



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101960309 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 200980108030. 1

G01N 33/577(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 01. 16

C07K 14/47(2006. 01)

C07K 16/18(2006. 01)

(30) 优先权数据

2008-008411 2008. 01. 17 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 09. 07

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/050524 2009. 01. 16

(87) PCT申请的公布数据

W02009/091023 JA 2009. 07. 23

(71) 申请人 东丽株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 田中祥德 小林道元 友田史绪里

郑基晚 小川修 中村英二

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 16 页 序列表 13 页

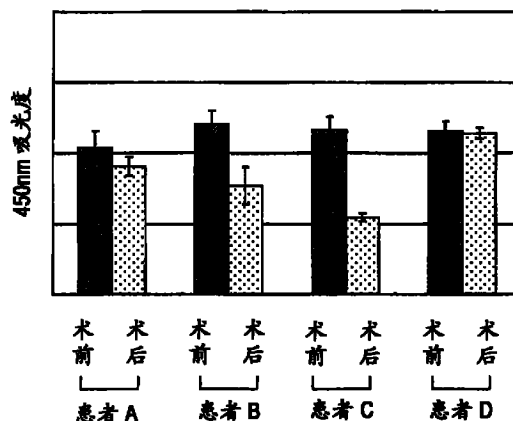
附图 4 页

(54) 发明名称

用于肾癌诊断或检测的组合物及方法

(57) 摘要

本发明涉及一种肾癌的检测方法以及用于诊断或检测肾癌的组合物,所述检测方法包括测定来自受试者的生物试样中的序列号 1~7 表示的多肽、其变异体或其片段中的任一个或多个。



1. 一种体外检测肾癌的方法,所述方法包括测定来自受试者的生物试样中的序列号 1~7 表示的多肽或其片段中的任一个或多个。
2. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述片段为多肽片段,所述多肽片段在以序列号 1~7 中的任一个表示的多肽的氨基酸序列中分别含有序列号 8~16 中的任一个表示的氨基酸序列。
3. 如权利要求 1 所述的方法,其中,测定所述多肽或其片段的量或测定所述多肽或其片段是否存在。
4. 如权利要求 3 所述的方法,其中,以所述多肽或其片段的量与所述多肽或其片段在对照试样中的量相比显著地增大或显著地减小作为指标。
5. 如权利要求 1 所述的方法,其中,通过免疫学方法测定所述多肽或其片段。
6. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述测定使用与所述多肽或其片段可结合的物质进行。
7. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述可结合的物质为抗体或其片段。
8. 如权利要求 7 所述的方法,其中,所述抗体被标记。
9. 如权利要求 1 所述的方法,其中,包括使用与所述多肽或其片段特异性结合的抗体或其片段,采用免疫学方法测定所述试样中的所述多肽或其片段中的一个或多个的量或测定所述多肽或其片段是否存在,将所述多肽或其片段的量与所述多肽或其片段在对照试样中的量相比增大或减少作为指标、或以所述多肽或其片段只存在于所述试样或对照试样中的任一方向作为指标来检测肾癌。
10. 如权利要求 1 所述的方法,其中,所述试样为血液、血浆、血清或尿、或者来自肾的组织或细胞。
11. 如权利要求 7 所述的方法,其中,所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。
12. 一种用于肾癌的诊断或检测的组合物,含有与序列号 1~7 表示的多肽或其片段中的至少一个特异性结合的抗体或其片段或所述抗体或其片段的化学修饰衍生物中的一个或多个。
13. 如权利要求 12 所述的组合物,其中,所述多肽的片段为在序列号 1~7 中的任一个表示的多肽的氨基酸序列中分别含有序列号 8~16 中的任一个表示的氨基酸序列的多肽片段。
14. 如权利要求 12 所述的组合物,其中,所述多肽的片段含有由至少 7 个氨基酸构成的表位。
15. 如权利要求 12 所述的组合物,所述组合物为试剂盒的形式。
16. 权利要求 12 所述的组合物在受试者的肾癌体外检测中的应用。

## 用于肾癌诊断或检测的组合物及方法

### 技术领域

- [0001] 本发明涉及一种对肾癌的诊断和检测有用的组合物。  
[0002] 本发明还涉及一种使用该组合物检测肾癌的方法。

### 背景技术

[0003] 肾脏是重要的泌尿器官,具有过滤血液生成尿从而将生物体内的废弃物排到体外的作用。另外,同时也是重要的内分泌器官,可产生控制血压的血管紧张素、作为红细胞造血因子的促红细胞生成素等激素。

[0004] 肾脏中发生的肿瘤有:发生在成人中的肾细胞癌和发生在儿童中的 Wilms' 肿瘤、为稀少肿瘤的肉瘤,以下将发生率最高的恶性肿瘤即肾细胞癌称为肾癌。肾癌的发生率为每 10 万人中有约 2.5 人,男女比例为 2~3:1,男性具有多发倾向。在泌尿系统的恶性肿瘤中,是继前列腺癌、膀胱癌之后发生率最高的肿瘤。

[0005] 作为肾癌的危险因素,已知有遗传学因素,但一般可以举出吸烟、脂肪摄取量等。另外,已知长期接受透析的患者中该肿瘤的发生率高。

[0006] 肾癌患者在肿瘤最大直径为 5cm 以下时,几乎没有任何自觉症状,多在检诊时通过 CT 扫描等被发现。尺寸大的肿瘤,可见血尿、腹部肿痛、疼痛等症状。另外,作为全身症状,有时引起发热、体重减少、贫血等,偶尔因内分泌因子引起红细胞增多症或高血压、高钙血症等。另一方面,有时因肾癌扩散至后腔静脉内,引起腹部体表的静脉曲张或睾丸静脉曲张。大约 20% 的肾癌在肺或骨转移后被发现。肾癌在静脉中具有较强的肿瘤扩散倾向,易向其它脏器转移。

[0007] 作为肾癌的检查法,有超声波检查、CT 检查、血管造影检查等方法,由于特异性生化标记物尚属未知,故必须利用机器进行检查。

[0008] 另外,肾癌还可以按病理学分成几类,已知其中占 90% 的透明细胞型肾癌的发生原因是在于作为癌抑制基因的 VHL (von-Hippel-Lindau) 基因的缺陷(非专利文献 1)。已知 VHL 基因缺陷通过阻断 HIF- $\alpha$  /VHF 聚集,导致低氧诱导基因组转录活化(非专利文献 2),引起 VEGF、TGF $\beta$  等基因表达增强。

[0009] 肾癌治疗主要采用外科疗法。无论病期如何,在能够切除时将肾脏全部或部分切除为最常用的方法,即使发生转移,也可考虑采用外科方法将肾脏切除。作为外科疗法之外的方法,有肾动脉的动脉栓塞术,该方法在不能进行肾脏切除时或在切除较大肿瘤时于手术前实施。

[0010] 肾癌在较早期被发现的时候,预后比较好,初期癌的治疗中 90% 以上治愈。但是,5cm 以上的较大肿瘤或发生转移的肿瘤的治疗效果差(全部肾细胞癌患者的 5 年生存率约 50-60%),人们已经认识到早期发现的重要性。

[0011] 对发现早期的小尺寸肾癌,图像诊断技术是有效的方法,但是例如在健康检查等以众多受试者作为对象的情况下,效率不是很好,而且诊断所需的费用比较高。因此,强烈期望开发对肾癌具有特异性并且灵敏性高的血中标记物。一般认为通过利用血中标记物可

以比较便宜地进行高通量筛选的检查以及诊断。

[0012] 专利文献 1 中公开了利用基因表达的差异检测或诊断人肾癌的方法。另外,作为已知在人肾癌中增加的蛋白质,有通过分解细胞外基质使癌细胞的运动性增加的 MMP2(非专利文献 3)、已知在肾功能障碍中表达增加的 TNFRSF7(非专利文献 4),除此之外,还有 PDE8B(专利文献 2)、FLOT1(专利文献 3)、CD5(非专利文献 5)、ECM1(专利文献 4)等,然而,相对而言其特异性并不高,仅通过其表达量获得的高灵敏性的肾癌检查方法尚未用于临床。

[0013] 专利文献 1:国际公开第 2005/024603 号说明书

[0014] 专利文献 2:国际公开第 2004/042077 号说明书

[0015] 专利文献 3:国际公开第 2004/048933 号说明书

[0016] 专利文献 4:美国专利第 6303765 号说明书

[0017] 非专利文献 1:Latif, F. 等, Science, 1993 年, 第 260 卷, p. 1317-1320

[0018] 非专利文献 2:Maxwell, P. 等, Nature, 1999 年, 第 399 卷, p. 271-275

[0019] 非专利文献 3:Lein, M. 等, International Journal of Cancer, 2000 年, 第 85 卷, p. 801-804

[0020] 非专利文献 4:Nakatsuji, T. Clinical and Experimental Medicine, 2003 年, 第 2 卷, p. 192-196

[0021] 非专利文献 5:Nagase, Y. 等, 日本泌尿器科学会杂志, 1991 年, 第 82 卷, p. 1781-1789

## 发明内容

[0022] 然而,上述现有的标记物以及候补标记物缺乏特异性及/或灵敏性、或尚未确立从生物试样中有效地检测方法,所以一般情况下不用于临床,人们迫切期望开发出特异性及灵敏性更高的肾癌标记物。

[0023] 本发明的目的在于提供一种对肾癌诊断有用的组合物,以及利用该组合物检测肾癌的方法。

[0024] 作为标记物的寻找方法,可以举出下述方法,即,通过某种手段对肾癌细胞与非癌细胞中基因表述或蛋白质表达、或细胞代谢产物等的量方法进行比较的方法;或对肾癌患者或非癌患者的体液中所含的基因、蛋白质、代谢产物等的量进行测定的方法。

[0025] 为了解决上述课题,本发明人等此次发现了一种蛋白质标记物组,对于肾癌患者及健康人的血浆,只在肾癌患者血浆中能够被特异性地检测到或者只在健康人血浆中能够被特异性地检测到。

[0026] 本发明具有以下特征。

[0027] (1) 一种体外检测肾癌的方法,所述方法包括测定来自受试者的生物试样中的序列号 1~7 表示的多肽或其片段中的任一个或多个。

[0028] (2) 如上述(1)所述的方法,其中,所述片段为多肽片段,所述多肽片段在序列号 1~7 中的任一个表示的多肽的氨基酸序列中分别含有序列号 8~16 中的任一个表示的氨基酸序列。

[0029] (3) 如上述(1)或(2)所述的方法,其中,测定所述多肽或其片段的量或测定所述

多肽或其片段是否存在。

[0030] (4) 如上述 (1) ~ (3) 中任一项所述的方法, 其中, 以所述多肽或其片段的量与所述多肽或其片段在对照试样中的量相比显著地增大或显著地减小作为指标。

[0031] (5) 如上述 (1) ~ (4) 中任一项所述的方法, 其中, 所述多肽或其片段采用免疫学方法测定。

[0032] (6) 如上述 (1) ~ (5) 中任一项所述的方法, 其中, 所述测定使用与所述多肽或其片段可结合的物质进行。

[0033] (7) 如上述 (6) 所述的方法, 其中, 所述可结合的物质为抗体或其片段。

[0034] (8) 如上述 (7) 所述的方法, 其中, 所述抗体被标记。

[0035] (9) 如上述 (1) ~ (8) 中任一项所述的方法, 包括使用与所述多肽或其片段特异性结合的抗体或其片段, 采用免疫学方法测定所述样品中的该多肽或其片段中的一个或多个的量或测定所述多肽或其片段是否存在, 以该多肽或其片段的量与所述多肽或其片段在对照试样中的量相比增大或减少作为指标, 或以该多肽或其片段只存在于所述样品或对照试样中的任一方向作为指标, 来检测肾癌。

[0036] (10) 如上述 (1) ~ (9) 中任一项所述的方法, 其中, 所述试样为血液、血浆、血清或尿。

[0037] (11) 如上述 (1) ~ (9) 中任一项所述的方法, 其中, 所述试样来自于肾的组织或细胞。

[0038] (12) 如上述 (7) ~ (9) 中任一所述的方法, 其中, 所述抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0039] (13) 一种用于肾癌的诊断或检测的组合物, 含有与序列号 1 ~ 7 表示的多肽或其片段中的至少一个特异性结合的抗体或其片段或所述抗体或其片段的化学修饰衍生物中的一个或多个。

[0040] (14) 如上述 (13) 所述的组合物, 其中, 所述多肽片段为在以序列号 1 ~ 7 中的任一个表示的多肽的氨基酸序列中分别含有序列号 8 ~ 16 中的任一个表示的氨基酸序列的多肽片段。

[0041] (15) 如上述 (13) 或 (14) 所述的组合物, 其中, 所述多肽片段含有由至少 7 个氨基酸构成的表位。

[0042] (16) 如上述 (13) ~ (15) 中任一项所述的组合物, 其中, 所述组合物为试剂盒的形式。

[0043] (17) 上述 (13) ~ (16) 中任一项所述的组合物在受试者的肾癌体外检测中的应用。

[0044] 本说明书中使用的用语具有以下定义。

[0045] 本说明书中“化学修饰衍生物”, 是指通过酶、荧光团、放射性同位素等标记产生的标记化衍生物, 或含有乙酰化、糖基化、磷酸化、硫酸化等化学修饰的衍生物。

[0046] 本说明书中, 所谓“用于诊断或检测的组合物”, 是指为了诊断或检测是否罹患肾癌、罹患程度、或有无改善或改善的程度, 或者为了筛选对肾癌的预防、改善或治疗有用的候选物质, 可以直接或间接使用的物质。

[0047] 本说明书中, 作为检测或诊断对象的“生物试样”, 是指由生物体采集的试样, 所述

试样含有或被怀疑含有随着肾癌的发生表达量增加或减少的靶多肽。

[0048] 在本说明书中，“特异性结合”是指抗体或其片段只与本发明中作为肾癌标记物的靶多肽、其变异体或其片段形成抗原-抗体复合物，而与其他肽性或多肽性物质实质上不形成该复合体。此处，“实质上”是指虽然程度小，但能引起非特异性复合物的形成。

[0049] 在本说明书中，“表位”是指在本发明的靶多肽、其变异体或其片段中，具有抗原性或免疫原性的部分氨基酸领域（即，抗原决定簇）。表位通常由至少 5 个氨基酸、优选至少 7 个氨基酸或至少 8 个氨基酸、更优选至少 10 个氨基酸构成。

[0050] 本发明中的肾癌标记物，能出现在肾癌患者的血液等生物试样中但在健康人中几乎或完全没有，或者相反地只出现在健康人的生物试样中但在肾癌患者中几乎或完全没有，因此具有下述特别的作用效果，即，只需以该标记物的存在或量为指标，例如利用血液即可容易地检测肾癌。

### 附图说明

[0051] [图 1] 表示本发明中序列号 8 表示的多肽的 MS 峰强度。

[0052] [图 2] 表示本发明中序列号 9 ~ 12 表示的多肽的 MS 峰强度。

[0053] [图 3] 表示本发明中序列号 13 ~ 16 表示的多肽的 MS 峰强度。

[0054] [图 4] 表示 4 名肾癌患者在切除手术前后血浆中的 ARHGAP25 肽的浓度。

### 具体实施方式

[0055] 以下更加具体地说明本发明。

[0056] < 肾癌标记物 >

[0057] 使用本发明的用于肾癌诊断或检测的组合物，用于体外检测肾癌的肾癌标记物为序列号 1 ~ 7 表示的多肽或其片段。

[0058] 将本发明的序列号 1 ~ 7 的多肽、其基因名（GenBank 登录名）及蛋白质序号（Swissprot 登录序号）及其特性一同表示在下述表 1 中。上述多肽中，序列号 1 表示的多肽能够在肾癌患者血浆中特异性地被检测到，在健康者的血浆中检测不出或与肾癌患者血浆相比检测量显著地减少。另外，序列号 2 ~ 7 表示的多肽能够在健康者血浆中特异地被检测到，在肾癌患者的血浆中检测不出或与健康人血浆相比检测量显著地减少。需要说明的是，所述多肽及 / 或基因（cDNA）的氨基酸序列或核苷酸（或者碱基）序列，通过访问 NCBI、GenBank、Swissprot 等数据库可以得到。

[0059] [表 1]

[0060]

序列号	基因名	蛋白质序号	特性
1	ARHGAP25	P42331	Rho GTPase - activating protein 25
2	ZYX	Q15942	Zyxin (Zyxin - 2)
3	VASP	P50552	Vasodilator - stimulated phosphoprotein (VASP)
4	RBP4	P02753	Plasma retinol - binding protein
5	SERP INF2	P08697	Alpha - 2 - antiplasmin
6	ARHGDIB	P52566	Rho GDP - dissociation inhibitor 2 (Rho GDI 2) (Rho - GDI beta) (Ly - GDI)
7	NUCB1	Q02818	Nucleobindin - 1

[0061] 另外,本发明的上述多肽片段,含有该多肽的氨基酸序列的至少7个、至少8个、至少10个、至少15个,优选至少20个、至少25个、更优选至少30个、至少40个、至少50个、至少100个、至少200个的连续氨基酸残基,持有一个或多个表位。所述片段能够免疫特异性地与本发明的抗体或其片段结合。假设所述多肽存在于例如血液中时,在存在于血液中的蛋白酶或肽酶等酶的作用下被切断而形成片段,以片段形式存在。

[0062] 另外,如下述实施例1所示,在本发明中序列号8表示的多肽与健康者相比在肾癌患者的生物试样中以特别高的水平被检测出。另外,相反地,序列号9~16表示的多肽与肾癌患者相比在健康者的生物试样中以特别高的水平被检测出。上述多肽为序列号1、2、5~7表示的多肽的片段,因此,上述序列号8~16表示的多肽以及内部具有该多肽的片段,较优选用作肾癌标记物。下述表2中,一并给出了序列号8~16的多肽相当于序列号1、2、5~7表示的多肽的哪个部分。

[0063] 另外,序列号14、15的氨基酸序列在序列号6的氨基酸序列中连续地出现。因此,将序列号14、15的氨基酸序列连结的序列、即从序列号6的第5个丙氨酸到第30个赖氨酸为止的序列表示的多肽,以及内部具有该多肽的片段,也较优选用作肾癌标记物。

[0064] [表2]

[0065]

序列号	序列号1~7表示的多肽中的部位
8	从序列号1的第1个蛋氨酸至第15个精氨酸
9	从序列号2的第36个缬氨酸至第54个精氨酸
10	从序列号2的第185个丝氨酸至第201个赖氨酸
11	从序列号2的第254个甘氨酸至第265个赖氨酸
12	从序列号2的第344个丝氨酸至第354个赖氨酸
13	从序列号5的第476个亮氨酸至第491个赖氨酸
14	从序列号6的第5个丙氨酸至第21个赖氨酸

15	从序列号 6 的第 22 个亮氨酸至第 30 个赖氨酸
16	从序列号 7 的第 452 个亮氨酸至第 461 个亮氨酸

[0066] 本发明中,用于肾癌检测的上述靶多肽均被赋予下述特征:在肾癌患者中,血液等生物试样中的该多肽水平,与健康人相比在罹患肾癌的受试者中显著地或特别地高或低。

[0067] 本发明中的多肽,可以根据例如作为本领域中常规技术的固相合成等化学合成法或 DNA 重组技术制备。从流程或纯化简便方面考虑,优选使用 DNA 重组技术。

[0068] 首先,使用 DNA 自动合成装置化学合成编码本发明多肽的部分序列的多核苷酸序列。该合成一般使用亚磷酸胺法,利用该方法能够自动合成至多约 100 个碱基的单链 DNA。DNA 自动合成装置可以从例如 Polygen 公司和 ABI 公司等购买。

[0069] 使用所得的多核苷酸作为探针或引物,根据公知的 cDNA 克隆法制备 cDNA 克隆,具体而言可以从表达作为靶标的上述基因的肾组织等生物组织中提取总 RNA,将该总 RNA 用寡聚 dT 纤维素柱处理得到聚 A(+)RNA,通过 RT-PCR 法由该聚 A(+)RNA 制备 cDNA 文库,通过杂交筛选、表达筛选、抗体筛选等进行筛选,从该 cDNA 文库得到目标 cDNA 克隆。可以根据需要,利用 PCR 法扩增 cDNA 克隆。由此能够得到与目标基因对应的 cDNA。

[0070] 可以基于序列号 1~7 表示的多肽序列从 15~100 个连续碱基序列中选择并合成探针或引物。另外,例如在 Sambrook, J. 及 Russel, D. 著, *Molecular Cloning, A LABORATORY MANUAL*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001 年 1 月 15 日发行的第 1 卷 7.42~7.45, 第 2 卷 8.9~8.17 中记载了 cDNA 克隆技术。

[0071] 然后,将如上所述得到的 cDNA 克隆整合到表达载体中,通过培养由该载体转化或转染的原核或真核宿主细胞,从该细胞或培养上清液中得到目标多肽。此时,在编码目标成熟多肽的 DNA 的 5' 末端,侧翼分布编码分泌信号序列的核苷酸序列,由此能够向细胞外分泌成熟多肽。

[0072] 载体以及表达系统可以从 Novagen 公司、宝酒造、第一化学药品、Qiagen 公司、Stratagene 公司、Promega 公司、Roche Diagnostics 公司、Invitrogen 公司、Genetics Institute 公司、Amersham Bioscience 公司等获得。作为宿主细胞,能够使用细菌等原核细胞(例如大肠杆菌、枯草杆菌)、酵母(例如酿酒酵母)、昆虫细胞(例如 Sf 细胞)、哺乳动物细胞(例如 COS、CHO、BHK、NIH3T3 等)等。载体中除含有编码该多肽的 DNA 外,还可以含有调节元件,例如启动子(例如 lac 启动子、trp 启动子、P<sub>L</sub> 启动子、P<sub>R</sub> 启动子、SV40 病毒启动子、3-磷酸甘油酸激酶启动子、糖酵解酶启动子等)、增强子、多腺苷酸化信号、核糖体结合部位、复制起点、终止子、选择标记物(例如氨苄青霉素耐药基因、四环素耐药基因等的药剂耐药基因;LEU2、URA3 等营养缺陷型标记物等)等。

[0073] 另外,为了容易进行多肽的纯化,可以在多肽的 C 末端或 N 末端结合了标记肽的融合多肽的形式生成表达产物。代表的标记肽中,可以举出 6~10 个残基的组氨酸重复序列(His 标签)、FLAG、myc 肽、GST 多肽、GFP 多肽等,但标记肽不限于于此。

[0074] 在不结合标记肽的状态下生产本发明的多肽时,可以利用其物理或化学性质,根据本领域技术人员公知的方法纯化、分离该多肽。作为所述纯化方法,例如可以举出离子交换色谱法、凝胶过滤色谱法、正相色谱法、反相色谱法、疏水作用色谱法、等电点色谱法、高效液相色谱法(HPLC)、电泳、硫酸铵分级分离、盐析、盐溶、超滤、透析等方法中的一个或多



个方法的组合。另一方面,在该多肽上结合组氨酸重复序列、FLAG、myc、GST、GFP 之类的标记肽时,可以举出适合通常使用的各种标记肽的亲亲和色谱法。此时,可以构建易于分离、纯化的表达载体。特别是构建能以多肽和标记肽的融合多肽的形式进行表达的表达载体,利用基因工程技术制备该多肽时,也可容易地进行分离及纯化。

[0075] 本发明中所述多肽中还包含其变异体。所谓“变异体”,是在序列号 1~7 表示的氨基酸序列或其部分序列中,缺失、置换、添加或者插入 1 个以上、优选 1 个或数个氨基酸的变异体,或者与该氨基酸序列或其部分序列具有约 80%以上、约 85%以上、优选约 90%以上、更优选约 95%以上、约 97%以上、约 98%以上、约 99%以上的同源性百分比的变异体。上述变异体中例如包括不同于人的哺乳动物种的同源物、以同种哺乳动物(例如人种)间的多态性变异为基础的变异体等天然变异体。

[0076] 此处,“数个”是指 10、9、8、7、6、5、4、3 或 2 的整数。

[0077] 另外,“同源性百分比”可以通过采用例如 BLAST 或 FASTA 等蛋白质或核酸的同源检索系统,导入空位或不导入空位而进行确定(Karlin, S. 等,1993 年,Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A., 第 90 卷, p. 5873-5877;Altschul, S.F. 等,1990 年,Journal of Molecular Biology, 第 215 卷, P. 403-410;Pearson, W.R. 等,1988 年,Proceedings of the National Academic Sciences U.S.A., 第 85 卷, p. 2444-2448;高木利久·金久实编,基因组网络的数据库使用方法(第 2 版)1998 年,共立出版社,东京,日本)。

[0078] <用于肾癌诊断或检测的组合物>

[0079] 本发明提供一种用于肾癌的诊断或检测的组合物,含有与序列号 1~7 表示的多肽或其片段特异性结合的抗体或其片段或所述抗体或其片段的化学修饰衍生物中的一个或多个。

[0080] 另外,较优选本发明中用于肾癌诊断或检测的组合物含有可与下述多肽片段特异性结合的抗体或其片段或所述抗体或其片段的化学修饰衍生物中的一个或多个,所述多肽片段为序列号 1~7 表示的多肽的片段且分别含有序列号 8~16 中的任一个表示的氨基酸序列。

[0081] 识别作为肾癌标记物的多肽的抗体,能够通过抗体的抗原结合部位与该多肽特异性结合。本发明可以使用的抗体可以如下制备:使用含有序列号 1~7 的氨基酸序列的多肽或其片段或其融合多肽作为一个或多个免疫原,采用惯用的技术进行制备。作为免疫原使用的所述多肽、片段、变异体或融合多肽,在序列号 1~7 表示的各多肽的氨基酸序列中,含有至少 7 个、至少 8 个、至少 10 个、至少 15 个、优选至少 20 个、至少 25 个、至少 30 个、至少 40 个、至少 50 个、至少 100 个、至少 200 个的连续氨基酸残基,或含有序列号 1~7 表示的各多肽全长。另外,更优选为分别含有序列号 8~16 中任一个表示的氨基酸序列的多肽片段。

[0082] 上述多肽、或其片段、变异体或融合多肽,含有促使抗体形成的表位,该表位可以为直链的表位,或者也可以为不连续的表位(高级结构)。需要说明的是,该表位可以通过该技术领域已知的所有表位解析法,例如噬菌体展示(Phage display)法、反向免疫遗传学技术等鉴定。

[0083] 作为本发明的抗体,可以举出抗血清、多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗

体、人源化抗体、人类抗体等,但不限于此。

[0084] 本发明中可以使用的抗体还包含任何类型、纲、亚纲。上述抗体中,包含例如 IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、IgY、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2 等。

[0085] 另外,通过本发明的多肽可以诱导所有形式的抗体。如果分离该多肽的全部或一部分或表位,那么多克隆抗体及单克隆抗体均可采用常规技术制备。例如包括如下方法: Kennet 等(主编), *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, New York, 1980 中列举的方法。

[0086] 多克隆抗体可以通过用本发明的多肽免疫禽类(例如鸡等)、哺乳动物(例如家兔、山羊、马、绵羊、小鼠等)等动物进行制备。可以适当组合硫酸铵分级分离、离子交换色谱法、亲和色谱等方法,从被免疫动物的血液中纯化目标抗体。

[0087] 单克隆抗体可以通过包括利用常规技术在小鼠中生产杂交瘤细胞株的方法得到,所述杂交瘤细胞株产生对各多肽特异的单克隆抗体。用于生产上述杂交瘤细胞株的一种方法如下所述:用本发明的多肽免疫动物,从被免疫的动物中采集脾细胞,将该脾细胞与骨髓瘤细胞株融合,由此制备杂交瘤细胞,然后鉴定生产与该多肽结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。单克隆抗体可以通过常规技术回收。

[0088] 以下详细地说明单克隆及多克隆抗体的制备。

[0089] A. 单克隆抗体的制备

[0090] (1) 免疫及抗体产生细胞的采集

[0091] 对哺乳动物例如大鼠、小鼠(例如近交系小鼠 Balb/c)、兔子等给予按上述方法得到的免疫原。免疫原 1 次的给药量可以根据免疫动物的种类、给药途径等适当确定,每 1 只动物给药约 50 ~ 200  $\mu$ g。主要通过皮下、腹腔内注射免疫原进行免疫。另外,免疫的间隔没有特殊的限定,初次免疫后,间隔数日至数周,优选间隔 1 ~ 4 周,进行 2 ~ 10 次,优选 3 ~ 4 次加强免疫。初次免疫后,利用 ELISA (Enzyme-linked ImmunoSorbent Assay) 法等反复测定免疫动物血清中的抗体值,当抗体值达到平台时,向静脉内或腹腔内注射免疫原,进行最终免疫。然后,从最终免疫日起 2 ~ 5 日后,优选 3 日后,采集抗体产生细胞。作为抗体产生细胞,可以举出脾细胞、淋巴结细胞、外周血细胞等,优选脾细胞或局部淋巴结细胞。

[0092] (2) 细胞融合

[0093] 制备产生对各蛋白质特异的单克隆抗体的杂交瘤细胞株,该杂交瘤可以通过常规技术生产并鉴定。用于生产该杂交瘤细胞株的方法之一是用本发明的多肽免疫动物,从被免疫的动物中采集脾细胞,使脾细胞与骨髓瘤细胞株融合,由此生成杂交瘤细胞,鉴定产生与该酶结合的单克隆抗体的杂交瘤细胞株。作为能与抗体产生细胞融合的骨髓瘤细胞株,可以使用通常能购买到的小鼠等动物的细胞株。作为使用的细胞株,优选具有下述性质的细胞株,即具有药剂选择性,并具有在未融合状态下在 HAT 选择培养基(含有次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶)中不能存活,只有在与抗体产生细胞融合的状态下才能存活的性质。另外,细胞株优选来自与免疫动物同种系的动物的细胞。作为骨髓瘤细胞株的具体例,可以举出来自于 BALB/c 小鼠的次黄嘌呤·鸟嘌呤·磷酸核糖基·转移酶(HGPRT)缺陷细胞株的 P3X63-Ag. 8 株(ATCC TIB9)等。

[0094] 接着,使上述骨髓瘤细胞株与抗体产生细胞进行细胞融合。细胞融合如下进行:在不含血清的 DMEM、RPMI-1640 培养基等动物细胞培养用培养基中,以约 1 : 1 ~ 20 : 1 的

比例混合抗体生成细胞与骨髓瘤细胞株,在细胞融合促进剂的存在下进行融合反应。作为细胞融合促进剂,可以使用浓度约为 10 ~ 80%、平均分子量 1500 ~ 4000 道尔顿的聚乙二醇等。另外,视情况的不同,为了提高融合效率,可以同时使用二甲基亚砷等辅助剂。还可以使用利用电刺激(例如电穿孔)的市售的细胞融合装置使抗体产生细胞与骨髓瘤细胞株融合。

### [0095] (3) 杂交瘤的筛选及克隆

[0096] 从细胞融合处理后的细胞中筛选目标杂交瘤。作为筛选方法,使用例如含有胎牛血清的 RPMI-1640 培养基等适当稀释细胞悬浮液后,以约 200 万个细胞 / 孔接种到微孔板上,向各孔中加入选择培养基,并在以后适当更换选择培养基,进行培养。培养温度为 20 ~ 40°C,优选为约 37°C。骨髓瘤细胞是 HGPRT 缺陷株或胸腺嘧啶激酶缺陷株时,可以通过使用含有次黄嘌呤·氨基蝶呤·胸腺嘧啶核苷的选择培养基(HAT 培养基),仅选择性培养、增殖具有抗体产生能力的细胞与骨髓瘤细胞株的杂交瘤。结果在用选择培养基开始培养开始后,生长约 14 天左右的细胞可以作为杂交瘤被得到。

[0097] 接着,对进行了增殖的杂交瘤的培养上清液中是否存在目标抗体进行筛选。杂交瘤的筛选可以按照常规的方法,没有特别限定。例如,采集作为杂交瘤培养的包含在孔中的培养上清液的一部分,通过酶免疫测定法(EIA:Enzyme Immuno Assay、及 ELISA)、放射性免疫测定法(RIA:Radio Immuno Assay)等进行筛选。融合细胞的克隆通过极限稀释法进行,从而最终确立产生单克隆抗体的细胞即杂交瘤。杂交瘤在 RPMI-1640、DMEM 等基本培养基中的培养稳定,并能产生、分泌与本发明的多肽性癌标记物特异性反应的单克隆抗体。

### [0098] (4) 抗体的回收

[0099] 单克隆抗体可以利用常规技术进行回收。即,作为从确立的杂交瘤中采集单克隆抗体的方法,可以采用通常的细胞培养法或腹水形成法等。采用细胞培养法时,在通常的培养条件(例如 37°C、5% CO<sub>2</sub> 浓度)下,在含有 10% 胎牛血清的 RPMI-1640 培养基、MEM 培养基或无血清培养基等动物细胞培养基中培养杂交瘤 2 ~ 10 日,从该培养上清液中获得抗体。采用腹水形成法的情况下,向与提供骨髓瘤细胞的哺乳动物同种系的动物的腹腔内给予约 1000 万个杂交瘤,使杂交瘤大量地增殖。并在 1 ~ 2 周后采集腹水或血清。

[0100] 对于上述抗体的采集方法,在需要纯化抗体的情况下,可以通过适当选择硫酸铵盐析法、离子交换色谱法、亲和色谱法、凝胶过滤色谱等公知的方法,或组合使用上述方法,得到纯化的本发明的单克隆抗体。

### [0101] B. 多克隆抗体的制备

[0102] 制备多克隆抗体时,与上述相同地免疫动物,从最终的免疫日起 6 ~ 60 天后,利用酶免疫测定法(EIA 及 ELISA)、放射性免疫测定法(RIA)等测定抗体值,在显示最大抗体值当天采血,得到抗血清。然后,利用 ELISA 法等测定抗血清中的多克隆抗体的反应性。

[0103] 另外,本发明中,也可以使用上述抗体的抗原结合片段。利用常规技术可以产生的抗原结合片段的例子包含 Fab 及 Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、scFv、dsFv 等的片段,但不限于于此。也包含利用基因工程技术产生的抗体片段及衍生物。该抗体中,包含例如合成抗体、重组抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、单链抗体等。

[0104] 本发明的抗体在体外及体内均可以用于测定本发明中用于检测多肽或其(多)肽片段的的存在。为了能够在测定中特异性地检测出,优选使用单克隆抗体,但即使是多克隆抗

体,也可以通过所谓的吸收法得到特异性抗体,所述吸收法包括将抗体结合在结合有纯化多肽的亲合色谱柱上。

[0105] 因此,本发明的组合物至少含有一种可与序列号 1~7 的多肽、其变异体或其片段特异性结合的抗体或其片段,优选含有多种、更优选含有全部种类的上述抗体或其片段。另外,更理想的情况为:本发明的组合物至少含有一种可与下述多肽片段特异性结合的抗体或其片段,所述多肽片段为序列号 1~7 表示的多肽的片段、分别含有序列号 8~16 中的任一个表示的氨基酸序列,优选含有多种、更优选含有全部种类的上述抗体或其片段。

[0106] 本发明的组合物中,上述与各多肽特异性结合的抗体或其片段,可以分别单独地、或适当混合以混合物的形式装入单独容器(例如安瓿)中进行包装。抗体或其片段可以与固相载体结合或者也可以以游离的形式存在,与固相载体结合时可以将抗体或其片段附着或结合在固相载体上,所述固相载体例如为由聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚乙烯基甲苯、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、尼龙、聚甲基丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚四氟乙烯、聚偏 1,1-二氟乙烯、乳胶、琼脂糖、纤维素、琼脂糖凝胶、玻璃、金属、陶瓷、磁性体等材料形成的多孔板、微珠、试管、棒、试验片等形状。以游离形式存在时,为冻干固体等固体或溶液等液体。

[0107] 根据需要也可以将标记物例如荧光团、酶、放射性同位素等结合在本发明使用的抗体或其片段上,或者也可以将所述标记物结合在二抗上。

[0108] 荧光团包括例如荧光素及其衍生物、罗丹明及其衍生物、单磺酰氯及其衍生物、伞形酮。

[0109] 酶包括例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖氧化酶、乳酸脱氢酶、淀粉酶等。

[0110] 放射性同位素包括例如碘( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、磷( $^{32}\text{P}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、金属类(例如 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、 $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{99}\text{Tc}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ 等)、氟等。

[0111] 其它的标记物包括例如 NADH-、FMNH<sub>2</sub>-、吖啶鎓酯、氨基苯二酰肼等发光材料,荧光素酶、荧光素等生物发光物质等。

[0112] 另外,根据需要可以利用抗生物素-生物素系统或链霉抗生物素-生物素系统,此时,例如生物素也可以与本发明的抗体或其片段结合。

[0113] 本发明的组合物也可以采取试剂盒的形式。用于检测肾癌标记物的上述抗体类可以单独包装,或者适当混合,装入单个的容器(例如安瓿等)中进行包装。并且,如上所述上述抗体可以与固相载体结合或者也可以以游离的形式存在。本发明的试剂盒可以含有标记二抗、载体、洗涤缓冲液、试样稀释液、酶底物、反应停止液、作为纯化的标准物质的标记物多肽、使用说明书等。

[0114] <肾癌的检测>

[0115] 依据本发明,通过下述方法检测肾癌,所述方法包括针对来自受试者的生物试样中的序列号 1~7 表示的多肽或其片段,优选针对其中的一种或多种,使用与上述肾癌标记物可结合的物质,测量所述多肽或其片段的量或检测所述多肽或其片段是否存在。依据本发明的方法,为下述情况时能够诊断受试者已罹患肾癌:受试者生物试样中检测出序列号 1 表示的多肽、其变异体或其片段,或判定所述多肽、其变异体或其片段的表达量显著高于对照的情况;或者未检测出序列号 2~7 表示的多肽、其变异体或其片段,或判定所述多肽、其变异体或其片段的表达量显著低于对照的情况。

[0116] 另外,较优选通过下述方法检测肾癌,所述方法包括测定下述多肽片段中的任一个或多个的量或检测其是否存在,所述多肽片段为序列号 1~7 表示的多肽的片段、分别含有序列号 8~16 中的任一个表示的氨基酸序列。依据本发明的方法,为下述情况时能够诊断受试者已罹患肾癌:在受试者生物试样中检测出含有序列号 8 表示的氨基酸序列的多肽片段,或判定所述多肽、其变异体或其片段的表达量显著高于对照的情况;或者未检测出含有序列号 9~16 表示的氨基酸序列的多肽片段,或判定所述多肽、其变异体或其片段的表达量显著低于对照的情况。

[0117] 本发明的方法中,上述肾癌标记物的检测可以针对单一标记物,但优选针对多个标记物,例如采用 2 个以上、3 个以上、4 个以上或 5 个以上至 14、15 或 16 个以下的标记物进行。这是因此,针对多个标记物进行检测能够避免检测到预料之外的非特异性复合体,换言之即能够避免误诊。另外,本发明中的肾癌标记物也可以与本领域技术人员已知的其他癌的诊断标记物组合使用。

[0118] 本发明的组合物用于肾癌的诊断、判定或检测,即针对诊断是否罹患或罹患的程度是有用的。在肾癌的诊断中与正常组织(或细胞)、非癌组织(或细胞)、正常体液等对照进行比较,检测受试者生物试样中的上述肾癌标记物的存在或量,如果其存在或量的差别显著,则怀疑受试者罹患肾癌。

[0119] 作为本发明方法中采用的检体试样,例如为肾组织、其周边组织、肾细胞、或体液例如血液、血清、血浆、肾液、尿等。受试者的生物组织可以通过活体解剖等采集,或者采用手术得到。

[0120] 本发明中受试者为包括人在内的哺乳动物,优选人。

[0121] 与上述肾癌标记物可结合的物质,例如包括上述抗体或其片段、适配体、Affibody(Affibody 公司商标)、各肾癌标记物的受体、各肾癌标记物的特异作用抑制物质,各肾癌标记物的特异作用活化物质等,优选抗体或其片段、或所述抗体或其片段的化学修饰衍生物。

[0122] 在本发明的实施方案中,测定可以包括下述步骤:使根据需要用常用的酶或荧光团进行了标记的抗体或片段,与组织切片或经匀浆的组织或体液接触的工序;定性或定量地测定抗原-抗体复合物的工序。检测可以根据下述方法进行:例如采用免疫电镜测定靶多肽的存在及水平的方法;通过酶抗体法(例如 ELISA)、荧光抗体法、放射性免疫测定法、均质法、非均质法、固相法、夹心法等常用方法测定靶多肽的存在或水平的方法等。此外,在本发明中为了更容易地检测本发明的抗体与试样中的靶多肽的反应,可以通过标记本发明的抗体直接检测该反应,或通过采用标记二抗间接地检测。对于本发明的检测方法,考虑到灵敏度,优选利用后者即间接地检测。

[0123] 根据上述肾癌标记物的种类为下述情况时可以确定为肾癌:在从受试者得到的体液或肾癌组织或细胞中,优选在血液中,靶多肽存在或消失的情况,或者与对照比较靶多肽的水平显著地增大或减小的情况。此处,所谓“显著地”表示统计学中有显著性差异,这种情况下显著性水平低于 0.05。

[0124] 作为替代免疫学方法的测定方法,包括采用质谱法的方法。具体而言可以采用实施例记载的方法进行。即,将生物试样例如血清或血浆用过滤器过滤除去杂质,用缓冲液(例如 pH 约 8)稀释,调节浓度在约 10mg/ml~约 15mg/ml 范围内,之后使其通过可除去分

子量 5 万以上的蛋白质的中空纤维过滤器（下述参考例（1））或离心平膜过滤器，进行分子量截留，级分用蛋白酶（例如胰蛋白酶）处理进行肽化，产物通过质谱（利用基质辅助激光解吸电离法或电喷雾法的类型），基于来自目标多肽的特定峰值的质荷比和强度，可以测定肾癌切除手术前的患者与健康人之间样品中多肽的存在量的差异。

## 实施例

[0125] 通过以下实施例更具体地说明本发明。但是，本发明的范围并不限于这些实施例。

[0126] < 参考例 >

[0127] (1) 中空纤维过滤器的制备

[0128] 将 100 根膜表面存在截留分子量约 5 万的孔径的聚砜中空纤维扎成一束，为了不阻塞中空纤维的中空部分，用环氧类灌封剂将两末端固定在玻璃管上，制成微型模块。该微型模块（模块 A）用于除去血清或血浆中的高分子量蛋白质，其直径约为 7mm，长约 17cm。同样地，用截留分子量约 3 千的孔径的膜，制作用于浓缩低分子量蛋白质的微型模块（模块 B）。在微型模块的一端有连接中空纤维内腔的入口，相对侧的一端为出口。中空纤维的入口与出口是由硅胶管形成的封闭循环系统流路，液体被 Peristar 泵驱动在所述流路内循环。另外，中空纤维外侧所套的玻璃管具备将从中空纤维漏出的液体排出的端口，构成了一个模块装置。采用“T”型连接器将模块连接到流路中，3 个模块 A 与 1 个模块 B 串联连接作为一个中空纤维过滤器。用蒸馏水清洗所述中空纤维过滤器清洗，填充 PBS（含有 0.15mM NaCl 的磷酸缓冲液，pH7.4）水溶液。级分原料的血清或血浆从该中空纤维过滤器的流路入口注入，分离及浓缩后从流路出口排出。注入该中空纤维过滤器的血清或血浆在每个模块 A 中经过分子量约 5 万的分子筛，分子量低于 5 万的低分子量成分被模块 B 浓缩，进行制备。

[0129] < 实施例 1 >

[0130] (1) 健康人及肾癌患者血浆的蛋白质鉴定

[0131] 在切除手术前及切除手术一个月后由 7 名 50 ~ 70 岁的肾癌患者获得 EDTA 血浆，同时由年龄相似的 8 名健康人得到 EDTA 血浆，对各血浆进行测定。用孔径为 0.22  $\mu\text{m}$  的过滤器过滤血浆，除去杂质物质，进行调整，使蛋白质浓度为 50mg/mL。进一步将该血浆注入到 25mM 碳酸氢铵溶液（pH8.0）中进行稀释，使浓度为 12.5mg/mL，用参考例（1）中所示的中空纤维过滤器根据分子量进行分离。分离后的血浆样品（总量 1.8mL，含有最多 250  $\mu\text{g}$  的蛋白质）用 ProteomeLab（注册商标）PF2DSystem（Beckman Coulter 公司）反相色谱分离成 7 种级分，各级分冻干后，再溶解于 100  $\mu\text{L}$  的 25mM 碳酸氢铵溶液中（pH8.0）。将该样品用总蛋白质 1/50 量的胰蛋白酶在 37°C 下消化 2 ~ 3 小时，进行肽化。再利用离子交换柱（KYA 技术，日本）将各分离的肽分离成 4 种级分。所述各级分用反相色谱柱（KYA 技术，日本）进一步分离，用在线连接的质谱 Q-TOF Ultima（Micromass 公司）通过分析扫描模式对洗脱的肽进行测定。

[0132] 本领域中通常在测定时使用标准物质对质荷比进行校正。而在本发明的解析中，除进行上述校正之外，还进行再校正，即将通常作为血液蛋白质肯定被检测的白蛋白、 $\alpha$ -血纤蛋白原等几个蛋白质作为内标，使用这些蛋白质的理论质量值，对测量数据进行再校正，由此实现数据的更精密化。对如上所述进行了精密化的数据，用蛋白质分析软件

MASCOT(Matrix Science 公司,英国)分析数据。作为鉴定血液蛋白质的标准使用下述标准,在尽可能排除错误蛋白质鉴定的条件下进行解析,所述标准为:(i)在属于上述蛋白质的肽中,以Mowse分数在34分以上的高可靠性检测到至少一根肽;(ii)肽的MS数据的测定值及MS/MS数据的测定值,与肽的理论值之间的误差小于0.03道尔顿。

[0133] (2)在肾癌患者的癌切除手术前的血浆中,与健康人的血浆中相比被检测到的人数增加或减少的蛋白质

[0134] 在健康人与癌患者之间比较此数据,在鉴定的蛋白质中,在3名以上肾癌患者的癌切除手术前的血浆中被检测到而在健康人的血浆中完全未检出的蛋白质,作为与健康人相比其在肾癌切除手术前患者的血浆中的表达显著增强的蛋白质被发现。上述蛋白质为下表3所示的序列号1表示的多肽。另外,在被鉴定的蛋白质中,在健康人血浆中被检测到的人数与在手术前肾癌患者血浆中被检测到的人数相比多3人以上的蛋白质,作为与健康人相比其在肾癌切除前患者的血浆中的表达量显著减少的蛋白质被发现。上述蛋白质为下面表3所示的序列号2~7表示的多肽。因此,表明上述序列号1~7表示的多肽作为肾癌标记物在肾癌检测中是有用的。

[0135] [表3]

[0136]

序列号	基因名	各组的检测人数	
		健康人	肾癌切除手术前的病人
1	ARHGAP25	0	4
2	ZYX	7	1
3	VASP	6	1
4	RBP4	5	0
5	SERPINF2	5	0
6	ARHGDIB	5	1
7	NUCB1	3	0

[0137] (3)在肾癌患者的癌切除手术前的血浆中,与健康人的血浆中相比MS峰强度增加或减少的蛋白质

[0138] 进而,对属于上述(2)中被鉴定蛋白质的肽,解析其检测时的MS峰强度。该MS峰强度不是严格地定量的指标,而是以某种程度反映蛋白质的存在量的数值,用MS峰强度能够定量地比较分析,这是本领域技术人员所公知的。在健康人与癌患者之间,比较各肽检出时的MS峰强度,在被检测到的肽中,发现下述肽在患者肾癌切除手术前的血浆中其存在量显著增加,所述肽在肾癌患者的癌切除手术前血浆中的峰强度与健康人的相比显著增大、且肾癌患者的癌切除手术前血浆中的峰强度与癌切除手术一个月后血浆中峰强度相比较。上述肽为序列号8表示的多肽,序列号1表示的多肽的片段。另外,同样地在被检测的肽中,发现下述肽与健康人相比在肾癌切除手术前的患者的血浆中其存在量显著减少,所述肽在肾癌患者的癌切除前血浆中的峰强度与健康人相比显著地减小、且肾癌患者的癌切除手术前血浆中的峰强度与癌切除手术一个月后的血浆中的峰强度相比减小。上述肽为序列号9~16表示的多肽,所述肽为序列号2、5~7表示的多肽中任一个的片段。因此,可以判明上述序列号8~16表示的多肽及内部含有其片段,作为肾癌标记物在肾癌检测中是

有用的。表 4 给出了上述序列号 8 ~ 16 表示的多肽片段的各个基因名、其是序列号 1、2、5 ~ 7 表示的序列中的哪个部位的片段、肽链长度、氨基酸序列（单字母表示）。另外，将序列号 8 ~ 16 表示的多肽片段在健康人、肾癌患者（术前）、肾癌患者（术后）中的 MS 峰强度示于图 1 ~ 3。各序列的肾癌患者及健康人的 MS 峰强度上的数字表示每人的编号。

[0139] [表 4]

[0140]

序列号	原始序列	基因名	全长序列的相关部分	肽链长度 (残基数)	肽序列(单字母表示)
8	序列号 1	ARHGAP25	第 1 - 15 号	15	MSLGQSACLFLSIAR
9	序列号 2	ZYX	第 36 - 54 号	19	VNPFPRPGDSEPPPAPGAQR
10	序列号 2	ZYX	第 185 - 201 号	17	SSTKPAAGGTAPLPPWK
11	序列号 2	ZYX	第 254 - 265 号	12	GPPASSPAPAPK
12	序列号 2	ZYX	第 344 - 354 号	11	SPGAPGPLTLK
13	序列号 5	SERPINF2	第 476 - 491 号	16	LVPPMEEDYPQFGSPK
14	序列号 6	ARHGDIB	第 5 - 21 号	17	APEPHVEEDDDDELDSK
15	序列号 6	ARHGDIB	第 22 - 30 号	9	LNYPKPPQK
16	序列号 7	NUCB1	第 452 - 461 号	10	LPEVEVPQHL

[0141] < 实施例 2 >

[0142] (1) 人 ARHGAP25 的制备

[0143] 本发明中的肾癌标记物之一为序列号 1 表示的人 ARHGAP25 多肽。另外，如实施例 1(3) 及图 1 所示，在该人 ARHGAP25 多肽中，肾癌患者中更特征性地被检测到的部位为序列号 8 表示的人 ARHGAP25 多肽的从第 1 氨基酸至第 15 氨基酸为止的序列（以下称为 ARHGAP25 肽）。该 ARHGAP25 肽是委托 Takara Bio 公司（日本）通过化学合成得到的。另外，针对该 ARHGAP25 肽的家兔多克隆抗体的制备也同样委托 Takara Bio 公司得到。进而，作为用于取得 ARHGAP25 肽检测用小鼠单克隆抗体的免疫原，制备序列号 17 表示的多肽（以下称作 ARHGAP25(1-97)）作为来自大肠杆菌的重组蛋白质，所述序列号 17 表示的多肽由序列号 1 表示的氨基酸序列中含有序列号 8 表示的氨基酸序列的第 1 氨基酸至第 97 氨基酸的区域组成。ARHGAP25(1-97) 的制备过程如下所述。

[0144] 首先，由 HEK293 细胞制备人 ARHGAP25mRNA。使用 Qiashredder 及 RNeasy mini kit(Qiagen 公司制)，按照附带的操作说明进行详细操作，由此制备 mRNA。接着，用逆转录酶 SuperscriptII(invitrogen 公司制)，以所得的总 mRNA 为模板合成 cDNA，制备人 cDNA 文库。逆转录反应按照该酶的附带的操作说明进行。接着，以所得的 cDNA 文库作为模板，利用由序列号 18 及 19 表示的碱基序列构成的引物装置进行 PCR。序列号 18 表示的碱基序列含有 ARHGAP25 基因的一部分及其上游的 BamHI 识别序列。序列号 19 表示的碱基序列含有 ARHGAP25 基因的一部分及其下游的 EcoRI 识别序列。利用上述引物使用 PCR 法进行基因扩增时，得到编码 ARHGAP25(1-97) 的 DNA 序列作为扩增 DNA 片段。PCR 反应用 KOD(东洋纺公司制，日本)作为 DNA 聚合酶，按照 KOD 附带的操作说明进行制备，使其含有 cDNA 文库 10ng 和各引物 10pmol。反应条件为在 94℃ 的温度下加热一分钟后，在 94℃ 下保持 30 秒、在 55℃ 下保持 30 秒、在 72℃ 下保持 1 分钟，将上述循环重复 30 次后，最后在 72℃ 下保温 4 分钟。扩增的 DNA 片段利用 Quantum prepPCR Kleen Spin Columns(Bio-rad 公司制)纯化。通过此反应得到全长约 300bp 的 PCR 产物。



[0145] 将所得 DNA 片段用 BamHI 及 EcoRI 切断,同时采用 BAP 酶进行末端部的脱磷酸化处理,进而利用琼脂糖凝胶萃取法纯化。将所述 DNA 片段与事先用 BamHI 及 EcoRI 切断处理所得的组氨酸标记融合型表达载体 pET30b(Novagen 公司制)混合,进行连接反应。DNA 连接酶使用 Ligation High(东洋纺公司制,日本),反应按照附带的操作说明进行。接着,用连接反应后的溶液,进行感受态细胞的转化。感受态细胞用大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ (Takara Bio Inc. 公司制,日本)具体按照附带的操作说明进行。将转化处理后的菌体涂布在含有 100  $\mu$ g/mL 抗生素氨苄青霉素的 LB 平板上,在 37 $^{\circ}$ C 下培养一夜。所得转化体在含有 100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中在 37 $^{\circ}$ C 下培养一夜,通过小量制备(mini-prep)得到目标 pET30b\_ARHGAP25(1-97)。

[0146] 为了制备重组型 ARHGAP25(1-97),利用 pET30b\_ARHGAP25(1-97) 向大肠杆菌菌株 Rosetta-Gami2(Novagen 公司制)转化。所得的转化体用含有氨苄青霉素及氯霉素的 LB 培养基 3L 在 37 $^{\circ}$ C 下培养 3 小时,添加终浓度 1mM 的 IPTG 在 30 $^{\circ}$ C 下培养 18 小时,诱导目标组氨酸标记融合型重组 ARHGAP25(1-97) 表达后,用离心分离回收菌体。

[0147] 所得的菌体用 PBS 清洗后,用 B-PER(PIERCE 公司制)以沉淀的形成制备得到不溶性级分。具体按照附带的操作说明进行。接着将不溶性级分用含有 8M Urea 的 PBS 增殖后,用 Ni-NTA agarose resin(QIAGEN 公司制)吸附组氨酸标记融合型 ARHGAP25。将吸附了蛋白质的树脂用含有 10mM 咪唑的 PBS 清洗后,用 1M 咪唑溶液洗脱。接着从所得的洗脱级分中,进行蛋白质的重折叠。首先,在含有 6M 盐酸胍的 PBS-T 溶液中透析一夜后,在含有 0.4M 精氨酸、1mM DTT 的 PBS-T 溶液中透析一夜,对所得的重折叠溶液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,利用考马斯亮蓝染色确认 ARHGAP25(1-97) 的纯化。

[0148] (2) 针对人 ARHGAP25 肽的小鼠单克隆抗体的制备

[0149] 将上述(1)中所得的 100  $\mu$ L 的 2mg/mL 人 ARHGAP25(1-97) 溶液与 100  $\mu$ L 的 MPL+TDM Emulsion(Corixa 公司制)混合,将其全部腹腔给与 7 周龄的 BALB/c 小鼠。2 周后及 4 周后给予相同量的同样配制的 ARHGAP25(1-97) 溶液。5 周后从小鼠尾部静脉采血 100  $\mu$ L,静置一夜后,以 5000 $\times$ g 离心 5 分钟回收上清液作为部分血清。用该血清评价针对 ARHGAP25 肽的抗体值。

[0150] 对确认产生了针对 ARHGAP25 肽的抗体的小鼠,6 周后腹腔给与与上述同样配制的 ARHGAP25(1-97) 溶液,3 日后切除脾。切除的脾用注射器穿孔,注入 RPMI1640 培养基(GIBCO 公司制)挤压脾细胞,得到脾细胞液。所得脾细胞液在 1200rpm 下离心 7 分钟后除去上清液,用 RPMI1640 培养基清洗。在 RPMI1640 培养基中再次混悬,计算细胞数,配制脾细胞数 1/10 量的 SP2/0 骨髓瘤细胞液。将两细胞液混合,在 2200rpm 下离心 10 分钟,弃去上清液。使用穿刺术使细胞松散,添加将 PEG(ROCHE 公司制)和 HBSS(GIBCO 公司制)以 5 : 1 的比例混合的溶液 1mL 并搅拌。以后的操作中,除非另有说明使用的溶液和培养基均在 37 $^{\circ}$ C 下保温。

[0151] 向加入 PEG 与 HBSS 的细胞溶液中,经 5 分钟添加 9mL RPMI1640 培养基,慢慢地混合后,在 2200rpm 下离心 10 分钟,除去上清液。所得沉淀细胞在添加了 15% FCS 和 HAT(ROCHE 公司制)的 RPMI1640 培养基中混悬,按照每孔注入 200  $\mu$ L 将其注入 96 孔细胞培养板(Greiner 公司制)中,在 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 的条件下培养一周。

[0152] 在添加 HAT 条件下生长的菌落被确定为由脾细胞与骨髓瘤细胞融合的杂交瘤,并

且从中筛选产生针对 ARHGAP25 肽的抗体的杂交瘤。首先,向 96 孔肽吸附板 (Nunc 公司制) 的孔中加入  $1 \mu\text{g/mL}$  的 ARHGAP25 肽  $50 \mu\text{L}$ ,固相化一夜。弃去孔中的蛋白溶液后,注入  $200 \mu\text{L}$  稀释 4 倍的 BlockAce 溶液 (大日本住友制药公司制,日本),在室温下静置 1 小时。之后,用 PBS-T 清洗,作为 ARHGAP25 肽固相化板。将菌落生长的孔中的上清液稀释 5 倍,将其中的  $100 \mu\text{L}$  添加到上述 ARHGAP25 肽固相化板的孔中,室温静置 1 小时。之后,弃去孔中的溶液,用 PBS-T 清洗后,加入  $100 \mu\text{L}$  HRP 标记抗小鼠 IgG 溶液 (Dako 公司制),进一步在室温下静置 1 小时。弃去孔中的溶液,用 PBS-T 清洗后,加入  $100 \mu\text{L}$  TMB 溶液反应 15 分钟。在  $450\text{nm}$  吸光度下确认到反应生成的显色,将显色孔作为阳性。将阳性孔的菌群混悬在含有 15% FCS 和 HT (invitrogen 公司制) 的 RPMI 培养基中,利用极限稀释法进行阳性克隆的克隆。将克隆结果所得的 20 种杂交瘤在 SFM 培养基中驯化,产生抗体。在  $60\text{mL}$  的 100% SFM 培养基中以  $1 \times 10^5$  细胞 /mL 接种杂交瘤,培养 10 日直到细胞死亡后,将培养液在  $3000\text{rpm}$  下离心分离 15 分钟除去细胞。所得培养上清液用 Mab Trap Kit (GEHEALTHCARE BIOSCIENCE 公司制,日本) 对含有的抗体进行纯化。另外,对 20 种各抗体用生物素化试剂 Sulfb-NHS-Biotin (PIERCE 公司制) 进行抗体的生物素化。生物素化按照试剂附带的操作说明进行。

[0153] (3) 通过使用了所得抗体的夹心 ELISA 法检测肾癌患者血浆中的人 ARHGAP25 肽

[0154] 使用上述 (2) 中所得的纯化抗体及生物素标记的纯化抗体,利用夹心 ELISA 法进行关于检测系统构建的研究。将未进行生物素化的纯化抗体用作捕捉用抗体,将经生物素标记的纯化抗体用作检测用抗体,选定分别由捕捉用抗体、检测用抗体各一种组成的组合,所述捕捉用抗体、检测用抗体可以最高灵敏地检测人 ARHGAP25 肽。将上述捕捉用抗体配制成  $2 \mu\text{g/mL}$  的 PBS 溶液后,加入 96 孔蛋白质吸附板 (Nunc) 中每孔  $50 \mu\text{L}$ ,固相化一夜,第二天用含有 1% BSA 和 10% 蔗糖的 PBS-T 溶液在室温封闭 2 小时。接着,如实施例 1 及图 1 所示,将明显检测到 ARHGAP25 肽的肾癌切除手术前的患者血浆 4 个检体与各患者的术后血浆 4 个检体共 8 个检体的血浆,用 1% BSA-PBST 稀释 2 倍,向抗体固相化板的各孔中分别添加  $100 \mu\text{L}$  各样品,室温反应 2 小时。反应后,弃去孔内的样品溶液用 PBS-T 清洗,在用 1% BSA-PBST 稀释的  $50 \mu\text{L}$   $200\text{ng/mL}$  检测用抗体中室温反应 1 小时。清洗反应后的孔,将  $100 \mu\text{L}$  avidin-HRP 溶液 (R&D 公司制) 在室温反应 30 分钟。用 PBS 稀释 avidin-HRP。用 PBS-T 清洗后,加入  $100 \mu\text{L}$  TMB 溶液 (PIERCE 公司制) 反应 15 分钟后,添加  $100 \mu\text{L}$  1N 硫酸溶液使反应停止,测定  $450\text{nm}$  的吸光度。结果如图 4 表示,所有的肾癌患者中,切除手术前血浆中的 ARHGAP25 肽浓度与切除手术后的值相比显示了更高的值。另外,4 名肾癌患者中有 2 名的血浆中切除手术前的 ARHGAP25 肽浓度与手术后的浓度相比显著地增高。因此,可以判断实施例 1 中表示的 ARHGAP25 肽及含有它的 ARHGAP25 蛋白质作为判定是否罹患肾癌的标志物是有用的。

[0155] 产业上的可利用性

[0156] 本发明提供一种特异性及感受性优异的、用于肾癌的诊断或检测的组合物,因此,在医疗领域特别有用。

[0157] 本说明书包括作为本申请的优先权基础的日本专利申请 2008-008411 号的说明书及 / 或附图中公开的内容。另外,本说明书中引用的全部刊物、专利及专利申请都直接作为参考引入本发明书中。

[0001]

## 序列表

<110> 东丽株式会社  
 <120> 用于肾癌诊断或检测的组合物及方法  
 <130> PH-3815-PCT  
 <140> PCT/JP2009/05024  
 <141> 2009-01-16  
 <150> JP 2008-008411  
 <151> 2008-01-17  
 <160> 19  
 <170> PatentIn version 3.4  
 <210> 1  
 <211> 638  
 <212> PRT  
 <213> 人类  
 <400> 1  
 Met Ser Leu Gly Gln Ser Ala Cys Leu Phe Leu Ser Ile Ala Arg Ser  
 1 5 10 15  
 Arg Ser Val Met Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala Phe His Pro Ser Ser  
 20 25 30  
 Thr Pro Asn Pro Leu Glu Arg Pro Ile Lys Met Gly Trp Leu Lys Lys  
 35 40 45  
 Gln Arg Ser Ile Val Lys Asn Trp Gln Gln Arg Tyr Phe Val Leu Arg  
 50 55 60  
 Ala Gln Gln Leu Tyr Tyr Tyr Lys Asp Glu Glu Asp Thr Lys Pro Gln  
 65 70 75 80  
 Gly Cys Met Tyr Leu Pro Gly Cys Thr Ile Lys Glu Ile Ala Thr Asn  
 85 90 95  
 Pro Glu Glu Ala Gly Lys Phe Val Phe Glu Ile Ile Pro Ala Ser Trp  
 100 105 110  
 Asp Gln Asn Arg Met Gly Gln Asp Ser Tyr Val Leu Met Ala Ser Ser  
 115 120 125  
 Gln Ala Glu Met Glu Glu Trp Val Lys Phe Leu Arg Arg Val Ala Gly  
 130 135 140  
 Thr Pro Cys Gly Val Phe Gly Gln Arg Leu Asp Glu Thr Val Ala Tyr  
 145 150 155 160  
 Glu Gln Lys Phe Gly Pro His Leu Val Pro Ile Leu Val Glu Lys Cys  
 165 170 175  
 Ala Glu Phe Ile Leu Glu His Gly Arg Asn Glu Glu Gly Ile Phe Arg  
 180 185 190  
 Leu Pro Gly Gln Asp Asn Leu Val Lys Gln Leu Arg Asp Ala Phe Asp  
 195 200 205

[0002]

Ala Gly Glu Arg Pro Ser Phe Asp Arg Asp Thr Asp Val His Thr Val  
210 215 220

Ala Ser Leu Leu Lys Leu Tyr Leu Arg Asp Leu Pro Glu Pro Val Val  
225 230 235 240

Pro Trp Ser Gln Tyr Glu Gly Phe Leu Leu Cys Gly Gln Leu Thr Asn  
245 250 255

Ala Asp Glu Ala Lys Ala Gln Gln Glu Leu Met Lys Gln Leu Ser Ile  
260 265 270

Leu Pro Arg Asp Asn Tyr Ser Leu Leu Ser Tyr Ile Cys Arg Phe Leu  
275 280 285

His Glu Ile Gln Leu Asn Cys Ala Val Asn Lys Met Ser Val Asp Asn  
290 295 300

Leu Ala Thr Val Ile Gly Val Asn Leu Ile Arg Ser Lys Val Glu Asp  
305 310 315 320

Pro Ala Val Ile Met Arg Gly Thr Pro Gln Ile Gln Arg Val Met Thr  
325 330 335

Met Met Ile Arg Asp His Glu Val Leu Phe Pro Lys Ser Lys Asp Ile  
340 345 350

Pro Leu Ser Pro Pro Ala Gln Lys Asn Asp Pro Lys Lys Ala Pro Val  
355 360 365

Ala Arg Ser Ser Val Gly Trp Asp Ala Thr Glu Asp Leu Arg Ile Ser  
370 375 380

Arg Thr Asp Ser Phe Ser Ser Met Thr Ser Asp Ser Asp Thr Thr Ser  
385 390 395 400

Pro Thr Gly Gln Gln Pro Ser Asp Ala Phe Pro Glu Asp Ser Ser Lys  
405 410 415

Val Pro Arg Glu Lys Pro Gly Asp Trp Lys Met Gln Ser Arg Lys Arg  
420 425 430

Thr Gln Thr Leu Pro Asn Arg Lys Cys Phe Leu Thr Ser Ala Phe Gln  
435 440 445

Gly Ala Asn Ser Ser Lys Met Glu Ile Phe Lys Asn Glu Phe Trp Ser  
450 455 460

Pro Ser Ser Glu Ala Lys Ala Gly Glu Gly His Arg Arg Thr Met Ser  
465 470 475 480

Gln Asp Leu Arg Gln Leu Ser Asp Ser Gln Arg Thr Ser Thr Tyr Asp  
485 490 495

Asn Val Pro Ser Leu Pro Gly Ser Pro Gly Glu Glu Ala Ser Ala Leu  
500 505 510

[0003]

Ser Ser Gln Ala Cys Asp Ser Lys Gly Asp Thr Leu Ala Ser Pro Asn  
 515 520 525

Ser Glu Thr Gly Pro Gly Lys Lys Asn Ser Gly Glu Glu Glu Ile Asp  
 530 535 540

Ser Leu Gln Arg Met Val Gln Glu Leu Arg Lys Glu Ile Glu Thr Gln  
 545 550 555 560

Lys Gln Met Tyr Glu Glu Gln Ile Lys Asn Leu Glu Lys Glu Asn Tyr  
 565 570 575

Asp Val Trp Ala Lys Val Val Arg Leu Asn Glu Glu Leu Glu Lys Glu  
 580 585 590

Lys Lys Lys Ser Ala Ala Leu Glu Ile Ser Leu Arg Asn Met Glu Arg  
 595 600 605

Ser Arg Glu Asp Val Glu Lys Arg Asn Lys Ala Leu Glu Glu Glu Val  
 610 615 620

Lys Glu Phe Val Lys Ser Met Lys Glu Pro Lys Thr Glu Ala  
 625 630 635

<210> 2  
 <211> 572  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 2

Met Ala Ala Pro Arg Pro Ser Pro Ala Ile Ser Val Ser Val Ser Ala  
 1 5 10 15

Pro Ala Phe Tyr Ala Pro Gln Lys Lys Phe Gly Pro Val Val Ala Pro  
 20 25 30

Lys Pro Lys Val Asn Pro Phe Arg Pro Gly Asp Ser Glu Pro Pro Pro  
 35 40 45

Ala Pro Gly Ala Gln Arg Ala Gln Met Gly Arg Val Gly Glu Ile Pro  
 50 55 60

Pro Pro Pro Pro Glu Asp Phe Pro Leu Pro Pro Pro Pro Leu Ala Gly  
 65 70 75 80

Asp Gly Asp Asp Ala Glu Gly Ala Leu Gly Gly Ala Phe Pro Pro Pro  
 85 90 95

Pro Pro Pro Ile Glu Glu Ser Phe Pro Pro Ala Pro Leu Glu Glu Glu  
 100 105 110

Ile Phe Pro Ser Pro Pro Pro Pro Pro Glu Glu Glu Gly Gly Pro Glu  
 115 120 125

Ala Pro Ile Pro Pro Pro Pro Gln Pro Arg Glu Lys Val Ser Ser Ile  
 130 135 140

[0004]

Asp Leu Glu Ile Asp Ser Leu Ser Ser Leu Leu Asp Asp Met Thr Lys  
 145 150 155 160

Asn Asp Pro Phe Lys Ala Arg Val Ser Ser Gly Tyr Val Pro Pro Pro  
 165 170 175

Val Ala Thr Pro Phe Ser Ser Lys Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gly  
 180 185 190

Gly Thr Ala Pro Leu Pro Pro Trp Lys Ser Pro Ser Ser Ser Gln Pro  
 195 200 205

Leu Pro Gln Val Pro Ala Pro Ala Gln Ser Gln Thr Gln Phe His Val  
 210 215 220

Gln Pro Gln Pro Gln Pro Lys Pro Gln Val Gln Leu His Val Gln Ser  
 225 230 235 240

Gln Thr Gln Pro Val Ser Leu Ala Asn Thr Gln Pro Arg Gly Pro Pro  
 245 250 255

Ala Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Lys Phe Ser Pro Val Thr Pro Lys  
 260 265 270

Phe Thr Pro Val Ala Ser Lys Phe Ser Pro Gly Ala Pro Gly Gly Ser  
 275 280 285

Gly Ser Gln Pro Asn Gln Lys Leu Gly His Pro Glu Ala Leu Ser Ala  
 290 295 300

Gly Thr Gly Ser Pro Gln Pro Pro Ser Phe Thr Tyr Ala Gln Gln Arg  
 305 310 315 320

Glu Lys Pro Arg Val Gln Glu Lys Gln His Pro Val Pro Pro Pro Ala  
 325 330 335

Gln Asn Gln Asn Gln Val Arg Ser Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Thr  
 340 345 350

Leu Lys Glu Val Glu Glu Leu Glu Gln Leu Thr Gln Gln Leu Met Gln  
 355 360 365

Asp Met Glu His Pro Gln Arg Gln Asn Val Ala Val Asn Glu Leu Cys  
 370 375 380

Gly Arg Cys His Gln Pro Leu Ala Arg Ala Gln Pro Ala Val Arg Ala  
 385 390 395 400

Leu Gly Gln Leu Phe His Ile Ala Cys Phe Thr Cys His Gln Cys Ala  
 405 410 415

Gln Gln Leu Gln Gly Gln Gln Phe Tyr Ser Leu Glu Gly Ala Pro Tyr  
 420 425 430 435

Cys Glu Gly Cys Tyr Thr Asp Thr Leu Glu Lys Cys Asn Thr Cys Gly  
 435 440 445

[0005]

Glu Pro Ile Thr Asp Arg Met Leu Arg Ala Thr Gly Lys Ala Tyr His  
 450 455 460  
 Pro His Cys Phe Thr Cys Val Val Cys Ala Arg Pro Leu Glu Gly Thr  
 465 470 475 480  
 Ser Phe Ile Val Asp Gln Ala Asn Arg Pro His Cys Val Pro Asp Tyr  
 485 490 495  
 His Lys Gln Tyr Ala Pro Arg Cys Ser Val Cys Ser Glu Pro Ile Met  
 500 505 510  
 Pro Glu Pro Gly Arg Asp Glu Thr Val Arg Val Val Ala Leu Asp Lys  
 515 520 525  
 Asn Phe His Met Lys Cys Tyr Lys Cys Glu Asp Cys Gly Lys Pro Leu  
 530 535 540  
 Ser Ile Glu Ala Asp Asp Asn Gly Cys Phe Pro Leu Asp Gly His Val  
 545 550 555 560  
 Leu Cys Arg Lys Cys His Thr Ala Arg Ala Gln Thr  
 565 570  
 <210> 3  
 <211> 380  
 <212> PRT  
 <213> 人类  
 <400> 3  
 Met Ser Glu Thr Val Ile Cys Ser Ser Arg Ala Thr Val Met Leu Tyr  
 1 5 10 15  
 Asp Asp Gly Asn Lys Arg Trp Leu Pro Ala Gly Thr Gly Pro Gln Ala  
 20 25 30  
 Phe Ser Arg Val Gln Ile Tyr His Asn Pro Thr Ala Asn Ser Phe Arg  
 35 40 45  
 Val Val Gly Arg Lys Met Gln Pro Asp Gln Gln Val Val Ile Asn Cys  
 50 55 60  
 Ala Ile Val Arg Gly Val Lys Tyr Asn Gln Ala Thr Pro Asn Phe His  
 65 70 75 80  
 Gln Trp Arg Asp Ala Arg Gln Val Trp Gly Leu Asn Phe Gly Ser Lys  
 85 90 95  
 Glu Asp Ala Ala Gln Phe Ala Ala Gly Met Ala Ser Ala Leu Glu Ala  
 100 105 110  
 Leu Glu Gly Gly Gly Pro Pro Pro Pro Pro Ala Leu Pro Thr Trp Ser  
 115 120 125  
 Val Pro Asn Gly Pro Ser Pro Glu Glu Val Glu Gln Gln Lys Arg Gln  
 130 135 140  
 Gln Pro Gly Pro Ser Glu His Ile Glu Arg Arg Val Ser Asn Ala Gly

[0006]

145 150 155 160  
 Gly Pro Pro Ala Pro Pro Ala Gly Gly Pro Pro Pro Pro Pro Gly Pro  
                                   165                                  170                                  175  
 Pro Pro Pro Pro Gly Pro Pro Pro Pro Pro Gly Leu Pro Pro Ser Gly  
                                   180                                  185                                  190  
 Val Pro Ala Ala Ala His Gly Ala Gly Gly Gly Pro Pro Pro Ala Pro  
                                   195                                  200                                  205  
 Pro Leu Pro Ala Ala Gln Gly Pro Gly Gly Gly Gly Ala Gly Ala Pro  
                                   210                                  215                                  220  
 Gly Leu Ala Ala Ala Ile Ala Gly Ala Lys Leu Arg Lys Val Ser Lys  
                                   225                                  230                                  235                                  240  
 Gln Glu Glu Ala Ser Gly Gly Pro Thr Ala Pro Lys Ala Glu Ser Gly  
                                   245                                  250                                  255  
 Arg Ser Gly Gly Gly Gly Leu Met Glu Glu Met Asn Ala Met Leu Ala  
                                   260                                  265                                  270  
 Arg Arg Arg Lys Ala Thr Gln Val Gly Glu Lys Thr Pro Lys Asp Glu  
                                   275                                  280                                  285  
 Ser Ala Asn Gln Glu Glu Pro Glu Ala Arg Val Pro Ala Gln Ser Glu  
                                   290                                  295                                  300  
 Ser Val Arg Arg Pro Trp Glu Lys Asn Ser Thr Thr Leu Pro Arg Met  
                                   305                                  310                                  315                                  320  
 Lys Ser Ser Ser Ser Val Thr Thr Ser Glu Thr Gln Pro Cys Thr Pro  
                                   325                                  330                                  335  
 Ser Ser Ser Asp Tyr Ser Asp Leu Gln Arg Val Lys Gln Glu Leu Leu  
                                   340                                  345                                  350  
 Glu Glu Val Lys Lys Glu Leu Gln Lys Val Lys Glu Glu Ile Ile Glu  
                                   355                                  360                                  365  
 Ala Phe Val Gln Glu Leu Arg Lys Arg Gly Ser Pro  
                                   370                                  375                                  380  
 <210> 4  
 <211> 201  
 <212> PRT  
 <213> 人类  
 <400> 4  
 Met Lys Trp Val Trp Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ala Leu Gly Ser Gly  
                                   5                                  10                                  15  
 Arg Ala Glu Arg Asp Cys Arg Val Ser Ser Phe Arg Val Lys Glu Asn  
                                   20                                  25                                  30  
 Phe Asp Lys Ala Arg Phe Ser Gly Thr Trp Tyr Ala Met Ala Lys Lys  
                                   35                                  40                                  45

[0007]



Asp Pro Glu Gly Leu Phe Leu Gln Asp Asn Ile Val Ala Glu Phe Ser  
 50 55 60

Val Asp Glu Thr Gly Gln Met Ser Ala Thr Ala Lys Gly Arg Val Arg  
 65 70 75 80

Leu Leu Asn Asn Trp Asp Val Cys Ala Asp Met Val Gly Thr Phe Thr  
 85 90 95

Asp Thr Glu Asp Pro Ala Lys Phe Lys Met Lys Tyr Trp Gly Val Ala  
 100 105 110

Ser Phe Leu Gln Lys Gly Asn Asp Asp His Trp Ile Val Asp Thr Asp  
 115 120 125

Tyr Asp Thr Tyr Ala Val Gln Tyr Ser Cys Arg Leu Leu Asn Leu Asp  
 130 135 140

Gly Thr Cys Ala Asp Ser Tyr Ser Phe Val Phe Ser Arg Asp Pro Asn  
 145 150 155 160

Gly Leu Pro Pro Glu Ala Gln Lys Ile Val Arg Gln Arg Gln Glu Glu  
 165 170 175

Leu Cys Leu Ala Arg Gln Tyr Arg Leu Ile Val His Asn Gly Tyr Cys  
 180 185 190

Asp Gly Arg Ser Glu Arg Asn Leu Leu  
 195 200

<210> 5  
 <211> 491  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 5

Met Ala Leu Leu Trp Gly Leu Leu Val Leu Ser Trp Ser Cys Leu Gln  
 1 5 10 15

Gly Pro Cys Ser Val Phe Ser Pro Val Ser Ala Met Glu Pro Leu Gly  
 20 25 30

Arg Gln Leu Thr Ser Gly Pro Asn Gln Glu Gln Val Ser Pro Leu Thr  
 35 40 45

Leu Leu Lys Leu Gly Asn Gln Glu Pro Gly Gly Gln Thr Ala Leu Lys  
 50 55 60

Ser Pro Pro Gly Val Cys Ser Arg Asp Pro Thr Pro Glu Gln Thr His  
 65 70 75 80

Arg Leu Ala Arg Ala Met Met Ala Phe Thr Ala Asp Leu Phe Ser Leu  
 85 90 95

Val Ala Gln Thr Ser Thr Cys Pro Asn Leu Ile Leu Ser Pro Leu Ser  
 100 105 110

[0008]

Val Ala Leu Ala Leu Ser His Leu Ala Leu Gly Ala Gln Asn His Thr  
 115 120 125

Leu Gln Arg Leu Gln Gln Val Leu His Ala Gly Ser Gly Pro Cys Leu  
 130 135 140

Pro His Leu Leu Ser Arg Leu Cys Gln Asp Leu Gly Pro Gly Ala Phe  
 145 150 155 160

Arg Leu Ala Ala Arg Met Tyr Leu Gln Lys Gly Phe Pro Ile Lys Glu  
 165 170 175

Asp Phe Leu Glu Gln Ser Glu Gln Leu Phe Gly Ala Lys Pro Val Ser  
 180 185 190

Leu Thr Gly Lys Gln Glu Asp Asp Leu Ala Asn Ile Asn Gln Trp Val  
 195 200 205

Lys Glu Ala Thr Glu Gly Lys Ile Gln Glu Phe Leu Ser Gly Leu Pro  
 210 215 220

Glu Asp Thr Val Leu Leu Leu Asn Ala Ile His Phe Gln Gly Phe  
 225 230 235 240

Trp Arg Asn Lys Phe Asp Pro Ser Leu Thr Gln Arg Asp Ser Phe His  
 245 250 255

Leu Asp Glu Gln Phe Thr Val Pro Val Glu Met Met Gln Ala Arg Thr  
 260 265 270

Tyr Pro Leu Arg Trp Phe Leu Leu Glu Gln Pro Glu Ile Gln Val Ala  
 275 280 285

His Phe Pro Phe Lys Asn Asn Met Ser Phe Val Val Leu Val Pro Thr  
 290 295 300

His Phe Glu Trp Asn Val Ser Gln Val Leu Ala Asn Leu Ser Trp Asp  
 305 310 315 320

Thr Leu His Pro Pro Leu Val Trp Glu Arg Pro Thr Lys Val Arg Leu  
 325 330 335

Pro Lys Leu Tyr Leu Lys His Gln Met Asp Leu Val Ala Thr Leu Ser  
 340 345 350

Gln Leu Gly Leu Gln Glu Leu Phe Gln Ala Pro Asp Leu Arg Gly Ile  
 355 360 365

Ser Glu Gln Ser Leu Val Val Ser Gly Val Gln His Gln Ser Thr Leu  
 370 375 380

Glu Leu Ser Glu Val Gly Val Glu Ala Ala Ala Ala Thr Ser Ile Ala  
 385 390 395 400

Met Ser Arg Met Ser Leu Ser Ser Phe Ser Val Asn Arg Pro Phe Leu  
 405 410 415

[0009]

Phe Phe Ile Phe Glu Asp Thr Thr Gly Leu Pro Leu Phe Val Gly Ser  
 420 425 430

Val Arg Asn Pro Asn Pro Ser Ala Pro Arg Glu Leu Lys Glu Gln Gln  
 435 440 445

Asp Ser Pro Gly Asn Lys Asp Phe Leu Gln Ser Leu Lys Gly Phe Pro  
 450 455 460

Arg Gly Asp Lys Leu Phe Gly Pro Asp Leu Lys Leu Val Pro Pro Met  
 465 470 475 480

Glu Glu Asp Tyr Pro Gln Phe Gly Ser Pro Lys  
 485 490

<210> 6  
 <211> 201  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 6

Met Thr Glu Lys Ala Pro Glu Pro His Val Glu Glu Asp Asp Asp Asp  
 1 5 10 15

Glu Leu Asp Ser Lys Leu Asn Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Lys Ser Leu  
 20 25 30

Lys Glu Leu Gln Glu Met Asp Lys Asp Asp Glu Ser Leu Ile Lys Tyr  
 35 40 45

Lys Lys Thr Leu Leu Gly Asp Gly Pro Val Val Thr Asp Pro Lys Ala  
 50 55 60

Pro Asn Val Val Val Thr Arg Leu Thr Leu Val Cys Glu Ser Ala Pro  
 65 70 75 80

Gly Pro Ile Thr Met Asp Leu Thr Gly Asp Leu Glu Ala Leu Lys Lys  
 85 90 95

Glu Thr Ile Val Leu Lys Glu Gly Ser Glu Tyr Arg Val Lys Ile His  
 100 105 110

Phe Lys Val Asn Arg Asp Ile Val Ser Gly Leu Lys Tyr Val Gln His  
 115 120 125

Thr Tyr Arg Thr Gly Val Lys Val Asp Lys Ala Thr Phe Met Val Gly  
 130 135 140

Ser Tyr Gly Pro Arg Pro Glu Glu Tyr Glu Phe Leu Thr Pro Val Glu  
 145 150 155 160

Glu Ala Pro Lys Gly Met Leu Ala Arg Gly Thr Tyr His Asn Lys Ser  
 165 170 175

Phe Phe Thr Asp Asp Asp Lys Gln Asp His Leu Ser Trp Glu Trp Asn  
 180 185 190

[0010]

Leu Ser Ile Lys Lys Glu Trp Thr Glu  
 195 200

<210> 7  
 <211> 461  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 7

Met Pro Pro Ser Gly Pro Arg Gly Thr Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Leu Arg Ala Val Leu Ala Val Pro Leu Glu Arg Gly  
 20 25 30

Ala Pro Asn Lys Glu Glu Thr Pro Ala Thr Glu Ser Pro Asp Thr Gly  
 35 40 45

Leu Tyr Tyr His Arg Tyr Leu Gln Glu Val Ile Asp Val Leu Glu Thr  
 50 55 60

Asp Gly His Phe Arg Glu Lys Leu Gln Ala Ala Asn Ala Glu Asp Ile  
 65 70 75 80

Lys Ser Gly Lys Leu Ser Arg Glu Leu Asp Phe Val Ser His His Val  
 85 90 95

Arg Thr Lys Leu Asp Glu Leu Lys Arg Gln Glu Val Ser Arg Leu Arg  
 100 105 110

Met Leu Leu Lys Ala Lys Met Asp Ala Glu Gln Asp Pro Asn Val Gln  
 115 120 125

Val Asp His Leu Asn Leu Leu Lys Gln Phe Glu His Leu Asp Pro Gln  
 130 135 140

Asn Gln His Thr Phe Glu Ala Arg Asp Leu Glu Leu Leu Ile Gln Thr  
 145 150 155 160

Ala Thr Arg Asp Leu Ala Gln Tyr Asp Ala Ala His His Glu Glu Phe  
 165 170 175

Lys Arg Tyr Glu Met Leu Lys Glu His Glu Arg Arg Arg Tyr Leu Glu  
 180 185 190

Ser Leu Gly Glu Glu Gln Arg Lys Glu Ala Glu Arg Lys Leu Glu Glu  
 195 200 205

Gln Gln Arg Arg His Arg Glu His Pro Lys Val Asn Val Pro Gly Ser  
 210 215 220

Gln Ala Gln Leu Lys Glu Val Trp Glu Glu Leu Asp Gly Leu Asp Pro  
 225 230 235 240

Asn Arg Phe Asn Pro Lys Thr Phe Phe Ile Leu His Asp Ile Asn Ser  
 245 250 255

Asp Gly Val Leu Asp Glu Gln Glu Leu Glu Ala Leu Phe Thr Lys Glu

[0011]

260	265	270
Leu Glu Lys Val Tyr Asp Pro Lys Asn Glu Glu Asp Asp Met Arg Glu 275 280 285		
Met Glu Glu Glu Arg Leu Arg Met Arg Glu His Val Met Lys Asn Val 290 295 300		
Asp Thr Asn Gln Asp Arg Leu Val Thr Leu Glu Glu Phe Leu Ala Ser 305 310 315 320		
Thr Gln Arg Lys Glu Phe Gly Asp Thr Gly Glu Gly Trp Glu Thr Val 325 330 335		
Glu Met His Pro Ala Tyr Thr Glu Glu Glu Leu Arg Arg Phe Glu Glu 340 345 350		
Glu Leu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Leu Asn Ala Lys Ala Gln Arg Leu 355 360 365		
Ser Gln Glu Thr Glu Ala Leu Gly Arg Ser Gln Gly Arg Leu Glu Ala 370 375 380		
Gln Lys Arg Glu Leu Gln Gln Ala Val Leu His Met Glu Gln Arg Lys 385 390 395 400		
Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gln Gly His Lys Ala Pro Ala Ala His Pro 405 410 415		
Glu Gly Gln Leu Lys Phe His Pro Asp Thr Asp Asp Val Pro Val Pro 420 425 430		
Ala Pro Ala Gly Asp Gln Lys Glu Val Asp Thr Ser Glu Lys Lys Leu 435 440 445		
Leu Glu Arg Leu Pro Glu Val Glu Val Pro Gln His Leu 450 455 460		
<210> 8		
<211> 15		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 8		
Met Ser Leu Gly Gln Ser Ala Cys Leu Phe Leu Ser Ile Ala Arg 1 5 10 15		
<210> 9		
<211> 19		
<212> PRT		
<213> 人类		
<400> 9		
Val Asn Pro Phe Arg Pro Gly Asp Ser Glu Pro Pro Pro Ala Pro Gly 1 5 10 15		
Ala Gln Arg		

[0012]

<210> 10  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 10

Ser Ser Thr Lys Pro Ala Ala Gly Gly Thr Ala Pro Leu Pro Pro Trp  
 1 5 10 15

Lys

<210> 11  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 11

Gly Pro Pro Ala Ser Ser Pro Ala Pro Ala Pro Lys  
 1 5 10

<210> 12  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 12

Ser Pro Gly Ala Pro Gly Pro Leu Thr Leu Lys  
 1 5 10

<210> 13  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 13

Leu Val Pro Pro Met Glu Glu Asp Tyr Pro Gln Phe Gly Ser Pro Lys  
 1 5 10 15

<210> 14  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 14

Ala Pro Glu Pro His Val Glu Glu Asp Asp Asp Asp Glu Leu Asp Ser  
 1 5 10 15

Lys

<210> 15  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> 人类

<400> 15

Leu Asn Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Lys  
 1 5

<210> 16

[0013]

<211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人类  
  
 <400> 16  
  
 Leu Pro Glu Val Glu Val Pro Gln His Leu  
 1 5 10  
  
 <210> 17  
 <211> 97  
 <212> PRT  
 <213> 人类  
  
 <400> 17  
  
 Met Ser Leu Gly Gln Ser Ala Cys Leu Phe Leu Ser Ile Ala Arg Ser  
 1 5 10 15  
  
 Arg Ser Val Met Thr Gly Glu Gln Met Ala Ala Phe His Pro Ser Ser  
 20 25 30  
  
 Thr Pro Asn Pro Leu Glu Arg Pro Ile Lys Met Gly Trp Leu Lys Lys  
 35 40 45  
  
 Gln Arg Ser Ile Val Lys Asn Trp Gln Gln Arg Tyr Phe Val Leu Arg  
 50 55 60  
  
 Ala Gln Gln Leu Tyr Tyr Tyr Lys Asp Glu Glu Asp Thr Lys Pro Gln  
 65 70 75 80  
  
 Gly Cys Met Tyr Leu Pro Gly Cys Thr Ile Lys Glu Ile Ala Thr Asn  
 85 90 95

Pro

<210> 18  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人类  
  
 <400> 18  
 cgcgatccc tttgetcact gccccatgtc 30

<210> 19  
 <211> 30  
 <212> DNA  
 <213> 人类  
  
 <400> 19  
 ctcgaattct tatgggttg tggcgatctc 30

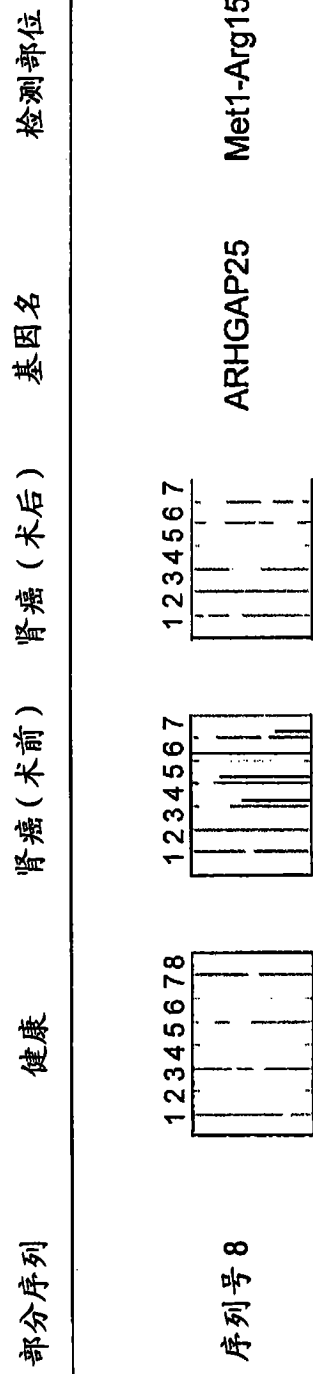


图 1



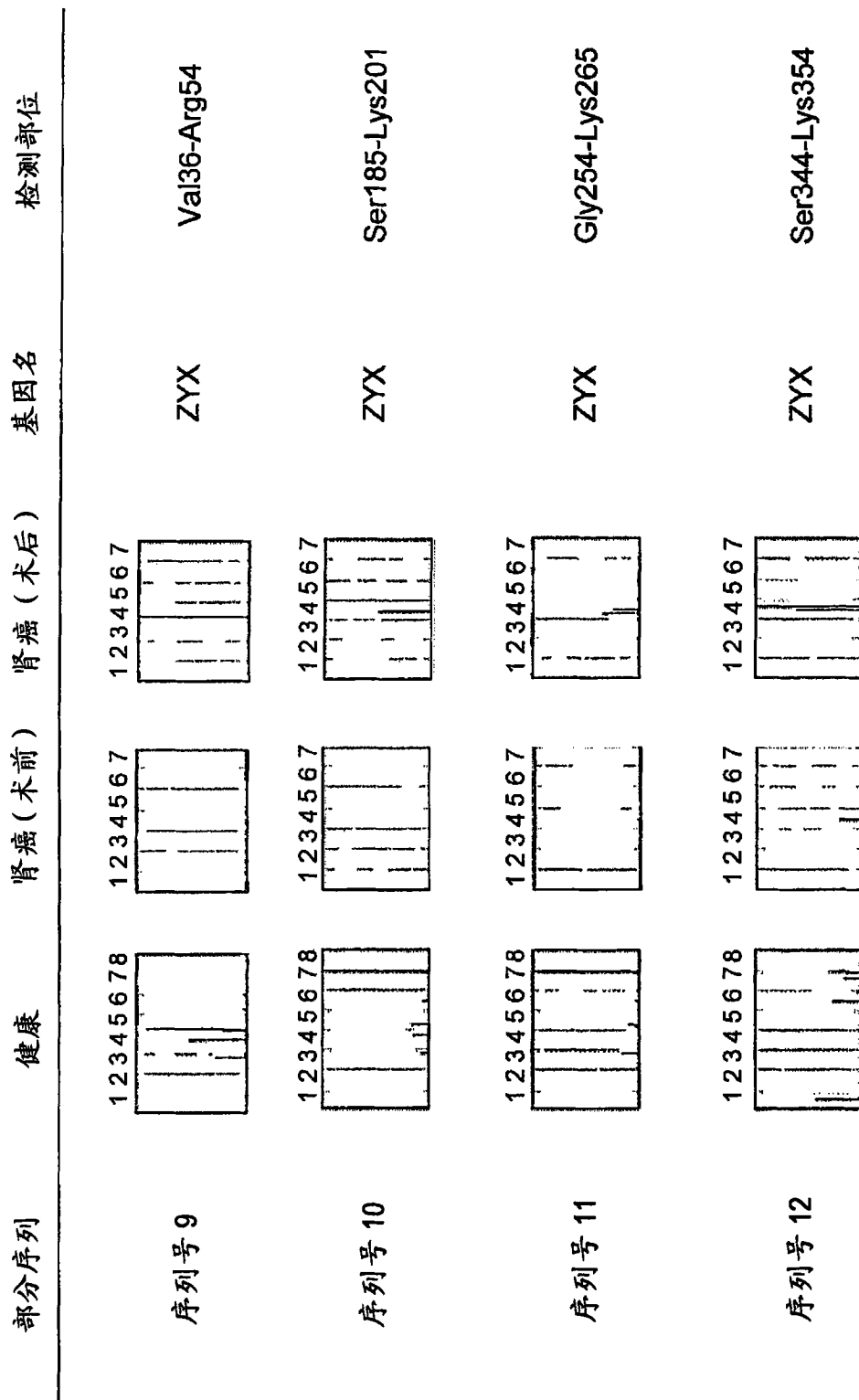


图 2

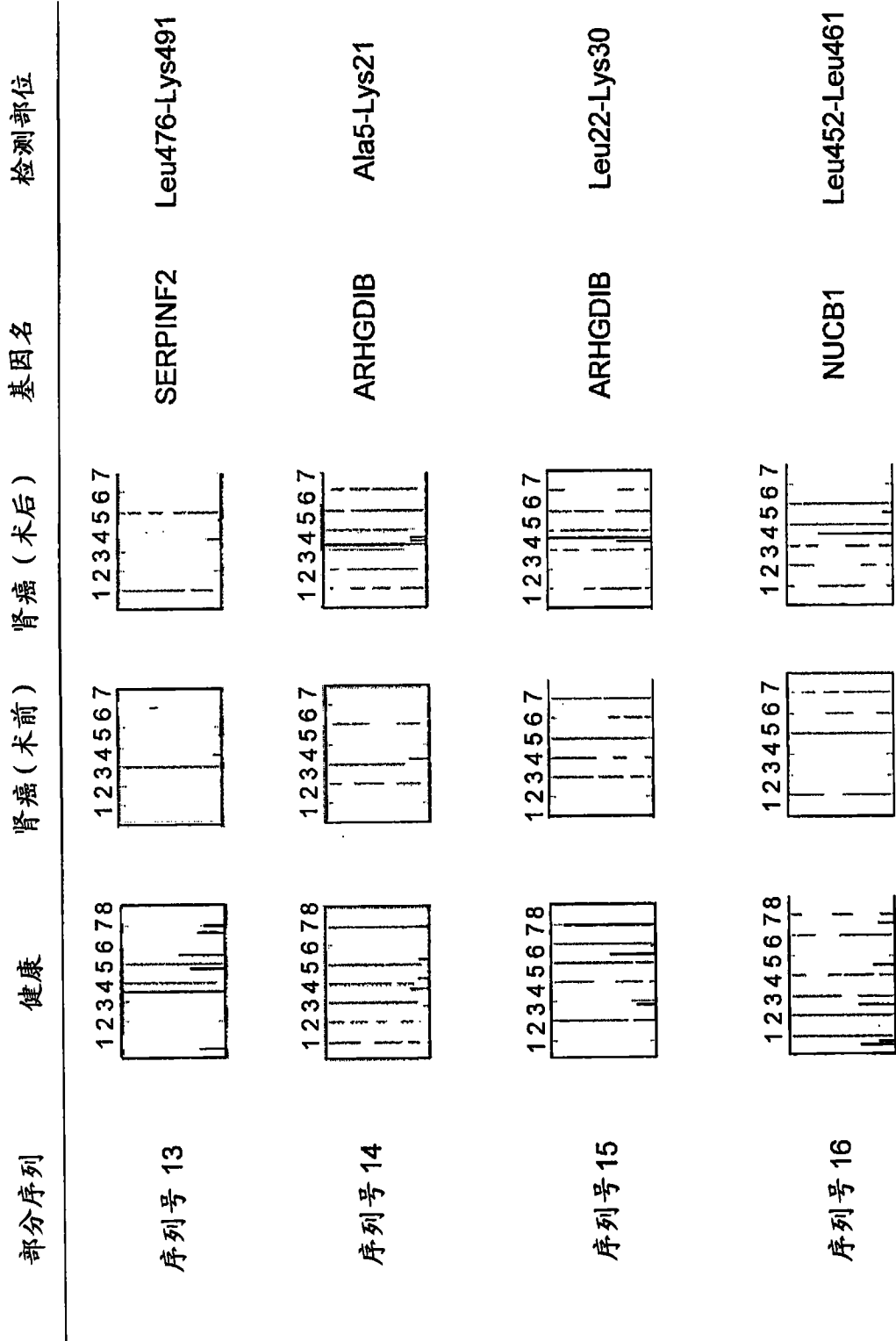


图 3

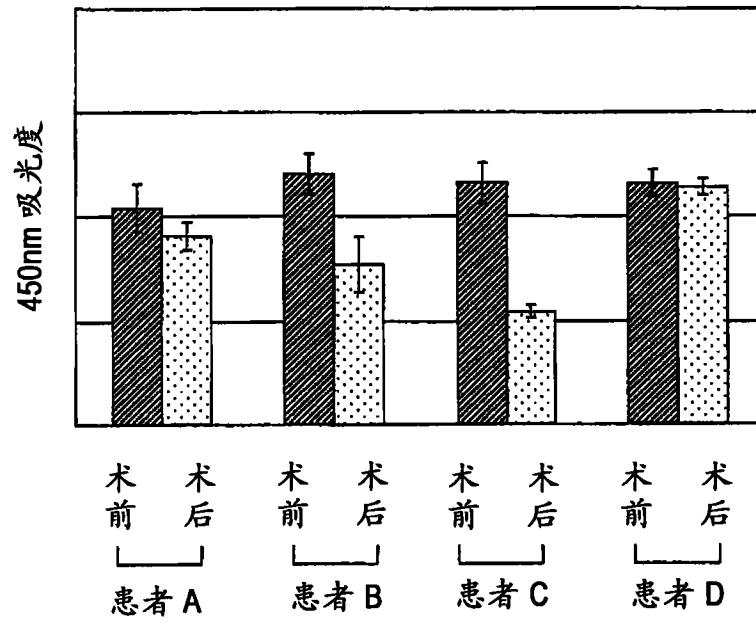


图 4