



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년10월02일

(11) 등록번호 10-1556726

(24) 등록일자 2015년09월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

G01N 30/72 (2006.01) *G01N 33/49* (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-7024976

(22) 출원일자(국제) 2011년02월22일

심사청구일자 2012년11월06일

(85) 번역문제출일자 2012년09월24일

(65) 공개번호 10-2013-0004309

(43) 공개일자 2013년01월09일

(86) 국제출원번호 PCT/US2011/000323

(87) 국제공개번호 WO 2011/106084

국제공개일자 2011년09월01일

(30) 우선권주장

61/338,938 2010년02월24일 미국(US)

(56) 선행기술조사문헌

J. Natl. Cancer Inst., Vol.99, Issue 11(2007)*
 US20100003247 A1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

바이오디식스, 임크.

미국 콜로라도 보울더 스위트 100 월더네스 플레이스 2970 (우:80301)

(72) 발명자

그리고리예바, 줄리아

미국 80487 콜로라도 스텁보트 스프링즈 코베이 씨클 3360

뢰더, 하인리히

미국 80487 콜로라도 스텁보트 스프링즈 웨스트 화이트우드 드라이브 22105

트시편, 맥심

미국 80487 콜로라도 스텁보트 스프링즈 코베리 씨클 3360

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 34 항

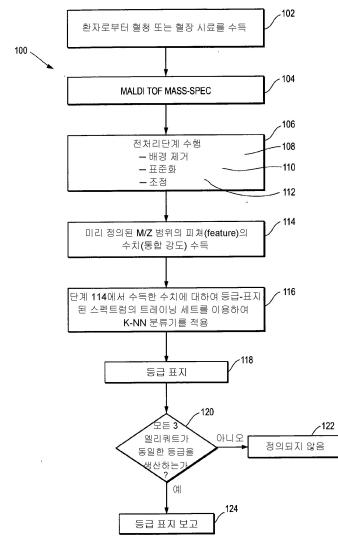
심사관 : 김도현

(54) 발명의 명칭 질량스펙트럼 분석을 이용한 치료제 투여를 위한 암 환자 선별

(57) 요 약

질량스펙트럼 데이터 분석 및 분류 알고리즘을 이용한 방법은 고형 상피성 종양 암 환자가 수용체의 아고니스트, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK(mitogen-activated protein kinase), PI3K 또는 PKC(protein kinase C) 경로에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는, 예를 들어 EGFR 및/또는 HER2를 표적화하는, 치료제 또는 치료제의 조합으로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위한 능력을 제공한다. 상기 방법은 또한 암 환자가 EGFR를 표적화하는 치료제와 COX2를 표적화하는 치료제의 조합으로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 결정하고 또는 암 환자가 NF-κB 억제제로 치료를 통한 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 결정하기 위한 능력을 제공한다.

대 표 도 - 도1



명세서

청구범위

청구항 1

- a) 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계;
- b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계를 수행하는 단계;
- c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및
- d) 환자가 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하기 위하여, 다른 고형 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계를 포함하는,

고형 상피성 종양 암 환자가, Akt 또는 ERK/JNK/p38(extracellular signal-regulated kinases/c-Jun amino-terminal kinases/p38) 또는 PKC(protein kinase C)에서의, 또는 그들의 상류에서의 MAPK(mitogen-activated protein kinases), PI3K(phosphoinositide-3-kinase) 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체의 아고니스트, 수용체 또는 단백질을 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하기 위한 방법으로서, 상기 치료제 또는 치료제의 조합물이 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(EGFR-TKI)가 아닌 방법.

청구항 2

- a) 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계;
- b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계를 수행하는 단계;
- c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및
- d) 환자가 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 없는지를 확인하기 위하여, 다른 고형 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계를 포함하는,

고형 상피성 종양 암 환자가, Akt 또는 ERK/JNK/p38(extracellular signal-regulated kinases/c-Jun amino-terminal kinases/p38) 또는 PKC(protein kinase C)에서의, 또는 그들의 상류에서의 MAPK(mitogen-activated protein kinases), PI3K(phosphoinositide-3-kinase) 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체의 아고니스트, 수용체 또는 단백질을 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 없는지를 확인하기 위한 방법으로서, 상기 치료제 또는 치료제의 조합물이 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(EGFR-TKI)가 아닌 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 환자가 NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 억제제로 치료를 통한 혜택을 얻을 수 있는지에 관한 등급 표지에 의해 추가로 확인되는 방법.

청구항 8

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위는 다음으로 구성된 m/z 범위의 그룹에서 선택되는 방법:

5732 내지 5795

5811 내지 5875

6398 내지 6469

11376 내지 11515

11459 내지 11599

11614 내지 11756

11687 내지 11831

11830 내지 11976

12375 내지 12529

23183 내지 23525

23279 내지 23622 및

65902 내지 67502.

청구항 9

고형 상피성 종양 암 환자로부터의 혈액 기반 시료의 질량스펙트럼을 저장하는 기억장치; 및

a) 질량스펙트럼에 대한 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하고, b) 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에서 상기 질량스펙트럼 내의 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하고 및 c) 환자가 치료제 또는 치료제의 조합물로 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하기 위하여, 다른 고형 상피성 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 b) 단계에서 수득한 수치를 이용하도록 설정된 소프트웨어 지시를 수행하는 처리기를 포함하는,

고형 상피성 종양 암 환자가, Akt 또는 ERK/JNK/p38(extracellular signal-regulated kinases/c-Jun amino-terminal kinases/p38) 또는 PKC(protein kinase C)에서의, 또는 그들의 상류에서의 MAPK(mitogen-activated protein kinases), PI3K(phosphoinositide-3-kinase) 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체의 아고니스트, 수용체 또는 단백질을 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하도록 설정된 장치로서, 상기 치료제 또는 치료제의 조합물이 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(EGFR-TKI)가 아닌 장치.

청구항 10

고형 상피성 종양 암 환자로부터의 혈액 기반 시료의 질량스펙트럼을 저장하는 기억장치; 및

a) 질량스펙트럼에 대해 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리

리 단계들을 수행하고, b) 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에서 상기 질량스펙트럼 내의 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하고 및 c) 환자가 치료제 또는 치료제의 조합물로 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하기 위하여, 다른 고형 상피성 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 b) 단계에서 수득한 수치를 이용하도록 설정된 소프트웨어 지시를 수행하는 처리기를 포함하는,

고형 상피성 종양 암 환자가, Akt 또는 ERK/JNK/p38(extracellular signal-regulated kinases/c-Jun amino-terminal kinases/p38) 또는 PKC(protein kinase C)에서의, 또는 그들의 상류에서의 MAPK(mitogen-activated protein kinases), PI3K(phosphoinositide-3-kinase) 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체의 아고니스트, 수용체 또는 단백질을 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하도록 설정된 장치로서, 상기 치료제 또는 치료제의 조합물이 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(EGFR-TKI)가 아닌 장치.

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

제 9항 또는 제 10항에 있어서,

상기 환자가 NF- κ B(nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) 억제제로 치료를 통한 혜택을 얻을 수 있는지에 관하여 추가로 확인되는 장치.

청구항 16

제 9항 또는 제 10항에 있어서,

상기 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위는 다음으로 구성된 m/z 범위의 그룹에서 선택되는 장치:

5732 내지 5795

5811 내지 5875

6398 내지 6469

11376 내지 11515

11459 내지 11599

11614 내지 11756

11687 내지 11831

11830 내지 11976

12375 내지 12529

23183 내지 23525

23279 내지 23622 및

65902 내지 67502.

청구항 17

- a) 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계;
- b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하는 단계;
- c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및
- d) 환자가 COX2(cyclooxygenase 2) 억제제 및 EGFR(epidermal growth factor receptor) 억제제의 조합물의 투여에 의한 치료로 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하기 위하여, 다른 고령 상피성 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계를 포함하는,

암 환자가 COX2 억제제 및 EGFR 억제제의 조합물의 투여로 혜택을 얻을 수 있는지를 예측하기 위한 방법.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위는 다음으로 구성된 m/z 범위의 그룹에서 선택되는 방법:

5732 내지 5795

5811 내지 5875

6398 내지 6469

11376 내지 11515

11459 내지 11599

11614 내지 11756

11687 내지 11831

11830 내지 11976

12375 내지 12529

23183 내지 23525

23279 내지 23622 및

65902 내지 67502.

청구항 19

제 1항 또는 제 2항에 있어서,

상기 방법은 연구실 시험 센터에서 수행되는 방법.

청구항 20

제 17항에 있어서,

상기 방법은 연구실 시험 센터에서 수행되는 방법.

청구항 21

암 환자로부터의 혈액 기반 시료의 질량스펙트럼을 저장하는 기억장치; 및

- a) 질량스펙트럼에 대해 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하고, b) 상기 a) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의

미리 정의된 m/z 범위에서 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하고; 및 c) 환자가 COX2(cyclooxygenase 2) 억제제 및 EGFR(epidermal growth factor receptor) 억제제의 조합물의 투여로 치료를 통한 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하기 위하여, 다른 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 b) 단계에서 수득한 수치를 이용하도록 설정된 소프트웨어 지시를 수행하는 처리기를 포함하는,

암 환자가 COX2 억제제 및 EGFR 억제제의 조합물의 투여로 혜택을 얻을 수 있는지를 예측하도록 설정된 장치.

청구항 22

- a) 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계;
- b) a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하는 단계;
- c) b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및
- d) 환자가 상피성장인자 수용체 표적화 약물로부터 혜택을 얻을 수 없을 것으로 예측되는 암 환자의 하위 그룹의 구성원인지를 확인하기 위하여, 다른 고형 상피성 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계를 포함하는,

고형 상피성 암 환자가 상피성장인자 수용체 표적화 약물로부터 혜택을 얻을 수 없을 것으로 예측되는 암 환자의 하위 그룹의 구성원인지를 확인하는 방법.

청구항 23

제 22항에 있어서,

상기 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위는 다음으로 구성된 m/z 범위의 그룹에서 선택되는 방법:

5732 내지 5795

5811 내지 5875

6398 내지 6469

11376 내지 11515

11459 내지 11599

11614 내지 11756

11687 내지 11831

11830 내지 11976

12375 내지 12529

23183 내지 23525

23279 내지 23622 및

65902 내지 67502.

청구항 24

제 22항에 있어서, 상기 암 환자가 비소세포성 폐암을 갖는 방법.

청구항 25

제 22항에 있어서, 상기 암 환자가 유방암을 갖는 방법.

청구항 26

- a) 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계;
- b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계를 수행하는 단계;
- c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및
- d) 환자가 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하기 위하여, 다른 고형 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계로서, 상기 치료제의 조합물이 티로신 키나아제 억제제(TKI) 및 간세포 성장인자 수용체(HGFR) 억제제, 또는 티로신 키나아제 억제제 및 MET 억제제를 포함하는 단계를 포함하는,
고형 상피성 종양 암 환자가, Akt 또는 ERK/JNK/p38 또는 PKC에서의, 또는 그들의 상류에서의 MAPK, PI3K 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체의 아고니스트, 수용체 또는 단백질을 표적화하는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하기 위한 방법.

청구항 27

- a) 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계;
- b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 배경 제거, 조정 및 표준화로 구성된 군으로부터 선택된 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계를 수행하는 단계;
- c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및
- d) 환자가 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 없는지를 확인하기 위하여, 다른 고형 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계로서, 상기 치료제의 조합물이 티로신 키나아제 억제제(TKI) 및 간세포 성장인자 수용체(HGFR) 억제제, 또는 티로신 키나아제 억제제 및 MET 억제제를 포함하는 단계를 포함하는,
고형 상피성 종양 암 환자가, Akt 또는 ERK/JNK/p38 또는 PKC에서의, 또는 그들의 상류에서의 MAPK, PI3K 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체의 아고니스트, 수용체 또는 단백질을 표적화하는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 없는지를 확인하기 위한 방법.

청구항 28

제 26항 또는 제 27항에 있어서,
상기 HGFR 억제제가 HGF를 표적화하는 단일클론항체 약물을 포함하는 방법.

청구항 29

제 28항에 있어서,
상기 단일클론항체 약물이 AV-299를 포함하는 방법.

청구항 30

제 26항 또는 제 27항에 있어서,
상기 TKI가 상피성장인자 수용체-티로신 키나아제 억제제(EGFR-TKI)를 포함하는 방법.

청구항 31

제 30항에 있어서,
상기 EGFR-TKI가 엘로티닙(erlotinib), 게피티닙(gefitinib) 및 세톡시맙(cetuximab)으로 구성된 군으로부터 선택되는 방법.

청구항 32

제 26항 또는 제 27항에 있어서,

상기 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위는 다음으로 구성된 m/z 범위의 그룹에서 선택되는 방법:

5732 내지 5795

5811 내지 5875

6398 내지 6469

11376 내지 11515

11459 내지 11599

11614 내지 11756

11687 내지 11831

11830 내지 11976

12375 내지 12529

23183 내지 23525

23279 내지 23622 및

65902 내지 67502.

청구항 33

제 21항에 있어서,

상기 암 환자가 고형 상피성 종양 암 환자인 장치.

청구항 34

제 17항에 있어서,

상기 환자가 NF-κB 억제제로 치료를 통한 혜택을 얻을 수 있는지에 관한 등급 표지에 의해 추가로 확인되는 방법.

청구항 35

제 21항에 있어서,

상기 환자가 NF-κB 억제제로 치료를 통한 혜택을 얻을 수 있는지에 관하여 추가로 확인되는 장치.

청구항 36

제 21항에 있어서,

상기 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위는 다음으로 구성된 m/z 범위의 그룹에서 선택되는 장치:

5732 내지 5795

5811 내지 5875

6398 내지 6469

11376 내지 11515

11459 내지 11599

11614 내지 11756

11687 내지 11831

11830 내지 11976

12375 내지 12529

23183 내지 23525

23279 내지 23622 및

65902 내지 67502.

청구항 37

제 17항에 있어서,

상기 분류 알고리즘은 환자가 EGFR 억제제와 함께 COX2(cyclooxygenase 2) 억제제로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지를 확인하는 등급 표지를 생산하는 방법.

청구항 38

제 17항에 있어서,

상기 분류 알고리즘은 환자가 EGFR 억제제를 표적화하는 치료제만으로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 없는지를 확인하는 등급 표지를 생산하는 방법.

청구항 39

제 17항에 있어서,

상기 COX2(cyclooxygenase 2) 억제제는 셀레콕시브를 포함하는 방법.

청구항 40

제 17항에 있어서,

상기 COX2(cyclooxygenase 2) 억제제는 로페콕시브를 포함하는 방법.

청구항 41

제 21항에 있어서,

상기 COX2(cyclooxygenase 2) 억제제는 셀레콕시브를 포함하는 장치.

청구항 42

제 21항에 있어서,

상기 COX2(cyclooxygenase 2) 억제제는 로페콕시브를 포함하는 장치.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 우선권

[0002] 본 출원은 2010년 2월 24일에 출원된 미국 가출원 번호 61/338,938의 35 U.S.C. §§ 1 19(e)의 우선권의 이익을 주장하고, 그 내용은 본 명세서에서 통합된다.

[0003] 본 발명은 특정 유형 및 등급의 약물, 및/또는 그들의 조합의 투여로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 예측하기 위한 방법 및 시스템에 관한 것이다. 상기 방법 및 시스템은 환자의 혈액 기반 시료로부터 수득한 질량스펙트럼 데이터 및 질량스펙트럼 데이터를 작동하는 분류기로 구성된 컴퓨터를 사용하는 것을 수반한다.

배경 기술

[0004] 본 발명의 양수인, 바이오디식스 인크는 비세포성 폐암(NSCLC) 환자가 약물을 표적화하는 상피성장인자 수용체(EGFR) 경로의 치료로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 예측하는 베리스트래트로 알려진 시험을 개발하였다. 이 실험은 본 명세서에서 참조로써 통합되는 내용인 미국 특허 7,736,905에 기술되어 있다. 이 시험은 또한 본 명세서에서 참조로써 통합되는 내용인 Taguchi F. 등¹에 기재되어 있다. 이 시험의 추가적인 적용은 본 명세서에서 참조로써 통합되는 내용인 미국 특허 7,858,390; 7,858,389 및 7,867,775에 또한 기술되어 있다.

[0005] 간단히, 베리스트래트 시험은 암 환자의 혈청 및/또는 혈장시료에 기초한다. MALDI-TOF 질량분석법 및 컴퓨터에서 시행되는 데이터 분석 알고리즘의 조합을 통해, 그것은 미리 정의된 m/z 범위에서 여덟 개의 통합 피크 강도 세트를 트레이닝 집단으로부터의 것들과 비교하고 환자시료에 대해 등급 표지를 생산한다: 베리스트래트 "좋음", 베리스트래트 "나쁨", 또는 베리스트래트 "중간". 다양한 임상 비준 연구에서, 선-치료 혈청/혈장이 베리스트래트 "좋음"이었던 환자는 그 시료가 베리스트래트 "나쁨" 특징을 나타내는 환자 보다 상피성장인자 수용체 억제제 약물을 이용하여 치료할 때 상당히 더 좋은 결과를 나타내는 것이 밝혀졌다. 몇몇 경우에는(2% 이하), 베리스트래트 중간표지 결과를 초래하면서 아무런 결정이 내려질 수 없다. 베리스트래트는 본 발명의 양수인, 바이오디식스 인크로부터 상업적으로 이용가능하고 비소세포성 폐암 환자의 치료 선별에 사용된다.

[0006] 대부분의 현대 바이오마커-기반 시험은 종양 유형 및 조직학, 특정 개입, 및 임상 병리학적 인자와 매우 특이적으로 관련이 있다. 예를 들어, EGFR 도메인에서의 돌연변이에 대한 시험, KRAS 돌연변이 및 FISH(Fluorescence In-Situ Hybridization)를 통한 유전자 복제수 분석과 같은 종양 조직에 기초한 유전자 검사는 매우 특이적 표시만으로 일하는 것으로 보인다. EGFR 돌연변이는 선암종과 NSCLS 첫 번째 라인에서 계피티닙 반응에 대한 암시를 줄 수 있는 반면, 그것들은 NSCLS 유형에서의 돌연변이는 매우 희귀하기 때문에 편평상피세포 암종에 대한 유사한 이용을 나타내지 않는다. KRAS 돌연변이는 대장암에서 세톡시맙과 반응과 관련있을 수 있지만, 이것을 NSCLC로 변경하려는 시도는 실패하여 왔다. 머리와 목(SCCHN)의 편평상피세포 암에 대한 EGFR 억제제(EGFRI)의 혜택에 대한 마커는 알려진 바가 없다. 이러한 유전자 검사의 제한성은 발암의 복잡한 메커니즘의 극히 작은 부분인 특정 돌연변이에 대한 집중과 연관될 수 있다. 또한, 이러한 시험 모두는 환원주의자의 관점, 예를 들어 종양 생물학을 단지 종양 세포로 줄이고, 종양 세포와 혈관 지지 시스템의 상피세포, 세포외 기질, 염증 세포와 같은 면역시스템 요소 및 암과 관련된 만성 염증 메커니즘에 관여하는 다양한 케모카인 및 사이토카인으로 구성된 종양 미세환경 사이의 중요한 상호작용을 무시하는 것에 기초하고 있다.

발명의 내용

[0007] 본 명세서에 있어서, 본 발명자들은 종양 세포의 경로는 베리스트래트 "나쁨" 상피성 종양의 구별된 특징과 연관되어 있는 것에 관한 이해와 그 증거를 제시한다. 본 명세서에서 제시된 이해의 증거는 임상적 증거, 현상학적 증거, 문헌 분석 및 암 환자의 혈청 시료의 질량분석법에 기초한 분자적 증거를 포함하는 여러 원인에 기초한다. 본 명세서에 기재된 구현의 결과는 암 환자가 아래 자세히 기재된 특정 분류의 약물 또는 그들의 조합으로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 예측하기 위한 새로운 방법(현실적 시험)의 형태를 가질 수 있다.

[0008] 간단히, 베리스트래트 "나쁨"으로 확인된 환자에 대하여, 베리스트래트 시험은 EGFR과 같은 성장 및 생존 인자 수용체 하류의 하나 이상의 경로, 표준 및 비표준MAPK (mitogen-activated protein kinases), PKC(단백질 인산화효소 C)에 의해 조절되는 반응뿐 아니라 PI3K(phosphatidylinositol 3-kinases) 케스케이드를 포함하는 가능한 후보 경로의 활성을 측정한다(도 2 참조). 화학요법 및 위약 대조군의 결과에 관한 가변성은 그들에 의한 이러한 경로의 활성이 나쁜 예후를 초래할 수 있고, 세포 반응을 조절하고 염증 및 면역 반응에서의 기본적인 역할을 수행하며 세포 증식 및 생존을 조절하는 NF- κ B(활성화된 B-세포의 핵 인자 카파경쇄 인핸서)-중요한 전사인자의 관여를 시사할 수 있음을 나타낸다. 그것은 또한 화학요법에 대한 반응에 관여되는 것으로 알려져 있다.

[0009] 일반적인 문제로, 베리스트래트 시험은 나쁜 예후를 가지는 개체군의 부분집합을 확인하고 고령 상피성 종양 암 환자가 수용체 티로신 키나제(RTK)의 아고니스트, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK, PI3K(phosphatidylinositol 3-kinases) 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합으로 치료한 경우 구별되는 혜택을 얻을 수 있는지를 예

측할 것이다. EGFR 억제제는 그러한 제제의 예시이다. 항-EGFR 제제로 혜택을 얻을 수 있을 것으로 예상되는 환자는 베리스트래트 "좋음" 표지로 확인되고 반면에 항-EGFR 제제로 혜택을 얻을 수 없을 것으로 예상되는 환자는 베리스트래트 "나쁨" 표지로 확인된다. 본 명세서에서 용어 MAPK (mitogen-activated protein kinase)는 하나의 효소가 아니라 세 개 이상의 관련 케스케이드의 이름으로 사용된다(도 2 참조).

[0010] 상기 내용의 당연한 결과로, 베리스트래트 "나쁨" 표지와 연관된 환자에 대하여, 베리스트래트 시험은 "나쁨" 환자를 나쁜 예후를 가지는 암 환자의 소집단으로 진단한다. 사실상, 베리스트래트 "나쁨" 환자는 베리스트래트 "좋음" 환자와는 다른 질병 상태를 가지는 것으로 여겨질 수 있다.

[0011] 더욱이, 베리스트래트 "좋음" 표지를 가지는 암 환자는 MAPK 경로에 관여하는 수용체의 아고니스트, 수용체 또는 단백질을 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합으로 치료를 통한 더 큰 혜택을 얻을 수 있다 한편 베리스트래트 "나쁨" 표지를 가지는 환자는 그러한 치료제로 치료를 통한 임상적 혜택을 얻을 수 있을 것 같지 않다 반면에, 베리스트래트 "나쁨" 환자는 하류, 독립된 수용체, 이러한 경로의 활성을 방해하는 치료제 또는 치료제의 조합으로 혜택을 얻을 수 있다.

[0012] 이러한 이해의 현실적인 적용은 첨부된 청구항에 나타난 바와 같이 여러가지 형태를 가질 수 있다. 그 방법은 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼 데이터를 수득하고 분류기로 기능하는 프로그램 컴퓨터를 이용한 스펙트럼의 분석을 수반한다. 한 가지 형태로, 다음의 단계를 포함하는 고형 상피성 종양 암 환자가 RTK의 아고니스트, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK, PI3K 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합으로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위한 방법이 제공된다:

[0013] a) 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계; b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하는 단계; c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및 d) 환자가 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위하여, 다른 고형 상피성 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계.

[0014] 다른 구체예에서, 다음의 단계를 포함하는 암 환자가 COX2 억제제 및 EGFR 억제제의 조합물의 투여로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 예측하기 위한 방법이 제공된다:

[0015] a) 암환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계;

[0016] b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하는 단계;

[0017] c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및

[0018] d) 환자가 COX2 억제제 및 EGFR 억제제의 조합물의 투여에 의한 치료로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위하여, 다른 고형 상피성 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 도를 이용하여 알고리즘을 분류하는 데 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 환자의 혈액 기반 시료에 대한 베리스트래트 시험을 수행하는 과정을 나타내는 흐름도이다.

도 2는 인간 세포에서 선별된 신호전달 경로를 나타내는 흐름도이다.

도 3은 혈청 아밀로이드 A(SAA)의 선별된 생물학적 활성 및 암 과정 및 치료 저항성에 대한 가능한 역할을 나타내는 것이다.

도 4는 EGFR 신호전달 경로, 그 상호작용 및 SAA에 활성의 가능한 포인트를 나타내는 것이다.

도 5는 문헌 [Yarden Y, Shilo BZ. SnapShot: EGFR signaling pathway. Cell 2007; 131: 1018]로부터의 EGFR 및 그 억제제를 포함하는 ErbB 패밀리 성장 인자 수용체를 나타내는 것이다.

도 6은 모든 공개된 베리스트래트 분석에 대한 치료 암(arm)에 의한 베리스트래트 좋음 및 나쁨 환자 사이의 혜자드 비율을 나타내는 포레스트 플롯이다.

도 7은 화학요법 치료를 받은 환자 및 그런 환자에 대한 베리스트래트 표지("좋음" 및 "나쁨")의 전체 생존(OS)의 카프란-마이어 플롯(Kaplan-Meier plot)를 나타내는 것이다.

도 8은 상이한 계피티닙 농도의 존재 하 베리스트래트 "나쁨" 및 베리스트래트 "좋음" 혈청에서 계피티닙 민감성 세포주 HCC4006 및 계피티닙 저항성 세포주 A549의 성장 플롯이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 정의

[0021] 본 명세서에서, 단수형 "하나의" "하나의" 및 "그"는 문맥상 명백히 달리 지시하지 않는 한 복수의 대상을 포함한다.

[0022] 본 명세서에서, 용어 "고형 상피성 종양"은 필수적으로 제한되는 것은 아니라 NSCLC, SCCHN, 유방암, 신장암, 퀘장암, 흑색종 및 대장암(CRC)을 포함한다.

[0023] 본 명세서에서, 용어 "수용체의 아고니스트, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK 경로 또는 PI3K 및 PKC 케스케이드에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합"은 이에 한정되지는 않으나 EGFR (HER1), HER2, HER3, 및 HER4를 포함하는 erbB 수용체 밀리, VEGF 수용체 (VEGFR2), 간세포 성장 인자 수용체 (HGFR 또는 MET), G-단백질공역수용체, 인슐린 유사 성장 인자 (IGF) 수용체, VEGF, TGF α 및 EGF와 같은 성장 인자 및 PI3K 케스케이드에서의 Akt 또는 그 상류의 임의의 다른 단백질, 또는 ERK/JNK7 p38 MAPK, 또는 PKC 경로를 표적화하는 치료제 또는 제제를 포함한다. 또한, 본 명세서에서, 용어 "수용체의 아고니스트, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK 경로 또는 PI3K 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합"은 알려진 치료제뿐만 아니라 지금까지 발견되었거나 공개된 이러한 단백질을 표적화하는 치료제를 포함한다. 더욱이, 상기 치료제의 조합은 그것들이 고형 상피성 종양의 치료를 위한 조합에 이미 사용되었든 아니든 간에 임의의 치료제의 조합을 포함한다. 치료제가 특정 단백질 또는 경로의 억제제로 확인되었더라도, 그러한 분류는 그 작용 메커니즘의 표현을 나타내는 것을 의미하는 것이 아님을 주목해야 한다. 왜냐하면 많은 이러한 제제의 작용 메커니즘은 완전히 이해되지 못하기 때문이다. 제한적인 리스트를 의미하는 것은 아니라 예를 들어, 이러한 치료제는 다음을 포함한다:

[0024] (1) 티로신 키나제 억제제(TKIs): 현재 많은 약물이 판매되고 있고, 저분자 티로신 키나제 억제제로 분류된 임상 실험 I-III 단계에 있다. 티로신 키나제 억제제는 상피성장인자 수용체(EGFR)와 같은 특정 분자 수용체를 표적할 수 있고 또한 복합 수용체("복합 키나제 억제제"로 불림)를 표적할 수 있다. 이들은 이에 한정되지는 않으나, 엘로티닙, 계피티닙, 소리페닙, 수니티닙, 파조파닙, 이마티닙, 니로티닙, 라파티닙을 포함한다.

[0025] 항체 기반의 억제제는 세툭시맙 (항-EGFR), 패니투무맙 (항-EGFR), 트라스투주맙(항-Her2)를 포함한다.

[0026] (2) HGFR 또는 MET 억제제: 현재 임상 시험 I-II 단계에 있는, MET 또는 P13K(MET 하류의 신호 변환 효소)를 억제하는 약물의 긴 목록이 있다. 이들은 다양한 정도로 평가되고 있으나 현재 임상적으로 사용되지는 않는다. 예를 들어, XL880은 MET 및 VEGFR2의 강력한 억제제이다. 본 명세서에서, 용어 "MET 억제제"는 이에 한정되는 것은 아니라 다음을 포함한다: AMG 208, AMG 102, ARQ 197, AV-299, MetMab, GSK 1363089 (XL880), EMD 1214063, EMD 1204831, MGCD265, 크리조타닙(PF-02341066), PF-04217903, MP470.

[0027] (3) COX2 억제제: 본 명세서에서, 용어 "COX2 억제제"는 이에 한정되는 것은 아니라 다음을 포함한다: 선택적 COX2 억제제: 쎄레콕시브, 로페콕시브, 발레콕시브, 루미라콕시브.

[0028] (4) 이부프로펜, 아스피린, 인도메타신, 및 설린닥과 같은 COX1 및 COX2 모두를 억제하는 다른 비스테로이드 항염증약물 (NSAIDs). 이와 같은 약물은 또한 NF- κ B 활성을 억제하는 것으로 보인다.

[0029] (5) 다른 NF- κ B 억제제. 본 명세서에서, 용어 "NF- κ B 억제제"는 이에 한정되는 것은 아니라 삼산화 비소(ATO), 탈리도마이드 및 그 유사체, 레스베라스톨을 포함한다. 또한, COX2 억제제는 또한 NF- κ B 경로에 억제 효

과를 가지는 것으로 알려져있다. 따라서, 이부프로펜, 아스피린, 인도메타신, 및 설린탁과 같은 NSAID는 NF-κB 활성을 억제하는 것으로 보여지고 따라서 NF-κB 억제제로 인식된다.

[0030] 본 명세서에서, 용어 "VEGF 억제제"는 이에 한정되는 것은 아니나 다음을 포함한다: 베바시쭈맵, 세다라닙, 악시타닙, 모테사닙, BIBF 1120, 라무시루맵, VEGF 트랩, 리니파닙(ABT869), 티보자닙, BMS-690514, XL880, 수니티닙, 소라페닙, Brivanib, XL-184, 파조파닙을 포함한다.

[0031] 본 명세서에서, 용어 "표적 치료"는 수용체와 같은 특정 분자와 반응시키기 위하여, 특정 효소의 저분자 억제제 또는 단일클론항체와 같은 약물 또는 다른 물질을 사용하는 치료 유형을 의미한다. 그러한 예시로는 EGFR-TKIs(엘로티닙, 게피티닙), 세툭시맵, 베바시쭈맵 등이 있다.

[0032] 본 명세서에서, 용어 "비-표적 화학요법" 또는 "화학요법"은 DNA와 경합하거나(예를 들어, 시스플라틴, 카보플라틴, 옥살리플라틴과 같은 알킬화제 또는 5-플루오라실 또는 페메트렉시드와 같은 항대사성물질 또는 이리노데칸과 같은 토포이소머라제 억제제) 또는 세포 분열을 방해함으로써(예를 들어, 비노렐빈, 도세탁셀, 파클리탁셀) 세포의 빠른 분열을 방해하는 치료를 의미한다.

[0033] 본 명세서에서, 용어 "예후의"는 치료의 부재 또는 표준 치료의 적용에서 임상적 결과와 연관된 인자 또는 측정을 의미한다. 그것은 질병의 자연적 이력의 측정으로 생각될 수 있다.

[0034] 용어 "예측의"는 특정 치료로 인한 혜택 또는 혜택의 결핍과 연관된 인자 또는 측정을 의미한다. 예측 인자는 예측 마커의 상태에 의존하는 치료로 인한 상이한 혜택을 의미한다². 본 명세서에서, 용어 "질병 상태"는 상이한 예후 및/또는 치료에 대한 반응 및/또는 특정 분자 및/또는 대사 특징에 의해 특징화될 수 있는 진단 조건의 특정 서브타입을 의미한다.

토의

[0035] 본 발명자들은 베리스트래트 시험이 혈청 시료의 질량스펙트럼 데이터로부터 수득한 신호에 기초하고 있기 때문에 현재 대부분의 바이오마커-기반의 시험과 대조적으로 암과 연관된 일반적 인자를 측정할 수 있다는 것을 발견하였다. 이러한 사실은 아래에서 기술되는 베리스트래트 시험을 이용한 치료의 선택에 대한 새로운 실용적인 적용을 가능하게 한다. 특히, 베리스트래트 시험은 EGFR 억제의 작용 메커니즘에 상관없이, 베리스트래트 "좋음"으로 확인된 환자와 베리스트래트 "나쁨"으로 확인된 환자 사이에 생존 커브의 유사한 분리의 결과를 내었다. 본 발명자들의 이전 연구에서, 베리스트래트 시험은 저분자 EGFR-티로신 키나제 억제제 게피티닙(Iressa) 및 엘로티닙(Tarceva)로 처리되고, 효소의 ATP 결합 부위를 방해함으로써 수용체를 억제하는 환자 시료 세트를 사용하였다¹. 본 발명자들은 NSCLC 및 대장암(CRC) 모두에서 EGFR 세툭시맵(Erbitux)을 표적화하는 다른 치료제에 대하여 베리스트래트 "좋음"으로 확인된 환자 및 베리스트래트 "나쁨"으로 확인된 환자 사이에 유사한 분리를 관측하였다³. 세툭시맵은 EGF 수용체를 직접적으로 방해하는 항체이다.

[0037] 또한, 베리스트래트 시험은 베리스트래트 "좋음"으로 확인된 환자 및 베리스트래트 "나쁨"으로 확인된 환자 사이에서 임상병리학적 특징을 통하여 유사한 분리를 나타낸다. 예를 들어, 베리스트래트 시험은 그 종양이 선암 종인 환자뿐만 아니라 종양이 편평상피세포 암종인 환자에서도 사용될 수 있다.

[0038] 또한, 다양한 고형 상피성 종양에서 베리스트래트 시험은 베리스트래트 "좋음"으로 확인된 환자 및 베리스트래트 "나쁨"으로 확인된 환자 사이에서 분리를 나타낸다. 본 발명자들은 이것을 NSCLC, 머리 및 목의 편평상피세포암(SCCHN) 및 CRC에서 관측하였다.

[0039] 또한, 본 발명자들은 비표적 화학요법으로 처리된 환자에서 베리스트래트 시험 분류에 의한 생존 커브의 분리가 개체군, 개입 유형 및 종양 유형에 관한 세부사항에 의존하여 다양하다는 것을 발견하였다. 다른 세트에서는 분리가 나타나지 않은 반면, 일부 비표적 화학요법 처리된 세트에서 분리의 증거가 있다. 또한 위약 암(placebo arm)에서 강한 분리가 나타났다. 예를 들어, 베리스트래트 시험이 예후적 요소를 가지고 있음을 나타내는 비개입.

[0040] 도 6의 포레스트 플롯은 지금까지 공개되거나 존재하는 베리스트래트 시험의 모든 분석 데이터를 요약한다. 그것은 연구되는 각 치료 암에 대한 베리스트래트 "좋음" 및 베리스트래트 "나쁨" 환자 간의 전체적인 생존에 대

한 해자드 비율(hazard ratio (HR))을 나타낸다. 상기 데이터는 치료 유형에 의존하여 그룹으로 나뉘는 것으로 보일 수 있다. 얻어진 해자드 비율의 범위는 베리스트래트가 사실상 특정 치료 유형의 결과로 더 나은 또는 더 나쁜 결과를 나타내고 따라서 예측 능력을 갖는다는 것을 나타낸다.

[0041] 도 6에서, 치료제는 B=베바시주맙, C=세톡시맙, CT=화학요법, E=엘로티닙, G=게피티닙이다. 공개/발표는 문헌 [1] D. Carbone, 2nd European Lung Cancer Conference, April 2010, [2] data on file at Biodesix, updated from F. Taguchi et al., J Natl Cancer Inst. 2007 Jun;99(12):838-8461, [3] C. Chung et al., Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2010 Feb;19(2):358-653 및 [4] D. Carbone et al., Lung Cancer 2010 Sept; 69(3):337-3404 이다.

[0042] 비표적 화학요법 처리된 개체군의 재-분석은 명백한 분리가 탁산으로 처리된 개체군의 부분집합에서 관측되지 않음에도 불구하고, 탁산을 함유하지 않은 화학요법 톱니를 처리한 베리스트래트 "좋음" 및 베리스트래트 "나쁨" 그룹 간에 분리가 있음을 보여주었다(도 7 참조).

[0043] 시험이 그러한 큰 적용 범위를 가지는 것은 특이한 것이다.

[0044] 요약하면, 다음의 결론을 상기 토의와 도 6 및 7로부터 얻는다:

[0045] 1. 베리스트래트 시험은 베리스트래트 "좋음" 및 "나쁨"의 약 45개의 EGFR 억제제(EGFRI) 단일-치료 소집단 간에 해자드 비율의 분리를 보여준다.

[0046] - EGFR 억제제의 작용 메커니즘과 관계없음, 예를 들어, 저분자 TKI (엘로티닙, 게피티닙) 및 항체 (수용체) 억제 기반 EGFRI, 예를 들어, 세톡시맙.

[0047] - 조직학적 유형 예를 들어, 선암종 및 편평상피세포 암종과 관계 없음, 또한

[0048] - 장기, 예를 들어, NSCLC, SCCHN 및 CRC와 관계 없음.

[0049] 2. 다른 개체군 특징과 중요한 관련성이 관측되지 않는다:

[0050] - 유전자 마커, 예를 들어 EGFR 돌연변이 상태 또는 KRAS 상태 없음

[0051] - 성별 및 인종과 같은 개체군 특징 없음.

[0052] 3. 베리스트래트는 치료를 받지 않은 베리스트래트 "나쁨" 및 베리스트래트 "좋음" 소집단 사이의 분리에 의해 나타나는 강력한 예후적 요소를 갖는다.

[0053] - 그러나, 베리스트래트 "나쁨" 소집단에서는 예를 들어, 엘로티닙 치료가 베리스트래트 "나쁨" 소집단에서 위약 치료와 필수적으로 동등한 것과 같이, EGFRI 단독 투여의 치료 혜택이 측정되지 않는다. 반면, 베리스트래트 "좋음" 소집단에서는 EGFR 억제제의 치료 혜택이 측정된다.

[0054] - 치료 조합의 효과는 특정 약물 조합 및 상호작용하는 경로에 대한 그 효과에 의존한다.

[0055] 베리스트래트 "나쁨" 집단에서만 시료의 질량스펙트럼에서의 특정 피크가 관측된 것과 함께 이러한 모든 사실은 베리스트래트가 고형 상피성 종양에서 임상적 중요성(더 나쁜 결과)의 신규한 질병 상태를 정의한다는 결론을 가져온다. 관측된 현상은 베리스트래트 "나쁨" 종양의 문자 상태에 관한 일부 잠정적인 결론을 가능하게 한다: EGFR 억제제가 이 등급의 환자에서 효과적이지 않고 그 효과가 TKI 및 항체 기반의 치료 모두에 대하여 동일하기 때문에, 베리스트래트 "나쁨" 개체에서 수용체 및 티로신 키나제 도메인 아래의 경로 상태는 베리스트래트 "좋음" 개체, 예를 들어 상향조절된 것과 상이할 수 있다. 본 발명자들은 KRAS 돌연변이 상태와 관련성을 관측하지 못하였기 때문에, 영향을 받는 경로는 RAS 아래라고 결론을 내린다.

[0056] 상기 관측, 문헌 분석 및 다른 증거들에 기초하여, 본 발명자들은 본 명세서에서 종양 세포의 경로는 베리스트래트 "나쁨" 상피성 종양의 구별된 특징에 연관되어 있다는 이해를 제시한다. 간단히, 본 발명자들은 베리스트래트 "나쁨"으로 확인된 환자에서 베리스트래트 시험이 EGF와 같은 수용체 티로신 키나제(RTK)로부터 하류의 하나 이상의 경로의 활성을 측정하는 것을 제안한다. 후보 경로는 표준 및 비표준 MAPK, PI3K/Akt뿐만 아니라 PKC에 의해 조절되는 반응을 포함한다(200A 및 200B의 도 2 참조). 화학요법 및 위약 대조군의 결과에 관한 가변성은 그들에 의한 이러한 경로의 활성이 나쁜 예후를 초래할 수 있고, 염증 과정과 암 진행에서 중요한 역할을 수행하며 화학요법에 대한 반응에 관여하는 NF-κB 전사인자-세포생존의 중요한 조절자의 관여를 시사할 수 있음

을 나타낸다.

[0057] 일반적인 문제로, 베리스트래트 시험은 더 나쁜 예후 (베리스트래트 "나쁨")를 가지는 개체군의 부분집합을 확인하고 고형 상피성 종양 암 환자가 RTK의 아고니스트 또는 MAPK, PI3K/Akt 또는 PKC 캐스케이드에 관여하는 단백질을 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합으로의 치료를 통해 혜택을 얻는 고형 상피성 종양 암 환자를 예측할 것이다. EGFR 억제제는 이와 같은 제제의 예시이다. 항-EGFR 제제로 혜택을 얻을 것으로 예측되는 환자는 베리스트래트 "좋음" 표지로 확인된다 반대로, 항-EGFR 제제로 혜택을 얻지 못할 것으로 예측되는 환자는 베리스트래트 "나쁨" 표지로 확인된다. 베리스트래트 "나쁨" 표지를 가지는 환자는 MAPK 경로를 활성화시키는 수용체를 표적화하는 치료제로 치료를 통한 임상적 혜택을 얻을 수 있을 것 같지 않다. 반면에, 베리스트래트 "나쁨" 환자는 하류, 독립된 수용체, 이러한 경로의 활성을 방해하는 치료제 또는 치료제의 조합으로 혜택을 얻을 수 있다.

[0058] 본 명세서에서 용어 MAPK (mitogen-activate protein kinase)는 하나의 효소가 아니라 세 개 이상의 관련 케스케이드의 이름으로 사용된다(도 2 참고).

[0059] 상기 내용의 당연한 결과로, 베리스트래트 "나쁨" 표지와 연관된 환자에 대하여, 베리스트래트 시험은 "나쁨" 환자를 나쁜 예후를 가지는 암 환자의 소집단으로 진단한다.

[0060] 현실의 결과는 암 환자가 약물의 특정 등급으로 혜택을 얻을 수 있을지 아닌지를 예측하기 위한 새로운 방법의 형태, 예를 들어, 실용적인 시험을 선택할 수 있다.

[0061] 하나의 실용적인 적용으로, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 고형 상피성 종양 암 환자가 수용체의 아고니스트, RTK 및, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK, PI3K/Akt 및 PKC와 같은 경로에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위한 방법이 제공된다:

a) 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계

[0063] b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하는 단계 (예를 들어, 배경 제거, 노이즈 추정, 표준화 및 스펙트럼 조정);

[0064] c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위 (및 바람직하게는 표 1에 기재된 m/z 피크에 상응하는 아래 기술된 m/z 범위)에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피크의 통합 강도 수치를 수득하는 단계 및

[0065] d) 환자가 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위하여, 다른 고형 상피성 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘(예를 들어, K-최단인접이웃)에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계.

[0066] 특정 예시로, 치료 레짐으로 EGFR-I에 COX2 억제제, 예를 들어 쎄레콕시브 또는 로페콕시브를 첨가하는 것은 베리스트래트 분류에 따라 구별되는 결과를 가질 수 있다. 베리스트래트 시험은 따라서 COX2 억제제 및 EGFR-I를 포함하는 병용요법의 처방을 내리기 위한 지표로 활용될 수 있다.

[0067] 또 다른 특정 예시로, 베리스트래트 "나쁨" 신호는 NF- κ B의 특정 활성과 연관된 것으로 알려져 있다. 따라서, 시험은 NF- κ B 억제제로부터 최대한 혜택을 얻을 수 있는 환자를 선별하고, 이에 따라 불필요한 치료 및 관련 이환률을 감소시키는 데 사용될 수 있다.

[0068] 또 다른 구체 예시로, 베리스트래트 "나쁨" 특징은 아마도 그 과정에서 NF- κ B 인자의 관여 때문에, 특정 비-표적 화학요법, 특히 시스플라틴, 켐시타빈 또는 페메트렉스트와 같은 DNA 복제 및 유전자 발현을 방해하는 제제로부터의 약간의 임상적 혜택과 연관된 것으로 알려져 있다.

[0069] 베리스트래트 "나쁨"으로 분류된 환자에 대하여, (1) COX2 억제제와 같이 하류, 독립된 수용체, MAPK 경로의 활성을 방해하거나 (2) 염증 속주 반응을 최소화하는 제제의 첨가 또는 크로스토크 경로 활성을 방해하는 다른 표적 제제의 첨가는 표적 제제의 저항성을 극복시킬 수 있다.

[0070]

베리스트래트 시험

[0071]

본 명세서에 따라 RTK 및, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK, PI3K 및 PKC경로와 같은 경로의 아고니스트, 또는 PKC를 표적화하는 제제로써, 특정 치료제 또는 치료제의 조합으로 치료에 대한 환자를 선별하기 위하여 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료를 시험하기 위한 방법은 과정 100으로 도 1에 흐름도 형태로 나타나 있다.

[0072]

과정 102에서, 혈청 또는 혈장 시료를 환자로부터 얻는다. 한 구체예에서, 혈청 시료는 세 엘리퀴트로 분리되고, 질량분석법 및 후속 단계 104, 106(서브스텝 108, 110 및 112를 포함하는), 114, 116 및 118이 각 엘리퀴트에 대하여 독립적으로 수행되었다. 엘리퀴트의 수는 예를 들어, 4, 5 또는 10 엘리퀴트로 다양할 수 있고 각 엘리퀴트는 후속 진행 단계의 대상이 된다.

[0073]

과정 104에서, 시료(엘리퀴트)는 질량분석법의 대상이 된다. 질량분석법의 바람직한 방법은 MALDI-TOF 질량분석법이지만, 다른 방법도 가능하다. 질량분석법은 당업계에서 통상적인, 많은 m/z 수치에서 강도 수치를 나타내는 데이터 포인트를 생산한다. 하나의 예시적인 구체예에서, 시료는 해동되고 4°C에서 5분 동안 1500rpm으로 원심분리된다. 또한, 혈청 시료는 MilliQ 워터로 1 : 10 또는 1 : 5로 희석될 수 있다. 희석 시료는 3회의 MALDI 플레이트에 무작위로 할당된 위치에 나타날 수 있다(예를 들어, 세 번의 상이한 MALDI 표적에 대하여). 0.75ul의 희석 혈청이 MALDI 플레이트에 나타난 이후에, 35 mg/ml 시나핀산(50 % 아세토나이트릴 및 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA))의 0.75 ul이 첨가되고 피펫팅에 의해 5회 위아래로 혼합될 수 있다. 플레이트는 상온에서 건조된다. 다른 기술 및 과정이 본 발명의 원칙에 따른 혈청을 준비하고 진행하는 데 이용될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0074]

질량스펙트럼은 스펙트럼의 자동화된 또는 매뉴얼 모음으로 Voyager DE-PRO 또는 DE-STR MALDI TOF 질량스펙트럼을 이용하여 선형 모형에서 양이온을 위하여 획득된다. 75 또는 100 스펙트럼은 각 스펙트럼 표본에 대하여 평균 525 또는 500 스펙트럼을 생산하기 위하여 각 MALDI 스팟에서 7개 또는 5개 위치에서 수집된다. 스펙트럼은 단백질 표준(인슐린(소)), 티오레토신(대장균) 및 아포미글로빈(말)의 혼합을 이용하여 외연적으로 눈금 매겨진다.

[0075]

과정 106에서, 과정 104에서 수득한 스펙트럼은 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계의 대상이다. 전처리 단계 106은 과정 104에서 수득된 질량스펙트럼 데이터에 작동하는 소프트웨어 지시를 이용하여 일반적 목적 컴퓨터에서 시행된다. 전처리 단계 106은 배경 제거(과정 108), 표준화(과정 110) 및 조정(과정 112)을 포함한다. 배경 제거 과정은 바람직하게 스펙트럼에서 배경의 로버스트, 비대칭적 추정치를 생산하는 데 관여하고 스펙트럼으로부터 배경을 제거한다. 과정 108은 본 명세서에서 참조로써 통합되는 미국 특허 7,736,905 B2 및 미국 특허 출원 공개 2005/0267689에 기술된 배경 제거 기술을 이용한다. 표준화 과정 110은 스펙트럼에서 제거된 배경의 표준화를 수반한다. 표준화는 미국 특허 7,736,905에 기술된 바와 같이, 부분적 이온 흐름 표준화 또는 전체 이온 흐름 표준화 형태를 가질 수 있다. 과정 112는 미국 7,736,905에 기술된 바와 같이, 분류기에 의해 사용되는 트레이닝 세트의 분석으로부터 수득될 수 있는 미리 정의된 질량 등급에 대한 표준화된, 배경 제거된 스펙트럼을 조정한다.

[0076]

전처리 단계 106이 수행되면, 과정 100은 미리 정의된 m/z 범위에 대한 스펙트럼에서 선별된 피크(피크)의 수치를 수득하는 과정 114에 이르게 된다. 알고리즘을 발견하는 피크의 피크-너비 세팅을 이용하여, 표준화되고 배경 제거된 진폭은 이를 m/z 범위에 통합되고, 이러한 피크의 통합 수치로 조정된다(예를 들어, 피크의 너비 사이의 커브 아래 영역). 아무런 피크도 이러한 m/z 범위내에서 검출되지 않았던 스펙트럼에 대하여, 통합 범위는 현재 m/z 위치에서의 피크 너비에 상응하는 너비로 이 피크의 평균 m/z 위치주변의 간격으로 정의될 수 있다.

[0077]

이 과정은 미국 특허 7,736,905에 더 자세히 기술되어 있다.

[0078]

과정 114에서, 미국 특허 7,736,905에 기술되어 있는 바와 같이, 스펙트럼에서 피크의 통합 수치는 하나 이상의 다음의 m/z 범위에서 수득된다:

[0079]

5732 내지 5795

[0080]

5811 내지 5875

- [0081] 6398 내지 6469
- [0082] 11376 내지 11515
- [0083] 11459 내지 11599
- [0084] 11614 내지 11756
- [0085] 11687 내지 11831
- [0086] 11830 내지 11976
- [0087] 12375 내지 12529
- [0088] 23183 내지 23525
- [0089] 23279 내지 23622 및
65902 내지 67502.
- [0091] 바람직한 구체예에서, 수치는 아래 표 1에 나타난 8개의 m/z 범위, 선택적으로 12개의 이를 모든 범위에서 수득된다. 중요성, 이 피크의 발견 방법은 미국 특허 7,736,905에 설명되어 있다.
- [0092] 과정116에서, 과정 114에서 수득한 수치는 분류기로 공급되고, 기술된 구체예에서 그것은 K-최단인접이웃(KNN) 분류기이다. 분류기는 다수의 다른 환자(암 환자 또는 다른 고령 상피성 암 환자, 예를 들어, HNSCC, 유방암 환자일 수 있음).로부터 등급 표지된 스펙트럼의 트레이닝 세트의 이용을 만든다. 114에서의 수치 및 트레이닝 세트에 대한 KNN 분류 알고리즘의 적용은 미국 특허 7,736,905에 설명되어 있다. 다른 분류기로는 확률적 KNN 분류기 또는 다른 분류기를 포함하여 사용될 수 있다.
- [0093] 과정 118에서, 분류기는 스펙트럼 등급, "좋음", "나쁨" 또는 "정의되지 않음을 제공한다. 위에서 언급된 바와 같이, 과정 104-118은 주어진 환자 시료로부터 세 개의분리된 엘리퀴트(또는 어떤 개수의 엘리퀴트든지 사용됨)에서 동시에 수행된다. 과정 120에서, 모든 엘리퀴트가 동일한 등급 표지를 제공하는지 여부를 결정하기 위한 확인이 이루어진다. 그렇지 않으면 정의되지 않은 결과가 과정 122에서 나타나는 것으로 보고된다.
- [0094] 본 명세서에 기재된 바와 같이, 과정 124에서 보고된 등급 표지의 새롭고 예측되지 않은 용도가 기술된다.
- [0095] 과정 106, 114, 116 및 118은 전처리 과정 106을 코딩하는 소프트웨어, 과정 114에서 스펙트럼 수치를 수득, 과정 116에서 KNN 분류 알고리즘의 적용및 과정 118에서 등급 표지의 생산을 이용하여 프로그램 일반 목적 컴퓨터에서 전형적으로 수행되는 것으로 이해될 것이다. 과정 116에서 사용된 등급 표지된 스펙트럼의 트레이닝 세트는 컴퓨터의 메모리 또는 컴퓨터에 접근가능한 메모리에 저장된다.
- [0096] 상기 방법 및 프로그램 컴퓨터는 본 발명자들의 이전 특허 출원공개 미국 특허 7,736,905에서 기술된 연구 시험 과정 센터에서 유리하게 수행될 수 있다.
- [0097] 베리스트래트 시험의 작용 메커니즘 및 실용적인 결과에 대한 이해는 본 섹션에서 더욱기술되는 몇몇 근원으로부터 유래한다.
- [0098] 단백질 ID로부터의 직접 증거
- [0099] 베리스트래트는 혈청 또는 혈장으로부터 MALDI-TOF MS 피크의 강도를 측정한다. 하나의 구체예에서, 베리스트래트 특징은 아래 표 1에서 기술된 8개 질량 스펙트럼 피크로 구성된다. 분류는 강도, 예를 들어 피쳐 수치를 추정하고, 미리 처방된 m/z 범위(상기 리스트 및 표 1 참고)에 대한 시료의 질량스펙트럼을 통합하고, 관측된 8개의 피쳐 수치 세트를 7 최단근접이웃 분류 알고리즘을 이용하여 훈련 시료로부터의 것과 관련시킴으로써 수행된다. 이러한 과정은 비선형 조합에서 피쳐 수치를 이용하고 일차원적 점수의 정의를 허락하지 않는다. 피쳐 수치의 선형 조합으로부터 점수기능을 생산하기 위한 시도는 항상 비 성공적이었고 좋지 않은 실적을 유도하여

왔다. 모두 또는 대부분의 이들 8개의 피크는 임상적 이용을 제공하는 데 유용한 것으로 보인다.

[0100] 사용된 피크 수치의 단백질 함량의 결정은 베리스트래트 시험의 작용 메커니즘의 이해를 제공하는 것으로 여겨진다. 하지만, 이것은 이 기구의 m/z 분해능이 주어진 m/z 범위에서 오직 하나의 단백질 또는 펩타이드 사슬이 존재한다는 것을 확신하기에 충분히 높지 않다는 사실에 의해 복잡해진다. 이것은 또한, 8 이상의 펩타이드는 8개의 피크 특징을 구성하고 번역 후 변형 또는 산화된 일부는 동일한 아미노산 서열을 형성하고, 반면에 다른 것들은 여전히 확인되지 않은 펩타이드일 수 있는 것처럼 보인다. 또한, 피크 수치, 예를 들어 추정 피크 강도는 시료의 주어진 분석론의 존재와 단순히 상응하지 않는다. 이것은 MALDI 이온화 과정의 복잡함 때문이고, 검출기를 치는 이온의 수는 분석론의 존재 및 이온화 가능성 모두의 기능이다. 반정량적 방법으로 피크(피크 수치)를 비교하는 것은 단백질ID (LC-MS/MS)에 대한 표준 방법과의 비교가 어렵게 만든다.

[0101] [표 1]

[0102] 베리스트래트에서 사용된 피크

피크 수	m/z
1	5843
2	11445
3	11529
4	11685
5	11759
6	11903
7	12452
8	12579

[0103]

[0104] 이러한 어려움에도 불구하고, 본 발명자들은 표 1의 세 가지 피크가 혈청 아밀로이드 A(SAA)와 연관되어 있다는 강력한 증거를 가지고 있다. 본 발명자들은 담겨 있는 베리스트래트 "좋음" 및 베리스트래트 "나쁨" 시료 간에 DIGE(differential gel) 분석을 수행하고, 그들을 SAA 19-122 및 SAA 20-122로 확인하기에 충부한 서열 범위로 m/z 11529 및 11685에서의 피크를 분리하는 데 성공하였다. 이론적 질량은 관측된 m/z 수치와 잘 맞는다. 겔 상에서 관측된 0.4 PI 이동 역시 이론적 예상과 잘 맞는다.

[0105] 본 발명자들은 또한 m/z 5843에서의 피크가 11685에서의 피크의 두 배 대전한 형태라는 것을 알고 있다. 이러한 피크는 다른 5에 의해서도 관측되었다(Ducet, et al. Electrophoresis 1996, 17, 866-876 Kiernan et al. FEBS Letters 2003, 537, 166-170). 11445에서의 피크가 모 SAA 단백질의 말단으로부터의 절단 서열과 관계된 또 다른 SAA 이소폼인 것 역시 가능하다.

[0106] 다른 단백질 또는 단백질 이소폼이 베리스트래트 특징에서 존재하는 것은 명백한 반면, SAA 이소폼이 베리스트래트 시험의 작용 메커니즘에서 중요한 역할을 수행하는 것이 가능하다. 다음 섹션에서, 본 발명자들은 SAA가 베리스트래트 "나쁨"에서 세 개 이상의 피크의 주요 부분이라는 발견에 기초한 베리스트래트 시험의 작용 메커니즘의 가능한 이론을 제공한다 SAA와 특정 수용체 및 이들 상호작용의 생물학적 결과의 상호작용에 관한 알려진 정보, 뿐만 아니라 다양한 암 세포에서 기능적으로 SAA와 결합하는 이들 수용체의 존재에 관한 정보. 그러나, 본 발명은 이러한 이론에 필수적으로 기초하지 않으며 그러한 이론은 한정되는 것은 아니다.

[0107] 암에서 바이오 마커로 SAA에 관한 선행기술문헌: 참조문헌 6-16을 참조하라.

[0108] SAA: 생물학적 기능 및 종양 발병의 관여

[0109] 기능

[0110] SAA 패밀리의 중요성은 SAA가 진화를 통해 매우 보존된 서열이라는 사실¹⁷ 및 감염, 외상 또는 병적 과정에 대한 반응에서 SAA 발현의 증가에 의해 제안된다. 그러나, SAA 패밀리의 정확한 생물학적 기능은 여전히 완전히 이해되지 못하고 있다. SAA는 지질 수송 및 HDL의 요소로써 신진대사에 관여하고, 아마도 질병의 급성기에서 보호 역할을 수행한다. 반면에, 만성 조건에서는 SAA가 부정적인 인자가 된다¹⁸. SAA의 지속적인 과발현은 류마티스 관절염과 같은 일부 질병에서 아밀로이드 A 전분변성을 유도한다¹⁹. 그러나, SAA 단백질의 임상적으로 중요한 기능의 범위는 훨씬 넓고, 만성 염증 및 발암에서의 영향을 포함한다. 뒤의 두 가지는 면밀히 관련되어 있고 Vlasova 및 Moshkovskii²⁰, Malle 등²¹의 고찰에서 자세히 논의되어 있다.

[0111] 발암에 대한 SAA의 관여는 다면적인 생물학적 활성에 기인할 수 있다: 전염증 유전자 발현 활성 및 사이토카인 조절을 통한 지원적 만성 과정을 포함하는 염증의 관여, 세포외 기질 분해의 참여, 항-세포자살 특성 및 발암에 복잡하게 연관되는 것으로 알려진 MAPK을 포함하는 특정 경로의 활성.

[0112] SAA는 세포외 기질 (ECM) 부착 단백질로²² 행동하고 MMPs를 유도할 수 있는 것으로 보이고^{18, 23}, ECM 분해 및 리모델링에 중요한 역할을 수행하고 발암, 전이 및 종양 침범과 연관이 있다^{24, 25}.

[0113] SAA의 면역-관련 기능은 사이토카인-유사 활성에 의해 정의된다. 그것은 IL-8, TNF-a 및 IL-1 β ^{26, 27} 뿐만 아니라 (SAA 발현에 대한 양성 피드백을 유도), 세포-매개 면역 반응에서 중요한 역할을 수행하는 IL-12 및 11-23의 생산을 자극할 수 있다²⁸. SAA는 또한 PI3K 및 p38 MAPK를 활성화할 수 있는 것으로 보여진다.

[0114] 염증 조절에 대한 SAA의 관여는 NF- κ B 및 MAPK 경로의 활성과 동시에 COX2 발현을 유도하는 능력과 연관될 수 있다^{29, 30}. 암 및 염증의 원칙적인 상호관계는 수많은 연구와 고찰의 주제이다³¹⁻³⁷. 최근 데이터의 큰 몸체는 SAA의 표준 및 비표준의 MAPK 경로와 같은 염증 및 발암 경로와 전사 인자 NF-KB를 활성화하고, 아마도 크로스토크에 참여하는 능력 때문에, SAA가 두 과정 간의 조절자의 하나로 필수적인 역할을 수행할 수 있음을 나타낸다. 베리스트래트 특징과 함께 SAA의 증가된 레벨은 경로의 활성을 측정하는 유용한 방법으로 사용될 수 있다.

[0115] SAA 생물학적 활성과 연관된 수용체 및 경로

[0116] NF-KB 전사인자는 수많은 상피 및 혈액 암에서 본질적으로 활성화되어 있는 것으로 알려져 있고, 항-세포자살, 전-세포자살 표적 유전자, 기질-금속 로프로티아제 발현, 신생혈관형성 및 세포 사이클을⁴¹ 조절함으로써 염증-관련 암을³⁸⁻⁴⁰ 촉진시키는 데 필수적인 것으로 인식된다. 반면에, NF- κ B는 또한 전-세포자살 유전자 활성을 가하고 세포자살을 유도하기 위하여 종양 억제유전자 p53와 협력할 수 있다⁴². 실질적인 영향은 자극, 세포 유형 및 관련 서브유닛에 의존적이다⁴³. Rel/NF- κ B 인자의 항-세포자살 및 전-세포자살 효과는 필연적으로 교대로 이루어지는 것은 아니지만, 동일 표적 유전자의 상향조절을 통하여 동일한 세포에서 연속적으로 일어날 수 있다⁴⁴. NF-KB는 IL-6 및 TNF-a와 같은 전염증 사이토카인과 MMPs 및 COX-2^{35, 45, 46}를 포함하는 케모카인의 유도와의 연관성 때문에 염증 및 암 사이의 주요 연결고리의 하나이다. NF- κ B 활성은 EGF에 의해 유도될 수 있다: EGF 자극은 NF- κ B 활성을 통해 세포자살을 유도하는 치사 수용체를 방해한다.

[0117] COX-2 과발현은 폐암을⁴⁸ 포함하는 전암 상태, 악성 및 전이성 인간 상피성 암의⁴⁷ 넓은 범위에서 관측된다. COX2는 프로스타글란딘 E2(PGE2)를 통하여 세포증식, 신생혈관형성, 세포 자살 및 세포 이동을 중재하고, 또한 미토젠-활성 단백질 키나제 MAPK 케스케이드의 종양 신호를 전사촉진한다^{49, 50}. COX2는 Erk 활성을 통해 MAPK를 전사촉진한다^{49, 92}. 그 관계는 상호적이다: MAPK 경로를 통해 활성화되는 표피생장인자 (EGF)는 일부 상피세포에서 COX2를 극적으로 유도한다⁵¹. TGF α 에 의한 EGFR의 활성은 COX2를 자극하고 PGE2의 방출 및 증가된 유사분

열을 유도한다

[0118]

MAPK 케스케이드는 그것이 활성화된 성장인자 수용체로부터 성장-자극의 신호를 변환하기 때문에 정상 세포 생물학뿐만 아니라 암 발병에서도 중요한 역할을 한다. MAPK 신호 변환은 성장인자 하나가 멤브레인 수용체 티로신 키나제 수용체(RTK)에 결합함으로써 종종 시작되고, 이것은 Raf, MEK 및 세포외-신호 조절 인산화효소(ERK)의 인케이지먼트를 유도한다. 최근의 연구는 RTK에서 ERK로의 신호는 단순한 선형 Ras-의존 경로보다 훨씬 더 복잡하다는 것을 밝히고, 다양한 신호 조절자가 ETK-중재 ERK 신호의 세기, 지속 및 세포 위치를 결정하는 데 중요한 역할을 수행하는 것으로 밝혀졌다⁵⁰. SAA는 다양항 상피 세포의 일부 수용체와 기능적으로 결합하고, 이러한 결합은 상기 기술된 NF-κB 및 MAPK 경로 모두의 하류 활성에 영향을 가하고, 특정 치료에 대한 베리스 트래트 "나쁨" 환자의 저항성을 유도할 수 있다(상기 논의된 바와 같이). 이를 수용체의 일부에 관한 개요는 다음과 같다:

[0119]

FPRL 수용체

[0120]

FPRL 수용체는 간세포⁵³, 내장 상피⁵⁴ 및 폐⁵⁵를 포함하는 다양한 세포에서 발현된다. SAA는 전형적인 G-단백질공 역수용체의 하나인 FPRL과 상호작용하고 세포의 기능, 상피 증식 및/또는 세포자살의 조절에 필수적인 신호 네트워크를 유발시킨다. SAA가 FPRL1에 결합하면 인터루킨의 활성 및 유도를 유발한다. FPRL의 관여는 단백질 인산화효소 C (PKC) 및 세포 자살의 억제 및 암 진행과 연관된 전사 인자 NF-κB 경로를 활성화시킨다^{56, 57, 41}. SAA의 FPRL1 결합은 STAT3 활성과 세포 내 Ca²⁺의 방출뿐만 아니라 MAPK의 인산화반응, ERK 1/2, PI3K/Akt 신호에 의해 중재되는 호중구 및 류마티즘성의 시니비오사이트(synivioocyte)의 세포 자살 구조를 유도하고, 따라서 세포 증식과 생존을 촉진시킨다.

[0121]

SR-BI 수용체

[0122]

스캐빈저 수용체 B-I (SR-BI)는 선택적 콜레스테롤 흡수를 중재하는 고 밀도 지방단백질로 알려져 있다⁶¹. SR-BI는 스테로이드 조절 및 간에서 가장 풍부하게 발현된다. 하지만, 또한 염증 동안에 마크로파지 및 단핵백혈구에서 상향조절되었다 SR-BI 과발현은 인간 아테로스clerosis 동맥 경화증 병변에서 지방이 가득한 마크로파지에서 확인되었고 또한 SAA 존재에 의해 특징화된다. SAA는 SR-BI62에 의해 조절되는 세포 콜레스테롤 유출을 촉진하는 것으로 보인다⁶².

[0123]

Baranova⁶³ 등은 SAA(HDL와 연관된)가ERK1/2의 인산화반응, p38 MAPKs 및 I1-8과 연관된 HeLa 및 THP1 세포(인간 급성 단구성백혈병 세포주)에서의 SR-BI와 특이적으로 결합하는 것을 증명하였다. SR-BI 수용체의 발현은 인간 폐 암종 세포주를 포함하는 상이한 세포에서 나타났다⁶⁴.

[0124]

RAGE

[0125]

RAGE(Receptor for Advanced Glycation Endproducts)는 오직 폐에서 즉시 측정될 수 있는 정도로 끊임없이 발현되지만, 염증 부위, 대부분 염증 및 상피 세포에서 빠르게 증가한다. 상피세포 RAGE에서 멤브레인-결합 또는 용해 단백질이 압력에 의해 현저히 상향조절된다는 것이 발견되었다. RAGE를 통한 계속되는 신호는 생존 경로 및 감소된 세포자살 및 괴사(ATP 소모와 함께)를 유도하였다. 이는 많은 경우에 상피 암이 발생하는 환경을 형성하는 만성 염증을 유발하였다⁶⁵. RAGE 과발현은 전립선, 대장 및 위 종양과 연관이 있었다 반면에 폐와 식도암의 후기 단계는 RAGE의 하향조절에 의해 특징된다⁶⁶. 구강에서 RAGE의 편평상피세포 암종 발현은 종양 진행 및 재발과 강하게 연관되어 있고, RAGE-양성 환자는 매우 짧은 무병 생존을 보여주었다. 다른 다수의 리간드 가운데 SAA는 단백질 최종 당화산물의 수용체에 결합하고(RAGE), ERK1/2 및 p38 MAPK 경로(COX 경로의 유도 없이)를

통해 NF-κ B를 유도하는 것이 발견되었다⁶⁷.

[0126] TLRs

[0127] 최근의 발견은 SAA가 TLR(toll-like receptor) TLR4 및 TLR2²¹에 대한 내생 아고니스트로 기능할 수 있다는 것을 밝혀내었다. 밝혀지는 것으로 밝혀진 TLR4는 일부 인간 암 세포이다^{68, 69}. 폐암에서, TLR4의 활성은 면역억제의 사이토카인 TGF-베타, 전-신생혈관형성의 케모카인 IL-8 및 VEGF의 생산을 촉진하는 것으로 보인다. 증가된 VEGF 및 IL-8 분비는 p38MAPK 활성과 연관된다⁷⁰. SAA에 의한 TLR4의 활성은 p42/44 및 p38 MAPK71의 인산화반응을 요구하였다⁷¹.

[0128] TLR2는 또한 SAA에 대한 기능적 수용체인 것으로 보여졌다. TLR2를 발현하는 HeLa 세포는 NF-κ B β의 잠재적 활성으로 SAA에 반응하였다. SAA 자극은 ERK1/2 (P-ERK1/2), p38 MAPK (P-p38), 및 JNK (P-JNK) MAPKs의 증가된 인산화반응을 유도하고, TLR2-HeLa 세포에서 I κ B α (NFKB 억제제) 분해를 촉진하였다⁷². SAA에 의한 특정 활성의 결과로 NF-κ B의 자극은 마크로파지에서 증명되었다.

[0129] SAA의 가능한 상호작용 및 암 진행 및 치료 저항성에 대한 SAA의 생물학적 효과에 관한 간단한 도식이 도 3에 나타나있다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, SAA의 생물학적 기능은 SAA와 다양한 수용체의 상호작용에 의해 유발된 다양한 경로의 크로스토크의 면에서 검토될 수 있다. 이들은, 종양 성장 및 전이에 영향을 주는, 전염증성 사이토카인의 방출, 화학유인작용, 매트릭스 메탈로프로테인레이즈(matrix metalloproteinase: MMP)의 상승 조절, VEGF 발현과 같은 넓은 스펙트럼의 반응을 유발한다(도 3). 종양 세포에서 이들 경로는 결국 주요 MAPK 경로의 하나 이상의 활성으로 모여진다: ERK, p38 및 JNK^{21, 41} 및/또는 NF-KB 활성. 이러한 상호작용의 일부는 도 4의 EGFR 전달 경로의 도식으로 나타난다.

[0130] EGFR은 Ras-Raf-Mek를 포함하는 일부 주요 하부 신호 경로와 PI3K(phosphoinositide 3-kinase), Akt, 및 PKC로 구성된 경로를 활성화하는 수용체 티로신 키나제(RTK)이다. 이것은 차례대로 NF-κ B 전사 활성 경로 및 예를 들어, COX2에 의해 유도되는 염증 경로와의 크로스토크 연관을 통해 상호작용하는 증식, 생존, 침입, 전이성 전파 및 종양 신생혈관형성에 영향을 미친다. SAA는 티로신 키나제 수용체와 별개로 이 경로를 활성화할 수 있다(도 4, 굵은 화살표로 표시됨).

[0131]

[0132] EGFR의 과발현 및/또는 구조적 활성은 뇌, 유방, 장 및 폐를 포함하는 다양한 암과 연관된다. 케스케이드 요소들의 변경은 경로의 활성을 유도하고 암 유도 및 진행과 연관된 것으로 인식된다. 예를 들어, EGFR 키나제 도메인(비흡연자에서) 또는 KRAS(흡연자에서)의 돌연변이 활성화는 초기 폐암의 발병과 연관이 있다^{74, 75}.

[0133] Ras 단백질은 상류 조절과 관계없는 세포분열 신호를 유발하면서 종양의 약25%에서 계속해서 활성화 된다^{76, 77}. 새로 축적된 데이터의 큰 몸체는 비-선행의 신호 및 전사촉진이 암 발병 및 진행에서 중요한 역할을 수행함을 제시한다.

[0134] 항암 치료에 대한 SAA 상호작용 및 저항성

[0135] 화학요법, 방사선요법 및 항염증 치료

[0136] 상기 기술된 내용과 도 3 및 4에 나타난 바와 같이, SAA와 많은 수용체의 상호작용은 암 치료에 대한 저항성과 연관된 경로의 활성을 유도한다. 화학- 및 방사선-저항에서 NF-κ B의 역할은 이전에 논의되어 왔다⁴¹. NF-κ B의 억제는 세포 자살 반응을 향상시킴으로써 방사선 치료^{78, 79} 및 치사 사이토카인에⁸⁰ 대한 민감성을 주었다. 동

시에, 방사선 및 특정 화학요법 약물에 대한 노출은 NF-κB 활성 및 세포 자살에 대한 잇따르는 저항성을 유도 한다^{81, 79}. 화학요법(젠피타빈)-유도된 NF-κB 활성의 억제는 화학요법-유도된 세포 자살에 대한 NSCLC 세포주의 민감도를 회복시키는 것으로 보였다^{81, 82}.

[0137] 반면에, 몇몇 경우에는, NF-κB가 화학요법에 대한 민감도와 연관된 것으로 보였다. 예를 들어, 그것은 파클리탁셀-유도된 세포치사에 필요한 것으로 제안되어 왔다⁸².

[0138] 이러한 정보를 고려하면, 베리스트래트 "나쁨" 환자에 대한 특징을 가지는 혈청 또는 혈장 내 증가된 SAA 농도로부터 얻어지는 한 가지 가능한 결론은 증가된 SAA가 NF-κB 전사인자 및 MAPK 경로의 활성을 유발시킨하는 것이다. 이것은 방사선 치료에 대한 암 일차 저항과 연관될 수 있고 환자의 화학요법에 대한 반응에 영향을 미칠 수 있다. 그러나, 각 치료 유형 및 환자 집단에 대하여 개별적으로 평가되어야 하는 다수의 인자가 있다.

[0139] 삼산화 비소, 커큐민, 탈리도마이드와 같은 NF-KB 억제제는 수많은 임상 시도의 대상이었다. 그러나, NF-KB 억제제는 또한 정상 조혈모세포 프로제니터의 화학요법-유도된 세포 자살을 증진시키기 때문에 화학요법에서 아주반트로씨 NF-KB 억제제의 이용은 골수 회복을 지연시켰다. NF-κB가 선천성 및 후천성 면역 반응의 활성에 중요한 역할을 가지기 때문에 장기 사용 억제제는 면역 결핍의 위험성과 연관될 수 있음을 이해하여야 한다.

[0140] 만일 사실상 베리스트래트 "나쁨" 특징이 NF-κB의 특정 활성과 연관된다면, 이러한 특징은 NF-κB 억제제로부터 가장 혜택을 얻을 수 있는 환자를 선별하고 불필요한 치료 및 관련 이환률을 감소시키는데 사용될 수 있다.

[0141] 수용체 티로신 키나제- 표적 치료

[0142] erbB 수용체 및 MAPK 경로

[0143] EGFR 및 HER2은 4개의 구성원 (EGFR (HER1), erbB4 (HER4), erbB3 (HER3), 및 erbB2 (HER2))으로 구성된 상피성 장인자 수용체 (EGFR) 패밀리에 속한다. 상피성 암의 대부분은 표피생장인자 수용체(EGFR) 및 GER2 수용체의 비정상적인 활성을 나타내기 때문에 이들 수용체의 특정 억제는 표적 암 치료의 전략이 되었고 이는 수많은 연구의 주제이다.

[0144] 리간드가 없는 경우, EGFR 수용체는 키나제 활성을 억제하는 형태로 존재한다. 리간드가 결합하면 수용체의 이합체화 반응을 유도하는 "이합체화 루프"의 정체를 드러내는 구조적 변화를 시작한다. 이러한 변화는 키나제 도메인을 활성화시키기 위하여 혈청 멤브레인을 통하여 전달된다. 이러한 활성 구조에 대한 변화는 ErbB 패밀리에서 발견된다. ErbB-3은 기능적 키나제는 아니지만, 트랜센티베이트(transactivate) 이합체 파트너일 수 있고 HER2/ErbB-2는 활성 형태에서 리간드가 제거된 종양 수용체 "잠김(locked)"이다.

[0145] 이러한 이합체화 반응은 세 가지 주요 신호 경로를 통한 신호 전달, 및 그에 따른 세포 자살의 회피, 지속적인 신생혈관형성, 항-성장 신호에 대한 저항, 성장 신호에서 자급자족 및 전이를 유도하는 티로신 키나제 기능의 활성 결과를 나타낸다.

[0146] 케스케이드 요소의 변경은 경로의 활성을 유도하고 암 유도 및 진행과 연관된 것으로 생각된다. 예를 들어, EGFR 키나제 도메인(비흡연자에서) 또는 KRAS(흡연자에서)의 돌연변이 활성화는 초기 폐암의 발병과 연관이 있다^{74, 72}. Ras 단백질은 상류 조절과 관계없는 세포분열 신호를 유발하면서 종양의 약25%에서 계속해서 활성화된다^{76, 77}.

[0147] 몇몇 티로신 키나제 억제제는 두 개의 저분자 EGFR 티로신 키나제 억제제-엘로티닙 및 계피티닙뿐만 아니라 듀얼 EGFR 및 HER2 억제제 라파티닙을 포함하는 다양한 고형 종양을 위한 임상적 실시에서 현재 사용된다. 또한, 인간 단일클론 항-HER2 항체 트라스투주맙 및 두 가지 항-EGFR 항체-세툭시맙 및 패니투무맙은 임상 적용을 위한 승인이 이루어졌다.

- [0148] 다수의 간행물에서 검토된 티로신 키나제 억제제(저분자뿐만 아니라 단일클론항체)에 대한 선천적, 후천적 저항성은 KRAS 돌연변이 활성, met-원종양유전자의 증폭⁸⁴ 및 T790M 돌연변이와 같은 다양한 인자에 기인한다. 암의 다양성 및 표적 제제에 대한 몇몇 저항 경로를 나타내는 능력은 다른 이유들 중에서도 리간드와 수용체의 정상 상류 상호작용에 관계없는 신호의 활성 가능성 때문에 하나의 치료제에 의한 치유 치료의 가능을 벽차게 만든다. 성장하는 증거는 다양한 티로신 키나제, 수용체 하류 경로의 크로스토크 및 전달 케스케이드의 하류 활성의 동시발현의 중요성을 시사한다.
- [0149] 경로의 전사촉진은 다양한 연구에서 저항성의 메커니즘의 하나로 제안되었다. 예를 들어, 인슐린 유사 성장 인자-I 수용체 (IGF-1R) 신호는 인간 유방암 및 전립선 암 세포주에서 게피티닙에 의한 EGFR 봉쇄를 보상할 수 있을 것으로 여겨진다⁸⁵. 하류 신호 변경은 특히 발암 PIK3CA 또는 다른 RTK에 의한 Akt 활성을 통하여 NSCLC에서 TKI에 대한 저항 메커니즘의 하나로 설명되어 왔다⁸⁶.
- [0150] Cappuzzo 등⁸⁸은 NSCLC의 게피티닙에 대한 환자의 민감도가 Akt가 활성화되면 매우 낮다는 것을 관측하였다. 반면에, EGFR 발현은 EGFR 독립적인 활성이 게피티닙 저항성을 유도할 수 있다는 것을 확인하는것으로 부정적이었다.
- [0151] 본 발명자들은 베리스트래트 시험에 의해 측정된 SAA의 상호작용이 MAPK 케스케이드의 RTK-독립적인 활성을 유도할 수 있고 그 결과, TKI 저항성을 유도할 수 있음을 제안한다. SAA의 이러한 작용 메커니즘은 직접적이거나 간접적이다. SAA의 직접적 행동은 RAGE 또는 TLR2 및 TLR 4 수용체에 결합함으로써 중재될 수 있고, 전형적인 MAPK 경로(JNK 및 p38의 활성에 의해)의 활성을 유도한다. 다양한 암 세포, 뿐만 아니라 암 관련 세포의 표면에 이들 수용체의 존재 및 그들의 상호작용은 Malle 등에 의해 검토되었다²¹. TLR 수용체의 활성의 결과로 EGFR 경로의 활성에 대한 직접적인 증거가 있다⁶⁶.
- [0152] SAA의 간접적인 행동은 FPRL 수용체를 통한 행동에 의해 설명될 수 있고, 이는 차례로 G 단백질공역수용체와 반응하는 인터루킨I16 및 I18의 방출을 유도하고 PKC를 활성화시킨다(PKC의 활성은 세포 증식 및 바소투과성 (vasopermeability), 및MAPK 경로에서 MEK의 활성을 유도한다). 게다가, 그것은 VEGF 발현을 유도한다.
- [0153] SAA는 폐 상피세포 및 마크로파지에서 TRL4에 대한 리간드이다. 종양 세포에서 발현되는 TLR의 라이케이션은 또한 VEGF 수준을 증가시킨다.
- [0154] 이러한 정보는 SAA에 의한 세 가지 모든 주요 MAPK 경로의 하류 활성에 책임이 있는 메커니즘의 존재에 대한 증거를 제공한다. 하류 활성 MAPK 경로는 RTK에 독립적이고 "교차" 검사점으로부터 상류의 표적 억제에 대한 저항성을 유도할 수 있다.
- [0155] 상기와 같은 점에서, 베리스트래트를 이용하여 병용요법을 포함하는 특정 치료에 가장 적합한 환자를 선별하는 것은 일부 유형의 약물 저항성을 극복하는 데 있어서 중요할 수 있다.
- [0156] 병용요법 및 베리스트래트 특징
- [0157] TKI 및 COX2 억제제
- [0158] 위에서 논의한 바와 같이, SAA는 COX2의 발현을 유도할 수 있다. 폐암에서의 COX2의 과발현은 COX2가 선암종의⁸⁸ 약 70%에서 관측되었다는 Huang⁸⁷ 등에 의해 처음 보고되었고, 많은 다른 연구에서 확인되었다.
- [0159] 많은 시도들이 COX2와 EGFR 신호 경로 사이의 크로스토크를 증명하여 왔다. 위에서 논의한 바와 같이, MAPK 경로를 통해 행동하는 표피생장인자 (EGF)는 일부 상피세포에서 COX2 활성을 극적으로 유도한다⁴⁷. TGF α α 에 의한 EGFR의 활성은 COX2를 자극하고 PGE2의 방출 및 증가된 유사분열을 유도한다⁴⁸. 반면에, COX2의 산물인 프로스타글란딘 E2(PGE2)는 EGF 수용체를 전사촉진할 수 있다. NSCLC에서, PGE2는 EGFR-독립적인 방식으로 세포내 크로스토크에 의한 MAPK/Erk 경로를 활성화하는 것이 증명되었다 그 효과는 G-단백질공역수용체 및 단백질 인산화효

소 C (PKC)를 통해 중재되었고 EGFR-TKI 저항성에 기여할 수 있었다.

[0160] 반면에, COX2 억제제는 NF-κB 경로를 억제하는 것으로 보인다. 세레콕시브는 Akt 및 IKK의 억제를 통해 그 효과를 나타내었다. 인간 비소세포성 폐 암종에서, 세레콕시브는 NF-κB 뿐만 아니라 IKK 및 Akt 활성 억제를 통하여 TNF-유도된 JNK, p38 MAPK 및 ERK 활성을 억제하고, COX-2 합성 및 염증, 증식 및 발암에 필요한 다른 유전자들의 하향조절을 유도하는 것으로 나타났다^{46, 90}. 아스피린 및 이부프로펜을 포함하는 다른 NSAID는 IKK 활성 및 IκBα 분해를 억제함으로써 활성화되는 것으로 나타났다. 조합하면, 이러한 고찰은 COX2를 표준 암 치료에 추가하는 것에 대한 강력한 이유를 제공하였다.

[0161] NSCLC에서 항염증 및 티로신 키나제 수용체-표적 치료의 조합에 관한 연구 및 EGFR-TKIs 저항성을 극복하기 위한 그 잠재력은 이전에 검토되어왔다^{90, 91}. 그러한 시도의 결과는 부정적이었다: 게피티닙과 세레콕시브의 병용 요법에서 반응 속도 및 환자의 생존, 및 로페록시브 및 엘로티닙으로 치료한 환자에서의 질병 대조군 속도는 단일 약물 치료에서 관측된 것과 유사한 것으로 밝혀졌다.

[0162] COX 억제제의 침가의 효과는 제안된 이러한 경로에 대한 SAA의 상향조절 효과 때문에 베리스트래트 "나쁨" 환자에서 더 확연할 수 있다. 그러나, 효과의 규모는 MAPK 활성 및 NF-κB 하류, 및 그들의 상호작용에 대한 COX2 경로 억제의 알려지지 않은 효과의 규모 때문에 예측하기 어렵다. 이러한 가설은 더욱 조사되어야 한다.

[0163] 세포주 증거 (도 8)

[0164] 본 발명자들은 베리스트래트 "나쁨" 혈청이 종양 세포에서 생물학적 효과를 야기할 수 있음을 증명하였다. 특히, 그것은 약물-민감성 세포주에서 게피티닙에 대한 세포의 저항성을 증가시킬 수 있다. 실험은 게피티닙 민감성 라인 HCC4006 (그것은 EGFR 엑손 19 결실을 가짐) 및 저항성 라인 A549 (EGFR 야생형)에 대하여 수행되었다. 인간 혈청은 IIIB/IV NSCLC 환자로부터 얻고 베리스트래트 "좋음" 또는 "나쁨"으로 특징화되었다. 풀은 각 등급에서 혈청과 조합하여 만들어지고 성장 억제 분석에 사용되었다. 세포를 두 가지 배지 조성을 이용하여 플레이팅하였다(10 복제물/약물농도 2,000 세포/웰); 10% 좋은 혈청의 RPMI 또는 10% 나쁨 혈청의 RPMI. 24시간 후, 게피티닙을 추가하고 플레이트를 6일 동안 인큐베이션하였다. MTT 분석은 성장 억제를 측정하기 위하여 사용되었다. 그 결과는 아래 표 2 및 도 8에 나타나있다.

[표 2]

HCC4006에서 Mann-Whitney 시험에 의한 좋음 vs. 나쁨 수치에 대한 P<0.0001

	HCC4006*		A549	
	좋음	나쁨	좋음	나쁨
IC ₅₀ μmol/L	0.054	0.098	>10	>10
0.03 μmol/L에서 % 억제	32	10	0	0
0.06 μmol/L에서 % 억제	55	25	0	1
0.10 μmol/L에서 % 억제	82	52	3	0
0.30 μmol/L에서 % 억제	93	84	2	2
0.60 μmol/L에서 % 억제	96	93	14	11
1.0 μmol/L에서 % 억제	ND	ND	13	10
3.0 μmol/L에서 % 억제	ND	ND	22	20
6.0 μmol/L에서 % 억제	ND	ND	25	32
10.0 μmol/L에서 % 억제	ND	ND	34	40

* In HCC4006 P<0.0001 for Good vs. Poor values by Mann-Whitney Test

[0167]

[0168]

도 8은 게피티닙의 상이한 농도 존재에 따른 베리스트래트 "나쁨" 및 "좋음" 혈청에서 게피티닙 민감성 세포주 HCC4006 및 게피티닙 저항성 세포주 A549의 성장을 보여주는 그레프를 묘사한 것이다. 도 8에서, % 대조군은 상응하는 증식 배지에서 약물이 없는 경우의 평균 흡수에 대한 주어진 게피티닙 농도에서의 흡수 비율로부터 계산되었다. 예리 바는 표준화된 측정의 표준 편차에 상응한다.

[0169]

베리스트래트 "나쁨" 혈청에서 성장할 때 민감성 세포의 억제가 상대적으로 감소하였지만, 저항성 종양 세포에서는 중요한 변화가 없었다. 그 결과는 베리스트래트 "나쁨" 혈청이 종양 세포에 대해 직접적인 생물학적 효과를 가지고 그것은 베리스트래트 "좋음" 혈청의 효과와 상이하다는 것을 증명한다. 이러한 결과는 베리스트래트 메커니즘, 그것의 숙주-종양 상호작용 및 환자 개체군에서 표적 치료의 상대적인 효과와의 관련성에 관한 본 발명자들의 가설을 지지해준다.

[0170]

화학요법에서의 베리스트래트

[0171]

도 7에 나타난 바와 같이, 베리스트래트 "나쁨" 특징은 일부 비-표적 치료에 대한 나쁜 반응과 연관이 있는 반면, 다른 것들에 대하여는 그렇지 않다. 베리스트래트 분류는 DNA 복제 및 NF-kB(시스플라틴, 켐시타빈 등과 같은)에 의해 조절되는 유전자 전사를 방해하는 화학요법에서의 결과와 관련이 있을 수 있다. 그러나, 비-표적 치료에서 베리스트래트 유용성의 확고한 영역은 실험적으로 결정될 필요가 있다.

[0172]

베리스트래트 시험에 대한 실질적인 적용의 예시는 암 환자가 예를 들어 DNA의 복제 및/또는 NF-kB 전사인자에 의해 조절되는 유전자의 활성과 상호작용하는 것과 같은 특정 비-표적 화학요법 레짐의 투여로부터 혜택을 얻을 수 있는지를 예측하는 다음을 포함하는 방법을 제공하는 것일 수 있다: 시료(도 1)에 베리스트래트 시험을 수행하고 그 결과가 "나쁨" 등급 표지이면 상기 환자가 혜택을 얻기 어렵다는 결과를 나타내는 것임.

[0173]

증가된 SAA가 NF-kB 전사인자를 유발시킬 뿐만 아니라 다양한 치료에 대한 암 진행 및 반응에서의 NF-kB 활성의 역할을 유발시킨다는 문헌으로부터 얻어진 정보를 고려할 때, 베리스트래트 특징은 방사선 치료에 대한 암 일차 저항성 및 환자의 화학요법에 대한 반응과 연관될 수 있다.

[0174]

삼산화 비소, 커큐민, 탈리도마이드와 같은NF-KB 억제제는 항암 제제로 임상시험에서 평가되고 있다. 그러나, 그 유용성은 이들 제제에 대한 반응의 바이오마커의 부재, 뿐만 아니라 그들의 부작용에 의해서 제한될 수 있다. 베리스트래트는 NF-kB의 향상된 활성의 바이오마커로 유용할 수 있고, 따라서 환자(침작전대, 베리스트래트 "나쁨")의 선별을 위해 NF-kB 억제제로부터 잠재적으로 가장 혜택을 얻을 수 있다.

[0175]

상기 내용을 모두 요약하면, 본 발명은 도 1의 베리스트래트 시험의 추가적인 용도를 포함한다. 일반적인 문제로, 베리스트래트 시험은 암 환자가 수용체의 아고니스트, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK, PI3K/Akt 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합으로 치료를 통한 혜택을 얻는지를 예측할 것이다. 다수의 예측은 특정 약물 또는 약물의 조합에 의존할 것이다. 베리스트래트 시험은 하류 조절을 표적화하는 약물의 효과를 예측하지 않을 것이다.

[0176]

한 구체예에서, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 고형 상피성 종양 암 환자가 수용체의 아고니스트, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK, PI3K/Akt 또는 PKC 경로에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위한 방법으로 고려될 수 있다:

[0177]

a) 고형 상피성 종양 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계;

[0178]

b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하는 단계(예를 들어, 배경 제거, 표준화 및 스펙트럼 조정);

[0179]

c) b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위(및 바람직하게는 표 1에 기재된 m/z 피크에 상응하는 이전에 기술된 m/z 범위)에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및

[0180]

d) 환자가 치료제 또는 치료제의 조합물로 치료한 경우 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위하여, 다른

고형 상피성 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계.

[0181] 특정 예시로, EGFR-I에 대한 MAPK 경로의 하류 활성을 방해하는 표적 제제의 추가는 EGFR-I에 대한 베리스트래트 "나쁨" 특징을 가지는 환자의 저항성을 극복할 수 있다.

[0182] 다른 특정 예시로, COX2 억제제, 치료 레짐으로 셀레콕시브 또는 로페콕시브의 EGFR-I에 대한 추가는 EGFR-I에 대한 베리스트래트 "나쁨" 특징을 가지는 환자의 저항성을 극복할 수 있다. 따라서 베리스트래트 시험은 COX2 억제제 및 EGFR 억제제를 포함하는 병용요법을 처방하기 위한 지표로 이용될 수 있다. 특정 구체예에서, 암 환자가 COX2 억제제 및 EGFR 억제제의 투여로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 예측하기 위한 방법은 다음의 단계를 포함한다: a) 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 질량스펙트럼을 수득하는 단계; b) 상기 a) 단계에서 수득한 질량스펙트럼에 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하는 단계(예를 들어, 배경 제거, 표준화 및 스펙트럼 조정); c) 상기 b) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위(및 바람직하게는 표 1에 기재된 m/z 피크에 상응하는 이전에 기술된 m/z 범위)에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하는 단계; 및 d) 환자가 COX2 억제제 및 EGFR 억제제의 조합물의 투여에 의한 치료로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위하여, 다른 고형 상피성 종양 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 c) 단계에서 수득한 수치를 이용하는 단계. 특히, 만일 등급 표지가 "나쁨"이면 환자는 혜택을 얻을 수 있을 것으로 표시된다.

[0183] 또 다른 특정 예시로, 베리스트래트 "나쁨" 특징은 NF- κ B의 특정 활성과 연관된 것으로 알려져 있다. 따라서, 이 시험은 표준화학요법 치료에 대한 NF- κ B 억제제 및 COX2 억제제의 추가로부터 가장 혜택을 얻을 수 있는 환자를 선별하고, 동시에 불필요한 치료 및 관련 이환률을 감소시키는 데 사용될 수 있다.

[0184] 본 명세서의 방법은 암 환자의 혈액 기반 시료를 수득하고, 기계 판독 메모리에 질량스펙트럼 데이터를 저장하고, 기계, 예를 들어 등급 표지(베리스트래트 "좋음" 또는 "나쁨")를 제공하는 프로그램 컴퓨터를 이용하여 도 1에 나타난 과정 및 분류 단계를 수행하고, 따라서 환자가 상기 기술된 치료제 또는 치료제의 조합으로 치료를 통한 혜택을 얻을 수 있는지에 대한 확인의 예측을 제공하는 연구실 시험 센터로 수행될 수 있다. 또 다른 구체예로, 본 발명은 암 환자가 OX2 억제제 및 EGFR 억제제의 조합물의 투여로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하거나 예측하기 위해 설정된 장치로써 설정될 수 있다. 상기 장치는 암 환자로부터의 혈액 기반 시료의 질량스펙트럼을 저장하는 기억장치, 컴퓨터 메모리 또는 데이터베이스 및 a) 질량스펙트럼에 대한 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계를 수행하고(도 1 참조); b) 상기 a) 단계에서 질량스펙트럼에 대한 전처리 단계들을 수행한 이후에 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위(예를 들어, 표 1의 피크 리스트 또는 상기 기술된 m/z 범위를 포함하는 범위)에 있는 상기 스펙트럼 내의 선택된 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하고 및 c) 암 환자가 COX2 억제제 및 EGFR 억제제의 조합물의 투여로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위하여, 다른 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘(예를 들어, KNN 분류 알고리즘)에서 b) 단계에서 수득한 수치를 이용하도록 설정된 소프트웨어 지시를 수행하는 처리기(예를 들어, 프로그램 일반 목적 컴퓨터의 통상적인 CPU)의 조합으로 구성된다.

[0185] 또 다른 예시로, 본 발명은 고형 상피성 종양 암 환자가 수용체의 아고니스트, Akt 또는 ERK/JNK/p38로부터의 상류 또는 Akt 또는 ERK/JNK/p38에서의 MAPK(mitogen-activated protein kinase), PI3K 또는 PKC(protein kinase C) 경로에 관여하는 수용체 또는 단백질, 또는 PKC를 표적화하는 치료제 또는 치료제의 조합으로 치료를 통한 혜택을 받을 수 있는지 아닌지를 확인하도록 설정된 장치로 구성될 수 있다. 상기 장치는 고형 상피성 종양 암 환자로부터의 혈액 기반 시료의 질량스펙트럼을 저장하는 기억장치 및 a) 질량스펙트럼에 대한 하나 이상의 미리 정의된 전처리 단계들을 수행하고(도 1 참조); b) 하나 이상의 미리 정의된 m/z 범위(예를 들어, 표 1의 피크 리스트 또는 상기 기술된 m/z 범위를 포함하는 범위)에 있는 상기 스펙트럼 내의 피쳐의 통합 강도 수치를 수득하고 및 c) 환자가 치료제 또는 치료제의 조합으로 혜택을 얻을 수 있는지 아닌지를 확인하기 위하여, 다른 고형 상피성 암 환자의 혈액 기반 시료로부터 생산된 등급-표지된 스펙트럼을 포함하는 트레이닝 세트를 이용한 분류 알고리즘에서 b) 단계에서 수득한 수치를 이용하도록 설정된 소프트웨어 지시를 수행하는 처리기의 형태를 가진다.

- [0186] 본 발명의 추가적인 예시가 첨부된 청구항에 기술되어 있다.
- [0187] 첨부
- [0188] 인용된 참고문헌
- [0189] 1. Taguchi F, Solomon B, Gregorc V, et al. Mass spectrometry to classify non-small-cell lung cancer patients for clinical outcome after treatment with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors: a multicohort cross-institutional study. *J Natl Cancer Inst* 2007;99:838-46.
- [0190] 2. Clark GM, Zborowski DM, Culbertson JL, et al. Clinical utility of epidermal growth factor receptor expression for selecting patients with advanced non-small cell lung cancer for treatment with erlotinib. *J Thorac Oncol* 2006; 1:837-46.
- [0191] 3. Chung CH, Seeley EH, Roder H, et al. Detection of tumor epidermal growth factor receptor pathway dependence by serum mass spectrometry in cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19:358-65.
- [0192] 4. Carbone DP, Salmon JS, Billheimer D, et al. VeriStrat((R)) classifier for survival and time to progression in non-small cell lung cancer (NSCLC) patients treated with erlotinib and bevacizumab. *Lung Cancer* 2009.
- [0193] 5. Kiernan UA, Tubbs A, Nedelkov D, Niederkofler EE, Nelson RW. Detection of novel truncated forms of human serum amyloid A protein in human plasma. *FEBS Lett* 2003;537: 166-70.
- [0194] 6. Cremona M, Calabro E, Randi G, et al. Elevated levels of the acute-phase serum amyloid are associated with heightened lung cancer risk. *Cancer* 2010.
- [0195] 7. Benson MD, Eyanson S, Fineberg NS. Serum amyloid A in carcinoma of the lung. *Cancer* 1986;57: 1783-7.
- [0196] 8. Biran H, Friedman N, Neumann L, Pras M, Shainkin-Kestenbaum R. Serum amyloid A (SAA) variations in patients with cancer: correlation with disease activity, stage, primary site, and prognosis. *J Clin Pathol* 1986;39:794-7.
- [0197] 9. Khan N, Cromer CJ, Campa M, Patz EF, Jr. Clinical utility of serum amyloid A and macrophage migration inhibitory factor as serum biomarkers for the detection of nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 2004;101 :379-84.
- [0198] 10. Cho WC, Yip TT, Yip C, et al. Identification of serum amyloid a protein as a potentially useful biomarker to monitor relapse of nasopharyngeal cancer by serum proteomic profiling. *Clin Cancer Res* 2004;10:43-52.
- [0199] 11. Yokoi K, Shih LC, Kobayashi R, et al. Serum amyloid A as a tumor marker in sera of nude mice with orthotopic human pancreatic cancer and in plasma of patients with pancreatic cancer. *Int J Oncol* 2005;27: 1361-9.
- [0200] 12. Gutfeld O, Prus D, Ackerman Z, et al. Expression of serum amyloid A, in normal, dysplastic, and neoplastic human colonic mucosa: implication for a role in colonic tumorigenesis. *J Histochem Cytochem* 2006;54:63-73.
- [0201] 13. Engwegen JY, Mehra N, Haanen JB, et al. Validation of SELDI-TOF MS serum protein profiles for renal cell carcinoma in new populations. *Lab Invest* 2007;87: 161-72.
- [0202] 14. Dai S, Wang X, Liu L, et al. Discovery and identification of Serum Amyloid A protein elevated in

- lung cancer serum. *Sci China C Life Sci* 2007;50:305-11.
- [0203] 15. Liu DH, Wang XM, Zhang LJ, et al. Serum amyloid A protein: a potential biomarker correlated with clinical stage of lung cancer. *Biomed Environ Sci* 2007;20:33-40.
- [0204] 16. Michaeli A, Finci-Yeheskel Z, Dishon S, Linke RP, Levin M, Urieli-Shoval S. Serum amyloid A enhances plasminogen activation: implication for a role in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;368:368-73.
- [0205] 17. Uhlar CM, Burgess CJ, Sharp PM, Whitehead AS. Evolution of the serum amyloid A (SAA) protein superfamily. *Genomics* 1994;19:228-35.
- [0206] 18. Uhlar CM, Whitehead AS. Serum amyloid A, the major vertebrate acute-phase reactant. *Eur J Biochem* 1999;265:501-23.
- [0207] 19. Sipe JD. Amyloidosis. *Annu Rev Biochem* 1992;61:947-75.
- [0208] 20. Vlasova MA, Moshkovskii SA. Molecular interactions of acute phase serum amyloid A: possible involvement in carcinogenesis. *Biochemistry (Mosc)* 2006;71:1051-9.
- [0209] 21. Malle E, Sodin-Semrl S, Kovacevic A. Serum amyloid A: an acute-phase protein involved in tumour pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 2009;66:9-26.
- [0210] 22. Preciado-Patt L, Levartovsky D, Prass M, Hershkoviz R, Lider O, Fridkin M. Inhibition of cell adhesion to glycoproteins of the extracellular matrix by peptides corresponding to serum amyloid A. Toward understanding the physiological role of an enigmatic protein. *Eur J Biochem* 1994;223:35-42.
- [0211] 23. Migita K, Kawabe Y, Tominaga M, Origuchi T, Aoyagi T, Eguchi K. Serum amyloid A protein induces production of matrix metalloproteinases by human synovial fibroblasts. *Lab Invest* 1998;78:535-9.
- [0212] 24. Hynes RO. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science* 2009;326:1216-9.
- [0213] 25. Vihtinen P, Ala-aho R, Kahari VM. Matrix metalloproteinases as therapeutic targets in cancer. *Curr Cancer Drug Targets* 2005;5:203-20.
- [0214] 26. Furlaneto CJ, Campa A. A novel function of serum amyloid A: a potent stimulus for the release of tumor necrosis factor- α , interleukin-1 β , and interleukin-8 by human blood neutrophil. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;268:405-8.
- [0215] 27. Patel H, Fellowes R, Coade S, Woo P. Human serum amyloid A has cytokine-like properties. *Scand J Immunol* 1998;48:410-8.
- [0216] 28. He R, Shepard LW, Chen J, Pan ZK, Ye RD. Serum amyloid A is an endogenous ligand that differentially induces IL-12 and IL-23. *J Immunol* 2006;177:4072-9.
- [0217] 29. Malle E, Bollmann A, Steinmetz A, Gemsa D, Leis HJ, Sattler W. Serum amyloid A (SAA) protein enhances formation of cyclooxygenase metabolites of activated human monocytes. *FEBS Lett* 1997;419:215-9.
- [0218] 30. Jijon HB, Madsen KL, Walker JW, Allard B, Jobin C. Serum amyloid A activates NF- κ B and proinflammatory gene expression in human and murine intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 2005;35:718-26.
- [0219] 31. Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature* 2002;420:860-7.
- [0220] 32. Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Mark Evers B. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg* 2004;239:763-9; discussion 9-71.
- [0221] 33. Ditsworth D, Zong WX. NF- κ B: key mediator of inflammation-associated cancer. *Cancer Biol Ther* 2004;3:1214-6.
- [0222] 34. Balkwill F, Coussens LM. Cancer: an inflammatory link. *Nature* 2004;431:405-6.

- [0223] 35. Lu H, Ouyang W, Huang C. Inflammation, a key event in cancer development. *Mol Cancer Res* 2006;4:221-33.
- [0224] 36. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature* 2008;454:436-44.
- [0225] 37. Lee JM, Yanagawa J, Peebles KA, Sharma S, Mao JT, Dubinett SM. Inflammation in lung carcinogenesis: new targets for lung cancer chemoprevention and treatment. *Crit Rev Oncol Hematol* 2008;66:208-17.
- [0226] 38. Greten FR, Eckmann L, Greten TF, et al. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell* 2004; 118:285-96.
- [0227] 39. Pikarsky E, Porat RM, Stein I, et al. NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer. *Nature* 2004;431 :461-6.
- [0228] 40. Karin M. The IkappaB kinase - a bridge between inflammation and cancer. *Cell Res* 2008;18:334-42.
- [0229] 41. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 2007;29: 19-35.
- [0230] 42. Graham B, Gibson SB. The two faces of NFkappaB in cell survival responses. *Cell Cycle* 2005;4: 1342-5.
- [0231] 43. Kaltschmidt B, Kaltschmidt C, Hofmann TG, Hehner SP, Droege W, Schmitz ML. The pro- or anti-apoptotic function of NF-kappaB is determined by the nature of the apoptotic stimulus. *Eur J Biochem* 2000;267:3828-35.
- [0232] 44. Bernard D, Monte D, Vandenbunder B, Abbadie C. The c-Rel transcription factor can both induce and inhibit apoptosis in the same cells via the upregulation of MnSOD. *Oncogene* 2002;21 :4392-402.
- [0233] 45. Li Q, Verma IM. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol* 2002;2:725-34.
- [0234] 46. Shishodia S, Koul D, Aggarwal BB. Cyclooxygenase (COX)-2 inhibitor celecoxib abrogates TNF-induced NF-kappa B activation through inhibition of activation of I kappa B alpha kinase and Akt in human non-small cell lung carcinoma: correlation with suppression of COX-2 synthesis. *J Immunol* 2004; 173:201 1-22.
- [0235] 47. Koki AT, Khan NK, Woerner BM, et al. Characterization of cyclooxygenase-2 (COX-2) during tumorigenesis in human epithelial cancers: evidence for potential clinical utility of COX-2 inhibitors in epithelial cancers. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 2002;66: 13-8.
- [0236] 48. Soslow RA, Dannenberg AJ, Rush D, et al. COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors. *Cancer* 2000;89:2637-45.
- [0237] 49. Pai R, Soreghan B, Szabo IL, Pavelka M, Baatar D, Tarnawski AS. Prostaglandin E2transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat Med* 2002;8:289-93.
- [0238] 50. McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. *Oncogene* 2007;26:31 13-21.
- [0239] 51. Richards JA, Petrel TA, Brueggemeier RW. Signaling pathways regulating aromatase and cyclooxygenases in normal and malignant breast cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;80:203-12.
- [0240] 52. Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, et al. Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins, and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:657-62.
- [0241] 53. Prossnitz ER, Ye RD. The N-formyl peptide receptor: a model for the study of chemoattractant receptor structure and function. *Pharmacol Ther* 1997;74:73-102.
- [0242] 54. Babbin BA, Lee WY, Parkos CA, et al. Annexin I regulates SKCO-15 cell invasion by signaling

- through formyl peptide receptors. *J Biol Chem* 2006;281 : 19588-99.
- [0243] 55. Rescher U, Danielczyk A, Markoff A, Gerke V. Functional activation of the formyl peptide receptor by a new endogenous ligand in human lung A549 cells. *J Immunol* 2002; 169: 1500-4.
- [0244] 56. Su SB, Gong W, Gao JL, et al. A seven-transmembrane, G protein-coupled receptor, FPRL1, mediates the chemotactic activity of serum amyloid A for human phagocytic cells. *J Exp Med* 1999;189:395-402.
- [0245] 57. Biswas DK, Martin KJ, McAlister C, et al. Apoptosis caused by chemotherapeutic inhibition of nuclear factor- κ B activation. *Cancer Res* 2003;63:290-5.
- [0246] 58. El Kebir D, Jozsef L, Khreiss T, et al. Aspirin-triggered lipoxins override the apoptosis-delaying action of serum amyloid A in human neutrophils: a novel mechanism for resolution of inflammation. *J Immunol* 2007;179:616-22.
- [0247] 59. Lee HY, Kim MK, Park KS, et al. Serum amyloid A induces contrary immune responses via formyl peptide receptor-like 1 in human monocytes. *Mol Pharmacol* 2006;70:241-8.
- [0248] 60. Lee MS, Yoo SA, Cho CS, Suh PG, Kim WU, Ryu SH. Serum amyloid A binding to formyl peptide receptor-like 1 induces synovial hyperplasia and angiogenesis. *J Immunol* 2006;177:5585-94.
- [0249] 61. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT, Xu S, Hobbs HH, Krieger M. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science* 1996;271 :518-20.
- [0250] 62. van der Westhuyzen DR, Cai L, de Beer MC, de Beer FC. Serum amyloid A promotes cholesterol efflux mediated by scavenger receptor B-I. *J Biol Chem* 2005;280:35890-5.
- [0251] 63. Baranova IN, Vishnyakova TG, Bocharov AV, et al. Serum amyloid A binding to CLA-1 (CD36 and LIMP-II analogous- 1) mediates serum amyloid A protein-induced activation of ERK1/2 and p38 mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 2005;280:8031-40.
- [0252] 64. Hrzenjak A, Reicher H, Wintersperger A, et al. Inhibition of lung carcinoma cell growth by high density lipoprotein-associated alpha-tocopheryl-succinate. *Cell Mol Life Sci* 2004;61 : 1520-31.
- [0253] 65. Sparvero LJ, Asafu-Adjei D, Kang R, et al. RAGE (Receptor for Advanced Glycation Endproducts), RAGE ligands, and their role in cancer and inflammation. *J Transl Med* 2009;7: 17.
- [0254] 66. Franklin WA. RAGE in lung tumors. *Am J Respir Crit Care Med* 2007;175: 106-7.
- [0255] 67. Cai H, Song C, Endoh I, et al. Serum amyloid A induces monocyte tissue factor. *J Immunol* 2007;178: 1852-60.
- [0256] 68. WangL, Liu Q, Sun Q, Zhang C, Chen T, Cao X. TLR4 signaling in cancer cells promotes chemoattraction of immature dendritic cells via autocrine CCL20. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;366:852-6.
- [0257] 69. Fukata M, Chen A, Vamathevan AS, et al. Toll-like receptor-4 promotes the development of colitis-associated colorectal tumors. *Gastroenterology* 2007;133: 1869-81.
- [0258] 70. He W, Liu Q, Wang L, Chen W, Li N, Cao X. TLR4 signaling promotes immune escape of human lung cancer cells by inducing immunosuppressive cytokines and apoptosis resistance. *Mol Immunol* 2007;44:2850-9.
- [0259] 71. Sandri S, Rodriguez D, Gomes E, Monteiro HP, Russo M, Campa A. Is serum amyloid A an endogenous TLR4 agonist? *J Leukoc Biol* 2008;83 : 1 174-80.
- [0260] 72. Cheng N, He R, Tian J, Ye PP, Ye RD. Cutting edge: TLR2 is a functional receptor for acute-phase serum amyloid A. *J Immunol* 2008;181 :22-6.
- [0261] 73. He RL, Zhou J, Hanson CZ, Chen J, Cheng N, Ye RD. Serum amyloid A induces G-CSF expression and neutrophilia via Toll-like receptor 2. *Blood* 2009;1 13:429-37.

- [0262] 74. Westra WH. Early glandular neoplasia of the lung. *Respir Res* 2000; 1 : 163-9.
- [0263] 75. Tang X, Shigematsu H, Bekele BN, et al. EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res* 2005;65:7568-72.
- [0264] 76. Medema RH, Bos JL. The role of p21ras in receptor tyrosine kinase signaling. *Crit Rev Oncog* 1993;4:615-61.
- [0265] 77. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
- [0266] 78. Shao R, Karunagaran D, Zhou BP, et al. Inhibition of nuclear factor- κ B activity is involved in E1A-mediated sensitization of radiation-induced apoptosis. *J Biol Chem* 1997;272:32739-42.
- [0267] 79. Yamagishi N, Miyakoshi J, Takebe H. Enhanced radiosensitivity by inhibition of nuclear factor κ B activation in human malignant glioma cells. *Int J Radiat Biol* 1997;72: 157-62.
- [0268] 80. Luo JL, Kamata H, Karin M. The anti-death machinery in IKK/NF- κ B signaling. *J Clin Immunol* 2005;25:541-50.
- [0269] 81. Brach MA, Hass R, Sherman ML, Gunji H, Weichselbaum R, Kufe D. Ionizing radiation induces expression and binding activity of the nuclear factor κ B. *J Clin Invest* 1991 ;88:691-5.
- [0270] 82. Jones DR, Broad RM, Madrid LV, Baldwin AS, Jr., Mayo MW. Inhibition of NF- κ B sensitizes non-small cell lung cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Ann Thorac Surg* 2000;70:930-6; discussion 6-7.
- [0271] 83. Gazdar AF. Personalized Medicine and Inhibition of EGFR Signaling in Lung Cancer. *N Engl J Med* 2009.
- [0272] 84. Lynch TJ, Jr., Blumenschein GR, Jr., Engelman JA, et al. Summary statement novel agents in the treatment of lung cancer: Fifth Cambridge Conference assessing opportunities for combination therapy. *J Thorac Oncol* 2008;3:S 107-12.
- [0273] 85. Jones HE, Goddard L, Gee JM, et al. Insulin-like growth factor-I receptor signalling and acquired resistance to gefitinib (ZD1839; Iressa) in human breast and prostate cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2004; 11 :793-814.
- [0274] 86. Engelman JA, Janne PA. Mechanisms of acquired resistance to epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:2895-9.
- [0275] 87. Huang M, Stolina M, Sharma S, et al. Non-small cell lung cancer cyclooxygenase-2-dependent regulation of cytokine balance in lymphocytes and macrophages: up-regulation of interleukin 10 and down-regulation of interleukin 12 production. *Cancer Res* 1998;58: 1208-16.
- [0276] 88. Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res* 1998;58:3761-4.
- [0277] 89. Krysan K, Reckamp L, Dalwadi H, et al. Prostaglandin E2 activates mitogen-activated protein kinase/Erk pathway signaling and cell proliferation in non-small cell lung cancer cells in an epidermal growth factor receptor-independent manner. *Cancer Res* 2005;65:6275-81.
- [0278] 90. Krysan K, Reckamp KL, Sharma S, Dubinett SM. The potential and rationale for COX-2 inhibitors in lung cancer. *Anticancer Agents Med Chem* 2006;6:209-20.
- [0279] 91. Reckamp KL, Gardner BK, Figlin RA, et al. Tumor response to combination celecoxib and erlotinib therapy in non-small cell lung cancer is associated with a low baseline matrix metalloproteinase-9 and a decline in serum-soluble E-cadherin. *J Thorac Oncol* 2008;3: 17-24.
- [0280] 92. Gadgeel SM, Ruckdeschel JC, Heath EI, Heilbrun LK, Venkatramamoorthy R, Wozniak A. Phase II study of gefitinib, an epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor (EGFR-TKI), and celecoxib, a cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor, in patients with platinum refractory non-small cell

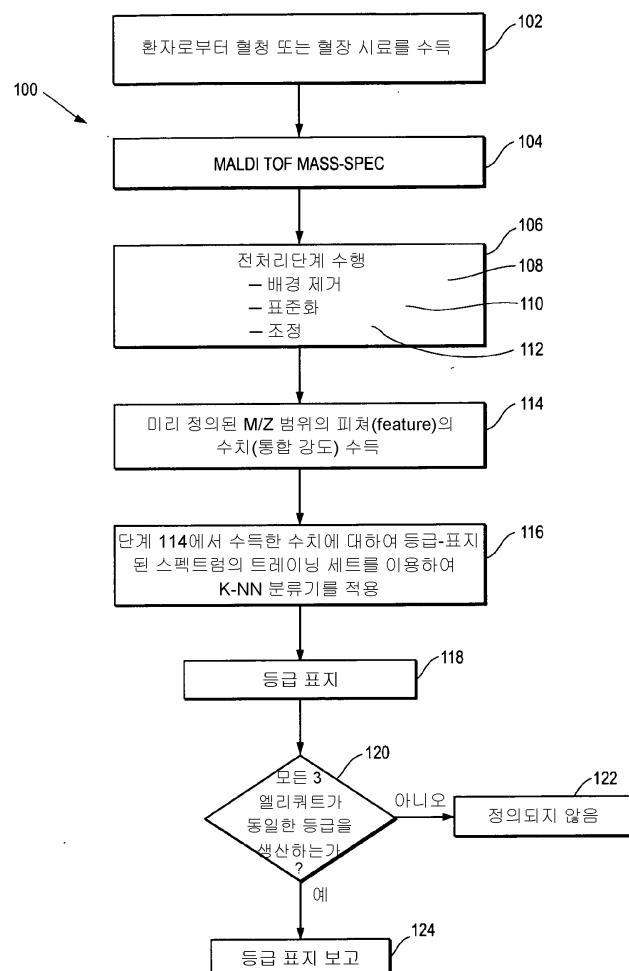
lung cancer (NSCLC). J Thorac Oncol 2007;2:299-305.

[0281]

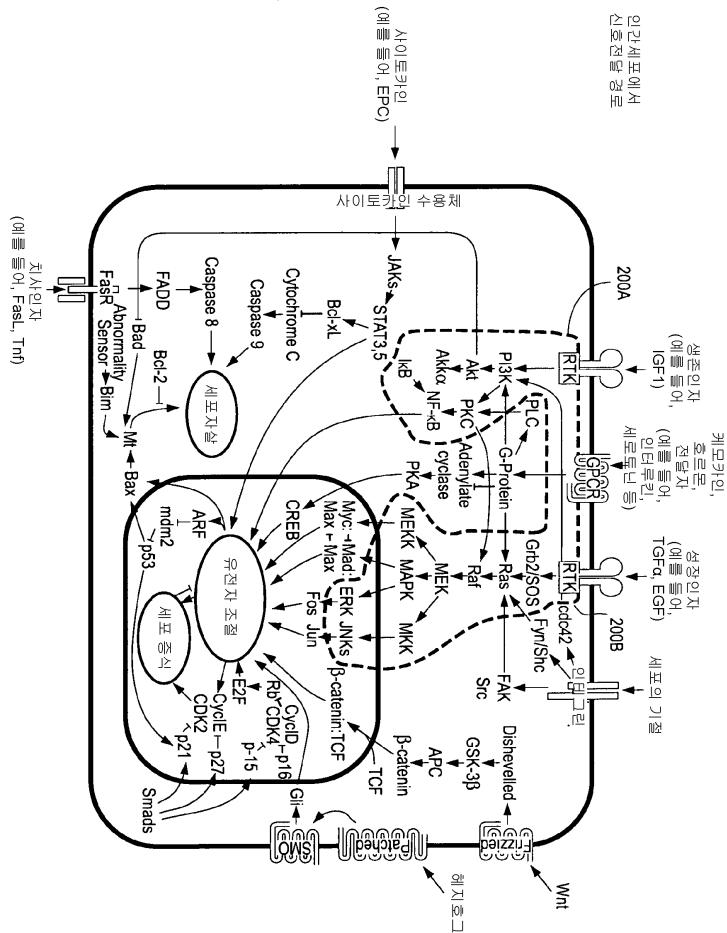
93. O'Byrne KJ, Danson S, Dunlop D, et al. Combination therapy with gefitinib and rofecoxib in patients with platinum-pretreated relapsed non small-cell lung cancer. J Clin Oncol 2007;25:3266-73.

도면

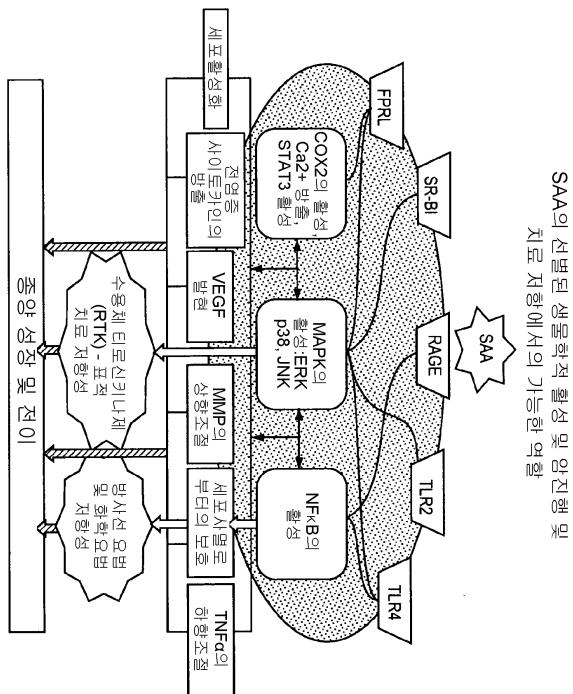
도면1



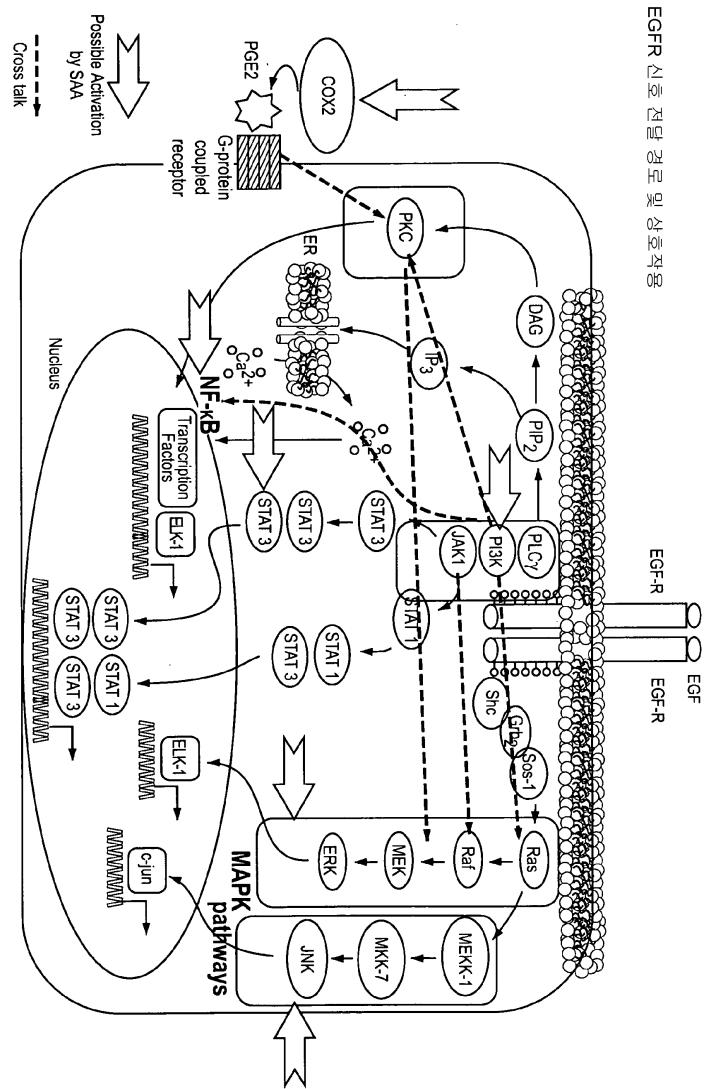
도면2



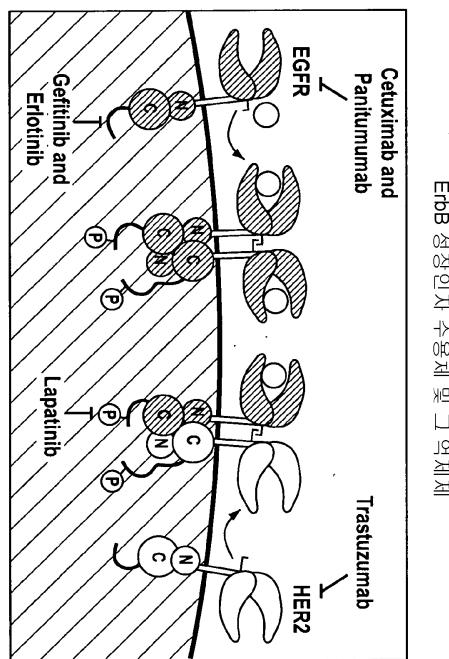
도면3



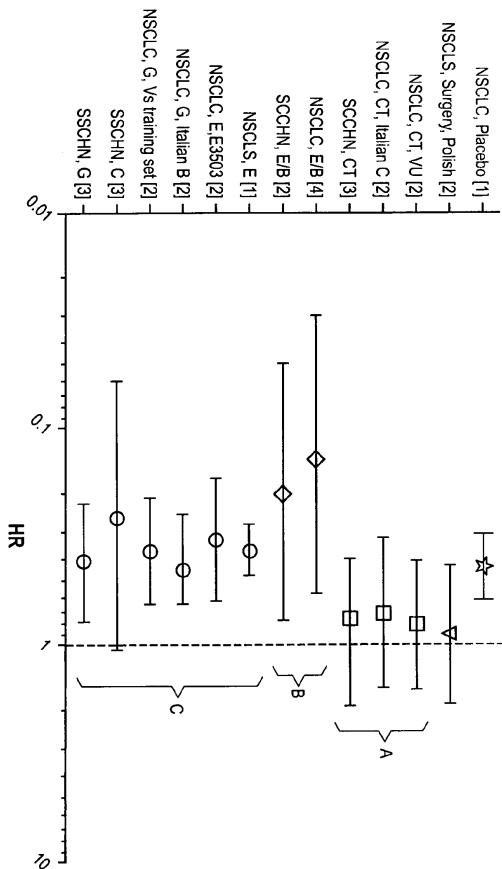
도면4



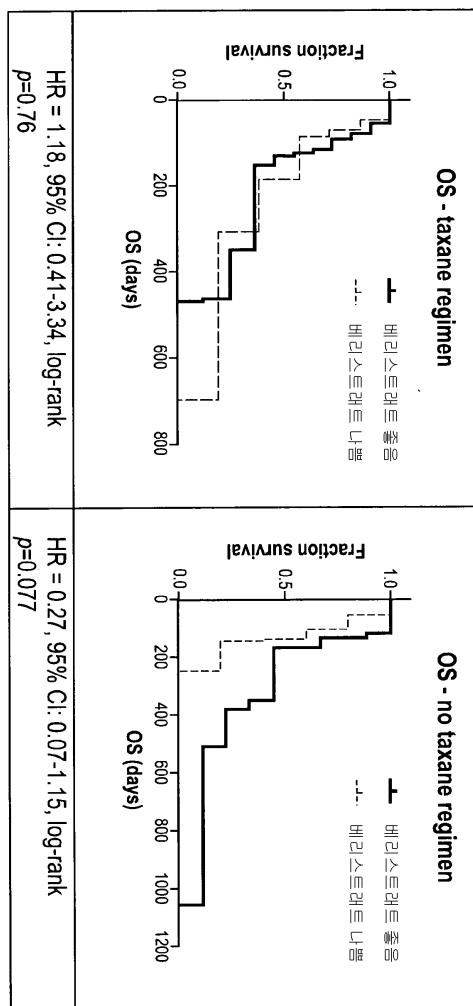
도면5



도면6



도면7



상이한 화학요법 치료를 받은 환자들에 대한 베리스트래트에 의한 OS의 Kaplan-Meier plots

도면8

