制剂”是指作为旨在阻断MET驱动的肿瘤逃逸的MET和VEGF通路的强大双重抑制剂的任何化合物。MET不仅在肿瘤细胞和内皮细胞中表达,而且在成骨细胞(形成骨的细胞)和破骨细胞(去除骨的细胞)中表达。HGF在所有这些细胞类型上结合MET,使得MET通路在多个自分泌和旁分泌环中起重要作用。肿瘤细胞中MET的活化似乎在转移性骨病变的建立中是重要的。同时,在成骨细胞和破骨细胞中MET通路的活化可以导致骨转移的病理学特征,包括异常的骨生长(即成骨病变)或破坏(即溶骨性病变)。因此,靶向MET通路可能是预防转移性骨病变的建立和进展的可行的测量。Cabozantinib (Exelixis, Inc), 之前称为XL184 (CAS 849217-68-1), 是旨在阻断MET驱动的肿瘤逃逸的MET和VEGF通路强大双重抑制剂。在多个临床前研究中, cabozantinib已经显示出杀死肿瘤细胞、降低转移并抑制血管生成(支持肿瘤生长所必需的新血管的形成)。另一个合适的双重抑制剂是E7050 (N-[2-氟-4-({2-[4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基氨基吡啶-4-基}氧基)苯基]-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺(2R,3R)-酒石酸盐) (CAS 928037-13-2) 或Foretinib (也称为GSK1363089, XL880, CAS 849217-64-7)。

[0165] 一根据在本文中所使用的,“RANKL的抑制剂”是指任何能够引起RANK活性降低的化合物。RANKL存在于成骨细胞、基质细胞和T淋巴细胞的膜的表面上,并且这些T淋巴细胞是唯一的其中已经证实具有分泌RANKL的能力的细胞。其主要功能是激活破骨细胞,即参与骨再吸收的细胞。RANKL抑制剂可以通过阻断RANKL与其受体(RANK)的结合,通过阻断由RANK介导的信号传导,或者通过经由阻断RANKL的转录或翻译而引起RANKL的表达下降而起作用。适合于在本发明中使用的RANKL拮抗剂或抑制剂包括但不限于:

[0166] ○能够结合RANKL并且包含RANK蛋白的细胞外结构域的全部或片段的合适RANK蛋白。可溶性RANK可以包含鼠类或人RANK多肽的信号肽和细胞外结构域,或者备选地,可以使用去除了信号肽的该蛋白质的成熟形式。

[0167] ○护骨蛋白或其具有结合RANKL的能力的变体。

[0168] ○特异于RANKL的反义分子

[0169] ○具有加工RANKL的转录物的能力的核酶

[0170] ○抗-RANKL的特异性抗体。在本文中,“抗-RANKL抗体或针对RANKL的抗体”是指所有这样的抗体,其能够特异地结合核因子 κ B的活化受体的配体(RANKL),从而抑制RANKL的一个或多个功能。可以通过使用本领域技术人员已知的任何方法来制备所述抗体。因此,通过用待被抑制的蛋白质免疫动物来制备多克隆抗体。通过使用Kohler, Milstein et al. (Nature, 1975, 256:495) 所描述的方法来制备单克隆抗体。在本发明的背景下,合适的抗体包括包含结合抗原的可变区和恒定区的完整抗体,片段“Fab”、“F(ab')₂”和“Fab'”, Fv,

scFv, 双链抗体和双特异性抗体。

[0171] ○特异性抗RANKL的纳米抗体。纳米抗体是抗体衍生的治疗性蛋白,其含有天然存在的重链抗体的独特结构及功能特性。纳米抗体技术最初是继发现了骆驼(骆驼和美洲驼)具有缺乏轻链的全功能性抗体后开发的。纳米抗体的一般结构是

[0172] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0173] 其中FR1至4是框架区1至4,CDR1至CDR3是互补决定区1至3。这些重链抗体含有单个可变结构域(VHH)和两个恒定结构域(CH2和CH3)。重要的是,克隆并分离的VHH结构域是非常稳定的多肽,其携带原始重链抗体的全部抗原结合能力。这些新近开发的具有它们独特结构及功能特性的VHH结构域形成新一代的治疗性抗体(Ablynx已命名为纳米抗体)的基础。

[0174] 在一个实施方案中,所述RANKL的抑制剂选自自由以下组成的组:RANKL的特异性抗体、RANKL的特异性纳米抗体和护骨蛋白。在一个特定的实施方案中,所述抗-RANKL抗体为单克隆抗体。在又一个更特定的实施方案中,所述抗-RANKL抗体为地舒单抗(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3):210-215, CAS号615258-40-7) (其全部内容通过引用的方式在此引入本文)。地舒单抗是结合RANKL并且阻止其活化的全人单克隆抗体(其不结合RANK受体)。地舒单抗的各个方面由美国专利号6,740,522;7,411,050;7,097,834;7,364,736 (其全部内容通过引用的方式在此引入本文)涵盖。在另一个实施方案中,RANKL的抑制剂为抗体、抗体片段或融合构建体,其与地舒单抗结合相同的表位。

[0175] 在一个优选的实施方案中,所述抗-RANKL纳米抗体为如W02008142164 (其内容通过引用的方式在此引入本申请)中所述的任何纳米抗体。在又一个更优选的实施方案中,所述抗-RANKL抗体为ALX-0141 (Ablynx)。ALX-0141已被设计为抑制与绝经后骨质疏松症、类风湿关节炎、癌症和某些药物相关的骨质流失,并恢复健康骨代谢的平衡。

[0176] 在一个优选的实施方案中,所述防止骨降解的试剂选自自由以下组成的组:二磷酸类、RANKL的抑制剂、PTH和PTHrP抑制剂或PRG类似物、雷尼酸锶、DKK-1抑制剂、双重MET和VEGFR2抑制剂、镭-223、降钙素和组织蛋白酶K的抑制剂。在一个更优选的实施方案中,所述防止骨降解的试剂为二磷酸类。在又一个更优选的实施方案中,所述二磷酸类为唑来膦酸。

[0177] 在一个实施方案中,施用CCR5拮抗剂以预防或抑制原发肺癌肿瘤转移至骨。在一个实施方案中,所述CCR5拮抗剂为大分子。在另一个实施方案中,所述CCR5拮抗剂为小分子。在一些实施方案中,所述CCR5拮抗剂为马拉韦罗 (Maraviroc) (Velasco-Velázquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850.)。在一些实施方案中,所述CCR5拮抗剂为Vicriviroc (Velasco-Velázquez, M. et al. 2012. CCR5 Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. Cancer Research. 72:3839-3850.)。在一些方面,所述CCR5拮抗剂为Aplaviroc (Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplaviroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. Retrovirology 2 (Suppl. 1):S13)。在一些方面,所述CCR5拮抗剂为螺哌啶CCR5拮抗剂 (Rotstein D.M. et al. 2009. Spiropiperidine CCR5 antagonists. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 19 (18):5401-5406.)。在一些实施方案中,所述CCR5拮抗剂为INCB009471 (Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1 entry inhibitors: an

overview.Curr.Opin.HIV AIDS.4(2):82-7)。

[0178] 在一个优选的实施方案中,所述双重MET和VEGFR2抑制剂选自Cabozantinib、Foretinib和E7050组成的组。

[0179] 在一个优选的实施方案中,所述镭223疗法是alpharadin。

[0180] 备选地,可以进行联合治疗,其中将超过一种上面提及的试剂相联合以治疗和/或预防转移或者可以将所述试剂与其他补充物(例如钙或维生素D)或与激素治疗组合。

[0181] 在具有骨转移的肺癌患者中设计本发明的个性化疗法的方法

[0182] 患有已经转移至骨的肺癌并且其中有增加的c-MAF水平的患者可以特别地得益于旨在防止由增加的破骨细胞活性造成的骨降解的疗法。

[0183] 因此,在另一个方面,本发明涉及用于为患有具有骨转移的肺癌的受试者设计个性化疗法的体外方法(在下文中,本发明的第三个方法),其包括

[0184] (i) 定量在来自所述受试者的骨的转移性肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平,和

[0185] (ii) 将在前面所获得的表达水平与在对照样品中所述基因的表达水平进行比较,

[0186] 其中如果所述表达水平相对于在对照样品中所述基因的表达水平而言增加,那么所述受试者容易接受旨在防止骨降解的疗法。

[0187] 其中如果所述表达水平相对于所述参照数值而言没有增加,那么所述受试者不容易接受旨在预防和/或治疗骨转移的疗法。

[0188] 已经针对本发明的第一个方法详细描述了术语和表述“受试者”、“肺癌”、“肿瘤组织样品”、“转移”、“表达水平的确定”、“c-MAF基因”、“增加的表达水平”和“对照样品”,并且它们同样可应用于本发明的第二个和第三个方法。

[0189] 在一个优选的实施方案中,所述骨转移为溶骨性转移。

[0190] 本发明的第三个方法包括,在第一个步骤中,定量患有肺癌的受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因表达水平。在本发明的第三个方法的情况下,所述样品为骨转移的组织样品。

[0191] 在一个优选的实施方案中,本发明的第三个方法包括仅定量c-MAF基因的表达水平作为唯一标志物,即该方法不涉及任何另外的标志物的表达水平的确定。

[0192] 在第二个步骤中,将在受试者的肿瘤样品中获得的c-MAF基因表达水平与在对照样品中所述基因的表达水平进行比较。必须将c-MAF基因的表达水平的确定与对照样品或参考样品的值相关联。取决于待分析的肿瘤的类型,对照样品确切性质可以变化。因此,在涉及本发明的第三个方法的情况下,那么参考样品为还未转移的肺癌受试者的肿瘤组织样品,或者其相应于在还未转移的肺癌受试者的活组织检查样品中在肿瘤组织集合中所测量的c-MAF基因表达水平的中位值。

[0193] 一旦测量了样品中c-MAF基因的表达水平并将其与对照样品进行了比较,如果所述基因的表达水平相对于在对照样品中其的表达水平而言增加了,那么可以得出所述受试者容易接受旨在避免或防止骨降解的疗法的结论。

[0194] 根据在本文中所使用的,“用于避免或防止骨降解的试剂”是指任何这样的分子,其能够治疗或终止骨降解,要么通过刺激成骨细胞的增殖要么通过抑制破骨细胞的增殖而实现。

[0195] 用于避免和/或防止骨降解和/或骨转移的试剂的示例性的例子包括,但不限于:

[0196] 一甲状旁腺激素(PTH)或其重组形式(特立帕肽,其相应于PTH的氨基酸1-34)。该激素通过刺激成骨细胞和增加其活性而起作用。

[0197] 一雷尼酸锶:其是口服治疗的备选方案,并且构成称为“双重作用骨试剂”(DABAs)的药物组的一部分,因为它们刺激成骨细胞的增殖和抑制破骨细胞的增殖。

[0198] 一“雌激素受体的调节剂”(SERM)是指干扰或抑制雌激素与受体结合的化合物,不论机制为何。雌激素受体的调节剂的例子包括,尤其是雌激素、孕激素、雌二醇、屈洛昔芬、雷洛昔芬、拉索昔芬、TSE-424、他莫昔芬、艾多昔芬、LY353381、LY117081、托瑞米芬、氟维司群、4-[7-(2,2-二甲基-1-氧代丙氧基)-4-甲基-2-[4-[2-(1-哌啶基)乙氧基]苯基]-2H-1-苯并吡喃-3-基]-苯基-2,2-二甲基丙酸酯、4,4'-二羟基二苯甲酮-2,4-二硝基苯基-胺和SH646。

[0199] 一降钙素:其通过降钙素受体而直接抑制破骨细胞的活性。已在破骨细胞的表面上鉴定出了降钙素受体。

[0200] 一二磷酸类:其是一组这样的药物,所述药物用于预防和治疗具有骨吸收和再吸收的疾病,例如骨质疏松症和具有骨转移的癌症,后者具有或没有高钙血症,与乳腺癌和前列腺癌相关联。可以在通过本发明的第三个方法而设计出的疗法中使用的二磷酸类的例子包括但不限于,含氮的二磷酸类(例如,帕米膦酸盐、奈立膦酸盐、奥帕膦酸盐、阿仑膦酸盐、伊班膦酸盐、利塞膦酸盐、伊卡膦酸盐、唑来膦酸盐或唑来膦酸等)和不含氮的二磷酸类(例如,依替膦酸盐、氯膦酸盐、替鲁膦酸盐等)。

[0201] 一“组织蛋白酶K的抑制剂”是指干扰组织蛋白酶K的半胱氨酸蛋白酶活性的化合物。组织蛋白酶K的抑制剂的非限制性例子包括:4-氨基-嘧啶-2-甲腈的衍生物(描述在以Novartis Pharma GMBH的名义的国际专利申请WO 03/020278中),在出版物WO 03/020721(Novartis Pharma GMBH)和出版物WO 04/000843(ASTRAZENECA AB)中所描述的吡咯并嘧啶类,以及在Axys Pharmaceuticals的PCT W000/55126、Merck Frosst Canada&Co.和Axys Pharmaceuticals的W001/49288这些出版物中所描述的抑制剂。

[0202] 一根据在本文中所使用的,“DKK-1(Dickkopf-1)抑制剂”是指能够降低DKK-1活性的任何化合物。DKK-1是可溶性Wnt通路拮抗剂,其主要在成年骨中表达并在具有溶骨性病变的骨髓瘤患者中上调。靶向DKK-1的试剂可能在多发性骨髓瘤患者中起到预防溶骨性骨疾病的作用。来自Novartis的BHQ880是一种一线的全人抗DKK-1中和抗体。临床前研究支持BHQ880促进骨形成并从而抑制肿瘤诱发的溶骨性疾病的假说(Ettenberg S.et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract)。

[0203] 一根据在本文中所使用的,“双重MET和VEGFR2抑制剂”是指作为旨在阻断MET驱动的肿瘤逃逸的MET和VEGF通路的强大双重抑制剂的任何化合物。MET不仅在肿瘤细胞和内皮细胞中表达,而且在成骨细胞(形成骨的细胞)和破骨细胞(去除骨的细胞)中表达。HGF结合所有这些细胞类型上的MET,使MET通路在多个自分泌和旁分泌循环中起重要作用。肿瘤细胞中MET的活化似乎在转移性骨病变的建立中是重要的。同时,在成骨细胞和破骨细胞中MET通路的活化可以导致骨转移的病理学特征,包括异常的骨生长(即成骨病变)或破坏(即溶骨性病变)。因此,靶向MET通路可能是预防转移性骨病变的建立和进展的可行的测量。

Cabozantinib (Exelixis, Inc), 之前称为XL184 (CAS 849217-68-1), 是旨在阻断MET驱动的肿瘤逃逸的MET和VEGF通路的有力双重抑制剂。在多个临床前研究中, cabozantinib已经显示出杀死肿瘤细胞、降低转移并抑制血管生成(支持肿瘤生长所必需的新血管的形成)。另一个合适的双重抑制剂是E7050 (N-[2-氟-4-({2-[4-(4-甲基哌嗪-1-基)哌啶-1-基]羰基氨基吡啶-4-基}氧基)苯基]-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二甲酰胺(2R,3R)-酒石酸盐)(CAS928037-13-2)或Foretinib(也称为GSK1363089, XL880, CAS849217-64-7)。

[0204] 根据在本文中所使用的, “RANKL的抑制剂”是指任何能够引起RANK的活性降低的化合物。RANKL存在于成骨细胞、基质细胞和T淋巴细胞的膜的表面上, 并且这些T淋巴细胞是唯一的其中已经证实具有分泌RANKL的能力的细胞。其主要功能是激活破骨细胞, 这是参与骨吸收的细胞。RANKL的抑制剂可以通过阻断RANKL与其受体(RANK)的结合, 通过阻断由RANK介导的信号传导, 或者通过经由阻断RANKL的转录或翻译而引起RANKL的表达下降而起作用。适合于在本发明中使用的RANKL的拮抗剂或抑制剂包括但不限于:

[0205] ○能够结合RANKL并且包含RANK蛋白的细胞外结构域的全部或片段的合适的RANK蛋白。可溶性RANK可以包含鼠类或人RANK多肽的信号肽和细胞外结构域, 或者备选地, 可以使用去除了信号肽的该蛋白质的成熟形式。

[0206] ○护骨蛋白或其具有结合RANKL的能力的变体。

[0207] ○特异于RANKL的反义分子

[0208] ○具有加工RANKL的转录物的能力的核酶

[0209] ○抗-RANKL的特异性抗体。在本文中, “抗-RANKL抗体或针对RANKL的抗体”是指所有这样的抗体, 其能够特异地结合核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL), 从而抑制RANKL的一个或多个功能。可以通过使用本领域技术人员已知的任何方法来制备所述抗体。因此, 通过用希望被抑制的蛋白质免疫动物来制备多克隆抗体。通过使用Kohler, Milstein et al. (Nature, 1975, 256:495)所描述的方法来制备单克隆抗体。在本发明的背景下, 合适的抗体包括包含结合抗原的可变区和恒定区的完整抗体, 片段“Fab”、“F(ab')₂”和“Fab'”, Fv, scFv, 双链抗体和双特异性抗体。

[0210] ○特异性抗RANKL的纳米抗体。纳米抗体是抗体来源的治疗性蛋白, 其含有天然存在的重链抗体的独特结构及功能特性。纳米抗体技术最初是继发现了骆驼(骆驼和美洲驼)具有缺乏轻链的全功能抗体后开发的。纳米抗体的一般结构是

[0211] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4其中FR1至4是框架区1至4, CDR1至CDR3是互补决定区1至3。这些重链抗体含有单个可变结构域(VHH)和两个恒定结构域(CH2和CH3)。重要的是, 克隆并分离的VHH结构域是非常稳定的多肽, 其携带原始重链抗体的全部抗原结合能力。这些新发现的具有它们独特结构及功能特性的VHH结构域形成新一代的治疗性抗体(Ablynx已命名为纳米抗体)的基础。

[0212] 在一个实施方案中, 所述RANKL的抑制剂选自以下组成的组: RANKL的特异性抗体、RANKL的特异性纳米抗体和护骨蛋白。在一个特定的实施方案中, 所述抗-RANKL抗体为单克隆抗体。在又一个更特定的实施方案中, 所述抗-RANKL抗体为地舒单抗(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1(3):210-215, CAS号615258-40-7)。在本发明的背景下, 地舒单抗是结合RANKL并且阻止其活化的单克隆抗体(其不结合RANK受体)。地舒单抗的各个方面由美国专利号6,740,522;7,411,050;7,097,834;7,364,736(其全部内容通过引用的方式在

此引入本文)涵盖。在另一个实施方案中,RANKL的抑制剂为抗体、抗体片段或融合构建体,其与地舒单抗结合相同的表位。

[0213] 在一个优选的实施方案中,所述抗-RANKL纳米抗体为如W02008142164(其内容通过引用的方式在此引入本申请)中所述的任何纳米抗体。在又一个更优选的实施方案中,所述抗-RANKL抗体为ALX-0141(Ablynx)。ALX-0141已被设计为抑制与绝经后骨质疏松症、类风湿关节炎、癌症和某些药物相关的骨质流失,并恢复健康骨骼代谢的平衡。

[0214] 在一个优选的实施方案中,所述防止骨降解的试剂选自由以下组成的组:二磷酸类、RANKL的抑制剂、PTH和PTHrP抑制剂或PRG类似物、雷尼酸锶、DKK-1抑制剂、双重MET和VEGFR2抑制剂、雌激素受体调节剂、镭-223、降钙素和组织蛋白酶K的抑制剂。在一个更优选的实施方案中,所述防止骨降解的试剂为二磷酸类。在又一个更优选的的实施方案中,所述二磷酸类为唑来膦酸。

[0215] 在一个实施方案中,施用CCR5拮抗剂以预防或抑制原发肺癌肿瘤转移至骨。在一个实施方案中,所述CCR5拮抗剂为大分子。在另一个实施方案中,所述CCR5拮抗剂为小分子。在一些实施方案中,所述CCR5拮抗剂为马拉韦罗(Maraviroc)(Velasco-Velázquez,M.et al.2012.CCR5Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells.Cancer Research.72:3839-3850.)。在一些实施方案中,所述CCR5拮抗剂为Vicriviroc(Velasco-Velázquez,M.et al.2012.CCR5Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells.Cancer Research.72:3839-3850.)。在一些方面,所述CCR5拮抗剂为Aplaviroc(Demarest J.F.et al.2005.Update on Aplaviroc:An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5.Retrovirology 2(Suppl.1):S13)。在一些方面,所述CCR5拮抗剂为螺哌啶CCR5拮抗剂(Rotstein D.M.et al.2009.Spiropiperidine CCR5antagonists.Bioorganic& Medicinal Chemistry Letters.19(18):5401-5406.)。在一些实施方案中,所述CCR5拮抗剂为INCB009471(Kuritzkes,D.R.2009.HIV-1entry inhibitors:an overview.Curr.Opin.HIV AIDS.4(2):82-7)。

[0216] 在一个优选的实施方案中,所述双重MET和VEGFR2抑制剂选自由Cabozantinib、Foretinib和E7050组成的组。

[0217] 在另一个方面,所述治疗是mTor抑制剂。在一些方面,所述mTor抑制剂是双功能mTor/PI3激酶抑制剂。在一些方面,所述mTor抑制剂用于预防或抑制转移。在一些方面,所述mTor抑制剂选自以下组成的组:ABI009(西罗莫司)、雷帕霉素(西罗莫司)、Abraxane(紫杉醇)、Absorb(依维莫司)、Afinitor(依维莫司)、具有格列维克的Afinitor、AS703026(pimasertib)、Axxess(umirolimus)、AZD2014、BEZ235、Biofreedom(umirolimus)、BioMatrix(umirolimus)、BioMatrix flex(umirolimus)、CC115、CC223、康宝生物工程西罗莫司洗脱支架ORBUSNEICH(西罗莫司)、Curaxin CBLC102(米帕林)、DE109(西罗莫司)、DS3078、Endeavor DES(佐他莫司)、Endeavor Resolute(佐他莫司)、Femara(来曲唑)、Hocena(antroquinonol)、INK128、Inspiron(西罗莫司)、IPI504(retaspimycin hydrochloride)、KRN951(tivozanib)、ME344、MGA031(teplizumab)、MiStent SES(西罗莫司)、MKC1、Nobori(umirolimus)、OSI027、OVI123(虫草素)、Palomid 529、PF04691502、Promus Element(依维莫司)、PWT33597、Rapamune(西罗莫司)、Resolute DES(佐他莫司)、RG7422、SAR245409、SF1126、SGN75(vorsetuzumab mafodotin)、Synergy(依维莫司)、

Taltorvic (ridaforolimus)、Tarceva (厄洛替尼)、Torisel (坦罗莫司)、Xience Prime (依维莫司)、Xience V (依维莫司)、Zomaxx (佐他莫司)、Zortress (依维莫司)、佐他莫司洗脱外围支架MEDTRONIC (佐他莫司)、AP23841、AP24170、ARmTOR26、BN107、BN108、Canstatin GENZYME (血管能抑素)、CU906、EC0371、EC0565、KI1004、LOR220、NV128、雷帕霉素 ONCOIMMUNE (西罗莫司)、SB2602、西罗莫司PNP SAMYANG BIOPHARMACEUTICALS (西罗莫司)、TOP216、VLI27、VS5584、WYE125132、XL388、Advacan (依维莫司)、AZD8055、Cypher Select+ 西罗莫司洗脱冠脉支架 (西罗莫司)、Cypher 西罗莫司洗脱冠脉支架 (西罗莫司)、涂覆药物的球囊 (西罗莫司)、E-Magic+ (西罗莫司)、Emtor (西罗莫司)、Esprit (依维莫司)、Evertor (依维莫司)、HBF0079、LCP-Siro (西罗莫司)、Limus CLARIS (西罗莫司)、mTOR抑制剂 CELLZOME、Nevo 西罗莫司洗脱冠脉支架 (西罗莫司)、nPT-mTOR、Rapacan (西罗莫司)、Renacept (西罗莫司)、ReZolve (西罗莫司)、Rocas (西罗莫司)、SF1126、Sirolim (西罗莫司)、西罗莫司NORTH CHINA (西罗莫司)、西罗莫司RANBAXY (西罗莫司)、西罗莫司WATSON (西罗莫司)、Siropam (西罗莫司)、Sirova (西罗莫司)、Supralimus (西罗莫司)、Supralimus-Core (西罗莫司)、他克莫司WATSON (他克莫司)、TAF A93、坦罗莫司ACCORD (坦罗莫司)、坦罗莫司SANDOZ (坦罗莫司)、TOP216、Xience Prime (依维莫司)、Xience V (依维莫司)。在一个特定方面,所述mTor抑制剂是Afinitor (依维莫司) (http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&No_vald=4029462064338207963;最后一次登录11/28/2012)。在另一个方面,可以通过本领域已知的方法鉴定mTor抑制剂。(参见例如Zhou, H. et al. Updates of mTor inhibitors. 2010. Anticancer Agents Med. Chem. 10 (7): 571-81, 其通过引用的方式在此引入本文)。在一些方面,所述mTor抑制剂被用于在患有晚期肺癌的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面,所述mTor抑制剂与第二种治疗联合使用。在一些方面,所述第二种治疗是本发明所述的任何治疗。

[0218] 在另一个方面,所述治疗是Src激酶抑制剂。在一些方面,所述Src抑制剂用于预防或抑制转移。在一些方面,所述Src激酶抑制剂选自以下组: AZD0530 (saracatinib)、Bosulif (bosutinib)、ENMD981693、KD020、KX01、Sprycel (dasatinib)、Yervoy (ipilimumab)、AP23464、AP23485、AP23588、AZD0424、c-Src激酶抑制剂KISSEI、CU201、KX2361、SKS927、SRN004、SUNK706、TG100435、TG100948、AP23451、Dasatinib HETERO (dasatinib)、Dasatinib VALEANT (dasatinib)、Fontrax (dasatinib)、Src激酶抑制剂 KINEX、VX680 (tozasertib 乳酸盐)、XL228 和 SUNK706。在一些实施方案中,所述Src激酶抑制剂是dasatinib。在另一个方面,可以通过本领域已知的方法鉴定Src激酶抑制剂(参见例如Sen, B. and Johnson, F. M. Regulation of Src Family Kinases in Human Cancers. 2011. J. Signal Transduction. 2011: 14 页, 其通过引用的方式在此引入本文)。在一些方面,所述Src激酶抑制剂被用于在SRC反应性标签(SRS)阳性的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面,所述患者是SRS+和ER-。(参见例如Zhang, CH. -F, et al. Latent Bone Metastasis in Breast Cancer Tied to Src-Dependent survival signals. 2009. Cancer Cell. 16: 67-78, 通过引用并入本文中)。在一些方面,所述Src激酶抑制剂被用于在患有晚期肺癌的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面,所述Src激酶抑制剂与第二种治疗联合使用。在一些方面,所述第二种治疗是本发明所述的任何治疗。

[0219] 在另一个方面,所述治疗是COX-2抑制剂。在一些方面,所述COX-2抑制剂被用于预

防或抑制转移。在一些方面,所述COX-2抑制剂选自以下组:ABT963、对乙酰氨基酚ER JOHNSON(对乙酰氨基酚)、Acular X(酮咯酸氨丁三醇)、BAY1019036(阿司匹林)、BAY987111(苯海拉明,萘普生钠)、BAY11902(吡罗昔康)、BCIBUCH001(布洛芬)、Capoxigem(apricoxib)、CS502,CS670(培比洛芬)、双氯芬酸HPBCD(双氯芬酸)、Diractin(酮洛芬)、GW406381,HCT1026(硝基氟比洛芬)、Hyanalges-D(双氯芬酸)、HydrocoDex(对乙酰氨基酚,右美沙芬,氢可酮)、布洛芬钠PFIZER(布洛芬钠)、具有对乙酰氨基酚的布洛芬PFIZER(对乙酰氨基酚,布洛芬)、Impracor(酮洛芬)、IP880(双氯芬酸)、IP940(吡罗美辛)、ISV205(双氯芬酸钠)、JNS013(对乙酰氨基酚,盐酸曲马多)、酮洛芬TDS(酮洛芬)、LTNS001(萘普生 etemesil)、美沙拉嗪SALIX(美沙拉嗪)、美沙拉嗪SOFAR(美沙拉嗪)、美沙拉嗪(美沙拉嗪)、ML3000(licofelone)、MRX7EAT(依托度酸)、萘普生IROKO(萘普生)、NCX4016(硝基阿司匹林)、NCX701(硝基对乙酰氨基酚)、Nuprin SCOLR(布洛芬)、OMS103HP(盐酸阿米替林,酮洛芬,盐酸羟甲唑啉)、Oralease(双氯芬酸)、OxycoDex(右美沙芬,羟考酮)、P54,PercoDex(对乙酰氨基酚,右美沙芬,羟考酮)、PL3100(萘普生,磷脂酰胆碱)、PSD508,R-酮洛芬(酮洛芬)、Remura(溴芬酸钠)、ROX828(酮咯酸氨丁三醇)、RP19583(酮洛芬赖氨酸)、RQ00317076,SDX101(R-依托度酸)、TDS943(双氯芬酸钠)、TDT070(酮洛芬)、TPR100,TQ1011(酮洛芬)、TT063(S-氟比洛芬)、UR8880(cimicoxib)、V0498TA01A(布洛芬)、VT122(依托度酸,普萘洛尔)、XP20B(对乙酰氨基酚,右旋丙氧吩)、XP21B(双氯芬酸钾)、XP21L(双氯芬酸钾)、Zoenasa(乙酰半胱氨酸,美沙拉嗪)、Acephen、Actifed+、Actifed-P、Acular、Acular LS、Acular PF、Acular X、Acuvail、雅维、雅维抗窦抗过敏、雅维抗感冒和抗窦、雅维解除堵塞、雅维PM、雅维PM胶囊、空气撒隆巴斯、Airtal、无酒精NyQuil解除感冒&流感、Aleve、Aleve ABDI IBRAHIM、Aleve-D、Alka-Seltzer、Alka-Seltzer BAYER、超强Alka-Seltzer、Alka-Seltzer柠檬-酸橙、原始Alka-Seltzer、Alka-Seltzer+、Alka-Seltzer+抗感冒和抗咳嗽、Alka-Seltzer+抗感冒和抗咳嗽配方、Alka-Seltzer+日夜抗感冒配方、Alka-Seltzer+白天无昏睡抗感冒配方、Alka-Seltzer+抗流感配方、Alka-Seltzer+夜晚抗感冒配方、Alka-Seltzer+抗窦配方、Alka-Seltzer+闪闪发光的原始抗感冒配方、Alka-Seltzer PM、Alka-Seltzer唤醒、Anacin、Anaprox、Anaprox MINERVA、Ansaid、蜂毒素、Apranax、Apranax abdi、Arcoxia、抗关节炎配方Bengay、Arthrotec、Asacol、Asacol HD、Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL、Asacol ORIFARM、阿司匹林BAYER、复合阿司匹林、阿司匹林Migran、AZD3582、Azulfidine、Baralgan M、BAY1019036、BAY987111、BAY11902、BCIBUCH001、苯海拉明抗过敏、日夜苯海拉明、Benylin 4抗流感、Benylin抗感冒和抗流感、Benylin日夜抗感冒和抗流感、Benylin日夜抗感冒和抗窦日夜、Benylin抗感冒和抗窦+、Benylin日夜解除感冒和流感、Benylin1All-In-One、Brexin、Brexin ANGELINI、Bromday、百服宁、Buscopan+、Caldolor、Calmatel、Cambia、Canasa、Capoxigem、Cataflam、西乐葆、西乐葆ORIFARM、儿童雅维抗窦抗过敏、儿童泰诺、儿童泰诺抗咳嗽和抗流涕、儿童泰诺+抗感冒、儿童泰诺+抗感冒和抗咳嗽、儿童泰诺+抗感冒和抗流涕、儿童泰诺+抗流感、儿童泰诺+抗感冒&抗过敏、儿童泰诺+抗咳嗽&抗流涕、儿童泰诺+抗咳嗽&抗咽喉痛、儿童泰诺+抗多症状感冒、Clinoril、Codral抗感冒和流感、Codral日夜日片、Codral日夜夜片、晚间Codral、Colazal、Combunox、康泰克抗感冒+抗流感、康泰克抗感冒+抗流感无昏睡、Coricidin D、Coricidin HBP抗感冒和抗流感、Coricidin HBP日夜抗多症状感冒、Coricidin HBP抗最强流感、Coricidin HBP

晚间抗多症状感冒、Coricidin II超强抗感冒和抗流感、CS502、CS670、Daypro、Daypro Alta、DDS06C、Demazin抗感冒和抗流感、Demazin抗咳嗽、抗感冒和抗流感、Demazin日/夜抗感冒和抗流感、Demazin PE抗感冒和抗流感、Demazin PE日/夜抗感冒和抗流感、双氯芬酸 HPBCD、Dimetapp日解除、Dimetapp抗多症状感冒和流感、Dimetapp夜解除、Dimetapp解除疼痛和发烧、Dimetapp PE抗寒抗疼痛、Dimetapp PE抗寒抗疼痛+抗过敏、Dipentum、Diractin、Disprin抗感冒'n'抗发烧、Disprin Extra、Disprin Forte、Disprin+、Dristan抗感冒、初级Dristan、Drixoral+、Duexis、Dynastat、Efferalgan、Efferalgan+维生素C、Efferalgan维生素C、Elixsure IB、Excedrin背部和身体、Excedrin抗偏头痛、Excedrin PM、Excedrin抗寒抗头痛、Excedrin抗紧张性头痛、Falcol、Fansamac、Feldene、FeverAll、Fiorinal、具有可待因的Fiorinal、Flanax、Flector Patch、Flucam、Fortagesic、Gerbin、Giazio、Gladio、Goody's抗背部和身体疼痛、Goody's酷橙、Goody's超强、Goody's PM、无油脂的Bengay、GW406381、HCT1026、He Xing Yi、Hyanalgesic-D、HydrocoDex、布洛芬钠 PFIZER、具有对乙酰氨基酚的布洛芬PFIZER、Icy Hot SANOFI AVENTIS、Impracor、Indocin、吡哌美辛APP PHARMA、吡哌美辛MYLAN、婴幼儿泰诺、IP880、IP940、Iremod、ISV205、JNS013、小泰诺、Junifen、初级强度雅维、初级强度美林、酮洛芬TDS、Lemsip Max、Lemsip Max All in One、夜Lemsip Max All、Lemsip Max抗感冒和抗流感、Lialda、李施德林漱口水、劳埃德霜、Lodine、Lorfit P、Loxonin、LTNS001、Mersyndol、美沙拉嗪SALIX、美沙拉嗪SOFAR、美沙拉嗪、Mesasal GLAXO、Mesasal SANOFI、Mesulid、Metsal Heat Rub、Midol Complete、Midol扩展解除、Midol液体凝胶、Midol PM、Midol青少年配方、Migranin包衣片、ML3000、Mobic、Mohrus、美林、美林抗感冒和抗寒抗疼痛、美林PM、Movalis ASPEN、MRX7EAT、Nalfon、Nalfon PEDINOL、Naprelan、萘普生、萘普生RPG生命科学、萘普生IROKO、NCX4016、NCX701、NeoProfen LUNDBECK、Nevanac、Nexcede、Niflan、Norgesic MEDICIS、安乃近、Nuprin SCOLR、Nurofen、Nurofen抗感冒和抗流感、Nurofen最强抗偏头痛、Nurofen+、Nuromol、具有维生素C的NyQuil、Ocufen、OMS103HP、Oralease、Orudis ABBOTT JAPAN、Oruvail、Osteluc、OxycoDex、P54、必理通、必理通Actifast、Paradine、Paramax、Parfenac、Pedeo、Pennsaid、颇得斯安、颇得斯安ORIFARM、Peon、Percodan、Percodan-Demi、PercoDex、Percogesic、Perfalgan、PL2200、PL3100、Ponstel、Prexige、Prolensa、PSD508、R-酮洛芬、Rantudil、Relafen、Remura、Robaxisal、Rotec、Rowasa、ROX828、RP19583、RQ00317076、Rubor、Salofalk、Salonpas、Saridon、SDX101、Seltouch、sfRowasa、Shinbaro、Sinumax、Sinutab、Sinutab、sinus、Spalt、Sprix、Strefen、Sudafed抗感冒和抗咳嗽、Sudafed抗头感冒和抗寒、Sudafed PE抗感冒+抗咳嗽、Sudafed PE抗压+抗疼痛、Sudafed PE、严重感冒、Sudafed PE抗寒日+夜解除日片、Sudafed PE抗寒日+夜解除夜片、Sudafed PE抗寒+抗炎疼痛解除、Sudafed高级抗寒、Surgam、Synalgos-DC、Synflex、Tavist抗过敏/抗寒/抗头痛、TDS943、TDT070、Theraflu抗感冒和抗咽喉痛、Theraflu日间抗严重感冒和咳嗽、Theraflu日间变暖解除、Theraflu变暖解除片日间抗多症状感冒、Theraflu变暖解除抗感冒和抗胸闷、Thomapyrin、Thomapyrin C、Thomapyrin Effervescent、Thomapyrin Medium、Tilcotil、Tispol、Tolectin、Toradol、TPR100、TQ1011、Trauma-Salbe、Trauma-Salbe Kwizda、Treo、Treximet、Trovex、TT063、泰诺、泰诺抗多症状过敏、泰诺抗背部疼痛、泰诺抗感冒&抗咳嗽日间、泰诺抗感冒&抗咳嗽晚间、泰诺抗感冒和抗寒日间、泰诺抗感冒和抗寒夜

间、泰诺抗严重感冒头堵塞、泰诺抗多症状感冒日间、泰诺抗多症状感冒夜间液体、泰诺抗严重多症状感冒、泰诺抗感冒无昏睡配方、泰诺抗感冒严重堵塞日间、泰诺抗完全感冒、夜间抗咳嗽和流感、泰诺抗流感夜间、经期泰诺、泰诺PM、泰诺抗窦堵塞&抗疼痛日间、泰诺抗窦堵塞&抗疼痛晚间、泰诺抗窦堵塞&抗疼痛严重、泰诺抗窦严重堵塞日间、泰诺超级解除、具有咖啡因和磷酸可待因的泰诺、具有磷酸可待因的泰诺、超强Bengay霜、Ultracet、UR8880、V0498TA01A、Vicks NyQuil解除感冒和流感、Vicoprofen、Vimovo、扶他林乳胶剂、扶他林凝胶、扶他林NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH、扶他林XR、VT122、Xefo、快速Xefo、Xefocam、Xibrom、XL3、Xodol、XP20B、XP21B、XP21L、Zipsor和Zoenasa。在另一个方面，可以通过本领域已知的方法鉴定COX-2抑制剂（参见例如Dannhardt, G. and Kiefer, W. Cyclooxygenase inhibitors-current status and future prospects. 2001. Eur. J. Med. Chem. 36:109-126, 其通过引用的方式在此引入本文）。在一些方面，所述COX-2抑制剂被用于在患有晚期肺癌的患者中治疗或预防或抑制转移。在一些方面，所述COX-2抑制剂与第二种治疗联合使用。在一些方面，所述第二种治疗是本发明所述的任何治疗。在一些方面，所述COX-2抑制剂与选自由以下组成的组的第二种治疗联合使用：地舒单抗（Denosumab）、Zometa (http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633; last accessed 12/2/2012)、Carbozantinib或Cabozantinib、阻断PTHLH（甲状旁腺激素样激素）或PTHrP（甲状旁腺激素相关蛋白）的抗体或肽。

[0220] 在一个优选的实施方案中，所述镭223疗法是Alpharadin (aka, Xofigo)（镭-223二氯化物）。Alpharadin使用来自镭-223衰变的 α 辐射杀死癌细胞。由于其作为钙模拟物的特征，镭-223天然地自我靶向骨转移。（当与基于 β 或 γ 辐射的当前放射疗法相比） α 辐射具有非常短的2-10个细胞的范围，因此导致对周围健康组织的损伤小（特别是骨髓）。因具有与钙相似的性质，镭-223被吸引到其中钙用于在身体里建立骨的地方，包括更快的、异常骨生长的位点——例如在患有晚期、去势抗性前列腺癌的男子的骨转移中所见到的。注射后，镭-223在血流中被携带至异常骨生长的位点。癌症在身体内开始的位置已知是原发肿瘤。其中一些细胞可能脱离并在血流中被携带至身体的另一个部分。然后，癌细胞可以定居在身体的该部分并形成新的肿瘤。如果发生这种情况，就被称为继发性癌症或转移。大多数患有晚期前列腺癌的患者在他们的骨中遭受疾病的最大负担。镭-223的目标是选择性靶向该继发性癌症。在骨中没有吸收的任何镭-223被迅速排到肠道并排出体外。在一个优选的实施方案中，所述防止骨降解的试剂为二膦酸类。在又一个优选的实施方案中，所述二膦酸类为唑来膦酸。

[0221] 备选地，可以进行联合治疗，其中将超过一种上面提及的试剂相联合以治疗和/或预防转移，或者可以将所述试剂与其他补充物（例如钙或维生素D）或与激素治疗组合。

[0222] 基于c-MAF基因扩增的检测而对肺癌中转移进行诊断或预后的方法

[0223] 在一个方面，本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中对转移进行诊断（在下文中，本发明的第四个诊断方法）和/或用于在患有肺癌的受试者中对形成转移的倾向进行预后的体外方法，其包括确定在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因是否出现扩增，其中如果相对于对照样品而言存在所述基因的扩增，那么所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向。

[0224] 在一个特定的实施方案中,在本发明的第四个方法中诊断的肺癌为NSCLC。

[0225] 已经在本发明的第一个方法的背景下详细描述了术语“c-MAF基因”、“转移”、“肿瘤组织样品”、“肺癌”、“在患有肺癌的受试者中转移的诊断”、“在患有肺癌的受试者中对形成转移的倾向进行预后”、“受试者”、“患者”、“具有转移的阳性诊断的受试者”、“具有更大的形成转移的倾向的受试者”,并且同样可应用于本发明的第四个方法。

[0226] 在一个特定的实施方案中,c-MAF基因的扩增程度的确定可以通过确定包含所述基因的染色体区域的扩增来确定。优选地,其扩增是存在c-MAF基因扩增的指示的染色体区域为基因座16q22-q24,其包括c-MAF基因。基因座16q22-q24位于染色体16上,在所述染色体的长臂中,在带22和带24之间的范围内。该区域在NCBI数据库中相应于重叠群(contig) NT_010498.15和NT_010542.15。在另一个优选的实施方案中,c-MAF基因的扩增程度的确定可以通过使用特异于所述基因的探针来测定。

[0227] 本发明的第四个诊断/预后方法包括,在第一个步骤中,确定在受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因是否出现扩增。为此,将在肿瘤样品中c-MAF基因的扩增相对于对照样品进行比较。

[0228] 根据在本文中所理解的,术语“基因的扩增”是指这样的过程,通过该过程,在个体细胞或细胞系中形成基因或基因片段的各个拷贝。基因的拷贝不必位于相同的染色体上。复制出的区域经常称为“扩增子”。通常,所产生的mRNA的量,即基因表达水平,也与特定基因的拷贝数成比例地增加。

[0229] 在一个特定的实施方案中,用于在患有肺癌的受试者中对转移进行诊断和/或用于在患有肺癌的受试者中对形成转移的倾向进行预后的本发明的第四个方法包括,测定在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因的拷贝数并将所述拷贝数与对照样品或参考样品的拷贝数进行比较,其中如果c-MAF的拷贝数相对于对照样品的c-MAF的拷贝数而言更多,那么所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向。

[0230] 对照样品是指还未发生转移的肺癌受试者的肿瘤组织样品,或者其相应于在还未发生转移的肺癌受试者的活组织检查样品中肿瘤组织集合中所测量的c-MAF基因拷贝数的中位值。通常通过将等量的受试者群体的样品相合并来获得所述参考样品。如果c-MAF基因的拷贝数相对于在对照样品中所述基因的拷贝数而言出现增加,那么所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向。

[0231] 根据在本文中所使用的,术语“基因的拷贝数”是指细胞中核酸分子的拷贝数。基因的拷贝数包括在细胞的基因组(染色体)DNA中基因的拷贝数。在正常的细胞(非肿瘤细胞)中,基因的拷贝数通常是两个拷贝(在染色体对的每个成员中具有一个拷贝)。基因的拷贝数有时包括从细胞群体样品中获取的基因拷贝数的一半。

[0232] 在本发明中,当c-MAF基因的拷贝数高于参考样品或对照样品所具有的拷贝数时,则称为“基因的拷贝数增加”。特别地,当拷贝数多于2个拷贝,例如3、4、5、6、7、8、9或10个拷贝,甚至多于10个拷贝的c-MAF基因时,可以认为样品具有增加的c-MAF拷贝数。

[0233] 在一些实施方案中,所述扩增是在16q23基因座的区域中。在一些实施方案中,所述扩增是在大约染色体16-大约79,392,959bp至大约79,663,806bp(从着丝粒至端粒)之间的染色体区域的任何部分中。在一些实施方案中,所述扩增是在大约染色体16-大约79,392,959bp至大约79,663,806bp之间但排除DNA重复元件的基因组区域中。在一些实施方案

中,采用特异性针对该区域的探针测量扩增。

[0234] 在一个特定的实施方案中,所述扩增或所述拷贝数通过原位杂交或PCR来进行确定。

[0235] 用于确定c-MAF基因或染色体区域16q22-q24是否出现扩增的方法是现有技术中广泛知晓的。所述方法包括,但不限于,原位杂交(ISH)(例如,荧光原位杂交(FISH)、生色原位杂交(CISH)或银染原位杂交(SISH))、比较基因组杂交或聚合酶链反应(例如,实时定量PCR)。对于任何ISH方法,所述扩增或所述拷贝数可以通过对在染色体中或在细胞核中荧光点、着色点或银染点的数目进行计数来确定。

[0236] 荧光原位杂交(FISH)是用于检测和定位染色体中特定DNA序列的存在或不存在的细胞遗传学技术。FISH使用荧光探针,所述荧光探针仅结合与其显示出高度序列相似性的染色体的那些部分。在一个典型的FISH方法中,DNA探针用荧光分子或半抗原进行标记,所述荧光分子或半抗原通常以荧光染料-dUTP(fluor-dUTP)、地高辛-dUTP、生物素-dUTP或半抗原-dUTP的形式,它们通过使用酶促反应例如切口平移或PCR而掺入到DNA中。将包含遗传物质(染色体)的样品放在载玻片上并通过甲酰胺处理来使其变性。然后,经标记的探针在合适的条件下与所述包含遗传物质的样品杂交,所述合适的条件将由本领域技术人员来决定。在杂交后,要么直接地(在用荧光染料(fluorine)标记探针的情况下)要么间接地(使用经荧光标记的抗体来检测半抗原)观察样品。

[0237] 在CISH的情况下,探针用地高辛、生物素或荧光素进行标记,并且在合适的条件下与包含遗传物质的样品进行杂交。

[0238] 可以使用任何能够结合DNA的标签或标记分子来标记在本发明的第四个方法中使用的探针,从而允许核酸分子的检测。用于进行标记的标记的例子包括但不限于,放射性同位素、酶底物、辅因子、配体、化学发光试剂、荧光团、半抗原、酶及其组合。用于进行标记的方法和用于选择适合于不同目的的标记的指导可以例如在Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York, 1989) 和 Ausubel et al. (In Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley and Sons, New York, 1998) 中找到。

[0239] 一旦确定了扩增的存在(要么通过直接确定c-MAF基因的扩增,要么通过确定基因座16q22-q24的扩增),并且在将其与对照样品中所述基因的扩增进行比较后,在检测到在c-MAF基因中的扩增的情况下,其指示所述受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向。

[0240] 必须将c-MAF基因的扩增的确定与对照样品或参考样品的值相关联,所述对照样品或参考样品的值相应于在还未发生转移的肺癌受试者的肿瘤组织样品中所测量的c-MAF基因的扩增水平,或者相应于在还未发生转移的患有肺癌的受试者的活组织检查样品中在肿瘤组织集合中所测量的c-MAF基因扩增的中位值。通常通过将等量的受试者群体的样品相合并来获得所述参考样品。通常,典型的参考样品将从在临床上经充分证明的并且其中转移的不存在经充分表征的受试者获得。从其得到参考水平的样品的集合将优选地由患有与研究目标患者相同类型的癌症(例如NSCLC)的受试者构成。一旦建立了该中位值,就可以将患者肿瘤组织中c-MAF的扩增水平与该中位值进行比较,并且如此地,如果存在扩增,那么该受试者具有关于转移的阳性诊断或者更大的形成转移的倾向。

[0241] 在一个优选的实施方案中,所述转移为骨转移。在又一个更优选的实施方案中,所述骨转移为溶骨性骨转移。根据在本文中所使用的,表述“溶骨性骨转移”是指这样的转移类型,其中在转移附近产生骨吸收(骨密度的逐渐丧失),其由于肿瘤细胞刺激了破骨细胞的活性而导致,并且以严重的疼痛、病理性骨折、高钙血症、脊髓压迫和其他由于神经压迫而导致的症状为特征。

[0242] 基于c-MAF基因易位的检测对肺癌中转移进行预后的方法

[0243] 在另一个方面,本发明涉及预测患有肺癌的患者的临床结果的体外方法,其包括确定在所述受试者的样品中c-MAF基因是否出现易位,其中c-MAF基因的易位意味着不佳的临床结果。

[0244] 在另一个方面,本发明涉及预测患有肺癌的患者的临床结果的体外方法,其包括确定在所述受试者的样品中c-MAF基因是否出现易位,其中c-MAF基因的易位意味着不佳的临床结果。

[0245] 在一些实施方案中,易位的基因是来自16q23基因座的区域。在一些实施方案中,易位的基因是来自大约染色体16-大约79,392,959bp至大约79,663,806bp(从着丝粒至端粒)之间的染色体区域的任何部分。在一些实施方案中,易位的基因是来自大约染色体16-大约79,392,959bp至大约79,663,806bp之间但排除DNA重复元件的基因组区域。在一些实施方案中,采用特异性针对该区域的探针测量易位。

[0246] 在一个特定的实施方案中,c-MAF基因的易位可以通过确定包含所述基因的染色体区域的易位来确定。在一个实施方案中,所述易位是t(14,16)易位。在另一个实施方案中,易位的染色体区域是来自基因座16q22-q24。基因座16q22-q24位于染色体16上,在所述染色体的长臂中并且在带22和带24之间的范围内。该区域在NCBI数据库中相应于重叠群NT_010498.15和NT_010542.15。在一个优选的实施方案中,c-MAF基因易位至染色体14的基因座14q32,导致t(14,16)(q32,q23)易位。该易位将MAF基因置于IGH基因座中的强启动子旁边,其在一些情况下导致MAF的过表达(Eychène, A., Rocques, N., and Puopponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8:683-693.)。

[0247] 在一个优选的实施方案中,c-MAF基因的易位可以通过采用特异性针对所述易位的探针来确定。在一些实施方案中,采用双色探针测量所述易位。在一些实施方案中,采用双重融合探针测量所述易位。在一些实施方案中,采用双色、双重融合探针测量所述易位。在一些实施方案中,采用两个独立的探针测量所述易位。

[0248] 在另一个优选的实施方案中,c-MAF基因的易位采用Vysis LSI IGH/MAF双色双重融合探针(<http://www.abbottmolecular.com/us/products/analyte-specific-reagent/fish/vysis-lsi-igh-maf-dual-color-dual-fusion-probe.html>;最后一次登录11/5/2012)确定,所述探针包括针对14q32和16q23的探针。在另一个优选的实施方案中,c-MAF基因的易位采用以下探针确定:Kreatech诊断MAF/IGH gt(14;16)融合探针(<http://www.kreatech.com/products/repeat-free-tm-poseidon-tm-fish-probes/hematology/maf-igh-gt1416-fusion-probe.html>;最后一次登录11/5/2012)、Abnova MAF FISH探针(http://www.abnova.com/products/products_detail.asp?Catalog_id=F_A0375;最后一次登录11/5/2012)、癌症遗传学意大利IGH/MAF双色双重融合易位探针(<http://www.cancergeneticsitalia.com/dna-fish-probe/ighmaf/>;最后一次登录11/5/2012)、创

意生物阵列IGH/MAF-t (14;16) (q32;q23) FISH探针 (<http://www.creative-bioarray.com/products.asp?cid=35&page=10>;最后一次登录11/5/2012)、奥雅纳实验室通过FISH的多发性骨髓瘤组 (<http://www.aruplab.com/files/technical-bulletins/Multiple%20Myeloma%20%28MM%29%20by%20FISH.pdf>;最后一次登录11/5/2012)、特异性针对16q23或14q32的安捷伦探针 (<http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?chr=16&start=79483700&end=79754340>;最后一次登录11/5/2012; <http://www.genomics.agilent.com/ProductSearch.aspx?Pageid=3000&ProductID=637>;最后一次登录11/5/2012)、特异性针对16q23或14q32的Dako探针 (http://www.dako.com/us/ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?setCountry=true&purl=ar42/psg42806000/baseproducts_surefish.htm?undefined&submit=Accept%20country;最后一次登录11/5/2012)、CytoCell IGH/MAF易位、双重融合探针 (http://www.zentech.be/uploads/docs/products_info/prenatology/cytoCell%202012-2013%20catalogue%5B3%5D.pdf;最后一次登录11/5/2012)、Metasystems XL IGH/MAF易位-双重融合探针 (http://www.metasystems-international.com/index.php?option=com_joomla&view=article&jobbase=5&id=12%3Ad-5029-100-og&Itemid=272;最后一次登录11/5/2012)、蔡司FISH探针XL, 100 μ l, IGH/MAFB (<https://www.micro-shop.zeiss.com/?s=440675675dedc6&l=en&p=uk&f=r&i=5000&o=&h=25&n=1&sd=000000-0528-231-uk>;最后一次登录11/5/2012) 或Genycell生物技术IGH/MAF双重融合探针 (http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=1&ved=0CCQQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.genycell.es%2Fimages%2Fproductos%2Fbrochures%2F1phmie6__86.ppt&ei=MhGYUOi3GKWH0QGlt4D0Dw&usg=AFQjCNEqQMbT8vQGjJbi9riEf3lVgoFTFQ&sig2=V5IS8juEMVHB18Mv2Xx_Ww;最后一次登录11/5/2012)。

[0249] 在一些实施方案中,探针上的标记是荧光团。在一些实施方案中,探针上的荧光团是橙色。在一些实施方案中,探针上的荧光团是绿色。在一些实施方案中,探针上的荧光团是红色。在一些情况下,探针上的荧光团是黄色。在一些实施方案中,一个探针用红色荧光团标记且一个用绿色荧光团标记。在一些实施方案中,一个探针用绿色荧光团标记且一个用橙色荧光团标记。在一些情况下,探针上的荧光团是黄色。例如如果MAF特异性探针用红色荧光团标记且IGH特异性探针用绿色荧光团标记,如果观察到白色则意味着信号重叠并且易位已经发生。

[0250] 在一些实施方案中,所述荧光团是SpectrumOrange。在一些实施方案中,所述荧光团是SpectrumGreen。在一些实施方案中,所述荧光团是DAPI。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright405。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright415。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright495。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright505。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright550。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright547。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright570。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright590。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright647。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright495/550。在一些实施方案中,所述荧光团是PlatinumBright415/495/550。

在一些实施方案中,所述荧光团是DAPI/PlatinumBright495/550。在一些实施方案中,所述荧光团是FITC。在一些实施方案中,所述荧光团是得克萨斯红。在一些实施方案中,所述荧光团是DEAC。在一些实施方案中,所述荧光团是R6G。在一些实施方案中,所述荧光团是Cy5。在一些实施方案中,所述荧光团是FITC、得克萨斯红和DAPI。在一些实施方案中,DAPI负染用于呈现易位、扩增或拷贝数的改变。

[0251] 本发明的一个实施方案包括一种方法,其中在第一个步骤中确定c-MAF基因在受试者的样品中是否发生易位。在一个优选的实施方案中,所述样品是肿瘤组织样品。

[0252] 在一个特定的实施方案中,本发明的用于在患有肺癌的受试者中对形成骨转移的倾向进行预后的方法包括确定在其中c-MAF基因发生易位的所述受试者的样品中c-MAF基因的拷贝数并将所述拷贝数与对照或参考样品的拷贝数进行比较,其中如果c-MAF的拷贝数相对于对照样品的c-MAF的拷贝数而言增加,那么所述受试者具有更大的形成骨转移的倾向。在一个优选的实施方案中,所述骨转移是非常早期的骨转移。在一个优选的实施方案中,所述骨转移为溶骨性骨转移。

[0253] 根据在本文中所使用的,“平均水平”涉及c-MAF表达水平的单个值(如算术平均值、众数或中位值),其概括或代表一组不相等的值的一般意义。在一个优选的实施方案中,所述平均水平相应于由肺癌肿瘤的代表性组群获得的表达水平的平均值。患者组群通过想要评估的个体患者代表性的年龄定义。

[0254] 根据在本文中所使用的,“标准差”涉及数字集合的分散性的测量。例如,c-MAF的平均正常水平的标准差是在癌症肿瘤样品中发现的c-MAF水平的集合的分散性。数据分散得越开,该差越高。标准差可以通过从观测值的频率分布中的算术平均值减去它们的方差的算术平均值的平方根来获得。

[0255] 一旦测量了患有肺癌的受试者的样品中c-MAF基因表达水平并已经与平均水平进行了比较,如果所述基因的表达水平相对于平均水平而言高于平均值加一个标准差,那么可以得出所述受试者具有更大的形成早期骨转移的倾向的结论。

[0256] 用于确定c-MAF基因或染色体区域16q22-q24是否发生易位的方法是现有技术中广泛知晓的并且包括之前用于c-MAF的扩增所述的那些。所述方法包括,但不限于,原位杂交(ISH)(例如,荧光原位杂交(FISH)、生色原位杂交(CISH)或银染原位杂交(SISH))、比较基因组杂交或聚合酶链反应(例如,实时定量PCR)。对于任何ISH方法,所述扩增或所述拷贝数或易位可以通过对在染色体中或在细胞核中荧光点、着色点或银染点的数目进行计数来确定。在其它实施方案中,拷贝数改变和易位的检测可以通过采用全基因组测序、外显子测序或通过采用任何PCR衍生的技术来进行检测。例如,可以对基因组DNA的样品进行PCR以检测易位。在一个实施方案中,采用定量PCR。在一个实施方案中,用特异性针对c-MAF基因的引物和特异性针对IGH启动子区域的引物进行PCR;如果产生产物,则易位已经发生。

[0257] 在一些实施方案中,在确定c-MAF基因的易位之后确定c-MAF基因的扩增和拷贝数。在一些实施方案中,探针用于确定细胞针对c-MAF基因是否是多倍体。在一些实施方案中,通过确定是否存在目的基因的2个以上信号来确定多倍性。在一些实施方案中,通过测量特异性针对目的基因的探针的信号并将其与着丝粒探针或其它探针进行比较来确定多倍性。

[0258] 基于检测c-MAF基因的扩增或易位对肺癌的临床结果进行预后的方法

[0259] 在另一个方面,本发明涉及预测患有肺癌的患者的临床结果的体外方法(在下文中,本发明的第七个方法),其包括确定在所述受试者的样品中c-MAF基因相对于参考基因的拷贝数是否出现扩增或易位,其中c-MAF基因相对于所述参考基因拷贝数的扩增意味着不佳的临床结果。

[0260] 本发明的第七个方法包括,在第一个步骤中,确定在受试者的样品中c-MAF基因是否出现扩增。c-MAF基因的扩增的确定基本上如本发明的第五个方法中所述的进行。在一个优选的实施方案中,所述样品是肿瘤组织样品。在一个优选的实施方案中,c-MAF基因的扩增通过确定基因座16q23或16q22-24的扩增来确定。在另一个优选的实施方案中,c-MAF基因的扩增通过采用c-MAF基因特异性探针来确定。

[0261] 在第二个步骤中,本发明的第七个方法包括将所述拷贝数与参考或对照样品的拷贝数进行比较,其中如果c-MAF的拷贝数相对于对照样品的c-MAF拷贝数而言更大,那么这意味着不佳的临床结果。

[0262] 在一个优选的实施方案中,当所述c-MAF基因的拷贝数比参考样品或对照样品具有的拷贝数更高时,所述c-MAF基因相对于参考基因拷贝数而言是扩增的。在一个例子中,如果在测试样品中c-MAF基因的基因组拷贝数相对于对照样品增加了至少2(即6拷贝)、3(即8拷贝)、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45或50倍,则所述c-MAF基因被认为“扩增了”。在另一个例子中,如果每个细胞的c-MAF基因的基因组拷贝数为至少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等,则所述c-MAF基因被认为“扩增了”。

[0263] 在另一个实施方案中,参考基因拷贝数是没有发生骨转移的受试者的肺癌样品中的基因拷贝数。

[0264] 在另一个实施方案中,通过原位杂交或PCR确定扩增。

[0265] 本发明的治疗方法

[0266] 使用c-MAF的抑制性试剂来治疗骨转移

[0267] c-MAF基因表达的抑制性试剂或由所述基因编码的蛋白质的抑制性试剂可以用于肺癌转移的治疗和/或预防。

[0268] 在另一个方面,本发明涉及c-MAF的抑制性试剂用于制备肺癌骨转移的治疗或预防的药物的用途。

[0269] 在另一个方面,本发明涉及在有此需要的受试者中用于治疗或防止肺癌的骨转移的方法,包括给所述受试者施用c-MAF的抑制性试剂。

[0270] 在另一个方面,本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中防止或降低骨转移的风险的方法,所述方法包括给所述受试者施用防止或降低骨转移的试剂,其中所述试剂根据由定量所述受试者中c-MAF的表达水平所确定的治疗方案进行施用。

[0271] 因此,在另一个方面,本发明涉及c-MAF基因表达抑制性试剂或由所述基因编码的蛋白质的抑制性试剂(此后在下文中,本发明的抑制性试剂)在制备用于治疗 and/或预防肺癌转移的药物中的用途。备选地,本发明涉及c-MAF基因表达的抑制性试剂或由所述基因编码的蛋白质的抑制性试剂,其用于肺癌转移的治疗和/或预防中。备选地,本发明涉及用于在受试者中治疗肺癌转移的方法,其包括向所述受试者施用c-MAF的抑制剂。

[0272] 根据在本文中所使用的,“c-MAF的抑制性试剂”是指能够全部地或部分地抑制c-

MAF基因表达的任何分子,其既通过阻碍所述基因的表达产物产生(中断c-MAF基因的转录和/或阻断来自c-MAF基因表达的mRNA的翻译)也通过直接抑制c-MAF蛋白的活性来实现。c-MAF基因表达的抑制剂可以通过使用基于下述方面的方法来鉴定:基于假定的抑制剂阻断c-MAF促进体外细胞增殖的能力的能力,如在国际专利申请W02005/046731(以其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所显示的;基于假定的抑制剂在表达c-MAF的细胞中阻断在细胞周期蛋白D2启动子或包含c-MAF应答区域(MARE或c-MAF应答元件)的启动子的控制之下报道基因的转录能力的能力,如在W02008098351(以其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所描述的;或者基于假定的抑制剂在表达NFATc2和c-MAF的细胞中阻断响应于用PMA/离子霉素进行的刺激在IL-4启动子控制之下的报道基因的表达能力,如在US2009048117A(以其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所描述的。

[0273] 举例说明而非限制性地,适合于在本发明中使用的c-MAF的抑制性试剂包括反义寡核苷酸、干扰RNA(siRNA)、催化性RNA或特异性核酶和抑制性抗体。

[0274] 反义寡核苷酸

[0275] 本发明的另外一个方面涉及使用分离的“反义”核酸来抑制编码其活性希望被抑制的c-MAF的核酸的表达,例如抑制其转录和/或翻译。反义核酸可以通过常规的碱基互补,或者例如在与双链DNA结合的情况下,通过双螺旋的大沟中的特异性相互作用,与药物的潜在靶点结合。一般地,这些方法涉及在本领域中通常使用的一系列技术,包括基于与寡核苷酸序列的特异性结合的任何方法。

[0276] 可以例如作为表达质粒来施用本发明的反义构建物,所述表达质粒当在细胞中转录时,产生与编码c-MAF的细胞mRNA的至少一个独特部分互补的RNA。备选地,所述反义构建物是这样的寡核苷酸探针,其是离体产生的,并且当被引入细胞中时,通过与靶核酸的mRNA和/或基因序列杂交而产生基因表达的抑制。此类寡核苷酸探针优选地是经修饰的寡核苷酸,其对于内源性核酸酶(例如核酸外切酶和/或核酸内切酶)具有抗性,并且因此在体内是稳定的。可用作反义寡核苷酸的示例性的核酸分子为氨基磷酸酯、硫代磷酸酯和甲基磷酸酯的DNA类似物(还可参见美国专利号5176996、5264564和5256775)(以其全部内容通过引用的方式在此引入本文)。另外,已综述了用于构建在反义疗法中有用的寡聚体的一般性方法,例如,在Van der Krol et al., *BioTechniques* 6:958-976, 1988;和Stein et al., *Cancer Res* 48:2659-2668, 1988中。

[0277] 关于反义寡核苷酸,优选源自靶基因的翻译起始位点(例如,在-10和+10之间)的寡脱氧核糖核苷酸区域。反义方法牵涉与编码靶多肽的mRNA互补的寡核苷酸(DNA或者RNA)的设计。反义寡核苷酸与被转录的mRNA相结合并阻止翻译。

[0278] 与mRNA的5'末端(例如,直至并包括起始密码子AUG的5'非翻译序列)互补的寡核苷酸应当以最有效的方式起作用以抑制翻译。然而,已显示与mRNA的3'非翻译序列互补的序列对于抑制mRNA的翻译也是有效的(Wagner, *Nature* 372:333, 1994)。因此,在用于抑制mRNA的翻译的反义方法中可以使用与5'或3'非翻译区(基因的非编码区)互补的寡核苷酸。与mRNA的5'非翻译区互补的寡核苷酸应当包括起始密码子AUG的互补物。与mRNA的编码区互补的寡核苷酸是效率较低的翻译抑制剂,但根据本发明也可以使用。如果它们被设计用于与mRNA的5'区、3'区或编码区杂交,那么反义核酸应当具有至少六个核苷酸的长度,并且优选地具有少于大约100个核苷酸,更优选地少于大约50、25、17或10个核苷酸的长度。

[0279] 优选地,首先进行体外研究以定量反义寡核苷酸抑制基因表达的能力。优选地,这些研究使用区分所述寡核苷酸的反义基因抑制与非特异性生物学效应的对照。还优选地,这些研究将靶RNA或靶蛋白的水平与RNA或蛋白质的内部对照进行比较。可以将通过使用反义寡核苷酸而获得的结果与通过使用对照寡核苷酸而获得的结果进行比较。优选地,对照寡核苷酸具有与待检验的寡核苷酸大约相同的长度,并且所述寡核苷酸的序列与反义序列的不同之处仅在于其对于阻止与靶序列的特异性杂交来说是必要的。

[0280] 反义寡核苷酸可以是单链的或双链的DNA或RNA或者其嵌合混合物或衍生物或经修饰的形式。所述寡核苷酸可以在碱基基团、糖基团或磷酸酯主链中进行修饰,例如以便改善分子的稳定性、其杂交能力等。所述寡核苷酸可以包括结合的其他基团,例如肽(例如,为了将它们导向宿主细胞的受体),或者用于促进通过细胞膜(参见例如,Letsinger et al., Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:6553-6556,1989;Lemaitre et al., Proc.Natl.Acad.Sci.84:648-652,1987;PCT公开号W088/09810)或血脑屏障(参见例如,PCT公开号W089/10134)的转运的试剂,嵌入剂(参见例如,Zon,Pharm.Res.5:539-549,1988)。为此目的,可以将所述寡核苷酸缀合至其他分子,例如肽、转运试剂、由杂交引发的切割试剂等。

[0281] 反义寡核苷酸可以包含至少一个经修饰的碱基基团。反义寡核苷酸还可以包含至少一个经修饰的糖基团,其选自包括但不限于阿拉伯糖、2-氟阿拉伯糖、木酮糖和己糖的组。反义寡核苷酸还可以包含与中性肽类似的主链。此类分子称为肽核酸(PNA)寡聚体,并且描述在例如Perry-O'Keefe et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93:14670,1996,和Eglom et al.,Nature 365:566,1993中。

[0282] 在还另外一个实施方案中,反义寡核苷酸包含至少一个经修饰的磷酸酯主链。在还另外一个实施方案中,反义寡核苷酸为 α -异头寡核苷酸。

[0283] 尽管可以使用与靶mRNA序列的编码区互补的反义寡核苷酸,也可以使用与被转录的非翻译区互补的那些反义寡核苷酸。

[0284] 在一些情况下,可能比较难于达到足以抑制内源mRNA翻译的细胞内反义寡核苷酸浓度。因此,一个优选的方法使用重组DNA构建物,其中将反义寡核苷酸置于pol III或pol II强启动子的控制之下。

[0285] 备选地,可以通过下述方式来降低靶基因的表达:将互补的脱氧核糖核苷酸序列导向该基因的调控区(即,启动子和/或增强子),从而形成阻止在身体内靶细胞中该基因的转录的三股螺旋结构(一般地参见,Helene,Anticancer Drug Des.6(6):569-84,1991)。在某些实施方案中,反义寡核苷酸为反义吗啉寡核苷酸(Morpholines)。

[0286] siRNA

[0287] 小干扰RNA或siRNA是能够通过RNA的干扰来抑制靶基因表达的试剂。siRNA可以化学合成,可以通过体外转录获得,或者可以在靶细胞中体内合成。典型地,siRNA由双链RNA组成,所述双链RNA的长度为15至40个核苷酸,并且可以包含1至6个核苷酸的3'和/或5'突出区。突出区的长度不依赖于siRNA分子的总长度。siRNA通过转录后降解或沉默靶信使而起作用。

[0288] 本发明的siRNA与c-MAF编码基因的mRNA或与编码所述蛋白质的基因序列实质上同源。“实质上同源”是指具有这样的序列,其与靶mRNA充分互补或相似,从而该siRNA能够

通过RNA的干扰而引起mRNA的降解。适合于引起所述干扰的siRNA包括由RNA形成的siRNA,以及包含不同化学修饰的siRNA,例如:

[0289] 一这样的siRNA,其中核苷酸之间的键(例如硫代磷酸酯键)不同于在自然界中出现的那些。

[0290] 一RNA链与功能性试剂(例如荧光团)的缀合物。

[0291] 一RNA链的末端的修饰物,特别是3'末端的修饰物,其通过用2'位处的不同羟基进行修饰。

[0292] 一这样的核苷酸,其具有经修饰的糖,例如在2'位处进行O-烷基化的残基,例如2'-O-甲基核糖或2'-O-氟核糖。

[0293] 一这样的核苷酸,其具有经修饰的碱基,例如卤代碱基(例如5-溴尿嘧啶和5-碘尿嘧啶)、烷基化碱基(例如7-甲基鸟苷)。

[0294] 可以就这样来使用siRNA,即以具有前面提及的特征的双链RNA的形式。备选地,可能使用包含siRNA的有义链和反义链序列处于在适合于其在目的细胞中表达的启动子的控制之下的载体。

[0295] 适合于siRNA的表达的载体为这些载体,其中编码siRNA的两条链的两个DNA区域处于串联排列在同一条DNA链中,并且由间隔区(其在转录后形成环)分隔开,并且其中单独一个启动子指导DNA分子的转录,产生shRNA。

[0296] 备选地,有可能使用这样的载体,其中形成siRNA的链中的每一条由不同转录单位的转录来形成。而又将这些载体划分为背驰转录载体和趋同转录载体。在背驰转录载体中,编码形成siRNA的每条DNA链的转录单位串联地位于载体中,从而每条DNA链的转录依赖于其自身的启动子,所述启动子可以是相同的或不同的(Wang, J. et al., 2003, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 100:5103-5106; 和 Lee, N. S. et al., 2002, Nat. Biotechnol., 20:500-505)。在趋同转录载体中,产生siRNA的DNA区域形成侧翼为两个反向启动子的DNA区域的有义链和反义链。在有义和反义RNA链的转录后,它们形成杂合体从而形成功能性siRNA。已经描述了具有反向启动子系统的载体,其中使用2个U6启动子(Tran, N. et al., 2003, BMC Biotechnol., 3:21), 小鼠U6启动子和人H1启动子(Zheng, L. et al., 2004, Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 135-140和W02005026322)以及人U6启动子和小鼠H1启动子(Kaykas, A. 和 Moon, R., 2004, BMC Cell Biol., 5:16)。

[0297] 适合用于从趋同或背驰表达载体表达siRNA的启动子包括与待在其中表达所述siRNA的细胞相容的任何启动子或启动子对。因此,适合于实施本发明的启动子包括但不限于:组成型启动子,例如真核生物病毒(例如多瘤病毒、腺病毒、SV40、CMV、鸟类肉瘤病毒、乙型肝炎病毒)的基因组衍生的启动子,金属硫蛋白基因的启动子,单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因启动子,反转录病毒LTR区,免疫球蛋白基因启动子,肌动蛋白基因启动子,EF-1 α 基因启动子,以及诱导型启动子,其中蛋白质的表达依赖于分子或外源信号的添加,例如四环素系统, NF κ B/UV光系统, Cre/Lox系统, 和热休克基因启动子, 在W0/2006/135436中所描述的可调节型RNA聚合酶II启动子, 以及组织特异性启动子(例如, 在W02006012221中所描述的PSA启动子)。在一个优选的实施方式中,所述启动子是组成性地起作用的RNA聚合酶III启动子。RNA聚合酶III启动子在有限数目的基因(例如, 5S RNA、tRNA、7SL RNA和U6snRNA)中出现。不同于其它RNA聚合酶III启动子, III型启动子不需要任何基因内序列,

但需要在5'方向上包括位置-34至-24处的TATA盒,在-66和-47之间的近侧序列元件(PSE),和在一些情况下,在位置-265和-149之间的远侧序列元件(DSE)的序列。在一个优选的实施方案中,III型RNA聚合酶III启动子为人或鼠类来源的H1基因和U6基因启动子。在一个更加优选的实施方案中,所述启动子为2个人或鼠类U6启动子,小鼠U6启动子和人H1启动子,或者人U6启动子和小鼠H1启动子。

[0298] 可以从所谓的shRNA(短发夹RNA)细胞内产生siRNA,所述shRNA的特征在于,形成siRNA的反向平行链通过环或发夹区相连接。所述shRNA可以由质粒或病毒(特别是反转录病毒)编码,并且处在启动子的控制之下。适合于shRNA的表达的启动子为在上面的段落中关于siRNA的表达所指出的那些。

[0299] 适合于siRNA和shRNA的表达的载体包括原核生物表达载体,例如pUC18、pUC19、Bluescript及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、CoIE1、pCR1、RP4;噬菌体和穿梭载体,例如pSA3和pAT28;酵母表达载体,例如2 μ 质粒类型的载体、整合质粒、YEP载体、着丝粒质粒等;昆虫细胞表达载体,例如pAC系列和pVL系列的载体;植物表达载体,例如pIBI、pEarleyGate、pAVA、pCambia、pGSA、pGWB、pMDC、pMY、pORE等系列的载体;和高等真核生物细胞表达载体,其要么基于病毒载体(腺病毒、腺病毒相关病毒以及反转录病毒,特别是慢病毒),要么基于非病毒载体例如pcDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、pZeoSV2、pCI、pSVL和pKSV-10、pBPV-1、pML2d和pTDT1。在一个优选的实施方案中,所述载体为慢病毒载体。

[0300] 本发明的siRNA和shRNA可以通过使用本领域技术人员已知的一系列技术来获得。用作用于设计siRNA的基础的核苷酸序列的区域不是有限制的,可以包含编码序列区(在起始密码子和终止密码子之间),或备选地,可以包含5'或3'非翻译区的序列,其优选地具有25至50个核苷酸的长度并且在处于相对于起始密码子而言3'方向位置处的任何位置中。设计siRNA的一种方式牵涉AA(N19)TT基序的鉴定(其中N可以是在c-MAF基因序列中的任何核苷酸),并且选择具有高G/C含量的那些。如果未找到所述基序,有可能鉴定NA(N21)基序,其中N可以是任何核苷酸。

[0301] 特异于c-MAF的siRNA包括在W02005046731(其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所描述的siRNA,其链之一为ACGGCUCGAGCAGCGACAA(SEQ ID NO:6)。其他特异于c-MAF的siRNA的序列包括但不限于:CUUACCAGUGUGUUCACAA(SEQ ID NO:7)、UGGAAGACUACUACUGGAUG(SEQ ID NO:8)、AUUUGCAGUCAUGGAGAACC(SEQ ID NO:9)、CAAGGAGAAAUACGAGAAGU(SEQ ID NO:10)、ACAAGGAGAAAUACGAGAAG(SEQ ID NO:11)和ACCUAGGAAGACUACUACUGG(SEQ ID NO:12)。

[0302] DNA酶

[0303] 另一方面,本发明还考虑使用DNA酶来抑制本发明的c-MAF基因的表达。DNA酶合并了反义技术和核酶技术两者的一些机理性特征。DNA酶被设计成与反义寡核苷酸类似地识别特定的靶核酸序列,然而与核酶类似,它们是催化性的并且特异地切割靶核酸。

[0304] 核酶

[0305] 还可以使用设计用于催化性切割靶mRNA的转录物的核酶分子,以阻止编码其活性希望被抑制的c-MAF的mRNA的翻译。核酶是能够催化特异性RNA切割的酶促RNA分子(关于综述,参见Rossi,Current Biology 4:469-471,1994)。核酶的作用机制牵涉核酶分子序列与

互补的靶RNA的特异性杂交,随后是内切核酸溶解性切割事件。核酶分子的组成优选地包括一个或多个与靶mRNA互补的序列,和熟知的负责mRNA切割的序列或在功能上等价的序列(参见例如,美国专利号5093246)。

[0306] 在本发明中使用的核酶包括锤头状核酶,核糖核酸内切酶RNA(此后在下文中,“Cech类型的核酶”)(Zaug et al., Science 224:574-578, 1984)。

[0307] 核酶可以由经修饰的寡核苷酸构成(例如为了改善稳定性、靶向等),并且应当被分配至在体内表达靶基因的细胞。一个优选的分配方法牵涉使用在强组成型pol III或pol II启动子的控制之下“编码”核酶的DNA构建物,从而经转染的细胞产生足够量的核酶以用于破坏内源靶信使和抑制翻译。由于与其他反义分子不同,核酶是催化性的,因此对于其效力而言要求较低的细胞内浓度。

[0308] 抑制性抗体

[0309] 在本发明的背景下,“抑制性抗体”是指任何这样的抗体,其能够特异地结合c-MAF蛋白并抑制所述蛋白质的一个或多个功能,优选地与转录相关的功能。可以通过使用本领域技术人员已知的任何方法(其中一些已经在上面提及)来制备所述抗体。因此,通过用待被抑制的蛋白质免疫动物来制备多克隆抗体。通过使用Kohler, Milstein et al. (Nature, 1975, 256:495)所描述的方法来制备单克隆抗体。在本发明的背景下,合适的抗体包括包含结合抗原的可变区和恒定区的完整抗体,片段“Fab”、“F(ab')₂”和“Fab'”, Fv, scFv片段, 双链抗体和双特异性抗体、 α 抗体、环肽和装订肽。一旦鉴定了具有结合c-MAF蛋白的能力的抗体,就通过使用鉴定抑制性试剂的试验来选择能够抑制该蛋白质的活性的那些。

[0310] 抑制性肽

[0311] 根据在本文中所使用的,术语“抑制性肽”是指能够结合c-MAF蛋白并抑制其活性(如上面所解释的)、即阻止c-MAF能够激活基因转录的那些肽。

[0312] c-MAF的显性失活变体

[0313] 由于maf家族的蛋白质能够同二聚体化并且与AP-1家族的其他成员(例如Fos和Jun)异二聚体化,那么抑制c-MAF活性的一种方式是通过使用显性失活变体,其能够与c-MAF二聚体化但缺乏激活转录的能力。因此,c-MAF的显性失活变体可以是这样的任何小的maf蛋白,其存在于细胞中并且缺乏包含反式激活结构域的氨基末端三分之二(例如,mafK、mafF、mafG和pi 8)(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)。

[0314] 备选地,c-MAF的显性失活变体包括这样的c-MAF变体,其保持与其他蛋白质进行二聚体化的能力但缺乏激活转录的能力。这些变体例如为缺乏位于该蛋白质N-末端的c-MAF反式激活结构域的那些。因此,举例说明地,c-MAF显性失活变体包括这样的变体,在所述变体中已经去除了至少氨基酸1-122,至少氨基酸1-187,或至少氨基酸1-257(考虑人c-MAF的编号,如在US6274338(以其全部内容通过引用的方式在此引入本文)中所描述的)。

[0315] 本发明涵盖了c-MAF显性失活变体以及编码c-MAF的多核苷酸(在适合于在靶细胞中进行表达的启动子的有效控制之下)的用途。可以用于调节本发明的多核苷酸转录的启动子可以是组成型启动子(即其指导基础水平的转录)或诱导型启动子(其中转录活性需要

外部信号)。适合于转录调节的组成型启动子尤其为CMV启动子、SV40启动子、DHFR启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒启动子(MMTV)、1a延伸因子(EF1a)启动子、白蛋白启动子、ApoA1的启动子、角蛋白的启动子、CD3的启动子、免疫球蛋白重链或轻链的启动子、神经丝的启动子、神经元特异性烯醇化酶的启动子、L7启动子、CD2启动子、肌球蛋白轻链激酶的启动子、HOX基因的启动子、胸苷激酶的启动子、RNA聚合酶II的启动子、MyoD基因的启动子、磷酸甘油酸激酶(PGK)基因的启动子、低密度脂蛋白(LDL)的启动子、肌动蛋白基因的启动子。在一个优选的实施方案中,调节反式激活蛋白的表达的启动子为PGK基因启动子。在一个优选的实施方案中,调节本发明的多核苷酸的转录的启动子为T7噬菌体RNA聚合酶的启动子。

[0316] 优选地,可以在本发明的背景下使用的诱导型启动子为响应于诱导剂、在诱导剂不存在时显示出零或可忽略的基础表达、并且其能够促进位于3'位置处的基因的激活的那些启动子。根据诱导剂的类型,可以将诱导型启动子分类为Tet开/关启动子(Gossen,M.和H.Bujard(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551;Gossen,M.et al.,1995,Science 268:1766-1769;Rossi,F.M.V.和H.M.Blau,1998,Curr.Opin.Biotechnol.9:451-456)、Pip开/关启动子(US6287813)、抗孕酮依赖性启动子(US2004132086)、蜕皮激素依赖性启动子(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;和W09738117)、金属硫蛋白依赖性启动子(W08604920)和雷帕霉素依赖性启动子(Rivera et al.,1996,Nat.Med.2:1028-32)。

[0317] 适合于表达编码c-MAF显性失活变体的多核苷酸的载体包括衍生自下列载体的载体:原核生物表达载体,例如pUC18、pUC19、Bluescript及其衍生物、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4;噬菌体和穿梭载体,例如pSA3和pAT28;酵母表达载体,例如2 μ 型质粒载体、整合质粒、YEP载体、着丝粒质粒等;昆虫细胞表达载体,例如pAC系列和pVL系列的载体;植物表达载体,例如pIBI、pEarleyGate、pAVA、pCAMBIA、pGSA、pGWB、pMDC、pMY、pORE等系列的载体;和高等真核生物细胞表达载体,其要么基于病毒载体(腺病毒、腺病毒相关病毒以及反转录病毒,特别是慢病毒),要么基于非病毒载体例如pSilencer 4.1-CMV(Ambion)、pcDNA3、pcDNA3.1/hyg、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1、pZeoSV2、pCI、pSVL和pKSV-10、pBPV-1、pML2d和pTDT1。

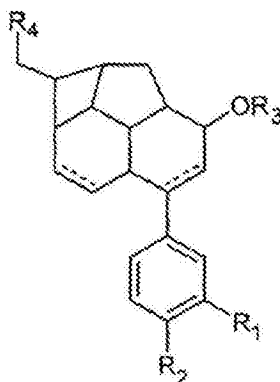
[0318] c-MAF蛋白活性的其他抑制性化合物

[0319] 适合于在本发明中使用的其他c-MAF抑制性化合物包括:

[0320] 表1:具有抑制c-MAF的能力的小分子

[0321]

土楠酸 H 的衍生物，例如在 WO2004014888 中所描述的且相应于下述通式的那些：

**I**

其中，

R₁ 和 R₂ 相互独立地为

1.0 H，或

2.0 -O-C₁-C₆ 烷基、-O-C₂-C₆ 烯基、-O-C₂-C₆ 炔基或 -O-C₆-C₁₀

[0322]

芳基基团，其中所述烷基、烯基和炔基为直链的或支化的，并且其中所述烷基、烯基和炔基基团被下列基团单取代或二取代：

2.1 -OH，

2.2 =O，

2.3 -O-C₁-C₆ 烷基，其中所述烷基为直链的或支化的，

2.4 -O-C₂-C₆ 烯基，其中所述烯基为直链的或支化的，

2.5 -C₆-C₁₀ 芳基，

2.6 -NH-C₁-C₆ 烷基，其中所述烷基为直链的或支化的，

2.7 -NH-C₂-C₆ 烯基，其中所述烯基为直链的或支化的，

2.8 -NH₂，或

2.9 卤素，

并且其中所述芳基基团任选地被取代基 2.1 或 2.3 至 2.9 单取代或二取代，

其中取代基 2.3、2.4、2.6 和 2.7 另外可以被-CN、酰胺或脒官能团取代，取代基 2.5 可以另外被-CN 或酰胺官能团取代，或者 R₁ 和 R₂ 一起形成环，其中 R₁ 和 R₂ 表示-O-[(C₁-C₆)亚烷基]-O-基团，

R₃ 为

1.0 H，或

2.0 -O-C₁-C₆ 烷基、-O-C₂-C₆ 烯基、-O-C₂-C₆ 炔基或-O-C₆-C₁₀ 芳基基团，其中所述烷基、烯基和炔基为直链的或支化的，并且其中所述烷基、烯基和炔基基团被下列基团单取代或二取代：

2.1 -OH，

2.2 =O，

2.3 -O-C₁-C₆ 烷基，其中所述烷基为直链的或支化的，

2.4 -O-C₂-C₆ 烯基，其中所述烯基为直链的或支化的，

2.5 -C₆-C₁₀ 芳基，

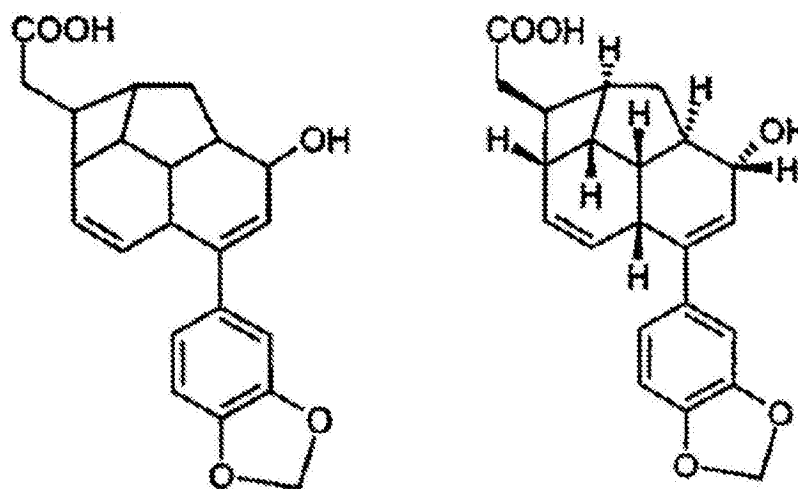
2.6 -NH-C₁-C₆ 烷基，其中所述烷基为直链的或支化的，

2.7 -NH-C₂-C₆ 烯基，其中所述烯基为直链的或支化的，

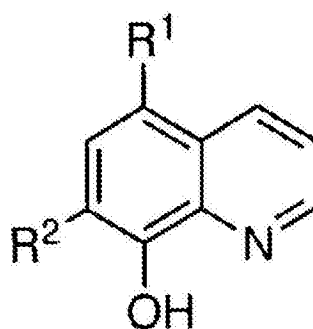
2.8 -NH₂，或

[0323]

2.9 卤素，
并且其中所述芳基基团任选地被取代基 2.1 或 2.3 至 2.9 单取代或二取代，
其中取代基 2.3、2.4、2.6 和 2.7 可以另外被-CN、酰胺或脒官能团取代，取代基 2.5 可以另外被-CN 或酰胺官能团取代，
 R_4 为 CO_2R_3 、 CO_2NHR_3 、 CHO 、 CH_2OR_3 、 $CH_2OSi(R_3)_3$ 、 CH_2Br 、 CH_2CN ，其中 R_3 如上面所定义，
并且，特别地，其为下述化合物



8-羟基喹啉衍生物，例如具有下述通式的在 WO2009146546 中所描述的那些：

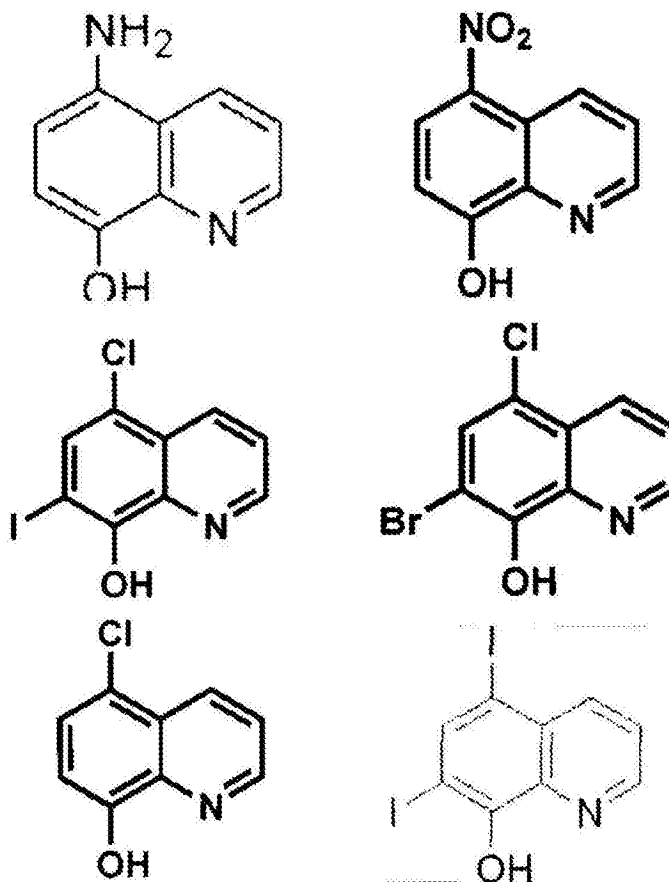


II

其中，
 R_1 选自由 NO_2 、 NH_2 、 $NH(C_1-C_6 \text{ 烷基})$ 和 $N(C_1-C_6 \text{ 烷基})(C_1-C_6 \text{ 烷基})$ 组成的组；
 R_2 选自 H、卤素、 $C_1-C_6 \text{ 烷基}$ 和被氟取代的 $C_1-C_6 \text{ 烷基}$ ，
或者

[0324]

R_1 为 Cl, 和 R_2 为 Br 或 H,
并且, 优选地, 其为下述化合物

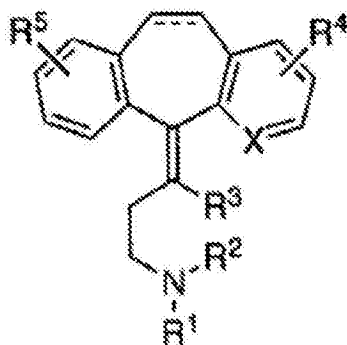


III

氯碘羟喹 (5-氯-7-碘喹啉-8-醇), 如在 WO09049410 中所描述的

IV

化合物, 例如具有下述通式的在 WO08098351 中所描述的那些



其中,

==--::-- 为单键或双键,

R^1 选自由 H、 C_1 - C_4 烷基、 $C(O)O$ C_1 - C_4 烷基、 $C(O)$ C_1 - C_4 烷

[0325]

	基和 C(O)NH C₁-C₄ 烷基组成的组； R² 选自 H 和 C₁-C₄ 烷基； R³ 选自 H 和 C₁-C₄ 烷基； 或者 R² 和 R³ 与它们所结合的碳原子和氮原子结合在一起形成哌啶环， R⁴ 和 R⁵ 独立地选自 H、卤素、羟基、C₁-C₄ 烷基、被氟取代的 C₁-C₄ 烷基和 C₁-C₄ 烷氧基；和 X 选自 C 和 N， 并且，优选的化合物为例如： 赛庚啶（4-(5H-二苯并[a,d]环庚烯-5-亚基)-1-甲基哌啶盐酸盐）， 阿米替林（3-(10,11-二氢-5H-二苯并[[a,d]]环庚烯-5-亚基)-N,N-二甲基-1-丙胺）， 氯雷他定（4-(8-氯-5,6-二氢-11H-苯并[5,6]环庚并[1,2-b]吡啶-11-亚基)-1-哌啶甲酸乙酯）， 环苯扎林（3-(5H-二苯并[a,d]环庚烯-5-亚基)-N,N-二甲基-1-丙胺）。
V	瓜萎镰菌醇（12,13-环氧-3,4,7,15-四羟基单端孢霉-9-烯-8-酮）， 如在 WO0359249 中所描述的

[0326] 在专利申请W02005063252中描述了其他c-MAF抑制剂，如下表(表2)中所显示的。

[0327] 表2:c-MAF抑制剂

[0328]

拮抗剂	关于 cdk2 抑制活性的参考文献
嘌呤类似物	

[0329]

Purvalanols, 例如以商品名 Purvalanol A (#P4484, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{19}H_{25}ClN_6O$ 的 2-(1R-异丙基-2-羟基乙基氨基)-6-(3-氯苯胺基)-9-异丙基嘌呤, Purvalanol B, aminopurvalanol, 化合物 52 (其中 Purvalanol A 的异丙基被 H 代替)	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)
以商品名奥罗莫星 (#O0886) 从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{15}H_{18}N_6O$ 的 2-(羟基乙基氨基)-6-苄基氨基-9-甲基嘌呤, 以商品名 N^9-异丙基奥罗莫星 (#I0763) 从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{17}H_{22}N_6O$ 的 2-(2'-羟基乙基氨基)-6-苄基氨基-9-异丙基嘌呤; CVT-313	Vesely, J. <i>et al.</i>, (1994), Eur. J. Biochem, 224, 771-86, 11; Brooks, E.E. <i>et al.</i>, (1997), J. Biol. Chem., 272, 29207-11
以商品名 Roscovitine (#R7772) 从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{19}H_{26}N_6O$ 的 6-(苄基氨基)-2(R)-[[1-(羟基甲基)丙基]氨基]-9-异丙基嘌呤或 2-(R)-[[9-(1-甲基乙基)-6-[(苄基甲基)氨基]-9H-嘌呤-2-基]氨基]-1-丁醇, methoxyroscovitine	Wang, D. <i>et al.</i>, J. Virol. 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J. <i>et al.</i>, Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L. <i>et al.</i>, (1997), Eur. J. Biochem, 243, 527-36

[0330]

以商品名 CGP74514 (#C3353) 从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{19}H_{24}ClN_7$ 的嘌呤类似物 N2-(顺式-2-氨基环己基)-N6-(3-氯苯基)-9-乙基-9H-嘌呤-2,6-二胺	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)
CGP79807, CGP74514 (见上) 的类似物, 其中 Cl 被 CN 代替, OH 被去除, 并且环己烷环的邻位是 NH_2	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)
嘌呤类似物, 例如 O6-环己基甲基鸟嘌呤 NU2058	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
嘌呤类似物, 例如 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)
异戊烯基腺嘌呤	Vesely, J., <i>et al.</i> , (1994), Eur. J. Biochem, 224, 771-86
不基于嘌呤的试剂	
靛玉红类, 例如以商品名 (#I0404) 从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{16}H_{11}N_3O_2$ 的靛玉红-3'-单肟, 靛玉红的 5-磺酸盐, 5-氯靛玉红	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; Hellberg <i>et al.</i> 的 PCT/US02/30059, 以 WO 03/027275 公开

[0331]

在此表的第 2 列中所提及的 Fischer 的羟吲哚 1 (#IN118, JMAR, Chemical)	Poros-Makkay, M. <i>et al.</i> , Tetrahedron 2000, 56, 5893, Org. Process. Res. Dev, 2000, 4, 10
茛并吡唑类	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)
吡啶并(2,3-d)嘧啶-7-酮, Fischer 的化合物 3	Barvian, M. <i>et al.</i> , J. Med. Chem. 43, 4606-4616 (2000); Toogood, P.L., Med. Res. Rev., 21, 487-498 (2001)
喹唑啉类, 例如苯胺基喹唑啉	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
噻唑类, 例如以商品名 GW8510 (#G7791) 从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{21}H_{15}N_5O_3S_2$ 的稠合噻唑 4-{[(7-氧代-6,7-二氢-8H-[1,3]噻唑并[5,4-e]吲哚-8-亚基)甲基]氨基}-N-(2-吡啶基)苯磺酰胺	Davis, S.T. <i>et al.</i> , Science, 291, 134-137 (2001); Hellberg <i>et al.</i> 的 PCT/US02/30059, 以 WO 03/027275 公开
黄酮吡多类, 例如黄酮吡多 (L86 8275; NCS 649890, National Cancer Institute, Bethesda, MD) 和脱氧衍生物	Carlson, B.A. <i>et al.</i> , (1996), Cancer Res., 56, 2973-8

[0332]

生物碱类，例如星形孢菌素（#S1016, A.G. Scientific, San Diego, CA）或 UCN-01（7-羟基星形孢菌素）National Cancer Institute, Bethesda, MD	Rialet, V. <i>et al.</i>, (1991) <i>Anticancer Res.</i>, 11, 1581-90; Wang, Q. <i>et al.</i>, (1995) <i>Cell growth Differ.</i> 6, 927-36; Akiyama, T. <i>et al.</i> (1997), <i>Cancer Res.</i>, 57, 1495-501; Kawakami, K. <i>et al.</i>, (1996) <i>Biochem. Biophys. Res. Commun.</i>, 219, 778-83
Paullones，例如以商品名 kenpaullone（#K3888）从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{16}H_{11}BrN_2O$ 的 9-溴-7,12-二氢-吲哚并[3,2-d][1]苯并氮杂革-6(5H)-酮，或以商品名 alsterpaullone（#A4847）从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{16}H_{11}N_3O_3$ 的 9-硝基-7,12-二氢吲哚并[3,2-d][1]苯并氮杂革-6(5)-酮	Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i>, <i>Cancer Res.</i>, 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. <i>et al.</i>, <i>J. Med. Chem.</i> 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W. <i>et al.</i>, (1999) <i>Cancer Res.</i>, 59, 2566-9; Hellberg <i>et al.</i> 的 PCT/US02/30059, 以 WO 03/027275 公开
CGP41251, 生物碱	Begemann, M. <i>et al.</i>, (1998) <i>Anticancer Res.</i>, 18, 2275-82; Fabbro <i>et al.</i>, <i>Pharmacol Ther.</i>, 1999 年 5 月-6 月, 82(2-3): 293-301
Hymenialdisines，例如从 Biochemicals.net（A.G. Scientific, Inc. (San Diego, CA)的一个部门）可得的具有分子式 $C_{11}H_{10}BrN_5O_2$ 的 10z-hymenialdisine（H-1150）	Meijer, L. <i>et al.</i>, (1999) <i>Chemistry & Biology</i>, 7, 51-63; Hellberg <i>et al.</i> 的 PCT/US02/30059, 以 WO 03/027275 公开
CGP60474, 苯基氨基嘧啶	21; WO95/09853, Zimmermann <i>et al.</i>, 1994 年 9 月 21 日

[0333]

噻唑并嘧啶 2	Attaby <i>et al.</i> , Z. Naturforsch. 54b, 788-798 (1999)
二芳基脲	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)
以商品名丁内酯-I (B7930) 从 Sigma-Aldrich 可得的具有分子式 $C_{24}H_{24}O_7$ 的 (2R)-2,5-二氢-4-羟基-2-[(4-羟基-3-(3-甲基-2-丁烯基)苯基)甲基]-3-(4-羟基苯基)-5-氧代-2-呋喃甲酸甲酯	Kitagawa, M. <i>et al.</i> , Oncogene, 8, 2425-2432 (1993)
Aloisine A, 目录号 128125 (Calbiochem, San Diego, CA)	Mettey, <i>et al.</i> , J. Med. Chem., 2003, 46, 222-236

[0334] 在一个优选的实施方案中,使用c-MAF抑制性试剂来治疗和/或预防骨转移。在一个更加优选的实施方案中,所述骨转移为溶骨性转移。

[0335] 通常,将c-MAF抑制性试剂与药学上可接受的载体相组合地进行施用。

[0336] 术语“载体”是指用来施用活性成分的稀释剂或赋形剂。此类药学载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。优选地,使用水或生理盐水溶液以及右旋糖和甘油的水溶液作为载体,特别是对于可注射溶液。合适的药学载体描述在“Remington's Pharmaceutical Sciences”, E.W.Martin,1995中。优选地,本发明的载体获得州或联邦政府管理机构批准,或者被列入美国药典或对于其在动物中(更特别地,在人类中)的使用普遍得到认可的其他药典中。

[0337] 除了其他因素之外,对于制备本发明的药物组合物的所希望的药物剂型来说必需的载体和辅助物质尤其取决于所选择的药物剂型。所述药物组合物的药物剂型可按照本领域技术人员已知的常规方法来进行制备。用于施用活性成分的不同方法、待使用的赋形剂及其生产方法的综述可以在“Tratado de Farmacia Galénica”,C.Faulí Trillo,Luzán 5,S.A.,1993版中找到。药物组合物的例子包括任何用于口服、局部或肠胃外施用的固体组合物(片剂、丸剂、胶囊、颗粒剂等)或液体组合物(溶液、悬浮液或乳液)。此外,根据需要,药物组合物还可以包含稳定剂、悬浮液、防腐剂、表面活性剂等。

[0338] 为了在医学中的使用,c-MAF抑制性试剂可以以前药、盐、溶剂化物或笼形包合物的形式存在,分离地或者与另外的活性试剂相组合地,并且可以与药学上可接受的赋形剂一起进行配制。对于在本发明中的使用来说优选的赋形剂包括糖类、淀粉、纤维素、橡胶和

蛋白质。在一个特定的实施方案中,将本发明的药物组合物配制成固体药物剂型(例如片剂、胶囊、糖衣丸剂、颗粒剂、栓剂、可以进行重构以提供液体形式的结晶或无定形的无菌固体,等等)、液体药物剂型(例如溶液、悬浮液、乳液、酏剂、洗剂、软膏剂,等等)或半固体药物剂型(凝胶剂、油膏、霜剂,等等)。本发明的药物组合物可以通过任何途径进行施用,包括但不限于口服、静脉内、肌内、动脉内、髓内、鞘内、心室内、经皮、皮下、腹膜内、鼻内、肠、局部、舌下或直肠途径。不同的活性成分施用形式、待使用的赋形剂和其制备过程的综述可以在 *Tratado de Farmacia Galénica*, C.Faulí Trillo, Luzán 5, S.A., 1993 版中和在 *Remington's Pharmaceutical Sciences* (A.R.Gennaro, 编辑), 第20版, Williams&Wilkins PA, USA (2000) 中找到。药学上可接受的载料的实例是现有技术中已知的,并且包括磷酸缓冲盐水,水,乳液,例如油/水乳液,不同类型的湿润剂,无菌溶液等。包含所述载料的组合物可以通过现有技术中已知的常规方法来进行配制。

[0339] 在施用核酸(siRNA、编码siRNA或shRNA的多核苷酸或者编码c-MAF显性失活变体的多核苷酸)的情况下,本发明涵盖为所述核酸的施用特别制备的药物组合物。这些药物组合物可以包含以裸露形式的所述核酸,即不存在保护核酸免于其被机体的核酸酶降解的化合物,这带来了这样的优点:去除了与用于转染的试剂相关的毒性。适合于裸露化合物的施用途包括血管内、肿瘤内、颅内、腹膜内、脾内、肌内、视网膜下、皮下、粘膜、局部和口服途径(Templeton, 2002, *DNA Cell Biol.*, 21:857-867)。备选地,所述核酸可以通过下述方式进行施用:成为脂质体的一部分,所述脂质体缀合至胆固醇或缀合至能够促进转运通过细胞膜的化合物,例如衍生自HIV-1TAT蛋白的Tat肽、黑腹果蝇(*D.melanogaster*)触角蛋白的同源域的第三个螺旋、单纯疱疹病毒的VP22蛋白、精氨酸寡聚体和诸如在W007069090中所描述的那些肽(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; 和 Snyder, E.L. 和 Dowdy, S.F., 2004, *Pharm.Res.* 21:389-393)。备选地,所述多核苷酸可以通过下述方式进行施用:成为质粒载体或病毒载体的一部分,优选地基于腺病毒、腺伴随病毒或反转录病毒(例如基于鼠白血病病毒(MLV)或慢病毒(HIV、FIV、EIAV)的病毒)的载体。

[0340] c-MAF抑制性试剂或包含其的药物组合物可以以少于10mg/千克体重,优选地少于5、2、1、0.5、0.1、0.05、0.01、0.005、0.001、0.0005、0.0001、0.00005或0.00001mg/kg体重的剂量进行施用。单位剂量可以通过注射、通过吸入或通过局部施用来进行施用。

[0341] 剂量取决于待治疗的病状的严重性和应答,并且可以在几天和几个月之间或者直至观察到病状减轻进行变化。最佳用量可以通过进行在患者机体中试剂浓度的定期测量来确定。最佳剂量可以从通过体外或体内(在动物模型中)预先试验而获得的EC50值来确定。单位剂量可以每天一次地或少于每天一次地,优选少于每2、4、8或30天一次地进行施用。备选地,可以施用起始剂量,随后施用一个或几个维持剂量,其通常具有比起始剂量少的量。维持方案可以牵涉用在下述范围内变动的剂量来治疗患者:0.01 μ g至1.4mg/kg体重/天,例如10、1、0.1、0.01、0.001或0.00001mg/kg体重/天。优选地,维持剂量最多以每5、10或30天一次的方式施用。治疗应当持续一段时间,该段时间将会根据患者所遭受的紊乱的类型、其严重性和患者的状态而变化。在治疗后,应当监测患者的进展以便确定在疾病对于所述治疗没有应答的情况下是否应当增加剂量,或者如果观察到疾病的改善或如果观察到不希望

的副作用,则减少剂量。

[0342] 在呈现出c-MAF升水平的、具有骨转移的肺癌患者中治疗或预防骨降解

[0343] 本发明的作者已经证明,在转移(在一个优选的实施方案中为骨转移)中c-MAF的水平出现升高。患有已经转移至骨中的肺癌并且其中在所述转移中出现升高的c-MAF水平的那些患者可以特别地受益于旨在避免由增加的破骨细胞活性引起的骨降解的疗法。

[0344] 因此,在另一个方面,本发明涉及用于避免或防止骨降解的试剂在制备药物中的用途,所述药物用于在受试者中预防和/或治疗骨转移,所述受试者患有肺癌并且在转移性肿瘤组织样品中具有相对于对照样品而言升高的c-MAF水平。

[0345] 备选地,本发明涉及用于避免或防止骨降解的试剂用于在受试者中预防和/或治疗骨转移,所述受试者患有肺癌并且在转移性肿瘤组织样品中具有相对于对照样品而言升高的c-MAF水平。

[0346] 备选地,本发明涉及在受试者中预防和/或治疗骨降解的方法,所述受试者患有肺癌并且在转移性肿瘤组织样品中具有相对于对照样品而言升高的c-MAF水平,该方法包括向所述受试者施用用于避免或防止骨降解的试剂。

[0347] 在一个特定的实施方案中,所述骨转移为溶骨性转移。在另一个特定的实施方案中,所述肺癌为NSCLC。

[0348] 已经针对本发明第一个方法详细描述了术语和表述“受试者”、“肺癌”、“肿瘤组织样品”、“转移”、“c-MAF基因”、“增加的或升高的表达水平”和“对照样品”,它们同样可应用于用于避免或防止骨降解的试剂。

[0349] 适合于在本发明中所述治疗方法的能够避免或防止骨降解的试剂已经在个性化疗法方法的背景下在前面详细进行了描述。

[0350] 参考样品或对照样品为具有还未遭受转移的肺癌受试者的肿瘤组织样品,或者其相应于在未遭受转移的肺癌受试者的活组织检查样品中在肿瘤组织集合中所测量的c-MAF基因表达水平的中位值。

[0351] 已经针对本发明的第一个方法详细描述了用于确定或定量c-MAF的水平相对于对照样品而言是否出现升高的方法,它们同样可应用于用于避免或防止骨降解的试剂。

[0352] 备选地,可以进行联合治疗,其中将超过一种上面提及的用于避免或防止骨降解的试剂相联合以治疗和/或预防转移,或者可以将所述试剂与其他补充物(例如钙或维生素D)或与某些激素组合。

[0353] 通常,将用于避免或防止骨降解的试剂与药学上可接受的载体相组合地进行施用。已经在上面关于c-MAF的抑制性试剂以及可以进行施用的形式和剂量定义了术语“载体”和载体的类型,它们同样可应用于用于避免或防止骨降解的试剂。

[0354] 本发明的试剂盒

[0355] 在另一个方面,本发明涉及用于在患有肺癌的受试者中预测肺癌的骨转移的试剂盒,所述试剂盒包括:a)用于定量在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的装置;和b)用于将在所述样品中c-MAF的表达的定量水平与参考c-MAF表达水平进行比较的装置。

[0356] 在另一个方面,本发明涉及用于预测患有肺癌骨转移的受试者的临床结果的试剂盒,所述试剂盒包括:a)用于定量在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的装置;和b)用于将在所述样品中c-MAF的定量的表达水平与参考c-MAF表达水平进行比较的装置。

[0357] 在另一个方面,本发明涉及用于确定用于患有肺癌的患者的疗法的试剂盒,所述试剂盒包括:a)用于定量在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的装置;和b)用于将在所述样品中c-MAF的定量的表达水平与参考c-MAF表达水平进行比较的装置;和c)用于基于所定量的表达水平与参考表达水平的比较确定用于在所述受试者中预防和/或降低骨转移的疗法的装置。d)用于基于所定量的表达水平与参考表达水平的比较而排除用于在所述受试者中预防和/或降低骨转移的疗法的装置。

[0358] 在另一个方面,本发明涉及一种试剂盒,包括:i)用于定量在患有肺癌的受试者的样品中c-MAF的表达水平的试剂,和ii)已经预先确定与骨转移的风险相关的一个或多个c-MAF基因表达水平指标。

[0359] 用于定量所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的装置已经在前面详细进行了描述,包括16q23和16q22-24基因座扩增和易位。

[0360] 在一个优选的实施方案中,用于对表达定量的装置包括特异性结合和/或扩增所述c-MAF基因的探针和/或引物组。

[0361] 在一个特定的实施方案中,所述肺癌为SCLC或NSCLC癌症。

[0362] 在一个特定的实施方案中,所述试剂盒应用于(但不限于)肺癌活检组织、循环肺癌细胞、循环肺肿瘤DNA。

[0363] 本发明的方法的所有特定实施方案均适用于本发明的试剂盒和它们的用途。

[0364] 用于对患有肺癌的受试者的样品进行分型的方法

[0365] 在另一个方面,本发明涉及用于对患有肺癌的受试者的样品进行分型的体外方法,所述方法包括:

[0366] a) 提供所述受试者的样品;

[0367] b) 定量在所述样品中c-MAF的表达水平;

[0368] c) 通过将c-MAF的定量的表达水平与c-MAF表达的预先确定的参考水平进行比较来对所述样品进行分型;

[0369] 其中所述分型提供在所述受试者中骨转移的风险相关预后信息。

[0370] 用于定量在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的装置已经在前面详细进行了描述,包括16q23和16q22-24基因座扩增和易位。在一个特定的实施方案中,所述肺癌为SCLC或NSCLC癌症。在一个优选的实施方案中,所述样品是肿瘤组织样品、循环肿瘤细胞或循环肿瘤DNA。

[0371] 用于对患有肺癌的受试者进行分类的方法

[0372] 在另一个方面,本发明涉及将患有肺癌的受试者分类成组群的方法,包括:a)确定在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平;b)将所述样品中c-MAF的表达水平与c-MAF表达的预先确定的参考水平进行比较;和c)基于在所述样品中所述c-MAF的表达水平将所述受试者分类成组群。

[0373] 用于定量在所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的装置已经在前面详细进行了描述,包括16q23和16q22-24基因座扩增和易位。

[0374] 在一个特定的实施方案中,所述肺癌为SCLC或NSCLC癌症。在一个优选的实施方案中,所述样品是肿瘤组织样品、循环肿瘤细胞或循环DNA。在一个优选的实施方案中,所述组群包括至少一个其他个体,其已经被确定为与所述参考表达水平相比具有可比较的c-MAF

表达水平。在另一个优选的实施方案中,所述样品中c-MAF的所述表达水平相对于所述预先确定的参考水平而言增加,并且其中组群的成员被分类为骨转移风险增加。在一个另一个优选的实施方案中,所述组群是用于进行临床试验的。在一个优选的实施方案中,所述样品是肿瘤组织样品。

[0375] 下面的实施例用于举例说明本发明,但并不意欲限制其范围。

实施例

[0376] 实施例1

[0377] c-MAF和16q22-24的临床相关性和预后值用于鉴定处于转移(特别是骨转移)风险的患者

[0378] 在不同肺癌患者样品组群中测试了c-MAF。第一组群包括基因表达谱和针对含有肺癌原发肿瘤的转录组的转移的临床记录,以及第二组群基于组织微阵列形式的肺肿瘤活检组织和针对到骨转移的时间和总存活率的临床记录。这些肿瘤是所有肺癌亚型和阶段的代表。在第一组群中,c-MAF基因的表达与包括到转移的时间的临床参数相关。类似地,第二组(n=74)肺原发肿瘤活检组织,其用于确定针对原发肿瘤诊断之后的骨复发和总存活率,建立了采用特异于c-MAF的抗体和特异于c-MAF基因座的FISH探针通过免疫组化和荧光原位杂交得到c-MAF蛋白表达和16q23基因组增益(genomic gain)的水平以及c-MAF表达和16q23基因组获得的水平与骨复发的风险之间的关系。

[0379] 详细说明:

[0380] 患者组群I

[0381] 我们进行了适当的统计学分析以观察在这些肿瘤中MAF的表达是否与转移相关。我们采用了一个组群的肺原发肿瘤,包括EGFR和KRAS突变体以及SCLC和NSCLC。患者的信息是被提取自:

[0382] Chitale D,Gong Y,Taylor BS,Broderick S,Brennan C,Somwar R,Golas B,Wang L,Motoi N,Szoke J,Reinersman JM,Major J,Sander C,Seshan VE,Zakowski MF,Rusch V,Pao W,Gerald W,Ladanyi M.“An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4in EGFR-mutant tumors.”Oncogene.2009;28:2773-83.

[0383] 所有的统计学分析是采用Bioconductor(Gentleman et al.(2004))在R中进行的。

[0384] 我们调整了Cox比例风险模型(采用来自Packaged survival的R函数coxph)以观察我们是否可以通过MAF表达来解释转移表型。C-MAF具有统计学上显著的作用(采用在affymetrix阵列中特异性针对c-MAF的三个独立探针)。肺原发肿瘤中c-MAF的基因表达与如在卡-迈图中所观察到的转移显著相关,并通过所获得的HR和p值高度突出(图1)。患者组群II

[0385] 类似地,固定肺原发肿瘤的数据组(dataset)(74),其可用于针对原发肿瘤诊断之后的骨复发的临床记录,采用特异于c-MAF的抗体通过免疫组化确定c-MAF的水平,建立c-MAF表达的水平 and 骨复发的风险之间的关系。样品来自肺癌患者的第二石蜡包埋原发肿瘤组织。这些样品由Vall d'Hebron肿瘤学研究所在其临床实践过程中与所需相关临床数据一起收集并得到临床委员会的批准。

[0386] 样品选择符合以下要求:

[0387] 9个样品属于诊断时患有局部疾病(M0)、在随访的任何时间确认有骨复发的患者。

[0388] 49个样品属于诊断时在至少5年后保持没有转移的患者。

[0389] 剩下的16个肿瘤来自诊断时在之后在除了骨之外的任何其它位置具有复发的M0患者。

[0390] 实施例2

[0391] c-MAF基因表达与肺癌中的转移(特别是骨转移)风险相关

[0392] 采用上述肺癌表达数据组,将c-MAF骨转移基因的表达与包括转移的临床参数相关联。如图1中所述,c-MAF的表达与转移的高风险相关。标准的统计学分析之后,我们显示了在这些肿瘤中MAF表达与转移显著相关。采用了一个组群的肺原发肿瘤,包括EGFR和KRAS突变体以及SCLC和NSCLC。所有的统计学分析是采用Bioconductor(Gentleman et al.(2004))进行的。

[0393] 调整了Cox比例风险模型(采用来自Packaged survival的R函数coxph)以观察我们是否可以通过MAF表达来解释转移表型。c-MAF具有统计学上显著的作用(采用在affymetrix阵列中特异性针对c-MAF的三个独立探针)。如在卡-迈(kaplan meier)图中所观察到的,在肺原发肿瘤中c-MAF的基因表达与转移显著相关,通过所获得的HR和p值高度突出(图1)。根据三组c-MAF表达,肿瘤被分类为高(>+1平均值标准偏差)、中(<+1平均值标准偏差并且>-1平均值标准偏差)和低(<-1平均值标准偏差)。

[0394] 实施例3

[0395] c-MAF的表达与骨转移相关

[0396] 免疫组化分析

[0397] 在Dako Link平台中的带正电的载玻片上进行cMAF免疫染色。脱蜡处理之后,进行抗原修复(retrieval)。淬灭内源性过氧化物酶。采用抗c-MAF的抗体,接着用与过氧化物酶偶联的二抗孵育。由计算机化的测量对c-MAF免疫染色进行评分。

[0398] 在肺癌中针对转移和骨转移的c-MAF的预后和预测值

[0399] 评估了针对肺癌转移的c-MAF表达的预后和预测值。通过免疫组化(IHC)确定c-MAF蛋白水平。由计算机化的测量对MAF免疫染色进行评分。采用配备了Nuance Fx多光谱成像系统的DM2000徕卡显微镜(CRI Inc)在420和700nm之间以10nm的波长间隔对每个样品获取九个代表性图像。在获取图像的光谱数据组之前,进行常规自动曝光,并对载片的空白区域进行成像以确定在每个波长大约填满90%的装置孔所需的曝光时间,以补偿源强度(source intensity)、滤光片传递效率(filter transmission efficiency)和相机灵敏度的差异。建立纯的DAB和苏木素染料颜色库并将其用于采用Nuance 1.6.4软件对颜色拆混。然后针对每个新的病例获取参考的多维数据集(在不同波长拍摄的图像的堆叠),接着采用相同的曝光时间对三个代表性组织区域进行光谱成像。图像解卷积之后,光谱数据被平场处理(flat fielded)以补偿照射中的不均匀性并且过滤背景。采用Beer定律转换将样品除以参考多维数据集的比取负对数,将阳性信号从传递转换成光密度单位。设置计算机辅助的阈值,其建立突出所有阳性信号的伪颜色图像。分析获得感兴趣区域的平均强度的c-MAF定量数据。只有表皮细胞(正常的和恶性的)而不是基质细胞或淋巴细胞的核通过设定不同大小阈值而被自动检测,并由病理学家确认。计算每个病例用于统计学分析的所有感兴趣

区域的信号强度的平均值。计算机化测量的输出产生针对c-MAF表达的范围在1160至99760光密度单位(O.D.)的连续数据。按照标准程序(AUC0.802)基于接收的工作曲线确定高和低表达的截断值(200000.O.D.)。结果总结于表3中。

[0400] 表3

		骨转移	
		否	是
[0401]	c-MAF ≤20,000 OD	61	2
	c-MAF >20,000 OD	4	7

[0402] 基于这些值,高c-MAF组对低c-MAF组患有骨转移的风险的比值比是OR(任何时候的骨转移)=53.37(95%C.I.8.24-345.92)。

[0403] 接下来,确认了该研究的总群体中骨进展的时间(图2a),然后评估这两组没有存活时在任何时候的骨转移的概率(图2b)。有趣的是,在研究的组群中,c-MAF高表达的肿瘤比那些表达低水平的具有更低的总存活率。

[0404] 基于所分析的第二组群,提取了诊断临床特征。c-MAF高水平表达以0.778的灵敏度、0.938的特异性、63.6%的阳性预测值和96.8%的阴性预测值而预测骨转移。

[0405] 肺肿瘤中的c-MAF基因或蛋白表达与任何时候的转移和骨转移显著相关。

[0406] 实施例4

[0407] 16q22-q24(包括c-MAF基因)染色体扩增预测并且是肺癌中转移(特别是骨转移)风险的预后指标

[0408] 接下来,我们确定包括c-MAF基因座的chr16q22-q24的增益是否与肺癌患者中的骨转移的风险相关。为此,采用鉴定chr16q22-q24扩增的16q2314q32双重荧光原位杂交(FISH)探针以测量16q22-24区域的拷贝数。还采用14q32探针来标准化肿瘤多倍性。

[0409] 评估了与肺癌中骨转移相关的16q22-24CAN增益的预后和预测值。通过FISH确定16q23和14q32拷贝。载片与16q23MAF和14q32IGH探针混合物孵育。该SpectrumOrange探针侧接MAF基因区域并由每个大约350kb并间隔大约2.2Mb的两个节段组成。该着丝粒节段定位于chr16:75729985-76079705(2006年3月组装,UCSC基因组浏览器)并且该端粒节段定位于chr16:78290003-78635873(2006年3月组装,UCSC基因组浏览器)。该探针侧接五个基因VAT1L、CLEC3A、WWOX、5srRNA和MAF(从着丝粒至端粒的顺序)。平行地,CEP16(着丝粒chr16)探针(Abbot)用于确定CNA。CEP16(16q11.2)(Abbot)探针用于对16q23CNA进行评分。应用DAPI复染色并用荧光显微镜获取图像。

[0410] 结果总结于表4和5中。

[0411] 表4:基于截断值16q23>=2.5个拷贝,肿瘤针对16q22-24增益将是阳性的

		骨转移	
		否	是
[0412]	16q23 ≤2.5	13	9
	FISH >2.5	44	0

[0413] 表5: 基于截断值 $16q23 \geq 1.5$ 个拷贝、通过 $14q23$ 的拷贝数标准化, 肿瘤针对 $16q22-24$ CNA增益将是阳性的。

		骨转移	
		否	是
[0414]	16q23		
	≤ 1.5	4	9
	CNA		
	> 1.5	53	0

[0415] 基于这些值, 计算了在 $16q22-24$ 增益或CNA增益阳性组对阴性组中患有骨转移风险的比值比。由于没有患有骨转移的患者针对该确定评分为负并且为了避免估算上的误差, 按照标准统计学程序 (Glas, A.S. et al., 2003, Journal of Clinical Epidemiology 56, 1129-1135), 给每个值加上0.5单位并重新计算参数。基于该估算, 患有骨转移的 $16q22-24$ 增益阳性患者的OR为62.63 (95%CI 3.42-1147.78), 采用 $14q32$ 阳性患者对对照标准化的 $16q22-24$ CNA增益的OR为225.89 (95%CI 11.22-4546.99)。组群大小较小使得估算不精确, 但在每个病例中最少3.42和11.22的临床相关OR之内。

[0416] 基于采用FISH以测量 $16q23$ 增益的数据, 提取诊断临床特征。 $16q22-24$ 增益 (每个细胞 ≥ 2.5 拷贝) 以1.00的灵敏度、0.772的特异性、40.9%的阳性预测值和100.0%的阴性预测值预测处于骨转移高风险的肺癌患者。

[0417] 表6: 诊断临床特征

		C.I.	95%
[0418]	灵敏度	100.0%	70.1% - 100.0%
	特异性	77.2%	64.8% - 86.2%
	PPV	40.9%	23.3% - 61.3%
	NPV	100.0%	92.0% - 100.0%

[0419] 基于采用FISH以测量 $16q23$ 增益、相对 $14q32$ 拷贝标准化的数据, 提取诊断临床特征。 $16q22-24$ CNA增益 (每个细胞相对 $14q32$ 拷贝标准化, 为 ≥ 1.5 个 $16q23$ 拷贝) 以1.00的灵敏度、0.930的特异性、69.2%的阳性预测值和100.0%的阴性预测值预测肺癌的骨转移风险。

[0420] 表7: 诊断临床特征

		C.I.	95%
[0421]	灵敏度	100.0%	70.1% - 100.0%
	特异性	93.0%	83.3% - 97.2%
	PPV	69.2%	42.4% - 87.3%
	NPV	100.0%	93.2% - 100.0%

[0422] 肺肿瘤中的 $16q22-24$ (并且特别是 $16q23$) 的扩增/增益或CNA增益强力预测并与任何时候的骨转移风险相关。

序列表

<110> Fundacio Privada Institut de Recerca Biomedica
 Fundacio Privada Institutio Catalana de Recerca I Estudis Avancats
 Gomis, Roger
 Planet, Evarist
 <120> 用于肺癌转移的诊断、预后和治疗的方法
 <130> 3190.002PC01/TJS/E-H
 <140> To Be Assigned
 <141> Herewith
 <150> 61/656,372
 <151> 2012-06-06
 <160> 13
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 6878
 <212> DNA
 <213> 人 (Homo sapiens)
 <400> 1
 agaggtctta aaatctttt tcatcttcta gctgtagctc gggetgcttg teggtcttgc 60
 ctccccctcc cccctttgct ctctgctcgc tctttcccca ggaattcgct attttgett 120
 tttaaaaaaa ggcaagaaag aactaaactc cccctccct ctctccagt cgggtctgac 180
 ctctgctctg cactttgcac agaggtagag agcgccgcgag ggagagagag gaaagaaaaa 240
 aaataataaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactcccccg 300
 tgccaaggcc cgcgcccccc ggacagacgc ccgccgcgc tccagccccg agcggacgcc 360
 gcgcgcgcgc tgcctgcagc ccgggcccgc gaggcgagcc ctctcttatg caaagcgcgc 420
 agcggagcgg cgagcggggg acgccgcgc ccgggcccgg ctctccagc ttcgcgcgcg 480
 cagccacacac cgcgcgcacc gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgcgcgc 540
 tcggcgcgca aggagggcag cgagcaagga ggggccgggg cgagcgaggg agcacattgg 600
 cgtgagcagg ggggagggag ggcggcgcg gcgggcgcgg gcaggcgagg ggggtgtgtg 660
 tgtgagcgcg ctccgagggt tcgggcagc caccgccgcg caagctagaa gcgcgccagc 720
 cggcaagct ggtcaccgcg ctggccacc agcacagccc gctggccct ctctgcagc 780
 ccactctggc gagcgggcgc ggcggcggc gcggcggcag gagaatggca tcagaactgg 840
 caatgagcaa ctccgacctg cccaccagtc ccttgccat ggaatatgtt aatgacttcg 900
 atctgatgaa gtitgaagtg aaaaaggaa cgggtggagc cgaccgcac atcagccagt 960
 gcggccgtct catcgccggg ggtctgctgt cctccacccc catgagcacg ccgtgcagct 1020
 cggtgccccc ttccccagc ttctcggcgc ccagccggg ctcgggcagc gaggagaagg 1080
 cgcacctgga agactactac tggatgaccg gtaeccgca gcagctgaac cccgaggcgc 1140
 tgggtttcag ccccgaggac gcggtcgagg cgtcatcag caacagccac cagctccagg 1200
 gcggcttcga tggttacgc cgcggggcgc agcagctggc cgcggcgccc ggggcccgtg 1260
 ccggcgccct cttgggcggc agcggcgagg agatgggcc ccgcccgcc gfggtgtccg 1320
 ccgtgatcgc cgcggcgccc gcgcagagcg gcgcgggccc gcactaccac caccaccacc 1380
 accacgcgc eggcaccac caccaccga cggccggcgc gcccggcgc gcgggcagcg 1440
 cggccgcctc ggccggtggc gctggggcgc cggcgggcgg tggcccgcc agcgtgggg 1500

[0001]

[0002]	gcggcggcgg cggcggcggc ggcggaggcg gcggggcgcg ggcggggcg gggggcgccc	1560
	tgcacccgca ccacccgcc ggccggcctgc acttegacga ccgcttctcc gacgagcage	1620
	tggtagccat gtctgtgcgc gagctgaacc ggcagctgcg cggggctcagc aaggaggagg	1680
	tgatccggt gaagcagaag aggcggaccc tgaaaaaccg cggetatgcc cagtcctgcc	1740
	gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgtgcagc	1800
	aagtcgacca cctcaagcag gagatctcca ggctgggtgcg cgagagggaac gcgtacaagg	1860
	agaaatacga gaagttagtg agcagcggtc tccgagaaaa cggtctgagc agcgacaacc	1920
	cgctctctcc cgagtcttct atgtgagctc gacacgcgat tccagctagc caccctgata	1980
	agtgtctccg gggggctcgg ctgggtgtgc ggcttgcctag ttctagagcc atgtctgcca	2040
	ccacctcacc acccccacc ccaccgagtt tggccccctt ggccccctac acacacacaa	2100
	accgcgacgc acacaccaca cacacacaca cacacacaca cacaceccac accctgctcg	2160
	agtttgtggt ggtgggtggt gtittaaact ggggagggaa tgggtgtctg gctcatggat	2220
	tgccaatctg aaattctcca taacttgcct gcttgttttt tttttttttt tacacccccc	2280
	cgcgccaccc ccggaclgc acaatgtica atgactcag cagagttctt caigtgaac	2340
	gttgatcacc tttagagcct gcacattcca catatttttt ctctctcttc ccttcagtt	2400
	catgaactgg ttttcatttt ctgtgtgtgt gtgtgtttta tttgttttg attttttttt	2460
	ttaattttac ttttagagct tgetgtgttg cccacctttt ttccaacctc caccctcact	2520
	cttctcaac ccatctcttc cgagatgaaa gaaaaaaaa agcaaagtgt tttttcttc	2580
	tcctgagttc ttcatgtgag attgagcttg caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag	2640
	acttgacgag tgccgagttc catcggtttt ttttttttgc attgttatgc taaaatagag	2700
	aaaaaaaaac tcatgaacct tccacaatca agcttcgcatc aaacctcttg gtgtgacttg	2760
	tgagtttttg ccttgtgatg ccaaatctga gagtttagtc tgccattaaa aaaacictat	2820
	ctcatctcat gcattattat gcttgcactc ttgtcttagc aacaatgaac tataactgtt	2880
	tcaaagactt tatgaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcctgctgga	2940
	catgtatggt ataattattt ttctcttttt ttctcttttt ggtttgaaa tggacgttcg	3000
	aagacttata gcctggcatt catacttttg ttttattgcc tcatgacttt tttagttta	3060
	gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa ttttgcatct gctccaaaac	3120
	tgctttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgcactg aaggcattcc ttgtcaaga	3180
	taccagaatg ggttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactcttaa tgtttcttt	3240
	ttaataagaa tgacgcccc ctttggggac taaaattgtg ctattgccga gaagcagttc	3300
	aaaattttat ttttaaaaag agaaactgcc ccattatttt tggtttgttt tatttttatt	3360
	ttatattttt tggttttttg tcatgttcaa atgtggaatg ctctgggttt ctagtatata	3420
	atttaattct agtttttata atctgttagc ccagttaaaa tgatgctac agataaagga	3480
	atgttataga taaatttgaa agagttaggt ctgttttagc gtagattttt taaacgattg	3540
	atgcactaaa ttgtttacta ttgtgatgtt aaggggggta gagtttgcaa ggggactgtt	3600
	taaaaaagt agcttataca gcctgtgctt gcaacttaaa tataagttgg gtatgtgtag	3660
	cttttgcctt accacigact gttttgaaaa ccaagttatt aagaggggaa acgccccgtt	3720
	ttatattctg aggggtattt tacattcaaa aatgtatgtt ttttttctt ttcaaaatta	3780

[0003]

```

aagtatttgg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaaa 3840
ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca 3900
cagtttttaag atgatgcaga tttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattttct 3960
gtaactttaa aaaaaatcca cagtttttaa ggcaataatc agtaaatgtt attttaggg 4020
actgacatcc tgtcttttaa aagaaatgaa aagtaaatct taccacaata aatataaaaa 4080
aatcttgca gttacttttc tttacatat ttgtctgtc aaaattgttt tatactttga 4140
gttactaaet aaccaegcgt gttgttccta tgtcttttc ttctatttc aattctggtt 4200
atatcaagaa aagaataatc facaataata aacggcattt ttttttgatt ctgtactcag 4260
tttcttagtg tacagtttaa ciggcccaa caacctcgtt aaaagtgtaa atgcatect 4320
tttctccagt ggaaggatcc ctggaggaat agggagacag taaticaggg tgaaattata 4380
ggtgtttttt tgaagttagg aggtcggccc catatactga ttagcaatat ttaafataga 4440
tgtaaatatt gacctattt tttctcccc aaagttttca gttttcaaat gagttgagcc 4500
ataattgccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggcttc ctgagcatgg 4560
ccctacactt ctgacagga gcaaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc 4620
gcacacaggg tggcttgccc acataatgat tgaacggtaa agagaaacag cgtttgcctt 4680
ttcactaaag ttgactattt ttctttcttc tcttacacac cgagattttc ttgttagcaa 4740
ggcctgacaa gatitaaat aaacatgaca aatcatagtt gttgttttg tttgtcttt 4800
ctctttaaca ctgaagatca ttgtcttaa ataggaaaa gaaaatccac tcttacttc 4860
catatttcca agtacatata tggtttaaac tatgttatca aatcataatt caccgtgaat 4920
attcagtggg gaacttctct acctggaiga gctagtaatg attcagatc atgctatccc 4980
cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaaatatag gctgtgcttt gatttactgg 5040
tatttcccc aaaaataggt gigtatgggg gctgaactaa agatcccttg gaaagactca 5100
aaactacctt cactagtagg actccaaage gctgacctat ttttaaata cacaattcca 5160
tgaaactaat gttacaaatt catgcagttt gcactcttag tcatctccc ctgacacacc 5220
aatagaatgt tagacaaagc cagcactgtt ttgaaaatc agccaaacac gatgactttt 5280
gttttgttt ctgcegttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340
cttattttta agaaaacagg ttgtgtttgg tctgtctaag ttctggccag tttatcatct 5400
ggccttccct cctatttttt acaaaacacg aagacagtgt gtaacctcga cattttgacc 5460
ttcctttatg tctagtttta gacaggctcc tgaatccaca ctttaatttg ctttaacaaa 5520
gtcttaatat taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcatatatt 5580
tctttcttt ttttttttt ttctctatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag 5640
cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaaa agcatctgat gaaagatttt agggcaaacat 5700
ttcacaataa agagtatat tctggatgta gttattgcag ttatctcatg acaaatgagg 5760
cctggatttg aaggaaaaata tagttgtgta gaattaagca ttttgatagg aatctacaag 5820
gtagtgaat ataataagca gggttgggcc cccaaacttt agaaaatcaa atgcaaaggt 5880
gctggcaaaa atgaggtttg agtggctggc tgaagagaa ggttaactcc tagtaaaagg 5940
catttttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtgggagtag caaacaata 6000
catgtttttt tttcttaca aagaactcct aatccctgag taagtgccat tcattacaat 6060

```

	aagtctctaa atttaaaaaa aaaaaaatca taigaggaaa tctagctttc cccittacgc	6120
	tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcccttc attccaatta cagaactgag	6180
	cccactcgca agttggagcc atcagtgga tacgccacat ttiggaagcc ccagcatcgt	6240
	gtacttacca ggtgttcac aaatgaaat ttgtgtgaga getgfacatt aaaaaaatc	6300
	atcattatta ttattatttg cagtcattga gaaccaccta cccctgaact ctgtttagtc	6360
	tcctttttta ataaaaatta ctgtgttaga gaagaagget attaatgta gtagttaact	6420
	atgcctcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa ggcactcct gcttttcgat	6480
	ttatggtgtg tgcaagtaaa caggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaaa	6540
	ttcaactgaa ttacaaagat acatatatat gcatatatat aatggaaagt ttcccgaat	6600
	gcaacaatta gcattttaaa atcatatata ggcatgcaca ttctaaatag tacttttca	6660
	tgtctcattg ttctcttggc agataatttt actaagaaga aaaatagata ttgactccc	6720
	cttccctaaa caaatccacg ggcagaggct ccagcggagc cgagccccc gtittctcgc	6780
	taggccctag acggtgttgc atttateagt gatgtcaaac gtgtctattt gtcagacata	6840
	gctgtaaatg aaaacaatgt gggcaaat acaaagtt	6878
	<210> 2	
	<211> 2656	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 2	
[0004]	gagcctttta aatctttttt catcttctag ctgtagctcg gctgtctgt cggettggcc	60
	tccectccc ccccttgctc tctgctcgt ctttcccag gacttcgta ttttgtttt	120
	ttaaaaaag gcaagaaaga actaaactc cccctccc ctcctccagtc ggcgtgcacc	180
	tctgctttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaa	240
	aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt	300
	gccaaaggccc gcgcgcgccg gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgccg	360
	cgcgcgccct gcttcagacc cgggcggcgc aggcgagccc ttctttatgc aaagcgcga	420
	gcggagcggc gagcggggga gcgcgcgcac cgggcggggc tcttcagct tcgccgccgc	480
	agccaccacc gccgccaccg cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gccgccggt	540
	cggcgcgcga ggaggcgagc gagcaaggag gggcgggggc gagcgaggga gcacattggc	600
	gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgt	660
	gtgagcgcgc tcggagggtt cgggccagcc accgcgcgc aagctagaag cgcgccagcc	720
	cggcaagctg gctcaccgcc tggccacca gcacagcccg ctggccctc tcttcagcc	780
	catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc	840
	aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtc cctggccatg gaatagtta atgacttca	900
	tctgatgaag tttagaagta aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatca tcagccagt	960
	cggcgtctc atcgccgggg gctcgtgtc ctccaccccc atgagcacgc cgttcagctc	1020
	ggtgccccct tccccagct tctcggcgc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc	1080
	gcacctgga gactactact ggaatgaccg ctaccgcgag cagctgaacc ccgaggcgt	1140
	gggttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccagg	1200

	cggtctcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcgccg gggccggtgc	1260
	cggcgcctcc ttgggcggca gcgzcagga gatgggccc gccgcgcgc tgggtgccgc	1320
	cgtagctgcc ggggcgcgc cgagagcgc cgcgggccc cactaccacc accaccacca	1380
	ccacgcgcgc gccaccacc accaccgac gccgcgcgc ccgggcgcgc cgggcagcgc	1440
	ggccgcctcg gccggtggcg ctgggggcgc gggcgcggt gggccggcca gcgctggggg	1500
	cgggcgcggc gggcgcggc gcgagggcg cgggggcggc gggggcgcg ggggcgcct	1560
	gcacccgac cagccgcgc gcgctgca ctgcagcgc cgttctccg acgagcagct	1620
	ggtgacctg tcgtgcgcg agcgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggagaggt	1680
	gacccgctg aagcagaaga ggcggacct gaaaaaccg ggctatgcc agtctgccg	1740
	cttaagagg gtgcagcga gacacgctt ggagtcggg aagaaccagc tgcgcagca	1800
	agtcgaccac ctcaagcagg agatctccg gctggtgcgc gagagggagc cgtacaagga	1860
	gaaatagcag aagtgtgga gcagcgctt ccgagaaaac ggtcgcagca gcgacaacc	1920
	gicctctccc gagttttca taactgagc cactcgcaag ttggagccat cagtgggata	1980
	cgccacattt tggagcccc agcatcggt acttaccagt gtgttcaca aatgaaattt	2040
	gtgtgagagc tctacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgc gtcagggaga	2100
	accacctacc ctgacitct gtttagctc ctllltaaa aaaaallact ggttagaga	2160
	agaaggctat taaatgtagt agttaactat gcctcttgc tgggggttcc atagagaccg	2220
	gtaggaaage gcactcctgc ttttgcatt atggtgtgt caagtaaaca ggtgcattgc	2280
	tttaaccctg ccaactagt tttaaaaatt cactgaaatt acaagatac atataatgc	2340
[0005]	atatataaa tggaaagttt ccgggaagc aacaattagc attllaaat cataatagg	2400
	catgcacatt ctaaatagta cttttcatg ctccattgtt tcctggcag ataattttac	2460
	taagaagaaa aafagatatt cgactccct tccctaaaca aatccacggg cagaggctcc	2520
	agcgagcgc agccccctg tttctcgta gccctagac ggtgtgcct ttatcagta	2580
	tgcaaacgt gctcatttgc cagacatagc tglaaatgaa acaatgtgt ggcaaaaac	2640
	aaagttaaaa aaaaaa	2656
	<210> 3	
	<211> 6887	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 3	
	gaggctttaa aatctttttt catctcttag ctgtagctcg ggtgcttgt cgcttggcc	60
	tcctctccc ccttttctc tctgctctg ctctcccgac gacttcgta ttttctttt	120
	ttaaaaaag gcaagaaaga actaaatcc cccctccctc tctccagtc gggctgcacc	180
	tcctccttc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaa	240
	aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccct	300
	gccaaaggcc gcgcgcgcg gacagacgcc cgccgcgct ccagcccgga gcggacgcg	360
	cgcgcgcct gctgcagcc cgggcgcgc aggcagacc ttccttatgc aaagcgcga	420
	gcggagcgc gagcgggga gcgcgcgac cgggcgggc tctccagct tcgccgcgc	480
	agccaccacc gccgccacc cagctcgcg aggatcttcc cgagcctgaa gccgcgcgt	540
	cggcgcgcaa ggaggcagc gagcaaggag gggccgggc gagcgaggga gcacattggc	600

[0006]	gtgagcaggg gggagggagg gcgggcgcgg ggggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgtgt	660
	gtgagcgcgc tcggaggttt cgggccagcc accgccgcgc aagctagaag cgccccagcc	720
	cggcaagctg gctcaccgcg tggccaccca gcacagcccg ctggcccccic tectgcagcc	780
	catctggcgg agcggcggcg gcggcgccgg cggcggcagg agaattggcat cagaactggc	840
	aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga	900
	tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcatica tcagccagtg	960
	cggccgtctc ategccgggg gctcgtctgc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc	1020
	ggtgccccct tccccagct tctcggcgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc	1080
	gcacctgtaa gactactact ggatgaccgg ctacccgcag cagctgaacc ccgaggcgct	1140
	gggcttcage cccgaggacg cggtcgaggg gctcatcagc aacagccacc agctccaggg	1200
	cggcttcgat ggtacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcgcgcggcg ggcccggtgc	1260
	cggcgccctcc ttggggcgca gcggcgagga gatgggcccc gccgcgcggc tgggtgtccgc	1320
	cgtgatcgcc gcggcccgcc cgcagagcgg cgcgggcccc cactaccacc accaccacca	1380
	ccacgcgcgc ggccaccacc accaccgcac ggccggcgcg cccggcgccg cgggcagcgc	1440
	ggccgcctcg gccggtggcg ctggggcgcg gggcgggcgt ggcccgccca gcgctggggg	1500
	cggcgggcgc ggccggcgcg gcggagggcg cggggcgcg gcggggcgcg gggcgccct	1560
	gcaccgcac caccgcgcgc gcggcctgca cttcgacgac cgcttctccg acgagcagct	1620
	ggtgaccatg tctgtgcgc agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt	1680
	gacccgctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtctgcgc	1740
	cttaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag aagaaccagc tgetgcagca	1800
	agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgggtgcg gagaggagc cgtacaagga	1860
	gaaatacgag aagtgtgtga gcagcgctt ccgagaaaac ggctcgagca gcgacaaccc	1920
	gtctctccc gagtttttca tgtgagtcg acacgcgatt ccagctagcc acctgataa	1980
	gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgcctgt tctagagcca tgcctgccac	2040
	cacctacca ccccccacc caccagttt ggccccctg gcccccata cacacacaa	2100
	cccgacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acaccacaca cctgtctga	2160
	gtttgtgtgt gtgtgtgtgt ttttaacctg gggagggaat ggggtgtctg ctcatggatt	2220
	gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt tttttttttt acaccccccc	2280
	gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgatctcage agagtcttcc atgtgaaacg	2340
	ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atattttttc ttctcttccc ctttcagttc	2400
	atgaactggt gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat ttgttttggg tttttttttt	2460
	taattttact tttagagctt gctgtgttgc ccacettttt tccaacctcc acctcactc	2520
	cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaa gcaagttttt ttttcttct	2580
	cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aanaatgtga atgttataga	2640
	cttgccgcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga	2700
	aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcccgcatca accttctggg tgtgacttgt	2760
	gagtttttgc ctgtgagtc caaatctgag agtttagtct gccattaaaa aaacatcttc	2820
	tcctctcag catatttatg cttgctaact tgtcttagca acaatgaact ataactgttt	2880

[0007]

```

caaaagacitt atggaaga gacattatat taataaaaa aaaaagcctg catgctggac 2940
atgtatggta taattatttt ttccittttt ttcccttttg gcttggaaat ggacgttcga 3000
agacttatag catggcatte atacttttgt tttattgcct catgactttt ttgagtttag 3060
aacaanaacag tgaaccgta gagccttctt cccatgaat ttfgcatctg ctccaaaact 3120
gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga aggcattcct tgteaaagat 3180
accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt 3240
taataagaat gacgccccac ttgggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagctca 3300
aaatttattt tttaaaaaga gaaactgecc cattattttt ggtttgtttt atttttatit 3360
tatatttttt ggcttttggg cattgtcaaa tgtggaatgc tctgggttcc tagtatataa 3420
tttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat gtatgctaca gataaaggaa 3480
tgttatagat aaatttgaag gagtttagtc tgttttagct tagatttttt aaacgattga 3540
tgcactaaat tgtttactat tgtgatgta aggggggtag agtttgcaag gggactgttt 3600
aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat ataagttggg tatgtgtagt 3660
ctttgtctata ccactgactg tattgaaaac caaagtattt agaggggaaa cgccctgttt 3720
tatatctgia ggggtatttt acattcaaaa atgtatgttt tttttcttt tcaaaaattaa 3780
agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag catataatc aaaaaaaat 3840
tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta taaaatggc attactgcac 3900
agttttaaga tgaatgcagat ttttttacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg 3960
taacttaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca gtaaatgta ttttcaggga 4020
ctgacatcct gcttttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt accacaataa atataaaaa 4080
atcttgtcag ttacttttct ttacatatat ttgctgtgca aaattgtttt atacttttag 4140
ttactaacta accacgcgtg ttgttcttat gtgcttttct ttcaatttca attctggtta 4200
tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt tttttagtcc tgtactcagt 4260
ttcttagtgt acagtttaac tgggcccac aacctcgta aaagtgtaaa atgcattcct 4320
ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag 4380
gctgtttttt gaagttagga ggctggcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat 4440
gtaaatatg accctatttt tttctccca aagttttcag ttttcaaatg agttgagcca 4500
taattgcctt tggtaggaaa acaaaaacaa aacagtggaa ctaggcttcc tgagcatggc 4560
cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga ggagccggac aaatatggcg 4620
catcagaggt ggcttgcgca catatgcatt gaacggtaaa gagaacacgc gcttgccttt 4680
tcactaaagt tgactatttt tctttcttct cttaacaccc gagattttct tgttagcaag 4740
gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagttg tttgttttgt tttgcttttc 4800
tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag aaaaaccact cttacttcc 4860
atatttccaa gtacatatct ggtttaact atgttatcaa atcatatttc acctgaata 4920
ttcagtgtag aaettctcta cctggatgag ctagttaatg tttcagatca tgctatcccc 4980
agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg ctgtgctttg atttactggt 5040
atttacccca aaataggctg tgtatgggg ctgacttaaa gateccttgg aaagactcaa 5100
aactacette actagtagga ctctaagcg ctgacctatt tttaatgac acaaatteat 5160

```

[0008]

```

gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt catcttcccc tagcacacca 5220
atagaatggt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca gccaaacacg atgacitttg 5280
ttttgttttc tgcctgttctt aaaagaaaaa aagataatat tgcaactctg actgaaagac 5340
ttatttttaa gaaaacaggt tgtgttttgt gcctgctaagt tctggccagt ttaicacttg 5400
gccttccctg ctatttttta caaaacaaga agacagtgtg taacctcgac attttgacct 5460
tcctttatgt gctagtttag acaggctect gaatccacac ttaattttgc ttaacaaaag 5520
tcttaatagt aaacctcccc tcatgagett gaagtcaagt gttcttgact tcagatatit 5580
ctttcccttt tttttttttt tcttcateac aactaagaga tacacaaact ctgaagaagc 5640
agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcactctgat aaagatttta ggcaaacatt 5700
ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt tatctcatga caaatgaggc 5760
ctggatttga aggaaaatat agttgtgtag aattaaagcat tttgatagga atctacaagg 5820
tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaaacitta gaaaatcaaa tgcaagggtg 5880
ctggcaaaaa tgaggtttga gtggctggct gtaagagaag gttaactcct agtaaaaggc 5940
atttttagaa ataacaatta ctgaaaaact tgaagtatag tgggagtagc aaacaaatac 6000
atgttttttt ttctttacaa agaactccta aatcctgagt aagtgccatt cattacaata 6060
agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctagctttcc cttttacgt 6120
gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgttaaa attcctttca ttccaattac agaactgagc 6180
ccactcgcaa gttggagcca tcagtgggat acgccacatt ttggaagccc cagcatcgtg 6240
tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag ctgtacatta aaaaaaatca 6300
tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac cctgacttc tgtttagtct 6360
cctttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaatgtag tagttaacta 6420
tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag cgcactcctg cttttcgatt 6480
tatgtgtgtg gcaagtaaac aggtgcatg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540
tcaactgaaat tacaagata catatatatg catatatata atggaaagtt tcccggaatg 6600
caacaattag catttttaaa tcatatafag gcatgcacat tctaaatagt actttttcat 6660
gcttcatigt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720
ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780
agggccctaga cgggtgttga tttatcagtg atgtcaaacg tgcctatttg tcagacatag 6840
ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttaaa aaaaaaaa 6887

```

<210> 4
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> 人

<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 50	Leu Ser Ser Thr 55	Pro Met Ser Thr Pro Cys 60
Ser Ser Val Pro Pro 65	Ser Pro Ser Phe Ser 70	Ala Pro Ser Pro Gly Ser 75 80
Gly Ser Glu Gln Lys 85	Ala His Leu Glu Asp 90	Tyr Tyr Trp Met Thr Gly 95
Tyr Pro Gln Gln Leu 100	Asn Pro Glu Ala Leu 105	Gly Phe Ser Pro Glu Asp 110
Ala Val Glu Ala Leu 115	Ile Ser Asn Ser His 120	Gln Leu Gln Gly Gly Phe 125
Asp Gly Tyr Ala Arg 130	Gly Ala Gln Gln Leu 135	Ala Ala Ala Gly Ala 140
Gly Ala Gly Ala Ser 145	Leu Gly Gly Ser Gly 150	Glu Glu Met Gly Pro Ala 155 160
Ala Ala Val Val Ser 165	Ala Val Ile Ala Ala 170	Ala Ala Gln Ser Gly 175
Ala Gly Pro His Tyr 180	His His His His His 185	His Ala Ala Gly His His 190
His His Pro Thr Ala 195	Gly Ala Pro Gly Ala 200	Ala Gly Ser Ala Ala Ala 205
Ser Ala Gly Gly Ala 210	Gly Gly Ala Gly Gly 215	Gly Gly Pro Ala Ser Ala 220
Gly Gly Gly Gly Gly 225	Gly Gly Gly Gly Gly 230	Gly Gly Gly Gly Ala Ala 235 240
Gly Ala Gly Gly Ala 245	Leu His Pro His His 250	Ala Ala Gly Gly Leu His 255
Phe Asp Asp Arg Phe 260	Ser Asp Glu Gln Leu 265	Val Thr Met Ser Val Arg 270
Glu Leu Asn Arg Gln 275	Leu Arg Gly Val Ser 280	Lys Glu Glu Val Ile Arg 285
Leu Lys Gln Lys Arg 290	Arg Thr Leu Lys Asn 295	Arg Gly Tyr Ala Gln Ser 300
Cys Arg Phe Lys Arg 305	Val Gln Gln Arg His 310	Val Leu Glu Ser Glu Lys 315 320
Asn Gln Leu Leu Gln 325	Gln Val Asp His Leu 330	Lys Gln Glu Ile Ser Arg 335
Leu Val Arg Glu Arg 340	Asp Ala Tyr Lys Glu 345	Lys Tyr Glu Lys Leu Val 350

[0009]

	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> 人		
	<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
[0010]	Leu Ile Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ser Thr Pro Met Ser Thr Pro Cys		
	50	55	60
	Ser Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Phe Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ser		
	65	70	75
			80
	Gly Ser Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly		
	85	90	95
	Tyr Pro Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp		
	100	105	110
	Ala Val Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe		
	115	120	125
	Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Gly Ala		
	130	135	140
	Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala		
	145	150	155
			160
	Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala 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

[0011]

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> 人工序列

<220>
<223> c-MAF特异性siRNA

<400> 6
acggcucgag cagcgacaa

19

<210> 7
<211> 19
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>
<223> c-MAF特异性siRNA

<400> 7
cuuaccagug uguucacaa

19

<210> 8
<211> 20
<212> RNA
<213> 人工序列

<220>

[0012]	<223> c-MAP特异性siRNA	
	<400> 8	
	uggaagacua cuacuggaug	20
	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> c-MAP特异性siRNA	
	<400> 9	
	auuugcaguc auggagaacc	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> c-MAP特异性siRNA	
	<400> 10	
	caaggagaaa uacgagaagu	20
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> c-MAP特异性siRNA	
	<400> 11	
	acaaggagaa auacgagaag	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> c-MAP特异性siRNA	
	<400> 12	
	accuggaaga cuacuacugg	20
	<210> 13	
	<211> 13878	
	<212> DNA	
	<213> 人	
	<400> 13	
	aactatata taaacacctc cggctcigaga ggccgtgttg ggtgtctttg tcaggtgaag	60
	aaagagaaga aggcctgtac accttcccag gaattctcac tgaagaaaac atcctggattt	120
	tttaccatctc ttgtgcaaaa caaacaaaga ttctattaag tgatgtatat tgttttccaa	180
	ggaagaaacc tgcagagaca aaaacaaata agcaaatat tgaacaaaa atatgataaa	240
	cccccaatt ctctcagtc taatttacct gttatcatgg ttctctacaa aggcagagat	300
	cactaattac aggtttttcc agaattcaca ttteacgtca agatcatcca atccaaacag	360
	tgtaaggaaa gccataggcc ttcttacctt tgcaccttac cccaccttac acacaagccc	420
	ccatctaaat gatacccttg gaaagaaacc tacacatctc atttgtctat attttgcttc	480

[0013]	ctccctcgcc tcccggtaac caaatgtgag ttgttcteta actgcactgg agaatacagaa	540
	ttttattgtac ataigtittgt gtccacatta ataaaaaac ctatatittta agataaaactt	600
	tgttagtaaat tcatgaggta agigactaatt tatgctaate aggcagaaat atattctcaa	660
	gcataatgca ttacataaat ttgaatgtaa aatgttcaat tatgaagtaa atacaggtaa	720
	tgcaataaat aaattaccte taataaaaaat tataaaaagat gtgccittgaa agagagagcg	780
	gctttaactt acaactigtga attgcttaaa gagaaaagaa ttaataaatg ctgaattact	840
	ctgatgatta tttagcacat aattcaccta ttcataacga ctcttagtaa tcagactgtt	900
	gtttcacate ctccaacatg aggcaagact gtctctcag caattttgcc cttatcagat	960
	tatctegtct gattctatta attttcttcc atgaatctgc taacagtgat ttgtgattta	1020
	cttaccctgc taactgaaga ctgtttaaag galitaleia acacigagcc taagaacagt	1080
	gtacgectta tcgttcagtt actctgaaga actctttctc aaatcaattt agttggtttc	1140
	atagtgaat ttagtggaca ctggttagtt ctgcccata aaatcagccc ctaaacaaag	1200
	agtcagaca ccataacctga tgcateccat tctattcaga ttatggatgt ctgatccaa	1260
	caigatata ttgagtgtct ataactcaca atcggggaaa atatatctct ttaagctttt	1320
	aatctttgta atttggacat gaacaggggt ttgtttttc atttttgc atgaatcatta	1380
	tgtatgtact gacgtgaac tataattgtg ttctgtatgt tactgtgtca caatattcta	1440
	tgcgatgtaa cccatgtctt cctcccctc acaaatctcc tataaatatt cattgcttcc	1500
	aaaaacttta atactactgg tccgaattgg tcaataatga caaatgcatg gtttctaaat	1560
	tactgtatata tgtttctacag agattactag agtatatata gcaaggggat gtttaagcagt	1620
	aagaaaaaac agttcacatt gtatttggat tagattggct tggatagaag tgaacaacac	1680
	aatgttiagca aagaagtcta aagacatgtg gccactgtta attgtacaga atcaaaaacc	1740
	tgaatagtac tcatiaaaat gagagagctc aattgttata aaagaaatgc tgctaacaga	1800
	gaactgtaaa tgtttagaca cccctgtgaa tcaataaata ataagttaa aaggataaaa	1860
	atgagaattt agttataagc ctgagagcat tactgttaca catctaaaaa aataattctg	1920
	atctctcttt ttttttttcc aagagaaaaa gggcgactat aaaagacctt gcaataagag	1980
	aaataaaaaa accatgtctt cacagcagtg tacataaata aaccataaaa atgtgcagat	2040
	aafaatafat ttactgtccc aaacatgggc atttaatttc tagaaatgat atataacaat	2100
	gtaacaatta gatactcage catgaatgtg tatggcacag tcttcatcat tagcaaaactt	2160
	tgtgtataaa atattatitia ttattatitia taatactgct ttacagaggca atgatcatac	2220
	cttacagctt ttaacacaaa tatgatgcaa aaggaitaaa agtatatcat aaacaaacaa	2280
	taaattcttt ctaaatacac ttaaattcat attttacatg aaaaatataa acttctaca	2340
	tttgtgacta ctgactttta aaaagacctt gaaaactatt gttacgggca atgtiaaatg	2400
	acataatgct tatgtaatgg aaagtgtgga ttttctctta aataaactat aatcccttaa	2460
	cttcattact agggaaaata ttgttaaaga gaaggaaagc aagggaattc tgctaggttg	2520
	cataaafatt gacataatct tcactcttcc ttcccacac tggtaataga catagtttat	2580
	tcccccacac aaaaatgctt tataagacca aaactacctt tattaacac ttctctgcag	2640
	tcacgatgaa aagaascact acttgtctga aaaaaccga cagcgtgcc cttttcagat	2700
	taggggtgtc ctacgaatct ttgtggaagt ctccattaa ggattcctgg gtttgcgaa	2760

[0014]

```

actgaagtct actaggatca gagaaattaa cacaggteta atatggtgca aggaacgagt 2820
gagagacacc tgaggttata aatagcaaag catgctgcgg ggtggggaag accattctga 2880
agtgcattgt tcaagacgct ggcttaatat atgactaagt gtcagaagtc aggttttctg 2940
agaatttactt tccagataaa caacttttata gcactgcaact taatcttact tactagagac 3000
atctcattta tcactgaatt acaagtaact ttaatcctat tgatattgcc ataaagcccc 3060
ttgaaaatec atcctggcac ttttaaaggg tttggggccc tgttacatgg ggtacctctt 3120
gcaaaggctc cagccagaaa ttacaccccc aggggtgtctg tatccccctgg cctctttgtc 3180
aacaatcaag gagaagagga ggggcacaaa igatctctgc atctgccagc actttcttcg 3240
gcccccttcc tatagggctg ggttctccca ctteagtcna actaacttfg tgtgtctctt 3300
tcctcctccc acactgggta accagctgct tttcacttca tcgacaaaac tggacacgga 3360
tcaatttcaa ctgaccttgg ccgaaagggt gcgcigtiga ggtaaaaacc aactcgtccc 3420
aacaatagtt tccactcttc gatccttttg caggcttttc agaatttttt ttttttttta 3480
atgcaccctc ctagegtctc ccccttctca taaagtaaaa taaatacgat taaaaacacc 3540
aantgcattt catttaattga aggaatcaac agtcccaact tctaagcaga cgggctggtc 3600
ttccaaaggc tgggtcggtt tcaggagctt tctctccaaa taaatctctg cttcttcgac 3660
ttgcctatcg cttaaaaaac tttagaacag agttagtgtg tggtttctct cttttttctt 3720
tttttttttt atttcttttt tgcataaaet tttagagaat caatctagaa atttgaacta 3780
cttaattagca ttgcaactg ggggtggggg gaggcagctc cccacccca cccccactc 3840
tgcgtttccg gactagtcc agaaaccgcg gtttaaaatt taacccttcg agggtagctg 3900
gtgaggcgctg gggatttgtt tttccccctt gctccctgcc acgatcaagt ccgaaataat 3960
taaaggaaac gtaaaagtgc aaagggcgcg cctgaacctg ataaacagag gtcagatttc 4020
gtaaggggac gggtagtgtt gagtgttgtt gtgttttgtt gtgtgttgtt aagagagaga 4080
gagagcgagc gegcaatatg agtctcaaa gccaaactcc ggccagtcag gagccggaag 4140
gctgagcccc gctgaacctga ctttagctt ccccgagtt atctcgata ggcgtctgct 4200
ctgtccaaag gcacgcgacg ccagcgggca gccggtctcc gtgaagaatg gcctctaac 4260
aacttatitt acctcgttgt aaagagaggg ataaaatggg ctttccctct ccacggatgc 4320
ccagccttct gggcaggcgc atggccgggc ggcgccagc ccgcagccc gatccggaca 4380
ccccactgca tccctccctt cccggtccct tcccgcacg ggcgcccgag agacggacaa 4440
agagttgggg ccaagtttga gcgccggca cggccaggct cagggaagga aggtccccgg 4500
cagacacctg ggtaccagag ttggtgcgag gaggaanaag tgggaggcga attcacaate 4560
ctgggggttg agggcaggca ggggagggga atcaggccaa tcccagccga gtgagccccc 4620
agcgagctgg ggtccggat gggaggcctg tctcgcgctc caaagaaaag caaaccgccc 4680
tcccaggctc gcccgattg ccgaagcccc tctgaaaaa ctcttcccc tcttacaaca 4740
aactttgcgc cgggcctcgt tccctcccg gtaggcagcg gcgcaggaag ggtaagcca 4800
gcccgtccca gctgacagtc agctgattgg gccctgattg acagctccga aaagtctct 4860
tgtttctata ctattatgct aatcgcgccc gctctcgcc cctcccattg gcccgagtg 4920
ccagtcattt tctcatttgg acctgacgtc acgagtcta taaaactcag caattgcttt 4980
aaactcttct tgcggtaca gaggctttaa aatcttttt catcttctag ctgtagctcg 5040

```

[0015]	gggtgcttgt cggttggcc tccccctccc ccttttgcgc tctgcctcgt ctttcccag	5100
	gacttcgcta ttttgccttt ttaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc	5160
	tctccagtc gggtgcacc tcigccttgc actttgcaca gaggiagaga gcgcgcgagg	5220
	gagagagagg aaagaaaaa aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca	5280
	tgaagtgtta actccccgt gccaaagccc gcgcgcgccg gacagacgcc cgcgcgcct	5340
	ccagccccga gggagcgcg cgcgcgcct gccigcagcc cgggcgcgcg aggcgagccc	5400
	ttccttatgc aaagcgcga gcgagcggc gagcgggga cgcgcgcac cgggcgcgc	5460
	tectccagct tcgcgcgcg agccaccacc gccgccacc cagctcgcg aggatcttcc	5520
	cgagcctgaa gccgcgcgt cggcgcgca ggaggcgagc gagcaaggag gggcgcgggc	5580
	gagcgaggga gcacattggc gtgagcaggc ggaggggagg gcgggcgcg ggggcgcgg	5640
	caggcgcggc ggggtgtgt gtgagcgcg tcggaggttt cgggcagcc accgccgcg	5700
	aagctagaag cgcgccagc cggcaagctg gctcaccgc tggccacca gcacagccc	5760
	ctggccctc tctgcagcc catciggcgc agcgcgcgcg gcggcgcgc cggcgcgagc	5820
	agaatggcat cagaactggc aatgagcaac tccgacctg ccaccagtc cctggccatg	5880
	gaatatgtta atgacttga tctgatgaag tttaagtga aaaaggaacc ggtggagacc	5940
	gaccgcatac taagccagt cggcgcgtc atcgcgggc gctcgtgtc ctccacccc	6000
	atgagcacgc cgtgcagtc ggtgccccc tccccagct tctcgcgcg cagcccggc	6060
	tcgggcagcg agcagaagc gcacctgaa gactactact ggatgaccg ctaccgcag	6120
	cagctgaacc ccgagcgct gggcttgcgc cccgaggac cggtcgagc gctcatcagc	6180
	aacagccacc agctccagg cggcttcgat ggctaegcgc gcgggcgca gcagctggc	6240
	gggcgcgcg gggccgtgc cggcgcctc ttgggggca gcggcgagga gatgggccc	6300
	gccgcgcgc ttgtgtccc cgtgatcgc gcggccgcg cgcagagcg cgcgggcgc	6360
	cactaccacc accaccacca ccacgcgcg ggccaccacc accaccgac ggccggcgcg	6420
	cccggcgcg cgggcagcgc ggcgcctcg gccggtggc ctgggggcgc gggcggcgt	6480
	ggcccgcca gcgtggggc cggcgcgcg ggccggcgc gcggagcgc cggggcgcg	6540
	gcggggcgc ggggcgcct gcaccgcac cagccgcgc gcggcctgca cttgcagac	6600
	cgtttctcc acgagcagct ggtgacctg tctgtgcgc agctgaacc gcagctgcg	6660
	ggggtcagca aggaggaggt gatccggctg aagcagaaga ggcggacct gaaaaaccg	6720
	ggctatgcc agtcttgcg ctccaagagg gtgcagcaga gacacgctt ggagtcggg	6780
	aagaaccagc tgcgcagca agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctgtgtgc	6840
	gagagggacg cgtacaagga gaaatacgag aagtgtgtg gcagcgctt ccgagaaaac	6900
	ggctcgagca gcgacaaccc gtctctccc gatttttca tgtagtctg acacgcgatt	6960
	ccagctagcc accctgataa gtgtccgcg ggggtccgc tcgggtgtg gcttgcctg	7020
	tctagagcca tgcctgccac cactcacca cccccccc caccgagttt ggccccctg	7080
	gccccctaca cacacacaaa ccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac	7140
	acaccccaca cctgtctga gtttgtgtg gtgtgtgtg ttttaactg gggagggaat	7200
	gggtgtctg ctcatggatt gcaaatctga aattctccat aacttgetag cttgttttt	7260
	ttttttttt acacccccc gcccccacc cggacttgc caatgtfcaa tgatctcagc	7320

[0016]	agagttcttc atgtgaaacg ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atatcttttc	7380
	ttcttcttcc ccttcagttc atgaactggg gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgttttat	7440
	tttgitttga tttttttttt taattttact tttagagcct gctgtgttgc ccaccttttt	7500
	tccaacctcc accctcacte ctctcacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa	7560
	gcagaagttt tttttcttct cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa	7620
	aaaaatgtaa atgttataga cttgcagcgt gccgagttcc atcgggtttt ttttttagca	7680
	ttgttatget aaaaatagaa aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gctgcatca	7740
	accttctggg tgtgacttgt gagttttggc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct	7800
	gccattaaaa aaactcatte tcatctcatg cattattatg cttgctactt tgtcttagca	7860
	acaatgaact alaactgttt caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa	7920
	aaaaagcctg catgctggac atgtatggta taattatttt ttcttttttt ttctcttttg	7980
	gcttggaatt ggacgttcca gaacttatag catggcatte atacittttgt tttattgcct	8040
	catgaatttt ttgagtttag aacaaaacag tgcaaccgtt gagcttcttt ccatgaaat	8100
	tttgcactcg ctccaaaact gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcaactga	8160
	aggcattcct tgtcaaagat accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag	8220
	aactcttaat gttttctttt taataagaat gacgccccac ttgggggact aaaattgtgc	8280
	tattgccgag aagcagtcct aaattttttt tttaaaaaga gaaactgccc cattattttt	8340
	ggtttgtttt atttttattt tataattttt ggcttttggg catgttcaaa tgtggaatgc	8400
	tctgggttcc tagtatataa ttttaattcta gtttttataa tctgttagcc cagttaaaat	8460
	gtatgtctaca gataaaggaa tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgttttagctg	8520
	tagatttttt aaacgattga tgcactaaat tgtttactat tgtgatgta aggggggtag	8580
	agtttgcaag gggactgttt aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttg caacttaaat	8640
	ataagttggg tatgtgtagt ctttctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta	8700
	agaggggaaa cgccctgttt tatactctga ggggtatttt acattcaaaa atgtatgitt	8760
	tttttctttt tcaaaattaa agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag	8820
	catataatac aaaaaaaaaa tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtta	8880
	taaaaatggc attactgcac agttttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgtg	8940
	gtgcagaact ggattttctg taacttaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca	9000
	gtaaaigtta ttttcagggc ctgacatcct gcttttataa agaaatgaaa agttaaattt	9060
	accacaataa atataaaaaa atcttgtcag ttacttttct ttacataatt ttgtgtgca	9120
	aaattgtttt atatcttgag ttactaacta accacgcgtg ttgttcttat gtgtttttct	9180
	ttcattttca atcttgttta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatitt	9240
	tttttgattc tgaactcagt ttcttagtgt acagttaac tgggccaac aacctgtta	9300
	aaagtgtaaa atgcatcctt ttctccagtg gaaggattcc tggaggataa gggagacagt	9360
	aattcagggt gaaattatag gctgtttttt gaagtagga ggcgtggccc atatactgat	9420
	tagcaatatt taatatagat gtaattatg acctcatttt ttctcccca agttttcag	9480
	ttttcaaatg agtttagcca taattgccct tggtaggaaa acaaaaacaa aacagtggaa	9540
	ctaggttccc tgagcatggc cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga	9600

[0017]	ggagccggac aaatatggcg catcagaggt ggcttgcgca cataigcatt gaacggtaaa	9660
	gagaaacagc gcttgccttt tcactaaagt igactatitt iccticttct cttacacacc	9720
	gagatittct tgttagcaag gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgtg	9780
	tttgttttgt tttgcitttc tctttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa taggaaaaag	9840
	aaaatccact cettacttcc atatttccaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa	9900
	atcatatttc accgtgaata ttacatggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga	9960
	tttcagatca tgetatcccc agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg	10020
	ctgtgctttg atttactggt atttaccaca aaataggetg tgtatggggg ctgacttaaa	10080
	gatacccttg aaagactcaa aactaccttc actagtagga ctctaagcg ctgacctatt	10140
	tttaaatgac acaaattcat gaaactaatg ttacaaattc atgcagtttg cactcttagt	10200
	catcttcccc tagcacacca atagaatggt agacaaagcc agcactgttt tgaaaataca	10260
	gccaaacacg atgacttttg ttttgttttc tgccttctt aaaagaaaaa aagataatat	10320
	tgcacctctg actgaaagac ttatttttaa gaaaacaggt tgtgttttgt gctgctaagt	10380
	cttgccaggt ttatcatctg gccctcctgc ctatttttta caaaacaaga agacagtgtg	10440
	taacctcgac attttgacct tcttttatgt gctagttag acaggctcct gaatccacac	10500
	ttatatttgc ttaacaaaag tcttaatagt aaacctcccc tcatgagett gaagtcaagt	10560
	gttcttgact tcagatatit ctttcttttt ttttttttt tctctatcac aactaagaga	10620
	tacacaaact ctgaagaagc agaaatggag agaattgctt taacaaaaaa gcatctgatg	10680
	aaagatttta ggcaaacatt ctcaaaaata gagtgatatt ctggatgtag ttattgcagt	10740
	tatctcatga caaatgagc ctggattgga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat	10800
	ttgatagga atctacaagg tagttgaata taataagcag gtttgggccc ccaaacttta	10860
	gaaaatcaaa tgc aaagggt ctggcaaaaa tgaggittga gtggctggct gtaagagaag	10920
	gttaactcct agtaaaagc atttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag	10980
	tgggagtagc aaacaaatac atgttttttt ttctttacaa agaactccta aatcctgagt	11040
	aagtgccatt cattacaata agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat	11100
	ctagctttcc ccttiacgct gcgtttgatc tttgtctaaa tagtgttaaa attccttica	11160
	ttccaattac agaactgagc ccactcgcaa gttaggacca tcagtggat acgccacatt	11220
	ttggaagccc cagcatcgtg tacttaaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag	11280
	ctgtacatta aaaaaaatca tctttattat tattatttgc agtcattggag aaccacctac	11340
	ccctgaattc tgtttagtct cttttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta	11400
	ttaatgttag tagttaacta tgcctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag	11460
	cgcactcctg cttttcgatt tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct	11520
	gccatactag ttttaaaaat tcactgaaat tacaagata catatatatg catatatata	11580
	atggaaggtt tcccgaatg caacaattag cattttaaaa tcatatatag gcatgcacat	11640
	tciaaatagt actttttcat gtttcattgt ttctctggca gataatttta ctaagaagaa	11700
	aaatagatat tcgactcccc ttccctaaac aaatcccagg gcagaggctc cagcggagcc	11760
	gagcccccgt gttttctcgt aggccctaga cgggtgttga tttatcagt atgtcaaacg	11820
	tgtctatttg tcagacatag ctgtaaatga aaacaatgtg tgccaaaaata caaagttagt	11880

[0018]

taaatacaca cccctctgtgt gatTTTTTgc tcccttttct tttttgctcc tactcaaaaa	11940
aaaaaaaaate aectctctta catttccctg gcttcttgca tgtttccctt ttcaaaaacc	12000
atgtaataat tttttacaat gtatctgaca cattaatata ttgacatcaa ataggcagac	12060
attctacttt tgcctggcaa ataaatctgc tacggagaca tcatttcctc actgtctcaa	12120
agccataact acctgggagt cttcaacac agaccctcc gatgggaaat gctgtttatt	12180
actgaatgca ggatgctcac gctctgatct tttctccctt gtccttttac cccagtcatt	12240
tttacttagc aacaccaatt ctagatactt ctgttctgaa gtagaaccac ccccttgcca	12300
cactgccagt tttctctgta aaagcagtg acagaagaca gatcatggtc accctcacia	12360
acatggcaca cagctgtctc ggtagctgca ttcccagcat gtcctggctc aaatatctag	12420
agttgcctat gacacgttca aaggttccca agcacagtac atggggaggc ttttgcctgt	12480
gtggccgttg ttttctgta ggccaactta cttccgtatt cacatactct tggctttacg	12540
aaatacactc ctccagtcta ctaggccaat caatataatt aaaagtctga ttgccacata	12600
agtcctctct tctctctttt tgttttttgt ttgtttgttt tttctgttt tggctgccgg	12660
tagttaaaga ctgagatagg ttggaagact aaaatacagg agtacctgag tgacaacctt	12720
cagccgtctg atttccatgc cggtaaaaca cacaaccaag ctcttcttag cgtctgtaat	12780
ataaacattc actaagaggg aataggaagt gagatttacc agcttcactt tgcctgattg	12840
caaggttccc cactacgatt cactgtcatt tgatttttga aaaataattt tgcctgtctc	12900
tttgaagaaa tgccttagtt cttttatttt gtttgtttgg ttttttttag agaagtttta	12960
tctgcagtga taggctacaa tttttatctc cgtctgattat ttgtcaggat gctgaatgaa	13020
taatttggtc ctgtgccttc cttgtttgtc tgaggaaaat aagagaaact tggaagtttg	13080
tttctactct agcccatcct aaatctaaaa gaagaigtc caggctccagg caggccatgt	13140
agtagttata aaggaggttg tccaggtcca gccacctcaa tcaggatttg tttgttttga	13200
agcatttgc taaaagcgga gcaagagtct taacccaact tgccataaca ctgcttttct	13260
cgtttttgat gtaaatcttc aaaattcaga cateaaacag cccagaaaa ggggaattct	13320
ctccaggcat tgctccgcc cagctcctga acaaaccag ctctgtctag catttttttc	13380
cctagcgggg gtaggggaca gggtagaga atttcagctc cccaggtgt ctcattgattg	13440
ttagggcata aagaaacaca gtcttgccac aaattgggag catctttacc ctttagagag	13500
aaacaaaaa aaactaaaca aacaaatcaa attgctttgc atgaaggcgt agcaaataaa	13560
atctcgggct cctgtttccc tgcaccattt gtaggagtg agaaatgagg gaaacaagag	13620
aaaggggaac tttaaaagcg ggaggcccag aaataatccc tgttaccagt ctgaatttca	13680
cttgctccgt ggctaacgtc agacctagt tgcatgtatg ccagaagtaa actaggctcg	13740
gctgtccatt tctttaaaat atgttcacat gtttcctttt tgaaaacaat ttgggggact	13800
aaacccaaat ggagagattt gaggaaatcg ttaatgtctt aacatttgag tatatttata	13860
aatgtatcag tctgtgat	13878

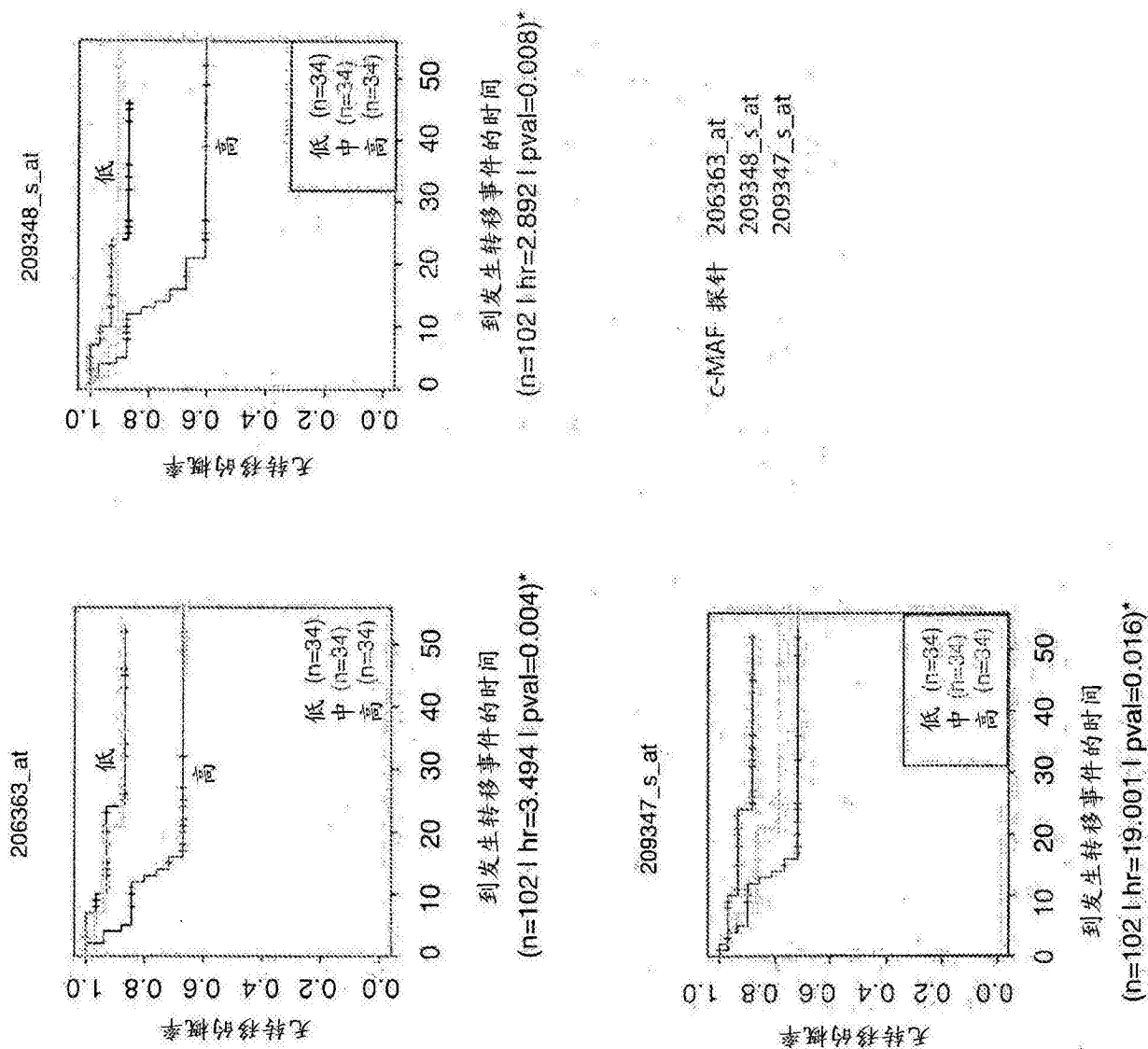


图1

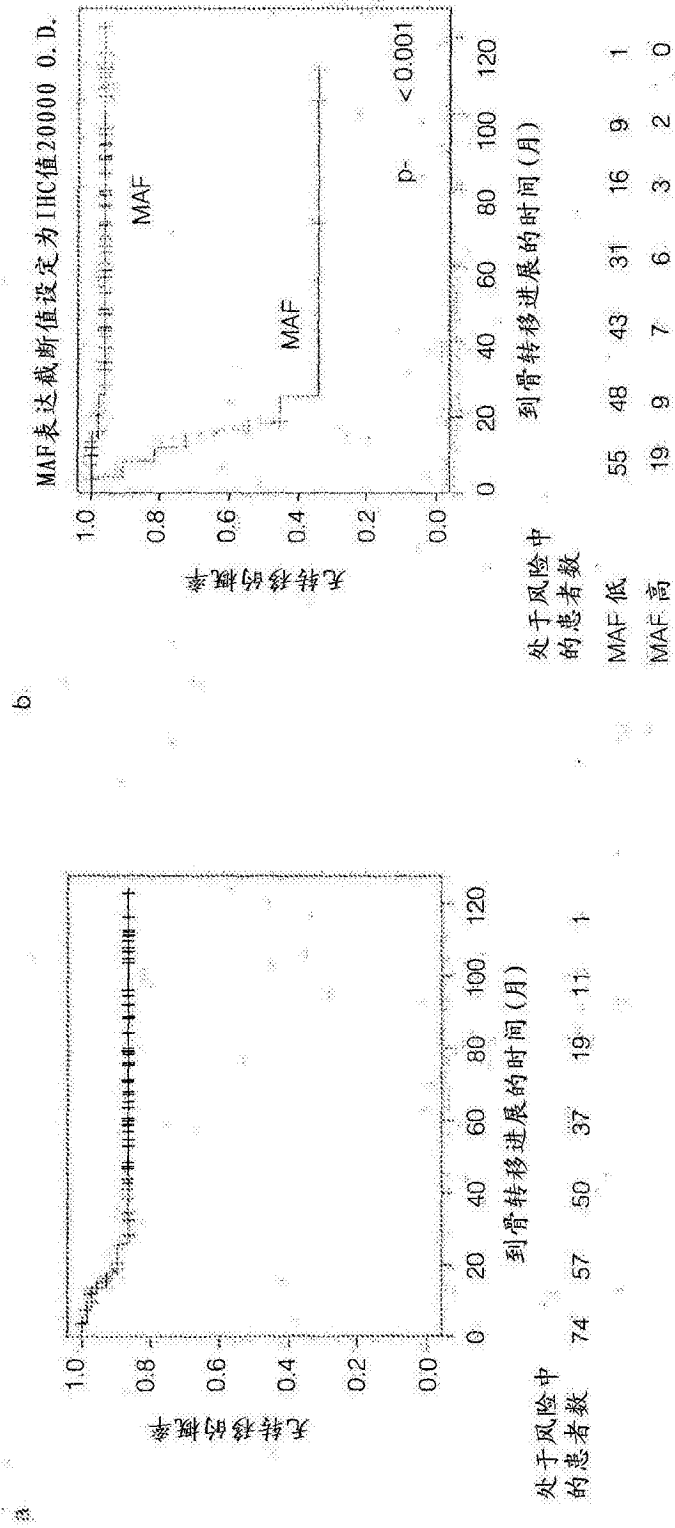


图2

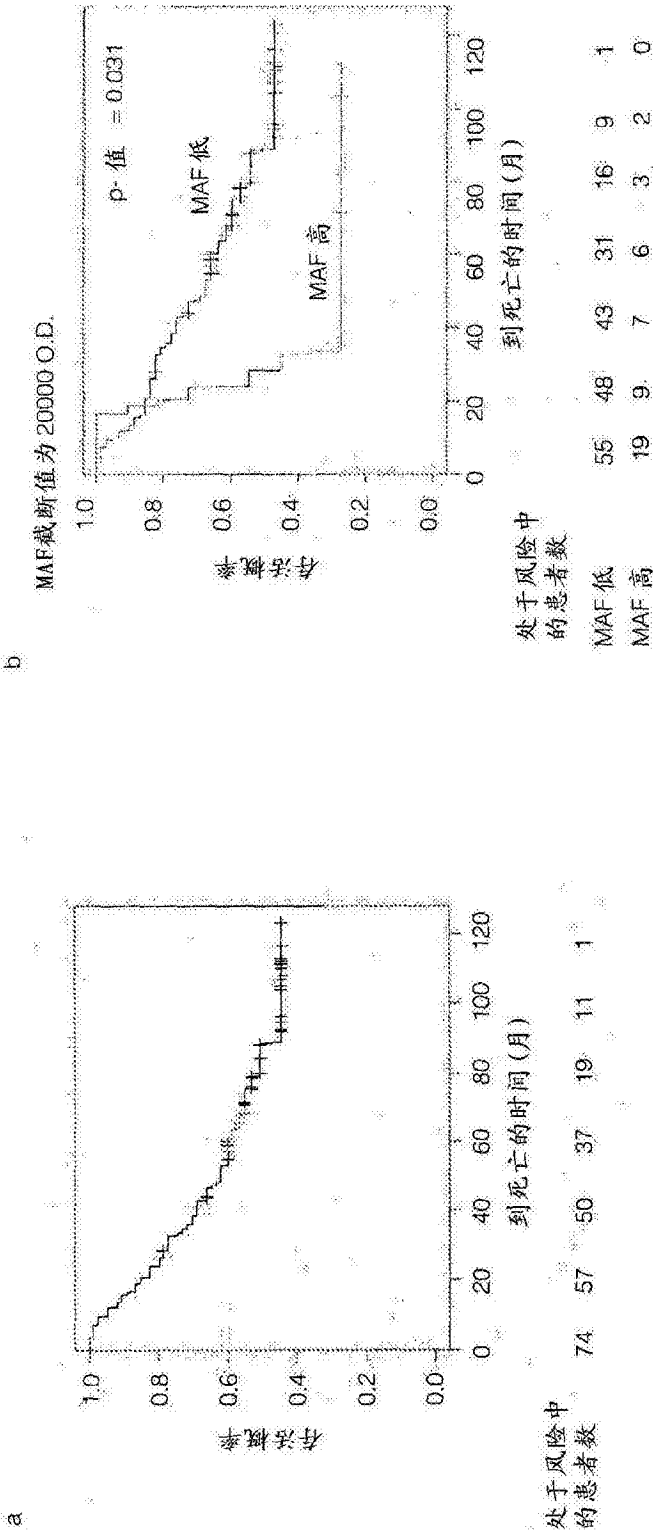


图3