



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119548484 A

(43) 申请公布日 2025. 03. 04

(21) 申请号 202411710355.X

(22) 申请日 2019.12.06

(30) 优先权数据

62/776,323 2018.12.06 US

(62) 分案原申请数据

201980081052.7 2019.12.06

(71) 申请人 雷迪厄斯制药公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 H·帕特尔 T·比哈尼

H·阿尔特 N·陶

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int. Cl.

A61K 31/137 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

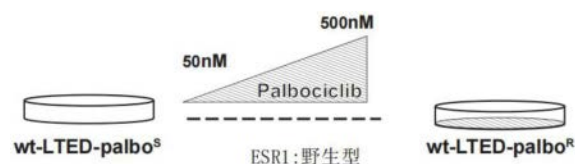
权利要求书1页 说明书22页 附图26页

(54) 发明名称

治疗CDK4/6抑制剂耐药性癌症的方法

(57) 摘要

本发明公开了治疗具有野生型雌激素受体 $\alpha$ 和/或突变雌激素受体 $\alpha$ 的受试者中CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症的方法,所述方法包括给药于所述受试者治疗有效量的依拉司群或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中所述突变雌激素受体 $\alpha$ 包含选自D538G、Y537X<sub>1</sub>、L536X<sub>2</sub>、P535H、V534E、S463P、V392I、E380Q及其组合组成的组中的一个或多个突变,其中:X<sub>1</sub>为S、N或C;且X<sub>2</sub>为R或Q。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌和垂体癌组成的组中。



1. 一种抑制和降解受试者中CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症的方法,包括给药于所述受试者治疗有效量的依拉司群或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利、利波西利、阿贝西利或其组合具有耐药性。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利具有耐药性。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对利波西利具有耐药性。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对阿贝西利具有耐药性。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症包含选自D538G、Y537X<sub>1</sub>、L536X<sub>2</sub>、P535H、V534E、S463P、V392I、E380Q及其组合组成的组中的一个或多个突变,其中:X<sub>1</sub>为S、N或C;且X<sub>2</sub>为R或Q。

7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述突变为Y537S。

8. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述突变为D538G。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症还对选自抗雌激素药、芳香化酶抑制剂及其组合组成的组中的药物具有耐药性。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌和垂体癌组成的组中。

## 治疗CDK4/6抑制剂耐药性癌症的方法

[0001] 本申请是申请日为2019年12月6日、申请号为201980081052.7 (国际申请号为PCT/US2019/065005)、名称为“治疗CDK4/6抑制剂耐药性癌症的方法”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35U.S.C.§119(e)要求于2018年12月6日提交的美国临时专利申请62/776,323的优先权。上述申请的全部内容,包括附图,在此通过引用整体并入。

### 技术领域

[0004] 本发明提供了在对CDK4/6抑制剂具有耐药性的ESR1突变的癌症模型中使用依拉司群(elacestrant)提供抗肿瘤活性的方法。本发明还涉及治疗具有可导致CDK4/6抑制剂耐药性的ESR1突变的雌激素阳性(ER+)癌症的方法,其中使用依拉司群治疗所述癌症。

### 背景技术

[0005] 乳腺癌基于三种受体的表达分为三种亚型:雌激素受体(ER)、孕酮受体(PR)和人表皮生长因子受体-2(Her2)。在许多乳腺癌患者中发现ER的过表达。ER阳性(ER+)乳腺癌占所有乳腺癌的三分之二。除了乳腺癌,雌激素和ER与例如卵巢癌、结肠癌、前列腺癌和子宫内膜癌有关。

[0006] ER可以被雌激素激活并易位(translocate)到细胞核中以结合DNA,从而调节各种基因的活性。例如参见,Marino et al.,“Estrogen Signaling Multiple Pathways to Impact Gene Transcription,”Curr.Genomics 7 (8):497-508(2006);以及Heldring et al.,“Estrogen Receptors:How Do They Signal and What Are Their Targets,”Physiol.Rev.87 (3):905-931(2007)。

[0007] 抑制雌激素产生的药剂,例如芳香化酶抑制剂(AI,例如来曲唑(letrozole)、阿那曲唑(anastrozole)和依西美坦(exemestane)),或直接阻断ER活性的药剂,例如选择性雌激素受体调节剂(SERM,例如他莫昔芬(tamoxifen)、托瑞米芬(toremifene)、屈洛昔芬(droloxifene)、艾多昔芬(idoxifene)、雷洛昔芬(raloxifene)、拉索昔芬(lasofloxifene)、阿佐昔芬(arzoxifene)、米普昔芬(miproxifene)、左美洛昔芬(levormeloxifene)和EM-652(SCH 57068))和选择性雌激素受体降解剂(SERD,例如氟维司群(fulvestrant)、TAS-108(SR16234)、ZK191703、RU58668、GDC-0810(ARN-810)、GW5638/DPC974、SRN-927、ICI182780和AZD9496),先前已被用于或正被开发用于治疗ER阳性乳腺癌。

[0008] SERM和AI往往用作ER阳性乳腺癌的一线辅助系统性治疗。AI通过阻断在体内将雄激素转变为雌激素的芳香化酶的活性抑制外周组织中雌激素的产生。然而,AI不能阻止卵巢产生雌激素。因此,AI主要用于治疗绝经后女性。此外,由于AI比SERM他莫昔芬更有效,严重副作用更少,AI也可用于治疗卵巢功能受到抑制的绝经前女性。例如参见,Francis et al.,“Adjuvant Ovarian Suppression in Premenopausal Breast Cancer,”the

N.Engl.J.Med., 372:436-446 (2015)。

[0009] 对内分泌疗法的耐药性(resistance)是在雌激素受体阳性(ER+)乳腺癌患者的管理中的一个具有挑战性的方面。最近的研究表明,在用芳香化酶抑制剂治疗后,通过在雌激素受体1(ESR1)基因中出现突变,可以产生获得性耐药性。与新生和获得性耐药性相关的另一种机制是平行生长因子信号传导通路的适应性上调以及这些通路之间的串扰,包括促进细胞周期蛋白D1表达和细胞周期蛋白依赖性激酶4(CDK4)和CDK6(CDK4/6)活化。虽然用这些药剂的初始治疗可能是成功的,但是许多患者最终复发了耐药性乳腺癌。影响ER的突变已经成为产生这种耐药性的一种可能的机制。例如参见Robinson et al., “Activating ESR1 mutations in hormone-resistant metastatic breast cancer,” Nat Genet. 45: 1446-51 (2013)。在来自接受至少一次内分泌治疗的患者的转移性ER阳性乳腺肿瘤样本中,有20-40%发现了在ER的配体结合结构域(LBD)中的突变。参见Jeselson, et al., “ESR1 mutations—a mechanism for acquired endocrine resistance in breast cancer,” Nat. Rev. Clin. Oncol., 12:573-83 (2015)。

[0010] 因此,仍然需要更持久和有效的ER靶向治疗来克服与目前内分泌治疗相关的一些挑战并对抗CDK4/6耐药性的发展。

## 发明内容

[0011] 在一个方面,本发明涉及抑制和降解受试者中CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症的方法,包括给药于所述受试者治疗有效量的依拉司群或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0012] 本发明的这个方面的实施方式可以包括一个或多个以下可选特征。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利(palbociclib)、利波西利(ribociclib)、阿贝西利(abemaciclib)或其组合具有耐药性。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利具有耐药性。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对利波西利具有耐药性。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对阿贝西利具有耐药性。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症包含选自D538G、Y537X<sub>1</sub>、L536X<sub>2</sub>、P535H、V534E、S463P、V392I、E380Q及其组合组成的组中的一个或多个突变,其中:X<sub>1</sub>为S、N或C;且X<sub>2</sub>为R或Q。在一些实施方式中,所述突变为Y537S。在一些实施方式中,所述突变为D538G。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对选自抗雌激素药、芳香化酶抑制剂及其组合组成的组中的药物具有耐药性。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌和垂体癌组成的组中。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症是晚期或转移性乳腺癌。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症是乳腺癌。在一些实施方式中,所述受试者是绝经后女性。在一些实施方式中,所述受试者是绝经前女性。在一些实施方式中,所述受试者是在进行过选择性雌激素受体调节剂(SERM)和/或芳香化酶抑制剂(AI)的在先治疗之后病情复发或进展的绝经后女性。在一些实施方式中,所述依拉司群以约200mg/天至约500mg/天的剂量给药于所述受试者。在一些实施方式中,所述依拉司群以约200mg/天、约300mg/天、约400mg/天或约500mg/天的剂量给药于所述受试者。在一些实施

方式中,所述依拉司群以所述受试者的最大耐受剂量的剂量给药于受试者。在一些实施方式中,所述方法还包括通过测定选自ABL1、AKT1、AKT2、ALK、APC、AR、ARID1A、ASXL1、ATM、AURKA、BAP、BAP1、BCL2L11、BCR、BRAF、BRCA1、BRCA2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CDH1、CDK4、CDK6、CDK8、CDKN1A、CDKN1B、CDKN2A、CDKN2B、CEBPA、CTNNB1、DDR2、DNMT3A、E2F3、EGFR、EML4、EPHB2、ERBB2、ERBB3、ESR1、EWSR1、FBXW7、FGF4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FLT3、FRS2、HIF1A、HRAS、IDH1、IDH2、IGF1R、JAK2、KDM6A、KDR、KIF5B、KIT、KRAS、LRP1B、MAP2K1、MAP2K4、MCL1、MDM2、MDM4、MET、MGMT、MLL、MPL、MSH6、MTOR、MYC、NF1、NF2、NKX2-1、NOTCH1、NPM、NRAS、PDGFRA、PIK3CA、PIK3R1、PML、PTEN、PTPRD、RARA、RB1、RET、RICTOR、ROS1、RPTOR、RUNX1、SMAD4、SMARCA4、SOX2、STK11、TET2、TP53、TSC1、TSC2和VHL组成的组中的一个或多个基因的高表达以确认所述治疗的受试者。在一些实施方式中,所述一种或多种基因选自AKT1、AKT2、BRAF、CDK4、CDK6、PIK3CA、PIK3R1和MTOR。在一些实施方式中,在给药后的所述肿瘤中的依拉司群或其盐或溶剂化物的浓度与血浆中的依拉司群或其盐或溶剂化物的浓度的比例(T/P)至少约为15。

[0013] 在另一方面,本发明涉及治疗具有野生型雌激素受体 $\alpha$ 和/或突变雌激素受体 $\alpha$ 的受试者中CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症的方法,所述方法包括给药于所述受试者治疗有效量的依拉司群或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中所述突变雌激素受体 $\alpha$ 包含选自D538G、Y537X<sub>1</sub>、L536X<sub>2</sub>、P535H、V534E、S463P、V392I、E380Q及其组合组成的组中的一个或多个突变,其中:X<sub>1</sub>为S、N或C;且X<sub>2</sub>为R或Q。

[0014] 本发明的这个方面的实施方式可以包括一个或多个以下可选特征。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利、利波西利、阿贝西利或其组合具有耐药性。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利具有耐药性。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对利波西利具有耐药性。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对阿贝西利具有耐药性。在一些实施方式中,所述癌症对选自抗雌激素药、芳香化酶抑制剂及其组合组成的组中的药物具有耐药性。在一些实施方式中,所述抗雌激素药选自他莫昔芬、托瑞米芬和氟维司群组成的组中,所述芳香化酶抑制剂选自依西美坦、来曲唑和阿那曲唑组成的组中。在一些实施方式中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ -阳性癌症选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌和垂体癌组成的组中。在一些实施方式中,所述癌症是晚期或转移性乳腺癌。在一些实施方式中,所述癌症是乳腺癌。在一些实施方式中,所述受试者是绝经后女性。在一些实施方式中,所述受试者是绝经前女性。在一些实施方式中,所述受试者是在进行过SERM和/或AI的在先治疗之后病情复发或进展的绝经后女性。在一些实施方式中,所述受试者表达选自D538G、Y537S、Y537N、Y537C、E380Q、S463P、L536R、L536Q、P535H、V392I和V534E组成的组中的至少一种突变雌激素受体 $\alpha$ 。在一些实施方式中,所述突变包括Y537S。在一些实施方式中,所述突变包括D538G。在一些实施方式中,所述方法还包括通过测定选自ABL1、AKT1、AKT2、ALK、APC、AR、ARID1A、ASXL1、ATM、AURKA、BAP、BAP1、BCL2L11、BCR、BRAF、BRCA1、BRCA2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CDH1、CDK4、CDK6、CDK8、CDKN1A、CDKN1B、CDKN2A、CDKN2B、CEBPA、CTNNB1、DDR2、DNMT3A、E2F3、EGFR、EML4、EPHB2、ERBB2、ERBB3、ESR1、EWSR1、FBXW7、FGF4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FLT3、FRS2、HIF1A、HRAS、IDH1、IDH2、IGF1R、JAK2、KDM6A、KDR、KIF5B、KIT、KRAS、LRP1B、MAP2K1、MAP2K4、MCL1、MDM2、MDM4、MET、

MGMT、MLL、MPL、MSH6、MTOR、MYC、NF1、NF2、NKX2-1、NOTCH1、NPM、NRAS、PDGFRA、PIK3CA、PIK3R1、PML、PTEN、PTPRD、RARA、RB1、RET、RICTOR、ROS1、RPTOR、RUNX1、SMAD4、SMARCA4、SOX2、STK11、TET2、TP53、TSC1、TSC2和VHL组成的组中的一个或多个基因的高表达以确认所述治疗的受试者。在一些实施方式中,所述一种或多种基因选自AKT1、AKT2、BRAF、CDK4、CDK6、PIK3CA、PIK3R1和MTOR。在一些实施方式中,所述依拉司群以约200至约500mg/天的剂量给药于所述受试者。在一些实施方式中,所述依拉司群以约200mg/天、约300mg/天、约400mg/天或约500mg/天的剂量给药于所述受试者。在一些实施方式中,所述依拉司群以约300mg/天的剂量给药于所述受试者。在一些实施方式中,在给药后的所述肿瘤中的依拉司群或其盐或溶剂化物的浓度与血浆中的依拉司群或其盐或溶剂化物的浓度的比例(T/P)至少约为15。

[0015] 除非另有定义,本发明所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。本发明描述了用于本发明的方法和材料;也可使用本领域已知的其它合适的方法和材料。材料、方法和实施例仅是说明性的,而不是限制性的。本文提及的所有出版物、专利申请、专利、序列、数据库条目和其它参考文献均通过引用整体并入本文。在冲突的情况下,以本说明书,包括定义为准。

[0016] 本发明的其它特征和优点将从以下的详细描述和附图以及权利要求中体现。

## 附图说明

[0017] 以下附图是作为示例提供的,而不是要限制所要求保护的本发明的范围。

[0018] 图1A对于哌柏西利敏感(palbo<sup>S</sup>)和哌柏西利耐药(palbo<sup>R</sup>)的细胞系,图中示出了ESR1:野生型LTED细胞系中对于哌柏西利耐药性的产生。

[0019] 图1B对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:野生型细胞系绘制相对于Log[哌柏西利( $\mu$ M)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。

[0020] 图1C提供了对照以及用哌柏西利(500nM)处理后的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:野生型细胞系的集落形成试验图。

[0021] 图1D示出了具有ESR1:野生型基因的LTED、LTED+palbo、LTED-palbo<sup>R</sup>和LTED-palbo<sup>R</sup>+palbo模型的蛋白质印迹图。

[0022] 图2A对于哌柏西利敏感(palbo<sup>S</sup>)和哌柏西利耐药(palbo<sup>R</sup>)的细胞系,图中示出了ESR1:D538G LTED细胞系中对于哌柏西利耐药性的产生。

[0023] 图2B对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:D538G细胞系绘制相对于Log[哌柏西利( $\mu$ M)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。

[0024] 图2C提供了对照以及用哌柏西利(500nM)处理后的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:

[0025] D538G细胞系的集落形成试验图。

[0026] 图2D示出了具有ESR1:D538G突变的LTED、LTED+palbo、LTED-palbo<sup>R</sup>和LTED-palbo<sup>R</sup>+palbo模型的蛋白质印迹图。

[0027] 图3A对于哌柏西利敏感(palbo<sup>S</sup>)和哌柏西利耐药(palbo<sup>R</sup>)的细胞系,图中示出了ESR1:Y537S LTED细胞系中对哌柏西利耐药性的产生。

[0028] 图3B对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:Y537S细胞系绘制相对于Log[哌柏西利( $\mu$ M)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。

- [0029] 图3C提供了对照以及用哌柏西利 (500nM) 处理后的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:
- [0030] Y537S细胞系的集落形成试验图。
- [0031] 图3D示出了具有ESR1:Y537S突变的LTED、LTED+palbo、LTED-palbo<sup>R</sup>和LTED-palbo<sup>R</sup>+palbo模型的蛋白质印迹图。
- [0032] 图4A对于利波西利敏感(ribo<sup>S</sup>)和利波西利耐药(ribo<sup>R</sup>)的细胞系,图中示出了ESR1:野生型LTED细胞对利波西利耐药性的产生。
- [0033] 图4B对于阿贝西利敏感(abema<sup>S</sup>)和阿贝西利耐药(abema<sup>R</sup>)的细胞系,图中示出了ESR1:野生型LTED细胞系对阿贝西利耐药性的产生。
- [0034] 图4C对ribo<sup>S</sup>和ribo<sup>R</sup>的ESR1:野生型细胞系绘制相对于Log[利波西利(μM)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。
- [0035] 图4D提供了对照以及用利波西利(500nM)处理后的ribo<sup>S</sup>和ribo<sup>R</sup>的ESR1:野生型细胞系的集落形成试验图。
- [0036] 图4E对abema<sup>S</sup>和abma<sup>R</sup>的ESR1:野生型细胞系绘制相对于Log[阿贝西利(μM)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。
- [0037] 图4F提供了对照以及用阿贝西利(500nM)处理后的abema<sup>S</sup>和abema<sup>R</sup>的ESR1:
- [0038] 野生型细胞系的集落形成试验图。
- [0039] 图5A对于利波西利敏感(ribo<sup>S</sup>)和对利波西利耐药(ribo<sup>R</sup>)的细胞系,图中示出了ESR1:D538G LTED细胞系对利波西利耐药性的产生。
- [0040] 图5B对阿贝西利耐药性的产生将ESR1:D538G LTED细胞系划分为对阿贝西利敏感(abema<sup>S</sup>)和对阿贝西利耐药(abema<sup>R</sup>)的细胞系。
- [0041] 图5C对ribo<sup>S</sup>和ribo<sup>R</sup>的ESR1:D538G细胞系绘制相对于Log[利波西利(μM)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。
- [0042] 图5D提供了对照以及用利波西利(500nM)处理后的ribo<sup>S</sup>和ribo<sup>R</sup>的ESR1:
- [0043] D538G细胞系的集落形成试验图。
- [0044] 图5E对abema<sup>S</sup>和abema<sup>R</sup>的ESR1:D538G细胞系绘制相对于Log[阿贝西利(μM)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。
- [0045] 图5F提供了对照以及用阿贝西利(500nM)处理后的abema<sup>S</sup>和abema<sup>R</sup>的ESR1:D538G细胞系的集落形成试验图。
- [0046] 图6A对于利波西利敏感(ribo<sup>S</sup>)和利波西利耐药(ribo<sup>R</sup>)的细胞系,图中示出了ESR1:Y537S LTED细胞系对利波西利耐药性的产生。
- [0047] 图6B对于阿贝西利敏感(abema<sup>S</sup>)和阿贝西利耐药(abema<sup>R</sup>)的细胞系,图中示出了ESR1:Y537S LTED细胞系对阿贝西利耐药性的产生。
- [0048] 图6C对ribo<sup>S</sup>和ribo<sup>R</sup>的ESR1:Y537S细胞系绘制相对于Log[利波西利(μM)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。
- [0049] 图6D提供了对照以及用利波西利(500nM)处理后的ribo<sup>S</sup>和ribo<sup>R</sup>的ESR1:
- [0050] Y537S细胞系的集落形成试验图。
- [0051] 图6E对abema<sup>S</sup>和abema<sup>R</sup>的ESR1:Y537S细胞系绘制相对于Log[阿贝西利(μM)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。
- [0052] 图6F提供了对照以及用阿贝西利(500nM)处理后的abema<sup>S</sup>和abema<sup>R</sup>的ESR1:Y537S

细胞系的集落形成试验图。

[0053] 图7A提供 $EC_{50}$  (nM) 值, 并对ESR1:野生型CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:野生型哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:野生型利波西利<sup>R</sup>和ESR1:野生型阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系绘制相对于Log[依拉司群 (nM)]的生长抑制百分比曲线图。

[0054] 图7B提供 $EC_{50}$  (nM) 值, 并对ESR1:D538G CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:

[0055] D538G哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:D538G利波西利<sup>R</sup>和ESR1:D538G阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系绘制相对于Log[依拉司群 (nM)]的生长抑制百分比曲线图。

[0056] 图7C提供 $EC_{50}$  (nM) 值, 并对ESR1:Y537S CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:Y537S哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:Y537S利波西利<sup>R</sup>和ESR1:Y537S阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系绘制相对于Log[依拉司群 (nM)]的生长抑制百分比曲线图。

[0057] 图8A顶行中的集落形成试验图显示了对照组ESR1:野生型CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:野生型哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:野生型利波西利<sup>R</sup>和ESR1:野生型阿贝西利<sup>R</sup>细胞系的生长, 而底行的图片显示了ESR1:野生型CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:野生型哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:野生型利波西利<sup>R</sup>和ESR1:野生型阿贝西利<sup>R</sup>细胞系用依拉司群 (300nM) 处理后的细胞生长。

[0058] 图8B顶行中的集落形成试验图显示了对照组ESR1:D538G CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:D538G哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:D538G利波西利<sup>R</sup>和ESR1:D538G阿贝西利<sup>R</sup>细胞系的生长, 而底行的图片显示了ESR1:D538G CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:

[0059] D538G哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:D538G利波西利<sup>R</sup>和ESR1:D538G阿贝西利<sup>R</sup>细胞系用依拉司群 (300nM) 处理后的细胞生长。

[0060] 图8C顶行中的集落形成试验图显示了对照组ESR1:Y537S CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:Y537S哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:Y537A利波西利<sup>R</sup>和ESR1:Y537S阿贝西利<sup>R</sup>细胞系的生长, 而底行的图片显示了ESR1:Y537S CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:

[0061] Y537S哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:Y537S利波西利<sup>R</sup>和ESR1:Y537S阿贝西利<sup>R</sup>细胞系用依拉司群 (300nM) 处理后的细胞生长。

[0062] 图9A在用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 处理的, 植入了具有ESR1:D538G突变的WHIM43-HIPDX异种移植物的无胸腺裸鼠中随时间推移的平均肿瘤体积。

[0063] 图9B在具有ESR1:D538G突变的WHIM43-HIPDX异种移植模型中, 通过对比ER $\alpha$ /黏着斑蛋白 (相对于对照标准化) 确定对采用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 处理的ER $\alpha$ 蛋白水平的定量。

[0064] 图9C在具有ESR1:D538G突变的WHIM43-HIPDX异种移植模型中, 通过对比E2F1/黏着斑蛋白 (相对于对照标准化) 确定采用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 处理的E2F1蛋白水平的定量。

[0065] 图9D在具有ESR1:D538G突变的WHIM43-HIPDX异种移植模型中, 通过对比CCNE1/黏着斑蛋白 (相对于对照标准化) 确定采用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 处理的CCNE1蛋白水平的定量。

[0066] 图9E在具有ESR1:D538G突变的WHIM43-HIPDX异种移植模型中, 通过对比倍数变化 (相对于对照标准化) 确定用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 处理的对PgRNA水平的定量。



[0067] 图9F示出了在具有ESR1:D538G突变的WHIM43-HIPDX异种移植模型中用载体对照、哌柏西利、氟维司群(3mg/剂)和依拉司群(30和60mg/kg)处理的蛋白印迹图。

[0068] 图10A在具有ESR1:野生型突变的肿瘤细胞模型中,通过对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的PgR mRNA水平(相对于对照标准化)对比确定孕酮受体(PgR)的定量。

[0069] 图10B在具有ESR1:野生型突变的肿瘤细胞模型中,通过对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的TFF1 mRNA水平(相对于对照标准化)对比确定三叶因子1(TFF1)的定量。

[0070] 图10C在具有ESR1:野生型突变的肿瘤细胞模型中,通过对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的GREB1 mRNA水平(相对于对照标准化)对比确定雌激素调节的生长(GREB1)的定量。

[0071] 图11A在具有ESR1:D538G突变的肿瘤细胞模型中,通过对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的PgR mRNA水平(标准化为对照)对比确定孕酮受体(PgR)的定量。

[0072] 图11B在具有ESR1:D538G突变的肿瘤细胞模型中,通过对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的TFF1 mRNA水平(标准化为对照)对比确定三叶因子1(TFF1)的定量。

[0073] 图11C在具有ESR1:D538G突变的肿瘤细胞模型中,通过对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的GREB1 mRNA水平(标准化为对照)对比确定雌激素调节的生长(GREB1)的定量。

[0074] 图12A在具有ESR1:Y537S突变的肿瘤细胞模型中,通过对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的PgR mRNA水平(标准化为对照)对比确定孕酮受体(PgR)的定量。

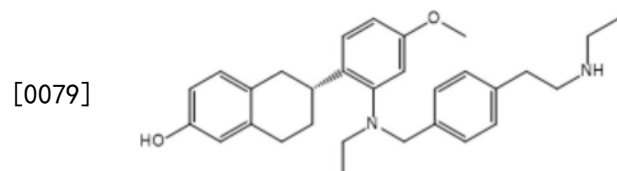
[0075] 图12B在具有ESR1:Y537S突变的肿瘤细胞模型中,通过用对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的TFF1 mRNA水平(标准化为对照)对比确定三叶因子1(TFF1)的定量。

[0076] 图12C在具有ESR1:Y537S突变的肿瘤细胞模型中,通过对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系处理的GREB1 mRNA水平(标准化至对照)对比确定雌激素调节的生长(GREB1)的定量。

[0077] 图13相对于治疗天数的ST941-HIPDX异种移植模型(未经过治疗的, treatment-naïve)的肿瘤体积图,其中该模型之前曾采用载体治疗或氟维司群和哌柏西利的联合治疗(氟维司群3mg/剂数据来自单独的研究)。然后将来自氟维司群和哌柏西利臂的肿瘤重新植入另一项研究中(经哌柏西利处理的ST941-HI;第一次传代),随后用载体、氟维司群(3mg/剂)、哌柏西利(25mg/kg)和依拉司群(30mg/kg)治疗,以证明依拉司群在先前用氟维司群和哌柏西利联合治疗过的PDX模型中仍有效抑制肿瘤生长。

## 具体实施方式

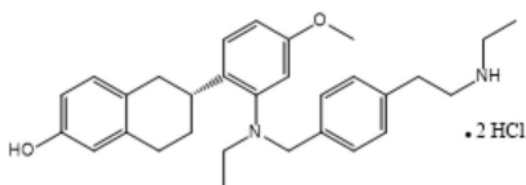
[0078] 如本发明所用,依拉司群或“RAD1901”是口服生物可利用的选择性雌激素受体降解剂(SERD)并具有以下化学结构:



[0080] 依拉司群

[0081] 包括其盐、溶剂化物(例如水合物)和前体药物(prodrugs)。临床前数据已经证明,依拉司群在具有野生型和突变型ESR1的ER+乳腺癌模型中有效抑制肿瘤生长。在本发明所述的一些实施方式中,将依拉司群以具有以下化学结构的二盐酸( $\cdot 2\text{HCl}$ )盐(bis hydrochloride( $\cdot 2\text{HCl}$ ) salt)形式给药:

[0082]



[0083] 盐酸依拉司群(elacestrant dihydrochloride)

[0084] 在绝经后女性中,目前治疗ER+癌症如乳腺癌的标准包括通过以下方式抑制ER通路:1)抑制雌激素的合成(芳香化酶抑制剂(AI));2)直接结合ER并使用SERM(例如他莫昔芬)调节其活性;和/或3)直接结合ER并使用SERD(例如氟维司群)引起受体降解。在绝经前女性中,目前的治疗标准还包括通过卵巢切除术或促黄体激素释放激素(LHRH)激动剂的卵巢抑制。在内分泌剂中加入细胞周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂在某些情况下已显示大体上加倍了无进展生存(Progression Free Survival,PFS),其中这些类型的结果已导致批准并使用某些CDK4/6抑制剂与任一种AI在第一线转移性情况(the first-line metastatic setting)中进行联合治疗或与氟维司群在第二线转移性情况(the second-line metastatic setting)中进行联合治疗。显示ESR1突变并对AI和/或CDK4/6抑制剂产生耐药性的趋势的数据突出了对新的和改良的口服生物可利用的对野生型ESR1和所有ESR1突变具有疗效的内分泌治疗的需要。

[0085] 将细胞周期蛋白依赖性激酶4/6(CDK4/6)抑制剂加入内分泌药剂中使无进展生存(PFS)大体上加倍,这导致批准并使用某些CDK4/6抑制剂与第一线转移性情况中的任一种AI进行联合治疗或与氟维司群组合在第一线或第二线转移性情况中进行联合治疗。在本发明所述的方法中,依拉司群无论在有在先治疗史的或是ESR1突变情况下,均显示出诱导CDK4/6抑制剂耐药性癌细胞系的剂量依赖性长期生长抑制。依拉司群(30mg/kg)在体内PDX模型中也证实了对在先用哌柏西利治疗(>100天)和/或从头对哌柏西利有耐药性的肿瘤具有生长抑制。此外,在几种证明了CDK4/6抑制剂耐药性的几种分子标记的CDK4/6抑制剂耐药性模型中,依拉司群证明了体外和体内生长抑制活性,例如但不限于Rb缺失、细胞周期蛋白E1的过表达、E2F1的过表达、细胞周期蛋白D1的过表达和CDK6的过表达。

[0086] 依拉司群(30mg/kg)已在WHIM43-HIPDX模型(哌柏西利-耐药/Rb缺失)中显示出能够降解ER、降低E2F1表达以及降低细胞周期蛋白E1表达。CDK4/6抑制剂耐药性的表征证明,在这些耐药性细胞系中,ER、ER信号传导,以及重要的是,ER驱动的增殖得以保留。因此,本发明的研究表明有效使用依拉司群治疗具有各种类型ESR1突变的CDK4/6抑制剂耐药性癌症是前途无量的发现。

[0087] 定义

[0088] 除非另有说明,否则如本发明所用的术语将适用下列定义。

[0089] 如本发明所用,术语“RAD1901”和“依拉司群”是指相同的化合物,并且可互换使用。

[0090] 本发明所用的ER $\alpha$ 阳性肿瘤的“抑制生长”可以指减缓肿瘤生长速率,或完全停止肿瘤生长。[0091] 本发明所用ER $\alpha$ 阳性肿瘤的“肿瘤消退”或“消退”可指减小肿瘤的最大尺寸。在某些实施方式中,施用如本文所述的联合药物或其溶剂化物(例如水合物)或盐可导致肿瘤尺寸相对于基线(即,在治疗开始之前的尺寸)减小,或甚至根除或部分根除肿瘤。因此,在某

些实施方式中,本文提供的肿瘤消退方法可以以此特征被视为相对于基线减小肿瘤大小的方法。

[0092] 如本发明所用,“肿瘤”是恶性肿瘤,并且与“癌症”互换使用。

[0093] 本发明所用的“雌激素受体 $\alpha$ ”或“ER $\alpha$ ”指由基因ESR1编码的包含野生型ER $\alpha$ 氨基酸序列、由其组成或基本上由其组成的多肽。

[0094] 本发明所用的“雌激素受体 $\alpha$ 阳性”、“ER+”或“ER $\alpha$ ”的肿瘤是指其中一个或多个细胞表达至少一种ER $\alpha$ 同种型的肿瘤。

[0095] 治疗方法

[0096] 在一些实施方式中,本发明涉及抑制和降解受试者中CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症的方法,包括对受试者给药治疗有效量的依拉司群或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0097] 在其它实施方式中,本发明涉及治疗具有野生型雌激素受体 $\alpha$ 和/或突变雌激素受体 $\alpha$ 的受试者中CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症的方法,所述方法包括给药予所述受试者治疗有效量的依拉司群或其药学上可接受的盐或溶剂化物,其中所述突变雌激素受体 $\alpha$ 包含选自D538G、Y537X<sub>1</sub>、L536X<sub>2</sub>、P535H、V534E、S463P、V392I、E380Q及其组合组成的组中的一个或多个突变,其中:X<sub>1</sub>为S、N或C;且X<sub>2</sub>为R或Q。

[0098] 依拉司群的给药

[0099] 当对受试者给药时,依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐对一种或多种癌症或肿瘤具有治疗效果。肿瘤生长抑制或消退可能局限于单个肿瘤或特定组织或器官内的一组肿瘤,也可能是全身性的(即,影响所有组织或器官中的肿瘤)。

[0100] 由于已知依拉司群相对于雌激素受体 $\beta$  (ER $\beta$ ) 优先结合ER $\alpha$ ,除非另有说明,雌激素受体、雌激素受体 $\alpha$ 、ER $\alpha$ 、ER和野生型ER $\alpha$ 在本发明中可互换使用。在某些实施方式中,ER+细胞过表达ER $\alpha$ 。在某些实施方式中,患者具有在肿瘤内表达一种或多种形式的ER $\beta$ 的一种或多种细胞。在某些实施方式中,ER $\alpha$ 阳性肿瘤和/或癌症与乳腺癌、子宫癌、卵巢癌或垂体癌有关。在这些实施方式中的某些中,患者具有位于乳腺、子宫、卵巢或垂体组织中的肿瘤。在患者具有位于乳腺中的肿瘤的那些实施方式中,该肿瘤可以与是或可以不是HER2阳性的管腔乳腺癌相关,并且对于HER2+肿瘤,该肿瘤可以高表达或低表达HER2。在其它实施方式中,患者具有位于另一组织或器官(例如骨骼、肌肉、脑)中的肿瘤,但是仍然与乳腺癌、子宫癌、卵巢癌或垂体癌(例如源自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌或垂体癌的迁移或转移所引起的肿瘤)相关。因此,在本发明提供的肿瘤生长抑制或肿瘤消退方法的某些实施方式中,被靶向的肿瘤是转移性肿瘤和/或在其他器官(例如,骨骼和/或肌肉)中具有ER过表达的肿瘤。在某些实施方式中,被靶向的肿瘤是脑肿瘤和/或脑癌。在某些实施方式中,相比于其他治疗而言,被靶向的肿瘤对依拉司群的治疗更敏感,所述其他治疗采用另一种SERD(例如氟维司群、TAS-108(SR16234)、ZK191703、RU58668、GDC-0810(ARN-810)、GW5638/DPC974、SRN-927和AZD9496)、Her2抑制剂(例如曲妥单抗(trastuzumab)、拉帕替尼(lapatinib)、ado-曲妥珠单抗(ado-trastuzumab emtansine)和/或帕妥珠单抗(pertuzumab))、化疗药物(例如白蛋白结合型紫杉醇(abraxane)、阿霉素(adriamycin)、卡铂(carboplatin)、环磷酰胺(cytosan)、道诺霉素(daunorubicin)、盐酸阿霉素脂质体(doxil)、表阿霉素(ellence)、氟尿嘧啶(flourouracil)、健择(gemzar)、赫拉文(helaven)、伊沙匹隆(lxempra)、甲氨蝶呤

(methotrexate)、丝裂霉素(mitomycin)、米考酮(micoxantrone)、去甲长春碱(navelbine)、紫杉醇(raxol)、泰素帝(taxotere)、噻替派(thiotepa)、长春新碱(vincristine)和希罗达(xeloda))、芳香化酶抑制剂(例如阿那曲唑、依西美坦和曲唑)、选择性雌激素受体调节剂(例如他莫昔芬、雷洛昔芬、拉索昔芬和/或托瑞米芬)、血管生成抑制剂(例如贝伐单抗(bevacizumab))和/或利妥昔单抗(rituximab)进行。

[0101] 除了证明依拉司群抑制表达野生型ER $\alpha$ 的肿瘤中肿瘤生长的能力之外,依拉司群还表现出抑制表达突变形式ER $\alpha$ 肿瘤生长的能力,即Y537S ER $\alpha$ 。ER $\alpha$ 突变实例的计算机建模评估显示,这些突变中没有一个被预期会影响LBD或特异性地阻碍依拉司群结合,例如具有一个或多个选自具有Y537X(其中X是S、N或C)突变的ER $\alpha$ 、具有D538G突变的ER $\alpha$ 和S463P突变的ER $\alpha$ 组成的组中的ER $\alpha$ 。基于这些结果,本发明提供了通过给予癌症患者以治疗有效量的依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐,以抑制在配体结合结构域(LBD)内具有一个或多个突变的ER $\alpha$ 阳性肿瘤生长或使其产生消退的方法,所述突变选自其中X<sub>1</sub>是S、N或C的Y537X<sub>1</sub>、D538G、其中X<sub>2</sub>是R或Q的L536X<sub>2</sub>、P535H、V534E、S463P、V392I、E380Q,特别是Y537S ER $\alpha$ 组成的组中。本发明所用的“突变ER $\alpha$ ”指包含一个或多个替换或缺失及其变体的ER $\alpha$ ,其包含与ER $\alpha$ 的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%同一性的氨基酸序列,其由该氨基酸序列组成,或基本上由该氨基酸序列组成。

[0102] 除了在动物异种移植模型中抑制乳腺癌肿瘤生长外,依拉司群在肿瘤细胞中显示出显著的积累,并能够穿透血脑屏障。通过依拉司群给药显著延长脑转移瘤异种移植模型的存活,证实了其穿透血脑屏障的能力。因此,在本文提供的肿瘤生长抑制或肿瘤消退方法的某些实施方式中,被靶向的ER $\alpha$ 阳性肿瘤位于脑中或中枢神经系统中的其它位置。在这些实施方式中的某些中,ER $\alpha$ 阳性肿瘤主要与脑癌有关。在其它实施方式中,ER $\alpha$ 阳性肿瘤是转移性肿瘤,其主要与另一类型的癌症有关,例如乳腺癌、子宫癌、卵巢癌或垂体癌,或从另一组织或器官迁移的肿瘤。在这些实施方式中的某些中,肿瘤是脑转移瘤,例如乳腺癌脑转移瘤(BCBM)。在本发明公开的方法的某些实施方式中,依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐在靶标肿瘤内的一个或多个细胞中积累。

[0103] 在本发明公开的方法的某些实施方式中,依拉司群或其溶剂化物(例如,水合物)或盐优选以约15或更高、约18或更高、约19或更高、约20或更高、约25或更高、约28或更高、约30或更高、约33或更高、约35或更高、或约40或更高的T/P比(肿瘤中依拉司群浓度/血浆中依拉司群浓度)在肿瘤中积累。

#### [0104] 剂量

[0105] 用于本发明的方法的依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐的组合的治疗有效量是当在特定时间间隔内给药时导致实现一个或多个治疗基准(例如减缓或停止肿瘤生长,导致肿瘤消退、症状停止等)的量。用于本发明方法的组合可以一次或多次给药于受试者。在其中化合物被多次给药的那些实施方式中,它们可以以设定的间隔施用,例如每天、每隔一天、每周或每月。或者,它们可以以不规则的间隔给药,例如基于症状、患者健康情况等根据需要给药。治疗有效量的组合可以每天一次给药(q.d.),连续给药1天、至少2天、至少3天、至少4天、至少5天、至少6天、至少7天、至少10天或至少15天。任选地,在治疗期间或之后检测癌症的状态或肿瘤的消退,例如通过受试者的FES-PET扫描进行监测。根据癌症的

状态或检测到的肿瘤的消退,可以增加或减少向受试者施用的组合的剂量。

[0106] 理想的情况下,治疗有效量不超过使50%或更多的治疗对象经历恶心或其它阻止进一步给药的毒副反应的最大耐受剂量。对受试者的治疗有效量可根据各种因素而变化,包括症状的种类和程度、性别、年龄、体重或受试者的一般健康状况、给药方式和盐或溶剂化物类型、对药物的敏感性的变化、疾病的具体类型等。

[0107] 用于本发明公开的方法的治疗有效量的依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐的剂量实例包括但不限于,对于具有耐药性ER驱动的肿瘤或癌症的受试者,每天约150至约1,500mg、约200至约1,500mg、约250至约1,500mg或约300至约1,500mg;对于同时患有野生型ER驱动的肿瘤和/或癌症以及耐药肿瘤和/或癌症的受试者,每天约150至约1,500mg、约200至约1,000mg或约250至约1,000mg或约300至约1,000mg;以及对于主要具有野生型ER驱动的肿瘤和/或癌症的受试者,每天约300至约500mg、约300至约550mg、约300至约600mg、约250至约500mg、约250至约550mg、约250至约600mg、约200至约500mg、约200至约550mg、约200至约600mg、约150至约500mg、约150至约550mg、或约150至约600mg。在某些实施方式中,本发明提供的方法中,式I化合物(例如,依拉司群)或其盐或溶剂化物对成年受试者的剂量通常为每天口服约200mg、400mg、30mg至2,000mg、100mg至1,500mg或150mg至1,500mg。每日剂量可以通过单次给药或多次给药来实现。

[0108] 依拉司群用于治疗包括具有耐药性和表达突变受体的乳腺癌的剂量在每天100mg至1,000mg的范围内。例如,可以每天给药依拉司群100、200、300、400、500、600、700、800、900或1,000mg。特别是每天200mg、400mg、500mg、600mg、800mg和1,000mg。在口服(PO)给药后依拉司群在人体中的惊人的长半衰期使得这种选择特别可行。因此,所述药物可以按200mg BID(每天400mg)、250mg BID(每天500mg)、300mg BID(每天600mg)、400mg BID(每天800mg)或500mg BID(每天1,000mg)给药。在一些实施方式中,给药方式是口服。

[0109] 在本发明公开的方法的某些实施方式中,依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐优选以约15或更高、约18或更高、约19或更高、约20或更高、约25或更高、约28或更高、约30或更高、约33或更高、约35或更高、或约40或更高的T/P比(肿瘤中依拉司群浓度/血浆中依拉司群浓度)在肿瘤中累积。

[0110] 依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐可以一次或分多次给药于受试者。在那些化合物被多次给药的实施方式中,药物可以以设定的间隔给药,例如每天、每隔一天、每周或每月。或者,药物可以以不规则的间隔给药,例如基于症状、患者健康等根据需要给药。

#### [0111] 制剂

[0112] 在一些实施方式中,依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐作为单一制剂的一部分给药。例如,将依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐配制在用于口服给药的单个丸剂中或用于注射的单次量中。在某些实施方式中,以单一制剂给予化合物改善了患者的依从性。

[0113] 在一些实施方式中,包含依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐的制剂可进一步包含一种或多种药物赋形剂、载体、佐剂和/或防腐剂。

[0114] 用于本发明公开的方法的依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐可被配制成单位剂型,其指适于作为接受治疗的受试者的单位剂量的物理上离散的单位,其中每个单位含有经计算可产生预期的治疗效果的预定量的活性物质,任选地与合适的药物载体组

合。单位剂型可以是单次日剂量或多次日剂量中的一种(例如,每日约1至4次或更多次)。当使用多次日剂量时,单位剂型对于每次剂量可以是相同的或不同的。在某些实施方式中,所述化合物可以被配制成控释制剂(controlled release)。

[0115] 用于本发明公开的方法的依拉司群或溶剂化物(例如水合物)或其盐和盐或溶剂化物可根据任何可用的常规方法配制。优选的剂型实例包括片剂、粉末、精细颗粒、包衣片剂、胶囊、糖浆、锭剂、吸入剂、栓剂、注射剂、软膏、眼用软膏、滴眼剂、滴鼻剂、滴耳剂、糊剂、洗剂等。在制剂中,可以使用通常使用的添加剂,例如稀释剂、粘合剂、崩解剂、润滑剂、着色剂、调味剂,以及如果需要,可以使用稳定剂、乳化剂、吸收促进剂、表面活性剂、pH调节剂、防腐剂、抗氧化剂等。另外,也可以按照常规方法将通常用作药物制剂原料的组合物混合进行配制。这些组合物的实例包括,例如,(1)油如大豆油、牛油和合成甘油酯;(2)烃,例如液体石蜡、角鲨烷和固体石蜡;(3)酯油,如辛基十二烷基肉豆蔻酸(octyldodecyl myristic acid)和异丙基肉豆蔻酸(isopropyl myristic acid);(4)高级醇,例如十六醇十八醇混合物(cetostearyl alcohol)和二十二醇(behenyl alcohol);(5)硅树脂;(6)硅油;(7)表面活性剂,例如聚氧乙烯脂肪酸酯、脱水山梨糖醇脂肪酸酯(sorbitan fatty acid ester)、甘油脂肪酸酯、聚氧乙烯脱水山梨糖醇脂肪酸酯(polyoxyethylene sorbitan fatty acid ester)、固体聚氧乙烯蓖麻油和聚氧乙烯聚氧丙烯嵌段共聚物(solid polyoxyethylene castor oil and polyoxyethylene polyoxypropylene block co-polymer);(8)水溶性高分子,例如羟乙基纤维素、聚丙烯酸、羧乙烯基聚合物(carboxyvinyl polymer)、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮和甲基纤维素;(9)低级醇,例如乙醇和异丙醇;(10)多价醇,例如甘油、丙二醇、二丙二醇和山梨醇;(11)糖,例如葡萄糖和蔗糖;(12)无机粉末如无水硅酸、硅酸铝镁和硅酸铝;(13)纯净水等。用于上述制剂的添加剂可包括,例如,1)乳糖、玉米淀粉、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、山梨醇、结晶纤维素和二氧化硅作为稀释剂;2)聚乙烯醇、聚乙烯醚、甲基纤维素、乙基纤维素、阿拉伯胶、黄芪胶、明胶、虫胶、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、聚乙烯吡咯烷酮、聚丙二醇-聚氧乙烯嵌段共聚物(polypropylene glycol-poly oxyethylene-block co-polymer)、葡甲胺、柠檬酸钙、糊精、果胶等作为粘合剂;3)淀粉、琼脂、胶粉、结晶纤维素、碳酸钙、碳酸氢钠、柠檬酸钙、糊精、果胶、羧甲基纤维素/钙等作为崩解剂;4)硬脂酸镁、滑石粉、聚乙二醇、二氧化硅、浓缩植物油等作为润滑剂;5)其加入是药学上可接受的任何着色剂都适合作为着色剂添加;6)可可粉、薄荷脑、芳香剂、薄荷油、肉桂粉作为调味剂;以及7)其加入是药学上可接受的抗氧化剂,,例如抗坏血酸或生育酚( $\alpha$ -tphenol)。

[0116] 用于本发明公开的方法的依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐可以作为本发明所述的活性化合物中的任何一种或多种和生理学可接受的载体(也称为药学可接受的载体或溶液或稀释剂)配制成药物组合物。这些载体和溶液包括本发明方法中所用化合物的药学上可接受的盐和溶剂化物,以及包含两种或多种这些化合物、这些化合物的药学上可接受的盐和这些化合物的药学上可接受的溶剂化物的混合物。这些组合物是按照可接受的制药方法制备的,例如按照雷明顿的《药学科学》,第17版,阿方索·R·加图索编辑,马克出版公司(1985)(Remington's Pharmaceutical Sciences,17th edition,ed.Alfonso R.Gennaro,Mack Publishing Company,Eaton,Pa.(1985))中所述的方法制备,其在此通过引用并入。

[0117] 术语“药学上可接受的载体”是指在不引起被给药的患者过敏反应或其它不良反

应并且与制剂中的其它成分相容的载体。药学上可接受的载体包括,例如,根据预期的给药形式适当选择的并且与常规的药学实践一致的药物稀释剂、赋形剂或载体。例如,固体载体/稀释剂包括但不限于树胶、淀粉(例如玉米淀粉、预胶化淀粉)、糖(例如乳糖、甘露醇、蔗糖、右旋糖)、纤维索材料(例如结晶纤维素)、丙烯酸酯(例如聚丙烯酸甲酯(polymethylacrylate))、碳酸钙、氧化镁、滑石粉或其混合物。药学上可接受的载体可以进一步包含少量增加治疗剂的保存期限或有效性的辅助物质,例如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂。

[0118] 游离形式的依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐可通过常规方法转化成盐。本发明所用的术语“盐”不受限制,只要所述盐是依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐形成的并且是药理学可接受的;盐的优选实例包括氢卤酸盐(例如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐等)、无机酸盐(例如硫酸盐、硝酸盐、高氯酸盐、磷酸盐、碳酸盐、碳酸氢盐等)、有机羧酸盐(例如乙酸盐、马来酸盐、酒石酸盐、富马酸盐、柠檬酸盐等)、有机磺酸盐(例如甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、甲苯磺酸盐、樟脑磺酸盐等)、氨基酸盐(例如天冬氨酸盐、谷氨酸盐等)、季铵盐、碱金属盐(例如钠盐、钾盐等)、碱土金属盐(镁盐、钙盐等)等。此外,优选盐酸盐、硫酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐等作为本发明化合物的“药理学上可接受的盐”。

[0119] 依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐的异构体(例如几何异构体、光学异构体、旋转异构体、互变异构体等)可以使用一般的分离方法纯化为单一异构体,包括例如重结晶、光学拆分如非对映体盐法、酶分级分离法、各种色谱法(例如薄层色谱法、柱色谱法、玻璃色谱法等)。术语“单一异构体”在此不仅包括纯度为100%的异构体,而且包括含有目标物以外的通过常规纯化操作也存在的异构体。依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐和/或氟维司群有时存在结晶多晶型物,并且其所有结晶多晶型物都包括在本发明中。结晶多晶型物有时是单一的,有时是混合的,并且两者都包括在本发明中。

[0120] 在某些实施方式中,依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐可以为前体药物形式,意味着其必须经历一些改变(例如氧化或水解)以获得其活性形式。或者,依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐可以是通过将母体前药改变为其活性形式而产生的化合物。

#### [0121] 给药途径

[0122] 依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐的给药途径包括但不限于局部给药、口服给药、皮内给药、肌内给药、腹膜内给药、静脉内给药、膀胱内输注、皮下给药、经皮给药和经粘膜给药。在一些实施方式中,给药途径是口服。

#### [0123] 基因谱分析

[0124] 在某些实施方式中,本发明提供的肿瘤生长抑制或肿瘤消退的方法还进一步包括对受试者进行基因谱分析,其中待分析的基因是选自ABL1、AKT1、AKT2、ALK、APC、AR、ARID1A、ASXL1、ATM、AURKA、BAP、BAP1、BCL2L11、BCR、BRAF、BRCA1、BRCA2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CDH1、CDK4、CDK6、CDK8、CDKN1A、CDKN1B、CDKN2A、CDKN2B、CEBPA、CTNNB1、DDR2、DNMT3A、E2F3、EGFR、EML4、EPHB2、ERBB2、ERBB3、ESR1、EWSR1、FBXW7、FGF4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FLT3、FRS2、HIF1A、HRAS、IDH1、IDH2、IGF1R、JAK2、KDM6A、KDR、KIF5B、KIT、KRAS、LRP1B、MAP2K1、MAP2K4、MCL1、MDM2、MDM4、MET、MGMT、MLL、MPL、MSH6、MTOR、MYC、NF1、NF2、NKX2-1、NOTCH1、NPM、NRAS、PDGFRA、PIK3CA、PIK3R1、PML、PTEN、PTPRD、RARA、RB1、RET、RICTOR、ROS1、RPTOR、RUNX1、SMAD4、SMARCA4、SOX2、STK11、TET2、TP53、TSC1、TSC2和VHL组成

的组中的一种或多种基因。在其它实施方式中,待分析的基因是选自AKT1、AKT2、BRAF、CDK4、CDK6、PIK3CA、PIK3R1和MTOR组成的组中的一种或多种基因。

[0125] 在一些实施方式中,本发明提供了治疗乳腺癌患者亚群的方法,其中所述亚群具有一种或多种上文公开的基因的高表达,并根据本发明中描述的给药实施方式,用有效剂量的依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐治疗所述亚群。

#### [0126] 剂量调整

[0127] 除了发现依拉司群抑制肿瘤生长的能力之外,依拉司群还抑制雌二醇与子宫和垂体中的ER结合。在这些实验中,通过FES-PET成像评价雌二醇与子宫和垂体组织中ER的结合。在用依拉司群处理后,观察到的ER结合水平处于或低于背景水平。这些结果证实,依拉司群对ER活性的拮抗作用可以通过实时扫描进行评估。基于这些结果,本发明提供了通过测量雌二醇-ER在一种或多种靶组织中的结合来监测依拉司群或其溶剂化物(例如,水合物)或盐在本发明公开的联合治疗中的功效的方法,其中结合的减少或消失表示有效。

[0128] 进一步提供了基于雌二醇-ER结合调节依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐在本发明公开的联合治疗中的剂量的方法。在这些方法的某些实施方式中,在一次或多次给药第一剂量的化合物之后的某个时间点测量结合。如果雌二醇-ER结合不受影响或表现出低于预定阈值的降低(例如,结合相对于基线的降低小于5%、小于10%、小于20%、小于30%或小于50%),则认为第一剂量太低。在某些实施方式中,这些方法包括将化合物以提高了的第二剂量给药的额外步骤。这些步骤可以重复,重复增加剂量直到达到所需的雌二醇-ER结合的降低量。在某些实施方式中,这些步骤可以并入本发明提供的抑制肿瘤生长的方法中。在这些方法中,雌二醇-ER结合可以作为肿瘤生长抑制的替代模式,或作为评估生长抑制的补充手段。在其它实施方式中,这些方法可与依拉司群或其溶剂化物(例如水合物)或盐的给药一起用于除抑制肿瘤生长之外的目的,包括例如抑制癌细胞增殖。

[0129] 在某些实施方式中,在联合治疗中本发明提供的用于调节依拉司群或其盐或溶剂化物(例如水合物)的剂量的方法包括:

[0130] (1) 以第一剂量的依拉司群或其盐或溶剂化物(例如水合物)(例如,约350至约500或约200至约600mg/天)给药3、4、5、6或7天;

[0131] (2) 检测雌二醇-ER结合活性;其中:

[0132] (i) 如果ER结合活性未检出或低于预定的阈值水平,则继续用第一剂量给药(即维持该剂量水平);或

[0133] (ii) 如果ER结合活性可检出或高于预定的阈值水平,则以大于第一剂量的第二剂量(例如,第一剂量加约50至约200mg)给药3、4、5、6或7天,然后进行步骤(3);

[0134] (3) 检测雌二醇-ER结合活性;其中

[0135] (i) 如果ER结合活性未检出或低于预定的阈值水平,则继续第二剂量给药(即维持该剂量水平);或

[0136] (ii) 如果ER结合活性可检出或高于预定的阈值水平,则以大于第二剂量的第三剂量(例如,第二剂量加约50至约200mg)给药3、4、5、6或7天,然后进行步骤(4);

[0137] (4) 重复上述步骤至第四剂量、第五剂量等,直至未检测到ER结合活性。

[0138] 在某些实施方式中,本发明包括使用PET成像来检测和/或定量ER敏感或ER耐药性癌症。



[0139] 以下实施例用于更好地说明要求保护的发明,而不应解释为限制本发明的范围。就提到的具体材料而言,其仅用于说明的目的,而不是要限制本发明。本领域技术人员可以不偏离本发明的范围的开发等同的手段或反应物,而不发挥创造性的能力。可以理解的是,在此描述的过程中可以进行许多变化,而仍然保持在本发明的范围内。发明人的意图是,这样的变化包括在本发明的范围内。

[0140] 实施例

[0141] 材料和方法

[0142] 试验化合物

[0143] 以下实施例中使用的依拉司群是(6R)-6-(2-(N-(4-(2-(乙氨基)乙基)苄基)-N-乙氨基)-4-甲氧基苯基)-5,6,7,8-四氢化萘-2-醇二盐酸盐((6R)-6-(2-(N-(4-(2-(ethylamino)ethyl)benzyl)-N-ethylamino)-4-methoxyphenyl)-5,6,7,8-tetrahydronaphthalen-2-ol dihydrochloride),例如由IRIX制药有限公司(佛罗伦萨,SC)制造。依拉司群以干粉形式储存,以其中含有0.5% (w/v) 甲基纤维素的去离子水配制成均匀悬浮液使用,并对动物模型经口给药。他莫昔芬、雷洛昔芬和雌二醇(E2)获自Sigma-Aldrich(圣路易斯,MO),并通过皮下注射给药。氟维司群获自Tocris Biosciences(明尼阿波利斯,MN),并通过皮下注射给药。除非另有说明,其它实验室试剂购自Sigma-Aldrich。

[0144] CDK4/6抑制剂耐药性的产生

[0145] 体外试验

[0146] 目前Palbo<sup>R</sup>和Ribo<sup>R</sup>细胞分别维持在500nM的哌柏西利和利波西利,Abema<sup>R</sup>细胞维持在250nM的阿贝西利的HCC1428-LTED-CDK4/6<sup>R</sup>细胞、MCF7-Y537S-CDK4/6<sup>R</sup>和MCF7-D538G-CDK4/6<sup>R</sup>通过将HCC1428-LTED细胞暴露于浓度增加的适当的CDK4/6i而产生。

[0147] 体内试验

[0148] 将源于ST941-HI患者的异种移植碎片植入无胸腺裸鼠中。用游标卡尺测量肿瘤两次/周;使用下式计算体积:  $(L \times W^2) \times 0.5$ 。用载体、氟维司群(3mg/剂/周)+哌柏西利(25mg/kg每日)和RAD1901(30mg/kg每日)治疗所述肿瘤。使在氟维司群(3mg/剂/周)+哌柏西利(25mg/kg每日)存在下生长的肿瘤生长 $>1500\text{mm}^3$ ,然后收获并再移植到新的考虑传代的小鼠群中(P1)。

[0149] PDX模型

[0150] 将肿瘤作为碎片传代入无胸腺裸鼠(Nu(NCR)-Foxn1Nu)。将源于WHIM43患者的异种移植碎片植入没有雌二醇补充的(视野中)卵巢切除小鼠中。所有小鼠都在无病原体的饲养室中饲养在单独通风的具有灭菌和无尘的被褥芯(bedding cobs)的笼具中,在明暗周期(人造光源的12-14小时昼夜节律周期)和受控的室温和湿度下随意获取灭菌食物和水。用游标卡尺测量肿瘤两次/周;使用下式计算体积:  $(L \times W^2) \times 0.52$ 。在研究期间每天口服给药依拉司群和哌柏西利。皮下给药氟维司群一次/周。

[0151] 定量实时PCR(RT-qPCR)

[0152] 体内异种移植模型

[0153] 研究结束用cryoPREP<sup>TM</sup>撞击器(Covaris)粉碎肿瘤,用RNeasy mini试剂盒(Qiagen)提取总RNA。使用Taqman Fast Virus 1-Step Master Mix和TaqMan<sup>TM</sup>探针(Applied Biosystems)进行qPCR。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法,以GAPDH作为内参分析Ct值以评估

PgR(孕酮受体)mRNA表达的相对变化。

[0154] 体外异种移植模型

[0155] 在处理结束时,用来自1-step Cells-to-Ct试剂盒的裂解缓冲液裂解细胞,并根据生产商的说明书处理裂解物。使用1-step master mix和TaqMan™探针(Applied Biosystems)进行qPCR。使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法,以GAPDH作为内参分析Ct值以评估PgR(孕酮受体)mRNA、tff1(三叶因子1)mRNA和GREB1(雌激素调节的生长)mRNA表达的相对变化。

[0156] 增殖试验

[0157] 细胞以5000细胞/孔的密度铺板,第二天用相应的处理方法处理。在与药物一起孵育7天后测量活力,并且将数据相对于作为100%的对照值进行标准化。数据以在第7天时相对于对照的%生长抑制作图。

[0158] 集落形成试验

[0159] 以1000-10000个细胞/孔的密度铺板,并根据细胞系使之生长2-5周。一式三份进行处理;每周更换培养基和化合物。在处理结束时,将细胞固定在多聚甲醛(paraformaldehyde)中,并用结晶紫染色观察。

[0160] 蛋白质印迹分析

[0161] 按剂量给药后收获细胞或肿瘤),并使用标准操作方式和抗体分析如下蛋白质表达:ERa, PR, E2F1, CCNE1, CCNE2, CCND1, Rb, pRb, CDK2, CDK4, CDK6 (Cell Signaling Technologies, Cat#13258; #3153; #3742; #4129; #4132; #2978、

[0162] #9309、#8516、#2546、#12790、#13331), p107, p130 (Abcam: ab168458, ab6545) 和粘着斑蛋白:Sigma-Aldrich, #v9131。使用AzureSpot软件定量蛋白质表达并相对黏着斑蛋白表达标准化。对敏感和耐药细胞系的差异作用的检测通过使用500nM哌柏西利处理两种细胞系24小时并与它们相对的对照比较进行。用最后一次给药4小时后收集的研究结束肿瘤检测依拉司群、氟维司群和哌柏西利的体内作用。

[0163] 实施例

[0164] 参照图1A-1D,提供了在野生型和突变型ESR1背景中哌柏西利耐药性模型的产生和表征。在图1A中,示出了产生的ESR1:野生型LTED细胞系中哌柏西利敏感(palbo<sup>S</sup>)和哌柏西利耐药(palbo<sup>R</sup>)的细胞系对于哌柏西利的耐药性。在图1B中,对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:野生型细胞系绘制了相对于Log[哌柏西利( $\mu$ M)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图1C中,提供了对于对照和哌柏西利(500nM)处理后的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:野生型细胞系的集落形成试验图。在图1D中,示出了具有ESR1:野生型基因的LTED、LTED+palbo、LTED-palbo<sup>R</sup>和LTED-palbo<sup>R</sup>+palbo模型的蛋白质印迹图。

[0165] 参照图2A-2D,提供了在野生型和突变型ESR1背景中哌柏西利耐药性模型的产生和表征。在图2A中,绘制出了产生的ESR1:D538G LTED细胞系中哌柏西利敏感(palbo<sup>S</sup>)和哌柏西利耐药(palbo<sup>R</sup>)的细胞系对于哌柏西利的耐药性。在图2B中,对palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:D538G细胞系绘制了相对于Log[哌柏西利( $\mu$ M)]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图2C中,提供了对于对照和哌柏西利(500nM)处理后的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>的ESR1:D538G细胞系的集落形成试验图。在图2D中,示出了具有ESR1:D538G突变的LTED、LTED+palbo、LTED-palbo<sup>R</sup>和LTED-palbo<sup>R</sup>+palbo模型的蛋白质印迹图。

[0166] 参照图3A-3D,提供了在野生型和突变型ESR1背景中哌柏西利耐药性模型的产生

和表征。在图3A中,绘制出了产生的ESR1:Y537S LTED细胞系中哌柏西利敏感( $\text{palbo}^S$ )和哌柏西利耐药( $\text{palbo}^R$ )的细胞系对于哌柏西利的耐药性。在图3B中,对 $\text{palbo}^S$ 和 $\text{palbo}^R$ 的ESR1:Y537S细胞系绘制了相对于Log[哌柏西利( $\mu\text{M}$ )]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图3C中,提供了对于对照和哌柏西利(500nM)处理后的 $\text{palbo}^S$ 和 $\text{palbo}^R$ 的ESR1:Y537S细胞系的集落形成试验图。在图3D中,示出了具有ESR1:Y537S突变的LTED、LTED+ $\text{palbo}$ 、LTED- $\text{palbo}^R$ 和LTED- $\text{palbo}^R$ + $\text{palbo}$ 模型的蛋白质印迹图。

[0167] 现在参照图4A-4F,提供了在野生型和突变型ESR1背景中利波西利和阿贝西利耐药性模型的产生和表征。在图4A中,绘制出了产生的ESR1:野生型LTED细胞系中利波西利敏感( $\text{ribo}^S$ )和利波西利耐药( $\text{ribo}^R$ )的细胞系对于利波西利的耐药性。在图4B中,绘制出了产生的ESR1:野生型LTED细胞系中阿贝西利敏感( $\text{abema}^S$ )和阿贝西利耐药( $\text{abema}^R$ )的细胞系对于阿贝西利的耐药性。在图4C中,对 $\text{ribo}^S$ 和 $\text{ribo}^R$ 的ESR1:野生型细胞系绘制了相对于Log[利波西利( $\mu\text{M}$ )]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图4D中,提供了对于对照和利波西利(500nM)处理后的 $\text{ribo}^S$ 和 $\text{ribo}^R$ 的ESR1:野生型细胞系的集落形成试验图。在图4E中,对 $\text{abema}^S$ 和 $\text{abema}^R$ 的ESR1:野生型细胞系绘制了相对于Log[阿贝西利( $\mu\text{M}$ )]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图4F中,提供了对于对照和阿贝西利(500nM)处理后的 $\text{abema}^S$ 和 $\text{abema}^R$ 的ESR1:野生型细胞系的集落形成试验图。

[0168] 现在参照图5A-5F,提供了在野生型和突变型ESR1背景中利波西利和阿贝西利耐药性模型的产生和表征。在图5A中,绘制出了产生的ESR1:D538G LTED细胞系中利波西利敏感( $\text{ribo}^S$ )和利波西利耐药( $\text{ribo}^R$ )的细胞系对于利波西利的耐药性。在图5B中,绘制出了产生的ESR1:D538G LTED细胞系中阿贝西利敏感( $\text{abema}^S$ )和阿贝西利耐药( $\text{abema}^R$ )的细胞系对于阿贝西利的耐药性。在图5C中,对 $\text{ribo}^S$ 和 $\text{ribo}^R$ 的ESR1:

[0169] D538G细胞系绘制了相对于Log[利波西利( $\mu\text{M}$ )]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图5D中,提供了对于对照和用利波西利(500nM)处理后的 $\text{ribo}^S$ 和 $\text{ribo}^R$ 的ESR1:D538G细胞系的集落形成试验图。在图5E中,对 $\text{abema}^S$ 和 $\text{abema}^R$ 的ESR1:D538G细胞系绘制了相对于Log[阿贝西利( $\mu\text{M}$ )]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图5F中,提供了对于对照和用阿贝西利(500nM)处理后的 $\text{abema}^S$ 和 $\text{abema}^R$ 的ESR1:D538G细胞系的集落形成试验图。

[0170] 现在参照图6A-6F,提供了在野生型和突变型ESR1背景中利波西利和阿贝西利耐药性模型的产生和表征。在图6A中,绘制出了产生的ESR1:Y537S LTED细胞系中利波西利敏感( $\text{ribo}^S$ )和利波西利耐药( $\text{ribo}^R$ )的细胞系对于利波西利的耐药性。在图6B中,绘制出了产生的ESR1:Y537S LTED细胞系中阿贝西利敏感( $\text{abema}^S$ )和阿贝西利耐药( $\text{abema}^R$ )的细胞系对于阿贝西利的耐药性。在图6C中,对 $\text{ribo}^S$ 和 $\text{ribo}^R$ 的ESR1:

[0171] Y537S细胞系绘制了相对于Log[利波西利( $\mu\text{M}$ )]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图6D中,提供了对于对照和用利波西利(500nM)处理后的 $\text{ribo}^S$ 和 $\text{ribo}^R$ 的ESR1:Y537S细胞系的集落形成试验图。在图6E中,对 $\text{abema}^S$ 和 $\text{abema}^R$ 的ESR1:Y537S细胞系绘制了相对于Log[阿贝西利( $\mu\text{M}$ )]的生长抑制百分比(相对于对照标准化为100%)曲线图。在图6F中,提供了对于对照和用阿贝西利(500nM)处理后的 $\text{abema}^S$ 和 $\text{abema}^R$ 的ESR1:Y537S细胞系的集落形成试验图。

[0172] 现在参照图7A-7C,不管在先治疗史或ESR1状态如何,依拉司群显示出剂量依赖性

的肿瘤生长抑制和肿瘤消退。在图7A中,提供了 $EC_{50}$  (nM) 值,并相对于Log[依拉司群 (nM)]绘制了ESR1:野生型CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:野生型哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:野生型利波西利<sup>R</sup>和ESR1:野生型阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系生长抑制百分比曲线图。在图7B中,提供了 $EC_{50}$  (nM) 值,并相对于Log[依拉司群 (nM)]绘制了ESR1:D538GCDK4/6抑制剂敏感、ESR1:D538G哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:D538G利波西利<sup>R</sup>和ESR1:D538G阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系生长抑制百分比曲线图。在图7C中,提供了 $EC_{50}$  (nM) 值,并相对于Log[依拉司群 (nM)]绘制了ESR1:Y537S CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:Y537S哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:Y537S利波西利<sup>R</sup>和ESR1:Y537S阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系生长抑制百分比曲线图。

[0173] 参照图8A-8C,依拉司群在CDK4/6抑制剂耐药的细胞系中显示出长期生长抑制。在图8A中,顶行的集落形成试验图中示出了对照组ESR1:野生型CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:野生型哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:野生型利波西利<sup>R</sup>和ESR1:野生型阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系的生长,而底行的图片中示出了用依拉司群 (300nM) 处理后的ESR1:野生型CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:野生型哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:野生型利波西利<sup>R</sup>和ESR1:野生型阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系的细胞生长。在图8B中,顶行的集落形成试验图中示出了对照组ESR1:D538G CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:D538G哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:D538G利波西利<sup>R</sup>和ESR1:D538G阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系的生长,而底行的图片中示出了用依拉司群 (300nM) 处理后的ESR1:D538G CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:D538G哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:D538G利波西利<sup>R</sup>和ESR1:D538G阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系的细胞生长。在图8C中,顶行的集落形成试验图中示出了对照组ESR1:Y537S CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:Y537S哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:Y537S利波西利<sup>R</sup>和ESR1:Y537S阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系的生长,而底行的图片中示出了用依拉司群 (300nM) 处理后的ESR1:Y537S CDK4/6抑制剂敏感、ESR1:Y537S哌柏西利<sup>R</sup>、ESR1:Y537S利波西利<sup>R</sup>和ESR1:Y537S阿贝西利<sup>R</sup>的细胞系的细胞生长。

[0174] 现在参照图9A-9F,依拉司群显示出对哌柏西利不敏感的PDX模型的生长抑制。在图9A中,示出了在用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 处理的植入了具有ESR1:D538G突变的WHIM43 PDX异种移植物的无胸腺裸鼠中,随时间推移的平均肿瘤体积。在图9B中,通过图中展示的ER $\alpha$ /黏着斑蛋白 (相对于对照标准化) 对比用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 对具有ESR1:D538G突变的WHIM43 PDX异种移植模型的处理结果确定ER $\alpha$ 蛋白水平的定量。在图9C中,通过图中展示的E2F1/黏着斑蛋白 (相对于对照标准化) 对比用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 对具有ESR1:D538G突变的WHIM43 PDX异种移植模型的处理结果确定E2F1蛋白水平的定量。在图9D中,通过图中展示PgR mRNA水平 (相对于对照标准化) 对比用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 对具有ESR1:D538G突变的WHIM43 PDX异种移植模型的处理结果确定CCNE1蛋白 (或细胞周期蛋白E1) 水平的定量。在图9E中,通过图中展示PgR mRNA水平 (相对于对照标准化) 对比用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 对具有ESR1:D538G突变的WHIM43 PDX异种移植模型的处理结果确定PgR mRNA水平。在图9F中,示出了用载体对照、哌柏西利、氟维司群 (3mg/剂) 和依拉司群 (30和60mg/kg) 处理的具有ESR1:D538G突变的WHIM43PDX异种移植模型的蛋白印迹图。。

[0175] 现在参照图10A-10C,依拉司群在CDK4/6抑制剂耐药性模型中显示出对ER信号传导的抑制。在图10A中,通过图中展示的用对照或依拉司群 (100nM和1000nM) 处理的palbo<sup>S</sup>

和palbo<sup>R</sup>细胞系的PgR mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:野生型突变的肿瘤模型中的孕酮受体(PgR)定量。在图10B中,通过图中展示的用对照或依拉司群(100nM和1000nM)处理的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系的TFF1 mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:野生型突变的肿瘤模型中的三叶因子1(TFF1)定量。在图10C中,通过图中展示的用对照或依拉司群(100nM和1000nM)处理的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系的GREB1 mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:野生型突变的肿瘤模型中的雌激素调节的生长(GREB1)定量。

[0176] 现在参照图11A-11C,依拉司群在CDK4/6抑制剂耐药性模型中显示出对ER信号传导的抑制。在图11A中,通过图中展示的用对照或依拉司群(100nM和1000nM)处理的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系的PgR mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:D538G突变的肿瘤模型中的孕酮受体(PgR)定量。在图11B中,通过图中展示的用对照或依拉司群(100nM和1000nM)处理的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系的TFF1 mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:D538G突变的肿瘤模型中的三叶因子1(TFF1)定量。在图11C中,通过图中展示的用对照或依拉司群(100nM和1000nM)处理的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系的GREB1 mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:D538G突变的肿瘤模型中的雌激素调节的生长(GREB1)定量。

[0177] 现在参照图12A-12C,依拉司群在CDK4/6抑制剂耐药性模型中显示出对ER信号传导的抑制。在图12A中,通过图中展示的用对照或依拉司群(100nM和1000nM)处理的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系的PgR mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:Y537S突变的肿瘤模型中的孕酮受体(PgR)定量。在图11B中,通过图中展示的用对照或依拉司群(100nM和1000nM)处理的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系的TFF1 mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:Y537S突变的肿瘤模型中的三叶因子1(TFF1)定量。在图11C中,通过图中展示的用对照或依拉司群(100nM和1000nM)处理的palbo<sup>S</sup>和palbo<sup>R</sup>细胞系的GREB1 mRNA水平(相对于对照标准化)对比,确定在具有ESR1:Y537S突变的肿瘤模型中的雌激素调节的生长(GREB1)定量。

[0178] 现在参照图13,依拉司群显示出对先前用氟维司群和哌柏西利联合治疗的PDX模型的肿瘤生长抑制。在图13中,用载体或氟维司群和哌柏西利联合治疗(氟维司群3mg/剂量的数据来自单独的研究)的ST941-HIPDX异种移植模型(未经治疗的)的肿瘤体积对治疗天数作图。来自氟维司群和哌柏西利臂的肿瘤接着重新植入另一项研究(ST941-HI哌柏西利治疗;第一次传代),然后用载体、氟维司群(3mg/剂)、哌柏西利(25mg/kg)和依拉司群(30mg/kg)治疗,以证明在之前用氟维司群和哌柏西利联合治疗的PDX模型中,依拉司群仍然有效抑制肿瘤生长。

#### [0179] 其它实施方式

[0180] 本发明中提及的所有出版物和专利均通过引用并入本发明,其程度如同每个单独的出版物或专利申请被具体地和单独地指明通过引用并入本发明。如果通过引用并入的任何专利或出版物中的术语的含义与本发明中使用的术语的含义冲突,则以本发明中的术语的含义为准。此外,前述内容仅公开和描述了本发明的示例性实施方式。本领域技术人员在不背离如所附权利要求中限定的本发明的精神和范围的情况下,将从这些内容和附图以及权利要求中容易地认识到,可以在其中进行各种改变、修改和变化。

[0181] 本发明还涉及以下各项的实施方式：

[0182] 项1.一种抑制和降解受试者中CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症的方法,包括给药于所述受试者治疗有效量的依拉司群或其药学上可接受的盐或溶剂化物。

[0183] 项2.根据项1所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利、利波西利、阿贝西利或其组合具有耐药性。

[0184] 项3.根据项1所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利具有耐药性。

[0185] 项4.根据项1所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对利波西利具有耐药性。

[0186] 项5.根据项1所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对阿贝西利具有耐药性。

[0187] 项6.根据项1-5中任一项所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症包含选自D538G、Y537X<sub>1</sub>、L536X<sub>2</sub>、P535H、V534E、S463P、V392I、E380Q及其组合组成的组中的一个或多个突变,其中:X<sub>1</sub>为S、N或C;且X<sub>2</sub>为R或Q。

[0188] 项7.根据项6所述的方法,其中,所述突变为Y537S。

[0189] 项8.根据项6所述的方法,其中,所述突变为D538G。

[0190] 项9.根据项1-8中任一项所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症还对选自抗雌激素药、芳香化酶抑制剂及其组合组成的组中的药物具有耐药性。

[0191] 项10.根据项1-9中任一项所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌和垂体癌组成的组中。

[0192] 项11.根据项1-10中任一项所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症是晚期或转移性乳腺癌。

[0193] 项12.根据项1-10中任一项所述的方法,其中,所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症是乳腺癌。

[0194] 项13.根据项1-12中任一项所述的方法,其中,所述受试者是绝经后女性。

[0195] 项14.根据项1-12中任一项所述的方法,其中,所述受试者是绝经前女性。

[0196] 项15.根据项1-12中任一项所述的方法,其中,所述受试者是在进行过选择性雌激素受体调节剂(SERM)和/或芳香化酶抑制剂(AI)的在先治疗之后病情复发或进展的绝经后女性。

[0197] 项16.根据项1-15中任一项所述的方法,其中,所述依拉司群以约200mg/天至约500mg/天的剂量给药于所述受试者。

[0198] 项17.根据项1-16中任一项所述的方法,其中,所述依拉司群以约200mg/天、约300mg/天、约400mg/天或约500mg/天的剂量给药于所述受试者。

[0199] 项18.根据项1-15中任一项所述的方法,其中,所述依拉司群以所述受试者的最大耐受剂量的剂量给药于所述受试者。

[0200] 项19.根据项1-18中任一项所述的方法,所述方法还包括:

[0201] 通过测定选自ABL1、AKT1、AKT2、ALK、APC、AR、ARID1A、ASXL1、ATM、AURKA、BAP、BAP1、BCL2L11、BCR、BRAF、BRCA1、BRCA2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CDH1、CDK4、CDK6、CDK8、CDKN1A、CDKN1B、CDKN2A、CDKN2B、CEBPA、CTNNB1、DDR2、DNMT3A、E2F3、EGFR、EML4、

EPHB2、ERBB2、ERBB3、ESR1、EWSR1、FBXW7、FGF4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FLT3、FRS2、HIF1A、HRAS、IDH1、IDH2、IGF1R、JAK2、KDM6A、KDR、KIF5B、KIT、KRAS、LRP1B、MAP2K1、MAP2K4、MCL1、MDM2、MDM4、MET、MGMT、MLL、MPL、MSH6、MTOR、MYC、NF1、NF2、NKX2-1、NOTCH1、NPM、NRAS、PDGFRA、PIK3CA、PIK3R1、PML、PTEN、PTPRD、RARA、RB1、RET、RICTOR、ROS1、RPTOR、RUNX1、SMAD4、SMARCA4、SOX2、STK11、TET2、TP53、TSC1、TSC2和VHL组成的组中的一个或多个基因的高表达以确认所述治疗的受试者。

[0202] 项20. 根据项19所述的方法, 其中, 所述一种或多种基因选自AKT1、AKT2、BRAF、CDK4、CDK6、PIK3CA、PIK3R1和MTOR。

[0203] 项21. 根据项1-20中任一项所述的方法, 其中, 在给药后的所述肿瘤中的依拉司群或其盐或溶剂化物的浓度与血浆中的依拉司群或其盐或溶剂化物的浓度的比例(T/P)至少约为15。

[0204] 项22. 一种治疗具有野生型雌激素受体 $\alpha$ 和/或突变雌激素受体 $\alpha$ 的受试者中CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症的方法, 所述方法包括:

[0205] 给药于所述受试者治疗有效量的依拉司群或其药学上可接受的盐或溶剂化物,

[0206] 其中所述突变雌激素受体 $\alpha$ 包含选自D538G、Y537X<sub>1</sub>、L536X<sub>2</sub>、P535H、V534E、S463P、V392I、E380Q及其组合组成的组中的一个或多个突变, 其中: X<sub>1</sub>为S、N或C; 且X<sub>2</sub>为R或Q。

[0207] 项23. 根据项22所述的方法, 其中, 所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利、利波西利、阿贝西利或其组合具有耐药性。

[0208] 项24. 根据项22所述的方法, 其中, 所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对哌柏西利具有耐药性。

[0209] 项25. 根据项22所述的方法, 其中, 所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对利波西利具有耐药性。

[0210] 项26. 根据项22所述的方法, 其中, 所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症对阿贝西利具有耐药性。

[0211] 项27. 根据项22-26中任一项所述的方法, 其中, 所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症还对选自抗雌激素药、芳香化酶抑制剂及其组合组成的组中的药物具有耐药性。

[0212] 项28. 根据项27所述的方法, 其中, 所述抗雌激素药选自他莫昔芬、托瑞米芬和氟维司群组成的组中, 且所述芳香化酶抑制剂选自依西美坦、来曲唑和阿那曲唑组成的组中。

[0213] 项29. 根据项22-28中任一项所述的方法, 其中, 所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症选自乳腺癌、子宫癌、卵巢癌和垂体癌组成的组中。

[0214] 项30. 根据项22-29中任一项所述的方法, 其中, 所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症是晚期或转移性乳腺癌。

[0215] 项31. 根据项22-29中任一项所述的方法, 其中, 所述CDK4/6抑制剂耐药性雌激素受体 $\alpha$ 阳性癌症是乳腺癌。

[0216] 项32. 根据项22-31中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者是绝经后女性。

[0217] 项33. 根据项22-31中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者是绝经前女性。

[0218] 项34. 根据项22-31中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者是在进行过SERM和/或AI的在先治疗之后病情复发或进展的绝经后女性。

[0219] 项35.根据项22-34中任一项的方法,其中,所述受试者表达选自D538G、Y537S、Y537N、Y537C、E380Q、S463P、L536R、L536Q、P535H、V392I和V534E组成的组中至少一种的突变雌激素受体 $\alpha$ 。

[0220] 项36.根据项35所述的方法,其中,所述突变包括Y537S。

[0221] 项37.根据项35所述的方法,其中,所述突变包括D538G。

[0222] 项38.根据项22至37中任一项所述的方法,所述方法还包括:

[0223] 通过测定选自ABL1、AKT1、AKT2、ALK、APC、AR、ARID1A、ASXL1、ATM、AURKA、BAP、BAP1、BCL2L11、BCR、BRAF、BRCA1、BRCA2、CCND1、CCND2、CCND3、CCNE1、CDH1、CDK4、CDK6、CDK8、、CDKN1A、CDKN1B、CDKN2A、CDKN2B、CEBPA、CTNNB1、DDR2、DNMT3A、E2F3、EGFR、EML4、EPHB2、ERBB2、ERBB3、ESR1、EWSR1、FBXW7、FGF4、FGFR1、FGFR2、FGFR3、FLT3、FRS2、HIF1A、HRAS、IDH1、IDH2、IGF1R、JAK2、KDM6A、KDR、KIF5B、KIT、KRAS、LRP1B、MAP2K1、MAP2K4、MCL1、MDM2、MDM4、MET、MGMT、MLL、MPL、MSH6、MTOR、MYC、NF1、NF2、NKX2-1、NOTCH1、NPM、NRAS、PDGFRA、PIK3CA、PIK3R1、PML、PTEN、PTPRD、RARA、RB1、RET、RICTOR、ROS1、RPTOR、RUNX1、SMAD4、SMARCA4、SOX2、STK11、TET2、TP53、TSC1、TSC2和VHL组成的组中的一个或多个基因的高表达以确认所述治疗的受试者。

[0224] 项39.根据项38所述的方法,其中,所述一种或多种基因选自AKT1、AKT2、BRAF、CDK4、CDK6、PIK3CA、PIK3R1和MTOR。

[0225] 项40.根据项22-39中任一项所述的方法,其中,所述依拉司群以约200至约500mg/天的剂量给药于所述受试者。

[0226] 项41.根据项22-40中任一项所述的方法,其中,所述依拉司群以约200mg/天、约300mg/天、约400mg/天或约500mg/天的剂量给药于所述受试者。

[0227] 项42.根据项22-41中任一项所述的方法,其中,在给药后的所述肿瘤中的依拉司群或其盐或溶剂化物的浓度与血浆中的依拉司群或其盐或溶剂化物的浓度的比例(T/P)至少约为15。



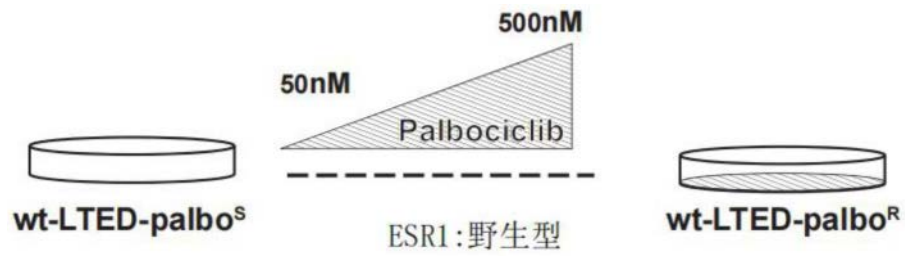


图1A

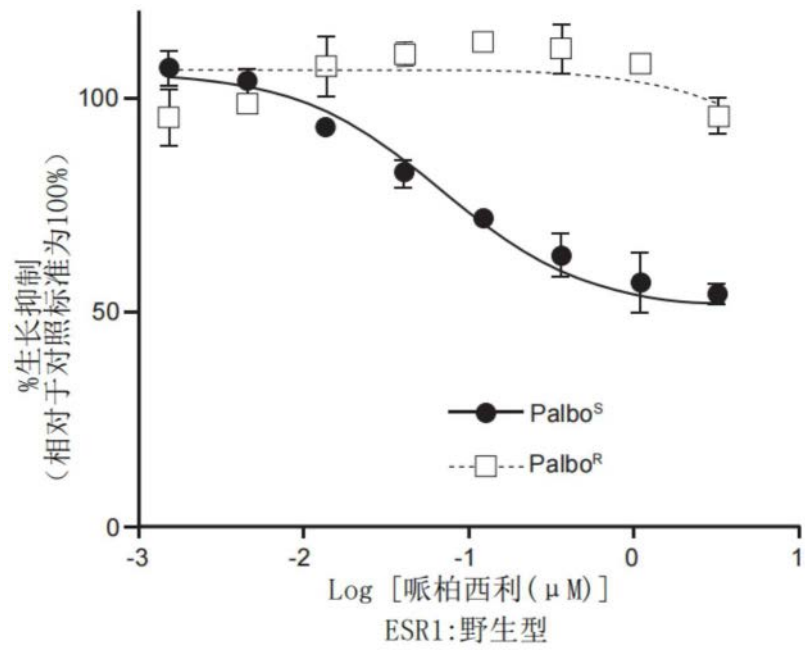


图1B

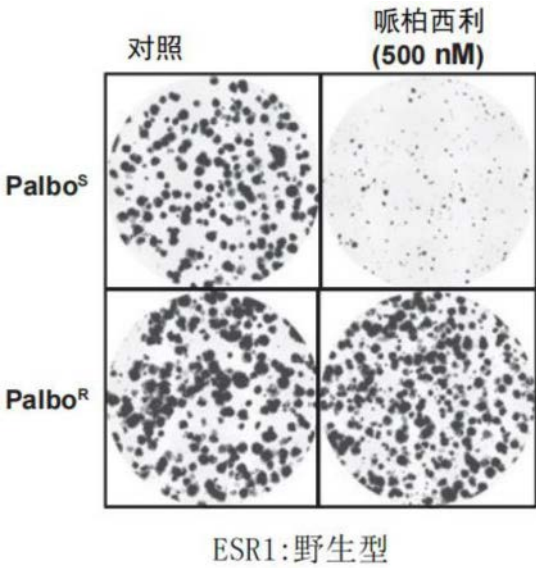


图1C

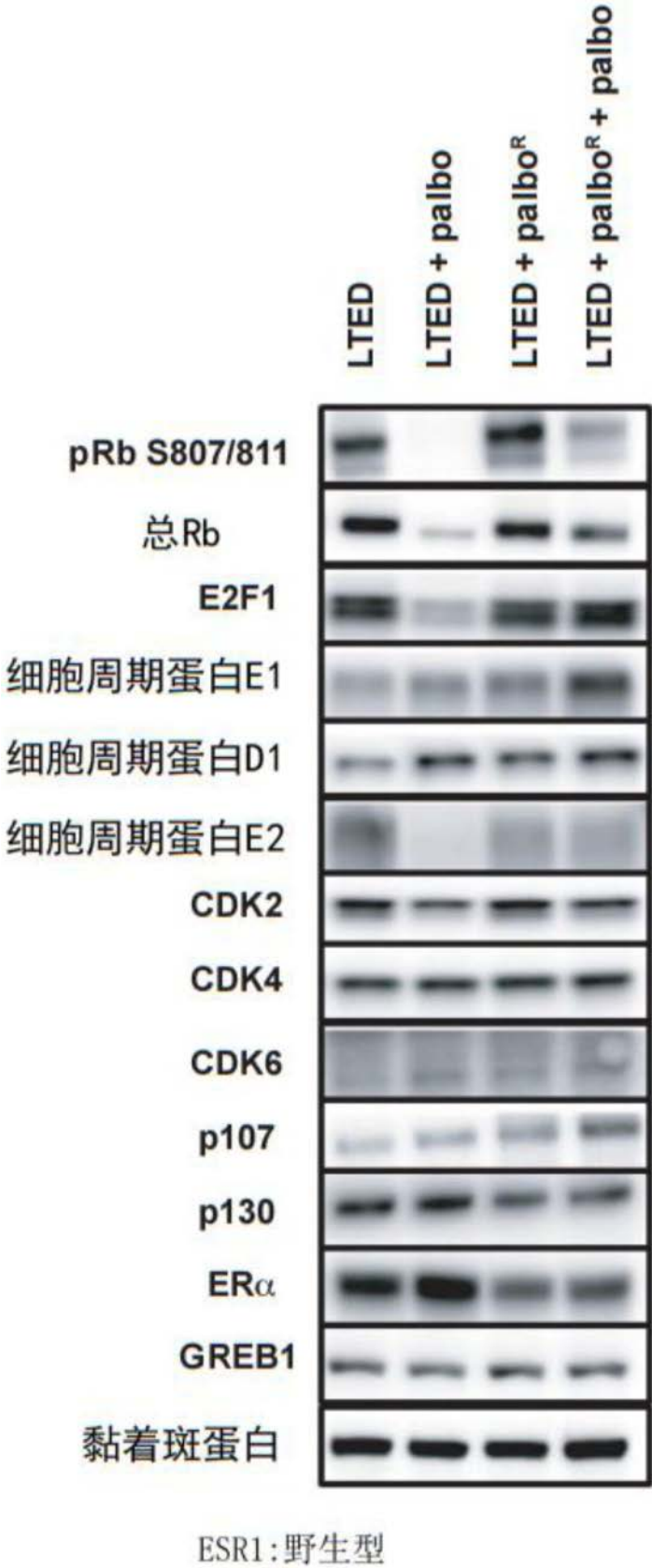


图1D

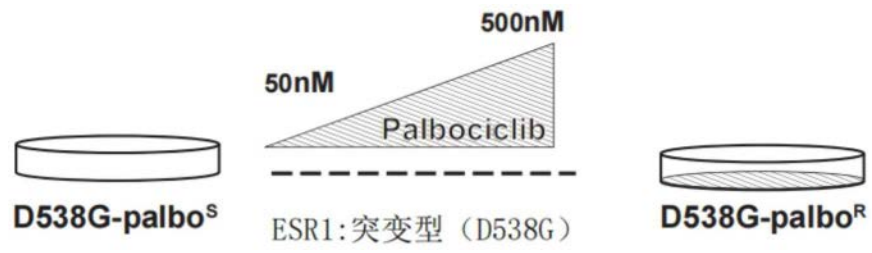


图2A

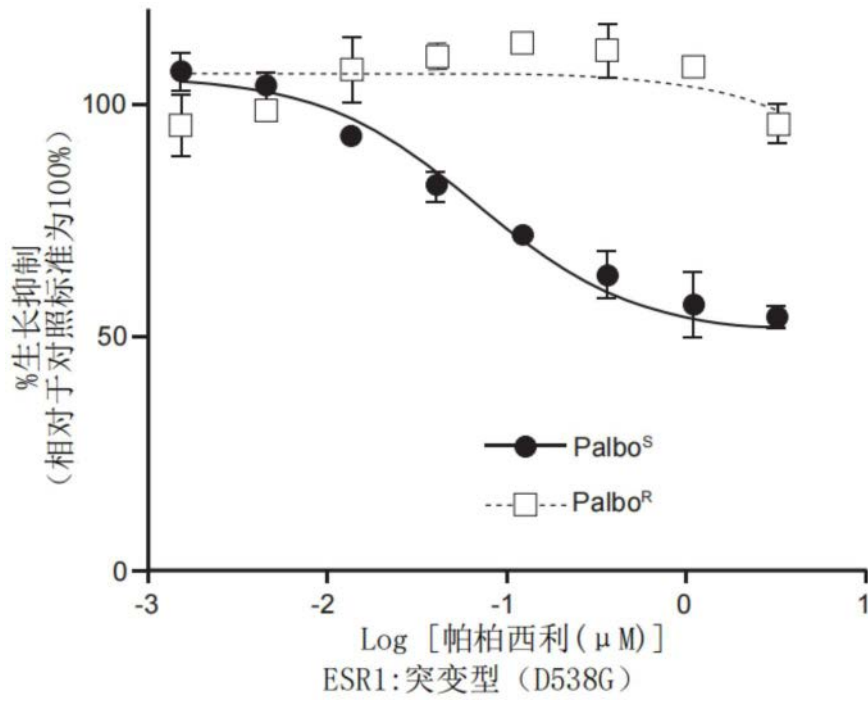


图2B

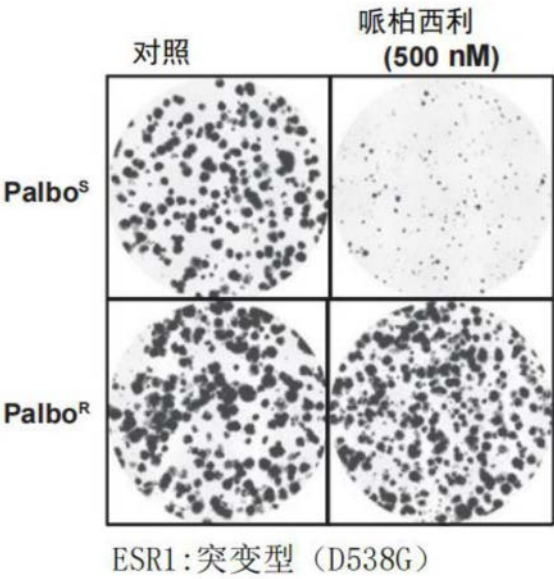


图2C

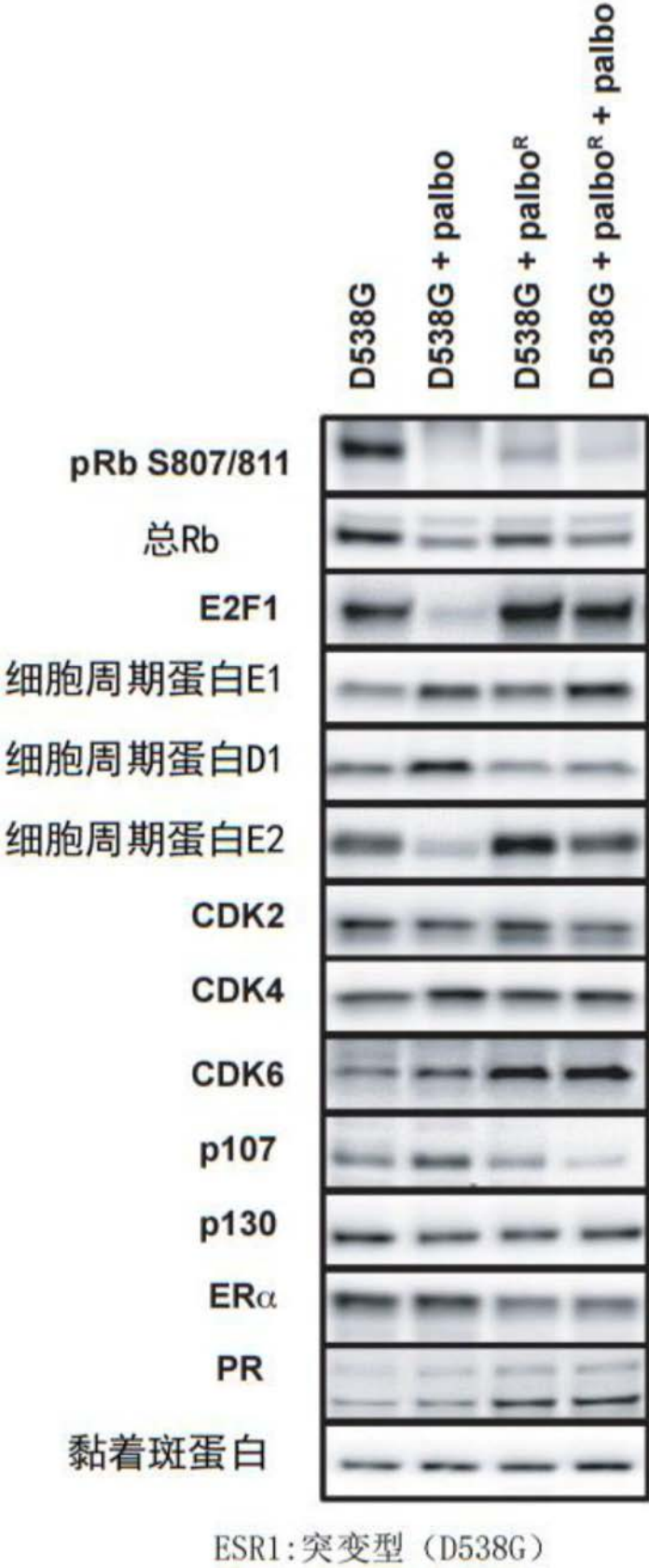


图2D

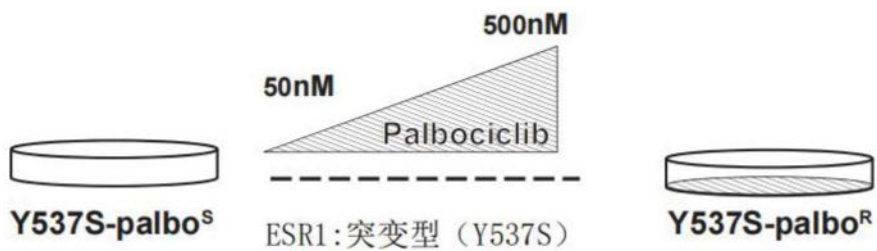


图3A

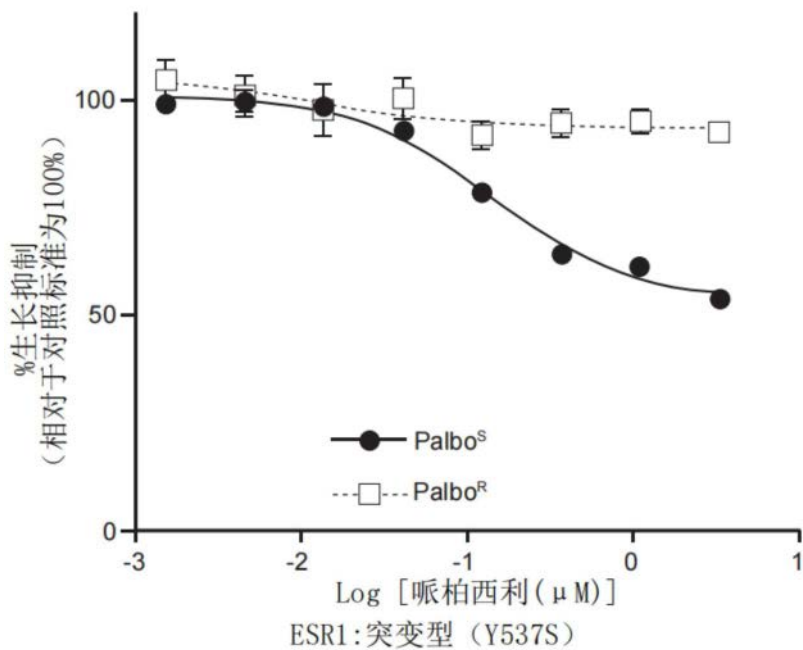


图3B

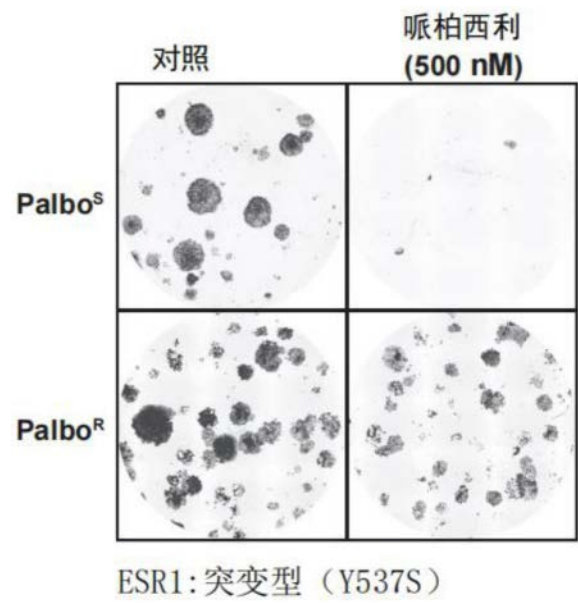


图3C





图3D

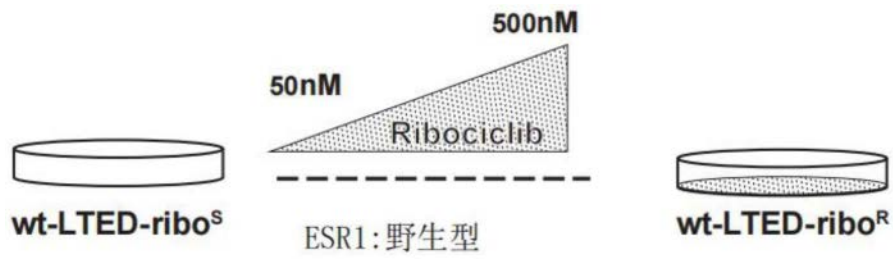


图4A

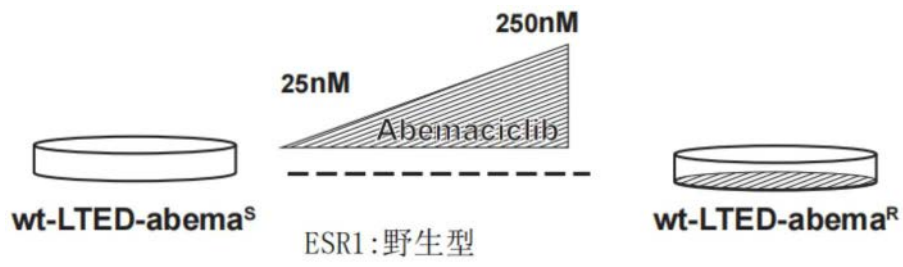


图4B

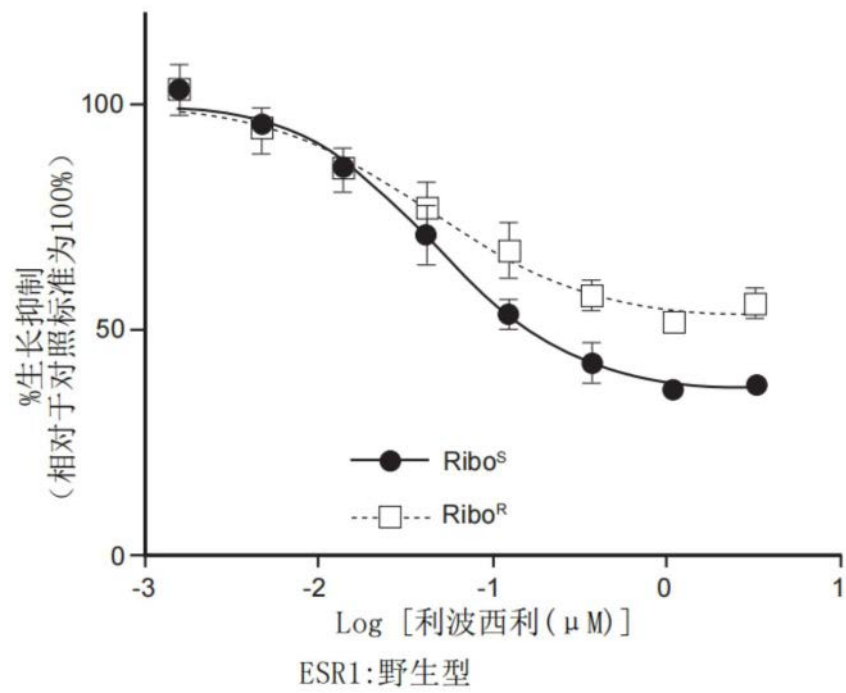


图4C

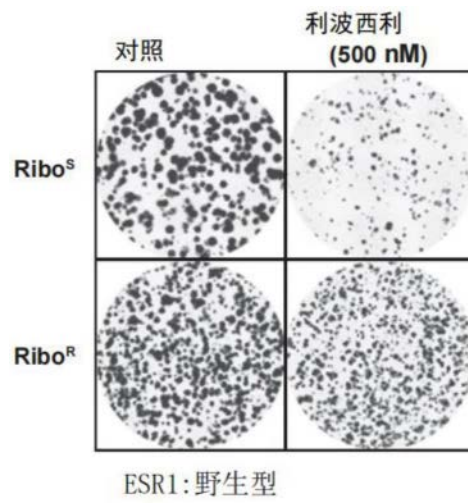


图4D

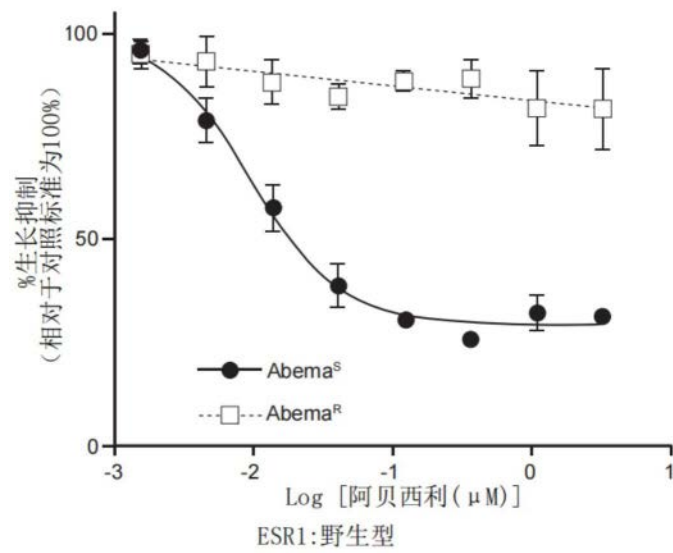


图4E

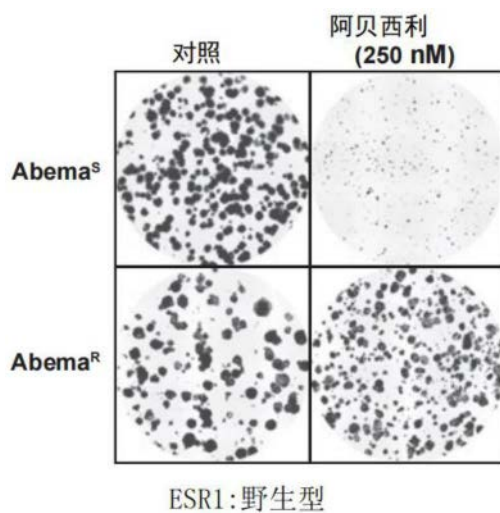


图4F

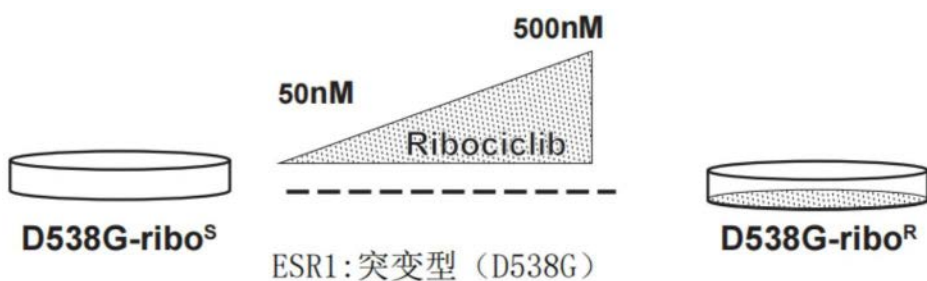


图5A

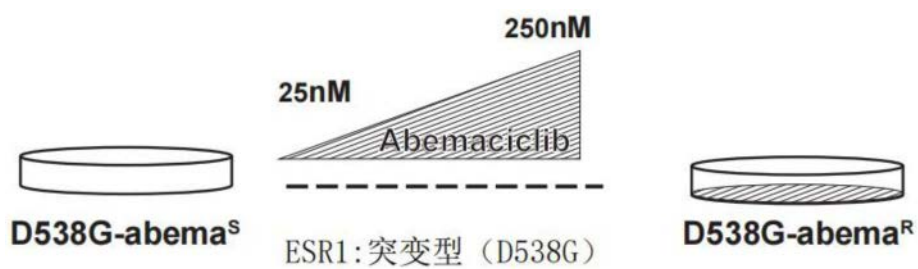


图5B

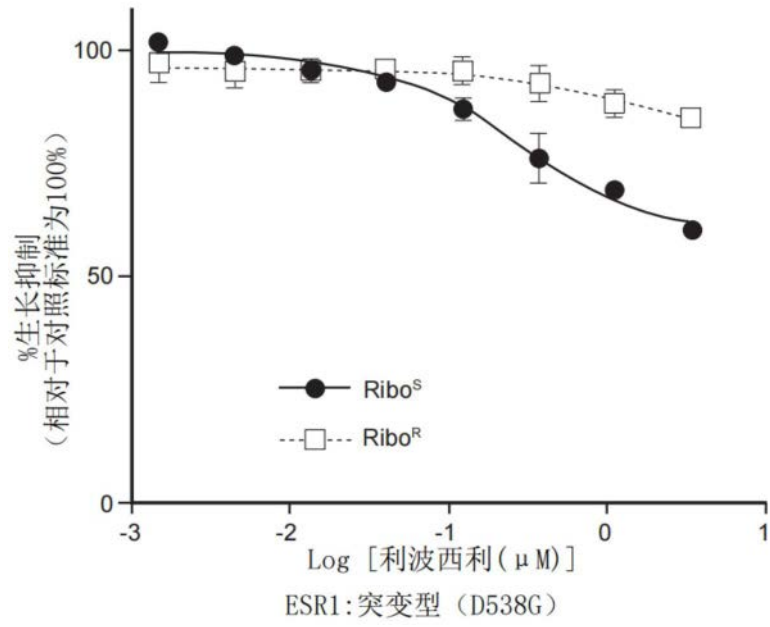


图5C

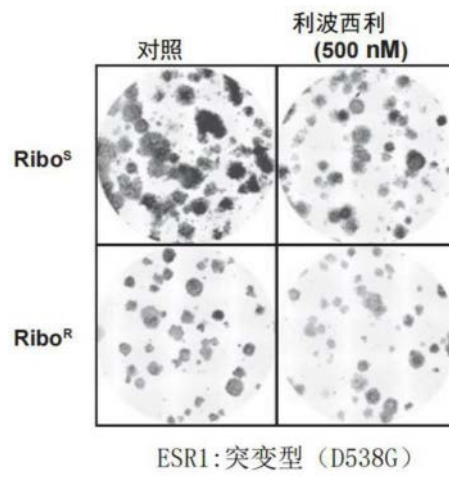


图5D

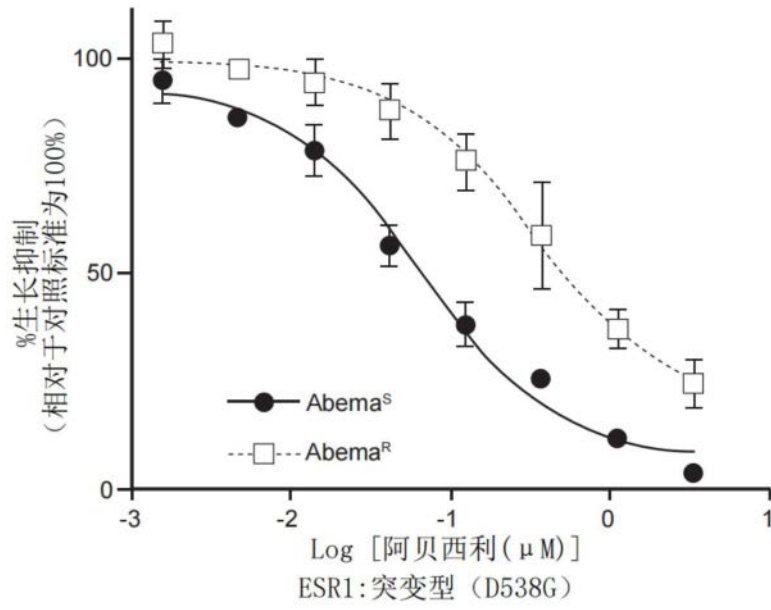


图5E

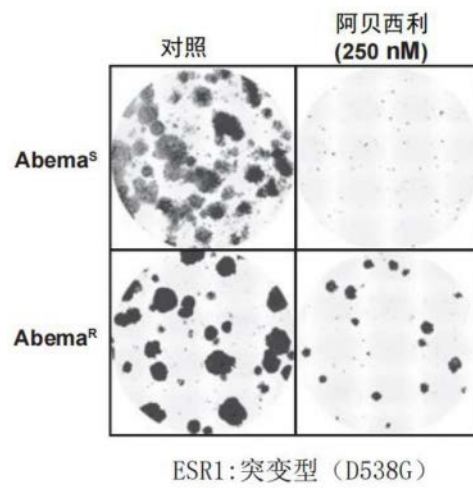


图5F

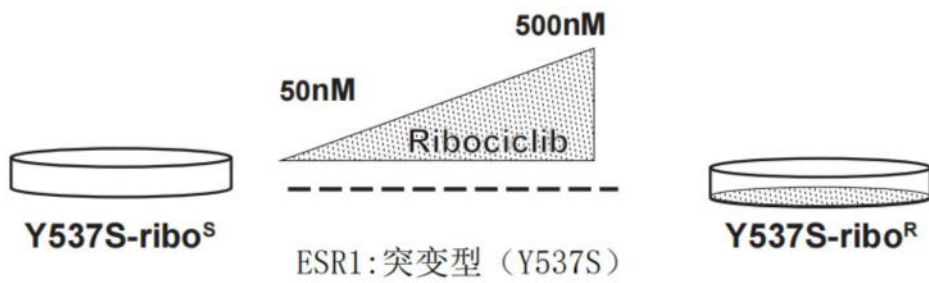


图6A

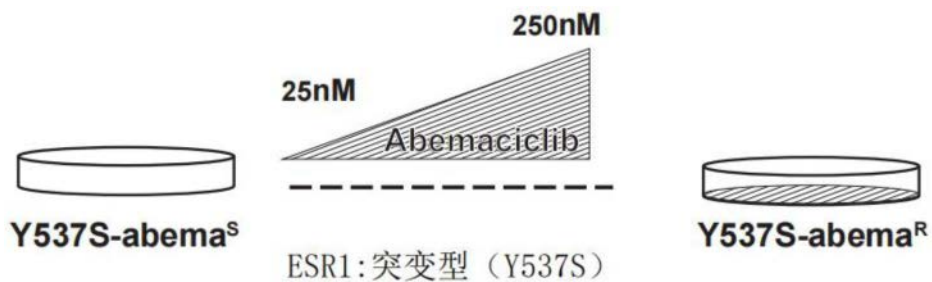


图6B

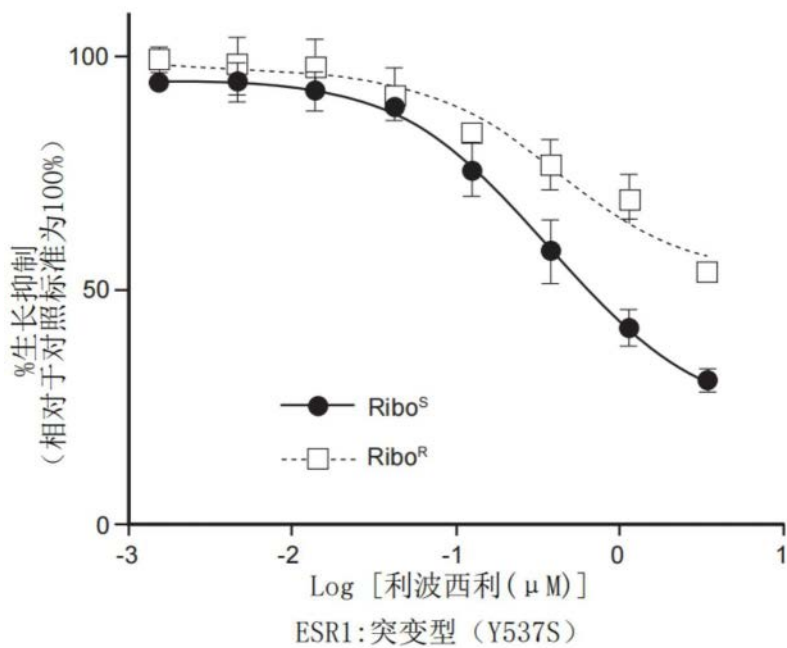


图6C

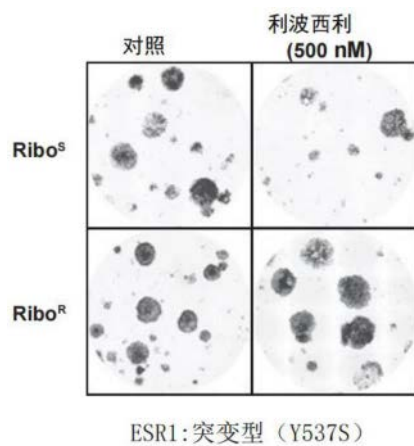


图6D

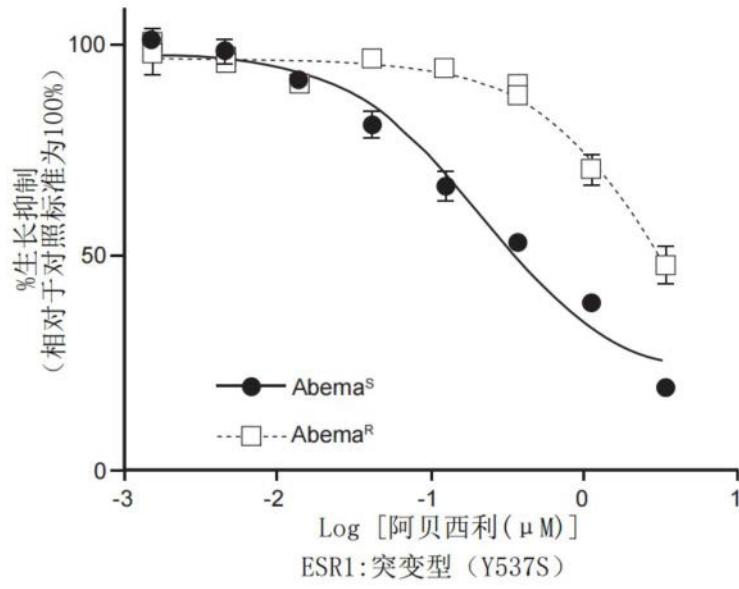


图6E

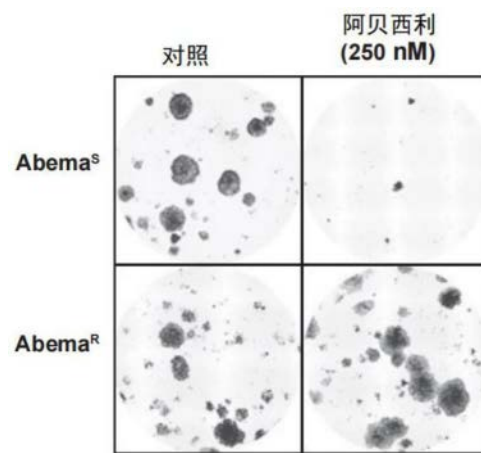


图6F



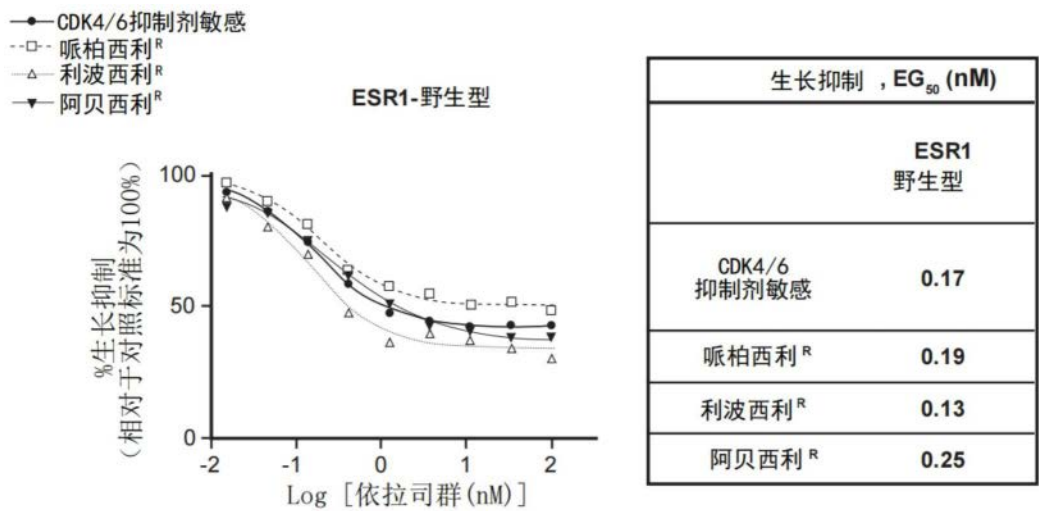


图7A

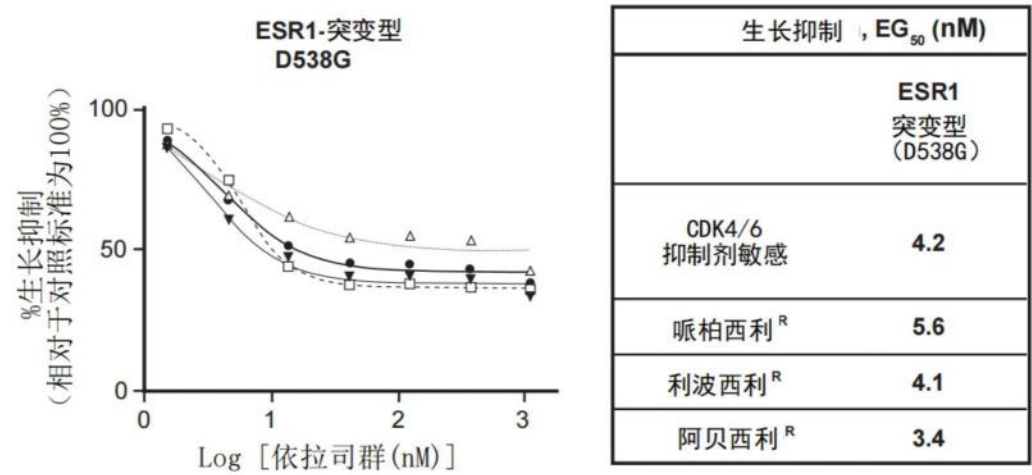


图7B

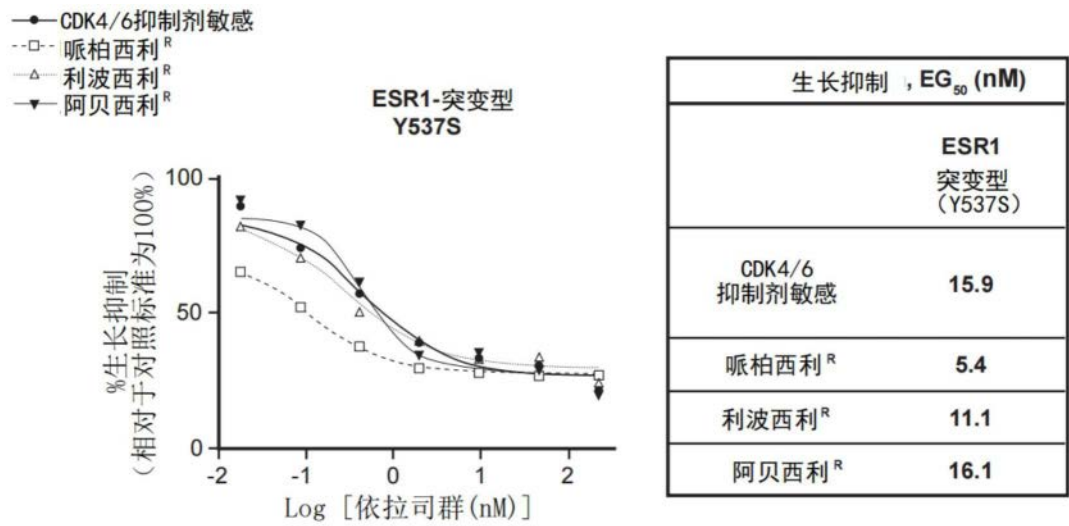


图7C

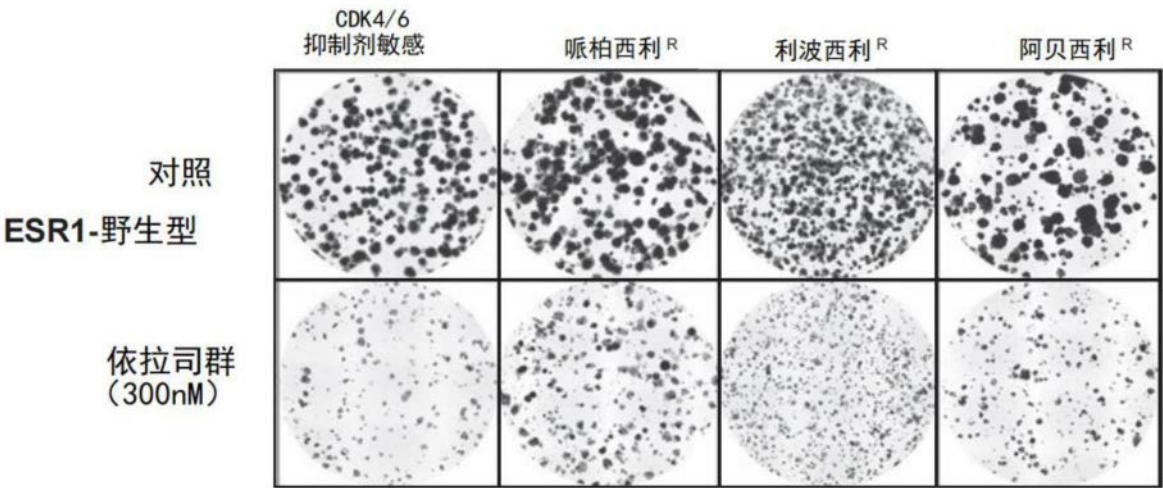


图8A

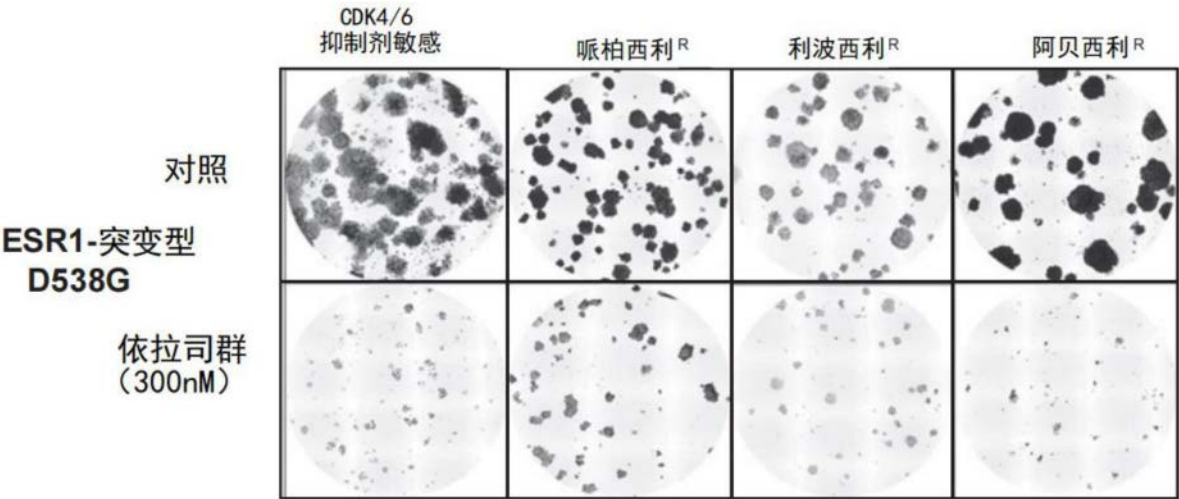


图8B

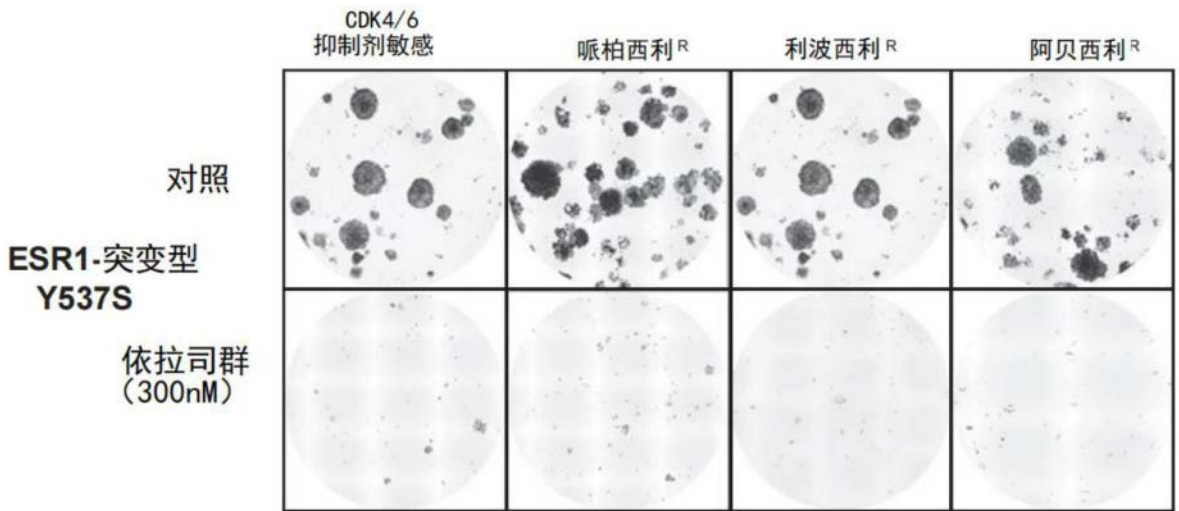


图8C

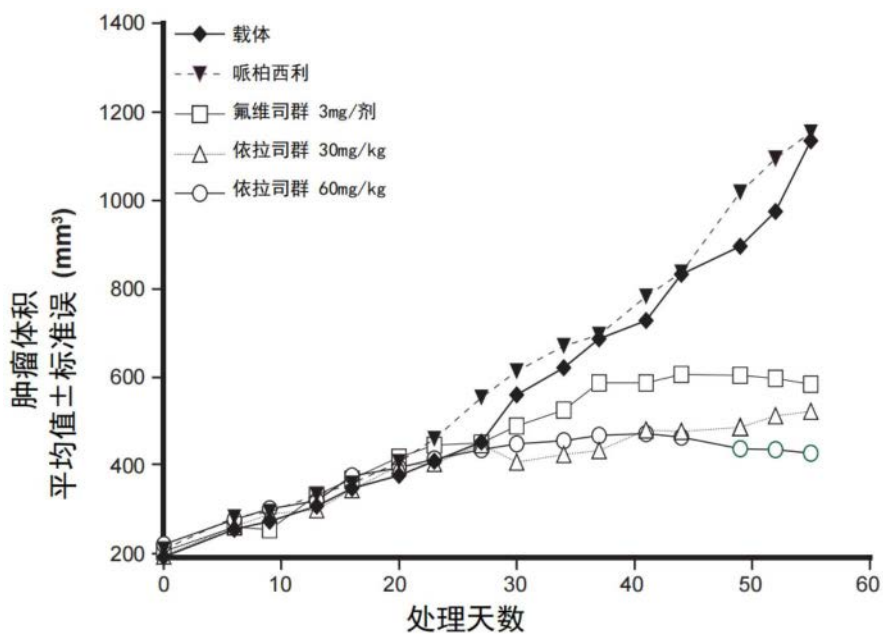


图9A

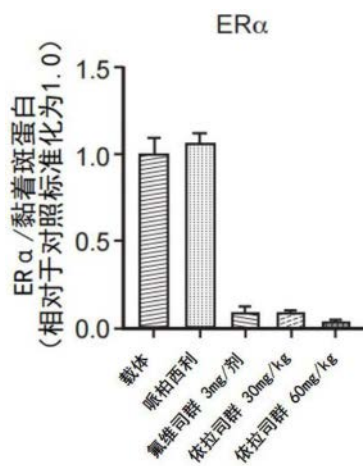


图9B

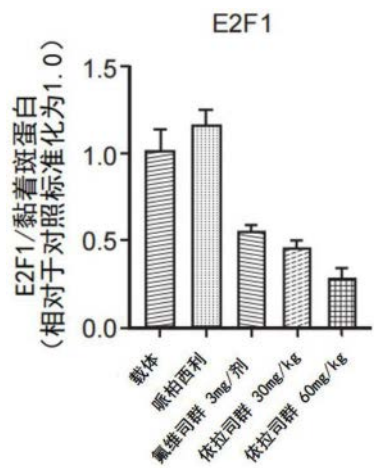


图9C

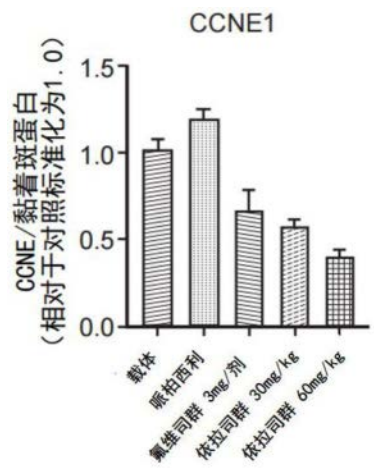


图9D

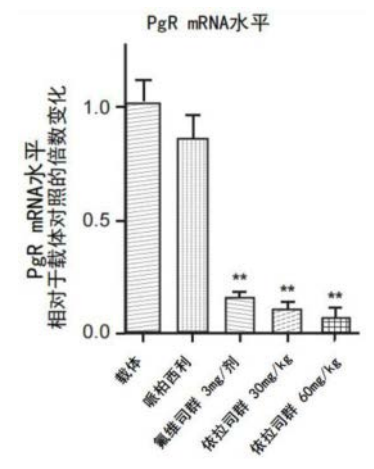


图9E

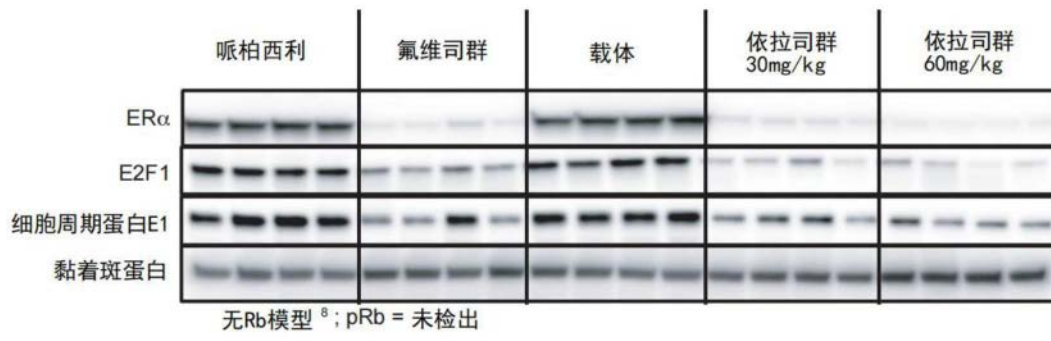


图9F

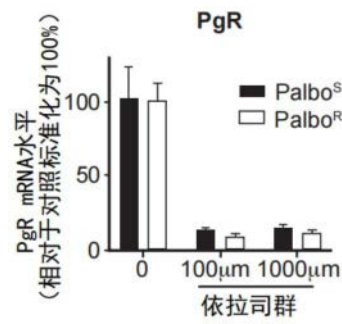


图10A

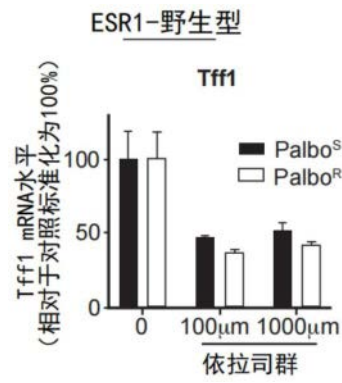


图10B

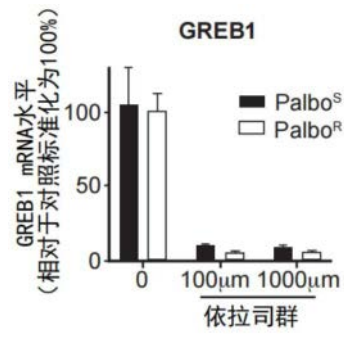


图10C

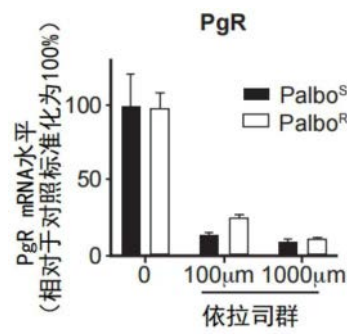


图11A

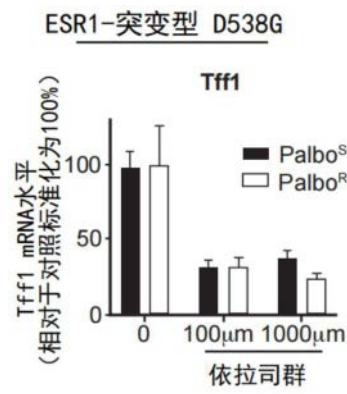


图11B

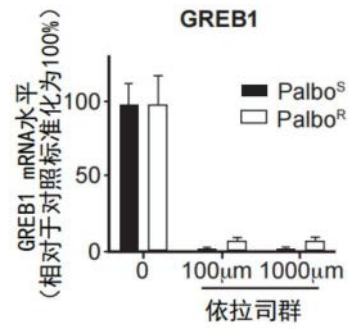


图11C

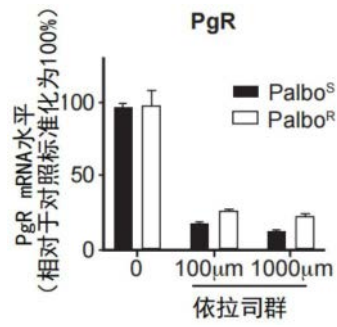


图12A

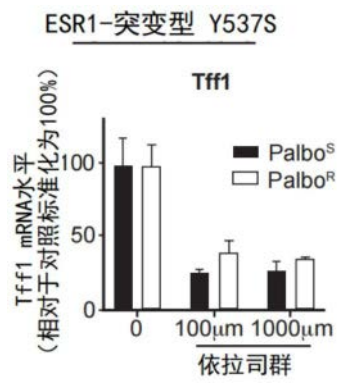


图12B



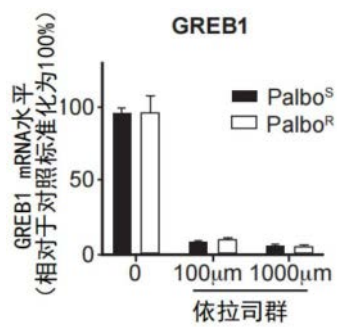


图12C

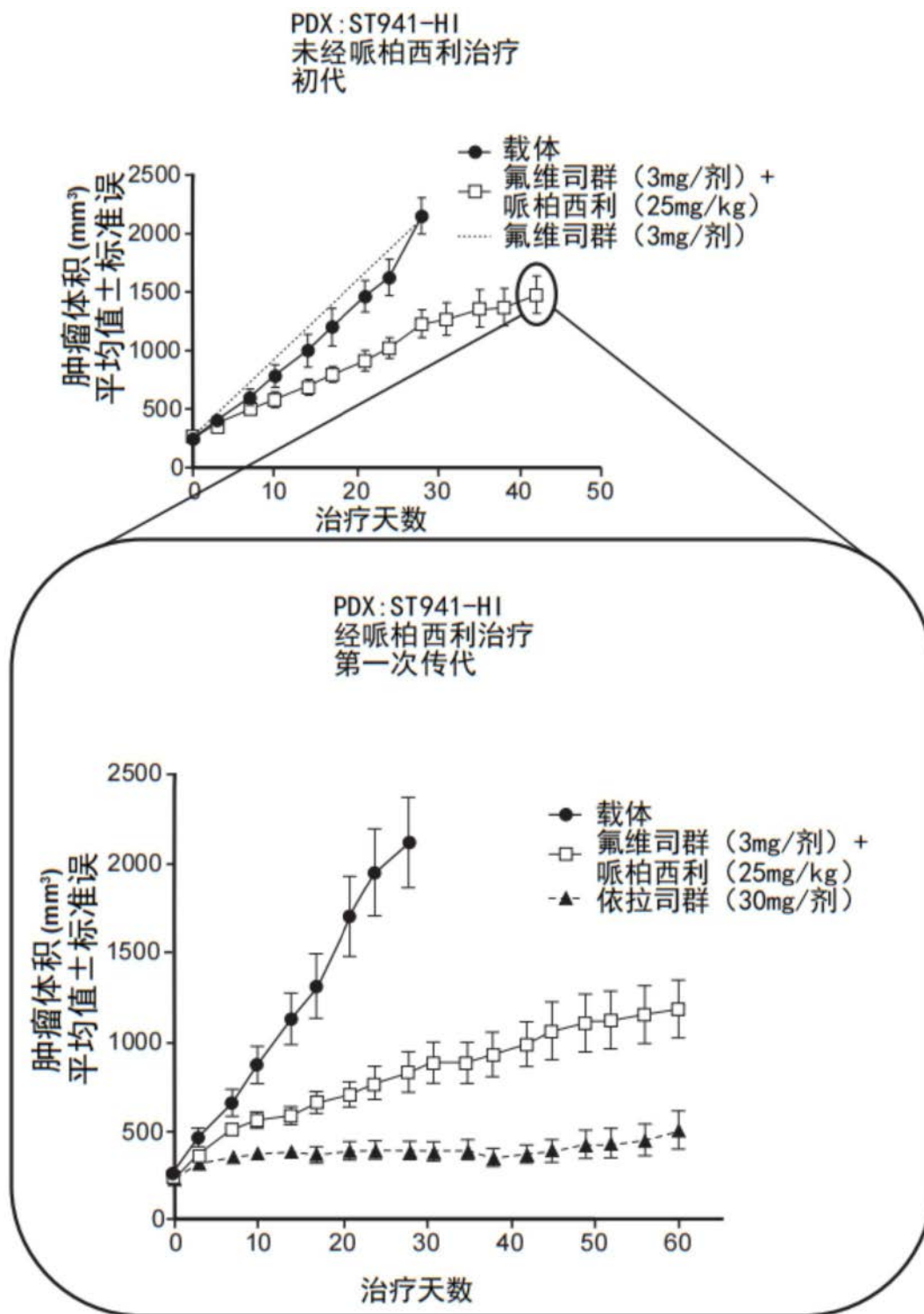


图13