

1. 如下成分的联合制备用于筛查患者样本是否存在表达 IGF-1R 的循环肿瘤细胞或所述细胞的数目以预测或监控 IGF-1R 拮抗剂治疗在患者中的效力的检验试剂盒的用途,所述联合包括:

- a) 与肿瘤细胞特异性反应的配体;
- b) 抗细胞角蛋白抗体;和
- c) 胰岛素样生长因子受体的抗体,即, IGF-1R 的抗体。

2. 权利要求 1 的用途,其中抗细胞角蛋白抗体用异硫氰酸荧光素标记。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述抗 IGF-1R 抗体用藻红蛋白标记。

4. 权利要求 1 的用途,其中所述患者样本得自血液。

5. 权利要求 1 的用途,其中所述配体是上皮细胞粘着分子抗体。

6. 权利要求 1 的用途,其中所述联合另外包括细胞特异性染料,其能从分析中排除残余的无核细胞和细胞碎片。

7. 权利要求 1-6 中任一项的用途,其中所述样品是免疫磁性样本,其包括与偶联于配体的磁性粒子相混合的得自患者的生物标本。

8. 权利要求 7 的用途,其中所述磁性粒子是胶态的。

9. 权利要求 1-6 任一项的用途,还包括用于分析表达 IGF-1R 的循环肿瘤细胞的装置,其中所述装置能够进行选自以下的至少一种方法:多参数流式细胞计数法、免疫荧光显微术、激光扫描细胞计数、基于亮视野的图像分析、毛细管容量分析、光谱图像分析、手动细胞分析、CELLSPOTTER 分析和自动细胞分析。

10. 如下成分联合制备用于筛查患者样本是否存在表达 IGF-1R 的循环肿瘤细胞或其数目以预测或监控 IGF-1R 拮抗剂治疗在患者中的效力的检验试剂盒的用途,所述联合包括:a) 包括磁芯材料的有涂层的磁性纳米粒子、蛋白质基础涂层材料和特异性地结合于肿瘤细胞的特征决定簇的抗体,所述抗体直接或间接地连接于所述基础涂层材料;b) 抗角蛋白抗体;和 c) 抗 IGF-1R 抗体。

11. 权利要求 10 的用途,另外包括用于分析表达 IGF-1R 的循环肿瘤细胞的装置。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述装置能够执行选自以下的至少一种方法:多参数流式细胞计数法、免疫荧光显微术、激光扫描细胞计数、基于亮视野的图像分析、毛细管容量分析、光谱图像分析、手动细胞分析、CELLSPOTTER 分析和自动细胞分析。

13. 权利要求 10 的方法,其中所述磁性纳米粒子是胶态的。

14. 权利要求 1-6 和 10-13 任一项的用途,其中所述 IGF-1R 拮抗剂治疗包括抗 IGF-1R 抗体。

循环肿瘤细胞分析

发明领域

[0001] 本发明涉及肿瘤学和诊断性检验的领域,和更具体地用于癌筛查和用于预测和监控化学疗法治疗反应、癌的复发等的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 胰岛素样生长因子 (IGF-1) 是在血浆中以高浓度循环并且可以在大多数组织中检测到的一种 7.5kD 多肽。IGF-1 在结构上与胰岛素相似,其刺激细胞分化和细胞增殖并且是大多数哺乳动物细胞型持续增殖所需要的。这些细胞型尤其包括人二倍体成纤维细胞、上皮细胞、平滑肌细胞、T 淋巴细胞、神经细胞、骨髓细胞、软骨细胞、成骨细胞和骨髓干细胞。

[0004] 产生由 IGF-1- 刺激的细胞增殖或分化的转导通道中的第一个步骤是 IGF-1 或 IGF-2 (或超生理学浓度的胰岛素) 结合于 IGF-1 受体 (IGF-1R)。IGF-1R 属于酪氨酸激酶生长因子受体家族 (Ullrich 等人, Cell 61 :203-212, 1990) 并且在结构上与胰岛素受体相似 (Ullrich 等人, EMBO J. 5 :2503-2512, 1986)。

[0005] 流行病学研究建议,与 IGF-1 水平处于正常水平低端的个体相比,IGF-1 正常水平的高端使癌危险增加,例如肺癌、乳腺癌、前列腺癌和结肠直肠癌。此外,有相当多的证据证明 IGF-1 和 / 或 IGF-1R 在体外和体内维持肿瘤细胞的作用。在以下肿瘤中 IGF-1R 水平有所升高:肺肿瘤 (Kaiser 等人, J. Cancer Res. Clin. Oncol. 119 :665-668, 1993 ;Moody 等人, Life Sciences 52 :1161-1173, 1993 ;Macaulay 等人, Cancer Res. , 50 :2511-2517, 1990)、乳腺肿瘤 (Pollak 等人, Cancer Lett. 38 :223-230, 1987 ;Foekens 等人, Cancer Res. 49 :7002-7009, 1989 ;Arteaga 等人, J. Clin. Invest. 84 :1418-1423, 1989)、前列腺和结肠肿瘤 (Remaole-Bennet 等人, J. Clin. Endocrinol. Metab. 75 :609-616, 1992 ;Guo 等人, Gastroenterol. 102 :1101-1108, 1992)。IGF-1 在前列腺上皮中的反常表达在转基因小鼠中引起肿瘤形成 (DiGiovanni 等人, Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 97 :3455-3460, 2000)。另外,IGF-1 似乎是人神经胶质瘤的自泌刺激物 (Sandberg-Nordqvist 等人, Cancer Res. 53(11) :2475-78, 1993), 而 IGF-1 已经表明刺激过度表达 IGF-1R 的纤维肉瘤的生长 (Butler 等人, Cancer Res. 58 :3021-3027, 1998)。关于 IGF-1/IGF-1R 相互作用在各种人肿瘤生长中所起作用的综述,参见 Macaulay, Br. J. Cancer, 65 :311-20, 1992。

[0006] 使用 IGF-1R RNA 的反义表达载体或反义寡核苷酸,已经表明用 IGF-1R 进行干涉引起 IGF-1- 介导的细胞生长受到抑制 (参见例如, Wraight 等人, Nat. Biotech. 18 :521-526, 2000)。生长还可以使用以下物质来抑制:IGF-1 的肽类似物 (Pietrzkowski 等人, Cell Growth & Diff. 3 :199-205, 1992 ;Pietrzkowski 等人, Mol. Cell. Biol. 12 :3883-3889, 1992), 或表达对 IGF-1RNA 的反义 RNA 的载体 (Trojan 等人, Science 259 :94-97, 1992)。另外, IGF-1R 的抗体 (Arteaga 等人, Breast Canc. Res. Treatm. 22 :101-106, 1992 ;和 Kalebic 等人, Cancer Res. 54 :5531-34, 1994) 和 IGF-1R 的显性失活突变体 (Prager 等人, Proc. Nat' l Acad. Sci. USA 91 :2181-85, 1994 ;Li 等人, J. Biol. Chem. 269 :32558-2564, 1994 ;Jiang 等人, Oncogene 18 :6071-6077, 1999) 可以反转变形的表现型、抑制肿瘤发生和诱导

转移性表现型的损失。

[0007] IGF-1 对于调节细胞凋亡同样重要。细胞凋亡是编程性细胞死亡,其涉及多种进化过程,包括免疫和神经系统成熟。除了在发育中的作用之外,细胞凋亡还已经作为针对肿瘤发生的重要的细胞保护措施 (Williams, *Cell* 65 :1097-1098,1991 ;Lane, *Nature* 362 :786-787,1993)。凋亡程序的抑制可有助于恶性肿瘤的形成和进展。

[0008] IGF-1 通过在 IL-3- 依赖性造血细胞中的细胞因子退隐来保护免于细胞凋亡 (Rodriguez-Tarduchy, G. 等人, *J. Immunol.* 149 :535-540,1992), 并且在 Rat-1/mycER 细胞中保护免于血清退隐 (Harrington, E. 等人, *EMBO J.* 13 :3286-3295,1994)。c-myc 驱动的成纤维细胞的存活依赖 IGF-1 的论证提示, IGF-1 受体在维持肿瘤细胞方面有重要的作用, 具体地是通过抑制细胞凋亡, 这是与 IGF-1 或 IGF-1R 的增殖作用不同的作用

[0009] IGF-1 对细胞凋亡的保护作用依赖于在细胞上存在有 IGF-1R 来与 IGF-1 相互作用 (Resnicoff 等人, *Cancer Res.* 55 :3739-41,1995)。还通过使用 IGF-1R 的反义寡核苷酸进行的研究提供了对 IGF-1R 维持肿瘤细胞的抗凋亡功能的支持, 所述研究确定了 IGF-1R 水平、细胞凋亡的程度和大鼠同基因肿瘤的致癌潜能之间的数量关系 (Resnicoff 等人, *Cancer Res.* 55 :3739-3741,1995)。已经发现过度表达的 IGF-1R 在体外保护肿瘤细胞免于依托泊苷诱导的细胞凋亡 (Se11 等人, *Cancer Res.* 55 :303-06,1995) 并且, 更引人注目的是, IGF-1R 水平降低到低于野生型水平在体内引起肿瘤细胞的大规模细胞凋亡 (Resnicoff 等人, *Cancer Res.* 55 :2463-69,1995)。

[0010] 一些研究提示 IGF-1R 的表达水平与临床结果相关。在肿瘤模型中, IGF-1R 调节细胞增殖、存活和转移, 并且诱导对靶向治疗的抵抗性。抑制 IGF-1R 显著地增加胞毒剂的活性 (Cohen, B. 等人, *Clin. Cancer Res.* 11(5) :2063-73)。因此, 抑制 IGF-1R 信号转导似乎是开发新的癌疗法的有前途的策略。

[0011] 上皮组织的恶性肿瘤是癌的最常见形式, 并且引起大多数与癌有关的死亡。由于这些肿瘤的外科治疗的进展, 死亡率越来越涉及早期转移和复发, 这在最初诊断时经常是隐蔽的 (Racila 等人, *Proc. Nat' l Acad. Sci. USA* 95 :4589-94,1998 ;Pantel 等人, *J. Nat' l Cancer Inst.* 91(13) :1113-24,1999)。例如, 一些器官的远距离解剖学部位使得在那些器官上的肿瘤不太可能在侵入相邻组织和生长到大于 1cm 之前被检测到。即使对于乳腺癌, 通过乳腺摄影检测的小的乳腺癌肿瘤 (< 1cm) 已经有 12-37% 在诊断时已经转移 (Chadha M. 等人, *Cancer* 73(2) :350-3,1994)。

[0012] 循环肿瘤细胞 (“CTC”) 是在患有不同实体恶性肿瘤的患者的循环中存在的上皮来源的细胞。它们来源于原发肿瘤的克隆并且是恶性的。(参见 Fehm 等人, *Clin. Cancer Res.* 8 :2073-84,2002)。在文献中已经有越来越多的证据表明 CTC 可以被认为是以下癌的癌症进展的独立诊断 (Beitsch&Clifford, *Am. J. Surg.* 180(6) :446-49,2000(乳腺癌) ;Feezor 等人, *Ann. Oncol. Surg.* 9(10) :944-53,2002(结肠直肠癌) ;Ghossein 等人, *Diagn. Mol. Pathol.* 8(4) :165-75,1999(黑素瘤、前列腺癌、甲状腺癌) ;Glaves, *Br. J. Cancer* 48 :665-73,1983(肺癌) ;Matsunami 等人, *Ann. Surg. Oncol.* 10(2) :171-5,2003(胃癌) ;Racila 等人,1998 ;Pantel 等人,1999)。

[0013] 有许多理由使得循环肿瘤细胞的检测和计数对于病人监护是重要的。它们可以在原发肿瘤之前被检测到, 因此允许早期的诊断。它们响应治疗而降低, 因此, 计数 CTC 的能

力允许监控给定治疗方案的有效性。它们可在辅助性情况中用作工具来监控在没有可测量的疾病的患者中的复发。例如,发现在乳房切除术 8-22 年之后的乳腺癌患者中有 36% 存在有 CTC,显然来自微小转移(单个肿瘤细胞沉积或赘生性细胞的非常小的聚簇)。Meng 等人, Clin. Can. Res. 10(24) :8152-62, 2004。

[0014] 另外, CTC 可用于预测无进展的存活率 (PFS) 和总的存活率 (OS), 因为已经证明了转移性癌患者中循环肿瘤细胞的存在 / 数量与 PFS 和 OS 都相关。参见例如, Cristofanilli 等人, J. Clin. Oncol. 23(1) :1420-1430, 2005 ;Cristofanilli 等人, N. Engl. J. Med. 351(8) :781-791, 2004。

[0015] 然而,仍需要比仅仅检测 CTC 更灵敏的快速的和可靠的测定法。

发明内容

[0016] 本发明涉及预测 IGF-1R 拮抗剂治疗在患者中的效力的方法,包括以下步骤:a) 从患者获得生物标本;b) 制备样本,其中将生物标本与配体混合,所述配体特异性地与肿瘤细胞反应,以便基本上排除其它样本组分;c) 使样品与特异性地结合上皮细胞的至少一种试剂接触;d) 使样品与对于细胞上的胰岛素样生长因子受体 (IGF-1R) 有结合亲合力的试剂接触;和 e) 分析样品来决定表达 IGF-1R 的肿瘤细胞的存在,在样品中表达 IGF-1R 的肿瘤细胞的存在是患者中 IGF-1R 拮抗剂治疗的效力的预报。

[0017] 本发明还涉及监控患者中 IGF-1R 拮抗剂治疗在患者中的效力的方法,包括以下步骤:a) 从患者获得第一生物标本;b) 制备第一样本,其中将第一生物标本与配体混合,所述配体特异性地与肿瘤细胞反应,以便基本上排除其它样本组分;c) 使第一样本与特异性地结合上皮细胞的至少一种试剂接触;d) 使第一样本与对于细胞上的胰岛素样生长因子受体 (IGF-1R) 有结合亲合力的试剂接触;e) 分析第一样本,以测定表达 IGF-1R 的肿瘤细胞的存在和数量;f) 对所述患者给予 IGF-1R 拮抗剂治疗;g) 在给予 IGF-1R 拮抗剂治疗之后,从患者获得第二生物标本;h) 从第二生物标本制备第二样本,其中将第二生物标本与配体混合,所述配体特异性地与肿瘤细胞反应,并且对第二样本进行步骤 c)-e);和 i) 将第一样本中的表达 IGF-1R 的肿瘤细胞数目与第二样本中的表达 IGF-1R 的肿瘤细胞数目进行比较,第二样本中的数目较小表示 IGF-1R 拮抗剂治疗对所述患者的有效性。

[0018] 在优选实施方案中, IGF-1R 拮抗剂治疗是抗-IGF-1R 抗体。

[0019] 本发明进一步涉及用于筛查患者样本是否存在表达 IGF-1R 的循环肿瘤细胞的试剂盒,包括:a) 包括磁芯材料的有涂层的磁性纳米粒子、蛋白质基础涂层材料和特异性地结合于肿瘤细胞的特征决定簇的抗体,所述抗体直接或间接地连接于所述基础涂层材料;b) 用于从分析中排除非肿瘤细胞的样本组分的细胞特异性染料;和 c) 对于 IGF-1R 具有结合亲合力的至少一种可检测的标记试剂。

[0020] 为了使本发明的前述和其它目的、优点和特征在下文中变得显而易见,可以通过参考以下发明详述、附图说明和随后的权利要求更清楚地理解本发明的性质。

附图说明

[0021] 图 1 是各种细胞系的 IGF-1R-藻红蛋白染色的频率曲线的叠加。

[0022] 图 2 是标记的 MCF-7 乳腺癌细胞 (A 图) 和 T-24 膀胱细胞 (B 图) 的荧光显微图

像的汇集。

[0023] 图 3 是可能的循环肿瘤细胞的荧光显微图像的汇集。

[0024] 图 4 是用抗-IGF-1R 抗体治疗的四名患者的总的循环肿瘤细胞数目和 IGF-1R- 阳性的循环肿瘤细胞数目的图示。

[0025] 图 5 是用抗-IGF-1R 抗体与多西他赛的组合治疗的四名患者的总的循环肿瘤细胞数目和 IGF-1R- 阳性的循环肿瘤细胞数目的图示。

[0026] 图 6 是用抗-IGF-1R 抗体与紫杉醇和卡铂的组合治疗的四名患者的总的循环肿瘤细胞数目和 IGF-1R- 阳性的循环肿瘤细胞数目的图示。

[0027] 发明详述

[0028] 除非在本文中明确定义,涉及本发明使用的科学和技术术语具有本领域技术人员通常理解的含义。另外,除非上下文要求,单数的术语包括复数并且复数术语包括单数。

[0029] 在美国每年确诊超过 1000,000 的新的癌症病例;其中大约五分之一的死亡是由癌症或与其治疗相关的并发症引起的。有相当多的研究计划不断地针对改善这种疾病的治疗和诊断。大多数癌症患者不是被他们的原发肿瘤杀死;而是死于转移病变:从原发肿瘤分出并且遍及身体传播的恶性细胞建立多重分布广泛的肿瘤集落,经常是传播到远的位置。不幸的是,转移性集落经常比原发肿瘤更难以检测和清除,并且经常是不可能成功地治疗它们的全部。恶性细胞转移的能力仍是癌症治疗的主要阻碍,并且其可由 IGF-1 受体促进。参见例如,Bahr 等人,Growth Factors 23:1-14,2005。

[0030] 基于癌症和癌症转移的复杂性和多年来治疗癌症患者的挫折,许多努力已经开始针对开发诊断检查,来指导治疗和监控这种治疗对转移病变或复发的作用。这种检查可能可用于癌症筛查,代替相对粗糙的检查例如用于乳房肿瘤的乳腺摄影或用于前列腺癌的手指直肠检验。

[0031] 考虑到已知 IGF-1 和 IGF-1R 与某些癌症的关系,进行了研究来评价抗-IGF-1R 抗体对循环肿瘤细胞数目及其 IGF-1R 表达的影响,以及该抗体的临床效力。现在已经开发了可用于癌症的诊断和治疗的检测和计数表达 IGF-1R 的循环肿瘤细胞 (IGF-1R- 阳性 CTC) 的测定法,并且其优于涉及 CTC 的现有技术方法。所述测定法可有助于更好地理解 IGF-1 受体的生物学功能。例如,尽管已经假定 IGF-1R 水平升高对于触发肿瘤细胞侵袭性/转移性表现型来说是需要的,但是 IGF-1R 表达水平与转移可能性之间的关系尚未完全阐明。现在已经发现 IGF-1R- 阳性 CTC 计数高的患者似乎是具有更具侵袭性的肿瘤,如快速的疾病进展所证明的。因此,IGF-1R 表达增加与转移可能性之间的可能的关系可能是将检测 IGF-1R- 阳性 CTC 作为不良结果的预报和/或治疗性介入的基础。

[0032] 最初,本发明的 CTC-IGF-1R 测定法可用于早期检测肿瘤,或者用于证实诊断。它们还可以用于评价预后。

[0033] 本发明的方法对于治疗计划也是有用的。已经发现在治疗之前具有 IGF-1R- 阳性循环肿瘤细胞的患者很可能响应 IGF-1R 拮抗剂治疗,而没有所述循环肿瘤细胞的患者不响应。通过在开始任何治疗之前筛查患者的 IGF-1R- 阳性抗体,有可能预先选择很可能响应于 IGF-1R 拮抗剂治疗的群体并且因此设计治疗方案。CTC-IGF-1R 测定法作为抗-IGF-1R 抗体的生物标志物的可能应用可以包括鉴定最佳的生物学剂量、选择剂量和治疗方案和确定治疗持续时间。

[0034] 已经发现在血液中的 IGF-1R- 阳性 CTC 水平变化与化学疗法和临床状态之间具有好的相关性。考虑到这些相关性,还有可能使用本发明的测定法来评价患者对治疗的响应或疾病进展。测量循环肿瘤细胞上的 IGF-1 受体提供了真实的药效学 (PD) 终点。一旦开始治疗,测量肿瘤细胞上的 IGF-1R 可用于测定是否已经实现靶的最大抑制而没有达到最大耐受剂量 (MTD)。还可以监控对已知治疗的抵抗性的形成。本发明的另外的优点在于,可以通过测量 CTC 比常规方法更频繁地测定药物的效果。

[0035] 最后,本发明的方法还可以用于检测肿瘤的复发,即使在没有临床症状的存在下亦如此。

[0036] 本发明的方法可用于与非血液学恶性肿瘤的诊断和 / 或治疗结合,所述非血液学恶性肿瘤包括乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、肺癌和结肠癌,特别是非小细胞肺癌 (NSCLC) 和激素难治疗的前列腺癌 (HRPC)。

[0037] 对多肿瘤类型的患者进行筛查表明,在 HRPC 患者中频繁地检测到 CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC。在 HRPC 中鉴定这些细胞具有预后或治疗方面的意义。事实上,在先前的研究中,发现 CTC 的存在是 HRPC 患者中存活率的最有意义的参数预报 (Moreno 等人, *Urology* 65 :713-718,2005)。多重研究已经确立了 IGF-1R 在前列腺癌形成中的作用,并且体外数据显示,IGF-1R 表达和 / 或活性的增加与激素难治疗的表现型的进展有关 (Hellowell 等人, *Cancer Res.*, 62 :2942-2950,2002 ;Chott 等人, *Am. J. Pathol.* 155 :1271-1279,1999)。在本文描述的一项研究中,被认为是 IGF-1R 阳性 (即,检测到至少一种 IGF-1R- 阳性 CTC) 的 HRPC 患者在登记时具有比没有可检测的 CTC 的那些患者更高的血清 PSA 中值水平。此外,PSA 水平和 CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 计数在治疗响应或疾病进展过程中平行地改变。以前已经表明具有进行性转移性 HRPC 的患者的 CTC 计数比先前疾病组的那些显著更高,并且在两名患者中报告了在用多西他赛初步治疗一周之后 CTC 计数降低 (Moreno 等人,2005,同前)。然而,这两名患者都发生了进展,尽管给予了另外的多西他赛剂量,但仍表现出 CTC 计数和 PSA 水平升高。本文所述的研究提示,只有 CTC 计数的持续降低才与 HRPC 中的治疗响应相关。因此,CTC 计数可以提供独立于 PSA 水平的预后信息。重要的是,临床前数据表明,PSA 响应抗 -IGF-1R 治疗的改变反映了前列腺肿瘤生长的变化 (Wu 等人, *Clin. Cancer Res.* 11 :3065-3074,2005)。

[0038] 还已经发现,对组合的抗 -IGF-1R 抗体和多西他赛治疗有响应的比例在研究录入时具有可检测的 IGF-1R- 阳性 CTC 的那些患者中比在其中没有检测到这些细胞的那些患者中更高。此外,在 IGF-1R-CTC 阴性患者中观察到不是与临床利益必然相关的延迟响应 (参见例如, *Petrylak* 等人, *J. Nat'l Cancer Inst.* 98 :516-521,2006)。这些数据暗示了 IGF-1R CTC 计数用于鉴定可以受益于抗 -IGF-1R 治疗的 HRPC 患者的可能应用。

[0039] 本发明的方法可用于设计和 / 或监控使用抑制 IGF-1R 信号转导的各种化学治疗化合物进行的治疗。特别优选的是抗 -IGF-1R 抗体,例如在美国专利 7,037,498 和美国专利申请公布 2005/0069539 中描述的那些。其它优选的抗 -IGF-1R 抗体包括 F-50035 和 MK-0646 (PierreFabre/Merck) ;19D12 (Schering-Plough) ;R1507 (Roche/Genmab) ;EM-164/AVE-1642 (Immunogen/Sanofi-Aventis) ;IMC-A12 (ImCloneSystems) ;AMG479 (Amgen) ;以及在国际专利申请 W02006/069202、美国专利申请公布 2005/0147612、美国专利申请公布 2005/0084906、美国专利申请公布 2005/0249730、美国专利申请公

布 2004/0018191、美国专利申请公布 2005/0136063、美国专利申请公布 2003/0235582、美国专利申请公布 2004/0265307、美国专利申请公布 2004/0228859、美国专利申请公布 2005/0008642、欧洲专利申请 1622942、美国专利申请公布 2003/0165502 和美国专利公布 2005/0048050 中描述的抗体。

[0040] 适合用于本发明的分子的其它类别包括特异性地结合于 IGF-1R 的肽适配体、反义寡核苷酸 IGF-1R 调节剂；和小分子的 IGF-1R 抑制剂。优选的小分子的 IGF-1R 抑制剂包括 OSI-906 (OSI Pharmaceuticals)；AEW-541 (Novartis)；BMS-536924 和 BMS-554417 (Bristol-Myers Squibb)；INSM-18 (Insmed)；AG-1024 (Pfizer)；XL228 (Exelixis)；苦鬼白脂素；以及在国际专利申请 W02004/043962 和 W02004/054996 中披露的那些。

[0041] 如以下更具体地阐述的，本发明的方法包括从患者样本选择性除去具有某些抗原活性部点的细胞。用于这种选择性除去的方法和装置为本领域技术人员公知的。参见例如，美国专利 4,551,435、4,795,698、4,925,788、5,108,933 和 5,200,084 和美国专利申请公布 2004/0157271。在优选实施方案中，所关心的细胞是使用铁磁流体从患者样本免疫磁性分离的。铁磁流体包含在胶态悬浮体中的微小的磁性粒子，其流动可以由磁铁或磁场控制。

[0042] 为了更好地理解本发明，给出以下实施例。这些实施例只是用于说明的目的，不应将其看作是以任何方式限制本发明的范围。

具体实施方式

[0043] 实施例

[0044] 在本文中给出的实施例中，从人受试者的多个部位取得血样到 CELLSAVE Preservative Tubes (Immunicon, Huntingdon Valley, PA) 中，所述 CELLSAVE Preservative Tubes 为包含细胞防腐剂以保持细胞形态和细胞表面抗原表达的排空的 10mL 抽血管。将样本保持在室温并且在血液收集的 72 小时内如上所述处理。

[0045] 使用实体瘤反应评价标准 (Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) (RECIST) 放射性评价患者对治疗的响应 (参见 Therasse 等人, J. Nat'l Cancer Inst. 92: 205-216, 2000)，或者，在 HRPc 患者中使用前列腺特异性抗原工作组 (PSAWG) 标准放射性评价患者对治疗的响应 (参见 Bublely 等人, J. Clin. Oncol. 17: 3461-3467, 1999)。

[0046] 实施例 1

[0047] IGF-1R 循环肿瘤细胞测定法的开发

[0048] 细胞培养和细胞掺入示踪剂 (spiking)：在包含补充有 10% FCS 的 RPMI-1640 细胞培养基的烧瓶中培养乳腺癌细胞系 MCF-7、前列腺细胞系 PC3-9、膀胱细胞系 T-24 和造血细胞系 CEM，并且随后使用胰蛋白酶收获细胞。只有在通过台盘蓝染料排除试验评价细胞悬液的细胞存活力超过 90% 时才使用所述细胞悬液。为了测定实际的细胞数，将细胞的 50 μ L 等分试样透化处理并且通过加入包含 0.05% 皂苷和与最终浓度为 0.5 μ g/ml 的藻红蛋白 (PE) 缀合的 10 μ L 抗细胞角蛋白单克隆抗体的 200 μ L PBS 进行荧光标记。在室温培养 15 分钟之后，加入 200 μ L 缓冲液和包含总计大约 20,000 个小珠的 20 μ L 荧光小珠 (Beckman-Coulter, Inc., Miami, FL)。将只含小珠的双份的管在流式细胞计数器 (FACSCalibur, BD Biosciences, San Jose, CA) 上运行，直到 100% 的样品被吸出。这样提

供了存在于 20 μ l 中小珠数目的精确估计值。然后在流式细胞计数器上一式三份检测实验管,直到在每个管中计数到 10,000 个小珠。使用已知的每单位体积的小珠数,测定细胞的浓度。对于 IGF-1R 检测,估计在 7.5mL 血液中掺入示踪剂的细胞数为 130 到 220 个。

[0049] CTC 的分离和计数:制备用于从血液分离细胞的样本并且使用 CELLTRACKS 系统 (Immunicon, Huntingdon Valley, PA) 进行分析,所述 CELLTRACKS 系统包括 CELLTRACKS AUTOPREP 系统、试剂盒和 CELLSPOTTER 分析仪。CELLTRACKS AUTOPREP 系统是用于稀疏细胞检测的自动的样品制备系统。所述试剂盒包括涂有免疫磁性富集细胞的抗体的铁磁流体;荧光结合的抗体(与分别用于标记上皮细胞和白细胞的 PE 和别藻蓝蛋白(APC)结合的抗体);细胞核染料;用于洗涤、透化和再悬浮细胞的缓冲液的混合物。为了检测癌细胞,将 7.5mL 血液与涂有针对肿瘤相关抗原 EpCAM(上皮细胞粘着分子、或上皮细胞表面抗原)的抗体的铁磁流体混合。在免疫磁性富集之后,将识别细胞角蛋白 4、5、6、8、10、13、18 和 19 的异硫氰酸荧光素(FITC)-标记的抗体,识别白细胞抗原 CD45 的 APC-标记的抗体,识别 IGF-1R 的 PE-标记的抗体,和核酸染料 4',6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)与透化缓冲液一起加入,以便荧光标记所述免疫磁性标记的细胞。在系统上进行培养之后,重复磁力分离并且吸出过量的染色剂。在最后的处理步骤中,将细胞再悬浮在 MAGNEST Cell Presentation Device (Immunicon, Huntingdon Valley, PA) 中。这个装置包括一个腔室和两个磁铁,所述磁铁使免疫磁性标记的细胞定向,以便使用荧光显微镜进行分析。

[0050] 将 MAGNEST 置于 CELLSPOTTER 分析仪上,所述 CELLSPOTTER 分析仪为四色半自动荧光显微镜。抓拍覆盖四个荧光滤光器立方体中的每一个的盒体(cartridge)的整个表面的图像画面。包含满足预定标准的对象的抓拍图像自动地呈现在能上网的浏览器中,由操作者从中进行最后的细胞选择。定义为 CTC 的对象的标准包括圆形到椭圆形的形态、可见的细胞核(DAPI 阳性)、细胞角蛋白阳性染色和没有 CD45 表达(通过阴性 CD45-APC 染色测定的)。细胞计数的结果总是表示为每 7.5mL 血液中的细胞数目。

[0051] 选择 IGF-1R 抗体和在肿瘤细胞系上检测 IGF-1R:在来自乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞的细胞上滴定抗 IGF-1R 抗体 1H7(PE 缀合物;BDBiosciences, San Jose, CA) 和 33255.111(R&D Systems, Minneapolis, MN)。交叉阻断实验显示没有抑制,表明这些抗体结合于 IGF-1R 的不同的和非竞争性的抗原决定部位。使用 CP-751,871 人抗-IGF-1R 抗体(Pfizer Inc.;参见美国专利 7,037,498)进行的交叉阻断实验表明,抗体 33255.111 完全地被基本上等摩尔量的 CP-751,871 阻断,不能结合细胞。相反,1H7 抗体表现出在 CP-751,871 的存在下结合没有受到抑制。这些数据显示,33255.111 和 CP-751,871 结合于相同或相关的抗原决定部位。因为 1H7 抗体对 IGF-1R 的结合没有在 CP-751,871 的存在下被阻断,选择 1H7 用于进一步的评价。

[0052] 通过用 PE 标记的抗-IGF-1R 抗体 1H7 染色随后进行流式细胞计数来评价造血细胞系 CEM、前列腺癌细胞系 PC3-9、膀胱细胞系 T-24 和 MCF-7 乳腺癌细胞系上的抗原密度。图 1 表示各种细胞系的 IGF-1R-PE 染色的频率曲线的叠加。CEM 细胞的染色与对照相似,因此,IGF-1R 密度低于检测极限。可以从背景分辨 PC3-9 细胞的 IGF-1R-PE 染色,并且 T24 和 MCF-7 细胞明显地具有更亮的染色。通过用具有已知数量 PE 分子的小珠校准流式细胞计数器来得到对抗原密度的估计值。PC3-9 细胞上的 IGF-1R 密度为约 10,000 IGF-1R 抗原,T-24 上为约 50,000 IGF-1R 抗原,MCF-7 细胞上为约 1,000,000 IGF-1R 抗原。

[0053] IGF-1R 测定法表征 :使用 CELLTRACKS 系统的标准的 CTC 测定法使用 PE 来检测在上皮来源的细胞上存在的细胞角蛋白,使用 APC 来检测造血来源的细胞上存在的 CD45,和使用 FITC 来检测被定义为细胞角蛋白阳性的、CD45- 阴性的有核细胞的 CTC 上的被分析物特异性试剂。用于使用 FITC 标记抗体检测抗原的 CELLSPOTTER 分析仪 s 的目前的检测极限为约每细胞大约 100,000 抗原。为了增加这个灵敏度,对 CTC 测定法进行重新配置,以便降低 IGF-1R 检测的检测极限。用 FITC 标记在上皮细胞上以高密度表达的细胞角蛋白,其允许使用 PE 标记的抗 -IGF-1R 抗体。在单独的实验中,将 130 到 200 个 PC3-9、T-24 或 MCF-7 细胞掺入 7.5mL 血液中并且用新配置的染色剂进行准备。在制备之后,将样品在 CELLSPOTTER 分析仪上扫描。所述分析仪被重新配置为使得为用户提供细胞角蛋白 FITC- 阳性的、有核的 DAPI- 阳性的结果作为 CTC 候选物。

[0054] 在图 2 的 A 图中,表示了从 7.5mL 血液回收的 MCF-7 细胞的典型实例。顶行表示明显表达 IGF-1R 受体的 3 个 MCF-7 细胞的聚簇,紧挨着合成图像的检验记号表明操作者将该细胞分类为 CTC,紧挨着表示 IGF-1R 染色的图像的检验记号表明操作者将这些 CTC 分类为表达 IGF-1R 的 CTC。在 A 图中所示的所有细胞都明显地表达 IGF-1R 受体。在掺有 MCF-7 细胞的得自十六名健康个体的血液中,回收的 MCF-7 细胞有 80.6% (SD7.7) 被分类为表达 IGF-1R 的 CTC。在图 2 的 B 图中,表示了从 7.5mL 血液回收的 T-24 细胞的典型实例。与 MCF-7 细胞的 IGF-1R 染色相比,四个 T-24 细胞的 IGF-1R 表达明显更加模糊,并且操作者只将底部的两个细胞分类为表达 IGF-1R 受体的 CTC。在掺有 T-24 细胞的得自六名健康个体的血液中,回收的 MCF-7 细胞有 13.6% (SD3.9) 被分类为表达 IGF-1R 的 CTC。在掺有 PC3-9 细胞的得自六名健康个体的血液中,回收的 MCF-7 细胞有 3.8% (SD6.0) 被分类为表达 IGF-1R 的 CTC。这些数据为转移性癌患者的 CTC 上的 IGF-1R 抗原密度提供指导,其需要通过这个测定法来检测。

[0055] 转移性癌中的 CTC 上的 IGF-1R 表达 :在得自 139 名健康个体的 7.5mL 血液中,实际上不含 CTC(在 135 名个体中为 0CTC,在 4 名个体中为 1CTC)。为了检验是否可以确实地在转移性癌患者中的 CTC 上检测 IGF-1R,对得自 50 名患者的血样进行检验。在 7.5mL 血液中,在 50 名患者中的 11 名 (22%) 中检测到 CTC。在这 50 名患者中,18 名患有乳腺癌并且在 28% 中检测到了 CTC,13 名患有结肠直肠癌并且在 31% 中检测到了 CTC,3 名患有前列腺癌并且在 33% 中检测到了 CTC,12 名患有肺癌并且在 8% 中检测到了 CTC,在患有卵巢癌的 4 名患者中没有检测到 CTC。检测的 CTC 的实例表示在图 3 中。在该图中表示了八个 CTC 候选物。事件 1、事件 4、事件 5、事件 7 和事件 8 被分类为 CTC,只有第 1 和 4 行的 CTC 被分类为表达 IGF-1R 的 CTC。指出的是,在第 5 和 7 行中的 CTC 可以观察到可能的 IGF-1R 染色,但是认为这不足以将其分类为 IGF-1R 阳性 CTC。表 1 表示在具有 CTC 的 11 名患者中检测到的 CTC 数目、表达 IGF-1R 的 CTC 数目和表达 IGF-1R 的 CTC 的比例。在 11 名患者中的 8 名 (91%) 中检测到表达 IGF-1R 的 CTC。然而,表达 IGF-1R 的 CTC 的比例变化很大。

[0056] 表 1

[0057]

	CTC	IGF-1R (+) CTC	% IGF-1R (+) CTC
乳腺癌	180	47	26
	25	11	44
	5	1	20
	4	1	25
结肠直肠癌	6	1	17
	5	0	0
	4	0	0
	2	0	0
	1	1	100
前列腺癌	16	1	6
肺癌	2	1	50

[0058] 实施例 2

[0059] 在抗-IGF-1R 抗体的 1 期剂量-确定研究中在 CTC 上的 IGF-1R 表达

[0060] 研究 1 是用于剂量确定的 1 期研究,其设计用于确定如美国专利 7,037,498 所述的完全的人抗-IGF-1R 抗体在晚期实体瘤患者中的安全性和耐受性。在这项研究中,每 21 天给予 3-20mg/kg 剂量的抗-IGF-1R 抗体治疗(21 天周期)。为了评价用抗-IGF-1R 抗体进行治疗对这些患者中的 CTC 和表达 IGF-1R 的 CTC 的数目的影响,在每个 21 天治疗周期的筛选时、在剂量给药前 1 天和研究的第 8 天抽取血样。在患者无论何时由于疾病进展退出该研究时取得另一个样本。有 26 名患者提供了用于在研究过程中计数 CTC 的血样。

[0061] 在 26 名患者中有 16 名(61%) 在研究过程中的某一时间点具有一个或多个 CTC(剂量给药前或治疗过程中)。在研究过程中的某一时间点检测到 CTC 的 16 名患者中有 3 名没有检测到 IGF-1R- 阳性 CTC。在两种情况中,在 7.5mL 血液中只检测到一个 CTC。将 CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 的水平相对于时间绘图并且观察对抗-IGF-1R 抗体治疗的响应的几种模式。在图 4 中描绘了四个实例。在 A 图中,表示了得自用 6mg/kg 抗-IGF-1R 抗体的单剂量治疗的患者的 CTC 计数。在这名患者中,在用抗-IGF-1R 抗体治疗的第 8 天,CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 的数目降低,并且在第 15 天不再可检测到,然后在第 2 周期开始之前重现。在 B 图中,表示了得自用 10mg/kg 抗-IGF-1R 抗体的单剂量治疗的患者的 CTC 计数。在治疗 8 和 15 天 CTC 有轻微的减少之后,随着患者中断研究,CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 的数目随时间增加。通过 CT 扫描确定这名患者出现了疾病进展。在 C 图中,表示了得自用单剂量的 20mg/kg 抗-IGF-1R 抗体治疗的患者的 CTC 计数。除了在给予所述剂量 15 天之后出现的 CTC 峰之外,CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 数量未受影响。D 图表示得自用单剂量的 3mg/kg 抗-IGF-1R 抗体治疗的患者的 CTC 计数,其中几乎所有检测到的 CTC 都表达 IGF-1R。在患者中断研究时发现 CTC 增加。随这些数据的一个可能的解释是,这些患者中的大多数循环肿瘤细胞都表达 IGF-1R,并且用抗-IGF-1R 抗体进行治疗似乎是阻断了保存 CTC 所需的

存活信号。或者,抗-IGF-1R抗体的作用可能是直接地针对肿瘤质量,抑制CTC的迁移。

[0062] 尽管有易变性,但是观察到在剂量给药后的CTC和IGF-1R-阳性CTC数目减小以及在结束治疗周期时循环细胞数目的反弹。在研究后的随访中也观察到CTC和IGF-1R-阳性CTC数目的增加。这些数据支持了CTC和CTC-IGF-1R测定法在监测对抗-IGF-1R抗体的生物学响应和临床响应中的作用。

[0063] 实施例 3

[0064] 在抗-IGF-1R抗体与多西他赛组合的研究中的CTC上的IGF-1R表达

[0065] 研究2是用如美国专利7,037,498所述的完全的人抗-IGF-2R抗体与多西他赛(TAXOTERE)的组合在晚期实体瘤患者中的剂量确定的1b期研究。在第1天和第22天将多西他赛和抗-IGF-1R抗体分别以 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 和 $0.1\text{--}10\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量给药。有27名患者提供了用于计数CTC的血样,包括19名激素难治疗的前列腺癌(HRPC)患者。在每个周期的剂量给药前第1天和第8天收集CTC样本。

[0066] 27名患者中有19名(70%)在研究过程中在某一时间点具有一个或多个CTC。在研究的某一时间点检测到CTC的十九名患者中,只有一名没有检测到IGF-1R-阳性CTC。有趣的是,在这名患者的所有的5次CTC评价中,都检测到CTC,但是没有检测到IGF-1R-阳性CTC,表明这名患者肿瘤位点本身不能表达IGF-1R。

[0067] 在大多数患者中观察到响应于治疗的CTC数目减少。将CTC和IGF-1R-阳性CTC相对于时间绘图并且观察对抗-IGF-1R抗体治疗的响应的几种模式。在图5中描绘了四个实例。A图描绘在用 $10\text{mg}/\text{kg}$ 抗-IGF-1R抗体和 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 的多西他赛(21天周期)治疗的激素难治疗的前列腺癌患者中的CTC和IGF-1R-阳性CTC数目。在治疗之后,CTC的总数减少,反映了对联合治疗的反应。得自这名患者的PSA值证实了对治疗的临床反应。另外,在这名患者中,在抗-IGF-1R抗体/多西他赛治疗之前,大约50%的CTC原来是IGF-1R-阳性的;IGF-1R-阳性CTC的数目随着治疗迅速地减少。因为抗-IGF-1R抗体的生物学效应是诱导IGF-1R的向下调节,这些数据支持了CTC和CTC-IGF-1R测定法在监控抗-IGF-1R抗体的临床和生物学(生物标志物)活性中的可能的作用。B图描绘了CTC和IGF-1R阳性CTC数目发生类似减少的患者。C和D图描绘了其中在给予每个剂量之后CTC和IGF-1R-阳性CTC数目减小但是每次都反弹的两名患者。两名患者都用低剂量的抗-IGF-1R抗体治疗(分别为 0.8 和 $3\text{mg}/\text{kg}$)。

[0068] 加入研究2的在登记时具有至少一个可检测的IGF-1R-阳性CTC的HRPC患者具有比IGF-1R-CTC阴性的那些($n = 8$, PSA中位值为 $92\text{ng}/\text{mL}$)更高的PSA水平($n = 10$, PSA中位值为 $475\text{ng}/\text{mL}$)。由于遗漏样本,不可能在两名患者进行评价。尽管有明显更高的肿瘤负荷,在登记时为IGF-1R-CTC阳性的患者以比IGF-1R-CTC阴性的那些(8名中的2名)更高的比例(10名中有6名)以PSA标准响应,并且总的说来,对多西他赛和抗-IGF-1R抗体的组合响应更早。

[0069] 表 2

[0070]

HRPC 患者的 治疗反应	基线 PSA (ng/mL)	基线 CTC	基线 IGF-1R(+) CTC	最初的 PSA 反应的治 疗周期
1006	238	2	1	3 rd
1008	471	4	1	12 th
1014	9944	12	5	2 nd
1019	617	44	19	3 rd
1022	1639	6	2	1 st
1025	807	160	37	1 st
1003	13	0	0	6 th
1011	131	0	0	12 th

[0071] 在研究登记时没有检测到 CTC 的 8 名患者中,有 6 名对治疗无反应,并且实际上它们中的 3 名在疾病进展时经历了 CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 计数的增加。最后,用多西他赛和抗 -IGF-1R 抗体治疗的检测到 CTC 但是没有检测到 IGF-1R- 阳性 CTC 的一名 HRPC 患者对联合治疗没有反应。其 CTC 计数的减小也是暂时的(1 个周期)。

[0072] 在表 3 中,显示了研究 2 中 HRPC 患者的患者最好反应的概要。在开始治疗前没有在 7.5mL 中检测到 IGF-1R- 阳性 CTC 的 8 名患者中有 2 名(25%)表现出对治疗的部分反应,而在 7.5mL 中有 > 1 个 IGF-1R- 阳性 CTC 的 11 名患者中有 6 名(55%)表现出部分反应。这些数据强有力地支持了如下的概念,即,CTC-IGF-1R 测定法可用于确定患者可受益于抗 -IGF-1R 抗体治疗,以及用于确定最佳剂量和决定治疗持续时间。

[0073] 表 3

[0074] 研究 2 中的 IGF-1R- 阳性循环肿瘤细胞和患者最好反应

[0075] 患者 基线时的 IGF-1R(+) CTC(n) 最好反应

[0076] 1001 2 PD

[0077] 1005 2 SD

[0078] 1006 1 PR

[0079] 1008 1 PR

[0080] 1012 31 PD

[0081] 1013 4 PD

[0082] 1014 5 PR

[0083] 1019 19 PR

[0084] 1021 4 PD

[0085] 1022 2 PR

[0086] 1025 37 PR

[0087] 合计 = 6PR/11 患者

[0088]	患者	基线时的 IGF-1R(+) CTC(n)	最好反应
[0089]	1002	0	SD
[0090]	1003	0	PR
[0091]	1010	0	PD
[0092]	1011	0	PR
[0093]	1015	0	SD
[0094]	1016	0	PD
[0095]	1018	0	SD
[0096]	1020	0	SD
[0097]			合计 = 2PR/8 患者

[0098] PD = 疾病进展 ;SD = 疾病稳定 ;PR = 部分反应

[0099] 实施例 4

[0100] 将抗-IGF-1R 抗体与紫杉醇和卡铂组合的研究中在 CTC 上的 IGF-1R 表达

[0101] 研究 3 是用如美国专利 7,037,498 所述的完全的人抗-IGF-3R 抗体与紫杉醇 (TAX01) 和卡铂 (PARAPLATIN) 的组合在晚期实体瘤患者中的 1b 期研究。紫杉醇、卡铂和抗-IGF-1R 抗体的剂量分别是 200mg/m²、6AUC 和 0.05-10mg/kg。41 名患者提供了用于计数 CTC 的血样。在每个周期的剂量给药前第 1 天和第 8 天收集血样。

[0102] 41 名患者中有 21 名 (51%) 在研究过程中的某一点具有一个或多个 CTC, 而 41 名患者中有 10 名 (24%) 在给予第一剂量之前具有一个或多个 CTC。41 名患者中有 16 名 (39%) 在研究过程中的某一点具有一个或多个 IGF-1R- 阳性 CTC, 而 41 名患者中有 8 名 (20%) 在给予第一剂量之前具有一个或多个 IGF-1R- 阳性 CTC。参加研究的一名 HRPC 患者在研究登记时具有大的 CTC 数目 (71 CTC 和 15 IGF-1R- 阳性 CTC), 所述数目响应于治疗而减小 (在治疗第 21 天为 21 CTC 和 2 IGF-1R CTC)。

[0103] 将 CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 水平相对于时间绘图并且观察响应治疗的几种模式。在图 6 中描绘了四个实例。A 图表示得自在参加研究时具有极低 CTC 数目的患者的数据在用紫杉醇 / 卡铂和 0.05mg/kg 的抗-IGF-1R 抗体治疗 6 个周期和随后用 3mg/kg 的抗-IGF-1R 抗体治疗 2 个另外的周期之后, 该患者不再对治疗有反应。这种临床反应的缺少涉及 CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 数目的显著增加。通过 CT 扫描证实了这名患者的疾病进展。在 B 图中, 数据得自在研究过程中 CTC 和 IGF-1R- 阳性 CTC 具有类似的增长模式的患者。在 C 和 D 图中, 显示两名患者在开始治疗之前的 CTC。所述患者分别接受 1.5 和 6mg/kg 的抗-IGF-1R 抗体。在患者接受抗-IGF-1R 治疗时, IGF-1R- 阳性细胞的数目似乎是降低的 (C 图) 或保持低的 (D 图)。这些数据进一步支持了 CTC 和 CTC-IGF-1R 测定法在监控对抗-IGF-1R 抗体治疗的作用和抵抗性形成中的可能的作用。

[0104] 尽管已经在本文中描述了本发明的目前优选的实施方案, 但是对于本发明所属技术领域的路上人员显而易见的是, 可对所述的实施方案进行改变和修饰而不脱离本发明的精神实质和范围。因此, 意在本发明只受随后的权利要求和法律的适用条款所要求的程度的限制。

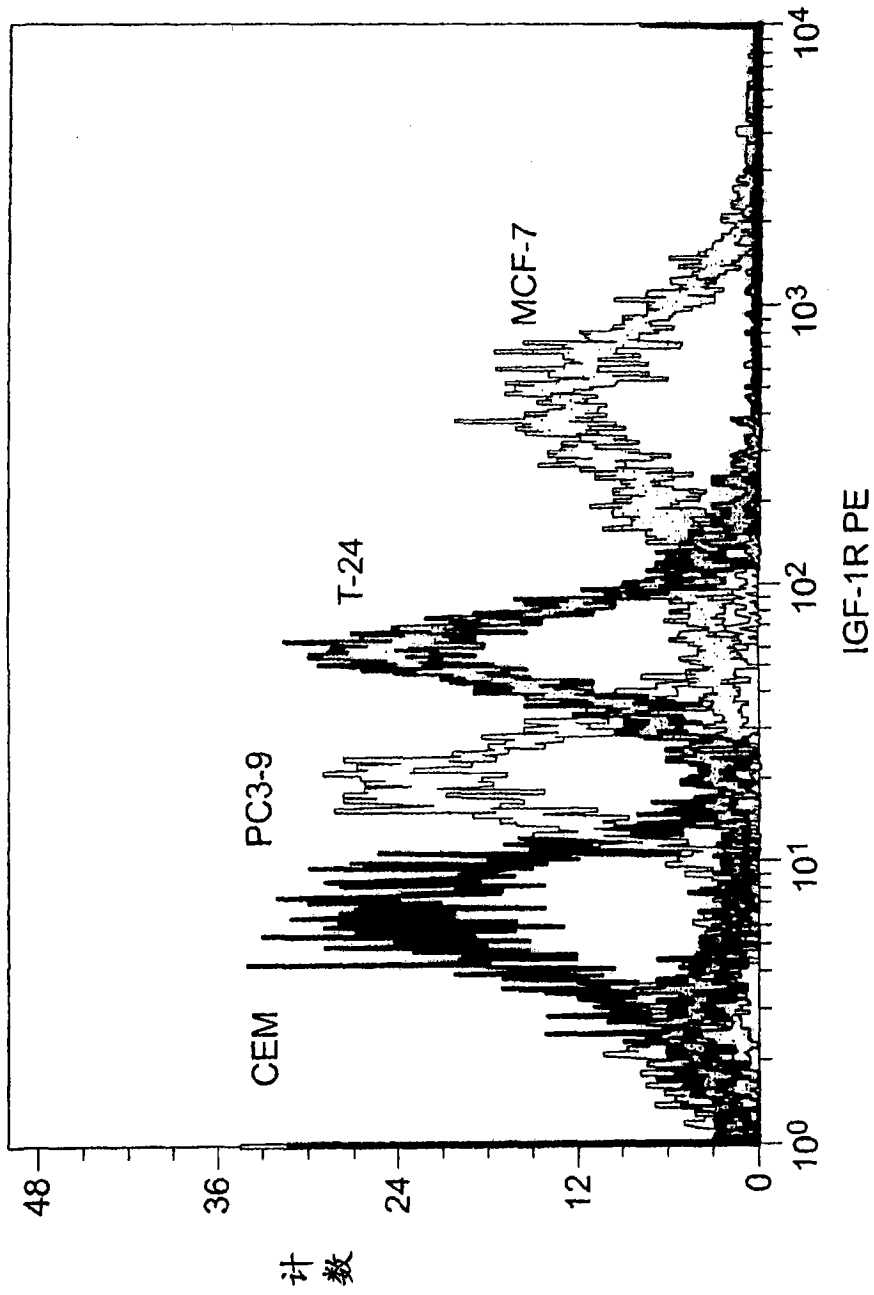


图1

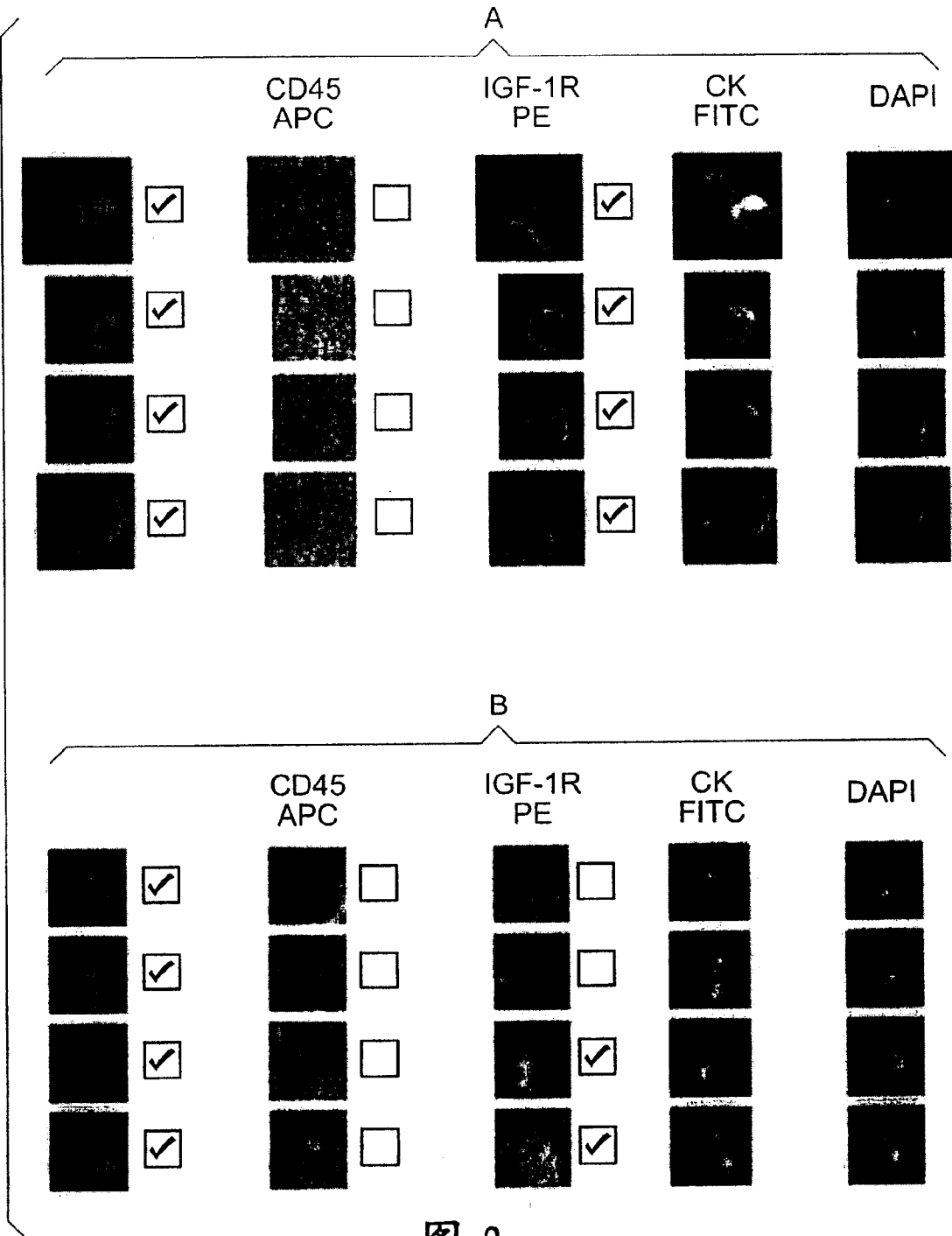


图 2

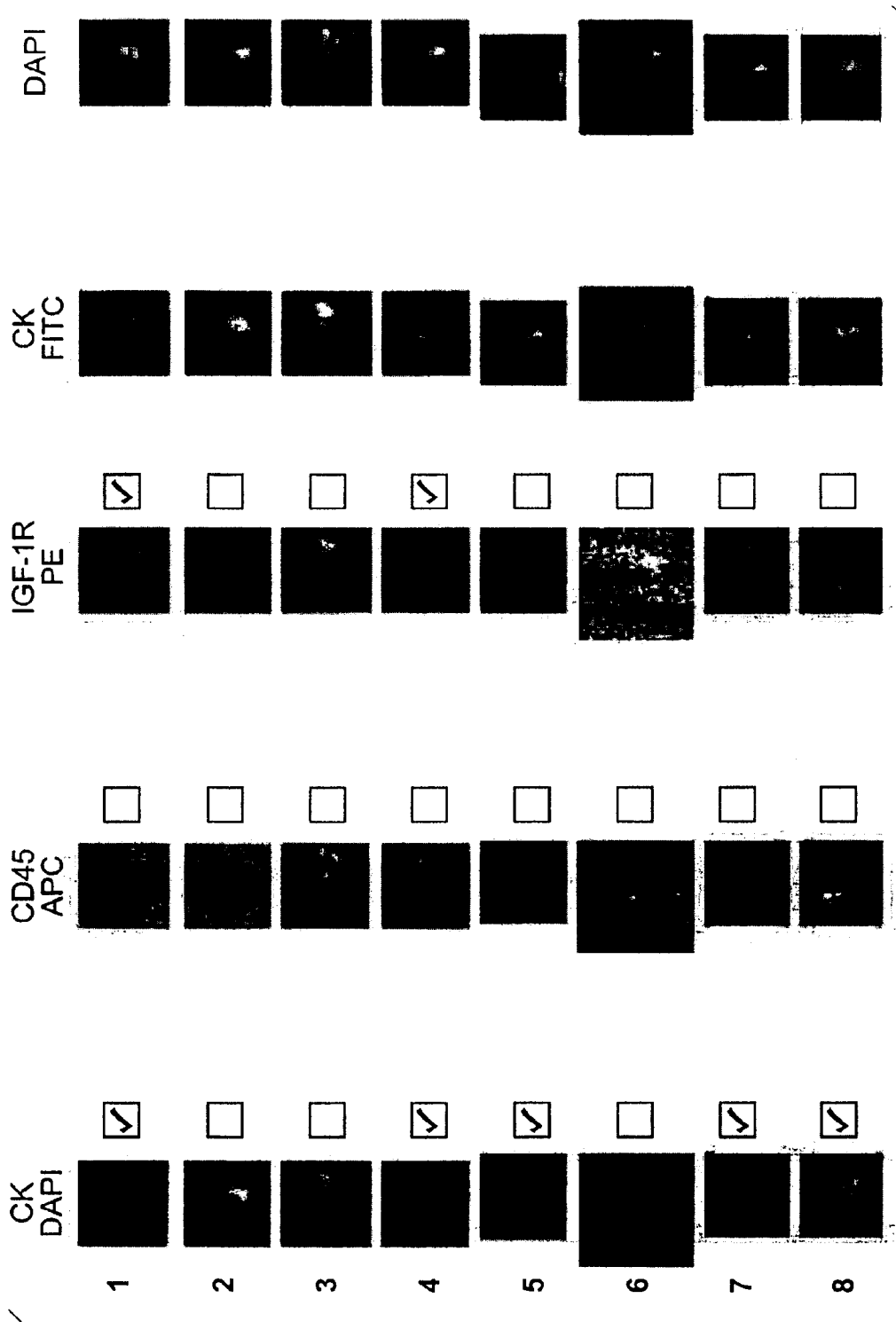


图 3

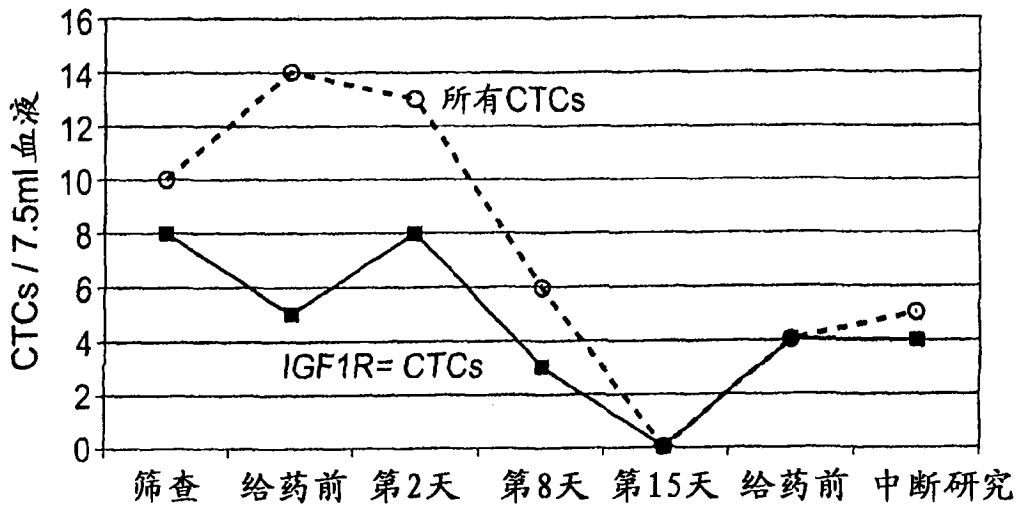


图 4A

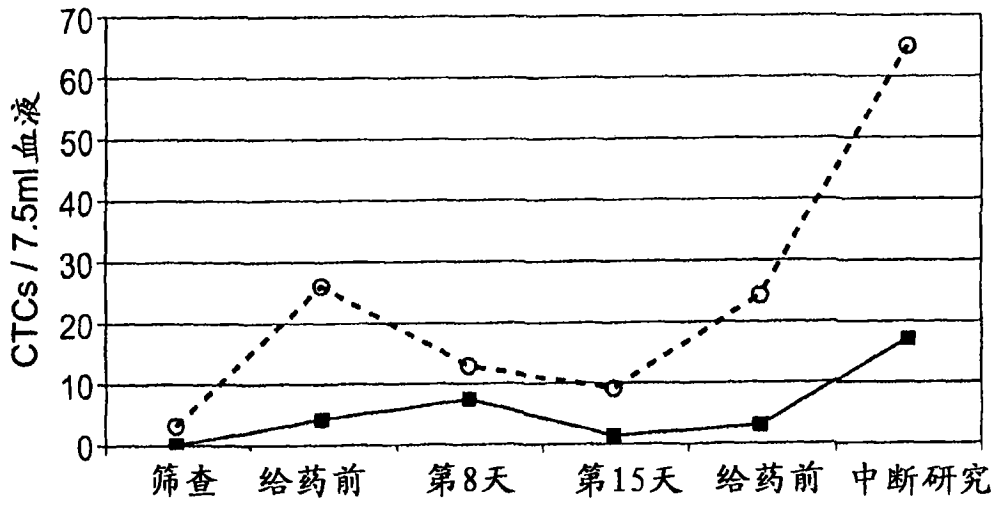


图 4B

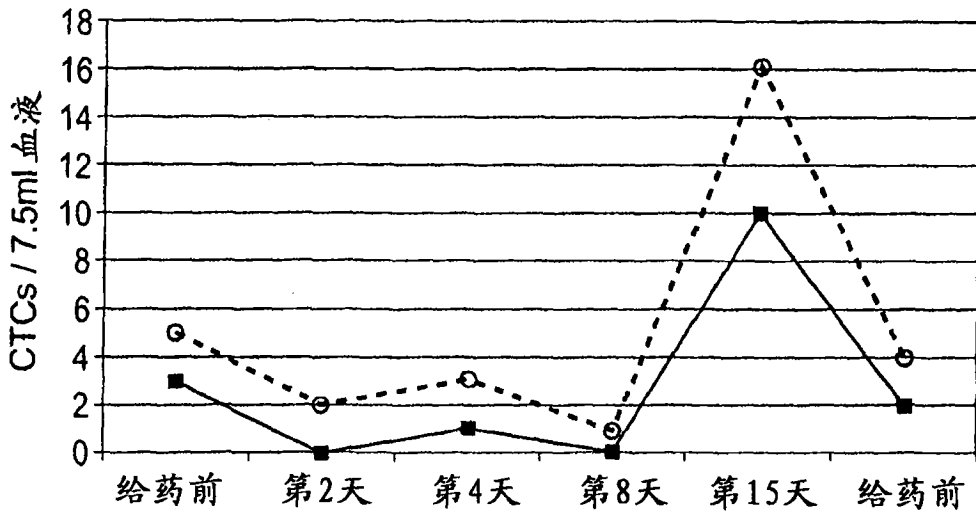


图 4C

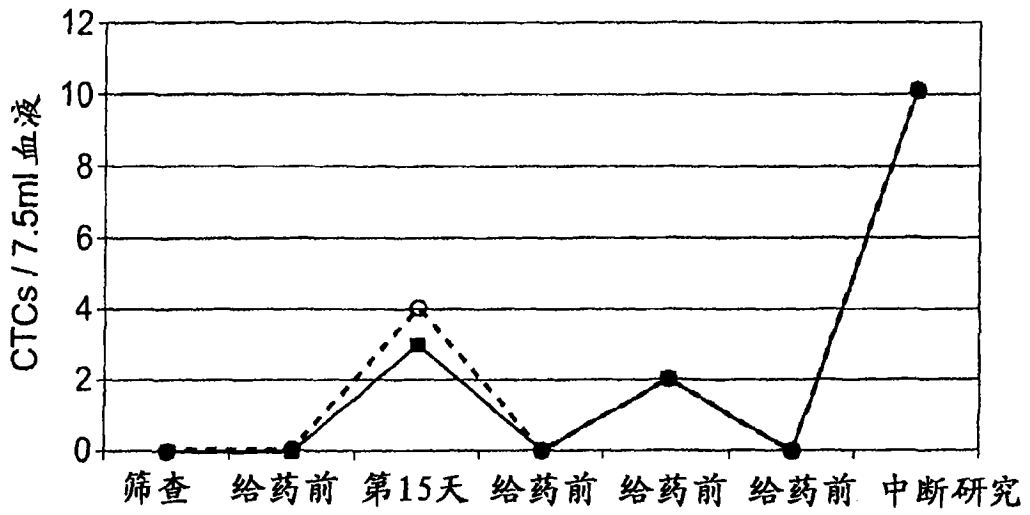


图 4D

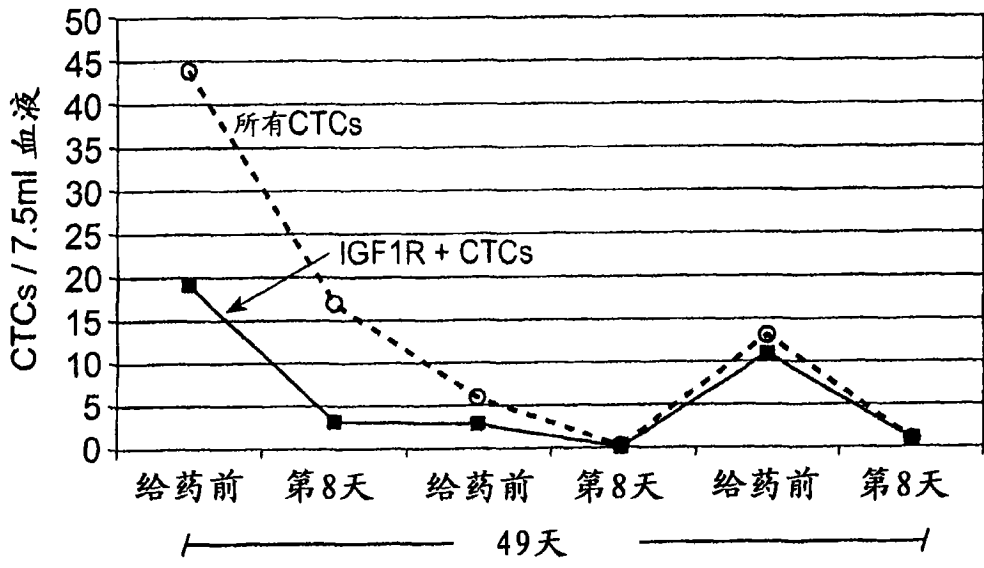


图 5A

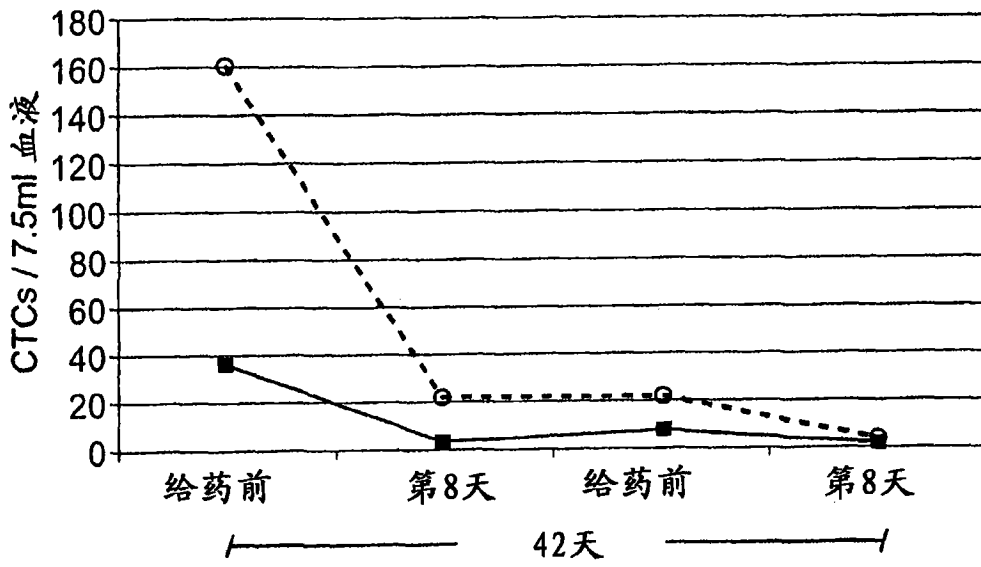


图 5B

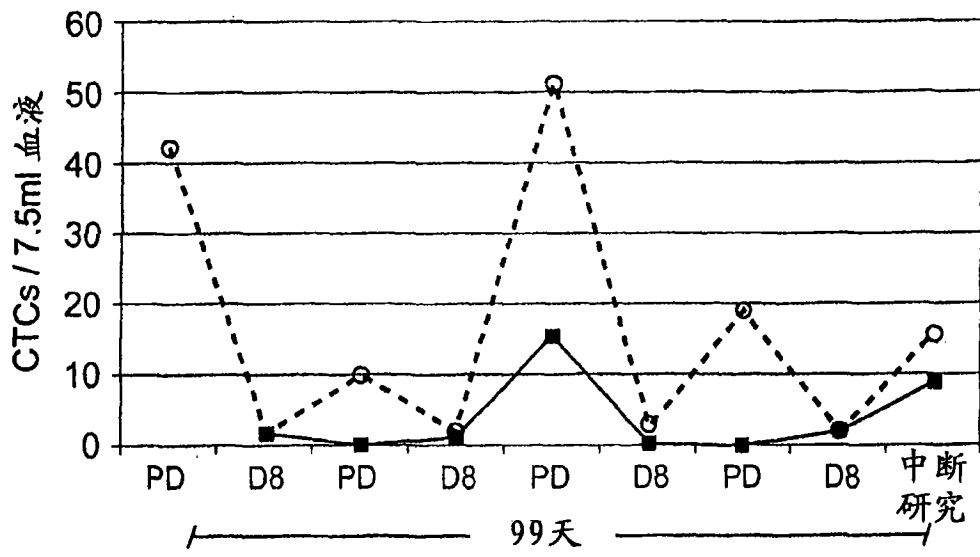


图 5C

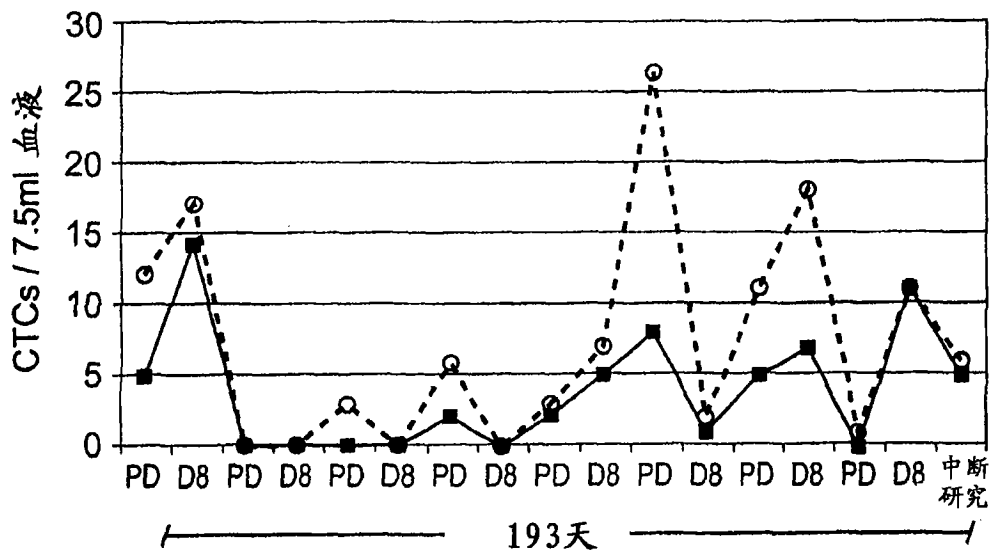


图 5D

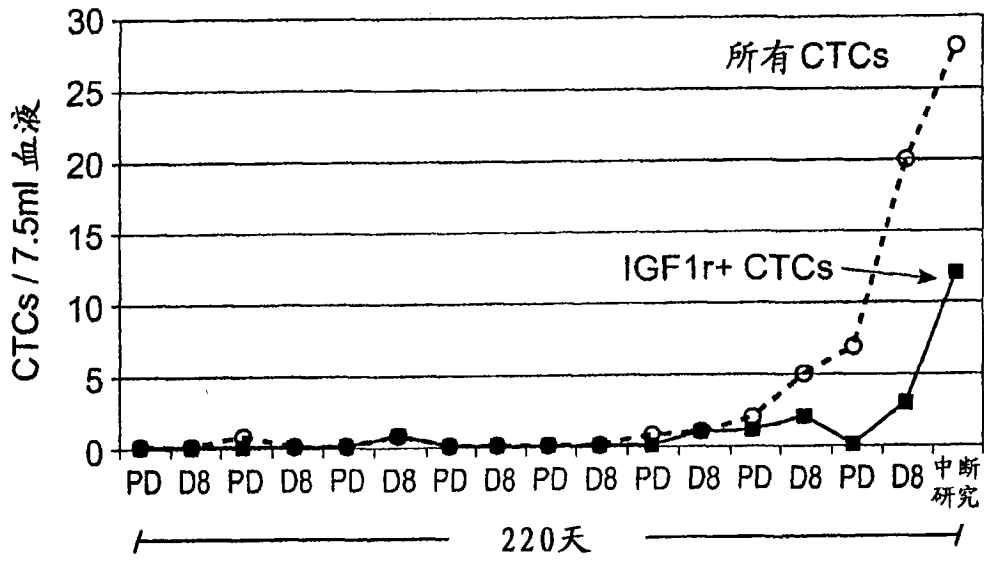


图 6A

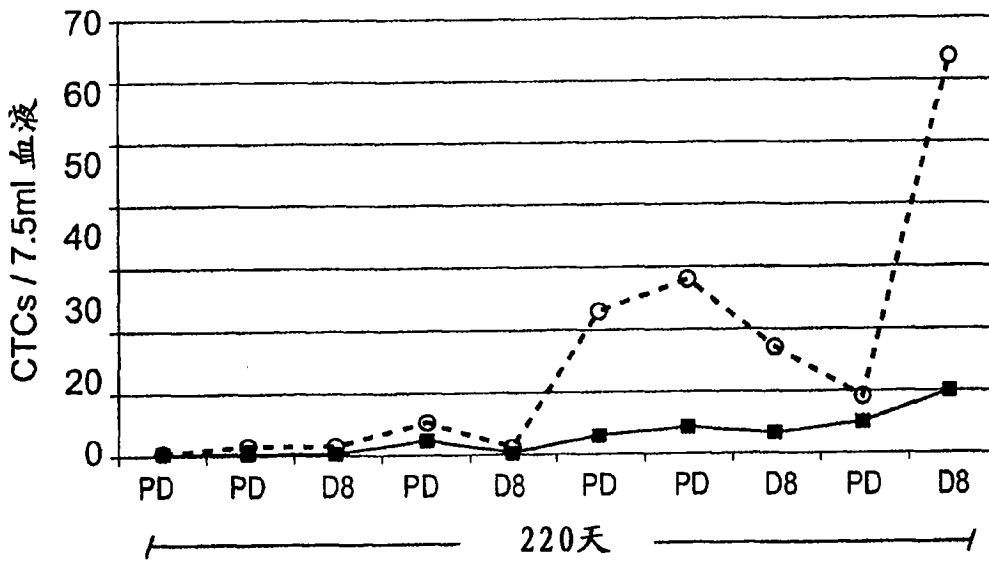


图 6B

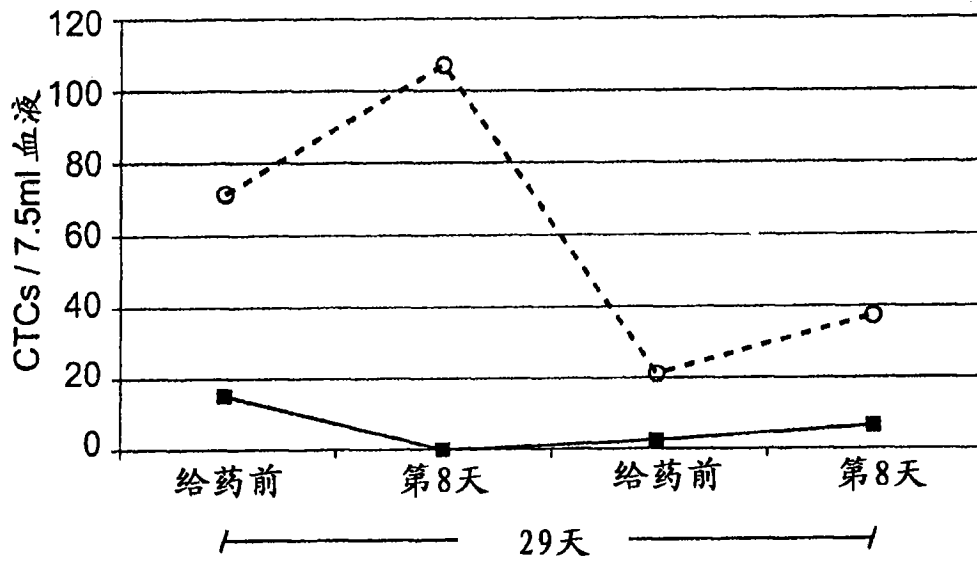


图 6C

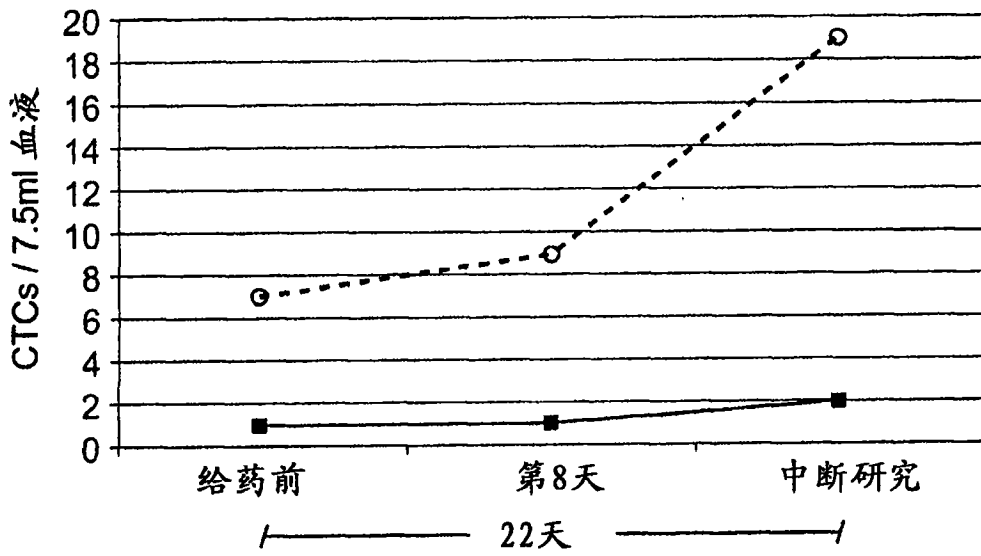


图 6D