



# (12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106537148 B

(45)授权公告日 2019.10.11

(21)申请号 201580037960.8

(22)申请日 2015.06.25

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 106537148 A

(43)申请公布日 2017.03.22

(30)优先权数据  
62/016,773 2014.06.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.01.12

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/IL2015/050663 2015.06.25

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02015/198334 EN 2015.12.30

(73)专利权人 泰尔哈绍梅尔医学研究基础设施  
和服务有限公司  
地址 以色列拉马特甘

(72)发明人 本杰明·德克尔  
奥里特·哈拉里斯坦伯格

(74)专利代理机构 北京京万通知识产权代理有限公司 11440

代理人 齐晓静

(51)Int.Cl.  
G01N 33/574(2006.01)  
A61K 45/00(2006.01)  
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件  
CN 101868534 A,2010.10.20,  
US 2011/0111434 A1,2011.05.12,  
CN 101855339 A,2010.10.06,  
Naomi Pode-Shakked et al..The  
isolation and characterization of renal  
cancer initiating cells from human Wilms'  
tumour xenografts unveils new therapeutic  
targets.《EMBO Molecular Medicine》.2013,第  
5卷

审查员 赵晓明

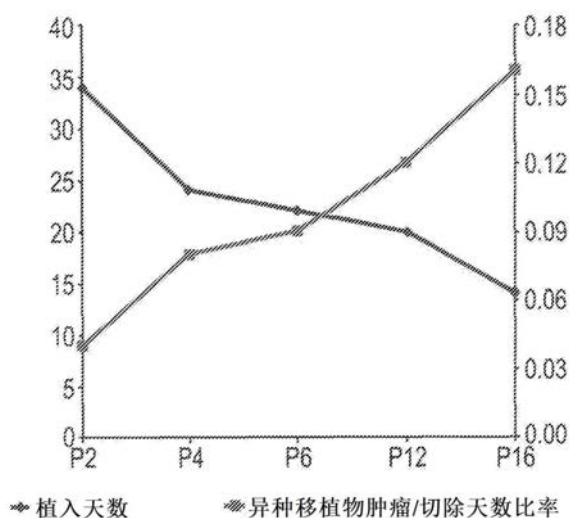
权利要求书1页 说明书38页 附图23页

## (54)发明名称

癌症干细胞的鉴定及其用于诊断和治疗的用途

## (57)摘要

公开了一种鉴定人原发性肿瘤中的癌症干细胞标志物的方法。所述方法包括:(a)使所述原发性肿瘤体内传代;并且(b)比较所述原发性肿瘤的第一群传代肿瘤细胞与所述原发性肿瘤的第二群肿瘤细胞中至少一种抗原的水平,其中与所述第二群肿瘤细胞中所述抗原的量相比,所述第一群肿瘤细胞中所述抗原的量增加表明在所述人原发性肿瘤中有癌症干细胞标志物。





1. 一种鉴定人原发性肿瘤中的癌症干细胞标志物的方法,其包括:
  - (a) 在免疫缺陷动物中使所述原发性肿瘤体内传代;其中,所述原发性肿瘤的细胞和所述原发性肿瘤的传代细胞未受免疫分离;并且
  - (b) 比较所述原发性肿瘤的第一群传代肿瘤细胞与所述原发性肿瘤的第二群肿瘤细胞中至少一种抗原的水平,其中第一群传代肿瘤细胞体内传代至少10代,并且其中所述第二群肿瘤细胞是:
    - (i) 所述人原发性肿瘤的非传代细胞;或
    - (ii) 所述人原发性肿瘤的体内传代细胞,其中所述第二群肿瘤细胞已经在体内传代比所述第一群传代肿瘤细胞少至少一代,其中与所述第二群肿瘤细胞中所述抗原的量相比,所述第一群肿瘤细胞中所述抗原的量增加表明在所述人原发性肿瘤中有癌症干细胞标志物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述抗原为多肽。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述多肽量的所述增加是每个细胞中所述多肽表达水平的增加。
4. 根据权利要求2所述的方法,其中所述多肽量的所述增加是表达所述多肽的细胞的量的增加。
5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述多肽量的所述增加是每个细胞中所述多肽表达水平的增加和表达所述多肽的细胞的量的增加。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述原发性肿瘤为小儿肿瘤。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述原发性肿瘤选自非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤(ATRT)、尤文氏肉瘤、血管肌脂瘤、胸膜肺母细胞瘤和威尔姆氏肿瘤。
8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第二群肿瘤细胞在体内连续传代不超过5代。
9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一群传代肿瘤细胞传代了10-30代。
10. 根据权利要求1所述的方法,其中所述第一群传代肿瘤细胞传代了10-20代。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传代在小鼠中实现。
12. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传代是通过将所述原发性肿瘤异种移植物的组织样品的非解离细胞植入动物体内来实现。
13. 根据权利要求1所述的方法,其中所述传代是通过将所述原发性肿瘤异种移植物的单细胞悬液植入动物体内来实现。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中在mRNA水平确定所述至少一种抗原的所述水平。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中在蛋白质水平确定所述至少一种抗原的所述水平。
16. 根据权利要求1所述的方法,所述(a)中每代的实现耗时1-3个月或直到肿瘤大小达到1-3cm的直径。



## 癌症干细胞的鉴定及其用于诊断和治疗的用途

[0001] 技术领域和背景技术

[0002] 本发明,在其一些实施方案中,涉及富集并鉴定原发性肿瘤中的癌症干细胞及任选将其从中分离的方法。然后可以鉴定将癌症干细胞与原发性肿瘤中存在的其它癌细胞区分的标志物以便帮助诊断癌症。另外,对于癌症治疗而言可靶向该标志物。

[0003] 近年来已见证了实体瘤中癌症引发性/癌症干细胞(CSC)的惊人发现。应用由干细胞研究确立的原理,使用异种移植(Xn)小鼠模型通过其再生癌症的强化能力在功能上定义人CSC。与正常干细胞相似,CSC自身可以通过自我更新过程复制,这可以在连续移植测定法中进行研究。另外,源自纯化CSC的癌症再现它们所来源的亲本癌症的异源表型,反映了CSC的分化能力。已基于表面标志物表达进行了CSC的前瞻性分离,使得能够在细胞培养之前通过流式细胞术重复分离高度纯化的干细胞群。

[0004] 恶性横纹肌样肿瘤是幼儿中最具侵袭性且高度恶性的胚胎瘤。这些肿瘤可以出现在肾脏(称为横纹肌样肿瘤)、肾外组织或中枢神经系统(称为ATRT)。它们的特征在于SMARCB1(位于染色体22长臂的11.2区域(22q11.2)处的SWI/SNF染色质重构复合物的核心组分)损失的几乎完全外显率。种系突变已有描述并且与极早期诊断、不同位置的同时和异时性肿瘤及最差预后相关联。由于SWI/SNF功能丧失引起的基因表达异常被认为在癌形成中起主要作用,与染色质重构在细胞因子信号传递、分化、多能性和自我更新中的重要作用一致。尽管优化了目前可用的医疗护理,包括手术、化疗和放疗,但横纹肌样肿瘤预后仍然极差,总存活率接近25%。为提高治愈率和降低短期和长期发病率,不断扩展我们对肿瘤来源、开发肿瘤癌询问模型及开发更耐受的新型生物靶向疗法的了解是必要的。

[0005] 背景技术包括Pode-Shakked等,EMBO Molecular Medicine,第5卷,第1期,第18-37页,2013和Metildi等,Cancer Res 2014;74(19Suppl):Abstract nr 4960.doi:10.1158/1538-7445.AM2014-4960。

### 发明内容

[0006] 根据本发明一些实施方案的一个方面,提供了一种鉴定人原发性肿瘤中的癌症干细胞标志物的方法,其包括:

[0007] (a)使所述原发性肿瘤体内传代;并且

[0008] (b)比较所述原发性肿瘤的第一群传代肿瘤细胞与所述原发性肿瘤的第二群肿瘤细胞中至少一种抗原的水平,其中所述第二群肿瘤细胞是:

[0009] (i)所述人原发性肿瘤的非传代细胞;或

[0010] (ii)所述人原发性肿瘤的体内传代细胞,其中所述第二群肿瘤细胞已经在体内传代比所述第一群传代肿瘤细胞少至少一代,

[0011] 其中与所述第二群肿瘤细胞中所述抗原的量相比,所述第一群肿瘤细胞中所述抗原的量增加表明在所述人原发性肿瘤中有癌症干细胞标志物。

[0012] 根据本发明一些实施方案的一个方面,提供了一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的下调抗原表达和/或抑制抗原活性的试剂,



其中所述肿瘤的体内传代细胞中所述抗原的量:所述肿瘤的原代细胞中所述抗原的量的比率高于预定水平。根据本发明一些实施方案的一个方面,提供了一种诊断受试者中的癌症的方法,其包括分析所述受试者肿瘤中抗原的水平,其中所述抗原的存在表明为癌症,其中所述肿瘤的体内传代细胞中所述抗原的量:所述肿瘤的原代细胞中所述抗原的量的比率高于预定水平。

[0013] 根据本发明一些实施方案的一个方面,提供了一种监测受试者中的癌症治疗的方法,其包括分析在所述癌症治疗施用之后所述受试者的原发性肿瘤中抗原的水平,其中与所述癌症治疗施用之前所述抗原的水平相比,所述抗原的量降低表明为治疗性治疗,其中所述受试者肿瘤的体内传代细胞中所述抗原的量:所述受试者肿瘤的原代细胞中所述抗原的量的比率高于预定水平。

[0014] 根据本发明一些实施方案的一个方面,提供了一种选择用于受试者中癌症治疗的试剂的方法:

[0015] (a) 根据本文描述的方法鉴定所述受试者原发性肿瘤中的至少一种癌症干细胞标志物;并且

[0016] (b) 选择下调所述癌症干细胞标志物的表达和/或抑制所述癌症干细胞标志物的活性的试剂,从而选择用于癌症治疗的试剂。

[0017] 根据本发明一些实施方案的一个方面,提供了一种在有需要的受试者中治疗非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤(ATRT)的方法,其包括向所述受试者施用治疗有效量的结合多肽和/或下调多肽表达的试剂,所述多肽选自信号素3C(SEMA3C)、赖氨酰氧化酶(LOX)、糖蛋白M6A(GPM6A)、肝细胞生长因子(HGF/SF)和醛脱氢酶1(ALDH1),从而治疗ATRT。

[0018] 根据本发明一些实施方案的一个方面,提供了一种监测受试者中的癌症治疗的方法,其包括:

[0019] (a) 根据本文描述的方法鉴定所述受试者原发性肿瘤中的至少一种癌症干细胞标志物;

[0020] (b) 分析所述癌症治疗之后所述受试者肿瘤中所述癌症干细胞标志物的量,其中与治疗之前所述癌症干细胞标志物的量相比,肿瘤中所述癌症干细胞标志物的量降低表明癌症治疗有效。

[0021] 根据本发明一些实施方案的一个方面,提供了一种诊断受试者中的癌症的方法,其包括根据本文描述的方法鉴定所述受试者的生物样品中的至少一种癌症干细胞标志物,其中所述癌症干细胞标志物的存在表明为癌症。

[0022] 根据本发明的一些实施方案,选择所述第一群传代细胞的传代次数,使得存在至少连续两代不显著增加的明显肿瘤侵袭性表型。

[0023] 根据本发明的一些实施方案,选择所述第一群的传代次数,使得使用所述第一群传代细胞的5000个细胞引发晚代异种移植的频率与所述人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少5倍。

[0024] 根据本发明的一些实施方案,选择所述第一群传代细胞的传代次数,使得所述第一群传代细胞中癌症干细胞:非癌症干细胞的比率大于1:1000。

[0025] 根据本发明的一些实施方案,所述抗原为多肽。

[0026] 根据本发明的一些实施方案,所述多肽量的增加是每个细胞中所述多肽表达水平



的增加。

[0027] 根据本发明的一些实施方案,所述多肽量的增加是表达所述多肽的细胞的量的增加。

[0028] 根据本发明的一些实施方案,所述多肽量的增加是每个细胞中所述多肽表达水平的提高和表达所述多肽的细胞的量的增加。

[0029] 根据本发明的一些实施方案,所述第一群肿瘤细胞中的癌症干细胞频率:所述第二群肿瘤细胞中的癌症干细胞频率大于5:1。

[0030] 根据本发明的一些实施方案,所述原发性肿瘤为小儿肿瘤。

[0031] 根据本发明的一些实施方案,所述原发性肿瘤选自非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤(ATRT)、尤文氏肉瘤(Ewings' s sarcoma)、血管肌脂瘤、胸膜肺母细胞瘤和威尔姆氏肿瘤(Wilms' tumor)。

[0032] 根据本发明的一些实施方案,所述第一群传代肿瘤细胞传代最少2代。

[0033] 根据本发明的一些实施方案,所述第二群肿瘤细胞在体内连续传代不超过5代。

[0034] 根据本发明的一些实施方案,所述第一群传代肿瘤细胞在体内传代至少5代。

[0035] 根据本发明的一些实施方案,所述传代在小鼠中实现。

[0036] 根据本发明的一些实施方案,所述传代是通过将所述原发性肿瘤异种移植物的组织样品的非解离细胞植入动物体内来实现。

[0037] 根据本发明的一些实施方案,所述传代是通过将所述原发性肿瘤异种移植物的单细胞悬液植入动物体内来实现。

[0038] 根据本发明的一些实施方案,在mRNA水平实现测定所述至少一种多肽的表达。

[0039] 根据本发明的一些实施方案,在蛋白质水平实现测定所述至少一种多肽的表达。

[0040] 根据本发明的一些实施方案,所述癌细胞侵袭性表型选自癌细胞标志物的水平、基因表达谱、获取异种移植物的时间、产生异种移植物所需的细胞数量、迁移能力、侵入非癌组织的能力和增殖水平。

[0041] 根据本发明的一些实施方案,所述第一群肿瘤细胞尚未进行免疫隔离。

[0042] 根据本发明的一些实施方案,所述抗原是根据本文描述的方法鉴定的癌症干细胞标志物。

[0043] 根据本发明的一些实施方案,所述抗原为多肽。

[0044] 根据本发明的一些实施方案,原发性肿瘤中所述多肽的表达:体内传代细胞中所述多肽的表达的比率为至少1:5。

[0045] 根据本发明的一些实施方案,所述体内传代细胞包含已进行至少3次体内传代的细胞。

[0046] 根据本发明的一些实施方案,所述多肽为赖氨酰氧化酶(LOX)。

[0047] 根据本发明的一些实施方案,所述试剂为 $\beta$ -氨基丙腈(BAPN)。

[0048] 根据本发明的一些实施方案,当所述癌症干细胞标志物选自信号素3C(SEMA3C)、赖氨酰氧化酶(LOX)、糖蛋白M6A(GPM6A)、肝细胞生长因子(HGF/SF)和醛脱氢酶1(ALDH1)时,所述癌症为ATRT。

[0049] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和/或科学术语均具有本发明所属领域中普通技术人员通常所理解的含义。虽然在本发明实施方案的实践或试验中可使用与



本文所述类似或等效的方法和材料,但是下面描述的是示例性方法和/或材料。如有冲突,以专利说明书,包括定义为准。另外,所述材料、方法和实例仅为说明性而非旨在为必要性限制。

## 附图说明

[0050] 本文仅以举例的方式,参考附图描述了本发明的一些实施方案。现详细地具体参考附图,强调所示细节仅举例而言并且是为了说明性讨论本发明实施方案的目的。就这一点而言,随附图所做的描述使得对于本领域中的技术人员而言可如何实践本发明的实施方案显而易见。

[0051] 图中:

[0052] 图1A-D. MRT的长期繁殖与CSC频率增加相关。(A) 连续Xn繁殖与肿瘤植入时间更短(蓝色)和重量与切除时间比增大(红色)有关联,表明肿瘤行为朝更具侵袭性的表型变化;(B) 原代MRT、早代Xn (P2)、中间代Xn (P7) 和晚代Xn (P14) 的H&E染色。Xn肿瘤细胞保持基本横纹肌样细胞形态,具有一些形态差异包括获得梭形细胞、大面积坏死、凋亡小体更少且有丝分裂更多(白色箭头)。比例尺,100 $\mu$ m(上)和50 $\mu$ m(下);(C) 细胞角蛋白AE1/AE3、上皮细胞膜抗原(EMA)、神经丝蛋白(NFP)和波形蛋白(vimentin)的连续切片中原代MRT、早代Xn (P2)、中间代Xn (P7) 和晚代Xn (P14) 的IHC。高代Xn显示分化标志物损失(上面三个图),而原发性肿瘤和Xn组织强烈表达波形蛋白(下图)。比例尺,200 $\mu$ m;(D) 比较原发性肿瘤、早代Xn (P3) 和晚代(P17) 间E-钙粘蛋白(E-cadherin)和波形蛋白的表达水平的qRT-PCR分析。上皮标志物(E-钙粘蛋白)的表达在整个连续繁殖过程中被下调,而波形蛋白的表达保持持久。对于qRT-PCR分析,原发性肿瘤细胞的值用于归一化(因此=1)并且相对于其计算所有其它值。结果呈现为三次独立实验的平均值 $\pm$  S.E.M.\* $p < 0.05$ ;(D) 来自低、中和高MRT传代的Xn细胞的代表性流式细胞术分析,以分析单细胞悬液上几种CSC标志物包括CD24、CD34、CD90、CD56、CD326和ALDH1抗原的表达。结果揭示ALDH1是MRT CSC标志物的良好候选物,呈现了通过Xn传代增加表达的模式。

[0053] 图2A-E. 与肿瘤引发活性增强相关的全基因标记揭示了假定CSC生物标志物和新的治疗靶标。(A) 比较几种不同样品的微阵列基因表达分析:1. 原代MRT,2. 早期MRT Xn (P2),3. 中间MRT Xn (P7),4. 晚期MRT Xn (P17),5. 人胚胎干细胞(hESC),6. 胎肾(FK),7. 成人肾(AK),8. 胎脑(FB),9. 成人脑(AB)。无监管的分级群聚揭示了MRT晚代和hESC之间的巨大相似性,强调了它们的未分化特性;(B) 对MRT组织的比较揭示了两种不同的基因表达模式;在整个传代过程中上调(红色)和下调(绿色)的基因;(C) 与MRT中CSC功能增强相关的前十种上调基因,包括信号素3C(SEMA3C)、赖氨酰氧化酶(LOX)、糖蛋白M6A(GPM6A)、肝细胞生长因子(HGF/SF)和醛脱氢酶1(ALDH1);(D) 比较不同MRT样品间几种增殖标志物(例如KI67、CDC20、CDK1和CCNA2)的表达模式的基因热图,揭示高代具高度增殖性;(E) ingenuity<sup>©</sup>功能分析证明与原发性肿瘤和低代Xn相比高代Xn中的细胞坏死、细胞死亡和细胞分化减少。

[0054] 图3A-E. ALDH1是MRT CSC的假定标志物。(A) 人MRT Xn在NOD/SCID小鼠中连续繁殖导致表达ALDH1的细胞富集,图解;(B) 对不同MRT Xn传代的代表性FACS分析。随着肿瘤进展,表达ALDH1的细胞的比例显著增加,在源自P4的细胞中为4%(左)而在源自P10细胞的细胞中为25%(右),表明通过Xn连续繁殖表达ALDH1<sup>+</sup>的细胞富集;(C) 对原代MRT、中间代Xn



(P7) 和晚代Xn (P13) 的ALDH1的IHC分析揭示随着Xn连续繁殖而表达增加。比例尺, 200 $\mu$ m; (D) 对原代MRT的ALDH1的大放大倍数IHC分析证明高度表达ALDH1的细胞主要是大横纹肌样细胞。比例尺, 200 $\mu$ m; (E) 经由qRT-PCR验证揭示在晚代中ALDH1高度表达, 相比于原发性肿瘤高约40倍。对于qRT-PCR分析, 原发性肿瘤细胞的值用于归一化(因此=1) 并且据此计算所有其它值。结果呈现为三次独立实验的平均值 $\pm$ S.E.M。\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ 。

[0055] 图4A-D. 对ALDH1作为MRT CSC标志物的功能验证。(A) 比较ALDH1+和ALDH1-MRT细胞之间的菌落形成能力。ALDH1+细胞形成的菌落数量相比于ALDH1-细胞明显更高(左上方柱状图;  $p = 0.0083$ )。与ALDH1-细胞相比, 细胞数量/个菌落明显更高(左下方柱状图;  $p = 0.0024$ )。右侧呈现了由ALDH1+和ALDH-细胞形成的菌落的代表性图像。实验进行三次; (B) 由ALDH1+细胞产生的肿瘤可进一步连续移植到二级受者中, 展示出体内自我更新能力, 与在该群体中存在肿瘤引发能力一致; (C) RNA测序实验证明相比于ALDH-细胞在ALDH+细胞中上调最多的基因是相比于原发性肿瘤在Xn晚代中明显过表达的那些基因(例如ANXA1、GPM6A、HGF和LOX)。(D) 经由qRT-PCR验证揭示相比于ALDH-细胞在分选的ALDH+中LOX高度表达。对于qRT-PCR分析, ALDH-细胞的值用于归一化(因此=1) 并且据此计算所有其它值。结果呈现为三次独立实验的平均值 $\pm$ S.E.M; \* $p < 0.05$ 。

[0056] 图5A-D. LOX抑制剂作为可能的MRT治疗靶标的功能验证。(A) 对原发性肿瘤、早代(P2)、中间代(P7) 和晚代(P14) MRT的LOX的IHC染色。染色揭示了随着Xn连续繁殖广泛、递增的表达。比例尺, 100 $\mu$ m; (B) BAPN对威尔姆氏肿瘤(WT) Xn的影响, 威尔姆氏肿瘤是在小鼠中连续繁殖的常见小儿肾脏实体瘤。结果证明对WT细胞增殖无影响, 表明LOX抑制对MRT细胞的特异性作用。\* $p < 0.01$ ; (C) BAPN处理诱导MRT细胞上的形态变化, 包括核固缩和细胞吞噬。比例尺, 100 $\mu$ m(上) 和50 $\mu$ m(下); (D) 迁移测定揭示与未处理的细胞相比, 100 $\mu$ M BAPN处理48小时显著抑制MRT细胞的迁移能力。比例尺, 1000 $\mu$ m。

[0057] 图6. ATRT Xn模型的建立, 图解。原发性肿瘤移植通过皮下移植2-5mm肿瘤碎片到免疫缺陷小鼠中而形成。在允许肿瘤繁殖的所有小鼠中都观察到肿瘤摄取。ATRT Xn在NOD/SCID小鼠中的连续繁殖通过组织样品移植或利用 $1 \times 10^6$ 个固定数量的细胞进行单细胞悬液移植来进行。连续繁殖允许我们建立低(<P5)、中(P5-P10) 和高代(P10-P15) ATRT Xn传代。组织片段还用于IHC染色, RNA、DNA和蛋白质分离。粘附细胞也用于肿瘤细胞的体外研究。

[0058] 图7A-D. LOX抑制剂作为ATRT CIC/CSC治疗剂的功能验证。(A) 处理后的细胞活力测定。对以不同浓度BAPN (10-1000 $\mu$ M) 生长48小时的P2Xn细胞进行MTS分析, 检查细胞活力。处理导致在用100 $\mu$ M BAPN处理之后增殖显著减少(相比于UT细胞为47%)。\* $p < 0.01$ 。(B) BAPN处理诱导ATRT细胞上的形态变化。处理后观察到的变化为: 核固缩和细胞吞噬。比例尺, 100 $\mu$ m(上) 和50 $\mu$ m(下)。(C) BAPN处理抑制细胞迁移。迁移测定揭示与未处理的细胞相比, 100 $\mu$ M BAPN处理48小时显著抑制ATRT细胞的迁移能力。比例尺, 1000 $\mu$ m。(D) 在ATRT细胞中BAPN有效抑制LOX活性。LOX活性定量试剂盒在P3和P10细胞上用100 $\mu$ M BAPN处理后显示出显著抑制(分别为81%和63%)。

[0059] 图8A-B是直到出现肿瘤的平均天数随异种移植物传代而变化的图表。在尤文氏肉瘤(图8A) 和威尔姆氏肿瘤(图8B) 两种中连续Xn繁殖与肿瘤植入时间更短有关联, 表明肿瘤行为朝更具侵袭性的表型变化。



[0060] 图9是基因热图,其揭示了晚期肿瘤异种移植物为高度增殖性,呈现自我更新基因上调,具有侵入基因标记,预测了转移性行为。

[0061] 图10A-对几种Xn传代(P4、P8、P12和P17)的NCAM1的免疫组织化学分析(IHC)揭示随Xn连续增殖而表达增加。比例尺,200 $\mu$ m;

[0062] 图10B-qRT-PCR分析揭示相比于成人肺部对照在原发性肿瘤中NCAM1高度表达(右)并且相比于成人肺部在胎肺中NCAM1高度表达(左)。结果呈现为三次独立实验的平均值 $\pm$ S.E.M.\*, $p<0.05$ 。

[0063] 图11A-对几种Xn传代(P4、P8、P12和P17)的CD44的IHC分析揭示随Xn连续增殖而表达增加。比例尺,200 $\mu$ m;

[0064] 图11B-对原代PPB的CD44的大放大倍数IHC分析证明高度表达CD44的细胞沿着肿瘤分散。比例尺,200 $\mu$ m。

### 具体实施方式

[0065] 本发明,在其一些实施方案中,涉及富集并鉴定原发性肿瘤中的癌症干细胞及任选将其从中分离的方法。然后可以鉴定将癌症干细胞与原发性肿瘤中存在的其它癌细胞区分的标志物以便帮助诊断癌症。另外,对于癌症治疗而言可靶向该标志物。

[0066] 在详细解释本发明的至少一个实施方案之前,应理解本发明在其应用上不一定限于以下描述中提出或通过实施例举例说明的细节。本发明能够有其它实施方案或以各种方式实践或实施。

[0067] 癌症干细胞代表分级组织肿瘤中的恶性细胞亚类,其能够选择性地引发肿瘤和自我更新并且通过分化产生非致瘤性癌细胞后代的混合群体。

[0068] 作为生理干细胞抗药性表型的观察结果的推论,已假设CSC可能也代表癌症中特征在于对化疗和放疗的抗性增加的亚群。因此,通过特定标志物靶向CSC的癌症治疗有可能通过降低复发和播散风险而增加当前治疗形式的功效。癌症干细胞的鉴定是一项复杂任务,尤其是鉴于它们通常在肿瘤细胞中以极低数量表达的这一事实。

[0069] 在小儿实体瘤中,对多种新鲜肿瘤标本的使用权有限使这个问题复杂化,进一步加强了稳健性CSC分析和新型治疗策略的有效开发。

[0070] 发明人结合人非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤(ATRT)、高侵袭性和致命性小儿肿瘤的长期体内繁殖,与在免疫缺陷小鼠中的有限稀释异种移植物而发现CSC表型。使用这种方法,发明人能够使用少至50个细胞(与低代异种移植物相比少40倍)产生ATRT。

[0071] 发明人由这些实验推断,连续循环的异种移植可用于选择另外的CSC表型并且这种方法对于癌症诊断和治疗而言是有价值的工具。

[0072] 与ATRT类似,发明人证实尤文氏肉瘤、威尔姆氏肿瘤和胸膜肺母细胞瘤(PPB)产生的异种移植物(Xn)的连续繁殖与肿瘤植入时间更短和肿瘤生长加速有关联,表明肿瘤侵袭性随着传代而提升。因此,发明人推断可以使用上述方法对多种癌症进行CSC的鉴定。

[0073] 对于特定肿瘤的CSC的了解有助于新治疗的开发。这可以在个性化水平(即检查特定受试者肿瘤中的CSC并相应地治疗)或在更一般的水平(开发用于特定癌症的治疗剂)实现。

[0074] 根据本发明的一个方面,提供了一种鉴定人原发性肿瘤中的癌症干细胞标志物的



方法,其包括:

[0075] (a) 使所述原发性肿瘤体内传代许多代以产生第一群传代肿瘤细胞;并且(b) 比较所述原发性肿瘤的第一群传代肿瘤细胞与所述原发性肿瘤的第二群肿瘤细胞中至少一种抗原的水平,其中所述第二群肿瘤细胞是:

[0076] (i) 所述人原发性肿瘤的非传代细胞;或

[0077] (ii) 所述人原发性肿瘤的体内传代细胞,其中所述第二群肿瘤细胞已经在体内传代比所述第一群传代肿瘤细胞少至少一代,

[0078] 其中与第二群肿瘤细胞中所述抗原的量相比,第一群肿瘤细胞中所述抗原的量增加表明在所述人原发性肿瘤中有癌症干细胞标志物。

[0079] 如本文中所用,术语“癌症干细胞”,(也称为“CSC”),是指具有使用异种移植物(Xn)小鼠模型使癌症再生的能力的细胞。CSC自身可以通过自我更新过程复制,这可以在连续移植测定法中进行研究。另外,源自纯化CSC的癌症再现它们所来源的亲本癌症的异源表型,反映了CSC的分化能力。

[0080] 如本文中所用,术语“肿瘤”是指通过失调细胞增殖而形成的一类细胞或组织。肿瘤可显示出部分或完全缺乏结构组织和与正常组织的功能协调,并且通常形成不同的组织团块,该团块可以是良性的或恶性的。在一个实施方案中,术语肿瘤是指恶性肿瘤。根据一个实施方案,术语“肿瘤细胞”还包含非实体癌细胞如白血病细胞。根据另一个实施方案,非实体癌的各个细胞未被术语“肿瘤细胞”所涵盖。

[0081] 根据一个特定实施方案,所述肿瘤是具有胚胎干细胞来源的实体瘤(例如小儿的)。

[0082] 此类实体瘤的实例包括但不限于肉瘤和癌,例如但不限于:纤维肉瘤、粘液肉瘤、胸膜肺母细胞瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚性癌、威尔姆氏肿瘤、宫颈癌、睾丸瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室鼓膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑脊膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞瘤。小儿实体瘤的实例包括但不限于:威尔姆氏肿瘤/肾母细胞瘤、横纹肌肉瘤、尤文氏家族的肿瘤/原始神经外胚层肿瘤、骨肉瘤、外周神经外胚层瘤、儿童期生殖细胞肿瘤、性腺外生殖细胞肿瘤、肾癌、肝癌、成神经细胞瘤、卵巢癌、成视网膜细胞瘤、肉瘤(更具体地,骨肉瘤、横纹肌肉瘤)、促结缔组织增生性小圆细胞肿瘤、肝母细胞瘤、生殖细胞瘤、成神经细胞瘤和成神经管细胞瘤。

[0083] 短语“原发性肿瘤”如本文中所用是指从肿瘤进开始并继续产生癌性团块的解剖部位获得的细胞。

[0084] 所述抗原可以是与没有使用异种移植物(Xn)小鼠模型使癌症再生的能力并且自身无法通过自我更新过程复制的相同肿瘤的癌细胞相比,在CSC中以不同量存在的任何分子。

[0085] 因此,例如,CSC标志物可为多肽、碳水化合物、肽或RNA分子。

[0086] 所述抗原可位于细胞表面上或者可为细胞内分子。



[0087] 根据一个特定实施方案,CSC标志物为多肽。

[0088] 所述多肽可为细胞表面蛋白(即膜蛋白)。根据一个特定实施方案,细胞表面蛋白为碳水化合物结合分子(例如凝集素)。

[0089] 根据另一个实施方案,所述蛋白为细胞内蛋白(例如可溶性蛋白)。

[0090] 所述多肽可起到一定作用,例如用作转录因子、途径相关标志物等。

[0091] 如本文中所用,短语“体内传代”是指包括原发性肿瘤初始植入动物(例如小鼠)体内,等待一段时间直至继发性肿瘤发展,收获肿瘤细胞并将那些肿瘤细胞植入第二动物体内(即连续移植)的过程。然后可进行后续连续传代。本发明考虑传代至少一代、至少两代、至少三代、至少四代、至少五代、至少六代、至少七代、至少八代、至少九代和至少十代,至少十一代、至少十二代、至少十三代、至少十四代、至少十五代、至少十六代、至少十七代、至少十八代、至少十九代、至少二十代。

[0092] 根据一个特定实施方案,传代5代或更多代,例如5-30代或5-20代之间。

[0093] 根据一个特定实施方案,传代10代或更多代,例如10-30代或10-20代之间。

[0094] 根据一个特定实施方案,肿瘤细胞(第一群肿瘤细胞和/或第二群肿瘤细胞)尚未进行体内传代。

[0095] 根据再一个特定实施方案,肿瘤细胞尚未进行超过一轮体外传代。

[0096] 用于体内传代的动物的实例包括线虫、果蝇、斑马鱼;优选使用实验室哺乳动物如小鼠(裸鼠、SCID小鼠、NOD/SCID小鼠、Beige/SCID小鼠)、大鼠、兔或灵长类动物(例如人)。根据一个实施方案,免疫缺陷动物。根据另一个实施方案,用人进行体内传代。

[0097] 通常,在每次体内传代中使用相同种类的动物。因此,例如,如果使用免疫缺陷小鼠进行初始移植,则使用免疫缺陷小鼠进行后续传代。

[0098] 可植入任何量的原发性肿瘤,只要其在第二动物中引发继发性肿瘤发展。根据一个特定实施方案,将原发性肿瘤切成碎片(例如1-10mm碎片)。优选地,不使用酶解离原发性肿瘤的细胞。另外,优选不切碎或研磨原发性肿瘤的细胞。

[0099] 根据一个特定实施方案,在移植之前原发性肿瘤的细胞尚未进行一轮纯化(例如免疫分离,如使用特异性结合NCAM的抗体通过流式细胞术进行)。进一步地,后续体内传代的异种移植物的细胞也优选尚未进行一轮纯化(例如免疫分离,如使用特异性结合NCAM的抗体通过流式细胞术进行)。

[0100] 可按任何方式在动物体内植入肿瘤,只要其引发肿瘤发展。根据一个实施方案,皮下植入肿瘤。

[0101] 通常,在植入约1-3个月后或在其达到1-3cm的尺寸例如1.5cm直径时收获肿瘤。

[0102] 可通过植入异种移植物的单细胞悬液或异种移植物组织碎片来实现后续异种移植物繁殖。

[0103] 对于单细胞悬液而言,解离细胞的数量将取决于体内传代中所用的动物和肿瘤的侵袭性。通常使用来自新取回的Xn组织的约 $0.5-3 \times 10^6$ 个解离细胞。

[0104] 异种移植物组织碎片通常介于1-10mm之间,更优选地介于2-5mm之间。

[0105] 可以通过在适当介质(优选也含有抗生素)中切碎、研磨或分散,接着用蛋白酶如胶原酶处理来获得单细胞悬液。然后可以在适当介质中捣碎经酶处理的组织。

[0106] 根据一个特定实施方案,第二群肿瘤细胞是人原发性肿瘤的非传代细胞。根据另



一个实施方案,第二群肿瘤细胞已进行一轮传代。根据另一个实施方案,第二群肿瘤细胞已进行两轮传代。根据另一个实施方案,第二群肿瘤细胞已进行三轮传代。根据另一个实施方案,第二群肿瘤细胞已进行四轮传代。根据另一个实施方案,第二群肿瘤细胞已进行超过五轮传代。

[0107] 第一群肿瘤细胞至少已进行一轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少两轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少三轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少四轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少五轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少六轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少七轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少八轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少九轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少十轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少十五轮体内传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行至少二十轮体内传代。

[0108] 通常,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的5000个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少5倍。

[0109] 如本文这所用,术语“异种移植”是指将来自一个种、属或家族的个体的组织或器官手术移植或植入到另一个种、属或家族的个体中。

[0110] 优选地,在至少2只动物,例如3只动物、5只动物或更优选甚至10只动物中测定引发晚期异种移植的频率,以便得到统计上显著的数字。

[0111] 因此,举例而言,如果第二群肿瘤细胞在试验的10小鼠中的1只中引发晚期异种移植,则第一群肿瘤细胞应进行足够的体内传代,使得使用相同数量的肿瘤细胞在10小鼠中的至少5只中引发晚期异种移植。通常,用于引发晚期异种移植的肿瘤细胞是在单细胞悬液中。

[0112] 试验是否已经引发晚期异种移植是在本领域技术人员的专业知识范围内。可用于测定是否已经引发异种移植的示例性方法包括总体肿瘤触诊、卡尺、超声引导成像等。

[0113] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的5000个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少10倍。

[0114] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的5000个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少20倍。

[0115] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的1000个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少5倍。

[0116] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的1000个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少10倍。

[0117] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的1000个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增



加至少20倍。

[0118] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的500个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少5倍。

[0119] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的500个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少10倍。

[0120] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的500个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少20倍。

[0121] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的100个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少5倍。

[0122] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的100个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少10倍。

[0123] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的100个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少20倍。

[0124] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的50个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少5倍。

[0125] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的50个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少10倍。

[0126] 根据一个实施方案,第一群肿瘤细胞已进行足够的体内传代,使得使用所述第一群传代细胞的50个细胞引发晚期异种移植的频率与人原发性肿瘤的非传代细胞相比增加至少20倍。

[0127] 通常,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行一轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行两轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行三轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行四轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行五轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行六轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行七轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行八轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行九轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行十轮传代。根据另一个实施方案,第一群肿瘤细胞已经比第二群肿瘤细胞多进行十轮以上的传代。

[0128] 在一个实施方案中,第一群肿瘤细胞已经传代,使得存在至少连续两代不显



著增加的明显肿瘤侵袭性表型。

[0129] 应认识到在初始传代期间,肿瘤侵袭性表型的增长率很高。经过后续传代,肿瘤侵袭性表型的增长率减缓,直到特定代数,达到稳定状态。此时肿瘤侵袭性表型的水平保持不变或者经过后续传代甚至可能降低。

[0130] 发明人考虑使肿瘤传代许多代,使得肿瘤侵袭性表型达到稳定状态。稳定状态下肿瘤侵袭性表型的变化优选不大于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或甚至1%。

[0131] 可以根据本发明的这个方面测量的肿瘤侵袭性表型的实例包括但不限于:癌细胞标志物的水平、基因表达谱、侵入性水平、转移能力、转移水平、获取异种移植物的时间(即在动物模型中异种移植物产生特定尺寸的肿瘤的时间)、在动物模型中产生特定尺寸的异种移植物所需的细胞数量。可测量的另外的肿瘤侵袭性表型包括染色体稳定性、激酶活性、细胞粘附、凋亡、癌细胞生长、细胞周期蛋白生成、细胞增殖、癌细胞生长、测量克隆形成(clonogenicity)(软琼脂测定法)、测量锚定不依赖性生长、测量细胞周期调控、测量癌细胞运动性、测量血管生成及测量细胞死亡等。

[0132] 测量可以在体内(即在动物模型中)或在体外(例如在细胞培养物中)实现。

[0133] 细胞增殖测定法包括但不限于MTT测定法(例如,Vybrant<sup>TM</sup> MTT细胞增殖测定试剂盒(Invitrogen));BrdU掺入测定法(例如,Absolute-S SBIP测定法(Invitrogen));测量细胞内ATP水平(该测定法的商业形式包括ATPLite<sup>TM</sup>-M,1,000测定试剂盒(PerkinElmer)和ATP细胞活力测定试剂盒(BioVision));DiOc18测定法,一种可透过膜的染料(Invitrogen);葡萄糖-6-磷酸脱氢酶活性测定法(例如,Vibrant细胞毒性测定法(Invitrogen));测量细胞LDH活性;及<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入法和细胞滴度Glo测定法(Promega)。

[0134] 细胞周期进展可以通过溴脱氧尿苷(BRDU)掺入法来测定。此类测定法通过将BRDU掺入到新合成的DNA中来鉴定正在进行DNA合成的细胞群。然后可使用抗BRDU抗体(Hoshino等,1986,int.J.Cancer 38,369;Campana等,1988,J.Immunol.Meth.107,79),或通过其它方式检测新合成的DNA。也可以通过磷酸化组蛋白H3染色来测定细胞增殖,这样通过组蛋白H3的磷酸化鉴定出正在进行有丝分裂的细胞群。使用对组蛋白H3的丝氨酸10残基的磷酸化形式有特异性的抗体来检测组蛋白H3在丝氨酸10处的磷酸化。(Chadlee,D.N.1995,J.Biol.Chem.270:20098-105)。也可以使用<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入法来检查细胞增殖(Chen,J.,1996,Oncogene 13:1395-403;Jeoung,J.,1995,J.Biol.Chem.270:18367-73)。这种测定法允许定量表征S-期DNA合成。在这种测定法中,合成DNA的细胞将使<sup>3</sup>H-胸腺嘧啶核苷掺入到新合成的DNA中。然后可以通过标准技术,例如通过在闪烁计数器(例如,Beckman LS 3800液体闪烁计数器)中对放射性同位素的计数来测量掺入。另一种增殖测定法使用染料Alamar Blue(可从Biosource International得到),其在活细胞中被还原时发荧光并且提供对细胞数量的间接测量(Voytik-Harbin S L等,1998,In Vitro Cell Dev Biol Anim34:239-46)。再一种增殖测定法,即MTS测定法,是基于对工业化学品的体外细胞毒性评估,并且使用可溶性四唑盐(MTS)。MTS测定法可商购并且包括Promega CellTiter 96. RTM. Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay(产品目录号G5421)。也可以通过软琼脂中的菌落形成来测定细胞增殖(Sambrook等,Molecular Cloning,Cold Spring Harbor(1989))。也可以通过测量作为代谢活性细胞指标的ATP水平来测定细胞增



殖。此类测定法可商购并且包括Cell Titer-Glo.TM. ((Promega)。也可以通过流式细胞术来测定细胞周期增殖(Gray J W等(1986) Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med 49:237-55)。可用碘化丙啶为细胞染色并且在流式细胞仪中进行估计以测量在细胞周期的不同阶段细胞的积累。

[0135] 可测量的肿瘤侵袭性表型的另一实例穿过屏障的能力。优选地防止肿瘤细胞穿过屏障。肿瘤细胞的屏障可以是体外的人工屏障或体内的天然屏障。体外屏障包括但不限于细胞外基质涂层膜,如Matrigel。因此,然后如Parish,C.R.等,“A Basement-Membrane Permeability Assay which Correlates with the Metastatic Potential of Tumour Cells,”Int.J.Cancer(1992) 52:378-383所详述,可以在Matrigel侵入测定系统中测试肿瘤细胞抑制肿瘤细胞侵入的能力。Matrigel是一种重组基底膜,其含有IV型胶原、层粘连蛋白(laminin)、硫酸乙酰肝素蛋白聚糖(如基底膜聚糖(perlecan),其特异性结合并定位bFGF、玻连蛋白(vitronectin)以及转化生长因子- $\beta$ . (TGF- $\beta$ .))、尿激酶型纤溶酶原激活物(uPA)、组织纤溶酶原激活物(tPA)和称为纤溶酶原激活物抑制剂1型(PAI-1)的丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)。其它体外和体内转移测定法在现有技术中已有描述,参见,例如1999年8月10日发布的美国专利第5,935,850号,其通过引用并入本文。体内屏障是指受试者体内存在的细胞屏障。

[0136] 肿瘤的生长特征也可以用作肿瘤侵袭性表型(例如,群体倍增能力、倍增时间、至衰老的代数)。基因表达谱(例如,基因芯片阵列;聚合酶链式反应(例如,逆转录酶PCR、实时PCR和常规PCR))也可用于分析肿瘤侵袭性表型。

[0137] 本发明考虑到的另外的测定法在Pouliot N、Pearson HB、Burrows A. Investigating Metastasis Using In Vitro Platforms. In: Madame Curie Bioscience Database [Internet]. Austin (TX): Landes Bioscience; 2000有概述—其内容通过引用并入本文。

[0138] 与肿瘤侵袭性相关性增加的癌细胞标志物的实例包括增殖标志物(例如KI67、E2F2和CDK1)、自我更新多梳基因(例如BMI1、TOP2A和EZH2)和转移标记基因(例如SPARC、CXCR4和LTBP1)。

[0139] 应认识到,进行根据本发明这个方面的方法,允许相对于第二群癌细胞在第一群癌细胞中富集癌症干细胞。本发明考虑到癌症干细胞富集水平为2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍或甚至100倍以上。

[0140] 第二群肿瘤细胞中的癌症干细胞数量可为1000个肿瘤细胞中少于1个,2000个肿瘤细胞中少于1个,3000个肿瘤细胞中少于1个,4000个肿瘤细胞中少于1个,5000个肿瘤细胞中少于1个,6000个肿瘤细胞中少于1个,7000个肿瘤细胞中少于1个,8000个肿瘤细胞中少于1个,9000个肿瘤细胞中少于1个,10000个肿瘤细胞中少于1个。

[0141] 第一群肿瘤细胞中的癌症干细胞数量通常为1000个肿瘤细胞中多于1个,900个肿瘤细胞中多于1个,800个肿瘤细胞中多于1个,700个肿瘤细胞中多于1个,600个肿瘤细胞中多于1个,500个肿瘤细胞中多于1个,400个肿瘤细胞中多于1个,300个肿瘤细胞中多于1个,200个肿瘤细胞中多于1个,100个肿瘤细胞中多于1个或甚至10个肿瘤细胞中多于1个。

[0142] 优选地,第一群肿瘤细胞中癌症干细胞:非癌症干细胞的比率(即癌症干细胞的频率)使得可能通过用可接受的信噪比进行基因表达分析而检测出标志物。应认识到,抗原量



的增加可能是由于每个细胞中抗原的量(例如每个细胞中多肽的表达水平)的增加和/或可能是由于包含抗原的细胞的频率(例如表达所述多肽的细胞的数量)的增加。

[0143] 与第二群肿瘤细胞中抗原的量相比,第一群肿瘤细胞中抗原的量的总体增量通常为至少2倍、至少3倍、至少4倍或甚至至少5倍。

[0144] 包含抗原的细胞频率的增加可以是增加2倍、增加3倍、增加4倍、增加5倍、增加6倍、增加7倍、增加8倍、增加9倍、增加10倍、增加20倍、增加30倍、增加40倍、增加50倍、增加60倍、增加70倍、增加80倍、增加90倍、增加100倍或更多。

[0145] 下文提供了分析蛋白质表达的方法。应认识到该方法可以在RNA水平或蛋白质水平进行。

[0146] 检测RNA表达水平的方法

[0147] 在本发明一些实施方案的细胞中RNA的表达水平可以使用本领域已知的方法测定。

[0148] Northern印迹分析:这种方法涉及检测RNA混合物中的特定RNA。通过用防止碱基对之间氢键结合的试剂(例如,甲醛)处理使RNA样品变性,确保所有RNA分子具有未折叠的线性构象。然后根据尺寸通过凝胶电泳分离单独的RNA分子并转移到基于硝酸纤维素或尼龙的膜上,变性RNA附着于该膜。然后将该膜暴露于标记DN探针。可使用放射性同位素或酶联核苷酸来标记探针。可以使用放射自显影术、比色反应或化学发光进行检测。这种方法允许量化特定RNA分子的量并通过膜上表示电泳期间在凝胶中的迁移距离的相对位置测定其同一性。

[0149] RT-PCR分析:这种方法使用相对罕见RNA分子的PCR扩增。首先,从细胞中纯化RNA分子并使用逆转录酶(如MMLV-RT)和引物(如寡dT、随机六聚体或基因特异性引物)转化为互补DNA(cDNA)。然后通过应用基因特异性引物和Taq DNA聚合酶,在PCR仪中进行PCR扩增反应。本领域的技术人员能够选择基因特异性引物的长度和序列及适于检测特定RNA分子的PCR条件(即,退火温度、循环次数等)。应认识到,可通过调节PCR循环次数并且将扩增产物与已知对照做比较而采用半定量RT-PCR反应。

[0150] RNA原位杂交染色:在这种方法中DNA或RNA探针附着于细胞中存在的RNA分子。通常,首先将细胞固定至显微镜载玻片以保护细胞结构和防止RNA分子降解,然后经受含有标记探针的杂交缓冲液。杂交缓冲液包括使得DNA或RNA探针与其原位靶mRNA分子的特异性杂交成为可能,同时避免探针的非特异性结合的试剂,如甲酰胺和盐(例如,氯化钠和柠檬酸钠)。本领域的技术人员能够对特定探针和细胞类型调节杂交条件(即,温度、盐和甲酰胺的浓度等)。杂交之后,洗掉所有未结合的探针并且使用已知方法检测结合的探针。例如,如果使用放射性标记探针,则使载玻片经受照相乳剂,其显示使用放射性标记探针产生的信号;如果探针用酶标记,则添加酶特异性底物以形成比色反应;如果探针使用荧光标记来标记,则使用荧光显微镜来显示结合的探针;如果探针使用标签(例如地高辛(digoxigenin)、生物素等)来标记,则可以在与可使用已知方法检测的标签特异性抗体的相互作用之后检测结合的探针。

[0151] 原位RT-PCR染色:在Nuovo GJ等[Intracellular localization of polymerase chain reaction(PCR)-amplified hepatitis C cDNA.Am J Surg Pathol.1993,17:683-90]和Komminoth P等[Evaluation of methods for hepatitis C virus detection in



archival liver biopsies.Comparison of histology,immunohistochemistry,in situ hybridization,reverse transcriptase polymerase chain reaction(RT-PCR)and in situ RT-PCR.Pathol Res Pract.1994,190:1017-25]中描述了这种方法。简言之,通过将标记的核苷酸掺入到PCR反应中对固定细胞进行RT-PCR反应。该反应使用特定原位RT-PCR装置如可从Arcturus Engineering (Mountainview,CA)获得的激光捕获显微解剖PixCell I LCM系统进行。

[0152] DNA微阵列/DNA芯片:可以使用DNA微阵列同时分析成千上万个基因的表达,允许分析生物在特定发育过程或生理反应期间的完整转录程序。DNA微阵列由成千上万个附着在支撑物如显微镜载玻片表面上的密集区的单独基因序列组成。已经开发了各种方法用于制备DNA微阵列。在一种方法中,单独PCR扩增每个基因的编码区的大约1千碱基片段。采用机器人装置将每种扩增的DNA样品涂敷到显微镜载玻片表面上的密集区,随后通过热和化学处理以使DNA序列与支撑物表面结合并使其变性。通常,此类阵列约为2x2cm并且含有约6000个单独的核酸点。在该技术的变型中,由与支撑物表面共价结合的初始核苷酸合成了通常长度为20个核苷酸的多个DNA寡核苷酸,使得在支撑物表面上的小正方形区域中合成数以万计的相同寡核苷酸。在载玻片的相邻区域中合成来自单个基因的多个寡核苷酸序列,以分析该基因的表达。因此,在一张载玻片上可以展示成千上万个基因。合成寡核苷酸的此类阵列在本领域中可称为“DNA芯片”,与如上所述的“DNA微阵列”相对[Lodish等(编辑).章节7.8:DNA Microarrays:Analyzing Genome-Wide Expression.In:Molecular Cell Biology,,第4版,W.H.Freeman,New York.(2000)]。

[0153] 寡核苷酸微阵列-在这种方法中,能够与本发明一些实施方案的多核苷酸特异性杂交的寡核苷酸探针附着于固体表面(例如,玻璃晶片)。每个寡核苷酸探针长度为大约20-25个核酸。为检测特定细胞样品(例如,血细胞)中本发明一些实施方案的多核苷酸的表达模式,使用本领域已知的方法(使用例如TRIZOL溶液,Gibco BRL,USA)从细胞样品中提取RNA。杂交可以使用经标记的寡核苷酸探针(例如,5'-生物素化探针)或经标记的互补DNA(cDNA)或RNA(cRNA)片段进行。简言之,使用逆转录酶(RT)(例如,Superscript II RT)、DNA连接酶和DNA聚合酶I,全部根据生产商的说明(Invitrogen Life Technologies, Frederick,MD,USA)由RNA制备双链cDNA。为制备经标记cRNA,使双链cDNA在生物素化核苷酸的存在下使用(例如)BioArray高产RNA转录产物标记试剂盒(Enzo,Diagnostics, Affymetix Santa Clara CA)进行体外转录反应。为了有效杂交,可通过在94℃下在40mM Tris乙酸盐(pH 8.1)、100mM乙酸钾和30mM乙酸镁中孵育RNA 35分钟使经标记cRNA片段化。杂交后,洗涤微阵列并且使用共聚焦激光荧光扫描仪扫描杂交信号,该扫描仪测量与探针阵列结合的经标记cRNA发射的荧光强度。

[0154] 例如,在Affymetrix微阵列(Affymetrix®,Santa Clara,CA)中,阵列上的每个基因由一系列不同的寡核苷酸探针代表,其中,每个探针对由完美匹配的寡核苷酸和错配寡核苷酸组成。虽然完美匹配探针具有与特定基因精确互补的序列,从而使得特定基因的表达水平的测量成为可能,但错配探针与完美匹配探针的差异之处在于中心碱基位置处的单个碱基取代。使用Agilent扫描仪扫描杂交信号,并且Microarray Suite软件将错配探针产生的非特异性信号从完美匹配探针产生的信号中减去。

[0155] 检测蛋白质表达和/或活性的方法



[0156] 可以使用本领域已知的方法测定在本发明一些实施方案的培养物的细胞中表达的蛋白质的表达和/或活性水平。

[0157] 酶联免疫吸附测定 (ELISA): 这种方法涉及将含有蛋白质底物的样品 (例如, 固定细胞或蛋白质溶液) 固定到表面如微量滴定板孔。涂敷与酶偶合的底物特异性抗体并使其与底物结合。然后采用与抗体偶合的酶通过比色反应监测并量化抗体的存在。这种方法中通常所采用的酶包括辣根过氧化酶和碱性磷酸酶。若良好校准并且在反应的线性范围之内, 样品中存在的底物的量与产生的颜色的量成正比。通常采用底物标准品以提高定量精确性。

[0158] 蛋白质印迹 (Western blot): 这种方法涉及借助于丙烯酰胺凝胶将底物与其它蛋白质分开, 接着将底物转移到膜 (例如, 尼龙 (nylon) 或 PVDF) 上。然后通过对底物有特异性的抗体检测底物的存在, 转用抗体结合试剂来检测所述抗体。抗体结合试剂可以是, 例如蛋白 A 或其它抗体。抗体结合试剂可以如上文所述经放射性标记或经酶联。可以使用放射自显影术、比色反应或化学发光进行检测。这种方法允许量化底物的量并通过膜上表示电泳期间在丙烯酰胺凝胶中的迁移距离的相对位置测定其同一性。

[0159] 放射免疫测定法 (RIA): 在一种型式, 这种方法涉及用固定在可沉淀载体如琼脂糖珠粒上的特异性抗体和放射性标记的抗体结合蛋白 (例如, 经  $I^{125}$  标记的蛋白 A) 使所需蛋白 (即, 底物) 沉淀。沉淀团中的计数数量与底物的量成正比。

[0160] 在 RIA 的替代性型式, 采用经标记的底物和未标记的抗体结合蛋白。按不同量添加含有未知量的底物的样品。来自经标记的底物的沉淀计数的减少与所加样品中底物的量成正比。

[0161] 荧光活化细胞分选 (FACS): 这种方法涉及通过底物特异性抗体检测细胞内的原位底物。底物特异性抗体与荧光团联接。借助于细胞分选仪进行检测, 细胞分选仪读取当细胞穿过光束时从细胞发射的光的波长。这种方法可同时采用两种或更多种抗体。

[0162] 免疫组织化学分析: 这种方法涉及通过底物特异性抗体检测固定细胞内的原位底物。底物特异性抗体可经酶联或与荧光团联接。通过显微镜检查法和主观或自动评价进行检测。如果采用酶联抗体, 则可需要比色反应。应认识到常常在免疫组织化学分析之后, 使用例如苏木精或吉姆萨染液 (Hematoxyline or Giemsa stain) 为细胞核复染。

[0163] 原位活性测定法: 根据这种方法, 在含活性酶的细胞上涂敷生色底物并且所述酶催化底物被分解生成通过光学或荧光显微镜可见的生色产物的反应。

[0164] 体外活性测定法: 在这些方法中测量提取自细胞的蛋白质混合物中特定酶的活性。该活性可以在分光光度计孔中使用比色法测量或者可以在非变性丙烯酰胺凝胶 (即, 活性凝胶) 中测量。电泳后, 将凝胶浸入含有底物和比色试剂的溶液中。所产生的染色条带与目标蛋白的酶活性相对应。如果良好校准并且在反应的线性范围之内, 样品中存在的酶的量与产生的颜色的量成正比。通常采用酶标准品以提高定量精确性。

[0165] 一经鉴定了癌症干细胞标志物, 发明人就提出此类标志物可用于分离癌症干细胞。考虑到的方法包括基于离心的方法、淘析 (elutriation)、密度梯度分离、分离性输血 (apheresis)、亲和性选择、淘选 (panning)、基于免疫学的系统如荧光活化细胞分选 (FACS); 免疫亲和性交换; 非光学细胞分选方法, 包括使用结合特定细胞类型的抗体涂层磁珠以分离所需细胞的磁性细胞分选。



[0166] 另外,发明人考虑到为了治疗的目的而靶向CSC标志物。

[0167] 进一步地,发明人提出为了诊断、确定最佳治疗、监测治疗功效和/或分期的目的而分析标志物的存在和/或水平。

[0168] 因此,根据本发明的另一方面,通过了一种诊断受试者中的癌症的方法,其包括分析所述受试者肿瘤中抗原的存在,其中所述抗原的存在表明为癌症,其中肿瘤的体内传代细胞:肿瘤的原代细胞中所述抗原的量的比率高于预定水平。

[0169] 如本文中所用,术语“诊断”是指将受试者分类为患有癌症并且包括为癌症分类,确定癌症的严重程度(等级或时期),监测癌症进展,预测癌症的结果和/或恢复的希望。

[0170] 本发明的方法在检测表面上健康的个体的早期癌症中特别有用。

[0171] 受试者可以是正在进行常规健康检查的健康动物或人类受试者。可选地,受试者可处于患上癌症的风险中(例如,有遗传素因的受试者、有癌症医疗史和/或家族史的受试者、已经暴露于致癌物、职业性危害、环境危害的受试者]和/或显示出癌症可疑临床体征的受试者[例如,便血或黑粪症、不明原因的疼痛、发汗、不明原因的发热、不明原因的体重减轻至厌食、排便习惯改变(便秘和/或腹泻)、里急后重(排便不全的感觉,特别是对于直肠癌而言)、贫血和/或全身无力)。

[0172] CSC的量将取决于癌症的类型和时期。在一些实施方案中,CSC标志物的水平表明为癌症。在其它实施方案中,CSC标志物的存在(与其水平无关)表明为癌症。

[0173] 肿瘤的体内传代细胞:肿瘤的原代细胞中所述抗原的表达比率至少高于2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、50:1或甚至100:1。

[0174] 肿瘤的体内传代细胞优选已经传代至少一代、至少两代、至少三代、至少四代、至少五代、至少六代、至少七代、至少八代、至少九代和至少十代,至少十一代、至少十二代、至少十三代、至少十四代、至少十五代、至少十六代、至少十七代、至少十八代、至少十九代、至少二十代。

[0175] 分析CSC标志物的表达可以使用上文描述的方法进行。

[0176] 根据一个特定实施方案,所述分析使用识别CSC标志物的抗体实现。

[0177] 各种类型的可检测或报告部分可与抗体缀合。这些包括但不限于放射性同位素(如<sup>[125]</sup>碘)、磷光化学品、化学发光化学品、荧光化学品(荧光团)、酶、荧光多肽、亲和性标签和可通过正电子发射断层扫描术(PET)或磁共振成像(MRI)检测的分子(造影剂)。

[0178] 合适的荧光团的实例包括但不限于藻红蛋白(PE)、异硫氰酸荧光素(FITC)、Cy-铬、若丹明(rhodamine)、绿色荧光蛋白(GFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)、德州红(Texas red)、PE-Cy5等。另外的关于荧光团选择的指导、使荧光团联接到各种类型的分子的方法,参见Richard P.Haugland,“Molecular Probes:Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals 1992-1994”,第5版,Molecular Probes,Inc.(1994);Oncoimmunin Inc.的美国专利第6,037,137号;Hermanson,“Bioconjugate Techniques”,Academic Press New York,N.Y.(1995);Kay M.等,1995.Biochemistry 34:293;Stubbs等,1996.Biochemistry 35:937;Gakamsky D.等,“Evaluating Receptor Stoichiometry by Fluorescence Resonance Energy Transfer,”在“Receptors:A Practical Approach,”第2版中,Stanford C.和Horton R.(编辑),Oxford University Press,UK.(2001);Targesome,Inc.的美国专利第6,350,466号]。与荧光可检测部分缀合时,可用于检测抗体



的荧光检测方法包括,例如荧光活化细胞分选(FACS)、免疫荧光共聚焦显微镜检查法、荧光原位杂交(FISH)和荧光共振能量转移(FRET)。

[0179] 许多类型的酶可附着于抗体[例如,辣根过氧化物酶(HRP)、 $\beta$ -半乳糖苷酶和碱性磷酸酶(AP)]并且可以使用ELISA(例如,在溶液中)、酶联免疫组织化学测定法(例如,在固定组织中)、酶联化学发光测定法(例如,在电泳分离的蛋白质混合物中)或本领域已知的其它方法[参见例如,Khatkhatay MI.和Desai M.,1999.J Immunoassay 20:151-83;Wisdom GB.,1994.Methods Mol Biol.32:433-40;Ishikawa E.等,1983.J Immunoassay 4:209-327;Oellerich M.,1980.J Clin Chem Clin Biochem.18:197-208;Schuurs AH.和van Weemen BK.,1980.J Immunoassay1:229-49)进行酶缀合抗体的检测。

[0180] 示例性的可检测部分包括但不限于绿色荧光蛋白、碱性磷酸酶、过氧化物酶、组氨酸标签、生物素、橙色荧光蛋白和链霉亲和素。

[0181] 应认识到,CSC的鉴定具有多种应用,其涉及单独优化癌症治疗、监测受试者中的抗癌治疗、为受试者确定抗癌治疗及鉴定能够治疗癌症的试剂。

[0182] 因此,根据本发明的另一方面,提供了一种监测受试者中的癌症治疗的方法,其包括分析在所述癌症治疗施用之后所述受试者的原发性肿瘤中抗原的水平,其中与所述癌症治疗施用之前所述抗原的水平相比,所述抗原的水平降低表明为治疗性治疗,其中肿瘤的体内传代细胞中所述抗原的量:肿瘤的原代细胞中所述抗原的量高于预定水平。

[0183] 根据本发明的这个方面分析的癌症治疗可以是如下文所进一步描述的试剂或条件。

[0184] 如本文中所用,术语“试剂”是指包含生物试剂或化学试剂的试验组合物。

[0185] 可根据本发明的方法作为潜在抗癌剂测试的生物试剂的实例包括但不限于核酸,例如多核苷酸、核酶、siRNA和反义分子(包括但不限于具有改变的骨架和/或bass结构或其它化学修饰的RNA、DNA、RNA/DNA杂种、肽核酸和多核苷酸类似物);蛋白质、多肽(例如肽)、碳水化合物、脂质和“小分子”药物候选物。“小分子”可以是,例如,分子量小于约10,000道尔顿,优选小于约5,000道尔顿,及最优选小于约1,500道尔顿的天然存在的化合物(例如,源自植物提取物、微生物发酵液等的化合物)或合成有机或有机金属化合物。

[0186] 可根据本发明的方法作为潜在抗癌剂测试的条件的实例包括但不限于辐射暴露(如 $\gamma$ 辐射、UV辐射、X辐射)。

[0187] 根据本发明这个方面的一个实施方案,“CSC标志物”也在接触癌症治疗之前受测定,以便可在治疗前后进行比较。

[0188] 根据本发明这个方面的另一个实施方案,使所述试剂经受癌细胞足够长的时间才具有抗癌效果。

[0189] 正如所提到的那样,对癌症干细胞标志物的鉴定也允许治疗表达此类标志物的癌症。

[0190] 如本文中所用,术语“治疗”包括消除、基本上抑制、减缓或逆转病状的进展,基本上改善病状的临床或美学症状或基本上防止病状的临床或美学症状的出现。

[0191] 应认识到,如果癌症干细胞标志物为细胞表面抗原,则发明人考虑使用能够结合标志物的分子(例如抗体),使治疗性部分靶向那些分子。治疗性部分可以是,例如,细胞毒性部分、毒性部分、细胞因子部分和包含对本发明抗体的不同特异性的二次抗体部分。



[0192] 优选地,所述抗体特异性结合CSC标志物的至少一个表位。如本文中所用,术语“表位”是指抗原上与抗体互补位结合的任何抗原决定簇。

[0193] 表位决定簇通常由诸如氨基酸或碳水化合物侧链等分子的化学活性表面基团(groupings)组成并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

[0194] 术语“抗体”如本文中所用包括能够结合巨噬细胞的完整分子及其功能片段,如Fab、F(ab')<sub>2</sub>和Fv。这些功能抗体片段定义如下:(1) Fab,含有抗体的单价抗原结合片段的片段,可以通过下述方式产生:用木瓜蛋白酶消化全抗体以产生完整轻链和一条重链的一部分;(2) Fab',抗体分子的片段,可以通过下述方式产生:用胃蛋白酶处理全抗体,接着还原以产生完整轻链和一部分重链;每个抗体分子获得两个Fab'片段;(3) (Fab')<sub>2</sub>,抗体分子的片段,可以通过下述方式产生:用胃蛋白酶处理全抗体,无需后续还原;(Fab')<sub>2</sub>是通过两个二硫键结合在一起的两个Fab'片段的二聚体;(4) Fv,定义为含有作为两条链表达的轻链可变区和重链可变区的基因工程化片段;及(5) 单链抗体(“SCA”),含有轻链可变区和重链可变区,通过合适的多肽接头连接成基因融合单链分子的基因工程化分子。

[0195] 下文,表1中提供了可与本发明的抗体缀合的治疗性部分的非限制性实例。

[0196] 表1

[0197]

核酸序列	氨基酸序列	治疗性部分
EU090068	ABU63124	假单胞菌外毒素
AY820132.1	AAV70486	白喉毒素
A02159	CAA00227	白细胞介素2
X03884	P07766	CD3
NM_000569.6	NP_000560.5	CD16
NM_000589.2	NP_000580.1	白细胞介素4
K02883	P01892	HLA-A2
M57627	P22301	白细胞介素10
EQ975183	EEF27734	蓖麻毒素

[0198] 表1

[0199] 也可以使用本领域中广泛实践的标准化学合成技术[参见例如, [hypertexttransferprotocol://worldwideweb\(dot\)chemistry\(dot\)org/portal/Chemistry](http://hypertexttransferprotocol://worldwideweb(dot)chemistry(dot)org/portal/Chemistry)],例如使用任何合适的化学连接(直接或间接的),如经由肽键(当功能部分为多肽时)或经由与插入接头元件(如接头肽)或其它化学部分(如有机聚合物)的共价键合,使治疗性部分附着于本发明的抗体。嵌合肽可经由在肽的羧基(C)或氨基(N)末端键合,或经由与内部化学基团如直链、支链或环状侧链、内部碳原子或氮原子等键合而联接。在美国专利第3,940,475、4,289,747和4,376,110号中详细地提供了抗体荧光标记的描述。

[0200] 识别CSC标志物的抗体可附着于包含细胞毒性剂的颗粒。

[0201] 如本文中所用,短语“封装颗粒”是指特征在于存在由形成一个或多个内部孔隙的脂质和/或脂肪酸配制的一种或多种壁或膜的实体。该壁或膜可以是同心的或另外的。囊泡的壁或膜可基本上为固体(均匀),或称为,例如脂质体、脂质球、纳米脂质体、颗粒、胶束、气泡、微泡、微球、纳米球、纳米结构、微珠、微胶囊、气凝胶、笼形包合物结合囊泡、六角/立方



体/六角II相结构等。

[0202] 封装颗粒中所包括的脂质组分可包括经靶向分子衍生化的脂质,或具有可以根据本发明,经预成型颗粒中的靶向分子衍生化的极性头部化学基团的脂质。

[0203] 使靶向部分与封装颗粒共价附着的其它方法包括使用酰胺、酯或醚键、链霉亲和素和生物素(参见,例如美国专利第5,171,578号)及肽经碳二亚胺活化,接着偶合至活化羧基(例如美国专利第5,204,096号)。美国专利第5,258,499号中公开了可用于使肽与脂质共价结合的方法的其它实例。

[0204] 另外,本发明考虑使用能够下调CSC标志物的表达的试剂下调CSC标志物的表达以治疗癌症。

[0205] 下调可以在蛋白质水平(例如使用中和抗体)或RNA水平(例如使用siRNA、DNA酶、核酶、miRNA等)实现。

[0206] 根据本发明的一个特定方面,所述癌症为非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤(ATRT)。可用于治疗这种癌症的示例性试剂是靶向(并下调)下列多肽中的至少一种的那些试剂:信号素3C(SEMA3C)、赖氨酰氧化酶(LOX)、糖蛋白M6A(GPM6A)、肝细胞生长因子(HGF/SF)和醛脱氢酶1(ALDH1),从而治疗ATRT。

[0207] 因此,可用于治疗ATRT的示例性试剂是靶向(并下调)赖氨酰氧化酶(LOX)的一种试剂-例如β-氨基丙腈(BAPN)。

[0208] 该试剂可自身或作为药物组合物的一部分施用。

[0209] 如本文中所用,“药物组合物”是指本文所述一种或多种活性成分与其它化学组分如生理上合适的载体和赋形剂的制剂。药物组合物的用途是利于向生物施用化合物。

[0210] 在本文中术语“活性成分”是指可说明生物学效应的组分。

[0211] 在下文中,可互换使用的短语“生理上可接受的载体”和“药学上可接受的载体”是指不会对生物产生明显刺激并且不会消除所施化合物的生物学活性和性质的载体或稀释剂。在这些短语下包括佐剂。

[0212] 在本文中术语“赋形剂”是指添加到药物组合物中以进一步促进活性成分的施用的惰性物质。赋形剂的实例包括但不限于碳酸钙、磷酸钙、各种糖和各类淀粉、纤维素衍生物、明胶、植物油和聚乙二醇。

[0213] 在通过引用并入本文的“Remington's Pharmaceutical Sciences,”Mack Publishing Co.,Easton,PA最新版中可以找到用于药物配制和施用的技术。

[0214] 合适的施用途径可以(例如)包括口服、直肠、经粘膜,尤其是经鼻、肠道或肠胃外递送,包括肌肉内、皮下和髓内注射以及鞘内、直接心室内、心脏内注射到(例如)右或左室腔、常见冠状动脉,静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0215] 向中枢神经系统(CNS)递送药物的常规方法包括:神经外科策略(例如,脑内注射或脑室内输注);对试剂的分子操作(例如,产生包含对内皮细胞表面分子有亲和力的转运肽连同自身不能穿过BBB的试剂的嵌合融合蛋白)以试图开拓BBB的其中一条内源转运途径;设计用于增加试剂的脂溶性的药理学策略(例如,水溶性试剂与脂质或胆固醇载体缀合);及通过高渗破坏(由于向颈动脉输注甘露醇溶液或使用生物活性剂如血管紧张肽而引起)来暂时性破坏BBB完整性。然而,这些策略中的每一种都有局限性,如与侵入性手术相关的固有风险,内源转运系统固有的局限性所强加的尺寸局限性,与全身性施用由可在CNS外



有活性的载体基序组成的嵌合分子相关的潜在不良生物副作用,及在BBB被破坏的脑部区域内有脑部损伤的可能性风险,这致使所述策略成为次优递送方法。

[0216] 可选地,药物组合物可以局部而非全身性方式施用,例如经由向患者的组织区域直接注射药物组合物。

[0217] 可通过本领域公知的工艺,例如借助于常规混合、溶解、粒化、制糖丸、淘洗、乳化、封装、包埋或冻干工艺来生产本发明的药物组合物。

[0218] 因此供根据本发明使用的药物组合物可按常规方式使用一种或多种生理上可接受的载体,包括利于将活性成分加工成可以在药学上使用的制剂的赋形剂和助剂配制。适当的配方取决于所选施用途径。

[0219] 对于注射而言,药物组合物的活性成分可配制于水溶液,优选生理上相容的缓冲液如汉克氏液(Hank's solution)、林格氏液(Ringer's solution)或生理盐缓冲液中。对于经粘膜施用而言,在配制中使用适于待透过屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域已知的。

[0220] 对于口服施用而言,可通过将活性化合物与本领域公知的药学上可接受的载体合并而容易地配制药物组合物。此类载体使得能够将药物组合物配制成片剂、丸剂、糖衣丸、胶囊、液体、凝胶、糖浆、膏剂、混悬剂等,供患者口服。供口服用的药理学制剂可以使用固体赋形剂制成,任选地在添加合适助剂之后(若需要)研磨所得混合物,并且加工颗粒混合物,以获得片剂或糖衣丸核。合适的赋形剂尤其是填充剂如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠;和/或生理上可接受的聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。若需要,可以添加崩解剂,如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐如藻酸钠。

[0221] 为糖衣丸核提供合适的包衣。为此,可以使用浓糖汁,其可任选地含有阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波姆凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇、二氧化钛、漆溶液及合适的溶剂或溶剂混合物。可以向片剂或糖衣丸包衣中添加染料或色素以鉴别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0222] 可口服使用的药物组合物包括由明胶制成的推入配合胶囊以及由明胶和增塑剂(如甘油或山梨醇)制成的软、密封胶囊。推入配合胶囊可含有与填充剂(如乳糖)、粘合剂(如淀粉)、润滑剂(如滑石或硬脂酸镁)和任选地稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性成分可溶解或悬浮在合适的液体,如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇中。另外,可添加稳定剂。供口服施用的所有配制剂应该呈适合所选施用途径的剂量。

[0223] 对于口腔含服施用而言,所述组合物可呈以常规方式配制的片剂或锭剂形式。

[0224] 对于通过鼻吸入施用而言,供根据本发明使用的活性成分便于呈气溶胶喷雾呈现形式使用合适的推进剂,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷或二氧化碳从加压包或雾化器中递送。在加压气溶胶的情况下,可通过提供一阀门以递送计量的量来确定剂量单位。可配制例如用于分配器中的明胶的胶囊和药盒,其含有所述化合物和合适的粉末基质如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0225] 本文描述的药物组合物可配制用于肠胃外施用,例如通过快速浓注或连续输注。供注射的配制剂可呈单位剂量形式,例如在安瓿或多剂量容器中任选地与添加的防腐剂一起呈现。该组合物可以是在油性或水性媒介物中的混悬液、溶液或乳液,并且可含配方剂,



如助悬剂、稳定剂和/或分散剂。

[0226] 供肠胃外施用的药物组合物包括呈水溶性形式的活性制剂水溶液。另外,可将活性成分的混悬液制备成适当的油性或水基注射混悬液。合适的亲脂性溶剂或媒介物包括脂肪油如芝麻油,或合成脂肪酸酯如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射混悬液可含有增加混悬液粘度的物质,如羧甲基纤维素钠、山梨醇或葡聚糖。任选地,混悬液还可含合适的稳定剂或增加活性成分的溶解度以允许制备高浓缩溶液的试剂。

[0227] 可选地,活性成分可呈粉末形式以在使用之前,用合适的媒介物,例如无菌、无热源水基溶液复水。

[0228] 也可以使用(例如)常规栓剂基质如可可油或其它甘油酯,将本发明的药物组合物配制成直肠组合物如栓剂或保留灌肠剂。

[0229] 适合用于本发明情况的药物组合物包括其中含有有效达到预期目的的量的活性成分的组合物。更具体地,治疗有效量意指有效预防、减轻或改善病症症状或延迟受治受试者的存活期的活性成分的量。

[0230] 治疗有效量的测定是在本领域技术人员的能力范围之内,尤其是根据本文提供的详细公开内容。

[0231] 对于用于本发明方法中的任何制剂而言,治疗有效量或剂量最初均可由体外和细胞培养测定法估计。例如,在动物模型中可以配制一个剂量以达到所需浓度或滴度。此类信息可用于更精确地测定在人类中的有用剂量。

[0232] 可以通过标准制药工序在体外、细胞培养物或实验动物中测定本文描述的活性成分的毒性和治疗功效。从这些体外和细胞培养测定法及动物研究获得的数据可用于配制一系列用于人类的剂量。该剂量可根据采用的剂量形式和利用的施用途径而改变。确切的配方、施用途径和剂量可由个别医师鉴于患者的情况来选择。(参见例如,Fingl等,1975,在“The Pharmacological Basis of Therapeutics”,第1章第1页)。

[0233] 可单独调节剂量和间隔以提供足以诱导或抑制生物学效应的活性成分水平(最低有效浓度,MEC)。MEC对于每种制剂而言将会不同,但是可由体外数据估计。达到MEC所必需的剂量将取决于个体特征和施用途径。检测测定法可用于测定血浆浓度。

[0234] 根据待治病状的严重程度和反应性,给药可以是单次或多次施用,疗程持续几天至几周,直至实现治愈或达到疾病状态减轻。

[0235] 当然,要施用的组合物的量将取决于受治受试者、疾患的严重程度、施用方式、处方医师的判断等。

[0236] 若需要,本发明的组合物可以呈现在包装或分配器装置,如FDA批准的试剂盒中,其可容纳一个或多个含活性成分的单位剂量形式。所述包装可以,例如包含金属或塑料箔,如泡罩包装。所述包装或分配器装置可附有施用说明书。所述包装或分配器也可提供有呈监管药品生产、使用或销售的政府机构所规定形式的与容器相关的通知,该通知反映了该机构对组合物形式或人类或兽医施用的批准。此类通知,例如,可以具有经美国食品和药物管理局对于处方药所批准的标签或具有批准的产品插页。正如以上进一步详述的那样,也可以制备包含配制于相容性药物载体中的本发明制剂的组合物,放置在适当容器中,并标示用于治疗指定病状。

[0237] 术语“包含(comprises)”、“包含(comprising)”、“包括(includes)”、“包括



(including)”、“具有”及其同根词意为“包括但不限于”。该术语涵盖术语“由……组成”和“基本上由……组成”。

[0238] 短语“基本上由……组成”意指所述组合物或方法可包括附加成分和/或步骤,但只有在附加成分和/或步骤不实质性改变要求保护的组合物或方法的基本和新颖特征时。

[0239] 如本文中所用,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一”、“一种(个)”和“所述”包括复数指示物。例如,术语“一种化合物”或“至少一种化合物”可包括多种化合物,包括其混合物。

[0240] 在本申请通篇,本发明的各个实施方案均可呈范围形式呈现。应理解呈范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁而不得解释为对本发明范围的僵化限制。因此,范围的描述应视为已经具体公开了所有可能的子范围以及在该范围内的独立数值。例如,范围的描述如1至6应视为已经具体公开了子范围如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的独立数值,例如1、2、3、4、5和6。不管范围的宽度如何,这都适用。

[0241] 当在本文中指定数值范围时,这意味着包括指定范围内的任何引用数值(小数或整数)。短语“范围介于”第一指定数值和第二指定数值之间及“范围为”第一指定数值“至”第二指定数值在本文中可互换使用并且意为包括第一和第二指定数值以及之间的所有小数和整数数值。

[0242] 如本文中所用,术语“方法”是指用于实现指定任务的方式、手段、技术和工序,包括但不限于化学、药学、生物学、生物化学和医学领域的从业人员已知或易于由已知方式、手段、技术和工序开发的那些方式、手段、技术和工序。

[0243] 词“示例性”在本文中用于意指“用作实例、例子或说明”。描述为“示例性”的任何实施方案不一定被解释为优先于或优于其它实施方案和/或将特征的并入从其它实施方案中排除。

[0244] 词“任选地”在本文中用于意指“在一些实施方案中提供而在其它实施方案中未提供”。除非此类特征冲突,否则本发明的任何特定实施方案均可包括多个“任选”特征。

[0245] 应当理解,为了清楚起见在单独实施方案的上下文中描述的本发明的某些特征也可在单个实施方案中呈组合提供。相反,为简洁起见在单个实施方案的上下文中描述的本发明的各种特征也可单独地或呈任何合适的子组合或如其所应在本发明的任何其它所述实施方案中提供。不得将各个实施方案的上下文中描述的某些特征视为那些实施方案的必需特征,除非没有那些要素该实施方案无效。

[0246] 如上文所述以及如下面的权利要求部分所要求保护的本发明的各个实施方案和方面从以下实施例中得到实验性支持。

[0247] 实施例

[0248] 现参考以下实施例,与以上描述一起以非限制性方式说明本发明的一些实施方案。

[0249] 通常,本文所用的命名和本发明中利用的实验室工序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。在文献中透彻地解释了此类技术。参见,例如,“Molecular Cloning: A laboratory Manual”Sambrook等,(1989);“Current Protocols in Molecular Biology”第I-III卷Ausubel,R.M.编辑(1994);Ausubel等,“Current Protocols in Molecular Biology”,John Wiley and Sons,Baltimore,Maryland(1989);Perbal,“A Practical



Guide to Molecular Cloning”, John Wiley&Sons, New York (1988); Watson等, “Recombinant DNA”, Scientific American Books, New York; Birren等 (编辑) “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series”, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 美国专利第4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659和5,272,057号中阐述的方法; “Cell Biology: A Laboratory Handbook”, 第I-III卷, Cellis, J.E. 编辑 (1994); “Culture of Animal Cells—A Manual of Basic Technique” by Freshney, Wiley-Liss, N.Y. (1994), 第3版; “Current Protocols in Immunology” 第I-III版 Coligan J.E. 编辑 (1994); Stites等 (编辑), “Basic and Clinical Immunology” (第8版), Appleton&Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell和Shiigi (编辑), “Selected Methods in Cellular Immunology”, W.H. Freeman and Co., New York (1980); 在专利和科学文献中广泛地描述了可用免疫测定法, 参见, 例如, 美国专利第3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771和5,281,521号; “Oligonucleotide Synthesis” Gait, M.J. 编辑 (1984); “Nucleic Acid Hybridization” Hames, B.D. 和 Higgins S.J. 编辑 (1985); “Transcription and Translation” Hames, B.D. 和 Higgins S.J. 编辑 (1984); “Animal Cell Culture” Freshney, R.I. 编辑 (1986); “Immobilized Cells and Enzymes” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning” Perbal, B., (1984) 和 “Methods in Enzymology” 第1-317卷, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications”, Academic Press, San Diego, CA (1990); Marshak等, “Strategies for Protein Purification and Characterization—A Laboratory Course Manual” CSHL Press (1996); 其全部通过引用并入, 如同在本文中全面阐述一样。在本文件全篇提供了其它一般参考文献。据信其中的工序在本领域中众所周知并且是为了方便读者而提供。其中所含全部信息通过引用并入本文。

#### [0250] 实施例1

[0251] 作为鉴定、分离和靶向癌症干细胞的平台的非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤异种移植模型的长期繁殖

#### [0252] 材料和方法

[0253] 原发性非典型畸胎样/横纹肌样肿瘤样品: 在1小时手术内从患者获得原发性ATRT样品。根据赫尔辛基宣言 (declaration of Helsinki) 由所涉及的患者的法定监护人授予知情同意。

[0254] 体内异种移植物形成: 动物实验根据舍巴医疗中心动物实验指南 (Guidelines for Animal Experiments of Sheba Medical Center) 进行。如先前所述 (Dekel等, 2006a), 进行对5-8周龄、雌性、非肥胖性糖尿病免疫缺陷 (NOD/SCID) 小鼠的初始ATRT异种移植。简言之, 将原发性ATRT组织切成2-5mm碎片并且皮下植入小鼠背部。将小鼠保持在无病原体的环境中并且每周监测肿瘤生长。每周通过触诊检测继发性肿瘤。在植入大约1-3个月或当肿瘤达到1.5cm直径的尺寸时收获肿瘤。记录每个植入Xn的植入时间、切除时间、重量和体积。立即将Xn组织切成小碎片并且如下进行处理用于进一步实验: (i) 速冻以进行提取的分析物的后续分子表征; (ii) 福尔马林固定和石蜡包埋以进行进一步的免疫组织化学 (IHC) 研究; (iii) 向NOD/SCID小鼠的侧腹皮下植入组织; 及 (iv) 如下所述制备单细胞悬



液以进行后续Xn繁殖和体外实验(体外研究、有限稀释测定法和FACS分选)。

[0255] 通过在含有抗生素(青霉素和链霉素)的伊斯考夫改良的杜尔贝科培养基(IMDM)中切碎样品,接着在37℃下用胶原酶IV处理2小时获得单细胞悬液。使用为胶原酶溶液两倍体积的IMDM研磨经酶处理的组织并且过滤悬液(100 $\mu$ m细胞滤网)并用含抗生素的IMDM洗涤两次。用ACK RBS裂解缓冲液去除红细胞。

[0256] 使用两种方法形成Xn连续传代:1.连续注射大约 $1 \times 10^6$ 个来自新取回的ATRT Xn的解离细胞;在100 $\mu$ l 1:1无血清培养基/Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) 中注射细胞。2.将ATRT Xn组织切成2-5mm碎片并且皮下植入小鼠背部。

[0257] 肿瘤繁殖细胞相对频率的估计:为了评价和比较来自低代和高代的Xn细胞的致瘤活性,向NOD/SCID小鼠的侧腹皮下注射悬浮在100 $\mu$ l PBS和100 $\mu$ l Matrigel中的细胞连续稀释液( $1 \times 10^6$ -50个细胞)。使用ELDA在线软件(bioinfodotwehidotedudotau/software/ellda/)在线计算癌症繁殖细胞的相对频率的估计值。

[0258] 高ALDH细胞中肿瘤繁殖细胞相对频率的估计:为了测定高ALDH细胞对应于低ALDH细胞中肿瘤繁殖细胞的频率,如上所述使用有限稀释测定法。简言之,根据得自Xn的细胞中的ALDH1高表达进行细胞分选后,将分选的群体[ALDH1<sup>高</sup>、ALDH1<sup>低</sup>和未分选细胞(US)]收集到无菌DMEM中。使细胞重新悬浮在100 $\mu$ l PBS和100 $\mu$ l Matrigel中并于连续稀释液中皮下注入到NOD/SCID小鼠的侧腹。

[0259] 荧光活化细胞分选(FACS)分析:如先前所述(Dekel等,2006a),进行对原发性ATRT细胞和后续Xn来源的新鲜细胞的FACS分析。将小肿瘤碎片解离成单细胞,在4℃下在RBC裂解液(由8.3g NH<sub>4</sub>Cl、1.0g KHC<sub>3</sub>O<sub>3</sub>、1.8ml于双蒸馏H<sub>2</sub>O中的5%EDTA组成)中按1ml/5ml细胞悬液比率洗涤。然后在最终离心之前通过30 $\mu$ m尼龙网过滤细胞。使全部细胞重新悬浮在由在PBS中的0.5%牛血清白蛋白(BSA;Sigma-Aldrich, St. Louis)和0.02%叠氮化钠组成的FACS缓冲液中。通过按每 $10^6$ 个细胞5 $\mu$ g抗体的浓度用荧光染料缀合抗体在4℃下于黑暗中孵育30分钟来标记表面标志物抗原[CD24(eBioscience, 120247-42)、CD34(Miltenyi, 3008100)、CD56(eBioscience, 1205942)、CD90(Beckman Coulter, IM3600U)]以防抗体内化。另外,使用7-氨基-放线菌素D(7AAD;eBioscience, San Diego, CA)进行活细胞门控。所有洗涤步骤均在FACS缓冲液中进行。所有定量测量均相比于IgG同型抗体(eBioscience, San Diego, CA)进行。如先前所述(Christophe Ginestier等,2007;Dylla等,2008),对具有高ALDH1酶活性的细胞的检测使用ALDEFLUOR试剂盒(StemCell Technologies, Durham, NC, USA)进行。使细胞悬浮在含有BODIPY-氨基乙醛(BAAA)(一种不带电的ALDH1底物)的Aldefluor测定缓冲液中,接着在37℃下于黑暗中孵育30-45分钟。BAAA仅被活细胞通过被动扩散摄取,然后在细胞内被ALDH1转化为BODIPY-氨基乙酸盐(一种带负电的反应产物),其保留在表达高水平ALDH1的细胞内部,导致这些细胞变得具有明亮的荧光。这些表达ALDH1的细胞(ALDH1<sup>+</sup>)的荧光可以通过FACS Aria (BD Biosciences, San Jose, CA)的绿色荧光通道(520-540nm)来检测。作为阴性对照,对于每份细胞样品而言,另外用二乙氨基苯甲醛(DEAB)(一种特异性ALDH1抑制剂)孵育在相同条件下处理的等分试样。用BAAA孵育细胞,而不添加DEAB,导致定义ALDH1<sup>+</sup>群体的BAAA荧光的改变。因为只有具有完整细胞膜的细胞保留Aldefluor反应产物,所以仅鉴定活性ALDH1<sup>+</sup>细胞。

[0260] FACS分选:如上所述收获细胞,在最终离心之前通过30 $\mu$ m尼龙网过滤细胞,然后重



新悬浮在FACS缓冲液或ALDEFLUOR缓冲液中。使用FACS Aria以便富集表达表面标志物和ALDH1高活性的细胞。使用100- $\mu\text{m}$ 喷嘴(BD Biosciences, San Jose, CA)、20-25磅每平方英寸(PSI)的鞘压力和1,000-3,000个事件/秒的获得率作为经优化用于ATRT细胞分选的条件。在7AAD的基础上门控单活细胞,然后物理分选到收集管中用于所有后续实验。另外使用FlowJo软件分析和呈现数据。

[0261] 芯片阵列:将芯片阵列存放在公开文库(GEO)中。所有实验均使用Affymetrix HU GENE1.0寡核苷酸阵列进行(Pode-Shakked等,2009)。根据生产商的推荐,使用来自每份样品的总RNA制备生物素化靶DNA。按照生产商的推荐,使用Affymetrix基因芯片仪系统处理由每份样品产生的靶cDNA。可在线找到质量控制措施的详情。过滤明显变化的基因,变化至少两倍(p值:0.05)。

[0262] 定量实时逆转录PCR分析-基因表达分析:进行定量逆转录PCR(qRT-PCR)以测定一组基因表达的变化倍数。使用RNeasy Micro试剂盒(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)根据生产商的说明从细胞分离总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems, California USA)在总RNA上合成cDNA。使用ABI7900HT序列检测系统(Perkin-Elmer/Applied Biosystems, California, USA)在TaqMan基因表达预混液(Applied Biosystems, California, USA)的存在下进行实时PCR。使用基因特异性TaqMan基因表达测定预制试剂盒(Applied Biosystems, California, USA)进行PCR扩增。每个分析反应进行三次。在整个实验分析中使用HPRT1或GAPDH作为内源对照。使用SDS RQ Manager 1.2软件分析PCR结果。使用非配对双尾T检验进行统计分析。在 $P < 0.05$ 时视为统计显著性。

[0263] H&E染色:石蜡包埋组织的H&E染色:将石蜡包埋组织的5 $\mu\text{m}$ 切片固定在super frost/plus载玻片上并且在60 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育40分钟。脱蜡后,载玻片在Mayer苏木精溶液(Sigma-Aldrich)中孵育并且在70%乙醇中用1% HCl孵育1分钟。然后载玻片在伊红(Eosin) (Sigma-Aldrich)中孵育10秒。使用Olympus BX51TF成像。

[0264] 原发性ATRT和ATRT Xn的免疫组织化学染色:从原发性ATRT和ATRT Xn切下4- $\mu\text{m}$ 厚的切片用于免疫组织化学分析。如先前所述(Dekel等,2006b)进行免疫染色。简言之,处理切片以免抗原氧化。在免疫染色之前,在97 $^{\circ}\text{C}$ 下用10mM柠檬酸盐缓冲液,PH 6.0处理切片10分钟以便抗原恢复,接着用3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 处理10分钟。随后使用标记链霉亲和素-生物素(LAB-SA)方法,使用Histostain plus试剂盒(Zymed, San Francisco, CA, USA)为载玻片染色。通过基于HRP的色原/底物体系(液体DAB底物试剂盒-Zymed, San Francisco, CA, USA)使免疫反应可视化。按1:100稀释使用抗人ALDH1抗体(BD Biosciences, #611195)。通过基于HRP的色原/底物体系(液体DAB底物试剂盒-Zymed, San Francisco, CA, USA)使免疫反应可视化。对所有切片的波形蛋白、上皮细胞膜抗原(EMA)、平滑肌肌动蛋白(SMA)、AE1/AE3、NFP和INI1使用常规免疫组织化学工序染色。所有抗体稀释如同染色抗体的生产商所推荐那样进行。

[0265] LOX活性测定法:如先前所述(15843371),使用Amplex红荧光测定法(AAA Bioquest, 15255)测量LOX酶活性。测定反应混合物由50mM硼酸钠(pH 8.2)、1.2M脲、50 $\mu\text{M}$  Amplex红、0.1个单位/ml辣根过氧化物酶和10mM 1,5-二氨基戊烷(尸胺)底物组成。将蛋白质样品添加到存在或缺乏100 $\mu\text{M}$  BAPN的反应混合物中,然后在37 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育30分钟。在590nm下使用光吸收酶标仪测量荧光产物。

[0266] MTS-细胞活力测定法:平板接种 $5 \times 10^3$ 个细胞,一式三份并且使其在96孔板中生长



过夜。第二天,更换培养基并补充不同浓度的BAPN并且进一步孵育细胞48小时。使用CellTiter 96Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega) 根据生产商的说明测量细胞增殖。简言之,在37℃下用MTS溶液孵育细胞3小时并且使用酶标仪测定492nm下的吸光度。进行三次独立实验。

[0267] 细胞迁移测定法:使细胞生长过夜,之后更换培养基并补充100 $\mu$ M BAPN。48小时后,用1ml塑料移液管尖端通过融合单层进行刮擦。然后在相同时间点(24和48小时)为经处理的和对照细胞拍照。

[0268] 统计分析:除非另有说明,否则将结果表示为平均值 $\pm$ S.E.M。使用学生t检验评价ATRT细胞群之间在基因表达上的统计学差异。体内实验中的统计学差异使用ANOVA/卡方检验(Chi-square test)计算。对于所有统计分析而言,除非另有说明,否则将显著性水平设为 $p < 0.05$ 。

[0269] 结果

[0270] MRT异种移植模型的建立和细胞培养物表征:从男新生儿的左侧颈部肿块获得人恶性横纹肌样肿瘤样品。原发性肿瘤的H&E染色证明中等至较大多边形肿瘤细胞具有圆形细胞核、细染色质和较大的嗜酸性核仁。肿瘤细胞的形态特征,结合免疫组织化学性质,确认了对恶性横纹肌样肿瘤的诊断。实际上,大多数肿瘤细胞未显示出INI-1蛋白的表达。对原发性肿瘤细胞进行流式细胞术分析,证明两个细胞群在尺寸上不同。对于体外表征,使细胞在两种不同条件下生长:具有10%FBS的DMEM和补充了生长因子的无血清培养基。观察到两种形态不同的细胞类型:粘附性成纤维细胞样细胞和松散附着于粘附细胞的原形细胞,与先前所述培养中的MRT细胞的形态一致。当这些细胞在具有10%FBS的DMEM中培养时观察到明显的细胞生长。原发性肿瘤细胞培养物中的形态保持约8代。原发性肿瘤移植通过向4只免疫缺陷小鼠皮下移植2-5mm肿瘤碎片而形成(图6)。在允许进一步肿瘤繁殖的4/4只小鼠中观察到肿瘤植入。ATRT Xn在NOD/SCID小鼠中的连续繁殖通过组织样品移植或利用 $1 \times 10^6$ 个固定数量的细胞进行单细胞悬液移植来进行(表2和图6)。连续繁殖允许我们建立低(<P5)、中(P5-P10)和高代(P10-P15)MRT Xn传代,对其进行研究以进行MRT CSC表型表征和阐明与MRT引发能力相关的致病途径(表2、下文和图6)。

[0271] 表2

[0272] NOD/SCID小鼠中人ATRT Xn模型的产生和建立



[0273]

组织移植			细胞注射*			代数
植入率(%)	植入组织 的数量	移植次数	植入率(%)	植入肿瘤 的数量	注射次数	
100	4	4	Na	0	0	P1
100	8	8	67	4	6	P2
93	13	14	83	10	12	P3
100	6	6	88	7	8	P4
75	3	4	100	8	8	P5



[0274]

67	4	6	100	4	4	P6
50	2	4	100	2	2	P7
50	1	2	50	2	4	P8
na	0	0	100	4	4	P9
na	0	0	100	2	2	P10
100	2	2	100	4	4	P11
100	2	2	100	2	2	P12
100	2	2	100	4	4	P13
100	2	2	100	4	4	P14
100	1	1	100	4	4	P15
na	0	0	100	4	4	P16
88	50	57	90	65	72	总量

[0275] 由连续注射1x10<sup>6</sup>\*个细胞和组织移植产生原发性人ATRT X<sub>n</sub>。从新生儿的ATRT获得原发性肿瘤组织。

[0276] MRT的长期繁殖与CSC频率增加相关

[0277] 用1x10<sup>6</sup>个固定细胞数量的细胞连续繁殖MRT X<sub>n</sub>与肿瘤植入时间更短和肿瘤生长加速有关联(图1A和表3),表明肿瘤侵袭性随着传代而提升。

[0278] 表3.繁殖期间的ATRT X<sub>n</sub>频率和特征

[0279]	X <sub>n</sub> 重量/切除天数比率	植入天数(平均值)	植入率(%)	代数
--------	--------------------------	-----------	--------	----



[0280]

(平均值)				
0.04	34	4/6	P2	低
0.07	23	10/12	P3	
0.08	24	7/8	P4	
<b>0.06</b>	<b>26</b>	<b>21/26(80)</b>		
0.11	15	8/8	P5	中
0.09	22	4/4	P6	
0.12	15	2/2	P7	
0.10	28	2/4	P8	
0.06	23	4/4	P9	
0.06	22	2/2	P10	
<b>0.09</b>	<b>20</b>	<b>22/24(92)</b>		
0.05	19	4/4	P11	高
0.12	20	2/2	P12	
0.08	16	4/4	P13	
0.11	16	4/4	P14	
0.19	14	4/4	P15	
0.16	14	4/4	P16	
<b>0.12</b>	<b>16</b>	<b>22/22(100)</b>		

[0281] 表总结了从ATRT X<sub>n</sub>获得并进一步繁殖的1x10<sup>6</sup>个细胞形成继发性肿瘤的频率和特征。ATRT X<sub>n</sub>连续繁殖期间,注意到肿瘤植入时间更短和肿瘤生长加速。在低代和中代X<sub>n</sub>



之间的比较中, \* $p < 0.01$ 。

[0282] 其次发明人怀疑CSC能力是否随MRT繁殖而在功能上加强。他们用源自低、中和高代Xn的MRT细胞进行有限稀释异种移植实验。这项分析对于高代Xn中的CSC频率显示出明显积极的选择(表4)。

[0283] 表4:表示繁殖期间的CSC频率的有限稀释异种移植总结

[0284]

移植肿瘤的数量/注射次数			注射的肿瘤细胞数量
高	中	低	
9/10	4/6	1/10	1000
2/2	1/2	-	750
3/5	2/3	2/10	500
2/2	-	-	250
6/8	-	1/16	100
1/2	-	0/4	50
<b>1/120</b>	<b>1/1801</b>	<b>1/3930</b>	肿瘤繁殖细胞频率 (95% CI)

[0285] 已经观察到高代MRT Xn富集更多数量的CSC,分析了伴随CSC表型随传代的获得的组织学和免疫组织化学变化(图1B-C)。H&E染色揭示Xn来源的肿瘤保持基本横纹肌样细胞形态。然而,在高代Xn中观察到一些形态差异,包括获得梭形细胞形态、大面积坏死、凋亡小体更少且有丝分裂更多(图1B)。免疫组织化学(IHC)染色公开原发性肿瘤和Xn组织两者强烈表达间叶细胞标志物波形蛋白(图1C)。然而,与原发性肿瘤大不相同,高代Xn显示包括上皮细胞膜抗原(EMA)、细胞角蛋白AE1/AE3和神经丝蛋白(NFP)在内的分化标志损失(图1C)。为了验证IHC结果,对原发性肿瘤、早期和晚期Xn进行qRT-PCR。基因表达分析证明随着上皮分化标志物(E-钙粘蛋白)的损失,波形蛋白保持(图1D)。因此,CSC频率增强与保持相似组织病理学横纹肌样特征并显示出针对间叶细胞表型去分化的MRT Xn相关。

[0286] 与肿瘤引发活性增强相关的全基因标记揭示了假定CSC生物标志物

[0287] 接下来发明人设法表征了连续MRT Xn的全分子图谱,其伴随对CSC表型的选择。为



此,他们进行了微阵列基因表达分析,比较了几种不同的样品:1.原代MRT,2.早期MRT Xn (P2),3.中间MRT Xn (P7),4.晚期MRT Xn (P16),5.人胚胎干细胞(hESC),6.胎肾(FK),7.成人肾(AK),8.胎脑(FB),9.成人脑(AB)。全局表达分析显示正如通过分级群聚所说明的那样,繁殖的MRT Xn细胞与hESC更紧密地群聚,而不与其来源的原发性肿瘤群聚(图2A)。另外,Xn组织与人胎组织存在更大的相似性。总的来说,这些结果确认了肿瘤繁殖期间对于细胞表型的选择。对原发性MRT和连续MRT Xn(低、中和高代)更仔细的检查鉴定了多种基因表达模式,包括在整个传代过程中被上调和下调的两大基因集群(图2B)。上调基因组群包括伴随所观察到的CSC表型的获得的分子,如信号素3C(SEMA3C)、赖氨酰氧化酶(LOX)、糖蛋白M6A(GPM6A)、肝细胞生长因子(HGF/SF)和醛脱氢酶1(ALDH1)(图2C)。这种基因表达谱也可以证实随着传代的肿瘤生物性质,正如揭示晚代为高度增殖性(例如KI-67、CDK1和AURKA)的基因热图所显示的那样(图2D)。另外,ingenuity<sup>®</sup>功能分析证明细胞坏死、细胞死亡和细胞分化减少(图2E),两者均支持由H&E和IHC染色获得的结果,H&E和IHC染色证明与原发性肿瘤和低代Xn相比高代Xn中的细胞坏死减少、有丝分裂增加且分化标志物损失。因此,连续Xn繁殖模型产生了涉及连续肿瘤引发和进展及MRT中CSC表型的获得的假定生物标志物分子。

[0288] ALDH1作为MRT CSC生物标志物的功能验证

[0289] 已经观察到目前公开的分子筛选单独地指出ALDH1为MRT中获得CSC表型的标志物,发明人进一步检查了其表达和功能作用。重要的是,ALDH1已经被认为CSC标志物,并且因此可以验证所述方法。表达分析证明ALDH1比例随着肿瘤繁殖而显著增加(图3A)。用于量化Xn进展的不同阶段中ALDH1群体的比例的FACS分析揭示,相比于晚代(10代)中25%的细胞,在低代Xn细胞(4代)中,仅4%的细胞为ALDH1<sup>+</sup>(图3B)。另外,ALDH1 IHC染色证明ALDH1的表达随着传代而增加(图3C)。此外,表达ALDH1<sup>高</sup>的细胞主要是大横纹肌样细胞(图3D)。在基因表达水平上,qRT-PCR分析揭示了晚代中的高ALDH1表达,相比于原发性肿瘤高约40倍(图3E)。然后发明人分选ALDH1<sup>+</sup>成分以便确定它们作为CSC是否合格。癌症干细胞的定义属性是它们在体外形成克隆物的功能性能力。菌落形成测定法显示根据CSC表型,与ALDH1-MRT细胞相比,在ALDH1<sup>+</sup>中的克隆物数量明显更高且菌落更大(图4A)。另外,通过其在移植到免疫缺陷小鼠体内后重新形成肿瘤的能力来定义CSC。为研究体内ALDH1<sup>+</sup>细胞的致瘤性,使用有限稀释分析(18)在NOD/SCID小鼠的侧腹注射递减量的经FACS纯化的ALDH1<sup>+</sup>和ALDH1<sup>-</sup>细胞。未分选的细胞作为对照注射(表2)。在低代(P3)中,与注射了ALDH1<sup>-</sup>细胞的小鼠都未形成肿瘤相比,注射了2000个或更少ALDH1<sup>+</sup>细胞的6只小鼠中有4只形成肿瘤( $p < 0.05$ )。在高代(P12)中,注射了1000个或更少ALDH1<sup>+</sup>细胞的小鼠全部形成继发性肿瘤,而注射了ALDH1<sup>-</sup>细胞的11只小鼠中仅2只发展出肿瘤( $p < 0.001$ ),表明这个群体相对缺乏肿瘤引发细胞(表2)。重要的是,由ALDH1<sup>+</sup>细胞产生的肿瘤可进一步连续移植到二级受者中,与在该群体中存在肿瘤引发能力一致,证明了ALDH<sup>+</sup>细胞的体内自我更新能力(图4B)。总的来说,这些数据证实ALDH1是MRT CSC的标志物,验证了我们以长期繁殖来定义的CSC表型与特定分子如ALDH1的关联。为了在分子水平上更好地表征分选的ALDH<sup>+</sup>CSC并确定它们是否富集通过长期繁殖来预测的CSC生物标志物,对从MRT Xn获得的分选ALDH<sup>+</sup>和ALDH<sup>-</sup>细胞进行RNA测序实验(图4C)。有趣的是,发现相比于ALDH<sup>-</sup>细胞在ALDH<sup>+</sup>细胞中上调最多的基因是相比于原发性肿瘤在Xn晚代中明显过表达的那些基因(例如ANXA1、GPM6A、HGF和LOX)(图4C)。进行qRT-



PCR分析,验证相比于ALDH<sup>-</sup>细胞在ALDH<sup>+</sup>中的LOX高表达(图4D)。这些结果强调了我们的Xn繁殖技术作为鉴定与肿瘤侵袭性和CSC频率有关联的分子和途径的有效性。LOX在进行性MRT Xn和分选的ALDH<sup>+</sup>CSC成分中的高表达引导我们检查LOX是否可以用作治疗靶标。

[0290] LOX抑制剂作为MRT CSC治疗剂的功能验证

[0291] LOX,一种细胞外基质重构酶,调节诸如染色质压缩(19)、基因转录(20,21)以及早期细胞分化和组织发育等事件,并因此与特征在于调节类似活性的INI-1损失的MRT有关。最近的研究已经证实LOX在几种恶性肿瘤,包括乳腺、结肠和胰腺肿瘤中过表达(23,24)并且与肿瘤进展和转移相关(25)。IHC染色分析LOX在原代MRT、早代(P2)、中代(P7)和晚代(P14)Xn中的表达,确认在整个传代过程中表达广泛递增,在横纹肌样细胞中显著表达(图5A)。先前,证实BAPN,一种LOX抑制剂,对各种癌细胞具有积极作用(23)。因为LOX基因在Xn中在增殖和CSC表型选择期间以及在分选的MRT CSC中上调,所以发明人设法检查了LOX抑制对MRT细胞是否有影响。首先,使Xn细胞在不同浓度的BAPN中生长48小时。MTS分析,检查细胞活力,证明在三次不同实验中用100 $\mu$ M BAPN处理之后增殖显著减少(数据未示出)。接下来,他们检查了BAPN对WT Xn细胞(在小鼠体内连续繁殖的肾脏常见小儿实体瘤)的影响。结果证明对WT细胞增殖无影响,表明LOX抑制对MRT细胞的特异性作用(图5B)。接下来发明人检查了由于BAPN处理产生的MRT细胞形态并且证实处理诱导形态变化,包括核固缩和细胞吞噬(图5C)。重要的是,迁移测定揭示与未处理的细胞相比,BAPN处理48小时显著抑制MRT细胞的迁移能力(图5D)。因为所有体外结果都是使用中代Xn(P10)获得的,所以发明人着手确定BAPN对更类似于原发性肿瘤细胞是否会具有类似作用。对P2细胞进行类似实验并且揭示了相同结果(图7A-C)。LOX活性测量验证100 $\mu$ M BAPN实际上显著抑制LOX活性(图7D)。这些结果表明,靶向新型MRT CSC生物标志物可以消除肿瘤生长并且保证LOX为可能的MRT治疗靶标。

[0292] 实施例1的参考文献

[0293] 1.Pode-Shakked N,Metsuyanin S,Rom-Gross E,Mor Y,Fridman E,Goldstein I,et al.Developmental tumorigenesis:NCAM as a putative marker for the malignant renal stem/progenitor cell population.Journal of cellular and molecular medicine.2009Aug;13(8B):1792-808.

[0294] 2.Dekel B,Metsuyanin S,Schmidt-Ott KM,Fridman E,Jacob-Hirsch J,Simon A,et al.Multiple imprinted and stemness genes provide a link between normal and tumor progenitor cells of the developing human kidney.Cancer research.2006Jun 15;66(12):6040-9.

[0295] 3.Metsuyanin S,Pode-Shakked N,Schmidt-Ott KM,Keshet G,Rechavi G,Blumental D,et al.Accumulation of malignant renal stem cells is associated with epigenetic changes in normal renal progenitor genes.Stem cells(Dayton, Ohio).2008Jul;26(7):1808-17.

[0296] 4.Pode-Shakked N,Dekel B.Wilms tumor—a renal stem cell malignancy? Pediatric nephrology(Berlin,Germany).2011Sep;26(9):1535-43.

[0297] 5.Pode-Shakked N,Shukrun R,Mark-Danieli M,Tsvetkov P,Bahar S,Pri-Chen S,et al.The isolation and characterization of renal cancer initiating cells



from human Wilms' tumour xenografts unveils new therapeutic targets. *EMBO molecular medicine*. 2013 Jan; 5(1):18-37.

[0298] 6. Shukrun R, Dekel B, Pode-Shakked N, Pleniceanu O, Omer D, Vax E, et al. Wilms' Tumor Blastemal Stem Cells Dedifferentiate to Propagate the Tumor

[0299] Bulk. *Stem Cell Reports*. 2014.

[0300] 7. Parham DM, Weeks DA, Beckwith JB. The clinicopathologic spectrum of putative extrarenal rhabdoid tumors. An analysis of 42 cases studied with immunohistochemistry or electron microscopy. *The American journal of surgical pathology*. 1994 Oct; 18(10):1010-29.

[0301] 8. Wick MR, Ritter JH, Dehner LP. Malignant rhabdoid tumors: a clinicopathologic review and conceptual discussion. *Seminars in diagnostic pathology*. 1995 Aug; 12(3):233-48.

[0302] 9. Versteeg I, Sevenet N, Lange J, Rousseau-Merck MF, Ambros P, Handgretinger R, et al. Truncating mutations of hSNF5/INI1 in aggressive paediatric cancer. *Nature*. 1998 Jul 9; 394(6689):203-6.

[0303] 10. Olson TA, Bayar E, Kosnik E, Hamoudi AB, Klopfenstein KJ, Pieters RS, et al. Successful treatment of disseminated central nervous system malignant rhabdoid tumor. *Journal of pediatric hematology/oncology*. 1995 Feb; 17(1):71-5.

[0304] 11. Douglass EC, Valentine M, Rowe ST, Parham DM, Wilimas JA, Sanders JM, et al. Malignant rhabdoid tumor: a highly malignant childhood tumor with minimal karyotypic changes. *Genes, chromosomes & cancer*. 1990 Sep; 2(3):210-6.

[0305] 12. Rorke LB, Packer RJ, Biegel JA. Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood: definition of an entity. *Journal of neurosurgery*. 1996 Jul; 85(1):56-65.

[0306] 13. Biegel JA, Tan L, Zhang F, Wainwright L, Russo P, Rorke LB. Alterations of the hSNF5/INI1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res*. 2002 Nov; 8(11):3461-7.

[0307] 14. Biegel JA, Zhou JY, Rorke LB, Stenstrom C, Wainwright LM, Fogelgren B. Germ-line and acquired mutations of INI1 in atypical teratoid and rhabdoid tumors. *Cancer research*. 1999 Jan 1; 59(1):74-9.

[0308] 15. Euskirchen G, Auerbach RK, Snyder M. SWI/SNF chromatin-remodeling factors: multiscale analyses and diverse functions. *The Journal of biological chemistry*. 2012 Sep 7; 287(37):30897-905.

[0309] 16. Tomlinson GE, Breslow NE, Dome J, Guthrie KA, Norkool P, Li S, et al. Rhabdoid tumor of the kidney in the National Wilms' Tumor Study: age at diagnosis as a prognostic factor. *J Clin Oncol*. 2005 Oct 20; 23(30):7641-5.

[0310] 17. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells



- and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.
- [0311] 18. Hu Y, Smyth GK. ELDA: extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of immunological methods*. 2009 Aug 15;347(1-2):70-8.
- [0312] 19. Mello ML, Contente S, Vidal BC, Planding W, Schenck U. Modulation of ras transformation affecting chromatin supraorganization as assessed by image analysis. *Experimental cell research*. 1995 Oct;220(2):374-82.
- [0313] 20. Di Donato A, Lacal JC, Di Duca M, Giampuzzi M, Ghiggeri G, Gusmano R. Micro-injection of recombinant lysyl oxidase blocks oncogenic p21-Ha-Ras and progesterone effects on *Xenopus laevis* oocyte maturation. *FEBS letters*. 1997 Dec 8;419(1):63-8.
- [0314] 21. Giampuzzi M, Botti G, Di Duca M, Arata L, Ghiggeri G, Gusmano R, et al. Lysyl oxidase activates the transcription activity of human collagen III promoter. Possible involvement of Ku antigen. *The Journal of biological chemistry*. 2000 Nov 17;275(46):36341-9.
- [0315] 22. Maki JM, Rasanen J, Tikkanen H, Sormunen R, Makikallio K, Kivirikko KI, et al. Inactivation of the lysyl oxidase gene *Lox* leads to aortic aneurysms, cardiovascular dysfunction, and perinatal death in mice. *Circulation*. 2002 Nov 5;106(19):2503-9.
- [0316] 23. Bondareva A, Downey CM, Ayres F, Liu W, Boyd SK, Hallgrimsson B, et al. The lysyl oxidase inhibitor, beta-aminopropionitrile, diminishes the metastatic colonization potential of circulating breast cancer cells. *PloS one*. 2009;4(5):e5620.
- [0317] 24. Melstrom LG, Bentrem DJ, Salabat MR, Kennedy TJ, Ding XZ, Strouch M, et al. Overexpression of 5-lipoxygenase in colon polyps and cancer and the effect of 5-LOX inhibitors in vitro and in a murine model. *Clin Cancer Res*. 2008 Oct 15;14(20):6525-30.
- [0318] 25. Barker HE, Cox TR, Erler JT. The rationale for targeting the LOX family in cancer. *Nature reviews*. 2012 Aug;12(8):540-52.
- [0319] 26. Findlay VJ, Wang C, Watson DK, Camp ER. Epithelial-to-mesenchymal transition and the cancer stem cell phenotype: insights from cancer biology with therapeutic implications for colorectal cancer. *Cancer gene therapy*. 2014 May 2.
- [0320] 27. Marjanovic ND, Weinberg RA, Chaffer CL. Poised with purpose: cell plasticity enhances tumorigenicity. *Cell cycle (Georgetown, Tex)*. 2013 Sep 1;12(17):2713-4.
- [0321] 28. Lander AD. The 'stem cell' concept: is it holding us back? *Journal of biology*. 2009;8(8):70.
- [0322] 29. Bertucci F, Bouvier-Labit C, Finetti P, Metellus P, Adelaide J,



Mokhtari K, et al. Gene expression profiling of solitary fibrous tumors. *PloS one*. 2013; 8 (5) :e64497.

[0323] 30. Ma LJ, Li YG, Huang L, Han M, Ma BJ, Sun BJ, et al. [Expression of LOX and MMP-2 in gastric cancer tissue and the effects of LOX and MMP-2 on tumor invasion and metastasis]. *Zhonghua zhong liu za zhi* [Chinese journal of oncology]. 2011 Jan; 33 (1) :37-41.

[0324] 31. Thomas C, Karnoub AE. Lysyl oxidase at the crossroads of mesenchymal stem cells and epithelial-mesenchymal transition. *Oncotarget*. 2013 Mar; 4 (3) :376-7.

[0325] 32. Kordes U, Gesk S, Fruhwald MC, Graf N, Leuschner I, Hasselblatt M, et al. Clinical and molecular features in patients with atypical teratoid rhabdoid tumor or malignant rhabdoid tumor. *Genes, chromosomes & cancer*. 2003 Feb; 49 (2) :176-81.

[0326] 实施例2

[0327] 人威尔姆氏肿瘤和尤文氏肉瘤异种移植物的长期繁殖

[0328] 材料和方法

[0329] 体内异种移植物形成和植入时间计算: 动物实验根据舍巴医疗中心动物实验指南进行。如上文所述, 进行对5-8周龄、雌性、非肥胖性糖尿病免疫缺陷 (NOD/SCID) 小鼠的初始肿瘤异种移植。简言之, 将原发性肿瘤组织切成2-5mm碎片并且皮下植入小鼠背部。将小鼠保持在无病原体的环境中并且每周监测肿瘤生长。每周通过触诊检测继发性肿瘤。当肿瘤达到1.5cm直径的尺寸时收获肿瘤。记录每个植入Xn的植入时间、切除时间、重量和体积。立即将Xn组织切成小碎片并且处理用于向NOD/SCID小鼠侧腹的皮下组织移植及如下所述制备单细胞悬液用于后续Xn繁殖。通过在含有抗生素 (青霉素和链霉素) 的伊斯考夫改良的杜尔贝科培养基 (IMDM) 中切碎样品, 接着在37°C下用胶原酶IV处理2小时获得单细胞悬液。使用为胶原酶溶液两倍体积的IMDM研磨经酶处理的组织并且过滤悬液 (100μm细胞滤网) 并用含抗生素的IMDM洗涤两次。用ACK RBS裂解缓冲液去除红细胞。

[0330] 用两种方法形成Xn连续传代: 1. 连续注射大约 $1 \times 10^6$ 个来自新取回的Xn的解离细胞; 在100μl 1:1无血清培养基/Matrigel (BD Biosciences, San Jose, CA) 中注射细胞。2. 将Xn组织切成2-5mm碎片并且皮下植入小鼠背部。

[0331] 结果

[0332] 尤文氏肉瘤 (图8A) 和威尔姆氏肿瘤 (图8B) Xn的连续繁殖与肿瘤植入时间更短有关联, 表明肿瘤行为朝更具侵袭性的表型变化。

[0333] 实施例3

[0334] 人胸膜肺母细胞瘤 (PPB) 异种移植物的长期繁殖

[0335] 材料和方法

[0336] 体内异种移植物形成和植入时间计算: 动物实验根据舍巴医疗中心动物实验指南进行。如上文所述, 进行对5-8周龄、雌性、非肥胖性糖尿病免疫缺陷 (NOD/SCID) 小鼠的初始肿瘤异种移植。简言之, 将原发性肿瘤组织切成2-5mm碎片并且皮下植入小鼠背部。将小鼠保持在无病原体的环境中并且每周监测肿瘤生长。每周通过触诊检测继发性肿瘤。当肿瘤



达到1.5cm直径的尺寸时收获肿瘤。记录每个植入Xn的植入时间、切除时间、重量和体积。立即将Xn组织切成小碎片并且处理用于向NOD/SCID小鼠侧腹的皮下组织移植及如下所述制备单细胞悬液用于后续Xn繁殖。通过在含有抗生素(青霉素和链霉素)的伊斯考夫改良的杜尔贝科培养基(IMDM)中切碎样品,接着在37℃下用胶原酶IV处理2小时获得单细胞悬液。使用为胶原酶溶液两倍体积的IMDM研磨经酶处理的组织并且过滤悬液(100 $\mu$ m细胞滤网)并用含抗生素的IMDM洗涤两次。用ACK RBS裂解缓冲液去除红细胞。

[0337] 用两种方法形成Xn连续传代:1.连续注射大约 $1 \times 10^6$ 个来自新取回的Xn的解离细胞;在100 $\mu$ l 1:1无血清培养基/Matrigel(BD Biosciences, San Jose, CA)中注射细胞。2.将Xn组织切成2-5mm碎片并且皮下植入小鼠背部。

[0338] 肿瘤繁殖细胞相对频率的估计:为了评价和比较来自低代和高代的Xn细胞的致瘤活性,向NOD/SCID小鼠的侧腹皮下注射悬浮在100 $\mu$ l PBS和100 $\mu$ l Matrigel中的细胞连续稀释液( $1 \times 10^6$ -50个细胞)。使用ELDA在线软件(bioinfodotwehidotedudotau/software/ellda/)在线计算癌症繁殖细胞的相对频率的估计值。

[0339] 芯片阵列:所有实验均使用Affymetrix HU GENE1.0寡核苷酸阵列进行。根据生产商的推荐,使用来自每份样品的总RNA制备生物素化靶cDNA。按照生产商的推荐,使用Affymetrix基因芯片仪系统处理由每份样品产生的靶cDNA。可在线找到质量控制措施的详情。过滤明显变化的基因,变化至少两倍(p值:0.05)。

[0340] PPB Xn的免疫组织化学染色:从原发性PPB和PPB Xn切下4- $\mu$ m厚的切片用于免疫组织化学分析。如上文所述进行免疫染色。简言之,处理切片以免抗原氧化。在免疫染色之前,在97℃下用10mM柠檬酸盐缓冲液,PH 6.0处理切片10分钟以便抗原恢复,接着用3% $H_2O_2$ 处理10分钟。随后使用标记链霉亲和素-生物素(LAB-SA)方法,使用Histostain plus试剂盒(Zymed, San Francisco, CA, USA)为载玻片染色。通过基于HRP的色原/底物体系(液体DAB底物试剂盒-Zymed, San Francisco, CA, USA)使免疫反应可视化。按1:1200稀释使用抗人NCAM抗体(BD Biosciences, #611195)。通过基于HRP的色原/底物体系(液体DAB底物试剂盒-Zymed, San Francisco, CA, USA)使免疫反应可视化。

[0341] 定量实时逆转录PCR分析-基因表达分析:进行定量逆转录PCR(qRT-PCR)以测定NCAM表达的变化倍数。使用RNeasy Micro试剂盒(Qiagen GmbH, Hilden, Germany)根据生产商的说明从细胞分离总RNA。使用高容量cDNA逆转录试剂盒(Applied Biosystems, California USA)在总RNA上合成cDNA。使用ABI7900HT序列检测系统(Perkin-Elmer/Applied Biosystems, California, USA)在TaqMan基因表达预混液(Applied Biosystems, California, USA)的存在下进行实时PCR。使用基因特异性TaqMan基因表达测定预制试剂盒(Applied Biosystems, California, USA)进行PCR扩增。每个分析反应进行三次。在整个实验分析中使用HPRT1或GAPDH作为内源对照。使用SDS RQ Manager 1.2软件分析PCR结果。使用非配对双尾T检验进行统计分析。在 $P < 0.05$ 时视为统计显著性。

[0342] 结果

[0343] PPB Xn连续繁殖与肿瘤植入时间更短和肿瘤生长加速有关联,表明肿瘤侵袭性随着传代而提升。如下文表6所示,在早代(1-4代)和晚代(7-12代)Xn之间的比较中,肿瘤植入时间从58天从下降到33天( $p < 0.02$ )。

[0344] 表6



[0345]

	植入率(%)	植入时间(天)*	切除时间(天)	平均重量	平均体积	重量/切除时间 比(平均值)
早期	63.16	58.08	77.57	1.43	0.88	0.02
晚期	87.50	33.85	51.94	1.83	1.03	0.04

[0346] 用源自早代和晚代Xn的PPB细胞进行有限稀释异种移植实验。这项分析对于高代Xn中的CSC频率显示出明显积极的选择。如下文表7所示,在早代和晚代CSC之间的比较中,CSC频率从1/1581升高到1/304细胞 (p=0.009) 。

[0347] 表7

[0348]

代数	注射的细胞数量	植入率	干细胞频率
早代	1000	3/4	1/1581
	500	3/4	
	100	0/4	
晚代	1000	3/4	1/304
	500	4/4	
	100	2/4	
	50	1/4	
	10	0/4	

[0349] 图9中提供了基因热图,比较了不同PPB样品,成人肺(AL)和胎肺(FL)之间,几种增殖标志物(例如KI67、E2F2和CDK1)、自我更新多梳基因(例如BMI1、TOP2A和EZH2)和转移标记基因(例如SPARC、CXCR4和LTBP1)的表达模式,揭示高代为高度增殖性并且呈现自我更新基因上调,具有侵入基因标记,预测了转移性行为。



[0350] 如图10A所说明的,对几种Xn传代(P4、P8、P12和P17)的NCAM1的免疫组织化学分析(IHC)揭示随着Xn连续繁殖而表达增加。qRT-PCR分析揭示相比于成人肺部对照在原发性肿瘤中NCAM1高度表达(右)并且相比于成人肺部在胎肺中NCAM1高度表达(左),强调了NCAM1在癌发生和进展期间起到重要作用的事实(图10B)。

[0351] 如图11A-B所说明的,对几种Xn传代(P4、P8、P12和P17)的CD44的IHC分析揭示随着Xn连续繁殖而表达增加。

[0352] 尽管本发明已经结合其具体实施方案进行了描述,但是显然许多替代、修改和变型对本领域技术人员而言将显而易见。因此,其意图在于包括属于所附权利要求的精神和宽范围内的所有此类替代、修改和变型。

[0353] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请在本文中通过引用整体并入本说明书中,其程度如同特别地且单独地指出将每个单独的出版物、专利或专利申请通过引用并入本文一样。另外,本申请中任何参考文献的引用或标识不应解释为承认此类参考文献可用作本发明的现有技术。至于所使用的章节标题,不应将其解释为必要性限制。



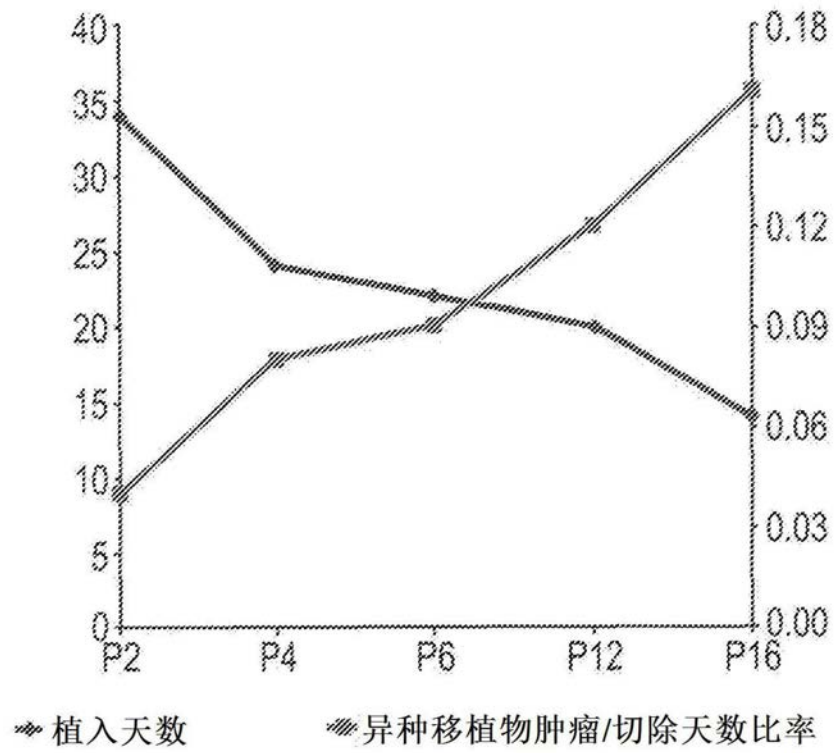


图1A

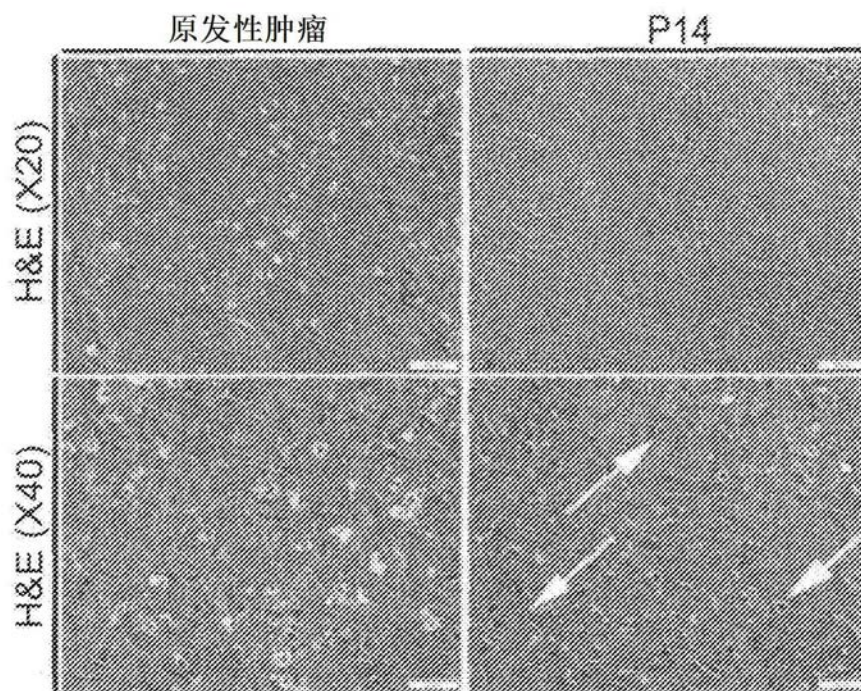


图1B



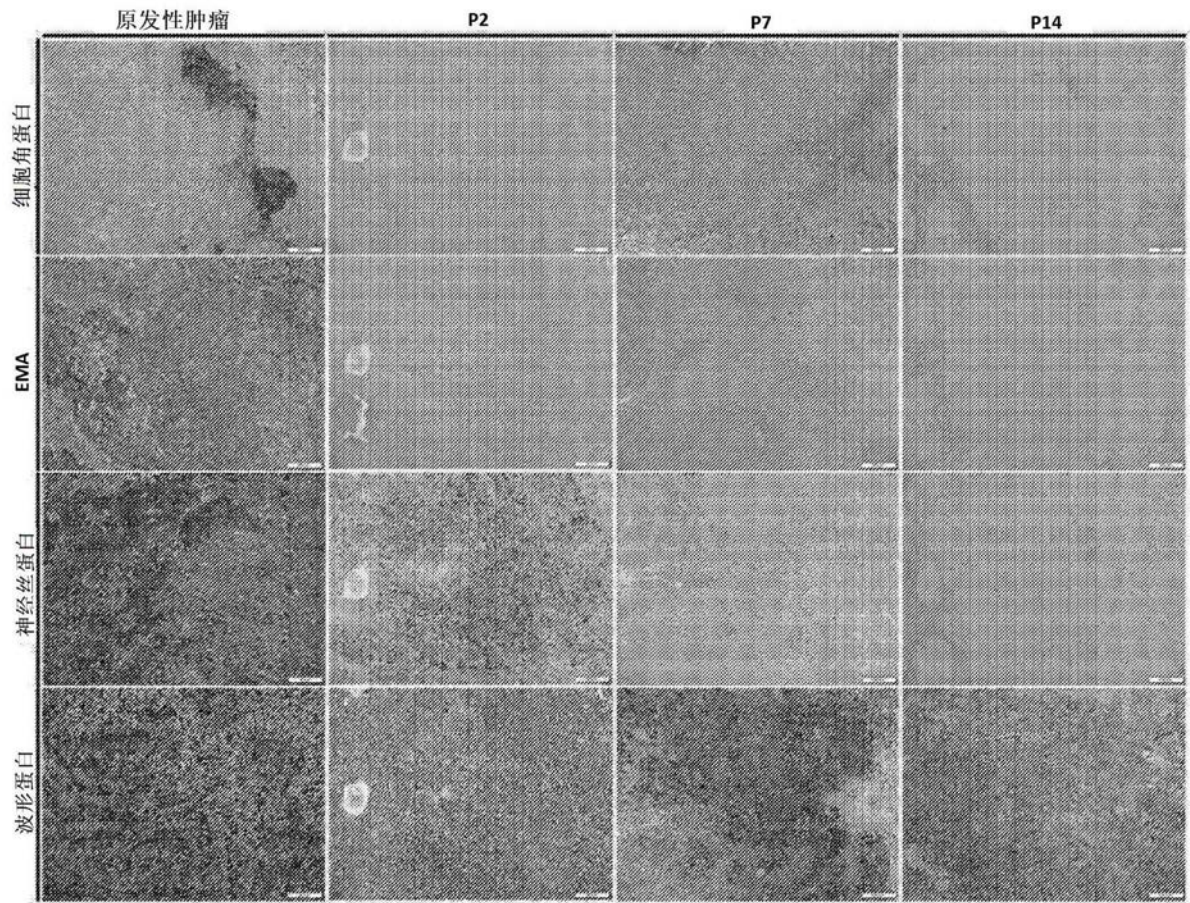


图1C



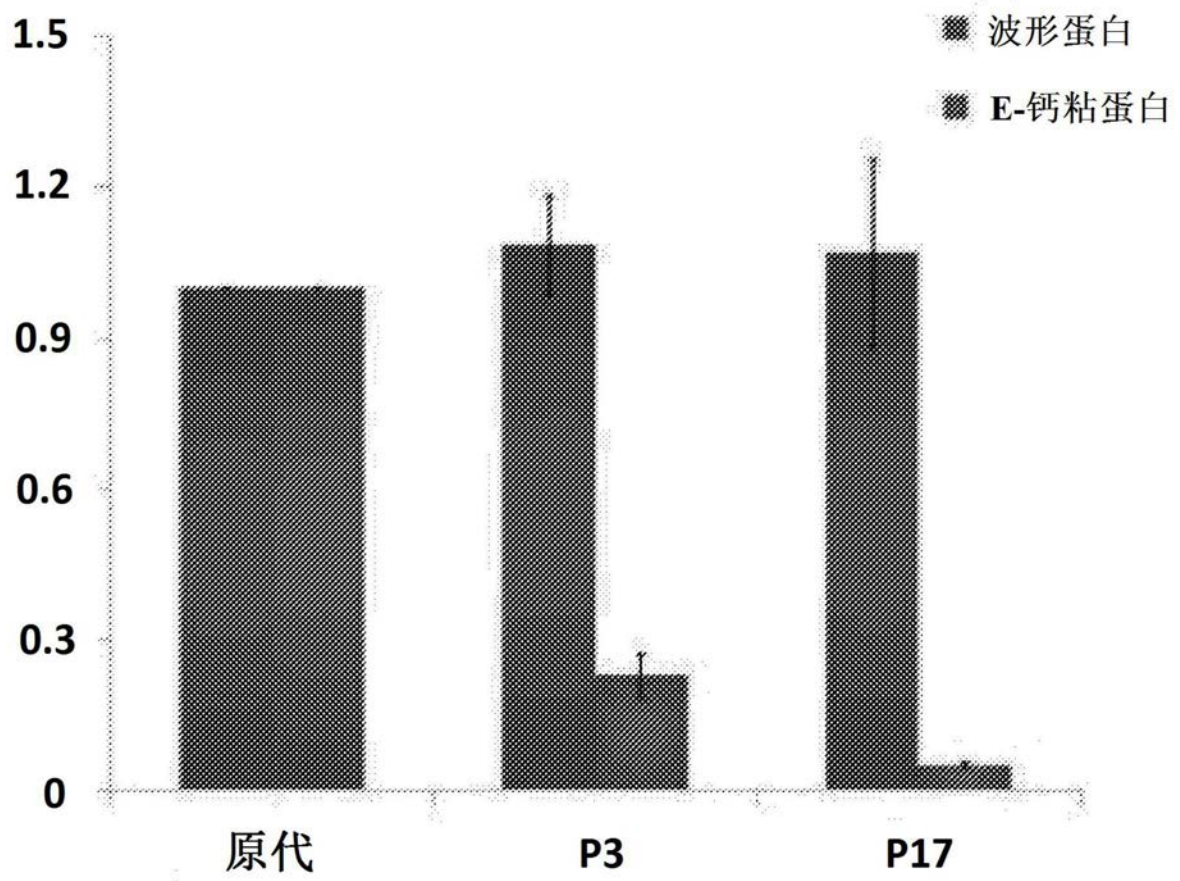


图1D



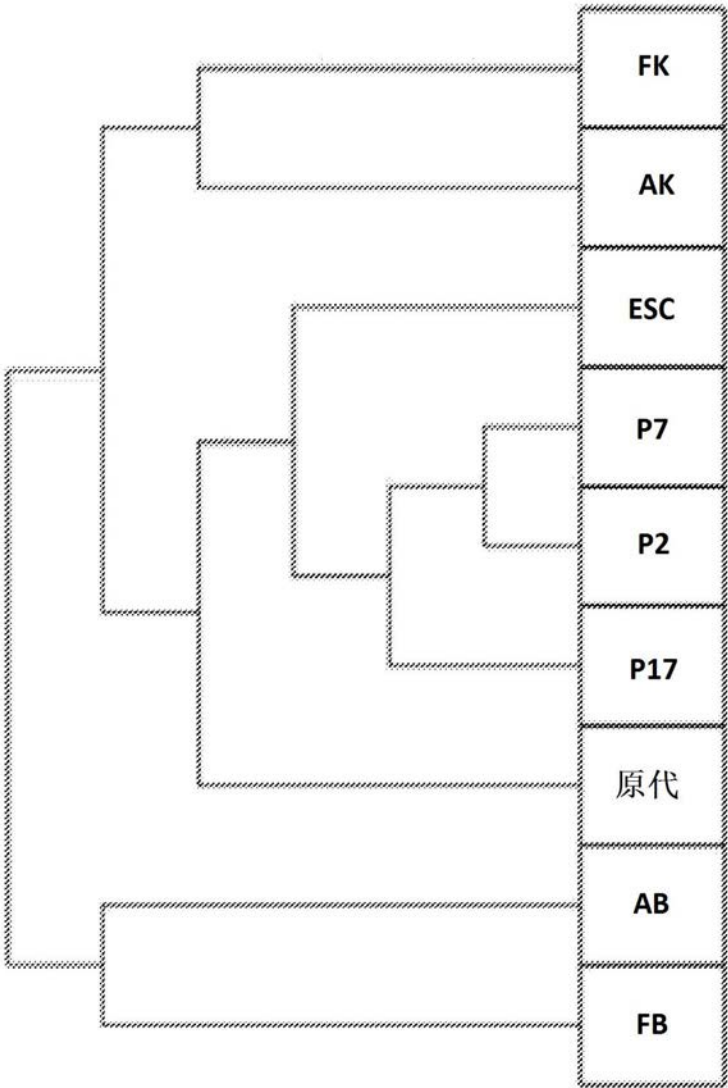


图2A



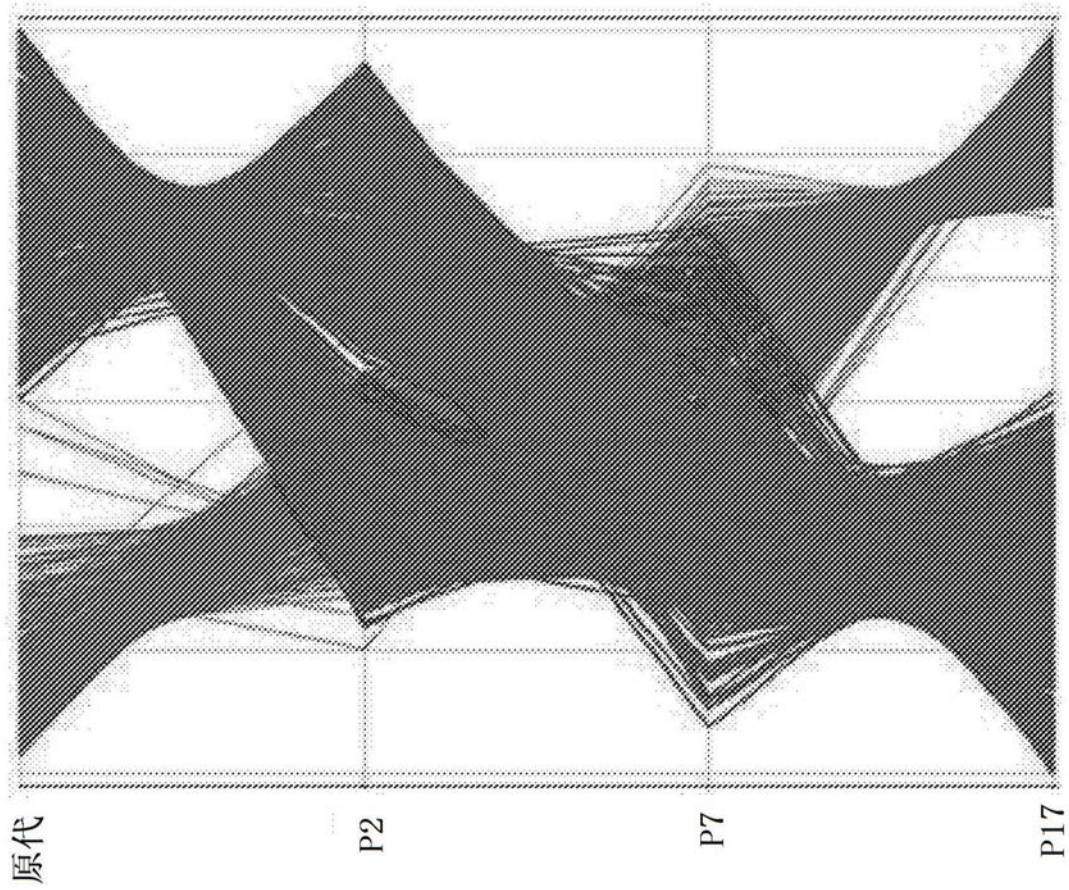


图2B



10个上调最多的基因  
10个下调最多的基因

基因	ID	符号	P2 vs P	P7 vs P	P17 vs P	基因	ID	符号	P2 vs P	P7 vs P	P17 vs P
CXCL6	11730801	趋化因子(C-X-C基序)配体6	122	119.4	287.0	HBG1	11758898	血红蛋白γA	-383.1	-381.3	-433.4
CXCL5	11728715	趋化因子(C-X-C基序)配体5	121	55.8	246.8	EBF3	11725867	早期B细胞因子3	-12	-20	-197.7
SEMA3C	11723668	Sema结构域	55.0	105.2	235.4	HBB	11715347	血红蛋白β	-147.2	-120.8	-168.6
GPM6A	11730201	糖蛋白M6A	28.5	120.7	169.4	SPP1	11727790	分泌型焦磷酸蛋白1	-86.2	-18.1	-123.0
FSTL5	11743826	卵泡抑素样蛋白5	102	110.8	139.9	CD163	11728679	CD163分子	-87.4	-98.3	-102.5
ALDH1A1	11743044	醛脱氢酶1家族, A1	237	100.8	130.4	SDC2	11720753	多配体聚糖2	-15	-12.4	-94.1
ANXA1	11717514	膜联蛋白A1	419	63.3	115.0	RNASE1	11716222	核糖核酸酶, RNA酶A家族, 1	-69.7	-88.5	-82.3
LOX	11728200	赖氨酰氧化酶	32.5	25.4	109.5	FBN1	11720338	结缔组织起始因子同源物	-3.5	-3.6	-73.5
DSEL	11730623	硫酸皮肤素差向异构酶样蛋白	140	38.6	97.6	SERPINE2	11718831	serpin肽酶抑制剂, B亚型	-4.4	-82.3	-68.9
DUX2	11735181	同源盒转录因子2	57	4.6	76.0	SSTR1	11728041	生长激素受体1	-87	-8.1	-68.4

图2C



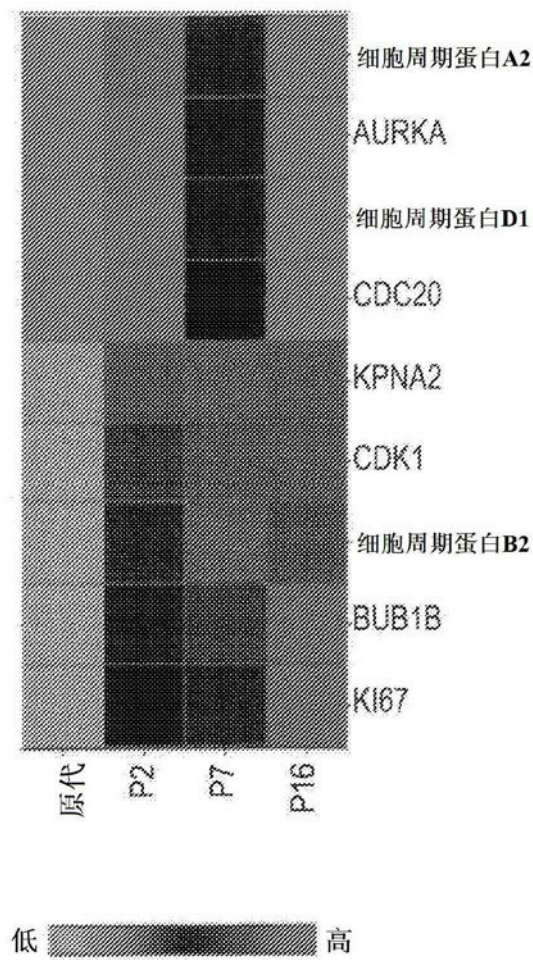


图2D

功能注释	p-值	预测活化状态	活化z-得分	分子数
细胞死亡	2.20E-15	降低	-2.8	457
坏死	2.27E-14	降低	-2.431	363
细胞分化	3.97E-12	降低	-4.112	287

图2E



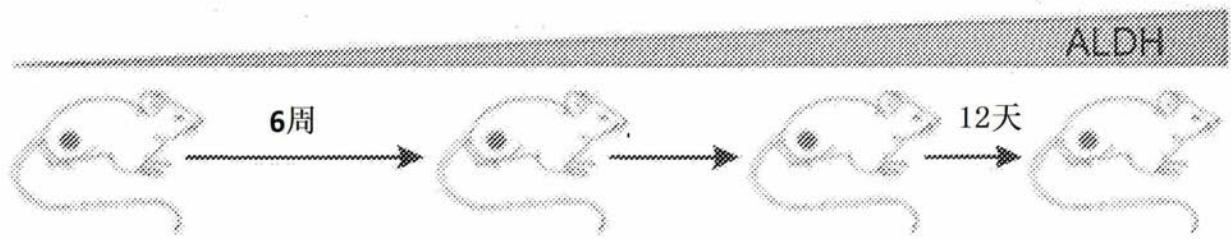


图3A

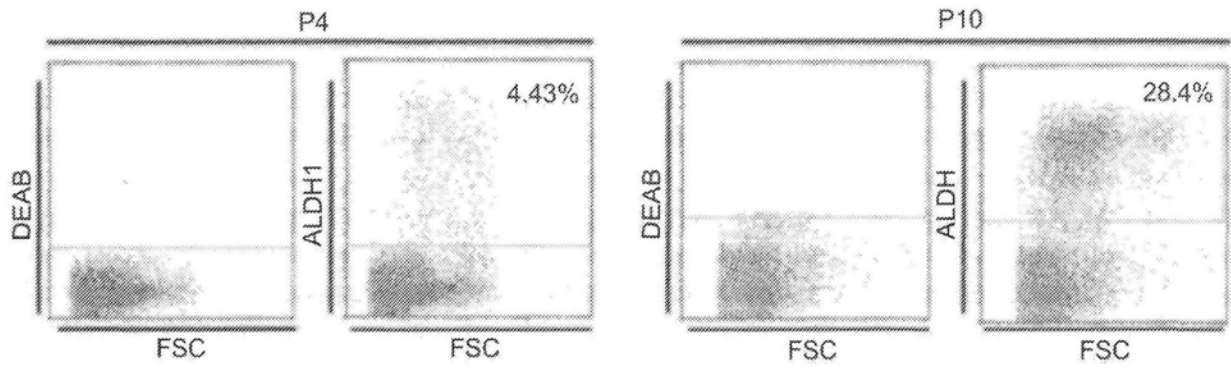


图3B



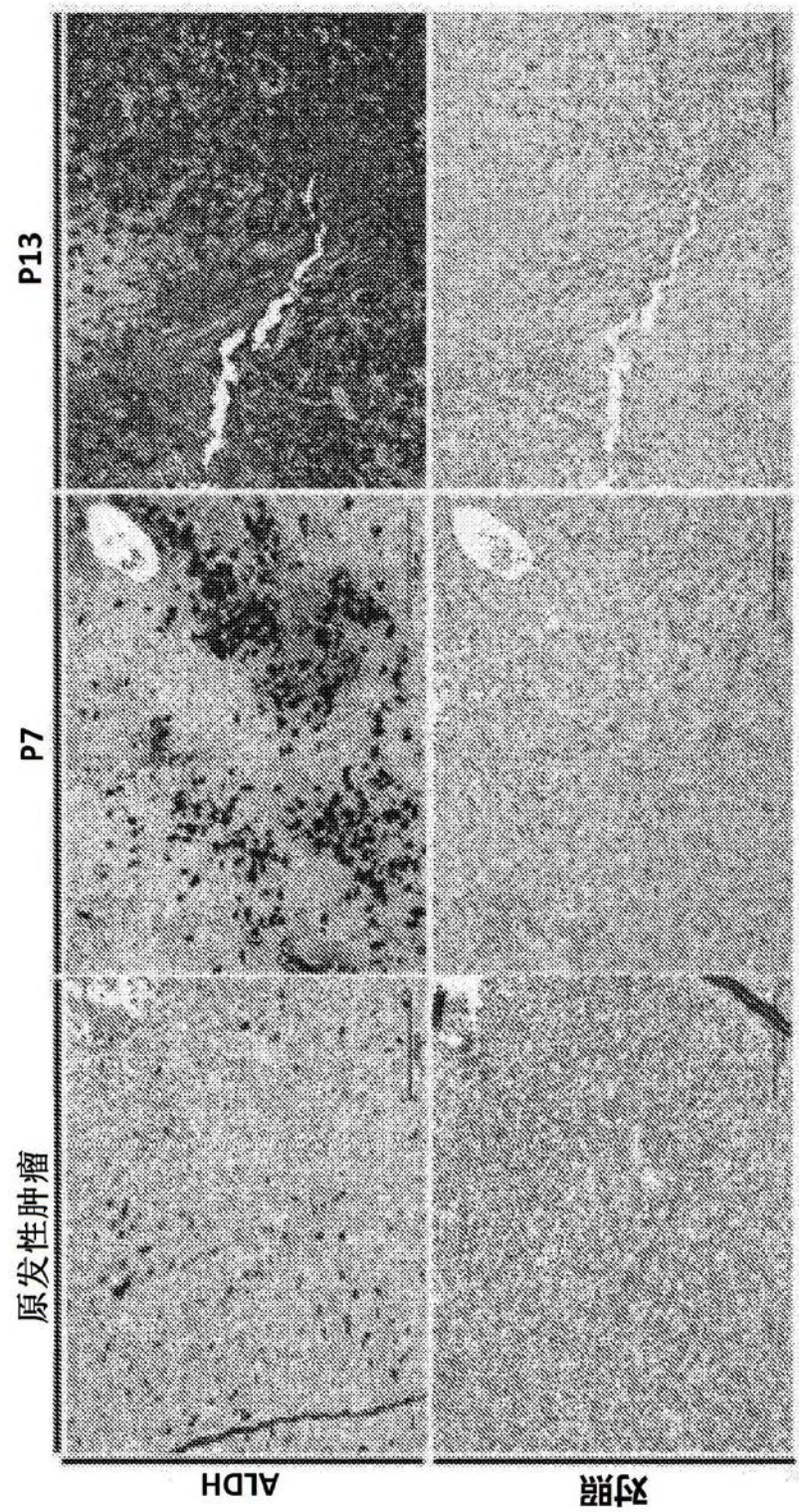


图3C



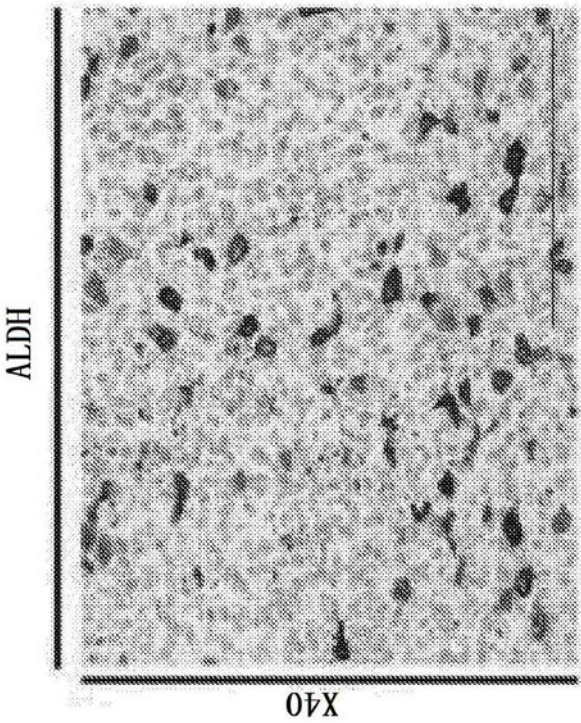


图3D

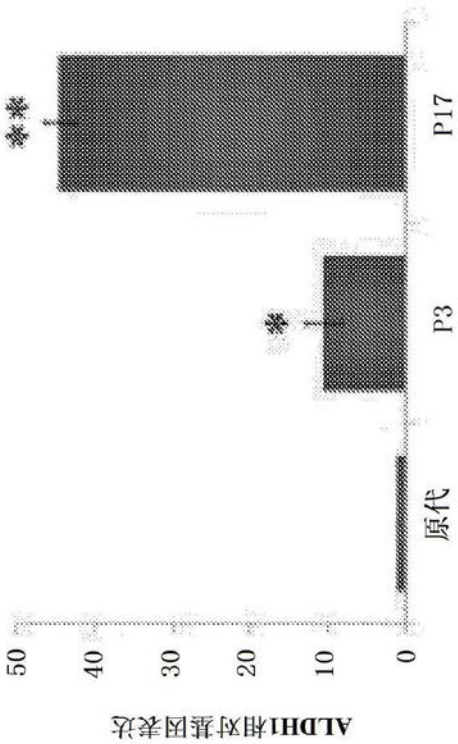


图3E



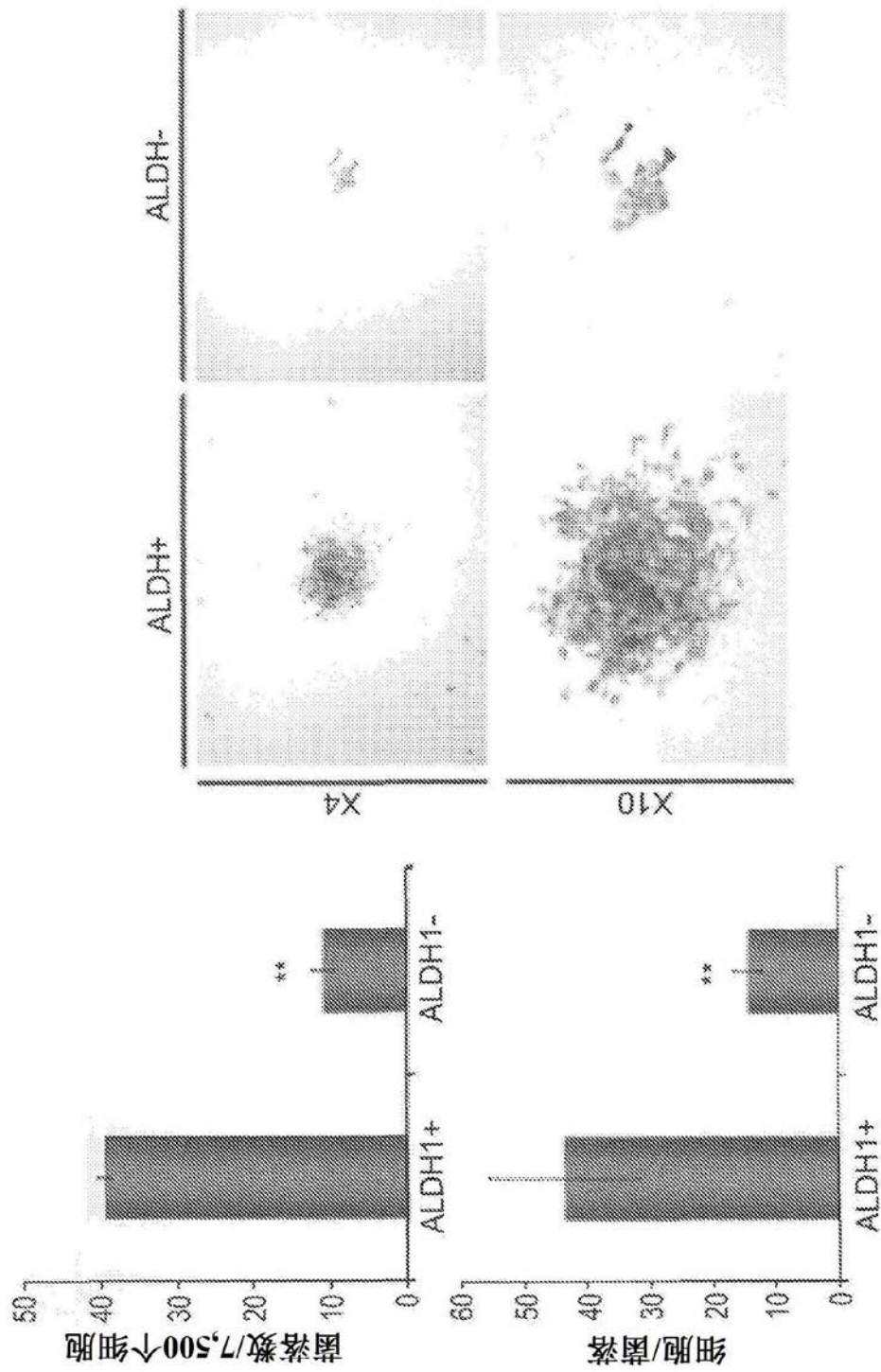


图4A







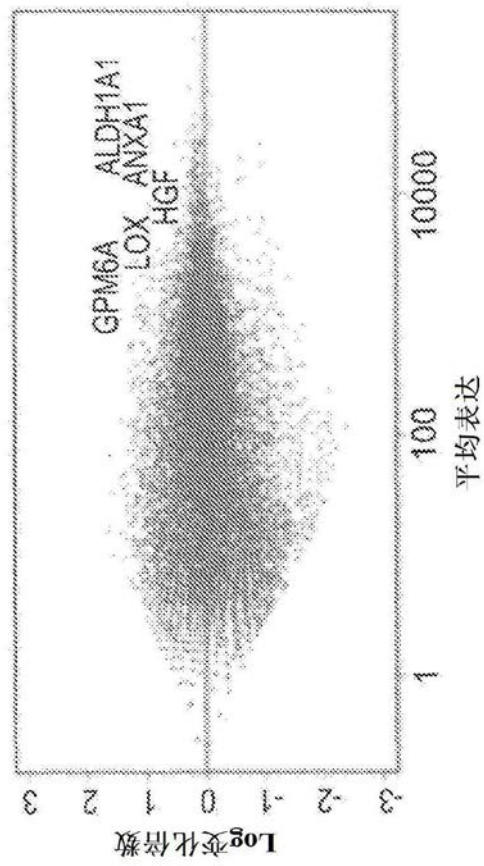


图4C

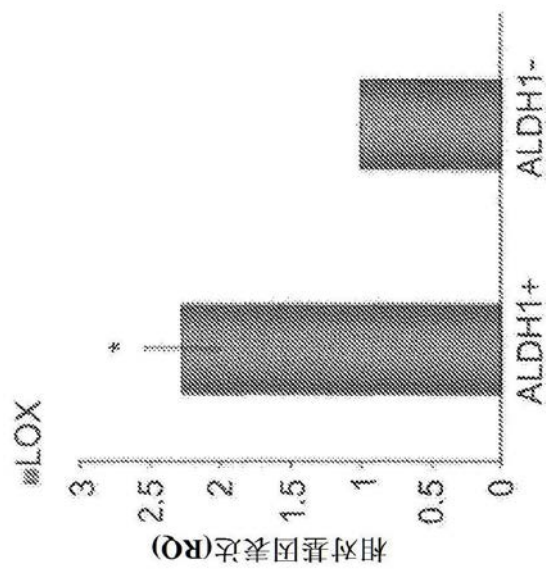


图4D



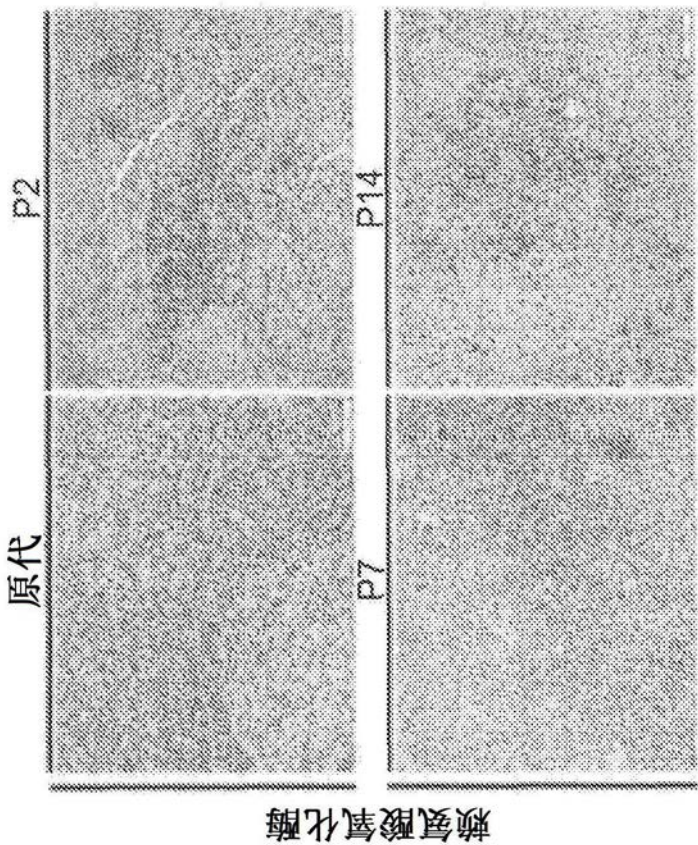


图5A

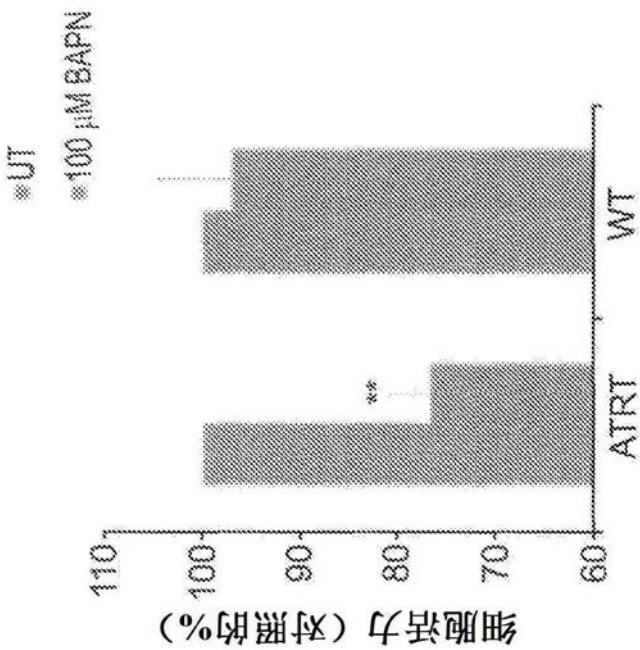


图5B



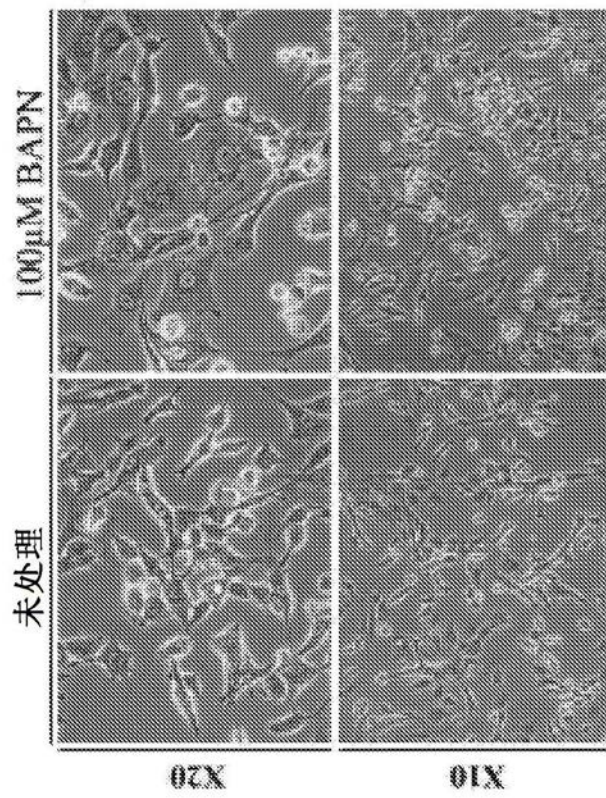


图5C

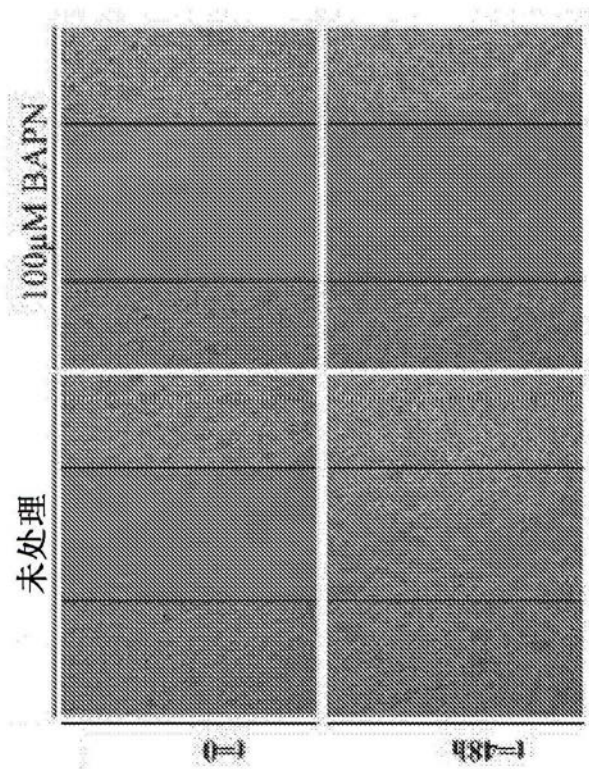


图5D



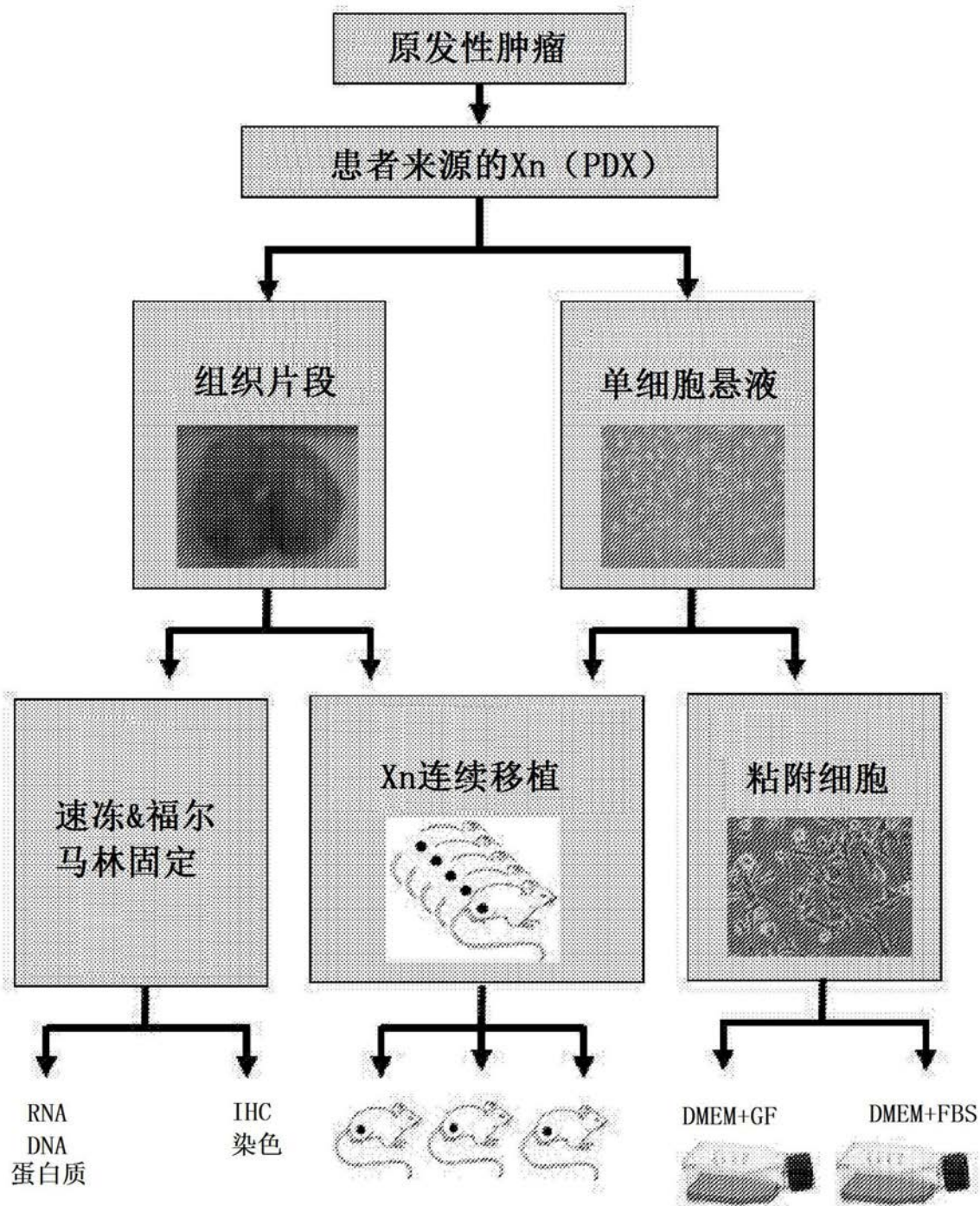


图6



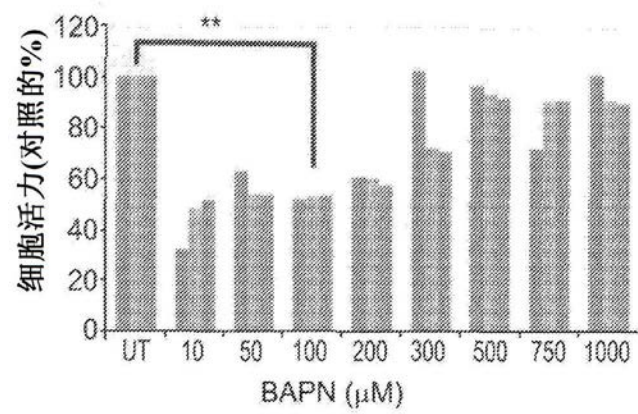


图7A

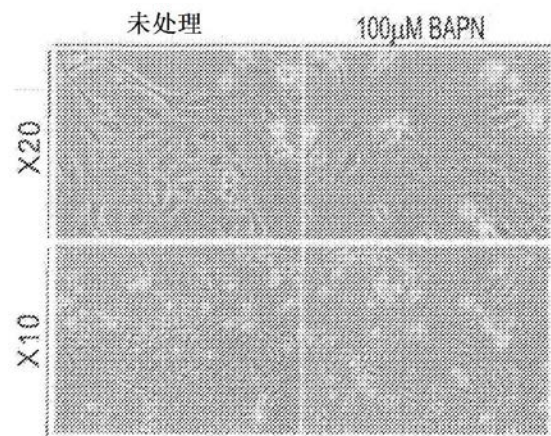


图7B

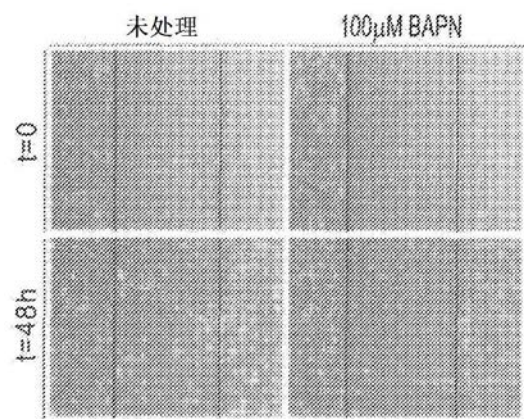


图7C



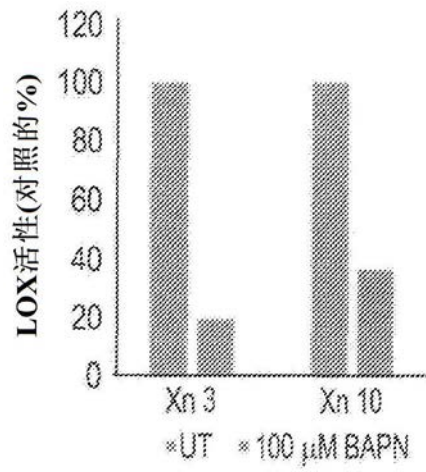


图7D

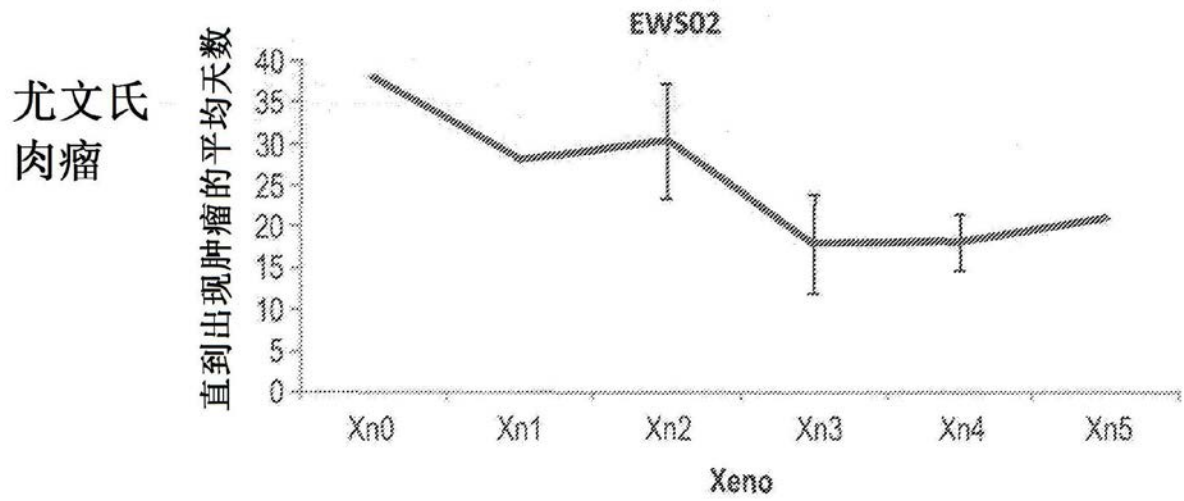


图8A

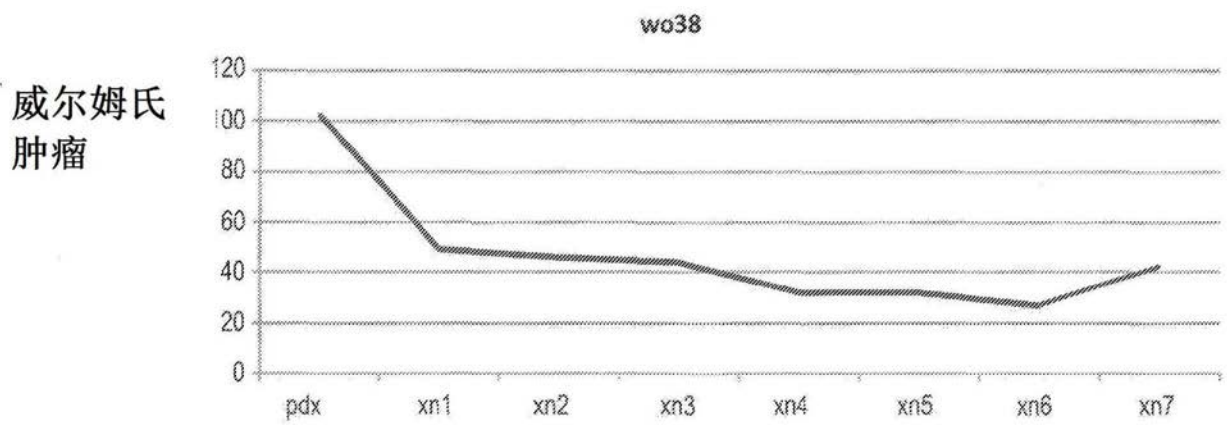


图8B



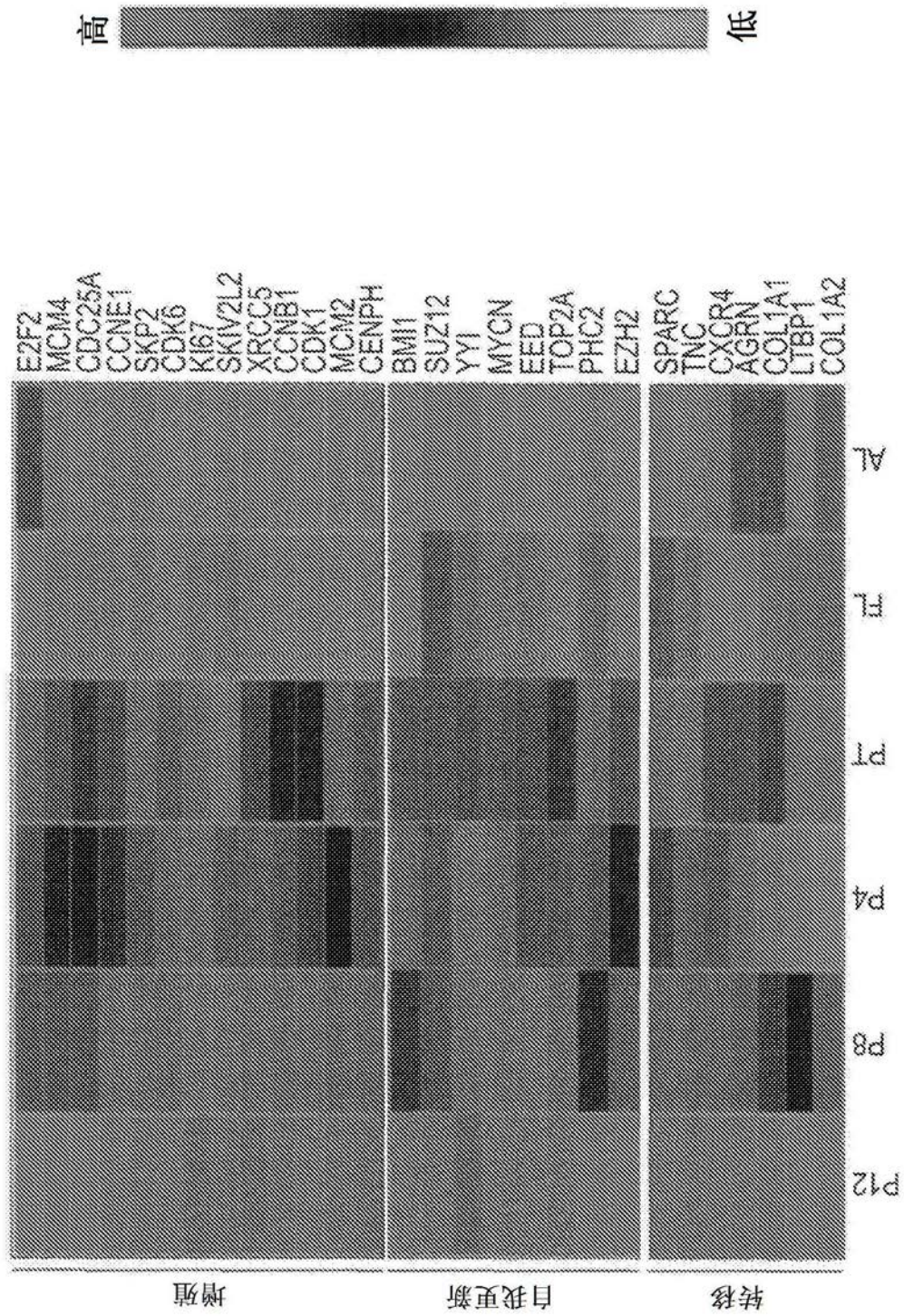


图9



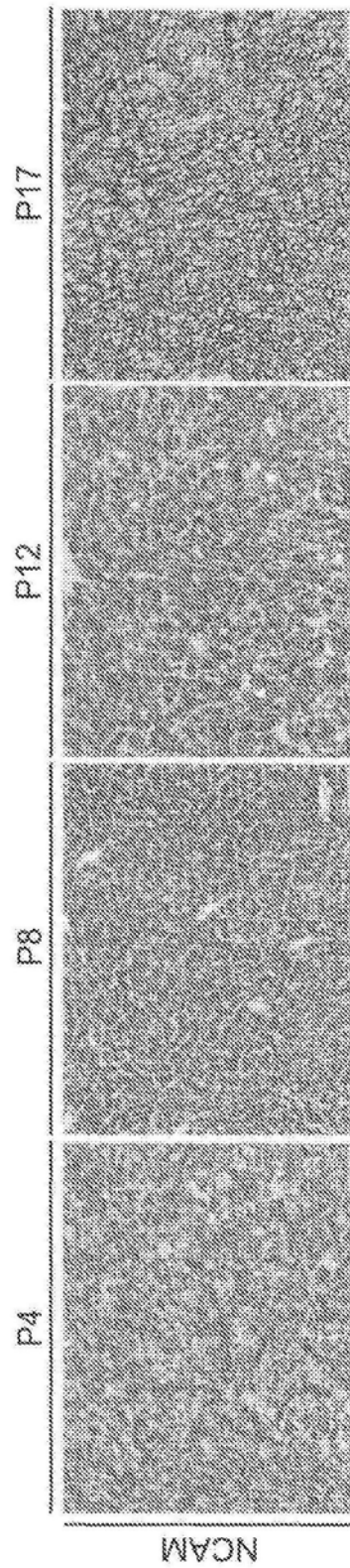


图10A



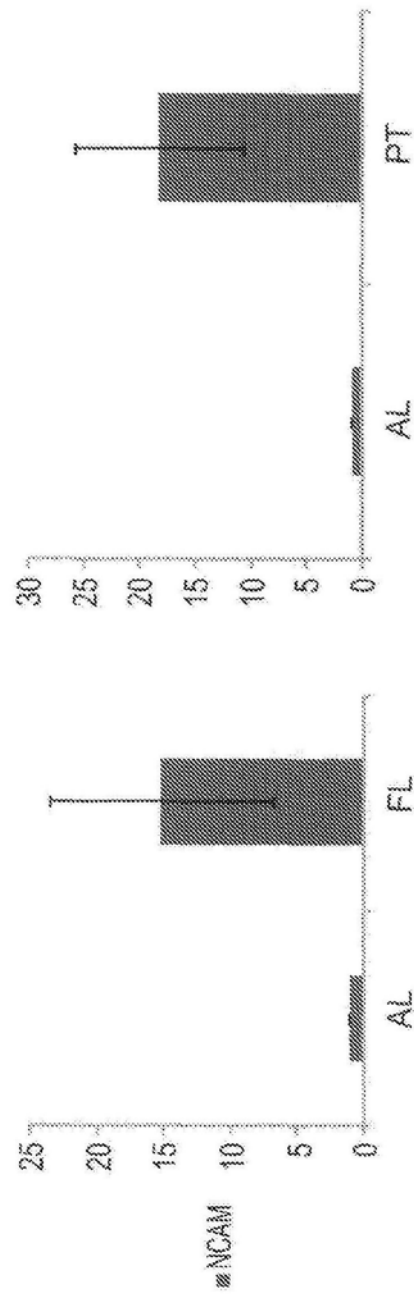


图10B



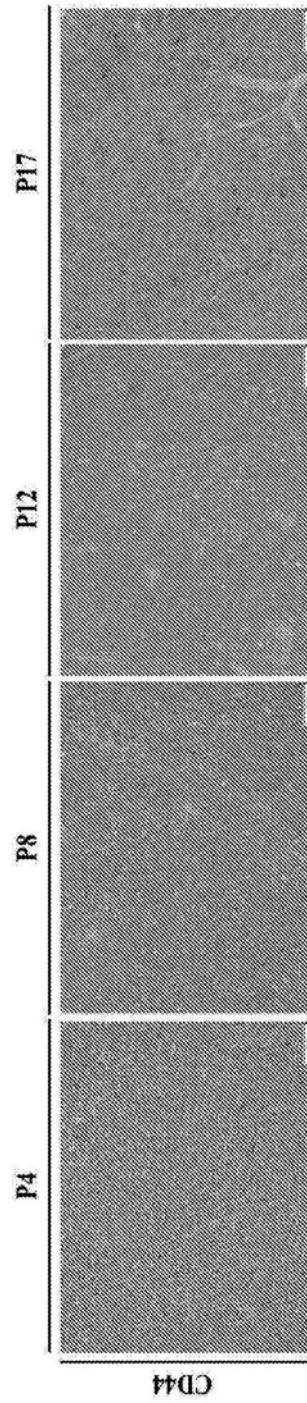
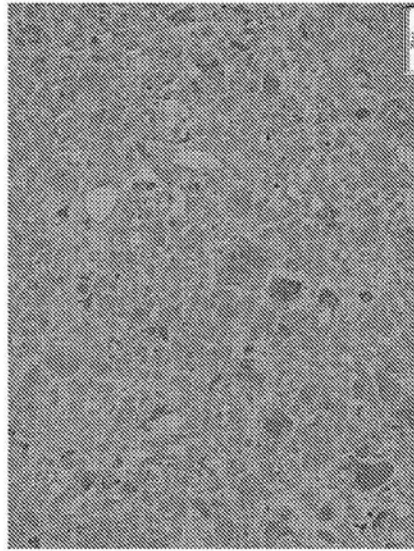


图11A



X20



原发性肿瘤

图11B