



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103339265 B

(45)授权公告日 2018.03.30

(21)申请号 201180058347.6

(22)申请日 2011.10.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103339265 A

(43)申请公布日 2013.10.02

(30)优先权数据
P201031478 2010.10.06 ES
P201131073 2011.06.27 ES

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2013.06.04

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/ES2011/070693 2011.10.05

(87)PCT国际申请的公布数据
W02012/045905 ES 2012.04.12

(73)专利权人 生物医学研究机构私人基金会
地址 西班牙巴塞罗那
专利权人 加泰罗尼亚高级研究和学习机构
私人基金会

(72)发明人 R·戈米斯卡布雷
M·塔拉戈纳苏涅尔

A·阿纳尔埃斯塔佩

M·帕夫洛维茨

(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

代理人 傅宇昌

(51)Int.Cl.
C12Q 1/68(2006.01)

(56)对比文件
US 2005/0181375 A1,2005.08.18,全文.
EP 1961825 A1,2008.08.27,全文.
Adam M. Brufsky.The Evolving Role of
Bone-Conserving Therapy in Patients With
Breast Cancer.《SEMINARS IN ONCOLOGY》
.2010,第37卷(第补充1期),第12、14、15页.
NATHALIE ROCQUES等.GSK-2-MEDIATED
PHOSPHORYLATION ENHANCES MAF-TRANSFORMING
ACTIVITY.《MOLECULAR CELL》.2007,第28卷(第4
期),第584-597页.

审查员 陈仕高

权利要求书2页 说明书35页
序列表12页 附图13页

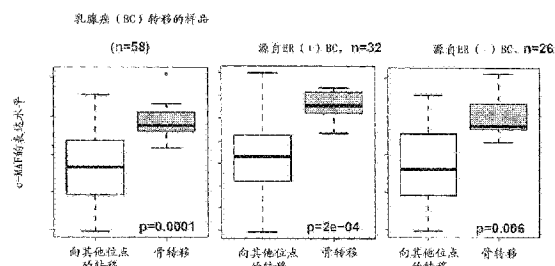
(54)发明名称

用于乳腺癌转移的诊断、预后和治疗的方法

(57)摘要

本发明涉及用于在乳腺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ER-乳腺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,本发明涉及使用作为用于治疗ER-乳腺癌转移的治疗性靶标的c-MAF的抑制剂。

A.



1. 用于定量在肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平的物质在制备试剂中的用途,所述试剂在用于在患有ER+乳腺癌的受试者中对形成骨转移的倾向进行预后的体外方法中使用,所述方法包括:

(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

(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,

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更大的形成骨转移的倾向。

2. 用于定量在肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平的物质在制备试剂中的用途,所述试剂在用于设计对于患有ER+乳腺癌的受试者的个性化疗法的体外方法中使用,所述方法包括:

(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

(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,

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,那么所述受试者可以接受旨在预防和/或治疗骨转移的疗法。

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. 用于定量在肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平的物质在制备试剂中的用途,所述试剂在用于设计对于患有具有骨转移的乳腺癌的受试者的个性化疗法的体外方法中使用,所述方法包括:

(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,和

(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,

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,那么所述受试者可以接受旨在避免和/或防止骨降解的疗法。

5. 根据权利要求4的用途,其中在所述旨在避免和/或防止骨降解的疗法中所使用的试剂选自由下列各项组成的组:二磷酸类、RANKL的抑制剂、PTH、雷尼酸锶、雌激素受体的调节剂、降钙素和组织蛋白酶K的抑制剂。

6. 根据权利要求5的用途,其中所述RANKL的抑制剂选自由下列各项组成的组:RANKL的特异性抗体和护骨蛋白。

7. 根据权利要求6的用途,其中所述RANKL的特异性抗体为地舒单抗。

8. 根据权利要求5的用途,其中所述二磷酸类为唑来膦酸。

9. 根据权利要求4至8中任一项的用途,其中所述乳腺癌为ER+或ER-乳腺癌。

10. 根据权利要求1、2和4至8中任一项的用途,其中所述c-MAF基因的表达水平的定量包括所述基因的信使RNA (mRNA),或所述mRNA的片段,或所述基因的互补DNA (cDNA),或所述cDNA的片段的定量。

11. 根据权利要求1、2和4至8中任一项的用途,其中所述c-MAF基因的表达水平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。

12. 根据权利要求11的用途,其中所述蛋白质的水平的定量通过Western印迹、ELISA或蛋白质阵列来进行。

13. 用于确定在肿瘤组织样品中c-MAF基因是否出现扩增的物质在制备试剂中的用途,所述试剂在用于在患有乳腺癌的受试者中对骨转移进行诊断和/或用于在患有乳腺癌的受

试者中对形成骨转移的倾向进行预后的体外方法中进行使用,所述方法包括确定相比于对照而言在所述受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因是否出现扩增,其中如果相比于对照而言在所述受试者的肿瘤组织样品中存在所述基因的扩增,那么所述受试者具有关于骨转移的阳性诊断或者更大的形成骨转移的倾向。

14. 根据权利要求13的用途,其中所述乳腺癌为ER+或ER-乳腺癌。

15. 根据权利要求13或14的用途,其中所述c-MAF基因的扩增的确定通过座位16q22-q24的扩增的确定来进行。

16. 根据权利要求13或14的用途,其中所述c-MAF基因的扩增的确定通过使用特异于c-MAF基因的探针来进行。

17. 根据权利要求13或14的用途,其中所述扩增通过原位杂交或PCR来进行确定。

18. 根据权利要求13或14的用途,其中所述骨转移为溶骨性转移。

19. 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/或预防乳腺癌的骨转移。

20. 根据权利要求19的用途,其中所述乳腺癌为ER+或ER-乳腺癌。

21. 根据权利要求19或20的用途,其中所述c-MAF的抑制性试剂选自由下列各项组成的组:特异于c-MAF的siRNA、特异于c-MAF的反义寡核苷酸、特异于c-MAF的核酶、c-MAF的抑制性抗体、c-MAF的显性失活变体、说明书中所记述的表1的化合物和说明书中所记述的表2的化合物。

用于乳腺癌转移的诊断、预后和治疗的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及在乳腺癌中转移的诊断或预后,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,本发明还涉及用于在乳腺癌中转移的诊断或预后的方法,以及涉及用于设计在具有乳腺癌的受试者中的个性化疗法的方法,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乳腺癌转移的治疗性靶标的用途。

发明背景

[0002] 在世界上,乳腺癌是第二种最常见的癌症类型(10.4%;在肺癌之后)并且是第五种最常见的癌症死亡原因(在肺癌、胃癌、肝癌和直肠癌之后)。在妇女中,乳腺癌是最常见的癌症死亡原因。在2005年,乳腺癌在世界上造成502,000例死亡(癌症死亡的7%;所有死亡的差不多1%)。自20世纪70年代以来,世界范围的病例数已显著地增加,这是部分地归罪于西方世界中现代生活方式的现象。

[0003] 根据TNM系统,将乳腺癌划分为几个阶段。预后与阶段划分的结果紧密相关,并且阶段划分还用于在临床试验中和在医疗实践中分配患者进行治疗。用于阶段划分的信息如下:

[0004] ●TX:无法评价原发肿瘤。T0:没有关于肿瘤的证据。Tis:原位癌,没有侵袭。T1:肿瘤为2cm或更小。T2:肿瘤大于2cm但小于5cm。T3:肿瘤大于5cm。T4:在乳房壁或皮肤中生长的任何大小的肿瘤,或炎性乳腺癌。

[0005] ●NX:无法评价邻近的淋巴结。N0:癌症尚未扩散到局部淋巴结。N1:癌症已经扩散到1至3个腋淋巴结或一个乳内淋巴结。N2:癌症已经扩散到4至9个腋淋巴结或多个乳内淋巴结。N3:下列情形之一适用:

[0006] ■癌症已经扩散到10个或更多个腋淋巴结,或者癌症已经扩散到锁骨下淋巴结,或者癌症已经扩散到锁骨上淋巴结,或者癌症影响腋淋巴结并且已经扩散到乳内淋巴结,或者癌症影响4个或更多个腋淋巴结,并且在乳内淋巴结中或在警戒淋巴结活组织检查中存在最小量的癌症。

[0007] ●MX:无法评价远端扩散(转移)的存在。M0:没有远端扩散。

[0008] M1:已经产生向远端器官的扩散,其不包括锁骨上淋巴结。

[0009] 在具有实体瘤癌症的患者中大多数的死亡由后来的转移产生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,其允许它们定居于具体的器官。

[0010] 所有这些细胞在其表面上、在其细胞质中和在细胞核中都具有受体。某些化学信使例如激素与所述受体相结合,并且这引起细胞中的改变。存在有三种可以影响乳腺癌细胞的重要受体:雌激素受体(ER)、孕酮受体(PR)和HER2/neu。为了命名具有这些受体中的一些受体的细胞,当所述受体存在时,就给予配置正号,而如果不存在,就给予配置负号:ER阳性(ER+)、ER阴性(ER-)、PR+(阳性)、PR阴性(PR-)、HER2阳性(HER2+)和HER2阴性(HER2-)。受体状态已变成所有乳腺癌的关键性评价,因为它决定了使用特定治疗(例如,他莫昔芬或曲

妥珠单抗)的适合性。雌激素受体(ER)的 α 同种型在大约65%的经诊断的乳腺癌病例中过表达。该乳腺癌类型称为“ER阳性”(ER+)。在该情况下,雌激素与ER的结合刺激肿瘤乳腺细胞的增殖。ER+肿瘤细胞高度依赖于该刺激来进行增殖,因此,目前将ER用作治疗性靶标。

[0011] 乳腺癌治疗的要旨是,当肿瘤限于局部时,进行外科手术,以及可能的激素辅助疗法(用他莫昔芬或芳香酶的抑制剂)、化学疗法和/或放射疗法。目前,关于外科手术后的治疗的建议(辅助疗法)遵循一套模式。该模式经历了改变,因为每两年在瑞士圣加仑举行一次世界会议,以讨论世界多中心研究的实际结果。同样地,所述模式还根据国立卫生研究院(NIH)的一致标准进行修订。基于这些标准,超过85-90%的不具有淋巴结转移的患者将会是接受辅助性全身疗法的候选者。

[0012] 目前,PCR试验例如Oncotype DX,或微阵列试验例如Mamma Print,可以基于特定基因的表达来预测乳腺癌复发的风险。在2007年2月,通过获得食品药品监督管理局(Food and Drug Administration)的正式认可,Mamma Print试验成为第一种乳腺癌指示物。

[0013] 专利申请EP1961825-A1描述了用于预测乳腺癌向骨、肺、肝或脑的转移出现的方法,其包括测定在肿瘤组织样品中一个或多个标志物的表达水平,相对于其在对照样品中的相应表达水平而言,其中包括c-MAF。然而,该文献需要同时测定数个基因以便能够测定乳腺癌患者的存活率,并且基因组标签预测没有骨转移的存活率的能力之间的相关性不是在统计学上显著的。

[0014] Bos,P.D.等人[Nature,2009,459:1005-1009]描述了参与乳腺癌向脑转移的基因。

[0015] 专利申请US2005/0181375描述了用于检测转移性乳腺癌的方法,其基于检测在转移性肿瘤中(特别是在向脑转移的肿瘤中)处于上调或下调的一系列基因的表达水平。

[0016] 国际专利申请W02010/000907描述了基因标签,其可用作在乳腺癌患者中的远端转移的基因组预测者。

[0017] 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/或预测患有特定乳腺癌(例如,ER-或ER+乳腺癌)的患者是否将遭受或不遭受转移,从而可以如此地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ER+或ER-乳腺癌的受试者中转移的存在和/或预测患有ER+或ER-乳腺癌的受试者形成转移的可能性。新的预后因素的鉴定将在选择最合适的治疗中用作指导。

发明概述

[0018] 本发明的作者已鉴定并验证了c-MAF为与更大的ER+乳腺癌引起转移(特别是骨转移)的倾向相关的标志物。该过表达至少部分地归因于c-MAF基因所位于的座位16q22-q24的扩增。并不希望束缚于任何理论,特别地,认为雌激素受体(ER)的信号传导途径有助于乳腺癌的转移,其中导致对于产生所述转移来说必需的分子事件。

[0019] c-MAF基因在ER+乳腺癌转移中的作用已经由发明人进行了表征,通过向免疫缺陷小鼠接种MCF7细胞系(人ER+乳腺癌细胞系),以便随后获得与从所述MCF7细胞的骨转移获得的细胞系相关的表达谱。从所述表达谱开始并通过应用各种不同的标准,选择出了c-MAF基因,其中证明了表达水平的变化预测乳腺癌的原发肿瘤的骨复发。然后,在包含乳腺癌患者的原发肿瘤和乳腺癌患者的转移的表达谱和临床记录的两个不同数据库中研究了c-MAF的表达水平,其中观察到c-MAF的基因表达与不同的临床参数(包括复发和转移)正相关。另

外,测定了在乳腺癌的骨转移中c-MAF的表达水平,其中观察到在来自ER+和ER-肿瘤的转移中高的c-MAF水平。最后,通过体内转移定居试验,以及随后的借助于慢病毒载体的功能获得实验和借助于使用干扰RNA(siRNA)的功能缺失实验,独个地验证了c-MAF基因。这些研究已证明了c-MAF在乳腺癌的转移(特别是乳腺癌的骨转移)中作为预后标志物和作为靶标基因的作用。同样地,发明人还将座位16q22-q24(其包括c-MAF基因)的扩增与乳腺癌受试者中转移的存在相关联,和将乳腺癌细胞系中c-MAF基因的扩增与形成骨转移的倾向相关联。

[0020] 因此,在第一个方面,本发明涉及用于在患有ER+乳腺癌的受试者中对转移进行诊断和/或用于在患有ER+乳腺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:

[0021] (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

[0022] (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,

[0023] 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的倾向。

[0024] 在第二个方面,本发明涉及用于设计对于患有ER+乳腺癌的受试者的个性化疗法的体外方法,其包括:

[0025] (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

[0026] (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,

[0027] 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,那么所述受试者可以接受旨在预防和/或治疗转移的疗法。

[0028] 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乳腺癌的受试者的个性化疗法的体外方法,其包括:

[0029] (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,和

[0030] (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,

[0031] 其中如果c-MAF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,那么所述受试者可以接受旨在防止骨降解的疗法。

[0032] 在第四个方面,本发明涉及用于在患有乳腺癌的受试者中对转移进行诊断和/或用于在患有乳腺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。

[0033] 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/或预防乳腺癌的转移。

[0034] 在最后一个方面,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,所述受试者患有乳腺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高的c-MAF水平。

附图简述

[0035] 图1. (A) 组织特异性转移亚群的体内选择过程的图解。后继的骨转移代中的每一代被命名为BoM0、BoM1和BoM2。在免疫抑制小鼠中的移植模型之中通过心内注射来分析这

些细胞类型的转移能力。(B)从亲本ER+乳腺癌细胞和其继的转移性衍生细胞系BoM0、BoM1和BoM2的转录谱开始获得的分级聚类。(C)卡-迈(Kaplan-Meier)曲线,其中根据c-MAF的表达水平来分开患者组,并且指出了对于每一个患者组的随时间的复发和骨转移的概率。全部数据包括560个乳腺癌原发肿瘤。所述分析分别限于ER+和ER-肿瘤(Gene Expression Omnibus数据库,登录号GSE2603、2034和12276)。(D)使用c-MAF的表达水平来分开在NKI组群中所描述的338个乳腺癌原发肿瘤的表达谱。通过卡-迈曲线,以比较的方式显示了每个组的患者随时间的存活概率。在C和D中显示的p-值数据表明,通过使用这些值作为连续变量,c-MAF基因的表达与ER之间的相交独立地和显著地预测了复发或转移,其中使用COX类型的多变量模型(p-值<0.01)。

[0036] 图2.(A)相比于其他转移位点(脑、肝和肺)而言,在源自乳腺癌的骨转移中c-MAF基因的经标准化的表达水平(GSE14020)。(B)在具有不同的骨定居能力的且衍生自MDA-MB-231(ER-)乳腺癌细胞的不同亚群中c-MAF基因的经标准化的表达水平。(C)在具有不同的骨定居能力的且衍生自MDA-MB-231(ER-)乳腺癌细胞的或者具有编码MAF基因(长的同种型=Long)的cDNA的外源过表达的不同亚群中CTGF基因(由c-MAF的转录活性诱导的基因)的经标准化的表达水平。

[0037] 图3.(A)通过定量RT-PCR来进行的在MCF7ER+乳腺癌细胞和其转移性衍生物(BoM)中c-MAF的表达水平的分析。(B)和(C)c-MAF的功能缺失和功能获得实验。c-MAF的缺失和获得分别在高度骨转移性的和微弱骨转移性的细胞中进行。将具有和没有c-MAF的表达的衍生细胞系注射到免疫抑制小鼠的左心室中,并且通过生物发光成像技术来分析实时的体内骨定居,以验证在ER+乳腺癌中c-MAF对于骨转移的贡献。MAF-sho表示短的c-MAF(短的同种型)。

[0038] 图4.从来自亲本MCF7细胞或者过表达任一种c-MAF同种型(short—短的同种型,和long—长的同种型)的细胞的条件培养基开始,从源自骨髓的前体细胞开始的破骨细胞分化试验。破骨细胞的数目通过TRAP技术来进行测量。组之间的统计学差异通过双尾wilcoxon检验来进行评价。

[0039] 图5.(A)在染色体16中,相比于MCF7细胞而言,在BoM2细胞中从基因表达水平开始的拷贝数分析。在上部分中,显示了表达指示物。在该图的中间部分中,显示了转录物或基因(对于其配置了表达值)的参考序列(转录物参考序列),其根据它们的基因组位置进行安排;(B)ACE分析(基于表达数据的通过拷贝数来进行的改变分析)在348个ER+乳腺癌原发肿瘤中在具有转移的乳腺癌患者中鉴定出了在区域16q12-q24中反复出现的基因组获益。所述区域包括包含c-MAF基因的座位16q22-q24。基因表达与转移形成之间的关联通过应用“Cox log风险比率(HR)”模型来进行。通过在整个基因组中排列HR的对数(1000种排列)来获得统计学显著性,其中通过Benjamini-Hochberg来调整p值以控制FDR(假阳性率)至0.05的水平。仅将具有至少15个连续的显著基因的那些区域以灰色进行报道。

[0040] 图6.(A)通过荧光原位杂交(FISH)的MAF和IGH基因的拷贝数的检测,其中使用c-MAF基因的特异性探针(具有星号的箭头)和IGH基因的特异性探针(箭头)。将IGH基因用作对照。比例尺:25 μ m。(B)具有所示的MAF基因的拷贝数与IGH基因的拷贝数之比的细胞百分比的定量(指出了对于每个组所计数的细胞的总数目)。

发明详述

[0041] 基于c-MAF的表达水平的在乳腺癌中转移的诊断和预后方法

[0042] 发明人已经表明,c-MAF基因在乳腺癌转移中,特别是在ER+肿瘤中过表达,以及在原发肿瘤中c-MAF的表达水平与乳腺癌的不同临床参数,特别是与复发和转移概率相关。因此,根据在本发明的实施例中所观察到的(参见实施例2),c-MAF的过表达与ER+乳腺肿瘤的骨转移的出现相关(参见图1)。因此,c-MAF可以用作用于在患有ER+乳腺癌的受试者中对于转移进行诊断和/或预后的标志物。

[0043] 因此,在一个方面,本发明涉及用于在患有ER+乳腺癌的受试者中对转移进行诊断和/或用于在患有ER+乳腺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:

[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,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的倾向。

[0047] 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)。从所述DNA序列中转录出两种信使RNA,它们中的每一个产生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。

[0048] 在本发明的背景下,“转移”是指癌性病灶蔓延至与其所起始的器官不同的器官。转移通常通过血液或淋巴途径而发生。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,如果乳腺癌散布(转移)至肺,那么继发性肿瘤由乳腺癌的恶性细胞形成。在肺中的疾病是转移性乳腺癌而不是肺癌。在本发明方法的一个特别的实施方案中,所述转移是已散布(转移)至骨的ER+乳腺癌。

[0049] 在本发明中,“ER+乳腺癌”是指其肿瘤细胞表达雌激素受体(ER)的乳腺癌。这使得所述肿瘤对于雌激素敏感,这意味着雌激素使得该癌性乳腺肿瘤生长。相反地,“ER-乳腺癌”是指其肿瘤细胞不表达雌激素受体(ER)的乳腺癌。

[0050] 在本发明中,“在患有乳腺癌的受试者中转移的诊断”是指通过检查其症候,即在本发明的背景下,通过c-MAF基因在乳腺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),来识别疾病(转移)。

[0051] 在本发明中,“在患有ER+乳腺癌的受试者中对形成转移的倾向进行预后”是指从指证开始来知晓侵害所述受试者的ER+乳腺癌将来是否将会遭受转移。在本发明的背景下,所述指证为在肿瘤组织中c-MAF基因的过表达。

[0052] 本发明的方法包括,在第一个步骤中,定量在受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平。

[0053] 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作为唯一标志物的c-MAF基因的表达水平,即该方法不涉及任何另外的标志物的表达水平的测定。

[0054] 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,家畜和农畜、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。

[0055] 在本发明中,“肿瘤组织样品”是指来自ER+乳腺癌的原发肿瘤的组织样品。所述样品可以通过常规方法(例如活组织检查,通过使用对于在相关医学技术方面的技术人员来说熟知的方法)来获得。用于获得活组织检查样品的方法包括将肿瘤分割成大块,或显微切割,或其他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,然后包埋在可冷固化的介质(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。

[0056] 如本领域技术人员所理解的,基因表达水平的定量可以通过所述基因的信使RNA的水平或由所述基因编码的蛋白质的水平来进行测定。

[0057] 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(Sambrook, J. 等人, “Molecular cloning: a Laboratory Manual”, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 第1-3卷)来提取核酸。

[0058] 因此, c-MAF 基因的表达水平的定量可以从由所述基因的转录而得的RNA(信使RNA或mRNA)开始,或备选地,从所述基因的互补DNA(cDNA)开始来进行。因此,在本发明的一个特别的实施方案中, 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。

[0059] 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的扩增产物的定量(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, 优选地, 通过使用合适标记的实时定量PCR。类似地, 相应于所述由c-MAF基因编码的mRNA的cDNA的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的扩增产物的定量。定量表达水平的常规方法可以例如在Sambrook等人, 2001(根据上面所引用的)中找到。

[0060] 在一个特别的实施方案中, c-MAF 基因的表达水平的定量通过定量聚合酶链反应(PCR)或者DNA或RNA阵列来进行。

[0061] 另一方面, 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, 在一个特别的实施方案中, 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。

[0062] 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执行与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的启动子或包含对于c-MAF的应答区域(MARE或c-MAF应答元件)的启动子的控制之下的报道基因的转录能力的能力,如在W02008098351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的在IL-4的启动子的控制之下的报道基因的表达能力,如在US2009048117A中所描述的。

[0063] 优选地,根据本发明的变体与c-MAF蛋白的同种型(SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)中的任一种同种型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%的序列同一性。所述变体与上面所定义的c-MAF蛋白的特定序列之间的同一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。氨基酸序列之间的同一性优选地通过使用BLASTP算法[BLAST Manual, Altschul, S. 等人, NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S. 等人, J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]来进行测定。

[0064] c-MAF蛋白的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,所述蛋白质的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实例包括放射性同位素、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试验,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织化学技术、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、双链抗体、三链抗体、四链抗体和人源化抗体。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、Bioworld Technology、Gene Tex等。

[0065] 在一个特别的实施方案中,c-MAF蛋白的水平定量通过Western印迹、ELISA或蛋白质阵列来进行。

[0066] 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中获得的c-MAF基因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。

[0067] 一旦测量了在患有ER+乳腺癌的受试者的肿瘤组织样品中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,那么可以得出这样的结论: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。

[0068] 必需将c-MAF基因的表达水平的测定值与对照样品或参考样品的值相关。取决于作为分析对象的肿瘤的类型,对照样品的准确性质可以变化。因此,在待评价该诊断的情况下,那么参考样品为具有还未遭受转移的ER+乳腺癌的受试者的肿瘤组织样品,或者其相应于在具有还未遭受转移的ER+乳腺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基因的表达水平的平均值。

[0069] 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。在这样的样品中,可以确定生物标志物(c-MAF基因)的正常的(参考的)浓度,例如通过提供关于参考群体的平均浓度。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,例如属于各种年龄类别。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患者相同类型的癌症的受试者构成。

[0070] 一旦建立了该平均值,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平均值进行比较,并且如此被分配至“增加的”表达水平。归因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)。如此,在一个特别的实施方案中,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检定c-MAF的表达水平。那么,可以将c-MAF的“减少的”水平分配给,优选地这样的样品,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”表达水平分配给,优选地这样的样品,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。

[0071] 在本发明中,“增加的表达水平”是指这样的表达水平,当该表达水平涉及高于在参考样品或对照样品中出现的水平的c-MAF基因的水平时。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,可以考虑一个样品具有高的c-MAF表达水平。

[0072] 在本发明的背景下,应当理解,当由所述受试者所患有的ER+乳腺癌遭受向身体的其他器官的转移(在一个特别的实施方案中,向骨的转移)时,“受试者具有关于转移的阳性诊断”。

[0073] 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。根据在本发明中所使用的,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。

[0074] 另一方面,在本发明中,应当理解,当由所述受试者所患有的ER+乳腺癌在未来遭受转移的概率高时,“患者具有更大的形成转移的倾向”。

[0075] 本领域技术人员将会理解,不企望关于遭受从乳腺原发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,可以鉴定出在统计学上显著的一部分的受试者(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和Wearden, Statistics for Research, John Wiley and Sons, Nueva 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。

[0076] 在具有ER+乳腺肿瘤的患者中本发明的设计个性化疗法的方法

[0077] 正如从现有技术中知晓的,待向患有癌症的受试者施行的治疗取决于这是否是恶性肿瘤,即是否具有高的遭受转移的概率,或者这是否是良性肿瘤。在第一个假设中,所选择的治疗为全身治疗,例如化学疗法,而在第二个假设中,所选择的治疗为局部治疗,例如放射疗法。

[0078] 因此,根据在本发明中所描述的,假定在乳腺癌细胞中c-MAF基因的过表达与转移的存在相关,那么c-MAF基因的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做出决定。

[0079] 因此,在另一个方面,本发明涉及用于设计对于患有ER+乳腺癌的受试者的个性化疗法的体外方法(在下文中,本发明的第二个方法),其包括:

[0080] (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

[0081] (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,

[0082] 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,那么所述受试者可以接受旨在避免和/或治疗转移的疗法。

[0083] 在一个特别的实施方案中,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。

[0084] 已经关于本发明的第一个方法详细描述了术语和表述“受试者”、“ER+乳腺癌”、“肿瘤组织样品”、“转移”、“表达水平的测定”、“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。

[0085] 本发明的第二个方法包括,在第一个步骤中,定量在患有ER+乳腺癌的受试者的肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平。

[0086] 在一个优选的实施方案中,本发明的第二个方法包括仅定量作为唯一标志物的c-MAF基因的表达水平,即该方法不涉及任何另外的标志物的表达水平的测定。

[0087] 在本发明的第二个方法的情况下,所述样品为受试者的原发肿瘤组织样品。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。必需将c-MAF基因的表达水平的测定值与对照样品或参考样品的值相关。取决于作为分析对象的肿瘤的类型,对照样品的准确性质可以变化。因此,在一个优选的实施方案中,参考样品为具有还未遭受转移的ER+乳腺癌的受试者的肿瘤组织样品,或者其相应于在具有还未遭受转移的ER+乳腺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基因的表达水平的平均值。

[0088] 一旦测量了在样品中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,那么可以得出这样的结论:所述受试者可以接受旨在避免(如果该受试者还未遭受转移)和/或治疗(如果该受试者已经遭受了转移)转移的疗法。

[0089] 当癌症已产生转移时,采用全身治疗,其中包括但不限于,化学疗法、激素治疗、免疫疗法或这些的组合。此外,可以采用放射疗法和/或外科手术。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以及先前所使用的治疗类型。

[0090] 全身治疗是达到整个身体的那些治疗:

[0091] 一化学疗法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,化学疗法与放射治疗一起使用。

[0092] 一激素疗法基于,某些激素促进某些癌症的生长。例如,在女性中的雌激素(其由卵巢产生)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,卵巢;在男性的情况下,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。

[0093] 一免疫疗法是辅助患者的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。

[0094] 在具有有着骨转移的乳腺癌的患者中本发明的设计个性化疗法的方法

[0095] 本发明的作者已经表明,具有高的引起骨转移的能力并过表达c-MAF的衍生自原发乳腺肿瘤的细胞系的条件培养基能够以比不过表达c-MAF的细胞大的程度诱导破骨细胞形成。因此,患有已经转移至骨的ER-乳腺癌并且其中出现高的c-MAF水平的那些患者可以特别地得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。

[0096] 因此,在另一个方面,本发明涉及用于设计对于患有具有骨转移的ER-乳腺癌的受试者的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:

[0097] (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,和

[0098] (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,

[0099] 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,那么所述受试者可以接受旨在防止骨降解的疗法。

[0100] 已经关于本发明的第一个方法详细描述了术语和表述“受试者”、“ER+乳腺癌”、“肿瘤组织样品”、“转移”、“表达水平的测定”、“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。

[0101] 在一个更优选的实施方案中，所述骨转移为溶骨性转移。

[0102] 本发明的第三个方法包括，在第一个步骤中，定量在患有乳腺癌的受试者中在肿瘤组织样品中c-MAF基因的表达水平。在本发明的第三个方法的情况下，所述样品为骨转移组织样品。

[0103] 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作为唯一标志物的c-MAF基因的表达水平，即该方法不涉及任何另外的标志物的表达水平的测定。

[0104] 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。必需将c-MAF基因的表达水平的测定值与对照样品或参考样品的值相关。取决于作为分析对象的肿瘤的类型，对照样品的准确性质可以变化。因此，在涉及本发明的第三个方法的情况下，那么参考样品为具有还未遭受转移的乳腺癌的受试者的肿瘤组织样品，或者其相应于在具有还未遭受转移的乳腺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基因的表达水平的平均值。

[0105] 一旦测量了在样品中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，那么可以得出这样的结论：所述受试者可以接受旨在避免或防止骨降解的疗法。

[0106] 根据在本发明中所使用的，“用于避免或防止骨降解的试剂”是指任何这样的分子，其能够治疗或制止骨降解，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。用于避免和/或防止骨降解的试剂的举例说明性的实例包括但不限于：

[0107] 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。

[0108] 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”(DABA)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。

[0109] 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实例包括，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-脘和SH646。

[0110] 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。

[0111] 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或骨重吸收的疾病，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三个方法而设计出的疗法中使用的二磷酸类的实例包括但不限于，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)。

[0112] —“组织蛋白酶K的抑制剂”是指干扰组织蛋白酶K这种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实例包括：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W003/020278中），在出版物W003/020721（Novartis Pharma GMBH）和出版物W004/000843（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。

[0113] —“RANKL的抑制剂”，根据在本发明中所使用的，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T淋巴细胞是唯一的其中显示出分泌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：

[0114] ○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。

[0115] ○护骨蛋白或其具有结合RANKL的能力的变体。

[0116] ○特异于RANKL的反义分子。

[0117] ○具有加工RANKL的转录物的能力的核酶。

[0118] ○抗-RANKL的特异性抗体。在本发明的背景下，“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κB受体活化因子配体”（RANKL），从而引起RANKL的一个或多个功能的抑制。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等人（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。

[0119] 在一个优选的实施方案中，所述抗-RANKL抗体为单克隆抗体。在一个更加优选的实施方案中，所述抗-RANKL抗体为地舒单抗（Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3):210-215, CAS编号615258-40-7）。在本发明的背景下，地舒单抗是结合RANKL并且阻碍其激活的单克隆抗体（不结合受体RANK）。

[0120] 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。在一个更加优选的实施方案中，所述二膦酸类为唑来膦酸。

[0121] 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）或与激素治疗相联合。

[0122] 基于c-MAF基因扩增的检测的在乳腺癌中转移的诊断或预后方法

[0123] 本发明的作者已鉴定，衍生自ER+乳腺肿瘤并且具有高度转移能力的细胞系显示出座位16q22-q24（其包括相应于c-MAF基因的基因座）的扩增和c-MAF基因的扩增。

[0124] 因此，在一个方面，本发明涉及用于在患有乳腺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/或用于在患有乳腺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。

[0125] 在一个特别的实施方案中,在本发明的第四个方法中诊断的乳腺癌为ER+或ER-乳腺癌。

[0126] 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”、“ER+乳腺癌”、“在患有ER+乳腺癌的受试者中转移的诊断”、“在患有ER+乳腺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。

[0127] 在一个特别的实施方案中,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测定。在一个优选的方案中,其扩增是存在c-MAF基因的扩增的指示的染色体区域为座位16q22-q24,其包括c-MAF基因。座位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之间的区间内。该区域在NCBI数据库中相应于重叠群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。

[0128] 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。

[0129] 如在本发明中所理解的,术语“基因的扩增”是指这样的过程,通过该过程在特定细胞或细胞系中形成基因或基因片段的多个拷贝。基因的拷贝不必需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。

[0130] 在一个特别的实施方案中,用于在患有乳腺癌的受试者中对转移进行诊断和/或用于在患有乳腺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。

[0131] 对照样品是指具有还未遭受转移的ER+或ER-乳腺癌(根据受试者所遭受的癌症类型)的受试者的肿瘤组织样品,或者其相应于在具有还未遭受转移的ER+或ER-乳腺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基因的拷贝数的平均值。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。

[0132] 如在本发明中所使用的,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(非肿瘤的)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的拷贝数的平均值。

[0133] 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“增加的基因的拷贝数”。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,和甚至多于10个拷贝的c-MAF基因时,可以认为一个样品具有增加的c-MAF的拷贝数。

[0134] 在一个特别的实施方案中,所述扩增或所述拷贝数通过原位杂交或PCR来进行确定。

[0135] 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。

[0136] 荧光原位杂交(FISH)是用于检测和定位在染色体中特定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程度的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(fluor)进行标记的探针的情况下)要么间接地(使用经荧光标记的抗体来检测半抗原)使样品可视化。

[0137] 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。

[0138] 可以使用任何能够结合DNA的标记分子或标签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物的实例包括但不限于,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、酶以及这些的组合。用于进行标记的方法和用于选择适合于不同目的的标记物的指导可以,例如在Sambrook等人(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,New York,1989)和Ausubel等人(In Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,New York,1998)中找到。

[0139] 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,要么通过确定座位16q22-q24的扩增),并且在将其与在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,其是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指示。

[0140] 必需将c-MAF基因的扩增的测定结果与对照样品或参考样品的值相关,所述对照样品或参考样品的值相应于在具有还未遭受转移的乳腺癌的受试者的肿瘤组织样品中所测量的c-MAF基因的扩增水平,或者相应于在具有还未遭受转移的乳腺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基因的扩增的平均值。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的受试者构成。一旦建立了该平均值,就可以将在患者的肿瘤组织中c-MAF的扩增水平与该平均值进行比较,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。

[0141] 在一个优选的实施方案中,所述转移为骨转移。在一个更加优选的实施方案中,所

述骨转移为溶骨性骨转移。根据在本发明中所使用的,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。

[0142] 本发明的治疗方法

[0143] 使用c-MAF的抑制性试剂来治疗骨转移

[0144] 通过为此使用异种移植实验模型,本发明的作者已经表明,在乳腺癌细胞中c-MAF的表达的抑制导致在从所述细胞形成骨转移方面在统计学上显著的下降。相反地,在该相同的系统中,在肿瘤细胞中c-MAF的过表达引起所述细胞的转移能力的增加。因此,可以在乳腺癌转移的治疗和/或预防中使用c-MAF基因表达或由所述基因编码的蛋白质的抑制性试剂。

[0145] 因此,在另一个方面,本发明涉及c-MAF基因表达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/或预防乳腺癌转移的药物中的用途。备选地,本发明涉及c-MAF基因表达或由所述基因编码的蛋白质的抑制性试剂,其用于在乳腺癌转移的治疗和/或预防中使用。备选地,本发明涉及在受试者中治疗乳腺癌转移的方法,其包括向所述受试者施用c-MAF的抑制剂。

[0146] 根据在本发明中所使用的,“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,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。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在体外促进细胞增殖的能力的能力,如在国际专利申请WO2005/046731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的启动子或包含对于c-MAF的应答区域(MARE或c-MAF应答元件)的启动子的控制之下的报道基因的转录能力的能力,如在WO2008098351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的在IL-4的启动子的控制之下的报道基因的表达能力,如在US2009048117A中所描述的。

[0147] 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。

[0148] 反义寡核苷酸

[0149] 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,例如通过抑制其转录和/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,通过在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技术的范围并且包括基于与寡核苷酸序列的特异性结合的任何方法。

[0150] 可以例如作为表达质粒来分发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,并且其在当引入细胞中时,通过与靶核酸的mRNA和/或基因组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,其对于内源的核酸酶(例如核酸外切酶和/或核酸内切酶)具有抗性,并且其因此

在体内是稳定的。用于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)。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等人,Bio Techniques6:958-976,1988;和Stein等人,Cancer Res48:2659-2668,1988中。

[0151] 关于反义寡核苷酸,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是优选的。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mRNA的转录物相结合并阻止翻译。

[0152] 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最有效地起作用以抑制翻译。然而,最近已显示,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,Nature372:333,1994)。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)充分互补的寡核苷酸。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,并且具有优选地少于大约100个核苷酸,和更优选地少于大约50、25、17或10个核苷酸的长度。

[0153] 优选的是,首先进行用于定量反义寡核苷酸抑制基因表达的能力的体外研究。优选的是,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。也优选的是,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。优选的是,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需的。

[0154] 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等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.86:6553-6556,1989;Lemaitre等人,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。

[0155] 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等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93:14670,1996,和Eglom等人,Nature365:566,1993中。

[0156] 在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。

[0157] 尽管可以使用与mRNA的靶序列的编码区互补的反义寡核苷酸,但还可以使用与非翻译转录区互补的那些反义寡核苷酸。

[0158] 在一些情况下,达到足以抑制内源mRNA的翻译的细胞内反义寡核苷酸浓度可能是困难的。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的强启动子的控制之下。

[0159] 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在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(Morpholinos)。

[0160] siRNA

[0161] 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RNA双链组成,所述RNA双链的长度为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通过靶信使的转录后降解或沉默而起作用。

[0162] 本发明的siRNA与编码c-MAF的基因的mRNA或与编码所述蛋白质的基因组序列实质上同源。“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:

[0163] 一这样的siRNA,其中核苷酸之间的键不同于在自然界中出现的那些,例如硫代磷酸酯键;

[0164] 一RNA链与功能性试剂(例如荧光团)的缀合物;

[0165] 一RNA链的末端的修饰物,特别是3' 末端的修饰物,通过用不同的官能团对在2' 位处的羟基进行修饰;

[0166] 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;

[0167] 一这样的核苷酸,其具有经修饰的碱基,例如卤化碱基(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)。

[0168] 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,可能的是使用这样的载体,其包含siRNA的有义链和反义链的序列,它们处于在适合于其在目的细胞中表达的启动子的控制之下。

[0169] 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,并且其中唯一的启动子指导产生shRNA的DNA分子的转录。

[0170] 备选地,可能的是使用这样的载体,其中形成siRNA的链中的每一条由不同的转录单位的转录开始来形成。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DNA链的每一条链的转录单位串联地位于载体中,从而每一条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. 等人, 2003, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 100:5103-5106; 和Lee, N. S. 等人, 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.等人,2003,BMC Biotechnol.,3:21),使用小鼠U6启动子和人H1启动子(Zheng,L.等人,2004,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,135-140,和W02005026322),和使用人U6启动子和小鼠H1启动子(Kaykas,A.和Moon,R.,2004,BMC Cell Biol.,5:16)。

[0171] 适合于在从趋同或背驰表达载体开始的siRNA的表达中使用的启动子包括与希望在其中表达所述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必需限于: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)的基因组的衍生物,金属硫蛋白基因的启动子,单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因的启动子,反转录病毒的LTR区,免疫球蛋白基因的启动子,肌动蛋白基因的启动子,EF-1 α 基因的启动子,以及诱导型启动子,其中蛋白质的表达依赖于外源分子或信号的添加,例如四环素系统,NF kappa B/UV光系统,Cre/Lox系统,和热休克基因的启动子,在W0/2006/135436中所描述的RNA聚合酶II的可调节型启动子,以及组织特异性启动子(例如,在W02006012221中所描述的PSA的启动子)。在一个优选的实施方案中,所述启动子是组成性地起作用的RNA聚合酶III的启动子。RNA聚合酶III的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RNA聚合酶III的其他启动子,III型启动子不需要任何基因内序列,但需要在5'方向上的序列,其包括在位置-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)。在一个优选的实施方案中,RNA聚合酶III的III型启动子为人或鼠类来源的H1基因和U6基因的启动子。在一个更加优选的实施方案中,所述启动子为2个人或鼠类来源的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。在本发明的背景下,对于在乳腺肿瘤中(优选地,在ER+乳腺肿瘤中)特异地表达目的基因来说特别合适的并因此特别优选的启动子为ER α 基因或细胞周期蛋白D1基因的启动子。

[0172] 可以从所谓的shRNA(短发夹RNA)开始在细胞内产生siRNA,所述shRNA的特征在于,形成siRNA的反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。

[0173] 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 m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。

[0174] 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,并且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'有义位置处的任何位置

中。用于设计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基因的序列中的任何核苷酸),并且选择具有高的G/C含量的那些。如果未找到所述基序,那么可能的是,鉴定NA (N21) 基序,其中N可以是任何核苷酸。

[0175] 特异于c-MAF的siRNA包括在W02005046731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ACCUGGAAGACUACUACUGG (SEQ ID NO:12)。

[0176] DNA酶

[0177] 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。所述DNA酶合并了反义技术和核酶技术两者的一些机理性特征。这样地设计DNA酶,从而与反义寡核苷酸类似,它们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。

[0178] 核酶

[0179] 还可以使用设计用于催化切割靶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RNA的特异性切割的酶促RNA分子(关于综述,参见Rossi, Current Biology4:469-471,1994)。核酶的作用机制牵涉核酶分子的序列与互补的靶RNA的特异性杂交,随后是内核溶解性切割事件。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)。

[0180] 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等人,Science224:574-578,1984)。

[0181] 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),并且应当被分发至在体内表达靶基因的细胞。一个优选的分发方法牵涉使用在pol III或pol II的强组成型启动子的控制之下“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需要较低的细胞内浓度。

[0182] 抑制性抗体

[0183] 在本发明的背景下,“抑制性抗体”是指所有这样的抗体,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等人(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。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出能够抑制该蛋白质的活性的那些。

[0184] 抑制性肽

[0185] 如在本文中所使用的,术语“抑制性肽”是指这样的那些肽,其能够结合c-MAF蛋白并抑制其活性(根据在上面所解释的),即阻止c-MAF能够激活基因转录。

[0186] c-MAF的显性失活变体

[0187] 假定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的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的三分之二(例如,mafK、mafF、mafG和pi8)(Fujiwara等人,(1993)Oncogene8,2371-2380;Igarashi等人,(1995)J.Biol.Chem.270,7615-7624;Andrews等人,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA90,11488-11492;Kataoka等人,(1995)Mol.Cell.Biol.15,2180-2190)(Kataoka等人,(1996)Oncogene12,53-62)。

[0188] 备选地,c-MAF的显性失活变体包括这样的c-MAF的变体,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的N-末端的c-MAF的反式激活结构域的那些。因此,举例说明地,c-MAF的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中所描述的)。

[0189] 本发明考虑了c-MAF的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的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、小鼠乳腺肿瘤病毒的启动子(MMTV)、延伸因子1a(EF1a)的启动子、白蛋白的启动子、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基因的启动子。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噬菌体T7RNA聚合酶的启动子。

[0190] 优选地,可以在本发明的背景下使用的诱导型启动子为那些启动子,其响应于诱导剂,其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。根据诱导剂的类型,可以将诱导型启动子分类为Tet on/off启动子(Gossen,M.和H.Bujard(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551;Gossen,M.等人,1995,Science268:1766-1769;Rossi,F.M.V.和H.M.Blau,1998,Curr.Opin.Biotechnol.9:451-456)、Pip on/off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等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:6314-6318;No等人,1996,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:3346-3351;Suhr等人,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等人,1996,Nat.Med.2:1028-32)。

[0191] 适合于表达编码c-MAF的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 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pSilencer4.1-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。

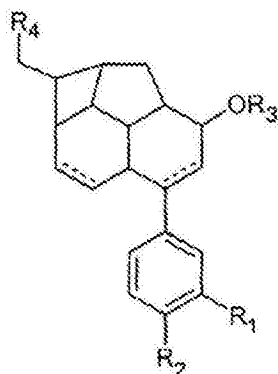
[0192] c-MAF蛋白的活性的其他抑制性化合物

[0193] 适合于在本发明中使用的c-MAF的其他抑制性化合物包括：

[0194] 表1：具有抑制c-MAF的能力的小分子

[0195]

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：



其中，

R_1 和 R_2 相互独立地为

1.0 H, 或

I 2.0 $-O-C_1-C_6$ 烷基、 $-O-C_2-C_6$ 烯基、 $-O-C_2-C_6$ 炔基或 $-O-C_6-C_{10}$ 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双取代：

2.1 $-OH$,

2.2 $=O$,

2.3 $-O-C_1-C_6$ 烷基，其中所述烷基为直链的或支化的，

2.4 $-O-C_2-C_6$ 烯基，其中所述烯基为直链的或支化的，

2.5 $-C_6-C_{10}$ 芳基，

2.6 $-NH-C_1-C_6$ 烷基，其中所述烷基为直链的或支化的，

2.7 $-NH-C_2-C_6$ 烯基，其中所述烯基为直链的或支化的，

2.8 $-NH_2$, 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 单取代或双取代，

[0196]

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，和取代基 2.5 另外可以被-CN 或酰胺官能团取代，或者 R_1 和 R_2 一起形成环，其中 R_1 和 R_2 表示-O-[(C₁-C₆)亚烷基]-O-基团， R_3 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双取代：

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，

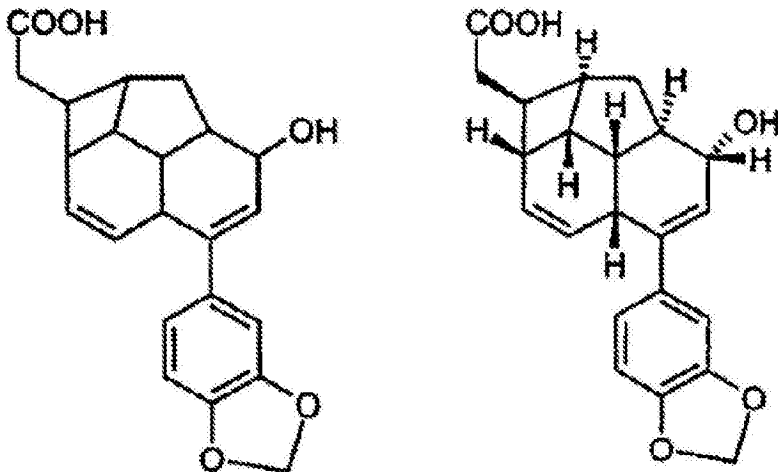
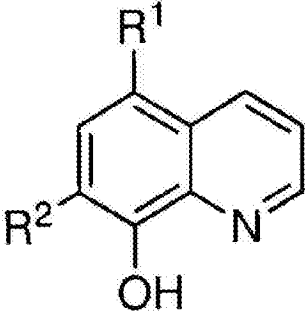
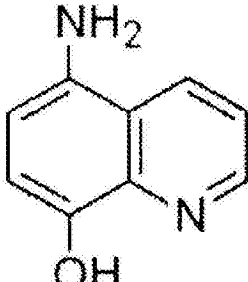
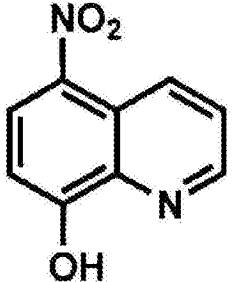
并且其中所述芳基基团，任选地被取代基 2.1 或 2.3 至 2.9 单取代或双取代，

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，和取代基 2.5 另外可以被-CN 或酰胺官能团取代，

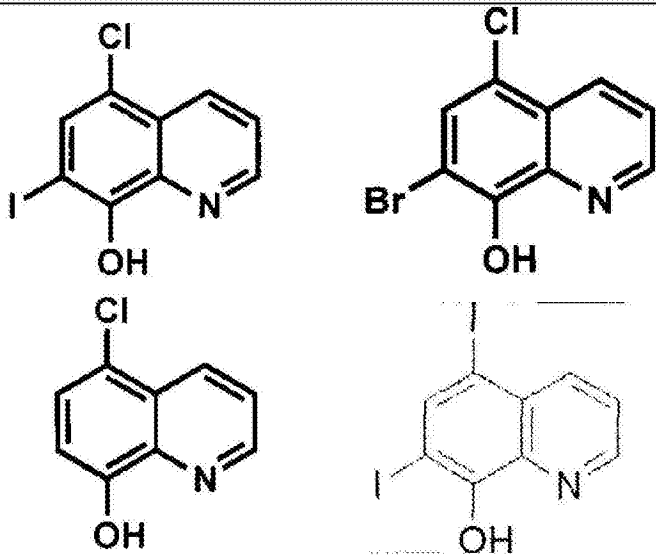
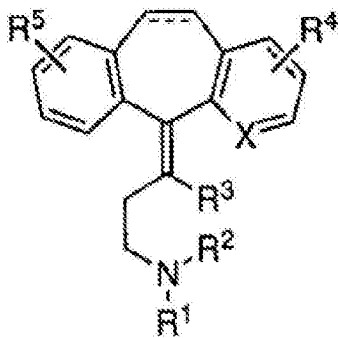
R_4 为 CO₂R₃、CO₂NHR₃、CHO、CH₂OR₃、CH₂OSi(R₃)₃、CH₂Br、CH₂CN、其中 R_3 如上面所定义，

并且，特别地，其为下述化合物

[0197]

	
II	8-羟基喹啉的衍生物，例如具有下述通式的在 WO2009146546 中所描述的那些：  其中， R_1 选自由 NO_2、NH_2、$\text{NH}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基})$ 和 $\text{N}(\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基})(\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基})$ 组成的组； R_2 选自 H、卤素、$\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基}$ 和被氟取代的 $\text{C}_1\text{-C}_6\text{烷基}$， 或者 R_1 为 Cl，和 R_2 为 Br 或 H， 并且，优选地，其为下述化合物  

[0198]

	
III	氯碘羟喹 (5-氯-7-碘喹啉-8-醇), 如在 WO09049410 中所描述的化合物, 例如具有下述通式的在 WO08098351 中所描述的那些
IV	 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 烷基和 $C(O)NH$ C_1-C_4 烷基组成的组; R^2 选自 H 和 C_1-C_4 烷基; R^3 选自 H 和 C_1-C_4 烷基; 或者 R^2 和 R^3 与它们所结合的碳原子和氮原子结合在一起从而形成哌啶环, R^4 和 R^5 独立地选自 H、卤素、羟基、C_1-C_4 烷基、被氟取代的 C_1-C_4 烷基和 C_1-C_4 烷氧基; 和 X 选自 C 和 N, 并且, 优选的化合物为例如:

[0199]

	赛庚啉（4-(5H-二苯并[a,d]环庚烯-5-亚基)-1-甲基哌啶）， 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]芳庚并[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

[0200] 在专利申请W02005063252中描述了其他c-MAF的抑制剂,如在下表(表2)中所显示的。

[0201] 表2:c-MAF的抑制剂

[0202]

拮抗剂	关于 cdk2 抑制活性的参考文献
嘌呤类似物	
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. 等人, Science, 281, 533-538 (1998); Chang, Y.T.等人, 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.等人, (1994), Eur. J. Biochem, 224, 771-86, 11; Brooks, E.E.等人, (1997), J. Biol. Chem., 272, 29207-11

[0203]

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.等人, J. Virol. 75, 7266-7279 (2001); McClue, S.J.等人, Int. J. Cancer, 102, 463-468 (2002); Meijer, L.等人, (1997), Eur. J. Biochem, 243, 527-36
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-氯苄基)-9-乙基-9H-嘌呤-2,6-二胺	Imbach, P.等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K.等人, 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.等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 9, 91-96 (1999); Dreyer, M.K.等人, 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. 等人, J. Med. Chem. 43, 2797-2804 (2000); Davies 等人, Nature Structural Biology, 9:10, 745-749, 2002
嘌呤类似物, 例如 NU6102	Arris, C.E. 等人, J. Med. Chem. 43, 2797-2804 (2000); Davies, T.G.等人, Nat. Struct. Biol., 9, 745-749 (2002)
异戊烯基腺嘌呤	Vesely, J., 等人, (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.等人, Structure, 9, 389-397 (2001); Marko, D.等人, Br. J. Cancer, 84, 283-289 (2001); Hoessel, R.等人, (1999), Nat. Cell Biol., 1, 60-7; Hellberg 等人的 PCT/US02/30059, 以 WO 03/027275 公开
在该表的第 2 列中所提及的 Fischer 的羟嘌呤 1 (#IN118, JMAR, Chemical)	Poros-Makkay, M. 等人, Tetrahedron 2000, 56, 5893, Org. Process. Res. Dev, 2000, 4, 10
茚并吡唑类	Nugiel, D.A. 等人, J. Med. Chem. 44, 1334-1336 (2001); Nugiel, D.A. 等人, J. Med. Chem. 45, 5224-5232 (2002); Yue, E.W.等人, J. Med. Chem. 45, 5233-5248 (2002)

[0204]

吡啶并(2,3-d)嘧啶-7-酮, Fischer 的化合物 3	Barvian, M. 等人, 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. 等人, Bioorg. Med. Chem. Lett., 11, 1157-1160 (2001); Mettrey 等人, 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]咪唑-8-亚基)甲基]氨基]-N-(2-吡啶基)苯磺酰胺	Davis, S.T. 等人, Science, 291, 134-137 (2001); Hellberg 等人的 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. 等人, (1996), Cancer Res., 56, 2973-8
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. 等人, (1991) Anticancer Res., 11, 1581-90; Wang, Q. 等人, (1995) Cell growth Differ. 6, 927-36; Akiyama, T. 等人 (1997), Cancer Res., 57, 1495-501; Kawakami, K. 等人, (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., 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-咪唑并[3,2-d][1]苯并氮杂萘-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-7,12-二氢咪唑并[3,2-d][1]苯并氮杂萘-6(5)-酮	Zaharevitz, D.W. 等人, Cancer Res., 59, 2566-2569 (1999); Schultz, C. 等人, J. Med. Chem. 42, 2909-2919 (1999); Zaharevitz, D.W. 等人, (1999) Cancer Res., 59, 2566-9; Hellberg 等人的 PCT/US02/30059, 以 WO 03/027275 公开
CGP41251, 生物碱	Begemann, M. 等人, (1998) Anticancer Res., 18, 2275-82; Fabbro 等人, Pharmacol Ther., 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. 等人, (1999) Chemistry & Biology, 7, 51-63; Hellberg 等人的 PCT/US02/30059, 以 WO 03/027275 公开
CGP60474, 苯基氨基嘧啶	21; WO95/09853, Zimmermann 等人, 1994 年 9 月 21 日

[0205]

噻唑并嘧啶 2	Attaby 等人, Z. Naturforsch. 54b, 788-798 (1999)
二芳基脲	Honma, T. 等人, J. Med. Chem., 44, 4628-4640 (2001); Honma, T. 等人, 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. 等人, Oncogene, 8, 2425-2432 (1993)
Aloisine A, 目录号 128125 (Calbiochem, San Diego, CA)	Mettey, 等人, J. Med. Chem., 2003, 46, 222-236

[0206] 在一个优选的实施方案中,使用c-MAF的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。

[0207] 通常,将c-MAF的抑制性试剂与药学上可接受的“载料”相组合地进行施用。

[0208] 术语“载料(vehicle)”是指用其来施用活性成分的稀释剂或赋形剂。此类药学载料可以是无菌液体,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料,特别是对于可注射溶液。合适的药学载料描述在“Remington's Pharmaceutical Sciences”, E.W.Martin, 1995中。优选地,本发明的载料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。

[0209] 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施用形式来说必需的载料和辅助物质尤其取决于所选择的药物施用形式。所述药物组合物的药物施用形式按照本领域技术人员已知的常规方法来进行制备。不同的用于施用活性成分的方法、待使用的赋形剂和用于生产它们的过程的综述可以在“Tratado de Farmacia Galénica”, C.Faulii Trillo, Luzán5, S.A., 1993版中找到。药物组合物的实例包括任何用于口服、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。

[0210] 为了在医学中的使用,c-MAF的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,并且可以与从药学观点来看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、树胶和蛋白质。在一个特别的实施方案中,将本发明的药物组合物配制成固体药物施用形式(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晶体的或无定形的无菌固体,等等)、液体药物施用形式(例如溶液、悬浮液、乳液、酏剂、洗剂、软膏剂,等等)或半固体药物施用形式(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. Faulii Trillo, Luzán5, 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。

[0211] 在施用核酸(sRNA、编码sRNA或shRNA的多核苷酸或者编码c-MAF的显性失活变体的多核苷酸)的情况下, 本发明考虑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, 即在不存在保护核酸免于其被机体的核酸酶降解的化合物的情况下, 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-1的TAT蛋白的Tat肽、黑腹果蝇(D. melanogaster)的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中所描述的那些的肽(Lindgren, A. 等人, 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:99-103; Schwarze, S.R. 等人, 2000, Trends Pharmacol. Sci., 21:45-48; Lundberg, M等人, 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。

[0212] c-MAF的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。单个剂量可以通过注射、通过吸入或通过局部施用来进行施用。

[0213] 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。单个剂量可以每天一次地或每天少于一次地, 优选地每2、4、8或30天少于一次地进行施用。备选地, 可能的是, 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: 0.01μg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, 维持剂量最多每5、10或30天施用一次。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, 应当监测患者的变化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。

[0214] 在呈现出高c-MAF水平的、具有骨转移的乳腺癌的患者中治疗或预防骨降解

[0215] 本发明的作者已经证明, 在乳腺肿瘤的骨转移中, c-MAF的水平现出升高。同样地, 本发明的作者已经表明, 具有高的引起骨转移的能力并过表达c-MAF的衍生自原发乳腺肿瘤的细胞系的条件培养基能够以比不过表达c-MAF的细胞大的程度诱导破骨细胞形成。因此, 患有已经转移至骨的乳腺癌并且其中在所述转移中出现高的c-MAF水平的那些患者可

以特别地得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。

[0216] 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,所述受试者患有乳腺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高的c-MAF水平。

[0217] 备选地,本发明涉及用于避免或防止骨降解的试剂,其用于在受试者中预防和/或治疗骨转移,所述受试者患有乳腺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高的c-MAF水平。

[0218] 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,所述受试者患有乳腺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。

[0219] 在一个特别的实施方案中,所述骨转移为溶骨性转移。在另一个特别的实施方案中,所述乳腺癌为ER+或ER-乳腺癌。

[0220] 已经关于本发明的第一个方法详细描述了术语和表述“受试者”、“ER+乳腺癌”、“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”,并且它们同样可应用于用于避免或防止骨降解的试剂。

[0221] 适合于在本发明中所描述的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。

[0222] 参考样品或对照样品为具有还未遭受转移的ER+或ER-乳腺癌的受试者的肿瘤组织样品,或者其相应于在具有还未遭受转移的ER+乳腺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基因的表达水平的平均值。

[0223] 已经关于本发明的第一个方法详细描述了用于测定或定量c-MAF的水平相对于对照样品而言是否出现升高的方法,并且它们同样可应用于用于避免或防止骨降解的试剂。

[0224] 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)或与某些激素相联合。

[0225] 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料相组合地进行施用。已经在上面关于c-MAF的抑制性试剂以及可以以其进行施用的形式和剂量定义了术语“载料”和载料的类型,并且它们同样可应用于用于避免或防止骨降解的试剂。

[0226] 下面的实施例用于举例说明本发明,而并不意欲限制其范围。

实施例

[0227] I. 材料和方法

[0228] 研究的实验模型

[0229] 已开发了新的实验模型用于研究在ER+乳腺癌中的转移。为此目的,使用了称为MCF7的人ER+乳腺癌细胞系,将其用允许GFP/萤光素酶表达的载体稳定地进行转染。通过经心室内途径或在尾静脉中进行注射来将该细胞系接种在免疫缺陷小鼠(Balb-c/裸鼠)中,以便可以选择出具有向不同器官转移的能力的细胞。所述小鼠携带皮下雌激素植入物,其保证在整个实验期间该激素的存在。

[0230] 转移性群体的选择

[0231] 通过鉴定和分离转移损伤的细胞来选择出在不同组织中的转移性群体。为此,使用生物发光成像技术,其利用允许检测在不同时间处在目的器官中肿瘤细胞的建立和生长并定量所存在的肿瘤细胞的数目的技术。为了应用该技术,这些细胞已被转变成表达萤光素酶和GFP基因并由此允许对于其以非侵入性方法实时地进行体内追踪。发光图像(萤光素酶活性)的捕获用处于麻醉状态下的动物来进行,其中使用Xenogen IVIS型设备和Livingimage软件作为优选的方法,这归因于其灵敏度和速度。为了分离转移性细胞,切开肿瘤损伤并随后通过荧光(GFP)激光扫描细胞计量术技术来将转移性细胞与宿主生物体自身的细胞分离开。一旦分离出这些细胞,就重复该过程以富集其对于通过不同组织的向性。通过这些过程,分离出了不同的具有组织特异性的转移性群体,包括骨转移。

[0232] 一旦鉴定并分离出转移性群体,就进行高效的转录分析。总之,该策略使得能够鉴定出其转录增加的基因,和作为在具有差的预后的癌细胞中的转移过程的介体起作用的一些基因。通过无偏体内选择过程确证了其表达发生改变的基因参与了至于转移性细胞而言在具体组织和器官中的定居。

[0233] 鉴定在ER+乳腺癌中的骨转移中富集的基因的组

[0234] 通过比较高度地和差地转移性的细胞亚群的基因表达谱,鉴定出了一组其过表达或抑制与骨转移的溶骨表型相关的基因。与成骨细胞性的那些(合成)不同,溶骨性骨转移损伤(降解)与在临床上更具攻击性的骨转移性乳腺癌形式相关。通过使用标准化的方法,获得了与具有高的骨转移能力的细胞系相关的表达谱。通过无偏分析,关于其骨攻击性表型和其表达谱,将不同的来自ER+乳腺细胞的骨转移性衍生物进行了分类。在这两种情况下,转移性衍生细胞系,BoM1和BoM2,均显示出具有不同于起始细胞(MCF7)的转移行为,既在基因表达谱水平上也在表型上(图1A)。

[0235] 关于在ER+乳腺癌中的骨转移而富集的基因的组包括细胞因子、细胞粘附分子、膜蛋白酶、信号传导的介体和转录因子。

[0236] 然后,使作为调节在ER+乳腺癌中骨转移的能力的候选物而被选择出的那组基因经历在人中的临床验证。为此,将候选基因的表达的改变与在两个组群的基因表达谱中出现的改变进行比较,所述两个组群中的一个为乳腺原发肿瘤,和另一个为转移,其分别包括560个乳腺肿瘤和58个转移。

[0237] 鉴定在ER+乳腺癌中的骨转移中富集的那些基因,其在ER-乳腺癌中的骨转移中是相关的

[0238] 接着评价在ER+乳腺癌中的骨转移中富集的基因在ER-亚型中的作用。关于在ER+乳腺癌中的骨转移而富集的基因的组包括转录因子c-MAF。

[0239] 生物信息学和计算生物学

[0240] 为了获得在转移中富集的基因的组并证实其临床相关性,使用了R和Bioconductor统计学软件包。输入对于数据处理来说特殊的函数和结构,并且其来自通过www.bioconductor.org的公众开放访问。

[0241] 实施例1

[0242] 相关基因的选择

[0243] 进行分析以选择在衍生自具有形成骨转移的倾向的ER+乳腺癌细胞系的细胞中差异表达的基因(图1A)。所进行的分析使得能够鉴定出91个在衍生自具有向骨转移的能力的

MCF7ER+细胞系的细胞系中富集的或沉默的基因(图1B)。独个地选择出决定性的基因和功能以便根据下述标准进行更详细的研究:

[0244] i) 与攻击性ER+乳腺癌和骨转移的临床相关性,

[0245] ii) 先前已知参与与攻击性表型相容的过程的功能(例如,骨重吸收、炎症、血管发生),

[0246] iii) 相比于亲本而言在转移性群体之间表达水平的变化,如先前所描述的,和

[0247] iv) 在基因调控网络和细胞信号传导途径中的中心作用。

[0248] 基于这些标准,鉴定出了转录因子c-MAF,并且检查了其表达水平的变化如何预测在ER+乳腺癌原发肿瘤中的骨复发。

[0249] 实施例2

[0250] 关于不依赖于乳腺癌亚型的骨转移而富集的基因的治疗价值和预后价值

[0251] 将通过在此处开发的用于选择转移性细胞群体的实验系统在骨转移中富集的基因针对两个不同的数据库进行评价,所述数据库包含560个乳腺癌原发肿瘤和58个乳腺癌患者转移的表达谱和临床记录。这些肿瘤是所有乳腺癌亚型和转移定位的代表。这两个数据库及其临床记录都是公众可访问的(GSE2603、2034、12276和14020)。

[0252] 在ER+原发肿瘤中骨转移基因的基因表达与复发、无转移存活率和存活率显著相关(图1C和D)。

[0253] 另一方面,在58个乳腺癌患者转移的组群中评价了在转移性组织中c-MAF基因的表达水平(GSE14020)。这些转移分离自肺、肝、骨和脑。证实了c-MAF基因特异地在骨转移中富集,其不依赖于肿瘤或转移损伤所属于的乳腺癌亚型,ER+或ER-(图2A)。

[0254] 实施例3

[0255] 在ER-乳腺癌中骨转移基因c-MAF的体内功能验证

[0256] 将在所述分析中结果为阳性的转移基因c-MAF在小鼠中的乳腺癌转移移植实验模型之中在骨转移定居试验中从功能上进行验证。具有高的在骨中生长的能力的ER-乳腺癌细胞的选择与转移基因c-MAF的高水平的选择相伴随(图2B)。

[0257] 为了验证该候选基因指导转移过程而进行的方法为功能获得试验。为此目的,使c-MAF基因在亲本细胞MDA-MB-231中表达,并随后评价其诱导有助于转移的基因(CTGF)的表达的能力(图2C)。

[0258] 实施例4

[0259] 组织特异性转移基因的体内功能验证

[0260] 将在所述分析中结果为阳性的转移基因c-MAF在小鼠中的乳腺癌转移移植实验模型之中在骨转移定居试验中从功能上进行验证。

[0261] 为了验证该候选基因指导转移过程而进行的方法为功能缺失或功能获得试验。为此目的,使c-MAF基因在亲本细胞中或者在对于骨来说高度转移性的衍生细胞中表达或沉默,并随后在体内评价其骨转移能力。

[0262] 功能获得试验

[0263] 为了表达c-MAF基因,使用慢病毒系统来诱导该候选基因在亲本肿瘤细胞中和在具有低转移能力的所选择出的那些细胞中的异源表达。通过经心内途径接种在小鼠中的转移性细胞的生物发光追踪的技术来测定c-MAF基因的诱导转移的能力(如在“研究的实验模

型”部分中所描述的)。在所有情况下,在作为阴性对照的平行动物组群中平行地注射用不表达c-MAF蛋白的慢病毒载体感染的相应对照细胞(图3B)。

[0264] 功能缺失试验

[0265] 在高度骨转移性的并且具有高的内源c-MAF基因表达水平的BoM2细胞系中抑制c-MAF基因的表达(图3A和3C)。为此目的,使用允许表达干扰RNA(siRNA)的慢病毒载体,所述干扰RNA具有使c-MAF基因的表达相对于在BoM2细胞系中存在的水平而言减少80%的能力。将具有经沉默的c-MAF基因表达的细胞群体通过心内途径接种(如在“研究的实验模型”部分中所描述的)到免疫抑制小鼠中,其中监测这些动物以通过生物发光成像技术来检测转移活性。在这些实验中,使用通过用慢病毒载体进行感染而从BoM2细胞系获得的细胞作为阴性对照,所述慢病毒载体编码有效地对抗与转移过程无关的其他基因的表达的siRNA。

[0266] 实施例5

[0267] 破骨细胞分化试验

[0268] 分离来自小鼠骨髓的原代细胞,并使其在M-CSF(巨噬细胞集落刺激因子)存在下培养生长。在3天后,使细胞进行胰蛋白酶消化,并接种在24-孔平板中(1.5×10^4 个细胞/孔),对于每一个实验条件进行三次重复。为了诱导破骨细胞的分化,在RANK配体和M-CSF存在下,用来自MCF7ER+乳腺癌细胞(其具有或没有c-MAF基因的“短的”和“长的”同种型的过表达)的条件培养基培养这些前体。每三天更换培养基,在第七天,进行破骨细胞的特异性染色,其包括检测耐酒石酸的酸性磷酸酶(TRAP)。通过倒转光束光学显微镜来观察图像。测定TRAP阳性细胞的数目,并除以每个视野中的细胞的总数目。最后,将所有值用对照组(MCF7)的值进行标准化。如可以在图4中观察到的,当使破骨细胞的前体与来自过表达c-MAF的短的同种型或长的同种型的MCF7ER+乳腺癌细胞的培养基相接触时,破骨细胞的数目增加。

[0269] 该试验使得能够测定转移性细胞与代表骨的转移环境或小生境的组分的相互作用。破骨细胞负责骨的降解,并且显现在溶骨性转移损伤中。

[0270] 实施例6

[0271] 在区域chr16q22-q24(包括c-MAF基因)中染色体扩增的鉴定

[0272] 通过表达谱分析来检测拷贝数改变(CNA)在理论上是可能的,因为在基因组改变与在受影响的基因组区域中基因的异常表达之间存在强的相关性(Pollack等人,2002,PNAS,99:12963-12968)。具体而言,使用基因表达分析来准确检测CNA是可能的,并且其困难来自起始表达数据的类型(Hu等人,2009Cancer Cell,15:9-20)。

[0273] 已经评价了在ER+乳腺癌中的骨转移中富集的基因的作用。为此,分析了在衍生自MCF7乳腺癌细胞系的高度骨转移性的细胞BoM2中基因组拷贝数的改变,所述BoM2在研究者自身实验室中产生并且以高水平的c-MAF基因表达为特征。该分析基于亲本细胞与衍生自MCF7的BoM2的基因表达谱的比较。在人细胞中存在的23种染色体类型中,在其位置方面,将相比于亲本细胞而言在BoM2细胞中观察到的基因表达差异进行了对准和定位。

[0274] 以这种方式,鉴定出了其中出现这样的基因的基因组区域(图5),所述基因的表达在BoM2细胞中相比于亲本细胞而言过或低呈现,这是基因组DNA的扩增或缺失的指示(Hu等人,2009,Cancer Cell,15:9-20)。为此,使用“Partek Genomic Suite6.5”软件。该软件允许我们鉴定出其表达在BoM2细胞中相比于亲本细胞而言增加或减少的那些基因。一旦鉴定

了这些基因,就将对于每一个基因所观察到的表达差异描绘在所述基因的相应染色体定位中。这些观察结果的图解表示使得能够鉴定出染色体区域的增殖或损失,基于具有连续染色体定位的基因的增加的或减少的持续表达(图5)。通过使用众所周知的和上面所描述的染色体区带(cytoband),本发明的作者已经能够定位这些区域。

[0275] 在相比于MCF7ER+乳腺癌亲本细胞而言在BoM2细胞中差异扩增的区域之中,观察到在染色体区域16q22-q24(其包括编码c-MAF基因的基因座)中的增殖。

[0276] 紧接着,评价了在乳腺癌患者中,在乳腺肿瘤中基因拷贝数的改变与转移之间的关系。以这种方式,已经鉴定出了具有重大数目的与患者中的转移相关的基因的染色体区域,所述基因通过使用“Cox log风险比率(HR)”模型来鉴定。随后是ACE中的概念(在表达数据中拷贝数改变的分析)(Hu等人,2009,根据上面所引用的),通过定位在拷贝数方面具有变化的潜在区域。使用了R软件包“phenoTest”的函数。因此,通过经由交叉验证来选择参数,经由加性模型的归纳获得了关于每一个基因的“log HR”,并且通过在整个基因组中排列“log HR”(1000种排列)且经由Benjamini-Hochberg来调整P-值以控制假阳性率(FDR)至0.05的水平来评价统计学显著性。仅鉴定了具有最少15个连续的显著基因的区域(图5B)。在这些区域之中存在有包括c-MAF基因的区域16q12-q24。

[0277] 然后,进行通过荧光原位杂交(FISH)来表征在亲本MCF7细胞中和在以具有高的形成向骨组织的转移的倾向为特征的BoM2细胞系中c-MAF基因的拷贝数。作为该实验的对照,同时测定IGH基因的拷贝数。结果显示,大多数所研究的MCF7细胞具有等于或小于1.5的c-MAF基因的拷贝数与IGH基因的拷贝数之比,即这两个基因的拷贝数是相似的(图6),然而大部分所研究的BoM2细胞显示出大于2的c-MAF基因的拷贝数与IGH基因的拷贝数之比(图6)。这些结果证明,至于乳腺癌细胞而言骨转移表型的获得与c-MAF基因的拷贝数的增加相伴随。

[0278] 结论

[0279] c-MAF是用于诊断和预后的标志物,并且是在乳腺癌中的转移过程中,特别是在ER+乳腺癌的骨转移中的原因性靶基因。该结论得到临床验证数据以及功能获得和功能缺失实验(其构成本发明的一部分)支持。

[0280] 考虑到在本发明中所给出的结果(其中证明,在原发肿瘤中c-MAF的表达预示了高的在乳腺癌患者中遭受骨转移的风险),其肿瘤包含具有在基因组区域chr16q22-q24中的扩增或c-MAF基因的扩增的细胞的患者也易于遭受高的骨转移风险。因此,c-MAF基因或座位16q22-q24的扩增的确定作为从乳腺癌原发肿瘤开始的骨转移的诊断方法和预测方法是有用的。

[0281] 同样地,本发明的实验(实施例4和5)暗示,c-MAF是适合于治疗和/或预防转移(从ER+肿瘤开始的和从ER-肿瘤开始的)的靶标。因此,c-MAF的抑制剂对于在具有乳腺癌的受试者中治疗转移将会是有用的。

序列表

<110> 生物医学研究机构私人基金会
加泰罗尼亚高级研究和学习机构私人基金会

<120> 用于乳腺癌转移的诊断，预后和治疗的方法

<130> P6136E501

<160> 12

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 6878

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

agaggettta aaatcttttt tcattctcta gctgtagctc gggtctgttg taggtttgga      60
ctccccctcc cccctttgct ctctgctcgc tctttcccca ggaattcget attttgcttt      120
tttaaaaaaa ggcaagaaag aactaaacte cccccctcct ctctccagct cgggtctgca      180
ctctgctttg caatttgcac agaggttagag agcgcgcgag ggagagagag gaaagaaaaa      240
aaataataaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactccccgc      300
tgccaagccc cgcgcgcgcc ggacagacgc ccgcgcgcgc tccagccccg agcggacgcc      360
gcgcgcgcgc tgctgcagc ccgggcgcgc gaggcgcgc ctctcttatg caaagcgcgc      420
agcggagcgc cgagcggggg acgcgcgcgc ccgggcgcgc ctctccagc ttgcgcgcgc      480
cagccaccac cgcgcgcacc gcagctcgcg gaggtatttc ccagacctga agcgcgcgcgc      540
tcgggcgcgc agaagcgcgc cgagcaagga ggggcgcgcgc ccagcgcgcgc agcacattgc      600
cgtgagcagc ggagagggag agcgggcgcgc ggggcgcgcgc ccaggggcgcgc ggggtgtatg      660
tgtgagcgcgc ctgcgaggtt tcgggcgcgc caccgcgcgc caagctagaa gcgcgcgcgc      720
ccggcaagct ggctcaccgc ctggccaccg agcacagccc gctggccctc ctctgcagc      780
ccatctggcg gagcgcgcgc ggcgcgcgcgc gcgggcgcgc gagaatggca teagaactgg      840
caatgagcaa ctccgacctg ccaccagtc cctggccat ggaatatgtt aatgacttcg      900
atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cgttgagagc ccagccgcat atcagccagt      960
gcggcgtctc catgcgcgcg ggcctcgtgt cctccacccc catgagcagc ccgtgcagct      1020
cgttgcccc ttccccagc ttctggcgcc ccagccgcgc ctgcggcagc ggcagagaag      1080
cgcacctgga agactactac tggatgaacg gctaccgcgc gcagctgaac cccgagcgcgc      1140
tgggcttcag ccccgaggac gcggtcgagg cgtctatcag caacagccac cagctccagg      1200
gcggcttcga tggtacgcgc cgcgggcgcgc agcagctgga cgcgcgcgc gcggccggtg      1260
cgcgcgcctc ctgggcgcgc agcgcgcgcgc agatggccc cgcgcgcgc gcgtgtctcg      1320
cgtgatgcgc cgcgcgcgc gcgcagagcg gcgcgggcgc gcactaccac caccaccacc      1380
accacgcgc cgcgcaccac caccaccaga cggcgcgcgc gccgcgcgc gcgggcagcg      1440
cggcgcctc ggcgcgtgga gctgggggcgc cgggcgcgcgc tggeccgcgc agcgtgsgg      1500
gcgggcgcgc cgcgcgcgc gcgcgagcg gcgggcgcgc gcgggcgcgc ggggcgcgcgc      1560
tgacccgcgc ccacgcgcgc ggcgcctgc atttcagca cgcctctcc gacgagcagc      1620
tggtgacctg gctgtgcgc gagctgaacc ggcagctgcgc cggggtcagc aaggagagcg      1680
tgatccggtt gaagcagaag aggcggacc tgaataacc cggctatgac cagtcctgac      1740

```

[0001]

	gcttcaagag gggtcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgtctcagc	1800
	aagtcgacca cctcaagcag gagatctcca ggctgggtcg cgagaggagc gcgtacaagg	1860
	agaaatacga gaagttgggt agcagcggtc tccgagaaaa cggctcagagc agcgacaacc	1920
	cgtctctccc cgagtttttc atgtgagttc gacacgggat tccagctagc caccctgata	1980
	agtctctcgc gggggctcgc ctgggggtgc ggcttctagc ttctagagcc atgtctgcca	2040
	ccacctaccc accccacccc ccaccgagtt tggccccctt ggcacctac acacacacaa	2100
	accgcacgc acacaccaca cacacacaca cacacacaca cacacccac accctgtctg	2160
	agtttggtgt gggtgggtgt gttttaaact ggggagggaa tgggtgtctg gctcatggat	2220
	tgcacatctg aaattctcca taacttgcta gcttggtttt ttttttttt tacacccccc	2280
	cgcctcaccc ccggacttgc acaatgttca atgatctcag cagagttctt catgtgaac	2340
	gttgatcacc ttgaagcct gcatacttca catatttttt cttctctctt ccttcagtt	2400
	catgaactgg tgttcatatt ctgtgtgtgt gtgtgtttta tttgttttg atttttttt	2460
	ttaattttac ttttagagct tgcgtgtgtt ccacatttt ttccacccct caccctcact	2520
	ccttctcac ccactctctt cgagatgaaa gaaaaaaa agcaaagttt tttttcttc	2580
	tcttgagttc ttcatgtgag attgagcttg caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag	2640
	acttgacgag tgcgagttc catgggtttt ttttttttgc attgttatgc taaaatagag	2700
	aaaaaatccc tcatgaacct tccacaatca agcctgcac acccttctgg gtgtgacttg	2760
	tgagttttgg cctgtgtgat ccaaatctga gagtttagtc tgcattttaa aaaactcatt	2820
	ctcatctcat gcattattat gcttgcactt ttgtctttagc aacaatgaac tataactgtt	2880
[0002]	tcaagacctt tatggaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaaagcct gcattctgga	2940
	catgtatggt ataattattt ttctcttttt ttctctttt ggtttgaaa tggacgttcg	3000
	aagacttata gcattggcatt cactactttg tttattgccc tcatgacttt ttgagtta	3060
	gaacaaaasca gtcaacctg agagccttct tccatgaaa ttttgcactt gctccaaaac	3120
	tgttttgagt tactcagaac ttcaacctcc caatgcactg aagccattcc ttgtcaaaag	3180
	taccagaatg ggttacacat ttaacctgga aaacattgaa gaactcttaa tgtttcttt	3240
	ttaataagaa tgaagcccca cttgggggac taaaattgtg ctattgcaga gaagcagttc	3300
	aaaaatttatt ttttaaaaag agaaactgcc ccattatttt tggtttttt tatttttatt	3360
	ttatattttt tggcttttgg tcatgttcaa atgtggaatg ctctgggttt ctagtatata	3420
	atttaattct agttttata atctgtttagc ccagttaaaa tglatgttac agataaagga	3480
	atgttataga taaatttgaa agagtttagt ctgtttagct gtagattttt taaacgattg	3540
	atgcactaaa ttgtttaeta ttgtgatgtt aaggggggta gagtttgcaa ggggactgtt	3600
	taaaaaaagt agcttataca gcattgtctt gcaactttaa tataagtgg gtatgtgtag	3660
	tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaagfatt aagaggggaa accccctgt	3720
	ttatctctgt aggggtattt tacattcaaa aatgtatgtt ttttttctt ttcaaaatta	3780
	aagtatttgg gactgaattg cactaagata taacctgcaa gcatataata caaaaaaaa	3840
	ttgcaaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcagtt ataaaaatgg cattactgca	3900
	cagttttaag atgatgcaga tttttttaca gtgtattgtt gggtcagacc tggattttct	3960
	gtaacitaaa aaaaaatcca cagttttaaa ggcataatc agtaaatgtt atttccagg	4020

[0003]

```

actgacatcc tgcctttaaa aagaaatgaa aagtaaatct taccacaata aatataaaaa 4080
aatcttgtea gtiacttttc ttttacatat ttigtctgce aaaattgttt tatatcttga 4140
gttactaact aaccacgcgt gttgttccca tgtgccttcc tttcattttc aattctgggt 4200
aatccaagaa aagaataatc tacaataata aaaggcaattt ttttttgatt ctgtactcag 4260
tttctiagtg tacagtttaa ctgggcccac caacctcggt aaaagtgtaa aatgcatect 4320
ttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taaticaggg tgaattata 4380
ggctgttttt tgaagtggag aggtctgccc catatactga ttageaatat ttaatataga 4440
tgtaaattat gacctcattt tttctccccc aaagttttca gttttcaat gattigagcc 4500
ataatigccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtgga actaggcttc ctgagcattg 4560
ccctacaatt ctgacaggga gcaaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc 4620
gcatcagagg tggcttgccc acatatgcat tgaacggtaa agagaaacag cgcttgcctt 4680
ttcactaaag ttgactattt ttctctcttc tcttacacac cgagattttc ttgttagcaa 4740
ggcctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagtt gtttgitttg ttttgccttt 4800
ctctttaaca ctgaagatca ttgtctttaa ataggaaaaa gaaaatccac tcttacttc 4860
catatttcca agtacatata tggtttaaac tatgttatca aatcatattt caacgtgaat 4920
attcagtgga gaacttctct acctggatga gctagttaatg attcagatc atgtateccc 4980
cagaaataaa agcaaaaaat aatacctgtg tggaaatatag gctgtgcttt gatttactgg 5040
tattttaccc aaaatagget gtgtatgggg gtgacctaa agateccctg gaaagactca 5100
aaactacett cactagtagg actcctaagg gtgacctat ttttaaatga cacaatttca 5160
tgaactaat gttaaaaatt catgcagttt gaactcttag tcatcttccc ctagcacacc 5220
aatagaatgt tagacaaaag cagcaatggt ttgaaaatac agccaaacac gatgaatttt 5280
gttttgtttt ctgccgttct taaaagaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340
cttattttta agaaaacagg ttgtgtttgg tctgtetaag ttctggccag tttatcatct 5400
ggccttccctg cctatttttt acanaacacg aagacagtgt gtaaccttga cattttgacc 5460
ttcttttatg tctagtttta gacaggtccc tgaatecaca cttaattttg cttaacaaaa 5520
gtttaaatag taaacctccc ctcatgagct tgaagtcaag tgttcttgac ttcagatatt 5580
tcttttcttt tttttttttt ttctctatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag 5640
cagaaatgga gagaatgctt ttaacaaaaa agcatctgat gaaagatttt aggraaacat 5700
tctcaaaaaa agagtgatct tctggatgta gtatctgag ttatctcatg acaaatgagg 5760
cttggaattg aaggaaaata tagttgtgta gaattaaaga ttttgatagg aatctacaag 5820
gtagtgaat ataataagca ggtttggccc cccaaacttt agaaaatcaa atgcaaaggt 5880
gttgcaaaa atgaggtttg agtggctggc tgaagagaa ggttaaactc tagtaaaagg 5940
cattttttag aataacaatt actgaaaact ttgaagfata gtgggagtag caaaaaata 6000
catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aaatctgag taagtgccat tcatataat 6060
aagtctctaa atttaaaaaa aaaaaaatca taigaggaaa tctagcttcc ccttttacc 6120
tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgttaa aattcccttc attccaatta cagaactgag 6180
cccactctca agttggagcc atcagtggga taagccacat ttgggaagcc ccagcactgt 6240
gtaactacca gttgtttcac aaatgaaat ttgtgtgaga gtgtacatt aaaaaaaatc 6300

```

	atcattatta ttattatttg cagtcattga gaaccaccta cccctgactt ctgtttagtc	6360
	tcctttttta ataaaaatta ctgtgttaga gaagaaggct attaatgta gtagttaact	6420
	atgectcttg tctgggggtt tcatagagac cggtaggaaa ggcacacctt gcttttcgat	6480
	ttatgggttg tgcagtaaa cagggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaa	6540
	ttcactgaaa ttacaaagat acatatatat gcatatatat aatggaaagt tteccggaat	6600
	gcaacaatta gcattttaaa atcatatata ggcatgcaca ttctaataag tactttttca	6660
	tgttcatttg tttctctggt agataatitt actaagaaga aaaatagata ttgactccc	6720
	cttccctaaa caaatcccag ggcagagget ccagcggagc cgagccccc tgttttctcg	6780
	taggcccetg acgggtgttg atttatcagt gatgtcaaac gtgttcattt gtcagacata	6840
	gctgtaaatg aaacaaatgt gtggcaaaat acaaagtt	6878
	<210> 2	
	<211> 2656	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 2	
	gaggctttta aaictttttt catcttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggtttggcc	60
	teccctccc cccittgctc tctgctcgt ctttcccag gaattcgeta ttttgetitt	120
	ttaaaaaaag gcaagaaga actaaactcc cccctccctc tctccagtc gggtgcacc	180
	tctgcttgc actttgcaca gaggtagaga ggcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa	240
[0004]	aataataaag agagccaaag agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt	300
	gccaaaggccc ggcgcgcccg gacagacgcc cgcgcgcct ccagcccca gcggacgcc	360
	cgcgcgcctt gcttcagccc cgggcgcgag aggcgagccc ttccttatgc aaagcgcgca	420
	gcggagcggc gagcggggga cgcgcgcac cgggcggggt tctccagct tgcgcgcgc	480
	agccaccacc gccgccacc cagctcgcgg aggatcttcc cgagcctgaa gcgcgcggt	540
	cggcgcgcaa ggcggcgagc gagcaaggag gagccggggc gagcgaggga gcacattggt	600
	gtgagcaggc ggcagggagg gcgggcgcgg ggcgcgcggc caggcgcggc gsgtgtgtgt	660
	gtgagcgcgc tggaggttt cgggccagcc accgcgcgc aaatagaaag cccccagcc	720
	cggcaagctg gctcaccgcc tggccacca gcacagcccg ctggccctc tctgcagcc	780
	catctgscgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcgccagg acaatggcat cagaactggt	840
	aatgagcaac tccgacctgc ccaccagtc cctggccatg gaatatgta atgaattga	900
	tctgatgaag ttgaagtga aaaggaacc ggtggagacc gaccgcacca tcagccagt	960
	cggcgtctc atgcgcggg gctcgtgtc ctccaccctc atgagcagc cgtgcagtc	1020
	ggtgccctt tccccagct tctcgccgc cagccgggc tgggcagcg agcagaaggc	1080
	gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc ccgaggcgt	1140
	ggctttcagc cccgaggacg cgttcagggc gctcatcagc aacagccacc agctccagg	1200
	cgcttcgat ggtacgcgc gcggggcgca gcagctggc gcggcgccg ggcccggtgc	1260
	cggcgcctcc ttggcgcca gcggcgaggc gatgggcctc gccgcgcgc tgggtgcgc	1320
	cgtgatccc gcggccgcg cgcagagcgg cgcgggcctc cactaccacc accaccacca	1380
	ccagcgcgc ggcaccacc acccccagc ggcggcggc cccggcgcc cgggcagcgc	1440

	ggcgcgctcg gccggtagcg ctggggggcg gggcgcggt gcccgggcca gcgcggggg	1500
	cgccggcggc gggggcgcg gcggagcgcg cggggcgcg gcggggcgcg gggcgcgct	1560
	gcacccgcac cagcgcgcg gcggcgca ctgcgacgc cgtctctcg acgagcagct	1620
	ggtagcctg ttgtgcgcg agctgaacg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt	1680
	gacccgcg aagcagaaga ggcggaccc gaaaaacgc ggcctgcgc agtcctgcgc	1740
	cttaagagg gtgcagcaga gacacgctct ggagtcggag aagaaccagc tgcgcagca	1800
	agtcgacac ctcaagcagg agatctccg gctggtgcgc gagaggagc cgtacaagga	1860
	gaaatacag aagttagga gcagcgctt ccgagaaaac ggtcgcagca gcgacaacc	1920
	gtctctccc gattttttca taactgagc cactgcagc ttggagccat cagtgggata	1980
	cgcacattt tgaagccgc agcatctgt actaccagt gtgttcaca aatgaaatt	2040
	gtgtgagagc tctacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcctggaga	2100
	accacctacc cctgacttct gtttagtct ctttttaaat aaaaattact gtgttagaga	2160
	agaaggctat taaatgtagt agttaactat gctcttgct tgggggttct atagagaccg	2220
	gtaggaaagc gactcctgc tttcgattt atggtgtgt caagtaaaca ggtgcattgc	2280
	tttaacctg ccatactagt tttaaaaatt cactgaaatt acaaagatac atatatatgc	2340
	atatatataa tggaaagtgt ccgggaatgc aacaattagc attttaaat catatatagg	2400
	cctgcacatt ctaaatacta cttttctat ctteattgt tctctggcag ataattttac	2460
	taagaagaaa aatagatatt cgaactccct tccctaaaca aatccacggg cagaggtcc	2520
	agcggagcgc agcccccctg tttctcgta ggccttagac gggttgcat ttatcagtga	2580
[0005]	gtcaaacgt gctcatttgt cagacatagc tgaatatga aacaatgtgt ggcaaaatc	2640
	aaagtfaaaa aaaaaa	2656
	<210> 3	
	<211> 6887	
	<212> DNA	
	<213> 智人	
	<400> 3	
	gaggttttaa aatcttttt catctcttag ctgtagctcg gctgcttct cggttgccc	60
	tcccccctcc cctttgcct tctgcctct ctttcccag gacttcgta ttttctttt	120
	ttaaaaaag gaagaaaga actaaactc cccctccct tctccagtc gggtgcacc	180
	tctgccttgc actttgcaca gaggttaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaa	240
	aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt	300
	gccaaaggcc gcgcgcgcg gacagacgc cgcgcgcct ccagccccga gcggacgcg	360
	cgcgcgcct gcctgcagc cgggcgcgc aggcgcgcct tccctatgc aaagcgcgc	420
	gcggagcggc ggcggggga cgcgcgcac cgggcgcgc tctccagct tgcgcgcgc	480
	agccaccacc gccgccacc cagctgcgc aggatcttc cgagcctgaa gcgcgcgct	540
	cgcgcgcgaa ggaggcgagc gagcaaggag ggagcgggga gagcaggga gcacattgga	600
	gtgagcaggc gggaggagg gcgggcgcg ggggcgcgc caggcgggga ggggtgtgt	660
	gtgagcgcgc tcggagggtt cgggcgcgc accgcgcgc aagctagaag cgcgcgcgc	720
	cgcgaagctg gctcacccgc tggccacca gcacagccgc ctggccctc tctgcagcc	780
	cctctgcgcg agcggcgcg gcggcgcggc cggcgcgagc agaagggcat cagaactgga	840

[0006]

```

aatgagcaac tccgacctgc ccaccagttc cctggccatg gaatatgtta atgacttcca 900
tcctgatgaag ttigaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcacca tcagccagtg 960
cgcccgcttc atcgccgggg gctcgctgtc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020
ggctccccct tccccagct tctcgccgcc cagcccgggc tcgggcagcg agcagaaggc 1080
gcacciggaat gaetactact ggatgaccgg ctaccgcagc cagctgaacc ccgaggcgtc 1140
gggtctcage cccgaggacg cggctcaggg gctcaccage aacagccacc agctccaggg 1200
cggtctcagt ggctacggcg gggggcgcca gcagctggcc gggcgggcgg ggcccggtgc 1260
cgccgctccc ttggcgggca gggcgaggga gatggggccc gccgcgcgcg tgggtgtccg 1320
cgctgctgcc gggcgccggc cgcagagcgg cggggggccc cactaccacc accaccaaca 1380
ccacgcgcgc ggcaccacc accaccgac ggcggcgccg cccggcgccg cgggcagcgc 1440
ggcgccctcg gccggtggcg ctggggcgcg gggcgggcgt ggcggcgcca gcgtggggg 1500
cgggggcgcg gccggcgcg ggggagcgg cggggcgcg gggggggcg gggcgccct 1560
gcaccgcac cagccgcgc gggcgctga ctccagcgc cgtcttccc agcagcagct 1620
ggctgacctg tctgtcgcg agctgaacc gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680
gctccggctg aagcagaaga ggcggacct gaaaaacgc ggtatgccc agtctgcgc 1740
ctcaagagg gtgcagcaga gacacgctt ggagtcggag aagaaccage tctgcagca 1800
agtgcaccac ctcaagcagg agatctccg gctgggtgcg gagaggagc cgtacaagga 1860
gaatacagag aagttggtga gcagcgctt ccagaaaaa ggtctgagca ggcacaccc 1920
gtctctccc gagtttttca tgtgagctg acacggcgtt ccagctagcc acctgataa 1980
gtgtctcgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gtttctagt tctagagcca tctctgcac 2040
cacctcacca ccccccccc caccagcttt ggcccccttg gccctcaca caccacaaa 2100
cccgcagca caccacacac acacacacac acacacacac acacccaca cctgtctga 2160
gtttgttggt gtggtggtg ttttaacct gggagggaat ggtgtcttg ctcatggatt 2220
gccaatctga aattctccat aacttctag ctgtttttt tttttttt acacccccc 2280
gccccacccc cggacttcca caatgttcaa tgcctcage agagttcttc atgigaaaag 2340
ttgatccct ttgaagcctg caccattcac atatttttc ttctcttcc ccttcagttc 2400
atgaactggt gttcatttcc tgtgtgtgtg tgtgtttat ttgttttga tttttttt 2460
taattttact tttagagctt gctgtgttgc ccaactttt tccaaccicc acctcactc 2520
cttctcacc cactcttccc gagatgaaag aaaaaaaaa gcaagtttt ttttcttct 2580
cctgagttct tcatgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa aaatgtigaa atgttataga 2640
cttgcagcgt gccagttcc atcggtttt ttttttagca ttgttatgt aaaatagaga 2700
aaaaaatct catgaacctt ccacaatcaa gctgcacca acctctggg tgtacttgt 2760
gagttttggt cttgtatgc caaatctgag agtttagctt gcattaaaa aaactcattc 2820
tcctctcatg cattattatg ctgtctactt tctcttagca acaatgaact ataactgtt 2880
caaagacitt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa aaaaagcctg catgctggac 2940
atgtatggta taattatttt ttctttttt ttctctttg gcttggaaat ggacgttcca 3000
agacttatag catggcattc ataactttgt ttatagcct catgactttt ttgagtttag 3060
aacaacacag tgcaaccgta gacgttctt ccatgaaat ttgcactctg ctccaaaact 3120

```

[0007]

```

gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga aggcatttct tgcataagat 3180
accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt 3240
taataagaat gacgccccac ttgggggact aaaattigtc tattgceagag aagcagtcia 3300
aaatttatit tttaaaaaga gaaactgccc cattatitit ggtttgtttt atttttatit 3360
tatatititit ggettttggg cattgtcaaa tctggaatgc tctgggttcc tagtatataa 3420
tttaattteta gtttttataa tctgttagcc cagttaaat gtatgttaca gataaaggaa 3480
tgttatagat aaatttgaaa gagttaggtc tgttagctg tagatitit aaacgatiga 3540
tgcactaaat tgtttactat tgtgatgta aggggggtag agtttgcaag gggactgttt 3600
aaaaaaagta gctttacag catgtgctg caacttaaat ataagttggg tatgtgtagt 3660
ctttgtata ccactgactg tatgaaaac caagatatta agaggggaaa cgccccgtt 3720
tatatctgta ggggtatitit acattcaaaa atgtatgttt tttttcttt tcaaaattaa 3780
agtatttggg actgaattgc actaagatat aacctgcaag calataatac aaaaaaaaaat 3840
tgcaaaactg tttagaagcc taataaaatt tatgcagtta taaaatigge attactgcac 3900
agtttttaaga tcatgcagat ttttttacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg 3960
taacttaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca gtaaatgtta ttttcaggga 4020
ctgacatctt gcttttaaaa agaaaigaaa agtaaatctt accacaataa atataaaaaa 4080
atcttgtcag ttacttttct ttacatatt ttctgtgca aaattgtttt atatcttgag 4140
ttactaacta accacggctg ttgttctat gtgttttct tcatittca attctggta 4200
tatcaagaaa agaataatct acaataataa accgcatit tttttgattc tgaactcagt 4260
ttcttagtgt acagttaac tgggcccac aacctegttt aaagtgtaaa atgtafctt 4320
ttctccagtg gaaggattcc tggaggtaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag 4380
gctgtttttt gaagtgagga ggttgcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat 4440
gtaaatatg acctcatit tttctccca aagtttcag tttcaaatg agttgagcca 4500
taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa ctaggcttcc tggcatggc 4560
cttacaactt tcatcaggag caaagccat catagacaga ggagccggac aaatatggcg 4620
catcagaggt ggttgcgca catatgcatt gaacggtaa gagaacagc gcttgcctt 4680
tcaactaaat tgaactitit tctttctct ctacacacc gagattttct tgttagcaag 4740
gctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagtgt ttgttttgt tttgtttt 4800
tcttlaaac tgaagatcat ttgtttaa taggaaaaag aaaaaccact cttacttcc 4860
atatttccaa gtacatatct ggtttaaac atgtatcaa atcatattt accgtgaata 4920
ttcagtggag aacttcteta cctggatgag ctagtaatga tttcagatca tctatcccc 4980
agaaataaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg ctgtgctttg attactggt 5040
atttaacca aaatagctg tgtatgggg ctgactfaaa gatcccttgg aaagactcaa 5100
aactacctt actagtagga ctctaagcg ctgacctatt tttaaatgac acaattcat 5160
gaaactaatg ttacaaatc atgcagtgt cactcttagt catcttccc tagcacacca 5220
atagaatgtt agacaaagcc agcactgttt tgaatafaca gccaaacag atgactttg 5280
tttgtttt tgcgtttctt aaagaaaaa agataatat tgcactctg actgaagac 5340
ttatttttaa gaaaacaggt tgtgtttgt gtgtctaagt tctggccagt ttatcatctg 5400

```

[0008]

```

gccttctctgc ctatttttta caaaacacga agacagtgtg taacctcgac atttigacct 5460
tcctttatgt gctagtttag acaggeiect gaateccacac ttaattttgc ttaacaaaag 5520
tcttaatagt aaacctcccc tcatgagctt gaagtcaggt gttcttgact tcagatattt 5580
cttctctttt tttttttttt tectctctac aactaagaga tacacaaact ctgaagaagc 5640
agaaatggag agaatgcttt taacaaaaaa gcactcgatg aaagatttta ggcaaacatt 5700
ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgtag ttatgcagct tatctcatga caaatgagge 5760
ctggatttga aggaaaatat agttgtgtag aattaagcat ttgatagga atctacaagg 5820
tagttgaata taataagcag gtttgggccc cnaacttta gaaaatcaaa tgcnaagggtg 5880
ctggcaaaaa tgaggtttga gtgcttgctt gtaagagaag gttaactcct agtaaaagge 5940
atttttagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag tgggagtage aaacaaatac 6000
atgttttttt ttctttacaa agaactccta aatctcgagt aagtgccatt cattacaata 6060
agtctctaaa tttaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctagctttcc cttttaoget 6120
gggtttgact ttgtctaaa 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
cttttttaaa taaaaattac tgtgtagag aagaaggcta ttaaatgtag tagttaacta 6420
tgctcttgt ctgggggttt catagagacc ggtaggaaag cgcactctg cttttcgatt 6480
tatgggtgtg gcaagtaaac aggtgcattg ctttcaacct gccatactag ttttaaaaaa 6540
tcactgaaat tacaaagata catatatatg catatatata atggaaagtt tcccggaatg 6600
caacaattag catttttaaa tcatatatag gcctgcacat tctaaatagt actttttcat 6660
gcttcattgt ttctctgcca gataatttta ctaagaagaa aaatagatat tgcactcccc 6720
ttccttaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gttttctcgt 6780
aggccctaga cgggtgttga ttatcagtg atgtcaaacg tgctcattg tcagacatag 6840
ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttaaa aaaaaaa 6887

```

<210> 4
 <211> 403
 <212> PRI
 <213> 智人

<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 Leu Ser Ser Thr Pro Met Ser Thr Pro Cys
50 55 60

Ser Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Phe Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ser

65	70	75	80
Gly Ser Glu Gln Lys	Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly		
85	90	95	
Tyr Pro Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp			
100	105	110	
Ala Val Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe			
115	120	125	
Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala			
130	135	140	
Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala			
145	150	155	160
Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly			
165	170	175	
Ala Gly Pro His Tyr His His His His His His Ala Ala Gly His His			
180	185	190	
His His Pro Thr Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala			
195	200	205	
Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Pro Ala Ser Ala			
210	215	220	
Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Ala			
225	230	235	240
Gly Ala Gly Gly Ala Leu His Pro His His Ala Ala Gly Gly Leu His			
245	250	255	
Phe Asp Asp Arg Phe Ser Asp Glu Gln Leu Val Thr Met Ser Val Arg			
260	265	270	
Glu Leu Asn Arg Gln Leu Arg Gly Val Ser Lys Glu Glu Val Ile Arg			
275	280	285	
Leu Lys Gln Lys Arg Arg Thr Leu Lys Asn Arg Gly Tyr Ala Gln Ser			
290	295	300	
Cys Arg Phe Lys Arg Val Gln Gln Arg His Val Leu Glu Ser Glu Lys			
305	310	315	320
Asn Gln Leu Leu Gln Gln Val Asp His Leu Lys Gln Glu Ile Ser Arg			
325	330	335	
Leu Val Arg Glu Arg Asp Ala Tyr Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Val			
340	345	350	
Ser Ser Gly Phe Arg Glu Asn Gly Ser Ser Ser Asp Asn Pro Ser Ser			
355	360	365	
Pro Glu Phe Phe Ile Thr Glu Pro Thr Arg Lys Leu Glu Pro Ser Val			

[0009]

[0010]

Gly Ala Gly Gly Ala Leu His Pro His His Ala Ala Gly Gly Leu His
 245 250 255
 Phe Asp Asp Arg Phe Ser Asp Glu Gln Leu Val Thr Met Ser Val Arg
 260 265 270
 Glu Leu Asn Arg Gln Leu Arg Gly Val Ser Lys Glu Glu Val Ile Arg
 275 280 285
 Leu Lys Gln Lys Arg Arg Thr Leu Lys Asn Arg Gly Tyr Ala Gln Ser
 290 295 300
 Cys Arg Phe Lys Arg Val Gln Gln Arg His Val Leu Glu Ser Glu Lys
 305 310 315 320
 Asn Gln Leu Leu Gln Gln Val Asp His Leu Lys Gln Glu Ile Ser Arg
 325 330 335
 Leu Val Arg Glu Arg Asp Ala Tyr Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Val
 340 345 350
 Ser Ser Gly Phe Arg Glu Asn Gly Ser Ser Ser Asp Asn Pro Ser Ser
 355 360 365
 Pro Glu Phe Phe Met
 370

[0011]

<210> 6
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 特异于c-MAP的siRNA

<400> 6
 acggcucgag cagcgacaa 19

<210> 7
 <211> 19
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 特异于c-MAP的siRNA

<400> 7
 cuuaccagug uguucacaa 19

<210> 8
 <211> 20
 <212> RNA
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 特异于c-MAP的siRNA

<400> 8
 uggaagacua cuacuggaug 20

<210> 9
 <211> 20
 <212> RNA

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 特异于c-MAF的siRNA	
	<400> 9	
	auuugcaguc auggagaacc	20
	<210> 10	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 特异于c-MAF的siRNA	
	<400> 10	
	caaggagaaa uacgagaagu	20
[0012]	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 特异于c-MAF的siRNA	
	<400> 11	
	acaaggagaa auacgagaag	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 特异于c-MAF的siRNA	
	<400> 12	
	accuggaaga cuacuacugg	20

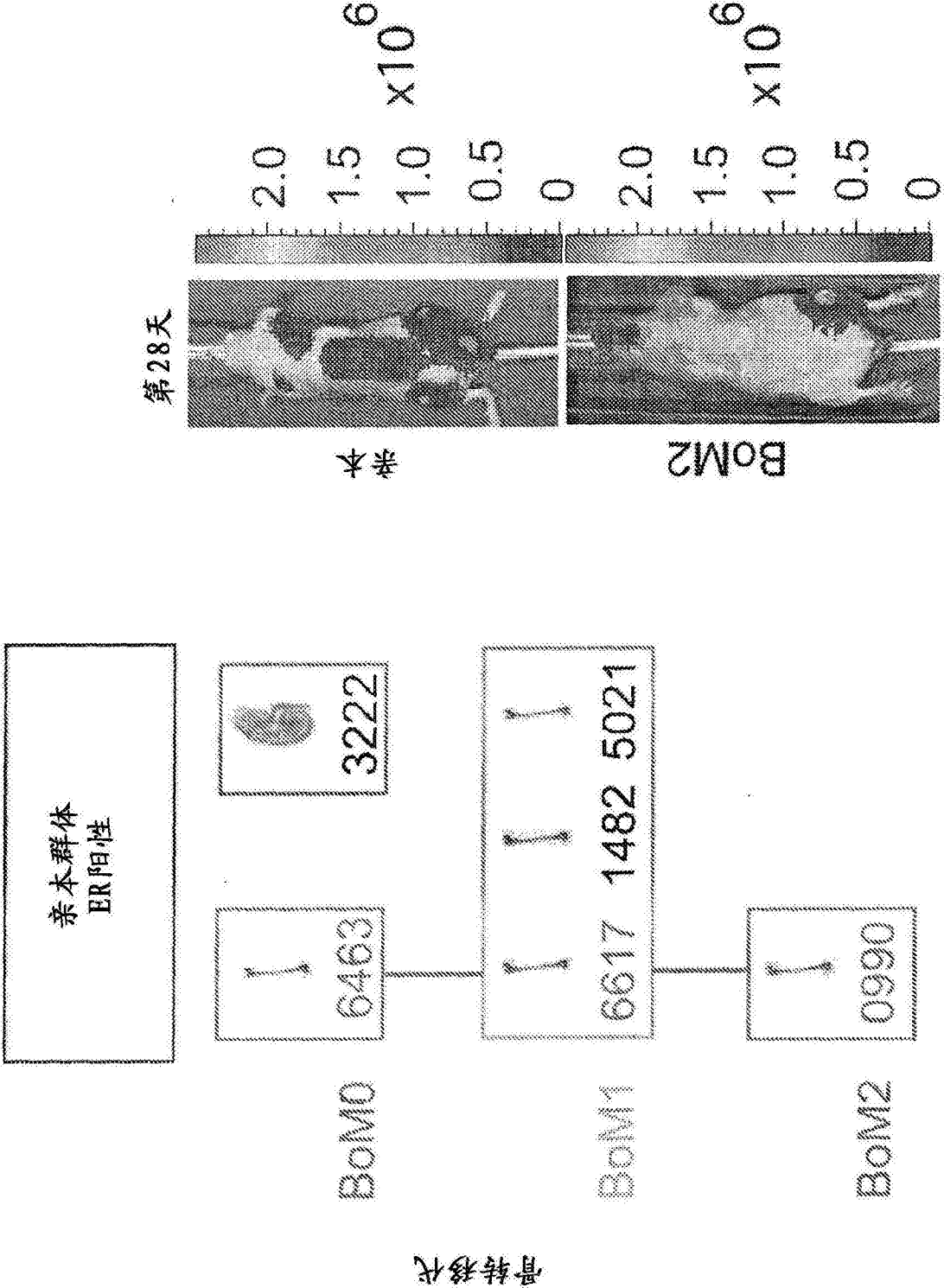


图1A

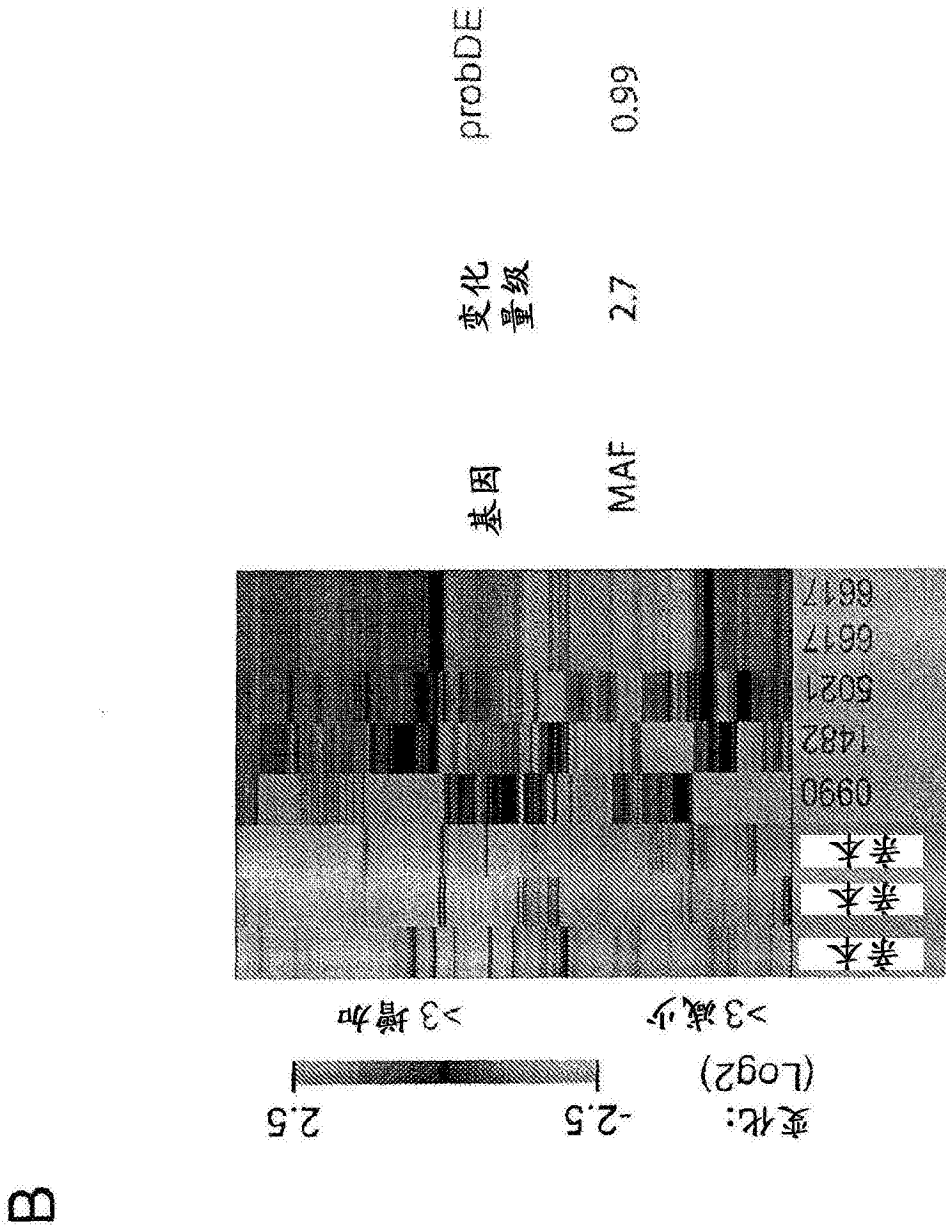


图1B

C

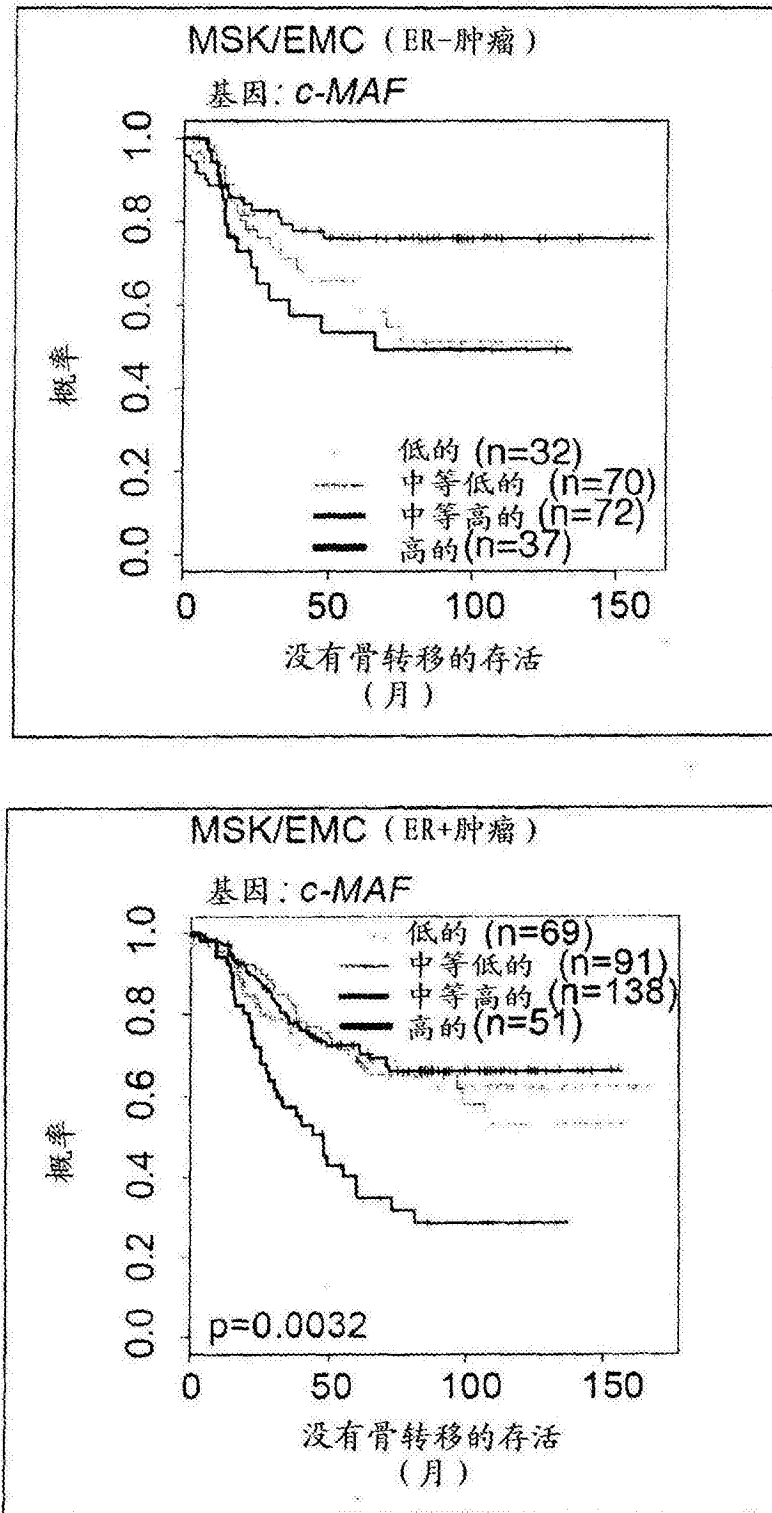


图1C

D

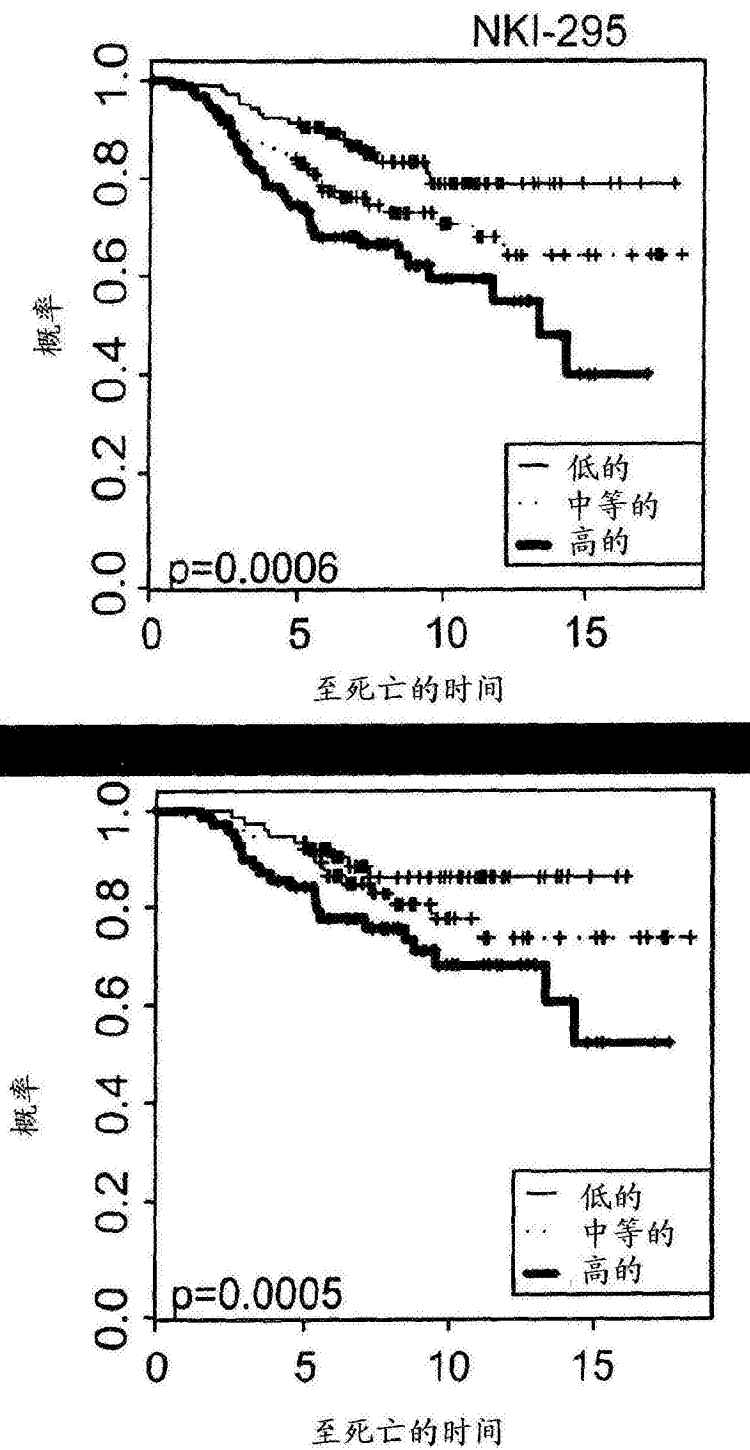


图1D

A

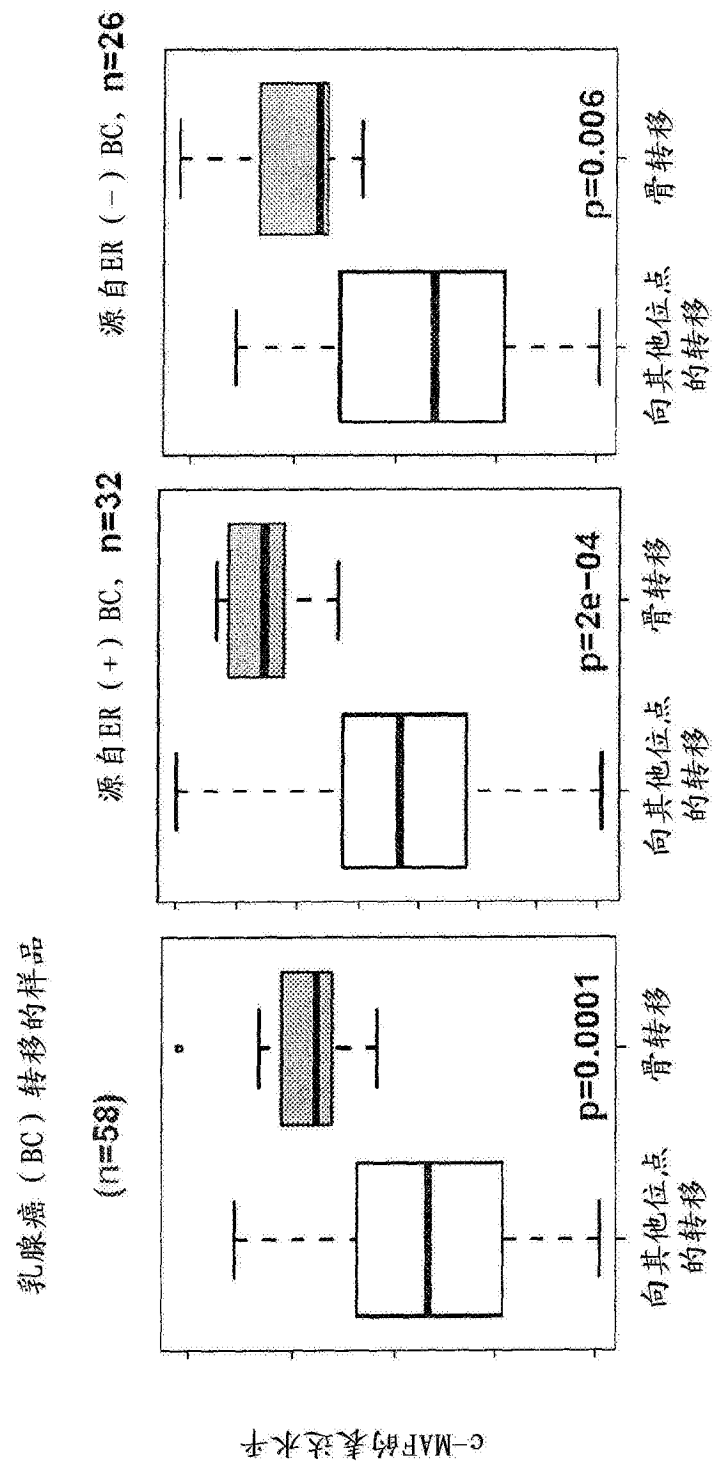


图2

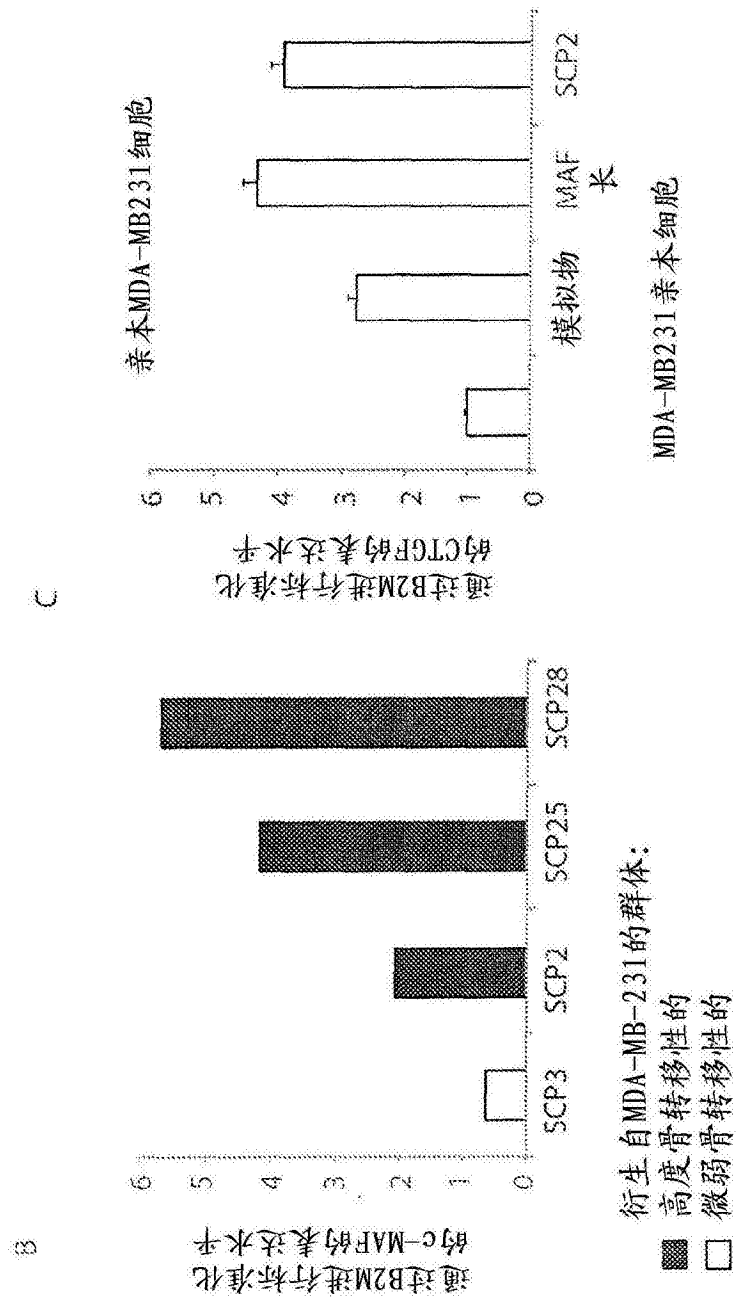


图2(续)

A

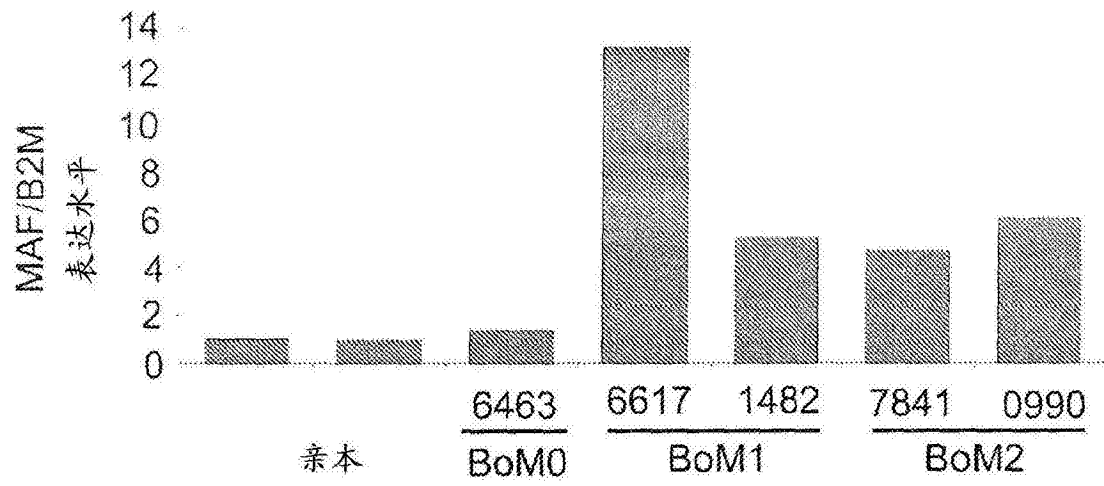


图3

B

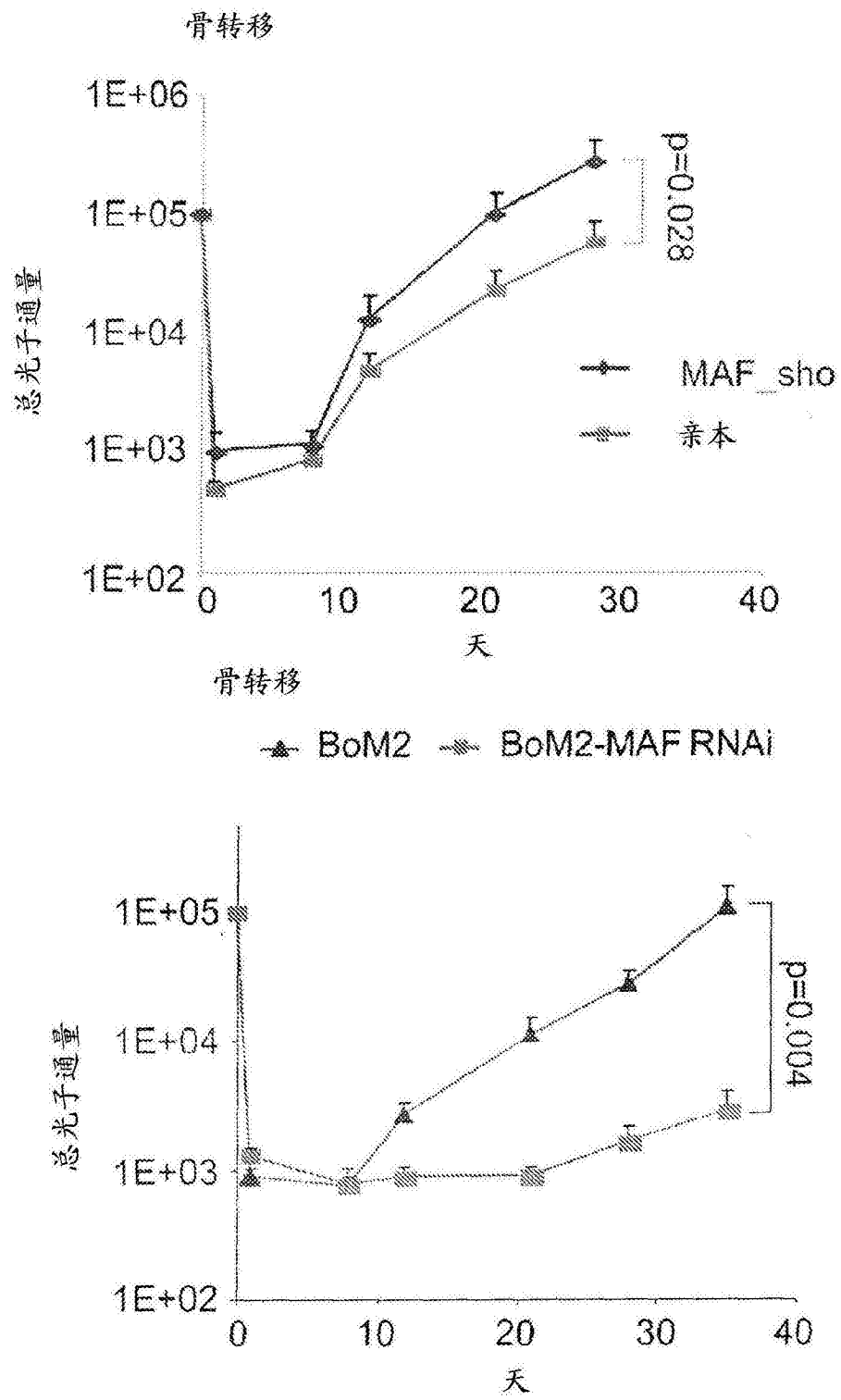


图3(续)

C

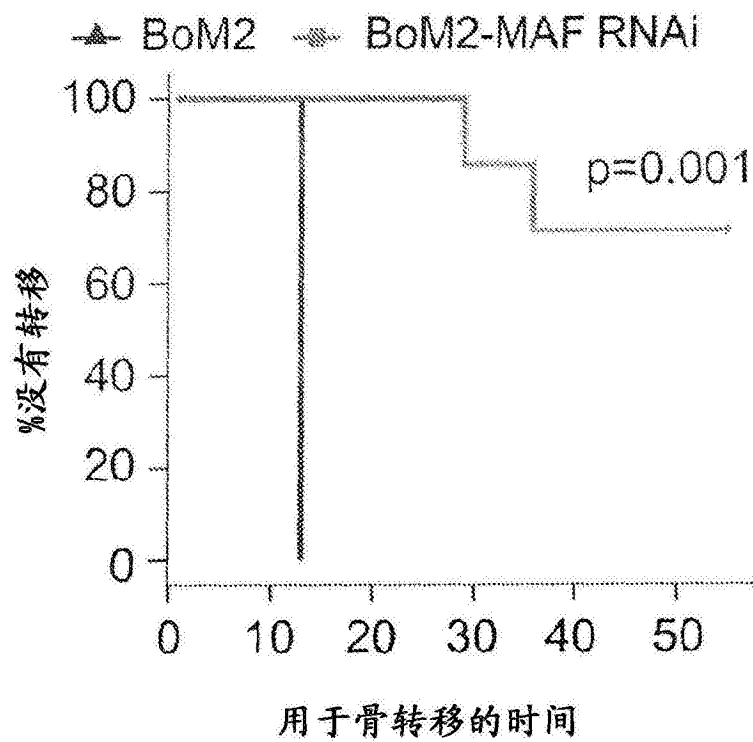


表3(续)

MCF7 (ER+) 细胞

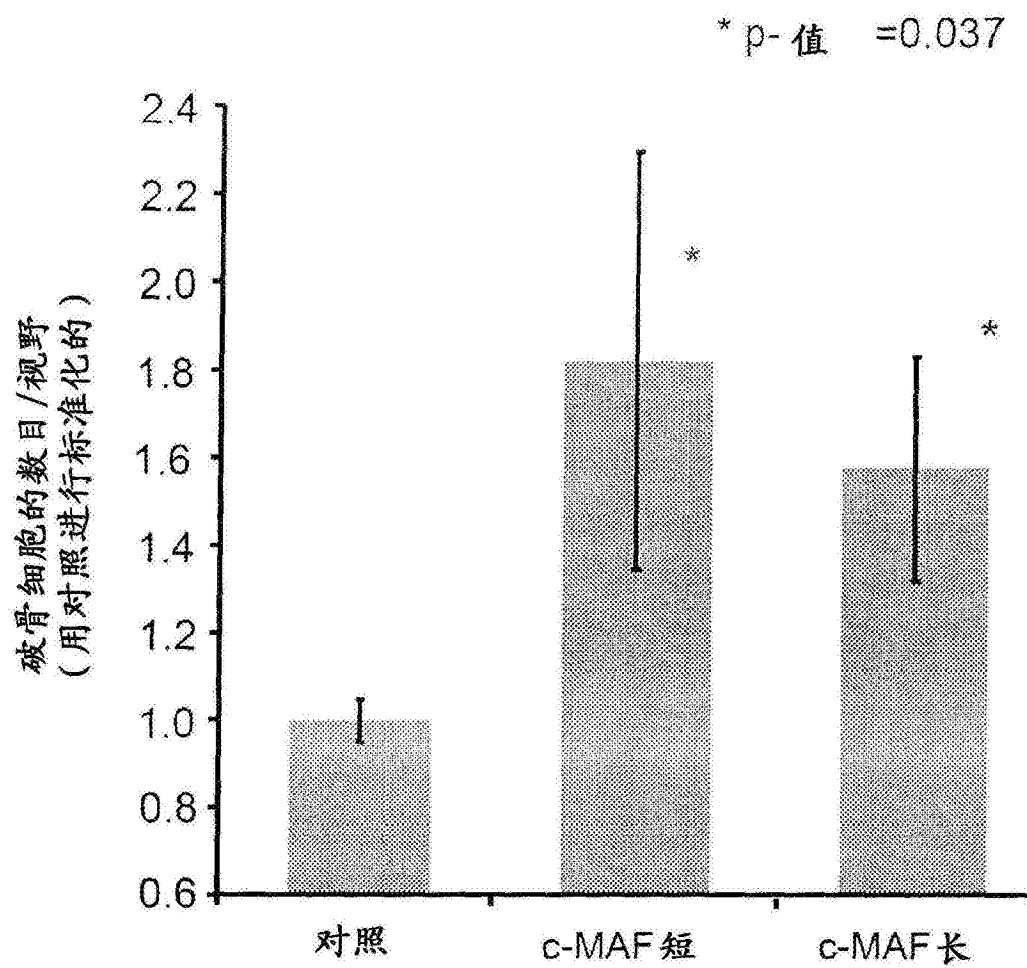


图4

A 相比于MCF7而言，在BoM2细胞中基因的表达水平及其定位

染色体16

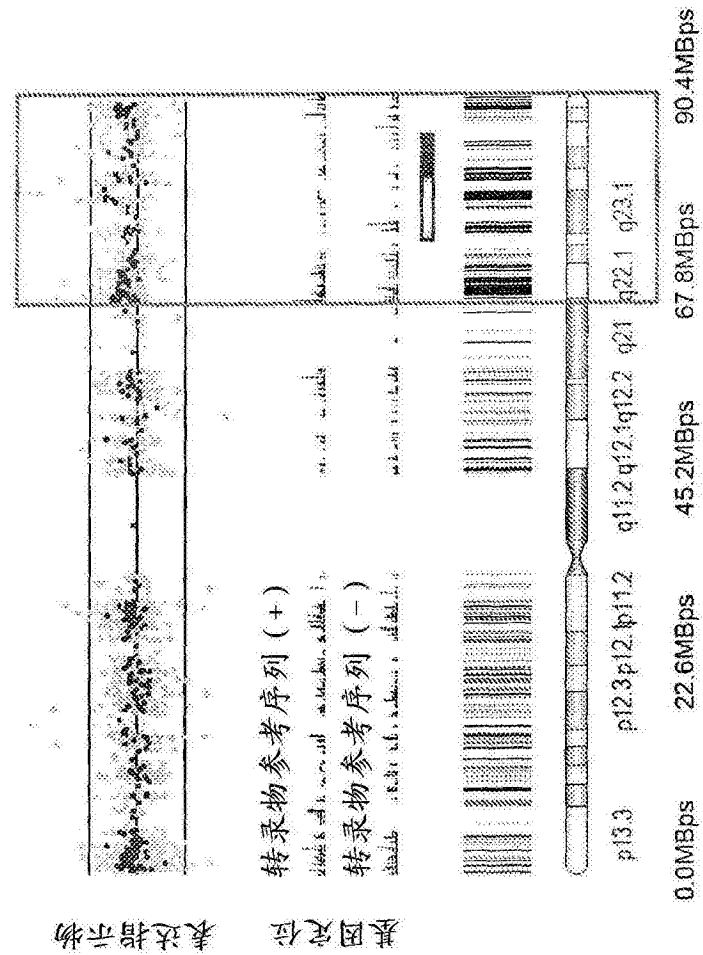
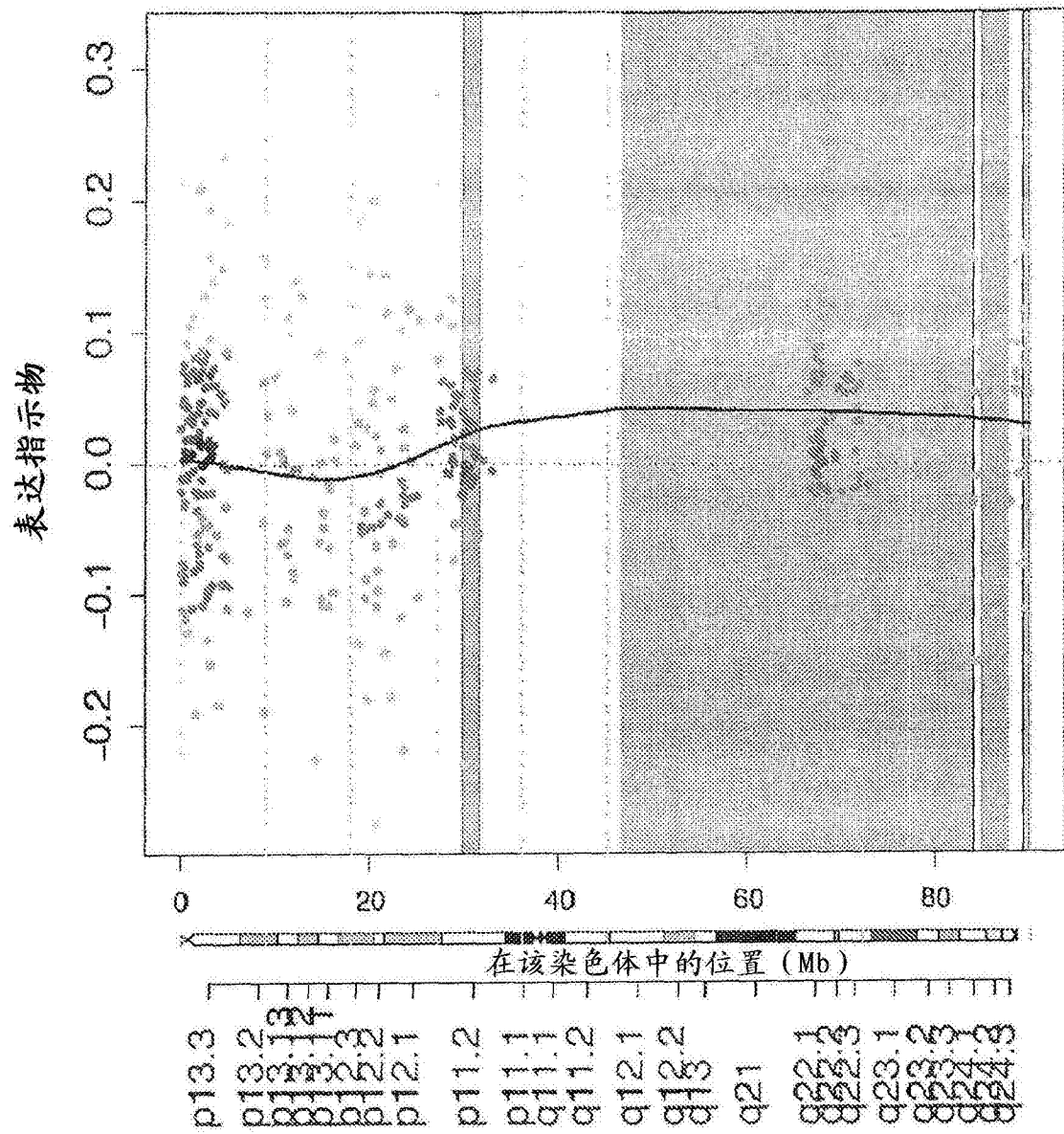


图5

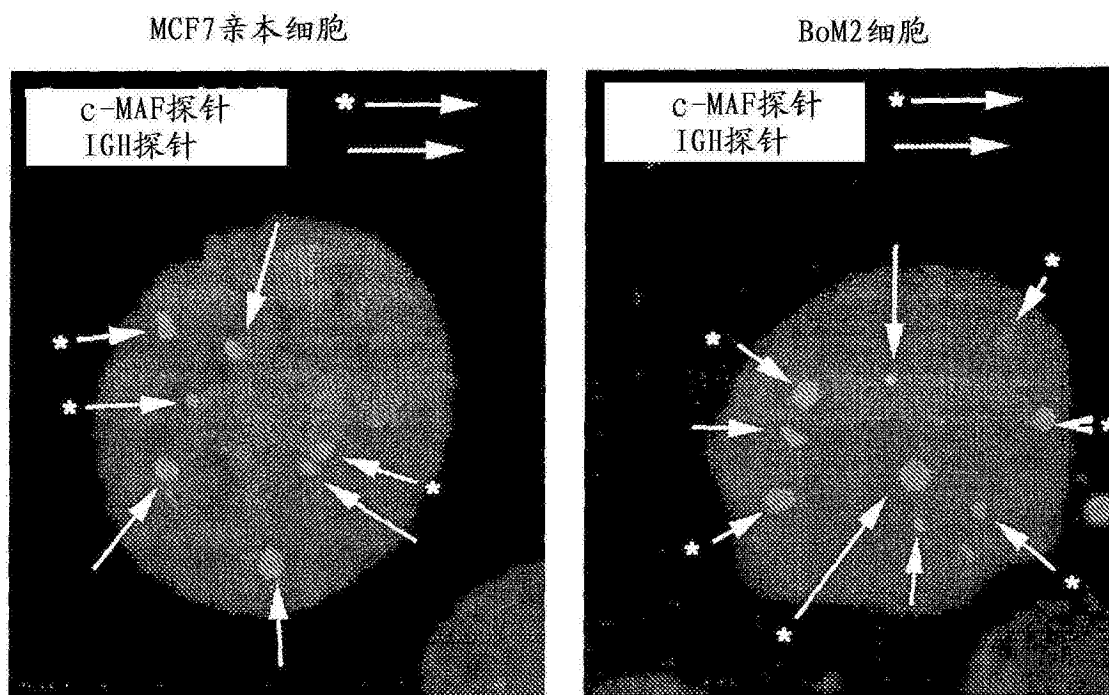
染色体16



B

图5(续)

A



B

MAF基因的拷贝数/IGH 基因的拷贝数之比	MCF7亲本 (n=199)	BoM2 (n=70)
≤ 1.5	67.3%	11.4%
> 1.5	32.7%	88.6%
≥ 2	21.1%	75.7%

图6