



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년10월05일

(11) 등록번호 10-2585006

(24) 등록일자 2023년09월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 31/517 (2006.01) A61K 31/436 (2006.01)
A61K 31/444 (2006.01) A61K 45/06 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C07K 14/71 (2006.01)
C12Q 1/6886 (2018.01)

(52) CPC특허분류

A61K 31/517 (2013.01)
A61K 31/436 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-7017346

(22) 출원일자(국제) 2017년11월17일

심사청구일자 2020년11월16일

(85) 번역문제출일자 2019년06월17일

(65) 공개번호 10-2019-0085980

(43) 공개일자 2019년07월19일

(86) 국제출원번호 PCT/US2017/062326

(87) 국제공개번호 WO 2018/094225

국제공개일자 2018년05월24일

(30) 우선권주장

62/423,732 2016년11월17일 미국(US)

(뒷면에 계속)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020160043114 A

Kye Young Lee, Molecular diagnosis in lung cancer, J. Lung. Cancer, 2010, 9(1), 9-14. (2010.12.31.)

(73) 특허권자

더 보드 오브 리젠츠 오브 더 유니버시티 오브 텍사스 시스템

미국, 텍사스 78701, 오스틴, 210 웨스트 7 스트리트

(72) 발명자

로비쇼 재클린

미국, 텍사스 77030, 휴스턴, 티8.3970, 1515 홀콤 블러바드, 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

닐슨 모니크

미국, 텍사스 77030, 휴스턴, 티8.3970, 1515 홀콤 블러바드, 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

헤이마치 존 브이.

미국, 텍사스 77030, 휴스턴, 티8.3970, 1515 홀콤 블러바드, 유.티.엠.디. 앤더슨 캔서 센터

(74) 대리인

특허법인한얼

전체 청구항 수 : 총 8 항

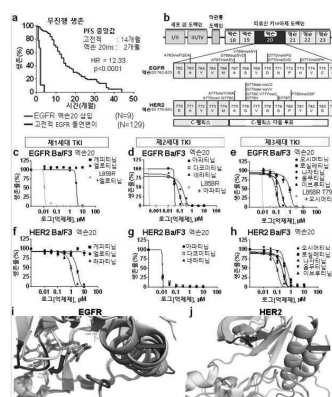
심사관 : 나영국

(54) 발명의 명칭 EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 암 세포에 대한 항종양 활성을 갖는 화합물

(57) 요약

본 개시는 포지오티닙 또는 아파티닙과 같은 제3 세대 티로신 키나아제 억제제를 투여하여 삼엽 돌연변이와 같은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 환자의 암을 치료하는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 31/444 (2013.01)
A61K 45/06 (2013.01)
A61P 35/00 (2018.01)
C07K 14/71 (2013.01)
C12Q 1/6886 (2022.01)
A61K 2300/00 (2023.05)
C12Q 2531/113 (2013.01)
C12Q 2600/106 (2013.01)
C12Q 2600/156 (2013.01)

(30) 우선권주장

62/427,692 2016년11월29일 미국(US)
 62/572,716 2017년10월16일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

1개 이상의 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 대상체에서 암을 치료하기 위한 약제학적 조성물로서, 상기 조성물은 유효량의 포지오티닙을 포함하고, 상기 1개 이상의 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이가 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, 및 N771del insFH으로 구성되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 대상체가 잔기 C797 또는 T790M에는 EGFR 돌연변이를 갖지 않는 것으로 확인된 것인, 약제학적 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 추가적인 항암요법을 더 포함하는, 약제학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 추가적인 항암요법이 화학요법, 방사선요법, 유전자요법, 수술, 호르몬요법, 신생혈관형성억제요법 또는 면역요법인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 포지오티닙 및/또는 항암요법이 정맥 내, 피하, 골 내, 경구, 경피, 지속성 방출, 제어 방출, 지연 방출, 좌제, 또는 설하로 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 포지오티닙 및/또는 항암요법이 매일 투여되는 것인, 약제학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 암이 비소세포 폐암, 구강암, 구강인두암, 비인두암, 호흡기 암, 비뇨생식기 암, 소화기 암, 중추 또는 말초 신경계 조직 암, 내분비 또는 신경내분비 암 또는 조혈암, 신경아교종, 육종, 암종, 림프종, 흑색종, 섬유종, 수막종, 뇌암, 구강인두암, 비인두암, 신장암, 담도암, 크롬 친화성 세포종, 췌장 소도세포 암, 리-프라우메니 증양, 갑상선암, 부갑상선암, 뇌하수체 종양, 부신 종양, 골육종 종양, 다발성 신경내분비성 I형 및 II형 종양, 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 대상체가 항암요법으로 치료받는 중인 것인, 약제학적 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

청구항 59

삭제

청구항 60

삭제

청구항 61

삭제

청구항 62

삭제

청구항 63

삭제

청구항 64

삭제

청구항 65

삭제

청구항 66

삭제

청구항 67

삭제

청구항 68

삭제

청구항 69

삭제

청구항 70

삭제

청구항 71

삭제

청구항 72

삭제

청구항 73

삭제

청구항 74

삭제

청구항 75

삭제

청구항 76

삭제

청구항 77

삭제

청구항 78

삭제

청구항 79

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 이 출원은 2016년 11월 17일 출원된 미국 가특허출원 제62/423,732호, 2016년 11월 29일 출원된 미국 가출원 제62/427,692호 및 2017년 10월 16일 출원된 미국 가출원 제62/572,716호의 이익을 주장하며, 이들 각각의 전체 내용은 본 설명에 참조로서 포함된다.
- [0002] (마이크로소프트 윈도우즈에서 측정된 바에 따르면) 4 KB이고 2017년 11월 17일에 생성된 "UTFCP1306W0.txt"라는 명칭의 파일에 포함된 서열 목록은 전자적 제출에 의해 본 설명과 함께 출원되며, 본 설명에 참조로서 포함된다.
- [0003] [배경]
- [0004] 본 발명은 국립보건원이 부여한 보조금 번호 CA190628 하에 정부 지원으로 이루어졌다. 정부는 본 발명에 일정한 권리가 있다.
- [0005] [기술분야]
- [0006] 본 발명은 일반적으로 분자 생물학 및 의학 분야에 관한 것이다. 더욱 구체적으로는, 본 발명은 삼입 돌연변이와 같은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이가 있는 환자의 치료 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0007] 비소세포암(NSCLC)의 대략 10 내지 15%는 활성화 EGFR 돌연변이를 보유한다. 종양이 "고전적인" 민감성 돌연변이(L858R 및 엑손 19 결실)를 갖는 환자 대부분을 위하여, 게피티닙 및 엘로티닙과 같은 TKI는 극적인 임상적 이익을 제공하며, 대략 70%는 화학요법 단독과 비교하여 객관적 반응(OR), 개선된 무진행 생존(PFS) 및 삶의 질을 경험한다(Maemondo *et al.*, 2010). 그러나 EGFR 돌연변이체 NSCLC 종양의 대략 10 내지 12%는 EGFR의 엑손 20 내에 프레임 내(in-frame) 삼입을 가지고 있으며, 일반적으로는 EGFR TKI에 저항성이 있다. 또한, NSCLC의 HER2 돌연변이의 90%는 엑손 20 돌연변이이다(Mazieres *et al.*, 2013). 종합하면, EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이는 NSCLC 환자의 대략 4%를 포함한다. 지금까지는, 이 데이터는 이용할 수 있는 HER2의 TKI(아파티닙, 라파티닙, 네라티닙, 다코미티닙)는 HER2 돌연변이체 종양을 가진 환자에서 제한된 활성을 나타냄을 시사하며, 많은 연구가 40% 미만의 OR 비율을 보고하고 있으나(Kosaka *et al.*, 2017), 일부 전임상 활성이 아파티닙 처리된 HER2 마우스 모델에서 관찰되었다(Perera *et al.*, 2009).
- [0008] EGFR 및 HER2의 엑손 20은 두 개의 주요 영역인 c-헬릭스(EGFR의 잔기 762 내지 766 및 HER2의 잔기 770 내지 774)와 c-헬릭스 다음의 루프(EGFR의 잔기 767 내지 774 및 HER2의 잔기 775 내지 783)를 포함한다. EGFR 엑손 20 삼입 D770insNPG의 결정학은 잔기 764 이후 삼입에서 제1 세대 TKI에 대한 저항성을 유도하는 안정화된, 율통불통한 활성형 입체구조를 밝혀냈다. 그러나 EGFR A763insFQEA의 모델링은 잔기 764 이전 삼입은 이러한 효과를 나타내지 않으며, 약물 저항성을 유도하지 않음을 증명하였다(Yasuda *et al.*, 2013). 나아가, 삼입이 c-헬릭스 다음의 루프에 있는(EGFR H773insNPH) EGFR 엑손 20에 의한 NSCLC의 환자 유래 이종이식(PDX) 모델에서, 제3 세대 EGFR TKI인 오시머티닙(AZD9291) 및 로실레티닙(CO-1696)이 최소한의 활성을 가짐이 밝혀졌다(Yang *et al.*, 2016). 희귀한 EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이에 대한 최근의 연구에서, 저자들은 다코미티닙 및 아파티닙

과 같은 공유적인 퀴나졸린 기반의 제2 세대 억제제에 대한 이질적인 반응을 발견하였다; 그러나 더욱 일반적인 엑손 20 삽입 돌연변이를 표적으로 하는 데 필요한 농도는 임상적으로 달성 가능한 농도를 초과하였다(Kosaka *et al.*, 2017). 따라서, *EGFR* 및 *HER2*에 엑손 20 돌연변이, 특히 삽입 돌연변이를 보유하는 NSCLC 종양의 고유한 약물 저항성을 극복하기 위한 신규한 치료법을 확인할 임상적 필요성이 크다.

발명의 내용

- [0009] 본 개시는 엑손 20 삽입 돌연변이와 같은 *EGFR* 및/또는 *HER2* 엑손 20 돌연변이를 갖는 환자에서 암을 치료하는 방법 및 조성물을 제공한다. 일 구현예에서, 대상체에 유효량의 포지오티닙을 투여하는 단계를 포함하는 대상체의 암 치료 방법이 제공되며, 이때, 대상체는 1개 이상의 *EGFR* 엑손 20 삽입 돌연변이와 같은 1개 이상의 *EGFR* 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 바 있다. 특정 양태에서, 대상체는 인간이다.
- [0010] 특정 양태에서, 1개 이상의 *EGFR* 엑손 20 돌연변이는 아미노산 763 내지 778 사이에 3 내지 18개 뉴클레오티드의 1개 이상의 점 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 포함한다. 일부 양태에서, 대상체는 2, 3, 또는 4개의 *EGFR* 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 바 있다. 일부 양태에서, 1개 이상의 *EGFR* 엑손 20 돌연변이는 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, 및 H773으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기에 있다. 특정 양태에서, 대상체는 잔기 C797에는 *EGFR* 돌연변이를 갖지 않는 것으로 확인된 바 있다. 일부 양태에서, 1개 이상의 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, 및 N771dupNPH로 구성된 군으로부터 선택된다.
- [0011] 특정 양태에서, 대상체는 대상체로부터의 게놈 샘플을 분석하여, 삽입 돌연변이와 같은 *EGFR* 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인되었다. 일부 양태에서, 게놈 샘플은 타액, 혈액, 소변, 정상 조직 또는 종양 조직으로부터 분리된다. 특정 양태에서, *EGFR* 엑손 20 돌연변이의 존재는 핵산 시퀀싱(예컨대, 종양 조직 또는 혈장으로부터의 순환하는 자유 DNA의 DNA 시퀀싱) 또는 PCR 분석에 의해 결정된다.
- [0012] 특정 양태에서, 방법은 추가적인 항암요법을 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 양태에서, 항암요법은 화학요법, 방사선요법, 유전자요법, 수술, 호르몬요법, 신생혈관형성억제요법 또는 면역요법이다. 특정 양태에서, 포지오티닙 및/또는 항암요법은 정맥 내, 피하, 골 내, 경구, 경피, 지속성 방출, 제어 방출, 지연 방출, 좌제, 또는 설하로 투여된다. 일부 양태에서, 포지오티닙 및/또는 항암요법 투여는 국소적, 지역적 또는 전신성 투여를 포함한다. 특정 양태에서, 포지오티닙 및/또는 항암요법은 매일, 이틀마다 또는 매주와 같이 2회 이상 투여된다.
- [0013] 일부 양태에서, 암은 구강암, 구강인두암, 비인두암, 호흡기 암, 비뇨생식기 암, 소화기 암, 중추 또는 말초 신경계 조직 암, 내분비 또는 신경내분비 암 또는 조혈암, 신경아교종, 육종, 암종, 림프종, 흑색종, 섬유종, 수막종, 뇌암, 구강인두암, 비인두암, 신장암, 담도암, 크롬 친화성 세포종, 췌장 소도세포 암, 리-프라우메니 종양, 갑상선암, 부갑상선암, 뇌하수체 종양, 부신 종양, 골육종 종양, 다발성 신경내분비성 I형 및 II형 종양, 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암이다. 특정 양태에서, 암은 비소세포 폐암이다.
- [0014] 또 다른 구현예에서, 1개 이상의 *EGFR* 엑손 20 삽입 돌연변이와 같은 1개 이상의 *EGFR* 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 환자를 위한 포지오티닙을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 특정 양태에서, 1개 이상의 *EGFR* 엑손 20 돌연변이는 아미노산 763 내지 778 사이에 3 내지 18개 뉴클레오티드의 점 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 포함한다. 일부 양태에서, 대상체는 2, 3, 또는 4개의 *EGFR* 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 바 있다.
- [0015] 일부 양태에서, 1개 이상의 *EGFR* 엑손 20 삽입 돌연변이는 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, 및 H773으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기에 있다. 특정 양태에서, 대상체는 잔기 C797에는 *EGFR* 돌연변이를 갖지 않는 것으로 확인된 바 있다. 특정 양태에서, 1개 이상의 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, 및 N771dupNPH로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 양태에서, 환자는 항암요법으로 치료받는 중이다.
- [0016] 또 다른 구현예에서, 암을 앓는 대상체에서 포지오티닙 단독 또는 항암요법과 병용한 포지오티닙에 대한 반응을 예측하는 방법으로, 상기 환자로부터 얻은 게놈 샘플에서 *EGFR* 엑손 20 돌연변이(예컨대, *EGFR* 엑손 20 삽입 돌연변이)를 검출하는 단계를 포함하며, 이때, 샘플이 *EGFR* 엑손 20 돌연변이의 존재에 대해 양성이면 이 환자는 포지오티닙 단독 또는 항암요법과 병용한 포지오티닙에 대해 양호한 반응을 나타낼 것으로 예측되는 것인, 방법이 제공된다. 일부 양태에서, 게놈 샘플은 타액, 혈액, 소변, 정상 조직 또는 종양 조직으로부터 분리된다. 특

정 양태에서, EGFR 엑손 20 돌연변이의 존재는 핵산 시퀀싱 또는 PCR 분석에 의해 결정된다. 특정 양태에서, EGFR 엑손 20 돌연변이는 아미노산 763 내지 778 사이에 3 내지 18개 뉴클레오타이드의 1개 이상의 점 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 포함한다. 일부 양태에서, EGFR 엑손 20 돌연변이는 잔기 A763, H773, A767, S768, V769, D770, N771, 및/또는 D773에 존재한다. 일부 양태에서, EGFR 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, 및 N771dupNPH로 구성된 군으로부터 선택된다. 특정 양태에서, 포지오티닙 억제제 단독 또는 항암요법과 병용한 포지오티닙 억제제에 대한 양호한 반응은 종양 크기 또는 부담의 감소, 종양 성장의 차단, 종양 관련 통증의 감소, 암 관련 병리의 감소, 암 관련 증상의 감소, 암 무-진행, 증가된 무질병 간격, 진행까지의 증가된 시간, 관해 유도, 전이 감소 또는 증가된 환자 생존을 포함한다. 추가적인 양태에서, 양호한 반응을 나타낼 것으로 예측된 환자는 포지오티닙을 단독으로 또는 제2 항암요법과 병용하여 투여된다.

[0017] 추가적인 구현에는 유효량의 포지오티닙 또는 아파티닙을 대상체에 투여하는 단계를 포함하는 환자의 암 치료 방법을 제공하며, 이때, 대상체는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC 및 P780insGSP로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 바 있다. 일부 양태에서, 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 아미노산 770 내지 785 사이에 3 내지 18개 뉴클레오타이드의 1개 이상의 점 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 더 포함한다. 일부 양태에서, 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 A775, G776, S779, 및/또는 P780에 존재한다. 특정 양태에서, 대상체는 인간이다.

[0018] 일부 양태에서, 이 방법은 mTOR 억제제를 투여하는 단계를 더 포함한다. 특정 양태에서, mTOR 억제제는 라파마이신, 템시롤리무스, 에버롤리무스, 리다포롤리무스 또는 MLN4924이다. 특정 양태에서, mTOR 억제제는 에버롤리무스이다.

[0019] 특정 양태에서, 포지오티닙 또는 아파티닙 및/또는 mTOR 억제제는 정맥 내, 피하, 골 내, 경구, 경피, 지속성 방출, 제어 방출, 지연 방출, 좌제, 또는 설하로 투여된다. 일부 양태에서, 환자는 환자로부터의 게놈 샘플을 분석하여 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인되었다. 특정 양태에서, 게놈 샘플은 타액, 혈액, 소변, 정상 조직 또는 종양 조직으로부터 분리된다. 일부 양태에서, HER2 엑손 20 돌연변이의 존재는 핵산 시퀀싱 또는 PCR 분석에 의해 결정된다.

[0020] 추가적인 양태에서, 방법은 추가적인 항암요법을 투여하는 단계를 더 포함한다. 일부 양태에서, 항암요법은 화학요법, 방사선요법, 유전자요법, 수술, 호르몬요법, 신생혈관형성억제요법 또는 면역요법이다.

[0021] 일부 양태에서, 암은 구강암, 구강인두암, 비인두암, 호흡기 암, 비뇨생식기 암, 소화기 암, 중추 또는 말초 신경계 조직 암, 내분비 또는 신경내분비 암 또는 조혈암, 신경아교종, 육종, 암종, 림프종, 흑색종, 섬유종, 수막종, 뇌암, 구강인두암, 비인두암, 신장암, 담도암, 크롬 친화성 세포종, 췌장 소도세포 암, 리-프라우메니 종양, 갑상선암, 부갑상선암, 뇌하수체 종양, 부신 종양, 골육종 종양, 다발성 신경내분비성 I형 및 II형 종양, 유방암, 폐암, 두경부암, 전립선암, 식도암, 기관암, 간암, 방광암, 위암, 췌장암, 난소암, 자궁암, 자궁경부암, 고환암, 결장암, 직장암 또는 피부암이다. 특정 양태에서, 암은 비소세포 폐암이다.

[0022] 또 다른 구현예에서, A775insV G776C, A775insYVMA, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, 및 P780insGSP로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 환자를 위한 포지오티닙 또는 아파티닙을 포함하는 약학적 조성물이 제공된다. 일부 양태에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 아미노산 770 내지 785 사이에 3 내지 18개 뉴클레오타이드의 1개 이상의 점 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 더 포함한다. 일부 양태에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 A775, G776, S779, 및/또는 P780에 존재한다. 일부 양태에서, 환자는 항암요법으로 치료받는 중이다.

[0023] 또 다른 구현예에서, 암 환자에서 포지오티닙 또는 아파티닙 단독 또는 항암요법과 병용한 포지오티닙 또는 아파티닙에 대한 반응을 예측하는 방법으로, 상기 환자로부터 얻은 게놈 샘플에서 A775insV G776C, A775insYVMA, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, 및 P780insGSP로 구성된 군으로부터 선택된 HER2 엑손 20 돌연변이(예컨대, HER2 엑손 20 삽입 돌연변이)를 검출하는 단계를 포함하며, 이때, 샘플이 HER2 엑손 20 돌연변이의 존재에 대해 양성이면 이 환자는 포지오티닙 또는 아파티닙 단독 또는 항암요법과 병용한 포지오티닙 또는 아파티닙에 대해 양호한 반응을 나타낼 것으로 예측되는 것인, 방법이 제공된다. 일부 양태에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 아미노산 770 내지 785 사이에 3 내지 18개 뉴클레오타이드의 1개 이상의 점 돌연변이, 삽입, 및 또는 결실을 더 포함한다. 특정 양태에서, HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 A775, G776, S779, 및/또는 P780에 존재한다.

- [0024] 일부 양태에서, 게놈 샘플은 타액, 혈액, 소변, 정상 조직 또는 종양 조직으로부터 분리된다. 특정 양태에서, HER2 엑손 20 돌연변이의 존재는 핵산 시퀀싱 또는 PCR 분석에 의해 결정된다. 특정 양태에서, 항암요법은 mTOR 억제제이다. 일부 양태에서, 포지오티닙 또는 아파티닙 억제제 단독 또는 항암요법과 병용한 포지오티닙 또는 아파티닙 억제제에 대한 양호한 반응은 종양 크기 또는 부담의 감소, 종양 성장의 차단, 종양 관련 통증의 감소, 암 관련 병리의 감소, 암 관련 증상의 감소, 암 무-진행, 증가된 무질병 간격, 진행까지의 증가된 시간, 관해 유도, 전이 감소 또는 증가된 환자 생존을 포함한다. 추가적인 양태에서, 양호한 반응을 나타낼 것으로 예측된 환자는 포지오티닙을 단독으로 또는 제2 항암요법과 병용하여 투여된다.
- [0025] 또한, 인간 암 세포로부터 단리된 핵산; 및 인간 EGFR 또는 HER2 암호화 서열의 엑손 20의 적어도 제1 부분을 증폭시킬 수 있는 프라이머 쌍을 포함하는 조성물이 본 설명에 제공된다. 일부 양태에서, 이 조성물은 서열에 돌연변이가 있을 때 인간 EGFR 또는 HER 암호화 서열의 엑손 20의 제1 부분에 특이적으로 혼성화할 수 있는 라벨링된 프로브 분자를 더 포함한다. 특정 양태에서, 이 조성물은 열에 안정적인 DNA 중합효소를 더 포함한다. 일부 양태에서, 이 조성물은 dNTPs를 더 포함한다. 일부 양태에서, 라벨링된 프로브는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, 및 N771dupNPH로 구성된 군으로부터 선택된 돌연변이가 존재할 때 인간 EGFR 암호화 서열의 엑손 20의 제1 부분에 혼성화한다. 특정 양태에서, 라벨링된 프로브는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, 및 P780insGSP로 구성된 군으로부터 선택된 돌연변이가 존재할 때 인간 HER2 암호화 서열의 엑손 20의 제1 부분에 혼성화한다.
- [0026] 또 다른 구현예에서, 돌연변이체 EGFR 단백질을 암호화하는 단리된 핵산이 제공되는데, 이때, 상기 돌연변이체 단백질은 아미노산 763 내지 778 사이에 3 내지 18개 뉴클레오티드의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 1개 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이에 의해 야생형 인간 EGFR과 다르다. 일부 양태에서, 1개 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, 및 H773으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기에 있다. 특정 양태에서, 1개 이상의 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH, 및 N771dupNPH로 구성된 군으로부터 선택된다. 구체적인 양태에서, 이 핵산은 서열번호 8, 9, 10, 11, 또는 12의 서열을 포함한다.
- [0027] 또 다른 구현예에서, 돌연변이체 HER2 단백질을 암호화하는 단리된 핵산이 제공되는데, 이때, 상기 돌연변이체 단백질은 아미노산 770 내지 785 사이에 3 내지 18개 뉴클레오티드의 1개 이상의 점 돌연변이, 삽입 및/또는 결실을 포함하는 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이에 의해 야생형 인간 HER2와 다르다. 일부 양태에서, 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 A775, G776, S779, 및/또는 P780에 존재한다. 특정 양태에서, 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, 및 P780insGSP로 구성된 군으로부터 선택된다. 구체적인 양태에서, 이 핵산은 서열번호 14, 15, 16, 17, 또는 18의 서열을 포함한다.
- [0028] 본 발명의 기타 목적, 특징 및 장점은 다음의 상세한 설명으로부터 명백해질 것이다. 그러나 본 발명의 사상 및 범위 내의 다양한 변경 및 수정은 이 상세한 설명으로부터 당업자에게 명백해질 것이므로 상세한 설명 및 구체적인 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 나타내지만 오로지 예시로서만 제공됨을 이해하여야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0029] 다음의 도면은 본 명세서의 일부를 형성하며, 본 발명의 특정 양태를 추가적으로 증명하고자 포함된 것이다. 본 발명은 본 설명에 제시된 특정 구현예의 상세한 설명과 조합하여 1개 이상의 이러한 도면을 참조함으로써 더 잘 이해될 수 있다.

도 1a 내지 1j: 엑손 20 삽입 돌연변이는 공유 및 비공유 TKI에 대하여 새로운(*de novo*) 저항성을 유도한다. (**도 1a**) 고전적인 돌연변이 및 엑손 20 EGFR 돌연변이를 가진 환자의 무진행 생존(PFS)은 1차 치료에 대한 저항성을 나타낸다. 엑손 20 삽입을 가진 환자는 생존(%)가 감소되었다. (**도 1b**) 안정적인 Ba/F3 모델에서 생성된 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이의 개략도. 72시간 동안 1세대, 2세대 및 3세대 TKI로 처리된 EGFR(**도 1c 내지 1e**) 및 HER2(**도 1f 내지 1h**) 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 Ba/F3 세포주의 세포 생존율의 용량 반응 곡선. (**도 1c 내지 1h**) 6개 세포주의 평균 $\pm$ SEM을 각각의 농도에 대해 도표화하였다(n=3). (**도 1i**) EGFR D770insNPG 및 T790M의 3-D 모델링. P-루프와 α -c-헬릭스의 결합 포켓 내로의 이동은 입체 장애를 유발하여, AZD9291을 결합 포켓 밖으로 밀어낸다. (**도 1j**) HER2 A775insYVMA 및 WT의 3-D 모델링. P-루프 및 α -c-헬릭스의 결합 포켓 내로의 전체적인 이동은 결합 포켓 크기의 전체적인 감소를 가져온다.

도 2a 내지 2g: 포지오티닙은 강력하게 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이를 억제한다. 72시간 동안 포지오티닙 처리된 EGFR(**도 2a**) 및 HER2(**도 2b**) 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 Ba/F3 세포주의 세포 생존율의 용량 반응 곡선. 각각의 개별적인 세포주의 평균 $\pm$ SEM을 각각의 농도에 대해 도표화하였다(n=3). (**도 2c**) 웨스턴 블롯팅은 포지오티닙 처리 2시간 후 Ba/F3 세포주에서의 p-EGFR 및 p-HER2의 억제를 확인시켜 준다(n=2). (**도 2d**) Ba/F3 EGFR 엑손 20 삽입 위치와 아미노산 위치의 상관관계(n=2). 그래프패드 프리즘(GraphPad Prism)을 이용하여 피어슨 상관관계 및 p-값을 결정하였다. 72시간 동안 포지오티닙 또는 아파티닙 처리된 (**도 2e**) EGFR A767dupASV를 발현하는 환자 유래 세포주 CUTO14 및 (**도 2f**) EGFR N771del insFH를 발현하는 YUL0019의 세포 생존율의 용량 반응 곡선(n=3). (**도 2f**) 72시간 동안 아파티닙, 오시머티닙, 로실레티닙, 또는 포지오티닙과의 인큐베이션 후 Ba/F3 EGFR T790M 세포주의 IC50 값에 대해 정규화한 EGFR 돌연변이체 Ba/F3 세포의 IC50 값(n=3). (**도 2g**) 막대는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. 1보다 큰 값은 T790M과 비교하여 덜 강력한 억제를 나타내고, 1보다 작은 값은 T790M과 비교하여 엑손 20 삽입의 더욱 강력한 억제를 나타낸다.

도 3a 내지 3h: 포지오티닙은 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이 마우스 모델에서 종양 부담을 감소시킨다. EGFR D770insNPG(**도 3a**) 또는 HER2 A775insYVMA(**도 3b**) 마우스에 4주 동안 매일 비히클(EGFR n=5 및 HER2 n=4), 20mg/kg의 아파티닙(EGFR n=4), 또는 10mg/kg의 포지오티닙(EGFR n=5 및 HER2 n=6)을 처리하였다. MRI로 측정된 바에 따르면 종양 부피 변화의 폭포형 도표는 각각 EGFR 및 HER2 GEMM에서 4주차의 포지오티닙에 의한 85% 및 60% 종양 억제를 증명한다. (**도 3a 내지 3b**) 양측 스튜던트 t-검정을 이용하여 p-값을 계산하였다. 포지오티닙 처리 전 및 처리 4주 후의 EGFR(**도 3c**) 및 HER2 (**도 3d**) GEMM의 대표적인 MRI 영상은 활발한 종양 퇴화를 증명한다. 12주 동안 5일/주의 10mg/kg의 포지오티닙 처리된 EGFR D770insNPG(**도 3e**)(n=4) 및 HER2 A775insYVMA(**도 3f**)(n=6)의 종양 부피 도표는 마우스가 계속하여 포지오티닙 처리에 반응함을 나타낸다. (**도 3g**) 아파티닙 또는 포지오티닙 처리된 YUL-0019(EGFR N771delinsFH) 세포. 10 mg/kg 포지오티닙 처리된 세포는 가장 작은 종양 부피를 나타냈고, 5 mg/kg 처리된 세포는 두 번째로 작은 종양 부피를 나타냈다. (**도 3h**) EGFR H773insNPH PDX 마우스에 비히클 대조군(n=6), 5mg/kg(n=6) 또는 10mg/kg(n=3)의 포지오티닙을 처리하였다. 포지오티닙 처리된 마우스는 감소된 종양 부피를 나타냈다. 폭포형 도표는 포지오티닙 처리된 모든 마우스에서 종양 부피가 85% 넘게 감소되었음을 증명하며, 9마리의 포지오티닙 처리된 마우스 중 8마리에서, 이종이식편은 잔류 볼루스까지 완전히 감소되었다. 일원 분산분석법을 터키 검정법과 조합하여 사용하여 통계적인 유의도, ***, $p < 0.0001$ 을 결정하였다.

도 4a 내지 4c: EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 활성화 돌연변이이다. (**도 4a**) EGFR 엑손 20 삽입을 가진 개별적인 환자의 폭포형 도표는 엘로티닙, 게피티닙, 또는 아파티닙에 대한 새로운 저항성을 보여준다. 환자 돌연변이를 각각의 대표 막대 아래에 열거하였다. (**도 4b**) EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 안정적인 Ba/F3 세포주는 Ba/F3 빈 벡터 발현 세포 또는 EGFR WT를 발현하는 Ba/F3 세포와는 달리 IL-3에 비의존적인 조건에서 생존 가능하여, EGFR 엑손 20 삽입이 활성화 돌연변이임을 나타낸다. (**도 4c**) 상이한 HER2 돌연변이를 발현하는 11종의 안정적인 Ba/F3 세포주의 IL-3 비의존적 성장은 HER2 활성화 돌연변이 대부분이 HER20의 엑손 20 내에 있음을 나타낸다. L755P를 제외하고, 모든 활성화 돌연변이는 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이였다. (**도 4b 내지 4c**) 세포 생존율을 셀 타이터 글로(Cell Titer Glo) 분석법으로 결정하였다. 평균 $\pm$ SEM을 각 세포주에 대해 도표화하였다(n=3).

도 5: 72시간 동안 1세대, 2세대 및 3세대 TKI로 처리된 EGFR 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 각각의 Ba/F3 세포주의 세포 생존율의 용량 반응 곡선. 평균 $\pm$ SEM을 각각의 농도에 대해 도표화하였다(n=3).

도 6: 72시간 동안 1세대, 2세대 및 3세대 TKI로 처리된 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이를 발현하는 각각의 Ba/F3 세포주의 세포 생존율의 용량 반응 곡선. 평균 $\pm$ SEM을 각각의 농도에 대해 도표화하였다(n=3).

도 7a 내지 7d: 잔기 A763 이후의 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 1세대 및 3세대 TKI에 저항성이 있다. EGFR 엑손 20 삽입이 있는 Ba/F3 세포를 1시간 동안 혈청 기아 처리한 다음, 2시간 동안 표시된 용량의 (**도 7a**) 엘로티닙 또는 (**도 7c**) 오시머티닙을 처리하였다(N=2). (**도 7b**) 엘로티닙 처리 및 (**도 7d**) 오시머티닙 처리 후 p-EGFR 및 p-HER2 수준을 포토샵을 이용하여 정량화하였다. 값을 그래프패드 프리즘으로 도표화하였고, 막대는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. (N=2) $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) 또는 $p < 0.001$ (***).

도 8a 내지 8e: EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 시험관 내에서 포지오티닙에 민감하다. (**도 8a**) 표시된 Ba/F3 세포주에서 2시간의 포지오티닙 처리 후의 p-EGFR 및 p-HER2의 웨스턴 블롯을 포토샵을 이용하여 정량화하였다. 값을 그래프패드 프리즘으로 도표화하였고, 막대는 평균 $\pm$ SEM을 나타낸다. (N=2) (**도 8b**) 3시간의 표시된 용량의 아파티닙 또는 포지오티닙 후의 CUTO-14 환자 유래 세포주의 웨스턴 블롯(N=3). (**도 8c**) CUTO-14

세포주에서 3시간의 표시된 용량의 아파티닙 또는 포지오티닙 후의 웨스턴 블롯으로부터의 p-EGFR의 정량화. 포지오티닙 처리는 감소된 p-EGFR을 초래하였다. (도 8d) IC50 값 대 Ba/F3 세포주의 상대적인 발현의 선형 회귀 도표는 발현과 포지오티닙에 대한 민감성 사이에는 상관관계가 없음을 증명하였다(n=2). (도 8e) IC50 값 대 HER2 수용체 내에서의 돌연변이 위치의 선형 회귀 도표는 HER2 돌연변이체 Ba/F3 세포주에서 위치와 포지오티닙에 대한 민감성 사이에는 상관관계가 없음을 증명하였다(n=2). 그래프패드 프리즘을 이용하여 피어슨 상관관계 및 p-값을 계산하였다. $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) 또는 $p < 0.001$ (***).

도 9: C797S 및 EMT는 시험관 내에서 포지오티닙 저항성의 두 가지 구분되는 메커니즘이다. 72시간 동안 포지오티닙 처리된 EGFR 돌연변이체 Ba/F3 세포주의 세포 생존율의 용량 반응 곡선. 평균 $\pm$ SEM을 각각의 농도에 대해 도표화하였다(n=3).

도 10: 표시된 TKI 처리된 MCF10A HER2 G776del insVC 세포주의 세포 생존율의 용량 반응 곡선.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

예시적인 구현예의 설명

표피 성장 인자 수용체(EGFR) 돌연변이체 비소세포 폐암(NSCLC)의 활성화 돌연변이의 대부분은 이용 가능한 EGFR 티로신 키나아제 억제제(TKI)에 대해 민감하지만, EGFR 및 HER2의 엑손 20에 변화가 있는 부분 집합은 본질적으로 저항성이 있다. 본 연구는 가상실험(*in silico*), 시험관 내 및 생체 내 시험을 활용하여 이러한 엑손 20 돌연변이에 의해 유도된 구조 변화 모델을 만들고, 효과적인 억제제를 확인하였다. 3-D 모델링은 크고 단단한 억제제의 결합을 강요하는 약물 결합 포켓의 크기를 제한하는 중요한 변화를 밝혀내었다. 포지오티닙은 작은 크기와 유연성으로 인해 이러한 입체적 변화를 우회할 수 있었으며, EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이체 단백질의 강력하고, 상대적으로 선택적인 억제제임이 발견되었다. 포지오티닙은 또한, 돌연변이체 엑손 20 EGFR 또는 HER2 NSCLC 환자 유래 이종이식편(PDX) 모델 및 유전자 조작된 마우스 모델에서 강력한 활성을 갖는다. 따라서, 이러한 데이터는 포지오티닙을 EGFR/HER2 엑손 20 돌연변이의 강력한, 임상적 활성 억제제임을 확인시켜 주며, 이러한 삽입에 의해 유도된 입체 변화를 우회할 수 있는 키나아제 억제제의 분자적 특징을 밝혀준다.

따라서, 본 개시의 특정 구현예는 엑손 20 삽입과 같은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 가진 암 환자의 치료 방법을 제공한다. 특히, 본 방법은 EGFR 및/또는 HER 엑손 20 삽입 돌연변이를 가진 것으로 확인된 환자에 대한 포지오티닙(HM781-36B로도 알려져 있음) 또는 아파티닙의 투여를 포함한다. 포지오티닙의 크기 및 유연성은 입체 장애를 극복하여, 낮은 나노몰 농도에서 EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이체를 억제한다. 따라서, 포지오티닙 또는 아파티닙뿐만 아니라, 구조적으로 비슷한 억제제는 비가역적인 2세대 및 3세대 TKI에 대해 저항성이 있는 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입 둘 다를 표적으로 하는 데 사용할 수 있는 강력한 EGFR 또는 HER2 억제제이다.

I. 정의

본 명세서에 사용된 바와 같이, 단수형("a" 또는 "an")은 하나 이상을 의미할 수 있다. 청구범위에서 사용된 바와 같이, 단어 "포함하는"과 함께 사용될 때, 이 단어("a" 또는 "an")는 하나 이상을 의미할 수 있다.

청구범위에서 용어 "또는"의 사용은 대안만을 지칭하는 것으로 명시적으로 표시되지 않는 한, 또는 대안들이 상호 배타적이지 않는 한, "및/또는"을 의미하고자 사용되지만, 본 개시는 대안만 그리고 "및/또는"을 지칭하는 정의를 뒷받침한다. 본 설명에 사용된 바와 같이, "또 다른"은 적어도 제2의 또는 그 이상을 의미할 수 있다.

본 출원 전체에 걸쳐, 용어 "약"은 값이 이 값을 결정하는 데 활용되는 방법, 장치의 오차의 고유한 변화, 또는 연구 대상 중에 존재하는 이 변화를 포함함을 나타내기 위하여 사용된다.

"치료" 또는 "치료하는"은 (1) 질병의 병리 또는 증상을 경험하거나 나타내는 대상체 또는 환자에서 이 질병을 억제(예컨대, 병리 및/또는 증상의 추가적인 발달을 저지), (2) 질병의 병리 또는 증상을 경험하거나 나타내는 대상체 또는 환자에서 이 질병을 개선(예컨대, 병리 및/또는 증상을 역전), 및/또는 (3) 질병의 병리 또는 증상을 경험하거나 나타내는 대상체 또는 환자에서 이 질병의 임의의 측정 가능한 감소를 가져오는 것을 포함한다. 예를 들어, 치료는 유효량의 포지오티닙 또는 아파티닙의 투여를 포함할 수 있다.

"예방" 또는 "예방하는"은 (1) 질병의 위험이 있고/있거나 질병에 걸리기 쉬울 수 있지만 이 질병의 임의의 또는 모든 병리 또는 증상을 아직 경험하거나 나타내지 않는 대상체 또는 환자에서 질병의 개시를 억제, 및/또는 (2) 질병의 위험이 있고/있거나 질병에 걸리기 쉬울 수 있지만 이 질병의 임의의 또는 모든 병리 또는 증상을 아직 경험하거나 나타내지 않는 대상체 또는 환자에서 질병의 병리 또는 증상의 개시를 지연시키는 것을 포함한다.

다.

- [0039] 본 설명에 사용된 바와 같이, 용어 "환자" 또는 "대상체"는 살아있는 포유동물 유기체, 예컨대, 인간, 원숭이, 소, 양, 염소, 개, 고양이, 마우스, 랫트, 기니피그, 또는 이의 형질전환 종을 지칭한다. 특정 구현예에서, 환자 또는 대상체는 영장류이다. 인간 환자의 비제한적인 예는 성인, 청소년, 유아 및 태아이다.
- [0040] 용어 "유효한"은, 그 용어가 본 명세서 및/또는 청구범위에 사용되는 바와 같이, 원하는, 기대한, 또는 의도한 결과를 달성하기에 적합한 것을 의미한다. "유효량", "치료적 유효량" 또는 "약학적 유효량"은, 환자 또는 대상체를 화합물로 치료하는 맥락에서 사용될 때, 화합물이 질병을 치료 또는 예방하기 위하여 대상체 또는 환자에 투여될 때 질병의 이러한 치료 또는 예방을 가져오기에 충분한 양인 화합물의 양을 의미한다.
- [0041] 본 설명에 사용된 바와 같이, 용어 " IC_{50} "은 얻어진 최대 반응의 50%인 억제 용량을 지칭한다. 이 정량적인 척도는 얼마나 많은 특정 약물 또는 다른 물질(억제제)이 주어진 생물학적, 생화학적 또는 화학적 절차(또는 절차의 성분, 즉, 효소, 세포, 세포 수용체 또는 미생물)를 절반으로 억제하는 데 필요한지를 나타낸다.
- [0042] "항암"제는 예를 들어, 암세포의 살상을 촉진시킴으로써, 암세포에서의 세포자멸사를 유도함으로써, 암세포의 성장 속도를 감소시킴으로써, 전이의 발생 정도 또는 수를 감소시킴으로써, 종양 크기를 감소시킴으로써, 종양 성장을 억제함으로써, 종양 또는 암세포로의 혈액 공급을 감소시킴으로써, 암세포 또는 종양에 대한 면역 반응을 촉진함으로써, 암의 진행을 예방하거나 억제함으로써, 또는 암을 앓는 대상체의 수명을 증가시킴으로써, 대상체의 암세포/종양에 부정적으로 영향을 미칠 수 있다.
- [0043] 용어 "삽입" 또는 "삽입 돌연변이"는 DNA 서열 내로의 1개 이상의 뉴클레오타이드 염기 쌍의 첨가를 지칭한다. 예를 들어, 약 2 내지 21개 염기 쌍의 EGFR의 엑손 20의 삽입 돌연변이는 아미노산 767 내지 774 사이에서 발생할 수 있다. 또 다른 예에서, HER2 엑손 20 삽입 돌연변이는 아미노산 770 내지 785 사이에서 3 내지 18개 뉴클레오타이드의 1개 이상의 삽입을 포함한다. 예시적인 EGFR 및 HER 엑손 20 삽입 돌연변이는 본 개시의 도 1에 도시되어 있다.
- [0044] "혼성화하다" 또는 "혼성화"는 핵산 사이의 결합을 지칭한다. 혼성화 조건은 결합되는 핵산의 서열 상동성에 따라 다를 수 있다. 따라서, 대상 핵산 사이의 서열 상동성이 높은 경우, 엄격한 조건이 사용된다. 서열 상동성이 낮은 경우, 가벼운 조건이 사용된다. 혼성화 조건이 엄격할 때, 혼성화 특이성은 증가하며, 혼성화 특이성의 이러한 증가는 비특이적 생성물의 수율 감소를 초래한다. 그러나 가벼운 혼성화 조건 하에서는, 혼성화 특이성이 감소하며, 혼성화 특이성의 이러한 감소는 비특이적 생성물 수율 증가를 초래한다.
- [0045] "프로브"는 적어도 여덟(8) 개의 뉴클레오타이드 길이이며, 프로브 내의 적어도 하나의 서열의, 표적 영역 내의 서열과의 상보성으로 인해, 표적 서열과 혼성 구조체를 형성하는 폴리뉴클레오타이드를 지칭한다. 이 폴리뉴클레오타이드는 DNA 및/또는 RNA로 구성될 수 있다. 특정 구현예에서의 프로브는 검출 가능하게 라벨링된다. 프로브 크기는 상당히 다양할 수 있다. 일반적으로, 프로브는 예를 들어, 적어도 8개 내지 15개 뉴클레오타이드 길이이다. 다른 프로브는 예를 들어, 적어도 20, 30 또는 40개 뉴클레오타이드 길이이다. 또 다른 프로브는 다소 더 길어서, 적어도, 예를 들어, 50, 60, 70, 80, 또는 90개 뉴클레오타이드 길이이다. 또한, 프로브는 전술한 범위 내에 속하는 임의의 특정 길이일 수 있다. 바람직하게는, 이 프로브는 중합효소 연쇄 반응 중에 표적 서열을 준비시키는 데 사용된 서열(들)에 대해 상보적인 서열을 함유하지 않는다.
- [0046] "올리고뉴클레오타이드" 또는 "폴리뉴클레오타이드"는 단일 가닥 또는 이중 가닥 데옥시리보뉴클레오타이드 또는 리보뉴클레오타이드의 고분자를 지칭하며, 이는 개질되지 않은 RNA 또는 DNA 또는 개질된 RNA 또는 DNA일 수 있다.
- [0047] "개질된 리보뉴클레오타이드" 또는 데옥시리보뉴클레오타이드는 핵산에서 자연 발생적인 염기 대신 이용될 수 있는 분자이며, 개질된 퓨린 및 피리미딘, 작은 염기, 전환 가능한 뉴클레오시드, 퓨린 및 피리미딘의 구조적 유사체, 라벨링된, 유도체화된 및 개질된 뉴클레오시드 및 뉴클레오타이드, 콘주게이트된 뉴클레오시드 및 뉴클레오타이드, 서열 개질자, 말단 개질자, 스페이서 개질자, 및 리보스 개질 뉴클레오타이드, 포스포아미데이트, 포스포로티오에이트, 포스포아미다이트, 메틸 포스포네이트, 메틸 포스포아미다이트, 메틸 포스포아미다이트, 5'- β -시아노에틸 포스포아미다이트, 메틸렌포스포네이트, 포스포로디티오에이트, 펩티드 핵산, 아키랄 및 중성 뉴클레오타이드 내 연결을 포함하나 이에 한정되지 않는 백본 개질이 있는 뉴클레오타이드를 포함하나, 이에 한정되지 않는다.
- [0048] "변이체"는 각각 1개 이상의 뉴클레오타이드 또는 아미노산의 교환, 결실, 또는 삽입에 의해, 야생형 또는 개체군에서 가장 보편적인 형태에 대해 상이한 폴리뉴클레오타이드 또는 폴리펩티드를 지칭한다. 교환, 결실, 또는 삽입

된 뉴클레오티드 또는 아미노산의 수는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 이상, 예컨대, 25, 30, 35, 40, 45 또는 50일 수 있다.

[0049] "프라이머" 또는 "프라이머 서열"은 핵산 합성 반응을 준비시키기 위하여 표적 핵산 서열(예를 들어, 증폭되는 DNA 주형)에 혼성화하는 올리고뉴클레오티드를 지칭한다. 프라이머는 DNA 올리고뉴클레오티드, RNA 올리고뉴클레오티드, 또는 키메라 서열일 수 있다. 프라이머는 천연, 합성, 또는 개질된 뉴클레오티드를 함유할 수 있다. 프라이머의 길이의 상한 및 하한은 경험적으로 결정된다. 프라이머 길이에 대한 하한은, 핵산 증폭 반응 조건 하에서 표적 핵산과 혼성화할 때 안정적인 중복 부위(duplex)를 형성하는 데 필요한 최소한의 길이이다. (대개 3 또는 4개 뉴클레오티드 길이보다 작은) 매우 짧은 프라이머는 이러한 혼성화 조건 하에서 표적 핵산과 열역학적으로 안정적인 중복 부위를 형성하지 않는다. 상한은 종종 표적 핵산 내의 사전에 결정된 핵산 서열 이외의 영역에 중복 부위 형성을 가질 가능성에 의해 결정된다. 일반적으로, 적합한 프라이머 길이는 약 10 내지 약 40 개 뉴클레오티드 길이 범위이다. 특정 구현예에서는, 예를 들어, 프라이머는 10 내지 40, 15 내지 30, 또는 10 내지 20개 뉴클레오티드 길이일 수 있다. 프라이머는 적당한 조건 하에 놓였을 때 폴리뉴클레오티드 서열 상에서 합성 개시점으로 작용할 수 있다.

[0050] "검출", "검출 가능한" 및 이의 문법적 균등물은 표적 핵산 서열의 존재 및/또는 양 및/또는 정체를 결정하는 방법을 지칭한다. 일부 구현예에서, 검출은 표적 핵산 서열의 증폭시킴으로써 일어난다. 다른 구현예에서, 표적 핵산의 시퀀싱은 표적 핵산 서열의 "검출"을 특징으로 할 수 있다. 프로브에 부착된 라벨은 예를 들어, 화학적 또는 물리적 수단에 의해 검출될 수 있는, 당해 분야에 공지된 다양한 상이한 라벨 중 임의의 것을 포함할 수 있다. 프로브에 부착될 수 있는 라벨은 예를 들어, 형광 및 발광 물질을 포함할 수 있다.

[0051] "증폭시키는", "증폭" 및 이의 문법적 균등물은 핵산 서열을 선형적으로 또는 기하급수적으로 증폭시키는 광범위한 기술을 제한 없이 포함하는, 표적 핵산 서열의 적어도 일부가 주형 의존적인 방식으로 재생산되는 임의의 방법을 지칭한다. 증폭 단계를 수행하는 예시적인 수단에는 리가아제 연쇄 반응(LCR), 리가아제 검출 반응(LDR), 라이게이션 후 Q-레플리카아제 증폭, PCR, 프라이머 신장, 가닥 변위 증폭(SDA), 초분기 가닥 변위 증폭, 다중 변위 증폭(MDA), 핵산 가닥-기반 증폭(NASBA), 2단계 다중화 증폭, 회전환 증폭(RCA), 재조합효소-중합효소 증폭(RPA)(TwistDx, 영국 케임브리지), 및 다중 버전을 포함한 자체 지속성 서열 복제(3SR) 또는 이의 조합이 포함되며, 예를 들어 OLA/PCR, PCR/OLA, LDR/PCR, PCR/PCR/LDR, PCR/LDR, LCR/PCR, PCR/LCR(조합된 연쇄 반응-CCR로도 알려져 있음) 등이 있으나, 이에 한정되지 않는다. 이러한 기술에 대한 설명은 다른 곳 중에서도 문헌[Sambrook *et al.* Molecular Cloning, 3rd Edition]에서 찾아볼 수 있다.

[0052] "EGFR" 또는 "표피 성장 인자 수용체" 또는 "EGFR"은 티로신 키나아제 세포 표면 수용체를 지칭하며, GenBank 접근번호 NM_005228.3, NM_201282.1, NM_201283.1 및 NM_201284.1로 나타나는 네 가지의 대안적인 전사체 중 하나에 의해 암호화된다. EGFR의 변이체는 엑손 20에 삽입을 포함한다.

[0053] "HER2" 또는 "ERBB2"는 EGFR/ErbB 패밀리의 구성원이며, GenBank 접근번호 NM_004448.2로 나타난다. HER2의 변이체는 엑손 20에 삽입을 포함한다.

[0054] 본 설명에 일반적으로 사용된 바와 같이, "약학적으로 허용 가능한"은 과도한 독성, 자극, 알레르기 반응, 또는 합리적인 편익/위험비에 비례한 기타 문제 또는 합병증 없이, 타당한 의학적 판단의 범위 내에서 인간 및 동물의 조직, 기관 및/또는 체액과 접촉하여 사용하기에 적합한 화합물, 물질, 조성물 및/또는 투여 형태를 지칭한다.

[0055] "약학적으로 허용 가능한 염"은 위에 정의된 바와 같이 약학적으로 허용 가능하며, 원하는 약학적 활성을 보유하는, 본 발명의 화합물의 염을 의미한다. 이러한 염의 비제한적인 예에는 염산, 브롬화수소산, 황산, 질산 및 인산과 같은 무기산과 형성된 산 부가염; 또는 1,2-에탄디설펜산, 2-하이드록시에탄설펜산, 2-나프탈렌설펜산, 3-페닐프로피온산, 4,4'-메틸렌비스(3-하이드록시-2-엔-1-카르복시산), 4-메틸비시클로[2.2.2]옥트-2-엔-1-카르복시산, 아세트산, 지방족 노노- 및 디카르복시산, 지방족 황산, 방향족 황산, 벤젠설펜산, 벤조산, 캄포설펜산, 탄산, 신남산, 시트르산, 시플로펜탄프로피온산, 에탄설펜산, 푸마르산, 글루코헵톤산, 글루콘산, 글루탐산, 글리콜산, 헵탄산, 헥산산, 하이드록시나프토산, 락트산, 라우릴황산, 말레산, 말산, 말론산, 만델산, 메탄설펜산, 묄론산, *o*-(4-하이드록시벤조일)벤조산, 옥살산, *p*-클로로벤젠설펜산, 페닐-치환된 알칸산, 프로피온산, *p*-톨루엔설펜산, 피루브산, 살리실산, 스테아르산, 숙신산, 타르타르산, 3차 부틸아세트산, 및 트리메틸아세트산과 같은 유기산과 형성된 산 부가염이 포함된다. 또한, 약학적으로 허용 가능한 염은 존재하는 산성 양성자가 무기 또는 유기 염기와 반응할 수 있을 때 형성될 수 있는 염기 부가염을 포

함한다. 허용 가능한 무기 염기에는 수산화나트륨, 탄산나트륨, 수산화칼륨, 수산화알루미늄 및 수산화칼슘이 포함된다. 허용 가능한 유기 염기의 비제한적인 예에는 에탄올아민, 디에탄올아민, 트리에탄올아민, 트로메타민 및 *N*-메틸글루카민이 포함된다. 본 발명의 임의의 염의 일부를 형성하는 특정 음이온 또는 양이온은 염이 전체로서 약학적으로 허용 가능한 한 중요하지 않음은 인정되어야 한다. 약학적으로 허용 가능한 염 및 이의 제조 방법 및 용도의 추가적인 예는 문헌[*Handbook of Pharmaceutical Salts: Properties, and Use* (P. H. Stahl & C. G. Wermuth eds., Verlag Helvetica Chimica Acta, 2002)]에 제시되어 있다.

II. EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이

본 개시의 특정 구현예는 대상체가 삽입 돌연변이와 같은, 1개 이상의 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이, 특히 도 1에 도시된 바와 같은 1개 이상의 삽입 돌연변이를 갖고 있는지를 결정하는 것과 관련이 있다. 대상체는 2, 3, 4개 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 가질 수 있다. PCR 분석 및 핵산 시퀀싱뿐만 아니라, FISH 및 CGH도 포함하는 돌연변이 검출 방법이 당해 분야에 공지되어 있다. 특정 양태에서, 엑손 20 돌연변이는 종양으로부터 또는 혈장으로부터 순환하는 유리 DNA로부터와 같은 DNA 시퀀싱에 의해 검출된다.

EGFR 엑손 20 돌연변이는 아미노산 763 내지 778 사이에 3 내지 18개 뉴클레오타이드의 1개 이상의 점 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 1개 이상의 EGFR 엑손 20 돌연변이는 A763, A767, S768, V769, D770, N771, P772, 및 H773으로 구성된 군으로부터 선택된 1개 이상의 잔기에 위치할 수 있다.

EGFR 엑손 20 삽입은 H773_V774insH, A767_v769ASV, N771_P772insH, D770_N771insG, H779_V774insH, N771delinsHH, S768_D770dupDVD, A767_V769dupASV, A767_V769dupASV, P772_H773dup, N771_H773dupNPH, S768_D770dupSVD, N771delinsGY, S768_D770delinsSVD, D770_D770delinsGY, A767_V769dupASV, 및/또는 H773dup를 포함할 수 있다. 특정 양태에서, 엑손 20 돌연변이는 A763insFQEA, A767insASV, S768dupSVD, V769insASV, D770insSVD, D770insNPG, H773insNPH, N771del insGY, N771del insFH 및/또는 N771dupNPH이다.

일부 양태에서, 대상체는 포지오티닙과 같은 TKI에 대한 저항성을 초래할 수 있는 EGFR 잔기 C797에서 돌연변이를 가지거나 발달시킬 수 있다. 따라서, 특정 양태에서, 대상체는 EGFR C797에서 돌연변이를 갖지 않는 것으로 확인된다.

HER2 엑손 20 돌연변이는 아미노산 770 내지 785 사이에 3 내지 18개 뉴클레오타이드의 1개 이상의 점 돌연변이, 삽입, 및/또는 결실을 포함할 수 있다. 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 잔기 A775, G776, S779, 및/또는 P780에 존재할 수 있다. 1개 이상의 HER2 엑손 20 돌연변이는 A775insV G776C, A775insYVMA, G776V, G776C V777insV, G776C V777insC, G776del insVV, G776del insVC, 및/또는 P780insGSP일 수 있다.

환자 샘플은 대상체의 폐암으로부터의 핵산을 포함하는 임의의 체조직 또는 체액일 수 있다. 특정 구현예에서, 샘플은 순환하는 종양 세포 또는 세포 유리 DNA를 포함하는 혈액 샘플일 것이다. 다른 구현예에서, 샘플은 조직, 예컨대, 폐 조직일 수 있다. 폐 조직은 종양 조직으로부터 유래할 수 있고, 신선 냉동되거나 포르말린 고정, 파라핀 포매(PFPE)될 수 있다. 특정 구현예에서, 폐 종양 PFPE 샘플이 얻어진다.

본 설명에 기술된 방법에 사용하기에 적합한 샘플은 유전 물질, 예컨대, 게놈 DNA(gDNA)를 함유한다. 게놈 DNA는 전형적으로 혈액 또는 입 안의 점막 긁음 표본과 같은 생물학적 샘플로부터 추출되나, 소변, 종양 또는 거담체를 포함한 다른 생물학적 샘플로부터 추출될 수 있다. 샘플 그 자체는 전형적으로 유핵 세포(예컨대, 혈액 또는 구강 세포) 또는 정상 또는 종양 조직을 포함한 대상체로부터 제거된 조직을 포함할 것이다. 샘플 획득, 가공처리 및 분석 방법 및 시약은 당해 분야에 공지되어 있다. 일부 구현예에서, 샘플은 예컨대, 채혈을 위하여, 의료인의 도움으로 얻어진다. 일부 구현예에서, 샘플은 예컨대, 구강 면봉 또는 브러시를 이용하여 얻어지는 구강 세포를 포함하는 샘플, 또는 구강 세척제 샘플로서와 같이, 예컨대, 샘플이 비침습적으로 얻어지는 경우, 의료인의 도움 없이 얻어진다.

일부 경우, 생물학적 샘플은 DNA 단리를 위하여 가공처리될 수 있다. 예를 들어, 세포 또는 조직 샘플 내 DNA는 샘플의 다른 성분들로부터 분리될 수 있다. 세포는 당해 분야에 공지된 표준적인 기술을 이용하여 생물학적 샘플로부터 수확될 수 있다. 예를 들어, 세포는 세포 샘플을 원심분리하고, 펠릿화된 샘플을 재현탁시켜 수확될 수 있다. 세포는 인산 완충 식염수(PBS)와 같은 완충 용액에 재현탁될 수 있다. 세포 현탁액을 원심분리하여 세포 펠릿을 획득한 후, 세포는 용해되어 DNA, 예컨대, gDNA를 추출할 수 있다. 예컨대, Ausubel *et al.* (2003) 참조. 이 샘플은 농축 및/또는 정제되어 DNA를 단리할 수 있다. 임의의 종류의 추가적인 가공처리를 거친 샘플을 포함한, 대상체로부터 획득된 모든 샘플은 대상체로부터 획득된 것으로 간주된다. 예를 들어, 페놀 추출을

포함한, 통상적인 방법이 생물학적 샘플로부터 게놈 DNA를 추출하기 위하여 사용될 수 있다. 대안적으로, 게놈 DNA는 QIAamp® 조직 키트(Qiagen, 미국 캘리포니아 주 채츠워스 소재) 및 Wizard® 게놈 DNA 정제 키트(Promega)와 같은 키트로 추출될 수 있다. 샘플 공급원의 비제한적인 예에는 소변, 혈액 및 조직이 포함된다.

[0065] 본 설명에 기술된 바와 같이, 엑손 20 삽입 돌연변이와 같은 EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이의 존재 또는 부존재는 당해 분야에 공지된 방법을 이용하여 결정될 수 있다. 예를 들어, 겔 전기영동, 모세관 전기영동, 크기 배제 크로마토그래피, 시퀀싱, 및/또는 어레이는 삽입 돌연변이의 존재 또는 부존재 검출에 사용될 수 있다. 필요한 경우, 핵산의 증폭은 당해 분야에 공지된 방법, 예컨대, PCR을 이용하여 달성될 수 있다. 한 예에서, 샘플(예컨대, 게놈 DNA를 포함하는 샘플)은 대상체로부터 획득된다. 그런 다음, 샘플 내의 DNA는 본 설명에 기술된 바와 같이 삽입 돌연변이의 정체를 확인하기 위하여 조사된다. 삽입 돌연변이는 본 설명에 기술된 임의의 방법에 의해, 예컨대, 시퀀싱에 의해 또는 게놈 DNA, RNA, 또는 cDNA 내의 유전자의, 핵산 프로브, 예컨대, (cDNA 및 올리고뉴클레오타이드 프로브를 포함하는) DNA 프로브 또는 RNA 프로브에 대한 혼성화에 의해, 검출될 수 있다. 핵산 프로브는 특정 변이체와 특이적으로 또는 우선적으로 혼성화하도록 설계될 수 있다.

[0066] 프로브 세트는 전형적으로, 프라이머 세트, 대개 프라이머 쌍, 및/또는 본 개시의 실행 가능한 치료 권고에 사용된 표적 유전자 변이(예컨대, EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이)를 검출하는 데 사용되는 검출 가능하게 라벨링된 프로브를 지칭한다. 프라이머 쌍은 전술된 유전자 각각에 대한 표적 유전자 변이 영역에 걸쳐 이어지는 앰플리콘을 정의하기 위하여 증폭 반응에 사용된다. 앰플리콘 세트는 매치된 프로브 세트에 의해 검출된다. 예시적인 구현예에서, 본 방법은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이와 같은 표적 유전자 변이 세트를 검출하는 데 사용되는 TaqMan™(Roche Molecular Systems, 미국 캘리포니아 주 플레젠트 소재) 분석법을 이용할 수 있다. 일 구현예에서, 프로브 세트는 차세대 시퀀싱 반응과 같은, 핵산 시퀀싱 반응에 의해 검출되는 앰플리콘을 생성하기 위하여 사용되는 프로브 세트이다. 이러한 구현예에서, 예를 들어, AmpliSeq™(Life Technologies/Ion Torrent, 미국 캘리포니아 주 칼스배드 소재) 또는 TruSeq™(Illumina, 미국 캘리포니아 주 샌디에이고 소재) 기술이 사용될 수 있다.

[0067] 핵산 마커의 분석은 서열 분석, 및 전기영동 분석을 제한 없이 포함한, 당해 분야에 공지된 기술을 이용하여 수행될 수 있다. 서열 분석의 비제한적인 예에는 맥삼-길버트(Maxam-Gilbert) 시퀀싱, 생거(Sanger) 시퀀싱, 모세관 어레이 DNA 시퀀싱, 열 사이클 시퀀싱(Sears *et al.*, 1992), 고체상 시퀀싱(Zimmerman *et al.*, 1992), 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화 이동시보 질량 분광법과 같은 질량 분광법을 이용한 시퀀싱(MALDI-TOF/MS; Fu *et al.*, 1998), 및 혼성화에 의한 시퀀싱(Chee *et al.*, 1996; Drmanac *et al.*, 1993; Drmanac *et al.*, 1998)이 포함된다. 전기영동 분석의 비제한적인 예에는 아가로스 또는 폴리아크릴아미드 겔 전기영동과 같은 슬랩 겔 전기영동, 모세관 전기영동 및 변성 구배 겔 전기영동이 포함된다. 추가적으로, 차세대 시퀀싱 방법은 Life Technologies/Ion Torrent PGM 또는 Proton과 같은 회사로부터의 상업적으로 이용 가능한 키트와 기기, Illumina HiSeq 또는 MiSeq, 및 Roche/454 차세대 시퀀싱 시스템을 이용하여 수행될 수 있다.

[0068] 핵산 분석의 기타 방법은 직접적인 수동식 시퀀싱(Church and Gilbert, 1988; Sanger *et al.*, 1977; 미국 특허 번호 5,288,644); 자동화 형광 시퀀싱; 단일 가닥 구조 다형성 분석법(SSCP)(Schafer *et al.*, 1995); 클램핑된 변성 겔 전기영동(CDGE); 2차원 겔 전기영동(2DGE 또는 TDGE); 형태 민감성 겔 전기영동(CSGE); 변성 구배 겔 전기영동(DGGE) (Sheffield *et al.*, 1989); 변성 고성능 액체 크로마토그래피(DHPLC, Underhill *et al.*, 1997); 적외선 매트릭스-보조 레이저 탈착/이온화(IR-MALDI) 질량 분광법(WO 99/57318); 이동성 변화(mobility shift) 분석(Orita *et al.*, 1989); 제한 효소 분석(Flavell *et al.*, 1978; Geever *et al.*, 1981); 정량적 실시간 PCR(Raca *et al.*, 2004); 이형이중가닥(heteroduplex) 분석; 화학적 미스매치 절단(CMC)(Cotton *et al.*, 1985); RNA 가수분해효소 보호 분석(Myers *et al.*, 1985); 뉴클레오타이드 미스매치를 인식하는 폴리펩티드, 예컨대, *E. coli* mutS 단백질의 이용; 대립유전자 특이적 PCR 및 이러한 방법의 조합을 포함할 수 있다. 예컨대, 전체가 참조로서 본 설명에 포함되는 미국 특허 공개 번호 2004/0014095 참조.

[0069] 한 예에서, 샘플에서 EGFR 및/또는 HER2 돌연변이를 확인하는 방법은 상기 샘플로부터의 핵산을, 돌연변이된 EGFR 또는 HER2 단백질을 암호화하는 핵산 또는 돌연변이를 포함하는 이의 단편에 특이적으로 혼성화할 수 있는 핵산 프로브와 접촉시키는 단계 및 상기 혼성화를 검출하는 단계를 포함한다. 특정 구현예에서, 상기 프로브는 방사성 동위원소(³H, ³²P, 또는 ³³P), 형광제(로다민, 또는 플루오레세인) 또는 발색제 같은 것으로 검출 가능하게 라벨링된다. 특정 구현예에서, 프로브는 안티센스 올리고머, 예를 들어, PNA, 모르폴리노-포스포아미데이트, LNA 또는 2'-알콕시알콕시이다. 프로브는 약 8개 뉴클레오타이드 내지 약 100개 뉴클레오타이드, 또는 약 10개 내지 약 75개, 또는 약 15개 내지 약 50개, 또는 약 20개 내지 약 30개일 수 있다. 또 다른 양태에서, 본 개시의 상

기 프로브는 샘플에서 EGFR 또는 HER2 돌연변이를 확인하기 위한 키트 내에 제공되며, 상기 키트는 EGFR 또는 HER2 유전자의 돌연변이 부위에 또는 이에 인접하여 특이적으로 혼성화하는 올리고뉴클레오타이드를 포함한다. 이 키트는 키트를 이용한 혼성화 시험 결과를 기반으로 하여 EGFR 또는 HER2 삽입 돌연변이를 함유하는 종양을 앓는 환자를 포지오티닙 또는 아파티닙으로 치료하기 위한 설명서를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0070] 또 다른 양태에서, 샘플에서 엑손 20 돌연변이를 검출하는 방법은 상기 샘플로부터 돌연변이를 함유한다고 의심되는 상기 EGFR 유전자 또는 HER2의 엑손 20에 상응하는 핵산, 또는 이의 단편을 증폭시키는 단계, 및 증폭된 핵산의 전기영동 이동성을, 상응하는 야생형 EGFR 또는 HER2 유전자 또는 이의 단편의 전기영동 이동성과 비교하는 단계를 포함한다. 이동성 차이는 증폭된 핵산 서열 내의 돌연변이의 존재를 나타낸다. 전기영동 이동성은 폴리아크릴아미드 겔에서 결정될 수 있다.

[0071] 대안적으로, 핵산은 효소적 돌연변이 검출(EMD)을 이용한 돌연변이 검출을 위하여 분석될 수 있다(Del Tito *et al.*, 1998). EMD는 박테리오파지 위치특이성 재조합촉진효소 T₄ 엔도뉴클레아제 VII을 이용하는데, 이는 점 돌연변이, 삽입 및 결실로부터 기인하는 염기 쌍 미스매치에 의해 유발된 구조적 왜곡을 검출하고 이를 절단할 때까지 이중 가닥 DNA를 따라 스캔한다. 위치특이성 재조합촉진효소 절단에 의해 형성된 두 개의 짧은 단편의, 예를 들어, 겔 전기영동에 의한, 검출은 돌연변이의 존재를 나타낸다. EMD 방법의 이점은 PCR 반응으로부터 직접적으로 분석된 점 돌연변이, 결실 및 삽입을 확인하는 단일 프로토콜로, 샘플 정제의 필요성을 없애고, 혼성화 시간을 단축하며, 신호 대 잡음비를 증가시킨다는 것이다. 최대 20배의 정상적인 DNA 및 최대 4 kb 크기의 단편을 함유하는 혼합 샘플이 분석될 수 있다. 그러나 EMD 스캐닝은 돌연변이 양성 샘플에서 발생하는 특정 염기 변화를 확인하지 않아, 필요한 경우 돌연변이의 정체에 대한 추가적인 시퀀싱 절차를 필요로 한다. 미국 특허 번호 5,869,245에서 증명된 바와 같이, CEL I 효소가 위치특이성 재조합촉진효소 T₄ 엔도뉴클레아제 VII과 유사하게 사용될 수 있다.

[0072] III. 치료 방법

[0073] 엑손 20 삽입과 같은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 대상체에, 유효량의 포지오티닙, 아파티닙, 또는 구조적으로 유사한 억제제를 투여하는 단계를 포함하는, 개체에서 암을 치료하거나 암의 진행을 지연시키는 방법이 본 설명에서 추가적으로 제공된다. 대상체는 둘 이상의 EGFR 및/또는 HER 엑손 20 돌연변이를 가질 수 있다.

[0074] 치료를 위해 고려되는 암의 예에는 폐암, 두경부암, 유방암, 췌장암, 전립선암, 신장암, 골암, 고환암, 자궁경부암, 소화기 암, 림프종, 폐의 중앙전 병변, 결장암, 흑색종 및 방광암이 포함된다. 특정 양태에서, 암은 비소세포 폐암이다.

[0075] 일부 구현예에서, 대상체는 포유동물, 예컨대, 영장류, 바람직하게는 고등 영장류, 예컨대, 인간(예컨대, 본 설명에 기술된 장애를 앓는 환자, 또는 앓을 위험이 있는 환자)이다. 일 구현예에서, 대상체는 면역반응을 증진시킬 필요가 있다. 특정 구현예에서, 대상체는 면역력이 약화되었거나 면역력 약화의 위험이 있다. 예를 들어, 대상체는 화학요법 치료 및/또는 방사선요법을 받고 있거나 받은 적이 있다. 대안적으로, 또는 조합하여, 대상체는 감염의 결과로서 면역력이 약화되었거나 면역력 약화의 위험이 있다.

[0076] 특정 구현예는 엑손 20 삽입과 같은 EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 대상체에 대한 (HM781-36B, HM781-36, 및 1-[4-[4-(3,4-디클로로-2-플루오로아닐리노)-7-메톡시퀴나졸린-6-일]옥시피페리딘-1-일]프로프-2-엔-1-온으로도 알려져 있는) 포지오티닙의 투여에 관한 것이다. 포지오티닙은 HER1, HER2, 및 HER4를 포함한, 티로신 키나아제 수용체의 HER 패밀리를 통한 신호 전달을 비가역적으로 차단하는 퀴나졸린 기반의 범-HER 억제제이다. 포지오티닙 또는 구조적으로 비슷한 화합물(예컨대, 미국 특허 번호 8,188,102 및 미국 특허 공개 번호 20130071452; 본 설명에 참조로 포함됨)이 본 방법에 사용될 수 있다.

[0077] B. 약학적 조성물

[0078] 엑손 20 삽입과 같은 EGFR 또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 갖는 것으로 확인된 대상체를 위한, 포지오티닙 또는 아파티닙 및 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 약학적 조성물 및 제형 또한, 본 설명에 제공된다.

[0079] 본 설명에 기술된 바와 같은 약학적 조성물 및 제형은 원하는 정도의 순도를 갖는 활성 성분(예컨대 항체 또는 폴리펩티드)을 1종 이상의 선택적인 약학적으로 허용 가능한 담체와 동결건조 제형 또는 수용액의 형태로 혼합하는 것에 의해 제조될 수 있다(Remington's Pharmaceutical Sciences 22nd edition, 2012). 약학적으로 허용 가능한 담체는 사용된 투여량 및 농도에서 수용자에게 일반적으로 무독성이고, 완충제, 예컨대 포스페이트, 시

트레이트 및 다른 유기 산; 아스코르브산 및 메티오닌을 포함한 항산화제; 보존제(예컨대 옥타데실디메틸벤질 암모늄 클로라이드; 헥사메토늄 클로라이드; 벤즈알코늄 클로라이드, 벤제토늄 클로라이드; 페놀, 부틸 또는 벤질 알콜; 알킬 파라벤, 예컨대 메틸 또는 프로필 파라벤; 카테콜; 레조르시놀; 시클로헥사놀; 3-펜타놀; 및 m-크레졸); 저분자량(약 10개 미만의 잔기) 폴리펩티드; 단백질, 예컨대 혈청 알부민, 젤라틴 또는 면역글로불린; 친수성 중합체, 예컨대 폴리비닐피롤리돈; 아미노산, 예컨대 글리신, 글루타민, 아스파라긴, 히스티딘, 아르기닌 또는 리신; 당당류, 이당류 및 글루코오스, 만노오스 또는 텍스트린을 포함한 기타 탄수화물; 킬레이트화제, 예컨대 EDTA; 당, 예컨대 수크로오스, 만니톨, 트레할로스 또는 소르비톨; 염 형성 반대이온, 예컨대 나트륨; 금속 착물(예를 들어, Zn-단백질 착물); 및/또는 비이온성 계면활성제, 예컨대 폴리에틸렌 글리콜(PEG)을 포함하나, 이에 한정되지 않는다. 본 설명의 예시적인 약학적으로 허용 가능한 담체에는 간질성 약물 분산제, 예컨대 가용성 중성-활성 히알루로니다아제 당단백질(sHASEGP), 예를 들어 인간 가용성 PH-20 히알루로니다아제 당단백질, 예컨대 rHuPH20(힐레넥스(HYLENEX)®, Baxter International, Inc.)이 추가적으로 포함된다. rHuPH20을 포함한, 특정의 예시적인 sHASEGP 및 사용 방법은 미국 특허 공개 번호 2005/0260186 및 2006/0104968에 기술되어 있다. 일 양태에서, sHASEGP는 1개 이상의 추가적인 글리코사미노글리카나아제, 예컨대 콘드로이티나아제와 조합된다.

[0080] **C. 병용 요법**

[0081] 특정 구현예에서, 본 구현예의 조성물 및 방법은 적어도 1종의 추가적인 요법과 조합한 포지오티닙 또는 아파티닙을 포함한다. 추가적인 요법은 방사선요법, 수술(예컨대, 유방 종양 절제술 및 유방절제술), 화학요법, 유전자요법, DNA 치료법, 바이러스 요법, RNA 치료법, 면역요법, 골수이식, 나노요법, 단클론항체 치료법, 또는 전술한 것들의 조합일 수 있다. 추가적인 요법은 보강제 또는 신 보강제 치료법의 형태일 수 있다.

[0082] 일부 구현예에서, 추가적인 요법은 소분자 효소적 억제제 또는 항전이제의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가적인 요법은 부작용 제한제(예컨대, 치료의 부작용의 발생 및/또는 중증도를 줄이고자 한 작용제, 예컨대, 항오심제 등)의 투여이다. 일부 구현예에서, 추가적인 요법은 방사선요법이다. 일부 구현예에서, 추가적인 요법은 수술이다. 일부 구현예에서, 추가적인 요법은 방사선요법과 수술의 조합이다. 일부 구현예에서, 추가적인 요법은 감마선 조사이다. 일부 구현예에서, 추가적인 요법은 PBK/AKT/mTOR 경로를 표적으로 하는 요법, HSP 억제제, 튜불린 억제제, 세포자멸사 억제제 및/또는 화학예방성 작용제이다. 추가적인 요법은 당해 분야에 공지된 1종 이상의 화학치료제일 수 있다.

[0083] 포지오티닙 또는 아파티닙은 면역 체크포인트 치료법과 같은 추가적인 암 치료법에 대해 이전에, 도중에, 이후에, 또는 다양한 조합으로 투여될 수 있다. 투여는 동시에 내지 수 분, 수 일, 수 주 범위의 간격으로 이루어질 수 있다. 포지오티닙 또는 아파티닙이 추가적인 치료제와는 별도로 환자에 제공되는 구현예에서, 두 화합물이 여전히 환자에 대해 유리하게 조합된 효과를 발휘할 수 있도록 각각의 전달 시간 사이에는 상당한 기간이 끝나지 않았음을 일반적으로 확실히 할 것이다. 이러한 경우, 서로 약 12 내지 24 또는 72시간 이내에, 더욱 상세하게는 서로 약 6 내지 12시간 이내에 항체요법 및 항암요법을 환자에 제공할 수 있음이 고려된다. 일부 경우, 각각의 투여 사이에 수 일(2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일) 내지 수 주일(1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 8주)이 경과하는 경우, 치료 기간을 상당히 연장하는 것이 바람직할 수 있다.

[0084] 다양한 구현예가 이용될 수 있다. 아래의 예에서, 포지오티닙 또는 아파티닙은 "A"이고, 항암요법은 "B"이다:

[0085] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B

[0086] B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A

[0087] B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A

[0088] 본 구현예의 임의의 화합물 또는 치료법의 환자로의 투여는, (만약에 존재한다면) 이러한 작용제의 독성을 고려하여, 이러한 화합물의 투여를 위한 일반적인 프로토콜을 따를 것이다. 따라서, 일부 구현예에서는 병용 요법이 원인이 되는 독성을 모니터링하는 단계가 있다.

[0089] **1. 화학요법**

[0090] 다양한 화학요법제가 본 구현예에 따라 사용될 수 있다. 용어 "화학요법"은 암을 치료하기 위한 약물의 사용을 지칭한다. "화학요법제"는 암 치료에 투여되는 화합물 또는 조성물을 의미하고자 사용된다. 이들 작용제 또는 약물은 세포 내에서의 활성 모드, 예를 들어 세포 주기에 영향을 미치는지 여부 및 어느 단계에서 미치는지에 의해 분류된다. 대안적으로, 작용제는 DNA를 직접적으로 가교결합하는 능력, DNA에 삽입되는 능력, 또는 핵산

합성에 영향을 미침으로써 염색체 및 유사분열 이상을 유도하는 능력에 기초하여 특징지어질 수 있다.

[0091]

화학요법제의 예에는 알킬화제, 예를 들어 티오테파 및 사이클로스포스파미드; 알킬 설포네이트, 예를 들어 부설판, 임프로설판 및 피포설판; 아지리딘, 예를 들어 벤조도파, 카보퀸, 메투레도파 및 우레도파; 에틸렌이민 및, 알트레타민, 트리에틸렌멜라민, 트리에틸렌포스포라미드, 트리에틸렌티오포스포라미드 및 트리메틸올로멜라민을 포함한, 메틸아멜라민; 아세토게닌(특히, 불라타신 및 불라타시논); 캄프토테신(합성 유사체 토포테칸 포함); 브리오스타틴; 칼리스타틴; CC-1065(이의 아도젤레신, 카젤레신 및 비젤레신 합성 유사체 포함); 크립토피신(특히, 크립토피신 1 및 크립토피신 8); 돌라스타틴; 듀오카마이신(합성 유사체인 KW-2189 및 CB1-TM1 포함), 엘루테로빈; 판크라티스타틴; 사르코딕티인; 스폰기스타틴; 질소 머스타드, 예를 들어 클로람부실, 클로르나파진, 클로로포스파미드, 에스트라무스틴, 이포스파미드, 메클로르에타민, 메클로르에타민 옥사이드 하이드로클로라이드, 멜팔란, 노벤비친, 페네스테린, 프레드니무스틴, 트로포스파미드, 및 우라실 머스타드; 니트로소우레아, 예를 들어 카무스틴, 클로로조토신, 포테무스틴, 로무스틴, 니무스틴, 및 라님누스틴; 항생제, 예를 들어 에네딘 항생제(예컨대, 칼리체아미신, 특히 칼리체아미신 감마II 및 칼리체아미신 오메가II; 디네미신 A를 포함한 디네미신; 비스포스포네이트, 예를 들어 클로드로네이트; 에스페라미신; 및 네오카지노스타틴 발색단 및 관련 발색단단백질 에네딘 항생제 발색단, 아클라시노마이신, 악티노마이신, 아우트라르니신, 아자세린, 블레오마이신, 캅티노마이신, 카라비신, 카미노마이신, 카지노필린, 크로모마이시니스, 닥티노마이신, 다우노루비신, 데토루비신, 6-디아조-5-옥소-L-노르류신, 독소루비신(모르폴리노-독소루비신, 시아노모르폴리노-독소루비신, 2-피롤리노-독소루비신 및 데옥시독소루비신 포함), 에피루비신, 예소루비신, 이다루비신, 마르셀로마이신, 미토마이신, 예를 들어 미토마이신 C, 미코페놀산, 노갈라마이신, 올리보마이신, 페폴로마이신, 포트피로마이신, 푸로마이신, 쿠엘라마이신, 로도루비신, 스트렙토니그린, 스트렙토조신, 투베르시딘, 우베니멕스, 지노스타틴, 및 조루비신; 항대사제, 예를 들어 메토크세이트 및 5-플루오로우라실(5-FU); 폴산 유사체, 예를 들어 테노프테린, 프테로프테린, 및 트리메트렉세이트; 푸린 유사체, 예를 들어 플루다라빈, 6-메르캅토푸린, 티아미프린, 및 티오구아닌; 피리미딘 유사체, 예를 들어 안시트라빈, 아자시티딘, 6-아자우리딘, 카모푸르, 시타라빈, 디데옥시우리딘, 독시플루리딘, 예노시타빈, 및 플록수리딘; 안드로젠, 예를 들어 칼루스테론, 드로모스타놀론 프로피오네이트, 에피티오스타놀, 페피티오스탄, 및 테스톨락톤; 항부신물(anti-adrenals), 예를 들어 미토탄 및 트릴로스탄; 폴산 보충물, 예를 들어 프롤린산; 아세글라톤; 알도포스파미드 글리코시드; 아미노레볼린산; 에닐우라실; 암사크린; 베스트라부실; 비산트렌; 에다트렉세이트; 데포파빈; 데메콜신; 디아지퀸; 엘포르미틴; 엘립티늄 아세테이트; 에포틸론; 에토글루시드; 질화갈륨; 하이드록시우레아; 렌티난; 로니다이닌; 메이탄시노이드, 예를 들어 메이탄신 및 안사미토신; 미토구아존; 미톡산트론; 모피단물; 니트라에린; 펜토스타틴; 페나메트; 피라루비신; 로속산트론; 포도필린산; 2-에틸하이드라지드; 프로카바진; PSK 폴리사카라이드 복합체; 라족산; 리족신; 시조피란; 스피로게르마늄; 테누아존산; 트리아지퀸; 2,2',2"-트리클로로트리메틸아민; 트리코테센(특히, T-2 독소, 베라쿠린 A, 로리딘 A 및 안구이딘); 우레탄; 빈테신; 다카바진; 만노무스틴; 미토브로니톨; 미톨락톨; 피포브로만; 가시토신; 아라비노사이드("Ara-C"); 시클로포스파미드; 탁소이드, 예를 들어 파클리탁셀 및 도세탁셀 켐시타빈; 6-티오구아닌; 메르캅토푸린; 백금 배위 착물, 예를 들어 시스플라틴, 옥살리플라틴 및 카보플라틴; 빈블라스틴; 백금; 에토포시드(VP-16); 이포스파미드; 미톡산트론; 빈크리스틴; 비노렐빈; 노반트론; 테니포시드; 에다트렉세이트; 다우노마이신; 아미노프테린; 크셀로다; 이반드로네이트; 이리노테칸(예: CPT-11); 토포이소머라제 억제제 RFS 2000; 디플루오로메틸오르니틴(DMFO); 레티노이드, 예를 들어 레티노산; 카페시타빈; 카보플라틴, 프로카바진, 폴리코마이신, 켐시타빈, 나벨바인, 파네실-단백질 전달효소 억제제, 트랜스백금, 및 이들 중 임의의 것의 약학적으로 허용 가능한 염, 산, 또는 유도체가 포함된다.

[0092]

2. 방사선요법

[0093]

DNA 손상을 유발하고 널리 사용되었던 다른 인자들에는 일반적으로 γ -선, X-선 및/또는 중양 세포로의 방사성 동위원소의 지시된 전달로 알려져 있는 것들이 포함된다. DNA 손상 인자의 다른 형태, 예를 들면, 마이크로웨이브, 양성자 빔 조사(미국 특허 5,760,395 및 4,870,287) 및 UV-조사 또한, 고려된다. 이들 인자 모두가 DNA, DNA의 전구체, DNA의 복제 및 수복, 그리고 염색체의 조립 및 유지에 대한 광범위한 손상에 영향을 미칠 가능성이 매우 높다. X-선의 투여량 범위는 장시간 동안(3 내지 4주) 50 내지 200뢴트겐의 1일 용량 내지 2000 내지 6000뢴트겐의 단일 용량이다. 방사성 동위원소의 투여량 범위는 매우 다양하고, 동위원소의 반감기, 방출된 방사선의 강도 및 유형, 그리고 신생물 세포에 의한 흡수에 좌우된다.

[0094]

3. 면역요법

[0095]

당업자는 추가적인 면역요법이 구현예의 방법과 조합하여 또는 함께 사용될 수 있음을 이해할 것이다. 암 치료의 맥락에서, 면역요법은 일반적으로, 종양 세포를 표적화하고 파괴하기 위하여 면역 이펙터 세포 및 분자의 사

용에 의존한다. 리투시맵(리투산(RITUXAN®))은 이러한 예이다. 면역 이펙터는, 예를 들면, 종양 세포의 표면상의 일부 마커에 대해 특이적인 항체일 수 있다. 항체는 단독으로 치료법의 이펙터로서 작용할 수 있거나, 세포 사멸에 실제로 영향을 미치는 다른 세포를 모집할 수 있다. 항체는 또한, 약물 또는 독소(화학치료제, 방사선헌종, 리신 A쇄, 콜레라 독소, 백일해 독소 등)에 접합될 수 있고, 표적화제로서 기능할 수 있다. 대안적으로, 이펙터는 종양 세포 표적과 직접 또는 간접적으로 상호 작용하는 표면 분자를 동반하는 림프구일 수 있다. 다양한 이펙터 세포는 세포독성 T 세포 및 NK 세포를 포함한다.

[0096] 항체-약물 접합체는 암 치료제 개발의 획기적인 접근법으로서 등장하였다. 암은 전 세계적으로 주요 사망 원인 중 하나이다. 항체-약물 접합체(ADC)는 세포-사멸 약물에 공유 결합되는 단일클론 항체(mAb)를 포함한다. 이러한 접근법은 항원 표적에 대한 고 특이성의 MAb를 매우 강력한 세포독성제와 조합하여, 탑재물(약물)을 농축된 항원 수준의 종양 세포들로 전달하는 "보강된(armed)" MAb를 생성한다. 약물의 표적화 전달은 또한, 정상 조직에서 약물의 노출을 최소화하여, 독성을 감소시키고 치료 지수를 개선한다. FDA의 2종의 ADC 약물 애드세트리스(ADCETRIS®)(브렌독시맵 베도틴)(2011년) 및 캐드실라(KADCYLA®)(트라스투주맵 엠탄신 또는 T-DM1)(2013년)에 대한 승인은 이 접근법이 옳음을 증명하였다. 30종이 넘는 ADC 약물 후보가 현재 암 치료를 위한 다양한 단계의 임상 시험 중에 있다(Leal *et al.*, 2014). 항체 조작 및 링커-탑재물 최적화가 더욱 더 성숙해짐에 따라, 새로운 ADC의 발견 및 개발은 이 접근법에 적합한 새로운 표적의 확인 및 검증, 그리고 표적화 mAb의 생성에 점점 더 의존하고 있다. ADC 표적에 대한 2가지 기준은 종양 세포에서의 상향조절된/높은 수준의 발현 및 활발한 내재화이다.

[0097] 면역요법의 일 양태에서, 종양 세포는 쉽게 표적화될 수 있는, 즉, 다수의 다른 세포들에 존재하지 않는, 일부 마커를 보유하여야 한다. 많은 종양 마커들이 존재하며, 이들 중 임의의 것은 본 발명의 구현예의 맥락에서 표적화에 적합할 수 있다. 일반적인 종양 마커에는 CD20, 암배아 항원, 티로시나아제(p97), gp68, TAG-72, HMFG, 시알릴 루이스 항원, MucA, MucB, PLAP, 라미닌 수용체, erb B, 및 p155가 포함된다. 면역요법의 대안적 양태는 면역 자극 효과와 항암 효과를 조합하는 것이다. 다음을 비롯한 면역 자극 분자 또한, 존재한다: 사이토카인, 가령, IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF, 감마-IFN, 케모카인, 가령, MIP-1, MCP-1, IL-8, 및 성장 인자, 가령, FLT3 리간드.

[0098] 면역요법의 예에는, 면역 보강제, 예컨대, 소결핵균 (*Mycobacterium bovis*), 열대 열원충(*Plasmodium falciparum*), 디니트로클로로벤젠 및 방향족 화합물(미국 특허 5,801,005 및 5,739,169; Hui and Hashimoto, 1998; Christodoulides *et al.*, 1998); 사이토카인 요법, 예컨대, 인터페론 α , β 및 γ , IL-1, GM-CSF, 및 TNF(Bukowski *et al.*, 1998; Davidson *et al.*, 1998; Hellstrand *et al.*, 1998); 유전자요법, 예컨대, TNF, IL-1, IL-2, 및 p53(Qin *et al.*, 1998; Austin-Ward and Villaseca, 1998; 미국 특허 5,830,880 및 5,846,945); 및 단일클론 항체, 예컨대, 항-CD20, 항-강글리오시드 GM2, 및 항-p185(Hollander, 2012; Hanibuchi *et al.*, 1998; 미국 특허 5,824,311)가 포함된다. 본 설명에 기술된 항체 요법과 함께 1종 이상의 항암 요법이 사용될 수 있음이 고려된다.

[0099] 일부 구현예에서, 면역요법은 면역 체크포인트 억제제일 수 있다. 면역 체크포인트는 신호를 높이거나(예를 들어 공동 자극 분자) 또는 신호를 낮춘다. 면역 체크포인트 봉쇄에 의해 표적화될 수 있는 억제성 면역 체크포인트에는 아데노신 A2A 수용체(A2AR), B7-H3(CD276으로도 알려져 있음), B 및 T 림프구 감쇠자(BTLA), 세포독성 T-림프구 관련 단백질 4(CTLA-4, CD152로도 알려져 있음), 인돌아민 2,3-디옥시게나아제(IDO), 살해-세포 면역 글로불린(KIR), 림프구 활성화 유전자-3(LAG3), 예정세포사 1(PD-1), T-세포 면역 글로불린 도메인 및 뮤신 도메인 3(TIM-3) 및 T 세포 활성화의 V-도메인 Ig 억제인자(VISTA)가 포함된다. 특히, 면역 체크포인트 억제제는 PD-1 축 및/또는 CTLA-4를 표적화한다.

[0100] 면역 체크포인트 억제제는 소분자, 리간드 또는 수용체의 재조합 형태와 같은 약물일 수 있거나, 특히 항체, 예를 들어 인간 항체이다(예를 들어, 국제 특허 공개 WO2015016718; Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012; 둘은 본 설명에 참조로 포함됨). 면역 체크포인트 단백질 또는 이의 유사체의 공지된 억제제가 사용될 수 있으며, 특히 키메라화, 인간화 또는 인간 형태의 항체가 사용될 수 있다. 당업자가 알게 되는 바와 같이, 대안적 및/또는 동등한 명칭이 본 개시에 언급된 일부 항체에 대해 사용되고 있을 수 있다. 이러한 대안적 및/또는 동등한 명칭은 본 발명의 맥락에서 서로 교환 가능하다. 예를 들어, 램브롤리주맵은 대안적인 및 동등한 명칭 MK-3475 및 펄브롤리주맵 하에 알려져 있다.

[0101] 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 PD-1의 리간드 결합 파트너에 대한 PD-1의 결합을 억제하는 분자이다. 특정 양태에서, PD-1 리간드 결합 파트너는 PDL1 및/또는 PDL2이다. 또 다른 구현예에서, PDL1 결합 길항제는

PDL1의 리간드 결합 파트너에 대한 PDL1의 결합을 억제하는 분자이다. 특정한 양태에서, PDL1 결합 파트너는 PD-1 및/또는 B7-1이다. 또 다른 구현예에서, PDL2 결합 길항제는 PDL2의 리간드 결합 파트너에 대한 PDL2의 결합을 억제하는 분자이다. 특정한 양태에서, PDL2 리간드 결합 파트너는 PD-1이다. 길항제는 항체, 이의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질, 또는 올리고펩티드일 수 있다. 예시적인 항체는 미국 특허 번호 8,735,553, 8,354,509, 및 8,008,449에 기술되어 있으며, 모두 본 설명에 참조로 포함된다. 모두 본 설명에 참조로 포함된다. 미국 특허 공개 번호 US20140294898, US2014022021, 및 US20110008369에 기술된 바와 같이, 본 설명에 제공된 방법에 사용하기 위한 다른 PD-1 축 길항제는 당해 분야에 공지되어 있다.

[0102] 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 항-PD-1 항체(예를 들어 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체)이다. 일부 구현예에서, 항-PD-1 항체는 니볼루맵, 펌브롤리주맵 및 CT-011로 구성된 군으로부터 선택된다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 면역부착소(예를 들어 불변 영역(예를 들어 면역 글로불린 서열의 Fc 영역)에 융합된 PDL1 또는 PDL2의 세포 외 또는 PD-1 결합 부분을 포함하는 면역부착소)이다. 일부 구현예에서, PD-1 결합 길항제는 AMP-224이다. MDX-1106-04, MDX-1106, ONO-4538, BMS-936558, 및 오피디보(OPDIVO®)로도 알려져 있는 니볼루맵은 WO2006/121168에 기재된 항-PD-1 항체이다. MK-3475, 머크(Merck) 3475, 람브롤리주맵, 키트루다(KEYTRUDA®), 및 SCH-900475로도 알려져 있는 펌브롤리주맵은 WO2009/114335에 기재된 항-PD-1 항체이다. hBAT 또는 hBAT-1로도 알려져 있는 CT-011은 WO2009/101611에 기재된 항-PD-1 항체이다. B7-DCIg로도 알려져 있는 AMP-224는 WO2010/027827 및 WO2011/066342에 기재된 PDL2-Fc 융합 가용성 수용체이다.

[0103] 본 설명에 제공된 방법에서 표적화될 수 있는 또 다른 면역 체크포인트는 CD152로도 알려져 있는 세포독성 T-림프구 관련 단백질(CTLA-4)이다. 인간 CTLA-4의 완전한 cDNA 서열은 Genbank 접근 번호 L15006을 갖는다. CTLA-4는 T 세포의 표면 상에서 발견되며, 항원 제시 세포 표면의 CD80 또는 CD86에 결합될 때 "오프" 스위치로서 작용한다. CTLA4는, 헬퍼 T 세포의 표면상에서 발견되고 T 세포로 억제 신호를 전송하는 면역글로불린 수퍼패밀리의 구성원이다. CTLA4는 T-세포 공동자극 단백질 CD28과 유사하며, 두 분자는 모두 항원 제시 세포 상의 CD80 및 CD86(각각 B7-1 및 B7-2라 지칭되기도 함)에 결합한다. CTLA4는 억제 신호를 T 세포로 전송하는 반면 CD28은 자극 신호를 전송한다. 세포 내 CTLA4는 또한, 조절성 T 세포에서 발견되며, 그의 기능에 중요할 수 있다. T 세포 수용체 및 CD28을 통한 T 세포 활성화는 B7 분자에 대한 억제 수용체인 CTLA-4의 증가된 발현을 유도한다.

[0104] 일부 구현예에서, 면역 체크포인트 억제제는 항-CTLA-4 항체(예를 들어 인간 항체, 인간화 항체, 또는 키메라 항체), 이의 항원 결합 단편, 면역부착소, 융합 단백질 또는 올리고펩티드이다.

[0105] 본 방법에 사용하기에 적합한 항-인간-CTLA-4 항체(또는 이로부터 유래된 VH 및/또는 VL 도메인)는 당해 분야에 주지된 방법을 이용하여 생성될 수 있다. 대안적으로, 당해 분야에 인정된 항-CTLA-4 항체가 이용될 수 있다. 예를 들어, 미국 특허 번호 8,119,129, 국제 특허 공개 번호 WO 01/14424, WO 98/42752 및 WO 00/37504(CP675,206, 트레멜리무맵으로도 알려져 있음; 이전에는 티실리무맵); 미국 특허 번호 6,207,156; Hurwitz *et al.*, 1998; Camacho *et al.*, 2004; 및 Mokyr *et al.*, 1998에 개시된 항-CTLA-4 항체가 본 설명에 개시된 방법에 사용될 수 있다. 전술된 간행물 각각의 교시는 본 설명에 참조로 포함된다. CTLA-4에 대한 결합에 대해 이러한 당해 분야에 인정된 항체들 중 임의의 것과 경쟁하는 항체도 사용될 수 있다. 예를 들어, 인간화 CTLA-4 항체가 국제 특허 출원 번호 WO2001014424, 및 WO2000037504, 및 미국 특허 번호 8,017,114에 기술되어 있으며; 모두 본 설명에 참조로 포함된다.

[0106] 예시적인 항-CTLA-4 항체는 10D1, MDX-010, MDX-101, 및 예르보이(Yervoy®)로도 공지되어 있는 이필리무맵 또는 이의 항원 결합 단편 및 변이체이다(예컨대, WO 01/14424 참조). 다른 구현예에서, 항체는 이필리무맵의 중쇄 및 경쇄 CDR 또는 VR을 포함한다. 따라서, 일 구현예에서, 항체는 이필리무맵의 VH 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인, 및 이필리무맵의 VL 영역의 CDR1, CDR2 및 CDR3 도메인을 포함한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 위에 언급된 항체와 동일한 CTLA-4 상의 에피토프와의 결합에 대해 경쟁하고/경쟁하거나 이에 결합한다. 또 다른 구현예에서, 항체는 위에 언급된 항체와 적어도 약 90% 가변 영역 아미노산 서열 동일성(예를 들어 이필리무맵과 적어도 약 90%, 95%, 또는 99% 가변 영역 동일성)을 갖는다.

[0107] CTLA-4를 조절하기 위한 다른 분자에는 미국 특허 번호 5,844,905, 5,885,796 및 국제 특허 출원 번호 WO1995001994 및 WO1998042752(모두 본 설명에 참조로 포함됨)에 기재된 바와 같은 CTLA-4 리간드 및 수용체, 및 본 설명에 참조로 포함된다 미국 특허 번호 8,329,867에 기재된 바와 같은 면역부착소가 포함된다.

[0108] 4. 수술

[0109] 암을 보유한 사람들 중 대략 60%는 일부 유형의 수술을 받게 될 것이며, 이러한 수술에는 예방적, 진단적 또는

병기 결정, 치유 및 완화 수술을 포함한다. 치유 수술은 암 조직의 전부 또는 일부를 물리적으로 제거, 절제 및/또는 파괴하는 절제술을 포함하며 다른 요법, 가령, 본 구현예의 치료, 화학요법, 방사선요법, 호르몬요법, 유전자요법, 면역요법 및/또는 대체 요법과 함께 사용될 수 있다. 종양 절제술은 종양의 적어도 일부를 물리적으로 제거하는 것을 지칭한다. 종양 절제술 이외에도, 수술에 의한 치료는 레이저 수술, 냉동수술, 전기수술, 및 현미경으로 제어되는 수술(모스 수술)을 포함한다.

[0110] 암 세포, 조직, 또는 종양의 일부 또는 모두를 절제 시, 신체에 공동이 형성될 수 있다. 치료는 관류, 직접 주입, 또는 추가적인 항암 요법을 이용한 영역의 국소 적용에 의해 이루어질 수 있다. 이러한 치료는, 예를 들어, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 또는 7일마다, 또는 1, 2, 3, 4, 및 5 주마다 또는 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 또는 12개월마다 반복될 수 있다. 이러한 치료는 다양한 투여량으로 이루어질 수도 있다.

[0111] 5. 기타 작용제

[0112] 치료의 치료 효능을 개선하기 위하여 다른 작용제가 본 구현예의 특정 양태와 조합하여 사용될 수 있음이 고려된다. 이러한 추가적인 작용제에는 세포 표면 수용체 및 GAP 연결부의 상향 조절에 영향을 미치는 작용제, 세포 증식억제제 및 분화제, 세포 부착 억제제, 세포사멸 유도인자에 대한 이상증식 세포의 민감도를 증가시키는 작용제, 또는 기타 생물학적 작용제가 포함된다. GAP 연결부의 수를 상승시킴에 의한 세포 간 신호전달 증가는 이웃한 이상증식 세포 모집단에 대한 항-이상증식 효과를 증가시킬 것이다. 다른 구현예에서, 세포증식억제제 또는 분화제는 치료의 항-이상증식 효능을 개선하기 위하여 본 구현예의 특정 양태와 조합하여 사용될 수 있다. 본 구현예의 효능을 개선하기 위하여 세포 부착 억제제가 고려된다. 세포 부착 억제제의 예는 국소 부착 키나아제(FAK) 억제제 및 로바스타틴이다. 치료 효능을 개선하기 위하여 이상증식 세포의 세포자멸사에 대한 민감성을 증가시키는 다른 작용제, 가령, 항체 c225가, 본 구현예의 특정 양태와 조합하여 사용될 수 있음이 추가적으로 고려된다.

[0113] IV. 키트

[0114] 또한, 본 설명에 개시된 것들과 같은 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이를 검출하기 위한 키트가 본 개시의 범위 내에 있다. 이러한 키트의 예는 엑손 20 돌연변이 특이적 프라이머 세트를 포함할 수 있다. 이 키트는 본 설명에 기술된 특이적인 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이의 존재 또는 부존재를 검출하기 위한 프라이머 사용 설명서를 더 포함할 수 있다. 이 키트는 암 환자로부터의 샘플에서 본 설명에 기술된 EGFR 및/또는 HER2 엑손 20 돌연변이의 양성 확인이 티로신 키나아제 억제제 포지오티닙 또는 아파티닙 또는 구조적으로 비슷한 억제제에 대한 민감성을 나타낸다고 지시하는, 진단 목적을 위한 설명서를 더 포함할 수 있다. 이 키트는 암 환자로부터의 샘플에서 본 설명에 기술된 EGFR 및/또는 엑손 20 돌연변이의 양성 확인이 환자가 포지오티닙, 아파티닙, 또는 구조적으로 비슷한 억제제로 치료되어야 함을 나타낸다고 지시하는 설명서를 더 포함할 수 있다.

[0115] V. 실시예

[0116] 다음 실시예는 본 발명의 바람직한 구현예를 증명하기 위하여 포함된다. 당업자는 다음의 실시예에 개시된 기술들이 본 발명의 실시에서 잘 기능하기 위해 발명자에 의해 발견된 기술들을 나타내며, 따라서 이의 바람직한 실시 방식을 구성하는 것으로 간주될 수 있음을 알아야 한다. 그러나 당업자는 본 개시의 관점에서 다수의 변화가 본 발명의 사상 및 범위로부터 벗어나지 않으면서, 개시되고 여전히 유사한 결과를 획득하는 특정한 구현예에서 이루어질 수 있음을 알아야 한다.

[0117] 실시예 1 - EGFR 또는 HER 엑손 20 삽입이 있는 암세포를 위한 약물 확인

[0118] 임상적 데이터베이스의 EGFR 엑손 20 삽입을 보유한 종양 환자에서 TKI에 대한 임상적 반응을 조사하였다; EGFR 돌연변이체 NSCLC 환자 280명 가운데, 고전적 EGFR 돌연변이(엑손 19 결실, L858R, 및 L861Q)를 가진 129명의 환자가 확인되었고, 단일 작용제 엘로티닙, 게피티닙 또는 아파티닙 치료된 EGFR 엑손 20 삽입을 가진 9명의 환자가 확인되었다. 고전적인 EGFR 돌연변이를 가진 NSCLC 환자는 14개월의 PFS 중앙값을 나타낸 반면, EGFR 엑손 20 삽입을 가진 환자는 겨우 2개월의 PFS 중앙값을 나타냈다($p < 0.0001$, 로그 순위 검정; 도 1a). 9명의 EGFR 엑손 20 삽입 환자 중에서, OR은 아파티닙을 받은 S768del-insIL 돌연변이를 보유한 1명의 환자에서만 관찰되었다(도 4a). 이 임상 데이터는 EGFR 엑손 20 삽입에 의한 NSCLC에서의 이용 가능한 EGFR TKI의 제한된 활성을 보여주며, 이러한 특이적인 종양을 위하여 대안적인 치료 전략이 필요함을 증명한다.

[0119] 약물 스크리닝의 첫번째 단계로서, 7개의 EGFR 돌연변이 및 11개의 HER2 돌연변이를 Ba/F3 세포에서 발현시켰다. EGFR 및 HER2 엑손 20 돌연변이의 위치를 도 1b에 요약하였다. EGFR 및 HER2의 어떤 엑손 20 돌연

변이가 활성화 증인지를 평가하기 위하여, IL-3 비의존적 생존에 대해 Ba/F3 세포주를 스크리닝하였다. 시험한 모든 *EGFR* 엑손 20 삽입이 활성화 돌연변이였고(도 4b), 6개의 *HER2* 엑손 20 돌연변이 및 엑손 19에 위치한 L755P가 활성화 돌연변이였음이 발견되었다(도 4c). 다음으로, 가역적(1세대), 비가역적(2세대) 및 비가역적 돌연변이체-특이적 TKI(3세대)를 포함한, 임상 평가를 거친 *EGFR* 및 *HER2* TKI에 대한 민감성을 엑손 20 삽입을 대상으로 시험한 다음, 고전적인 민감성 돌연변이인 *EGFR* L858R에 대한 민감성과 비교하였다. *EGFR* A763insFQEA를 제외하고, *EGFR* 엑손 20 삽입(n=6)은 제1 세대(도 1c, IC₅₀= 3.3 내지 >10 μ M), 제2 세대(도 1d, IC₅₀= 40 내지 135 nM) 및 제3 세대(도 1e, IC₅₀= 103 내지 850 nM) *EGFR* TKI에 대해 저항성을 나타냈다(도 5, 표 1). 또한, *HER2* 엑손 20 돌연변이체(n=6)는 제1 세대(도 1f, IC₅₀ = 1.2 내지 13 μ M) 및 제3 세대(도 1h, IC₅₀= 114 내지 505 nM) TKI에 대해 저항성을 나타냈다. 제2 세대 TKI는 Ba/F3 *HER2* 엑손 20 돌연변이체 세포주에 대해 약간의 활성을 나타냈다(도 1g, IC₅₀= 10 내지 12 nM, 도 6, 표 1). 약물 스크리닝과 일관되게, 더 낮은 용량에서 부분적인 억제를 보였던 *EGFR* A763insFQEA를 제외하고, 웨스턴 블롯팅은 엘로티닙 및 오시머티닙이 *EGFR* 엑손 20 삽입 돌연변이에서 p-*EGFR*2를 유의미하게 억제하지 않았고, 500 nM에서만 *HER2* 엑손 20 삽입 돌연변이체에서 p-*HER2*를 유의미하게 억제하였음을 증명하였다(도 7a 내지 7d).

표 1

[0120]

EGFR/HER2 TKI를 이용한 EGFR 및 HER2 엑손 20 삽입의 IC50 값

		EGFR 엑손 20 삽입 평균(N=6개 세포주)	HER2 엑손 20 삽입 평균(N=6개 세포주)
1세대 TKI	엘로티닙	3,310 nM	3,250 nM
	게피티닙	>10,000 nM	12,900 nM
	라파티닙	-	1,190 nM
	L858R + 엘로티닙	17.0 nM	
2세대 TKI	아파티닙	39.9 nM	11.7 nM
	다코미티닙	61.1 nM	12.4 nM
	네라티닙	135 nM	10.4 nM
	L858R + 아파티닙	0.876 nM	
3세대 TKI	오시머티닙	103 nM	444 nM
	로실레티닙	850 nM	505 nM
	이브루티닙	143 nM	114 nM
	올무티닙	204 nM	352 nM
	나자르티닙	198 nM	233 nM
	L858R/T790M + 오시머티닙	9.00 nM	

[0121]

엑손 20 삽입이 제1 세대 및 제3 세대 *EGFR* TKI에 대해 저항성을 나타내는 이유를 조사하기 위하여, *EGFR* T790M과 *EGFR* D770insNPG 및 *EGFR* WT의 용해된 결정 구조 상에서 3-D 모델링을 수행하여 약물 결합 포켓 내의 변화를 가시화하였다. 이 모델링으로 *EGFR* 엑손 20 삽입이 문지기 잔기 T790의 정렬에서 T790M 돌연변이와 유사하며, 이는 ATP에 대한 증가된 친화도 및 제1 세대 억제제의 감소된 결합을 초래하여, 이들 돌연변이가 비공유적 억제제에 대해 저항성을 나타내게 만든다는 점이 밝혀졌다. 또한, *HER2* 엑손 20 삽입은 구조적 활성 형태를 유도하여, 비활성 형태에서 *HER2*에 결합하는 비공유적 *HER2* 억제제인 라파티닙의 결합을 막는다. 나아가, *EGFR* 및 *HER2* 엑손 20 삽입은 약물 결합 포켓에 대해 극적인 영향을 미친다. *EGFR*(도 1i) 및 *HER2*(도 1j) 엑손 20 삽입의 가상실험(*in silico*) 모델링은 α -c-헬릭스의 울퉁불퉁한 배치를 안쪽의 활성화된 위치에 강제하는, α -c-헬릭스의 C-말단에서의 삽입으로 인한 α -c-헬릭스의 약물 결합 포켓 내로의 상당한 이동(화살표)(도 1j)을 밝혀냈다. 또한, 3-D 모델링은 두 수용체의 약물 결합 포켓(도 1i, 도 1j) 내로의 P-루프의 상당한 이동을 증명하였다. 이러한 이동이 합쳐져서 *EGFR* 및 *HER2* 엑손 20 돌연변이체 단백질에서 두 가지 방향으로부터의 약물 결합 포켓의 입체 장애를 초래한다. 위에 언급된 시험관 내 시험과 일관되게, 3-D 모델링은 아파티닙이 오시머티닙보다 더욱 효과적으로 엑손 20 삽입을 억제한다는 관찰을 뒷받침한다. 오시머티닙은 단단한 퍼리미딘 코어에 직접적으로 연결된 큰 말단의 1-메틸인돌 기를 갖는다. 이 커다란 경직성 기는 *EGFR* 엑손 20 삽입에서 오시머티닙이 아파티닙만큼 효율적으로 C797 잔기에 도달하는 능력을 감소시킨다(도 1i). 대안적으로, 아파티닙은 2차 아민 기를 통해 퀴나졸린 코어에 간접적으로 연결된 더 작은 1-클로로-2-플루오로벤젠 고리 말단 기를 가져, 입체적으로 장애가 있는 결합 포켓 내로 아파티닙이 꼭 들어맞을 수 있게 한다. 더구나, 입체 장애는 오시머티닙의 *HER2* A775insYVMA에 대한 결합을 막는다. 종합하면, 시험관 내 데이터와 가상실험 모델링은 작고, 유연한 퀴나

졸린 유도체가 *EGFR/HER2* 엑손 20 삽입을 표적화할 수 있음을 나타낸다.

[0122] 다음으로, 엑손 20 삽입에 대한 증진된 활성을 나타내는 TKI를 확인하고자 하였다. 아파티닙처럼 포지오티닙 또한, 작은 말단 기와 유연한 퀴나졸린 코어를 함유한다. 그러나 포지오티닙은 아파티닙과 비교하여 퀴나졸린 코어에 미카엘 수용자 기를 연결시키는 더 작은 치환기 및 아파티닙과 비교하여 말단 벤젠 고리의 증가된 할로젠화를 갖는다. 이 전자가 풍부한 모이어티 또한, K745와 같은 *EGFR*의 염기성 잔기와 상호 작용하여 결합을 더 안정화시킨다. 따라서, 포지오티닙을 Ba/F3 시스템에서 시험하였다. 시험관 내에서, 포지오티닙은 *EGFR* 엑손 20 돌연변이체 Ba/F3 세포주(도 2a) 및 *HER2* 엑손 20 돌연변이체 Ba/F3 세포(도 2b)의 성장을 강력하게 억제하였다. 포지오티닙은 *EGFR* 엑손 20 돌연변이체 Ba/F3 세포주에서 1.0 nM의 평균 IC_{50} 값을 나타내, 시험관 내에서 포지오티닙을 오시머티닙보다 약 100배 더, 아파티닙보다 40배 더 강력하게 만들었다. 나아가, 포지오티닙은 *HER2* 엑손 20 돌연변이체 Ba/F3 세포주에서 1.9 nM의 평균 IC_{50} 값을 나타내, 시험관 내에서 포지오티닙을 오시머티닙보다 200배 더, 아파티닙보다 6배 더 강력하게 만들었다. 이러한 결과를 웨스턴 블롯팅으로 증명하였는데, 웨스턴 블롯팅에서는 포지오티닙이 5 nM의 낮은 농도에서 *EGFR* 및 *HER2*의 인산화를 억제하였다(도 2c, 도 8a). 나아가, 포지오티닙 민감성이 *EGFR* 또는 *HER2* 돌연변이체의 발현 수준으로 인한 것이 아님을 증명하기 위하여, 각각의 돌연변이체의 발현을 ELISA로 결정하고, IC_{50} 값에 대해 도표화하였다(도 8d). IC_{50} 과 발현 사이에는 어떠한 상관관계도 발견되지 않았으나($R=-0.056$, $p=0.856$), 포지오티닙 민감성과 *EGFR*에 대한 돌연변이의 위치 사이에는 상관관계가 발견되어($R=0.687$, $p=0.044$)(도 2d), 삽입이 α -c-헬릭스로부터 더 멀리 떨어질수록 IC_{50} 이 더 커짐을 시사하였다. 흥미롭게도, 이러한 상관관계는 위치보다는 삽입의 규모가 더 다양한 *HER2* 엑손 20 돌연변이에 대해서는 발견되지 않았다(도 8e). 이 상관관계는 돌연변이의 정확한 위치가 약물 결합 포켓에 대해 다양한 영향을 미치며, 관찰된 약물 반응의 이질성에 기여함을 시사한다. 또한, 포지오티닙은 각각 1.84 nM 및 0.30 nM의 평균 IC_{50} 값으로 환자 유래 세포주 CUT014(*EGFR* A767dupASV) 및 YUL0019(*EGFR* N771del insFH)의 성장을 효과적으로 억제하였는데, CUT014의 경우 아파티닙보다 15배 강력하고, YUL0019의 경우 아파티닙보다 100배 넘게 더 강력하였다(도 2e, 도 2f). CUT014 세포주의 웨스턴 블롯팅은 10 nM 포지오티닙 처리에서 p-*EGFR*의 상당한 억제가 있었으나, p-*EGFR*은 아파티닙에 의해서는 1000 nM까지는 유의미하게 억제되지 않았음을 밝혀냈다(도 8b, 도 8c).

[0123] T790M 돌연변이체와 비교하여 엑손 20 돌연변이체를 억제하는 포지오티닙의 특이성을 결정하기 위하여, 엑손 20 돌연변이체에서 아파티닙, 오시머티닙, 로실레티닙 및 포지오티닙의 IC_{50} 값을 *EGFR* T790M 돌연변이체 Ba/F3 세포주에서 아파티닙, 오시머티닙, 로실레티닙, 및 포지오티닙의 IC_{50} 값과 비교하였다. 단일 *EGFR* T790M 돌연변이에 대해 정규화된 IC_{50} 값을 표시하였는데, 여기서 1 미만의 값은 T790M과 비교하여 엑손 20 삽입에 대한 특이성을 나타낸다(도 2g). *EGFR* T790M 돌연변이체와 비교할 때, *EGFR* 엑손 20 삽입은 포지오티닙에 대해 65배 더 민감하였다. 나아가, *EGFR* 엑손 20 삽입 돌연변이는 *EGFR* T790M 돌연변이체보다 오시머티닙에 대해 5.6배 더 저항성을 나타냈고, 로실레티닙에 대해 24배 더 저항성을 나타냈다(도 2g).

[0124] 포지오티닙이 T790M 돌연변이에 비해 엑손 20 돌연변이체를 선택적으로 및 강력하게 억제하고, 오시머티닙과 같은 제3 세대 TKI는 그렇지 않은 이유를 조사하기 위하여, 3-D 모델링을 수행하여 약물 결합 포켓의 변화가 약물 결합에 어떻게 영향을 미치는지를 결정하였다. 오시머티닙은 *EGFR* T790M 돌연변이체 수용체의 약물 결합 포켓 내로 꼭 들어맞지만(도 2h), 엑손 20 돌연변이체에서는, 결합 포켓 내의 큰 변화(도 2i)가 제3 세대 억제제의 결합을 입체적으로 방해한다. 그러나 포지오티닙은 더 작고, 더 큰 유연성을 가져 입체적으로 장애가 있는 엑손 20 결합 포켓 내로 꼭 들어맞을 수 있게 한다(도 2i). 나아가, 포지오티닙 및 아파티닙으로의 *EGFR* D770insNPG의 3-D 모델링은 약물 결합 포켓 내로 이동된 P-루프가 포지오티닙으로 하여금 아파티닙보다 약물 결합 포켓 내로 더욱 단단히 결합하게 함을 시사한다. 구조적 모델링 계산은 포지오티닙에 대한 결합의 자유 에너지(London ΔG)가 아파티닙보다 낮음을 나타내어, 포지오티닙의 더 강한 결합 친화도를 나타낸다. 오시머티닙과의 WT *HER2*의 3-D 모델링은 WT *HER2*의 결합 포켓이 *HER2* A775insYVMA의 결합 포켓보다 더 큼을 증명한다. 따라서, 포지오티닙은 *HER2* A775insYVMA의 입체적으로 장애가 있는 약물 결합 포켓 내로 깊숙이 단단하게 결합하여, 엑손 20 삽입으로 유도된 구조적 변화를 극복한다.

[0125] *EGFR* 및 *HER2* 엑손 20 삽입에 의한 NSCLC의 GEM 모델을 이용하여 포지오티닙의 효능을 생체 내에서 시험하였다. 이전에 기술된 *EGFR* D770insNPG(Cho *et al.*, 2013) 및 *HER2* A775insYVMA(Perera *et al.*, 2009) 마우스에서 폐 종양을 유도하고, 동물들에게 4주 동안 경구로 포지오티닙(10 mg/kg) 또는 비히클 대조군을 매일 제공하였다. MRI로 결정한 바에 따르면, 포지오티닙은 *EGFR* 엑손 20 GEM에서 종양 부담을 85% 감소시켰고(도 3a, 3c) *HER2*

엑손 20 GEMM에서 60% 감소시켰으며(도 3b, 3d), 이는 동일한 GEM 모델에서 아파티닙에 대해 이전에 관찰된 37% 보다 더 높은 억제 수준이었다. 포지오티닙 이전 및 이후의 종양의 대표적인 MRI 영상을 *EGFR* 및 *HER2* GEMM에 대해 나타내었다(도 3c, 3d). *EGFR* 및 *HER2* GEM 모델 둘 다에서, 10 mg/kg 포지오티닙 처리된 마우스는 12주에서 진행의 징후 없이 지속성 있는 퇴화를 증명하였다(도 3e, 3f). 또한, 포지오티닙 처리(5 또는 10 mg/kg)는 *EGFR* 엑손 20 삽입 PDX 모델 LU0387(H773insNPH)에서 14일쯤에 종양을 완전히 감소시켰다(>85% 억제)(도 3g).

[0126] 포지오티닙이 다른 비가역적인 억제제처럼 C797에서 공유적으로 결합하는지를 결정하기 위하여, 오시머티닙 저항성을 나타내는 환자의 약 30%에서 관찰된 C797S 돌연변이로 Ba/F3 세포주를 생성하였다(Thress *et al.*, 2015). C797S 돌연변이는 >10 μ M의 IC₅₀ 값으로 포지오티닙에 대한 저항성을 유도하였음이 발견되었다. 이러한 실험을 종합한 결과는 포지오티닙이 다른 제3 세대 TKI와 유사한 후천적 저항 메커니즘에 민감할 수 있음을 시사하였다.

[0127] 위의 발견을 증명하기 위하여, *HER2* G776del insVC가 있는 유방암 세포주 MCF10A를 이용하여 실험을 수행하였다. 세포를 다양한 농도의 상이한 억제제로 처리하였고, 유방암 세포주가 시험한 다른 세포주에서 보이는 바와 같이 포지오티닙에 대해 민감성을 발견하였다(도 10). 따라서, 포지오티닙은 엑손 20 돌연변이가 있는 다른 암의 치료를 위해 사용될 수 있다.

[0128] 따라서, 엑손 20 돌연변이체는 제1, 제2 및 제3 세대 TKI에 대한 새로운(*de novo*) 저항성을 나타냄이 발견되었다. *EGFR* D770insNPG 및 *HER2* A775insYVMA의 3-D 모델링을 이용하여, 포지오티닙이 엑손 20 내의 삽입에 의해 유도된 약물 결합 포켓 내부의 변화를 극복할 수 있는 구조적인 특징을 가지고 있음을 확인하였다. 나아가, 포지오티닙의 예상 활성을 시험관 내 및 생체 내 모델을 이용하여 확인하여, 이러한 돌연변이가 있는 세포에서 포지오티닙의 강력한 항종양 활성을 증명하였다.

[0129] 포지오티닙은 *EGFR* 엑손 20 돌연변이체에서 아파티닙보다 대략 40배 더 강력하고, 다코미티닙보다 65배 더 강력한 것으로 나타났다. 또한, 포지오티닙은 시험관 내에서 *HER2* 엑손 20 돌연변이체에서 아파티닙과 다코미티닙보다 6배 더 강력하였다. 종합하면, 이러한 데이터는 포지오티닙이 아파티닙 및 다코미티닙과 비슷한 কিন아졸린 핵본을 공유하지만, 키나아제 억제제의 추가적인 특징이 증가된 활성 및 더욱 일반적인 T790M 돌연변이와 비교하여 *EGFR* 엑손 20 돌연변이에 대한 상대적인 특이성을 초래한다는 점을 나타낸다.

[0130] 3-D 모델링은 포지오티닙의 더 작은 크기, 증가된 할로젠화 및 유연성이 엑손 20 돌연변이체 *EGFR/HER2*의 입체적으로 장애가 있는 약물 결합 포켓에서 이 억제제에 경쟁력 있는 장점을 제공함을 시사한다. α -c-헬릭스로부터의 거리 및 약물 민감성 사이에서는 음의 상관관계가 관찰되었다. 이러한 관계는 돌연변이의 정확한 위치가 약물 결합 포켓 및/또는 TKI의 결합 친화도에 영향을 미침을 시사한다. 나아가, 이 데이터는 삽입의 크기 또한, 약물 민감성에 영향을 미침을 나타내었다. 나아가, 단지 한 개의 아미노산의 순 이역을 가진 환자 유래 세포주 YUL0019(N771del insFH)가 더 큰 *EGFR* 엑손 20 삽입을 가진 세포주보다 কিন아졸린 기반의 범-HER 억제제에 대해 더 민감하였다.

[0131] 실시예 2 - 재료 및 방법

[0132] **환자 모집단 및 통계적 분석:** 전향적으로 수집된 MD Anderson Lung Cancer Moon Shot GEMINI 데이터베이스에 등록된 *EGFR* 돌연변이체 NSCLC 환자를 확인하였다. 일상적인 임상 진료에 사용되는 50, 134 또는 409개 유전자 패널의 PCR 기반 차세대 시퀀싱 중 하나를 이용하여 *EGFR* 돌연변이 상태를 결정하였다. 카플란 마이어 방법을 이용하여 PFS를 계산하였다. PFS는 *EGFR* TKI의 개시로부터 방사선학 진행 또는 사망에 이르기까지의 시간으로 정의되었다. 치료 중 6 내지 8주 간격으로 병기 재분류(restaging) 스캔을 획득하였고, *EGFR* 엑손 20 삽입 NSCLC 환자에서 반응률을 결정하기 위하여 고형 종양에서의 반응 평가 기준(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST)) 버전 1.1에 따라 후향적으로 평가하였다.

[0133] **세포주 생성 및 IL-3 박탈:** 멸균 조건 하에서 L-글루타민, 10% 열 불활성화 FBS(Gibco), 1% 페니실린/스트렙토마이신(Sigma Life Science) 및 10 ng/ml 마우스 IL-3(R&D systems)이 첨가된 완전 RPMI-1640(R8758; Sigma Life Science) 배지에서 Ba/F3 세포주를 배양하였다. 12시간 동안 Ba/F3 세포주의 레트로바이러스 형질도입에 의해 안정적인 세포주를 생성하였다. 리포펙타민 2000(Invitrogen)을 이용하여 Phoenix 293T 앰포 패키징 세포주(Orbigen) 내로 표 2에 요약된 pBabe-Puro 기반의 벡터(Addgene 및 Bioinnovatise)를 형질감염시켜 레트로바이러스를 생성하였다. 형질도입 72시간 후, 2 μ g/ml 푸로마이신(Invitrogen)을 배지에 첨가하였다. 5일의 선택 후, 세포를 FITC-HER2(Biolegend) 또는 PE-EGFR(Biolegend)로 염색하고, FACS를 통해 구분하였다. 그런 다음, 15일 동안 IL-3의 부존재 하에 세포주를 성장시키고, 셀 타이터 글로(Cell Titer Glo) 분석법(Progenia)을 이용

하여 3일마다 세포 생존율을 결정하였다. 생성된 안정적인 세포주를 IL-3 없이 위에 기술된 완전 RPMI-1640 배지에서 유지시켰다. ATCC로부터 HCC827 및 HCC4006 폐암 세포주를 입수하여, 멸균 조건 하에 10% RPMI에 유지시켰다. PowerPlex 1.2 키트(Promega)를 이용하여 단기 일렬반복을 통해 DNA 지문술에 의해 세포주 정체를 확인하였다. 지문술 결과를 세포주의 1차 공급원에 의해 유지된 기준 지문과 비교하였다. 모든 세포주는 미코플라스마가 없었다. 엘로티닙 저항성 세포주를 생성하기 위하여, HCC827 및 HCC4006(둘 다 *EGFR* 돌연변이체) 세포를 저항성 변이체가 출현할 때까지 증가하는 농도의 엘로티닙과 배양하였다.

표 2

안정적인 세포주 생성에 사용된 벡터.

명칭	돌연변이	판매사
EGFR A763insFQEA (서열번호 1)	c.2290_2291insTCCAGGAAGCCT (서열번호 2)	Addgene의 pBabe-puro-EGFR WT(#11011)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
EGFRA767insASV	c.2302_2303insGCCAGCGTG	Addgene(#32066)에서 구입
EGFR S768dupSVD	c.2303_2304dupAGCGTGGAC	Addgene의 pBabe-puro-EGFR WT(#11011)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
EGFRV769insASV	c.2308_2309insCCAGCGTGG	Addgene의 pBabe-puro-EGFR WT(#11011)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
EGFRD770insNPG	c.2310_2311insAACCCCGGC	Addgene(#11016)에서 구입
EGFRD770insSVD	c.2311_2312insGCGTGGACA	Addgene의 pBabe-puro-EGFR WT(#11011)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
EGFRH773insNPH	c.2319_2320insAACCCCCAC	Addgene의 pBabe-puro-EGFR WT(#11011)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
EGFR T790M		Addgene(#32070)에서 구입
EGFRT790M L858R		Addgene(#32073)에서 구입
EGFRT790M Ex19del		Addgene(#32072)에서 구입
EGFR T790M L858R C797S	c.2389T>A	Addgene의 pBabe-puro-EGFR L858R/T790M(#32073)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
EGFR T790M Ex19del C797S	c.2389T>A	Addgene의 pBabe-puro-EGFR Del1/T790M(#32072)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
HER2 S310F	c.929C>T	Addgene(#40991)에서 구입
HER2 S310Y	c.929C>A	Addgene(#40992)에서 구입
HER2C311R	c.931T>C	Addgene(#40980)에서 구입
HER2L755P	c.2263_2264delinsCC	Addgene의 pBabe-puro-HER2 WT(#40978)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
HER2A775insV G776C	c.2323-2324insTTT	Addgene(#40979)에서 구입
HER2 A775insVMA (서열번호 3)	c.2323_2324insTATGTCATGGCT (서열번호 4)	Addgene(#40982)에서 구입
HER2G776V	c.2327G>T	Addgene의 pBabe-puro-HER2 WT(#40978)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
HER2G776C V777insV	c.2326G>T, c.2331_2332insTGT	Addgene의 pBabe-puro-HER2 WT(#40978)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
HER2G776del insVV	c.2327delinsTTGT	Addgene의 pBabe-puro-HER2 WT(#40978)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
HER2G776del insVC	c.2326_2328insTCT	Addgene의 pBabe-puro-HER2 WT(#40978)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.
HER2P780insGSP	c.2339_2340insTGGCTCCCC	Addgene의 pBabe-puro-HER2 WT(#40978)로부터 Bioinnovatise에서 생성됨.

세포 생존율 분석 및 IC_{50} 평가: 셀 타이터 글로 분석법(Promega)을 이용하여 세포 생존율을 결정하였다. 현탁 배지로부터 세포를 수집하고, 300xg에서 5분 동안 회전시키고, 새로운 RPMI 배지에 재현탁시키고, Countess 자동화 세포 계수기 및 트리판 블루(Invitrogen)를 이용하여 계수하였다. 웰당 1500개 세포를 384-웰 플레이트(Greiner Bio-One)에 기술적 3반복으로 플레이팅하였다. 단계별로 3배 희석된 TKI 내의 7종의 상이한 농도의 역

제제 또는 비히클 단독을 웰당 최종 부피 40 μ L로 세포에 처리하였다. 72시간 후, 11 μ L의 셀 타이터 글로를 각 웰에 첨가하였다. 플레이트를 10분 동안 진탕하고, FLUOstar OPTIMA 다중모드 마이크로플레이트 판독기(BMG LABTECH)를 이용하여 생물발광을 결정하였다. 생물발광 값을 DMSO 처리된 세포에 대해 정규화하고, 가변적인 기울기를 갖는 정규화된 데이터에 대한 비선형 회귀 적합도를 이용하여 그래프패드 프리즘에 정규화된 값을 도표화하였다. 50% 억제에서 그래프패드 프리즘에 의해 IC₅₀ 값을 계산하였다. 달리 표시되지 않는 한 각각의 실험은 3회 반복되었다.

[0136] *티로신 키나아제 억제제*: 라파티닙, 아파티닙, 다코미티닙, AZD9291, CO-1686, EGF816, 이브루티닙, 및 HM781-36B는 Selleck Chemical로부터 구입하였다. 엘로티닙 및 게피티닙은 텍사스 대학교 MD 앤더슨 암 센터 부속 약국에서 입수하였다. BI-694는 Boehringer-Ingelheim이 제공하였다. 모든 억제제를 10 mM의 농도로 DMSO에 용해시키고, -80°C에 보관하였다.

[0137] *3-D 모델링*: EGFR D770insNPG 단백질의 구조를 검색하고(Protein Data Bank 입력 코드: 4LRM), 이를 EGFR D770insNPG의 분자 3-D 구조 모델을 구축하기 위한 주형으로 사용하였다. 이전에 Shen *et al.*에 공개된 모델을 이용하여 HER2 A775insYVMA를 구축하였다. 상동성 모델은 MODELLER 9v6을 이용하여 구축되었으며, Molecular Operating Environment 소프트웨어 패키지(Chemical Computing Group, 캐나다 몬트리올 소재)를 이용하여 더욱 효과적으로 최소화하였다. 달리 언급되지 않는 한 디폴트 파라미터와 함께 GOLD 소프트웨어를 이용하여 엑손 20 돌연변이체 EGFR 및 HER2 내로의 분자 도킹을 수행하였다. 도킹 과정에서는 조기 종결이 허용되지 않았다. 수용체와 억제제 사이의 공유 결합 형성을 모델링하기 위하여 억제 수단(restraint)을 사용하였다. 결합 포켓 내에서의 잔기의 유연성은 GOLD 소프트웨어를 이용하여 처리하였다. PYMOL을 이용하여 EGFR/HER2 및 억제제 사이의 상호 작용을 증명하는 그림을 시각화하였다.

[0138] *Ba/F3 돌연변이체의 웨스턴 블롯팅*: 웨스턴 블롯팅을 위하여, 세포를 인산 완충 식염수에 세척하고, 단백질 분해 완충액(ThermoFisher) 및 프로테아제 억제제 각테일 정제(Roche)에 분해시켰다. 단백질(30 내지 40 μ g)을 BioRad에서 구입한 겔 안으로 로딩하였다. BioRad 반건조 이송을 이용한 다음, pEGFR(#2234), EGFR(#4267), pHER2(#2247), HER2(#4290)(1:1000; Cell Signaling)에 대한 항체로 프로빙하였다. 로딩 대조군으로 β -액틴(Sigma-Aldrich, #A2228) 또는 빈쿨린(Sigma-Aldrich, # V4505)에 대한 항체로 블롯을 프로빙하고, SuperSignal West Pico 화학발광 기질(ThermoFisher) 및 BioRad의 ChemiDoc 터치 영상화 시스템 또는 방사선 필름을 이용하여 노출시켰다. 두 개의 별도의 단백질 분리물의 대표적인 영상을 나타내었고, 블롯을 2반복하여 실행하였다. 웨스턴 블롯팅의 정량화를 포토샵으로 완료하고, (배경 평균 강도 - 샘플 평균 강도) (픽셀 수) = 밴드 강도로 계산하였다. 샘플을 먼저 로딩 대조군(β -액틴 또는 빈쿨린)에 대해 정규화한 다음, DMSO에 대해 정규화하고, 그래프패드 프리즘으로 그래프화하였다. DMSO로부터의 유의도를 그래프패드 프리즘으로 계산하였다.

[0139] *ELISA 및 Ba/F3 돌연변이체의 상관관계*: 위에 기술된 바와 같이 모 Ba/F3 세포주 및 활성화 돌연변이인 것으로 밝혀진 Ba/F3 엑손 20 돌연변이체 각각으로부터 단백질을 수확하였다. 총 EGFR(Cell signaling, #7250) 및 총 HER2(Cell Signaling, #7310)를 위하여 제조 설명서에 설명된 바와 같이 ELISA를 수행하였다. ELISA에 의한 상대적인 발현을 위에 기술된 바와 같이 계산된 IC₅₀ 값에 대해 도표화하였다. 그래프패드 프리즘에 의해 피어슨 상관관계 및 p-값을 결정하였다.

[0140] *환자 유래 세포주 연구*: 이전에 기술된 배양 방법을 이용하여, 사전동의서에 따라 폐 선암종 환자의 가슴막 삼출액으로부터 CUTO14 세포를 생성하였다(Davies *et al.*, 2013). 72시간 동안 지시된 용량의 아파티닙 또는 포지오티닙으로 세포주를 처리하고, MTS 분석법(Promega)에 의해 세포 생존율을 결정하였다. 이전에 기술된 바와 같이 IC₅₀을 계산하였다(n=3). 이전에 기술된 바와 같이 환자 유래 세포주를 이용한 웨스턴 블롯팅을 완료하였다(Hong *et al.*, 2007)(n=3). 지시된 용량의 아파티닙 또는 포지오티닙으로 세포를 2시간 동안 처리하였다. 총 EGFR(BD Transduction Laboratories) 및 GAPDH(Calbiochem)를 제외한 모든 항체는 Cell Signaling Technology로부터 구입하였다.

[0141] IRB 승인 프로토콜 하에 폐의 진행 선암종 환자로부터 얻은 악성 심장막액으로부터 YUL0019 세포주를 확립하였다. 세포주를 10% 열 불활성화 소 태아 혈청(Atlanta Biologicals) 및 1% 페니실린/스트렙토마이신(Corning)이 첨가된 RPMI + L-글루타민(Corning)에서 배양하였다. EGFR 돌연변이의 존재를 확인하기 위하여, 제조사의 설명서에 따라 RNeasy 미니 키트(Qiagen #74104)를 이용하여 세포 펠렛으로부터 RNA를 추출하였다. Superscript III First-Strand cDNA 합성 키트(Invitrogen #18080-051)를 이용하여 cDNA를 합성하고, EGFR 증폭을 위한 주형으로 사용하였다. 다음 프라이머를 이용하여 생거 시퀀싱에 의해 PCR 생성물을 시퀀싱하였다: EGFR-2080F:

CTTACACCC AGTGGAGAAGC (서열번호 5) 및 EGFR-2507R ACCAAGCGACGGTCCTCCAA (서열번호 6). 정방향 및 역방향 서열 추적을 수동으로 검토하였다. 환자 유래 세포주에서 검출된 변이체는 두 개의 아미노산, 페닐알라닌 및 히스티딘에 의한 위치 771에서의 아미노산 아스파라긴의 교체를 가져오는 EGFR의 엑손 20의 복잡한 삽입(N771delinsFH)이었다. 위에 기술된 바와 같이 세포 생존률 및 IC₅₀ 평가를 수행하였다.

[0142] 환자 유래 이중이식편(PDX) 연구: Crown BioSciences가 LU0387 PDX 실험을 완료하였다. 간략하게는, EGFR H773insNPH를 발현하는 종양으로부터의 종양 단편을 5 내지 6주령의 암컷 nu/nu 누드 마우스에 접종하였다. 종양이 100 내지 200 mm³에 이르렀을 때, 마우스를 3개 군으로 무작위화하였다: 5 mg/kg 포지오티닙, 10 mg/kg 포지오티닙, 또는 비히클 대조군(dH₂O 중 20% PEG-400, 3% Tween-80). 매주 2회 종양 부피와 체중을 측정하였다. 5 mg/kg 포지오티닙을 받는 마우스는 4 내지 5일 동안 약물을 제공한 다음, 4일 동안 투약 휴가를 갖게 하고, 4일 더 투약을 실시하였다. 그런 다음, 투약 없이 2일 더 마우스를 관찰하였다. 10 mg/kg 포지오티닙을 받는 마우스는 3 내지 4일 동안 약물을 제공한 다음, 투약 없이 10일 동안 관찰하였다. 종양 부담과 관련 없는 사건으로 인도적으로 안락사시킨 마우스는 최종 분석에서 제외시켰다.

[0143] 유전자 조작 마우스 모델(GEMM) 연구: 이전에 기술된 바와 같이 EGFR D770insNPG 및 HER2 A775insYVMA GEMM을 생성하였다(Perera *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2013). 마우스는 OLAW(Office of Laboratory Animal Welfare)가 정의하고 Dana-Farber Cancer Institute Institutional Animal Care and Use Committee(미국 매사추세츠 주 보스턴)의 승인을 얻어 수행한 GAP(Good Animal Practices)에 따라 취급하였다. 마우스는 6주령부터 지속적인 독시사이클린 식단을 먹었다. 이전에 기술된 바와 같이 MRI로 종양 부피를 결정하였다(Perera *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2013). MRI에 의해 결정된 명백한 종양 형성 시에 동일한 초기 종양 부피를 갖는 마우스를 비히클 및 1일 10 mg/kg 포지오티닙으로 비맹검 무작위화하였다. 종양 부담과 관련 없는 사건으로 인도적으로 안락사시킨 마우스는 최종 분석에서 제외시켰다.

[0144] * * *

[0145] 본 설명에 개시되고 청구된 방법 전부는 본 개시의 관점에서 과도한 실험 없이 이루어지고 실행될 수 있다. 본 발명의 구성물 및 방법은 바람직한 구현예의 측면에서 설명되었지만, 본 발명의 개념, 사상 및 범위로부터 벗어나지 않고 방법 및 본 설명에 기술된 방법의 단계 또는 이러한 단계의 순서에 변화가 적용될 수 있음은 당업자에게 분명할 것이다. 더욱 구체적으로, 동일하거나 비슷한 결과가 달성되는 동안, 화학적으로 및 생리적으로 관련된 특정 작용제가 본 설명에 기술된 작용제를 대체할 수 있음이 분명할 것이다. 당업자에게 분명한 이러한 비슷한 대체물 및 변형 모두는 첨부된 청구범위에 의해 한정된 바와 같이, 본 발명의 사상, 범위 및 개념 내에 있는 것으로 간주된다.

[0146] 참고문헌

[0147] 다음의 참고문헌은 그것들이 예시적인 절차 또는 본 설명에 기재된 것들에 대해 보충적인 기타 세부 사항을 제공하는 정도까지 본 설명에 참조로 구체적으로 포함된다.

[0148] Arcila *et al.*, *Clin Cancer Res* 18:4910-8, 2012.

[0149] Arcila *et al.*, *Mol Cancer Ther* 12(2):220-229, 2013.

[0150] Austin-Ward and Villaseca, *Revista Médica de Chile*, 126(7):838-845, 1998.

[0151] Ausubel *et al.*, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, New York, NY, 2003.

[0152] Bukowski *et al.*, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347, 1998.

[0153] Camacho *et al.* *J Clin Oncology* 22(145): Abstract No. 2505 (antibody CP-675206), 2004.

[0154] Cha *et al.* *Int J Cancer* 130:2445-54, 2012.

[0155] Chee *et al.*, *Science*, 274:610-614, 1996.

[0156] Cho *et al.*, *Cancer Res* 73:6770-9, 2013.

[0157] Christodoulides *et al.*, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037, 1998.

[0158] Church and Gilbert, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995 (1988).

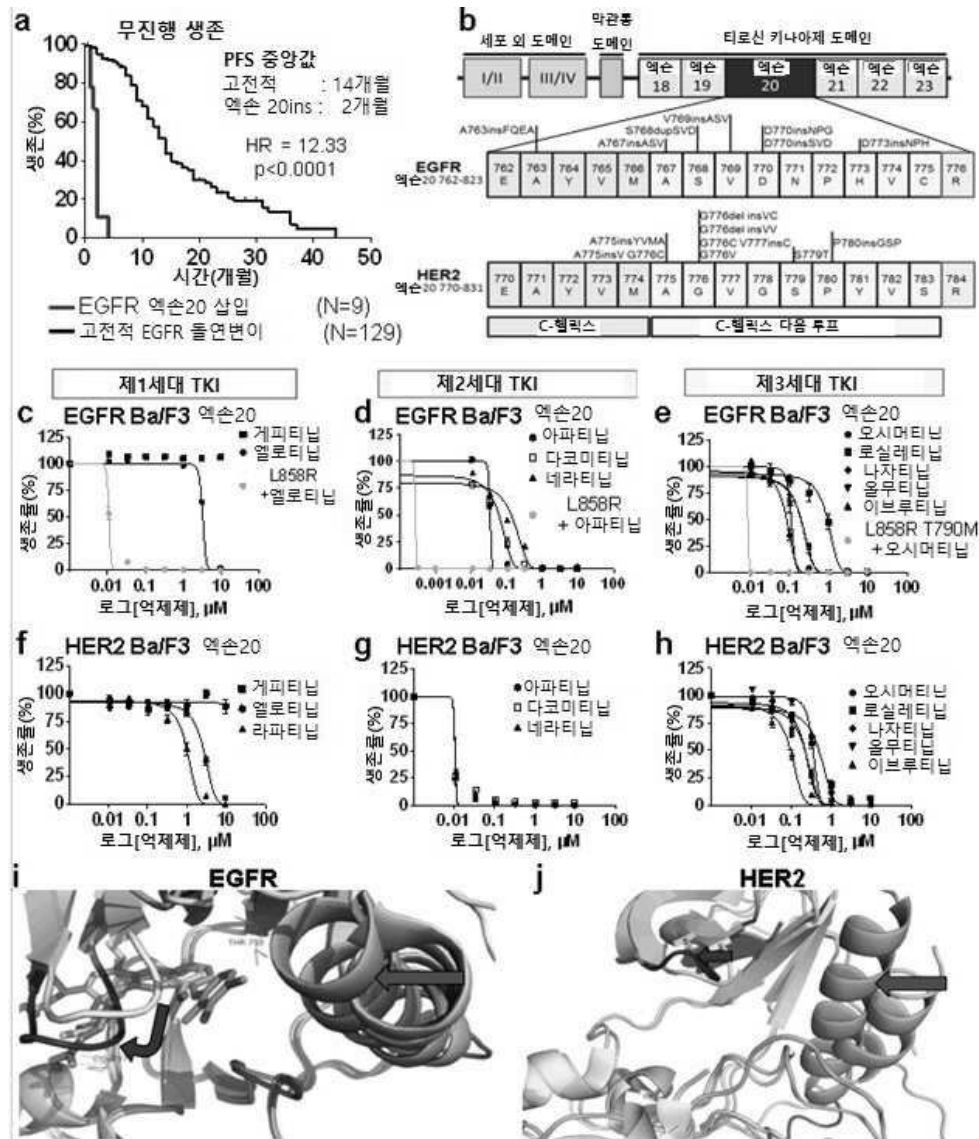
- [0159] Cotton *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:4397-4401 (1985).
- [0160] Davidson *et al.*, *J. Immunother.*, 21(5):389-398, 1998.
- [0161] Davies *et al.*, *Plos One* 8, 2013.
- [0162] Del Tito *et al.*, *Clinical Chemistry* 44:731-739, 1998.
- [0163] Drmanac *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:54-58, 1998.
- [0164] Drmanac *et al.*, *Science*, 260:1649-1652, 1993.
- [0165] Flavell *et al.*, *Cell* 15:25 (1978).
- [0166] Fu *et al.*, *Nat. Biotechnol.*, 16:381-384, 1998/
- [0167] Geever *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:5081 (1981).
- [0168] Hanibuchi *et al.*, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485, 1998.
- [0169] Hellstrand *et al.*, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353, 1998.
- [0170] Hollander, *Front. Immun.*, 3:3, 2012.
- [0171] Hong *et al.*, *J Biol Chem* 282:19781-7, 2007.
- [0172] Hui and Hashimoto, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336, 1998.
- [0173] Hurwitz *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* 95(17): 10067-10071, 1998.
- [0174] 국제 특허 공개 번호 WO 99/57318
- [0175] 국제 특허 공개 번호 W01995001994
- [0176] 국제 특허 공개 번호 W01998042752
- [0177] 국제 특허 공개 번호 W02000037504
- [0178] 국제 특허 공개 번호 W02001014424
- [0179] 국제 특허 공개 번호 W02009/101611
- [0180] 국제 특허 공개 번호 W02009/114335
- [0181] 국제 특허 공개 번호 W02010/027827
- [0182] 국제 특허 공개 번호 W02011/066342
- [0183] 국제 특허 공개 번호 W02015016718
- [0184] 국제 특허 공개 번호 WO 00/37504
- [0185] 국제 특허 공개 번호 W001/14424
- [0186] 국제 특허 공개 번호 W098/42752
- [0187] Kosaka *et al.*, *Cancer Res* 2017.
- [0188] Leal, M., *Ann N Y Acad Sci* 1321, 41-54, 2014.
- [0189] Lynch *et al.*, *N Engl J Med.* 350(21):2129-2139, 2004.
- [0190] Maemondo *et al.*, *N Engl J Med* 362:2380-8, 2010.
- [0191] Mitsudomi and Yatabe, *Cancer Sci.* 98(12):1817-1824, 2007.
- [0192] Mokyr *et al.* *Cancer Res* 58:5301-5304, 1998.
- [0193] Oxnard *et al.*, *J Thorac Oncol.* 8(2):179-184, 2013.
- [0194] Paez *et al.*, *Science* 304(5676):1497-1500, 2004.

- [0195] Pao *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 101(36):13306-13311, 2004.
- [0196] Pardoll, *Nat Rev Cancer*, 12(4): 252-64, 2012.
- [0197] Perera *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:474-9, 2009.
- [0198] Qin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416, 1998.
- [0199] Raca *et al.*, *Genet Test* 8(4):387-94 (2004).
- [0200] Sanger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463-5467 (1977).
- [0201] Sears *et al.*, *Biotechniques*, 13:626-633, 1992.
- [0202] Sheffield *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:232-236 (1989).
- [0203] Shen *et al.*, *J Recept Signal Transduct Res* 36:89-97, 2016.
- [0204] Thress *et al.*, *Nat Med* 21:560-2, 2015.
- [0205] 미국 특허 번호 4,870,287
- [0206] 미국 특허 번호 5,288,644
- [0207] 미국 특허 번호 5,739,169
- [0208] 미국 특허 번호 5,760,395
- [0209] 미국 특허 번호 5,801,005
- [0210] 미국 특허 번호 5,824,311
- [0211] 미국 특허 번호 5,830,880
- [0212] 미국 특허 번호 5,844,905
- [0213] 미국 특허 번호 5,846,945
- [0214] 미국 특허 번호 5,869,245
- [0215] 미국 특허 번호 5,885,796
- [0216] 미국 특허 번호 6,207,156
- [0217] 미국 특허 번호 8,008,449
- [0218] 미국 특허 번호 8,017,114
- [0219] 미국 특허 번호 8,119,129
- [0220] 미국 특허 번호 8,188,102
- [0221] 미국 특허 번호 8,329,867
- [0222] 미국 특허 번호 8,354,509
- [0223] 미국 특허 번호 8,735,553
- [0224] 미국 특허 공개 번호 2004/0014095
- [0225] 미국 특허 공개 번호 2005/0260186
- [0226] 미국 특허 공개 번호 2006/0104968
- [0227] 미국 특허 공개 번호 20110008369
- [0228] 미국 특허 공개 번호 20130071452
- [0229] 미국 특허 공개 번호 2014022021
- [0230] 미국 특허 공개 번호 20140294898

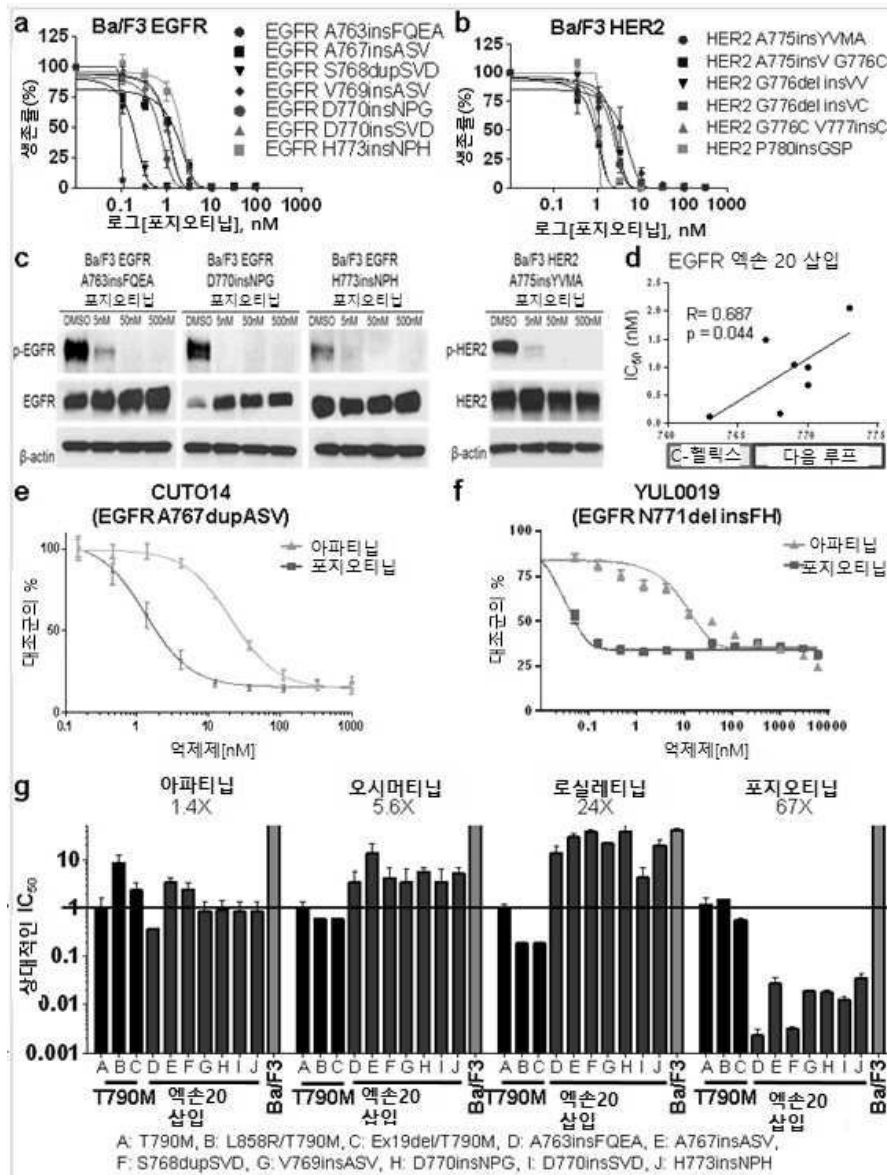
- [0231] Underhill *et al.*, *Genome Res.* 7:996-1005 (1997).
- [0232] Yang *et al.*, *Int J Cancer* 2016.
- [0233] Yasuda *et al.*, *Sci Transl Med* 5(216):216ra177, 2013.
- [0234] Zimmerman *et al.*, *Methods Mol. Cell. Biol.*, 3:39-42, 1992.

도면

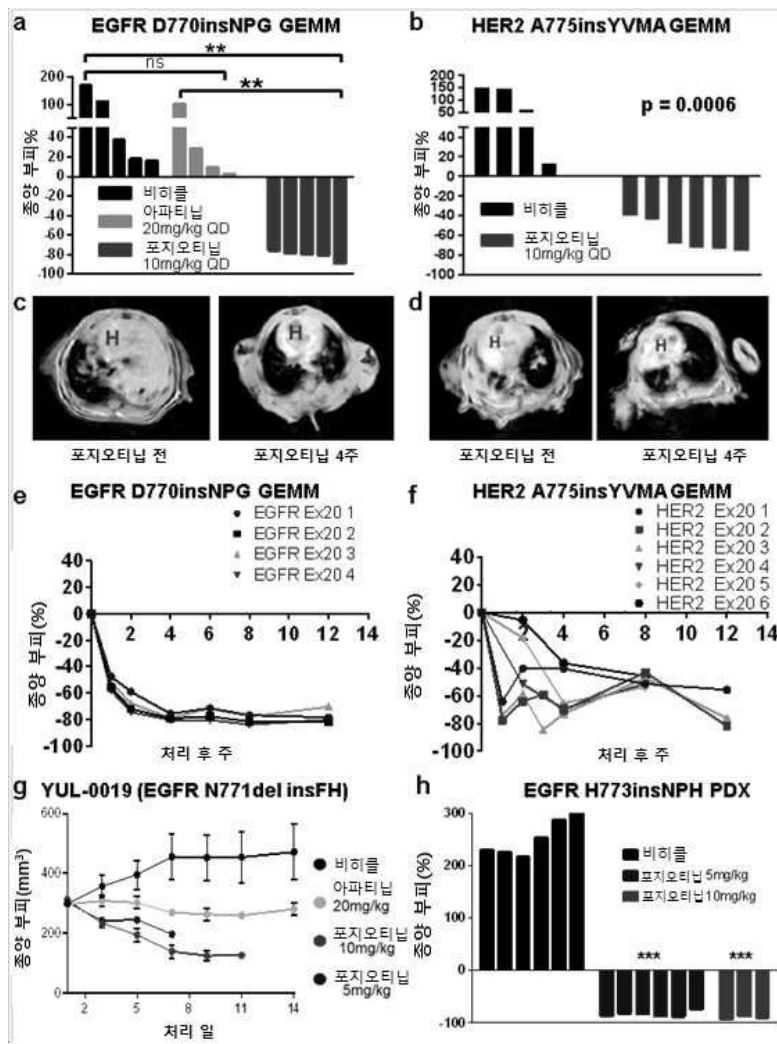
도면1



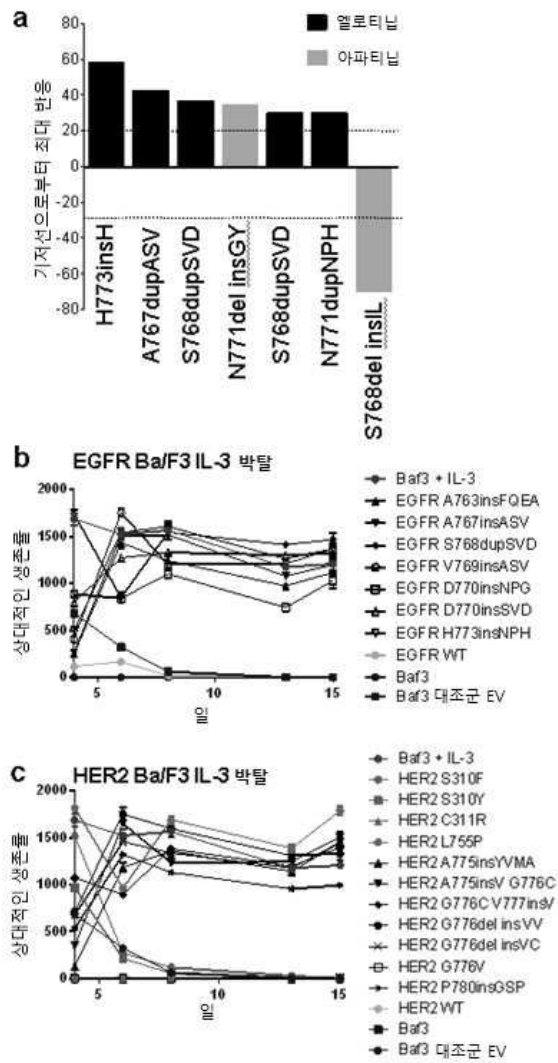
도면2



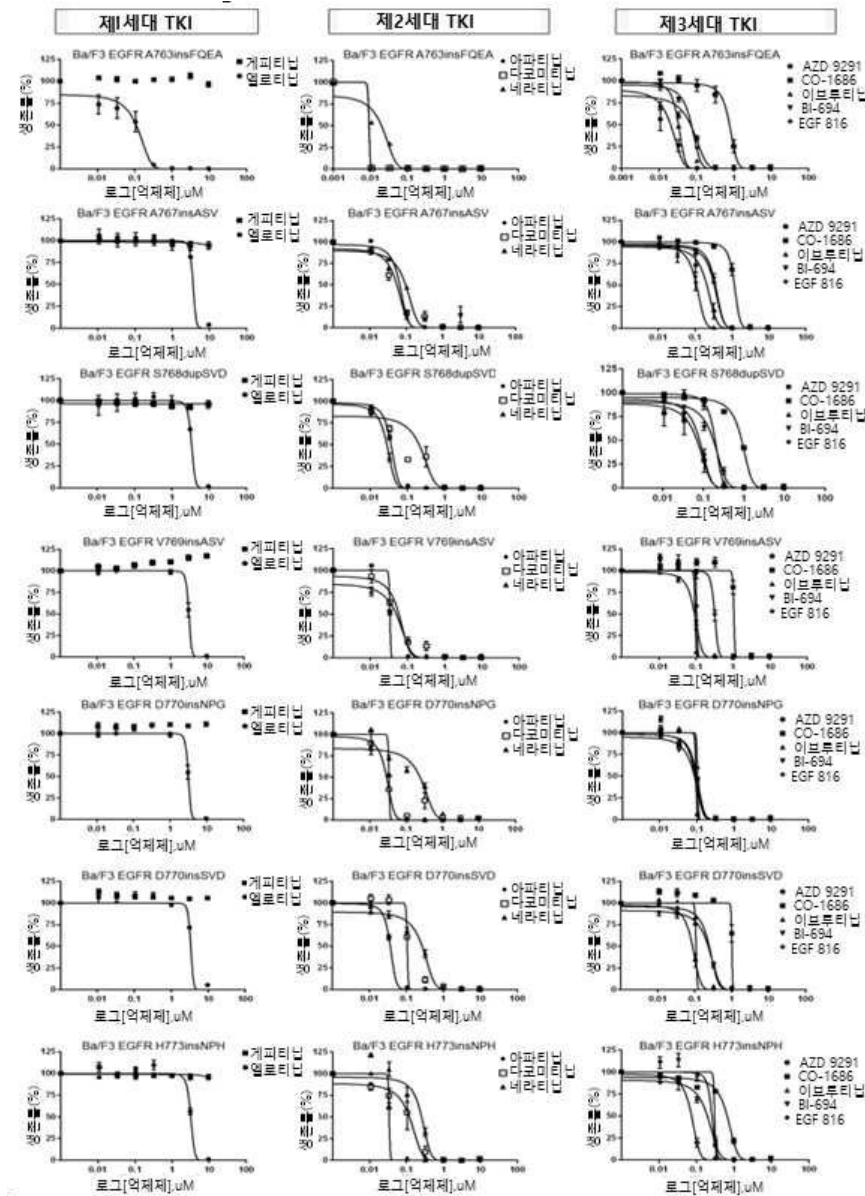
도면3



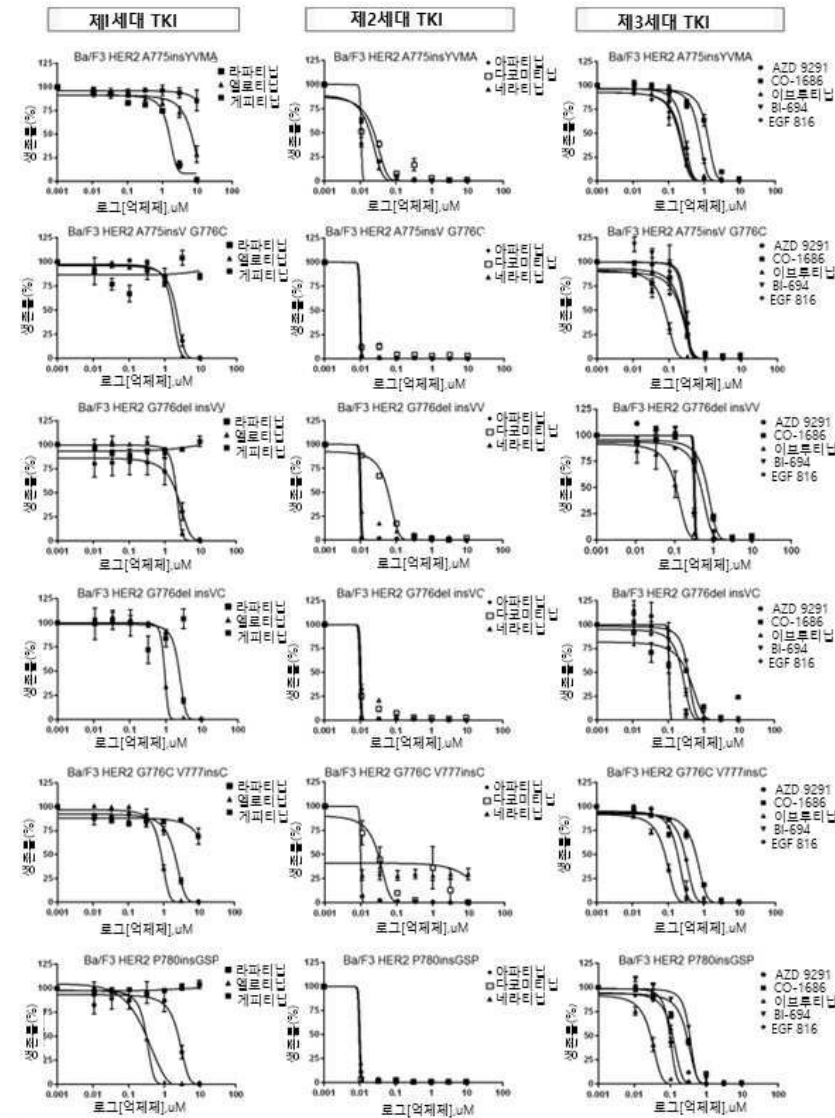
도면4



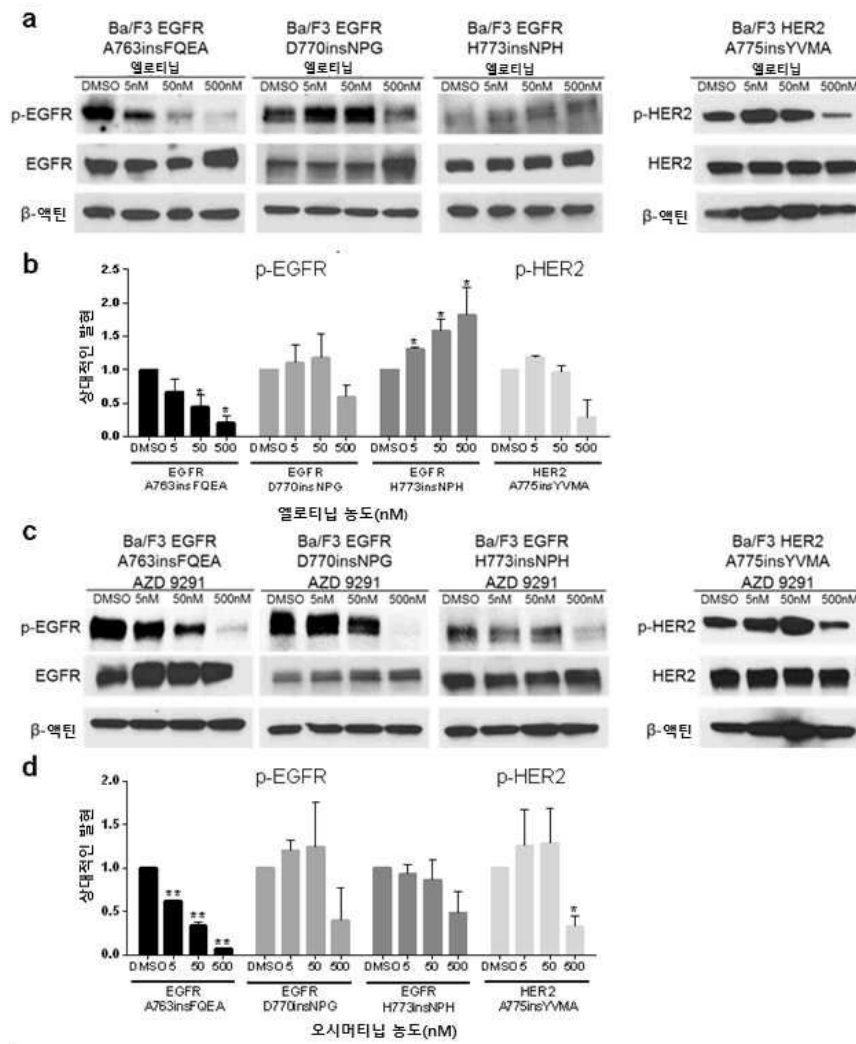
도면5



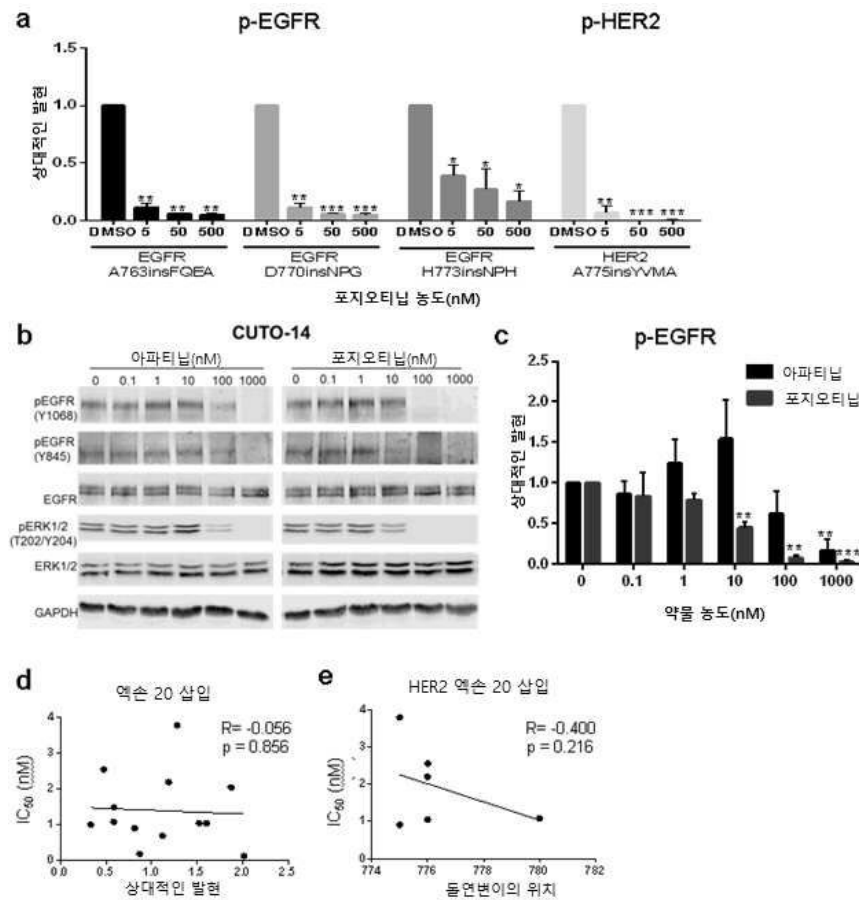
도면6



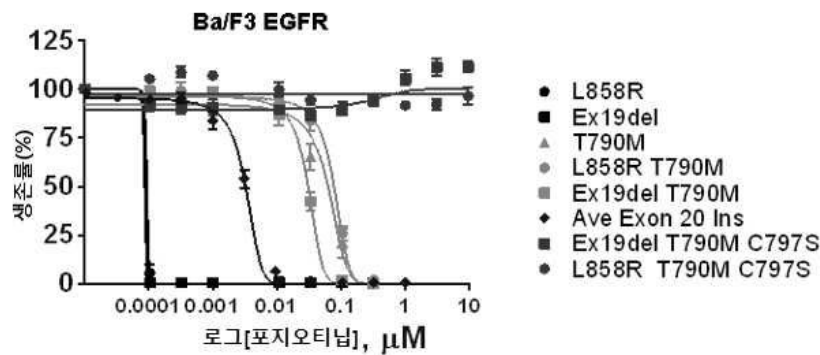
도면7



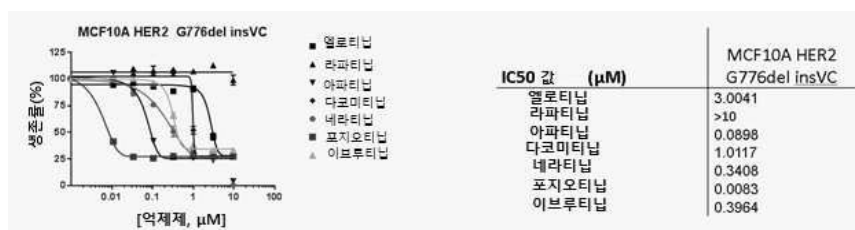
도면8



도면9



도면10



서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> Board of Regents, The University of Texas System

<120> COMPOUNDS WITH ANTI-TUMOR ACTIVITY AGAINST CANCER CELLS BEARING EGFR OR HER2 EXON 20 MUTATIONS

<130> IPA190788-US

<150> US 62/423,732

<151> 2016-11-17

<150> US 62/427,692

<151> 2016-11-29

<150> US 62/572,716

<151> 2017-10-16

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR mutation

<400> 1

Phe Gln Glu Ala

1

<210> 2

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR mutation

<400> 2

tccaggaagc ct

12

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 mutation

<400> 3

Tyr Val Met Ala

1

<210> 4

<211> 12

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 mutation

<400> 4

tatgtcatgg ct 12

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 5

cttacacca gtggagaagc 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Primer

<400> 6

accaagcgac ggtcctcaa 20

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 7

gaagcctacg tgatggccag cgtggacaac cccacgtgt gccgc 45

<210> 8

<211> 66

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> EGFR exon 20 A763insFQEA

<400> 8
gaagcctcca ggaagcctta cgtgatggcc agcagcgtgg acgtggacaa cccccacgtg 60
tgccgc 66
<210> 9
<211> 45
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFR exon 20 S768dupSVD
<400> 9
gaagcctacg tgatggccag cgtggacaac cccccacgtgt gccgc 45
<210> 10
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFR exon 20 V769insASV
<400> 10
gaagcctacg tgatggccag cgtggcagcg tgggacaacc cccacgtgtg ccgc 54
<210> 11
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFR exon 20 D770insSVD
<400> 11
gaagcctacg tgatggccag cgtggacgcg tggacaaacc cccacgtgtg ccgc 54
<210> 12
<211> 54
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220><223> EGFR exon 20 H773insNPH
<400> 12
gaagcctacg tgatggccag cgtggacaac ccccacaacc cccacgtgtg ccgc 54
<210> 13
<211> 48
<212> DNA

<

213> Homo sapiens

<400> 13

gaagcatacg tgatggctgg tgtgggctcc ccatatgtct cccgcctt 48

<210> 14

<211> 48

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 exon 20 G776V

<400> 14

gaagcatacg tgatggctgt tgtgggctcc ccatatgtct cccgcctt 48

<210> 15

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 exon 20 G776V V777insV

<400> 15

gaagcatacg tgatggcttg tgtgttgggc tcccatatg tctccgcct t 51

<210> 16

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 exon 20 G776del insVV

<400> 16

gaagcatacg tgatggctgt tgttgtgggc tcccatatg tctccgcct t 51

<210> 17

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 exon 20 G776del ins V

<400> 17

cgaagcatac gtgatgctg gtgtgtctgg ctcccatat gtctccgcc tt 52

<210> 18

<211> 57

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> HER2 exon P780insGSP

<400> 18

gaagcatacg tgatggctgg tgtgggctcc ccatggctcc cctatgtctc ccgcctt 57