



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101711284 A

(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号	200880006008.1	A61K 38/16 (2006.01)
(22) 申请日	2008.01.24	A61K 31/7072 (2006.01)
(30) 优先权数据		A61K 31/704 (2006.01)
	60/897,383 2007.01.25 US	A61K 31/48 (2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日		A61K 31/19 (2006.01)
	2009.08.24	A61K 39/395 (2006.01)
(86) PCT申请的申请数据		
	PCT/US2008/001024 2008.01.24	
(87) PCT申请的公布数据		
	W02008/091701 EN 2008.07.31	
(71) 申请人	达娜-法勃肿瘤研究所	
	地址 美国马萨诸塞	
(72) 发明人	K-K·王	
(74) 专利代理机构	中国国际贸易促进委员会专 利商标事务所 11038	
	代理人 罗菊华	
(51) Int. Cl.		
	C12Q 1/68 (2006.01)	

权利要求书 1 页 说明书 23 页 附图 5 页

(54) 发明名称

抗 EGFR 抗体在治疗 EGFR 突变体介导的疾病中的用途

(57) 摘要

本发明涉及治疗抗酪氨酸激酶抑制剂疗法的 EGFR 介导的疾病,特别是癌症。提供了用于在具有次级 EGFR 突变,特别地酪氨酸激酶结构域突变的抗标准疗法的个体中治疗癌症和减少肿瘤生长的方法。本发明提供了使用抗 EGFR 抗体治疗抗酪氨酸激酶抑制剂的癌症的方法。描述了使用抗体抗 EGFR mAb806 治疗抗酪氨酸激酶抑制剂的复发性肺癌包括非小细胞肺癌的方法。

1. 在哺乳动物中治疗酪氨酸激酶抑制剂抗性 EGFR 介导的疾病的方法, 其中所述抗性 EGFR 介导的疾病是 EGFR 中次级突变从而产生突变的 EGFR 的结果, 并且其中所述突变与 EGFR vIII 突变不同, 该方法包括对所述哺乳动物施用有效量的、能够结合并抑制突变的 EGFR 的抗 EGFR 抗体。

2. 权利要求 1 的方法, 其中次级 EGFR 突变是 EGFR 酪氨酸激酶结构域突变。

3. 权利要求 2 的方法, 其中酪氨酸激酶结构域突变是 T790M。

4. 权利要求 1 的方法, 其中抗 EGFR 抗体是 mAb806 抗体或其活性片段。

5. 权利要求 4 的方法, 其中 mAb806 是重组抗体或人源化抗体。

6. 权利要求 1 的方法, 其中抗 EGFR 抗体选自 ABX-EGF (帕尼单抗)、DH8.3、L8A4 和 / 或其活性片段。

7. 权利要求 1 的方法, 其中 EGFR 介导的疾病是癌症并且选自成胶质细胞瘤、头颈癌、胰腺癌、肺癌、神经系统的癌症、胃肠癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、肾癌、视网膜癌、皮肤癌、肝癌、生殖 - 泌尿癌和膀胱癌。

8. 权利要求 7 的方法, 其中癌症是肺腺癌、肺鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

9. 用于在癌症患者中降低 EGFR 介导的肿瘤生长的方法, 其中所述癌症患者之前已用一种或多种酪氨酸激酶抑制剂进行治疗并且已发生了复发性疾病和肿瘤生长, 该方法包括对所述患者施用有效量的抗 EGFR 抗体以使复发性疾病和肿瘤生长被抑制和降低。

10. 权利要求 9 的方法, 其中抗 EGFR 抗体是 mAb806 抗体或其活性片段。

11. 权利要求 10 的方法, 其中 mAb806 是重组抗体或人源化抗体。

12. 权利要求 9 的方法, 其中抗 EGFR 抗体选自 ABX-EGF (帕尼单抗)、DH8.3、L8A4 和 / 或其活性片段。

13. 权利要求 9 的方法, 其中癌症患者已经发生了为 EGFR 酪氨酸激酶结构域突变的次级 EGFR 突变。

14. 权利要求 13 的方法, 其中酪氨酸激酶结构域突变是 T790M。

15. 在哺乳动物中治疗 EGFR 介导的癌症的方法, 该方法包括对所述哺乳动物施用酪氨酸激酶抑制剂和抗 EGFR 抗体, 其中在使用酪氨酸激酶抑制剂作为二线疗法的治疗后施用所述抗 EGFR 抗体来抑制抗酪氨酸激酶抑制剂的潜在的次级突变的 EGFR。

16. 权利要求 15 的方法, 其中 EGFR 介导的癌症选自成胶质细胞瘤、头颈癌、胰腺癌、肺癌、神经系统的癌症、胃肠癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、肾癌、视网膜癌、皮肤癌、肝癌、生殖 - 泌尿癌和膀胱癌。

17. 权利要求 16 的方法, 其中癌症是肺腺癌、肺鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

18. 权利要求 15 的方法, 其中酪氨酸激酶抑制剂是可逆酪氨酸激酶抑制剂。

19. 权利要求 18 的方法, 其中可逆酪氨酸激酶抑制剂是苯胺喹唑啉化合物和选自吉非替尼、厄洛替尼、AG1478、ST1571 和 SU-6668。

20. 权利要求 15 的方法, 其中酪氨酸激酶抑制剂是不可逆酪氨酸激酶抑制剂。

21. 权利要求 20 的方法, 其中不可逆酪氨酸激酶抑制剂选自 EKB-569、EKI-569、HKI-272、HKI-357 和 BIBW 2992。

抗 EGFR 抗体在治疗 EGFR 突变体介导的疾病中的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及治疗抗酪氨酸激酶抑制剂疗法的 EGFR 介导的疾病,特别是癌症。提供了用于在具有次级 EGFR 突变,特别地酪氨酸激酶结构域突变的抗标准疗法的个体中治疗癌症和降低肿瘤生长的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 靶向癌症疗法被设计用来破坏致癌作用和肿瘤生长所需的特定分子的功能,从而杀死或阻止癌细胞的生长 (Ji H 等人 (2006) CellCycle 5(18):2072-2076 Epub 2006 Sep15)。与常规细胞毒性化学疗法相反,此类靶向癌症疗法更有效并且对正常细胞的伤害更小。靶向癌症疗法领域的主要努力一直以来是开发靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 的试剂。EGFR 是密切相关的受体 (包括的 EGFR (ErbB-1)、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3) 和 Her4 (ErbB-4)) 的 ErbB 家族的成员。EGFR 的激活导致受体酪氨酸激酶的激活和一系列下游信号传导事件 (所述信号传导事件介导细胞增殖、运动、粘着、侵入和对化学疗法的抗性以及对细胞凋亡的抑制 (2-4)), 对于癌细胞的持续增殖和存活至关重要的过程。

[0004] 迄今为止,两个主要类型的抗 EGFR 试剂已进入临床环境:抗 EGFR 抗体和小分子 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) (5,6)。抗 EGFR 抗体例如西妥昔单抗 (cetuximab) 经设计以结合 EGFR 的细胞外结构域并且阻断 EGFR 下游信号传导的激活 (7)。西妥昔单抗 (也称为抗体 225, 美国专利 4,943,533) 是针对 A431 细胞产生的,所述细胞表达高水平的野生型 EGFR。相反地,小分子 TKI 例如吉非替尼 (化合物 ZD 1839, 易瑞沙) 或厄洛替尼 (化合物 OSI-774, 它赛瓦) 与 ATP 竞争对 EGFR 酪氨酸激酶的细胞外催化结构域的结合,从而阻止 EGFR 的自磷酸化作用和下游信号转导 (4)。

[0005] 这两种抗 EGFR 药物类型都已在患有多种不同类型癌症的患者的亚群中显示一些临床功效。在患有具有 EGFR 激酶结构域突变的肺癌的患者中使用吉非替尼或厄洛替尼进行的治疗通常产生显著的临床反应 (5,8)。然而,吉非替尼或厄洛替尼在具有野生型 EGFR 的肺腺癌或其他组织学亚型例如鳞状细胞癌中的功效是有限的 (9,10)。此外,在临床前和临床试验中已显示吉非替尼或厄洛替尼在抑制 EGFRvIII 突变体 (11) (其中存在外显子 II 至 VII 的符合读框的缺失 (也称为 EGFRde2-7) 的不同的激活性 EGFR 突变) 的功能中很大程度上是无效的。EGFRvIII 通常见于成胶质细胞瘤 (Glioblastoma), 并且最近发现存在于人肺鳞状细胞癌的亚群 (12) 和大部分头颈癌 (13) 中。

[0006] 显示西妥昔单抗在非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者和患有头颈癌的患者以及结肠直肠癌患者的小亚群中是有效的。然而,对西妥昔单抗的反应似乎与 EGFR 的表达水平无关。因此,不清楚这些患者对西妥昔单抗治疗有反应然而其肿瘤具有高 EGFR 表达的其他癌症患者对西妥昔单抗治疗不显疗效的原因 (14)。

[0007] 由于 EGFR vIII 突变受体的表达限定于肿瘤细胞,因此其代表了抗体疗法的高度特异性靶。因此,已产生了对于 de2-7EGFR 的独特的肽是特异性的多克隆和单克隆抗体。使用独特的 de2-7 肽免疫后分离的一系列小鼠 mAb 都显示对于截短的受体和裸小鼠中生长的被靶向的 de2-7EGFR 阳性异种移植物的选择性和特异性 (Wikstrand CJ 等人 (1995))

Cancer Res 55 :3140-3148 ;Okamoto, S 等人 (1996) Br J Cancer 73 :1366-1372 ;Hills D 等人 (1995) Int J Cancer 63 :537-543 ;Reist CJ 等人 (1997) Cancer Res 57 :1510-1515 ;Reist CJ 等人 (1995) Cancer Res 55 :4375-4382 ;美国专利 5,401,828)。抗 EGFR vIII 抗体的实例包括 ABX-EGF (帕尼单抗)、DH8.3、L8A.4 和 Y10。

[0008] MAb806 是新型鼠抗体,最初使用表达 EGFR vIII 突变体的完整细胞作为免疫原产生该抗体以识别独特的截短的突变体 EGFRvIII (15-17)。重要地,被 mAb806 识别的表位在无活性的野生型 (wt) EGFR 中是不可接近的,但在过表达 EGFR 和表达 EGFRvIII 的细胞中暴露于 wt EGFR 的过渡形式中 (18)。表位研究受到免疫组织化学研究支持,后者证明 806 抗体结合存在于神经胶质瘤以及广泛的上皮癌中的表位但不结合正常人组织 (16,19)。这些和其他临床前数据表明 mAb806 可能具有与西妥昔单抗和其他抗 EGFR 抗体不同的临床活性谱和副作用特征谱。在异种移植模型中,mAb806 已展示出有效的不靶向正常组织的抗肿瘤活性。因此,mAb806 的独特的靶向能力代表了癌症特异性分子靶向疗法的新范例。

[0009] 当过表达时或被突变激活时,酪氨酸激酶 (包括 EGFR) 促成了癌症的发生并且这些突变的酪氨酸激酶 (TK) 通常为选择性和特异性癌症疗法提供了靶或敏感性。EGFR 基因的酪氨酸激酶结构域中的体细胞突变与肺癌对包括吉非替尼和厄洛替尼的某些酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) 的敏感性有关。外显子 19 中的符合读框的 EGFR 缺失 (del L747-S752) 和密码子 858 (外显子 21) 中的常见点突变 (L858R) 已在非小细胞肺癌和腺癌中得到鉴定,并且与对 TKI 吉非替尼和厄洛替尼的敏感性相关 (Lynch TJ 等人 (2004) N Engl J Med 350 :2129-2139 ;Paez JG 等人 (2004) Science 304 :1497-1500 ;Pao W 等人 (2004) PNAS 101 (36) :13306-13311)。最近的研究已显示 10-30% 的 NSCLC 患者具有 EGFR 激酶结构域突变,而 5% 的肺鳞状细胞癌 (SCC) 患者具有细胞外结构域 EGFRvIII 突变 (12,20)。测定癌症对 EGFR 靶向治疗的反应性的方法基于对 EGFR 中,特别是激酶结构域中的突变的估量,患者中预测的抑制剂敏感性描述于 Bell 等人 (WO 2005/094357 和 US20060147959)。

[0010] 由继发抗药性 (secondary resistance) 或补偿性突变 (compensatory mutations) 介导的、所获得的对化学疗法或靶向癌症疗法的抗性是正在面临的挑战。尽管使用 TKI 进行持续的治疗,但对 TKI (包括吉非替尼或厄洛替尼) 敏感的肿瘤最终不断地发展。已在复发性和抗性患者的肿瘤活检组织中鉴定了 EGFR 的位点 790 上的次级突变 (T790M) (Kobayashi S 等人 (2005) N Engl J Med 352 (8) :786-792)。预测该突变导致抑制剂在 ATP- 激酶 - 结合口袋中的结合的空间位阻。

[0011] 考虑到在 EGFR 介导的疾病中获得的对 TKI 的抗性的存在和盛行以及显著的癌症复发率,存在对更广的有效的治疗方案的需要,所述治疗方案使用 EGFR 靶向试剂,所述试剂有效地针对,靶向或避免在 EGFR 突变体和 EGFR 介导的疾病中获得的抗性。

[0012] 本文中参考资料的引用不应当解释为这是对于本发明的现有技术的承认。

[0013] 发明概述

[0014] 现已在许多 EGFR 介导的癌症 (包括肺癌) 中鉴定了激活表皮生长因子受体 (EGFR) 的突变。已在人非小细胞肺癌 (NSCLC) 中鉴定了 EGFR 突变,5% 的人肺鳞状细胞癌具有 EGFRvIII 突变以及 10-30% 的肺腺癌具有 EGFR 激酶结构域突变。EGFR 靶向性单克隆抗体 mAb806 识别野生型 (wt) EGFR 以及截短的 EGFRvIII 突变体的构象表位。为了进一步表征 mAb806 对 EGFR 介导的癌症疗法的应用,将 mAb806 用于治疗经基因工程改造的、患

有肺肿瘤的小鼠,所述肺肿瘤由 EGFRvIII 或 EGFR 激酶结构域的突变驱动。本发明验证了抗 EGFR vIII 抗体,特别是 mAb806 在阻断 EGFRvIII 信号传导和诱导肿瘤细胞凋亡,从而在 EGFRvIII 驱动的鼠类肺癌中导致显著的肿瘤衰退中是非常有效的。针对表达高水平的野生型 EGFR 的细胞产生的不同的 EGFR- 靶向性抗体 - 西妥昔单抗未能在这些遗传上确定的肺肿瘤中显示活性。此外,使用 mAb806 进行的对由公认的和临床相关的 EGFR 激酶结构域突变 (L858R) 驱动的鼠肺肿瘤的治疗诱导了显著的肿瘤衰退。已显示该激酶结构域突变对 TKI 疗法,特别是吉非替尼或厄洛替尼是敏感的。

[0015] 获得的对 TKI (包括吉非替尼或厄洛替尼) 的抗性是正在面临的挑战,并且尽管进行持续的疗法,但对 TKI 敏感的肿瘤最终继续发展。该获得的抗性可由继发抗药性或补偿性突变,特别包括在 EGFR 的位点 790 上的次级突变 (T790M) 介导。研究者现在证明抗 EGFR 抗体,特别是 mAb806 有效地抗 T790M 突变,从而在 EGFR T790M/L858R 驱动的鼠肺癌中导致显著的肿瘤衰退。总的说来,这些数据证明抗 EGFR 抗体,特别是 mAb806 在具有 EGFR 激酶结构域突变的患者 (包括癌症患者,特别是肺癌患者) 的治疗中提供了有效的备选或辅助。

[0016] 本发明提供了在哺乳动物中治疗酪氨酸激酶抑制剂抗性 EGFR 介导的疾病的方法,其中所述抗性 EGFR 介导的疾病是 EGFR 中次级突变从而产生突变的 EGFR 的结果并且其中所述突变与 EGFR vIII 突变不同,该方法包括对所述哺乳动物施用有效量的能够结合并抑制突变的 EGFR 的抗 EGFR 抗体。在特定的方面,次级 EGFR 突变是 EGFR 酪氨酸激酶结构域突变。在另外的方面,酪氨酸激酶结构域突变是 T790M。

[0017] 在所述方法的特定实施方案中,抗 EGFR 抗体是 mAb806 抗体或其活性片段。MAb806 包括鼠抗体、重组抗体或人源化抗体。

[0018] 另外的抗 EGFR 抗体,包括靶向 EGFRvIII 突变体的那些抗体,可用于本发明的治疗方法。示例性和已知的抗 EGFR 抗体可选自 ABX-EGF (帕尼单抗)、DH8.3、L8A4 和 / 或其活性片段。

[0019] 在所述方法中进行治疗的 EGFR 介导的疾病包括癌症。EGFR 介导的癌症包括成胶质细胞瘤、头颈癌、胰腺癌、肺癌、神经系统的癌症、胃肠癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、肾癌、视网膜癌、皮肤癌、肝癌、生殖 - 泌尿癌和膀胱癌。在特定的方面,EGFR 介导的癌症是肺腺癌、肺鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

[0020] 本发明提供了用于在癌症患者中降低 EGFR 介导的肿瘤生长的方法,其中所述癌症患者之前已用一种或多种酪氨酸激酶抑制剂进行了治疗并且已发生了复发性疾病和肿瘤生长,该方法包括对所述患者施用有效量的抗 EGFR 抗体以使复发性疾病和肿瘤生长被抑制和降低。

[0021] 在用于降低肿瘤生长的本方法的特定实施方案中,抗 EGFR 抗体是 mAb806 抗体或其活性片段。MAb806 包括鼠抗体、重组抗体或人源化抗体。

[0022] 可使用另外的抗 EGFR 抗体,包括靶向 EGFRvIII 突变体的那些抗体。示例性和已知的抗 EGFR 抗体可选自 ABX-EGF (帕尼单抗)、DH8.3、L8A4 和 / 或其活性片段。

[0023] 在特定的临床方面,癌症患者中的复发性疾病和肿瘤生长是次级 EGFR 突变的结果,所述次级 EGFR 突变是 EGFR 酪氨酸激酶结构域突变。特定的次级 EGFR 突变是酪氨酸激酶结构域突变 T790M。

[0024] 本发明还提供了在哺乳动物中治疗 EGFR 介导的癌症的方法,该方法包括对所述

哺乳动物施用酪氨酸激酶抑制剂和抗 EGFR 抗体,其中在使用酪氨酸激酶抑制剂作为二线疗法的治疗后施用所述抗 EGFR 抗体来抑制抗酪氨酸激酶抑制剂的潜在的次级突变的 EGFR。

[0025] EGFR 介导的癌症可选成胶质细胞瘤、头颈癌、胰腺癌、肺癌、神经系统的癌症、胃肠癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、肾癌、视网膜癌、皮肤癌、肝癌、生殖-泌尿癌和膀胱癌。在特定的方面,癌症是肺腺癌、肺鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

[0026] 在本方法的一个方面,酪氨酸激酶抑制剂是可逆酪氨酸激酶抑制剂。可逆酪氨酸激酶抑制剂可以是苯胺喹唑啉化合物 (aniliniquinazoline) 和选自吉非替尼、厄洛替尼、AG1478、ST1571 和 SU-6668。

[0027] 在本方法的另外方面,酪氨酸激酶抑制剂是不可逆酪氨酸激酶抑制剂。示例性不可逆酪氨酸激酶抑制剂在本领域内是已知的并且包括但不限于 EKB-569、EKI-569、HKI-272、HKI-357 和 BIBW 2992。

[0028] 根据参考下列举例说明的附图的下列描述,其他目的和有利方面对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0029] 附图概述

[0030] 图 1 描绘由 EGFRvIII 表达驱动的鼠肺癌肿瘤对 mAb806 和 ch806 抗体治疗敏感但抗西妥昔单抗治疗。通过每日一次 I.P. 注射 0.5mg/ 剂的 mAb806 或 ch806 或 1mg/ 剂的西妥昔单抗治疗 Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA, Ink4A/Arf-/- 小鼠。在每周的治疗后,以相同的剂量每两天给予抗体。在指定的时间点上进行系列 MRI,显示各治疗组中代表性小鼠的相应切片。表示为平均值 $\pm$ 标准差 (SD) 的条状图 (Bar diagram) 示例说明通过 MRI 测量的肿瘤衰退,并且使用学生氏精确 t 检验 (Student's exact t test) 进行统计分析。在整个实验过程中使所有小鼠持续饮食多西环素。H:标示心脏的区域。

[0031] 图 2A 和 2B 描绘了使用 mAb806 治疗的 EGFRvIII 驱动的小鼠中的肺腺癌的组织病理学特征。(A) 通过 EGFRvIII 表达进行超过 8 周驱动的肺腺癌 (上方的图框)。在用 mAb806 治疗 1 周后,肿瘤开始变小并且具有增加的纤维化 (中间的图框)。当在第 5 周结束 mAb806 治疗时肺样品总体上正常 (下方的图框)。箭头显示纤维化结节 (fibrotic nodule),其由成纤维细胞和巨噬细胞组成。在该特定的纤维化区域中未发现肿瘤细胞。左图框:100X,在图框:800X。(B) 可在对照小鼠和用 mAb806 治疗 1 周的小鼠 (分别为左上和左下图框) 中观察到总 EGFR 的免疫组织学染色的相似模式和强度;当与未治疗的肿瘤 (右上图框) 相比时,在 1 周的治疗后,肿瘤细胞的 phospho-EGFR 染色的强度减小 (右下图框)。代表性照片在 200X 放大率下拍摄。(C) TUNEL 染色显示当与未治疗的肿瘤 (左上图框) 相比时,在用 mAb806 治疗 1 周后在 EGFRvIII 驱动的肺肿瘤 (左下图框) 中凋亡的细胞核 (红色箭头) 增加。代表性照片在 200X 放大率下拍摄。表示为平均值 $\pm$ SD 的条状图示例说明从至少 200 倍的高倍视野 (HPF) 中测定在 1 周的 mAb806 治疗前和治疗后肺肿瘤中的细胞凋亡指数。使用学生氏精确 t 检验 (右图框) 进行统计分析。

[0032] 图 3 显示来自 mAb806 治疗的 Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA, Ink4A/Arf-/- 小鼠的整个肺裂解物的 Western 印迹分析。分析来自在 mAb806 治疗的不同时间点上从小鼠采集的肿瘤的完整肺裂解物。EGFR 磷酸化的抑制可在治疗的 1 周后就观察到,然而总 EGFR 水平只在治疗的 5 周后才减少。在 mAb806 施用的整个过程中,Erk1,2 磷酸化被抗体抑制,但

AKT 磷酸化在两个治疗时间点上都保持在与未治疗的对照相当的水平上, β 肌动蛋白用作上样对照。

[0033] 图 4A 和 4B。EGFR 激酶结构域突变 L858R 驱动的小鼠肺腺癌对 ch806 治疗有反应。(A) 通过每日一次 I. P 注射 0.5mg/ 剂的 ch806 来治疗 Tet-op-EGFR L858R-IRES- 荧光素酶/CCSP-rtTA 小鼠, 进行 4 周。在治疗的 2 和 4 周后, MRI 显示肿瘤体积减少。表示为平均值 $\pm$ SD 的条状图示例说明通过 MRI 测量到的肿瘤衰退, 使用学生氏精确 t 检验进行统计分析 (右图框)。H: 标示心脏的区域。(B) 组织病理学分析显示, 当与未治疗对照 (左边的两个图框) 相比较时, Tet-op-EGFR L858R-IRES- 荧光素酶/CCSP-rtTA 小鼠 (右边的两个图框) 中肿瘤皱缩并且具有显著的巨噬细胞浸润。箭头显示残留肿瘤的病灶。来自 100X 和 800X 放大率的照片如图中的脚标所标示所示。

[0034] 图 5A 和 5B 描绘了使用 mAb806 对比西妥昔单抗, 对 EGFR T790M-L858R 肺肿瘤治疗的结果。将持续多西环素饮食超过 8 周的小鼠进行 MRI 以记录肿瘤负荷。每日一次通过 I. P. 注射 0.5mg 剂量, 将 mAb806 递送至具有肺肿瘤的小鼠, 进行 4 周。每日一次通过 I. P. 注射 1mg/ 剂对小鼠施用西妥昔单抗, 进行 4 周。使用同窝出生小鼠 (Littermate) 作为所有治疗研究的对照 (未治疗)。(A) 在第 0、2 和 4 或 5 周用 MRI 对小鼠进行成像来测定肿瘤体积的减小。(B) 在治疗和 MRI 成像完成后, 杀死小鼠以进行进一步的组织学和生物化学研究。

[0035] 发明详述

[0036] 根据本发明, 可使用在本领域技术人员的能力之内的常规分子生物学、微生物学和重组 DNA 技术。此类技术在文献中进行了详尽的说明。参见, 例如, Sambrook 等人, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1989); "Current Protocols in Molecular Biology" 第 I-III 卷 [Ausubel, R. M., ed. (1994)]; "Cell Biology: A Laboratory Handbook" 第 I-III 卷 [J. E. Celis, ed. (1994)]; "Current Protocols in Immunology" 第 I-III 卷 [Coligan, J. E., ed. (1994)]; "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait ed. 1984); "Nucleic Acid Hybridization" [B. D. Hames & S. J. Higgins eds. (1985)]; "Transcription And Translation" [B. D. Hames & S. J. Higgins, eds. (1984)]; "Animal Cell Culture" [R. I. Freshney, ed. (1986)]; "Immobilized Cells And Enzymes" [IRL Press, (1986)]; B. Perbal, "A Practical Guide To Molecular Cloning" (1984)。

[0037] 因此, 如果在本文中出现, 下列术语将具有下面所示的定义。

[0038] 术语“抗体”描述了无论是天然还是部分或完全合成产生的免疫球蛋白。抗体包括结合特定表位的任何免疫球蛋白, 包括抗体和其片段。该术语包括多克隆、单克隆、重组、人源化以及嵌合抗体。该术语还涵盖具有是抗体结合结构域的或与其同源的结合结构域的任何多肽或蛋白质。该术语也包括 CDR 移植抗体。

[0039] 由于抗体可通过许多方法进行修饰, 因此, 术语“抗体”应当解释为涵盖具有拥有需特异性的结合结构域的任何特定的结合成员或物质。因此, 该术语涵盖抗体的抗体片段、衍生物、功能等同物 and 同源物, 其中包括包含免疫球蛋白结合结构域的任何多肽, 无论是天然的还是完全或部分合成的多肽。因此包括包含融合至另一个多肽的免疫球蛋白结合结构域或等同物的免疫嵌合分子。嵌合抗体的克隆和表达描述于 EP-A-0120694 和

EP-A-0125023 以及美国专利 4,816,397 和 4,816,567 中。

[0040] 已显示,完整抗体的片段可行使结合抗原的功能。结合片段的实例是 (i) 由 VL、VH、CL 和 CH1 结构域组成的 Fab 片段;(ii) 由 VH 和 CH1 结构域组成的 Fd 片段;(iii) 由单个抗体的 VL 和 VH 结构域组成的 Fv 片段;(iv) 由 VH 结构域组成的 dAb 片段 (Ward, E. S. 等人., Nature 341,544-546(1989));(v) 分离的 CDR 区域;(vi) F(ab')₂ 片段,包含两个连接的 Fab 片段的二价片段;(vii) 单链 Fv 分子 (scFv),其中 VH 结构域和 VL 结构域通过肽连接体连接,所述肽连接体允许两个结构域结合形成抗原结合部位 (Bird 等人, Science, 242,423-426,1988;Huston 等人, PNAS USA, 85,5879-5883,1988);(viii) 多价抗体片段 (scFv 二聚体、三聚体和 / 或四聚体 (Power 和 Hudson, JImmunol. Methods 242: 193-204 9(2000));(ix) 双特异性单链 Fv 二聚体 (PCT/US92/09965) 和 (x) “双特异抗体 (Diabody)”,通过基因融合构建的多价或多特异性片段 (W094/13804;P. Holliger 等人 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448, (1993))。

[0041] “抗体结合部位”是由轻链或重链以及轻链可变区和高变区组成的抗体分子的结构部分,其特异性结合抗原。

[0042] 以其不同语法形式在本文中使用的短语“抗体分子”包括完整的免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分。

[0043] 示例性抗体分子是完整的免疫球蛋白分子、大体上完整的免疫球蛋白分子和包含互补位 (paratope) 的免疫球蛋白分子的那些部分,其中包括本领域内称为 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 F(v) 的那些部分,所述部分优选用于本文中描述的治疗方法。

[0044] 抗体还可以是双特异性的,其中抗体的一个结合结构域是本发明的特定结合成员,并且另一个结合结构域具有不同的特异性,例如招募效应子功能等。本发明的双特异性抗体包括其中抗体的一个结合结构域是本发明的特定结合成员 (以括其片段),并且另一个结合结构域是不同的抗体或其片段,包括不同的抗 EGFR 抗体例如抗体 528 (美国专利 4,943,533)、嵌合的和人源化的 225 抗体 (美国专利 4,943,533 和 W0/9640210)、抗 de2-7 抗体例如 DH8.3 (Hills, D. 等人 (1995) Int. J. Cancer 63(4):537-543)、抗体 L8A4 和 Y10 (Reist, CJ 等人 (1995) Cancer Res. 55(19):4375-4382;Foulon CF 等人. (2000) Cancer Res. 60(16):4453-4460), ICR62 (Modjtahedi H 等人 (1993) Cell Biophys. Jan-Jun; 22(1-3):129-46;Modjtahedi 等人 (2002) P. A. A. C. R. 55(14):3140-3148 或 Wikstrand 等人的抗体 (Wikstrand C. 等人 (1995) Cancer Res. 55(14):3140-3148) 的片段。另一个结合结构域可以是识别或靶向特定细胞类型的抗体,如在神经或胶质细胞特异性抗体中的。在本发明的双特异性的抗体中,本发明的抗体的一个结合结构域可以与其他结合结构域或分子组合,所述其他结合结构域或分子识别特定细胞受体和 / 或以特定的方式例如作为免疫调节剂 (例如,白细胞介素)、生长调节剂或细胞因子 (例如肿瘤坏死因子 (TNF),特别地,2002 年 2 月 13 日提交的 U. S. S. N. 60/355,838 (以其全文通过引用合并入本文) 中记载的 TNF 双特异性形式 (modality)) 或毒素 (例如,蓖麻毒素) 或抗有丝分裂或细胞凋亡试剂或因子来调控细胞。

[0045] 抗体分子的 Fab 和 F(ab')₂ 部分可通过熟知的方法通过木瓜蛋白酶和胃蛋白酶分别对大体上完整的抗体分子进行蛋白水解反应来制备。参见例如,属于 Theofilopolous 等人的美国专利 4,342,566。Fab' 抗体分子部分也是熟知的并且从 F(ab')₂ 部分产生,

然后用巯基乙醇还原连接两个重链部分的二硫键,然后用试剂例如碘乙酰胺来烷基化所得的蛋白质硫醇来产生。包含完整的抗体分子的抗体在本文中是优选的。

[0046] 以其不同语法形式显示的短语“单克隆抗体”是指只具有一种能够与特定抗原发生免疫反应的抗体结合部位的抗体。因此单克隆抗体通常展示对于与其发生免疫反应的任何抗原的单一结合亲和力。单克隆抗体还可以包含具有多个抗体结合部位的抗体分子,每一个抗体结合部位对于不同的抗原是免疫特异性的;例如,双特异性(嵌合)的单克隆抗体。

[0047] 术语“抗原结合结构域”描述了包含特异性结合抗原的部分或全部和与抗原的部分或全部互补的区域的抗体的部分。当抗原很大时,抗体可以只结合抗原的特定部分,该部分称为表位。抗原结合结构域可由一个或多个抗体可变结构域提供。优选,抗原结合结构域包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH)。

[0048] 术语“mAb806”、“806 抗体”、“单克隆抗体 806”、“ch806”、“人源化 806”和未特别列出的任何变体可在本文中互换使用,并且如在整个本申请和权利要求中所使用。因此,同样地包括抗体,其中包括重组的、嵌合的、经遗传修饰的或备选的抗体。这些修饰可以有意的,例如通过定点诱变获得的修饰,或者可以是偶然的,例如通过在作为抗体或其片段的产生者的宿主中的突变获得的修饰。同样,术语“mAb806”、“806 抗体”、“单克隆抗体 806”、“ch806”、“人源化 806”意欲将本文中明确引用的和本领域技术人员已知的、公共公开的蛋白质和免疫球蛋白以及所有大体上同源的类似物和等位基因变异包括在它们的范围内。mAb806 抗体,包括其产生、特定的活性、氨基酸和核酸序列、抗原结合结构域、可变区序列得到了公开并且对于本领域技术人员来说是已知的,包括 WO 02/092771;Luwor RB 等人(2001)Cancer Res 61:5355-5361;Mishima K 等人(2001)CancerRes 61:5349-5354;Johns TG 等人(2002)Int J Cancer 98:398-408;Jungbluth AA 等人(2003)Proc Natl Acad Sci 100(2):639-644(其各自以其全文通过引用合并入本文)中所提供的。

[0049] 本文中描述的氨基酸残基优选以“L”同分异构形式存在。然而,可用以“D”同分异构形式存在的的残基置换任何 L 氨基酸残基,只要多肽保持期望的免疫球蛋白-结合的功能特性。NH₂ 是指存在于多肽的氨基末端的游离氨基。COOH 是指存在于多肽的羧基末端的游离羧基。与标准的多肽命名法, J. Biol. Chem., 243:3552-59(1969)一致,氨基酸残基的缩写示于下列对应表(table of Correspondence)中:

[0050] 对应表

[0051]	<u>符号</u>		<u>氨基酸</u>
[0052]	1- 字母	3- 字母	
[0053]	Y	Tyr	酪氨酸
[0054]	G	Gly	甘氨酸
[0055]	F	Phe	苯丙氨酸
[0056]	M	Met	甲硫氨酸
[0057]	A	Ala	丙氨酸
[0058]	S	Ser	丝氨酸
[0059]	I	Ile	异亮氨酸
[0060]	L	Leu	亮氨酸

[0061]	T	Thr	苏氨酸
[0062]	V	Val	缬氨酸
[0063]	P	Pro	脯氨酸
[0064]	K	Lys	赖氨酸
[0065]	H	His	组氨酸
[0066]	Q	Gln	谷氨酰胺
[0067]	E	Glu	谷氨酸
[0068]	W	Trp	色氨酸
[0069]	R	Arg	精氨酸
[0070]	D	Asp	天冬氨酸
[0071]	N	Asn	天冬酰胺
[0072]	C	Cys	半胱氨酸

[0073] 应当指出,所有氨基酸残基序列在本文中由其左至右的方向以氨基端至羧基端的常规方向排列的分子式 (formulae) 表示。此外,应当指出氨基酸残基序列的起始或终止处的短划线 (dash) 表示连接至一个或多个氨基酸残基的另外序列的肽键。提供上表以使在本文中交替出现的三字母和一字母符号相对应。

[0074] 应当理解,也在用于本发明的方法的组合物的范围内的是编码和 / 或表达有效的抗 EGFR 抗体,特别包括 mAb806 和 ch806 的 DNA 序列,其编码具有与公共公开的和本领域技术人员已知的 mAb806 抗体相同的氨基酸序列的抗 EGFR 抗体、其抗原结合结构域或其活性片段,但与已知的 mAb806 序列简并。“与……简并”是指不同的三字母密码子用于确定特定的氨基酸。本领域内熟知的是,下列密码子可互换用于编码各特定的氨基酸:

[0075]	苯丙氨酸 (Phe 或 F)	UUU 或 UUC
[0076]	亮氨酸 (Leu 或 L)	UUA 或 UUG 或 CUU 或 CUC 或 CUA 或 CUG
[0077]	异亮氨酸 (Ile 或 I)	AUU 或 AUC 或 AUA
[0078]	甲硫氨酸 (Met 或 M)	AUG
[0079]	缬氨酸 (Val 或 V)	GUU 或 GUC 或 GUA 或 GUG
[0080]	丝氨酸 (Ser 或 S)	UCU 或 UCC 或 UCA 或 UCG 或 AGU 或 AGC
[0081]	脯氨酸 (Pro 或 P)	CCU 或 CCC 或 CCA 或 CCG
[0082]	苏氨酸 (Thr 或 T)	ACU 或 ACC 或 ACA 或 ACG
[0083]	丙氨酸 (Ala 或 A)	GCU 或 GCG 或 GCA 或 GCG
[0084]	酪氨酸 (Tyr 或 Y)	UAU 或 UAC
[0085]	组氨酸 (His 或 H)	CAU 或 CAC
[0086]	谷氨酰胺 (Gln 或 Q)	CAA 或 CAG
[0087]	天冬酰胺 (Asn 或 N)	AAU 或 AAC
[0088]	赖氨酸 (Lys 或 K)	AAA 或 AAG
[0089]	天冬氨酸 (Asp 或 D)	GAU 或 GAC
[0090]	谷氨酸 (Glu 或 E)	GAA 或 GAG
[0091]	半胱氨酸 (Cys 或 C)	UGU 或 UGC
[0092]	精氨酸 (Arg 或 R)	CGU 或 CGC 或 CGA 或 CGG 或 AGA 或 AGG

[0093] 甘氨酸 (Gly 或 G) GGU 或 GGC 或 GGA 或 GGG

[0094] 色氨酸 (Trp 或 W) UGG

[0095] 终止密码子 UAA (赭石) 或 UAG (琥珀) 或 UGA (蛋白石)

[0096] 应当理解,上面指定的密码子是针对 RNA 序列的。DNA 的相应密码子用 T 替代 U。

[0097] 可在抗 EGFR 抗体序列,包括在 mAb806 抗体序列中进行突变以使特定的密码子改变成编码不同氨基酸的密码子。这样的突变通常通过尽可能最少的核苷酸变化来产生。可以以非保守方式(即,通过将密码子从属于具有特定大小或特征的氨基酸类型的氨基酸变成属于另一类型的氨基酸)或以保守方式(即,通过将密码子从属于具有特定大小或特征的氨基酸类型的氨基酸变成属于相同类型的氨基酸)进行该类置换突变来改变所得蛋白质中的氨基酸。这样的保守变化通常导致所得蛋白质的结构和功能的更少的变化。非保守变化更可能改变所得蛋白质的结构、活性或功能。应当认为本发明包括包含不显著改变所得免疫球蛋白和抗体的活性或结合特征的保守变化的序列。

[0098] 类似地,预期某些 EGFR 突变(其可以甚至显著地影响或改变 EGFR 的活性),例如本文中描述和利用的 EGFR 激酶结构域突变,可以不影响抗 EGFR 抗体(特别地包括抗 EGFR vIII 突变抗体,特别地包括 mAb806 抗体)对 EGFR 的识别、结合或抑制。因此,预期 mAb806 可相似地有效抗其他迄今未被识别的或迄今未知的 EGFR 突变,特别地在抗癌疗法中产生的次级突变。这些突变可作为 TKI 抑制疗法的结果或作为抗性 EGFR 介导的疾病的其他疗法的结果产生,所述疗法可靶向 EGFR 的激酶或其他活性。

[0099] 氨基酸可分类为相似的或不同、保守的或非保守的。氨基酸的分类可基于它们的 R 基团(例如非极性、不带电荷的极性、带电荷的极性、具有苯基的氨基酸)、基于它们的分子量或它们 R 基的大小、以及基于分子量。特别优选置换是:Lys 对 Arg 的置换以及反之亦然,这样正电荷可得到保持;Glu 对 Asp 的置换以及反之亦然,这样负电荷可得到保持;Ser 对 Thr 的置换,这样游离 -OH 可得到保持;以及 Gln 对 Asn 的置换,这样游离 NH₂ 可得到保持。

[0100] 还可导入氨基酸置换以置换具有特别优选的性质的氨基酸。例如,可将 Cys 导入用于与另一个 Cys 形成二硫键的潜在位置。可导入 His 作为独特的“催化”位点(即,His 可作为酸或碱起作用并且是生物化学催化中最常见的氨基酸)。由于其特殊的平面结构(该结构在蛋白质的结构中诱导 β 转角),可导入 Pro。

[0101] 当至少大约 70% 的氨基酸残基(优选至少大约 80%,和最优选至少大约 90 或 95%)是相同的或代表保守置换时,两个氨基酸序列是“大体上同源的”。

[0102] 短语“药学上可接受的”是指当对人施用时,为生理上可耐受的和通常不产生过敏的或相似的不利反应例如心嘈(gastric upset)、眩晕等的分子实体和组合物。

[0103] 短语“治疗有效量”在本文中用于指这样的量,该量足以预防和优选减少靶细胞团块的 S 期活性的临床显著变化或靶细胞团块或肿瘤的大小或尺寸的显著变化或可伴随其存在和活性的其他病理学特征的显著变化的至少大约 20%、更优选至少 30%、更优选至少 50%、更优选至少 70%、更优选至少 90%。

[0104] 抗体或活性片段可配制成经中和的药学上可接受的盐形式的治疗性组合物。药学上可接受的盐包括与无机酸例如盐酸或磷酸或者与有机酸例如醋酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等形成的酸加成盐(与多肽或抗体分子的游离氨基形成的)。从游离羧基形成的盐还可

来源于无机碱例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铝、氢氧化钙或氢氧化铁和有机碱例如异丙胺、三甲胺、2-乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因 (procaine) 等。

[0105] 常规地静脉内例如通过单位剂量的注射施用包含治疗性抗体或活性片段的组合物。术语“单位剂量”，当涉及本发明的治疗性组合物使用时，是指适合作为用于人的单一剂量的物理上分开的单位，每一个单位包含经计算产生期望的治疗效果的与所需的稀释剂（即载体或媒介物）结合的预先确定量的活性物质。

[0106] 以与剂型相兼容的方式和治疗有效量施用组合物。待施用的量取决于待治疗的受试者、受试者的免疫系统利用活性成份的能力和期望的抑制程度或被靶向的肿瘤块的大小。需要施用的活性成份的精确量取决于医生的判断并且对于每一个体是特有的。然而，合适的剂量可在大约 0.1 至 20，优选大约 0.5 至大约 10，以及更优选 1 至数毫克的活性成份 / 千克个体体重 / 天的范围内，并且取决于施用的途径。用于最初施用和加强注射的合适方案也是可变的，但通常在初始施用后，通过随后的注射或其他施用途径以 1 小时或数小时的间隔重复给药。备选地，包括使用足以在血液中保持 10 纳摩尔至 10 微摩尔的浓度的连续静脉内输注。

[0107] 如本文中所使用的，“pg”表示皮克，“ng”表示纳克，“ug”或“ μ g”表示微克，“mg”表示毫克，“ μ l”或“ μ l”表示微升，“ml”表示毫升，“l”表示升。

[0108] 为了进一步表征 mAb806 在 EGFR 介导的癌症疗法中的应用，本发明描述了 mAb806 用于治疗经基因工程改造的、具有由 EGFRvIII 或 EGFR 激酶结构域突变驱动的肺肿瘤的小鼠的用途。这些突变中的每一个突变对于 EGFR 介导的疾病，特别是癌症（包括肺癌、胰腺癌、结肠直肠癌、头颈癌和成胶质细胞瘤）是临床相关的和重要的 (significant)。本发明验证了抗 EGFR vIII 抗体，特别是 mAb806 在阻断 EGFRvIII 信号传导和诱导肿瘤细胞凋亡，从而在 EGFRvIII 驱动的鼠肺癌中导致显著的肿瘤衰退中是非常有效的。针对表达高水平的野生型 EGFR 的细胞产生的独特的靶向 EGFR 的抗体——西妥昔单抗在这些经遗传确定的肺肿瘤中不能显示活性。此外，使用 mAb806 对由公认的和临床相关的 EGFR 激酶结构域突变 (L858R) 驱动的鼠肺肿瘤的治疗诱导了显著的肿瘤衰退。已显示该激酶结构域突变对 TKI 疗法，特别是吉非替尼或厄洛替尼敏感。获得的对 TKI 包括吉非替尼或厄洛替尼的抗性是正在面临的挑战，尽管继续治疗，但对 TKI 敏感的肿瘤最终继续发展。该获得的抗性可通过继发抗性或补偿性突变，特别是在 EGFR 的位点 790 上的次级突变 (T790M) 介导。研究者现在显示抗 EGFR 抗体，特别是 mAb806 有效地抗 T790M 突变，从而在 EGFR T790M/L858R 驱动的鼠肺癌中导致显著的肿瘤衰退。总的来说，这些数据证明抗 EGFR 抗体，特别是 mAb806 在具有 EGFR 激酶结构域突变的患者，包括癌症患者，特别是肺癌患者的治疗中提供了有效的备选或辅助。

[0109] 因此，通过证明抗 EGFR 抗体，特别是 mAb806 的抗肿瘤活性提供和产生了治疗性和诊断性应用以及方法。如在本文中最初建议的和进一步详细阐述的，本发明包括其中牵涉 EGFR 的级联反应和信号传导的药物干预，从而调节与 EGFR 突变包括激酶结构域突变（原发性和次级抗性突变）相关的致癌能力。

[0110] 本文中提供的数据证明 mAb806 抗 EGFR 激酶结构域突变包括 L858R 和抗 TKI 的 T790M 的活性。预期另外的激酶结构域突变或 EGFR 次级突变可存在或随着持续的和推进的导向抗 EGFR 治疗而产生。在半胱氨酸 T797（对应于 EGFR vIII 缺失突变体中的半胱氨酸

酸 530) 上结合 EGFR 的不可逆抑制剂 HKI272 在临床前方案中推行。如果不是预期的,那么在半胱氨酸上具有置换的抗性次级突变也是可能的。这些额外的 EGFR 二次突变体将是抗 EGFR 抗体疗法的候选物。

[0111] 因此,本发明提供了在哺乳动物中治疗酪氨酸激酶抑制剂抗性 EGFR 介导的疾病的方法,其中所述抗性 EGFR 介导的疾病是 EGFR 中次级突变从而产生突变的 EGFR 的结果,并且其中所述突变与 EGFR vIII 突变不同,所述方法包括对所述哺乳动物施用有效量的能够结合并抑制突变的 EGFR 的抗 EGFR 抗体。在特定的方面,次级 EGFR 突变是 EGFR 酪氨酸激酶结构域突变。在另外的方面,酪氨酸激酶结构域突变是 T790M。在所述方法的特定实施方案中,抗 EGFR 抗体是 mAb806 抗体或其活性片段。MAb806 包括鼠抗体、重组抗体或人源化抗体。另外的抗 EGFR 抗体,包括靶向 EGFRvIII 突变体的抗体,可用于本发明的治疗方法。示例性和已知的抗 EGFR 抗体可选自 ABX-EGF(帕尼单抗)、DH8.3、L8A4 和其活性片段。

[0112] 用以治疗的 EGFR 介导的疾病特别地是癌症并且可选自成胶质细胞瘤、头颈癌、胰腺癌、肺癌、神经系统的癌症、胃肠癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、肾癌、视网膜癌、皮肤癌、肝癌、生殖-泌尿癌和膀胱癌。在特定的方面,EGFR 介导的癌症是肺腺癌、肺鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

[0113] 本发明包括用于在癌症患者中降低 EGFR 介导的肿瘤生长的方法,其中所述癌症患者之前已用一种或多种酪氨酸激酶抑制剂进行治疗并且已发生了复发性疾病和肿瘤生长,该方法包括对所述患者施用有效量的抗 EGFR 抗体以使复发性疾病和肿瘤生长被抑制和降低。在用于降低肿瘤生长的本方法的特定实施方案中,抗 EGFR 抗体是 mAb806 抗体或其活性片段。MAb806 包括鼠抗体、重组抗体或人源化抗体。可使用另外的抗 EGFR 抗体,其中包括靶向 EGFRvIII 突变体的那些抗体。示例性和已知的抗 EGFR 抗体可选自 ABX-EGF(帕尼单抗)、DH8.3、L8A4 和 / 或其活性片段。

[0114] 在特定的临床方面,癌症患者中的复发性疾病和肿瘤生长是次级 EGFR 突变的结果,所述次级 EGFR 突变是 EGFR 酪氨酸激酶结构域突变。特定的次级 EGFR 突变是酪氨酸激酶结构域突变 T790M。

[0115] 本发明还提供了在哺乳动物中治疗 EGFR 介导的癌症的方法,该方法包括对所述哺乳动物施用酪氨酸激酶抑制剂和抗 EGFR 抗体。在一个方面,同时施用酪氨酸激酶抑制剂和抗 EGFR 抗体。在一个方面,在常规化学疗法之前或之后,同时或顺次地和反复地施用酪氨酸激酶抑制剂和抗 EGFR 抗体。

[0116] 本发明还提供了在哺乳动物中治疗 EGFR 介导的癌症的方法,该方法包括对所述哺乳动物施用酪氨酸激酶抑制剂和抗 EGFR 抗体,其中在使用酪氨酸激酶抑制剂作为二线疗法的治疗后施用所述抗 EGFR 抗体来抑制抗酪氨酸激酶抑制剂的潜在的次级突变的 EGFR。

[0117] 酪氨酸激酶抑制剂可以是可逆酪氨酸激酶抑制剂或不可逆酪氨酸激酶抑制剂。可抑制酪氨酸激酶抑制剂可以是苯胺喹唑啉化合物和选自吉非替尼、厄洛替尼、AG 1478、ST1571 和 SU-6668。示例性不可逆酪氨酸激酶抑制剂在本领域内是已知的并且包括但不限于 EKB-569、EKI-569、HKI-272、HKI-357 和 BIBW 2992(Kwak EL 等人 (2005) Proc Natl Acad Sci USA 102(21):7665-70)。

[0118] EGFR 介导的癌症可选自成胶质细胞瘤、头颈癌、胰腺癌、肺癌、神经系统的癌症、胃肠癌、前列腺癌、卵巢癌、乳腺癌、肾癌、视网膜癌、皮肤癌、肝癌、生殖-泌尿癌和膀胱癌。特别地,癌症是肺腺癌、肺鳞状细胞癌或非小细胞肺癌。

[0119] 可在所述方法中单独地或与其他抗 EGFR 抗体组合施用抗 EGFR 抗体,特别是 mAb806。因此,可连续地或与西妥昔单抗组合施用 Mab806。还可连续地或与其他抗 EGFR vIII 抗体包括 ABX-EGF(帕尼单抗)、DH8.3、L8A4 和 / 或其活性片段组合施用 mAb806。

[0120] 可将抗 EGFR 抗体与适当的载体一起并且以对于通过不同方法对患者施用是有效的强度制备于药物组合物中。可使用多种施用技术,其中有胃肠外技术例如皮下、静脉内和腹膜内注射、导管插入术(catheterization)等。抗体或它们的活性片段的量可以变化并且特别地应当基于有资格的医生或兽医的推荐和处方,其中包括基于对本文中提供的结果和数据的考虑。

[0121] 用于本发明的抗 EGFR 抗体包括 mAb806 可提供有用的诊断应用,其中包括成像应用或诊断性活组织检查应用,以用于诊断和 / 或监控癌症患者(包括在 TKI 治疗后或 TKI 治疗一有结论后)。

[0122] 通常用于此类研究的标记物是放射性元素、酶、当暴露于紫外光时发荧光的化学药品和其他物质。许多荧光材料是已知的并且可用作标记物。这些标记物包括例如,荧光素、罗丹明、金胺、德克萨斯红、AMCA 蓝和荧光黄。

[0123] 可用可检测的或功能性的标记物标记本发明的抗体。可检测的标记物包括但不限于放射性标记物例如同位素 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{36}Cl 、 ^{51}Cr 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{59}Fe 、 ^{90}Y 、 ^{121}I 、 ^{124}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{211}At 、 ^{198}Au 、 ^{67}Cu 、 ^{225}Ac 、 ^{213}Bi 、 ^{99}Tc 和 ^{186}Re ,可使用抗体成像领域内已知的常规化学作用将其连接至本发明的抗体。标记物还包括荧光标记物和本领域中常规用于 MRI-CT 成像的标记物。它们还包括酶标记物,例如辣根过氧化物酶。标记物还包括化学部分例如生物素,其可通过结合至特定的关联(cognate)可检测部分例如经标记的抗生物素蛋白而被检测。

[0124] 功能性标记物包括经设计用来被靶向肿瘤的位点以引起破坏肿瘤组织的物质。此类功能性标记物包括细胞毒性药物例如 5-氟尿嘧啶或蓖麻毒素,以及酶例如细菌羧肽酶或硝基还原酶,其能够在肿瘤的位点将前体药物转化成活性药物。

[0125] 放射性标记的抗 EGFR 抗体和其片段用于体外诊断技术和用于体内放射成像(radioimaging)技术和用于放射免疫疗法。在体内成像的情况下,可将本发明的特定结合成员缀合至显像剂(imaging agent)而非放射性同位素,所述显像剂包括磁共振成像增强剂(magneticresonance image enhancing agent),其中例如通过整合基用大量的顺磁离子装载抗体分子。整合基的实例包括 EDTA、卟啉、多胺冠醚(polyamines crown ether)和聚肟(polyoxime)。顺磁离子的实例包括钆、铁、锰、铈、镧、铈和 ferbium。在本发明的另外方面中,放射性标记的特定结合成员,特别是抗体和其片段,特别是放射免疫缀合物(radioimmunoconjugate)用于放射免疫疗法,特别是作为放射性标记的抗体用于癌症治疗。在另外的方面,放射性标记的特定结合成员,特别是抗体和其片段用于放射免疫导向手术技术(radioimmuno-guided surgery technique),其中它们可在除去癌细胞、癌前细胞、肿瘤细胞、肿瘤细胞和过度增殖(hyperproliferative)细胞的手术之前、期间或之后鉴定和指示这样的细胞的存在和 / 或定位。

[0126] 本发明的免疫缀合物或抗体融合蛋白（其中本发明的特定结合成员，特别是抗体和其片段缀合至或连接至其他分子或试剂）还包括但不限于缀合至化学消融剂（chemical ablation agent）、毒素、免疫调节剂、细胞因子、细胞毒素剂、化学治疗剂或药物的结合成员。

[0127] 放射免疫疗法（RAIT）已进入临床并且通过使用各种抗体免疫缀合物证明了其功效。已在结肠直肠癌中评估了¹³¹I标记的人源化抗癌胚抗原（抗CEA）抗体hMN-14（Behr TM等人（2002）Cancer 94(4Suppl):1373-81），和已在甲状腺髓样癌中评估了用⁹⁰Y标记的相同抗体（SteinR等人（2002）Cancer 94(1):51-61）。关于何杰金氏淋巴瘤和胰腺癌，也已评估和报导了使用单克隆抗体的放射免疫疗法（Goldenberg DM(2001)Crit Rev Oncol Hematol 39(1-2):195-201;Gold DV等人（2001）Crit Rev Oncol Hematol 39(1-2)147-54）。使用特定抗体的放射免疫疗法也描述于美国专利6,306,393和6,331,175中。放射免疫导向手术（RIGS）也已进入临床并且证明了功效和有用性，其中包括使用抗CEA抗体和定向针对与肿瘤相关的抗原的抗体（Kim JC等人（2002）Int J Cancer 97(4):542-7;Schneebaum S等人（2001）World J Surg 25(12):1495-8;Avital S等人（2000）Cancer 89(8):1692-8;McIntosh DG等人（1997）Cancer Biother Radiopharm 12(4):287-94）。

[0128] 可通过任何适当的途径，通常通过注射入血流或CSF或直接注射入肿瘤的位点来对需要治疗的患者施用本发明的抗体。精确的剂量将取决于许多因素，包括抗体是用于诊断的还是用于治疗的，肿瘤的大小和位置、抗体的精确性质（是完整抗体、片段或者双特异抗体等）以及连接至抗体的可检测的或功能性的标记物的性质。当放射性核素用于治疗时，适当的最大单一剂量是大约45mCi/m²至最大大约250mCi/m²。优选剂量在15至40mCi的范围内，更优选的剂量范围为20至30mCi或10至30mCi。这样的治疗可能需要骨髓或干细胞置换。用于肿瘤成像或肿瘤治疗的常用抗体剂量可在0.5至40mg，优选1至4mg的F(ab')₂形式的抗体的范围内。优选以20至1000mg蛋白质/剂，或20至500mg蛋白质/剂，或20至100mg蛋白质/剂的剂量施用裸抗体。这是用于成年患者的单次治疗的剂量，其可按比例调整用于儿童和婴儿，还可按分子量比例调整用于其他抗体形式。可在医生的指导下以每日一次，每周两次、每周一次或每月一次的间隔重复治疗。

[0129] 通过参考下列作为本发明的示例提供的非限定性实施例可更好地理解本发明。下列实施例提供用来更详尽地举例说明本发明的优选实施方案，然而绝不当解释为限定本发明的宽广的范围。

[0130] 实施例1

[0131] 治疗性抗EGFR抗体806在具有新生EGFR突变体依赖性肺癌的鼠中产生反应。

[0132] 激活性表皮生长因子受体（EGFR）突变发生在人非小细胞肺癌（NSCLC）中，5%的人肺鳞状细胞癌具有EGFRvIII突变，10-30%的肺腺癌具有EGFR激酶结构域突变。靶向EGFR的单克隆抗体mAb806识别野生型（wt）EGFR以及截短的EGFRvIII突变体的构象表位。为了进一步探测该抗体对于EGFR靶向的癌症疗法的抗癌谱，将mAb806用于治疗经基因工程改造的、具有由EGFRvIII或EGFR激酶结构域突变驱动的肺肿瘤的小鼠。我们的结果证明mAb806在阻断EGFRvIII信号传导和诱导肿瘤细胞凋亡，从而在EGFRvIII驱动的鼠肺癌中导致显著的肿瘤衰退中是非常有效的。另一种靶向EGFR的抗体西妥昔单抗在这些经遗

传确定的肺肿瘤中不能显示活性。此外,使用 mAb806 进行的对由 EGFR 激酶结构域突变驱动的鼠肺肿瘤的治疗诱导了显著的肿瘤衰退,虽然达到比在 EGFRvIII 驱动的肿瘤中观察到的程度更低的程度。总的来说,这些数据支持假说,即 mAb806 可在具有这两类 EGFR 突变的 NSCLC 患者的群体的治疗中提供显著的活性。

[0133] 引言

[0134] 靶向癌症疗法经设计用来破坏致癌作用和肿瘤生长所需的特定分子的功能,从而杀死或阻止癌细胞的生长 (1)。与常规化学毒性化学疗法相反,此类靶向癌症疗法可以更有效并且对正常细胞的伤害更小。靶向癌症疗法领域的主要努力一直以来是开发靶向表皮生长因子受体 (EGFR) 的试剂。EGFR 是密切相关的受体 (包括的 EGFR (ErbB-1)、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3) 和 Her4 (ErbB-4)) 的 ErbB 家族的成员。EGFR 的激活导致受体酪氨酸激酶的激活和一系列下游信号传导事件 (所述信号传导事件介导细胞增殖、运动、粘着、侵入和对化学疗法的抗性以及对细胞凋亡的抑制 (2-4))、对于癌细胞的持续增殖和存活是至关重要的过程。

[0135] 迄今为止,两个主要类型的抗 EGFR 试剂已进入临床环境:抗 EGFR 抗体和小分子 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂 (TKI) (5,6)。抗 EGFR 抗体例如西妥昔单抗经设计用来结合 EGFR 的细胞外结构域并且阻断 EGFR 下游信号传导的激活 (7)。相反,小分子 TKI 例如吉非替尼或厄洛替尼与 ATP 竞争对 EGFR 酪氨酸激酶的细胞外催化结构域的结合,从而阻止 EGFR 的自磷酸化作用和下游信号转导 (4)。

[0136] 这两种抗 EGFR 药物类型都已在患有多种不同类型癌症的患者的亚群中显示一些临床功效。在患有具有 EGFR 激酶结构域突变的肺癌的患者中使用吉非替尼或厄洛替尼进行治疗通常产生显著的临床反应 (5,8)。然而,吉非替尼或厄洛替尼在具有野生型 EGFR 的肺腺癌或其他组织学亚型例如鳞状细胞癌中的功效是有限的 (9,10)。此外,在临床前和临床试验中已显示吉非替尼或厄洛替尼在抑制 EGFRvIII 突变体 (11) (其中存在外显子 II 至 VII 的符合读框的缺失的不同的激活性 EGFR 突变) 的功能中是基本无效的。EGFRvIII 通常见于成胶质细胞瘤,最近发现存在于人肺鳞状细胞癌的亚型 (12) 和大部分头颈癌 (13) 中。显示西妥昔单抗在非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者和患有头颈癌的患者以及结肠直肠癌患者的小亚群中是有效的。然而,对西妥昔单抗的反应似乎与 EGFR 的表达水平无关。因此,不清楚这些患者对西妥昔单抗治疗有反应然而其肿瘤具有高 EGFR 表达的其他癌症患者对西妥昔单抗治疗不显疗效的原因 (14)。

[0137] mAb806 是新型鼠类抗体,最初产生用来识别独特的截短突变体 EGFRvIII (15-17)。重要地,被 mAb806 识别的表位在无活性的野生型 (wt) EGFR 中是不可接近的,但在过表达 EGFR 和表达 EGFRvIII 的细胞中暴露于 wt EGFR 的过渡形式中 (18)。表位研究受到免疫组织化学研究的支持,后者证明 806 抗体结合存在于神经胶质瘤以及广泛的上皮癌中的表位但不结合正常人组织 (16,19)。这些和其他临床前数据表明 mAb806 可能具有与西妥昔单抗和其他抗 EGFR 抗体不同的临床活性谱和副作用特征谱。在异种移植模型中, mAb806 已展示有效的不靶向正常组织的抗肿瘤活性。因此, mAb806 的独特的靶向能力代表了癌症特异性分子靶向疗法的新范例。

[0138] 最近的研究已显示 10-30% 的 NSCLC 患者具有 EGFR 激酶结构域突变,而 5% 的肺鳞状细胞癌 (SCC) 患者具有细胞外结构域 EGFRvIII 突变 (12,20)。为了研究 mAb806 在具

有 EGFR 突变的 NSCLC 患者的癌症特异性靶向治疗中的临床潜能,我们使用两个已建立的依赖于 EGFRvIII 或 EGFR 激酶结构域突变体的小鼠肺癌模型。我们的数据显示 mAb806 在由 EGFRvIII 或 EGFR 激酶结构域突变的表达驱动的鼠 NSCLC 的治疗中十分有效,并且表明该抗体可能在其肿瘤具有相似突变的患者中具有临床活性。

[0139] 结果

[0140] 使用 mAb806 而非西妥昔单抗的治疗在具有拥有 EGFRvIII 突变的肺肿瘤的小鼠中诱导肿瘤衰退。

[0141] 之前的研究已确定了 EGFRvIII 突变在由突变驱动的鼠肺肿瘤的维持中的重要作用。阻断 EGFRvIII 的激活导致在新生鼠肺癌模型中与细胞凋亡相关的显著的肿瘤衰退 (12)。Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA、Ink4A/Arf-/- 小鼠在施用 8 至 10 周的多西环素后产生具有细支气管肺泡癌 (BAC) 特征的肺腺癌, (图 1, 左图框; 图 2A, 上方的图框)。在通过 MRI 鉴定具有肿瘤的小鼠后, 通过在第一周中每日一次, 其后的 4 周中每 2 天一次进行腹腔内 (I. P.) 注射给予 0.5mg/剂量的 mAb806。在治疗 1、3 和 5 周结束时进行系列 MRI 来测定肿瘤体积和 / 或密度的变化。在 mAb806 治疗 1 周后通过 MRI 观察到肿瘤的减小是显著的 (在 6 只小鼠中 60% ± 5% 的平均减小, 图 1, 上方的图框)。在治疗 3 周后肿瘤负荷持续减小 (95% ± 8% 的平均减小), 并且所有 6 只小鼠在治疗 5 周后具有完全的肿瘤衰退。相反地, 使用西妥昔单抗进行的小鼠治疗甚至在使用相同的给药方案以每小鼠 1mg 进行 5 周的治疗后, 不能在 4 只 Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA、Ink4A/Arf-/- 小鼠中诱导肿瘤衰退。我们还观察到用西妥昔单抗治疗的小鼠日益变得虚弱并且一些小鼠由于在治疗期间严重的肿瘤负荷而甚至死亡 (数据未显示)。

[0142] 来自这些小鼠的肺的病理检查与 MRI 发现: 在使用 mAb806 治疗 1 周后, 在腺癌中存在肿瘤细胞构成的减少 (图 2A, 中间的图框) 相关。在 5 周后, 肺具有局灶性纤维化和瘢痕化, 具有零星的单核细胞浸润; 可能代表从退缩的肿瘤持续重塑的区域 (图 2A, 下方的图框)。虽然在这些纤维化结节的几个病灶中仍可罕见地观察到活的癌细胞, 但大部分纤维化和瘢痕化区域不包含任何肿瘤细胞。相反地, 来自用西妥昔单抗治疗的小鼠的肿瘤, 当与未治疗的肿瘤相比较时, 似乎未受影响, 无可见的组织学差异 (数据未显示)。因此, 使用 mAb806 抗体的治疗在 EGFRvIII 驱动的小鼠肺癌模型中导致快速和显著的肿瘤衰退, 而西妥昔单抗治疗基本上是无效的。

[0143] mAb806 抑制 EGFRvIII 磷酸化并且在 Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA、Ink4A/Arf-/- 小鼠中诱导肿瘤细胞的细胞凋亡。

[0144] 为了确定腹腔内施用的 mAb806 是否在肺肿瘤中识别其靶, 我们使用抗总 EGFR 和 phospho-EGFR 的抗体在用或不用 mAb806 治疗的小鼠的肺肿瘤中进行免疫组织化学染色。如所预期的, mAb806 治疗对肿瘤细胞中总 EGFRvIII 的表达没有影响 (图 2B)。然而, 在 mAb806 治疗 1 周后, phospho-EGFRvIII 的表达减少 (图 2B)。然后, 我们通过使用在使用 mAb806 的治疗期间在不同时间点上收集的肺裂解物进行的免疫印迹分析来验证这些发现。在 mAb806 治疗 1 周后, phospho-EGFRvIII 的水平显著降低, 然而总 EGFRvIII 水平与未治疗的对照的总 EGFRvIII 水平保持相似 (图 3), 这表明 mAb806 对 EGFRvIII 磷酸化的强抑制作用。有趣地, 总 EGFRvIII 水平在 mAb806 施用 5 周后最终确实减少。该现象的一个解释可以是有活力的肿瘤细胞的数目的显著减少。与该解释相符的是, 在 mAb806 治疗 1 周后, 与未

治疗的肿瘤相比,在肺肿瘤中观察到大大增加的 TUNEL 染色(图 2C)。除了 phospho-EGFR 水平的改变以外,1 周的 mAb806 治疗还减少 phospho-Akt 和 phospho-Erk1,2 的表达,这些 EGFR 下游信号传导分子在功能上与抗细胞凋亡和增殖通路相关。令人惊讶的是,当与 1 周的治疗相比较时,在 mAb806 治疗 5 周后我们观察到微弱的但可重现的 phospho-Akt 水平的增加。Akt 的磷酸化不可能由 EGFRvIII 启动,因为 phospho-EGFRvIII 在该时间点上非常低。很可能,Akt 可通过参与肺重塑过程的其他信号传导事件来激活。这些数据表明 mAb806 通过阻止 EGFR 的激活和增加肿瘤细胞的细胞凋亡来在 EGFRvIII 小鼠中诱导肿瘤的退缩。

[0145] Ch806 治疗在具有 EGFRvIII 突变的鼠肺肿瘤中导致显著的肿瘤衰退。

[0146] Ch806 是 mAb806 的人源化形式(22)。为了确定人源化抗体在肺腺癌的体内治疗中是否与鼠 mAb806 一样有效,我们在第一周中每日一次进行通过 I. P. 注射一个剂量的 0.5mg 的 ch806,然后在另外 7 周每两天一次施用一个剂量,来治疗荷瘤 Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA、Ink4A/Arf-/- 小鼠。这些小鼠在治疗的第 1.5、5 和 8 周经历再成像,然后杀死小鼠以用于组织学分析。我们治疗从 1.5 周开始的 MRI 扫描观察到肿瘤体积的显著减小($43\% \pm 3\%$),在 4 只用 ch806 治疗的小鼠的每一只中在治疗 8 周时获得几乎完全的肿瘤衰退($83\% \pm 7\%$)(图 1,下方的图框)。用 ch806 治疗的小鼠的组织学(数据未显示)与 mAb806 治疗后的肿瘤的组织学相似并且与 MRI 数据相符。

[0147] Ch806 在具有 EGFR L858R 突变的鼠肺肿瘤的治疗中是有效的

[0148] 为了阐明 ch806 是否有效地抗 EGFR 激酶结构域突变驱动的肺癌,使用 EGFR L858R-IRES-荧光素酶/CCSP-rtTA 小鼠。每天一次以 0.5mg/小鼠施用 Ch806,进行 4 周,在治疗 1、2 和 4 周结束时对所有治疗的小鼠进行系列 MRI 扫描。在 ch806 治疗 2 周后观察到肿瘤的退缩($21\% \pm 2\%$),在 ch806 治疗 4 周时肿瘤的退缩为 $41\% \pm 2\%$ (图 4A)。通过显微镜观察,ch806 治疗的小鼠的肺显示巨噬细胞,特别地在围绕剩下的有活力的肿瘤的区域中的巨噬细胞的弥散性细胞浸润增加。此外,巨噬细胞存在于肿瘤的多个区域,这表明巨噬细胞介导的细胞毒性可能是抗体诱导的肿瘤衰退(图 4B)的背后机制中的一个机制。还应当指出,由于不断增加的与肿瘤细胞相关的巨噬细胞的积累而引起的肺内实变(consolidation)的存在可高估通过 MR 成像测量的肿瘤体积。

[0149] 讨论

[0150] EGFR 突变和激活事件在人恶性肿瘤包括 NSCLC 中是常见的。EGFR 信号传导的激活可通过受体过表达而发生以及通过由于 EGFR 的功能获得突变形式引起的组成型信号传导而发生。大约 10-30% 的 NSCLC 患者在它们的肺肿瘤中具有 EGFR 激酶结构域突变,大约 5% 的患者具有鳞状细胞肺癌的患者具有特定的 EGFRvIII 细胞外结构域突变(12,20)。此处,我们显示 mAb806 和其人源化形式 ch806 在治疗具有两种类型的 EGFR 突变的鼠肺癌中是有效的。观察到的显著的肿瘤衰退与 EGFRvIII 信号传导的阻断和随后增加的细胞凋亡相关。在具有拥有 EGFR 激酶结构域突变的肺肿瘤的小鼠中,对 ch806 的反应没有报导的对厄洛替尼和 cetuximab 的反应那么明显,尽管它们在放射摄影和组织学上(21,23)确实具有客观的反应(objective response)($41\% \pm 2\%$)。相反地,在用 mAb806 治疗后,在具有 EGFRvIII 驱动的肺肿瘤的小鼠中获得几乎完全的肿瘤衰退,然而西妥昔单抗无效。该后一结果可能不令人惊讶,因为西妥昔单抗经设计用来干扰配体和 EGFR 细胞外结构域之间的相互作用(24)。已确定,EGFRvIII 突变导致构象变化并且展示不依赖于配体刺激的组成型

激酶活性,这促成了肿瘤形成(25)。虽然西妥昔单抗已被FDA批准用于癌症患者,但不存在用以预测使用该抗体的治疗在个体患者中的功效的明确的生物标记,因为应答率和总存活与通过免疫组织化学测量的EGFR蛋白的表达不相关(14)。

[0151] 虽然小分子TKI在具有EGFR激酶结构域突变的许多NSCLC患者的治疗中是有效的,但所有患者最终产生与次级突变T790M相关的抗性(10,26)。相一致地,体外研究已显示具有T790M突变的肿瘤细胞使用厄洛替尼的治疗具有抗性(27,28)。来自具有次级T790M突变的EGFR激酶结构域的晶体结构的证据表明T790M突变对受体功能的影响应当很小。T790M突变可能干扰厄洛替尼与ATP酶口袋的结合(27)。然而,T790M突变体的细胞外结构域潜在地提供了基于抗体的癌症治疗(包括西妥昔单抗和mAb806)的良好靶。这可意味着抗小TKI治疗的具有次级T790M点突变的NSCLC肿瘤可能对mAb806治疗有反应。为了测试该假说,正在进行产生如下小鼠的努力,所述小鼠具有包含激活性激酶结构域突变和T790M突变的复合突变EGFR等位基因。

[0152] 最近从I期临床试验释放的数据已显示ch806抗体,与西妥昔单抗不同,选择性地结合肺癌包括鳞状细胞肺癌的肿瘤细胞,但不结合正常组织(Scott,ASCO 2006)。在该试验中未观察到ch806抗体的显著毒性。与其他EGFR靶向癌症疗法包括西妥昔单抗和TKI治疗相比较,通过靶向癌细胞上的EGFR的构象依赖性表位然而极少靶向大多数(如果不是全部)正常细胞上的wt EGFR,ch806似乎具有大得多的特异性。我们的结果清楚地表明mAb806在阻断EGFR信号传导上的功效。因此,ch806的独特的靶向能力代表了癌症特异性分子靶向疗法的新型和令人激动的范例,该疗法可使其癌症依赖于由于过表达或功能获得突变(包括EGFRvIII或EGFR激酶结构域突变)而引起的不受控制的EGFR信号转导的患者受益。

[0153] 方法

[0154] 小鼠群(Mouse cohorts)

[0155] 之前描述了Tet-op-EGFRvIII/CCSP-rtTA、Ink4A/Arf-/-小鼠和Tet-op-EGFR L858R-IRES-荧光素酶/CCSP-rtTA小鼠的产生(12,21)。所有小鼠圈养Harvard School of Public Health的无病原体环境中并且进行的所有小鼠实验获得Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)批准。同窝出生小鼠在所有实验中用作对照。为了诱导EGFRvIII和EGFR L858R表达,用多西环素饮食(Research Diets, Inc.)饲养小鼠。之前的研究中的多西环素撤回实验(withdraw experiment)明确地鉴定了来自两个等位基因的肺肿瘤完全依赖于多西环素。

[0156] 体内使用mAb806或ch806或西妥昔单抗的靶向疗法

[0157] 将持续进行多西环素饮食超过8周的小鼠经历MRI以记录肺肿瘤负荷。通过I.P.注射,以每日一次0.5mg/剂将MAb806或ch806(由Ludwig Institute for Cancer Research, Melbourne, Australia生产的)递送入具有肺肿瘤的小鼠。在1周的治疗后,以相同的剂量每两天一次施用抗体,进行另外的指定的周数。使用相同的给药方案通过I.P.注射以1mg/剂对小鼠施用西妥昔单抗(从BMS pharmaceuticals商购获得的)。在指定的时间点上使用MRI对小鼠进行成像以确定肿瘤体积的减少,然后杀死小鼠以在完成治疗后进行进一步的组织学和生物化学研究。将所有小鼠在整个实验过程中保持多西环素饮食。同窝出生小鼠用作所有药物治疗研究的对照。

[0158] 肺肿瘤的病理学评估

[0159] 在指定的时间上对小鼠实施安乐死,解剖它们的左肺,然后进行快速冷冻以进行生物化学分析。然后在压力 (25cm) 下用中性缓冲的 10% 福尔马林使它们的右肺膨胀,进行 10 分钟,然后固定过夜。在 Department of Pathology at Brigham and Women's Hospital 对来自福尔马林固定的、石蜡包埋的肿瘤样品的 5 μ m 厚的切片进行苏木精和伊红 (H&E) 染色。

[0160] 对福尔马林固定的石蜡切片进行免疫组织化学分析。在二甲苯中对切片脱石蜡,然后在乙醇中进行连续再水化。对于需要抗原修复的抗体,按照厂商说明书使用抗原暴露溶液 (antigen-unmasking solution) (Vector Laboratories)。在过氧化氢 (0.3% - 3%) 中淬灭载玻片以阻断内源过氧化物酶活性,然后在自动缓冲器 (Fisher Scientific) 中洗涤。在室温下在 5% 正常血清中封闭载玻片 1 小时,然后在 4°C 下与稀释于封闭缓冲液中的一抗温育过夜。使用抗生物素蛋白生物素过氧化物酶复合物法 (Vector),使用苏木精对载玻片进行复染。将载玻片在乙醇中进行连续脱水,用二甲苯清洗,然后用 Permount (Fisher) 进行封片 (mount)。以 1 : 100 使用生物素化的 DBA 凝集素 (Vector)。使用的抗体是总 EGFR 和 phospho-EGFR Y1068 (1 : 50, Cell Signaling Technology)。使用 TUNEL 测定法 (ApopTag 试剂盒; Intergen, Inc.) 通过计数阳性细胞来测量细胞凋亡。

[0161] Western 印迹分析。

[0162] 在含有完全蛋白酶抑制剂混合物 (Complete Protease Inhibitors Cocktail) 和磷酸酶抑制剂混合物组 I 和 II (Phosphatase Inhibitors Cocktail Set I and II) (EMD Biosciences) 的 RIPA 缓冲 (Boston Bioproducts) 中匀浆快速冷冻的肺组织样品。通过离心澄清肺裂解物,然后在 1x 终十二烷基硫酸钠 (SDS) 样品缓冲液 (50mM Tris (pH 6.8), 10% 甘油, 0.715M β -巯基乙醇, 2% SDS 和 0.01% 溴酚蓝) 中煮沸 5 分钟。然后通过 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 分离裂解物,将其转移至硝基纤维素膜,然后使用 SuperSignal West PicoChemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology) 利用抗体进行免疫印迹来检测。本研究中所使用的抗体为定向针对总 EGFR、phospho-EGFR (pY1068)、总 Akt、phospho-AKT (pS473)、总 Erk1/2 和 phospho-ERK 1/2 (pT202/pY204) (全部来自 Cell Signaling); 和 β -肌动蛋白 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 的抗体。按照厂商推荐的条件使用抗体。

[0163] MRI 和肿瘤体积的测量

[0164] 通过鼻锥体 (nose cone) 使用混合在 100% 的氧气中的 1.5-2% 异氟烷 (IsoFlo[®], Abbot Laboratories) 麻醉动物。为了消除运动问题,给所有 MRI 研究提供心脏和呼吸门控。因为 MR 信号的采集与心脏和呼吸循环同步,因此在各心期 (cardiac phase) 和终末呼出期 (end-expiratory phase) 获得 MR 信号,从而使得运动伪差显著减小。

[0165] 经最优化用于估量正常小鼠 (29) 中的肺实质和脉管的 MRI 方案适用于在 4.7 德斯拉 (Biospec 47/40, Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany) 下的操作。系统配备有具有 30G/cm 的最大功率梯度 (power gradient) 的屏蔽梯度系统和心脏-呼吸触发系统 (cardiac-respiratory triggering system, BioTrig, Bruker BioSpin, Karlsruhe, Germany)。然后,将使动物俯卧放置,将用于心脏门控的电极 (前垫和左后垫) 和呼吸传感器置于它们身体上,头首先进入系统,使胸廓中心对准射频笼式线圈 (内径 3cm) 的中心。

为了成像区域的可重复定位,使用快速自旋回波程序 (fast spin echo sequence) (RARE : 使用弛豫增强快速采集, TR/ 有效 TE = 1000/28 毫秒,带宽 = 50kHz,视野 = 30mm,矩阵 = 128X128,层面厚度 = 1mm,激励次数 = 1) 首先获得整个肺在横切面和冠状平面上的低分辨率多层图像 (用作终末呼出期定位器)。此外,使用心脏 - 呼吸门控在包括整个肺的多层横截面和冠状平面中进行二维 (2D) 多层梯度回波成像。选择短于一个心动周期 (范围在 150 至 200 毫秒内,平均 178 毫秒) 的持续时间的脉冲重复时间 (TR),其中就每一单次脉搏的每一个图像填充一个 k- 空间线 (k-space line)。使用最小回波时间 (TE : 1.8 毫秒) 以减少由于空气 / 骨和组织之间的干扰引起的可减少 MR 信号的易感性效应。其他扫描参数是 : 翻转角 = 22° , 矩阵大小 = 256x256, 视野 (FOV) = 2.56cm^2 , 薄片厚度 = 1mm 以及激发次数 (NEX) = 4, 提供 $100\mu\text{m}^2$ 的面内分辨率 (in-plane resolution)。在各平面内,总扫描时间为大约 6-7 分钟,这取决于个体动物的心脏 / 呼吸率。在每一个 MR 图像上,手工分割标示肺肿瘤的区域,然后使用 ImageJ (ver. 1.33, National Institute of Health) 进行测量以计算肿瘤体积。

[0166] 参考文献

[0167] 1. Ji, H., Sharpless, N. E., and Wong, K. K. 2006. EGFR Target Therapy : View From Biological Standpoint. Cell Cycle. 5(18) : 2072-2076. Epub 2006 Sep 15.

[0168] 2. Hynes, N. E., and Lane, H. A. 2005. ERBB receptors and cancer : the complexity of targeted inhibitors. Nat. Rev. Cancer. 5 : 341-354.

[0169] 3. Arteaga, C. L. 2003. ErbB-targeted therapeutic approaches in human cancer. Exp. Cell. Res. 284 : 122-130.

[0170] 4. Mendelsohn, J., and Baselga, J. 2000. The EGF receptor family as targets for cancer therapy. Oncogene. 19 : 6550-6565.

[0171] 5. Snyder, L. C., Astsaturov, I., and Weiner, L. M. 2005. Overview of monoclonal antibodies and small molecules targeting the epidermal growth factor receptor pathway in colorectal cancer. Clin. Colorectal Cancer. 5 Suppl 2 : S71-80.

[0172] 6. Herbst, R. S. 2002. Targeted therapy in non-small-cell lung cancer. Oncology (Williston Park). 16 : 19-24.

[0173] 7. Groner, B., Hartmann, C., and Wels, W. 2004. Therapeutic antibodies. Curr. Mol. Med. 4 : 539-547

[0174] 8. Haber, D. A., et al. 2005. Molecular targeted therapy of lung cancer : EGFR mutations and response to EGFR inhibitors. Cold Spring Harb Symp. Quant. Biol. 70 : 419-426.

[0175] 9. Park, K., and Goto, K. 2006. A review of the benefit-risk profile of gefitinib in Asian patients with advanced non-small-cell lung cancer. Curr. Med. Res. Opin. 22 : 561-573.

[0176] 10. Sakurada, A., Shepherd, F. A., and Tsao, M. S. 2006. Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in lung cancer : impact of primary or secondary mutations. Clin. Lung Cancer. 7 Suppl 4 : S138-144.

[0177] 11. Halatsch, M. E., Schmidt, U., Behnke-Mursch, J., Unterberg, A., and

Wirtz, C. R. 2006. Epidermal growth factor receptor inhibition for the treatment of glioblastoma multiforme and other malignant brain tumours. *Cancer Treat. Rev.* 32 :74-89.

[0178] 12. Ji, H., et al. 2006. Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 :7817-7822.

[0179] 13. Sok, J. C., et al. 2006. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contributes to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin. Cancer. Res.* 12 :5064-5073.

[0180] 14. Italiano, A. 2006. Targeting the epidermal growth factor receptor in colorectal cancer: advances and controversies. *Oncology.* 70 :161-167.

[0181] 15. Jungbluth, A. A., et al. 2003. A monoclonal antibody recognizing human cancers with amplification/overexpression of the human epidermal growth factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100 :639-644.

[0182] 16. Luwor, R. B., et al. 2001. Monoclonal antibody 806 inhibits the growth of tumor xenografts expressing either the de2-7 or amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) but not wild-type EGFR. *Cancer Res.* 61 :5355-5361.

[0183] 17. Mishima, K., et al. 2001. Growth suppression of intracranial xenografted glioblastomas overexpressing mutant epidermal growth factor receptors by systemic administration of monoclonal antibody (mAb) 806, a novel monoclonal antibody directed to the receptor. *Cancer Res.* 61 :5349-5354.

[0184] 18. Johns, T. G., et al. 2004. Identification of the epitope for the epidermal growth factor receptor-specific monoclonal antibody 806 reveals that it preferentially recognizes an untethered form of the receptor. *J. Biol. Chem.* 279 :30375-30384.

[0185] 19. Johns, T. G., et al. 2002. Novel monoclonal antibody specific for the de2-7 epidermal growth factor receptor (EGFR) that also recognizes the EGFR expressed in cells containing amplification of the EGFR gene. *Int. J. Cancer.* 98 :398-408.

[0186] 20. Shigematsu, H., and Gazdar, A. F. 2006. Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int. J. Cancer.* 118 :257-262.

[0187] 21. Ji, H., et al. 2006. The impact of human EGFR kinase domain mutations on lung tumorigenesis and in vivo sensitivity to EGFR-targeted therapies. *Cancer Cell.* 9 :485-495.

[0188] 22. Panousis, C., et al. 2005. Engineering and characterisation of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR. *Br. J. Cancer.* 92 :1069-1077.

[0189] 23. Politi, K., et al. 2006. Lung adenocarcinomas induced in mice by mutant

EGFreceptors found in human lung cancers respond to a tyrosine kinase inhibitor or todown-regulation of the receptors. *Genes. Dev.* 20 :1496-1510.

[0190] 24. Li, S., et al. 2005. Structural basis for inhibition of the epidermal growth factorreceptor by cetuximab. *Cancer Cell.* 7 :301-311.

[0191] 25. Pedersen, M. W., and Poulsen, H. S. 2006. [Mutations in the epidermal growthfactor receptor :structure and biological function in human tumors]. *Ugeskr. Laeger.* 168 :2354-2361.

[0192] 26. Janne, P. A., Engelman, J. A., and Johnson, B. E. 2005. Epidermal growth factorreceptor mutations in non-small-cell lung cancer :implications for treatment andtumor biology. *J Clin. Oncol.* 23 :3227-3234.

[0193] 27. Kobayashi, S., et al. 2005. EGFR mutation and resistance of non-small-cell lungcancer to gefitinib. *N. Engl. J. Med.* 352 :786-792.

[0194] 28. Kobayashi, S., et al. 2005. An alternative inhibitor overcomes resistance caused bya mutation of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Res.* 65 :7096-7101.

[0195] 29. Kubo, S., et al. 2006. Three-dimensional magnetic resonance microscopy ofpulmonary solitary tumors in transgenic mice. *Magn. Reson. Med.* 56 :698-703.

[0196] 实施例 2

[0197] 806 抗体在具有 EGFR T790M 突变的肺肿瘤中导致肿瘤的退缩

[0198] 产生表达人 EGFR 次级突变 T790M 的小鼠。通过 I. P. 注射以每日一次 0.5mg/ 剂将 mAb806 递送入具有肺肿瘤的小鼠,进行 4 周。如下面所描述的,在治疗 的 2 和 4 周结束时对被治疗的小鼠进行系列 MRI 扫描。

[0199] Tet-op-hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA 小鼠群的产生

[0200] 为了产生具有人 EGFR T790M-L858R 突变体的诱导型表达的小鼠,我们构建了 4.7-kb DNA 区段,其由四环素 (tet)-操纵子的 7 个正向重复,随后 EGFR T790M-L858R cDNA 和? -珠蛋白 polyA 组成。将构建体注射入 FVB/N 胚泡,使用 PCR 策略筛选后代。鉴定 15 个 Tet-op-hEGFRT790M-L858R 创立者 (founder),然后将它们与 CCSP-rtTA 小鼠 (显示等位基因特异性靶向逆四环素反式激活物蛋白 (reversetetracycline trans-activator protein) (rtTA) 在 II 型肺泡上皮细胞中的表达 (Fisher GH 等人 (2001) *Genes Dev* 15(24) :3249-62) 杂交来产生具有激活物和应答者转基因的诱导型双转基因小鼠群 (Fisher GH 等人 (2001) *Genes Dev* 15(24) :3249-62 ;Perl AK, Tichelaar JW, and Whitsett JA. (2002) *Transgenic Res* 11(1) :21-9)。通过 RT-PCR 分析鉴定了 4 个受密切调控的 hEGFRT790M-L858R (#17、#19、#24 和 #29) 创立者,通过定量实时 PCR 测定来自个体创立者的拷贝数目 (Ji H 等人 (2006) *Cancer Cell* 9(6) :485-95)。

[0201] EGFR T790M-L858R 在肺组织中的 RNA 水平上的受密切调控的表达

[0202] 使用人 EGFR 特异性引物通过 RT-PCR 在 RNA 水平上估计 EGFR 突变转基因表达在肺隔室中的可诱导性。在 8 周的多西环素施用之前和之后以及 8 周的多西环素施用后 3 天的多西环素撤回后,收集各潜在的创立者的双转基因小鼠 Tet-op-hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA 群的肺。未能从非转基因小鼠或未进行多西环素治疗的双转基因小鼠中检测

到 EGFR 突变转录物,然而在 8 周的多西环素施用后其变得可容易地被检测到;通过在所有品系中进行 3 天的多西环素撤回完全消除了突变的 EGFR 的转录。为了进一步验证突变的 EGFR 转录物是可诱导的并且受多西环素的密切调控,对在多西环素施用和撤回的系列时间点上收集的来自创立者 #19 的肺样品进行使用上述相同的引物的 RT-PCR 和定量实时 PCR。在 1 周的多西环素施用后观察到 EGFR 的表达,其表达在整个 8 周的施用期间保持在相当的水平;多西环素撤回足以阻止突变的 EGFR 的表达,在 12 周的多西环素撤回后未观察到转基因的表达。

[0203] EGFR T790M-L858R 突变体的过表达驱动肺腺癌的发展,所述肺腺癌在实质中具有细支气管肺泡特征和在气道中具有乳头状腺癌。

[0204] 为了确定 hEGFR 突变体的过表达是否驱动肺肿瘤发生,将进行持续多西环素施用的双转基因 hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA 小鼠经历系列磁共振成像 (MRI),然后在不同的时间点杀死小鼠以进行肺的组织学检查。肿瘤只有在施用多西环素 5 至 6 周后才能通过 MRI 观察到,通过 MRI 确定的肿瘤体积在延长的多西环素治疗后增加。与未治疗的小鼠相反,在多西环素治疗 2 至 3 周后,早期损伤在肺的实质中开始发生。在 4 至 5 周后,典型的 BAC 出现。

[0205] 在 7 至 9 周后,具有细支气管肺泡特征的侵入性腺癌出现,并且在多西环素治疗 12 周后成为占优势的组织学模式。在我们的小鼠模型中观察到肺实质腺癌在组织学上与之前描述的 EGFR L858R 小鼠模型的肺实质腺癌相似 (Ji, H., 等人. (2006) Cancer Cell 9 : 485-495 ;Politi, K., 等人. (2006) Genes Dev. 20 :1496-1510),并且也与在最初对厄洛替尼有反应的 NSCLC 患者的亚群中看到的肺实质腺癌相似。

[0206] 除了实质腺癌以外, hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA 小鼠还发生支气管乳头状腺癌。在 2 至 3 周的连续多西环素施用后在细支气管中观察到早期乳头状瘤形成 (papillary neoplasia),然后在另外的 6 至 8 周内其发展成腺癌。所有 4 个创立者都显示相似的形态学特征和相似的肿瘤发生潜伏期。在所有 4 只本研究中鉴定的 hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA 小鼠的创立者中发现支气管肿瘤,但其不存于所有我们的 EGFR L858R 小鼠中。偶然地,可在发生 EGFR T790M-L858R 驱动的肺肿瘤的小鼠但非具有 EGFR L858R 驱动的肿瘤的小鼠的淋巴结中观察到腺癌的转移灶。使用特定细胞标记支气管和实质肿瘤的 IHC 染色显示不同的分化模式。Prosurfactant 蛋白 C (SPC) 是肺泡中 II 型肺细胞的独特的生物标记,而克拉拉细胞分泌蛋白 (CCSP) 对于细支气管上皮中的克拉拉细胞是特异性的。大多数实质肿瘤显示强烈的 SPC 染色,暗示着 II 型的肺细胞来源,如所预期的。相反地,支气管肿瘤对于 SPC 是阴性的。有趣地,只有支气管肿瘤细胞的小亚群对于 CCSP 是阳性的。这可能可通过克拉拉细胞起源,然后经历导致 CCSP 表达标记丢失的不良分化来解释。

[0207] hEGFR T790M-L858R 突变体的表达对于实质和支气管腺癌的肿瘤维持是重要的。

[0208] 来自 hEGFR T790M-L858R/CCSP-rtTA 小鼠的支气管和实质肺腺癌被总 EGFR 和 phospho-EGFR 抗体阳性染色,这表明表达的 EGFR 突变体具有功能活性。在 3 天的多西环素撤回后,未观察到来自任一抗体的阳性信号,这表明两种类型的肿瘤由 EGFR T790M-L858R 驱动并且它们的存活依赖于 EGFR T790M-L858R。在多西环素撤回后,我们还观察到末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP-生物素缺口末端标 (TUNEL) 测定的阳性染色增加,这表明细胞凋亡过程被触发。

[0209] 与通过 TUNEL 染色表明的细胞凋亡一致, MRI 结果证明 EGFR T790M-L858R 驱动的肺肿瘤在 10 天的多西环素撤回后完全退缩。来自通过 MRI 检查的相同小鼠的肺的显微镜分析显示大体上正常的肺组织学。在 12 周的多西环素撤回后, 在其他具有肿瘤的小鼠的气道和实质中未发现肿瘤损伤。

[0210] 为了更好地在蛋白质水平上定量突变的 EGFR 在肿瘤中的表达, 我们在多西环素施用的不同时间使用来自双转基因小鼠的完整肺裂解物进行 western 印迹。虽然存在个体差异, 但 EGFR 磷酸化受到多西环素的密切调控并且与肿瘤的存在同步, 这验证了突变的 EGFR 信号传导在肿瘤维持中的重要作用, 如在 IHC 染色和 MRI 中观察到的。因此, EGFR 仍然是我们的新型小鼠肺癌模型的具有吸引力的治疗靶。

[0211] 使用 mAb806 进行的对 EGFR T790M-L858R 驱动的肺肿瘤的治疗

[0212] 使用 mAb806 对比使用西妥昔单抗进行的对 EGFR T790M-L858R 肺肿瘤的治疗的结果描述于图 5 中。将持续进行多西环素饮食超过 8 周的小鼠经历 MRI 以记录肿瘤负荷。通过 I. P. 注射每天一次进行 4 周以 0.5mg 的剂量将 mAb806 递送入具有肺肿瘤的小鼠。通过 I. P. 注射每天一次进行 4 周以 1mg/ 剂对小鼠施用西妥昔单抗。在第 0、2 和 4 或 5 周使用 MRI 对小鼠成像, 以确定肿瘤体积的减小。通过使用 mAb806 的治疗, 肿瘤体积在第 2 周减小 (超过 20%), 在第 4 周减小更显著减少 (超过 30%)。虽然通过使用西妥昔单抗治疗 2 周时, 肿瘤体积开始减小, 但肿瘤体积在经过使用西妥昔单抗治疗 5 周后显著增加 (在 5 周的西妥昔单抗治疗时观察到的肿瘤体积比在第 0 周的初始体积更大)。在治疗和 MRI 成像完成后, 杀死小鼠以进行进一步的组织学和生物化学研究。对于所有治疗研究, 同窝出生小鼠用作对照 (未治疗)。

[0213] 本发明可以以其他形式体现或以其他方式进行而不背离其精神和基本特征。因此本公开内容在所有方面被认为是示例说明而非限制性的, 本发明的范围由所附权利要求指出, 并且在等同的意义和范围内出现的所有变化意在包含在其中。

[0214] 在整个本说明书中引用了不同的参考资料, 其各自以其全文通过引用合并入本文。

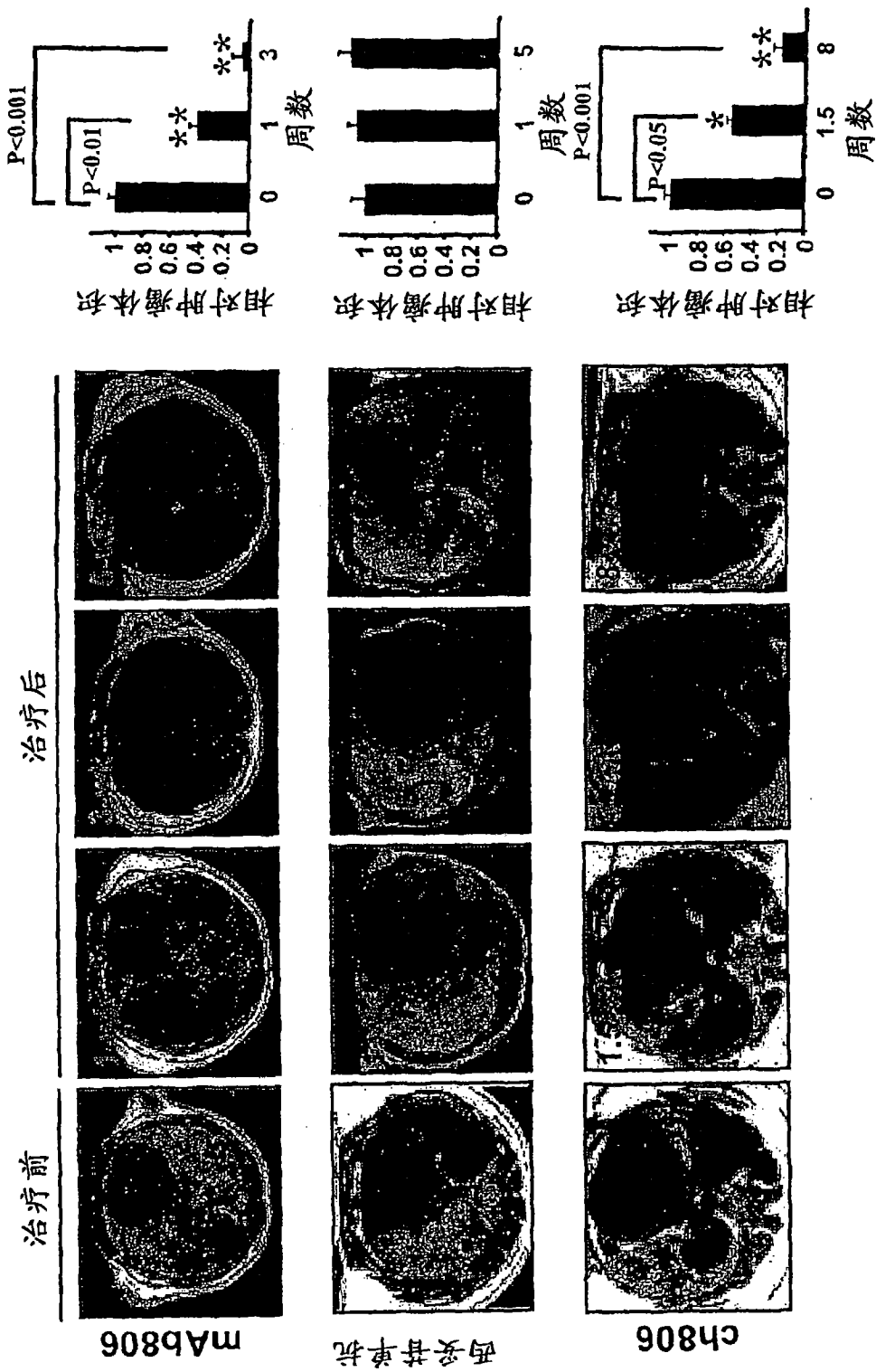


图 1

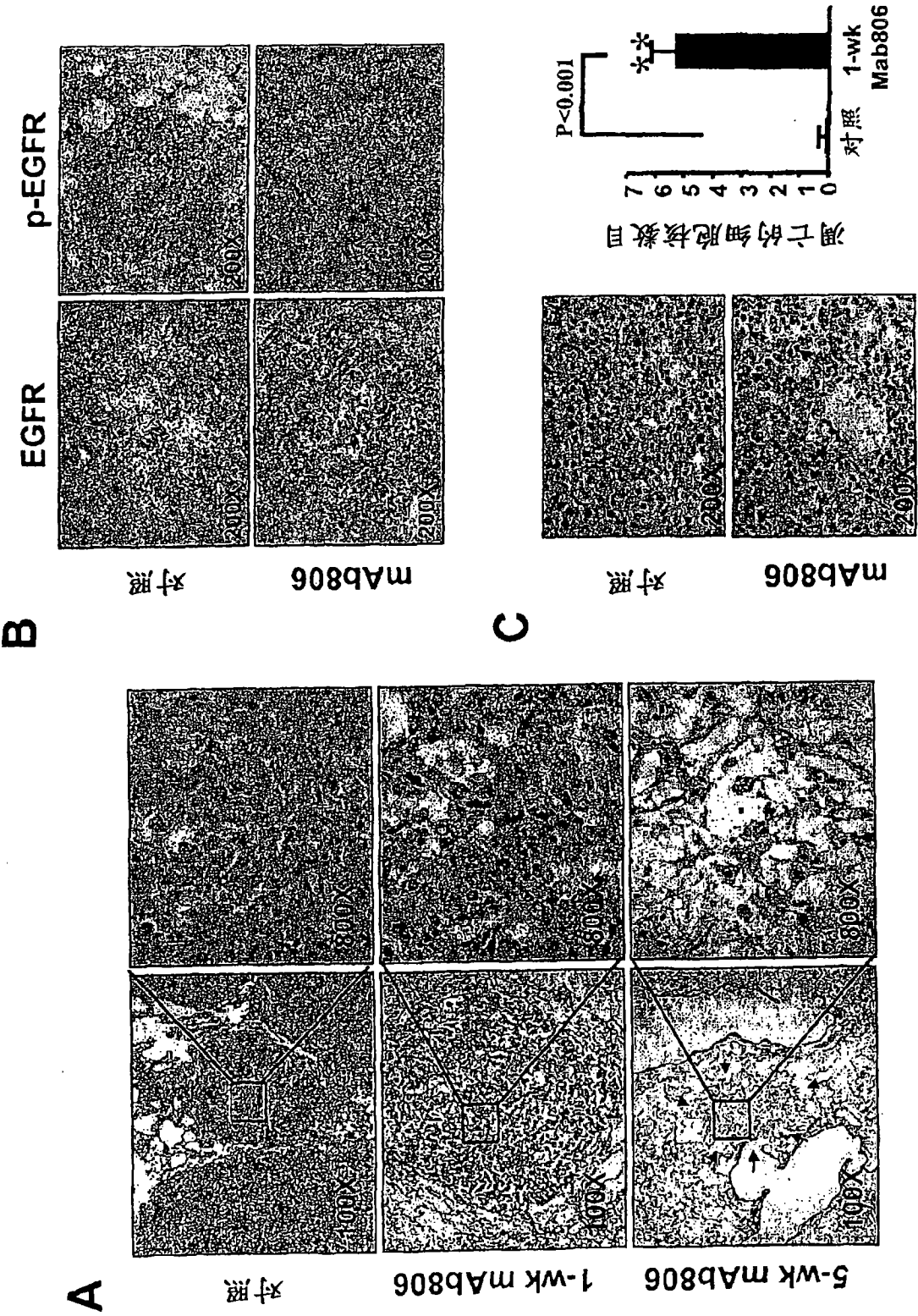


图 2

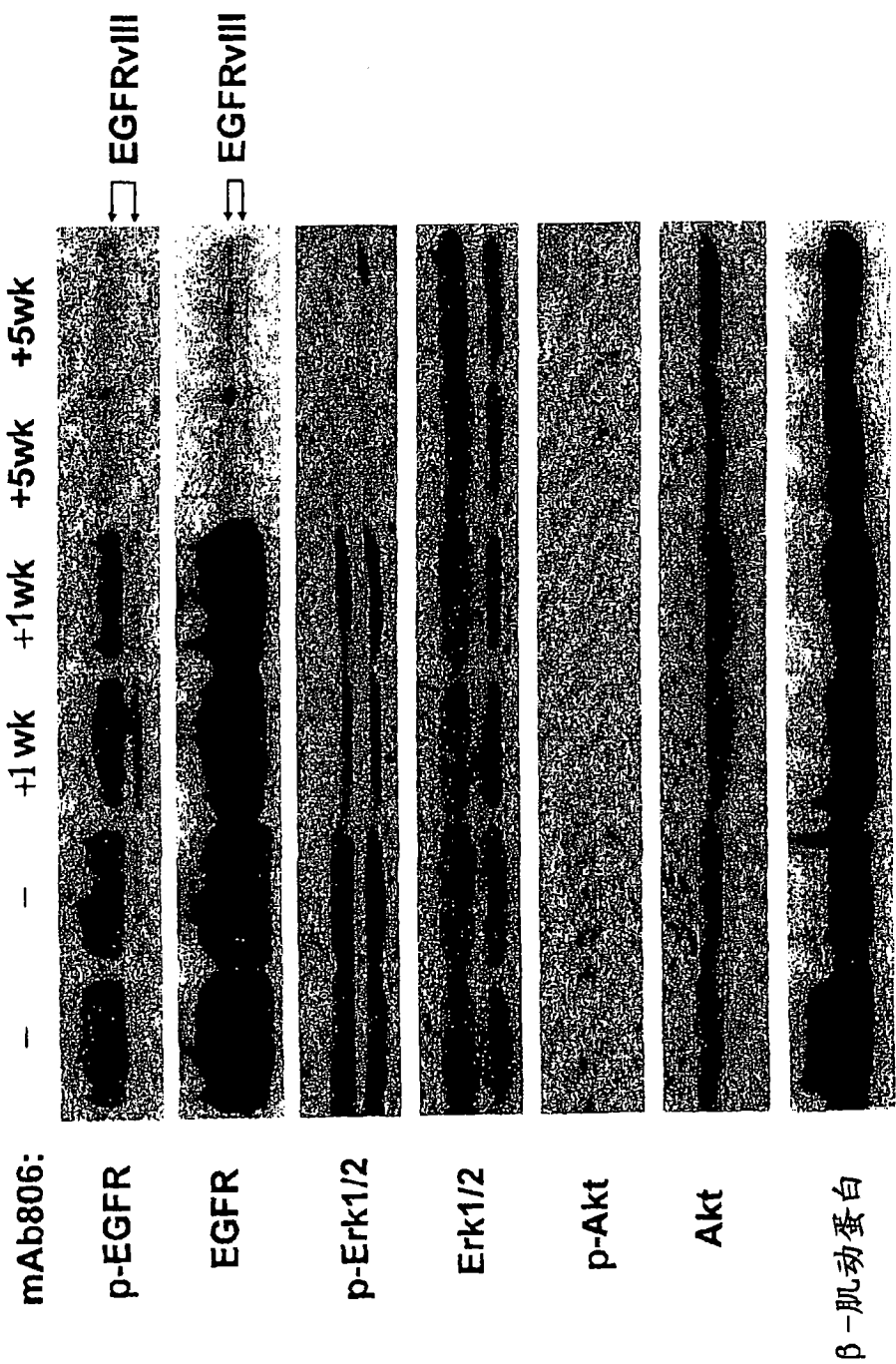


图 3

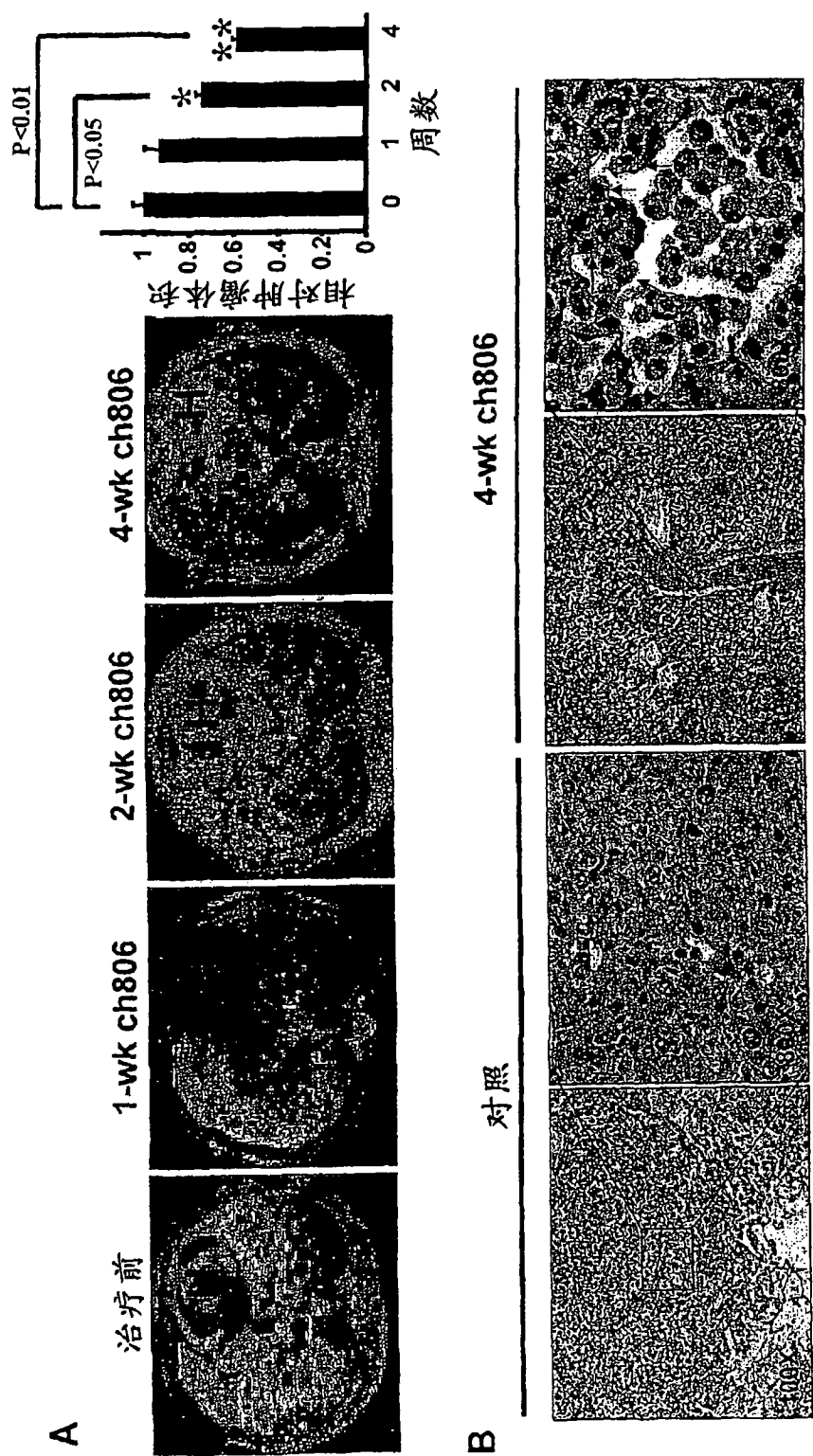


图 4

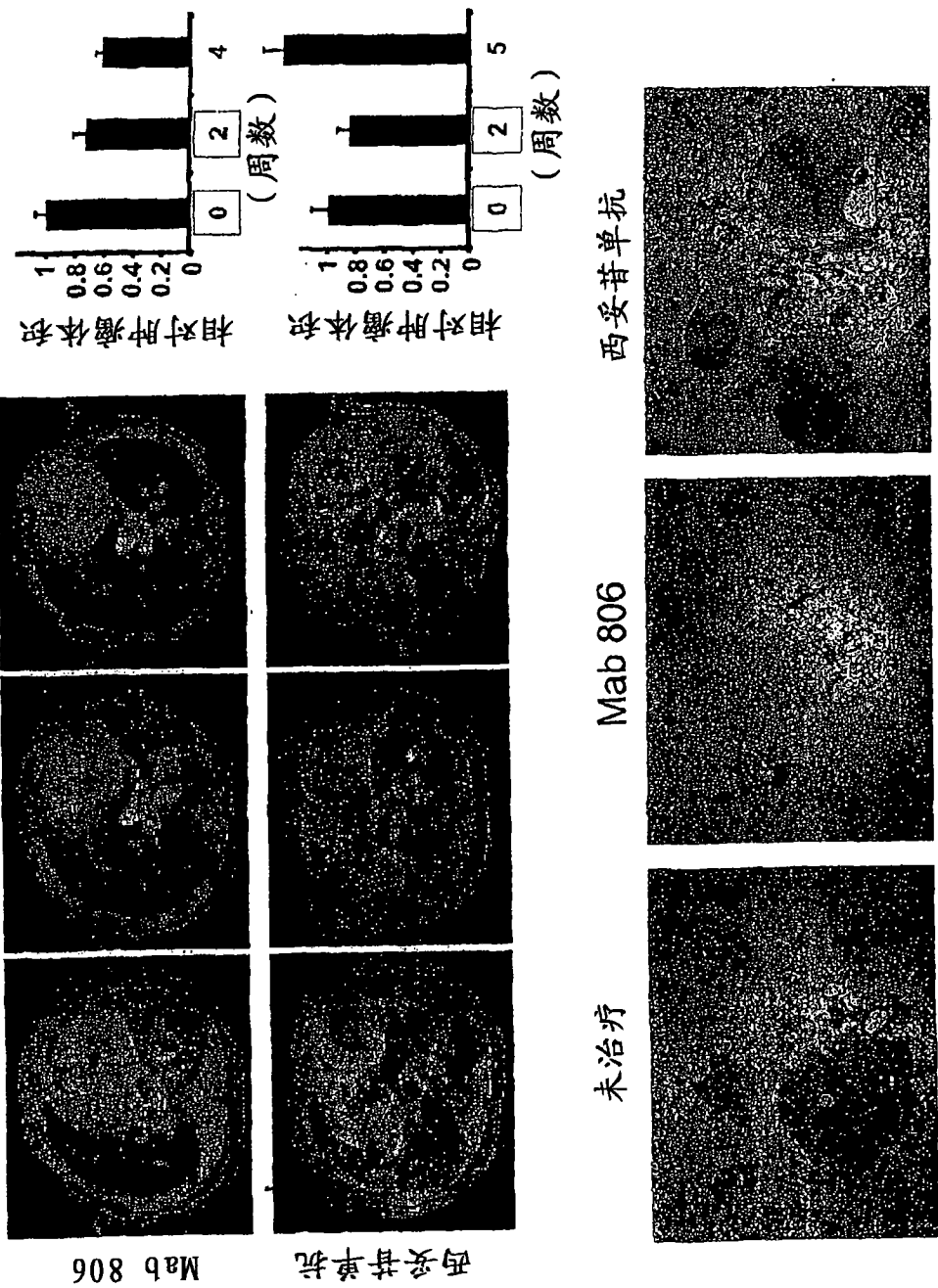


图 5