



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0090431
 (43) 공개일자 2017년08월07일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 31/53 (2006.01) *A61K 31/4184* (2006.01)
A61K 31/4965 (2006.01) *A61K 31/498* (2006.01)
A61K 31/506 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 31/53 (2013.01)
A61K 31/4184 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-7015421
- (22) 출원일자(국제) 2015년12월08일
 심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2017년06월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/EP2015/078919
- (87) 국제공개번호 WO 2016/091849
 국제공개일자 2016년06월16일
- (30) 우선권주장
 14197400.6 2014년12월11일
 유럽특허청(EPO)(EP)

- (71) 출원인
바이엘 파마 악티엔게젤샤프트
 독일 베를린 물레르스트라쎄 178 (우편번호 :
 데-13353)
- (72) 발명자
엘링하우스, 페터
 독일 49324 멜레 아우프 테어 오브스트비제 3
헤라울트, 멜라니
 독일 40223 뒤셀도르프 울렌베르크 스트라쎄 3데
- (74) 대리인
양영준, 안철균

전체 청구항 수 : 총 31 항

(54) 발명의 명칭 **범 FGFR 억제제의 용도 및 범 FGFR 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적절한 암 환자를 확인하는 방법**

(57) 요약

본 발명은 대상체로부터의 종양 조직 샘플 중의 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA의 합계가 과다발현된 것으로 측정된 대상체에서 암 치료에 사용하기 위한 범 FGFR 억제제에 기초한다.

(52) CPC특허분류

A61K 31/4965 (2013.01)

A61K 31/498 (2013.01)

A61K 31/506 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

대상체로부터의 종양 조직 샘플 중에 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA의 합계가 과다발현된 것으로 측정된 대상체에서 암 치료에 사용하기 위한 범 FGFR 억제제.

청구항 2

제1항에 있어서, mRNA 과다발현이 계내 하이브리드화에 의하면 종양 조직 샘플의 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA의 합계의 점수가 적어도 4인 것을 특징으로 하는 것인 범 FGFR 억제제.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 두경부의 편평 세포 암종인 범 FGFR 억제제.

청구항 4

제3항에 있어서, 점수 합계가 적어도 6인 범 FGFR 억제제.

청구항 5

제4항에 있어서, FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3 중 적어도 하나의 점수가 적어도 3인 범 FGFR 억제제.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 식도암인 범 FGFR 억제제.

청구항 7

제6항에 있어서, 점수 합계가 적어도 5인 범 FGFR 억제제.

청구항 8

제7항에 있어서, FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3 중 적어도 하나의 점수가 적어도 4인 범 FGFR 억제제.

청구항 9

제8항에 있어서, FGFR1의 점수가 적어도 4인 범 FGFR 억제제.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 난소암인 범 FGFR 억제제.

청구항 11

제10항에 있어서, 점수 합계가 적어도 9인 범 FGFR 억제제.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 폐암인 범 FGFR 억제제.

청구항 13

제12항에 있어서, 점수 합계가 적어도 5인 범 FGFR 억제제.

청구항 14

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 결장암인 범 FGFR 억제제.

청구항 15

제1항 또는 제2항에 있어서, 암이 방광암인 범 FGFR 억제제.

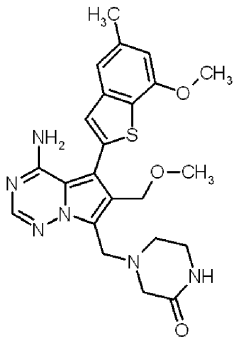
청구항 16

제15항에 있어서, 점수 합계가 적어도 5인 범 FGFR 억제제.

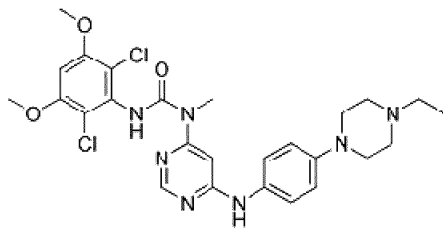
청구항 17

염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있는 하기 화학식 I, II, III, IV 및 V의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택되는, 제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 따른 범 FGFR 억제제의 용도:

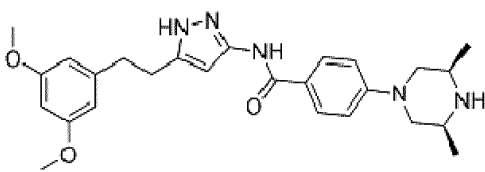
<화학식 I>



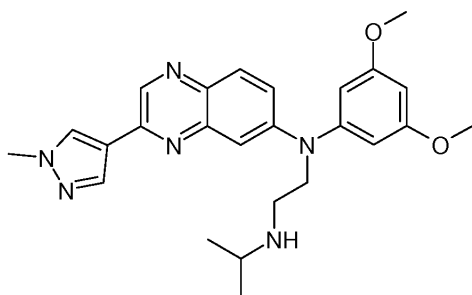
<화학식 II>



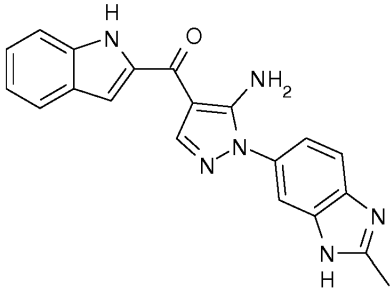
<화학식 III>



<화학식 IV>



<화학식 V>



청구항 18

환자로부터의 종양 조직 샘플을 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA 과다발현의 존재에 대하여 시험하는 것을 포함하며, 여기서 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3의 측정된 mRNA 발현의 합계가 과다발현인 경우, 환자는 범 FGFR 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적격인, 범 FGFR 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적격인 암 환자를 확인하는 방법.

청구항 19

제18항에 있어서, 암이 두경부의 편평 세포 암종인 방법.

청구항 20

제18항에 있어서, 암이 식도암인 방법.

청구항 21

제18항에 있어서, 암이 난소암인 방법.

청구항 22

제18항에 있어서, 암이 폐암인 방법.

청구항 23

제18항에 있어서, 암이 결장암인 방법.

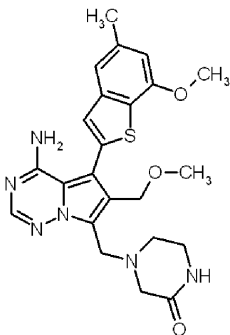
청구항 24

제18항에 있어서, 암이 방광암인 방법.

청구항 25

제18항에 있어서, 범 FGFR 억제제는 염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있는 하기 화학식 I의 화합물인 방법:

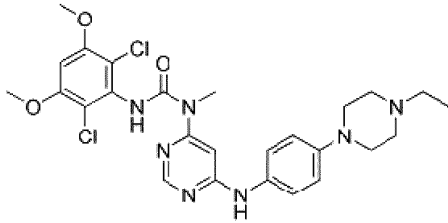
<화학식 I>



청구항 26

제18항에 있어서, 범 FGFR 억제제는 염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있는 하기 화학식 II의 화합물인 방법:

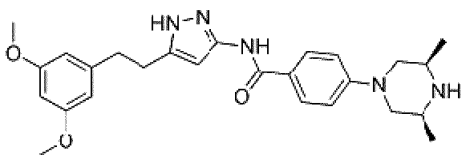
<화학식 II>



청구항 27

제18항에 있어서, 범 FGFR 억제제는 염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있는 하기 화학식 III의 화합물인 방법:

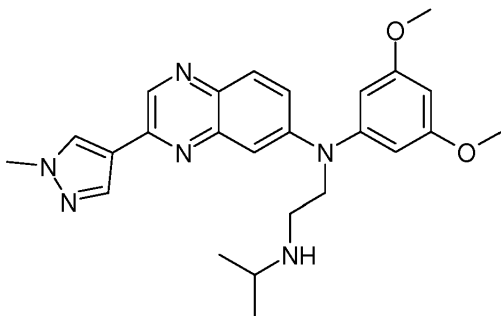
<화학식 III>



청구항 28

제18항에 있어서, 범 FGFR 억제제는 염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있는 하기 화학식 IV의 화합물인 방법:

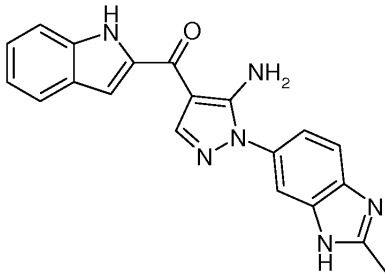
<화학식 IV>



청구항 29

제18항에 있어서, 범 FGFR 억제제는 염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있는 하기 화학식 V의 화합물인 방법:

<화학식 V>



청구항 30

제18항 내지 제29항 중 어느 한 항에 있어서, 계내 하이브리드화에 의하면 포름알데히드 고정된 암 조직 샘플의 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3의 합계의 점수가 적어도 4인 환자가 각각의 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적격인 것인 방법.

청구항 31

대상체로부터의 종양 조직 샘플 중에 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA의 합계가 과다발현된 것으로 측정된 대상체에서, 유효량의 범 FGFR 억제제를 투여함으로써 암을 치료하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 대상체로부터의 종양 조직 샘플 중 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA의 합계가 과다발현된 것으로 측정된 대상체에서 암 치료에 사용하기 위한 범 FGFR 억제제에 기초한다.
- [0002] 추가 실시양태에서, 본 발명은 환자로부터의 종양 조직 샘플을 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA 과다발현의 존재에 대하여 시험하는 것을 포함하고, 여기서 FGFR1, FGFR2 및 FGFR3의 측정된 mRNA 발현의 합계가 과다발현인 경우, 환자는 범 FGFR 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적격인, 범 FGFR 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적격인 암 환자를 확인하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 암이 전 세계 사망의 주요 원인이며, 2008년 760만 건의 사망 (전체 사망의 약 13%)을 차지하였다. 암에 의한 사망은 전 세계적으로 계속 상승하여 2030년에는 1,100만 건을 초과할 것으로 추정된다 (WHO source, Fact Sheet No. 297, February 2011).
- [0004] 암이 발생할 수 있는 방식에는 여러 가지가 존재하며, 이는 암 요법이 어려운 이유 중 하나가 된다. 세포의 형질전환이 발생할 수 있는 한 방식은 유전자 변형을 따르는 것이다. 인간 게놈 프로젝트 완료 결과, 인간 암 유전자의 게놈 불안정성 및 이질성이 밝혀졌다. 상기 유전자 변형을 확인하는 최근의 전략법을 통해 암 유전자 발견 프로세스는 가속화되었다. 유전자 이상은 예를 들어, 단백질의 과다발현을 일으킬 수 있고, 이로써 상기 단백질의 비-생리학적인 활성화를 초래할 수 있다. 다수의 종양단백질의 유래 기점이 되는 한 단백질 패밀리는 티로신 키나제 및 특히, 수용체 티로신 키나제 (RTK)이다. 지난 20년 동안, 다수의 연구 방안을 통해 암을 일으키는 유해 세포 성장에 있어서의 RTK 매개 신호전달의 중요성이 입증되었다. 최근 수년간, 진료소에서 신규한 부류의 항-종양원성 작용제로서 티로신 키나제에 대한 선택성 소분자 억제제를 이용한 결과 유망한 결과가 달성되었다 [Swinney and Anthony, *Nature Rev. Drug Disc.* 10 (7), 507-519 (2011)].
- [0005] 섬유모세포 성장 인자 (FGF) 및 그의 수용체 (FGFR)는 다양한 측면의 배아 발생 및 성인 병리생리상태를 포함하는 각종의 생물학적 프로세스에서 중요한 역할을 하는 독특하고 다양한 신호전달 시스템의 일부를 형성한다 [Itoh and Ornitz, *J. Biochem.* 149 (2), 121-130 (2011)]. 시공간적 방식으로, FGF는 FGFR 결합을 통해, 이동, 증식, 분화, 및 생존을 비롯한 다양한 세포 기능을 자극한다.
- [0006] FGF 패밀리는 세포 표면에서 발현된, 고도로 보존된 4개의 수용체 티로신 키나제 (FGFR-1 내지 -4)에 결합하는 18개의 분비형 폴리펩티드 성장 인자를 포함한다. 추가로, FGFR-5도 FGF에 결합할 수 있지만, 이는 키나제 도

메인은 갖고 있지 않으며, 따라서 세포내 신호전달은 없다. 리간드/수용체 상호작용의 특이성은 선택적 전사 개시, 선택적 스플라이싱, 및 C-말단 말단절단에 의해 다수의 이소형을 생성시키는 다수의 전사 및 번역 프로세스에 의해 증진된다. 각종의 헤페란 술페이트 프로테오글리칸 (예컨대, 신데칸)은 FGF/FGFR 복합체의 일부일 수 있고, 신호전달 반응을 유도할 수 있는 FGF의 능력에 강하게 영향을 미칠 수 있다 [Polanska *et al.*, *Developmental Dynamics* 238 (2), 277-293 (2009)]. FGFR은 3개의 세포외 면역글로불린-유사 도메인, 단일 통과 막횡단 도메인, 및 세포내 이량체화된 티로신 키나제 도메인으로 이루어진 세포 표면 수용체이다. FGF의 결합은 세포내 키나제를 매우 인접하게 하여 서로 간에 인산 전달 반응이 이루어질 수 있도록 할 수 있다. 7개의 인산화 부위가 확인되었다 (예컨대, FGFR-1에서, Tyr463, Tyr583, Tyr585, Tyr653, Tyr654, Tyr730, 및 Tyr766).

[0007] 상기 포스포티로신 기 중 일부는, 그 자체가 또한 FGFR에 의해 직접 인산화될 수 있는 하류 신호전달 분자에 대한 도킹 부위로서의 역할을 하며, 이는 다중의 신호전달 경로의 활성화를 유도한다. 따라서, MAPK 신호전달 캐스케이드는 세포 성장 및 분화에 연루되어 있고, PI3K/Akt 신호전달 캐스케이드는 세포 생존 및 세포 운명 결정에 관여하는 반면, PI3K 및 PKC 신호전달 캐스케이드는 세포 극성을 제어하는 작용을 한다. 현재까지 FGF 신호전달에 대한 수개의 피드백 억제제가 확인되었으며, 이는 Spry (스프라우트(Sprouty)) 및 Sef (FGF와 발현이 유사) 패밀리의 구성원을 포함한다. 추가로, 특정 조건하에서, FGFR은 프리-골지막으로부터 세포질로 방출된다. 수용체 및 그의 리간드인 FGF-2는 임포틴을 포함하는 기전에 의해 핵 내로 함께 공동 수송되고, 유전자 활성화 계이팅 인자로서의 역할을 하는 공동 필수 전사 공활성인자인 CREB-결합 단백질 (CBP) 복합체에 관여한다. FGF-2, FGFR-1 및 FGFR-2의 면역-조직화학적 발현과, 그의 세포질 및 핵 종양 세포 국제화 사이에 다중의 상관관계가 있는 것으로 관찰되었다. 예를 들어, 이러한 연관성은 또한 폐 선암종에서 핵 수준에서 관찰되었고, 이는 핵에서의 상기 복합체의 적극적인 역할을 강조한다 [Korc and Friesel, *Curr. Cancer Drugs Targets* 5, 639-651 (2009)].

[0008] FGF는 발생 조직 및 성인 조직, 둘 모두에서 광범위하게 발현되고, 조직 발생, 조직 재생, 혈관신생, 신생물성형질전환, 세포 이동, 세포 분화, 및 세포 생존을 비롯한, 각종의 정상적 및 병적 프로세스에서 중요한 역할을 한다. 추가로, 혈관신생유발 인자로서의 FGF는 또한 혈관 내피 성장 인자 수용체-2 (VEGFR-2) 억제에 대한 저항 현상 출현과 연루되어 왔다 [Bergers and Hanahan, *Nat. Rev. Cancer* 8, 592-603 (2008)].

[0009] 최근 신호전달 네트워크의 온코게놈 프로파일을 통해 인간에서 흔한 일부 암 출현에서 비정상적인 FGF 신호전달에 대한 중요한 역할이 입증되었다 [Wesche *et al.*, *Biochem. J.* 437 (2), 199-213 (2011)]. 리간드-비의존적 FGFR 구성적 신호전달이 다수의 인간 암, 예컨대, 뇌암, 두경부암, 위암 및 난소암에서 기술되었다. FGFR의 돌연변이화된 형태 뿐만 아니라, FGFR-유전자내 전좌가 악성 종양, 예컨대, 골수증식성 질환에서 확인되었다. 흥미롭게도, 다수의 발생 장애의 원인이 되는 것으로 밝혀진 동일한 돌연변이는 또한 종양 세포에서도 발견된다 (예컨대, FGFR-3의 이량체화를 유발하고, 이로써 구성적 활성화를 일으키는 것인, 연골무형성증 및 치사성 이형성증에서 관찰되는 돌연변이는 또한 방광암에서도 빈번하게 발견된다). 이량체화를 촉진시키는 돌연변이는 FGFR로부터의 리간드-비의존적 신호전달을 증가시킬 수 있는 유일한 기전이다. FGFR의 키나제 도메인 내부 또는 외부에 위치하는 다른 돌연변이도 도메인의 입체구조를 변경시켜 영구적으로 활성을 띠는 키나제를 생성시킬 수 있다.

[0010] *FGFR-1*의 게놈 위치인 염색체 영역 8p11-12의 증폭이 유방암에서 공통된 중심 증폭이며, 유방암 중 대략 10%에서, 주로 에스트로겐 수용체-양성 암에서 발생한다. *FGFR-1* 증폭은 또한 비-소세포 폐 편평세포 암종에서 보고되었고, 이는 난소암, 방광암 및 횡문근육종에서 낮은 발생률로 발견된다. 유사하게, 위암 중 대략 10%는 *FGFR-2* 증폭을 보이며, 이는 예후가 불량한 비-소세포 편평세포 폐암 (sqNSCLC)인 미만형 암과 연관이 있다. 또한, *FGFR-1* 내지 -4에 위치하는 다중의 단일 뉴클레오티드 다형성 (SNP)는 선택성 암 발생 위험 증가와 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌거나, 또는 불량한 예후와 연관이 있는 것으로 보고되었다 (예컨대, 유방암, 결장암 및 폐 선암종에서 *FGFR-4* G388R 대립유전자). 암을 촉진시키는 데 있어서 상기 SNP의 직접적인 역할은 여전히 많은 논란의 대상이 되고 있다.

[0011] *FGFR1* 8p12 유전자의 유전자좌의 증폭이 대상체 중 최대 20%에서 관찰되었다 [Dutt A. *et al.* *PLoS One.* 2011;6(6):e20351]. *FGFR1* 유전자 증폭은 또한 현재까지 sqNSCLC에서 가장 빈번하게 관찰되는 분자 변경 중 하나인 반면, *FGFR-코딩* 유전자 중의 돌연변이는 sqNSCLC 대상체에서는 매우 드물다 (< 2%) [Lim *et al.* *Future Oncol.* 2013 Mar;9(3):377-86]. *FGFR1* 유전자 증폭과 표적 발현 수준 (mRNA 또는 단백질 발현) 사이의 상관관계를 연구한 최근 공개 문헌에 따르면, *FGFR1* 유전자 증폭의 부재하에서 종양 조직 중 높은 *FGFR1* mRNA 과다발현을 보인 sqNSCLC 대상체는 매우 높은 비율 (50%)인 것으로 밝혀졌다. 더욱더 중요하게, *FGFR1* 카피수 획득이

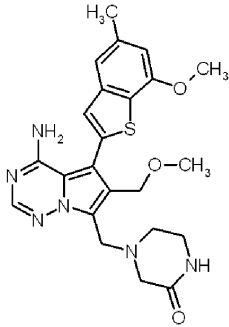
확인된 54%의 대상체에서는 상기 획득이 FGFR1 표적 발현 수준을 더 높게 증가시키지 않으며, 이는 범 FGFR 억제제를 이용한 치료 성공 가능성을 매우 희박하게 만든다. 추가로, 폐 선암종 (AC) 중 22%에서 높은 FGFR1 mRNA 발현 또한 관찰된 반면, 상기 조직학적 유형에서는 단 1건의 FGFR1 증폭 사례도 관찰되지 않았다. 시험관 내에서, 폐암 세포주에서의 FGFR1 mRNA 발현은 각 세포주의 FGFR1 카피수보다는 FGFR 억제제인 포나티닙에 대한 항증식성 반응과 더 우수한 상관관계를 가졌다 [Wynes et al.].

- [0012] FGFR1 유전자 증폭은 두경부의 편평 세포 암종 (HNSCC) 중 12.6%의 사례에서 관찰된 반면 [Boehm D. et al. *Virchows Arch.* 2014 May;464(5):547-51], 상기 문헌에서 FGFR1 종양 단백질 과다발현 출현율 범위는 12 내지 100%이다. HNSCC 환자 종양에서의 FGFR1 mRNA 과다발현 출현율에 대해 현재까지는 상기 문헌에서 연구되지는 않았지만, 최근 공개 문헌에서는 두경부의 SCC (편평 세포 암종) 세포주가 그의 FGFR1 카피수, mRNA 및 단백질 발현 상태에 따라 특징 구명되었고, 이어서, 소분자 FGFR 억제제 BGJ398에 대한 그의 감수성에 대해서 시험되었다. 저자는 FGFR1 유전자 증폭이 mRNA와도, 단백질 발현과도 상관관계가 없다는 것을 발견하게 되었다. 흥미롭게도, BGJ398에 대한 감수성은 단백질 및 mRNA 수준이 높은 상기 세포주에서만 유일하게 관찰되었다 [Maessenhausen et al. *Annals of Translational Medicine* Vol 1, No 3 (October 2013)]. 원발성 HNSCC 종양에서의 FGFR2 mRNA 과다발현 출현율 및 FGFR 억제제에의 치료 반응에 대한 그의 상관관계에 대해서는 알려진 바 없지만, FGFR2-코딩 유전자 중의 활성화 돌연변이가 환자 유래의 HNSCC 세포주를 FGFR 억제제를 이용한 치료에 대하여 감수성으로 만들었다 [Liao, *RG Cancer Res.* 2013 Aug 15;73(16):5195-205]. HNSCC에서의 FGFR3 mRNA 발현과 관련하여, 최근 공개 문헌에서는 비-종양 대조군과 비교하였을 때, HNSCC 암 환자 종양에서 FGFR3 mRNA 발현이 더 낮은 것으로 관찰되었다 [Marshall ME et al. *Clin Cancer Res.* 2011 Aug 1;17(15):5016-25]. HNSCC에서의 FGFR3 mRNA 발현과 FGFR 억제제를 이용한 치료에 대한 반응 사이의 어떤 상관관계도 현재까지는 기술된 바 없다.
- [0013] FGFR1 유전자는 식도암 환자 중 약 21%에서 증폭되어 있는 반면 [Bandla et al., *Ann Thorac Surg.* 2012 Apr;93(4):1101-6], FGFR2 유전자는 식도암 환자 중 약 4%에서 증폭되어 있다 [Kato H et al. *Int J Oncol.* 2013 Apr;42(4):1151-8]. FGFR1 [De-Chen, L VOLUME 46 | NUMBER 5 | MAY 2014 *Nature Genetics*] 및 FGFR2 [Paterson et al. *J Pathol.* 2013 May;230(1):118-28]. 단백질은 식도암 환자 중 10-20%에서 과다발현된 것으로 나타났다. 현재까지는 식도암 환자에서 FGFR1 및 FGFR2 mRNA 발현 수준에 대해 조사된 바 없다. 범 FGFR 억제제에 대한 식도암의 약물 감수성에 대해서도 공지된 바 없다.
- [0014] FGFR1 증폭은 난소암 중 약 8%에서 관찰되었고 [Theillet et al. *Genes Chromosom. Cancer*, 7: 219-226], 최근 FGFR2 과다발현이 관찰되었다 [Taniguchi et al. *Int J Gynecol Cancer.* 2013 Jun;23(5):791-6]. FGFR 억제제에 대한 약물 감수성과 관련하여, 난소암 세포주 A2780은 시험관내에서 BGJ398을 이용한 치료에 대하여 감수성인 것으로 나타났다 [Guagnano et al. *Cancer Discov.* 2012 Dec;2(12):1118-33]. 그에 반해, 난소암 환자에서의 FGFR2 융합체는 상기 환자의 순환 종양 세포를 BGJ398 치료에 대해 감수성을 띠도록 만들었다 [Martignetti et al. *Neoplasia.* 2014 Jan;16(1):97-103]. 이에, FGFR-코딩 유전자 중 DNA 변경의 종양원성 구동자 기능은 여전히 논란의 대상이 되고 있다.
- [0015] FGFR1 증폭은 골육종 환자 중 약 18%에서 관찰되고 [Fernanda-Amary et al., *Cancer Med.* 2014 Aug;3(4):980-7], 그와 함께 FGFR 소분자 억제제 BGJ398의 항증식성 효과가 FGFR1-증폭된 골육종 세포주 G-292에서 관찰되었다 [문헌 [Guagnano et al.] 참조].
- [0016] 요약하면, FGFR-1 내지 -4를 중요한 암 표적으로서 입증하는 시험관내 및 생체내 연구가 다수 수행되어 왔고, 종합적인 리뷰를 통하여 이러한 관찰 결과가 요약되었다 (예를 들어, 문헌[Heinzle et al., *Expert Opin. Ther. Targets* 15 (7), 829-846 (2011)]; [Wesche et al., *Biochem. J.* 437 (2), 199-213 (2011)]; [Greulich and Pollock, *Trends in Molecular Medicine* 17 (5), 283-292 (2011)]; [Haugsten et al., *Mol. Cancer Res.* 8 (11), 1439-1452 (2010)] 참조). 인간 종양에서 비정상적인 FGFR-1 내지 -4 신호전달을 약화시키기 위한 것으로서, 차단 항체 및 소분자 억제제를 비롯한, 수개의 전략법이 이어졌다. 현재, 다수의 선택적 소분자 FGFR 억제제, 예컨대, AZD-4547 (아스트라제네카(AstraZeneca) 화학식 III의 화합물), BJJ-398 (노바티스(Novartis), 화학식 II의 화합물) JNJ-42756493 (존슨&존슨(Johnson&Johnson), 화학식 IV의 화합물) 및 CH 5183284 (창누기(Chanugi), 화학식 V의 화합물)가 임상 개발 중에 있다.
- [0017] 오직 암 환자만이 a) FGFR1 또는 FGFR2 유전자 카피수 상승, b) FGFR-코딩 유전자의 활성화 돌연변이, 또는 c) FGFR 융합 단백질의 존재에 기초한 FGFR 티로신 키나제 억제제 (TKI) 임상 시험에서 시험되고 있으며, 등록된 상태이다 [Wynes et al. *Clin Cancer Res.* 2014 Jun 15;20(12):3299-309]

발명의 내용

[0018] 이에, 본 발명자들은 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA 발현의 함계가, 염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있는 하기 화학식 I에 따른 범 FGFR 억제제에 대한 치료 반응을 예측하는 데 특히 적합하다는 것을 확인하게 되었다:

[0019] <화학식 I>



[0020]

[0021] 본 발명에 따라 추가로 바람직한 범 FGFR 억제제는 예를 들어, AZD-4547 (아스트라제네카, 화학식 III의 화합물), BJJ-398 (노파르티스, 화학식 II의 화합물), JNJ-42756493 (존슨&존슨, 화학식 IV의 화합물) 및 CH 5183284 (창누기, 화학식 V의 화합물)이며, 이들은 모두 그의 염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있다.

[0022] 본 발명의 목적을 위한 염은 바람직하게는 본 발명에 따른 화합물의 제약상 허용되는 염이다 (예를 들어, 문헌 [S. M. Berge *et al.*, "Pharmaceutical Salts", *J. Pharm. Sci.* **1977**, 66, 1-19] 참조). 그 자체가 제약 용도로 적합하지는 않지만, 예를 들어, 본 발명에 따른 화합물의 단리 또는 정제를 위하여 사용될 수 있는 염 또한 포함된다.

[0023] 제약상 허용되는 염은 무기산, 카르복실산, 및 술폰산의 산 부가 염, 예를 들어, 염산, 브로민화수소산, 황산, 인산, 메탄술폰산, 에탄술폰산, 벤젠술폰산, 톨루엔술폰산, 나프탈렌디술폰산, 포름산, 아세트산, 트리플루오로아세트산, 프로피온산, 락트산, 타르타르산, 말산, 시트르산, 푸마르산, 말레산, 및 벤조산의 염을 포함한다.

[0024] 제약상 허용되는 염은 또한 통상적인 염기의 염, 예컨대, 예를 들어, 및 바람직하게, 알칼리 금속 염 (예를 들어, 나트륨 및 칼륨 염), 알칼리 토금속 염 (예를 들어, 칼슘 및 마그네슘 염), 및 암모니아 또는 유기 아민 예컨대, 예시적으로 및 바람직하게, 에틸아민, 디에틸아민, 트리에틸아민, *N,N*-다이소-프로필에틸아민, 모노에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 디메틸-아미노-에탄올, 디에틸아미노에탄올, 프로카인, 디시클로헥실아민, 디벤질아민, *N*-메틸-모르폴린, *N*-메틸피페리딘, 아르기닌, 리신, 및 1,2-에틸렌디아민으로부터 유도된 암모늄 염을 포함한다.

[0025] 본 발명과 관련하여 용매화물이란, 용매 분자와의 화학량론적 배위 결합에 의해 고체 또는 액체 상태의 복합체를 형성하는 본 발명에 따른 화합물의 형태로서 지정된 것이다. 수화물은 배위 결합이 물과 이루어진 것인, 용매화물의 구체적인 형태이다. 본 발명과 관련하여 수화물이 바람직한 용매화물이다.

[0026] 본 발명은 대상체로부터의 종양 조직 샘플 중의 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA의 함계가 과다발현된 것으로 측정된 대상체에서 암 치료에 사용하기 위한 범 FGFR 억제제에 기초한다.

[0027] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 환자로 부터의 종양 조직 샘플을 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA 과다발현의 존재에 대하여 시험하는 것을 포함하고, 여기서 FGFR1, FGFR2 및 FGFR3의 측정된 mRNA 발현의 함계가 과다발현인 경우, 환자는 범 FGFR 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적극적인, 범 FGFR 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적극적인 암 환자를 확인하는 방법에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0028] 본 발명에 따른 암은 암 및 종양 질환이다. 이는 하기 질환을 의미하는 것을 이해되나, 이에 제한되지 않는다: 유방 암종 및 유방 종양 (또한 유관 상피내 및 및 소엽 상피내 형태), 기도 종양 (소세포 및 비-소세포 폐 암종 (NSCLC) (NSCLC는 폐의 폐 선암종 포함), 편평 세포 폐 암종 및 대세포 폐 암종, 소세포 및 비-소세포 암종, 기

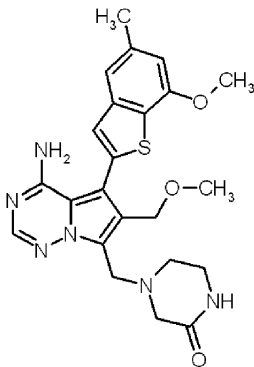
관지 암종, 기관지 선종, 흉막과 폐의 모세포종), 뇌 종양 (예컨대, 뇌간 종양 및 시상하부 종양, 성상세포종, 아교모세포종, 수모세포종, 상의세포종, 및 신경외배엽 및 송과체 종양), 소화 기관 (식도, 위, 담낭, 소장, 대장, 직장, 항문)의 종양, 간 종양 (그 중에서도 특히, 간세포 암종, 담관세포 암종 및 혼합형 간세포 및 담관세포 암종), 두경부 부위 (후두, 하인두, 비인두, 구강인두, 입술 및 구강)의 종양, 피부 종양 (편평 상피 암종, 카포시 육종, 악성 흑색종, 메르켈 세포 피부암 및 비-흑색종성 피부암), 연조직 종양 (그 중에서도 특히, 연조직 육종, 골육종, 악성 섬유성 조직구종, 림프육종 및 횡문근육종), 눈 종양 (그 중에서도 특히, 안내 흑색종, 포도막 흑색종 및 망막모세포종), 내분비선 및 외분비선 (예컨대, 갑상선 및 부갑상선, 췌장 및 타액선)의 종양, 요로 종양 (방광, 음경, 신장, 신우, 및 요관 종양), 생식 기관 종양 (여성에서의 자궁 내막 암종, 자궁 경부 암종, 난소 암종, 질 암종, 음문 암종 및 자궁 암종, 및 남성에서의 전립선 암종 및 고환 암종) 뿐만 아니라, 그의 원격 전이. 이들 장애는 또한 고체 형태의 및 순환 혈액 세포로서의 증식성 유발 혈액 질환, 예컨대, 림프종, 백혈병 및 골수증식성 질환, 예컨대, 급성 골수양, 급성 림프모구성, 만성 림프구성, 만성 골수성 및 모세포 백혈병, 및 AIDS-관련 림프종, 호지킨 림프종, 비-호지킨 림프종, 피부 T-세포 림프종, 버킷 림프종, 및 중추 신경계에서의 림프종도 포함한다.

[0029] 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 암은 두경부암, 바람직하게, 두경부의 편평 세포 암종, 식도암, 난소암, 방광암, 결장암 및/또는 폐암이다. 더욱더 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 폐암은 NSCLC, 더욱 바람직하게는 폐의 편평 세포 암종이다.

[0030] 다른 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 육종은 지방육종, 섬유육종, 평활근육종, 연골육종, 활막육종, 혈관육종, 유잉육종 및 투명 세포 육종일 수 있다.

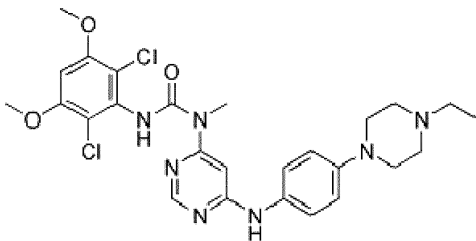
[0031] 바람직한 실시양태에서, 범 FGFR 억제제는 그의 염, 용매화물 및/또는 염의 용매화물의 형태로 존재할 수 있는 하기 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물로 이루어진 군으로부터 선택된다:

[0032] <화학식 I>



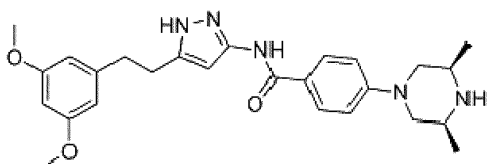
[0033]

[0034] <화학식 II>



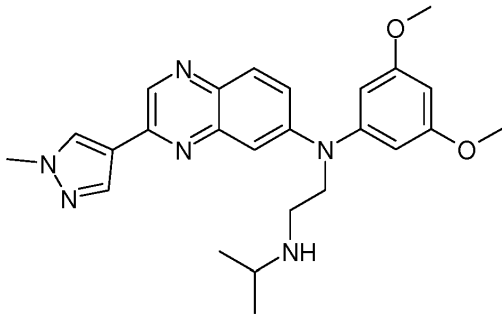
[0035]

[0036] <화학식 III>



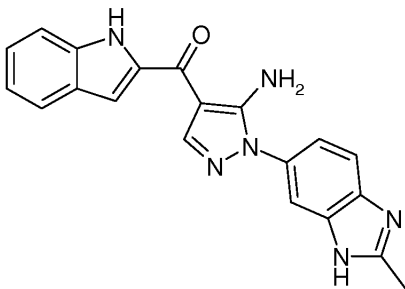
[0037]

[0038] <화학식 IV>



[0039]

[0040] <화학식 V>



[0041]

[0042] 특히 바람직한 실시양태에서, 본 발명에 따른 범 FGFR 억제제는 화학식 I의 억제제이다.

[0043] 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물은 단독 제약 작용제로서, 또는 하나 이상의 추가의 치료제와의 조합이 바람직하지 못한 및/또는 허용되지 않는 부작용을 일으키지 않는 한, 상기와 같은 조합으로 투여될 수 있다. 상기 조합 요법은 상기 정의된 바와 같은 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물 및 하나 이상의 추가의 치료제를 함유하는 단일의 제약 투여용 제제의 투여 뿐만 아니라, 그 자체의 별개의 제약 투여용 제제 중의 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물, 및 각각의 추가 치료제의 투여를 포함한다. 예를 들어, 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물, 및 치료제는 환자에게 단일 (고정된) 경구 투여용 조성물, 예컨대, 정제 또는 캡슐제로 함께 투여될 수 있거나, 또는 각 작용제는 별개의 투여용 제제 중의 것으로 투여될 수 있다.

[0044] 별개의 투여용 제제가 사용될 경우, 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물, 및 하나 이상의 추가 치료제는 본질적으로 동시에 (즉시에, 공동으로) 또는 별개로 시차를 두고 다른 시점에 (즉, 순차적으로) 투여될 수 있다.

[0045] 특히, 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물은 다른 항암제, 예컨대, 알킬화제, 항대사물질, 식물 유래 항-종양제, 호르몬 요법제, 토포이소머라제 억제제, 튜블린 억제제, 키나제 억제제, 표적화 약물, 항체, 항체-약물 접합체 (ADC), 면역물질, 생물 반응 개질제, 항-혈관신생 화합물, 및 다른 항-증식성, 세포 증식 억제제 및/또는 세포독성 물질과 고정된 또는 별개의 조합으로 사용될 수 있다. 이와 관련하여, 하기는 본 발명의 화합물과 조합하여 사용될 수 있는 제2 작용제의 예에 대한 비제한적인 목록이다:

[0046] 아바렐릭스, 아비라테론, 아클라루비신, 아파티닙, 아플리베르셉트, 알데스류킨, 알렘투주맙, 알리트레티노인, 알파라딘, 알트레타민, 아미노글루테티미드, 아모나피이드, 암루비신, 암사크린, 아나스트로졸, 안드로무스틴, 아르글라빈, 아스파라기나제, 악시티닙, 5-아자시티딘, 바실릭시맙, 벨로테칸, 벤다무스틴, 베마시주맙, 백사로텐, 비칼루타미드, 비산트렌, 블레오마이신, 보르테조미, 보수티닙, 브리바닙 알라니네이트, 부세렐린, 부솔판, 카바지탁셀, CAL-101, 칼슘 폴리네이트, 칼슘 레보폴리네이트, 캄포테신, 카페시타빈, 카르보플라틴, 카르모푸르, 카르무스틴, 카투막소맙, 세디라닙, 셀모류킨, 세톡시맙, 클로람부실, 클로르마디논, 클로르메틴, 시도포비르, 시스플라틴, 클라드리빈, 클로드론산, 클로파라빈, 콤프레타스타틴, 크리산타스파제, 크리조티닙, 시클로포스파미드, 시프로테론, 시타라빈, 다카르바진, 닥티노마이신, 다르베포에틴 알파, 다리나파라신, 다사티닙, 다우노루비신, 데시타빈, 데가렐릭스, 데니류킨 디프티톡스, 데노수맙, 데슬로렐린, 디브로스피딤 클로라이드, 도세탁셀, 도비티닙, 독시플루리딘, 독소루비신, 두타스테리드, 에콜리주맙, 에드레콜로맙, 에플로르니틴, 엘립티닙 아세테이트, 엘트롬보팍, 엔도스타틴, 에노시타빈, 에팜비신, 에피루비신, 에피티오스타놀, 에포에틴

알파, 에포에틴 베타, 에포틸론, 엡타플라틴, 에리블린, 에를로티닙, 에스트라디올, 에스트라무스틴, 에토포시드, 에베롤리무스, 엑사테칸, 엑세메스탄, 엑시술린드, 파드로졸, 펜레티니드, 필그라스티프, 피나스테리드, 플라보피리돌, 플루다라빈, 5-플루오로우라실, 플루옥시메스테론, 플루타미드, 포레티닙, 포르메스탄, 포테무스틴, 폴베스트란트, 가니렐릭스, 게피티닙, 겐시타빈, 겐투주맵, 기마테칸, 기메라실, 글루포스파미드, 글루톡심, 고세렐린, 히스트렐린, 히드록시우레아, 이반드론산, 이브리투모맵 티옥세탄, 이다루비신, 이포스파미드, 이마티닙, 이미퀴모드, 임프로술판, 인테다닙, 인터페론 알파, 인터페론 알파-2a, 인터페론 알파-2b, 인터페론 베타, 인터페론 감마, 인터루킨-2, 이필리무맵, 이리노테칸, 익사베필론, 란레오티드, 라파티닙, 라소폭시켄, 레날리도미드, 레노그라스티프, 렌티난, 렌바티닙, 레스타우르티닙, 레트로졸, 류프로렐린, 레바미솔, 리니파닙, 린시티닙, 리수리드, 로바플라틴, 로무스틴, 로니다민, 루르토테칸, 마포스파미드, 마파투무맵, 마시티닙, 마소프로콜, 메드록시프로게스테론, 메게스트롤, 메라르소프롤, 멜팔란, 메피티오스탄, 메르캅토포린, 메토티렉세이트, 메틸아미노레볼리네이트, 메틸테스토스테론, 미파무르티드, 미페프리스톤, 밀테포신, 미리플라틴, 미토브로니톨, 미토구아존, 미토락톨, 미토마이신, 미토탄, 미토크산트론, 몰그라모스틴, 모테사닙, 난드롤론, 네다플라틴, 넬라라빈, 네라티닙, 닐로티닙, 닐루타미드, 니모투주맵, 니무스틴, 니트라크린, 노라트렉세드, 오파투무맵, 오프렐베킨, 옥살리플라틴, 과클리탁셀, 팔리페르민, 파미드론산, 파니투무맵, 파조파닙, 페가스파르가제, peg-에포에틴 베타, 페그필가스트리프, peg-인터페론 알파-2b, 펠리트렉솔, 페메트렉세드, 펨투모맵, 펜토스타틴, 페플로마이신, 퍼포스파미드, 페리포신, 퍼투주맵, 피시바닐, 피람비신, 피라루비신, 플레릭사포르, 플리카마이신, 폴리글루삼, 폴리에스트라디올 포스페이트, 포나티닙, 포르피머 소듐, 프랄라트렉세이트, 프레드니무스틴, 프로카르바진, 프로코다졸, PX-866, 퀴나골리드, 랄록시켄, 랄티트렉세드, 라니비주맵, 라니무스틴, 라족산, 레고라페닙, 리세드론산, 리톡시맵, 로미렘신, 로미프롤스틴, 루비테칸, 사라카티닙, 사르그라모스틴, 사트라플라틴, 세루메티닙, 시푸류셀-T, 시로리무스, 시조피란, 소부족산, 소라페닙, 스트렙토조신, 수니티닙, 탈라포르핀, 타미바로텐, 타목시켄, 탄두티닙, 타소네르민, 테세류킨, 테가푸르, 테라티닙, 테모포르핀, 테모졸로미드, 템시롤리무스, 테니포시드, 테스트라톤, 테스트스테론, 테트로포스민, 탈리도미드, 티오테파, 티말파신, 티오구아닌, 티피파르닙, 티보자닙, 토세라닙, 토실리주맵, 토포테칸, 토레미켄, 토시투모맵, 트라벡테딘, 트라스투주맵, 트레오술판, 트레티노인, 트리아핀, 트릴로스탄, 트리메트렉세이트, 트립토텐린, 트로포스파미드, 우베니멕스, 발루비신, 반데타닙, 바프레오티드, 바르티티닙, 바타라닙, 베무라페닙, 빈다라빈, 빈블라스틴, 빈크리스틴, 빈데신, 빈플루닌, 비노렐빈, 볼로식시맵, 보리노스타트, 지노스타틴, 졸레드론산, 및 조루비신.

- [0047] 일반적으로, 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물과 다른 항암제와의 조합을 사용하여 하기 목적을 추구할 수 있다:
- [0048] · 단일 활성 화합물을 사용한 치료와 비교하여, 종양 성장의 저속화, 그의 크기 축소 또는 심지어 그의 완전한 제거에서의 활성 개선;
- [0049] · 화학요법제를 단독요법의 경우보다 더 낮은 투여량으로 사용할 수 있는 가능성;
- [0050] · 개별 투여와 비교하여 부작용은 더 적고, 허용성은 더 큰 요법의 가능성;
- [0051] · 더욱 광범위한 스펙트럼의 암 및 종양 질환에 대한 치료 가능성;
- [0052] · 요법에 대한 더 높은 반응을 달성;
- [0053] · 표준 요법과 비교하여 환자의 연장된 생존 시간.
- [0054] 암 치료에서, 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물은 또한 방사선 요법 및/또는 외과적 개입과 함께 조합되어 사용될 수 있다.
- [0055] 본원에서 사용되는 바, "FGF 수용체"는 FGF 수용체 패밀리에 속하는 수용체 단백질 티로신 키나제이고, 이는 FGFR1, FGFR2, FGFR3 FGFR4 및 추후 확인되는, 상기 패밀리의 다른 구성원을 포함한다. FGF 수용체는 일반적으로는 FGF 리간드에 결합할 수 있는 세포외 도메인; 친유성 막횡단 도메인; 보존되는 세포내 티로신 키나제 도메인; 및 인산화될 수 있는 수개의 티로신 잔기를 보유하는, 카복실-말단 신호전달 도메인을 포함할 것이다. FGF 수용체는 천연 서열 FGF 수용체 또는 그의 아미노산 서열 변이체일 수 있다. 바람직하게, FGF 수용체는 천연 서열 인간 FGF 수용체이다.
- [0056] 본 발명에 따른 "조직 샘플"이란, 바람직하게는 염색체 물질과 함께 유핵 세포를 함유하는, 대상체 또는 환자의 조직으로부터 수득된 유사 세포 집단을 의미한다. 4가지 주요 인간 조직은 (1) 상피; (2) 결합 조직 (혈관, 뼈 및 연골 포함); (3) 근육 조직; 및 (4) 신경 조직이다. 조직 샘플의 공급원으로 신선한, 냉동된 및/또는 보존

된 기관 또는 조직 샘플 또는 생검으로부터의 고체 조직일 수 있다.

- [0057] 본원에서의 목적을 위해, 조직 샘플의 "절편"이란, 조직 샘플의 단일 부분 또는 조각, 예컨대, 조직 샘플로부터 커팅된 조직 또는 세포의 얇은 슬라이스를 의미한다. 본 발명에 따라 조직 샘플의 다중 절편을 채취할 수 있고, 그를 분석할 수 있다는 것을 이해한다.
- [0058] 샘플 제조
- [0059] 대상체로부터의 임의의 조직 샘플을 사용할 수 있다. 사용될 수 있는 조직 샘플의 예로는 난소, 폐, 자궁내막, 두부, 경부, 식도 및 방광을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 조직 샘플은 외과적 절제 또는 생검을 포함하나, 이에 제한되지 않는, 다양한 방법에 의해 획득될 수 있다. 조직은 신선한 것 또는 냉동된 것일 수 있다. 한 실시양태에서, 조직 샘플을 고정시키고, 파라핀에 포매시키는 등 이를 수행한다.
- [0060] 조직 샘플을 종래 방법에 의해 고정시킬 수 있다 (즉, 보존시킬 수 있다) (예컨대, 문헌 [Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology, 3rd Edition Lee G. Luna, HT (ASCP) Editor, The Blakston Division McGraw-Hill Book Company: New York; (1960)]; [The Armed Forces Institute of Pathology Advanced Laboratory Methods in Histology and Pathology (1994) Ulreka V. Mikel, Editor, Armed Forces Institute of Pathology, American Registry of Pathology, Washington, D.C.] 참조). 고정제를 선택하는 것은 조직학적으로 염색하거나, 또는 다르게는 분석하고자 하는 조직이 취하는 목적에 의해 결정된다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 통상의 기술자는 또한 고정 기간은 조직 샘플의 크기, 및 사용되는 고정제에 의존한다는 것도 이해할 것이다. 예를 들어, 중성 완충처리된 포르말린이 조직 샘플을 고정시키는 데 사용될 수 있다.
- [0061] 일반적으로, 조직 샘플을 먼저 고정시킨 후, 오름차순의 알콜 시리즈를 통해 탈수시키고, 침윤시키고, 파라핀 또는 다른 절편화 매질로 포매시켜 조직 샘플을 절편화시킬 수 있다. 대안적으로, 조직을 절편화시키고, 획득된 절편을 고정시킬 수 있다. 예를 들어, 조직 샘플을 종래 방법에 의해 포매시키고, 파라핀 중에서 프로세싱할 수 있다. 사용될 수 있는 파라핀의 예로는 파라플라스트(Paraplast), 브로로이드(Broloid) 및 티슈메이(Tissuemay)를 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 일단 조직 샘플을 포매시키고 나면, 샘플을 마이크로톰 등으로 절편화시킬 수 있다. 예를 들어, 본 절차를 위해, 절편 두께는 약 3 μm 내지 약 5 μm 범위일 수 있다. 일단 절편화시키고 나면, 절편을 여러 표준 방법에 의해 슬라이드에 접착시킬 수 있다. 슬라이드 접착제의 예로는 실란, 젤라틴, 폴리-L-리신 등을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. RNA 계내 하이브리드화를 위해서는 양으로 하전된 슬라이드, 예컨대, 폴리-L-리신으로 코팅된 슬라이드에 접착된 파라핀 포매된 절편이 특히 적합하다.
- [0062] 파라핀이 포매 물질로 사용되었다면, 일반적으로 조직 절편에서 파라핀을 제거하고, 물로 재수화시킨다. 수개의 종래 표준 방법에 의해 조직 절편에서 파라핀을 제거할 수 있다. 예를 들어, 크실렌 및 점진적 내림차순의 알콜 시리즈가 사용될 수 있다. 대안적으로, 상업적으로 이용가능한 파라핀 제거용 비-유기 작용제, 예컨대, 헤모-De7(Hemo-De7) (CMS: 미국 텍사스주 휴스턴)이 사용될 수 있다.
- [0063] 본 발명에 따른 mRNA-과다발현이란, FGFR 단백질-코딩 메신저 RNA가 정상 세포와 비교하였을 때, 종양 세포 상에서 더 높은 수준으로 발현된다는 것을 지칭한다. 일반적으로, 비교를 위한 정상 세포는 종양과 같은 조직 유형, 특히, 표현형의 것, 또는 종양 유래 기점이 된 것이다.
- [0064] 종양 조직 샘플 중의 FGFR1, 2 및 3 mRNA 발현 수준을 FGFR1, 2 또는 3 프로브를 사용하여 RNA 계내 하이브리드화에 의해 정량화한다. 계내 하이브리드화 방법은 예컨대, 문헌 [Wang et al. in J Mol Diagn. 2012 Jan;14(1):22-9]에 기술되어 있는 바와 같이, 관련 기술분야에 공지되어 있다. FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3 mRNA 발현을 검출하기 위한 ISH 프로브를 예를 들어, 문헌 [Jin and Lloyd (J Clin Lab Anal. 1997;11(1):2-9)]에 따라 디자인한다. 본 발명에 따른 프로브를 디자인하는 데 사용된 서열은 진뱅크(GenBank) 서열 수탁 번호 NM_023110.2 (FGFR1), NM_000141.4 (FGFR2), 또는 NM_000142.4 (FGFR3)를 가지는 서열인 반면, 상기 진뱅크 수탁 번호에서 제공된 폴리A 테일은 프로브 디자인하는 데에는 사용되지 않는다는 것에 대해서 통상의 기술자는 알고 있다. 포르말린 고정, 파라핀 포매된 조직 표본 또는 냉동 표본에 대한 방법은 공지되어 있다. 명시야 현미경 검사법을 위해 통상의 발색 염료를, 또는 다중 분석을 위해 형광성 염료를 사용할 수 있다. 레프스키(Levsky) 및 싱어(Singer)는 문헌 [J Cell Sci. 2003 Jul 15;116(Pt 14):2833-8]에서 형광 계내 하이브리드화 개발에 대해 논의하였다.
- [0065] 바람직하게, ACD (어드밴스드 셀 다이아그노스틱스, 인크.(Advanced Cell Diagnostics, Inc.: 미국 캘리포니아주 94545 헤이워드 포인트 에텐 웨이 3960))로부터의 RNA스코프(RNAscope) 기술을 사용하여, 바람직하게, FGFR1

프로브 카탈로그 #310071, FGFR2 프로브 카탈로그 #311171, 및 FGFR3 프로브 카탈로그 #310791을 사용하여 RNA 계내 하이브리드화에 의해 중앙 조직 샘플 중 FGFR1, 2 및/또는 3 mRNA 발현 수준을 정량화한다.

- [0066] 계내 하이브리드화 (ISH)
- [0067] 계내 하이브리드화는 보통 슬라이드에 고정된 세포 또는 조직 절편 상에서 수행된다. 일반적으로, 계내 절차에서 직접 또는 간접적인 방법이 사용된다.
- [0068] 직접적인 방법에서, 검출가능한 분자 (예컨대, 형광단, 즉, 형광 계내 하이브리드화 또는 FISH)를 핵산 프로브에 직접 결합시키고, 이로써 프로브-표적 하이브리드는 하이브리드화 반응 직후 현미경 하에서 시각화될 수 있다. 상기 방법의 경우, 프로브-리포터 결합은 필수적으로 매우 엄격한 하이브리드화 및 세척 조건을 견뎌 내야 한다. 그러나, 리포터 분자가 하이브리드화 반응을 방해하지 않는 것이 아마도 더 중요하다. 바우만(Bauman) 등 (1980, 1984)에 의해 개발된 RNA 프로브의 말단 형광 색소 표지 방법, 및 렌츠(Renz) 및 쿠르츠(Kurz) (1984)에 의해 기술된 핵산의 직접적인 효소 표지 방법이 상기 기준을 충족시킨다. 베링거 만하임(Boehringer Mannheim)은 DNA 또는 RNA 프로브의 표지 및 직접적인 검출을 위해 사용될 수 있는 수개의 형광 색소 표지된 뉴클레오티드를 도입하였다. 대안적으로, 방사성 표지가 사용될 수 있다. 간접적인 방법을 위해서는 프로브는 친화성 세포화학적, 예컨대, 비오틴-스트렙타비딘 시스템에 의해 검출될 수 있는 것으로서, 화학적으로 또는 효소적으로 도입된 검출가능한 분자를 함유하여야 한다.
- [0069] 예컨대, 세포에서 표적 뉴클레오티드 서열에 상보적인 핵산 서열 프로브를 표지하는 데 형광단이 사용된다. 표적 뉴클레오티드 서열을 함유하는 각 세포는 표지된 프로브에 결합하여 형광 신호를 발생시킬 것이다. 표적 뉴클레오티드 서열은 FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3 서열이다. ISH 분석은 제한 없이, 형태학적 염색법을 비롯한 다른 검정법과 함께 사용될 수 있다.
- [0070] ISH 검정법의 감도는 하이브리드화의 다양한 엄격도를 이용하여 조정될 수 있다. 하이브리드화 조건이 더욱 엄격해질수록, 안정적인 이중체를 형성하고, 그를 유지시키기 위해서는 프로브와 표적 사이에 더욱 큰 정도의 상보성이 요구된다. 하이브리드화 조건을 조정함으로써, 예컨대, 검정 온도를 승온시키거나, 하이브리드화 용액의 염 농도를 저하시킴으로써 엄격도를 증가시킨다. 하이브리드화 후, 필요한 엄격도에 따라 수분 내지 수시간으로 다양한 세척 시간으로 일반적으로 하이브리드화 용액 중에서 발견된 것과 유사한 시약을 함유하는 용액 중에서 슬라이드를 세척한다 (예컨대, 문헌 ["Darby, Ian A., and Tim D. Hewitson. 2006. *In situ hybridization protocols*. Totowa, N.J.: Humana Press]; 또는 [Schwarzacher, Trude, and J. Heslop-Harrison. 2000. *Practical in situ hybridization*. Oxford, UK: BIOS]; 또는 [Buzdin, Anton, and Sergey Lukyanov. 2007. *Nucleic acids hybridization modern applications*. Dordrecht: Springer] 참조).
- [0071] ISH 분석에서 사용된 프로브는 RNA 또는 DNA 올리고뉴클레오티드 또는 폴리뉴클레오티드일 수 있고, 이는 천연적으로 발생된 뉴클레오티드 뿐만 아니라, 그의 유사체, 예컨대, 디곡시게닌 표지된 dCTP, 또는 비오틴 표지된 유도체, 예컨대, 비오틴 dcTP 7-아자구아노신을 함유할 수 있다.
- [0072] 프로브는 표적 핵산 서열과 프로브 사이에 안정적이고, 특이적인 결합이 이루어질 수 있도록 관심 표적 핵산 서열에 대하여 충분한 상보성을 가져야 한다. 안정적인 하이브리드화를 위해 필요한 상보성 정도는 하이브리드화의 엄격도 및/또는 세척 완충제에 따라 달라진다. 바람직하게, 표적 서열에 대하여 완전히 상보적인 프로브가 본 발명에서 사용된다 (예컨대, 문헌 [Sambrook, J., et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press, (1989)] 참조).
- [0073] 프로브 선택은 관심 표적 유전자의 특징에 의존한다는 것을 통상의 기술자는 이해할 것이다. 프로브는 플라스미드, 파지, 코스미드, YAC, 박테리아 인공 염색체 (BAC), 바이러스 벡터, 또는 임의의 다른 적합한 벡터에 클로닝된 게놈 DNA, cDNA, 또는 RNA일 수 있다. 프로브는 종래 방법에 의해 클로닝되거나, 또는 화학적으로 합성될 수 있다 (예컨대, 문헌 [Sambrook, 상기 문헌 동일] 참조).
- [0074] 본 발명에서, 프로브는 바람직하게, 형광단으로 표지된다. 형광단의 예로는 희토류 킬레이트 (유로퓸 킬레이트), 텍사스 레드(Texas Red), 로다민, 플루오레세인, 또는 단실을 포함하나, 이에 제한되지 않는다. 본 검정법에서 사용된 다중 프로브는 1개 초과와 구별이 가능한 형광성 또는 간접 표지로 표지될 수 있다.
- [0075] ISH를 위해 프로세싱한 후, 슬라이드를 표준 현미경 검사법 기술에 의해 분석할 수 있다. 간략하면, 적절한 여기 필터, 이색성, 및 장벽 필터가 장착된 현미경을 사용하여 각 슬라이드를 관찰한다. FISH 경우, 필터는 사용되는 형광단의 여기 및 방출 스펙트럼에 기초하여 선택된다.

[0076] 전형적으로, 조직 샘플 중 수백 개의 샘플을 스캐닝하고, 형광성 스폿 형태로 특이 표적 핵산 서열을 정량화하며, 세포 개수 기준으로 상대적으로 계수한다. 본원에서 제공하는 바와 같이, FGFR1, FGFR2 및 FGFR3 과다발현 측정이 범 FGFR 억제제 요법, 바람직하게, 화학식 I, II, III, IV 및/또는 V의 화합물을 이용한 요법, 가장 바람직하게, 화학식 I의 화합물을 이용한 요법 (상기 화합물은 모두 그의 염, 상기 염의 용매화물 및/또는 용매화물의 형태로 존재할 수 있다)이 효과적일 것이라는 가능성을 훨씬 더 효과적으로 나타낸다.

[0077] 점수화는 하기와 같이 정의된다:

염색 점수	현미경 관찰 점수화
0	염색된 것이 없거나, 또는 세포 10개당 1개 미만의 도트 (40X 배율)
1	1-3개의 도트/세포 (20-40X 배율에서 육안 관찰 가능)
2	4-10개의 도트/세포. 매우 적은 개수의 도트 클러스터 (20-40X 배율에서 육안 관찰 가능)
3	>10개의 도트/세포. 10% 미만의 양성 세포가 도트 클러스터를 가짐 (20X 배율에서 육안 관찰 가능)
4	>10개의 도트/세포. 10% 초과인 양성 세포가 도트 클러스터를 가짐 (20X 배율에서 육안 관찰 가능)

[0078]

[0079] 본 발명에 따른 범 FGFR 억제제를 사용하는 치료에 대하여 적절한 대상은 FGFR 이소형 (FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3) 중 하나의 점수가 또는 3가지 FGFR 이소형 모두의 합계가 3으로 나타난 대상이고, 바람직한 적격 대상은 중앙 조직 샘플 점수가 적어도 4인 대상, 특히 바람직한 대상은 점수가 4 초과인 대상이다.

[0080] 본 발명에 따른 암은 바람직하게, 두경부암이고, 두경부의 편평 세포 암종이 특히 바람직하다. 점수 합계가 적어도 6인 두경부의 편평 세포 암종이 더욱더 바람직하고, FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3 중 적어도 하나의 점수가 적어도 3인 것이 더욱더 바람직하다.

[0081] 또 다른 실시양태에서, 암은 식도암이고, 바람직하게는 점수 합계가 적어도 5인 것이다. FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3 중 적어도 하나의 점수가 적어도 4인 것이 더욱더 바람직하다.

[0082] 또 다른 바람직한 실시양태는 난소암이며, 점수 합계가 적어도 9일 때, 특히 바람직하다.

[0083] 추가 실시양태에서, 암은 폐암, 바람직하게, NSCLC, 더욱더 바람직하게는, 편평 세포 폐 암종이다. 점수 합계는 바람직하게, 적어도 5, 더욱더 바람직하게는 적어도 7이고, 가장 바람직하게는 적어도 9이다.

[0084] 또 다른 실시양태에서, 암은 결장암이고, 바람직하게는 점수 합계가 적어도 4인 것이다.

[0085] 또 다른 실시양태에서, 암은 방광암이고, 바람직하게는 점수 합계가 적어도 5인 것이다.

[0086] 또 다른 실시양태에서, 본 발명은 대상체로부터의 중앙 조직 샘플 중 FGFR1, FGFR2 및/또는 FGFR3 mRNA의 합계가 과다발현된 것으로 측정된 대상체에서, 유효량의 범 FGFR 억제제를 투여함으로써 암을 치료하는 방법에 관한 것이다.

[0087] **실시예**

[0088] **물질 및 방법**

[0089] **RNA 추출 및 정량적 실시간 증합효소 연쇄 반응 (RT-PCR)**

[0090] 이중이식 중앙 조각을 즉시 드라이아이스 상에서 급냉시키고, 트리졸 방법을 사용하여 전체 RNA를 추출하였다.

수득된 RNA의 무결성을 바이오애널리저(Bioanalyzer) (애질런트(Agilent)) 상에서 체크하였다. 역전사를 위해 1 μ g의 전체 RNA를 먼저 RNase 무함유 DNase I로 실온에서 15 min 동안 소화시킨 후, 총 반응 부피 40 μ l로 프로모스크립트(Promiscript)를 사용하여 키트 공급업체의 표준 프로토콜에 따라 역전사시켰다. 65°C에서 15 min 동안 가열하여 효소를 불활성화시킨 후, 수득된 cDNA를 2차 증류수(bidest. water)를 이용하여 최종 부피 150 μ l로 희석시키고, 표준 사이클러 조건 하에 택맨 유니버살 마스터 믹스(TaqMan Universal Master Mix) (2x) (상세한 설명에 대해서는 어플라이드 바이오시스템즈(Applied Biosystems)의 택맨 사용자 가이드(TaqMan User Guide) 참조) 및 ABI PRISM 9600 서열 검출 시스템을 사용하여 최종 부피 반응 부피 20 μ l로 PCR 반응당 4 μ l를 선택하였다. PCR 프라이머 및 FAM-표지된 프로브의 DNA 서열은 프라이머 익스프레스 1.5 소프트웨어(Primer Express 1.5 software) (어플라이드 바이오시스템즈)에 의해 디자인하였고, 이는 하기 표 1에 요약되어 있다. 각각 프라이머의 농도는 300 nM이고, 표지된 프로브의 농도는 150 nM이었다. 모든 프라이머/프로브 세트에 대하여 비교할 만한 증폭 효율을 표준 희석 곡선에 의해 체크하였다. 문헌 [Livak and Schmittgen (Methods. 2001 Dec;25(4):402-8.)]에 기술된 ddCt 방법을 사용하되, 단, 예외적으로, 각 FGFR mRNA의 정규화된 발현 수준은 하기 공식: 발현 = $2^{(20-dCt)}$ (여기서, dCt는 관심 유전자와 참조 유전자 사이의 Ct 값 차이이다)을 사용하여 계산함으로써, 발현을 계산하였다. 전체 RNA의 출발량이 다른 것은 배제시키기 위하여 Ct 값을 리보솜 단백질 L32, 베타-2 마이크로글로불린, 시토졸 베타-액틴 및 글리세르알데히드 3-포스페이트 데히드로게나제 mRNA 수준에 대하여 보정하였다. 본 발명자들은 발현 수준 계산치는 사용된 하우스킵핑 유전자와는 독립적이었다는 것을 관찰할 수 있었다. 그러므로, 본 발명자들은 모든 FGFR mRNA 발현 데이터를 L32 리보솜 단백질로 정규화하기로 결정하였다. 하기 표 2 & 3에 제시된 생성된 발현 수준은 3회 수행된 독립 실험의 평균 (+/-) SD이며, 이는 임의 단위로 제시되어 있다.

[0091] **FGFR1 유전자 카피수 획득 정량화.**

[0092] 퀴아젠(Qiagen)으로부터의 DN이지(DNeasy) 게놈 DNA 추출용 키트를 사용하여 이중이식 종양으로부터의 게놈 DNA를 단리시켰다. 라이프 테크놀러지즈(Life Technologies)로부터의 FGFR1 택맨 진 카피 넘버 어세이(FGFR1 TaqMan Gene Copy Number Assay)를 사용하여 샘플당 0.5 ng의 게놈 DNA를 FGFR 유전자 카피수 획득에 대하여 분석하였다. FGFR에 대한 결과는 공급업체의 프로토콜에서 주어진 대로 단일 카피 참조 유전자 RNase P로 정규화하였다. 표 번호 2에 따라 FGFR1이 증폭된 것으로 여겨지는 이중이식 모델은 모두 단일 카피 유전자에 대하여 예상된 것보다 더 높은 신호 강도를 보였다.

[0093] **생체내**

[0094] **HN9897**

[0095] 할런-빙켈만(Harlan-Winkelmann: 독일)으로부터의 암컷, 6-8주령된 면역손상된 nu/nu 마우스 (19-27 g)를 환자 유래의 HN9798 두경부 편평 세포 암종 연구를 위해 사용하였다.

[0096] 실험은 최소 6일의 순응기 이후에 개시하였다. 마우스를 12시간의 명기/암기 사이클에서 유지시켰고, 음식물 및 식수는 임의대로 이용가능하였고, 하우징 온도는 20-26°C였다. 마우스를 무작위로 각 군당 마우스 10마리씩 2개의 실험군으로 배정하였다. 처리 시작시, 동물 귀에 코딩하여 표시하였고, 각 케이지에 대한 식별 라벨은 하기 정보를 포함하였다: 동물 연령, 성별, 계통, 입수 일자, 처리, 연구 번호, 군 번호, 및 처리 시작 일자.

[0097] 선택된 원발성 인간 두경부암 조직 (HN9798)을 접종받은 스톡 마우스로부터의 종양 단편을 수거하고, 암컷 nu/nu 누드 마우스에 접종하는 데 사용하였다. 한 종양 단편 (2x2 mm)을 각 마우스 우측 옆구리에 피하로 접종하였다. 처리는 평균 종양 크기가 대략 0.075 cm³에 도달하였을 때인 이식 후 제6일에 시작하였다. 대조군에 있는 마우스가 희생 기준에 도달하였을 때, 종양을 샘플링하고, 접종 후 제50일에 최종 종양 중량을 측정하였다.

[0098] 캘리퍼를 사용하여 2차원으로 종양 크기를 주 2회에 걸쳐 측정하였고, 부피 (mm³)는 하기 공식을 사용하여 표시하였다: $V = 0.5 a \times b^2$ (여기서, a 및 b는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다). 이어서, T/C 값을 위해 종양 크기를 사용하였다. 처리군의 평균 종양 크기가 미리 결정된 크기 (예컨대, 1,000 mm³)에 도달하는 데 소요되는 시간 (일)으로서의 T를 이용하여 T-C를 계산하였고, C는 대조군의 평균 종양 크기가 같은 크기에 도달하는 데 소요되는 시간 (일)이었다. T/C 값은 항-종양 효과의 지표였고: T 및 C는 각각 지정일의 처리군 및 대조군의 평균 부피였다.

[0099] 부검 당일 모든 군의 최종 종양 면적 및 종양 중량에 대하여 기술 통계를 내었다. 시그마스타트(SigmaStat) 소프트웨어를 사용하여 통계학적 분석을 사정하였다. 일원 분산 분석을 수행하였고, 던 방법(Dunn's method)을

이용하는 다중 비교에 의해 대조군과의 차이를 비교하였다.

- [0100] **ES204**
- [0101] 바이탈 리버(Vital River: 중국)로부터의 암컷, 6-8주령된 면역손상된 nu/nu 마우스 (18-24 g)를 환자 유래의 ES204 식도 편평 세포 암종 연구를 위해 사용하였다.
- [0102] 실험은 최소 6일의 순응기 이후에 개시하였다. 마우스를 12시간의 명기/암기 사이클에서 유지시켰고, 음식물 및 식수는 임의대로 이용가능하였고, 하우징 온도는 20-26°C였다. 본 연구에서의 동물 취급, 관리, 및 처리에 관한 모든 절차는 국제 실험 동물 관리 평가 인증 협회(Association for Assessment and Accreditation of Laboratory Animal Care: AAALAC)의 가이드스에 따라 크라운바이오(CrownBio)의 실험 동물 운영 위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee: IACUC)의 승인을 받은 가이드스에 따라서 수행하였다.
- [0103] 마우스를 무작위로 각 군당 마우스 10마리씩 4개의 실험군으로 배정하였다. 처리 시작시, 동물 귀에 코딩하여 표시하였고, 각 케이지에 대한 식별 라벨은 하기 정보를 포함하였다: 동물 번호, 성별, 계통, 입수 일자, 처리, 연구 번호, 군 번호, 및 처리 시작 일자.
- [0104] 선택된 원발성 인간 식도암 조직 (ES204)을 접종받은 스톡 마우스로부터의 종양 단편을 수거하고, 암컷 nu/nu 누드 마우스에 접종하는 데 사용하였다. 한 종양 단편 (직경 2-3 mm)을 각 마우스 우측 옆구리에 피하로 접종 하였다. 처리는 평균 종양 크기가 대략 100-150 mm³에 도달하였을 때인 이식 후 제25일에 시작하였다. 대조군에 있는 마우스가 희생 기준에 도달하였을 때, 종양을 샘플링하고, 처리 시작 후 제23일에 최종 종양 중량을 측정하였다.
- [0105] 캘리퍼를 사용하여 2차원으로 종양 크기를 주 2회에 걸쳐 측정하였고, 부피 (mm³)는 하기 공식을 사용하여 표시 하였다: $V = 0.5 \times a \times b^2$ (여기서, a 및 b 는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다). 이어서, T/C 값 계산을 위해 종양 크기를 사용하였다. 처리군의 평균 종양 크기가 미리 결정된 크기 (예컨대, 1,000 mm³)에 도달하는 데 소요되는 시간 (일)으로서의 T를 이용하여 T-C를 계산하였고, C는 대조군의 평균 종양 크기가 같은 크기에 도달하는 데 소요되는 시간 (일)이었다. T/C 값은 항-종양 효과의 지표였고: T 및 C는 각각 지정일의 처리군 및 대조군의 평균 부피였다.
- [0106] 부검 당일 모든 군의 최종 종양 면적 및 종양 중량에 대하여 기술 통계를 내었다. 시그마스타트 소프트웨어를 사용하여 통계학적 분석을 사정하였다. 일원 분산 분석을 수행하였고, 던 방법을 이용하는 다중 비교에 의해 대조군과의 차이를 비교하였다.
- [0107] **OVX1023**
- [0108] 장비에(Janvier: 프랑스)로부터의 암컷, 5-7주령된 면역손상된 nu/nu 마우스 (18-24 g)를 환자 유래의 OVX1023 난소 암종 연구를 위해 사용하였다.
- [0109] 동물을 개별적으로 환기구가 설치된 케이지 (테크니플라스트 실세이프™-IVC-시스템(TECNIPLAST Sealsafe™-IVC-System), 테크니플라스트(TECNIPLAST: 독일 호헨페이센버그))에서 하우징하고, 14L:10D 인공 광주기 사이클 하에서 유지시켰다. 동물을 매일 2회에 걸쳐 모니터링하였다. 군 크기에 따라 III형 케이지 또는 II형의 긴 케이지를 사용하였다. 크기가 대략 5 x 5 x 1 mm인 포플러 나무 칩(아베드(ABEDD)® - 랩 & 베트 서비스 게엠 베하(LAB & VET Service GmbH: 오스트리아 비엔나), 제품 코드: LTE E-001)으로 이루어진 무진 베딩을 사용하였다. 추가의 네스팅 물질을 통상적으로 추가하였다. 베딩 및 네스팅 물질을 포함하는 케이지를 매주 교체하였다. 케이지 내부 온도는 25±1°C로 유지시켰고, 상대 습도는 45 - 65%였다. 케이지내 환기 (AC)율은 60 AC/h로 유지시켰다. 모든 물질은 사용 전에 오토클레이빙하였다. 동물에게 오토클레이버블 테크래드 글로벌 19% 프로테인 익스트루디드 다이어트(Autoclavable Teklad Global 19% Protein Extruded Diet) (T.2019S.12, 할런 라보라토리즈(Harlan Laboratories))를 공급하였다. 모든 동물은 멸균 여과된 산성화된 (pH 2.5) 수돗물을 이용할 수 있었다. 병을 사용 전에 오토클레이빙하였고, 주 2회에 걸쳐 교체하였다. 음식물 및 식수는 임의대로 제공받았다. 모든 물질은 사용 전에 오토클레이빙하였다.
- [0110] 모든 실험은 지방 당국의 승인을 받았고, 모든 적용가능한 국제, 국내 및 지방 법 및 가이드스에 따라 수행하였다. 건강 상태가 괜찮은 동물만을 선택하여 검사 절차에 가입시켰다. 동물을 실험 당일 1일 2회, 및 주말 및 공휴일에는 매일 통상적으로 모니터링하였다.
- [0111] 마우스를 무작위로 각 군당 마우스 10마리씩 4개의 실험군으로 배정하였다. 동물을 종양 이식 동안, 또는 용량

발견 실험 시작시에 전파 식별 (RFID) 트랜스폰더를 사용하여 임의로 넘버링하였다. 동물 종, 계통, 공급원, 성별, 인도 일자, 실험 번호, 종양 이식 일자, 무작위화 일자, 종양 히스토타입, 종양 개수 및 계대, 군 아이덴티티, 시험 화합물, 투여량, 스케줄, 및 투여 경로를 나타내는 색인 카드를 사용하여 각 케이지를 표지하였다.

- [0112] 선택된 원발성 인간 식도암 조직 (OVX1023)을 접종받은 스톡 마우스로부터의 종양 단편을 수거하고, 암컷 nu/nu 누드 마우스에 접종하는 데 사용하였다. 한 종양 단편 (직경 4-5 mm)을 각 마우스 우측 옆구리에 피하로 접종하였다. 최대 개수의 이식편이 고휘 종양 성장의 시작을 알리는 뚜렷한 징후를 보일 때까지 매일 동물 및 종양 이식편을 모니터링하였다.
- [0113] 처리는 평균 종양 크기가 대략 100-150 mm³에 도달하였을 때인 이식 후 제49일에 시작하였다. 대조군에 있는 마우스가 희생 기준에 도달하였을 때, 종양을 샘플링하고, 처리 시작 후 제50일에 최종 종양 중량을 측정하였다.
- [0114] 캘리퍼를 사용하여 2차원으로 종양 크기를 주 2회에 걸쳐 측정하였고, 부피 (mm³)는 하기 공식을 사용하여 표시하였다: $V = 0.5 a \times b^2$ (여기서, a 및 b 는 각각 종양의 긴 직경 및 짧은 직경이다). 이어서, T/C 값 계산을 위해 종양 크기를 사용하였다. 처리군의 평균 종양 크기가 미리 결정된 크기 (예컨대, 1,000 mm³)에 도달하는 데 소요되는 시간 (일)으로서의 T를 이용하여 T-C를 계산하였고, C는 대조군의 평균 종양 크기가 같은 크기에 도달하는 데 소요되는 시간 (일)이었다. T/C 값은 항-종양 효과의 지표였고: T 및 C는 각각 지정일의 처리군 및 대조군의 평균 부피였다.
- [0115] 부검 당일 모든 군의 최종 종양 면적 및 종양 중량에 대하여 기술 통계를 내었다. 시그마스타트 소프트웨어를 사용하여 통계학적 분석을 사정하였다. 일원 분산 분석을 수행하였고, 던 방법을 이용하는 다중 비교에 의해 대조군과의 차이를 비교하였다.
- [0116] 하기 표 2 & 3에 열거된 바와 같은 다른 모든 종양의 경우, 상기 기술된 바와 유사한 방식으로 실험을 수행하였다.
- [0117] <표 1>
- [0118] **mRNA 정량화를 위해 사용된 RT-PCR 프라이머/프로브 서열 (모든 5'-3' 방향)**
- [0119] 인간 섬유모세포 성장 인자 수용체-1:
- [0120] 정방향 GGGCCAGACAACCTGCCTTA
- [0121] 프로브 CCACCGACAAAGAGATGGAGGTGCTT
- [0122] 역방향 TGGCTCTCAAAGGAGACAT
- [0123] 인간 섬유모세포 성장 인자 수용체-2:
- [0124] 정방향 GCTGCTGAAGGAAGGACACA
- [0125] 프로브 AGCCAGCCAACTGCACCAACGAA
- [0126] 역방향 GCATGCCAACAGTCCCTCA
- [0127] 인간 섬유모세포 성장 인자 수용체-3:
- [0128] 정방향 CTCGGGAGATGACGAAGAC
- [0129] 프로브 CTGTGTCCACACCTGTGTCCTCA
- [0130] 역방향 CGGGCCGTGTCCAGTAA
- [0131] 인간 시토줄 베타-액틴
- [0132] 정방향 TCCACCTCCAGCAGATGTG
- [0133] 프로브 ATCAGCAAGCAGGAGTATGACGAGTCCG
- [0134] 역방향 CTAGAAGCATTTGCGGTGGAC
- [0135] 인간 베타-2 마이크로글로불린:
- [0136] 정방향 GTCTCGCTCCGTGGCCTTA

- [0137] 프로브 TGCTCGCGCTACTCTCTCTTTCTGGC
- [0138] 역방향 TGGAGTACGCTGGATAGCCTC
- [0139] 인간 L32 리보솜 단백질:
- [0140] 정방향 CTGGTCCACAACGTCAAGGA
- [0141] 프로브 TGGAAGTGCTGCTGATGTGCAA
- [0142] 역방향 AGCGATCTCGGCACAGTAAGA
- [0143] 인간 글리세르알데히드 3-포스페이트 데히드로게나제:
- [0144] 정방향 CTGGGCTACACTGAGACCA
- [0145] 프로브 TGGTCTCCTCTGACTTCAACAGCGACAC
- [0146] 역방향 CAGCGTCAAAGGTGGAGGAG
- [0147] <표 2>

모델	암 유형	FGFR1 mRNA	FGFR1 증폭	생체내 효능
ES204	식도암	72914	무	유
H520	폐암	30407	유	무
LXFL1121	폐암	18937	유	유
LU1901	폐암	16633	유	무
MFE280	자궁내막암	15018	무	유
OVXF1023	난소암	12632	무	유
H1581	폐암	11135	유	유
H1703	폐암	8667	유	무
Colo699	폐암	8227	유	무
LXFE211	폐암	7817	무	유
A2780	난소암	5565	무	유
LXFA1584	폐암	5442	유	무
DMS114	폐암	5346	유	유

[0148]

[0149] FGFR-mRNA 발현 수준, FGFR1 카피수 획득과, 생체내 화학식 I의 화합물에 대한 치료 효능 사이의 상관관계. 물질 & 방법에 기술된 바와 같이 이중이식 종양으로부터의 전체 RNA를 단리시키고, 실시간 PCR에 의해 FGFR1 mRNA에 대해 정량화하였다. 동시에, 게놈 DNA를 단리시키고, 택맨 카피수 검정법을 이용하여 FGFR1 유전자 카피수 획득을 정량화하였다. FGFR1 신호 강도가 단일 카피 유전자 (RNase P)에 대한 것보다 강하게 나타났을 때, 모델은 모두 유전자 증폭이 일어난 것으로 간주되었다. 화학식 I의 화합물 처리시 종양 중량이 적어도 50% 만큼 감소된 모델은 모두 생체내 효능이 있는 것으로 간주되었다.

[0150] <표 3>

모델	암 유형	FGFR1 mRNA	FGFR2 mRNA	FGFR3 mRNA	전체 FGFR mRNA	생체내 효능
SNU16	위암	83	89184	126	89393	유
H716	결장암	12	78179	143	78335	유
ES204	식도암	72914	2140	114	75167	유
HN9897	두경부암	277	960	51495	52732	유
RT112	방광암	99	1127	41267	42493	유
H520	폐암	30407	9	401	30817	무
H1581	폐암	11135	12817	397	24348	유
MFM223	유방암	1062	17770	24	18855	유
LXFL1121	폐암	18937	28	134	19099	유
LU1901	폐암	16633	1	2	16636	무
MFE280	자궁내막암	15018	381	230	15629	유
OVXF1023	난소암	12632	2346	224	15202	유
OMP2	흑색종	25	0	13066	13092	무
HepG2	간암	704	916	6778	8398	무
LU299	폐암	3615	4742	1150	9507	유
LXFE211	폐암	7817	11	474	8302	유
LU0697	폐암	1884	980	6156	9020	유
H1703	폐암	8667	68	187	8923	무
Colo699	폐암	8227	360	77	8664	유
HN366	두경부암	214	599	7297	8110	유
KYSE-140	식도암	1520	4802	1366	7688	무
LXFA1584	폐암	5442	248	1627	7318	무
HNXF908	두경부암	643	4311	1201	6155	유
DMS114	폐암	5346	187	47	5580	유
A2780	난소암	5565	0	13	5578	유

[0151]

[0152] FGFR1, 2 및 3-mRNA 발현 수준과, 생체내 화학식 I의 화합물에 대한 치료 효능 사이의 상관관계. 물질 & 방법에 기술된 바와 같이 전체 RNA를 단리시키고, RT-PCR에 의해 FGFR1-3 mRNA 수준을 정량화하였다. 화학식 I의 화합물 처리시 종양 중량이 적어도 50% 만큼 감소된 모델은 모두 생체내 효능이 있는 것으로 간주되었다.

[0153]

HN9897	처리 시작 후 제 44 일의 T/C ²
비히클 ¹ 10ml/kg 2QD po	1
화학식 I의 화합물 50 mg/kg 2QD po	0.08

[0154]

¹. 10% 에탄올. 40% 솔루톨(Solutol) HS15, 50% NaCl 0.9%

[0155]

². T/C: 화학식 I의 화합물로 처리된 종양 평균/비히클로 처리된 종양 평균 (부피).

[0156]

단일요법으로 화학식 I의 화합물을 이용하여 처리한 경우, 생체내 효능에 대하여 시험하였을 때, FGFR1-mRNA가 극도로 강하게 과다발현된 환자 유래의 식도 편평 세포 종양 [표 2에서 ES204]에도 같은 관찰 결과가 적용되었다:

[0157]

ES204	처리 시작 후 제 23 일의 T/C ²
비히클 ¹ 10ml/kg 2QD po	1
화학식 I의 화합물 50mg/kg 2QD po	0.1

[0158]

¹. 10% 에탄올. 40% 솔루톨 HS15, 50% H₂O

[0159]

². T/C: 화학식 I의 화합물로 처리된 종양 평균/비히클로 처리된 종양 평균 (부피).

[0160]

높은 FGFR1 mRNA 과다발현을 보이는, 환자 유래의 난소암 모델 [표 2에서 OVXF1023] 또한 생체내 효능이 매우 높은 것으로 나타났다:

OVXF1023	처리 시작 후 제 38 일의 T/C ² .
비히클 ¹ 10ml/kg 2QD 5 일 진행-2 일 휴식 po	1
화학식 I 의 화합물 35mg/kg 2QD 5 일 진행-2 일 휴식 po	0.2

[0161]

[0162]

^{1.} 10% 에탄올, 40% 솔루톨 HS15, 50% H₂O

[0163]

^{2.} T/C: 화학식 I 의 화합물로 처리된 종양 평균/비히클로 처리된 종양 평균 (부피).

[0164]

종양 FGFR1-3 RNA 발현량을 더욱 잘 정량화하기 위해, 본 발명자들은 표 3으로부터 선택된 모델을 이용하여 RNA 계내 하이브리드화를 수행하였다. FGFR1-, FGFR2- 또는 FGFR3-특이 프로브를 이용하여, 포르말리 고정, 파라핀 포매된 이종이식 종양의 5 μm 슬라이드에서 RNA를 염색하고, 광학 현미경을 사용하여 점수화 체계 (상세한 설명에 대해서는 물질 & 방법 섹션 참조)에 의해 정량화하였다.

[0165]

<표 4>

모델	암 유형	FGFR1 RNA-ISH 점수	FGFR2 RNA-ISH 점수	FGFR3 RNA-ISH 점수	생체내 효능
H716	결장암	0	4	0	유
ES204	식도암	4	1	0	유
HN9897	두경부암	1	1	4	유
RT112	방광암	0	1	4	유
H520	폐암	4	1	2	무
H1581	폐암	4	4	1	유
LXFL1121	폐암	4	0	1	유
LU1901	폐암	4	1	2	무
OVXF1023	난소암	4	3	2	유
LU299	폐암	4	3	3	유
LXFE211	폐암	4	1	2	유
LU0697	폐암	3	2	3	유
H1703	폐암	4	1	1	무
Colo699	폐암	4	3	3	유
HN366	두경부암	2	3	4	유
LXFA1584	폐암	4	2	3	무
HNXF908	두경부암	1	2	3	유
DMS114	폐암	4	1	1	유

[0166]

[0167]

FFPE 슬라이드 및 FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3에 특이적인 프로브를 이용한, 선택된 이종이식 종양 모델의 FGFR1-3 RNA 계내 하이브리드화 점수화.

[0168]

ACD (어드밴스드 셀 다이아그노스틱스, 인크.: 미국 캘리포니아주 94545 헤이워드 포인트 에덴 웨이 3960)로부터의 RNA스코프 기술을 사용하여 공급업체의 매뉴얼에 따라 RNA 계내 하이브리드화에 의해 종양 조직 샘플 중 FGFR1, 2 및 3 mRNA 발현 수준을 정량화하였다. FGFR1-3 프로브 또한 ACD로부터 상업적으로 이용가능하였다:

[0169]

RNA스코프® 2.0 HD 리에이전트 키트(RNAscope® 2.0 HD Reagent Kit) (RED) #310036,

[0170]

프로브 - Hs-FGFR1 #310071

[0171]

프로브 - Hs-FGFR2 #311171

[0172]

프로브 - Hs-FGFR3 #310791

[0173] 하기에 따라 점수화를 수행하였다:

염색 점수	현미경 관찰 점수화
0	염색된 것이 없거나, 또는 세포 10개당 1개 미만의 도트 (40X 배율)
1	1-3개의 도트/세포 (20-40X 배율에서 육안 관찰 가능)
2	4-10개의 도트/세포. 매우 적은 개수의 도트 클러스터 (20-40X 배율에서 육안 관찰 가능)
3	>10개의 도트/세포. 10% 미만의 양성 세포가 도트 클러스터를 가짐 (20X 배율에서 육안 관찰 가능)
4	>10개의 도트/세포. 10% 초과인 양성 세포가 도트 클러스터를 가짐 (20X 배율에서 육안 관찰 가능)

[0174]

[0175] 높은 FGFR 발현 점수화에도 불구하고 약물 감수성이 부족한 것은 저항 기전으로 설명될 수 있으며, 예컨대, LU1901은 c-MET-과다발현 종양이고, H520은 kras-돌연변이화된 종양이고, 두 기전 모두 FGFR 억제제에 대해 무감응성을 부여하는 것으로 설명된다.

[0176] <표 5>

Pat ID	종양 유형	FGFR mRNA			RECIST 반응	RECIST 반응
		RNA-ISH 점수			C2 후	C5 후
		FGFR1	FGFR2	FGFR3	(% 종양 변화)	(% 종양 변화)
100010010	sqNSCLC	1	2	3	SD (0)	SD (+ 8)
580010016	sqNSCLC	1	3	4	SD (-5)	SD (- 6)
580010012	sqNSCLC	2	3	3	SD (-10)	SD (-10)
580010022	방광암	1	1	3	SD (- 3)	SD (-2)
100020012	sqNSCLC	2	3	3	SD (-10)	
560020029	sqNSCLC	3	3	3	SD (+4)	SD (+5)
580010038	미지의 원발성 종양	0	3	4	PD (+26)	
560020064	SCLC	4	0	0	SD (- 2)	
100010018	중피종	3	3	2	SD (+ 14)	

[0177]

[0178] 포르말린 고정, 파라핀 포매된 (FFPE) 슬라이드 및 FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3에 특이적인 프로브를 사용하여 임상 시험 NCT01976741로부터의 선택된 환자의 FGFR1-3 RNA 계내 하이브리드화 점수화 데이터. FGFR1, FGFR2 또는 FGFR3 중 적어도 하나의 점수가 적어도 3이라면, 환자를 본 시험에 포함시켰다. 표 5에 제시된 바와 같이, 상기 점수화 결과, RECIST (고형 종양의 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors) - 암 환자가 치료 동안 호전되었을 때 ("관해"), 동일하게 유지된 때 ("안정"), 또는 악화된 때 ("진행"))를 정의한 공개된 규칙 세트 - 고형 종양의 신규한 반응 평가 기준(New response evaluation criteria in solid tumors): 개정된 RECIST 가이드라인(Revised RECIST guideline) (버전 1.1) (European Journal of Cancer 45 (2009) 228-247) CT 스캔 평가 기준)에 따르면, 9명의 환자 중 8명이 화학식 I의 화합물을 이용하여 800 mg BID ("하루 두번" = 1일 2회)로 2 사이클 (C2 = 6주) 후, 또는 심지어 5 사이클 (C5 = 15주) 이후에도 안정 병

변을 나타내었다. FGFR mRNA-양성 환자 중 단 1명만이 진행성 질환 (PD)을 보였고, 본 시험으로부터 퇴출되었다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

- <110> Bayer Pharma Aktiengesellschaft

- <120> Use of pan FGFR inhibitors and method of identifying patients with cancer eligible for treatment with a pan FGFR inhibitor
- <130> BHC 14 1 052-FC
- <160> 24
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Human Fibroblast Growth Factor Receptor-1 forward primer
- <400> 1
- ggcccagaca acctgcctta 20

- <210> 2
- <211> 26
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Human Fibroblast Growth Factor Receptor-1 probe
- <400> 2
- ccaccgacaa agagatggag gtgctt 26

- <210> 3
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> Human Fibroblast Growth Factor Receptor-1 reverse primer
- <400> 3
- tgcgtcctca aaggagacat 20

- <210> 4
- <211> 20
- <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223

> Human Fibroblast Growth Factor Receptor-2 forward primer

<400> 4

gctgctgaag gaaggacaca 20

<210> 5

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Fibroblast Growth Factor Receptor-2 probe

<400> 5

agccagccaa ctgcaccaac gaa 23

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Fibroblast Growth Factor Receptor-2 reverse primer

<400> 6

gcatgccaac agtcctca 19

<210> 7

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Fibroblast Growth Factor Receptor-3 forward primer

<400> 7

ctcgggagat gacgaagac 19

<210> 8

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human Fibroblast Growth Factor Receptor-3 probe

<400> 8

agccagccaa ctgcaccaac gaa 23

<210> 9

<211> 17
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223>
 > Human Fibroblast Growth Factor Receptor-3 reverse primer
 <400> 9
 cgggccgtgt ccagtaa 17
 <210> 10
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human cytosolic beta-Actin forward primer
 <400> 10
 tccaccttcc agcagatgtg 20
 <210> 11
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human cytosolic beta-Actin probe
 <400> 11
 atcagcaagc aggagtatga cgagtccg 28
 <210> 12
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human cytosolic beta-Actin reverse primer
 <400> 12
 ctagaagcat ttgcggtgga c 21
 <210> 13
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human beta-2 microglobulin forward primer
 <400> 13

gtctcgctcc gtggcctta 19

<210> 14

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human beta-2 microglobulin probe

<400> 14

tgctcgcgct actctctctt tctggc 26

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human beta-2 microglobulin reverse primer

<400> 15

tggagtacgc tggatagcct c 21

<210> 16

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human L32 ribosomal protein forward primer

<400> 16

ctggtccaca acgtcaagga 20

<

210> 17

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human L32 ribosomal protein probe

<400> 17

tggaagtgct gctgatgtgc aa 22

<210> 18

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Human L32 ribosomal protein reverse primer
 <400> 18
 agcgatctcg gcacagtaag a 21
 <210> 19
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase forward primer
 <400> 19
 ctgggctaca ctgagcacca 20
 <210> 20
 <211> 28
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase probe
 <400> 20
 tggctctctc tgacttcaac agcgacac 28
 <210> 21
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> Human glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase reverse primer
 <400> 21
 cagcgtcaaa ggtggaggag 20
 <210> 22
 <211> 5917
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NM_023110.2 (FGFR1)
 <400> 22
 agatgcaggg gcgcaaacgc caaaggagac caggctgtag gaagagaagg gcagagcgcc 60
 ggacagctcg gcccgctccc cgtcctttgg ggccgcggct ggggaactac aaggcccagc 120
 aggcagctgc agggggcgga ggccgaggag ggaccagcgc gggtgggagt gagagagcga 180

gccctcgcgc cccgccggcg catagcgctc ggagcgctct tgcggccaca ggcgcggcgt 240
 cctcggcggc gggcggcagc tagcgggagc cgggacgccg gtgcagccgc agcgcgcgga 300
 ggaacccggg tgtgccggga gctggggcgc cacgtccgga cgggaccgag acccctcgta 360

 gcgcattgcg gcgacctcgc cttccccggc cgcgagcgcg ccgctgcttg aaaagccgcg 420
 gaaccaagg acttttctcc ggtccgagct cggggcgcgc cgcagggcgc acggtaccgc 480
 tgctgcagtc gggcacgccg cggcggcggg gcctccgagc ggcgatggag cccggtctgc 540
 aagaaaagtg aggcgccgcc gctgcgttct ggaggagggg ggcacaaggt ctggagacct 600
 cgggtggcgg acgggagccc tcccccgcc ccgctccgg ggcaccagct ccggtccat 660
 tgttccccgc cgggctggag gcgccgagca ccgagcggc cgggagtcg agcggccggc 720
 gcggagctct tgcgaccccg ccaggacccg aacagagccc gggggcggcg ggccggagcc 780

 ggggacgcgg gcacacgccc gctcgcacaa gccacggcgg actctcccga ggcggaacct 840
 ccacccgagc cgagggtcag ttgaaaagg aggatcgagc tcaactgtga gtatccatgg 900
 agatgtggag ccttgtcacc aacctctaac tgcagaactg ggatgtggag ctggaagtgc 960
 ctctcttctt gggtgtgct ggtcaccagc aactctgca ccgctaggcc gtccccgacc 1020
 ttgcctgaac aagcccagcc ctggggagcc cctgtggaag tggagtcctt cctggtccac 1080
 cccggtgacc tctgcagct tcgctgtcgg ctgcgggacg atgtgcagag catcaactgg 1140
 ctgcgggacg ggtgcagct ggcggaaaagc aaccgcacce gcatcacagg ggaggaggtg 1200

 gaggtgcagg actccgtgcc cgcagactcc ggctctatg cttgcgtaac cagcagcccc 1260
 tcgggcagtg acaccaccta cttctccgtc aatgtttcag atgctctccc ctctcggag 1320
 gatgatgatg atgatgatg ctctcttca gaggagaaag aaacagataa caccaacca 1380
 aaccgtatgc ccgtagctcc atattggaca tccccagaaa agatggaaaa gaaattgcat 1440
 gcagtgccgg ctgccaagac agtgaagttc aaatgcctt ccagtgggac cccaaacccc 1500
 aactgcgct ggttgaaaaa tggcaaagaa ttcaaacctg accacagaat tggaggctac 1560
 aaggtccgtt atgccacctg gagcatcata atggactctg tggcctctc tgacaagggc 1620

 aactacacct gcattgtgga gaatgagtac ggcagcatca accacacata ccagctggat 1680
 gtcgtggagc ggtccccca cggccccatc ctgcaagcag ggttgcccc caacaaaaca 1740
 gtggccctgg gtagcaactg ggagttcatg tgtaaggtgt acagtgacc gcagccgcac 1800
 atccagtggc taaagcatat cgaggtgaat gggagcaaga ttggcccaga caacctgcct 1860
 tatgtccaga tcttgaagac tgctggagtt aataccaccg acaaagagat ggaggtgctt 1920
 cacttaagaa atgtctcctt tgaggacgca ggggagtata cgtgcttggc gggttaactc 1980

atcggactct cccatcactc tgcattggtt accgttctgg aagccctgga agagaggccg 2040

 gcagtgatga cctcgcacct gtacctggag atcatcatct attgcacagg ggccttcctc 2100
 atctcctgca tgggtggggtc ggtcatcgtc tacaagatga agagtggtag caagaagagt 2160
 gacttcaca gccagatggc tgtgcacaag ctggccaaga gcatccctct gcgcagacag 2220
 gtaacagtgt ctgctgactc cagtgcattc atgaactctg gggttcttct ggttcggcca 2280
 tcacggctct cctccagttg gactccatg ctgacagggg tctctgagta tgagcttccc 2340
 gaagaccctc gctgggagct gcctcgggac agactggtct taggcaaacc cctgggagag 2400
 ggctgctttg ggcaggtggt gttggcagag gctatcgggc tggacaagga caaacccaac 2460

 cgtgtgacca aagtggctgt gaagatgtt g aagtcggacg caacagagaa agacttgtca 2520
 gacctgatct cagaaatgga gatgatgaag atgatcggga agcataagaa tatcatcaac 2580
 ctgctggggg cctgcacgca ggatggtecc ttgtatgtca tcgtggagta tgcctccaag 2640
 ggcaacctgc gggagtacct gcagccccgg agccccccag ggctggaata ctgctacaac 2700
 cccagccaca acccagagga gcagctctcc tccaaggacc tgggtctctg cgcctaccag 2760
 gtggcccag gcattgagta tctggcctcc aagaagtga tacaccgaga cctggcagcc 2820
 agaatgtcc tggtagacaga ggacaatgtg atgaagatag cagactttgg cctcgcacgg 2880

 gacattcacc acatcgacta ctataaaaag acaaccaacg gccgactgcc tgtgaagtgg 2940
 atggcacccg aggcattatt tgaccggatc tacaccacc agagtgatgt gtggtctttc 3000
 ggggtgctcc tgtgggagat cttcactctg ggcggctccc cataccccgg tgtgctgtg 3060
 gaggaacttt tcaagctgct gaaggagggt caccgcatgg acaagcccag taactgcacc 3120
 aacgagctgt acatgatgat gcgggactgc tggcatgcag tgcctcaca gagaccacc 3180
 ttcaagcage tgggtggaaga cctggaccgc atcgtggcct tgacctcaa ccaggagtac 3240
 ctggacctgt ccatgccctt ggaccagtac tccccagct tteccgacac ccggagctct 3300

 acgtgctcct caggggagga ttccgtcttc tctcatgagc cgctgcccga ggagccctgc 3360
 ctgccccgac acccagccca gcttgccaat ggcgactca aacgccctg actgccacc 3420
 acagccctc cccagactcc accgtcagct gtaacctca cccacagccc ctgctgggcc 3480
 caccactgt ccgtccctgt cccctttct gctggcagga gccggctgcc taccaggggc 3540
 ctctctgtgt ggctgcctt caccacctc agctcactc tccctccacc tectctccac 3600
 ctgctggtga gaggtgcaaa gaggcagatc tttgctgcca gccacttcat ccctcccag 3660
 atgttgacc aacaccctc cctgccacca ggcactgctt ggagggcagg gactgggagc 3720

caatgaacag gcatgcaagt gagagcttcc tgagctttct cctgtcggtt tggctctgtt 3780
 tgccttcacc cataagcccc tgcactctg gtggcagggt ccttgtcctc agggctacag 3840
 cagtagggag gtcagtgtt cgtgcctcga ttgaagggtga cctctgcccc agatagggtg 3900
 tgccagtggc ttattaattc cgatactagt ttgctttgct gaccaaatgc ctggtaccag 3960
 aggatggtga ggcgaaggcc aggttggggg cagtgttgtg gccctggggc ccagcccaa 4020
 actgggggct ctgtatatag ctatgaagaa aacacaaagt gtataaatct gagtatatat 4080
 ttacatgtct ttttaaaagg gtcgttacca gagatttacc catcgggtaa gatgctcctg 4140

 gtggctggga ggcatcagtt gctatatatt aaaaacaaaa aagaaaaaaa aggaaaatgt 4200
 ttttaaaaag gtcatatatt ttttctact tttgctgtt tatttttta aattatgttc 4260
 taaacctatt ttcagtttag gtcctcaat aaaaattgct gctgcttcat ttatctatgg 4320
 gctgtatgaa aagggtggga atgtccactg gaaagaaggg acaccacgg gccctggggc 4380
 taggtctgtc ccgagggcac cgcatgctcc cggcgcagg tccctgtaac ctcttcttc 4440
 taggtcctgc acccagacct cacgacgac ctctgctc tccgctgctt ttggaaagtc 4500
 agaaaaagaa gatgtctgct tcgagggcag gaacccatc catgcagtag aggcgctggg 4560

 cagagagtca aggccagca gccatcgacc atggatggtt tcctccaagg aaaccggtgg 4620
 ggttgggctg gggagggggc acctacctag gaatagccac ggggttagagc tacagtgatt 4680
 aagaggaaag caagggcgcg gttgtcacc cctgtaatcc cagcactttg ggacaccgag 4740
 gtgggcagat cacttcaggt caggagttt agaccagcct ggccaactta gtgaaacccc 4800
 atcttacta aaaaatgcaa aattatccag gcatggtggc acacgctgt aatcccagct 4860
 ccacaggagg ctgaggcaga atccctttaa gctgggaggc ggaggttgca gtgagccgag 4920
 attgcgcat tgcactccag cctgggcaac agagaaaaca aaaaggaaaa caaatgatga 4980

 aggtctgcag aaactgaaac ccagacatgt gtctgceccc tctatgtggg catggttttg 5040
 ccagtgttc taagtgcagg agaacatgtc acctgaggct agttttgcat tcaggtcct 5100
 ggcttcgtt ctgtttgta tcctccca gatcgtcctt cctgtatcca tgtgaccaga 5160
 ctgtattgt tgggactgtc gcagatctt gcttcttaca gttcttctg tccaaactec 5220
 atcctgtccc tcaggaacgg ggggaaaatt ctccaatgt ttttggttt ttggctgctt 5280
 ggaatttact tctgccact gctgtctc actgtctca ctaagtggat tctggctccc 5340
 ccgtacctca tggtcaaac taccactcct cagtcgtat attaaagctt atatttctg 5400

 ggattactgc taaatacaaa agaaagtca atatgtttc atttctgtag ggaaaatggg 5460
 attgtgctt taaatttctg agctagggat tttttggcag ctgcagtgtt ggccactatt 5520
 glaaaattct cttgtttct ctctgtaa atgcacctg aacattaca tttgtattta 5580

tgtttaaaga aggcattcatt tggatgaacag aactagggaaa tgaatTTTTA gctcttAAAA 5640
 gcatttgctt tgagaccgca caggagtgtc tttccttgta aaacagtgat gataatttct 5700
 gccttggccc taccttgaag caatgtttgtg tgaagggatg aagaatctaa aagtcttcat 5760
 aagtcttgg gagaggtgct agaaaaatat aaggcactat cataattaca gtgatgtcct 5820

 tgctgttact actcaaatca cccacaaatt tccccaaaga ctgctgtagc tgtcaaataa 5880
 aagacagtga aattgacctg aaaaaaaaaa aaaaaaa 5917
 <210> 23
 <211> 4654
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> NM_000141.4 (FGFR2)
 <400> 23
 ggcggcggct ggaggagagc gcggtggaga gccgagcggg cgggcggcgg gtgcggagcg 60
 ggcgaggagag cgcgcgcggc cgccacaaag ctcgggcgcc gcggggctgc atgcggcgta 120
 cctggcccgg cgcgcgact gctctccggg ctggcggggg ccggccgcga gccccggggg 180
 ccccaggcc gcagcttgcc tgcgcgctct gagccttcgc aactcgcgag caaagtttgg 240

 tggaggcaac gccaagcctg agtcttttct tctctcgtt ccccaaatcc gagggcagcc 300
 cgcgggcgtc atgccccgcg tctcgcgag cctgggggtac gcgtgaagcc cgggaggctt 360
 ggcgccggcg aagaccaag gaccactctt ctgcgtttgg agttgctccc cgcaaccccg 420
 ggctcgtcgc tttctccatc ccgaccacg cggggcgcgg ggacaacaca ggtcgcggag 480
 gagcgttgcc attcaagta ctgcagcagc agcggcagcg cctcggttcc tgagcccacc 540
 gcagctgaa ggcattgccc gtagtccatg cccgtagagg aagtgtgcag atgggattaa 600
 cgtccacatg gagatatgga agaggaccgg ggattggtac cgtaacctg gtcagctggg 660

 gtcgtttcat ctgcctggtc gtggtcacca tggcaacctt gtcctggcc cggccctcct 720
 tcagtttagt tgaggatacc acattagagc cagaagagcc accaacaaa taccaaatct 780
 ctcaaccaga agtgtactg gctgcgccag gggagtcgct agaggtgccc tcctgttga 840
 aagatgccg cgtgatcagt tggactaagg atggggtgca cttggggccc aacaatagga 900
 cagtgttat tggggagtac ttgcagataa agggcgccac gcctagagac tccggcctct 960
 atgcttgtag tgccagtagg actgtagaca gtgaaacttg gtacttcatg gtgaatgtca 1020
 catgacctc ctcatccgga gatgatgagg atgacaccga tggcgggaa gattttgtca 1080

 gtgagaacag taacaacaag agagcacat actggacca cacagaaaag atggaaaagc 1140

ggctccatgc tgtgcctgcg gccaacactg tcaagtttcg ctgcccagcc ggggggaacc 1200
 caatgccaac catgcggtgg ctgaaaaacg ggaaggagtt taagcaggag catcgattg 1260
 gaggtctaaa ggtacgaaac cagcactgga gcctcattat ggaaagtgtg gtcccatctg 1320
 acaagggaaa ttatacctgt gtagtggaga atgaatacgg gtccatcaat cacacgtacc 1380
 acctggatgt tgtggagcga tcgcctcacc ggcccatcct ccaagccgga ctgccggcaa 1440
 atgcctccac agtggtcgga ggagacgtag agtttgtctg caaggtttac agtgatgccc 1500

 agccccacat ccagtggatc aagcacgtgg aaaagaacgg cagtaatac gggcccagac 1560
 ggctgccta cctcaaggtt ctcaaggccg ccggtgttaa caccacggac aaagagattg 1620
 aggttctcta taitcggaat gtaacttttg aggacgctgg ggaatatacg tgcttggcgg 1680
 gtaattctat tgggatatcc tttcactctg catggttgac agttctgcca gcgcctggaa 1740
 gagaaaagga gattacagct tccccagact acctggagat agccatttac tgcatagggg 1800
 tcttcttaat cgctgtatg gtggtaacag tcacctctgt ccgaatgaag aacacgacca 1860
 agaagccaga cttcagcagc cagccggtg tgcacaagct gaccaaact atccccctgc 1920

 ggagacaggt aacagtttcg gctgagteca gtcctecat gaactccaac accccgctgg 1980
 tgaggataac aacacgcctc tcttaacgg cagacacccc catgctggca ggggtctccg 2040
 agtatgaact tccagaggac ccaaaatggg agtttccaag agataagctg aactgggca 2100
 agcccctggg agaaggttgc tttgggcaag tggatcatggc ggaagcagtg ggaattgaca 2160
 aagacaagcc caaggaggcg gtcaccgtgg ccgtgaagat gttgaaagat gatgccacag 2220
 agaaaacct ttctgatctg gtgtcagaga tggagatgat gaagatgatt gggaaacaca 2280
 agaatatcat aaatcttctt ggagcctgca cacaggatgg gcctctctat gtcatagttg 2340

 agtatgcctc taaaggcaac ctccgagaat acctccgagc ccggaggcca cccgggatgg 2400
 agtactccta tgacattaac cgtgttctctg aggagcagat gaccttaag gacttgggtg 2460
 catgcaccta ccagctggcc agaggcatgg agtacttggc ttcccaaaaa tgtattcatc 2520
 gagatttagc agccagaaat gttttggtaa cagaaaacaa tgtgatgaaa atagcagact 2580
 ttggactcgc cagagatata aacaatatag actattacaa aaagaccacc aatgggcggc 2640
 ttccagtcaa gtggatggct ccagaagccc tgtttgatag agtatacact catcagagtg 2700
 atgtctggtc cttcggggtg ttaatgtggg agatcttcac tttagggggc tcgcctacc 2760

 cagggattcc cgiggaggaa ctttttaagc tgctgaagga aggacacaga atggataagc 2820
 cagccaactg caccaacgaa ctgtacatga tgatgagga ctgttggcat gcagtgcct 2880
 cccagagacc aacgttcaag cagttggtag aagacttga tcgaattctc actctcacia 2940
 ccaatgagga atacttggac ctcagccaac ctctcgaaca gtattcacct agttaccctg 3000

acacaagaag ttcttgttct tcaggagatg attctgtttt ttctccagac cccatgcctt 3060
 acgaacctg ccttctcag tatccacaca taaacggcag tgttaaaaca tgaatgactg 3120
 tgtctgcctg tccccaaca ggacagcact gggaacctag ctacactgag cagggagacc 3180

atgcctccca gagcttgttg tctccacttg tatatatgga tcagaggagt aaataattgg 3240
 aaaagtaate agcatatgtg taaagattta tacagttgaa aacttgtaat cttccccagg 3300
 aggagaagaa ggtttctgga gcagtggact gccacaagcc accatgtaac cectctcacc 3360
 tgccgtgcgt actggctgtg gaccagtagg actcaagggtg gacgtgcgtt ctgccttctt 3420
 tgttaatttt gtaataattg gagaagattt atgtcagcac acacttacag agcacaatg 3480
 cagtatatag gtgctggatg tatgtaata tattcaaatt atgtataaat atatattata 3540
 tattacaag gatttatttt ttgtattgat tttaaatgga tgtccaatg cacctagaaa 3600

attggtctct ctttttttaa tagctatttg ctaaagtctg ttcttacaca taatttctta 3660
 attttcaccg agcagagggtg gaaaaatact ttgctttca gggaaaatgg tataacgtta 3720
 atttattaat aaattggtaa tatacaaac aattaatcat ttatagtttt ttttgaatt 3780
 taagtggcat ttctatgcag gcagcacagc agactagtta atctattgct tggacttaac 3840
 tagttatcag atcctttgaa aagagaatat ttacaatata tgactaattt ggggaaaatg 3900
 aagttttgat ttatttgtgt ttaaagtctg ctgtcagacg attgttctta gacctcctaa 3960
 atgcccata ttaaagaac tcattcatag gaaggtgttt cattttggtg tgcaaccctg 4020

tcattacgtc aacgcaactg ctaactggac ttcccaagat aaatggtacc agcgtcctct 4080
 taaaagatgc cttaatccat tccttgagga cagaccttag ttgaaatgat agcagaatgt 4140
 gcttctctct ggcagctggc cttctgcttc tgagttgcac attaatacaga ttagcctgta 4200
 ttctcttcag tgaattttga taatggcttc cagactcttt ggcgttggag acgcctgta 4260
 ggatcttcaa gtcccatcat agaaaattga aacacagagt tgttctgctg atagttttgg 4320
 ggatacgtcc atctttttaa gggattgctt tcactaatt ctggcaggac ctacacaaaa 4380
 gatccagcct catacctaca tcagacaaaa tatcgccgtt gttccttctg tactaaagta 4440

ttgtgttttg ctttggaaac acccactcac ttgcaatag ccgtgcaaga tgaatgcaga 4500
 ttactactgat cttatgtgtt acaaaattgg agaaagtatt taataaaacc tgttaatttt 4560
 tatactgaca ataaaaatgt ttctacagat attaaatgtta acaagacaaa ataaatgtca 4620
 cgcaacttat ttttttaata aaaaaaaaaa aaaa 4654

<210> 24

<211> 4304

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> NM_000142.4 (FGFR3)

<400> 24

gtcgcgggca gctggcgccg cgcggctctg ctctgccggt cgcacggacg caccggcggg 60
 ccgccggccg gaggggacggg gcgggagctg ggccccgga cagcagaccg gagcgggagc 120

 cgcgcgtage gagccgggct ccggcgctcg ccagtctccc gagcggcgcc cgcctcccgc 180
 cgggtgccgc gccgggcccgt ggggggcagc atccccgcgc gcgctgcctg aggaccccgc 240
 ggccccgcc cccgccatgg gcgcccctgc ctgcgccctc gcgctctgcg tggcctggc 300
 catcgtggcc ggcgcctcct cggagtcctt ggggacggag cagcgcgtcg tggggcgagc 360
 ggcagaagtc ccgggccag agccccgcca gcaggagcag ttggtcttcg gcagcgggga 420
 tgctgtggag ctgagctgtc cccccccgg ggggtgtccc atggggcca ctgtctgggt 480
 caaggatggc acagggctgg tgccctcgga gcgtgtcctg gtggggcccc agcggctgca 540

 ggtgctgaat gcctcccacg aggactccgg ggcctacagc tgccggcagc ggctcacgca 600
 gcgctactg tgccacttca gtgtcgggt gacagacgct ccatcctcgg gagatgacga 660
 agacggggag gacgaggctg aggacacagg tgtggacaca gggggccctt actggacacg 720
 gcccgagcgg atggacaaga agctgctggc cgtgccggcc gccaacaccg tccgcttccg 780
 ctgccagcc gctggcaacc ccactccctc catctcctgg ctgaagaacg gcagggagtt 840
 ccgcggcgag caccgattg gaggcatcaa gctgcggcat cagcagtgga gcctggtcat 900
 ggaaaagcgtg gtgccctcgg accgcggcaa ctacacctgc gtcgtggaga acaagtttg 960

 cagcatccgg cagacgtaca cgctggacgt gctggagcgc tccccgacc ggcccatcct 1020
 gcaggcgggg ctgccggcca accagacggc ggtgctgggc agcagcgtgg agttccactg 1080
 caaggtgtac agtgacgcac agccccacat ccagtggctc aagcacgtgg aggtgaatgg 1140
 cagcaaggtg ggccccgacg gcacacccta cgttacctg ctcaagacgg cgggcgctaa 1200
 caccaccgac aaggagctag aggttctctc cttgcacaac gtcaccttg aggaccccgg 1260
 ggagtacacc tgctggcgg gcaattctat tgggttttct catcactctg cgtggctggt 1320
 ggtgctgcca gccgaggagg agctggtgga ggctgacgag gcgggcagtg tgtatgcagg 1380

 catcctcagc tacggggtgg gcttttctt gttcactctg gtggtggcgg ctgtgacgct 1440
 ctgcccctg cgcagcccc ccaagaaagg cctgggctcc cccaccgtgc acaagatctc 1500
 ccgcttccc ctcaagcagc aggtgtccct ggagtccaac gcgtccatga gctccaacac 1560
 accactggtg cgcategcaa ggctgtctc aggggagggc cccacgtgg ccaatgtctc 1620
 cgagctcgag ctgcctgccg accccaaatg ggagctgtct cgggccccgc tgaccctggg 1680

caagcccctt ggggagggt gcttcggcca ggtggtcatg gcggaggcca tcggcattga 1740
 caaggaccgg gccccaagc ctgtcaccgt agccgtgaag atgctgaaag acgatgccac 1800

 tgacaaggac ctgtcggacc tgggtgtctga gatggagatg atgaagatga tcgggaaaca 1860
 caaaaacatc atcaacctgc tgggcgcctg cacgcagggc gggcccctgt acgtgctggt 1920
 ggagtacgc gccaaaggta acctcgggga gtttctgcgg gcgcggcggc ccccgggct 1980
 ggactactcc ttcgacacct gcaagccgcc cgaggagcag ctcaccttca aggacctggt 2040
 gtctgtgcc taccagggtg cccggggcat ggagtacttg gcctcccaga agtgcaccca 2100
 cagggacctg gctccccga atgtctggt gaccgaggac aacgtgatga agatgcaga 2160
 cttcgggctg gcccgggacg tgcacaacct cgactactac aagaagaaa ccaacggccg 2220

 gctgcccgtg aagtggatgg cgcctgagge cttgtttgac cgagtctaca ctcaccagag 2280
 tgacgtctgg tctttgggg tctgtctctg ggagatcttc acgtggggg gctccccgta 2340
 ccccgcatc cctgtggagg agctcttcaa gctgctgaag gagggccacc gcatggaaa 2400
 gcccgcaac tgcacacacg acctgtacat gatcatgcgg gagtgtggtc atgccgcgc 2460
 ctcccagagg cccacctca agcagctggt ggaggacctg gacctgttcc ttacctgac 2520
 gtccaccgac gactacctgg acctgtcggc gcctttcgag cagtactccc cgggtggcca 2580
 ggacaccccc agctccagct cctcagggga cgactccgtg tttgccacg acctgtgctc 2640

 cccggcccca cccagcagtg ggggctcgcg gacgtgaagg gccactggtc cccaacaatg 2700
 tgagggttcc ctacagccc acctgtctgc tggtgacag ccactccccg gcatgagact 2760
 cagtgcagat ggagagacag ctacacagag ctttggctg tgtgtgtgtg tgtgcgtgtg 2820
 tgtgtgtgtg tgtgcacatc cgcgtgtgcc tgtgtcgtg cgcatcttgc ctccaggtgc 2880
 agaggtacce tgggtgtccc cgctgtctg caacggtctc ctgactggtg ctgcagcacc 2940
 gagggcctt tgttctgggg ggaccagctg cagaatgtaa gtggccccc cgggtgggac 3000
 cccgtgggg caggagctg ggcccacat ggctccggcc tctgcctttg caccacggga 3060

 catcacaggg tggcctcgg cccctcccac accaaaagct gagcctgcag ggaagcccca 3120
 catgtccagc accttgtgcc tgggtgttga gtggcaccgc ctccccacct ccaggctttc 3180
 ccacttcca cctgcccct cagagactga aattacgggt acctgaagat gggagccttt 3240
 accttttatg caaaagttt attccgaaa ctagtgtaca tttctataaa tagatgctgt 3300
 gtatatgta tatatacata tatatatata acatatatgg aagaggaaaa ggctgtgaca 3360
 acggaggcct gcgacctgg gggcacagga ggcaggcatg gccctgggcg gggcgtgggg 3420

gggcgtggag ggaggcccca gggggtctca cccatgcaag cagaggacca ggccttttc 3480

tggcaccgca gttttgtttt aaaactggac ctgtatattt gtaaagctat ttatgggccc 3540

ctggcactct tgttcccaca cccaacaact tccagcattt agctggccac atggcggaga 3600

gttttaattt ttaacttatt gacaaccgag aaggtttatc ccgccgatag agggacggcc 3660

aagaatgtac gtccagcctg ccccgagct ggaggatccc ctccaagcct aaaagttgt 3720

taatagtgg aggtgattcc agtgaagata ttttatttcc tttgtcctt ttcaggagaa 3780

ttagatttct ataggatttt tctttaggag atttattttt tggacttcaa agcaagctgg 3840

tattttcata caaattcttc taattgctgt gtgtcccagg cagggagacg gtttccaggg 3900

aggggccggc ccigtgtgca ggttccgatg ttattagatg ttacaagttt atatatatct 3960

atatatataa tttattgagt ttttacaaga tgtatttggt gtagacttaa cacttcttac 4020

gcaatgcttc tagagtttta tagcctggac tctaccttt caaagcttgg agggaagccg 4080

tgaattcagt tggttcgttc tgtactgtta ctggccctg agtctgggca gctgtcctt 4140

gcttgctgc agggccatgg ctccaggttg tctcttcttg gggcccagtg catggtggcc 4200

agaggtgtca cccaaaccgg caggtgcgat tttgttaacc cagcgacgaa ctttccgaaa 4260

aataagaca ccigtgtgct aacctggaaa aaaaaaaaaa aaaa 4304