

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020年7月16日 (16.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/143424 A1

(51) 国际专利分类号:
C12Q 1/68 (2018.01) *A61P 35/00* (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/126730

(22) 国际申请日: 2019年12月19日 (19.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910017277.8 2019年1月8日 (08.01.2019) CN

(71) 申请人: 中国科学院上海营养与健康研究所 (SHANGHAI INSTITUTE OF NUTRITION AND HEALTH, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区岳阳路319号, Shanghai 200031 (CN)。

(72) 发明人: 王跃祥 (WANG, Yuexiang); 中国上海市徐汇区岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。 庞裕智 (PANG, Yuzhi); 中国上海市徐汇区岳阳路320号, Shanghai 200031 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,

SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(54) **Title:** GASTROINTESTINAL STROMAL TUMOR TARGET DEPDC5 AND APPLICATION THEREOF IN DIAGNOSIS AND TREATMENT

(54) 发明名称: 胃肠道间质瘤的靶点DEPDC5及其在诊断和治疗中的应用

(57) **Abstract:** The present invention provides a gastrointestinal stromal tumor target DEPDC5 and an application thereof in diagnosis and treatment. Specifically, provided is a use of a gene, mRNA, cDNA, or a protein of DEPDC5, or a detection reagent thereof for (i) serving as markers used to detect primary gastrointestinal stromal tumors or advanced gastrointestinal stromal tumors and/or (ii) preparing diagnostic reagents or kits used to detect primary gastrointestinal stromal tumors or advanced gastrointestinal stromal tumors. Further provided is an application of the DEPDC5 gene, a protein thereof, or an agonist thereof in the treatment of gastrointestinal stromal tumors.

(57) **摘要:** 本发明提供了胃肠道间质瘤的靶点DEPDC5及其在诊断和治疗中的应用, 具体地, 提供了DEPDC5基因、mRNA、cDNA、或蛋白或其检测试剂的用途: (i) 用作检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的标志物和/或(ii) 用于制备检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的诊断试剂或试剂盒; 以及DEPDC5基因或其蛋白、或其激动剂在治疗胃肠道间质瘤中的应用。



WO 2020/143424 A1

胃肠道间质瘤的靶点DEPDC5及其在诊断和治疗中的应用

技术领域

本发明涉及肿瘤学和诊断领域。更具体地，本发明涉及胃肠道间质瘤的靶点 DEPDC5 及其在诊断和治疗中的应用。

背景技术

胃肠道间质瘤是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤。胃肠道间质瘤依据有无转移分为原发和转移胃肠道间质瘤，原发胃肠道间质瘤依据病理学指标（肿瘤大小、每高倍视野有丝分裂数、解剖位置等）分为低危、中危和高危胃肠道间质瘤，如高危间质瘤指发生转移复发的危险级别高。高危胃肠道间质瘤和转移胃肠道间质瘤统称为进展期胃肠道间质瘤。临床上，不同危险级别的间质瘤治疗原则和方案不同。接受标准治疗方案后，临床仍然有部分中危甚至低危胃肠道间质瘤的疗效不佳（体现为肿瘤复发甚至转移）。所以本领域迫切需要开发具有评估病人危险度级别价值的胃肠道间质瘤的靶点。

胃肠道间质瘤经常被误诊为其他的消化道肿瘤（如消化道平滑肌肿瘤、消化道神经鞘瘤等），所以本领域需要开发具有鉴别诊断胃肠道间质瘤的靶点

约80%的胃肠道间质瘤含有KIT激活突变，靶向KIT癌蛋白的分子靶向治疗革新了胃肠道间质瘤尤其是进展期间质瘤的治疗方案，但胃肠道间质瘤个体间的分子异质性导致不同的个体对靶向治疗的反应高度不一致。基因检测在预测胃肠道间质瘤靶向治疗疗效及疾病预后等方面有重要作用。目前，对于接受靶向治疗的胃肠道间质瘤患者来说，几乎所有患者都产生耐药，如何提高以伊马替尼为代表的靶向治疗药物的疗效是临床医学和基础医学急需解决的问题。

因此，本领域迫切需要开发具有治疗作用的胃肠道间质瘤的靶点。

发明内容

本发明的目的就是提供一种具有诊断或联合诊断价值、以及治疗作用的胃肠道间质瘤的靶点。

本发明的另一目的在于基于DEPDC5基因在人类各类肿瘤中的失活突变情况，能够对胃肠道间质瘤临床鉴别诊断提供分子标记物（能将胃肠道间质瘤与其他消化道肿瘤区别），可以研制诊断试剂盒诊断胃肠道间质瘤；能够对胃肠道间质瘤危险度级别评价提供分子标记物。

本发明的另一目的在于基于DEPDC5蛋白及其信号通路在胃肠道间质瘤恶

性进展中的作用，DEPDC5蛋白及其信号通路是胃肠道间质瘤治疗的靶点，可以研制药物，对胃肠道间质瘤提供个体化治疗。

在本发明第一方面，提供了一种 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白或其检测试剂的用途，(i)用作检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的标志物；和/或(ii)用于制备检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的诊断试剂或试剂盒。

在另一优选例中，所述诊断试剂包括抗体、引物、探针、测序文库、核酸芯片(如 DNA 芯片)或蛋白质芯片。

在另一优选例中，所述的蛋白包括全长蛋白或蛋白片段。

在另一优选例中，所述的 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白来源于哺乳动物，较佳地来源于啮齿动物(如小鼠、大鼠)、灵长动物和人，更佳地，来源于被诊断患有原发性胃肠道间质瘤的患者或被诊断患有进展期胃肠道间质瘤的患者。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白来源于患有原发性或进展期胃肠道间质瘤的患者。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白为突变的 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白。

在另一优选例中，所述突变选自下组：移码突变、缺失突变、点突变、无义突变、错义突变、基因重排、或其组合。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 基因含有选自下组的一个或多个基因突变位点(表 A)：

表 A

c.80_105del26; c.106G>A
c.2347C>T
c.1_4719del14719
c.1_3237del3237
c.1_2356del2356
c.1_1693del1693

其中，核苷酸位置编号基于野生型人 DEPDC5 编码基因(mRNA)序列(NM_014662)。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 基因的登录号为 NG_034067。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 mRNA 的登录号为 NM_014662。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 蛋白的登录号为 NP_055477。

在另一优选例中，所述检测包括实体肿瘤样本检测、正常组织（瘤旁组织）样本检测。

在另一优选例中，所述检测是血液样本检测和/或血清样本检测。

在另一优选例中，所述检测试剂包括 DEPDC5 的特异性抗体、DEPDC5 的特异性结合分子、特异性扩增引物、探针或芯片。

在另一优选例中，所述检测试剂选自下组：抗体、引物、探针、测序文库、核酸芯片(如 DNA 芯片)、蛋白质芯片、或其组合。

在另一优选例中，所述试剂盒含有一种或多种选自下组的试剂：

(a) 针对 *DEPDC5* 基因的特异性引物；

(b) 用于检测一种或多种所述基因突变位点的特异性探针；

(c) 用于检测一种或多种所述基因突变位点的芯片；

(d) 用于检测一种或多种所述基因突变位点所对应的氨基酸突变的特异性抗体。

在另一优选例中，所述的 DEPDC5 蛋白或其特异性抗体或特异性结合分子偶联有或带有可检测标记。

在另一优选例中，所述可检测标记选自下组：生色团、化学发光基团、荧光团、同位素或酶。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 的特异性抗体是单克隆抗体或多克隆抗体。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 蛋白还包括 DEPDC5 蛋白的衍生物。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 蛋白的衍生物包括经修饰的 DEPDC5 蛋白、氨基酸序列与天然 DEPDC5 蛋白同源且具有天然 DEPDC5 蛋白活性的蛋白分子、含有 DEPDC5 蛋白氨基酸序列的融合蛋白。

在另一优选例中，所述经修饰的 DEPDC5 蛋白是 PEG 化的 DEPDC5 蛋白。

在另一优选例中，所述“氨基酸序列与天然 DEPDC5 蛋白同源且具有天然 DEPDC5 蛋白活性的蛋白分子”是指其氨基酸序列与 DEPDC5 蛋白相比具有 $\geq 85\%$ 的同源性，较佳地 $\geq 90\%$ 的同源性，更佳地 $\geq 95\%$ 的同源性，最佳地 $\geq 98\%$ 同源性；并且具有天然 DEPDC5 蛋白活性的蛋白分子。

在另一优选例中，所述检测试剂或试剂盒还用于区分(a) 胃肠道间质瘤和癌旁

组织；(b) 胃肠道间质瘤和其他的消化道肿瘤（如消化道平滑肌肿瘤、消化道神经鞘瘤、胃肠癌）。

在另一优选例中，所述原发性胃肠道间质瘤包括低危、中危胃肠道间质瘤。

在另一优选例中，所述进展期胃肠道间质瘤包括高危胃肠道间质瘤、转移胃肠道间质瘤。

在另一优选例中，所述进展期胃肠道间质瘤还包括高危胃肠道间质瘤患者中原发瘤和一年后形成的转移瘤、转移胃肠道间质瘤患者的一个或多个（如 1 个及 1 个以上，较佳地，2 个及 2 个以上，更佳地，5 个及 5 个以上）不同转移瘤。

在本发明第二方面，提供了一种用于检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤复发转移风险的诊断试剂盒，所述的试剂盒含有一容器，所述容器中含有检测DEPDC5基因、mRNA、cDNA、或蛋白的检测试剂；以及标签或说明书，所述标签或说明书注明所述试剂盒用于检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白为突变的 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白。

在另一优选例中，所述突变选自下组：移码突变、缺失突变、点突变、无义突变、错义突变、基因重排、或其组合。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 基因含有选自下组的一个或多个基因突变位点(表 A)：

表 A

c.80_105del26; c.106G>A
c.2347C>T
c.1_4719del4719
c.1_3237del3237
c.1_2356del2356
c.1_1693del1693

其中，核苷酸位置编号基于野生型人 DEPDC5 编码基因(mRNA)序列(NM_014662)。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 具有选自下组的一个或多个氨基酸残基突变：

p.P27fs;

p.Q783*;

DEPDC5 蛋白的所对应的启动子及翻译起始位点缺失;

其中, 氨基酸位置编号基于野生型人DEPDC5蛋白序列(NP_055477)。

在另一优选例中, 所述的检测进展期胃肠道间质瘤指判断发生进展期胃肠道间质瘤复发转移的可能性大小。

在另一优选例中, 所述判断包括预先判断(预测)。

在另一优选例中, 所述的检测 DEPDC5基因、mRNA、cDNA、或蛋白的检测试剂包括:

(a).抗DEPDC5 蛋白的特异性抗体; 和/或

(b).特异性扩增DEPDC5 的mRNA或cDNA 的特异性引物。

在另一优选例中, 所述检测试剂包括一种或多种选自下组的试剂:

(a) 针对 *DEPDC5* 基因的特异性引物;

(b) 用于检测一种或多种所述基因突变位点的特异性探针;

(c) 用于检测一种或多种所述基因突变位点的芯片;

(d) 用于检测一种或多种所述基因突变位点所对应的氨基酸突变的特异性抗体。

在另一优选例中, 所述检测是实体肿瘤组织样本检测。

在另一优选例中, 所述检测是血液样本检测和/或血清样本检测。

在另一优选例中, 所述检测 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白或其检测试剂可作为对照品或参照品。

在另一优选例中, 所述标签或说明书注明所述试剂盒用于:

(i) 检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤; 和/或

(ii) 区分胃肠道间质瘤和癌旁组织; 和/或

(iii) 区分胃肠道间质瘤和其他的消化道肿瘤(如消化道平滑肌肿瘤、消化道神经鞘瘤、胃肠癌); 和/或

(iv) 区分胃肠道间质瘤复发转移的危险度级别。

在另一优选例中, 所述的检测对象为人或非人哺乳动物。

在另一优选例中, 所述的试剂盒还用于预测胃肠道间质瘤患者的生存时间或预后。

在本发明第三方面，提供了一种检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的方法，所述方法包括：

a)提供来自受试者的测试样品；

b)检测测试样品中 DEPDC5 蛋白的表达水平和/或 DEPDC5 蛋白的突变状况；和

c)将步骤 b)中所测定的 DEPDC5 蛋白的表达水平与对照进行比较，

其中与所述对照相比，所述样品中 DEPDC5 蛋白的表达水平低于参比值，表明受试者患有胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的几率高于一般人群（对照组人群）；或

如果 DEPDC5 蛋白含有选自下组的一个或多个氨基酸突变位点，则表明受试者患有原发性胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的几率高于一般人群（对照组人群）；

p.P27fs；

p.Q783*；

DEPDC5 蛋白的所对应的启动子及翻译起始位点缺失；

其中，氨基酸位置编号基于野生型人 DEPDC5 蛋白序列(NP_055477)。

在另一优选例中，所述的受试者为人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述测试样品为原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的实体瘤组织样本。

在另一优选例中，所述的测试样品包括原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的血液样本和/或血清样本。

在另一优选例中，所述方法为非诊断和非治疗性的。

在另一优选例中，所述参比值为截断值(cut-off 值)。

在另一优选例中，所述参比值为样品中 DEPDC5 的相对表达水平。

在另一优选例中，所述参比值为 0.4。

在另一优选例中，通过 RT-PCR 或免疫组织化学检测样品中的 DEPDC5 蛋白的表达水平。

在本发明第四方面，提供了一种确定治疗方案的方法，包括：

a)提供来自受试者的测试样品；

b)检测测试样品中 DEPDC5 蛋白的表达水平和/或 DEPDC5 蛋白的突变状况；和

c)基于所述样品中的 DEPDC5 蛋白的表达水平和/或 DEPDC5 蛋白的突变状况来确定治疗方案。

在另一优选例中，所述的受试者为人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，当所述样品中DEPDC5蛋白的表达水平低于参比值，表明受试者患有原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的几率高于一般人群（对照组人群），所述治疗方案包括DEPDC5基因疗法、DEPDC5激动剂疗法、和/或靶向下游分子机制疗法。

在另一优选例中，当 DEPDC5 蛋白含有选自下组的一个或多个氨基酸突变位点，则表明受试者患有原发性胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的几率高于一般人群（对照组人群），所述治疗方案包括 DEPDC5 基因疗法、DEPDC5 激动剂疗法、和/或靶向下游分子机制疗法。

在另一优选例中，所述 DEPDC5 基因疗法、DEPDC5 激动剂疗法和/或靶向下游分子机制疗法选自下组：

DEPDC5 基因疗法：人 DEPDC5 基因或其蛋白；

DEPDC5 激动剂：：表达 DEPDC5 蛋白的载体、小分子化合物、或其组合；

靶向下游分子机制疗法：mTORC1 抑制剂。

在另一优选例中，所述 mTORC1 抑制剂选自下组：依维莫司(Everolimus)、雷帕霉素(Rapamycin)、替西罗莫司(Temsirolimus)、AZD8055、WYE-354、WYE-125132、WYE-687、WAY-600、XL388、CZ415、Zotarolimus、Tacrolimus、Palomid 529、Ridaforolimus (Deforolimus 或 MK-8669)、Dactolisib (BEZ235 或 NVP-BEZ235)、或其组合。

在另一优选例中，当受试者患有原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的几率高于一般人群（对照组人群）时，所述治疗方案还包括 DEPDC5 基因疗法、激动剂疗法和/或靶向下游分子机制疗法；和其他治疗胃肠道间质瘤药物的联用。

在另一优选例中，所述其他治疗胃肠道间质瘤药物选自下组：伊马替尼、舒尼替尼、瑞格非尼、Avapritinib (BLU-285)、Ripretinib (DCC-2618)、或其

组合。

在另一优选例中，所述治疗方案还包括其他进展期胃肠道间质瘤的疗法。

在另一优选例中，所述其他进展期胃肠道间质瘤的疗法选自下组：伊马替尼、舒尼替尼、瑞格非尼、Avapritinib (BLU-285)、Ripretinib (DCC-2618)、或其组合。

在本发明第五方面，提供了一种 DEPDC5 基因、或其蛋白、或其激动剂的用途，用于制备预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物。

在另一优选例中，所述激活剂为促进所述基因的表达或提高所述基因表达产物(蛋白)的活性的物质。

在另一优选例中，所述激动剂选自下组：DEPDC5 蛋白、表达 DEPDC5 蛋白的核酸、表达 DEPDC5 蛋白的载体、小分子化合物、或其组合。

在本发明第六方面，提供了一种药物组合物，包括：

(a) DEPDC5 基因、或其蛋白、或其激动剂；

(b) 其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的药物；和

(c) 药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物选自下组：伊马替尼、舒尼替尼、瑞格非尼、Avapritinib (BLU-285)、Ripretinib (DCC-2618)、或其组合。

在另一优选例中，所述组分 (a) 与组分 (b) 的重量比为 100:1—0.01:1，较佳地，10:1—0.1:1，更佳地，2:1—0.5:1。

在另一优选例中，所述产品组合中，所述组分(a)的含量为 1%—99%，较佳地，10%—90%，更佳地，30%—70%。

在另一优选例中，所述产品组合中，所述组分(b)的含量为 1%—99%，较佳地，10%—90%，更佳地，30%—70%。

在另一优选例中，所述产品组合中，所述组分(a)和组分(b)占所述产品组合总重的 0.01-99.99wt%，较佳地 0.1-90wt%，更佳地 1-80wt%。

在另一优选例中，所述的药物组合物的剂型包括注射剂型、和口服剂型。

在另一优选例中，所述口服剂型包括片剂、胶囊剂、膜剂、和颗粒剂。

在另一优选例中，所述的药物组合物的剂型包括缓释型剂型、和非缓释型

剂型。

在本发明第七方面，提供了一种药盒，包括：

(a1) 第一容器，以及位于所述第一容器中的DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂，或含有DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂的药物；

(b1) 第二容器，以及位于所述第二容器中的其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物，或含有其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物的药物。

在另一优选例中，所述的第一容器和第二容器是相同或不同的容器。

在另一优选例中，所述的第一容器的药物是含DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂的单方制剂。

在另一优选例中，所述的第二容器的药物是含其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物的单方制剂。

在另一优选例中，所述药物的剂型为口服剂型或注射剂型。

在另一优选例中，所述的试剂盒还含有说明书。

在另一优选例中，所述说明书记载了选自下组的一个或多个说明：

(a)将DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂和其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物联用预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的方法；

(b) 将DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂和其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物联用同时检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤患者的DEPDC5蛋白的表达水平或DEPDC5蛋白的突变状况，来治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的方法。

在本发明第八方面，提供了一种本发明第六方面所述的药物组合物或本发明第七方面所述的药盒的用途，用于预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤。

在另一优选例中，所述药物组合物中，DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂的作用浓度为40-400000 ng/ml，较佳地，400-40000 ng/ml，更佳地，2000-8000 ng/ml。

在另一优选例中，所述药物组合物中，所述其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的药物的作用浓度为10-100000 ng/ml，较佳地，100-10000 ng/ml，更佳地，500-2000 ng/ml。

在另一优选例中，所述药物组合物或药盒包括(a) DEPDC5基因、或其蛋

白、或其激动剂；和其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物；和（b）药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述药物组合物或药盒中，所述DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂；和其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物占所述药物组合物或药盒总重的0.01-99.99wt%，较佳地0.1-90wt%，更佳地1-80wt%。

在本发明第九方面，提供了一种预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的方法，包括：

给需要的对象施用DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂；或本发明第六方面所述的药物组合物或本发明第七方面所述的药盒。

在另一优选例中，所述对象包括患有原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的人或非人哺乳动物。

在另一优选例中，所述非人哺乳动物包括啮齿动物和灵长目动物，优选小鼠、大鼠、兔、猴。

在另一优选例中，所述DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂的施用剂量为0.24-2400mg /kg体重，较佳地为2.4-240mg /kg体重，最佳地为12-48mg /kg体重。

在另一优选例中，所述其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物的施用剂量为0.06-600mg /kg体重，较佳地为0.6-60 mg /kg体重，最佳地为3-12 mg /kg体重。

在另一优选例中，所述DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂的施用频率为1-4次/天，较佳地为1-2次/天。

在另一优选例中，所述其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物的施用频率为1-4次/天，较佳地为1-2次/天。

在另一优选例中，所述DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂的相邻2次施用的间隔时间为6小时以上，较佳地为12小时以上，最佳地为24小时以上。

在另一优选例中，所述其他预防和/或治疗胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物的相邻2次施用的间隔时间为6小时以上，较佳地为12小时以上，最佳地为24小时以上。

在另一优选例中，所述DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂与其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物同时或先后施用。

在本发明第十方面，提供了一种体外非治疗性的抑制胃肠道间质瘤生长或

增殖的方法，包括步骤：在 DEPDC5 基因、或其蛋白、或其激动剂存在下，培养胃肠道间质瘤细胞，从而抑制胃肠道间质瘤细胞生长或增殖。

在另一优选例中，所述胃肠道间质瘤细胞包括原发性胃肠道间质瘤细胞和/或进展期胃肠道间质瘤细胞。

在另一优选例中，所述的方法还包括向胃肠道间质瘤细胞的培养体系中添加其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物，从而抑制胃肠道间质瘤细胞的生长或增殖。

在另一优选例中，所述胃肠道间质瘤细胞为体外培养 of 细胞。

在本发明第十一方面，提供了一种筛选预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的候选化合物的方法，所述方法包括步骤：

(a) 测试组中，在细胞的培养体系中添加测试化合物，并观察所述测试组的细胞中 DEPDC5 的表达量和/或活性；在对照组中，在相同细胞的培养体系不添加测试化合物，并观察对照组的所述细胞中 DEPDC5 的表达量和/或活性；

其中，如果测试组中细胞的 DEPDC5 的表达量和/或活性高于对照组，就表明该测试化合物是对 DEPDC5 的表达和/或活性有促进作用的预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的候选化合物。

在另一优选例中，所述的 DEPDC5 的表达量是通过 RT-PCR 或免疫组织化学检测而得出的。

在另一优选例中，所述方法还包括步骤：

(b) 对于步骤(a)中获得的候选化合物，进一步测试其对原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞生长或增殖的抑制作用；和/或进一步测试其对 DEPDC5 基因是否有上调的作用。

在另一优选例中，在步骤(b)中包括步骤：测试组中，原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞的培养体系中添加测试化合物，并观察原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞的数量和/或生长情况；在对照组中，在原发性肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞的培养体系不添加测试化合物，并观察原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞的数量和/或生长情况；其中，如果测试组中原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞的数量或生长速度小于对照组，就表明该测试化合物是对原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞的生长或增殖有抑制作用的预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞的候选化合物。

应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

图 1 显示了 (a) 在 40 例 GIST 患者中发现 7 例 (17.5%) 含有 *DEPDC5* 失活突变。箭头指示单核苷酸或插入缺失突变,蓝色横线表示缺失的外显子区域。(b) *DEPDC5* 基因突变仅发生在患者肿瘤组织中,而在正常组织则不存在,证明 *DEPDC5* 基因突变是体细胞突变。(c) 测序结果表明 29 号患者 GIST 中 *DEPDC5* 的移码突变。(d) SNP 全基因组芯片分析表明患者 GIST 中存在 *DEPDC5* 基因纯合缺失,正常组织则不存在。(e) qPCR 结果表明相对于正常组织,GIST 中 *DEPDC5* 相应外显子区域缺失。(f) FISH 分析表明 GIST 细胞中存在 *DEPDC5* 基因纯合缺失,正常细胞中则不存在。

图 2 显示了 (a) 在一例 GIST 患者中原发灶和一年后形成的转移灶组织均存在 *DEPDC5* 基因缺失突变,正常组织则不存在。(b-c) 在另一例 GIST 患者的各个转移灶,以及转移灶各个部分组织均存在 *DEPDC5* 基因移码突变,正常组织则不存在。(d) 对 GIST882 进行体内连续异种移植,或用不同药物体外连续培养一段时间后,仍能检测到 *DEPDC5* 基因缺失突变。(e) *DEPDC5* 基因的相对表达随着 GIST 患者风险程度增加而降低。

图 3 显示了 *DEPDC5* 基因在 GISTs 中的突变频率显著高于其他肉瘤。

图 4 显示了与对照组相比,GIST882 导入 *DEPDC5* 后细胞体外生长速度明显减慢 (a),细胞活力明显下降 (b),细胞内 PCNA 表达量降低 (c),细胞周期 G0/G1 期比例上升,同时 S 期比例下降 (d),提示细胞增殖能力降低,在裸鼠体内肿瘤生长速度 (e) 和肿瘤大小 (f) 受到抑制,细胞分裂活性明显降低 (g)。

图 5 显示了与对照组相比,GIST430 敲除 *DEPDC5* 后细胞体外生长速度增加 (a),细胞内 PCNA 表达量升高 (b),细胞周期 G0/G1 期比例下降 (c),提示 *DEPDC5* 敲除后促进细胞增殖。

图 6 显示了 (a) GSEA 分析显示相对于对照组, DEPDC5 导入后 mTORC1 信号通路, 以及细胞周期 (E2F 靶基因, G2M 细胞周期检验点, 有丝分裂纺锤体) 相关基因在转录水平表达的降低出现明显富集。(b) 免疫印迹显示与对照组相比, 在 DEPDC5 导入 GIST882 细胞后 mTOR 下游蛋白 p70S6K、S6 磷酸化水平降低, AKT 磷酸化水平增高, 说明 mTORC1 信号通路收到抑制, 而 KIT 或 MAPK 蛋白磷酸化水平没有明显变化。(c) 免疫印迹显示与对照组相比, 在 GIST-T1 或 GIST430 细胞敲除 DEPDC5 后 mTOR 下游蛋白 p70S6K、S6 磷酸化水平升高, 反映 mTORC1 信号通路更加活化, 而 KIT 或 MAPK 蛋白磷酸化水平没有明显变化。

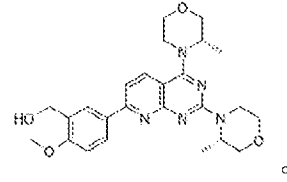
图 7 显示了 (a) 量效曲线显示, 与对照组相比, DEPDC5 导入后 Imatinib 的半数抑制浓度(IC_{50})明显降低, 证明 DEPDC5 导入的 GIST882 细胞对 Imatinib 更加敏感。(b) 免疫印迹显示 Imatinib 与 DEPDC5 分别作用于 KIT 和 mTOR 信号通路, Imatinib 可以通过抑制 KIT 来抑制 mTOR 下游蛋白。(c) DEPDC5 导入和 Imatinib 处理同时作用对 GIST882 细胞的抑制效果大于二者分别单独作用, 说明 DEPDC5 蛋白和 Imatinib 存在协同作用。(d-e) Everolimus 和 Imatinib 联合处理对 GIST882 细胞的抑制效果大于单独用药, 说明二者存在协同作用; 当 DEPDC5 导入后, 两种药物的协同效应减弱。(f) 量效曲线显示, 与对照组相比, DEPDC5 敲除后 Imatinib 的 IC_{50} 升高, 表明 DEPDC5 敲除的 GIST430 细胞对 Imatinib 更加耐受。(g) Everolimus 和低浓度 Imatinib 联合处理对 GIST430 细胞的抑制效果存在协同作用; 当 DEPDC5 敲除后, 两种药物的协同效应增强。

具体实施方式

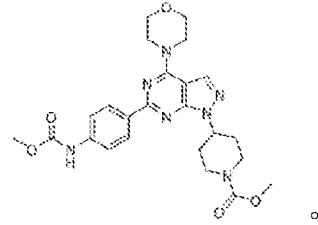
本发明人经过广泛而深入的研究, 首次意外地发现, 在原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤中存在 DEPDC5 的基因突变, 而在正常组织中没有 DEPDC5 的基因突变。因此, 可根据 DEPDC5 基因可用作检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的标志物。并且, 申请人还意外的发现, DEPDC5 基因或其蛋白、或其激动剂可提高胃肠道间质瘤对胃肠道间质瘤治疗药物的敏感性, 从而可提高胃肠道间质瘤的治疗效果, 并且, DEPDC5 基因或其蛋白、或其激动剂与胃肠道间质瘤治疗药物联用有显著的协同效果。此外,

单用 DEPDC5 基因或其蛋白、或其激动剂也可有效治疗胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤。在此基础上，本发明人完成了本发明。

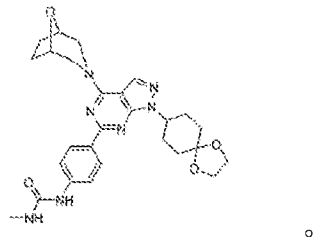
如本文所用，术语“AZD8055”的结构式为



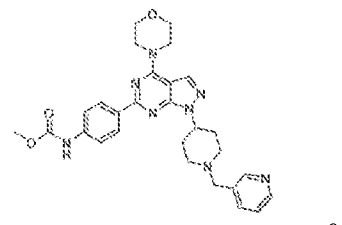
如本文所用，术语“WYE-354”的结构式为



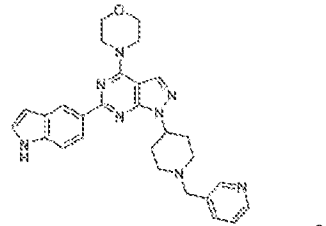
如本文所用，术语“WYE-125132”的结构式为



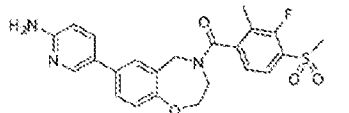
如本文所用，术语“WYE-687”的结构式为



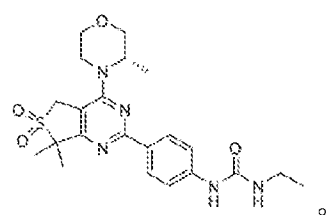
如本文所用，术语“WAY-600”的结构式为



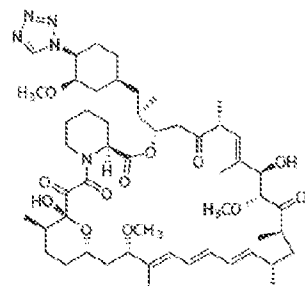
如本文所用，术语“XL388”的结构式为



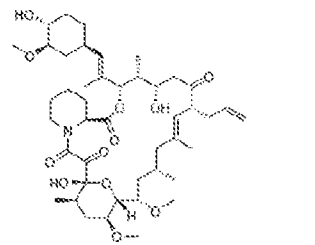
如本文所用，术语“CZ415”的结构式为



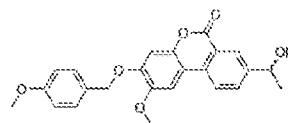
如本文所用，术语“Zotarolimus”的结构式为



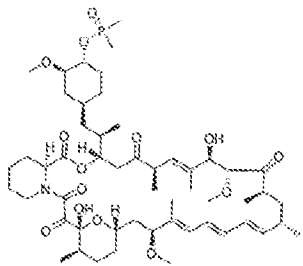
如本文所用，术语“Tacrolimus”的结构式为



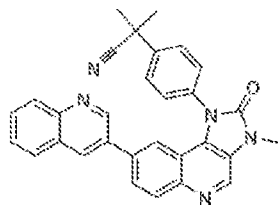
如本文所用，术语“Palomid 529”的结构式为



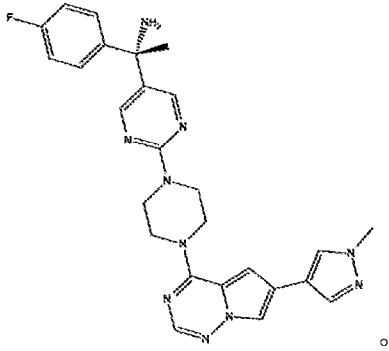
如本文所用，术语“Ridaforolimus (Deforolimus 或 MK-8669)”的结构式为



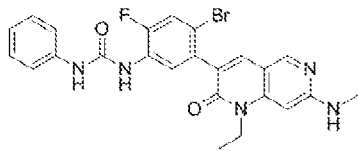
如本文所用，术语“Dactolisib (BEZ235 或 NVP-BEZ235)”的结构式为



如本文所用，术语“Avapritinib (BLU-285)”结构式为



如本文所用，术语“Ripretinib (DCC-2618)”的结构式为



胃肠道间质瘤

胃肠道间质瘤是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤，临床上有症状的胃肠道间质瘤好发于45岁以上的成年人，胃肠道间质瘤可发生于整个消化道，但大多数发生于胃和小肠，临床间质瘤是最常见的肉瘤，年发病率为10-20/100万人。随着内镜技术及影像技术的进步，越来越多体积较小的胃肠道间质瘤被发现。多项病理研究已经证实，直径小于1 cm的微小胃肠道间质瘤在中老年人中很常见，发现率可达35%，随着世界人口老龄化的加剧，估计中国微小胃肠道间质瘤患者达1亿人。

胃肠道间质瘤主要发病机制是卡哈尔间质细胞中原癌基因 KIT 的激活突变，从而异常激活下游信号通路，主要包括 MAPK 通路和 PI3K-AKT 通路，使得细胞生存、生长和增殖失去控制。

进展期胃肠道间质瘤

胃肠道间质瘤依据有无转移分为原发胃肠道间质瘤和转移胃肠道间质瘤，原发胃肠道间质瘤依据病理学指标（肿瘤大小、每高倍视野有丝分裂数、解剖位置等）分为低危、中危和高危胃肠道间质瘤，如高危胃肠道间质瘤指转移复发的危险级别高。高危胃肠道间质瘤和转移胃肠道间质瘤统称为进展期胃肠道间质瘤。进展期胃肠道间质瘤预后差，临床急需治疗手段。约 80%的胃肠道间

质瘤含有 *KIT* 激活突变, 靶向 *KIT* 癌蛋白的分子靶向治疗革新了进展期间质瘤的治疗方案, 但胃肠道间质瘤个体间的分子异质性导致不同的个体对靶向治疗的反应高度不一致。基因检测在预测胃肠道间质瘤靶向治疗疗效及疾病预后等方面有重要作用。目前, 对于接受靶向治疗的胃肠道间质瘤患者来说, 几乎所有患者都产生耐药, 如何提高以伊马替尼为代表的靶向治疗药物的疗效是临床医学和基础医学急需解决的问题。

样品

本文中使用的术语“样品”或“样本”是指与受试者特异地相关联的材料, 从其中可以确定、计算或推断出与受试者有关的特定信息。样品可以全部或部分由来自受试者的生物材料构成。样品也可以是以某种方式与受试者接触过的材料, 这种接触方式使得对样品进行的测试可以提供与受试者有关的信息。样品也可以是已经与其它材料接触过的材料, 这种其它材料不是受试者的, 但是能够使第一材料随后被测试以确定与受试者有关的信息, 例如样品可以是探针或解剖刀的清洗液。样品可以为接触受试者之外的生物材料源, 只要本技术领域的专业人员仍然能够从样品确定与受试者有关的信息就行。

表达

如本文所用, 术语“表达”包括 mRNA 从基因或基因部分的产生, 并且包括由 RNA 或基因或基因部分所编码的蛋白质的产生, 还包括与表达相关的检测物质的出现。例如, cDNA, 结合配体(如抗体)与基因或其它寡核苷酸、蛋白质或蛋白质片段的结合以及结合配体的显色部分都包括在术语“表达”的范围内。因此, 在免疫印迹如 western 印迹上半点密度的增加也处于以生物学分子为基础的术语“表达”的范围内。

参比值

如本文所用, 术语“参比值”是指当与分析结果相比时与特定结果统计学相关的值。在优选的实施方案中, 参比值是根据对比较 DEPDC5 蛋白的表达与已知的临床结果的研究进行的统计学分析来确定的。在本文的实施例部分中显示了一些这样的研究。但是, 来自文献的研究和本文公开的方法的用户经验也可用于生产或调整参比值。参比值也可以通过考虑与患者的医疗史、遗传学、年龄和其它因素特别相关的情况和结果来确定。

在本发明中, 所述参比值指截断值 (cut-off 值), 指实体瘤中 DEPDC5 相对表达水平, 优选 0.4 。

DEPDC5 蛋白和多核苷酸

在本发明中，术语“本发明蛋白”、“DEPDC5 蛋白”、“DEPDC5 多肽”可互换使用，都指具有 DEPDC5 氨基酸序列的蛋白或多肽。它们包括含有或不含起始甲硫氨酸的 DEPDC5 蛋白。此外，该术语还包括全长的 DEPDC5 及其片段。本发明所指的 DEPDC5 蛋白包括其完整的氨基酸序列、其分泌蛋白、其突变体以及其功能上活性的片段。

DEPDC5 (DEP domain-containing 5) 蛋白包含一个 DEP (Dishevelled、Egl-10、Pleckstrin) 结构域和一个 DUF3608 结构域，在人体组织中普遍表达。DEPDC5 编码基因位于人类 22 号染色体长臂。

人的 DEPDC5 蛋白全长为 1572 个氨基酸(登录号为 NP_055477)。鼠的 DEPDC5 蛋白全长为 1591 个氨基酸(登录号为 NP_001164038)。

在本发明中，术语“DEPDC5 基因”、“DEPDC5 多核苷酸”可互换使用，都指具有 DEPDC5 核苷酸序列的核酸序列。

人 DEPDC5 基因的基因组全长 160084bp(NCBI GenBank 登录号为 NG_034067; Gene ID: 9681)，其转录产物 mRNA 序列全长 5326bp(NCBI GenBank 登录号为 NM_014662)。

鼠 DEPDC5 基因的基因组全长 130536bp(NCBI GenBank 登录号为 Gene ID: 277854)，其转录产物 mRNA 序列全长 7944bp(NCBI GenBank 登录号为 NM_001170567)。

人和鼠 DEPDC5，在 DNA 水平的相似性为 94.9%，蛋白序列相似性为 94.2%。

需理解的是，当编码相同的氨基酸时，密码子中核苷酸的取代是可接受的。另外需理解的是，由核苷酸取代而产生保守的氨基酸取代时，核苷酸的变换也是可被接受的。

在得到了 DEPDC5 的氨基酸片段的情况下，可根据其构建出编码它的核酸序列，并且根据核苷酸序列来设计特异性探针。核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的 DEPDC5 核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中

分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(如载体)和细胞中。

通过常规的重组 DNA 技术，可利用本发明的多核苷酸序列可用来表达或生产重组的 DEPDC5 多肽。一般来说有以下步骤：

- (1).用本发明的编码人 DEPDC5 多肽的多核苷酸(或变体)，或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞；
- (2).在合适的培养基中培养的宿主细胞；
- (3).从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中，DEPDC5 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含 DEPDC5 编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；昆虫细胞；动物细胞等。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

基因突变

基因突变(DNA 序列变异, gene mutation)是由于 DNA 分子中发生碱基对的增添、缺失或替换，而引起的基因结构的改变。

基因上发生基因突变的位点即为本文中的突变位点，在突变位点上可以发生碱基的增添、缺失或替换。

如“chr11:g.67051695A>C”表示在人第 11 号染色体上的 g.67051695 位点由 A 突变为了 C。

“chr11:g.64577368_64577374(GCGGGTC)>-”表示在人第 11 号染色体上的 g.64577368 至 64577374 位点的 GCGGGTC 缺失。

“chr19:g.14938120->T”表示在人第 19 号染色体上的 g.14938120 位点增添了碱基 T。

在本发明中，c.80_105del26; c.106G>A 指 DEPDC5 编码基因 (mRNA) 的第 80 到 105 位缺失，第 106 位的鸟嘌呤突变为腺嘌呤。

c.2347C>T 指 DEPDC5 编码基因 (mRNA) 的第 2347 位的胞嘧啶突变为胸腺嘧啶。

c.1_4719del4719 指 DEPDC5 编码基因 (mRNA) 的第 1 到 4719 位缺失。

c.1_3237del3237 指 DEPDC5 编码基因 (mRNA) 的第 1 到 3237 位缺失。

c.1_2356del2356 指 DEPDC5 编码基因 (mRNA) 的第 1 到 2356 位缺失。

c.1_1693del1693 指 DEPDC5 编码基因 (mRNA) 的第 1 到 1693 位缺失。

一类典型的基因突变是 SNV，即单核苷酸变异，尤其是导致氨基酸突变的 SNV。

此外，在本发明中，还存在氨基酸突变或 DEPDC5 蛋白无表达（启动子及翻译起始位点缺失）的情况。

如“p.P27fs”指 DEPDC5 蛋白从第 27 位的脯氨酸开始移码突变，在下游第 11 个氨基酸后形成终止密码。

“p.Q783*”指 DEPDC5 蛋白的第 783 位的谷氨酰胺突变为终止密码。

单核苷酸变异(SNV)

单核苷酸变异是人类基因组中的 DNA 序列变异，在各种生物学和生物医学的应用中获得了越来越多的重要性。SNVs 可以用来探索人类种群进化历史、分析法医样品，因此在遗传学中发挥重要作用。药物遗传学利用这些 DNA 变异来阐明构成不同药物功效或不良事件的基础遗传因素。

本发明涉及鉴定特定疾病的单核苷酸变异(SNVs)，其明确鉴定为与垂体腺瘤相关，因此，或者在疾病症状存在之前，可以对这些个体进行干预，例如饮食改变，锻炼和/或药物治疗。鉴定涉及垂体腺瘤的 SNVs 有助于更好的理解疾病过程，改善诊断试剂和治疗试剂。

如本文所用，术语“SNV”是指在个体群体之间不同的人类基因组中特定位置上的单核苷酸变异。在本发明中，SNV 可以通过它的名称或通过位于特定序列的位置来确定。如 SNV“[G/A]”表示在该序列的该位置的核苷酸碱基(或等位基因)可以是鸟嘌呤或腺嘌呤。

如本文所用，INDEL 插入缺失标记，指的是两种亲本中在全基因组中的差异，相对另一个亲本而言，其中一个亲本的基因组中有一定数量的核苷酸插入或缺失。

如本文所用，本发明公开的核苷酸序列包括所述核苷酸序列的互补序列。另外，术语“SNV”包括在一组等位基因中的任何等位基因。

如本文所用，术语“等位基因”是指在定义 SNV 的核苷酸选择中特定的核苷酸。

如本文所用，术语“风险等位基因”是指与胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤疾病关联的等位基因。

如本文所用，术语“单倍型”是指来自于两个或多个 SNVs 的具体等位基因的组合。

如本文所用，术语“风险状态单倍型”是指与胃肠道间质瘤或转移性胃肠道

间质瘤疾病相关联的单倍型。

各具体基因及其所含的突变位点见表 A。

表 A

c.80_105del26; c.106G>A
c.2347C>T
c.1_4719del4719
c.1_3237del3237
c.1_2356del2356
c.1_1693del1693

其中，核苷酸位置编号基于野生型人 DEPDC5 编码基因（mRNA）序列（NM_014662）。

如无特殊说明，本发明中基因位点编号依据人类基因组序列(UCSC)hg19 版本。

含突变位点的多核苷酸

本发明还提供了含本发明所述突变位点的多核苷酸。在本发明的一个优选地实施方式中，本发明还提供了含有所述多核苷酸的载体、宿主细胞。

如本文所用，术语“多核苷酸”是指任何长度的核苷酸的多态式。多核苷酸可以含有脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、和/或它们的类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构，包括单链、双链和三螺旋分子结构，并且可以执行任何已知或未知的功能。如以下非限制性实施例：基因或基因片段、外显子、内含子、mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、核酶、cDNA、重组多核苷酸、质粒、载体、分离的任何序列的 DNA、分离的任何序列的 RNA、核酸探针、引物。多核苷酸也可以包括经修饰的核酸分子，如甲基化核酸分子和核酸分子类似物。

在另一优选例中，所述的多核苷酸本身还可以包括检测所述多核苷酸的检测试剂，包括引物、探针、扩增产物、或质粒。

如本文所用，术语“基本分离的”或“分离的”多核苷酸是指基本没有天然的相关序列的多核苷酸。基本上没有是指至少 50%、较优地至少 70%、更优地至少 80%或最优地至少 90%不含其它天然相关物质。“分离的多核苷酸”还包括重组的多核苷酸。

如本文所用，术语“在严格条件下杂交”意在描述杂交条件，在该条件下，彼此至少 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或 98%相同的核苷酸序列典型地彼此保持杂交。这些严格的条件是本领域技术人员已知的并且可以在 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y.(1989)中找到。严格杂交的一个非限制性实例是在约 45°C 下在 6x 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中杂交，接着在 0.2xSSC, 0.1%SDS 中在 50-65°C 下一次或多次洗涤。

如本文所用，术语“引物”是指在与模板配对，在 DNA 聚合酶的作用下能以其为起点进行合成与模板互补的 DNA 链的寡核苷酸的总称。引物可以是天然的 RNA、DNA，也可以是任何形式的天然核苷酸。引物甚至可以是非天然的核苷酸如 LNA 或 ZNA 等。引物“大致上”(或“基本上”)与模板上一条链上的一个特殊的序列互补。引物必须与模板上的一条链充分互补才能开始延伸，但引物的序列不必与模板的序列完全互补。比如，在一个 3'端与模板互补的引物的 5'端加上一段与模板不互补的序列，这样的引物仍大致上与模板互补。只要有足够长的引物能与模板充分的结合，非完全互补的引物也可以与模板形成引物-模板复合物，从而进行扩增。

如本文所用，术语“载体”是指可以携带插入的 DNA 并且可以为维持在宿主细胞中的 DNA 分子。载体也可以为克隆载体，克隆媒介物等。术语“载体”包括主要功能为将核酸分子插入到细胞中的载体，主要功能在于复制核酸的复制载体，和用于转录和/或翻译 DNA 或 RNA 的表达载体，还包括提供多余一种上述功能的载体。

如本文所用，术语“宿主细胞”是指单个细胞或细胞培养物，其可以是或已经是载体或核酸分子和/或蛋白质整合的接受体。宿主细胞包括单一宿主细胞的子代，并且由于天然的、随机的或有意突变，所述子代可能未必与亲代完全相同(在形态上或在总 DNA 互补序列上)。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸转染的细胞。“分离的宿主细胞”是指已经与它来源的生物在物理上分离的宿主细胞。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属的细菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；昆虫细胞；动物细胞等。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用

MgCl₂。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

特异性抗体

在本发明中，术语“本发明抗体”和“抗 DEPDC5 的特异性抗体”可互换使用。

本发明还包括对人 DEPDC5 多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于人 DEPDC5 基因产物或片段。较佳地，指那些能与人 DEPDC5 基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明中抗体包括那些能够结合并抑制人 DEPDC5 蛋白的分子，也包括那些并不影响人 DEPDC5 蛋白功能的抗体。本发明还包括那些能与修饰或未经修饰形式的人 DEPDC5 基因产物结合的抗体。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链 Fv 分子(Ladner 等人，美国专利 No. 4,946,778)；或嵌合抗体，如具有鼠抗体结合特异性但仍保留来自人的抗体部分的抗体。

本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。例如，纯化的人 DEPDC5 基因产物或者其具有抗原性的片段，可被施用于动物以诱导多克隆抗体的产生。与之相似的，表达人 DEPDC5 蛋白或其具有抗原性的片段的细胞可用来免疫动物来生产抗体。本发明的抗体也可以是单克隆抗体。此类单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见 Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Kohler 等人, Eur.J.Immunol. 6: 511, 1976; Kohler 等人, Eur.J.Immunol. 6: 292, 1976; Hammerling 等人, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N.Y., 1981)。本发明的抗体包括能阻断人 DEPDC5 蛋白功能的抗体以及不影响人 DEPDC5 蛋白功能的抗体。本发明的各类抗体可以利用人 DEPDC5 基因产物的片段或功能区，通过常规免疫技术获得。这些片段或功能区可以利用重组方法制备或利用多肽合成仪合成。与人 DEPDC5 基因产物的未修饰形式结合的抗体可以用原核细胞(例如 *E. Coli*)中生产的基因产物来免疫动物而产生；与翻译后修饰形式结合的抗体(如糖基化或磷酸化的蛋白或多肽)，可以用真核细胞(例如酵母或昆虫细胞)中产生的基因产物来免疫动物而获得。

抗人 DEPDC5 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测标本(尤其是组织样本或血清样本)中的人 DEPDC5 蛋白。由于 DEPDC5 蛋白存在胞外区，因此在胞外区脱落并进入血液的情况下，这些可溶性的 DEPDC5 胞外区就可成为血清检测的靶对象。

检测方法

利用突变的 DEPDC5 存在于胃肠道间质瘤的实体瘤组织中和体液(优选血清或血液)中, 且与胃肠道间质瘤复发转移的危险度密切相关这一特点, 本发明还提供了检测进展期胃肠道间质瘤的方法。

在本发明的一个优选例中, 本发明提供一种检测突变的 DEPDC5 的高通量二代测序法以及 Sanger 测序、荧光定量 PCR (qPCR)、单核苷酸多态性 (SNP) 基因组分析、原位免疫荧光法 (FISH)。

检测试剂盒

基于突变的 DEPDC5 与胃肠道间质瘤复发转移的相关性, 即突变的 DEPDC5 存在于胃肠道间质瘤实体瘤组织中和体液(优选血液或血清)中, 因此突变的 DEPDC5 可以作为进展期胃肠道间质瘤的一种诊断标志物。

本发明还提供了一种检测原发性胃肠道间质瘤或胃肠道间质瘤复发转移风险的诊断试剂盒, 它含有检测 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白的检测试剂; 以及标签或说明书, 所述标签或说明书注明所述试剂盒用于检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤;

其中, 所述的标签或说明书注明以下内容:

- (i) 检测胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤; 和/或
- (ii) 区分胃肠道间质瘤和癌旁组织; 和/或
- (iii) 区分胃肠道间质瘤和其他的消化道肿瘤 (如消化道平滑肌肿瘤、消化道神经鞘瘤、胃肠癌等); 和/或
- (iv) 区分胃肠道间质瘤复发转移的危险度级别。

应理解, 在本发明首次揭示了本发明突变位点与胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的相关性之后, 本领域技术人员可以方便地设计出可特异性扩增出含所述突变位点的扩增产物, 然后通过测序等方法确定是否存在这些突变位点。

通常, 引物的长度为 15-50bp, 较佳地为 20-30bp。虽然引物与模板序列完全互补是优选的, 但是本领域技术人员知道, 在引物与模板存在一定的不互补 (尤其是引物的 5'端) 的情况下, 也能够特异性地扩增 (即仅扩增出所需的片段)。含有这些引物的试剂盒和使用这些引物的方法都在本发明范围之内, 只要该引

物扩增出的扩增产物含有本发明突变位点的对应位置。

虽然扩增产物的长度没有特别限制，但是通常扩增产物的长度为100-3000bp，较佳地为150-2000bp，更佳地为200-1000bp。

本发明的主要优点包括：

(1) 本发明首次发现，在胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤中存在DEPDC5的失活突变（如缺失突变、移码突变、无义突变、错义突变等），而正常组织中不存在。

(2) 本发明首次发现，DEPDC5（尤其是突变的DEPDC5）可用作检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的标志物。

(3) 本发明首次发现，DEPDC5基因的相对表达随着原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤患者风险程度的增加而降低。

(4) 本发明首次发现，DEPDC5的失活突变可促进原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的生长、促进原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的细胞生长、激活mTORC1信号通路促进细胞生长。

(5) 本发明首次发现，DEPDC5基因或其蛋白或其激动剂可有效治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤。

(6) 本发明首次发现，DEPDC5基因或其蛋白、或其激动剂可提高胃肠道间质瘤对胃肠道间质瘤治疗药物的敏感性，从而可提高胃肠道间质瘤的治疗效果，并且，DEPDC5基因或其蛋白、或其激动剂、与胃肠道间质瘤治疗药物联用有显著的协同效果。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用来限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明，否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

除非特别说明，否则本发明实施例中所用材料和试剂均为市售产品。

通用方法

1、慢病毒包装

用聚乙烯亚胺（polyethylenimine, PEI）介导293T细胞转染。细胞在转染前

一天以适当的密度分盘至 10cm 培养皿中，细胞生长至大约 70-90%时用无血清培养基换液，2 小时后用 PEI 转染质粒。慢病毒包装质粒为 9 μ g δ 8.9 和 3.5 μ g vsv-g，目的质粒 10 μ g。转染后 4-6 小时用完全培养基换液，24、36、48、60 小时后收集上清获取病毒液。

2、全外显子测序

组织样品用基因组 DNA 试剂盒提取 DNA，以至少 12.5ng/ μ L 的浓度溶解于洗脱缓冲液（Elution buffer, EB）中。对 DNA 质量进行检测，取大于 1 μ g 合格的 DNA 样品进行文库构建后用 Illumina HiSeq X10 进行双端测序，平均覆盖度约为 130 \times 。

3、细胞活力检测

细胞活力用 CellTiter-Glo（CTG）试剂盒检测。将处理后的 96 孔板细胞于室温孵育 30 分钟，CTG 试剂用 PBS 稀释 4 倍，细胞每孔加入 100 μ L 稀释的 CTG 试剂，室温避光条件下置于摇床上混合 2 分钟将细胞裂解，再静置 10 分钟后用酶标仪检测发光强度。

4、细胞周期检测

培养的细胞制备成单细胞悬液，PBS 洗涤后用 75%乙醇于-20 $^{\circ}$ C 固定，24 小时后用 PBS 洗涤，加入 RNase A，混匀置于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟，再加入碘化丙啶（propidium iodide, PI）对 DNA 染色，室温避光孵育 30 分钟后用流式细胞仪进行检测。

实施例 1

40 例胃肠道间质瘤（Gastrointestinal stromal tumors, GISTs）患者中 *DEPDC5* 基因突变情况, 17.5%的 GISTs 含有 *DEPDC5* 基因突变

实验步骤：

- 1) 从患者肿瘤和正常组织样品中提取基因组 DNA；
- 2) 对基因组 DNA 进行全外显子组测序；
- 3) 对发现突变的患者 DNA 进行 Sanger 测序、荧光定量 PCR（qPCR）、单核苷酸多态性（SNP）基因组分析、原位免疫荧光杂交（FISH）验证。

结果如图 1（a-f）所示，结果表明，17.5%的胃肠道间质瘤患者中含有 *DEPDC5* 基因突变。

实施例 2

GIST 一旦获得 *DEPDC5* 基因突变，该突变始终伴随着 GIST 演变过程
实验步骤：

- 1) 分别对 GIST 患者原发灶、转移灶和正常组织进行 SNP 基因组分析；
- 2) 对发现突变的患者原发灶、转移灶和正常组织 DNA 进行 Sanger 测序验证；
- 3) 利用患者 GIST 肿瘤组织建立细胞系 (GIST882)，连续对裸鼠进行异种移植，或用不同药物连续选择多代后进行 SNP 全基因组芯片分析；
- 4) 提取 GIST 不同演进阶段肿瘤组织 RNA，逆转录后进行荧光定量 PCR 检测 *DEPDC5* 基因的相对表达。

结果如图 2 (a-e) 所示。结果表明，胃肠道间质瘤一旦获得 *DEPDC5* 基因突变，该突变始终伴随着胃肠道间质瘤演变过程。

实施例 3

比较 *DEPDC5* 基因在 GIST 及其他肉瘤中的突变情况

实验步骤：

统计 40 例 GISTs 患者全外显子测序数据及 TCGA 数据库 255 例其他肉瘤中 *DEPDC5* 基因突变情况，并进行比较。

结果如图 3 所示，结果表明，*DEPDC5* 基因在胃肠道间质瘤中的突变频率显著高于其他肉瘤。

实施例 4

***DEPDC5* 基因缺失促进 GIST 细胞肿瘤生长 (体外、体内实验)**

实验步骤：

- 1) 构建外源 *DEPDC5* 基因表达载体；
- 2) 包装慢病毒后感染 GIST882 细胞；
- 3) 6 天后观察细胞，并用 CellTiter-Glo (CTG) 试剂盒检测细胞活力；
- 4) 免疫印迹对增殖细胞核抗原 (PCNA) 染色检测细胞增殖；
- 5) 流式细胞仪检测细胞周期各时期的比例，进而反映细胞增殖；

- 6) 将细胞注射至裸鼠皮下进行异种移植, 定期观察检测肿瘤生长情况;
- 7) 对异种移植的肿瘤进行苏木精-伊红 (HE) 染色。

结果如图 4 (a-g) 所示, 结果表明, *DEPDC5* 基因缺失促进胃肠道间质瘤细胞肿瘤生长。

实施例 5

*DEPDC5*基因敲除促进GIST细胞生长

实验步骤:

- 1) 设计两条靶向 *DEPDC5* 的 sgRNA;
- 2) 构建 LentiCRISPR v2 基因敲除载体;
- 3) 包装慢病毒后感染 GIST430 细胞;
- 4) 定期用 CTG 试剂盒检测细胞活力;
- 5) 免疫印迹对 PCNA 染色检测细胞增殖;
- 6) 流式细胞仪检测细胞周期各时期的比例, 进而反映细胞增殖。

结果如图5 (a-c) 所示, 结果表明, *DEPDC5*基因敲除促进胃肠道间质瘤细胞生长。

实施例 6 在 GISTs 中 *DEPDC5* 的失活激活 mTORC1 信号通路促进细胞生长

实验步骤:

- 1) 包装 *DEPDC5* 基因表达载体慢病毒后感染 GIST882 细胞;
- 2) 提取细胞 RNA 样品, RNA-seq 测序后对数据进行基因集富集分析 (Gene Set Enrichment Analysis, GSEA);
- 3) 包装 *DEPDC5* 基因敲除载体慢病毒后分别感染 GIST-T1 和 GIST430 细胞;
- 4) 分别提取相应慢病毒感染后的 GIST882、GIST-T1、GIST430 细胞蛋白样品, 免疫印迹检测 mTOR 信号通路相关蛋白表达水平。

结果如图6 (a-c) 所示, 结果表明, 胃肠道间质瘤中 *DEPDC5* 的失活激活 mTORC1 信号通路促进细胞生长。

实施例 7 *DEPDC5* 调节 GISTs 对 KIT 抑制剂的敏感性, *DEPDC5* 失活的

GIST 对 KIT 抑制剂和 mTOR 抑制剂联用有效

实验步骤：

- 1) 包装 *DEPDC5* 基因表达载体慢病毒后感染 GIST882 细胞；
- 2) 用梯度浓度的伊马替尼 (Imatinib) 处理 GIST882 细胞, 6 天后 CTG 试剂盒检测细胞活力；
- 3) 用梯度浓度的 Imatinib 处理 GIST882 细胞, 4 小时后提取处理的 GIST882 细胞蛋白样品, 免疫印迹检测 mTOR 信号通路相关蛋白表达水平；
- 4) 分别用梯度浓度的伊马替尼和依维莫司 (Everolimus) 联合处理 GIST882 细胞, 6 天后 CTG 试剂盒检测细胞活力；
- 5) 包装 *DEPDC5* 基因敲除载体慢病毒后感染 GIST430 细胞；
- 6) 用梯度浓度的 Imatinib 处理 GIST430 细胞, 3 天后 CTG 试剂盒检测细胞活力；
- 7) 分别用梯度浓度的 Imatinib 和 Everolimus 联合处理 GIST430 细胞, 3 天后 CTG 试剂盒检测细胞活力。

结果如图7 (a-f) 所示, 结果表明, *DEPDC5* 调节胃肠道间质瘤对 KIT 抑制剂的敏感性, *DEPDC5* 失活的胃肠道间质瘤对 KIT 抑制剂和 mTOR 抑制剂联用有效。

权 利 要 求

1. 一种 DEPDC5 基因、mRNA、cDNA、或蛋白或其检测试剂的用途，其特征在于，(i)用作检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的标志物；和/或(ii)用于制备检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的诊断试剂或试剂盒。

2. 一种用于检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤复发转移风险的诊断试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒含有一容器，所述容器中含有检测DEPDC5基因、mRNA、cDNA、或蛋白的检测试剂；以及标签或说明书，所述标签或说明书注明所述试剂盒用于检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤。

3. 一种检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的方法，其特征在于，所述方法包括：

a)提供来自受试者的测试样品；

b)检测测试样品中 DEPDC5 蛋白的表达水平和/或 DEPDC5 蛋白的突变状况；和

c)将步骤 b)中所测定的 DEPDC5 蛋白的表达水平与对照进行比较，

其中与所述对照相比，所述样品中 DEPDC5 蛋白的表达水平低于参比值，表明受试者患有胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的几率高于一般人群（对照组人群）；或

如果 DEPDC5 蛋白含有选自下组的一个或多个氨基酸突变位点，则表明受试者患有原发性胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的几率高于一般人群（对照组人群）；

p.P27fs ；

p.Q783*；

DEPDC5 蛋白的所对应的启动子及翻译起始位点缺失；

其中，氨基酸位置编号基于野生型人 DEPDC5 蛋白序列(NP_055477)。

4. 一种确定治疗方案的方法，其特征在于，包括：

a)提供来自受试者的测试样品；

b)检测测试样品中 DEPDC5 蛋白的表达水平和/或 DEPDC5 蛋白的突变状况；和

c)基于所述样品中的 DEPDC5 蛋白的表达水平和/或 DEPDC5 蛋白的突变状况来确定治疗方案。

5. 一种 DEPDC5 基因、或其蛋白、或其激动剂的用途，其特征在于，用于制备预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物。

6. 一种药物组合物，其特征在于，包括：

(a) DEPDC5 基因、或其蛋白、或其激动剂；

(b) 其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或转移性胃肠道间质瘤的药物；和

(c) 药学上可接受的载体。

7. 一种药盒，其特征在于，包括：

(a1) 第一容器，以及位于所述第一容器中的DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂，或含有DEPDC5基因、或其蛋白、或其激动剂的药物；

(b1) 第二容器，以及位于所述第二容器中的其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物，或含有其他预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物的药物。

8. 一种权利要求6所述的药物组合物或权利要求7所述的药盒的用途，其特征在于，用于预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤。

9. 一种体外非治疗性的抑制胃肠道间质瘤生长或增殖的方法，包括步骤：在 DEPDC5 基因、或其蛋白、或其激动剂存在下，培养胃肠道间质瘤细胞，从而抑制胃肠道间质瘤细胞生长或增殖。

10. 一种筛选预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的候选化合物的方法，其特征在于，所述方法包括步骤：

(a) 测试组中，在细胞的培养体系中添加测试化合物，并观察所述测试组的细胞中 DEPDC5 的表达量和/或活性；在对照组中，在相同细胞的培养体系中不添加测试化合物，并观察对照组的所述细胞中 DEPDC5 的表达量和/或活性；

其中，如果测试组中细胞的 DEPDC5 的表达量和/或活性高于对照组，就表明该测试化合物是对 DEPDC5 的表达和/或活性有促进作用的预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的候选化合物。

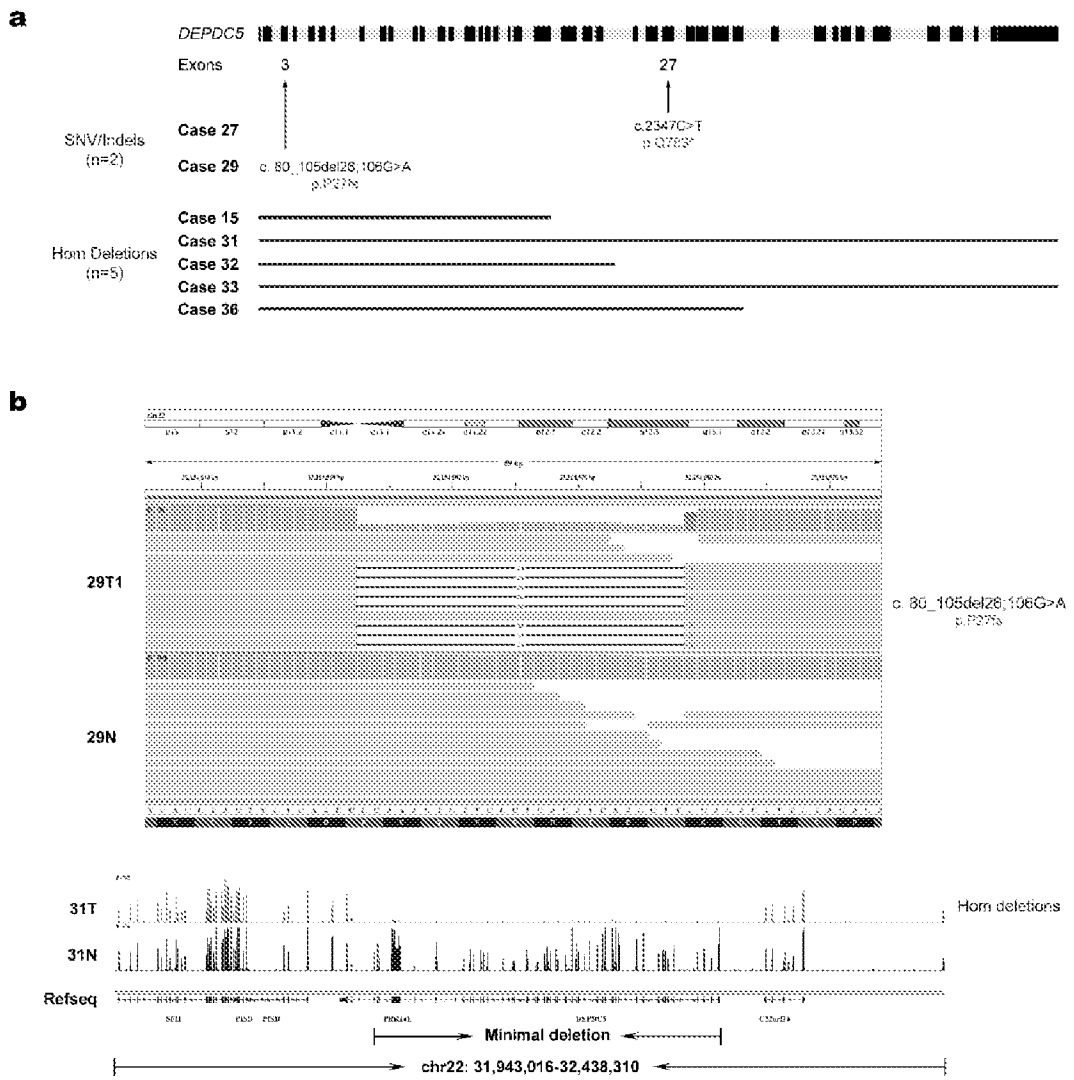


图 1

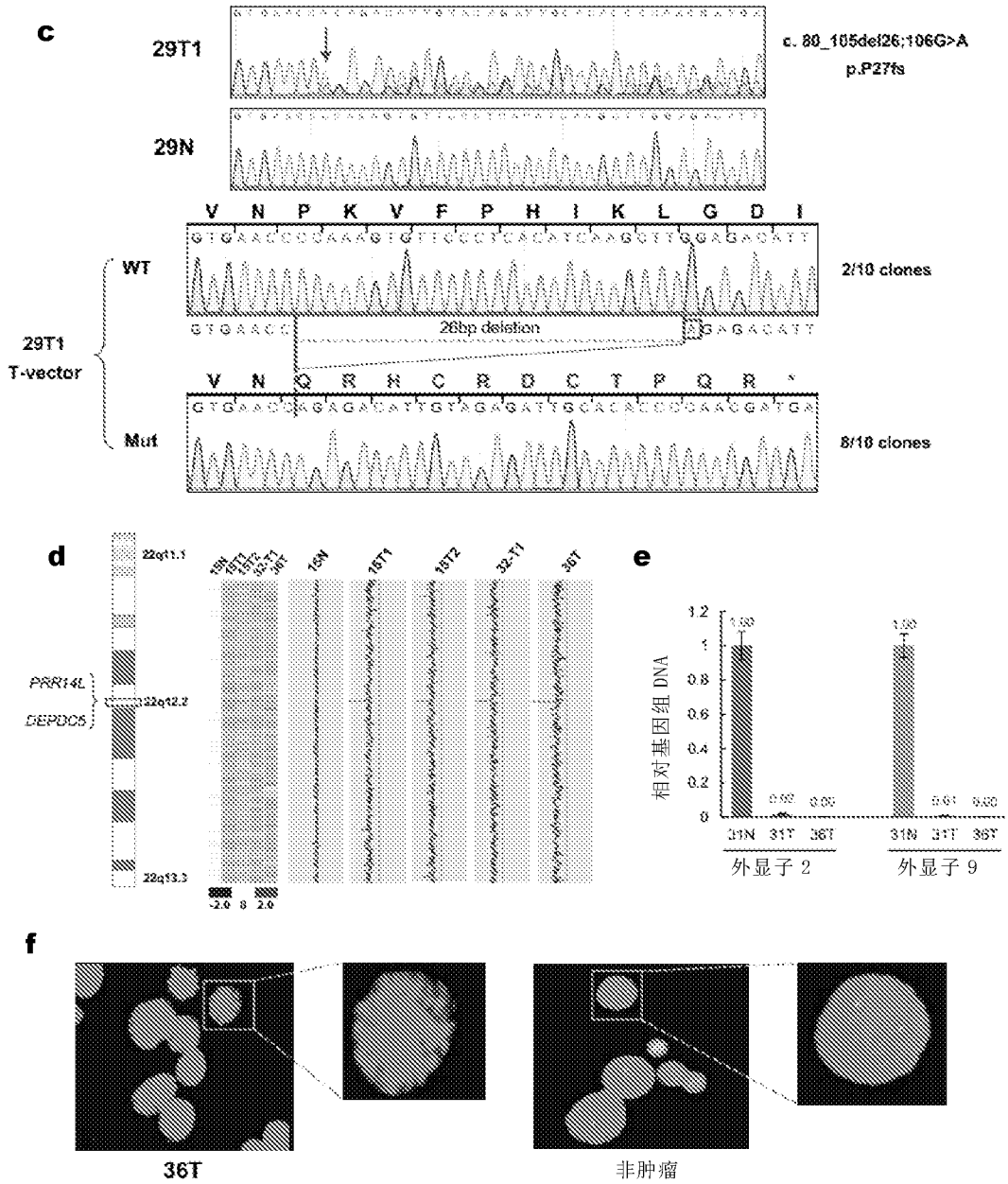


图 1 (续)

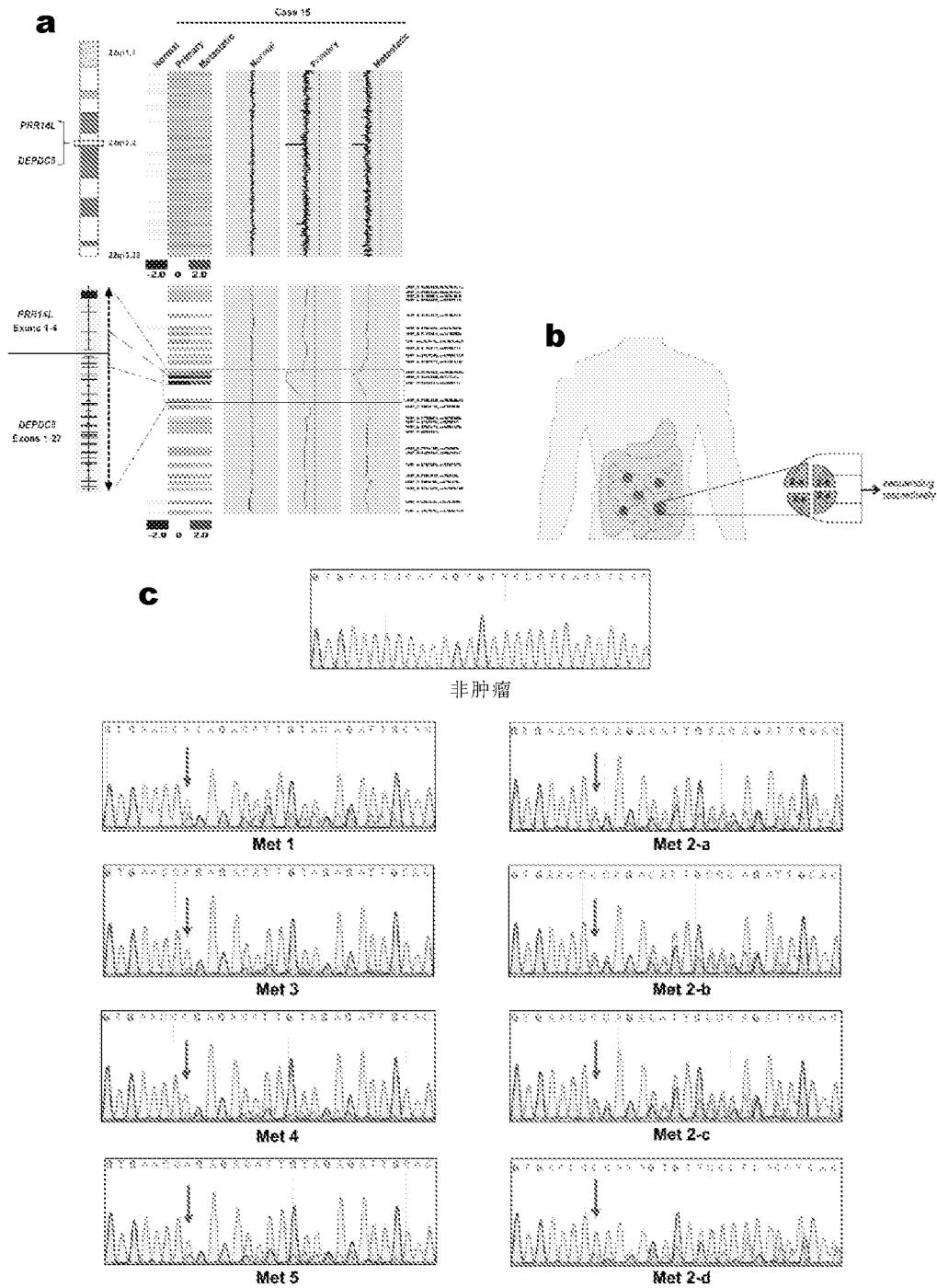


图 2

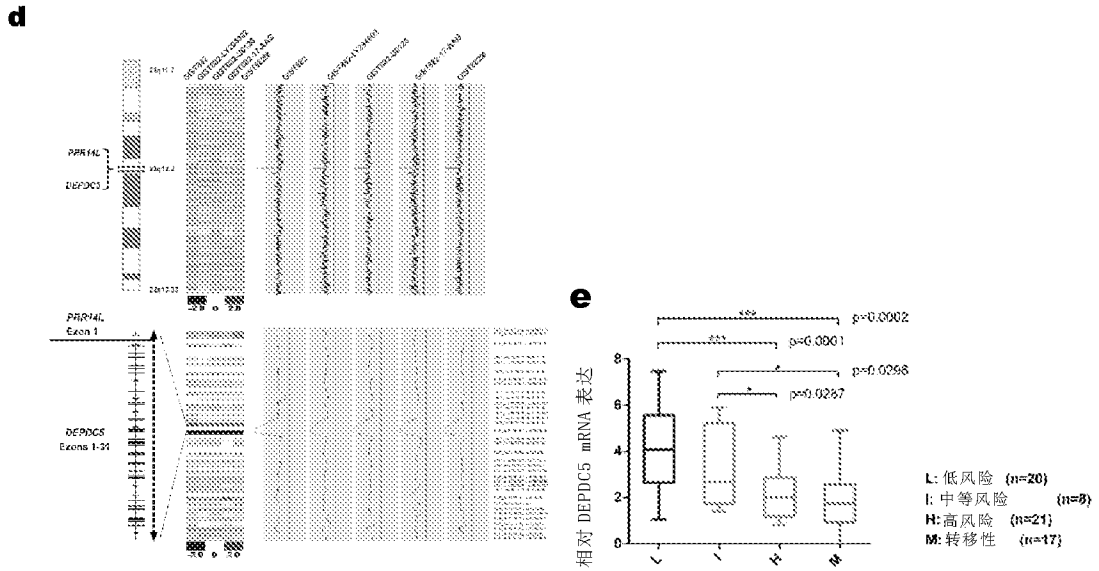


图 2 (续)

	DEPDC5 畸变	正常 DEPDC5	总数	DEPDC5 畸变频率
GISTs	7	33	40	17.5%
Non-GIST肉瘤 (TCGA, Pan-Cancer Atlas)	3*	252	255	1.2%

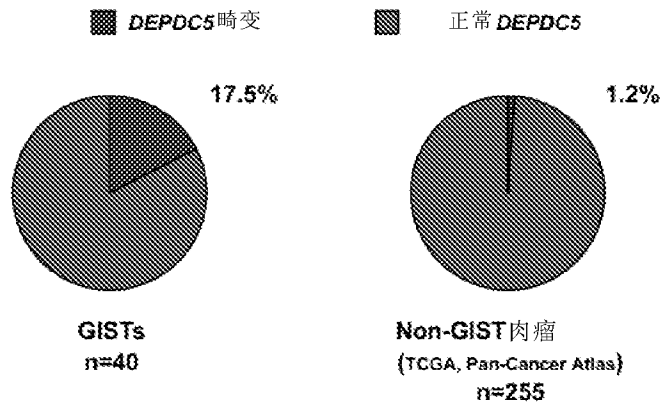


图 3

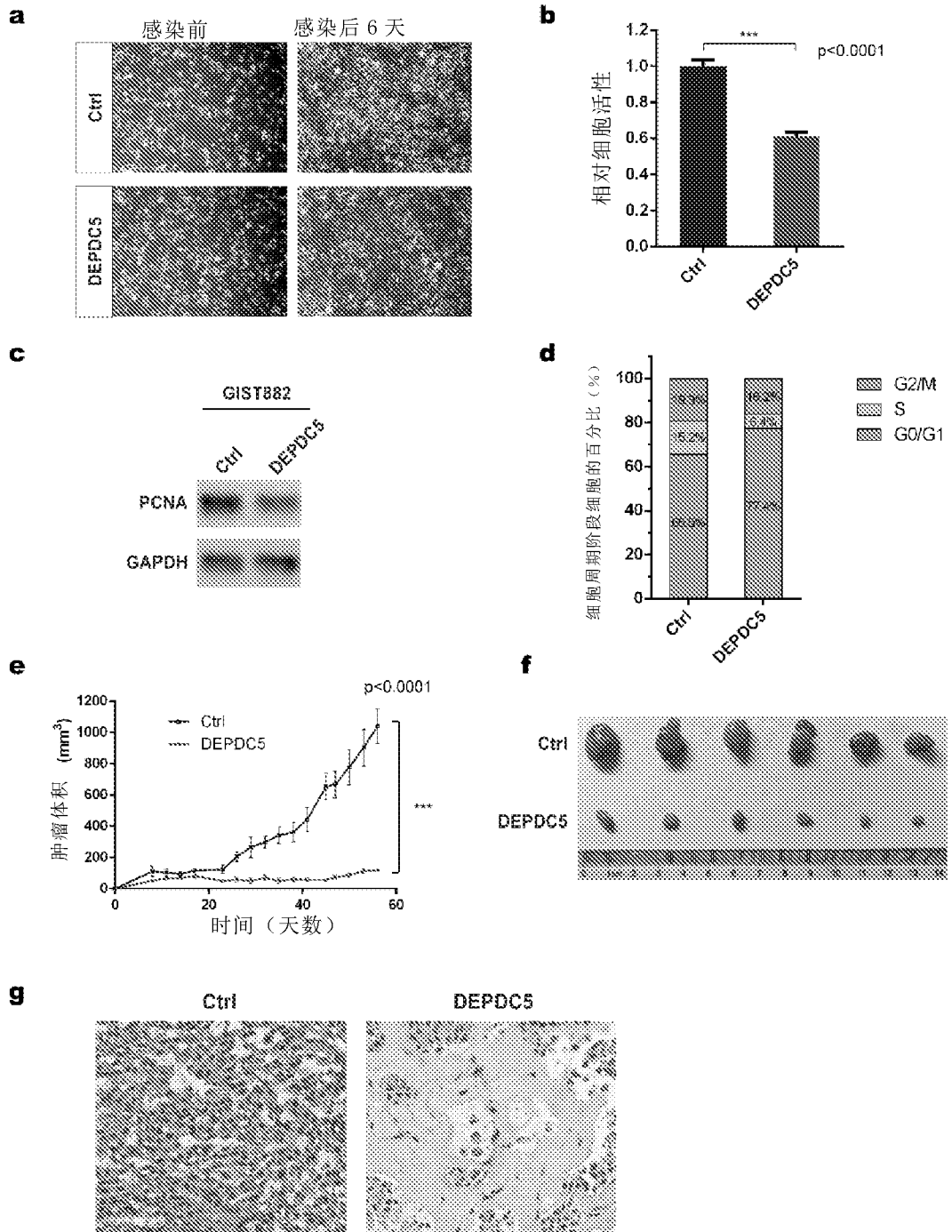


图 4

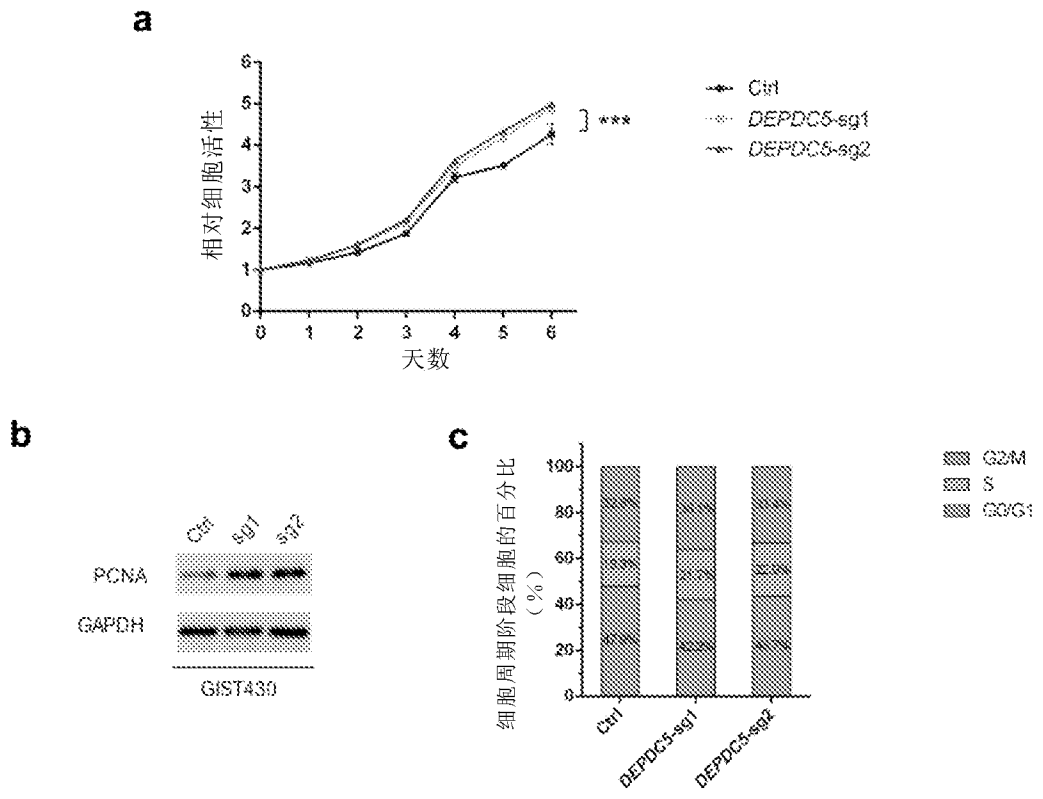


图 5

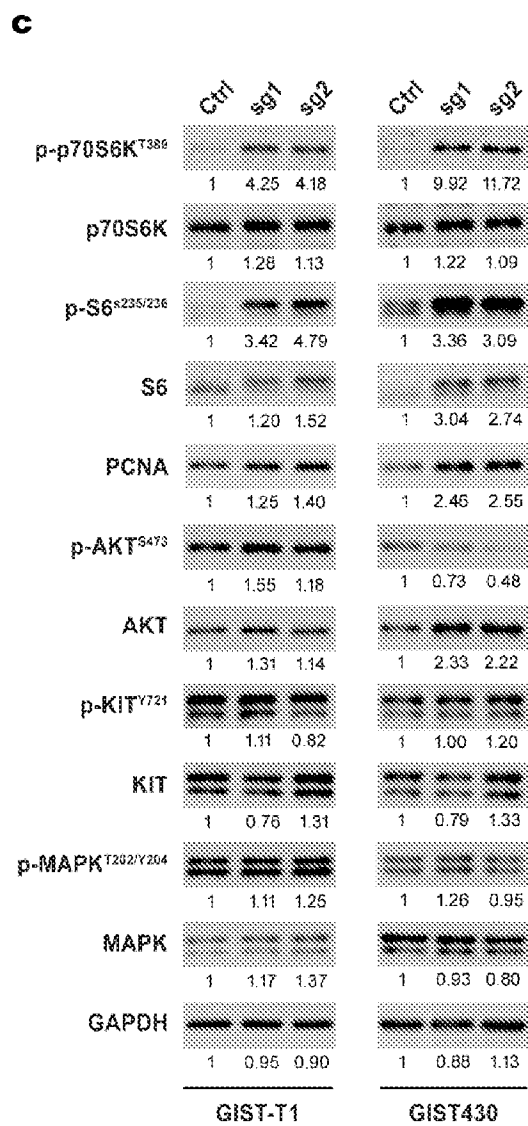
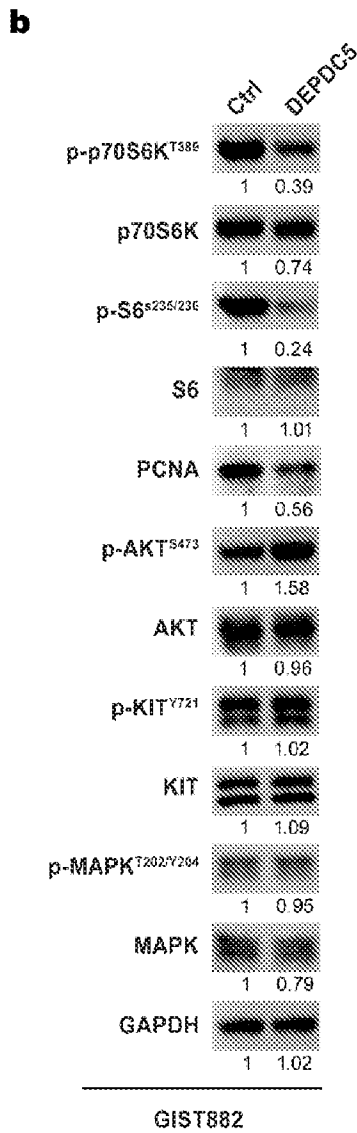
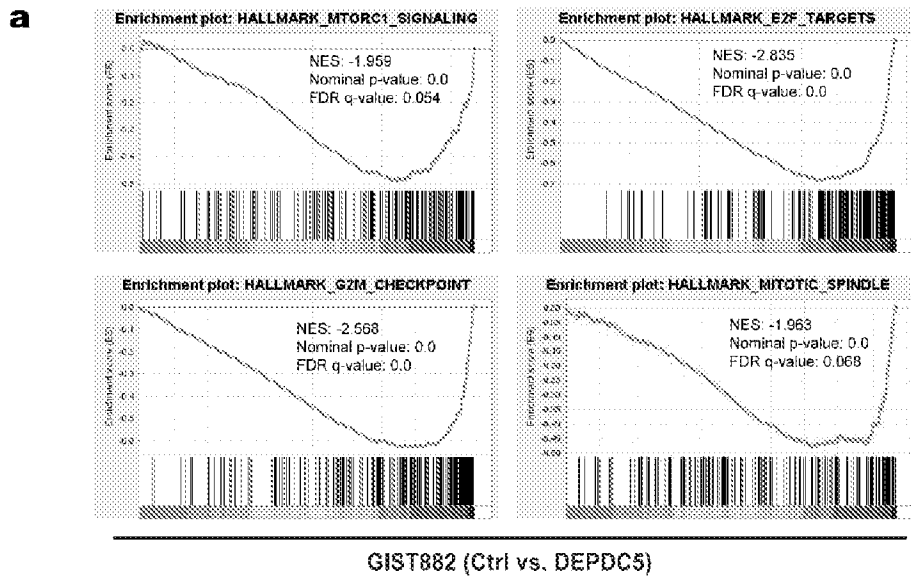


图 6

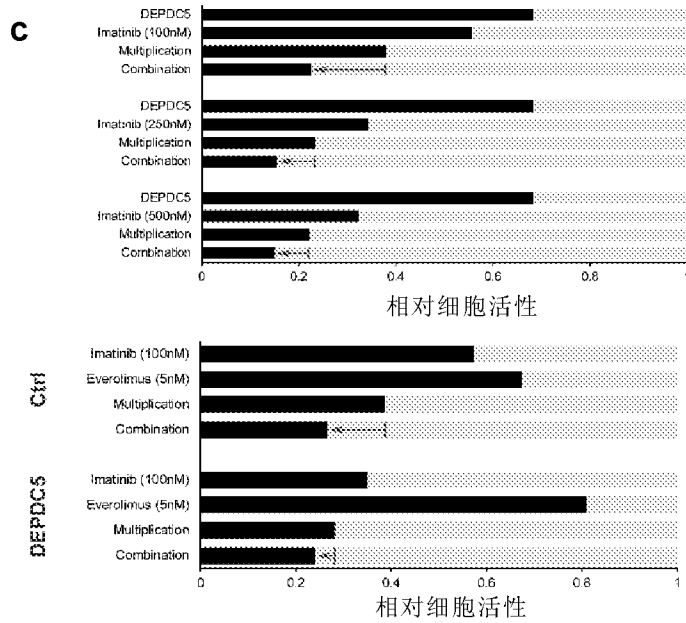
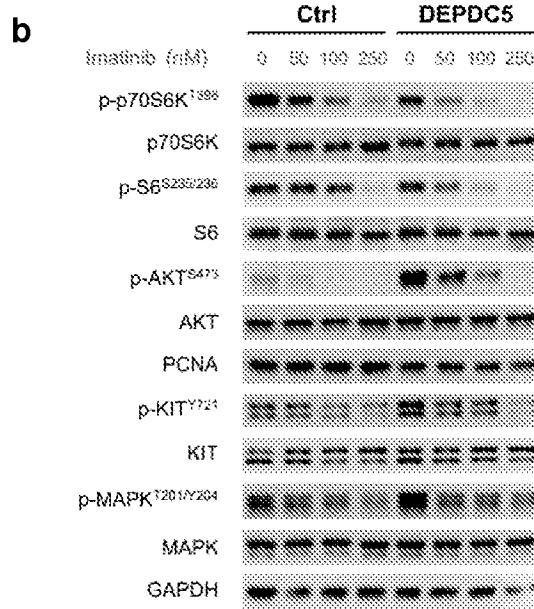
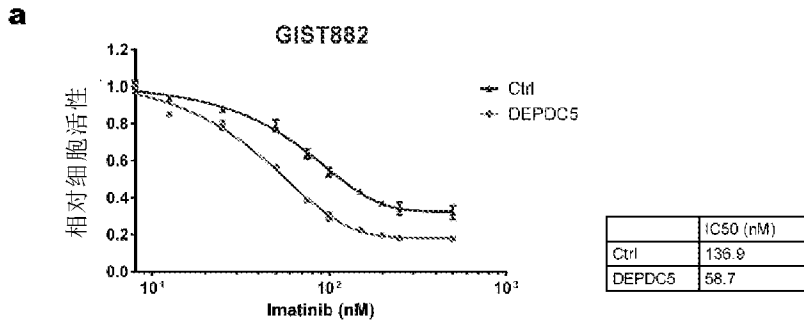


图 7

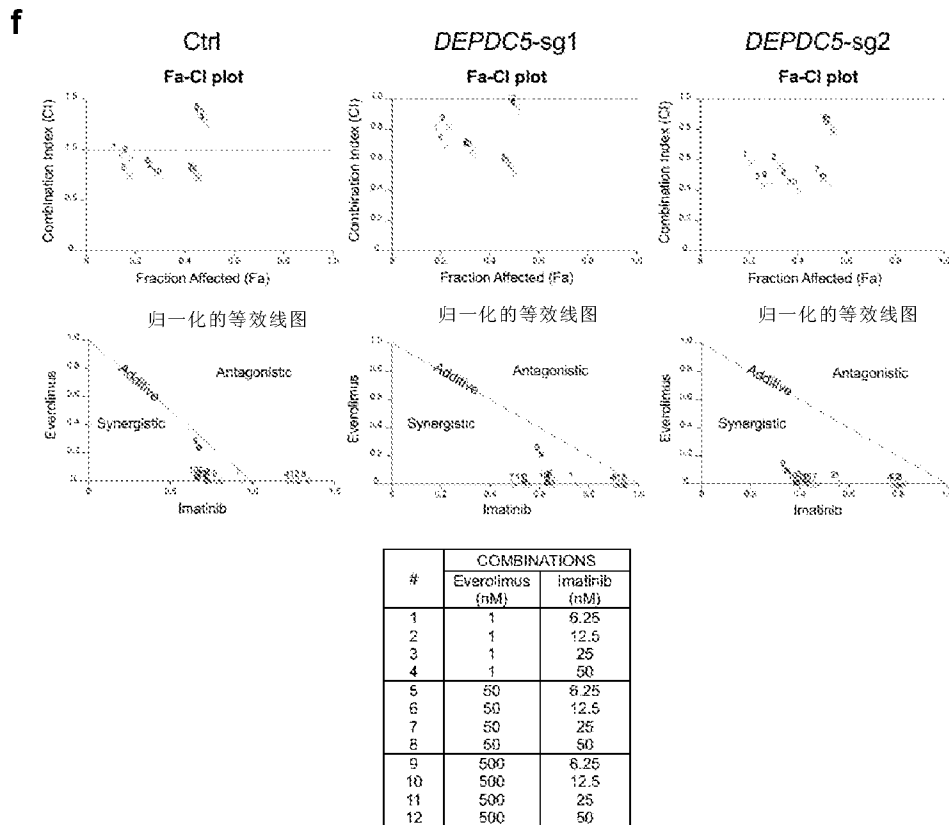
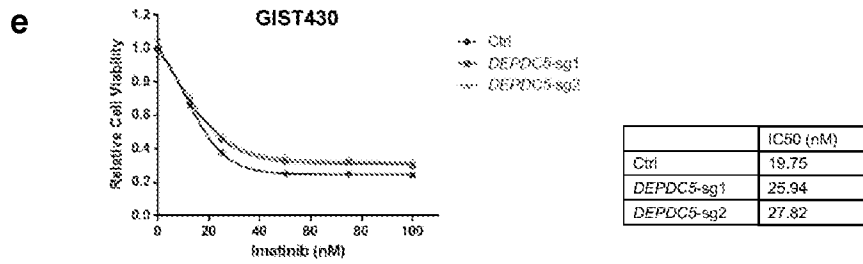
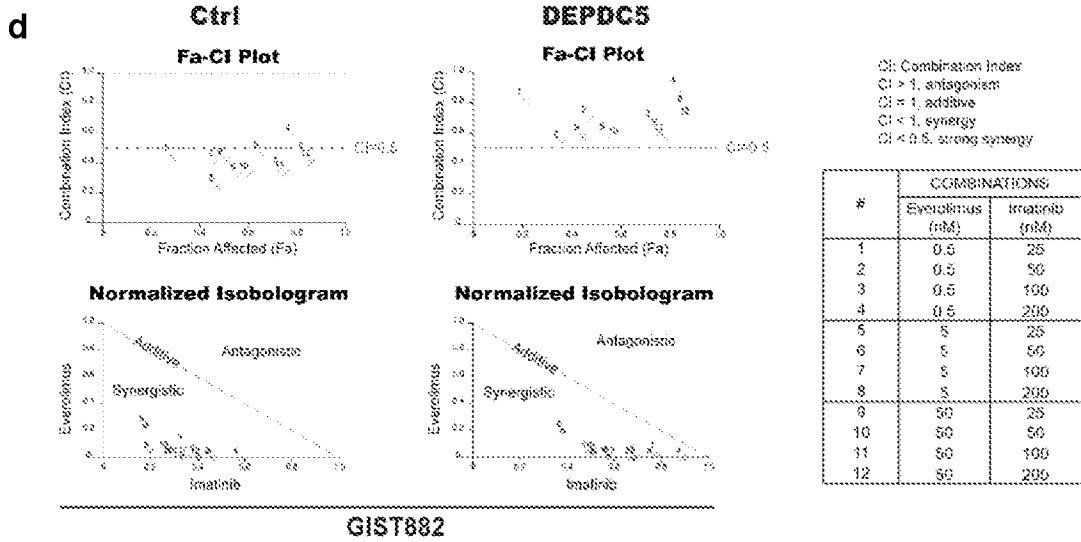


图 7 (续)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/126730

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C12Q 1/68(2018.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12Q; A61K; A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) DWPI, SIPOABS, CNABS, CNKI, ISI Web of knowledge, NCBI, Google Scholar, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM: DEPDC, 肿瘤, 癌, 胃, 肠, 表达, 突变, tumor, cancer, , GIST, express, mutation, 对于权利要求3中所列突变位点的检索, a search for mutation sites listed in claim 3		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 2770325 A1 (INST DU CERVEAU ET DE LA MOELLE éPINIèRE ICM et al.) 27 August 2014 (2014-08-27) claims	2, 4, 6, 7
A	EP 2770325 A1 (INST DU CERVEAU ET DE LA MOELLE éPINIèRE ICM et al.) 27 August 2014 (2014-08-27) entire document	1, 3, 5, 8-10
A	YUKI, M. et al. "DEPDC5 Deficiency Contributes to Resistance to Leucine Starvation via P62 Accumulation in Hepatocellular Carcinoma" <i>Scientific Report</i> , Vol. 8, No. (1), 31 December 2018 (2018-12-31), abstract	1-10
A	MA, N. et al. "Role of IFN-ks, IFN-ks Related Genes and the DEPDC5 Gene in Hepatitis B Virus-Related Liver Disease" <i>Journal of Viral Hepatitis</i> , Vol. 21, No. (7), 31 December 2014 (2014-12-31), abstract	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 08 January 2020		Date of mailing of the international search report 06 February 2020
Name and mailing address of the ISA/CN China National Intellectual Property Administration No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer Telephone No.

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 1, 3, 4, 8
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] The subject matter of claims 1(i), 3, 4 and 8 relates to a method for treatment of the human or animal body, which falls within the cases where a search is not required under PCT Rule 39.1(iv).
 - [2] The subject matter of claim 3 is assumed as “a use of a reagent for detecting DEPDC5 protein p.P27fs and/or p.Q783* mutation in preparing a reagent for detecting a primary gastrointestinal stromal tumour or advanced gastrointestinal stromal tumour”. The subject matter of claim 4 is assumed as a use of a reagent for “detecting DEPDC5 protein expression level and/or DEPDC5 protein mutation status in a test sample” in preparing a reagent for determining a treatment scheme. The subject matter of claim 8 is assumed as “a use of a pharmaceutical composition as claimed in claim 6 or a kit as claimed in claim 7 in preparing a drug/agent for preventing and/or treating a primary gastrointestinal stromal tumour or advanced gastrointestinal stromal tumour”.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/126730

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
EP 2770325 A1	27 August 2014	WO 2014131468 A1	04 September 2014

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12Q 1/68(2018.01)i; A61K 38/00(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12Q; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>DWPI、SIP0ABS、CNABS、CNKI、ISI Web of knowledge、NCBI、Google Scholar、GenBank、中国专利生物序列检索系统: DEPDC、肿瘤、癌、胃、肠、表达、突变、tumor、cancer、GIST、express、mutation, 对于权利要求3中所列突变位点的检索</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>EP 2770325 A1 (INST DU CERVEAU ET DE LA MOELLE éPINIèRE ICM等) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 权利要求书</td> <td>2、4、6、7</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>EP 2770325 A1 (INST DU CERVEAU ET DE LA MOELLE éPINIèRE ICM等) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 全文</td> <td>1、3、5、8-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Yuki Mizuno 等. "DEPDC5 deficiency contributes to resistance to leucine starvation via p62 accumulation in hepatocellular carcinoma" Scientific Report, 第8卷, 第1期, 2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31), 摘要</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>N.Ma 等. "Role of IFN-ks, IFN-ks related genes and the DEPDC5 gene in Hepatitis B virus-related liver disease" Journal of Viral Hepatitis, 第21卷, 第7期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 摘要</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	EP 2770325 A1 (INST DU CERVEAU ET DE LA MOELLE éPINIèRE ICM等) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 权利要求书	2、4、6、7	A	EP 2770325 A1 (INST DU CERVEAU ET DE LA MOELLE éPINIèRE ICM等) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 全文	1、3、5、8-10	A	Yuki Mizuno 等. "DEPDC5 deficiency contributes to resistance to leucine starvation via p62 accumulation in hepatocellular carcinoma" Scientific Report, 第8卷, 第1期, 2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31), 摘要	1-10	A	N.Ma 等. "Role of IFN-ks, IFN-ks related genes and the DEPDC5 gene in Hepatitis B virus-related liver disease" Journal of Viral Hepatitis, 第21卷, 第7期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 摘要	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
X	EP 2770325 A1 (INST DU CERVEAU ET DE LA MOELLE éPINIèRE ICM等) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 权利要求书	2、4、6、7															
A	EP 2770325 A1 (INST DU CERVEAU ET DE LA MOELLE éPINIèRE ICM等) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 全文	1、3、5、8-10															
A	Yuki Mizuno 等. "DEPDC5 deficiency contributes to resistance to leucine starvation via p62 accumulation in hepatocellular carcinoma" Scientific Report, 第8卷, 第1期, 2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31), 摘要	1-10															
A	N.Ma 等. "Role of IFN-ks, IFN-ks related genes and the DEPDC5 gene in Hepatitis B virus-related liver disease" Journal of Viral Hepatitis, 第21卷, 第7期, 2014年 12月 31日 (2014 - 12 - 31), 摘要	1-10															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2020年 1月 8日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2020年 2月 6日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>授权官员</p> <p>张起</p> <p>电话号码 62411036</p>															

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 1、3、4、8
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
 - [1] 权利要求1(i)项、权利要求3、4、8的主题涉及人体或动物体的治疗方法，属于PCT实施细则第39.1(iv)规定的无须检索的情况。
 - [2] 以下将权利要求3的主题假设为“检测DEPDC5蛋白p. P27fs和/或p. Q783*突变的试剂在制备检测原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的试剂中的应用”，将权利要求4的主题假设为“检测测试样品中DEPDC5蛋白的表达水平和/或DEPDC5蛋白的突变状况”的试剂在制备确定治疗方案的试剂中的应用。将权利要求8的主题假设为“权利要求6所述的药物组合物或权利要求7所述的药盒在制备预防和/或治疗原发性胃肠道间质瘤或进展期胃肠道间质瘤的药物/试剂中的应用”
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/126730

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
EP 2770325 A1	2014年 8月 27日	WO 2014131468 A1	2014年 9月 4日