

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

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



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480031015.9

[43] 公开日 2006年12月20日

[11] 公开号 CN 1882698A

[22] 申请日 2004.8.20

[21] 申请号 200480031015.9

[30] 优先权

[32] 2003.8.20 [33] US [31] 60/496,552

[32] 2004.2.27 [33] US [31] 60/548,201

[86] 国际申请 PCT/JP2004/012411 2004.8.20

[87] 国际公布 WO2005/019475 英 2005.3.3

[85] 进入国家阶段日期 2006.4.20

[71] 申请人 肿瘤疗法科学股份有限公司

地址 日本神奈川县

[72] 发明人 中村佑辅 片桐丰雅

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 4 页 说明书 45 页 序列表 27 页
附图 14 页

[54] 发明名称

低氧可诱导的蛋白 2 (HIG2) 作为新的治疗肾细胞癌 (RCC) 的潜在靶

[57] 摘要

本发明提供了通过将癌细胞，尤其是肾细胞癌与由 HIG2 siRNA 或 HIG2 抗体组成的组合物接触，来抑制细胞生长的方法。本发明还提供了诊断肾细胞癌的方法。

1、一种诊断受试对象的RCC或RCC易感性的方法，包括确定衍生自受试对象的生物样品中的RCC-相关基因的表达水平，所述RCC相关基因选自RCCX基因1-32，其中与所述基因的正常对照水平相比，表达水平提高说明所述受试对象患有或易患RCC。

2、权利要求1所述的方法，其中确定的所述样品表达水平比所述正常对照水平至少高10%。

3、权利要求1所述的方法，其中所述方法进一步包括确定多种RCC-相关基因的表达水平。

4、权利要求1所述的方法，其中采用选自下组的方法测定表达水平：

- (a) 测定RCC-相关基因的mRNA，
- (b) 测定由RCC-相关基因编码的蛋白，和
- (c) 测定由RCC-相关基因编码的蛋白的生物活性。

5、权利要求1所述的方法，其中所述样品表达水平通过检测RCC-相关基因探针与所述受试对象-衍生的生物样品的基因转录物之间的杂交来进行测定。

6、权利要求5所述的方法，其中所述杂交步骤在DNA阵列上进行。

7、权利要求1所述的方法，其中所述生物样品包括透明细胞。

8、权利要求7所述的方法，其中所述生物样品包括来自RCC的透明细胞。

9、权利要求1所述的方法，其中所述生物样品包括体液。

10、权利要求4所述的方法，其中所述方法包括步骤：

i. 将采自受试对象的生物样品与识别RCC-相关基因所编码蛋白的抗体接触，

ii. 检测抗体和蛋白之间的结合，

iii. 将来自该受试对象的生物样品的结合水平与来自正常受试对象的生物样品的结合水平进行比较，和

iv. 当比较显示与正常样品相比该受试对象衍生的样品中的结合水平更高，就判断该受试对象患有RCC。

11、权利要求10所述的方法，其中抗体和蛋白的结合通过酶联免疫吸附试验进行检测。

12、权利要求10所述的方法，其中RCC-相关基因是HIG2。

13、权利要求9所述的方法，其中所述体液是血液或尿。

14、一种RCC参照表达谱，包括两种或多种选自RCCX基因1-32所组成组的基因的表达模式。

15、一种筛选治疗或预防RCC的化合物的方法，所述方法包括步骤：

- a) 将待测化合物与由选自RCCX基因1-32的核酸编码的多肽接触；
- b) 检测多肽和待测化合物之间的结合活性；和
- c) 选出结合该多肽的待测化合物。

16、一种筛选治疗或预防RCC的化合物的方法，所述方法包括步骤：

- a) 将候选化合物与表达一种或多种标记基因的细胞接触，其中一种或多种标记基因选自RCCX基因1-32；和
- b) 选出降低选自RCCX基因1-32的一种或多种标记基因的表达水平的候选化合物。

17、权利要求16所述的方法，其中所述细胞包括RCC细胞。

18、一种筛选治疗或预防RCC的化合物的方法，所述方法包括步骤：

- a) 将待测化合物与由选自RCCX基因1-32的核酸编码的多肽接触；
- b) 测定步骤(a)的多肽的生物活性；和
- c) 选出与待测化合物不存在时测定的生物活性相比，抑制由选自RCCX基因1-32的核酸编码的多肽的生物活性的待测化合物。

19、权利要求18所述的方法，其中多肽的生物活性是细胞增殖活性。

20、权利要求19所述的方法，其中多肽是HIG2。

21、一种筛选治疗或预防RCC的化合物的方法，所述方法包括步骤

a) 将候选化合物与导入了含有一种或多种标记基因的转录调节区和报告基因的载体的细胞接触，所述报告基因在所述转录调节区的调控下表达，其中所述一种或多种标记基因选自RCCX基因1-32；

b) 测定所述报告基因的活性或表达水平；和

c) 当所述标记基因是已被上调的选自RCCX基因1-32的标记基因时，选出与对照相比降低所述报告基因的活性或表达水平的候选化合物。

22、RCC诊断试剂盒，所述试剂盒包括与选自RCCX基因1-32的两种或多种基因结合的检测试剂。

23、RCC诊断试剂盒，所述试剂盒包括与至少一种由选自RCCX基因1-32的任何一种基因编码的蛋白结合的检测试剂。

24、权利要求23所述的试剂盒，其中所述蛋白由HIG2基因编码。

25、一种阵列，包括与选自RCCX基因1-32的两种或多种核酸序列结合的核酸。

26、一种治疗或预防受试对象RCC的方法，包括给所述受试对象施用降低由选自RCCX基因1-32的基因编码的多肽的表达或活性的化合物的步骤。

27、一种治疗或预防受试对象RCC的方法，包括给所述受试对象施用具有与选自RCCX基因1-32的编码序列互补的核苷酸序列的反义多核苷酸或其衍生物的步骤。

28、一种治疗或预防受试对象RCC的方法，包括给所述受试对象施用降低选自RCCX基因1-32的核酸序列的表达的siRNA的步骤。

29、权利要求28所述的方法，其中所述siRNA降低HIG2的表达。

30、权利要求29所述的方法，其中所述siRNA的有义链包括选自SEQ ID NO:77，SEQ ID NO:78，SEQ ID NO:79，和SEQ ID NO:80的核苷酸序列。

31、一种治疗或预防受试对象RCC的方法，包括给所述受试对象施用药学上有效量的与由选自RCCX基因1-32的任何一种基因编码的蛋白结合的抗体或其片段的步骤。

32、权利要求31所述的方法，其中所述抗体或其片段结合由HIG2基因编码的蛋白。

33、权利要求32所述的方法，其中所述抗体或其片段结合包括HIG2基因编码的蛋白的至少C-末端区的蛋白。

34、权利要求33所述的方法，其中所述C-末端区包括氨基酸序列EPTKGLPDHPSRSM。

35、一种治疗或预防受试对象RCC的方法，包括给所述受试对象施用疫苗的步骤，所述疫苗含有由选自RCCX基因1-32的核酸编码的多肽或所述多肽的免疫活性片段，或编码该多肽的多核苷酸。

36、一种治疗或预防受试对象RCC的方法，所述方法包括施用通过权利要求15-21任一项所述方法获得的化合物的步骤。

37、一种诱导针对RCC的抗肿瘤免疫的方法，所述方法包括将抗原呈递细胞与选自RCCX基因1-32的核酸编码的多肽或所述多肽的免疫活性片段，或编码该多肽的多核苷酸或含有该多核苷酸的载体接触的步骤。

38、权利要求37所述的方法，其中所述方法进一步包括给受试对象施用所述抗原呈递细胞的步骤。

39、一种治疗或预防RCC的组合物，所述组合物包括药学有效量的针对选自RCCX基因1-32的多核苷酸的反义多核苷酸或小分子干扰RNA。

40、权利要求39所述的组合物，其中所述siRNA的有义链包括选自SEQ ID NO:77，SEQ ID NO:78，SEQ ID NO:79，和SEQ ID NO:80的核苷酸序列。

41、一种治疗或预防RCC的组合物，所述组合物包括药学有效量的与由选自RCCX基因1-32的任何一种基因编码的蛋白结合的抗体或其片段。

42、权利要求41所述的组合物，其中所述抗体或其片段与HIG2基因编码的蛋白结合。

43、权利要求42所述的组合物，其中所述抗体或其片段与含有由HIG2基因编码的蛋白的至少C-末端区的蛋白结合。

44、权利要求43所述的组合物，其中所述C-末端区包括氨基酸序列EPTKGLPDHPSRSM。

45、一种治疗或预防RCC的组合物，所述组合物包括药学有效量的作为活性成分的通过权利要求15-21的任一项方法选出的化合物，和药学上可接受的载体。

46、一种结合HIG2基因编码的蛋白的抗体，其中所述抗体识别氨基酸序列EPTKGLPDHPSRSM组成的表位。

低氧可诱导的蛋白 2(HIG2)作为新的
治疗肾细胞癌(RCC)的潜在标靶

本申请要求 2003 年 8 月 20 日提交的 U.S.临时申请 60/496,552 和 2004 年 2 月 27 日提交的 U.S.临时申请 60/548,201 的权益，在此其内容以其整体引入作为参考。

技术领域

本发明涉及在肾细胞癌中差异表达的基因和蛋白，和利用这些基因和蛋白诊断和治疗肾细胞癌的方法。

背景技术

肾细胞癌(RCC)是第三种最常见的泌尿生殖系统恶性肿瘤，相当于全部人类恶性肿瘤的 2-3%。对于局部 RCC 肿瘤患者来说，外科切除术是最有效的疗法，但是对于晚期患者来说，该疗法并不满意。虽然已报道一些生物医学治疗显示了-20%的反应率，但它们经常还引起严重的副反应，而不能改善患者的成活率。在那些采用外科治疗的患者中，外科手术后约有 25-30% 复发(Ljungberg B., Alamdari F. I., Rasmuson T. & Roos G. Follow-up guidelines for nonmetastatic renal cell carcinoma based on the occurrence of metastases after radical nephrectomy. *BJU Int.* 84, 405-411 (1999); Levy DA., Slaton JW., Swanson DA. & Dinney CP. Stage specific guidelines for surveillance after radical nephrectomy for local renal cell carcinoma. *J Urol.* 159, 1163-1167 (1998))。肿瘤阶段和外科可切除性是 RCC 最重要的预测因素；但到目前为止，对于影响此预测变化的潜在分子机理几乎一无所知。

根据组织特征，可将 RCC 肿瘤细分成透明细胞(80%)，乳头状(~10%)，嫌色(Chromophobe)(< 5%)，颗粒状，纺锤状和囊肿伴随性癌(5-15%)。这些组织学亚型都显示了独特的临床特性，透明细胞和粒型趋于表现更具攻击力的临床表型。意欲揭示致癌机理的研究已经促进了某些抗肿瘤剂分子靶

的鉴定。例如，最初用来抑制与 Ras 相关的生长信号通路的法尼基转移酶抑制剂(FTIs)，其活性由转译后法尼基化决定，能有效治疗动物模型中的 Ras 依赖性肿瘤(He 等, *Cell* 99:33-45 (1999))⁵。相似地，使用抗肿瘤药物和抗 HER2 单克隆抗体的组合药物，曲妥珠单抗(trastuzumab)已经能使人临床试验拮抗原致癌基因受体 HER2/neu；并获得了改善的临床疗效，使乳腺癌患者全部存活(Lin 等, *Cancer Res* 61:6345-9 (2001))。最后，酪氨酸激酶抑制剂 STI-571，其能选择性地使 bcr-abl 融合蛋白失活，该抑制剂已开发用于治疗慢性骨髓性白血病，其中 bcr-abl 酪氨酸激酶的基本活性在白细胞转化过程中起关键作用。将此类型的试剂设计为抑制特定基因产物的致癌活性(Fujita 等, *Cancer Res* 61:7722-6 (2001))。因此，一般在瘤细胞中上调的基因产物可以作为开发新抗癌试剂的潜在靶标。

已经进一步证明了 CD8⁺细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)能识别衍生自存在于 MHC I 类分子和裂解肿瘤细胞中肿瘤相关抗原(TAAs)的表位肽。自从 MAGE 家族成为发现的第一个 TAAs 实例以来，已经利用免疫学方法发现了许多的其它 TAAs (Boon, *Int J Cancer* 54: 177-80 (1993); Boon 和 van der Bruggen, *J Exp Med* 183: 725-9 (1996); van der Bruggen 等, *Science* 254: 1643-7 (1991); Brichard 等, *J Exp Med* 178: 489-95 (1993); Kawakami 等, *J Exp Med* 180: 347-52 (1994))。现在，某些新发现的 TAAs 正处于作为免疫治疗靶标的临床开发阶段。到目前为止，已发现的 TAAs 包括 MAGE(van der Bruggen 等, *Science* 254: 1643-7 (1991)), gp100(Kawakami 等, *J Exp Med* 180: 347-52 (1994)), SART(Shichijo 等, *J Exp Med* 187: 277-88 (1998)), 和 NY-ESO-1(Chen 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1914-8 (1997))。另一方面，已证实在肿瘤细胞中特异性过表达的基因产物可以作为诱导细胞免疫应答的靶标被识别。所述基因产物包括 p53(Umano 等, *Brit J Cancer* 84: 1052-7 (2001)), HER2/neu(Tanaka 等, *Brit J Cancer* 84: 94-9 (2001)), CEA(Nukaya 等, *Int J Cancer* 80: 92-7 (1999))等。

尽管在 TAAs 的基础和临床研究方面取得了重大进步(Rosenbeg 等, *Nature Med* 4: 321-7 (1998); Mukherji 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 8078-82 (1995); Hu 等, *Cancer Res* 56: 2479-83 (1996))，仅有少量候选 TAAs 是可获得的，所述候选 TAAs 治疗腺癌，包括结肠直肠癌。在癌细胞中大量表达，同时其表达受到癌细胞的限制的 TAAs 将可能作为免疫治疗靶标的候选物。

另外,预期对诱导有效的和特异性抗肿瘤免疫应答的新 TAA 的鉴定可以增强肽疫苗策略对各种类型癌症的临床效用(Boon 和 van der Bruggen, *J Exp Med* 183: 725-9 (1996); van der Bruggen 等, *Science* 254: 1643-7 (1991); Brichard 等, *J Exp Med* 178: 489-95 (1993); Kawakami 等, *J Exp Med* 180: 347-52 (1994); Shichijo 等, *J Exp Med* 187: 277-88 (1998); Chen 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 1914-8 (1997); Harris, *J Natl Cancer Inst* 88: 1442-5 (1996); Butterfield 等, *Cancer Res* 59: 3134-42 (1999); Vissers 等, *Cancer Res* 59: 5554-9 (1999); van der Burg 等, *J Immunol* 156: 3308-14 (1996); Tanaka 等, *Cancer Res* 57: 4465-8 (1997); Fujie 等, *Int J Cancer* 80: 169-72 (1999); Kikuchi 等, *Int J Cancer* 81: 459-66 (1999); Oiso 等, *Int J Cancer* 81: 387-94 (1999)。

已经多次报道了: 在 ^{51}Cr -释放分析中, 肽刺激的来自某些健康捐献者的外周血单核细胞(PBMCs)能引起有效量的 $\text{IFN-}\gamma$ 应答该肽, 但很少会在 HLA-A24 或-A0201 限制性方式中表现出对抗肿瘤细胞的细胞毒性(Kawano 等, *Cancer Res* 60: 3550-8 (2000); Nishizaka 等, *Cancer Res* 60: 4830-7 (2000); Tamura 等, *Jpn J Cancer Res* 92: 762-7 (2001))。但是, 在日本人和白种人(Caucasion)中, HLA-A24 和 HLA-A0201 都是一种常见的 HLA 等位基因(Date 等, *Tissue antigens* 47: 93-101 (1996); Kondo 等, *J Immunol* 155: 4307-12 (1995); Kubo 等, *J Immunol* 152: 3913-24 (1994); Imanishi 等, *Proceeding of the eleventh International Hictocompatibility Workshop and Conference Oxford University Press, Oxford, 1065 (1992); Williams 等, *Tissue antigen* 49: 129 (1997))。因此, 由这些 HLAs 呈递的癌症抗原性肽尤其在日本人和白种人中治疗癌症是有利的。另外, 通常体外低亲合性 CTL 的诱导获自使用高浓度的肽, 在抗原呈递细胞(APCs)中产生高水平的特异性肽/MHC 络合物, 该络合物将能有效地激活这些 CTL(Alexander-Miller 等, *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 4102-7 (1996))。*

来自 Hippel-Lindau 病, 包括肾在内的遗传癌综合症, 是由于 *VHL* 基因内的种系突变所致(Latif F., Tory K., Gnarr J., Yao M., Duh FM., Orcutt ML., Stackhouse T., Kuzmin I., Modi W., Geil L. 等 *Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. Science.* 260, 1317-20 (1993))。而且, *VHL* 经常在 RCCs 中失活。在生理条件下, 由于遍在蛋白化作用的机能失调, *VHL* 的突变或缺失会导致 HIF1 蛋白异常积累; 反过来, 积累的

HIF1 会引起组成型表达与肿瘤细胞生长和发育相关的下游基因。例如，利用建立自 *HIF1* 缺陷性小鼠的细胞，Denko 等证明 *HIG2* 的表达在低氧条件下由 *HIF1* 调节(Denko N.等, Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* **6**, 480-487 (2000) 和 <http://171.65.6.67/Hypoxia/outline%20for%20hig2.htm>)。 *HIF1* 由两个亚单位组成，*HIF1 α* 和 *HIF1 β* 。 *HIF1 α* 是决定 HIF1 活性的氧调节组分，在含氧量正常的条件下，经蛋白酶体途径快速降解。

到目前为止，利用群分析已经鉴定出了一些可能对预测预报或 RCC 分类有用的基因(Takahashi M., Rhodes DR., Furge KA., Kanayama H., Kagawa S., Haab BB., Teh BT. Gene expression profiling of clear cell renal cell carcinoma: gene identification and prognostic classification. *Proc Natl Acad Sci.* **98**, 9754-9759 (2001); Skubitz KM., Skubitz AP. Differential gene expression in renal-cell cancer. *J Lab Clin Med.* **140**, 52-64 (2002))。为了明白与 RCC 相关的致癌机理，并鉴定出开发 RCC 新抗癌试剂的潜在靶标，本发明人对大量的优势型肿瘤——透明细胞癌的基因表达谱进行了分析。

发明概述

因此，本发明包括发现了与肾细胞癌相关的基因表达模式。在肾细胞癌中差异表达的基因在本文中统称“RCCX 核酸”或“RCCX 多核苷酸”，相应编码多肽称“RCCX 多肽”或“RCCX 蛋白”。

与正常、非癌性肾细胞组织和其它正常组织相比，*HIG2* 在肾细胞癌中过表达。特别是，获自 RCC 患者的临床材料的 ELISA 分析鉴定出 RCC 患者血浆内的 *HIG2* 蛋白分泌，甚至在肿瘤早期阶段也有分泌，而在正常健康志愿者或慢性肾小球肾炎患者内未检测到 *HIG2* 蛋白。*HIG2* 过表达导致肾细胞增殖的异常增加和肿瘤形成。因此，本发明的特点是通过让细胞与 *HIG2* 小分子干扰 RNA(siRNA)组合物接触来抑制细胞生长的方法。另外，可以通过将细胞与 *HIG2* 特异性抗体或其片段的组合物接触来抑制细胞生长。细胞可以体外，体内或回体提供。受试对象可以是哺乳动物，如人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛。细胞可以是泌尿生殖系统的细胞，如肾细胞。另外，细胞可以是肿瘤细胞(即，癌细胞)，如癌细胞。例如，细胞可以是肾细胞癌细胞，如透明细胞(clear cell)。“抑制细胞生长”包括与未

处理细胞相比，导致细胞增殖率降低或生存力降低的处理。细胞生长可以通过本领域已知的增殖试验来进行测定。

术语“siRNA”是指阻止靶 mRNA 翻译的双链 RNA 分子。可以使用将 siRNA 导入细胞的常规技术，包括以 DNA 为模板转录出 RNA 的那些。在本发明上下文中，siRNA 包括有义 HIG2 核酸序列，反义 HIG2 核酸序列或此两者。优选，构建 siRNA，从而使单一转录物含有靶基因的有义序列和互补的反义序列，如发夹。

术语“HIG2 抗体”是指特异性结合 HIG2 蛋白的多克隆或单克隆抗体。抗体可以是完整抗体。另外，抗体可以是片段。抗体片段包括，例如 Fab，F(ab')₂，或 Fv 片段。在本发明上下文中，抗体结合亲水结构域的表位，如 HIG2 C-末端的 14 个残基，EPTKGLPDHPSRSM。另外，抗体可以结合 HIG2 的疏水结构域或 HIG2 的 C-末端。

可利用本发明的方法改变由于细胞恶性转化而使 HIG2 表达上调的细胞中的基因表达。在靶细胞内 siRNA 与 HIG2 转录物的结合会导致细胞产生的 HIG2 减少。寡核苷酸的长度通常至少为 10 个核苷酸，但可以与天然存在的 HIG2 转录物等长。优选地，寡核苷酸长度为 19-25 个核苷酸。最优选地，寡核苷酸长度小于 75，或小于 50，或小于 25 个核苷酸。例如，在哺乳动物细胞中抑制 HIG2 表达的 HIG2 siRNA 寡核苷酸包括含有 SEQ ID NO: 77-80 的寡核苷酸。

另外，本发明的方法可用于改变 HIG2 表达上调的细胞或组织中的 HIG2 蛋白活性。在本发明上下文中，“HIG2 的生物活性”通常指促进细胞增殖。例如，将细胞如肾细胞与 HIG2 接触会使细胞增殖增强。相反，HIG2 抗体与 HIG2 结合会使促进天然 HIG2 活性的细胞增殖减弱。

在本发明中还包括分离的核酸分子，其包括核酸序列 SEQ ID NO: 77-80 或与核酸序列 SEQ ID NO: 77-80 互补的核酸分子。如本文所用，术语“互补”指在核酸分子的核苷酸单位之间的 Watson-Crick 或 Hoogsteen 碱基配对，术语“结合”指两个多肽或化合物或其相关多肽或化合物或组合物之间的物理或化学相互作用。在本发明上下文中，核酸分子长度优选小于 1372 个核苷酸。例如，核酸分子长度小于 500，小于 200，或小于 75 个核苷酸。本发明还包括含一种或多种本文所述核酸的载体，和含所述载体的细胞。

本发明的进一步特点是诊断或确定受试对象发生肾细胞癌的易感性的

方法，包括确定在诸如组织样品或体液样品等衍生自患者的生物样品内，肾细胞癌相关基因的表达水平。术语“肾细胞癌”包括透明细胞，乳头状，嫌色，颗粒状，纺锤状和囊肿伴随性癌。在本发明上下文中，肾细胞癌相关基因指特征为与正常细胞相比，在获自肾细胞癌细胞的细胞内其表达水平不同的基因。在此，“正常”细胞是获自已知非癌性肾组织的细胞。肾细胞癌相关基因包括，如 RCCX 基因 1-32 中的一或多种基因。变化，例如，与基因的正常对照水平相比，基因表达水平增加表明受试对象患有肾细胞癌或具有肾细胞癌发生风险。可用本发明的方法检测早期肿瘤，如在对 von Hippel-Lindau(VHL)基因内的突变或缺失进行检测之前，或不存在所述突变时。例如，本发明的方法可用于检测恶性肿瘤疾病的恶性前 I 期，I 期，II 期，以及晚期。

术语“正常对照水平”指正常健康个体或已知未患肾细胞癌的个体群中检测的基因表达水平。对照水平可以是衍生自单一参照群体的单一表达模式，或衍生自多种表达模式的表达模式。例如，在本发明上下文中，对照水平可以是以前检测的细胞的表达模式数据库。

与正常对照水平相比，在待测样品中检出 RCCX 基因 1-32 任一种的水平增加表明受试对象(提供样品者)患有肾细胞癌或具有肾细胞癌发生风险。

另外，可以将样品内的一组肾细胞癌相关基因的表达与同一组基因的肾细胞癌参照水平作对比。在本发明上下文中，“肾细胞癌参照水平”指在患有肾细胞癌的群体内发现的肾细胞癌相关基因的表达谱。

与正常对照水平相比，基因表达能增长 10%，25%，或 50%。或者，与正常对照水平相比，基因表达能增长 1，2，5 或更多倍。通过检测肾细胞癌相关基因探针与获自患者的组织样品的基因转录物或其复制体之间的杂交来测定表达，例如，在微阵列或阵列上检测杂交。

获自患者的组织样品可以是待测受试对象，如已知或怀疑患有肾细胞癌的任何组织。例如，所述组织可以包括痰，血液，血清，血浆或肾细胞(如从肾脏等泌尿生殖系统获得的活检样品)。

本发明还提供了 RCCX 基因 1-32 中两个或多个成员的表达水平的肾细胞癌参照表达谱。

本发明进一步提供了鉴定抑制肾细胞癌相关基因如 RCCX 基因 1-32 表达或活性的试剂的方法，包括将表达肾细胞癌相关基因的待测细胞与待测

试剂接触，确定随后的肾细胞癌相关基因的表达水平。待测细胞可以是肾细胞。与该基因的对照水平(如不存在待测试剂时)相比，在存在待测试剂时，RCCX 基因 1-32 水平降低说明待测试剂是可用于缓解肾细胞癌症状的肾细胞癌相关基因抑制剂。

本发明还包括疫苗和接种方法。例如，通过给受试对象施用含由 RCCX 基因 1-32 编码的多肽或免疫活性片段如多肽的疫苗来治疗或预防受试对象内的 RCC 的方法。在本发明上下文中，免疫活性片段是长度比全长天然蛋白短但仍能诱导免疫应答的多肽。例如，在本发明上下文中，免疫活性片段应至少长 8 个残基，并能刺激免疫细胞如 T 细胞或 B 细胞。免疫细胞刺激可通过检测细胞增殖，细胞因子(如 IL-2)生成，或抗体产生来进行测定。

除非另外定义，本文所用的全部技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员常规理解的意思相同。虽然在实践和检测本发明时，可使用与本文所述相似或相同的方法和材料，但适合的方法和材料将在下面进行描述。本文提到的全部公开物，专利申请，专利和其它参考文献都以其整体引入供参考。一旦发生纠纷，本说明书，包括定义，将会调节。另外，该材料，方法和实施例仅意在说明而非限制。

附图说明

图 1 的印迹图显示了肾细胞癌中上调的 32 个基因的表达。半定量 RT-PCR 确定该上调。

图 2A 的柱状图描述了利用 cDNA 微阵列，在临床 RCC 样品中的 HIG2 表达谱。在 10 例 RCC 中有 9 例 HIG2 转录水平明显提高。“T”表示肿瘤，“N”表示相应正常组织。

图 2B 的 Northern 印迹照片显示了多个组织中的 HIG2 表达水平。

图 2C 的印迹图显示了在衍生自下述肿瘤组织的各种细胞系中，通过半定量 RT-PCR 测定的 HIG2 表达水平：结肠直肠癌细胞系(CC)，乳癌细胞系(BC)，肝细胞癌细胞系(HCC)，和肾细胞癌细胞系(RCC)。

图 3A 的免疫印迹照片说明了纯化的抗-HIG2 pAb 的特异性和检测 RCC 细胞系中的内源 HIG2 表达。“模拟(mock)”泳道含有用 pcDNA3.1(+)转染的 COS7 细胞的裂解物；HIG2 泳道含有 pcDNA3.1(+)/HIG2-转染细胞的裂解物。在低氧条件下保存 RCC 细胞(5% O₂, 95% N₂)，从而可以清楚地检测

HIG2。

图 3B 的照片，通过将在 COS7 中瞬时表达的 myc 标记的-HIG2 用免疫荧光染色，来说明 HIG2 蛋白的亚细胞定位。用小鼠抗-myc 抗体和 FITC-偶联的抗-小鼠 IgG 检测 HIG2。

图 3C 的免疫印迹照片，说明利用细胞裂解物(CL)和培养基(CM)来确认作为分泌蛋白的 HIG2。利用抗-HIG2 抗体进行 HIG2 检测。

图 3D 是用抗-HIG2 抗体对下述组织中的 HIG2 蛋白进行免疫组织化学染色的照片：成人肾脏(i, ii)，肾细胞癌(iii, iv)，和胎儿肾脏(v, vi)切片。在 RCC 和胎儿肾脏中检测到强表达，在正常肾脏中未检测到染色。

图 3E 是用抗-HIG2 抗体对人正常组织切片中的 HIG2 蛋白进行免疫组织化学染色的照片。在所有正常人组织中都没有观察到 HIG2 蛋白的表达。

图 3F 是正常肾脏(i, ii)和 RCC(iii, iv)中 HIG2 蛋白的免疫组织化学染色照片：(i, iii)在抑制之前，(ii, iv)，在抑制之后。如箭头所示，重组 hHIG2 蛋白的加入抑制了染色，同时，几乎没有检测到多克隆抗-HIG2 抗体的非特异性染色。

图 3G 是颗粒型和乳突型肾细胞癌中的 HIG2 蛋白的免疫组织化学染色照片。

图 3H 是用抗-HIF1 α mAb(i, ii)或抗-HIG2pAb(iii, iv)对 RCC 切片进行免疫组织化学染色的照片。CN 指中央坏死区，箭头指示 HIF1 α 的表达。

图 4A 的印迹照片说明利用引物对通过 RT-PCR 测定的 HIG2 稳定转染体的表达，所述引物对的 PCR 产物覆盖了 HIG2 ORF。

图 4B 的照片说明建立的 HIG2 稳定转染体的单克隆特性。

图 4 C 的柱状图显示 HIG2 稳定转染体的增殖活性。与模拟-稳定转染体相比，HIG2 稳定转染体的生长速度提高。柱代表三次实验的平均值 \pm SD；*，经 student's t-检验计算相对于模拟具有显著差异($p < 0.01$)。

图 5A 的照片描述了在 RCC 细胞系，caki-1 中 siRNA 引起的内源 HIG2 mRNA 和蛋白表达的抑制。

图 5B 的照片描述了在 RCC 细胞系，caki-2 中 siRNA 引起的内源 HIG2 mRNA 和蛋白表达的抑制。

图 5C 的照片描述了在胚胎肾脏系，HEK293 中 siRNA 引起的内源 HIG2 mRNA 和蛋白表达的抑制。

图 5D 的柱状图描述了 MTT 试验的结果, 显示 siRNA 使 RCC 和胎儿肾脏细胞系细胞增殖降低。

图 6A 的柱状图说明, 经过过表达 HIG2 的 COS7 细胞调整的培养基促进天然 COS7 细胞增殖的自分泌效应。柱代表三次实验的平均值 \pm SD; *, 经 student's t-检验计算相比于模拟具有显著差异($p<0.01$)。

图 6B 的柱状图说明了重组 hHIG2 促进天然 COS7 细胞的细胞增殖。将加入的 BSA 和 hHIG2 浓度调到 1mM。柱代表三次实验的平均值 \pm SD; *, 经 student's t-检验计算相比于模拟具有显著差异($p<0.01$)。

图 6C 的照片说明抗-HIG2 抗体对癌细胞生长的抑制。让细胞分别暴露于 1mM 浓度的非免疫兔 IgG 和抗- HIG2 抗体 5 天。

图 6D 的柱状图显示抗-HIG2 抗体对癌细胞生长的抑制。让细胞分别接触 1mM 浓度的非免疫兔 IgG 和抗- HIG2 抗体 5 天。柱代表三次实验的平均值 \pm SD; *, 经 student's t-检验计算相比于模拟具有显著差异($p<0.01$)。

图 6E 描述了 FACS 的结果, 其揭示抗- HIG2 pAb 促进 RCC-特异性细胞死亡。凋亡细胞的比例用 FACS 分析中的 G1 亚群百分数表示。

图 7 描述了 RCC 患者血浆中 HIG2 蛋白的检测。(a)经 ELISA 检测, 仅在 RCC 患者血浆内观察到 HIG2 蛋白。在 CGN 患者或正常健康志愿者中, 没有检测到 HIG2 蛋白。(b)外科切除术降低了 RCC 患者血浆内的 HIG2 水平, 但在转移性肿瘤中就不是这样。在手术 7 天后, 评价肿瘤切除对血浆内的 HIG2 水平的影响。柱代表三次实验的平均值 \pm SD; *, 与患者进行手术之前的血浆中的 HIG2 浓度相比具有显著差异($p<0.01$)。

发明详述

本文所描述的数据代表肾细胞癌(RCC)内全基因组(genome-wide)基因的表达分析。更具体的说, 本发明数据提供了肾细胞癌的全基因组表达谱, 该表达谱由对临床样品内超过 23,000 个基因的表达进行测定而获得。本文鉴定的差异表达的基因可用于诊断目的和开发抑制肾细胞癌的基因靶标治疗途径。

对超过 23,000 个基因进行 cDNA 微阵列分析, 选出在肾细胞癌癌症患者中一贯且可信地过表达的基因。尤其是, 在大于 50%的检测样品中发现了 32 个基因过表达。更具体的说, 可被低氧诱导的蛋白 2(HIG2)在检测的

10 例 RCC 中有 9 例明显过表达。随后的半定量 RT-PCR, northern 印迹和免疫组织化学分析证实 HIG2 在 RCC 细胞内明显上调, 而未在任何正常的重要器官内检测到上调。

本发明部分基于发现与非癌性肾组织相比, 编码低氧诱导蛋白 2(HIG2) 的基因在肾细胞癌(RCC)内过表达。HIG2 最初是作为由低氧诱导的基因而被鉴定出的(Denko N., Schindler C., Koong A., Laderoute K., Green C., Giaccia A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 6, 480-487 (2000)). HIG2 cDNA 长 1372 个核苷酸(GENBANK 登录号 NM_013332; SEQ ID NO:1)。跨越残基 206-394 的 ORF 编码 63 个氨基酸的蛋白和由 Signal IP 预报的位于密码子 1-21 的信号序列。

HIG2 在 COS7 细胞中的外源表达可以使细胞生长增加。相反, 用反义 S-寡核苷酸抑制其表达或通过用 HIG2 特异性多克隆抗体中和 HIG2 蛋白活性会抑制肾细胞如肾癌细胞或胚胎肾细胞生长。

因此, 本发明涉及抑制细胞生长的方法, 即通过抑制 HIG2 表达而抑制癌细胞生长。可通过使用特异性靶向 HIG2 基因的小分子干扰 RNA(siRNA) 来抑制 HIG2 表达。HIG2 靶标包括, 如核酸序列 SEQ ID NO:77-80。

在非哺乳动物细胞中, 显示双链 RNA(dsRNA)对基因表达具有强烈且特异性的沉默效应, 称作 RNA 干涉(RNAi) (Sharp PA. RNAi and double-strand RNA. *Genes Dev.* 1999 Jan 15;13(2):139-41.)。可用含 RNase III 基元的酶将 dsRNA 加工为称作小分子干扰 RNA (siRNA)的 20-23 个核苷酸的 dsRNA。这些 siRNA 特异性靶向含多组分核酸酶复合物的互补 mRNA (Hammond SM, Bernstein E, Beach D, Hannon GJ. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 2000 Mar 16;404(6775):293-6., Hannon GJ. RNA interference. *Nature.* 2002 Jul 11;418(6894):244-51.)。在哺乳动物细胞中, siRNA 是由 19 个互补核苷酸和 3'末端上的胸腺嘧啶或嘧啶互补二聚体组成的 20 或 21-mer dsRNA, 它具有基因特异性的敲减(knock-down)效应且不会诱导基因表达的普遍改变 (Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 2001 May 24;411(6836):494-8.)。另外, 含小分子核 RNA (snRNA)U6

或聚合酶 III H1-RNA 启动子的质粒能有效产生这种短 RNA, 从而动员 III 型 RNA 聚合酶 III, 并因此可以组成性地抑制其靶 mRNA(Miyagishi M, Taira K. U6 promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. Nat Biotechnol. 2002 May;20(5):497-500, Brummelkamp TR, Bernards R, Agami R. A System for Stable Expression of Short Interfering RNAs in Mammalian Cells Science. 296(5567):550-553, April 19, 2002.)。

构建四个不同的表达质粒来表达 HIG2-siRNA(参见实施例 5)。检测质粒抑制细胞生长的能力。用 HIG2-siRNA 表达载体转染各种人肾癌细胞和正常(即非癌性的)肾细胞, 与对照质粒相比, 存活细胞数减少。

还可以利用 HIG2 抗体中和 HIG2 蛋白活性来抑制细胞生长。例如, 利用与 HIG2 蛋白的 C-末端 14 个氨基酸残基(EPTKGLPDHPSRSM)相一致的亲水性肽和不包括 N-末端信号肽基元的全长重组 HIG2 蛋白产生多克隆抗体。针对 HIG2 的纯化抗体特异地识别 HIG2 蛋白。检测这些抗体抑制细胞生长的能力。将抗-HIG2 抗体加到两种 RCC 细胞 caki-1 和 caki-2 的培养基内, 明显抑制它们生长。

另外, 本文鉴定的差异表达的基因可用于诊断目的和开发抑制肾细胞癌的基因靶标治疗途径。例如, 通过测定不同基因在细胞样品中的表达, 就可以确定细胞和细胞群内的肾细胞癌的存在。类似地, 通过测定这些基因对不同试剂应答后的表达, 就能确定治疗肾细胞癌的试剂。

抑制细胞生长的方法

在本发明上下文中, 通过将细胞与含 HIG2 siRNA 的组合物接触来抑制细胞生长。可将该细胞进一步与转染剂接触。适合的转染剂是本领域已知的。另外可通过将细胞与含 HIG2 抗体或其片段的组合物接触来抑制细胞生长。

细胞可以是能表达或过表达 HIG2 的任何细胞。例如, 细胞可以是肾细胞, 如肾脏细胞。另外, 细胞可以是肿瘤细胞, 如癌。在优选的实施方式中, 细胞是肾细胞癌, 如透明细胞。

在本发明上下文中, “抑制细胞生长”包括与未接触所述组合物的细胞相比, 增殖率降低或生存力降低的细胞。细胞生长可以通过本领域已知的方法, 如 MTT 细胞增殖试验来进行测定。

HIG2-siRNA

在本发明上下文中，HIG2-siRNA 可以靶向单个靶 HIG2 基因序列。另外，可将 HIG2-siRNA 靶向多个靶 HIG2 基因序列。例如，组合物可以含靶向两个，三个，四个或五个或更多个 HIG2 靶序列的 HIG2-siRNA。在本发明上下文中，HIG2 靶序列是与 HIG2 基因的一部分相同，或与天然 HIG2 基因的一部分互补的核苷酸序列。靶序列可以包括人 HIG2 基因的 5'端非翻译(UT)区，开放阅读框(ORF)或 3'端非翻译区。另外，siRNA 可以是与 HIG2 基因表达的上游或下游调控子互补的核酸序列。上游或下游调控子的例子包括但不限于，结合 HIG2 基因启动子的转录因子，与 HIG2 多肽，HIG2 启动子和 HIG2 增强子相互作用的激酶或磷酸酶。

与靶 mRNA 杂交的 HIG2-siRNA 通过与正常单链 mRNA 转录物结合，而干扰翻译以及蛋白表达，来降低或抑制由 HIG2 基因编码的 HIG2 多肽产物的产生。siRNA 长度优选小于 500，小于 200，小于 100，小于 50，小于 25 个核苷酸。更优选 siRNA 长 19-25 个核苷酸。用于制备 HIG2-siRNA 的示例性核酸序列包括序列 SEQ ID NO: 77-80。此外，为了提高 siRNA 的抑制活性，可将核苷酸“u”加到靶序列反义链的 3'端。“u”的添加数量至少是 2，通常是 2-10，优选 2-5 个。添加的“u”在 siRNA 的反义链 3'端形成单链。

可以将 HIG2-siRNA 以能结合 mRNA 转录物的形式直接导入细胞内。另外，编码 HIG2-siRNA 的 DNA 可以是在载体内的。

可以通过将 HIG2 靶序列克隆到表达载体内、使其与 HIG2 序列侧翼调控序列以允许表达双链的方式(通过转录 DNA 分子)操纵连接，来制备载体 (Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P., 和 Rossi, J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnology* 20 : 500-505)。HIG2 mRNA 的反义 RNA 由第一个启动子(例如，克隆化 DNA 3'端的启动子序列)转录，HIG2 mRNA 的有义链由第二个启动子(例如，克隆化 DNA 5'端的启动子序列)转录。有义和反义链在体内杂交产生使 HIG2 基因沉默的 siRNA 构建体。另外，可用两个构建体创造 siRNA 构建体的有义和反义链。克隆的 HIG2 可编码具有二级结构如发夹的构建体，在该构建体内单转录物同时具有来自靶基因的有义序列和互补反义序列。

由任意核苷酸序列组成的环序列可位于有义和反义序列之间，这样就能形成发夹环结构。因此，本发明还提供了具有通式 5'-[A]-[B]-[A']-3'的 siRNA，其中[A]是相应于选自由 SEQ ID NOs: 77-80 组成的组的序列的核糖核苷酸序列，[B]是由 3-23 个核苷酸组成的核糖核苷酸序列，[A']是由[A]的互补序列构成的核糖核苷酸序列。区域[A]与[A']杂交，而形成由区域[B]构成的环。环序列优选长 3-23 个核苷酸。环序列，如可选自下述序列(参见 http://www.ambion.com/techlib/tb/tb_506.html):

CCC, CCACC 或 CCACACC (Jacque, J. M., Triques, K.和 Stevenson, M (2002) Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. Nature, Vol. 418: 435-438);

UUCG (Lee, N.S., Dohjima, T., Bauer, G., Li, H., Li, M.-J., Ehsani, A., Salvaterra, P.,和 Rossi, J. (2002) Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. Nature Biotechnology 20 : 500-505; Fruscoloni, P., Zamboni, M.,和 Tocchini-Valentini, G. P. (2003) Exonucleolytic degradation of double-stranded RNA by an activity in *Xenopus laevis* germinal vesicles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100(4): 1639-1644); 和

UUCAAGAGA (Dykxhoorn, D. M., Novina, C. D.,和 Sharp, P. A. (2002) Killing the messenger: Short RNAs that silence gene expression. Nature Reviews Molecular Cell Biology 4: 457-467)。

另外，由 23 个核苷酸组成的环序列还可提供活性 siRNA(Jacque, J.M., Triques, K.,和 Stevenson, M. (2002) Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. Nature 418 : 435-438)。

适合本发明上下文使用，并具有发夹环结构的示例性 siRNAs 如下所示。在下述结构中，环结构可选自 CCC, UUCG, CCACC, CCACACC 和 UUCAAGAGA。优选的环序列是 UUCAAGAGA(DNA 中是“ttcaagaga”)。

gcatgtgataagacctct-[b]-aggaggtcttatcacatgc(SEQ ID NO:77 靶序列);
cactgacctagacatgtcc-[b]-ggacatgtctaggtcagtg(SEQ ID NO:78 靶序列);
gaacctgtctaactggatg-[b]-catccagtagacaggttc(SEQ ID NO:79 靶序列); 和
cctgtctaactggatgctc-[b]-gagcatccagtagacagg(SEQ ID NO:80 靶序列)。

在 HIG2 序列侧翼的调控序列可以相同或者不同，这样就能独立地或分时间或分空间地调节其表达。通过将 HIG2 基因模板克隆入包含诸如小分子

核 RNA (snRNA) U6 或人 H1-RNA 启动子的 RNA pol III 转录单元的载体内, 可以在细胞内转录 siRNA。为了将载体导入细胞内, 可以使用转染增强剂。FuGENE (Rochediagnostices), Lipofectamin 2000 (Invitrogen), Oligofectamin (Invitrogen), 和 Nucleofactor (Wako pure Chemical) 可用作转染增强剂。

按照常规方法, 在体外检测寡核苷酸和互补于 HIG2 mRNA 各部分的寡核苷酸降低肿瘤细胞中 HIG2 产量的能力。利用 HIG2-特异性抗体或其它检测策略, 可检测出, 在接触候选 siRNA 组合物的细胞内与在不存在候选组合物时培养的细胞相比 HIG2 基因产物减少。然后, 可以在体外基于细胞的或无细胞的试验中, 检测那些降低 HIG2 产量的序列对细胞生长的抑制效力。接着, 对体外抑制细胞生长的序列, 可以在大鼠或小鼠体内进行检测, 从而证实, 在恶性瘤动物内, HIG2 产量降低且肿瘤细胞生长降低。

HIG2 抗体

在本发明上下文中, HIG2 抗体可以是多克隆抗体。另外, HIG2 抗体可以是单克隆抗体。氨基酸序列“EPTKGLPDHPSRSM”是被本发明 HIG2 抗体识别的优选表位。在本发明上下文中, HIG2 抗体可以是抗体片段或修饰的抗体, 只要它能与 HIG2 结合。比如, 抗体片段可以是 Fab, F(ab')₂, Fv 或单链 Fv(scFv), 其中来自 H 和 L 链的 Fv 片段由合适的接头连接。更具体地, 适合的抗体片段可以用酶, 如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体产生的。另外, 可以构建编码抗体片段的基因, 将该基因插入表达载体, 并在合适的宿主细胞中表达(参见如 Co M. S.等 J. Immunol. 152:2968-2976 (1994); Better M.和 Horwitz A. H. Methods Enzymol. 178:476-496 (1989); Pluckthun A.和 Skerra A. Methods Enzymol. 178:497-515 (1989); Lamoyi E. Methods Enzymol. 121:652-663 (1986); Rousseaux J.等 Methods Enzymol. 121:663-669 (1986); Bird R. E.和 Walker B. W. Trends Biotechnol. 9:132-137 (1991))。

抗体可以通过与各种分子, 如聚乙二醇(PEG)偶联进行修饰。本发明提供了所述修饰的抗体。所述修饰抗体可以通过对抗体进行化学修饰而获得的。这些修饰方法是本领域常用的。

另外, 抗体可以包括嵌合抗体或人源化抗体, 其中嵌合抗体具有非人类抗体的可变区和人抗体的恒定区, 人源化抗体具有非人类抗体的互补决

定区(CDR)、人抗体的框架区(FR)和恒定区。所述抗体可以利用已知技术加以制备。

治疗恶性肿瘤的方法

在本发明上下文中，通过施用 HIG2-siRNA 或 HIG2-抗体来治疗以过表达 HIG2 为特征的肿瘤患者。siRNA 或抗体疗法用于抑制患有或易患肾细胞癌的患者内的 HIG2 表达或活性。所述患者采用具体肿瘤型的常规方法来进行鉴定。例如，肾细胞癌可以通过计算机化体层摄影法(CT)扫描和超声波检查法来进行诊断。

当获得临床效益如例如 HIG2 的表达降低，或受试对象的肿瘤缩小，流行性或转移潜力降低时，就认为治疗有效。当进行预防性治疗时，术语“有效”是指该治疗延迟或阻止肿瘤形成或减轻肿瘤临床症状。

肾细胞癌症状和征兆包括如疼痛，血尿，肋腹肿块(flank mass)，体重减轻，发烧，高血压，盗汗(night sweat)，男性患者突发精索静脉曲张和肿瘤伴随综合症其具有多种症状如高血压，高钙血症，发热，和肝功能异常。有效性由诊断或治疗具体肿瘤类型的任何已知方法来确定。

利用常规载体和/或基因传递系统，通过给患者施用 siRNA 来进行 siRNA 疗法。适合的基因传递系统包括脂质体，受体介导的传递系统，或病毒载体如疱疹病毒，逆转录病毒，腺病毒和腺伴随病毒等。治疗性核酸组合物可以与药学上可接受的载体结合配制。治疗性组合物还可以包括上述基因传递系统。药学上可接受的载体是适合动物给药的生物学上相容的运载工具，如生理盐水。组合物的治疗有效量是能产生医学上所需结果的量，如 HIG2 基因产物的产量减少，细胞生长如增殖的减弱，或治疗动物内的肿瘤生长减少。

可用肠胃外给药，如静脉内，皮下，肌内和腹膜内传递途径来传递本发明的 HIG2-siRNA 组合物。对于肝肿瘤治疗，直接注入门静脉是有利的。

适合剂量由许多因素决定，包括患者体积，体表面积，年龄，施用的具体核酸，性别，给药时间和途径，常规健康状况，及同时施用的其它药物。核酸的静脉内给药剂量范围从约 10^6 到 10^{22} 个核酸分子拷贝。

本发明的多核苷酸采用常规方法给药，如通过注射到组织如肌肉或皮肤的间质腔，导入循环或体腔内或通过吸入或吹入给药。通常，将所述多核苷酸与药学上可接受液态载体，如水性或部分水性的液态载体一起注入

或传给动物。多核苷酸还可与脂质体(如阳离子或阴离子脂质体)结合。本发明的多核苷酸优选包括由靶细胞表达时所需的遗传信息,如启动子。

本文所述的 HIG2-特异性抗体可用于抑制肿瘤细胞生长或杀死肿瘤细胞。例如,将氨基酸序列“EPTKGLPDHPSRSM”识别为表位的抗体可在本文所述方法中使用。具体地,可将纯化的抗体制剂(如纯化的单克隆抗体,抗体片段,或单链抗体)施给诊断患有或易患肿瘤的个体。可采用被动免疫领域所熟知的方法,如静脉内或肌肉内注射方式给药抗体制剂。另外,本文所述方法中使用的抗体可与生理上可接受的赋形剂结合配制。所述赋形剂,如生理盐水,是本领域已知的。

诊断肾细胞癌

在本发明上下文中,肾细胞癌通过测定来自待测细胞群(即患者组织样本)的一种或多种 RCCX 核酸的表达来进行诊断。优选,待测细胞群包括肾细胞,如获自肾系统的细胞。还可以从骨髓,血,粪,尿,或其它体液如痰测定基因表达。

测定待测细胞中一种或多种肾细胞癌相关基因,如 RCCX 基因 1-32 的表达,并与正常对照水平的表达对比。在本发明上下文中,“正常对照水平”是指在已知未患肾细胞癌的群体中通常发现的肾细胞癌相关基因的表达谱。与正常对照水平相比,患者组织样本内的肾细胞癌相关基因表达水平增加说明该受试对象患有肾细胞癌或者具有肾细胞癌发生风险。

与正常对照水平相比,在待测群体内一种或多种肾细胞癌相关基因的改变说明该受试对象患有或者具有肾细胞癌发生风险。例如,在本文鉴定的肾细胞癌相关基因至少 10%,至少 20%,至少 50%,至少 60%,至少 80%,至少 90%或更多种发生改变,指示可诊断肾细胞癌。

当表达谱分析显示表达谱包含肾细胞癌特征,可判断该受试对象患有肾细胞癌。术语“肾细胞癌特征”是指一组 RCCX 基因的表达水平的变化模式,该模式是肾细胞癌特有的。具体地说,例如,假设在肾细胞癌中,基因的表达水平比对照中高;当与对照相比,包括在表达谱内的该基因的表达水平提高时,可评定该表达谱具有肾细胞癌特征。当在构成表达谱的表达水平中的大部分变化模式是肾细胞癌特有的时,就评定该表达谱具有肾细胞癌特征。

具体地说，当不是所有的但大部分的 RCCX 基因显示基因表达水平的肾细胞癌相关变化模式时，就认为包括 RCCX 基因表达谱的表达谱具有肾细胞癌特征。

当构成表达谱的 50%或更多，优选 60%或更多，更优选 80%或更多，还优选 90%或更多的 RCCX 基因显示基因表达水平的肾细胞癌相关变化模式时，就断定该表达谱具有肾细胞癌特征。

在本发明中，还提供了诊断肾细胞癌的诊断剂。本发明的诊断剂包括结合 RCCX 基因的 DNA 或蛋白的化合物或组合物。优选地，与 RCCX 基因的多核苷酸杂交的寡核苷酸，或特异性结合 RCCX 基因编码的蛋白的抗体可以作为该化合物或组合物。

另外，RCCX 基因的蛋白可以通过免疫学方法进行检测。本领域的技术人员可以选择任何免疫分析方式。例如，酶联免疫吸附试验(ELISA)、酶免疫测定(EIA)、放射免疫测定(RIA)，和/或免疫荧光法可用于检测和测定所述蛋白。在 ELISA 中，将识别所述蛋白的抗体固定在固相上，将含所述蛋白的样品加至固相上。将平板，微珠，或磁珠作固相使用。然后，加入识别所述蛋白且用酶如碱性磷酸酶标记的二抗，对固相进行孵育。接着，在洗涤后，将酶底物如对硝基苯磷酸加至固相中，并测量吸光度，从而评价样品的抗原结合活性。

在本发明中，待测的 RCCX 基因的蛋白优选衍生自采自待诊受试对象的体液。体液样品包括血液样品或血液衍生样品，如血清，血浆，或全血。优选，将取自待诊受试对象的样品(即待测样品)中的蛋白浓度与对照，如来自正常受试对象的样品(即正常样品)中的蛋白浓度作比较。当该比较显示待测样品中的蛋白表达水平高于正常样品中的表达水平时，就判定该受试对象患有 RCC。可以同时的正常样品和待测样品中的蛋白表达水平进行测定。另外，可以利用事先采自对照组的样品中的蛋白表达水平，经统计学分析，确定表达水平的正常范围。将待测样品中的表达水平与正常范围进行比较；当结果不落在该正常范围内时，就判定受试对象患有 RCC。优选地，将 HIG2 的表达水平作为本发明的诊断方法中的 RCCX 蛋白。

鉴定抑制肾细胞癌相关基因表达的试剂

通过将表达肾细胞癌相关基因的待测细胞群与待测试剂接触，测定肾细胞癌相关基因的表达水平，来对抑制肾细胞癌相关基因的表达或活性的试

剂进行鉴定。与对照水平相比，肾细胞癌相关基因的表达降低说明该试剂是肾细胞癌相关基因的抑制剂，并且在抑制肾细胞癌中是有用的。

待测细胞群可以是表达肾细胞癌相关基因的任何细胞。例如，待测细胞群可以包含肾细胞。更具体地说，待测细胞可以是衍生自肾细胞癌细胞的无限增殖细胞系。

评价受试对象肾细胞癌的治疗效力

本文中鉴定的差异表达的 RCC-相关基因还能监测肾细胞癌的治疗过程。在此方法中，待测细胞群获自正接受肾细胞癌治疗的受试对象。如果需要，可以在各种时间点，在治疗之前，期间，和/或之后从受试对象获得待测细胞群。然后，测定细胞群中的一种或多种 RCC-相关基因的表达，并与对照细胞群进行比较，所述对照细胞群包括已知肾细胞癌状态的细胞。对照细胞应该未接触过治疗。

如果对照细胞群包括非肾细胞癌细胞，待测细胞群和对照细胞群之间的 RCC-相关基因的表达相似性说明治疗是有效的，或者具有临床效益。但是，待测细胞群和对照细胞群之间的 RCC-相关基因的表达差异说明临床结果或预后不理想。

术语“有效”说明，例如，治疗使得受试对象内的病理性上调基因的表达降低，或肾细胞癌缩小、流行性或转移潜力降低。当治疗是预防性地应用时，术语“有效”意思是该治疗延迟或防止肾细胞癌形成。可利用临床方法评定肾细胞癌所处阶段。

结合任何已知的诊断或治疗肾细胞癌的方法可以测定有效性。

选择适于具体个体的肾细胞癌治疗剂

个体遗传特性的差异导致他们代谢各种药物的相对能力的不同。在受试对象内代谢成起抗肾细胞癌试剂作用的试剂，通过将受试对象细胞内的基因表达模式从癌状态特征诱导为基因表达模式非癌状态特征来表现其自身。这样，本文所公开的差异表达的 RCC-相关基因允许推定的治疗性或预防性抗肾细胞癌试剂在来自选定受试对象的待测细胞群中进行检测，从而确定该试剂是否是适合该受试对象的抗肾细胞癌试剂。

为了鉴定适合具体受试对象的抗肾细胞癌试剂，将来自该受试对象的待测细胞群与治疗剂接触，测定 RCCX 基因 1-32 中一或多种基因的表达。

待测细胞群应该包括表达至少一种肾细胞癌相关基因的肾细胞癌细胞。优选地，待测细胞是肾脏细胞。例如，待测细胞群可以在存在候选剂的条件下孵育，测定待测样品的基因表达模式，并与一种或多种对照谱进行比较，如肾细胞癌对照表达谱或非肾细胞癌对照表达谱。

相对于包括肾细胞癌的对照细胞群，待测细胞群中的 RCCX 基因 1-32 中一或多种基因表达降低说明该试剂是治疗性的。待测试剂可以包括任何化合物或组合物。例如，待测试剂可以是免疫调节剂或与异常过表达的 RCCX 核酸相应的特异性反义核苷酸化合物。

鉴定治疗剂的筛选试验

本文所公开的差异表达的序列还可以用于鉴定治疗肾细胞癌的候选治疗剂。该方法的基础是筛选候选治疗剂，确定它是否将肾细胞癌状态特有的 RCCX 基因 1-32 表达谱变成表示或更相似于与肾细胞癌无关的临床状态的模式。

在本发明的方法中，将细胞与待测试剂或待测试剂的组合接触(逐次地或连续地)，测定该细胞中的 RCCX 基因 1-32 中一或多种基因的表达。将待测细胞群中的 RCCX 核酸的表达谱与未接触过待测试剂的对照细胞群中的 RCCX 核酸表达水平进行比较。

在本发明的筛选方法中，当标记基因的表达水平在肾细胞癌中升高时，选出的候选剂应该具有使该表达水平与在对照中相比降低的活性。

另外，本发明的筛选可以包括下述步骤：(1)将候选剂与标记基因编码的蛋白接触；和

(2)选出与对照相比改变该蛋白活性的候选剂。

进行筛选所需的蛋白可以利用标记基因的核苷酸序列以重组蛋白形式获得。在标记基因相关信息的基础上，本领域技术人员可以对作为筛选标引的蛋白活性和适合测定所选活性的方法进行选择。

另外，本发明的筛选可以包括下述步骤。

(1)制备在标记基因的转录调节区的控制下，能保证报道基因表达的报道基因构建体；

(2)将候选剂与宿主细胞接触，该细胞包括并能表达上面提到的报道基因构建体；和

(3)测定报道基因的活性或表达水平，选出与对照相比具有改变该表达水平的活性的候选剂。

进行筛选所需的报道基因构建体可以利用标记基因的转录调节区来加以制备。当标记基因的转录调节区是本领域已知的时，可利用现有序列信息来制备报道基因构建体。当标记基因的转录调节区还未确定时，可以以标记基因的核苷酸序列信息为基础，从基因组文库中分离出含有转录调节区的核苷酸片段。

可在本发明的筛选方法中使用的候选剂类型没有任何限制。本发明的候选剂可以利用本领域已知的组合文库法中的大量方法中的任何方法来加以制备，包括：生物文库；空间可寻址(addressable)平行固相或溶液相文库；需重叠合法(deconvolution)的合成文库法；“单珠单化合物”文库法；和利用亲和层析选择的合成文库法。生物文库法仅限于肽文库，而其它四种方法适用于肽，非肽寡聚物或化合物的小分子文库(Lam (1997)Anticancer Drug Des. 12:145)。

有效抑制一种或多种过表达基因的试剂被认为能获得临床效益。可进一步对这类化合物的预防肿瘤细胞生长的活性进行测定。

评价肾细胞癌患者的预后

本文还提供了评价肾细胞癌患者的预后的方法，其是在整个病程中，将待测细胞群中的一种或多种 RCC-相关基因的表达与衍生自患者的对照肾细胞群中的相同基因的表达进行比较。通过比较待测细胞群与对照细胞群中的一种或多种 RCC-相关基因的基因表达，或者通过比较受试对象的待测细胞群中基因随时间的表达模式，可以对受试对象的预后进行评价。例如，与正常对照相比，一种或多种 RCC-相关基因的表达随时间增加就说明该预后效果不理想。

试剂盒

本发明还包括 RCCX-检测试剂，例如特异性结合或鉴定一种或多种 RCCX 核酸的核酸，例如与 RCCX 核酸的一部分互补的寡核苷酸序列或结合 RCCX 核酸编码的蛋白的抗体。可将试剂以试剂盒形式包装在一起。可将试剂包装在不同的容器内，如核酸或抗体(与固体基质结合或与使它们与基质结合的试剂分开包装)，对照试剂(阳性的和/或阴性的)，和/或可测标记。

可将进行试验的说明书(如成文, 磁带, VCR, CD-ROM 等)包括在试剂盒内。试剂盒的试验形式是本领域已知的 Northern 杂交或夹心 ELISA。

例如, 可将 RCCX 检测试剂固定在固体基质如多孔条带上, 形成至少一个 RCCX 检测点。多孔条带的测定或检测区域可以包括多个含核酸的位点。待测条带还可以包括阳性和/或阴性对照位点。另外, 对照位点可以位于与待测条带不同的条带上。任选地, 不同的检测位点可以包括不同量的固相核酸, 即较高量在第一检测位点内, 较低量在随后的位点内。在加入待测样品后, 显示可测信号的位点数量就定量地说明在该样品中存在的 RCCX 量。可以使检测位点形成任何可适当检测的形状, 通常为试验条片或横跨整个待测条带的点。

另外, 试剂盒可以包括含一种或多种核酸序列的核酸底物阵列。阵列上的核酸能特异性地识别 RCCX 基因 1-32 所代表的一种或多种核酸序列。凭借与阵列待测条带或芯片的结合水平, 对 RCCX 基因 1-32 所代表的 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 或更多种序列的表达进行鉴定。基质阵列可以在例如固体基质, 如 U.S. 专利 No.5,744,305 所描述的“芯片”上。

另外, 结合 RCCX 基因的蛋白的抗体可以包括在试剂盒内。优选地, 将抗体固定在固相如平板、微珠、或磁珠上。另外, 结合在固相上的抗体可以与二抗结合, 所述二抗用的标记物如产生信号的分子标记。酶、荧光团、或发光分子是合适的产生信号的分子。含抗体的试剂盒可以进一步包括检测试剂, 该试剂用于检测标记物所产生的信号。

阵列和多数(pluralities)

本发明还包括含一种或多种核酸序列的核酸基质阵列。阵列上的核酸特异性地与 RCCX 基因 1-32 所代表的一种或多种核酸序列相一致。RCCX 基因 1-32 所表示的 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 或更多种序列的表达水平可通过检测结合阵列的核酸来进行鉴定。

本发明还包括分离的多数(即, 两种或多种核酸混合物)核酸序列。核酸序列可以在液相或固相中, 如固定在固相支持物如硝酸纤维素膜上。多数包括 RCCX 基因 1-32 所表示的一种或多种核酸序列。在各种实施方式中, 多数包括 RCCX 基因 1-32 所表示的 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25 或更多种序列。

DNA 阵列是一种同时方便的比较很多基因的表达水平的设备。例如，可采用“Microarray Biochip Technology “ (Mark Schena, Eaton Publishing, 2000)所公开的方法等进行基于 DNA 阵列的表达谱分析。

DNA 阵列包括用于检测大量基因的固相高密度探针。因此，许多基因的表达水平可以通过单轮分析来同时进行评价。也就是说，可用 DNA 阵列测定样本的表达谱。因此，本发明的基于 DNA 阵列的方法优选包括下述步骤：

- (1) 合成 aRNAs 或 cDNAs，包括标记基因的那些；
- (2) 将 aRNAs 或 cDNAs 与标记基因的探针杂交；和
- (3) 检测与探针杂交的 aRNAs 或 cDNAs，并对其 mRNA 进行定量。

术语“aRNA”是指用 RNA 聚合酶，从模板 cDNA 转录的 RNA(即，扩增的 RNA)。用于基于 DNA 阵列的表达谱分析的 aRNA 转录试剂盒是可商购的。用所述试剂盒，可以利用 T7 RNA 聚合酶，从作为模板的 T7 启动子-连接的 cDNA 合成 aRNA。在另一方面，可以用随机引物，采用合成自 mRNA 的 cDNA 作为模板，PCR 扩增 cDNA。

另外，DNA 阵列可以包括点在其上的探针，该探针检测本发明的标记基因。对点在 DNA 阵列上的标记基因数量无限制。例如，可以选择 5%或更多，优选 20%或更多，更优选 50%或更多，还更优选 70%或更多的本发明的标记基因。除本发明标记基因之外的其它基因也可以点在 DNA 阵列上。例如，可将表达水平几乎不改变的基因的探针点在 DNA 阵列上。当欲对多个芯片之间或不同试验之间的试验结果进行比较时，所述基因可用于使试验结果标准化。

对各所选标记基因设计探针，并将探针点在 DNA 阵列上。所述探针可以是，例如，含 5-50 个核苷酸残基的寡核苷酸。用于在 DNA 阵列上合成所述寡核苷酸的方法是本领域技术人员已知的。较长的 DNAs 可以化学合成或用 PCR 合成。用于将 PCR 合成的长 DNA 或类似物点在载玻片上的方法也是本领域技术人员已知的。通过上述方法所获得的 DNA 阵列可用于诊断本发明所述的肾细胞癌。

例如，将制备的 DNA 阵列与 aRNA 接触，接着测定探针和 aRNA 间的杂交。aRNA 可以预先用荧光染料标记。可用荧光染料如 Cy3(红)和 Cy5(绿)标记 aRNA。分别用不同的荧光染料标记获自受试对象和对照的 aRNA。此

两者间的表达水平差异可根据信号强度的差异进行评价。DNA 阵列上的荧光染料信号可以用扫描仪检测，利用具体程序进行分析。例如，Affymetrix 的 Suite 是一种 DNA 阵列分析软件包。

抑制RCC的方法

本发明进一步提供了通过降低RCCX基因1-32中一或多种基因的表达或活性，治疗或减轻受试对象内的一种或多种RCC症状的方法。可以将治疗化合物预防性地或治疗性地施给患有(或易感)RCC的受试对象。

可以全身或局部给药。可以利用常规临床方法或通过检测 RCCX 基因 1-32 的表达水平或活性对所述受试对象进行鉴定。治疗剂包括细胞增殖抑制剂。

本发明的方法包括降低RCCX基因1-32的基因产物的表达和/或功能的步骤。可以用本领域已知的许多方式中的任何一种抑制表达。例如，可以通过给受试对象施用核酸来抑制表达，所述核酸抑制或拮抗过表达基因的表达，例如破坏过表达基因的表达的反义寡核苷酸或小分子干扰 RNA (siRNA)。

如上所述，与 RCCX 基因 1-32 的核苷酸序列相应的反义寡核苷酸可以用于降低 RCCX 基因 1-32 的表达水平。与在 RCC 中上调的 RCCX 基因 1-32 的核苷酸序列相应的反义寡核苷酸对治疗 RCC 是有用的。更具体地说，本发明的反义核酸能与 RCCX 基因 1-32 的核苷酸序列或其相应 mRNA 结合，从而抑制该基因的转录或翻译，促使所述 mRNA 降解，和/或抑制 RCCX 基因 1-32 的核酸所编码的蛋白的表达，最终抑制所述蛋白的功能来起作用。本文所用术语“反义核酸”包括与靶序列完全互补的核苷酸，和那些含有核苷酸错配的核苷酸，只要该反义核酸能与靶序列特异性地杂交。例如，本发明的反义核酸包括在跨至少 15 个连续的核苷酸跨度中，有至少 70%或更高，优选 80%或更高，更优选 90%或更高，甚至更优选 95%或更高同源性的多核苷酸。本领域已知的算法可用于测定同源性。

本发明的反义核酸能对产生由标记基因编码的蛋白的细胞起作用，通过将该反义核酸与编码该蛋白的 DNA 或 mRNA 结合，抑制其转录或翻译，促使所述 mRNA 降解，并抑制蛋白的表达，从而抑制所述蛋白的功能。

本发明的反义核酸通过与适合的基质材料混合可制成外用制剂，如搽剂或泥敷剂，其中基质材料无法使所述衍生物失活。

而且,在需要的时候,通过添加赋形剂、等渗剂、增溶剂、稳定剂、保存剂、止痛剂等,可以将反义核酸制成片剂、粉剂、颗粒、胶囊、脂质体胶囊、注射剂、溶液、滴鼻剂和冻干剂。它们可以通过下述已知方法制备。

本发明的反义核酸可通过下述方法施给患者:将其直接应用在病患处或注射入血管内使其能到达病患处。反义封固介质可用于增加耐久性和膜渗透性。实例包括,但不限于,脂质体、聚-L-赖氨酸、脂质、胆固醇、lipofectin或其衍生物。

本发明的反义核酸的用量可以根据患者的情况进行适当调节,并以所需量使用。例如,施用的剂量可以为 0.1-100 mg/kg,优选 0.1-50 mg/kg。

本发明的反义核酸抑制本发明的蛋白的表达,因此对抑制该蛋白的生物活性是有用的。而且,由于能抑制本发明的蛋白的生物活性,因此包括本发明的反义核酸的表达抑制剂也是有用的。

本发明的反义核酸包括修饰的寡核苷酸。例如,硫代寡核苷酸可对寡核苷酸赋予核酸酶抗性。

而且,抗标记基因的 siRNA 可用于降低标记基因的表达水平。术语“siRNA”是指阻止靶 mRNA 翻译的双链 RNA 分子。可使用将 siRNA 导入细胞的常规技术,包括以转录出 RNA 的 DNA 为模板的那些。在本发明上下文中,siRNA 包括针对上调的标记基因如 *HIG2* 的有义核酸序列和反义核苷酸序列。构建 siRNA,从而使单一转录物含有来自靶基因的有义序列和互补反义序列,如发夹。

可利用该方法改变例如由于细胞恶性转化而上调的基因在细胞中的表达。在靶细胞中 siRNA 与 *RCCX* 基因 1-32 的相应转录物的结合会导致细胞产生的蛋白量减少。所述寡核苷酸的长度至少为 10 个核苷酸,并且可以与天然存在的转录物等长。优选地,寡核苷酸长度为 19-25 个核苷酸。最优选地,寡核苷酸长度小于 75, 50, 25 个核苷酸。在哺乳动物细胞中抑制表达的 *HIG2* siRNA 寡核苷酸的例子包括含 SEQ ID NO: 77-80 的靶序列。

siRNA 的核苷酸序列可以利用可从 Ambion 网址 (http://www.ambion.com/techlib/misc/siRNA_finder.html)获得的 siRNA 设计程序对其进行设计。该程序根据下述方案选出用于 siRNA 合成的核苷酸序列:

siRNA 靶位点的选择:

1. 从目标转录物的 AUG 起始密码开始, 向下游寻找 AA 二核苷酸序列。记下出现的每个 AA 和其 3'端相邻的 19 个核苷酸, 作为潜在的 siRNA 靶位点。Tuschl 等建议在设计 siRNA 时, 不要针对 5'和 3'端的非翻译区(UTRs)和邻近起始密码子的区域(75 个碱基范围内), 原因是这些地方有很多调控蛋白结合位点。UTR-结合蛋白和/或翻译起始复合物可能会影响 siRNA 核酸内切酶复合物的结合。

2. 将潜在的靶位点和人基因组数据库进行比较, 排除任何与其他编码序列明显同源的靶序列。可以利用 BLAST 进行同源性检索, 其可在 NCBI 服务器的以下网址找到: www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/。

3. 选出适于合成的靶序列。在 Ambion, 优选沿基因长度, 选出多个靶序列进行评价。

本发明的反义寡核苷酸或 siRNA 抑制由 RCCX 基因 1-32 编码的多肽的表达, 从而其可用于抑制该多肽的生物活性。而且, 含有本发明的反义寡核苷酸或 siRNA 的表达抑制剂由于能抑制 RCCX 基因 1-32 编码的多肽的生物活性, 因此它们是有用的。因此, 含有本发明的反义寡核苷酸或 siRNA 的组合物可用于治疗 RCC。

另外, 过表达的基因的基因产物的功能可以通过施用结合或抑制该基因产物功能的化合物或组合物来进行抑制。例如, 化合物或组合物可以包括结合过表达的基因产物的抗体。

本发明涉及抗体, 尤其是抗上调的标记基因编码的蛋白的抗体, 或其抗体片段的用途。如本文所用, “抗体”是指具有特异性结构的免疫球蛋白分子, 其仅与用于合成该抗体的抗原(即上调的标记基因产物)或与其非常相关的抗原相互作用(即结合)。此外, 抗体可以是抗体片段或修饰的抗体, 只要它能与 RCCX 基因 1-32 编码的蛋白结合。比如, 抗体片段可以是 Fab, F(ab')₂, Fv 或单链 Fv(scFv), 其中来自 H 链和 L 链的 Fv 片段由合适的接头连接(Huston J. S.等 Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85:5879-5883 (1988))。更具体地, 抗体片段可以用酶, 如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶处理抗体产生的。另外, 编码抗体片段的基因可以是构建的, 将该基因插入表达载体, 并在合适的宿主细胞中表达(参见如 Co M. S.等 J. Immunol. 152:2968-2976 (1994); Better M.和 Horwitz A. H. Methods Enzymol. 178:476-496 (1989); Pluckthun A.和 Skerra A. Methods Enzymol. 178:497-515 (1989); Lamoyi E.

Methods Enzymol. 121:652-663 (1986); Rousseaux J.等 Methods Enzymol. 121:663-669 (1986); Bird R. E.和 Walker B. W. Trends Biotechnol. 9:132-137 (1991))。

抗体可以通过与各种分子，如聚乙二醇(PEG)偶联而进行修饰。本发明提供了所述修饰的抗体。所述修饰抗体可以是通过对抗体进行化学修饰而获得的。这些修饰方法是本领域常用的。

另外，抗体可以包括嵌合抗体，或人源化抗体，其中嵌合抗体具有衍生自非人类抗体的可变区和衍生自人抗体的恒定区，其中人源化抗体具有衍生自非人类抗体的互补决定区(CDR)、衍生自人抗体的框架区(FR)和恒定区。所述抗体可以利用已知技术加以制备。

针对癌细胞中发生的特异性分子变化的癌疗法已经通过下述抗癌药的临床研发和获批规定认可为有效：治疗晚期乳癌的 trastuzumab (Herceptin)，治疗慢性髓样白血病的 imatinib methylate (Gleevec)，治疗非小细胞肺癌 (NSCLC)的 gefitinib (Iressa)，和治疗 B-细胞淋巴瘤和皮质细胞(mantle cell)淋巴瘤的 rituximab (抗-CD20 mAb)得以证明(Ciardello F, Tortora G. A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor. Clin Cancer Res. 2001 Oct;7(10):2958-70. Review.; Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. N Engl J Med. 2001 Mar 15;344(11):783-92.; Rehwald U, Schulz H, Reiser M, Sieber M, Staak JO, Morschhauser F, Driessen C, Rudiger T, Muller-Hermelink K, Diehl V, Engert A. Treatment of relapsed CD20+ Hodgkin lymphoma with the monoclonal antibody rituximab is effective and well tolerated: results of a phase 2 trial of the German Hodgkin Lymphoma Study Group. Blood. 2003 Jan 15;101(2):420-424.; Fang G, Kim CN, Perkins CL, Ramadevi N, Winton E, Wittmann S and Bhalla KN. (2000). Blood, 96, 2246-2253.)。这些药物临床上是有用的，并且比传统抗癌剂具有更好的耐受性，因为它们仅仅靶向转化的细胞。因此，这类药物不仅能改善癌患者的存活率和生活质量，而且能验证分子靶向的癌疗法概念的正确性。另外，靶向药物当与常规化疗联用时，可以提高常规化疗的效力(Gianni L. (2002)。

Oncology, 63 Suppl 1, 47-56.; Klejman A, Rushen L, Morrione A, Slupianek A 和 Skorski T. (2002). Oncogene, 21, 5868-5876.)。因此, 未来的癌治疗将很可能涉及将常规药物与针对肿瘤细胞不同特性如血管生成和侵袭性的特异性靶向试剂联用。

这些调节方法可以回体或在体外(如通过用试剂培养细胞), 或另外, 在体内(如通过将试剂施给受试对象)进行。该方法涉及施用蛋白或蛋白组合或核酸分子或核酸分子组合作为治疗, 来抑制差异表达的基因的异常表达或活性。

那些以所述基因的表达水平或生物活性增加为特征的疾病和病症(相对未患该疾病或病症的受试对象)可以用拮抗(即降低或抑制)过表达的一种或多种基因的活性的治疗剂来进行治疗。拮抗活性的治疗剂可以治疗性地或预防性地给药。

可以使用的治疗剂包括, 例如(i)过表达的序列的多肽, 或其类似物, 衍生物, 片段或同源物(ii)过表达的序列的抗体(iii)编码过表达的序列的核酸; (iv)反义核酸或“非功能”的核酸(即由于在过表达的序列的编码序列内的异源插入); (v)小分子干扰 RNA (siRNA); 或(vi)调节剂(即改变过表达的多肽和其结合伴侣间的相互作用的抑制剂, 激动剂和拮抗剂)。非功能的反义分子通过同源重组“敲除”多肽的内源功能(参见如 Capecchi, *Science* 244: 1288-1292 1989)。

增长水平可以很容易地通过定量肽和/或 RNA 来测定: 获取患者组织样品(如从活体解剖组织), 体外测定其 RNA 或肽水平、表达的肽(或表达发生改变的那些基因的 mRNAs)的结构和/或活性。本领域所熟知的方法包括但不限于, 免疫分析(例如, Western 印迹分析, 免疫沉淀和随后的十二烷基硫酸钠(SDS)聚丙烯酰胺凝胶电泳, 免疫细胞化学等)和/或测定 mRNAs 表达的杂交试验(例如, Northern 试验, 点印迹, 原位杂交等)。

预防给药在出现明显的疾病临床症状之前进行, 从而预防疾病或病症, 或另外, 延缓其进一步发展。

本发明的治疗方法包括将细胞与调节一种或多种差异表达的基因产物的活性的试剂接触。调节蛋白活性的试剂包括核酸或蛋白, 所述蛋白的天然存在的同源配体, 肽, 肽基模拟物, 或其它小分子。

本发明还涉及治疗或预防受试对象的 RCC 的方法，包括对所述受试对象施用疫苗的步骤，该疫苗含有由 RCCX 基因 1-32 编码的多肽或所述多肽的免疫活性片段，或编码该多肽的多核苷酸或其片段。多肽的施用诱导受试对象内的抗肿瘤免疫。为了诱导抗肿瘤免疫，施用由 RCCX 基因 1-32 编码的多肽或所述多肽的免疫活性片段，或编码该多肽的多核苷酸。多肽或其免疫活性片段可作为针对 RCC 的疫苗。在一些情况下，可以将所述蛋白或其片段以与 T 细胞受体(TCR)结合的形式或由抗原呈递细胞(APC)，如巨噬细胞、树突细胞(DC)或 B-细胞呈递的形式给药。由于树突细胞的强的抗原呈递能力，在 APCs 中最优选使用 DC。

在本发明上下文中，针对 RCC 的疫苗是指在接种动物后，具有诱导抗肿瘤免疫的能力的物质。根据本发明，认为由 RCCX 基因 1-32 编码的多肽或其片段是 HLA-A24 或 HLA-A*0201 限制性表位肽，它们能针对表达 RCCX 基因 1-32 的 RCC 细胞诱导强有力的特异性免疫应答。因此，本发明还包括利用多肽诱导抗肿瘤免疫的方法。通常，抗肿瘤免疫包括如下免疫应答：

- 诱导针对肿瘤的细胞毒性淋巴细胞，
- 诱导识别肿瘤的抗体，和
- 诱导抗肿瘤细胞因子产生。

因此，当一种蛋白通过给动物接种能诱导任一种所述免疫应答时，就认为该蛋白具有抗肿瘤免疫诱导效力。蛋白诱导的抗肿瘤免疫可通过在体内或体外对该宿主免疫系统抗该蛋白的应答进行观察来测定。

例如，用于测定对细胞毒性 T 淋巴细胞诱导的方法是熟知的。进入活体的外源物质通过抗原呈递细胞(APCs)的作用呈递给 T 细胞和 B 细胞。由于抗原的刺激，以抗原特异性方式，对 APC 呈递的抗原起反应的 T 细胞分化为细胞毒性 T 细胞(或细胞毒性 T 淋巴细胞；CTLs) 随后增殖(也就是 T 细胞激活)。因此，一种肽对 CTL 的诱导可以通过用 APC 将该肽呈递给 T 细胞，并测定 CTL 的诱导来进行评价。另外，APCs 具有激活 CD4+ T 细胞、CD8+ T 细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和 NK 细胞的效力。由于 CD4+ T 细胞和 CD8+ T 细胞在抗肿瘤免疫中也是很重要的，则可利用这些细胞的激活效应作为指示，对该肽的抗肿瘤免疫诱导作用进行评价。

利用树突细胞(DCs)作为选定的 APC 评价 CTLs 诱导作用的方法是本领域所熟知的。树突细胞是在抗原呈递细胞中具有最强 CTL-诱导作用的典型抗原呈递细胞。在该方法中,先将待测多肽与 DC 接触,然后将此 DC 与 T 细胞接触。在 T 细胞与 DC 接触后,检测对目标细胞具有细胞毒性效应的 T 细胞,从而显示该待测多肽具有诱导细胞毒性 T 细胞的活性。例如,利用 ^{51}Cr -标记的肿瘤细胞的裂解作为指示,对 CTLs 的抗肿瘤活性进行测定。另外,利用 ^3H -胸腺嘧啶核苷吸收活性或 LDH(乳酸脱氢酶)-释放作为指示剂,评价肿瘤细胞损坏程度的方法也是熟知的。

除 DC 之外,可以用外周血单核细胞(PBMCs)作为 APC。据报道,在存在 GM-CSF 和 IL-4 的条件下培养 PBMC 能提高对 CTL 的诱导。相似地,在存在匙孔血蓝蛋白(KLH)和 IL-7 的条件下培养 PBMCs 能够诱导 CTL。

利用这些方法证实具有 CTL-诱导活性的待测多肽是具有树突细胞激活效应和随后的 CTL-诱导活性的多肽。因此,能诱导抗肿瘤细胞的 CTLs 的多肽可作为抗肿瘤疫苗。另外,经与多肽接触而能诱导抗肿瘤的 CTLs 的 APCs 也可作为抗肿瘤疫苗。另外,由于 APCs 对多肽抗原的呈递而获得细胞毒性的 CTLs 也可作为抗肿瘤疫苗。这种利用由 APCs 和 CTLs 引起的抗肿瘤免疫活性进行的肿瘤治疗方法称为细胞免疫疗法。

通常已知,当用多肽进行细胞免疫疗法时,通过将具有不同结构的多种多肽联合,并与 DCs 接触,可使 CTL-诱导效力增加。因此,当用蛋白片段对树突细胞进行刺激时,优选使用多种类型的片段的混合物。

另外,多肽对抗肿瘤免疫活性的诱导可以通过观察抗肿瘤的抗体生成作用的诱导来确定。例如,当针对多肽的抗体已在用该多肽免疫的实验动物中诱导产生,并且当这些抗体抑制肿瘤细胞生长时,可以认为该多肽具有诱导抗肿瘤免疫的能力。

抗肿瘤免疫通过施用本发明的疫苗可以诱导,而且抗肿瘤免疫活性的诱导使得能治疗和预防 RCC。抗癌疗法或预防癌症发生包括如下任一步骤:如抑制癌细胞生长、癌症衰退和抑制癌症发生。患癌个体死亡率降低、血液中肿瘤标记物减少、与癌症相伴的可测的症状减轻等都包括在癌症治疗或预防的范围内。这类治疗和预防效力优选是在统计学上有意义的。例如,其中抗细胞增生性疾病的疫苗的治疗或预防效力与未施用疫苗的对照进行

比较,观察到的显著性水平为5%或更低。例如,可利用 Student's t-检测法, Mann-Whitney U 检测法,或 ANOVA 法进行统计学分析。

可以将上述具有免疫活性的蛋白或编码该蛋白的载体与佐剂联用。佐剂是指在与具有免疫活性的蛋白联合(或相继)给药时,能提高针对该蛋白的免疫应答的化合物。佐剂的例子包括,但不限于,霍乱毒素、沙门氏菌毒素、矾等。另外,可以将本发明的疫苗与药学上可接受的载体适当联合。所述载体的例子有无菌水、生理盐水、磷酸盐缓冲液、培养液等。另外,如果需要,疫苗可以包括稳定剂、悬浮剂、保存剂、表面活性剂等。疫苗可全身给药或局部给药。疫苗给药可以采用一次注射,或采用多次注射加强给药。

当利用 APC 或 CTL 作为本发明的疫苗时,可以通过回体方法治疗或预防肿瘤。更具体地,收集接受治疗或预防的受试对象的 PBMCs,在体外将细胞与所述多肽接触,接着对 APCs 或 CTLs 进行诱导,然后将该细胞施给受试对象。还可以在体外通过将编码该多肽的载体导入 PBMCs 中,而诱导 APCs。可以在给药前,对体外诱导的 APCs 或 CTLs 进行克隆。通过对具有较高的破坏靶细胞的活性的细胞进行克隆和培养,能够更有效地进行细胞免疫治疗。另外,以此方式分离的 APCs 和 CTLs,不仅可针对产生该细胞的个体进行细胞免疫治疗,而且针对来自其他个体的相似类型肿瘤进行细胞免疫治疗。

另外,本发明提供了含有药学有效量的本发明多肽的治疗或预防细胞增生性疾病如癌症的药物组合物。该药物组合物可用于产生抗肿瘤免疫。

抑制 RCC 的药物组合物

药物制剂包括那些适合口服、直肠、鼻、局部(包括口腔和舌下)、阴道、或胃肠外(包括肌肉内、皮下和静脉内)给药,或通过吸入或吹入给药的制剂。优选静脉内给药。任选地,制剂以分立的剂量单位包裹。

适合口服给药的药物制剂包括胶囊、扁囊剂(cachet)或片剂,它们各自包括预定量的活性成分。制剂还包括粉剂、颗粒或溶液、悬浮剂或乳剂。任选地,活性成分以大丸剂、药糖剂或糊剂给药。口服施用的片剂和胶囊可以包括常规赋形剂,如结合剂、填充剂、润滑剂、崩解剂或湿润剂。片剂可以通过任选地与一种或多种制剂成分压缩或模压制成。通过在合适的机器中对自由流动形式如粉状或颗粒状的活性成分进行压缩,并任选地与

结合剂、润滑剂、惰性稀释剂、润滑剂、表面活性剂或分散剂混合，可以制成压缩的片剂。模压片剂可以通过在合适的机器中用惰性液态稀释剂润湿的粉状化合物的混和物进行模压而制成。片剂可以根据本领域所熟知的方法来进行包衣。口服的液体制剂可以是如水性或油性悬浮液、溶液、乳液、糖浆或酏剂(elixirs)形式的，或者以干燥制品形式存在，该干燥制品在使用前用水或其它适合的赋形剂重建。这类液体制剂可以包括常规添加剂，如悬浮剂，乳化剂，非水性溶剂(可包括食用油)，或保存剂。可任选地配制片剂，从而可以缓慢或控制地释放其中的活性成分。片剂包装可以包括每月服用一片的片剂。

胃肠外给药制剂包括水性或非水性无菌注射液，其可包括抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和可赋予制剂与受体血液等渗的溶质；和水性或非水性无菌悬浮液，其可包括悬浮剂和增稠剂。制剂可以存在于单位剂量或多剂量容器内，例如，密封安培瓶或管状瓶，而且可以保存在冷冻干燥(冻干)条件下，只需在使用前加入无菌液态载体，如盐水、注射用水即可。另外，制剂可以连续注入。即时注射液和悬浮液可以从前面所述的无菌粉剂、粒剂和片剂种类制备。

直肠给药制剂包括栓剂，其具有常规载体，如可可油或聚乙二醇。口中给药，如口腔或舌下局部给药的制剂包括糖锭(lozenge)和锭剂(pastille)，糖锭在有香味的基质如蔗糖和阿拉伯树胶或黄芪胶中包含活性成分，锭剂在明胶和甘油或蔗糖和阿拉伯树胶等基质中含活性成分。用于鼻内给药的本发明化合物可以以液态喷剂或分散的粉末或滴剂形式使用。滴剂可以与水性或非水性基质一起配制，所述水性或非水性基质同样包括一种或多种分散剂，增溶剂或悬浮剂。

吸入给药的化合物可以从注入器，喷雾器，加压包或其它传递气溶胶喷雾的便利工具来方便地传递。加压包可以包括适合的发射剂如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其它适合的气体。在加压气溶胶的情况下，剂量单位可通过提供递送米制量的阀来确定。

另外，吸入或吹入给药的化合物可以采用干粉组合物形式，例如化合物与适合的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末组合物。粉末组合物可以以单位剂量形式存在于如胶囊、药筒、明胶或透明塑料袋中，在吸入器或吹入器的帮助下可从其施用粉末。

其它制剂包括释放治疗剂的可植入装置和贴敷块。

当需要时，可以施用适合持续释放活性成分的上述制剂。药物组合物还可以包括其它活性成分，如抗菌剂，免疫抑制剂或保存剂。

应该理解，除了上述特别提到的成分之外，本发明的制剂可以包括本领域常规用于这些制剂类型的其它试剂。例如，适合口服给药的制剂可以包括芳香剂。

优选的单位剂量制剂包括下面所述的有效剂量的活性成分，或有效剂量的一部分的活性成分。

对于前述的各条件，组合物，例如多肽和有机化合物，可以口服给药或通过注射给药，每天为约 0.1-约 250 mg/kg 的剂量。成人的剂量范围通常为约 5mg-约 17.5g/天，优选约 5mg-约 10g/天，最优选约 100mg-约 3g/天。以分开的单位提供的片剂或其它单位剂量形式可以便利地包括在该剂量有效的量或多份同样量，比如，含约 5mg-约 500mg，通常约 100 mg-约 500 mg 的单位。

所用剂量由多种因素决定，包括受试对象的年龄和性别，正治疗的确切病症和其严重性。而且，给药途径可以依赖于条件和其严重性而异。

下面的实施例将对本发明进行进一步的描述，其并不限制权利要求中所述的本发明的范围。

实施例 1: 一般方法

临床样品

用于 cDNA 微阵列和免疫组织化学分析的 RCC 肿瘤和周围的正常肾脏组织获自进行过外科切除的 10 名患者，所用样品 10 名患者表示同意。各例的临床病理学数据总结在表 1 中。所有均诊断在 I 或 II 期阶段。在外科切除后，迅速将一对样品速冻在液氮内，-80℃保存。各样本内至少有 90% 的活细胞鉴定为肿瘤细胞；因此，认为非癌细胞污染极小。从这些组织，选出含足够量和品质的 RNA 的细胞群用于微阵列分析。用于 ELISA 分析的来自 RCC 和慢性肾小球肾炎患者(CGN)的血浆样品也是经过同意获得的。此外，来自正常健康志愿者的 20 份血浆样品也是经过同意获得的。

表1. 10名RCC病例的病理学背景

病例号	组织学	pTNM	阶段	等级	年龄
KR-450	透明细胞	pT2N0M0	II	G1>G2	63
KR-445	透明细胞	pT1bN0M0	I	G1>>G2	82
KR-444	透明细胞	pT1aN0M0	I	G1>>G2	57
KR-273	透明细胞	pT1bN0M0	I	G1>G2	71
KR-372	透明细胞	pT1bN0M0	I	G2>G1	61
KR-443	透明细胞	pT1aN0M0	I	G2	76
KR-394	透明细胞	pT1bN0M0	I	G1>G2	60
KR-479	透明细胞	pT2N0M0	II	G2>G1	52
KR-471	透明细胞	pT1aN0M0	I	G1	74
KR-462	透明细胞	pT1aN0M0	I	G1	53

细胞系和组织样本

将衍生自四种 RCC(A498, 786-O, caki-1, caki-2), 1 种子宫颈腺癌(HeLa), 9 种结肠癌(SW480, SW948, LoVo, DLD1, HT29, HCT15, HCT116, SNU-C4 和 SNU-C5), 1 种乳癌(MCF7), 4 种肝细胞癌(Huh7, SNU475, HepG2, 和 Alexander), 1 种人胚肾细胞系(HEK293)和 COS7 细胞的细胞系在加入 10% 胎牛血清(FBS)和 1% 抗生素/抗真菌溶液的合适培养基中单层生长, 维持在 37°C、含 5% CO₂ 的气体环境中。

cDNA 微阵列

按照制造商的说明书, 利用 TRIzol (Invitrogen) 提取总 RNA。在用 DNase I (Nippon Gene, Osaka, 日本) 处理后, 利用 T7 转录试剂盒(Epicentre Technologies, Madison, WI) 扩增来自各肿瘤和相应正常组织的 10 µg 总 RNA, 在 Cy5-dCTP 和 Cy3-dCTP 分别存在时(每个 5-µg) 对扩增的 RNAs 进行逆转录。采用 Automatic Slide Processor(Amersham Biosciences, Buckinghamshire, U.K.) 手段, 将标记探针混和, 并杂交到含 23,040 个 cDNAs 的微阵列载玻片上。调节各点的 Cy5 和 Cy3 荧光强度, 从而使 52 个管家基因的平均 Cy5/Cy3 比等于 1。由于衍生自低信号强度的数据不太可靠, 因此给各载玻片确定截断值, 当 Cy3 和 Cy5 提供的信号强度都低于该截断值时, 就拒绝基因进行进一步的分析。

鉴定 RCC 中的上调基因

各基因的相对表达(Cy5/Cy3 强度比)定义如下: (i)上调(表达比>2.0), (ii) 下调(表达比<0.5), (iii)未改变(表达比在 0.5-2.0 之间), 或(iv)未表达(或少量表达但在检测的截断值之下)。用这些范畴按 Schena 等的方法检测一组在各样品之间具有共通的表达比变化的基因, 以及一组具有特异性表达比变化的基因。为了检测 RCC 中的通常上调的基因, 首选对微阵列上的 23,040 个基因的全部表达模式进行筛选, 选出如(i), (ii), 或(iii)所分类的存在于>50% 的 RCC 例中的表达比>2.0 的基因。最终, 获得对 RCC 高度特异的诊断标记物, 并鉴定潜在的分子靶标, 参考正常人组织的表达数据, 选出在正常肾脏中不表达的基因。

半定量 RT-PCR 分析

利用寡(dT)₂₁引物和 SuperScript II 逆转录酶(Invitrogen), 将提取的 RNAs 逆转录。用与构建 cDNA 微阵列所制备的引物相同的基因特异性引物, 或用作内部对照的微管蛋白 alphaIII (*TUBA3*)-特异性引物进行半定量 RT-PCR 实验。引物序列列于表 2 中。对 PCR 反应的循环数进行优化, 保证产物强度在扩增的对数期内。

表 2 RT-PCR 引物对确认

编号	登录号	符号	正向引物序列	SEQ ID No	反向引物序列	SEQ ID No
1	AI088196		TGGAGCCTAAAATGGGG AAT	3	AGGTGCGTTGAACCCAT ATT	4
2	AA010816		TGCCCTTTCACACACT TT	5	GGAGTTGGGGGAGAAGG AGT	6
3	U62317	384D8-2	TGTCCAGGAGACAGAGC TGA	7	GAGCAGTCTCAGGGACA TGG	8
4	AA844401		TGCTTTCTGCATTTGGTG TT	9	GAATTTTGGGGTGTTC AA	10
5	AA156269		CAGCTGGAGACTGGCTC TCT	11	CAGTTTCAACAGGTAAG GCGATA	12
6	AI245600		CCAGCATTTATGGCAAAT GG	13	TGACCCTCCAAATGTACC AAA	14
7	AA844729		CTTCTGCGTGACAAGTGA GG	15	CTCCAAGCATAAAAACA GCA	16
8	AA436623		GCGACAAGTCAGACCTA GCC	17	TCTAACTGCCTCCCAGGA CA	18

9	AA903456		GAGGACCTTGACTGGGT	19	CAGGTCAAGAGACCCTT	20
			TCA		TCTTC	
10	W45464	FLJ23399	GGGACATGGGGAGCTTA	21	CAAAAAGGTGCACCAAA	22
			GAT		ACA	
11	AA251072		GAGCACATCCTACGCAC	23	GCTAAATTTGGGGCAATT	24
			AAG		TGT	
12	AA551154		TGGCAAAATTCTGATGC	25	TTGGGCTTTTTGGAAAAT	26
			AAA		TG	
13	AI218114		AGTTTGGCAGGCATGAA	27	CGGGATCTGCACACATCT	28
			GAG		TT	
14	W63748		CCCAAAATGGGTGTATCT	29	GGTTCTGAGCAACCTCTA	30
			GG		TAACTG	
15	AA845903		AAGCCCAACTTTGATATA	31	CTTTATTGGTGTGTTTGA	32
			GCCTG		GCTGG	
16	AA081184	TCF4	TAGTCTGCTGGCTGACTG	33	ACAAGAATGAAAAAGGC	34
			GA		CACA	
17	AA171694	CP	TCAATCCCAGAAGGAAG	35	AAGCTATGGCCGTGAAA	36
			CTG		ATG	
18	AA993406	EVA1	CATATCTGTCTCATTCTG	37	AACAGGCCCATATTACC	38
			CCTTTT		CCT	
19	U67784	RDC1	AGCGTGACTTTCAGTTTT	39	AATGCAACTGTTCGTTGT	40
			GACT		GTG	
20	AI273576	NEK6	TCCAATTGTCTGAGCTGT	41	AACTCCCAGTCACCCTGT	42
			CG		TTT	
21	L09235	ATP6A1	TTTCAGATCGGTCACTGA	43	GTGAAATCTCAAGGATA	44
			TAGTATG		AGGAGG	
22	AA233853	E1B-AP5	TCGTCAACCAGCAGAGC	45	CCGCGTAGTTCATCTGCC	46
			TT			
23	AI301935	CFFM4	TGTCTCCTGACCAGTGTC	47	TCACACTTGACCATGAGT	48
			AGTT		GTTG	
24	AF055460	STC2	ACCCTCAGCCAAGATTG	49	TGCCTTTATTTGTCCCCT	50
			GTA		TG	
25	AA872040	INHBB	TGAACGCACATGACATA	51	TTTTCAAATGGCAGTTTC	52
			GCA		TGA	
26	T91708	MD	CCTCCAAGCTCCTCTGAC	53	TGAAAAGCAGGTGAGTC	54
			TG		TGGT	
27	AA608952	SAGE	ACCATCAAGGAAGCAGC	55	AACAGCTCCCTTTTTTCGT	56
			AAG		AGC	
28	W74530	PYCS	GTAGGGTCTGCCTGTTGG	57	ACTAAATGCCAAGGGGG	58
			AA		ACT	

29	AA568223	TOP2A	CTCTTGACCTGTCCCCTC	59	CGTTGATAACATTACTCA	60
			TG		AGTCACA	
30	AA054583	HIG2	AGATAGGTTGATCTCGCC	61	ACACCTCTTCAACTGCTA	62
			CTTAC		TCCAA	
31	X89426	ESM1	GATGGATTGCAGAGAGA	63	TCATACACACACAAACC	64
			CCTG		ACCAGT	
32	AA165698		CGATACAGATATGTTCG	65	CCTCCATTCTTCATCTCT	66
			GTGATG		CAATG	
	AF141347	TUBA3	CTTGGGTCTGTAACAAA	67	AAGGATTATGAGGAGGT	68
			GCATTC		TGGTGT	

多组织 Northern 印迹分析

将人 *HIG2* (*hHIG2*) cDNA 探针用 [α - 32 P] dCTP 标记, 并按照提供商的手册与 Human MTN Blots (Clontech) 杂交。按照提供商的推荐方案进行预杂交, 杂交和洗涤。于 -80°C , 用增感屏(intensifying screens)对印迹进行 14 天自显影。

hHIG2 稳定转化体的克隆和构建

利用 KOD-plus DNA 聚合酶(TOYOBO), RT-PCR 扩增 *HIG2* 的完整编码序列, 将该序列插入 pcDNA3.1(+)-Myc/His 载体(Invitrogen)(含 neo-抗性基因的 *Bam*HI 和 *Xho*I 限制性酶切位点内(pcDNA3.1(+)-*hHIG2*-Myc/His)。构建体通过测序确认。引物序列是正向 5'- TTTCTCTGCAGAGGAGTAGGG-3' (SEQ ID NO; 69); 和反向 5'-CATGCTTCTGGATGGATGG-3' (SEQ ID NO; 70)。为了获得 *hHIG2* 稳定转化体, 按照说明书手册, 利用 FuGene 6 (Roche diagnostics), 将 pcDNA-*hHIG2* 转染入 COS7 细胞, 将转染细胞培养在含 10% FCS 和遗传霉素(GENETICIN) (0.5mg/ml)的 DMEM 中。约三周后, 选出 20 个克隆, 利用有限稀释试验(Limiting Dilution Assay, LDA)筛选稳定转染体。利用 RT-PCR 和免疫组织化学染色法检查每个克隆的 *HIG2* 表达。

重组 hHIG2 (rhHIG2)的制备

将编码疏水域的 *HIG2* 片段(27-63 个氨基酸残基)亚克隆至 pET28a *E.coli* 载体 (Novagen)内。将 pET28a-*hHIG2* 转化入 BL21 codon plus (Invitrogen)感受态细胞内, 于 37°C 用 0.5mM IPTG 诱导 3 小时。按照提供商的说明书手册, 采用 TALON Metal Affinity Resins (金属亲和树脂, Clontech) 从澄清的细胞裂解物中提纯 rh*HIG2*。利用 ÄKTAexplorer 10S (Amersham

Biosciences), 在 MonoQ 阴离子交换柱上进行 *HIG2* 的最后纯化, 获得大肠杆菌蛋白的无污染单峰。

多克隆抗体

通过用佐剂乳化抗原溶液来制备注射用的 rh*HIG2* 蛋白。在兔中产生抗纯化的 rh*HIG2* 蛋白的多克隆抗-*HIG2* 抗体(抗-*HIG2* pAb) (Medical & Biological Laboratories, Nagoya, Japan)。如下进行抗血清的亲纯化。rh*HIG2* 蛋白用 20mM HEPES 缓冲液(pH 8.5)透析, 然后与已平衡的 Affi-Gel 15 凝胶 (Bio-Rad) 孵育 2 小时。为了封闭凝胶树脂的活性酯, 加入 1M 乙醇胺-HCl (pH 8.0), 旋转 1 小时。将结合亲和树脂的配体转至柱内, 用 TBS-T 平衡。将过滤的抗血清加到上述柱上, 4℃孵育, 旋转 2 小时。在用 TBS-T 和 50mM Tris-HCl (pH 7.5), 1M NaCl, 1% Triton X-100 洗涤后, 用加入 10% 乙二醇的 0.1M 甘氨酸-HCl (pH 2.5) 洗脱纯化的抗体, 然后用 PBS 透析。

免疫组织化学分析

用混有 FuGene6 转染剂 (Roche, Basel, Switzerland) 的 1μg pcDNA3.1(+)-*HIG2*-Myc/His 质粒转染 COS7 细胞。COS7-衍生的稳定转染体用 PBS(-) 洗涤两次, 室温下用 4% 多聚甲醛溶液固定 10 分钟, 用含 0.1% Triton X-100 的 PBS(-) 通透 2.5 分钟。用含 3% BSA 的 PBS(-) 覆盖细胞 60 分钟, 以便在与一抗反应前将非特异性抗体结合位点封闭。Myc-标记的 *HIG2* 蛋白用抗-*HIG2* pAb 作为一抗, 和 FITC-连接的抗兔 IgG 的山羊 IgG 级分 (ICN Biomedicals, Inc. Aurora, OH) 作为二抗进行检测。用二甲苯和乙醇处理正常人组织的石蜡-包埋样本(心脏, 肝脏, 肺, 成人肾脏, 胎儿肾脏, 前列腺, 胰腺, 脊髓; BIOCHAIN), 除去石蜡。在内源过氧化酶和蛋白封闭剂反应后, 用 ENVISION+ Kit/HRP (DAKO) 检测 *HIG2*, 加入亲和纯化的兔抗-h*HIG2* 多克隆抗体作为一抗, 该混合物用 HRP-标记的抗兔 IgG 作为二抗进行处理。最后, 加入底物-色原, 用苏木精复染组织样本。还进行了抑制免疫染色的实验, 如前所述 (Mintz PJ., Kim J., Do KA., Wang X., Zinner RG., Cristofanilli M., Arap MA., Hong WK., Troncoso P., Logothetis CJ., Pasqualini R., Arap W. Fingerprinting the circulating repertoire of antibodies from cancer patients. *Nat Biotechnol.* 21, 57-63 (2003))。

Western 印迹

将转染的 COS7 细胞维持在无血清培养基中, 转染后 24 小时和 48 小时收集。用 15% SDS-聚丙烯酰胺凝胶将裂解物和浓缩的培养介质分开, 并转移到硝酸纤维素膜上, 用抗-*HIG2* pAb 孵育。在用小鼠抗-人 c-Myc 单克隆抗体 9E10 (Roche) 和羊抗-小鼠 IgG-HRP 抗体(Amersham Biosciences)孵育后, 用 ECL 试剂盒(Amersham Bioscience)观察信号。在 5% O₂ 条件下, 将 RCC 细胞系, A498, 786-O, caki-1 和 caki-2 培养 24 小时。用亲和-纯化的 *HIG2*-pAb 作为一抗并用羊抗-兔 IgG-HRP 作为二抗(Amersham Biosciences)检测内源 *HIG2* 蛋白。1:2000 稀释的 β -肌动蛋白作为蛋白的上样对照(克隆 AC-15, Sigma)。

细胞生长试验

将 COS7 细胞的 *HIG2* 稳定转染体接种至 6-孔微滴定平板上(1×10^4 细胞/孔), 在加入了 0.5mg/ml 遗传霉素的含 10% FCS 的培养基中维持 24 小时, 48 小时, 72 小时, 96 小时, 120 小时, 和 144 小时。在各时间点, 利用细胞克隆试剂盒(Cell Counting Kit, WAKO)评价细胞增殖。在加入重组 *hHIG2* 蛋白后, 将转染体(5×10^3 细胞/孔)在含 0.1% FCS 和 100nM 或 1mM BSA 的 DMEM 中培养 5 天, 对细胞数量进行再次检测。将 RCC 细胞系 caki-1 和 caki-2 接种至 12-孔微量培养板上(1×10^3 细胞/孔), 在添加了 1mM 亲和-纯化的抗-*HIG2* pAb 的含 0.5% FCS 的 McCoys'5A 培养基中培养 5 天。

自分泌试验

在无 FBS 的 DMEM 中, 将 *HIG2*-转染的 COS7 细胞维持 2 天, 以便确认细胞生长期间的 *HIG2* 自分泌。在培养了表达 *HIG2* 的 COS7 细胞和非表达细胞的调整培养基(conditioned medium)中培养 COS7 细胞。通过与 1mM 浓度的抗-*HIG2* pAb 接触来抑制自分泌效应。生长中的变化用血细胞计数器监测。

Giemsa 染色

将在 100 mm 器皿中培养的细胞用冰冷却的 PBS(-)洗涤两次, 并在 4°C 用 4%多聚甲醛固定 30 分钟, 再用 PBS(-)洗涤两次, 用 Giemsa 溶液染色。

FACS 分析. 分别用 0.5 和 1.0 μ M 抗-*HIG2* pAb 以及 0.5 和 1.0 μ M 免疫前兔 IgG 处理 Caki-1 细胞 5 天。为了进行 FACS 分析, 将粘附和离脱细胞混合, 并在 4°C 用 70%乙醇固定。在用 PBS 漂洗两次后, 于 37°C, 用含 1 μ g 煮沸的 RNase I 的 1ml PBS 孵育细胞 30 分钟。然后, 细胞在含 50 μ g 碘

化丙锭(PI)的 1ml PBS 中染色。在流式细胞计数器(FACScalibur; Becton Dickinson, San Diego, CA)中,从至少 2000 个细胞测定亚 G1 级分的百分数。

HIG2 的 ELISA. 为了检测和定量 RCC 患者血浆内的 HIG2 蛋白,利用在 50mM 碳酸钠中浓度为 10 μ g/ml 的亲纯化抗-HIG2 pAb 包被聚苯乙烯平板(Nalge Nunc),进行酶联免疫吸附试验(ELISA)。在 37 $^{\circ}$ C,用 2%牛血清白蛋白/PBS 封闭多余的结合位点 2 小时。在 37 $^{\circ}$ C,将来自 RCC 患者、慢性肾小球肾炎(CGN)患者和健康正常志愿者的血浆孵育 2 小时。血浆中的人 HIG2 蛋白,与生物素化的抗-HIG2 pAb 和过氧化物酶(HRP)-标记的抗生物素蛋白(DAKO)孵育,用邻苯二胺(DAKO)溶液进行检测。

实施例 2: 鉴定具有肾细胞癌细胞中的临床相关表达模式的基因

为了阐明肾细胞癌的癌发生机制,对此类肿瘤中通常上调的基因进行搜索。对 10 种肿瘤中 20,000 个以上基因进行 cDNA 微阵列分析,鉴定出 32 个基因在大于 50%的调查病例中是上调的(表 3)。利用半定量 RT-PCR 分析对此 32 个基因的上调进行再次确认(图 1)。

表 3. RCC 中的 32 个上调基因

RCCX 编号	登录号	符号	基因名称
1	AI088196		ESTs
2	AA010816	NM_031310	ESTs, 与S57447 HPBRII-7蛋白[人]略相似
3	U62317	NM_152299	384D8-2 推定蛋白384D8_6
4	AA844401	NM_138786	ESTs, 与T4S1_人跨膜4超家族成员1[人]略相似
5	AA156269	NM_207310	人 mRNA; cDNA DKFZp434E2321 (来自克隆 DKFZp434E2321); 部分cds
6	AI245600		ESTs
7	AA844729		ESTs
8	AA436623		ESTs
9	AA903456	NM_025085	人cDNA FLJ13325 fis, 克隆OVARC1001762, 与N-末端乙酰基转移酶1 (EC 2.3.1.88) 略相似
10	W45464	NM_022763	FLJ23399 推定蛋白FLJ23399
11	AA251072		ESTs

12	AA551154		ESTs
13	AI218114	AB097022	ESTs, 与细胞色素P-450[人] 略相似
14	W63748	NM_024689	人cDNA FLJ14103 fis, 克隆MAMMA1001073
15	AA845903	NM_024898	人cDNA: FLJ22757 fis, 克隆KAIA0803
16	AA081184	TCF4	转录因子4
17	AA171694	NM_000096 CP	血浆铜蓝蛋白(亚铁氧化酶(ferroxidase))
18	AA993406	NM_005797 EVA1	上皮V-样抗原1
19	U67784	NM_020311 RDC1	G 蛋白-偶联受体
20	AI273576	NM_014397 NEK6	NIMA (决不在有丝分裂基因a中)-相关的激酶6
21	L09235	NM_001690 ATP6A1	ATPase, 运输H+, 溶酶体型(空泡的质子泵), α 多肽, 70kD, 同工型1
22	AA233853	NM_002886 E1B-AP5	E1B-55kDa-关连蛋白5
23	AI301935	NM_206940 CFFM4	高亲和力免疫球蛋白 ϵ 受体 β 亚单位
24	AF055460	NM_003714 STC2	stanniocalcin 2
25	AA872040	NM_002193 INHBB	抑制素, β B (活化素AB β 多肽)
26	T91708	NM_004271 MD	MD, RP105关连型
27	AA608952	NM_018666 SAGE	推定的肿瘤抗原
28	W74530	NM_002860 PYCS	吡咯啉-5-羧酸酯合成酶(谷氨酸 γ -半醛合成酶)
29	AA568223	NM_001067 TOP2A	拓扑异构酶(DNA) II α (170kD)
30	AA054583	NM_013332 HIG2	低氧诱导蛋白2
31	X89426	NM_007036 ESM1	ESM-1蛋白的人mRNA
32	AA165698	NM_024572	人cDNA FLJ12691 fis, 克隆NT2RM4002571, 与UDP-GalNAc:多肽N-乙酰基半乳糖氨基转移酶的人mRNA略相似

实施例 3: HIG2 的特性

在检测的 10 例 RCCs 中有 9 例的 HIG2 上调(图 1, 2a)。相反, 除胎儿肾脏之外, 在检测的其它 29 种器官中几乎检测不到 HIG2 表达(Saito-Hisaminato A., Katagiri T., Kakiuchi S., Nakamura T., Tsunoda T., Nakamura Y. Genome-wide profiling of gene expression in 29 normal human tissues with a cDNA microarray. *DNA Res.* 9, 35-45 (2002))。多组织 northern(MTN)印迹分析也证明在气管、脊髓和甲状腺中 HIG2 表达统一处于低水平(图 2b)。

为了进一步检测 HIG2 在除肾细胞癌之外的肿瘤中的表达水平, 利用衍生自各种组织的癌细胞系进行 RT-PCR 分析。HIG2 在 RCC 细胞系中表达

很强，但在衍生自其它器官的癌细胞系，包括结肠癌(CC)，乳癌(BC)，和肝细胞癌(HCC)细胞系中表达水平很低(图 2c)。

为了证实 *HIG2* 产物的内源表达，制备抗 *HIG2* 多克隆抗体。用下述各种肽免疫兔：与重组 *HIG2* 蛋白 C-末端的 14 个氨基酸残基相一致的亲水性 EPTKGLPDHPSRSM 肽以及除去 N-末端信号肽基元之外的全长蛋白。如材料和方法章节所述，用 rh*HIG2* 对这些兔产生的抗体进行纯化。首先证明，这些纯化的 *HIG2*-特异性多克隆抗体(抗-*HIG2* pAb)能够识别 RCC 细胞系(A498, 786-O, caki-1 和 caki-2)的内源 *HIG2* 蛋白且没有任何非特异性带(图 3a)。这些结果与图 2c 所示的 RT-PCR 分析结果相一致。为了进一步研究 *HIG2* 蛋白的细胞外分泌，用 myc-标记的 *HIG2* 和抗-*HIG2* pAb 进行免疫组织化学染色。如预期，myc-标记的 *HIG2* 的产物显示分泌小泡中的胞质内颗粒状分布(图 3b)(Denko N., Schindler C., Koong A., Laderoute K., Green C., Giaccia A. Epigenetic regulation of gene expression in cervical cancer cells by the tumor microenvironment. *Clin Cancer Res.* 6, 480-487 (2000))。另外，在将意欲表达 myc-标记的 *HIG2* 的质粒瞬时转染入 COS7 细胞后，利用抗-*HIG2* pAb 对 COS7 细胞的细胞裂解物和培养基进行了 western 印迹分析(参见材料和方法章节)。在培养基中检测到 *HIG2* 蛋白，分泌蛋白的量随时间增加(图 3c)。

RCCs，以及各种器官如心脏、肝脏、肺、肾脏、胎儿肾脏、脊髓、前列腺和胰腺的免疫组织化学分析显示，只有在 RCCs(图 3d; iii, iv)和胎儿肾脏(图 3d; v, vi)中有 *HIG2* 强染色。在其他组织中观察到的染色很弱或没有(图 3e)。免疫组织化学信号的抑制还可以用重组 *HIG2* 蛋白来证明(图 3f, 箭头)，说明抗-*HIG2* pAb 具有很高的特异性。虽然 *HIG2* 的过表达是用透明细胞型的 RCC 进行鉴定的，免疫组织化学分析还可以鉴定乳头状细胞癌但非颗粒型 RCCs 中的表达(图 3g)。不考虑其低氧条件，利用抗-*HIF1 α* mAb 或抗-*HIG2* pAb，在全部 RCC 组织切片内观察到大量 *HIG2* 表达(图 3h)。

实施例 4: *HIG2* 调节癌细胞生长

为了确定 *HIG2* 是否是 RCC 细胞生长因子，进行了 MTT 试验和集落形成试验。将为表达 *HIG2* 而设计的质粒表达载体转染入内源 *HIG2* 表达很低的 COS7 细胞(Mock; 图 4a)，稳定过表达 *HIG2* 的已有细胞群(稳定 A, B;

图 4a-4b)中。与转染对照载体质粒的 COS7 细胞相比, COS7-HIG2-stable 显示的细胞生长明显提高(图 4c)。此结果用 3 个独立试验进行了核实。

实施例 5: HIG2 siRNA 表达载体的制备

用 RNA 聚合酶 III 转录 H1 RNA 基因, 产生在其 3' 末端具有尿苷的短转录物。利用下述引物对, 5'-TGGTAGCCAAGTGCAGGTTATA-3' (SEQ ID NO; 71), 和 5'-CCAAAGGGTTTCTGCAGTTTCA -3' (SEQ ID NO; 72), 以人胎盘 DNA 作为模板, 对含有 H1 RNA 启动子域的基因片段进行 PCR 扩增。纯化产物, 并按照供应商的方案(invitrogen), 利用 TA 克隆试剂盒将产物克隆至 pCR2.1 质粒载体内。纯化含有 H1 RNA 基因的 BamHI, XhoI 片段, 并克隆至 pcDNA3.1(+)的 56 至 1257 位核苷酸之间, 利用引物: 5'-TGCGGATCCAGAGCAGATTGTACTGAGAGT-3' (SEQ ID NO; 73)和 5'-CTCTATCTCGAGTGAGGCGGAAAGAACCA-3' (SEQ ID NO; 74)经 PCR 扩增该片段。用连接的 DNA 作 PCR 扩增的模板, 引物为: 5'-TTTAAGCTTGAAGACCATTTTTGGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAC-3' (SEQ ID NO; 75), 和 5'-TTTAAGCTTGAAGACATGGGAAAGAGTGGTCTCA-3' (SEQ ID NO; 76)。用 *Hind*III 消化产物, 随后其自我连接获得 psiH1BX 载体质粒。通过将下表 4 所示的双链寡核苷酸克隆至 psiH1BX 载体的 *Bbs*I 位点, 制得针对 HIG2 的 siRNA 表达载体(psiH1BX-HIG2)。

表 4	序列	SEQ ID NO
si#1	5'-TCCCGCATGTGATAAGACCTCCTTTCAAGAGAAGGAGGT 有义 CTTATCACATGC-3'	83
si#1	5'-AAAAGCATGTGATAAGACCTCCTTCTCTTGAAAGGAGGT 反义 CTTATCACATGC-3'	84
si#2	5'-TCCCCACTGACCTAGACATGTCCTTCAAGAGAGGACATG 有义 TCTAGGTCAGTG-3'	85
si#2	5'-AAAACACTGACCTAGACATGTCCTTCTCTTGAAGGACATG 反义 TCTAGGTCAGTG-3'	86
si#3	5'-TCCCGAACCTGTCTAACTGGATGTTCAAGAGACATCCAG 有义 TTAGACAGGTTC-3'	87
si#3	5'-AAAAGAACCTGTCTAACTGGATGTCTCTTGAACATCCAG	88

反义	TTAGACAGGTTC-3'	
si#4	5'-TCCCCCTGTCTAACTGGATGCTCTTCAAGAGAGAGCATC	89
有义	CAGTTAGACAGG-3'	
si#4	5'-AAAACCTGTCTAACTGGATGCTCTCTTGAAGAGCATC	90
反义	CAGTTAGACAGG-3'	

HIG2 的靶序列是:

siRNA #1

5'-GCATGTGATAAGACCTCCT-3' (SEQ ID NO; 77),

siRNA #2

5'-CACTGACCTAGACATGTCC-3' (SEQ ID NO; 78),

siRNA #3

5'-GAACCTGTCTAACTGGATG-3'(SEQ ID NO; 79),

siRNA #4 和

5'-CCTGTCTAACTGGATGCTC-3' (SEQ ID NO; 80).

作为对照, 将双链寡核苷酸

5'-TCCCGAAGCAGCACGACTTCTTCTTCAAGAGAGAAGAAGTCGT
GCTGCTTC-3' (SEQ ID NO; 81)和

5'-AAAAGAAGCAGCACGACTTCTTCTTCTTGAAGAAGAAGTCGT
GCTGCTTC-3' (SEQ ID NO; 82)克隆至 psiH1BX3 的克隆位点, 制得
psiH1BX3-EGFP。

实施例 6: HIG2 siRNA 和 HIG2 抗体抑制细胞生长

为了确定 HIG2 siRNA 对细胞生长的效力, 利用 Lipofectamine™2000 (Invitrogen)将上述各 siRNA 表达载体转染至内源表达 HIG2 的 RCC 细胞系 caki-1 和 caki-2, 和人胚胎肾细胞 HEK293 内。在用遗传霉素(Invitrogen)选择后, 如上所述通过 Giemsa 染色(选择 2 周)和 MTT 分析(选择 1 周)评价细胞增殖模式, 通过半定量 RT-PCR 和 Western 印迹分析确定 HIG2 mRNA 的击倒(konckdown)效力。

由于导入了 siRNA 明显抑制了内源 HIG2 的表达, 并导致两种 RCC 细胞(caki-1 和 caki-2)和人胚胎肾脏细胞(HEK293)的细胞生长减弱(图 5a-d)。

由于 HIG2 是经转染的 COS7 细胞而分泌入培养基的, 因此测定该蛋白是否以自分泌方式增强细胞增殖。

制备过表达 HIG2 的稳定 COS7 细胞所用的培养基(参见图 4b, c), 将亲本 COS7 细胞培养在含 HIG2 的培养基中。将 rhHIG2 加至亲本 COS7 细胞培养基内。两个实验都揭示对细胞生长的促进(图 6a, b), 加入抗-HIG2 pAb 使此生长促进效应被中和(图 6a)。另外, 当将该抗体加到支持两种 RCC 细胞系 caki-1 和 caki-2 的培养基中时, 细胞生长明显被抑制(图 6c, d)。

然后, 利用经过抗-HIG2 pAb 处理的 caki-1 细胞进行 FACS 分析, 发现抗-HIG2 pAb 以剂量依赖方式使 caki-1 细胞的凋亡(亚-G1) 细胞群增加(图 6e), 而衍生自其它器官的癌细胞系不受抗-HIG2 pAb 处理的影响(数据未示出)。这些结果有力地支持了下述结论: HIG2 作为一种分泌分子, 起肾肿瘤细胞增殖所必需的自分泌生长因子的作用。

这些结果说明 HIG2 通过起细胞增殖的自分泌调节剂的作用而负责人癌细胞的异常细胞生长。

HIG2 是 RCC 患者的潜在诊断标记物

为了评价 HIG2 作为 RCC-特异性诊断肿瘤标记物的有效性, 利用 32 名 RCC 患者以及作为阴性对照的 20 名健康正常志愿者和 10 名慢性肾小球肾炎(CGN)患者的血浆样品进行夹心 ELISA 分析。在来自所有 32 名 RCC 患者的血浆中观察到的 HIG2 蛋白水平远高于来自 20 名健康正常志愿者和 10 名 CGN 患者的血浆中的蛋白水平(图 7a)。正如所料, 在肿瘤外科手术后, 有局部肿瘤的 RCC 患者的血浆内的 HIG2 蛋白水平戏剧性地降低(图 7b)。但是, 有转移性肿瘤的患者甚至在用外科手术切除原发病灶后, 其血浆内的 HIG2 蛋白水平也几乎没有变化。这些结果暗示 HIG2 表达对 RCC 是特异的, 而且其作为 RCC 的敏感诊断标记物的潜力很高, 而目前还没有 RCC 的特异性肿瘤标记物。

这些结果说明 HIG2 通过起细胞增殖的自分泌调节剂的作用而负责人癌细胞的异常细胞生长。

工业实用性

本文所描述的通过联合使用激光捕获解析(laser-capture dissection)和全基因组的 cDNA 微阵列获得的 RCC 基因表达分析, 鉴定出了可作为癌症预

防和治疗靶标的特异性基因。基于这些差异表达的基因群的表达，本发明提供了用于鉴定或检测 RCC 的分子诊断标记物。

本文所述方法在对预防、诊断和治疗 RCC 的附加分子靶标的鉴定方面也是有用的。本文所报道的数据加深了对 RCC 的全面理解，促进发展新诊断策略，提供鉴定治疗性药物和预防性试剂的分子靶标的线索。所述信息促使对肾肿瘤发生有更深入的理解，提供用于开发诊断、治疗和最终预防 RCC 的新策略的指示剂。

其它实施方式

应该理解，虽然结合详细的说明书对本发明进行了描述，但前述描述仅在于阐释而不限制本发明的范围，其由附加的权利要求的范围定义。其它方面，优势和修改都落在下述权利要求的范围之内。

<110> 肿瘤疗法科学股份有限公司 (ONCOTHERAPY SCIENCE, INC.)
 国立大学法人 东京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO)

<120> 低氧可诱导的蛋白 2(HIG2)作为新的治疗肾细胞癌(RCC)的潜在靶

<130> ONC-A0303Y1P

<150> US 60/496,552
 <151> 2003-08-20

<150> US 60/548,201
 <151> 2004-02-27

<160> 90

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
 <211> 1372
 <212> DNA
 <213> 人(Homo sapiens)

<220>
 <221> CDS
 <222> (206)..(397)
 <223>

<400> 1
 gcacgagggc gcttttgtct ccggtgagtt ttgtggcggg aagcttctgc gctggtgctt 60
 agtaaccgac tttcctcogg actcctgcac gacctgctcc tacagccggc gatccactcc 120
 cggctgttcc cccggagggt ccagaggcct ttcagaagga gaaggcagct ctgtttctct 180
 gcagaggagt agggtccttt cagcc atg aag cat gtg ttg aac ctc tac ctg 232
 Met Lys His Val Leu Asn Leu Tyr Leu
 1 5
 tta ggt glg gta ctg acc cta ctc tcc atc ttc gtt aga gtg atg gag 280
 Leu Gly Val Val Leu Thr Leu Leu Ser Ile Phe Val Arg Val Met Glu
 10 15 20 25

<210> 2
 <211> 63
 <212> PRT
 <213> 人 (*Homo sapiens*)

<400> 2
 Met Lys His Val Leu Asn Leu Tyr Leu Leu Gly Val Val Leu Thr Leu
 1 5 10 15

 Leu Ser Ile Phe Val Arg Val Met Glu Ser Leu Glu Gly Leu Leu Glu
 20 25 30

 Ser Pro Ser Pro Gly Thr Ser Trp Thr Thr Arg Ser Gln Leu Ala Asn
 35 40 45

 Thr Glu Pro Thr Lys Gly Leu Pro Asp His Pro Ser Arg Ser Met
 50 55 60

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 3
 tggagcctaa aatggggaat 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 4
 aggtgcgttg aacctatatt 20

<210> 5
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 5
 tgccctttca cacacacitt 20

 <210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 6
 ggagttgggg gagaaggagt 20

 <210> 7
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 7
 tgtccaggag acagagctga 20

 <210> 8
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 8
gagcagtctc agggacatgg 20

<210> 9
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 9
tgctttctgc atttgggttt 20

<210> 10
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 10
gaattttggg gtgtttccaa 20

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 11
cagctggaga ctggctctct 20

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 12

cagtttcaac aggtaaggcg ata

23

<210> 13

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 13

ccagcattta tggcaaatgg

20

<210> 14

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 14

tgaccctcca aatgtaccaa a

21

<210> 15

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 15

cttctgctg acaactgagg

20

<210> 16
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 16
 ctcccaagca laaaacagca 20

<210> 17
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 17
 gcgacaagtc agaccctagcc 20

<210> 18
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 18
 tctaactgcc tcccaggaca 20

<210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 19
gaggaccttg actgggttca 20

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 20
caggtcaaga gaccctttct tc 22

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 21
gggacatggg gagcttagat 20

<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 22
caaaaaggig caccaaaaca 20

<210> 23
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 23

gagcacaatcc tacgcacaag

20

<210> 24

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 24

gctaaatttg gggcaatttg t

21

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 25

tggcaaaatt ctgatgcaaa

20

<210> 26

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 26

ttgggcittt tgaaaaattg

20

<210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 27
 agtttggcag gcatgaagag 20

<210> 28
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 28
 cgggatctgc acacatcttt 20

<210> 29
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 29
 cccaaaatgg gtgtatctgg 20

<210> 30
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 30
 ggttctgagc aacctctata actg 24

<210> 31
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 31
 aagcccaact ttgatatagc ctg 23

<210> 32
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 32
 ctttatttgggt gtgtttgagc tgg 23

<210> 33
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 33
 tagtctgctg gctgactgga 20

<210> 34
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 34

acaagaatga aaaagccac a

21

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 35

tcaatcccag aaggagctg

20

<210> 36

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 36

aagctatggc cgtgaaaatg

20

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 37

catatctgtc tcattctgcc tttt

24

<210> 38

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 38

aacaggccca tattaccct

20

<210> 39

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 39

agcggactt tcagtttga ct

22

<210> 40

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 40

aatgcaactg ttcgttgt g

21

<210> 41

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 41
tccaattgtc tgagctgtcg 20

<210> 42
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 42
aactcccagt caccctgtt t 21

<210> 43
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 43
tttcagatcg gtcacigata gtag 25

<210> 44
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 44
gtgaaatctc aaggataagg agg 23

<210> 45
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 45

tcgtcaacca gcagagctt

19

<210> 46

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 46

ccgcgtagtt catctgcc

18

<210> 47

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 47

tgtctcctga ccagtgtag tt

22

<210> 48

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 48

tcacacttga ccatgagigt tg

22

<210> 49
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 49
 accctcagcc aagattggta 20

<210> 50
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 50
 tgcctttatt tgcaccttg 20

<210> 51
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

 <400> 51
 tgaacgcaca tgacatagca 20

<210> 52
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 52
ttttcaaag gcagtttctg a 21

<210> 53
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 53
cctccaagct cctctgactg 20

<210> 54
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 54
tgaaaagcag gtgagtctgg t 21

<210> 55
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 55
accatcaagg aagcagcaag 20

<210> 56
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 56

aacagctccc ttttcgtag c

21

<210> 57

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 57

gtaggtctg cctgttgaa

20

<210> 58

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 58

actaaatgcc aagggggact

20

<210> 59

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 59

ctcttgacct gtcccctctg

20

<210> 60
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 60
 cgttgataac attactcaag tcaca 25

<210> 61
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 61
 agatagggttg atctcgccct tac 23

<210> 62
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 62
 acacctcttc aactgctatc caa 23

<210> 63
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 63
gatggattgc agagagacct g 21

<210> 64
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 64
tcatacacac acaaaccacc agt 23

<210> 65
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 65
cgatacagat atgttcgggtg atg 23

<210> 66
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 66
cctccattct tcaatctctca atg 23

<210> 67
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 67

cttgggtctg taacaaagca ttc

23

<210> 68

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 RT-PCR 的人工合成的引物序列

<400> 68

aaggattatg aggaggttgg tgt

23

<210> 69

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 69

tttctctgca gaggagtagg g

21

<210> 70

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 70

catgcttctg gatggatgg

19

<210> 71
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 71

tggtagccaa gtgcaggtta ta

22

<210> 72
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 72

ccaaagggtt tctgcagttt ca

22

<210> 73
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 73

tgcggatcca gagcagattg tactgagagt

30

<210> 74
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 74
 cictaictcg agtgaggcgg aaagaacca 29

<210> 75
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 75
 tttaagcttg aagaccattt ttggaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaac 47

<210> 76
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 76
 tttaagcttg aagacatggg aaagagtggc ctca 34

<210> 77
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人工合成的引物序列

<400> 77
 gcatgtgata agacctcct 19

<210> 78
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 78

cactgacctgac gacatgtcc

19

<210> 79

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 79

gaacctgtct aactggatg

19

<210> 80

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 人工合成的引物序列

<400> 80

cctgtctaac tggatgctc

19

<210> 81

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

<400> 81

tcccgaagca gcacgacttc ttcttcaaga gagaagaagt cgtgctgctt c

51

<210> 82
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

 <400> 82
 aaaagaagca gcacgacttc ttctctcttg aagaagaagt cgtgcigctt c 51

 <210> 83
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

 <400> 83
 tcccgatgt gataagacct cctttcaaga gaaggaggtc ttatcacatg c 51

 <210> 84
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

 <400> 84
 aaaagcatgt gataagacct ccttctcttg aaaggaggtc ttatcacatg c 51

 <210> 85
 <211> 51
 <212> DNA
 <213> 人工的

 <220>
 <223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

<400> 85
tccccactga cctagacatg tccttcaaga gaggacatgt ctaggtcagt g 51

<210> 86
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

<400> 86
aaaacactga cctagacatg tccttctctg aaggacatgt ctaggtcagt g 51

<210> 87
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

<400> 87
tcccgaacct gtctaactgg atgttcaaga gacatccagt tagacaggtt c 51

<210> 88
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

<400> 88
aaaagaacct gtctaactgg atgttctctg aacatccagt tagacaggtt c 51

<210> 89
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

<400> 89

tccccctgtc taactggatg ctcttcaaga gagagcatcc agttagacag g 51

<210> 90

<211> 51

<212> DNA

<213> 人工的

<220>

<223> 用于 siRNA 的人工合成的寡核苷酸序列

<400> 90

aaaacctgtc taactggatg ctctctcttg aagagcatcc agttagacag g 51

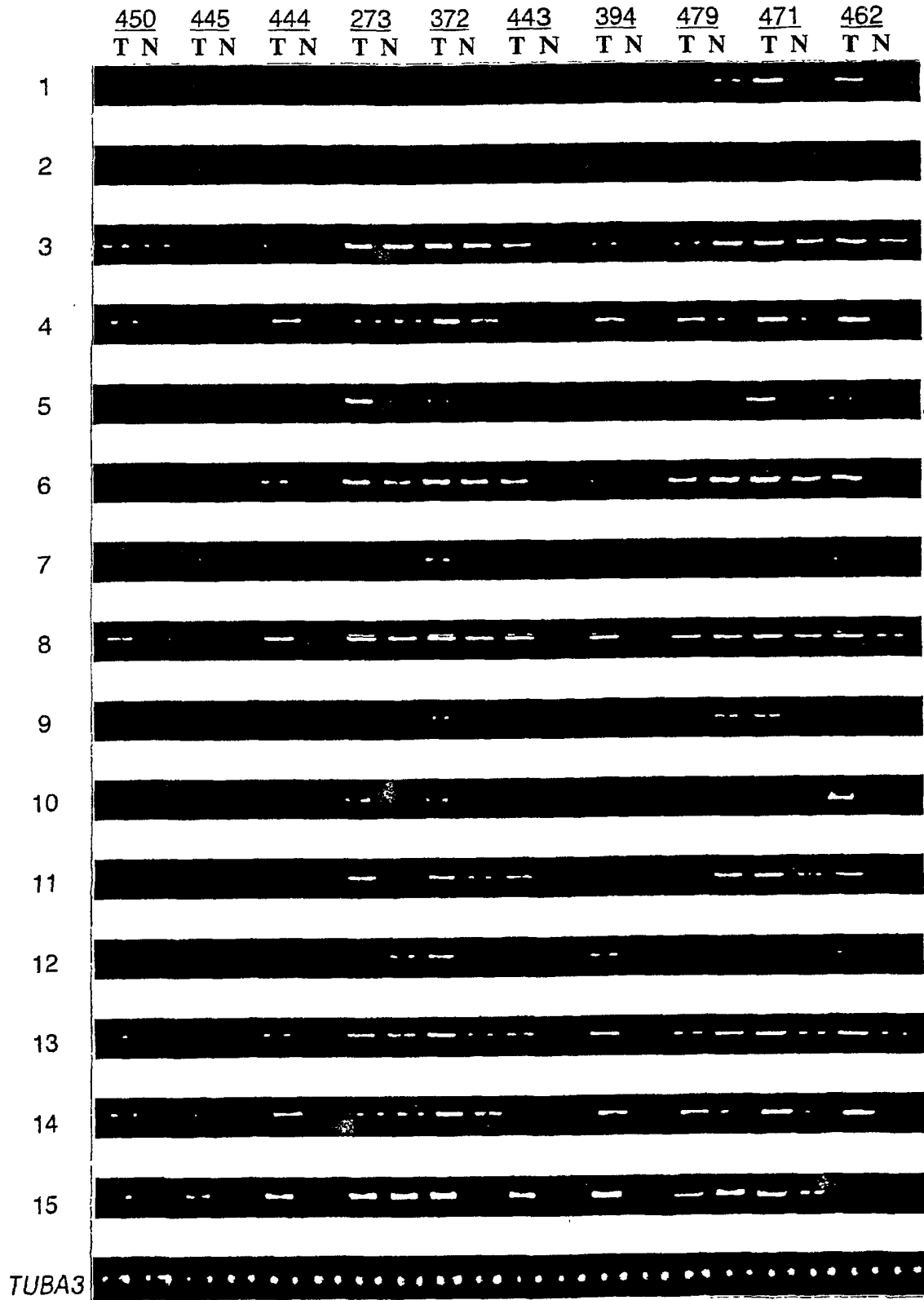


图 1-1

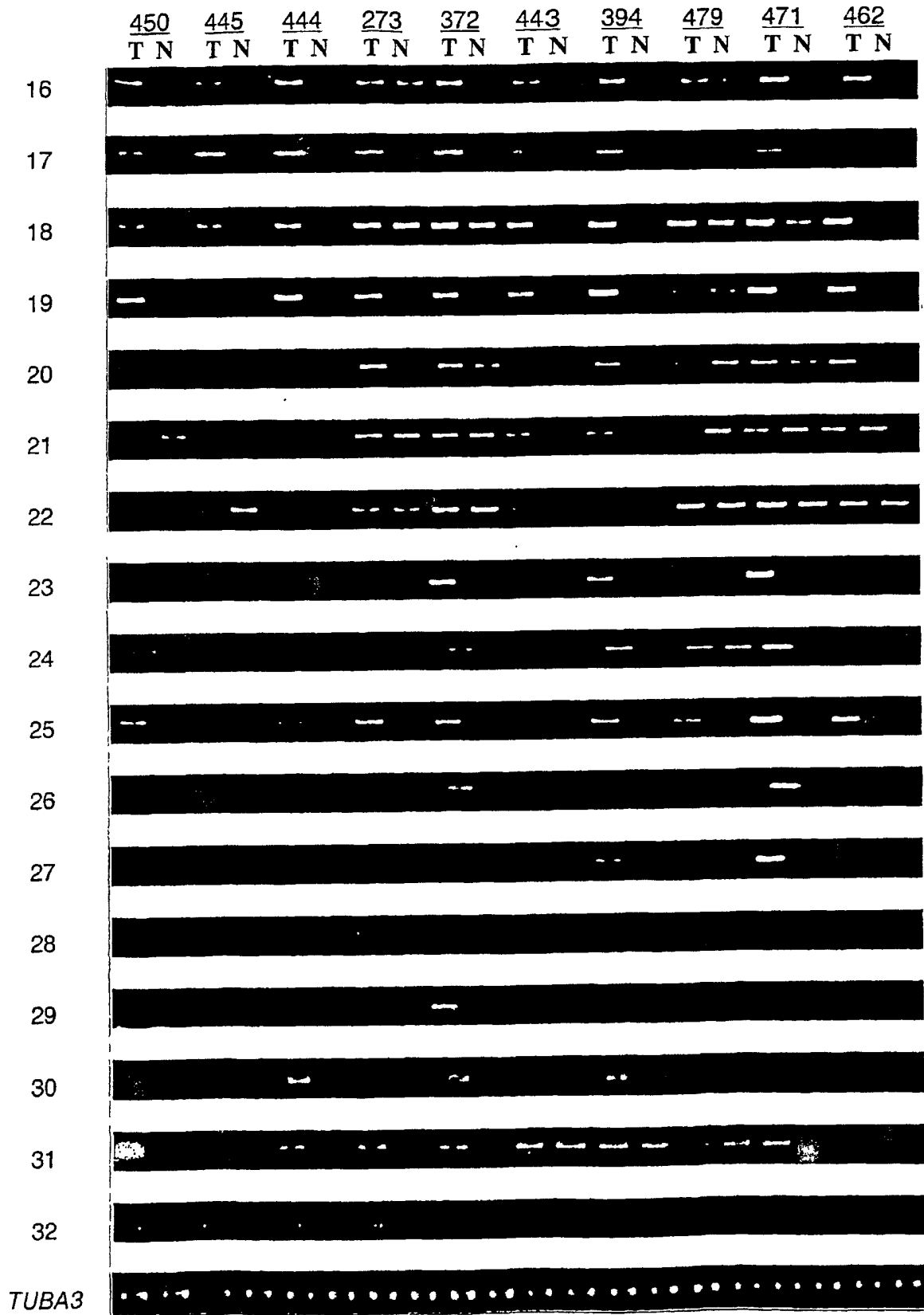
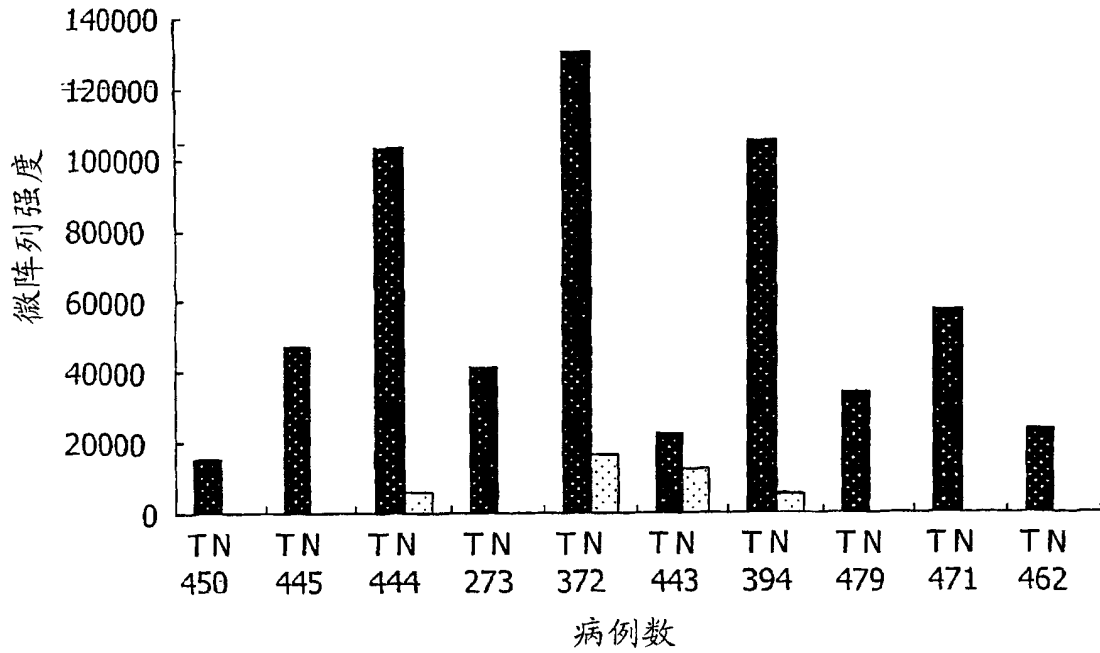
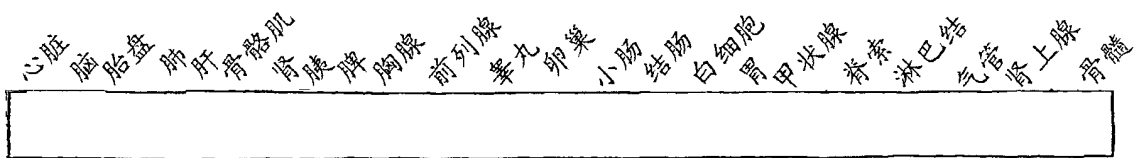


图 1-2

A



B



C

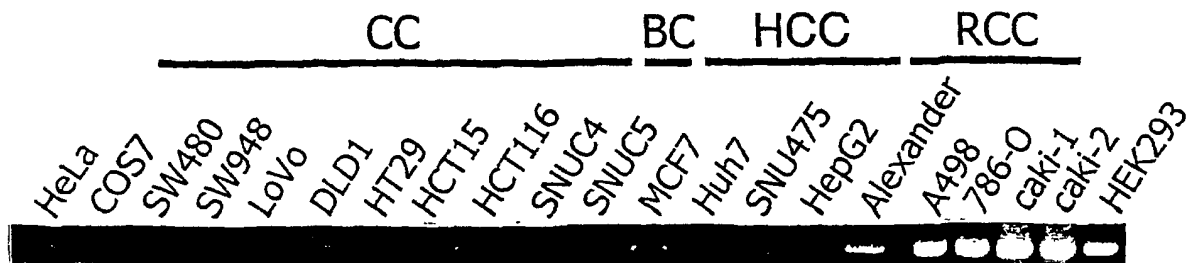


图 2

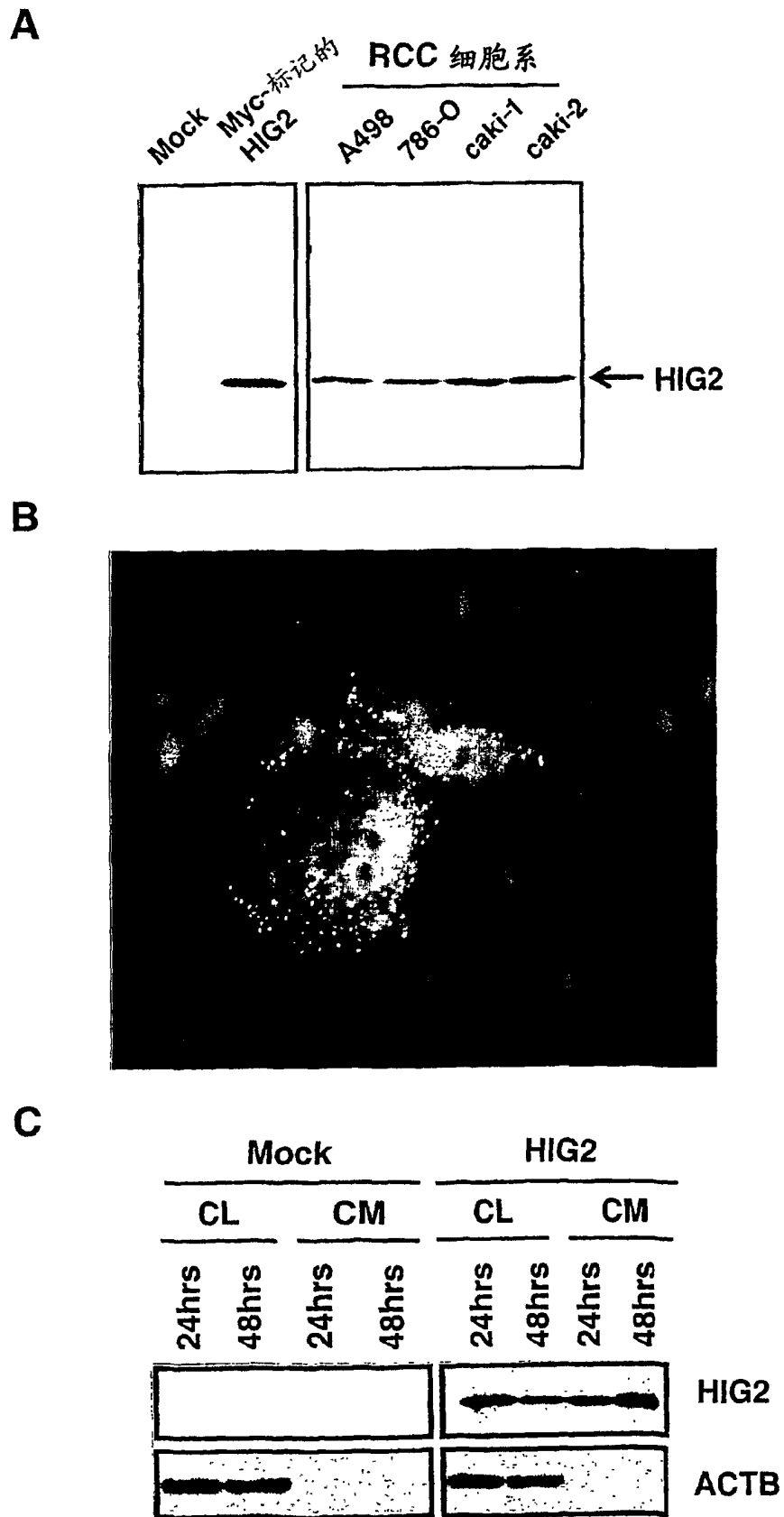


图 3-1

D

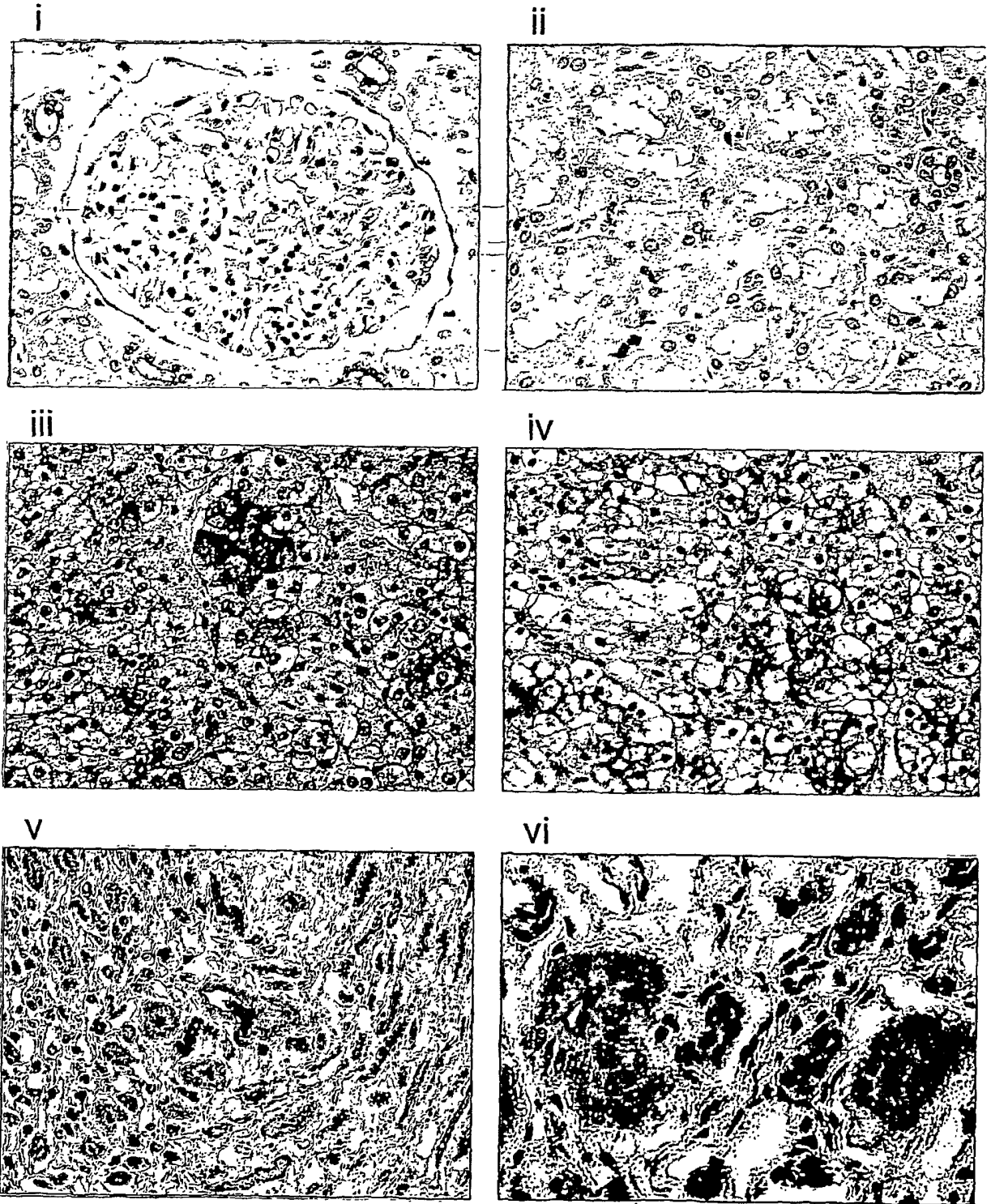


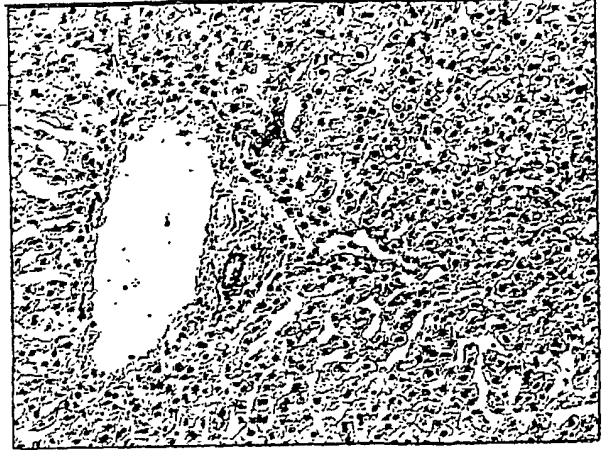
图 3-2

E

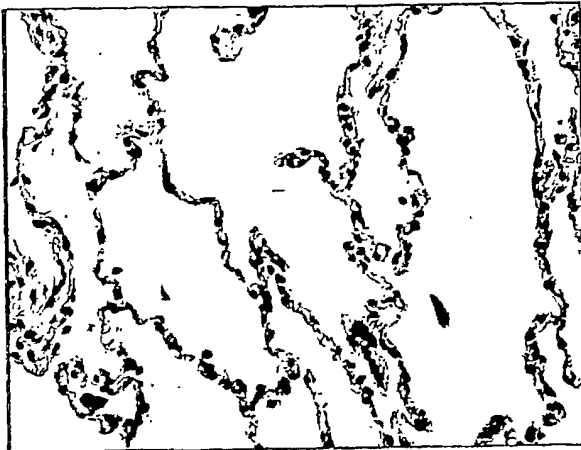
心脏



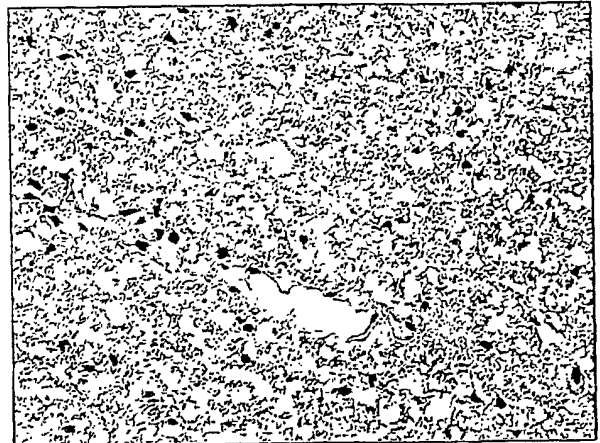
肝



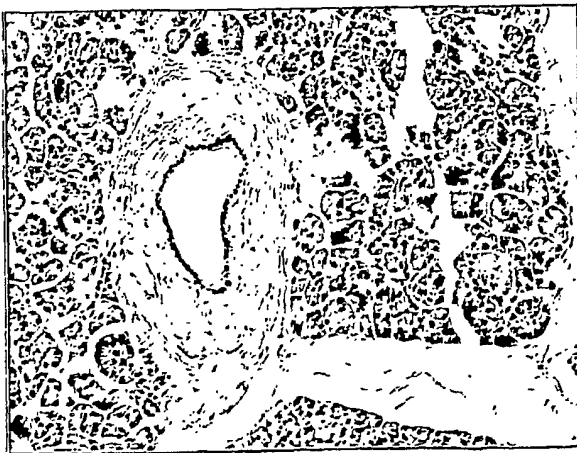
肺



脊索



胰



前列腺

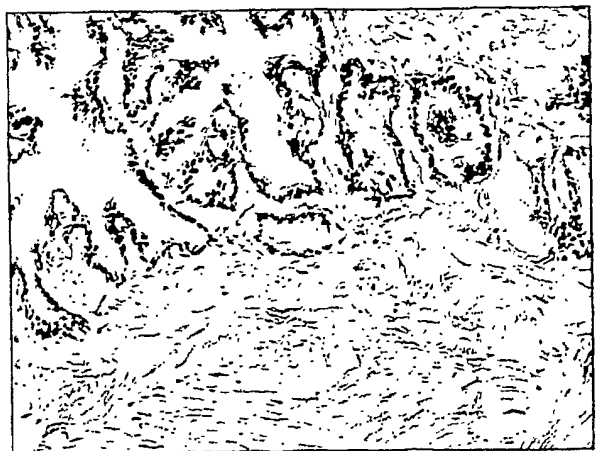


图 3-3

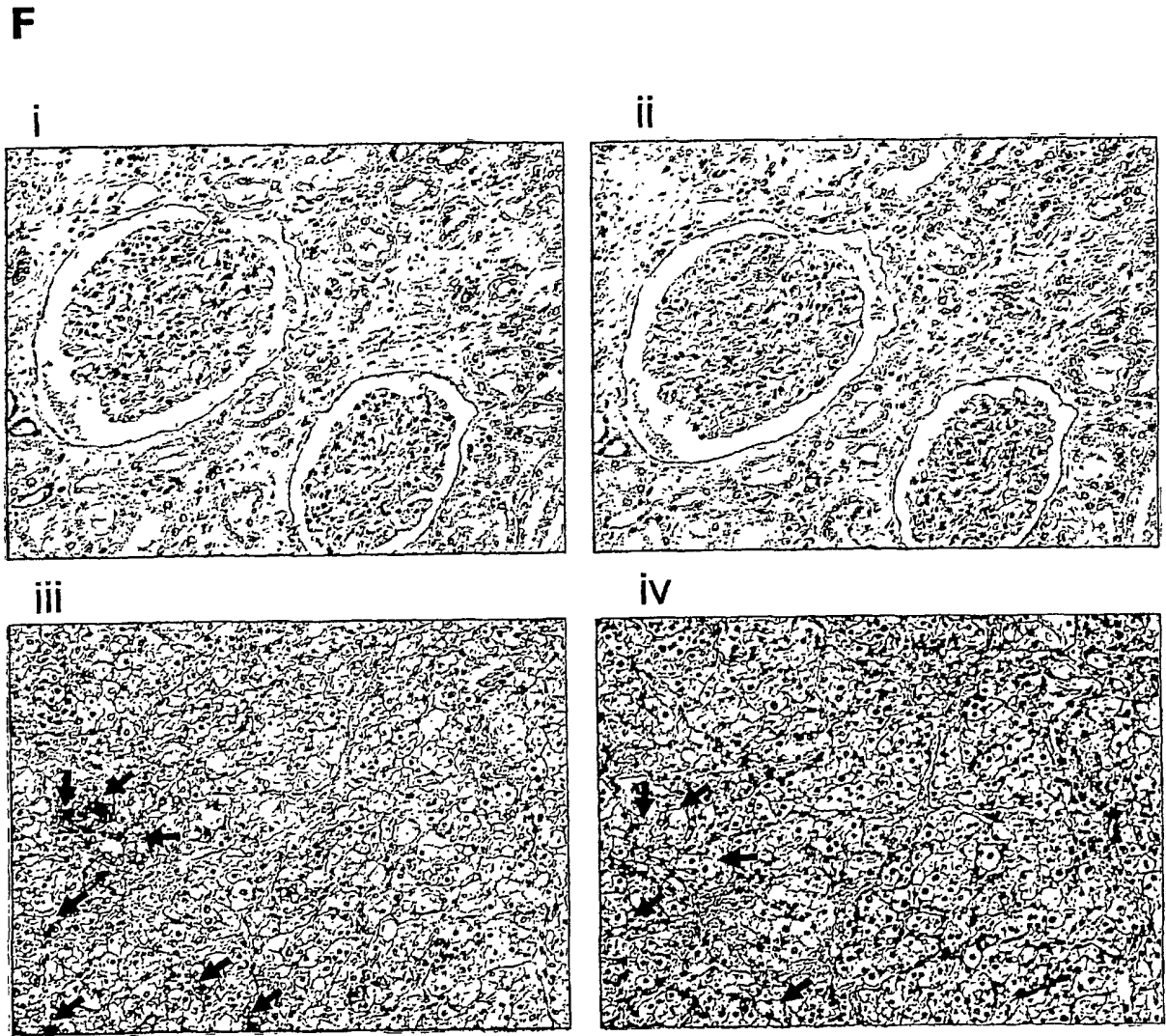


图 3-4

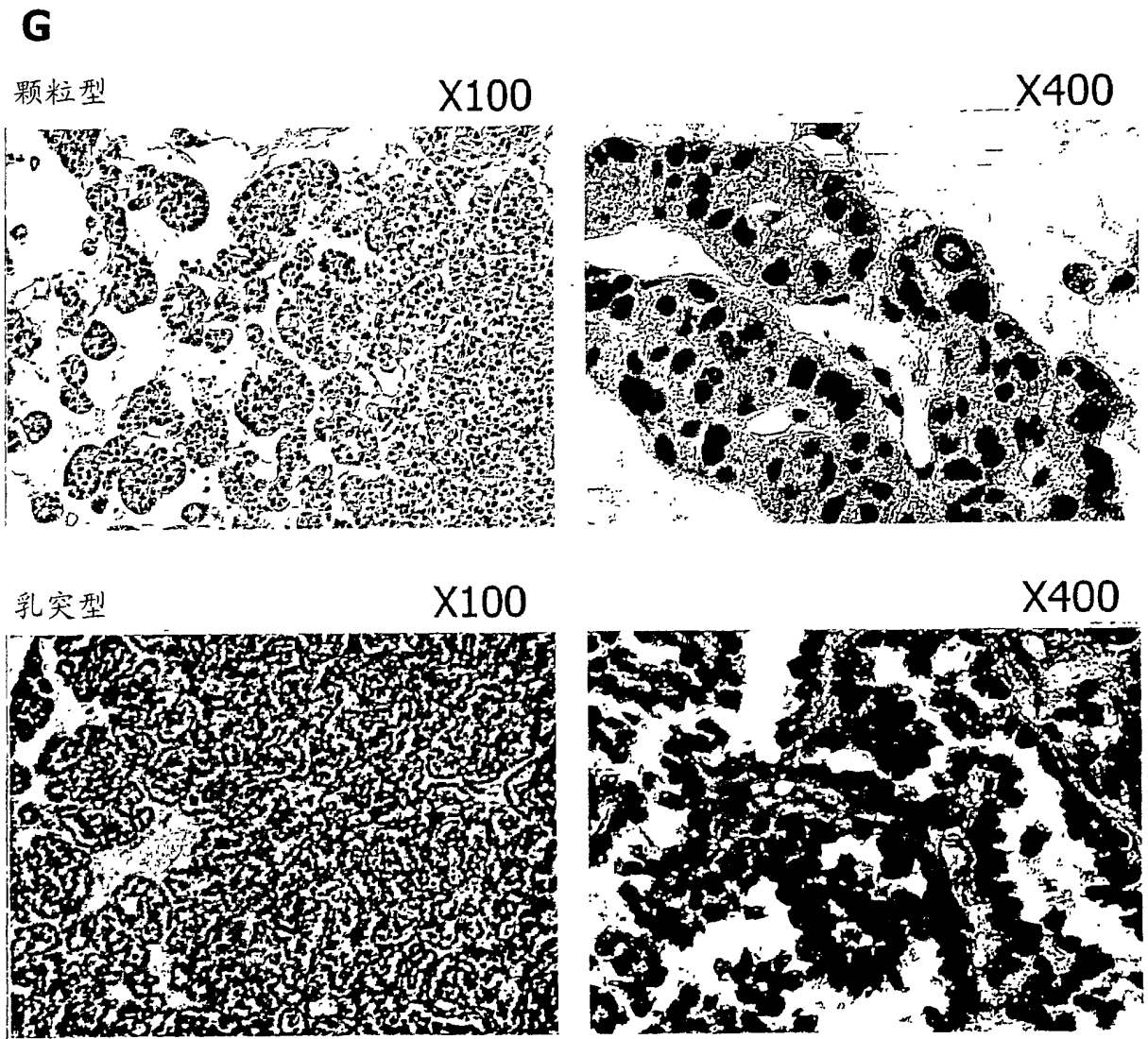


图 3-5

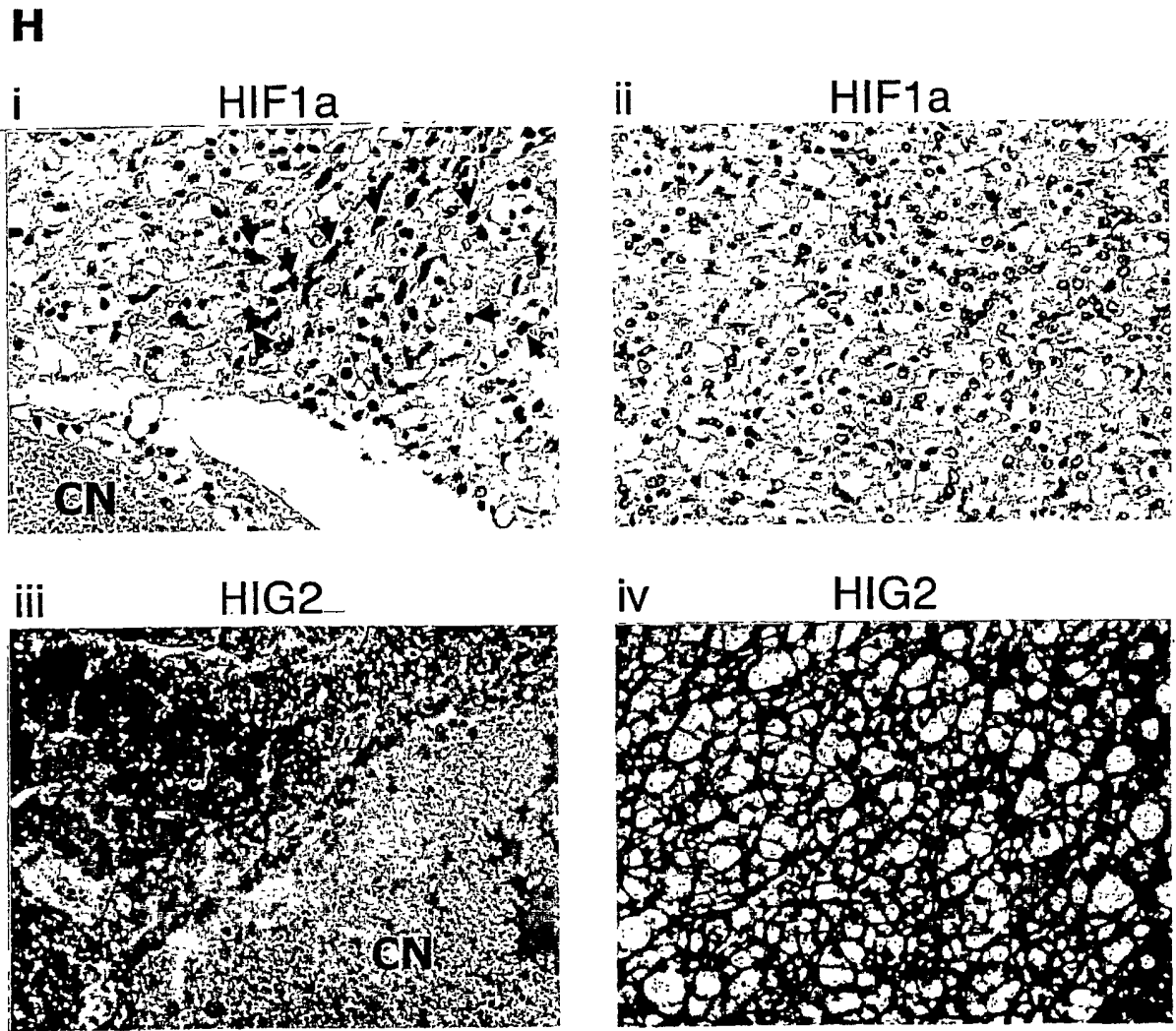


图 3-6

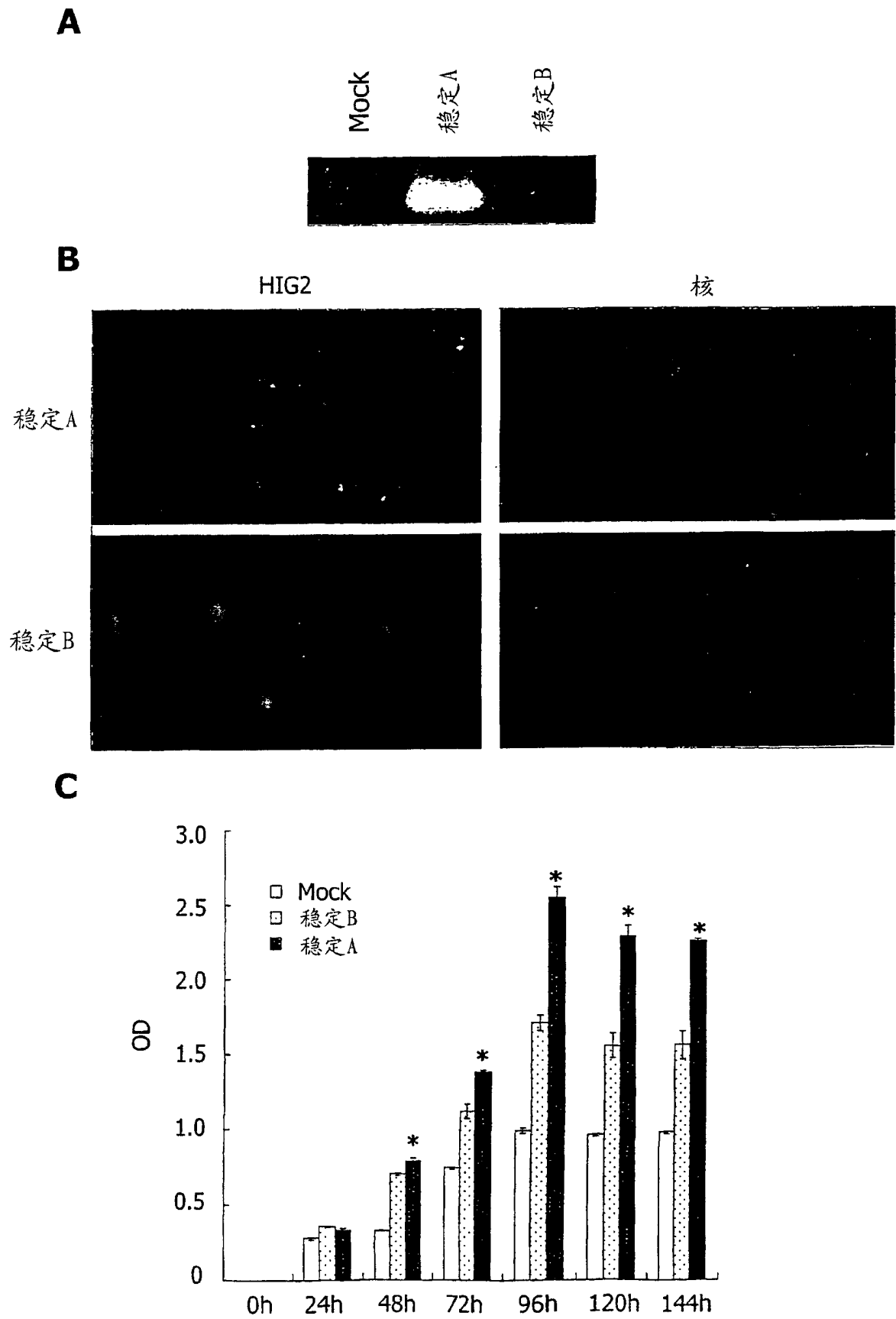


图 4

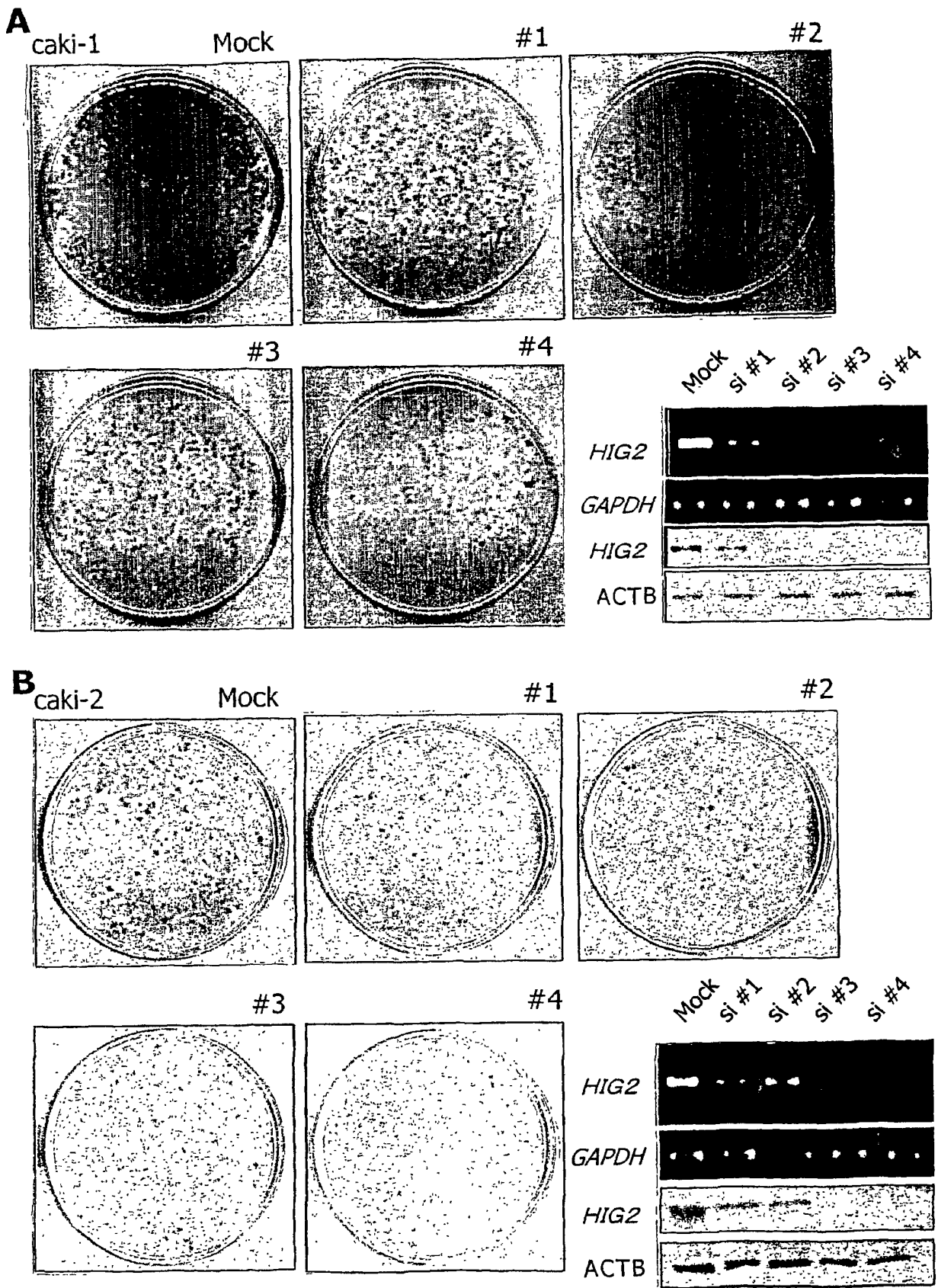


图 5-1

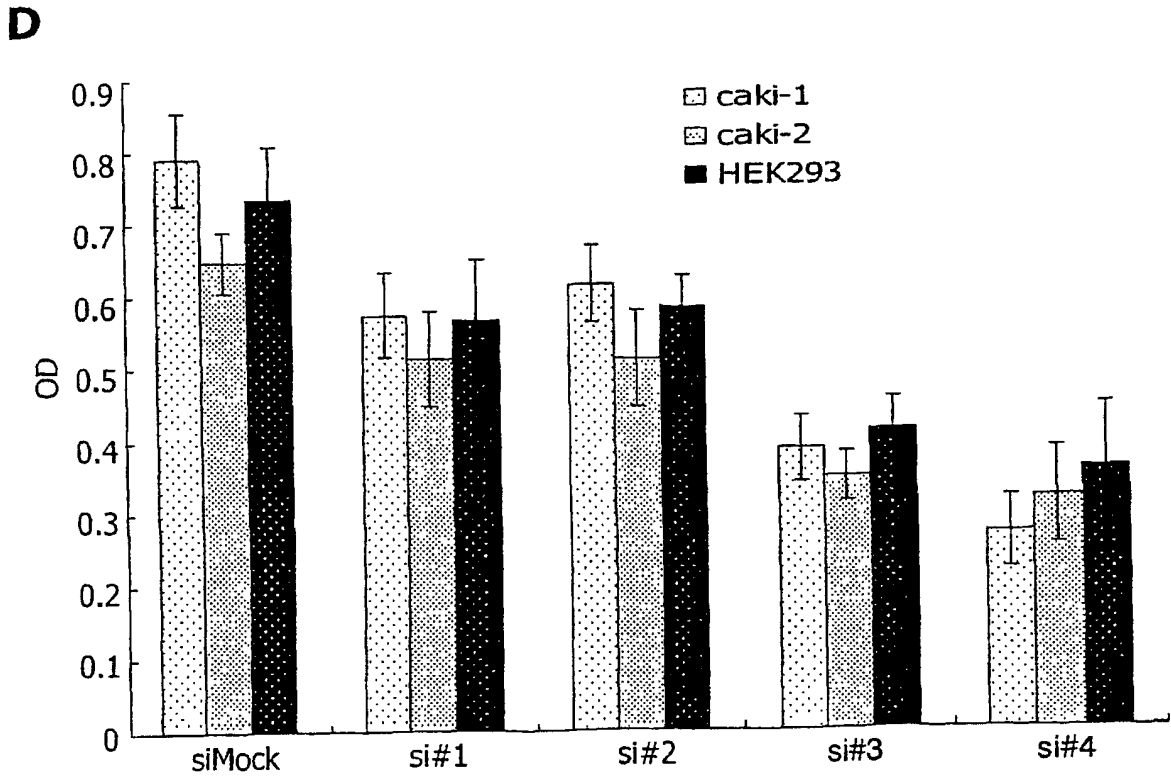
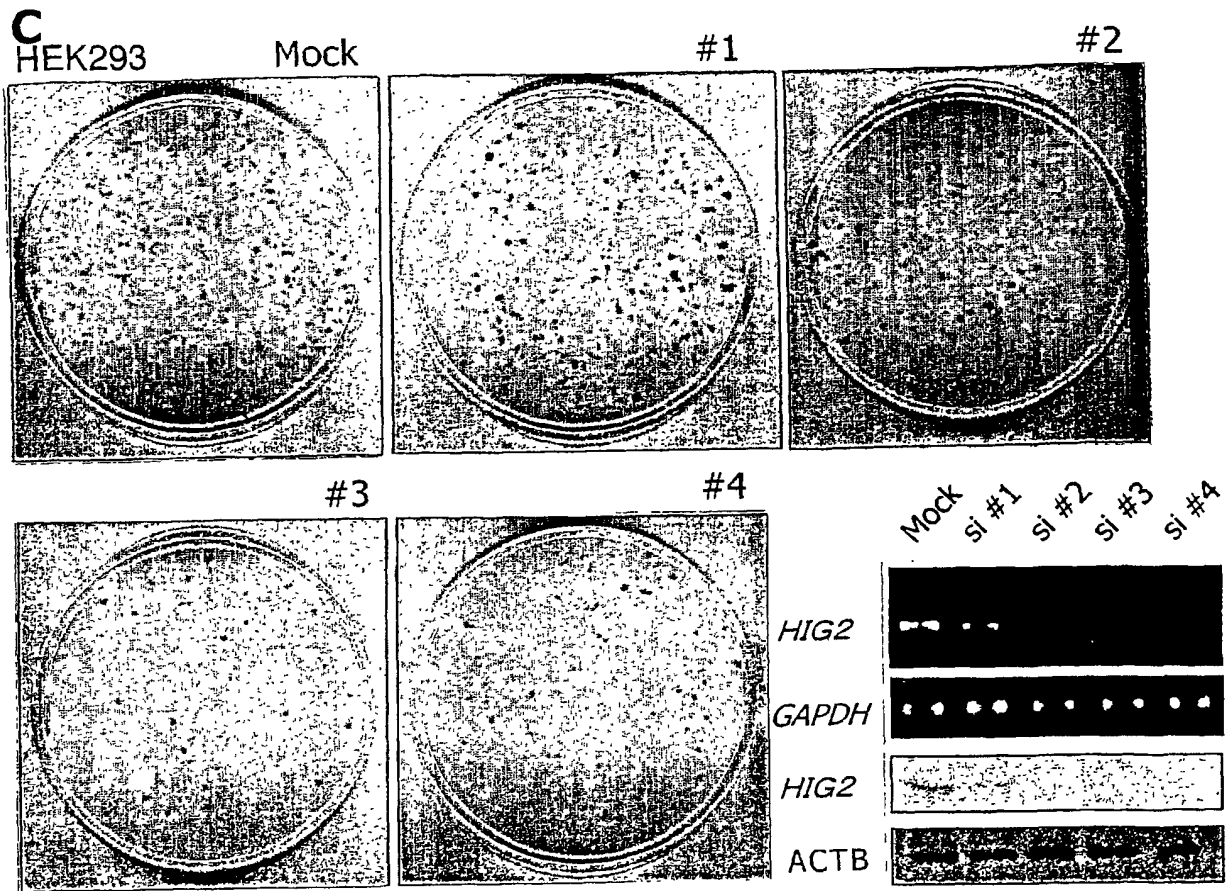


图 5-2

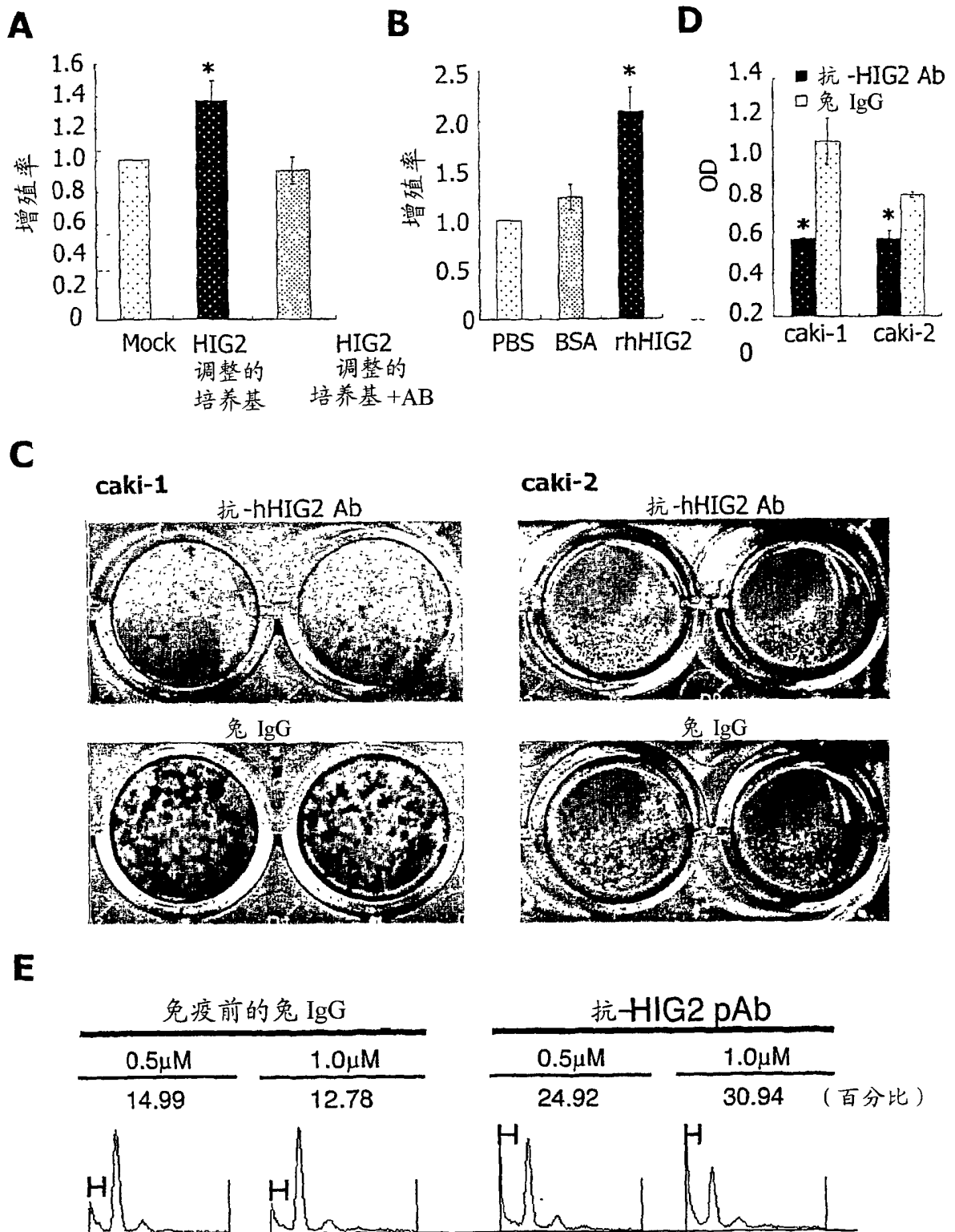
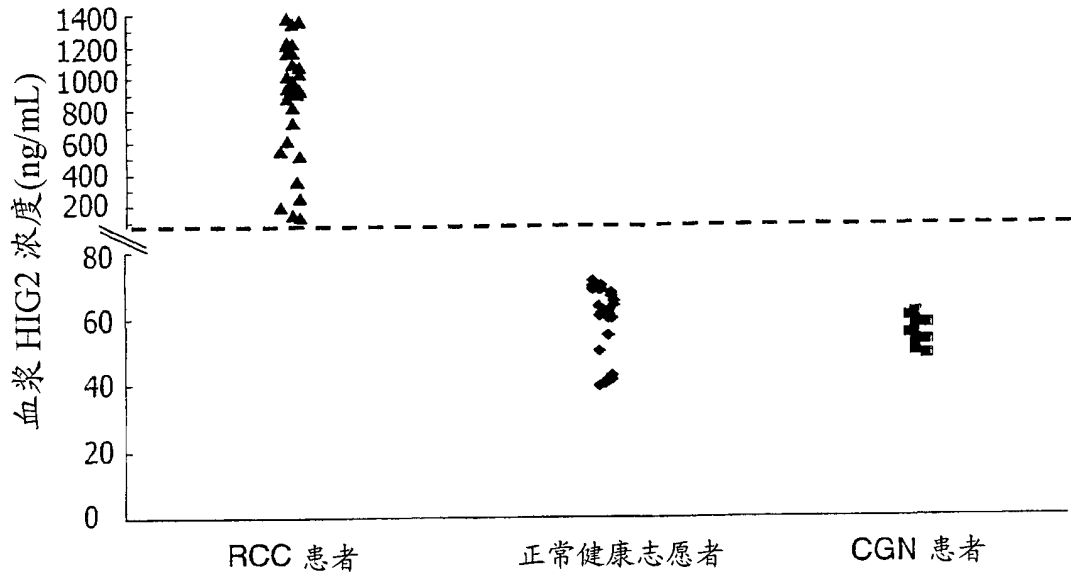


图 6

A



B

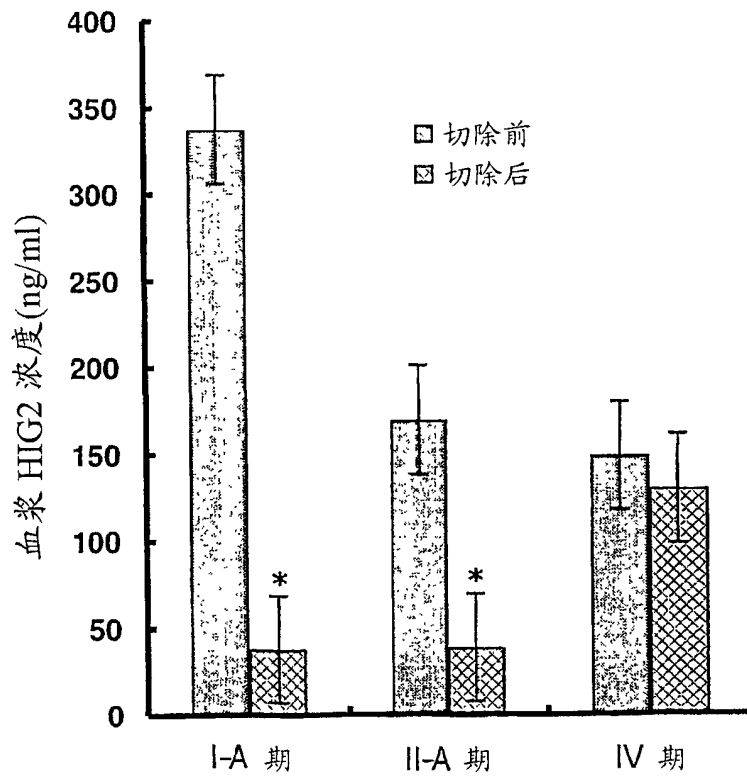


图 7