

1. 抗体或其功能片段，其特异性结合人c-MAF，其中所述抗体或其功能片段包含：SEQ ID NO:38所示的重链CDR1, SEQ ID NO:40所示的重链CDR2, SEQ ID NO:42所示的重链CDR3；SEQ ID NO:26所示的轻链CDR1, SEQ ID NO:28所示的轻链CDR2和SEQ ID NO:30所示的轻链CDR3。
2. 根据权利要求1所述的抗体或其功能片段，其中所述抗体是兔抗体、嵌合抗体或人源化抗体。
3. 根据权利要求1所述的抗体或其功能片段，其中所述抗体或其功能片段包含具有包含SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的序列的V_H结构域。
4. 根据权利要求1所述的抗体或其功能片段，其中所述抗体或其功能片段包含具有包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的序列的V_L结构域。
5. 根据权利要求1所述的抗体或其功能片段，其中所述抗体或其功能片段包括包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的重链序列。
6. 根据权利要求1所述的抗体或其功能片段，其中所述抗体或其功能片段包括包含SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的轻链序列。
7. 多核苷酸，其编码权利要求1-6中任一项所述的抗体或其功能片段。
8. 根据权利要求7所述的多核苷酸，其中所述多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:15所示的核苷酸序列相同的序列的V_H结构域。
9. 根据权利要求7所述的多核苷酸，其中所述多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:20所示的核苷酸序列相同的序列的V_L结构域。
10. 根据权利要求7所述的多核苷酸，其中所述多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:14所示的核苷酸序列相同的序列的重链。
11. 根据权利要求7所述的多核苷酸，其中所述多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:18所示的核苷酸序列相同的序列的轻链。
12. 根据权利要求7-11中任一项所述的多核苷酸，其中所述多核苷酸编码的氨基酸与SEQ ID NO:22所示的表位结合。
13. 载体，其包含权利要求7-12中任一项所述的多核苷酸。
14. 宿主细胞，其包含权利要求7-12中任一项所述的多核苷酸、权利要求13所述的载体，或表达权利要求1-6中任一项所述的抗体。
15. 产生权利要求1-6中任一项所述的抗体的方法，其包括培养权利要求14所述的宿主细胞。
16. 由权利要求14所述的宿主细胞或权利要求15所述的方法产生的抗体在制备检测c-MAF的试剂盒中的用途。

用于人c-MAF的结合成员

[0001] 对序列表的引用

[0002] 与本申请一起提交的电子提交的序列表 ("3190_012PC01_SL.txt", 77,454字节, 产生于2015年12月4日) 的内容通过引用以其全文并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及结合人c-MAF的结合成员,特别是抗体分子。结合成员用于定量c-MAF, 用于c-MAF相关病症的诊断和预后,以及用于c-MAF相关病症的治疗。

[0004] 发明背景

[0005] 问题

[0006] 转移(由不同重要器官的肿瘤细胞与周围正常组织之间精细的相互作用引起的复杂过程)占所有患有实体瘤患者癌症死亡的90%。必须了解导致原发性肿瘤形成转移的分子和细胞机制,以更好地解决这一主要危及生命的问题。鉴定转移基因和机制对于了解这种致死病况的基本生物学及其对临床实践的影响至关重要。以前的工作提供了转移过程的复杂性的感觉,但没有解释转移如何发生和发生的原因,什么机制使转移成为组织特异性过程,什么事件允许休眠转移变得活跃和去除原发性肿瘤多年后死亡,以及哪些转移介导基因最终将构成有价值的诊断标志物和治疗靶点。

[0007] 本发明基于以下认识:可预测骨转移的标志物的可靠鉴定将通过对癌细胞对骨转移组织的扩散和定植进行限制并延迟或转变致死病况提供预防性治疗机会,以及识别转移预测标记物的表达机制的必要性。因此,例如,已经显示,可以通过其它潜在机制中的16q22-24 (16q23) 扩增或16q23易位获得MAF(一种真正的乳腺癌骨转移基因)的蛋白质和mRNA积累.c-MAF还负责驱动癌骨转移损伤,包括溶骨性骨转移。

[0008] 发明概述

[0009] 在一个实施方案中,本发明涉及通过使用抗体检测遗传异常以及基于此对癌症中的转移(例如骨转移)进行预后和/或诊断。在一个实施方案中,本发明涉及使用抗体来测定原发肿瘤样品中目的基因的水平。在一个实施方案中,本发明涉及特异性结合人c-MAF的结合成员(例如抗体)。同样,本发明还涉及用于设计患有癌症的受试者的定制治疗方法,其包括使用抗体测定样品中目的基因的水平。在一个实施方案中,目的基因是MAF。在另一个实施方案中,癌症是乳腺癌、肺癌、前列腺癌或肾癌。

[0010] 在一个方面,本发明涉及特异性结合SEQ ID NO:22编码的表位的结合成员或其功能片段或变体。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体特异性结合人c-MAF,其中结合成员或其功能片段或变体包括包含SEQ ID NO:38的氨基酸序列的重链CDR1,和/或包含SEQ ID NO:40的氨基酸序列的重链CDR2,和/或包含SEQ ID NO:42的氨基酸序列的重链CDR3;和/或包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链CDR1,和/或包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列的轻链CDR2和/或包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列的轻链CDR3。

[0011] 在一些实施方案中,所述结合成员是抗体。在一些实施方案中,抗体是兔抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

[0012] 在一些实施方案中,所述结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少80%相同的序列的VH结构域。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少90%相同的序列的VH结构域。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少95%相同的序列的VH结构域。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列的序列的VH结构域。

[0013] 在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少80%相同的序列的VL结构域。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少90%相同的序列的VL结构域。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少95%相同的序列的VL结构域。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的序列的VL结构域。

[0014] 在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少80%相同的重链序列。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少90%相同的重链序列。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少95%相同的重链序列。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列的重链序列。

[0015] 在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少80%相同的轻链序列。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体包含具有与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少90%相同的轻链序列。

[0016] 权利要求18的结合成员或其功能片段或变体,其中结合成员或其功能片段或变体具有与SEQ ID NO:20的氨基酸序列至少95%相同的轻链序列。在一些实施方案中,抗体或其片段包括包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的轻链序列。

[0017] 在一些实施方案中,本发明涉及编码本文所述的任意结合成员或其功能片段或变体的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸编码多肽,多肽编码抗原结合分子或其片段。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体是抗体。

[0018] 在一些实施方案中,多核苷酸包含具有与SEQ ID NO:15的核苷酸序列至少80%相同的序列的VH结构域。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:15的核苷酸序列至少90%相同的序列的VH结构域。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:15的核苷酸序列至少95%相同的序列的VH结构域。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:15的核苷酸序列相同的序列的VH结构域。

[0019] 在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:20的核苷酸序列至少80%相同的序列的VL结构域。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:20的核苷酸序列至少90%相同的序列的VL结构域。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:20的核苷酸序列至少95%相同的序列的VL结构域。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:20的核苷酸序列相同的序列的VL结构域。

[0020] 在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:14的核苷酸序列至少80%相同的序列的重链。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID NO:14的核苷酸序列至

少90%相同的序列的重链。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID N0:14的核苷酸序列至少95%相同的序列的重链。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID N0:14的核苷酸序列相同的序列的重链。

[0021] 在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID N0:18的核苷酸序列至少80%相同的序列的轻链。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID N0:18的核苷酸序列至少90%相同的序列的轻链。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID N0:18的核苷酸序列至少95%相同的序列的轻链。在一些实施方案中,多核苷酸编码具有与SEQ ID N0:18的核苷酸序列相同的序列的轻链。

[0022] 在一些实施方案中,多核苷酸编码的氨基酸与SEQ ID N0:22所述的表位结合。

[0023] 在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体以至少约1.5nM或更小的亲和力(KD)结合人c-MAF。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体以至少约1.2nM或更小的亲和力(KD)结合人c-MAF。在一些实施方案中,结合成员或其功能片段或变体以至少约1.1nM或更小的亲和力(KD)结合人c-MAF。

[0024] 在一些实施方案中,本发明涉及包含本文所公开的任意多核苷酸的载体。

[0025] 在一些实施方案中,本发明涉及宿主细胞,其包含本文所公开的任意多核苷酸或本文所公开的任意载体或表达本文所公开的任意结合成员。在一些实施方案中,本发明涉及产生抗原结合成员的方法,其包括培养宿主细胞。在一些实施方案中,本发明涉及使用宿主细胞或该方法或生产产生的抗原结合成员检测c-MAF的方法。

[0026] 在一些实施方案中,本发明涉及与INB-1-11-8竞争结合SEQ ID N0:22编码的表位的结合成员或其功能片段或变体。

[0027] 附图简要说明

[0028] 图1示例了c-MAF的2种同种型的比较——短的同种型(MAF(短))和长的同种型(MAF(长))。

[0029] 图2示例了来自智人(H.sapiens)、黑猩猩(P.troglodytes)、牛(B.Taurus)、小鼠(M.musculus)、大鼠(R.norvegicus)、原鸡(G.gallus)和斑马鱼(D.rerio)的c-MAF氨基酸序列的比较。

[0030] 图3.A) Elisa抗原特异性结合结果。在一系列稀释液中测试INB-1-11-8以评估其抗原结合的特异性。结果证实,即使在1:500以上的稀释度下,仍保留抗原亲和力。B)通过Western印迹检测INB-1-11-8抗体特异性。使用3%BSA作为封闭溶液、以1:50的稀释度使用抗体。抗体特异性识别内源性c-MAF同种型(包括翻译后修饰蛋白)及其降解形式。此外,它特异性地识别重组表达长和短的人c-MAF同种型和小鼠c-MAF同种型。MCF7和T47是ER+乳腺癌细胞系。BoM2是骨转移性MCF7衍生物。293T细胞是肾细胞。C)代表性的原发性乳腺癌组织的c-MAF免疫组织化学图像。左列图像代表c-MAF阳性肿瘤。右列图像是c-MAF阴性肿瘤。顶部图像用针对Maf的INB-1-11-8抗体染色。提供了从Santa Cruz Biotechnology Inc.获得的M153抗体的底部图像用于比较。

[0031] 图4示出了市售BSA和cMaf(Q1)样品的SDS-PAGE分析。

[0032] 图5示出了cMaf(Q1)的CFCA分析的示例性传感图。

[0033] 图6示出了结合INB-1-11-8的c-MAF(Q1)的动力学分析。

[0034] 图7示出了结合INB-1-11-8的c-MAF(Q1)的单一浓度拟合。

- [0035] 图8说明了c-MAF抗体INB-1-11-8的重链和轻链的序列。
- [0036] 图9.A) IHC评分。模型评估:直方图。B) 灵敏度和特异性曲线。C) 接收操作曲线(ROC)。
- [0037] 图10.基线特征双变量分析。
- [0038] 图11.A) 描绘无骨转移概率的Kaplan-Meier曲线;B) 累积骨转移发生曲线。
- [0039] 发明详述
- [0040] 一般术语和表述的定义
- [0041] 本文使用的“和/或”将被视为具有或不具有另一个的两个特定特征或组件中每一个的具体公开。例如’A和/或B’被视为(i) A、(ii) B和(iii) A和B中的每一个的具体公开,就好像本文单独列出每一个一样。
- [0042] 如本文所用,“结合成员”描述了彼此结合的一对分子的一个成员。结合对的成员可以是天然衍生的或全部或部分合成产生的。该对分子中的一个成员在其表面上具有一个区域或一个空腔,其与该对分子的另一个成员的特定空间和极性组织结合并因此与之互补。结合对的类型的实例是抗原-抗体、受体-配体和酶-底物。在一些实施方案中,结合成员是抗体。在一些实施方案中,结合成员是结合c-MAF抗原的抗体。
- [0043] 如本文所用,“CDR区”或“CDR”旨在表示由Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Edition.US Department of Health and Human Services,Public Service,NIH,Washington定义的免疫球蛋白的重链和轻链的高变区。抗体通常包含3个重链CDR,称为HCDR1、HCDR2和HCDR3,以及3个轻链CDR,称为LCDR1、LCDR2和LCDR3。术语CDR (CDR或CDRs) 在这里用于指示这些区域中的一个或这些区域中的几个或甚至全部,其含有负责通过抗体对抗原或它识别的表位的亲和力的结合的大部分氨基酸残基。在六个CDR序列中,重链的第三个CDR (HCDR3) 具有最大的大小变异性,即更大的多样性,主要是本领域已知的机制如种系免疫球蛋白重链基因座的V、D和J基因片段的V(D)J重排。HCDR3可以短至两个氨基酸或长达26个氨基酸,或者在这两个极端长度之间可以具有任何长度。CDR长度也可以根据适应于特定基础框架的长度而变化。功能上,HCDR3可以在测定抗体特异性方面起重要作用(Segal et al., (1974) Proc Natl Acad Sci USA. 71 (11) : 4298-302; Amit et al., (1986) Science 233 (4765) : 747-53; Chothia et al., (1987) J. Mol. Biol. 196 (4) : 901-17; Chothia et al., (1989) Nature 342 (6252) : 877-83; Caton et al., (1990) J. Immunol. 144 (5) : 1965-8; Sharon (1990a) PNAS USA. 87 (12) : 4814-7, Sharon (1990b) J. Immunol. 144:4863-4869, Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Edition.US Department of Health and Human Services,Public Service,NIH,Washington)。
- [0044] 如本文所用,“抗体”、“抗体分子”或“抗体”描述了无论是天然或是部分或完全合成产生的免疫球蛋白。该术语还涵盖包含抗体抗原结合位点的任何多肽或蛋白质。这里必须理解,本发明不涉及天然形式的抗体,也就是说它们不在其天然环境中,而是能够通过天然来源的纯化分离或获得,或者通过遗传重组、或通过化学合成获得,然后它们可以含有非天然氨基酸。包含抗体抗原结合位点的抗体片段包括但不限于分子如Fab、Fab'、F(ab')²、Fab'-SH、scFv、Fv、dAb和Fd。包括一个或多个抗体抗原结合位点的各种其它抗体分子已被工程改造,包括例如Fab2、Fab3、双抗体、三抗体、四抗体、骆驼体、纳米抗体和微型抗体。抗

体分子及其构建方法和用途描述于Hollinger&Hudson (2005) Nature Biot. 23 (9) :1126-1136中。

[0045] 如本文所用，“抗体分子”应解释为覆盖具有所需特异性的抗体抗原结合位点和/或与抗原结合的任何结合成员或物质。因此，该术语涵盖功能性抗体片段和衍生物，包括包含抗体抗原结合位点的任何多肽，无论是天然还是全部或部分合成的。因此，包括与另一多肽融合的包含抗体抗原结合位点或等同物的嵌合分子（例如衍生自另一物种或属于另一抗体类或亚类）。嵌合抗体的克隆和表达描述于例如EP0120694A (Boss et al) 和EP0125023A (Cabilly et al)，其全部内容并入本文。

[0046] 如本文所用，例如本发明的结合成员的“功能片段或变体”是指保留完整结合成员的至少一些功能的结合成员的片段或变体（例如，特异性结合抗原如Maf的能力）。

[0047] 如本文所用，术语“基因的扩增”是指在个体细胞或细胞系中形成基因或基因片段的各种拷贝的过程。基因的拷贝不一定位于相同的染色体上。复制的区域通常称为“扩增子”。通常，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。

[0048] 如本文所用，“MAF基因”、“Maf”、“c-MAF”或“c-Maf”（也称为Maf或MGC71685的v-Maf肌肉性肌肉瘤性纤维肉瘤致癌基因同源物（禽））是含有锌指的转录因子，其像同源二聚体或异源二聚体起作用。根据DNA结合位点，编码的蛋白质可以是转录激活物或阻遏物。编码MAF的DNA序列描述于NCBI数据库中，登录号为NG_016440 (SEQ ID NO:1 (编码序列))。MAF的基因组序列如SEQ ID NO:13所示。本发明的方法可以利用编码序列或基因组DNA序列。从所述DNA序列转录两种信使RNA，其中每一个将产生两种c-MAF蛋白同种型之一，即 α 同种型和 β 同种型。每种所述同种型的互补DNA序列分别在NCBI数据库中以登录号NM_005360.4 (SEQ ID NO:2) 和NM_001031804.2 (SEQ ID NO:3) 进行描述。关于c-MAF同种型的更多信息可以在Eychene et al., NRC 8:683-693 (2008) 中找到，其全部内容通过引用并入本文。在一些实施方案中，本发明涉及c-MAF基因用于通常预测癌症的预后的用途，例如国际申请PCT/IB2013/001204和PCT/ES2011/070693和美国专利申请13/878,114和13/878,114（三阴性乳腺癌和ER+乳腺癌）、国际申请PCT/US2014/026154（肾细胞癌）、国际申请号PCT/US2014/028722（乳腺癌）、国际申请号PCT/US2013/044584（肺癌）、美国专利申请号14/050,262和国际申请号PCT/IB2013/002866（前列腺癌）、国际申请号PCT/US2014/059506（HER2+乳腺癌）、美国申请号14/213,670和国际申请号PCT/US2014/028569（转移癌），其每一篇的全部内容通过引用并入本文。

[0049] 在本发明的上下文中，“c-MAF蛋白的功能等同变体”被理解为 (i) c-MAF蛋白的变体 (SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5)，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（优选保守的氨基酸残基）置换，其中这种置换的氨基酸残基可以是或可以不是由遗传密码编码的，或 (ii) 变体，其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，即充当DNA结合转录因子。可以使用基于c-MAF的以下能力的方法来鉴定c-MAF蛋白的变体：如国际专利公开号W02005/046731（通过引用整体并入本文）所示的促进体外细胞增殖、在国际专利公开号W02008/098351（通过引用整体并入本文）所述的抑制剂或测试化合物在表达c-MAF的细胞中阻断在细胞周期蛋白D2启动子或包含c-MAF反应区 (MARE或c-MAF反应元件) 的启动子控制下的报道基因的转录能力的能力。也可以基于如美国公开号US2009/048117A（通过引用整体并入本文）所述的抑制剂响应于用表达NFATc2和c-MAF的细

胞中PMA/离子霉素的刺激阻断在IL-4启动子的控制下报道基因表达的能力鉴定c-MAF的变体。

[0050] 根据本发明的c-MAF变体优选与c-MAF蛋白质同种型 (SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5) 中的任一个的氨基酸序列具有至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%的序列相似性。使用本领域技术人员广泛已知的算法和计算机程序来确定先前定义的变体和特异性c-MAF蛋白质序列之间的相似性。优选使用BLASTP算法确定两个氨基酸序列之间的相似性 [BLAST Manual, Altschul, S., et al., NCBI NLM NIH Bethesda, Md. 20894, Altschul, S., et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)]。

[0051] 如本文所用,雷帕霉素(mTOR)的哺乳动物靶标或“mTor”是指对应于EC 2.7.11.1 的那些蛋白质。mTor酶是丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶并且调节细胞增殖、细胞运动、细胞生长、细胞存活和转录。

[0052] 如本文所用,“mTor抑制剂”是指能够完全或部分抑制mTor基因表达的任何分子,无论是通过阻止所述基因的表达产物产生(中断mTor基因转录和/或阻断来自mTor基因表达的mRNA的翻译) 和直接抑制mTor蛋白活性。包括具有双重或更多靶标其中mTor蛋白活性的抑制剂。

[0053] 如本文所用,“Src”是指对应于EC 2.7.10.2 的那些蛋白质。Src是非受体酪氨酸激酶和原癌基因。Src可能在细胞生长和胚胎发育中发挥作用。

[0054] 如本文所用,“Src抑制剂”是指能够完全或部分抑制Src基因表达的任何分子,通过阻止所述基因的表达产物产生(中断Src基因转录和/或阻断来自Src基因表达的mRNA的翻译) 和直接抑制Src蛋白的活性。

[0055] 本文所用的“前列腺素-内过氧化物合成酶2”、“环加氧酶-2”或“COX-2”是指对应于EC 1.14.99.1 的那些蛋白质。COX-2负责将花生四烯酸转化为前列腺素内过氧化物H2。

[0056] 如本文所用,“COX-2抑制剂”是指能够完全或部分抑制COX-2基因表达的任何分子,通过阻止所述基因的表达产物产生(中断COX-2基因转录和/或阻断来自COX-2基因表达的mRNA的翻译) 和直接抑制COX-2蛋白活性。

[0057] 本文所用的“结果”或“临床结果”是指所产生的疾病过程和/或疾病进展,并且可以表征为例如复发、直到复发的时间段、转移、直到转移的时间段、转移的数目、转移灶数和/或因疾病死亡。例如,良好的临床结果包括治愈、预防复发、预防转移和/或在固定的时间段内存活(没有复发),而不好的临床结果包括疾病进展、转移和/或在固定的时间段内死亡。

[0058] 如本文所用,术语基因的“表达水平”是指受试者样品中基因产生的基因产物的可测量的量,其中基因产物可以是转录产物或翻译产物。因此,表达水平可以涉及核酸基因产物如mRNA或cDNA或多肽基因产物。表达水平来源于受试者的样品和/或一个或多个参考样品,并且可以例如从头检测或对应于先前的测定。可以例如使用本领域技术人员已知的微阵列方法、PCR方法(例如qPCR) 和/或基于抗体的方法来测定或测量表达水平。在一些实施方案中,使用本文公开的抗体测量c-MAF的表达水平。

[0059] 如本文所用,术语“基因拷贝数”是指细胞中核酸分子的拷贝数。基因拷贝数包括细胞基因组(染色体) DNA中的基因拷贝数。在正常细胞(非肿瘤细胞)中,基因拷贝数通常为

两个拷贝(在每个染色体对成员中一个拷贝)。基因拷贝数有时包括取自细胞群样品的基因拷贝数的一半。

[0060] “增加的表达水平”被理解为当提及的MAF基因的水平大于参考样品或对照样品时的表达水平。不排除基因或16q23或16q22-24染色体基因座扩增或易位的其它机制可能引起增加的水平。特别地,当从患者分离的样品中的表达水平为参考或对照的至少约1.1倍、约1.5倍、约5倍、约10倍、约20倍、约30倍、约40倍、约50倍、约60倍、约70倍、约80倍、约90倍、约100倍或甚至更多倍时可以认为样品具有高c-MAF表达水平。

[0061] 如本文所用,“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,探针可以特异性针对已知经历易位的染色体区域。在一些实施方案中,探针具有特定的标记或标签。在一些实施方案中,标签是荧光团。在一些实施方案中,探针是DNA原位杂交探针,其标记基于铂与核酸和蛋白质的稳定配位结合。在一些实施方案中,探针在美国专利申请12/067532和美国专利申请12/181,399中描述的,其全部内容通过引用并入,或如Swennenhuis et al. “Construction of repeat-free fluorescence in situ hybridization probes” Nucleic Acids Research 40(3):e20(2012)所述的。

[0062] 如本文所用,“标签”或“标记”是指与探针直接或间接结合的任何物理分子,允许将探针或探针的位置可视化、标记或以其它方式捕获。

[0063] 如本文所用,“易位”是指在染色体之间以不相等或相等的量交换染色体物质。在一些情况下,易位位于相同的染色体上。在一些情况下,易位位于不同的染色体之间。在许多类型的癌症(包括乳腺癌和白血病)中易位高频发生。易位可以是初级相互易位或更复杂的二次易位。有几个涉及免疫球蛋白重链(IgH)基因座的初级易位被认为构成许多癌症中的起始事件。(Eychène, A., Rocques, N., and Puoponnot, C., A new MAFia in cancer. 2008. Nature Reviews: Cancer. 8:683-693.)

[0064] 如本文所用,“多倍体”或“多倍体性”表示细胞含有目的基因的两个以上拷贝。在某些情况下,目的基因是MAF。在一些实施方案中,多倍体性与目的基因的表达的积累相关。在一些实施方案中,多倍体性与基因组不稳定性相关。在一些实施方案中,基因组不稳定性可导致染色体易位。

[0065] 如本文所用的“全基因组测序”是其中生物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.

[0066] 如本文所使用的“外显子组测序”是对生物体的DNA的整个编码区进行测序的方法。在外显子组测序中,对mRNA进行测序。基因组的非翻译区不包括在外显子组测序中。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.

[0067] 如本文所使用的“转移”被理解为癌症从其起始于的器官至不同器官的繁殖。它通常通过血液或淋巴系统发生。当癌细胞扩散并形成新的肿瘤时,后者称为继发性或转移性肿瘤。构成继发性肿瘤的癌细胞与原始肿瘤相似。例如,如果乳腺癌扩散(转移)到肺,则继发性肿瘤由恶性乳腺癌细胞形成。肺中的疾病是转移性乳腺癌而不是肺癌。

[0068] 本文所用的“预测”是指确定患有癌症的受试者将发展至远处器官的转移的可能性。如本文所用,“良好的预后”表示在一定时间段内受试者预期(例如预测)存活和/或受试

者没有复发或远处转移或处于具有复发或远处转移的低风险。术语“低”是相对术语，在本申请的上下文中，是指关于临床结果(复发，远处转移等)的“低”表达组的风险。“低”风险可被认为是低于异质性癌症患者人群的平均风险的风险。在Paik et al. (2004)的研究中，复发的总体“低”风险被认为低于15%。风险也将随着时间的推移而变化。时间可以是例如在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。

[0069] 如本文所用，“不良预后”表示预期例如预测受试者在一段时间内无法生存和/或具有复发或远处转移或处于具有复发或远处转移的高风险。术语“高”是相对的术语，在本申请的上下文中，是指关于临床结果(复发，远处转移等)的“高”表达组的风险。“高”风险可被认为是高于异质性癌症患者人群的平均风险的风险。在Paik et al. (2004)的研究中，复发的总体“高”风险被认为高于15%。风险也将随着时间的推移而变化。时间可以是例如在癌症初始诊断之后或作出预后之后的五年，十年，十五年甚至二十年。

[0070] 本文使用的“参考值”是指用作通过实验室检查患者或从患者收集的样品获得的值/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；一系列值；平均值；中值，平均数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，从被测试对象的样品但是在较早的时间点处获得的值。参考值可以基于大量样品，例如来自按时间顺序的年龄匹配组的受试者的群体，或者基于包括或排除待测样品的样品池。

[0071] 如本文所用，“受试者”或“患者”是指分类为哺乳动物的所有动物，包括但不限于家畜和农场动物、灵长类和人类，例如人，非人灵长类动物，牛，马，猪，羊，山羊，狗，猫或啮齿动物。优选地，受试者是任何年龄或种族的男人或女人。

[0072] 本文所用的术语“治疗”是指任何类型的治疗，其旨在终止、预防、改善或降低对如本文所述的临床病症的易感性。在优选的实施方案中，术语治疗涉及如本文所定义的病症或病况的预防性治疗(即减轻对临床病症的易感性的治疗)。因此，“治疗”、“医治”及其等效术语是指获得期望的药理学或生理学作用，涵盖哺乳动物(包括人)中病理状况或病症的任何治疗。效果在完全或部分预防病症或其症状方面可以是预防性的，和/或在部分或完全治愈病症和/或由病症引起的有害作用的方面可以是治疗性的。也就是说，“治疗”包括(1)防止病症在受试者中发生或复发，(2)抑制病症，例如阻止其发展，(3)停止或终止病症或至少与其相关的症状，因此宿主不再患有病症或其症状，例如导致疾病或其症状消退，例如通过恢复或修复失去、缺失或缺陷的功能，或刺激低效过程，或(4)缓解、减轻或改善病症或与之相关的症状，其中改善用于广义地指参数诸如炎症、疼痛或免疫缺陷的量级的至少减小。在一些实施方案中，治疗是防止骨质降解。在一些实施方案中，治疗是被公开或考虑于以下文献的任何治疗：国际申请号PCT/IB2013/001204、美国临时申请号61/801,769、美国临时申请号61/801,642、美国临时申请号61/801,718、国际申请号PCT/US2013/044584、美国临时申请号61/713,318和国际申请号PCT/US2014/059506，其通过引用全文并入本文。

[0073] 如本文所用，“样品”或“生物样品”是指从受试者分离的生物材料。生物样品可以含有任何适于测定c-MAF基因表达水平的生物材料。样品可以从任何合适的生物组织或流体分离，例如肿瘤组织，血液，血浆，血清，尿液或脑脊髓液(CSF)。

[0074] “肿瘤组织样品”被理解为源自原发性癌肿瘤的组织样品。所述样品可以通过常规方法获得，例如通过活检，使用相关医学技术领域的技术人员熟知的方法。

[0075] “溶骨性骨转移”是指其中在由肿瘤细胞刺激破骨细胞活性导致的转移附近产生骨吸收(骨密度的渐进丧失)的转移类型,其特征在于严重的疼痛,病理性骨折,高钙血症,脊髓压迫以及神经压迫引起的其它综合征。

[0076] 结合成员

[0077] 结合成员通常包含具有结合位点的分子。例如,结合成员可以是包含结合位点的抗体分子或非抗体蛋白质。可以通过在抗体框架区和/或非抗体蛋白质支架如纤连蛋白或细胞色素B等上的CDR的排列来提供结合位点(Haan&Maggos (2004) BioCentury, 12 (5) :A1-A6; Koide et al., (1998) J.Mol.Biol.284:1141-1151; Nygren et al., (1997) Curr.Op.Struct.Biol.7:463-469),或者通过随机化或突变蛋白质支架内的环的氨基酸残基以赋予针对所需靶的结合特异性来提供结合位点。用于工程化蛋白质中的新型结合位点的支架已经被Nygren et al., (同上)详细地综述。用于抗体模拟物的蛋白质支架公开于W0 00/034784 A1 (Lipovsek),其中发明人描述了包括具有至少一个随机化环的纤连蛋白III型结构域的蛋白(抗体模拟物)。用于移植一个或多个CDR例如一组HCDR的合适的支架可以由免疫球蛋白基因超家族的任何结构域成员提供。支架可以是人或非人蛋白质。非抗体蛋白质支架的优点是其可以在比至少一些抗体分子更小和/或更容易制造的支架分子中提供抗原结合位点。小尺寸的结合成员可以赋予有用的生理特性,例如进入细胞的能力,深度渗透入组织或达到其它结构内的靶点,或者结合在靶抗原的蛋白质腔内。在非抗体蛋白质支架中使用抗原结合位点综述于Wess, (2004) In:BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12 (42), A1-A7。典型的是具有稳定主链和一个或多个可变环的蛋白质,其中一个或多个环的氨基酸序列被特异地或随机地突变以产生结合靶的抗原结合位点。这样的蛋白质包括来自金黄色葡萄球菌的蛋白A的IgG结合结构域,转铁蛋白,tetranectin,纤连蛋白,脂笼蛋白以及 γ 结晶和其它AffilinTM支架(Sc11蛋白)。

[0078] 其它方法的实例包括基于环寡肽(cyclotide)的合成“微体”——具有分子内二硫键的小蛋白质,微蛋白质(VersabodiesTM, Amunix)和锚蛋白重复蛋白(DARPin, Molecular Partners)。

[0079] 除了抗体序列和/或抗原结合位点之外,根据本发明的结合成员可以包含其它氨基酸,例如,形成肽或多肽,例如折叠结构域,或赋予分子结合抗原能力以外的另外的功能特征。本发明的结合成员可携带可检测标记,或可与毒素或靶向部分或酶缀合(例如通过肽基键或接头)。例如,结合成员可以包含催化位点(例如在酶结构域中)以及抗原结合位点,其中抗原结合位点结合抗原,因此将催化位点靶向至抗原。催化位点可能抑制(例如通过切割)抗原的生物学功能。

[0080] 在一些实施方案中,结合成员是抗体。尽管如上所述,抗体的CDR可以由非抗体支架携带,但是用于携带本发明的CDR或一组CDR的结构通常是抗体重链或轻链序列或其实质部分,其中CDR或CDR组位于对应于由重排的免疫球蛋白基因编码的天然存在的V_H和V_L抗体可变结构域的CDR或CDR组的位置。可以通过参考Kabat et al., (1991) (同上)及其更新来确定免疫球蛋白可变结构域的结构和位置。有多个学术和商业在线资源可用于查询此数据库。例如,见Martin, (1996) PROTEINS:Structure, Function and Genetics, 25:130-133和相关在线资源,目前网址为<http://www.bioinf.org.uk/abs/simkab.html>。

[0081] 可以采用单克隆抗体和其它抗体并使用重组DNA技术的技术来产生结合靶抗原的

其它抗体或嵌合分子。这样的技术可以包括将编码抗体的免疫球蛋白可变区或CDR的DNA引入不同免疫球蛋白的恒定区或恒定区加框架区。参见例如EP0184187A (Kudo et al) 或EP0239400A (Winter)。产生抗体的杂交瘤或其它细胞可能经历遗传突变或其它变化，其可能改变或不会改变所产生的抗体的结合特异性。

[0082] 抗体工程技术中可获得的其它技术已经使得分离人和人源化抗体成为可能。例如，人杂交瘤可以如Kontermann&Dubel (2001) Antibody Engineering, Springer-Verlag New York, LLC; ISBN:3540413545所述制成。在许多出版物例如Kontermann&Dubel (同上) 和 WO 92/01047A1 (McCafferty et al) 中已经详细描述了噬菌体展示，用于产生结合成员的另一种已建立的技术。

[0083] 其中小鼠抗体基因被失活并用人源抗体基因功能性替代同时留下小鼠免疫系统的完整其它成分的转基因小鼠可用于分离人抗体 (Mendez et al., (1997) Nature Genet. 15 (2) :146-156)。或者由Grawunder&Melchers (WO 03/068819A1) 所述的方法可以用于生成遗传修饰的脊椎动物前体淋巴细胞，用于生产异源抗体或结合蛋白质。在一些实施方案中，使用兔来产生抗体。在一些实施方案中，使用杂交瘤上清液、重组抗体瞬时表达方法或重组抗体-稳定细胞系开发和制备方法产生抗体。在一些实施方案中，任选地用蛋白A纯化抗体。可以使用本领域已知的技术制备人源化抗体，例如在例如WO 91/09967 A1 (Adair et al) 中公开的那些。进一步，WO 04/006955 A1 (Foote) 描述了用于人源化抗体的方法，基于通过比较非人抗体可变区的CDR序列的典型CDR结构类型与来自人抗体序列例如种系抗体基因片段的文库的相应CDR的典型CDR结构类型来从人抗体基因选择可变区框架序列。具有与非人CDR相似的典型CDR结构类型的人抗体可变区形成从其选择人框架序列的人抗体序列成员的子集。可以通过人和非人CDR序列之间的氨基酸相似性进一步对子集成员进行排序。在WO 04/006955A1 (同上) 的方法中，选择排名靠前的人序列以提供用于构建嵌合抗体的框架序列，所述嵌合抗体使用所选人框架子集成员用非人CDR对应物功能替代人CDR序列，从而提供高亲和力和低免疫原性的人源化抗体，而不需要比较非人和人抗体之间的框架序列。还公开了根据该方法制备的嵌合抗体。

[0084] 已经显示整个抗体的片段可以发挥结合抗原的功能。结合片段的实例是 (i) 由V_L, V_H, C_L和C_H1结构域组成的Fab片段；(ii) 由V_H和C_H1结构域组成的Fd片段；(iii) 由单个抗体的V_L和V_H结构域组成的Fv片段；(iv) dAb片段 (Ward et al., (1989) Nature 341 (6242) :544-6; McCafferty et al., (1990) Nature 348 (6301) :552-4; Holt et al., (2003) Trends in Biotechnology 21:484-490) , 其由V_H或V_L结构域组成；(v) 分离的CDR区；(vi) F(ab')₂片段，其是包含两个连接的Fab片段的二价片段；(vii) 单链Fv分子 (scFv) , 其中V_H结构域和V_L结构域通过肽接头连接，其允许两个结构域结合形成抗原结合位点 (Bird et al., (1998) Science 242 (4877) :423-6; Huston et al., (1988) PNAS USA, 85:5879-5883) ; (viii) 双特异性单链Fv二聚体 (WO93/011161A1 (Whitlow et al.)) 和(ix) “双抗体”，其是通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (Holliger et al., 1993) PNAS USA. 90 (14) :6444-8&WO 94/13804A1) 。可以通过并入连接V_H和V_L结构域的二硫桥来稳定Fv、scFv或双抗体分子 (Reiter et al., (1996) Nature Biotech, 14:1239-1245) 。还可以制备包含连接到C_H3结构域的scFv的微体 (minibody) (Hu et al, (1996) Cancer Res. 56:3055-3061) 。结合片段的其它实例是 Fab'，其通过在重链C_H1结构域的羧基末端添加少量残基 (包括来自抗体铰链区的一个或多

个半胱氨酸)而不同于Fab片段,和Fab'-SH,其是其中恒定结构域的半胱氨酸残基具有游离巯基的Fab'片段。还描述了仅包含由框架区连接的两个CDR的抗体分子(Qui et al., (2007) Nat.Biotechnol.25:921-929)。将来自V_H或V_L结构域的CDR3与另一结构域的CDR1或CDR2环经由FR区域通过选定的CDR1或CDR2的C末端与CDR3的N末端的键进行连接。

[0085] 结构域抗体(dAb)是抗体的小单体抗原结合片段,即抗体重链或轻链的可变区(Holt et al., (2003) Trends in Biotechnology 21:484-490)。V_H dAb天然存在于骆驼科动物(例如骆驼,美洲驼)中,并且可以通过用目标抗原免疫骆驼,分离抗原特异性B细胞并直接从个体B细胞克隆dAb基因来产生;然而dAb也可以在细胞培养物中产生。本发明的结合成员可以是包含基本上如本文所述的V_H或V_L结构域的dAb,或者是包含含有基本上如本文所述的一组CDR的V_H或V_L结构域的dAb。

[0086] 本发明的抗体片段可以从本文公开的任何抗体开始,通过诸如酶(例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)消化的方法获得,和/或通过化学还原裂解二硫键获得。另一方面,本发明中包含的抗体片段可以通过本领域技术人员公知的遗传重组技术获得,或者通过肽合成或通过核酸合成和表达获得。

[0087] 根据本发明的功能性抗体片段包括其半衰期通过化学修饰特别是通过聚乙二醇化或通过掺入例如脂质体中而增加的任何功能性片段。

[0088] 双特异性或双功能抗体形成第二代单克隆抗体,其中两个不同的可变区在相同的分子中组合(Holliger&Bohlen, (1999) Cancer&Metastasis Rev.18:411-419),它们在诊断领域和治疗领域中的使用已经从其招募新的效应子功能或靶向肿瘤细胞表面上的几种分子的能力得到证明。当使用双特异性抗体时,这些可以是常规的双特异性抗体,其可以以各种方式制造(Holliger&Winter, (1993) Curr.Op.Biotech.4:446-449)。双特异性抗体的实例包括**BiTE**®技术(Micromet, Inc.)的那些,其中具有不同特异性的两个抗体的结合结构域可以使用并经由短的柔性肽直接连接。这将两个抗体组合在短的单个多肽链上。双抗体和scFv可以构建为没有Fc区,仅使用可变结构域,从而潜在地减少抗独特型反应的作用。

[0089] 双特异性抗体可以构建为完整的IgG,双特异性F(ab')₂,Fab'PEG,双抗体,或双特异性scFv。此外,可以使用本领域已知的常规方法连接两种双特异性抗体以形成四价抗体。与双特异性全抗体相反的双特异性双抗体也可能是特别有用的,因为它们可以容易地在大肠杆菌中构建和表达。

[0090] 如上所述,在一些实施方案中,根据本发明的结合成员是与c-MAF结合的抗体。可以从初始筛选直接获得高效能结合成员。测定和效力在本文其它地方更详细地描述。

[0091] 在一些实施方案中,结合成员是结合人c-MAF的抗原结合分子或其片段,其中所述抗体结合分子或其片段包含与SEQ ID NO:38的氨基酸序列至少约70%,约75%,约75%,约80%,约85%,约90%,约95%,约99%或约100%同一的重链CDR1,和/或与SEQ ID NO:40的氨基酸序列至少约70%,约75%,约75%,约80%,约85%,约90%,约95%,约99%或约100%同一的重链CDR2,和/或与SEQ ID NO:42的氨基酸序列至少约70%,约75%,约75%,约80%,约85%,约90%,约95%,约99%或约100%同一的重链CDR3;和/或包含与SEQ ID NO:26的氨基酸序列至少约70%,约75%,约75%,约80%,约85%,约90%,约95%,约99%或约100%同一的轻链CDR1,和/或与SEQ ID NO:28的氨基酸序列至少约70%,约75%,约75%,约80%,约85%,约90%,约95%,约99%或约100%同一的轻链CDR2,和/或与SEQ ID

N0:30的氨基酸序列至少约70%，约75%，约75%，约80%，约85%，约90%，约95%，约99%或约100%同一的轻链CDR3。

[0092] 在一些实施方案中，抗原结合分子或其片段是抗体。在一些实施方案中，抗体是兔抗体，小鼠抗体，嵌合抗体或人源化抗体。

[0093] 在一些实施方案中，抗体或其片段包含V_H结构域，其序列至少约70%，至少约75%，至少约80%，至少约85%，至少约90%，至少约95%，至少约99%，至少约99%，或至少约100%等同于SEQ ID N0:17的氨基酸序列。

[0094] 在一些实施方案中，抗原结合分子或其片段V_L结构域，其序列至少约70%，至少约75%，至少约80%，至少约85%，至少约80%，至少约85%，至少约90%，至少约95%，至少约99%，至少约99%，或至少约100%等同于SEQ ID N0:21的氨基酸序列。

[0095] 在一些实施方案中，抗体或其片段包含重链序列，其至少约70%，至少约75%，至少约80%，至少约85%，至少约90%，在至少约95%，至少约99%，至少约99%，或至少约100%等同于SEQ ID N0:16的氨基酸序列。

[0096] 在一些实施方案中，抗体或其片段包含轻链序列，其至少约70%，至少约75%，至少约80%，至少约85%，至少约90%，在至少约95%，至少约99%，至少约99%，或至少约100%等同于SEQ ID N0:20的氨基酸序列。

[0097] 在一些实施方案中，可以以分离形式提供具有所述选择的结合成员的氨基酸序列的抗体V_H可变结构域，包含这样的V_H结构域的结合成员也可如此。在一些实施方案中，可以以分离的形式提供具有所述选择的结合成员的氨基酸序列的抗体V_L可变结构域，包含这样的V_L结构域的结合成员也可如此。在一些实施方案中，结合成员是本文公开的任何结合成员的变体。在一些实施方案中，V_H和/或V_L结构域是本文公开的任何V_H和/或V_L结构域的变体。

[0098] 可以进一步测试结合c-MAF的能力，还可以测试与本发明的任何抗体分子竞争结合c-MAF的能力。可以在适当的条件下比较不同结合成员的结合亲和力。

[0099] 本发明的V_H和V_L结构域和CDR(包括对于其示出氨基酸序列的那些，以及可以用于本发明的结合成员的那些)的变体，可以借助于序列改变或突变的方法并筛选具有所需特征的抗原结合成员来获得。所需特征的实例包括但不限于：

[0100] • 抗原结合亲和力相对于特异于该抗原的已知抗体增加

[0101] • 相对于相对于特异于抗原的已知抗体而言，如果活性已知，抗原活性的中和增加

[0102] • 以特定摩尔比与已知抗体或针对抗原的配体的指定竞争能力

[0103] • 免疫沉淀复合物的能力

[0104] • 能够结合指定的表位，如线性表位，例如使用以线性和/或约束构象筛选的肽，或由非连续残基形成的构象表位

[0105] • 能够调节c-MAF或下游分子的新生物活性。这里还提供了这样的方法。

[0106] 在一些实施方案中，结合成员结合抗原c-MAF。在一些实施方案中，结合成员结合人c-MAF。在一些实施方案中，结合成员结合对应于人起源的c-MAF的83-EQKAHLEDYYWMTGYPQQ-100(18a.a.)(SEQ ID N0:22)的表位。

[0107] 由V_H结构域和V_L结构域构成的抗体抗原结合位点通常由多肽的六个环形成：三个

来自轻链可变结构域(V_L)，三个来自重链可变结构域(V_H)。原子结构已知的抗体的分析已经揭示了抗体结合位点的序列与三维结构的关系。这些关系表明，除了 V_H 结构域中的第三个区域(环)，结合位点环具有少量主链构象或典型结构之一。已经显示特定环中形成的典型结构由其大小和在环中和在框架区中的关键位点处的某些残基的存在决定(Chothia et al., (1992) J. Molecular Biology 227:799-817; Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273 (4):927-948)。

[0108] 序列与结构关系的该研究不仅可以用于预测序列已知的抗体中的那些残基，而且可以用于预测未知三维结构，其在维持CDR环的三维结构并因此维持结合特异性方面是重要的。在结构方法中，可以使用任意可自由获得的或市售的软件包例如WAM(Whitelegg&Rees, (2000) Prot. Eng. 12:815-824)来建立抗体分子的模型(Chothia et al., (1986) Science 223:755-758)。然后，可以使用蛋白质可视化和分析软件包例如Insight II (Accelrys, Inc.)或Deep View(Guex&Peitsch, (1997) Electrophoresis 18:2714-2723)来评估在CDR中每个位置处可能的置换。然后，该信息可以用于产生可能具有对活性的最小或有益作用的置换。

[0109] 在CDR，抗体 V_H 或 V_L 结构域和结合成员的氨基酸序列内进行置换所需的技术通常在本领域中是可获得的。可以使用可以被预测或不可被预测为对活性具有最小或有益作用的置换制备变体序列，并测试结合c-MAF的能力和/或任何其它所需性质。

[0110] 如本文所讨论的，根据本发明可以使用其序列在本文中具体公开的任何 V_H 和 V_L 结构域的可变结构域氨基酸序列变体。

[0111] 本发明的另一个方面是包含 V_H 结构域和/或 V_L 结构域的抗体分子，该 V_H 结构域与所附序列表中显示的任意抗体的 V_H 结构域(例如SEQ ID NO.17)具有至少约60%、约70%、约80%、约85%、约90%、约95%、约98%或99%的氨基酸序列同一性，该 V_L 结构域与所附序列表中显示的任意抗体的 V_L 结构域(例如SEQ ID NO.21)具有至少约60%、约70%、约80%、约85%、约90%、约95%、约98%或99%的氨基酸序列同一性。可用于计算两个氨基酸序列的同一性百分比的算法包括例如BLAST(Altschul et al., (1990) J. Mol. Biol. 215 (3):403-10)、FASTA(Pearson&Lipman, (1988) PNAS USA 85 (8):2444-8)或Smith-Waterman算法(Smith&Waterman, (1981) J. Mol. Biol. 147 (1):195-7)，例如采用默认参数。特定变体可以包括一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的添加、缺失、置换和/或插入)。

[0112] 可以在一个或多个框架区和/或一个或多个CDR中产生改变。改变通常不导致功能损失，因此包含由此改变的氨基酸序列的结合成员可以保留结合c-MAF的能力。例如如本文所述的测定所测量的，它可以保留与其中没有产生改变的结合成员相同的定量结合能力。包含由此改变的氨基酸序列的结合成员可以具有改善的结合c-MAF的能力。

[0113] 改变可以包括用非天然存在的或非标准氨基酸替换一个或多个氨基酸残基、将一个或多个氨基酸残基修饰成非天然存在或非标准的形式或者向序列中插入一个或多个非天然存在或非标准的氨基酸。本发明序列中的改变的数量和位置的实例在本文其它地方进行了描述。天然存在的氨基酸包括由它们的标准单字母编码标识为G,A,V,L,I,M,P,F,W,S,T,N,Q,Y,C,K,R,H,D,E的20个“标准”L-氨基酸。非标准氨基酸包括可以被并入多肽主链的任意其它残基或者是现有氨基酸残基的修饰的结果。非标准氨基酸可以天然存在或者非天然存在。若干天然存在的非标准氨基酸在本领域中是已知的，例如4-羟脯氨酸、5-羟赖氨

酸、3-甲基组氨酸、N-乙酰丝氨酸(Voet&Voet, Biochemistry, 3rd Edition, (Wiley) 2004)。在其N- α 位置衍生化的那些氨基酸残基将仅位于氨基酸序列的N-末端。通常在本发明中氨基酸是L-氨基酸,但也可以是D-氨基酸。因此,改变可包括将L-氨基酸修饰为D-氨基酸或用D-氨基酸替代。氨基酸的甲基化、乙酰化和/或磷酸化形式也是已知的,并且本发明中的氨基酸可以进行这种修饰。

[0114] 本发明的抗体结构域和结合成员中的氨基酸序列可以包含上述非天然或非标准氨基酸。可以在合成时或通过在合成氨基酸序列后修饰或替换“原始”标准氨基酸将非标准氨基酸(例如D-氨基酸)掺入氨基酸序列中。

[0115] 非标准和/或非天然存在的氨基酸的使用增加结构和功能多样性,因此可以增加在本发明的结合成员中获得期望的c-MAF结合性质的潜力。此外,由于在向动物例如人施用后具有L-氨基酸的多肽的体内降解,D-氨基酸和类似物被显示与标准L-氨基酸相比具有不同的药代动力学特征,这意味着D-氨基酸对于一些体内应用是有利的。

[0116] 可以使用一个或多个选择的V_H和/或V_L基因的随机诱变以生成在整个可变结构域内的突变从而生成本发明的携带CDR来源序列的新的V_H或V_L区。这样的技术由Gram et al., (1992) 描述,其使用易错PCR。在一些实施方案中,在整个可变结构域或CDR组内产生一个或两个氨基酸置换。可以使用的另一方法是指导对V_H或V_L基因的CDR区的诱变(Barbas et al., (1994) PNAS USA 91:3809-3813; Schier et al., (1996) J.Mol.Biol.263:551-567)。

[0117] 所有上述技术在本领域中是已知的,技术人员将能够使用这样的技术来使用本领域的常规方法来提供本发明的结合成员。

[0118] 本发明的另一个方面提供用于获得针对c-MAF的抗体抗原结合位点的方法,该方法包括借助于在本文所示的V_H结构域的氨基酸序列中添加、缺失、置换或插入一个或多个氨基酸提供为该V_H结构域的氨基酸序列变体的V_H结构域,任选地将由此提供的V_H结构域与一个或多个V_L结构域组合,并且测试V_H结构域或一个或多个V_H/V_L组合以鉴定针对c-MAF并且任选地具有一种或多种期望的性质例如结合c-MAF的能力的结合成员或抗体抗原结合位点。所述V_L结构域可以具有基本上如本文所列出的氨基酸序列。可以采用类似的方法,其中本文所公开的V_L结构域的一个或多个序列变体与一个或多个V_H结构域进行组合。在一些实施方案中,V_L或V_H结构域的变体是功能变体。如上所述,基本上如本文所列出的CDR氨基酸序列可以被携带为人抗体可变结构域中的CDR或其实质部分。基本上如本文所列出的HCDR3序列代表本发明的实施方案,并且这些中的每一个可以被携带为人重链可变结构域中的HCDR3或其实质部分。

[0119] 类似地,一个或多个、或者所有三个CDR可以移植到V_H或V_L结构域的库(repertoire)中,然后对其筛选针对c-MAF的一个或多个结合成员。

[0120] 例如,可以采用一个或多个抗体HCDR1、HCDR2和HCDR3或HCDR组(SEQ ID NO 38、40和42),和/或可以采用一个或多个抗体LCDR1、LCDR2和LCDR3或LCDR组(SEQ ID NO 26、28和30)。类似地,可以采用本文所公开的其它V_H和V_L结构域、CDR组和HCDR组和/或LCDR组。

[0121] 其它操作步骤包括引入接头以将本发明的可变结构域连接到另外的蛋白质序列,包括抗体恒定区,其它可变区或可检测/功能性标记,如本文其它地方更详细讨论的。

[0122] 尽管在本发明的一些方面中,结合成员包含一对V_H和V_L结构域,但是基于V_H或V_L结构域序列的单个结合结构域形成本发明的另一方面。已知单个免疫球蛋白结构域(特别是

V_H 结构域)能够以特异性的方式结合靶抗原。在任一单个结合结构域的情况下,这些结构域可以用于筛选能够形成能够结合c-MAF的二-结构域结合成员的互补结构域。这可以通过噬菌体展示筛选方法使用如在W092/01047 (McCafferty et al) 中和在Marks et al., (1992) Biotechnology 10 (7) :779-83中公开的所谓分级双重组合方法来实现。

[0123] 本发明的结合成员可以进一步包含抗体恒定区或其部分,例如人抗体恒定区或其部分。例如 V_L 结构域可以在其C末端处连接至抗体轻链恒定结构域。类似地,基于 V_H 结构域的结合成员可以在其C末端连接至衍生自任意抗体同种型例如IgG、IgA、IgE和IgM和任意同种型亚类特别是IgG₁和IgG₄的免疫球蛋白重链的全部或部分(例如C_H1结构域)。IgG₁是有利的,由于其效应子功能和便于制造。具有这些性质并稳定化可变区的任意合成的或其它恒定区变体也可以用于本发明。

[0124] 本发明的结合成员还可以包括包含修饰的Fc区的抗体或片段,其中修饰的Fc区相对于野生型Fc区包含至少一个氨基酸修饰。可以相对于包含野生型Fc区的可比较分子设计变体Fc区,以便以更高或更小的亲和力结合Fc受体。Fc区是指与IgG的木瓜蛋白酶消化时产生的IgG C-末端结构域同源的天然存在或合成的多肽。IgG Fc具有约50kD的分子量。对于本发明的抗体和/或片段,可以使用整个Fc区,或仅使用半衰期增强部分。

[0125] 如果需要,Fc区可以被突变以抑制其以高亲和力结合Fc受体和固定补体的能力。在本发明的一个实施方案中,抗体或片段可以具有修饰的Fc区,其中天然存在的Fc区被修饰以增加生物环境中的抗体或片段的半衰期,例如血清半衰期,或通过体外测定测量的半衰期。用于改变IgG的Fc区的原始形式的方法也描述于US6,998,253 (Presta&Snedecor) 中。可以通过修饰Fc区(通过修饰糖基化模式或通过修饰Fc区的氨基酸序列)改变(例如,增强)的效应子功能包括但不限于:例如补体依赖性细胞毒性(CDC),抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)。潜在的修饰包括一个或多个氨基酸残基的插入、缺失或置换,包括用丙氨酸置换,保守置换,非保守置换,或者用来自不同IgG亚类的相同位置的相应氨基酸残基置换(例如在该位置用相应的IgG₂残基替换IgG₁残基)。

[0126] 因此,在另一方面,本发明包括本文别处所述的c-MAF结合成员,其中所述结合成员包含Fc区或至少包含IgG CH2区的等同区,其已被修饰以增加一种或多种效应子功能。在一个实施方案中,修饰结合成员以改变N-连接的寡糖的糖基化模式,使得一种或多种效应子功能的活性增加。在另一个实施方案中,修饰结合成员以改变Fc区的氨基酸序列,使得增加一种或多种效应子功能的活性。测量效应子功能活性并确定是否增加其的方法是本领域熟知的。

[0127] 本发明的结合成员可用可检测或功能标记来标记。因此,结合成员或抗体分子可以以免疫缀合物的形式存在,以获得可检测和/或可定量的信号。免疫缀合物可以包含与可检测或功能标记缀合的本发明的抗体分子。标记可以是产生或可诱导产生信号的任何分子,包括但不限于荧光染料,放射性标记物,酶,化学发光剂或光敏剂。因此,可以通过检测荧光或发光、放射活性、酶活性或光吸收度来检测和/或测量结合。可使用的标记的说明性实例包括放射性同位素,酶,荧光染料,化学发光试剂,酶底物或辅因子,酶抑制剂,颗粒,染料等。

[0128] 作为说明而非限制的合适标记包括酶,例如碱性磷酸酶,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶('G6PDH'), α -D-半乳糖苷酶,葡萄糖氧化酶,葡萄糖淀粉酶,碳酸酐酶,乙酰胆碱酯酶,溶菌

酶,苹果酸脱氢酶和过氧化物,例如辣根过氧化物酶;染料;荧光标记或荧光燃料,例如荧光素及其衍生物,罗丹明化合物和衍生物,绿/黄荧光蛋白(G/YFP),红荧光蛋白(RFP),蓝荧光蛋白(BFP),丹磺酰,伞形酮,藻红蛋白,藻蓝蛋白,别藻蓝蛋白,邻苯二甲醛和荧光胺;荧光团,如镧系元素穴状化合物和螯合物,例如铕等(Perkin Elmer和Cis Biointernational),化学发光标记或化学发光剂,如异鲁米诺,鲁米诺和二氧化杂环丁烷;生物发光标记,如萤光素酶和萤光素;增敏剂;辅酶;酶底物;放射性标记包括但不限于溴77、碳14、钴57、氟8、镓67、镓68、氢3(氚)、铟111、铟113m、碘123m、碘125、碘126、碘131、碘133、汞107、汞203、磷32、钌99m、钌101、钌105、钌95、钌97、钌103、钌105、钪47、硒75、硫35、锝99、锝99m、碲121m、碲122m、碲125m、铥165、铥167、铥168、钇199以及本文提及的其它放射性标记;颗粒,如胶乳或碳颗粒;金属溶胶;微晶;脂质体;细胞等,其可以用染料、催化剂或其它可检测的基团进一步标记;分子如生物素,地加氧原素或5-溴脱氧尿苷;毒素部分,例如选自假单胞菌外毒素(PE或其细胞毒性片段或突变体)、白喉毒素或其细胞毒性片段或突变体、肉毒杆菌毒素A、B、C、D、E或F、蓖麻毒蛋白或其细胞毒性片段、例如蓖麻毒蛋白A、相思豆毒蛋白或其细胞毒性片段、皂草毒蛋白或其细胞毒性片段、美洲商陆抗病毒毒素或其细胞毒性片段和异株泻根毒蛋白1或其细胞毒性片段的毒素部分。

[0129] US4,275,149 (Litman et al) 和US4,318,980 (Boguslaski et al) 中公开了合适的酶和辅酶,在US4,275,149中公开了合适的荧光剂和化学发光剂,其全部内容通过引用并入本文。标签还包括化学部分,例如可以通过结合特定同源可检测部分(例如标记的抗生物素蛋白或链霉亲和素,或遗传工程化的链霉亲和素,如streptactin (IBA GmbH, **Göttingen**, DE))检测的生物素。可检测的标记可以使用本领域已知的常规化学过程连接到本发明的抗体上。

[0130] 免疫缀合物或其功能片段可以通过本领域技术人员已知的方法制备。它们可以直接偶联至酶或荧光标记,或通过间隔基团或连接基团(例如聚醛如戊二醛,乙二胺四乙酸(EDTA),二亚乙基-三氨基四乙酸(DPTA))的中间体进行偶联,或在偶联剂(例如上述用于治疗性缀合物的偶联剂)的存在进行偶联。含有荧光素类型标记的缀合物可以通过与异硫氰酸酯反应来制备。

[0131] 存在用于将治疗性放射性同位素直接或经由螯合剂(例如EDTA,DTPA,如上所述)偶联至抗体的本领域技术人员已知的方法可用于可用于诊断的放射性元件。同样可以通过氯胺T法(Hunter&Greenwood, (1962) Nature 194:495-6)使用碘-131或者通过US4,424,200 (Crockford&Rhodes) 中描述的技术或经由US4,479,930 (Hnatowich) 中所述的DTPA的附接使用锝-99m(Tc-99m)进行标记,两个专利均通过引用整体并入本文。

[0132] 存在标签可以通过其产生可通过外部手段检测的信号的许多方法,例如通过目视检查,电磁辐射,热和化学试剂。标签还可以结合到结合本发明的结合成员的另一个结合成员或支持物。

[0133] 标签可以直接产生信号,因此不需要另外的组分来产生信号。许多有机分子,例如荧光剂,能够吸收紫外和可见光,其中光吸收将能量转移到这些分子并将其升高到激发态。然后,这种吸收的能量通过在第二波长的光发射而消散。该第二波长发射也可以将能量转移到标记的受体分子,并且通过光发射例如荧光共振能量转移(FRET)从受体分子消散所得能量。直接产生信号的其它标签包括放射性同位素和染料。

[0134] 或者,标签可能需要其它组分来产生信号,然后信号产生系统将包括产生可测量信号所需的所有组分,其可以包括底物,辅酶,增强子,附加酶,与酶促产物反应的物质,催化剂,活化剂,辅因子,抑制剂,清除剂,金属离子和结合信号发生物质所需的特异性结合物质。在US5,185,243(Ullman et al)中可以找到合适的信号产生系统的详细讨论。本发明提供了一种方法,其包括引起或允许如本文所提供的对于c-MAF特异性的结合成员的结合。如上所述,这种结合可以在体内发生,例如,在施用结合成员或编码结合成员的核酸之后,或者其可以在体外进行,例如在ELISA、Western印迹、亲和层析、免疫细胞化学、免疫沉淀、中和生物化学或基于细胞的测定中。

[0135] 使用本发明的抗体测定目的基因的水平

[0136] 在优选的实施方案中,本发明的结合成员(例如抗体)用于定量c-MAF蛋白表达水平。c-MAF蛋白表达水平可以通过允许检测和定量来自受试者的样品中的所述蛋白质的任何常规方法进行定量。作为非限制性说明,可以例如通过使用具有c-MAF结合能力的抗体(或其含有抗原决定簇的片段)并随后定量所形成的复合物来量化所述蛋白质水平。在一些实施方案中,用于检测c-MAF蛋白表达水平的抗体是本文所述的任何抗体。在这些测定中使用的抗体可以被标记或可以不被标记。在本发明中可以使用广泛的已知测定法,其使用未标记的抗体(一抗)和标记抗体(二抗);这些技术包括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,基于包含特异性抗体的蛋白质微阵列或生物芯片的使用的技术,或基于胶体沉淀的测定法,例如以浸渍片的形式。用于检测和定量所述c-MAF蛋白的其它方法包括亲和层析技术,配体结合测定等。当使用免疫学方法时,已知以高亲和力结合c-MAF蛋白的任何抗体或试剂可以用于检测其量。然而,优选使用抗体,例如多克隆血清,杂交瘤的上清液或单克隆抗体,抗体片段,Fv,Fab,Fab'和F(ab')₂,scFv,人源化双抗体,三抗体,四抗体,纳米抗体, α 抗体,装订的肽、环肽和抗体。在一些实施方案中,抗体是实施例1中描述的INB-1-11-8。INB-1-11-8轻链序列是SEQ ID NO:20且INB-1-11-8重链序列是SEQ ID NO:16。

[0137] 可以通过表面等离子体共振例如, **BIACORE**[®] 来测定 K_D 。表面等离子体共振涉及将流体相中的分析物通过连接到固体支持物上的配体,并测定分析物和配体之间的结合速率(k_a)和解离速率(k_d)。例如可以进行表面等离子体共振,由此结合成员在流动相中通过附着于支持物的gB蛋白。Biacore允许不同分子与固定在传感器表面上的单个配偶体相互作用的程度被确定,并揭示了相互作用的特异性。Biacore允许测定分析物和配体之间的结合速率(k_a)和解离速率(k_d)。可以从传感图中的信息确定相互作用的动力学,即复合物形成速率(k_a)和解离速率(k_d)。亲和力可以表示为解离常数 K_D ,其从使用单价分析物数据模型通过表面等离子体共振测定的解离和结合速率常数比 k_d/k_a 计算。在一些实施方案中,亲和力是单价结合亲和力。

[0138] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或其片段以下面的亲和力(KD)结合人c-MAF:至少约1μM、100nM、50nM、10nM、至少约9nM、至少约8mM、至少约7nM、至少约6nM、至少约5nM、至少约4nM、至少约3nM、至少约2.5nM、至少约2nM、至少约1.9nM、至少约1.8nM、至少约1.7nM、至少约1.6nM、至少约1.5nM、至少约1.4nM、至少约1.3nM、至少约1.2nM、至少约1.1nM、至少约1.0nM、至少约0.9nM、至少约0.8nM、至少约0.7nM、至少约0.6nM、至少约

0.5nM、至少约0.4nM、至少约0.3nM、至少约0.2nM、至少约0.1nM、至少约75pM、至少约50pM、至少约25pM或者至少约1pM。在一些实施方案中,针对c-MAF的抗体的亲和力(KD)为至少约1nM至约1.2nM、至少约1nM至约1.5nM、至少约1nM至约2.0nM、至少约1nM至约3.0nM、至少约1nM至约4.0nM、至少约1nM至约5.0nM、至少约1nM至约6.0nM、至少约1nM至约7.0nM、至少约1nM至约8.0nM、至少约1nM至约9.0nM、至少约1nM至约10nM。在一些实施方案中,至少约1nM至约50nM、至少约1nM至约100nM、至少约1nM至约1μM、至少约0.1nM至约1.5nM或者至少约10pM至约1.5nM。在一些实施方案中,本文所述的抗体或其片段以至少约1.1nM的亲和力(KD)结合人c-MAF。

[0139] 在特定实施方案中,借助于Western印迹、ELISA或蛋白质阵列定量c-MAF蛋白质水平。

[0140] 在另一特定实施方案中,从外排体(exosome)、循环DNA或循环肿瘤细胞定量c-MAF蛋白水平。外排体是由大多数细胞类型体内和体外分泌的40-100nm膜囊泡。外排体以特定外排体群体形成,称为向内出芽进入腔室内腔的多泡体(MVB)。一旦MVB与质膜融合,这些内囊泡被分泌。外排体可以通过本领域众所周知的若干方法分离自各种各样的细胞系或体液(Théry C. et al., Curr Protoc Cell Biol. 2006 Apr; Chapter 3:Unit 3.22) (其全部内容通过引用并入本文)。若干市售试剂盒可用于分离外排体,例如ExoQuickTM或ExoTestTM。

[0141] 本发明提供了通过使用根据本发明的结合成分,例如在生物传感器系统中直接测量抗原水平的方法。例如,本发明包括检测和/或测量与c-MAF的结合的方法,包括(i)将所述结合成员暴露于c-MAF和(ii)检测所述结合成员与c-MAF的结合,其中使用本文所述的任何方法或可检测标记检测结合。这和本文所述的任何其它结合检测方法可以由执行该方法的人直接解释,例如通过目测观察可检测标记。或者,该方法或本文描述的任何其它结合检测方法可以以放射自显影图,照片,计算机打印输出,流式细胞术报告,图,表,包含结果的试管或容器或孔或方法结果的任何其它视觉或物理表示的形式产生报告。

[0142] 可以确定结合成员与c-MAF的结合量。定量可能与测试样品中抗原的量有关,这可能是具有诊断益处的。筛选结合和/或其定量可能是有用的,例如在针对本文涉及的疾病或病症和/或涉及异常c-MAF表达和/或活性的任何其它疾病或病症对患者进行的筛选中。

[0143] 本发明的诊断方法可以包括(i)从受试者获得组织或流体样品,(ii)将所述组织或流体样品暴露于本发明的一种或多种结合成员(例如抗体);和(iii)与对照样品相比,检测结合的c-MAF,其中与对照相比,c-MAF结合量的增加可以指示c-MAF表达和/或活性。待测试的组织或流体样品包括肿瘤,血液,血清,唾液,尿液,痰液,活检材料或怀疑含有Maf的任何组织。对增加的c-MAF检测阳性的受试者也可受益于本文稍后公开的治疗方法。根据本文公开的方法,本领域技术人员能够根据其偏好和一般知识,选择确定结合成员与抗原结合的合适方式。

[0144] 一个实施方案包括在第二步骤中将来自受试者的样品(例如肿瘤样品)中获得的c-MAF基因表达水平与参考值进行比较。

[0145] 在已经测量了来自患有癌症的受试者的样品中的c-MAF基因表达水平并与参考值进行比较后,如果所述基因的表达水平相对于所述参考值增加,则可以推断所述受试者具有更大的发生转移(例如骨转移)的倾向。

[0146] c-MAF基因表达水平的测定应与参考值相关。

[0147] 在一个实施方案中,如本文中预期的参考值可以表达MAF的绝对量。在另一个实施方案中,来自被测试受试者的样品中任何一种或多种生物标志物的量可以相对于参考值直接确定(例如,以增加或减少,或倍数增加或折叠减少方式)。有利地,这可以允许将来自受试者的样品中的任何一种或多种生物标志物的量与参考值进行比较(换句话说,以测量来自受试者的样品中任何一种或多种生物标志物相对参考值的相对量),而不需要首先确定所述一种或多种生物标志物的各自绝对量。

[0148] 在优选的实施方案中,参考值是对照样品或参照样品中的c-MAF基因表达水平。根据要分析的肿瘤类型,对照或参照样品的确切性质可能有所不同。因此,在要评估预后的情况下,参考样品是来自未转移或对应于在来自没有转移的癌症受试者的活检样品中的肿瘤组织收集中测量的c-MAF基因表达水平的中值的癌症的样品。

[0149] 所述参考样品通常通过组合来自受试群体的等量样品来获得。一般来说,典型的参考样品将从临床良好记录的受试者中获得,并且其中转移的不存在被良好表征。在这样的样品中,生物标志物(MAF基因)的正常浓度(参考浓度)可以通过例如提供参考群体的平均浓度来确定。当确定标志物的参考浓度时,会考虑各种考虑因素。在这些考虑之中,包括患者的年龄,体重,性别,一般身体状况等。例如,等量的至少约2个,至少约10个,至少约100个,至优选多于约1000个受试者的组(优选根据前述考虑因素例如根据各种年龄类别进行分类)被视为参考组。参考水平来源于的样品集合优选地由患有与研究的患者对象相同类型的癌症的受试者形成。

[0150] 在特定实施方案中,c-MAF表达的“增加”或“降低”表达的参考值通过用常规方法计算百分位数来确定,其涉及在从其疾病通过上述任何方法良好记录c-MAF表达水平的受试者分离的一个或多个样品中进行测定。然后可以优选将c-MAF的“降低”水平分配给其中c-MAF表达水平等于或低于正常群体中约第50百分位数的样品,包括例如等于或低于正常人群中约第60百分位数、等于或低于正常人群中约第70百分位数,等于或低于正常人群中约第80百分位数,等于或低于正常人群中约第90百分位数,和等于或低于正常人群中约第95百分位数。然后可以优选将“增加的”c-MAF基因表达水平分配给其中c-MAF基因表达水平等于或大于正常群体中约第50百分位数的样品,包括例如等于或大于正常人群中约第60百分位数,等于或大于正常人群约第70百分位数,等于或大于正常人群约第80百分位数,等于或大于正常人群约第90百分位数,和等于或大于正常人群约第95百分位数。

[0151] 样品中结合成员的反应性可以通过任何适当的方法确定。竞争性结合测定可以与放射性抗原例如同位素标记例如⁹⁹Tc、¹⁴C、¹³¹I、¹²⁵I、³H、³²P或³⁵S或使用与报告分子连接的抗原或类似物的非放射性抗原一起使用。报告分子可以是具有光谱隔离的吸收或发射特性的荧光染料,磷光体或激光染料。合适的荧光染料包括荧光素,罗丹明,藻红蛋白和德克萨斯红,以及镧系元素螯合物或穴状化合物。合适的显色染料包括二氨基联苯胺。

[0152] 其它报告物包括大分子胶体颗粒或颗粒材料,例如着色、磁性或顺磁性的胶乳珠,以及可以直接或间接地引起被视觉观察、电子检测或以其它方式记录的可检测信号的生物或化学活性剂。这些分子可以是例如催化发生或改变颜色或引起电性质变化的反应的酶。它们可以是能够分子激发的,使得能量状态之间的电子跃迁导致特征光谱吸收或发射。它们可以包括与生物传感器结合使用的化学实体。可以使用生物素/抗生物素蛋白或生物素/链霉亲和素和碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶检测系统。

[0153] 由个体结合成员-报告物缀合物产生的信号可以用于得到在样品中结合的相关结合成员的可量化的绝对或相对数据(正常和测试)。

[0154] 本发明还提供如上所述的结合成员(例如,抗体)用于在竞争测定中测量抗原水平(例如,Maf)的用途,也就是说通过在竞争测定中使用由本发明提供的结合成员测量样品中抗原水平的方法。这可以是当不需要结合抗原与未结合抗原的物理分离时使用的。将报告分子连接到结合成员上使得在结合时发生物理或光学变化是一种可能性。报告分子可以直接或间接地产生可检测的信号,这可以是可量化的。报告分子的连接可以直接或间接的、共价的(例如通过肽键)或非共价的。通过肽键的连接可以是编码抗体和报告分子的基因融合体的重组表达的结果。

[0155] 在各个方面和实施方案中,本发明延伸到与任何抗体竞争结合c-MAF的结合成员。可以在体外测定结合成员之间的竞争,例如通过将特异性报告分子标记到一个可在其它未标记的结合成员存在下检测的结合成员,以便能够鉴定结合相同表位或重叠表位的结合成员。可以例如使用ELISA或通过表面等离子体共振来测定竞争,其中将hCMV固定在固相上,并且将第一加标签或标记的结合成员连同一个或多个其它未加标签或未标记的结合成员加入到固相中。通过标记的结合成员发出的信号的降低来观察与标记的结合成员竞争的未标记的结合成员的存在。

[0156] 例如,本发明包括鉴定c-MAF结合化合物的方法,其包括(i)将蛋白质固定在支持物上,(ii)将所述固定的蛋白质同时或以逐步方式与根据本发明的至少一种加标签或标记的结合成员和一种或多种未加标签或未标记的测试结合化合物接触,和(iii)通过观察来自标记的结合成员的结合标签的量的减少来鉴定新的c-MAF结合化合物。这种方法可以使用多孔或阵列格式以高通量方式进行。这样的测定也可以在溶液中进行。参见例如US5,814,468(Sliman et al),其全部内容通过引用并入本文。如上所述,结合的检测可以由执行该方法的人直接解释,例如通过目测观察可检测的标记或其存在的减少。或者,本发明的结合方法可以以放射自显影图、照片、计算机打印输出、流式细胞术报告或方法结果的任何其它视觉或物理表示的形式产生报告。

[0157] 竞争测定也可用于表位表征。在一个实例中,表位表征可以用于鉴定由任选地可以具有优化的中和和/或调节特征的c-MAF结合成员结合的表位。这样的表位可以是线性的或构象的。构象表位可以包含Maf的至少两个不同结构域,其中当c-MAF蛋白在其三级或四级结构中折叠以形成被Maf抑制剂(例如本说明书中提供的任何c-MAF结合成员)识别的构象表位时,所述结构域彼此靠近。在竞争测试中,可以使用抗原的肽片段,特别是包括目的表位或由其组成的肽。可以使用具有表位序列并且在任一端加上一个或多个氨基酸的肽。根据本发明的结合成员可以使得它们与抗原的结合被具有或包含所给序列的肽抑制。

[0158] 本文所述的结合成员的使用方法

[0159] 在一些实施方案中,本发明涉及使用本文所述的结合成员(例如,抗体)、其变体或片段定量受试者的肿瘤样品中的c-MAF基因表达水平的体外方法。

[0160] 在一些实施方案中,本发明涉及用于患有癌症的受试者中的转移的诊断和/或患有癌症的受试者中的转移倾向的预后的体外方法,所述方法包括:

[0161] (i) 使用本文所述的结合成员(例如,抗体)、其变体或片段定量所述受试者的肿瘤样品中的c-MAF基因表达水平,以及

[0162] (ii) 将 (i) 中获得的表达水平与对照样品中 c-MAF 基因的表达水平进行比较，

[0163] 其中如果所述肿瘤样品中 c-MAF 基因的表达水平相对于对照样品中 c-MAF 基因的表达水平增加，则所述受试者具有转移的阳性诊断或发展转移的最大倾向。

[0164] 在一些实施方案中，本发明涉及用于设计具有癌症的受试者的定制治疗的体外方法，其包括

[0165] (i) 使用本文所述的结合成员（例如，抗体）、其变体或片段定量所述受试者的肿瘤样品中的 c-MAF 基因表达水平，以及

[0166] (ii) 将 (i) 中获得的表达水平与对照样品中 c-MAF 基因的表达水平进行比较，

[0167] 其中如果表达水平相对于所述参考值增加，则所述受试者易于接受旨在预防和/或治疗转移的治疗。如果表达水平相对于所述参考值没有增加，则所述受试者不易于接受旨在预防和/或治疗转移的治疗。在一些实施方案中，样品是肿瘤衍生的样品，包括：肿瘤样品，循环肿瘤样品，循环肿瘤DNA或肿瘤衍生的外排体。

[0168] 在一些实施方案中，本发明涉及用于设计患有具有转移的癌症的受试者的定制治疗的体外方法，其包括

[0169] (i) 使用本文所述的结合成员（例如抗体）、其变体或片段定量所述受试者的肿瘤组织样品中的 c-MAF 基因表达水平，以及

[0170] (ii) 将步骤 (i) 中获得的表达水平与对照样品中 c-MAF 基因的表达水平进行比较，

[0171] 其中如果相对于对照样品中的 c-MAF 基因的表达水平，肿瘤组织样品中的 c-MAF 基因表达水平增加，则所述受试者易于接受旨在预防或抑制骨转移和降解的治疗。如果表达水平相对于所述参考值没有增加，则所述受试者不易于接受旨在预防和/或治疗骨转移和降解的治疗。

[0172] 在一些实施方案中，本发明涉及用于设计患有具有转移的癌症的受试者的定制治疗的体外方法，其包括

[0173] (i) 使用本文所述的结合成员（例如抗体）、其变体或片段定量所述受试者的骨转移性肿瘤组织样品中的 c-MAF 基因表达水平，以及

[0174] (ii) 将步骤 (i) 中获得的表达水平与对照样品中 c-MAF 基因的表达水平进行比较，

[0175] 其中如果相对于对照样品中的 c-MAF 基因的表达水平，肿瘤组织样品中的 c-MAF 基因表达水平增加，则所述受试者易于接受旨在预防或抑制骨降解的治疗。如果表达水平相对于所述参考值没有增加，则所述受试者不易于接受旨在预防和/或治疗骨降解的治疗。

[0176] 在一些实施方案中，本发明涉及用于分型患有癌症的受试者的样品的体外方法，所述方法包括：

[0177] a) 从所述受试者提供样品；

[0178] b) 使用本文所述的结合成员（例如抗体）、其变体或片段定量所述样品中 c-MAF 的表达水平；和，

[0179] c) 通过将 c-MAF 的量化表达水平与 c-MAF 表达的预定参考水平进行比较来对所述样品进行分型；

[0180] 其中所述分型提供与所述受试者的骨转移风险相关的预后信息。

[0181] 在另一方面，本发明涉及用于确定患有癌症的受试者的转移风险的体外方法，其包括使用本文所述的结合成员确定所述受试者的样品中 c-MAF 基因的表达水平。

[0182] 在优选的实施方案中,转移是骨转移。在一个实施方案中,高于平均值的所述基因的表达水平加上一个标准偏差表明早期骨转移的风险增加。

[0183] 在优选的实施方案中,骨转移是非常早期的骨转移。

[0184] 在优选的实施方案中,骨转移是溶骨性转移。

[0185] 如本文所用的“早期骨转移”涉及在乳腺癌患者手术后5年前出现的骨转移。

[0186] 如本文所用,“非常早期的骨转移”涉及在乳腺癌患者手术后3年前出现的骨转移。

[0187] 在一些实施方案中,本发明涉及用于预防,抑制或降低患有癌症的受试者的转移风险的方法,所述方法包括向所述受试者施用本文所述的结合成员(例如抗体)、其变体或片段。在一些实施方案中,转移是骨转移。

[0188] 在一些实施方案中,癌症选自:乳腺癌,肺癌,前列腺癌和肾细胞癌。在一些实施方案中,乳腺癌选自:HER2+乳腺癌,ER+乳腺癌和三阴性乳腺癌。

[0189] 因此,本发明提供了治疗或诊断c-MAF相关病症的方法。在一些实施方案中,本发明提供了治疗c-MAF相关病症的方法,该方法包括向有需要的患者施用有效量的单独的本发明的一种或多种结合成员(例如抗体)或与本领域已知的或本文所述的另一种合适的药物构成组合治疗方案的本发明的一种或多种结合成员(例如抗体)。

[0190] 如现有技术中已知的,对患有癌症的受试者施用的治疗取决于癌症是否是恶性肿瘤,即其是否具有经历转移的高可能性,或者癌症是否为良性肿瘤。在第一个假设中,选择的治疗是诸如化疗的全身治疗,而在第二个假设中,治疗选择是局部治疗如放射治疗。

[0191] 因此,如本发明所述,由于c-MAF基因在癌细胞中的过表达与转移(例如骨转移)的存在有关,所以c-MAF基因的表达水平对于在患有所述癌症的受试者最合适的治疗方面作出决定是有用的。

[0192] 在一个具体实施方案中,转移是骨转移。在一些实施方案中,骨转移是溶骨性转移。

[0193] 在一个实施方案中,本发明包括在患有癌症的受试者的样品中定量c-MAF基因表达水平的第一步。在优选的实施方案中,样品是肿瘤组织样品。

[0194] 在另一个具体实施方案中,该方法包括仅将c-MAF基因表达水平定量为单个标志物,即该方法不涉及确定任何另外的标志物的表达水平。

[0195] 在特定实施方案中,样品可以是受试者的原发性肿瘤组织样品。

[0196] 在一个实施方案中,将在受试者的肿瘤样品中获得的c-MAF基因表达水平与参考值进行比较。在优选的实施方案中,参考值是对照样品中所述基因的c-MAF基因表达水平。c-MAF基因表达水平的测定必须与对照样品或参考样品的值相关。取决于要分析的肿瘤类型,对照样品的确切性质可能会有所不同。因此,优选地,参考样品是具有未转移或对应于在来自没有转移的癌症受试者的活检样品中的肿瘤组织收集中测量的c-MAF基因表达水平的中值的癌症的受试者的样品。

[0197] 在使用本文公开的结合成员测量了样品中的c-MAF基因表达水平并与参考值进行比较后,如果所述基因的表达水平相对于参考值增加,则其可以推断所述受试者易于接受治疗或不接受旨在预防(如果受试者尚未经历转移)和/或治疗转移或不预防和/或治疗转移(如果受试者已经经历转移)的治疗。

[0198] 当检测到具有或不具有转移的原发性癌症或其已转移时,可以使用包括但不限于

化疗、激素治疗、免疫治疗或其组合的全身治疗。另外,可以使用放射治疗和/或手术。治疗的选择通常取决于原发性癌症的类型,尺寸,转移的位置,年龄,患者的一般健康状况以及之前使用的治疗类型。

[0199] 全身治疗是达到整个身体并且可以代表旨在预防或抑制(如果受试者尚未经历转移)和/或治疗转移(如果受试者已经经历转移)的治疗方法的治疗,例如:

[0200] -化疗是使用药物来破坏癌细胞。药物通常通过口服或静脉内途径施用。有时,化疗与放射治疗一起使用。乳腺癌的合适化疗方案包括但不限于蒽环类(多柔比星,表柔比星,聚乙二醇化脂质体多柔比星),紫杉烷(紫杉醇,多西他赛,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(长春瑞滨,长春花碱),吉西他滨,铂盐(顺铂,卡铂),环磷酰胺,依托泊苷和上述一种或多种的组合,如环磷酰胺/蒽环霉素+/-5-氟尿嘧啶方案(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/甲氧雷布酯/5-氟尿嘧啶(CMF),蒽环类/紫杉烷类(如多柔比星/紫杉醇或多柔比星/多西他赛),多西他赛/卡培他滨,吉西他滨/紫杉醇,紫杉烷/铂方案(如紫杉醇/卡铂或多西他赛/卡铂)。

[0201] -免疫治疗是一种帮助患者免疫系统本身抵抗癌症的治疗方法。有几种类型的免疫治疗用于治疗患者的转移。这些包括但不限于细胞因子,单克隆抗体和抗肿瘤疫苗。

[0202] 另一方面,治疗是阿法拉丁(二氯化镭-223)。阿拉法丁使用镭-223衰变的 α 辐射杀死癌细胞。镭-223由于其作为钙模拟物的性质天然地自身靶向骨转移。 α 辐射具有2-10个细胞的非常短的范围(与当前基于 β 或 γ 辐射的放射治疗相比),因此对周围的健康组织(特别是骨髓)的损伤较少。与钙具有相似的性质,镭-223被吸引到使用钙在体内构建骨骼的位置,包括更快的异常骨生长(例如在具有晚期、去势难治性前列腺癌的男性的骨骼转移中所见的)的位点。注射后镭-223在血液中被运载至异常骨生长部位。癌症在体内开始的地方被称为原发性肿瘤。这些细胞中的一些可能会脱落,并在血液中被运载到身体的另一部分。癌细胞然后可以沉淀在身体的那部分并形成新的肿瘤。如果发生这种情况,它被称为继发性癌症或转移瘤。大多数患有晚期前列腺癌的患者遭受在其骨骼中的最大的疾病负担。镭-223的目的是选择性地靶向这种继发性癌症。未被骨骼吸收的任何镭-223被迅速传递到肠道并排泄。

[0203] 另一方面,治疗是mTor抑制剂。在某些方面,mTor抑制剂是双重mTor/PI3激酶抑制剂。在某些方面,mTor抑制剂用于预防或抑制转移。在一些方面,mTor抑制剂选自: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),Aflein with Gleevec,AS703026(pimasertib),Axxess(鸢尾霉素),AZD2014,BEZ235,Biofreedom(umirolimus),BioMatrix(umirolimus),BioMatrix flex(umirolimus),CC115,CC223,Combo Bio-engineered西罗莫司洗脱支架ORBUSNEICH(西罗莫司),Curaxin CBLC102(mepacrine),DE109(西罗莫司)DS3078,Endeavour DES(zotarolimus),Endeavour Resolute(zotarolimus),Femara(来曲唑),Hocena(antroquinonol),INK128,Inspiron(西罗莫司),IPI504(盐酸retaspimycin),KRN951(tivozanib),ME344,MGA031(teplizumab),MiStent SES(西罗莫司),MKC1,Nobori(喔罗莫司),OSI027,0VI123(cordycepin),Palomid 529,PF04691502,Promus Element(依维莫司)

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(ridaf奥立莫司),特罗凯(替罗非尼),托西塞尔(替西罗莫司),Xience Prime(依维莫司),Xience V(依维莫司),Zomaxx(zotarolimus),Zortress(依维莫司),Zotarolimus洗脱外周支架MEDTRONIC(zotarolimus),AP23841,AP24170,ARmTOR26,BN107,BN108,Canstatin GENZYME(canstatin),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,V_LI27,VS5584,WYE125132,XL388,Advacan依西莫司),AZD8055,Cypher Select Plus西罗莫司洗脱冠状动脉支架(西罗莫司),Cypher Sirolimus洗脱冠状动脉支架(西罗莫司),药物包衣气囊(西罗莫司),E-Magic Plus(西罗莫司),Emtor(西罗莫司),Esprit(依维莫司)转铁蛋白(依维莫司),HBF0079,LCP-Siro(西罗莫司),Limus CLARIS(西罗莫司),mTOR抑制剂CELLZONE,Nevo Sirolimus洗脱冠状动脉支架(西罗莫司),nPT-mTOR,Rapacan(西罗莫司),Renacept(西罗莫司),ReZolve),Rocas(西罗莫司),SF1126,Sirolim(西罗莫司),Sirolim西罗莫司,西罗莫司,西罗莫司WATSON(西罗莫司)硅丙西林(西罗莫司),西罗莫司(Sirolimus),Supralimus(西罗莫司),Supralimus-Core(西罗莫司),他克莫司WATSON(他克莫司),TAFA93,(temsirolimus),Temsirolimus SANDOZ(temsirolimus),TOP216,Xience Prime(依维莫司),Xience V(依维莫司)。在特定方面,mTor抑制剂是Afinitor(依维莫司)(http://www.afinitor.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=4029462064338207963;最后访问11/28/2012)。另一方面,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,其通过引用并入本文)。另一方面,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,其通过引用并入本文)。在一些方面,mTor抑制剂用于治疗或预防或抑制对激素受体阳性的患者中的转移。(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)。在一些实施方案中,患者是ER+。在某些方面,mTor抑制剂用于治疗或预防或抑制晚期乳腺癌患者的转移。在一些方面,mTor抑制剂与第二种治疗组合使用。在一些方面,第二种治疗是本文所述的任何治疗。

[0204] 另一方面,治疗是Src激酶抑制剂。在某些方面,Src抑制剂用于预防或抑制转移。在一些方面,Src激酶抑制剂选自:AZD0530(塞卡替尼),Bosulif(博舒替尼),ENMD981693,KD020,KX01,Sprycel(达沙替尼),Yervoy(依匹木单抗),AP23464,AP23485,AP23588,AZD0424,c-Src激酶抑制剂KISSEI,CU201,KX2361,SKS927,SRN004,SUNK706,TG100435,TG100948,AP23451,Dasatinib HEATO(达沙替尼),Dasatinib VALEANT(达沙替尼),Fontrax(达沙替尼),Src激酶抑制剂KINEX,VX680,(托萨司他乳酸),XL228和SUNK706。在一些实施方案中,Src激酶抑制剂是达沙替尼。另一方面,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,其通过引用并入本文)。在一些方面,Src激酶抑制剂用于治疗或预防或抑制对SRC反应性标志(SRS)呈阳性的患者中的转

移。在某些方面，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, 其通过引用并入本文)。在一些方面，Src激酶抑制剂用于治疗或预防或抑制晚期乳腺癌患者的转移。在一些方面，Src激酶抑制剂与第二种治疗组合使用。在一些方面，第二种治疗是本文所述的任何治疗。

[0205] 在另一方面，治疗是COX-2抑制剂。在一些方面，COX-2抑制剂用于预防或抑制转移。在一些方面，COX-2抑制剂选自：ABT963, Acetaminophen 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, 荚普生钠) , BAY11902(吡罗昔康) , BCIBUCH001(布洛芬) , Capoxigem(阿利考昔) , CS502, CS670(培鲁比洛芬) , Diclofenac HPBCD(双氯芬酸) , Diractin(酮洛芬) , GW406381, HCT1026(硝基氟比洛芬) , Hyanalgese-D(双氯芬酸) , Hydrocodex(对乙酰氨基酚, 右美沙芬, 氢可酮) , Ibuprofen Sodium PFIZER(布洛芬钠) , Ibuprofen with Acetaminophen PFIZER(对乙酰氨基酚, 布洛芬) , Impracor(酮洛芬) , IP880(双氯芬酸) , IP940(吲哚美辛) , ISV205(双氯芬酸钠) , JNS013(对乙酰氨基酚, 盐酸曲马多) , Ketoprofen TDS(酮洛芬) , LTNS001(奈普生 etemesil) , Mesalamine SALIX(美沙拉嗪) , Mesalamine SOFAR(美沙拉嗪) , Mesalazine(美沙拉嗪) , ML3000(利克飞龙) , MRX7EAT(依托度酸) , Naproxen IROKO(奈普生) , 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) , Oradelese(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(奈普生, 磷脂酰胆碱) , PSD508, R-Ketoprofen(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(西米考昔) , V0498TA01A(布洛芬) , VT122(依托度酸, 普萘洛尔) , XP20B(对乙酰氨基酚, 右旋丙氧芬) , 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 Plus, Actifed-P, Acular, Acular LS, Acular PF, Acular X, Acuvail, Advil, Advil Allergy Sinus, Advil Cold and Sinus, Advil Congestion Relief, Advil PM, Advil PM Capsule, Air Salopas, Airtal, Alcohol-Free NyQuil Cold&Flu Relief, Aleve, Aleve ABDI IBRAHIM, Aleve-D, Alka-Seltzer, Alka-Seltzer BAYER, Alka-Seltzer Extra Strength, Alka-Seltzer Lemon-Lime, Alka-Seltzer Original, Alka-Seltzer Plus, Alka-Seltzer plus Cold and Cough, Alka-Seltzer plus Cold and Cough Formula, Alka-Seltzer Plus Day and Night Cold Formula,, Alka-Seltzer Plus Day Non-Drowsy Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Flu Formula, Alka-Seltzer Plus Night Cold Formula, Alka-Seltzer Plus Sinus Formula, Alka-Seltzer Plus Sparkling Original Cold Formula, Alka-Seltzer PM, Alka-Seltzer Wake-Up Call, Anacin, Anaprox, Anaprox MINERVA, Ansaid, Apitoxin, Apranax, Apranax abdi, Arcoxia, Arthritis Formula Bengay, Arthrotec, Asacol, Asacol HD, Asacol MEDUNA ARZNEIMITTEL, Asacol ORIFARM, Aspirin BAYER, Aspirin Complex, Aspirin Migran, AZD3582, Azulfidine, Baralgan M, BAY1019036, BAY987111, BAY11902, BCIBUCH001, Benadryl Allergy, Benadryl Day and Night, Benylin 4Flu, Benylin Cold and Flu, Benylin Cold and Flu Day and Night, Benylin Cold and

Sinus Day and Night,Benylin Cold and Sinus Plus,Benylin Day and Night Cold and Flu Relief,Benylin1 All-In-One,Brexin,Brexin ANGELINI,Bromday,Bufferin, Buscopan Plus,Caldolor,Calmate1,Cambia,Canasa,Capoxigem,Cataflam,Celebrex, Celebrex ORIFARM,Children' s Advil Allergy Sinus,Children' s Tylenol,Children' s Tylenol Cough and Runny Nose,Children' s Tylenol plus cold,Children' s Tylenol plus Cold and Cough,Children' s Tylenol plus cold and stuffy nose,Children' s Tylenol plus Flu,Children' s Tylenol plus cold&allergy,Children' s Tylenol plus Cough&Runny Nose,Children' s Tylenol plus Cough&Sore Throat,Children' s Tylenol plus multi symptom cold,Clinoril,Codral Cold and Flu,Codral Day and Night Day Tablets,Codral Day and Night Night Tablets,Codral Nightime,Colazal,Combunox, Contac Cold plus Flu,Contac Cold plus Flu Non-Drowsy,Coricidin D,Coricidin HBP Cold and Flu,Coricidin HBP Day and Night Multi-Symptom Cold,Coricidin HBP Maximum Strength Flu,Coricidin HBP Nighttime Multi-Symptom Cold,Coricidin II Extra Strength Cold and Flu,CS502,CS670,Daypro,Daypro Alta,DDS06C,Demazin Cold and Flu,Demazin Cough,Cold and Flu,Demazin day/night Cold and Flu, Demazin PE Cold and Flu,Demazin PE day/night Cold and Flu,Diclofenac HPBCD, Dimetapp Day Relief,Dimetapp Multi-Symptom Cold and Flu,Dimetapp Night Relief,Dimetapp Pain and Fever Relief,Dimetapp PE Sinus Pain,Dimetapp PE Sinus Pain plus Allergy,Dipentum,Diractin,Disprin Cold 'n' Fever,Disprin Extra, Disprin Forte,Disprin Plus,Dristan Cold,Dristan Junior,Drixoral Plus,Duexis, Dynastat,Efferalgan,Efferalgan Plus Vitamin C,Efferalgan Vitamin C,Elixsure IB,Excedrin Back and Body,Excedrin Migraine,Excedrin PM,Excedrin Sinus Headache,Excedrin Tension Headache,Falcol,Fansamac,Feldene,FeverAll,Fiorinal, Fiorinal with Codeine,Flanax,Flector Patch,Flucam,Fortagesic,Gerbin,Giazo, Gladio,Goody' s Back and Body Pain,Goody' s Cool Orange,Goody' s Extra Strength, Goody' s PM,Greaseless Bengay,GW406381,HCT1026,He Xing Yi,Hyanalgese-D, HydrocoDex,Ibuprofen Sodium PFIZER,Ibuprofen with,Acetaminophen PFIZER,Icy Hot SANOFI AVENTIS,Impracor,Indocin,Indomethacin APP PHARMA,Indomethacin MYLAN,Infants' Tylenol,IP880,IP940,Iremod,ISV205,JNS013,Jr.Tylenol,Junifen, Junior Strength Advil,Junior Strength Motrin,Ketoprofen TDS,Lemsip Max,Lemsip Max All in One,Lemsip Max All Night,Lemsip Max Cold and Flu,Lialda, Listerine Mouth Wash,Lloyds Cream,Lodine,Lorfit P,Loxonin,LTNS001,Mersyndol,Mesalamine SALIX,Mesalamine SOFAR,Mesalazine,Mesasal GLAXO,Mesasal SANOFI,Mesulid,Metsal Heat Rub,Midol Complete,Midol Extended Relief,Midol Liquid Gels,Midol PM, Midol Teen Formula,Migranin COATED TABLETS,ML3000,Mobic,Mohrus,Motrin,Motrin Cold and Sinus Pain,Motrin PM,Movalis ASPEN,MRX7EAT,Nalfon,Nalfon PEDINOL, Naprelan,Naprosyn,Naprosyn RPG LIFE SCIENCE,Naproxen IROKO,NCX4016,NCX701, NeoProfen LUNDBECK,Nevanac,Nexcede,Niflan,Norgesic MEDICIS,Novalgin,Nuprin SCOLR,Nurofen,Nurofen Cold and Flu,Nurofen Max Strength Migraine,Nurofen

Plus, Nuromol, NyQuil with Vitamin C, Ocufen, OMS103HP, Oralease, Orudis ABBOTT JAPAN, Oruvail, Osteluc, OxycoDex, P54, Panadol, Panadol Actifast, Paradine, Paramax, Parfenac, Pedea, Pennsaid, Pentasa, Pentasa ORIFARM, Peon, Percodan, Percodan-Demi, PercoDex, Percogesic, Perfalgan, PL2200, PL3100, Ponstel, Prexige, Prolensa, PSD508, R-Ketoprofen, Rantudil, Relafen, Remura, Robaxisal, Rotec, Rowasa, ROX828, RP19583, RQ00317076, Rubor, Salofalk, Salonpas, Saridon, SDX101, Seltouch, sfRowasa, Shinbaro, Sinumax, Sinutab, Sinutab, 窝, Spalt, Sprix, Strefen, Sudafed Cold and Cough, Sudafed Head Cold and Sinus, Sudafed PE Cold plus Cough, Sudafed PE Pressure plus Pain, Sudafed PE, Severe Cold, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Day Tablets, Sudafed PE Sinus Day plus Night Relief Night Tablets, Sudafed PE Sinus plus Anti-inflammatory Pain Relief, Sudafed Sinus Advance, Surgam, Synalgos-DC, Synflex, Tavist allergy/sinus/headache, TDS943, TDT070, Theraflu Cold and Sore Throat, Theraflu Daytime Severe Cold and Cough, Theraflu Daytime Warming Relief, Theraflu Warming Relief Caplets Daytime Multi-Symptom Cold, Theraflu Warming Relief Cold and Chest Congestion, Thomapyrin, Thomapyrin C, Thomapyrin Effervescent, Thomapyrin Medium, Tilcotil, Tispol, Tolectin, Toradol, TPR100, TQ1011, Trauma-Salbe, Trauma-Salbe Kwizza, Treo, Treximet, Trovex, TT063, Tylenol, Tylenol Allergy Multi-Symptom, Tylenol Back Pain, Tylenol Cold&Cough Daytime, Tylenol Cold&Cough Nighttime, Tylenol Cold and Sinus Daytime, Tylenol Cold and Sinus Nighttime, Tylenol Cold Head Congestion Severe, Tylenol Cold Multi Symptom Daytime, Tylenol Cold Multi Symptom Nighttime Liquid, Tylenol Cold Multi Symptom Severe, Tylenol Cold Non-Drowsiness Formula, Tylenol Cold Severe Congestion Daytime, Tylenol Complete Cold, Cough and Flu Night time, Tylenol Flu Nighttime, Tylenol Menstrual, Tylenol PM, Tylenol Sinus Congestion&Pain Daytime, Tylenol Sinus Congestion&Pain Nighttime, Tylenol Sinus Congestion&Pain Severe, Tylenol Sinus Severe Congestion Daytime, Tylenol Ultra Relief, Tylenol with Caffeine and Codeine phosphate, Tylenol with Codeine phosphate, Ultra Strength Bengay Cream, Ultracet, UR8880, V0498TA01A, Vicks NyQuil Cold and Flu Relief, Vicoprofen, Vimovo, Voltaren Emulgel, Voltaren GEL, Voltaren NOVARTIS CONSUMER HEALTH GMBH, Voltaren XR, VT122, Xefo, Xefo Rapid, Xefocam, Xibrom, XL3, Xodol, XP20B, XP21B, XP21L, Zipsor 和 Zoenasa。在另一方面,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, 其通过引用并入本文)。在一些方面,COX-2抑制剂用于治疗或预防或抑制患有晚期乳腺癌的患者中的转移。在一些方面,COX-2抑制剂用于与第二治疗组合。在一些方面,第二治疗是本文所述的任意治疗。在一些方面,COX-2抑制剂用于与选自以下的第二治疗组合:地诺单抗、Zometa (http://www.us.zometa.com/index.jsp?usertrack.filter_applied=true&NovaId=2935376934467633633; 最后访问12/2/2012)、Carbozantinib或Cabozantinib(卡博替尼)、阻断PTHLH(甲状旁腺激素样激素)或PTHrP(甲状旁腺激素相关蛋白)的抗体或肽以及依维

莫司。

[0206] 在另一方面,用于避免和/或预防骨降解的治疗剂包括但不限于:

[0207] - 甲状旁腺激素(PTH)和甲状旁腺样激素(PTHLH)抑制剂(包括阻断抗体)或其重组形式(对应于PTH的氨基酸7-34的特立帕肽)。该激素通过刺激破骨细胞并增加其活性来起作用。

[0208] -雷奈酸锶:是一种替代性口服治疗药物,由于它们刺激成骨细胞增殖并抑制破骨细胞增殖,因此形成称为“双重作用骨代谢剂”(DABA)的药物组的一部分。

[0209] -“雌激素受体调节剂”(SERM)是指干扰或抑制雌激素与受体结合的化合物,不管其机制如何。雌激素受体调节剂的实例包括雌激素孕激素,雌二醇,屈洛昔芬,雷洛昔芬,拉索昔芬,TSE-424,他莫昔芬,异昔芬,L Y353381,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-2,4-二硝基苯腙和SH646。

[0210] -降钙素:通过降钙素受体直接抑制破骨细胞活性。已经在破骨细胞的表面鉴定了降钙素受体。

[0211] -双膦酸盐:是一组药物用于预防和治疗骨吸收和再吸收疾病如骨质疏松症和骨转移癌症,后者具有或不具有高钙血症且与乳腺癌和前列腺癌相关。可用于通过本发明第五种方法设计的治疗方法中的双膦酸盐的实例包括但不限于含氮双膦酸盐(例如帕米膦酸盐,奈奈膦酸盐,奥帕膦酸盐,阿仑膦酸盐,伊班膦酸盐,利塞膦酸盐,伊铂膦酸盐,唑来膦酸盐或唑来膦酸等)和非含氮双膦酸盐(如依替膦酸盐,氯膦酸盐,替鲁膦酸盐等)。

[0212] -“组织蛋白酶K抑制剂”是指干扰组织蛋白酶K半胱氨酸蛋白酶活性的化合物。组织蛋白酶K抑制剂的非限制性实例包括4-氨基-嘧啶-2-甲腈衍生物(申请人为Novartis Pharma GMBH的国际专利申请WO 03/020278中描述的),在公开号WO 03/020721(Novartis Pharma GMBH)和公开号WO 04/000843(ASTRAZENECA AB)中描述的吡咯并-嘧啶以及Axys Pharmaceuticals的公开号PCT WO 00/55126、Merck Frosst Canada&Co.和Axys Pharmaceuticals的WO 01/49288中描述的抑制剂。

[0213] -本文所用的“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是主要在成人骨中表达并且在溶骨性病变的骨髓瘤患者中上调的可溶性Wnt通路拮抗剂。靶向DKK-1的药物可能在预防多发性骨髓瘤患者中的溶骨性骨病中发挥作用。来自诺华公司的BHQ880是一流的、完全人类的抗DKK-1中和抗体。临床前研究支持BHQ880促进骨形成并因此抑制肿瘤诱导的溶骨性疾病假说(Ettenberg S. et al., American Association for Cancer Research Annual Meeting. April 12-16, 2008; San Diego, Calif. Abstract)。

[0214] -本文所用的“双MET和VEGFR2抑制剂”是指其是设计为阻断MET驱动的肿瘤逃逸的MET和VEGF途径的有效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(骨形成细胞)和破骨细胞(骨去除细胞)中表达。HGF与所有这些细胞类型上的MET结合,使得MET途径在多种自分泌和旁分泌环路中起重要作用。在肿瘤细胞中激活MET似乎在建立转移性骨病变中是重要的。同时,成骨细胞和破骨细胞中MET途径的激活可能导致骨转移的病理特征,包括异常的骨生长(即变形性损伤)或破坏(即溶解性损伤),因此靶向MET途径可能是预防转移性骨损伤的建立和进展的可行策略。卡博替尼(Exelixis,

Inc),以前称为XL184(CAS 849217-68-1)是MET和VEGF途径的有效双重抑制剂,被设计为阻断MET驱动的肿瘤逃逸。在多种临床前研究中,卡博替尼已显示能够杀死肿瘤细胞,减少转移和抑制血管生成(形成支持肿瘤生长所需的新血管)。另一种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)。

[0215] -本文所用的“RANKL抑制剂”是指能够降低RANK活性的任何化合物。RANKL在基质和T淋巴细胞的成骨细胞膜的表面上发现,这些T淋巴细胞是唯一表现出分泌能力的T淋巴细胞。其主要功能是活化破骨细胞(参与骨吸收的细胞)。RANKL抑制剂可以通过阻断RANKL与其受体(RANK)的结合,阻断RANK介导的信号传导或通过阻断RANKL的转录或翻译降低RANKL的表达来起作用。适用于本发明的RANKL拮抗剂或抑制剂包括但不限于:

[0216] ○能够结合RANKL并且包含RANK蛋白的细胞外结构域的整个或片段的合适的RANK蛋白。可溶性RANK可以包含信号肽和鼠或人RANK多肽的细胞外结构域,或者可以使用去除了信号肽的蛋白质的成熟形式。

[0217] ○具有结合RANKL能力的护骨因子或其变体。

[0218] ○RANKL特异性反义分子

[0219] ○能够加工RANKL的转录产物的核酶

[0220] ○特异性抗RANKL抗体。“抗RANKL抗体或针对RANKL的抗体”在本文中被理解为能够特异性结合抑制一种或多种RANKL功能的核因子κB的激活受体(RANKL)的配体的所有抗体。可以使用本领域技术人员已知的任何方法来制备抗体。因此,通过用待抑制的蛋白质免疫动物来制备多克隆抗体。使用由Kohler,Milstein et al.(Nature,1975,256:495)所述的方法制备单克隆抗体。在本发明的情况下适用的抗体包括完整抗体,其包含可变抗原结合区和恒定区、片段“Fab”,“F(ab')2”和“Fab`”,Fv,scFv、双抗体和双特异性抗体。

[0221] ○特异性抗RANKL纳米抗体。纳米抗体是抗体衍生的治疗性蛋白质,其含有天然存在的重链抗体的独特结构和功能特性。最初根据骆驼科动物(骆驼和美洲驼)具有缺乏轻链的全功能抗体的发现开发出纳米抗体技术。纳米抗体的一般结构是

[0222] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0223] 其中FR1至FR4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可变结构域(VHH)和两个恒定结构域(CH2和CH3)。重要的是,克隆和分离的VHH结构域是具有原始重链抗体的完全抗原结合能力的完全稳定的多肽。这些新发现的具有独特结构和功能特性的VHH结构域构成了新一代治疗性抗体的基础,Ablynx已经命名为纳米抗体。

[0224] 在一个实施方案中,RANKL抑制剂选自RANKL特异性抗体,RANKL特异性纳米抗体和护骨因子。在具体实施方案中,抗RANKL抗体是单克隆抗体。在更具体的实施方案中,抗RANKL抗体是地诺单抗(Pageau,Steven C.(2009).mAbs 1 (3):210-215,CAS号615258-40-7)(其全部内容通过引用整体并入本文)。地诺单抗是一种完全人单克隆抗体,其结合RANKL并阻止其活化(其不结合RANK受体)。地诺单抗的各个方面由美国专利号6,740,522;7411050;7097834;7,364,736(其全部内容通过引用整体并入本文)覆盖。在另一个实施方案中,RANKL抑制剂是结合与地诺单抗相同表位的抗体、抗体片段或融合构建体。

[0225] 在优选实施方案中,抗RANKL纳米抗体是如W02008142164(其内容通过引用并入本

申请)中所述的任意纳米抗体。在更优选的实施方案中,抗RANKL抗体是ALX-0141 (Ablynx)。ALX-0141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丢失,并恢复健康骨代谢的平衡。

[0226] 在优选实施方案中,预防骨降解的试剂选自双膦酸盐,RANKL抑制剂,PTH和PTHLH抑制剂或PRG类似物,雷奈酸锶,DKK-1抑制剂,双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抑制剂。在更优选的实施方案中,预防骨降解的试剂是双膦酸盐。在又一个更优选的实施方案中,双膦酸盐是唑来膦酸。

[0227] 在一个实施方案中,施用CCR5拮抗剂以预防或抑制原发性乳腺癌肿瘤转移至骨。在一个实施方案中,CCR5拮抗剂是大分子。在另一个实施方案中,CCR5拮抗剂是小分子。在一些实施方案中,CCR5拮抗剂是Maraviroc (Velasco-Veláquez, 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,CCR5拮抗剂是Vicriviroc (Velasco-Veláquez, M. et al. 2012. CCR5Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research.* 72:3839-3850.)。在一些方面,CCR5拮抗剂是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,CCR5拮抗剂是螺哌啶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,CCR5拮抗剂是INCB009471 (Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 4 (2): 82-7)。

[0228] 在优选的实施方案中,双重MET和VEGFR2抑制剂选自卡博替尼,Foretinib和E7050。

[0229] 在优选的实施方案中,镭223疗法是阿拉法丁。

[0230] 或者,可以进行组合治疗,其中将多于一种来自上述药物的药剂组合以治疗和/或预防转移,或所述药剂可与其它补充剂如钙或维生素D或与激素治疗组合。

[0231] 在测量样品中的c-MAF基因表达水平并与参考值(例如,对照样品的c-MAF基因表达水平)进行比较后,如果所述基因的表达水平相对于参考值增加,则这表明所述受试者易于接受旨在避免或预防骨降解的治疗。

[0232] 用于避免和/或预防骨降解的药剂的示例性实例包括但不限于:

[0233] -甲状腺激素(PTH)和甲状旁腺样激素(PTHLH)抑制剂(包括阻断抗体)或其重组形式(对应于PTH的氨基酸7-34的特立帕肽)。该激素通过刺激破骨细胞并增加其活性来起作用。

[0234] -雷奈酸锶:是一种替代性口服治疗药物,由于它们刺激成骨细胞增殖并抑制破骨细胞增殖,因此形成称为“双重作用骨代谢剂”(DABA)的药物组合的一部分。

[0235] -“雌激素受体调节剂”(SERM)是指干扰或抑制雌激素与受体结合的化合物,不管其机制如何。雌激素受体调节剂的实例包括雌激素孕激素,雌二醇,屈洛昔芬,雷洛昔芬,拉索昔芬,TSE-424,他莫昔芬,异昔芬,L Y353381,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-2,4-二硝基苯腙和SH646。

[0236] -降钙素:通过降钙素受体直接抑制破骨细胞活性。已经在破骨细胞的表面鉴定了降钙素受体。

[0237] -双膦酸盐:是一组用于预防和治疗骨吸收和再吸收疾病如骨质疏松症和骨转移的癌症的药物,后者与乳腺癌和前列腺癌相关的患有高钙血症。可用于通过本发明第五种方法设计的治疗方法中的双膦酸盐的实例包括但不限于含氮双膦酸盐(例如帕米膦酸盐,奈奈膦酸盐,奥帕膦酸盐,阿仑膦酸盐,伊班膦酸盐,利塞膦酸盐,伊铂膦酸盐,唑来膦酸盐或唑来膦酸等)和非含氮双膦酸盐(如依替膦酸盐,氯膦酸盐,替鲁膦酸盐等)。

[0238] -阿拉法丁(二氯镭-223)。阿拉法丁使用镭-223衰变的 α 辐射杀死癌细胞。镭-223由于其作为钙模拟物的性质天然地自身靶向骨转移。 α 辐射具有2-10个细胞的非常短的范围(与当前基于 β 或 γ 辐射的放射治疗相比),因此对周围的健康组织(特别是骨髓)的损伤较少。与钙具有相似的性质,镭-223被吸引到使用钙在体内构建骨骼的位置,包括更快的异常骨生长(例如在具有晚期、去势难治性前列腺癌的男性的骨骼转移中所见的)的位点。注射后镭-223在血液中被运载至异常骨生长部位。癌症在体内开始的地方被称为原发性肿瘤。这些细胞中的一些可能会脱落,并在血液中被运载到身体的另一部分。癌细胞然后可以沉淀在身体的那部分并形成新的肿瘤。如果发生这种情况,它被称为继发性癌症或转移瘤。大多数患有晚期前列腺癌的患者遭受在其骨骼中的最大的疾病负担。镭-223的目的是选择性地靶向这种继发性癌症。未被骨骼吸收的任何镭-223被迅速传递到肠道并排泄。

[0239] -“组织蛋白酶K抑制剂”是指干扰组织蛋白酶K半胱氨酸蛋白酶活性的化合物。组织蛋白酶K抑制剂的非限制性实例包括4-氨基-嘧啶-2-甲腈衍生物(申请人为Novartis Pharma GMBH的国际专利申请W0 03/020278中描述的),在公开号W0 03/020721(Novartis Pharma GMBH)和公开号W0 04/000843(ASTRAZENECA AB)中描述的吡咯并-嘧啶以及Axys Pharmaceuticals的公开号PCT WO 00/55126、Merck Frosst Canada&Co.和Axys Pharmaceuticals的WO 01/49288中描述的抑制剂。

[0240] -本文所用的“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是主要在成人骨中表达并且在溶骨性病变的骨髓瘤患者中上调的可溶性Wnt通路拮抗剂。靶向DKK-1的药物可能在预防多发性骨髓瘤患者中的溶骨性骨病中发挥作用。来自诺华公司的BHQ880是一流的、完全人类的抗DKK-1中和抗体。临床前研究支持BHQ880促进骨形成并因此抑制肿瘤诱导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)。

[0241] -本文所用的“双MET和VEGFR2抑制剂”是指其是设计为阻断MET驱动的肿瘤逃逸的MET和VEGF途径的有效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(骨形成细胞)和破骨细胞(骨去除细胞)中表达。HGF与所有这些细胞类型上的MET结合,使得MET途径在多种自分泌和旁分泌环路中起重要作用。在肿瘤细胞中激活MET似乎在建立转移性骨病变中是重要的。同时,成骨细胞和破骨细胞中MET途径的激活可能导致骨转移的病理特征,包括异常的骨生长(即变形性损伤)或破坏(即溶解性损伤),因此靶向MET途径可能是预防转移性骨损伤的建立和进展的可行策略。卡博替尼(Exelixis, Inc),以前称为XL184(CAS 849217-68-1)是MET和VEGF途径的有效双重抑制剂,被设计为阻断MET驱动的肿瘤逃逸。在多种临床前研究中,卡博替尼已显示能够杀死肿瘤细胞,减少转

移和抑制血管生成(形成支持肿瘤生长所需的新血管)。另一种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]羧基氨基吡啶-4-基)氧基]苯基)-N'-(4-氟苯基)环丙烷-1,1-二酰胺(2R,3R)-酒石酸盐)(CAS 928037-13-2)或Foretinib(也称为GSK1363089、XL880、CAS 849217-64-7)。

[0242] -本文所用的“RANKL抑制剂”是指能够降低RANK活性的任何化合物。RANKL在基质和T淋巴细胞的成骨细胞膜的表面上发现,这些T淋巴细胞是唯一表现出分泌能力的T淋巴细胞。其主要功能是活化破骨细胞(参与骨吸收的细胞)。RANKL抑制剂可以通过阻断RANKL与其受体(RANK)的结合,阻断RANK介导的信号传导或通过阻断RANKL的转录或翻译降低RANKL的表达来起作用。适用于本发明的RANKL拮抗剂或抑制剂包括但不限于:

[0243] ○能够结合RANKL并且包含RANK蛋白的细胞外结构域的整个或片段的合适的RANK蛋白。可溶性RANK可以包含信号肽和鼠或人RANK多肽的细胞外结构域,或者可以使用去除了信号肽的蛋白质的成熟形式。

[0244] ○具有结合RANKL能力的护骨因子或其变体。

[0245] ○RANKL特异性反义分子

[0246] ○能够加工RANKL的转录产物的核酶

[0247] ○特异性抗RANKL抗体。“抗RANKL抗体或针对RANKL的抗体”在本文中被理解为能够特异性结合抑制一种或多种RANKL功能的核因子κB的激活受体(RANKL)的配体的所有抗体。可以使用本领域技术人员已知的任何方法来制备抗体。因此,通过用待抑制的蛋白质免疫动物来制备多克隆抗体。使用由Kohler, Milstein et al. (Nature, 1975, 256:495)所述的方法制备单克隆抗体。在本发明的情况下适用的抗体包括完整抗体,其包含可变抗原结合区和恒定区、片段“Fab”,“F(ab')2”和“Fab`”,Fv, scFv、双抗体和双特异性抗体。

[0248] ○特异性抗RANKL纳米抗体。纳米抗体是抗体衍生的治疗性蛋白质,其含有天然存在的重链抗体的独特结构和功能特性。最初根据骆驼科动物(骆驼和美洲驼)具有缺乏轻链的全功能抗体的发现开发出纳米抗体技术。纳米抗体的一般结构是

[0249] FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0250] 其中FR1至FR4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可变结构域(VHH)和两个恒定结构域(CH2和CH3)。重要的是,克隆和分离的VHH结构域是具有原始重链抗体的完全抗原结合能力的完全稳定的多肽。这些新发现的具有独特结构和功能特性的VHH结构域构成了新一代治疗性抗体的基础,Ablynx已经命名为纳米抗体。

[0251] 在一个实施方案中,RANKL抑制剂选自RANKL特异性抗体,RANKL特异性纳米抗体和护骨因子。在具体实施方案中,抗RANKL抗体是单克隆抗体。在更具体的实施方案中,抗RANKL抗体是地诺单抗(Pageau, Steven C. (2009). mAbs 1 (3) :210-215,CAS号615258-40-7)(其全部内容通过引用整体并入本文)。地诺单抗是一种完全人单克隆抗体,其结合RANKL并阻止其活化(其不结合RANK受体)。地诺单抗的各个方面由美国专利号6,740,522;7411050;7097834;7,364,736(其全部内容通过引用整体并入本文)覆盖。在另一个实施方案中,RANKL抑制剂是结合与地诺单抗相同表位的抗体、抗体片段或融合构建体。

[0252] 在优选实施方案中,抗RANKL纳米抗体是如W02008142164(其内容通过引用并入本申请)中所述的任意纳米抗体。在更优选的实施方案中,抗RANKL抗体是ALX-0141(Ablynx)。ALX-0141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丢

失，并恢复健康骨代谢的平衡。

[0253] 在优选实施方案中，预防骨降解的试剂选自双膦酸盐，RANKL抑制剂，PTH和PTHLH抑制剂或PRG类似物，雷奈酸锶，DKK-1抑制剂，双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抑制剂。在更优选的实施方案中，预防骨降解的试剂是双膦酸盐。在又一个更优选的实施方案中，双膦酸盐是唑来膦酸。

[0254] 在一个实施方案中，施用CCR5拮抗剂以预防或抑制原发性乳腺癌肿瘤转移至骨。在一个实施方案中，CCR5拮抗剂是大分子。在另一个实施方案中，CCR5拮抗剂是小分子。在一些实施方案中，CCR5拮抗剂是Maraviroc (Velasco-Veláquez, 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，CCR5拮抗剂是Vicriviroc (Velasco-Veláquez, M. et al. 2012. CCR5Antagonist Blocks Metastasis of Basal Breast Cancer Cells. *Cancer Research.* 72:3839-3850.)。在一些方面，CCR5拮抗剂是Aplavirroc (Demarest J.F. et al. 2005. Update on Aplavirroc: An HIV Entry Inhibitor Targeting CCR5. *Retrovirology* 2 (Suppl.1) :S13)。在一些方面，CCR5拮抗剂是螺哌啶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，CCR5拮抗剂是INCB009471 (Kuritzkes, D.R. 2009. HIV-1entry inhibitors: an overview. *Curr. Opin. HIV AIDS.* 4 (2) :82-7)。

[0255] 在优选的实施方案中，双重MET和VEGFR2抑制剂选自卡博替尼，Foretinib和E7050。

[0256] 在优选的实施方案中，镭223疗法是阿拉法丁。

[0257] 本发明的另一方面涉及分离的“反义”核酸用于抑制表达，例如用于抑制编码其活性待被抑制的c-MAF的核酸的转录和/或翻译。反义核酸可以通过常规碱基互补性或例如在结合双链DNA的情况下通过双螺旋的大凹槽中的特异性相互作用结合到药物的潜在靶标上。通常，这些方法是指本领域通常使用的一系列技术，它们包括基于与寡核苷酸序列的特异性结合的任何方法。

[0258] 小干扰RNA或siRNA是能够通过RNA干扰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。通常，siRNA由15至40个核苷酸长的双链RNA组成，并且可含有1至6个核苷酸的3' 和/或5' 突出区域。突出区域的长度与siRNA分子的总长度无关。siRNA通过在转录后降解或沉默靶信使来起作用。

[0259] 本发明的siRNA与c-MAF编码基因的mRNA或编码所述蛋白质的基因序列基本上同源。“基本上同源”被理解为具有与靶mRNA足够互补或相似的序列，使得siRNA能够通过RNA干扰降解靶mRNA。适于引起所述干扰的siRNA包括由RNA形成的siRNA，以及含有不同化学修饰的siRNA，例如：

[0260] - siRNA，其中核苷酸之间的键不同于天然出现的键，例如硫代磷酸酯键。

[0261] - RNA链与功能试剂如荧光团的缀合物。

[0262] - 通过在2'位置使用不同羟基官能团的修饰来修饰RNA链的末端，特别是3'末端。

[0263] - 在2'-位上具有修饰的糖例如O-烷基化残基的核苷酸，如2'-O-甲基核糖或2'-O-氟代核糖。

[0264] -具有修饰的碱基的核苷酸,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)。

[0265] 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酶包含反义和核酶技术的一些机械特征。DNA酶被设计成使得它们识别与反义寡核苷酸相似的特定靶核酸序列,但是与核酶一样,它们是催化性的并且特异性切割靶核酸。

[0266] 也可以使用设计用于催化切割靶mRNA转录产物以防止编码其活性被抑制的c-MAF的mRNA的翻译的核酶分子。核酶是能够催化特异性RNA切割的酶促RNA分子(综述参见Rossi, Current Biology 4:469-471, 1994)。核酶作用的机制涉及核酶分子序列与互补靶RNA的特异性杂交,随后是内切核苷酸切割事件。核酶分子的组成优选包括与靶mRNA互补的一个或多个序列和负责切割mRNA或功能等同序列的公知序列(参见例如美国专利号5093246)。

[0267] 在一个实施方案中,使用以下公开的任何c-MAF抑制剂、反义寡核苷酸、siRNA、DNA酶、核酶、抑制性抗体、抑制肽、负显性c-MAF或其它c-MAF抑制分子治疗受试者:国际申请号PCT/IB2013/001204和美国专利申请号13/878,114和13/878,114(三阴性乳腺癌和ER+乳腺癌),国际申请号PCT/US2014/026154(肾细胞癌),国际申请号PCT/US2014/028722(乳腺癌),国际申请号PCT/US2013/044584(肺癌),美国专利申请号14/050,262和国际申请号PCT/IB2013/002866(前列腺癌),国际申请号PCT/US2014/059506(HER2+乳腺癌),美国申请号14/213,670和国际申请号PCT/US2014/028569(转移癌),其全部内容各自通过引用并入本文。在一些实施方案中,c-MAF抑制剂用于治疗或预防骨降解。

[0268] 或者,可以进行组合治疗,其中将来自上述的超过一种药剂组合以治疗和/或预防转移或者可以将所述药剂与其它补充剂例如钙或维生素D或者与激素治疗组合。

[0269] 在另一方面,本发明涉及用于预测患有癌症的受试者中的所述癌症的转移的体外方法,该方法包括使用本文公开的结合成员确定c-MAF基因是否在所述受试者的样品中相对于参考基因拷贝数发生扩增,其中相对于所述参考基因拷贝数的c-MAF基因的扩增表示发生转移的风险增加。在一些实施方案中,扩增在16q23基因座处的区域中。

[0270] 在另一方面,本发明涉及用于预测患有癌症的患者的临床结果的体外方法,其包括确定c-MAF基因是否在所述受试者的样品中易位,其中c-MAF基因的易位表示临床结果差。

[0271] 在另一方面,本发明涉及用于预测患有癌症的患者的临床结果的体外方法,其包括确定c-MAF基因是否在所述受试者的样品中易位,其中c-MAF基因的易位表示临床结果差。

[0272] 在一些实施方案中,易位的基因来自位于16q23基因座的区域。在一些实施方案中,易位的基因来自约16号染色体与约79,392,959bp至79,663,806bp(从着丝粒到端粒)之间的染色体区域的任意部分。在一些实施方案中,易位的基因来自约16号染色体与约79,392,959bp至79,663,806bp之间的基因组区域,但不包括DNA重复元件。

[0273] 在另一方面,本发明涉及用于预测患有癌症的患者的临床结果的体外方法(以下称为本发明的第七种方法),其包括确定c-MAF基因在所述受试者的样品中是否相对于参照基因拷贝数发生扩增,其中相对于所述参考基因拷贝数的c-MAF基因的扩增表示临床结果差。

[0274] 一个实施方案包括在第一步骤中确定c-MAF基因是否在受试者的样品中被扩增。基本上如前所述进行c-MAF的扩增的测定。在优选的实施方案中，样品是肿瘤组织样品。在优选的实施方案中，通过确定基因座16q23或16q22-q24的扩增来确定c-MAF基因的扩增。在另一个优选的实施方案中，通过使用本文公开的c-MAF基因特异性探针或抗体来确定c-MAF基因的扩增。在第二步骤中，本实施方案包括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拷贝数相对于对照样品的c-MAF拷贝数较大，则这表明临床结果差。

[0275] 在优选实施方案中，当c-MAF基因拷贝数高于参考样品或对照样品具有的拷贝数时，c-MAF基因相对于参考基因拷贝数扩增。在一个实例中，如果c-MAF基因的基因组拷贝数在测试样品中相对于对照样品增加至少2倍(即6个拷贝)、3倍(即8个拷贝)、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍或50倍，则c-MAF基因被认为是“扩增的”。在另一实例中，如果每个细胞中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c-MAF基因被认为是“扩增的”。

[0276] 在一些实施方案中，抗体在以下中所描述的任意方法中使用：国际申请PCT/IB2013/001204和美国专利申请13/878,114(三阴性乳腺癌和ER+乳腺癌)，国际申请PCT/US2014/026154(肾细胞癌)，国际申请号PCT/US2014/028722(乳腺癌)，国际申请号PCT/US2013/044584(肺癌)，美国专利申请号14/050,262和国际申请号PCT/IB2013/002866(前列腺癌)，国际申请号PCT/US2014/059506(HER2+乳腺癌)，美国申请号14/213,670和国际申请号PCT/US2014/028569(转移癌)，其全部内容各自通过引用并入本文。

[0277] 治疗方法

[0278] 本发明的结合成员(例如，抗体)可以以药物组合物的形式施用，其可以包含至少一种除了结合成员以外的成分。因此，根据本发明的和根据本发明使用的药物组合物除活性成分之外还可包含本领域技术人员熟知的药学活性赋形剂，载体，缓冲液，稳定剂或其它物质。这些材料应无毒，并且不应干扰活性成分的功效。载体或其它材料的精确性质将取决于施用途径，其可以是口服，吸入，气管内，局部，囊内或注射，如下所述。

[0279] 用于口服施用的药物组合物可以是片剂，胶囊剂，粉剂，液体或半固体形式。片剂可以包含固体载体，例如明胶或佐剂。液体药物组合物通常包含液体载体，例如水，石油，动物或植物油，矿物油或合成油。可以包括生理盐水溶液，葡萄糖或其它糖溶液或二醇，例如乙二醇，丙二醇或聚乙二醇。

[0280] 可以根据需要使用防腐剂，稳定剂，缓冲剂，抗氧化剂和/或其它添加剂，包括缓冲剂如磷酸盐，柠檬酸盐和其它有机酸；抗氧化剂，如抗坏血酸和甲硫氨酸；防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵；六甲基氯化铵；苯扎氯铵；苄索氯铵；苯酚，丁醇或苄醇；对羟基苯甲酸烷基酯，例如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯；邻苯二酚；间苯二酚；环己醇；3'-戊醇；间甲酚)；低分子量多肽；蛋白质，如血清白蛋白，明胶或免疫球蛋白；亲水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸，如甘氨酸，谷氨酰胺，天冬酰胺，组氨酸，精氨酸或赖氨酸；单糖，二糖和其它碳水化合物，包括葡萄糖，甘露糖或糊精；螯合剂，如EDTA；糖，如蔗糖，甘露醇，海藻糖或山梨糖醇；盐形成反离子，如钠；金属络合物(例如Zn-蛋白复合物)；和/或非离子表面活性剂，例如TWEENTM，PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0281] 取决于分子的物理化学性质和递送途径，本发明的结合成员(例如抗体)可以配制

成液体,半固体或固体形式。制剂可以包括赋形剂或赋形剂的组合,例如:糖,氨基酸和表面活性剂。液体制剂可以包括宽范围的抗体浓度和pH。固体制剂可以通过例如冻干、喷雾干燥或通过超临界流体技术干燥来制备。结合成员的制剂将取决于预期的递送途径。结合成员可以与将保护结合成员以防止快速释放的载体一起制备,例如控制释放制剂,包括植入物,透皮贴剂和微囊化递送系统。可以使用可生物降解的生物相容性聚合物,例如乙烯乙酸乙烯酯,聚酐,聚乙醇酸,胶原,聚原酸酯和聚乳酸。用于制备这些制剂的许多方法是本领域技术人员已知的(Robinson, (1978) Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems,Marcel Dekker, Inc., New York)。

[0282] 取决于待治疗的病症,组合物可以单独施用或与其它治疗组合施用,或者与其它治疗同时或顺序地施用。

[0283] 本发明的结合成员(例如,抗体)可以作为与另外的药物成分结合的组合治疗的一部分。可以使用组合治疗来提供显著的协同效应,特别是本发明的结合成员与一种或多种其它抗体的组合。本发明的结合成员可以与另一种或多种治疗剂或药剂同时或依次或作为组合制剂施用,用于治疗本文所列的一种或多种病症。

[0284] 本发明的结合成员(例如抗体)和一种或多种上述另外的药物组分可用于制备药物。药物可以用于单独或组合施用至个体,因此可以包含结合成员和另外的组分作为组合制剂或作为分开的制剂。可以使用分开的制剂来促进单独和顺序或同时施用,并允许通过不同途径(例如口服和肠胃外施用)施用组分。

[0285] 根据本发明,所提供的组合物可以施用于哺乳动物。施用通常是“治疗有效量的”,这足以显示对患者的益处。这种益处至少可以改善至少一种症状。施用的实际量,以及施用的速率和时间过程将取决于所治疗的病况的性质和严重性,所治疗的具体哺乳动物,个体患者的临床状况,病症的原因,组合物的递送部位,结合成员的类型,施用方法,施用的安排以及医生已知的其它因素。治疗的处方,例如关于剂量等的决定在普通医生和其它医生的责任范围内,并且可能取决于症状的严重性和/或所治疗疾病的进展。抗体的适当剂量是本领域公知的(Ledermann et al., (1991) Int.J.Cancer 47:659-664; Bagshawe et al., (1991) Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals 4:915-922)。可以使用本文或Physician's Desk Reference (2009) 中指出的适用于正在施用的药物类型的特定剂量。本发明的结合成员(例如,抗体)的治疗有效量或合适剂量可以通过比较其在动物模型中的体外活性和体内活性来确定。将小鼠和其它测试动物中的有效剂量外推给人的方法是已知的。精确的剂量将取决于许多因素,包括抗体是用于诊断、预防或治疗,待治疗区域的大小和位置,抗体(例如全抗体或片段)的确切性质和与抗体相连的任何可检测标记或其它分子的性质。对于全身应用,典型的抗体剂量将在至少约100 μ g至约1g的范围内,并且对于局部应用为至少约1 μ g至约1mg。可以施用初始较高的负荷剂量,随后是一个或多个较低剂量。通常,抗体将是完整的抗体,例如IgG1同种型。这是成人患者的单次治疗的剂量,对儿童、婴儿和新生儿可以对其进行比例调整,并且还可对于其它抗体形式根据分子量进行调整。治疗可以每天,每周两次,每周或每月一次重复,由医师自行决定。治疗可以每两至四周进行皮下施用,每四至八周进行静脉内施用。治疗可以是周期性的,并且施用之间的时间段为约两周或更长时间,例如,约三周或更长时间,约四周或更长时间,或约一个月一次。可以在移植手术之前和/或之后给予治疗,和/或可以在手术治疗的解剖部位直接给药或施用。

[0286] 核酸

[0287] 本发明还提供编码本发明的结合成员(例如抗体)的分离的核酸。核酸可以包括DNA和/或RNA。在一个实施方案中,本发明提供编码如上文所定义的本发明的CDR或CDR组或V_H结构域或V_L结构域或抗体抗原结合位点或抗体分子的核酸。在一些实施方案中,多核苷酸编码包含与SEQ ID NO:38、40和42具有至少约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%同一性的重链CDR的多肽。在一些实施方案中,多核苷酸编码包含与SEQ ID NO:26、28和30具有至少约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%同一性的重链CDR的多肽。在一些实施方案中,编码V_H的多核苷酸与SEQ ID NO:15具有至少约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%的同一性。在一些实施方案中,编码V_H的多核苷酸是SEQ ID NO:15。在一些实施方案中,编码重链的多核苷酸与SEQ ID NO:14具有至少约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%的同一性。在一些实施方案中,编码重链的多核苷酸是SEQ ID NO:14。在一些实施方案中,编码V_L的多核苷酸与SEQ ID NO:20具有至少约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%的同一性。在一些实施方案中,编码V_L的多核苷酸是SEQ ID NO:20。在一些实施方案中,编码轻链的多核苷酸与SEQ ID NO:18具有至少约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约99%或约100%的同一性。在一些实施方案中,编码轻链的多核苷酸是SEQ ID NO:18。

[0288] 在一些实施方案中,本发明涉及包含编码本文所述的任何抗原结合成员的多核苷酸的载体。在一些实施方案中,宿主细胞包含载体。本发明还提供了包含如上所述的至少一种多核苷酸的质粒、载体、转录或表达盒形式的构建体。

[0289] 在一些实施方案中,本发明涉及包含编码本文所述的任何抗原结合分子的多核苷酸的宿主细胞。本发明还提供了包含如上所述的一种或多种构建体的重组宿主细胞。编码任何CDR或CDR组或V_H结构域或V_L结构域或抗体抗原结合位点或抗体分子的核酸本身形成本发明的一个方面,生产编码的产物的方法也如此,所述方法包括来自编码核酸的表达。通过在合适的条件下培养含有核酸的所述重组宿主细胞可以方便地实现表达。在表达生产包含本文公开的V_H或V_L结构域的结合成员后,可以使用本领域已知的合适的技术分离和/或纯化结合成员并将其视为合适的。

[0290] 根据本发明的核酸可以包含DNA或RNA,并且可以是全部或部分合成的。本文中提及的核苷酸序列包括具有指定序列的DNA分子,并且包括其中U代替T的具有指定序列的RNA分子,除非另有说明。

[0291] 在一些实施方案中,本发明涉及产生结合人c-MAF的抗体或其片段的方法,包括培养本文所述的任何宿主细胞,使得核酸被表达并产生抗体。另一方面提供一种生产包含本发明的V_H和/或V_L可变结构域的结合成员的方法,所述方法包括引起编码核酸的表达。这样的方法可以包括在产生所述抗体V_H和/或V_L可变结构域的条件下培养重组宿主细胞。

[0292] 制备方法可以包括分离和/或纯化产物的步骤。生产方法可以包括将产品配制成为包含至少一种另外的组分例如药物活性赋形剂的组合物。

[0293] 用于在多种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是众所周知的。合适的宿主细胞包括细菌,哺乳动物细胞,植物细胞,丝状真菌,酵母和昆虫细胞以及转基因植物和动物。在原核细胞中抗体和抗体片段的表达在本领域中是良好建立的。综述参见例如Pluckthun,

(1991) BioTechnology 9:545-551。常见的细菌宿主是大肠杆菌。

[0294] 培养物中的真核细胞中的表达也可由本领域技术人员使用作为制备结合成员的选择 (Chadd&Chamow, (2001) Curr.Op.Biotech.12:188-194; Andersen&Krummen, (2002) Curr.Op.Biotech.13:117; Lerrick&Thomas, (2001) Curr.Op.Biotech.12:411-418)。本领域可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO)细胞,HeLa细胞,幼仓鼠肾(BHK)细胞,NS0小鼠黑素瘤细胞,YB2/0大鼠骨髓瘤细胞,人胚肾(HEK)细胞,人类胚胎视网膜细胞和许多其它细胞。

[0295] 可以选择或构建合适的载体,其含有适当的调节序列,包括启动子序列,终止子序列,多聚腺苷酸化序列,增强子序列,标记基因和其它适当的序列。根据需要,载体可以是质粒,噬菌粒或病毒载体,例如逆转录病毒载体 (Sambrook&Russell, Molecular Cloning:a Laboratory Manual:3rd edition, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press)。Ausubel et al., eds. Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, 4th edition 1999中详细描述了用于操作核酸的许多已知技术和方案,例如在制备核酸构建体、诱变、测序、将DNA引入细胞和基因表达以及蛋白质分析中。

[0296] 本发明的另一方面提供了本文公开的含有核酸的宿主细胞。这样的宿主细胞可以在体外保持并且可以在组织培养物中繁殖。这样的宿主细胞也可以在体内维持,例如,以产生腹水中的结合成员。宿主细胞的体内存在可以允许本发明的结合成员的细胞内表达作为“胞内抗体”或细胞内抗体。胞内抗体可用于基因治疗。

[0297] 另一方面提供了包括将本发明的核酸引入宿主细胞的方法。引入可以采用任何可用的技术。对于真核细胞,合适的技术可包括磷酸钙转染,DEAE-葡聚糖,电穿孔,脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其它病毒(例如痘苗病毒,或对于昆虫细胞,杆状病毒)的转导,或其任何组合。在宿主细胞,特别是真核细胞中引入核酸可以使用病毒或基于质粒的系统。质粒系统可以游离地保持或可以并入宿主细胞基因组或人工染色体中。并入可以是在单个或多个基因座处一个或多个拷贝的随机或靶向整合。对于细菌细胞,合适的技术可以包括氯化钙转化,电穿孔和使用噬菌体的转染。

[0298] 引入之后可以引起或允许来自核酸的表达,例如,通过在表达结合成员的条件下培养宿主细胞。表达产物的纯化可以通过本领域技术人员已知的方法来实现。

[0299] 本发明的核酸可以整合到宿主细胞的基因组(例如染色体)中。根据标准技术,可以通过包含促进与基因组的重组的序列来促进整合。

[0300] 本发明还提供一种方法,其包括在表达系统中使用如上所述的构建体,以便表达如上所述的结合成员或多肽。

[0301] 在一些实施方案中,本发明的结合成员因此可用于诊断或治疗与增加的c-MAF感染相关的病症的方法。

[0302] 本发明的试剂盒

[0303] 还提供了包含根据本发明的任何方面或实施方案的结合成员(例如抗体)的试剂盒。另一方面,试剂盒用于预测患有所述癌症的受试者中的癌症转移,所述试剂盒包含:a)用于量化所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的手段;和b)将所述样品中c-MAF表达的量化水平与参考c-MAF表达水平进行比较的手段。在一些实施方案中,使用的手段是光密度测

量以定量c-MAF免疫组织化学染色或组织病理学评分,其中-代表非阳性肿瘤,+、++、+++代表不同水平的阳性。

[0304] 在一些实施方案中,免疫组织化学染色是组织微阵列免疫组织化学染色。在一些实施方案中,该手段是用于进行免疫组织化学染色的试剂。在一些实施方案中,试剂用于制备用于免疫组织化学染色的福尔马林固定和/或石蜡包埋的(FFPE)细胞或组织样品。免疫组织化学的描述可以在美国专利号No.8,785,150中找到,其全部内容通过引用并入本文。

[0305] 在一些实施方案中,该手段是用于进行组织病理学评分的试剂。在一些实施方案中,用于比较c-MAF表达的量化水平与参考c-MAF表达水平的手段包括c-MAF的可量化内参照标准。在一些实施方案中,转移是骨转移。在一些实施方案中,骨转移是溶骨性骨转移。

[0306] 另一方面,本发明涉及用于预测患有来自癌症的骨转移的受试者的临床结果的试剂盒,所述试剂盒包括:a)用于定量所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的手段;和b)用于将所述样品中c-MAF的量化表达水平与参考c-MAF表达水平进行比较的手段。

[0307] 在另一方面,本发明涉及用于确定患有癌症的受试者的治疗的试剂盒,所述试剂盒包括:a)用于量化所述受试者的样品中c-MAF表达水平的手段;b)将所述样品中c-MAF的量化表达水平与参考c-MAF表达水平进行比较的手段;和c)基于量化表达水平与参考表达水平的比较来确定用于预防和/或减少所述受试者的骨转移的治疗的手段。

[0308] 另一方面,本发明涉及一种试剂盒,其包括:i)用于量化受试者的样品中c-MAF的表达水平的手段,和ii)一个或多个c-MAF基因表达水平指数,其已被预先确定为与骨转移的风险相关。

[0309] 在一些实施方案中,本发明提供了用于预测患有癌症的受试者中所述癌症的骨转移的试剂盒,所述试剂盒包含:a)本文所述的抗原结合分子或其片段或由本文所述的多核苷酸编码的多肽,其用于定量所述受试者的肿瘤样品中c-MAF的表达水平;和b)将所述样品中c-MAF表达的量化水平与参考c-MAF表达水平进行比较的手段。

[0310] 已经详细描述了用于定量所述受试者的样品中c-MAF的表达水平的手段,其包括16q23和16q22-24基因座扩增和易位。

[0311] 在一个实施方案中,用于定量表达的手段包括一组抗体。在一些实施方案中,用于定量表达的手段还包括特异性结合和/或扩增c-MAF基因的探针和/或引物。

[0312] 在一个具体实施方案中,癌症是乳腺癌,肺癌,前列腺癌或肾癌。

[0313] 本发明的方法的所有具体实施方案可应用于本发明的试剂盒及其用途。

[0314] 在试剂盒中,可以标记结合成员(例如,抗体)以允许其在样品中的反应性被确定,例如如下面进一步描述的。此外,结合成员可以或可以不附着到固体支持物上。试剂盒的组分通常是无菌的,并且在密封的小瓶或其它容器中。试剂盒可用于诊断分析或其中可使用结合成员的其它方法。试剂盒可以包含在方法例如根据本发明的方法中使用组分的说明。辅助或使得能够执行这样的方法的辅助材料可以包括在本发明的试剂盒内。辅助材料包括与第一结合成员结合并与可检测标记(例如荧光标记,放射性同位素或酶)缀合的第二不同结合成员。基于抗体的试剂盒还可以包含用于进行免疫沉淀的珠粒。试剂盒的每个组分通常都在其自己合适的容器中。因此,这些试剂盒通常包含适合每个结合成员的不同容器。此外,试剂盒可以包括用于进行测定的说明书和用于解释和分析由测定的执行产生的数据的方法。

实施例

- [0315] 实施例1
- [0316] c-MAF特异性抗体的构建
- [0317] 针对对应于人起源的c-MAF的氨基酸83-EQKAHLEDYYWMTGYPQQ-100 (18a.a.) 的表位产生抗体INB-1-11-8。该表位偶联至KLH (NAc-EQKAHLEDYYWMTGYPQQ-Ahx-C-KLH (20a.a.))。将该抗体与M153 (Santa Cruz Biotechnologies Inc.) 进行比较。针对对应于小鼠起源的c-MAF的氨基酸19-171的表位产生M153抗体。c-MAF在人和小鼠之间高度保守(参见图2的比对)。
- [0318] INB-1-11-8的轻链序列(图8)是SEQ ID NO:20(前导序列(SEQ ID NO:24);框架1(SEQ ID NO:25);CDR1 (SEQ ID NO:26);框架2 (SEQ ID NO:27);CDR2 (SEQ ID NO:28);框架3 (SEQ ID NO:29);CDR3 (SEQ ID NO:30);接合处 (SEQ ID NO:31);LC部分 (SEQ ID NO:32))。
- [0319] 最接近于INB-1-11-8轻链序列的轻链的人种系序例如下:
- [0320] >VKI_2-1- (U)_L12 (SEQ ID NO:23)
- [0321] DIQMTQSPSTLSASVGDRVITIC RASQSISS-----WLA WYQQKPGKAPKLLIY
- [0322] DASSLES GVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDFATYYC QQYNSYS
- [0323] >VKI_2-1- (1)_L19 (SEQ ID NO:46)
- [0324] DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC RASQGISS-----WLA WYQQKPGKAPKLLIY
- [0325] ASSLQSVGVRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QQANSFP
- [0326] >VKI_2-1- (1)_L5 (SEQ ID NO:47)
- [0327] DIQMTQSPSSVSASVGDRVITIC RASQGISS-----WLA WYQQKPGKAPKLLIY
- [0328] ASSLQSVGVRSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC QQANSFP
- [0329] INB-1-11-8重链序列(图8)是SEQ ID NO:16(前导序列(SEQ ID NO:36);框架1(SEQ ID NO:37);CDR1 (SEQ ID NO:38);框架2 (SEQ ID NO:39);CDR2 (SEQ ID NO:40);框架3 (SEQ ID NO:41);CDR3 (SEQ ID NO:42);接合处 (SEQ ID NO:43);HC部分 (SEQ ID NO:44))。
- [0330] INB-1-11-8重链序列的最接近的人种系序例如下:
- [0331] >V_H3_1-3_3-64 (SEQ ID NO:33)
- [0332] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS S--YAMH WVRQAPGKGLEYVS
- [0333] AISS--NGGSTYYANSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMGLRAEDMAVYYCAR
- [0334] >V_H3_1-1_3-66 (SEQ ID NO:34)
- [0335] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVS S--NYMS WVRQAPGKGLEWVS
- [0336] VIY---SGGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
- [0337] >V_H3_1-1_3-53 (SEQ ID NO 35)
- [0338] EVQLVETGGGLIQPGGSLRLSCAASGFTVS S--NYMS WVRQAPGKGLEWVS
- [0339] VIY---SGGSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
- [0340] 在从1:10至1:1000的一抗逐渐增加的稀释度的范围内计算Maf抗体敏感性。使用亲本和Maf过表达(Maf长和短同种型) MCF7、T47D(获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)) 和0990人类乳腺癌细胞测定抗体特异性。使用免疫组织化学标准方法处理福尔马林固定的细

胞沉淀。在balb-c小鼠(小鼠型)中的异位MCF7和MCF7-Maf(长和短同种型)异种移植植物中也显示了特异性。使用与正常兔IgG2(IS600,Dako)代替第一抗体孵育的相同样本的切片作为阴性对照。

[0341] 抗原特异性ELISA

[0342] 使用抗原特异性ELISA来测试抗原的抗体敏感性。为此,将上述表位肽1与BSA缀合。将其附着于进行ELISA的板表面并洗涤。然后应用INB-1-11-8c-MAF特异性抗体,使其能够结合抗原。进行孵育时间和TBST洗涤后,使用特异于兔抗体并与碱性磷酸酶缀合的第二抗体评估第一抗体与抗原的结合。使用几种稀释液来测试抗体的滴度,其是抗体对其抗原的亲和力的指示(图3A)。

[0343] Western印迹

[0344] 在1:50至1:250的一抗逐渐增加的稀释度的范围内计算通过Western印迹的c-MAF抗体特异性。使用亲本和Maf过表达(Maf长和短同种型)MCF7、T47D、293T(获自美国典型培养物保藏中心)和来自MCF7的具有骨转移倾向的BoM2人乳腺癌细胞确定特异性。按照标准方法(Tarragona et al.J.Biol.Chem.(2012)287:21346-55)所述处理细胞沉淀,并通过整个裂解物的Western印迹证实结果(图3B)。

[0345] c-MAF免疫染色

[0346] 使用3 μ m组织切片进行免疫染色,将其置于Dako Link平台上的带正电荷的载玻片上。去石蜡化后,在pH 6.1,0.01mol/L柠檬酸盐基缓冲溶液(Dako)中进行热抗原回收。内源过氧化物酶被淬灭。在室温下以1:100稀释使用小鼠多克隆抗cMaf抗体30分钟,然后与抗过氧化物酶偶联的抗兔Ig葡聚糖聚合物(Flex+,Dako)孵育。然后将切片用3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显影并用苏木精复染(图3C)。

[0347] 实施例2

[0348] 单克隆兔抗体与抗原c-MAF之间的相互作用的分析

[0349] a) 通过SDS-PAGE分析cMaf蛋白制剂

[0350] 为了确认抗原制剂的纯度,将c-MAF(Q1)与商业BSA标准品通过使用SDS-PAGE在还原条件下进行比较。将三种量(800ng,550ng和275ng)的c-MAF(Q1)与四种量(750ng,500ng,250ng和125ng)的BSA进行比较。图4显示考马斯染色后的SDS-PAGE凝胶。

[0351] 对于c-MAF(Q1),SDS-PAGE凝胶显示出约25kDa(**~60%**)和20kDa(*)(**~40%**)的两个不同的带。基于序列信息计算的分子的分子量为19.2kDa,无论如何,在SDS-PAGE中计算和表观尺寸之间的这样的差异是常见的。对于c-MAF(Q1),标称浓度似乎具有如瓶上所示的较低(小于三分之一)的浓度。

[0352] Mr=19.2kDa;pI 5,6;无共有N-糖基化位点;2个半胱氨酸

[0353] b) 通过免校准浓度分析(calibration free concentration analysis,CFCA)分析c-MAF蛋白制剂

[0354] 为了测定c-MAF(Q1)结合INB-1-11-8的活性浓度,使用CFCA方法。该方法依赖于当分子至传感器表面的运输受到扩散的限制时结合速率随着变化的流速的改变。浓度根据测量的结合速率和分析物的分子量和估计的扩散系数计算。通过捕获>3000RU的INB-1-11-8,实现了配体表面上的高密度结合。以5、20和100 μ L/min的流速测量结合速率。图5显示了

CFCA分析的传感图的一个例子。测定c-MAF (Q1) 的浓度为1.3mg/ml。这些结果支持在SDS-PAGE分析中进行的观察,其中其浓度与BSA标准相比进行估计。假设在SDS-PAGE中观察到的25kDa条带和较小的20kDa条带都具有抗体结合活性,则CFCA测量对于c-MAF (Q1) 测定的浓度。在这种情况下,在SDS-PAGE凝胶上观察到的条带的量相加以估计抗原制剂的活性浓度。

[0355] c) 动力学分析

[0356] 在以下条件下进行动力学测量以测量抗体INB-1-11-8和c-MAF (Q1) 制剂之间的亲和常数:

[0357] 实验条件

[0358] • 仪器:BiacoreT200

[0359] • 运行缓冲液:HBS-EP, 10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% Tween 20, pH 7.4

[0360] • 测定温度:25°C

[0361] • 传感器表面:重组蛋白A;通过标准胺偶联固定 (EDC/NHS化学)

[0362] 进行测试测量以确认抗体INB-1-11-8的蛋白A结合,并为分析物的动力学测量选择合适的捕获水平。选择240RU的捕获水平用于c-MAF (Q1) 的测量,导致每抗体分子结合的两个19.6kDa抗原的约64RU的预期R_{max}。为了产生足够高的肽结合信号,选择较高的980kDa的捕获水平,也导致约30RU的预期R_{max}。将抗原的系列稀释液注射180秒,然后进行600s缓冲液注射用于解离速率测定(参见图6)。对于c-MAF片段,根据由CFCA确定的浓度计算用于系列稀释的摩尔浓度。进行动力学测量两次以确认结合行为。该图显示了在蛋白质的浓度>10nM的分析物快速结合。

[0363] 为了估计c-MAF (Q1) 与抗体INB-1-11-8的相互作用的亲和力(表1),基于1:1相互作用模型进行单浓度拟合,假设R_{max}为23RU(图7)。基于这个初步数据,已经对相互作用大致估计了nM范围内的亲和力。结合的特征在于非常快的结合速率和快速的解离速率,即结合不是非常紧密。

[0364] 表1.

[0365] 估算的c-MAF与抗体INB-1-11-8的动力学速率和平衡解离常数

样品	C _{分析物}	k _{结合}	k _{解离}	K _D	R _{max}	Chi ²
c-MAF (Q1)	6.5nM	5.3 • 10 ⁶ • M ⁻¹ s ⁻¹	5.6 • 10 ⁻³ • s ⁻¹	1.1nM	23RU	0.77

[0366] c-MAF (Q1):使用的包括Aa 19-208的cMAF的片段

[0367] MEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRILAGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFSAAPSPCGSGEQKA
HLEDYYWMTGYQPQLNPEALGFSPEDAVEALISNSHQLQGGFDGYARGAQQLAAAAGAGAGASLGGSGEEMGPAAA
VVSAVIAAAAAQSGAGPHYHHHHHAAGHHHPTAGAPGAAGSAAA (SEQ ID NO:45)

[0368] 试剂:

[0369] • INB-1-11-8;c-MAF特异性单克隆抗体(兔)INB-1-11-8(克隆ID11-8;批号:11-8);浓度1.7mg/ml;3等分试样,约200μL

[0370] • c-MAF (Q1) 片段

[0371] • HBS-EP(运行缓冲液)

[0372] • CM5传感器芯片

[0373] • 胺偶联试剂盒

[0375] • 蛋白A

[0376] • 30mM HCl (再生缓冲液)

[0377] 实施例3

[0378] 验证乳腺癌原位肿瘤样品队列

[0379] 在人乳腺肿瘤队列中测试抗体鉴定和预测骨转移的能力。验证集由来自患有I期、II期或III期乳腺癌并注明临床随访 (Rojo F., Ann Oncol 23 (5) :1156-1164 (2012)) 的患者的多于380例的原发性乳腺癌样本组成。根据标准程序处理组织微阵列。根据标准临床病理参数对肿瘤进行分类,然后进行适当的统计学分析,以观察这些肿瘤中的c-MAF (MAF) 蛋白表达是否与骨转移事件相关。

[0380] 该第二队列的统计分析基于以下前提:

[0381] i) 诊断性能

[0382] 通过比较ROC曲线的AUG来评估诊断性能。基于最具预测性的变量 (MAF IHC水平),为每个分类类别计算灵敏度 (Se)、特异性 (Sp)、阳性预测值 (PPV) 和阴性预测值 (NPV) (图9)。基于接受操作曲线参数 (ROC) 建立了选择MAF阳性和阴性肿瘤的截断值。

[0383] ii) 基线特征的比较 (图10)

[0384] 使用Kruskal-Wallis检验测试年龄平均值的差异。将分类变量在适用时与卡方检验进行比较。

[0385] iii) 预后作用——计算至骨转移的结局时间的风险比和Cox回归模型 (图11)

[0386] 应当理解,本文描述的示例和实施例仅用于说明目的,并且对本领域技术人员将提出其各种修改或改变,并且将被包括在本申请的精神和范围内。

[0387] 所有出版物、专利、专利申请、互联网站点,包括本文所引用的多核苷酸和多肽序列的所有出版物、专利申请、数据库序列/数据库序列的全部内容通过引用并入本文,其范围如同每个单独出版物、专利、专利申请、互联网站点或登录号/数据库序列被具体地和单独地指示为通过引用并入本文。

- [0001] 序列表
[0002] <110> INBIOMOTION S.L.
[0003] GOMIS, ROGER
[0004] TERCERO, JUAN CARLOS
[0005] <120> 用于人C-MAF的结合成员
[0006] <130> 3190.0120000
[0007] <140> To Be Assigned
[0008] <141> Herewith
[0009] <160> 47
[0010] <170> PatentIn version 3.5
[0011] <210> 1
[0012] <211> 6878
[0013] <212> DNA
[0014] <213> 智人
[0015] <400> 1
[0016] agaggctta aaatctttt tcacatctcta gctgttagctc gggctgcttg tcggcttggc 60
[0017] ctccccctcc cccccttgct ctctgcctcg tctttccca ggacttcgct attttgcttt 120
[0018] tttaaaaaaa ggcaagaaaag aactaaactc ccccctccct ctccctccagt cgggctgcac 180
[0019] ctctgccttg cactttgcac agaggttagag agcgcgcgag ggagagagag gaaagaaaaaa 240
[0020] aaataataaaa gagagccaag cagaagagga ggcgagaagc atgaagtgtt aactcccccg 300
[0021] tgccaaggcc cgccgcgcgc ggacagacgc ccgcgcgcgc tccagccccc agcggacgcc 360
[0022] gcgcgcgcgc tgcctgcagc ccggccggc gaggcgagcc ttcccttatg caaagcgcgc 420
[0023] agcggagcgg cgagcggggg acgcgcgcga ccggccggg ctccctccagc ttgcgcgcgc 480
[0024] cagccaccac cgccgcaccgc gcagctcgcg gaggatcttc ccgagcctga agccgcggc 540
[0025] tcggcgcgcga aggaggcgag cgagcaagga ggggcccggg cgagcgaggg agcacattgg 600
[0026] cgtgagcagg ggggagggag ggccggcgcg gggggcgcgg gcagggcggg ggggtgtgt 660
[0027] tgtgagcgcg ctcggaggtt tcggccagc caccgcgcg caagctagaa gcgcgcgc 720
[0028] ccggcaagct ggctcacccg ctggccaccc agcacagccc gctggccct ctccctgcagc 780
[0029] ccatctggcg gagcggccggc ggccgcggcg gcggcggcag gagaatggca tcagaactgg 840
[0030] caatgagcaa ctccgacactg cccaccagtc ccctggccat ggaatatgtt aatgacttcg 900
[0031] atctgatgaa gtttgaagtg aaaaaggaac cggtgagac cgaccgcac atcagccagt 960
[0032] gcggccgtct catgcgcggg ggctcgctgt cctccacccc catgagcacgc ccgtgcagct 1020
[0033] cgggtccccc ttcccccagc ttctcgccgc ccagccggg ctcggccagc gagcagaagg 1080
[0034] cgcacctgga agactactac tggatgaccg gctacccgca gcagctgaac cccgaggcgc 1140
[0035] tgggcttcag ccccgaggac gcggtcgagg cgctcatcag caacagccac cagctccagg 1200
[0036] gcggcttcga tggctacgcg cgccggcgcg agcagctggc cgccgcggcc ggggcccgtg 1260
[0037] ccggcgcctc cttggccggc agcggcgagg agatggccc cgccgcgcgt gtgggttcg 1320
[0038] ccgtgatcgc cgccgcgcgc gcgcagagcg gcgcggccccc gcactaccac caccaccacc 1380
[0039] accacgcgcgc cgccacccac caccacccga cggccggcgc gcggccgcgc gcggcagcg 1440
[0040] cgccgcctc ggccgggtgc gctggggcgc cggccggcgg tggcccgcc agcgctgggg 1500
[0041] cggccggcgg cggccggcgc ggccggaggcg gcgggggcgc ggcggggcgc gggggcgc 1560

[0042] tgaccccgca ccacgcccgc ggcggcctgc acttcgacga ccgccttctcc gacgagcaggc 1620
 [0043] tggtaaccat gtctgtgcgc gagctgaacc ggcagctgag cgggtcagc aaggaggagg 1680
 [0044] tggatccggct gaagcagaag aggccggaccc tggaaaaaccg cggttatgcc cagtccctgcc 1740
 [0045] gcttcaagag ggtgcagcag agacacgtcc tggagtcgga gaagaaccag ctgctgcagc 1800
 [0046] aagtgcacca cctcaagcag gagatctcca ggctggcgc cgagagggac gcgtacaagg 1860
 [0047] agaaaatacga gaagttggtg agcagcggct tccgagaaaa cggctcgagc agcgacaacc 1920
 [0048] cgtccctctcc cgagttttc atgtgagtct gacacgcgt tccagctagc caccctgata 1980
 [0049] agtgctccgc gggggccgg ctccgggtgt ggcttgctg ttctagagcc atgctcgcca 2040
 [0050] ccacccctacc accccccaccc ccaccgagtt tggcccccctt ggccccctac acacacaccaa 2100
 [0051] accccgcacgc acacaccaca cacacacaca cacacacaca cacacccac accctgctcg 2160
 [0052] agtttgtggt ggtgggtggct gttttaact ggggaggggaa tgggtgtctg gctcatggat 2220
 [0053] tgccaaatctg aaattctcca taacttgcta gcttgggttt ttttttttt tacacccccc 2280
 [0054] cggcccccaccc cccggacttgc acaatgttca atgatctcg cagagttctt catgtgaaac 2340
 [0055] gttgatcacc tttaaggcct gcatcattca catattttt cttcttcttc cccttcagtt 2400
 [0056] catgaactgg tggatccatttt ctgtgtgtgt gtgtgtttt tttttttgg attttttttt 2460
 [0057] ttaattttac ttttagagct tgctgtgttgc cccacccctt ttccaaacctc caccctcaact 2520
 [0058] cttctcaac ccatcttcc cgagatgaaa gaaaaaaaaa agcaaagttt tttttttttc 2580
 [0059] tcctgagttc ttcatgttagt attgagcttgc caaaggaaaa aaaaatgtga aatgttatag 2640
 [0060] acttgcagcg tgccgagttc catcggttt ttttttttagc attgttatgc taaaatagag 2700
 [0061] aaaaaaaaaatcc tcatgaacact tccacaatca agcctgcata aacccctgg gtgtgacttg 2760
 [0062] ttagttttgg ctttgtgatg ccaaacttgc gagtttagtc tgccattaaa aaaactcatt 2820
 [0063] ctcatctcat gcattattat gctgtact ttgtcttagc aacaatgaac tataactgtt 2880
 [0064] tcaaagactt tatggaaaag agacattata ttaataaaaa aaaaagcct gcatgctgaa 2940
 [0065] catgtatggt ataatttattt tttccctttt tttccctttt ggctggaaa tggacgttcg 3000
 [0066] aagacttata gcatggcatt catactttt ttttatttgc tcatgacttt ttgagttt 3060
 [0067] gaacaaaaca gtgcaaccgt agagccttct tcccatgaaa ttttgcattct gctccaaaac 3120
 [0068] tgctttgagt tactcagaac ttcaaccttcc caatgcactg aaggcattcc ttgtcaaaga 3180
 [0069] taccagaatg gtttacacat ttaacctggc aaacattgaa gaactctaa tttttttttt 3240
 [0070] ttaataagaa tgacgccccca ctttggggac taaaatttgc ctattgccga gaagcagtct 3300
 [0071] aaaaattttt ttttaaaaag agaaacttgc ccatttattt tggtttgcattttt tttttttttt 3360
 [0072] ttatattttt tggcttttgg tcattgtcaa atgtggatg ctctgggttt ctgttatata 3420
 [0073] atttaattct agttttata atctgttagt ccagttaaaa tgtatgtac agataaaagg 3480
 [0074] atgttataga taaatttgc agagtttagt ctgttttagt gtagattttt taaacgattt 3540
 [0075] atgcactaaa ttgtttacta ttgtgtgtt aaggggggta gagttgcaa ggggactgtt 3600
 [0076] taaaaaaaaatg agcttataca gcatgtgtt gcaactttaa tataatttgc gtatgtgt 3660
 [0077] tctttgctat accactgact gtattgaaaa ccaaagtatt aagagggaa acgccccctgt 3720
 [0078] ttatattctgt aggggttattt tacattcaaa aatgttatgtt tttttttctt ttcaaaatattt 3780
 [0079] aagtattttgg gactgaatttgc cactaagata taacctgcaaa gcatataata caaaaaaaaaa 3840
 [0080] ttgcacaaact gtttagaacg ctaataaaat ttatgcattt ataaaaatgg cattactgca 3900
 [0081] cagttttaaag atgatgcaga ttttttaca gttgtattgt ggtgcagaac tggattttct 3960
 [0082] gtaactttaaa aaaaatccca cagttttaaa ggcaataatc agtaaatgtt attttcaggg 4020
 [0083] actgacatcc tgcattttaaa aagaaatgaa aagtaaatct taccacaata aatataaaaaa 4080

[0084] aatcttgtca gttactttc tttacatat tttgctgtgc aaaattgttt tatatcttga 4140
 [0085] gttactaact aaccacgcgt gttgttccta tgtgctttc tttcattttc aattctggtt 4200
 [0086] atatcaagaa aagaataatc tacaataata aacggcattt tttttgatt ctgtactcag 4260
 [0087] tttcttagtg tacagttaa ctggcccaa caacctcgtt aaaagtgtaa aatgcaccc 4320
 [0088] tttctccagt ggaaggattc ctggaggaat agggagacag taattcaggg tgaaattata 4380
 [0089] ggctgtttt tgaagtgagg aggctggccc catatactga ttagcaatat ttaatataga 4440
 [0090] tgtaaattat gacctcattt tttctcccc aaagtttca gtttcaaatt gagttgagcc 4500
 [0091] ataattgccc ttggtaggaa aaacaaaaca aaacagtggaa actaggcttc ctgagcatgg 4560
 [0092] ccctacactt ctgatcagga gcaaagccat ccatagacag aggagccgga caaatatggc 4620
 [0093] gcatcagagg tggcttgcgc acatatgcatt tgaacggtaa agagaaacag cgcttgcctt 4680
 [0094] ttcactaaag ttgactattt ttcttcttc tcttacacac cgagattttc ttgttagcaa 4740
 [0095] ggctgacaa gatttaacat aaacatgaca aatcatagtt gtttggggg ttttgcctt 4800
 [0096] ctcttaaca ctgaagatca ttgtcttaa ataggaaaaaa gaaaatccac tccttacttc 4860
 [0097] catatttcca agtacatatac tggtttaaac tatgttatca aatcatattt caccgtgaat 4920
 [0098] attcagtggaa gaacttctt acctggatga gcttagtaatg atttcagatc atgctatccc 4980
 [0099] cagaaataaaa agcaaaaaat aataccgtt tggaatata gctgtgcctt gatttactgg 5040
 [0100] tatttacccc aaaataggct gtgtatgggg gctgacttaa agatccctt gaaagactca 5100
 [0101] aaactacctt cacttagtagg actcctaagc gctgacctat tttaaatga cacaattca 5160
 [0102] tgaaactaat gttacaaatt catgcagttt gcactcttag tcattttccc ctgcacacc 5220
 [0103] aatagaatgt tagacaaagc cagcactgtt ttgaaaatac agccaaacac gatgactttt 5280
 [0104] gtttggggg ctgcgttct taaaagaaaaaa aaagataata ttgcaactct gactgaaaga 5340
 [0105] ctatTTTtaa agaaaacagg ttgtgttgg tgctgctaag ttctggccag tttatcatct 5400
 [0106] ggccTTTcctg cctatTTTt acaaaccacg aagacagtgt gtaacctcga cattttgacc 5460
 [0107] ttccTTTatg tgcttagttt gacaggctcc tgaatccaca cttaattttt cttaacaaaa 5520
 [0108] gcttaatag taaacccc ctcattgact tgaagtcaag ttttttttgcattt ttcagatatt 5580
 [0109] tctttccccc tttttttttt ttccatca caactaagag atacacaaac tctgaagaag 5640
 [0110] cagaaatggaa gagaatgctt ttaacaaaaaa agcatctgtat gaaagattttt aggcaaaat 5700
 [0111] tctcaaaata agagtatat tctggatgtt gttattgcag ttatctcatg acaaattgagg 5760
 [0112] cctggattgg aaggaaaata tagttgtgtt gaattaagca ttttgcattt aatctacaag 5820
 [0113] gtagttgaat ataataagca ggtttggcc cccaaactt agaaaatcaa atgcaaaagg 5880
 [0114] gctggcaaaa atgagggttg agtggctggc tgtaagagaa ggttaactcc tagtaaaagg 5940
 [0115] catttttaga aataacaatt actgaaaact ttgaagtata gtggagtag caaacaataa 6000
 [0116] catgtttttt ttttcttaca aagaactcct aaatcctgag taagtgcatt tcattacaat 6060
 [0117] aagtctctaa atttaaaaaaa aaaaaaatca tatgagggaa tctagcttc cccttacgc 6120
 [0118] tgcgtttgat ctttgtctaa atagtgtttt aattccttc attccaattt cagaactgag 6180
 [0119] cccactcgca agttggagcc atcagtggaa tacgccat tttgaaagcc ccagcatcgt 6240
 [0120] gtacttacca gtgtgttcac aaaatgaaat ttgtgtgaga gctgtacatt aaaaaaaaaatc 6300
 [0121] atcattatta ttatttttg cagtcatttga gaaccacca cccctgactt ctgttttagtc 6360
 [0122] tccttttaa ataaaaattt ctgtgttaga gaagaaggct attaaatgtt gtagttact 6420
 [0123] atgccttgc tctgggggtt tcatagagac cggttagaaaa ggcactcctt gcttttcgt 6480
 [0124] ttatgggtgtg tgcaagttaa caggtgcatt gctttcaacc tgccatacta gttttaaaaaa 6540
 [0125] ttcaactgaaa ttacaaagat acatataat gcatatataat aatgaaagt ttcccgaaat 6600

[0126] gcaacaatta gcattttaaa atcatatata ggcacatgcaca ttctaaatag tacttttca 6660
 [0127] tgcttcattg tttctctggc agataattt actaagaaga aaaatagata ttcgactccc 6720
 [0128] cttccctaaa caaatccacg ggcagaggct ccagcggagc cgagccccct gttttctcg 6780
 [0129] taggccctag acggtgttgc atttatcagt gatgtcaaac gtgctcattt gtcagacata 6840
 [0130] gctgtaaatg aaaacaatgt gtggcaaaat acaaagtt 6878
 [0131] <210> 2
 [0132] <211> 2656
 [0133] <212> DNA
 [0134] <213> 智人
 [0135] <400> 2
 [0136] gaggcttaa aatcttttt catttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttgccc 60
 [0137] tc(ccc)ttccc ccctttgtc tctgcctcg tttccccag gacttcgcta ttttgctttt 120
 [0138] ttaaaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc 180
 [0139] tctgccttgc actttgcaca gaggttagaga gcgcgcgagg gagagagagg aaagaaaaaa 240
 [0140] aataataaaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt 300
 [0141] gccaaggccc gcgcgcgcgc gacagacgcc cgcgcgcgc ccagccccga gcggacgcgc 360
 [0142] cgcgcgcct gcctgcagcc cggccggcg aggcgagccc ttcccttatgc aaagcgcgc 420
 [0143] gcggagcggc gagcggggga cgccgcgcac cggccgggc tcctccagct tcgcgcgcgc 480
 [0144] agccaccacc gccgccaccg cagctcgccg aggatcttcc cgagcctgaa gccgcggct 540
 [0145] cggcgcgcaaa ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcaggaga gcacattggc 600
 [0146] gtgagcaggg gggagggagg gcggcgcgg gggcgcggg cagggcgggg gggtgtgtgt 660
 [0147] gtgagcgcgc tcggaggttt cggccagcc accgcgcgc aagctagaag cgccccagcc 720
 [0148] cggcaagctg gctcacccgc tggccaccca gcacagcccg ctggccctc tcctgcagcc 780
 [0149] catctggcgg agcggcggcg gcggcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc 840
 [0150] aatgagcaac tccgacactgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga 900
 [0151] tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcata tcagccagtg 960
 [0152] cggccgtctc atcgccgggg gctcgctgc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020
 [0153] ggtccccct tcccccaact tctcggcgc cagccccggc tcggcagcg agcagaaggc 1080
 [0154] gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctacccgcag cagctgaacc ccgaggcgct 1140
 [0155] gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc aacagccacc agctccagg 1200
 [0156] cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgca gcagctggcc gcggcggccg gggccgggtgc 1260
 [0157] cggccctcc ttggcggca gcggcggaga gatggccccc gccggcggcc tggtgtccgc 1320
 [0158] cgtgatcgcc gcggccgcgc cgcagagcgg cgcggcccg cactaccacc accaccacca 1380
 [0159] ccacgcccgc ggcacccacc accacccgac ggccggcgc cccggcgcgc cggcagcgc 1440
 [0160] gcccgcctcg cccgggtggcg ctggggcgcc gggcggcggt gcccggcca ggcgtgggg 1500
 [0161] cggcggcgcc ggcggcggcg gcggaggcgg cggggcgcg gcggggcgcc gggcgcgcct 1560
 [0162] gcacccgcac cacggccccc gcggcctgc cttcgacgc acgttctccg acgagcagct 1620
 [0163] ggtgaccatg tctgtgcgcg agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680
 [0164] gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgcgc 1740
 [0165] cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtggag aagaaccagc tgctgcagca 1800
 [0166] agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggcgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860
 [0167] gaaatacggag aagtttgtga gcagcggctt ccgagaaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920

[0168] gtcctctccc gagttttca taactgagcc cactcgcaag ttggagccat cagtggata 1980
 [0169] cggcacattt tggaagcccc agcatcggt acttaccagt gtgtcacaa aatgaaattt 2040
 [0170] gtgtgagagc tgtacattaa aaaaaatcat cattattatt attatttgca gtcatggaga 2100
 [0171] accacctacc cctgacttct gtttagtctc cttttaaat aaaaattact gtgttagaga 2160
 [0172] agaaggctat taaatgttagt agttaactat gccttgc tgggggttc atagagaccg 2220
 [0173] taggaaagc gcactcctgc tttcgattt atgggtgtg caagtaaaca ggtgcattgc 2280
 [0174] tttcaacctg ccatactagt tttaaaatt cactgaaatt acaaagatac atatatatgc 2340
 [0175] atatatataa tggaaagttt cccggaatgc aacaattagc attttaaat catatatagg 2400
 [0176] catgcacatt ctaaatagta cttttcatg cttcattgtt tctctggcag ataattttac 2460
 [0177] taagaagaaa aatagatatt cgactcccct tccctaaaca aatccacggg cagaggctcc 2520
 [0178] agcggagccg agccccctgg tttctcgta gcccctagac ggtgttgcatttgc 2580
 [0179] tgtcaaacgt gtcatttgt cagacatagc tgtaaatgaa aacaatgtgt ggcaaaatac 2640
 [0180] aaagttaaaa aaaaaaa 2656
 [0181] <210> 3
 [0182] <211> 6887
 [0183] <212> DNA
 [0184] <213> 智人
 [0185] <400> 3
 [0186] gaggcttaa aatcttttt catttctag ctgtagctcg ggctgcttgt cggcttgcc 60
 [0187] tccccctccc cccttgctc tctgcctcgt ctcccccag gacttcgcta tttgtctttt 120
 [0188] ttaaaaaaaaag gcaagaaaga actaaactcc cccctccctc tcctccagtc gggctgcacc 180
 [0189] tctgccttgc actttgcaca gaggttagaga ggcgcgcagg gagagagagg aaagaaaaaa 240
 [0190] aataataaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca tgaagtgtta actccccgt 300
 [0191] gccaaggccc ggcgcgcgcg gacagacgcc cgccgcgcct ccagccccga gcggacgcgg 360
 [0192] cgccgcgcct gcctgcagcc cggccggcg aggccgagccc ttcccttatgc aaagcgcgc 420
 [0193] gcccggcggc gagcggggga cggccgcac cggccgggc tcctccagct tcggccgcgc 480
 [0194] agccaccacc gccgccaccgc cagctcgccagg agatcttcc cgaggctgaa gccggccggc 540
 [0195] cggcgcgcaca ggaggcgagc gagcaaggag gggccggggc gagcgaggga gcacattggc 600
 [0196] gtgagcaggg gggagggagg gcggcgcgg gggcgcggg cagggcgggg ggggtgtgt 660
 [0197] gtgagcgcgc tcggaggttt cggccagcc accgcgcgc aagctagaag cgccccagcc 720
 [0198] cggcaagctg gtcacccgc tggccaccca gcacagcccg ctggccctc tcctgcagcc 780
 [0199] catctggcgg agcggcggcg ggcgcggcgg cggcggcagg agaatggcat cagaactggc 840
 [0200] aatgagcaac tccgacactgc ccaccagtcc cctggccatg gaatatgtta atgacttcga 900
 [0201] tctgatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc gaccgcata tcagccagtg 960
 [0202] cggccgtctc atgcggggg gtcgcgttc ctccaccccc atgagcacgc cgtgcagctc 1020
 [0203] ggtccccct tcccccaact tctggcgcc cagccgggc tcggcagcg agcagaaggc 1080
 [0204] gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctaccgcag cagctgaacc cgcggcgcgt 1140
 [0205] gggcttcagc cccgaggacg cggtcgaggc gtcacgc aacagccacc agctccagg 1200
 [0206] cggcttcgat ggctacgcgc gccccggca gcagctggcc gcggcggccg gggccggcgc 1260
 [0207] cggccctcc ttggcggca gcggcgggaa gatggggccc gcccggccg tgggtccgc 1320
 [0208] cgtgatgcgc gcggccgcgc cgcagagcgg cgcggcccg cactaccacc accaccacca 1380
 [0209] ccacgcgcgc gcggcaccacc accaccgcgc gcggcggccg cccggcgcgc cgggcagcgc 1440

[0210] ggccgcctcg gccgggtggcg ctgggggcgc gggcggcggt ggcccggcca ggcgctgggg 1500
 [0211] cggcggcggc ggcggcggcg gcggaggcgg cgggggcgcg gcggggcgg ggggcgcct 1560
 [0212] gcacccgcac cacggccccc gcggcctgca ctgcacgac cgcttctccg acgagcagct 1620
 [0213] ggtgaccatg tctgtgcgc agctgaaccg gcagctgcgc ggggtcagca aggaggaggt 1680
 [0214] gatccggctg aagcagaaga ggccggaccct gaaaaaaccgc ggctatgccc agtcctgccg 1740
 [0215] cttcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtccggag aagaaccagc tgctgcagca 1800
 [0216] agtcgaccac ctcaaggcagg agatctccag gctggtgcgc gagagggacg cgtacaagga 1860
 [0217] gaaatacggag aagttggta gcagcggctt ccgagaaaaac ggctcgagca gcgacaaccc 1920
 [0218] gtccctctccc gagttttca tgtgagtctg acacgcgatt ccagctagcc accctgataa 1980
 [0219] gtgctccgcg ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt tctagagcca tgctgccac 2040
 [0220] cacctcacca cccccacccc caccgagttt ggcccccctt gccccctaca cacacacaaa 2100
 [0221] cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac acacccaca ccctgctga 2160
 [0222] gtttgtgtg gtggggctg tttaaactg gggagggaaat ggggtctgg ctcatggatt 2220
 [0223] gccaatctga aattctccat aacttgctag cttgtttttt tttttttt acacccccc 2280
 [0224] gccccacccc cggacttgca caatgttcaa tgcgttcac agagttctt atgtgaaacg 2340
 [0225] ttgatcacct ttgaagcctg catcattcac atatttttc ttcttcttcc ctttcagttc 2400
 [0226] atgaactggc gttcattttc tgtgtgtgtg tgtgtttat tttgtttgaa tttttttt 2460
 [0227] taattttact tttagagctt gctgtgtgc ccacctttt tccaacctcc accctcactc 2520
 [0228] cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa gcaaagttt ttttcttct 2580
 [0229] cctgagttct tcatgtgaga ttgagttgc aaaggaaaaa aaaatgtgaa atgttataga 2640
 [0230] ctgcagcgt gccgagttcc atcggtttt ttttttagca ttgttatgct aaaatagaga 2700
 [0231] aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcatca acctctggg tgtgacttt 2760
 [0232] gagtttggc cttgtgtatgc caaatcttag agtttagtct gccattaaaa aaactcattc 2820
 [0233] tcatctcatg cattattatg ctgtctactt tgtcttagca acaatgaact ataactgttt 2880
 [0234] caaagacttt atggaaaaaga gacattatat taataaaaaa aaaaagcctg catgctggac 2940
 [0235] atgtatggta taattttttt ttcctttttt tttcctttt gcttggaaat ggacgttcga 3000
 [0236] agacttatag catggcattc atactttgt tttattgcct catactttt ttgagtttag 3060
 [0237] aacaaaacag tgcaaccgta gagccttctt cccatgaaat tttgcatctg ctccaaaact 3120
 [0238] gctttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga aggcatcct tgtcaaagat 3180
 [0239] accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag aactcttaat gttttctttt 3240
 [0240] taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc tattgccgag aagcagtcta 3300
 [0241] aaatttattt tttaaaaaga gaaactgccc cattattttt gttttttttt attttttattt 3360
 [0242] tatattttttt ggcttttgtt cattgtcaaa tgtggaatgc tctgggttcc tagtatataa 3420
 [0243] ttaattcta gttttataa tctgttagcc cagttaaaat gtatgctaca gataaaggaa 3480
 [0244] ttttatagat aaatttgaaa gagtttagtc ttttagctg tagattttt aaacgattga 3540
 [0245] tgcactaaat tttttactat tgtgtatgtt aggggggttag agttgcag gggactgttt 3600
 [0246] aaaaaaagta gcttatacag catgtgcctg caacttaat ataagttggg tatgtgttagt 3660
 [0247] ctgtctata ccactgactg tattgaaaac caaagtatta agagggaaa cggccctgtt 3720
 [0248] tatactgtta ggggtattttt acattcaaaa atgtatgttt tttttcttt tcaaaattaa 3780
 [0249] agtatttgaa actgaattgc actaagatata aacctgcaag catataatac aaaaaaaaaat 3840
 [0250] tgcaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagttta taaaaatggc attactgcac 3900
 [0251] agtttaaga tgcacat tttttacag ttgtattgtg gtgcagaact ggattttctg 3960

[0252] taactaaaa aaaaatccac agttttaaag gcaataatca gtaaatgtta tttcaggga 4020
 [0253] ctgacatcct gtcttaaaa agaaatgaaa agtaaatctt accacaataa atataaaaaaa 4080
 [0254] atttgtcag ttactttct ttacatatt ttgctgtgca aaattgtttt atatcttgag 4140
 [0255] ttactaacta accacgcgtg ttgtcctat gtgccttct ttcatttca attctggta 4200
 [0256] tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcattt ttttgattc tgtactcagt 4260
 [0257] ttcttagtgt acagttAAC tgcccac aacctcgta aaagtgtaaa atgcattcctt 4320
 [0258] ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt aattcagggt gaaattatag 4380
 [0259] gctgtttttt gaagtggag ggctggcccc atatactgat tagcaatatt taatatagat 4440
 [0260] gtaaattatg acctcatttt ttctccca aagtttcag tttcaaattg agttgagcca 4500
 [0261] taattgccct tggtaggaaa aacaaaacaa aacagtggaa ctaggcttcc tgagcatggc 4560
 [0262] cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga ggagccggac aaatatggcg 4620
 [0263] catcagaggt ggcttgcgc catatgcatt gaacgtaaa gagaaacacgc gcttcctt 4680
 [0264] tcactaaagt tgactatTTT tccttcttctt cttacacacc gagattttct tggtagcaag 4740
 [0265] gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagttg tttttttgt ttgcTTTC 4800
 [0266] tcttaaacac tgaagatcat ttgtcttaaa tagaaaaaag aaaatccact cttacttcc 4860
 [0267] atattccaa gtacatatct ggtttaact atgttatcaa atcatatttc accgtgaata 4920
 [0268] ttcaGGGAG aacttctcta cctggatgag ctagtaatga tttcagatca tgctatcccc 4980
 [0269] agaaaataaaaa gcaaaaaata atacctgtgt ggaatatagg ctgtcTTTG atttactgg 5040
 [0270] atttacccca aaataggctg tgtatgggg ctgacttaaa gatcccttgg aaagactcaa 5100
 [0271] aactacccctc actagtagga ctccaaagcg ctgacctatt ttAAATGAC acaaattcat 5160
 [0272] gaaactaatg ttacaaattt atgcagttt cactcttagt catctccccc tagcacacca 5220
 [0273] atagaatgtt agacaaAGCC agcaactgtt tgaaaataca gccaaacacg atgactttt 5280
 [0274] ttgttttgc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataatat tgcaactctg actgaaagac 5340
 [0275] ttatTTTAA gaaaacaggt tgtgttttgt gctgctaagt tctggccagt ttatcatctg 5400
 [0276] gccttcctgc ctatTTTA caaaacacga agacagtgtg taacccgac atttgaccc 5460
 [0277] tccttatgt gctagtttag acaggctctt gaatccacac ttaatttgc ttaacaaaag 5520
 [0278] tcctaatagt aaacccccc tcatgagctt gaagtcaagt gttttgact tcagatattt 5580
 [0279] ctTCCTTTT ttTTTTTT tcctcatcac aactaagaga tacacaaact ctgaagaAGC 5640
 [0280] agaaatggag agaatgtttt taacaaaaaa gcatctgatg aaagattttt gcaaaacatt 5700
 [0281] ctcaaaataa gagtgatatt ctggatgttag ttattgcagt tatctcatga caaatgaggc 5760
 [0282] ctggattgga aggaaaatat agtgtgttag aattaagcat ttgtatgatgatcataagg 5820
 [0283] tagttgaata taataagcag gtttggccc ccaaacttta gaaaatcaaa tgcaaaagg 5880
 [0284] ctggcaaaaaa tgaggttga gtggctggct gtaagagaag gttactcctt agtaaaaggc 5940
 [0285] atttttagaa ataacaattt ctgaaaactt tgaagtatag tggagtagc aaacaaatac 6000
 [0286] atgttttttt ttcttacaa agaactccta aatccctgagt aagtgcattt cattacaata 6060
 [0287] agtctctaaa tttaaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat ctgcTTCC ccttacgct 6120
 [0288] gcgtttgatc ttgtctaaa tagtgttttattccatttca ttccaaatttca agaactgagc 6180
 [0289] ccactcgcaa gttggagcca tcagtggat acggccacatt ttggaaAGCCC cagcatcg 6240
 [0290] tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag ctgtacattt aaaaaatca 6300
 [0291] tcattattat tattatttgc agtcatggag aaccacctac ccctgacttc tggtagtct 6360
 [0292] cttttttaaa taaaaattac tgtgttagag aagaaggcta ttaaatgttag tagttaacta 6420
 [0293] tgcccttgc ctgggggtttt catagagacc ggttagaaag cgcaactcctg cttttcgatt 6480

[0294] tatggtgtgt gcaagtaaac aggtgcattt ctttcaacct gccatactag ttttaaaaat 6540
 [0295] tcactgaaat tacaaagata catatatatg catatatata atggaaagt tcccggaatg 6600
 [0296] caacaattag cattttaaaa tcataatag gcatgcacat tctaaatagt acttttcatt 6660
 [0297] gcttcattgt ttctctggca gataattta ctaagaagaa aaatagatat tcgactcccc 6720
 [0298] ttcccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc gagccccctg gtttctcg 6780
 [0299] aggccctaga cggtgttgca tttatcgtg atgtcaaacg tgctcatttgc tagacatag 6840
 [0300] ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaata caaagttaaa aaaaaaaaa 6887
 [0301] <210> 4
 [0302] <211> 403
 [0303] <212> PRT
 [0304] <213> 智人
 [0305] <400> 4
 [0306] Met Ala Ser Glu Leu Ala Met Ser Asn Ser Asp Leu Pro Thr Ser Pro
 [0307] 1 5 10 15
 [0308] Leu Ala Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe Asp Leu Met Lys Phe Glu Val
 [0309] 20 25 30
 [0310] Lys Lys Glu Pro Val Glu Thr Asp Arg Ile Ile Ser Gln Cys Gly Arg
 [0311] 35 40 45
 [0312] Leu Ile Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ser Thr Pro Met Ser Thr Pro Cys
 [0313] 50 55 60
 [0314] Ser Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Phe Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ser
 [0315] 65 70 75 80
 [0316] Gly Ser Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly
 [0317] 85 90 95
 [0318] Tyr Pro Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp
 [0319] 100 105 110
 [0320] Ala Val Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe
 [0321] 115 120 125
 [0322] Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Gly Ala
 [0323] 130 135 140
 [0324] Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala
 [0325] 145 150 155 160
 [0326] Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly
 [0327] 165 170 175
 [0328] Ala Gly Pro His Tyr His His His His His Ala Ala Gly His His
 [0329] 180 185 190
 [0330] His His Pro Thr Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala
 [0331] 195 200 205
 [0332] Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Pro Ala Ser Ala
 [0333] 210 215 220
 [0334] Gly Ala Ala
 [0335] 225 230 235 240

[0336]	Gly Ala Gly Gly Ala Leu His Pro His His Ala Ala Gly Gly Leu His		
[0337]	245	250	255
[0338]	Phe Asp Asp Arg Phe Ser Asp Glu Gln Leu Val Thr Met Ser Val Arg		
[0339]	260	265	270
[0340]	Glu Leu Asn Arg Gln Leu Arg Gly Val Ser Lys Glu Glu Val Ile Arg		
[0341]	275	280	285
[0342]	Leu Lys Gln Lys Arg Arg Thr Leu Lys Asn Arg Gly Tyr Ala Gln Ser		
[0343]	290	295	300
[0344]	Cys Arg Phe Lys Arg Val Gln Gln Arg His Val Leu Glu Ser Glu Lys		
[0345]	305	310	315
[0346]	Asn Gln Leu Leu Gln Gln Val Asp His Leu Lys Gln Glu Ile Ser Arg		
[0347]	325	330	335
[0348]	Leu Val Arg Glu Arg Asp Ala Tyr Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Val		
[0349]	340	345	350
[0350]	Ser Ser Gly Phe Arg Glu Asn Gly Ser Ser Ser Asp Asn Pro Ser Ser		
[0351]	355	360	365
[0352]	Pro Glu Phe Phe Ile Thr Glu Pro Thr Arg Lys Leu Glu Pro Ser Val		
[0353]	370	375	380
[0354]	Gly Tyr Ala Thr Phe Trp Lys Pro Gln His Arg Val Leu Thr Ser Val		
[0355]	385	390	395
[0356]	400		
[0356]	Phe Thr Lys		
[0357]	<210> 5		
[0358]	<211> 373		
[0359]	<212> PRT		
[0360]	<213> 智人		
[0361]	<400> 5		
[0362]	Met Ala Ser Glu Leu Ala Met Ser Asn Ser Asp Leu Pro Thr Ser Pro		
[0363]	1	5	10
[0364]	15		
[0364]	Leu Ala Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe Asp Leu Met Lys Phe Glu Val		
[0365]	20	25	30
[0366]	Lys Lys Glu Pro Val Glu Thr Asp Arg Ile Ile Ser Gln Cys Gly Arg		
[0367]	35	40	45
[0368]	Leu Ile Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ser Thr Pro Met Ser Thr Pro Cys		
[0369]	50	55	60
[0370]	Ser Ser Val Pro Pro Ser Pro Ser Phe Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ser		
[0371]	65	70	75
[0372]	80		
[0372]	Gly Ser Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly		
[0373]	85	90	95
[0374]	Tyr Pro Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp		
[0375]	100	105	110
[0376]	Ala Val Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe		
[0377]	115	120	125

[0378] Asp Gly Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Ala Gly Ala
[0379] 130 135 140
[0380] Gly Ala Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala
[0381] 145 150 155 160
[0382] Ala Ala Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly
[0383] 165 170 175
[0384] Ala Gly Pro His Tyr His His His His His Ala Ala Gly His His
[0385] 180 185 190
[0386] His His Pro Thr Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala
[0387] 195 200 205
[0388] Ser Ala Gly Gly Ala Gly Gly Gly Gly Pro Ala Ser Ala
[0389] 210 215 220
[0390] Gly Ala Ala
[0391] 225 230 235 240
[0392] Gly Ala Gly Gly Ala Leu His Pro His His Ala Ala Gly Gly Leu His
[0393] 245 250 255
[0394] Phe Asp Asp Arg Phe Ser Asp Glu Gln Leu Val Thr Met Ser Val Arg
[0395] 260 265 270
[0396] Glu Leu Asn Arg Gln Leu Arg Gly Val Ser Lys Glu Glu Val Ile Arg
[0397] 275 280 285
[0398] Leu Lys Gln Lys Arg Arg Thr Leu Lys Asn Arg Gly Tyr Ala Gln Ser
[0399] 290 295 300
[0400] Cys Arg Phe Lys Arg Val Gln Gln Arg His Val Leu Glu Ser Glu Lys
[0401] 305 310 315 320
[0402] Asn Gln Leu Leu Gln Gln Val Asp His Leu Lys Gln Glu Ile Ser Arg
[0403] 325 330 335
[0404] Leu Val Arg Glu Arg Asp Ala Tyr Lys Glu Lys Tyr Glu Lys Leu Val
[0405] 340 345 350
[0406] Ser Ser Gly Phe Arg Glu Asn Gly Ser Ser Ser Asp Asn Pro Ser Ser
[0407] 355 360 365
[0408] Pro Glu Phe Phe Met
[0409] 370
[0410] <210> 6
[0411] <211> 19
[0412] <212> RNA
[0413] <213> 人工序列
[0414] <220>
[0415] <223> c-MAF特异性siRNA
[0416] <400> 6
[0417] acggcucgag cagcgacaa 19
[0418] <210> 7
[0419] <211> 19

- [0420] <212> RNA
- [0421] <213> 人工序列
- [0422] <220>
- [0423] <223> c-MAF特异性siRNA
- [0424] <400> 7
- [0425] cuuaccagug uguucaccaa 19
- [0426] <210> 8
- [0427] <211> 20
- [0428] <212> RNA
- [0429] <213> 人工序列
- [0430] <220>
- [0431] <223> c-MAF特异性siRNA
- [0432] <400> 8
- [0433] uggaagacua cuacuggaung 20
- [0434] <210> 9
- [0435] <211> 20
- [0436] <212> RNA
- [0437] <213> 人工序列
- [0438] <220>
- [0439] <223> c-MAF特异性siRNA
- [0440] <400> 9
- [0441] auuugcaguc auggagaacc 20
- [0442] <210> 10
- [0443] <211> 20
- [0444] <212> RNA
- [0445] <213> 人工序列
- [0446] <220>
- [0447] <223> c-MAF特异性siRNA
- [0448] <400> 10
- [0449] caaggagaaa uacgagaagu 20
- [0450] <210> 11
- [0451] <211> 20
- [0452] <212> RNA
- [0453] <213> 人工序列
- [0454] <220>
- [0455] <223> c-MAF特异性siRNA
- [0456] <400> 11
- [0457] acaaggagaa auacgagaag 20
- [0458] <210> 12
- [0459] <211> 20
- [0460] <212> RNA
- [0461] <213> 人工序列

- [0462] <220>
[0463] <223> c-MAF特异性siRNA
[0464] <400> 12
[0465] accuggaaga cuacuacugg 20
[0466] <210> 13
[0467] <211> 13878
[0468] <212> DNA
[0469] <213> 智人
[0470] <400> 13
[0471] aactatatat taaacacctc cggtctgaga ggccgtgtt ggtgtcttg tcaggtgaag 60
[0472] aaagagaaga aggctggta accttcccag gaatttcac tgaagaaaac atctggattt 120
[0473] ttacatctc ttgtgcaaaa caaacaaga tttcattaag tgatgtatat tgtttccaa 180
[0474] ggaagaaacc tgtagagaca aaaacaata agcaaataat tgaaacaaaa atatgataaa 240
[0475] cccccaaatt ctccagtgc taatttactt gttatcatgg ttctctacaa aggtagagat 300
[0476] cactaattac aggttttcc agaattcaca tttcacgtca agatcatcca atccaaacag 360
[0477] tgtacggaaa gccttagggcc ttcttcactt tgccccctac cccaccctac acacacgccc 420
[0478] ccatctaaat gataccctt gaaagaaacc tacacatctc atttgtctat attttgcttc 480
[0479] ctccctcgcc tcccgtaac caaatgtgag ttgttctcta actgcactgg agaatcagaa 540
[0480] ttattgtac atatgttgt gttccactt ataaaaaaaaac ctatattta agataaactt 600
[0481] tgtagtaat tcatgaggta agtgactatt tatgtaatc aggtagaaat atattctcaa 660
[0482] gcataatgca ttacataaat ttgaatgtaa aatgttcaat tatgaagtaa atacaggtaa 720
[0483] tgcaaataat aaattacctc taataaaaaat tataaaagat gtgcctgaa agagagagcg 780
[0484] gcttaactt acaactgtga attgctaaa gagaaaaagaa ttaataaattt ctgaattact 840
[0485] ctgatgatta tttagcacat aattcaccta ttccataacga ctcctagtaa tcagactgtt 900
[0486] gttcacatc ctccaacatg aggcaagact gttccctcag caatttgcc cttatcagat 960
[0487] tatctcgct gattctatta attttcttcc atgaatctgc taacagtgtt ttgtgattta 1020
[0488] cttaccctgc taactgaaga ctgttaaaag gatttatcta acactggacc taagaacagt 1080
[0489] gtacgcctt tcgtttagtt actctgaaga actctttctc aaatcaattt agttggttc 1140
[0490] atagtggaaat ttagtgaca ctggtagtt ctgccttccata aatcagccc ctaaacaag 1200
[0491] agtccagaca ccatacctga tgcattccat tctattcaga ttatggatgt ctgattccaa 1260
[0492] catgatataat ttgagttgct ataactcaca atcggggaaa atatattcct ttaagcttt 1320
[0493] aatcttgta atttggacat gaacaggggt ttgttttcc attttgcat gaagtcatta 1380
[0494] tttatgtact gacgtgaaac tataatttg tttctgtatgt tactgtgtca caatattcta 1440
[0495] tgcgtatgtaa cccatgtcct cctccccctc acaaattctcc tataaatattt cattgccttc 1500
[0496] aaaaacttta atactactgg tccgaattgg tcaataatga caaatgcatt gtttctaaat 1560
[0497] tactgtatata ttgttctacag agattactag agtataatata gcaagggat gtttgcgtt 1620
[0498] aagaaaaacac agttcacatt gtattggat tagattggct tggatagaag tgaaacaac 1680
[0499] aatgttagca aagaagtcta aagacatgtg gccactgtca attgtacaga atcaaaaacc 1740
[0500] tgaatagtac tcattaaat gagagagctc aattgttata aagaaaatgc tgctaacaga 1800
[0501] gaactgtaaa ttttttagaca cccctgtgaa tcactaaata ataatgtaaa aaggataaaaa 1860
[0502] atgagaatta agttataaggc ctgagagcat tactgttaca catctaaaaa aataattctg 1920
[0503] atcctctctt tttttttcc aagagaaaaat gggcgactat aaaagacctt gcaataagag 1980

[0504] aaataaaaat accatgtctt cacagcagtg tacataaaata aaccataaaa atgtgcagat 2040
 [0505] aataatatat ttagctgccc aaacatggc atttaatttc tagaaatgtat atataacaat 2100
 [0506] gtaacaatta gataactcagc catgaatgt tatggcacag tttcatcat tagcaaactt 2160
 [0507] tgtgtataaa atattattta ttatttatta taatactgtt ttcagaggca atgatcatac 2220
 [0508] cttagcattt ttaacacaaa tatgtatgcaa aaggattaaa agtatcat aaacaaacaa 2280
 [0509] taaattctt ctaaatacac ttaaattcat atttacatg aaaaatataa acttcctaca 2340
 [0510] ttgtgacta ctgactttt aaaagaccta gaaaactatt gttacggca atgttaatg 2400
 [0511] acataatgct tatgtatgg aaagtgtgga tttcctcta aataaactat aatcccttaa 2460
 [0512] cttcattact agggaaaata ttgttaaaga gaaggaaagc aagggattc tgcttagttg 2520
 [0513] cataaatatt gacataatct tcactcttc ttccccaaac tggtataga catagttt 2580
 [0514] tccacccaac aaaatgctct tataagacca aaactaccct tattaacaac ttctctgcag 2640
 [0515] tcacgatgaa aagaaacact acttgtctga aaaataccga cagcgctgcc ctttcagat 2700
 [0516] taggggtgc ctacgaatct tttgggaagt cttccattaa ggattcctgg gtttgctgaa 2760
 [0517] actgaagtct actaggatca gagaattaa cacaggtcta atatggtca aggaacgagt 2820
 [0518] gagagacacc tgaggtata aatagcaaag catgctgcgg ggtgggaag accattctga 2880
 [0519] agtgcaatgt tcaagacgct ggcttaatat atgactaagt gtcagaagtc aggtttctg 2940
 [0520] agaattactt tccagataaa caactttata gcactgact taatcttact tactagagac 3000
 [0521] atctcattta tcactgaatt acaagtaact ttaatcctat tgatattgcc ataaagcccg 3060
 [0522] ttgaaaatcc atcctggcac tttaaaggg tttggggccc tggtacatgg ggatccttt 3120
 [0523] gcaaaggctc cagccagaaaa ttacaccccg agggtgtctg tatcccctgg cctcttg 3180
 [0524] aacaatcaag gagaagagga gggcaaaaa tgatctctgc atctgccagc actttctcg 3240
 [0525] gccctttcc tataggtcg ggtctccca cttcagtcacta actaactttg tgtgtcttt 3300
 [0526] tcctcctccc acactggta accagctgtc tttcacttca tcgacaaaac tggacacgga 3360
 [0527] tcaatttcaa ctgaccttg ccgaaagggtc ggcgtgttga ggtaaaaacc aactcgctcc 3420
 [0528] aacaatagtt tccactcttc gatcctttt caggctttc agaattttt tttttttt 3480
 [0529] atgcaccctc ctagcgctc cccctctca taaagtaaaa taaatacgat taaaacacc 3540
 [0530] aaatgcattt cattaattga aggaatcaac agtcccact tctaagcaga cggctggc 3600
 [0531] ttccaaaggc tgggtcggtt tcaggagctt tctctccaaa taaatctctg cttcttcgac 3660
 [0532] ttgcctatcg cttaaaatc ttagaaacag agttagttt tggttcctt cttttttttt 3720
 [0533] tttttttt atttctttt tgcatataact ttttagagaat caatctagaa atttgaacta 3780
 [0534] ctatttagca ttgcacttg ggggtgggg gagcagcctc cccacccca ccccccactc 3840
 [0535] tgcgttccg gactagttcc agaaaccgcg gttaaaatt taaccctcg agggtagctg 3900
 [0536] gtgagggctg gggattgtt tttccctt gctccctgcc acgatcaagt ccgaaataat 3960
 [0537] taaaggaaac gtaaaagtgc aaaggcgcg cctgaccctg ataaacagag gtcagattc 4020
 [0538] gtaagggac gggtagtgtt gagttgtgtt gtgtttgtt gtgtgtgtt aagagagaga 4080
 [0539] gagagcgagc gcgcaatatg agtctcaaag gccaaactcc ggccagtcag gagccggaag 4140
 [0540] gctgagcccg gctgaccctga ctggagctt cccggagtt atctgcata ggcgctcgct 4200
 [0541] ctgtccaagg gcacgcgacg ccagcggca gccggctcc gtgaagaatg gcctctaaac 4260
 [0542] aacttatttt acctcggtt aaagagaggg ataaaatggg ctggctctt ccacggatgc 4320
 [0543] ccagccttctt gggcaggcgc atggccggc ggcggccagc ccgcagcccc gatccggaca 4380
 [0544] ccccaactgca tccctccctt cccggccct tcccccacg ggcggccgag agacggacaa 4440
 [0545] agagttgggg ccaagttga gcggccggca cgcccgaggct cagggaaagga aggtccccgg 4500

[0546] cagacacctg ggtaccagag ttgggtcgag gagaaaaagc tgggaggcga attcacaatc 4560
 [0547] ctgggggtgg agggcaggca ggggagggga atcaggccaa tcccagccga gtgagcccc 4620
 [0548] agcgagctgg ggctccggat gggaggcctg tctcgcgctc caaagaaaag caaacgc(cc) 4680
 [0549] tcccaggtcc gcccggattt ccgaagcccc tctggaaaaa ctcctccccc tcttacacca 4740
 [0550] aactttgcgc cgcccctcg tccctccgg gtaggcagcg gcgcaggaag ggttaagcca 4800
 [0551] gcccgccccca gctgacagtc agctgattgg gcccctgattt acagctccga aaagtttctt 4860
 [0552] tgtttctata ctattatgct aatcgccggc gctctcgccg cctccattt gcccggagtg 4920
 [0553] ccagtcaatt tctcatttgg acctgacgac acgagtgcta taaaacttag caattgtttt 4980
 [0554] aaactttctt tgctggatca gaggcttaa aatctttttt catcttctag ctgttagctcg 5040
 [0555] ggctgcttgtt cggcttggcc tccccctccc ccctttgctc tctgcctcg tttccccag 5100
 [0556] gacttcgcttca ttttgcctttt taaaaaaaag gcaagaaaaga actaaactcc cccctccctc 5160
 [0557] tcctccagtc gggctgcacc tctgccttgc actttgcaca gaggtagaga gcgcgcgagg 5220
 [0558] gagagagagg aaagaaaaaaa aataataaaag agagccaagc agaagaggag gcgagaagca 5280
 [0559] tgaagtgtta actccccctt gccaaggccc gcgcgcgcgc gacagacgcc cgccgcgcct 5340
 [0560] ccagccccga gcggacgcgc cgccgcgcct gcctgcagcc cggccggcgc aggccgagccc 5400
 [0561] ttcccttatgc aaagcgcgc gcccggcgc gaggcggggaa cggccgcac cggccggggc 5460
 [0562] tcctccagct tcgcgcgcgc agccaccacc gcccgcacccg cagctcgccg aggatcttc 5520
 [0563] cgagcctgaa gcccggcgc cggcgcgc gaggcggcgc gaggcggggc 5580
 [0564] gagcggaggaa gcacattggc gtgagcagg gggagggagg gcggcgcgc gggcgcgcgg 5640
 [0565] cagggcgggg gggtgtgtgt gtgagcgcgc tcggaggtt cggccagcc accgcgcgc 5700
 [0566] aagctagaag cggcccgcc cggcaagctg gctcacccgc tggccacccca gcacagcccc 5760
 [0567] ctggcccttc tcctgcagcc catctggcgg agcggcggcgc gcggcggcgg cggcggcagg 5820
 [0568] agaatggcat cagaactggc aatgagcaac tccgacactgc ccaccagtc cctggccatg 5880
 [0569] gaatatgtta atgacttcga tctgtatgaag tttgaagtga aaaaggaacc ggtggagacc 5940
 [0570] gaccgcatca tcagccactg cggccgtctc atgcggggg gctcgctgc ctccacccccc 6000
 [0571] atgagcacgc cgtgcagctc ggtccccct tcccccaagtc tctcgccgc cagccggggc 6060
 [0572] tcggcagcg agcagaaggc gcacctggaa gactactact ggatgaccgg ctacccgcag 6120
 [0573] cagctgaacc cccggcgcgc gggctcagc cccgaggacg cggtcgaggc gctcatcagc 6180
 [0574] aacagccacc agctccaggg cggcttcgat ggctacgcgc gcggggcgc gcaactggcc 6240
 [0575] gcggcggccg gggccggcgc cggccgcctcc ttggcggca gcggcggagga gatggggcccc 6300
 [0576] gcccggccg tggtgtccgc cgtgatcgcc gcggccgcgc cgcagagcgg cggggccccc 6360
 [0577] cactaccacc accaccacca ccacgcgc gggcaccacc accacccgc gcccggcgc 6420
 [0578] cccggcgcgc cggcagcgc gcggccctcg gcgggtggcg ctggggcgc gggcggcgg 6480
 [0579] gggccggcca gcgctggggg cggcggcgc gggcggcggc gggaggcgg cggggcgcgc 6540
 [0580] gcggggcgg gggcccccgc acacccgcac cacgcgcgc gcggcctgc ctgcacgc 6600
 [0581] cgcttctccg acgagcagct ggtgaccatg tctgtcgccg agctgaaccg gcagctgcgc 6660
 [0582] ggggtcagca aggaggaggat gatccggctg aagcagaaga ggcggaccct gaaaaaccgc 6720
 [0583] ggctatgccc agtcctgcgc ctcaagagg gtgcagcaga gacacgtcct ggagtcggag 6780
 [0584] aagaaccagc tgctgcagca agtcgaccac ctcaagcagg agatctccag gctggtcgc 6840
 [0585] gagagggacg cgtacaagga gaaatacgag aagttggta gcagcggcctt ccgagaaaaac 6900
 [0586] ggctcgagca gcgacaaccc gtcctccccc gagttttca tgtgagtctg acacgcgatt 6960
 [0587] ccagctagcc accctgataa gtgctccgc ggggtccggc tcgggtgtgg gcttgctagt 7020

[0588] tctagagcca tgctcgccac cacccatcca cccccacccc caccgagttt ggcccccttg 7080
 [0589] gccccctaca cacacacaaa cccgcacgca cacaccacac acacacacac acacacacac 7140
 [0590] acacccca ca ccctgctcga gtttgtgtg gtggtggtg ttttaactg gggaggaaat 7200
 [0591] gggtgtctgg ctcatggatt gccaatctga aattctccat aactgcttag ctgttttt 7260
 [0592] tttttttt acacccccc gccccacccc cggaacttgca caatgttcaa tgatctcagc 7320
 [0593] agagttcttc atgtgaaacg ttgatcacct ttgaaggctg catcattcac atatttttc 7380
 [0594] ttcttcttcc ccttcagttc atgaactggt gttcatttc tgtgtgtgtg tgtgtttat 7440
 [0595] ttgtttgga tttttttt taatttact ttttagagctt gctgtgtgc ccacctttt 7500
 [0596] tccaacctcc accctcaact cttctcaacc catctcttcc gagatgaaag aaaaaaaaaa 7560
 [0597] gcaaagtttt ttttcttct cctgagttct tcattgtgaga ttgagcttgc aaaggaaaaa 7620
 [0598] aaaatgtgaa atgttataga ctgcagcgt gccgagttcc atcggggtttt ttttttagca 7680
 [0599] ttgttatgct aaaatagaga aaaaaatcct catgaacctt ccacaatcaa gcctgcata 7740
 [0600] accttctggg tgtgacttgt gagtttgcc cttgtgatgc caaatctgag agtttagtct 7800
 [0601] gccattaaaaa aaactcatc tcatttcattt cattattatg ctgtactt tgtcttagca 7860
 [0602] acaatgaact ataactgttt caaagacttt atggaaaaga gacattatat taataaaaaa 7920
 [0603] aaaaagcctg catgctggac atgtatggta taatttattt ttccctttt ttccctttt 7980
 [0604] gcttggaaat ggacgttcga agactttag catggcatc atactttgt tttattgcct 8040
 [0605] catgactttt ttgagtttag aacaaaacag tgcaaccgtt gaggcttcc cccatgaaat 8100
 [0606] ttgcattctg ctccaaaact gcttgagtt actcagaact tcaacctccc aatgcactga 8160
 [0607] aggcatcct tgtcaaagat accagaatgg gttacacatt taacctggca aacattgaag 8220
 [0608] aactcttaat gttttcttt taataagaat gacgccccac tttggggact aaaattgtgc 8280
 [0609] tattgccgag aagcagtcta aaatttattt tttaaaaaga gaaactgccc cattatttt 8340
 [0610] gttttgtttt atttttattt tatattttt ggcttttgtt cattgtcaaa tgtgaaatgc 8400
 [0611] tctgggtttc tagtatataa tttaattcta gttttataa tctgttagcc cagttaaaat 8460
 [0612] gtatgctaca gataaaggaa tgttatagat aaatttggaa gagtttagtc tgtttagctg 8520
 [0613] tagattttt aaacgattga tgcactaaat tgtttactat tgtatgtta agggggtag 8580
 [0614] agtttgcaag gggactgttt aaaaaaagta gcttatacag catgtgcttgc caacttaaat 8640
 [0615] ataagttggg tatgtgttagt ctgtatataa ccactgactg tattgaaaac caaagtatta 8700
 [0616] agagggaaaa cgcctgtt tatatctgtt ggggtatttt acattcaaaa atgtatgttt 8760
 [0617] tttttcttt tcaaaaattaa agtatttggg actgaattgc actaagatata aacctgcaag 8820
 [0618] catataatac aaaaaaaaaat tgcaaaaactg tttagaacgc taataaaatt tatgcagtt 8880
 [0619] taaaaatggc attactgcac agtttaaga tgatgcagat ttttttacag ttgtattgt 8940
 [0620] gtgcagaact ggattttctg taactaaaa aaaaatccac agtttaaag gcaataatca 9000
 [0621] gtaaatgtta tttcaggaa ctgacatcct gtctttaaa agaaatgaaa agtaaatctt 9060
 [0622] accacaataa atataaaaaaa atcttgtcgtt ttactttct tttacatatt ttgcgtgtca 9120
 [0623] aaattgtttt atatcttgat ttactaacta accacgcgtt ttgttcctat gtgtttct 9180
 [0624] ttcatttca attctgttta tatcaagaaa agaataatct acaataataa acggcatttt 9240
 [0625] ttttgattc tgtactcagt ttcttagtgt acagtttaac tggcccaac aacctcgat 9300
 [0626] aaagtgtaaa atgcattccctt ttctccagtg gaaggattcc tggaggaata gggagacagt 9360
 [0627] aattcagggt gaaattatag gctttttt gaagttagga ggctggcccc atataactgt 9420
 [0628] tagcaatatt taatatacat gtaaattatg acctcatttt tttctccccca aagttttcag 9480
 [0629] tttcaaatg agttgagcca taattgcct ttgttagaaaa aacaaaacaa aacagtggaa 9540

[0630] ctaggcttcc tgagcatggc cctacacttc tgatcaggag caaagccatc catagacaga 9600
 [0631] ggagccggac aaatatggcg catcagaggt ggcttgcga catatgcatt gaacggtaaa 9660
 [0632] gagaaaacagc gcttgccttt tcactaaagt tgactatttt tccttcttct cttacacacc 9720
 [0633] gagatttct tggtagcaag gcctgacaag atttaacata aacatgacaa atcatagttg 9780
 [0634] ttgttttgt tttgctttc tcttaacac tgaagatcat ttgtcttaaa tagaaaaaag 9840
 [0635] aaaatccact ccttacttcc atatttccaa gtacatatct ggtttaaact atgttatcaa 9900
 [0636] atcatatttc accgtgaata ttcaagtggag aacttctcta cctggatgag ctagtaatga 9960
 [0637] tttcagatca tgctatcccc agaaaataaaa gcaaaaaata ataccgtgt ggaatataagg 10020
 [0638] ctgtgctttg atttactggt atttacccca aaataggctg tgtatgggg ctgacttaaa 10080
 [0639] gatcccttgg aaagactcaa aactacccctc actagtagga ctcctaagcg ctgacccatt 10140
 [0640] tttaaatgac acaaattcat gaaactaatg ttacaaattc atgcagttt cactcttagt 10200
 [0641] catttcccc tagcacacca atagaatgtt agacaaagec agcactgtt tgaaaataca 10260
 [0642] gccaaacacg atgactttt tttgttttgc tgccgttctt aaaagaaaaa aagataataat 10320
 [0643] tgcaactctg actgaaagac ttatTTTaa gaaaacaggt tgtgttggt gctgctaagt 10380
 [0644] tctggccagt ttatcatctg gccttcctgc ctatTTTaa caaaacacga agacagtgt 10440
 [0645] taacctcgac attttgaccc tcccttatgt gctagtttag acaggctcctt gaatccacac 10500
 [0646] ttaatTTTgc ttaacaaaag tcttaatagt aaacccccc tcatgagctt gaagtcaagt 10560
 [0647] gttcttgact tcagatattt ctTCCTTT tttttttt ccTCTCATCAC aactaagaga 10620
 [0648] tacacaaact ctgaagaagc agaaatggag agaatgctt taacaaaaaa gcatctgatg 10680
 [0649] aaagattttt ggcacaaacatt ctcaaaataa gagtgtatatt ctggatgtat ttattgcagt 10740
 [0650] tatctcatga caaatgaggc ctggattgga aggaaaatatt agttgtgtat aattaagcat 10800
 [0651] ttgtatagga atctacaagg tagttgata taataagcag gttttggccc ccaaacttta 10860
 [0652] gaaaatcaaa tgcaaagggt ctggcaaaaa tgaggTTGA gtggctggct gtaagagaag 10920
 [0653] gtttaactcct agtaaaaggc atTTTtagaa ataacaatta ctgaaaactt tgaagtatag 10980
 [0654] tgggagtagc aaacaaatac atTTTTTTT tttcttacaa agaactccta aatcctgagt 11040
 [0655] aagtgccatt cattacaata agtctctaaa tttaaaaaaaa aaaaaatcat atgaggaaat 11100
 [0656] cttagttcc ccttacgct gcgtttgatc tttgtctaaa tagtggtaaa attcctttca 11160
 [0657] ttccaattac agaactgagc ccactcgca gttggagcca tcagtggat acgccacatt 11220
 [0658] ttggaagccc cagcatcgat tacttaccag tgtgttcaca aaatgaaatt tgtgtgagag 11280
 [0659] ctgtacatta aaaaaatca tcattattat tattattgc agtcatggag aaccacccat 11340
 [0660] ccctgacttc tgTTTGTCT cttttttaaa taAAAattac tgtgttagag aagaaggcta 11400
 [0661] ttAAATGTA tagttaacta tgccttgcgt ctgggggtt catagagacc ggttagaaag 11460
 [0662] cgcaactcctg ctTTTcgatt tatgggtgt gcaagtaaac aggtgcattt cttcaacct 11520
 [0663] gccatacttag tttaaaaaat tcactgaaat tacaaagata catatatatg catatatata 11580
 [0664] atggaaagtt tcccgaaatg caacaattag cattttaaaaa tcataatata gcatgcacat 11640
 [0665] tctaaatagt actTTTcat gtttcttgc ttccttgc gataattttt ctaagaagaa 11700
 [0666] aaatagatat tcgactcccc ttccctaaac aaatccacgg gcagaggctc cagcggagcc 11760
 [0667] gagccccctg gtttctcgat agggccctaga cgggttgca tttatcagt atgtcaaacg 11820
 [0668] tgctcatttgc tcagacatag ctgtaaatga aaacaatgtg tggcaaaaata caaagtttagt 11880
 [0669] taaatacaca ccctctgtgt gatTTTGC tcccttttctt ttttgctcc tactcaaaaa 11940
 [0670] aaaaaaaaaatc acctccttta cattccctg gtttcttgc tggccctt ttcaaaaaacc 12000
 [0671] atgtataat ttTTTacaat gtatctgaca cattaaatata ttgacatcaa ataggcagac 12060

- [0672] attctacttt tgcctggcaa ataaatctgc tacggagaca tcatttcctc actgtctcaa 12120
 [0673] agccataact acctggagt cttcaacac agaccctcc gatggaaat gctgttatt 12180
 [0674] actgaatgca ggatgctcac gctctgatct tttctccctt gtgccttac cccagtcatt 12240
 [0675] ttacttagc aacaccaatt ctagatactt ctgttctgaa gtagaaccac ccccttgcca 12300
 [0676] cactgccagt ttcctgcta aaagcagtgg acagaagaca gatcatggc accctcacaa 12360
 [0677] acatggcaca cagctgtctc ggtagctca ttcccagcat gtcctggct aaatatctag 12420
 [0678] agttgcctat gacacgttca aaggttcca agcacagtagt attgggaggc ttttgctgct 12480
 [0679] gtggccgttg tttcggtta ggccaactta cttccgtatt cacatactt tggcttacg 12540
 [0680] aaatacactc ctccagtcata ctaggccaat caatatattt aaaagtctga ttgccacata 12600
 [0681] agtctctctc tctctcttt tgtttttgt ttgtttgtt tttctgttt tggctgccgg 12660
 [0682] tagttaaaga ctgagatagg ttggaagact aaaatacagg agtacatgag tgacaacett 12720
 [0683] cagccgtctg atttccatgc cggtaaaaca cacaaccaag ctcttcttag cgctgcta 12780
 [0684] ataaacattc actaagaggg aataggaagt gagatttacc agcttcactt tgctgattt 12840
 [0685] caaggttccc cactacgatt cactgtcatt tgattttga aaaataattt tgtccgtctc 12900
 [0686] ttgaagaaa tgtcttagtt cttttatTTT gttgtttgg ttttttttag agaagttta 12960
 [0687] tctgcagtga taggctacaa ttttatctc cgctgattat ttgtcaggat gctgaatgaa 13020
 [0688] taatttggtc ctgtgccttc ctgttggc tgaggaaaaat aagagaaact tggaaagttt 13080
 [0689] ttccactctt agcccatcct aaatctaaaa gaagatgtcc caggtccagg caggccatgt 13140
 [0690] agtagttata aaggaggtgg tccaggtcca gccaccta 13200
 [0691] agcatttgct taaaagcgg acaagagtct taacccact tgccataaca ctgctttct 13260
 [0692] cgctttgtat gtaaatcttc aaaattcaga catcaaacag ccccgaaaaa ggggaattct 13320
 [0693] ctccaggcat tgctccccc cagctcctga acaaaccagg ctctgtctag cattttttc 13380
 [0694] cctagcgggg gtagggaca gggtagaga atttcagtc cccaggctgt ctcatgattt 13440
 [0695] ttagggcata aagaaacaca gtcctgccc 13500
 [0696] aaacaaaaca aaactaaaca aacaaatcaa attgcttc 13560
 [0697] atctcggct ccctgttccc tgcaccattt gtaggaggtg agaaatgagg gaaacaagag 13620
 [0698] aaagggAAC tttaaaagcg ggaggcccag aaataatccc ttttaccgt ctgaatttca 13680
 [0699] ctgctccgt ggctaacgtc agacctagtg tgcatgtatg ccagaagtaa actaggctcg 13740
 [0700] gctgtccatt tctttaaaat atttcacat gtttccttt tgaaaacaat tttggggact 13800
 [0701] aaacccaaat ggagagattt gaggaaatcg ttaatgtt aacatttgat tatatttata 13860
 [0702] aatgtatcag tctgtgat 13878
 [0703] <210> 14
 [0704] <211> 1368
 [0705] <212> DNA
 [0706] <213> 人工序列
 [0707] <220>
 [0708] <223> INB-1-11-8 (H1) 重链
 [0709] <220>
 [0710] <221> misc_feature
 [0711] <222> (1) .. (396)
 [0712] <223> 可变重链
 [0713] <220>

[0714] <221> misc_feature
 [0715] <222> (397) .. (402)
 [0716] <223> 恒定区起始
 [0717] <220>
 [0718] <221> misc_feature
 [0719] <222> (949) .. (1248)
 [0720] <223> 变体
 [0721] <400> 14
 [0722] atggagactg ggctgcgtg gcttcctg gtcgtgtc tcaaagggtt ccagtgtc 60
 [0723] tcgctggagg agtccgggg tcgcctggc acgcctggg caccctgac actcacctgc 120
 [0724] acagcctctg gatttcctt caataactat ccaatgacct gggtccgcca ggctccaggg 180
 [0725] aaggggctgg attatatcg agtcattaaat aatagtggt aaacagccta cgcgacactgg 240
 [0726] gcgaagcgcc gattcaccat ctccagaacc tcgaccacgt tgtatctgaa aatcgccagt 300
 [0727] ccgacaatcg aggacacggc caccatttc tgtgccagag ggggtcctgt tagtagtgat 360
 [0728] atgtggggcc caggcaccct ggtcatcgtc tcctcaggc aacctaaggc tccatcagtc 420
 [0729] ttcccactgg cccccctgtcg cggggacaca cccagctcca cggtaaccctt gggctgcctg 480
 [0730] gtcaaagggtt acctcccgga gccagtgacc gtgacctgga actcggcac cctcaccaat 540
 [0731] ggggtacgca cttcccgctc cgtccggcag tcctcaggcc tctactcgct gagcagcgtg 600
 [0732] gtgagcgtga cctcaagcag ccagccgctc acctgcaacg tggcccaccc agccaccaac 660
 [0733] accaaagtgg acaagaccgt tgccctcg acatgcagca agccacgtg cccacccct 720
 [0734] gaactcctgg ggggaccgtc tgtttcatc ttccccccaa aacccaagga caccctcatg 780
 [0735] atctcacgca ccccccggggtt cacatgcgtg tggtggacg tgagccagga tgaccccgag 840
 [0736] gtgcagttca catggtacat aaacaacgag caggtgcgca ccgcccggcc gccgctacgg 900
 [0737] gagcagcgt tcaacagcac gatccgcgtg gtcagcaccc tccccatcgc gcaccaggac 960
 [0738] tggctgaggg gcaaggagtt caagtcaaaa gtccacaaca aggcaactccc ggcccccattc 1020
 [0739] gagaaaaacca tctccaaagc cagagggcag cccctggagc cgaaggctta caccatggc 1080
 [0740] cctccccggg aggagctgag cagcaggtcg gtcagcctga cctgcatgat caacggcttc 1140
 [0741] tacccttcg acatctcggt ggagtggag aagaacgggaa aggcaagagga caactacaag 1200
 [0742] accacgcccgg ccgtgctgga cagcgcacggc tcctacttcc tctacagcaa gctctcagtg 1260
 [0743] cccacgagtg agtggcagcg gggcgacgtc ttcacctgct ccgtgatgca cgaggcctt 1320
 [0744] cacaaccact acacgcagaa gtccatctcc cgctctccgg gtaaatga 1368
 [0745] <210> 15
 [0746] <211> 396
 [0747] <212> DNA
 [0748] <213> 人工序列
 [0749] <220>
 [0750] <223> INB-1-11-8 (H1) 可变重链
 [0751] <400> 15
 [0752] atggagactg ggctgcgtg gcttcctg gtcgtgtc tcaaagggtt ccagtgtc 60
 [0753] tcgctggagg agtccgggg tcgcctggc acgcctggg caccctgac actcacctgc 120
 [0754] acagcctctg gatttcctt caataactat ccaatgacct gggtccgcca ggctccaggg 180
 [0755] aaggggctgg attatatcg agtcattaaat aatagtggt aaacagccta cgcgacactgg 240

[0756] gcgaagcgcc gattcaccat ctccagaacc tcgaccacgt tgtatctgaa aatgccagt 300
 [0757] ccgacaatcg aggacacggc caccatttc tgtgccagag ggggtcctgt tagtagtgat 360
 [0758] atgtggggcc caggcacccct ggtcatcgta tcctca 396
 [0759] <210> 16
 [0760] <211> 455
 [0761] <212> PRT
 [0762] <213> 人工序列
 [0763] <220>
 [0764] <223> INB-1-11-8 (H1) 重链
 [0765] <220>
 [0766] <221> MISC_FEATURE
 [0767] <222> (1)..(132)
 [0768] <223> 可变重链
 [0769] <220>
 [0770] <221> MISC_FEATURE
 [0771] <222> (133)..(138)
 [0772] <223> 恒定区起始
 [0773] <220>
 [0774] <221> MISC_FEATURE
 [0775] <222> (317)..(416)
 [0776] <223> 变体
 [0777] <400> 16
 [0778] Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
 [0779] 1 5 10 15
 [0780] Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
 [0781] 20 25 30
 [0782] Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn
 [0783] 35 40 45
 [0784] Asn Tyr Pro Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp
 [0785] 50 55 60
 [0786] Tyr Ile Gly Val Ile Asn Asn Ser Gly Glu Thr Ala Tyr Ala Thr Trp
 [0787] 65 70 75 80
 [0788] Ala Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Leu Tyr Leu
 [0789] 85 90 95
 [0790] Lys Ile Ala Ser Pro Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
 [0791] 100 105 110
 [0792] Arg Gly Gly Pro Val Ser Ser Asp Met Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
 [0793] 115 120 125
 [0794] Ile Val Ser Ser Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
 [0795] 130 135 140
 [0796] Pro Cys Cys Gly Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu
 [0797] 145 150 155 160

[0798]	Val Lys Gly Tyr Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly		
[0799]	165	170	175
[0800]	Thr Leu Thr Asn Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser		
[0801]	180	185	190
[0802]	Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln		
[0803]	195	200	205
[0804]	Pro Val Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp		
[0805]	210	215	220
[0806]	Lys Thr Val Ala Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro		
[0807]	225	230	235
[0808]	Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
[0809]	245	250	255
[0810]	Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
[0811]	260	265	270
[0812]	Asp Val Ser Gln Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn		
[0813]	275	280	285
[0814]	Asn Glu Gln Val Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe		
[0815]	290	295	300
[0816]	Asn Ser Thr Ile Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp		
[0817]	305	310	315
[0818]	Trp Leu Arg Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu		
[0819]	325	330	335
[0820]	Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu		
[0821]	340	345	350
[0822]	Glu Pro Lys Val Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser		
[0823]	355	360	365
[0824]	Arg Ser Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
[0825]	370	375	380
[0826]	Ile Ser Val Glu Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys		
[0827]	385	390	395
[0828]	400		
[0829]	Thr Thr Pro Ala Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser		
[0830]	405	410	415
[0831]	Lys Leu Ser Val Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr		
[0832]	420	425	430
[0833]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[0834]	435	440	445
[0835]	Ile Ser Arg Ser Pro Gly Lys		
[0836]	450	455	
[0837]	<210> 17		
[0838]	<211> 132		
[0839]	<212> PRT		
	<213> 人工序列		

- [0840] <220>
- [0841] <223> INB-1-11-8 (H1) 可变重链
- [0842] <400> 17
- [0843] Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly
- [0844] 1 5 10 15
- [0845] Val Gln Cys Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro
- [0846] 20 25 30
- [0847] Gly Thr Pro Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn
- [0848] 35 40 45
- [0849] Asn Tyr Pro Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp
- [0850] 50 55 60
- [0851] Tyr Ile Gly Val Ile Asn Asn Ser Gly Glu Thr Ala Tyr Ala Thr Trp
- [0852] 65 70 75 80
- [0853] Ala Lys Arg Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Leu Tyr Leu
- [0854] 85 90 95
- [0855] Lys Ile Ala Ser Pro Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala
- [0856] 100 105 110
- [0857] Arg Gly Gly Pro Val Ser Ser Asp Met Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val
- [0858] 115 120 125
- [0859] Ile Val Ser Ser
- [0860] 130
- [0861] <210> 18
- [0862] <211> 711
- [0863] <212> DNA
- [0864] <213> 人工序列
- [0865] <220>
- [0866] <223> INB-1-11-8 (L4) 轻链
- [0867] <220>
- [0868] <221> misc_feature
- [0869] <222> (1) .. (399)
- [0870] <223> 可变轻链
- [0871] <220>
- [0872] <221> misc_feature
- [0873] <222> (400) .. (401)
- [0874] <223> 恒定区起始
- [0875] <220>
- [0876] <221> misc_feature
- [0877] <222> (436) .. (447)
- [0878] <223> 变体
- [0879] <400> 18
- [0880] atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
- [0881] acatttcccc aagtgctgac ccagactgca tcccctgtgt ctgcagttgt gggaggcaca 120

- [0882] gtcaccatca attgccagtc cagtcagagt gtttatcggt gcgactgggtt agcctggat 180
 [0883] cagcagagac cagggcagcc tcccaagctc ctgatctatg gtgcattcac tttggcatct 240
 [0884] ggggtccccat cgcggttcaa aggcaagtgga tctggacac acttcactct caccatcagc 300
 [0885] gacctggact gtgacgatgc tgccacttac tattgtgcag gcgggttttag tggccatatt 360
 [0886] tatgatttcg gcggaggac cgaggtgggtg gtcaaaagggt atccagttgc acctactgtc 420
 [0887] ctcatcttcc caccagctgc tgatcaggtg gcaactggaa cagtcaccat cgtgtgtgt 480
 [0888] gcaataaat actttcccga tgtcaccgtc acctggagg tggatggcac cacccaaaca 540
 [0889] actggcatcg agaacagtaa aacaccgcag aattctgcag attgtaccta caacctcagc 600
 [0890] agcaactctga cactgaccag cacacagtac aacagccaca aagagtacac ctgcaagggt 660
 [0891] acccaggca cgacctcagt cgtccagac ttcaataggg gtgactgtta g 711
 [0892] <210> 19
 [0893] <211> 399
 [0894] <212> DNA
 [0895] <213> 人工序列
 [0896] <220>
 [0897] <223> INB-1-11-8 (L4) 可变轻链
 [0898] <400> 19
 [0899] atggacacga gggcccccac tcagctgctg gggctcctgc tgctctggct cccaggtgcc 60
 [0900] acatttgcac aagtgtgtac ccagactgca tcccctgtgt ctgcagttgt gggaggcaca 120
 [0901] gtcaccatca attgccagtc cagtcagagt gtttatcggt gcgactgggtt agcctggat 180
 [0902] cagcagagac cagggcagcc tcccaagctc ctgatctatg gtgcattcac tttggcatct 240
 [0903] ggggtccccat cgcggttcaa aggcaagtgga tctggacac acttcactct caccatcagc 300
 [0904] gacctggact gtgacgatgc tgccacttac tattgtgcag gcgggttttag tggccatatt 360
 [0905] tatgatttcg gcggaggac cgaggtgggtg gtcaaaagggt 399
 [0906] <210> 20
 [0907] <211> 236
 [0908] <212> PRT
 [0909] <213> 人工序列
 [0910] <220>
 [0911] <223> INB-1-11-8 (L4) 轻链
 [0912] <220>
 [0913] <221> MISC_FEATURE
 [0914] <222> (1) .. (133)
 [0915] <223> 可变轻链
 [0916] <220>
 [0917] <221> MISC_FEATURE
 [0918] <222> (134) .. (139)
 [0919] <223> 恒定区起始
 [0920] <220>
 [0921] <221> MISC_FEATURE
 [0922] <222> (146) .. (149)
 [0923] <223> 变体

[0924]	<400>	20	
[0925]	Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp		
[0926]	1	5	10
[0927]	Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro		15
[0928]	20	25	30
[0929]	Val Ser Ala Val Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser		
[0930]	35	40	45
[0931]	Gln Ser Val Tyr Arg Gly Asp Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro		
[0932]	50	55	60
[0933]	Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser		
[0934]	65	70	75
[0935]	Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr		80
[0936]	85	90	95
[0937]	Leu Thr Ile Ser Asp Leu Asp Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys		
[0938]	100	105	110
[0939]	Ala Gly Gly Phe Ser Gly His Ile Tyr Asp Phe Gly Gly Gly Thr Glu		
[0940]	115	120	125
[0941]	Val Val Val Lys Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro		
[0942]	130	135	140
[0943]	Pro Ala Ala Asp Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val		
[0944]	145	150	155
[0945]	Ala Asn Lys Tyr Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly		160
[0946]	165	170	175
[0947]	Thr Thr Gln Thr Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser		
[0948]	180	185	190
[0949]	Ala Asp Cys Thr Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr		
[0950]	195	200	205
[0951]	Gln Tyr Asn Ser His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr		
[0952]	210	215	220
[0953]	Thr Ser Val Val Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys		
[0954]	225	230	235
[0955]	<210> 21		
[0956]	<211> 133		
[0957]	<212> PRT		
[0958]	<213> 人工序列		
[0959]	<220>		
[0960]	<223> INB-1-11-8 (L4) 可变轻链		
[0961]	<400> 21		
[0962]	Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Trp		
[0963]	1	5	10
[0964]	Leu Pro Gly Ala Thr Phe Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro		15
[0965]	20	25	30

[0966]	Val Ser Ala Val Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ser Ser			
[0967]	35	40	45	
[0968]	Gln Ser Val Tyr Arg Gly Asp Trp Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro			
[0969]	50	55	60	
[0970]	Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser			
[0971]	65	70	75	80
[0972]	Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr			
[0973]	85	90	95	
[0974]	Leu Thr Ile Ser Asp Leu Asp Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys			
[0975]	100	105	110	
[0976]	Ala Gly Gly Phe Ser Gly His Ile Tyr Asp Phe Gly Gly Thr Glu			
[0977]	115	120	125	
[0978]	Val Val Val Lys Gly			
[0979]	130			
[0980]	<210> 22			
[0981]	<211> 18			
[0982]	<212> PRT			
[0983]	<213> 智人			
[0984]	<400> 22			
[0985]	Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly Tyr Pro			
[0986]	1	5	10	15
[0987]	Gln Gln			
[0988]	<210> 23			
[0989]	<211> 95			
[0990]	<212> PRT			
[0991]	<213> 人工序列			
[0992]	<220>			
[0993]	<223> VKI_2-1-(U)_L12			
[0994]	<400> 23			
[0995]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0996]	1	5	10	15
[0997]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Trp			
[0998]	20	25	30	
[0999]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[1000]	35	40	45	
[1001]	Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1002]	50	55	60	
[1003]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[1004]	65	70	75	80
[1005]	Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Ser			
[1006]	85	90	95	
[1007]	<210> 24			

- [1008] <211> 22
[1009] <212> PRT
[1010] <213> 人工序列
[1011] <220>
[1012] <223> 前导序列
[1013] <400> 24
[1014] Met Asp Thr Arg Ala Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
[1015] 1 5 10 15
[1016] Leu Pro Gly Ala Thr Phe
[1017] 20
[1018] <210> 25
[1019] <211> 23
[1020] <212> PRT
[1021] <213> 人工序列
[1022] <220>
[1023] <223> 框架1
[1024] <400> 25
[1025] Ala Gln Val Leu Thr Gln Thr Ala Ser Pro Val Ser Ala Val Val Gly
[1026] 1 5 10 15
[1027] Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys
[1028] 20
[1029] <210> 26
[1030] <211> 13
[1031] <212> PRT
[1032] <213> 人工序列
[1033] <220>
[1034] <223> CDR1
[1035] <400> 26
[1036] Gln Ser Ser Gln Ser Val Tyr Arg Gly Asp Trp Leu Ala
[1037] 1 5 10
[1038] <210> 27
[1039] <211> 15
[1040] <212> PRT
[1041] <213> 人工序列
[1042] <220>
[1043] <223> 框架2
[1044] <400> 27
[1045] Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
[1046] 1 5 10 15
[1047] <210> 28
[1048] <211> 7
[1049] <212> PRT

- [1050] <213> 人工序列
[1051] <220>
[1052] <223> CDR2
[1053] <400> 28
[1054] Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser
[1055] 1 5
[1056] <210> 29
[1057] <211> 32
[1058] <212> PRT
[1059] <213> 人工序列
[1060] <220>
[1061] <223> 框架3
[1062] <400> 29
[1063] Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr His Phe Thr
[1064] 1 5 10 15
[1065] Leu Thr Ile Ser Asp Leu Asp Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
[1066] 20 25 30
[1067] <210> 30
[1068] <211> 10
[1069] <212> PRT
[1070] <213> 人工序列
[1071] <220>
[1072] <223> CDR3
[1073] <400> 30
[1074] Ala Gly Gly Phe Ser Gly His Ile Tyr Asp
[1075] 1 5 10
[1076] <210> 31
[1077] <211> 10
[1078] <212> PRT
[1079] <213> 人工序列
[1080] <220>
[1081] <223> 接合处
[1082] <400> 31
[1083] Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Lys
[1084] 1 5 10
[1085] <210> 32
[1086] <211> 104
[1087] <212> PRT
[1088] <213> 人工序列
[1089] <220>
[1090] <223> LC部分
[1091] <400> 32

[1092]	Gly Asp Pro Val Ala Pro Thr Val Leu Ile Phe Pro Pro Ala Ala Asp
[1093]	1 5 10 15
[1094]	Gln Val Ala Thr Gly Thr Val Thr Ile Val Cys Val Ala Asn Lys Tyr
[1095]	20 25 30
[1096]	Phe Pro Asp Val Thr Val Thr Trp Glu Val Asp Gly Thr Thr Gln Thr
[1097]	35 40 45
[1098]	Thr Gly Ile Glu Asn Ser Lys Thr Pro Gln Asn Ser Ala Asp Cys Thr
[1099]	50 55 60
[1100]	Tyr Asn Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Ser Thr Gln Tyr Asn Ser
[1101]	65 70 75 80
[1102]	His Lys Glu Tyr Thr Cys Lys Val Thr Gln Gly Thr Thr Ser Val Val
[1103]	85 90 95
[1104]	Gln Ser Phe Asn Arg Gly Asp Cys
[1105]	100
[1106]	<210> 33
[1107]	<211> 98
[1108]	<212> PRT
[1109]	<213> 人工序列
[1110]	<220>
[1111]	<223> VH3_1-3_3-64
[1112]	<400> 33
[1113]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1114]	1 5 10 15
[1115]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[1116]	20 25 30
[1117]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Tyr Val
[1118]	35 40 45
[1119]	Ser Ala Ile Ser Ser Asn Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asn Ser Val
[1120]	50 55 60
[1121]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1122]	65 70 75 80
[1123]	Leu Gln Met Gly Ser Leu Arg Ala Glu Asp Met Ala Val Tyr Tyr Cys
[1124]	85 90 95
[1125]	Ala Arg
[1126]	<210> 34
[1127]	<211> 97
[1128]	<212> PRT
[1129]	<213> 人工序列
[1130]	<220>
[1131]	<223> VH3_1-1_3-66
[1132]	<400> 34
[1133]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[1134]	1	5	10	15
[1135]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn			
[1136]	20	25	30	
[1137]	Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[1138]	35	40	45	
[1139]	Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
[1140]	50	55	60	
[1141]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
[1142]	65	70	75	80
[1143]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[1144]	85	90	95	
[1145]	Arg			
[1146]	<210> 35			
[1147]	<211> 97			
[1148]	<212> PRT			
[1149]	<213> 人工序列			
[1150]	<220>			
[1151]	<223> VH3_1-1_3-53			
[1152]	<400> 35			
[1153]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Ile Gln Pro Gly Gly			
[1154]	1	5	10	15
[1155]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Val Ser Ser Asn			
[1156]	20	25	30	
[1157]	Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[1158]	35	40	45	
[1159]	Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys			
[1160]	50	55	60	
[1161]	Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu			
[1162]	65	70	75	80
[1163]	Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala			
[1164]	85	90	95	
[1165]	Arg			
[1166]	<210> 36			
[1167]	<211> 19			
[1168]	<212> PRT			
[1169]	<213> 人工序列			
[1170]	<220>			
[1171]	<223> 前导序列			
[1172]	<400> 36			
[1173]	Met Glu Thr Gly Leu Arg Trp Leu Leu Leu Val Ala Val Leu Lys Gly			
[1174]	1	5	10	15
[1175]	Val Gln Cys			

- [1176] <210> 37
[1177] <211> 29
[1178] <212> PRT
[1179] <213> 人工序列
[1180] <220>
[1181] <223> 框架1
[1182] <400> 37
[1183] Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Thr Pro Gly Thr Pro
[1184] 1 5 10 15
[1185] Leu Thr Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Ser Leu Asn
[1186] 20 25
[1187] <210> 38
[1188] <211> 5
[1189] <212> PRT
[1190] <213> 人工序列
[1191] <220>
[1192] <223> CDR1
[1193] <400> 38
[1194] Asn Tyr Pro Met Thr
[1195] 1 5
[1196] <210> 39
[1197] <211> 14
[1198] <212> PRT
[1199] <213> 人工序列
[1200] <220>
[1201] <223> 框架2
[1202] <400> 39
[1203] Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Tyr Ile Gly
[1204] 1 5 10
[1205] <210> 40
[1206] <211> 16
[1207] <212> PRT
[1208] <213> 人工序列
[1209] <220>
[1210] <223> CDR2
[1211] <400> 40
[1212] Val Ile Asn Asn Ser Gly Glu Thr Ala Tyr Ala Thr Trp Ala Lys Arg
[1213] 1 5 10 15
[1214] <210> 41
[1215] <211> 30
[1216] <212> PRT
[1217] <213> 人工序列

- [1218] <220>
- [1219] <223> 框架3
- [1220] <400> 41
- [1221] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Thr Ser Thr Thr Leu Tyr Leu Lys Ile Ala
- [1222] 1 5 10 15
- [1223] Ser Pro Thr Ile Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala Arg
- [1224] 20 25 30
- [1225] <210> 42
- [1226] <211> 8
- [1227] <212> PRT
- [1228] <213> 人工序列
- [1229] <220>
- [1230] <223> CDR3
- [1231] <400> 42
- [1232] Gly Gly Pro Val Ser Ser Asp Met
- [1233] 1 5
- [1234] <210> 43
- [1235] <211> 11
- [1236] <212> PRT
- [1237] <213> 人工序列
- [1238] <220>
- [1239] <223> 接合处
- [1240] <400> 43
- [1241] Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Ile Val Ser Ser
- [1242] 1 5 10
- [1243] <210> 44
- [1244] <211> 323
- [1245] <212> PRT
- [1246] <213> 人工序列
- [1247] <220>
- [1248] <223> HC部分
- [1249] <400> 44
- [1250] Gly Gln Pro Lys Ala Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Cys Gly
- [1251] 1 5 10 15
- [1252] Asp Thr Pro Ser Ser Thr Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
- [1253] 20 25 30
- [1254] Leu Pro Glu Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Thr Leu Thr Asn
- [1255] 35 40 45
- [1256] Gly Val Arg Thr Phe Pro Ser Val Arg Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
- [1257] 50 55 60
- [1258] Leu Ser Ser Val Val Ser Val Thr Ser Ser Ser Gln Pro Val Thr Cys
- [1259] 65 70 75 80

[1260]	Asn Val Ala His Pro Ala Thr Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Ala		
[1261]	85	90	95
[1262]	Pro Ser Thr Cys Ser Lys Pro Thr Cys Pro Pro Pro Glu Leu Leu Gly		
[1263]	100	105	110
[1264]	Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
[1265]	115	120	125
[1266]	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln		
[1267]	130	135	140
[1268]	Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Thr Trp Tyr Ile Asn Asn Glu Gln Val		
[1269]	145	150	155
[1270]	Arg Thr Ala Arg Pro Pro Leu Arg Glu Gln Gln Phe Asn Ser Thr Ile		
[1271]	165	170	175
[1272]	Arg Val Val Ser Thr Leu Pro Ile Ala His Gln Asp Trp Leu Arg Gly		
[1273]	180	185	190
[1274]	Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val His Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
[1275]	195	200	205
[1276]	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Arg Gly Gln Pro Leu Glu Pro Lys Val		
[1277]	210	215	220
[1278]	Tyr Thr Met Gly Pro Pro Arg Glu Glu Leu Ser Ser Arg Ser Val Ser		
[1279]	225	230	235
[1280]	Leu Thr Cys Met Ile Asn Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val Glu		
[1281]	245	250	255
[1282]	Trp Glu Lys Asn Gly Lys Ala Glu Asp Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Ala		
[1283]	260	265	270
[1284]	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Ser Val		
[1285]	275	280	285
[1286]	Pro Thr Ser Glu Trp Gln Arg Gly Asp Val Phe Thr Cys Ser Val Met		
[1287]	290	295	300
[1288]	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Ile Ser Arg Ser		
[1289]	305	310	315
[1290]	320		
[1291]	Pro Gly Lys		
[1292]	<210> 45		
[1293]	<211> 190		
[1294]	<212> PRT		
[1295]	<213> 人工序列		
[1296]	<214>		
[1297]	<215> 45		
[1298]	<216> 使用的包含Aa 19-208的cMAF片段		
[1299]	<217> 45		
[1300]	Met Glu Tyr Val Asn Asp Phe Asp Leu Met Lys Phe Glu Val Lys Lys		
[1301]	1	5	10
			15
			20
			25
			30

[1302] Ala Gly Gly Ser Leu Ser Ser Thr Pro Met Ser Thr Pro Cys Ser Ser
[1303] 35 40 45
[1304] Val Pro Pro Ser Pro Ser Phe Ser Ala Pro Ser Pro Gly Ser Gly Ser
[1305] 50 55 60
[1306] Glu Gln Lys Ala His Leu Glu Asp Tyr Tyr Trp Met Thr Gly Tyr Pro
[1307] 65 70 75 80
[1308] Gln Gln Leu Asn Pro Glu Ala Leu Gly Phe Ser Pro Glu Asp Ala Val
[1309] 85 90 95
[1310] Glu Ala Leu Ile Ser Asn Ser His Gln Leu Gln Gly Gly Phe Asp Gly
[1311] 100 105 110
[1312] Tyr Ala Arg Gly Ala Gln Gln Leu Ala Ala Ala Gly Ala Gly Ala
[1313] 115 120 125
[1314] Gly Ala Ser Leu Gly Gly Ser Gly Glu Glu Met Gly Pro Ala Ala Ala
[1315] 130 135 140
[1316] Val Val Ser Ala Val Ile Ala Ala Ala Ala Gln Ser Gly Ala Gly
[1317] 145 150 155 160
[1318] Pro His Tyr His His His His His Ala Ala Gly His His His His
[1319] 165 170 175
[1320] Pro Thr Ala Gly Ala Pro Gly Ala Ala Gly Ser Ala Ala Ala
[1321] 180 185 190
[1322] <210> 46
[1323] <211> 95
[1324] <212> PRT
[1325] <213> 人工序列
[1326] <220>
[1327] <223> VKI_2-1-(1)_L19
[1328] <400> 46
[1329] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly
[1330] 1 5 10 15
[1331] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp
[1332] 20 25 30
[1333] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1334] 35 40 45
[1335] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1336] 50 55 60
[1337] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1338] 65 70 75 80
[1339] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro
[1340] 85 90 95
[1341] <210> 47
[1342] <211> 95
[1343] <212> PRT

[1344]	<213> 人工序列			
[1345]	<220>			
[1346]	<223> VKI_2-1-(1)_L5			
[1347]	<400> 47			
[1348]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Val Ser Ala Ser Val Gly			
[1349]	1	5	10	15
[1350]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp			
[1351]	20	25	30	
[1352]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[1353]	35	40	45	
[1354]	Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1355]	50	55	60	
[1356]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[1357]	65	70	75	80
[1358]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ala Asn Ser Phe Pro			
[1359]	85	90	95	

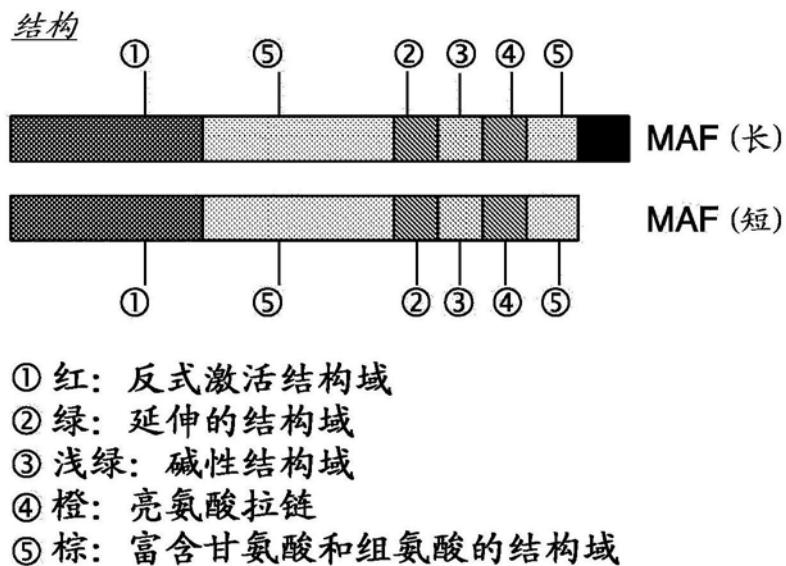


图1

序列比对

NP_001038136.1	1	MASELAMSGSDLPTSPЛАMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLI	50
NP_571919.1	1	MASELALSSSDLPTSPЛАMEYVNDFDLMKFEVKKEPLEPDRSITQCSRLI	50
XP_003201520.1	1	MASELAMSSSDLPTSPЛАMEYVNDFDLMKFEVKKEPVEPDRSISQCGRLI	50
NP_005351.2	1	MASELAMNSSDLPTSPЛАMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLI	50
XP_511123.2	1	MASELAMNSSDLPTSPЛАMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLI	50
NP_001099107.1	1	MASELAMSNSDLPTSPЛАMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLI	50
NP_062191.1	1	MASELAMNNSDLPTSPЛАMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLI	50
NP_001020748.2	1	MASELAMNNSDLPTSPЛАMEYVNDFDLMKFEVKKEPVETDRIISQCGRLI	50
NP_001038136.1	51	AGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFASAPSPGSGTDQKTHLEDYYWMTGYPQQ	100
NP_571919.1	51	AGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFASAPSPGSGNEQKGHLEDFYWMTGYQQQ	100
XP_003201520.1	51	AGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFASAPSPGSGEQKAHLEDFYWMTGYQQQ	100
NP_005351.2	51	AGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFASAPSPGSGEQKAHLEDYYWMTGYPQQ	100
XP_511123.2	51	AGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFASAPSPGSGEQKAHLEDYYWMTGYPQQ	100
NP_001099107.1	51	AGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFASAPSPGSGEQKAHLEDYYWMTGYPQQ	100
NP_062191.1	51	AGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFASAPSPGSGEQKAHLEDYYWMTGYPQQ	100
NP_001020748.2	51	AGGSLSSTPMSTPCSSVPPSPSFASAPSPGSGEQKAHLEDYYWMTGYPQQ	100
NP_001038136.1	101	LNPEALGFSPEDAVEALINSSHPLPGAFDGYARG-QQLAAAAA-GGSV-	146
NP_571919.1	101	LNPEALGFSSDAVEALINSTHQ-LQ-SYDGYARG-QQFSNTAGTGGM-	146
XP_003201520.1	101	LNPEALGFSPEDAVEALISSSHQ-LQ-SFDGYARG-QQFGGAAGAGGM-	146
NP_005351.2	101	LNPEALGFSPEDAVEALISNSHQ-LQGGFDGYARGAQQLAAAAGAGAGAS	149
XP_511123.2	101	LNPEALGFSPEDAVEALISNSHQ-LQGGFDGYARGAQQLASAAGAGAGAS	149
NP_001099107.1	101	LNPEALGFSPEDAVEALISNSHQ-LQGGFDGYARGAQQLAAAAGAGAGAS	149
NP_062191.1	101	LNPEALGFSPEDAVEALISNSHQ-LQGGFDGYARGAQQLAAAAGAGAGAS	149
NP_001020748.2	101	LNPEALGFSPEDAVEALISNSHQ-LQGGFDGYARGAQQLAAAAGAGAGAS	149
NP_001038136.1	147	---PAEEMGSAAAVSAVIAAAAAAQGA-PHYHHHHHHPHHGGGGGGGH	192
NP_571919.1	147	---AGEEMGSAAAVSAVIAAAAQNQGA-PHHHHHHHH----GHHQQ	186
XP_003201520.1	147	---AGEEMGSAAAVSAVIAAAAQNQGA-PHHHHHHHHH---PAGHHHH	189
NP_005351.2	150	LGGSGEEMGPAAAVSAVIAAAAQSAGPHY--HHHHHH---AAGHHHH	194
XP_511123.2	150	LGGSGEEMGPAAAVSAVIAAAAQSAGPHY--HHHHHH---AAGHHHH	194
NP_001099107.1	150	LGGSGEEMGPAAAVSAVIAAAAQSAGPHYHHHHHHH---AAGHHHH	196
NP_062191.1	150	LGGSGEEMGPAAAVSAVIAAAAQSAGPHY--HHHHHH---ATGHHHH	194
NP_001020748.2	150	LGGSGEEMGPAAAVSAVIAAAAQSAGPHY--HHHHHH---AAGHHHH	194

蛋白质登录号	基因	生物
NP_005351.2 MAF	智人	
XP_511123.2 MAF	黑猩猩	
NP_001099107.1	MAF	牛
NP_001020748.2	Maf	小鼠
NP_062191.1 Maf		大鼠
NP_001038136.1	MAF	原鸡
XP_003201520.1	LOC100537332	斑马鱼
NP_571919.1 maf		斑马鱼

图2

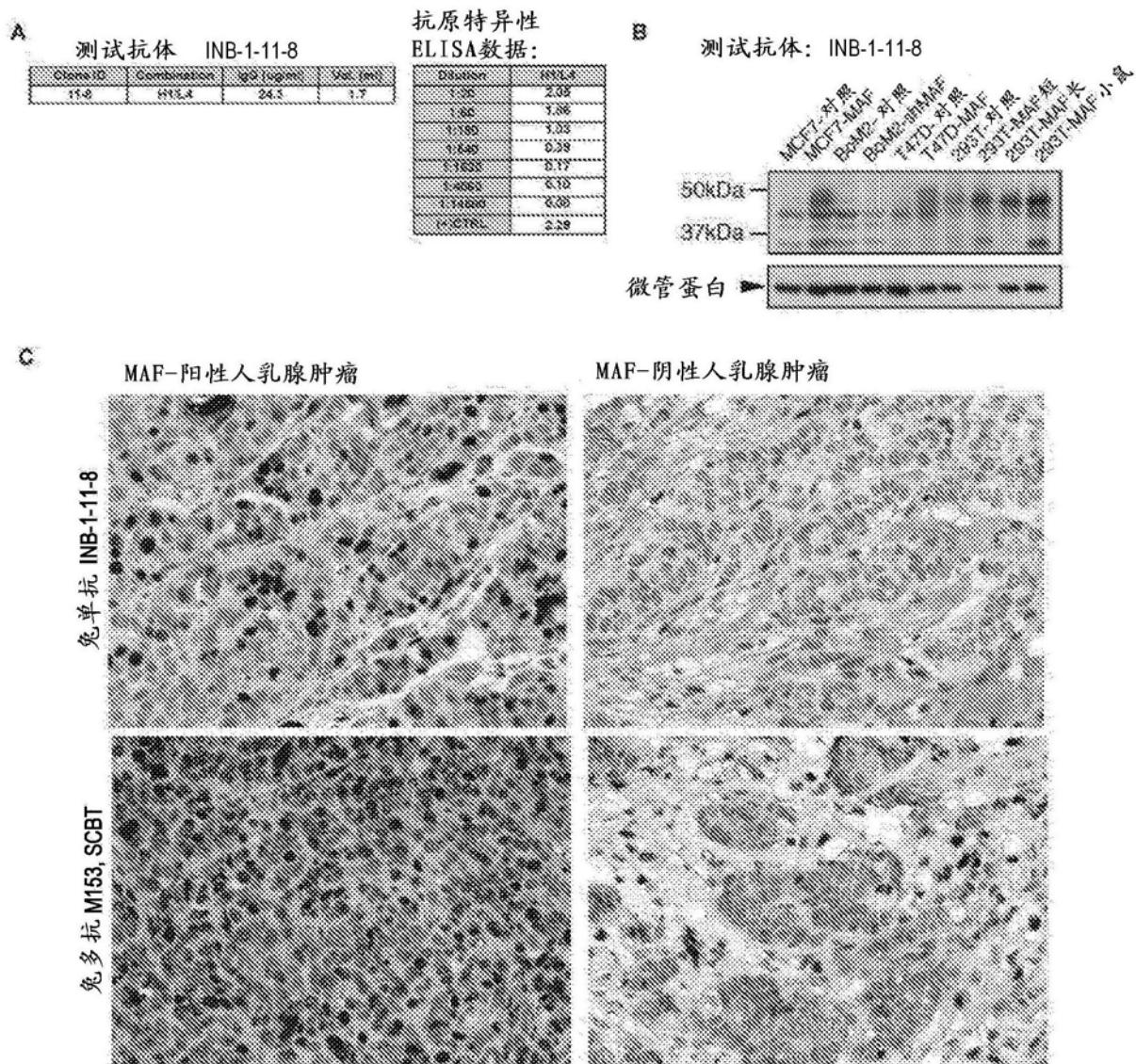


图3

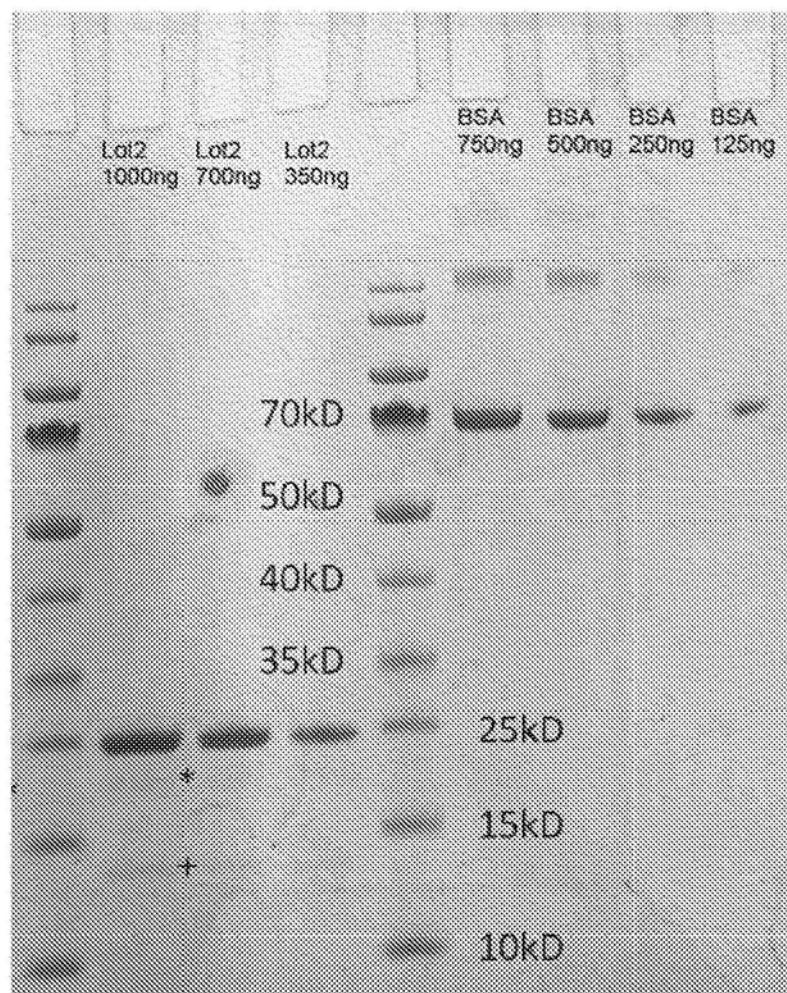


图4

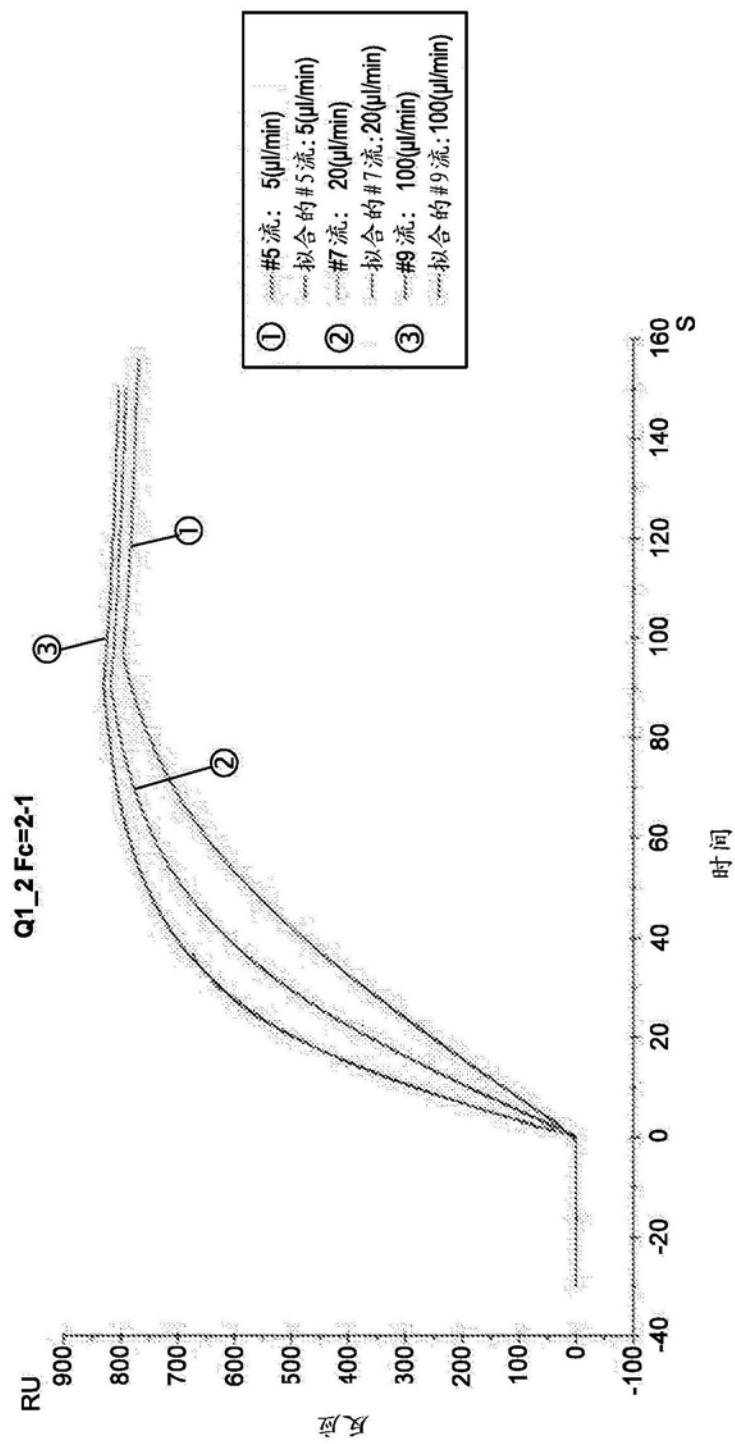


图5

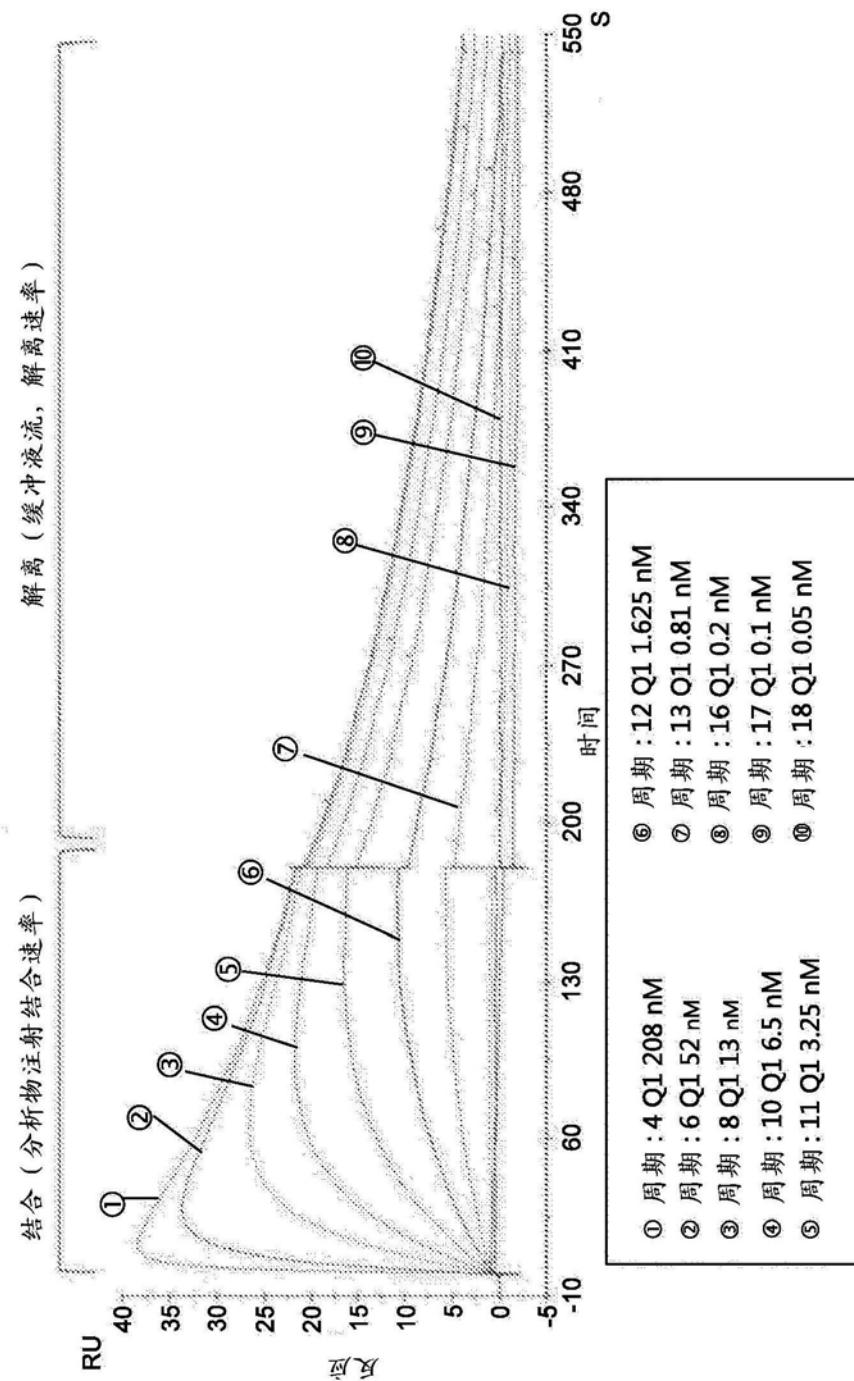


图6

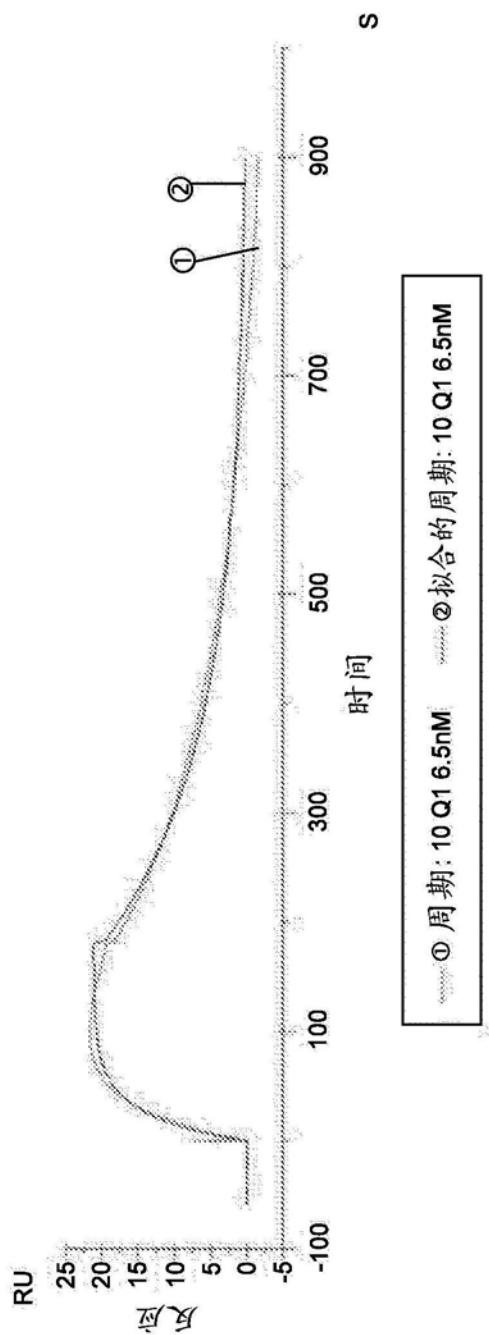


图7

INB-1-11-8 (H1) 重链 (SEQ ID NO: 16)

5' 框架 1

METGLRWLLLVAVLKGVQCQSLEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLNNYPMTWVRQAPG
 KGLDYIGVINNSGETAYATWAKRRFTISRTSTLYLKIASPTIEDTATYFCARGGPVSSD
 MWGPGTLVIVSSGQPKAPSVPFLAPCCGDTPSSTVTLGCLVKGYLPEPVTVWNSGTLTN
 GVRTFPSVRQSSGLYSLSVVSVTSSSQPTCNVAHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPP
 ELLGGPSVVFPPPKPKDTLMISRTEVTCVVVDVSQDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLR
 EQQFNSTIRVVSTLPIAHQDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMG
 PPREELSSRSVSLTCMINGFYPDSISVEWEKNGKAEDNYKTPAVLDSDGSYFLYSKLSV
 PTSEWQRGDVFTCSVVMHEALHNHYTQKSISRSPGK

说明：

GQPKAP: 恒定区开始

GCG...AGC 变体

INB-1-11-8 (L4) 轻链 (SEQ ID NO: 20)

5' 框架 1

MDTRAPTLGLLLLWLPGATFAQVLTQTAASPVAVVGGTVTINCQSSQSVYRGDWLAWY
 QQRPGQQPKLLIYGASTLASGVPSRFKGSGSGTHFTLTISDLDCDAATYYCAGGFSGHI
 YDFGGGTEVVVKGDPAVTVLIFPPAADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTWTWEVDGTTQT
 TGIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC

说明：

DPVAPT: 恒定区开始

GCTGCTGATCAG: 变体

图8

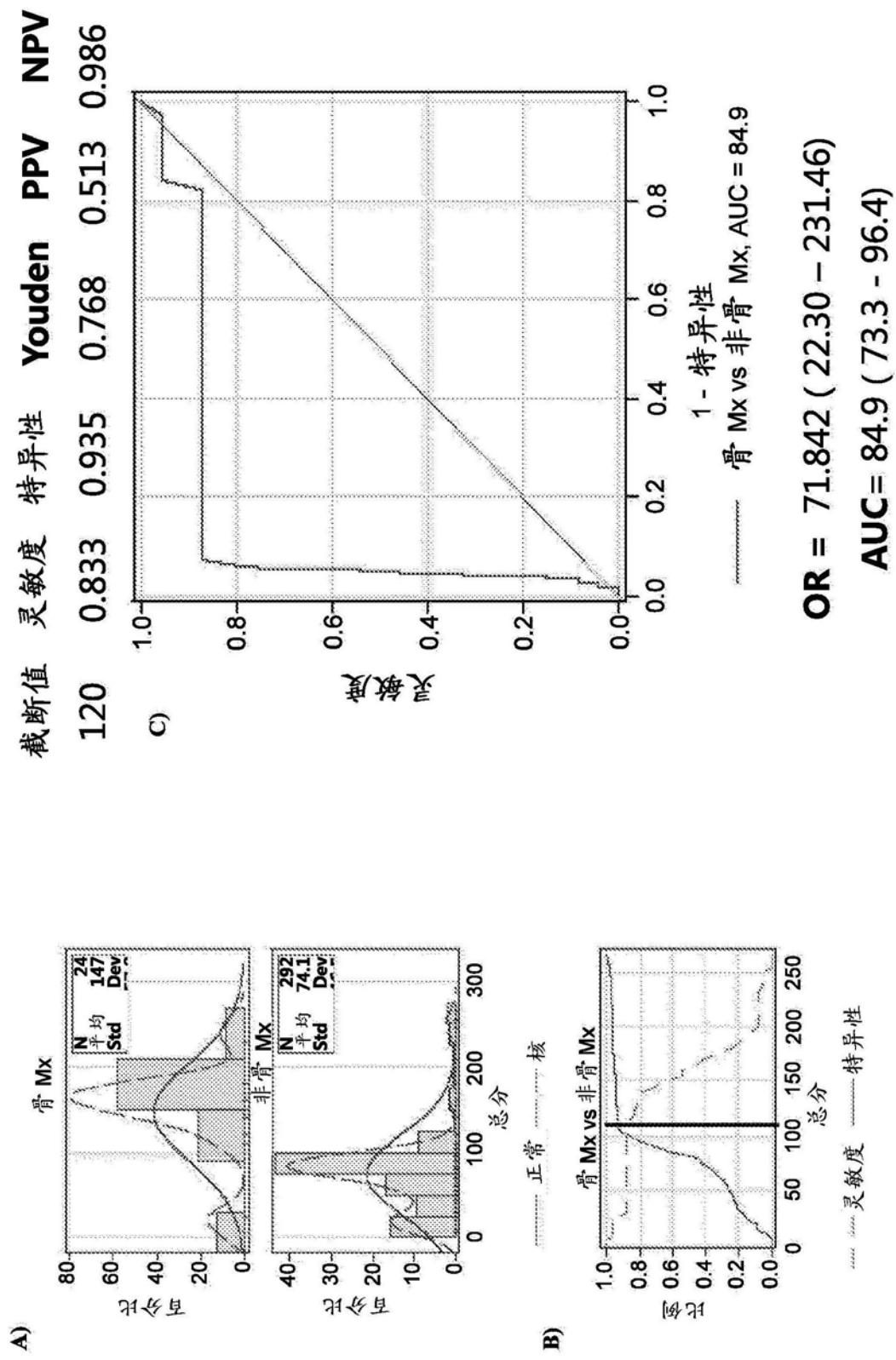


图9

变量	MAF IHC 阴性 (n=284)	MAF IHC 阳性 (n=39)	总计 (n=323)	p-值
骨 Mx	277	39	316	
非骨 Mx	273 (98.6%)	19 (48.7%)	292 (92.4%)	<.001 C
骨 Mx	4 (1.4%)	20 (51.3%)	24 (7.6%)	
年龄	275	36	311	
平均	57.1	60.9	57.6	0.055 K
中位	57.0	63.5	58.0	
期	282	39	321	
1	43 (15.2%)	4 (10.3%)	47 (14.6%)	
2	137 (48.6%)	23 (59.0%)	160 (49.8%)	
3	102 (36.2%)	12 (30.8%)	114 (35.5%)	0.448 C
pT	282	39	321	
1	172 (61.0%)	16 (41.0%)	188 (58.6%)	<.001 C
2	91 (32.3%)	13 (33.3%)	104 (32.4%)	
3	19 (6.7%)	10 (25.6%)	29 (9.0%)	
pN	282	39	321	
0	169 (59.9%)	18 (46.2%)	187 (58.3%)	
1	79 (28.0%)	8 (20.5%)	87 (27.1%)	0.002 C
2	24 (8.5%)	7 (17.9%)	31 (9.7%)	
3	10 (3.5%)	6 (15.4%)	16 (5.0%)	
St Gallen	284	39	323	
管腔 A	148 (52.1%)	19 (48.7%)	167 (51.7%)	
管腔 B HER2-	32 (11.3%)	6 (15.4%)	38 (11.8%)	0.831 C
管腔 B HER2+	43 (15.1%)	4 (10.3%)	47 (14.6%)	
HER2	16 (5.6%)	3 (7.7%)	19 (5.9%)	
TN	45 (15.8%)	7 (17.9%)	52 (16.1%)	
最后事件	277	39	316	
无疾病	238 (85.9%)	19 (48.7%)	257 (81.3%)	<.001 C
患有疾病存活	14 (5.1%)	8 (20.5%)	22 (7.0%)	
死亡	25 (9.0%)	12 (30.8%)	37 (11.7%)	
复发	277	39	316	
否	235 (84.8%)	17 (43.6%)	252 (79.7%)	<.001 C
是	42 (15.2%)	22 (56.4%)	64 (20.3%)	
家族史				
n	109	26	135	
否	90 (82.6%)	22 (84.6%)	112 (83.0%)	0.803 C
是	19 (17.4%)	4 (15.4%)	23 (17.0%)	

K = Kruskal-Wallis; C= 卡方检验

图10

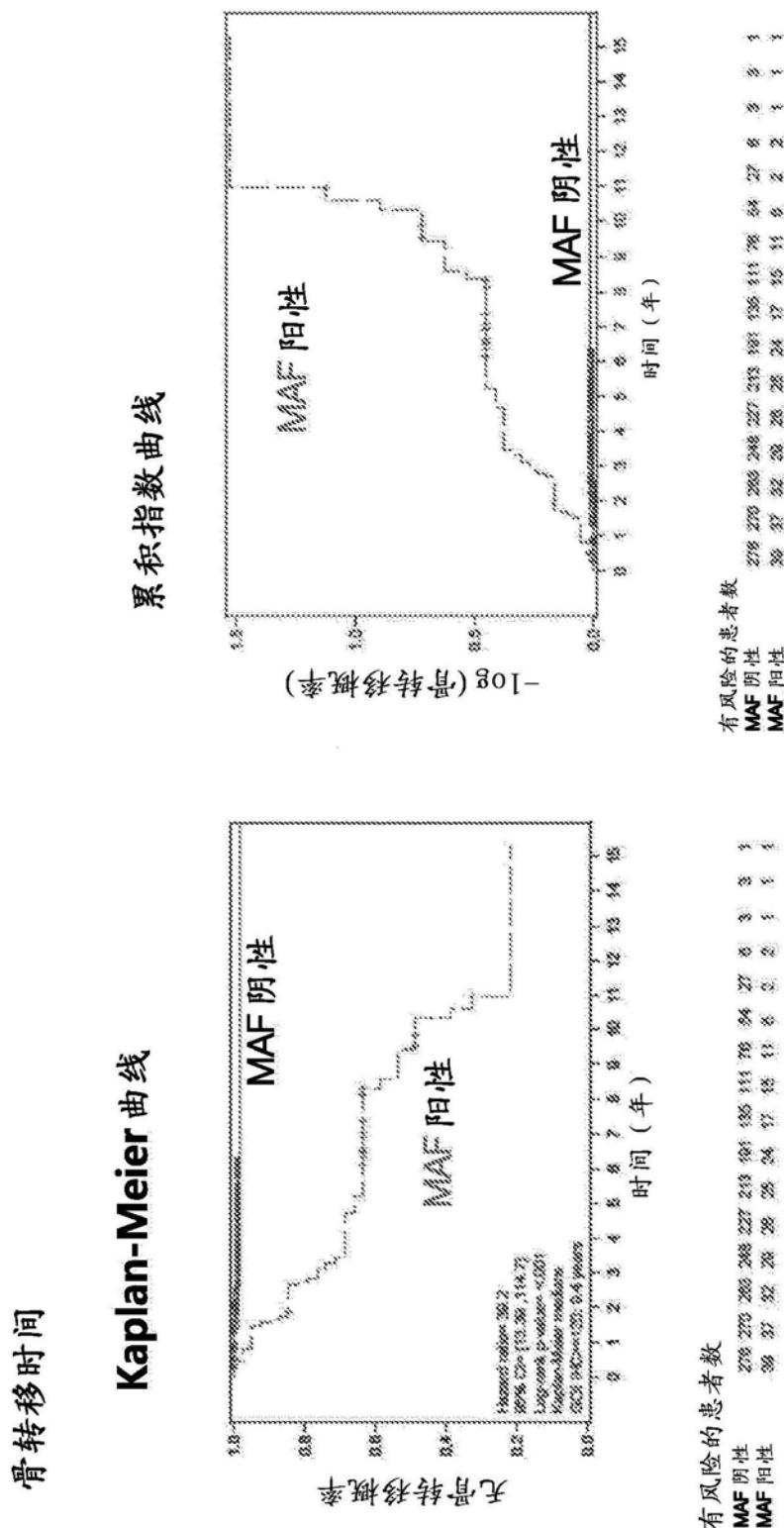


图11