



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105358985 B

(45)授权公告日 2018.08.28

(21)申请号 201480036588.4

(22)申请日 2014.06.24

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105358985 A

(43)申请公布日 2016.02.24

(30)优先权数据
61/884,226 2013.07.09 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2015.12.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/043793 2014.06.24

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/006043 EN 2015.01.15

(73)专利权人 内布拉斯加大学董事会
地址 美国内布拉斯加州林肯市

(72)发明人 迈克尔·安东尼·霍林斯沃思
普拉卡什·拉达克里希南

(74)专利代理机构 北京三高永信知识产权代理
有限责任公司 11138

代理人 闫小刚

(51)Int.Cl.
G01N 33/574(2006.01)

(56)对比文件
US 2013/0059744 A1,2013.03.07,
Birgit C. Schultes et al..Inducion of
tomor- and CA125-specific T cell
responses in patients(pts) with
epithelial ovarian cancer(EOC) treated
with OvaRex ® MAb-B43.13.《Proceedings of
the American Association for Cancer
Research》.2002,第43卷

H.Fingert et al..Clinical development
of Ovarex MAb-B43.13 monoclonal antibody
for treatment of ovarian cancer: impact
of immune responses and circulating CA125
levels on clinical efficacy.《European
Journal of Cancer》.2001,第37卷S260.

审查员 赵晓明

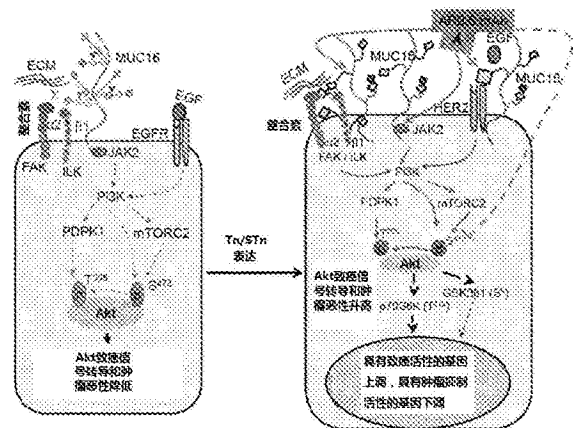
权利要求书1页 说明书16页 附图12页

(54)发明名称

靶向糖蛋白以治疗癌症的新方法

(57)摘要

本发明涉及一种抑制肿瘤生长的方法。更具体地讲,本发明涉及靶向糖蛋白上的截短O-聚糖的单克隆抗体抑制促存活细胞信号转导通路的活化以抑制肿瘤生长的用途。例如,单克隆抗体AR9.6可用于靶向MUC16糖蛋白上的截短O-聚糖,从而抑制磷脂酰肌醇3-激酶/Akt(PI3K/Akt)信号转导通路。



CN 105358985 B

1. 一种单克隆抗体AR9.6在制备用于抑制表达MUC16的胰腺肿瘤的胰腺肿瘤生长的药物的用途,其中单克隆抗体AR9.6可结合至O-聚糖粘蛋白型糖蛋白MUC16的SEA结构域5,以抑制促存活细胞信号转导通路PI3K/Akt的活化。

2. 根据权利要求1所述的用途,其中所述O-聚糖粘蛋白型糖蛋白MUC16包含截短O-聚糖。

3. 根据权利要求2所述的用途,其中所述截短O-聚糖包含Tn抗原、唾液酸化Tn抗原(STn)或它们的组合。

4. 根据权利要求1所述的用途,还包括施用包含另外的抗体或其治疗活性片段或化疗方案中的至少一者的第二治疗剂。

5. 根据权利要求1所述的用途,还包括施用包含细胞毒素剂的第二治疗剂。

6. 根据权利要求5所述的用途,其中所述细胞毒素剂是吉西他滨和凯素中的至少一者。

7. 根据权利要求4所述的用途,其中所述另外的抗体或其治疗活性片段是奥戈伏单抗抗体B43.13。

8. 根据权利要求4所述的用途,其中所述化疗方案是福尔费力纳科斯。

9. 根据权利要求1所述的用途,其中所述药物用于治疗胰腺癌症。

10. 一种药物组合物,用于抑制促存活细胞信号转导通路PI3K/Akt的活化,用于抑制表达MUC16的胰腺肿瘤的胰腺肿瘤生长,该药物组合物包含单克隆抗体AR9.6和药学上可接受的载体,该单克隆抗体AR9.6可结合至O-聚糖粘蛋白型糖蛋白MUC16的SEA结构域5。

11. 根据权利要求10所述的药物组合物,还包括包含另外的抗体或其治疗活性片段或化疗方案中的至少一者的第二治疗剂。

12. 根据权利要求10所述的药物组合物,还包括包含细胞毒素剂的第二治疗剂。

13. 根据权利要求12所述的药物组合物,其中所述细胞毒素剂是吉西他滨和凯素中的至少一者。

14. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述另外的抗体或其治疗活性片段是奥戈伏单抗抗体B43.13。

15. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述化疗方案是福尔费力纳科斯。

16. 根据权利要求10所述的药物组合物,其中所述药物组合物用于治疗胰腺癌症。

靶向糖蛋白以治疗癌症的新方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求提交于2013年7月9日的美国临时专利申请61/844,226的优先权,该临时专利申请的说明书在此以引用方式整体并入本发明。

背景技术

[0003] (a) 技术领域

[0004] 本发明涉及治疗癌症的方法。更具体地讲,本发明涉及靶向糖蛋白上的截短O-聚糖的单克隆抗体抑制促存活细胞信号转导通路活化的用途。例如,单克隆抗体AR9.6可用于靶向MUC16糖蛋白上的截短O-聚糖。

[0005] (b) 相关现有技术

[0006] 在美国,胰腺癌是癌症相关死亡的第四大原因,其5年存活率低于4%且中值存活期短于6个月。根据美国癌症协会(American Cancer Society)的预计,2013年在美国由于胰腺癌而导致的新病例数和死亡例数分别为45,220和38,460。在诊断时,超过80%的胰腺癌患者患有局部晚期或高转移性疾病。

[0007] 目前,福尔费力纳科斯(FOLFIRINOX)是转移性疾病患者的最好治疗剂,并且具有良好的性能状态,吉西他滨(gemcitabine)单独或与凯素(Abraxane)组合是治疗其他胰腺癌患者的一线化疗剂。然而,其响应率一般,而且总体中值存活期仍不理想。患者对化疗响应较差和预后较差部分地是由于与产生耐药性、侵袭致瘤性和早期转移相关的致癌信号转导通路的组成型活化导致的。

[0008] 这些不利影响导致了对战胜致命性癌症(通常包括但不限于胰腺癌)的新型分子靶向疗法的需要。

[0009] 已经公认,膜粘蛋白MUC16的异常表达与肿瘤进展以及例如卵巢癌和胰腺癌的癌症的转移相关。MUC16在肿瘤进展和转移中的作用通过与致癌调节剂的相互作用进行。例如,应当理解,MUC16在卵巢癌细胞中的异常表达通过与间皮素(肿瘤分化因子)的相互作用以及通过因阻断自然杀伤细胞介导的细胞毒性作用而发挥的免疫抑制功能促进腹膜转移,而MUC16的过表达经由刺激亚努斯(Janus)激酶2(JAK2)增加乳腺癌细胞的增殖。还应当理解的是,MUC16在胰腺癌中上调,并且其表达在肝转移中升高,但在胰腺上皮内瘤变(PanIN)或正常胰腺中均未检测到MUC16的表达,暗示MUC16的表达可能随后在疾病进展中出现。

[0010] 尽管MUC16在疾病进展中的作用已知,但粘蛋白型糖蛋白上的寡糖(O-连接的糖基化)修饰的可能作用尚属未知。研究显示,截短O-聚糖(Tn和唾液酸化Tn,STn)的表达在胰腺癌中出现的百分比高于其他类型的恶性肿瘤,并且截短O-聚糖的异常表达与肿瘤进展和不利患者结局相关是公认的。例如,超过80%的人类恶性肿瘤表达STn抗原,并且在所有情况下STn的检测与预后差和患者总体存活期短相关。另外,粘蛋白型糖蛋白上肿瘤相关截短糖类抗原Tn和STn的表达在胰腺癌中所观察到的最常见肿瘤特异性寡糖改变之中。Tn和STn表位出现在癌细胞表面上是由于ST6GalNAc-1的过表达或核心3合酶/核心1合酶活性的缺乏和/或核心1合酶特异性分子伴侣(Cosmc)的缺陷。已在多种上皮癌细胞上观察到STn抗原的过

表达,但在胰腺癌中观察到的频率最高。例如,STn的过表达出现在肿瘤进展早期的上皮癌细胞(例如,早期上皮良性病变)和胰腺癌(例如,胰腺上皮内瘤变III期(PanIN-3))中,其被认为是先于胰腺癌发展的癌前病变。总之,这些发现表明截短O-聚糖的过表达是导致胰腺癌发展的早期事件。然而,胰腺肿瘤发生期间这些截短O-聚糖的确切生物机理尚不完全清楚。

[0011] 尽管进行了二十年的研究,但在癌症的分子靶向疗法的开发中利用已知的癌症生物标记物,例如粘蛋白型O-聚糖的尝试仍然以失败告终。

[0012] 因此,需要使用靶向粘蛋白型糖蛋白上的O-聚糖的单克隆抗体抑制促存活细胞信号转导通路的活化的新方法。

发明内容

[0013] 根据一个实施方案,提供了抑制肿瘤生长的方法,该方法包括将靶向O-聚糖粘蛋白型糖蛋白的单克隆抗体施用给对其有需要的受试者,以抑制促存活细胞信号转导通路的活化。

[0014] 单克隆抗体可以是AR9.6。

[0015] 粘蛋白型糖蛋白可以是MUC16。

[0016] 促存活细胞信号转导通路可以是PI3K/Akt信号转导通路。

[0017] O-聚糖粘蛋白型糖蛋白可包括截短O-聚糖。

[0018] 截短O-聚糖可包含Tn抗原、唾液酸化Tn抗原(STn)或它们的组合。

[0019] 本发明的方法还可以包括施用包含细胞毒素剂、另外的抗体或其治疗活性片段或化疗方案中的至少一者的第二治疗剂。

[0020] 细胞毒素剂可以是吉西他滨和凯素中的至少一者。

[0021] 另外的抗体或其治疗活性片段可以是奥戈伏单抗(oregovomab)抗体B43.13。

[0022] 化疗方案可以是福尔费力纳科斯。

[0023] 肿瘤可选自胰腺肿瘤、结肠肿瘤、卵巢肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤和肝肿瘤。

[0024] 该方法可用于治疗癌症。

[0025] 根据另一个实施方案,提供了包含靶向O-聚糖粘蛋白型糖蛋白的单克隆抗体与药学上可接受的载体组合的药物组合物。

[0026] 单克隆抗体可以是AR9.6。

[0027] 粘蛋白型糖蛋白是MUC16。

[0028] 药物组合物还可包括包含细胞毒素剂、另外的抗体或其治疗活性片段或化疗方案中的至少一者的第二治疗剂。

[0029] 细胞毒素剂可以是吉西他滨和凯素中的至少一者。

[0030] 另外的抗体或其治疗活性片段可以是奥戈伏单抗抗体B43.13。

[0031] 化疗方案可以是福尔费力纳科斯。

[0032] 根据另一个实施方案,提供了抑制肿瘤生长的方法,该方法包括将本发明的药物组合物施用给对其有需要的受试者。

[0033] 该方法可用于治疗癌症。

[0034] 根据另一个实施方案,提供了单克隆抗体靶向O-聚糖粘蛋白型糖蛋白抑制促存活

细胞信号转导通路的活化以抑制肿瘤生长的用途。

[0035] 单克隆抗体可以是AR9.6。

[0036] 粘蛋白型糖蛋白可以是MUC16。

[0037] 促存活细胞信号转导通路可以是PI3K/Akt通路。

[0038] O-聚糖粘蛋白型糖蛋白可包含截短O-聚糖。

[0039] 根据权利要求22所述的用途,其中截短O-聚糖包含Tn抗原、唾液酸化Tn抗原(STn)或它们的组合。

[0040] 该用途还可包括选自细胞毒素剂、另外的抗体或其治疗活性片段或化疗方案中的至少一者的第二治疗剂的用途。

[0041] 细胞毒素剂可以是吉西他滨和凯素中的至少一者。

[0042] 另外的抗体或其治疗活性片段可以是奥戈伏单抗抗体B43.13。

[0043] 化疗方案可以是福尔费力纳科斯。

[0044] 癌症可选自胰腺肿瘤、结肠肿瘤、卵巢肿瘤、乳腺肿瘤、肺肿瘤和肝肿瘤。

[0045] 该用途可用于治疗癌症。

[0046] 根据另一个实施方案,提供了本发明的组合物用于抑制肿瘤生长的用途。

[0047] 该用途可用于治疗癌症。

[0048] 下面定义如下的术语。

[0049] 术语“施用...”和/或“...的施用”旨在意指给需要治疗的受试者提供根据本发明的含有或不含有另外的化合物的抗体。

[0050] 术语“组合物”旨在意指包含规定量的规定成分的产品,以及直接或间接源于规定量的规定成分的组合的任何产品。此类与药物组合物有关的术语旨在涵盖包含构成药学上可接受的载体的活性成分和惰性成分的产品,以及直接或间接源自任何一种或更多种成分的组合、复合或聚集,或源自一种或更多种成分的解离,或源自一种或更多种成分的其他类型的反应或相互作用的任何产品。因此,本发明的药物组合物涵盖将根据本发明的抗体与药学上可接受的载体混合而制成的任何组合。所谓“药学上可接受的”是指载体、稀释剂或赋形剂必须与制剂的其他成分相容并且对其受体无害。

[0051] 术语“化疗方案”旨在意指若干化疗剂的组合。此类化疗方案背后的基本原理是不同化疗药物通过不同的细胞毒素机理工作,而且使用多种药物的结果在一些程度上将协同作用。因为它们具有不同剂量限制的不利影响,所以它们在化疗方案中可以全剂量一起给药。化疗方案可包括诱导和维持方案。

[0052] 术语“诱导方案”旨在意指用于疾病的初始治疗的化疗方案。

[0053] 术语“维持方案”旨在意指不间断使用化疗,以减少癌症复发的几率或防止现有癌症继续发展。

[0054] 如附图所示,关于主题的特征和优点根据以下所选实施方案的详细说明将更显而易见。如将认识到的是,本发明所公开的和受权利要求书保护的主体能够在均不脱离权利要求书的范围的情况下在多个方面进行修改。因此,附图和具体实施方式实际上被认为是示例性的,而不是限制性的,并且主题的全部范围在权利要求书中示出。

附图说明

[0055] 本发明的另外特征和优点从以下结合附图实施的具体实施方式将显而易见,其中:

[0056] 图1A和图1B示出了截短O-聚糖在胰腺癌细胞中的生成。敲除胰腺癌细胞系中的Cosmc基因(1A)显示,截短O-聚糖(Tn和STn)(1B)通过使核心1合酶的酶活性(1A-B)不稳定而表达。Cosmc的重新表达通过稳定核心1合酶的酶活性(1A-B)减少截短O-聚糖(1B)的形成;

[0057] 图2A示出了Cosmc敲除细胞的体外迁移(2A)增加,而图2B示出了其侵袭(2B)增加。Cosmc的重新表达恢复了此效果;

[0058] 图3示出了Cosmc敲除细胞增加了体内原位胰腺癌小鼠模型中的肿瘤重量(3A)和体积(3B)。Cosmc的重新表达恢复了此效果;

[0059] 图4A示出了Capan-1野生型和CKO细胞中的磷蛋白表达。CKO细胞中GSK3、Akt、S6Kb1、PKCa、内收蛋白(Adducin)、Jun和Raf1的磷酸化水平提高。CKO细胞中磷蛋白的相对倍数变化(每分钟计数,CPM)规一化为野生型细胞中的水平;

[0060] 图4B示出了对亲本和Cosmc敲除(KO)细胞进行的磷酸化免疫印迹,以验证p-AKT和PGSK3b;

[0061] 图5示出了OVCAR-3(卵巢癌)和HepG2细胞(肝癌)的亲本和Cosmc KO细胞中PGSK3b和T-合酶的验证;

[0062] 图6A示出了Capan-1野生型和CKO细胞之间差异表达变化>2倍的基因的RNA测序分析;

[0063] 图6B示出,大部分差异表达基因与癌症相关(n=72,37%);

[0064] 图7A示出,根据分子和细胞功能对差异表达基因进行的IPA分析显示,49个基因与细胞死亡和存活相关,28个基因与细胞运动相关;

[0065] 图7B示出了通过qRT-PCR对所选的差异表达基因的mRNA水平进行验证(来自RNA测序结果)。IGFBP5、FGFG19、LIF、SPPI、SPDEF、MUC2、C13ORF15、TNC、DAPK1和MUTYH的相对表达值(n倍变化)通过CKO细胞对野生型细胞的规一化(使用GAPDH)值计算。每个点表示三个独立实验的一式三份决定因素的平均值±S.D.。[***: p<0.0005, **: p<0.005, *: p<0.05, ns: 无意义];

[0066] 图8示出了RNA测序数据的独创通路分析(Ingenuity pathway analysis, IPA)。相较于野生型Capan-1细胞,在CKO细胞中的一个高度上调基因IGFBP5的IPA。IGFBP5受到ErbB家族成员的严密调控;

[0067] 图9A示出,在Cosmc KO细胞中观察到ErbB2/EGFR2/HER2(Y1248)的磷酸化水平提高;

[0068] 图9B示出用HER2抑制剂(CP724714, 24h)处理Capan-1cosmc KO细胞通过剂量依赖方式抑制了Akt(S473)的磷酸化。

[0069] 图10A示出了邻位连接分析(PLA),其显示了在Cosmc KO细胞和亲本(野生型)Capan-1细胞中观察到的MUC16和ErbB2之间的相互作用增加;

[0070] 图10B示出了邻位连接分析(PLA),其显示了在Cosmc KO细胞和亲本(野生型)Capan-1细胞中观察到的MUC16和ErbB2之间的相互作用增加;

[0071] 图11示出了用MUC16特异性抗体处理Capan-1(A)和OVCAR-3(B)细胞的结果。在24h

时间点后,通过免疫印迹探测细胞裂解液的野生型和CKO细胞中的Akt磷酸化;

[0072] 图12A和12B示出了AR9.6mAb的表位作图。AR9.6mAb结合MUC16的无糖基化TR (SEA域5和6) 上的构象表位。MUC16TR1.7包含部分TR4接头区域、SEA结构域5、完整TR5接头区域和TR6的SEA结构域的一半 (12,660-12,993,264aa)。MUC16TR 1.2包含部分TR4接头区域、SEA结构域5和TR5接头区域 (12,665-12,858,194aa)。MUC165/2TR构建体包含SEA结构域5的一半、TR5接头区域和TR6的SEA结构域 (12,757-12,923,167aa);

[0073] 图13示出了现有方法的汇总。MUC16上截短O-聚糖的表达通过活化致癌细胞信号转导增强了胰腺癌细胞恶性性质。

具体实施方式

[0074] 在实施方案中,公开了治疗癌症的新方法。更具体地讲,提供了使用靶向粘蛋白型糖蛋白上的截短O-聚糖的单克隆抗体抑制促存活细胞信号转导通路的活化的新方法。根据本发明的一个实施方案,靶向截短粘蛋白型糖蛋白抑制了这些糖蛋白在致瘤性和肿瘤进展中的作用。

[0075] 在一个实施方案中,治疗有效量的单克隆抗体AR9.6可用于靶向MUC16糖蛋白上的截短O-聚糖,从而抑制磷脂酰肌醇3-激酶/Akt (PI3K/Akt) 信号转导通路。

[0076] 在其他方面,现有方法教导,MUC16糖蛋白(也称为CA125) 上O-聚糖的癌症特异性截短形成了Her2/Neu(也称为ErbB2) 受体的配体,其通过增加癌细胞致癌潜力的Akt引起致癌信号转导级联反应。此方法指出,除作为恶性肿瘤的生物标记物之外,MUC16的异常糖形还可充当一种形式的致癌细胞因子。

[0077] MUC16是在子宫内膜、气管和角膜的正常上皮中表达的膜结合的高度糖基化的细胞表面糖蛋白。通常MUC16的表达在还生成循环可溶形式的MUC16的恶性肿瘤中也上调。已知的是,膜粘蛋白MUC16的异常表达与致瘤性和癌症,例如胰腺癌的转移相关。另外,在胰腺上皮内瘤变(PanIN) 中未检测到MUC16,在原发肿瘤和转移性病变中升高,暗示该粘蛋白的表达是疾病进展中的后续事件。MUC16在卵巢癌细胞中的异常表达通过与间皮素(肿瘤分化因子) 的相互作用以及通过因阻断自然杀伤细胞介导的细胞毒性作用而发挥的免疫抑制功能促进腹膜转移。最近的研究还显示,MUC16的过表达通过刺激亚努斯(Janus) 激酶2(JAK2) 增加了乳腺癌细胞的增殖。这些报道强烈暗示,MUC16通过与致癌调节剂的相互作用在肿瘤进展和转移中发挥主要作用。因此,研究暗示MUC16通过与致癌调节剂相互作用在癌症中发挥主要作用,然而对粘蛋白型糖蛋白例如MUC16上的寡糖(O-连接的糖基化) 修饰,尤其是作为潜在的癌症疗法的研究却很少。

[0078] 预期,现有方法和治疗策略可单独或与细胞毒素剂组合使用,以延长总体患者存活期。细胞毒素剂包括但不限于血管生成抑制剂、抗增殖剂、激酶抑制剂、受体酪氨酸激酶抑制剂、极光激酶抑制剂、球(Polo) 样激酶抑制剂、Bcr-Abl激酶抑制剂、生长因子抑制剂、COX-2抑制剂、非甾体抗炎药(NSAIDS)、抗有丝分裂剂、烷基化剂、抗代谢物、嵌入抗生素、含铂剂、生长因子抑制剂、电离辐射、细胞周期抑制剂、酶、拓扑异构酶抑制剂、生物响应调节剂、免疫剂、抗体、激素治疗剂、类视色素/三角肌植物碱、蛋白酶体抑制剂、HSP-90抑制剂、组蛋白脱乙酰基酶抑制剂(HDAC)、嘌呤类似物、嘧啶类似物、MEK抑制剂、CDK抑制剂、ErbB2受体抑制剂、mTOR抑制剂以及它们的组合以及其他抗肿瘤药。

[0079] 血管生成抑制剂包括但不限于EGFR抑制剂、PDGFR抑制剂、VEGFR抑制剂、TTE2抑制剂、IGF1R抑制剂、基质金属蛋白酶2 (MMP-2) 抑制剂、基质金属蛋白酶9 (MMP-9) 抑制剂、血小板反应蛋白类似物例如血小板反应蛋白-1和N-Ac-Sar-Gly-Val-D-alloIle-Thr-Nva-He-Arg-Pro-NHCH₂CH₃或它们的盐和N-Ac-Sar-Gly-Val-D-alloIle-Thr-Nva-Ile-Arg-PrO-NHCH₂CH₃的类似物例如N-Ac-GlyVal-D-aIle-Ser-Gln-Ile-Arg-ProNHCH₂CH₃或它们的盐。

[0080] EGFR抑制剂的实例包括但不限于易瑞沙 (Iressa) (吉非替尼 (gefitinib))、特罗凯 (Tarceva) (厄洛替尼 (erlotinib) 或OSI-774)、埃克替尼 (Icotinib)、爱必妥 (Erbix) (西妥昔单抗 (cetuximab))、EMD-7200、ABX-EGF、HR3、IgA抗体、TP-38 (IVAX)、EGFR融合蛋白、EGF-疫苗、抗EGFr免疫脂质体和泰嘉锭 (Tykerb) (拉帕替尼 (lapatinib))。

[0081] PDGFR抑制剂的实例包括但不限于CP-673,451和CP-868596。

[0082] VEGFR抑制剂的实例包括但不限于安维汀 (Avastin) (贝伐单抗 (bevacizumab))、索坦 (Sutent) (舒尼替尼 (sunitinib), SU1 1248)、蕾莎瓦 (Nexavar) (索拉非尼 (sorafenib), BAY43-9006)、CP-547,632、阿西替尼 (axitinib) (AG13736)、阿帕替尼 (Apatinib)、卡博替尼 (cabozantinib)、拉克提吗 (Zactima) (凡德他尼 (vandetanib), ZD-6474)、AEE788、AZD-2171、VEGF捕集剂、瓦他拉尼 (Vatalanib) (PTK-787, ZK-222584)、Macugen、M862、帕唑帕尼 (Pazopanib) (GW786034)、ABT-869和安吉笛明 (angiozyme)。

[0083] 血小板反应蛋白类似物的实例包括但不限于TSP-I和ABT-510。

[0084] 极光激酶抑制剂的实例包括但不限于VX-680、AZD-1152和MLN-8054。球样激酶抑制剂的实例包括但不限于BI-2536。

[0085] Bcr-Abl激酶抑制剂的实例包括但不限于格列卫 (Gleevec) (伊马替尼 (imatinib)) 和达沙替尼 (Dasatinib) (BMS354825)。

[0086] 含铂剂的实例包括但不限于顺铂、伯尔定 (Paraplatin) (卡铂)、依铂、洛铂、奈达铂、乐沙定 (Eloxatin) (奥沙利铂) 或赛特铂。

[0087] mTOR抑制剂的实例包括但不限于CCI-779、雷帕霉素、西罗莫司、依维莫司、RAD001、INK-128和雷达罗莫司 (ridaforolimus)。

[0088] HSP-90抑制剂的实例包括但不限于格尔德霉素、根赤壳菌素、17-AAG、KOS-953、17-DMAG、CNF-101、CNF-1010、17-AAG-nab、NCS-683664、迈克格雷伯 (Mycograb)、CNF-2024、PU3、PU24FC1、VER49009、IPI-504、SNX-2112和STA-9090。

[0089] 组蛋白脱乙酰基酶抑制剂 (HDAC) 的实例包括但不限于辛二酰苯胺异羟肟酸 (SAHA)、MS-275、丙戊酸、TSA、LAQ-824、穿普克辛、图巴辛 (Tubacin)、图巴斯坦辛 (Tubastatin)、ACY-1215和缩酚肽 (Depsipeptide)。

[0090] MEK抑制剂的实例包括但不限于PD325901、ARRY-142886、ARRY-438162和PD98059。

[0091] CDK抑制剂的实例包括但不限于夫拉平度 (flavopiridol)、MCS-5A、CVT-2584、赛力西克利博 (seliciclib (CYC-202, R-roscovitine))、ZK-304709、PHA-690509、BMI-1040、GPC-286199、BMS-387,032、PD0332991和AZD-5438。

[0092] COX-2抑制剂的实例包括但不限于CELEBREX™ (塞来考昔 (celecoxib))、帕瑞昔布 (parecoxib)、地拉考昔 (deracoxib)、ABT-963、MK-663 (依托昔布 (etoricoxib))、COX-189 (罗美昔布 (Lumiracoxib))、BMS347070、RS 57067、NS-398、Bextra (伐地昔布 (valdecoxib))、帕拉昔布 (paracoxib)、万络 (Vioxx) (罗非昔布 (rofecoxib))、SD-8381、4-

甲基-2-(3,4-二甲基苯基)-1-(4-氨磺酰-苯基-1H-吡咯)、T-614、JTE-522、S-2474、SVT-2016、CT-3、SC-58125和安康信(Arcoxia)(依托昔布)。

[0093] 非甾体抗炎药(NSAID)的实例包括但不限于双水杨酸(Amigesic)、双氟尼酸(Dolobid)、布洛芬(美林(Motrin))、酮洛芬(奥鲁地(Orudis))、萘丁美酮(瑞力芬(Relafen))、吡罗昔康(Feldene)、萘普生(Aleve, Naprosyn)、双氯芬酸(服他灵(Voltaren))、吲哚美辛(Indocin)、舒林酸(奇诺力(Clinoril))、托美丁(Tolectin)、依托度酸(Etodolac)(罗丁(Lodine))、酮咯酸(Toradol)和噁丙嗪(Daypro)。

[0094] ErbB2受体抑制剂的实例包括但不限于CP-724-714、CI-1033(卡奈替尼(canertinib))、赫赛汀(Herceptin)(曲妥单抗(trastuzumab))、奥密塔克(Omitarg)(2C4, 帕妥珠单抗(petuzumab))、TAK-165、GW-572016(洛那法尼(Ionafarnib))、GW-282974、EKB-569、PI-166、dHER2(HER2疫苗)、APC8024(HER2疫苗)、抗HER/2neu双特异性抗体、B7.her2IgG3、AS HER2三功能双特异性抗体、mAB AR-209和mAB 2B-1。

[0095] 烷基化剂的实例包括但不限于氮芥N-氧化物、环磷酰胺、异环磷酰胺、曲磷胺、苯丁酸氮芥、美法仑、白消安、二溴甘露醇、卡巴醌、噻替哌、雷莫司汀、尼莫司汀、替莫唑胺、AMD-473、六甲蜜胺、AP-5280、阿帕兹醌、布罗斯塔林辛(brostallicin)、苯达莫司汀、卡莫司汀、雌莫司汀、福莫司汀、葡磷酰胺、KW-2170、异环磷酰胺(mafosfamide)和二溴卫矛醇、卡莫司汀(BCNU)、洛莫司汀(CCNU)、白消安、曲奥舒凡、达卡巴仁和替莫唑胺。

[0096] 抗代谢物的实例包括但不限于甲氨蝶呤、6-巯嘌呤核糖核苷、巯嘌呤、尿嘧啶类似物例如5-氟尿嘧啶(5-FU)单独或与甲酰四氢叶酸组合、替加氟、UFT、去氧氟尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、阿糖胞苷十八烷基磷酸盐、依诺他宾、S-I、力比泰(Alimta)(培美曲塞二钠, LY231514, MTA)、健择(Gemzar)(吉西他滨)、氟达拉滨、5-阿扎胞苷、卡培他滨、克拉屈滨、氯伐拉滨、地西他滨、依氟鸟氨酸、乙炔基胞苷、阿糖胞苷、羟基脲、TS-I、美法仑、奈拉滨、诺拉曲特、奥芬赛特(ocfosate)、培美曲塞二钠、喷司他丁、皮利曲松、雷替曲塞、特里阿宾(triapine)、三甲曲沙、阿糖腺苷、长春新碱、长春瑞滨、霉酚酸、噻唑呋林、利巴韦林、EICAR、羟基脲和去铁胺。

[0097] 抗生素的实例包括嵌入抗生素但不限于阿柔比星、放射菌素类例如放线菌素D、氨基柔比星、蒽环霉素、阿霉素、博来霉素a、博来霉素b、柔红霉素、多柔比星、依沙芦星、表柔比星、格拉比星(glarbuicin)、伊达比星、丝裂霉素C、奈莫柔比星、新制癌菌素、派来霉素、吡柔比星、蝴蝶霉素、斯酯、链脲霉素、戊柔比星、净司他丁以及它们的组合。

[0098] 拓扑异构酶抑制剂的实例包括但不限于选自阿柔比星、氨茶非特、贝洛替康、喜树碱、10-羟基喜树碱、9-氨基喜树碱、二氟替康、盐酸伊立替康(开普拓(Camptosar))、艾特唑林(edotecarin)、表柔比星(Ellence)、依托泊苷、依喜替康、吉马替康、勒托替康、奥拉西辛(orathecin(Supergen))、BN-80915、米托蒽醌、皮拉布辛(pirarubicin)、匹杉琼、鲁比替康、索布佐生、SN-38、特卢普塞和托泊替康的一种或多种药剂。

[0099] 抗体的实例包括但不限于利妥昔单抗(Rituximab)、西妥昔单抗、贝伐单抗、曲妥单抗、特异性CD40抗体和特异性IGF1R抗体。

[0100] 激素治疗剂的实例包括但不限于依西美坦(阿诺新(Aromasin))、乙酸亮丙瑞林、阿那曲唑(瑞宁得(Arimidex))、佛思瑞林(诺雷得(Zoladex))、戈舍瑞林、多西骨化醇、法偈唑、福美司坦、柠檬酸他莫昔芬(他莫昔芬)、康士得(Casodex)、阿巴瑞克(Abarelix)、特拉

尔斯塔 (Trelstar)、非那雄胺、氟维司群、托瑞米芬、雷洛昔芬、拉索昔芬、来曲唑、氟他胺、比卡鲁胺、甲地孕酮、米非司酮、尼鲁米特、地塞米松、泼尼松和其他糖皮质激素。

[0101] 类视色素/三角肌的实例包括但不限于西奥骨化醇 (EB 1089, CB 1093)、雷萨卡尔希特鲁 (lexacalcitrol) (KH 1060)、芬维A胺、阿利维A酸 (Aliretinoin)、贝沙罗汀 (Bexarotene) 和LGD-1550。

[0102] 植物碱的实例包括但不限于长春新碱、长春碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0103] 蛋白酶体抑制剂的实例包括但不限于硼替佐米 (万珂 (Velcade))、MG1 32、NPI-0052和PR-171。

[0104] 免疫剂的实例包括但不限于干扰素和多种其他免疫增强剂。干扰素包括干扰素 α 、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、干扰素 β 、干扰素 γ -1a、干扰素 γ -1b (Actimmune) 或干扰素 γ -n1以及它们的组合。其他药剂包括非格司亭、蘑菇多糖、西索菲兰、赛拉克丝 (TheraCys)、乌苯美司、WF-10、阿地白介素、阿来组单抗 (alemtuzumab)、BAM-002、达卡巴仁、达克珠单抗 (daclizumab)、地尼白介素、吉妥单抗奥唑米星 (gemtuzumab ozogamicin)、替伊莫单抗 (ibritumomab)、咪喹莫特、来格司亭、蘑菇多糖、黑素瘤疫苗 (Corixa)、莫拉司亭、OncoVAC-CL、沙格司亭、他索纳明、特克莱汀 (tecleukin)、胸腺法新、托西莫单抗、维如利金 (Virulizin)、Z-100、依帕珠单抗 (epratuzumab)、米妥莫单抗、奥戈伏单抗、帕尼单抗 (pemtumomab) (Y-muHMFg1)、普罗文奇 (Provence (Dendreon))、CTLA4 (细胞毒素淋巴细胞抗原4) 抗体以及能够阻断CTLA4例如MDX-010的药剂。

[0105] 生物响应调节剂的实例是改变活生物体的防卫机理或生物响应, 例如存活、生长或组织细胞分化, 以引导其具有抗肿瘤活性的药剂。此类药剂包括云芝多糖、蘑菇多糖、西索菲兰、毕西巴尼和乌苯美司。

[0106] 嘧啶类似物的实例包括但不限于5-氟尿嘧啶、氟尿苷、去氧氟尿苷、雷替曲塞、阿糖胞苷 (ara C)、阿糖胞苷、氟达拉滨和吉西他滨。

[0107] 嘌呤类似物的实例包括但不限于巯嘌呤和硫鸟嘌呤。

[0108] 抗有丝分裂剂的实例包括但不限于ABT-751、紫杉醇、多西他赛、埃博霉素D (KOS-862) 和ZK-EPO。

[0109] 本发明的化合物还旨在用作提高放疗功效的放射致敏剂。放疗的实例包括但不限于体外放疗 (XBRT) 或远距离治疗、近距离治疗或封装源放疗和非封装源放疗。

[0110] 本发明的化合物也可与不同类别的Bcl-2抑制剂例如ABT263或ABT737组合使用。

[0111] 现有方法将通过以下实施例进一步描述。

[0112] 参考以下实施例将更容易理解本发明, 这些实施例的提供旨在示出本发明而不是限制其范围。

[0113] 实施例1

[0114] 含TN/STN表位的糖蛋白在胰腺癌发病中的作用

[0115] 第一实验的进行旨在评估含Tn/STn表位的糖蛋白在胰腺癌发病中的作用。Tn和STn表位出现在癌细胞表面上是由于ST6GalNAc-1基因的过表达、核心3合酶/核心1合酶活性的缺乏和/或核心1合酶特异性分子伴侣“Cosmc”的缺陷。在该实验中, 使用在癌细胞表面 (SimpleCells) 形成截短O-聚糖的通用和稳定基因工程策略。该方法包括使用人类胰腺癌细胞系, 其中Cosmc基因座、控制O-聚糖延长的酶核心1合酶的分子伴侣使用锌指核酸酶

(ZFN) 技术将O-聚糖表位限制到Tn和STn来检测。

[0116] 参见图1, Capan-1细胞中Cosmc的敲除 (KO) 通过核心1合酶的降解在癌细胞表面上生成截短O-聚糖。该细胞系上Cosmc的重新表达 (CR) 通过恢复核心1合酶的酶活性延长了Tn表位。另外, 在同基因的OVCAR-3、CoLo205和HepG2癌细胞中也观察到类似的结果 (数据未示出)。这些结果暗示, 癌细胞中Cosmc敲除导致了癌细胞表面上肿瘤相关截短糖类抗原 (Tn和STn) 的组成型表达。Capan-1Cosmc重新表达细胞克隆no.1用于其余研究。

[0117] 实施例2

[0118] 截短O-聚糖对胰腺细胞致瘤性的作用

[0119] 第二实验的进行旨在研究截短O-聚糖对胰腺细胞致瘤性的作用。在原位移植模型中评估细胞的致瘤和转移潜力。

[0120] 参见图2A和图2B, 在与亲本和cosmc重新表达细胞进行比较时, 胰腺Capan-1细胞中截短O-聚糖的表达使体外迁移 (使用聚对苯二甲酸乙二醇酯膜测定法, 图2A) 和侵袭 (博伊登室测定法, 图2B) 增加。参见图3A和图3B, 在体内原位胰腺肿瘤模型中生长的cosmc缺失细胞中观察到肿瘤重量和体积显著增加。

[0121] 概括地说, 与亲本细胞相比, 表达Tn/STn表位的cosmc缺失细胞表现出显著增加的体外迁移、侵袭和体内肿瘤生长以及转移性质。

[0122] 实施例3

[0123] 磷酸激酶组分析

[0124] 为了进一步研究细胞信号转导机理受到细胞表面受体或其配体的异常糖基化影响的可能性, 使用金奈特工作 (Kinetworks) KPSS-1.3筛选进行同基因Capan-1细胞系中磷酸蛋白表达的重点分析 (n=38)。磷酸激酶组筛选显示, 与亲本细胞相比, Cosmc KO细胞中九个磷酸蛋白PKBa/Akt1 (S⁴⁷³和T³⁰⁸)、GSK3B (S⁹和Y²¹⁶)、S6Kb1、GSK3a (S²¹)、PKCa/β2、PKCa、内收蛋白γ、PKCa、Jun (S⁷³) 和Raf1选择性上调 (以每分钟计数CPM来度量), 七个磷酸蛋白Msk1、PKCδ、MEK1/2、B23、Smad1/5/8、Jun (S73, 两个低分子量蛋白) 和Erk1下调, 变化为至少24% (重复分析的平均值中的中值区间为±12) (图4A)。CKO细胞的上调磷酸蛋白CPM值用野生型细胞CPM值归一化, 并以磷酸化的倍数变化表示 (图4A)。通过同基因Capan-1细胞中的西部 (Western) 印迹分析对所选磷酸化蛋白 (pAkt和pGSK) 水平进行了确认和验证 (图4B)。Capan-1CKO细胞中Akt T308的磷酸化高于基线, 但由于亲本细胞中该位点的基线磷酸化不可检测, 确切的百分比无法计算。另外, 这些结果在其他同基因癌细胞系 (OVCAR-3和HepG2) 中得到了确认和验证 (图5)。这些结果显示, 癌细胞中Tn/STn抗原的表达活化了PC细胞中的磷脂酰肌醇3-激酶/Akt (PI3K/Akt) 致癌信号转导通路。

[0125] 实施例4

[0126] 截短O-聚糖介导的全局基因表达改变

[0127] 为了评估CKO胰腺癌细胞中截短O-聚糖的表达是否影响全局基因表达水平, 而进行RNA测序和独创 (Ingenuity) 通路分析 (IPA)。

[0128] RNA测序分析显示, 与野生型细胞相比, CKO细胞中59个基因上调, 67个基因下调, 变化>2倍, 8个基因沉默 (图6A)。此外, 在根据疾病和病症分类时, 大部分差异表达基因与癌症相关 (n=72, 37%) (图6B)。大部分差异表达基因与细胞死亡和存活以及细胞运动功能相关 (图7A)。CKO细胞 (与野生型细胞相比) 中所选促瘤基因的mRNA水平通过定量实时PCR分析

进行了验证。与野生型细胞相比，COSMC KO细胞中的上调基因MUC2、SPDEF、LIF、C13ORF15、FGF19和IGFBP5显示出qRT-PCR倍数差异(2.20、2.85、4.21、5.59、9.56和17.36)和RNA测序倍数差异(3.42、2.48、2.74、2.48、3.00和6.04)。与野生型细胞相比，COSMC KO细胞中的下调基因DAPK1和MUTYH显示出qRT-PCR倍数差异(1.4和1.6)和RNA测序倍数差异(2.0和2.1)。总之，这些结果暗示癌细胞表面上截短O-聚糖的异常表达调节功能与肿瘤促发相关的基因的表达。

[0129] 实施例5

[0130] 独创(INGENUITY)通路分析(IPA)

[0131] 为了鉴定在表达截短O-聚糖的PC细胞中活化所观察到的致癌细胞信号转导通路(PI3K/Akt)的上游受体-配体相互作用,使用独创(Ingenuity)通路分析(IPA)对这些差异磷酸化蛋白(38个中的29个)进行网络分析。

疾病和病症		
名称	p-值	# 分子数
癌症	6.37E-11-3.92E-04	15 ←
发育障碍	1.50E-09-3.21E-04	12
神经疾病	4.03E-08 - 3.82E-04	11
生物体损伤和异常	4.03E-08 - 3.16E-04	12
心血管疾病	1.73E-07 - 3.21E-04	12

[0133] 表1-疾病和病症

主要的典型通路		
名称	p-值	比率
癌症的分子机理	1.4E-16	12/381 (0.031)
B细胞受体信号转导	3.04E-16	10/171 (0.058)
ErbB2-ErbB3信号转导	6.56E-16	8/60 (0.133) ←
14-3-3介导的信号转导	2.05E-15	9/121 (0.074)
前列腺癌信号转导	1.54E-14	8/99 (0.081)

[0135] 表2-主要的典型通路

[0136] IPA揭示,大量癌症通路(表1)受到PC细胞中Cosmc敲除的影响。这些通路当中值得注意的是,CKO细胞中表皮生长因子受体(ErbB2-ErbB3)信号转导通路的活化(表2)。这些EGF受体的信号转导依赖于受体二聚化。多项研究报道,癌细胞表面上ErbB2-ErbB3的二聚

化活化了包括胰腺癌的癌症中的PI3K/Akt致癌细胞信号转导通路。这些结果暗示,PI3K/Akt致癌细胞信号转导的活化通过表达截短O-聚糖的PC细胞上EGF受体的活化进行。

[0137] 相似地,通过IPA对CKO细胞中的所有上调基因进行网络分析。网络分析揭示,IGFBP5(胰岛素样生长因子结合蛋白5)基因表达(RNA测序升高6倍,qRT-PCR升高17.6倍)受到EGF家族受体(EGFR1、2、3和4)的严密调控(图8)。相似地,另一个基因SPDEF(转录因子)也受到EGFR2调控(数据未示出)。RNA测序和IPA的组合结果显示,癌细胞上截短O-聚糖的表达活化了EGF受体家族成员,以诱导下游致癌细胞信号转导通路,这导致CKO PC细胞中肿瘤发生的提高。

[0138] 实施例6

[0139] HER2的活化及其下游AKT信号转导通路

[0140] 磷脂酰肌醇3-激酶/Akt(PI3K/Akt)信号转导通路是介导细胞过程,包括细胞增殖、生长、运动和细胞存活的潜在致癌信号转导通路是已知的。Akt活性提高主要通过作用于多个下游靶标而与细胞存活相关,包括促凋亡蛋白的失活、抗凋亡基因的活化和细胞周期的进展。实际上,Akt的活化与胰腺癌预后差相关(例如,研究显示,59%的胰腺癌显示出Akt的超活化)。

[0141] 然后,研究了表达O-聚糖的细胞是否活化PI3K/Akt信号转导通路。该活化可通过与MUC4、MUC4上的Tn抗原或MUC16与ErbB-2受体的相互作用进行。这些粘蛋白-生长因子受体相互作用可差异调节具有致癌(即,上调)和肿瘤抑制(即,下调)功能的基因的表达。

[0142] 参见图9,粘蛋白型糖蛋白上截短O-聚糖的过表达通过结合或诱导受体家族成员之间的异二聚化提高了ErbB2受体的活化。与野生型和Cosmc重新表达细胞相比,Cosmc KO细胞中观察到HER2(Y1248)的磷酸化提高(图9A)。另外,用小分子HER2抑制剂(CP724714)处理Cosmc KO细胞以剂量依赖方式降低了Akt的磷酸化(图9B)。这些结果暗示,截短O-聚糖的表达组成型活化Cosmc KO细胞中的HER2/Akt致癌信号转导通路。

[0143] 实施例7

[0144] HER2与其他EGFR家族成员和粘蛋白之间的蛋白质-蛋白质相互作用

[0145] 为了研究EGF受体二聚化和活化状态,通过Capan-1野生型和CKO细胞的邻位连接分析(PLA)进行蛋白质相互作用研究。将PLA例行地用于通过使用蛋白质特异性抗体来鉴定蛋白质相互作用。使用该方法鉴定生长因子受体EGFR2(ErbB2)、EGFR3(ErbB3)、EGFR4(ErbB4)之间,以及这些生长因子受体和粘蛋白分子MUC1、MUC4、MUC4上的Tn和MUC16之间的相互作用。重要的是,观察到与亲本细胞相比,CKO细胞中EGFR2与MUC4、MUC4上的Tn和MUC16的相互作用显著增加(图10A-B)。然而,未观察到野生型和CKO Capan-1细胞之间EGF受体的均二聚化或异二聚化的显著改变。这些结果显示,MUC4、Tn-MUC4和MUC16与EGFR2/ErbB2相互作用,并活化表达截短O-聚糖的癌细胞中的PI3K/Akt信号转导级联反应。

[0146] 实施例8

[0147] MUC16特异性单克隆抗体(MAB)AR9.6抑制AKT磷酸化

[0148] 为了直接确定粘蛋白-EGF受体相互作用是否活化CKO胰腺细胞中的下游Akt磷酸化,进行抗体阻断分析。野生型和CKO细胞用MUC1和MUC16特异性单克隆抗体(mAb)处理。MUC1抗体未引起Akt磷酸化的可测变化(数据未示出)。然而,用抗MUC16抗体(5E11、B43.13和AR9.6)处理Capan-1野生型细胞抑制了Akt(S473)的基线水平活化(由于癌细胞表面上作

为肿瘤自然进展一部分的截短O-聚糖量最少),并且与对照和IgG处理的CKO细胞相比,在24h仅AR9.6mAb (2.5和5 μ g/ml)显著减少组成型超磷酸化Akt (S473) (由于截短O-聚糖的组成型表达) (图11A)。另外,OVCAR-3同基因细胞中也观察到类似的效果(图11B)。这些结果暗示,MUC16和EGF受体之间的相互作用活化了表达截短O-聚糖的PC细胞中的致癌细胞存活信号转导级联反应。

[0149] 参见图11,与对照和IgG处理的细胞相比,2.5和5 μ g/ml浓度的MUC16特异性mAb AR9.6引起24小时时间点的Akt磷酸化显著降低。因此,AR9.6看起来靶向配体本身,而不是生长受体,从而看起来能够与细胞表面相关糖蛋白或循环糖蛋白结合。因此,本发明的方法可潜在地用于以类似于已证实的靶标诸如Her2/Neu/EGF等的方式,但通过不同的机理治疗癌症。

[0150] AR9.6最初制造为识别卵巢癌抗原CA125形式的MUC16蛋白,尽管CA125与奥戈伏单抗抗体B43.13显著不同。B43.13抗体不识别截短O-聚糖形式的MUC16。

[0151] 概括地说,MUC16特异性mAb (AR9.6)表现出显著抑制PI3K/Akt通路。这些结果暗示,AR9.6可阻断MUC16-ErbB2相互作用,从而抑制促存活信号转导通路的活化。因此,粘蛋白型糖蛋白(MUC16)上的截短O-聚糖通过ErbB2受体组成型活化致癌存活信号转导通路,从而提高胰腺细胞的致癌性。所有结果的汇总提供于图13中。

[0152] 实施例9

[0153] AR9.6MAB表位作图

[0154] 然后,进行ELISA实验以找出MUC16上AR9.6mAb的结合位点。将包含SEA结构域的不同MUC16串联重复序列(TR)与浓度逐渐增加的AR9.6mAb一起温育。MUC16TR1.7包含部分TR4接头区域、SEA结构域5、完整TR5接头区域和TR6的SEA结构域的一半(12,660-12,993,264aa)。MUC16TR 1.2包含部分TR4接头区域、SEA结构域5和TR5接头区域(12,665-12,858,194aa)。MUC165/2TR构建体包含SEA结构域5的一半、TR5接头区域和TR6的SEA结构域(12,757-12,923,167aa)。所有这些构建体在罗塞塔2(Rosetta 2) (DE3)细胞中表达。观察到与包含MUC165/2TR的序列相比,AR9.6mAb与MUC161.7TR和MUC161.2TR反应性提高(图12A-B)。这些结果暗示,AR9.6mAb结合MUC16TR上的无糖基化构象表位。然而,糖基化是否影响这些结合仍未知。

[0155] 实施例10

[0156] 用AR9.6和吉西他滨联合疗法

[0157] 讨论了通过mAb AR9.6与吉西他滨组合靶向疾病特异性MUC16来联合治疗致命性胰腺癌。

[0158] 前述实施例和初步观察结果暗示了,MUC16特异性mAb例如AR9.6mAb连同吉西他滨靶向疾病特异性形式的MUC16从而战胜高转移性胰腺癌的用途。最近的研究还显示,靶向疗法单独或与细胞毒素剂组合显著延长了患者总体存活期。例如,用MUC16特异性mAb (B43.13或OVARex)单独治疗卵巢癌患者,以及用ErbB2特异性mAb (赫赛汀)连同细胞毒素剂治疗乳腺癌患者,显示出患者总体存活期显著延长。

[0159] 根据一个实施方案,MUC16特异性mAb AR.9.6与吉西他滨联合治疗胰腺癌可提供高度有效的治疗方法,而且可满足目前开发可改善患者药物响应和总体存活期的治疗策略的需要。

[0160] 本实例暗示, MUC16特异性mAb例如AR9.6mAb连同吉西他滨处理的联合疗法可减少胰腺癌的生长和转移。就这一点而言, MUC16特异性mAb例如AR9.6以及MUC16特异性mAb例如AR9.6与吉西他滨的组合, 可影响人类胰腺癌体外细胞系中的恶性性质和致癌信号转导。亲本和Cosmc敲除(表达截短O-聚糖)胰腺癌细胞系可用MUC16特异性mAb例如AR9.6mAb、吉西他滨或MUC16特异性mAb例如AR9.6mAb与吉西他滨组合处理, 以评估单独的以及与化疗联合的抗体治疗抑制肿瘤细胞的恶性性质的潜力。此外, 可分析该疗法影响致癌细胞信号转导通路(PI3K/Akt)的能力。

[0161] 另外, MUC16特异性mAb例如AR9.6mAb可有效影响体内原位胰腺癌模型中的吉西他滨处理。胰腺癌的原位肿瘤模型可用于严重联合免疫缺陷小鼠。可将小鼠用MUC16特异性mAb例如AR9.6mAb、吉西他滨或组合处理一个或两个治疗周期。肿瘤生长可通过近红外体内成像仪(PEARL), 使用IRDye800CW 2-脱氧葡萄糖作为染料来监控。肿瘤进展和总体存活期可在各个时间点监控。体内增殖指数和细胞凋亡可分别通过免疫组织化学和TUNEL测定法分析。

[0162] 根据本发明的一个实施方案, 本文公开了粘蛋白型糖蛋白上截短O-聚糖的异常表达和MUC16的过表达与肿瘤进展和胰腺癌的转移相关, 因此, 用AR9.6mAb和吉西他滨靶向包含截短O-聚糖的MUC16的这些疾病特异性形式应会抑制肿瘤细胞的生长。根据一个实施方案, 表达截短O-聚糖的胰腺癌细胞可用MUC16特异性mAb例如AR9.6连同吉西他滨处理。可研究用AR9.6mAb、吉西他滨、AR9.6mAb和吉西他滨组合处理MUC16和ErbB2/Her2阳性胰腺癌细胞。细胞活力和细胞凋亡可分别通过基于荧光的阿尔玛蓝测定法和活/死细胞测定法分析。可评估细胞信号转导通路(PI3K/Akt轴)的变化。AR9.6mAb和吉西他滨组合抑制癌细胞迁移和侵袭可分别使用聚对苯二甲酸乙二醇酯(PET)膜和博伊登室测定法进行。

[0163] 胰腺癌细胞系Capan-1和Colo357(亲本和Cosmc KO)细胞可用不同浓度的AR9.6mAb单独、吉西他滨单独以及两种药剂的组合在不同时间点处理, 使用基于荧光的阿尔玛蓝测定法测定细胞活力, 如Radhakrishnan P., et al. Clin Cancer Res 2013Apr 15; 19(8):2025-35所述。用磷酸盐缓冲盐水和抗体同种型IgG处理细胞可作为上述处理的对照。剂量响应曲线可使用美国国家癌症研究所(National Cancer Institute, NCI)算法评估: $Tz_{1/4}$ 时间 t_0 的对照细胞的数量, $C_{1/4}$ 时间 t 的对照细胞的数量, $T_{1/4}$ 时间 t 的经处理细胞的数量; $100 \times [(T - Tz) / (C - Tz)]$ 。这些实验可重复至少三次, 并且统计分析可使用未配对学生t检验进行。

[0164] 可使用活/死细胞分析试剂盒(Invitrogen)分析亲本和Cosmc KO Capan-1和Colo357细胞中AR9.6mAb、吉西他滨以及二者组合诱导的细胞凋亡, 如Radhakrishnan P., et al. Clin Cancer Res 2013Apr 15; 19(8):2025-35所述。用磷酸盐缓冲盐水和抗体同种型IgG处理细胞可作为上述处理的对照。细胞活力(活/死)可通过荧光显微镜法对活(绿色)和死(红色)细胞计数测定。实验可重复3次, 并且可将学生t检验用于确定显著性。除活/死细胞测定之外, 还可通过半胱天冬酶活化测定法或使用半胱天冬酶原特异性抗体的免疫印迹(显示完整和切割的半胱天冬酶)来研究细胞凋亡通路引发者和执行者例如半胱天冬酶3、8和9的活化。

[0165] 由于ErbB2-PI3K/Akt信号转导通路的活化影响细胞迁移和癌细胞侵袭, AR9.6mAb、吉西他滨单独或两种药剂组合处理的PC细胞的迁移和侵袭分析可使用聚对苯二

甲酸乙二醇酯膜和基质胶 (Matrigel) (500 μ g/过滤器) 涂覆的聚碳酸酯过滤器 (12-mm孔径; Becton Dickinson) 进行, 如此前的Radhakrishnan P., et al. Clin Cancer Res 2013Apr 15; 19 (8) : 2025-35所述。跨膜和基质胶 (Matrigel) 的细胞可使用Diff-Quick细胞染色试剂盒 (Dade Behring, Inc) 染色。细胞可以每个孔6个视场在放大100倍下进行计数, 并以每个视场的平均细胞数表示。每种情况进行三次独立测定。数据可以三次独立测定的平均值 \pm SD表示。

[0166] 与亲本细胞相比, 可进行Cosmc KO Capan-1细胞中GSK3b、Akt、S6K和PKCa的活化, 从而可研究AR9.6mAb或吉西他滨单独或两种药剂组合处理的PC细胞上, MUC16-ErbB2相互作用介导的PI3K/Akt及其下游信号转导效应子的活化。可使用磷酸化-pI3激酶p85 (Ty458)/p55 (Tyr199) 和磷酸化-Akt (Thr308和Ser473) 抗体通过免疫印迹分析未处理的和经处理的Capan-1和Colo357亲本和Cosmc KO细胞裂解液的PI3K和Akt蛋白失活/未磷酸化。活化的Akt是细胞存活、细胞周期进展和增殖信号转导级联反应的主要调节因子, 其通过翻译后修饰例如磷酸化使下游蛋白活化或失活来调节。因此, 我们可使用磷酸化-GSK3b (Ser9)、磷酸化-p21 (Thr145和Ser146)、磷酸化-p27 (Thr157) 和细胞周期蛋白D1特异性抗体通过免疫印迹分析细胞增殖和细胞周期进展功能相关蛋白质 (GSK3b、p21^{Clp1}、p27^{Kip1}和细胞周期蛋白D1) 的磷酸化。另外, 细胞存活相关的蛋白质 (Bad和XIAP) 可使用磷酸化-Bad (Ser136)、磷酸化-XIAP (Ser87) 特异性抗体通过免疫印迹评估。

[0167] 假设MUC16-ErbB2相互作用的抑制可减少AR9.6mAb单独或与吉西他滨组合处理的细胞中PI3K/Akt及其下游信号转导效应子的活化。AR9.6mAb处理可提供对PI3K/Akt信号转导轴或者其他通路例如MUC16活化JAK2信号转导通路的可能性的显著抑制。Akt还通过以下方式延长癌细胞存活期: 通过转录因子cAMP响应元件结合蛋白 (CREB) 的活化作用, 而对抗细胞凋亡基因表达进行转录调控。抗细胞凋亡基因 (包括Bcl-2) 的mRNA表达可通过AR9.6mAb单独或与吉西他滨组合处理的亲本和Cosmc KO细胞的实时PCR分析来定量。本领域技术人员将会知道此类体外方法涉及在实验室中的常规测定。单因素方差分析和未配对学生t检验可用于确定对照和不同的处理组之间是否存在显著性差异。仅p<0.05的差异被视为具有显著性。

[0168] mAb与细胞毒素化疗组合的靶向治疗是最近十年的重要研究领域。该治疗方法有希望改善胰腺癌患者的结局。AR9.6mAb处理的PC细胞显示, 通过改变粘蛋白-生长因子受体相互作用抑制PI3K/Akt存活信号转导通路, 暗示用AR9.6mAb预处理癌细胞可通过组成型活性存活通路的抑制增强吉西他滨的抗肿瘤发生效果。此目标的工作思路是在原位胰腺癌模型中展示AR9.6mAb对吉西他滨处理的增强效果。可研究严重联合免疫缺陷小鼠 (对照和AR9.6mAb、吉西他滨单独和组合处理) 的胰腺癌体内原位肿瘤模型。肿瘤生长 (体积) 可使用珍珠脉冲 (Pearl Impulse) 体内成像仪监控。可通过免疫组织化学和TUNEL测定法评估肿瘤进展时间和总体存活期, 以及体内增殖和细胞凋亡。

[0169] 表达截短O-聚糖的胰腺癌细胞可原位植入小鼠胰腺, 如Derosier LC, et al. Mol Cancer Ther 2007Dec; 6 (12Pt 1) : 3198-207所述。简而言之, 可通过腹腔注射甲苯噻嗪-开他敏盐酸盐溶液麻醉小鼠。可在腹腔左上部做小切口, 并可通过收缩脾脏暴露胰腺。可使用27号针将胰腺癌细胞 (0.1-0.5 \times 10⁶ 30-40 μ l) 注入胰腺。腹腔可使用铬肠线和爱惜康 (ethilon) 的双层缝合线缝合。在植入2-3周后, 肿瘤生长可通过珍珠脉冲 (Pearl Impulse)

体内成像仪使用IRDye 800CW缀合的2-脱氧葡萄糖测定,然后将动物随机分配到不同的治疗组。

[0170] 在肿瘤细胞植入2-3周后,可将动物分配到以下各组(n=15只小鼠/组):未处理(载体对照PBS,第1组)、AR9.6单独处理(在植入后22、26、29和33天腹腔注射100 μ g,第2组)、吉西他滨单独处理(在植入后23和30天腹腔注射60mg/kg,第3组)、AR9.6(在植入后22、26、29和33天腹腔注射100 μ g)和吉西他滨(在植入后23和30天腹腔注射60mg/kg)组合处理(第4组)、AR9.6(在植入后25、28、32、35、53、56、60和63天腹腔注射100 μ g)和吉西他滨(在植入后26、33、54和62天腹腔注射60mg/kg)组合处理(第5组)。小鼠可经受另外的体内成像,并且可在植入后41、72和83天计算肿瘤面积。

[0171] 可计算每个治疗研究的处理组的所有小鼠的肿瘤面积,并与初始(治疗前)体内成像检查得到的数据比较。克里斯卡尔-华莱士(Kriskal-Wallis)检验可用于确定关于处理后肿瘤体积变化的组间差异。p值小于0.05可视为具有统计意义上的显著性。维克松(Wilcoxon)秩和检验(使用正态逼近)可用于配对比较。另外,可跟踪动物的存活期,在小鼠死亡时,或在根据内布拉斯加大学医学中心机构动物饲养管理和使用伦理委员会(University of Nebraska Medical Center Institutional Animal Care and Use Committee)批准的规程处死时记录肿瘤。对数秩检验可用于比较组间存活期。开普勒-梅耶(Kaplan-Meier)法可用于生成存活曲线。肿瘤转移到其他器官可通过目视和显微镜检查。

[0172] 来自上述研究的肿瘤组织(第1-4组)可用于通过末端核苷酸转移酶介导的缺口末端标记(TUNEL)分析进行细胞凋亡分析,以及通过免疫组织化学进行半胱天冬酶3活化分析。另外,体内增殖指数可通过抗Ki 67(增殖标记物)的免疫组织化学染色分析,如此前的Radhakrishnan P., et al. Clin Cancer Res 2013Apr15;19(8):2025-35所述。组织染色强度可根据组织染色强度和程度给出综合分数。强度可用四点量表来评级:-、+、++和+++。也可给出这些值的数值分数-[0]、+[1]、++[2]和+++[3]。染色程度可用四点量表来评级:1(0-24%)、2(25-49%)、3(50-74%)和4(75-100%)。可将两个值相乘得到综合分数,范围可为0-12。组间值通过单因素方差分析和未配对学生t检验比较。

[0173] 单克隆抗体和细胞毒素剂组合的靶向疗法可在癌症患者中提供更长的总体存活期。因此,相对于每种药剂单独处理,AR9.6mAb和吉西他滨联合疗法处理的小鼠,可使肿瘤进展时间和存活期显著延长。相似地,在联合疗法的肿瘤组织中,可使细胞凋亡显著增加,增殖指数显著降低。此外,对于AR9.6单独或与吉西他滨组合处理的动物,可显著减少转移。也可根据观察到的响应研究对照和经处理的动物之间的转移特征的显著改变。例如,如果发生腹膜种植和转移的减少,则MUC16和间皮素相互作用影响腹膜转移发展的可能性可通过分析腹膜液中MUC16的水平(使用MUC16特异性抗体的ELISA),以及通过免疫荧光(使用MUC16和间皮素特异性抗体)分析腹膜肿瘤组织中MUC16和间皮素相互作用来评估。如果所提出的AR9.6mAb处理未显著改善总体存活期或转移活性,则可进行剂量递增研究,并且可改变抗体施用计划,以全面研究体内原位肿瘤模型系统中AR9.6mAb单独或与吉西他滨组合的抗肿瘤发生潜力和细胞毒性效果。如果IRDye 800CW缀合的2-脱氧葡萄糖成像出现问题,也可使用STn抗原特异性mAb TKH-2缀合的IRDye 800CW。原位胰腺模型是已知的,已在该模型系统中进行了对多个抗胰腺癌的抗肿瘤剂的筛选。

[0174] 包含截短O-聚糖的MUC16是胰腺癌中的疾病特异性靶标,并且用mAb AR9.6连同吉

西他滨组合靶向该靶标可改善总体存活期。还可设想另外的化疗方法,例如福尔费力纳科斯与AR9.6组合,或MUC16的另一个抗体(例如B43.13)与吉西他滨组合,以确认战胜致命性胰腺癌的替代治疗处理。此外,也可评估人类胰腺癌肿瘤组织的MUC16水平、MUC16-ErbB2相互作用以及相同组织中致癌信号转导通路的相关活化。

[0175] 若干研究显示,截短O-聚糖的异常表达与肿瘤进展和不利患者结局相关。此外,STn抗原在胰腺癌前体病变PanIN-3中过表达,强烈暗示这些截短O-聚糖对于胰腺癌进展和早期转移是重要的。我们的初步数据表明,截短O-聚糖的过表达通过ErbB2受体活化致癌信号转导,从而增强了胰腺癌细胞的致瘤性。用MUC16特异性mAb AR9.6处理表达截短O-聚糖的细胞显著降低了致癌信号转导通路的活化。因此,可研究联合疗法(AR9.6+吉西他滨)对高侵袭性胰腺癌细胞的作用。所提供的研究具有高度创新性和新颖性,因为过去未研究过AR9.6和吉西他滨联合疗法对胰腺癌细胞的作用。

[0176] 多项研究报道,与所有其他癌症相比,在胰腺癌中观察到STn抗原表达频率最高。通过核心3合酶的异位表达延伸这些截短O-聚糖导致了胰腺癌细胞肿瘤生长和转移的抑制,暗示寡糖修饰影响了介导致癌性、肿瘤抑制因子以及转移性细胞活性的蛋白质的活性,从而显著影响肿瘤的进展和生物性质。另外,观察到通过致癌存活信号转导通路的活化,提高了表达截短O-聚糖的胰腺癌细胞的致瘤性。用MUC16特异性mAb AR9.6处理表达截短O-聚糖的细胞显示,PI3K/Akt信号转导通路的磷酸化被抑制(参见上文)。这些数据显示,MUC16上的截短O-聚糖提高了胰腺癌致瘤性。因此,可在体内原位胰腺肿瘤模型系统中评估AR9.6mAb和吉西他滨的联合疗法,以测定这些治疗组合的抗肿瘤潜力。从该研究获得的临床前数据可能产生新的胰腺癌治疗方法,更重要的是,可能为推进开发新型靶向治疗策略,帮助延长胰腺癌患者的总体存活期的长期目标提供关键信息。

[0177] 虽然上文结合附图描述和示出了优选的实施方案,但对本领域的技术人员将显而易见的是,可在不脱离本发明的情况下作出修改。此类修改被视为包括在本发明范围内的可能的变化。

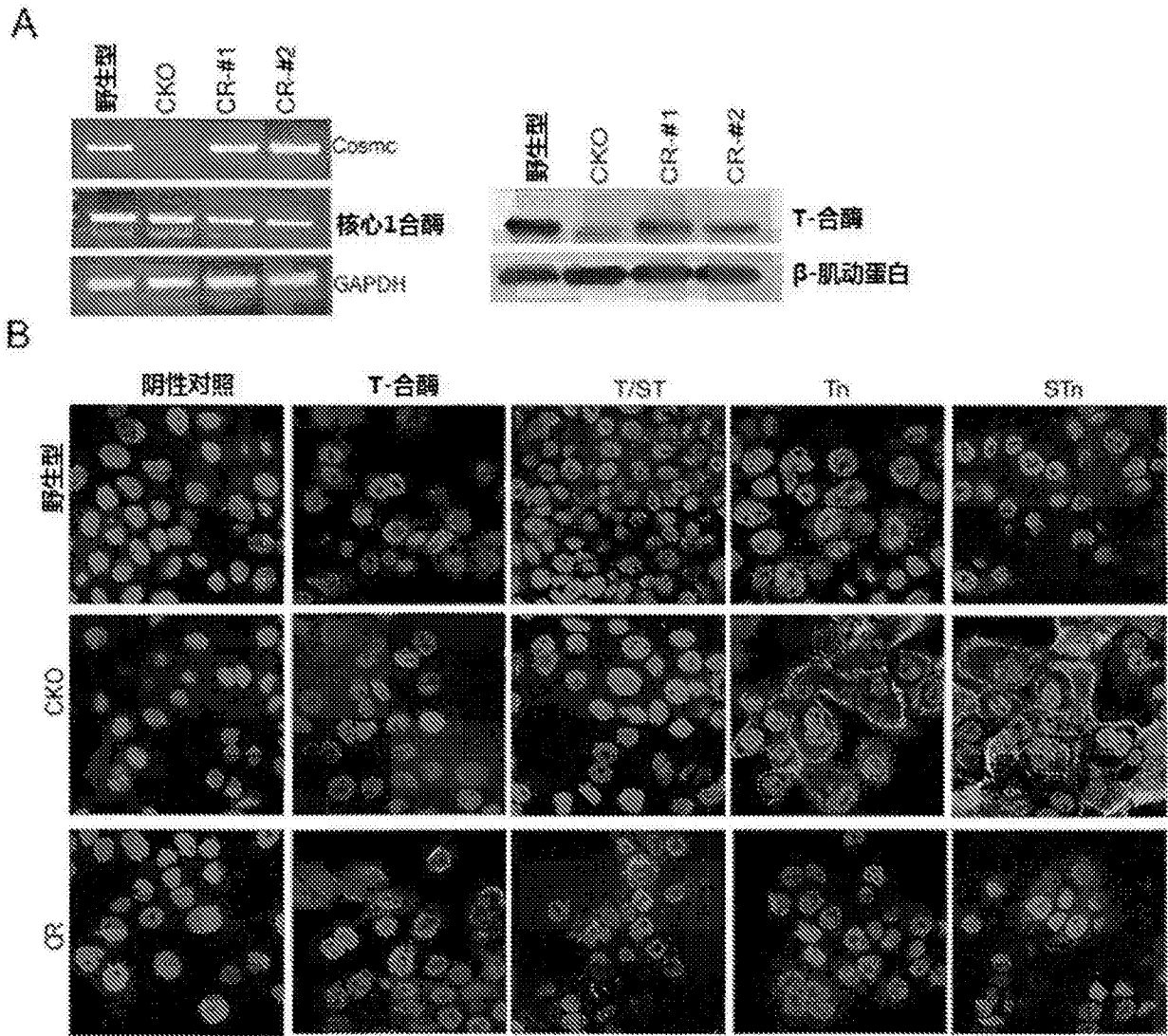


图1

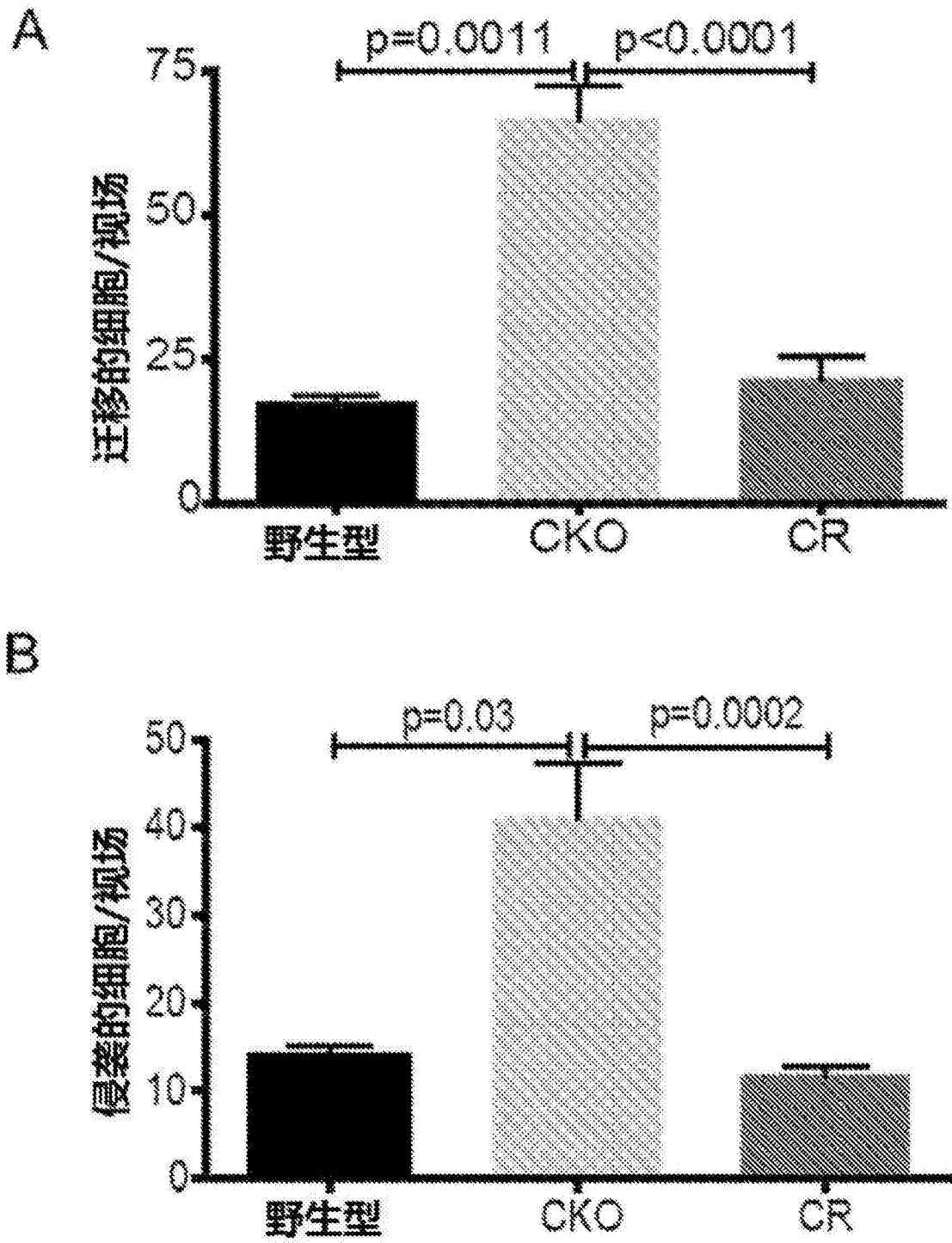


图2

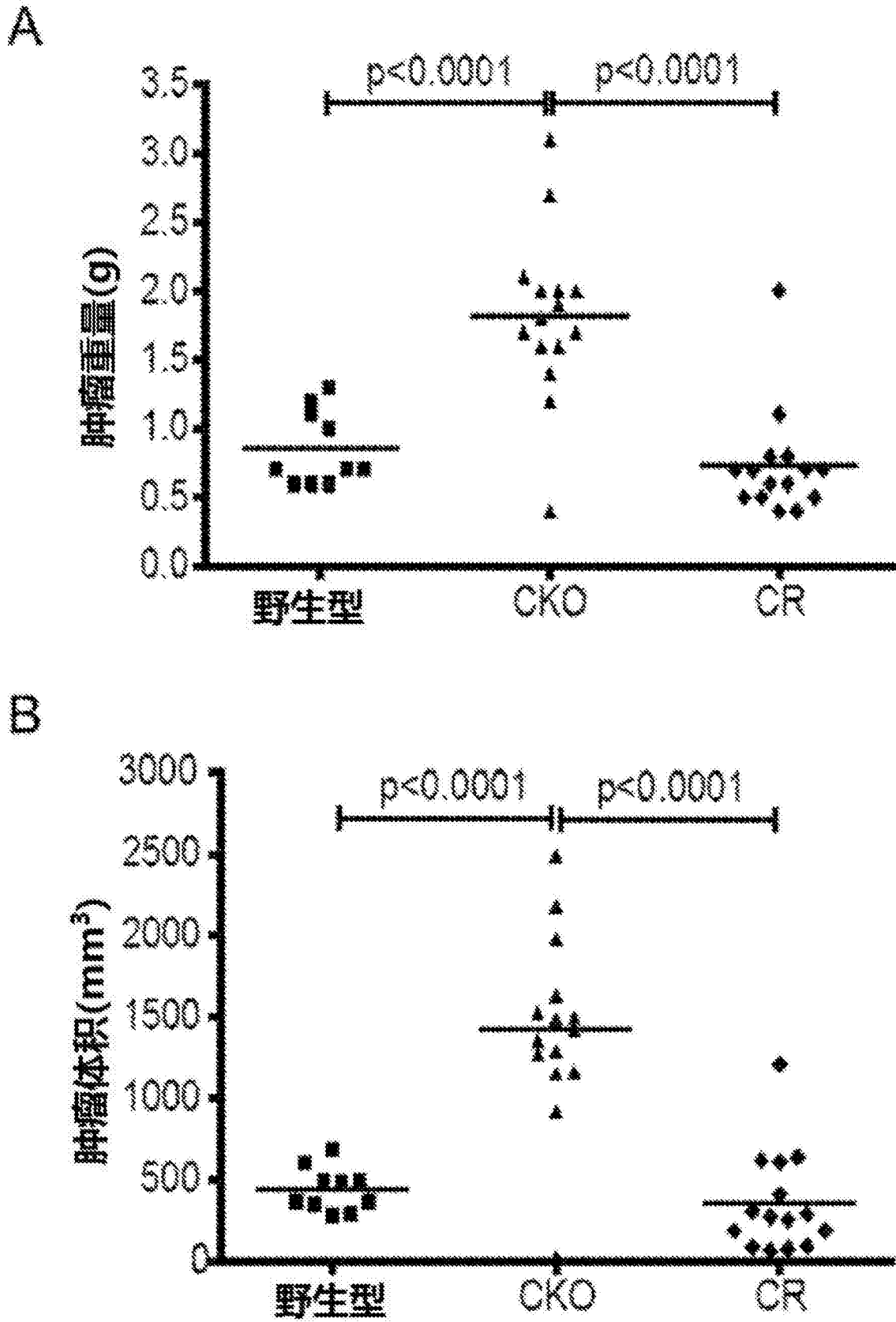


图3

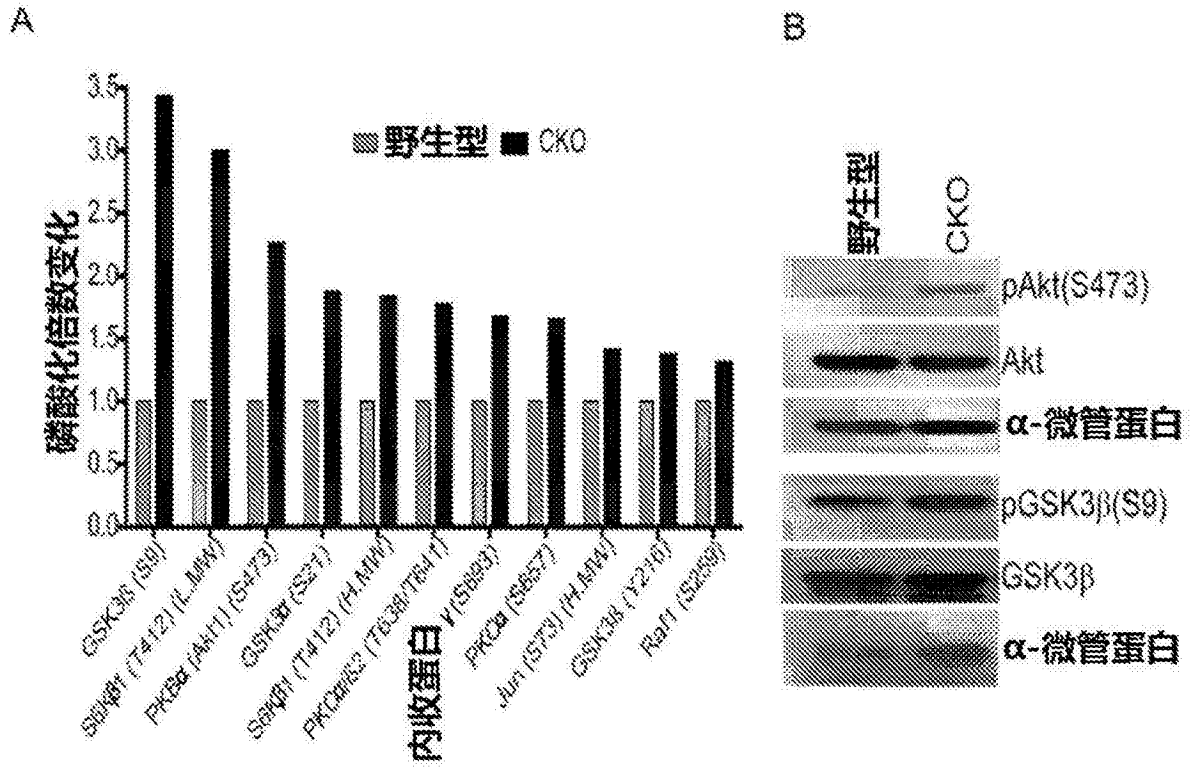


图4

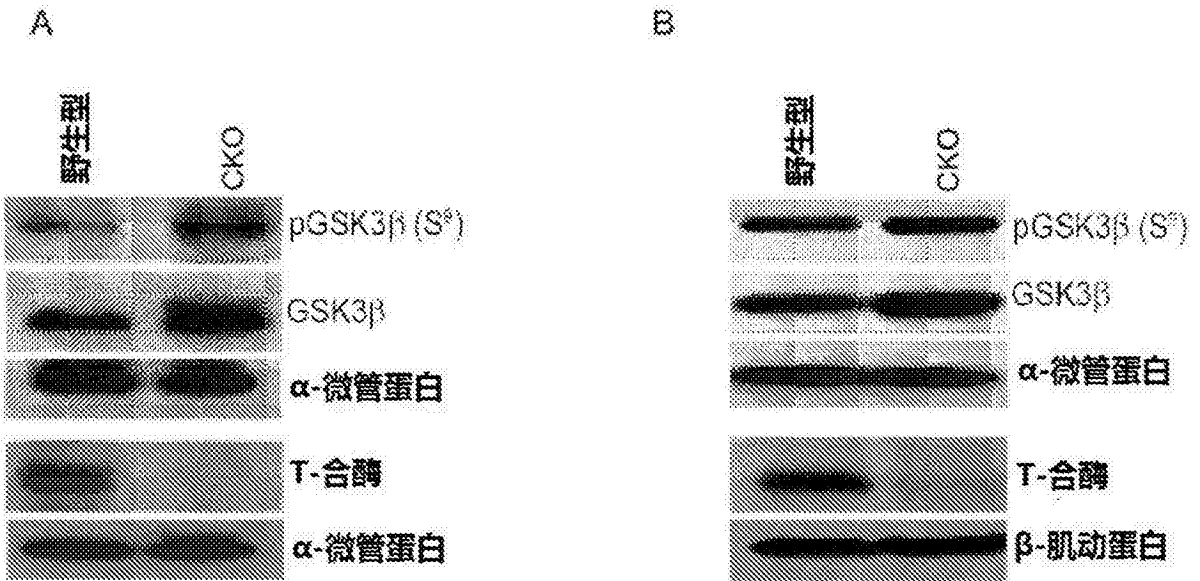
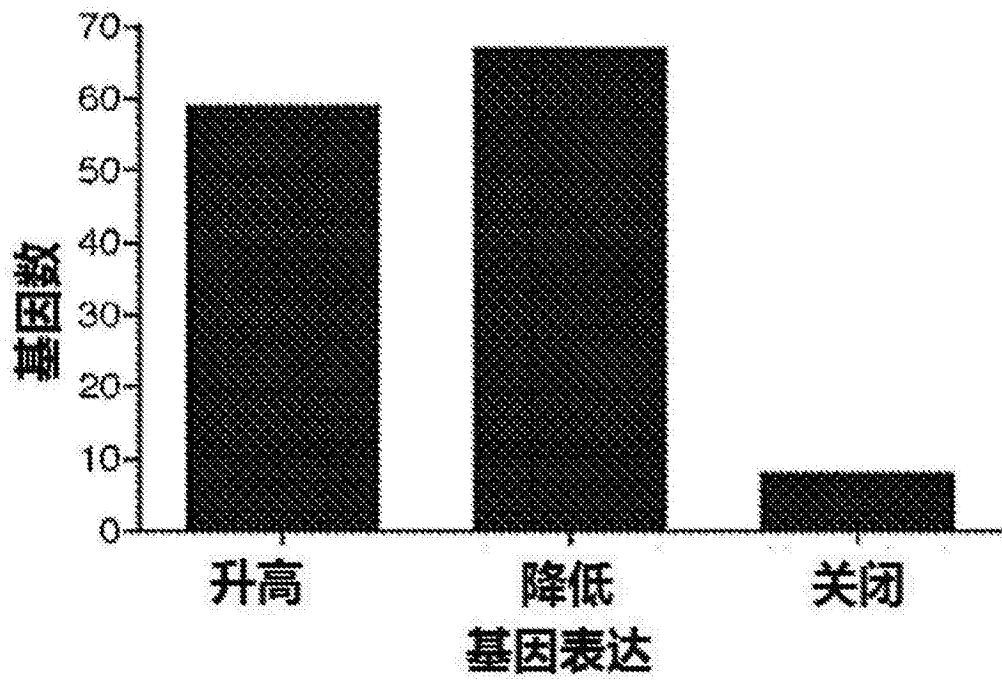


图5

A



B

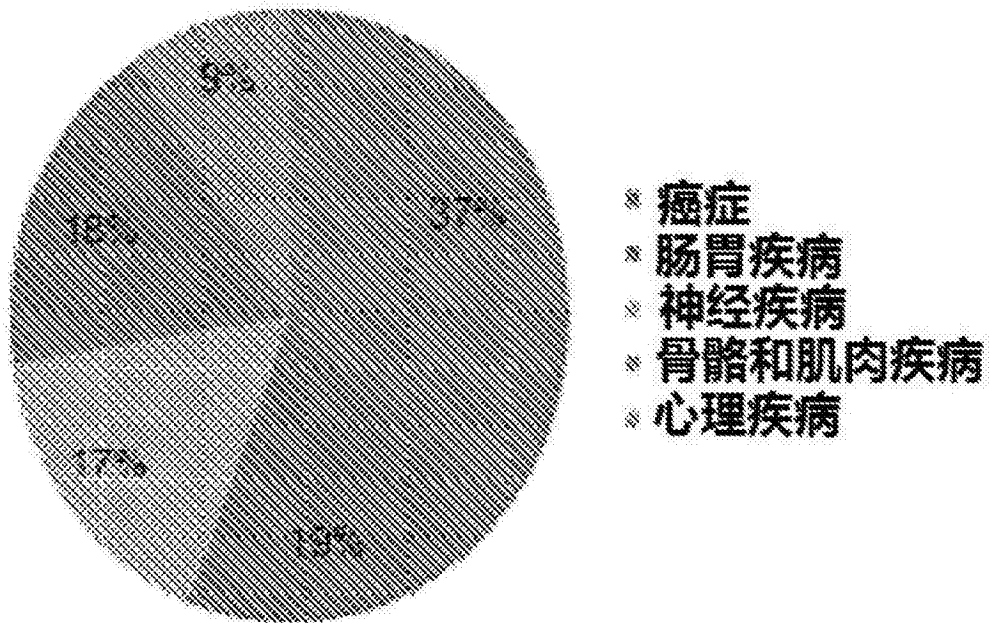
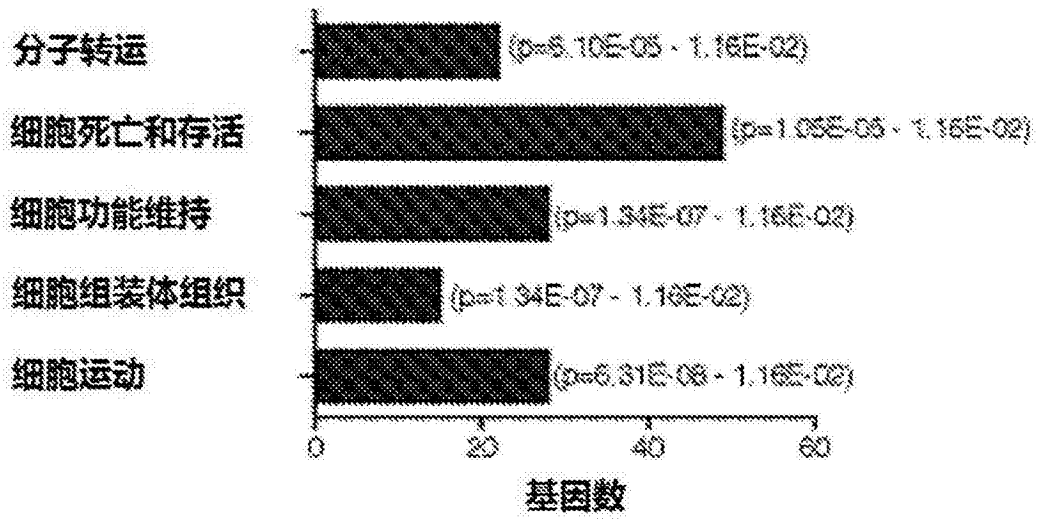


图6

A



B

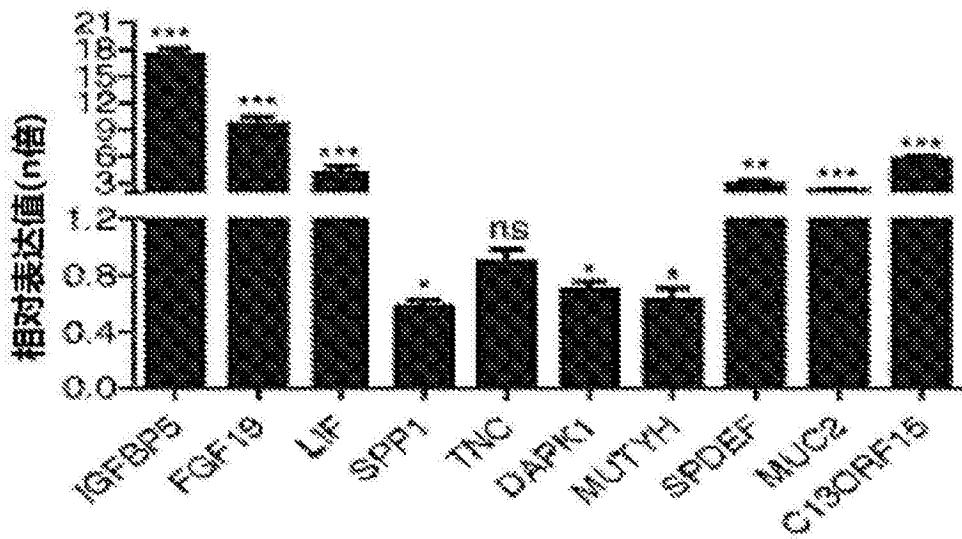


图7

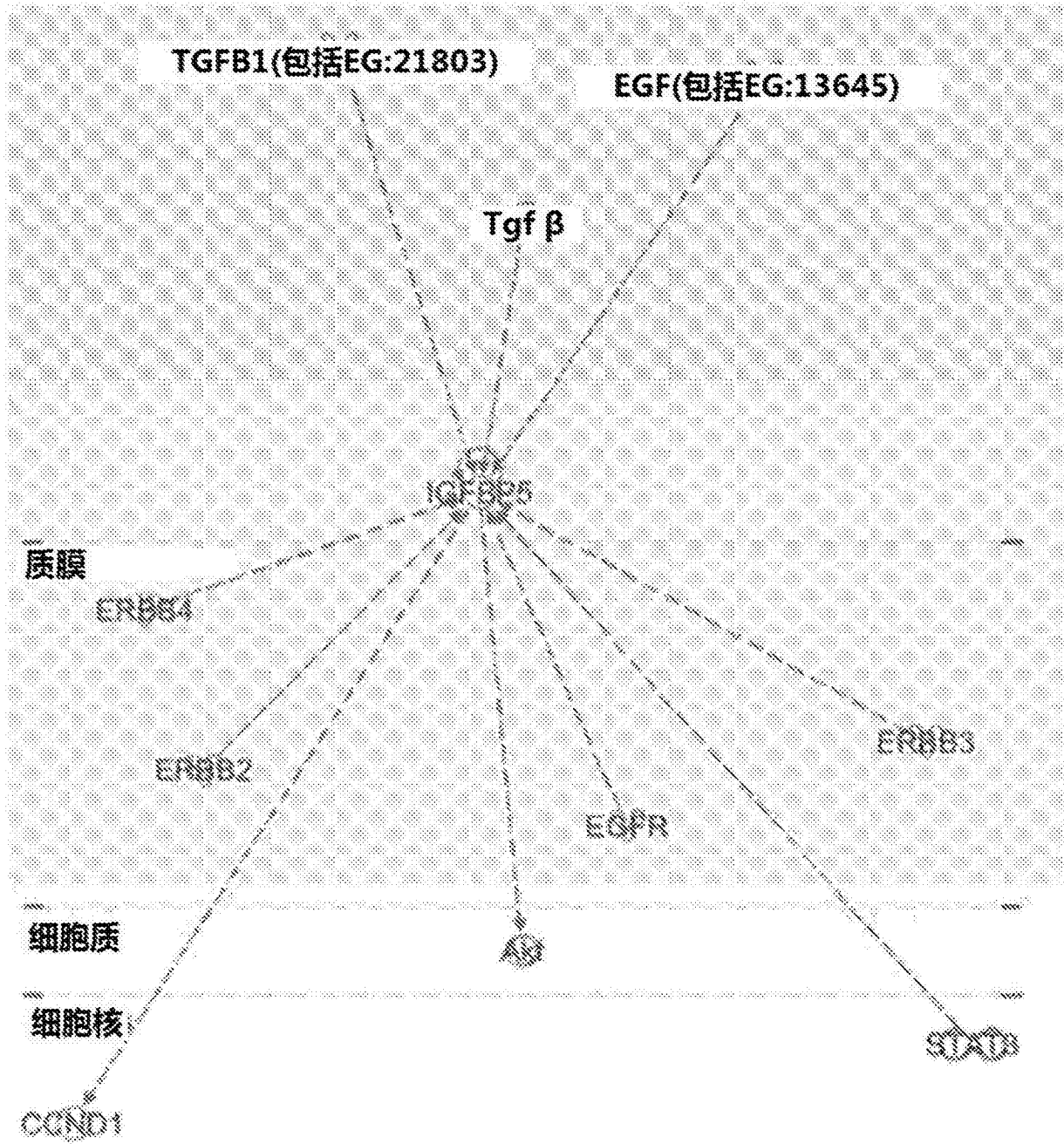
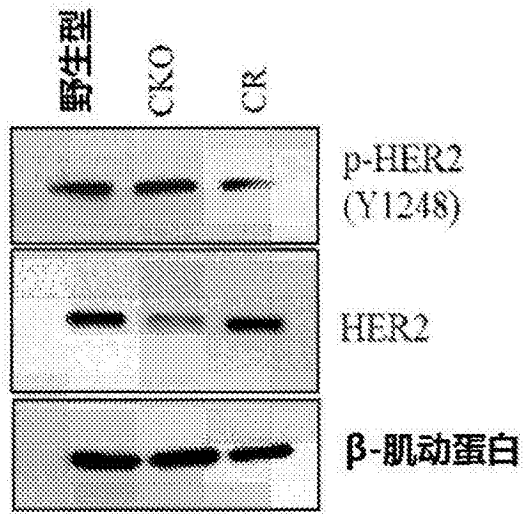


图8

A



B

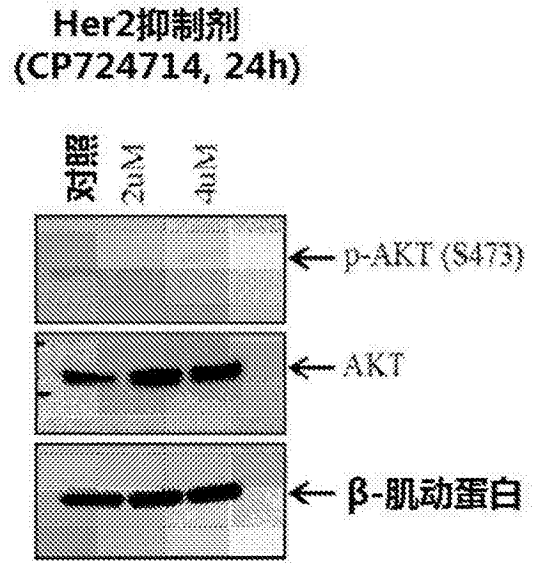


图9

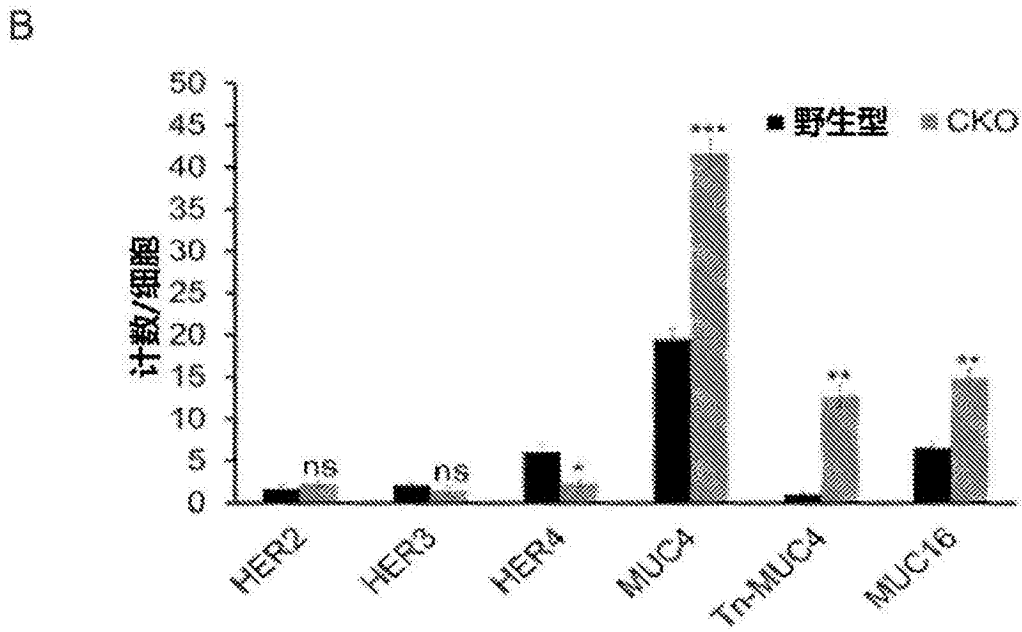
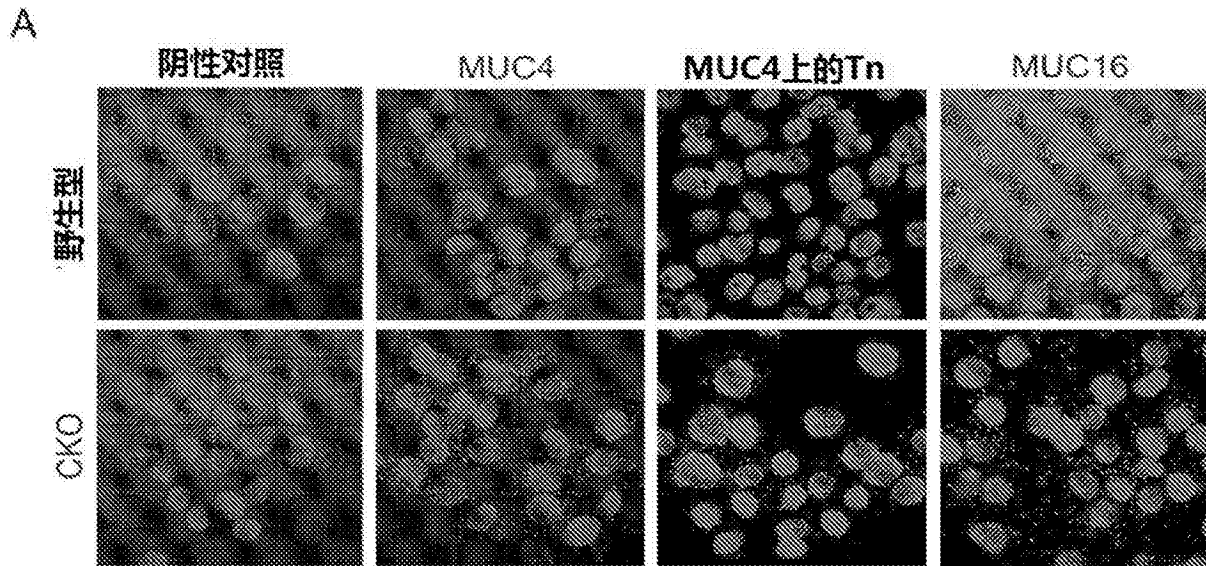


图10

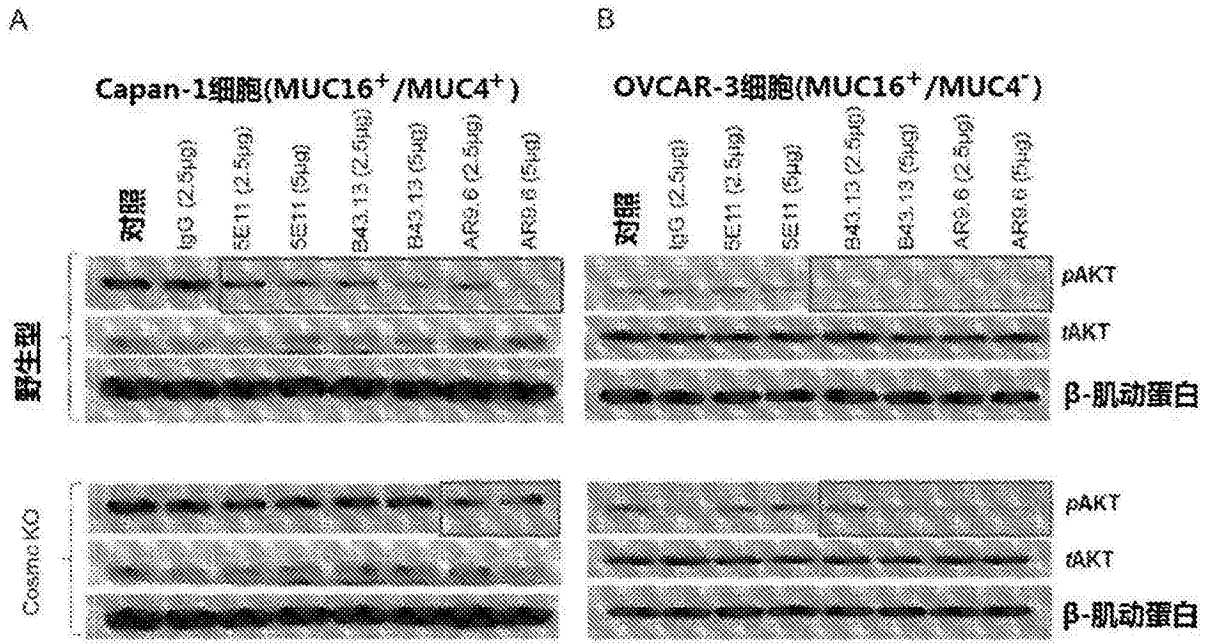


图11

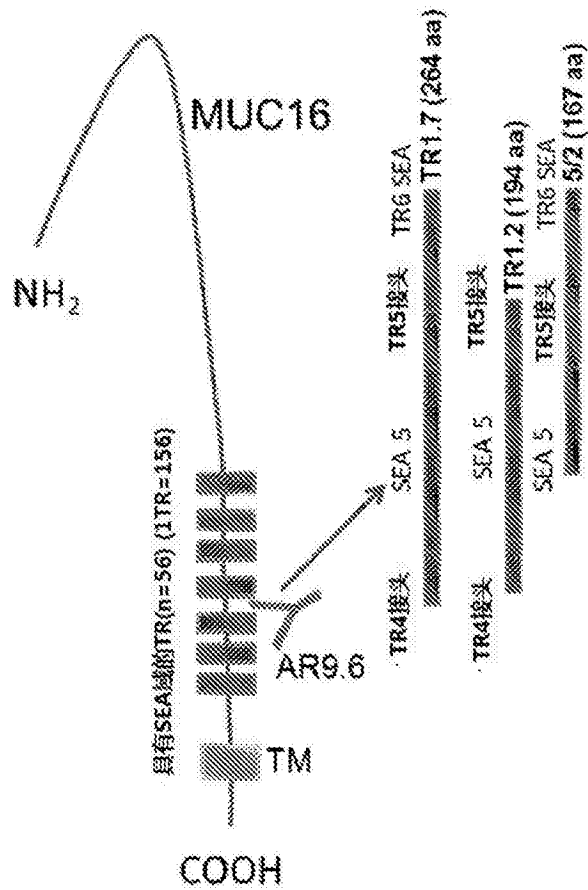
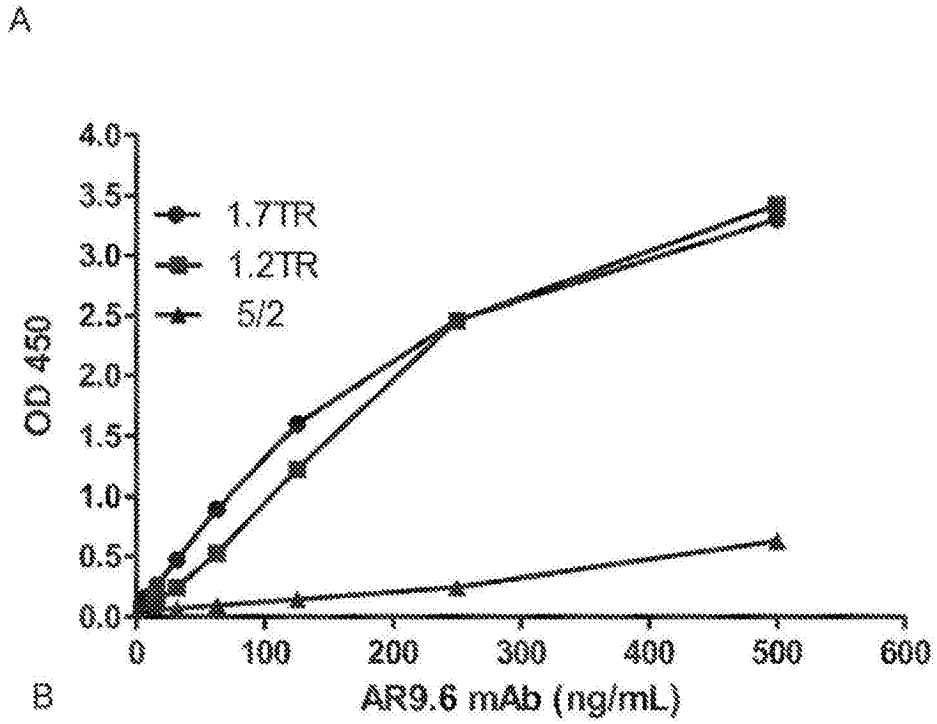


图12

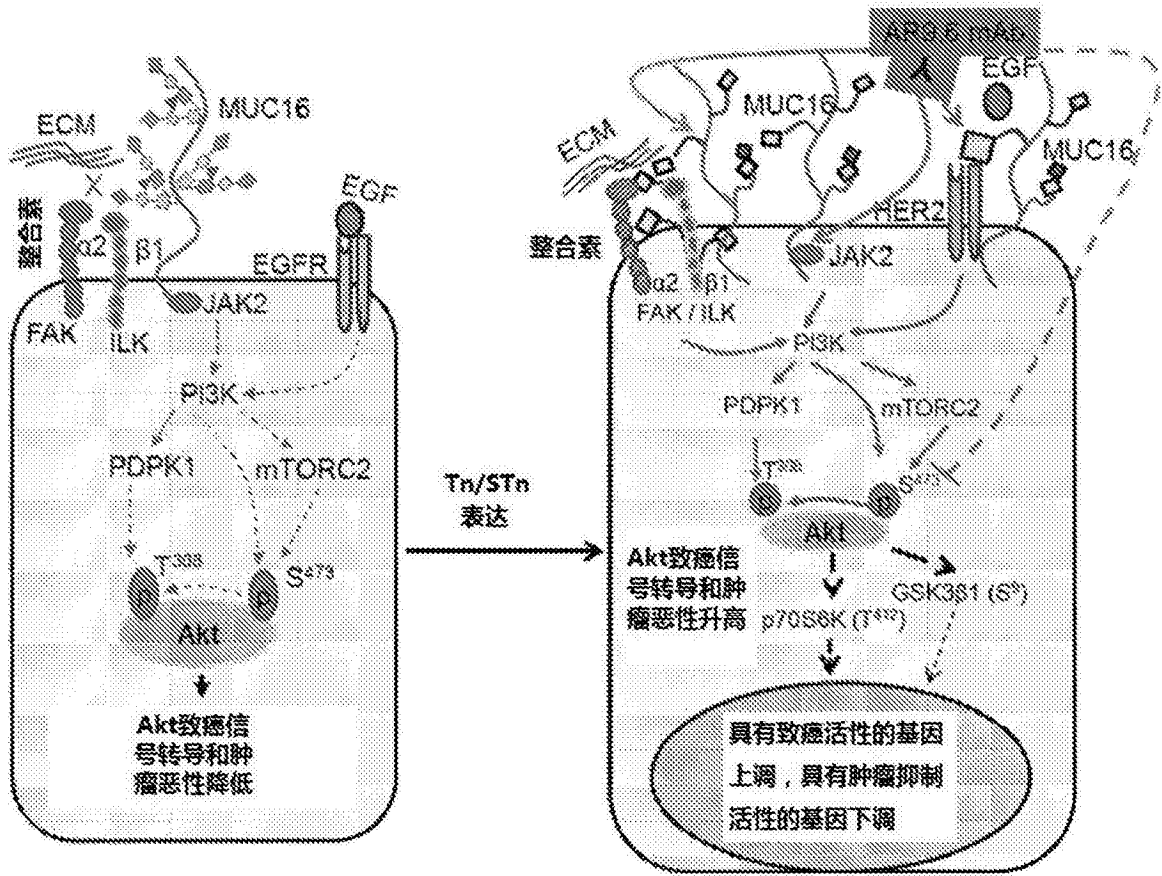


图13