



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106434561 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201610542229.7

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2011.09.02

C12N 5/09(2010.01)

G01N 33/574(2006.01)

(30)优先权数据

61/380181 2010.09.03 US

61/510413 2011.07.21 US

(62)分案原申请数据

201180053062.3 2011.09.02

(71)申请人 艾伯维施特姆森特克斯有限责任公
司

地址 美国伊利诺伊州

(72)发明人 S.J.戴拉 M.桑塔圭达
W.C.安德森

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公
司 72001

代理人 刘辛 万雪松

权利要求书3页 说明书47页 附图19页

(54)发明名称

细胞亚群的鉴定和富集

(57)摘要

本发明披露了用于鉴定、表征和任选地富集
或分离致瘤细胞或细胞亚群的标记。

1. 致癌细胞群, 其因表达至少一种TICAM而被富集, 其中所述至少一种TICAM选自下组, 该组由以下各项组成: CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

2. 组合物, 其包含如权利要求1所述的富集的致癌细胞群和药学上可接受的载体。

3. 分离的致癌细胞, 其包含至少一种TICAM, 其中所述至少一种TICAM选自下组, 该组由以下各项组成: CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

4. 组合物, 其包含如权利要求3所述的细胞和药学上可接受的载体。

5. 检测致癌细胞的方法, 其包括以下步骤:

- a. 使肿瘤细胞群与结合剂接触, 该结合剂优选地与至少一种TICAM结合; 并且
- b. 检测与所述致癌细胞结合的所述结合剂。

6. 如权利要求5所述的方法, 其中所述抗体优选地与选自下组的TICAM结合, 该组由以下各项组成: CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

7. 富集致癌细胞群的方法, 其包括以下步骤:

- a. 使肿瘤细胞群与结合剂接触, 该结合剂优选地与至少一种TICAM结合; 并且
- b. 分选与所述TICAM结合的所述细胞以提供富集的致癌细胞群。

8. 如权利要求7所述的方法, 其中所述抗体优选地与选自下组的TICAM结合, 该组由以下各项组成: CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

9. 组合物, 其包含如权利要求7所述的富集的致癌细胞群和药学上可接受的载体。

10. 分选致癌细胞的方法, 其包括以下步骤:

- a. 使肿瘤细胞群与结合剂接触, 该结合剂优选地与至少一种TICAM结合; 并且

b. 分选与所述至少一种TICAM结合的细胞。

11. 如权利要求10所述的方法, 其中所述抗体优选地与选自下组的TICAM结合, 该组由以下各项组成: CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

12. 确定从肿瘤样品获得的细胞是否致瘤的方法, 其包括使该肿瘤细胞与至少一种TICAM接触的步骤。

13. 如权利要求12所述的方法, 其中所述TICAM选自下组, 该组由以下各项组成: CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

14. 治疗或诊断对其有需要的失调受试者的方法, 其包括以下步骤:

a. 从该受试者获得肿瘤样品; 并且

b. 使该肿瘤样品与至少一种结合剂接触, 该结合剂优选地与TICAM结合。

15. 如权利要求14所述的方法, 其中所述抗体优选地与选自下组的TICAM结合, 该组由以下各项组成: CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

16. 确定从肿瘤样品获得的细胞的致瘤性的方法, 其包括使该肿瘤细胞与至少一种TICAM结合剂接触的步骤。

17. 如权利要求16所述的方法, 其中所述抗体优选地与选自下组的TICAM结合, 该组由以下各项组成: CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

18. 确定患有癌症的受试者是否处于复发风险的方法, 其包括以下步骤:

a. 从该受试者获得肿瘤样品; 并且

b. 使该肿瘤样品与至少一种结合剂接触, 该结合剂优选地与TICAM结合。

19. 如权利要求18所述的方法,其中所述抗体优选地与选自下组的TICAM结合,该组由以下各项组成:CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。

20. 一种用于诊断或监测过度增生性失调的试剂盒,其包括容器,该容器包含一种或多种TICAM结合剂和使用该一种或多种TICAM结合剂诊断或监测该过度增生性失调的指导材料。

21. 进行基因型或表型分析的方法,其包括以下步骤:

- a. 提供包含一种或多种TICAM的致瘤细胞群或富集的致瘤细胞群;
- b. 处理所述细胞或细胞群以提供遗传物质或蛋白质组物质;并且
- c. 分析所述遗传物质或蛋白质组物质。

22. 筛选潜在药物化合物的方法,其包括以下步骤:

- a. 使该致瘤细胞或致瘤细胞群暴露于候选化合物;并且
- b. 使所述致瘤细胞或致瘤细胞群与至少一种TICAM结合剂接触。

23. 诱导癌症的方法,其包括以下步骤:

- a. 提供针对一种或多种TICAM而富集的致瘤细胞群;并且
- b. 将该致瘤细胞群引入受试者中。

24. 诱导癌症的方法,其包括以下步骤:

- a. 分离展示一种或多种TICAM的致瘤细胞;并且
- b. 将分离的致瘤细胞引入受试者中。

25. 产生肿瘤样品的方法,其包括以下步骤:

- a. 提供包含一种或多种TICAM的致瘤细胞或富集的致瘤细胞群;
- b. 将该致瘤细胞或富集的致瘤细胞群引入受试者中;
- c. 等待该致瘤细胞或细胞群产生异质性肿瘤;并且
- d. 收获所述异质性肿瘤。

26. 用于分析药物化合物的动物模型,其包括植入有针对一种或多种TICAM而纯化或富集的致瘤细胞或细胞群的受试者。

27. 产生用于分析药物化合物的动物模型的方法,其包括引入针对一种或多种TICAM而纯化或富集的致瘤细胞或细胞群的步骤。

细胞亚群的鉴定和富集

本申请是2011年9月2日提交的题为“细胞亚群的鉴定和富集”的国家申请号为201180053062.3 (PCT/US2011/050451)的发明专利申请的分案申请。

交叉引用的申请

[0001] 本申请要求2010年9月3日提交的美国临时申请号61/380,181和2011年7月21日提交的美国临时申请号61/510,413在35U.S.C.119(e)下的权益,所述文献各自通过引用以其全文结合在此。

发明领域

[0002] 本发明总体上涉及细胞或细胞亚群,尤其是源自各种肿瘤的肿瘤起始细胞的鉴定、表征、以及任选地分离或富集。在选择的一个或多个方面,本发明也涉及分离肿瘤起始细胞的方法和所得到的制剂,以及使用肿瘤起始细胞和细胞群用于药物研究与开发和用于诊断、治疗和其他临床与非临床应用中的各种方法。

发明背景

[0003] 干细胞与祖细胞分化和细胞增殖是共同作用以支持器官发生期间的组织生长和所有活生物的生命期间的细胞替代及大多数组织的修复的正常持续过程。分化和增殖决定经常受到经平衡以维持细胞命运决定和组织结构的众多因素和信号的控制。正常组织结构由于应答于调节细胞分裂和组织成熟的微环境线索的细胞而被维持。因此,细胞增殖和分化通常只在必要时因替换受损或垂死细胞或因生长而出现。遗憾的是,可以因许多因素而引起细胞增殖和/或分化的破坏,这些因素包括例如,在各种信号转导化学物质下或其过于丰富、存在改变的微环境、基因突变或其某种组合。当正常的细胞增殖和/或分化被扰乱或以某种方式被破坏时,这可能导致各种疾病或失调,包括癌症。

[0004] 癌症的常规治疗包括化学疗法、放射疗法、手术、免疫疗法(例如,生物反应调节剂、疫苗或靶向治疗)或其组合。糟糕的是,太多种类的癌症对于这些常规疗法是不应答或最低地应答的,留给患者的选择很少。而且,取决于癌症的类型,一些可用的疗法(如手术)可能不是可行的替代方案。当试图护理已经经历过先前治疗并且随后已经再发的患者时,在护理治疗的当前标准中固有的局限是特别明显的。在这些情况下,失败的治疗方案和所产生的患者恶化可能促成难治性肿瘤,这些难治性肿瘤经常自我表现为最终证明为不可治的更为侵袭性的疾病。在癌症的诊断和治疗方面虽然多年来已经有巨大改进,许多实体瘤的总生存率仍然保持基本上不变,原因在于现有疗法防止再发、肿瘤复发和转移的失败。因此,开发更为靶向和有效的疗法仍然是一项挑战。

[0005] 有希望的研究领域包括使用靶向疗法来追踪显得奠定许多癌症的基础的致癌性“种子”细胞。为此目的,现在已知大部分实体组织含有成体组织居民干细胞群,这些干细胞群产生了构成这种组织的大部分的分化细胞类型。在这些组织中产生的肿瘤类似地由异质细胞群组成,这些异质细胞群也从干细胞中产生,但是在它们的总体增殖和机化方面明显不同。虽然越来越认识到大多数肿瘤细胞具有有限的增殖能力,少数癌细胞群(常称作癌干细胞或CSC)具有广泛自我更新的专有能力和/或使它们具有肿瘤再起始能力。更具体地说,癌

干细胞假设提出,在每种肿瘤内存在着能够无限自我更新和能够产生肿瘤细胞的不同细胞子集(即CSC)(大约0.1%-10%),这些肿瘤细胞在它们的复制能力方面由于其分化成肿瘤祖细胞并随后分化成终末分化肿瘤细胞而被逐步限制。

[0006] 近年来,已经变得更明显的是,这些CSC(也称作肿瘤永存细胞或TPC)对于传统的化学治疗剂或放射可能是更抵抗的,并且因此在标准的护理临床疗法之后存留,从而随后促进再发性肿瘤、继发性肿瘤和转移的增长。而且,存在着越来越多的证据,表明调节器官发生和/或正常组织居民干细胞的自我更新的途径在CSC中解除管制或改变,导致自我更新癌细胞的连续扩张和肿瘤形成。通常参见Al-Hajj等人,2004,PMID:15378087;和Dalerba等人,2007,PMID:17548814;所述文献各自通过引用以其全文结合在此。因此,传统的以及更为新近的靶向治疗方法的有效性已经因抗性癌细胞的存在和/或出现而明显受到限制,这些抗性癌细胞能够使癌症即使在面临这些多样的治疗方法的情况下永存。Huff等人,《欧洲癌症杂志》(European Journal of Cancer)42:1293-1297(2006)和Zhou等人,《自然评论:药物发现》(Nature Reviews Drug Discovery)8:806-823(2009),所述文献各自通过引用以其全文结合在此。这样的观察结果通过传统的减瘤剂(debulking agent)始终不能实质性地增加患者在患有实体瘤时的存活、以及通过产生关于肿瘤怎样生长、复发和转移的日益复杂的理解而证实。因此,用于治疗肿瘤性疾病的最近策略已经认识到消除、耗尽、沉默或促进肿瘤永存细胞的分化,从而减少肿瘤复发、转移或患者再发可能性的重要性。

[0007] 产生这样的策略的努力已经结合到最近的涉及非传统异种移植(NTX)模型的工作中,其中原发性人实体瘤标本被植入免疫低下小鼠中并且专有地传代。这样的技术证实,存在这样的细胞亚群,其具有产生异质性肿瘤并促进它们无限生长的独特能力。如先前假设,在NTX模型中的工作已经证实,鉴定的肿瘤细胞CSC亚群显得更抵抗减瘤方案如化学疗法和放射,这可能解释在临床缓解率与总生存期之间的不一致。此外,在CSC研究中采用NTX模型已经在药物发现和候选药物的临床前评估中激起根本变化,这可能导致对肿瘤复发和转移具有重大影响从而提高患者存活率的CSC靶向疗法。

[0008] 遗憾的是,这样的技术和相关的方法学在很大程度上依赖于高效而可靠地鉴定、表征和/或划分、分离或富集然后可以被有效分析的肿瘤永存细胞亚群的能力。为了最终进行这样的工作,允许细胞层次的剖析和机化的肿瘤细胞标记的鉴定和关联是关键。与肿瘤永存细胞(即CSC)相关的可靠标记的鉴定因此提供了对于在临床环境和基础研究环境中的多种应用有用的有价值的信息。来自特定肿瘤或转移病灶的肿瘤永存细胞的鉴定以及随后的分离在例如在用于诊断失调的病理学基础和/或开发合理的治疗处理中是有用的。在其他情况下,就针对生理机制和分子机制实施体外实验或就植入用于肿瘤产生、进展和/或治疗的体内研究的动物中而言,鉴定、表征、分离、划分或富集TPC是必要的。

[0009] 通过提供促进理解、治疗、预防和/或管理过度增生性失调的新颖的组合物、模型和方法,本发明着手解决了若干这些问题。

发明概述

[0010] 这些目标和其他目标由本发明提供,本发明在广义上是针对可以用来鉴定或表征并且任选地用来分离、划分、分开或富集与过度增生性失调或肿瘤性疾病相关的某些致瘤细胞或细胞亚群的方法、化合物、组合物和制造品。在优选的实施例中,受试者细胞或细胞亚群将包含肿瘤起始细胞和/或肿瘤永存细胞和/或肿瘤祖细胞。

[0011] 更具体地说,根据在此的教导,诸位发明人已经发现一系列可以独立或共同地用来精确鉴定、分选富集和/或和表征来自多种肿瘤的癌干细胞的标记。使用选择的生物化学技术,披露的标记与肿瘤结构中的特异性、自我更新的恶性细胞的新颖的关联提供了对表型不同的能够永存自我更新和肿瘤重演(tumor recapitulation)的细胞或肿瘤细胞亚群的富集、分离或纯化。与现有技术相反并且如由以下实例所证明,这些披露的标记能够识别或鉴定来自多种肿瘤的肿瘤起始细胞。这些标记定义的、相对同质的细胞群的富集或分离转而允许构成性癌干细胞的广泛表征,包括潜在治疗靶标的阐明和药物化合物的筛选。在其他实施例中,本发明的细胞和组合物可以与动物模型如非传统异种移植模型一起使用以便促进研究和药物开发努力。而且,披露的标记可以进一步在临床环境和非临床环境中使用,用于过度增生性失调的诊断、分类、监测和管理以及提供相关的试剂盒或其他制造品。

[0012] 在特别优选的实施例中,通过如在此所陈述的选择标记或标记组合的新颖用途,本发明提供了分别对肿瘤起始细胞(TIC)、肿瘤永存细胞(TPC)和肿瘤祖细胞(TProg)的鉴定、表征、富集和/或分离。就癌干细胞范例而言,每一种上述细胞亚群是或大或小程度致瘤的,并且正因如此是造成肿瘤生长、维持、转移和复发的原因。显著地,本发明允许这样的细胞亚群被鉴定并且任选地源自许多种不同的肿瘤类型和癌症阶段。也就是说,通过鉴定特异性癌干细胞标记,包括肿瘤起始细胞相关标记(TICAM)、肿瘤永存细胞相关标记(TPCAM)和肿瘤祖细胞相关标记(TProgAM),除其他方面外,本发明提供了高纯致瘤细胞亚群的一致且可重复的识别、表征和分选或分离,这转而允许鉴定用于前瞻性诊断的癌干细胞特异性治疗靶标和蛋白质。在这方面,可以在药物研究与开发活动中有效地采用如由单独或组合的披露的标记所定义的这些细胞或富集的细胞亚群来鉴定新颖的治疗靶标,这些治疗靶标被优化以便抑制或耗尽肿瘤饲养癌干细胞。

[0013] 因此,在优选的实施例中,本发明提供了由于表达至少一种TICAM而被富集的一种分离的致瘤细胞群。在相关的方法中,本发明将包括用于富集致瘤细胞群的方法,该方法包括以下步骤:

使肿瘤细胞群与结合剂接触,该结合剂优选地与至少一种TICAM结合;并且
分选与所述至少一种TICAM结合的所述细胞以提供富集的致瘤细胞群。

[0014] 在特别优选的实施例中,分选步骤包括荧光激活细胞分选、磁辅助细胞分选、底物辅助细胞分选、激光介导切割、荧光测定法、流式细胞术或显微技术。在其他优选实施例中,分选步骤将包括使肿瘤细胞群与多种结合剂接触。

[0015] 还由本发明提供的是源自异质性肿瘤块的富集的致瘤细胞群以及源自这些肿瘤的肿瘤起始细胞。应当理解的是,所披露的肿瘤起始细胞分选方法连同体内细胞传代技术及体外培养技术以及所产生的纯化细胞群提供了多种用途,如下文进一步描述。

[0016] 本发明的另一个方面包括患有肿瘤的受试者的个人化治疗方法,所述方法通过使用根据本发明的方法的源自该受试者的自身肿瘤的致瘤细胞的容易可获得性和可操作性而变得可能。

[0017] 在这个方面,本发明的另一个实施例包括治疗或诊断对其有需要的受试者的方法,该方法包括以下步骤:

从受试者获得肿瘤样品;并且
使该肿瘤样品与至少一种结合剂接触,该结合剂优选地与TICAM结合。

[0018] 在优选的实施例中,肿瘤样品将包括实体瘤样品。在其他优选实施例中,这种方法将进一步包括表征或评定与所述肿瘤样品结合的致瘤细胞的步骤。

[0019] 本发明的又另一个方面将包括确定从肿瘤样品获得的细胞是否为致瘤的方法,所述方法包括使肿瘤细胞与至少一种TICAM接触的步骤。

[0020] 本发明的又另一个方面提供治疗患有癌症的受试者的方法,其中该方法包括评定从受试者获得的样品中的TICAM阳性细胞。任选地,这种评定可以在受试者的治疗之后进行并且,在其他实施例中,这种评定将在受试者已经用一种或多种抗癌剂治疗之后进行。仍然在其他实施例中,将在患者被治疗之前进行这种评定。

[0021] 本发明的另一个实施例涉及确定受试者是否处于复发风险的方法,其中这种方法包括通过引入优选结合TICAM的结合剂而评定TICAM阳性细胞的存在,其中检测到肿瘤起始细胞表明该受试者处于转移或复发癌症的风险。在这样的实施例中,可以向受试者给予如本领域的普通技术人员已知的抗癌剂或疗法。

[0022] 类似地,本发明还提供了用于诊断和监测肿瘤起始细胞相关失调如癌症的试剂盒。为此目的,本发明优选地提供了用于诊断或治疗这样的失调的制造品,所述制造品包括包含一种或多种结合剂的一个容器或多个容器以及使用所述容器的指导材料,其中该结合剂优选地与肿瘤起始细胞相关标记结合。

[0023] 本发明的再另一个实施例包括进行基因型或表型分析的方法,该方法包括以下步骤:

- 提供包含一种或多种TICAM的致瘤细胞或富集的致瘤细胞群;
- 处理所述细胞或细胞群以提供遗传物质或蛋白质组物质;并且
- 分析所述遗传物质或蛋白质组物质。

[0024] 在优选的实施例中,这种分析将包括转录组的至少一部分的下一代(Next-Gen)测序。在其他实施例中,本发明将包括质谱分析。

[0025] 在又另一个实施例中,本发明将包括筛选潜在药物化合物的方法,该方法包括以下步骤:

- 使致瘤细胞或致瘤细胞群暴露于候选化合物;并且
- 使所述致瘤细胞或致瘤细胞群与至少一种TICAM接触。

[0026] 在选择实施例中,暴露步骤将在体内进行。在其他优选实施例中,暴露步骤将在体外进行。仍然在其他优选实施例中,该方法将进一步包括表征致瘤细胞或致瘤细胞群。

[0027] 在另一个实施例中,本发明提供了诱导癌症的方法,该方法包括以下步骤:

- 提供针对一种或多种TICAM而富集的致瘤细胞群;并且
- 将该致瘤细胞群引入受试者中。

[0028] 在又另一个优选实施例中,本发明包括诱导癌症的方法,该方法包括以下步骤:

- 分离展示一种或多种TICAM的致瘤细胞;并且
- 将分离的致瘤细胞引入受试者中。

[0029] 优选地,通过使所述细胞与一种或多种结合剂接触而分离这种细胞,其中该结合剂优选地与一种或多种TICAM结合。

[0030] 本发明进一步提供了产生肿瘤样品的方法,该方法包括以下步骤:

- 提供包含一种或多种TICAM的致瘤细胞或富集的致瘤细胞群;

将所述致瘤细胞或富集的致瘤细胞群引入受试者中；
等待所述致瘤细胞或细胞群产生异质性肿瘤；并且
收获所述异质性肿瘤。

[0031] 在优选的实施例中，将使用标准技术冷冻和保存收获的肿瘤。仍然在其他优选实施例中，将源自收获的肿瘤的细胞植入受试者中。还有本发明的其他优选实施例将包括肿瘤库，该肿瘤库包含这些收获的肿瘤。

[0032] 仍然在另一个特别优选的实施例中，本发明提供了用于分析药物化合物的动物模型，所述动物模型包括植入有针对一种或多种TICAM而纯化或富集的致瘤细胞或细胞群的受试者。在特别优选的实施例中，受试者将包括免疫低下小鼠。相关的优选实施例包括产生用于分析药物化合物的动物模型的方法，该方法包括引入针对一种或多种TICAM而纯化或富集的致瘤细胞或细胞群的步骤。

[0033] 除了前述方面之外，本发明的所选实施例提供了体内分析癌症进展和/或发病机制的方法，该方法包括以下步骤：

将包含一种或多种TICAM的一个或多个肿瘤起始细胞引入受试者中；并且
分析在受试者中的癌症进展和/或发病机制。

[0034] 在优选的实施例中，在引入一个或多个肿瘤起始细胞后，将用一种或多种抗癌剂治疗动物。

[0035] 符合本发明的优选TICAM将包括CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白(semaphorin) 4B、TROP-2和Vb9。在特别优选的实施例中，如在此所陈述富集或分离的细胞和细胞群应当包含标记表型，该标记表型包括一种或多种TICAM。如下文广泛讨论并且由所附实施例展示的，可以根据在此的教导使用每一种前述标记来鉴定、表征和任选地分开或富集致瘤细胞群。

[0036] 关于所有前述实施例，应当理解的是，特别优选的TICAM包括选自下组的TICAM，该组由以下各项组成：CD46、CD324和CD66c。在这个方面，应当理解的是，选择的特别优选的致瘤细胞或富集的细胞群将包含CD46^{hi}表型。在其他优选实施例中，披露的细胞或细胞群将包含CD324⁺表型。仍然在其他特别优选的实施例中，本发明的细胞或细胞组合物将包含CD46^{hi} CD324⁺表型。仍然在其他优选的实施例中，披露的细胞将具有CD46^{hi} CD324⁺ CD66c⁻表型，而仍然在其他实施例中，这些细胞将展示CD46^{hi} CD324⁺ CD66c⁺。当然，应当理解的是，使用与特定标记的每一种发生反应的结合剂，可以衍生包含前述表型的细胞群。

[0037] 前述内容是概述并且因此必要地含有细节的简化、泛化和省略；因此，本领域技术人员将理解这种概述仅仅是说明性的并且不是旨在以任何方式是限制性的。通过参考在此陈述的附图和教导内容，在此所述的方法、组合物和/或装置和/或其他主题的其他方面、特征和优点将变得明显。

附图简要说明

[0038] 图1A和图1B所示为CD46异质地实体瘤细胞上表达，描述了各个肿瘤细胞的展示

为柱状图的基于流式细胞术的蛋白质表达数据,其中同种型对照抗体的背景染色以灰色填充的柱状图显示,并且CD46表达由粗黑线展示;

[0039] 图2所示为CD324异质地实体瘤细胞上表达,显示了各个肿瘤细胞的展示为柱状图的基于流式细胞术的蛋白质表达数据的图示,其中同种型对照抗体的背景染色以灰色填充的柱状图显示,并且CD324表达由粗黑线展示;

[0040] 图3A和图3B所示为CD24和CD34在实体瘤细胞上总体显示同质表达,描述了各个肿瘤细胞的展示为柱状图的基于流式细胞术的表达数据,其中同种型对照抗体的背景染色以灰色填充的柱状图显示,并且CD24或CD34表达由粗黑线展示;

[0041] 图4A和4B是散点图,所示为结直肠致癌性与CD46^{hi} CD324⁺肿瘤细胞亚群相关,并且是显示来自代表性结直肠肿瘤的富集的CD46^{hi} CD324⁺细胞群的致癌性的图示;

[0042] 图5A和5B是散点图,所示为胰腺致癌性与CD46^{hi} CD324⁺肿瘤细胞亚群相关,并且是显示来自代表性胰腺肿瘤的富集的CD46^{hi} CD324⁺细胞群的致癌性的图示;

[0043] 图6A和6B是散点图,所示为非小细胞肺致癌性与CD46^{hi} CD324⁺肿瘤细胞亚群相关,并且是显示来自代表性肺肿瘤的富集的CD46^{hi} CD324⁺细胞群的致癌性的图示;

[0044] 图7A和7B是散点图,所示为乳腺致癌性与CD46^{hi} CD324⁺肿瘤细胞亚群相关,并且是显示来自代表性三阴性乳腺肿瘤的富集的ESA⁺ (CD46^{hi}) CD324⁺细胞群的致癌性的图示;

[0045] 图8所示为CD46^{hi} CD324⁺细胞亚群就不同癌症而言是高致癌性的,是使用表达CD46和CD324的各种组合的分离的肿瘤细胞亚群的代表性结直肠肿瘤、非小细胞肺肿瘤、胰腺肿瘤和三阴性乳腺肿瘤细胞移植实验的表格概述;

[0046] 图9A和9B所示为选择的蛋白质与CD46共表达并且与肿瘤起始细胞群相关,提供了标记的表格概述,观察到这些标记共表达于所示的对应实体瘤类型中的CD46^{hi} CD324⁺细胞上;

[0047] 图10所示为选择的蛋白质与结直肠肿瘤起始细胞群相关,显示了各个结直肠肿瘤细胞的基于流式细胞术的蛋白质表达数据的图示,其展示为散点图(上方)或柱状图(下方),其中在柱状图中,同种型对照抗体的背景染色以灰色填充的柱状图显示,并且所示蛋白质抗原的细胞表面表达由粗黑线展示;

[0048] 图11所示为选择的蛋白质与胰腺肿瘤起始细胞群相关,显示了各个胰腺肿瘤细胞的基于流式细胞术的蛋白质表达数据的图示,其展示为等值线图(上方)或柱状图(下方),其中在柱状图中,同种型对照抗体的背景染色以灰色填充的柱状图显示,并且所示蛋白质抗原的细胞表面表达由粗黑线展示;

[0049] 图12所示为选择的蛋白质与非小细胞肺肿瘤起始细胞群相关,显示了各个非小细胞肺肿瘤细胞的基于流式细胞术的蛋白质表达数据的图示,其展示为散点图(上方)或柱状图(下方),其中在柱状图中,同种型对照抗体的背景染色以灰色填充的柱状图显示,并且所示蛋白质抗原的细胞表面表达由粗黑线显示;

[0050] 图13A-C所示为CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻富集的细胞群重建异质性结直肠肿瘤,是描述结直肠肿瘤衍生的CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻富集细胞群重建异质性肿瘤的能力的图示,所述异质性肿瘤反映从中获得它们的亲本肿瘤;

[0051] 图14A和图14B所示为结直肠CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞重建原发性和二次移植中的异质性肿瘤,是显示经原发性移植中的不同结直肠肿瘤细胞亚群的CD66c⁻细胞重建

的柱状图和经二次移植物中的所示肿瘤细胞亚群的致瘤性的图示；

[0052] 图15A-C提供了散点图和表格概述,所示为CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻富集的细胞群显示强大的致瘤性,其显示了通过连续移植由CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻富集的细胞群展示的强大的致瘤性；

[0053] 图16A-D所示为CD46、CD324和CD66c的差异表达指示增殖和分化潜能,以图形方式展示了表达各种水平的CD46、CD324和CD66c的不同肿瘤细胞亚群在体外形成集落、分化和产生可溶性CD66c的能力；

[0054] 图17A-D所示为化学治疗剂增加残余肿瘤中的CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞的相对频率,提供了通过显示在治疗的肿瘤中的CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞的相对频率增加而展示化学治疗剂对结直肠肿瘤细胞亚群的影响的数据；

[0055] 图18A和图18B所示为化学治疗剂增加残余胰腺肿瘤中的CD46^{hi}致瘤细胞的相对频率,提供了通过显示在治疗的肿瘤中的CD46^{hi}细胞的相对频率增加而展示化学治疗剂对胰腺肿瘤细胞亚群的影响的数据；

[0056] 图19A是反映如本发明描述的细胞层次的示意图；图19B所示为如由本发明定义的在结直肠癌中的细胞层次的示意图；

[0057] 图20A-20D所示为在肿瘤细胞亚群中选择标记的基因表达,代表在结直肠异种移植肿瘤内分别与NTG细胞、TProg细胞和TPC结合的NOTUM(图20A)、APCDD1(图20B)、示例性胰腺蛋白(图20C)和MUC20(图20D)的代表性基因表达的图示。

发明详细说明

1引言

[0058] 在以下详细说明中,陈述了众多具体细节,以便提供对本发明的彻底理解。然而,本领域的技术人员将理解的是,可以在没有这些具体细节的情况下实施本发明的多个方面。在其他情况下,没有详细说明的熟知方法、程序和组分,以便不使本发明难于理解。

[0059] 已经证明表征肿瘤起始和生长的在治疗上有意义的方面以确定治疗策略并且提供有效治疗靶标是极其困难的。在过去,不能开发用于治疗各种癌症的成功治疗方案可能至少部分地归因于缺乏对驱动肿瘤生长和复发的基础力量的理解以及研究技术和工具的局限性。随着癌干细胞范例在过去几年内的开发和验证以及由日益有效的研究方法带来对肿瘤生理学的错综复杂事物的理解增强,如由患者存活所展示的重大临床进展应当是不证自明的。遗憾的是,并且具有一些引人瞩目的例外,未曾公认预期的改善,特别在某些实体瘤的情况下。

[0060] 部分地,临床成功的这种相对缺乏可以归因于将总体上精确的和启发性的研究技术误用于构思欠佳的或不正确定义的通常被认为是致瘤性的细胞群。例如,虽然差异性基因表达已经广泛用来鉴定癌相关基因活性和鉴定具有潜在治疗价值或诊断价值的表达的蛋白质,该技术在改善患者存活方面价值有限。这是因为经常使用遗传信息进行这种分析,其中遗传信息从利用非特异性或不恰当的癌干细胞标记所分选的肿瘤细胞或亚群的复杂混合物中获得。

[0061] 虽然这些方法可以提供某种关于一般的、同质表达的肿瘤相关基因产物的了解,它们几乎一点也没有鉴定到可以被开发以产生用于预防肿瘤复发和转移的靶向疗法的特异性的癌干细胞的有关标记。也就是说,因为原料的质量不良,这样的差异表达研究经常提

示来自表型多样的分化细胞的无关或相对不重要的基因和蛋白质(从病理学观点来看),在进一步研究之后,这些基因和蛋白质被证明作为癌干细胞标记是总体上无效的。相反,通过鉴定特异性癌干细胞标记,包括肿瘤起始细胞相关标记(TICAM)、肿瘤永存细胞相关标记(TPCAM)和肿瘤祖细胞相关标记(TProGAM),除了其他方面外,本发明提供了高纯致瘤细胞亚群的一致且可重复的识别、表征和分选或分离,这转而允许鉴定用于前瞻性诊断的癌干细胞特异性治疗靶标和蛋白质。

[0062] 更一般地说,根据在此的教导,诸位发明人已经发现一系列标记,这些标记可以独立或共同地用来精确鉴定、分选富集和/或和表征来自多种肿瘤的癌干细胞。使用选择的生物化学技术,披露的标记与肿瘤结构中的特异性、自我更新的恶性细胞的新颖的关联提供了对表型不同的能够永存自我更新和肿瘤重演的细胞或肿瘤细胞亚群的富集、分离或纯化。与现有技术相反并且如由以下实例所证明,这些披露的标记能够识别或鉴定来自多种肿瘤的肿瘤起始细胞。这些标记定义的、相对同质的细胞群的富集或分离转而允许构成性癌干细胞的广泛表征,包括潜在治疗靶标的阐明和药物化合物的筛选。在其他实施例中,本发明的细胞和组合物可以与动物模型如非传统异种移植模型一起使用以便促进研究和药物开发努力。而且,披露的标记可以进一步在临床环境和非临床环境中使用,用于过度增生性失调的诊断、分类、监测和管理以及提供相关的试剂盒或其他制造品。

[0063] 虽然已经展示和描述了本发明的某些特征,本领域的普通技术人员将想到许多修改、替换、变化和等同物。因此,将被理解的是,所附权利要求书旨在覆盖所有这样的修改和变化,因为它们落在本发明的真实精神范围之内。

II 选择的缩写

[0064] CSC,癌干细胞;ETP,早期肿瘤祖细胞;FACS,荧光激活细胞分选;LTP,晚期肿瘤祖细胞;MACS,磁辅助细胞分选;TIC,肿瘤起始细胞;TICAM,肿瘤起始细胞相关标记;TPC,肿瘤永存细胞;TPCAM,肿瘤永存细胞相关标记;TProG,肿瘤祖细胞;TProGAM,高度增殖性肿瘤祖细胞相关标记;NTX,非传统异种移植植物;

III 定义

[0065] 为方便,这里收集了在整个申请(包括本说明书、实例和所附权利要求书)中使用的某些术语。除非另有定义,在此使用的所有技术与科学术语具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。

[0066] 如在此使用的,术语“肿瘤起始细胞”(TIC)应当被认为是表示当移植时能够至少显著增殖并且能够在免疫低下小鼠中起始肿瘤的致瘤细胞或其群体。在这方面,肿瘤起始细胞群将包含肿瘤永存细胞和高度增殖性肿瘤祖细胞两者。

[0067] 为了本披露的目的,“肿瘤永存细胞”或“癌干细胞”(TPC或CSC)可以可互换地使用并且被定义为可以经历自我更新以及异常增殖和分化以形成肿瘤的细胞。肿瘤永存细胞的功能特征在于它们是致瘤的;它们可以通过自我更新产生另外的致瘤细胞;并且它们可以通过产生非致瘤性肿瘤细胞而完全重演异质性肿瘤块。

[0068] 就本发明而言,术语“肿瘤祖细胞”(TProG)是指致瘤细胞或其群体,它们是TPC的子代并且当体外培养或通过相容性动物宿主传代时拥有至少某种肿瘤重演和有限的自我更新的能力。某些TProG细胞或群体可以在此处称为高度增殖性的。如下文更详细地讨论的,TProG细胞群包括可以通过表型(例如,细胞表面标记)和重演肿瘤细胞结构的不同能力

加以区分的“早期肿瘤祖细胞”(ETP)和“晚期肿瘤祖细胞”(LTP)两者。

[0069] 在本申请中,“肿瘤起始细胞相关标记”(TICAM)应当被认为是包括与肿瘤起始细胞或细胞亚群相关并且允许对其鉴定、表征和任选的分选或富集的任何标记。

[0070] 如在此使用的,“肿瘤永存细胞相关标记”(TPCAM)应当被认为是包括与肿瘤永存细胞或细胞亚群相关并且允许对其鉴定、表征和任选的分选或富集的任何标记。应当理解的是,TICAM和TPCAM并不相互排斥并且单独的标记可以同时包含两者。

[0071] 出于本申请的目的,“肿瘤祖细胞相关标记”(TProGAM)包括与肿瘤祖细胞或细胞亚群相关并且允许对其鉴定、表征和任选的分选或富集的任何标记。应当理解的是,TICAM和TProGAM并不相互排斥并且单独的标记可以同时包含两者。

[0072] 如在此使用的,尤其是关于分离的细胞或分离的细胞群时,术语“致瘤的”是指源自肿瘤的当脱离并移植入适合的动物模型如免疫低下小鼠时能够形成肿瘤 of 细胞。

[0073] 在本申请中,“非致瘤细胞”(NTG)是指从肿瘤起始细胞产生的、但是本身不具有自我更新或产生构成肿瘤的肿瘤细胞异质谱系的能力的肿瘤细胞。实验上,NTG细胞不能在免疫低下小鼠中可重复地形成肿瘤,甚至当以过量细胞数移植时也是如此。

[0074] 出于本申请的目的,术语“选择”、“分选”、“划分”“剖分”或“分离”所选择的细胞、细胞群或细胞亚群可以互换地使用,并且除非上下文另外表明,表示将所选择的细胞或定义的细胞子集从组织样品中移出并且与不在定义这种细胞或细胞群的参数内的其他细胞和污染物分离。分离的癌干细胞将通常不被他细胞类型污染通过并且具有允许产生分化子代的自我更新和肿瘤重演的能力。然而,当该过程或治疗产生细胞群时,应当理解的是,提供具有绝对纯度的组合物是不切实际的。在这样的情况下,将细胞群针对选择的细胞“富集”,其中这些选择的细胞然后在不实质干扰所选择的细胞亚群的功能或特性的各种污染物(包括其他细胞类型)存在的情况下存在。

[0075] 如在此使用并且适用于细胞或细胞群的,术语“富集”可以宽泛地解释并且被认为是表示任何加工或处理的细胞群,其中所述细胞群含有比发现于未处理的、另外地等同的细胞群或样品中更高百分比的所选择的细胞类型。在一些优选的实施例中,富集细胞群是指与起始细胞群相比增加细胞群中的一种细胞类型的大约10%、大约20%、大约30%、大约40%、大约50%或大于50%的百分比。在其他优选实施例中,本发明的富集细胞群将包括至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%所选择的细胞类型。仍然在其他实施例中,可以将富集的肿瘤永存细胞制剂描述为包含在制剂中所含的总细胞群的大约1%或更多或大约0.5%至大约40%。通过比较,非富集的示例性肿瘤细胞制剂将仅包括大约0.2%至大约2.0%或更少的肿瘤永存细胞,这些肿瘤永存细胞能够在体内产生形成细胞球的次级集落或使异质性肿瘤永存。在一些实施例中,富集的制剂包含100倍、200倍、500倍、1,000倍或高达2,000倍或10,000倍至20,000倍富集的癌干细胞制剂,所述癌干细胞制剂能够以低细胞数开始在体内产生次级集落或使异质性肿瘤永存。

[0076] 在本发明的其他方面,就特定细胞群而言,术语“基本上纯的”是指相对于构成总细胞群的细胞,具有至少大约75%、优选至少大约85%、更优选至少大约90%、并且最优选至少大约95%纯度的细胞群。类似地,就一个或多个部分和/或终末分化的细胞类型的制剂而言,术语“基本上纯的”或“基本上纯化的”,是指含有少于大约20%、更优选少于大约15%、10%、8%、7%、最优选少于大约5%、4%、3%、2%、1%或少于1%的不是肿瘤起始细

胞的细胞的细胞群。

[0077] 如在此在细胞或组织的背景下所使用的,“标记”或“细胞标记”表示处于化学或生物实体形式的任何性状或特征,所述实体与特定细胞、细胞群或组织可鉴定地相关或特异性地发现于其中或其上,包括在受疾病或失调影响的组织或细胞群中或其上鉴定到的那些实体。标记可以在性质上是形态的、功能的或生物化学的。在优选的实施例中,标记是差异性或优先地由特定细胞类型(例如,TPC)表达(或不表达)或由细胞在某些条件(例如,在细胞生活周期的特定时点期间或在特定小生境中的细胞)下表达的细胞表面抗原。在此构思的标记具体地被认为是阳性或阴性的并且可以借助其存在(阳性)或不存在(阴性)指示细胞或细胞亚群。

[0078] 类似地,在组织、细胞或细胞群(例如,稳定的TPC表型)的背景下,术语“标记表型”表示可以用来表征、鉴定、定量、分开、分离、纯化或富集特定细胞或细胞群的任何标记或标记组合。在具体的优选实施例中,标记表型是可以通过检测或鉴定细胞表面标记组合的表达来确定的细胞表面表型。

[0079] 当其适用于标记或标记表型时,“阳性”、“低”和“阴性”表达水平如下所定义。具有阴性表达(即“-”)的细胞在此处定义为在另外的荧光发射通道中存在用于其他感兴趣的蛋白质的完全抗体染色混合物标记的情况下,表达小于或等于荧光通道中用同种型对照抗体所观察到的第95个百分位数表达的那些细胞。本领域的技术人员将理解的是,这种用于定义阴性事件的方法称作“荧光减一”或“FMO”染色法。在此将其表达大于使用上述FMO染色程序的用同种型对照抗体所观察到的第95百分位数表达的细胞定义为“阳性”(即“+”)。如在此定义的,存在着宽泛定义为“阳性”的各种细胞群。首先,具有低表达(即“lo”)的细胞通常定义为具有下述观察到的表达的那些细胞,其中所述观察到的表达高于使用FMO染色的用同种型对照抗体所确定的第95百分位数并且处于使用上述FMO染色程序的用同种型对照抗体所观察到的第95百分位数表达的标准偏差范围内。具有“高”表达(即“hi”)的细胞可以定义为具有下述观察到的表达的那些细胞,其中所述观察到的表达高于使用FMO染色的用同种型对照抗体所确定的第95百分位数并且大于使用上述FMO染色程序的用同种型对照抗体所观察到的第95百分位数表达以上的一个标准偏差。在其他实施例中,第99百分位数可以优选地用作在阴性与阳性FMO染色之间的分界点并且在特别优选的实施例中,这个百分位数可以大于99%。

[0080] 如在此使用的的术语“谱系”描述了具有共同祖先的细胞。例如,源自相同肿瘤起始细胞的细胞可以属于相同谱系,虽然子代已经分化成各种细胞类别。

[0081] 出于本披露的目的,除非由情况另外决定,术语“结合剂”、“结合分子”和“结合实体”是同义的,并且可以互换地使用。在本发明的上下文中,结合剂结合、识别在定义的细胞或细胞亚群上的选择标记,与之相互作用、反应或以别的方式优选地与之相关。示例性结合剂可以包括但不限于抗体或其片段、抗原、适配体、核酸(例如DNA和RNA)、蛋白质(例如受体、酶、酶抑制剂、酶底物、配体)、肽、凝集素、脂肪酸或脂质和多糖。例如,在选择实施例中,相容性结合剂可以包括麻疹病毒的血凝素蛋白或其CD46结合片段。在其他特别优选的实施例中,结合剂或实体包括抗体或其片段。

[0082] 如在此陈述的,术语“抗体”以最宽泛的意义而被使用并且具体地涵盖合成抗体、单克隆抗体、寡克隆或多克隆抗体(polyclonal antibody)、多克隆抗体(multiclonal

antibody)、重组产生的抗体、胞内抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体、多价抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、灵长类化抗体、Fab片段、F(ab')片段、单链FvFc(scFvFc)、单链Fv(scFv)、抗独特型(抗Id)抗体和任何其他免疫活性抗体片段,只要它们展示出所希望的生物活性(即,标记相关或结合)即可。在更广的意义上,本发明的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子(即,含有抗原结合部位的分子)的免疫活性片段,其中这些片段可以或可以不与另一个免疫球蛋白结构域(包括但不限于Fc区或其片段)融合。此外,如在此更详细地概述的,术语抗体和多种抗体具体地包括Fc变体或其片段,包括全长抗体和包含Fc区的变体Fc-融合物,其任选地包含至少一个氨基酸残基修饰并且与免疫球蛋白的免疫活性片段融合。

[0083] 如在此使用的,术语“表位”是指能够被特定抗体识别和特异性结合的靶标记或抗原的部分。当标记是多肽(如细胞表面受体)时,表位可以从连续氨基酸和由蛋白质的三级折叠而靠近的非连续氨基酸两者形成。从连续氨基酸形成的表位典型地在蛋白质变性时保留,而由三级折叠形成的表位典型地在蛋白质变性时丧失。表位典型地包含至少3个并且更常见地至少5个或8-10个处于独特空间构象的氨基酸。更具体地说,技术人员将理解的是,术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合或以别的方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。另外,表位可以是线性或构象性的。在线性表位中,在蛋白质与相互作用分子(如抗体)之间的所有相互作用点沿该蛋白质的一级氨基酸序列线性地存在。在构象表位中,相互作用点跨越蛋白质上彼此线性分离的氨基酸残基存在。

[0084] 如在此使用的术语“衍生物”是指这样的分子,包括已经通过标准分子生物学方法或以化学方式修饰(例如但不限于通过多项技术如蛋白化、标记(荧光团)、聚乙二醇化(用聚乙二醇衍生)或添加其他分子)的蛋白质和核酸。

[0085] 术语“功能衍生物”和“模拟物”可互换使用并且是指拥有生物活性(功能的或结构的)的化合物,所述生物活性与其功能衍生物的实体或分子的生物活性基本上相似。术语功能衍生物旨在包括分子的片段、变体、类似物或化学衍生物。

[0086] 如在此使用的,关于多核苷酸或多肽的“变体”是指分别与参考多核苷酸或多肽相比(例如,与野生型多核苷酸或多肽相比)可以在一级、二级或三级结构方面变化的多核苷酸或多肽。抗体的“变体”例如意思是指在结构和功能方面基本上相似的分子,例如,其中这些变体保留与选择的抗原或其片段结合的能力,然而具有改变的生物化学作用。

[0087] 如果两种分子具有基本上相似的结构物或如果两种分子拥有相似的生物活性,则将一种分子称为与另一种分子“基本上相似”。因此,假定两种分子拥有相似的活性,则如这个术语在此处所使用的,将它们视为变体,即使这些分子之一的结构未发现于另一种分子中、或如果氨基酸残基的序列不相同。

[0088] 分子的“片段”意思是指分子的任何连续多肽或核苷酸子集。例如跨膜蛋白的片段可以包括仅包含胞外结构域或其某个部分的构建体。就本发明而言,标记片段或衍生物可以包括选择标记的任何免疫反应性或免疫活性部分。

[0089] 分子(如标记)的“类似物”意思是指在功能上与整个分子或与其片段相似的分子。如在此使用的,当分子含有通常不是该分子的一部分的另外的化学部分时,将所述分子称

为另一种分子的“化学衍生物”。这样的部分可以改善分子的溶解度、吸收、生物半衰期,等等。这些部分可以替代地降低分子的毒性、消除或减弱分子的任何不良副作用,等等。能够介导这样的作用的部分披露于《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences) (第18次编辑,A.R.Gennaro编著,MackPubl.,Easton,Pa. (1990)) 中。

[0090] 如在此使用的,当用来描述多核苷酸时,“同源的”表示当两个多核苷酸或其指定的序列在最佳比对和比较时至少70%的核苷酸、通常从大约75%至99%、并且更优选至少大约98%至99%的核苷酸是一致的,伴有适当的核苷酸插入或缺失。如在此使用的术语“同源物”或“同源的”也指就结构和/或功能而言的同源性。就序列同源性而言,如果多个序列是至少50%、至少60%至少70%、至少80%、至少90%、至少95%相同、至少97%相同、或至少99%相同的,则它们是同源物。术语“基本上同源的”是指至少90%、至少95%相同、至少97%相同或至少99%相同的序列。同源序列可以是在不同种类中的相同功能基因。

[0091] 如在此使用的,在多肽序列的背景下,术语“实质相似性”表示这种多肽包含在大约10-100个氨基酸残基的比较窗(例如,抗体的重链或轻链可变区)范围内与参考序列具有至少60%序列一致性或与参考序列具有70%、或80%、或85%序列一致性、或最优选90%一致性的序列。在氨基酸序列的背景下,“实质相似性”进一步包括氨基酸的保守性置换。因此,例如,在两个肽以一个或多个保守性置换而不同的情况下,一个多肽与第二个多肽是基本上相似的。术语“实质一致性”表示当最佳比对(如通过使用默认空位权重的程序GAP或BESTFIT)时,两个肽序列共享至少百分之65序列一致性,优选至少百分之80或90序列一致性,更优选至少百分之95或更高的序列一致性(例如,百分之99或更高的序列一致性)。优选地,不相同的残基位置因保守性氨基酸置换而不同。

[0092] 本发明的基因或多肽的同源物的确定可以由技术人员容易地确定。术语“同源性”或“一致性”或“相似性”在此处可互换地使用并且是指两个肽之间或在两个核酸分子之间的序列相似性。可以通过比较在每个序列中可以用于比较目的比对的位置各自确定同源性和一致性。当所比较的序列中的等同位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则这些分子在这个位置是一致的;当等同部位被相同或相似(例如,在立体和/或电子性质方面相似)的氨基酸残基占据时,则可以将这些分子称为在这个位置同源(相似)。作为同源性/相似性或一致性百分比的表述是指在被比较的序列共享的位置处的一致或相似氨基酸的数目的函数。“不相关”或“非同源的”序列共享小于40%的一致性,虽然优选地与本申请的序列共享小于25%的一致性。

[0093] 如在此使用的,术语“受试者”或“患者”可以互换地使用并且是指可以向其施用本发明的任何衍生药物组合物和其中癌症或增生性失调可能出现的任何活生物。该术语包括,但不限于人、非人类动物,例如非人灵长类如黑猩猩和其他猿类和猴种类;农场动物如牛、绵羊、猪、山羊和马;家养受试者如狗和猫;实验室动物,包括啮齿类如小鼠、大鼠和豚鼠,等等。该术语不指示具体的年龄或性别。因此,预期涵盖成体和新生的受试者以及胎儿,无论雄性或雌性。术语“受试者”也包括易感于如贯穿本说明书的通常披露(但不限于此)的病征或疾病状态的活生物。受试者的实例包括人、狗、猫、牛、山羊和小鼠,包括转基因种类。术语“非人类动物”和“非人哺乳动物”在此可互换地使用,并且包括所有脊椎动物,例如哺乳动物,如非人灵长类(尤其高等灵长类)、绵羊、狗、啮齿类(例如小鼠或大鼠)、豚鼠、山羊、猪、猫、兔、牛、以及非哺乳动物如鸡、两栖类、爬行类,等等。在一个实施例中,受试者是人。

在另一个实施例中,受试者是作为疾病模型的实验动物或动物替代物。

[0094] 如在此使用的术语“有效量”是指为延缓、减轻或改善疾病或失调的至少一种症状所需要的药剂和/或药物组合物的量。例如,潜在药物化合物的有效量是降低植入试验动物中的肿瘤起始细胞的生长速率所需要的量。因此,有效量也是足以防止疾病症状产生或减少症状或降低症状进展速率的量。

[0095] 术语“恶性肿瘤”、“肿瘤”和“癌症”在此可互换地使用并且是指以细胞的不受控制、过度增生性或异常生长或转移为特征的疾病或失调。在其他方面,该术语也旨在包括哺乳动物中的器官或组织(例如,结直肠、胰腺、乳腺,等等)的任何疾病以及它对作为整体的身体的影响,其中所述疾病以正常细胞或异常细胞在这种组织中控制不良或不受控制的增殖为特征。在该定义范围内的失调包括良性肿瘤、异型增生(dysplasia)、增生以及显示转移性生长的肿瘤或任何其他转化例如经常在癌症发作或复发之前的白斑。

[0096] 如在此使用的,术语“难治性”最经常地通过未能达到临床终点(例如,缓解、延长的缓解持续时间、延长的无疾病、存活、无再发存活、无进展存活期和总生存期)确定。定义对于疗法的抵抗的另一种方式在于患者未能实现针对疗法的反应,从而确定该疗法不是治疗有效的。

[0097] 如在此使用的,短语“诊断剂”是指用于诊断疾病或失调目的的任何分子、化合物、和/或物质。在优选的实施例中,诊断剂应当包含与报道分子结合的结合剂。诊断剂的其他非限制性实例包括抗体、抗体片段、或其他蛋白质,包括与检测试剂结合的那些。如在此使用的,术语“检测试剂”或“报道子”是指通过本领域技术人员可获得的任何方法学可检测的任何分子、化合物、和/或物质。检测试剂或报道子的非限制性实例包括染料、荧光标记、气体、金属、或放射性同位素。如在此陈述的,“诊断剂”、“成像剂”和“报道子”或“报道分子”是等同的并且可以互换地使用,除非由上下文另外指示。

[0098] 如在此使用的,术语“治疗”包括防止与例如像癌症中的细胞的不适当增殖相关的病症、疾病或失调的至少一种副作用或症状的进展和/或使其减轻或逆转。

[0099] 如在此使用的,术语“给予”和“引入”在此可互换地使用并且是指将在此披露的药物组合物通过方法或途径置于受试者中,导致这种药物组合物至少局部定位于所希望的部位。可以通过在受试者中产生有效治疗的任何适当途径给予本发明的化合物。

[0100] 如在此使用的,短语“肠胃外给药”和“肠胃外给予”表示除了肠内和局部给药之外的给药方式,通常通过注射给药,并且包括,而限于静脉内、肌内、动脉内、鞘内、心室内、囊内、眶内、心内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、被膜下、蛛网膜下、椎管内、脑脊髓内(intracerebrospinal)、以及胸骨内注射和输注。如在此使用的短语“全身给药”、“经全身给药”、“外周给药”和“经外周给药”表示给予包含吡唑蒽酮和任选地其他药剂或物质的本发明药物组合物并非直接进入中枢神经系统中,使得它进入动物的全身并且因此经受代谢和其它相似的过程,例如皮下给药。

[0101] 短语“药学上可接受的”在此用来指这些化合物、材料、组合物和/或剂型,它们在合理的医学判断力范围内适合用于与人和动物的组织接触而没有过多毒性、刺激性、过敏反应或其他问题或并发症,与合理利益/风险比相称。

[0102] 如在此使用的短语“药学上可接受的载体”表示涉及从身体的一个器官或部分携带或转运主题药剂到身体的另一个器官或部分的药学上可接受的物质、组合物或载体,如

液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂、溶剂或包囊材料。每种载体在与制剂的其他成分相容的意义上必须是“可接受的”或是生物惰性的。

IV. 致瘤细胞和细胞亚群

[0103] 在特别优选的实施例中,通过在此陈述的选择标记或标记组合的新颖用途,本发明提供了分别对肿瘤起始细胞(TIC)、肿瘤永存细胞(TPC)和肿瘤祖细胞(TProg)的鉴定、表征、富集和/或分离。就癌干细胞范例而言,每一种上述细胞亚群是或大或小程度致瘤的,并且正因如此是造成肿瘤生长、维持、转移和复发的原因。显著地,本发明允许这样的细胞亚群被鉴定并且任选地源自许多种不同的肿瘤类型和癌症阶段。就这一点而论,消灭和消除这些细胞可能对于有效管理和治疗多种不同的肿瘤是关键的。在这方面,可以在药物研究与开发活动中有效地采用单独或组合的这些细胞或富集的细胞亚群来鉴定新颖的治疗靶标,这些治疗靶标被优化以便抑制或耗尽肿瘤饲养癌细胞。

[0104] 如已经对血液疾病和造血系统疾病所展示的,细胞层次可能存在于许多实体瘤内,其中不同的肿瘤细胞亚群拥有不同的增殖和分化潜能。更具体地说,如在图19中所展示的,使用在此披露的标记所分离的细胞群支持以下假设,在其中存在显著分化能力和参与这些分化程序的能力的肿瘤中,肿瘤永存细胞(即CSC)位于癌症中的细胞层次的顶部。这些细胞展示出限定干细胞的经典特征,而肿瘤祖细胞展示相似的特征,没有自我更新能力,如通过定义和高度纯化的细胞的连续移植所展示的。

[0105] 如先前所提到的,肿瘤起始细胞群包括肿瘤永存细胞和高度增生性肿瘤祖细胞,它们通常共同包含本体肿瘤或肿块的独特亚群(即0.1%-40%)。出于本披露的目的,术语肿瘤永存细胞和癌干细胞是等同的,并且可以在此可互换地使用。相反,TPC不同于TProg,在于它们可以完全重演存在于肿瘤内的肿瘤细胞的组成并且具有无限的自我更新能力,如通过低数目的分离细胞的连续移植(经小鼠两次或更多次传代)所展示的。如下文将更详细地讨论的,使用适当细胞表面标记的荧光激活细胞分选(FACS)是分离高度富集的肿瘤细胞亚群(>99%纯度)的可靠方法,这至少部分地归因于其在单个细胞与细胞块(即,双联体,等等)之间进行区分的能力。

[0106] 使用这样的技术已经显示,当将低细胞数目的高度纯化的TProg细胞移植入免疫低下小鼠时,它们可以促进原发性移植物中的肿瘤生长。然而,不同于纯化的TPC亚群,产生TProg的肿瘤并不在表型细胞异质性方面完全反映亲本肿瘤和/或在后续移植物中再起始连续肿瘤形成方面是可证明无效的。相反,TPC(或CSC)亚群完全重建亲本肿瘤的细胞异质性并且可以在连续分离和移植时高效地起始肿瘤。因此,本领域的技术人员会认识到尽管TPC和TProg均可以是在原发性移植物中产生肿瘤,但是二者之间的明确差异是TPC以低细胞数目连续移植后永存地促进异质性肿瘤生长的独特能力。表征TPC的其他常见途径包括形态学和细胞表面标记的检验,使用集落形成细胞测定法展示体外差异性增殖/分化能力、转录谱和抗药性的表征,虽然标记表达可以随培养条件和随体外细胞系传代而变化。

[0107] 因此,出于本发明的目的,像支持正常组织中的细胞层次的正常干细胞那样,肿瘤永存细胞优选地由它们的无限自我更新的能力同时维持多谱系分化的能力定义。肿瘤永存细胞因此能够产生致瘤子代(即,肿瘤起始细胞:TPC和TProg)和非致瘤(NTG)子代。如上文定义,“非致瘤细胞”是指从肿瘤起始细胞产生的、但是本身不具有自我更新或产生构成肿瘤的肿瘤细胞异质谱系的能力的肿瘤细胞。实验上,NTG细胞不能在小鼠中可重复地形成肿

瘤,甚至当以过量细胞数移植时也是如此。

[0108] 出于本披露的目的,也将TProg归类为肿瘤起始细胞,原因在于它们在小鼠中产生肿瘤的能力有限。TProg是TPC的子代并且典型地能够进行有限数目的非自我更新性细胞分裂。而且,如将在下文实例中看出,TProg细胞群可以进一步分裂成早期肿瘤祖细胞(ETP)和晚期肿瘤祖细胞(LTP),这些细胞各自可以通过表型(例如,细胞表面标记)和重演肿瘤细胞结构的不同能力加以区分。尽管这样的技术差异,ETP和LTP两者在功能上不同于TPC,在于以低细胞数目移植时,它们通常更不能够连续地重建肿瘤,并且典型地不反映亲本肿瘤的异质性。尽管前述区分,但是在个别情况下也已经显示,各种TProg群体可以赢得自我更新能力,这通常归因于干细胞并且它们自身变成TPC。无论如何,两种类型的肿瘤起始细胞可能呈现于单个患者的典型肿瘤块中并且如将在下文实例中所示,将经受如在此陈述的鉴定、表征、分开和/或富集或分离。

[0109] 更一般地说,TPC比构成肿瘤本体的TProg(ETP和LTP两者)、NTG细胞和源自肿瘤浸润性非TPC的细胞(例如成纤维细胞/基质、内皮及造血细胞)更有致瘤性、相对更静止并且经常更有化学治疗抵抗性。鉴于常规疗法和方案在很大程度上已经设计成缩减肿瘤体积并攻击快速增殖的细胞,TPC可能比较快增殖的TProg和其他本体肿瘤细胞群更抵抗常规疗法和方案。此外,TPC经常表现使其对常规疗法相对更具有化学治疗抵抗性的其他特征,如增加的多药抗药转运蛋白表达、增强的DNA修复机制和抗凋亡蛋白。这些特性(其中每一个有助于TPC的耐药性)构成了标准肿瘤学治疗方案失败(即未能充分靶向并且根除促进肿瘤持续生长和复发的细胞(即TPC或CSC))的关键原因,所述标准肿瘤学治疗方案旨在确保大多数患有晚期肿瘤的患者长期益处。鉴定、表征和分开或富集如在此披露的这些不同细胞亚群的能力在了解肿瘤病因学并随后鉴定新颖的化合物或调节剂中是关键,其中所述新颖的化合物或调节剂可以形成更有效的治疗处理的基础。

[0110] 如下文更详细地解释的,几乎所有结直肠癌肿瘤细胞、胰腺肿瘤细胞、非小细胞肺癌细胞和三阴性乳腺肿瘤细胞为 $ESA^+CD24^+CD34^-$,并且因此这些标记很少用于鉴定肿瘤细胞亚群。出人意料地,已经发现所披露的TICAM、TPCAM和TProgAM是用于鉴定、表征和任选分离或富集所选择的致瘤细胞群的特别有效的标记。例如,在包括结直肠癌的一个特别优选的实施例中,已经证明 $CD46^{hi}CD324^+CD66c^-$ 细胞能够产生完全异质的肿瘤,所述肿瘤部分地由 $CD46^{hi}CD324^+CD66c^-$ 和 $CD66c^+$ 细胞组成。这是有意义的,因为虽然 $CD46^{hi}CD324^+CD66c^+$ 细胞是致瘤性的,但是它们不具有产生 $CD46^{hi}CD324^+CD66c^-$ 细胞的能力并且不能通过连续移植高效地促进肿瘤生长。这些数据联合以下观察结果:具有a)连续移植后一致地产生异质性肿瘤的能力;b)大部分集落形成潜能;和c)体外产生CD66c细胞和蛋白质的潜能的细胞是 $CD46^{hi}CD324^+CD66c^-$,支持以下假设: $CD46^{hi}CD324^+CD66c^+$ 细胞是具有受限增殖能力和潜能的 $CD46^{hi}CD324^+CD66c^-$ 细胞的子代。

[0111] 体内致瘤性和体外集落形成潜能的总体降低连同当细胞丧失CD324表达时产生CD66c的能力的降低,支持以下假设: $CD46^{hi}CD324^-CD66c^+$ 细胞代表具有某种残余增殖能力、但是通常没有自我更新能力的晚期肿瘤祖细胞群(LTP)。最后,支持在图19A中展示的细胞层次, $CD46^-$ 细胞也是 $CD324^-$ 的并且通常也是 $CD66c^-$ 的。这些NTG细胞可能代表终末分化的子代,所述子代在结肠中包括分泌谱系的杯状细胞(G)和肠内分泌(eE)细胞或者吸收谱系的肠细胞(E)。分离的细胞亚群的基因表达支持这种假设,因为 $CD46^-$ 细胞表达许多基因,这些

基因归属于典型的结直肠组织的终末分化的分泌性和/或吸收性细胞类型。

[0112] 不同于许多常规的现有技术治疗剂,根据本发明鉴定和开发的新颖化合物和组合物在给予受试者之后优选地降低肿瘤起始细胞的频率,无论选择的调节剂的形式或特异性靶标(例如,遗传物质、细胞表面蛋白,等等)是什么。应当理解的是,肿瘤起始细胞频率的降低可以因以下情况出现:a)肿瘤起始细胞的消除、耗尽、敏化、沉默或抑制;b)控制肿瘤起始细胞的生长、扩张或复发;c)中断肿瘤起始细胞的起始、增殖、维持或增殖;或d)以别的方式阻碍致瘤细胞的存活、再生和/或转移。采用选择的调节剂,由于在一条或多条生理途径方面的变化而出现肿瘤起始细胞频率的降低。途径介入或调节,无论通过减少或消除肿瘤起始细胞或通过调节它们的潜能(例如,诱导的分化、小生境破坏)或以别的方式干扰它们对肿瘤环境或其他细胞发挥作用的能力,转而允许通过抑制肿瘤形成、肿瘤维持和/或转移和复发而更有效地治疗肿瘤性疾病。

[0113] 如下文将更详细地讨论和在实例中所显示,用来评定这样的肿瘤起始细胞频率的降低的优选方法包括使用根据本发明表征和分离的本体肿瘤细胞或肿瘤细胞亚群的体外或体内有限稀释分析。优选地,这项评定采用泊松分布统计分析或者以别的方式评定可测量事件(如体内产生肿瘤的能力或不产生肿瘤)的频率。虽然这样的有限稀释分析包括计算肿瘤起始细胞频率降低的优选方法,其他较低要求的方法也可以用来有效地确定希望值,尽管精度略微较低,并且完全符合在此的教导。也可能通过基于其标记表达谱评定对应的肿瘤细胞亚群的熟知的流式细胞手段或免疫组织化学手段来确定频率的降低,如在本发明中所展示。关于所有前述方法,参见例如Dylla等人,2008,PMCID:PMC2413402和Hoey等人,2009,PMID:19664991;所述文献各自通过引用以其全文结合在此。

V. 肿瘤起始细胞的来源

[0114] 除非在另外要求的情况下,可以用任何脊椎动物种类的肿瘤起始细胞实施本发明。包括来自人以及非人灵长类、家养动物(包括典型地在研究中使用的那些)、家畜、以及其他非人哺乳动物的癌干细胞。

[0115] 本领域的技术人员将理解的是,可以从处在不同临床或病理期的多种肿瘤获得前述细胞和细胞亚群。而且,如在下文实例中所展示,起始异源细胞群可以从直接取自患者或取自己已经在体内传代或在体外培养的继发性肿瘤的原发性肿瘤样品或活组织检查样品获得。在特别优选的实施例,待分析、表征和/或富集的肿瘤细胞群衍生自肿瘤,所述肿瘤源自含有TIC的本体肿瘤物质或已经在免疫低下小鼠中植入的富集的TIC群。在其他实施例中,将从非传统异种移植物(NTX)肿瘤库获得肿瘤样品。无论选择哪种肿瘤来源,优选地根据良好实验室规范处置这些肿瘤并且可以在表征、分开和/或分离之前使用本领域公认的机械和酶促解离技术将其解离成单细胞悬液。

[0116] 可以通过体内或体外培养或传代而直接或间接用作细胞源的示例性肿瘤包括但不限于肉瘤和癌瘤,如但不限于:纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、间皮瘤、尤因瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、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、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、星形细胞肿瘤(例如,弥散、浸润性胶质瘤、间变性星形细胞瘤、胶质

母细胞瘤、神经胶质肉瘤、毛细胞型星形细胞瘤、多形性黄色星形细胞瘤)、少枝胶质肿瘤和混合型胶质瘤(例如,少突胶质细胞瘤、间变性少突胶质细胞瘤、少突星形细胞瘤、间变性少突星形细胞瘤)、室管膜肿瘤(例如,室管膜瘤、间变性室管膜瘤、黏液乳头型室管膜瘤、室管膜下瘤)、脉络丛肿瘤、起源未确定的神经上皮肿瘤(星形母细胞瘤、脊索样胶质瘤、大脑胶质瘤病)、神经元肿瘤和混合性神经元-神经胶质肿瘤(例如,神经节胶质瘤和神经节细胞瘤、婴儿多纤维性星形细胞瘤和神经节胶质瘤、胚胎发育不良性神经上皮瘤、中枢神经细胞瘤、小脑脂肪神经细胞瘤、副神经节胶质瘤(paranglioglioma))、松果体实质肿瘤、胚胎瘤(髓上皮瘤、室管膜母细胞瘤、髓母细胞瘤、原始神经外胚层肿瘤、非典型畸胎样瘤/横纹肌样瘤)、外周神经母细胞性肿瘤、颅神经和外周神经肿瘤(例如,神经鞘瘤、神经纤维瘤、神经束膜瘤、恶性外周神经鞘瘤)、脑膜肿瘤(例如,脑膜瘤、间充质肿瘤、非脑膜上皮瘤、血管外皮细胞瘤、黑素细胞病变)、生殖细胞肿瘤、鞍区肿瘤(例如,颅咽管瘤、神经垂体颗粒细胞瘤)、血管母细胞瘤、黑色素瘤、以及视网膜母细胞瘤。

[0117] 在特别优选的实施例中,将从人结直肠肿瘤、乳腺肿瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胰腺肿瘤、黑色素瘤、卵巢肿瘤或头颈部肿瘤获得肿瘤样品。

[0118] 此外,如上文所提到的,本发明的富集细胞群可以源自从患有肿瘤性疾病的受试者直接获得的原发性肿瘤。然而,在其他实施例中,分离的细胞群从患者衍生的肿瘤获得,所述肿瘤已经在体外培养或通过非人类动物传代。就本发明而言并且如以更多细节和在下文实例中描述,使用本领域公认的技术开发并维护NTX肿瘤库。包含大量离散的肿瘤细胞系的NTX肿瘤库在免疫低下小鼠中通过异质性肿瘤细胞的多次传代而增殖,其中所述异质性肿瘤细胞最初从罹患多种实体瘤恶性肿瘤的众多癌症患者获得。具有良好定义的谱系的大量离散早期传代NTX肿瘤的持续可获得性大大促进了如在此陈述的TPC的鉴定和分离,因为它们允许可重复和反复地表征从这些细胞系中纯化的细胞。

[0119] 更具体地说,这样的模型的存在允许一致地验证所鉴定或分离的细胞或细胞亚群(如通过标记表型定义的)实际上是TIC,因为根据TPC组分在小鼠中产生表型上和形态上异质的肿瘤的能力,将它们以回顾的方式最精确地定义,它们重演了这些细胞从其中起源的患者肿瘤样品。也就是说,使用小群富集或分离的细胞在小鼠中产生完全异质性肿瘤的能力强烈地指示了分离的细胞包含TPC的事实并且验证了相关标记和假定的治疗靶标。在这样的作品中,使用传代最少的NTX细胞系大大简化了体内实验并且提供了易于证实的结果。而且,早期传代NTX肿瘤也对常规治疗剂如依立替康有反应,这为驱动肿瘤生长、对现有疗法的抵抗性和肿瘤复发的基础机制提供了临床有关的了解。VI. 定义致癌细胞群

[0120] 在优选的实施例中,本发明提供了所选择的肿瘤起始细胞或细胞亚群的鉴定、表征和任选地富集或分离。使用就不同细胞群而言在表型上异质的一种或多种标记(即,TICAM、TPCAM和TProGAM),通过差异性细胞分析完成癌干细胞群的这种分析和/或物理富集。如先前讨论的,应当理解的是,允许区分各种细胞群的任何性状或可辨别特征或其组合构成了根据在此的教导内容可以使用的标记。因此,虽然在优选的实施例中这样的标记是细胞表面蛋白,其他特征或性状可以发挥区分细胞亚群的作用并且被明确地构思为在本发明的范围之内。例如,除细胞表面表型分型之外,基于某些肿瘤永存细胞特征定量或表征细胞亚群可能是有用的。可以例如通过测量细胞在培养下自我更新和增殖的能力;或通过确定在这些细胞中存在特定的激活途径来确定这些属性。例如,在优选的实施例中,可以将核

酸构建体引入细胞或细胞群中,其中所述构建体包含编码可检测标记的序列,并且其中所述标记与转录反应元件可操作地连接,所述转录反应元件受选择的途径(例如,涵盖细胞表面蛋白TICAM表达的一条途径)调节或与其相关。当该途径被激活时,可检测标记被表达并且指示这种细胞或细胞亚群包含肿瘤永存细胞。在本发明的一些实施例中,可检测标记是荧光蛋白,例如绿色荧光蛋白(GFP)及其变体。可以分选表达GFP的活细胞,以便分离或富集感兴趣的细胞亚群。在本发明的这个方面,所披露的方法可以用来富集肿瘤永存细胞。

[0121] 如在此披露的,本发明的某些方面是针对鉴定或表征和任选地富集或分离肿瘤起始细胞或其细胞亚群(例如,TPC和/或TProg)。在这个方面,诸位发明人已经出人意料地发现了选择标记和/或标记组合,它们允许快速并有效地鉴定、表征和任选地富集或分离肿瘤起始细胞或其群体。如上文简要讨论的,如在此在细胞或组织的背景下所使用的,“标记”表示处于化学或生物实体形式的任何特征,所述实体与特定细胞、细胞群或组织可鉴定地相关或特异性地发现于其中或其上,包括在受疾病或失调影响的组织或细胞群中或其上鉴定到的那些实体。如所示,标记可以在性质上是形态的、功能的或生物化学的。在优选的实施例中,标记是差异性或优选地由特定细胞类型(例如,TPC)表达或由细胞在某些条件(例如,在细胞生活周期的特定时点期间或在特定小生境下的细胞)下表达的细胞表面抗原。

[0122] 应当理解的是,标记、标记组合或标记表型可以相对于特定细胞或细胞亚群或相对于细胞生活周期或层次而变动。在一些实施例中,标记将包括稳定或短暂的特征,无论是是否为特定细胞类型或群体特有的表型、形态、功能或生物化学特征(例如,酶促特征)。

[0123] 在特别优选的实施例中,相容性标记是蛋白质或多肽,并且更优选地拥有允许结合分子结合的一个或多个表位或活性部位,所述结合分子包括但不限于抗体或其免疫反应性片段、配体、底物或酶。然而,出于本申请的目的,标记可以由与细胞相关的任何分子或代谢物组成,其包括但不限于蛋白质(肽和多肽)、脂质、多糖、核酸和类固醇。在特别优选的实施例中,感兴趣的标记将在适当的时间位于细胞表面上,但是在其他实施例中,标记可以位于或定位于细胞间或细胞内(例如,在胞核上)。形态标记特征或性状的实例包括但不限于形状、大小和核/质比。功能性标记特征或性状的实例包括但不限于粘附于特定底物的能力、结合或排出特定染料(例如但不限于排出亲脂性染料)的能力、在特定条件下迁移的能力、以及沿特定谱系分化的能力。如在此讨论的,应当进一步理解的是,可以通过本领域的普通技术人员可获得的任何方法检测相容性标记。标记也可以是从报道基因(例如作为将编码报道基因的核酸序列引入细胞中及其转录的结果,由细胞表达的报道基因)表达的蛋白质,其中所述结果导致产生可以用作标记的报道蛋白。可以用作标记的这类报道基因例如是但不限于荧光蛋白、酶、染色粒蛋白(chromomeric protein)、抗性基因,等等。

[0124] 具体的优选标记将在下文更详细地讨论。如此源自这类标记的信息用于预后和诊断,包括对病情加速的易感性、患病状态的情况和对环境中的变化(如传代次数,用药物或其他模式治疗)的反应。也可以就它们应答于治疗剂和治疗的能力而将细胞分类、分离用于研究目的、针对基因表达进行筛选,等等。可以通过遗传分析、蛋白组学、细胞表面染色或其他手段进一步表征临床样品,以便确定在分类中有用的标记的存在。例如,遗传性异常可以是疾病易感性或药物反应性的原因或可以是这样的表型连锁。

[0125] 无论最终选择哪种标记来鉴定或表征所选择的细胞亚群,可以使用本领域技术人员熟知的许多标准技术中的任何一种来实施实际监测或分析。例如,可以通过免疫测定来

分析细胞表面标记表达,所述免疫测定包括但不限于蛋白质印迹法、免疫组织化学、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定、补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、免疫荧光法、蛋白A免疫测定、激光捕获显微切割、大规模多参数质量细胞计量术(massively multiparametric mass cytometry)、流式细胞术、以及FACS分析。在某些实施例中,癌干细胞在来自受试者的测试样品中的量可以通过将结果与参考样品中的癌干细胞的量(例如,来自未患有可检测癌症的受试者的样品)或与预定参考范围或与较早时间点(例如,在治疗之前或期间)的患者他/她本人比较来确定。

[0126] 在特定的实施例中,癌干细胞群从来自患者的肿瘤样品获得并且通过流式细胞术表征。如本领域熟知并且在所附实例中展示,这种方法利用某些表面标记相对于本体肿瘤在癌干细胞上的差异表达。出于通过任何数目的方法(包括磁性分离或FACS)富集或分离细胞的目的,标记抗体(例如,荧光抗体)可以用来与样品中的细胞上的标记反应,或使识别其他结合剂(即,第二结合剂)的结合剂识别这些标记。在一些实施例中,利用细胞表面标记的组合,以便进一步以原位方式(例如通过免疫荧光法或免疫组织化学)或使用肿瘤解离后分析单个细胞的方法(例如流式细胞术或大规模多参数质量细胞计量术)限定或量化样品中的癌干细胞。例如,阳性和阴性细胞分选两者都可以用来评定各种TPC亚群或量化样品中的癌干细胞的量。也可能通过以下方式确定癌干细胞在样品中的数目或频率:将有限稀释的未富集的肿瘤细胞移植到免疫低下小鼠中,随后使用泊松分布统计学,通过不同的稀释度分析肿瘤形成频率(独立于速率)。而且,如下文实例中展示的,可以通过评定表达肿瘤永存细胞标记和/或肿瘤祖细胞标记的细胞的频率和性质来表征特定的肿瘤类型。优选地,肿瘤包含使用在此披露的标记所鉴定的肿瘤起始细胞,所述标记包括经证实与对应的TIC群(如在此所述的并且可以通过分离和在免疫低下小鼠中移植证实其存在的那些)共表达的那些标记(即,TICAM)。

[0127] 在其他选择的实施例中,使用免疫组织化学或免疫荧光技术鉴定和表征样品(例如,组织样品,如实体瘤活组织检查样品)中的肿瘤起始细胞。如本领域已知的,这些方法利用某些表面标记相对于本体肿瘤在肿瘤起始细胞上的差异表达。抗体(例如,与荧光团结合的抗体)可以用来与感兴趣的细胞亚群反应。这些抗体可以被直接标记,或用检测第一抗体的第二结合剂检测。在优选的实施例中,将某些细胞表面标记的组合用来进一步限定和(如果需要)量化未解离的样品(即原位)中的癌干细胞。此外,通过评定区分感兴趣的癌干细胞或祖细胞的某些标记的表达,这样的染色技术允许将选择的肿瘤细胞亚群的可视化。这样的技术促进癌干细胞和/或祖细胞在肿瘤背景中的定位,允许建立空间特征如距血管的距离。

[0128] 使用本领域公认的用于细胞与细胞群识别和表征的前述技术连同在此的教导内容,人们可以容易地鉴定所披露的致癌细胞亚群。更具体地说,如在此广泛地讨论的,本发明至少部分地基于迄今未知的在某些肿瘤起始细胞相关标记(TICAM)与肿瘤起始细胞或细胞亚群之间的关联。这些标记,无论是否因为它们的相关细胞群上不存在或存在,允许有效鉴定或表征肿瘤起始细胞以及它们的对应TPC和TProG组分亚群。而且,在优选的实施例(如下文实例中陈述的那些)中,这些相同的标记允许快速和高效地鉴定、分开、划分、剖分、分离或富集限定的肿瘤起始细胞群或它们的对应TPC和/或TProG细胞亚群。如上文并且根据

本发明陈述的, TICAM应当被认为是表示允许鉴定、表征和任选地分离和富集肿瘤起始细胞或细胞群的任何标记或标记表型。同样, 可以通过它们的存在或不存在而用来鉴定或表征和任选地分离或富集TPC或TProg或细胞亚群的标记或标记表型包括如先前定义的TPCAM或TProgAM。如上文明确指出的, 应当理解的是三组标记不是相互排斥的并且单独的标记可以与不同的细胞亚群(例如, 单标记可以是TICAM和TPCAM) 相关。优选地, 这样的标记是蛋白质和甚至更优选地是细胞表面蛋白。

[0129] 出于本申请的目的, 特别优选的TICAM包括CD9、CD13、CD15、CD24、CD26、CD29、CD46、CD49a、CD49b、CD49c、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD58、CD63、CD66a、CD66c、CD66e、CD71、CD73、CD81、CD82、CD91、CD98、CD99、CD104、CD105、CD108、CD111、CD130、CD136、CD151、CD155、CD157、CD164、CD166、CD172a、CD186、CD221、CD230、CD262、CD273、CD275、CD295、CD298、CD317、CD318、CD324、CD340、CCR10、c-Met、Eph-B2、Eph-B4、FLOR1、Glut-2、磷脂酰肌醇蛋白聚糖5、HER3、IL-20Ra、整连蛋白a9b1、整连蛋白b5、LDL-R、Mer、脑信号蛋白4B、TROP-2和Vb9。在特别优选的实施例中, 标记将包括CD46。在其他优选实施例中, 标记将包括CD324。仍然在其他优选实施例中, 标记将包括CD66c。仍然在其他优选实施例中, CD46标记和CD324标记的组合将被用来鉴定和任选地富集或分离致瘤细胞亚群。

[0130] 就列出的TICAM而言, 图9A和图9B以表格形式提供了肿瘤表达信息, 而图10-12显示了如源自定义的肿瘤起始细胞群的单独的标记的表达数据。在这个方面, 应当理解的是, 虽然最常见地使用TICAM标记CD46和CD324例证或证实本发明的原理, 对于特定的肿瘤, 可以轻易地确定所列出的其他标记与在此的教导内容的相容性, 无需过度实验。也就是说, 尽管癌症的病因学和其中这些肿瘤出现的对应组织的生物学不同, 图10-12显示可以使用标准技术容易地辨别列出的标记的相容性和效用。鉴于这些教导内容和相关数据, 本领域的技术人员将能够容易地确定最佳TICAM或TICAM组合以便用来分析或分开来自特定肿瘤类型的致瘤细胞亚群。所披露的标记在很多肿瘤上是有用的意外发现仅仅强调了本发明的新颖性。

[0131] 根据本披露应当理解的是, 前述TICAM可以单独或组合地使用, 以便使用本领域公认的技术鉴定、表征或任选地纯化、分开、富集或分离定义的致瘤细胞群。在优选的实施例中, 细胞群将包含肿瘤永存细胞。在其他优选实施例中, 使用选择的TICAM所鉴定或富集的细胞群应当包含肿瘤永存细胞和肿瘤祖细胞。关于后面的这些实施例并且如所附实例中显示, 可以通过使TICAM富集的群体与提供对应的致瘤细胞亚群的分离的TPCAM和/或TProgAM接触而进一步表征和/或分开TIC组分。

[0132] 例如, 在特别优选的实施例中, 已经证明可以通过CD46和CD324的组合鉴定和表征TIC并且其展示出CD46^{hi} CD324⁺标记表型。因此, 在其他特别优选的实施例中, 通过使TIC与CD324和CD46的结合剂接触获得分离或富集的肿瘤细胞亚群, 其中这些结合剂可以与TIC以任何顺序或同时接触。相关的优选实施例包含分离或富集的TIC群, 所述TIC群包含CD46^{hi} CD324⁺标记表型。

[0133] 在结直肠癌中包含TIC的另一个选择的实施例中, 已经显示CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞能够产生完全异质的肿瘤, 这些肿瘤部分地由CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻和CD66c⁺细胞组成。这是有意义的, 因为虽然CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁺细胞是致瘤性的, 但是它们不具有产生CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞的能力并且不能通过连续移植高效地促进肿瘤生长。因此, 本发明的其他

优选实施例包含分离或富集的TIC群,所述TIC群包含CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻标记表型。

[0134] 如在此披露的,与致癌细胞相关的特别优选标记是已经发现作为TICAM有利地发挥作用的CD46。如贯穿下文实例中显示的,CD46标记可以单独或与其他标记组合地使用,以便鉴定、表征、探查、识别或区分肿瘤起始细胞、肿瘤永存细胞或其离散的细胞亚群。此外,在其他优选实施例中,CD46标记可以单独或与其他标记组合地使用,以便有效地剖析、划分、分离、纯化或富集致癌细胞或其亚群。优选地,将采用与全长CD46或其剪接变体或同种型发生免疫特异性反应的结合剂实施癌干细胞或细胞亚群的鉴定、表征或分离。在其他优选实施例中,CD46结合剂将包括抗体或其免疫反应性片段。在其他优选实施例中,CD46结合剂将与可检测的报道子实体结合。

[0135] CD46也称作膜辅蛋白或MCP。它是被广泛表达但因可变外显子剪接和糖基化而具有许多同种型的I型跨膜蛋白。最近Karosi等人,《喉镜》(Laryngoscope) 118:1669-1676 (Sept. 2008)报道了检测到该分子的十四种同种型,所述文献通过引用以其全文结合在此。mRNA从位于染色体1q32的单基因中转录并且经历广泛的可变剪接以产生编码多种蛋白质同种型的多种转录物。在构成该基因的14个外显子中,外显子1-6在所有CD46蛋白同种型中显得是保守的,而外显子7至9编码可变利用的富丝氨酸-苏氨酸-脯氨酸(“STP”)区,导致蛋白质同种型中的主要高变性。外显子11和12编码CD46的跨膜区,而外显子13和14编码该蛋白质的胞质尾区。最长的mRNA转录物,变体A(NM_002389),含有来自该基因的所有十四个外显子的序列。外显子7、8、9和13的可变剪接被认为产生CD46的十四种同种型的大多数,其中优势的观察到的蛋白质同种型66和56kDa从外显子8的可变纳入或排除中产生。外显子13的可变纳入/排除导致该分子的胞质尾区的编码序列变化,提示这些变化影响了该蛋白质的亚细胞运输、稳定性和信号特性。

[0136] 如Karosi等人陈述,CD46mRNA同种型D包含CD46基因的外显子1-6、8-12和14(等同于序列NM_153826,其编码蛋白质NP_722548),同种型F包含外显子1-6、9-12和14(等同于序列NM_172353,其编码NP_758863),并且同种型J包含外显子1-6、8、10-12和14(等同于序列NM_172356,其编码NP_758866)。更具体地说,CD46分子包含四个N端短共有重复序列(SCR)模块(“Sushi”结构域:处于1-3、2-4连接拓扑学的4个半胱氨酸),其中这些SCR结构域由该基因的前6个外显子编码。SCR2、3和4模块具有C3b/C4b结合和调节活性(下文讨论),而SCR1模块和SCR4远端的序列对于补充调节功能不是必需的。由可变利用的外显子7-9以及外显子10编码的近膜胞外序列主要通过O联糖高度糖基化。

[0137] 出于本披露的目的,除非上下文另外指示,术语“CD46”应当被认为是表示如上文刚才陈述的任何蛋白质,包括任何剪接变体或其免疫反应性片段以及编码这样的蛋白质、剪接变体或片段的任何核酸序列。因此,如上文讨论,“CD46标记”将宽泛地包括构成或编码CD46抗原的任何可检测的蛋白质、肽或核酸序列。在优选的实施例中,CD46标记将包括全长糖蛋白(变体A)或其报道的剪接变体或免疫反应性片段。甚至更优选地,CD46蛋白质标记将呈现于选择的致癌细胞群的细胞表面上。在其他优选实施例中,CD46标记将包括编码全长CD46、剪接变体或其片段的核酸序列(例如,DNA或mRNA)。

[0138] 可以任选地用来根据在此的教导内容表征选择的肿瘤起始细胞亚群的另一个优选标记是人CD324(hCD324),所述人CD324具有与GenBank登录号NM_004360相应的示例性核酸序列和与GenBank登录号NP_004351相应的示例性前蛋白氨基酸序列,所述每一个

GenBank登录号通过引用结合在此。CD324(也称作E-钙粘蛋白、桑椹胚粘着蛋白、钙粘蛋白-1或CAM 120/80)是介导钙依赖性细胞粘附的跨膜蛋白。它在上皮细胞中特异性表达,其中它涉及维持这些上皮细胞的表型。E-钙粘蛋白的胞浆域与 β -连环素蛋白结合,所述 β -连环素蛋白本身与细胞骨架的肌动蛋白丝网结合。这种E-钙粘蛋白/ β -连环素蛋白结合在稳定上皮组织的细胞/细胞粘附中发挥重要作用。E-钙粘蛋白的丧失可以因此减少细胞粘附并且增加癌细胞的侵袭能力。E-钙粘蛋白或 β -连环素蛋白的表达的减少通常与肿瘤的更大侵袭性和去分化相关,尤其是对于胃肠道癌而言。也已经显示,患有结直肠癌并且E-钙粘蛋白表达不足的患者比具有正常表达水平的患者具有更不良的预后。

[0139] 可以根据本发明使用的又一个优选标记是CD66c(也称作或NCA-90或CEACAM6)。人CD66c(hCD66c)核酸序列相应于GenBank登录号NM_002483,而蛋白质前体的氨基酸序列(344aa)相应于GenBank登录号NP_002474,所述每一个GenBank登录号通过引用结合在此。CD66c糖蛋白属于免疫球蛋白家族,特征在于该蛋白质的N端部分中的可变域和含有二硫键的恒定域,所述二硫键诱导环的形成(Hammarstrom和Baranov 2001)。CD66c通常表达于粒细胞、巨噬细胞和多核中性粒细胞的表面,而且由结肠、肺和脾脏中的上皮细胞表达(Audette等人,1987;Kolbinger等人,1989;von Kleist等人,1972;Jantscheff等人,2003)。与正常粘膜相比,CD66c也表达于增生性结肠息肉和腺瘤的增殖细胞中,并且由许多人类癌症表达(Scholzel等人,《美国病理学杂志》(Am J Pathol) 157:1051-52,2000;Kuroki等人,《抗癌研究》(Anticancer Res) 19:5599-5606,1999)。

VII. 结合剂

[0140] 如贯穿本申请讨论的,优选地通过如在此定义的结合剂检测、识别或探查所披露的标记。出于本发明目的的宽泛解释,相容性结合剂可以基本上包括优选地与标记结合并且为可检测的任何实体或分子。在这方面,结合剂可以采取许多形式,包括但不限于小分子、肽、蛋白质和核酸(包括DNA和RNA)。更具体地说,本发明的结合剂可以包括受体、酶、酶抑制剂、酶底物、配体、凝集素、脂肪酸、适配体、脂质或多糖。例如,在选择的实施例中,相容性结合剂可以包括麻疹病毒的血凝素蛋白或其CD46结合片段。在其他特别优选的实施例中,结合剂或实体包括抗体或其片段。仍然在其他优选实施例中,结合剂可以包括标记特异性小分子结合剂,它们可以破坏受体-配体相互作用、受体激活或二聚化/多聚化、辅助受体结合、或其他众多的胞内过程。就本披露而言,相容性结合剂的选择完全在本领域的技术人员的能力范围内,无需过度实验。

[0141] 如本发明的特别优选的实施例所提到的,包括处于抗体形式的结合剂。在此的术语“抗体”以最宽泛的意义而被使用并且具体地涵盖合成抗体、单克隆抗体、寡克隆或多克隆抗体(polyclonal antibody)、多克隆抗体(multiclonal antibody)、重组产生的抗体、细胞内抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、单价抗体、多价抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、灵长类抗体、Fab片段、F(ab')片段、单链FvFc(scFvFc)、单链Fv(scFv)、抗独特型(抗Id)抗体和任何其他免疫活性抗体片段,只要它们展示出所希望的生物活性(即,标记相关或结合)即可。在更广的意义上,本发明的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子(即,含有抗原结合部位的分子)的免疫活性片段,其中这些片段可以或可以不与另一个免疫球蛋白结构域(包括但不限于Fc区或其片段)融合。此外,如在此更详细地概述的,术语“抗体”和“多种抗体”具体地包括如在此所述的Fc变体,包括全长抗体和包含Fc区的变体

Fc-融合物、或其片段,其任选地包含至少一个氨基酸残基修饰并且与免疫球蛋白的免疫活性片段融合。

[0142] 而且,虽然所有5个类别的抗体(即,IgA、IgD、IgE、IgG、以及IgM)和所有同种型(即IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、以及IgA2)以及其变体均在本发明的范围内,但是仅出于说明目的将相当详细地讨论包含IgG类免疫球蛋白的优选实施例。然而,应当理解这样的披露仅说明实施本发明的示例性组合和方法并且不以任何方式限制本发明或所附权利要求书的范围。

[0143] 在本发明的背景下应当理解的是,对披露的TICAM特异的相容性抗体经常是可商业获得的(例如,从生命技术公司(Life Technologies)或BioLegend公司获得)。在任何情况下,抗体或它们的衍生物和/或它们的片段可以通过多种方法提供,所述方法是本领域的技术人员熟知的并且包括在正常或转基因小鼠中或在兔中的杂交瘤技术、或噬菌体展示抗体技术。在一个实施例中,使用了基因免疫。这项技术包含向非人类动物给予编码至少一种感兴趣的抗原的核酸序列或其功能等同物。编码的抗原由该动物产生,这刺激动物免疫系统抵抗所述抗原。在其他实施例中,将处于蛋白质或肽形式的抗原与佐剂一起(或没有佐剂)直接注射。无论怎样引入免疫原,在动物中引出了针对所述抗原的免疫应答。随后,优选地从所述动物获得对感兴趣的抗原特异的T细胞、B细胞和/或抗体。这些T细胞、B细胞和/或抗体任选地进一步被加工。在一个优选的实施例中,将获得的感兴趣的B细胞用于杂交瘤技术中,其中所述获得的B细胞与肿瘤细胞融合,以便产生形成杂交体抗体的细胞。

[0144] 本发明的更特别优选的实施例采用单克隆抗体作为结合剂。在优选的实施例中,从分离自免疫动物的细胞制备产生抗体的细胞系。

在免疫之后,将动物处死并且借助于本领域熟知的手段,使淋巴结和/或脾脏B细胞永生化。使细胞永生化的方法包括但不限于,将它们用癌基因转染、用致癌病毒感染它们并且在选择永生化细胞的条件下培养它们、使它们经受致癌性或突变化合物、使它们与永生化细胞(例如,骨髓瘤细胞)融合、以及使肿瘤抑制基因失活。如果使用与骨髓瘤细胞融合,骨髓瘤细胞优选地不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌型细胞系)。使用CD46或其免疫反应性部分筛选永生化细胞。在优选实施例中,使用酶联免疫测定(ELISA)或放射免疫测定进行初期筛选。

[0145] 更一般地说,可以使用本领域已知的多种技术(包括杂交瘤技术、重组技术、噬菌体展示技术、酵母文库、转基因动物(例如XenoMouse[®]或HuMAb小鼠[®])或其某种组合)制备符合本发明的离散的单克隆抗体。例如,可以使用如上文概括地描述的并且在Harlow和Lane等人,《抗体技术实验指南》(Antibodies:A Laboratory Manual)中,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press,第2版,1988);Hammerling等人,在《单克隆抗体与T细胞杂交瘤》(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas),563-681中(Elsevier,N.Y.,1981)中更详细描述杂交瘤技术产生单克隆抗体,所述文献各自通过引用结合在此。使用披露的操作方案,优选地通过多次皮下或腹膜内注射相关抗原和佐剂在哺乳动物中产生抗体。如先前讨论的,这种免疫通常引出免疫应答,所述免疫应答包括从活化的脾细胞或淋巴细胞产生抗原反应性抗体(如果免疫动物是转基因的,这些可以是完全人类的)。虽然可以从该动物的血清收获所生成的抗体以提供多克隆制剂,但是通常更希望的是从脾脏、淋巴结或外周血分离单独的淋巴细胞以提供同质的单克隆抗体制剂。更典型

地,从脾脏获得淋巴细胞并且使其永生化以提供杂交瘤。

[0146] 更一般地说,产生多克隆和单克隆抗体的方法是本领域的普通技术人员已知的。参见,例如,Coligan,Current Protocols in Immunology Wiley/Greene,N.Y.,1991;和Harlow和Lane,《抗体技术实验指南》,冷泉港实验室出版社,纽约,1989;Stites等人,(编著)《基础与临床免疫学》(Basic and Clinical Immunology)(第4版),兰格医学出版社(Lange Medical Publications),洛斯阿尔托斯(Los Altos),加利福尼亚,及其中引证的参考文献;Goding,《单克隆抗体:原理与实践》(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)(第2版),学术出版社(Academic Press),纽约,N.Y.,1986;和Kohler和Milstein,《自然》(Nature) 256:495-497,1975。其他适合的用于抗体制备的技术包括在噬菌体或相似载体中的重组抗体文库的选择。参见,Huse等人,《科学》(Science) 246:1275-1281,1989;和Ward等人,《自然》341:544-546,1989。免疫球蛋白及其某些变体是已知的并且许多已经在重组细胞培养物中制备(例如,参见美国专利号4,745,055;美国专利号4,444,487;WO 88/03565;EP 256,654;EP 120,694;EP 125,023;Faoukner等人,《自然》298:286,1982;Morrison,《免疫学杂志》(J.Immunol.) 123:793,1979;Morrison等人,《免疫学年鉴》(Ann Rev.Immunol) 2:239,1984)。用于制备嵌合(人源化)抗体的详细方法可以在美国专利号5,482,856中找到。关于人源化和其他抗体产生和工程化技术的其他细节可以在Borrebaeck(编著),《抗体工程》(Antibody Engineering),第2版,Freeman and Company, NY,1995;McCafferty等人,《抗体工程,实践方法》(Antibody Engineering,A Practical Approach),IRL at Oxford Press,牛津,英国,1996和Paul,《抗体工程手册》(Antibody Engineering Protocols),胡马纳出版社(Humana Press),Totowa,新泽西,1995中找到。前述文献各自通过引用以其全文结合在此。

[0147] 无论怎样获得抗体结合剂或抗体结合剂采取前述哪种形式(例如,人源化抗体、人抗体,等等),所披露药剂的优选实施例可以展示多种特征。在这方面,可以将产生TICAM抗体的细胞(例如,杂交瘤或酵母菌落)选择、克隆并且进一步筛选所希望的特征,包括例如,稳健生长、高抗体产量以及,如下文更详细地讨论的,所希望的抗体特征如亲和力、表位或结构域特异性,等等。杂交瘤可以在体内在同系动物和在缺乏免疫系统的动物(例如,裸鼠)中或在体外细胞培养物中扩增。选择、克隆和扩增杂交瘤和/或集落的方法(其中各自产生离散的抗体种类)是本领域的普通技术人员熟知的。

[0148] 应当进一步理解的是,所披露的抗体将与由选择标记所呈现的离散表位或决定簇相关或与之结合。如在此使用的,术语“表位”是指靶抗原的这种部分,所述部分能够被特定抗体识别和特异性结合。当抗原是多肽(如CD46)时,表位可以从连续氨基酸和由蛋白质的三级折叠而靠近的非连续氨基酸形成。从连续氨基酸形成的表位典型地在蛋白质变性时保留,而由三级折叠形成的表位典型地在蛋白质变性时丧失。表位典型地包含至少3个并且更常见地至少5个或8-10个处于独特空间构象的氨基酸。更具体地,技术人员将领会,术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合或否则与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。表位决定簇通常由分子的化学活性表面基团如氨基酸或碳水化合物或糖侧链组成,并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。另外,表位可以是线性或构象性的。在线性表位中,在蛋白质与相互作用分子(如抗体)之间的所有相互作用点沿该蛋白质的一级氨基酸序列线性地存在。在构象表位中,相互作用点跨越蛋白质上彼此线性分离

的氨基酸残基存在。

[0149] 一旦确定所希望的抗原上的表位,有可能例如使用本发明中描述的技术产生针对这个表位的抗体。可替代地,在发现过程期间,抗体的产生和表征可以阐明关于所希望的表位的信息。根据这种信息,则可能针对与相同表位的结合竞争性地筛选抗体。实现这点的方案将实施竞争研究,以便找到彼此竞争性地结合的抗体,即竞争与抗原结合的抗体。WO 03/48731中描述了基于抗体交叉竞争作用将抗体分级(binning)的高通量方法。

[0150] 如在此使用的,术语“分级”是指基于抗体的抗原结合特征将抗体分组的方法。级数(bins)的指定多少是有些任意性的,取决于观察到的所测试抗体的结合模式的如何不同。因此,虽然这项技术是将本发明抗体分类的有用工具,但是级数并不总是与表位直接关联,并且这样的初步确定应当进一步通过本领域公认的其他方法证实。

[0151] 有了这个警告,人们可以通过使用本领域已知的并且在此陈述的实例中的方法,确定所选择的第一抗体(或其片段)是否与相同的表位结合或交叉竞争与第二抗体结合。在选择的实施例中,允许本发明的第一抗体与标记在饱和条件下结合并且随后测量第二抗体与相同标记结合的能力。如果测试抗体能够与第一标记抗体在相同的时间与标记结合,则第二抗体与不同于第一抗体的表位结合。然而,如果第二抗体不能够在相同的时间与标记结合,则第二抗体与相同表位、重叠表位或与被第一抗体结合的表位靠近的表位结合。如本领域已知的,可以使用固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定、Biacore™系统(即,表面等离子体共振-GE Healthcare)、ForteBio®分析仪(即,生物层干涉测量法-ForteBio公司)或流式细胞方法获得所希望的数据。如在此使用的,术语“表面等离子体共振”是指允许通过检测生物传感器基质内的蛋白质浓度的改变来分析实时生物特异性相互作用的光学现象。在特别优选的实施例中,使用Biacore或ForteBio仪器进行这种分析。

[0152] 当在竞争相同表位的抗体的背景下使用时,术语“竞争”表示在抗体之间的由测定法确定的竞争,其中这种抗体或免疫功能性片段在测试时阻止或抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合。典型地,这样的测定法涉及纯化抗原的使用,所述纯化抗原与携带未标记的这些试验免疫球蛋白和标记的参考免疫球蛋白中任一种的固体表面或细胞结合。通过在试验免疫球蛋白存在的情况下确定与固体表面或细胞结合的标记物的量而测量竞争性抑制。通常,试验免疫球蛋白以过量存在。通过竞争测定法(竞争性抗体)鉴定的抗体包括结合与参考抗体相同的表位的抗体以及与相邻表位结合的抗体,所述相邻表位充分邻近于被参考抗体结合的表位以便发生空间位阻。在此的实施例中提供了另外的关于确定竞争性结合的方法的细节。通常,当竞争性抗体过量存在时,它将抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合的至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%。在一些情况下,结合被抑制至少80%、85%、90%、95%、或97%或更多。

[0153] 除了表位特异性之外,可以使用许多不同的物理特征(例如包括结合亲和力、熔化温度(T_m)、以及等电点)表征所披露的抗体。

[0154] 在这个方面,本发明进一步包括对选择标记具有高结合亲和力的抗体的使用。当解离常数 K_d (k_{off}/k_{on}) 是 $\leq 10^{-8}M$ 时,将本发明的抗体称作特异性结合其靶抗原。当 K_d 是 $\leq 5 \times 10^{-9}M$ 时,抗体以高亲和力特异性结合抗原,并且当 K_d 是 $\leq 5 \times 10^{-10}M$ 时,抗体以很高亲和力特异性结合抗原。在本发明的一个实施例中,抗体具有 $\leq 10^{-9}M$ 的 K_d 和大约 1×10^{-4} /秒的解离

速率。在本发明的一个实施例中,解离速率是 $<1 \times 10^{-5}$ /秒。在本发明的其他实施例中,抗体将以 10^{-8}M 与 10^{-10}M 之间的 K_d 与CD46结合,并且在又一个实施例中,它将以 $K_d \leq 2 \times 10^{-10}\text{M}$ 结合。还是本发明的其他选择的实施例包括具有小于 10^{-2}M 、小于 $5 \times 10^{-2}\text{M}$ 、小于 10^{-3}M 、小于 $5 \times 10^{-3}\text{M}$ 、小于 10^{-4}M 、小于 $5 \times 10^{-4}\text{M}$ 、小于 10^{-5}M 、小于 $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 、小于 10^{-6}M 、小于 $5 \times 10^{-6}\text{M}$ 、小于 10^{-7}M 、小于 $5 \times 10^{-7}\text{M}$ 、小于 10^{-8}M 、小于 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 、小于 10^{-9}M 、小于 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 、小于 10^{-10}M 、小于 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 、小于 10^{-11}M 、小于 $5 \times 10^{-11}\text{M}$ 、小于 10^{-12}M 、小于 $5 \times 10^{-12}\text{M}$ 、小于 10^{-13}M 、小于 $5 \times 10^{-13}\text{M}$ 、小于 10^{-14}M 、小于 $5 \times 10^{-14}\text{M}$ 、小于 10^{-15}M 或小于 $5 \times 10^{-15}\text{M}$ 的解离常数或 K_d ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$) 的抗体。

[0155] 在特定的实施例中,与CD46免疫特异性结合的本发明抗体具有至少 $10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $2 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、至少 $5 \times 10^7\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、或至少 $10^8\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 的结合速率常数或 k_{on} 速率 ($\text{CD46 (Ab)} + \text{抗原 (Ag)} \xrightarrow{k_{\text{on}}} \text{Ab-Ag}$)。

[0156] 在另一个实施例中,与CD46免疫特异性结合的本发明抗体具有小于 10^{-1}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-1}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-2}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-2}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-3}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-3}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-4}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-4}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-5}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-5}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-6}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-6}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-7}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-7}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-8}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-8}\text{s}^{-1}$ 、小于 10^{-9}s^{-1} 、小于 $5 \times 10^{-9}\text{s}^{-1}$ 或小于 10^{-10}s^{-1} 的 k_{off} 速率 ($\text{CD46 (Ab)} + \text{抗原 (Ag)} \xrightarrow{k_{\text{off}}} \text{Ab-Ag}$)。

[0157] 在本发明的其他所选择的实施例中,抗CD46抗体将具有至少 10^2M^{-1} 、至少 $5 \times 10^2\text{M}^{-1}$ 、至少 10^3M^{-1} 、至少 $5 \times 10^3\text{M}^{-1}$ 、至少 10^4M^{-1} 、至少 $5 \times 10^4\text{M}^{-1}$ 、至少 10^5M^{-1} 、至少 $5 \times 10^5\text{M}^{-1}$ 、至少 10^6M^{-1} 、至少 $5 \times 10^6\text{M}^{-1}$ 、至少 10^7M^{-1} 、至少 $5 \times 10^7\text{M}^{-1}$ 、至少 10^8M^{-1} 、至少 $5 \times 10^8\text{M}^{-1}$ 、至少 10^9M^{-1} 、至少 $5 \times 10^9\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 $5 \times 10^{10}\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 $5 \times 10^{11}\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{12}M^{-1} 、至少 $5 \times 10^{12}\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{13}M^{-1} 、至少 $5 \times 10^{13}\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{14}M^{-1} 、至少 $5 \times 10^{14}\text{M}^{-1}$ 、至少 10^{15}M^{-1} 或至少 $5 \times 10^{15}\text{M}^{-1}$ 的亲合常数或 K_a ($k_{\text{on}}/k_{\text{off}}$)。

[0158] 一旦已经通过重组表达产生了本发明的蛋白质或免疫球蛋白结合剂,可以通过本领域已知的用于纯化免疫球蛋白分子或更一般地用于纯化蛋白质的任何方法将其纯化,例如通过层析(例如离子交换层析、亲和层析(尤其借助在蛋白A之后针对特异性抗原的亲和层析)、以及尺寸柱层析(sizing column chromatography)、离心、差别溶解度,或通过用于纯化蛋白质的任何其他标准技术。此外,本发明的结合剂可以与在此所述的或另外地本领域已知的异源多肽序列融合以促进纯化。在特别优选的实施例中,将使用蛋白A或蛋白G亲和层析至少部分地纯化本发明的调节剂。

[0159] 在其他优选实施例中,本发明的结合剂或其片段或衍生物与诊断或检测试剂或报道子结合、偶联或以别的方式与其相关,其中所述试剂或报道子可以是生物分子(例如,肽或核苷酸)或小分子或放射性同位素。如此中在别处陈述的,这样的标记的结合剂可以用于监测过度增生性失调的产生或进展或作为临床检验程序的部分用来确定包含所披露的调节剂的特定疗法的功效。在特别优选的实施例中,与报道子或检测试剂相关的所披露的结合剂可以用于鉴定或表征和任选地富集、分离、剖析、划分或纯化选择的致瘤细胞群。这样的细胞群可以用于众多的目的,包括但不限于靶标鉴定、药物研究和开发、毒理学研究,等等。

[0160] 这样的诊断、检测和/或分离或富集可以通过使结合剂与检测物质偶联或结合来实现,所述检测物质包括但不限于各种酶,例如包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;辅基、如但不限于链霉亲和素和抗生物素蛋白/生物素;荧光物质,

如但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate)、罗丹明、二氯三嗪氨基荧光素 (dichlorotriazinylamine fluorescein)、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质,如但不限于鲁米诺;生物发光物质,如但不限于萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;放射性物质,如但不限于碘 (^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 、 ^{121}I)、碳 (^{14}C)、硫 (^{35}S)、氚 (^3H)、铟 (^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 、 ^{111}In) 和锝 (^{99}Tc)、钽 (^{201}Ti)、镓 (^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、钯 (^{103}Pd)、钼 (^{99}Mo)、氙 (^{133}Xe)、氟 (^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{113}Sn 和 ^{117}Sn 锡;用于各种正电子发射断层摄影术中的正电子发射金属、非放射性顺磁金属离子、以及经放射标记或与特定放射性同位素结合的分子。在这样的实施例中,适当的检测方法是本领域熟知的并且容易地从众多商业来源可获得。在特别优选的实施例中,标记的结合剂可以在流式细胞分析或FACS中使用。

[0161] 如下文更详细地讨论的,这些结合剂可以与标记序列(如肽或荧光团)结合以促进细胞群的纯化或分离或诊断程序,如免疫组织化学或FACS。在特别优选的实施例中,这样的标记物应当包含MAXPARTM试剂系统(多伦多大学,Stemspec)。在优选的实施例中,标记氨基酸序列是6组氨基酸肽,如提供在pQE载体(Qiagen)(连同其他载体)中的标签,它们中的许多是可商业获得的。用于纯化的其他肽标签包括但不限于,血凝素“HA”标签,其相应于源自流感病毒血凝素蛋白的表位(Wilson等人,1984,《细胞》(Cell) 37:767)和“flag”标签(美国专利号4,703,004)。

VIII. 致瘤细胞亚群的分析

[0162] 如上文刚才讨论的,在此披露的标记提供了TPC与TProg(例如,在结直肠癌中)以及在多种其他肿瘤中的TIC与NTG的区分。虽然活细胞的分离是证明功能性重建并且因此明确证明肿瘤永存能力(即CSC身份)的前提,如使用披露的标记辨别的对TIC、其复合TPC和TProg细胞、以及NTG细胞身份的认识促进了与这些对应的细胞群相关的基因和蛋白质的发现,从而使得能够发现诊断和/或治疗靶蛋白。

[0163] 在使用在此披露的标记作为工具来鉴定TIC或TPC群时,可以鉴定从这些细胞分离的细胞或遗传物质和/或蛋白质组物质并且通过使用本领域公认的技术(如磁性分离、FACS(实施例2)、激光捕获显微切割或上文描述的其他技术)将它们与NTG细胞或污染物分离。另外,可以使用微阵列技术(实施例1)、下一代测序(实施例8)、质谱法、以及联合这些技术的若干方面的技术(如大规模多参数质量细胞计量术)来表征和/或量化分离或富集的群体。例如,用来分析在此披露的对应肿瘤细胞亚群时,这样的技术可以导致鉴定另外的TIC标记,包括蛋白质、可以通过荧光原位杂交(FISH)可鉴定的RNA标记、可以用生色染料或荧光染料可视化的生物化学标记、物理化学特性如对基底材料(即玻璃、塑料,等等)的差异粘附、或可以使用荧光或发光报道基因构建体鉴定的转录调节剂的表达,其中使用任何数目的转染方法或病毒转导方法将所述荧光或发光报道基因构建体插入基因组中。

[0164] 本领域的技术人员将理解的是,可以使用任何单一标记、披露的选择标记的任何组合、或与在此披露的那些标记(即,TICAM)的表达相关的替代标记来富集或分离在此披露的细胞群。如上文刚才陈述的,可以通过使它们与结合剂接触并且然后使用磁性分离、FACS或任何其他技术将肿瘤细胞亚群富集或分离,其中所述其他技术能够基于固有的物理化学特性(即,它们的电荷或对特定基底的差异粘附)或经由与TICAM结合的结合剂对不同肿瘤细胞亚群赋予的物理化学特性而分离披露的肿瘤细胞亚群。虽然磁性分离技术是常见的并

且通常成功富集表达特定标记的细胞群,但是以这种方式富集的样品常常被多种死细胞、非靶细胞和细胞团块污染。同样,通过耗尽具有除了不表达于靶细胞群上的标记(例如CD66c)之外的所有标记的细胞群所获得的细胞很少是纯的。

[0165] 因此,本申请的特别优选的实施例采用荧光激活细胞分选(FACS)用于细胞富集或分离,因为流式细胞术允许快速详细地分析单个细胞,并且区分单独的细胞的大小和复杂性,使得活细胞与死细胞、大细胞与小细胞、单个细胞与细胞团块、以及更多或更少的颗粒状细胞能够相互区别。除大小和复杂性参数之外,还可以通过反射镜和带通滤光镜的阵列测量发射的荧光,使得可以按这种方式以每秒数千个细胞的量级探查来自不同荧光蛋白、细胞内化学反应、滞留染料(retained dye)、或荧光染料结合抗体的多个光发射波长。此外,使用具有细胞分离能力的流式细胞仪(例如FACS Aria; Becton Dickinson),通常可以按更高的纯度(>99%)分离具有不同形态学、物理化学和/或荧光特征的单个细胞。使用这样的根据在此的教导内容的技术,有可能表征从原发性和转移性肿瘤获得的单个细胞群的异质性,所述单个细胞群直接从癌症患者和从小鼠中生长的NTX肿瘤获得。而且,可以在这个过程期间维持这些细胞的生存力,使得在证明使用在此披露的标记分离的细胞群的强大的致癌性中能够每只小鼠移植至少3个细胞。

[0166] 因为在本发明中披露的标记能够精确鉴定和分离例如结直肠癌中的TPC并且将这些细胞与TProg细胞、NTG细胞和间质细胞区分,所得到的致癌细胞群提供了与CSC相关的蛋白质编码基因、微小RNA、长或短的非编码RNA和/或蛋白质的检测。也就是说,可以如在此讨论鉴定由相对同质的致癌细胞亚群优先表达的自我更新、分化、增殖和/或存活的这些遗传性和/或蛋白质组决定子,它们被评价用作前瞻性诊断标记,所述前瞻性诊断标记可以例如基于它们由结直肠癌中的TPC(即,CSC)优先表达而真实地预测病情严重性、对特定治疗方案的反应或疾病结局。同样,在此披露的促进从胰腺癌、非小细胞肺癌和三阴性乳腺癌分离TIC和NTG细胞的标记使得能够发现与TIC相关的更好诊断标记。

[0167] 由本发明提供的富集或分离的实体瘤细胞亚群进一步允许精确阐明细胞层次和增强的细胞表型表征。在这个方面,应当理解的是恶性血液病属于理解最充分的恶性肿瘤,正是因为组成细胞容易获得并且确定这些细胞的命运和潜能的体内和体外测定法已经详尽地形成。同样,肿瘤学研究已经演进到这样的节点,其中不仅可以鉴定负责促进肿瘤生长的细胞,还可以使用在此的方法可靠地分离它们并且在体内和体外检验它们的特征。因为肿瘤起始细胞(TIC)优选地因它们在体内促进肿瘤生长的能力而以回顾方式鉴定,促进感受态TIC的分离的技术和仪器对于它们的精确鉴定是必需的。在这方面,将肿瘤永存细胞(即TIC的癌干细胞子集)基于它们促进异质性肿瘤生长的能力,通过使用小数目良好定义的细胞连续移植至少两轮以回顾方式最佳地鉴定,如在此对结直肠癌所展示的。

[0168] 虽然原发性移植物足以给出关于致癌性的初始读数,因此促进TIC和NTG细胞的回顾性鉴定,但是单一轮次的移植不足以在TPC细胞与TProg细胞之间明确区分,因为两个群体均是致癌的。如在此指示的,如在此针对结直肠癌所鉴定和披露的TProg细胞不同于TPC(即CSC),在于它们不能完全地重建肿瘤异质性,但是因为TPC水平典型地低,异质性的这种丧失(即TPC在由TProg细胞产生的肿瘤中的丧失)可能难以观察到。需要使用小数目细胞的第二轮移植来证明TPC细胞相对于TProg细胞的重建能力,因为后一细胞群缺乏自我更新特性,并且其增殖能力应当在二次移植之前已经耗尽。为了正确完成,这些连续移植实验应当

使用非常小数目的高度纯化的细胞(<200个由FACS分离的细胞),并且应当允许来自原发性移植物的肿瘤生长至 $>1,500\text{mm}^3$,在其中为TProg细胞在二次移植之前在体内耗尽其增殖能力提供机会。通过在此披露的技术大大促进了这样的分析。

[0169] 就这样的情况而言,应当理解的是,优选地使用一组标记来精确地鉴定任何定义的干细胞和/或祖细胞群。更一般地说,由某些独立标记定义的细胞群可能不是纯的,但是含有几种不同的细胞类型或具有不同潜能的细胞,其中需要另外的标记来解析剩余的异质性。为了确定一组标记是否足以精确地鉴定特定细胞群,优选地通过体内单个细胞移植和/或谱系追踪在单个细胞水平展示这个特定细胞群的潜能。上述连续移植方法使得能够鉴定包含TIC(TPC和TProg)和NTG细胞的对应肿瘤细胞亚群。

[0170] 当进一步修饰以包括用如在此所述分离的相同细胞群的稀释物移植至少3个组的小鼠时,也可以确定在输入细胞群中的TIC或其组成TPC或TProg细胞的实际频率。例如,使用泊松分布统计学确定这种频率,其中所述泊松分布统计学通过使用已知的输入细胞群的有限稀释物,经验地检验致瘤性(TIC能力的功能性展示)的频率(独立于肿瘤产生的速率),使得能够量化已知细胞群中的TIC。在输入细胞的每个稀释度所实现的限定结果(即,肿瘤)的数目用来计算在输入细胞群中的TIC的数目。以这种方式,可以评定制限定潜能(即,致瘤性)的细胞的真实频率。重要的是要注意,泊松分布统计学在实验中评定的稀释过程范围内从数目有限的限定事件(即,致瘤性)中赢得效能。如在此对从结直肠NTX-CR4患者衍生的异种移植系分离的 $\text{CD46}^{\text{hi}} \text{CD324}^+ \text{CD66c}^-$ 细胞群所展示,TIC显得在这个细胞群内以1:5频率呈现(图15),而表达其他标记的细胞是非致瘤的或是致瘤性很差的(图4和图8)。作为本发明新颖性的证据,如在此披露的,1:5TIC频率的展示代表胜过现有技术公认的针对其他TIC群标记的显著改善,因为具有这些标记的细胞在相似的实验中展示1:75的致瘤细胞频率(Dylla等人,2008,PLoS ONE 3:e2428)。

[0171] 将进一步理解的是,在优选的实施例,有可能将特定的肿瘤细胞亚群基于它们的标记谱而定量。例如,可以在用有希望的治疗剂治疗后的肿瘤中检测和定量CSC和NTG细胞,然后可以将其与预处理对照相比较。如上文讨论的,可以使肿瘤解离并且与结合于标记的药剂接触,所述标记定义了对应的肿瘤细胞亚群,并且可以通过流式细胞术评定这些细胞的相对频率。根据在此的教导内容,如下文实例中所述展示这一点,其中当暴露于分别涉及依立替康或吉西他滨的标准护理化学治疗方案后,CSC被富集于结直肠肿瘤和胰腺肿瘤中(图17和图18)。

[0172] 就有限稀释法分析而言,可以通过将表征和/或分离的(fractionated)人肿瘤细胞(例如分别来自治疗和未治疗的肿瘤)置于促进集落形成的体外生长条件中而完成肿瘤起始细胞频率的体外计数。以这种方式,可以通过集落的简单计数和表征或通过由例如以下组成的分析而计数集落形成细胞:将人肿瘤细胞以连续稀释的方式置入平板中并且在铺板后至少10天将每个孔针对集落形成评分为阳性或阴性。体内有限稀释实验或分析(在其确定肿瘤起始细胞频率的能力方面通常更精确)包括将例如来自未治疗的对照或治疗的病症中的人肿瘤细胞以连续稀释方式移植到免疫低下小鼠中并且随后在移植后至少60天将每只小鼠针对肿瘤形成评分为阳性或阴性。如上文所提到的,通过体内或体外有限稀释法分析推导细胞频率值优选地是通过将泊松分布统计学应用于阳性事件和阴性事件的已知频率,从而提供满足阳性事件定义的事件(在这种情况下,分别是集落或肿瘤形成)的频率

而进行的。

[0173] 就与本发明相容的可以用来计算肿瘤起始细胞频率的其他方法而言,最常见地包括可定量的流式细胞技术和免疫组织化学染色程序。虽然不如上文刚才描述的有限稀释法分析技术那样精确,但是这些程序耗费人力少得多并且在相对短的时间范围内提供了合理的值。因此,应当理解的是,技术人员可以使用流式细胞术细胞表面标记谱测定法并且由此测量来自各种样品的TIC水平,其中所述测定法使用一种或多种抗体或试剂,所述抗体或试剂结合现有技术公认的已知相对于肿瘤起始细胞富集的细胞表面蛋白(例如,在下文实例1中陈述的潜在相容的标记)。在再另一种相容性方法中,本领域的技术人员可以使用能够区分这些细胞的结合细胞表面蛋白的一种或多种抗体或试剂,通过免疫组织化学原位计数TIC频率(即,组织切片)。

[0174] 体外培养条件在它们模拟体内遇到的生理环境之前需要经历较长的过程;然而,体外测定可以用作通过使用细胞群连续移植在体内展示肿瘤的功能性重建的合适替代物,其中使用在此披露的标记富集或分离所述细胞群。具体而言,可以在可能预测体内行为的体外测定中测试感兴趣的细胞的功能特性,如增殖和/或分化能力。存在着其中定义的血清培养基能够在体外维持和扩增致瘤细胞的实例(Dylla等人,2008,PLoS ONE 3:e2428),表明致瘤细胞可以被体外维持持续至少短暂的时间。这样的测定典型地已经局限于集落形成细胞(CFC)或细胞球形成测定,例如,所述测定测量细胞群引发集落(附着的细胞群组总计 ≥ 50 个细胞)或漂浮细胞球(即,细胞球)的能力(Bao等人,2006,《自然》444:756)。形成的CFC或细胞球的数目可以用作TIC频率的替代物。而且,在这些集落和/或细胞球解离后,混合细胞随后再引发集落或细胞球的能力可以作为自我更新的替代读出。以这种方式,在任何不同的培养条件下,CFC/细胞球形成细胞的频率和自我更新程度可以用来鉴定和表征肿瘤细胞亚群(如使用在此披露的标记分离的那些)的潜能。

[0175] 还如本领域中的标准一样,可能例如通过以下方式促进分化:在不同的附着基质(例如,胶原蛋白或纤连蛋白)上培养肿瘤细胞亚群,添加某些生长因子和/或胎牛血清,从而允许实验探查所述肿瘤细胞亚群的分化潜能。此外,影响干细胞和/或祖细胞命运决定(如自我更新与分化)的基因、蛋白质和/或因子也可以通过将定义的TIC与这样的因子共培养或在用感兴趣的基因和/或蛋白质转染或转导之后进行探查。例如,传统CFC样测定可以富有信息,其中这些测定可以与分化能力读出关联,如NTG细胞相关基因产物(例如,CEACAM6)的产生,如在此展示的(图16B和16C)。更清楚地,可以通过以下方式在体外测量细胞分化潜能:以定义的细胞群的输入为基础并且监测可能受到有利于自我更新或分化的培养条件驱动的分化过程,随后表征所得到的细胞、这些细胞正在产生的蛋白质、和/或通过体内移植探查所得到的群体的潜能。使得能够鉴定表达在此披露的标记的细胞群的其他表征方法包括使用高内涵成像(high content imaging)技术。通过利用多种参数如促进鉴定特定标记和它们在活细胞或固定细胞中定位的多光谱分析,例如,可以分析多种参数如总集落数、每集落的细胞数和集落内的细胞中的细胞形态(例如,核/质比)的定量。许多这些分析中也可以手工进行。在其中通过高内涵、多光谱成像监测分别指示TIC、它们的混合TPC或TProg细胞和/或NTG细胞的标记体外测定中,可以体外确定对应肿瘤细胞亚群的数目或频率,并且可以评定这些细胞对可能影响这些细胞群的自我更新或分化的各种刺激的反应。

[0176] 如通过本披露证明的,在动物中传代和分析富集或分离的肿瘤起始细胞亚群的能力是本发明的有价值且重要的方面。在这方面,相容性动物宿主可以包含模式生物,如线虫、果蝇、斑马鱼;优选实验室哺乳动物,如小鼠(裸鼠、SCID小鼠、NOD/SCID小鼠、Beige/SCID小鼠、FOX/SCID小鼠)、大鼠、兔、或灵长类。重度免疫缺陷NOD-SCID小鼠是特别适合的移植的人癌干细胞的动物受体。免疫缺陷小鼠不排斥人组织,并且SCID和NOD-SCID小鼠已经被表征为用于体内研究人血细胞生成和组织移植的宿主。McCune等人,《科学》(Science) 241:1632-9 (1988);Kamel-Reid&Dick,《科学》242:1706-9 (1988);Larochelle等人,《自然医学》(Nat.Med.) 2:1329-37 (1996)。在特别优选的实施例,可以使用VP-16,针对asialo-GM1蛋白的抗体、放射疗法、化学疗法或其他免疫抑制性生物制剂进一步使NOD/SCID或Beige/SCID小鼠免疫抑制。能够增殖异种移植的人肿瘤的另外的小鼠模型包括裸Beige、NOD/SCID/IL2Rg-/-、RAG2-/-/IL2Rg-/-、RAG1-/-/IL2Rg-/-、NOD/ β -2微球蛋白-/-、以及无胸腺裸鼠。这些小鼠模型系统的每一种在适应性免疫应答方面具有严重缺陷,在天然免疫方面具有其他选择性缺陷,所述选择性缺陷允许植入否则将被宿主免疫系统排斥的组织。

[0177] 典型地,将分离的癌干细胞的单细胞悬液(或具有少许细胞聚集体,如20,000个细胞,理想地少于100个,优选地少于10个细胞的悬液)制备在包含1:1比率的细胞悬液和基质载体Matrigel (Invitrogen) 的混合物中,并且移植至小鼠中的适当解剖部位中。用于配制和注射细胞的一般技术可以在《雷明顿药物科学》第20版(Mack Publishing Co.,Easton, Pa.) 中找到。适合的途径可以包括肠胃外递送,例如包括肌内、皮下、髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内、脑内、或眼球内注射。对于注射剂,可以将本发明的细胞配制在水溶液中、优选地在生理相容性缓冲液如Hank溶液、Ringer溶液或生理盐水中。为了经粘膜给药,在制剂中使用了适合于渗透屏障的渗透剂。这样的渗透剂通常是本领域已知的。如在此陈述的,一旦建立致瘤性,则动物模型可以用于广泛类型的生物测定和分子测定,以便表征致瘤干细胞和从中产生的肿瘤。

[0178] 例如,在治疗晚期肿瘤情况下,允许肿瘤发展至所希望的尺寸,其中具有超过所希望的尺寸范围的肿瘤或那些发育不充分的肿瘤的动物被剔除。所选择的动物按随机方式分布以经历治疗和对照。未荷瘤的动物也可以经受与荷瘤动物相同的治疗,以便能够将来自测试剂的任何毒性与源自肿瘤相关物质的毒性或对所述测试剂的反应分开。化学治疗通常从移植之后21-60天开始,这取决于NTX肿瘤的类型,并且每日观察动物。可以将靶向的货物蛋白施用至动物,例如,通过腹膜内注射、静脉内注射、直接注射至肿瘤中(或具有肿瘤的器官中)、或推注输注。注射的试验化合物的量可以容易地由本领域的技术人员确定。典型地,将不同的动物组大约每周称重1或2次直至试验结束。一旦肿瘤是可触及的,则测量肿瘤,并且使用电子卡尺或3D扫描一周大约1或2次通过直接测量连续监测,直至肿瘤达到预定尺寸和/或重量,或直至动物死亡或如果这在肿瘤达到预定尺寸/重量之前出现,将动物进行安乐死。随后处死动物并且不但保存组织用于RNA分析、DNA分析、蛋白质分析、IHC分析和其他分析,而且使用在此所述的用于对应群体的相似分析的方法富集或分离肿瘤细胞亚群。

IX. 潜在治疗性化合物的分析

[0179] 在此披露的TICAM提供了极其有效的用于鉴定、表征、监测和分开或分离致瘤细胞亚群的方法。应当理解的是,所披露的观察技术和高度定义的细胞亚群提供了可以用来鉴定和验证治疗靶标或诊断靶标的强有力工具,所述工具也用于鉴定和验证用于治疗、预防

或诊断所选择的失调的药物化合物。

[0180] 在本发明的一个实施例中,分离的细胞或细胞群可以经历基因型或表型分析(例如,下文实例8)。更具体地说,将使用本领域已知的技术,处理或制备分离或富集的细胞以提供遗传物质或蛋白质组物质(即,信息,如转录组)。这种制备或处理的材料然后使用现代技术(如下一代测序法或质谱法)进行分析,以便提供所选择的关于致癌细胞或细胞亚群的信息(如蛋白质表达或形态)。

[0181] 此外,在此披露的定义的致癌细胞亚群可以用来在体外和/或体内评价试验化合物或候选化合物减少癌细胞和/或癌细胞的量、或抑制它们增殖的能力。候选化合物稳定或减少癌细胞、癌细胞和/或免疫细胞(例如,淋巴细胞)的量或抑制其增殖的能力可以通过以下方式评定:检测在癌细胞、癌细胞、以及免疫细胞上的抗原的表达;检测癌细胞、癌细胞、以及免疫细胞的增殖;使用功能测定检测癌细胞和癌细胞。在特别优选的实施例中,这种分析将包括致癌细胞亚群的鉴定、表征和/或分离和富集。可以使用本领域的技术人员已知的技术用于测量这些活性。例如,可以通过³H胸苷掺入测定和台盼蓝细胞计数来测定细胞增殖。可以例如通过免疫测定来测定抗原表达,所述免疫测定包括但不限于使用多项技术的竞争和非竞争测定系统,所述多项技术例如是蛋白质印迹、免疫组织化学、放射免疫测定、ELISA(酶联免疫吸附测定)、“夹心”免疫测定、免疫沉淀测定、沉淀素反应、凝胶扩散沉淀素反应、免疫扩散测定、凝集测定,补体结合测定、免疫放射测定、荧光免疫测定、蛋白A免疫测定、免疫荧光法、流式细胞术、以及FACS分析。

[0182] 在人类中使用之前,优选地针对所希望的治疗活性或预防活性在体外和然后在体内测试潜在药物化合物、药物组合物、或提出的方案。例如,可以用来确定特定化合物的给予是否被指示的测定包括细胞培养测定,其中患者组织样品(例如,完整肿瘤或富集的细胞亚群)在免疫低下小鼠中传代并且暴露于本发明的化合物或以别的方式与其接触,并且观察这样的化合物对该组织样品的作用。可以通过活组织检查从患者获得组织样品。这项试验允许鉴定针对每位个体患者的治疗上最有效的疗法(例如,预防剂或治疗剂)。通常,在人类中使用之前,优选地针对所希望的治疗活性或预防活性在体外和然后在体内测试疗法。

[0183] 更具体地说,标记和相关的细胞、培养物、群体和包含前者(包括其子代)的组合物可以用来筛选或鉴定影响肿瘤起始细胞或其子代的功能或活性的化合物或药剂(例如,药物)。本发明因此进一步提供了用于评价或鉴定化合物或药剂的系统和方法,其中所述化合物或物质可能通过干扰如显示于富集的群体中所选择的途径或功能而影响肿瘤起始细胞或其子代的功能或活性。这样的化合物或药剂可以是经筛选用于治疗例如过度增生性失调的候选药物。在一个实施例中,系统或方法包括富集的肿瘤起始细胞群以及化合物或药剂(例如,药物),其中所述细胞以及化合物或药剂(例如,药物)彼此接触。

[0184] 在另一个优选实施例中,这种方法包括在体内或体外使肿瘤起始细胞或其子代的富集群体与测试剂或化合物接触;并且确定所述测试剂或化合物是否调节了肿瘤起始细胞的活性或功能。可以调节的示例性活性或功能包括神经元祖细胞或其子代的细胞形态、标记表达、分化或去分化、成熟、增殖、生存力、凋亡或细胞死亡的变化。

[0185] 在一些实施例中,将有利的是筛选和选择可以影响一个以上的致癌亚群的化合物。因此,如果总生存期受治疗方案影响,则将基于这些药物的靶标主要在TPC、而且在TProg上或在其中的表达而最佳地选择这些靶标。人们可能期望的是,选择的TPC靶向作用

将会导致肿瘤最终消退,但是这可能经历一定的时间而发生,因为TProg在此处被证明在结直肠癌中具有显著的增殖能力。不仅由TPC表达,而且由TProg表达的治疗靶标可能是更好的候选药物,因为可能平行地根除肿瘤和高度增殖性TProg区室的两种自我更新组分,导致令人瞩目的肿瘤消退和延长的总生存期。这些药物靶标可以例如是基因、蛋白质、微小RNA和/或长或短的非编码RNA。药物靶标也可以包括不被TPC或TProg表达但是结合在TPC或TProg上的受体并且对于TPC的自我更新或Tprog的增殖是关键性的配体。

[0186] 更一般地说,当用来指代细胞或细胞培养物或方法步骤或治疗时,接触表示在富集或选择的致癌细胞或细胞亚群与另一个参考实体之间的直接或间接相互作用。直接相互作用的具体实例是物理相互作用。而且,这样的接触可以在体外或在体内(即,试验化合物施用至NTX动物)发生。间接相互作用的具体实例是组合物作用于中间分子的情况,所述中间分子转而作用于参考实体(例如,细胞或细胞培养物)。

[0187] 在本发明的这个方面,调节表示以这样的方式影响肿瘤起始细胞或子代细胞的活性或功能,所述方式相容于检测对细胞活性或功能的影响,所述细胞活性或功能已经被确定与本发明的肿瘤起始细胞或子代细胞的特定方面(例如,转移或增殖)有关。示例性活性和功能包括但不限于测量形态、发育标记、分化、增殖、生存力、细胞呼吸、线粒体活性、膜完整性、或与某些状态相关的标记的表达。因此,可以通过以下方式针对其对肿瘤起始细胞或子代细胞的影响而评价化合物或药剂(例如,候选药物):使这样的细胞或子代细胞与化合物或药剂接触并且测量如在此披露或技术人员将已知的肿瘤起始细胞或子代细胞的活性或功能的任何调节作用。

[0188] 筛选和鉴定药剂和化合物的方法包括适合于高通量筛选的那些方法,这些方法包括任选地在预定位置或地址安置或放置的细胞阵列(例如,微阵列)。高通量机器人或手工处理方法可以探测化学相互作用并且在短时间内确定许多基因的表达水平。已经开发了利用分子信号(例如,荧光团)的技术和以非常快的速率处理信息的自动化分析(参见例如,Pinhasov等人,《组合化学高通量筛选》(Comb.Chem.High Throughput Screen)7:133(2004))。例如,微阵列技术已经广泛地用来一次探测数千个基因的相互作用,同时提供特定基因的信息(参见,例如,Mocellin和Rossi,《实验医学与生物学进展》(Adv.Exp.Med.Biol.)593:19(2007))。

[0189] 除复杂生物制剂之外,候选药剂包括有机分子,所述有机分子包含对于结构相互作用必需的官能团,尤其是氢键,并且典型地至少包含胺、羰基、羟基或羧基,经常至少两种功能性化学基团。候选药剂经常包含用一个或多个以上官能团取代的环状碳或杂环结构和/或芳族或多芳族结构。候选药剂发现于以下生物分子中,包括肽、多核苷酸、糖、脂肪酸、类固醇、嘌呤、嘧啶、衍生物、结构类似物或其组合。

[0190] 包括药理活性药物、遗传活性分子,等等。感兴趣的化合物包括化学治疗剂、激素或激素拮抗剂,等等。适合于本发明的示例药用剂是在《治疗学的药理学基础》(The Pharmacological Basis of Therapeutics) (Goodman和Gilman,McGraw-Hill,New York, N.Y., (1996))第9版中下述章节下描述的那些:水、盐和离子(Water,Salts and Ions);影响肾功能和电解质代谢的药物(Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism);影响胃肠道功能的药物(Drugs Affecting Gastrointestinal Function);微生物疾病的化学疗法(Chemotherapy of Microbial Diseases);肿瘤病的化学疗法

(Chemotherapy of Neoplastic Diseases); 作用于造血器官的药物 (Drugs Acting on Blood-Forming organs); 激素和激素拮抗药 (Hormones and Hormone Antagonists); 维生素与皮肤学 (Vitamins, Dermatology); 和毒理学 (Toxicology), 均通过引用结合在此。还包括毒素和生物与化学战剂, 例如参见 Somani, S.M. (编著), 《化学战剂》(Chemical Warfare Agents), 学术出版社, 纽约, 1992)。

[0191] 这样的筛选方法 (例如, 高通量) 可以快速和高效地鉴定活性剂和化合物。例如, 可以将细胞安置或置于 (预先接种) 培养皿、管、烧瓶、滚瓶或平板 (例如, 单个多孔板或皿如 8、16、32、64、96、384 和 1536 多孔板或皿) 上, 任选地在限定的位置处, 用于鉴定潜在治疗性分子。可以筛选的文库例如包括小分子文库、噬菌体展示文库、全人抗体酵母展示文库 (Adimab, LLC)、siRNA 文库、以及腺病毒转染载体。在其他优选实施例中, 该方法包括在包含富集制备的致癌细胞的培养物中筛选感兴趣的化学化合物文库的活性。这样的化学文库可以包括 Spectrum™ Collection 文库、Lopac™ Collection 文库、Prestwick 化学物文库® 和 Maybridge® Collection 文库 (各自为用于筛选的化合物文库)。

[0192] 此外, 化合物 (包括候选药剂) 从多种来源获得, 所述来源包括合成或天然化合物文库。例如, 众多手段可用于随机和定向合成多种有机化合物 (包括生物分子), 所述手段包括随机化寡核苷酸和寡肽的表达。可替代地, 处于细菌提取物、真菌提取物、植物提取物和动物提取物形式的天然化合物文库是可获得的或容易产生。另外地, 通过常规的化学、物理和生物化学手段容易地修饰天然或合成产生的文库和化合物, 并且它们可以用来产生组合文库。已知的药理剂可以经历定向或随机化学修饰, 如酰化、烷基化、酯化、酰胺化, 等等, 以便产生结构类似物。

[0193] 在这样的实施例中, 待测量的参数包括可定量的细胞组分, 尤其是可以合乎需要地, 在高通量系统中精确测量的组分。参数可以是任何细胞组分或细胞产物, 包括细胞表面决定簇、受体、蛋白质或其构象性或翻译后修饰、脂质、碳水化合物、有机或无机分子、核酸 (例如 mRNA、DNA, 等等) 或源自这样的细胞组分的部分或其组合。虽然大多数参数将提供定量读出, 但是在一些情况下, 半定量或定性结果将是可接受的。读出可以包括单个确定的值或可以包括均数、中值或方差, 等等。特征性地, 将从许多相同的测定获得一系列参数读值。预期了变异性并且使用标准统计方法将获得检验参数组的每一个的一系列值, 其中常见统计方法用来提供单个值。

[0194] 通过将药剂添加到至少一个和通常多个细胞样品, 通常连同缺乏这种药剂的细胞而筛选药剂的生物活性。测量响应于这种药剂的参数变化, 并且通过与参考培养物 (例如在该药剂存在和不存在的条件下, 用其他药剂所获得的参考培养物, 等等) 比较而评价结果。

[0195] 将这些药剂以溶液或容易溶解的形式方便地添加到培养细胞的培养基。可以将这些药剂以断续或连续的方式添加到流通系统中, 或可替代地将大剂量的化合物单次或递增地添加至另外的静态溶液中。在流通系统中, 使用两种流体, 其中一种是生理中性溶液, 并且另一种是与所添加的试验化合物相同的溶液。第一流体在细胞上通过, 随后第二流体通过。在单一溶液方法中, 将大剂量试验化合物添加至细胞周围的培养基体积。培养基组分的总浓度不应当随这种大剂量的添加或在流通方法中的两种溶液之间显著变化。

[0196] 各种方法可以用于定量选择标记的存在。为了测量存在的分子的量,一种方便的方法是用可检测部分标记分子,所述可检测部分可以是荧光部分、发光部分、放射性部分、酶活性部分,等等,尤其是具有高亲和力的对结合于参数特异的分子。荧光部分容易地可用于标记几乎任何生物分子、结构、或细胞类型。免疫荧光部分可以不仅导向与特定的蛋白质结合,而且导向特定的构象、切割产物、或位点修饰如磷酸化。单独的肽和蛋白质可以被工程化以便自发荧光,例如通过将它们表达为细胞内部的绿色荧光蛋白嵌合体(对于综述,参见Jones等人,(1999)《生物技术动向》(Trends Biotechnol.) 17(12):477-81)。因此,可以将抗体进行基因修饰以提供荧光染料作为它们结构的部分。取决于所选择的标记,除使用荧光标记物之外,可以使用这样的免疫测定技术如放射免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA)、均相酶免疫测定、以及有关非酶促技术来测量参数。作为参数,核酸尤其是信使RNA的定量也是感兴趣的。可以通过依赖于核酸核苷酸序列的杂交技术测量这些核酸。多项技术包括聚合酶链反应方法以及基因阵列技术。例如参见《最新分子生物学实验方法汇编》(Current Protocols in Molecular Biology),Ausubel等人(编著),John Wiley&Sons,纽约,N.Y.,2000;Freeman等人,(1999)《生物技术》(Biotechniques) 26(1):112-225;Kawamoto等人,(1999)《基因组研究》(Genome Res) 9(12):1305-12;和Chen等人,(1998)《基因组学》(Genomics) 51(3):313-24。

X. 诊断用途

[0197] 在另一个优选的方面,本发明提供了诊断癌症或检测癌细胞或前癌细胞的方法,所述方法包括:获得从受试者的肿瘤富集或纯化的本体肿瘤细胞或肿瘤细胞亚群(例如TIC、TPC、TProg、NTG细胞、肿瘤基质、或完整肿瘤组织)并且评定这些肿瘤细胞亚群的频率和/或来自这些对应细胞群的基因谱和/或蛋白质组分子谱(proteomic molecular profile)。也可以基于在此披露的TICAM分离致瘤细胞,并且从受试者(例如,人)中分离致瘤细胞的各种方法是相关领域中已知的。

[0198] 在另一个实施例中,本发明提供了分析体内癌症进展和/或发病机制的方法。在另一个实施例中,分析体内癌症进展和/或发病机制包括确定肿瘤进展的程度。在另一个实施例中,分析包括肿瘤的鉴定。在另一个实施例中,对原发性肿瘤进行肿瘤进展的分析。在另一个实施例中,如本领域技术人员已知的,取决于癌症类型,随时间推移进行分析。在另一个实施例中,源自原发性肿瘤的转移细胞中的继发性肿瘤的进一步分析是在体内进行分析的。在另一个实施例中,分析了继发性肿瘤的尺寸和形状。在某一实施例中,进行了进一步的体外分析。在另一个实施例中,将患者的肿瘤移植至免疫低下小鼠中并且使其生长为异种移植物,使得进行分析癌症进展、发病机制的实施例和/或预测对有前景或实际的疗法的反应的实验。

[0199] 本发明的其他优选实施例也利用披露的TIC标记和TICAM、或采用使用这些TIC或TICAM富集或分离的细胞发现的TIC或TICAM相关的基因、蛋白质、微小RNA、或短的和长的非编码RNA的特性,以便基于所述TIC或TICAM相关基因、蛋白质、微小RNA、或短的和长的非编码RNA的表达,相对于对照标本或在不同时间点获得的标本,定量TIC在给定的标本(例如,肿瘤活组织检查)中的相对数目或频率。以这种方式,可以预测和/或主动评定对疗法的反应,而不直接评定TIC在如在此所述的样品内的实际数目。

[0200] 可以使用本领域的普通技术人员已知的可以检测和/或定量致瘤细胞的任何体内

或体外测定来监测疾病的过程,以便评价所选择的治疗和/或方案的影响。这些方法可以用来评定在研究环境以及在临床环境中的影响。然后这些测定的结果可以用来改变给药、药物或受试者的治疗时间。样品可以在检测、分离和/或测量样品中的癌干细胞群之前经历一个或多个预处理步骤。在某些实例中,通过离心、过滤、沉淀、透析、或层析,或通过这样的预处理步骤的组合来预处理生物流体。在其他实例中,通过冷冻、化学固定、石蜡包埋、脱水、透化、或均质化,随后离心、过滤、沉淀、透析、或层析,或通过这样的预处理步骤的组合来预处理组织样品。在某些实例中,在确定样品中的癌干细胞的量之前,通过从样品中移除致癌细胞亚群以外的细胞、或从样品中移除碎片来预处理样品。

[0201] 在另一个实施例中,本发明提供了分析体内癌症进展和/或发病机制的方法,所述方法包括确定细胞转移。在又一个实施例中,细胞转移的分析包括确定细胞在与原发性肿瘤不连续的部位处的进行性生长。在另一个实施例中,细胞转移分析的部位包括肿瘤扩散途径。在一些实施例中,细胞可以经由血管系统、淋巴管在体腔或其组合之内分散。在另一个实施例中,就细胞迁移、播散、外渗、增殖或其组合进行了细胞转移分析。在又一个实施例中,在静脉内、原位或肾包膜移植入免疫低下小鼠后分析了致癌细胞亚群的转移潜能。

[0202] 在某些实例中,可以在疗法或方案之前评定或表征受试者或来自受试者的样品中的致癌细胞,以便建立基线。在其他实例中,样品源自受治疗的受试者。在一些实例中,样品取自在受试者开始或终止治疗之后至少大约1、2、4、6、7、8、10、12、14、15、16、18、20、30、60、90天、6个月、9个月、12个月或>12个月的受试者。在某些实例中,在某个数目的剂量之后(例如,在2、5、10、20、30个、或更多个剂量的疗法之后)评定或表征致癌细胞。在其他实例中,在接收一次或多次疗法1周、2周、1个月、2个月、1年、2年、3年、4年或更多年之后表征或评定致癌细胞。

XI. 制造品

[0203] 本发明也提供了用于鉴定、表征和/或富集、或分离如在此所述的致癌细胞或细胞亚群的试剂盒。这样的试剂盒可以在临床环境中用于患者诊断目的或在研究中用于致癌细胞群的表征和/或富集。根据本发明的试剂盒将包括一个或多个容器,所述容器包含TICAM结合剂和容器上或与之结合的标签或包装说明书。适合的容器例如包括瓶、小瓶、注射器、96孔平板,等等。容器可以从多种材料如玻璃或塑料中形成。这种容器容纳一种或多种组合物,所述组合物包含有效用于分析致癌细胞和任选地提供如在此所述的富集或分离的细胞或细胞亚群的结合剂。这样的试剂盒通常将含有在适合的容器中的一种或多种TICAM结合剂的制剂,在多种结合剂的情况下,结合剂可以处于相同或不同的容器中。试剂盒也可以含有其他药学上可接受的制剂,用于诊断或用于标记或修饰封闭的结合剂。

[0204] 更具体地所,这些试剂盒可以具有单个容器,其含有一种或多种TICAM结合剂,有或没有另外的组分,或它们可以具有针对每种组分的不同容器。在提供用于结合的组合报道子的情况下,可以按摩尔当量组合或在一种组分超过其余组分的情况下将单独的溶液预混合。可替代地,试剂盒的结合剂和任何任选的标记剂可以在施用至受试者或体外使用之前分开地维持在不同容器之内。试剂盒也可以包含用于容纳无菌的、药学上可接受的缓冲液或其他稀释剂(如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、Ringer溶液和葡萄糖溶液)的第二/第三容器装置。

[0205] 当试剂盒的组分被提供在一种或多种液体溶液中时,液体溶液优选地是水溶液,

特别优选无菌水溶液。然而，试剂盒的组分可以被提供为干燥粉末。当试剂或组分被提供为干燥粉末时，可以通过添加适合的溶剂使粉末复原。构思了也可以将溶剂提供在另一个容器中。

[0206] 如上文简要指示的，试剂盒也可以含有借以施用结合剂和任何任选组分至受试者的装置，例如，一个或多个针头或注射器、或甚至点眼器、吸管或其他诸如此类的设备，从中可以将制剂注射或引入动物中或施加至身体的患病区域。本发明的试剂盒还典型地将包括用于容纳小瓶或类似物、密闭用于商业销售的其他组分的装置，例如像，将所希望的小瓶和其他设备置于其中并保留的注射成型或吹塑成型的塑料容器。在特别优选的实施例中，任何标签或包装说明书指示所述结合剂组合物用于诊断癌症，例如结直肠癌。在其他优选实施例中，附上的说明书指导或指示怎样在体内或体外研究环境中的一个或多个疗法中使用这些组分。

XII. 研究试剂

[0207] 本发明的其他优选实施例还利用了披露的TICAM的特性作为用于通过多种方法鉴定、分离、划分或富集肿瘤起始细胞群或亚群的有用工具，这些方法例如荧光激活细胞分选(FACS)、磁性激活细胞分选(MACS)、或激光介导切割。本领域的技术人员应当理解的是，可以在用于表征和操作TIC(包括癌干细胞)的若干相容性技术中使用调节剂(例如，参见美国序列号12/686,359、12/669,136和12/757,649，所述文献各自通过引用以其全文结合在此)。

XIII. 其他

[0208] 除非在此另有定义，所使用的与本发明相关的科学和技术术语应当具有本领域的普通技术人员通常理解的含义。此外，除非上下文另外要求，单数术语应当包括复数，并且复数术语应当包括单数。更具体地说，如本说明书和所附权利要求书中所使用的，除非上下文另外清楚地说明，单数形式“一个/一种(a)”、“一个/一种(an)”和“该(the)”包括复数指代物。因此，例如，对“一个/一种蛋白质”的指代包括多种蛋白质；对“一个/一种细胞”的指代包括包括细胞的混合物，等等。另外，提供在本说明书和所附权利要求书的范围包括两个终点以及在这些终点之间的所有点。因此，2.0至3.0的范围包括2.0、3.0、以及在2.0与3.0之间的所有点。

[0209] 通常，与在此所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质与核酸化学以及杂交一起使用的命名及其技术是本领域熟知的并且通常使用的那些。除非另有说明，本发明的方法和技术通常根据常规方法进行，这些常规方法是本领域熟知的并且如贯穿本说明书所引证和讨论的在各种一般和更具体的参考文献中所述。参见，例如，Sambrook J.和Russell D.《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)，第3版，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约(2000)；Ausubel等人，《精编分子生物学实验指南：来自当代分子生物学实验指南的方法的概要》(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology)，Wiley, John&Sons, Inc. (2002)；Harlow和Lane，《抗体使用：实验手册》(Using Antibodies:A Laboratory Manual)，冷泉港实验室出版社，冷泉港，纽约(1998)；和Coligan等人，《精编蛋白质科学实验指南》(Short Protocols in Protein Science)，Wiley, John&Sons公司(2003)。根据制造商的说明书进行酶促反应和纯化技术，如本领域中

通常所完成或如在此所述的。通常,与在此所述的分析化学、合成有机化学、以及医学和药物化学的实验室程序和技术一起使用的命名及其技术是本领域熟知的并且通常使用的那些。

[0210] 本说明书范围内所披露或引证的所有参考文献或文件在不限于此的情况下通过引用以其全文结合在此。而且,在此所用的任何节标题仅仅是出于组织目的并且不得解释为限制所述的主题。

实例

[0211] 通过参考以下实例,将更容易地理解如此总体描述的本发明,所述实例以说明的方式提供并且不旨在限制本发明。这些实例并不旨在表明以下实验是所进行的所有的或仅有的实验。除非另外指明,份数是以重量计的份数,分子量是重均分子量,温度是摄氏度,并且压力是在大气压或接近大气压。

实例1

肿瘤起始细胞群的表征

[0212] 为了在实体瘤在癌症患者中存在时表征它们的细胞异质性、使用特定表型标记阐明肿瘤永存细胞(TPC;即癌干细胞:CSC)的身份并且鉴定临床有关的诊断性生物标记和治疗靶标,使用本领域公认的技术开发并维护大型的非传统异种移植物(NTX™)肿瘤库。包含大量离散的原发性肿瘤的NTX肿瘤库在免疫低下小鼠中通过异质性肿瘤细胞的多次传代而增殖,其中所述异质性肿瘤细胞最初从患有多种实体瘤恶性肿瘤的癌症患者获得。具有良好定义的谱系的大量离散早期传代NTX肿瘤细胞系的可获得性大大促进了将TPC鉴定和分离为NTX肿瘤系,该系的细胞密切反映直接取自患者的肿瘤的生物学,允许可重复及反复地在体内表征肿瘤细胞亚群。更具体地说,将分离或纯化的TPC根据它们在小鼠中产生表型上和形态上异质的肿瘤的能力以回顾的方式最精确地定义,这些肿瘤重演了这些细胞从其中起源的患者肿瘤样品,同时保留它们在低细胞数(即<200个细胞)连续移植时促进肿瘤生长的能力。因此,使用小群分离的细胞通过至少两次连续移植在小鼠中产生完全异质性肿瘤的能力强烈地指示了分离的细胞包含TPC的事实。在这样的工作中,使用传代最少的在体外从未扩增(例如为了增加细胞数目的目的)的NTX细胞系大大简化了体内实验并且在生理有关环境中提供了可证实的结果。而且,早期传代NTX肿瘤也对治疗剂如依立替康(即Camptosar®)有反应,这为驱动肿瘤生长、对现有疗法的抵抗性和肿瘤复发的基础机制提供了临床有关的了解。

[0213] 随着NTX肿瘤系建立,使用流式细胞术分析组成肿瘤细胞表型来鉴定离散的标记,所述标记可能用来鉴定、表征、分离、纯化或富集肿瘤起始细胞(TIC)和分开或分析这样的群体内的TPC和肿瘤祖细胞。在这方面,发明人采用了专有的基于蛋白质组的平台(即PhenoPrint™阵列),所述平台提供了细胞蛋白表达的快速表征和潜在有用的标记的同时鉴定。

[0214] PhenoPrint阵列是专有的蛋白质组平台,其包含在96孔平板中排列的数百个离散的结合分子,许多从商业来源获得,其中每个孔含有在藻红蛋白(PE)荧光通道中的不同结合分子。出于鉴定肿瘤细胞样品内的亚群目的,在所有细胞分布至PhenoPrint阵列的孔之前,向它们均匀地施加非PE荧光通道中的其他结合分子。PhenoPrint阵列的使用允许快速鉴定蛋白质或标记,所述蛋白质或标记有望地区分TIC与非致瘤性(NTG)本体肿瘤细胞

和肿瘤基质(例如,成纤维细胞和内皮细胞)。更具体地说,在所有肿瘤细胞样品范围内显示异质性细胞表面表达的蛋白质允许基于差异性蛋白质表达鉴定、分离和移植不同的和高度纯化的TIC亚群。应当理解的是,基于本申请的标记表型表征和富集或分离细胞亚群(例如,通过流式细胞术或荧光激活细胞分选:FACS)允许将它们移植至免疫低下小鼠中,从而促进通过功能性测试TIC的体内致癌能力而评定它们在一个肿瘤细胞亚群中相对于另一个亚群是否被富集。当PhenoPrint阵列与本领域熟知的组织解离、移植和干细胞技术组合使用时(Al-Hajj等人,2004,Dalerba等人,2007和Dylla等人,2008,均见上文,所述文献各自通过引用以其全文结合在此),有可能有效地鉴定根据本发明的有关标记并且随后以高效率分离和移植特定人肿瘤细胞亚群。

[0215] 在这种情况下,使用本领域公认的技术,在严重免疫低下小鼠中建立包含人肿瘤的各种NTX肿瘤系。当达到800-2,000mm³时,将肿瘤从小鼠切除并且使用本领域公认的机械解离技术和涉及使用胶原酶、透明质酸酶和DNA酶I的酶促解离技术将其解离成单细胞悬液(参见,例如美国专利号2007/0292414,所述专利结合在此)。使用标准流式细胞技术,在BD FACSCantoTMII流式细胞仪(BD Biosciences)上表征单独的肿瘤细胞的数百种细胞表面蛋白的表达。与均匀表达(或不存在)的大多数细胞表面蛋白相反,选择的蛋白质(包括CD46、CD324和在图9-12中所述的那些)或大或小程度地在众多原发性人结直肠(“CR”)肿瘤细胞、胰腺(“PA”)肿瘤细胞、三阴性乳腺(“BR”)肿瘤细胞、以及非小细胞肺癌(“LU”)肿瘤细胞的表面上阳性地和/或异质性地表达。在图1和图2中针对几种不同的肿瘤类型展示了这些标记的两种(CD46和CD324)的异质性表达。更具体地说,图1和图2描述了单独的肿瘤细胞的基于流式细胞术的蛋白质表达数据,其显示为柱状图,其中使用同种型对照抗体的荧光减一(FMO)染色以灰色填充的柱状图显示,并且使用粗黑线显示如使用可商业获得的抗原特异性、结合PE的抗体所测定的靶抗原表达(即,CD46和CD324)。

[0216] 如可以在图1A中并且根据本发明所见,通常在存在各种类型的实体瘤的受试者中观察到CD46表达。而且,虽然表达水平变化,但是它通常高于背景染色。对使用来自新鲜分离的肿瘤的肿瘤细胞的柱状图的观察揭示CD46表达尤其在源自结直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌和三阴性乳腺癌患者的肿瘤中是异质的(图1B),其中亚群通常展示阴性/lo或阳性表达。具体而言,阳性表达CD46的那些细胞经常具有范围从低水平至高水平的染色,如使用同种型对照/FMO染色和标准流式细胞方法定量的。用CD324产生相似的结果,如在图2中所见,其中经常观察到表达CD324的肿瘤细胞亚群包含少数群体。出人意料地并且与本领域中的解释相反,当在相似的实体瘤类型中使用相同的技术测量时,通常被认为仅仅与致癌细胞的亚群相关的蛋白质(例如CD24和CD34)通常显示均匀表达,如在图3A(CD24)和图3B(CD34)中所列举的。就这一点而论,这些现有技术标记可以与在此的教导内容不相符。

[0217] 在任何情况下,精确重演肿瘤生理学的NTX肿瘤模型与如上所述的PhenoPrint阵列分析肿瘤细胞的联合使用,证明在表征许多的数百种肿瘤抗原(包括CD46和CD324)的细胞表面表达水平方面的可能性和用途。不同于显示同质表达的标记,本发明的标记在来自众多肿瘤类型的肿瘤细胞亚群之间通常是异质的,并且因此在鉴定、表征和/或分离或富集TIC或其组分时提供了显著优点。

实例2

通过FACS和移植富集肿瘤起始细胞群

[0218] 在显示特定蛋白质或感兴趣的蛋白质(例如,CD46和/或CD324)的异质表达的肿瘤中,基于这样的标记富集或分离细胞并且然后将它们移植至免疫低下小鼠中。更具体地说,为了确定高水平或低水平的表面CD46和/或CD324是否可能与增强的致瘤性相关,使用如上文所述的现有技术将NTX肿瘤样品解离并且使用FACS Aria流式细胞仪(BD Biosciences)分离以提供不同标记富集的亚群,所述群体然后移植至免疫低下小鼠中。在这个方面,将细胞以典型地范围在每只小鼠1,000个至50个细胞之间的剂量皮下注射至免疫受损的雌性受体NOD/SCID小鼠的乳腺脂肪垫中。当产生自这些移植物的肿瘤达到800–2,000mm³时,使小鼠安乐死并且将肿瘤移出并通过酶消化解离成单细胞悬液,目的在于表征表型,以便评定细胞的构造是否代表从中最初分离移植细胞的亲本肿瘤。

[0219] 图4–8展示了使用源自结直肠癌、胰腺癌、非小细胞肺癌和三阴性乳腺癌患者的NTX肿瘤的代表性实验的结果。图8中的空白空间表示未测试所指示的实验条件。显著地,致瘤性一致性地与表达CD46和CD324的细胞亚群相关,并且由具有CD46^{hi}CD324⁺表型的细胞产生的肿瘤在组成方面与它们的亲本肿瘤相似。而且,因为这些实体瘤内的所有人类细胞为上皮特异性抗原(ESA;EpCAM)阳性,并且所有或至少绝大多数为CD24⁺和CD34⁺(图3),可以使用表型谱ESA⁺CD46^{hi} CD324⁺CD24⁺CD34⁺,鉴定来自这些肿瘤的肿瘤起始细胞(TIC)亚群和绝大多数分析的那些肿瘤。然而,因为ESA、CD24和CD34在它们的表面表达方面变化很少并且在定义肿瘤细胞亚群方面用途有限,在此披露的TIC亚群可以被鉴定为CD324⁺和任选地鉴定为CD46^{hi}。如上文所述并且使用源自许多位结直肠癌、胰腺癌、三阴性乳腺癌和非小细胞肺癌患者的NTX系进行重复,当移植入小鼠时,CD46^{hi}细胞一致地产生异质性肿瘤,从而表明这种分离的细胞亚群针对TIC而被显著富集。根据在此的教导内容,虽然可以各自单独地使用CD46和CD324来富集和表征TIC亚群,但是本发明的各个方面将组合地使用这些标记,并且在替代性实施例中,用另外的标记来促进更精确的肿瘤细胞亚群的分层和分离(图8)。相反,不表达或表达低水平CD46或CD324的肿瘤细胞分别比它们的高表达或阳性表达对应物具有低得多的致瘤性(图4–8)。基于产生的数据,出人意料地发现,表达CD46^{hi} CD324⁺表型的肿瘤细胞亚群通常含有绝大部分的致瘤能力。

实例3

肿瘤起始细胞上表达的代表性细胞表面标记

[0220] 肿瘤起始细胞,如同所有的细胞,可以表达若非数百种则数千种的标记或抗原,优选地表达在它们的细胞表面上。就这一点而论,虽然CD46和CD324针对是TIC的优选标记,可以使用其他伴随的标记来鉴定和/或分离相同的肿瘤细胞亚群,这独立于使用能够检测CD46和/或CD324的分子。在使用上述细胞表面标记谱证实TIC群后,使用试剂重复PhenoPrint阵列,以便鉴定显示与CD46和/或CD324可比较的表达谱的蛋白质,这表明就本发明而言,可以使用这些蛋白质作为CD46和/或CD324的替代物。

[0221] 为了鉴定与TIC细胞群相关或与CD46和/或CD324大量地共表达的蛋白质,使在PhenoPrint阵列的所有孔中包含针对这些抗原的非PE结合的抗体,并且将识别各种不同的感兴趣的蛋白的独特抗体排列并且使用荧光分子PE评定它们。在图9A和图9B中列出了例如与CD46^{hi}CD324⁺(NTG)和/或CD324⁺亚组分相比,在异种移植的结直肠癌、胰腺癌、或非小细胞肺癌的人CD46^{hi} CD324⁺(TIC)亚组分内表达更高的蛋白质。图10中包括了显示在结直肠癌中每种标记与CD46和CD324共表达的代表性FACS图。图11中包括了显示在胰腺癌中每种标记

与CD46和CD324共表达的代表性FACS图。图12中包括了显示在非小细胞肺癌中每种标记与CD46和CD324共表达的代表性FACS图。大量表达每种列出的标记的细胞的表征或富集或分离也指示CD46^{hi} CD324⁺细胞(即,TIC)的表征或富集或分离。在这方面,图9-12的标记和与CD46或CD324表达相关的其他标记可以作为替代物使用并且有效地用来鉴定如在此陈述的TIC。因而,在图9-12中陈述的标记可以用于分离TIC亚群并且拥有作为诊断标记和治疗靶标的实质效用。

实例4

CD66c可以在结直肠CD46^{hi} CD324⁺亚群之间区分

[0222] 虽然大多数肿瘤细胞缺乏肿瘤形成能力并且可以因此表征为NTG,但是在正常细胞发育和造血系统肿瘤中存在能够在移植后重建组织和/或肿瘤而不具有自我更新能力(即有限寿命)并且因此最终衰竭的高度增殖性细胞(即短期重建性细胞、过渡放大细胞或祖细胞)的先例。在癌症的背景下,具有祖细胞表型的细胞可能再获得通常限于干细胞群的自我更新特性并且此后满足TPC或CSC的定义(Jamieson等人,《新英格兰医学杂志》(N Engl J Med);351,2004,所述文献通过引用以其全文结合在此),因为这些细胞和它们的子代将是长寿命的;然而,赋予祖细胞自我更新特性的这些诱变事件是罕见的。然而,由于:a)祖细胞的增殖能力可以是显著的;b)一旦肿瘤达到大约1,500-2,000mm³,必须使免疫低下小鼠必安乐死;和c)免疫低下小鼠的寿命相对于人寿命是短的(对于NOD/SCID小鼠,大约9-12个月),TIC在小鼠中产生肿瘤的能力不是显示TIC为TPC的足够稳健的读出。如在本领域讨论的,只要可能,通过干细胞的自我更新能力的展示必须显示在连续移植物中。

[0223] 为了确定CD46^{hi} CD324⁺细胞亚群是否或多或少具有致瘤性和/或具有改变的潜能,对具有这种表型的细胞系统地筛选异质性,以便鉴定使得能够细胞分离和移植实验的另外的标记。具体而言,使用如上文讨论的如前面实例中陈述的PhenoPrint阵列,鉴定感兴趣的细胞表面标记和潜在效用。在这些实验过程期间,将CD66c鉴定为这样的细胞表面标记,所述细胞表面标记通常显示在CD46^{hi} CD324⁺细胞群之间的异质性(图13A)并且使得能够分离拥有不同功能性重建能力的两个不同的CD46^{hi} CD324⁺细胞亚群。在图13A中表示了以每只小鼠200个细胞移植的对应群体。产生自移植CD46^{hi} CD324⁺细胞的CD66c⁻细胞子集的结直肠肿瘤是完全异质的并且反映从中衍生它们的亲本肿瘤(图13B和13C[白色栏相对于黑色栏]和图14A)。出人意料地并且与源自CD46^{hi} CD324⁺细胞的CD66c⁻子集的肿瘤相反,用少数目CD66c⁺子集的移植物没有产生完全异质的肿瘤,因为存在于从CD46^{hi} CD324⁺ CD66c⁺细胞所产生的肿瘤中的CD66c⁻细胞显著较少(图13C[灰色栏相对于黑色栏]和图14A),表明这些细胞是具有与正常祖细胞类似的特性的肿瘤祖细胞(TProg),所述特性即显著的增殖能力、但缺乏自我更新能力并且不能去分化成CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞。

[0224] 以小细胞数连续移植有希望的TPC(CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻)和TProg(CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁺)细胞证实:所提出的这些肿瘤细胞亚群的身份为产生自下述肿瘤的CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞,其中所述肿瘤由连续移植仅50个细胞(p2相对于p1肿瘤)后高效产生肿瘤的CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞产生,而在连续移植后,来自CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁺细胞产生的肿瘤中的CD66c⁻和CD66c⁺细胞亚群两者都不能高效地再引发肿瘤(图14B)。为清晰起见,从200个CD46^{hi}CD324⁺CD66c⁺细胞产生的肿瘤中所分离的50个CD46^{hi}CD324⁺CD66c⁺或50个CD46^{hi}CD324⁺CD66c⁻细胞是很少致瘤的。出人意料地,这些数据指示以下事实,在来自一些

结直肠癌患者的实体瘤中,CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞是TPC细胞并且CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁺细胞是TProg细胞。

[0225] 为了确定结直肠癌中上述TPC表型的准确度,通过FACS分离CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞(FACS前与FACS后;分别是图15A与图15B)并且将它们分别以每只小鼠1,000、200、50、20、8和3个细胞的稀释度移植。使用基于阳性事件的泊松分布统计学导致以下计算结果:CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻TPC中的真实TIC频率大致是 5.4 ± 2.5 个细胞中有1个细胞(图15C),其中所述阳性事件定义为独立于速率的成功肿瘤形成。我们已经出乎意料地在代表性结直肠NTX肿瘤中证明,使用新颖的CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻标记组合促进了可度量的TIC频率的富集,并且CD66c的使用进一步促进了一些患者中的TIC亚群解析成TPC与TProg。这项进展具有显著意义,因为不是所有的TIC是相同的并且仅仅TPC亚群在任何给定的患者中是真正推动疾病进展和复发的长寿命癌干细胞。

[0226] 先前未曾知道用来富集结直肠癌肿瘤中的上文定义的TPC和TProg细胞群的细胞表面蛋白的组合与任何组织或肿瘤中含有这种活性的细胞相关。这项工作代表在分离TIC及其亚群的方法的分辨率方面的重大改进,并且进一步改进了技术,以便鉴定、分离和表征不同的、高度富集的在移植后专有地含有肿瘤产生能力的实体瘤细胞亚群,从而区分具有或没有自我更新能力的致癌细胞亚群,即分别为TProg和TPC。我们进一步在此描述了一种通过以下方式计数TIC的方法:将人肿瘤细胞以细胞数逐步降低的稀释物移植并且评定独立于速率的后续频率,其中这些细胞稀释物能够以所述频率在免疫低下小鼠中引发肿瘤形成。因此,虽然使用专有的PhenoPrint阵列鉴定的大多数细胞表面标记未显示出使用标准FACS操作方案从肿瘤富集TIC群的能力,不同的标记及其组合可能用来鉴定至少两个TIC亚群,包括TPC和TProg,其中所述亚群被功能性证明为分别满足本领域中干细胞和祖细胞的定义标准。

实例5

TPC和TProg细胞群具有不同的潜能

[0227] 已经证明体外集落形成细胞(CFC)测定在协助剖析造血细胞层次中不同细胞群的分化潜能方面具有巨大效用;然而这些测定法对于上皮组织或实体瘤细胞是不适合的,因为测定条件并不有利于细胞生长和/或分化。使用其中许多表型上不同的肿瘤细胞亚群如它们在患者肿瘤中那样存在的NTX肿瘤模型,支持TIC自我更新或分化的FACS和体外分析条件有助于确定所定义的肿瘤细胞亚群的潜能。这些体外CFC测定起码在搜索新标记和搜索抗癌剂的筛选方面提供有效的优势,所述新标记定义了肿瘤细胞亚群,从而确定这些对应的细胞群的分化潜能。

[0228] 为了展示本发明的这样的方面,使用FACS Aria流式细胞仪(BD Biosciences),将具有定义的细胞表面表型CD46^{hi} CD324⁺(TIC)或CD46^{-/lo} CD324⁻(NTG)的单个细胞从NTX CR肿瘤分离并且以稀释度468、162、54、18、6或2个细胞/孔直接置入96孔板中。如作为本领域标准,然后将细胞在定义的无血清条件下在37°C/5%CO₂/5%O₂培养15天,并且如此评分集落形成阳性的孔(图16A)。利用L-Calculon™软件(Stemcell Technologies),利用实验设置信息最终确定每个群体的集落形成单位的频率,所述实验设置信息包括:a)被引发的单独的孔的数目;b)用来引发每个孔的细胞数;和c)独立于速率的、来自每个稀释度的经评分为阳性的孔数目。

[0229] 在用少至18个分选的CD46^{hi} CD324⁺细胞接种的孔中观察到集落,同时162个细胞是为观察到来自分选的CD46^{-/lo} CD324⁻细胞中的集落所需要的最小细胞数。因此集落形成细胞被证明对于TIC和NTG细胞群分别以每1,000个细胞7.3和1.1个细胞的频率存在(图16A)。为了清楚起见,在137个CD46^{hi} CD324⁺(TIC)细胞中有1个细胞在体外形成集落,而在918个CD46^{-/lo} CD324⁻(NTG)细胞中仅1个细胞具有这种能力。这些结果有力地表明,集落形成细胞在结直肠癌细胞的CD46^{hi} CD324⁺部分中显著地被富集并且这种活性与致瘤能力相关,如还通过体内移植所展示的。

[0230] 为了进一步评定在结直肠肿瘤内的更多不同的肿瘤细胞亚群的增殖和分化潜能,将表达CD46、CD324和CD66c的各种组合的细胞分选至含有支持干细胞自我更新的标准无血清培养基条件的平板中(Dylla等人,2008,上文)。以下细胞群从单个的、活的人ESA⁺细胞中分选:CD46^{-/lo}(NTG细胞;也主要是CD324⁻)、CD46^{hi} CD324⁻、CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁺和CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻。然后在铺板之后21天评定这些对应肿瘤细胞亚群引发集落的能力,作为是这些对应的肿瘤细胞亚群产生可溶性CD66c(即,CEACAM6)蛋白的潜能。CD66c常规地从细胞表面脱落,在上述体外培养物的上清液中是容易地可测量的,并且被用作分化的替代标记。

[0231] 具体而言,例如,将来自NTX肿瘤CR33的2,000个细胞分选至无血清培养基条件下的平底96孔Primaria平板(BD Biosciences)中并且在上文所述的环境条件中孵育。在21天之后,排列密集的贴壁细胞集落(定义为每个集落>50个细胞)已经在孔中形成和扩增。手工计数每个孔中的集落数(白色栏)并且通过ELISA测量上清液中的CD66c蛋白的浓度(黑色栏)(图16B)。集落形成的频率很好地相应于体内观察到的致瘤细胞的频率。也就是说,CD46^{-/lo}细胞(即NTG细胞)仅产生单个集落(1/2,000个细胞频率)并且尽管培养了21天,但在培养基中未检测到可溶性CD66c蛋白(图16B)。正如CD46^{hi} CD324⁻细胞很少展示体内肿瘤引发潜能,我们观察到小数目的体外集落并且在培养基中检测到相对低水平的CD66c。鉴于在许多NTX肿瘤中的CD46^{hi} CD324⁺细胞亚群表达CD66c并且这些细胞通常显得是短寿命的,这不令人惊讶。此外,CD46^{hi} CD324⁺细胞,无论是否表达CD66c,能够比CD46^{-/lo}或CD46^{hi} CD324⁻肿瘤细胞亚群更好地形成体外集落并且产生显著更可溶的CD66c(图16B)。另外,在上清液中产生的CD66c的量显得与集落数相关,表明最初接种至孔内的CD66⁺和CD66⁻细胞群两者都能够产生CD66c。这与CD66c⁻细胞能够生CD66c⁺细胞的观察结果一致,如上文在体内证明的。

[0232] 集落形成可以用作体内移植的替代物和确定TIC是否相对于另一个肿瘤细胞亚群而存在于一个肿瘤细胞亚群中,并且通常能够评定候选干细胞群和祖细胞群的潜能。然而,即使最好的体外细胞培养条件也不能模拟体内遇到的生理环境。此外,这些无血清培养条件通常支持自我更新并阻止分化,但是并不积极地促进分化。

[0233] 为了更好地评定具有上述定义的细胞表面表型的单个细胞的分化潜能,调整培养基条件以便含有10%胎牛血清(FCS),从而积极促进分化,如本领域中常见的。在14天后,移除培养基并且通过ELISA评定上清液中的CD66c的量。虽然在来自CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁺细胞的培养基中预期了升高水平的CD66c,但是CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞能够体外产生相似水平CD66c的事实与CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞可以分化成CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁺细胞的观念是一致的(图16C)。在如上文所述的支持自我更新的培养基条件下(即在定义的、无血清的培养基中)的扩增显得不支持稳健的CD66c产生;然而,添加FCS至这种培养基促进了分化并大

大辅助了细胞产生CD66c的能力。鉴于上文证明CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞经常是具有自我更新能力的唯一肿瘤细胞亚群(通过连续移植证明的),这或许并不令人惊讶,具有体外最大CD66c产生潜能的肿瘤细胞亚群也是CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞。虽然鉴于接种至孔中的细胞呈CD66c蛋白表达阴性,并且这个细胞群的Taqman qRT PCR分析显示很少存在甚至不存在CD66c转录物(数据未显示),这个结果出乎意料,这些结果证实了体内观察结果,其证明CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞最具增殖和分化潜能。这还暗示了体外铺板CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻细胞产生了表达CD66c的子代,并且通过促进分化的细胞生长条件增强了这个过程。

[0234] 如上文所述,不仅用NTX结直肠癌细胞而且用胰腺癌TIC观察到通过添加FCS诱导了体外TIC分化。在具有或没有血清情况下培养胰腺异种移植肿瘤细胞十四天之后,在其中存在FCS的条件下,相对于NTX PA14和PA20肿瘤细胞两者,CD46^{hi}细胞(也主要是CD324⁺)的百分比下降了(图16D)。这些数据进一步支持使用CD46和CD324作为体外区分较少分化和较多分化的NTX衍生的胰腺癌细胞之间的标记,并且支持以下主张:这些标记可能起到在几种上皮肿瘤类型中的TIC与NTG细胞之间进行区分的作用。

[0235] 这个实例显示,将TIC亚群(例如,TPC和TProg)可以基于它们引发集落、分化和产生通常与分化细胞相关的蛋白质的能力而进行体外区分。而且,也可以开发没有或具有FCS的促进分化的培养条件。

实例6

结直肠和胰腺肿瘤起始细胞相对抵抗标准护理化学治疗剂

[0236] 癌干细胞范例的中心原则是CSC通常抵抗标准护理治疗方案,如化学疗法和放射。为了评定哪种结直肠和胰腺肿瘤细胞亚群分别最抵抗标准护理方案如依立替康或吉西他滨,将小鼠用结直肠肿瘤或胰腺NTX肿瘤再引发,并且一旦肿瘤达到大约180-350mm³就进行随机化。然后小鼠分别接受每周两次腹膜内给予15mg/kg依立替康或25mg/kg吉西他滨持续大约20天的时间,此后,使它们安乐死以便切除肿瘤和细胞分析。

[0237] 为了评定肿瘤细胞亚群的化学抗性,将荷NTX结直肠肿瘤的小鼠的体内同期组群随机分成两个组,使得每个组的平均肿瘤体积是大致相等的。然后这些组用15mg/kg依立替康或等体积载体缓冲液治疗,每周两次。每次注射之前一天,监测肿瘤体积和动物健康并且记录,每周两次。在结直肠肿瘤的情况下,载体治疗的肿瘤继续生长,而依立替康治疗的肿瘤显示生长阻滞或体积减小(图17A)。当依立替康治疗的小鼠中肿瘤开始减小体积时,使这个实验中的所有小鼠安乐死并且将肿瘤收获、解离成单细胞悬液,并且使用本领域公认的技术通过流式细胞术分析它们单独的细胞表型。与盐水治疗的对应物相比,确定在活的人细胞中具有TPC表型(CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻)的细胞的频率比来自依立替康治疗小鼠的肿瘤中高2.5倍以上(图17B和17C)。这表明,具有TPC表型(CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻)的细胞抵抗依立替康诱导的细胞毒性,而其他肿瘤细胞亚群死于依立替康。另外,在载体治疗的肿瘤的CD46^{hi} CD324⁺群体中,大多数残余细胞为CD66c⁺;然而,在依立替康治疗的小鼠的CD46^{hi} CD324⁺群体中,大多数残余细胞为CD66c⁻(即,TPC或CSC)(图17D)。这些数据表明,具有TPC表型(即CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻)的细胞比其他肿瘤细胞亚群更抵抗依立替康诱导的细胞毒性,其中所述其他肿瘤细胞亚群包括TIC(即CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁺)的TProg子集和NTG细胞两者。

[0238] 在代表性胰腺NTX肿瘤中观察到类似结果,其中在吉西他滨治疗过程期间摘除残

余的胰腺NTX肿瘤并且将残余的肿瘤细胞亚群基于它们的标记表型进行分析。正如预期的,来自载体治疗小鼠的胰腺肿瘤继续生长而不减弱,而来自用吉西他滨治疗的小鼠的肿瘤响应于这种化学治疗剂而体积减小(图18A)。然后解离收获的肿瘤并且通过流式细胞术分析组成性单个细胞。如用依立替康治疗的结直肠癌NTX肿瘤中所观察的,吉西他滨治疗导致表达指示TIC的标记(例如CD46)的肿瘤细胞的富集。载体相对于吉西他滨治疗的肿瘤中的CD46表达的代表性实例显示于图18B中。与结直肠癌一样,胰腺TIC显得相对抵抗标准护理化学治疗剂吉西他滨。

[0239] 在此我们证明,并非所有肿瘤细胞亚群都同样地对护理化学治疗剂如依立替康或吉西他滨敏感或抵抗。而且,在结直肠癌中,我们证明虽然TPC和TProg均是致瘤的,TPC(即CSC)对化学疗法是更抵抗的。我们的精确鉴定最致瘤的化学抗性肿瘤亚群的能力促进了与致瘤性和化学抗性相关的基因和蛋白质的鉴定,并且因此将使得能够鉴定具有重大诊断和/或治疗效用的基因/蛋白质。

实例7

提出的在结直肠肿瘤内的细胞层次

[0240] 如上文讨论的,将TProg归类为TIC亚群,这部分地归因于它们在小鼠中产生肿瘤的有限能力。TProg是TPC的子代并且典型地能够进行有限数目的非自我更新性细胞分裂。而且,在造血细胞层次中存在例如几种不同祖细胞群的先例,所述祖细胞群维持多谱系分化潜能,但是在面临决定细胞命运之前具有不同的增殖能力。造血系统中的祖细胞的代表性实例是短期重建性造血干细胞(ST-HSC)和多能祖细胞(MPP)。虽然这两种细胞群都可以完全重建造血系统,但是二者都不能无限地重建(即,它们缺乏真实干细胞固有的自我更新能力)并且相比于MPP(是ST-HSC的子代),ST-HSC可以这样做较长的时间。虽然在实体组织和起源于这些组织的肿瘤两者中的细胞的层次定义不清楚,但是细胞层次可能存在于许多器官和肿瘤内,其中不同的细胞亚群拥有不同的增殖和分化潜能。我们在此首次证明,TProg不仅可以在结直肠癌内作为TIC子集存在,TProg细胞还可以是进一步细分成早期肿瘤祖细胞(ETP)和晚期肿瘤祖细胞(LTP)。这些对应的TProg细胞群的每一个可以通过表型(例如,细胞表面标记)和它们逐渐更小的增殖能力和分化潜能来区分,并且因此它们的重演某种肿瘤结构的总能力的不同的。

[0241] 如在图19A和图19B中所示,上述体内和体外数据,连同肿瘤组织形态学观察结果,支持以下假设:在存在显著分化能力和制定这些分化程序的能力的肿瘤中,TPC可以反映例如正常结肠干细胞的身份,其中我们在此提出所述正常结肠干细胞具有身份 $ESA^{+}CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}CD24^{+}CD34^{-}$ 。在此我们已经证明,几乎所有的结直肠肿瘤细胞为 $ESA^{+}CD24^{+}CD34^{-}$,并且因此这些标记在鉴定肿瘤细胞亚群中发挥很小的效用。我们进一步证明, $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}$ 细胞能够产生部分地由 $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}$ 和 $CD66c^{+}$ 细胞组成的完全异质性肿瘤,因而虽然 $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{+}$ 细胞是致瘤性的,它们不具有产生 $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}$ 细胞的能力并且不能通过连续移植高效地促进肿瘤生长。这些数据,连同以下观察结果:具有a)连续移植后一致地产生异质性肿瘤的能力;b)大部分集落形成细胞潜能;和c)体外产生CD66c细胞和蛋白质的潜能的细胞是 $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}$,支持以下假设: $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{+}$ 细胞是具有受限增殖能力和潜能的 $CD46^{hi}CD324^{+}CD66c^{-}$ 细胞的子代。体内致瘤性、体外集落形成潜能的进一步降低以及当细胞丧失CD324表达时产生CD66c的能力的降低,支持

以下假设:CD46^{hi} CD324⁻CD66⁺细胞代表具有某种残余增殖能力(如有时已经证明的那样)但是通常没有自我更新能力的晚期肿瘤祖细胞群(LTP)。最后,支持在图19A中展示的细胞层次,CD46⁻细胞也是CD324⁻的并且通常也是CD66c⁻的。这些NTG细胞可能代表终末分化的子代,所述子代在结肠中包括分泌谱系的杯状细胞(G)和肠内分泌(eE)细胞或者吸收谱系的肠细胞(E)。分离的细胞亚群的基因表达支持这种假设,因为CD46⁻细胞表达许多基因,这些基因归属于终末分化的分泌性和/或吸收性细胞类型(例如MUC2和MUC20;图20A)。

[0242] 以上实例出人意料地记录了多种肿瘤起始细胞群的存在,所述肿瘤起始细胞群以当它们植入小鼠中时产生肿瘤的不同能力为特征并且与独特标记表型相关。而且,离散的TIC亚群在它们自我更新和完全重建肿瘤的能力方面不同。肿瘤永存细胞(TPC),如它们在此被定义的,在它们展示的自我更新能力方面满足癌干细胞(CSC)的主流定义,如通过用小数目良好定义的细胞的连续移植和产生的肿瘤异质性的分析所检验的。相反,虽然在原发性移植物中致癌,肿瘤祖细胞(TProg)与真实的TPC或CSC不同,因为它们显得缺乏自我更新能力并且它们的分化潜能有时可能受到限制。以上实例也证明,存在着具有逐渐降低的增殖和分化潜能的离散TProg细胞群:ETP和LTP。在癌症情况下的这些细胞的身份的知识、以及可能正常的组织生物学,促进它们用于鉴定具有诊断和治疗效用的蛋白质和分子。如在图19A和图19B中图解和在本披露中记录的,包含致癌性细胞群和NTG细胞群的异质性肿瘤提供了TPC,其子代从CD46^{hi} CD324⁺CD66c⁻表型演进以获得CD66c(取得ETP身份)的表达并且最终丧失CD324的表达(LTP表型)。最后,末端分化明显地伴随CD66c和CD46的同时丧失。

实例8

从富集的肿瘤起始细胞群鉴定有希望的诊断靶标和治疗靶标

[0243] 例如,建立的结直肠NTX肿瘤系SCRx-CR4如在实例1中所述被传代并且用来在免疫低下小鼠中引发肿瘤。一旦平均肿瘤负荷达到约300mm³,将小鼠随机化并且用15mg/kg依立替康或载体对照(PBS)治疗,每周两次,持续至少二十天时间,之后将它们处死。然后移出肿瘤,并且通常使用在实例2中展示的技术分别分离TPC、TProg和NTG细胞。更具体地说,通过FACS分离细胞群并且立即使其沉淀,然后在Qiagen RLTplus RNA裂解缓冲液(Qiagen公司)中裂解。然后将裂解物贮存在-80℃直至使用。在融化后,使用Qiagen RNeasy分离试剂盒(Qiagen公司)遵循供应商的说明书提取总RNA,并且在Nanodrop(Thermo Scientific)和生物分析仪2100(安捷伦公司(Agilent))上再次使用供应商的操作方案和推荐的仪器设置进行定量。所得到的总RNA制剂适合于基因测序和分析。

[0244] 从载体或依立替康治疗的小鼠制备如从上文所述分离的对应细胞群获得的总RNA样品,用于使用Applied Biosystems SOLiD 3.0(通过寡核苷酸连接/检测测序)下一代测序平台(Life Technologies),以每份样品≥5ng总RNA开始,进行全转录组测序。由SOLiD平台产生的从人基因组中映射至34,609个基因的数据能够检测感兴趣的转录物,连同可验证的在所有样品中的转录物表达水平的测量值。

[0245] 通常,SOLiD3下一代测序平台能够平行地对与磁珠连接的克隆扩增的RNA/DNA片段进行测序。通过用染料标记的寡核苷酸连接的测序然后将被用来产生每个片段的50个碱基读码,所述片段存在于样品中,其中每份样品总计多于5千万个读码,产生基因组中蛋白质的mRNA转录物表达水平的精确得多的表示。仅仅基于读码覆盖率(唯一映射至基因组位置的读数),SOLiD3平台不仅能够捕获表达,而且还有SNP、已知的和未知的可变剪接事件、

以及潜在新的外显子发现。因此,这种下一代平台的使用允许确定转录物水平表达的差异以及表达的那些mRNA转录物的特定剪接变体的差异或优先性。而且,以使用来自Applied Biosystems的改良的全转录组操作方案的SOLiD3平台进行分析仅仅需要大约5ng的预扩增原料。这对于从分选的细胞群提取总RNA是有意义的,其中TPC细胞子集例如在数目上大大小于NTG或本体肿瘤并且因此产生很少量的可用原料。

[0246] 来自SOLiD3平台的一式二份运行测序数据被标准化并且转换,然后计算叠合率(fold ratio),正如标准工业实践一样。以这种方式,测量了在分离自SCRx-CR4肿瘤的NTG细胞(白色)、TProg(灰色)和TPC(黑色栏)中的转录物基因表达水平(表示为每百万个映射至外显子的读码;RPM_Exon)。以这种方式分析完整转录组数据鉴定到几种蛋白质和潜在的目的治疗靶,包括APCDD1、Notum、REG1A和CD46剪接变体。数据分析显示,相比于在载体和依立替康治疗的小鼠中的NTG细胞中的表达,这些感兴趣的蛋白质在转录物水平上被上调大于至少2倍(图20A-20C)。以这种方式鉴定的有希望的诊断靶标和治疗靶标转录物的代表性实例包括NOTUM(图20A)、APCDD1(图20B)、示例性胰腺蛋白(图20C)和MUC20。这些转录物在TPC中的表达提示,这些蛋白质也优选地由TPC细胞在蛋白质水平表达(即,APCDD1)或分泌(即,示例胰腺蛋白和NOTUM)并且这些蛋白质对于TPC维持和/或自我更新是关键的。同时可能鉴定由NTG细胞群(例如MUC20;图20D)优选表达的转录物,所述转录物可以用作鉴定终末分化细胞的标记,并且当这样做时促进了阴性选择,其中肿瘤被耗尽它们的本体肿瘤细胞群,使得可以更容易地鉴定和/或用治疗方案靶向更多致瘤组分。此外,因为NTG细胞通常比它们的TProg和TPC对应物更多,由这些细胞群表达的蛋白质将更容易检测,因此用作疾病负荷和/或状态的生物标记。

[0247] 本领域的技术人员将进一步理解的是,本发明可以具体化为其他特定的形式,而不脱离其精神或核心属性。由于本发明的前述说明仅仅披露了其示例性实施例,应当理解的是,其他变化被也被考虑为是在本发明的范围之内。因而,本发明不限于已经在在此详述的具体实施例。相反,应当参考所附的如指示本发明的范围和内容的权利要求书。

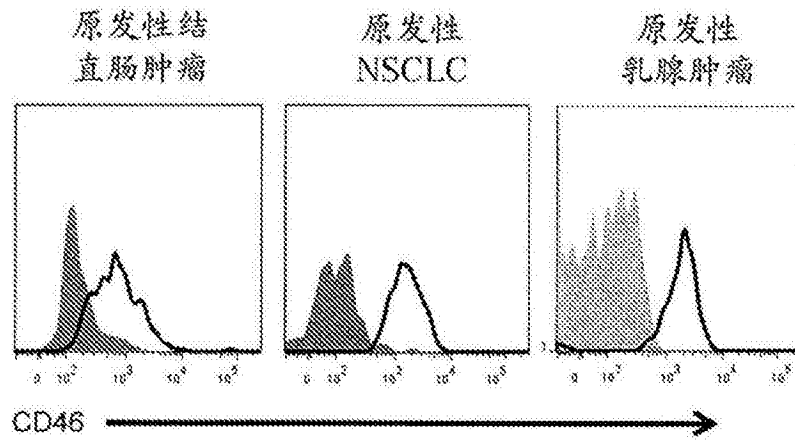


图1A

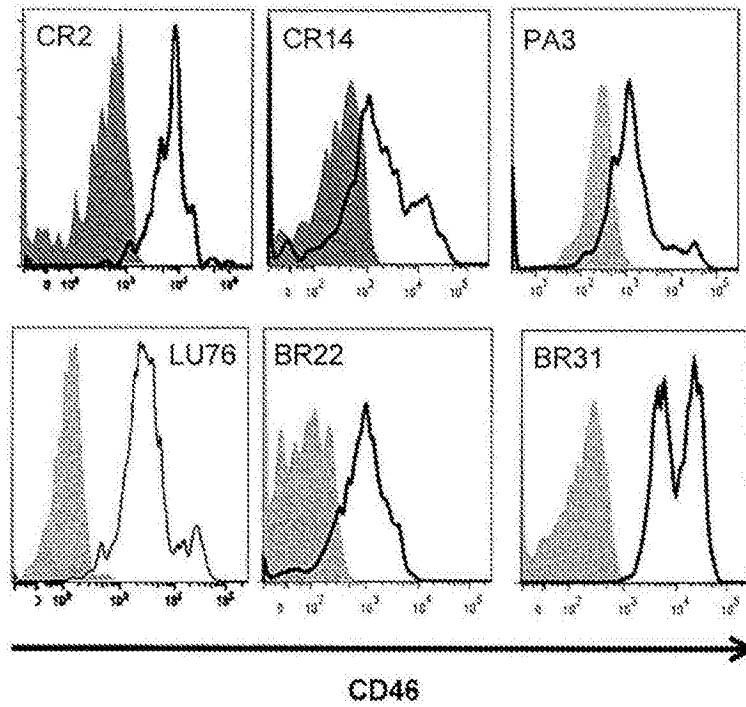


图1B

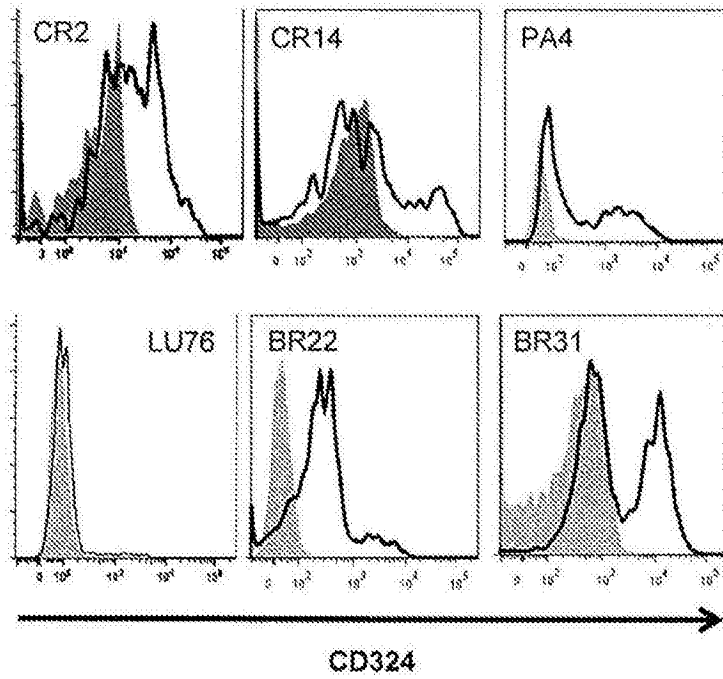


图2

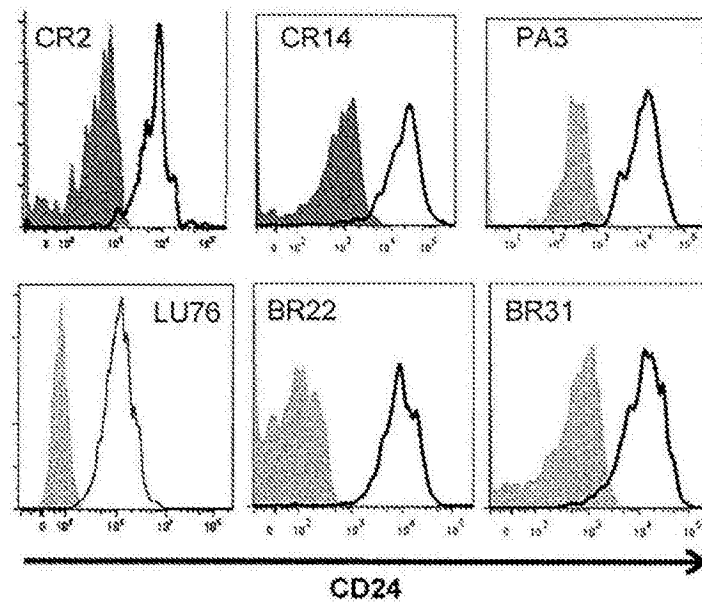


图3A

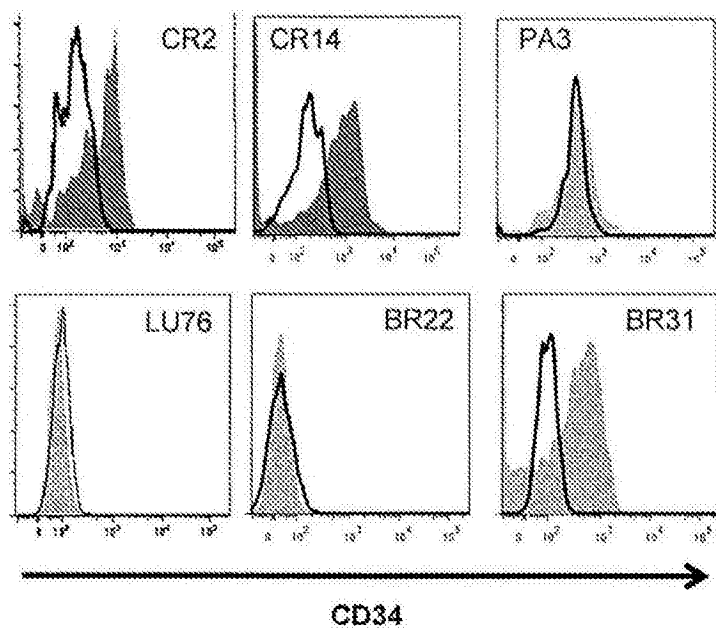


图3B

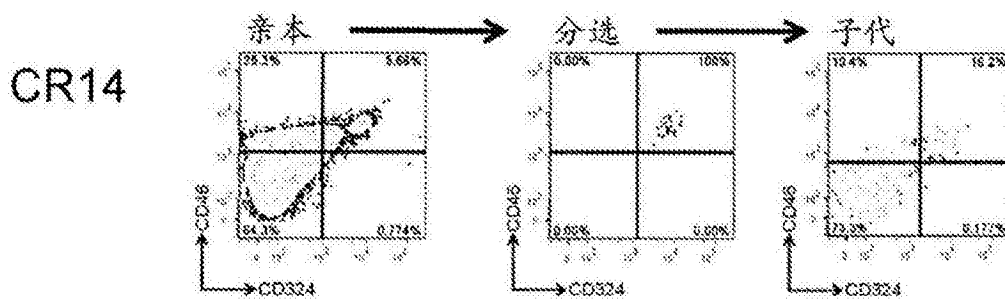


图4A

CR14

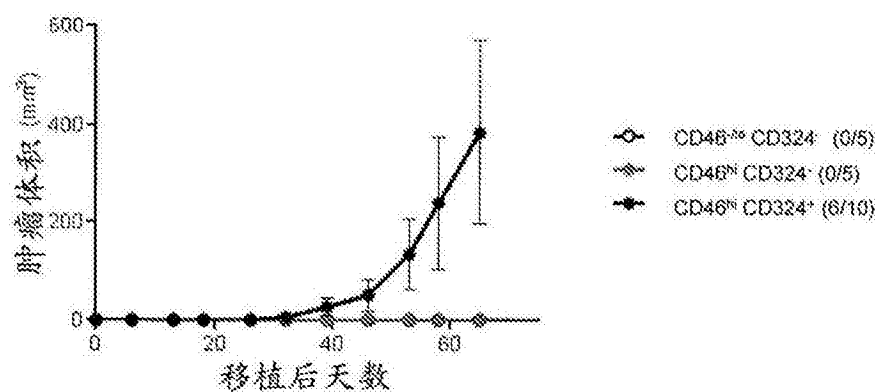


图4B

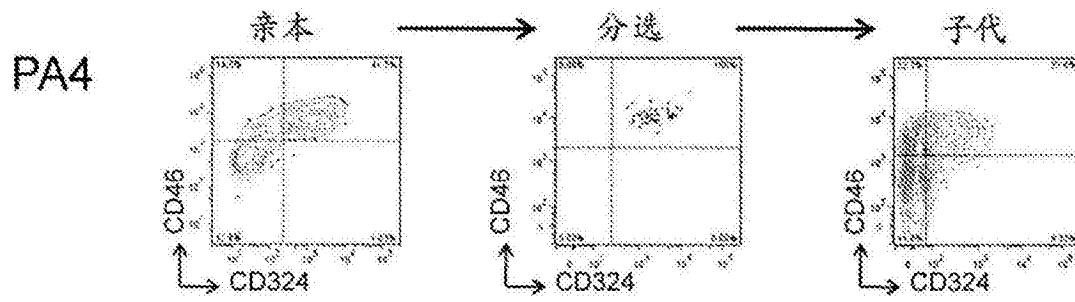


图5A

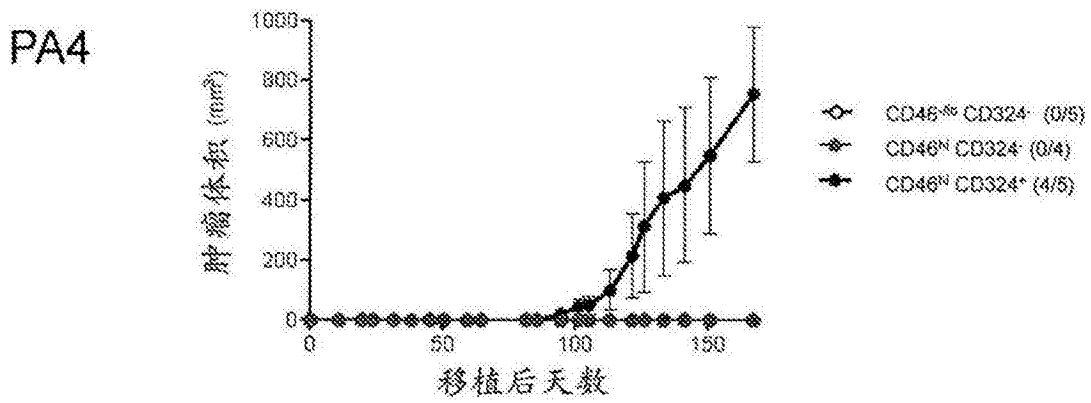


图5B

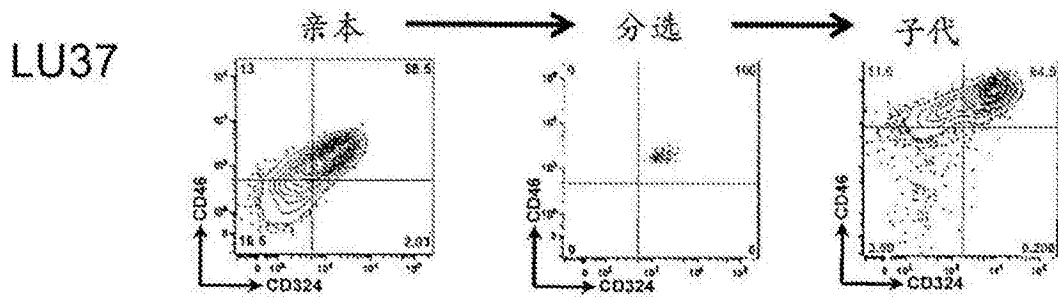


图6A

LU37

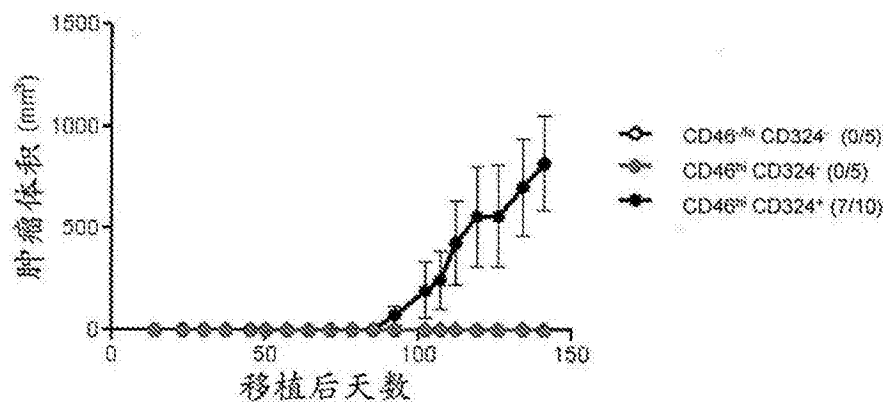


图6B

BR22

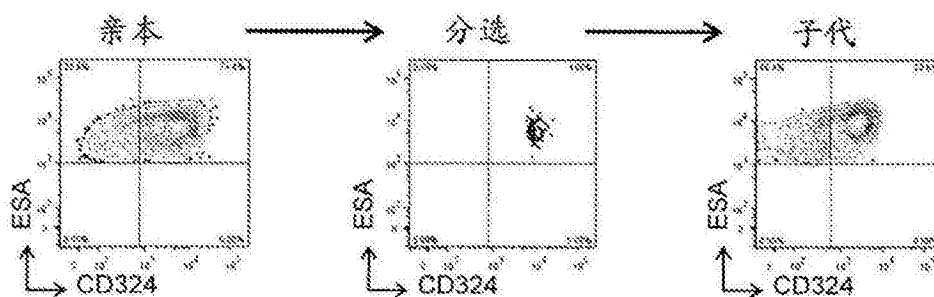


图7A

BR22

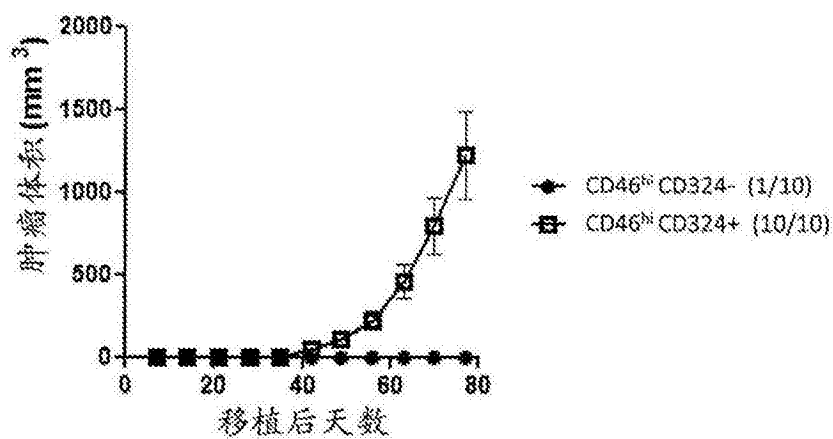


图7B

		500+ 个细胞		200-499 个细胞		50-199 个细胞		<50 个细胞	
SCRx-CR05	CD46 ^{lo} CD324-			0/5	0%	1/5	20%	1/5	20%
	CD46 ^{hi} CD324-			5/5	100%	7/9	78%		
	CD46 ^{hi} CD324+			5/5	100%	14/14	100%	18/25	72%
SCRx-CR10	CD46 ^{lo} CD324-			0/5	0%				
	CD46 ^{hi} CD324-			1/5	20%				
	CD46 ^{hi} CD324+			3/5	60%				
SCRx-CR14	CD46 ^{lo} CD324-	0/5	0%	3/15	20%	0/5	0%	0/5	0%
	CD46 ^{hi} CD324-			8/15	53%			0/5	0%
	CD46 ^{hi} CD324+	10/10	100%	20/20	100%	4/5	80%	6/10	60%
SCRx-CR16	CD46 ^{lo} CD324-			0/5	0%				
	CD46 ^{hi} CD324-			1/5	20%				
	CD46 ^{hi} CD324+			4/9	44%				
SCRx-LU37	CD46 ^{lo} CD324-	0/5	0%						
	CD46 ^{hi} CD324-	0/5	0%						
	CD46 ^{hi} CD324+	6/10	60%						
SCRx-LU49	CD46 ^{lo} CD324-					0/5	0%		
	CD46 ^{hi} CD324-								
	CD46 ^{hi} CD324+					5/5	100%		
SCRx-PA03	CD46 ^{lo} CD324-			0/5	0%				
	CD46 ^{hi} CD324-			3/5	60%				
	CD46 ^{hi} CD324+			5/5	100%				
SCRx-PA04	CD46 ^{lo} CD324-	0/5	0%						
	CD46 ^{hi} CD324-	0/5	0%						
	CD46 ^{hi} CD324+	5/5	100%						
SCRx-BR22	CD46 ^{hi} CD324-					1/10	10%		
	CD46 ^{hi} CD324+					10/10	100%		

图8

	结直肠	NSCLC	胰腺
CD9	x	x	
CD13		x	x
CD15		x	x
CD24		x	
CD26		x	
CD29		x	x
CD49a	x	x	
CD49b	x	x	x
CD49c	x	x	
CD49f	x	x	x
CD51	x	x	x
CD54			x
CD55	x		x
CD58		x	
CD63	x		
CD66			x
CD66a		x	x
CD66a/c/e			x
CD66c		x	x
CD66e		x	x
CD71		x	x
CD73	x	x	
CD81	x	x	
CD82	x		
CD91		x	
CD98	x	x	
CD99	x	x	x
CD104	x	x	x
CD105		x	
CD108			x
CD111		x	

图9A

	结直肠	NSCLC	胰腺
CD130		x	
CD136	x		
CD151	x	x	
CD155	x	x	x
CD157		x	
CD164		x	
CD166		x	
CD172a			x
CD185		x	
CD221		x	
CD230		x	
CD262		x	x
CD273			x
CD275	x	x	x
CD295		x	
CD298		x	
CD317		x	
CD318		x	
CD340		x	
CCR10	x		
e-Met	x	x	
EphB2		x	
EphB4		x	
FOLR1		x	
Glut-2			x
Glypican 5		x	
HER3		x	
IL-20 Ra			x
Integrin $\alpha 9 \beta 1$		x	
Integrin $\beta 5$			x
LDL-R			x
Mer			x
Semaphorin 4B		x	
TROP-2		x	
Vb9			x

图9B

CR14

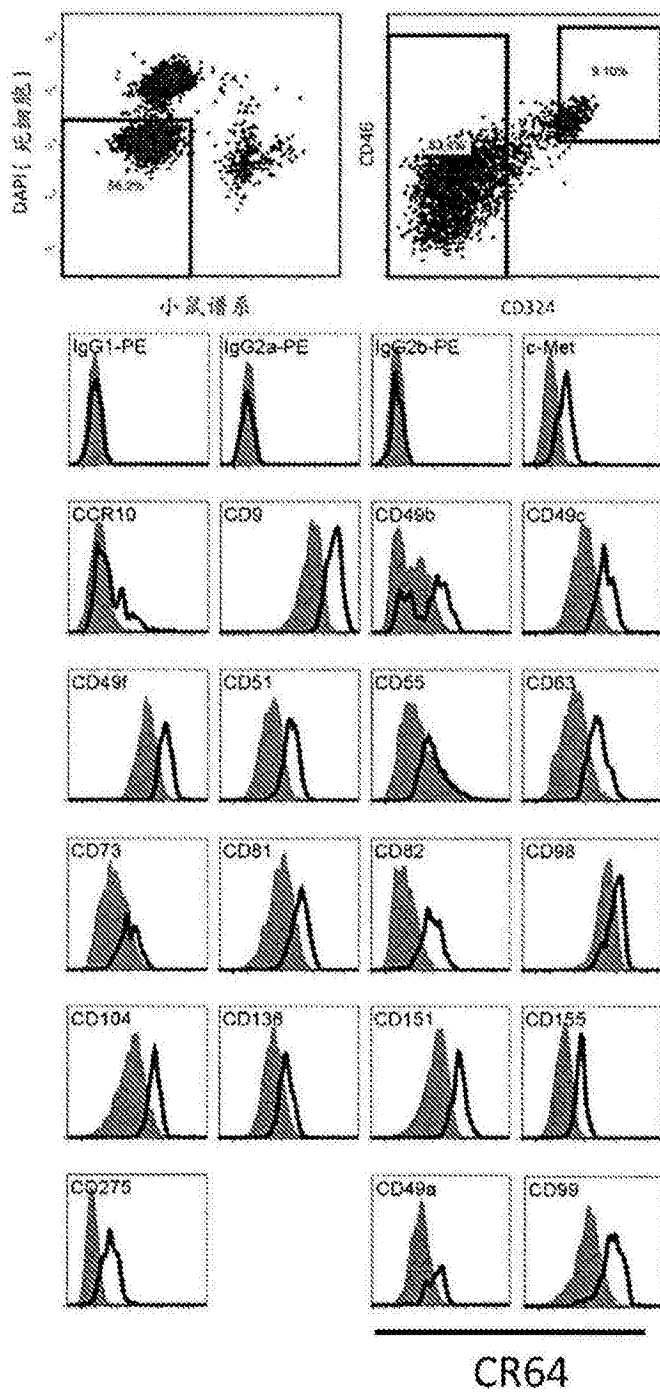


图10

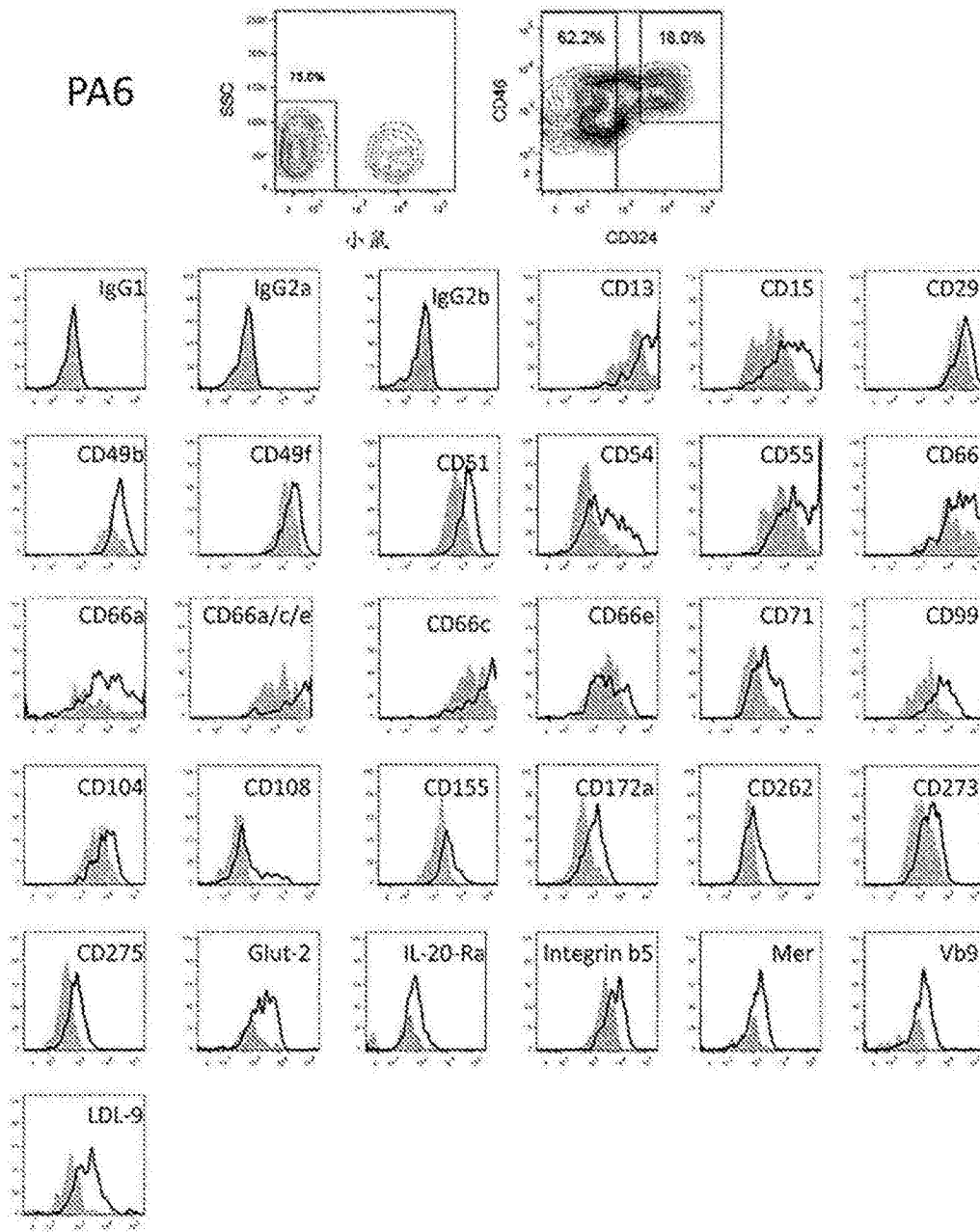


图11

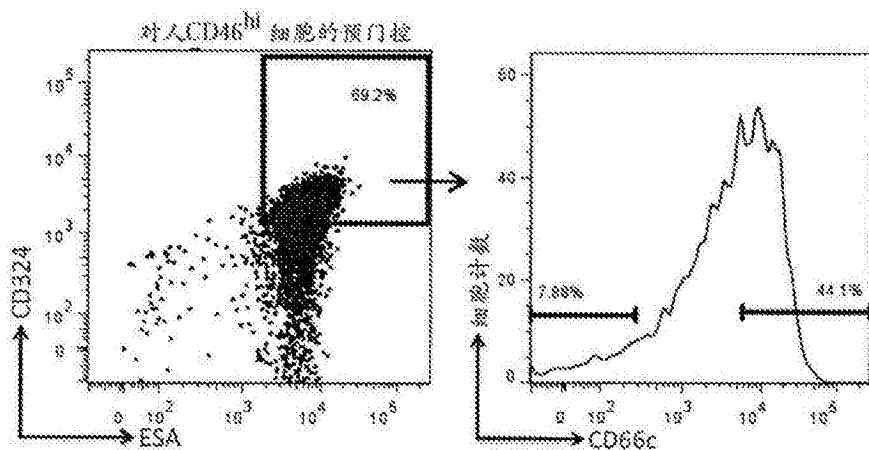


图13A

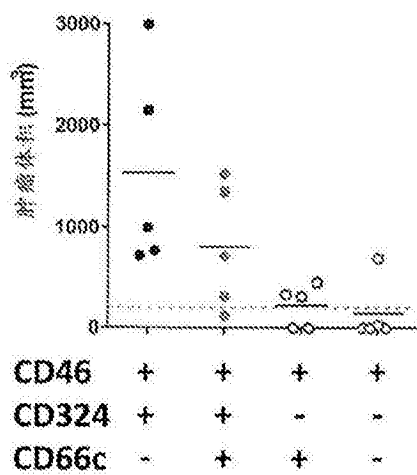
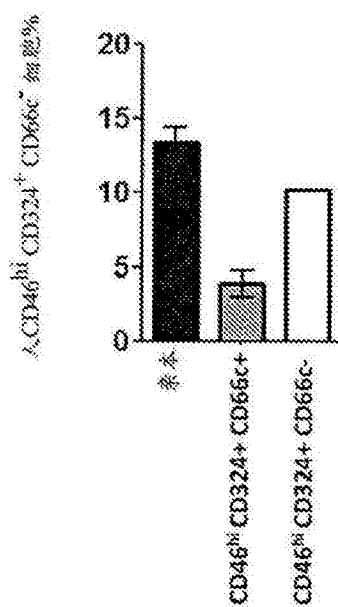


图13B



原发性移植物的特性

图13C

在源自以下细胞的肿瘤中表达CD66的细胞的分布

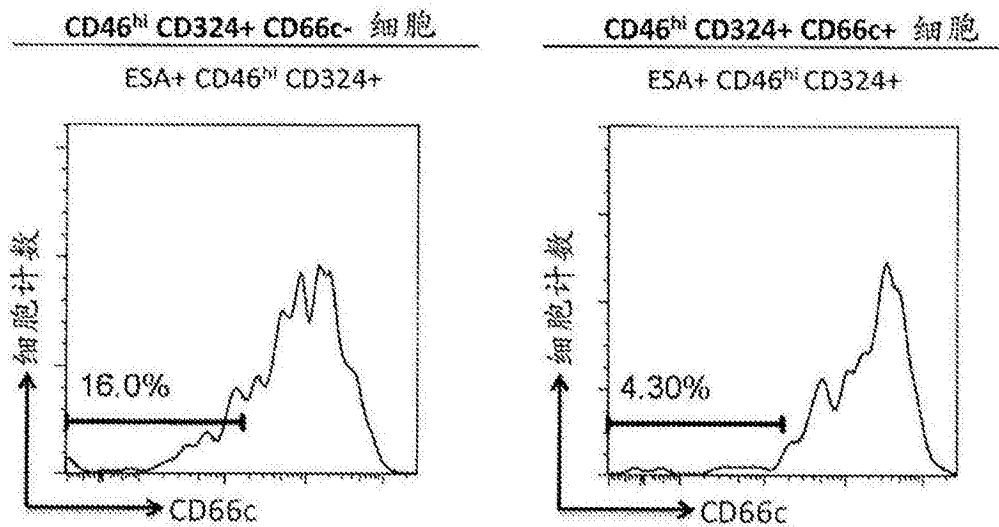


图14A

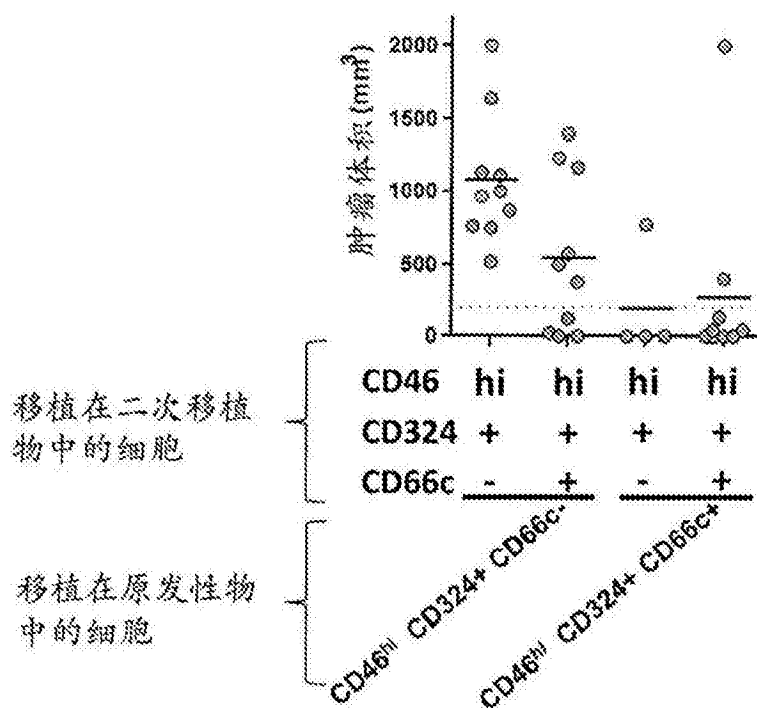


图14B

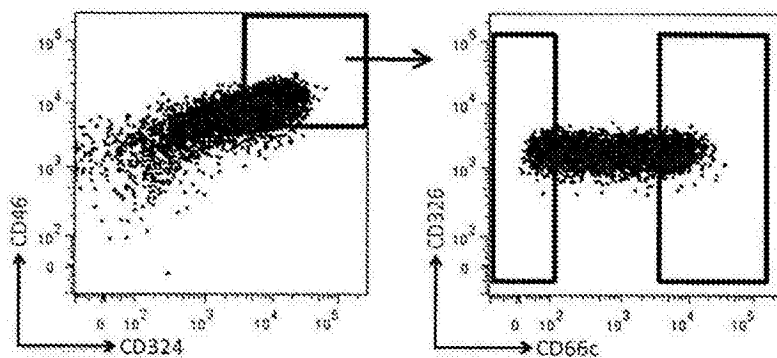


图15A

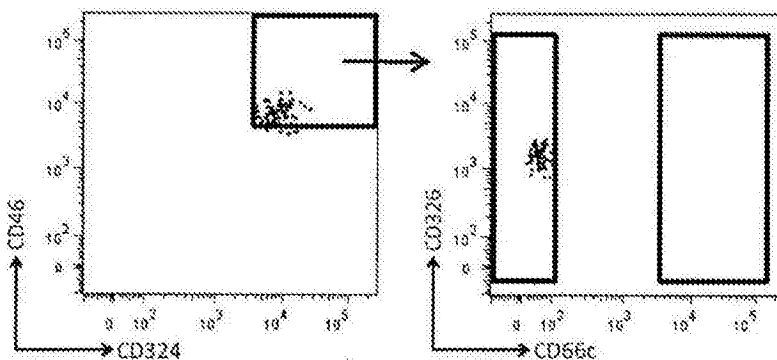


图15B

注射的CD46 ^{hi} CD324 ⁺ CD66c ⁻ 细胞数	注射的肿瘤/动物 (%)
1,000	19/19 (100%)
200	5/5 (100%)
50	9/9 (100%)
20	5/5 (100%)
8	3/5 (60%)
3	3/5 (60%)

图15C

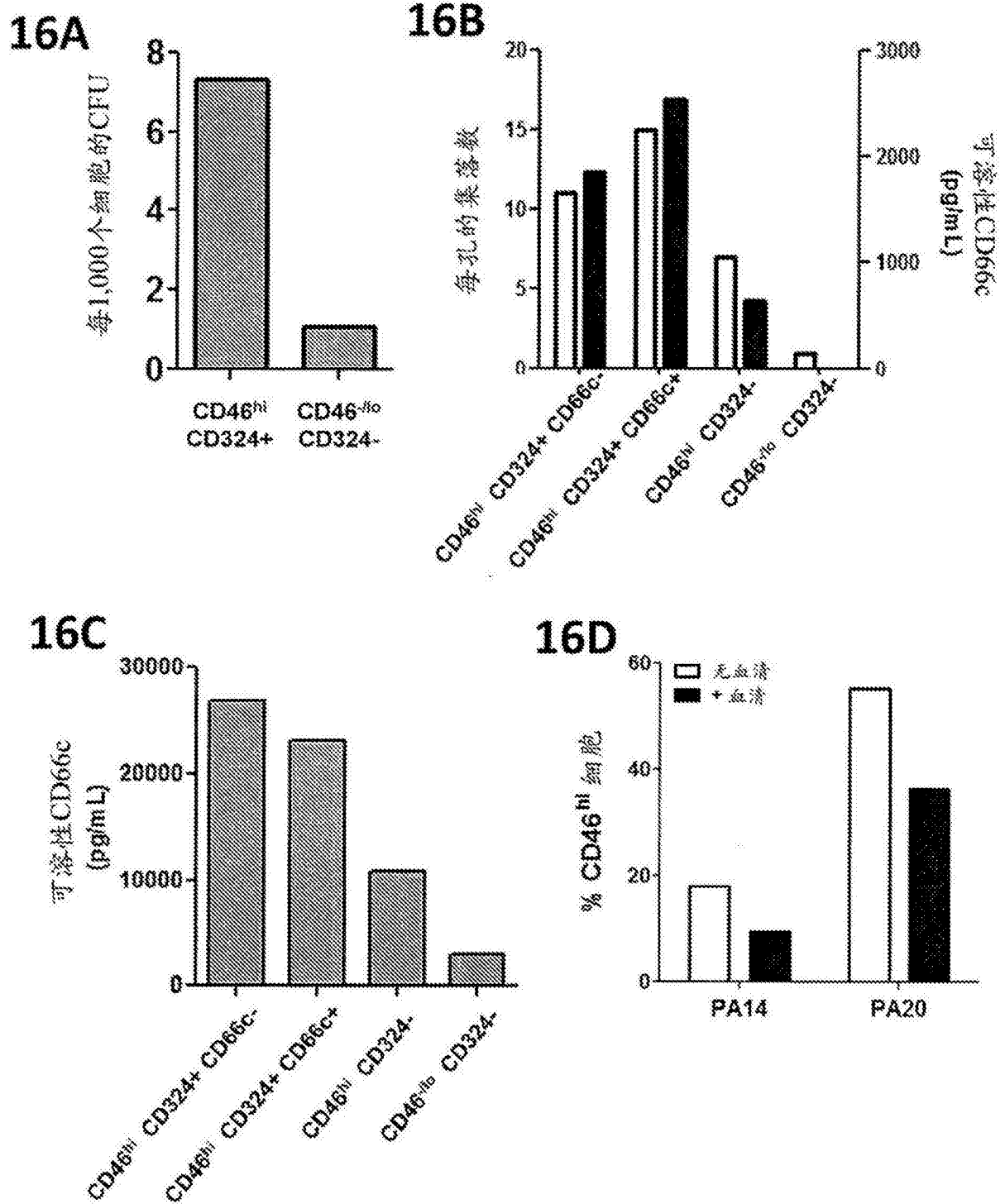
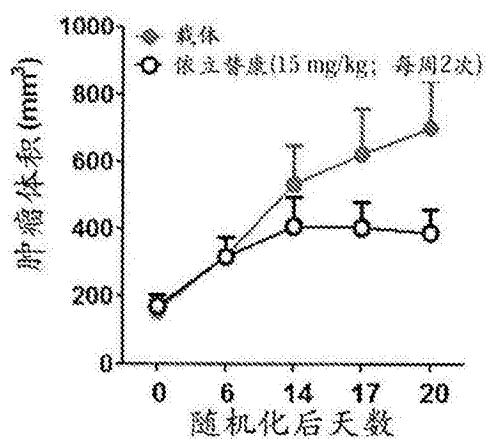
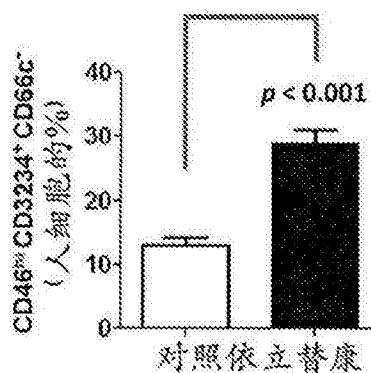


图16

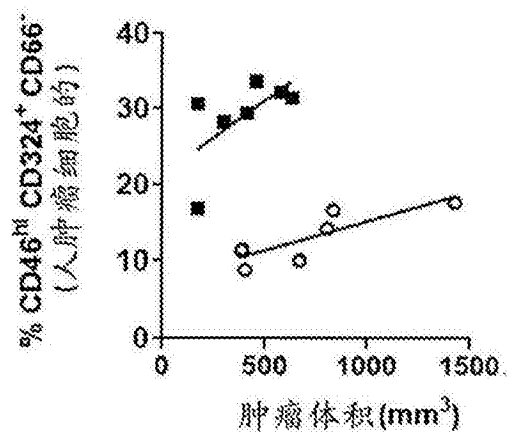
17A



17B



17C



17D

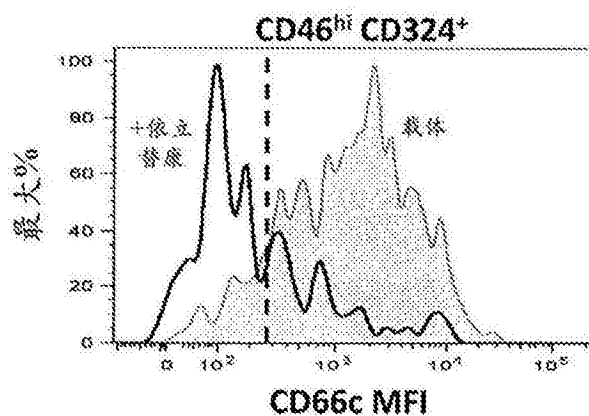


图17

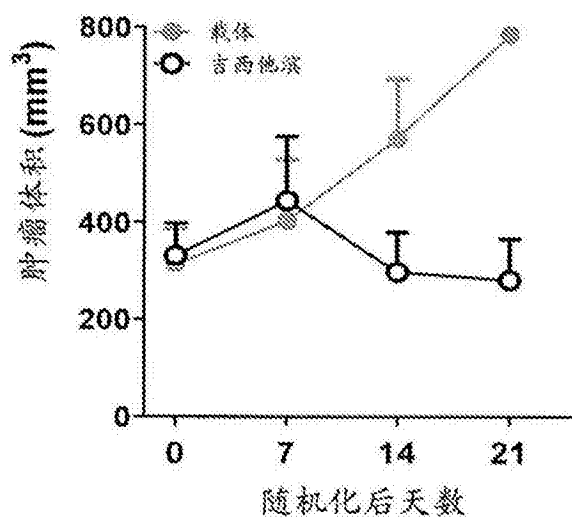


图18A

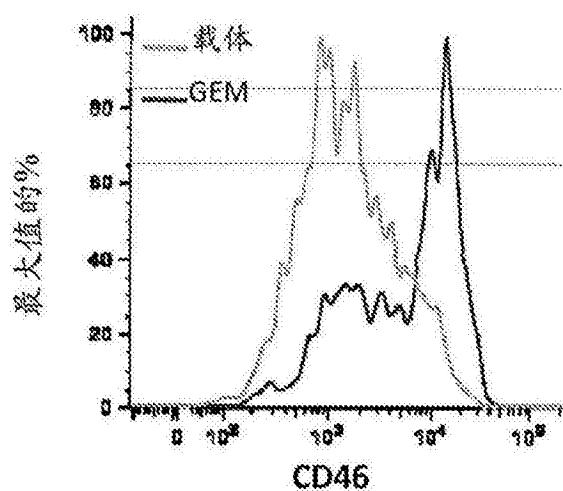


图18B

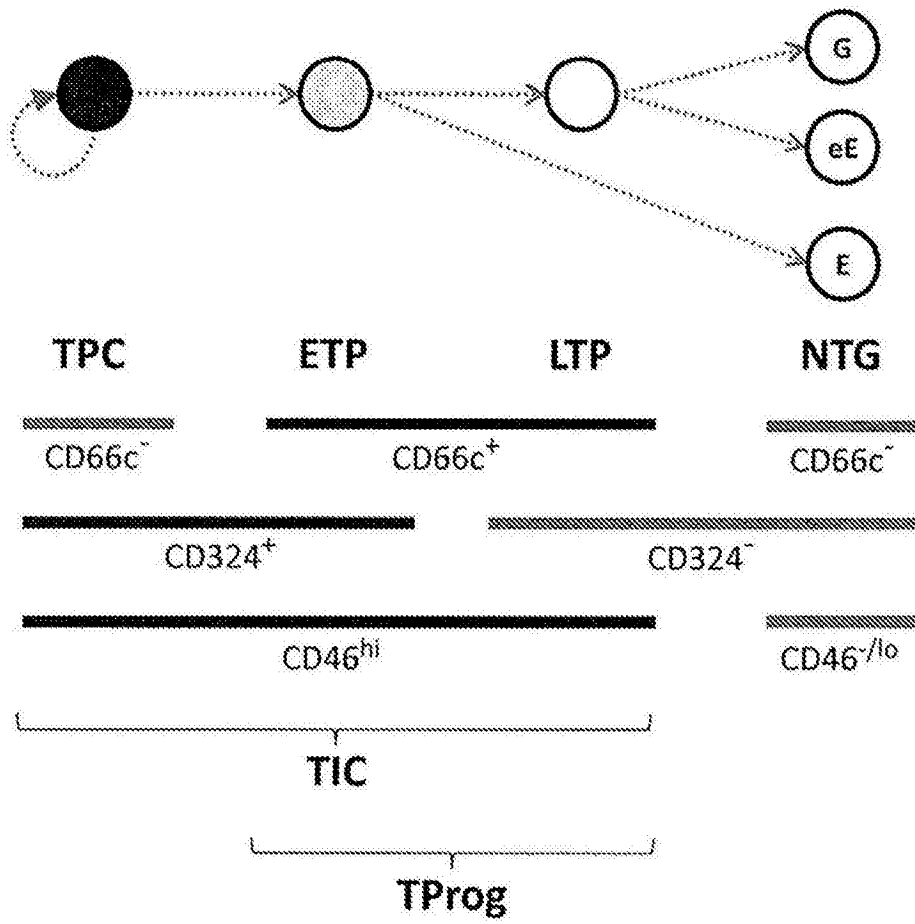


图19A

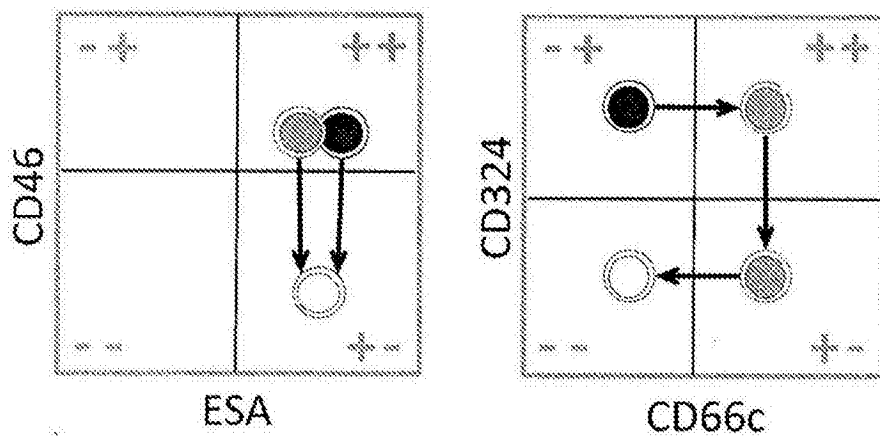
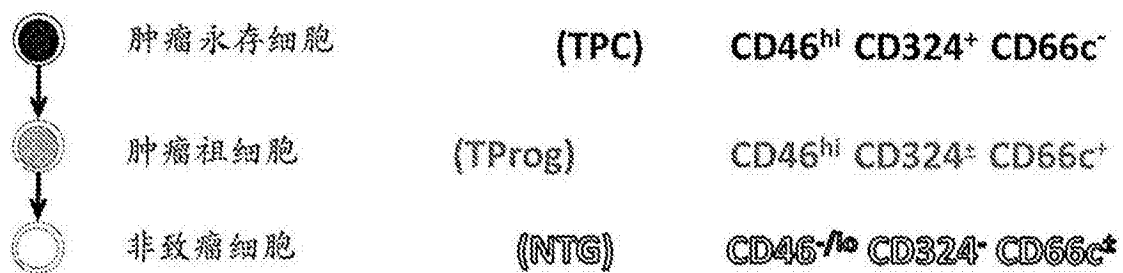
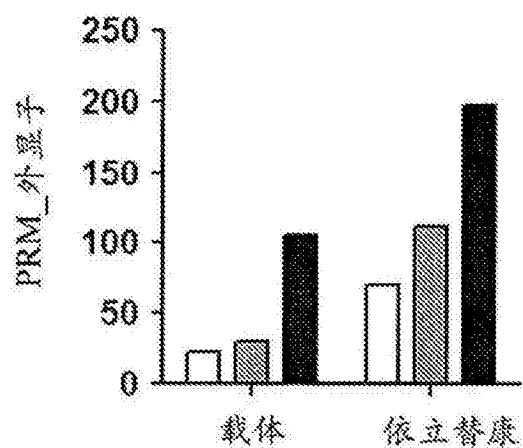
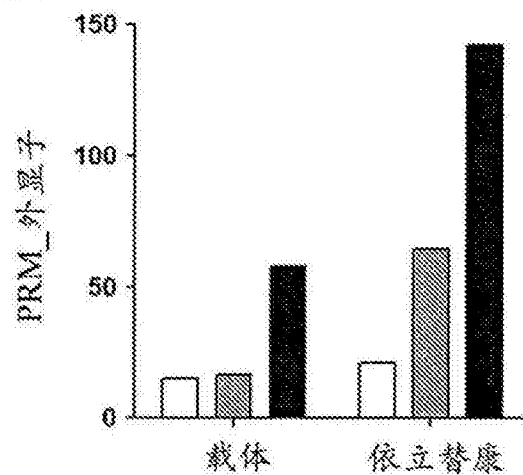


图19B

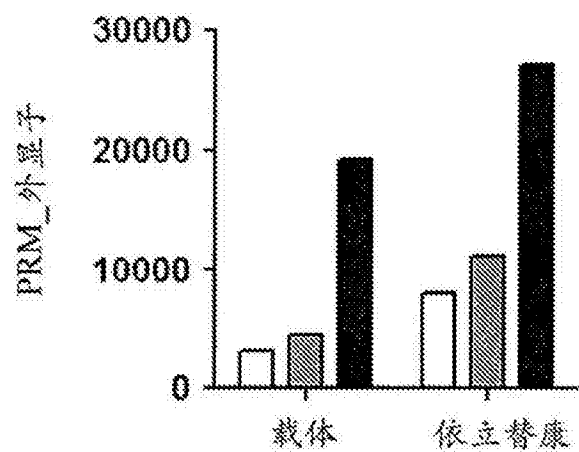
20A



20B



20C



20D

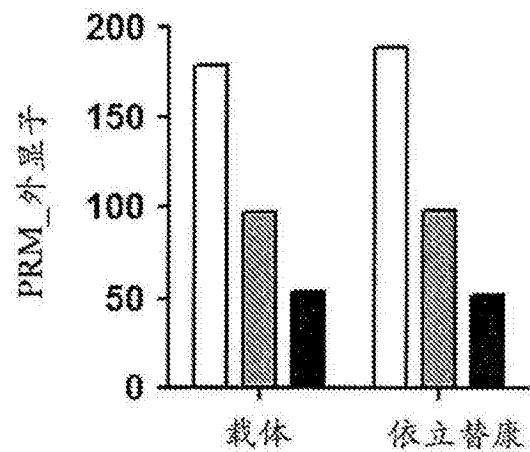


图20