



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102144163 A

(43) 申请公布日 2011. 08. 03

(21) 申请号 200980121922. 5

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

(22) 申请日 2009. 04. 10

代理人 罗菊华

(30) 优先权数据

61/043, 948 2008. 04. 10 US

61/053, 563 2008. 05. 15 US

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 12. 10

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/002254 2009. 04. 10

(87) PCT申请的公布数据

W02009/126310 EN 2009. 10. 15

(71) 申请人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

申请人 怀特黑德生物制剂研究所

(72) 发明人 P·古普塔 T·T·昂德尔

E·S·兰德尔 R·温伯格 S·马尼

M-J·廖

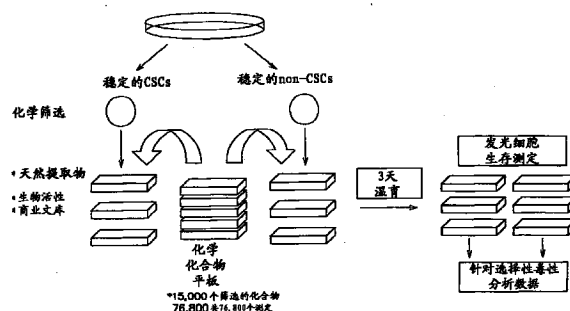
权利要求书 7 页 说明书 60 页 附图 39 页

(54) 发明名称

关于鉴定和使用靶向癌症干细胞的试剂的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于鉴定靶向癌症干细胞的化合物和组合物的方法。在某些方面,本发明涉及使用特异性靶向癌症干细胞的化合物和组合物的治疗方法,用于抑制有此需要的受试者中的癌症干细胞生长和/或存活。本发明的其他方面涉及癌症干细胞生物标记在用于抑制有此需要的受试者中的癌症干细胞生长和/或存活的治疗选择中的用途。



1. 用于测试化合物抑制癌症干细胞生长和 / 或存活的能力的方法,其包括
 - (a) 使一种或多种测试细胞与化合物的样品接触,其中所述一种或多种测试细胞已经历上皮至间质转变,和
 - (b) 检测通过所述化合物的所述一种或多种测试细胞的生长和 / 或存活抑制水平。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述上皮至间质转变起因于抑制所述一种或多种测试细胞中的 E- 钙粘蛋白活性。
3. 权利要求 2 的方法,其中所述抑制所述一种或多种测试细胞中的所述 E- 钙粘蛋白活性包括:使所述一种或多种测试细胞与针对 E- 钙粘蛋白的封闭抗体接触,诱导所述一种或多种测试细胞中的抗粘附蛋白表达,或干扰所述一种或多种测试细胞中的细胞极性基因。
4. 权利要求 2 的方法,其中所述抑制一种或多种测试细胞中的所述 E- 钙粘蛋白活性包括使所述一种或多种测试细胞与和 E- 钙粘蛋白 mRNA 互补的小干扰核酸接触。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述上皮至间质转变起因于诱导所述一种或多种测试细胞中的转录因子活性,其中所述转录因子选自:Snail1、Snail2、Goosecoid、FoxC2、TWIST、E2A、SIP-1/Zeb-2、dEF1/ZEB1、LEF1、Myc、HMGA2、TAZ、Klf8、HIF-1、HOXB7、SIM2s 和 Fos。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述上皮至间质转变起因于诱导 TWIST 的活性。
7. 权利要求 6 的方法,其中所述诱导所述一种或多种测试细胞中的所述 TWIST 活性包括使所述一种或多种测试细胞与编码 TWIST 的表达载体接触。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述上皮至间质转变起因于使所述一种或多种测试细胞与选自下述的生长因子接触:TGF- β /BMP 超家族成员、Wnt 家族成员、FGF 家族成员、Notch 配体、EGF 家族成员、IGF 家族成员、PDGF 和 HGF。
9. 权利要求 1 的方法,其中所述上皮至间质转变起因于调节所述一种或多种测试细胞中的信号途径活性,其中所述信号途径选自 TGF- β 、Wnt、BMP、Notch、HGF-Met、EGF、IGF、PDGF、FGF、P38-mapk、Ras、PI3Kinase-Akt、Src 和 NF-kB。
10. 权利要求 1 的方法,其中所述上皮至间质转变起因于对所述一种或多种测试细胞实施选自下述的应激:缺氧、照射和长期化学疗法治疗。
11. 权利要求 1 的方法,其中所述上皮至间质转变起因于对所述一种或多种测试细胞实施用烟碱、nAChR 激动剂、过氧化氢、C3a 或 MFG-E8 的处理。
12. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种测试细胞包括非致瘤性细胞。
13. 权利要求 1 的方法,其中所述一种或多种测试细胞包括致瘤性细胞。
14. 权利要求 1 的方法,其中所述方法包括
 - (a) 使一种或多种测试细胞和一种或多种对照细胞与化合物的样品接触,其中所述一种或多种测试细胞已经历上皮至间质转变,并且所述一种或多种对照细胞未经历 EMT,和
 - (b) 检测通过所述化合物的所述一种或多种测试细胞和对照细胞的生长和 / 或存活抑制水平;和
 - (c) 如果所述化合物对所述测试细胞的生长和 / 或存活具有比所述对照细胞更大的抑制作用,那么鉴定所述化合物为候选 CSC 选择性化学治疗剂。
15. 权利要求 14 的方法,其中所述测试细胞和对照细胞是遗传上匹配的。
16. 权利要求 14 的方法,其中所述测试细胞表达或包含抑制 E- 钙粘蛋白表达的小干扰 RNA,并且所述对照细胞不表达此类 RNA。

17. 权利要求 1-16 中任一项的方法,其进一步包括使一种或多种对照细胞与所述化合物的样品接触,并且检测通过所述化合物的所述一种或多种对照细胞的生长和 / 或存活抑制水平。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述一种或多种对照细胞是未经历上皮至间质转变的上皮细胞。

19. 权利要求 17 或权利要求 18 的方法,其中使所述一种或多种对照细胞与对照表达构建体或对照小干扰核酸接触。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述对照小干扰核酸不靶向所述一种或多种对照细胞的内源基因,任选地其中所述小干扰核酸靶向 GFPmRNA。

21. 权利要求 20 的方法,其中所述对照表达构建体编码 GFP。

22. 权利要求 21 的方法,其中所述对照表达构建体编码报道蛋白质。

23. 权利要求 18 的方法,其中所述一种或多种对照细胞包括非致瘤性细胞。

24. 权利要求 18 的方法,其中所述一种或多种对照细胞包括致瘤性细胞。

25. 权利要求 1-24 中任一项的方法,其中与至少一种其他测试细胞比较,所述一种或多种测试细胞各自与不同剂量的所述化合物接触,和 / 或与所述化合物接触不同持续时间;和 / 或其中与至少一种其他对照细胞比较,所述一种或多种对照细胞各自与不同剂量的所述化合物接触,和 / 或与所述化合物接触不同持续时间。

26. 权利要求 25 的方法,其进一步包括分析测试和 / 或对照剂量应答曲线,其中所述测试剂量应答曲线指示通过在多个剂量下的所述化合物的所述一种或多种测试细胞抑制水平;并且其中所述对照剂量应答曲线指示通过在多个剂量下的所述化合物的所述一种或多种对照细胞抑制水平。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述分析包括测定化合物对于所述一种或多种测试细胞和 / 或所述一种或多种对照细胞的 EC50 值。

28. 权利要求 27 的方法,其中所述化合物对于所述一种或多种对照细胞的所述 EC50 值在统计上明显小于所述化合物对于所述一种或多种测试细胞的所述 EC50 值。

29. 权利要求 27 的方法,其中所述化合物对于所述一种或多种对照细胞的所述 EC50 值在统计上明显大于所述化合物对于所述一种或多种测试细胞的所述 EC50 值。

30. 权利要求 25-28 中任一项的方法,其中所述化合物是对照化合物,任选地选自多柔比星、紫杉醇、放线菌素 D、喜树碱和星形孢菌素。

31. 权利要求 17-24 中任一项的方法,其中所述一种或多种对照细胞和所述一种或多种测试细胞在共培养中。

32. 权利要求 31 的方法,其中所述一种或多种测试细胞具有鉴定特征,其是可检测的并且不同于所述一种或多种对照细胞的鉴定特征,任选地其中所述鉴定特征包括 GFP 蛋白质和 / 或癌症干细胞生物标记的表达水平。

33. 权利要求 32 的方法,其中使所述一种或多种测试细胞中的 GFP 蛋白质表达水平与所述一种或多种对照细胞中的 GFP 蛋白质表达水平比较。

34. 权利要求 32 或权利要求 33 的方法,其进一步包括监控所述一种或多种测试细胞与所述一种或多种对照细胞的比,其中通过检测所述共培养物样品中每种细胞的鉴定特征,任选地其中所述检测包括荧光激活细胞分选。

35. 权利要求 1-24 中任一项的方法,其进一步包括测试多个测试样品,其中所述测试样品各自包括所述一种或多种测试细胞中的至少一种;和/或进一步包括测试多个对照样品,其中所述对照样品各自包括所述一种或多种对照细胞中的至少一种。

36. 权利要求 35 的方法,其中每种测试样品和/或每种对照样品在分开的培养小室中,任选地其中每个培养小室是多孔平板的孔。

37. 权利要求 36 的方法,其中所述多孔平板具有选自 6、12、24、96、384 或 1536 的孔数目。

38. 权利要求 1-24 和 35-37 中任一项的方法,其中所述化合物获自由多种化合物组成的文库,任选地其中所述文库选自天然产物文库、多样性文库、激酶抑制剂文库、HDAC 抑制剂文库、已知生物活性化合物文库、肽文库、抗体文库或 RNAi 文库。

39. 权利要求 38 的方法,其中所述接触所述一种或多种测试细胞包括将所述化合物的样品从所述文库转移到包含所述测试样品的培养小室;和/或其中所述接触所述一种或多种对照细胞包括将所述化合物的样品从所述文库转移到包含所述对照样品的培养小室。

40. 权利要求 39 的方法,其进一步包括鉴定对于所述一种或多种测试细胞比所述一种或多种对照细胞基本上更有细胞毒性的前导化合物,其中通过比较通过所述化合物的所述一种或多种测试细胞的生长和/或存活抑制水平与通过所述化合物的所述一种或多种对照细胞的生长和/或存活抑制水平。

41. 权利要求 40 的方法,其进一步包括使一种或多种癌细胞与所述前导化合物的样品接触;并且检测通过所述前导化合物的所述一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平。

42. 权利要求 41 的方法,其中所述一种或多种癌细胞获自结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、宫颈癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、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、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、肾母细胞瘤或睾丸瘤。

43. 权利要求 41 或 42 的方法,其中所述一种或多种癌细胞中的至少一种是癌症干细胞,其具有癌症干细胞生物标记。

44. 权利要求 35 或 43 的方法,其中所述癌症干细胞生物标记是 CD44⁺ 和 CD24⁻ 的细胞表面标记谱。

45. 权利要求 42 或 43 的方法,其中所述癌症干细胞是 MDA-MB-231、SUM159 或 T47D 乳腺癌细胞。

46. 权利要求 41-45 中任一项的方法,其中所述检测所述一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平包括测定其为至少一种癌症干细胞的所述一种或多种癌细胞的部分。

47. 权利要求 41-45 中任一项的方法,其中所述检测所述一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平包括测定所述一种或多种癌细胞在悬浮培养中形成集落的能力。

48. 权利要求 41-45 中任一项的方法,其中所述检测所述一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平包括测定所述一种或多种癌细胞在体内形成肿瘤的能力。

49. 权利要求 40-48 中任一项的方法,其进一步包括通过修饰所述前导化合物产生精制前导化合物,以达到 (i) 改善的效力、(ii) 降低的毒性,这可以任选是改善的治疗指数;(iii) 降低的副作用;(iv) 修饰的治疗作用发作和/或效应持续时间;和/或 (v) 修饰的药

代动力学参数,这可以任选是吸收、分布、代谢和 / 或排泄。

50. 权利要求 49 的方法,其进一步包括测定所述前导或精制前导化合物的体内毒理学谱,其中通过执行所述前导或精制前导化合物的定量结构活性关系分析。

51. 权利要求 49 或 50 的方法,其进一步包括通过用药学上可接受的载体配制所述前导或精制前导化合物产生药物组合物。

52. 权利要求 51 的方法,其进一步包括在体内测试所述前导或精制前导化合物,其中通过给具有癌细胞的受试者施用所述药物组合物,并且评估所述化合物对所述受试者的毒性和 / 或所述化合物对所述受试者中的所述癌细胞生长和 / 或存活的作用。

53. 权利要求 52 的方法,其中所述受试者选自小鼠、大鼠、兔、犬、猫、绵羊、猪、非人灵长类和人。

54. 权利要求 1-24 中任一项的方法,其进一步包括测定一种或多种癌症干细胞标记在所述测试细胞和 / 或所述对照细胞中的表达。

55. 权利要求 54 的方法,其中所述一种或多种癌症干细胞标记选自:CD20、CD24、CD34、CD38、CD44、CD45、CD105、CD133、CD166、EpCAM、ESA、SCA1、Pecam 和 Stro1。

56. 权利要求 55 的方法,其中所述一种或多种癌症干细胞标记是 CD24 和 CD44。

57. 权利要求 1-56 中任一项的方法,其中通过化合物的所述测试细胞和 / 或所述对照细胞的生长和 / 或存活抑制水平的检测包括执行选自下述的测定法:细胞计数测定法、复制标记测定法、细胞膜完整性测定法、基于细胞 ATP 的生存测定法、线粒体还原酶活性测定法、胱天蛋白酶活性测定法、膜联蛋白 V 染色测定法、DNA 含量测定法、DNA 降解测定法和核碎裂测定法。

58. 用于表征一种或多种细胞的方法,其包括

(a) 使所述一种或多种细胞与选自多柔比星、紫杉醇、放线菌素 D、喜树碱和星形孢菌素的化合物接触,

(b) 检测通过所述化合物的所述一种或多种细胞的生长和 / 或存活抑制水平,和

(c) 使 (b) 的结果和对照水平比较,其中如果通过所述化合物的所述一种或多种细胞的生长和 / 或存活抑制水平在统计上明显小于所述对照水平,那么所述一种或多种细胞具有癌症干细胞特征。

59. 权利要求 58 的方法,其进一步包括评估所述一种或多种细胞中的癌症干细胞生物标记或功能测定法。

60. 权利要求 59 的方法,其中所述癌症干细胞生物标记选自 E- 钙粘蛋白表达、TWIST 表达和 CD44/CD24 细胞表面标记谱。

61. 权利要求 59 的方法,其中所述功能测定法是集落形成测定法或体内肿瘤种植测定法。

62. 权利要求 58 的方法,其中所述对照水平是通过所述化合物的一种或多种癌细胞的生长和 / 或存活抑制水平,所述一种或多种癌细胞不是癌症干细胞。

63. 用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法,其包括给所述受试者施用与有效量的药物组合物组合的有效量的紫杉醇,所述药物组合物包括依托泊苷、沙利霉素、阿巴克丁或尼日利亚菌素。

64. 用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法,其包括给所述受试者施用有

效量的药物组合物,所述药物组合物包括依托泊苷、沙利霉素、阿巴克丁、尼日利亚菌素、或前述任何的衍生物。

65. 用于选择关于具有癌症的受试者治疗的方法,其包括评估所述癌症中的癌症干细胞生物标记,并且如果检测出所述癌症干细胞生物标记,那么通过给所述受试者施用有效量的药物组合物来治疗所述受试者,所述药物组合物包括沙利霉素、阿巴克丁、依托泊苷或尼日利亚菌素或其衍生物,任选地与紫杉醇或其衍生物组合。

66. 权利要求 65 的方法,其中所述癌症干细胞生物标记选自:E- 钙粘蛋白表达;TWIST 表达和 CD44/CD24 细胞表面标记谱。

67. 权利要求 63-66 中任一项的方法,其中评估所述癌症干细胞生物标记包括获得来自所述受试者的癌症样品。

68. 权利要求 66 的方法,其中所述癌症中的所述 E- 钙粘蛋白和 / 或 TWIST 表达这样进行测定:通过测量所述癌症中的 E- 钙粘蛋白和 / 或 TWIST 蛋白质和 / 或 RNA 表达水平,和任选地使所述水平与参考标准比较。

69. 权利要求 68 的方法,其中所述参考标准是癌症干细胞中的所述 E- 钙粘蛋白和 / 或 TWIST 蛋白质和 / 或 RNA 表达水平。

70. 权利要求 68 的方法,其中所述参考标准是癌细胞中的所述 E- 钙粘蛋白和 / 或 TWIST 蛋白质和 / 或 RNA 表达水平,所述癌细胞不是癌症干细胞。

71. 权利要求 63-70 中任一项的方法,其中所述癌症是结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、宫颈癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、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、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、肾母细胞瘤或睾丸瘤。

72. 权利要求 63-71 中任一项的方法,其中所述癌症是乳腺癌或肺癌。

73. 权利要求 63-72 中任一项的方法,其中所述受试者是哺乳动物,其任选地是人。

74. 权利要求 63-73 中任一项的方法,其中所述药物组合物静脉内、肌内、皮下、腹膜内、经口或作为气溶胶施用。

75. 用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法,其包括给所述受试者施用有效量的包括化合物的药物组合物,相对于未经历 EMT 的对照细胞的生长和 / 或增殖抑制,所述化合物选择性抑制已经历 EMT 的测试细胞生长和 / 或增殖。

76. 权利要求 75 的方法,其中所述测试和对照细胞是遗传上匹配的。

77. 权利要求 75 的方法,其中所述测试细胞是非致瘤性的。

78. 用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法,其包括给所述受试者施用有效量的化合物,相对于其对非 CSC 癌细胞的作用,所述化合物选择性抑制癌症干细胞增殖或杀死癌症干细胞。

79. 用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法,其包括给所述受试者施用有效量的化合物,相对于其对非癌性细胞的作用,所述化合物选择性抑制癌症干细胞增殖或杀死癌症干细胞。

80. 鉴定用于药物开发的靶的方法,其包括:

(a) 提供选择性抑制所述测试细胞生长和 / 或增殖的化合物,其中所述测试细胞是已经历 EMT 的细胞;和

(b) 鉴定所述化合物的生物靶。

81. 权利要求 80 的方法,其中所述生物靶是由所述测试细胞表达的蛋白质或 RNA。

82. 权利要求 80 的方法,其中所述化合物是表 1 中列出的化合物或其衍生物。

83. 权利要求 80 的方法,其进一步包括执行筛选,以鉴定与所述生物靶相互作用或作用于所述生物靶的第二种化合物。

84. 鉴定用于药物开发的靶的方法,其包括步骤:

(a) 使测试细胞或测试细胞裂解物与选择性抑制所述测试细胞生长和 / 或增殖的化合物接触,其中所述接触在其中所述化合物可以与细胞生物分子在物理上相互作用的条件下执行,并且其中所述测试细胞是已经历 EMT 的细胞;

(b) 分离与所述化合物在物理上相互作用的细胞生物分子;和

(c) 鉴定所述生物分子。

85. 权利要求 84 的方法,其进一步包括执行筛选,以鉴定与所述生物分子相互作用或作用于所述生物分子的第二种化合物。

86. 权利要求 84 的方法,其中所述化合物是表 1 中列出的化合物或其衍生物。

87. 权利要求 84 的方法,其中使所述化合物与载体附着,由此形成亲和基质。

88. 产生癌症干细胞的方法,所述方法包括诱导癌细胞经历 EMT。

89. 权利要求 88 的方法,其中所述癌细胞是实验上产生的癌细胞。

90. 权利要求 88 的方法,其中所述癌细胞衍生自天然存在的癌症。

91. 权利要求 88 的方法,其中所述上皮至间质转变起因于抑制所述癌细胞中的所述 E- 钙粘蛋白活性。

92. 权利要求 91 的方法,其中所述抑制所述癌细胞中的所述 E- 钙粘蛋白活性包括:使所述癌细胞与针对 E- 钙粘蛋白的封闭抗体接触,诱导所述癌细胞中的抗粘附蛋白表达,或干扰所述癌细胞中的细胞极性基因。

93. 权利要求 92 的方法,其中所述抑制癌细胞中的所述 E- 钙粘蛋白活性包括使所述癌细胞与和 E- 钙粘蛋白 mRNA 互补的小干扰核酸接触。

94. 权利要求 88 的方法,其中通过在一种或多种测试细胞中表达转录因子来诱导所述癌细胞经历 EMT,其中所述转录因子选自:Snail1、Snail2、Goosecoid、FoxC2、TWIST、E2A、SIP-1/Zeb-2、dEF1/ZEB1、LEF1、Myc、HMGA2、TAZ、Klf8、HIF-1、HOXB7、SIM2s 和 Fos。

95. 权利要求 94 的方法,其中通过组成性诱导所述转录因子活性来诱导所述癌细胞经历 EMT。

96. 权利要求 88 的方法,其中相对于未诱导经历 EMT 的癌细胞具有的可能性,所述癌症干细胞具有增加的下述可能性:(i) 起始肿瘤;(ii) 在软琼脂悬浮培养中形成集落;和 / 或 (iii) 形成肿瘤球。

97. 权利要求 89 的方法,其中所述实验上产生的癌细胞包括编码癌基因的表达载体。

98. 权利要求 97 的方法,其中所述癌基因是 V12H-RAS。

99. 权利要求 88 的方法,其进一步包括评估测试试剂抑制所述癌症干细胞增殖、在软琼脂悬浮培养中的集落形成、肿瘤球形成、和 / 或肿瘤起始能力的能力。

100. 权利要求 99 的方法,其中如果所述癌症干细胞的增殖、在软琼脂悬浮培养中的集落形成、肿瘤球形成、和 / 或肿瘤起始能力被抑制,那么所述测试试剂被鉴定为用于癌症治

疗的候选试剂。

101. 权利要求 88 的方法,其进一步包括将具有癌症干细胞性质的所述癌细胞引入动物宿主内。

102. 权利要求 101 的方法,其进一步包括评估所述测试试剂抑制所述动物宿主中的所述癌症干细胞增殖或肿瘤起始能力的能力。

103. 权利要求 102 的方法,其中如果所述癌症干细胞的增殖或肿瘤起始能力被抑制,那么所述测试试剂被鉴定为用于癌症治疗的候选试剂。

104. 癌症干细胞,其通过权利要求 88-98 中任一项的方法产生。

105. 动物宿主,其包括权利要求 104 的细胞。

106. 试剂盒,其包括具有权利要求 104 的癌症干细胞的容器。

107. 权利要求 106 的试剂盒,其进一步包括具有癌细胞的第二个容器,所述癌细胞未诱导经历 EMT,并且与已诱导经历 EMT 以产生癌症干细胞的癌细胞在遗传上匹配。

108. 权利要求 106 或 107 的试剂盒,其中所述一个或多个容器进一步包括冷冻保护剂。

关于鉴定和使用靶向癌症干细胞的试剂的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请根据 35U. S. C. § 119(e) 要求于 2008 年 4 月 10 日提交的美国临时申请序列号 61/043, 948, 和于 2008 年 5 月 15 日提交的申请序列号 61/053, 563 的优先权, 所述美国临时申请的完整内容通过引用合并入本文。

[0003] 政府资金

[0004] 本发明在批准号 N01-C0-12400 下由来自 National Institutes of Health 的 National Cancer Institute's Initiative for Chemical Genetics, 和在批准号 W81XWH-05-1-0268 下来自 U. S. Army Medical Research and Materiel Command 的政府支持进行。政府在本发明中拥有一定权利。

发明领域

[0005] 本发明涉及用于鉴定靶向癌症干细胞的化合物和组合物的方法。在某些方面, 本发明涉及使用特异性靶向癌症干细胞的化合物和组合物的治疗方法, 用于抑制有此需要的受试者中的癌症干细胞生长和 / 或存活。本发明的其他方面涉及癌症干细胞生物标记在用于抑制有此需要的受试者中的癌症干细胞生长和 / 或存活的治疗选择中的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 癌症可以起于许多遗传和后生改变, 其引起控制细胞迁移、增殖、分化和生长的机制中的缺陷。近期发现已证实肿瘤形成和生长通过在肿瘤内称为癌症干细胞的较小癌细胞亚群驱动。癌症干细胞 (CSCs) 是在肿瘤团块内的细胞, 其具有种植且产生次级肿瘤的能力, 且负责转移散布的癌症死亡率的主因。这个概念对于潜在癌症治疗的开发和临床前评估具有重大牵涉。

[0008] 发明概述

[0009] 癌症干细胞 (CSCs) 驱动肿瘤的长期生存。常规癌症治疗虽然在根除大块肿瘤方面是成功的, 但对隐伏的 CSCs 一般是较不有效的。由这些恶性细胞显示出的选择性药物抗性促成癌症中的显著发病率和死亡率。此外, CSCs 在动物模型中具有以有限稀释种植肿瘤的能力。因此, 需要特异性且选择性靶向 CSCs 的药物的需要。然而, 几个因素限制了有效鉴定此类药物的能力。关键限制是获得和维持 CSCs 培养物中的困难, 所述 CSCs 培养物在分离时分化且停止繁殖。因此, 开发靶向这个恶性亚类的药物候选物仍是癌症生物学家正在进行的挑战。

[0010] 本发明的一些方面基于用于鉴定新型治疗剂的方法的发现和开发, 所述新型治疗剂靶向癌症干细胞。在本发明的特定方面, 靶向癌症干细胞的疗法的发现通过高通量筛选方法来达到。在本发明的其他方面, 公开了特异性靶向癌症干细胞的化合物。因此, 本发明公开了通过高通量筛选方法鉴定的癌症干细胞靶向疗法及其用途。

[0011] 根据本发明的一个方面, 提供了用于测试化合物抑制癌症干细胞生长和 / 或存活的能力的方法。该方法包括 (a) 使一种或多种测试细胞与化合物的样品接触, 其中一种或多种测试细胞已经历上皮至间质转变, 和 (b) 检测通过化合物的一种或多种测试细胞的生

长和 / 或存活的抑制水平。

[0012] 在某些实施方案中, 上皮至间质转变起因于抑制一种或多种测试细胞中的 E- 钙粘蛋白活性。在某些实施方案中, 抑制一种或多种测试细胞中的 E- 钙粘蛋白活性包括使一种或多种测试细胞与针对 E- 钙粘蛋白的封闭抗体接触, 诱导一种或多种测试细胞中的抗粘附蛋白表达, 或干扰一种或多种测试细胞中的细胞极性基因。在某些实施方案中, 抑制一种或多种测试细胞中的 E- 钙粘蛋白活性包括使一种或多种测试细胞与和 E- 钙粘蛋白 mRNA 互补的小干扰核酸接触。

[0013] 在某些实施方案中, 上皮至间质转变起因于诱导一种或多种测试细胞中的转录因子活性, 其中所述转录因子选自 :Snail1、Snail2、Goosecoid、FoxC2、TWIST、E2A、SIP-1/Zeb-2、dEF1/ZEB1、LEF1、Myc、HMGA2、TAZ、Klf8、HIF-1、HOXB7、SIM2s 和 Fos。

[0014] 在某些实施方案中, 上皮至间质转变起因于诱导 TWIST 的活性。在某些实施方案中, 诱导一种或多种测试细胞中的 TWIST 活性包括使一种或多种测试细胞与编码 TWIST 的表达载体接触。

[0015] 在某些实施方案中, 上皮至间质转变起因于使一种或多种测试细胞与选自下述的生长因子接触 :TGF- β /BMP 超家族成员、Wnt 家族成员、FGF 家族成员、Notch 配体、EGF 家族成员、IGF 家族成员、PDGF 和 HGF。

[0016] 在某些实施方案中, 上皮至间质转变起因于调节一种或多种测试细胞中的信号途径活性, 其中所述信号途径选自 TGF- β 、Wnt、BMP、Notch、HGF-Met、EGF、IGF、PDGF、FGF、P38-mapk、Ras、PI3Kinase-Akt、Src 和 NF-kB。

[0017] 在某些实施方案中, 上皮至间质转变起因于对一种或多种测试细胞实施选自下述的应激 :缺氧、照射和长期化学治疗。在某些实施方案中, 上皮至间质转变起因于对一种或多种测试细胞实施用烟碱或活性氧生产者例如过氧化氢 (H_2O_2) 的处理。(参见例如, Dasgupta 等人 Nicotine induces cell proliferation, invasion and epithelial-mesenchymal transition in a variety of human cancer cell lines. Int J Cancer. 2009 年 1 月 1 日 ;124(1) :36-45 和 Lim 等人 Epigenetic changes induced by reactive oxygen species in hepatocellular carcinoma :methylation of the E-cadherin promoter. Gastroenterology. 2008 年 12 月 ;135(6) :2128-40, 2140. e1-8. Epub 2008 年 7 月 31 日.)。在某些实施方案中, 上皮至间质转变起因于对一种或多种测试细胞实施用 nAChR 激动剂、C3a 或 MFG-E8 的处理。(参见例如, Tang Z, 等人, C3a mediates epithelial-to-mesenchymal transition in proteinuric nephropathy, J Am Soc Nephrol. 2009 年 3 月 ;20(3) :459-60 ;Jinushi M, 等人, Milk fat globule EGF-8 promotes melanoma progression through coordinated Akt and twist signaling in the tumor microenvironment, Cancer Res. 2008 年 11 月 1 日 ;68(21) :8889-98.)

[0018] 在某些实施方案中, 一种或多种测试细胞包括非致瘤性细胞。

[0019] 在某些实施方案中, 一种或多种测试细胞在经历 EMT 后已变为致瘤性的。在其他实施方案中, 一种或多种测试细胞在经历 EMT 前已变为致瘤性的。

[0020] 在某些实施方案中, 该方法包括 (a) 使一种或多种测试细胞和一种或多种对照细胞与化合物的样品接触, 其中一种或多种测试细胞已经历上皮至间质转变, 并且一种或多种对照细胞未经历 EMT, (b) 检测通过化合物的一种或多种测试细胞和对照细胞的生长和 /

或存活抑制水平 ;和 (c) 如果化合物对测试细胞的生长和 / 或存活具有比对照细胞更大的抑制作用,那么鉴定化合物为候选 CSC 选择性化学治疗剂。在特定实施方案中,测试细胞和对照细胞是遗传上匹配的。在某些实施方案中,测试细胞表达或包含抑制 E- 钙粘蛋白表达的小干扰 RNA,并且对照细胞不表达此类 RNA。

[0021] 在某些实施方案中,该方法进一步包括使一种或多种对照细胞与化合物的样品接触,并且检测通过化合物的一种或多种对照细胞的生长和 / 或存活抑制水平。在某些实施方案中,一种或多种对照细胞是未经历上皮至间质转变的上皮细胞。在特定实施方案中,使一种或多种对照细胞与对照表达构建体或对照小干扰核酸接触。在某些实施方案中,对照小干扰核酸不靶向一种或多种对照细胞的内源基因,任选地其中所述小干扰核酸靶向 GFP mRNA。在某些实施方案中,对照表达构建体编码 GFP 蛋白质或报道蛋白质。在某些实施方案中,一种或多种对照细胞包括非致瘤性细胞。在其他实施方案中,一种或多种对照细胞包括致瘤性细胞。

[0022] 在该方法的某些实施方案中,与至少一种其他测试细胞比较,一种或多种测试细胞各自与不同剂量的化合物接触,和 / 或与化合物接触不同持续时间 ;和 / 或其中与至少一种其他对照细胞比较,一种或多种对照细胞各自与不同剂量的化合物接触,和 / 或与化合物接触不同持续时间。在特定实施方案中,该方法进一步包括分析测试和 / 或对照剂量应答曲线,其中测试剂量应答曲线指示通过在多个剂量下的化合物的一种或多种测试细胞抑制水平 ;并且其中对照剂量应答曲线指示通过在多个剂量下的化合物的一种或多种对照细胞抑制水平。在某些实施方案中,分析包括测定化合物对于一种或多种测试细胞和 / 或一种或多种对照细胞的 EC50 值。在特定实施方案中,化合物对于一种或多种对照细胞的 EC50 值在统计上明显小于化合物对于一种或多种测试细胞的 EC50 值。在其他实施方案中,化合物对于一种或多种对照细胞的 EC50 值在统计上明显大于化合物对于一种或多种测试细胞的 EC50 值。

[0023] 在某些实施方案中,化合物是对照化合物,任选地选自多柔比星、紫杉醇、放线菌素 D、喜树碱和星形孢菌素。

[0024] 在某些实施方案中,一种或多种对照细胞和一种或多种测试细胞在共培养中。在特定实施方案中,一种或多种测试细胞具有鉴定特征,其是可检测的并且不同于一种或多种对照细胞的鉴定特征,任选地其中所述鉴定特征包括 GFP 蛋白质和 / 或癌症干细胞生物标记的表达水平。在某些实施方案中,使一种或多种测试细胞中的 GFP 蛋白质表达水平与一种或多种对照细胞中的 GFP 蛋白质表达水平比较。在某些实施方案中,该方法进一步包括监控一种或多种测试细胞与一种或多种对照细胞的比,通过检测共培养物样品中每种细胞的鉴定特征,任选地其中所述检测包括荧光激活细胞分选。

[0025] 在某些实施方案中,该方法进一步包括测试多个测试样品,其中所述测试样品各自包括一种或多种测试细胞中的至少一种 ;和 / 或进一步包括测试多个对照样品,其中所述对照样品各自包括一种或多种对照细胞中的至少一种。在某些实施方案中,每种测试样品和 / 或每种对照样品在分开的培养小室中,任选地其中每个培养小室是多孔平板的孔。在某些实施方案中,多孔平板具有选自 6、12、24、96、384 或 1536 的孔数目。

[0026] 在某些实施方案中,化合物得自由多种化合物组成的文库,任选地其中所述文库选自天然产物文库、多样性文库、激酶抑制剂文库、HDAC 抑制剂文库、已知生物活性化合物

文库、肽文库、抗体文库或 RNAi 文库。在特定实施方案中,接触一种或多种测试细胞包括将化合物的样品从文库转移到包含测试样品的培养小室;和/或其中接触一种或多种对照细胞包括将化合物的样品从文库转移到包含对照样品的培养小室。在某些实施方案中,该方法进一步包括鉴定对于一种或多种测试细胞比一种或多种对照细胞基本上更有细胞毒性的前导化合物,通过比较通过化合物的一种或多种测试细胞的生长和/或存活抑制水平与通过化合物的一种或多种对照细胞的生长和/或存活抑制水平。在特定实施方案中,该方法进一步包括使一种或多种癌细胞与前导化合物的样品接触;并且检测通过前导化合物的一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平。在某些实施方案中,一种或多种癌细胞得自结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、宫颈癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、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、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、肾母细胞瘤或睾丸瘤。在特定实施方案中,一种或多种癌细胞中的至少一种是癌症干细胞,其具有癌症干细胞生物标记。

[0027] 在某些实施方案中,癌症干细胞生物标记是 CD44⁺ 和 CD24⁻ 的细胞表面标记谱。在某些实施方案中,癌症干细胞是 MDA-MB-231、SUM159 或 T47D 乳腺癌细胞。

[0028] 在某些实施方案中,检测一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平包括测定其为至少一种癌症干细胞的一种或多种癌细胞的部分。

[0029] 在某些实施方案中,检测一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平包括测定一种或多种癌细胞在悬浮培养中形成集落的能力。

[0030] 在某些实施方案中,检测一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平包括测定一种或多种癌细胞在体内形成肿瘤的能力。

[0031] 在某些实施方案中,该方法进一步包括通过修饰前导化合物产生精制前导化合物,以达到 (i) 改善的效力、(ii) 降低的毒性(改善的治疗指数);(iii) 降低的副作用;(iv) 修饰的治疗作用发作和/或效应持续时间;和/或 (v) 修饰的药代动力学参数(吸收、分布、代谢和/或排泄)。在特定实施方案中,该方法进一步包括测定前导或精制前导化合物的体内毒理学谱,其通过执行前导或精制前导化合物的定量结构活性关系分析。在某些实施方案中,该方法进一步包括通过用药学上可接受的载体配制前导或精制前导化合物产生药物组合物。在某些实施方案中,该方法进一步包括在体内测试前导或精制前导化合物,其通过给具有癌细胞的受试者施用药物组合物,并且评估化合物对受试者的毒性和/或化合物对受试者中的癌细胞生长和/或存活的作用。在特定实施方案中,受试者选自小鼠、大鼠、兔、犬、猫、绵羊、猪、非人灵长类和人。

[0032] 在某些实施方案中,该方法进一步包括测定一种或多种癌症干细胞标记在测试细胞和/或对照细胞中的表达。在特定实施方案中,一种或多种癌症干细胞标记选自:CD20、CD24、CD34、CD38、CD44、CD45、CD105、CD133、CD166、EpCAM、ESA、SCA1、Pecam 和 Stro1。在某些实施方案中,一种或多种癌症干细胞标记是 CD24 和 CD44。

[0033] 在某些实施方案中,检测通过化合物的测试细胞和/或对照细胞的生长和/或存活抑制水平包括执行选自下述的测定法:细胞计数测定法、复制标记测定法、细胞膜完整性测定法、基于细胞 ATP 的生存测定法、线粒体还原酶活性测定法、胱天蛋白酶活性测定法、膜联蛋白 V 染色测定法、DNA 含量测定法、DNA 降解测定法和核碎裂测定法。

[0034] 根据本发明的另一个方面,提供了用于表征一种或多种细胞的方法。该方法包括(a)使一种或多种细胞与选自多柔比星、紫杉醇、放线菌素 D、喜树碱和星形孢菌素的化合物接触,(b)检测通过化合物的一种或多种细胞的生长和/或存活抑制水平,和(c)使(b)的结果和对照水平比较,其中如果通过化合物的一种或多种细胞的生长和/或存活抑制水平在统计上明显小于对照水平,那么一种或多种细胞具有癌症干细胞特征。

[0035] 在某些实施方案中,该方法进一步包括评估一种或多种细胞中的癌症干细胞生物标记。在特定实施方案中,癌症干细胞生物标记选自 E-钙粘蛋白表达、TWIST 表达和 CD44/CD24 cell 细胞表面标记谱。在某些实施方案中,功能测定法是集落形成测定法或体内肿瘤种植测定法。

[0036] 在某些实施方案中,对照水平是通过化合物的一种或多种癌细胞的生长和/或存活抑制水平,所述一种或多种癌细胞不是癌症干细胞。

[0037] 根据本发明的另一个方面,提供了用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法。该方法包括给受试者施用与有效量的药物组合物组合的有效量的紫杉醇,所述药物组合物包括依托泊苷、沙利霉素、阿巴克丁或尼日利亚菌素。

[0038] 根据本发明的另一个方面,提供了用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法。该方法包括给受试者施用有效量的药物组合物,所述药物组合物包括依托泊苷、沙利霉素、阿巴克丁、尼日利亚菌素、或前述任何的衍生物。

[0039] 根据本发明的另一个方面,提供了用于选择关于具有癌症的受试者治疗的方法。该方法包括评估癌症中的癌症干细胞生物标记,并且如果检测出癌症干细胞生物标记,那么通过给受试者施用有效量的药物组合物来治疗受试者,所述药物组合物包括沙利霉素、阿巴克丁、依托泊苷或尼日利亚菌素或其衍生物,任选地与紫杉醇或其衍生物组合。

[0040] 在某些实施方案中,评估癌症干细胞生物标记包括获得来自受试者的癌症样品。

[0041] 在某些实施方案中,癌症干细胞生物标记选自:E-钙粘蛋白表达;TWIST 表达和 CD44/CD24 cell 细胞表面标记谱。在特定实施方案中,癌症中的 E-钙粘蛋白和/或 TWIST 表达这样进行测定:通过测量癌症中的 E-钙粘蛋白和/或 TWIST 蛋白质和/或 RNA 表达水平,和任选地使该水平与参考标准比较。在某些实施方案中,参考标准是癌症干细胞中的 E-钙粘蛋白和/或 TWIST 蛋白质和/或 RNA 表达水平。在其他实施方案中,参考标准是癌细胞中的 E-钙粘蛋白和/或 TWIST 蛋白质和/或 RNA 表达水平,所述癌细胞不是癌症干细胞。

[0042] 在某些实施方案中,癌症是结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、宫颈癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、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、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、肾母细胞瘤或睾丸瘤。在特定实施方案中,癌症是乳腺癌或肺癌。

[0043] 在某些实施方案中,受试者是哺乳动物,其任选地是人。

[0044] 在某些实施方案中,药物组合物静脉内、肌内、皮下、腹膜内、经口或作为气溶胶施用。

[0045] 根据本发明的另一个方面,提供了用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法。该方法包括给受试者施用有效量的包括化合物的药物组合物,相对于未经历 EMT 的

对照细胞的生长和 / 或增殖抑制,所述化合物选择性抑制已经历 EMT 的测试细胞生长和 / 或增殖。

[0046] 在某些实施方案中,测试和对照细胞是遗传上匹配的。

[0047] 在某些实施方案中,测试细胞是非致瘤性的。

[0048] 根据本发明的另一个方面,提供了用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法。该方法包括给受试者施用有效量的化合物,相对于其对非 CSC 癌细胞的作用,所述化合物选择性抑制癌症干细胞增殖或杀死癌症干细胞。

[0049] 根据本发明的另一个方面,提供了用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法。该方法包括给受试者施用有效量的化合物,相对于其对非癌性细胞的作用,所述化合物选择性抑制癌症干细胞增殖或杀死癌症干细胞。

[0050] 根据本发明的另一个方面,提供了鉴定用于药物开发的靶的方法。该方法包括步骤:提供选择性抑制测试细胞生长和 / 或增殖的化合物,其中所述测试细胞是已经历 EMT 的细胞;并且鉴定化合物的生物靶。

[0051] 在某些实施方案中,生物靶是由测试细胞表达的蛋白质或 RNA。

[0052] 在某些实施方案中,化合物是表 1 中列出的化合物或其衍生物。

[0053] 在某些实施方案中,该方法进一步包括执行筛选,以鉴定与生物靶相互作用或作用于生物靶的第二种化合物。

[0054] 根据本发明的另一个方面,提供了鉴定用于药物开发的靶的方法。该方法包括步骤:使测试细胞或测试细胞裂解物与选择性抑制测试细胞生长和 / 或增殖的化合物接触,其中所述接触在其中化合物可以与细胞生物分子在物理上相互作用的条件下执行,并且其中测试细胞是已经历 EMT 的细胞;分离与化合物在物理上相互作用的细胞生物分子;和鉴定生物分子。

[0055] 在某些实施方案中,该方法进一步包括执行筛选,以鉴定与生物分子相互作用或作用于生物分子的第二种化合物。

[0056] 在某些实施方案中,化合物是表 1 中列出的化合物或其衍生物。

[0057] 在某些实施方案中,使化合物与载体附着,由此形成亲和基质。

[0058] 根据本发明的另一个方面,提供了产生癌症干细胞的方法。该方法包括诱导癌细胞经历 EMT。

[0059] 在某些实施方案中,癌细胞是实验上产生的癌细胞。在某些实施方案中,实验上产生的癌细胞包括编码癌基因的表达载体。在特定实施方案中,癌基因是 V12H-RAS。

[0060] 在某些实施方案中,癌细胞衍生自天然存在的癌症。

[0061] 在某些实施方案中,上皮至间质转变起因于抑制癌细胞中的 E- 钙粘蛋白活性。在特定实施方案中,抑制癌细胞中的 E- 钙粘蛋白活性包括:使癌细胞与针对 E- 钙粘蛋白的封闭抗体接触,诱导癌细胞中的抗粘附蛋白表达,或干扰癌细胞中的细胞极性基因。在特定其他实施方案中,抑制癌细胞中的 E- 钙粘蛋白活性包括使癌细胞与和 E- 钙粘蛋白 mRNA 互补的小干扰核酸接触。

[0062] 在某些实施方案中,通过在一种或多种测试细胞中表达转录因子来诱导癌细胞经历 EMT,其中所述转录因子选自:Snail1、Snail2、Goosecoid、FoxC2、TWIST、E2A、SIP-1/Zeb-2、dEF1/ZEB1、LEF1、Myc、HMGA2、TAZ、Klf8、HIF-1、HOXB7、SIM2s 和 Fos。在特定实施

方案中,通过组成性诱导转录因子活性来诱导癌细胞经历 EMT。

[0063] 在某些实施方案中,相对于未诱导经历 EMT 的癌细胞具有的可能性,癌症干细胞具有增加的下述可能性:(i) 起始肿瘤;(ii) 在软琼脂悬浮培养中形成集落;和/或(iii) 形成肿瘤球。

[0064] 在某些实施方案中,该方法进一步包括评估测试试剂抑制癌症干细胞增殖、在软琼脂悬浮培养中的集落形成、肿瘤球形成、和/或肿瘤起始能力的能力。在特定实施方案中,如果抑制癌症干细胞的增殖、在软琼脂悬浮培养中的集落形成、肿瘤球形成、和/或肿瘤起始能力,那么测试试剂被鉴定为用于癌症治疗的候选试剂。

[0065] 在某些实施方案中,该方法进一步包括将具有癌症干细胞性质的癌细胞引入动物宿主内。在特定实施方案中,该方法进一步包括评估测试试剂抑制动物宿主中的癌症干细胞增殖或肿瘤起始能力的能力。在特定实施方案,如果抑制癌症干细胞的增殖或肿瘤起始能力,那么测试试剂被鉴定为用于癌症治疗的候选试剂。

[0066] 根据本发明的某些方面,提供了通过前述方法中的任何产生的癌症干细胞。

[0067] 根据本发明的其他方面,提供了包括前述癌症干细胞的动物宿主。

[0068] 根据本发明的其他方面,提供了包括具有癌细胞的容器的试剂盒,所述癌细胞已使用本文公开的方法中的任何一种诱导经历 EMT,以产生癌症干细胞。在某些实施方案中,试剂盒进一步包括具有癌细胞的第二个容器,所述癌细胞未诱导经历 EMT,并且与已诱导经历 EMT 以产生癌症干细胞的癌细胞在遗传上匹配。

[0069] 根据本发明的其他方面,提供了包括具有非癌细胞的容器的试剂盒,所述癌细胞已使用本文公开的方法中的任何一种诱导经历 EMT,以产生非癌症干细胞。在某些实施方案中,试剂盒进一步包括具有非癌细胞的第二个容器,所述非癌细胞未诱导经历 EMT,并且与已诱导经历 EMT 以产生非癌症干细胞的非癌细胞在遗传上匹配。

[0070] 在特定实施方案中,与试剂盒一起提供的一个或多个容器进一步包括冷冻保护剂。应当理解试剂盒并不限于任何一种具体冷冻保护剂,并且技术人员将能够选择合适的冷冻保护剂(例如,DMSO)。用于细胞的低温保存的示例性方法和试剂公开于 Freshney R. I., *Culture of Animal Cells, A Manual of Basic Technique*, 第 4 版,第 19 章, Wiley-Liss, Inc. (2000) 中。

[0071] 附图简述

[0072] 图 1 描述了 E-钙粘蛋白抑制和 EMT 诱导对转移、原发性肿瘤发生率、乳腺球形成能力和抗原标记表达的作用。图 1A 描述了在永生化的 HMLE 和经转化的 HMLER 细胞中的 E-钙粘蛋白和间质蛋白质 N-钙粘蛋白和波形蛋白表达水平。 β -肌动蛋白用作装载对照。底图显示细胞角蛋白 8 在 shCntrl 和 shEcad HMLER 细胞中的表达。图 1B 描述了(左侧)荷有 HMLER-shCntrl 和 shEcad 细胞的正位原发性肿瘤(orthotopic primary tumor)或这些系的尾静脉注射后 8 周的小鼠中的肺转移总负荷的定量。每个条代表分析的 5 只小鼠/组的平均值 $\pm$ s. d. (* $p < 0.001$)。右侧:荷有 HMLER-shCntrl 和 shEcad 细胞的正位原发性肿瘤的小鼠肺叶的代表性荧光图像。GFP 信号指示肿瘤细胞的存在。还显示的是来自相同肺组的切片用抗 T 抗体的代表性免疫组织化学染色。褐色核染色指示肿瘤细胞。N,肺组织;M,转移小结(右图)。图 1C 描述了通过 HMLER-shCntrl 和 HMLER-shEcad 细胞形成的原发性皮下肿瘤的生长模式。每个数据点代表 8 个原发性肿瘤的平均值(标准差 $\pm$ s. d.)。

图 1D 描述了在温育 10 周后用 HMLER-shCntrl 或 HMLER-shEcad 细胞以所示数目的注射细胞接种的 NOD/Scid 小鼠中的皮下肿瘤发生率。应当指出尽管 HMLER-shCntrl 细胞在较低稀释度下无法起始肿瘤,但 HMLER-shEcad 保留这样的能力。(E)HMLE 和 HMLER 衍生细胞系就 CD24 和 CD44 表达而言的流式细胞术分析。红圈指示 CD24⁺CD44⁺CSC 样部分。应当指出表达 shE-Cad 的永生化 (HMLE) 和经转化的 (HMLER) 细胞包含明显更大数目显示 CSC 抗原谱的细胞

[0073] 图 2 描述了通过 EMT 的传代导致对常规化学治疗药物的抗性。图 2A 描述了用紫杉醇和多柔比星处理的经转化的 HMLERshCntrl (浅灰色线) 和 HMLERshEcad (深灰色线) 细胞的剂量应答曲线。虚线指示 50% 部分存活。应当指出对于 2 种药物和任何给定浓度,与 HMLERshCntrl 细胞比较, HMLERshEcad 细胞更有抗性。图 2B 描述了永生化细胞对化学治疗药物的应答。HMLEshCntrl 和 HMLEshEcad 细胞用所示药物在 3 个浓度下处理 3 天,并且使用 MTS 测定法就生存进行测定。尽管多柔比星、放射菌素 D、紫杉醇和喜树碱是化学治疗药物,但星形孢菌素是有效诱导凋亡的一般激酶抑制剂。图 2C 描述了紫杉醇处理导致已经历 EMT 的较小细胞群体的选择性扩展。对照 HMLE 细胞和表达 GFP 的 HMLEshEcad 细胞以 20 : 1 的比混合,并且一式三份地种植到 6 孔平板上。在种植后 1 天,将在 2.5nm 或 10nm 浓度下的 DMSO 或紫杉醇加入混合细胞群体上,随后为 3 天温育。在处理结束时通过流式细胞术分析 GFP 阳性细胞的数目。在右侧上的曲线图显示 GFP 阳性的定量。应当指出在 10mM 紫杉醇处理后, GFP 阳性从 5% 增加到 14%。

[0074] 图 3 描述了高通量筛选,以鉴定具有癌症干细胞特异性毒性的化合物,并且提供 (A) 描述筛选设计的示意图; (B) 命中位置未显示任何显著位置偏差的证据,和 (C) 来自起始筛选的 z 得分分布。

[0075] 图 4A 描述了用在起始筛选过程中鉴定的 8 种化合物处理的 HMLEshCntrl (A, 浅灰色曲线) 和 HMLEshEcad (A, 深灰色曲线) 细胞的剂量应答曲线。将每种系的 1000 个细胞种植到 384 孔平板上,并且用在 2.5 对数范围内的 8 个不同化合物浓度处理。通过 Cell-Titer-Glo 测量在 3 天处理后的细胞生存。应当指出尽管顶端 4 种化合物 (从左到右: 沙利霉素、阿巴克丁、依托泊苷和尼日利亚菌素) 显示针对 HMLEshEcad 细胞的选择毒性,但底部 4 种化合物 (从左到右: 克霉唑、吡啶、间苯二酚和西吡氯铵, CPC) 未显示此类行为。图 4B 描述了用与 (A) 中相同的化合物处理的 HMLEshCntrl (具有正方形数据点的曲线) 和 HMLE-Twist (具有三角形数据点的曲线) 细胞的剂量应答曲线。应当指出即使使用不同 EMT 诱导方法,沙利霉素、阿巴克丁、依托泊苷和尼日利亚菌素 (顶部, 从左到右) 的选择性也被保留。(底图从左到右: 克霉唑、吡啶、间苯二酚和西吡氯铵, CPC) 图 4C 描述了使表达 GFP 的对照 HMLE 细胞和未经标记的 HMLE-twist 细胞混合且铺平板到 10-cm 皿上。在种植后 1 天,加入以所示浓度的 DMSO、沙利霉素 (1.25 或 5 μ M) 或阿巴克丁 (0.25 或 1.25 μ M)。因为 GFP 载体包含杀稻瘟菌素抗性基因,所以使用杀稻瘟菌素处理作为用于表达 GFP 的对照 HMLE 细胞扩展的阳性对照。在 3 天温育后,通过流式细胞术分析细胞的混合群体,并且测定 GFP 阳性细胞百分率。应当指出沙利霉素和阿巴克丁处理都导致针对 GFP 阴性 HMLE-twist 细胞的选择和 GFP 阳性对照细胞的相对扩展。图 4D 描述了用沙利霉素和阿巴克丁处理的经转化的 HMLERshCntrl (浅灰色线) 和 HMLERshEcad (深灰色线) 细胞的剂量应答曲线。虚线指示 50% 部分存活。应当指出即使当细胞进行转化时,沙利霉素针对经历 EMT 的细胞的

选择毒性也保留。

[0076] 图 5A 描述了就 CD44 和 CD24 的细胞表面表达而言, Sum159、MDA-MB-231 和 T47D 细胞系的流式细胞术分析。应当指出尽管 Sum159 和 MDA-MB-231 系中的大多数细胞包含大量 CSCs, 但 T47D 细胞具有非常少的此类细胞。图 5B 描述了用沙利霉素处理的 Sum159、MDA-MB-231 和 T47D 细胞的剂量应答曲线。图 5C 描述了响应沙利霉素处理在 Sum159 细胞系内 CSC 群体 (浅灰色条) 中的减少, 和在非 CSC 群体 (深灰色条) 中的伴随增加。

[0077] 图 6 描述了沙利霉素对 HMLER 细胞系中的 CSC 群体的作用。(A) HMLER 细胞用媒介物对照 (dms0)、沙利霉素或紫杉醇以所示浓度处理 15 天。在处理结束时执行 FACS 分析, 以测量 CD44+/CD24-CSC 群体 (右图)。应当指出沙利霉素使 CD44+/CD24- 群体从基础的 4.9% 降低到 0.2%。还对经处理的培养物实施乳腺球形形成测定法 (左图)。乳腺球数目 / 由每种培养物形成的 1000 个细胞在测定孔的代表性照片下指出。(B) 在用媒介物对照 (dms0)、沙利霉素或紫杉醇以 (A) 中所示浓度处理 15 天后, HMLER 培养物的生长速率。

[0078] 图 7 描述了原发性小鼠乳房干细胞、正常人乳腺干细胞样细胞和增生性人乳腺干细胞样细胞表达与 EMT 相关的标记。(A) 使用 FACS 从人乳房缩小成形术组织中分离 CD44 高 /CD24 低细胞 (R4) 和 CD44 低 /CD24 高细胞 (R3)。(B) 相对于 CD44 低 /CD24 高细胞 (R3), 在 CD44 高 /CD24 低细胞 (R4) 中编码 E- 钙粘蛋白、N- 钙粘蛋白、SIP-1 和 FOXC2 的 mRNAs 表达水平, 如通过实时 RT-PCR 测定的。GAPDH mRNA 用于标准化模板装载中的变异性。数据报告为平均值 $\pm$ SEM。(C) 热度图 (本文也称“热图”) 描述了与 CD44 低 /CD24 高细胞比较, 在 CD44 高 /CD24 低细胞中编码 EMT 标记的 mRNAs 表达水平, 如通过 SAGE 分析测定的。深灰色和浅灰色正方形分别与高和低 mRNA 水平相应。

[0079] 图 8 描述了 EMT 诱导与癌症干细胞相关的表型。(A) 用它莫西芬处理 10 天时间段的 NeuNT-Snail-ER、NeuNT-Twist-ER 和 NeuNT 对照载体细胞的相位差图像以及未经处理的细胞的图像。(B) 在小图 A 中所示的细胞中 HER2/neu、E- 钙粘蛋白、纤连蛋白和波形蛋白蛋白质表达的蛋白质印迹分析。β- 肌动蛋白用作上样或加载对照。(C) 通过用它莫西芬处理或未处理 10 天的 NeuNT-Snail-ER、NeuNT-Twist-ER 或 NeuNT 对照载体细胞种植的乳腺球的定量。数据报告为平均值 $\pm$ SD。(D) 在它莫西芬处理 10 天后, 在 NeuNT-Snail-ER、NeuNT-Twist-ER 和 NeuNT 载体细胞的软琼脂培养过程中形成的集落图像。软琼脂测定法在不存在它莫西芬的情况下执行。(E) 小图 D 中所示的软琼脂集落 (或称“克隆”) 的定量。数据报告为平均值 $\pm$ SD (**-P < 0.01; ***-P < 0.001, 与对照比较)。

[0080] 图 9 描述了通过 Snail-ER 或 Twist-ER 它莫西芬诱导性载体诱导 EMT 产生具有干细胞性质的细胞 (A) 用它莫西芬处理 12 天的 Snail-ER、Twist-ER 或对照载体细胞的相位差图像。(B) 编码与 EMT 相关蛋白质的 mRNAs 的表达水平, 如在通过 Snail-ER 的异位表达诱导经历 EMT 的 HMLE 细胞中观察到的 (它莫西芬诱导的)。表达水平相对于 12 天它莫西芬处理的第 0 天报告。GAPDH mRNA 用于标准化模板装载中的变异性。数据报告为平均值 $\pm$ SEM。

[0081] 图 10 描述了在它莫西芬 (4-OHT) 处理 (中间箭头) 10 天后经历 EMT 或未经处理 (顶端箭头) 的 HMLEN-Snail-ER 或 HMLEN-Twist-ER 细胞的相位差图像。在这种 4-OHT 处理后, 撤出 4-OHT, 并且在 15 天后观察细胞。未受感染的细胞或用所示病毒载体感染的细胞显示于柱中。

[0082] 图 11 描述了使用 Snail、Twist 或对照载体在 HMLER 细胞中的 EMT 诱导 (A)。使用针对 E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、纤连蛋白和波形蛋白的抗体,通过 Snail 或 Twist 的异位表达诱导经历 EMT 的 HMLER 细胞的免疫染色。显示对照细胞的免疫染色用于比较 (B)。相对于对照载体感染的细胞,通过 Snail 或 Twist 的异位表达诱导经历 EMT 的 HMLERs 中与 EMT 相关的 mRNAs 表达,如通过实时 RT-PCR 测定的。GAPDHmRNA 用于标准化模板装载中的变异性。数据报告为平均值 $\pm$ SEM。(C) 通过 Snail、Twist 或对照载体的异位表达诱导经历 EMT 的 HMLER 细胞中的 CD44 高/CD24 低细胞百分率。(D) 乳腺球数目/1000 个表达 Snail、Twist 或对照载体的 HMLER 细胞。数据报告为平均值 $\pm$ SEM。

[0083] 图 12 描述了衍生自表达 Snail、Twist 或对照载体的 HMLER 细胞的肿瘤的 H&E 染色。衍生自表达 (A) 载体、(B) Snail、(C) Twist 的 HMLER 细胞的肿瘤的光学显微镜图像 (10X)。

[0084] 图 13A 描述了用 DMSO、紫杉醇或沙利霉素以指定剂量处理 4 天的 HMLER 细胞。显示了在化合物处理后的 CD44^高/CD24^低细胞百分比,并且通过荧光激活细胞分选进行定量。条形图描述了用 2 种不同 HMLER 细胞群体 (HMLER_1、HMLER_2) 的 2 次独立实验的结果。图 13B 描述了用所示化学化合物处理的 HMLER_2 癌细胞群体的荧光激活细胞分选谱 (CD44 与 CD24 比较)。左上方的椭圆形 (——) 指示富含 CSC 部分,并且左下方椭圆形 (——) 指示 CSC 耗尽部分。

[0085] 图 14A 描述了用 DMSO、紫杉醇 (泰素) 或沙利霉素以指定剂量处理的亲本 HMLER 细胞的乳腺球形成潜力。图 14B 描述了用 DMSO、紫杉醇或沙利霉素处理的 MCF7Ras 或 4T1 细胞。下文显示了乳腺球形成潜力。

[0086] 图 15A 描述了在用沙利霉素、紫杉醇或媒介物处理的小鼠中,通过 SUM159 乳腺癌细胞的体内肿瘤形成。沙利霉素处理导致肿瘤生长的抑制。图 15B 描述了来自沙利霉素、紫杉醇或 DMSO 处理小鼠的 SUM159 肿瘤获得的癌细胞的乳腺球形成潜力。

[0087] 图 16 描述了沙利霉素处理减少临床相关乳腺 CSC 和祖先基因的表达。基因集富集分析用于测定与紫杉醇处理比较,先前报告的与干细胞样细胞相关的 3 个基因集是否响应于沙利霉素而被阻遏。曲线图是 Kolmogorov-Smirnov 富集得分与基于差异表达的基因排序比较。显示了反映关于每个分析的统计显著性的 P 值。

[0088] 详述

[0089] 肿瘤发生或致癌性涉及许多遗传和后生改变,其引起细胞增殖、分化、生长和存活中的缺陷。这些细胞缺陷产生可以是良性或恶性的肿瘤。虽然良性肿瘤通常在原发性肿瘤中保留局限性,所述原发性肿瘤在原始部位处保留局限性,并且就肿瘤生长而言通常是自限性的,但恶性肿瘤具有持续生长的趋势和播散或转移至遥远位置的能力。恶性肿瘤通过一系列逐步的进行性改变发展,所述改变导致不受控制的细胞增殖和侵入周围组织且转移至不同器官部位的能力。

[0090] 近期发现已证实肿瘤形成和生长通过肿瘤内的较小癌细胞亚群 - 癌症干细胞驱动 (Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF., Proc Natl Acad Sci U S A 2003;100(7):3983-8) (Li C, Heidt DG, Dalerba P, 等人, Cancer Res 2007;67(3):1030-7) (O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE., Nature 2007;445(7123):106-10) (Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, 等人, Nature 2007;

445(7123):111-5)(Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, 等人, Nature 2004;432(7015):396-401)。癌症干细胞(CSCs)在功能上定义为在肿瘤团块内具有种植且产生继发性肿瘤的能力的那些细胞。在某些方面,已在操作上通过其在动物模型中在有限稀释下种植肿瘤的能力定义CSCs。在这个功能范畴中牵涉的是癌症干细胞是在肿瘤内负责癌症死亡率-转移播散主因的细胞的概念。这个概念对于潜在癌症治疗的开发和临床前评估具有重大牵涉。本发明描述了使得能够开发靶向癌症干细胞的新型治疗的新方法。在本文描述的本发明方法之前,癌症干细胞靶向疗法的开发以高流通量筛选设置是不可能的。经由使所述方法付诸实践,通过开发特异性靶向癌症干细胞的新型化合物,我们建立了用于本发明的原理验证。因此,本发明首次使得能够使用高流通量筛选方法鉴定靶向癌症干细胞的治疗。

[0091] 上皮至间质转变

[0092] 正常和肿瘤细胞在体外和体内以各种分化状态存在。这些分化状态通过至少部分起于其中细胞驻留的组织微环境的复杂信号整合进行调节。通过许多遗传干扰可以诱导细胞(例如,癌细胞)经历上皮至间质转变(EMT),例如经由特定因子(例如, Twist、Snail、TGF- β 或 MMPs)的过表达,或通过粘附连接蛋白质例如 E-钙粘蛋白的抑制。不管使用的诱导方法,已诱导成 EMT 的细胞表达相似表型性状和蛋白质标记(例如,生物标记),指出 EMT 是核心分化程序。本发明涉及已诱导成 EMT 的细胞共享癌症干细胞的许多性质的发现,所述性质包括与癌症干细胞相关的细胞表面标记的表达,在悬浮培养中生长,在体内在低细胞数目下的肿瘤形成,和对特定标准化学治疗药物的抗性。因此,由已经历上皮至间质转变(也称为间质转分化或上皮至间质转分化)的细胞显示的分化状态可以用于鉴定特异性靶向癌症干细胞的治疗。在某些实施方案中,提供了诱导上皮-间质转变(例如,产生测试细胞)的方法。

[0093] 如本文使用的,“上皮至间质转变”(EMT)指上皮细胞至具有一种或多种间质特征的细胞的转化或部分转化,所述一种或多种间质特征的细胞也具有癌症或非癌症干细胞的一种或多种性质。一种或多种癌症或非癌症干细胞性质可以包括一种或多种蛋白质(例如,细胞表面标记)的存在或不存在(高表达水平或低表达水平),和/或一种或多种(至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种)功能性质中的增加,所述功能性质包括在悬浮培养中生长(增殖)的能力,在体内在低细胞种植数目下形成肿瘤的能力,对特定化学治疗的抗性(例如,对紫杉醇的抗性),转移能力,迁移能力,对凋亡或失巢凋亡(anoikis)的抗性,扩散和细胞形状的延长。应当理解通过执行与对照细胞的比较,可以评估已经历 EMT 的细胞显示一种或多种蛋白质表达的增加或降低,或癌症干细胞的一种或多种功能性质中的增加的程度,所述对照细胞例如是未经 EMT 的细胞(阴性对照细胞),或已经历 EMT 的细胞(阳性对照细胞),例如癌症干细胞。

[0094] 与未经 EMT 的细胞比较,已经历 EMT 的细胞中关于其的表达增加指示 EMT 的蛋白质例子包括 N-钙粘蛋白、波形蛋白、纤连蛋白、Snail1(Snail)、Snail2(Slug)、Twist、Goosecoid、FOXC2、Sox10、MMP-2、MMP-3、MMP-9、整联蛋白 $\alpha 6$ 、CD44 和 ESA。与未经 EMT 的细胞比较,已经历 EMT 的细胞中关于其的表达减少指示 EMT 的蛋白质例子包括 E-钙粘蛋白、桥粒斑蛋白、细胞角蛋白、闭锁蛋白和 CD24。上皮细胞已经历 EMT 的程度可以通过测定至少1种、至少2种、至少3种、至少4种、至少5种、至少6种、至少7种、至少8种、至少9种、至少10种、至少11种、至少12种、至少13种、至少14种、至少15种、至少16种、至少

17种、至少18种、至少19种、至少20种或更多种蛋白质的表达进行评估。此类蛋白质的表达可以使用各种测定方法进行测定,包括本文公开的那些和本领域已知的其他。应当理解其表达水平指示细胞中的EMT的某些蛋白质也是可以引起EMT发生的蛋白质。例如,在上皮细胞中Twist的过表达引起细胞经历EMT。类似地,在上皮细胞中E-钙粘蛋白表达中的减少引起细胞经历EMT。因此,当通过增加(例如,通过cDNA介导的过表达)蛋白质例如Twist表达或降低(例如,通过RNAi介导的抑制)蛋白质例如E-钙粘蛋白表达来达到EMT时,其他蛋白质(例如,CD44、桥粒斑蛋白)表达中的改变可以充当EMT的合适指示剂。

[0095] 应当理解癌症或非癌症干细胞的功能性质可以使用本领域已知的各种方法进行评估。悬浮培养中的生长例如可以这样进行评估:通过在旋转烧瓶中培育已经经历EMT的细胞,并且测量旋转烧瓶中随着时间过去细胞数目中的改变。细胞数目中的这种改变可以与对照细胞的细胞数目中的改变比较,所述对照细胞未经历EMT并且已在相同或相似条件下生长。与在相同或相似条件下生长但未经经历EMT的对照细胞比较,在悬浮培养中生长已经经历EMT的细胞倍增时间中高达10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更多增加,可能指示在悬浮中生长的能力增加。

[0096] 已经经历EMT的细胞在体内在低细胞种植数目下形成肿瘤的能力可以通过与对照细胞比较进行评估,所述对照细胞未经历EMT。在体内在低细胞种植数目下形成肿瘤的能力依赖于各种因素,所述因素对于技术人员将是显而易见的,包括例如其中注射细胞的动物类型(例如小鼠)、其中种植(例如,注射)细胞的位置、和动物发动针对细胞的免疫应答的能力。如本文使用的,“低细胞种植数目”意指高达 10^0 、高达 10^1 、高达 10^2 、高达 10^3 、高达 10^4 、高达 10^5 、高达 10^6 或更多细胞的种植。在细胞种植后(例如,一个或多个位置或在一个或多个动物中)在体内形成的肿瘤数目是通过其可以进行与对照的这种比较的示例性参数。在细胞种植后在体内形成的肿瘤大小(例如,体积)是通过其可以进行与对照的这种比较的另一种示例性参数。例如,肿瘤发生率或大小中高达10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更多增加,可以指示在体内在低细胞种植数目下形成肿瘤的能力。

[0097] 用于评估癌症或非癌症干细胞的功能性质的其他方法在本文中和其他地方公开,并且对于技术人员将是显而易见。(参见例如,SM Frisch和H Francis, Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis, J Cell Biol. 1994年2月;124(4):619-26; Mushinski JF, 等人, Inhibition of tumor cell motility by the interferon-inducible GTPase MxA. J Biol Chem. 2009年3月18日; Liu YN, 等人, Activated androgen receptor downregulates E-cadherin gene expression and promotes tumor metastasis. Mol Cell Biol. 2008年12月;28(23):7096-108; Carpenter PM, 等人, Motility Induction in Breast Carcinoma by Mammary Epithelial Laminin 332(Laminin 5), Mol Cancer Res. 2009年4月7日; Nakamura M, 等人, Polarized hydroxyapatite promotes spread and motility of osteoblastic cells. J Biomed Mater Res A. 2009年3月9日; Gu W, 等人, Measuring cell motility using quantum dot probes. Methods Mol Biol. 2007;374:125-31;和 Sakai K, 等人, Inducible expression of p57KIP2 inhibits glioma cell motility and invasion. J Neurooncol. 2004年7月;68(3):217-23.)

[0098] 本发明公开了用于诱导细胞中的 EMT 的方法。在特定实施方案中,通过抑制细胞中的 E- 钙粘蛋白表达或活性来达到上皮至间质转变。通过使用本领域普通技术人员已知的方法可以抑制 E- 钙粘蛋白的表达或活性。用于抑制 E- 钙粘蛋白表达或活性的示例性方法包括使细胞和与 E- 钙粘蛋白 mRNA 互补的小干扰核酸接触,使细胞和针对 E- 钙粘蛋白的封闭抗体接触,通过基于 cDNA 的抗粘附蛋白过表达而诱导抗粘附蛋白表达;和干扰细胞中的细胞极性基因。例如, Scribble 的耗尽破坏 E- 钙粘蛋白介导的细胞间粘附且诱导 EMT(Qin Y, 等人, J Cell Biol 2005 ;171 :1061-71)。因此,在某些实施方案中, Scribble 例如通过 RNA 干扰的抑制可以诱导 EMT。此外,果蝇属 (*Drosophila*) 中的遗传筛选鉴定出影响细胞极性的许多基因,其失活导致 E- 钙粘蛋白表达的丧失 (Pagliarini RA, 等人, Science 2003 ;302 :1227-31)。用于干扰细胞极性基因以诱导 EMT 的其他示例性方法是本领域已知的。

[0099] 在特定实施方案中,通过 RNA 干扰抑制 E- 钙粘蛋白活性。通过 RNA 干扰用于抑制基因表达例如 E- 钙粘蛋白表达的方法是在本文中公开和本领域已知的。在某些实施方案中,用与细胞中的 E- 钙粘蛋白 mRNA 互补的小干扰核酸转染细胞,以抑制细胞中的 E- 钙粘蛋白活性。示例性小干扰核酸在本文中公开且是本领域技术人员已知的。用于转染小干扰核酸 (例如, siRNA) 的方法是本领域众所周知的,并且例子在本文中公开。在某些实施方案中,细胞具有稳定整合的转基因,其表达与 E- 钙粘蛋白 mRNA 互补的小干扰核酸 (例如, shRNA、miRNA),并且通过 RNA 干扰途径引起 E- 钙粘蛋白 mRNA 的下调。

[0100] 本领域已知的用于基因击倒的各种策略可以用于抑制基因的表达,所述基因例如 E- 钙粘蛋白和对于诱导 EMT 有用的本文公开的其他基因。例如,可以使用利用 RNA 干扰 (RNAi) 和 / 或微小 RNA (miRNA) 途径的基因击倒策略,包括小干扰 RNA (siRNA)、小发夹 RNA (shRNA)、双链 RNA (dsRNA)、miRNAs、和本领域已知的其他基于核苷酸的分子。在一个实施方案中,基于载体的 RNAi 方式 (例如, shRNA 或 shRNA-mir 表达构建体) 用于减少细胞中的基因 (例如, E- 钙粘蛋白) 表达。

[0101] 广泛范围的基于 RNAi 的方式也可以用于抑制细胞中的基因表达,例如基于 siRNA 的寡核苷酸和 / 或经改变的基于 siRNA 的寡核苷酸。经改变的基于 siRNA 的寡核苷酸是进行修饰以改变效力、靶亲和力、安全谱和 / 或稳定性的那些,例如,以使得它们对细胞内降解有抗性或部分抗性。例如可以对寡核苷酸进行修饰例如硫代磷酸酯,以增加对核酸酶降解的抗性,结合亲和力和 / 或摄取。此外,疏水化和生物缀合增强 siRNA 递送和靶向 (De Paula 等人, RNA. 13(4) :431-56, 2007), 并且具有核 - 二氟甲苯酰核苷酸的 siRNAs 维持基因沉默活性 (Xia 等人, ASC Chem. Biol. 1(3) :176-83, (2006))。已产生具有酰胺连接的寡聚核糖核苷的 siRNAs, 其对 S1 核酸酶降解比未经修饰的 siRNAs 更有抗性 (Iwase R 等人 2006 Nucleic Acids Symp Ser 50 :175-176)。此外, siRNAs 在 2' - 糖位置上的修饰和磷酸二酯键赋予改善的血清稳定性而不丧失功效 (Choung 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 342(3) :919-26, 2006)。可以用于抑制基因 (例如, 负面调节 EMT 的基因, 例如 E- 钙粘蛋白) 表达的其他分子包括有义和反义核酸 (单或双链)、核酶、肽、DNA 酶、肽核酸 (PNAs)、三螺旋形成寡核苷酸、抗体和适体及其针对一种或多种基因、RNA 转录物或蛋白质中的序列的一种或多种修饰形式。通过减少基因产物的表达或通过突变位点处切割突变型转录物,反义和核酶抑制策略已导致肿瘤表型的逆转 (Carter

和 Lemoine Br. J. Cancer. 67(5) :869-76, 1993 ;Lange 等 人, Leukemia. 6(11) :1786-94, 1993 ;Valera 等人, J. Biol. Chem. 269(46) :28543-6, 1994 ;Dosaka-Akita 等人, Am. J. Clin. Pathol. 102(5) :660-4, 1994 ;Feng 等人, Cancer Res. 55(10) :2024-8, 1995 ;Quattrone 等人, Cancer Res. 55(1) :90-5, 1995 ;Lewin 等人, Nat. Med. 4(8) :967-71, 1998)。核酶也已提议作为抑制突变型基因的基因表达且通过靶向反式剪接校正突变型的手段 (Sullenger 和 Cech Nature 371(6498) :619-22, 1994 ;Jones 等人, Nat. Med. 2(6) :643-8, 1996)。通过使用例如非特异性核酸结合蛋白质或促进寡核苷酸可以增强核酶活性 (Herschlag 等人, Embo J. 13(12) :2913-24, 1994 ;Jankowsky 和 Schwenzer Nucleic Acids Res. 24(3) :423-9, 1996)。多靶核酶 (连接的或鸟枪) 已提议作为改善核酶效率用于基因抑制的手段 (Ohkawa 等人, Nucleic Acids Symp. Ser. (29) :121-2, 1993)。

[0102] 三螺旋方法也已研究用于序列特异性基因抑制。三螺旋形成寡核苷酸也已在某些情况下发现以序列特异性方式结合 (Postel 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 88(18) :8227-31, 1991 ;Duval-Valentin 等 人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 89(2) :504-8, 1992 ;Hardenbol 和 Van Dyke Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93(7) :2811-6, 1996 ;Porumb 等人, Cancer Res. 56(3) :515-22, 1996)。类似地, 肽核酸已显示抑制基因表达 (Hanvey 等人, Antisense Res. Dev. 1(4) :307-17, 1991 ;Knudsen 和 Nielson Nucleic Acids Res. 24(3) :494-500, 1996 ;Taylor 等人, Arch. Surg. 132(11) :1177-83, 1997)。小沟结合聚酰胺可以以序列特异性方式与 DNA 靶结合, 并且因此可以代表用于在 DNA 水平下抑制的有用小分子 (Trauger 等人, Chem. Biol. 3(5) :369-77, 1996)。此外, 抑制也已通过使用显性失活突变体肽和抗体在蛋白质水平下干扰而获得 (Herskowitz Nature 329(6136) :219-22, 1987 ;Rimsky 等人, Nature 341(6241) :453-6, 1989 ;Wright 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 86(9) :3199-203, 1989)。在许多情况下, 抑制策略已导致 RNA 水平中的减少而无蛋白质中的伴随减少, 而在其他中, RNA 中的减少已通过蛋白质中的减少反映。

[0103] 可以采用的抑制策略的不同排列包括 DNA 和 / 或 RNA 适体的使用, 其可以选择为靶向目的蛋白质 (例如, E- 钙粘蛋白)。例如, 在年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的情况下, 抗 VEGF 适体已产生且已显示在某些 AMD 患者中提供临床利益 (Ulrich H, 等人 Comb. Chem. High Throughput Screen 9 :619-632, 2006)。

[0104] 在某些实施方案中, 通过使细胞与一种或多种结合试剂 (例如, 针对 E- 钙粘蛋白的封闭抗体) 接触来抑制负面调节 EMT 的蛋白质 (例如, E- 钙粘蛋白) 活性。因此, 本发明包含结合试剂, 其例如可以是具有与蛋白质例如 E- 钙粘蛋白选择性结合的能力的抗体或抗体片段, 且诱导 EMT。抗体包括多克隆和单克隆抗体, 其可以根据常规方法进行制备。如本文使用的, E- 钙粘蛋白封闭抗体是与 E- 钙粘蛋白特异性结合且诱导 EMT 的抗体。

[0105] 明显地, 如本领域众所周知的, 仅抗体分子的小部分, 互补位, 涉及抗体与其表位的结合 (一般参见, Clark, W. R. (1986) The Experimental Foundations of Modern Immunology Wiley & Sons, Inc., New York ;Roitt, I. (1991) Essential Immunology, 第 7 版, Blackwell Scientific Publications, Oxford)。pFc' 和 Fc 区例如是补体级联的效应物, 但不涉及抗原结合。从其中酶促切割 pFc' 区, 或不含 pFc' 区产生的抗体, 命名为 F(ab')₂ 片段, 保留完整抗体的 2 个抗原结合位点。类似地, 从其中酶促切割 Fc 区, 或不含 Fc 区产生的抗体, 命名为 Fab 片段, 保留完整抗体分子的抗原结合位点之一。进一步加

工, Fab 片段由共价结合的抗体轻链和命名为 Fd 的部分抗体重链组成。Fd 片段是抗体特异性的主要决定簇(单个 Fd 片段可以与高达 10 条不同轻链结合,而不改变抗体特异性),并且 Fd 片段在分离中保留表位结合能力。

[0106] 在抗体的抗原结合部分内,如本领域众所周知的,存在与抗原的表位直接相互作用的互补决定区(CDRs),和维持互补位的三级结构的构架区(FRs)(一般参见,Clark,1986;Roitt,1991)。在 IgG 免疫球蛋白的重链 Fd 片段和轻链中,存在分别通过 3 个互补决定区(CDR1 到 CDR3)分开的 4 个构架区(FR1 到 FR4)。CDRs 且特别地 CDR3 区且更特别地重链 CDR3,在很大程度上负责抗体特异性。

[0107] 本领域目前充分确定哺乳动物抗体的非 CDR 区可以由同种特异性或异种特异性抗体的相似区域代替,同时保留原始抗体的表位特异性。这是在“人源化”抗体的开发和使用最明确表明,在所述“人源化”抗体中使非人 CDRs 与人 FR 和 / 或 Fc/pFc' 区共价连接,以产生功能抗体。参见例如,美国专利 4,816,567、5,225,539、5,585,089、5,693,762 和 5,859,205。

[0108] 通过免疫接种对于人免疫球蛋白重和轻链基因座的大部分转基因的小鼠,也可以制备全人单克隆抗体。在这些小鼠的免疫接种后(例如,XenoMouse (Abgenix)、HuMAb 小鼠 (Medarex/GenPharm)),单克隆抗体可以根据标准杂交瘤方法进行制备。这些单克隆抗体将具有人免疫球蛋白氨基酸序列,并且因此当施用于人时,将不引发人抗小鼠抗体(HAMA)应答。

[0109] 因此,如对于本领域普通技术人员显而易见的,本发明还提供了 F(ab')₂、Fab、Fv 和 Fd 片段;其中 Fc 和 / 或 FR 和 / 或 CDR1 和 / 或 CDR2 和 / 或轻链 CDR3 区已由同源人或非人序列代替的嵌合抗体;其中 FR 和 / 或 CDR1 和 / 或 CDR2 和 / 或轻链 CDR3 区已由同源人或非人序列代替的嵌合 F(ab')₂ 片段抗体;其中 FR 和 / 或 CDR1 和 / 或 CDR2 和 / 或轻链 CDR3 区已由同源人或非人序列代替的嵌合 Fab 片段抗体;和其中 FR 和 / 或 CDR1 和 / 或 CDR2 区已由同源人或非人序列代替的嵌合 Fd 片段抗体。本发明还包括所谓的单链抗体。

[0110] 在某些实施方案中,通过使细胞与 E-钙粘蛋白的小分子或肽拮抗剂接触来抑制 E-钙粘蛋白。在某些实施方案中,使用包含细胞粘附识别(CAR)序列的环肽,HAV(His-Ala-Val),任选连同在 CAR 序列任一侧上的侧翼序列。参见例如,美国专利公开号 20060183884。与 E-钙粘蛋白特异性结合的肽可以由本领域技术人员鉴定,使用例如诸如噬菌体展示技术。

[0111] 在某些实施方案中,通过调节转录因子(例如,调节 E-钙粘蛋白活性的转录因子)活性来达到 EMT。调节以诱导 EMT 的方向性(例如,抑制转录因子活性或诱导转录因子活性)可以通过技术人员使用例行实验进行测定或证实。在其中希望抑制转录因子活性的情况下,RNA 干扰是有用的。例如,如本文公开的,与转录因子 mRNA 互补的小干扰核酸可以用于抑制转录因子活性。在某些实施方案中,通过诱导选自下述的转录因子活性来达到 EMT: Snail1、Snail2、Goosecoid、FoxC2、TWIST、E2A、SIP-1/Zeb-2、dEF1/ZEb1、LEF1、Myc、HMGA2、TAZ、Klf8、HIF-1、HOXB7、SIM2s 和 Fos。用于诱导转录因子活性的示例性方法是本领域已知的。在其中希望诱导转录因子活性的某些情况下,转录因子的外源表达是有用的。例如,在细胞中 TWIST 表达的诱导在本领域中已知抑制细胞中的 E-钙粘蛋白活性且诱导 EMT。在一个实施方案中,通过用编码 TWIST 的表达载体转染细胞,在细胞中诱导 TWIST,从而在细

胞中外源表达 TWIST。在某些实施方案中,细胞具有稳定整合的转基因,其表达引起细胞中的 EMT 的转录因子,例如 TWIST。

[0112] 在某些实施方案中,通过调节细胞中的信号途径活性来产生 EMT,其中所述信号途径选自 TGF- β 、Wnt、BMP、Notch、HGF-Met、EGF、IGF、PDGF、FGF、P38-mapk、Ras、PI3Kinase-Akt、Src 和 NF-kB。在某些实施方案中,通过使细胞与选自下述的生长因子接触来调节诱导 EMT 的信号途径:TGF- β /BMP 超家族成员、Wnt- 家族成员、FGF 家族成员、Notch 配体、EGF 家族成员、IGF 家族成员、PDGF 和 HGF。在某些实施方案中,通过使细胞与 TGF- β ₁ 接触来调节诱导 EMT 的信号途径。示例性 TGF- β /BMP 超家族成员包括 TGF- β ₁、TGF- β ₂、TGF- β ₃、BMP2、BMP3、BMP4、BMP5、BMP6、BMP7、BMP8a、BMP8b、BMP10、BMP15、GDF1、GDF2、GDF3、GDF5、GDF6、GDF7、肌抑素 /GDF8、GDF9、GDF10、GDF11、GDF15、激活素 A 和 B/ 抑制素 A 和 B、抗苗勒管激素和 Nodal。示例性 FGF 家族成员包括 FGF1、FGF2、FGF4、FGF8、FGF10。示例性 Wnt- 家族成员包括 WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11 和 WNT16。示例性 EGF 家族成员包括肝素结合 EGF- 样生长因子 (HB-EGF)、转化生长因子- α (TGF- α)、双调蛋白 (AR)、表皮调节素 (EPR)、Epigen、Betacellulin (BTC)、神经调节蛋白-1 (NRG1)、神经调节蛋白-2 (NRG2)、神经调节蛋白-3 (NRG3) 和神经调节蛋白-4 (NRG4)。示例性 IGF 家族成员包括 IGF1 和 IGF2。

[0113] 在某些实施方案中,通过对细胞实施选自下述的应激来产生 EMT:缺氧、照射和长期化学疗法治疗。用于诱导细胞中的应激的方法是本领域已知的。示例性方法公开于 Docherty, NG, 等人, Am J Physiol Renal Physiol 290 :F1202-F1212, 2006 和 Manotham K, 等人, Kidney Int 65 :871-880, 2004 中,其内容通过引用整体合并入本文。

[0114] 用于诱导细胞中的 EMT 的示例性方法公开于 Weinberg RA, 等人, WO2007/005611 ; Zavadil J 等人, Oncogene 24 :5764-5774, 2005 ; Sato M, J Clin Invest 112 :1486-1494, 2003 ; Gregory PA, 等人, Nat Cell Biol. Mar 30, 2008 ; Zeng R, 等人, J Am Soc Nephrol. 2008 Feb ;19(2) :380-7. Epub 2008 年 1 月 9 日 ; Krawetz R, 等人, Cell Signal. 2008 年 3 月 ;20(3) :506-17 ; Jiang YG, 等人, Int J Urol. 2007 年 11 月 14 日 (11) :1034-9 ; Lo HW, 等人, Cancer Res. 2007 年 10 月 1 日, 67(19) :9066-76 ; Lester RD, 等人, J Cell Biol. 2007 年 7 月 30 日 178(3) :425-36 ; Moustakas A, 等人, Cancer Sci. 2007 年 10 月 98(10) :1512-20 ; 和 Wahab NA, 等人, Nephron Exp Nephrol. 2006, 104(4) :e129-34 中,其内容通过引用合并入本文。然而,这些方法不意欲是限制性的,并且其他合适方法对于本领域普通技术人员将是显而易见的。

[0115] 如本文使用的,“载体”可以是所需序列可以通过限制和连接插入其内的许多核酸分子中的任何一种,用于在不同遗传环境之间转运或用于在宿主细胞中表达。载体一般由 DNA 组成,尽管 RNA 载体也是可用的。载体包括但不限于质粒、噬菌粒和病毒基因组或其部分。

[0116] 表达载体是所需序列可以例如通过限制和连接插入其内的那种,从而使得它与调节序列可操作地连接,并且可以作为 RNA 转录物表达。载体可以进一步包含适合于在细胞鉴定中使用的一种或多种标记序列,所述细胞已用载体转化或转染或未转化或转染。标记包括例如编码其增加或降低对抗生素或其他化合物的抗性或敏感性的蛋白质的基因,编码

其活性可通过本领域已知的标准测定法检测的酶（例如， β -半乳糖苷酶或碱性磷酸酶）的基因，和可见地影响经转化或经转染的细胞、宿主、菌落或噬斑（例如，绿色荧光蛋白）表型的基因。

[0117] 如本文使用的，当它们以这样的方式共价连接，以便使编码序列的表达或转录置于调节序列的影响或控制下，编码序列和调节序列被说成“可操作地”连接的。如果希望编码序列被翻译成功能蛋白质，那么 2 个 DNA 序列被说成可操作地连接，条件是如果在 5' 调节序列中启动子的诱导导致编码序列的转录，并且如果在 2 个 DNA 序列之间的连接性质不 (1) 导致移码突变的引入，(2) 干扰启动子区指导编码序列转录的能力，或 (3) 干扰相应 RNA 转录物被翻译成蛋白质的能力。因此，如果启动子区能够实现那种 DNA 序列的转录，从而使得所得到的转录物可以被翻译成所需蛋白质或多肽，启动子区将与编码序列可操作地连接。应当理解编码序列无需编码蛋白质，而是相反可以例如编码功能 RNA 例如 shRNA。

[0118] 基因表达所需的调节序列的确切性质可以在物种或细胞类型之间变化，但需要时，一般而言应包括分别涉及转录和翻译起始的 5' 非转录和 5' 非翻译序列，例如 TATA 盒、加帽序列、CAAT 序列等。此类 5' 非转录调节序列将包括启动子区，其包括用于可操作地连接的基因的转录控制的启动子序列。需要时，调节序列还可以包括增强子序列或上游激活子序列。本发明的载体可以任选地包括 5' 前导区或信号序列。合适载体的选择和设计在本领域普通技术人员的能力和判断力内。本领域技术人员将知道用于表达干扰 RNA 例如 shRNA、miRNA 等的合适调节序列。

[0119] 在某些实施方案中，用于递送核酸分子的病毒载体选自腺病毒、腺相关病毒、痘病毒包括痘苗病毒和减毒痘病毒、塞姆利基森林病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、逆转录病毒、辛德毕斯病毒和 Ty 病毒样颗粒。已用于递送外源核酸的病毒和病毒样颗粒例子包括：复制缺陷型腺病毒（例如，Xiang 等人，Virology 219 :220-227, 1996 ;Eloit 等人，J. Virol. 71 :5375-5381, 1997 ;Chengalvala 等人，Vaccine 15 :335-339, 1997）、经修饰的逆转录病毒（Townsend 等人，J. Virol. 71 :3365-3374, 1997）、非复制性逆转录病毒（Irwin 等人，J. Virol. 68 :5036-5044, 1994 复制缺陷型塞姆利基森林病毒（Zhao 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92 :3009-3013, 1995），金丝雀痘病毒和高度减毒的痘苗病毒衍生物（Paoletti，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :11349-11353, 1996）、非复制型痘苗病毒（Moss，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93 :11341-11348, 1996）、复制型痘苗病毒（Moss，Dev. Biol. Stand. 82 :55-63, 1994）、委内瑞拉马脑炎病毒（Davis 等人，J. Virol. 70 :3781-3787, 1996）、辛德毕斯病毒（Pugachev 等人，Virology 212 :587-594, 1995）、慢病毒载体（Naldini L, 等人，Proc Natl Acad Sci USA. 1996 年 10 月 15 日 ;93(21) :11382-8）和 Ty 病毒样颗粒（Allsopp 等人，Eur. J. Immunol 26 :1951-1959, 1996）。

[0120] 对于特定应用有用的另一种病毒是腺相关病毒，双链 DNA 病毒。腺相关病毒能够感染广泛范围的细胞类型和物种，并且可以改造为复制缺陷型的。它进一步具有下述优点，例如热和脂溶剂稳定性、在不同谱系细胞包括造血细胞中的高转导频率，和缺乏重叠感染抑制，从而允许多重系列转导。腺相关病毒可以以位点特异性方式整合到人细胞 DNA 内，从而使插入诱变的可能性和经插入的基因表达变异性降到最低。此外，野生型腺相关病毒感染在不存在选择压力的情况下在组织培养中已跟踪超过 100 代，暗示腺相关病毒基因组整合是相对稳定事件。腺相关病毒也可以以染色体外方式起作用。

[0121] 一般而言,其他有用的病毒载体基于非致细胞病变真核病毒,其中非必需基因已由目的基因代替。非致细胞病变病毒包括特定逆转录病毒,其生命周期涉及基因组病毒RNA逆转录成DNA,接着前病毒整合到宿主细胞DNA内。一般而言,逆转录病毒是复制缺陷型的(即,能够指导所需转录物合成,但无法制造传染性颗粒)。此类遗传改变的逆转录病毒表达载体具有用于体内高效率基因转导的一般效用。用于产生复制缺陷型逆转录病毒的标准方案(包括外源遗传材料掺入质粒内、用质粒转染包装细胞系、通过包装细胞系产生重组逆转录病毒、从组织培养基中收集病毒颗粒、和用病毒颗粒感染靶细胞步骤)在Kriegler, M., “Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual,” W.H. Freeman Co., New York (1990) 和 Murry, E. J. 编辑 “Methods in Molecular Biology,” 第7卷, Humana Press, Inc., Clifton, New Jersey (1991) 中提供。

[0122] 各种技术可以用于将本发明的核酸分子引入细胞内,依赖于核酸分子是在体外还是在体内在宿主中引入。此类技术包括核酸分子-磷酸钙沉淀物的转染,与DEAE结合的核酸分子的转染,用包括目的核酸分子的前述病毒转染或感染,脂质体介导的转染等。其他例子包括:通过Sigma-Aldrich的N-TER™ Nanoparticle Transfection System,通过Polyplus Transfection的用于昆虫细胞的FectoFly™转染试剂,通过Polysciences, Inc., Unique的Polyethylenimine “Max”,通过Cosmo Bio Co., Ltd.的Non-Viral Transfection Tool,通过Invitrogen的Lipofectamine™ LTX Transfection Reagent,通过Stratagene的SatisFection™ Transfection Reagent,通过Invitrogen的Lipofectamine™ Transfection Reagent,通过Roche Applied Science的FuGENE® HD Transfection Reagent,通过Polyplus Transfection的GMP顺应体内-jetPEI™转染试剂,和通过Novagen的Insect GeneJuice® Transfection Reagent。

[0123] 本发明的某些方面提供了用于测试已经历EMT的细胞的方法,以测定细胞是否显示癌症干细胞的特征。例如,使用本文公开的方法测试已经历EMT的细胞,以测定与癌症干细胞相关的细胞表面标记的表达水平,在悬浮培养中生长,在体内在低细胞数目下的肿瘤转化,和对特定标准化学治疗药物的抗性。

[0124] 本发明的方面提供了测试细胞和对照细胞,例如对于鉴定特异性靶向癌症干细胞的化合物有用的测试和对照细胞。如本文描述的,测试或对照细胞可以是原代细胞、非永生化细胞系、永生化细胞系、经转化的永生化细胞系、良性肿瘤衍生的细胞或细胞系、恶性肿瘤衍生的细胞或细胞系、转基因细胞系等。在某些实施方案中,肿瘤是转移性肿瘤,在这种情况下细胞可以衍生自原发性肿瘤或转移灶。在优选实施方案中,测试细胞是已经历上皮至间质转变的细胞。对照细胞可以包括阳性和阴性对照细胞。在一个实施方案中,阳性对照细胞是癌症干细胞,任选地其表达一种或多种癌症干细胞生物标记。在特定实施方案中,癌症干细胞生物标记选自E-钙粘蛋白、TWIST和CD44⁺CD24⁻标记谱。非限制性癌症干细胞生物标记包括CD20、CD24、CD34、CD38、CD44、CD45、CD105、CD133、CD166、EpCAM、ESA、SCA1、Pecam、Stro1、FOXC2^{阳性}、N-钙粘蛋白^高、E-钙粘蛋白^{低/阴性}、α-连环蛋白^{低/阴性}、γ-连环蛋白^{低/阴性}、波形蛋白^{阳性}、和纤连蛋白^{阳性}。其他示例性癌症干细胞标记对于本领域普通技术人员将是显而易见的。在某些实施方案中,阳性对照细胞是已经历EMT的细胞,例如具有减少的E-钙粘蛋白表达的细胞。

[0125] 在某些实施方案中,阴性对照细胞是并非癌症干细胞的癌细胞,任选地其不显示

一种或多种癌症干细胞生物标记的可检测表达。可以提供超过一个对照细胞集,例如并非癌症干细胞的癌细胞和非癌细胞。可以对细胞(测试或对照)实施一种或多种遗传或化学干扰(例如, siRNA 处理或化合物处理),并且随后温育预定时间。预定时间是在对照细胞中足以产生所需效应的时间(例如,抑制其生长和/或存活)。

[0126] 在某些实施方案中,细胞是哺乳动物细胞,例如人细胞或非人动物细胞,例如非人灵长类、啮齿类(例如,小鼠、大鼠、豚鼠、兔)、起源或种间杂种的细胞。在特定实施方案中,测试和对照细胞得自活组织检查(例如,组织活组织检查、细针活组织检查等)或在用于癌性或非癌性病状的手术时。

[0127] 在某些实施方案中,本发明的细胞(例如,测试细胞、对照细胞)可以衍生自癌症(例如,天然存在的癌症)。在某些实施方案中,细胞可以由其衍生的癌症是结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、宫颈癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、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、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、肾母细胞瘤、黑素瘤或睾丸瘤。在一个实施方案中,癌症是肺癌。在一个实施方案中,癌症是乳腺癌。其他癌症将是本领域普通技术人员已知的。在某些实施方案中,癌症是自发出现的癌症。在某些实施方案中,癌症是与已知或特征性遗传突变或多态性相关的癌症。在某些实施方案中,癌症是在实验上产生的癌症。在某些实施方案中,癌症是激素应答性癌症。在某些实施方案中,癌症衍生自早期癌症或癌前病变,例如乳头状瘤、腺瘤、发育不良性病变等,或原位癌。在某些实施方案中,癌症是响应化学治疗剂或其组合(例如,下文讨论的化学治疗剂中的任何一种或多种)的癌症。在某些实施方案中,癌症是对化学治疗剂或其组合有抗性的癌症。

[0128] 在某些实施方案中,癌细胞在实验上产生。癌细胞可以通过本领域已知的许多方法在实验上产生,所述方法导致非癌细胞(未经转化的细胞)至癌细胞(经转化的细胞)的转化。此类在实验上产生的癌细胞可以是转移性或非转移性的。

[0129] 在某些情况下,通过用编码癌基因的一种或多种表达载体转染非癌细胞(瞬时或稳定地),由非癌细胞产生癌细胞。此类癌基因当表达时,导致细胞的赘生性或增生性转化。癌基因可以是癌基因的全序列,优选致癌形式的癌基因,或它可以是癌基因的片段,其维持癌基因的致癌潜力。示例性癌基因包括 MYC、SRC、FOS、JUN、MYB、RAS、ABL、BCL2、HOX11、HOX11L2、TAL1/SCL、LMO1、LMO2、EGFR、MYCN、MDM2、CDK4、GLI1、IGF2、活化的 EGFR,突变基因例如 FLT3-ITD,突变的 TP53、PAX3、PAX7、BCR/ABL、HER2/NEU、FLT3R、FLT3-ITD、SRC、ABL、TAN1、PTC、B-RAF、PML-RAR- α 、E2A-PBX1 和 NPM-ALK,以及 PAX 和 FKHR 基因家族成员的融合物。其他示例性癌基因是本领域众所周知的,并且几个此类例子在例如 The Genetic Basis of Human Cancer (Vogelstein, B. 和 Kinzler, K. W. 编辑 McGraw-Hill, New York, N. Y., 1998) 中描述。也可以使用此类基因的同系物。

[0130] 在某些情况下,通过用编码抑制分子(例如, shRNA、mirRNA)的一种或多种表达载体转染非癌细胞(瞬时或稳定地),由非癌细胞产生癌细胞,所述抑制分子能够抑制肿瘤抑制基因的表达。此类抑制分子当表达时,导致细胞的赘生性或增生性转化。示例性肿瘤抑制基因包括 RB、TP53、APC、NF-1、BRCA-1、BRCA-2 和 WT-1。其他示例性肿瘤抑制基因是本领域众所周知的。

[0131] 在某些情况下,通过用编码抑制分子(例如, shRNA)的一种或多种表达载体和编

码癌基因的一种或多种表达载体转染非癌细胞（瞬时或稳定地），由非癌细胞产生癌细胞，所述抑制分子能够抑制肿瘤抑制基因的表达。

[0132] 在某些实施方案中，本发明的细胞（例如，测试细胞、对照细胞）衍生自非癌性组织。例如，细胞可以衍生自任何上皮组织。本领域技术人员应当理解“上皮”指作为遍及机体结构的腔和表面的衬里的细胞层，并且也是至少部分形成许多腺体的组织类型。此类组织包括例如在乳腺、胃肠道（胃、小肠、结肠）、肝、胆道、支气管、肺、胰腺、肾、卵巢、前列腺、皮肤、子宫颈、子宫、膀胱、输尿管、睾丸、外分泌腺、内分泌腺、血管等中发现的组织。在某些实施方案中，上皮是内皮或间皮。在特定实施方案中，细胞是人乳腺上皮细胞。在特定实施方案中，细胞是得自乳房缩小成形术的非癌性人乳腺细胞。在特定实施方案中，测试和对照细胞衍生自通常表达 E- 钙粘蛋白的任何细胞类型。在特定实施方案中，测试和对照细胞是通常不表达 N- 钙粘蛋白的细胞类型。在特定实施方案中，测试和对照细胞是这样的细胞类型，与它在其下表达 N- 钙粘蛋白的那些比较，通常在平均起来高至少 5、10、20、50 或 100 倍水平的水平下表达 E- 钙粘蛋白。

[0133] 在某些实施方案中，细胞（测试和 / 或对照）已进行修饰，例如遗传修饰，以便表达、抑制或缺失一种或多种癌基因或肿瘤抑制基因。在某些实施方案中，此类修饰使细胞永生化。在某些实施方案中，此类修饰使细胞转化为致瘤细胞。例如，在特定实施方案中，测试和 / 或对照细胞通过在其中表达端粒酶催化亚单位（例如，人端粒酶催化亚单位；hTERT）得到永生化。在特定实施方案中，测试和 / 或对照细胞通过在其中表达 SV40（例如，早期区）或 Ras（任选地活化 Ras，例如 H-rasV12）得到永生化。在某些实施方案中，细胞进行修饰和 / 或处理，以便具有减少或基本上不存在的细胞周期检查点或 DNA 损伤感知蛋白质的表达和 / 或功能活性，所述蛋白质例如 p16 例如 p16^{INK4a}、p53 和 / 或成视网膜细胞瘤（Rb）蛋白质。例如，细胞可以进行修饰，以表达靶向这些基因中的一种或多种的 shRNA，或表达与这些蛋白质中的一种或多种结合的病毒蛋白质。可以使用此类修饰的组合。例如，细胞可以进行修饰以表达 SV40 大 T(LT)、hTERT 和 H-rasV12。使细胞永生化和 / 或转化的其他方法是本领域已知的，并且在本发明的范围内。

[0134] 在本发明的特定实施方案中，测试细胞和对照细胞衍生自未经历 EMT 的基本上等同细胞的原始群体。这些细胞中的某些这样进行处理，以便使其适合于用作测试细胞，例如通过这样修饰其，以便能够以控制方式诱导 EMT，并且随后诱导 EMT，或通过用诱导 EMT 的试剂处理它们，例如如上所述。在特定实施方案中，例如这些测试和对照细胞一般是遗传上匹配的，但具有一种或数种限定的遗传差异例如本文描述的那些，其导致测试细胞已经历 EMT，同时对照细胞未经历 EMT。在特定实施方案中，2 个细胞群体衍生自相同起始群体，其中一个群体已通过引入载体进行修饰，并且另一个群体未如此进行修饰。在特定实施方案中，2 个细胞群体衍生自相同起始群体，其中一个群体已通过引入编码抑制核酸或蛋白质元件的表达构建体进行修饰，并且另一个群体已通过引入表达构建体进行修饰，所述表达构建体编码对照核酸或蛋白质元件（例如，预期不抑制内源细胞基因或蛋白质的那种）。一般地，表达构建体在其他方面相似或等同。在本发明的特定实施方案中，测试细胞和对照细胞是遗传上匹配的，并且包含表达构建体（任选地整合到基因组内），其包括编码能够诱导 EMT 的小干扰 RNA 的序列（例如，靶向 E- 钙粘蛋白的 shRNA 或 miRNA），其中序列与调节型（例如，诱导型或阻遏型）启动子可操作地连接。在本发明的特定实施方案中，测试细胞和

对照细胞是遗传上匹配的,并且包含表达构建体(任选地整合到基因组内),其包括编码能够诱导 EMT 的蛋白质的序列,其中序列与调节型(例如,诱导型或阻遏型)启动子可操作地连接。可调节表达系统是本领域已知的,并且包括利用可通过重金属、小分子等诱导的启动子的系统。适合于在哺乳动物细胞中使用的药物调节型启动子包括四环素/多西环素调节型启动子系统。

[0135] “遗传上匹配的”包括具有大部分等同的基因组的细胞或细胞群体,例如,其基因组至少 95%、98%、99%、99.5%、99.9%、99.99%或更多等同。一般地,遗传上匹配的细胞衍生自相同受试者,或在特定物种例如小鼠或大鼠的情况下,衍生自属于特定近交品系的不同受试者。在某些实施方案中,遗传上匹配的细胞衍生自相同组织样品。在本发明的某些实施方案中,测试和对照细胞衍生自遗传上匹配细胞的相同起始细胞群体,并且在本发明方法中使用前,已经历不超过 2、5、10、15、20、25、30、35、40、50、60、70、80、90 或 100 轮细胞分裂。

[0136] 本发明提供了遗传上匹配的测试细胞(或可以诱导经历 EMT 且从而变得适合于用作测试细胞的细胞)和对照细胞和包含此类细胞的试剂盒。不希望受任何理论束缚,并且不以任何方式限制本发明,通过使用遗传上匹配并且主要或基本上不同之处在于测试细胞已经历 EMT 并且对照细胞未经历 EMT 的测试和对照细胞,本发明允许鉴定区别影响测试细胞与对照细胞比较的化合物(例如,抑制测试细胞生长的程度明显大于其抑制对照细胞生长的程度的化合物),因为测试细胞和对照细胞中由于细胞分化状态出现的差异,例如由于测试细胞已经历 EMT(与获得性癌症干细胞样性质相关),而不是因为测试和对照细胞中其他可能未知的遗传或后生差异。

[0137] 除非另有说明,否则本发明的实践采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学常规技术,这在本领域技术内。此类技术在文献中充分说明,例如 Molecular Cloning: A Laboratory Manual,第 2 版(Sambrook 等人,1989) Cold Spring Harbor Press; Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait, 编辑,1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook(J. E. Cellis, 编辑,1998) Academic Press; Animal Cell Culture(R. I. Freshney, 编辑,1987); Introduction to Cell and Tissue Culture(J. P. Mather 和 P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures(A. Doyle, J. B. Griffiths 和 D. G. Newell, 编辑,1993-8) J. Wiley and Sons; Methods in Enzymology(Academic Press, Inc.); Handbook of Experimental Immunology(D. M. Weir 和 C. C. Blackwell, 编辑); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J. M. Miller 和 M. P. Calos, 编辑,1987); Current Protocols in Molecular Biology(F. M. Ausubel 等人, 编辑,1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis 等人, 编辑,1994); Current Protocols in Immunology(J. E. Coligan 等人, 编辑,1991); Short Protocols in Molecular Biology(Wiley 和 Sons, 1999); Immunobiology(C. A. Janeway 和 P. Travers, 1997); Antibodies(P. Finch, 1997); Antibodies: a practical approach(D. Catty., 编辑, IRL Press, 1988-1989); Monoclonal antibodies: a practical approach(P. Shepherd 和 C. Dean, 编辑, Oxford University Press, 2000); Using antibodies: a laboratory manual(E. Harlow 和 D. Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies(M. Zanetti 和 J. D. Capra,

编辑, Harwood Academic Publishers, 1995); 和 Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita 等人, 编辑, J. B. Lippincott Company, 第 7 版, 2004 或第 8 版, 2008 年将出现)。关于癌症的更多信息可以在 The Biology of Cancer, Weinberg, RA, 等人, Garland Science, 2006 中找到。

[0138] 筛选 CSC 靶向化合物

[0139] 在一个实施方案中, 用于鉴定抑制 CSC 介导的肿瘤形成或生长的化合物或组合物的方法包括使测试细胞与化合物或组合物接触, 并且测定测试细胞的生长和 / 或存活中的改变。一般地, 测试细胞是已经历上皮至间质转变的细胞。筛选可以在体外或在体内执行, 使用本文公开的测定法中的任何一种, 或本领域普通技术人员已知的任何适合于使测试细胞与化合物或组合物接触, 并且测定测试细胞的生长和 / 或存活中的改变的测定法。

[0140] 在一个方面, 使化合物以预定剂量与测试细胞 (和任选地对照细胞) 接触。在一个实施方案中, 剂量可以是约高达 1nM。在另一个实施方案中, 剂量可以是约 1nM- 约 100nM。在另一个实施方案中, 剂量可以是约 100nM- 约 10uM。在另一个实施方案中, 剂量可以是或超过 10uM。在温育合适时间后, 任选地预定时间, 通过本领域普通技术人员已知的合适方法测定化合物或组合物对测试细胞的生长和 / 或存活的作用。细胞可以与化合物接触各种时间段。在特定实施方案中, 细胞接触 12 小时 -20 天, 例如 1-10 天、2-5 天、或任何介于其间的范围或特定值。细胞可以瞬时或连续接触。需要时, 化合物可以在评估生长和 / 或存活前去除。如本文使用的, “阻遏”、“抑制”或“减少”可以是完全或不完全的。例如, 细胞增殖也称为生长, 可以降低或未降低至完全停滞的状态, 这种状态用于被视为细胞增殖阻遏、抑制或减少的效应之一。类似地, 基因表达可以降低或未降低至完全停止的状态, 这种状态用于被视为基因表达阻遏、抑制或减少的效应之一。此外, “阻遏”、“抑制”或“减少”可以包括现有状态的维持和实现状态改变的过程。例如, 细胞增殖的抑制可以指非增殖细胞的增殖预防 (非增殖状态的维持) 和抑制增殖细胞增殖的过程 (影响增殖状态改变的过程)。类似地, 细胞存活的抑制可以指例如通过坏死或凋亡杀死一种或多种细胞, 和致使细胞对死亡敏感的过程, 例如通过抑制抗凋亡调节因子的表达或活性。阻遏、抑制或减少可以是至少约 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99% 的参考水平 (例如, 对照水平)。

[0141] 在某些情况下, 与对照水平比较的调节水平 (例如, 阻遏、抑制或减少) 是统计上显著的。如本文使用的, “统计上显著的”指小于 0.05 的 p 值, 例如小于 0.025 的 p 值或小于 0.01 的 p 值, 使用合适的统计检验 (例如, ANOVA、t 检验等)。

[0142] 在特定实施方案中, 通过选自下述的测定法测定测试细胞和 / 或对照细胞的生长和 / 或存活: 细胞计数测定法、复制标记测定法、细胞膜完整性测定法、基于细胞 ATP 的生存测定法、线粒体还原酶活性测定法、胱天蛋白酶活性测定法、膜联蛋白 V 染色测定法、DNA 含量测定法、DNA 降解测定法和核碎裂测定法。其他示例性测定法包括 BrdU、EdU 或 H3- 胸苷掺入测定法; 使用核酸染料的 DNA 含量测定法, 所述核酸染料例如 Hoechst 染料、DAPI、放线菌素 D、7- 氨基放线菌素 D 或碘化丙啶; 细胞代谢测定法例如 AlamarBlue、MTT、XTT 和 CellTitre Glo; 核碎裂测定法; 细胞质组蛋白结合的 DNA 碎裂测定法; PARP 切割测定法; TUNEL 染色; 和膜联蛋白染色。

[0143] 在一个实施方案中, 基因表达分析 (例如, 微阵列、cDNA 阵列、定量 RT-PCR、RNA 酶

保护测定法)用于检查其产物介导细胞周期/生长和/或存活的基因表达。示例性细胞周期/生长相关基因包括影响下述的那些:G1期和/或G1/S转变:ANAPC2、CCND1(细胞周期蛋白D1)、CCNE1(细胞周期蛋白E1)、CDC7、CDC34、CDK4、CDK6、CDKN1B(p27)、CDKN1C(p57)、CDKN3、CUL1、CUL2、CUL3、CUL4A、CUL5、E2F1、SKP2;S期和DNA复制:ABL1(C-ABL)、MCM2、MCM3、MCM4(CDC21)、MCM5(CDC46)、MCM6(Mis5)、MCM7(CDC47)、PCNA、RPA3、SUMO1、UBE1;G2期和G2/M转变:ANAPC2、ANAPC4、ANAPC5、ARHI、BCCIP、BIRC5、CCNA1(细胞周期蛋白A1)、CCNB1(细胞周期蛋白B1)、CCNG1(细胞周期蛋白G1)、CCNH、CCNT1、CCNT2、CDC25A、CDC25C、CDC37、CDK5R1、CDK5R2、CDK5RAP1、CDK5RAP3、CDK2、CDK7、CDKN3、CKS1B、CKS2、DDK11、DNM2、GTF2H1、GTSE1、HERC5、KPNA2、MNAT1、PKMYT1、RGC32、SERTAD1;M期:CCNB2(细胞周期蛋白B2)、CCNF、CDC2(CDK1)、CDC16、CDC20(p55cdc)、CDC25A、CDC25C、MRE11A、RAD50、RAD51;细胞周期检查点和细胞周期停滞:ATM、ATR、BRCA1、BRCA2、CCNA2(细胞周期蛋白A2)、CCNE2(细胞周期蛋白E2)、CCNG2(细胞周期蛋白G2)、CDC2(CDK1)、CDC25A、CDC34、CDC45L、CDC6、CDK2、CDKN1A(p21)、CDKN1B(p27)、CDKN1C(p57)、CDKN2A(p16)、CDKN2B(p15)、CDKN2C(p18)、CDKN2D(p19)、CDKN3、CHEK1(CHK1)、CHEK2(CHK2/RAD53)、CUL1、CUL2、CUL3、CUL4A、CUL5、GADD45A、HUS1、KNTC1、MAD2L1、MAD2L2、NBS1(NIBRIN)、RAD1、RAD17、RAD9A、RB1、RBBP8、TP53(p53);细胞周期调节:ABL1(C-ABL)、ANAPC2、ANAPC4、ANAPC5、ARHI、ATM、ATR、BCCIP、BCL2、BRCA2、CCNA1(细胞周期蛋白A1)、CCNA2(细胞周期蛋白A2)、CCNB1(细胞周期蛋白B1)、CCNB2(细胞周期蛋白B2)、CCNC(细胞周期蛋白C)、CCND1(细胞周期蛋白D1)、CCND2(细胞周期蛋白D2)、CCND3(细胞周期蛋白D3)、CCNE1(细胞周期蛋白E1)、CCNE2(细胞周期蛋白E2)、CCNF(细胞周期蛋白F)、CCNH(细胞周期蛋白H)、CCNT1、CCNT2、CDC16、CDC2(CDK1)、CDC20(p55cdc)、CDC25A、CDC25C、CDC37、CDC45L、CDC6、CDK2、CDK4、CDK5R1、CDK5R2、CDK6、CDK7、CDK8、CDKN1A(p21)、CDKN1B(p27)、CKS1B、CUL5、DDX11、E2F1、E2F2、E2F3、E2F4、E2F5、E2F6、GADD45A、KNTC1、MKI67(Ki67)、PCNA、PKMYT1、RAD9A、RB1、SKP2、TFDP1(DP1)、TFDP2(DP2);细胞周期负调节:ATM、BAX、BRCA1、CDC7、CDKN2B(p15)、CDKN2D(p19)、RBL1(p107RB)、RBL2(p130RB2)、TP53(p53)。示例性细胞存活/凋亡基因包括下述的那些:TNF配体家族:LTA(TNF- α)、TNF(TNF- α)、TNFSF5(CD40配体)、TNFSF6(FasL)、TNFSF7(CD27配体)、TNFSF8(CD30配体)、TNFSF9(4-1BB配体)、TNFSF10(TRAIL)、TNFSF14(HVEM-L)、TNFSF18;TNF受体家族:LTBR、TNFRSF1A(TNFR1)、TNFRSF1B(TNFR2)、TNFRSF5(CD40)、TNFRSF6(Fas)、TNFRSF6B、TNFRSF7(CD27)、TNFRSF9(4-1BB)、TNFRSF10A(DR4)、TNFRSF10B(DR5)、TNFRSF10C(DcR1)、TNFRSF10D(DcR2)、TNFRSF11B、TNFRSF12A、TNFRSF14(HVEM)、TNFRSF19、TNFRSF21、TNFRSF25;Bcl-2家族:BAD、BAG1、BAG3、BAG4、BAK1、BAX、BCL2、BCL2A1(bf1-1)、BCL2L1(bc1-x)、BCL2L2(bc1-w)、BCL2L10、BCL2L11(bim-样蛋白质)、BCL2L12、BCL2L13、BCLAF1、BID、BIK、BNIP1、BNIP2、BNIP3(nip3)、BNIP3L、BOK(Mtd)、HRK、MCL1;胱天蛋白酶家族:CASP1、CASP2、CASP3、CASP4、CASP5、CASP6、CASP7、CASP8、CASP9、CASP10、CASP14;IAP家族:BIRC1(NIAP)、BIRC2(IAP2)、BIRC3(IAP1)、BIRC4(XIAP)、BIRC5(存活素)、BIRC6(Bruce)、BIRC7、BIRC8;TRAF家族:TRAF1、TRAF2、TRAF3(CRAF1)、TRAF4、TRAF5;CARD家族:APAF1、BCL10(HuE10)、BIRC2、BIRC3、CARD4(NOD1)、CARD6、CARD8、CARD9、CARD10、CARD11、CARD12、CARD14、CARD15、CASP1、CASP2、CASP4、CASP5、CASP9、CRADD、NOL3(Nop30)、PYCARD、RIPK2(CARDIAC);死亡结构域

家族:CRADD、DAPK1、DAPK2、FADD、RIPK1、TNFRSF10A、TNFRSF10B、TNFRSF11B、TNFRSF1A、TNFRSF21、TNFRSF25、TNFRSF6、TRADD;CIDE 结构域家族:CIDEA、CIDEB、DFFA、DFFB;p53 和 DNA 损伤应答:ABL1、AKT1、APAF1、BAD、BAX、BCL2、BCL2L1、BID、CASP3、CASP6、CASP7、CASP9、GADD45A、TP53(p53)、TP53BP2、TP73、TP73L; 和 AKT1、BAG1、BAG3、BAG4、BCL2、BCL2A1、BCL2L1、BCL2L10、BCL2L2、BFAR、BIRC1、BIRC2、BIRC3、BIRC4、BIRC5、BIRC6、BIRC7、BIRC8、BNIP1、BNIP2、BNIP3、BRAF、CASP2、CFLAR、GDNF、IGF1R、MCL1、TNF(TNF- α)、TNFRSF6、TNFRSF6B、TNFRSF7、TNFRSF18、TNFRSF5。基本上改变一种或多种细胞周期、生长和 / 或存活基因的表达的化合物或组合物可以是用于癌症干细胞治疗的候选物,和 / 或可以使用本文公开的方法中的任何进行检查 / 测试。

[0144] 在其他实施方案中,测试细胞和 / 或对照细胞的生长和 / 或存活中的改变通过检查蛋白质水平进行评估,例如由前述细胞周期 / 生长和 / 或存活基因编码的蛋白质水平。蛋白质水平可以通过本领域普通技术人员已知的合适方法例如蛋白质分析进行评估。本领域普通技术人员已知的其他方法可以用于分析蛋白质水平,例如免疫组织化学、免疫细胞化学、ELISA、放射性免疫测定法、蛋白质组学方法,例如质谱法或抗体阵列。

[0145] 本文公开的相关评估细胞生长和 / 或存活的另外其他参数可以提供用于筛选化合物的测定法。例如,可以使用细胞的荧光激活细胞分选(FACS)或高容量成像。在一个实施方案中,通过使用自动化显微镜成像或 FACS 评估测试细胞的凋亡状态,可以评估化合物或组合物对测试细胞和 / 或对照细胞的作用(参见例如,美国专利公开 20070172818)。在某些情况下,基于荧光的 TUNEL 染色(例如,使用伴随本领域已知的标准 TUNEL 方法的 FITC-dUTP)可以揭示测试细胞和 / 或对照细胞中的凋亡。其他方法包括使用抗体(例如,经切割的 PARP、经切割的核纤层蛋白 A 等)的免疫组织化学,以检测胱天蛋白酶活性。在其他实施方案中,可以使用基于图像的细胞周期 / 生长标记,例如 Young DW,等人, Nat Chem Biol. 2008 Jan ;4(1):59-68 中例示的那些中的一种或多种。这些成像例子不旨在是限制性的,并且其他相似方法对于本领域普通技术人员将是显而易见的。

[0146] 在其他实施方案中,细胞生长和 / 或存活基因例如本文公开的那些的活性可以在化合物筛选中进行测定。在一个实施方案中,测定法包括表达载体,其包括与编码报道基因产物(例如,萤光素酶)的序列可操作地连接的细胞生长和 / 或存活基因的调节区,其中报道基因的表达与细胞生长和 / 或存活基因的激活相关。在这个实施方案中,报道基因表达(例如,萤光素酶活性)的评估提供用于评估细胞生长和 / 或存活的间接方法。这种和其他相似测定法将是本领域普通技术人员众所周知的。报道基因产物可以是但不限于,荧光或发光蛋白质、酶、或顺应方便检测和任选地定量的其他蛋白质。例子包括 GFP、RFP、BFP、YFP、CYP、SFP、造礁珊瑚荧光蛋白质、mFruits 例如 mCherry、萤光素酶、水母荧光素和前述任何的衍生物。酶报道蛋白质例如 β -半乳糖苷酶、碱性磷酸酶、氯霉素乙酰转移酶等也是有用的。在其他实施方案中,染色质免疫沉淀测定法可以用于评估在一种或多种细胞生长和 / 或存活基因的调节 DNA 区处的转录因子结合。

[0147] 本发明的前述测定方法顺应高通量筛选(HTS)实施。在某些实施方案中,本发明的筛选测定法可以是高通量或超高流通量的(例如 Fernandes, P. B., Curr Opin Chem Biol. 1998 2:597; Sundberg, S A, Curr Opin Biotechnol. 2000, 11:47)。HTS 指筛选高达且包括 100,000 种化合物 / 天。然而,超高流通量(uHTS)指测试超过 100,000 种化合物

/天。本发明的筛选测定法可以以多孔形式执行,例如 96-孔、384-孔形式或 1,536-孔形式,并且适合于自动操作。在本发明的高流通量测定法中,在单天内可以筛选数千种不同化合物或组合物。特别地,微量滴定板的每个孔可以用于运行针对所选择的测试化合物的单独测定法,或如果待观察浓度或温育时间效应,那么多个孔可以包含单一化合物的测试样品。可以测定多块平板/天;使用本发明的测定法,高达约 6,000、20,000、50,000 或超过 100,000 种不同化合物的测定法筛选是可能的。一般地,本文公开的测定法的 HTS 实现涉及自动操作的使用。在某些实施方案中,由一个或多个机器人组成的整合机器人系统在多个测定站之间转运测定微量滴定板,用于化合物、细胞和/或试剂添加、混合、温育和最终读数或检测。在某些方面,本发明的 HTS 系统可以同时制备、温育且分析多块平板,进一步加速数据收集过程。高流通量筛选实施是本领域众所周知的。示例性方法也公开于 William P. Janzen(2002) 的 *High Throughput Screening: Methods and Protocols* (Methods in Molecular Biology), 和 **Jörg** Hüser 的 *High-Throughput Screening in Drug Discovery* (Methods and Principles in Medicinal Chemistry) (2006) 中,其内容通过引用整体合并入本文。

[0148] 如上所述,使用所公开的测试方法可以开发这样的化合物或组合物,其基本上影响测试细胞和/或对照细胞的生长和/或存活,和/或其为癌症干细胞依赖性肿瘤生长的潜在调节物。可以进行测试的化合物或组合物类型的例子包括但不限于:抗转移试剂、细胞毒素剂、细胞生长抑制剂、细胞因子试剂、抗增殖试剂、免疫毒素剂、基因治疗试剂、血管生成抑制试剂、细胞靶向试剂、HDAC 抑制试剂等。如本文使用的,在某些情况下,化合物或组合物可以被称为测试试剂。

[0149] 下文提供了测试化合物的更多例子,并且不意欲是限制性的。本领域普通技术人员应认识到存在众多另外类型的合适测试化合物,其可以使用本发明的方法、细胞和/或动物模型进行测试。测试化合物可以是小分子(例如,其为小分子化学文库成员的化合物)。化合物可以是分子量低于约 3,000 道尔顿的小有机或无机分子。小分子可以是例如至少约 100Da-约 3,000Da(例如,约 100-约 3,000Da、约 100-约 2,500Da、约 100-约 2,000Da、约 100-约 1,750Da、约 100-约 1,500Da、约 100-约 1,250Da、约 100-约 1,000Da、约 100-约 750Da、约 100-约 500Da、约 200-约 1500、约 500-约 1000、约 300-约 1000Da 或约 100-约 250Da)。测试化合物也可以是微生物,例如细菌(例如,大肠埃希杆菌 (*Escherichia coli*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、鸟分枝杆菌 (*Mycobacterium avium*) 或百日咳博德特菌 (*Bordetella pertussis*))、真菌和原生生物(例如,亚马逊利什曼原虫 (*Leishmania amazonensis*)),其可以是或不是遗传修饰的。参见例如,美国专利号 6,190,657 和 6,685,935 以及美国专利申请号 2005/0036987 和 2005/0026866。

[0150] 小分子可以是天然产物、合成产物或组合化学文库的成员。不同分子集可以用于涵盖各种功能,例如电荷、芳香性、氢键合、弹性、大小、侧链长度、疏水性和刚性。适合于合成小分子的组合技术是本领域已知的(例如,如由 Obrecht 和 Villalagrodo, *Solid-Supported Combinatorial and Parallel Synthesis of Small-Molecular-Weight Compound Libraries*, Pergamon-Elsevier Science Limited(1998) 示例的),并且包括诸如“分裂合成 (split and pool)”或“平行”合成技术、固相和液相技术、和编码技术的那些(参见例如, Czarnik, A. W., *Curr. Opin. Chem. Biol.* (1997) 1:60)。此外,许多小分子文库是

公开或商购可得的（例如，通过 Sigma-Aldrich、TimTec (Newark, DE)、Stanford School of Medicine High-Throughput Bioscience Center (HTBC)、和 ChemBridge Corporation (San Diego, CA)。

[0151] 使用新方法筛选的化合物文库可以包括各种类型的测试化合物。给定文库可以包括一组结构上相关或无关的测试化合物。在某些实施方案中，测试化合物是肽或拟肽分子。在某些实施方案中，测试化合物包括但不限于肽类似物，包括包含非天然存在的氨基酸、氨基酸的磷类似物、具有非肽连接的氨基酸、或其他小有机分子的肽。在某些实施方案中，测试化合物是拟肽（例如，类肽寡聚物，例如类肽酰胺或酯类似物、D-肽、L-肽、寡聚尿素或寡聚氨基甲酸酯）；肽（例如，三肽、四肽、五肽、六肽、七肽、八肽、九肽、十肽或更大，例如 20-聚体或更多）；环肽；其他非天然肽样结构；和无机分子（例如，杂环分子）。测试化合物也可以是核酸。

[0152] 测试化合物及其文库可以这样获得：通过系统改变第一种“命中”化合物也称为先导化合物的结构，其具有化学治疗（例如，抗 CSC）效应，并且使那种结构与所得到的生物活性关联（例如，结构-活性关系研究）。

[0153] 此类文库可以使用本领域任何已知的组合文库方法中的众多方法获得，包括：类肽文库（具有肽功能性，但具有新型、非肽主链的分子主链，所述非肽主链对酶促降解有抗性，但仍然保留生物活性；参见例如，Zuckermann，等人，J. Med. Chem., 37 : 2678-85 (1994)）；可空间寻址的平行固相或液相文库；需要解卷积的合成文库方法；“一珠一化合物 (one-bead one-Compound)”文库方法；和使用亲和色谱法选择的合成文库方法 (Lam, Anticancer Drug Des. 12 : 145 (1997))。用于合成分子文库的方法的例子可以在本领域中找到，例如：DeWitt 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90 : 6909 (1993)；Erb 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91 : 11422 (1994)；Zuckermann 等人，J. Med. Chem., 37 : 2678 (1994)；Cho 等人，Science, 261 : 1303 (1993)；Carrell 等人，Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33 : 2059 (1994)；Carell 等人，Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33 : 2061 (1994)；和 Gallop 等人，J. Med. Chem., 37 : 1233 (1994)。化合物的文库可以在溶液中（例如，Houghten (1992) Biotechniques, 13 : 412-421）、或在珠 (Lam (1991) Nature, 354 : 82-84)、芯片 (Fodor (1993) Nature, 364 : 555-556)、细菌 (Ladner, USP 5, 223, 409)、孢子 (Ladner, 美国专利号 5, 223, 409)、质粒上 (Cull 等人 (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89 : 1865-1869) 或在噬菌体上呈现 (Scott 和 Smith (1990) Science, 249 : 386-390；Devlin (1990) Science, 249 : 404-406；Cwirla 等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 : 6378-6382；Felici (1991) J. Mol. Biol., 222 : 301-310；Ladner, 同上)。

[0154] 在某些实施方案中，本发明的方法用于筛选“批准药物”。“批准药物”是已由 FDA 或另一个国家中的相似政府机构为了任何目的批准用于在人中使用的任何化合物（这个术语包括生物分子例如蛋白质和核酸）。

[0155] 申请人保留从“测试化合物”的范围中和 / 或从本发明的组合物和方法中排除任何一种或多种特定化合物、或化合物类型的权利。在某些实施方案中，“测试化合物”是在本领域中未发现或未已知作为组织培养基的成分的化合物，例如为了培养细胞的目的提供的化合物。在某些实施方案中，测试化合物可以是在本领域中发现或已知作为组织培养基的成分的化合物，但以不同于它通常用作组织培养基成分的浓度的浓度用作测试化合物。在

某些实施方案中,化合物不是本领域已知对于治疗癌症和 / 或减少与化学疗法相关的副作用有用的化合物。

[0156] 本文公开的化合物鉴定和表征方法的特定结果可以是临床上有利的,例如如果化合物是 CSC 肿瘤生长的阻遏物,例如本文公开的那些。另外其他临床上有利的结果包括:(a) 原发性肿瘤生长的抑制或停滞,(b) 转移性肿瘤生长的抑制,和 (c) 测试受试者的存活延长。具有临床上有利的结果的化合物是潜在化学治疗剂,并且可以像这样配制。

[0157] 鉴定为具有化学治疗或抗 CSC 效应的化合物在本文中被称为前导化合物,并且可以例如使用合理设计进行选择且系统改变,以最佳化结合亲和力、亲合力、特异性或其他参数。此类最佳化也可以使用本文描述的方法进行筛选。因此,可以使用本文描述的方法筛选第一小分子文库,鉴定其为“命中”或“前导”的一种或多种化合物(根据例如其抑制测试细胞和 / 或癌症干细胞生长和 / 或存活的能力,和 / 或其减少 CSC 依赖性肿瘤的大小和 / 或数目的能力,例如在原始植入部位处和在转移部位处),且对这些命中实施系统结构改变,以创造与命中在结构上相关的第二化合物(例如,精制前导化合物)文库。第二文库随后可以使用本文描述的方法进行筛选。精制前导化合物可以通过修饰前导化合物而产生,以达到 (i) 改善的效力、(ii) 降低的毒性(改善的治疗指数);(iii) 降低的副作用;(iv) 修饰的治疗作用发作和 / 或效应持续时间;和 / 或 (v) 修饰的药代动力学参数(吸收、分布、代谢和 / 或排泄)。前导化合物可以例如从天然来源中纯化或化学合成。可以直接对前导化合物进行修饰,或可以由合适原材料合成精制前导化合物(例如,衍生物)。

[0158] 在本发明的特定实施方案中,使用本发明方法鉴定的化合物显示相对于其针对对照细胞的活性,针对测试细胞的选择活性(例如,增殖抑制、毒性)。例如,与对照细胞比较,化合物的 IC₅₀ 对于测试细胞可以低约 2、5、10、20、50、100、250、500 或 1000 倍。在某些实施方案中,与对于未经历 EMT 的遗传上匹配的细胞比较,化合物的 IC₅₀ 对于经历 EMT 的细胞可以低约 2、5、10、20、50、100、250、500 或 1000 倍。在某些实施方案中,与对于非 CSC 癌细胞比较,化合物的 IC₅₀ 对于 CSCs 可以低约 2、5、10、20、50、100、250、500 或 1000 倍。在某些实施方案中,与对于未经历 EMT 的正常(非癌性)细胞比较,化合物的 IC₅₀ 对于 CSCs 可以低约 2、5、10、20、50、100、250、500 或 1000 倍。

[0159] 无限制地,如实施例描述的,使用本发明方法沙利霉素被鉴定为针对癌症干细胞具有选择毒性的化合物。沙利霉素和各种衍生物和结构上相似的化合物的合成已得到报告(Allen, PR, 等人, J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 :2403-2411(1998))。本发明包括沙利霉素、沙利霉素衍生物和结构上相似的化合物的使用,包括但不限于在前述出版物中、在本发明的组合物和方法中描述的那些。

[0160] 无限制地,如实施例描述的,使用本发明方法阿巴克丁被鉴定为针对癌症干细胞具有选择毒性的化合物。阿巴克丁是包含除虫菌素 B1a 和更少量除虫菌素 B1b 的除虫菌素混合物,例如至少 80% 除虫菌素 B1a 和小于约 20% 除虫菌素 B1b。除虫菌素是通常衍生自土壤细菌除虫链霉菌(*Streptomyces avermitilis*) 的大环内酯。阿巴克丁是这种细菌的天然发酵产物。阿巴克丁也称为除虫菌素 B1 和 MK-936。除虫菌素家族成员包括伊维菌素(22, 23-二氢除虫菌素 B_{1a}+22, 23-二氢除虫菌素 B_{1b})、赛拉菌素、多拉菌素、以及前述除虫菌素。参见例如,美国专利公开号 20040101936、PCT 公开 WO/1993/018778、WO/1994/029328、WO/1999/005156、WO2008037934、WO2008019784 和前述任何中的参考文献,所有这些通过引

用合并入本文,用于讨论各种除虫菌素、除虫菌素衍生物,和用于产生特定除虫菌素和衍生物的过程。本发明进一步包括除虫菌素、除虫菌素衍生物和结构上相似的化合物(包括但不限于在所述出版物中、在本发明的组合物和方法中描述的那些)的用途。

[0161] 无限制地,如实施例描述的,使用本发明方法依托泊苷被鉴定为针对癌症干细胞具有选择毒性的化合物。参见,各种依托泊苷衍生物和结构上相关的化合物及其制备方法在例如 WO/2003/048166、WO/2003/035661、WO2004000859 和 WO2005056549、以及前述中的参考文献中描述,所有这些通过引用合并入本文。本发明包括依托泊苷、依托泊苷衍生物和结构上相似的化合物(包括但不限于在所述出版物中、在本发明的组合物和方法中描述的那些)的使用。

[0162] 无限制地,如实施例描述的,使用本发明方法尼日利亚霉素被鉴定为针对癌症干细胞具有选择毒性的化合物。尼日利亚霉素是其结构和性质类似于抗生素莫能星的那些的抗生素,这两者都充当离子载体且与单价和二价阳离子形成复合物。各种尼日利亚霉素衍生物和结构上相似的化合物及其制备方法例如在 EP0356944、EP0346760 和 EP0336248、以及前述中的参考文献中描述,所有这些通过引用合并入本文。本发明包括尼日利亚霉素、尼日利亚霉素衍生物和结构上相似的化合物(包括但不限于在所述出版物中、在本发明的组合物和方法中描述的那些)的使用。

[0163] 具有针对 CSCs 的选择毒性的另外化合物在实施例中提及。本发明提供了包括给受试者施用本文公开的 2 种或更多种 CSC 特异性化合物的联合治疗。还提供的是包括本文公开的 2 种或更多种 CSC 特异性化合物的组合物。在特定实施方案中,2 种或更多种化合物选自:沙利霉素、沙利霉素衍生物和结构上相似的化合物,除虫菌素、除虫菌素衍生物和结构上相似的化合物,依托泊苷、依托泊苷衍生物和结构上相似的化合物,以及尼日利亚霉素、尼日利亚霉素衍生物和结构上相似的化合物。

[0164] 在某些情况下,希望使用剂量应答测定法来测定本发明的化合物或组合物效力。用于测定化合物或组合物效力的方法是本领域众所周知的。在某些实施方案中,效力表征为化合物或组合物的半数最大有效浓度(EC₅₀)。如本文使用的,术语半数最大有效浓度(EC₅₀)指化合物或组合物的浓度,其在生物系统(例如,一种或多种细胞)中诱导在基线应答(例如,无化合物)和最大应答之间一半的应答。EC₅₀在本领域中通常用作化合物或组合物效力(例如,药物效力)的量度。剂量应答曲线的 EC₅₀ 代表其中观察到 50% 其最大效应(也称为最大应答)的化合物或组合物浓度。EC₅₀ 与半数最大抑制浓度(IC₅₀) 相关,所述 IC₅₀ 通常在生物化学测定法中用作通过化合物或组合物抑制(50%抑制)的量度,例如竞争结合测定法和功能激动剂/拮抗剂测定法。用于测定 EC₅₀/IC₅₀ 值的方法是本领域众所周知的。

[0165] 用于测定化合物结构的各种技术是已知的,并且可以用于本文描述的方法中(例如,NMR、质谱法、配备电子捕获检测器的气相色谱法、荧光和吸收光谱法)。

[0166] 测试化合物的化学治疗活性的测定法可以在体外或先体外后体内和/或在体内进行,其中使用本发明的细胞(例如,已经历上皮至间质转变的测试细胞,使用任何合适方法、癌细胞和癌细胞系等鉴定或产生的癌症干细胞)和方法或用于测试功效的任何合适系统。例如,测试化合物可以施用于非人受试者,对于所述非人受试者已施用(例如,植入或注射)多个本文描述的测试细胞,例如足以诱导一种或多种肿瘤(例如,CSC 依赖性肿瘤)、

肿瘤异种移植等形成的许多癌症干细胞。非人受试者可以是例如啮齿类（例如，小鼠）。任选地非人受试者是免疫妥协的，例如 Nude、SCID、NOD-SCID、Rag1^{-/-} 和 Rag2^{-/-} 小鼠。在某些实施方案中，测试受试者是有癌症倾向的动物，例如包含活化癌基因和 / 或缺乏肿瘤抑制基因的动物，或已暴露于致使动物倾向于发展癌症的条件、化合物或刺激的动物。如本文使用的，非人测试受试者也可以被称为动物宿主。

[0167] 测试化合物可以通过本领域已知的任何方案施用于受试者。例如，测试化合物可以在本发明的癌症干细胞施用之前、同时和 / 或之后施用。测试化合物也可以在方法过程自始至终定期施用，例如每天、每周、每两周或每月 1、2、3、4 或更多次，且在本发明的细胞已施用前或后开始。在其他实施方案中，测试化合物连续施用于受试者（例如，静脉内或通过从植入物、泵、持续释放制剂等中释放）。待施用的测试化合物的剂量可以依赖于多种因素，包括化合物类型、受试者重量、施用频率等。用量的测定对于本领域普通技术人员来说是常规的。一般用量是 0.01-200mg/kg（例如，0.1-20 或 1-10mg/kg）。

[0168] 受试者中的肿瘤大小和 / 或数目（例如，CSC 依赖性肿瘤）可以在肿瘤细胞和测试化合物施用后进行测定。肿瘤大小和 / 或数目可以通过本领域已知的任何方法非侵袭性测定。例如，荧光标记（例如，通过表达荧光蛋白质例如 GFP）的肿瘤细胞可以通过各种肿瘤成像技术或仪器进行监控，例如非侵袭性荧光方法例如双光子显微镜检查术。皮下植入的肿瘤大小可以在皮肤下面进行监测且测量。

[0169] 为了测定化合物是否影响 CSC 依赖性肿瘤形成或癌症干细胞生长，受试者中的肿瘤大小和 / 或数目可以与参考标准（例如，对照值）比较。参考标准可以是已给予癌症干细胞和测试化合物的相同实验方案的对照受试者，除测试化合物被省略或以无活性形式施用外。备选地，可以施用被认为在系统中惰性的化合物。参考标准也可以是对照受试者，其已施用并非癌症干细胞的癌细胞和测试化合物，并非癌症干细胞的癌细胞和无测试化合物，或并非癌症干细胞的癌细胞和无活性测试化合物。参考标准还可以是数值数字或数字范围，代表未经治疗的受试者中预期的 CSC 依赖性肿瘤的大小和 / 或数目。这个数值数字或数字范围可以通过观察未经治疗的受试者的代表性样品进行测定。参考标准还可以是在化合物施用前的测试动物。

[0170] 在某些情况下，化合物（例如，前导化合物）的活性可以通过接触在共培养中生长的对照细胞和测试细胞进行测试。共培养使得能够评估在共同生长室中与化合物接触的 2 个或更多个细胞群体（例如，对照和测试细胞）的选择生长和 / 或存活性质。一般地，共培养生长的每个细胞群体将具有鉴定特征，其是可检测的并且不同于共培养中的一个或多个其他细胞群体的鉴定特征。在某些实施方案中，鉴定特征包括 GFP 蛋白质或其他报道蛋白质所述例如上文提及的那些和 / 或癌症干细胞生物标记的表达水平。然而，本发明并不限于其，并且本领域已知的其他鉴定特征也可以是合适的，前提是鉴定特征使得能够测量（例如，通过 FACS 或本文公开的其他合适测定方法）共培养中的 2 个或更多个细胞群体各自的生长和 / 或存活水平。包括至少某些测试细胞（例如，1-99% 测试细胞）和至少某些对照细胞（例如，1-99% 对照细胞）的组合物例如共培养物是本发明的一个方面。在某些实施方案中，测试细胞的百分率是 10% -90%。在其他实施方案中，测试细胞的百分率是 20% -80%。在某些实施方案中，测试细胞的百分率是 30% -70%。在某些实施方案中，测试细胞的百分率是 40% -60%，例如约 50%。在某些实施方案中，组合物进一步包括测试试

剂。

[0171] 在其他实施方案中,测试细胞和对照细胞在基本上等同的条件下维持在分开器皿(例如,微孔平板的分开孔)中。

[0172] 包括测试细胞、对照细胞和一种或多种测试化合物例如 10、100、1000、10,000 种或更多种测试化合物的测定法系统是本发明的方面,其中细胞和测试试剂以适合于测定一种或多种测试化合物对细胞的作用的方式排列在一个或多个器皿中。一般地,器皿包含合适的组织培养基,并且测试化合物存在于组织培养基中。本领域技术人员可以选择对于培养特定细胞类型合适的培养基。在某些实施方案中,培养基不含或基本上不含血清或组织提取物,而在其他实施方案中,存在此类组分。在某些实施方案中,细胞在塑料或玻璃表面上培养。在某些实施方案中,细胞在预期提供在至少某些方面类似在许多组织中发现的细胞外环境的环境的材料上或中培养,所述材料包括胶原、层粘连蛋白、Matrigel®或合成材料,例如合成水凝胶。在某些实施方案中,测试和/或对照细胞与非癌性基质细胞一起培养。在某些实施方案中,测试和/或对照细胞与成纤维细胞一起培养。在某些实施方案中,测试和/或对照细胞在三维培养基质中培养。

[0173] 用于癌症干细胞基因的遗传筛选

[0174] 在某些实施方案中,本发明的测定方法用于鉴定新型癌症干细胞基因。如本文使用的,癌症干细胞基因是影响癌症干细胞生长和/或存活的基因。在一个实施方案中,癌症干细胞遗传筛选使一种或多种测试细胞和/或一种或多种对照细胞中 RNAi 介导的基因阻遏与用于细胞生长和/或存活的测定法组合。例如,已经历上皮至间质转变的一种或多种测试细胞和/或未经历上皮至间质转变的一种或多种对照细胞,可以与针对测试基因的 siRNA(或相似的基于 RNAi 的基因阻遏方式)接触,从而抑制一种或多种测试细胞和/或一种或多种对照细胞中的测试基因表达。在抑制测试基因表达后,例如通过使用任何本文公开的方法,可以评估一种或多种测试和/或对照细胞的生长和/或存活。在一个实施方案中,其抑制影响(例如,抑制、激活)一种或多种测试细胞而不是一种或多种对照细胞的生长和/或存活的测试基因是癌症干细胞基因。

[0175] 在一个实施方案中,基于全基因组 RNAi 的遗传筛选用于鉴定在全基因组范围上的癌症干细胞基因。在某些实施方案中,用于基于 RNAi 的遗传筛选的测试细胞是已经历上皮至间质转变的细胞。前述遗传筛选方法使用包括 RNAi 基因阻遏方式(例如 shRNA、siRNA、esiRNA 等)的文库,其靶向从在研究中的生物中的单基因到所有或基本上所有已知基因。在一个实施方案中,文库利用基于 mir-30 的 shRNA(shRNAmir) 表达载体,其中 shRNA 序列侧面为前 miR-30 序列的 5' 和 3' 的约 125 个碱基(Chang K, Elledge SJ, Hannon GJ. Nat. Methods. 2006 Sep; 3(9):707-14.)。表达载体可以采用聚合酶 I、聚合酶 II 或聚合酶 III 启动子,以驱动这些 shRNAs 的表达且导致细胞中的功能 siRNAs。前面一种聚合酶允许使用常规蛋白质表达策略,包括诱导型和组织特异性表达系统。其他文库编译(library compilation),例如基于慢病毒的系统、esiRNA 文库、siRNA 和针对人序列的文库,对于本领域普通技术人员是容易获得且众所周知的。用于癌症干细胞基因的遗传筛选不限于 RNAi 方法,并且可以包括基于 cDNA 的外源基因表达或遗传阻遏物元件(GSEs)的使用。在一个实施方案中,使用基于全基因组 cDNA 的遗传筛选。因此,筛选方法顺应包括基于 cDNA 或 GSE 方式的文库的使用,所述文库由从在研究中的生物中的单基因到所有或基本上所有已知基

因组成。

[0176] 靶鉴定

[0177] 本发明包括鉴定化合物的靶,所述化合物使用本发明方法鉴定,例如实施例中公开的化合物。术语“靶”在本文中与其在本领域中的含义一致使用,指生物学活性剂对其发挥作用的生物分子(例如,受试者机体中存在的生物分子),例如导致治疗利益例如抑制 CSCs 生长和/或增殖的作用。例如,化合物可以直接(通过物理相互作用)或间接作用于一种或多种细胞基因产物。靶可以是例如细胞表面或细胞内受体、酶、通道、分泌蛋白质等。使用本发明的方法鉴定为 CSC 选择性化合物的化合物的靶是用于药物开发努力的候选物(此类候选物有时被称为“药物开发靶”)。本发明因此提供了用于鉴定药物开发努力可以有用地针对其的候选生物分子的方法。本领域已知作用于此类生物分子的化合物可以用作 CSC 选择性试剂。此类试剂可以使用本文描述的方法进行测试。此外,本领域已知的标准筛选方法可以用于鉴定作用于此类生物分子的另外化合物,例如小分子、蛋白质、适体、抗体或抗体片段、核酸(例如,小干扰 RNAs)等。

[0178] 化合物使用本发明的方法鉴定为 CSC 选择性化合物后,各种方法可以用于鉴定化合物的一种或多种生物靶。在一个实施方案中, RNAi 或遗传阻遏物(GSE)元件文库用于抑制细胞中的个别基因,所述细胞例如 CSCs 或已经历 EMT 且对通过化合物的生长抑制敏感的细胞。在一个实施方案中, cDNA 文库用于在细胞中过表达每种基因,所述细胞例如 CSCs 或已经历 EMT 且对通过化合物的生长抑制敏感的细胞。如果特定基因的抑制或过表达调节(例如,在本发明的各种实施方案中,取消、减少或增加)敏感性,那么基因或此类基因的产物是成为化合物的靶和/或用于药物开发的靶的候选物。本领域技术人员将选择合适测定法或测定法的组合。

[0179] 在另一个实施方案中,化合物用于鉴定其分子靶。任何合适方法都可以用于靶鉴定。化合物可以进行标记或修饰以包括反应基团或标签。反应基团或标签可以例如在这样的位点上掺入,在所述位点上此类掺入基本上不影响化合物的活性。细胞与化合物接触,并且在其中化合物与其一种或多种靶相互作用的条件下维持。细胞可以但无需是测试细胞,例如已经历 EMT 的细胞。细胞可以但无需具有与用于最初鉴定化合物的那些细胞相同的类型。任选地,使化合物和它与之物理上相互作用的生物分子交联。化合物随后连同它与之结合的一种或多种生物分子一起分离(例如,除掉某些或所有其他细胞组成成分;部分纯化)。如果化合物是加上标签的,那么标签可以用于分离化合物。

[0180] 在另一个实施方案中,亲和色谱法用于鉴定化合物的一种或多种靶。化合物与载体例如色谱法树脂或其他载体附着,从而形成亲和基质。例如,接头例如四甘醇接头,可以在化合物的合适位置上附着,并且随后在合适条件下与 Affi-Gel 10 树脂偶联,以提供亲和基质。使亲和基质与细胞裂解物(例如,测试细胞裂解物、对照细胞裂解物)一起温育,并且随后洗涤,并且通过在含 SDS 缓冲液中煮沸,从树脂中洗脱经结合的生物分子,例如蛋白质。通过亲和基质保留的蛋白质可以例如通过 SDS/PAGE 分离,并且例如通过银染色或任何合适方法显现。它们随后可以从凝胶中分离。随后例如使用肽测序、质谱法等鉴定生物分子。需要时,无活性但结构上相似的化合物可以用作阴性对照。通过在与亲和基质结合的过程中将化合物加入细胞裂解物中,可以执行与可溶性化合物的竞争,以证实特异性。在某些实施方案中,与对照细胞比较,其在测试细胞中选择性存在和/或在测试细胞中与化

合物选择性结合的生物分子是有利的。

[0181] 在另一个实施方案中,微阵列分析、基因表达系列分析 (SAGE)、或相似技术用于评估使用本发明方法鉴定的化合物对所选择类型的细胞中的基因表达的作用,所述细胞例如测试细胞、对照细胞、癌细胞、CSCs 等。其表达由于暴露于化合物得到调节的基因是成为化合物的靶和 / 或用于药物开发的靶的候选物。在本发明的其他实施方案中,本领域已知的方法用于测定化合物对蛋白质水平、定位和 / 或修饰状态 (例如,磷酸化状态) 等的作用。其水平、定位和 / 或修饰状态由于暴露于化合物得到调节的蛋白质是成为化合物的靶和 / 或用于药物开发的靶的候选物。

[0182] 因此,使用本发明方法鉴定的化合物用作探针,以鉴定在 CSC 生物学中起重要作用的基因和基因产物,例如其活性促成 CSC 性质和 / 或使 CSCs 与非 CSC 癌细胞、正常细胞等区分的基因和基因产物。无限制地,此类基因和基因产物作为用于药物开发的靶是有用的,以用于鉴定选择性抑制 CSCs 生长和 / 或增殖的另外试剂的目的。

[0183] 癌症干细胞生物标记和受试者的治疗

[0184] 本文描述的方法具有治疗与癌症干细胞相关的病症例如癌症的广泛应用。癌症是特征在于不受控制或异常控制的细胞增殖和其他恶性细胞性质的疾病。如本文使用的,术语癌症包括但不限于,下述癌症类型:乳腺癌;胆道癌;膀胱癌;脑癌包括成胶质细胞瘤和成髓细胞瘤;宫颈癌;绒毛膜癌;结肠癌;子宫内膜癌;食管癌;胃癌;血液学肿瘤包括急性淋巴细胞性和髓性白血病;T 细胞急性成淋巴细胞性白血病 / 淋巴瘤;多毛细胞白血病;慢性髓性白血病、多发性骨髓瘤;AIDS 相关白血病和成人 T 细胞性白血病 / 淋巴瘤;上皮内肿瘤包括博文氏 (Bowen' s) 病和佩吉特氏 (Paget' s) 病;肝癌;肺癌;淋巴瘤包括霍奇金氏 (Hodgkin' s) 病和淋巴细胞淋巴瘤;成神经细胞瘤;口癌包括鳞状细胞癌;卵巢癌包括起于上皮细胞、基质细胞、生殖细胞和间充质细胞的那些;胰腺癌;前列腺癌;直肠癌;肉瘤包括平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、脂肪肉瘤、纤维肉瘤和骨肉瘤;皮肤癌包括黑素瘤、梅克尔 (Merkel) 细胞癌、卡波济氏 (Kaposi' s) 肉瘤、基底细胞癌和鳞状细胞癌;睾丸癌包括生殖细胞瘤例如精原细胞癌、非精原细胞癌 (畸胎瘤、绒毛膜癌)、基质肿瘤和生殖细胞肿瘤;甲状腺癌包括甲状腺腺癌和髓癌;和肾癌包括腺癌和肾母细胞瘤。在优选实施方案中,癌症是结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、宫颈癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、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、支气管原癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、肾母细胞瘤或睾丸瘤。在一个实施方案中,癌症是肺癌。在一个实施方案中,癌症是乳腺癌。其他癌症将是本领域普通技术人员已知的。

[0185] 本发明的某些方面是用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法,其包括给受试者施用有效量的选择性靶向癌症干细胞的化合物。本发明的其他方面是用于治疗具有癌症或怀疑具有癌症的受试者的方法,其包括给受试者施用与选择性靶向癌症干细胞的化合物组合的有效量的癌症化学治疗剂 (例如,多柔比星、紫杉醇、放线菌素 D、喜树碱和星形孢菌素)。如本文使用的,癌症化学治疗剂包含 CSC 选择性化合物以及并非 CSC 选择性的化合物。并非 CSC 选择性的化合物包括已知靶向 CSCs 和并非 CSCs 的癌细胞的化合物,和仅靶向并非 CSCs 的癌细胞的化合物。在某些实施方案中,受试者用与有效量的药物组合物组合的紫杉醇进行治疗,所述药物组合物包括选自下述的选择性癌症干细胞特异性化合

物：依托泊苷、沙利霉素、阿巴克丁和尼日利亚菌素、和前述任何的衍生物。

[0186] 对于本文公开的方法有用的癌症化学治疗剂的非限制性例子包括烷化剂和烷化剂样试剂，例如氮芥（例如，苯丁酸氮芥、氮芥气、环磷酰胺、异环磷酰胺和美法仑）、亚硝基脲（例如，卡莫司汀、福莫司汀、罗莫司汀和链佐星）、铂试剂（即，烷化剂样试剂）（例如，卡铂、顺铂、奥沙利铂、BBR3464 和沙铂）、白消安、达卡巴嗪、丙卡巴肼、替莫唑胺、噻替派、曲奥舒凡和乌拉莫司汀；抗代谢药例如叶酸（例如，氨基蝶呤、氨甲蝶呤、培美曲塞和雷替曲塞）；嘌呤例如克拉曲滨、氯法拉滨、氟达拉滨、硫嘌呤、喷司他丁和硫鸟嘌呤；嘧啶例如卡培他滨、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氟尿苷和吉西他滨；纺锤体毒剂 / 有丝分裂抑制剂例如紫杉烷（例如，多西他赛、紫杉醇）和长春花属（例如，长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨）；细胞毒性 / 抗肿瘤抗生素例如蒽环（例如，柔红霉素、多柔比星、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、Pixantrone 和戊柔比星）、通过链霉菌属 (*Streptomyces*) 的各种物种天然产生的化合物（例如，放线菌素、博来霉素、丝裂霉素、普卡霉素）和羟基脲、拓扑异构酶抑制剂例如喜树属（例如，喜树碱、托泊替康和伊立替康）和鬼臼属（例如，依托泊苷、替尼泊苷）；用于癌症免疫疗法的单克隆抗体，例如抗受体酪氨酸激酶（例如，西妥昔单抗、帕木单抗、曲妥珠单抗）、抗 CD20（例如，利妥昔单抗和托西莫单抗）、和其他例如阿仑珠单抗、贝伐珠单抗和吉妥珠单抗；光敏剂例如氨基酮戊酸、甲基氨基酮戊酸盐、卟吩姆钠和维替泊芬；酪氨酸激酶抑制剂例如西地尼布、达沙替尼、厄洛替尼、吉非替尼、伊马替尼、拉帕替尼、尼洛替尼、索拉非尼、舒尼替尼和凡德他尼；丝氨酸 / 苏氨酸激酶抑制剂（例如，Abl、c-Kit、一种或多种胰岛素受体家族成员、一种或多种 EGF 受体家族成员、Akt、mTOR（例如，雷帕霉素或其类似物、mTORC1 和 / 或 mTORC2 的直接抑制剂）、Raf 激酶家族、磷脂酰肌醇 (PI) 激酶例如 PI3 激酶、PI 激酶样激酶家族成员、细胞周期蛋白依赖性激酶家族成员、极光激酶家族的抑制剂）、生长因子受体拮抗剂、和其他例如类维生素 A（例如，阿利维 A 酸和维甲酸）、六甲蜜胺、安吡啶、阿那格雷、三氧化二砷、天冬酰胺酶（例如，培门冬酶）、贝沙罗汀、硼替佐米、地尼白介素、雌莫司汀、伊沙匹隆、马索罗酚、米托坦和睾内酯、Hsp90 抑制剂、蛋白酶体抑制剂、HDAC 抑制剂、血管生成抑制剂例如抗血管内皮生长因子试剂，例如贝伐珠单抗或 VEGF-Trap、基质金属蛋白酶抑制剂、促凋亡试剂（例如，凋亡诱导剂）、抗炎剂等。在某些情况下，可能希望评估在具有癌症或怀疑具有癌症的受试者中的癌症干细胞生物标记，并且基于生物标记评估的结果选择用于受试者的治疗。例如，如果检测出癌症干细胞生物标记，那么受试者可以用有效量的药物组合物进行治疗，所述药物组合物包括癌症干细胞特异性化合物，例如使用本文公开的方法鉴定的一种。在某些实施方案中，如果检测出癌症干细胞生物标记，那么受试者可以用有效量的药物组合物进行治疗，所述药物组合物包括沙利霉素、阿巴克丁、依托泊苷或尼日利亚菌素、或前述任何的衍生物，任选地与紫杉醇或其衍生物（例如，水溶性或靶向衍生物或结构上相关的化合物，例如类似物例如多西他赛（参见例如，WO/2003/045932 和 US2008033189）组合。使用本文公开的方法或本领域已知的任何合适方法，可以评估前述方法的癌症干细胞生物标记。示例性癌症干细胞生物标记包括 E-钙粘蛋白表达、TWIST 表达和 CD44⁺CD24⁻ 标记谱。其他示例性癌症干细胞生物标记在本文中公开，并且对于本领域普通技术人员将是显而易见的。

[0187] 为了评估癌症干细胞生物标记，可能必须从受试者获得临床样品（例如，癌症样品）。一般地，临床样品是肿瘤活组织检查或由其分离的细胞。然而，本发明并不限于其，

并且可以使用任何合适的临床样品,前提是样品具有在具有癌症干细胞的受试者中可检测的癌症干细胞生物标记。示例性临床样品包括唾液、齿龈分泌物、脑脊髓液、胃肠液、粘液、泌尿生殖分泌物、滑液、血液、血清、血浆、尿、囊液、淋巴液、腹水、胸腔积液、间隙液、细胞内液、眼液体、精液、乳房分泌物、玻璃体液和鼻分泌物。

[0188] 在某些实施方案中,本发明的治疗方法涉及具有(或含有)或处于具有癌症干细胞(CSC)和/或CSC依赖性肿瘤的危险中的受试者治疗。如本文使用的,受试者是哺乳动物,包括但不限于犬、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡、啮齿类或灵长类。受试者可以是家庭宠物(例如,犬、猫)、农业家畜动物(例如,牛、马、猪、鸡等)、实验室动物(例如,小鼠、大鼠、兔等)、动物园动物(例如,狮子、长颈鹿等),但不限于其。优选受试者是人受试者。人受试者可以是儿科或成人受试者。在某些实施方案中,成人受试者是老年受试者。受试者是否被视为“处于具有CSC还是CSC依赖性肿瘤的危险中”是可以在照顾受试者的熟练从业者的判断力内的决定。可以使用任何合适的诊断测试和/或标准。例如,受试者可以被视为“处于具有CSC或CSC依赖性肿瘤的危险中”,如果(i)相对于未具有突变或遗传多态性的一般群体的其他成员,受试者具有与发展或具有癌症的危险增加相关的突变、遗传多态性、基因或蛋白质表达谱、和/或血液中特定物质的存在;(ii)受试者具有一种或多种危险因素,例如具有癌症家族史,已暴露于致癌剂或肿瘤促进剂或条件,例如石棉、烟草烟雾、黄曲霉毒素、辐射、慢性感染/炎症等、高龄;(iii)受试者具有一种或多种癌症症状等。在某些实施方案中,如果化合物是先前(即在本发明前)已施用于受试者用于除治疗癌症外的目的的那种,例如用于治疗除癌症外的病状,那么受试者不是化合物通常将施用于其用于此类其他目的的那种,和/或化合物以不同于本领域已知对于此类其他目的有用的那种的制剂或剂量施用。

[0189] 此外,如本文使用的,疗法或治疗包括病症(例如,CSC依赖性肿瘤)的改善、治愈和/或治愈维持(即,复发的预防或延迟)。在病症已开始后的治疗旨在减少、改善或完全消除病症,和/或其相关症状,以防止其变得恶化,减慢进展率,或在它最初消除后预防病症重新出现(即,预防复发)。合适剂量和治疗方案可以依赖于所使用的特定化合物、化合物的递送方式和它是单独还是组合使用而改变。如本文使用的,治疗有效量是抑制CSC依赖性肿瘤形成、进展和/或播散(例如,转移)的化合物或组合物的量。治疗有效量可以指本文描述或使用本文描述的方法开发的任何一种或多种化合物或组合物,其具有CSC依赖性肿瘤抑制性质(例如,抑制CSCs的生长和/或存活)。用于确定关于本文描述的任何化合物或组合物的治疗有效量的方法是本领域普通技术人员已知的。如本文使用的,药物组合物包括以治疗有效量的具有治疗效用的化合物或组合物,和药学上可接受的载体,即促进化合物或组合物递送的载体。关于任何特定应用的有效量也可以依赖于此类因素如待治疗的癌症、待施用的特定化合物、受试者的尺寸或疾病或病状的严重性而改变。本领域普通技术人员可以凭经验测定本发明的特定分子的有效量,而无需过度实验。与本文提供的教导组合,通过在各种活性化合物和加权因子中选择,所述加权因子例如效力、相对生物利用度、患者体重、不良副作用的严重性和优选施用方式,可以计划有效的预防或治疗处理方案,目的是避免大量毒性且仍有效治疗特定受试者。在某些实施方案中,有用的化合物以统计上显著的方式增加用化合物治疗的受试者的存活的平均长度,增加无进展存活的平均长度,和/或减少复发率。

[0190] 本文描述的化合物的实施剂量一般范围是约 $0.1 \mu\text{g}$ -10,000mg, 更一般是约 $1 \mu\text{g}$ -8000mg, 例如约 $10 \mu\text{g}$ -100mg, 每天、每周、每月或其他时间间隔一次或多次。就受试者体重而言, 在本发明的特定实施方案中的一般用量范围是约 $0.1 \mu\text{g}$ -20mg/kg/天, 例如约 1-10mg/kg/天, 例如约 1-5mg/kg/天。绝对量将依赖于各种因素, 包括伴随治疗, 剂量数目和个别患者参数包括年龄、健康状况、大小和重量。这些是本领域普通技术人员众所周知的因素, 并且可以用不超过例行实验解决。通常是这样的情况, 使用最大剂量, 即根据合理医学判断的最高安全剂量。

[0191] 所使用的剂量可以是最大耐受剂量或亚治疗剂量或两者之间的任何剂量。还考虑本发明的分子的多次剂量。当本发明的分子与任一分子的亚治疗用量, 或两者的亚治疗用量组合施用, 可以用于治疗具有或处于发展癌症的危险中的受试者。当 2 类药物一起使用时, 癌症药剂可以以亚治疗剂量施用, 以产生所需治疗结果。如本文使用的, “亚治疗剂量” 指这样的用量, 如果在不存在其他试剂的情况下施用, 其小于在受试者中将产生治疗结果的那种用量。因此, 癌症药剂的亚治疗剂量是在不存在本发明的分子施用的情况下, 在受试者中不产生所需治疗结果的那种。癌症药剂的治疗剂量是用于癌症治疗的医学领域众所周知的。这些用量在参考文献中已广泛描述, 例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, 1990; 以及由医学职业依赖作为用于癌症治疗的指导的许多其他医学参考文献。

[0192] 本文公开的组合物可以通过任何合适方法施用, 例如经口、鼻内、皮下、肌内、静脉内、动脉内、肠胃外、腹膜内、鞘内、气管内、眼、舌下、经阴道、经直肠、皮肤、或作为气溶胶。依赖于待治疗的病状类型 (例如, 癌症), 本发明的化合物可以例如吸入、摄入或通过全身途径施用。因此, 各种施用方式或途径是可用的。所选择的特定方式当然将依赖于所选择的特定化合物、待治疗的特定病状和对于治疗效果所需的用量。一般而言, 本发明的方法可以使用任何施用方式进行实践, 所述施用方式是医学上可接受的, 意指产生可接受的功效水平而不引起临床上无法接受的不良作用的任何方式。优选施用方式是肠胃外和经口途径。术语“肠胃外” 包括皮下、静脉内、肌内、腹膜内和胸骨内注射或输注技术。在某些实施方案中, 由于直接递送至肺, 吸入药剂是特别有用的, 例如在肺癌患者中。几类计量吸入器常规用于通过吸入施用。这些类型的装置包括计量吸入器 (MDI)、呼吸引发型 MDI、干粉吸入器 (DPI)、与 MDI 组合的隔离物 / 容纳室、和喷雾器。其他合适途径对于本领域普通技术人员将是显而易见的。

[0193] 根据本发明的方法, 化合物可以在药物组合物中施用。施用本发明的药物组合物可以通过本领域技术人员已知的任何方法完成。除活性剂外, 本发明的药物组合物一般包括药学上可接受的载体。如本文使用的, 术语“药学上可接受的载体” 意指一种或多种相容固体或液体填充性稀释剂或封装物质, 其适合于施用于人或低等动物。在优选实施方案中, 药学上可接受的载体是无毒材料, 其不干扰活性成分的生物活性的有效性。如本文使用的, 术语“相容的” 意指药物组合物的组分能够以这样的方式与本发明的化合物混合以及彼此混合, 以使得在常规使用情况下不存在基本上减少药物组合物的药物功效的相互作用。药学上可接受的载体当然必须具有足够高的纯度和足够低的毒性, 以致使它们适合于施用于待治疗的人或低等动物。

[0194] 可以充当药学上可接受的载体的物质的某些例子是糖例如乳糖、葡萄糖和蔗糖;

淀粉例如玉米淀粉和马铃薯淀粉；纤维素及其衍生物，例如羧甲基纤维素钠、乙基纤维素、乙酸纤维素；黄蓍胶粉；麦芽；明胶；滑石；硬脂酸；硬脂酸镁；硫酸钙；蔬菜油例如花生油、棉籽油、芝麻油、橄榄油、玉米油和可可（theobroma）油；多元醇例如丙二醇、丙三醇、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇；糖；海藻酸；无热原水；等渗盐水；磷酸盐缓冲溶液；可可脂（栓剂基质）；乳化剂例如 Tweens. RTM.；以及在药物制剂中使用的其他无毒相容性物质。还可以存在润湿剂和润滑剂例如十二烷基硫酸钠，以及着色剂、调味剂、赋形剂、成片剂、稳定剂、抗氧化剂和防腐剂。

[0195] 与本发明的化合物结合采用的药学上可接受的载体以足以提供实际大小与用量关系的浓度使用。药学上可接受的载体总共可以包括约 60 重量% - 约 99.99999 重量% 本发明的药物组合物，例如约 80% - 约 99.99%，例如约 90% - 约 99.95%、约 95% - 约 99.9%、或约 98% - 约 99%。

[0196] 适合于制备用于经口施用和局部应用的单位剂型的药学上可接受的载体是本领域众所周知的。它们的选择将依赖于次级考虑如味道、成本和 / 或贮存稳定性，其对于本发明的目的不是关键的，并且可以由本领域技术人员毫无困难地进行。

[0197] 药学上可接受的组合物可以包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、稳定剂、增溶剂和本领域众所周知的其他材料。与本发明的化合物结合使用的药学上可接受的载体的选择基本上通过待施用化合物的方法来决定。特别用于肽的示例性药学上可接受的载体在美国专利号 5,211,657 中描述。此类制剂可以照常规包含盐、缓冲试剂、防腐剂、相容载体和任选地其他治疗剂。当在医学中使用时，盐应是药学上可接受的，但非药学上可接受的盐可以方便地用于制备其药学上可接受的盐，并且不从本发明的范围中排除。此类药理学和药学上可接受的盐包括但不限于由下述酸制备的那些：盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸、马来酸、乙酸、水杨酸、柠檬酸、甲酸、丙二酸、琥珀酸等。此外，药学上可接受的盐可以制备为碱金属或碱土金属盐，例如钠、钾或钙盐。还应当理解化合物可以作为药学上可接受的药物前体提供，或可以使用活性代谢物。此外，应当理解可以用增加其摄取、生物半衰期（例如，聚乙二醇化）等的部分修饰试剂，例如靶向部分。

[0198] 本发明的制剂在药学上可接受的溶液中施用，所述溶液可以照常规包含药学上可接受浓度的盐、缓冲试剂、防腐剂、相容载体、佐剂和任选地其他治疗剂。

[0199] 本发明的化合物可以配制成以固体、半固体、液体或气体形式的制剂，例如片剂、胶囊、粉剂、颗粒剂、软膏、溶液、沉积物、吸入剂和注射剂，和用于经口、肠胃外或手术施用的通常方法。本发明还包含配制例如通过植入物用于局部施用的药物组合物。

[0200] 适合于经口施用的组合物可以作为各自包含预定量的活性剂的离散单元呈现，例如胶囊、片剂、锭剂。其他组合物包括在水成液或非水成液中的悬浮液例如糖浆剂、酏剂或乳剂。

[0201] 当本文描述的化合物在治疗上使用时，在特定实施方案中，所需施用途径可以是 通过肺气溶胶。用于制备包含化合物的气溶胶递送系统的技术是本领域技术人员众所周知的。一般地，此类系统应利用不会显著损害肽的生物性质的组分（参见例如，通过引用合并的 Sciarra 和 Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, 1990, 第 1694-1712 页）。本领域技术人员可以容易地决定用于产生气溶胶的各种参数和条件，而无需借助于过度实验。

[0202] 本发明的化合物可以直接施用于组织。优选地,组织是其中发现癌细胞的那种。备选地,组织是其中癌症可能出现的那种。直接组织施用可以通过直接注射来达到。肽可以施用一次,或备选地,它们可以以多次施用进行施用。如果施用多次,那么肽可以经由不同途径进行施用。例如,第一次(或前数次)施用可以直接在受累组织内进行,而随后施用可以是全身性的。

[0203] 对于经口施用,通过使活性化合物与本领域众所周知的药学上可接受的载体组合,可以容易地配制化合物。此类载体使得本发明的化合物能够配制为片剂、丸剂、糖锭剂、胶囊、液体、凝胶剂、糖浆剂、膏剂、悬浮液等,以用于由待治疗的受试者经口摄取。用于经口施用的药物制剂可以作为固体赋形剂获得,任选地磨碎所得到的混合物,并且需要时,在加入合适助剂后,加工颗粒的混合物,以获得片剂或糖锭剂核心。合适的赋形剂特别是填充剂,例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露醇或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉蜀黍淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。需要时,可以加入崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐,例如海藻酸钠。任选地经口制剂还可以在盐水或缓冲液中配制,用于中和和内部酸条件,或可以无需任何载体而使用。

[0204] 糖锭剂核心与合适包衣一起提供。为了这个目的,可以使用浓缩的糖溶液,这可以任选地包含阿拉伯树胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波普凝胶、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。染料或颜料可以加入片剂或糖锭剂包衣中,用于鉴定或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0205] 可以经口使用的药物制剂包括由明胶制成的推入配合胶囊,以及由明胶和塑化剂例如甘油或山梨糖醇制成的软密封胶囊。推入配合胶囊可以包含与填充剂例如乳糖、粘合剂例如淀粉和/或润滑剂例如滑石或硬脂酸镁和任选地稳定剂混合的活性成分。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬浮于合适液体中,例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇。此外,可以加入稳定剂。也可以使用配制用于经口施用的微球体。此类微球体已是本发明充分限定的。用于经口施用的所有制剂应是适合于此类施用的用量。

[0206] 对于颊部施用,组合物可以采取以常规方式配制的片剂或锭剂的形式。对于通过吸入的施用,用于根据本发明使用的化合物可以以来自增压包或喷雾器的气溶胶喷雾剂呈现的形式方便地递送,其中伴随合适推进剂的使用,例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、二氧化碳或其他合适气体。在增压气溶胶的情况下,用量单位可以通过提供阀递送测定量进行测定。可以配制用于在吸入器或吹入器中使用的例如明胶胶囊和药筒,其中包含化合物和合适粉末基质例如乳糖或淀粉的粉末混合物。用于制备气溶胶递送系统的技术是本领域技术人员众所周知的。一般地,此类系统应利用不会显著损害活性剂的生物性质的组分(参见例如,通过引用合并的 Sciarra 和 Cutie, "Aerosols," in Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版, 1990, 第1694-1712页)。本领域技术人员可以容易地决定用于产生气溶胶的各种参数和条件,而无需借助过度实验。

[0207] 当希望系统地递送化合物时,它可以配制用于通过注射而肠胃外施用,例如通过弹丸注射或连续输注。用于注射的制剂可以以单位剂型呈现,例如在安瓿或多剂量容器中,其中伴随加入的防腐剂。组合物可以采取此类形式,如在油性或水性媒介物中的悬浮液、溶液或乳状液,并且可以包含配制试剂例如悬浮剂、稳定剂和/或分散剂。

[0208] 用于肠胃外施用的制剂包括无菌水性或非水性溶液、悬浮液和乳状液。非水性溶剂的例子是丙二醇、聚乙二醇、蔬菜油例如橄榄油、和可注射有机酯例如油酸乙酯。水性载体包括水、醇 / 水溶液、乳状液或悬浮液，包括盐水和缓冲介质。肠胃外媒介物包括氯化钠溶液、林格氏 (Ringer's) 右旋糖、右旋糖和氯化钠、乳酸林格氏液或不挥发性油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂、电解质补充剂 (例如基于林格氏右旋糖的那些) 等。还可以存在防腐剂和其他添加剂，例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等。较低剂量将由其他施用形式例如静脉内施用产生。在受试者中的应答在所应用的起始剂量下不足的事件中，较高剂量 (或通过不同的更局部化的递送途径的有效更高剂量) 可以用于达到患者耐受性允许的程度。考虑多次剂量 / 天，以达到合适的化合物系统水平。

[0209] 在另外一个实施方案中，优选媒介物是适合于植入哺乳动物接受者内的生物相容性微粒或植入物。依照这种方法有用的示例性生物蚀解性植入物在 PCT 国际申请号 PCT/US/03307 (公开号 WO 95/24929, 名称为“Polymeric Gene Delivery System”, 要求于 1994 年 3 月 15 日提交的美国专利申请序列号 213,668 的优先权) 中描述。PCT/US/0307 描述了用于包含生物大分子的生物相容的、优选生物可降解的聚合基质。聚合基质可以用于达到试剂在受试者中的持续释放。依照本发明的一个方面，本文描述的试剂可以封装或分散于 PCT/US/03307 中公开的生物相容的、优选生物可降解的聚合基质内。聚合基质优选以微粒例如微球体 (其中试剂分散遍及固体聚合基质) 或微胶囊 (其中试剂贮存于聚合壳的核心中) 的形式。用于包含试剂的其他形式的聚合基质包括薄膜、包衣、凝胶、植入物和支撑架。选择聚合基质装置的大小和组成，以导致在基质装置植入其内的组织中的有利释放动力学。聚合基质装置的大小进一步根据待使用的递送方法进行选择，一般注射到组织内或通过气溶胶将悬浮液施用到鼻内和 / 或肺区域内。聚合基质组合物可以选择为具有有利的降解率以及由生物粘附的材料形成，以当装置施用于脉管、肺或其他表面时，进一步增加转移的有效性。基质组成也可以选择为不降解而是通过经过延长时间段的扩散而释放。

[0210] 生物不可降解和生物可降解的聚合基质可以用于将本发明的试剂递送给受试者。生物可降解的基质是优选的。此种聚合物可以是天然或合成聚合物。合成聚合物是优选的。聚合物基于释放所需经过的时间段进行选择，一般以数小时到一年或更长时间的级别。一般地，经过数小时到 3-12 个月的时间段的释放是最希望的。聚合物任选地以水凝胶的形式，所述水凝胶可以吸收高达约 90% 的其在水中的重量，并且进一步任选地与多价离子或其他聚合物交联。

[0211] 一般而言，通过扩散或更优选地通过聚合基质的降解，使用生物蚀解性植入物可以递送本发明的试剂。可以用于形成生物可降解递送系统的示例性合成聚合物包括：聚酰胺、聚碳酸酯、聚烷撑、聚烷撑二醇、聚烷撑氧化物、聚烷撑对苯二酸酯 (terephthalates)、聚乙烯醇、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚乙烯卤化物、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙交酯、聚硅氧烷、聚氨基甲酸酯及其共聚物、烷基纤维素、羟基烷基纤维素、纤维素醚、纤维素酯、硝基纤维素、丙烯酸和甲基丙烯酸酯聚合物、甲基纤维素、乙基纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟丁基甲基纤维素、乙酸纤维素、丙酸纤维素、乙酸丁酸纤维素、乙酸邻苯二甲酸纤维素、羧乙基纤维素、三乙酸纤维素、硫酸纤维素钠盐、聚 (甲基甲基丙烯酸酯)、聚 (乙基甲基丙烯酸酯)、聚 (丁基甲基丙烯酸酯)、聚 (异丁基甲基丙烯酸酯)、聚 (己基甲基丙烯酸酯)、聚 (异癸基甲基丙烯酸酯)、聚 (十二烷基甲基丙烯酸酯)、聚 (苯基甲基丙烯酸酯)、聚 (甲

基丙烯酸酯)、聚(异丙基丙烯酸酯)、聚(异丁基丙烯酸酯)、聚(十八基丙烯酸酯)、聚乙烯、聚丙烯、聚(乙二醇)、聚(环氧乙烷)、聚(对苯二甲酸乙二酯)、聚(乙烯醇)、聚乙酸乙烯酯、聚氯乙烯、聚苯乙烯和聚乙烯吡咯烷酮。

[0212] 生物不可降解的聚合物的例子包括乙烯乙酸乙烯酯、聚(甲基)丙烯酸、聚酰胺、其共聚物和混合物。

[0213] 生物可降解聚合物的例子包括合成聚合物例如乳酸和乙醇酸聚合物、聚酐、聚(原酸)酯、聚氨基甲酸酯、聚(丁酸)、聚(戊酸)、和聚(丙交酯共己内酯)、和天然聚合物例如海藻酸盐和其他多糖包括右旋糖和纤维素、胶原、其化学衍生物(化学基团的置换、添加,例如烷基、烷撑、羟化、氧化和由本领域技术人员常规进行的其他修饰)、白蛋白和其他亲水蛋白质、玉米蛋白和其他醇溶谷蛋白和疏水蛋白质、其共聚物和混合物。一般而言,通过在体内酶促水解或暴露于水、通过表面或整体侵蚀来降解这些材料。

[0214] 特别有利的生物粘附聚合物包括由 H. S. Sawhney, C. P. Pathak 和 J. A. Hubell 在 *Macromolecules*, 1993, 26, 581-587 (其教导引入本文中) 描述的生物降解性水凝胶, 聚透明质酸、酪蛋白、明胶、明胶蛋白、聚酐、聚丙烯酸、海藻酸盐、壳聚糖、聚(甲基甲基丙烯酸酯)、聚(乙基甲基丙烯酸酯)、聚(丁基甲基丙烯酸酯)、聚(异丁基甲基丙烯酸酯)、聚(己基甲基丙烯酸酯)、聚(异癸基甲基丙烯酸酯)、聚(十二烷基甲基丙烯酸酯)、聚(苯基甲基丙烯酸酯)、聚(甲基丙烯酸酯)、聚(异丙基丙烯酸酯)、聚(异丁基丙烯酸酯)、和聚(十八基丙烯酸酯)。

[0215] 其他递送系统可以包括时间释放、延迟释放或持续释放递送系统。此类系统可以避免肽的重复施用, 增加对受试者和医生的方便。许多类型的释放递送系统是本领域普通技术人员可用和已知的。它们包括聚合物基质系统例如聚(丙交酯-乙交酯)、共聚草酸酯(copolyoxalates)、聚己酸内酯、聚酯酰胺、聚原酸酯、聚羟基丁酸和聚酐。包含药物的前述聚合物的微胶囊在例如美国专利 5, 075, 109 中描述。递送系统还包括非聚合物系统, 其为: 脂质, 包括甾醇例如胆固醇、胆固醇酯和脂肪酸或中性脂肪例如甘油单、二和三酯; 水凝胶释放系统; 硅橡胶系统; 基于肽的系统; 蜡包衣; 使用常规粘合剂和赋形剂的压缩片剂; 部分熔合的植入物; 等。特定例子包括但不限于: (a) 其中血小板减少试剂以在基质内的形式包含的侵蚀系统, 例如在美国专利号 4, 452, 775、4, 675, 189 和 5, 736, 152 中描述的那些, 和 (b) 其中活性组分以控制速率从聚合物渗透的扩散系统, 例如在美国专利号 3, 854, 480、5, 133, 974 和 5, 407, 686 中。此外, 可以使用基于泵的硬件递送系统, 其中某些适合于植入。

[0216] 长期持续释放植入物的使用可以特别适合于处于发展复发性癌症的危险中的受试者的预防治疗。如本文使用的, 长期释放意指植入物构建且安排为递送治疗水平的活性成分共至少 30 天, 且优选 60 天。长期持续释放植入物是本领域普通技术人员众所周知的, 并且包括上文描述的某些释放系统。

实施例

[0217] 实施例 1:

[0218] 通过高流通量筛选鉴定癌症干细胞的选择性抑制剂

[0219] 近期研究已暗示仅实体瘤内称为癌症干细胞(CSCs)的细胞亚群具有在移植后种植新肿瘤形成的能力; 已提出这些 CSCs 负责转移, 这是癌症死亡率的主因。这个概念暗示

杀死大量肿瘤细胞的许多癌症治疗可能最终失败,因为它们不消除 CSCs。理想地,将可能鉴定选择性靶向 CSCs 的试剂 - 以研究 CSC 生物学且用作用于着手药物开发的引导。不幸的是,由于 CSCs 在肿瘤细胞群体中的罕见性及其在培养中的相对不稳定性,此类筛选先前是不可能的。此处,我们报告了通过诱导经培养的上皮细胞的间质转分化,可以达到 CSCs 比例的 100 倍稳定增加。基于这个观察,设计且进行了化学筛选,以开发对于乳腺 CSCs 具有选择毒性的试剂;这导致几种此类化合物的鉴定。在体内肿瘤种植能力的功能测定法中(即,在体内肿瘤种植测定法中),相对于对照处理,一种化合物(沙利霉素)使 CSCs 减少 100 倍,并且相对于常见乳腺癌药物(紫杉醇)减少 1000 倍,所述紫杉醇诱导 CSCs 中的增加。这个研究证实了鉴定对于上皮 CSCs 显示出特异性毒性的试剂的实践方法。

[0220] 已在操作上通过其在动物模型中在有限稀释下种植肿瘤的能力定义 CSCs。此外, CSCs 通常具有特定重要细胞性质:(1)在某些情况下可以通过就特定细胞表面标记分选细胞来富集 CSCs(1-5);例如,乳腺癌中的 CSCs 在细胞的 CD44+/CD24- 亚部分中富集。(2) CSCs 在专门的悬浮培养中可以形成球形集落;这些集落在乳腺癌的情况下可以被称为乳腺球。(3) CSCs 通常显示出对于许多化学治疗剂增加的抗性(3-7);这个后面一种发现强调了开发 CSC 特异性治疗的重要性。

[0221] 筛选特异性杀死 CSCs 的试剂依赖于在体外获得且繁殖稳定、高度纯化的 CSCs 群体的能力。这对于造血干细胞是可能的,所述造血干细胞通过用细胞表面标记分选可以富集至 > 90% 纯度(8,9),并且可以在培养中维持,但这对于实体瘤仍未达到。对于乳腺癌用可用标记(CD44+/CD24-)分选达到大量富集(100 倍),但 CSCs 仍是整个群体的极少数($\sim 10^{-3}$)。此外,CSC 富集在细胞培养中快速丧失,推测是因为它们分化且产生表型上不同的后代细胞。

[0222] 我们因此感兴趣的是开发其性质类似乳腺癌中的 CSCs 那些的体外系统。就 CSC 标记分选的细胞的目视观察暗示 CSC 频率可能与分化状态相关且由分化状态调节。因此,我们着手检查在乳腺癌中的 CSCs 频率是否由分化状态调节。公开报告已显示特定基因的改变表达可以引起经分化的上皮细胞丧失特征性上皮蛋白质,并且获得在基础和间质细胞谱系中表达的蛋白质。因此,通过短发夹 RNA 干扰(shRNA)介导的 E-钙粘蛋白基因(shEcad)抑制,诱导 HMLER 乳腺癌细胞经历间质转分化(MT)(图 1A)。

[0223] 我们发现间质转分化引起携带与 CSCs 相关标记的乳腺癌细胞群体中的大量增加。特别地,我们观察到 CD44+/CD24- 细胞的百分率在 HMLERshEcad 细胞中比在对照细胞(HMLERshCntrl)中高 ~ 10 倍($\sim 90\%$ 与 5% 比较;图 1F)。在通过 Twist 表达诱导成 MT 的细胞中观察到相似增加(数据未显示)。

[0224] 这些发现暗示 MT 乳腺癌细胞可能具有较高比例的 CSCs。我们因此测试了 HMLERshEcad 细胞在悬浮中生长时形成乳腺球的能力;相对于对照细胞, HMLERshEcad 细胞显示乳腺球形成的 ~ 100 倍增加(15 个球体与 ~ 0.15 个球体/100 个细胞比较;图 1E)(10)。我们还直接测定 HMLERshEcad 细胞在小鼠中在体内种植肿瘤的能力。肿瘤由 1000 个 HMLERshEcad 细胞快速产生,这比对照细胞低 100 倍(图 1D)。值得注意的是,关于 CSCs 的 ~ 100 倍富集略微高于 CD44+/CD24- 细胞中的 $\sim 15-20$ 倍增加。这些结果显示相对于对照乳腺癌细胞,MT 乳腺癌细胞具有明显更多数目的 CSCs。

[0225] 我们还测试了 MT 乳腺癌细胞是否显示出增加的药物抗性,这是 CSCs 的报告性质。

事实上,对于 2 种常用化学治疗药物紫杉醇和多柔比星,HMLERshEcad 细胞比对照细胞明显更有抵抗力(图 2A)。

[0226] 增加的药物抗性可以反映 CSCs 比例的增加,或可以是间质转分化的区别状态的更一般性质。我们因此研究了 HMLE 细胞,这是永生化但非致瘤的乳腺上皮细胞,其不同于 HMLER 细胞之处在于它们缺乏致癌 HrasV12 转基因。这些细胞无法形成肿瘤,并且因此确定缺乏 CSCs。类似于 HMLERshEcad 细胞,相对于 HMLEshCntrl 对照,发现 HMLEshEcad 细胞包含增加数目的 CD44+/CD24- 细胞。值得注意的是,相对于对照细胞,HMLEshEcad 细胞也显示出对于紫杉醇和多柔比星增加的抗性(图 2B)。HMLEshEcad 细胞对于其他确定的化学治疗药物放线菌素 D、喜树碱和广泛激酶抑制剂星形孢菌素也有抵抗力。增加的药物抗性因此看起来是间质转分化的后果,而不是 CSC 亚类的独特性质。

[0227] 为了进一步表征所观察到的药物抗性,我们使用 GFP 标记的 HMLEshEcad 细胞和未经标记的对照细胞的紫杉醇处理的共培养物(1 : 20 比率)。与 DMSO 处理的共培养物比较,用 10nM 紫杉醇处理 4 天导致 HMLEshEcad 细胞比例的 4 倍增加(图 2C)。这些结果暗示异质上皮细胞群体的紫杉醇处理导致 MT 细胞的选择性长出。

[0228] 已发现间质转分化的 HMLEshEcad 细胞显示出对于标准化学治疗药物增加的抗性,我们设计了概念验证筛选,以鉴定选择性靶向这些细胞的试剂,希望它们也可能靶向 CSCs。我们就针对 HMLEshEcad 和对照 HMLEshCntrl 细胞的细胞毒性筛选化合物。将细胞种植在 384 孔平板中,允许生长 1 天,用化合物处理且在 3 天后使用发光测定法就细胞生存进行测定;对于每种细胞系,化合物一式两份地进行筛选(图 3A;参见实施例 3)。我们筛选了~16,000 种化合物的集合,包括具有已知生物活性的许多、天然提取物、组蛋白脱乙酰基酶调节物、和几种不同的商业文库。

[0229] 约 10% 的化合物抑制 HMLEshEcad 细胞的生存,但这些化合物中的绝大多数(98%)也抑制对照细胞。仅 32 种化合物(总文库的~0.2%)显示出针对 HMLEshEcad 的特异性毒性(图 3B)。在化合物文库中包含的~100 种化学治疗药物中,命中比例未显著更高,仅 3 种显示选择毒性的任何证据。

[0230] 我们追随 32 种化合物中的 8 种用于进一步研究,且评估其跨越一系列剂量的效应。在再测试后,这 8 种化合物中的 4 种显示选择毒性的一致证据(图 4A)。3 种化合物(依托泊苷、沙利霉素、阿巴克丁)显示中等至强选择性(与 HMLEshCntrl 细胞比较,对于 HMLEshEcad 细胞,IC₅₀ 低~10 倍);一种化合物显示较弱的选择性(尼日利亚菌素;~7 倍)。

[0231] 选择性抑制 MT 永生化乳腺上皮细胞(HMLEshEcad)的化合物也抑制起于 Twist 表达的 MT 细胞(HMLETwist)。对于所有 4 种化合物,关于 HMLETwist 细胞的剂量应答曲线事实上等同于对于 HMLEshEcad 细胞观察到的那些(图 4B)。我们还发现用沙利霉素或阿巴克丁处理 HMLETwist 和对照细胞的共培养物(10 : 1 比率)导致 HMLETwist 细胞比例的剂量依赖性减少(图 3C)。这些结果暗示化合物的作用不依赖于间质转分化的诱导物。

[0232] 因为化合物鉴定为 MT 乳腺上皮细胞(HMLEshEcad)(其是非致瘤的且因此缺乏 CSCs)的选择性抑制剂,所以不明确它们对 MT 致瘤细胞(HMLERshEcad)且特别地对 CSCs 是否具有任何选择作用。

[0233] 我们发现化合物对于 MT 致瘤细胞显示选择毒性(图 4D)。跨越一系列浓度,沙利

霉素对于 HMLERshEcad 细胞是选择毒性的,而阿巴克丁对于 HMLERshEcad 细胞展示适度但选择的毒性。

[0234] 我们随后转向化合物是否具有抑制乳腺癌细胞系中的 CSCs 的一般能力的关键问题。用 3 种乳腺癌系 (SUM159、T47D、MDA-MB-231) 的预实验指出沙利霉素选择性与 CSC 标记表达正相关 (图 5)。我们接下来比较沙利霉素、对照媒介物 DMSO 和紫杉醇对 HMLER 细胞的作用。相对于媒介物处理的细胞,沙利霉素处理使 CD44+/CD24- 细胞,即 CSC 富集部分的比例降低 20 倍;相比之下,紫杉醇处理使 CSC 部分增加 18 倍。因此 CD44+/CD24- 部分在用沙利霉素处理后比用紫杉醇低 360 倍 (图 6A)。相对于媒介物或紫杉醇处理,大量群体的增殖在用沙利霉素处理后未得到抑制 (图 6B)。用 SUM159 乳腺癌系观察到相似结果 (图 5)。

[0235] 我们检查了乳腺癌细胞在用沙利霉素处理后形成乳腺球的能力。相对于对照,沙利霉素处理导致乳腺球数目的~10 倍降低 (图 6A)。相比之下,紫杉醇和媒介物处理都不影响乳腺球数目,而紫杉醇实际上引起乳腺球大小中的显著增加。

[0236] 最后,还通过在药物处理后测定体内肿瘤种植能力直接评估 CSCs 的功能存在。细胞在体外处理 5 天,并且随后皮下注射到 NOD/SCID 小鼠内。系列稀释实验显示相对于媒介物处理,沙利霉素处理导致在肿瘤种植能力中的~100 倍降低,而相对于对照,紫杉醇处理导致~10 增加 (数据未显示)。因此与紫杉醇处理比较,功能 CSCs 的比例在沙利霉素处理后减少 1000 倍。因此,目前用于在操作上定义 CSCs 的每一种测定法指出沙利霉素成功靶向乳腺癌细胞群体中的 CSCs 生存。相比之下,用常见乳腺癌化学治疗药物紫杉醇处理导致乳腺癌细胞群体中 CSCs 数目中的增加。

[0237] 这些结果具有用于治疗实体瘤的牵涉。在恶性肿瘤内所观察到的癌细胞异质性暗示单个肿瘤的癌细胞以各种状态存在,其中每种可能显示出对于任何给定疗法的不同敏感性。为了成为最佳有效的,联合治疗应理想地掺入靶向肿瘤中的各相关亚型且特别是 CSCs 的试剂。我们描述了使得能够筛选对于上皮 CSCs 具有特异性毒性的试剂的方法。待解决的关键问题是在体内靶向癌症干细胞对于患者是否具有治疗利益。

[0238] 细胞系:

[0239] HMLE 是用 SV40 大 T 永生化的人乳腺上皮细胞系,并且 hTERT 和 HMLER 是用 SV40 大 T、hTERT 和 H-rasV12 永生化且转化的人乳腺上皮细胞系。参见例如,Elenbaas, 等人, Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells, Genes and Development, 第 15 卷, No. 1, 第 50-65 页, (2001); 和 Yang, J, Mani, SA, Donaher, JL, Ramaswamy, S, Itzykson, RA, Come, C, Savagner, P, Gitelman, I, Richardson, A & Weinberg, RA. Cell 117, 927-939 (2004)。

[0240] 实施例 1 参考文献

[0241] 1. Qin Y, Capaldo C, Gumbiner BM, Macara IG. The mammalian Scribble polarity protein regulates epithelial cell adhesion and migration through E-cadherin. J Cell Biol 2005; 171:1061-71.

[0242] 2. Pagliarini RA, Xu T. A genetic screen in Drosophila for metastatic behavior. Science 2003; 302:1227-31.

[0243] 3. Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, 等人 Ovarian cancer side population defines cells with stem cell-like characteristics and Mullerian

Inhibiting Substance responsiveness. Proc Natl Acad Sci U S A 2006 ;103 :11154-9.

[0244] 4. Bao S, Wu Q, McLendon RE, 等人 Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. Nature 2006 ;444 :756-60.

[0245] 5. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. J Natl Cancer Inst 2006 ;98 :1777-85.

[0246] 6. Liu G, Yuan X, Zeng Z, 等 人 Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancerstem cells in glioblastoma. Mol Cancer 2006 ;5 :67.

[0247] 7. Dean M, Fojo T, Bates S. Tumour stem cells and drug resistance. Nat Rev Cancer 2005 ;5 :275-84.

[0248] 8. Wagers AJ, Weissman IL. Plasticity of adult stem cells. Cell 2004 ;116 :639-48.

[0249] 9. Moore KA, Ema H, Lemischka IR. In vitro maintenance of highly purified, transplantable hematopoietic stem cells. Blood 1997 ;89 :4337-47.

[0250] 10. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, 等 人 In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. Genes Dev 2003 ;17 :1253-70.

[0251] 实施例 2:

[0252] 一般目的

[0253] 近期发现已证实肿瘤形成和生长通过在肿瘤内的较小癌细胞亚群驱动 (Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF., Proc Natl Acad Sci U S A 2003 ;100 (7) :3983-8) (Li C, Heidt DG, Dalerba P, 等人, Cancer Res 2007 ;67 (3) :1030-7) (O' Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE., Nature 2007 ;445 (7123) :106-10) (Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, 等人, Nature 2007 ;445 (7123) :111-5) (Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, 等人, Nature 2004 ;432 (7015) :396-401)。癌症干细胞 (CSCs) 在功能上定义为在肿瘤团块内的那些细胞, 其具有种植且产生次级肿瘤的能力。在这个功能范畴中牵涉的是癌症干细胞是在肿瘤内负责癌症死亡率-转移散布主因的细胞的观念。这个概念对于潜在癌症治疗的开发和临床前评估具有重大牵涉。本发明描述了使得能够开发靶向癌症干细胞的新型治疗的新方法。在本文描述的本发明方法之前, 癌症干细胞靶向疗法的开发以高流通量筛选设置是不可能的。经由使所述方法付诸实践, 通过开发特异性靶向癌症干细胞的新型化合物, 我们建立了用于本发明的原理验证。因此, 本发明首次使得能够使用高流通量筛选方法鉴定靶向癌症干细胞的治疗。

[0254] 技术描述

[0255] 正常和肿瘤细胞在体外和体内以各种分化状态存在。这些分化状态通过起于其中细胞驻留的组织微环境的复杂信号整合进行调节。通过许多遗传干扰可以诱导癌细胞经历上皮至间质转变 (EMT), 例如经由特定因子 (例如, Twist、Snail、TGF- β 或 MMPs) 的过表达, 或通过粘附连接蛋白质例如 E-钙粘蛋白的抑制。不管使用的诱导方法, 已诱导成 EMT 的细胞表达相似表型性状和蛋白质标记, 从而显示出 EMT 是核心分化程序。我们已观

察到已诱导成 EMT 的细胞共享在功能上定义癌症干细胞的许多性质,包括与癌症干细胞相关的细胞表面标记的表达,在悬浮培养中生长,和在体内在低细胞数目下的肿瘤转化。此外,如对于 CSCs 的情况 (Dean M, Fojo T, Bates S., *Nat Rev Cancer* 2005 ;5(4) :275-84) (Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ;103(30) :11154-9), 我们已观察到相对于未诱导成 EMT 的同胞细胞系,诱导成 EMT 的细胞对于化学化合物的广泛实验对象组明显更有抵抗力,包括标准化学治疗药物。重要的是,与 EMT 中的细胞是癌性还是非癌性无关,表现了对于响应死亡诱导试剂的死亡的抗性。作为本发明的关键部分,我们推断由已经历上皮至间质转变的细胞显示出的分化状态可以用于鉴定特异性靶向癌症干细胞的疗法。在本发明的方法中,衍生自共同来源的同胞细胞系用于鉴定对于已经历 EMT 的细胞有选择毒性的化合物。下文我们描述了使本发明付诸实践的一个详细技术方面。这种付诸实践导致选择性靶向 CSC 群体的 2 种化合物包括沙利霉素和阿巴克丁的鉴定。

[0256] 潜在抗癌化合物的功效目前使用肿瘤异种移植物测定法在免疫妥协小鼠中进行评估。因为癌症干细胞通常构成较小亚群,所以不预期对于癌症干细胞特异性毒性的处理将可察觉地影响这些短期测定法中的肿瘤大小测量。相反地,非常可能这个类型的测定法将无法鉴定靶向癌症干细胞的潜在治疗。因此,除少数例外,目前疗法开发为杀死在肿瘤内快速增殖的癌细胞且不靶向 CSCs。重要的是,近期报告已指出癌症干细胞对于目前使用中的广谱癌症治疗更有抵抗力,包括化学疗法、靶向酶抑制和放射疗法 (Dean M, Fojo T, Bates S., *Nat Rev Cancer* 2005 ;5(4) :275-84) (Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, 等人, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006 ;103(30) :11154-9) (Bao S, Wu Q, McLendon RE, 等人, *Nature* 2006 ;444(7120) :756-60) (Phillips TM, McBride WH, Pajonk F., *J Natl Cancer Inst* 2006 ;98(24) :1777-85) (Diehn M, Clarke MF., *J Natl Cancer Inst* 2006 ;98(24) :1755-7)。然而,在这个阶段,在本发明之前,不明瞭是否甚至可能鉴定靶向癌症干细胞的治疗,或由于对于细胞死亡的固有抗性,是否可能不是癌症干细胞不可避免地对于所有形式的治疗干预有抵抗力的情况。

[0257] 这些考虑显示开发策略以测定候选治疗对癌症干细胞的特异性作用的重要性和必要性。近期已报告了对于各种癌症类型允许富集癌症干细胞群体的细胞表面标记 (Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003 ;100(7) :3983-8) (Li C, Heidt DG, Dalerba P, 等人, *Cancer Res* 2007 ;67(3) :1030-7) (O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE., *Nature* 2007 ;445(7123) :106-10) (Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, 等人, *Nature* 2007 ;445(7123) :111-5) (Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, 等人, *Nature* 2004 ;432(7015) :396-401)。这些标记使得研究者能够从经培养的癌细胞或体内肿瘤中预期地分离癌症干细胞富集部分。原则上,可以设想使用此类标记分离细胞群体将证明是对于鉴定对于癌症干细胞特异性毒性的化合物有用的。在实际中,这个目的的实现已由癌症干细胞的富集在细胞的分离部分中丧失的快速性根本地障碍,通常在培养中的少数群体倍增内。这些因素已成为鉴定和开发靶向肿瘤中的 CSCs 的新型疗法的主要障碍物。事实上,这些困难排除筛选技术的应用,在原则上,所述筛选技术在其他方面可能促进新型 CSC 针对性抗肿瘤化合物的开发。在本发明中,我们描述了解决高通量筛选技术在用于鉴定靶向癌症干细胞的化

合物中的应用中的固有困难的方法。

[0258] 筛选备选方案

[0259] ●诱导 EMT 的方法

[0260] ●筛选的文库类型（例如，化学文库、RNAi 文库等）。

[0261] ●细胞类型（例如，测试细胞）可以衍生自任何类型的上皮组织。除使用 SV40ER 和 hTERT 永生化的细胞外，本发明可同样应用于原代人细胞、使用任何合适的永生化方法永生化的细胞、或癌性细胞。在每种情况下，可以筛选处于 EMT 和非 EMT 状态的细胞，以鉴定对于处于 EMT 状态的细胞显示出选择毒性的实体（例如，化合物）。

[0262] 在乳房上皮细胞中的 E- 钙粘蛋白消除诱导 EMT

[0263] 上皮细胞在体内表现出不同分化状态。我们希望测定这些后生指定的状态是否影响在赘生性转化后的肿瘤表型。作为研究这个问题的模型，我们集中于人乳房上皮细胞，因为存在与其分化状态对应的已知细胞标记。为了解决我们感兴趣的问题，必须利用其中细胞分化状态可以稳定改变的系统。

[0264] 广泛的先前工作已证实可以稳定诱导经培养的上皮细胞中的形态变换，这伴随分化标记的表达丧失 (Thiery JP., Nat Rev Cancer 2002 ;2(6) :442-54)。我们先前已描述了一个此类模型，其中永生化的 HMECs 中的 E- 钙粘蛋白抑制导致稳定的 EMT (Onder 等人 2008Cancer Research, 正在印刷中 ;图 1A)。与对照细胞 (HMLEsiGFP) 比较，这些细胞 (HMLEsiEcad) 停止表达与上皮细胞分化相关的细胞角蛋白蛋白质，并且获得与间质谱系相关的蛋白质表达，包括 N- 钙粘蛋白和波形蛋白（图 1A）。

[0265] 这些结果指出 E- 钙粘蛋白消除足以在永生化上皮细胞中诱导 EMT。值得注意的是，基本上等基因的上皮细胞的赘生性转换导致显著不同的肿瘤表型，这仅依赖于在转化时的细胞分化状态。尽管已经历 EMT 的上皮细胞的赘生性转换产生在体内快速转移的高度恶性的癌细胞 (HMLERsiEcad)，但未经 EMT 的基本上等基因的上皮细胞的类似转化产生不能转移的癌细胞 (HMLERsiGFP)（图 1B）。此外，与其分化 HMLERsiGFP 对应物比较，HMLERsiEcad 肿瘤显示出减少的潜伏期（图 1C）。因此，我们检查了这种区别是否可归于 2 种同胞细胞系中的癌症干细胞数目中的差异。

[0266] 有限稀释测定法指出 HMLERsiEcad 系在体内以少至 1000 个细胞种植肿瘤，这比通过 HMLERsiGFP 系形成肿瘤所需的最低限度细胞数目低 2 个数量级（图 1D）。此外，我们观察到相对于 HMLERsiGFP 系，HMLERsiEcad 系包含增加数目的乳腺球形成细胞（图 1E）(Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, 等人, Genes Dev 2003 ;17(10) :1253-70)。限定癌症干细胞 (CSCs) 的这些功能测定法指出相对于 HMLERsiGFP 细胞，HMLERsiEcad 系包含明显更多数目的 CSCs。使用 FACS 用针对标记的抗体进一步支持这个观念，所述标记的抗体据报告对于乳腺癌症干细胞群体富集（图 1F）(Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF., Proc Natl Acad Sci U S A 2003 ;100(7) :3983-8)。因此，与经分化的 HMLERsiGFP 系比较，HMLERsiEcad 系显示出 CD44+/CD24- 细胞百分率中的 ~ 10 倍增加（图 1F）。总之，这些发现指出已经历 EMT 的上皮细胞产生这样的经转化的细胞群体，其具有比起于未经 EMT 的上皮细胞的经转化的群体明显更高数目的癌症干细胞。

[0267] 已经历 EMT 的上皮细胞对于各种化学治疗药物有抵抗力

[0268] 先前工作已指出癌症干细胞对于广谱细胞毒素剂有抵抗力 (Dean M, Fojo T,

Bates S., Nat Rev Cancer 2005 ;5(4) :275-84) (Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, 等人, Proc Natl Acad Sci U S A 2006 ;103(30) :11154-9) (Bao S, Wu Q, McLendon RE, 等人, Nature 2006 ;444(7120) :756-60) (Phillips TM, McBride WH, Pajonk F., J Natl Cancer Inst 2006 ;98(24) :1777-85) (Liu G, Yuan X, Zeng Z, 等人, Mol Cancer 2006 ;5 :67)。因为 HMLERsiEcad 细胞在能够种植肿瘤的细胞频率中具有 100 倍增加,所以我们检查了相对于 HMLERs i GFP 对照,其对 2 种常用化学治疗药物的应答。我们用多柔比星或紫杉醇以各种浓度处理经培养的 HMLERsiGFP 和 HMLERsiEcad 细胞共 3 天时间。剂量应答曲线的检查指出,在 2 种药物的情况下,关于 HMLERsiEcad 细胞的 IC50 明显高于关于 HMLERsiGFP 细胞的 IC50 (图 2A)。这些数据与先前公开的癌症干细胞对于常见化学治疗药物有抵抗力的报告一致。

[0269] 原则上, HMLERsiEcad 系相对于 HMLERsiGFP 细胞系增加的抗性可以是前者细胞系中存在的癌症干细胞数目增加的后果。然而,我们假定所观察到的差异药物敏感性更确切地是癌细胞系由其衍生的永生化细胞的各自分化状态的后果。为了直接检查这个假设,我们用一系列化学化合物以各 3 个不同浓度处理 HMLEsiGFP 和 HMLEsiEcad 细胞共 4 天时间。在这些化合物中包括的是确定的化学治疗药物多柔比星、紫杉醇、放线菌素 D、喜树碱,以及广泛激酶抑制剂星形孢菌素。相对于 HMLEsiGFP 细胞, HMLEsiEcad 细胞展示对于所检查的药物各自增加的抗性 (图 2B)。尽管抗性程度天然依赖于所检查的特定药物 (比较放线菌素 D 与喜树碱 ;图 2B),但对于所有测试的化合物观察到增加的抗性。这个观察指出与其未经历 EMT 的 HMLEsiGFP 对应物比较,已经历 EMT 的 HMLEsiEcad 细胞对于细胞死亡固有地有抵抗力,与所使用的死亡诱导试剂无关。此外,这些发现指出相对于 HMLERsiGFP 系,由 HMLERsiEcad 系显示出的对于细胞死亡的差异敏感性是异向分化状态的直接后果。

[0270] 上述结果指出 EMT 和非 EMT 细胞群体显示出对于各种化学化合物的差异敏感性。无论细胞系是否经历赘生性转化,都独立地观察到这点。为了测定常规化学治疗药物对已经历 EMT 的上皮细胞和未经历 EMT 的上皮细胞混合物的作用,我们使 GFP 标记的 HMLEsiEcad 细胞与未经标记的 HMLEsiGFP 细胞以 1 : 20 的比率共混合,并且用紫杉醇处理所得到的共培养物。这种非化学计量混合物提供内部控制方法,以评估在其中已经历 EMT 的上皮细胞为少数的条件下,是否也表现出差异药物敏感性。在紫杉醇 (10nM) 处理 3 天后, FACS 分析揭示相对于 DMSO 处理的共培养物,已经历 EMT 的 HMLEsiEcad 细胞中的 4 倍增加 (图 2C)。用较低剂量的紫杉醇 (2.5nM) 也观察到已经历 EMT 的 HMLEsiEcad 细胞中的更适度增加。总之,这些结果指出异质上皮细胞群体的紫杉醇处理可以导致已经历 EMT 的细胞的选择性长出。

[0271] 化学化合物筛选

[0272] 总的来说,上述观察指出上皮细胞的 EMT 与肿瘤种植潜力和转移能力的增加相关,这种增加也伴随对于凋亡的抗性增加。我们因此推断抑制已经历 EMT 的上皮细胞而不是未经历 EMT 的上皮细胞生存的化合物,将优先靶向能够种植肿瘤且转移的癌细胞亚群。我们假定 HMLEsiGFP 和 HMLEsiEcad 细胞系可以用于揭示针对未经历 EMT 的上皮细胞显示出综合致命性的化合物的目的。

[0273] 我们开发了在高流通量筛选中用 384 孔平板使用基于 ATP 的发光生存测定法的条件 (关于方法参见实施例 3)。我们筛选了总共 16,000 种化合物作为我们筛选的部分。这

些化合物包括具有已知生物活性的集合、天然提取物、HDAC 偏差集合、和几种商业文库。为了使得基于平板的严格标准化成为可能,每块化合物平板携带仅具有 DMSO 载体的~10% 对照细胞。对于每种 HMLEsiEcad 和 HMLEsiGFP 细胞系,每块化合物平板用针转移到 2 个重复内。药物处理在种植后 1 天起始,并且最终测定法在药物处理后 3 天执行(图 3A-示意图)。对于每种 HMLEsiGFP 和 HMLEsiEcad 细胞系,我们一式两份地进行了筛选。

[0274] 使用来自平板标准化的 DMSO 对照孔的测量,我们构建了在不存在化合物的情况下关于每种细胞系的发光强度分布(图 3A)。关于对照和测试孔的每次测量构成关于细胞系的 2 个重复的平均值。相对于这些无效分布,对于每种化合物的效应指定 Z 得分,其中对于 HMLEsiGFP 和 HMLEsiEcad 细胞系各一个。经计算的 Z 得分未展示跨越药物平板、列或行数目的位置偏差,暗示在标准化数据的分析中不存在系统偏差(图 3B)。

[0275] 使用这种方法鉴定抑制化合物指出此类化合物中的绝大多数抑制 HMLEsiGFP 和 HMLEsiEcad 细胞的生存。因为我们感兴趣的是对于经诱导的 EMT 显示出综合致命性的化合物,所以我们鉴定了抑制 HMLEsiEcad 细胞生存但不超过抑制 HMLEsiGFP 生存的显著性阈值的那些化合物。在对于 siEcad 细胞有毒的化合物总数中,~2% 显示出针对 siEcad 系的特异性毒性。这些化合物在表 1 中列出。

[0276] 用于癌症化学治疗的各种确定的药物包括在筛选的化合物平板中。小于 1% 的这些化学治疗试剂在我们的测定法中评分为阳性。这暗示靶向快速增殖细胞的化合物在我们的测定法中未选择性富集。事实上,HMLEsiGFP 细胞具有比 HMLEsiEcad 细胞略微更高的增殖率(数据未显示)。因此,在我们的筛选中未阳性评分的罕见化学治疗剂(例如,依托泊苷、氮甲蝶呤)可能靶向与增殖不同的细胞过程。就后面这点而言,值得注意的是依托泊苷和依托泊苷都不通过插入或加合物形成直接诱导 DNA 损伤。因此,相对于筛选的全部化合物,在确定的化学治疗药物亚类中不存在阳性命中的富集。

[0277] 我们决定追随鉴定为对于 HMLEsiEcad 细胞选择毒性的 8 种化合物用于进一步研究:沙利霉素、依托泊苷、吡啶、西吡氯铵、间苯二酚、克霉唑、阿巴克丁和尼日利亚菌素。对于这些化合物中的每种,我们评估了对跨越一系列剂量对于诱导成或未诱导成 EMT 的同胞细胞系的细胞生存作用。前述化合物中的 3 种显示出相对于 HMLEsiGFP 细胞,对于 HMLEsiEcad 细胞的生存减少的强特异性(依托泊苷、沙利霉素、阿巴克丁;图 4A)。经鉴定的化合物中的一种,尼日利亚菌素,显示出相对于 HMLEsiGFP 细胞,对于 HMLEsiEcad 细胞的适度选择毒性。其余 4 种化合物在追踪观察时未显示出对生存的特异性作用。

[0278] 表 1:在筛选中鉴定的 40 种命中化合物列表:

[0279]	化合物名称	来源
[0280]	除虫菌素 b1	SpectrumJPN
[0281]	沙利霉素, 钠	SpectrumJPN
[0282]	玉米烯酮	SpectrumJH
[0283]	吡啶琐辛	SpectrumJPN2
[0284]	依托泊苷	SpectrumNAT
[0285]	尼日利亚菌素钠	SpectrumJPN
[0286]	乙酸落叶松醇	SpectrumNAT
[0287]	avocadyne	SpectrumJH

[0288]	heudelottin c	Spectrumx
[0289]	克霉唑 ; 克霉唑	PrestwickMED
[0290]	硫链丝菌肽	PrestwickMED
[0291]	氨基蝶呤	SpectrumJH
[0292]	斑点酸	SpectrumNAT
[0293]	美法仑	SpectrumJH
[0294]	奥利司他	SpectrumJH
[0295]	氨苯蝶啶	SpectrumJPN
[0296]	乙胺嘧啶	SpectrumC
[0297]	diffritic acid	SpectrumNAT
[0298]	hieracin	SpectrumNAT
[0299]	4- 甲基瑞香素	SpectrumNAT
[0300]	NP-000422	Analyticon
[0301]	NP-005365	Analyticon
[0302]	354169 ; VII_A12	Tang-W/Harvard
[0303]	WT_BH9	Tang-W/Harvard
[0304]	植物鞘氨醇 4- 羟基双氢神经鞘氨醇	Avanti
[0305]	PACOCF3	Calbiochem
[0306]	354473 ; V_A12	Tang-W/Harvard
[0307]	BiomolKI2_000006	Biomol-KI
[0308]	326369	Franz
[0309]	AG 494	Calbiochem
[0310]	356135 ; WT-III-101-II_XG09	Tang-W/Harvard
[0311]	354331 ; VI_B12	Tang-W/Harvard
[0312]	354635 ; II_B12	Tang-W/Harvard
[0313]	356110 ; WT-III-101-II_XD05	Tang-W/Harvard
[0314]	双酪氨酸磷酸化抑制剂	Calbiochem
[0315]	NP-010664	Analyticon
[0316]	NP-001642	Analyticon
[0317]	子囊霉素	Sigma
[0318]	354386 ; VI_H08	Tang-W/Harvard
[0319]	354325 ; VI_B04	Tang-W/Harvard

[0320] 为了测定这些化合物对于 HMLEsiEcad 细胞的特异性是否是该系的 EMT 状态的后果, 而不是所使用的特定遗传干扰, 我们还测试了这些化合物对由于 Twist 过表达诱导为 EMT 的细胞 (HMLE-Twist) 的作用。值得注意的是, 跨越所测试的化合物中的每一种, 关于 HMLE-Twist 细胞的剂量应答曲线事实上等同于对于 HMLEsiEcad 细胞观察到的那些 (图 4B)。这个观察强烈暗示在这个测定法中显示出特异性活性的化合物靶向不同分化状态而不是特定诱导试剂其自身。

[0321] 为了检查沙利霉素和阿巴克丁处理对已经历 EMT 的上皮细胞和未经历 EMT 的上皮

细胞异质群体的作用,我们使 GFP 标记的 HMLE 细胞与未经标记的 HMLE-Twist 细胞共混合,用化合物处理所得到的共培养物。作为用于这个实验的阳性对照,我们用杀稻瘟菌素处理共培养物,所述杀稻瘟菌素选择包含杀稻瘟菌素抗性基因的分化 HMLE-GFP 细胞。我们观察到相对于 DMSO 处理的对照,用沙利霉素、阿巴克丁或杀稻瘟菌素处理导致 GFP 阳性部分中的增加,指出未经历 EMT 的上皮细胞是选择性存活处理的(图 4C)。这与证实紫杉醇处理导致选择已经历 EMT 的上皮细胞的早期发现形成对比(图 2C)。因此,与常用化学治疗剂形成对比,通过我们的筛选鉴定的化学化合物导致已经历 EMT 的上皮细胞的选择性杀死。依照我们的先前观察(图 2A, B),通过使用非致瘤性细胞系就选择毒性筛选鉴定的这些化合物的亚类也展示对于已经历 EMT 的经转化的细胞系的选择毒性(图 4D)。

[0322] 沙利霉素特异性靶向 CSC 富集的癌细胞群体

[0323] 癌症干细胞对于广谱治疗和化学治疗剂有抵抗力。因为使用所述筛选方法鉴定的化合物优先靶向已经历 EMT 的上皮细胞,所以我们希望测定此类化合物是否还可能作用于靶向癌症干细胞。为此,我们使用 FACS 就报告为癌症干细胞富集的标记(CD44hi/CD24lo)表达分析了几种乳腺癌细胞系:MDA-MB-231 和 SUM159,其包含超过 90% CD44hi/CD24lo 细胞;相比之下,T47D 细胞展示<.1% CD44hi/CD24lo 细胞(图 5A)。在沙利霉素处理后,我们观察到与弱 CSC T47D 细胞比较,CSC 富集细胞系 SUM159 和 MDA-MB-231 跨越一系列剂量是更敏感的。用阿巴克丁处理也观察到相似结果,尽管较不显著(图 5B)。

[0324] 为了进一步表征化合物处理对癌细胞的作用,对用沙利霉素、阿巴克丁、泰素(也称“taxol”)或 DMSO 处理的 SUM159 细胞进行 FACS 分析。我们观察到相对于 DMSO 对照,尽管泰素处理不会显著影响 CD44hi/CD24lo 部分,但用沙利霉素处理显著减少 CD44hi/CD24lo 部分中的细胞百分比,同时具有 CSC 耗尽部分中的伴随增加(~3 倍)(图 5C)。相比之下,阿巴克丁处理不会显著改变 CD44hi/CD24lo 部分中的细胞百分比。

[0325] 用沙利霉素处理功能抑制癌症干细胞

[0326] 上文结果指出沙利霉素处理优先靶向报告为对于 CSCs 富集的细胞系和细胞亚群。为了直接评估沙利霉素对癌症干细胞群体的作用,我们在沙利霉素、泰素或 DMSO 处理的培养物中在功能上测定癌症干细胞活性。用 SUM159 乳腺癌细胞的乳腺球形成测定法指出,相对于对照 DMSO 处理,尽管泰素导致在悬浮培养中能够形成集落的细胞数目的增加,但沙利霉素处理明显减少这种能力。体内肿瘤形成稀释系列测定法也指出,相对于 DMSO 处理的对照,沙利霉素处理明显减少 CSC 功能活性,而泰素处理导致相反效应。利用用于在功能上限定 CSCs 的 2 种测定法的这些发现,指出沙利霉素明显减少经处理的癌细胞群体中的癌症干细胞数目。

[0327] 讨论

[0328] 呈现的发现暗示在癌细胞群体中的癌症干细胞部分与转化前靶细胞的分化状态相关。正是这个原理使得我们能够采用仅在其分化状态分歧的未经转化的细胞作为筛选工具,以鉴定具有癌症干细胞特异性毒性的试剂。考虑到用于筛选的细胞系是等基因但用于限定干扰的,所以我们推断存在很高的如下可能性,即对于 HMECsiEcad 细胞显示出综合致命性的化合物也将靶向处于间质分化状态中的上皮细胞,无论是经转化的还是未经转化的。

[0329] 实施例 2 参考文献

- [0330] 1. (Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF., Proc Natl Acad Sci U S A 2003 ;100(7) :3983-8)
- [0331] 2. (Li C, Heidt DG, Dalerba P, 等人, Cancer Res 2007 ;67(3) :1030-7)
- [0332] 3. (O' Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE., Nature2007 ;445(7123) : 106-10)
- [0333] 4. (Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, 等人, Nature2007 ;445(7123) : 111-5)
- [0334] 5. (Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, 等人, Nature 2004 ;432(7015) :396-401)
- [0335] 6. (Dean M, Fojo T, Bates S., Nat Rev Cancer 2005 ;5(4) :275-84)
- [0336] 7. (Szotek PP, Pieretti-Vanmarcke R, Masiakos PT, 等人, Proc Natl Acad Sci U S A 2006 ;103(30) :11154-9)
- [0337] 8. (Bao S, Wu Q, McLendon RE, 等人, Nature 2006 ;444(7120) :756-60)
- [0338] 9. (Phillips TM, McBride WH, Pajonk F., J Natl Cancer Inst2006 ;98(24) : 1777-85)
- [0339] 10. (Diehn M, Clarke MF., J Natl Cancer Inst 2006 ;98(24) :1755-7)
- [0340] 11. (Thiery JP., Nat Rev Cancer 2002 ;2(6) :442-54)
- [0341] 12. (Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, 等人, Genes Dev 2003 ;17(10) :1253-70)
- [0342] 13. (Liu G, Yuan X, Zeng Z, 等人, Mol Cancer 2006 ;5 :67)
- [0343] 实施例 3 :材料与方法
- [0344] 细胞培养。
- [0345] 如所述产生且维持经永生化 (HMLE) 或经转化 (HMLER) 的乳腺上皮细胞, 其表达对照 shRNA(shCntrl) 或靶向 E- 钙粘蛋白的 shRNA(shEcad) (Onder 等人 2008 Cancer Research, 正在印刷中)。HMLE-Twist 细胞先前也已得到描述 (Yang 等人 2004)。为了创造 GFP 表达品系, 我们使用标准操作作用携带杀稻瘟菌素抗性基因的 pWZL-GFP 逆转录病毒感染 HMLE 和 HMLE-shEcad 细胞 (Stewart 等人 2003)。
- [0346] 如所述的执行乳腺球培养 (Dontu 等人, 2003), 除培养基包含 0.9% 甲基纤维素 (干细胞技术) 以预防细胞聚集外。铺平板 102 或 103 个细胞 /96 孔平板的孔。使乳腺球培养 7-10 天, 并且随后拍照且计数。
- [0347] 抗体, 免疫印迹
- [0348] 用于免疫印迹的抗体是 E- 钙粘蛋白、N- 钙粘蛋白 (BD Transduction)、波形蛋白 V9 (NeoMarkers)、肌动蛋白 (Abcam)、H-Ras (Santa Cruz)、细胞角蛋白 8 (Troma-1, Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa)。所有操作如所述执行 (Onder 等人 2008 Cancer Research, 正在印刷中)。
- [0349] FACS
- [0350] 用于 FACS 分析的与 APC 缀合的抗 CD44 (克隆 G44-26) 抗体和与 PE 缀合的抗 CD24 抗体 (克隆 ML5) 得自 BD Bioscience, 并且根据制造商的说明书使用。碘化丙啶 (5ug/ml) 包括在染色方案中以区别活细胞。
- [0351] 对于细胞毒素剂的抗性的表征。
- [0352] 多柔比星、紫杉醇、放线菌素 D、喜树碱和星形孢菌素购自 Sigma, 并且溶解于二甲

亚砷 (dmsO) 中。铺平板在 100ul 培养基中的 5000 个细胞 /96 孔平板的孔。种植后 24 小时,将化合物以所示浓度加入孔中 (5 个孔 / 每个浓度)。DmsO 处理用作阴性对照。使用 CellTiter96Aqueous Assay (Promega) 根据制造商的说明书,在 72 小时后测量细胞生存。用 GraphPad Prism 软件 (GraphPad Software, Inc.) 产生剂量应答曲线。

[0353] 对于缺氧和 2- 脱氧葡萄糖处理,使用 CellTiter96 Aqueous Assay (MTT) 也在 72 小时后测量细胞生存。

[0354] 对于混合实验,使未经标记的和 GFP 标记的细胞以所示比率混合,并且种植到 6 孔平板上。一式三份的孔随后用 dmsO 或化合物 (紫杉醇、沙利霉素、阿巴克丁和杀稻瘟菌素) 处理 48 小时。用 PBS 洗涤细胞,用胰蛋白酶消化并且通过 FACS 分析 GFP 阳性。

[0355] 化学筛选

[0356] 关于一般自动化 HTS 方案的信息在 broad.harvard.edu/chembio/index.html 处可在线获得。使用自动化平板填装器 (Bio-Tek μ Filler ;Winsooki, VT),通过将包含 1000 个细胞的 40 μ L 培养基 / 孔铺平板到 384 孔不透明底部平板 (Nunc, Rochester, NY) 内,并且允许细胞贴壁 24 小时,从而起始测定法。使用自动化基于针的化合物转移机器人 (CyBio CyBi-Well vario ;Woburn, MA),将在 dmsO 中的 100nL 化合物母液从原种平板转移到 384 孔测定平板内。对于大多数化合物,每个孔中的终浓度计算为 10uM。

[0357] 筛选一式两份地执行。对于阴性对照,采用整块 dmsO 处理的对照平板,加上掺入每块化合物测定平板内的仅 dmsO 的对照孔。通过添加 20ul CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay 溶液 (Promega),就萤光素酶活性测定细胞。使用自动化平板阅读器 (Perkin-Elmer Envision 1 ;Wellesley, MA) 检测来自每块平板的发光信号。

[0358] 用于筛选平板的化合物平板数目是 2158-2167、2099-2105、2290-2297、2403-2407、Biokin1-2。使用商业软件包 SpotFire (SpotFire, Inc., Somerville, MA) 分析原始数据。

[0359] 命中验证

[0360] 个体化合物购自 Sigma 且溶解于 DMSO 中,除溶解于 100% 乙醇中的尼日利亚菌素外。使用基于 384 孔平板的系统,通过在对于最初筛选描述的相同细胞密度和培养条件下产生关于 HMLE-shCntrl、HMLE-shEcad 和 HMLE-Twist 的剂量应答曲线,定量化合物的活性。

[0361] 肿瘤发生测定法

[0362] 将在 DME 中 1 : 2 稀释的 100 μ l Matrigel 中 106、105、104 和 103 个 HMLER-shCntrl 或 HMLER-shEcad 细胞皮下注射到 NOD-SCID 小鼠内。在注射后监控肿瘤发生率 60 天。所有小鼠操作由 Animal Care and Use Committee of the Massachusetts Institute of Technology 预先批准,并且根据机构方针进行。

[0363] 实施例 4 :用于诱导 EMT 的示例性方法

[0364] 通过诱导特定转录因子的活性在细胞中达到 EMT (参见表 1)。产生具有一种或多种转基因的上皮细胞 (例如,经永生化的细胞例如 HMLE,或经转化的细胞例如 HMLER),所述转基因能够表达选自下述的 EMT 诱导转录因子 :Snail1、Snail2、Goosecoid、FoxC2、TWIST、E2A、SIP-1/Zeb-2、dEF1/Zeb1、LEF1、Myc、HMGA2、TAZ、Klf8、HIF-1、HOXB7、SIM2s 和 Fos。转基因的表达是组成性或诱导性的,并且在细胞中诱导 EMT。

[0365] 表 1 :介导 EMT 的转录因子

[0366]

Snail1	Snail2	Goosecoid
FoxC2	Twist	E2A(编码 E12/E47)
SIP-1/Zeb-2	dEF1/ZEb1	LEF1
Myc	HMG- 盒转录因子 -HMGA2	TAZ
Klf8	HIF-1	HOXB7
SIM2s 的丧失	Fos	

[0367] 通过调节细胞中的信号途径活性来达到 EMT(参见表 2 和 3)。使上皮细胞(例如, 经永生化细胞例如 HMLE, 或经转化的细胞例如 HMLER) 与选自下述的生长因子接触: TGF- β /BMP 超家族成员、Wnt- 家族成员、FGF 家族成员、Notch 配体、EGF 家族成员、IGF 家族成员、PDGF 和 HGF, 从而诱导细胞中的 EMT。

[0368] 表 2: 介导 EMT 的主要途径

[0369]

TGF- β	Wnt	BMP
Notch	HGF- Met	EGF、IGF、PDGF、FGF-受体酪氨酸激酶信号
P38-mapk	Ras	PI3Kinase- Akt
Src	Nf-kB	

[0370] 表 3: 报告为介导 EMT 的示例性途径 / 分子

[0371]

Hippo 途径	白介素样 EMT 诱导剂 (IL1)	整联蛋白-整联蛋白连接的激酶
内皮缩血管肽-1	蛋白质激酶 A (PKA) 和转录 3 的信号转导子和激活子 (STAT3)	基质金属蛋白酶 (MMP3, MT-MMP1)
活性氧 (ROS)	NBS1	uPAR
P68 RNA 解旋酶	KCC3(氯化钾协同转运蛋白)	磷酸酶: Pez, PRL-3

[0372] 达到 EMT 和 / 或 E- 钙粘蛋白下调的其他方法在表 4 中概述。通过下述来达到 EMT: 对上皮细胞(例如, 经永生化细胞例如 HMLE, 或经转化的细胞例如 HMLER) 实施低氧条件、照射和长期化学疗法治疗; 用针对 E- 钙粘蛋白的封闭抗体处理上皮细胞; 诱导上皮细胞中

的抗粘附蛋白表达 ;和 / 或抑制上皮细胞中的 Scribble 表达。

[0373] 表 4 :其他示例性方法

[0374]

缺氧	照射
长期化学疗法治疗	抗粘附蛋白的表达
针对 E-钙粘蛋白的功能封闭抗体	粘附连接蛋白质 (例如, 连环蛋白) 的抑制
干扰细胞极性基因 (例如, Scribble)	机械拉伸

[0375] 下游活性的描述 (例如, 命中表征和开发)

[0376] 我们已确定了就其对癌症干细胞的作用而言用于筛选命中的追踪观察评估的几种下游测定法 : (1) 用包括必要对照的筛选命中 (例如, 化合物、组合物、抗体、shRNAs 等) 处理培养中的细胞一段时间, 并且随后允许细胞恢复一段时间 (例如, 高达 12 小时、高达 24 小时、高达 48 小时、高达 72 小时等), 并且随后用鉴定对于癌症干细胞富集的群体的标记 (在乳腺癌的情况下, 例如但不限于 CD44⁺/CD24⁻) 执行 FACS。 (2) 用筛选命中处理培养中的细胞一段时间, 允许其恢复指定时间段, 并且随后在不存在化学化合物的情况下, 在悬浮中执行集落形成测定法 (对于乳腺癌细胞, 这些测定法被称为乳腺球形成测定法)。 (3) 用筛选命中处理培养中的细胞一段时间, 允许其恢复指定时间段, 并且随后将细胞以各种细胞数目皮下注射到免疫妥协的动物内, 并且评估肿瘤形成的频率。注射细胞的数目可以包括 10⁶、10⁵、10⁴、10³ 和 10² 细胞。使用追踪观察测定法, 例如本文公开的那些, 可以评估筛选命中 (或具有潜在 CSC 针对活性的任何药物) 是否是癌症干细胞的真正抑制剂。

[0377] 实施例 5 : 正常和赘生性人乳腺干细胞样细胞表达与 EMT 相关的标记

[0378] 我们分析直接从乳房缩小成形术或乳腺癌中分离的人乳房上皮细胞中的干细胞样标记。我们最初从正常乳房缩小成形术组织中分离 CD44^高/CD24^低和 CD44^低/CD24^高乳房上皮细胞 (图 7A), 并且使用实时 RT-PCR 测量其 mRNA 表达模式。相对于 CD44^低/CD24^高群体中分别 mRNAs 的表达水平, CD44^高/CD24^低细胞表达低水平的 E-钙粘蛋白 mRNA, 高水平的 N-钙粘蛋白 mRNA, 和升高水平的指定 2 种关键 EMT 诱导转录因子 SIP1 和 FOXC2 的 mRNAs (图 7B)。

[0379] 我们还从 3 种正常乳房缩小成形术组织和 5 种赘生性人乳腺组织中分离 CD44^高/CD24^低细胞和 CD44^低/CD24^高细胞, 并且执行基因表达系列分析 (SAGE) - 测量组织内表达的 mRNAs 谱的备选方法 (Shipitsin 等人, 2007)。相对于 CD44^低/CD24^高细胞, CD44^高/CD24^低细胞表达高水平的编码间质标记的 mRNAs, 特别是 CDH2 (N-钙粘蛋白)、VIM (波形蛋白)、FN1 (纤连蛋白)、ZEB2 (SIP-1)、FOXC2、SNAIL1 (Snail)、SNAIL2 (Slug)、TWIST1 和 TWIST2, 和低水平的 CDH11 (E-钙粘蛋白) mRNA (图 7C 和表 5)。这些数据指出从经培养的永生化 MECs 以及正常和赘生性人组织样品中分离的 CD44^高/CD24^低细胞表达与已经历 EMT 的细胞相关的多个基因。

[0380] 实施例 6 : EMT 促进癌症干细胞的产生

[0381] 本文公开的观察暗示乳房上皮干细胞样细胞可以通过诱导 EMT 由正常乳房上皮细胞的更分化群体产生。引申开来,我们推测 EMT 可以促进由更分化的赘生性细胞产生癌症干细胞。为了解决这个可能性,我们在实验上永生化的乳房上皮细胞中诱导 EMT (Elenbaas 等人,2001 ;Hahn 等人,1999),所述上皮细胞已通过引入激活形式的 HER2/neu 癌基因进行转化 (HMLN 细胞)。这些细胞也用表达它莫西芬可激活形式的 Snail (Snail-ER) 或 Twist (Twist-ER) 转录因子的载体感染,如早期所述。

[0382] 当在单层培养中用它莫西芬处理 10 天时,这些细胞经历 EMT (图 8A 和 8B),类似于这些 HER2/neu 转化细胞的永生化的、未经转化的前体的行为 (图 9A 和 9B)。在它莫西芬撤出后,在不存在它莫西芬的情况下,对这些 HMLN 细胞实施软琼脂和肿瘤球测定法;这些测定法中的第一种充当致肿瘤性的体外替代测量 (Cifone 和 Fidler,1980 ;Singh 等人,2004),同时第二种测量干细胞性。有趣的是,我们观察到在它莫西芬处理后已经历 EMT 的细胞形成比未暴露于它莫西芬的对照细胞多至少 10 倍的肿瘤球 (图 8C)。同样重要的是,经历 EMT 的经转化的细胞在软琼脂悬浮培养中形成比对照、未经处理的细胞多 ~ 10 倍的集落 (图 8D)。

[0383] 为了测量已经历 EMT 的经转化的细胞的致肿瘤性,将以有限稀释的 HMLN 细胞注射到小鼠宿主的皮下部位内,所述 HMLN 细胞携带 Snail-ER 或 Twist-ER,并且在植入前已用 4-OHT 处理 12 天。这些细胞无法在体内形成肿瘤,这暗示至少在这个实验模型中,EMT/干细胞状态的长期维持依赖于连续 EMT 诱导信号。为了进一步测试这个观念,我们使已经历 EMT 的 HMLN 细胞在不存在 4-OHT 的情况下在体外培养另外 15 天。这些细胞完全回复至上皮表型 (图 10),暗示通过这些细胞的干细胞状态的维持至少在体外依赖于连续 EMT 诱导信号。

[0384] 为了测试 EMT 诱导的转录因子的组成性表达是否成功改变经转化的细胞的肿瘤起始频率,我们将组成性表达 Snail 或 Twist 的 HMLER 细胞 [即,用 V12H-Ras 癌基因转化的 HMLE 细胞以致使其成为致瘤的 ;(Elenbaas 等人,2001)] 注射到免疫缺陷宿主内。类似于先前观察到的 HMLE 细胞行为,Snail 和 Twist 在这些 HMLER 细胞都诱导 EMTs,且增加 CD44^高/CD24^低细胞数目和形成乳腺球的能力 (图 11)。用 10³Twist- 或 Snail 表达 HMLER 细胞注射的大多数小鼠形成肿瘤 (9 只中的 6 只 -Snail ;9 只中的 7 只 -Twist),而当表达对照载体的相等数目细胞注射到小鼠内,未出现肿瘤 (表 6)。事实上,需要 10⁵ 对照细胞 (缺乏 Twist 或 Snail 表达) 以起始肿瘤形成,并且甚至随后肿瘤形成是不高效的 (9 只注射宿主中的 3 只)。因此,Twist 或 Snail EMT 诱导转录因子的表达显著增加肿瘤起始细胞数目 (~ 2 个数量级)。由对照细胞和表达 Snail 或 Twist 的细胞发展的肿瘤组织学作为鳞状化生出现,类似于由亲本细胞形成的肿瘤的那种 (图 12),如早期报告的 (Elenbaas 等人,2001)。

[0385]

表 5

		CD44 ^高 /CD24 ^低						CD44 ^低 /CD24 ^高							
SAGE 标签		正常			肿瘤			正常			肿瘤			基因名称	
SEQ ID NO 1:	18	0	0	8	8	22	115	18	34	12	81	78	CDH1 (E-钙粘蛋白)		
SEQ ID NO 2:	7	30	46	30	91	26	0	0	0	0	0	0	FN1 (纤连蛋白 1)		
SEQ ID NO 3:	1038	642	332	504	472	300	101	71	5	0	0	0	VIM (波形蛋白)		
SEQ ID NO 4:	4	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	FOXC2		
SEQ ID NO 5:	11	0	0	4	4	0	0	0	0	0	0	0	SNAIL1 (Snail)		
SEQ ID NO 6:	0	5	4	0	4	4	0	0	0	0	0	0	SNAIL2 (Slug)		
SEQ ID NO 7:	0	0	0	0	4	0	0	5	0	0	0	0	TCF-3 (转录因子 3)		
SEQ ID NO 8:	18	15	0	0	4	22	0	3	0	0	0	0	Twist1 (Twist 同系物 1)		
SEQ ID NO 9:	0	10	4	15	15	7	0	0	0	0	0	0	Twist2 (Twist 同系物 2)		
SEQ ID NO 10:	39	42	57	0	15	30	0	0	0	0	0	0	ZFH1B (锌指同源框 1b)		

[0386] 表 5 公开了对于本文公开的 EMT 基因特异的 SAGE 标签的序列, 以及从正常和增生性人乳腺中分离的 CD44^高/CD24^低和 CD44^低/CD24^高群体中存在的每种标签数目。由 2 种

浸润性导管癌、1 种胸腔积液和 1 种腹水制备肿瘤样品；正常样品由 2 个乳房缩小成形术制备。

[0387] 表 6

注射的细胞	肿瘤发生率/注射个数			
	1×10^6	1×10^5	1×10^4	1×10^3
HMLE-载体-Ras	2/6	3/9	0/9	0/9
HMLE-Snail-Ras	6/6	9/9	9/9	6/9
HMLE-Twist-Ras	6/6	9/9	9/9	7/9

[0389] 表 6 公开了通过 Snail 或 Twist 异位表达诱导为经历 EMT 并且随后以有限稀释注射到宿主小鼠内的经转化的 HMLEs 的肿瘤发生率。

[0390] 实施例 7：

[0391] 细胞培养

[0392] 永生化的人乳房上皮细胞 (HMLE) 如先前所述维持 (Elenbaas 等人, 2001)。通过用 pWZL-Snail-ER 或 pWZL-Twist-ER 载体感染 HMLE 细胞或 HMLEN 细胞, 随后用 5ng/ml 杀稻瘟菌素选择, 产生 HMLE-Snail-ER、HMLE-Twist-ER、HMLEN-Snail-ER 和 HMLEN-Twist-ER 细胞。通过用表达 Snail 或 Twist 的逆转录病毒载体或对照载体感染永生化的人乳房上皮细胞 (Elenbaas 等人, 2001), 并且用 $2 \mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素选择, 产生 HMLE-Snail-Ras、HMLE-Twist-Ras 和 HMLE-载体-Ras 细胞。随后通过引入表达 V12H-RAS 癌基因的 pWZL 逆转录病毒载体, 随后用 $4 \mu\text{g/ml}$ 杀稻瘟菌素选择, 转化这些细胞。对于 4-羟基它莫西芬 (4-OHT) 处理, 使 HMLE-Snail-ER、HMLE-Twist-ER、HMLEN-Snail-ER 和 HMLEN-Twist-ER 细胞暴露于以 20nM 终浓度的 4-OHT 共所指示的天数。在本文中描述了在这个研究中使用的质粒, 用于产生病毒的操作和使用这些病毒感染靶细胞。

[0393] 抗体、蛋白质印迹和免疫荧光

[0394] 在 50mM Tris PH7.5、150mM NaCl 和 0.5% NP-40 的存在下, 在冰上使细胞裂解。在 4-12% Bis-Tris Gel 上用 MOPs Running Buffer 分离来自每种样品的 $50 \mu\text{g}$ 总蛋白质, 并且转移至 PVDF 膜。随后用各种抗体探测印迹, 例如抗 β -肌动蛋白 (Abcam)、抗 E-钙粘蛋白 (BD Transduction)、抗纤连蛋白 (BD Transduction)、抗波形蛋白 V9 (NeoMarkers) 或抗 N-钙粘蛋白 (BD Transduction)。

[0395] 软琼脂和肿瘤发生测定法

[0396] 软琼脂测定法如先前所述执行 (Cifone 和 Fidler, 1980)。给培养物拍照, 并且使用 ImageJ 软件 (以前的 NIH 成像) 计数直径大于 $500 \mu\text{m}$ 的集落。将 105、104 和 103 个 HMLE-Snail-Ras 或 HMLE-Twist-Ras 或 HMLE-载体-Ras 细胞皮下注射到无胸腺裸鼠内。在注射后监控肿瘤发生率 25 天。所有小鼠操作由 Animal Care 和 Use Committee of the Massachusetts Institute of Technology 预先批准, 并且根据机构方针进行。

[0397] 逆转录酶 PCR 分析

[0398] SYBR-Green Real-time RT-PCR 和相应数据分析早期得到描述 (Yang 等人, 2004)。

对于所有 RT-PCR 分析, GAPDH mRNA 用于标准化 RNA 输入。用于扩增基因的引物序列在表 7 中列出。

[0399] FACS 分析

[0400] 用于 FACS 分析的抗-CD44(克隆 G44-26)和抗 CD24(克隆 ML5)抗体得自 BD Bioscience。为了分选原代小鼠乳房上皮细胞,用胶原酶(1 μ g/ml)消化小鼠乳腺,并且通过短暂离心(800rpm 共 45 秒)收集类器官。类器官用 0.025%胰蛋白酶在 37℃下消化 5 分钟,以便解离成单细胞。用针对 CD49f(Pharmingen)和 CD24(Pharmingen)以及几种谱系标记(CD45、CD31、Ter-119 和 CD140a(ebioscience))的抗体染色经解离的细胞,如 Stingl 等人 2006 中所述。Lin⁻细胞用于分选。

[0401] 原代人样品和 SAGE 文库

[0402] 通过用对于各种细胞标记特异的抗体偶联的珠顺次捕获细胞类型,从正常乳房缩小成形术组织和乳腺肿瘤中分离 CD44^高/CD24^低和 CD44^低/CD24^高细胞(Shipitsin 等人,2007)。从 Harvard 附属医院收集新鲜组织样品,并且立即使细胞部分纯化。从不同患者一式三份地收集 3 种正常组织、1 种胸腔积液、2 种腹水和 3 种浸润性导管癌。根据由 Dana-Farber Cancer Institute Institutional Review Board 批准的方案,收集不含患者标识符的样品。

[0403] 热度图

[0404] 图 7C 中的热度图使用表 5 中的 SAGE 标签计数产生,这使用 MapleTree(由 L. Simirenko 开发)显现。在显现前,使标签计数进行对数 2 转化(处理计数 0 如同它是 1),通过标签进行中值集中,并且使用 Cluster 通过标签和 SAGE 文库用未经集中的关联相似性度量,实施分层完全连接聚簇(Eisen 等人,1998)。

[0405] 统计分析

[0406] 所有数据作为平均值 $\pm$ SEM 呈现,除非另有说明。当比较 2 个组时,使用斯氏 t 检验($P < 0.05$ 被视为显著的)。

[0407] 质粒、病毒产生和靶细胞感染

[0408] pBp-Snail 和 pBp-Twist 的开发早期得到报告(Yang 等人,2004)。通过用由 pBp-hSnail PCR 扩增的 hSnail cDNA 或由 pBp-mTwist PCR 扩增的 mTwist cDNA 代替 pWZL-Blast-DN-MycER(Littlewood 等人,1995;Watnick 等人,2003)的 MYC cDNA,产生 pWZL-Blast-Snail-ER 和 pWZL-Blast-Twist-ER 构建体。慢病毒和兼嗜性逆转录病毒的产生以及靶细胞的感染先前得到描述(Stewart 等人,2003)。

[0409] 表 7:用于扩增基因的引物:

[0410]

hFOX2-5	GCCTAAGGACCTGGTGAAGC	SEQ ID NO 11
hFOX2-3	TTGACGAAGCACTCGTTGAG	SEQ ID NO 12
hGAPDH-5	ACCCAGAAGACTGTGGATGG	SEQ ID NO 13
hGAPDH-3	TCTAGACGGCAGGTCAGGTC	SEQ ID NO 14

hEcad-5	TGCCCAGAAAATGAAAAAGG	SEQ ID NO 15
hEcad-3	GTGTATGTGGCAATGCGTTC	SEQ ID NO 16
hNcad-5	ACAGTGGCCACCTACAAAGG	SEQ ID NO 17
hNcad-3	CCGAGATGGGGTTGATAATG	SEQ ID NO 18
hFN1-5	CAGTGGGAGACCTCGAGAAG	SEQ ID NO 19
hFN1-3	TCCCTCGGAACATCAGAAAC	SEQ ID NO 20
hVim-5	GAGAACTTTGCCGTTGAAGC	SEQ ID NO 21
hVim-3	GCTTCCTGTAGGTGGCAATC.	SEQ ID NO 22
hSnail-5	CCTCCCTGTCAGATGAGGAC	SEQ ID NO 23
hSnail-3	CCAGGCTGAGGTATTCCTTG	SEQ ID NO 24
hTwist-5	GGAGTCCGCAGTCTTACGAG	SEQ ID NO 25
hTwist-3	TCTGGAGGACCTGGTAGAGG	SEQ ID NO 26
hSIP1-5	TTCTGGGGCTACGACCATAC	SEQ ID NO 27
hSIP1-3	TGTGCTCCATCAAGCAATTC	SEQ ID NO 28
hSlug-5	GGGGAGAAGCCTTTTCTTG	SEQ ID NO 29
hSlug-3	TCCTCATGTTTGTGCAGGAG	SEQ ID NO 30

[0411]

[0412] 免疫荧光

[0413] 将约 2.5×10^4 细胞种植到 4 孔 Lab-TekII Chamber Slide 上。在 24 小时后,细胞用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗涤 2 次,并且进行渗透化处理,并且在 PBS 缓冲液中的 2% 多聚甲醛和 0.1% Triton X100 中在 40C 下固定 30 分钟。细胞随后用 PBS 洗涤 3 次,并且与封闭溶液 (在 PBS 中的 10% 山羊血清) 一起温育。细胞随后与初级抗体一起温育 (2 小时 - 过夜),用 PBS 加 0.1% Tween-20 洗涤 3 次共 15 分钟,并且最后与次级抗体 (Invitrogen) 和 DAPI 一起温育 2 小时。用 PBS 充分洗涤载玻片,并且用缓慢衰退 Light Anti fade Kit (Invitrogen) 固定。使用免疫荧光显微镜和相同曝光时间给所有匹配样品拍照 (对照和测试)。

[0414] 关于实施例 5、6 和 7 的参考文献

[0415] Cifone, M. A. 和 Fidler, I. J. (1980). Correlation of patterns of anchorage-independent growth with in vivo behavior of cells from a murine

fibrosarcoma. Proc Natl Acad Sci U S A 77,1039-1043.

[0416] Eisen, M. B. , Spellman, P. T. , Brown, P. O. 和 Botstein, D. (1998). Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. Proc Natl Acad Sci U S A 95,14863-14868.

[0417] Elenbaas, B. , Spirio, L. , Koerner, F. , Fleming, M. D. , Zimonjic, D. B. , Donaher, J. L. , Popescu, N. C. , Hahn, W. C. 和 Weinberg, R. A. (2001). Human breast cancer cells generated by oncogenic transformation of primary mammary epithelial cells. Genes Dev 15,50-65.

[0418] Hahn, W. C. , Counter, C. M. , Lundberg, A. S. , Beijersbergen, R. L. , Brooks, M. W. 和 Weinberg, R. A. (1999). Creation of human tumour cells with defined genetic elements. Nature 400,464-468.

[0419] Littlewood, T. D. , Hancock, D. C. , Danielian, P. S. , Parker, M. G. & Evan, G. I. (1995). Nucleic Acids Res, 23,1686-90.

[0420] Shipitsin, M. , Campbell, L. L. , Argani, P. , Weremowicz, S. , Bloushtain-Qimron, N. , Yao, J. , Nikolskaya, T. , Serebryiskaya, T. , Beroukhi, R. , Hu, M. , 等人 (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. Cancer Cell 11,259-273.

[0421] Singh, S. K. , Hawkins, C. , Clarke, I. D. , Squire, J. A. , Bayani, J. , Hide, T. , Henkelman, R. M. , Cusimano, M. D. 和 Dirks, P. B. (2004). Identification of human brain tumour initiating cells. Nature 432,396-401.

[0422] Stewart SA, Dykxhoorn DM, Palliser D, Mizuno H, Yu EY, An DS, Sabatini DM, Chen IS, Hahn WC, Sharp PA, Weinberg RA, Novina CD. Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells. RNA. 2003 Apr ;9(4) :493-501.

[0423] Stingl, J. , Eirew, P. , Ricketson, I. , Shackleton, M. , Vaillant, F. , Choi, D. , Li, H. I. 和 Eaves, C. J. (2006). Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. Nature 439,993-997.

[0424] Watnick R. S. , Cheng Y. N. , Rangarajan A. , Ince T. A. , Weinberg R. A. 2003. Ras modulates Myc activity to repress thrombospondin-1 expression and increase tumor angiogenesis. Cancer Cell 3 ;219-231

[0425] Yang, J. , Mani, S. A. , Donaher, J. L. , Ramaswamy, S. , Itzykson, R. A. , Come, C. , Savagner, P. , Gitelman, I. , Richardson, A. 和 Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. Cell 117,927-939.

[0426] 实施例 8

[0427] 检查了沙利霉素对癌症干细胞的作用。用沙利霉素或紫杉醇或作为对照的 DMSO 以各种剂量处理 HMLER 细胞共 4 天。(图 13A.) 通过荧光激活细胞分选定量在化合物处理后 CD44^高/CD24^低细胞的百分率。进行用 2 个不同 HMLER 细胞群体 (HMLER_1、HMLER_2) 的 2 次独立实验, 并且产生条形图以描绘结果 (图 13A.)。还检查了用沙利霉素或紫杉醇处理的 HMLER_2 癌细胞群体的荧光激活细胞分选谱的散布图。(图 13B.)

[0428] 还检查了在各种剂量下用 DMSO、紫杉醇 (泰素) 或沙利霉素处理的亲本 HMLER 细

胞的乳腺球形成潜力。沙利霉素而不是紫杉醇抑制 MCF7Ras 或 4T1 细胞中的乳腺球形成。(图 14.) 测定了沙利霉素、紫杉醇或媒介物对照处理对通过注射到小鼠中的 SUM159 乳腺癌细胞的体内肿瘤形成的作用。与用媒介物处理的小鼠比较,用沙利霉素或紫杉醇处理的小鼠具有减少的肿瘤体积。(图 15A.) 还测定了从来自沙利霉素、紫杉醇或 DMSO 处理小鼠的 SUM159 肿瘤获得的癌细胞的乳腺球形成潜力。(图 15B.)

[0429] 还测定了沙利霉素处理减少临床上相关的乳腺 CSC 和祖先基因表达的程度。基因集富集分析用于测定与紫杉醇处理比较,先前报告的与干细胞样细胞相关的 3 个基因集是否响应沙利霉素被阻遏。曲线图是 Kolmogorov-Smirnov 富集得分与基于差异表达的基因排序比较。显示了反映关于每个分析的统计显著性的 P 值。先前报告的 3 个基因标记是: CD44+CD24-IGS(Liu 等人,2007)、CD44+CD24-(Shipitsin 等人,2007) 和乳腺球 (Dontu 等人,2003)。(图 16.)

[0430] 参考文献

[0431] Liu, R., Wang, X., Chen, G. Y., Dalerba, P., Gurney, A., Hoey, T., Sherlock, G., Lewicki, J., Shedden, K. 和 Clarke, M. F. (2007). The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *The New England journal of medicine* 356,217-226.

[0432] Shipitsin, M., Campbell, L. L., Argani, P., Weremowicz, S., Bloushtain-Qimron, N., Yao, J., Nikolskaya, T., Serebryiskaya, T., Beroukhi, R., Hu, M., 等人 (2007). Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer cell* 11,259-273.

[0433] Dontu, G., Abdallah, W. M., Foley, J. M., Jackson, K. W., Clarke, M. F., Kawamura, M. J. 和 Wicha, M. S. (2003). In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes & development* 17,1253-1270.

[0434] 具有因此描述的本发明的至少一个实施方案的几个方面,应当理解各种改变、修饰和改善对于本领域技术人员将是容易想到的。此类改变、修饰和改善预期是本公开内容的部分,并且预期在本发明的精神和范围内。因此,前述说明书和图仅作为例子。本文描述的所有参考文献为了本文描述的目的引入作为参考。

[0435] 此外,本发明在其应用中并不限于在所公开的说明书中阐述或在图中举例说明的组分的构建和安排细节。本发明能够具有其他实施方案并且以各种方法实践且执行。此外,本文使用的措词和专门名词用于描述性目的,并且不应被视为限制性的。“包括”、“包含”或“具有”、“含有”、“涉及”及其变异在本文中的使用意欲包括其后列出的项目及其等价物以及另外项目。

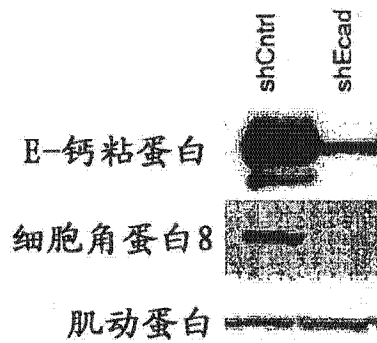
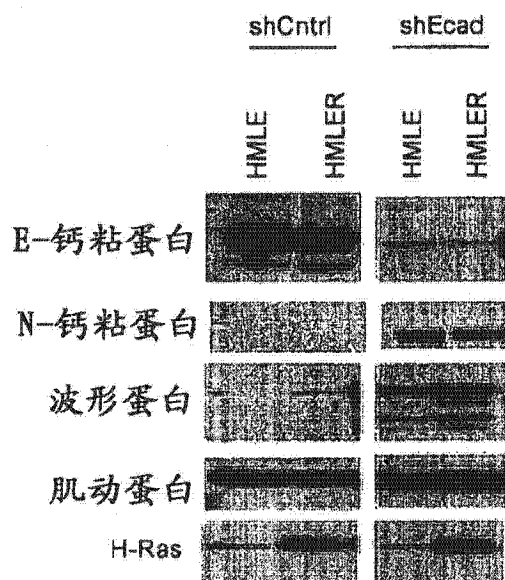


图 1A

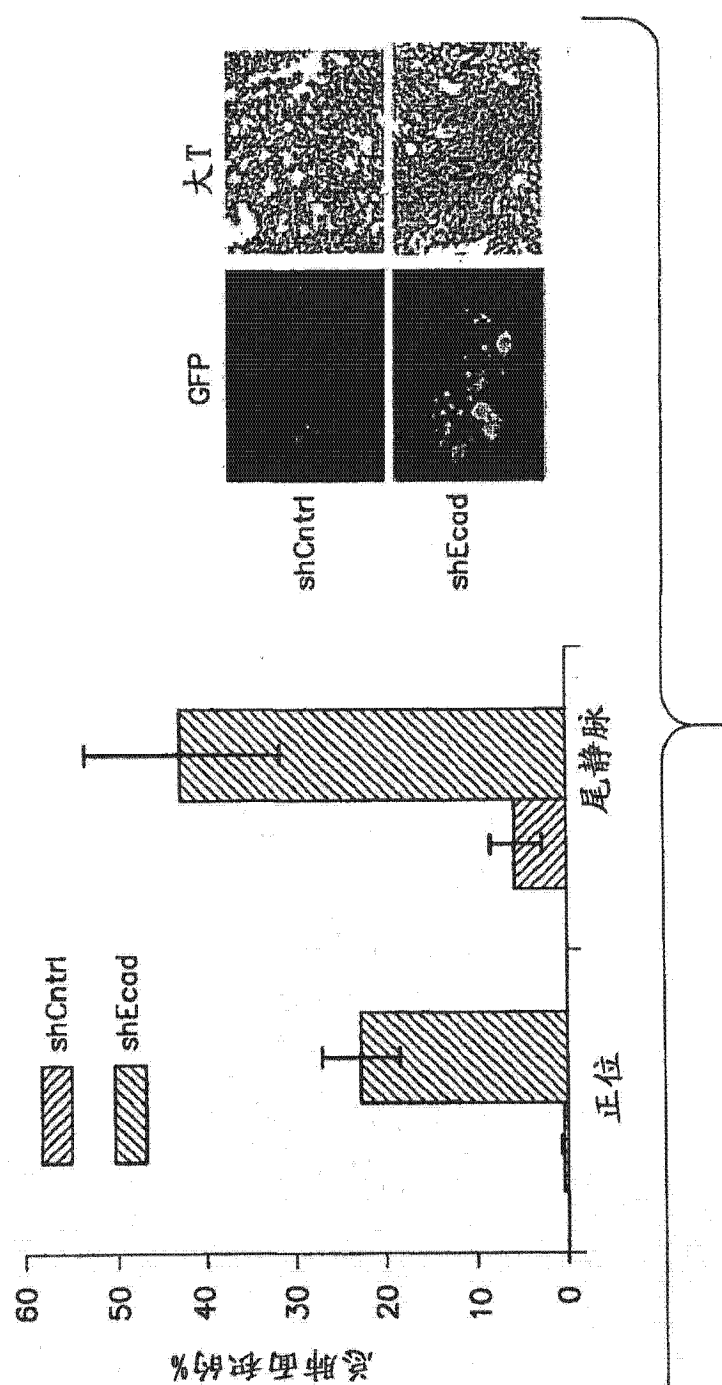


图 1B

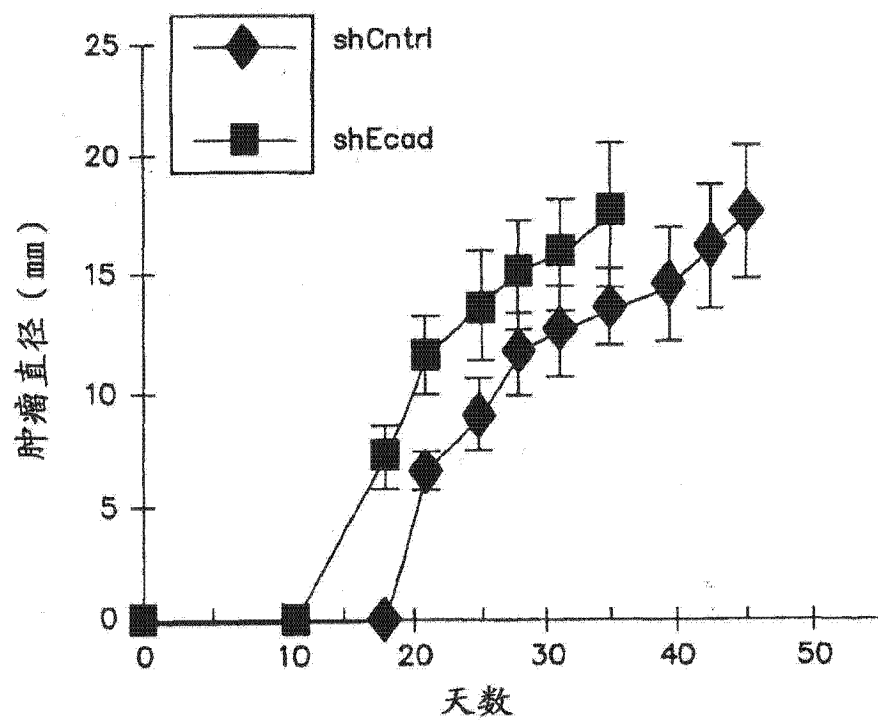


图 1C

致瘤性-HMLER		
	siCntrl	siE-cad
1×10^6	8/10	10/10
1×10^5	3/4	4/4
1×10^4	1/4	4/4
1×10^3	0/4	4/4

图 1D

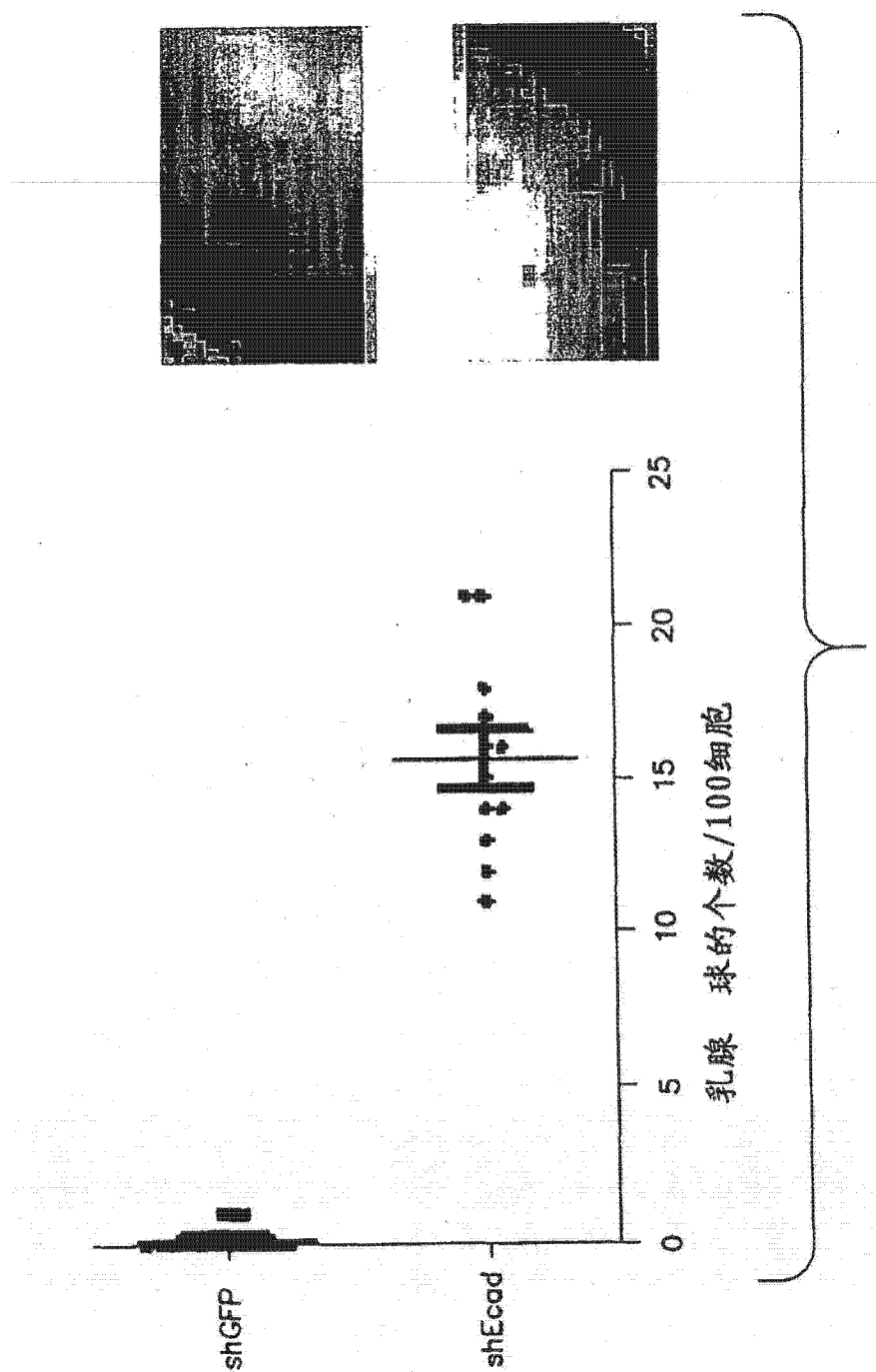


图 1E

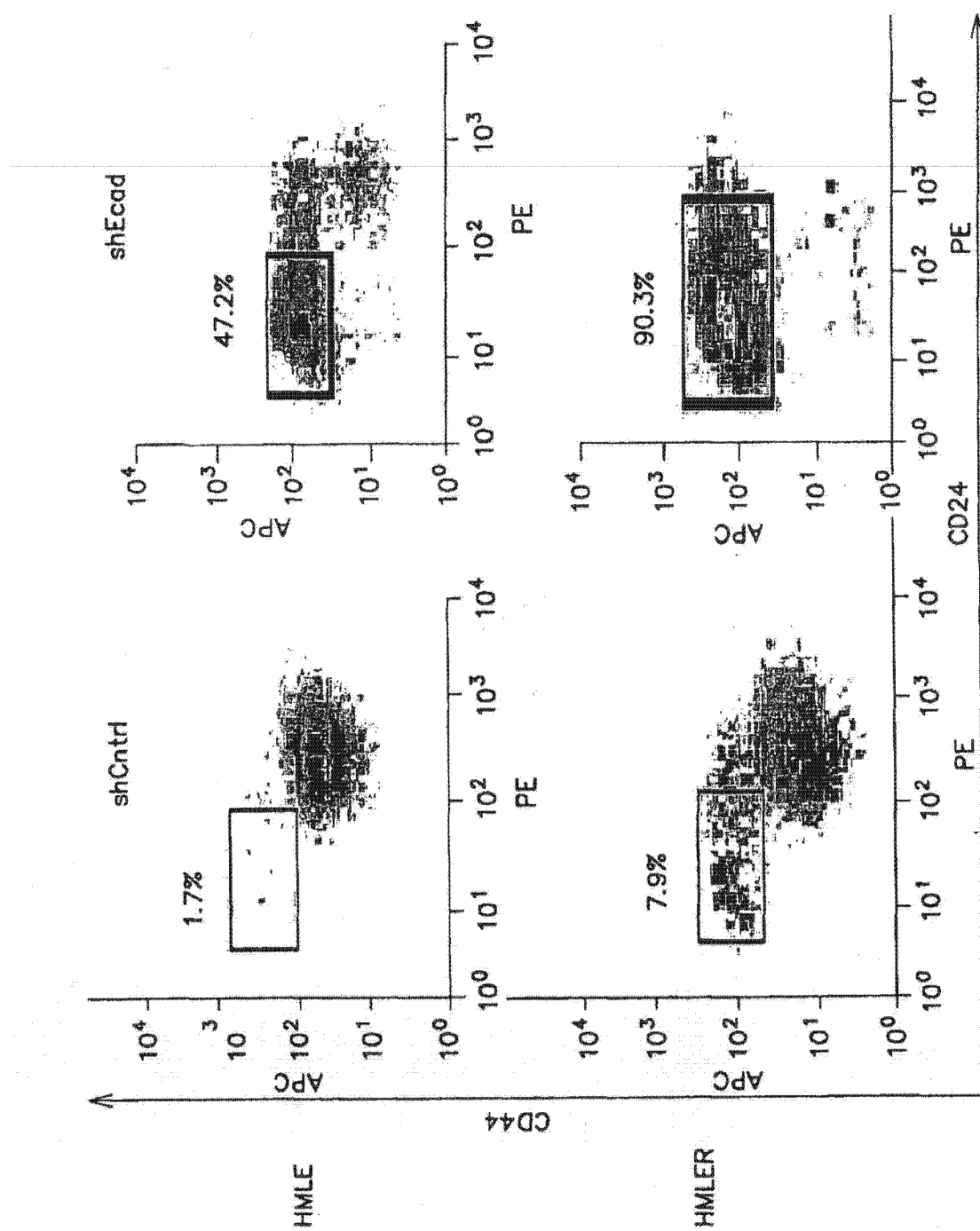


图 1F

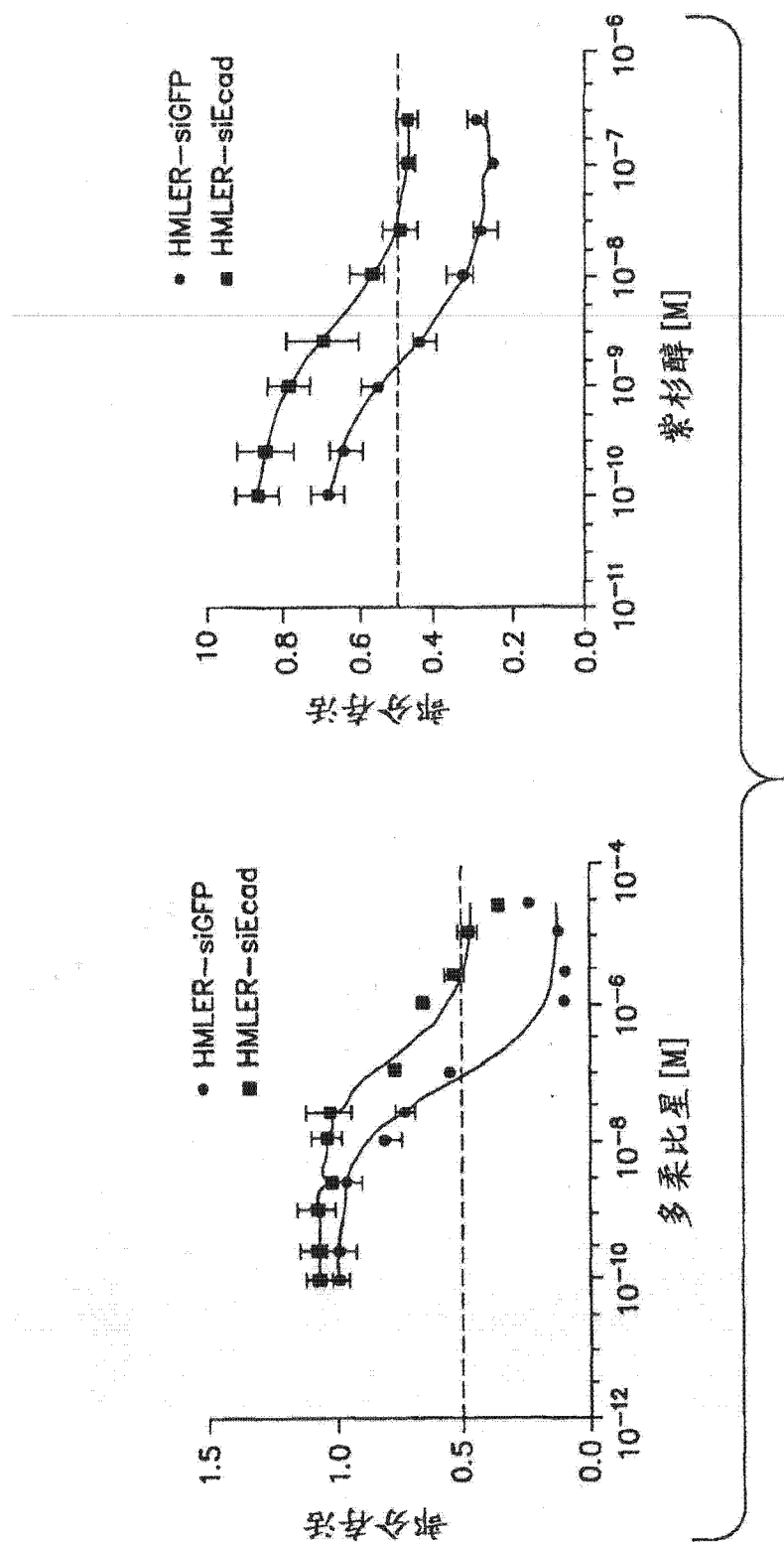


图 2A

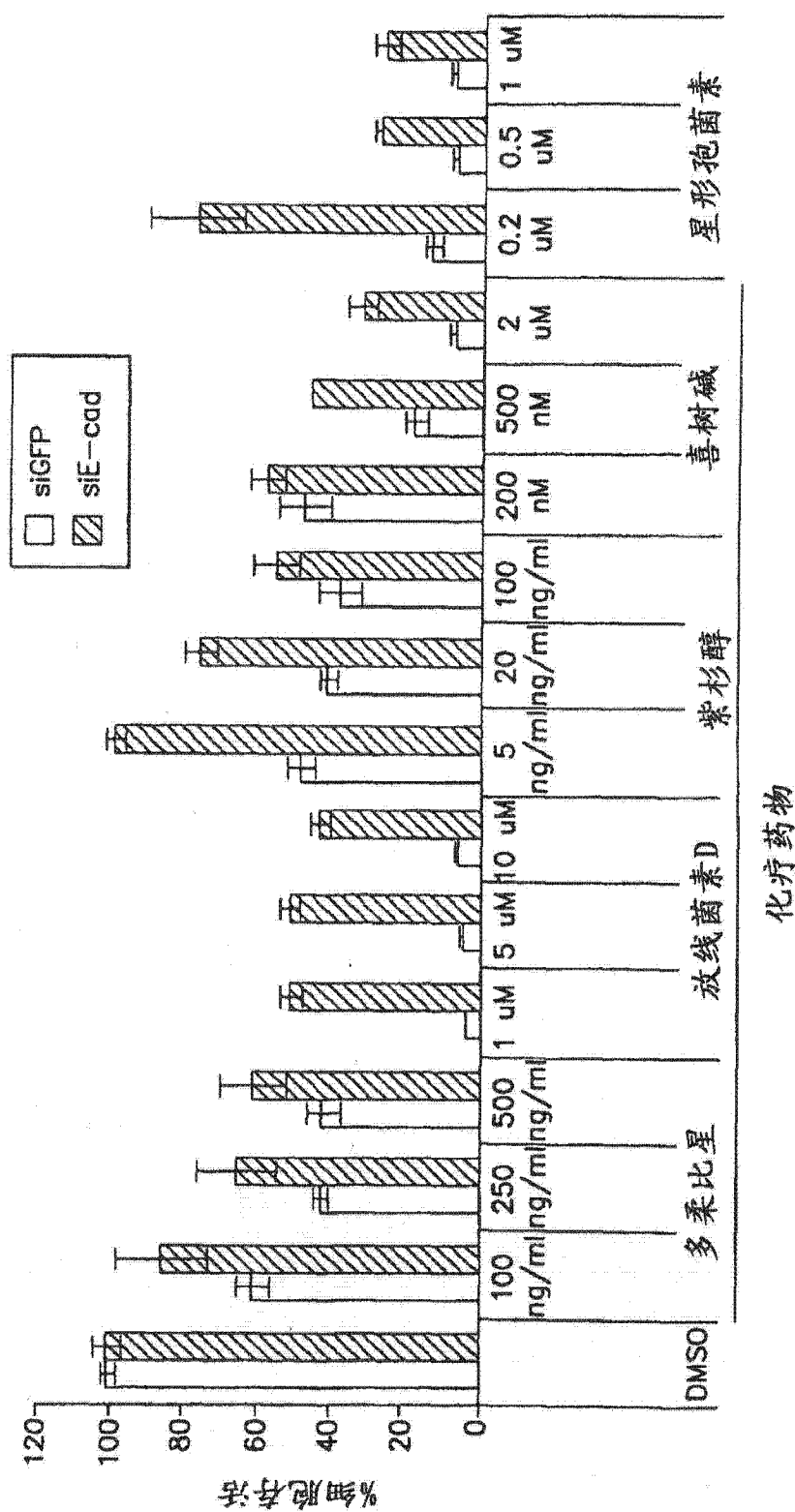


图 2B

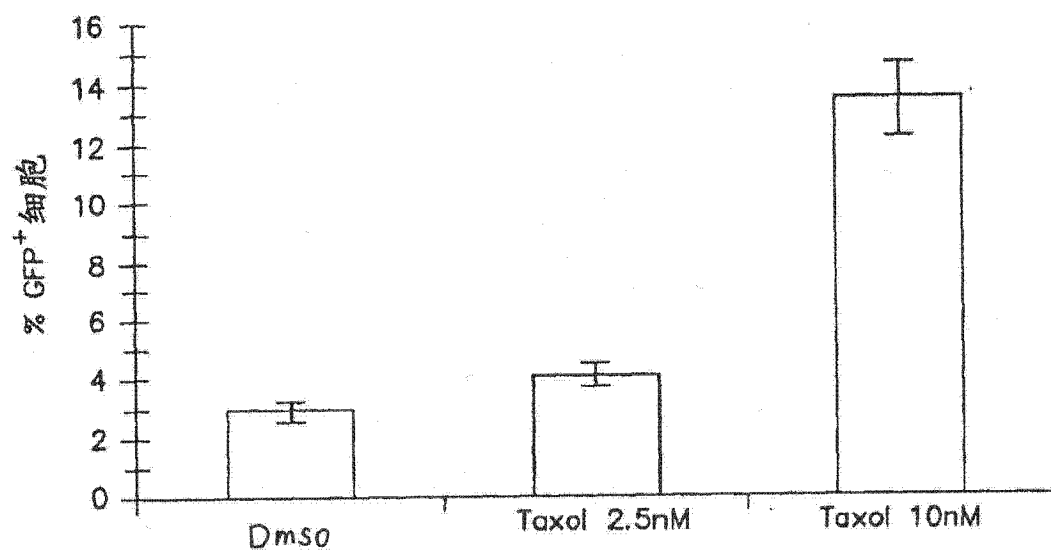


图 2C-2

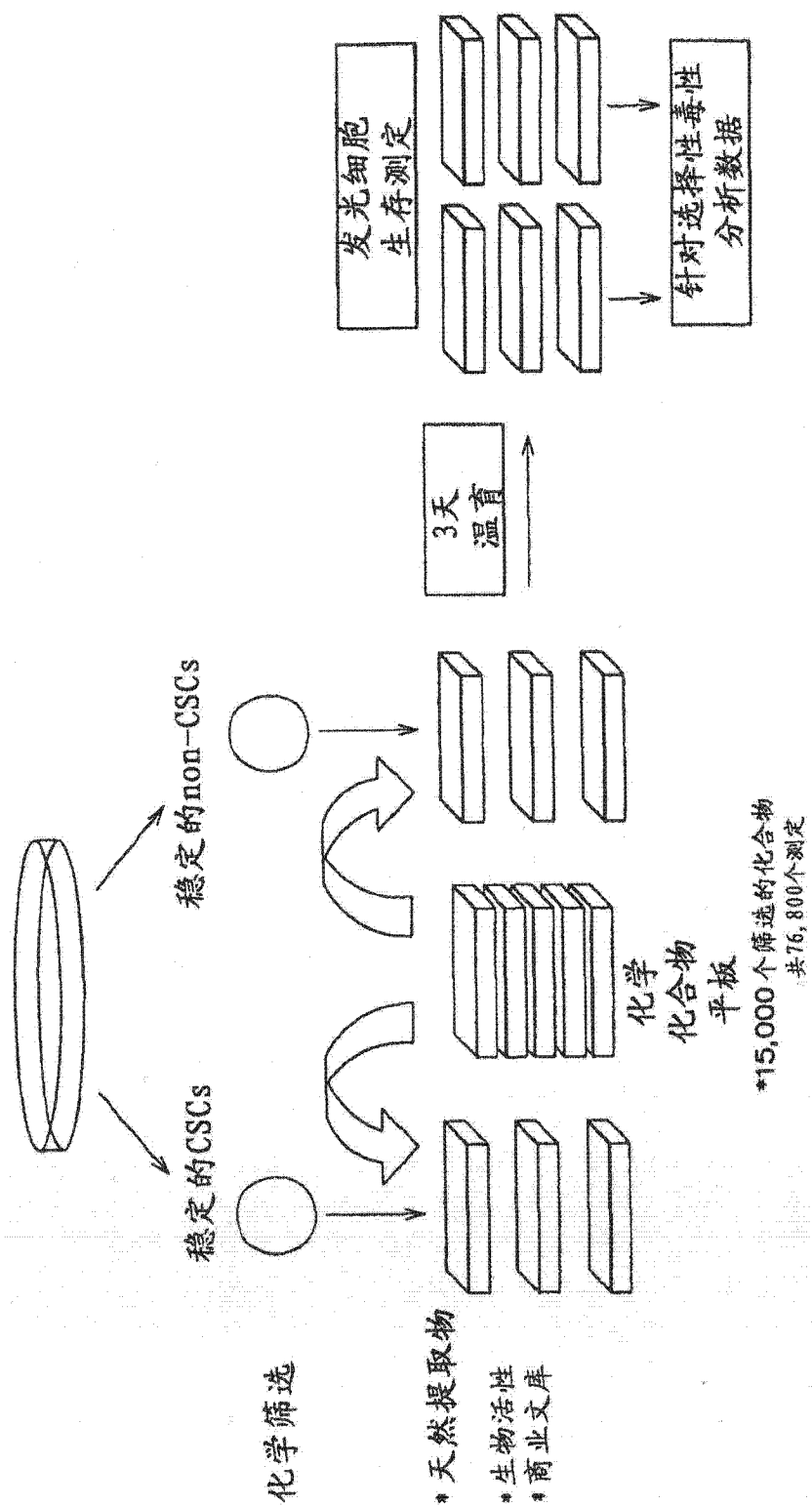


图 3-1

通过平板的化合物命中的热谱

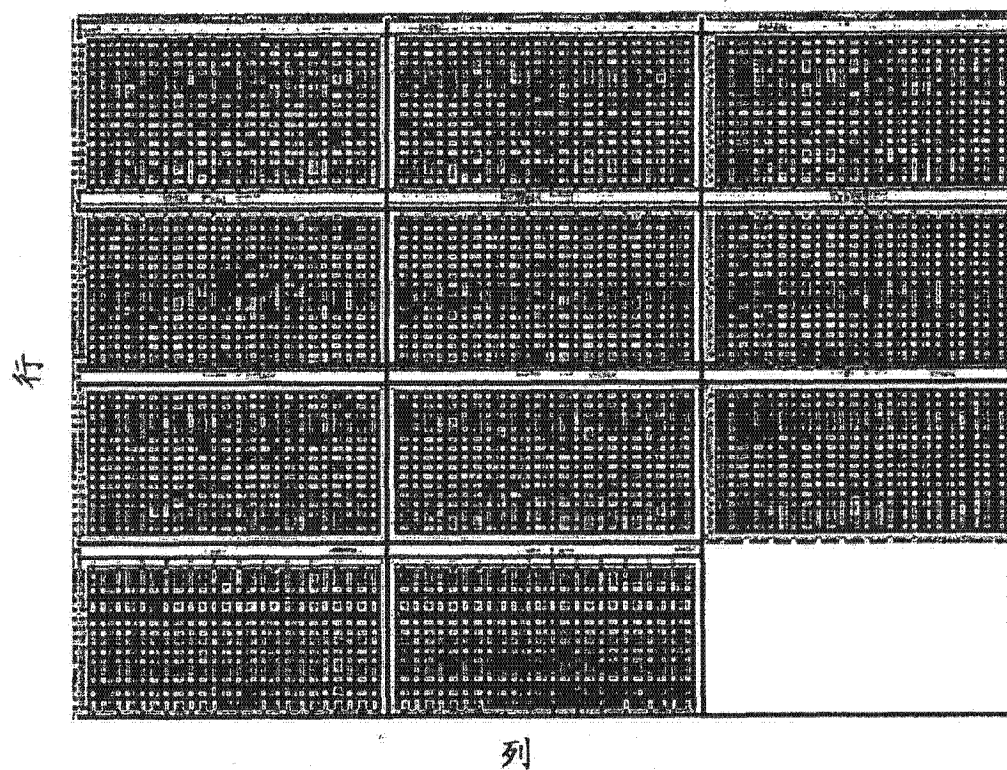


图 3-2

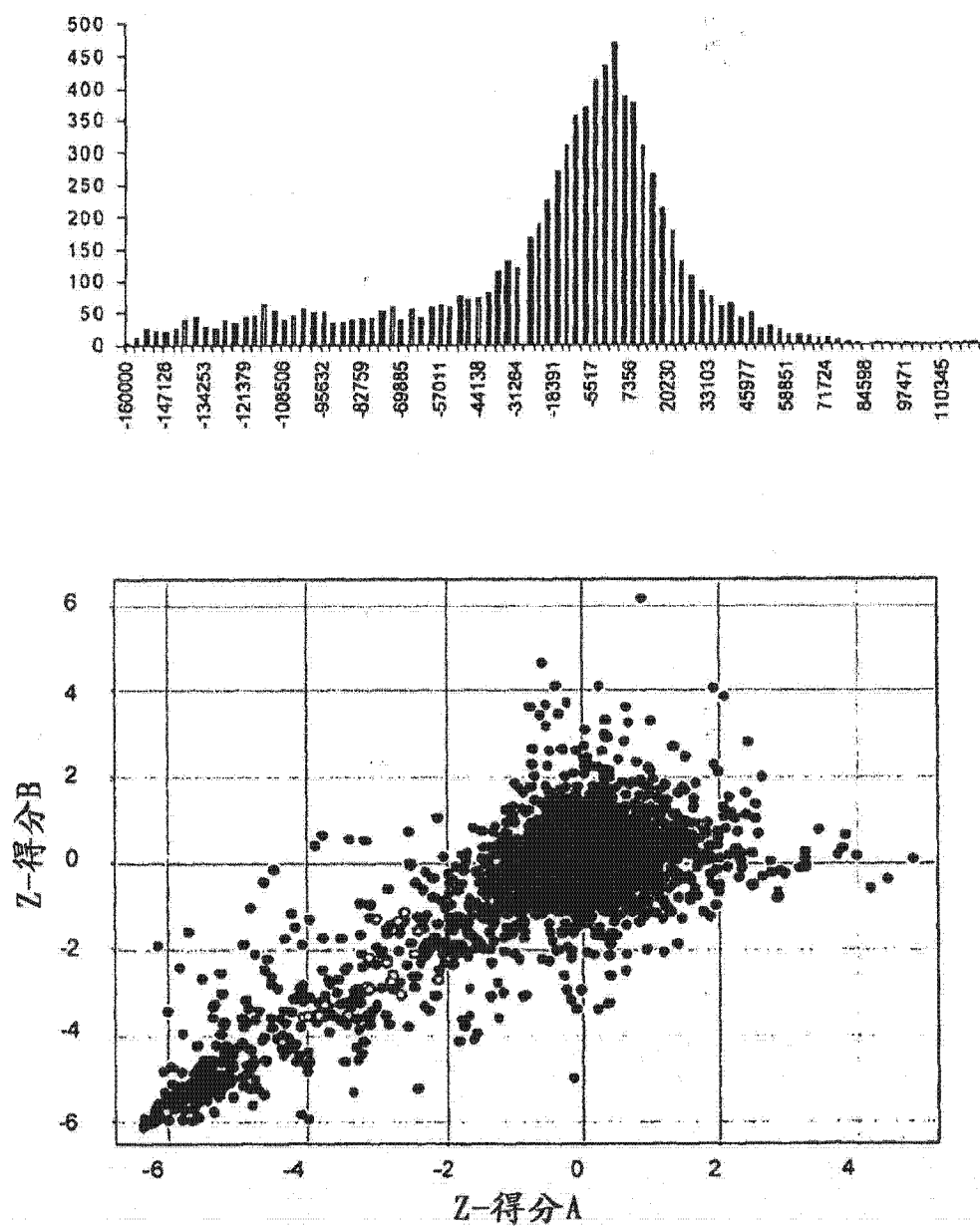


图 3-3

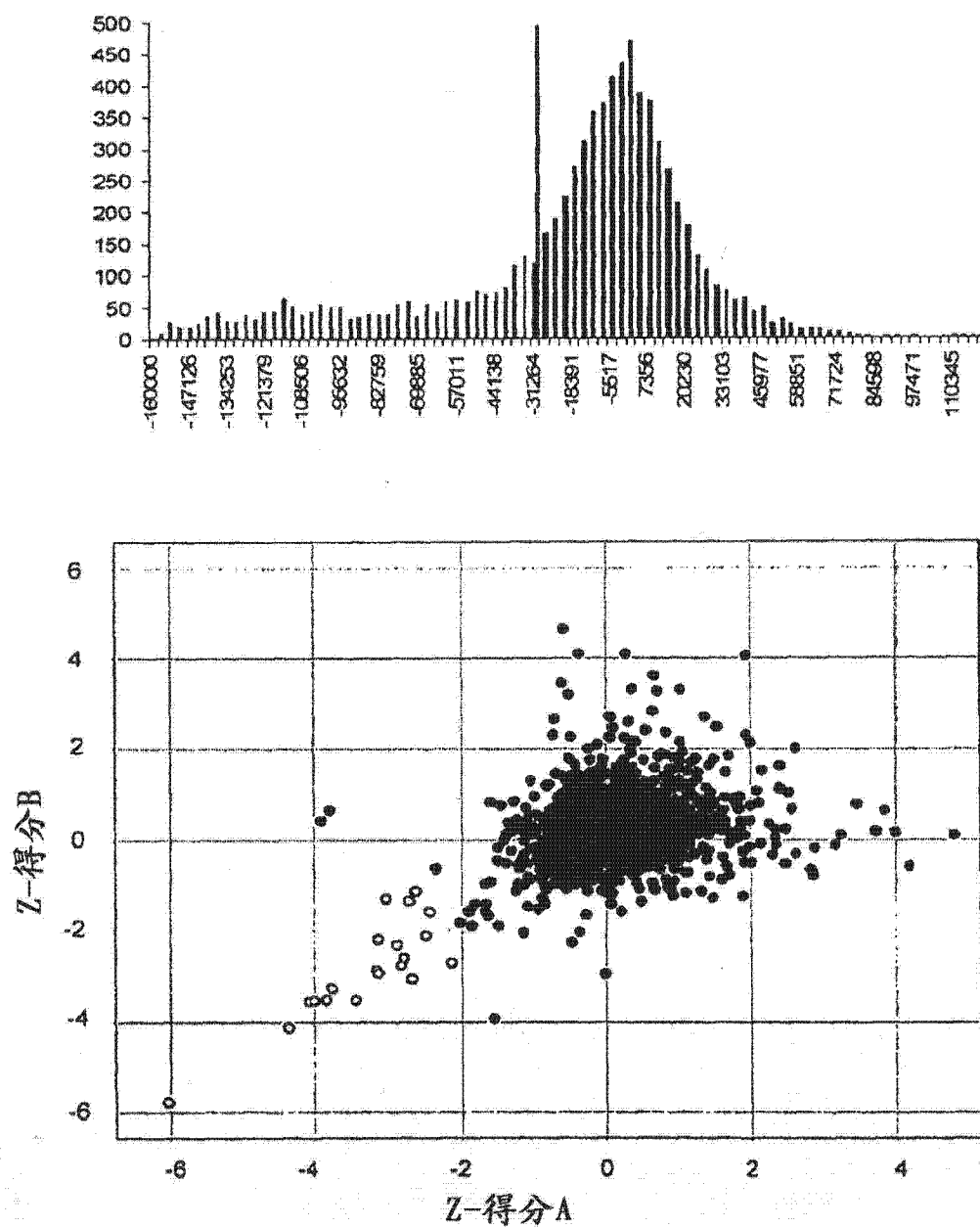


图 3-4

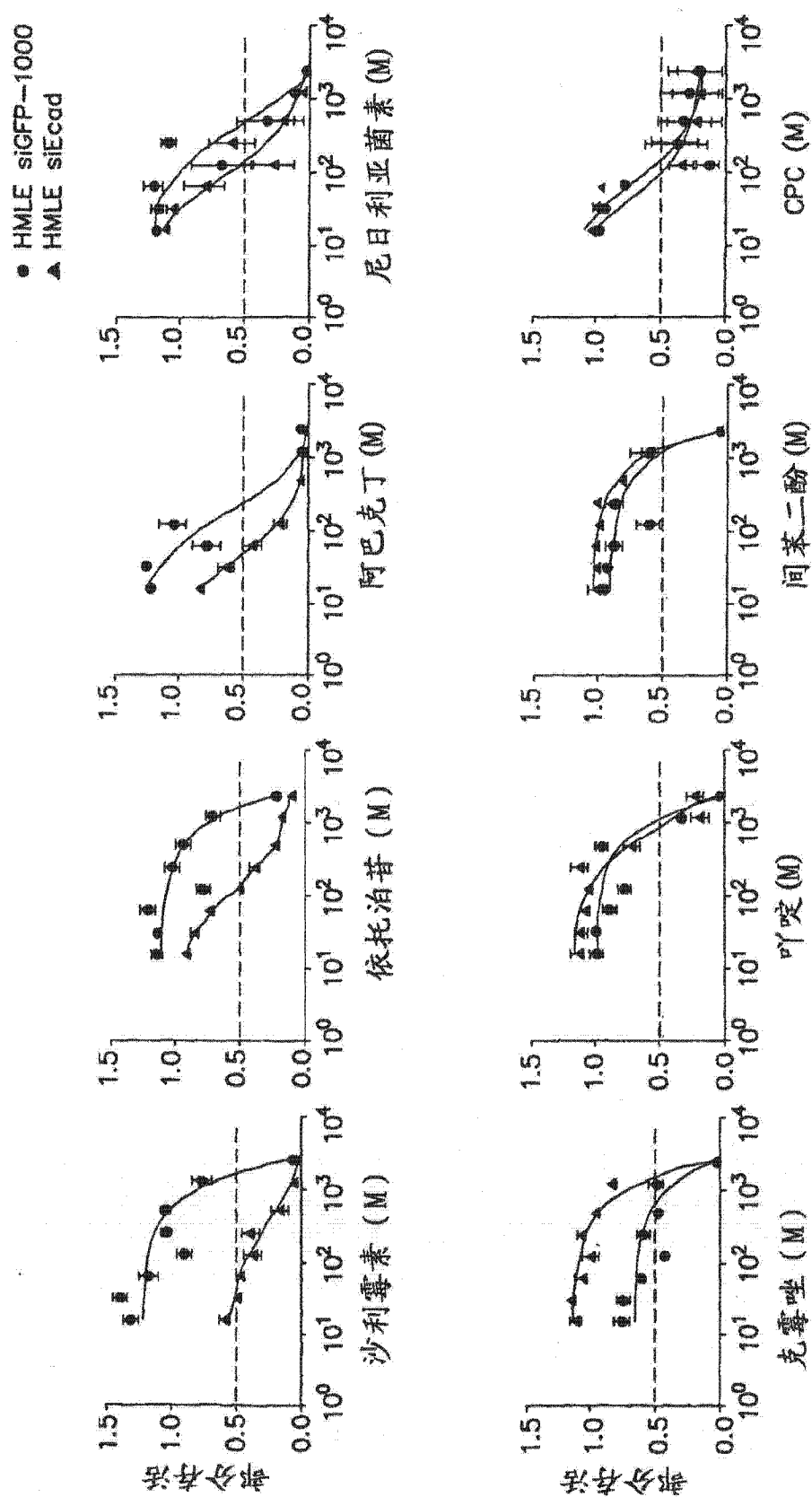


图 4A

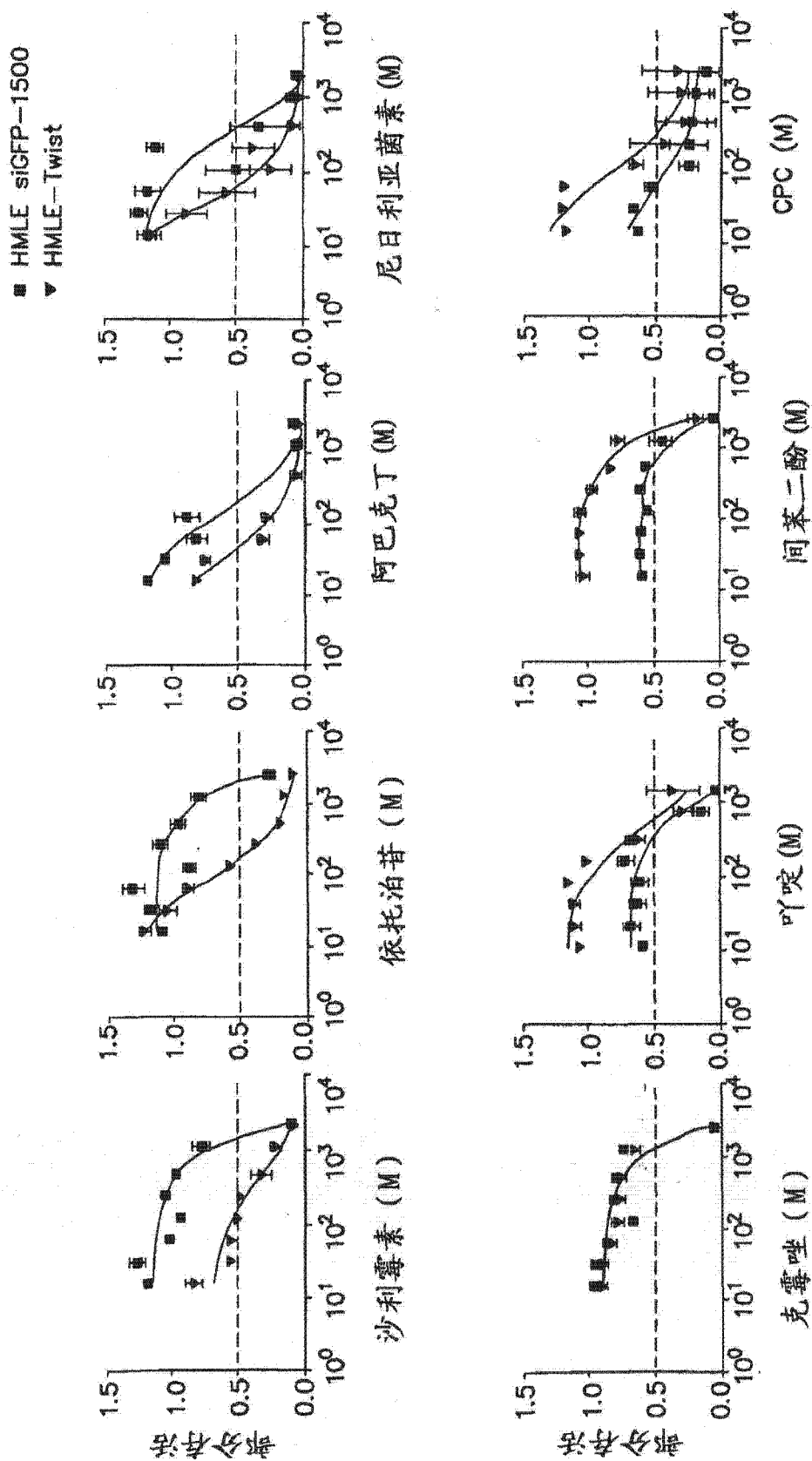


图 4B

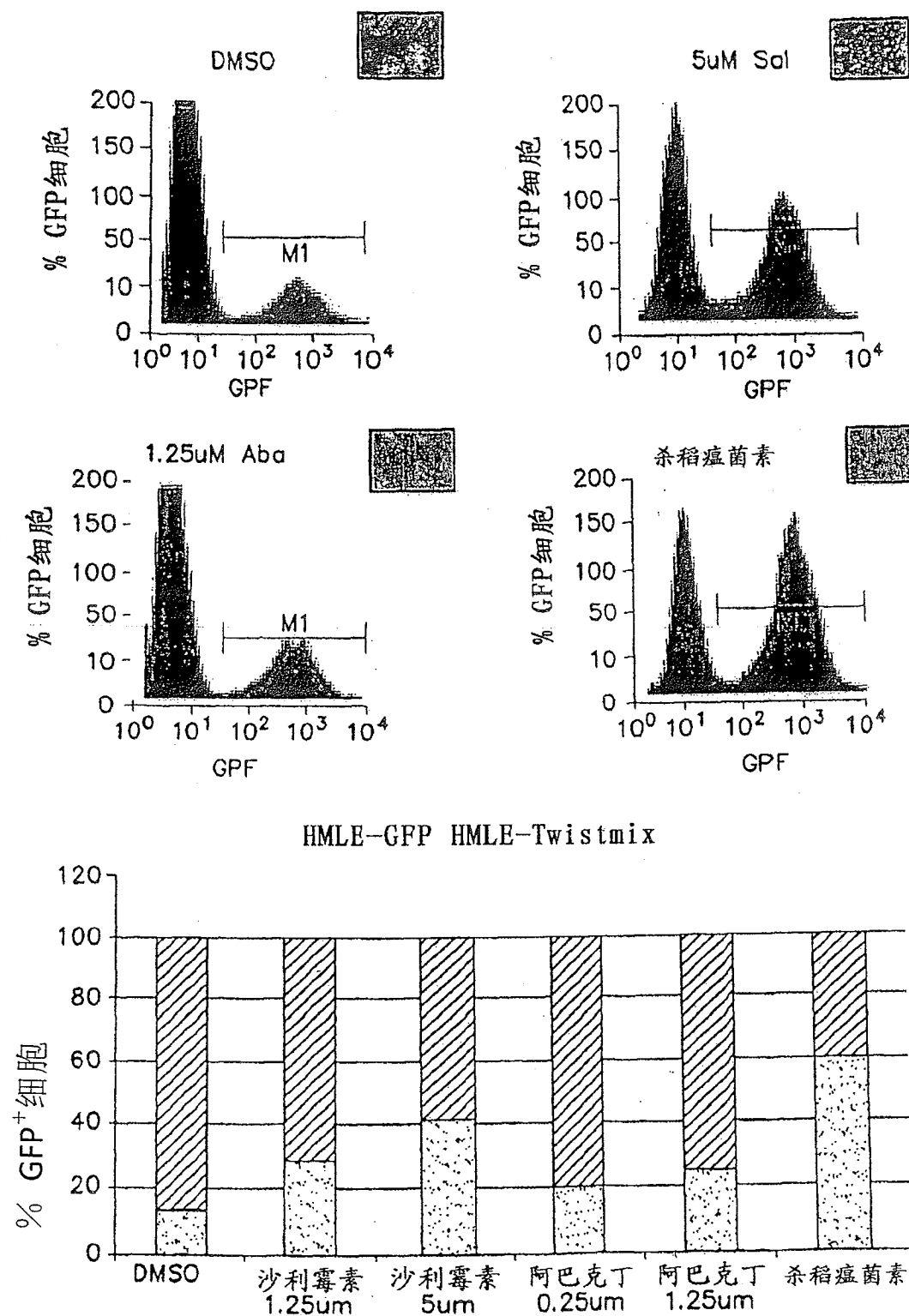


图 4C

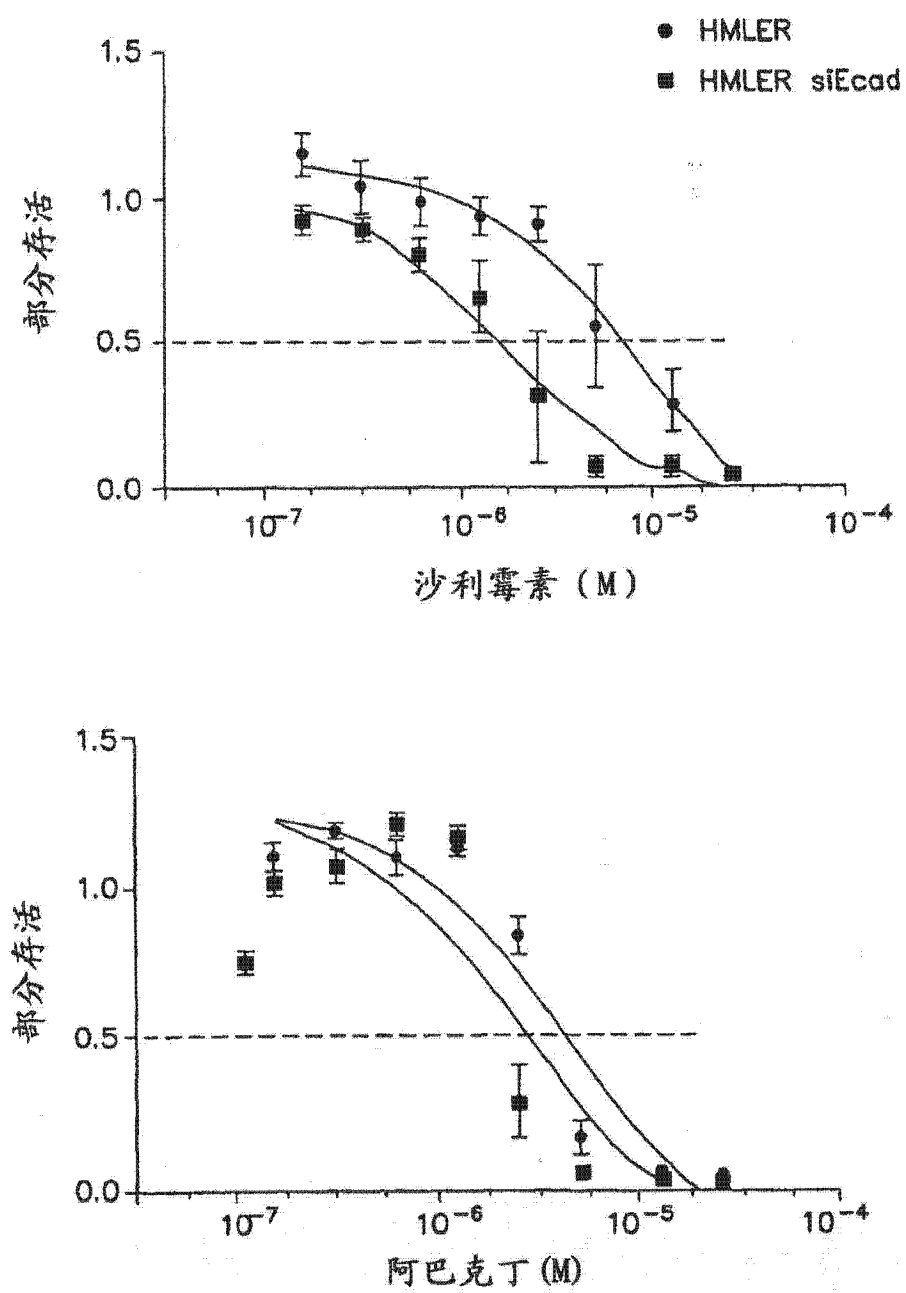


图 4D

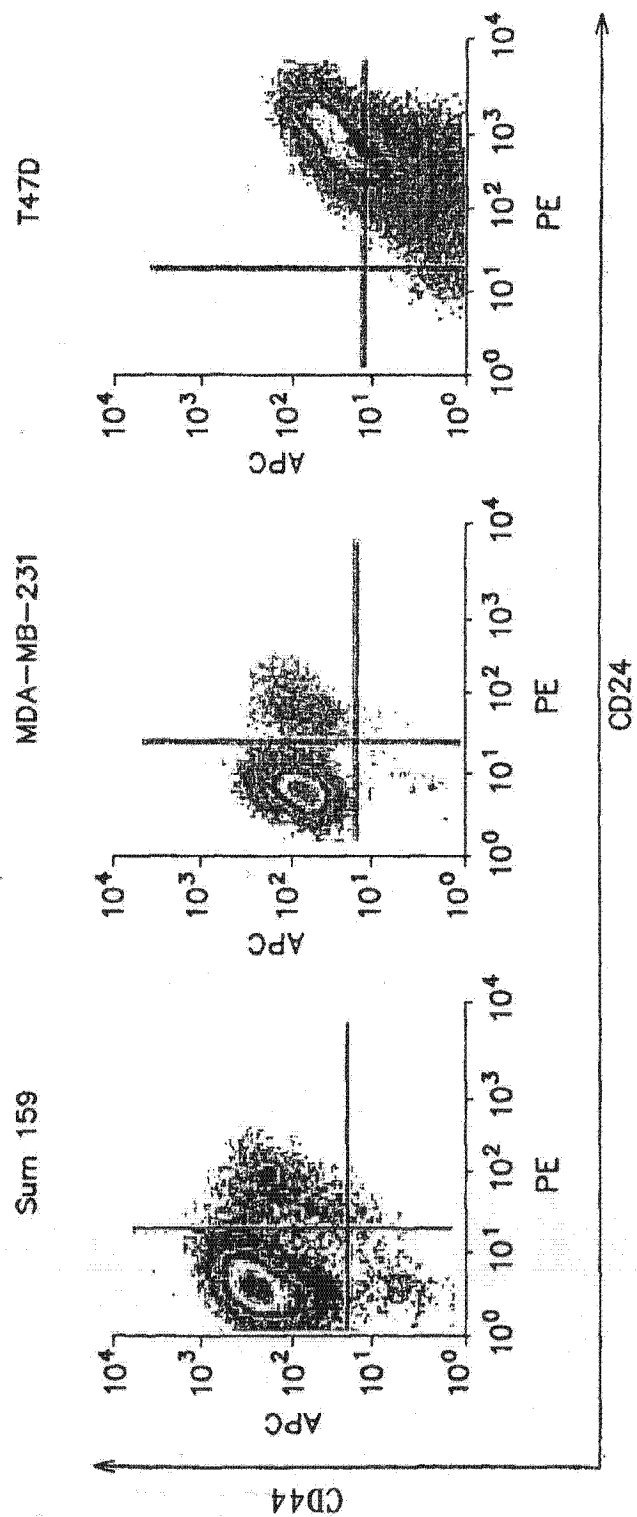


图 5A

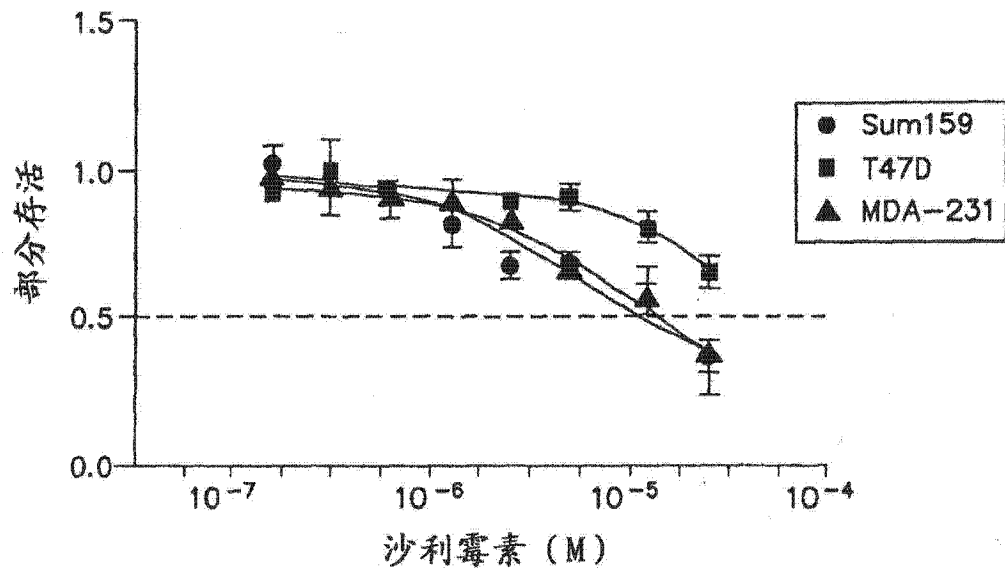


图 5B

细胞系	% CSCs (CD44 ⁺ CD24 ⁻)
Sum159	92.6%
MDA-MB-231	89.9%
T47D	0%

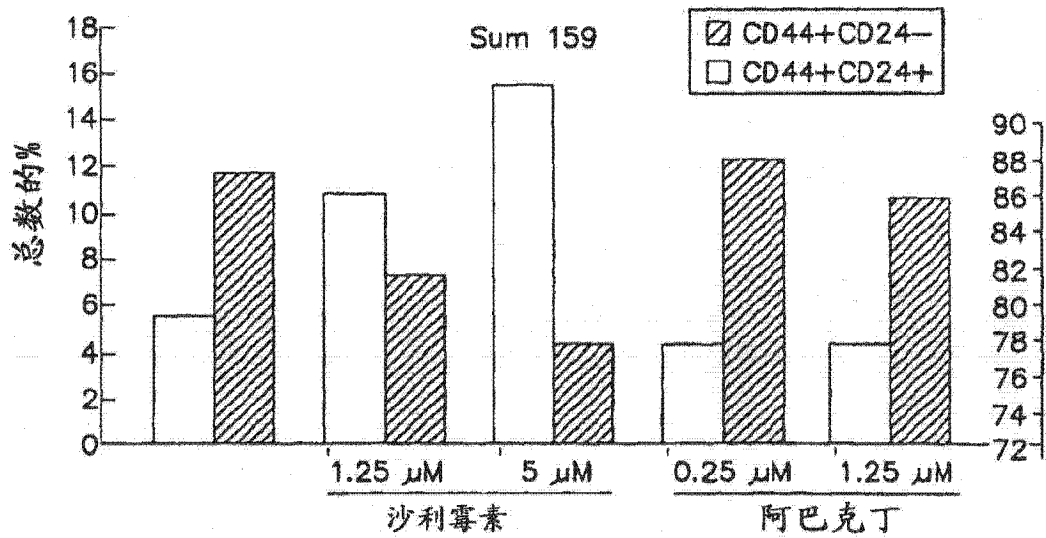


图 5C-1

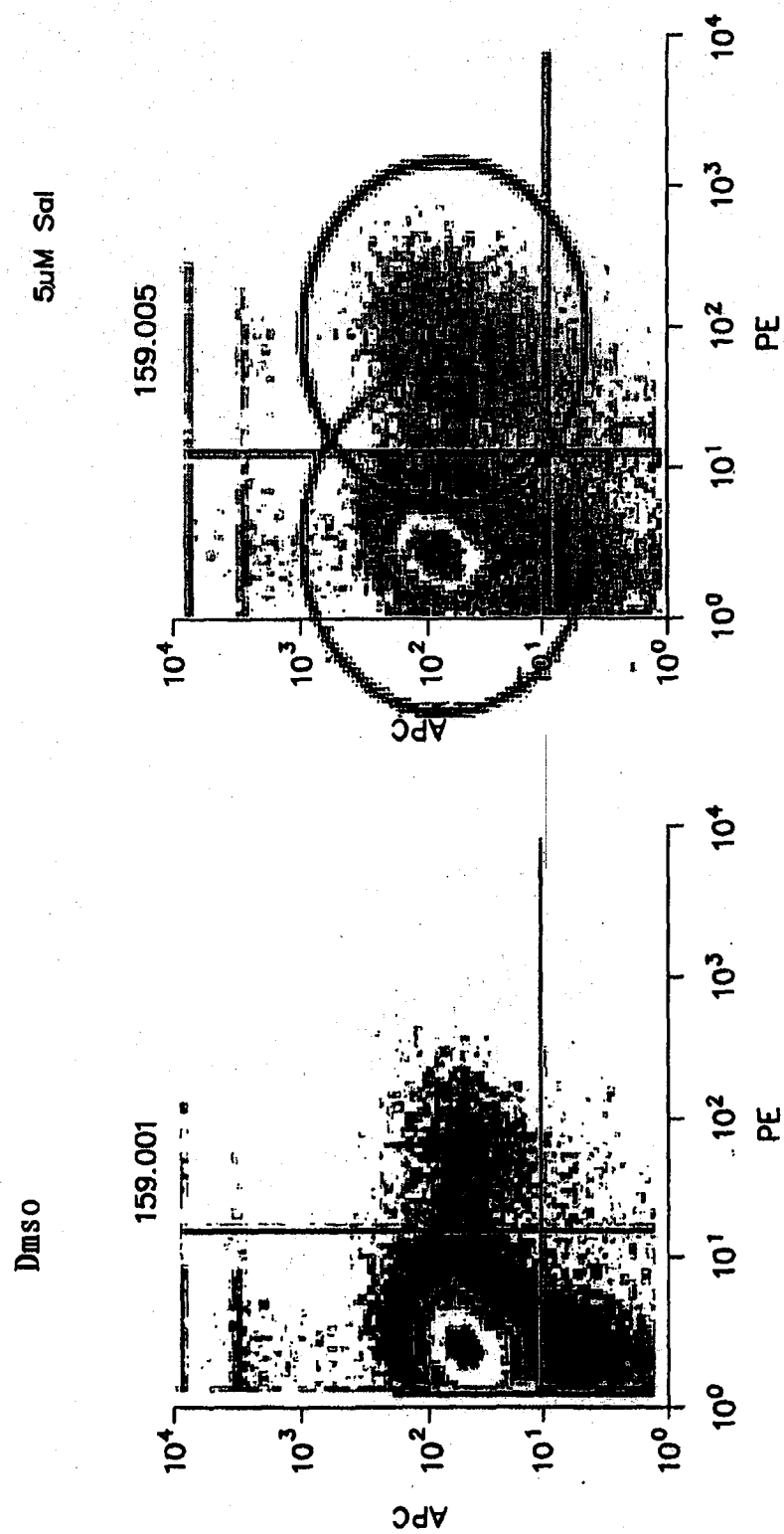


图 5C-2

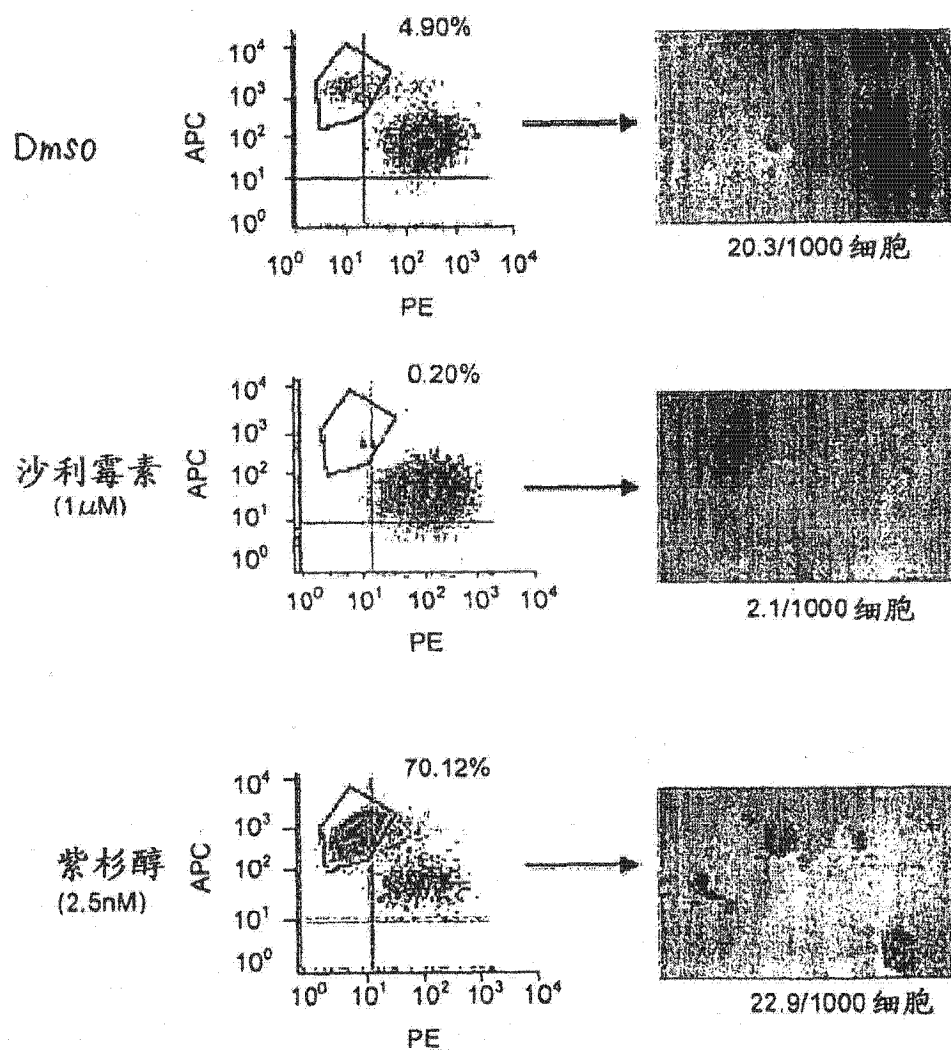


图 6A

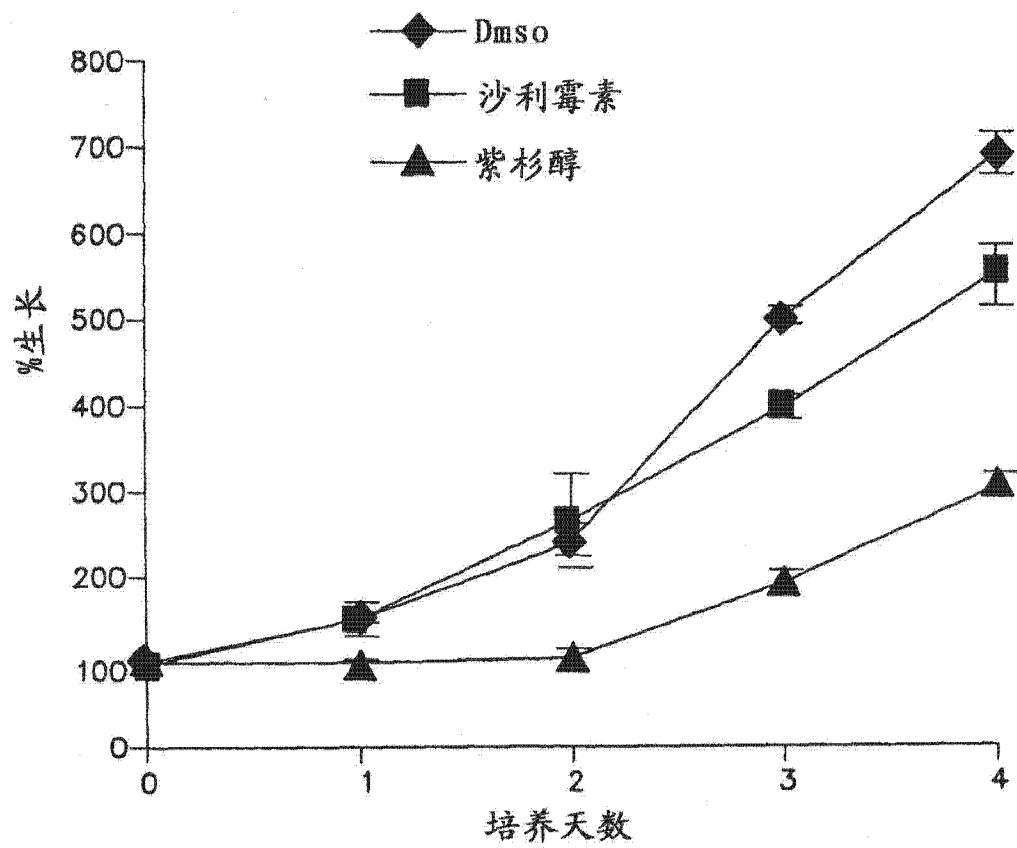


图 6B

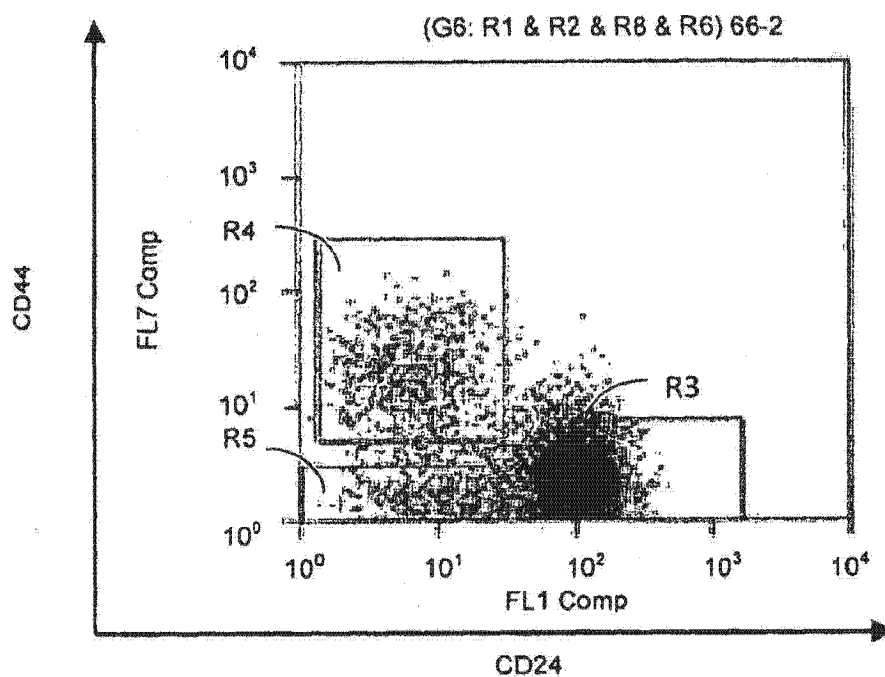


图 7A

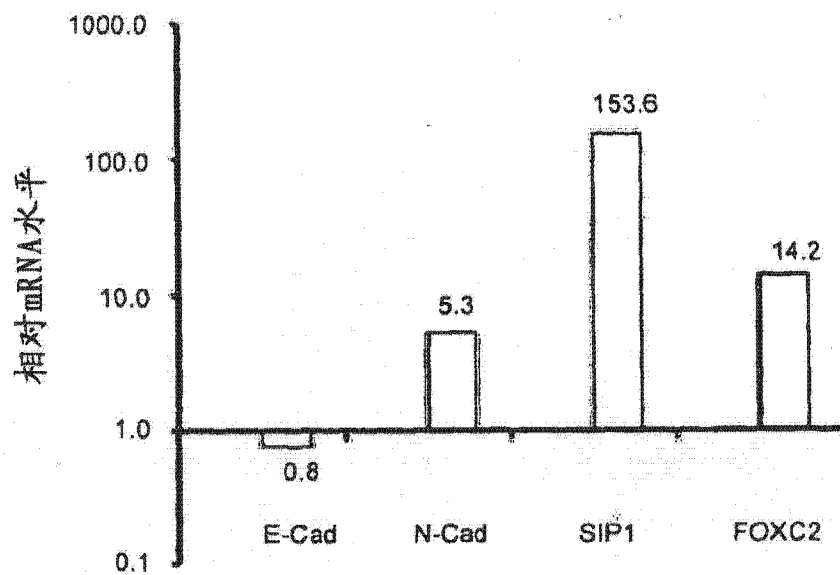


图 7B

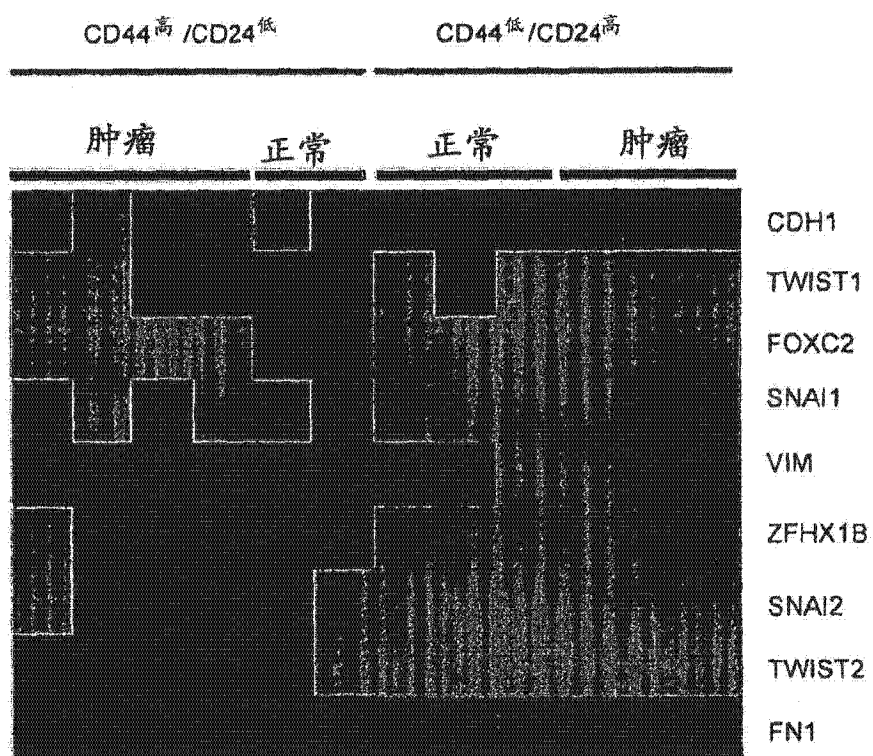


图 7C

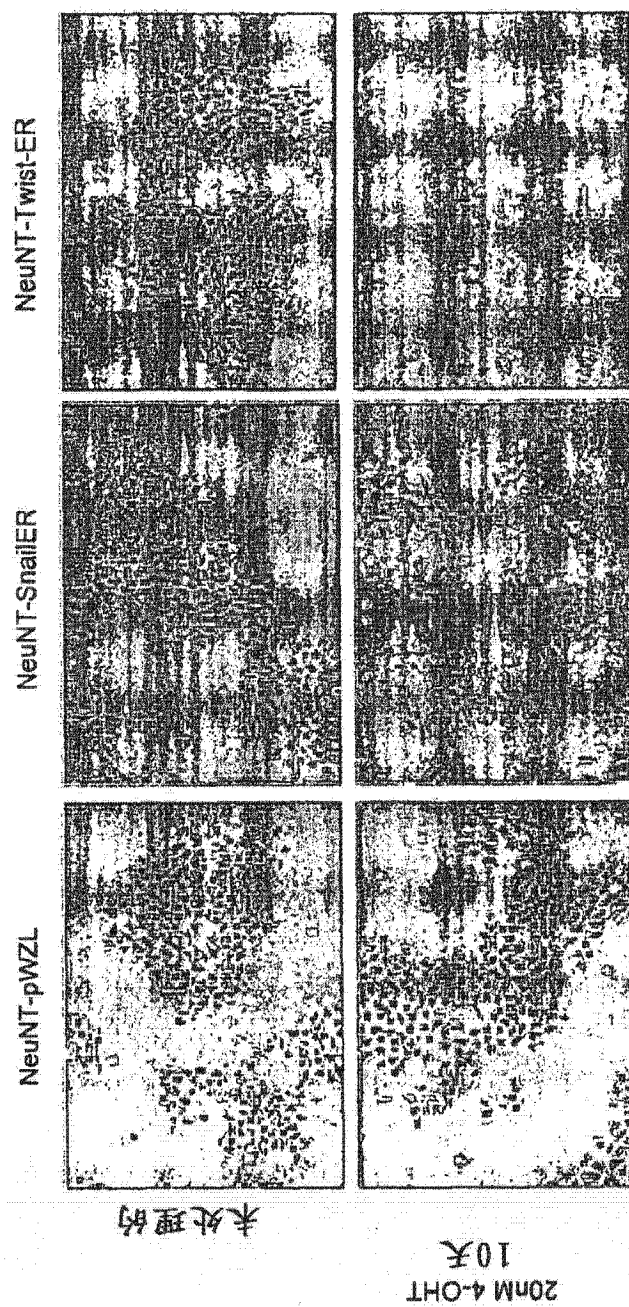


图 8A

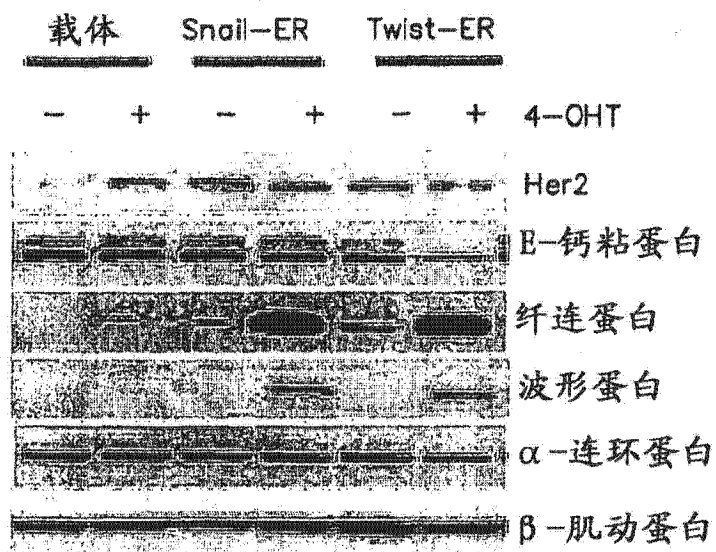


图 8B

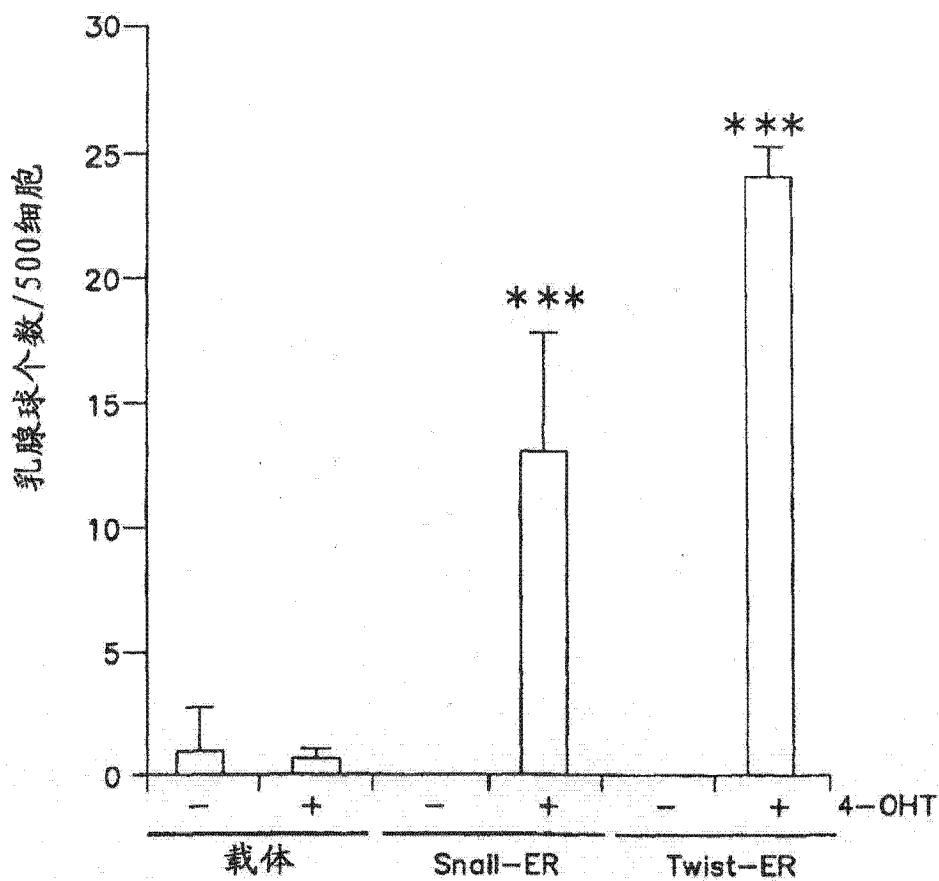


图 8C

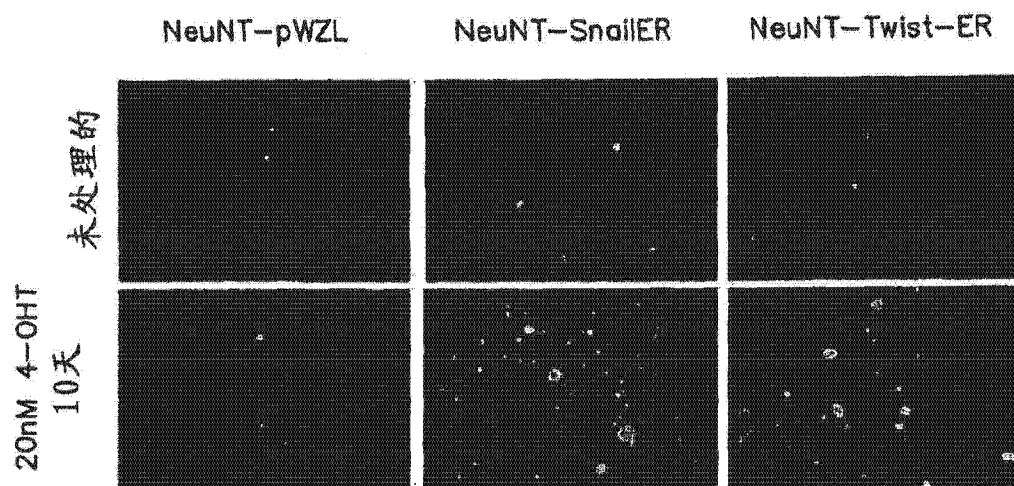


图 8D

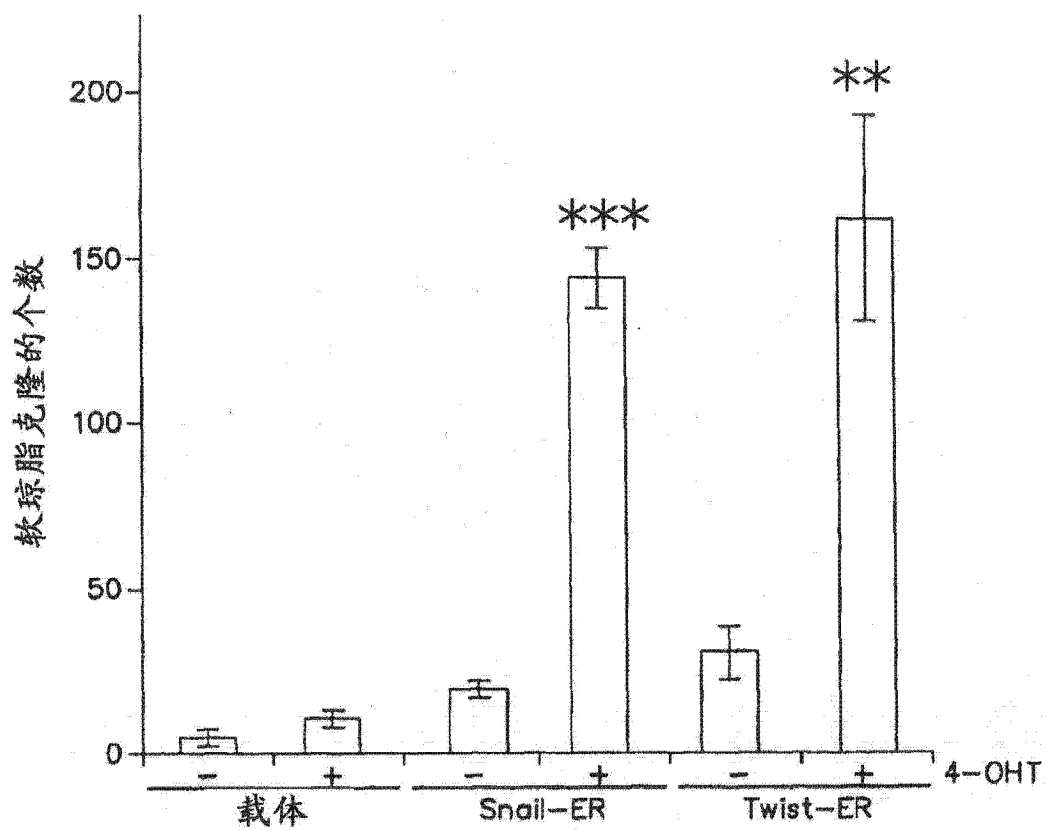


图 8E

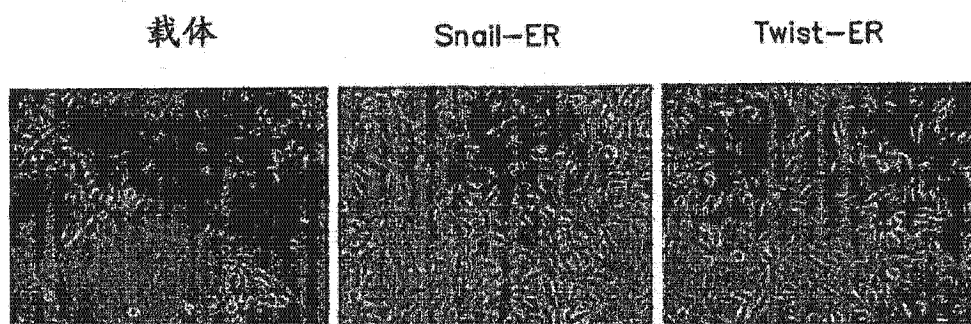


图 9A

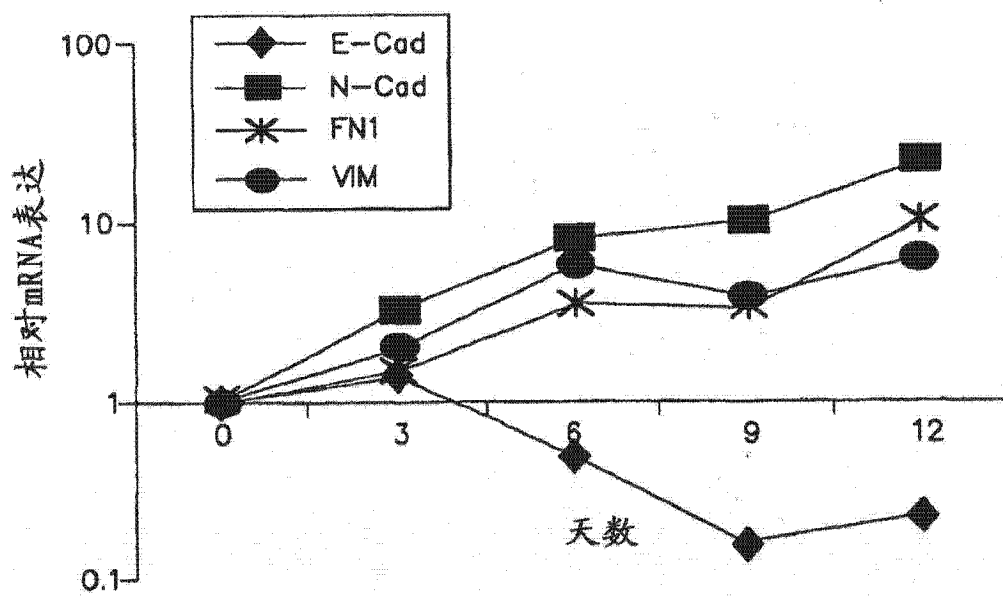


图 9B

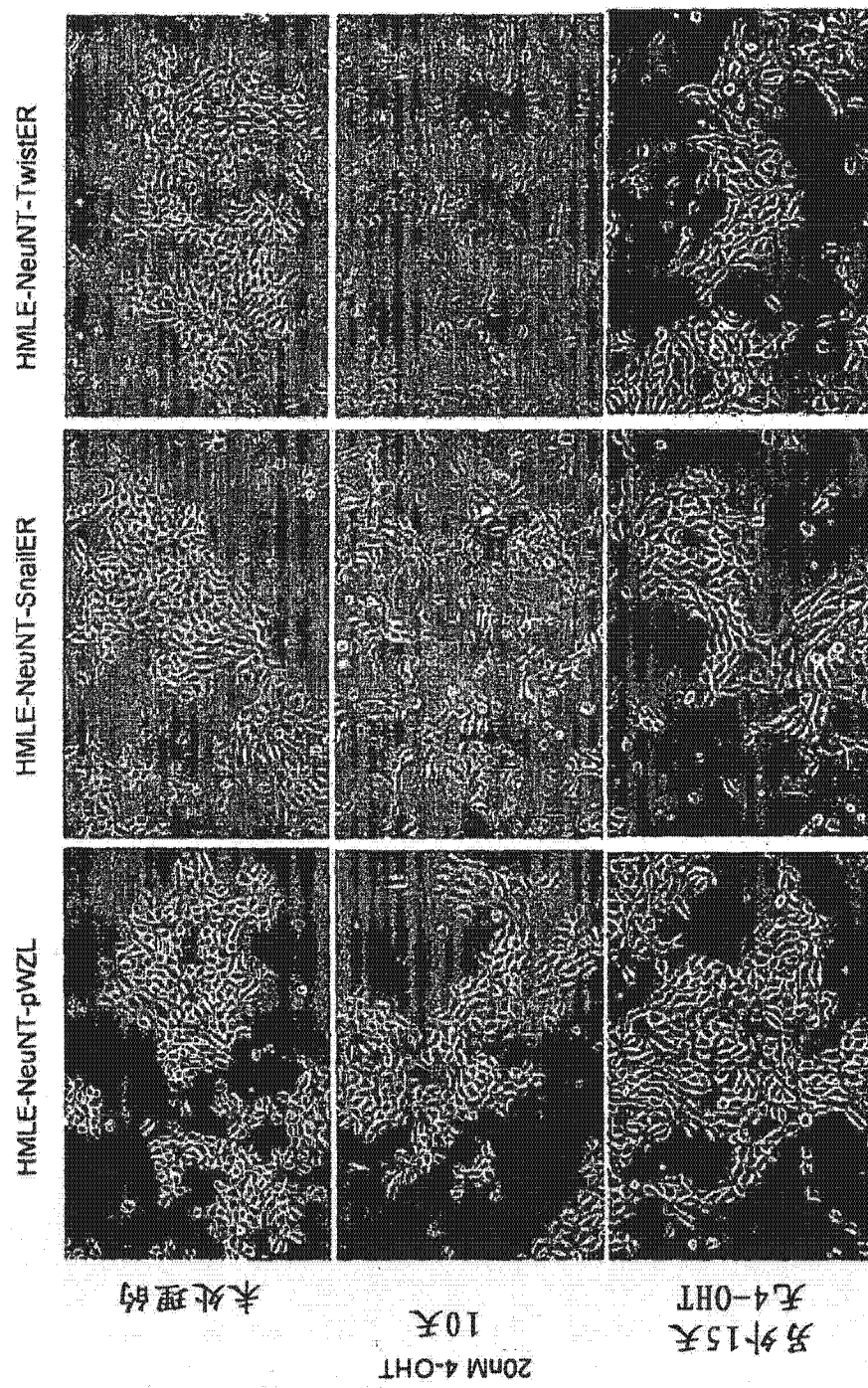


图 10

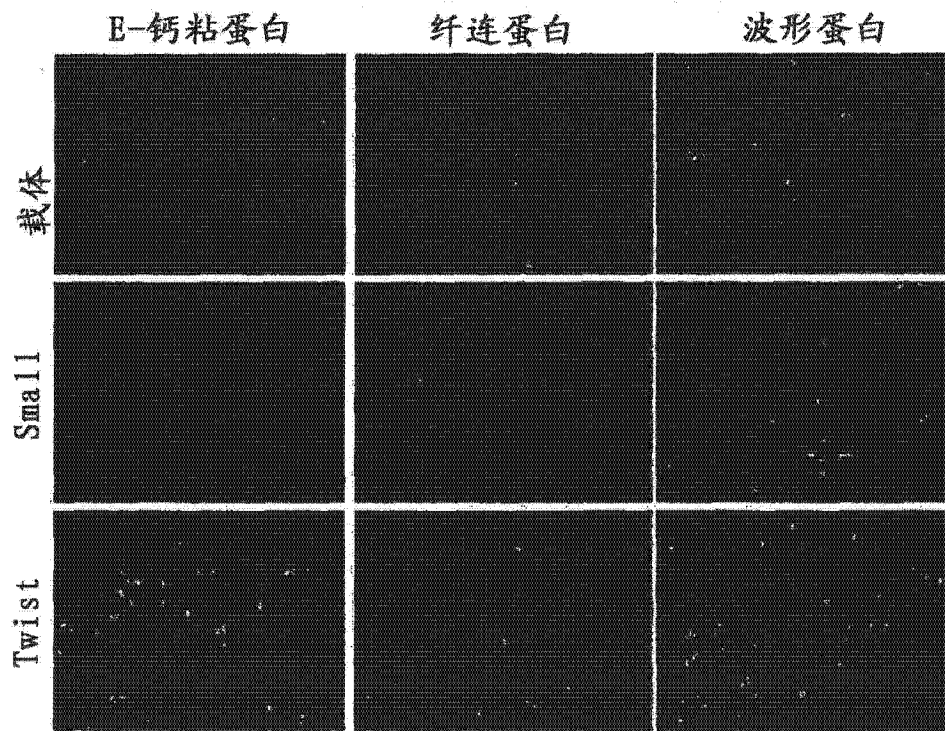


图 11A

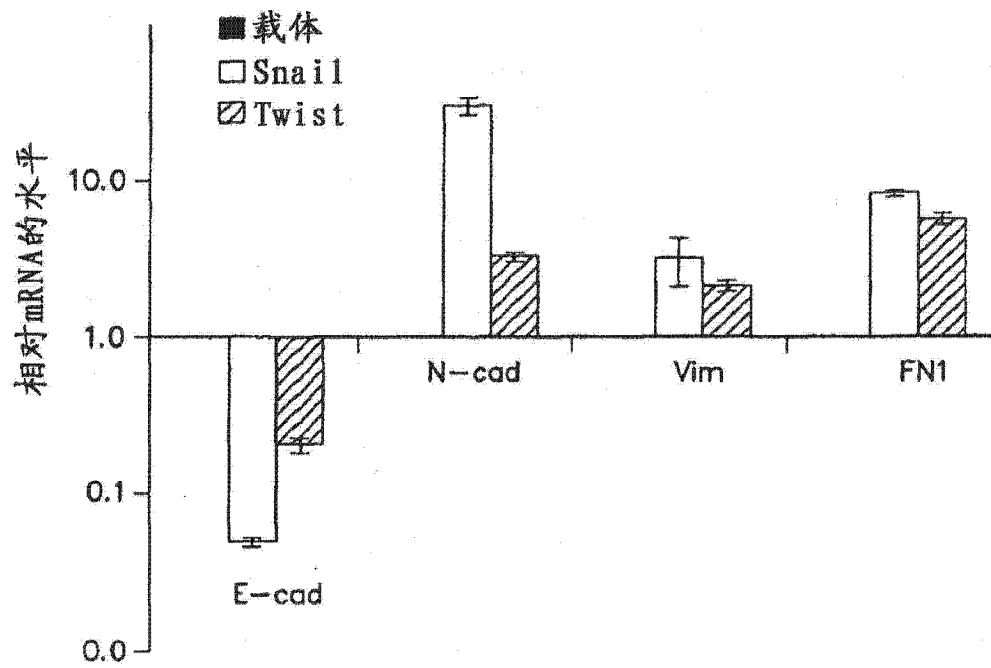


图 11B

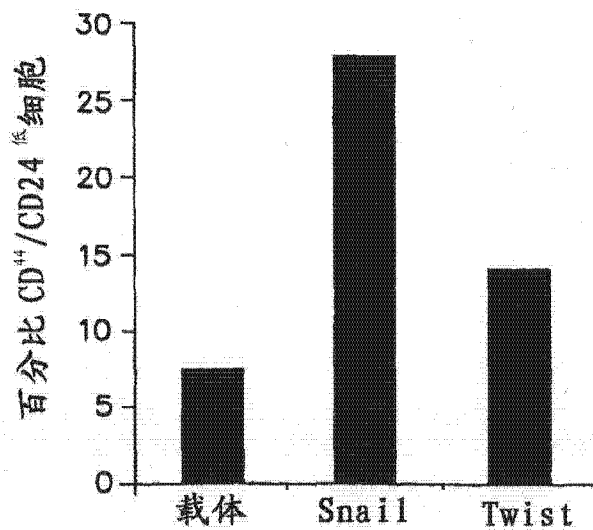


图 11C

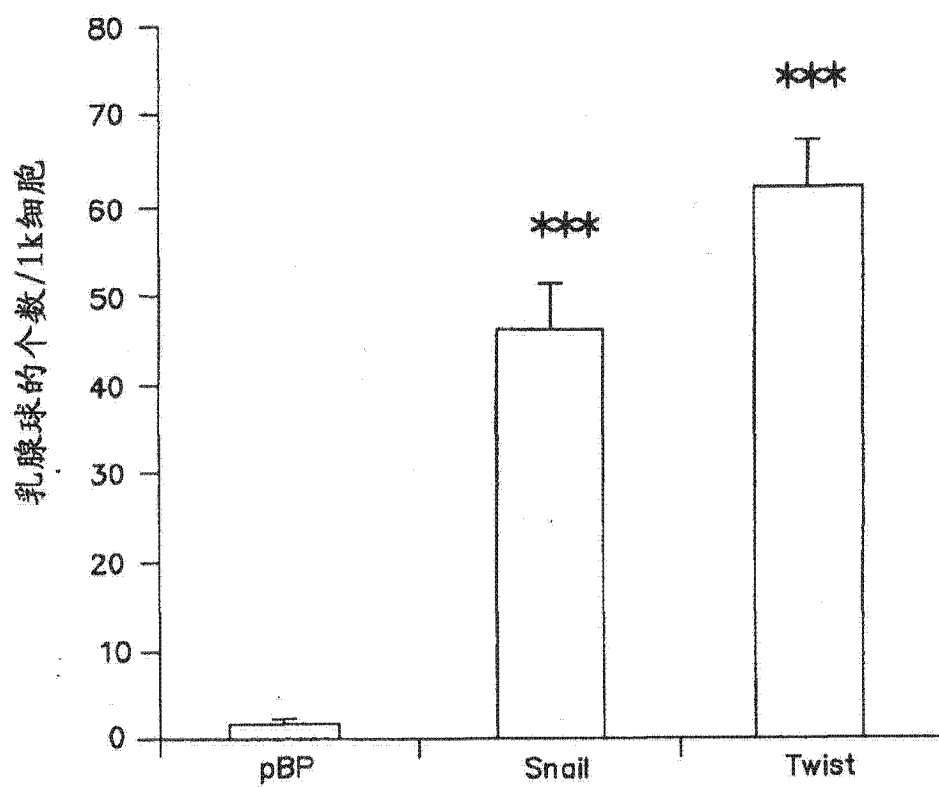


图 11D

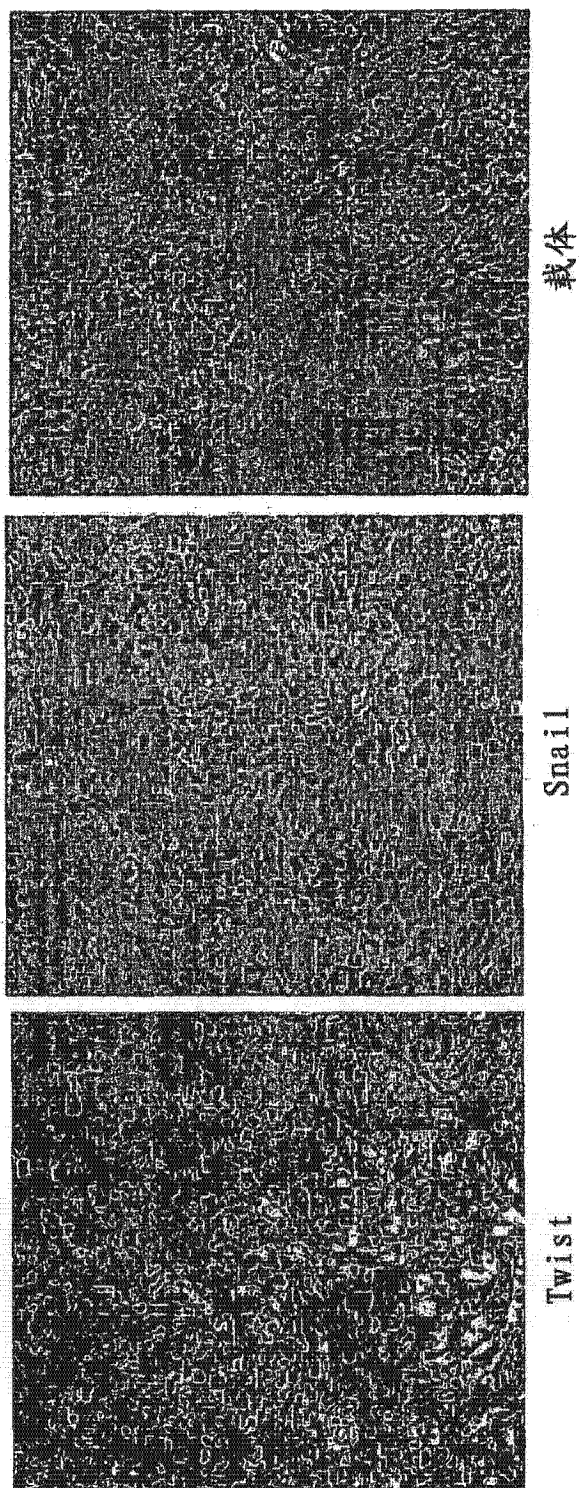


图 12

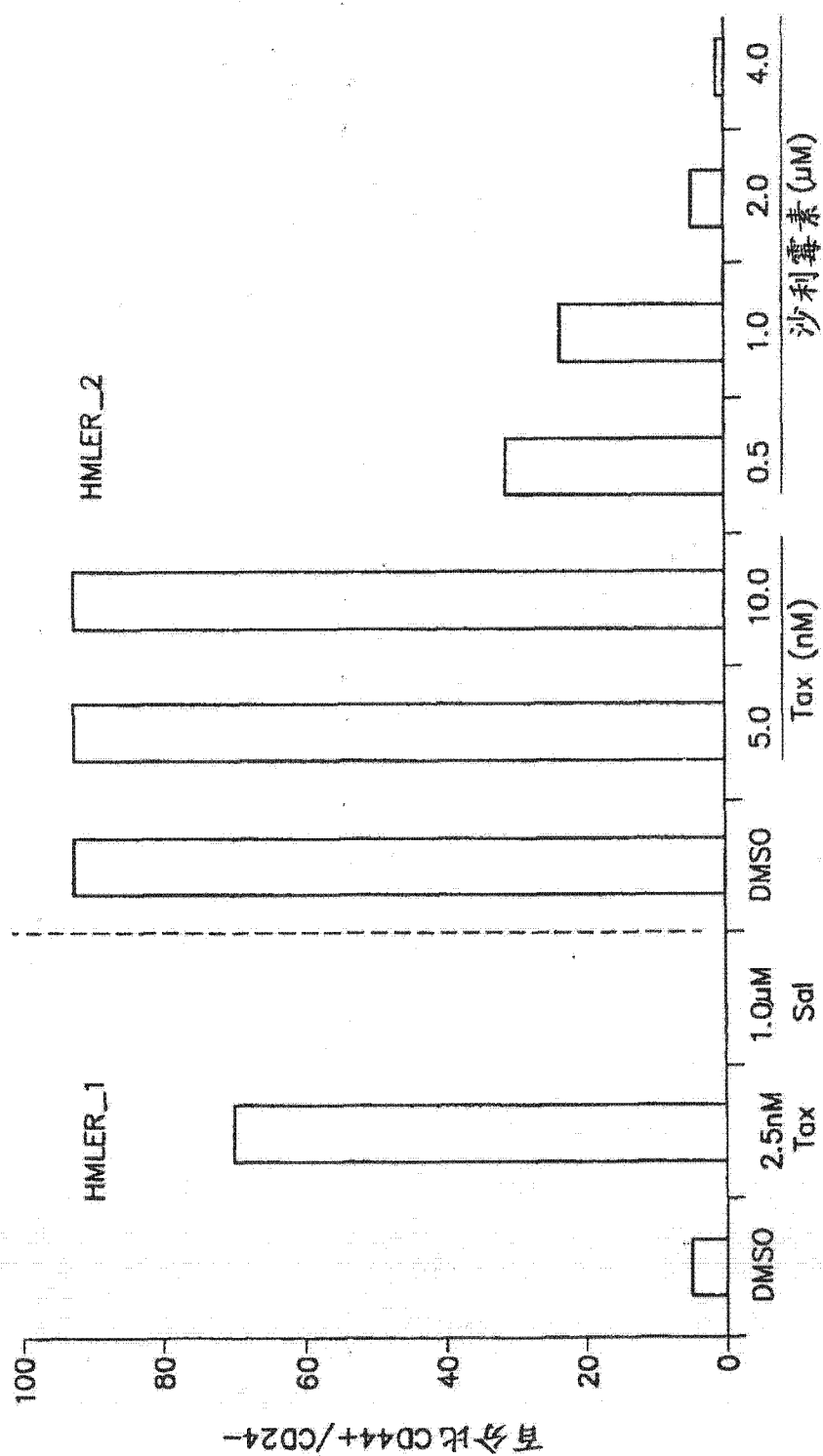


图 13A

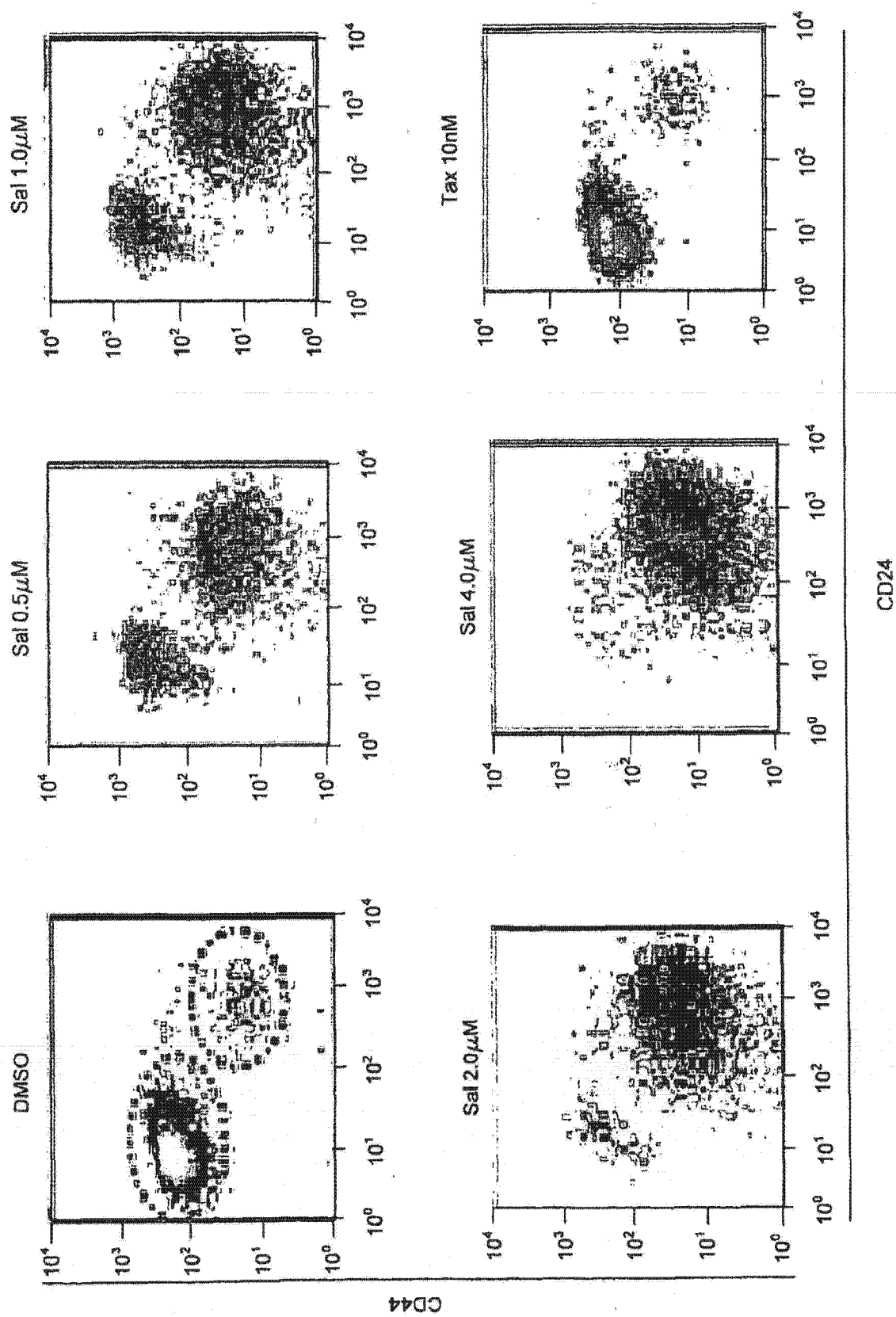


图 13B

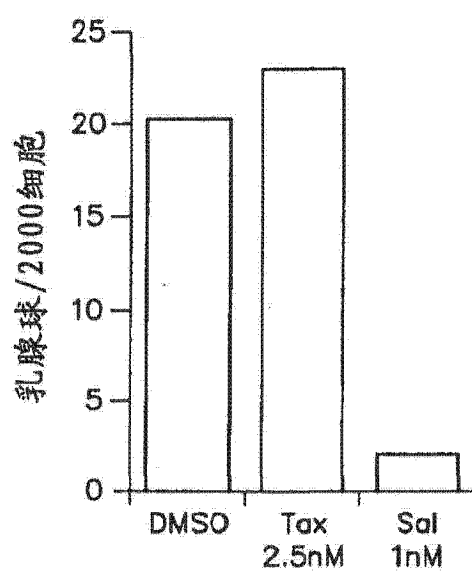


图 14A

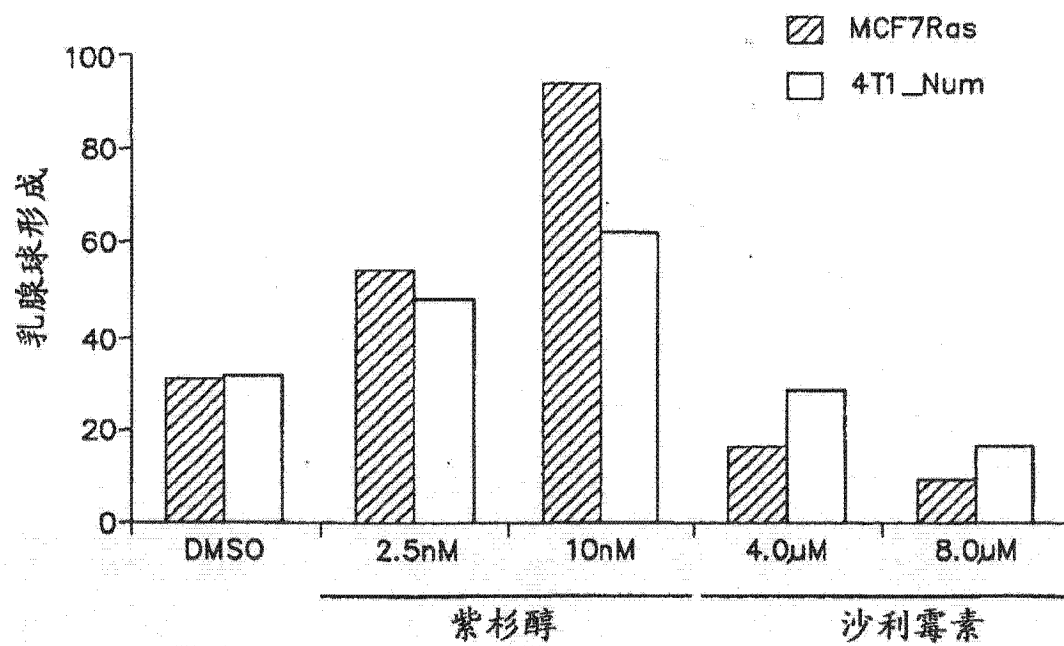


图 14B

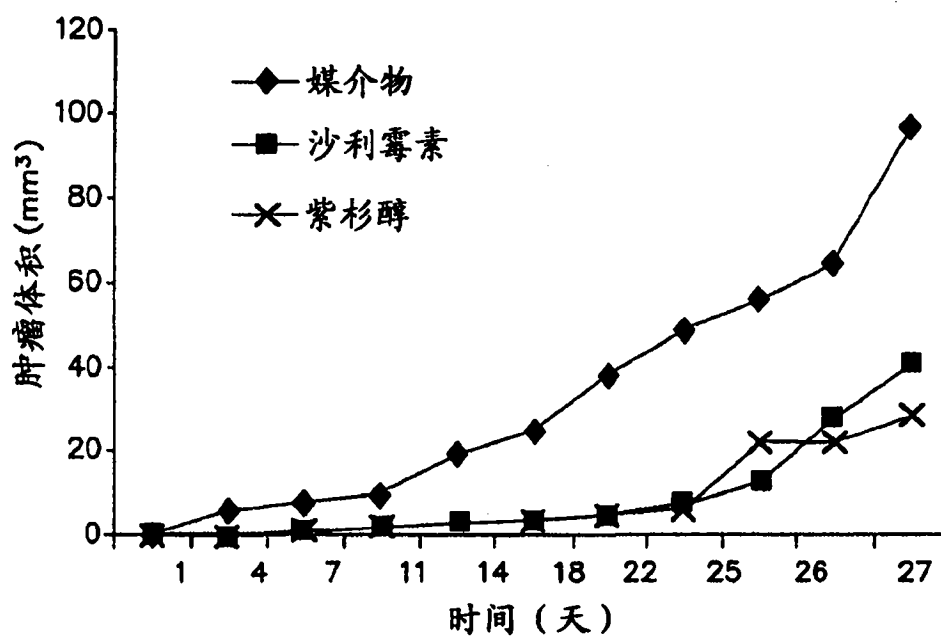


图 15A

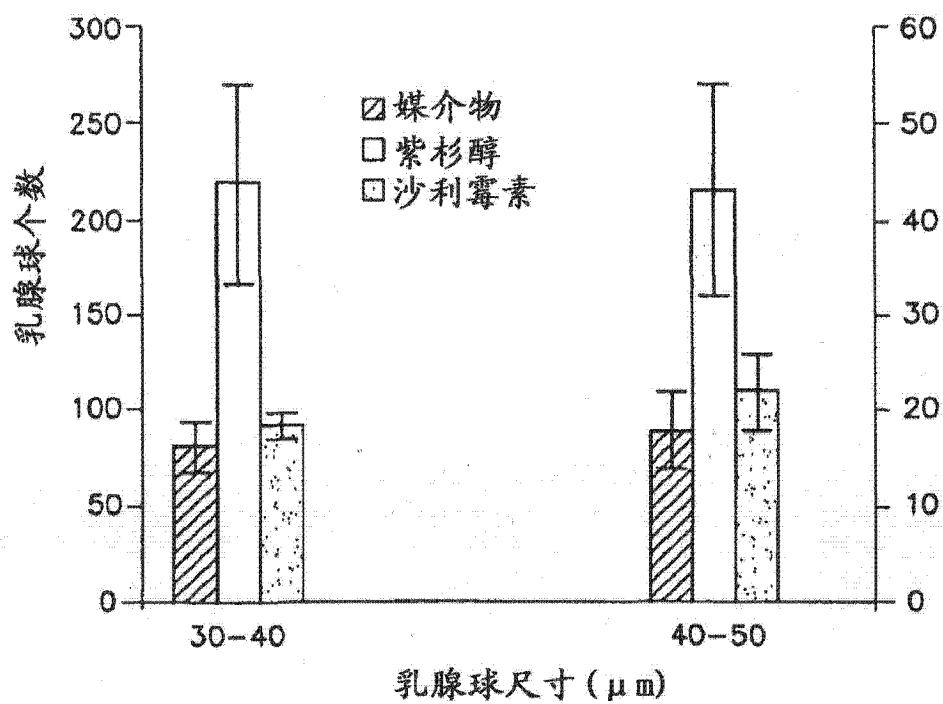


图 15B

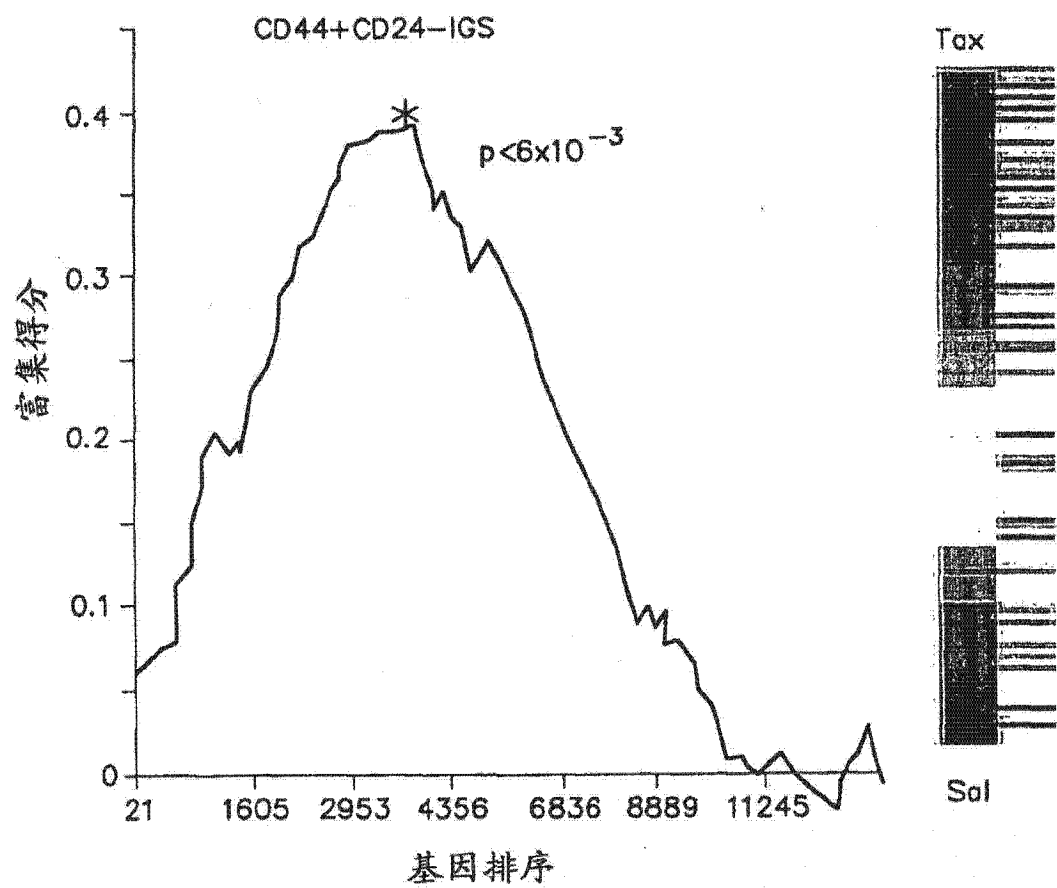


图 16-1

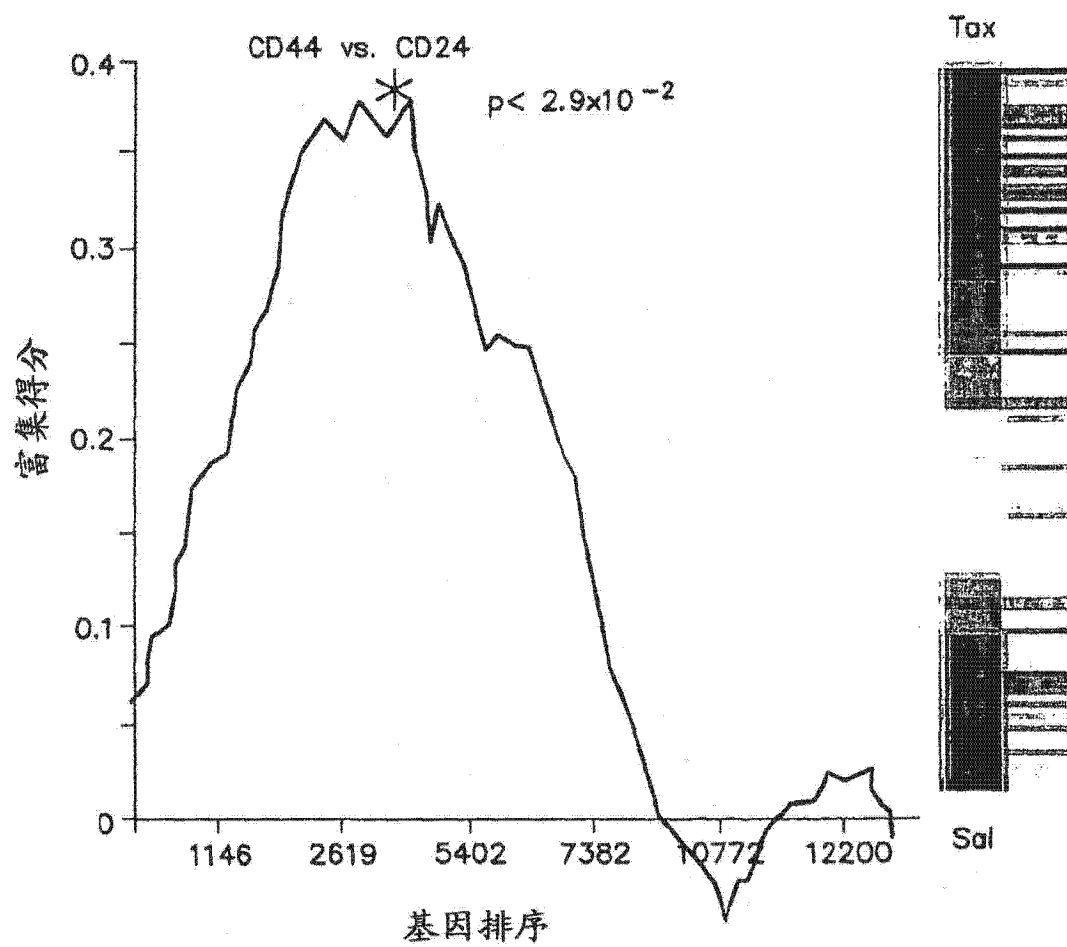


图 16-2

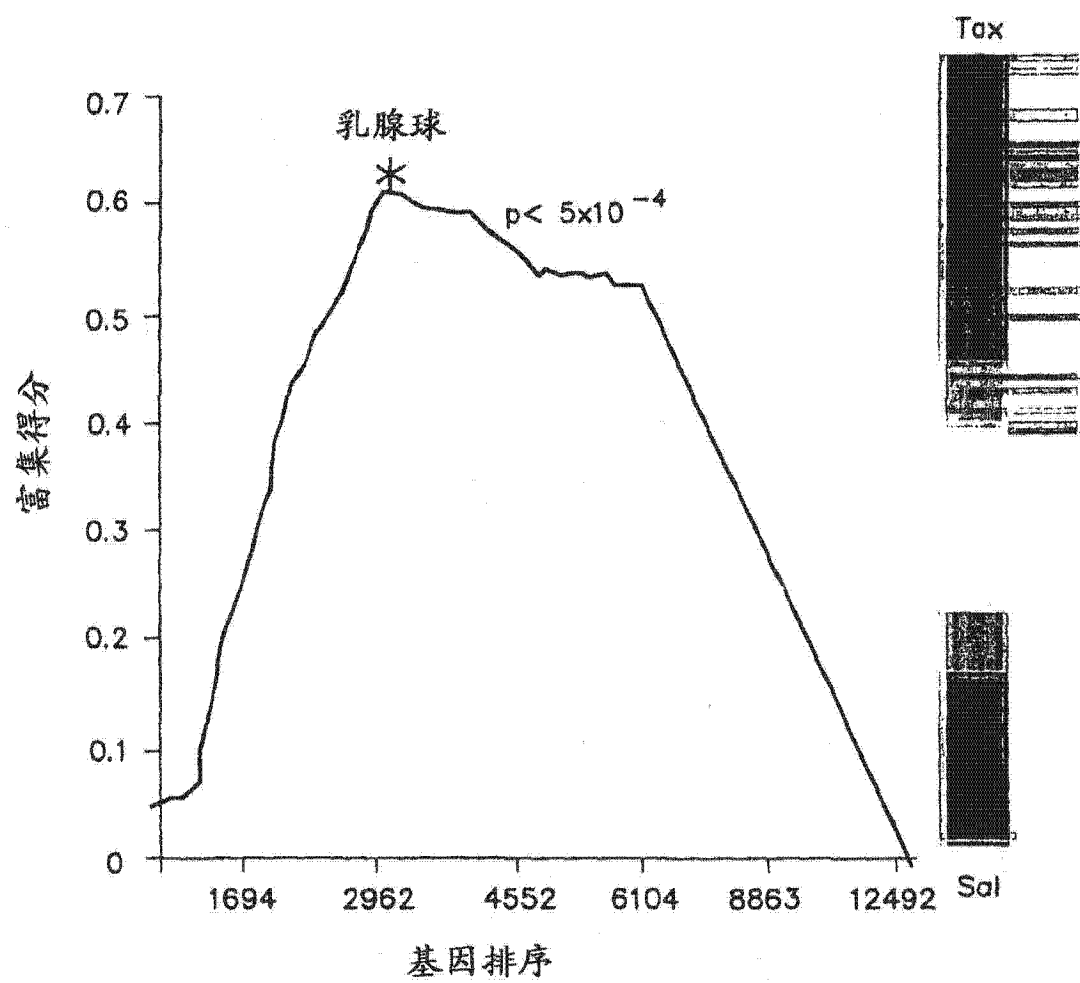


图 16-3