



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102483414 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 200980150076. X  
 (22) 申请日 2009.10.09  
 (30) 优先权数据  
 61/104038 2008.10.09 US  
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日  
 2011.06.09  
 (86) PCT国际申请的申请数据  
 PCT/CN2009/001117 2009.10.09  
 (87) PCT国际申请的公布数据  
 WO2010/040277 EN 2010.04.15  
 (73) 专利权人 香港大学  
 地址 中国香港薄扶林道  
 (72) 发明人 陆满晴 李珮瑜 刘凌晓 潘冬平  
 范上达  
 (74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
 72001  
 代理人 李进 郭文洁  
 (51) Int. Cl.  
 G01N 33/574(2006.01)  
 A61P 35/00(2006.01) (续)  
 (56) 对比文件  
 WO 2007141280 A2, 2007.12.13,  
 WO 2007141280 A2, 2007.12.13,  
 WO 9957149 A2, 1999.11.11,  
 Bonnie W. Wong 等人. Identification of

liver-intestine cadherin in hepatocellular carcinoma—a potential disease marker. 《Biochemical and Biophysical Research Communications》. 2003, 第 311 卷  
 Xiao Qi Wang 等人. Alternative mRNA splicing of liver intestine-cadherin in hepatocellular carcinoma.. 《Clinical Cancer Research》. 2005, 第 11 卷  
 Dietmar Berndorff 等人. Liver-intestine cadherin: Molecular cloning and characterization of a novel Ca<sup>2+</sup>-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine.. 《The Journal of Cell Biology》. 1994, 第 125 卷 (第 6 期),  
 Bonnie W. Wong 等人. Identification of liver-intestine cadherin in hepatocellular carcinoma—a potential disease marker. 《Biochemical and Biophysical Research Communications》. 2003, 第 311 卷  
 Xiao Qi Wang 等人. Alternative mRNA splicing of liver intestine-cadherin in hepatocellular carcinoma. 《Clinical Cancer Research》. 2005, 第 11 卷  
 Xiao Qi Wang 等人. Liver intestine-cadherin(CDH17) haplotype (续)

审查员 毕秀华

权利要求书1页 说明书50页 附图3页

(54) 发明名称  
 作为肝癌诊断标记和治疗靶标的钙黏着蛋白-17  
 (57) 摘要  
 本发明提供了基于 CDH17 检测或 CDH17 作为治疗性介入或预防性介入靶标的用途来诊断、治疗和 / 或预防以 CDH17 过量表达为特征的癌症的组合物和方法。使用 CDH17 表达来诊断和 / 或监测肝癌的方法包括检测和 / 或定量测定来自受试者的生物样品例如尿中的 CDH17 蛋白或编码核酸 (DNA 或 RNA)。肝组织中 CDH17 分子的存在表明发

生肝癌。所述方法可用于检测 CDH17 的可溶形式或截短形式,即通过使用对跨越截短型 CDH17 和分泌型 CDH17 的结构域 1 和结构域 2(D1-D2) 的独特区具有特异性的抗体。也已开发出使用 CDH17 作为靶标治疗肝癌的方法和使具有 CDH17 异常表达的细胞敏化的方法。所述方法包括通过给予有效量的 CDH17 抑制剂而抑制或敲减 CDH17 的表达。CDH17 的抑制或敲减能减小源自表现出升高的 CDH17 表达的肿瘤细胞的肝肿瘤大小并使肝肿瘤细胞对例如泰素、表柔比星和卡铂等某些化疗药和基于 p53 的基因治疗更敏感。

[ 转续页 ]

CN 102483414 B

[ 接上页 ]

(51) Int. Cl.

A61K 39/395(2006.01)

(56) 对比文件

is associated with increased risk of hepatocellular carcinoma. 《Clinical Cancer Research》.2006, 第 12 卷

Vivian W. Chan 等人.LI-cadherin(CDH17)/Beta-catenin pathway is involved in tumor proliferation and metastatic

potentials of hepatocellular carcinoma. 《Hepatology》.2006, 第 44 卷

陈筱婷等人. 肝肠钙粘蛋白单克隆抗体的制备及其对 HepG2 的生长抑制作用. 《南方医科大学学报》.2009, 第 29 卷 (第 5 期),

Vivian W. Chan 等人.LI-cadherin(CDH17)/Beta-catenin pathway is involved in tumor proliferation and metastatic potentials of hepatocellular carcinoma. 《Hepatology》.2006, 第 44 卷

1. 至少一种 CDH17 拮抗剂在制备用于杀伤涉及 CDH17 过量表达和 / 或上调的癌症的肝癌细胞或使所述癌症的细胞对化疗物更敏感的药物中的用途, 其中所述 CDH17 拮抗剂包括调节 CDH17 表达或活性的核苷酸分子, 并且其中所述核苷酸分子是靶向 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 的 shRNA,

其中所述靶向 SEQ ID NO :5 的 shRNA 的 RNA 发夹序列如 SEQ ID NO :2 所示,

其中所述靶向 SEQ ID NO :6 的 shRNA 是 shRNA 双链体, 以及

所述 shRNA 双链体的正向部分如 SEQ ID NO :3 所示, 并且所述 shRNA 双链体的反向部分如 SEQ ID NO :4 所示。

2. 权利要求 1 的用途, 其中所述药物还包含治疗药。

3. 权利要求 2 的用途, 其中所述 CDH17 拮抗剂在给予所述治疗药之前或之后给予。

4. 权利要求 2 的用途, 其中所述治疗药是杀伤癌细胞的化疗药。

5. 调节 CDH17 表达或活性的分离的多核苷酸, 其中所述多核苷酸是靶向 SEQ ID NO :5 或 SEQ ID NO :6 的 shRNA,

其中所述靶向 SEQ ID NO :5 的 shRNA 的 RNA 发夹序列如 SEQ ID NO :2 所示,

其中所述靶向 SEQ ID NO :6 的 shRNA 是 shRNA 双链体, 以及

所述 shRNA 双链体的正向部分如 SEQ ID NO :3 所示, 并且所述 shRNA 双链体的反向部分如 SEQ ID NO :4 所示。

6. 诊断测定试剂盒或试剂, 其包含权利要求 5 的多核苷酸。

7. 药物组合物, 其包含权利要求 5 的多核苷酸。

## 作为肝癌诊断标记和治疗靶标的钙黏着蛋白 -17

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2008 年 10 月 9 日申请的 U. S. S. N. 61/104, 038 的优先权。

### 发明领域

[0003] 本发明涉及用于检测和抑制癌症的组合物和方法,即通过靶向肝-肠钙黏着蛋白(LI-钙黏着蛋白)CDH17 的表达、翻译和生物活性而检测和抑制癌症的组合物和方法。

[0004] 发明背景

[0005] 肝细胞癌(HCC)通常称为肝癌,就病例数而言是全球第6大最常见癌症(在2002年有626,000个或5.7%新发癌症病例)。Parkin DM等,CA Cancer J Clin 2005;55:74-108。在美国,已报道的发病率已经增至4.7/100,000人。HCC是一种高死亡率的恶性肿瘤,并且因为预后很差,死亡数量(在2002年为598,000)几乎等同于每年报道的新增病例数(Parkin DM等,CA Cancer J Clin 2005;55:74-108)。高死亡率使HCC成为癌症致死的第三大常见原因。这样不幸的高死亡率主要是由于这种肿瘤诊断晚,在初次诊断时患者通常就已处于晚期。

[0006] HCC通常用所有现有的化学治疗都难以治疗。4类主要的治疗方式通常会给予HCC患者:(1)外科手术,包括肿瘤切除和肝移植;(2)经皮方法,例如射频消融;(3)经动脉介入,例如栓塞和化学栓塞;(4)使用带标签的抗体和药物进行的分子和药物治疗。遗憾的是,对HCC患者而言并无明确的治愈。手术切除是目前用于切除肿瘤结节(tumor nodule)的有效方式;然而,其并不适合具有大而多病灶的晚期HCC患者和具有远端转移的患者。其它治疗方法,例如经动脉介入,具有低反应率。系统性化疗对于无法切除的HCC的治疗而言并未证明是有效的。因为在治愈性治疗之后具有高复发率,所以对于初次诊断之后的HCC患者而言,5年存活率仍然未达到最佳,大约为15%。基本上,肝移植仍然是最佳的治疗性介入,其可提供最长的无病存活期。因此仍然需要用于诊断、预测和治疗HCC的额外方法。

[0007] 对于诊断肝癌而言,目前的监测方案主要依赖于对血清甲胎蛋白(AFP)的检测和超声成像。然而,AFP的血清学水平在肝肿瘤的检测中既不准确,也不灵敏,因为当AFP截止(cut-off)水平在20ng/ml时,灵敏度低(55-60%)(Debruyne EN和Delanghe JR, Clin Chim Acta, 395:19-26(2008)),而且在鉴别肝肿瘤与其它恶性肿瘤时是非特异性的(Marrero JA, Curr Opin Gastroenterol 19(3):243-249, 2003)。其它成像技术,例如磁共振成像、血管造影术、计算机断层摄影术,都常用于定位肝脏结节,但这些通常仅在其它症状或阳性筛选发生之后才采用。目前的分析通常是可变的并且是高度依赖于操作人员。

[0008] 因此,本发明的目标在于提供早期诊断肝癌的改进方法并鉴定用于肝癌治疗的新靶标。

[0009] 发明概述

[0010] 提供了用于根据对CDH17的检测来诊断和治疗以CDH17过量表达为特征的肝癌的组合物和方法,或CDH17作为治疗性介入靶标或预防性介入靶标的应用。

[0011] 使用CDH17表达诊断和/或监测肝癌的方法包括检测和/或定量生物样品例如受

试者血清中的 CDH17 蛋白或编码核酸 (DNA 或 RNA)。所述方法包括以下步骤:(a) 使所述生物样品与对 CDH17 具有特异性的抗体接触(反应),所述抗体已用可检测物直接或间接标记;和(b) 检测所述可检测物。肝组织中 CDH17 分子的存在表示患有肝癌。已经开发出对检测人 CDH17 具有特异性的一组小鼠单克隆抗体并用于检测 CDH17 蛋白的存在情况。所述方法可用于检测 CDH17 的可溶性形式或截短形式,即通过使用对跨越截短型 CDH17 和分泌型 CDH17 的结构域 1 和结构域 2(D1-D2) 的独特区具有特异性的抗体。在优选的实施方案中,所述抗体对 SEQ ID NO:1 具有特异性。在一个实施方案中,所述方法步骤包括:(a) 使所述生物样品与结合 CDH17 的结合剂接触而形成复合物;(b) 检测所述复合物;和(c) 将所检测复合物与样品中 CDH17 蛋白含量相互联系,其中升高的 CDH17 蛋白的存在表明患有癌症。在具体的实施方案中,(b) 的所述检测还包括将标记连接或结合到所述结合剂上,或者使用基于 ELISA 的免疫酶学检测。任选地,所述方法步骤还包括在检测 CDH17 之前、期间或之后,检测得自受试者的同一生物样品或不同生物样品中的癌症生物标记。任选地,所述方法步骤还包括将所述生物样品中的 CDH17 水平与正常对照样品中的 CDH17 水平进行比较,其中当所述生物样品中的 CDH17 水平比正常对照样品中的高时表明患有癌症,例如肝癌。

[0012] 所述方法能够使用 CDH17 作为肝癌的肿瘤生物标记。在优选的实施方案中,检测 HCC 患者血清中 CDH17 分子的存在情况,由此提供肝癌的非侵入性血清学测定,以用于对风险群体(例如肝炎携带者和肝硬化患者)的患者监测方案。

[0013] 在某些实施方案中,受试者尚未诊断出患有癌症。例如,所述方法可用于对患有或疑似患有癌症的受试者的预测性评价,所述方法包括:a) 测定获自所述受试者的生物样品中 CDH17 的水平,所述样品例如尿液、血液或腹水;b) 将步骤(a) 所测水平与已知存在于获自未患癌症的正常受试者的生物样品中的一系列 CDH17 进行比较;和 c) 根据步骤(b) 的比较确定所述受试者的预后,其中在步骤(a) 中高水平的 CDH17 指示癌症的侵袭形式,并因此指示预后不良。在其它实施方案中,所述受试者患有癌症例如肝癌,而且检测是在若干时间点以一定的间隔而进行,以在癌症治疗之前、期间或之后监测受试者。

[0014] 也已开发出用 CDH17 作为靶标治疗肝癌的方法和使 CDH17 异常表达细胞敏化的方法。所述方法包括通过给予有效量的 CDH17 抑制剂而抑制或敲减 CDH17 的表达。CDH17 的抑制或敲减能减小源自表现出升高的 CDH17 表达的肿瘤细胞的肝肿瘤大小,并使肝肿瘤细胞对例如泰素、表柔比星和卡铂等某些化疗药和基于 p53 的基因治疗更敏感。在一个实施方案中,所述组合物是包含约 19 至约 23 个碱基对的单链短干扰核糖核酸(siRNA) 分子,其下调 CDH17 基因表达。在另一个实施方案中,所述组合物是 siRNA 分子,其包含与包括 CDH17 和 / 或 CDH17 基因序列或其部分的序列互补的区(例如 siRNA 构建体反义区)。在另一个实施方案中,提供包含 siRNA 分子和药学上可接受的载体或稀释剂的药物。CDH17 拮抗剂可抑制 CDH17 基因表达、抑制 HCC 进展并使肿瘤细胞对常用化疗治疗敏感。在优选的实施方案中,使用靶向 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 的多核苷酸抑制剂来抑制 CDH17 表达。在另一个实施方案中,CDH17 拮抗剂是对 CDH17 具有特异性的单克隆抗体,其抑制 HCC 细胞中的过量表达蛋白的表达和 / 或活性。

[0015] 附图简述

[0016] 图 1 是表示 CDH17 在 MHCC97-H(97H) 肝肿瘤细胞中表达沉默之后,肿瘤异种移植物大小( $\text{mm}^3$ ) 随时间(周)减小的图。

[0017] 图 2A、2B、2C 和 2D 显示在 CDH17 表达沉默之后,使 MHCC97-H(97H) 肝肿瘤细胞对泰素(图 2A,  $\mu\text{m/ml}$ )、卡铂(图 2B,  $\text{mg/ml}$ )、表柔比星(图 2C,  $\mu\text{g/ml}$ )和基因治疗(2D, 病毒滴度 rAd-p53,  $\times 10^7$ )敏感,细胞生存力百分比对药物浓度作图。

[0018] 图 3A、3B、3C 和 3D,比较了用靶向 CDH17 外显子 5 的 shRNA 转染的 97H 细胞以及 97H 和 scramble(SC)对 CDH17 蛋白水平(图 3A,吸光度/时间,小时)、细胞增殖(图 3B,细胞浓度)、细胞侵入(图 3C,吸光度/胶原浓度,  $\mu\text{g/ml}$ )、集落形成(图 3D,集落数)的影响。

[0019] 图 4 显示当将敲减的 shCDH17 细胞(MHCC97-H)移植到裸鼠中以使肿瘤异种移植物生长时肿瘤体积( $\text{mm}^3$ )的减小,对照是 97H 和 SC。

[0020] 图 5 是显示通过 Dynabeads 将 D1D2 实验性免疫捕获到免疫捕获重组体 D1D2 的示意图。使用两种不同 Dynabeads(Dynabeads Protein G 和 Dynabeads M-280 Tosylactivated)。对于使用 Dynabeads Protein G 的免疫捕获,将不同浓度的 D1D2 与纯化 Lic5 一起孵育,然后与 Dynabeads Protein G 混合。对于使用 Dynabeads M-280 Tosylactivated 的免疫捕获,先将纯化 Lic5 与珠子偶联,然后再与不同浓度的 D1D2 混合。这之后再使用 SDS 样品缓冲液将 Lic5-D1D2 免疫复合物从珠子上洗脱下来,然后进行蛋白质印迹分析。用生物素化 Lic3 进行蛋白质印迹,以检测 D1D2,并使用辣根过氧化物酶(HRP)-缀合的链霉抗生物素与生物素化 Lic3 反应。

[0021] 发明详述

[0022] I. 定义

[0023] 本文所用的术语“体液”(“body fluid”和“bodily fluid”)是指得自人或动物受试者的组合物。体液包括但不限于尿液、全血、血浆、血清、泪液、精液、唾液、痰液、呼气、鼻分泌物、咽部渗出物、支气管肺泡灌洗液(bronchoalveolar alvage)、气管吸出物、间质液、淋巴液、脑膜液(meningal fluid)、羊水、腺体液(glandular fluid)、粪便、汗液、黏液、阴道或尿道分泌物、脑脊液和透皮渗出物。体液也包括经实验分离的所有前述溶液的分离物或含有均质的固体材料(粪便、组织和活检样品)的混合物。

[0024] 本文所用的术语“离体”是指在受试者之外的环境。因此,从受试者中收集到的体液样品就是离体体液样品。

[0025] 本文所用的术语“缀合物”是指包含两种以上分子任选通过连接基彼此键合而形成单一结构的化合物。结合可通过分子间直接连接(例如化学键)或通过使用连接基。

[0026] 本文所用的术语固体“支持体”“基质”和“表面”是指多孔或无孔的水不溶性材料的固相,其可具有多种形状中的任一种,例如条、棒、颗粒、珠或多孔板。

[0027] 本文所用的术语“肿瘤”是指所有赘生细胞的生长和增殖,无论是恶性还是良性的,以及所有前癌和癌的组织。例如,一种具体的癌症的特征在于实体瘤。可能存在的实体瘤块可以是原发性肿瘤块。原发性肿瘤块是指因组织的正常细胞转化所致的癌症细胞在该组织内的生长。在大多数情况下,原发性肿瘤块可根据囊肿的存在而鉴定,所述囊肿可通过目测或触诊方法而发现,或者原发性肿瘤块通过不规则的组织形状、结构或重量而发现。然而,某些原发性肿瘤无法触诊,仅可通过医学成像技术例如 X 射线(例如乳房 X 射线成像术)、超声波、CT 和 MRI,或者通过针吸来检测。后面的这些技术的应用在早期检测中更常见。对组织中的癌细胞进行分子和表型分析通常证实癌症是否是组织内生的或者病

灶是否是从其它部位转移而来的。

[0028] “样品”（生物样品）可以是来自人或非人类受试者的目标物处于任何物理状态（例如固态、液态、半固态、气态）和任何复杂性（complexity）的组合物。样品可以是合理地怀疑含有可由所公开的方法、装置和试剂盒来分析的 CDH17 的任何组合物。优选样品是液体（生物液体）。可将样品装入试管、培养容器、多孔板或任何其它容器或支持基质中。样品可以是例如细胞培养物或人体组织。细胞组织的液体匀浆是可含有用所公开的方法来检测的 CDH17 的生物液体。其它是液体组织，例如血或尿。

[0029] 样品的“复杂性（complexity）”是指样品中存在的不同分子种类的相对数目。

[0030] 本文所用的术语“标记（label）”和“标签（tag）”是指可提供可检测信号的物质。

[0031] 本文所用的术语“受体”和“受体蛋白”是指与其它分子例如 CDH17 特异性结合的生物活性蛋白质分子。

[0032] 本文所用的术语“配体”是指这样的分子：其含有通过与特定受体蛋白的特异性相互作用而被结合的结构部分。

[0033] 本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分（片段），即含有抗体结合位点或互补位的分子。该术语包括单克隆抗体、多克隆抗体和片段和单链重组抗体。

[0034] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指仅含一类能与特定抗原发生免疫反应的抗体结合位点的抗体分子。

[0035] “编码序列”或“编码区”是能转录为 mRNA 和 / 或翻译为多肽的多核苷酸序列。例如，编码序列可编码目标多肽。编码序列的边界是由 5' - 端的翻译起始密码子和 3' - 端的翻译终止密码子来决定的。编码序列可包括但不限于 mRNA、cDNA 和重组多核苷酸序列。

[0036] 本文所用的术语“多肽”是指包含任何数量氨基酸的任何聚合物，可与“蛋白质”、“基因产物”和“肽”互换。

[0037] 本文所用的术语“核苷”是指具有与核糖或脱氧核糖共价连接的嘌呤碱基或嘧啶碱基的分子。示例性的核苷包括腺苷、鸟苷、胞苷、尿苷和胸苷。

[0038] 术语“核苷酸”是指具有与糖部分以酯键连接的一个或多个磷酸基团的核苷。示例性的核苷酸包括核苷一磷酸、核苷二磷酸和核苷三磷酸。术语“多核苷酸”和“核酸分子”在本文中可互换，是指通过 5' 和 3' 碳原子之间的磷酸二酯键连接在一起的核苷酸聚合物。术语“核酸”或“核酸序列”包括寡核苷酸、核苷酸、多核苷酸或它们的任何片段、基因组或合成来源的 DNA 或 RNA（其可以是单链或双链并且可表示正义链或反义链）、肽核酸（PNA）或天然或合成来源的任何 DNA 样或 RNA 样物质。本领域技术人员将会理解，当核酸是 RNA 时，脱氧核苷酸 A、G、C 和 T 分别被核糖核苷酸 A、G、C 和 U 替代。

[0039] 本文所用的术语“RNA”或“RNA 分子”或“核糖核酸分子”通常是指核糖核苷酸的聚合物。术语“DNA”或“DNA 分子”或“脱氧核糖核酸分子”通常是指脱氧核糖核苷酸的聚合物。DNA 分子和 RNA 分子可天然合成（例如分别通过 DNA 复制或 DNA 转录）。RNA 分子可经翻译后修饰。DNA 分子和 RNA 分子也可经化学合成。DNA 分子和 RNA 分子可以是单链（即分别为 ssRNA 和 ssDNA）或多链（例如双链，即分别为 dsRNA 和 dsDNA）。术语“RNA”或“RNA 分子”或“核糖核酸分子”也可指这样的聚合物：其主要包含（即大于 80% 或优选大于 90%）核糖核苷酸，但任选包含至少一种非核糖核苷酸分子，例如至少一种脱氧核糖核

昔酸和 / 或至少一种核苷酸类似物。

[0040] 本文所用的术语“核苷酸类似物”在本文中也称为“改变的核苷酸”或“修饰的核苷酸”，是指非标准核苷酸，包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。优选的核苷酸类似物在任何位置被修饰，以便核苷酸的某些化学性质发生改变，但仍保持核苷酸类似物行使其预定功能的能力。

[0041] 本文所用的术语“RNA 类似物”是指这样的多核苷酸（例如化学合成的多核苷酸）：其与相应的未经改变或未经修饰的 RNA 相比，具有至少一个改变的或修饰的核苷酸，但保留与相应的未经改变或未经修饰的 RNA 同样或类似的特性或功能。如上所述，寡核苷酸可用这样的键连接：其导致 RNA 类似物与具有磷酸二酯键的 RNA 分子相比降低的水解率。示例性的 RNA 类似物包括糖修饰的和 / 或主链修饰的核糖核苷酸和 / 或脱氧核糖核苷酸。这样的改变或修饰还可包括添加非核苷酸物质，例如到 RNA 末端或内部（在 RNA 的一个或多个核苷酸）。RNA 类似物仅需要与天然 RNA 足够类似，使其具有介导 RNA 干扰或降低靶基因表达的能力。

[0042] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指仅含一种能与特定抗原发生免疫反应的抗体结合位点的抗体分子。因此，单克隆抗体组合物通常表现出对与其发生免疫反应的任何抗原的单一结合亲和力。

[0043] 本文所用的术语“ELISA”包括这样的酶联免疫吸附测定：其利用结合在固相上的抗体或抗原以及酶-抗原缀合物或酶-抗体缀合物，以检测和定量样品中存在的抗原（例如 CDH17）或抗体的含量。

[0044] 本文所用的术语“受试者”、“患者”和“个体”可互换使用，并旨在包括如人类和非人类哺乳动物物种。同样，可对这样的哺乳动物物种的细胞进行体外方法。可将包含本文所公开的外源多核苷酸的宿主细胞给予受试者，并且相对于受试者而言，所述宿主细胞可以例如是自体细胞（使用其自身细胞）、同种异体细胞（从一人到另一人）、或转基因细胞或异种细胞（从一种哺乳动物到另一种哺乳动物）。

[0045] 本文所述的细胞增殖性疾病可以是瘤。这样的瘤可以是良性或恶性的。术语“瘤”是指细胞新的异常生长或比正常复制更快的异常细胞的生长。瘤产生无组织的瘤块（肿瘤），其可以是良性或恶性的。术语“良性”是指并非癌症的肿瘤，例如其细胞不侵袭周围组织或不转移到远处位点。术语“恶性”是指转移并侵袭邻近组织或不再处于正常细胞生长控制之下的肿瘤。

[0046] 本文所用的“临床反应”是受试者对目标基因调节的反应。对治疗的反应的判定标准是广泛被接受的，并能比较备选治疗的功效（参见 Slapak 和 Kufe, Principles of Cancer Therapy, 载于 Harrisons' s Principles of Internal Medicine, 第 13 版, Isselbacher 等编著, McGraw-Hill, Inc. 1994）。完全反应（或完全消除）是所有可检测的恶性疾病都消失。部分反应是一个或多个病灶的最大正交直径的乘积减少大约 50%。可以是任何病灶的大小都未增加或未出现新病灶。进行性疾病是指一个病灶的最大正交直径的乘积增加了至少约 25% 或出现新病灶。在受试者完成治疗之后评价对治疗的反应。

[0047] 本文所用的术语“给予”、“引入”、“施用”、“治疗”、“移植”、“植入”、“递送”及其语法变体可互换使用，以将 CDH17 抑制剂在体外（例如离体）或体内提供给靶细胞，或将带有 CDH17 抑制剂的基因修饰（工程改造）细胞提供给受试者。



[0048] 本文所用的术语“共同给予”及其变体是指将两种以上药剂同时（在一个以上的制剂中）或连续给予。例如，可将一种以上的基因修饰细胞与其它药剂共同给予。

[0049] 本文所用的术语“标记”和“标签”是指可提供可检测信号的物质。包括但不限于酶（例如碱性磷酸酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶和辣根过氧化物酶、核酶）、复制酶例如 QB 复制酶的底物、启动子、染料、荧光剂（例如荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明化合物、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛（o-phthaldehyde）和荧光胺）、化学发光剂（例如异氨基苯二酰肼）、敏化剂、辅酶、酶的底物、放射性标记、颗粒（例如胶乳颗粒或碳颗粒）、脂质体、细胞等，其可进一步带有以下标记：染料、催化剂或其它可检测基团。

[0050] 本文所用的半透膜是指不能渗透液体但允许气体通过而转移的生物相容性材料。所述气体包括但不限于氧气、水蒸气和二氧化碳。半透膜是可用于形成限制流动室空腔（flow chamber cavity）的至少部分框架的材料实例。半透膜能将微生物污染排斥在外（例如孔径特性上足够小，以避免可污染分析物例如细胞的微生物穿过）。在一个特定方面，半透膜可具有足够的光学透明度和澄清度，以允许观察分析物（例如细胞）的颜色、生长、大小、形态、成像和用于本领域众所周知的其它目的。

[0051] 本文所用的术语“结合”是指可为永久性或瞬时性的任何物理联结或紧密缔合。可因例如氢键、疏水力、范德华力、共价键或离子键而导致结合。

[0052] 本文所用的术语“诊断”（“diagnosis”和“diagnostic”）通常包括测定受试者对疾病或病症的易感性、测定受试者目前是否已被疾病或病症所感染、受疾病或病症感染的受试者的预后（例如鉴定转移前或转移的癌症状态、癌症期或癌症对治疗的反应性）和治疗计量（therapeutics）（例如监测受试者的状况，以提供有关治疗作用或功效的信息）。

[0053] 本文所用的术语“颗粒”包括任何构型的不溶性材料，构型包括但不限于球形、线状、刷状和不规则形状等。颗粒可以是多孔的，其内部具有规则或随机孔道。颗粒可以是磁性的。颗粒的实例包括但不限于二氧化硅、纤维素、Sephacrose 珠、聚苯乙烯（固体、多孔、衍生的（derivatized））珠、可控孔度玻璃（controlled-pore glass）、凝胶珠、磁珠、溶胶、生物细胞、亚细胞颗粒、微生物（原生动植物、细菌、酵母、病毒和其它传染原）、胶束、脂质体、环糊精和其它不溶性材料。

[0054] 术语“有效连接”（“operably-linked”或“operatively-linked”）在本文中可互换使用，是指侧翼序列的排列，其中设置或装配所述侧翼序列以便行使它们的常用功能。因此，与编码序列有效连接的侧翼序列也许能够影响编码序列的复制、转录和 / 或翻译。例如，当启动子能指导编码序列转录时，所述编码序列是与启动子有效连接的。侧翼序列不一定毗邻编码序列，只要它恰当地起作用即可。因此，例如，对未翻译、但已转录序列的干预可以介于启动子序列与编码序列之间，而且启动子序列仍可被认为是与编码序列“有效连接”的。编码 siRNA 的每个核苷酸序列通常都具有其自身的有效连接的启动子序列。

[0055] 术语“载体”是指用于将编码信息（例如 CDH17 多核苷酸抑制剂）转移给宿主细胞的任何分子（例如核酸、质粒或病毒）。术语“表达载体”和“转录载体”可互换使用，是指适用于宿主细胞（例如受试者的细胞）并含有指导和 / 或控制外源核酸序列表达的核酸序列的载体。表达包括但不限于转录、翻译和内含子存在时的 RNA 剪接等加工。

[0056] 本文所用术语“RNA 干扰”（“RNAi”）是指 RNA 的选择性胞内降解。RNAi 在细胞中天然存在，用于清除外源 RNA（例如病毒 RNA）。天然 RNAi 的作用是通过从游离 dsRNA 切

下的片段进行（其将降解机制引导至其他类似 RNA 序列）。或者，RNAi 可人工控制启动，以例如沉默内源靶基因（例如 CDH17）的表达。

[0057] 本文所用的术语“癌症”、“肿瘤”和“癌”在本文中可互换使用，是指这样的细胞：其表现出相对自主生长，从而它们表现出特征为明显缺乏细胞增殖控制的异常生长表型。一般而言，在本申请中检测或治疗的目标细胞包括前癌（例如良性）细胞、恶性细胞、转移性细胞和非转移性细胞。对癌细胞的检测是特别令人关注的。

[0058] 本文所用的术语“小干扰 RNA”（“siRNA”）（在本领域也称为“短干扰 RNA”）是指包含约 10-50 个核苷酸（或核苷酸类似物）并能指导或介导 RNA 干扰的 RNA（或 RNA 类似物）。

[0059] 如本文所用，具有“足以与靶 mRNA 序列互补以指导靶特异性 RNA 干扰（RNAi）的序列”的 siRNA 是指该 siRNA 具有这样的序列：所述序列足以触发由 RNAi 机制或过程所致的靶 mRNA（例如 CDH17mRNA）破坏。“mRNA”或“信使 RNA”或“转录物”是决定一种或多种多肽的氨基酸序列的单链 RNA。在蛋白质合成期间，当核糖体与 mRNA 结合时，这种信息就被翻译。

[0060] 本文所用的术语“切割位点”是指这样的残基（例如核苷酸）：在所述残基处 RISC\* 切割靶 RNA，例如邻近靶 RNA 互补部分的中心，例如从靶 RNA 互补部分的 5' 末端开始的约 8-12 个核苷酸。

[0061] 术语“显性失活突变体”是本领域公知的，是指干扰野生型蛋白功能（例如通过与野生型蛋白相互作用）的野生型蛋白的突变形式。因此，可以预期显性失活突变体的过量表达干扰该蛋白质野生型形式的功能。

[0062] 本文所用的术语“错配”是指由非互补碱基组成的碱基对，例如并非正常互补的 G:C、A:T 或 A:U 碱基对。

[0063] 本文所用的术语“分离的”分子（例如分离的核酸分子）是指这样的分子：当通过重组技术产生时，其基本上不含其它细胞材料或培养基，或者当经化学合成时，其基本上不含化学前体或其它化学物质。

[0064] 本文所用的术语“体外”具有其本领域公知的含义，例如包括纯化试剂或提取物，例如细胞提取物。术语“体内”也具有其本领域公知的含义，例如包括有机体内的活细胞，例如有机体内的无限增殖细胞、原代细胞和 / 或细胞系。

[0065] 术语“检测”（“detecting”或“detect”）包括测定或证实靶 CDH17（编码核酸序列的 CDH17 或 CDH17 基因产物（多肽）、其亚基或结合试剂的靶标的组合等的存在与否，或者用于询问、探查、证实或确定肝癌、转移、病期或类似状态的一种或多种实际特征的测定。该术语包括 CDH17 和其它癌症生物标记的诊断、预测和监测应用。该术语包括定量、半定量和定性检测方法。在涉及 CDH17 蛋白（而不是编码 CDH17 蛋白的核酸分子）的检测的实施方法中，检测方法优选基于 ELISA 的方法。优选地，检测方法提供受试者样品中 CDH17 的存在、不存在或含量的相关信息的输出（即读出或信号）。例如，输出可以是定性（例如“阳性”或“阴性”）或定量（例如浓度，例如纳克 / 毫升）的。

[0066] II. CDH17 化合物

[0067] 组合物及其使用方法是根据以下发现：CDH17 水平与肝癌具有正相关性并且可以在低水平时灵敏而选择性地检测 CDH17 水平。

[0068] CDH17 是通常与细胞结构组织和细胞粘附相关的跨膜蛋白钙黏着蛋白家族成员。钙黏着蛋白家族分为表现出常见器官或细胞特异性的成员。钙黏着蛋白 CDH17 与肝和胃肠系统相关。已经证明 CDH17 在 HCC 中过表达,使 CDH17 分子能够用作人类肝癌的肿瘤生物标记。CDH17 在肝癌患者血清中以独特的截短形式存在。钙黏着蛋白-17 (CDH17) 或 LI 钙黏着蛋白 (肝肠钙黏着蛋白) 的基因是编码钙依赖性和膜结合糖蛋白的基因的钙黏着蛋白家族成员。所表达的 CDH17 蛋白由胞外区 (含 7 个钙黏着蛋白结构域)、跨膜区和胞质尾 (其不同于保守钙黏着蛋白胞质结构域) 组成。CDH17 以胃肠道和胰管的肽转运蛋白的形式存在。另外,CDH17 可能在肝和肠的结构组织中起作用。

[0069] 钙黏着蛋白超家族由若干钙黏着蛋白亚家族组成,包括 I 型和 II 型经典钙黏着蛋白。钙黏着蛋白在细胞粘附中通常起到重要作用,确保组织内的细胞结合在一起。它们依赖于钙 ( $\text{Ca}^{2+}$ ) 离子起作用。钙黏着蛋白不同类型通常用表明与它相关的组织类型的单字母前缀来命名 (参见表 1)。同一类型的钙黏着蛋白通常与自身结合 (同型相互作用)。例如,一个 N-钙黏着蛋白将会与另一个 N-钙黏着蛋白分子结合。另外,在某些情况下钙黏着蛋白也将会介导异型相互作用。

	<p><b>表 1. 钙黏着蛋白-人</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CDH1 - E-钙黏着蛋白(上皮)</li> <li>• CDH2 - N-钙黏着蛋白(神经)</li> <li>• CDH3 - P-钙黏着蛋白(胎盘)</li> <li>• CDH4 - R-钙黏着蛋白(视网膜)</li> <li>• CDH5 - VE-钙黏着蛋白(血管内皮)</li> <li>• CDH6 - K-钙黏着蛋白(肾)</li> <li>• CDH7 - 钙黏着蛋白-7</li> <li>• CDH8 - 钙黏着蛋白-8</li> <li>• CDH9 - 钙黏着蛋白-9 (T1-钙黏着蛋白)</li> <li>• CDH10 - 钙黏着蛋白-10 (T2-钙黏着蛋白)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CDH11 - OB-钙黏着蛋白(成骨细胞)</li> <li>• CDH12 - 钙黏着蛋白-12(N-钙黏着蛋白 2)</li> <li>• CDH13 - T-钙黏着蛋白(截短的)/H-钙黏着蛋白(心脏)</li> <li>• CDH15 - M-钙黏着蛋白(肌肉)</li> <li>• CDH16 - Ksp-钙黏着蛋白(肾特异性)</li> <li>• CDH17 - LI 钙黏着蛋白(肝肠)</li> <li>• CDH18 - 钙黏着蛋白-18, (同义词: CDH14)</li> <li>• CDH19 - 钙黏着蛋白-19</li> <li>• CDH20 - 钙黏着蛋白-20</li> </ul>
[0070]		

[0071] 先前已暗示 CDH17 是胃癌转移和预后的预测蛋白 (Park SS 等, Ann Surg Oncol 2007 ;14(1) :94-9 ;Ito R 等, Virchows Arch 2005 ;447(4) :717-22)。也已知道 CDH17 表达与结直肠癌的预后有关 (Kwak JM 等, Dis Colon Rectum 2007 ;50(11) :1873-80)。Takamura 等人发现降低的 CDH17 表达与结直肠癌的进程和更高的转移率相关 (Takamura M 等, Cancer Lett 2004 ;212(2) :253-59)。

[0072] 根据两种单核苷酸多态性,CDH17 具有 HCC 相关的可能遗传风险。Wang XQ 等, Clin Cancer Res 2006 ;12(17) :5248-52。此外,已经发现 CDH17 具有 HCC 相关的其异常转录物剪接。Wang XQ 等, Clin Cancer Res 2005 ;11 :483-489。然而,在没有更多信息情况下,CDH17 在 HCC 中的过表达和异常剪接并不能提供在 HCC 诊断或治疗中的预期应用。在评价这些公开内容的意义中特别重要的是,由意大利实验室检查了可溶性胞间粘附分子-1、可溶性白介素-2 受体、白介素-6 和抗 p53 的血清水平,结论是这些标记都不能用于诊断并且与肝细胞癌的预后无关 (Parasole 等, Clin Cancer Res, 7 :3504-3509(2001))。另外,在

患有肝病的大鼠血清中没有发现 CDH17 增加 (Lucka 等, FEBS Lett, 438 :37-40 (1998))。

[0073] I. CDH17 抑制剂 / 拮抗剂

[0074] (A) 多核苷酸 CDH 17 抑制剂 / 拮抗剂

[0075] CDH17 分子可用作靶标,用于肝癌的分子治疗。使 CDH17 在肝癌细胞中的表达沉默,减轻了肿瘤表型。也已发现对 CDH17 表达的抑制使肿瘤细胞对某些化疗药物和基于 p53 的基因治疗更敏感。一经确诊,使用例如抗 CDH17 单克隆抗体或小干扰 RNA (siRNA) 的 CDH17 靶向治疗,可抑制肿瘤进展并使肿瘤细胞对现有化疗治疗模式敏感。另外,用 CDH17 拮抗剂例如针对 CDH17 的单克隆抗体或 siRNA 治疗 HCC,将会改善目前有限的 HCC 治疗功效。

[0076] 抑制 CDH17 表达的 CDH17 拮抗剂导致裸鼠的肿瘤大小明显减小,其中的肿瘤异种移植植物是来自具有增加的 CDH17 表达的肝癌细胞。当 CDH17 表达在过量表达钙黏着蛋白的肝肿瘤细胞中受到抑制时,肿瘤细胞便对涉及使用化疗药和基因治疗应用的现有疗法更敏感。

[0077] 本文所用的 CDH17 拮抗剂 / 抑制剂是这样的化合物:其能与 CDH17、优选人 CDH17 特异性结合,或与 CDH17 的多核苷酸或其片段结合,并抑制 CDH17 蛋白或多核苷酸的活性和 / 或表达。其实例包括与 CDH17 结合的配体,例如重组或天然的抗体和抗体片段。其它实例包括与 CDH17 多核苷酸或其片段结合的反义寡核苷酸。在优选的实施方案中,CDH17 拮抗剂是 ShRNA。

[0078] (i) ShRNA

[0079] 多核苷酸 CDH17 抑制剂可以是小发夹 RNA (shRNA) 和经工程改造而表达 shRNA 的表达构建体。shRNA 的转录是在聚合酶 III (pol III) 启动子处启动的,并且被认为在 4-5- 胸腺嘧啶转录终止位点的位置 2 处终止。一旦表达后,认为 shRNA 折叠成具有 3' UU- 突出端的茎-环结构;然后,这些 shRNA 的末端被加工,将 shRNA 转化成约 21 个核苷酸的 siRNA 样分子 (Brummelkamp 等, Science 296 :550-553 (2002); Lee 等, Nature Biotechnol. 20 : 500-505 (2002); Miyagishi 和 Taira, Nature Biotechnol. 20 :497-500 (2002); Paddison 等, Genes Dev. 16 :948-958 (2002); Paul 等, Nature Biotechnol. 20 :505-508 (2002); Sui (2002) 出处同上; Yu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99 (9) :6047-6052 (2002)。

[0080] 在优选的实施方案中,用于通过靶向外显子 3 而敲减 CDH17 表达的 RNA 发夹序列是

[0081] TGCTGTTGACAGTGAGCGACCAAGAACCGAGTCAAATTATTAGTGAAGCCACAGATGTAATAATTTGAC TCGGTTCTGGCTGCCTACTGCCTCGGA (SEQ ID NO :2)。

[0082] 用于靶向外显子 5 的 shRNA 双链体的正向部分是

[0083] GATCCCGCCAGTCCCTATCACCATAGAGAAGCTTGTCTATGGTGATAGGGACTGGTTTTTT (SEQ ID NO :3),用于靶向外显子 5 的 shRNA 双链体的反向部分是

[0084] CTAGAAAAAACCAGTCCCTATCACCAT

[0085] AGACAAGCTTCTCTATGGTGATAGGGACTGGCGG (SEQ ID NO :4)。

[0086] RNA 干扰

[0087] RNAi 是一个有效过程,其中双链 RNA (dsRNA,在本文中也称为 siRNA 或 ds siRNA,对于双链小干扰 RNA) 诱导动植物细胞中的被靶向的 mRNA 的序列特异性降解 (Hutvagner 和 Zamore, Curr. Opin. Genet. Dev. :12, 225-232 (2002); Sharp, Genes Dev. ,

15:485-490(2001))。在哺乳动物细胞中, RNAi 可由以下物质触发:小干扰 RNA(siRNA) 的 21-核苷酸(nt)双链体(Chiu 等, Mol. Cell. 10:549-561(2002); Elbashir 等, Nature 411:494-498(2001))、或微小 RNA(miRNA)、功能性小发夹 RNA(shRNA) 或者可利用带有 RNA 聚合酶 III 启动子的 DNA 模板体内表达的其它 dsRNA(Zeng 等, Mol. Cell 9:1327-1333(2002); Paddison 等, Genes Dev. 16:948-958(2002); Lee 等, Nature Biotechnol. 20:500-505(2002); Paul 等, Nature Biotechnol. 20:505-508(2002); Tuschl, T., Nature Biotechnol. 20:440-448(2002); Yu 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(9):6047-6052(2002); McManus 等, RNA 8:842-850(2002); Sui 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(6):5515-5520(2002)), 其各自通过引用以其整体结合到本文中。

[0088] 科学文献包含突出它们的治疗潜力的许多利用 siRNA 的内源和外源基因表达沉默的报道(Gupta, S. 等, PNAS, 2004, 101:1927-1932; Takaku, H. Antivir Chem. Chemother, 2004, 15:57-65; Pardridge, W. M. Expert Opin. Biol. Ther., 2004, 4:1103-1113; Zheng, B. J. Antivir. Ther., 2004, 9:365-374; Shen, W. G. Chin. Med. J. (Engl), 2004, 117:1084-1091; Fuchs, U. 等, Curr. Mol. Med., 2004, 4:507-517; Wadhwa, R. 等, Mutat. Res., 2004, 567:71-84; Ichim, T. E. 等, Am. J. Transplant, 2004, 4:1227-1236; Jana, S. 等, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2004, 65:649-657; Ryther, R. C. 等, Gene Ther., 2005, 12:5-11; Chae, S-S. 等, J. Clin. Invest., 2004, 114:1082-1089; Fougerolles, A. 等, Methods Enzymol., 2005, 392:278-296), 其各自通过引用以其整体结合到本文中。文献中已经描述了通过系统给予 siRNA 而使内源基因发生治疗性沉默(Kim B. 等, American Journal of Pathology, 2004, 165:2177-2185; Soutschek J. 等, Nature, 2004, 432:173-178; Pardridge W. M., Expert Opin. Biol. Ther., 2004, July, 4(7):1103-1113), 其各自通过引用以其整体结合到本文中。

[0089] 因此, 药物组合物含有有效量的靶向 CDH17 mRNA 的这类干扰 RNA 分子。当将干扰 RNA 分子适当引入异常表达 CDH17 mRNA 的细胞中或在其中表达时, 所述干扰 RNA 分子能够通过 RNAi 而抑制 CDH17 基因表达。干扰 RNA 可以是双链 siRNA。siRNA 分子也可包含短的 3' DNA 序列。备选地, 所述核酸可以是 DNA(通常是双链 DNA), 当在细胞中转录时, 其产出具有通过间隔物连接的两个互补部分的 RNA, 从而当互补部分彼此杂交时, 所述 RNA 呈现发夹形式。在哺乳动物细胞中, 可由切酶将发夹结构从所述分子上切割下来, 得到两个不同的、但已杂交的 RNA 分子。

[0090] (ii) siRNA 分子

[0091] 短干扰 RNA(siRNA) 通过 RNAi 过程诱导序列特异性抑制或沉默(即降低表达, 其可达到部分或完全抑制的程度)基因。因此, siRNA 是 RNAi 过程的中间效应物分子。起 CDH17 抑制剂作用的干扰 RNA 包括在每条链上含有 16-30 个(例如 16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 个)核苷酸的 dsRNA 分子, 其中一条链与 CDH17 mRNA 的靶区基本相同, 例如具有至少 80%(或更多, 例如 85%、90%、95%或 100%)的同一性, 例如具有 3、2、1 或 0 个错配的核苷酸, 而另一条链与第一条链相同或基本相同。起 CDH17 抑制剂作用的 dsRNA 分子可以经化学合成, 或者可在体外从 DNA 模板转录而来, 或者在体内从例如 shRNA 转录而来。可采用本领域已知的任何方法来设计 dsRNA 分子, 例如通过采用以下方案:

[0092] 1. 使用本领域已知的任何方法,将潜在靶标与合适的基因组数据库(人、小鼠、大鼠等)进行比较并且从考虑中排除与其它编码序列具有显著同源性的任何靶序列。这类用于序列同源性搜索的方法之一称为BLAST,其可得自美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)的国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)网站。还可得自NCBI网站的是HomoloGene数据库,这是公众可得的用于自动化检测若干完全测序的真核基因组的已注释基因之间同源性的系统,并且是本领域普通技术人员容易使用的。

[0093] 2. 选择满足你的评价标准的一个或多个序列。有关siRNA的设计和使用的更多一般信息可参见“The siRNA User Guide”,得自洛克菲勒大学Thomas Tuschl博士的实验室网站(Elbashir等,EMBO J.,20:6877-6888(2001))。

[0094] 3. 阴性对照siRNA优选具有与所选siRNA相同的核苷酸组成,但与合适基因组没有显著的序列互补性。可通过随机打乱所选siRNA的核苷酸序列而设计这样的阴性对照;可进行同源性搜索以确保阴性对照缺乏与合适基因组中任何其它基因的同源性。另外,可通过将一个或多个碱基错配引入序列而设计阴性对照siRNA。

[0095] 首先,定义鉴定有效siRNA的基本标准,例如GC含量和靶序列在mRNA中的位置(Elbashir SM.等,Methods,26:199-213(2002))。新近已取得更多进展,RNAi酶复合体的装配被描述为是依赖于siRNA热力学特征(Khrvorova A.等,Cell,115:209-216(2003);Schwarz D. S.等,Cell,115:199-208(2003))。双链体两端的相对稳定性经测定对每条链进入siRNA途径的程度都有影响。另外,在siRNA指定位置上的某些序列基序据报道会影响其效力(Amarzguioui等,Biochem. Biophys. Res. Commun.,316:1050-1058(2004);Reynolds等,Nature Biotechnol.,22:326-330(2004))。在此基础上,已经开发出复杂的算法以增加siRNA设计的成功率并且是本领域技术人员可用的(Amarzguioui等,2004;Reynolds等,2004;和Ui-Tei等,Nucl. Acids Res.,32:936-948(2004),其各自通过引用以其整体结合到本文中)。可用于选择siRNA的其它计算工具载于Yuan等,Nucleic Acids Research,第32卷,W130-W134,(2004)和Bonetta,Nature Methods,1(1):79-86(2004),其各自通过引用以其整体结合到本文中。

[0096] 合理设计有效的干扰RNA的策略公开于Gong等,Trends in Biotechnol.,22(9):451(2004);Schubert等,J. Mol. Biol.,348:883-893(2005);Pancoska等,Nucleic Acids Res.,32(4):1469-1479(2004);和Mittal,Nat. Rev. Genet.,5(5):355-365(2004)(其各自通过引用以其整体结合到本文中)。

[0097] 可以按照例如以下文献所公开的方法,采用细胞培养物筛选最有效siRNA:Yang D.等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA,2002,99:9942-9947;Myers J. W.等,Nat. Biotechnol.,2003,21:324-328)。已经发现由这样消化而产生的短RNA在RNAi中有效。寡核苷酸阵列也可用于有效制备用于降低外源基因和内源基因例如CDH17表达的指定的siRNA混合物(Oleinikov A. V.等,Nucleic Acids Research,2005,33(10):e92)。

[0098] 未经修饰的siRNA和经修饰的siRNA都可使用。因此,可使用这样的siRNA衍生物:其包括具有两条互补核酸链从而使这两条链交联的siRNA。例如,一条链的3' OH端可被修饰,或者这两条链可以交联并在3' OH端被修饰。siRNA衍生物可含有单一交联(例如补骨脂素交联)。在某些实施方案中,可将siRNA与另一部分例如纳米颗粒缀合,以增强

所述组合物的性能,例如药代动力学参数,例如吸收、功效、生物利用度和 / 或半寿期。在这些实施方案中,siRNA 衍生物将在例如其 3' 端具有生物素分子(例如可光裂解的生物素)、肽(例如 Tat 肽)、纳米颗粒、肽模拟物、有机化合物(例如染料如荧光染料)或树枝状大分子(dendrimer)。按照这种方式修饰 siRNA 衍生物可与相应的 siRNA 相比改善细胞摄取或增强细胞对所得 siRNA 衍生物的靶向活性;可用于追踪细胞中的 siRNA 衍生物;或与相应 siRNA 相比能改善 siRNA 衍生物的稳定性的。

[0099] 可以通过本领域已知方法完成缀合,例如,采用例如以下文献所公开的本领域已知方法:Lambert 等, *Drug Deliv. Rev.* 47(1):99-112(2001);Fattal 等, *J. Control Release* 53(1-3):137-43(1998);Schwab 等, *Ann. Oncol.* 5 Suppl. 4:55-8(1994); 和 Godard 等, *Eur. J. Biochem.* 232(2):404-10(1995)。

[0100] 也可采用本领域已知的任何方法标记 siRNA;例如,核酸可用例如 Cy3、荧光素或罗丹明等荧光团标记。可用试剂盒例如 SILENCER siRNA 标记试剂盒(AMBIION)进行标记。另外,siRNA 可带有放射性标记,例如使用  $^3\text{H}$ 、 $^{32}\text{P}$  或其它合适的同位素。

[0101] 因为据信 RNAi 是通过至少一种单链 RNA 中间体而进行,技术人员将会理解,也可按照本文所述来设计 ss-siRNA(例如 ds-siRNA 的反义链)并按照要求保护的方法来使用。

[0102] 有许多公司都生产用于特定基因的干扰 RNA。Thermo Electron Corporation(Waltham,MA)已经开办了合成短干扰 RNA(siRNA)的定制合成服务。每条链由 18-20 个 RNA 碱基和在 3' 端突出的 2 个 DNA 碱基组成。Dharmacon, Inc. (Lafayette, CO) 采用 2' -ACE RNA 合成技术提供 siRNA 双链体。Qiagen(Valencia, CA) 使用 TOM- 化学,以高个体偶联得率而提供 siRNA(Li 等, *Nat. Med.*, 11(9):944-951(2005)。

[0103] 可将靶向 CDH17 mRNA 的 siRNA 与其它核苷酸分子或多肽融合,以便指导其它它们的递送或完成其它功能。因此,例如,包含能特异性干扰 CDH17 表达的 siRNA 寡核苷酸的融合蛋白可包含亲和和标签多肽序列,所述亲和和标签多肽序列是指通过与配体的特异性亲和和相互作用促进多肽的检测和分离的多肽或肽。配体可以是任何分子、受体、反受体、抗体等,亲和和标签可通过本文所述的特异性结合相互作用与其相互作用。这样的肽包括例如聚 His 或“FLAG”等,例如以下文献所述的抗原识别肽:美国专利号 5,011,912 和 Hopp 等(*Bio/Technology* 6:1204,1988)或 XPRESS 表位标签(INVITROGEN, Carlsbad, Calif.)。在细菌宿主的情况下,亲和序列可以是例如由 pBAD/His(INVITROGEN)或 pQE-9 载体来供应的六组氨酸标签,以便为纯化与标记融合的成熟多肽作准备,或者,例如,当使用哺乳动物宿主例如 COS-7 细胞时,亲和序列可以是血凝素(HA)标签。HA 标签对应于来源于流感血凝素蛋白的抗体限定表位(Wilson 等,1984 *Cell* 37:767)。

[0104] (iii) 反义寡核苷酸

[0105] “反义”核酸序列(反义寡核苷酸)可包括与编码蛋白质的“有义”核酸互补(例如与双链 cDNA 分子编码链互补或与 CDH17 mRNA 互补)的核苷酸序列。反义核酸序列和递送方法是本领域众所周知的(Goodchild, *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 6(2):120-128(2004); Clawson 等, *Gene Ther.*, 11(17):1331-1341(2004)),其通过引用以其整体结合到本文中。反义核酸可与靶序列的完整编码链互补,或仅与其部分互补。在另一个实施方案中,反义核酸分子对 CDH17 mRNA 中的核苷酸序列的编码链的“非编码区”而言是反义的。反义寡核苷酸的长度可以是例如约 7、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80 个或更多个

核苷酸。

[0106] 可设计反义核酸序列,使其与完整的 CDH17 mRNA 序列互补,但反义核酸序列也可以是仅对部分 CDH17 mRNA 是反义的寡核苷酸。例如,反义寡核苷酸可以与部分 CDH17 酶结构域(肌醇 5'-磷酸酶结构域)或部分氨基端 src-同源结构域(SH2)互补。

[0107] 可使用化学合成和酶促连接反应,采用本领域已知的方法构建反义核酸。例如,可使用天然存在的核苷酸或各种修饰核苷酸化学合成反义核酸(例如反义寡核苷酸),所述修饰核苷酸是设计用于增加分子的生物稳定性或者用于增加反义与有义核酸间所形成的双链体的物理稳定性,例如可以使用硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸。也可通过生物方法,使用已将核酸以反义方向(即从所插入核酸转录而来的 RNA 与目标靶核酸呈反义方向,其进一步描述见以下部分)亚克隆到其中的表达载体,产生反义核酸。

[0108] 有用的反义寡核苷酸的其它实例包括  $\alpha$ -端基异构的核酸。 $\alpha$ -端基异构的核酸分子与互补 RNA 构成特异性双链杂合体,其中与常见的  $\beta$ -亚基不同的是,这些链彼此平行(Gaultier 等, *Nucleic Acids. Res.* 15 :6625-6641(1987))。反义核酸分子也可包括 2'-O-甲基核糖核苷酸(Inoue 等, *Nucleic Acids Res.* 15 :6131-6148(1987))或嵌合 RNA-DNA 类似物(Inoue 等, *FEBS Lett.*, 215 :327-330(1987))。

[0109] (iv) 核酶

[0110] 核酶是可经工程改造而以特异性序列依赖性方式酶促切割和钝化其它 RNA 靶标的一类 RNA。核酶及其递送方法是本领域众所周知的(Hendry 等, *BMC Chem. Biol.*, 4(1) : 1(2004);Grassi 等, *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 5(4) :369-386(2004);Bagheri 等, *Curr. Mol. Med.*, 4(5) :489-506(2004);Kashani-Sabet M., *Expert Opin. Biol. Ther.*, 4(11) : 1749-1755(2004),其各自通过引用以其整体结合到本文中。通过切割靶 RNA,核酶抑制翻译,因而阻止靶基因的表达。可采用本领域已知方法,在实验室中化学合成核酶并对其进行结构修饰以增加其稳定性和催化活性。或者,可通过本领域已知的基因递送机制,将核酶基因引入细胞中。

[0111] 对 CDH17 mRNA 具有特异性的核酶可包括与 CDH17 mRNA 中的核苷酸序列互补的一个或多个序列,和具有负责 mRNA 切割的已知催化序列的序列(参见美国专利号 5,093,246 或 Haselhoff 等, *Nature* 334 :585-591(1988))。例如,可构建四膜虫 L-19 IVS RNA 衍生物,其中活性位点的核苷酸序列与 mRNA 中被切割的核苷酸序列互补,所述 mRNA 是由延伸、重叠的 5'-UTR AS mRNA 的 uORF 编码的(参见例如美国专利号 4,987,071 和 5,116,742)。备选地,CDH17 mRNA 可用于从 RNA 分子库中选择出具有特异性核糖核酸酶活性的催化 RNA(Bartel 等, *Science*, 261 :1411-1418(1993))。

[0112] (v) 载体和构建体

[0113] 也提供包含或编码多核苷酸 CDH17 抑制剂(例如 siRNA)的载体和构建体,尤其涉及:包括可经转录而得到 CDH17 特异性 siRNA 多核苷酸抑制剂的任何核酸(例如 DNA 多核苷酸区段)的“重组核酸构建体”;利用包含多核苷酸抑制剂的载体和/或构建体基因工程改造的宿主细胞;以及通过重组技术生产 siRNA 多核苷酸、多肽和/或融合蛋白、或其片段或变体。采用充分建立的方法例如本文所述方法,可对本文所公开的作为 RNA 多核苷酸的 siRNA 序列进行工程改造而产生相应 DNA 序列。因此,例如可从本文所述的任何 siRNA 序列产生 DNA 多核苷酸,从而将本发明的 siRNA 序列确定为也提供相应 DNA 多核苷酸(及其互



补物)。

[0114] 载体可包括含用于 RNA 分子转录的一个或多个启动子例如人 U6 snRNA 启动子的重组核酸构建体(参见例如 Miyagishi 等, *Nat. Biotechnol.* 20 :497-500(2002); Lee 等, *Nat. Biotechnol.* 20 :500-505(2002); Paul 等, *Nat. Biotechnol.* 20 :505-508(2002); Grabarek 等, *BioTechniques* 34 :73544(2003); 另见 Sui 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99 :5515-20(2002))。siRNA 多核苷酸的每条链都可在各自启动子的指导之下分别转录,然后在细胞内杂交而形成 siRNA 多核苷酸双链体。也可从各自的载体中转录各条链(参见 Lee 等, 出处同上)。备选地,对 CDH17 mRNA 序列具有特异性的有义和反义序列可在单一启动子的控制之下转录,使 siRNA 多核苷酸形成发夹分子(Paul 等, 出处同上)。在这种情况下, siRNA 特异性序列的互补链被间隔物分开,所述间隔物包含至少 4 个核苷酸,但可包含至少 5、6、7、8、9、10、11、12、14、16 或 18 个或更多个核苷酸,如本文所述。另外,在 U6 启动子控制之下转录而形成发夹的 siRNA 在 3' 末端可具有大约 4 个尿苷的延伸,其作用是作为转录终止信号(Miyagishi 等, 出处同上; Paul 等, 出处同上)。举例说明,如果靶序列是 19 个核苷酸,则 siRNA 发夹多核苷酸(从 5' 末端开始)具有 19-核苷酸的有义序列,后面是间隔物(其是靠近该 19-核苷酸的有义序列的 3' 末端的 2 个尿嘧啶核苷酸),而且间隔物与 19-核苷酸的反义序列连接,后面是 4-尿苷的终止序列,其导致突出端。具有所述突出端的 siRNA 多核苷酸有效干扰靶多肽的表达。也可用另一个 RNA 聚合酶 III 启动子即 H1 RNA 启动子来制备重组构建体,所述启动子可与 siRNA 多核苷酸特异性序列有效连接,用于转录包含 siRNA 特异性序列的发夹结构或分别转录 siRNA 双链体多核苷酸的每条链(参见例如 Brummelkamp 等, *Science* 296 :550-53(2002); Paddison 等, 出处同上)。可用于插入转录 siRNA 多核苷酸的序列的 DNA 载体包括 pSUPER 载体(参见例如 Brummelkamp 等, 出处同上);衍生自 pCWRSVN 的 pAV 载体(参见例如 Paul 等, 出处同上);和 pIND(参见例如 Lee 等, 出处同上)等。

[0115] 可通过多种方法将合适的 DNA 序列插入到载体中。一般而言,通过本领域已知方法将 DNA 序列插入到合适的限制酶位点。用于克隆、DNA 分离、扩增和纯化的标准技术、涉及 DNA 连接酶、DNA 聚合酶、限制酶等酶促反应的标准技术,和各种分离技术都是本领域技术人员已知和常用的。各种标准技术描述于例如以下文献:Ausubel 等(1993 *Current Protocols in Molecular Biology*(分子生物学的通用方案), Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., Boston, Mass.); Sambrook 等(2001 *Molecular Cloning*(分子克隆), 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N. Y.); Maniatis 等(1982 *Molecular Cloning*(分子克隆), Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, N. Y.); 和其它文献。

[0116] 表达载体中的 DNA 序列与至少一个合适的表达控制序列(例如启动子或调节启动子)有效连接,以指导 mRNA 合成。这类表达控制序列的代表性实例包括 LTR 启动子或 SV40 启动子、大肠杆菌 lac 启动子或 trp 启动子、 $\lambda$  噬菌体  $P_L$  启动子以及已知在原核或真核细胞或其病毒中控制基因表达的其它启动子。可使用 CAT(氯霉素转移酶)载体或具有选择性标记的其它载体,从任何所需基因中选择启动子区。真核启动子的实例包括 CMV 立即早期启动子、HSV 胸苷激酶启动子、早期和晚期 SV40 启动子、来自逆转录病毒的 LTR 启动子和小鼠金属硫蛋白 -I 启动子。对合适载体和启动子的选择是在本领域普通技术人员的水平

范围之内,本文描述了包含与本发明多核苷酸有效连接的至少一个启动子或调节启动子的某些特别优选的重组表达构建体的制备。

[0117] 在某些实施方案中,载体可以是病毒载体例如哺乳动物病毒载体(例如逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒、慢病毒)。例如,可从其得到逆转录病毒质粒载体的逆转录病毒包括但不限于莫洛尼鼠白血病毒、脾坏死病毒、逆转录病毒例如劳斯肉瘤病毒、Harvey 肉瘤病毒、禽类白血病毒、长臂猿白血病毒、人免疫缺陷病毒、腺病毒、骨髓增殖性肉瘤病毒和乳腺癌病毒。

[0118] 病毒载体包含一个或多个启动子。可使用的合适启动子包括但不限于逆转录病毒 LTR 启动子;SV40 启动子;和人巨细胞病毒(CMV)启动子,其描述于 Miller 等, *Biotechniques* 7:980-990(1989);或任何其它启动子(例如细胞启动子例如真核细胞启动子,包括但不限于组蛋白启动子、*pol* III 启动子和  $\beta$ -肌动蛋白启动子)。可使用的其它病毒启动子包括但不限于腺病毒启动子、腺伴随病毒启动子、胸苷激酶(TK)启动子和 B19 细小 DNA 病毒启动子。根据本文所述教导来选择合适启动子对本领域技术人员而言是显而易见的,并且合适启动子可选自调节启动子(例如组织特异性启动子或诱导型启动子)或如上所述的启动子。组织特异性启动子允许多核苷酸 CDH17 抑制剂在指定靶组织中优先表达,因而避免在其它组织中表达。肝特异性启动子包括人苯丙氨酸羟化酶(PAH)基因启动子(Bristeau 等, *Gene* 274:283-291,2001)、hB1F 启动子(Zhang 等, *Gene* 273:239-249,2001)和人 C-反应蛋白(CRP)基因启动子(Ruther 等, *Oncogene* 8:87-93,1993)。

[0119] (vi) 宿主细胞

[0120] 也提供含有上述重组构建体的宿主细胞。多核苷酸 CDH17 抑制剂可在合适启动子的控制之下,在哺乳动物细胞、酵母、细菌或其它细胞中表达,提供了用于评价如本文所述能干扰 CDH17 表达的 siRNA 多核苷酸的现成系统。用于原核和真核宿主的合适的克隆载体和表达载体描述于例如 Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验手册),第 3 版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y., (2001)。

[0121] 用所公开的载体和/或表达构建体例如克隆载体、穿梭载体或表达构建体,对宿主细胞进行基因工程改造/基因修饰(转导、转化或转染)。载体或构建体可以呈例如质粒、病毒颗粒、噬菌体等的形式。可将工程改造宿主细胞在修改的常规营养培养基中培养,所述修改是为了适于激活启动子、选择转化体或扩增特定基因例如编码 siRNA 多核苷酸或其融合蛋白的基因。选择用于表达的特定宿主细胞的培养条件,例如温度、pH 等,对本领域普通技术人员而言将是显而易见的。

[0122] 宿主细胞可以是诸如哺乳动物细胞等高等真核细胞或诸如酵母细胞等低等真核细胞,或者宿主细胞可以是原核细胞,例如细菌细胞。合适的宿主细胞的代表性实例包括但不限于:诸如大肠杆菌、链霉菌、鼠伤寒沙门氏菌等细菌细胞;酵母等真菌细胞;诸如果蝇 S2 和灰翅夜蛾(*Spodoptera*) Sf9 等昆虫细胞;诸如 CHO 细胞、COS 细胞或 293 细胞等动物细胞;腺病毒;植物细胞或者已经适应体外繁殖或照此从头建立的任何合适的细胞。

[0123] 也可使用多种哺乳动物细胞培养系统,从本文所公开的重组核酸构建体中产生多核苷酸 CDH17 抑制剂。因此,还提供通过培养包含重组核酸构建体的宿主细胞产生多核苷酸例如 siRNA 的方法,所述构建体包括与多核苷酸 CDH17 抑制剂有效连接的至少一个启动子。在某些实施方案中,启动子可以是本文所提供的调节启动子,例如四环素阻遏启动子。

在某些实施方案中,重组表达构建体是本文所提供的重组病毒表达构建体。哺乳动物表达系统的实例包括猴肾成纤维细胞的 COS-7 系,其描述于 Gluzman, Cell 23:175(1981);以及能表达相容性载体的其它细胞系,例如 C127、3T3、CHO、HeLa、HEK 和 BHK 细胞系。例如如本文所述就重组多核苷酸构建体的制备而言,哺乳动物表达载体将包含复制起点、合适的启动子和增强子、以及任何必需的核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、剪接供体位点和受体位点、转录终止序列和 5' 侧翼非转录序列。衍生自 SV40 剪接的 DNA 序列和聚腺苷酸化位点可用于提供所需的非转录遗传元件。可通过多种方法将构建体引入宿主细胞,所述方法都将是本领域技术人员熟知的,包括但不限于例如包括阳离子型脂质体在内的脂质体、磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖介导的转染或电穿孔(Davis 等,1986 Basic Methods in Molecular Biology(分子生物学基本方法))或其它合适的技术。

[0124] 所表达的多核苷酸可用于完整的宿主细胞;用于完整的细胞器例如细胞膜、胞内小泡或其它细胞器;或用于破碎的细胞制备物,包括但不限于细胞匀浆或裂解物、微粒体、单层和多层膜囊泡或其它制备物。备选地,可通过包括以下在内方法从重组细胞培养物中回收并纯化所表达的多核苷酸:硫酸铵或乙醇沉淀、酸提取、阴离子或阳离子交换色谱、磷酸纤维素色谱、疏水性相互作用色谱、亲和色谱、羟基磷灰石色谱和凝集素色谱。最后,可使用高效液相色谱(HPLC)进行最终的纯化步骤。

[0125] 一般而言,靶核酸是 DNA 或 RNA。然而,所公开的方法可使用例如含有 DNA 或者 DNA 和 RNA(包括信使 RNA)的样品,其中 DNA 或 RNA 可以是单链或双链,或者样品中可包含 DNA-RNA 杂合体。也可使用核酸混合物。所检测的特异性核酸序列可以是较大分子的一部分或者可以最初呈离散的分子的形式,以便特异性序列组成完整核酸。所研究的序列不必在开始就呈纯的形式;核酸可以是复杂混合物的一小部分,例如包含在完整的人体 DNA 中。可通过例如以下文献所述的多种技术来提取用于测定靶细胞对放疗的敏感性的含核酸的样品:Sambrook 等(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989;通过引用以其整体结合到本文中)。

[0126] 可从受试者的生物样品中获取表达从受试者中分离的靶核酸的细胞。可从以下材料中分离细胞或核酸:肿瘤组织、血、血浆、血清、淋巴、淋巴结、脾脏、骨髓或含有靶核酸的任何其它生物样品。可通过本领域技术人员已知的多种医学方法获取肿瘤组织、血、血浆、血清、淋巴、脾脏和骨髓。

[0127] (B)CDH17 抗体

[0128] 在优选的实施方案中,用于所公开的方法的抗体是生物样品中的 CDH17 单克隆抗体。更优选的是,提供跨越 CDH17 结构域 1 和 2(D1-D2) 的区域的单克隆抗体;这使得对 CDH17 的检测集中在容易分泌到 HCC 患者血清中的蛋白质形式上。

[0129] 单克隆抗体组合物通常由称为杂交瘤的单细胞克隆产生的抗体组成,所述杂交瘤仅分泌(产生)一种抗体分子。通过将产生抗体的细胞与骨髓瘤或其它自身永久增殖的细胞系融合而形成杂交瘤细胞。这类抗体最先是由以下文献描述的:Kohler 和 Milstein, Nature,1975,256:495-497,其公开内容通过引用结合到本文中。示例性的杂交瘤技术描述于 Niman 等,Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.,1983,80:4949-4953。产生单克隆抗体、杂交瘤细胞或杂交瘤细胞培养物的其它方法也是众所周知的。参见例如 Antibodies:A Laboratory Manual, Harlow 等, Cold Spring Harbor Laboratory,1988;或者从免疫混合

物 (immunological repertoire) 中分离单克隆抗体的方法描述于 Sasatry 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86 :5728-5732 ;和 Huse 等, Science, 1981, 246 :1275-1281。所引用的参考文献都通过引用结合到本文中。

[0130] 为了产生单克隆抗体,用 CDH17 蛋白或肽接种宿主哺乳动物,然后加强接种。在最后一次加强接种几天后,从接种哺乳动物中采集脾脏。按照 Kohler 和 Milstein (Nature, 1975, 256 :495-497) 所述的通用方法,将来自脾脏的细胞悬液与肿瘤细胞融合。为了应用,肽片段必须含有足够的氨基酸残基,以限定所检测的 CDH17 分子的表位。

[0131] 如果片段太短而没有免疫原性,则可使其与载体分子缀合。一些合适的载体分子包括匙孔血蓝蛋白和牛血清白蛋白。可通过本领域已知方法进行缀合。这类方法之一是将所述片段的半胱氨酸残基与载体分子的半胱氨酸残基结合。可通过本领域已知方法合成肽片段。某些合适的方法描述于 Stuart 和 Young “Solid Phase Peptide Synthesis (固相肽合成),” 第 2 版, Pierce Chemical Company (1984)。

[0132] 可用于所公开的方法的、对 CDH17 具有特异性的其它抗体可得自科学或商业来源。备选地,分离的天然 CDH17 或重组 CDH17 可用于制备抗体、单克隆抗体或多克隆抗体、以及免疫活性片段 (例如 Fab 或 (Fab)<sub>2</sub> 片段)、抗体重链、抗体轻链、人源化抗体、基因工程改造的单链 F<sub>v</sub> 分子 (Ladne 等, 美国专利号 4, 946, 778) 或嵌合抗体,例如含有鼠抗体的结合特异性、同时又保留人源部分的抗体。可用本领域技术人员已知的方法制备包括单克隆抗体和多克隆抗体,片段和嵌合体在内的抗体。优选地,如果用于所公开方法的抗体对 CDH17 的结合 K<sub>a</sub> 大于等于 10<sup>7</sup> M 时,则该抗体对 CDH17 具有反应性。在夹心免疫测定中使用小鼠多克隆抗体和兔多克隆抗体。

[0133] 可从已知的 CDH17 基因序列及其所编码的氨基酸序列中鉴定优选的结合表位,并用于产生具有高结合亲和力的 CDH17 抗体。另外,对 CDH17 结合表位的鉴定可用于设计和构建优选抗体。例如,可重组表达编码优选的 CDH17 表位的 DNA,并用于选择选择性结合该表位的抗体。然后,在足以使抗体与 CDH17 的特异性结合表位特异性结合的条件下,将所选抗体暴露给样品,然后检测所形成的复合物的量。特异性抗体方法学是众所周知的并描述于文献中。其制备的更详细描述可参见例如 Practical Immunology, Butt, W. R. 主编, Marcel Dekker, New York, 1984。

[0134] 可通过技术人员已知的多种方法完成对抗体或片段的纯化,所述方法包括硫酸铵或硫酸钠沉淀后针对盐水透析、离子交换色谱、亲和或免疫亲和色谱以及凝胶过滤、区带电泳等 (载于 Goding, Monoclonal Antibodies : Principles and Practice (单克隆抗体 : 原理和实践), 第 2 版, 第 104-126 页, Orlando, Fla., Academic Press)。优选使用具有至少部分 CDH17 结合区的纯化抗体或纯化抗体片段,其包括例如 F<sub>v</sub>、F(ab')<sub>2</sub>、Fab 片段 (Harlow 和 Lane, 1988, Antibody, Cold Spring Harbor Laboratory Press), 以检测肝癌患者或风险受试者的体液,优选肝癌患者的尿或血中的 CDH17。

[0135] 已经开发出一组识别 CDH17 的不同表位的已表征的单克隆抗体。这些抗体可用于在诊断测定中选择性区分肝肿瘤。识别分泌到 HCC 患者血清中的独特截短 CDH17 (跨越结构域 1 和结构域 2 (D1-D2)) 分子的单克隆抗体可作为 HCC 的优良诊断试剂。CDH17 分子及其特异性单克隆抗体的应用导致对肝癌的治疗。对 CDH17 具有特异性的单克隆抗体可用于筛选测定,以检测 HCC 患者肝肿瘤组织和血清中该分子的存在情况。抗 CDH17 抗体优选针

对 CDH17 分子的血清 - 分泌特异性 D1-D2 表位。这些单克隆抗体也可用作载体, 以将负载物 (例如核酸、药物或毒素) 递送给在细胞表面高度表达 CDH17 的肝肿瘤细胞; 或者简单地作为 CDH17 拮抗剂, 以抑制肿瘤细胞中 CDH17 的活性。另外, 当需要时, 杂交瘤细胞系提供产生单克隆抗体的无限来源。培养杂交瘤细胞可经济地产生大量抗体。因此, 提供了使用单克隆抗体来检测 / 监测生物样品中 CDH17 的存在情况的成本效果合算方法。

### [0136] III. 药物组合物

[0137] 可将 CDH17 抑制剂 (在本文中也称为“活性化合物”) 掺入到适于给药的药物组合物中。这类组合物通常包含药物有效量的 CDH17- 抑制性核酸分子、蛋白质或抗体以及药学上可接受的载体。本文所用的术语“治疗有效量”是指由研究人员、兽医、医生或其它临床医师所寻求的 CDH17 抑制剂单独或与另一药剂联合使用时在细胞 (例如组织) 中引发生物反应或医学反应 (包括减轻和 / 或预防所治疗疾病或障碍的症状) 的量。本文所用的术语“药学上可接受的载体”意在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣剂、抗菌剂和抗真菌剂、等渗和吸收延迟剂等。所述介质和药剂对于药物活性物的使用是本领域众所周知的。除了任何常规介质或药剂与活性化合物不相容的范围之外, 预期其在组合物中的应用。添加的活性化合物也可掺入到组合物中。

[0138] 药物组合物可配制成与其预期给予途径相容。给药途径的实例包括胃肠外例如静脉内、皮内、皮下、口服 (例如吸入)、透皮 (局部)、透黏膜、和直肠给药。用于胃肠外、皮内或皮下应用的溶液剂或混悬剂可包含以下成分: 无菌稀释剂, 例如注射用水、盐水溶液、不挥发的油类、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂; 抗菌剂, 例如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯; 抗氧化剂, 例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂, 例如乙二胺四乙酸; 缓冲剂, 例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐; 以及调节张度的试剂, 例如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱 (例如盐酸或氢氧化钠) 调节 pH。胃肠外制剂可封装在玻璃或塑料制安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0139] 在一个实施方案中, 多核苷酸 CDH17 抑制剂可与防止从体内快速清除或降解的载体一起配制, 例如控释制剂, 包括植入物和微胶囊递送系统。可使用生物可降解的、生物相容性聚合物, 例如乙烯醋酸乙烯酯共聚物、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。可使用标准技术制备这类制剂。脂质体混悬剂 (包括靶向抗原呈递细胞的具有单克隆抗体的脂质体) 也可用作药学上可接受的载体。可按照本领域技术人员已知的方法制备它们, 例如美国专利号 4, 522, 811 所述方法。例如按照美国专利号 6, 096, 720 (Love 等) 所述, 可采用抑制 RNA 酶 A 酶家族成员或者以其它方式保护多核苷酸 CDH17 抑制剂免遭这些酶作用的策略。将短寡核苷酸压实成界限清楚的浓缩物的策略也可用于递送本文所公开的 CDH17 抑制性多核苷酸 (Sarkar T. 等, *Nucleic Acids Research*, 2005, 33(1):143-151), 通过引用以其整体结合到本文中。

[0140] 在另一个实施方案中, 例如采用本领域已知的方法, 可将所述多核苷酸 CDH17 抑制剂插入到遗传构建体例如病毒载体、逆转录病毒载体、表达盒或质粒病毒载体中, 所述方法包括但不限于 Xia 等 (2002), 出处同上所述方法。可通过例如吸入、口服、静脉内注射、局部给予 (参见美国专利号 5, 328, 470) 或通过立体有规注射 (stereotactic injection) (参见例如 Chen 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:3054-3057 (1994)), 将遗传构建体递送给受试者。递送载体的药物制剂可包括可接受的稀释剂中的载体, 或者可包括已包埋递送

载体的缓释基质。备选地,当完全递送载体可从重组细胞中完整产生时,例如逆转录病毒载体,药物制剂可包括产生多核苷酸递送系统的一个或多个细胞。

[0141] (i) 注射用组合物

[0142] 适合注射用的药物组合物包括无菌水溶液剂(当可溶于水时)或者分散体和用于临时制备无菌注射用溶液剂或分散体的无菌粉针剂。对于静脉内给药,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL(BASF ;Parsippany, NJ) 或磷酸缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物都必须是无菌的并且应当具有存在易注射性程度的流动性。其在生产和贮存条件下必须稳定,并且必须保护其免受微生物(例如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,包括例如水、乙醇、多元醇(例如甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,可通过使用包衣例如卵磷脂、通过在分散体的情况下维持所需粒径和通过使用表面活性剂,来维持合适的流动性。可通过例如以下多种抗菌剂和抗真菌剂达到预防微生物的作用:对羟基苯甲酸酯类、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等。在很多情况下,在组合物中优选包含等渗剂,例如糖类、多元醇(例如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。可通过在组合物中添加延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶,达到注射用组合物的延长吸收。

[0143] 可视需要,通过将所需量的活性化合物掺入到具有上文列举成分的一种或组合的合适溶剂中,再经过滤除菌,制备无菌注射用溶液剂。通常,通过将活性化合物掺入到含有基础分散介质和上文列举的所需其它成分的无菌溶媒中,制备分散体。在用于制备无菌注射用溶液剂的无菌粉针剂的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,从其先前的无菌过滤溶液剂得到活性成分和任何额外的所需成分的粉末。

[0144] (ii) 口服组合物

[0145] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用的载体。它们可封装在明胶胶囊剂中或被压缩成片剂。对于口服治疗给药目的,可将活性化合物掺入到赋形剂中并以片剂、锭剂(troche)或胶囊剂形式来使用。也可使用液体载体制备口服组合物,以用作漱口剂,其中液体载体中的化合物经口服施用和含漱并吐出或咽下。药物相容性粘合剂和/或佐剂材料也可作为组合物的组成部分而包含于其中。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有任何以下成分或类似特性的化合物:粘合剂,例如微晶纤维素、黄芪树胶或明胶;赋形剂,例如淀粉或乳糖;崩解剂,例如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;润滑剂,例如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,例如胶态二氧化硅;甜味剂,例如蔗糖或糖精;或矫味剂,例如胡椒薄荷、水杨酸甲酯或橙皮矫味剂(orange flavoring)。这些并不常用于多核苷酸或抗体的给药。

[0146] (iii) 肺部给药用组合物

[0147] 对于吸入给药,从含有合适抛射剂例如气体(例如二氧化碳)的加压容器或分散器或喷雾器中,以喷雾剂形式给予所述化合物。

[0148] (iv) 局部给药用组合物

[0149] 系统性给药也可通过透黏膜或透皮方式进行。对于透黏膜或透皮给药,适于穿透屏障的渗透剂用于制剂。这样的渗透剂是本领域公知的,并且例如对于透黏膜给药而言,包括去垢剂、胆盐和夫西地酸衍生物。透黏膜给药可通过使用鼻腔喷雾剂或栓剂而进行。对于透皮给药,活性化合物可按照本领域公知常识配制成软膏剂、药膏剂、凝胶剂或乳膏剂。

[0150] (v) 胃肠外给药

[0151] 胃肠外给药用制剂包括无菌水或非水溶液剂、混悬剂和乳剂。非水溶剂的实例是

丙二醇、聚乙二醇、植物油（例如橄榄油）和注射用有机酯类（例如油酸乙酯）。水性载体包括水、醇/水溶液、乳液或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。胃肠外载体包括氯化钠溶液、复方氯化钠葡萄糖注射液、葡萄糖和氯化钠注射液、林格乳酸盐溶液或不挥发油类。静脉内载体包括液体和营养补充剂、电解质补充剂（例如基于林格氏葡萄糖的那些）等。也可存在防腐剂和其它添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。

[0152] 也提供了制备包含本发明治疗药的药物或药物组合物的方法，所述药物组合物用于治疗肝细胞癌。

[0153] 所述化合物也可制备成栓剂形式（例如用常规栓剂基质，例如可可脂和其它甘油酯）或保留灌肠剂形式，用于直肠递送。

[0154] 特别有利的是制备单位剂型形式的组合物，以便于给药和剂量的一致性。本文所用的单位剂型是指适于作为单一剂量给予所治疗的受试者的物理分散的单位；每一单位都含有经计算产生所需疗效的预定量的活性化合物，以及所需的药物载体。单位剂型形式的规格是由以下因素规定并直接依赖于以下因素：活性化合物的独特特征和要达到的具体疗效、以及配制所述活性化合物用于个体治疗的领域所固有的限制。

[0155] 可将药物组合物装入容器、包装或分散器中，并带有给药说明书。

[0156] IV. 使用的治疗方法

[0157] (A) 治疗 / 敏化方法：抑制或敲减 CDH17 表达

[0158] 治疗方法包括对处于异常靶基因表达或活性相关的疾病的风险之中（或疑似患病）或患有所述疾病的受试者的预防性方法和治疗性方法。备选地，靶基因表达或活性可以是正常的（非异常），但降低靶基因表达或活性对受试者具有有益作用。这样的疾病包括各种肝癌。

[0159] 治疗方法也包括通过共同给予所公开的 CDH17 抑制剂，使表现出异常 CDH17 表达的细胞对化疗药敏感。

[0160] 在一个方面，将调节或抑制靶基因（CDH17）表达的药物给予受试者。处于由异常靶基因表达或过量表达而引起或导致的病症例如肝癌的风险之中的受试者，可通过例如本领域已知的和本文所述的任何诊断性测定或预测性测定或其组合而得以鉴定。

[0161] 在优选的实施方案中，所述药剂抑制靶基因蛋白的一种或多种生物活性。所述抑制剂的实例包括反义靶基因核酸分子和抗靶基因抗体。这些调节方法可在体外（例如通过与药剂一起培养细胞）或备选地体内（例如通过将药剂给予受试者）进行。因此，提供对罹患以靶基因蛋白或核酸分子的异常表达或活性为特征的疾病或障碍个体的治疗方法。在一个实施方案中，所述方法包括给予调节（例如上调或下调）靶基因表达或活性的药剂或药剂组合。在另一个实施方案中，所述方法包括给予靶基因蛋白或核酸分子作为治疗，以补偿降低的或异常的靶基因表达或活性。

[0162] 例如，在一个实施方案中，所述方法包括将所需药物给予细胞群体表达靶基因水平相对高的个体，并同时给予靶基因表达或活性的抑制剂。给予和共同给予步骤可同时进行或以任何顺序进行，并且可以足以让要根除的细胞摄取每一种化合物的时间间隔分别进行。例如，可在给予药物之前，将反义药物组合物（或包含靶基因反义寡核苷酸以及一种或多种其它反义寡核苷酸的混合组合物）给予个体，提前的时间足以让反义组合物渗透到个体的组织（尤其是包含要根除的转化细胞的组织）中、被转化细胞内化和破坏靶基因表达

和 / 或蛋白质的产生。

[0163] 在靶基因被异常上调的情况下,例如在 HCC 中,对靶基因活性的抑制是所需的。

[0164] 用于本文所公开治疗药给药的剂量范围足够大以产生治疗 HCC 症状的所需效果的剂量。剂量应当不会大到引起不良副作用,例如不必要的交叉反应、过敏反应等。通常,剂量将因患者年龄、状况、性别和症状程度的不同而异,并且可由本领域技术人员来确定。如果发生任何禁忌症,那么可由个别医师调整剂量。剂量可取决于具体要治疗的 HCC,并且可由具有治疗这些疾病的普通技术的医师使用已知的剂量调节技术容易地确定。剂量通常在治疗化合物已确定的治疗范围内,其提供治疗效果并同时使额外的发病率和死亡率最小化。通常,治疗化合物的给予剂量范围为每一剂量 0.001mg/kg 至约 100mg/kg,优选 0.1-20mg/kg。约 0.5-5mg/kg 的优选剂量对含有本文所公开治疗药的化合物而言是特别有用的,每天给予一个或多个剂量,并持续一天或数天。

[0165] 在优选的实施方案中,CDH17 分子用作分子治疗的靶标。为此,若干方法例如作为靶向 CDH17 转录物的 CDH17 拮抗剂的小干扰 RNA (siRNA) 的施用,可用于抑制或下调 CDH17 在肝肿瘤细胞中的表达。另外,对 CDH17 表达的抑制可使肝肿瘤细胞对现有治疗药物或基因治疗更敏感,提高治疗功效。

[0166] 在治疗方法的一个实施方案中,可靶向 CDH17 的外显子 3,使 CDH17 表达沉默以抑制肝癌进展并使肝肿瘤细胞对治疗药物或基因治疗敏感,从而提高这些治疗的功效。

[0167] 在治疗方法的另一个实施方案中,可靶向 CDH17 的外显子 5,使 CDH17 表达沉默以抑制肝癌进展并使肝肿瘤细胞对治疗药物或基因治疗敏感,从而提高这些治疗的功效。

[0168] 在治疗方法的再一个实施方案中,将针对 CDH17 表达抑制的 RNAi 用于肝细胞癌的治疗性治疗。

[0169] “抑制”、“下调”、“敲减”或“沉默”是指降低编码 CDH17 的基因表达或者 RNA 或等效 RNA 的水平,使其低于在本文所公开的抑制性核酸分子不存在时所观察到的水平。在一个实施方案中,用酶性核酸分子的抑制或下调优选低于在酶活性缺乏或减弱的分子存在下所观察到的水平,所述分子能与靶 RNA 的相同位点结合,但不能切割该 RNA。在另一个实施方案中,用反义寡核苷酸的抑制或下调优选低于在例如具有乱序或错配的寡核苷酸存在下所观察到的水平。在另一个实施方案中,用所公开的抑制性核酸分子对 CDH17 的抑制或下调在所述核酸分子存在时强于其不存在时。

[0170] 已经证明,CDH17 拮抗剂 / 抑制剂对表达的抑制或敲减在肝癌治疗中具有益处。因此,对 CDH17 表达的抑制可用于产生对肝癌或 HCC 或其它细胞增殖性障碍的治疗的临床反应。所述方法包括将有效量的 CDH17 抑制剂给予有需要的受试者。

[0171] 本文所用的 CDH17 抑制剂(例如选择性干扰 CDH17 表达的干扰 RNA、反义寡核苷酸或核酶)的“有效量”,是在体外(例如离体)或体内给予 CDH17 抑制剂的细胞中有效带来所需生理变化的量。优选地,对 CDH17 功能的抑制(例如通过降低 CDH17 表达)导致肿瘤减小或对化疗的敏感性增加。

[0172] 表达的降低(抑制)导致 CDH17 mRNA 和 / 或蛋白质的降低。例如,在给定细胞中,给予通过降低 CDH17 表达而降低 CDH17 功能的 CDH17 抑制剂(例如干扰 RNA、反义寡核苷酸或核酶)对 CDH17 mRNA 的抑制,导致 CDH17 mRNA 量相对于未经治疗的细胞减少。抑制可以是部分抑制。优选的抑制程度为至少 50%,更优选至少 60%、70%、80%、85% 或 90%。



介于 90% 与 100% 之间的抑制水平通常称为表达的“沉默”。

[0173] 可在将 CDH17 抑制剂体外或体内引入之前和 / 或之后, 测定 CDH17 基因表达。可在蛋白质或 mRNA 水平上检测 CDH17 基因表达的降低。可通过蛋白质印迹、免疫荧光或者流式细胞术和细胞分选 (FACS), 进行蛋白质表达分析。例如, 可通过实时 RT-PCR、微阵列分析或 RNA 印迹在 mRNA 水平上检测 CDH17 基因表达的降低。优选地, 将所有表达数据与“持家”基因水平比较, 以使不同样品中的 RNA 不同含量标准化。

[0174] 在治疗方法的还一个实施方案中, 抗 CDH17 或 CDH17 拮抗剂抗体用于抑制过量表达 CDH17 的癌症症状。用于治疗 CDH17 拮抗剂抑制过量表达的 CDH17 蛋白的活性。

[0175] 在该实施方案中, 抗 CDH17 抗体优选针对跨越 CDH17 的结构域 1 和结构域 2 (D1-D2) 的表位, 所述表位具有以下序列:

[0176] PLKPMTFSIYEGQEPSQIIFQFKANPPAVTFELTGETDNIFVIEREGLLYNRLDRETRSTHNLQVAA  
LDANGIIVEGVPVITIKVKDINDNRPTFLQSKYEGSVRQNSRPGKPFYVNVATDLDDPATPNGQLYYQIVIQLP  
MINVVMYFQINNKTGAISLTREGSQELNPAKNPSYNLVISVKDMGGQSENSFSDTTSVDIIVTENIWKAPKP (SEQ ID NO :1)。

[0177] D1-D2 抗 CDH17 抗体的产生, 允许对在 HCC 中发生的 CDH17 过量表达形式的靶向抑制。

[0178] 在其它实施方案中, CDH17 抑制剂是多核苷酸 (在本文中称为“多核苷酸 CDH17 抑制剂”或“核酸 CDH17 抑制剂”), 例如反义、干扰 RNA 分子和核酶。多核苷酸 CDH17 抑制剂的靶标可以是 CDH17 基因或 CDH17 mRNA 的任何部分。

[0179] 可单独或与其它药物联合给予 CDH17 抑制剂。CDH17 的抑制或敲减表现为源自表现出升高的 CDH17 表达的肿瘤细胞的肝肿瘤大小减小, 并使肝肿瘤细胞对例如泰素、表柔比星和卡铂等某些化疗药和基于 p53 的基因治疗更敏感。

[0180] 在一个实施方案中, 当被适当引入正常表达 CDH17 mRNA 的细胞中或在其中表达时, 干扰 RNA 能够通过 RNAi 而抑制其表达, 其中干扰 RNA 通常靶向人 CDH17 cDNA 中的 CDH17 D1-D2 结构域。优选地, 干扰 RNA 序列的范围在约 19-23 个核苷酸内。例如, 在使用 shRNA 的那些实施方案中, 靶向 CDH17 的 shRNA 一部分的优选范围在约 19-23 个核苷酸内。CDH17 的优选 shRNA 靶向序列在外显子 3 中是 :CAAGAACCGAGTCAAATTA (SEQ ID NO :5) 或在外显子 5 中是 :CAGTCCCTATCACCATAGAA (SEQ ID NO :6)。

[0181] 用于本文所公开方法的干扰 RNA 与靶序列之间的完全同一性 / 互补性, 尽管是优选的, 但并非必需的。因此, 与 CDH17 mRNA 中的靶序列相比, 干扰 RNA 可包含一个错配。然而, 预期甚至一个错配的存在都可能导致功效降低, 所以优选没有错配。如果有的话, 3' 突出端可从错配数的考虑中排除。术语“互补性”不限于由天然存在的核糖核苷酸和 / 或脱氧核糖核苷酸组成的核酸之间的常规碱基配对, 也包括 mRNA 与包含非天然核苷酸的抑制性核酸之间的碱基配对。

[0182] 在另一个实施方案中, 对 CDH17 具有特异性的单克隆抗体可用作药物或毒素的递送载体。可使用生化方法将药物或毒素与抗体缀合。对钙黏着蛋白 -17 的氨基端具有特异性的单克隆抗体可用作药物或毒素的递送载体。这使得能够将药物或毒素转运到高度表达 CDH17 的肿瘤细胞中。

[0183] 术语“治疗” (“treatment” 和 “therapy”) 在本文中可互换使用, 如本文所用包

括预防性治疗和反应性治疗,可以是或急性短期或慢性长期的治疗,是指抑制或改善患者的肝细胞癌。“患者”包括动物,包括人。术语“治疗有效”是指所用的治疗药(抗 CDH17 单克隆抗体、针对 CDH17 的 siRNA(描述于下文))量是足以抑制或改善肝细胞癌症状的量。

[0184] 用于较长期表达的 siRNA 递送

[0185] 合成 siRNA 可通过本领域已知方法递送到细胞中,所述方法包括例如阳离子脂质体转染(例如 LIPOFECTAMINE 2000 试剂)和电穿孔。然而,这些外源 siRNA 通常显示出沉默效应的短期持续性(在培养细胞中 4-5 天),这在某些实施方案中可能是有益的。为了获得对 CDH17 表达的更长期抑制和便于在某些情况下递送,可在细胞中从重组 DNA 构建体表达一种或多种 siRNA 双链体,例如 CDH17 ds siRNA(McIntyre 等, BMC Biotechnology, 6:1-8(2006))。用于在细胞中从重组 DNA 构建体表达 siRNA 双链体以允许在细胞中长期抑制靶基因的这类方法是本领域已知的,包括能表达功能性双链 siRNA 的哺乳动物 Pol III 启动子系统(例如 H1 或 U6/snRNA 启动子系统(Tuschl(2002), 出处同上)。RNA Pol III 所致的转录终止发生在 DNA 模板中的 4 个连续 T 残基的循环处,提供在特定序列结束 siRNA 转录物的机制。siRNA 在 5' -3' 和 3' -5' 方向上与靶基因序列互补,并且 siRNA 的两条链可在同一构建体或不同构建体中表达。由 H1 或 U6 snRNA 启动子驱动的发夹 siRNA 可在细胞中表达,并且可抑制靶基因表达(Bagella 等, J. Cell. Physiol., 177: 206-213(1998); Lee 等(2002), 出处同上; Miyagishi 等(2002), 出处同上; Paul 等(2002), 出处同上; Yu 等(2002), 出处同上; Sui 等(2002), 出处同上)。当与表达 T7 RNA 聚合酶的载体共转染到细胞中时,含有处于 T7 启动子控制之下的 siRNA 序列的构建体也产生功能性 siRNA(Jacque(2002), 出处同上)。单个构建体可含有编码 siRNA 的多个序列,例如 CDH17 mRNA 的多个区,并且可由例如单独的 Pol III 启动子位点驱动。

[0186] 动物细胞表达一系列称为微小 RNA(miRNA)的约 22 个核苷酸的非编码 RNA,其在动物发育期间可在转录后或翻译后水平上调节基因表达。miRNA 的一个常见特征就是,它们都是可能通过切酶(RNA 酶 III 型酶)或其同源物从约 70 个核苷酸的前体 RNA 茎环上切割下来的。通过用与靶 mRNA 互补的 miRNA 序列来取代 miRNA 前体的茎序列,表达新 miRNA 的载体构建体可用于产生 siRNA,以在哺乳动物细胞中启动针对特异性 mRNA 靶标的 RNAi(Zeng(2002), 出处同上)。当通过含有聚合酶 III 启动子的 DNA 载体表达时,微小 RNA 设计的发夹可使基因表达沉默(McManus(2002), 出处同上)。

[0187] 病毒介导的递送机制也可用于通过表达 siRNA 而诱导靶基因的特异性沉默,例如通过产生携带处于 RNA Pol II 启动子转录控制之下的 siRNA 的重组腺病毒(Xia 等(2002), 出处同上)。这些重组腺病毒对 HeLa 细胞的感染允许减少内源靶基因表达。将重组腺病毒载体注射到表达 siRNA 靶基因的转基因小鼠中导致在体内降低靶基因表达。在动物模型中,全胚电穿孔可将合成 siRNA 有效递送给植入后小鼠胚胎中(Calegari 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99(22):14236-40(2002))。在成年小鼠中,siRNA 的有效递送可通过“高压”递送技术来完成,该技术是将大体积含 siRNA 溶液通过尾静脉快速注射(5 秒钟内)到动物中(Liu(1999), 出处同上; McCaffrey(2002), 出处同上; Lewis, Nature Genetics 32: 107-108(2002))。

[0188] 纳米颗粒、脂质体和其它阳离子型脂质分子也可用于将 siRNA 递送到动物中。已经证明,在脂质体制剂中系统性递送的 siRNA,可在非人灵长类动物中使疾病靶载脂蛋白

B(ApoB) 沉默 (Zimmermann 等, *Nature*, 2006, 441 :111-114)。凝胶基琼脂糖 / 脂质体 / siRNA 也是可用的 (Jiang 等, *Oligonucleotides*, 14(4) :239-48(2004))。

[0189] 如本文所述引入细胞或完整生物体中的工程改造 RNA 前体将导致产生所需 siRNA 分子。这样的 siRNA 分子随后将与 RNAi 途径的内源蛋白质成分缔合, 以结合和靶向特异性 mRNA 序列进行切割和破坏。通过这种方式, 将从细胞或生物体中耗尽由工程改造 RNA 前体产生的 siRNA 所靶向的 CDH17 mRNA, 导致细胞或生物体中由该 mRNA 编码的任何翻译产物的浓度下降。RNA 前体通常是单独编码 dsRNA 的一条链或编码 RNA 发夹环结构的完整核苷酸序列的核酸分子。

[0190] 通常将反义核酸分子给予受试者 (例如系统或通过直接注射到组织部位而局部给予) 或原位产生, 从而它们与编码 CDH17 的细胞 mRNA 和 / 或基因组 DNA 杂交或结合, 由此抑制 CDH17 基因的表达。备选地, 可修饰反义核酸分子以靶向所选细胞 (例如巨核细胞和 / 或巨核细胞前体细胞), 然后系统给予。对于系统给予, 可修饰反义分子, 从而它们与在所选细胞表面表达的受体或抗原 (例如 CD9、CD41、CD61、肌动蛋白或 FVIIIRAg) 特异性结合, 例如通过将反义核酸分子与结合细胞表面受体或抗原的肽或抗体连接。也可使用本文所述的载体将反义核酸分子递送到细胞中。为了达到反义分子足够的胞内浓度, 可使用将反义核酸分子置于强 pol II 或 pol III 启动子控制之下的载体构建体。

[0191] 也可利用本领域已知的方法通过转染或感染而给予 CDH17 抑制剂, 所述方法包括但不限于以下文献所述的方法: McCaffrey 等, *Nature* 418(6893) :38-39(2002) (流体动力转染); Xia 等, *Nature Biotechnol.* 20(10) :1006-10(2002) (病毒介导的递送); 或 Putnam, *Am. J. Health Syst. Pharm.* 53(2) :151-160(1996), 在 *Am. J. Health Syst. Pharm.* 53(3) :325(1996) 勘误。

[0192] 也可通过适合给予核酸药物例如 DNA 疫苗的任何方法给予多核苷酸 CDH17 抑制剂。这些方法包括基因枪、生物注射器和皮肤贴剂以及无针方法例如微粒 DNA 疫苗技术 (公开于美国专利号 6, 194, 389) 和用粉针剂形式疫苗对哺乳动物进行透皮无针接种 (公开于美国专利号 6, 168, 587)。另外, 可以采用鼻内递送, 其描述于 Hamajima 等, *Clin. Immunol. Immunopathol.* 88(2) :205-10(1998)。也可采用脂质体 (例如美国专利号 6, 472, 375 所述) 和微胶囊法。也可采用生物可降解的可靶向微粒递送系统 (例如美国专利号 6, 471, 996 所述)。

[0193] 特别地, 适合多核苷酸 CDH17 抑制剂的体外或体内细胞给予的技术的综述可参见例如 Borkhardt, *Cancer Cell*, 2 :167-8; Hannon(2002); *Nature*, 418 :244-51(2002); McManus 等, *Nat Rev Genet.*, 3 :737-47(2002); Scherr 等, *Curr Med. Chem.*, 10 :245-56(2003); Shuey 等, *Drug Discov Today*, 7 :1040-6(2002); Gilmore 等, *J. Drug Target.*, 12(6) :315-340(2004); Dykxhoorn 等, *Annu. Rev. Med.*, 2005, 56 :401-423。使用脂质体的系统性递送公开于例如 Lewis 等, *Nat Genet.*, 2002, 32 :107-8; Paul 等, *Nat Biotechnol.*, 2002, 20 :505-8; Song 等, *Nat Med.*, 2003, 9 :347-51; Sorensen 等, *J Mol Biol.*, 2003, 327 :761-6。

[0194] 病毒介导的转移公开于例如 Abbas-Terki 等, *Hum Gene Ther.*, 2002, 13 :2197-201; Barton 等, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99 :14943-5; Devroe 等, *BMC Biotechnol.*, 2002, 2 :15; Lori, F. 等, *Am J Pharmacogenomics*, 2002, 2 :245-52; Matta,

H. 等, *Cancer Biol Ther.*, 2003, 2 :206-10 ;Qin, X. F. 等, *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100 :183-8 ;Scherr, M. 等, *Cell Cycle*, 2003, 2 :251-7 ;Shen, C. 等, *FEBS Lett.*, 2003, 539 :111-4 ;Lee S. K. 等, *Blood*, 2005, 106 (3) :818-826, 2005 年 4 月 14 日电子版。肽递送公开于 Morris 等, *Curr Opin Biotechnol.*, 2000, 11 :461-6 ;Simeoni, F. 等, *Nucleic Acids Res.*, 2003, 31 :2717-24。Song 等, *Nat. Biotechnol.*, 23 (6) :709-717, (2005) 描述了通过细胞表面受体的抗体介导的 siRNA 的体内递送, 其可用于将干扰 RNA 分子靶向巨核细胞和巨核细胞前体细胞上的细胞表面受体。纳米颗粒或纳米囊递送公开于美国专利号 6, 649, 192B 和 5, 843, 509B。可用于选择、递送和监测干扰 RNA 分子的新技术包括 Raab 等, *Biotechnol. Bioeng.*, 88 :121-132 (2004) ;Huppi 等 *Mol. Cell*, 2005, 17 :1-10 ;Spagnou 等, *Biochemistry*, 2004, 43 :13348-13356 ;Muratovska 等, *FEBS Lett.*, 2004, 558 :63-68 ;Kumar 等, *Genome Res.*, 2003, 13 :2333-2340 ;Chen, A. A. 等, *Nucleic Acids Res.*, 2005, 33 :e190 ;Dykxhoorn, D. M. 等, *Gene Ther.*, 2006, 早于印刷版的电子版 ;Rodriguez-Lebron, E. 和 Paulson, H. L. *Gene Ther.*, 2005, 早于印刷版的电子版 ;Pai, S. I. 等, *Gene Ther.*, 2005, 早于印刷版的电子版 ;Raoul, C. 等, *Gene Ther.*, 2005, 早于印刷版的电子版 ;Manfredsson, F. P. 等, *Gene Ther.*, 2005, 早于印刷版的电子版 ;Downward, J. *BMJ*, 2004, 328 :1245-1248。

[0195] 可将同一类型或不同类型的 CDH17 拮抗剂的混合物在体外或体内引入细胞中。例如, 可将多核苷酸 CDH17 拮抗剂例如干扰 RNA 分子 (例如 2-4 种干扰分子或更多) 的混合物或库引入细胞中 (Oleinikov 等, *Nucleic Acids Research*, 2005, 33 (10) :e92 (2005))。优选地, 干扰 RNA 分子靶向 CDH17 mRNA 的不同区。优选地, 先前已经证实干扰 RNA 分子在降低 CDH17 表达上是单独起作用的。混合物中的单一干扰 RNA 可经化学合成而来 (Elbashir S. M. 等, *Genes Dev.*, 2001, 15 :188-200) 或可作为在细胞中被体外或体内转录的含有 RNA 聚合酶启动子的短 DNA 模板引入 (Yu J. Y. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99 :6047-6052)。

[0196] 可通过标准药理学方法在细胞培养物或实验动物中测定组合物的毒性和治疗性功效, 例如测定 LD<sub>50</sub> (50% 群体致死的剂量) 和 ED<sub>50</sub> (50% 群体治疗有效的剂量)。毒性与疗效之间的剂量比即治疗指数, 可表示为 LD<sub>50</sub>/ED<sub>50</sub> 比。可使用表现出高治疗指数的组合物。尽管可使用表现出毒副作用的组合物, 但是应当谨慎地设计将这样的化合物靶向患病组织部位的递送系统, 以将对未感染细胞的潜在损害最小化, 从而减少副作用。

[0197] 得自细胞培养测定和动物研究的数据可用于配制一系列用于人的剂量。这样的组合物的剂量通常落在包括没有或几乎没有毒性的 ED<sub>50</sub> 的循环浓度范围之内。剂量可在该范围之内变化, 取决于所用剂型和所用的给药途径。对于本文所公开方法所用的任何组合物, 可首先从细胞培养测定来估计治疗有效剂量。可在动物模型中配制剂量, 以达到包括在细胞培养中测定的 IC<sub>50</sub> (即达到症状的半数最大抑制的试验组合物的浓度) 在内的循环血浆浓度范围。这样的信息可用于更准确地确定在人体中的有用剂量。可通过例如高效液相色谱测量血浆水平。

[0198] 可按照任何合适时间表给予 CDH17 抑制剂, 例如从每天一次或多次到每周一次或多次; 包括每两天一次, 并持续任意天数或周数, 例如 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、1 周、10 天、2 周、3 周、4 周、5 周、6 周、7 周、8 周、2 个月、3 个月、6 个月或更长时间, 或其任意变型。本领域技术人员将会理解, 某些因素可影响有效治疗受试者所需的剂量和时间, 包括但

不限于疾病或障碍的严重程度、先期治疗、受试者的一般健康状况和 / 或年龄以及所患其它疾病。此外,用治疗有效量的 CDH17 抑制剂对受试者进行治疗,可包括单次治疗或可包括一系列治疗。

[0199] 如本文所述,可使用已知技术将多核苷酸 CDH17 抑制剂在体外或体内引入(给予)细胞(例如哺乳动物细胞)中,以抑制基因表达。同样,如本文所述,可使用用于 CDH17 抑制性 RNA 的瞬时或稳定表达的已知技术在体外或体内将含有 DNA 的遗传构建体(例如转录载体)引入到细胞中,以抑制基因表达。当在体内给予细胞时,可将多核苷酸 CDH17 抑制剂例如系统给予受试者(例如经静脉内),或局部给予细胞部位(例如肝)。

[0200] 引入多核苷酸 CDH17 抑制剂的细胞可以是含有 CDH17 mRNA 的任何细胞,例如巨核细胞或巨核细胞前体细胞。所述细胞可以是原代细胞、培养的细胞、细胞系的细胞等。在一个实施方案中,所述细胞来自肝脏。

[0201] 也可通过靶向与 CDH17 基因调节区互补的核苷酸序列以形成阻止 CDH17 在靶细胞中表达的三螺旋结构,来抑制 CDH17 表达。通常参见 Helene, *Anticancer Drug Des.*, 6 : 569-84(1991); Helene, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 660 : 27-36(1992); 和 Maher, *Bioassays* 14 : 807-15(1992)。可通过产生所谓的“转回 (switchback)”核酸分子,增加可靶向形成三螺旋的潜在序列。转回分子是以交替的 5' -3'、3' -5' 方式合成的,从而它们先与双链体的一条链碱基配对,再与另一条碱基配对,消除了双链体一条链上存在的嘌呤或嘧啶的相当大的延伸的需要。

[0202] 多核苷酸抑制剂靶标

[0203] 在某些实施方案中,核酸靶标是 CDH17 结构域或氨基端或 D1-D2 结构域。在其它实施方案中,核酸靶标是翻译起始位点、3' 非翻译区或 5' 非翻译区。在优选的实施方案中,多核苷酸 CDH17 抑制剂靶向所有已知人造血 CDH17 同种型所共有的 mRNA 序列。所述靶序列可由本领域技术人员容易地确定,因为同种型之间有大量的序列重叠。更优选地,将外显子 3 (SEQ ID NO :5) 和外显子 5 (SEQ ID NO :6) 中的序列(其显示出对人 CDH17 cDNA 序列的良好特异性和降低潜力 (> 50%)) 用作靶序列。

[0204] 小鼠 CDH17 (PubMed 登记号 :NM\_019753)、大鼠 CDH17 (PubMed 登记号 :NM\_053977) 和人 CDH17 (PubMed 登记号 :NM\_004063) 的核苷酸序列在若干年以来已是公众可得的。直向同源物的成对比对打分显示在人、小鼠和大鼠的 CDH17 序列中的高水平同源性。每个序列在胞外结构域具有 7 个 CDH17 结构域 (D1-D7), 并且人、小鼠和大鼠之间的这些结构域的核苷酸同源性程度介于 77% 和 93% 之间。另外,人、小鼠和大鼠之间 D1-D2 的同源性范围为 84% 至 92% (表 2)。

[0205] 表 2 : 人、小鼠和大鼠之间 CDH17 结构域的同源性百分比

[0206]

	同源性百分比(%)		
	人与小鼠	人与大鼠	小鼠与大鼠
D1	84	82	93

[0207]

D2	85	86	91
D3	82	82	93
D4	79	77	89
D5	77	80	91
D6	77	77	91
D7	81	81	93
D1-2	85	84	92
*用 ClustalW2 进行比对			

[0208] 靶 CDH17 序列可以是 CDH17 的任何直向同源物,例如与人、小鼠、大鼠或牛基本相同的序列或者任意前述序列的一部分,包括但不限于分别对应于人、小鼠和大鼠的 GenBank 登记号 (NM\_004063)、(NM\_019753) 和 (NM\_053977)。

[0209] 本文所用术语“直向同源物”是指与参比序列基本相同的序列。本文所用术语“基本相同”是指第一氨基酸或核苷酸序列与第二氨基酸或核苷酸序列含有足够或最小数量的相同或等同(例如具有类似侧链)氨基酸残基或核苷酸,从而第一和第二氨基酸或核苷酸序列具有共同结构域或共同功能活性。例如,含有共同结构域并具有至少约 60%或 65%同一性,可能是 75%同一性,更可能是 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸或核苷酸序列在本文中定义为基本相同。

[0210] 序列之间的同源性或序列同一性(这两个术语在本文中可互换使用)的计算按下述进行。

[0211] 为了确定 2 个氨基酸序列或 2 个核酸序列的同一性百分比,将序列进行比对以用于最佳比较目的(例如可将缺口引入第一和第二氨基酸或核酸序列之一或两者中用于最佳比对,并且可为比较目的忽略非同源序列)。在一个实施方案中,为比较目的而比对的参比序列长度是参比序列长度的至少 50%、至少 60%、至少 70%、80%、90%或 100%。然后比较相应氨基酸位置或核苷酸位置上的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列某位置被与第二序列相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则所述分子在该位置是相同的(如本文所用,氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。两个序列之间的同一性百分比是所述序列共享的相同位置数的函数,并考虑为最佳比对两个序列而需要引入的缺口数和每个缺口的长度。

[0212] 可采用数学算法完成两个序列之间的序列比较和同一性百分比确定。可采用 Needleman 和 Wunsch (J. Mol. Biol. 48 :444-453 (1970)) 算法确定 2 个氨基酸序列之间的同一性百分比,所述算法已经结合到 GCG 软件包(可得自官方 Accelrys 网址)的 GAP 程序中,并使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重。也可使用 GCG 软件包(可得自官方 Accelrys 网址)的 GAP 程序确定 2 个核苷酸序列之间的同一性百分比,并使用 NWSgapdna. CMP 矩阵以及 40、50、60、70 或 80 的缺口权重和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重。一组参数是 Blossum 62 打分矩阵,缺口罚分为 12,缺口延伸罚分为 4,移码缺口罚分为 5。

[0213] 2 个氨基酸或核苷酸序列之间的同一性百分比还可用 E. Meyers 和 W. Miller (CABIOS, 4 :11-17 (1989)) 的算法来确定,所述算法已经结合到 ALIGN 程序 (2.0 版) 中,并使用 PAM120 残基权重表 (weight residue table)、缺口长度罚分为 12 和缺口罚

分为 4。

[0214] 本文所述的核酸和蛋白质序列可用做“查询序列”，在公众数据库中进行搜索，以便例如鉴定其它直向同源物，例如家族成员或相关序列。这样的搜索可用 Altschul 等, *J. Mol. Biol.* 215 :403-10(1990) 的 NBLAST 和 XBLAST 程序 (2.0 版) 进行。BLAST 核苷酸搜索可以用 NBLAST 程序, 分值 = 100, 字长 = 12 进行, 以获得与已知 CDH17 核酸序列同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质搜索可以用 XBLAST 程序, 分值 = 50, 字长 = 3 进行, 以获得与 CDH17 基因的已知多肽产物同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对, 可按照 Altschul 等, *Nucleic Acids Res.* 25 :3389-3402(1997) 所述使用 Gapped BLAST。当使用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时, 可使用各自程序 (例如 XBLAST 和 NBLAST) 的默认参数 (参见美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 的国立生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 网站)。

[0215] 也可使用本领域已知的任何其它常规方法鉴定直向同源物, 所述方法例如筛选 cDNA 文库例如人 cDNA 文库、使用经设计用于鉴定与参比序列基本相同的序列的探针。

[0216] V. 用于监测、诊断或预测肝癌的方法

[0217] 公开了用于预测医学的方法, 包括用于预后 (预测) 目的以由此预防性治疗个体的诊断性测定、预后测定、药物基因组学 (pharmacogenomics) 和监测临床试验。因此, 提供诊断测定, 其用于测定生物样品 (例如血、血清、细胞、组织) 中的靶基因蛋白和 / 或核酸表达以及靶基因活性, 以因此确定个体是否罹患与异常靶基因表达或活性 (例如改变的抗药性) 相关的疾病或障碍或处于发展这样的疾病的风险中。还提供预后 (预测) 测定, 其用于确定个体是否处于发展与靶基因蛋白、核酸表达或活性 (例如改变的抗药性) 相关的疾病的风险之中。例如, 可在生物样品中测定靶基因中的突变。这样的测定可用于预后目的或预测目的, 以由此在以靶基因蛋白、核酸表达或活性为特征或与之相关的疾病发作之前, 预防性治疗个体。例如, 因为 HCC 与 CDH17 在细胞中的表达比正常水平高的情况相关, 所以 CDH17 靶基因的表达可用作 HCC 的指示物。

[0218] 将用于评价细胞靶基因的表达尤其是不需要的表达的方法用于诊断测定。不需要的 (例如过量) 表达可能表示 HCC 的存在、持续或复发。更通常的是, 异常表达可能表示出现了归因于靶基因的有害的或疾病相关表型。用于检测生物样品中靶基因存在与否的示例性方法包括从试验受试者 (优选从与可能的患病组织或恶性组织的诊断相牵连的身体部位) 中获取生物样品, 并使所述生物样品与能检测靶基因蛋白或编码所述靶基因蛋白的核酸 (例如 mRNA、基因组 DNA) 的化合物或试剂接触, 从而在所述生物样品中检测所述靶基因的存在情况。靶基因的存在和 / 或相对丰度表示细胞靶基因的异常或不需要的表达, 并且与 HCC 的原位发生相关。

[0219] 用于检测靶基因 mRNA 或基因组 DNA 的优选试剂是能与靶基因 mRNA 或基因组 DNA 杂交的标记核酸探针。所述核酸探针可以是例如全长靶基因核酸或其部分, 例如长度为至少 15、30、50、100、250 或 500 个核苷酸并且足以在严格条件下与靶基因 mRNA 或基因组 DNA 特异性杂交的寡核苷酸。用于诊断测定的其它合适的探针描述于本文。

[0220] 用于检测靶基因蛋白的优选试剂是能与靶基因蛋白结合的抗体, 优选具有可检测标记的抗体。抗体可以是多克隆的, 或更优选单克隆的。可使用完整抗体或其片段 (例如 Fab 或 F(ab')<sub>2</sub>)。对于探针或抗体而言, 术语“标记”意指包括通过将可检测物与探针或

抗体偶联（即物理连接）而直接标记探针或抗体，以及通过与被直接标记的另一试剂的反应性而间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括用荧光标记的第二抗体和用生物素在末端标记的 DNA 探针检测第一抗体，从而其可用荧光标记的链霉抗生物素来检测。术语“生物样品”意在包括分离自受试者的组织、细胞和生物液体，以及受试者体内存在的组织、细胞和液体。也就是说，本文所公开的检测方法可用于在体外以及体内检测生物样品中的靶基因 mRNA、蛋白或基因组 DNA。例如，检测靶基因 mRNA 的体外技术包括 RNA 杂交和原位杂交。检测靶基因蛋白的体外技术包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、蛋白质印迹、免疫沉淀和免疫荧光。检测靶基因基因组 DNA 的体外技术包括 DNA 杂交。

[0221] 在一个实施方案中，生物样品含有来自试验受试者的蛋白质分子。备选地，生物样品可含有来自试验受试者的 mRNA 分子或来自试验受试者的基因组 DNA 分子。优选的生物样品是通过常规方式分离自受试者的人血清。

[0222] 在另一个实施方案中，所述方法进一步包括从对照受试者中获取对照生物样品；使所述对照样品与能检测靶基因蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的化合物或试剂接触，从而在所述生物样品中检测靶基因蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的存在情况；并将对照样品中靶基因蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的存在情况与试验样品中靶基因蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的存在情况进行比较。

[0223] 在受试者中监测、诊断或预后癌症例如肝癌的方法包括检测来自受试者的生物样品中的 CDH17。使用能检测 CDH17 的试剂，所述方法可用于检测相对于非疾病状态而言 CDH17 的丰度过量或不足或者与疾病状态（例如肝癌）相关的修饰（例如小于全长）CDH17 的存在情况，或者向疾病状态的进展。所述方法可用于评价恶性细胞或恶化前期细胞存在的可能性。这样的方法可用于检测肿瘤、定量测定其生长并有助于肝癌的诊断和预后。所述方法可用于检测癌转移的存在情况，以及证实所有肿瘤组织在手术、癌症化疗和 / 或放疗之后不存在或被切除。它们还可进一步用于监测癌症化学治疗和肿瘤的重现。所述方法特别可用于诊断早期肝癌（例如当受试者尚无症状时）和用于肝癌的疾病进展和死亡率的预后。如本文所述，与标准水平（例如正常或良性疾病的水平）相比，在样品（例如尿、血清、血浆、全血、腹水）中检测到 CDH17 水平增加，表明疾病晚期，浆液组织学类型、亚最佳的缩小体积手术、大的残余肿瘤和 / 或疾病进展风险和死亡率增加。

[0224] 在某些实施方案中，在给予 CDH17 抑制剂之前，鉴别具有相关病症或疾病（例如肝癌）的受试者或者鉴别处于病症或疾病的风险中的患者。患者可以是没有诊断出患有疾病或病症的人（诊断、预后和 / 或分期）或经诊断患有疾病或病症的人（诊断、预后、监测和 / 或分期），包括治疗疾病或病症的人（预后、分期和 / 或监测）。备选地，所述人经诊断并未患有疾病或病症，但基于患者病史或家族病史或者特征症状的表现或观察而疑似患有疾病或病症。

[0225] 能够在受试者生物样品中检测 CDH17 的试剂是与 CDH17 多肽或编码 CDH17 的核酸分子相互作用或结合的试剂。这样的试剂（本文也称为结合剂）的实例包括但不限于 CDH17 抗体或其结合 CDH17 的片段、CDH17 结合配偶体和与编码 CDH17 多肽的核酸分子杂交的核酸分子。优选地，用可检测物（例如可检测部分）标记结合剂。结合剂本身可作为标记。

[0226] 所公开的方法可包括涉及与“适当对照”（在本文中可互换地称为“合适对照”）比较数值、水平、特性、特征、性能等的步骤。“适当对照”或“合适对照”是本领域技术人员熟



知的可用于比较目的的任何对照或标准。在一个实施方案中，“适当对照”或“合适对照”是在进行本文所述 RNAi 方法前测定的数值、水平、特性、特征、性能等。例如，在将本文所公开的 siRNA 引入细胞或生物体之前，可测定转录速率、mRNA 水平、翻译速率、蛋白质水平、生物活性、细胞特征或性能、基因型、表型等。在另一个实施方案中，“适当对照”或“合适对照”是在细胞或生物体中测定的数值、水平、特性、特征、性能等，所述细胞或生物体例如表现出例如正常性状的对照或正常细胞或生物体。在还一个实施方案中，“适当对照”或“合适对照”是预定数值、水平、特性、特征、性能等。

[0227] 在一个实施方案中，在受试者中检测 / 诊断肝癌的方法包括使样品与用可检测物直接或间接标记的对 CDH17 具有特异性的抗体接触，然后检测所述可检测物。

[0228] 所述方法步骤包括 (a) 使来自受试者的生物样品与用酶直接或间接标记的对 CDH17 具有特异性的抗体接触；(b) 加入所述酶的底物，其中所述底物选择为使所述底物或所述酶与底物的反应产物形成荧光复合物；(c) 通过测定所述荧光复合物的荧光而定量测定所述样品中的 CDH17；和 (d) 将定量测定水平与标准水平进行比较。

[0229] 优选实施方案包括以下步骤：

[0230] (a) 使生物样品与用可检测物直接或间接标记的对 CDH17 具有特异性的第一抗体和固定的对 CDH17 具有特异性的第二抗体一起孵育；

[0231] (b) 将第一抗体与第二抗体分离，以提供第一抗体相和第二抗体相；

[0232] (c) 检测第一或第二抗体相中的可检测物，从而定量测定所述生物样品中的 CDH17；和

[0233] (d) 将定量测定的 CDH17 与标准比较。

[0234] 标准可对应于得自健康对照受试者、患有良性疾病（例如良性肝病）的受试者、患有早期肝癌的受试者的样品或其它受试者样品的 CDH17 水平。与标准相比，CDH17 水平的增加可指示癌症，例如早期或晚期肝癌。

[0235] 在某些实施方案中，本文所述的方法适用于通过定量测定受试者的生物样品中的 CDH17 来诊断和监测肝癌。优选地，将在所测试受试者的样品中定量测定的 CDH17 量与在受试者的另一样品或较早样品中定量测定水平进行比较，或与对照样品定量测定水平进行比较。可通过预期性和 / 或追溯性统计学研究确定来自健康受试者的对照样品的水平。可选择没有临床明显疾病或异常的健康受试者用于统计学研究。可通过与对照样品或同一受试者的先前定量测定 CDH17 水平相比统计学差异的 CDH17 水平的结论而进行诊断。

[0236] 在检测 / 诊断方法的另一个实施方案中，可使用对 CDH17 具有特异性的单克隆抗体开发夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA)。该测定可用于在患者的疑似组织或血清中检测 CDH17 的存在情况。开发用于检测 CDH17 的 ELISA 容易使用。它具有高度特异性和灵敏性、低的测试内和测试间变化系数并使用对人类健康风险低且易于处理的化学品。因此它具有低的成本 / 利益比。它在样品处理方面灵活，并可用于处理少量或大量样品。该实施方案满足了长期迫切但未能解决的对低成本且简单准确地大量样品中检测人血清 CDH17 蛋白表达的方法的需要。

[0237] ELISA 技术的描述可参见 D. P. Sites 等，Basic and Clinical Immunology (基础和临床免疫学) 第 4 版第 22 章，1982, Lange Medical Publications (Los Altos, Calif.) 出版；和美国专利号 3,654,090、3,850,752 和 4,016,043，其公开内容通过引用结合到本文

中。ELISA 是可用于定量测定样品中的目标抗原、蛋白质或其它分子含量的测定方法。具体地讲, ELISA 可通过将对目标抗原或蛋白质具有特异性的抗体连接到固体支持体(例如聚氯乙烯)上而进行。可加入细胞提取物或其它目标样品例如尿或血以形成抗体-抗原复合物,然后将额外的未结合样品洗去。加入对抗原的不同位点具有特异性的酶联抗体。洗涤支持体以除去未结合的酶联第二抗体。酶联抗体可包括但不限于碱性磷酸酶。第二抗体上的酶可将加入的无色底物转化为有色产物,或者可将非荧光底物转化为荧光产物。本文所提供的基于 ELISA 的测定方法可在单室或在阵列室中进行,并适用于自动化方法。

[0238] 抗体可用以下物质来标记:成对的 FRET 染料、生物发光能量共振转移(BRET)蛋白、荧光染料-猝灭剂染料组合和  $\beta$ -gal 互补测定蛋白质片段。抗体可参与 FRET、BRET 和荧光猝灭或  $\beta$ -gal 互补,产生例如荧光信号、比色信号或增强化学发光(ECL)信号。这些方法常规用于检测抗原特异性抗体反应,并且在通用免疫学教科书上有充分描述,例如 Ivan Roitt, Jonathan Brostoff 和 David Male, *Immunology* (London: Mosby, c1998. 第 5 版) 和 *Immunobiology: Immune System in Health and Disease*/Charles A. Janeway 和 Paul Travers. Oxford: Blackwell Sci. Pub., 1994), 其内容通过引用结合到本文中。

[0239] 术语“样品”和“生物样品”是指已知或疑似表达或含有 CDH17 的材料,例如尿。试验样品可从来源获取后直接使用或经预处理而修饰样品特征之后使用。样品可得自任何生物来源,例如组织或提取物,包括细胞(例如肿瘤细胞)和生理液体,例如全血、血浆、血清、腹膜液、腹水等。样品可得自动物,优选哺乳动物,最优选人类。可通过任何方法预处理样品和/或可在不干扰测定的任何常规介质中制备样品。样品可在使用之前进行处理,例如从血液制备血浆、稀释粘性液体、将一种或多种蛋白酶抑制剂(例如 4-(2-氨基乙基)-苯磺酰氟、EDTA、亮抑酶肽和/或胃蛋白酶抑制剂)等施用于样品例如尿中等。样品处理可包括过滤、蒸馏、提取、浓缩、使干扰成分失活、加入试剂等。

[0240] 可在多种生物样品(包括组织或其提取物)中检测 CDH17 的存在情况。优选地,在人血清或血浆中检测 CDH17。

[0241] 与 CDH17 特异性反应的抗体或衍生物(例如酶缀合物或标记衍生物)可用于检测不同生物样品中的 CDH17,例如它们可用于依赖于蛋白质抗原决定簇与抗体之间的结合相互作用的任何已知免疫测定。这类测定的实例是放射免疫测定、酶免疫测定(例如 ELISA)、免疫荧光、免疫沉淀、乳胶凝聚试验、血细胞凝集和组织化学试验。

[0242] 对 CDH17 具有特异性的抗体可用可检测物标记,并根据可检测物的存在情况在生物样品中定位。可检测物的实例包括但不限于以下放射性同位素(例如  $^3\text{H}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ )、荧光标记(例如 FITC、罗丹明、镧系磷光体(lanthanide phosphors))、发光标记例如鲁米诺;酶标记(例如辣根过氧化物酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、乙酰胆碱酶)、生物素基团(其可通过标记的抗生物素蛋白检测,抗生物素蛋白例如含有通过光学方法或量热方法检测的荧光标记或酶活性的链霉抗生物素)、由第二报道分子所识别的预定多肽表位(例如亮氨酸拉链成对序列,第二抗体的结合位点、金属结合结构域、表位标签)。也可使用间接方法,其中通过引入第二抗体而放大第一抗原-抗体反应,所述第二抗体对与 CDH17 反应的抗体具有特异性。举例说明,如果对 CDH17 具有特异性的抗体是兔 IgG 抗体,则第二抗体可以用本文所述可检测物标记的山羊抗兔  $\gamma$ -球蛋白。

[0243] 用于缀合或标记上述抗体的方法可由本领域普通技术人员容易地进行(参见例

如 Imman, *Methods In Enzymology*, 第 34 卷, *Affinity Techniques, Enzyme Purification*: B 部分, Jakobý 和 Wickek (编著), Academic Press, New York, 第 30 页, 1974; 和 Wilchek 和 Bayer, *Anal. Biochem.* 171:1-32, (1988)。

[0244] 时间分辨荧光测定可用于检测信号。例如, Christopoulos T.K. 和 Diamandis E. P., *Anal. Chem.*, 1992:64:342-346 所述方法可与常规时间分辨荧光计一起使用。

[0245] 在一个实施方案中, 提供这样的方法: 其中 CDH17 抗体用酶标记并加入该酶的底物, 其中所述底物选择为使所述底物、或所述酶与底物的反应产物与镧系金属形成荧光复合物。加入镧系金属, 通过测定荧光复合物的荧光而定量测定所述样品中的 CDH17。对 CDH17 具有特异性的抗体可用酶直接或间接标记。根据酶的底物或酶与底物的反应产物与镧系金属 (例如铈和铽) 复合的能力来选择酶。合适酶的实例包括碱性磷酸酶和  $\beta$ -半乳糖苷酶。优选地, 酶是碱性磷酸酶。CDH17 抗体也可用酶间接标记。例如, 可将抗体与配体结合对的一个配偶体缀合, 而将酶与配体结合对的另一配偶体偶联。代表性实例包括抗生物素蛋白-生物素和核黄素-核黄素结合蛋白。优选地, 将抗体生物素化, 而将酶与链霉抗生物素偶联。

[0246] 选择底物, 使得在镧系金属 (例如铈、铽、钆和镱, 优选铈和铽) 存在下, 底物或酶与底物的反应产物与镧系金属形成荧光复合物。提供这样的荧光复合物的酶和酶的底物的实例描述于美国专利号 5, 3112, 922 (Diamandis)。用碱性磷酸酶标记的示例性酶底物是 4-甲基伞形酮磷酸酯或 5-氟水杨酸磷酸酯。复合物的荧光强度通常可用时间分辨荧光计例如 CyberFluor 615 Immoanalyzer (Nordion International, Kanata Ontario) 来测量。

[0247] 可将样品、对 CDH17 具有特异性的抗体或 CDH17 固定在载体上。合适载体的实例是琼脂糖、纤维素、葡聚糖、Sephadex、Sephacrose、脂质体、羧甲基纤维素、聚苯乙烯、滤纸、离子交换树脂、塑料薄膜、塑料管、玻璃珠、聚胺-甲基乙烯基醚-马来酸共聚物、氨基酸共聚物、乙烯-马来酸共聚物、尼龙、丝等。载体的形状可以是例如管、试验板、孔、珠、皿、球等。可使用已知理化方法例如溴化氰偶联通过将材料与合适的不可溶性载体反应而制备固定化抗体。

[0248] 依据实施方案, 提供用于通过免疫测定测量 CDH17 在合适样品例如尿或血 (优选血清或血浆) 中检测 CDH17 的方法。对本领域技术人员显而易见的是, 多种免疫测定方法可用于测量 CDH17。一般而言, CDH17 免疫测定方法可以是竞争性的或非竞争性的。竞争性方法通常使用针对 CDH17 的固定化抗体或可固定的抗体 (抗 CDH17) 和 CDH17 的标记形式。样品 CDH17 和标记的 CDH17 竞争结合抗 CDH17。将已结合抗 CDH17 的所得标记 CDH17 (结合部分) 与仍未结合的所得标记 CDH17 (未结合部分) 分离开之后, 测量结合部分或未结合部分中的标记含量, 并且可以任何常规方式 (例如与标准曲线进行比较) 将其与生物样品中 CDH17 含量相关联。

[0249] 优选地, 非竞争性方法可用于测定 CDH17, 其中最常见方法是“夹心”法。在该测定中, 使用 2 种抗 CDH17 抗体。一种抗 CDH17 抗体被直接或间接标记 (也称为“检测抗体”), 而另一种则被固定化或是可固定的 (也称为“捕获抗体”)。可使捕获抗体和检测抗体同时或序贯接触生物样品。序贯方法可通过以下方式进行: 将捕获抗体与样品一起孵育, 然后在此后的预定时间加入检测抗体 (有时称为“正向”方法); 或可使检测抗体先与样品一起孵育, 再加入捕获抗体 (有时称为“反向”方法)。在已进行必要的孵育之后, 为了完成测定,

将捕获抗体从液体试验混合物中分离出来,在至少部分的所分离的捕获抗体相或残余的液体试验混合物中测量标记。通常在捕获抗体相中测量,因为它包括被捕获抗体与检测抗体(“夹心”在其中)结合的 CDH17。

[0250] 在一个用于 CDH17 的典型的双位免疫测定 (two-site immunometric assay) 中,捕获抗体和检测抗体之一或两者是多克隆抗体。可从本领域常规已知的任何标记中选择用于检测抗体的标记。正如蛋白质检测测定的其它实施方案,标记可以是例如酶或化学发光部分或放射性同位素、荧光团、可检测配体(例如通过配体的标记结合配偶体的第二次结合而检测)等。优选地,抗体可用酶标记,所述酶可通过加入底物而检测,所述底物选择为使酶与底物的反应产物形成荧光复合物。选择捕获抗体,以便它提供与其余试验混合物分离的模式。因此,可将捕获抗体以已固定化或不溶性形式引入测定,或者可以是可固定的形式,也就是说,使得能够在将捕获抗体引入测定之后使固定得以完成的形式。固定化捕获抗体可包括与固相共价或非共价连接的抗体,所述固相例如磁性颗粒、胶乳粒子、微量滴定多孔板、珠、小管或其它反应容器。固定化捕获抗体的实例是这样的抗体:其已经用配体部分(例如半抗原、生物素等)进行化学修饰,并且可随后通过与配体的结合配偶体(例如抗体、抗生物素蛋白等)的固定化形式接触而固定化。在实施方案中,可使用结合到固相上的并对捕获抗体具有特异性的一类抗体,将捕获抗体固定化。

[0251] 在其它实施方案中,夹心免疫测定方法使用对 CDH17 具有反应性的两种抗体(第二抗体对于对 CDH17 具有反应性的抗体具有特异性并带有酶标),以及酶的荧光底物。在实施方案中,酶是碱性磷酸酶 (ALP),底物是 5-氟水杨酸磷酸酯。ALP 将磷酸从荧光底物 5-氟水杨酸磷酸酯上切下来,产生 5-氟水杨酸 (FSA)。5-氟水杨酸再形成形式为 FSA-Tb(3+)-EDTA 的高荧光的三元复合物,其可通过以时间分辨方式测量 Tb<sup>3+</sup>荧光而定量测定。如本文所述,荧光强度通常使用时间分辨荧光测定法来测定。

[0252] 上述免疫测定方法和形式是示例性的并非限制性的,因为,一般将会理解的是,任何免疫测定方法或形式都可用于所公开的方法。

[0253] 蛋白质检测方法、装置和试剂盒可利用纳米线传感器技术 (Zhen 等, *Nature Biotechnology*, 2005, 23(10) :1294-1301; Lieber 等, *Anal. Chem.*, 2006, 78(13) : 4260-4269, 它们通过引用结合到本文中) 或微悬臂 (microcantilever) 技术 (Lee 等, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20(10) :2157-2162; Wee 等, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20(10) :1932-1938; Campbell 和 Mutharasan, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21(3) : 462-473; Campbell 和 Mutharasan, *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21(4) :597-607; Hwang 等, *Lab Chip*, 2004, 4(6) :547-552; Mukhopadhyay 等, *Nano. Lett.*, 2005, 5(12) : 2835-2388, 它们通过引用结合到本文中) 检测样品中的 CDH17。另外, Huang 等人描述了通过市售表面等离子共振生物传感器进行的前列腺特异性抗原免疫测定 (*Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21(3) :483-490, 其通过引用结合到本文中), 其可适用于检测 CDH17。高灵敏度的小型化免疫测定也可用于检测 CDH17 (Cesaro-Tadic 等, *Lab Chip*, 2004, 4(6) : 563-569; Zimmerman 等, *Biomed. Microdevices*, 2005, 7(2) :99-110, 它们通过引用结合到本文中)。

[0254] 在优选的实施方案中,在肝癌患者或处于肝癌风险中的受试者的生物液体(优选肝癌患者或处于肝癌风险中的受试者的血)中检测 CDH17 核酸的方法,包括 RNA 印迹分析、

斑点印迹、DNA 印迹分析、FISH 和 PCR。

[0255] 与编码 CDH17 的核酸杂交的包括天然存在核酸在内的核酸、寡核苷酸、反义寡核苷酸和合成寡核苷酸,可用作试剂在肝癌患者或处于肝癌风险中的受试者的生物样品(优选肝癌患者或处于肝癌风险中的受试者的尿)中检测 CDH17 的存在情况。有用的核酸序列是对应于 CDH17 编码序列及其互补序列的序列,以及在编码序列上游或下游较远出现的与 CDH17 转录物序列互补的序列(例如包含于或延伸到 5' 非翻译区和 3' 非翻译区中的序列)。可以想像,可在 Bcl-1 阳性癌细胞内的生物液体中发现 CDH17 编码核酸分子,其是在研究时被流出或释放到液体中。聚合酶链反应(PCR)中的寡核苷酸对也可用于检测生物样品中 CDH17 的表达。寡核苷酸对包括正向 CDH17 引物和反向 CDH17 引物。

[0256] 优选用于检测生物样品中 CDH17 存在情况的寡核苷酸是与至少部分编码 CDH17 的 cDNA 序列互补的寡核苷酸。这些互补序列在本领域也称为“反义”序列。这些寡核苷酸可以是寡聚核糖核苷酸或寡聚脱氧核糖核苷酸。另外,寡核苷酸可以是由生物学上重要的核苷酸组成的天然寡聚物,所述核苷酸即 A(腺嘌呤)、dA(脱氧腺嘌呤)、G(鸟嘌呤)、dG(脱氧鸟嘌呤)、C(胞嘧啶)、dC(脱氧胞嘧啶)、T(胸腺嘧啶)和 U(尿嘧啶),或在核苷酸磷酸二酯键间用例如甲基或硫原子取代磷酸氧的修饰寡核苷酸种类。另外,这些核苷酸自身和/或核糖部分可被修饰。

[0257] 可使用本领域熟知的任何已知化学寡核苷酸合成方法来化学合成寡核苷酸。例如,可通过使用任何市售自动化核酸合成仪制备寡核苷酸。备选地,可通过标准重组 DNA 技术例如诱导非编码链转录产生寡核苷酸。可将编码 CDH17 的 DNA 序列在重组 DNA 系统中反转,例如以反方向插入合适启动子的下游,使非编码链被转录。

[0258] 尽管任何长度的寡核苷酸都可用于与编码 CDH17 的核酸杂交,但通常范围为 8-100 个核苷酸的寡核苷酸是优选的。用于在尿或血样品中检测 CDH17 的最优选寡核苷酸范围为 15-50 个核苷酸。

[0259] 无论是化学合成还是经重组 DNA 技术合成的选择用于与 CDH17 核酸分子杂交的寡核苷酸,随后都用标准技术进行分离和纯化,然后优选地,使用标准标记方案用放射性标记(例如用  $^{35}\text{S}$  或  $^{32}\text{P}$ )、荧光标记、酶、化学发光标签、比色标签或其它标记或标签来标记。

[0260] 可通过使用核酸杂交的技术测定患者样品中 CDH17 的存在情况,所述技术例如但不限于 RNA 印迹分析、斑点印迹、DNA 印迹分析、荧光原位杂交(FISH)和 PCR。色谱(优选 HPLC)和其它已知测定也可用于测定样品中 CDH17 的信使 RNA 水平。

[0261] 对于 RNA 印迹分析,分析的第一步包括通过凝胶电泳分离含有 CDH17 核酸的样品。然后将分散开的核酸转移到硝酸纤维素过滤介质或另一过滤介质上。然后,如 Molecular Cloning :A Laboratory Manual,Maniatis 等(1982,CSH Laboratory)中所述,在合适杂交条件(例如 50%甲酰胺,5x SSPE,2x Denhardt 氏溶液,0.1% SDS,42°C)下将标记的寡核苷酸暴露给过滤介质。本领域已知的其它有用方法包括溶液杂交、RNA 点线杂交和基于探针的微阵列。通过用本领域已知的标准方法测量杂交片段的放射性,定量测定患者生物液体中存在的 CDH17 核酸含量。

[0262] 斑点印迹包括将含有目标核酸的样品施加到膜上。可在施于膜上之前或之后使核酸变性。将膜与标记探针一起孵育。斑点印迹方法是本领域技术人员众所周知的,其更充分描述于美国专利号 4,582,789 和 4,617,261,所述文献的公开内容通过引用结合到本文

中。

[0263] 聚合酶链反应 (PCR) 是使用引物和聚合试剂扩增核酸样品中存在的一种或多种特异性核酸序列并随后检测所扩增序列的方法。当一个引物的延伸产物与另一个杂交时,就成为产生所需的特异性核酸序列的模板,反之亦然,所述过程视需要重复多次以产生所需量的序列。PCR在本领域中常规用于检测所需序列的存在情况(美国专利号 4,683,195)。本领域技术人员常规进行用于检测所需序列的 PCR 的具体实例是反转录 PCR(RT-PCR; Saiki 等, Science, 1985, 230 :1350 ;Scharf 等, Science, 1986, 233 :1076)。RT-PCR 包括从生物液体中分离总 RNA、在识别所需核酸序列的引物存在下使 RNA 变性、使用引物通过反转录产生 RNA 的 cDNA 拷贝、使用特异性引物通过 PCR 扩增 cDNA 和通过电泳或本领域技术人员已知的其它方法检测扩增的 cDNA。

[0264] 本文所述方法、装置和试剂盒可与一种或多种额外的癌症标记(“生物标记”)联合使用。因此,公开了用于分析生物样品中 CDH17 的存在情况并分析相同样品或同一受试者的另一生物样品中作为癌症特异性指示物的其它标记的存在情况的方法。可在检测 CDH17 之前、期间和 / 或之后对一种或多种额外标记进行检测。可通过包括检测额外标记或编码标记的核酸的试剂而修改本文所述的方法、装置和试剂盒。

[0265] 可与所公开方法联用的癌症标记包括但不限于:甲胎蛋白 (AFP),例如用于胰腺癌、肾癌、肝癌、宫颈癌和睾丸癌;癌胚抗原 (CEA),例如用于肺癌、胰腺癌、肾癌、乳腺癌、子宫癌、肝癌、胃癌和结直肠癌;糖抗原 15-3 (CA15-3),例如用于肺癌、胰腺癌、乳腺癌和肝癌;糖抗原 19-9 (CA19-9),例如用于肺癌、子宫癌、肝癌、胃癌、结直肠癌和胆管癌;癌抗原 125 (CA125),例如用于肺癌、胰腺癌、乳腺癌、肝癌、宫颈癌、子宫癌、胃癌和结直肠癌;游离的前列腺特异性抗原和前列腺特异性抗原 - $\alpha$  (1) (PSA),用于前列腺癌;游离的前列腺特异性抗原 (PSAF),用于前列腺癌和结直肠癌;前列腺特异性抗原 - $\alpha$  (1) 抗胰凝乳蛋白酶复合物 (PSAC),用于前列腺癌;前列腺酸性磷酸酶 (PAP),用于前列腺癌;人甲状腺球蛋白 (hTG),用于甲状腺癌或肾胚细胞瘤;人绒毛膜促性腺激素  $\beta$  (hCG $\beta$ ),例如用于肺癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、子宫癌、睾丸癌、结直肠癌、膀胱癌和脑癌;铁蛋白 (Ferr),例如用于肺癌、睾丸癌、喉癌、伯基特淋巴瘤、成神经细胞瘤和白血病;神经元特异性烯醇化酶 (NSE),用于肺癌、甲状腺癌、肾胚细胞瘤和成神经细胞瘤;白介素 2 (IL-2),用于肾癌和多发性骨髓瘤;白介素 6 (IL-6),用于肾癌、乳腺癌、肝癌和多发性骨髓瘤; $\beta$  2 微球蛋白 (B2M),用于肾癌、肝癌、前列腺癌、白血病、多发性骨髓瘤和淋巴瘤;和  $\alpha$  2 微球蛋白 (A2M),用于前列腺癌。对于在其中诊断和 / 或预后前述癌症的生物样品(例如血或尿)的选择,是本领域技术人员容易确定的。

[0266] 所公开的方法可在固相支持体上进行。该方法中的接触步骤可包括使生物样品与固相支持体(例如反应容器、微量容器、管、微量管、孔、多孔板或其它固相支持体)接触、结合或混合。

[0267] 所用的固相支持体可以是常规用于在生物样品中测定分析物的那些,并且通常可由纤维素、多糖例如 Sephadex 等材料构建,并且可以部分地被保护和 / 或操作固相支持体的外壳所包围。固相支持体可以是刚性的、半刚性的、柔软的、弹性的(具有形状记忆)等,视所需应用而定。可在体内或体外(离体)检测样品中的 CDH17。当不从身体中取出样品地检测样品中 CDH17 的量(即在体内)时,支持体应当对受试者无害并且可以是方便插入

身体合适部位的任何形式。例如,支持体可以是由聚四氟乙烯、聚苯乙烯或其它刚性无害塑料材料制成并具有使其能引入受试者体内的大小和形状的探测物。对合适惰性支持体及其用于预定目的的大小的选择是在本领域技术人员的能力范围内。

[0268] 可将样品和 / 或 CDH17 特异性结合剂在固相支持体上形成阵列,或者可为多重检测或分析使用多个支持体。“形成阵列”是指将文库成员(例如不同样品的阵列或靶向相同靶分子或不同靶分子的装置的阵列)或其它采集物组织或安排到逻辑阵列或物理阵列中的行为。因此,“阵列”是指例如生物样品的物理或逻辑排列。物理阵列可以是任何“空间形式”或“物理格栅形式(physically gridded format)”,其中相应文库成员的物理表现形式以有序方式排列,以使其自身适于组合筛选。例如,可将对应于样品文库的个体或混合成员的样品例如在多孔板上排列成一系列有编号的行和列。同样,可将结合剂铺板(plate)或沉积在微量滴定板(或盘)上,所述板(或盘)例如 96 孔、384 孔或 1536 孔板(或盘)。任选地,可将 CDH17 特异性结合剂固定在固相支持体上。

[0269] 在某些实施方案中,支持体具有优选作为组织基质(matrix)起作用的固定组织支持基质,例如微量滴定盘。固相支持体材料包括但不限于纤维素、多糖例如 Sephadex、玻璃、聚丙烯酰胺、硅石、可控孔度玻璃(CPG)、聚苯乙烯、聚苯乙烯 / 胶乳、聚乙烯例如超高分子量聚乙烯(UPE)、聚酰胺、聚偏二氟乙烯(PVDF)、聚四氟乙烯(PTFE;TEFLON)、羧基改性的特氟隆、尼龙、硝酸纤维素以及金属和合金例如金、铂和钯。固相支持体可以是生物、非生物、有机物、无机物或它们的任何组合,存在形式为颗粒、线、沉淀、凝胶、薄片、垫、卡片、条、杆、测试条、管、球、容器、毛细管、垫、切片、薄膜、板、玻片等,视具体应用而定。优选地,固相支持体形状是平的,以便于与生物样品(例如尿、全血、血浆、血清、腹膜液或腹水)接触。其它合适的固相支持体材料对本领域技术人员而言将是显而易见的。固相支持体可以是有或无背衬(例如聚苯乙烯或聚酯卡片背衬)的膜,例如可得自 Millipore Corp. (Bedford, MA) 的那些,例如 Hi-Flow™ Plus 膜卡片。固相支持体表面可含有用于连接核酸、蛋白质等的反应性基团,例如羧基、氨基、羟基、巯基等。虽然总非如此,但固相支持体的表面有时会由与支持体相同的材料组成。因此,表面可以由各种各样材料中的任一种组成,例如聚合物、塑料、树脂、多糖、硅石或基于硅石的材料、碳、金属、无机玻璃、膜或任何前述支持体材料(例如作为层或涂层)。

[0270] 如实施例所示,可将 CDH17 特异性单克隆抗体固定在磁珠(更具体地讲, Dynabeads M280 Tosylactivated)上,用于捕获通常限制在微孔或阵列平台上的大体积的靶蛋白。因此,在某些实施方案中,CDH17-磁性捕获测定据信增强检测灵敏度。

[0271] 可将用于进行所公开方法的诊断装置构建为适于预期应用的任何形式。在一个实施方案中,可将装置构建成一次性或可重复使用的测试条或棒,用于与生物样品(例如尿或血)接触,该生物样品的 CDH17 水平待测定。在另一个实施方案中,可使用本领域公知的微尺度制造技术来构建装置,以生产能够植入或注射到解剖部位(例如腹膜腔)的针状实施方案,用于留置诊断应用。在其它实施方案中,可将用于重复实验室用途的装置构建成延长探测物的形式。

[0272] 在优选的实施方案中,所公开的装置包括固相支持体(例如条或测验片(dipstick)),其具有作为限定生物样品(例如尿、全血、血清、血浆、腹膜液或腹水)流动路径的侧向流动基质的表面。固相支持体适用于 CDH17 的免疫色谱测定。

[0273] 用于检测各种目标分析物的免疫色谱测定是本领域已知的,其也称为侧流测试条(lateral flow test strip)或简称条测试。侧流测试的益处包括:用户友好形式、快速出结果、在大范围气候下的长期稳定性和相对低廉的制造成本。这些特征使侧流测试对于涉及各种分析物的家庭测试、护理测试的快速指示(rapid point)和野外测试的应用而言是理想的。测试的原理是简单的。基本上,可定性测试可与目测可检固相支持体(例如染色微球)结合的任何配体,在许多情况下甚至半定量测试。

[0274] 本领域已知的免疫色谱测定可适用于检测生物样品中的 CDH17。例如,用于检测血清中的游离和总前列腺特异性抗原的一步法侧流免疫条描述于 Fernandez-Sanchez 等, *J. Immuno. Methods*, 307 (1-2) :1-12 (2005), 其通过引用结合到本文中。目前市场上某些更常见的免疫色谱测定是用于妊娠(作为非处方(OTC)测试试剂盒)、链球菌性喉炎(*Strep throat*)和衣原体的测试。最近已经使用免疫色谱测定方法开发出许多用于公知抗原的新测试。例如,自 1917 年已知作为社区获得性肺炎最常见病因的抗原,但仅在最近才开发出简单的测定方法,这是用该简单的测试条方法(Murdoch, D. R. 等, *J Clin Microbiol*, 2001, 39 :3495-3498)完成。利用类似测定,已经在混合血中快速检测出人免疫缺陷病毒(HIV)(Soroka, S. D. 等, *J Clin Virol*, 2003, 27 :90-96)。硝酸纤维素膜卡片也已经用于诊断血吸虫病,即通过检测碳纳米颗粒的运动和结合(van Dam, G. J. 等, *J Clin Microbiol*, 2004, 42 :5458-5461)。

[0275] 免疫色谱测定的两种常用方法是非竞争性(或直接)和竞争性(或竞争性抑制)反应方案(TechNote #303, Rev. #001, 1999, Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN)。当测试具有多抗原位点的较大分析物例如黄体生成素(LH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)和 HIV 时,通常使用直接(双抗体夹心)形式。在这种情况下,需要少于过量的样品分析物,从而某些微球在捕获线上不会被捕获,并将继续流向固定化抗体的第二条线,即对照区。该对照线使用物种特异性抗免疫球蛋白抗体,其对微球体上的缀合抗体具有特异性。通过将样品(尿、血清等)加到加样垫上,将可能存在的游离抗原引入到装置上。然后,游离抗原与抗体-微球复合物结合。对样品抗原表位 1 具有特异性的抗体 1 与染色微球偶联,并在装置上干燥。当加入样品时,通过液体将微球-抗体复合物再水合并携带至捕获区和对照线。对样品抗原的第二抗原位点(表位 2)具有特异性的抗体 2 在捕获线处的膜上干燥。抗体 3(会与抗体 1 反应的物种特异性抗免疫球蛋白抗体)在对照线处的膜上干燥。如果抗原在样品中存在(即阳性测试),则它将通过它的两个抗原位点同时结合抗体 1(缀合至微球)和抗体 2(在捕获线处的膜上干燥)。无论抗原是否存在,抗体 1 包被微球在对照线处被抗体 3 结合。如果抗原在样品中不存在(阴性测试),则微球穿过捕获线而没被捕获,但被对照线捕获。

[0276] 当测试不能同时结合两种抗体的带单一抗原决定簇的小分子时,通常使用竞争性反应方案。正如双抗体夹心测定,通过将样品加到样品垫上,将可能存在的游离抗原引入到装置上。样品中存在的游离抗原与抗体-微球复合物结合。抗体 1 对样品抗原具有特异性,并与染色微球偶联。抗原-载体分子(通常是 BSA)缀合物在捕获线处的膜上干燥。抗体 2(Ab2)在对照线处的膜上干燥,它是会捕获试剂颗粒并证实测试完成的物种特异性抗免疫球蛋白。如果抗原在样品中存在(阳性测试),则微球上的抗体(Ab1)已经被样品抗原饱和,因此,在捕获线处结合的抗原缀合物不再与它结合。未被抗原载体分子捕获的任何微球



都可在对照线上被 Ab2 捕获。如果抗原在样品中不存在（阴性测试），则使得抗体包被染色微球被结合在捕获线上的抗原缀合物捕获。

[0277] 通常，用于将抗体固定到这些装置的适当位置上的膜是由主要疏水性材料例如硝酸纤维素制成。用作固相支持体的微球和缀合抗体都是疏水性的，它们与膜的相互作用使得它们在膜上有效干燥。

[0278] 可将样品和 / 或 CDH17 特异性结合剂在固相支持体上形成阵列，或者可为多重检测或分析使用多个支持体。“形成阵列”是指将文库成员（例如不同样品的阵列或靶向相同靶分子或不同靶分子的装置的阵列）或其它采集物组织或安排到逻辑阵列或物理阵列中的行为。因此，“阵列”是指例如生物样品的物理或逻辑排列。物理阵列可以是任何“空间形式”或“物理格栅形式 (physically gridded format)”，其中相应文库成员的物理表现形式以有序方式排列，以使其自身适于组合筛选。例如，可将对应于样品文库的个体或混合成员的样品例如在多孔板上排列成一系列有编号的行和列。同样，可将结合剂铺板 (plate) 或以其它方式沉积在微量滴定板（或盘）上，所述板（或盘）例如 96 孔、384 孔或 1536 孔板（或盘）。任选地，可将 CDH17 特异性结合剂固定在固相支持体上。

[0279] 对样品进行的 CDH17 和癌症生物标记的检测和其它测定，可与其它靶分子的检测同时进行或序贯进行，并且可以以高通量形式的自动化方式进行。

[0280] 可将 CDH17 特异性结合剂沉积但“游离”（非固定化）在缀合区，并且可固定在固相支持体的捕获区。CDH17 特异性结合剂可通过例如非特异性吸附到支持体上或通过共价结合到支持体上来固定。将结合剂固定到支持体上的技术是本领域已知的，并描述于例如美国专利号 4,399,217、4,381,291、4,357,311、4,343,312 和 4,260,678，所述文献通过引用结合到本文中。这类技术可用于固定 CDH17 结合剂。当固相支持体是聚四氟乙烯时，可能的是，通过使用钠和氨将其氨化而活化支持体并通过碳二亚胺反应将抗体与活化支持体共价结合，从而将抗体偶联到支持体上 (von Klitzing, Schultek, Strasburger, Fricke 和 Wood 载于“Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine 1982”，International Atomic Energy Agency, Vienna(1982)，第 57-62 页)。

[0281] 在一个实施方案中，所述装置使用侧流条 (LFS) 技术，其已用于多种其它快速条测定系统，例如非处方的基于人绒毛膜促性腺激素 (hCG) 抗体的早期妊娠测试条。正如许多其它诊断装置，所述装置利用结合剂与靶分子 (CDH17) 结合。所述装置具有接收生物样品例如血或尿的加样区 (application zone)、含有与样品中的 CDH17 结合的标记的标记区、保留 CDH17 标记的检测区和任选的参考区。样品从加样区向检测区的迁移通常通过检测区下游的吸液芯辅助，以有助于毛细管移动。该吸液芯通常是由吸收性材料例如吸墨纸或色谱纸形成。

[0282] 标记区和检测区含有 CDH17 的结合剂。在标记区和检测区的结合剂都是抗体的情况，它们通常识别靶分子 (CDH17 蛋白) 的不同表位。这使得能够形成包括抗体-CDH17-抗体的“夹心”。

[0283] 在优选的实施方案中，检测区、参考区和对照区优选在硝酸纤维素支持体上形成。

[0284] 可合宜地以测验片的形式简单廉价地生产所述装置。此外，它可被例如家庭用户非常容易地使用，因此提供可用于家庭的作为癌症例如肝癌筛选的装置。

[0285] 装置中的加样区适于接收待测生物样品。它通常是由吸收性材料例如吸墨纸构

成。

[0286] 标记区含有与样品中的任何 CDH17 结合的结合剂。结合剂可以是抗体（例如单克隆抗体、多克隆抗体）或抗体片段。为了便于检测，优选将结合剂与能提供肉眼可见的信号标记结合，例如它可用荧光标签或有色标签例如缀合的胶体金（可见粉红色）来标记。

[0287] 检测区在加样区的下游，而标记区通常位于这两者之间。检测区保留已与结合剂结合的 CDH17。这通常是通过使用固定化结合剂例如固定化抗体而实现。因此，样品将会从加样区迁移到标记区，在标记区，样品中的任何 CDH17 都与标记结合。

[0288] CDH17-结合剂复合物与过量结合剂一起继续迁移到检测区。当 CDH17-结合剂复合物遇到捕获试剂时，复合物被保留，而样品和过量结合剂继续迁移。随着样品中 CDH17 水平的增加，保留在检测区内的结合剂（以 CDH17-结合剂复合物的形式）的量也按比例增加。

[0289] 保留在检测区内的结合剂发出信号，该信号是不同的，取决于生物样品中 CDH17 水平是否小于、等于或大于给定阈值浓度。例如，在用于检测肝癌的血清 CDH17 的情况下，阈值浓度可介于 0ng/ml 至 2.0ng/ml 之间。在另一个实施方案中，在用于检测肝癌的血清 CDH17 的情况下，阈值浓度为 1.8ng/ml。CDH17 水平等于或大于给定参考 CDH17 浓度的受试者样品可称为“阈值水平”、“阈值量”或“阈值样品”。

[0290] 在优选的实施方案中，所述装置具有根据阈值浓度来区分样品的能力。这可通过不同方式来达到。

[0291] 在某些实施方案中，所述装置包括具有固定强度的信号的参考区，可将检测区所保留的结合剂的量与所述信号进行比较；当检测区信号等于参考区信号时，样品是阈值样品；当检测区信号强度弱于参考区时，样品含有比阈值样品少的 CDH17；当检测区信号强于参考区时，样品含有比阈值样品多的 CDH17。可容易地制备并标定合适的参考区。对这类装置，结合剂通常相对于样品中的 CDH17 过量，参考区可以在检测区上游，或优选下游。参考区信号与检测区信号是同一类型，即它们通常都是肉眼可见的，例如它们使用同一标签。这类装置中的优选参考区包含用胶体金标记的固定化蛋白（例如牛血清白蛋白）。

[0292] 在包括参考区的装置的其它实施方案中，参考区位于检测区下游，并包含捕获结合剂的试剂（例如固定化抗结合剂抗体）。流过装置的结合剂不过量存在，但其浓度使得 CDH17 为阈值浓度的样品与 50% 结合剂结合。因此，在阈值样品中，50% 结合剂将保留在检测区内，而 50% 在参考区内。如果样品中的 CDH17 水平大于阈值样品中的水平，那么少于 50% 的结合剂到达参考区，检测区将发出比参考区强的信号；相反，如果样品中的 CDH17 水平低于阈值样品中的水平，那么少于 50% 的结合剂被保留在检测区内，参考区将发出比检测区强的信号。

[0293] 在包括参考区的装置的再一些实施方案（其按照类似原理操作）中，参考区位于检测区下游，并包含有限量的捕获结合剂的试剂（例如固定化抗结合剂抗体）。试剂的存在水平使得它保留与对于阈值样品结合检测区量相同的标记，并有过量标记继续迁移越过参考区。

[0294] 因此，在这三类装置中，检测区与参考区之间的比较用于将样品与阈值浓度进行比较。可优选通过肉眼来判定检测：参考结合比。优选检测区与参考区接近并置，以便有助于这两区中信号强度的视觉比较。

[0295] 在装置的某些实施方案中,无需参考区,但设计检测区,使得它给出必要的开/关响应,例如在低于阈值浓度时不发出信号,但在等于或超出阈值时发出信号。

[0296] 在装置的其它实施方案中,无需参考区,但采用对应于阈值浓度的外部参考。这可采用多种形式,例如可用于比较检测区信号的印刷卡片,或可将检测区测量的绝对值(例如量热信号)与机器中已存储的参考值进行比较的机器阅读器。

[0297] 在装置的又一个实施方案中,所述装置包括检测区下游的对照区。这通常用于捕获穿过检测区和/或参考区的过量结合剂(例如使用固定化抗结合剂抗体)。当结合剂保留在对照区时,这证实了结合剂的运动和通过装置的迁移都已发生。可以理解,该功能可通过参考区而实现。

[0298] 在又一些其它装置中,使用电磁传感器,可极大提高检测灵敏度并且也可提高测定速度。

[0299] 提供了用于检测生物样品中靶基因存在情况的试剂盒。这类试剂盒可用于确定受试者是否患有靶基因异常表达(例如抗药性癌症的存在)相关的疾病或处于发展所述疾病的增加的风险之中。例如,试剂盒可包括能检测生物样品中的靶基因蛋白或 mRNA 的标记化合物或试剂,以及用于测定样品中靶基因量的工具(例如结合编码靶基因的 DNA 的抗靶基因抗体或寡核苷酸探针)。试剂盒也可包括说明书,其用于在靶基因蛋白或 mRNA 的量高于或低于正常水平的情况下观察试验受试者患有靶基因异常表达相关疾病或处于发展所述疾病的风险之中。

[0300] 提供用于诊断或监测肝癌的试剂盒。在一个实施方案中包括具有用于诊断或监测癌症的所需要素的试剂盒。优选地,所述试剂盒包含用于从患者采集生物液体的容器和用于检测液体中 CDH17 或其编码核酸的存在情况的试剂。试剂盒的成分可包装成水介质形式或冻干形式。

[0301] 可使用定性或定量检测样品例如血或尿中的 CDH17 的诊断试剂盒,进行本文所公开的检测/诊断方法。因此,所述试剂盒包括在一个或多个容器中的用于本文所述方法的试剂。所述试剂盒可包含分开的或组合的引物、特定的内部对照和/或探针、缓冲剂和/或赋形剂。每种试剂都可以适于存量贮存的固体形式或液体缓冲液形式来供应。试剂盒也可包括用于从宿主生物体或环境样品中获取样品的工具。

[0302] 对于基于抗体的试剂盒,所述试剂盒可包含例如:(1)与靶基因蛋白结合的第一抗体(例如与固相支持体连接);和任选地,(2)与靶基因蛋白或第一抗体结合并可检测试剂缀合的不同的第二抗体。

[0303] 对于基于寡核苷酸的试剂盒,所述试剂盒可包含例如:(1)与靶基因核酸序列杂交的寡核苷酸,例如可检测标记的寡核苷酸;或(2)可用于扩增靶基因核酸分子的一对引物。

[0304] 试剂盒也可包含例如缓冲剂、防腐剂或蛋白质稳定剂。试剂盒也可包含用于检测可检测试剂的必要成分(例如酶或底物)。试剂盒也可含有对照样品或一系列对照样品,其可被测定并与所含有的试验样品进行比较。试剂盒的每种成分通常都封装在单独容器中,所有不同容器都装入一个包装中并带有用于观察试验受试者是否患有靶基因异常表达相关疾病或处于发展所述疾病的风险之中的说明书。

[0305] 举例说明,试剂盒可含有对 CDH17 具有特异性的结合剂(例如抗体)、针对酶标抗

体的抗体 ;和酶的底物。试剂盒也可含有固相支持体例如微量滴定多孔板、标准品、测定稀释剂、洗涤缓冲剂、粘性盖板 (adhesive plate cover) 和 / 或使用试剂盒进行本文所公开方法的说明书。在一个实施方案中,试剂盒包含用于待测生物样品 (例如血或尿) 的一种或多种蛋白酶抑制剂 (例如蛋白酶抑制剂混合物)。

[0306] 在某些实施方案中,可制备这样的试剂盒 :其含有检测 CDH17 蛋白的一种或多种试剂,例如但不限于 CDH17 抗体、其片段或 CDH17 结合配偶体。试剂可与用于从患者采集生物液体的容器包装在一起。当抗体或结合配偶体以缀合物 (其中已连接标记,例如放射性金属离子或部分) 的形式用于试剂盒时,这样的缀合物的成分可提供为完全缀合形式、中间体形式或作为由试剂盒用户来缀合的单独部分。

[0307] 在其它实施方案中,也可制备这样的试剂盒 :其含有检测 CDH17 核酸 (例如但不限于全长 CDH17 核酸、CDH17 寡核苷酸) 的一种或多种试剂和 CDH17 引物对。试剂可与用于从患者采集生物样品的容器包装在一起。核酸可以是已标记形式或待标记形式。

[0308] 试剂盒的其它成分包括但不限于 :用于采集生物样品的工具、用于标记检测试剂 (结合剂) 的工具、用于固定生物样品中的 CDH17 蛋白或 CDH17 核酸的膜、用于将生物样品加样到膜上的工具、用于使试剂与受试者生物样品中的 CDH17 结合的工具、第二抗体、用于从受试者生物液体中分离总 RNA 的工具、用于进行凝胶电泳的工具、用于从分离的总 RNA 产生 cDNA 的工具、用于进行杂交测定的工具,以及用于进行 PCR 的工具等。

[0309] 可任选在合适包装中提供试剂盒。本文所用“包装”是指系统常规使用的并能将用于所公开的诊断 / 检测方法的一种或多种试剂成分固定到固定界限中的固体基质或材料。这样的材料包括包括玻璃和塑料 (例如聚乙烯、聚丙烯和聚碳酸酯) 的瓶、管形瓶、纸、塑料和塑料箔层压的封套等。优选地,固体基质是具有这种表面的结构 :所述表面可被衍生而锚定寡核苷酸探针、引物、分子信标、特定的内部对照等。优选地,固体基质是平面材料,例如微量滴定孔的侧面或测验片的侧面。在某些实施方案中,试剂盒包含具有两个以上孔并且孔中装有试剂的微量滴定盘,所述试剂包括引物、探针、特定的内部对照和 / 或分子信标。

[0310] 试剂盒可任选包括有关试剂盒成分和 / 或如何进行各种测定 (例如 CDH17 水平、与对照标准品的比较等) 的信息的一组印刷形式或电子形式 (例如磁盘或光盘) 的说明书。试剂盒也可作为更大的包装的组成部分而市售,所述包装包括用于测定其它生物化学成分仪器。

[0311] VI. CDH17 拮抗剂的筛选测定

[0312] 一种用于 CDH17 抑制剂,即结合 CDH17 蛋白或对例如 CDH17 基因表达或 CDH17 基因活性具有刺激或抑制效应的候选或试验化合物或试剂 (例如肽、肽模拟物、小分子或其它药物) 的鉴定 (本文也称为“筛选测定”) 方法。这样鉴定的化合物可用于调节抗药性。可用本领域已知的大量组合文库方法中的任一种来获取试验化合物,所述方法包括 :生物文库 ;天然产物文库 ;空间可寻址平行固相或溶液相文库 ;需要去卷积 (deconvolution) 的合成文库方法 ;“一珠一化合物”文库方法 ;和使用亲和色谱选择的合成文库方法。生物文库方法限于肽文库,而其它方法可用于肽、非肽寡聚物或化合物的小分子文库 (Lam(1997) *Anticancer Drug Des.* 12 :145)。

[0313] 在本领域可找到合成分子文库的方法实例,例如参见 :DeWitt 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, 90 :6909 ;Erb 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, 91 :11422 ;

Zuckermann 等, *J. Med. Chem.*, 1994, 37 :2678 ;Cho 等 *Science*, 1993, 261 :1303 ;Carrell 等, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, 33 :2059 ;Carell 等, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 1994, 33 :2061 ;和 Gallop 等, *J. Med. Chem.*, 1994, 37 :1233。

[0314] 化合物文库可存在于溶液中 (例如 Houghten *Bio/Techniques*, 1992, 13 :412-421), 或在珠 (Lam *Nature*, 1991, 354 :82-84)、芯片 (Fodor *Nature*, 1993, 364 :555-556)、细菌 (美国专利号 5, 223, 409)、孢子 (美国专利号 5, 571, 698 ;5, 403, 484 ;和 5, 223, 409)、质粒 (Cull 等 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1992, 89 :1865-1869) 或噬菌体上 (Scott 和 Smith *Science*, 1990, 249 :386-390 ;Devlin *Science*, 1990, 249 :404-406 ;Cwirla 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1990, 87 :6378-6382 ; 和 Felici *J. Mol. Biol.*, 1991, 222 :301-310)。

[0315] 在一个实施方案中,测定是基于细胞的测定,其中使表达靶基因蛋白或其生物活性部分的细胞与试验化合物接触,并测定试验化合物与靶基因蛋白的结合能力。细胞可以是例如酵母细胞或哺乳动物来源的细胞。对试验化合物与靶基因蛋白结合能力的测定可例如按如下方式完成:通过将试验化合物与放射性同位素或酶标记偶联,使得可以通过检测复合物中的标记化合物测定试验化合物与靶基因蛋白或其生物活性部分的结合。例如,试验化合物可以用  $^{125}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{14}\text{C}$  或  $^3\text{H}$  直接或间接标记,再通过放射性发射 (radioemission) 的直接计数或通过闪烁计数来检测放射性同位素。备选地,试验化合物可以用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶进行酶标记,并可通过测定合适底物向产物的转化来检测酶标记。在优选的实施方案中,测定包括:使表达靶基因蛋白或其生物活性部分的细胞和与靶基因结合的已知化合物接触而形成测定混合物、使测定混合物与试验化合物接触和测定试验化合物与靶基因蛋白相互作用的能力,其中对试验化合物与靶基因蛋白相互作用的能力的测定包括测定试验化合物相比已知化合物优先与靶基因或其生物活性部分结合的能力。

[0316] 在另一个实施方案中,测定是基于细胞的测定,其包括使表达靶基因蛋白或其生物活性部分的细胞与试验化合物接触,并测定试验化合物调节 (例如刺激或抑制) 靶基因蛋白或其生物活性部分的活性的能力。对试验化合物调节靶基因或其生物活性部分的活性的能力的测定可例如通过测定靶基因蛋白与靶基因靶分子结合或相互作用的能力来完成。本文所用“靶分子”是靶基因蛋白与之天然结合或相互作用的分子,例如在表达靶基因蛋白的细胞核或细胞质中的分子。靶基因靶分子可以是非靶基因分子或靶基因蛋白或多肽。靶标可以是例如具有催化活性的第二胞内蛋白质、与靶基因天然结合的蛋白质或促进 DNA 与靶基因缔合的蛋白质。

[0317] 可通过用于测定直接结合的上述方法之一,完成对靶基因蛋白与靶基因靶分子结合或相互作用的能力的测定。在优选的实施方案中,对靶基因蛋白与靶基因靶分子结合或相互作用的能力的测定可通过在化疗药存在下测定靶分子活性或检测细胞反应 (例如细胞存活或细胞增殖) 来完成。

[0318] 在又一个实施方案中,测定方法是无细胞测定,其包括使靶基因蛋白或其生物活性部分与试验化合物接触,并检测试验化合物与靶基因蛋白或其生物活性部分结合的能力。如上所述,可直接或间接测定试验化合物与靶基因蛋白的结合。在优选的实施方案中,测定包括:使靶基因蛋白或其生物活性部分和与靶基因结合的已知化合物接触而形成测

定混合物、使测定混合物与试验化合物接触和测定试验化合物与靶基因蛋白相互作用的能力,其中对试验化合物与靶基因蛋白相互作用的能力的测定包括测定试验化合物相比已知化合物优先与靶基因或其生物活性部分结合的能力。

[0319] 在另一个实施方案中,测定是无细胞测定,其包括使靶基因蛋白或其生物活性部分与试验化合物接触,并测定试验化合物调节(例如刺激或抑制)靶基因蛋白或其生物活性部分的活性的能力。对试验化合物调节靶基因活性的能力的测定可例如通过以下方式完成:通过用于测定直接结合的上述方法之一测定靶基因蛋白与靶基因靶分子结合的能力。在备选实施方案中,对试验化合物调节靶基因活性的能力的测定可通过测定靶基因蛋白进一步调节靶基因靶分子的能力来完成。例如,可如前所述地测定靶分子对合适底物的催化活性/酶活性。

[0320] 在又一个实施方案中,无细胞测定包括使靶基因蛋白或其生物活性部分和与靶基因结合的已知化合物接触而形成测定混合物、使测定混合物与试验化合物接触和测定试验化合物与靶基因蛋白相互作用的能力,其中对试验化合物与靶基因蛋白相互作用的能力的测定包括测定靶基因蛋白优先结合或调节靶基因靶分子活性的能力。

[0321] 所公开的无细胞测定适用于靶基因的天然和变体形式(例如肽片段和融合蛋白)。在包括靶基因的疏水形式的无细胞测定的情况下,可合乎需要地利用增溶剂,从而将靶基因的疏水形式维持在溶液中。这样的增溶剂的实例包括非离子型去垢剂例如正辛基葡萄糖苷、正十二烷基葡萄糖苷、正十二烷基麦芽糖苷、辛酰基-N-甲基葡萄糖酰胺(methylglucamide)、癸酰基-N-甲基葡萄糖酰胺、Triton<sup>®</sup> X-100、Triton<sup>®</sup> X-114、Thesit<sup>®</sup>、异十三聚烯醇醚(Isotridecypoly(ethylene glycol ether)n)、3-[(3-胆酰胺丙基(cholamidopropyl))二甲基氨基]-1-丙磺酸盐(CHAPS)、3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基氨基]-2-羟基-1-丙磺酸盐(CHAPSO)或N-十二烷基=N,N-二甲基-3-氨基-1-丙磺酸盐。

[0322] 在某些实施方案中,可合乎需要地固定靶基因或其靶分子,以促进这两种蛋白质中的一种或两者的复合形式与未复合形式的分离,并适合测定自动化。在候选化合物存在或不存在时试验化合物与靶基因的结合或者靶基因与靶分子的相互作用,可在适合装有反应物的任何容器中进行。这样的容器的实例包括微量滴定板、试管和微量离心管。在一个实施方案中,可提供加有使得两种蛋白质之一或二者能够结合到基质上的结构域的融合蛋白。例如,可使谷胱甘肽-S-转移酶/靶基因融合蛋白或谷胱甘肽-S-转移酶/靶融合蛋白吸附在谷胱甘肽 sepharose 珠(Sigma Chemical ;St.Louis,Mo.)或谷胱甘肽衍生的微量滴定板上,然后将其与试验化合物或者试验化合物和未吸附靶蛋白或靶基因蛋白混合,并在促进复合物形成的条件(例如盐和 pH 的生理条件)下孵育混合物。孵育之后,洗涤珠子或微量滴定板孔以除去任何未结合成分,在珠子情况下基质被固定,并例如如上所述地直接或间接测定复合物。备选地,可将复合物从基质上解离下来,并用标准技术测定靶基因结合或活性水平。

[0323] 将蛋白质固定在基质上的其它技术也可用于筛选测定。例如,可利用生物素和链霉抗生物素的缀合作用固定靶基因或其靶分子。可使用本领域众所周知的技术(例如生物素化试剂盒,Pierce Chemicals ;Rockford, Ill.)从生物素-NHS(N-羟基-琥珀酰亚胺)制备生物素化靶基因或靶分子,并固定在链霉抗生物素包被的 96 孔板(Pierce Chemical)的

孔中。备选地,可将与靶基因或靶分子反应但不干扰靶基因蛋白与其靶分子结合的抗体衍生到板的各孔中,通过抗体缀合将未结合靶标或靶基因捕获到孔中。除了上述用于 GST- 固定化复合物的那些之外,检测这类复合物的方法包括使用与靶基因或靶分子反应的抗体对复合物的免疫检测,以及依赖于检测靶基因或靶分子相关酶活性的酶联测定。

[0324] 在另一个实施方案中,在以下方法中鉴定对靶基因表达的调节:在所述方法中使细胞与候选化合物接触并测定靶基因在细胞中的表达(mRNA 或蛋白质,或者靶基因拷贝数)。将候选化合物存在时的靶基因表达水平与候选化合物不存在时的靶基因表达水平进行比较。随后基于该比较,可鉴定候选化合物为靶基因表达的调节剂。例如,当候选化合物存在时的靶基因 mRNA 或蛋白质表达高于(统计学上显著更高)候选化合物不存在时,候选化合物被鉴定为靶基因 mRNA 或蛋白质表达的刺激剂。备选地,当候选化合物存在时的靶基因 mRNA 或蛋白质表达低于(统计学上显著更低)候选化合物不存在时,候选化合物被鉴定为靶基因 mRNA 或蛋白质表达的抑制剂。细胞中靶基因 mRNA 或蛋白质的表达水平或每个细胞中靶基因的拷贝数可通过本文所述的用于检测靶基因基因组 DNA、mRNA 或蛋白质的方法来测定。

[0325] 靶基因蛋白质可作为“诱饵(bait)蛋白”用于双杂交测定(two-hybrid assay)或三杂交测定(three hybrid assay)(参见例如美国专利号 5,283,317;Zervos 等,Cell,1993,72:223-232;Madura 等,J. Biol. Chem.,1993,268:12046-12054;Bartel 等,Bio/Techniques,1993,14:920-924;Iwabuchi 等,Oncogene,1993,8:1693-1696;和 W094/10300),以鉴定与靶基因结合或相互作用的其它蛋白质(“靶基因结合蛋白”或“靶基因-bp”)并调节靶基因活性。

[0326] 双杂交系统是基于大部分转录因子的模块特性(modular nature),其由可分离的 DNA 结合结构域和激活结构域组成。简而言之,所述测定利用两种不同的 DNA 构建体。在一种构建体中,将编码靶基因的基因与编码已知转录因子(例如 GAL-4)的 DNA 结合结构域的基因融合。在另一种构建体中,将来自 DNA 序列文库的编码未鉴定蛋白质(“猎物(prey)”或“样品”)的 DNA 序列与编码已知转录因子激活结构域的基因融合。如果“诱饵”蛋白和“猎物”蛋白在体内能相互作用而形成靶基因依赖性复合物,则使转录因子的 DNA 结合结构域和激活结构域密切接触。这样的接近使得与响应转录因子的转录调节位点有效连接的报告基因(例如 LacZ)能够转录。可检测报告基因的表达,可分离出含有功能性转录因子的细胞集落并用于获取编码与靶基因相互作用的蛋白质的克隆基因。

[0327] 因此也提供通过上述筛选测定鉴定的新试剂及其在本文所述的治疗中的应用。

[0328] VII. 药物基因组学

[0329] 另一方面提供用于在个体中检测靶基因蛋白、核酸表达或靶基因活性并因此选择用于该个体的合适治疗性试剂或预防性试剂的方法(本文称为“药物基因组学”)。药物基因组学允许根据个体基因型(例如经检查以确定该个体响应特定试剂的个体基因型)来选择用于该个体的治疗性或预防性治疗的试剂(例如药物)。

[0330] 可将经筛选测定而鉴定的对靶基因活性(例如 CDH17)具有刺激效应或抑制效应的试剂或调节剂给予个体,以(预防性或治疗性)治疗异常靶基因活性相关疾病(例如贫血)。结合这样的治疗,可考虑个体的药物基因组学(即对个体基因型和该个体对外源化合物或药物的反应之间 CDH17 关系的研究)。治疗药代谢上的差异可通过改变药理学活性药

物的剂量与血药浓度之间的关系而导致严重毒性或治疗失败。因此,个体药物基因组学使得能够根据个体基因型的考虑而选择用于预防性治疗或治疗性治疗的有效试剂(例如药物)。这样的药物基因组学还可用于确定合适的剂量和治疗方案。因此,可测定个体中靶基因蛋白的活性、靶基因核酸的表达或靶基因的突变量,以由此选择用于该个体的治疗性或预防性治疗的合适试剂。

[0331] 药物基因组学涉及因染病者改变的药物处置和异常作用而导致的临床上重要的响应药物的遗传变异。参见例如 Linder, Clin. Chem., 1997, 43(2):254-266。一般而言,可区分两类药物遗传病症(pharmacogenetic condition)。作为改变药物对机体作用方式(改变的药物作用)的单因子遗传的遗传病症或作为改变机体对药物作用方式(改变的药物代谢)的单因子遗传的遗传病症。这些药物遗传病症可因罕见缺陷或多态性发生。例如,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷(G6PD)是一种常见的遗传酶病,其中主要临床并发症是在摄入氧化剂药物(抗疟药、磺胺类、镇痛药、硝基咪唑)和食用蚕豆之后发生溶血。

[0332] 因此,可测定个体中靶基因产物(CDH17)的活性、靶基因核酸的表达或靶基因的突变量,以由此选择用于该个体的治疗性或预防性治疗的合适试剂。另外,药物遗传学研究可用于将编码药物代谢酶的多态性等位基因的基因型应用于鉴定个体的药物反应性表型。当用于给药或药物选择时,该知识可避免在用靶基因调节剂(例如通过本文所述示例性筛选测定之一鉴定的调节剂)治疗受试者时产生不良反应或治疗失败,并因此增强治疗性或预防性功效。

[0333] VIII. 临床试验期间对效果的监测

[0334] 监测试剂(例如药物、化合物)对靶基因表达或靶基因活性(例如调节细胞的CDH17表型的能力)的影响,不仅可用于基础药物筛选,而且可用于临床试验。例如,在表现出增加的靶基因表达、蛋白质水平或上调的靶基因活性的受试者的临床试验中,可监测通过筛选测定而确定的试剂降低靶基因表达、蛋白质水平或下调靶基因活性的有效性。

[0335] 备选地,在设计用于增加靶基因表达、蛋白质水平或上调靶基因活性的化合物的临床试验中,可监测通过筛选测定而确定的试剂增加靶基因表达、蛋白质水平或上调靶基因活性(例如降低巨核细胞的产生)的有效性。在这样的临床试验中,靶基因和优选已知与例如细胞增殖障碍有关的其它基因的表达或活性,可用作特定细胞抗药性的“读出”或标记。

[0336] 例如但不限于,可以鉴定这样的基因(包括靶基因):所述基因在细胞中通过调节靶基因活性(例如在筛选测定中鉴定的)的试剂(例如化合物、药物或小分子)治疗而受到调节。因此,例如在临床试验中为了研究试剂对细胞增殖障碍的作用,可分离细胞、制备RNA和分析障碍相关的靶基因和其它基因的表达水平。可通过RNA印迹分析或RT-PCR或本领域已知的其它方法,或者通过测定所产生的蛋白质量,通过本文所述的方法之一,或通过测量靶基因或其它基因活性水平,定量测定基因表达水平(即基因表达图式)。这样,基因表达图式可作为指示细胞对药物的生理反应的标记。因此,可在用试剂治疗个体之前和期间的不同时间点测定这种反应状态。

[0337] 在优选的实施方案中,用试剂(例如激动剂、拮抗剂、肽模拟物、蛋白质、肽、核酸、小分子或通过本文所述的筛选测定鉴定的其它候选药物)治疗受试者的治疗有效性的监测方法包括以下步骤:(i)在给予试剂之前,从受试者获取给予前的样品;(ii)在给予前的



样品中检测靶基因蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的表达水平；(iii) 从所述受试者获取一个或多个给予后的样品；(iv) 在给予后的样品中检测靶基因蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的表达或活性水平；(v) 将给予前的样品中的靶基因蛋白、mRNA 或基因组 DNA 的表达或活性水平与给予后的样品中的靶基因蛋白、mRNA 或基因组 DNA 进行比较；和 (vi) 相应改变对受试者的试剂给予。例如，可合乎需要地增加试剂给予，以降低靶基因的表达或活性水平低于所检测水平，以增加试剂的有效性。

[0338] 除非另有说明，否则所有科技术语都具有本发明所属领域普通技术人员所通常理解的含义。尽管类似或等同于本文所述的任何方法和材料都可用于实施或测试本发明，但现在介绍优选的方法和材料。

[0339] 本文提及的所有出版物和专利申请都通过引用而结合，以公开和描述与所引用出版物相关的方法和 / 或材料。本文所涉及或引用的所有专利、专利申请、临时申请和出版物都通过引用以其整体（包括所有附图和表格）结合，直到它们与本说明书的明确教导不一致的程度。

[0340] 以下是说明实施本发明的方法的实施例。这些实施例不应视为是限制性的。

### 实施例

[0341] 实施例 1：人 HCC 细胞系和癌症患者中的 CDH17 mRNA 水平

#### [0342] 材料与方法

[0343] 使用 qPCR 分析，测量具有不同转移潜力的一组人 HCC 细胞系中的 CDH17 mRNA 水平。对照细胞系 MIHA 是无限增殖的正常人肝细胞，它表达极少量或不可检出的 CDH17。原代 HCC 细胞系表达少许 CDH17 转录物，而在其转移细胞（例如 MHCC97-H、MHCC97-L 和 H2-M）中观察到强烈表达。

[0344] 来自接受了治疗手术的 HCC 患者的 46 对肿瘤和邻近肝组织的结果支持了这些细胞系数据。下表 3 是根据在具有确切临床数据的总共 46 个 HCC 患者中进行的相关分析而制成的。用标准方案提取临床样品中的 mRNA 并逆转录为 cDNA，以使用定量聚合酶链反应 (qPCR) 来测定 CDH17 转录物的表达。使用  $\chi^2$  检验，比较临床样品的详细参数。

#### [0345] 结果

[0346] 将 qPCR 数据与临床参数相关揭示了 CDH17 过量表达与晚期肿瘤 (III-IV) 和静脉浸润存在情况的关系，而其它参数则没有发现显著相关性。CDH17 的过量表达与晚期肿瘤 (pTNM III 和 IV) ( $p = 0.022$ ) 和肿瘤的静脉侵入 ( $p = 0.022$ ) 强相关。其它临床病理参数没有发现显著相关性。更显著的是，拷贝数变异分析揭示，与邻近非肿瘤组织相比，CDH17 基因在肿瘤中的基因组在所分析的 49% 的 HCC 病例中有扩增 ( $n = 231$ ) (数据未显示)。综合来看，这些结果表明 CDH17 是用于介入 HCC 的发病和转移的候选靶标。

表 3. CDH17 表达与 HCC 患者临床病理参数间的统计相关性 ( $n = 46$ )。

[0347]

临床病理参数	频率 (%)	<u>CDH17 过量表达</u>		P 值
		-	+	
性别				0.116

	男	37 (80.4)	19	18	
	女	9 (19.6)	2	7	
	年龄				0.305
	<60	34 (73.9)	14	20	
	≥60	12 (26.1)	7	5	
	肿瘤大小(cm)				0.786
	<5	8 (17.4)	4	4	
	≥5	38 (82.6)	17	21	
	甲胎蛋白(AFP) (ng/ml)				0.226
	<250	24 (52.2)	13	11	
	≥250	22 (47.8)	8	14	
	HBsAg				0.126
	阴性	6 (1.0)	1	5	
	阳性	40 (87.0)	20	20	
[0348]	组织分化				0.261
	良好	26 (61.9)	9	7	
	中等, 差	16 (38.1)	10	16	
	TNM 期				0.022*
	早期(I, II)	18 (39.1)	12	6	
	晚期(III, IV)	28 (60.9)	9	19	
	静脉浸润				0.022*
	无	18 (39.1)	12	6	
	有	28 (60.9)	9	19	
	复发				0.161
	无	35 (76.1)	18	17	
	有	11 (23.9)	3	8	
	肝硬化				0.375
	阴性	23 (50.0)	9	14	
	阳性	23 (50.0)	12	11	

[0349] • 统计学显著性 ( $p < 0.05$ )

[0350] 实施例 2 :CDH17 水平在癌症患者中预测微血管侵入和疾病预后

[0351] 以上数据进一步为 Ding 等, Cancer, 115 July, 2009 所证实, 其内容通过引用结合到本文中。Ding 等人评价了三种 HBV- 阳性 HCC 细胞系和 HCC 癌症患者的组织样品中的 CDH17 表达。蛋白质印迹和免疫荧光分析显示, 与低侵入性 Hep3B 和 PLC/PRF/5 细胞相比, 在高侵入性 HCCLM3 细胞中 CDH17 蛋白水平显著升高。使用伤口愈合迁移测定, 调查了高侵入性细胞系中 CDH17 表达对细胞迁移 (转移的特征) 的影响。使用 SiRNA 介导的抑制, Ding 等人证明, 与对照细胞相比, CDH17 抑制在 HCCLM3-SiRNA 治疗的细胞中导致伤口闭合的明显延迟, 证实 CDH17 参与癌细胞迁移。在 Matrigel 侵入测定中, Ding 等人也证明, 与对照细胞相比, SiRNA 介导的 CDH17 抑制在 HCCLM3-SiRNA 治疗的细胞中导致侵入细胞的 57% 的

下降。

[0352] 使用针对 50 对 HCC 与邻近非肿瘤组织的免疫组织化学分析,证实 HBV 相关的 HCC 患者中 CDH17 与微血管转移间的关系。在所测试的 50 个 HCC 患者样品中,36 个 (72%) 表现出 CDH17 过量表达,其与血管侵入相关。因为微血管侵入预示接受治疗切除的 HCC 患者的肿瘤复发或预后差,Ding 等人使用 Kaplan-Meier 生存试验研究了在 HBV- 阳性 HCC 中 CDH17 过量表达与预后间的相关性。结果表明具有阳性 CDH17 表达的患者与没有 CDH17 表达的患者相比具有更差的预后。

[0353] 实施例 3:CDH17 在肝肿瘤细胞 MHCC97-H(97H) 中表达沉默之后,肿瘤异种移植物大小减小

#### [0354] 材料与方法

[0355] 97H 细胞得自具有高转移潜力的肝肿瘤细胞。这些细胞单独用载体(模拟)或用靶向 CDH17(shCDH17) 外显子 3(SEQ ID NO:5) 的短发夹 RNA(shRNA)(参见 SEQ ID NO:2) 稳定转染。将转染(模拟或 shCDH17) 或未转染(97H) 的 97H 细胞接种裸鼠,时间长达 8 周。定量测定肿瘤体积的改变并在图中示出。

#### [0356] 结果

[0357] 结果见图 1。在细胞接种后 4 周目测和使用荧光成像技术观察皮下肿瘤的生长。在细胞接种后第 8 周,解剖小鼠的肿瘤之后显示皮下肿瘤的外观和大小。当 CDH17 表达受抑制时,观察到肿瘤异种移植物大小明显减小。

[0358] 在将 97H 肿瘤细胞皮下移植或系统性注射的类似实验中,无论 97H 肿瘤细胞是经皮下移植或系统性注射,在第 8 周所有对照动物(模拟组)在肺中都发展出转移,如通过 GFP- 阳性肿瘤细胞的存在所示。相比之下,在 CDH17 shRNAmir 治疗组的动物中未观察到肺转移。因此 CDH17 的敲减不仅减少了肿瘤生长,而且降低了肝癌的转移潜力。这具有巨大的临床意义,因为大多数 HCC 患者死于因肝内或肝外转移所致的肿瘤复发。

[0359] 实施例 4:在 RNAi 介导的 CDH17 表达沉默之后,MHCC97-H(97H) 肝肿瘤细胞对药物和基因治疗变得敏感

#### [0360] 材料与方法

[0361] 97H 细胞得自具有高转移潜力的肝肿瘤细胞。这些细胞单独用载体(模拟)或用靶向 CDH17(miCDH17) 外显子 3(SEQ ID NO:5) 的短发夹 RNA(shRNA)(参见 SEQ ID NO:2) 稳定转染。用不同浓度的化疗药治疗 97H 细胞(97H、模拟和 miCDH17),化疗药例如泰素(图 2A)、卡铂(图 2C) 和表柔比星(图 2B)。另外,使用腺病毒介导的方法(rAd-p53) 用 p53(肿瘤抑制基因) 转染不同组的 97H 细胞(图 2D)。不同治疗组的细胞生存力通过 MTT 测定来评价。

#### [0362] 结果

[0363] 给予 CDH17 抑制剂(shRNA) 使肿瘤细胞对用其它化疗药(包括例如泰素、卡铂和表柔比星等药物) 和在腺病毒载体中给予的 p53 肿瘤抑制基因的治疗敏感。97H 肿瘤细胞经敏化,对化学治疗和基因治疗的治疗敏感。

[0364] 图 3A、3B、3C 和 3D 比较了用靶向 CDH17 外显子 5 的 shRNA 转染 97H 细胞以及 97H 和 scramble(SC) 对 CDH17 蛋白水平(图 3A,吸光度/时间,小时)、细胞增殖(图 3B,细胞浓度)、细胞侵入(图 3C,吸光度/胶原浓度, $\mu$ g/ml)、集落形成(图 3D,集落数)的影响。

CDH17 表达减少的肿瘤细胞“肿瘤发生”较少。

[0365] 实施例 5:两种 CDH17 的单克隆抗体的表征和这些抗体在建立用于检测人血清 CDH17 的 ELISA 中的用途

[0366] 材料与方法

[0367] 采用已建立的实验室方案合成并选择针对 CDH17 的两种单克隆抗体 (Lic3 和 Lic5)。用 IsoStrip Mouse Monoclonal Antibody Isotyping Kit(Roche) 测定这些抗体的同种型。Lic3 和 Lic5 的同种型分别是 IgG2a 和 IgG2b。

[0368] 结果

[0369] 基于初步数据,在 HCC 患者血清中检测跨越 CDH17 的结构域 1 和结构域 2(D1-D2) 的 CDH17 截短形式。假定人血清 D1-D2 的检测用作标记,以指示 HCC 的发病率。使用已建立的方案合成分子量为 85kDa 的重组 D1-D2(SEQ ID NO:1),并进行蛋白质印迹检查 Lic3 和 Lic5 在该重组蛋白的检测中的特异性。发现 Lic3 和 Lic5 检测出合成 D1-D2。合成的重组蛋白带有若干标签,例如 Nus 标签、His 标签和 S 标签。该蛋白质的表观分子量为约 147kDa(在聚丙烯酰胺凝胶上)。

[0370] 基于不同浓度的 D1-D2、Lic3 和 Lic5 进行 ELISA。针对重组 CDH17(代表 D1-D2 表位)的两种单克隆抗体的表征结果证实抗体可用于检测人血清 CDH17 的 ELISA。

[0371] 实施例 6:通过靶向外显子 5 的 shRNA 沉默 MHCC97-H 细胞的 CDH17 表达之后,肿瘤大小减小

[0372] 材料与方法

[0373] 设计了靶向人 CDH17 外显子 5 的 shRNA 构建体。基于 <http://www.sigma-aldrich.com/missionsearch> 设计了用于克隆到 shRNA 表达载体中的 shRNA 正向插入片段 (sh\_e5F: 5'-GAT CCC GCC AGT CCC TAT CAC CAT AGA GAA GCT TGT CTA TGG TGA TAG GGA CTG GTT TTT T-3') (SEQ ID NO:3) 和反向插入片段 (sh\_e5R:5' -CTA GAA AAA ACC AGT CCC TAT CAC CAT AGA CAA GCT TCT CTA TGG TGA TAG GGA CTG GCG G-3') (SEQ ID NO:4)。这两个插入片段通过 GeneEraser™ shRNA Mammalian Expression Vector Kit (Stratagene, La Jolla, CA) 所述的环序列连接。用 lipofectamine(Invitrogen, Carlsbad, CA) 将该构建体转染到肝癌细胞 (MHCC97-H 细胞) 中,以抑制 CDH17 的表达。用浓度 1mg/ml 的硫酸 G418(Calbiochem, San Diego, CA) 选择稳定的转染子。也包括 scramble 实验,以评价转染实验的特异性。

[0374] 结果

[0375] 当通过蛋白质印迹分析评价时,所选转染子 (shCDH17) 之一的 CDH17 蛋白质水平被降低。在 shCDH17 细胞中观察到细胞增殖、细胞侵入、集落形成和细胞粘附的明显减少。在肿瘤异种移植物模型中,在将 MHCC97-H 细胞皮下移植到裸鼠中发展肿瘤异种移植物前,按照上述在 MHCC97-H 细胞中敲减 CDH17。当 shCDH17 细胞用于移植到裸鼠中时,观察到皮下肿瘤的大小和体积的减小(图 4)。[ 缩略语 :MHCC97-H, 97H ;Scramble 对照, SC]。

[0376] 实施例 6:使用免疫磁珠捕获测定提取 CDH17 的重组 D1-D2(SEQ ID:1) 的方法

[0377] 如图 5 所示,使用了两种采用免疫磁珠捕获测定选择性提取 CDH17 的重组 D1-D2(D1-D2) 的方法。使用两种不同的 Dynabeads(Dynabeads Protein G 和 Dynabeads M-280 Tosylactivated)。对于使用 Dynabeads Protein G 的免疫捕获,将不同浓度的 D1-D2

与纯化 Lic5 一起孵育,然后与 Dynabeads Protein G 混合。对于使用 Dynabeads M-280 Tosylactivated 的免疫捕获,先将纯化 Lic5 与珠子偶联,然后与不同浓度的 D1-D2 混合。接着,使用 SDS 样品缓冲液将 Lic5-D1-D2 免疫复合物从珠子上洗脱下来,随后进行蛋白质印迹分析。用生物素化 Lic3 进行蛋白质印迹以检测 D1-D2,并使用辣根过氧化物酶 (HRP)-缀合的链霉抗生物素与生物素化 Lic3 反应。

[0378] 对第一种方法,按照制造商的方案将纯化抗 CDH17 Lic3 单克隆抗体与 Dynabeads M-250 Tosylactivated 珠 (Invitrogen) 偶联。再让抗 CDH17-珠与 D1-D2 结合。在此之后,将样品缓冲液加到珠子上以洗脱 Lic3-D1-D2 复合物。在用磁铁分离珠子之后,上清液用于进行蛋白质印迹或通过标准 ELISA 或质谱方法来检测抗原。进行滴定实验以优化用于缀合磁珠的包被的纯化 Lic3 单克隆抗体的浓度。对第二种方法,使纯化 Lic3 单克隆抗体与预洗涤的 Dynabeads Protein G (Invitrogen) 结合,再将珠子与 D1-D2 一起孵育。在此之后,将样品缓冲液加到珠子上以从珠子上洗脱 Lic3-D1-D2 复合物。在用磁铁分离珠子之后,上清液用于进行蛋白质印迹。也分析了使用 Dynabeads 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 提取 D1-D2 的能力,并用于测定 D1-D2 的量。

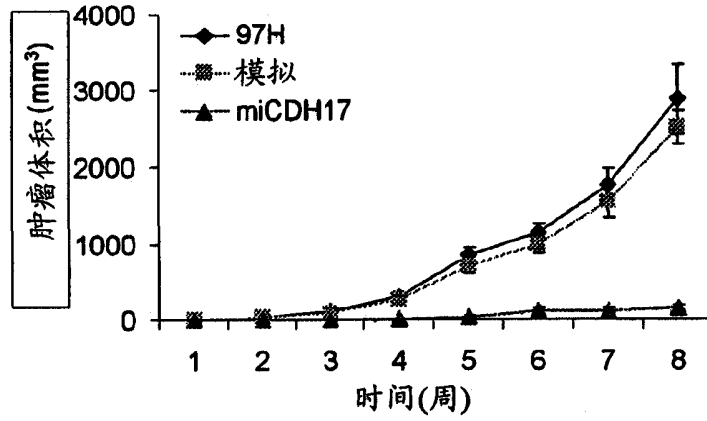


图 1

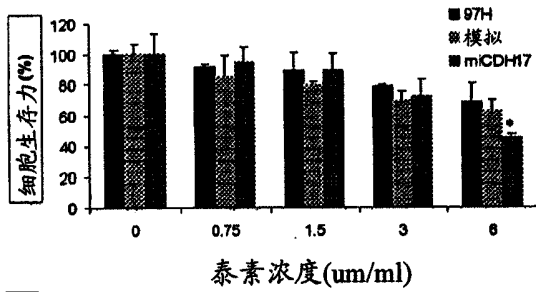


图 2A

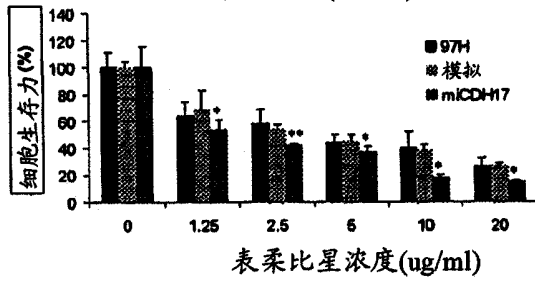


图 2B

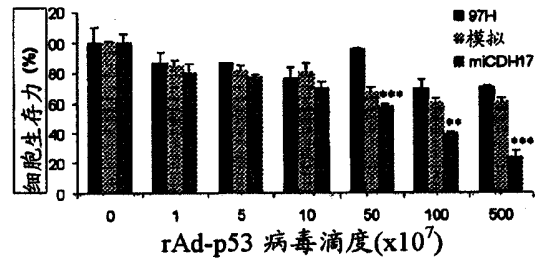
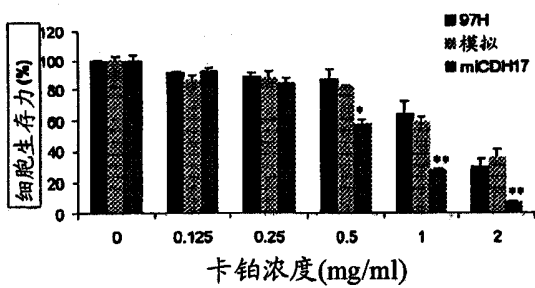


图 2D

图 2C

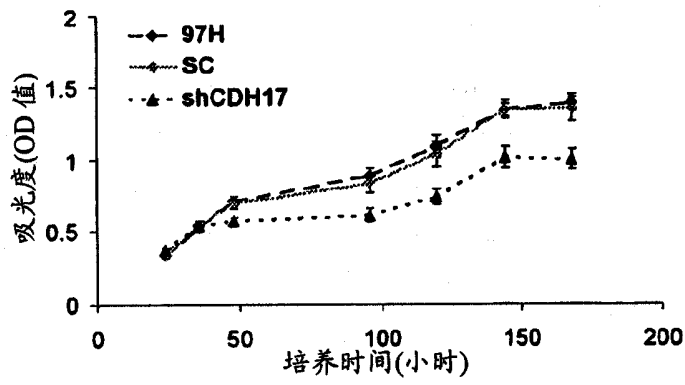


图 3A

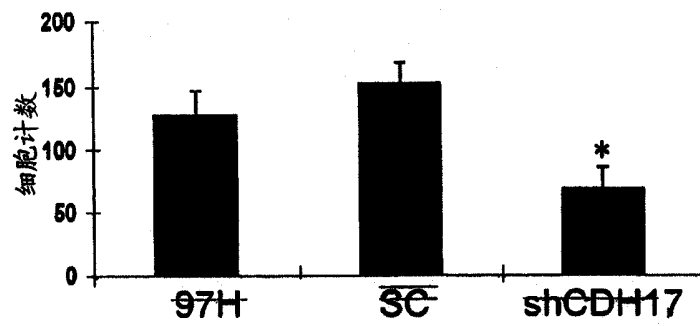


图 3B

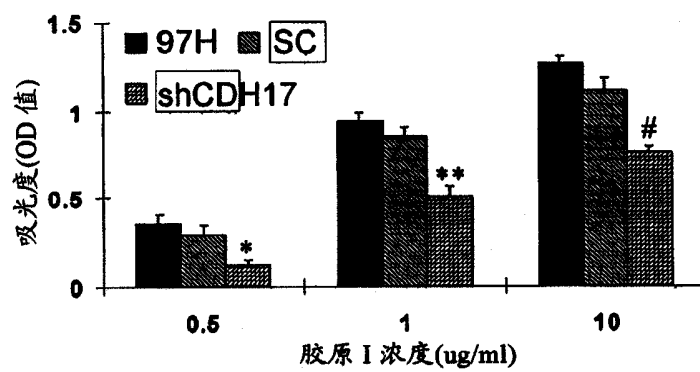


图 3C

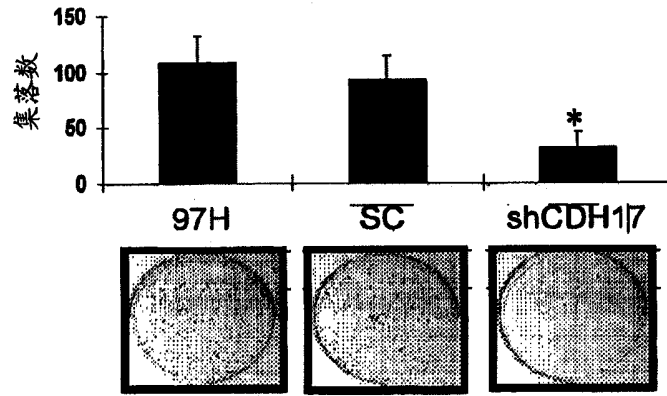


图 3D

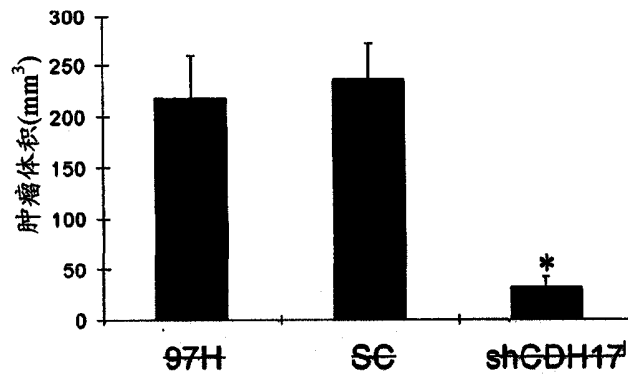


图 4

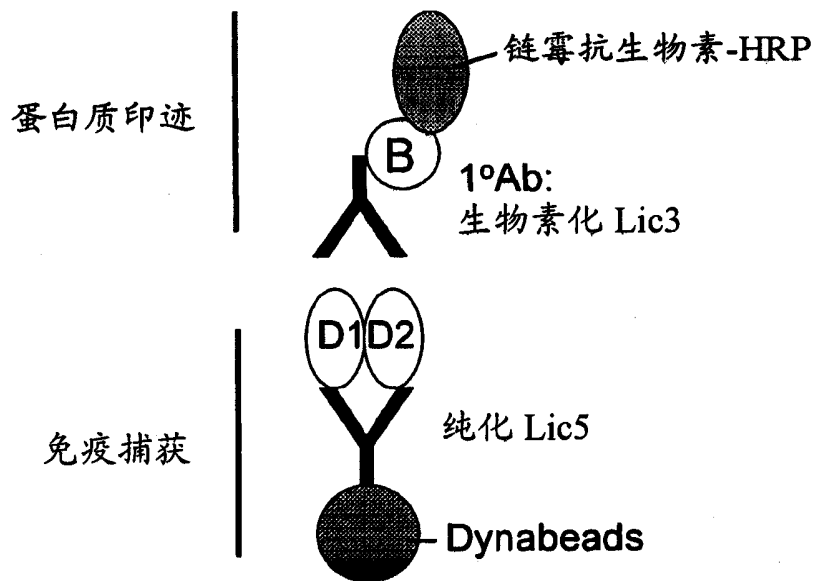


图 5