



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108289889 A

(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680063918.8

(22)申请日 2016.11.02

(30)优先权数据

62/250,406 2015.11.03 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/060088 2016.11.02

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2017/079273 EN 2017.05.11

(71)申请人 糖模拟物有限公司

地址 美国马里兰州

(72)发明人 约翰·L·麦格纳尼

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理  
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 31/4965(2006.01)

A61K 31/7034(2006.01)

A61K 45/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

权利要求书3页 说明书13页 附图14页

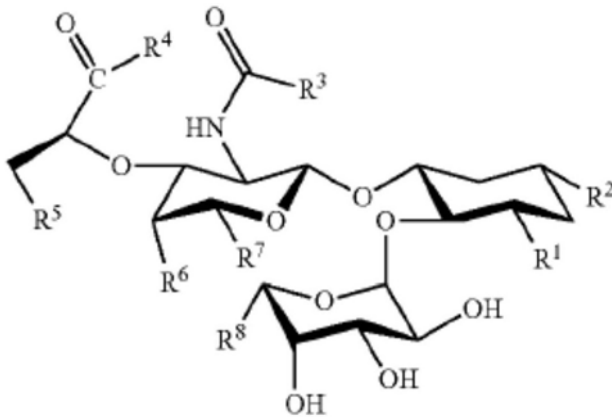
(54)发明名称

靶向癌症干细胞和治疗侵袭性癌症的抗体

(57)摘要

公开了鉴定和治疗患有可以结合E-选择素的癌症的患者的方法和系统。通过癌症细胞表面表达sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>碳水化合物表位来鉴定结合E-选择素的癌症,以及可以通过能结合sialyl Le<sup>a/x</sup>的抗体,如HECA-452来鉴定此类癌症。可用E-选择素的拮抗剂如拟糖化合物以及用靶向包含sialyl Le<sup>a/x</sup>结构域的细胞表面碳水化合物的免疫疗法来治疗此类癌症,以阻断和/或破坏E-选择素的结合。

1. 治疗患有癌症的患者的方法,其包括:  
从所述患者获得癌细胞、血液或血液级分样品;  
确定含有sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>结合结构域的抗体是否结合所述癌细胞;以及  
如果所述抗体结合所述癌细胞,则向有需要的所述患者施用有效量的至少一种拟糖化合物。
2. 如权利要求1所述的方法,其还包括向所述患者施用化疗和/或放疗。
3. 如权利要求1所述的方法,其还包括向所述患者施用硼替佐米。
4. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种拟糖化合物选自通式(I)的拟糖,通式(I)的前药以及前述任何一种的药学可接受的盐:



(I)

其中

R<sup>1</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基;

R<sup>2</sup>选自H、非拟糖部分和接头-非拟糖部分,其中所述非拟糖部分选自聚乙二醇、N-连接的环拉胺、噻唑基、苯并吡喃基、-C(=O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>NH<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基和-C(=O)OY基团,其中Y选自C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>炔基;

R<sup>3</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基;

R<sup>4</sup>选自-OH和-NZ<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>基团,其中Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>可以相同或者可以不同,其各自独立地选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基,其中Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>可以连接在一起而形成环;

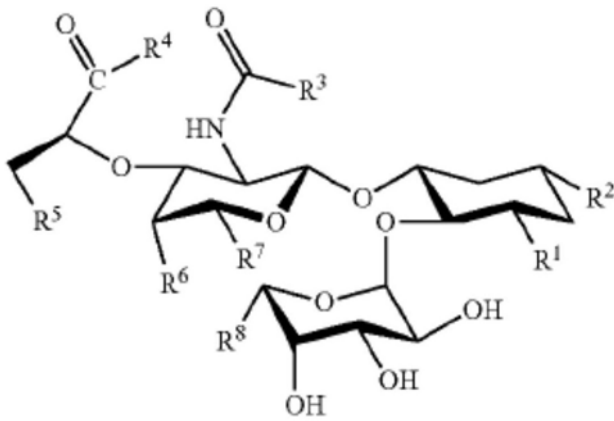
R<sup>5</sup>选自C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基;

R<sup>6</sup>选自-OH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基;

R<sup>7</sup>选自-CH<sub>2</sub>OH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基;以及

R<sup>8</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。
6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述癌症的特征是实体瘤。
7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体是HECA-452抗体。
8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种拟糖化合物选自异双功能化合物,其是E-选择素和CXCR4的拮抗剂。
9. 如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述至少一种拟糖化合物是GMI-1271或GMI-1359。
10. 产生用于鉴定癌症干细胞的抗体的方法,其包括向宿主施用癌细胞,并筛选得到的抗体群中能结合sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的抗体。
11. 检测表达sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的癌细胞的方法,其包括:  
从患者获得癌细胞样品;和  
通过使所述样品与能结合sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的抗体接触,并检测sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>与所述抗体之间的结合来检测所述样品中是否存在sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>。
12. 诊断患有癌症的患者的方法,其包括:  
从所述患者获得癌细胞、血液或血液级分样品;  
通过使所述样品与HECA-452抗体和CD62L抗体接触,并检测CD62L的HECA-452糖型与所述HECA-452抗体和所述CD62L抗体之间的结合来检测所述样品中是否存在CD62L的HECA-452糖型;以及  
当在所述样品中检测到CD62L的HECA-452糖型的存在时,则诊断所述患者患有侵袭性癌症。
13. 诊断患有癌症的患者的方法,其包括:  
从所述患者获得癌细胞、血液或血液级分样品;  
通过使所述样品与能结合sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的抗体接触,并检测sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>与所述抗体之间的结合来检测所述样品中是否存在sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>;以及  
当在所述样品中检测到sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的存在时,则诊断所述患者患有侵袭性癌症。
14. 诊断和治疗患有癌症的患者的方法,其包括根据权利要求12或13所述的方法对所述患者进行诊断,以及向有需要的所述患者施用有效量的至少一种拟糖化合物。
15. 如权利要求14所述的方法,其还包括向所述患者施用化疗和/或放疗。
16. 如权利要求14所述的方法,其还包括向所述患者施用硼替佐米。
17. 如权利要求16所述的方法,其中所述至少一种拟糖化合物选自通式(I)的拟糖,通式(I)的前药以及前述任何一种的药学可接受的盐:



(I)

其中

R<sup>1</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基；

R<sup>2</sup>选自H、非拟糖部分和接头-非拟糖部分，其中所述非拟糖部分选自聚乙二醇、N-连接的环拉胺、噻唑基、苯并吡喃基、-C(=O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>NH<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基和-C(=O)OY基团，其中Y选自C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>炔基；

R<sup>3</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基；

R<sup>4</sup>选自-OH和-NZ<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>基团，其中Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>可以相同或者可以不同，其各自独立地选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基，其中Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>可以连接在一起而形成环；

R<sup>5</sup>选自C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基；

R<sup>6</sup>选自-OH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基；

R<sup>7</sup>选自-CH<sub>2</sub>OH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基；以及

R<sup>8</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基。

18. 如权利要求14-17中任一项所述的方法，其中所述至少一种拟糖化合物选自异双功能化合物，其是E-选择素和CXCR4的拮抗剂。

19. 如权利要求14-17中任一项所述的方法，其中所述至少一种拟糖化合物是GMI-1271或GMI-1359。

20. 如权利要求10-19中任一项所述的方法，其中所述癌症是白血病、淋巴瘤或骨髓瘤。

21. 如权利要求10-20中任一项所述的方法，其中所述癌症的特征是实体瘤。

22. 如权利要求11和13-21中任一项所述的方法，其中所述抗体是HECA-452抗体。

## 靶向癌症干细胞和治疗侵袭性癌症的抗体

[0001] 根据35U.S.C. §119(e), 本申请要求于2015年11月3日提交的美国临时申请第62/250,406号的权益, 将该申请通过引用整体并入本文。

[0002] 本公开提供治疗患有侵袭性癌症的患者的方法和系统, 所述侵袭性癌症包括耐药癌症、具有高复发可能性的癌症、具有加速的疾病进展的癌症和/或具有降低的存活的癌症。本公开还提供鉴定癌症干细胞和/或侵袭性癌细胞(例如, 可能具有耐药性的癌细胞、具有高的引起患者复发的可能性的癌症、可能导致加速的疾病进展的癌症和/或与降低的存活相关的癌症), 以及通过阻断和/或破坏某些细胞表面碳水化合物(细胞表面结合位点)来治疗此类癌症的方法和组合物。还公开了利用血液样品, 包括血液级分样品(例如血浆或血清样品)来鉴定此类癌症的方法和组合物。

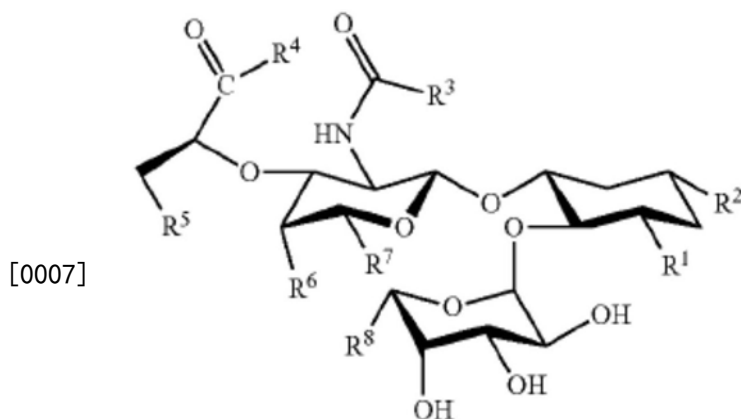
[0003] 并非所有的癌细胞都是相似的。即使在一组相关的癌细胞(例如多发性骨髓瘤细胞系或前列腺癌肿瘤)中, 基因表达和细胞表面表位也不同。被称为癌症干细胞的某些癌细胞可以建立新的肿瘤, 并且患者中较高数目的这些干细胞的存在与较差的预后相关。这些癌症干细胞也可能表现出更具侵袭性的癌症特性, 例如耐药性、加速的疾病进展, 更短的存活以及更高的复发率。鉴定癌症干细胞并从患者中清除这些细胞一直是一项挑战。以下可以提供克服这一挑战的方式。

[0004] 已发现癌症干细胞表达可结合E-选择素的细胞表面碳水化合物。可结合E-选择素的细胞表面碳水化合物包含被称为sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>碳水化合物的碳水化合物表位。这些sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>碳水化合物也被发现能与单克隆抗体HECA-452结合。换言之, 结合E-选择素和HECA-452抗体的sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>(sialyl Le<sup>a/x</sup>)存在共同的三糖结构域。参见Berg等人, “A Carbohydrate Domain Common to both Sialyl Lea and Sialyl Lex is Recognized by the Endothelial Cell Leukocyte Adhesion Molecule ELAM1”, J. Biol. Chem. (1991) 266:14869-72, 在此将其通过引用并入。能够结合E-选择素的癌细胞能够抵抗癌症的某些标准治疗, 如化疗。换言之, 可以结合sialyl Le<sup>a/x</sup>结构域(因此也可以结合E-选择素)的癌细胞群与耐药性、加速的疾病进展、更短的存活和更高的复发率相关。认为, 表达能结合含有sialyl Le<sup>a/x</sup>结合结构域的抗体的碳水化合物表位的癌细胞(例如, 可结合HECA-452抗体的癌细胞)能够在化疗治疗中存活, 因为它们也能够结合血管内皮表达的E-选择素。因此, 例如, 当与骨髓的保护龛(niche)中的E-选择素结合时, 这些癌细胞能够在诸如化疗的癌症治疗中存活。可以直接检测(例如与癌细胞本身结合)或间接检测(例如检测血液中与这些癌症相关的分子)这些癌细胞。

[0005] 根据本公开, 提供发现和产生能结合sialyl Le<sup>a/x</sup>的抗体的方法和组合物, 所述抗体可用于鉴定癌症干细胞。本文还提供利用这些方法和组合物的多种癌症治疗。具体地, 本公开中提供的抗体能够鉴定表达细胞表面碳水化合物的癌细胞群, 所述细胞表面碳水化合物也结合E-选择素。该鉴定可以是直接的(例如检测表达细胞表面碳水化合物的细胞)或间接的(例如检测分泌到血液中以其它方式存在于血液中的分子上的碳水化合物表位)。可将能结合sialyl Le<sup>a/x</sup>的任何抗体、寡核苷酸或肽分子(例如适配体或affimer)用于鉴定表达细胞表面碳水化合物的癌细胞群(或者用于鉴定存在于血液中的碳水化合物表位), 所述

表面碳水化合物也结合E-选择素。

[0006] 基于公开的sialyl Le<sup>a/x</sup>结合抗体与癌细胞或血液中存在的分子上的碳水化合物表位的结合,可以鉴定患有侵袭性癌症的癌症患者。本公开考虑用干扰细胞表面碳水化合物功能的疗法来治疗患有癌症的患者,所述癌症表达所述细胞表面碳水化合物或产生血液中的分子上的碳水化合物表位(其中所述表位是sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>共有的)。具体地,认为通过阻断或以其他方式抑制E-选择素,E-选择素不能与肿瘤细胞表面碳水化合物结合。在不能与E-选择素结合的情况下,癌症干细胞不能成为具有化学抗性的或者不能隐藏在骨髓的保护龕中,并且不能逃避化疗治疗。实例包括用诸如拟糖化合物的化合物或者用靶向细胞表面碳水化合物的免疫疗法进行治疗,所述细胞表面碳水化合物能用sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>共同的并干扰该细胞表面碳水化合物的功能的表位结合抗体。适合于此类治疗的拟糖化合物可以包含以下通式(I):



式(I)

[0008] 其中R<sup>1</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基;R<sup>2</sup>选自H、非拟糖部分和接头-非拟糖部分,其中所述非拟糖部分选自聚乙二醇、N-连接的环拉胺(cyclam)、噻唑基、苯并吡喃基、-C(=O)NH(CH<sub>2</sub>)<sub>1-4</sub>NH<sub>2</sub>、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基和-C(=O)OY基团,其中Y选自C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>4</sub>炔基;R<sup>3</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基;R<sup>4</sup>选自-OH和-NZ<sup>1</sup>Z<sup>2</sup>基团,其中Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>可以相同或者不同,其各自独立地选自H、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基,其中Z<sup>1</sup>和Z<sup>2</sup>可以连接在一起而形成环;R<sup>5</sup>选自C<sub>3</sub>-C<sub>8</sub>环烷基;R<sup>6</sup>选自-OH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基;R<sup>7</sup>选自-CH<sub>2</sub>OH、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基;以及R<sup>8</sup>选自C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>烯基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>炔基、C<sub>1</sub>-C<sub>8</sub>卤代烷基、C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代烯基和C<sub>2</sub>-C<sub>8</sub>卤代炔基。

[0009] 用于此类治疗的合适的化合物还可以包括通式(I)的前药和前述任何一种的药学可接受的盐。本公开在其范围内包括所有可能的互变异构体。此外,本公开在其范围内包括单独的互变异构体及其任何混合物。

[0010] 在一些实施方案中,R<sup>1</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>和R<sup>8</sup>如以上所限定,并且R<sup>2</sup>是接头-非拟糖部分,其中非拟糖部分包含聚乙二醇。拟糖E-选择素拮抗剂,如例如美国专利第9,109,002号(在此将其通过引用并入)中公开的拟糖E-选择素拮抗剂可以适用于此类治疗。一种此类拟

糖化合物是GMI-1271。

[0011] 在一些实施方案中, $R^1$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 和 $R^8$ 如以上所限定,并且 $R^2$ 是接头-非拟糖部分,其中非拟糖部分包含N-连接的环拉胺。作为E-选择素和CXCR4的拮抗剂的拟糖异双功能化合物,如例如在美国专利第8,410,066号(在此将其通过引用并入)中公开的那些可以适用于此类治疗。一种此类拟糖化合物是GMI-1359。参见例如Steele, Maria M.等人,“A small molecule glycomimetic antagonist of E-selectin and CXCR4 (GMI-1359) prevents pancreatic tumor metastasis and improves chemotherapy[摘要],”美国癌症研究协会第106次年会的会议记录,2015年4月18-22日,Philadelphia,PA;Philadelphia (PA):AACR, Cancer Res 2015,75 (15增刊):Abstract nr 425.doi:10.1158/1538-7445.AM2015-425;Gravina, Giovanni L.等人,“Dual E-selectin and CXCR4 inhibition reduces tumor growth and increases the sensitivity to docetaxel in experimental bone metastases of prostate cancer[摘要],”美国癌症研究协会第106次年会的会议记录,2015年4月18-22日,Philadelphia,PA;Philadelphia (PA):AACR, Cancer Res 2015,75 (15增刊):Abstract nr 428.doi:10.1158/1538-7445.AM2015-428,通过引用将其全部并入。

[0012] 附图简要描述

[0013] 图1A是MM1S<sup>亲本</sup>细胞群的图,其中Y轴表示MM1S<sup>亲本</sup>细胞的骨髓瘤细胞的CD138标志物,并且X轴表示HECA-452阳性的MM1S<sup>亲本</sup>细胞。

[0014] 图1B是MM1S<sup>HECA452</sup>细胞群的图,其中Y轴表示MM1S<sup>HECA452</sup>细胞的骨髓瘤细胞的CD138标志物,并且X-轴表示HECA-452阳性的MM1S<sup>HECA452</sup>细胞。

[0015] 图2是注射MM1S<sup>亲本</sup>细胞的雌性SCID小鼠和注射MM1S<sup>HECA452</sup>细胞的雌性SCID小鼠的存活率的图。

[0016] 图3是注射MM1S<sup>亲本</sup>细胞并用GMI-1271、硼替佐米(BTZ)以及GMI-1271和硼替佐米处理的小鼠的存活比例的图,使用盐水作为对照。

[0017] 图4是注射MM1S<sup>HECA452</sup>细胞并用GMI-1271、硼替佐米以及GMI-1271和硼替佐米处理的小鼠的存活比例的图,使用盐水作为对照。

[0018] 图5是1次剂量GMI-1271之后,植入MM1S<sup>HECA452</sup>的小鼠中动员进血流中的人CD138+MM细胞的数目随时间的图。

[0019] 图6是与复发患者的AML原始细胞相比,获自新确诊的患者的AML原始细胞通过mAb HECA-452检测的E-选择素配体的表达的图。

[0020] 图7提供了用于检测血清中的癌症标志物(包括癌症干细胞和/或侵袭性癌细胞的标志物)的HECA-452捕获/CD-B分析的概念图。

[0021] 图8提供了用于检测血清中癌症标志物(包括癌症干细胞和/或侵袭性癌细胞的标志物)的CD-B捕获/HECA-452分析的概念图。

[0022] 图9显示了通过流式细胞术检测的表达HECA-452的KG1和KG1a细胞(即HECA-452阳性)的百分比。

[0023] 图10A显示了利用HECA-452/CD62L夹心ELISA分析,KG1条件培养基中结合HECA-452抗体和CD62L抗体的配体的量。

[0024] 图10B显示了利用HECA-452/HECA-452夹心ELISA分析,KG1条件培养基中结合

HECA-452抗体的配体的量。

[0025] 图11显示了利用HECA-452/检测抗体夹心ELISA分析,KG1a条件培养基中结合HECA-452抗体和各种检测抗体((CD33、CD62L、CD123、CD43、CD44和CD147检测抗体)的各种配体的量。

[0026] 图12A利用CDL62L捕获/HECA-452检测ELISA分析,KG1条件培养基中结合CD62L抗体和HECA-452抗体的配体的量以及KG1a条件培养基中结合CD62L抗体和HECA-452抗体的配体的量。

[0027] 图12B显示了这样的结果(450nm处的吸光度),其指示利用HECA-452捕获/CD62L检测ELISA分析,KG1条件培养基中结合HECA-452抗体和CD62L抗体的配体的量以及KG1a条件培养基中结合HECA-452抗体和CD62L抗体的配体的量。

[0028] 现在将详细参考本公开的当前实施方案(示例性实施方案),其示例在附图中示出。在可能的情况下,在整个附图中将使用相同的参考编号来表示相同或相似的部分。

[0029] 本文使用的缩写通常具有其在化学和生物学领域的常规含义。

[0030] 术语“抗体(antibody)”、“抗体(anibodies)”、“ab”或“免疫球蛋白”以最广泛的含义可互换使用,并且包括单克隆抗体,其包括分离的抗体、工程化的抗体、化学合成的抗体或重组抗体(例如全长或完整的单克隆抗体)以及抗体片段、寡核苷酸或肽分子(例如适配体或affimer),只要它们表现出期望的生物学活性。在一个实施方案中,本公开涉及单克隆抗体。

[0031] 抗体分子由包含通过二硫键相互连接的至少两条重链(H)和两条轻链(L)的糖蛋白组成。每条重链包含重链可变区(或结构域)(本文缩写为HCVR或VH)和重链恒定区。重链恒定区包含三个或四个结构域,CH1、CH2、CH3和CH4。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为LCVR或VL)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域CL。VH和VL区可以进一步细分为称为互补决定区(CDR)的高变区,其中散布着称为框架区(FR)的更加保守的区域。每个VH和VL由三个CDR和四个FR组成,其从氨基末端到羧基末端按照以下顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述宿主组织或因子包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。

[0032] 根据本公开,抗体的“抗原结合片段”意指保留结合抗体的靶标的能力的任何肽、多肽或蛋白质。在一个实施方案中,所述靶标选自sialyl Le<sup>a</sup>、sialyl Le<sup>x</sup>、sialyl Le<sup>a/x</sup>和/或E-选择素配体。在某些实施方案中,通过重组DNA技术产生抗原结合片段。在其它实施方案中,通过酶切或化学切割完整抗体产生结合片段。结合片段包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv和单链抗体。

[0033] 本文所用的术语“单克隆抗体”或“Mab”指获自基本同质的抗体群(即群体的各个抗体除了可能少量存在的天然存在的突变之外是相同的)的抗体。通常,单克隆抗体是高度特异性的,其针对单一表位。此类单克隆抗体可以通过B细胞或杂交瘤的单个克隆产生。单克隆抗体也可以是重组的,即通过蛋白质工程产生。单克隆抗体也可以从噬菌体抗体文库中分离。此外,与通常包含针对多种决定簇或表位的多种抗体的多克隆抗体的制备物相反,每种单克隆抗体针对单一抗原表位。本公开涉及通过从细胞纯化分离或获得的抗体或者通过基因重组或化学合成获得的抗体。

[0034] 术语“抗原”是指能够与选择性结合剂例如抗体结合,并且还能够用于动物以产生能够结合该抗原的表位的抗体的分子或分子的一部分。抗原可含有一个或多个表位。术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合的任何决定簇,如例如多肽决定簇或碳水化合物决定簇。在某些实施方案中,表位决定簇包含分子的化学活性表面基团,如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基,并且在某些实施方案中,其可以具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。表位是抗原的被抗体结合的区域。在某些实施方案中,当抗体优先识别其蛋白质和/或大分子复杂混合物中的靶抗原时,认为抗体特异性结合抗原。在一个实施方案中,当解离常数小于或等于约1 $\mu$ M时,例如当解离常数小于或等于约100nM时,如例如当解离常数小于或等于约1nM时,以及如进一步示例当解离常数小于或等于约100pM时,认为抗体特异性结合抗原。本文使用的术语“对...具有特异性的”和“特异性结合”是可互换的,并且指抗体与预定的抗原结合,所述抗原例如sialyl Le<sup>a</sup>、sialyl Le<sup>x</sup>和sialyl Le<sup>a/x</sup>的共同表位。通常,抗体以10<sup>-6</sup>M或更低的解离常数(K<sub>D</sub>)结合预定抗原,并且以比其与预定抗原之外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白或任何其他指定的多肽)结合的K<sub>D</sub>低至少两倍的K<sub>D</sub>与预定抗原结合。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中术语“特异性结合抗原的抗体”可互换使用。

[0035] 如本文所使用的,“扩增”包括细胞数目的任何增加。扩增包括,例如造血干细胞的数目相对于用于起始培养的细胞群中存在的HSC的数目的增加。

[0036] 用干扰E-选择素与sialyl Le<sup>a</sup>或sialyl Le<sup>x</sup>表位结合的药物进行的治疗可用于改善其他癌症治疗(如化疗)的效力。具体地,液体癌症(如多发性骨髓瘤)和实体癌症(如前列腺癌)是用于sialyl Le<sup>a</sup>-和sialyl Le<sup>x</sup>-结合癌细胞的侵袭性亚群的此类鉴定的候选者,以及用于干扰含有sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>表位的细胞表面碳水化合物的药物进行治疗从而干扰细胞与E-选择素的结合的候选者。

[0037] 多发性骨髓瘤由浆细胞的转化引起,浆细胞是完全分化的B细胞谱系的细胞类型。其他血液癌症由正常B细胞的早期分化细胞引起,如早期B细胞和前B细胞。这些来自早期B细胞谱系的转化细胞被称为急性淋巴细胞白血病(ALL)。与浆细胞和多发性骨髓瘤相比,前B细胞和ALL细胞被HECA-452抗原(即sialyl Le<sup>a/x</sup>)重度糖基化,提示该抗原在该B细胞谱系中受发育调控。事实上,Sipkins等人,Nature 435:969-973(2005)(在此将其通过引用并入)证明ALL细胞系NALM-6被该碳水化合物表位糖基化,所述碳水化合物表位允许细胞结合骨髓脉管系统微结构域中表达的E-选择素。

[0038] Kikuchi等人,Glycobiology 15:271-280(2005)(在此将其通过引用并入)对B细胞谱系中发育调控的sialyl Le<sup>x</sup>糖基化及其转化的淋巴瘤进行了评估。Kikuchi等人显示sialyl Le<sup>x</sup>在B细胞谱系早期发育阶段的细胞中表达,并且在分化时丢失。该糖基化模式由这些发育阶段所引起的淋巴瘤反映。因此,如果克隆源性早期B细胞代表多发性骨髓瘤干细胞,则它们应表达sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的共同表位。然后这些MM干细胞也应该功能性结合E-选择素。

[0039] 如以下实施例1-4所示,本公开证实某些MM细胞亚群表达功能性E-选择素配体。换言之,约5%至约10%的MM细胞表达E-选择素配体sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>。在与骨髓中的低氧条件类似的低氧条件下,表达E-选择素配体的MM细胞的百分数可以增加。

[0040] 此外,如以下实施例5-8所示,本公开进一步证实这些E-选择素配体以可检测水平

的分泌。

### 实施例

[0041] 实施例1: E-选择素配体在MM细胞中的表达

[0042] 本公开提供关于多发性骨髓瘤细胞系MM1S上细胞表面碳水化合物的表达的信息。通过结合抗碳水化合物抗体,随后进行荧光激活细胞分选仪(FACS)分析来确定细胞表面碳水化合物的表达。如表1所示,如通过结合抗体HECA-452、E-选择素/hIg嵌合体和其他抗碳水化合物抗体所测定的,大部分MM1S细胞表达Le<sup>x</sup>碳水化合物表位(例如超过90%),而小得多的亚群(约5-10%)表达唾液酸化的Le<sup>a/x</sup>表位。以此种方式,通过表达E-选择素配体的MM1S细胞与HECA-452抗体的结合来鉴定此类细胞。

[0043] 表1:

| 标志物                            | MM1S 细胞 |     |
|--------------------------------|---------|-----|
|                                | %       | MFI |
| CD15 (Le <sup>x</sup> )        | 97      | 73  |
| CD15s (sLe <sup>x</sup> )      | 11      | 9.6 |
| CD18 (β2 整合素)                  | 2.1     | 4.1 |
| CD29 (β1 整合素)                  | 3.9     | 6.2 |
| CD34                           | 14      | 11  |
| [0044] CD44                    | 88      | 21  |
| CD65                           | 11      | 8.0 |
| HECA-452 (sLe <sup>a/x</sup> ) | 2.5     | 5.3 |
| GSLA2 (Le <sup>a</sup> )       | 13      | 11  |
| FH6 (延伸的 Le <sup>x</sup> )     | 5.7     | 5.0 |
| E-选择素-Fc 结合                    | 6.4     | 6.2 |
| P-选择素-Fc 结合                    | 60      | 32  |
| 抗 L-选择素                        | 2.7     | 4.5 |

[0045] 实施例2: 小鼠移植模型-多发性骨髓瘤

[0046] 先前已向来自能结合HECA-452的MM1S细胞系的MM细胞施用GMI-1271(一种E-选择素的小分子拟糖拮抗剂)。GMI-1271的应用阻断了MM1S细胞在E-选择素上的滚动。还发现GMI-1271的施用在体内小鼠移植模型中增强了硼替佐米(抗骨髓瘤药物)的活性(参见Natoni等人, Blood, 2014, 在此将其通过引用并入)。

[0047] 依次分选亲本异质MM细胞系MM1S和RPMI8226(分别为MM1S<sup>par</sup>、RPMI8226<sup>par</sup>)以获得高度富集(>85%)的表达能与HECA-452结合的细胞表面碳水化合物的细胞系(分别为MM1S<sup>HECA452</sup>、RPMI8226<sup>HECA452</sup>)。图1A和1B提供了支持分选MM1S细胞以获得用于扩增MM1S<sup>HECA452</sup>细胞系的HECA-452阳性细胞的数据。例如,图1A显示了亲本MM1S群,其大约5%的细胞是HECA-452阳性的。如图1B所示,MM1S<sup>HECA-452</sup>细胞中大约85%是HECA-452阳性。图1A和1B包含CD138作为活的骨髓瘤细胞的标志物。

[0048] 衍生的细胞系可以在体外传代并且对于由抗体HECA-452鉴定的富集的E-选择素配体的表达是稳定的。与显示最小粘附的亲本细胞相比,MM1S<sup>HECA452</sup>和RPMI8226<sup>HECA452</sup>在静态

粘附分析中显示与E-选择素的强结合。与保持非粘附、圆形且有折射力的亲本细胞相比，MM1S<sup>HECA452</sup>细胞在与E-选择素结合时显示出明显的形态学变化，其伸展并变得反射较少。MM1S<sup>HECA452</sup>和RPMI8226<sup>HECA452</sup>在剪切应力(模拟生理血流)下表现出在E-选择素上的强烈滚动。MM1S<sup>par</sup>或RPMI8226<sup>par</sup>在E-选择素上不能很好地滚动。在培养条件下，包含GMI-1271导致MM1S<sup>HECA452</sup>粘附的显著降低，并且极大地抑制了富含HECA-452的MM细胞系和亲本MM细胞系在E-选择素上的滚动。

[0049] 对这些体外结果的意义进行了体内研究。将雌性SCID米色小鼠静脉内注射MM1S<sup>par</sup>或MM1S<sup>HECA452</sup> ( $5 \times 10^5$ 个细胞,  $n=8$ /组), 随后存活(参见例如图2)。在各组中, 在移植MM1S<sup>par</sup>或MM1S<sup>HECA452</sup>细胞的小鼠中确定用盐水对照、GMI-1271、硼替佐米(BTZ)或两者的组合进行的处理的效果。如图2所示, 与移植了MM1S<sup>par</sup>的那些小鼠相比, 移植了MM1S<sup>HECA452</sup>的小鼠患有更具侵袭性的疾病, 存活显著更短。与亲本细胞系相比(参见图3), 植入MM1S<sup>HECA452</sup>的小鼠对BTZ处理表现出明显抗性(参见图4)。如图3所示, 单独的GMI-1271处理对存活没有影响, 但GMI-1271和BTZ的组合导致植入MM1S<sup>par</sup>的小鼠的存活显著提高( $P=0.0363$ )。重要的是, 如图4所示, 在植入MM1S<sup>HECA452</sup>的小鼠中, GMI-1271和BTZ的组合打破了抗性并恢复了BTZ的抗骨髓瘤活性( $P=0.0028$ )。

[0050] 在单次注射GMI-1271之后60分钟内, 一定数目的人CD138+MM细胞被动员进具有MM1S<sup>HECA452</sup>肿瘤的小鼠的血流中(参见例如图5), 并持续至少24小时( $2.37\% v. 0.03\%$ ,  $p < 0.001$ )。该效果与GMI-1271破坏肿瘤微环境并将MM1S<sup>HECA-452</sup>细胞从BM动员进外周血中一致。

[0051] 实施例3:人多发性骨髓瘤和E-选择素配体的表达

[0052] 考虑到这些发现, 对获自人患者的MM细胞样品中E-选择素配体的表达进行了研究, 并确定了E-选择素表达水平与疾病进展之间的相关性。在患有MM的患者知情同意后获得骨髓(BM)和/或外周血(PB)。利用HECA-452抗体, 通过流式细胞术分析浆细胞(CD38+/CD138+)中E-选择素配体的表达。所有原发MM样品( $n=25$ )均含有HECA-452反应性细胞群(中值22%)。与成对的BM样品( $n=14$ )相比, 从患者PB分离的一致较高比例的循环MM细胞表达HECA-452, 中值差异为33%(威尔科克森符号秩检验,  $p=0.02$ )。相对于诊断时采集的样品, 在复发时采集的样品中, PB中MM的HECA-452表达明显更高(平均高40%)(未配对t检验,  $p=0.0008$ )。

[0053] 这些研究表明携带E-选择素配体的细胞可以在诸如MM的癌症的传播、疾病进展和/或耐药性中起重要作用。因此, 并入拟糖化合物的临床策略(如U.S. 9,109,002中公开的那些, 其通过引用并入本文)可以改善患者的结果

[0054] 实施例4:E-选择素配体在急性髓性白血病(AML)细胞中的表达

[0055] 认为AML患者的复发是由白血病干细胞引起的, 该细胞据推测是通过与E-选择素的结合, 在骨髓的保护龕中逃避了化疗治疗。根据该机制, 应针对表达E-选择素配体(其是能结合sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的抗体(如HECA-452抗体)可检测的)的存活的复发细胞进行选择。当对来自患者的AML原始细胞的HECA-452表位的细胞表面表达进行分析时, 来自经受AML癌症复发的患者的那些细胞在细胞表面表达比获自新确诊的AML患者的AML原始细胞显著更多的HECA-452抗原。该研究的结果在图6的图中提供。

[0056] 实施例5:ELISA血清分析-实验程序

[0057] 本公开还提供了与以下相关的信息：癌细胞上表达的含有sialyl Le<sup>x</sup>或sialyl Le<sup>a</sup>表位的碳水化合物，表达的分子上的碳水化合物表位分泌或释放进血液（包括血液级分，如血浆或血清）中，以及检测分泌在血液中的分子上的碳水化合物表位以检测癌症，包括癌症干细胞和/或侵袭性癌症。下面提供了ELISA夹心HECA-452捕获/CD-B检测分析程序的概述。随后进行CD-B捕获/HECA-452检测分析的类似程序，用CD-B捕获抗体替代HECA-452捕获抗体（反之亦然）。

[0058] 利用碳酸盐缓冲液将微板用HECA-452捕获抗体包被过夜。然后弃去包被缓冲液，并用ELISA洗涤缓冲液洗涤孔，孵育3分钟，然后再次洗涤。然后加入ELISA封闭缓冲液，随后将微板在环境温度下缓慢摇动孵育1小时。然后用样品稀释缓冲液稀释血清测试样品。弃去封闭缓冲液，并将测试样品立即加入封闭的孔中而不洗涤。然后将微板缓慢摇动孵育2小时。弃去测试样品，用ELISA洗涤缓冲液洗涤孔，并摇动孵育3分钟（该步骤重复3次）。

[0059] 通过在样品稀释缓冲液中稀释来制备生物素标记的检测抗体。E-选择素配体检测抗体是CD43（克隆MEM-59；Novus，终浓度0.5μg/mL）、CD44（克隆F10-44-2；Novus，终浓度0.25μg/mL）、CD62L（绵羊pAb；R&D Systems，终浓度0.25μg/mL）和CD147（克隆MEM-M6/1；Thermo Fisher，终浓度0.5μg/mL）。AML标志物检测抗体是CD33（克隆HIM3-4；Novus，终浓度1μg/mL）和CD123（克隆6H6；Novus，终浓度0.5μg/mL）。

[0060] 然后，对于所测试的每种检测抗体，将检测抗体溶液加入到每个孔中，并在环境温度下缓慢摇动孵育1.5-2小时。弃去检测抗体溶液，并用ELISA洗涤缓冲液洗涤孔，摇动孵育3分钟（该步骤重复3次）。在样品稀释缓冲液中稀释酶缀合物，并将其加入到每个孔中，并在环境温度下缓慢摇动孵育45分钟。弃去酶缀合物。用ELISA洗涤缓冲液洗涤孔，并摇动孵育3分钟（该步骤重复3次）。将TMB底物加入到每个孔中，并在环境温度下缓慢摇动孵育15-20分钟。通过加入10%磷酸溶液终止反应。然后利用酶标仪测量吸光度。

[0061] 图7提供了与以上提供的概述一致的检测/捕获分析的概念图，其用于检测分子（用CD-B表示并通过抗CD-B的抗体检测）上的碳水化合物表位（利用HECA-452mAb）。在该分析中，表达sialyl Le<sup>a</sup>或sialyl Le<sup>x</sup>表位的所有血清分子均被固相捕获，并且通过合适的抗体（即抗CD-B）检测特定的目标糖基化分子（即CD-B）。可选地，对于捕获和检测，可以利用抗体HECA-452测定表达碳水化合物表位sialyl Le<sup>a</sup>或sialyl Le<sup>x</sup>的所有分子，以检测血清中AML（包括AML干细胞或侵袭性AML细胞）的标志物。此外，图8提供了用于检测血清中AML（包括AML干细胞或侵袭性AML细胞）的标志物的CD-B捕获/HECA-452检测分析的概念图。

[0062] 还制备了AML细胞条件上清液/培养基用于实验。具体地，使用KG1和KG1a细胞系。KG1细胞系开发自AML患者，并且是在形态学上处于成髓细胞和前髓细胞发育阶段的细胞。KG1a细胞系是KG1细胞系的亚克隆。它由在形态学和组织化学上处于未分化的原始细胞阶段的细胞组成。利用流式细胞术，在这些细胞系的每个细胞系中检测HECA-452的表达。如图9所示，超过40%的KG1细胞是HECA-452阳性的，并且将近70%的KG1a细胞表达HECA-452。通过抗体HECA-452检测到的KG1a细胞上E-选择素碳水化合物配体的增加的糖基化与该亚克隆相对于亲本KG1系的更多的癌症干细胞样特性一致。

[0063] 实施例6：通过捕获/检测夹心ELISA分析检测KG1测试样品中CD62L和HECA-452抗原的共表达

[0064] 使用以上实施例5中概述的ELISA夹心分析的一般程序，其中使用HECA-452捕获抗

体作为捕获抗体,并且使用生物素标记的CD62L抗体或生物素标记的HECA-452抗体作为检测抗体。

[0065] 如图10A所示,利用酶标仪读取未稀释(“纯”)的KG1培养基溶液、KG1培养基的1至16倍稀释溶液和样品缓冲液,观察450nm处的吸光度以测定各溶液中结合HECA-452抗体和CD62L的HECA-452糖型的量。

[0066] 如图10B所示,利用酶标仪读取未稀释(“纯”)的KG1培养基溶液、KG1培养基1至16倍稀释溶液和样品缓冲液,观察450nm处的吸光度以测定各溶液中结合HECA-452和CD62L的HECA-452糖型的量。

[0067] 结果显示在检测HECA-452捕获的分子方面,用抗CD62L的抗体(图10A)比用HECA-452抗体(图10B)具有更高的特异性和灵敏度。

[0068] 实施例7:在ELISA分析中利用HECA-452捕获检测KG1a测试样品中标志物的各HECA-452糖型

[0069] 使用以上实施例5中概述的ELISA夹心分析的一般程序,其中使用HECA-452捕获抗体作为捕获抗体,并且使用生物素标记的针对X轴上列出的各种标志物的抗体作为检测抗体。

[0070] 如图11所示,利用酶标仪读取未稀释(“纯”)的KG1a培养基溶液、KG1a培养基1至16倍稀释溶液和样品缓冲液,观察450nm处的吸光度以测定各溶液中结合HECA-452以及各自的配体抗体的HECA-452糖型的量。使用大鼠IgM捕获作为阴性对照。

[0071] 结果表明通过用HECA-452mAb捕获抗原并用抗CD62L的抗体进行检测而对CD62L的HECA-452糖型进行的检测获得了最高灵敏度。此外,在上清液中未检测到AML标志物CD33和CD123的HECA-452糖型。

[0072] 实施例8:KG1和KG1a上清液稀释液中的CD62L的HECA-452糖型的比较

[0073] 使用以上实施例5中概述的ELISA夹心分析的一般程序,其中使用CD62L捕获抗体作为捕获抗体,并且使用生物素标记的HECA-452抗体作为检测抗体。如图12A所示,利用酶标仪读取不同稀释度的KG1和KG1a培养基,观察450nm处的吸光度以确定各溶液中能结合HECA-452抗体和CD62L的HECA-452糖型的量。结果显示与KG1细胞相比,KG1a细胞上清液中发现了更大量的CD62L的HECA-452糖型,这与相比KG1细胞,KG1a细胞表面增加的HECA-452糖基化(E-选择素配体)(如图9所示)一致。

[0074] 对于图12A所示的结果,使用上文实施例5中概述的ELISA夹心分析的一般程序,其中使用HECA-452捕获抗体作为捕获抗体,并且使用生物素标记的CD62L抗体作为检测抗体。如图12B所示,利用酶标仪读取不同稀释度的KG1和KG1a培养基,观察450nm处的吸光度以确定各溶液中结合HECA-452抗体和CD62L的HECA-452糖型的量。结果显示,用抗体HECA-452捕获抗原并用抗CD62L的抗体检测的形式比用抗CD62L的抗体捕获抗原并用抗HECA-452的抗体检测显示出更高的灵敏度。

[0075] 实体瘤中E-选择素配体的表达

[0076] S.Yasmin-Karin等人,Oncotarget 2014年10月6日(在此将其通过引用并入),基于前列腺癌细胞在流动条件下在体外结合E-选择素的能力分离了前列腺癌细胞。基于它们结合E-选择素的能力,这些细胞还将在其细胞表面上表达HECA-452抗原。与不结合E-选择素的那些前列腺癌细胞相比,所选的结合E-选择素的这些前列腺癌细胞显示出严重的肿瘤

细胞的特性。这些特性包括(1)软琼脂中的集落形成；(2)体外形成肿瘤球状体；(3)侵入基质胶(Matrigel)；以及(4)体内转移行为和肿瘤生长以及侵袭性。这些前列腺癌肿瘤细胞以及表达E-选择素配体的其他实体瘤细胞也是通过能结合sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的抗体进行鉴定以及用拟糖化合物如GMI-1271进行治疗以改善患者的结果的候选者。

[0077] 如以上实施例1-4所示,可以利用本文公开的方法和组合物来完成对实体瘤的癌细胞的直接检测。并且如以上实施例5-9所示,也可以利用本文公开的方法和组合物来完成通过检测血液中分泌的糖型进行的此类癌症的间接检测。

[0078] 抗体

[0079] 本公开涉及发现和产生抗体的方法和组合物,所述抗体可用于通过直接检测细胞上的细胞表面碳水化合物或者通过检测分泌到血液中或以其它方式存在于血液中的此糖型来鉴定癌症干细胞和/或侵袭性癌细胞。

[0080] 在一个实施方案中,本文公开的技术为快速开发用于检测侵袭性癌症的诊断性和治疗性抗体提供了新的策略。在一个实施方案中,本文公开的技术为用干扰癌细胞上能结合E-选择素的细胞表面碳水化合物的化合物来治疗检测到的侵袭性癌症提供了新的策略。在一个实施方案中,检测的癌细胞来自液体癌症。在一个实施方案中,检测的癌细胞来自实体瘤。在一个实施方案中,通过检测血液中存在的碳水化合物来检测癌症。在一个实施方案中,检测的癌症是MM、ALL、AML或前列腺癌。在一个实施方案中,在通过诊断性抗体进行检测之后,用拟糖化合物治疗癌症。

[0081] 在一个实施方案中,本公开涉及可用于鉴定表达E-选择素配体的癌细胞的抗体。在一个实施方案中,本公开涉及可用于鉴定血液中存在的癌症配体的抗体。在一个实施方案中,抗体对sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>均具有特异性。在一个实施方案中,抗体检测CD62L的HECA-452糖型。

[0082] 在一个实施方案中,提供发现和产生可用于鉴定侵袭性癌细胞的抗体的细胞群。

[0083] 在一个实施方案中,本公开提供对sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>均具有特异性的抗体,所述抗体通过包括下述步骤的方法产生:向宿主注射癌细胞并筛选得到的抗体中能结合多孔板上包被的sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的那些抗体。在一个实施方案中,本公开提供对sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>均具有特异性的抗体,所述抗体通过包括下述步骤的方法产生:向宿主注射侵袭性癌细胞(例如来自复发患者的癌细胞、来自对化疗无应答的患者的癌细胞或以其他方式鉴定的侵袭性癌细胞),并筛选得到的抗体中能结合多孔板上包被的sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>的那些抗体。

[0084] 在一个实施方案中,本公开提供对HECA-452具有特异性的抗体和对CD62L具有特异性的抗体,例如如本文所述的分析方法中所述的,所述抗体可以共同用于检测CD62L的HECA-452糖型。HECA-452抗体可通过包括下述步骤的方法产生:向小鼠注射侵袭性癌细胞(例如来自复发患者的癌细胞、来自对化疗无应答的患者的癌细胞或者以其他方式鉴定的侵袭性癌细胞),并筛选得到的抗体中能结合多孔板上包被的HECA-452的那些抗体。CD62L抗体可以通过包括下述步骤的方法产生:向小鼠注射侵袭性癌细胞(例如来自复发患者的癌细胞、来自对化疗无应答的患者的癌细胞或者以其他方式鉴定的侵袭性癌细胞),并筛选得到的抗体中能结合多孔板上包被的CD62L的那些抗体。

[0085] 在一个实施方案中,本公开提供对HECA-452和CD62L均具有特异性,并且能够检测

CD62L的HECA-452糖型的抗体,所述抗体通过包括下述步骤的方法产生:向小鼠注射癌细胞,并筛选得到的抗体中能结合多孔板上包被的HECA-452和CD62L的那些抗体。在一个实施方案中,本公开提供对HECA-452和CD62L均具有特异性的抗体,所述抗体通过包括下述步骤的方法产生:向小鼠注射侵袭性癌细胞(例如来自复发患者的癌细胞、来自对化疗无应答的患者的癌细胞或者以其他方式鉴定的侵袭性癌细胞),并筛选得到的抗体中能结合多孔板上包被的HECA-452和CD62L的那些抗体。

[0086] 可以通过多种技术产生本公开的单克隆抗体(MAb),包括常规单克隆抗体方法,例如Kohler和Milstein,1975,Nature 256:495(在此将其通过引用并入)的标准体细胞杂交技术。可以使用体细胞杂交程序或者可以应用产生单克隆抗体的其他技术,包括例如B淋巴细胞的病毒性或致癌性转化。

[0087] 本领域技术人员可以用人Ig基因座的大片段将小鼠抗体产生有缺陷的小鼠品系工程化,以使此类小鼠在无小鼠抗体的情况下产生人抗体。大的人Ig片段可以保持大的可变基因的多样性以及适当调控的抗体产生和表达。通过利用用于抗体多样性和选择以及对人蛋白质缺乏免疫耐受的小鼠机制,在这些小鼠品系中再产生的人抗体库获得针对任何目标抗原(包括人抗原)具有高亲和力的抗体。利用杂交瘤技术,可以产生并选择具有期望特异性的抗原特异性的人MAb。

[0088] 在一个实施方案中,本公开的抗体可以在杂交瘤细胞系之外的细胞系中表达。在一个实施方案中,可将编码具体抗体的序列用于转化合适的哺乳动物宿主细胞。在一个实施方案中,可以利用将多核苷酸引入宿主细胞的任何已知方法来实现转化,包括例如将多核苷酸包装进病毒(或病毒载体)中并用病毒(或载体)转导宿主细胞,或者通过本领域已知的转染程序。此类程序由美国专利第4,399,216号、第4,912,040号、第4,740,461号和第4,959,455号示例,在此将所述专利通过引用并入。通常,所使用的转化程序可以取决于待转化的宿主。将异源多核苷酸引入哺乳动物细胞的方法在本领域众所周知,并且其包括但不限于:葡聚糖介导的转染、磷酸钙沉淀、聚凝胺介导的转染、原生质体融合、电穿孔、将多核苷酸封装在脂质体中、以及将DNA直接显微注射进细胞核。

[0089] 在一个实施方案中,本公开提供能够结合E-选择素的抗体。在一个实施方案中,抗体是HECA-452抗体。

[0090] 在一个实施方案中,本公开提供能够特异性结合癌细胞上表达或存在的E-选择素配体的抗体。在一个实施方案中,本公开提供能够特异性结合血液中表达或存在的E-选择素配体的抗体。

[0091] 可以通过本领域普通技术人员可用的多种技术中的任何技术来实现对能够特异性结合sialyl Le<sup>a</sup>和sialyl Le<sup>x</sup>和/或特异性结合E-选择素配体(例如癌细胞表达的E-选择素配体)的杂交瘤/抗体的筛选。

[0092] 诊断

[0093] 在一个实施方案中,本发明的抗体也可用于体内或离体检测侵袭性癌症和/或侵袭性癌细胞。在一个实施方案中,可以从患者获得癌细胞,并通过用荧光标记的抗体结合细胞来进行离体分析,以及通过荧光激活细胞分选进行分析。在一个实施方案中,可以从患者获得血液,并通过用荧光标记的抗体结合配体来进行离体分析,以及通过ELISA分析进行分析。在一个实施方案中,抗体能结合HECA-452和CD62L,这允许它们检测CD62L的HECA-452糖

型。在一些实施方案中,在检测中使用多种抗体。

[0094] 通过下述实现体内检测:标记本文所述的抗体,将标记抗体施用于对象,然后使对象成像。根据本公开可用于诊断成像的标记物的实例是:放射性标记物(如 $I^{123}$ 、 $I^{131}$ 、 $I^{111}$ 、 $Tc^{99m}$ 、 $P^{32}$ 、 $I^{125}$ 、 $H^3$ 、 $C^{14}$ 和 $Rh^{188}$ ),荧光标记物(如荧光素(fluorescein)和若丹明),核磁共振活性标记物,正电子发射断层扫描(“PET”)扫描仪可检测到的正电子发射同位素,化学发光物(如荧光素(luciferin))以及酶标志物(如过氧化物酶或磷酸酶)。也可以应用短程辐射发射器,如短程检测器探针(如经直肠探针)可检测到的同位素。可以利用本领域已知的技术用此类试剂标记抗体。对于涉及放射性标记抗体的技术,例如参见Wensel和Mearns, *Radioimmunoimaging and Radioimmunotherapy*, Elsevier, N.Y. (1983), 在此将其通过引用并入。也参见D.Colcher等人, “Use of Monoclonal Antibodies as Radiopharmaceuticals for the Localization of Human Carcinoma Xenografts in Athymic Mice”, *Meth.Enzymol.* 121:802-816 (1986), 在此将其通过引用并入。

[0095] 根据本公开的标记的抗体可以用于体外诊断测试,从而检测流入血流的癌症抗原(参见例如以上所述的实施例5-8)。抗体、其结合部分、探针或配体的比活性取决于放射性标记物的半衰期,同位素纯度以及如何将标记物掺入生物试剂中。在免疫分析测试中,一般而言,比活性越高,灵敏度越好。用放射性同位素标记抗体的程序在本领域通常是已知的。

[0096] 可以将放射性标记的抗体施用于患者,在该患者中,其定位于携带能与抗体反应的抗原的癌细胞,并利用已知技术(如利用例如 $\gamma$ 相机或发射断层扫描的放射性核素扫描)对体内进行“检测”或“成像”。参见例如A.R.Bradwell等人, “Developments in Antibody Imaging”, *Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy*, R.W.Baldwin等人(编辑), pp.65-85 (Academic Press 1985), 在此将其通过引用并入。可选地,当放射性标记物发射正电子(例如 $C^{11}$ 、 $F^{18}$ 、 $O^{15}$ 和 $N^{13}$ )时,可以使用正电子发射轴向断层扫描扫描仪,如位于Brookhaven国家实验室的指定Pet VI。

[0097] 可以由本领域已知的标准部分制备荧光团和发色团标记的生物学试剂。由于抗体和其他蛋白质吸收波长高达约310nm的光,因此应该选择在310nm以上的波长例如400nm以上具有大量吸收的荧光部分。Stryer, *Science*, 162:526 (1968) 和Brand, L等人, *Annual Review of Biochemistry*, 41:843-868 (1972) 描述了多种合适的荧光和发色团,在此将其通过引用并入。可以通过诸如美国专利第3,940,475号、第4,289,747号和第4,376,110号中所公开的那些的常规程序用荧光发色团标记抗体,在此将其通过引用并入。

[0098] 疗法

[0099] 在根据本公开的一个实施方案中,提供治疗、监测治疗性治疗的进展和/或有效性的方法。

[0100] 在本文所述的各治疗方法的一个实施方案中,首先确诊对象患有癌症。在一个实施方案中,首先确诊对象患有侵袭性癌症。在另一实施方案中,对象患有选自液体癌症(例如MM、ALL和AML)和实体癌症(例如前列腺癌)的疾病。在一个实施方案中,癌症患者被诊断为复发。在一个实施方案中,将本文的抗体用于诊断和/或治疗癌症患者。在一个实施方案中,将一种或多种拟糖化合物用于治疗癌症患者。在一个实施方案中,利用本文公开的抗体确诊对象患有侵袭性癌症。在一个实施方案中,在利用本文公开的抗体确诊患有侵袭性癌症之后,用一种或多种拟糖化合物治疗患者。

[0101] 本文公开的某些方法可适用于需要鉴定E-选择素配体的任何情况,例如用于临床研究或用于药物发现。

[0102] 在一个实施方案中,本文描述了包含一种或多种拟糖化合物以及药学可接受的载体的药物组合物。在一个实施方案中,药物组合物包含GMI-1271和药学可接受的载体。在一个实施方案中,药物组合物包含GMI-1359和药学可接受的载体。

[0103] 根据具体实施方案,本文所述的药物组合物可以包含这样的试剂:其例如干扰侵袭性癌细胞的细胞表面碳水化合物的功能,从而使细胞不能结合E-选择素。

[0104] 药物组合物的施用途径包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内和皮下途径。

[0105] 在另一实施方案中,在施用根据所公开的实施方案的药物组合物(之前、同时或之后),被治疗的对象接受化疗作为辅助。在一个实施方案中,在施用包含GMI-1271的药物组合物(之前、同时或之后),被治疗的对象接受化疗作为辅助。在一个实施方案中,在施用包含GMI-1359的药物组合物(之前、同时或之后),被治疗的对象接受化疗作为辅助。在一个实施方案中,辅助性化疗治疗包括施用硼替佐米。

[0106] 考虑本文公开的本公开的说明书和实施,本公开的其他实施方案对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

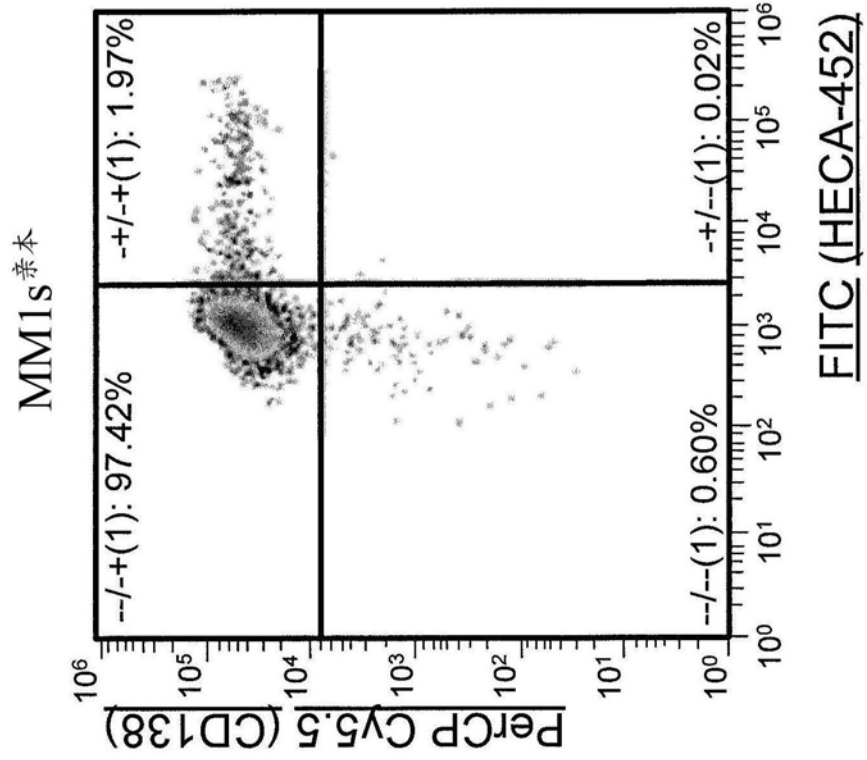


图1A

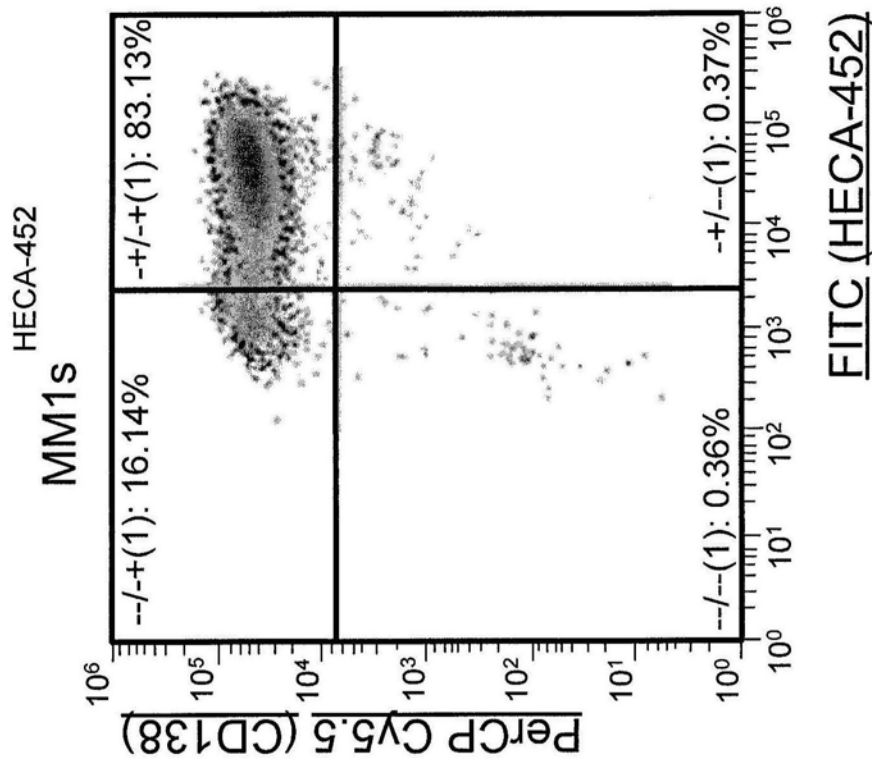


图1B

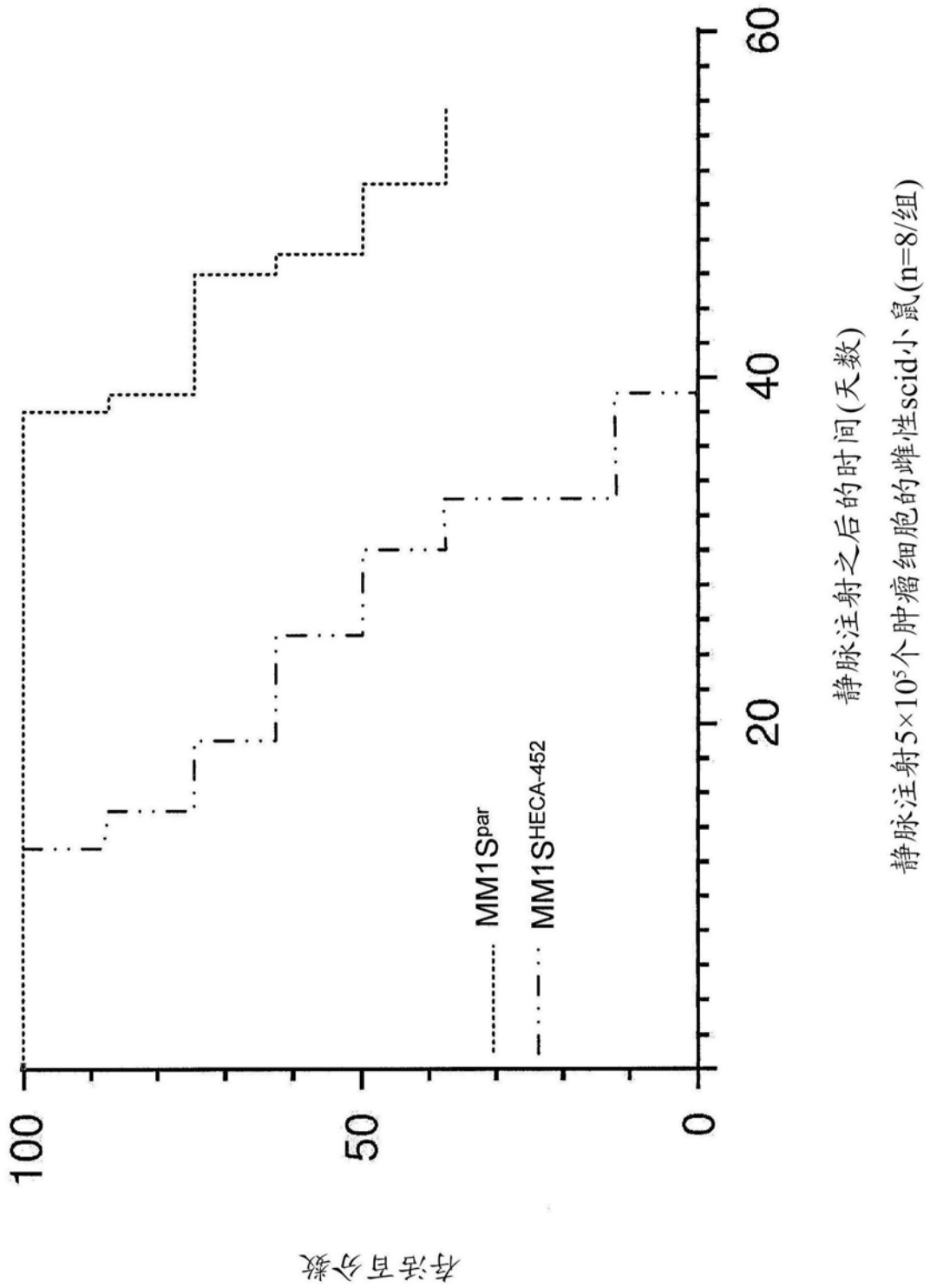


图2

|         | 处理                               | MST (天数)        | 存活% | P vs 盐水 |
|---------|----------------------------------|-----------------|-----|---------|
| .....   | 盐水                               | 33              | 0   |         |
| ——      | GMI-1271 (40 mg/kg IP qd x 21 天) | 31              | 0   |         |
| - - - - | 硼替佐米 (0.75 mg/kg IP qw x 3 周)    | 42              | 0   | 0.0622  |
| - · · - | GMI-1271 + 硼替佐米                  | 60 <sup>b</sup> | 0   | 0.0101  |

<sup>a</sup>P=0.0363 vs. 硼替佐米

MM1s 亲本

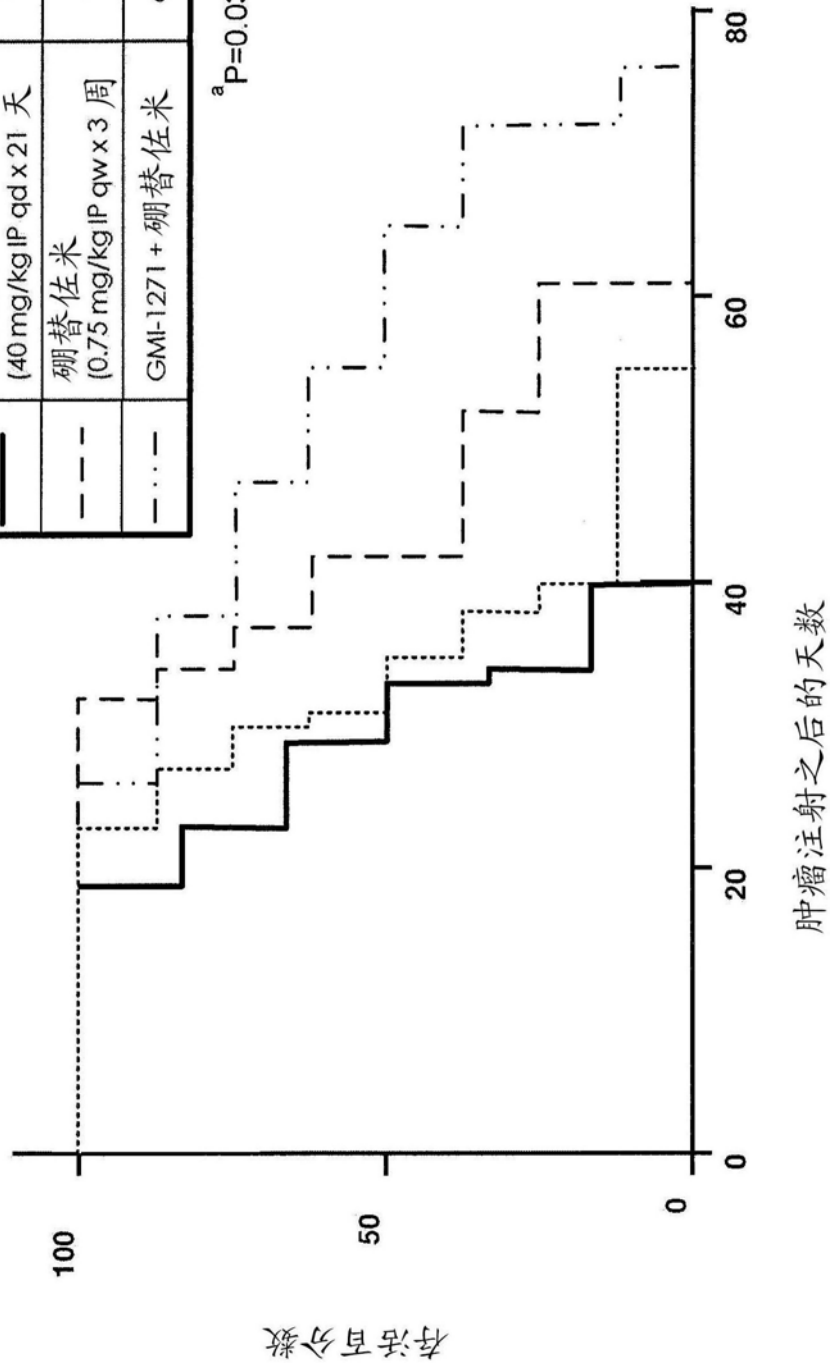


图3

| 处理                               | MST (天数)          | 存活%  | P vs 盐水 |
|----------------------------------|-------------------|------|---------|
| 盐水                               | 25.5              | 0    |         |
| GMI-1271 (40 mg/kg IP qd x 21 天) | 30                | 0    |         |
| 硼替佐米 (0.75 mg/kg IP qw x 3 周)    | 24                | 0    |         |
| GMI-1271 + 硼替佐米                  | 56.5 <sup>c</sup> | 37.5 | 0.0028  |

<sup>a</sup>P=0.0123 vs. 硼替佐米  
<sup>a</sup>在较低肿瘤接种物下进行的其它研究给出了类似的结果

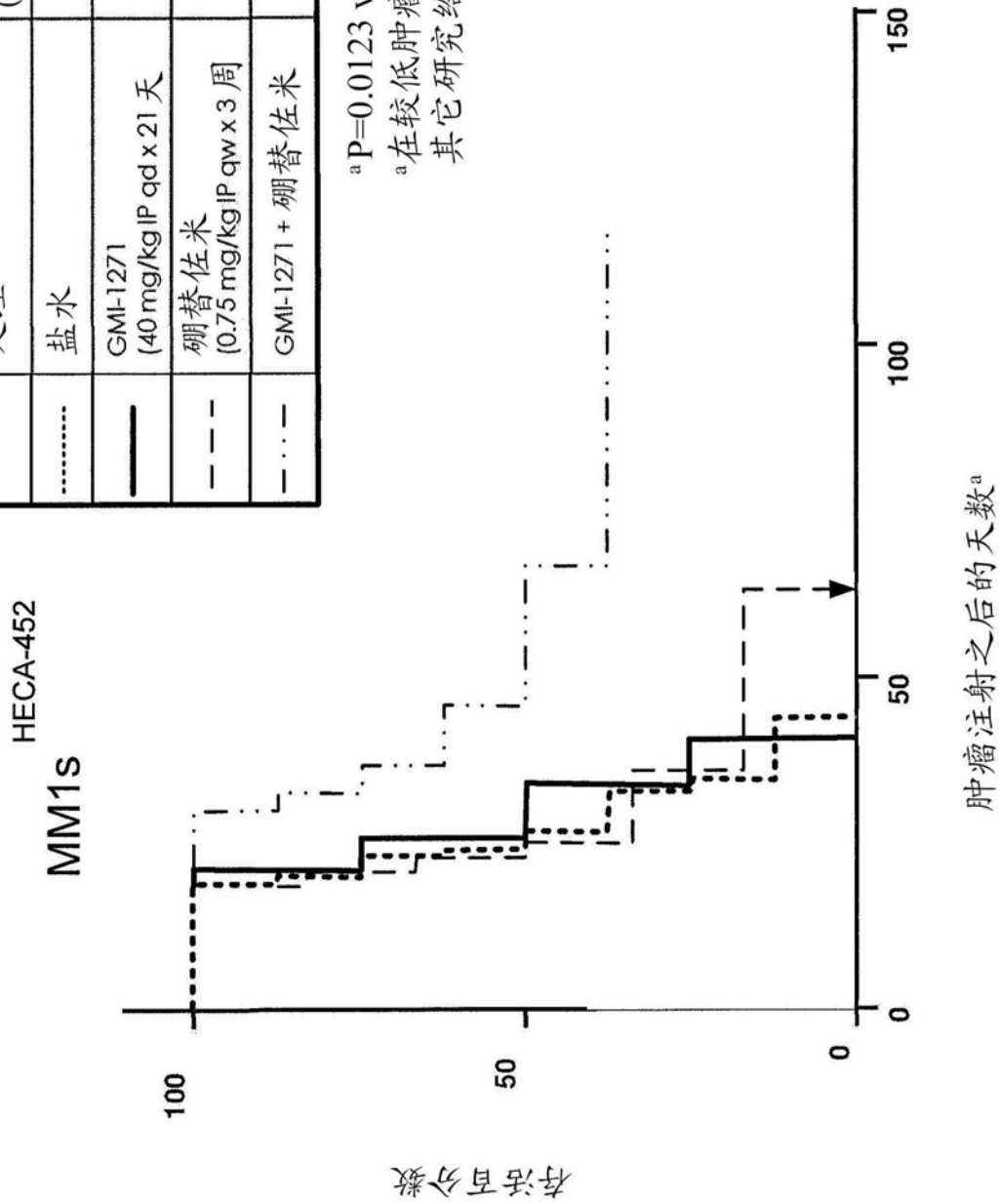


图4

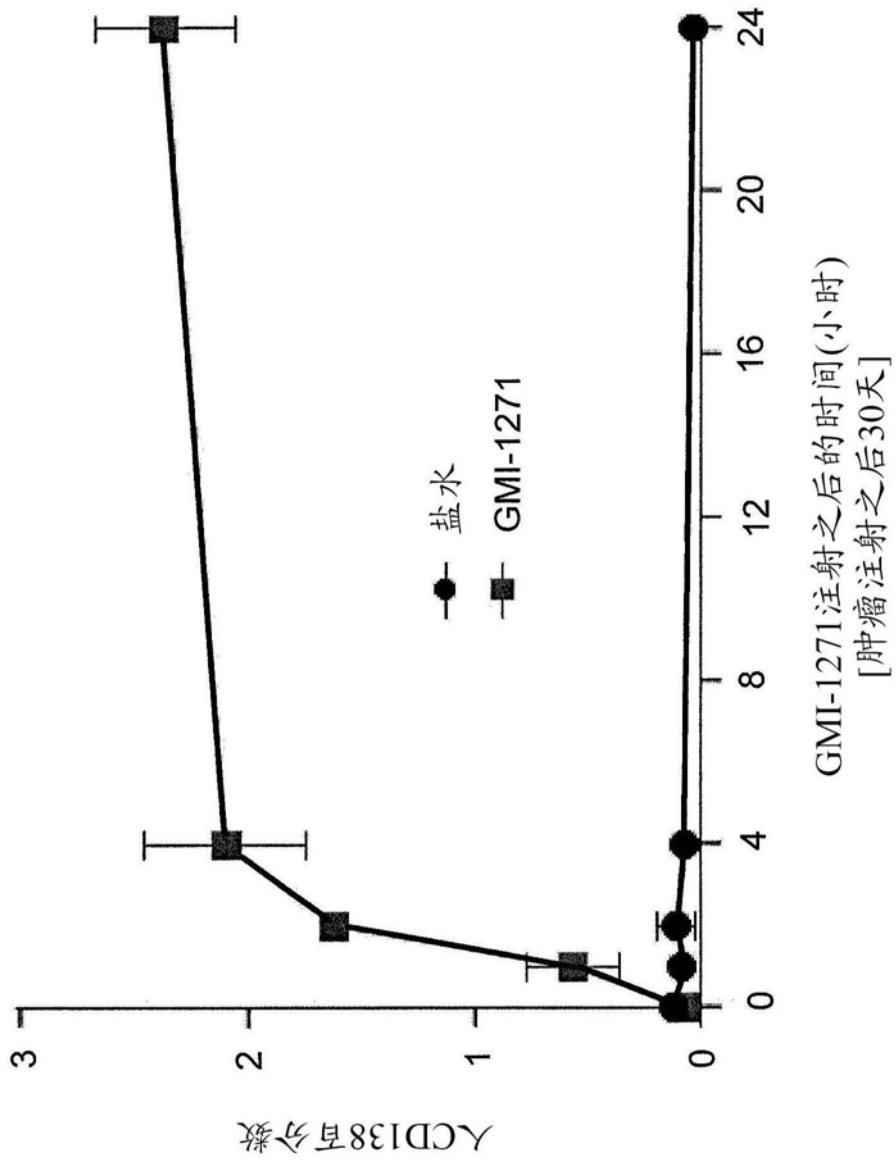


图5

E-选择素配体在AML原始细胞中的表达

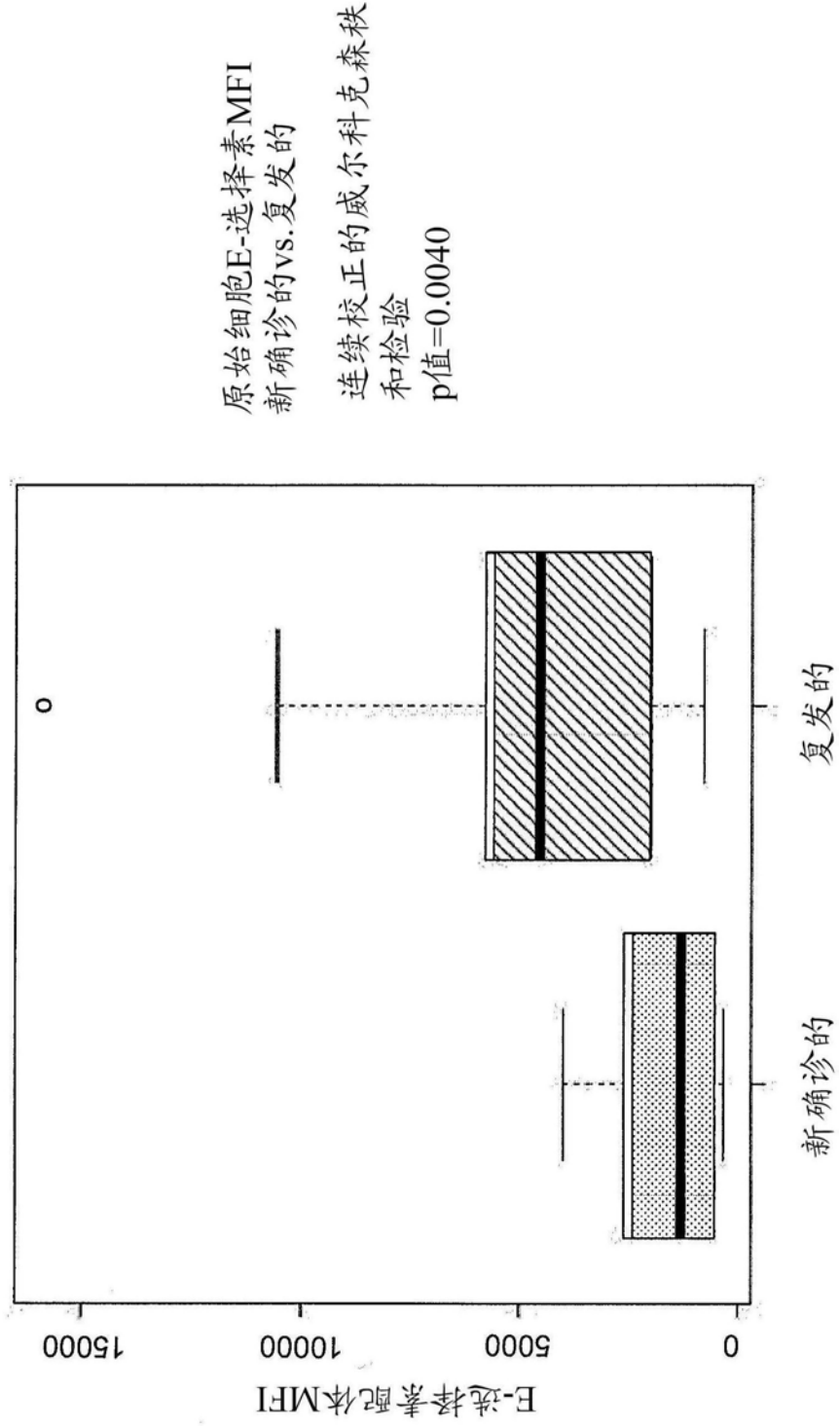


图6

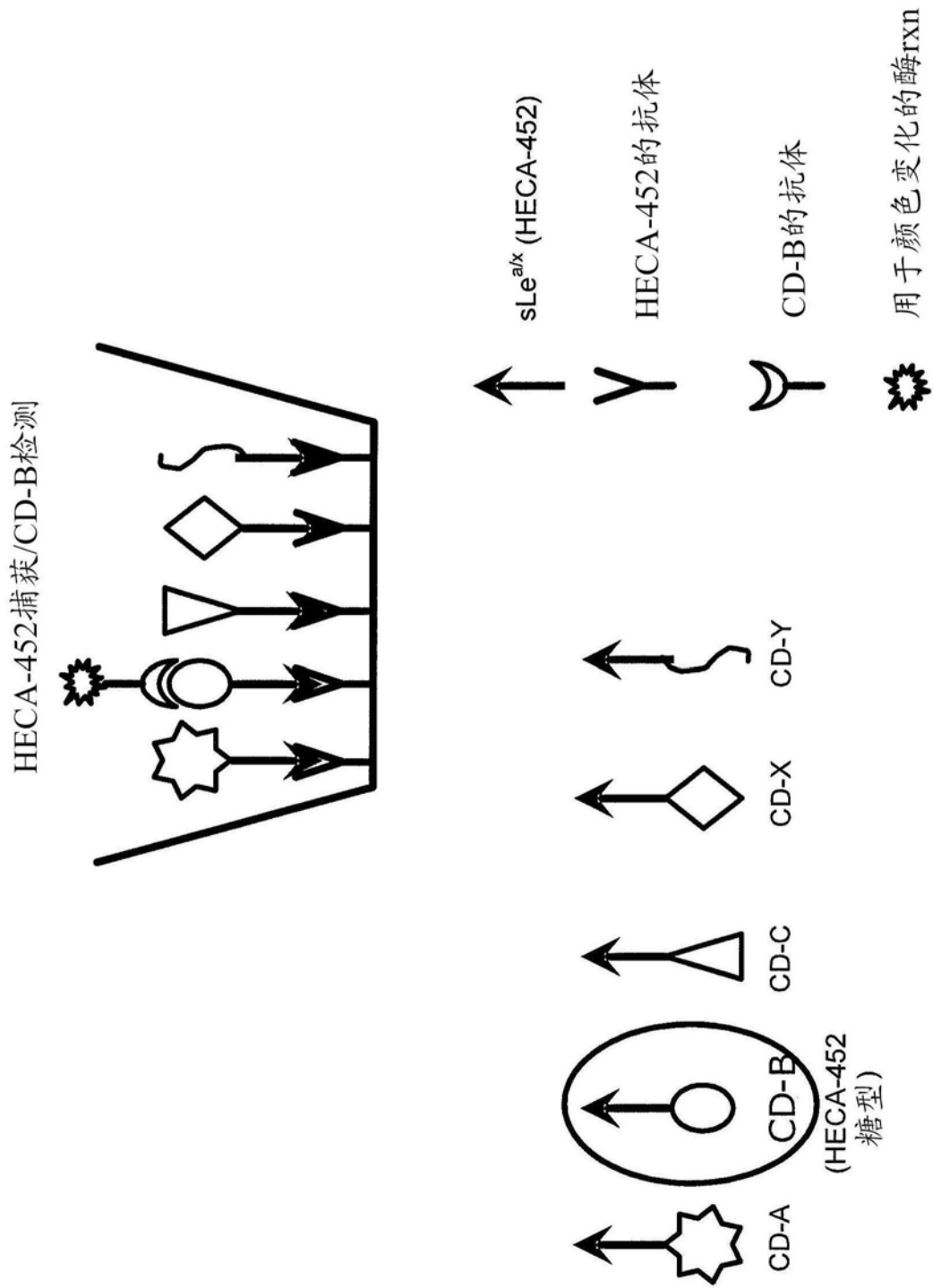


图7

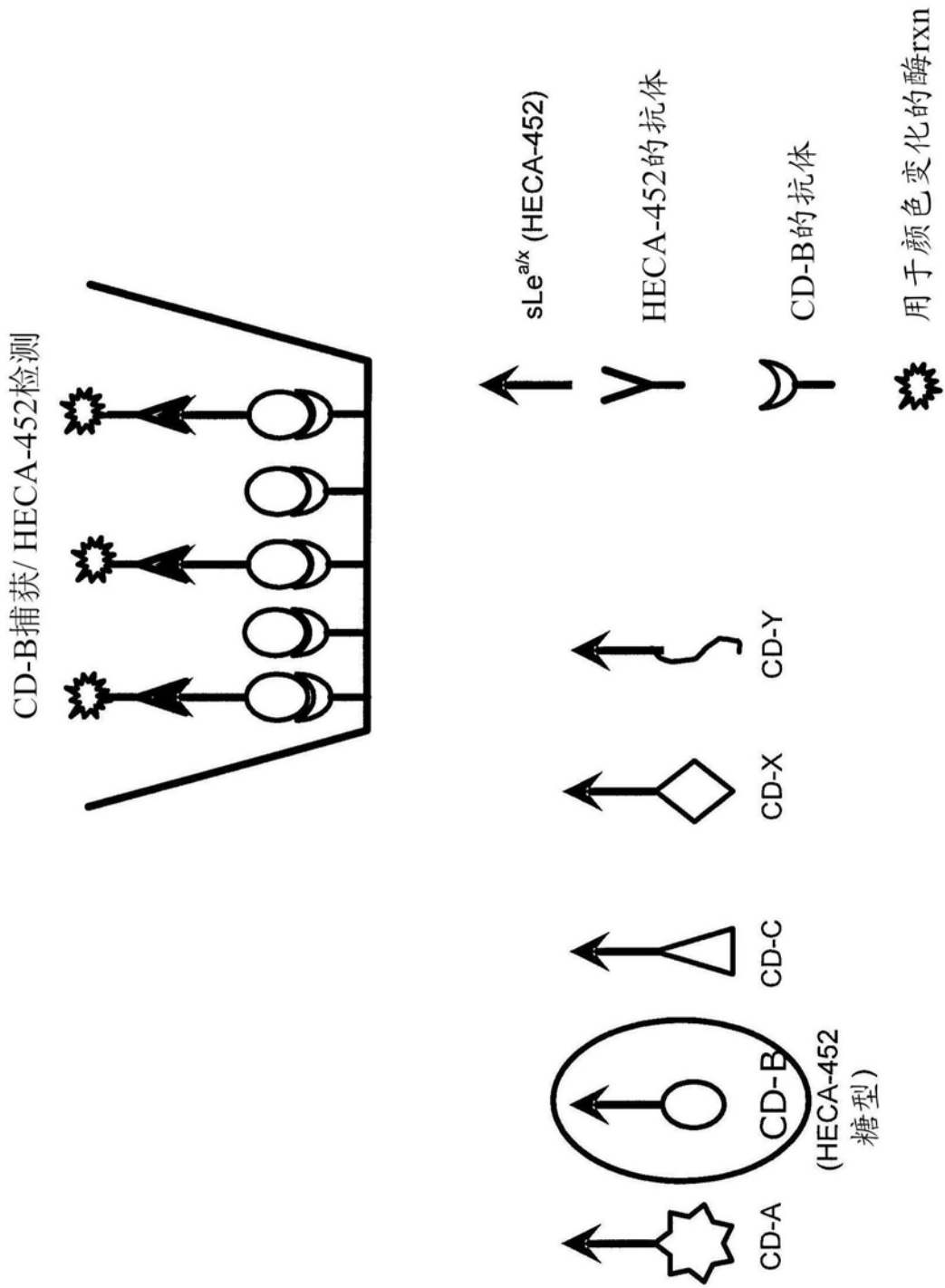


图8

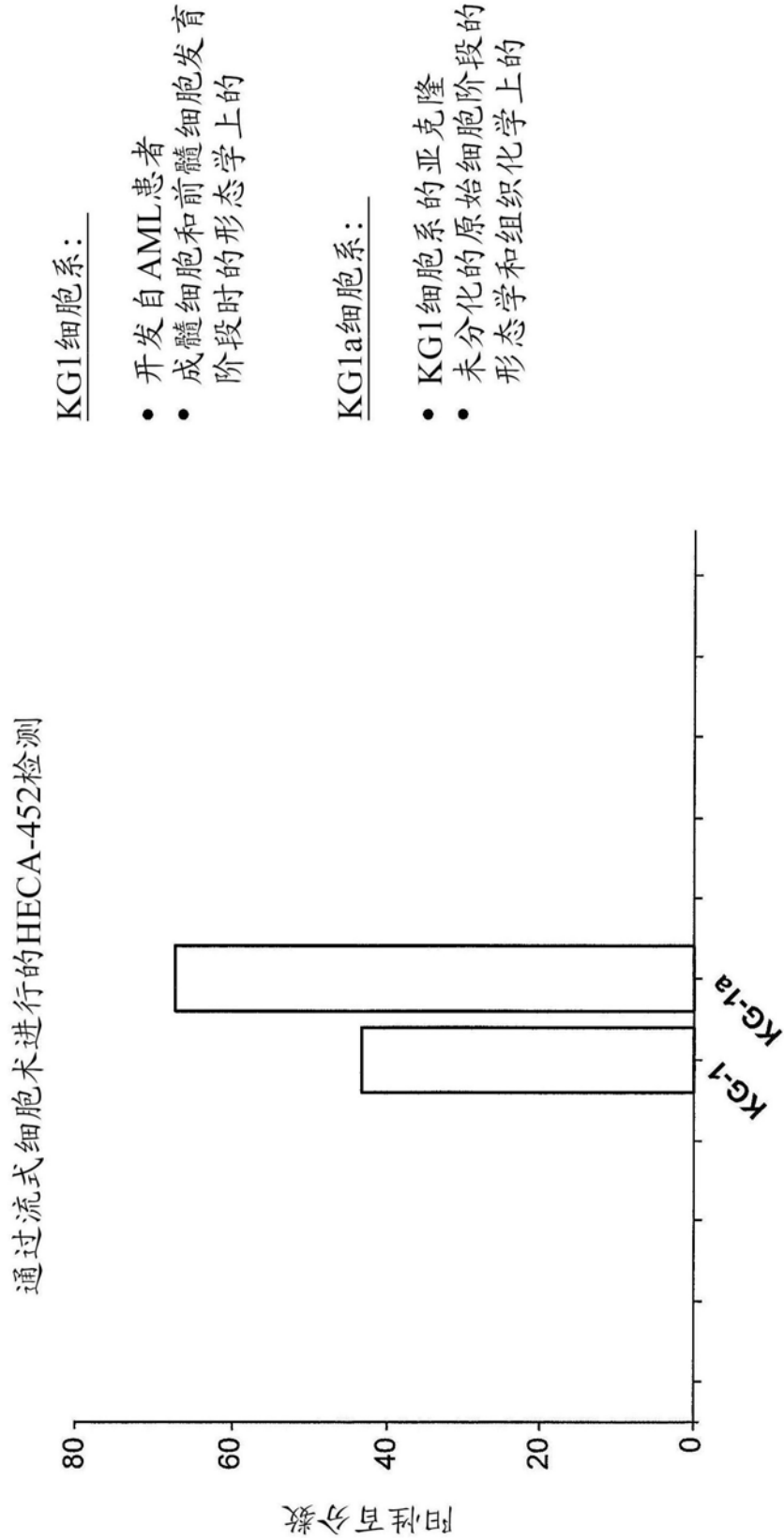


图9

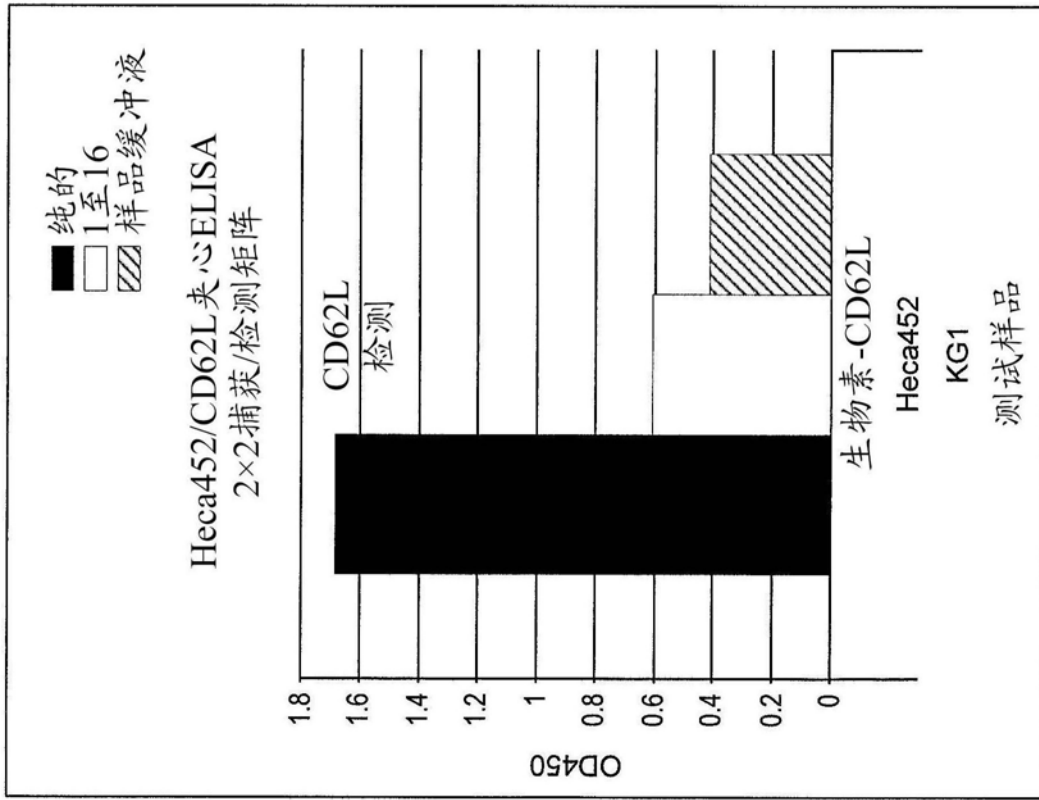


图10A

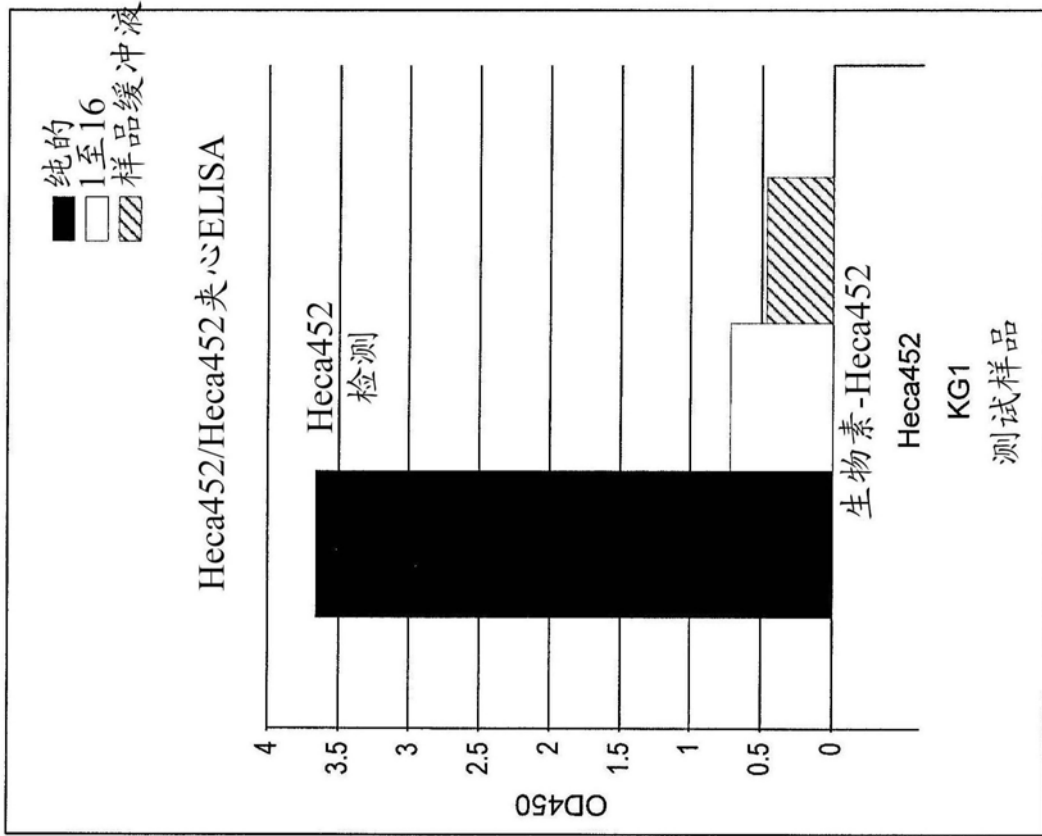


图10B

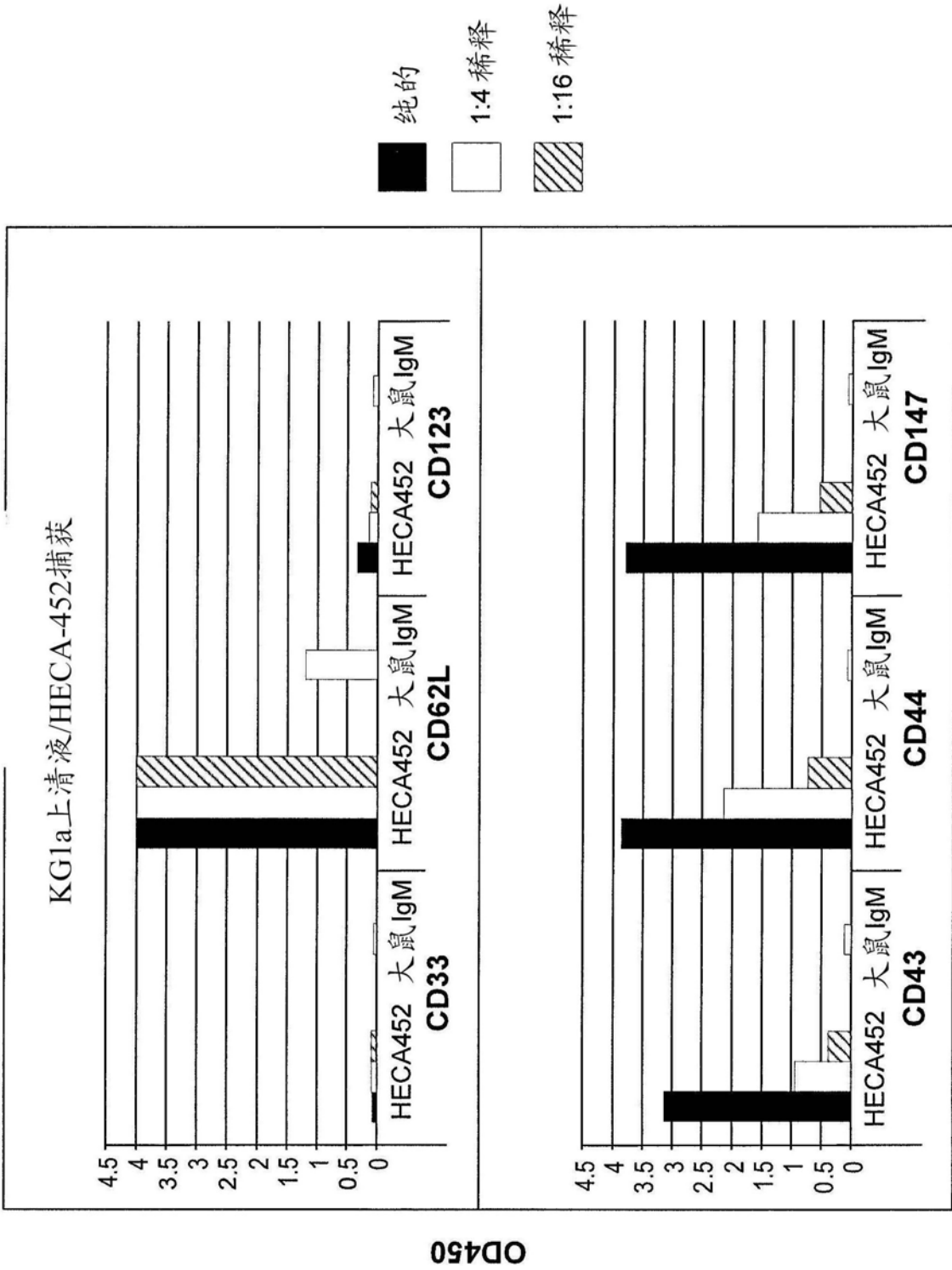


图11

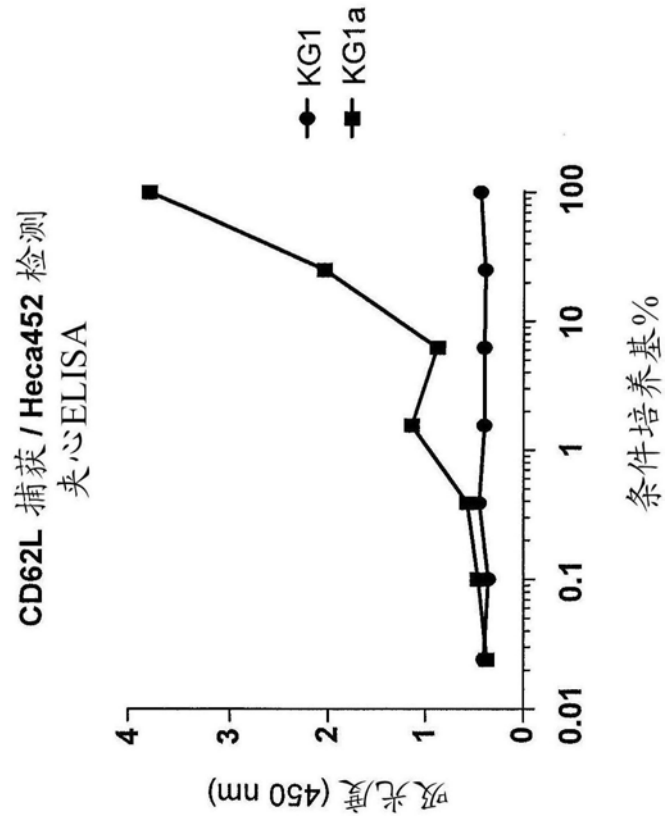


图12A

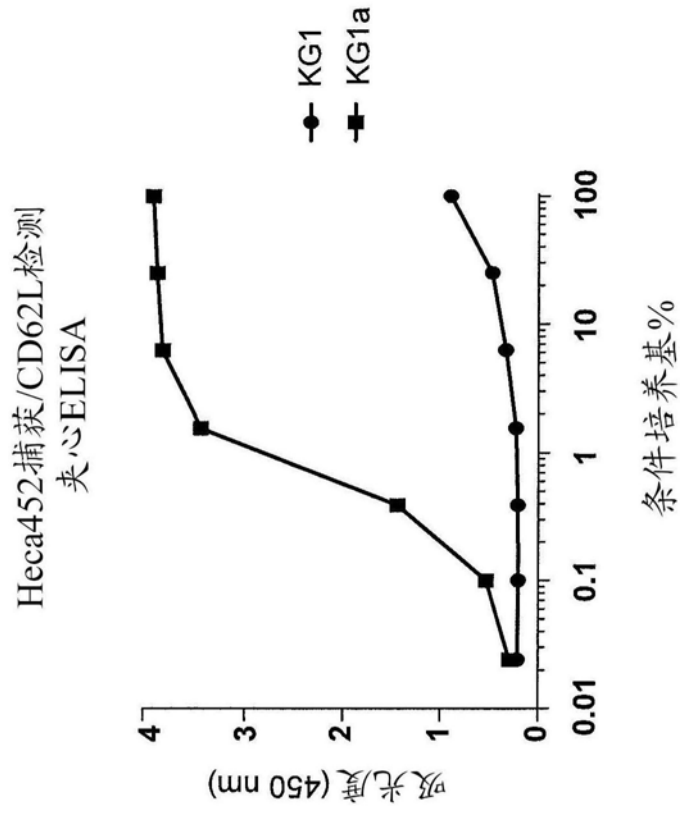
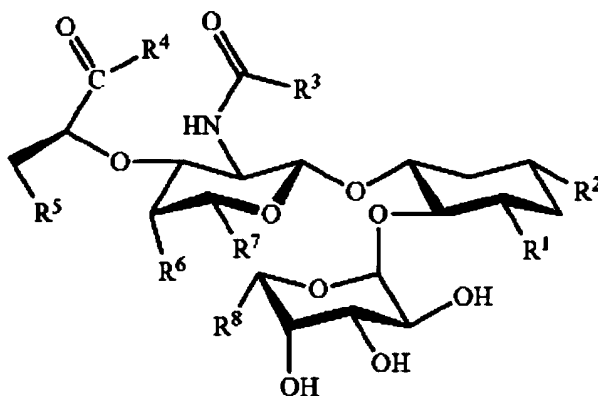


图12B

|                |                                                                                                               |         |            |
|----------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 靶向癌症干细胞和治疗侵袭性癌症的抗体                                                                                            |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN108289889A</a>                                                                                  | 公开(公告)日 | 2018-07-17 |
| 申请号            | CN201680063918.8                                                                                              | 申请日     | 2016-11-02 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 糖模拟物有限公司                                                                                                      |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 糖模拟物有限公司                                                                                                      |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 糖模拟物有限公司                                                                                                      |         |            |
| [标]发明人         | 约翰L麦格纳尼                                                                                                       |         |            |
| 发明人            | 约翰·L·麦格纳尼                                                                                                     |         |            |
| IPC分类号         | A61K31/4965 A61K31/7034 A61K45/06 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/577 A61P35/00 A61P35/02                         |         |            |
| CPC分类号         | A61K31/7034 A61K31/4965 A61K38/05 A61K45/06 G01N33/57407 G01N33/57426 G01N33/57492 G01N2333/70564 A61K2300/00 |         |            |
| 代理人(译)         | 洪欣                                                                                                            |         |            |
| 优先权            | 62/250406 2015-11-03 US                                                                                       |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                                                |         |            |

摘要(译)

公开了鉴定和治疗患有可以结合E-选择素的癌症的患者的方法和系统。通过癌症细胞表面表达sialyl Lea和sialyl Lex碳水化合物表位来鉴定结合E-选择素的癌症，以及可以通过能结合sialyl Lea/x的抗体，如HECA-452来鉴定此类癌症。可用E-选择素的拮抗剂如拟糖化合物以及用靶向包含sialyl Lea/x结构域的细胞表面碳水化合物的免疫疗法来治疗此类癌症，以阻断和/或破坏E-选择素的结合。



式(I)