



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0104419
(43) 공개일자 2014년08월28일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12Q 1/68 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 출원번호 10-2014-7014013
- (22) 출원일자(국제) 2012년11월23일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2014년05월23일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2012/073535
- (87) 국제공개번호 WO 2013/076282
국제공개일자 2013년05월30일
- (30) 우선권주장
11306568.4 2011년11월25일
유럽특허청(EPO)(EP)
12306042.8 2012년08월31일
유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
인테그라겐
프랑스, 에프-91000 에브리, 제나베니르 8, 5 루
헨리 테스브루에 레스, 제노폴 캠퍼스 1
아시스詈스 퍼블리끄-오뻬또 드 빠리
프랑스 에프-75004 빠리 아브뉘 빅토리아 3
(뒷면에 계속)
- (72) 발명자
리오 프리오, 토마스
프랑스, 에프-75005 파리, 38 루 데 라 몽타뉴 생
트 쥬느비에브
로랑 - 푸이그, 피에르
프랑스, 에프-92190 뢰동, 36 루 르낭
임베우드, 산드린
프랑스, 에프-94400 비트리 수르 센, 150 루 루이
스 아글라에 크리트

- (74) 대리인
손민

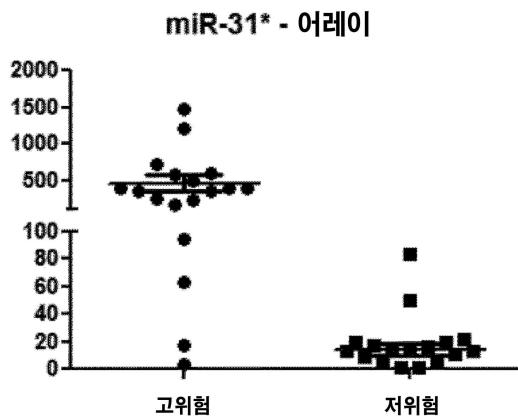
전체 청구항 수 : 총 30 항

(54) 발명의 명칭 EGFR 억제제를 사용한 치료에 대한 반응을 예측하는 방법

(57) 요약

본 발명은, 암 환자의 시료에서 hsa-miR-31-3p miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암 환자가 상피 성장 인자 수용체(EGFR)에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하기 위한 시험관내 방법에 관한 것이다. 본 발명은 또한 상기 EGFR 억제제에 반응할 것으로 예측된 환자에서 EGFR 억제제의 치료학적 용도에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(71) 출원인

위니베르시떼 파리 데카르트

프랑스 애프-75006 파리 뤼 드 레꼴 드 메드신 12

쌩뜨레 나티오날 데 라 르세르쉬 생띠끄 (씨. 엔.
알. 에스)

프랑스 애프-75016 파리 뤼 미셸 엔지 3

인스티튜트 내셔널 드 라 쌘테 에 드 라 리셰르셰
메디칼르 (인 셈)

프랑스, 파리 75013, 뤼에 드 톨비아크 101

특허청구의 범위

청구항 1

암 환자의 시료에서 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암 환자가 상피 성장 인자 수용체(EGFR)에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하기 위한 시험관내 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 환자가 KRAS 야생형 암을 갖는 것인, 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 환자가 결장직장, 폐, 유방, 난소, 자궁내막, 갑상선, 비인두, 전립선, 두경부, 간, 췌장, 신장, 방광 및 뇌로부터 선택된 암을 앓고 있는 것인, 방법.

청구항 4

제3항에 있어서, 암이 결장직장암, 특히 전이성 결장직장암인 것인, 방법.

청구항 5

제3항에 있어서, 암이 유방암, 특히 트리플 네가티브 유방암인 것인, 방법.

청구항 6

제3항에 있어서, 암이 폐암, 특히 비소세포 폐암(NSCLC)인 것인, 방법.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, EGFR 억제제가 항-EGFR 항체, 특히 세툭시맙 또는 파니투무맙인 것인, 방법.

청구항 8

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, EGFR 억제제가 티로신 키나제 EGFR 억제제, 특히 애를로티닙, 게피니닙 또는 라파티닙인 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항 중의 어느 한 항에 있어서, 시료가 종양 조직 생검 또는 종양 외과적 절제의 전체 또는 일부인 것인, 방법.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중의 어느 한 항에 있어서, miRNA의 발현 수준이 정량적 RT-PCR에 의해 측정되는 것인, 방법.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중의 어느 한 항에 있어서, miRNA의 발현 수준이 보다 낮을수록, 환자가 EGFR 억제제 치료에 반응할 가능성이 보다 높은 것인, 방법.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 있어서, miRNA의 발현 수준에 기초하여 예후 점수를 측정하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 상기 예후 점수는 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 나타내는 것인, 방법.

청구항 13

제12항에 있어서, 예후 점수가 하기 수학식에 의한 것인, 방법.

예후 점수 = $a * x + b$,

여기서, x는 환자의 시료에서 측정된 hsa-miR-31-3p의 기록된(logged) 발현 수준이고,

a 및 b는 기준 시료의 풀에 기초하여 미리 측정한 매개변수이고,

환자는, 그/그녀의 예후 점수가 역치 c 이하인 경우에 EGFR 억제제에 반응하는 것으로 예후되고, 이의 예후 점수가 역치 c보다 큰 경우에는 EGFR 억제제에 반응하지 않는 것으로 예측되며, 여기서 c 값은 기준 시료의 동일한 풀에 기초하여 측정된 것임.

청구항 14

제13항에 있어서, a, b 및 c가 바람직하게는 하기 범위 내인 것인, 방법:

- a : [0.1; 0.25], 바람직하게는 [0.17; 0.21];
- b : [-2; -0.5], 바람직하게는 [-1.8; -0.6], 바람직하게는 [-1.5; -0.7]; 및
- c : [-0.11; -0.01], 바람직하게는 [-0.10; -0.01].

청구항 15

제1항 내지 제11항 중의 어느 한 항에 있어서, 상기 환자의 BRAF 상태를 측정하고, hsa-miR-31-3p의 발현 수준 및 BRAF 상태를 고려하여 복합 점수를 계산하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 상기 복합 점수는 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 나타내는 것인, 방법.

청구항 16

a) 암 환자의 시료에서 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 시약, 및

b) 상기 환자의 BRAF 상태를 측정하기 위한 시약을 포함하거나 이들로 이루어지는,

암 환자가 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 측정하기 위한 키트.

청구항 17

제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항에 따르는 방법에 의해 반응할 가능성이 있는 것으로 분류된, 암을 앓고 있는 환자를 치료하는데 사용하기 위한 EGFR 억제제.

청구항 18

제17항에 있어서, 결장직장암, 보다 특히 전이성 결장직장암이 발병된 환자를 치료하는데 사용하기 위한 EGFR 억제제.

청구항 19

제17항에 있어서, 유방암, 특히 트리플 네가티브 유방암이 발병된 환자를 치료하는데 사용하기 위한 EGFR 억제제.

청구항 20

제17항에 있어서, 폐암, 특히 비소세포 폐암(NSCLC)이 발병된 환자를 치료하는데 사용하기 위한 EGFR 억제제.

청구항 21

제17항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 있어서, EGFR 억제제가 항-EGFR 항체, 특히 세톡시맙 또는 파니투무맙인 것인, 암을 앓고 있는 환자를 치료하는데 사용하기 위한 EGFR 억제제.

청구항 22

제17항 내지 제20항 중의 어느 한 항에 있어서, EGFR 억제제가 티로신 키나제 EGFR 억제제, 특히 에를로티닙,

제페니닙 또는 라파티닙인 것인, 암을 앓고 있는 환자를 치료하는데 사용하기 위한 EGFR 억제제.

청구항 23

(i) 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항의 방법에 의해 측정하는 단계, 및 (ii) 상기 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는 것으로 측정되는 경우에 상기 환자에게 EGFR 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법.

청구항 24

제23항에 있어서, (iii) 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 없는 것으로 측정되는 경우에, 대체 항암 치료를 상기 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함하는, 방법.

청구항 25

제23항 또는 제24항에 있어서, 환자가 결장직장암, 보다 특히 전이성 결장직장암을 앓고 있는, 방법.

청구항 26

제24항에 있어서, 상기 환자가 결장직장암, 보다 특히 전이성 결장직장암을 앓고 있고, 환자에게 투여된 대체 항암 치료가

- a. 유리하게는 FOLFOX 또는 FOLFIRI 화학요법과 조합된 VEGF 억제제, 또는
- b. 임의로 미토마이신 B와 조합된 5-FU로부터 선택되는 것인, 방법.

청구항 27

제23항 또는 제24항에 있어서, 환자가 유방암, 특히 트리플 네가티브 유방암을 앓고 있는 것인, 방법.

청구항 28

제23항 또는 제24항에 있어서, 환자가 폐암, 특히 비소세포 폐암(NSCLC)을 앓고 있는 것인, 방법.

청구항 29

제23항 내지 제28항 중의 어느 한 항에 있어서, EGFR 억제제가 항-EGFR 항체, 특히 세툭시맙 또는 파니투무맙인 것인, 방법.

청구항 30

제23항 내지 제29항 중의 어느 한 항에 있어서, EGFR 억제제가 티로신 키나제 EGFR 억제제, 특히 에를로티닙, 제페티닙 또는 라파티닙인 것인, 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은, 암 치료를 위한 화학요법을 개별화하는 방법, 및 특히 이러한 제제를 사용한 치료 전에 하나 이상의 상피 성장 인자(EGFR) 억제제에 대한 환자의 반응을 평가하는 방법을 제공한다.

배경기술

[0002] 프로테오좀은 활성화된 세포 막 성장 인자 수용체에 의해 유도된 조절 형질도입 단백질의 대사회전에 중요한 역할을 담당한다. 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 경로는 인간 상피 암의 발달 및 진행에 중요하다. EGFR 억제제와의 조합 치료는, Akt의 보다 효율적 및 지속적 억제를 통해 기능적 EGFR-의존성 자가분비 성장 경로를 갖는 상이한 인간 암 세포에서 상승적 성장 억제 및 프로-아폽토시스(pro-apoptotic) 활성을 갖는다.

[0003] EGFR 억제제는 비-소세포 폐암(NSCLC), 두경부암, 결장직장암 및 Her2-포지티브 유방암을 포함하는 다양한 암의 치료를 위해 승인되거나 시험되어 왔고, 점차 표준 치료에 추가되고 있다. EGFR 표적의 세포내 티로신 키나제

도메인 또는 세포외 도메인을 표적화할 수 있는 EGFR 억제제는 일반적으로 낮은 모집단 반응율에 의해 시달리어, 불필요한 약물 독성 및 비용 뿐만 아니라 다수의 경우에 비효과적 또는 비-최적 화학요법을 유도한다. 예를 들면, 세투시맵(EGFR의 세포외 도메인을 표적화하는 키메라 모노클로날 항체)를 사용한 결장직장암의 치료를 위한 보고된 임상 반응율은 약 11%이고[참조: Cunningham et al, N Engl Med 2004;351: 337-45], 에를로티닙을 사용한 NSCLC의 치료를 위한 보고된 임상 반응은 약 8.9%이다[참조: Shepherd F A, et al, N Engl J Med 2005; 353:123-132]. 특히, 내성이 KRAS 돌연변이의 경우에 관찰되었다. 결장직장암에서, KRAS 돌연변이는 EGFR 항체에 대한 내성과 명백하게 관련되기 때문에[참조: Lievre et al, Cancer Res. 2006 66(8):3992-5], 주요 과제 중의 하나는 이러한 치료에 대한 반응의 결여를 예측할 수 있는 다른 마커를 비돌연변이된 KRAS 환자에서 동정하는 것이다. 이들 중에서, 암 유전자의 증폭 또는 활성화 돌연변이 및 상기한 종양 억제 유전자의 불활성화 돌연변이는, EGFR 하류 포스포단백질 발현의 측정에 의해 평가된 EGFR 하류 신호전달 경로의 활성화 수준과 같이 관련 후보이다.

[0004] 폐암에서는 3개 환자 그룹이 부상하고 있다: 하나는 EGFR 티로신 키나제 억제제(EGFR TKI)의 사용이 결과를 개선시키는 것으로 증명된 EGFR 돌연변이된 종양을 갖는 환자를 계산하고, 둘째는 항-EGFR 치료가 아마도 양호한 대안이 아니라는 KRAS 돌연변이된 종양을 갖는 환자를 계산하고, 셋째는 반응이 예측될 수 없는 비-EGFR 및 비-KRAS 돌연변이된 종양을 계산한다. 비-돌연변이된 종양 그룹에서 약물 반응에 결합된 어떠한 마커도 이제까지 유용한 것으로 증명되지 않았다.

[0005] 따라서, 환자 치료를 보다 개별화시키기 위해, 이러한 제제를 사용한 치료 전에 EGFR 억제제에 대한 환자 반응을 예측할 필요가 있다. 다양한 항암 치료에 대한 감수성 또는 내성이 있어서 마이크로 RNA(miRNA)의 관여와 관련하여 선행 기술에는 다수의 문헌이 있다. 그러나, 대부분의 경우에, 연구는 부분적 또는 불완전하고, 실제로는 치료에 대한 임상 반응 또는 비-반응의 진정한 예측을 가능하게 하지 않는다. 실제로, 다수의 경우에, 연구는 시험관 내에서, 특정 치료에 감수성 또는 내성이 세포주에서 또는 환자 종양으로부터 분리된 종양 세포에서 miRNA 발현의 분석으로 제한된다. 또한, 다수의 연구에서, 세포 또는 환자의 2개 모집단 사이의 발현 수준의 차이가 나타나지만, 새로운 환자에서 반응 또는 비-반응을 실제로 예측하게 하는 어떠한 역치 또는 점수도 제공되지 않는다. 이는 다수의 연구가 임상 설정에서 수득된 데이터를 결여하는 제1 단점과 부분적으로 관련되어 있다. 더욱이, 임상 설정에서 수득된 일부 데이터가 제시되는 경우에도, 이들 데이터는 대부분 단지 소급적이고, 새로운 코호트에서 예측 방법을 실증하는 데이터는 종종 부족하다.

[0006] 일례로서, 국제공개공보 제WO 2010/121238호는, 시험관 내에서 EGFR 티로신 키나제 억제제 배양물에 대해 감수성 또는 내성이 있는 폐암 세포주에서 miRNA 발현의 분석을 기재한다. 임상 설정에서 수득된 어떠한 데이터도 제시되어 있지 않다.

[0007] 국제공개공보 제WO 2009/080437호는 항암 치료에 대한 반응 또는 비-반응을 예측하는 방법을 광범위하게 청구한다. 그러나, 국제공개공보 제WO 2009/080437호에 제시된 데이터는 다양한 종래의 화학요법 치료로 한정되고, EGFR 억제제에 관한 어떠한 데이터도 제공되지 않는다(항-EGFR 모노클로날 항체에 대해서도 EGFR 티로신 키나제 억제제에 대해서도 없음). 또한, 기타 화학요법 분자에 대해 제시된 데이터는 시험관 내에서 배양된 환자의 종양으로부터 단리된 종양 세포에서 mRNA의 발현에 기초하여 수득되었다. 임상 설정으로 수득된 어떠한 데이터도 제시되어 있지 않다.

[0008] 유사하게는, 국제공개공보 제WO 2011/135459호는 항암 치료에 대한 반응 또는 비-반응을 예측하는 방법을 광범위하게 청구하지만, 당해 문헌에 제공된 데이터는 시험관 내에서 다양한 항암제에 대한 암 세포주의 감수성 또는 내성의 예측으로 제한된다. 또한, 임상 설정으로 수득된 어떠한 데이터도 제시되어 있지 않고, 따라서 miRNA 발현 수준과 환자의 임상 반응 또는 생존 사이의 상관관계가 입증되지 않는다.

[0009] 라구사(Ragusa) 등[참조: Ragusa M. et al. Mol Cancer Ther. 2010 Dec;9(12):3396-409]은 세투시맵 치료에 대해 감수성 또는 내성이 있는 것으로 공지된 결장직장암 세포주에서 세투시맵을 사용한 치료 후에 miRNA의 발현 수준을 분석했다. 2개의 miRNA는 KRAS 야생형 대 KRAS 돌연변이된 환자에서 상이하게 발현되는 것으로 나타났다. 그러나, KRAS 야생형 대 KRAS 돌연변이된 환자에서 상이한 발현은 KRAS 야생형 환자에서 EGFR 억제제에 대한 반응을 예측하는 것을 허용하지 않는다. 또한, 다수의 기타 연구에서, 환자에서 EGFR 억제제에 대한 반응을 독립적으로 예측하는 이들 miRNA의 발현 수준의 능력을 나타내는 임상 설정으로 수득된 데이터는 제시되어 있지 않다.

[0010] 하타케야마(Hatakeyama) 등[참조: Hatakeyama H. et al. PLoS One. 2010 Sep 13;5(9):e12702]은, 두경부의 편평 세포암으로부터 유래된 2개 세포주, 즉 시험관내에서 세투시맵 치료 후에, 세투시맵에 감수성인 세포주 및

세특시맵에 내성인 다른 세포주에서 활성화된 단백질의 비교를 개시한다. EGFR 리간드(HB-EGF 또는 TGFA)는 세특시맵 내성 세포주에서 보다 높은 양으로 발견된다. 이러한 단백질은 miR-22에 의해 조절된다. 또한, 이러한 연구에서, 환자에서 세특시맵에 대한 반응을 예측하는 miR-22 발현 수준의 능력을 나타내는 임상 설정으로 수득된 데이터는 제시되어 있지 않다.

[0011] 따라서, 다수의 연구는, 특정 miRNA의 발현 수준이 치료에 대해 임상적으로 반응하는 환자(생존율의 증가를 가져오는)와 진행성 질환 및 생존율의 감소를 갖는 환자를 구별하는 것을 실제로 가능하게 하는 것을 나타내는 임상 데이터가 부족하다. 시험관 내에서 세포주 또는 종양 세포에 대한 데이터는 임상 설정에서 반응 또는 비-반응의 예측을 위한 추가의 분석을 뒷받침하는 것으로 고려되지만, 환자에서 임상 반응의 진정한 예측 방법을 제공하는 것으로 고려되기에 충분하지 않음이 명백하다. 이는, 상기 언급된 문헌에서 시험관 내에서 감수성 대내성 세포주 또는 종양 세포에서 상이하게 발현되는 것으로 밝혀진 miRNA가 본원에서 분석된 임상 데이터에서 임상 반응(진행성 무생존 또는 전체 생존)과 상당히 상관되는 것으로 나타나지 않은 사실에 의해 명백하게 입증된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 따라서, 이러한 치료가 몇몇 옵션 중의 하나인 환자에서 EGFR 억제제에 대한 반응을 예측하기 위한 진정한 검증 방법에 대한 필요성이 존재한다. 본 발명은 이러한 필요성에 대한 방안을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은, 암 환자의 시료에서 hsa-miR-31-3p(이전명칭 hsa-miR-31*로 명명됨, 서열번호 1) miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 암 환자가 상피 성장 인자 수용체(EGFR)에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하기 위한 시험관내 방법을 제공한다.

[0014] 바람직하게는, 환자는 KRAS 야생형 암을 갖는다.

[0015] 암은 바람직하게는 결장직장암, 특히 전이성 결장직장암이다.

[0016] 가장 바람직한 실시양태에서, 본 발명은, 암 환자의 종양 조직 시료에서 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA의 발현 수준을 측정하는 단계를 포함하는, 전이성 결장직장암을 갖는 환자가 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제, 예를 들면, 세특시맵 또는 파니투무맵에 반응할 가능성이 있는지 여부를 예측하기 위한 시험관내 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한, 암 환자의 시료에서 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 시약 및 상기 환자의 BRAF 상태를 측정하기 위한 시약을 포함하거나 이들로 이루어지는, 암 환자가 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 측정하는 키트를 제공한다.

[0018] 본 발명은 추가로, 본 발명에 따르는 방법에 의해, 반응할 가능성이 있는 것으로 분류되는 암을 앓고 있는 환자의 치료에 사용하기 위한 EGFR 억제제에 관한 것이다.

[0019] 본 발명은 또한, (i) 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 제1항 내지 제15항 중의 어느 한 항의 방법에 의해 측정하는 단계, 및 (ii) 상기 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는 것으로 측정되는 경우에 상기 환자에게 EGFR 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 어레이에 의해 정량화된 hsa-miR-31-3p의 발현 수준을 나타내는 그래프이다(n=43; 평균 ± SEM). 분자 중량이 제시되어 있다. P<0.0001.

도 2A는 정량적 RT-PCR에 의해 정량화된 발현 수준을 나타내는 그래프이다(n=23, 평균 ± SEM). 분자 중량이 제

시되어 있다. $P<0.0001$. 도 2B는, 예측 값을 최적화한 발현 역치를 사용하여, hsa-miR-31-3p의 높은 발현 ($n=12$) 또는 낮은 발현($n=11$)에 의해 그룹화한, 결장직장암을 갖는 비-돌연변이된 KRAS 환자에 대한 생존율의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 모델을 나타낸다. 이러한 콕스 비례 위험 모델에서, $p=0.02$. p -값은, 발현 데이터가 생존율을 예측하는 경우에 가설을 시험한다. 100 순열에 기초하여 로그-랭크(log-ranl) 시험의 순열 p -값: $p=0.08$.

도 3은, 예측 값을 최적화한 발현 역치를 사용하여, hsa-miR-31-3p의 높은 발현($n=17$) 또는 낮은 발현($n=16$)에 의해 그룹화한, 결장직장암을 갖는 비-돌연변이된 KRAS 환자에 대한 생존율의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 모델을 나타낸다. 이러한 콕스 비례 위험 모델에서, $p=0.016$.

도 4A 내지 4C는, 예측 값을 최적화한 발현 역치를 사용하여, hsa-miR-31-3p의 높은 발현 또는 낮은 발현에 의해 그룹화한, 결장직장암을 갖는 비-돌연변이된 KRAS 환자에 대한 진행 무생존의 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 모델을 나타낸다. 도 4A: 그룹 2+3(38명 환자), 도 4B: 그룹 2(세특시맵으로 치료한 19명 환자), 도 4C: 그룹 3(파니투무맵으로 치료한 19명 환자).

도 5는, hsa-miR31-3p 발현 수준 및 관련 예후에 기초하여 분리된 KRAS 돌연변이된 환자(KRASM) 및 2개의 KRAS 야생형 환자 모집단에 대한 생존율의 카플란-마이어 모델이다(양호: hsa-miR31-3p 발현에 기초한 양호한 예후 및 불량: hsa-miR31-3p 발현에 기초한 불량한 예후).

도 6A: 진행의 가능성(PFS)을 예측하기 위해 BRAF 돌연변이 상태 및 로그.(log.) miR 발현 인자를 사용한 다변량 논리 회귀 모델을 개발하기 위해 수행된 모델-구축 분석. 도 6B: BRAF 돌연변이 상태(brafm, NM: 비돌연변이됨; M: 돌연변이됨) 및 로그. miR 발현(miR)에 기초하여 구축된 생존 위험 진행을 예측하기 위한 PFS에 대한 노모그램(nomogram). 각 환자의 위험 예측을 개별화하기 위해, 포인트는 포인트 스케일로부터 상응하는 포인트를 선택함으로써 변수의 각각에 할당되어 있다. 예를 들면, 돌연변이된 BRAF를 갖는 환자는 8포인트를 획득할 것이고; 로그. miR=0.5를 갖는 환자는 12포인트를 획득할 것이다. 이어서, 포인트의 합계는, 예측된 진행 속도에 상응하는 전체 포인트 스케일에 기초하여 플로팅된다. 150 부트스트랩 실행 후, PFS를 위한 노모그램의 일치 지수는 0.75였다.

도 7A: 진행 가능성(PFS)을 예측하기 위해 BRAF 돌연변이 상태, 연령, 성별 및 로그. miR 발현 인자를 사용한 다변량 논리 회귀 모델을 개발하기 위해 수행된 모델-구축 분석. 도 7B: BRAF 돌연변이 상태(brafm, NM: 비돌연변이됨; M: 돌연변이됨), 연령, 성별(성별, 1: 남성, 2: 여성) 및 로그. miR 발현(miR)에 기초하여 구축된 생존 위험 진행을 예측하기 위한 PFS에 대한 노모그램. 각 환자의 위험 예측을 개별화하기 위해, 포인트는 포인트 스케일로부터 상응하는 포인트를 선택함으로써 변수의 각각에 할당되어 있다. 예를 들면, 돌연변이된 BRAF를 갖는 환자는 17포인트를 획득할 것이고; 성별=2를 갖는 환자는 22포인트를 획득할 것이고; 환자는 25년에 걸쳐 10년 까지 1포인트를 획득할 것이고; 로그. miR=0.5를 갖는 환자는 12포인트를 획득할 것이다. 이어서, 포인트의 합계는, 예측된 진행 속도에 상응하는 전체 포인트 스케일에 기초하여 플로팅된다. 150 부트스트랩 실행 후, PFS를 위한 노모그램의 일치 지수는 0.77였다.

도 8은 FFPE 시료 대 동결 시료에서 miR31-3p의 발현 수준의 산포도이다. 선형 회귀 분석은, 직선으로 나타낼 수 있고 $y = 40.439^* x - 397.3$ 으로 수학적으로 계산될 수 있는, 두 변수 사이의 밀접한 관계를 나타낸다. 원은 개개 시료를 나타내고, 라인은 선형 회귀이다.

도 9는, hsa-miR-31-3p의 "동결-예상된"(FE) 발현 수준으로 수행된 진행 가능성(PFS)을 예측하기 위한 논리적 회귀 모델이다. 곡선은 miR의 발현 수준(로그 베이스 10)의 4분위 분포에 상응한다. 회색은 95% 신뢰 구간을 형성한다.

도 10은, BRAF 돌연변이 상태 및 hsa-miR31-3p의 로그 발현 둘 다를 사용하여 실시예 2에서 상술한 PFS 기초 노모그램으로부터 계산한 "진행 위험" 점수로 수행된 진행 가능성(PFS)을 예측하기 위한 논리적 회귀 모델이다. 곡선 상의 숫자는 점수에 상응한다. 회색은 95% 신뢰 구간을 형성한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 정의

[0022] "환자"는 임의의 포유동물, 바람직하게는, 이의 연령 및 성별에 상관 없이, 인간일 수 있다. 환자는 암을 앓을 수 있다. 환자는 임의의 화학요법제에 의해 이미 치료를 받았거나, 아직 치료되지 않을 수 있다.

[0023]

암은 바람직하게는 EGFR을 통한 신호전달 경로가 관여하는 암이다. 특히, 예를 들면, 직장결장암, 폐암, 유방암, 난소암, 자궁내막암, 갑상선암, 비인두암, 전립선암, 두경부암, 신장암, 췌장암, 방광암 또는 뇌암일 수 있다[참조: Ciardello F et al. N Engl J Med. 2008 Mar 13;358(11):1160-74; Wheeler DL et al. Nat Rev Clin Oncol. 2010 September , 7(9): 493-507; Zeineldin R et al. J Oncol. 2010;2010:414676; Albitar L et al. Mol Cancer 2010;9:166; Leslie KK et al. Gynecol Oncol. 2012 Nov;127(2):345-50; Mimeault M et al. PLoS One. 2012;7(2):e31919; Liebner DA et al. Ther Adv Endocrinol Metab. 2011 Oct;2(5): 173-95; Leboulleux S et al. Lancet Oncol. 2012 Sep; 13(9):897 -905; Pan J et al. Head Neck. 2012 Sep 13; Chan SL et al. Expert Opin Ther Targets. 2012 Mar;16 Suppl 1:S63-8; Chu H et al. Mutagenesis. 2012 Oct 15; Li Y et al. Oncol Rep. 2010 Oct;24(4):1019-28; Thomasson M et al. Br J Cancer 2003, 89:1285-1289; Thomasson M et al. BMC Res Notes. 2012 May 3;5:216]. 특정 실시양태에서, 종양은 고형 조직 종양이고/이거나 성질상 상피이다. 예를 들면, 환자는 결장직장암 환자, Her2-포지티브 또는 Her2-네가티브(특히 트리플 네가티브, 즉 Her2-네가티브, 에스트로겐 수용체 네가티브 및 프로게스테론 수용체 네가티브) 유방암 환자, 비소세포 폐암(NSCLC) 환자, 두경부암 환자(특히, 두경부 환자의 편평 세포암), 췌장암 환자, 또는 자궁내막암 환자일 수 있다. 보다 특히, 환자는 결장직장암 환자, Her2-포지티브 또는 Her2-네가티브(특히, 트리플 네가티브) 유방암 환자, 폐암(특히 NSCLC) 환자, 두경부암 환자(특히, 두경부 환자의 편평 세포암) 또는 췌장암 환자일 수 있다.

[0024]

바람직한 실시양태에서, 암은 결장직장암이고, 보다 바람직하게는 암은 전이성 결장직장암이다. 실제로, 문헌 [참조: Mosakhani et al-2012 (Mosakhani N. et al. Cancer Genet. 2012 Oct 22. doi:pii: S221 0-7762(12)00229-3. 10.1016/j.cancergen.2012.08.003]에 기재된 바와 같은 것들 뿐만 아니라 실시예 1 내지 3에 제시된 데이터는, hsa-miR-31-3p 발현 수준이 결장직장암의 치료에서 EGFR 억제제(및 특히 항-EGFR 모노클로날 항체, 예를 들면, 세톡시맙 및 파니투무맙)에 대한 반응의 예측인자로서 사용될 수 있음을 명백히 나타낸다.

[0025]

EGFR 신호전달 경로가 관여하는 것으로 공지된 암에서 수득한 이들 결과는 hsa-miR-31-3p 발현 수준이, EGFR 신호전달 경로가 관여하는 것으로 공지되어 있는 임의의 기타 암, 예를 들면, 폐암, 난소암, 자궁내막암, 갑상선암, 비인두암, 전립선암, 두경부암, 신장암, 췌장암, 방광암 또는 뇌암에서 EGFR 억제제(및 특히 항-EGFR 모노클로날 항체, 예를 들면, 세톡시맙 및 파니투무맙)에 대한 반응 예측인자로서 사용될 수 있음을 명백하게 시사한다. 이는, hsa-miR-31-3p가 일부 이들 기타 암에서 과발현되는 것으로 밝혀졌기 때문에, 특히 그러하다[참조: Chang KW et al. Oral Oncol. 2012 Jul 30, Xiao W et al. 2012. PLoS ONE 7(6): e38648, and Zhao L. et al. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Nov;44(11):2051-9]. hsa-miR-31-3p는 EGFR 억제제 및 따라서 EGFR 신호전달 경로에 대한 반응과 관련되고 EGFR 신호전달 경로가 관여하는 것으로 공지되어 있는 몇몇 암에서 발현되기 때문에, EGFR 신호전달 경로가 관여하는 것으로 공지되어 있는 임의의 기타 암에서 EGFR 억제제(및 특히 항-EGFR 모노클로날 항체, 예를 들면, 세톡시맙 및 파니투무맙)에 대한 반응의 예측에 유용할 것으로 당연히 기대할 수 있다.

[0026]

다른 바람직한 실시양태에서, 암은 Her2-포지티브 또는 Her2-네가티브(특히 트리플 네가티브) 유방암, 바람직하게는 Her2-네가티브(특히 트리플 네가티브) 유방암이다.

[0027]

또 다른 바람직한 실시양태에서, 암은 폐암, 특히 비소세포 폐암(NSCLC)이다.

[0028]

또 다른 바람직한 실시양태에서, 암은 췌장암이다.

[0029]

명백하게는, 예측은 EGFR 억제제 처리와 관련되기 때문에, 환자의 종양은 바람직하게는 EGFR 포지티브이다.

[0030]

바람직하게는, 환자는 KRAS 야생형 종양을 갖고, 즉 환자 종양 중의 KRAS 유전자는 코돈 12, 13(액손 1) 또는 61(액손 3)에서 돌연변이되지 않는다. 달리 말하면, KRAS 유전자는 코돈 12, 13 및 61 상에서 야생형이다.

[0031]

야생형, 즉 비돌연변이된 코돈 12, 13(액손 1) 및 61(액손 3)은 각각 글리신(Gly, 코돈 12), 글리신(Gly, 코돈 13) 및 글루타민(Gln, 코돈 61)에 상응한다. 야생형 기준 KRAS 아미노산 서열은 진뱅크(Genbank) 수탁번호 NP_004976.2(서열번호 2)에서 발견할 수 있다.

[0032]

특히, 환자 종양의 KRAS 유전자는 하기 돌연변이 중의 어느 하나를 나타내지 않는다[참조:Bos. Cancer Res 1989;49:4682-4689; Edkins et al. Cancer Biol Ther. 2006 August ; 5(8): 928-932; Oemiralay et al. Surgical Science, 2012, 3, 111-115]:

Gly12Ser (GGT>AGT)
 Gly12Arg (GGT>CGT)
 Gly12Cys (GGT>TGT)
 Gly12Asp (GGT>GAT)
 Gly12Ala (GGT>GCT)
 Gly12Val (GGT>GTT)
 Gly13Arg (GGC>CGC)
 Gly13Cys (GGC>TGC)
 Gly13Asp (GGC>GAC)
 Gly13Ala (GGC>GCC)
 Gly13Val (GGC>GTC)

[0033]

[0034] 바람직하게는, 환자 종양의 KRAS 유전자는 하기 돌연변이 중의 어느 하나를 또한 나타내지 않는다[참조: Demiralay et al. Surgical Science, 2012, 3, 111-115]:

Gly12Phe (GGT>TTT)
 Gly13Ser (GGC>AGC)

[0035]

[0036] 바람직하게는, 환자 종양의 KRAS 유전자는 하기 돌연변이 중의 어느 하나를 또한 나타내지 않는다[참조: Bos. Cancer Res 1989;49:4682-4689; Tam et al. Clin Cancer Res 2006;12:1647-1653; Edkins et al. Cancer Biol Ther. 2006 August, 5(8): 928-932; Demiralay et al. Surgical Science, 2012, 3, 111-115]:

Gln61His (CAA>CAC)
 Gln61His (CAA>CAT)
 Gln61Arg (CAA>CGA)
 Gln61Leu (CAA>CTA)
 Gln61Glu (CAA>GAA)
 Gln61Lys (CAA>AAA)
 Gln61Pro (CAA>CCA)

[0037]

[0038] 당해 기술분야에 공지된 임의의 방법을 사용하여 환자의 KRAS 상태를 알 수 있다. 예를 들면, 종양 조직을 미세 해부하고, DNA를 파라핀-매립된 조직 블록으로부터 추출했다. KRAS 유전자의 코돈 12, 13 및 61을 덮는 영역은 폴리머라제 연쇄 반응(PCR)을 사용하여 증폭시켰다. 돌연변이 상태는 PCR 프로브를 사용한 대립인자 식별[참조: Laurent-Puig P, et al, J Clin Oncol. 2009, 27(35):5924-30] 또는 파이로시퀀싱 등의 임의의 기타 방법[참조: Ogiro S, et al. J Mol Diagn 2008;7:413-21]에 의해 측정한다.

[0039]

"시료"는, 핵산을 함유하는, 환자로부터 유래하는 임의의 생물학적 시료일 수 있다. 이러한 시료의 예는 유체 (혈액, 혈장, 타액, 뇨, 정액을 포함), 조직, 세포 시료, 기관, 생검 등을 포함한다. 바람직하게는, 시료는 종양 시료, 바람직하게는 종양 조직 생검 또는 종양 절제 수술의 전체 또는 일부이다. 시료는 종래 기술에 따라 수집될 수 있고, 진단을 위해 직접 사용되거나 저장될 수 있다. 종양 시료는 신선하거나, 냉동 또는 파라핀-매립될 수 있다. 일반적으로, 이용가능한 종양 시료는 냉동 또는 파라핀-매립되고, 대부분의 경우는 파라핀-매립된다. 본 발명자들 냉동 및 파라핀-매립 종양 시료를 모두 사용할 수 있다는 것을 보여 주었다.

[0040]

"기준 시료"란, EGFR 억제제 치료에 대한 포지티브 또는 네가티브 반응이 공지되어 있는 환자의 종양 시료(특히 종양 생검 또는 종양 절제 수술의 전체 또는 일부)를 의미한다. 바람직하게는, 기준 시료의 풀은 적어도 하나 (바람직하게는 몇 명, 보다 바람직하게는 적어도 5명, 보다 바람직하게는 적어도 6명, 적어도 7명, 적어도 8명, 적어도 9명, 적어도 10명)의 반응자 환자(들) 및 적어도 한(바람직하게는 몇 명, 보다 바람직하게는 적어도 6명, 적어도 7명, 적어도 8명, 적어도 9명, 적어도 10명)의 비반응자 환자(들)을 포함한다. 기준 시료의 반응자(또한 "포지티브"로서 지칭됨) 및 비반응자(또한 "네가티브"로 지칭됨)의 수가 높을수록, 본 발명에 따르는 예측 방법의 신뢰성은 보다 양호하다.

[0041]

본 발명의 문맥 내에서, 환자는 "반응 가능성"이 있거나 "반응자"이고, 항-EGFR 억제제를 사용한 치료에 반응할 수 있는 환자를 지칭하고, 이 환자의 종상의 적어도 하나는 완화될 것으로 예상되거나, 당해 질환의 발달이 정지되거나 지연된다. RECIST 기준[참조: Eisenhauer et al, European Journal of Cancer, 2009, 45:228-247]에

따르는 완전 반응자, 부분 반응자 또는 안정한 환자는 본 발명의 문맥에서 "반응 가능성" 또는 "반응자"로서 간주된다.

[0042] 고형 종양에서, RECIST 기준은 적어도 하나의 측정가능한 병변의 존재에 기초하는 국제 표준이다. "완전 반응"은 모든 표적 병변의 소실을 의미하고; "부분 반응"은 표적 병변의 최장 직경의 합계의 30% 감소를 의미하고, "진행성 질환"은 표적 병변의 최장 직경의 합계의 20% 증가를 의미하고, "안정한 질환"은 상기 기준에 부합하지 않는 변화를 의미한다.

[0043] 보다 바람직하게는, "반응자" 환자는 양호한 진행 무생존(PFS)를 나타내는 것으로 예측되고, 즉 환자는 당해 질환의 증상의 악화 없이 적어도 25주 생존할 가능성이 있고/있거나 이러한 환자는 우수한 전체 생존율(OS)를 나타내고, 즉 환자는 적어도 14개월 생존할 가능성이 있다.

[0044] 용어 "예측" 또는 "예후"는 환자가 EGFR 억제제를 사용한 치료에 반응할 개연성 또는 가능성을 지칭한다.

[0045] 본 발명에 따라서, EGFR 억제제에 의한 억제에 대한 종양 세포 성장의 감수성은 이러한 종양 세포가 hsa-miR-31-3p miRNA를 발현하는지에 의해 예측된다.

[0046] 용어 "치료하다" 또는 "치료"는 암 진행의 안정화, 완화, 치유 또는 감소를 의미한다.

[0047] "miRNA" 또는 "마이크로RNA"는, DNA로부터 전사되지만 단백질(비코딩 RNA)로 해독되지 않는 유전자에 의해 인코딩된 약 21 내지 24개 뉴클레오티드, 바람직하게는 21 내지 23개 길이의 단일쇄이고; 대신에 이들은 pri-miRNA로서 공지된 1차 전사체로부터 pre-miRNA로 불리우는 짧은 줄기-루프 구조 및 최종적으로 작용성 miRNA로 처리된다. 돌연변이 동안, 각각의 pre-miRNA는 높은 상보성을 갖는 2개의 특정한 단편, 5' 암으로부터 기원하는 하나 및 pri-miRNA를 인코딩하는 유전자의 3' 암으로부터 기원하는 다른 하나를 제공한다. 성숙 miRNA 분자는 하나 이상의 메신저 RNA(mRNA)에 부분적으로 상보성이고, 이들의 주요 기능은 유전자 발현을 하향조절하는 것이다.

[0048] miRNA의 국제적 명명법이 있고[참조: Ambros V et al, RNA 2003 9(3):277-279; Griffiths-Jones S. NAR 2004 32(Database Issue): D109-D111; Griffiths-Jones S et al. NAR 2006 34(Database Issue):D140-D144; Griffiths-Jones S et al. NAR 2008 36(Database Issue):D154-D158; and Kozomara A et al. NAR 2011 39(Database Issue):D152-D157], 이는 <http://www.mirbase.org/>에서 miRBase로부터 이용가능하다. 각각의 miRNA는 소정의 포맷을 갖는 독특한 명칭이 다음과 같이 할당되어 있다:

[0049] · 성숙한 miRNA의 경우: sss-miR-X-Y, 여기서

[0050] o sss는 miRNA의 종류를 나타내는 3문자 코드이고, "has"는 인간을 상정하고,

[0051] o miR에서 대문자 "R"은 성숙 miRNA를 지칭하는 것을 나타낸다. 그러나, 문헌에서 일부 저자는 성숙 miRNA에 대해 또한 "mir"를 남용적으로 사용한다. 이 경우에, "-Y"의 존재에 의해 성숙 miRNA를 지칭하는 것으로 인지될 수 있다.

[0052] o X는 특정 종류에서 miRNA의 서열로 할당된 고유한 임의 번호이고, 이는 몇몇 고도 상동성 miRNA가 공지되어 있는 문자가 계속된다. 예를 들면, "20a" 및 "20b"는 고도 상동성 miRNA를 지칭한다.

[0053] o Y는, pre-miRNA의 절단에 의해 수득된 성숙 miRNA가 pri-mRNA를 인코딩하는 유전자의 5' 암(Y는 "5p"이다) 또는 3' 암(Y는 "3p"이다)에 상응하는지를 나타낸다. miRNA의 이전 국제 명명법에서, "-Y"는 존재하지 않는다. 이어서, pri-miRNA를 인코딩하는 유전자의 5' 또는 3' 암으로부터 수득된 2개의 성숙 miRNA는 n 다음에 "*" 기호의 존재 또는 부재에 의해 구별된다. "*" 기호의 존재는 당해 서열이 덜 자주 검출된 miRNA에 상응하다는 것을 나타낸다. 이러한 분류는 변화에 제공되기 때문에, "3p" 및 "5p" 코드를 사용한 신규 명명법이 시행되었다.

[0054] · pri-miRNA:sss-mir-X의 경우, 여기서

[0055] o sss는 miRNA의 종류를 나타내는 3문자 코드이고, "has"는 인간을 상정하고,

[0056] o mir에서 소문자 "r"은 pri-miRNA를 지칭하고 성숙 miRNA를 지칭하지 않는 것을 나타내고, 이는 "-Y"의 부재에 의해 확인된다.

[0057] o n은 특정 종류에서 miRNA의 서열에 할당된 고유한 임의 번호이고, 이는 몇몇 고도 상동성 miRNA가 공지되어 있는 문자가 계속된다.

- [0058] 각각의 miRNA는 이의 서열에 대한 수탁번호가 또한 할당되어 있다.
- [0059] miRNA는 본 발명 ihsa-miR-31-3p에서 검출했다(이전 명칭 hsa-miR-31*). 이 명칭에서, "hsa"는 그것이 인간 miRNA에 관한 것임을 의미하고, "miR"은 성숙 miRNA를 지칭하고, "31"은 이러한 특정 miRNA에 할당된 임의의 번호를 지칭하고, "3p"는 성숙 miRNA가 pri-miRNA를 인코딩하는 유전자의 3' 암으로부터 수득되었음을 의미한다.
- [0060] miR-31-3p는 UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU(서열번호 1)이다.
- [0061] (<http://www.mirbase.org>에서 수탁번호 MIMAT0004504)
- [0062] 시료에서 miRNA 수준을 검출하는 방법
- [0063] miRNA의 발현 수준을 측정할 수 있고, 예를 들면, miRNA는 당해 기술분야의 기술자에게 공지된 방법으로 정량화 할 수 있다. 특히, 실시간 정량적 RT-PCR(qRT-PCR)이 유용할 수 있다.
- [0064] 핵산 분석 또는 어레이를 또한 사용하여, 시료 중의 miRNA의 수준을 평가할 수 있다.
- [0065] 일부 실시양태에서, 올리고뉴클레오티드 어레이를 제조하거나 구매할 수 있다. 어레이는 통상 고체 지지체 및 당해 지지체를 접촉하는 적어도 하나의 올리고뉴클레오티드를 함유하고, 여기서 올리고뉴클레오티드는 miRNA의 적어도 일부에 상응한다.
- [0066] 임의의 적합한 분석 플랫폼을 사용하여, 시료에서 miRNA의 존재를 측정할 수 있다. 예를 들면, 분석은 막, 칩, 디스크, 시험 스트립, 필터, 미소구, 다중웰 플레이트 등의 형태로 존재할 수 있다. 분석 시스템은 miRNA에 상응하는 올리고뉴클레오티드가 부착되어 있는 고체 지지체를 가질 수 있다. 고체 지지체는, 예를 들면, 플라스틱, 실리콘, 금속, 수지 또는 유리를 포함할 수 있다. 분석 성분을 제조하고, miRNA를 검출하는 키트로서 팩키징할 수 있다.
- [0067] 일부 실시양태에서, qRT-PCR은 RNA 표적의 검출 및 정량화 둘 다에 사용될 수 있다[참조: Bustin et al., 2005, Clin. Sci., 109:365-379]. qRT-PCR에 의해 수득된 정량적 결과는 종종 정성 데이터보다 더욱 많은 정보 일 수 있고, 분석 표준화 및 품질 관리를 단순화시킬 수 있다. 따라서, 일부 실시양태에서, qRT-PCR-기반 분석은 세포 기반 분석 동안 miRNA 수준을 측정하는데 유용할 수 있다. 또한, qRT-PCR 방법은 환자 치료의 모니터링에 유용할 수 있다. qRT-PCR-기반 방법의 예는, 예를 들면, 미국 특히 제7,101,663호에서 발견할 수 있다. 상업적으로 입수 가능한 qRT-PCR 기반 방법(예: Taqman® Array). 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems) 사의 인간 miRNA 패널을 또한 사용할 수 있다.
- [0068] 다른 실시양태에서, miRNA 정량화는 서열분석에 의해 수행할 수 있다.
- [0069] 환자의 분류
- [0070] hsa-miR-21-3p의 발현이 보다 낮을수록, 환자에게는 보다 양호하다. 따라서, miRNA의 발현 수준이 낮을수록, 환자는 EGFR 억제제 치료에 반응할 가능성이 보다 많다. 한 가지 실시양태에서, 환자는, hsa-miR-31-3p가 대조군 값보다 낮은 경우, "반응자" 또는 EGFR 억제제를 사용한 치료에 반응할 가능성이 있는 것으로 고려된다.
- [0071] 이러한 대조군 값은 상기 정의된 바와 같이 기준 시료의 풀에 기초하여 측정할 수 있다. 도 1 및 도 2A는, 기준 시료의 풀에 기초하여, EGFR 억제제 치료에 대한 반응 또는 비반응을 예측하게 하는 hsa-miR-31-3p 발현 수준(기록된(logged) hsa-miR-31-3p 발현 수준)에 대한 대조군 값이 정의될 수 있음을 명백하게 나타낸다.
- [0072] 그러나, 바람직한 실시양태에서, 당해 방법은 miRNA의 발현 수준에 기초하여 예후 점수 또는 지수를 측정하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 예후 점수는 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 나타낸다. 특히, 상기 예후 점수는 환자가, 소정의 역치(dichotomized) 결과보다 높거나 낮은지에 따라, EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 나타낼 수 있다. 다른 실시양태에서, EGFR 억제제에 반응 또는 비반응의 이산(discrete) 가능성이 예후 점수로부터 유도될 수 있다.
- [0073] 환자가 EGFR 억제제 치료에 반응할 가능성은, EGFR 억제제 치료가 상기 환자에게 투여되는 경우, 질환의 존재 또는 부재하에, 당해 환자가 생존할 가능성과 관련된다.
- [0074] 결과적으로, 예후 점수는, 상기 정의된 바와 같이, hsa-miR-31-3p의 발현 수준 및 기준 시료 풀의 진행 무생존

(PFS) 또는 전체 생존(OS) 사이의 상관 분석에 기초하여 측정될 수 있다. 따라서, hsa-miR-31-3p의 발현 수준에 대한 PFS 또는 OS의 상관 함수인 PFS 및/또는 OS 점수는 EGFR 억제제에 대한 반응 예측을 위한 예후 점수로서 사용될 수 있다. 바람직하게는, PFS 점수가 사용되고, 이는 질환 진행의 부재가 EGFR 억제제 치료에 대한 명백한 반응 지표이기 때문이다.

[0075] 바람직한 실시양태에서, 예후 점수는 실시예 부분에서 제시된 바와 같이 측정된 것들 중의 하나이다:

[0076] 예후 점수는 하기 수학식에 의해 계산될 수 있다(실시예 1에 개시된 바와 같이 22개 기준 시료의 풀에 기초하여 측정됨):

[0077] · PFS 점수 = $0.203738 * x - 1.453362$ (여기서, x는 hsa-miR-31-3p의 기록된 발현이다).

[0078] · OS 점수 = $0.190677 * x - 1.360191$ (여기서, x는 hsa-miR-31-3P의 기록된 발현이다).

[0079] 이어서, 환자는, 그/그녀의 예후 점수가 -0.098088 (PFS) 및/또는 -0.0918 (OS) 이하인 경우, 반응자인 것으로 예측된다. 바람직하게는, 환자는, 그/그녀의 예후 점수가 -0.098088 (PFS) 이하인 경우, 반응자인 것으로 분류된다.

[0080] 또 다른 실시양태에서, 예후 점수는 하기 수학식에 의해 계산될 수 있다(실시예 2에 개시된 바와 같이 33개 기준 시료에 기초하여 측정됨):

[0081] · PFS 점수 = $0.178366 * x - 1.363693$ (여기서, x는 hsa-miR31-3P의 기록된 발현이다).

[0082] · OS 점수 = $0.102142 * x - 0.780927$ (여기서, x는 hsa-miR31-3P의 기록된 발현이다).

[0083] 이어서, 환자는, 그/그녀의 예후 점수가 -0.03123 (PFS) 및/또는 -0.017884 (OS) 이하인 경우, 반응자인 것으로 예측된다. 바람직하게는, 환자는, 그/그녀의 예후 점수가 -0.03123 (PFS) 이하인 경우, 반응자인 것으로 분류된다.

[0084] 실험 부분에서 측정된 PFS 및 OS 점수는 23 및 33개 기준 시료의 풀에 기초하여 수득되었고, 이는 실시예 1 및 2에서 측정된 PFS 점수에서 hsa-miR-31-3p의 기록된 발현 수준에 대한 PFS의 선형 상관 함수의 매개변수 사이의 미세한 변화를 설명한다. 이를 매개변수에서 일부 추가의 미세한 변화가 추가의 기준 시료의 포함으로 발생할 수 있지만, 본 발명자들에 의해 수득된 결과는 환자 종양 시료에서 hsa-miR-31-3p의 생존(PFS 또는 OS) 및 기록된 발현 사이의 선형 상관관계의 존재를 확인한다. 따라서, 본 발명자들에 의해 수득된 실험 데이터로부터, 환자가 EGFR 억제제 치료에 반응할 가능성은 hsa-miR-31-3p의 기록된 발현 수준과 선형으로 상관되는 것으로 결론지을 수 있다. 바람직한 실시양태에서, 상기 예후 점수는 따라서 하기 수학식으로 나타내어진다.

[0085] 예후 점수 = $a * x + b$

[0086] 여기서, x는 환자의 시료에서 측정된 hsa-miR-31-3p의 기록된 발현 수준이고,

[0087] a 및 b는 상기 정의한 바와 같이 기준 시료의 풀에 기초하여 미리 측정한 매개변수이다. 환자는, 그/그녀의 예후 점수가 역치 c 이하인 경우에는 EGFR 억제제에 반응하는 것으로 예측되고, 이의 예후 점수가 역치 c보다 큰 경우에는 EGFR 억제제에 반응하지 않는 것으로 예측되며, 여기서 c 값은 기준 시료의 동일한 풀에 기초하여 측정된다. 본 발명자들에 의해 수행된 실험에 기초하여, 이 경우에, a, b 및 c는 바람직하게는 하기 범위 내인 것을 측정되었다.

[0088] · a : [0.1; 0.25], 바람직하게는 [0.17; 0.21];

[0089] · b : [-2; -0.5], 바람직하게는 [-1.8; -0.6], 바람직하게는 [-1.5; -0.7]; 및

[0090] · c : [-0.11; -0.01], 바람직하게는 [-0.10; -0.01]. 바람직하게는, PFS 점수가 사용되는 경우, c는 범위 [-0.10; -0.03]이고, OS 점수가 사용되는 경우, c는 범위 [-0.1; -0.015]이다. 또 다른 실시양태에서, EGFR 억제제에 반응 또는 비반응의 개별 가능성은 상기 $a * x + b$ 예후 점수로부터 유도될 수 있다. 예후 점수가 낮을수록, EGFR 억제제 치료에 대한 반응 가능성은 보다 높다. 예후 점수와 EGFR 억제제 치료에 대한 반응 가능성 사이의 정확한 상관관계는 기준 시료의 동일한 세트에 기초하여 측정될 수 있다.

- [0091] 본 발명자들은 또한, EGFR 억제제에 대한 반응이 hsa-miR-31-3p의 발현 수준 단독에 기초하여 예측될 수 있지만 (실시예 1 및 2 참조), 보다 신뢰성 있는 예측은 hsa-miR-31-3p 발현 수준과 BRAS 상태의 조합이 고려되는 경우에 이루어질 수 있음(실시예 2 참조)을 결정했다. 따라서, 바람직한 양태에서, 본 발명에 따르는 방법은 환자의 BRAF 상태를 측정하는 단계 및 hsa-miR-31-3p의 발현 수준 및 BRAF 상태를 고려하여 복합 점수를 계산하는 단계를 추가로 포함하고, 여기서 복합 점수는 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 나타낸다. BRAF 유전자는 또한 프로토-온코진(proto-oncogene) B-Raf 및 v-Raf 쥐 육종 바이러스 온코진 상동체 B1로서 지칭되고, 단백질은 세린/트레오닌-단백질 키나제 B-Raf로서 공식적으로 공지되어 있다. 이 단백질은 MAP 키나제/ERK 신호전달 경로의 조절에 중요한 역할을 담당하고, 이는 세포 분열, 분화 및 분비에 영향을 미친다. 이 유전자에서의 돌연변이는, 비호지킨 림프종, 결장직장암, 악성 흑색종, 갑상선암, 비소세포 폐암 및 폐 선암을 포함하는 다양한 암과 관련되어 있다.
- [0092] "BRAF 상태"는, 환자 종양의 BRAF 단백질이, 수탁번호 NP_004324.2(서열번호 3)에 의해 정의된 야생형 BRAF 단백질 서열과 비교하여, V600E 돌연변이(코돈 600에서 글루탐산에 의한 발린의 치환)을 포함하거나 포함하지 않는지 여부에 따라, 야생형 또는 돌연변이된 상태로서 정의된다. BRAF 상태는, BRAF 단백질이 단백질 서열 NP_004324.2와 비교하여 V600E 돌연변이를 포함하지 않는 경우에 "BRAF 야생형"으로 간주된다. 대조적으로, 환자 종양에서 BRAF 단백질이 단백질 서열 NP_004324.2와 비교하여 V600E 돌연변이를 포함하는 경우, BRAF 상태는 "BRAF 돌연변이된 상태"로서 정의된다.
- [0093] BRAF 상태는 대립인자 식별 분석[참조: Laurent-Puig P, et al, J Clin Oncol. 2009, 27(35):5924-30 and Lievre et al. J Clin Oncol. 2008 Jan 20;26(3):374-9] 또는, 예를 들면, 직접 서열분석에 의해, 바람직하게는 EGFR 억제제를 사용한 치료 전에, 종양 시료 상에서 측정할 수 있다.
- [0094] 복합 점수는 EGFR 억제제에 대한 반응의 예측과 관련된 추가의 매개변수를 추가로 포함한다. 이러한 추가의 매개변수는, 예를 들면, 연령 및 성별을 포함할 수 있다.
- [0095] 복합 점수는 특히 노모그램에 기초할 수 있고, 여기서 포인트 스케일은 복합 점수의 각각의 변수에 대해 확립된다. 소정 환자에 있어서, 포인트는 각 변수의 포인트 스케일로부터 상응하는 포인트를 선택함으로써 각 변수에 할당된다. 개별 변수(예를 들면, hsa-miR-31-3p 발현 수준 또는 연령)에 있어서, 변수에 기인하는 포인트 수는 변수의 값에 선형으로 상관된다. 이분 변수의 경우(가능한 2개 값, 예를 들면, BRAF 돌연변이 상태 또는 성별), 2개의 상이한 값은 2개의 가능한 값 또는 변수 각각에 기인한다.
- [0096] 이어서, 복합 점수는 각각의 변수에 할당된 포인트를 부가함으로써 계산된다. 복합 점수의 값에 기초하여, 환자는, 복합 점수가 역치(이분 점수)보다 낮거나 높은지에 따라 또는 당해 치료에 반응 또는 비반응 가능성에 따라 양호 또는 불량 반응 예후를 제공할 수 있다.
- [0097] 반응 예후가 양호 또는 불량인 역치 또는 복합 점수와 반응 또는 비반응 가능성 사이의 상관 뿐만 아니라 각 변수의 포인트 스케일은 기준 시료의 동일한 풀에 기초하여 측정될 수 있다.
- [0098] 이러한 복합 점수의 특정한 예는 실시예 2에 제공되고(도 6B 및 도 7B 참조), 본 발명의 바람직한 양태에 상응한다.
- [0099] EGFR 억제제
- [0100] 본 발명은, 이러한 제제를 사용한 치료 전에, 하나 이상의 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제에 대한 환자의 반응성을 예측할 수 있게 한다.
- [0101] EGFR 억제제는 EGFR 티로신 키나제 억제제일 수 있거나, 또는 대안적으로 EGFR 표적의 세포외 도메인을 표적화 할 수 있다.
- [0102] 바람직하게는, EGFR 억제제는 항-EGFR 항체, 바람직하게는 모노클로날 항체이다.
- [0103] 특정 실시양태에서, EGFR 억제제는 티로신 키나제 억제제, 예를 들면, 에를로티닙, 게피티닙 또는 라파티닙, 또는 EGFR 세포외 도메인을 표적화하는 분자, 예를 들면, 세툭시맙 또는 파니투무맙이다.
- [0104] 세툭시맙 또는 파니투무맙 등의 항-EGFR 모노클로날 항체를 포함하여 EGFR 세포외 도메인을 표적화하는 분자는 주로 결장직장암 치료 또는 유방암 치료에 사용된다. 결과적으로, 환자의 암이 결장직장암(특히 전이성 결장직장암) 또는 유방암인 경우, 본 발명에 따르는 방법은 바람직하게는 EGFR 세포외 도메인을 표적화하는 분자 및

특히 항-EGFR 모노클로날 항체, 예를 들면, 세툭시맙 또는 파니투무맙에 대한 반응을 예측하는데 사용될 수 있다.

[0105] 역으로, 티로신 키나제 EGFR 억제제는 폐암(특히 비소세포 폐암, NSCLC)의 치료에 주로 사용되고, 따라서 환자의 암이 폐암(특히 비소세포 폐암, NSCLC)인 경우, 본 발명에 따르는 방법은 바람직하게는 에를로티닙, 게피티닙 또는 라파티닙 등의 티로신 키나제 EGFR 억제제에 대한 반응을 예측하는데 사용될 수 있다.

[0106] 췌장암 또는 두경부암(특히 두경부의 편평 세포암(SCCHN))에서, 티로신 키나제 EGFR 억제제 및 항-EGFR 모노클로날 항체는 치료제로서 시험되고 있고, 따라서 환자의 암이 췌장암 또는 두경부암(특히 두경부의 편평 세포암(SCCHN))인 경우, 본 발명에 따르는 방법은 티로신 키나제 EGFR 억제제(예를 들면, 에를로티닙, 게피티닙 또는 라파티닙) 또는 항-EGFR 모노클로날 항체(예: 세툭시맙 또는 파니투무맙)에 대한 반응을 예측하는데 사용될 수 있다.

[0107] 세툭시맙 및 파니투무맙은 현재 임상적으로 주로 사용되는 항-EGFR 모노클로날 항체이다. 그러나, 추가의 항-EGFR 모노클로날 항체, 예를 들면, 니모투주맙(TheraCIM-h-R3), 마투주맙(EMD 72000) 및 잘루투무맙(HuMax-EGFr)은 개발중에 있다. 본 발명에 따르는 방법은 또한, 특히 환자가 결장직장암(특히 전이성 결장직장암), 유방암, 췌장암 또는 두경부암(특히 두경부의 편평 세포암(SCCHN))을 앓고 있는 경우, 이를 항-EGFR 모노클로날 항체 또는 추가로 개발될 수 있는 임의의 기타 항-EGFR 모노클로날 항체(단편 포함)에 대한 반응을 예측하는데 사용될 수 있다.

[0108] 유사하게는, 에를로티닙, 게피티닙 및 라파티닙은 현재 임상적으로 주로 사용되는 티로신 키나제 EGFR 억제제이다. 그러나, 추가의 티로신 키나제 EGFR 억제제, 예를 들면, 카네르티닙(CI-1033), 네라티닙(HKI-272), 아파티닙(BIBW2992), 다코미티닙(PF29980.4, PF-00299804), TAK-285, AST-1306, ARRY334543, AG-1478(Tyrphostin AG-1478), AV-412, OSI-420(Oesmethyl Erlotinib), AZ08931, AEE788(NVPAEE788), 펠리티닙(EKB-569), CUOC-101, AG 490, P0153035 HCl, XL647 및 BMS-599626(AC48)이 개발중에 있다. 본 발명에 따르는 방법은 또한, 특히 환자가 폐암(특히 비소세포 폐암, NSCLC), 췌장암 또는 두경부암(특히 두경부의 편평 세포암(SCCHN))을 앓고 있는 경우, 이들 티로신 키나제 EGFR 억제제 또는 추가로 개발될 수 있는 임의의 기타 티로신 키나제 EGFR 억제제에 대한 반응을 예측하는데 사용될 수 있다.

[0109] 키트

[0110] 본 발명은 또한, a) 암 환자의 시료(바람직하게는 종양 시료, 예를 들면, 종양 생검 또는 종양 외과적 절제의 전체 또는 일부)에서 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA의 발현 수준을 측정하기 위한 시약, 및 b) 상기 환자의 BRAF 상태를 측정하기 위한 시약을 포함하거나 이들로 이루어지는, 암 환자가 상피 성장 인자 수용체(EGFR) 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 측정하기 위한 키트에 관한 것이다.

[0111] 상기 환자의 시료에서 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA의 발현 수준을 측정하는 시약은 특히 프라이머 쌍(순방향 및 역방향 프라이머) 및/또는 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA에 특이적인 프로브 또는 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA에 특이적인 서열을 포함하는 miRNA 마이크로어레이를 포함한다.

[0112] 환자의 BRAF 상태를 측정하는 시약은, 예를 들면, ABI 7900HT 서열 분석 시스템(Applied Biosystems, Foster City, CA) 상에서 대립인자 식별 분석에 사용하기 위한, 서열분석 전에 BRAF 유전자의 전체 또는 일부를 증폭시키는 적어도 하나의 프라이머 쌍 또는 이들의 5' 말단에 형광 리포터 염료 FAM 및 VIC로 표지된 특이적 프로브 세트를 포함할 수 있다[참조: Laurent-Puig P, et al, J Clin Oncol. 2009, 27(35):5924-30 and Lievre et al. J Clin Oncol. 2008 Jan 20;26(3):374-9].

[0113] 본 발명의 키트는 환자가 hsa-miR-31-3p(서열번호 1) miRNA 발현 수준 및 BRAF 상태, 및 임의로 추가의 매개변수에 기초하여 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 측정하기 위한 지침을 추가로 포함할 수 있다. 특히, 도 5B 및 6B에 제시된 바와 같이, 복합 점수, 및 복합 점수(포인트의 전체 수)와 예측(반응/비반응 또는 반응 또는 비반응의 가능성) 사이의 상관관계에 포함된 모든 변수의 포인트 스케일을 포함하는 노모그램이 포함될 수 있다.

[0114] 의약, 치료학적 용도 및 치료 방법

- [0115] 본 발명의 방법은 EGFR 억제제에 대한 보고된 임상 반응 속도에 일치하는 속도로 EGFR 억제제에 대한 환자 반응 성을 예측한다.
- [0116] 따라서, 암 환자를 치료하는 방법이 추가로 제공되고, 당해 방법은 적어도 하나의 EGFR 억제제를 환자에게 투여하는 것을 포함하고, 여기서 환자는 상기한 바와 같은 방법에 의해 "반응자"로서 분류된다.
- [0117] 특히, 본 발명은, (i) 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는지 여부를 본 발명에 따르는 방법에 의해 측정하는 단계, 및 (ii) 환자가 EGFR 억제제에 반응할 가능성이 있는 것으로 측정되는 경우에 상기 환자에게 EGFR 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 암을 앓고 있는 환자를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- [0118] 당해 방법은, (iii) 환자가 EGFR 억제제에 반응하지 않는 것으로 측정되는 경우에, 대체 항암 치료를 환자에게 투여하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 이러한 대체 항암 치료는 특정한 암 및 이전 시험된 치료에 의존하지만, 특히 방사선치료, 기타 화학요법 분자 또는 기타 생물학, 예를 들면, 기타 항원에 대해 지시된 모노클로날 항체(항-Her2, 항-VEGF, 항-EPcAM, 항-CTLA4...) 등의 기타 생물제품으로부터 선택될 수 있다. 특히, 결장직장암의 경우에, 환자가 EGFR 억제제에 반응하지 않는 것으로 측정되는 경우에, 단계(iii)에서 투여된 대체 항암 치료는
- [0119] · 유리하게는 FOLFOX(류코보린(엽산), 5-플루오로우라실(5-FU) 및 옥살릴플라틴의 조합) 또는 FOLFIRI(류코보린(엽산), 5-플루오로우라실(5-FU) 및 이리노테칸의 조합) 화학요법과 조합된 EGF 억제제, 특히 항-VEGF 모노클로날 항체(예를 들면, 베바시주맙).
- [0120] · 대안적으로, 환자가, 임의로 FOLFOX 또는 FOLFIRI 화학요법과 조합하여 VEGF 억제제로 성공적으로 치료되지 않는 경우, 임의로 미토마이신 B와 조합하여 5-FU를 투여할 수 있다. 특정한 항신생물 섭생(즉 항암 치료가 아님)의 부재하에 삶의 질을 최대화할 목적으로 투여된 치료로서 정의된 최고의 지지 치료가 환자에게 추가로 투여될 수 있다.
- [0121] 본 발명의 또 다른 대상은 암을 앓고 있는 환자의 치료에 사용하기 위한 EGFR 억제제이고, 여기서 환자는 상기 정의된 방법에 의해 반응할 가능성이 있는 것으로 분류된다. 상기 환자는 결장직장암, 보다 특히 전이성 결장직장암을 앓을 수 있다. 또는, 상기 환자는 유방암, 특히 트리플 네가티브 유방암을 앓을 수 있다. 또는, 상기 환자는 폐암, 특히 비소세포 폐암(NSCLC)을 앓을 수 있다. 또는, 상기 환자는 두경부암, 특히 두경부의 편평 세포암을 앓을 수 있다. 또는, 상기 환자는 췌장암을 앓을 수 있다. 본 발명은 또한 상기 기재된 바와 같이 본 발명의 방법에 의해 "반응자"로서 분류되는 환자에서 암의 치료에 사용하기 위해 의도된 의약품을 제조하기 위한 EGFR 억제제의 용도에 관한 것이다.
- [0122] 바람직한 실시양태에서, EGFR 억제제는 항-EGFR 항체, 바람직하게는 세툭시맙 또는 파니투무맙이다. 대안적으로, EGFR 억제제는 티로신 키나제 EGFR 억제제, 특히 에를로티닙, 게피티닙 또는 라파티닙일 수 있다.
- [0123] 바람직한 실시양태에서:
- [0124] · 환자는 결장직장암, 특히 전이성 결장직장암을 앓고 있고, EGFR 억제제는 항-EGFR 항체, 바람직하게는 세툭시맙 또는 파니투무맙이고;
- [0125] · 환자는 유방암, 특히 트리플 네가티브 유방암을 앓고 있고, EGFR 억제제는 항-EGFR 항체, 바람직하게는 세툭시맙 또는 파니투무맙이고;
- [0126] · 환자는 폐암, 특히 비소세포 폐암(NSCLC)을 앓고 있고, EGFR 억제제는 티로신 키나제 EGFR 억제제, 특히 에를로티닙, 게피티닙 또는 라파티닙이고;
- [0127] · 환자는 두경부암, 특히 두경부의 편평 세포암 또는 췌장암을 앓고 있고, EGFR 억제제는 항-EGFR 항체(바람직하게는 세툭시맙 또는 파니투무맙) 또는 티로신 키나제 EGFR 억제제(특히 에를로티닙, 게피티닙 또는 라파티닙)이다.
- [0128] 실시예 및 도면은 본 발명의 범위를 제한하지 않고서 본 발명을 설명한다.
- [0129] 실시예
- [0130] 실시예 1: 항-EGFR로 치료된 환자에게서 생존율 차이를 측정하는 KRAS-야생형 결장직장암에서 miRNA의 수준

- [0131] 환자 및 방법
- [0132] 환자의 세트
- [0133] 제1 세트의 환자(본원에서 "발견 세트"라 지칭됨)는 남성 29명, 여성 14명의 43명으로 구성되었다. 연령의 중앙값은 61.3 ± 11.4 세였다. 모두는 본 연구에 포함시 전이성 질환을 앓고 있었다. 이러한 모든 환자는 KRAS 야생형 결장암이 발병했다.
- [0134] 다음과 같이 KRAS 상태가 측정되었다. 각 환자의 경우, 종양의 단편은 수술 직후 동결시켰다. DNA는 종양 단편에서 종양 세포의 비율의 검증 후 제조업체 권고에 따라서 큐아젠(Qiagen)사 키트를 사용하여 종양 조직으로부터 추출하였다(종양 세포의 50% 이상을 함유하는 유일한 단편을 DNA 추출 및 RNA 추출용으로 선택했다). KRAS 상태는 문헌[참조: Laurent-Puig P, et al, J Clin Oncol. 2009, 27(35):5924-30]에 보고된 방법에 따라 코돈 12 및 13상에서 태크만 프로브를 사용하여 추출된 종양 DNA에서 확인했다. 코돈 61의 돌연변이는 KRAS 유전자의 엑손 3 서열분석으로 검출되었다. 제1 세트 그룹에서 선택된 모든 종양은 코돈 12, 13 및 61 상의 KRAS 야생형이었다. 환자의 반응 상태는 RECIST 기준에 따라 평가하였다. 두 환자는 완전 반응자로서, 12명은 부분 반응자로서 간주되고, 17명은 안정한 질환을 갖는 것으로 간주되고, 12명은 첫 번째 평가에서 진행성이었다.
- [0135] 34명의 환자는 추적 기간 동안 진행을 문서화했고, 31명의 환자는 추적 기간 동안 사망했다.
- [0136] 진행까지 추적의 중앙값은 16.14주였고, 전체 생존 기간의 중앙값은 12.4개월이었다.
- [0137] 2명을 제외한 모든 환자는 이리노테칸에 비반응성이었고, 2명은 옥살리플라틴에 비반응성이었고, 33명은 세툭시맵과 이리노테칸의 조합을 수용하고, 1명은 파니투무맵과 이리노테칸의 조합을 수용하고, 6명은 세툭시맵 + 폴피리(FOLFIRI)의 조합을 수용하고, 2명은 세툭시맵과 폴폭스(FOLFOX)의 조합을 수용하고, 1명은 세툭시맵과 젤로다(XELODA)의 조합을 수용한다. 세툭시맵과 파니투무맵의 도입 전에 화학 요법의 라인 번호가 기록되었다.
- [0138] miRNA의 발현 수준의 정량화
- [0139] 작은 RNA는 앰비온(Ambion)으로부터의 mirVanamiRNA 분리 키트를 사용하여, 23명의 환자의 하위 그룹의 동결 종양에서 추출하였다. 글로벌 마이크로RNA(miRNA) 프로파일은 제조업자 권고사항에 따라 윤곽이 illumina 인간 V2의 마이크로RNA 발현 비드칩 상에서 각각의 시료로부터 추출한 RNA 750ng의 표지화 및 하이브리드화에 의해 수행했다. 비드칩은 illumina 스캔 리더로 스캐닝했고, 데이터를 GenomeStudio(illumina)에 나타내고, 변위치(quantile) 표준화하고, \log_2 형질변환시켰다. miRNA hsa-miR31-3p의 발현 수준의 특정 정량화는 역전사된 RNA의 ng 및 ABI7900HT 실시간 PCR 시스템 상에서 특정 TaqMan 사전 디자인된 분석을 사용하여 수행하였다. 발현 수준은 $\triangle\triangle Ct$ 방법을 통해 참조 snRNA RNU6B 수준으로 표준화하였다.
- [0140] 통계 분석
- [0141] 통계적 분석은 그래프패드 프리즘 소프트웨어를 사용하여 수행하였다. 정량적 실시간 PCR 발현 데이터는 평균 \pm SEM (평균의 표준 오차)으로서 제시했다.
- [0142] 비-파라메트릭 맨 휘트니(MW) 시험은 정량 값을 비교하는데 사용되었다. 보고된 모든 p-값은 양측 검정되었다.
- [0143] 생존 모델 예측
- [0144] 생존 위험 그룹의 마이크로RNA 발현 기반 예측자는 콕스 비례 위험 모델[참조: Cox, D. R. (1972). Regression models and life-tables. Journal of the Royal Statistical Society, Series B 34 (2), 187-220] 및 감독 주성분 방법[참조: E Bair & R Tibshirani, Semi-supervised methods to predict patient survival from gene expression data, PLOS Biology 2:511-522, 2004)]을 조합하여 계산했다.
- [0145] 변량 콕스 비례 위험 모델은 log 발현 수준이 생존 시간과 상관되는 miRNA를 분류하는 데 사용하였다. 생존 시간이 발현 수준과 독립적이라는 가설이 시험되었고, 거짓 발견의 비율은 다변량 순열 시험($N = 1000$, $p < 0.05$)을 사용하여 확인하였다. miRNA의 선택 후, 주요 성분을 계산하고, 콕스 비례 위험 회귀 분석을 수행하여 각 주요 성분에 대한 회귀 계수(중량)를 제공하였다.

- [0146] 복합 예후 점수는 이의 발현 프로파일이 x의 성분을 각 주성분 값의 가중 평균과 조합하는 \log 발현 수준의 벡터 x에 의해 설명되는 환자에 대해 계산하였다. 예후 점수의 높은 값은 죽음의 위험에 높은 가치, 그 결과 상대적으로 불량한 예측 생존률에 상응한다. 예측 값을 평가하기 위해, LOO 교차 검증(leave-one-out cross validation)을 사용한다. 양호한 예후와 불량한 예후 사이의 최적의 분리를 생산하는 점수 임계값은 카플란-마이어(Kaplan-Meier) 분석에 사용하였다.
- [0147] 결과
- [0148] 본 발명자들은 1145 miRNA의 발현 수준을 측정하는 11lumina 인간 마이크로RNA 발현 프로파일링 분석 v2를 사용하여 비돌연변이 KRAS 결장직장 종양 조직 시료의 글로벌 miRNA의 발현 프로파일링을 수행하였다. 1145 분석된 miRNA에서, 하나는 이의 발현 수준 및 예후 사이의 상관관계를 나타낸다. 도 1은 hsa-miR31-3p가 생존율과 서로 밀접히 관련되고 질환 비함유(PFA) 및 종체적(OS) 생존율에 대해 예상되는 예후를 나타내는 종양 시료에서 중요한 상이한 발현 수준을 나타낸다는 것을 도시한다. 다른 miRNA는 예후에 유의미하게 관련된 것으로 나타난 반면, ($p<0.05$), 하기 miRNA는 예후에 유의미하게 관련된 것으로 나타내지 않았다($p>0.05$): hsa-miR-29a, hsa-let-7d, hsa-miR-100, hsa-miR-1260, hsa-miR-25, hsa-let-7i, hsa-miR-146a, hsa-miR-594-pre, hsa-miR-24, hsa-miR-1826, hsa-miR-30c-2*, hsa-miR-34b*, hsa-miR-34c-3p, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-489, hsa-miR-191, hsa-miR-491-5p, hsa-miR-130a, hsa-miR-149, hsa-miR-193a-3p, hsa-miR-27a, hsa-miR-30a*, hsa-miR-30a, hsa-miR-30c-2*, hsa-miR-30c, hsa-miR-30e*, hsa-miR-320a, hsa-miR-320b, hsa-miR-320c, hsa-miR-362-5p, hsa-miR-500*, hsa-miR-500, 502-3p, hsa-miR-532-3p, hsa-miR-532-5p, hsa-miR-652, hsa-miR-671-5p, hsa-miR-146b-3p, hsa-miR-486-5p, hsa-let-7b, hsa-let-7e, hsa-miR-17*, hsa-miR-212, hsa-miR-128b, hsa-miR-21, 및 hsa-miR-23b.
- [0149] 상기 예측자 위험 그룹의 안정성을 추가로 조사하기 위해, 특정의 TaqMan 사전 설계된 분석을 사용하는 실시간 miRNA 정량적 PCR 분석을 miRNA의 발현 수준을 정량화하기 위해 EGFR 억제제로서 세톡시맵을 수용한 23명의 환자 모두의 시료에 대해 수행했다. 공정한 상관 관계가 $r = 0.88$ 로 두 기술에 의해 측정된 hsa-miR31-3p 발현 수준 사이에서 주시되었다. hsa-miR31-3p는 불량한 예후를 갖는 환자로부터의 종양 시료 및 양호한 예후를 갖는 환자로부터의 시료 사이에 상당히 다른 발현 수준을 나타냈다(도 2). 훈련된 데이터세트로부터 주성분을 사용하는 적합화된 쿠스 비례 위험 모델의 계수는 PFS에 대해 3.271 및 OS에 대해 3.061인 것으로 추정되었다. 시료는, 예후 점수가 -0.098088 (PFS) 및 -0.0918 (OS)보다 크거나/작거나 또는 동일할 경우, 고/저 위험에 노출되는 것으로 예상되었다.
- [0150] PPV는 반응자로 예측되는 시료가 실제로 반응자 그룹에 속하는 가능성이다. NPV는 비반응자로서 예측된 시료가 실제로 반응자 그룹에 속하지 않는 가능성이다.
- [0151] hsa-miR31-3p 발현 수준이 낮은 11명의 환자 중 총 9명이 질환 부재로서 25주 이상 생존하고, 14개월 동안 전체 생존을 나타내고(PPV = 82%, [95% CI: 48%-98%]), 반면 hsa-miR-31-3p 발현 수준이 높은 12명의 환자 중 8명이 25주 이내에 질환 진행을 나타내고 14개월 이내에 사망했다(NPV = 67% [95% CI: 35%-90%]). 이러한 값들은 hsa-miR-31-3p 발현에 대해 80% 생존[95% CI: 44%-97%](8/10)을 위한 특이성 및 69%[95% CI: 38%-91%](9/13)의 감도를 제시한다.
- [0152] 이어서, 예후 점수는 다음 식에 의해 계산될 수 있다:
- [0153] PFS 점수 = $0.203738 * x - 1.453362$ (여기서, x는 hsa-miR31-3p의 기록된 발현이다)
- [0154] OS 점수 = $0.190677 * x - 1.360191$ (여기서, x는 hsa-miR31-3p의 기록된 발현이다)
- [0155] hsa-miR31-3p의 예측 능력을 검증하기 위해, 이 miRNA의 발현 수준은 4개의 독립적인 시료(1개 파니투무맵 처리, 1개 (세톡시맵 + 5FU + 이리노테칸) 처리 및 2개 (세톡시맵 + 이리노테칸) 처리)에서 TaqMan으로 측정하고, 예후 점수를 계산하였다(표 1). 두 환자는 고위험 생존 그룹에 있었고, 2명은 저 위험 생존 그룹에 있었다. hsa-miR31-3p 발현이 낮은 두 환자 중 한명은 34개월 동안 총 생존을 나타내어 PPV 50%를 제시하고, 높은 수준의 hsa-miR31-3p를 갖는 두 환자 중의 한명은 9개월 이내에 사망하여 NPV 100%를 나타내는데, 이는 제2 환자의 생존이 여전히 겸열되기 때문이다. 이러한 값들은 hsa-miR31-3p 발현에 대한 50% 생존(1/2)에 대한 특이성 및 100%(1/1) 감도를 제시한다.

[0156]

표 1: 발현 수준 및 예후 점수

시료	생존 시간 (주) (PFS)	겹열 지시자 (PFS)	생존 시간 (개월) (OS)	겹열 지시자 (OS)	예측 위험 (Taqman)	hsa-miR31-3p 발현 (Taqman)
405 T	7.3	1	2.8	1	저	15.66
406 T	16.3	1	5.0	0	고	2481.18
417 T	10.7	1	34.6	1	저	31.64
421 T	15.7	1	8.8	1	고	787.69

"생존 시간"은 관찰 기간의 시작(예: 수술)으로부터 환자의 재발 사건(PFS, 주) 또는 사망 사건(OS, 개월)까지의 시간을 나타낸다.

"겹열 지시자"는 관찰 시간에 발생한 중요한 사건(재발 또는 사망)을 표시한다. 1: 사건 시간을 갖는 개체; 0: 개체가 관찰 시간 동안 어떤 사건도 갖지 않을 때, 또는 관찰이 불완전할 때 발생하는 겹열된 관찰.

"예측 위험"은 PFS 점수 임계치에 따라 '저'(낮은 사망 위험) 또는 '고'(높은 사망 위험)로서 명기된다.

"hsa-miR31-3p 발현"은 hsa-miR31-3p 발현 수준(입의 단위)을 나타낸다.

[0157]

[0158]

실시예 2: 상이한 항-EGFR로 처리된 환자에서 miRNA의 예후력의 확인 및 예후 노모그램의 정밀화

[0159]

환자 및 방법

[0160]

환자의 훈련 세트(그룹 1)는 24명의 남성과 9명의 여성인 33명의 환자로 구성된다. 평균 연령은 58.58 ± 11.6 세이다. 이들 중, 24명은 (세툭시맙 + 이리노테칸) 처리, 5명 (세툭시맙 + 5FU + 이리노테칸) 처리, 2명 (세툭시맙 + 5FU + 옥살리플라틴) 처리, 1명 (세툭시맙 + 젤로다) 처리 및 1명 (파니투무맙 + 이리노테칸) 처리를 받았다. 11명은 처리에 반응했고, 21명은 반응하지 않았다.

[0161]

유효성 검사 세트는 각각 19명의 두 독립 그룹으로부터 38명으로 구성된다:

[0162]

· 이 그룹 환자(그룹 2) 중 한 그룹은 11명의 남자 및 8명의 여자인 19명의 환자로 구성되고, 평균 연령은 67.65 ± 11.61 세였다. 이들 중, 11명은 (세툭시맙 + 이리노테칸) 처리, 4명 (세툭시맙 + 5FU + 이리노테칸) 처리, 4명은 파니투무맙 처리를 수용했다. 4명은 처리에 반응했고, 15명은 처리에 반응하지 않았다.

[0163]

· 다른 그룹의 환자(그룹 3)는 12명의 남자, 7명의 여자인 19명의 환자를 포함하고, 평균 연령은 61.84 ± 12.28 세였다. 모두는 이 연구에 포함될 때 전이성 질환을 앓고 있었다. 이들 환자 모두는 KRAS 야생형 결장암을 발생했다. 모두는 (파니투무맙 + 이리노테칸) 처리를 받았다. 8명은 처리에 반응했고, 11명은 처리에 반응하지 않았다.

[0164]

KRAS 상태의 측정, miRNA 발현 수준의 정량화 및 통계적 분석은 실시예 1에서 설명된 바와 같이 수행했다.

[0165]

BRAF 상태는 문헌[참조: Lievre et al, Cancer Res, 2006. 66: 3992-3995; and Laurent-Puig P, et al, J]에 기술된 설명된 바와 같이 대립 유전자 판별 분석에 의해 종양 시료에서 결정되었다. BRAF 유전자가 교체 V600E(T1799A)를 나타내지 않는 경우 종양 세포에서 BRAF 유전자는 야생형으로 간주하였다.

[0166]

생존 모델 예측은 실시예 1과 같이 계산하였다.

[0167]

환자의 반응 상태는 RECIST 기준에 따라 평가하였다. 진행까지 추적의 중간값은 19.86주였고, 전체 생존 기간의 중간값은 11.67개월이었다.

[0168]

결과

[0169]

특정 TaqMan 사전 설계된 분석을 사용하는 실시간 miRNA 정량적 PCR 분석을 훈련된 33명의 환자 세트에 대해 hsa-miR31-3p의 발현 정도를 정량화하기 위해 수행하였다. hsa-miR31-3p는 불량한 예후를 갖는 환자로부터의 시료와 양호한 예후를 갖는 환자로부터의 시료 사이의 상당히 상이한 발현 수준을 나타냈다(도 3). 훈련 데이터세트로부터의 주성분을 사용하는 적합화된 쿠스 비례 위험 모델의 계수는 PFS에 대해 3.388인 것으로 추정되었다. 시료는 예후 점수가 -0.03123(PFS)보다 크거나/작거나 또는 동일한 경우, 시료는 고위험/저위험에 존재하는 것으로 예측되었다.

[0170]

hsa-miR31-3p 발현 수준이 낮은 저위험 환자 16명 중 총 10명이 질환 부재로서 25주 이상 생존하고, PPV = 63%, [95% CI: 35%-85%]를 제공하는 반면, hsa-miR31-3p 발현 수준이 높은 17명의 환자 중 13명이 20주 이내에 질환

진행을 나타내고 NPV = 76% [95% C1: 50%-93%]를 제공한다. 이러한 값들은 hsa-miR31-3p 발현에 대해 68%[95% C1: 43%-87%](13/19)을 위한 특이성 및 71%[95% C1: 41%-91%](10/14)의 감도를 제시한다.

[0171] 예후 부재 생존 점수는 다음 식에 의해 계산될 수 있다:

[0172] PFS 점수 = $0.178366^* x - 1.363693$ (여기서, x는 hsa-miR31-3p의 기록된 발현이다).

[0173] hsa-miR31-3p의 예측 능력을 검증하기 위해, 이 miRNA의 발현 수준은 38개의 독립 시료에서 Taqman으로 측정했다. 본 발명자들은 환자의 질환 부재 생존을 예측하기 위해 그룹 1 내지 그룹 2 및 3으로부터 수득된 다변수 모델을 적용했다. 만텔-콕스(Mantel-Cox) 시험 및 게한-브르슬로-윌콕슨(Gehan-Breslow-Wilcoxon) 시험으로, 불량한 예후 시료를 갖는 환자로부터의 시료 및 양호한 예후를 갖는 환자로부터의 시료 사이에 상당히 상이하다. 검증 세트가 처리를 수용하면서 분리될 경우, 중요한 결과는 만텔-콕스 시험에 의해 그룹 2에서 및 그룹 3을 위해 잔류한다. hsa-miR31-3p 발현이 낮은 16명의 환자 중 13명은 21주 동안 진행 부재 생존(PFS)을 나타내어 PPV 81%[95% C1: 54%-96%]를 제시하고, 높은 수준의 hsa-miR31-3p를 갖는 22명의 환자 중 14명은 20개월 이하의 PFS를 나타내어 NPV 64%[95% C1: 41%-83%]를 나타낸다. 이러한 값들은 hsa-miR31-3p 발현에 대한 82%[95% C1: 56%-96%]의 특이성 및 62%[95% C1: 38%-82%] 감도를 제시한다.

[0174] 또한, hsa-miR31-3p 발현 수준에 기초한 예후의 평가는 임상적으로 고도로 현저한데, 이는 KRAS 상태 단독에 기초하여 반응할 가능성이 있는 것으로 현재까지 간주된, 고도 hsa-miR31-3p 발현을 갖는 KRAS 야생형 환자가 항-EGFR 항체에 반응하는 매우 낮은 기회 및 따라서 매우 불량한 예후를 실제로 갖기 때문이다. 이는 도 5에 설명되어 있고, 이는 KRAS 돌연변이된 환자(KRAS^M), 및 hsa-miR31-3p 발현 수준 및 관련된 예후에 기초하여 분리된 2개의 KRAS 야생형 환자 모집단의 생존 곡선을 나타낸다(낮은 hsa-miR31-3p 발현에 대해 양호한 예후, 및 고도 hsa-miR31-3p 발현에 대해 불량한 예후). KRAS 돌연변이된 환자(KRAS^M)의 생존 곡선은 hsa-miR31-3p(불량)의 발현 수준에 의해 불량한 예후 그룹으로 분류된 KRAS 야생형 환자의 생존 곡선과 유사하다. 이는, 환자가 hsa-miR31-3p의 발현 수준에 의해 "고위험"으로 분류되는 경우, 항-EGFR 치료의 전체 무효성을 시사한다.

[0175] 이들 결과에 의해, 공변량으로서 BRAF 돌연변이 상태 및 로그. miR 발현을 갖는 다변량 콕스 비례 위험 모델은 진행 가능성을 예측하기 위해 PFS에 대한 노모그램을 구축하는데 사용되었다(도 6A 및 6B 참조). 본 발명자들은 예측 모델을 개발하는데 사용된 훈련 세트(그룹 1로부터의 환자 포함) 및 검증 세트(그룹 2 및 3로부터의 환자 포함)으로 환자의 이용가능한 데이터를 분할했다. 당해 모델의 예측 정확도는 i) 수신기 작동 특성 곡선(0.7535888)하의 면적에 수치적으로 균등한 일치 지수 및 ii) 진행 위험에 기초하여 수행된 일변량 콕스 생존 분석($p<0.0001$)을 사용하여 독립적 검증 데이터세트로 정량화했다(도 6B). 이는 hsa-miR31-3p의 발현 수준과 진행 무생존 사이의 상관관계를 나타낸다. hsa-miR31-3p의 발현 수준이 많으면, 예후는 덜 양호하다.

[0176] hsa-miR31-3p의 발현 수준에 기초한 또 다른 노모그램은, AUC=0.77 및 일변량 콕스 $p<0.0001$ 인 모델의 예후 정확도로, 연령, 성별 및 BRAF 돌연변의 존재 또는 부재를 고려하여 정밀화했다(도 7A 및 7B).

[0177] 실시예 3: 포르말린 고정된-파라핀 매립된 시료와 동결 종양 시료 결과 사이의 상관관계, 및 FFPE 독립적 종양 시료 상에서 정밀화된 노모그램의 예측치의 확인

[0178] 환자 및 방법

[0179] 환자 시료는 41명의 환자, 27명의 남성 및 14명의 여성으로 구성된다. 연령의 평균은 60.5 ± 12.4 세이다. 모든 환자는 이리노테칸 기반 화학요법으로 진행했고, 이어서 각각 격주 사이클(사이클은 매 14일이다)의 1일에서 90분 이내에 이리노테칸 $180 \text{ mg}/\text{m}^2$ 의 투여 직전에, 60분 정맥내 주입으로 1일에 $6 \text{ mg}/\text{kg}$ 의 용량으로 파니투무맙을 제공받았다. 모든 이들 환자의 경우, 포르말린 고정된-파라핀 매립된(FFPE) 종양 시료는 이용가능하고, 이들중 15명의 경우, 동결 종양 시료가 또한 이용가능하며, 두 시료 유형 사이의 hsa-miRNA-31-3p 발현 수준의 직접 비교를 가능하게 한다.

[0180] 작은 RNA는 miRNeasy 추출 키트(Qiagen)을 사용하여 FFPE 종양 시료로부터 및 암비온(Ambion)사의 mirVanamiRNA 단리 키트를 사용하여 동결 종양 시료로부터 추출했다. 회귀 분석은 동일한 환자($n=15$)에 대해 동결 및 FFPE 값을 비교하기 위해 수행했다. 두 변수 사이의 관계를 설명하기 위한 선형 회귀 모델 시험은 데이터에 적합한 등식의 측정을 가능하게 한 직선을 사용하여 수행했다.

[0181] KRAS 및 BRAF 상태의 측정, miRNA 발현 수준의 정량화 및 통계학적 분석은 실시예 1 및 2에 기재된 바와 같이

수행했다. KRAS 돌연변이의 존재 때문에 2명의 환자는 제외했다. 환자의 반응 상태는 RECIST 기준에 따라 평가했다. 39명의 환자 중에서, 당해 치료에 17명은 반응했고 21명은 반응하지 않았고, 1명은 평가할 수 없었다. 진행까지의 후속 중앙값은 28.3주였고, 전체 생존의 중앙값은 12.9개월이었다.

[0182] 생존 분석 및 모델 예측은 실시예 2에 기재된 바와 같이 나머지 39명의 환자에 대해 수행되었다.

[0183] 결과

[0184] 특정의 TaqMan 사전-설계된 분석을 사용한 실시간 miRNA(miR) 정량적 PCR은 모든 39명 환자에 대해 hsa-miR31-3p의 발현 수준을 정량화하기 위해 FFPE 및 동결 시료로 수행했다.

[0185] 선형 회귀 모델(도 8)은 13명의 동결 및 상응하는 FFPE 시료의 발현 수치 사이에 강력한 상관관계($R^2=0.78$ 로 조정됨)를 생성했고, 직선성에 대한 실제의 증거($p=7.6e-06$, F-시험=50.98, DF=13)를 추정하지 않았고, 하기 식을 수득한다:

$$y = 40.439^* x - 397.3$$

[0187] 여기서, y는 동결 환자 시료에서 hsa-miR-31-3p의 발현 수준에 상응하고, x는 상응하는 FFPE 환자 시료에서 hsa-miR-31-3p의 발현 수준에 상응한다. 식은 각각 수집된 FFPE 시료에 대한 "동결-예상된"(FE) 발현 수치를 측정하기 위해 사용되었다.

[0188] 콕스 비례 위험 모델을 사용한 단변량 생존 분석은 hsa-miR-31-3p의 FE 발현 수준(Wald 시험, $p=0.004$)의 생존 위험 진행에 대한 예측 값을 확인했다(도 9 참조).

[0189] hsa-miR-31-3p의 FE 발현 수준의 예측 정확도는 또한 BRAF 돌연변이 상태 및 로그. miR 발현 둘 다를 사용하여 실시예 2에 상술한 PFS에 대한 노모그램에 기초하여 또한 측정했다. 150 부트스트랩 실행 후, 모델은 0.664의 일치 지수를 나타냈다. 각각의 시료 값은 진행의 생존 위험(Wald 시험, $p=0.0005$)을 예측하는 것으로 밝혀진 "진행 위험" 점수(실시예 2에 기재된 바와 같음)를 제공했다(도 10 참조).

[0190] 참고문헌 목록

Albitar Let al. Mol Cancer 2010;9:166;

Ambros V et al, RNA 2003 9(3):277-279 ;

Bair E. & R Tibshirani, PLOS Biology 2:511-522, 2004;
 Bos. Cancer Res 1989;49:4682-4689;
 Bustin et al., 2005, Clin. Sci., 109:365-379 ;
 Chan SL et al. Expert OpinTher Targets. 2012 Mar;16Suppl 1:S63-8;
 Chang KW et al. Oral Oncol. 2012 Jul 30,
 Chu H et al. Mutagenesis. 2012 Oct 15;
 Ciardello F et al. N Engl J Med. 2008 Mar 13;358(11):1160-74 ;
 Cox, D. R. (1972). Journal of the Royal Statistical Society, Series B 34 (2), 187–220;
 Cunningham et al, N Engl Med 2004;351: 337-45;
 Demiralay et al. Surgical Science, 2012, 3, 111-115;
 Edkins et al. Cancer BiolTher. 2006 August ; 5(8): 928–932
 Eisenhauer et al, European Journal of Cancer, 2009, 45:228-247 ;
 Griffiths-Jones S. NAR 2004 32(Database Issue):D109-D111;
 Griffiths-Jones S et al. NAR 2006 34(Database Issue):D140-D144;
 Griffiths-Jones S et al. NAR 2008 36(Database Issue):D154-D158;
 HatakeyamaH. et al. PLoS One.2010 Sep 13;5(9):e12702;
 Kozomara A et al. NAR 2011 39(Database Issue):D152-D157 ;
 Laurent-Puig P, et al, J Clin Oncol. 2009, 27(35):5924-30;
 Leboulleux S et al. Lancet Oncol. 2012 Sep;13(9):897-905;
 Leslie KK et al. GynecolOncol.2012 Nov;127(2):345-50;
 Li Y et al. Oncol Rep. 2010 Oct;24(4):1019-28;
 Liebner DA et al. TherAdvEndocrinolMetab. 2011 Oct;2(5):173-95;
 Lievre et al, Cancer Res. 2006 66(8):3992-5;
 Lièvre et al. J Clin Oncol. 2008 Jan 20;26(3):374-9 ;
 Mimeault M et al. PLoS One.2012;7(2):e31919;
 MosakhaniN. et al. Cancer Genet. 2012 Oct 22.doi:pii: S2210-7762(12)00229-3.
 10.1016/j.cancergen.2012.08.003;
 Ogino S, et al. J Mol Diagn 2008;7:413–21;
 Pan J et al. Head Neck. 2012 Sep 13;
 Ragusa M. et al. Mol Cancer Ther. 2010 Dec;9(12):3396-409;
 Shepherd F A, et al, N Engl J Med 2005; 353:123-132;
 Tam et al. Clin Cancer Res 2006;12:1647-1653;
 Thomasson M et al. Br J Cancer 2003, 89:1285–1289;
 Thomasson M et al. 2012 May 3;5:216;
 U.S. Pat. No. 7,101,663;
 Wheeler DL et al. Nat Rev ClinOncol. 2010 September ; 7(9): 493–507 ;
 WO2009/080437 ;
 WO2010/121238;

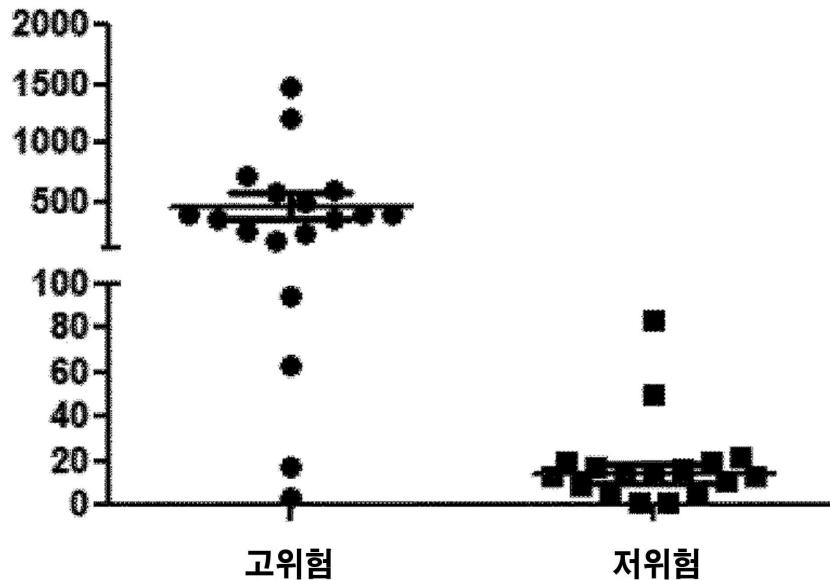
[0192]
 WO2011/135459;
 Xiao W et al. 2012. PLoS ONE 7(6): e38648;
 Zeineldin R et al. J Oncol. 2010;2010:414676,
 Zhao L. et al. Int J Biochem Cell Biol. 2012 Nov;44(11):2051-9.

[0193]

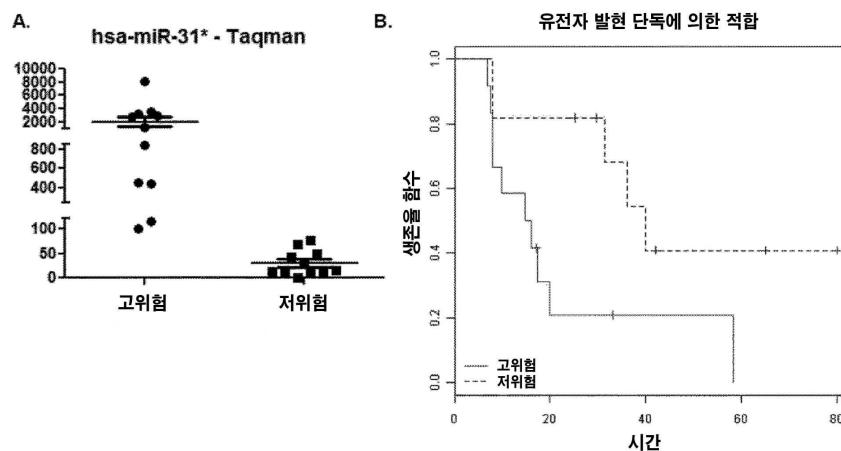
도면

도면1

miR-31* - 어레이

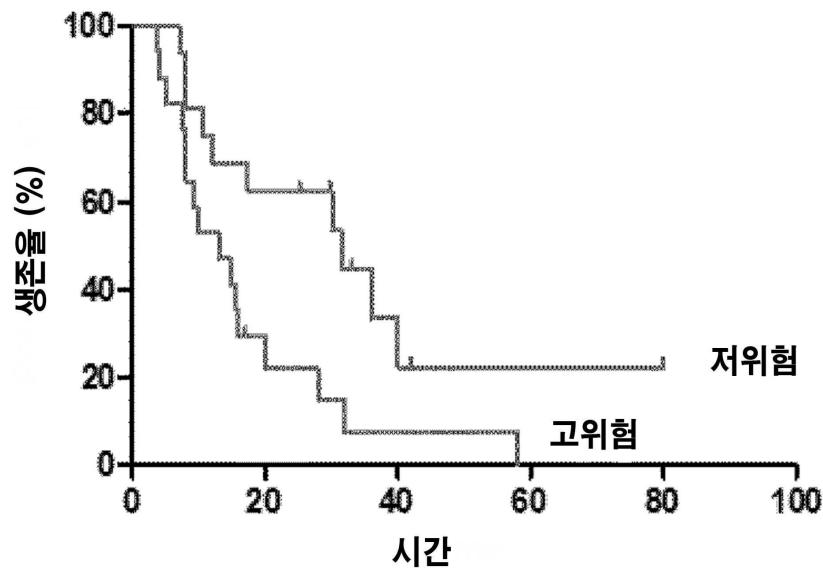


도면2

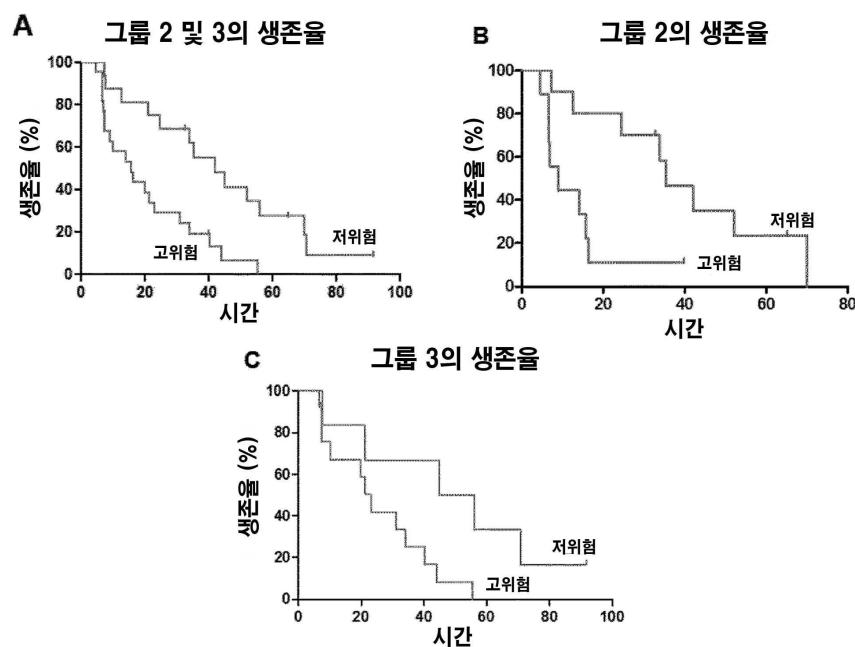


도면3

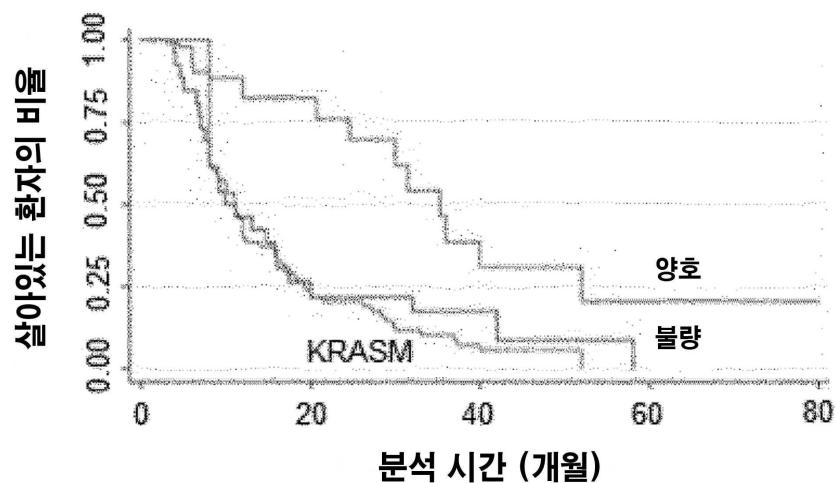
그룹 1의 생존율



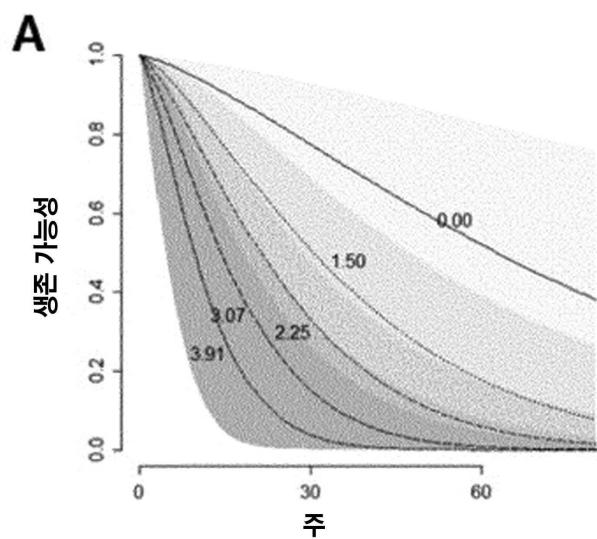
도면4



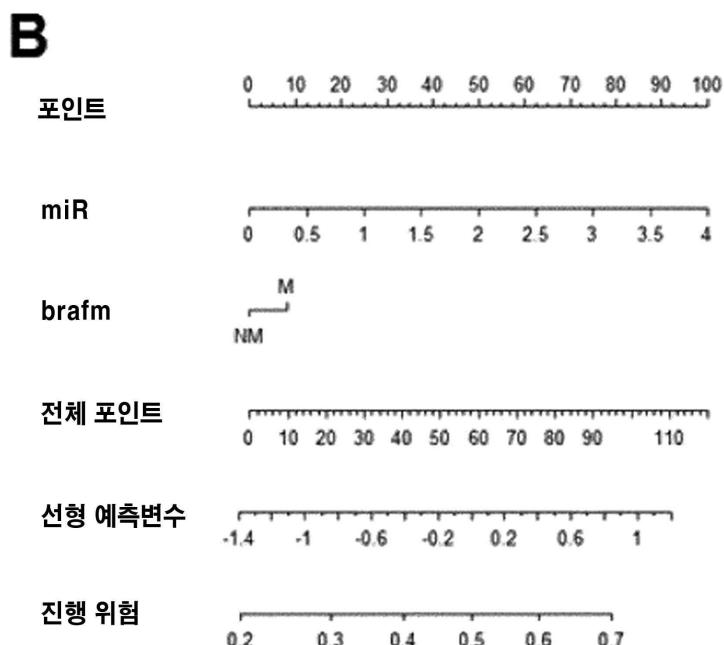
도면5



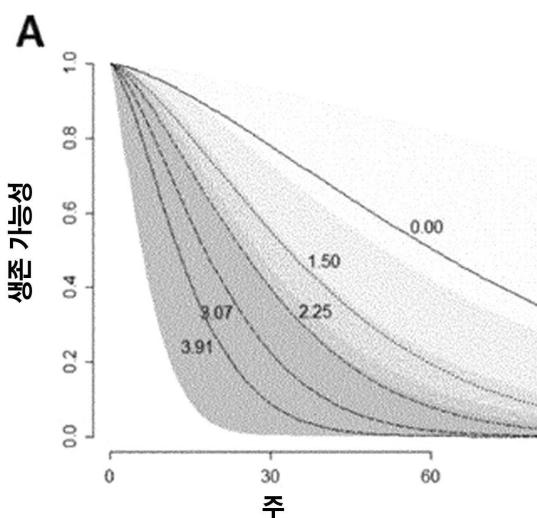
도면6



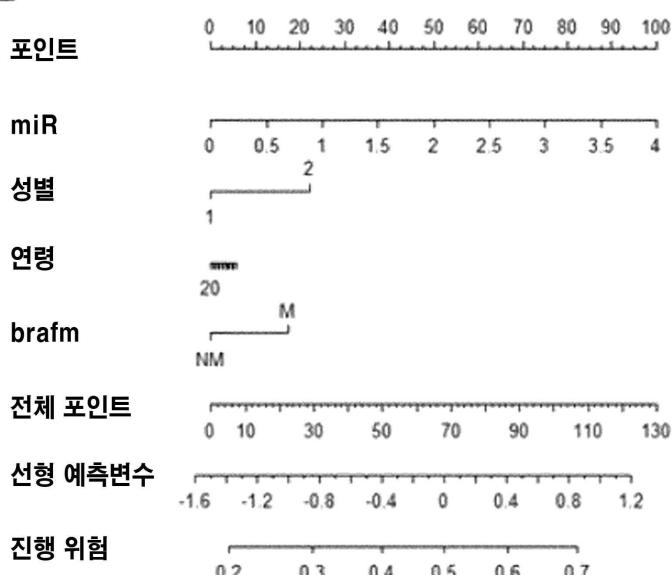
brafm=NM으로 조정됨



도면7

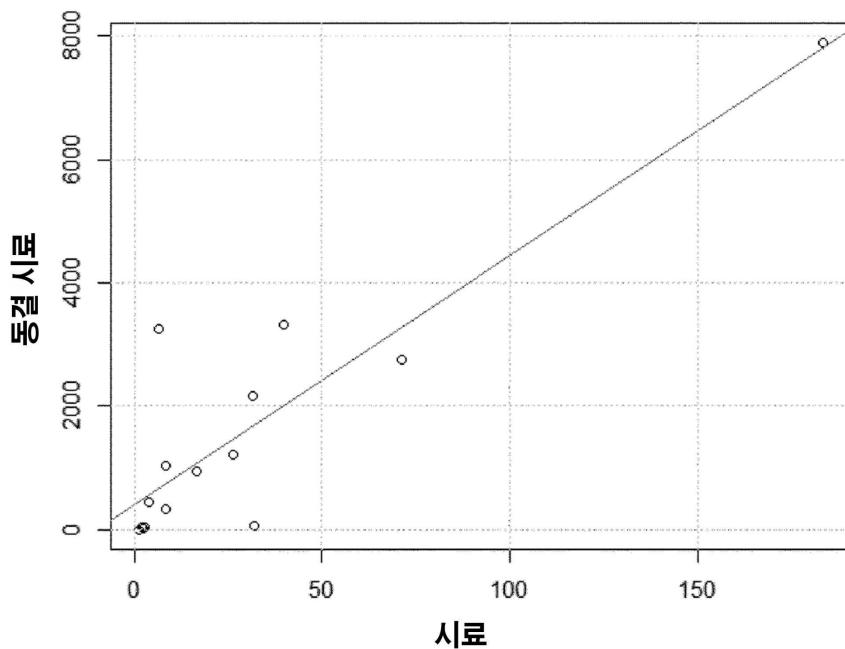


성별=1 연령=57 brafm=NM으로 조정됨

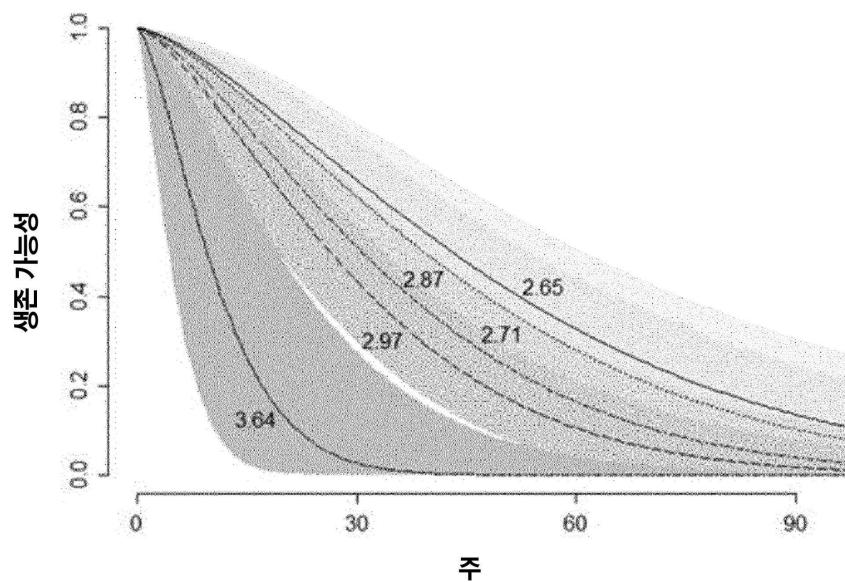
B

도면8

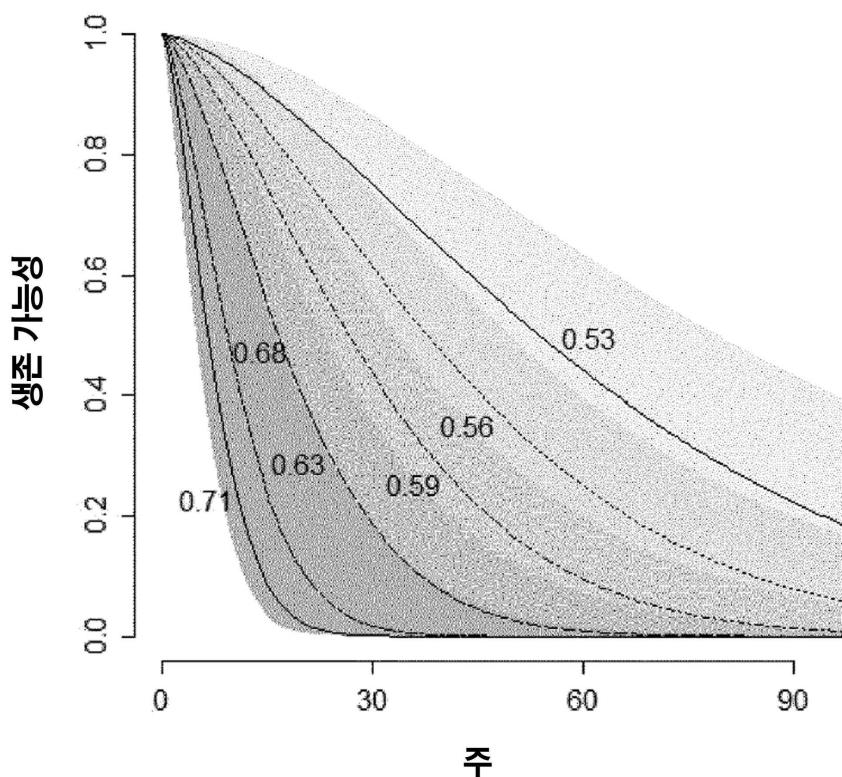
miR31-3p 발현 수준의 선형 회귀 분석



도면9



도면10



서 열 목 록

- <110> INTEGRAGEN
 INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE(INSERM)
 CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE(C.N.R.S.)
 ASSISTANCE PUBLIQUE-HOPITAUX DE PARIS
 UNIVERSITE PARIS DESCARTES
- <120> A method for predicting responsiveness to a treatment with an EGFR inhibitor
- <130> IPA140487-FR
- <150> EP 11306568.4
- <151> 2011-11-25
- <150> EP 12306042.8
- <151> 2012-08-31
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0
- <210>
 1
<211> 22
<212> RNA

<213> homo sapiens

<400> 1

ugcuaugcca acaauauugcc au 22

<210> 2

<211> 188

<212> PRT

<213> homo sapiens

<400> 2

Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr

20 25 30

Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly

35 40 45

Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr

50 55 60

Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys

65 70 75 80

Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr

85 90 95

Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val

100 105 110

Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys

115 120 125

Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr

130 135 140

Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val

145 150 155 160

Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys

165 170 175

Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met

180 185

<210> 3
 <211> 766
 <212> PRT
 <213> homo sapiens
 <400> 3

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly

20 25 30

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp

35 40 45

Asn Ile Lys Gln Met Ile Lys Leu Thr Gln Glu His Ile Glu Ala Leu

50 55 60

Leu Asp Lys Phe Gly Gly Glu His Asn Pro Pro Ser Ile Tyr Leu Glu

65 70 75 80

Ala Tyr Glu Glu Tyr Thr Ser Lys Leu Asp Ala Leu Gln Gln Arg Glu

85 90 95

Gln Gln Leu Leu Glu Ser Leu Gly Asn Gly Thr Asp Phe Ser Val Ser

100 105 110
 Ser Ser Ala Ser Met Asp Thr Val Thr Ser Ser Ser Ser Ser Leu

115 120 125

Ser Val Leu Pro Ser Ser Leu Ser Val Phe Gln Asn Pro Thr Asp Val

130 135 140

Ala Arg Ser Asn Pro Lys Ser Pro Gln Lys Pro Ile Val Arg Val Phe

145 150 155 160

Leu Pro Asn Lys Gln Arg Thr Val Val Pro Ala Arg Cys Gly Val Thr

165 170 175

Val Arg Asp Ser Leu Lys Ala Leu Met Met Arg Gly Leu Ile Pro

180 185 190

Glu Cys Cys Ala Val Tyr Arg Ile Gln Asp Gly Glu Lys Lys Pro Ile

195 200 205

Gly Trp Asp Thr Asp Ile Ser Trp Leu Thr Gly Glu Glu Leu His Val

210	215	220
Glu Val Leu Glu Asn Val Pro Leu Thr Thr His Asn Phe Val Arg Lys		
225	230	235
Thr Phe Phe Thr Leu Ala Phe Cys Asp Phe Cys Arg Lys Leu Leu Phe		
245	250	255
Gln Gly Phe Arg Cys Gln Thr Cys Gly Tyr Lys Phe His Gln Arg Cys		
260	265	270
Ser Thr Glu Val Pro Leu Met Cys Val Asn Tyr Asp Gln Leu Asp Leu		
275	280	285
Leu Phe Val Ser Lys Phe Phe Glu His His Pro Ile Pro Gln Glu Glu		
290	295	300
Ala Ser Leu Ala Glu Thr Ala Leu Thr Ser Gly Ser Ser Pro Ser Ala		
305	310	315
Pro Ala Ser Asp Ser Ile Gly Pro Gln Ile Leu Thr Ser Pro Ser Pro		
325	330	335
Ser Lys Ser Ile Pro Ile Pro Gln Pro Phe Arg Pro Ala Asp Glu Asp		
340	345	350
His Arg Asn Gln Phe Gly Gln Arg Asp Arg Ser Ser Ser Ala Pro Asn		
355	360	365
Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg		
370	375	380
Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala		
385	390	395
Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu		
405	410	415
Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser		
420	425	430
Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp		
435	440	445
Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly		
450	455	460
Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val		

465	470	475	480
Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln			
485	490	495	
Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn			
500	505	510	
Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val			
515	520	525	
Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile			
530	535	540	
Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr			
545	550	555	560
Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp			
565	570	575	
Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile			
580	585	590	
Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His			
595	600	605	
Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val			
610	615	620	
Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr			
625	630	635	640
Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr			
645	650	655	
Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly			
660	665	670	
Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala			
675	680	685	
Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Arg Asp Glu Arg			
690	695	700	
Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser			
705	710	715	720

Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala
725 730 735

Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys
740 745 750

Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
755 760 765